

19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 804 060**

51 Int. Cl.:

A61K 8/41 (2006.01)

A61Q 11/00 (2006.01)

A61K 8/68 (2006.01)

A23L 33/10 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

86 Fecha de presentación y número de la solicitud internacional: **26.04.2013 PCT/NL2013/050314**

87 Fecha y número de publicación internacional: **31.10.2013 WO13162366**

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **26.04.2013 E 13720618 (1)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **17.06.2020 EP 2849719**

54 Título: **Protección de materiales por compuestos a base de esfingosina**

30 Prioridad:

27.04.2012 EP 12166050
10.10.2012 EP 12187985

45 Fecha de publicación y mención en BOPI de la traducción de la patente:
02.02.2021

73 Titular/es:

STICHTING VU (100.0%)
De Boelelaan 1105
1081 HV Amsterdam, NL

72 Inventor/es:

BIKKER, FLORIS JACOB;
VEERMAN, ENGELMUNDUS CORNELIS
IGNATIUS;
VALENTIJN-BENZ, MARIANNE y
VAN 'T HOF, WILLEM

74 Agente/Representante:

SÁEZ MAESO, Ana

ES 2 804 060 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

Protección de materiales por compuestos a base de esfingosina

Campo de la invención

5 La invención se refiere al uso de compuestos basados en esfingosina, en particular compuestos de fitoesfingosina, en la protección de superficies y materiales tales como materiales que contienen hidroxiapatita tales como dientes y huesos. Tales compuestos y son especialmente útiles como capa protectora de superficies como en el tratamiento y prevención de caries dental, erosión dental, hipersensibilidad de la dentina y formación de sarro. También se proporcionan composiciones que comprenden compuestos basados en esfingosina. También se proporcionan métodos y dispositivos para prevenir la formación de biopelículas usando compuestos basados en esfingosina.

10 Antecedentes de la invención

15 El componente principal del esmalte dental es la hidroxiapatita de calcio mineral básico (HAP), $Ca_{10}(PO_4)_6(OH)_2$, que es inherentemente susceptible a la acción de grabado y disolución de los ácidos. Ejemplos de caries que son causadas por ácidos son la caries dental y la erosión dental. En la caries dental, los productos finales ácidos del metabolismo bacteriano anaeróbico en la placa dental causan la disolución local del esmalte dental, por lo general en sitios de difícil acceso para la higiene dental. La erosión dental es la disolución química de las superficies dentales por ácidos de origen dietético o gástrico que, a menudo en combinación con el desgaste mecánico (desgaste y abrasión), puede causar una pérdida generalizada de tejidos dentales superficiales. En condiciones normales, la saliva protege parcialmente el esmalte contra los efectos perjudiciales de los ataques ácidos por la acción neutralizante de sus sistemas reguladores y al depositar una película dental, que es una película lubricante de (glico)proteínas salivales que cubre las superficies dentales. El comportamiento de consumo actual ha aumentado los ataques ácidos a un nivel que supera la capacidad protectora de la saliva. A nivel mundial, esto ha llevado a una creciente incidencia de la erosión dental.

25 El esmalte dental también es susceptible a la formación de sarro (cálculo dental). El cálculo dental se refiere a una acumulación de placa endurecida (mineralizada) en los dientes, formada por la presencia de saliva, residuos y minerales. El cálculo dental es un depósito de sales de fosfato de calcio en la superficie de los dientes. Comprende una mezcla de minerales de fosfato de calcio tales como brushita, fosfato de octacalcio, fosfato de tricalcio y apatita biológica.

30 Las composiciones convencionales para el cuidado bucal, tales como pastas de dientes y enjuagues bucales, son particularmente apropiadas para la prevención de caries y formación de sarro. Sin embargo, ninguna formulación ha agregado con éxito una protección significativa contra la erosión dental. Por lo tanto, se necesitan urgentemente nuevas formulaciones para proteger las superficies dentales.

Sumario de la invención

En un aspecto, la divulgación proporciona compuestos de esfingosina que tienen la fórmula I, como se define en la reivindicación 1.

35 Preferiblemente, el uso de los compuestos y los recubrimientos resultantes previenen o reducen la desmineralización dental, un trastorno de desmineralización dental (preferiblemente seleccionado entre erosión dental, caries dental e hipersensibilidad de la dentina), enfermedad de las encías y/o la formación de cálculo dental. Preferiblemente, dichos compuestos se usan para proteger el diente de la erosión ácida asociada con un trastorno de desmineralización dental. Más preferiblemente, los compuestos se usan para prevenir o reducir la desmineralización dental o un trastorno de desmineralización dental (preferiblemente seleccionado entre erosión dental, caries dental e hipersensibilidad de la dentina).

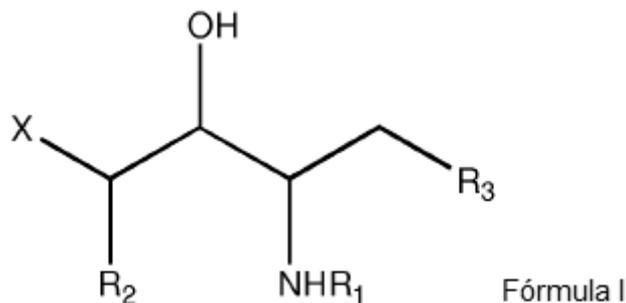
En un aspecto, los métodos, usos y tratamientos descritos en este documento comprenden además la provisión de nanopartículas de hidroxiapatita.

45 La divulgación proporciona composiciones que comprenden un compuesto de esfingosina que tiene la fórmula I. La composición es una composición para el cuidado bucal, preferiblemente seleccionada de dentífrico (tal como polvo de dientes y pasta de dientes), goma de mascar, saliva artificial y enjuague bucal. Preferiblemente, la composición es una composición alimenticia, preferiblemente seleccionada entre productos lácteos, productos alimenticios procesados, aceites, suplementos alimenticios y/o vitamínicos, productos de aperitivos y productos de bebidas. Preferiblemente, las composiciones comprenden además nanopartículas de hidroxiapatita.

50 En un aspecto, la divulgación proporciona un método para prevenir o reducir la formación de cálculo dental, xerostomía, desmineralización dental o un trastorno de desmineralización dental, que comprende administrar a un sujeto que lo necesite una cantidad eficaz de un compuesto de esfingosina como se describe en este documento. Preferiblemente, dicho método reduce, previene o alivia un síntoma de xerostomía, erosión dental, caries dental y/o hipersensibilidad de la dentina y cálculo dental.

El compuesto de esfingosina que tiene la fórmula es más preferiblemente, fitoesfingosina (PHS).

Preferiblemente, la fórmula I es



- 5 en la que X es un alquilo o alquenilo que tiene 8-24 carbonos, preferiblemente 10 a 20 carbonos, más preferiblemente un alquilo lineal;
- R₁ se selecciona entre H y C(=O)C₁₋₂₀, preferiblemente R₁ es H;
- R₂ se selecciona entre H y OH, preferiblemente R₂ es OH; y
- R₃ se selecciona de fosfato, OH o F, preferiblemente OH. Preferiblemente, X es un alquilo lineal que tiene de 10 a 20 carbonos, R₁ es H, R₂ es OH, y R₃ es OH.
- 10 Más preferiblemente, X es un alquilo o alquenilo que tiene 8-24 carbonos, preferiblemente 10 a 20 carbonos, más preferiblemente un alquilo lineal;
- R₁ es H;
- R₂ se selecciona entre H y OH, preferiblemente R₂ es OH; y
- R₃ se selecciona entre fosfato, OH o F, preferiblemente OH.
- 15 Preferiblemente, X es un alquilo o alquenilo que tiene 8-24 carbonos, preferiblemente 10 a 20 carbonos, R₁ es H;
- R₂ es OH; y
- R₃ se selecciona de fosfato, OH o F, preferiblemente OH.
- Preferiblemente, X es un alquilo o alquenilo que tiene 8-24 carbonos, preferiblemente 10 a 20 carbonos,
- R₁ es H;
- 20 R₂ es OH; y
- R₃ se selecciona de fosfato u OH.
- Preferiblemente, X es un alquilo o alquenilo que tiene 8-24 carbonos, preferiblemente 10 a 20 carbonos,
- R₁ es H;
- R₂ es OH; y
- 25 R₃ es OH.

Breve descripción de los dibujos

Figura 1. Los discos de HAP se recubrieron con 1: solución reguladora de saliva; 2: solución reguladora de saliva suplementado con albúmina de suero bovino al 1%; 3: con saliva humana entera; 4: con solución reguladora de saliva ((K₂HPO₄ 2 mM, KCl 50 mM, CaCl₂ 1 mM y MgCl₂ 0.1 mM, pH 6.8)) que contiene DMSO al 10%; 5: 500 ug/ml de fitoesfingosina (PHS) en solución reguladora de saliva que contiene 10% de DMSO). Después de la exposición a ácido cítrico 0.1 M (pH 3.0) durante 30 minutos, los discos se enjuagaron, secaron y pesaron.

30

Figura 2. Efectos antierosivos de la PHS a diferentes concentraciones. Los discos de HAP prepesados se incubaron con PHS a las concentraciones indicadas (0, 5, 50 y 500 μg/ml) en solución reguladora de saliva durante 3 h. Los discos fueron expuestos posteriormente a ácido cítrico 0.3 M durante 30 minutos. Después de enjuagar en agua desmineralizada, los discos se secaron durante la noche y se determinaron sus pesos.

35

- Figura 3. Protección por PHS después de la exposición al ácido cítrico durante diferentes períodos. Los discos de HAP (sin tratar y tratados con PHS de 50 µg/ml) se incubaron con ácido cítrico 0.1 M durante los tiempos indicados (15, 30 y 60 minutos, respectivamente). Después de enjuagar con agua, los discos se secaron y se determinó su peso. (Las barras con manchas blancas representan los discos no tratados, las barras bloqueadas representan los discos tratados con PHS).
- Figura 4. Efecto de la preparación de la solución madre sobre la actividad antierosiva de la PHS. Se prepararon soluciones de PHS de reserva (5 mg/ml) en ya sea DMSO o etanol. Estas soluciones madre se usaron para la preparación de soluciones PHS de 200 µg/ml en solución reguladora de saliva, con o sin sonicación (son.), durante 30 minutos. Los discos de HAP se trataron con las soluciones indicadas durante 3 horas y luego se expusieron a ácido cítrico 0.1 M, durante 30 minutos. Los discos se enjuagaron y secaron y se determinó su peso.
- Figura 5. Efecto de la presencia de una película salival sobre HAP sobre los efectos protectores de la PHS. Los discos de HAP se incubaron con saliva (HWS) o solución reguladora de saliva (control) durante 3 horas. Después del enjuague, los discos se incubaron posteriormente durante 3 horas con solución reguladora de saliva (solución reguladora de saliva-solución reguladora de saliva, solución reguladora de saliva HWS), HWS (solución reguladora de saliva-HWS) o PHS (solución reguladora de saliva-PHS, HWS-PHS). Luego, los discos se enjuagaron y se expusieron a ácido cítrico 0.1 M (pH = 3.0) durante 30 minutos. Los discos se enjuagaron con agua desmineralizada y se secaron durante la noche y se determinaron sus pesos.
- Figura 6. Estructuras moleculares de las esfingosinas usadas en el experimento de la figura 7.
- Figura 7. Efecto del fosfato de fitoesfingosina, esfinganina y PHS (fitoesfingosina) en la solución reguladora de saliva.
- Figura 8. Efecto de la solución reguladora sobre la protección de diversas esfingosinas. Los discos se trataron con diversas esfingosinas (50 µg/ml en solución reguladora de saliva (+/- CaCl₂) y Tris 20 mM (+/- CaCl₂). La erosión se determinó como se describe en la figura 7.
- Figura 9. Efecto protector de PHS sobre HAP recubierta de saliva. Los discos de HAP se incubaron con Tris 20 mM suplementado con Tween 20 al 0.1% (TrisT), Tris 20 mM (Tris), solución reguladora de saliva (Sol. Reg de Sal) o saliva entera humana limpiada (CHWS). Después de 20 horas, los discos se enjuagaron e incubaron en ya sea TrisT (barras izquierdas, TrisT) o TrisT suplementado con 100 µg/ml de PHS (barras derechas, PHS) durante 3 horas. Los discos se enjuagaron y se expusieron a ácido cítrico 0.1 M durante 30 minutos. Después de enjuagar y secar, se pesaron los discos para determinar la pérdida de peso. Los discos cubiertos con una película salival (CHWS) se protegieron en la misma medida que los controles tratados con TrisT, Tris o Sol. Reg. de sal.
- Figura 10. Efectos antierosivos de diferentes lípidos (esfingos). Los discos de HAP se incubaron por triplicado con 100 µg/ml de cada lípido en Tris-Tween durante 3 horas. Los discos se expusieron a ácido cítrico 0.1 M (pH = 3.0) durante 30 minutos y se determinó la pérdida de peso.
- Figura 11. Efectos antiadhesivos del recubrimiento PHS sobre HAP. La adhesión de bacterias a los discos de HAP se investigó usando un modelo de unión activo. Los discos de HAP se incubaron durante la noche a 30 °C en Tris 20 mM, Tween 20 al 0.1%, pH 6.8, sin (CONTROL) con 100 µg/ml de PHS (recubiertos con PHS). Los discos de HAP se lavaron para eliminar la PHS no unida. *Streptococcus mutans* se cultivó durante una noche en medio BHI y se diluyó 1:10 en BHI de potencia media (18.5 g de BHI/l, PIPES de 50 Mm/l, pH 7.0) hasta una densidad final de aproximadamente 10⁸ células/ml. La tapa con los discos de HAP se colocó en la parte superior de la placa de 24 pocillos que contenía 1.5 ml de suspensión bacteriana diluida y se incubó anaeróticamente durante 2 horas a 37 °C. Los discos de HAP se lavaron dos veces en agua con cisteína peptona (CPW), para eliminar las bacterias no adherentes. La capa unida de bacterias se dispersó mediante un baño de ultrasonidos durante 2 minutos con pulsos de 1 s. La suspensión resultante se sembró en placas en diferentes diluciones en placas BHI y se incubó anaeróticamente durante 48 horas a 37 °C antes de contar la CFU. PHS inhibió la adhesión bacteriana por más de 100 veces.
- Figura 12. Dependencia temporal de la adsorción de PHS a HAP. La PHS se mezcló con discos de HAP y se incubó durante 0.5, 1.5, 5, 15, 30, 60, 120 y 180 minutos. Los discos se enjuagaron y la PHS adsorbida se extrajo con etanol. Después de la derivación con OPA, la PHS se determinó por fluorimetría. En 5 minutos se alcanzó > 65% del nivel máximo de adsorción.
- Figura 13. Adsorción (círculos) y protección (cuadrados) en función de la concentración de PHS. Se incubaron diferentes concentraciones de PHS con discos de HAP durante 3 horas. La cantidad de PHS adsorbido se determinó después de la extracción y derivación con OPA usando fluorimetría. En un experimento separado, los discos tratados con PHS se expusieron durante 30 minutos a ácido cítrico 0.1 M (pH 3.0) y se determinó la pérdida de peso. Ya a niveles de unión submáximos (aproximadamente 6 µg por disco), PHS protege al máximo.
- Figura 14. Unión de PHS a HAP. A. Los discos de HAP se incubaron con PHS en concentraciones variables. Después de 3 horas, los discos se extrajeron con metanol y la cantidad de PHS adsorbido se determinó fluorimétricamente. B.

Los discos de HAP se incubaron con 100 µg/ml de PHS. En diferentes momentos, los discos se extrajeron con metanol y la PHS adsorbida se determinó fluorimétricamente. Las incubaciones se realizaron por triplicado.

5 Figura 15. Efectos protectores de los esfingolípidos cuando están presentes en el ácido cítrico durante el ataque erosivo. Dos barras a la izquierda: los discos de HA se pretratan con solución reguladora o 100 ug/ml de PHS, durante 3 horas, seguido de un tratamiento con ácido cítrico 0.1 M (pH = 3.0) durante 30 minutos. Dos barras a la derecha: los discos de HA se pretratan con ya sea solución reguladora o 100 ug/ml de PHS y luego se exponen a ácido cítrico 0.1 M en presencia de 100 ug/ml de PHS durante 30 minutos.

Figura 16. Actividad antiincrustante de esfingolípidos recubiertos sobre discos de HA contra *Streptococcus mutans*

Figura 17. Actividad antiincrustante de esfingolípidos recubiertos sobre discos de HA contra *Streptococcus sanguinis*

10 Figura 18. Actividad antiincrustante de esfingolípidos recubiertos sobre discos de HA contra *Streptococcus gordonii*

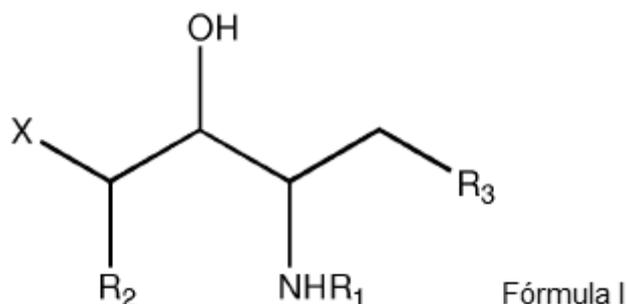
Figura 19. Lista de ejemplo de detergentes no iónicos

Descripción detallada de las realizaciones descritas

15 La presente divulgación demuestra el efecto protector de superficies/materiales por compuestos que contienen lípidos basados en la familia de esfingosinas. El tratamiento de la hidroxiapatita, la fase mineral sensible al ácido del esmalte dental, con un compuesto de esfingosina proporcionó más del 80% de protección contra la disolución por el ácido cítrico en relación con las muestras no tratadas (véanse, por ejemplo, las figuras 1 y 8). De acuerdo con lo anterior, se proporcionan métodos para proteger materiales que contienen hidroxiapatita usando un compuesto de esfingosina. Si bien no desea estar ligado a la teoría, se cree que los compuestos de esfingosina se adhieren a la hidroxiapatita formando una barrera protectora. Dicha adherencia hace que estos compuestos sean útiles en la protección contra, por ejemplo, la erosión ácida, la formación de biopelículas y la desmineralización dental.

20

Preferiblemente, la fórmula I es



en la que X es un alquilo o alquenilo que tiene 8-24 carbonos, preferiblemente 10 a 20 carbonos, más preferiblemente un alquilo lineal; R₁ se selecciona entre H y C(=O)C₁₋₂₀, preferiblemente R₁ es H;

25 R₂ se selecciona entre H y OH, preferiblemente R₂ es OH; y

R₃ se selecciona entre fosfato, OH o F, preferiblemente OH. Preferiblemente, X es un alquilo lineal que tiene de 10 a 20 carbonos, R₁ es H, R₂ es OH, y R₃ es OH.

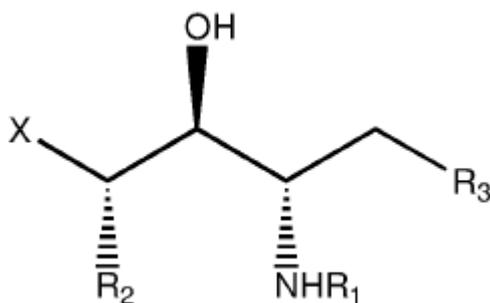
Más preferiblemente, X es un alquilo o alquenilo que tiene 8-24 carbonos, preferiblemente 10 a 20 carbonos, más preferiblemente un alquilo lineal;

30 R₁ es H;

R₂ se selecciona entre H y OH, preferiblemente R₂ es OH; y

R₃ se selecciona de fosfato, OH o F, preferiblemente OH.

Preferiblemente, la fórmula I es:



Preferiblemente, el compuesto de esfingosina es un compuesto a base de fitoesfingosina. Tales compuestos incluyen N-tetracosanoil fitoesfingosina, N-estearoil fitoesfingosina, N-oleoil fitoesfingosina, N-linoleoil-fitoesfingosina, N-(2-hidroxitetracosanoi-1), fitoesfingosina, N-(2-hidroxiocetadecanoil) fitoesfingosina, N-(2-hidroxiocetadecanoil) fitoesfingosina, N-(27-estearoilheptacosanoil) fitoesfingosina, N-(27-oleoilheptacosanoil) fitoesfingosina, N-(27-linoleoilheptacosanoil) fitoesfingosina, N-(23-estearoiltricosanoil) fitoesfingosina, N-acetil-fitoesfingosina, N-hexadecanoil-fitoesfingosina, N-hexanoil-fitoesfingosina, N-octadecanoil-fitoesfingosina y N-octanoil-fitoesfingosina se pueden usar. En realizaciones preferidas, el compuesto de esfingosina es un esfingolípido que comprende una base esfingoide como se describe en este documento. El compuesto de esfingosina más preferido es la fitoesfingosina. Los compuestos preferidos también son fitoesfingosina-fosfato y D-eritro-esfingosinas, tales como D-eritro-esfingosina C15.

Adicionalmente, la presente divulgación demuestra que los compuestos de esfingosina pueden prevenir la adherencia bacteriana a una superficie. Esto los hace útiles como agentes para reducir o prevenir la formación de biopelículas. Tales compuestos se pueden usar, por ejemplo, como recubrimientos en dispositivos médicos y equipos quirúrgicos. Este efecto también aumenta su utilidad en el cuidado bucal y las composiciones alimenticias. El efecto de los compuestos de esfingosina que previenen la adherencia bacteriana es separable de cualquier efecto como bactericida. En los métodos y composiciones (por ejemplo, cuidado bucal y composiciones alimenticias) descritos en este documento, los compuestos de esfingosina no se usan como antimicrobianos, sino más bien para prevenir la adherencia bacteriana. Preferiblemente, para estas aplicaciones y composiciones, el compuesto de esfingosina se selecciona de uno o más de los siguientes: PHS, fosfato de PHS, estearoil PHS, esfinganina y esfingosina. La más preferida para la prevención de la adherencia bacteriana es la esfinganina. Preferiblemente, se usa más de un compuesto de esfingosina en los métodos y composiciones como se describe en este documento. Preferiblemente, la PHS y la esfinganina se usan juntos en un método, composición o recubiertos en un artículo como se describe en este documento. Preferiblemente, se reduce la adherencia de las bacterias orales. Preferiblemente, se reduce la adherencia de *S. gordonii*. Preferiblemente, se reduce la adherencia de *S. sanguinis*. Más preferiblemente, se reduce la adherencia de *S. mutans*.

El compuesto de esfingosina también puede ser un conjugado de dicho compuesto, tal como un esfingolípido. Los esfingolípidos comprenden una gama compleja de lípidos en los que los ácidos grasos están unidos mediante enlaces amida a una base de cadena larga o esfingoide. Más precisamente, los esfingolípidos consisten en bases de cadena larga, unidas por un enlace amida a un ácido graso y a través del grupo hidroxilo terminal a unidades estructurales de complejos que contienen fósforo o carbohidratos. Las bases esfingoides incluyen dihidroesfingosina (esfinganina), esfingosina y fitoesfingosina. Las ceramidas son un grupo específico de esfingolípidos que contienen esfingosina, fitoesfingosina o dihidroesfingosina como base en el enlace amida con un ácido graso. Los esfingolípidos apropiados para la presente invención tienen una base esfingoide que tiene la fórmula de fórmula I como se describe en este documento.

Los conjugados apropiados de compuestos de esfingosina también comprenden los compuestos de fórmula I conjugados con una unidad estructural de proteína o péptido. Dicha unidad estructural puede mejorar la producción, suministro, direccionamiento de HAP, estabilidad o eficacia del compuesto de esfingosina. Las unidades estructurales peptídicas preferidas son unidades estructurales de unión a HAP. Varios de estos péptidos son conocidos en la técnica, incluyendo estaterina, aglutinina salival, poliglutamato y péptidos de caseína. Preferiblemente, dicho péptido comprende la secuencia DSpSpEEK (de estaterina, en la que Sp es serina fosforilada) o el dominio de unión a HAP de aglutinina salival. La conjugación de compuestos de esfingosina con proteínas y péptidos es bien conocida en la técnica y se describe, por ejemplo, en la Patente de los Estados Unidos No. 5543390, que se incorpora en este documento como referencia.

Un aspecto de la divulgación proporciona el uso de un compuesto de esfingosina para recubrir hueso o diente. El compuesto de esfingosina actúa como una barrera protectora contra, por ejemplo, la erosión ácida y la formación de precipitación de sal que conduce al sarro.

Un aspecto de la divulgación proporciona el uso de un compuesto de esfingosina para prevenir o reducir la desmineralización dental. El esmalte dental se somete naturalmente a un procedimiento de desmineralización, que se incrementa por la presencia de ácido, por ejemplo, de alimentos, bebidas, ácido gástrico o producido por bacterias. La

desmineralización dental es el procedimiento subyacente implicado en el desarrollo de caries dental, erosión dental e hipersensibilidad de la dentina (en este documento, denominado trastornos de desmineralización dental). Preferiblemente, dicho trastorno de desmineralización dental se debe a la presencia de ácido que no ha sido producido por bacterias, por ejemplo, el trastorno proviene de alimentos ácidos, bebidas ácidas o ácido gástrico. Preferiblemente, dichos compuestos de esfingosina se usan en métodos para prevenir o tratar trastornos de desmineralización dental que resultan del consumo de alimentos o bebidas ácidos o de ácido gástrico.

La hidroxiapatita se vuelve soluble cuando se expone a ambientes ácidos. Las sales, tales como las sales de fosfato de calcio, también pueden precipitar en hidroxiapatita. De acuerdo con lo anterior, se proporcionan métodos para proteger una superficie de hidroxiapatita que comprende poner en contacto dicha superficie con un compuesto de esfingosina como se describe en este documento. En algunas realizaciones, las superficies se pretratan con el compuesto de esfingosina. En algunas realizaciones, el compuesto de esfingosina está presente en una composición ácida (por ejemplo, en una bebida carbonatada). Los métodos son especialmente útiles para proteger los materiales que contienen hidroxiapatita de la erosión ácida y de la acumulación de sales precipitadas. Las superficies de hidroxiapatita incluyen dientes naturales y protésicos, así como huesos naturales y protésicos.

En las realizaciones preferidas de los métodos y productos descritos en este documento, se usa un compuesto de esfingosina junto con partículas de hidroxiapatita (nano). La hidroxiapatita se adhiere a las superficies de los dientes y promueve su recalcificación y fortalecimiento. Se ha usado con éxito en un método de relleno fino dental para proteger y restaurar fosas, fisuras y lesiones en el esmalte.

La hidroxiapatita se ha usado en las pastas de dientes en Japón desde 1980 y está disponible comercialmente bajo nombres como, por ejemplo, la pasta de dientes Apagard® nHAP, Sangi Co., Japón, que proporciona una pasta de dientes que contiene nanopartículas de hidroxiapatita al 5% y 10%.

El diámetro promedio de partícula de las partículas de hidroxiapatita está preferiblemente en el intervalo desde 1 a 200 nm, más preferiblemente desde 5-100 nm. Las unidades estructurales básicas del esmalte suelen ser de 20-40 nm de HAP. Preferiblemente, las partículas de hidroxiapatita usadas en este documento tienen un diámetro promedio de partícula de entre 15-50 nm. Los más preferidos son aquellos que tienen un diámetro promedio de partículas de alrededor de 20 nm como se describe en Li et al. (J of Mater. Chem 2008 18, 4079-4084).

Las nanopartículas de hidroxiapatita se pueden proporcionar recubiertas con uno o más compuestos de esfingosina como se describe en este documento. Tales partículas precubiertas se pueden usar en composiciones para el cuidado bucal o como recubrimiento para prótesis, por ejemplo, prótesis dental.

En la caries dental, los productos finales ácidos del metabolismo bacteriano anaeróbico en la placa dental causan la disolución local del esmalte dental, por lo general en sitios que son de difícil acceso para la higiene dental. La caries dental incluye caries dental detenida, caries dental incipiente, cavidad de fosas y fisuras, caries dental primaria, caries dental secundaria, cavidad de superficie lisa. En algunas realizaciones, el trastorno de desmineralización dental no es la caries dental. La erosión dental es la disolución química de las superficies dentales por ácidos de origen dietético o gástrico. La hipersensibilidad de la dentina es el dolor o las molestias que surgen de la dentina expuesta. En realizaciones preferidas, los compuestos descritos en este documento son útiles para prevenir, tratar o reducir la erosión ácida de los dientes, esto es, la erosión dental. Consulte la Solicitud de Patente de los Estados Unidos No. 20100034750 para una discusión sobre el desarrollo de la caries dental y la erosión después de la desmineralización.

La desmineralización dental y la formación de sarro se pueden reducir o prevenir mediante la aplicación de un compuesto de esfingosina como se describe en este documento. La remineralización es un procedimiento natural que resulta en el retorno de minerales a la superficie del diente. La reducción o prevención de la desmineralización dental, como se usa en este documento, se refiere a la desaceleración del procedimiento de desmineralización de modo que el efecto neto del procedimiento de desmineralización/mineralización sea tal que la desmineralización se reduzca o evite. El uso de un compuesto o composición de esfingosina que comprende dicho compuesto de esfingosina como se describe en este documento reduce el efecto neto de la desmineralización en al menos 5, al menos 10, al menos 20, al menos 30, al menos 50, al menos 60 o al menos 80% en comparación con los controles. El uso de un compuesto o composición de esfingosina que comprende dicho compuesto de esfingosina como se describe en este documento también reduce la formación de sarro en al menos 5, al menos 10, al menos 20, al menos 30, al menos 50, al menos 60 o al menos 80% en comparación con los controles.

Los compuestos de esfingosina también son útiles en el tratamiento o prevención de la xerostomía. La xerostomía, también conocida como boca seca, se refiere a la falta de saliva y puede ser causada por una producción insuficiente de saliva. Puede ser un síntoma de una enfermedad subyacente tal como diabetes y trastornos autoinmunes o un efecto secundario de la medicación. También se asocia con la vejez, la deshidratación corporal y la ansiedad. Aunque los compuestos de esfingosina se pueden proporcionar en cualquier composición descrita en este documento, se proporcionan preferiblemente en una goma de mascar o un producto de saliva artificial para esta indicación.

El compuesto de esfingosina se puede usar en un sujeto que padece o corre el riesgo de sufrir, erosión dental, caries dental, formación de sarro, hipersensibilidad de la dentina y xerostomía. El compuesto puede reducir o prevenir dichos

trastornos o aliviar un síntoma del mismo. Alternativamente, el compuesto se puede usar profilácticamente para prevenir el riesgo de desarrollar dicha condición o para fortalecer los dientes al reducir la desmineralización.

Los compuestos de esfingosina se pueden proporcionar en cualquier cantidad de composiciones apropiadas que incluyen una composición farmacéutica, una composición para el cuidado bucal y composiciones alimenticias.

5 Preferiblemente, dicha composición comprende, en particular cuando se usa fosfato de fitoesfingosina, un detergente neutro no iónico, tal como Tween 80, Triton X-100, Triton X114, Brij 35, Brij 58, Nonidet P40, octilglicósido y alcohol estearílico etoxilado.

X114, Brij 35, Brij 58, Nonidet P40, octilglicósido y alcohol estearílico etoxilado, y cualquier detergente no iónico como se enumera en la figura 19 son compatibles.

10 Preferiblemente, el compuesto de esfingosina se proporciona en forma de una composición para el cuidado bucal como se describe en este documento. El esmalte dental de la superficie de un diente se pone en contacto con dicho compuesto o composición, por ejemplo, cepillando los dientes con un dentífrico (tal como pasta de dientes o polvo de dientes), enjuagando con una suspensión de dentífrico o enjuague bucal, o masticando un producto de goma. Otros métodos incluyen el contacto del gel oral tópico, el aerosol bucal u otra forma, tal como tiras o películas, con los dientes

15 y la mucosa oral del sujeto. El compuesto o composición se puede aplicar directamente a los dientes, las encías u otra superficie oral con un cepillo, un aplicador de bolígrafo o con los dedos. Los compuestos de esfingosina también se pueden proporcionar en un producto alimenticio. Los productos alimenticios incluyen productos para consumo humano y/o animal e incluyen productos tanto sólidos como líquidos (bebidas). Preferiblemente, el compuesto de esfingosina se selecciona de uno o más de los siguientes: PHS, fosfato de PHS, estearoil PHS, esfinganina y esfingosina.

20 Preferiblemente, la composición incluye PHS y al menos un compuesto de esfingosina adicional, preferiblemente seleccionado de fosfato de PHS, estearoil PHS, esfinganina y esfingosina. Preferiblemente, la composición comprende PHS y esfinganina.

Los compuestos y composiciones de esfingosina que comprenden dichos compuestos también son útiles en aplicaciones cosméticas.

25 Los compuestos y composiciones de esfingosina que comprenden dichos compuestos son útiles tanto en aplicaciones terapéuticas (por ejemplo, prevención y reducción de la caries dental) como en aplicaciones no terapéuticas (por ejemplo, tratamientos cosméticos que reducen la decoloración dental).

Como se usa en este documento, "diente" se refiere a un diente natural así como a dientes protésicos que contienen hidroxiapatita, que incluyen una incrustación, una corona, prótesis dentales e implantes dentales.

30 Los compuestos de esfingosina se pueden usar en cualquier animal que lo necesite, incluyendo ganado, mascotas domésticas u otros animales domésticos, o animales mantenidos en cautiverio. Los productos para el cuidado de mascotas, tales como los masticables y los juguetes, se pueden formular para contener las presentes composiciones orales. Preferiblemente, los compuestos se usan en humanos.

35 El compuesto de esfingosina se proporciona preferiblemente a los dientes al menos una vez al día, más preferiblemente dos veces al día, por ejemplo, una vez por la mañana y otra por la noche. Preferiblemente, el compuesto de esfingosina se proporciona a los dientes regularmente, o más bien diariamente (o dos veces al día), en el transcurso de varios días, semanas o meses.

40 Preferiblemente, el compuesto de esfingosina se proporciona en una composición para el cuidado bucal. Por lo tanto, tales composiciones deben ser apropiadas para su uso en humanos y animales. Como se usa en este documento, las composiciones para el cuidado bucal se retienen en la cavidad oral durante un tiempo suficiente para contactar los dientes y no se tragan intencionalmente para fines de administración sistémica. Las composiciones preferidas para el cuidado bucal incluyen pasta de dientes, dentífrico, polvo de dientes, gel dental, gel subgingival, enjuague bucal, saliva artificial, producto de prótesis dental, aerosol bucal, comprimidos para deshacer en la boca, tabletas orales, o goma de mascar. Los compuestos de esfingosina también se pueden incorporar en tiras o películas para aplicación directa

45 o fijación a superficies orales. Algunos compuestos de esfingosina son más eficaces cuando se proporcionan en una solución reguladora que no contiene o contiene una cantidad mínima de fosfato (por ejemplo, esfinganina en la figura 8). La eficacia de estos compuestos se puede mejorar proporcionándolos en composiciones para el cuidado bucal que carecen de fosfato (o que comprenden solo cantidades mínimas). Alternativamente, o además de, tales compuestos se pueden proporcionar en un producto que no depende de la saliva. Por ejemplo, un producto para dentaduras postizas que trata las dentaduras postizas fuera de la boca (tal como cuando se coloca en una copa) no tendría contacto o tendría un contacto mínimo con la saliva.

50

55 Preferiblemente, el compuesto de esfingosina está presente en la composición para el cuidado bucal a una concentración de más de 5 ug/ml, preferiblemente al menos 10 ug/ml, más preferiblemente al menos 20 ug/ml, más preferiblemente al menos 50 ug/ml y lo más preferido al menos 100 ug/ml. Preferiblemente, la PHS está presente en una concentración de al menos 20 ug/ml. En el caso de una composición sólida para el cuidado bucal, el compuesto de esfingosina está presente en una concentración de más de 2.5 µg/gramo.

Preferiblemente, la composición para el cuidado bucal comprende además partículas de hidroxiapatita como se describe en este documento. Preferiblemente, la composición comprende entre 0.001-50% en peso, más preferiblemente entre 2-20% en peso de dichas partículas. Las nanopartículas de hidroxiapatita están disponibles comercialmente en, por ejemplo, nanoXIM•CarePaste (Fluidinova, SA). Las partículas de hidroxiapatita se pueden recubrir previamente con compuesto de esfingosina. Tal recubrimiento previo puede reducir las cantidades de compuesto de esfingosina necesarias para tener un efecto.

La composición y los medios para preparar composiciones apropiadas para el cuidado bucal son bien conocidos en la técnica. En algunas realizaciones, los productos están en forma de dentífricos, tales como pastas de dientes, geles dentales y polvos para dientes. Una persona experta puede seleccionar los componentes apropiados de la composición para el cuidado bucal en función del compuesto de esfingosina particular usado.

Los componentes de tal pasta de dientes y geles dentales generalmente incluyen uno o más de un abrasivo dental (desde 5% a 50%), un surfactante (desde 0.5% a 10%), un agente espesante (desde 0.1% a 5%), un humectante (desde 10% a 55%), un agente aromatizante (desde 0.04% a 2%), un agente edulcorante (desde 0.1% a 3%), un agente colorante (desde 0.01% a 0.5%) y agua (de 2% a 45%), así como un agente anticaries (desde 0.05% a 0.3% como ion fluoruro) y conservantes. Los polvos para dientes, por supuesto, contienen sustancialmente todos los componentes no líquidos.

Los componentes apropiados de la pasta de dientes descritos en este documento incluyen Carbómero 956, un polímero usado para espesar y como estabilizante de emulsión; carragenano, un agente espesante; carboximetilcelulosa de sodio, también conocida como goma de celulosa, se usa como espesante; cocamidopropil betaína, un ingrediente espumante derivado del aceite de coco; D&C Amarillo # 10, FD&C Azul # 1, y D&C Rojo # 30, colorantes sintéticos; glicerina, para equilibrar y mantener los niveles de humedad; sílice hidratada, un abrasivo; Mica, un abrasivo suave para ayudar a pulir la superficie del diente; PEG-8 y PEG-12, humectantes y solventes; poloxámero 407, un surfactante; propilenglicol, un humectante; copolímero PVM/MA, un aglutinante; el benzoato de sodio, previene la acumulación de microorganismos en la pasta de dientes; el fluoruro de sodio, fortalece el esmalte, previene las caries y combate la placa; hidróxido de sodio, para neutralizar el pH de otros ingredientes; sacarina de sodio; edulcorante artificial; sorbitol, un alcohol de azúcar y un agente humectante y texturizante; dióxido de titanio, le da a las pastas de dientes sin gel su blancura brillante; triclosán, para combatir la gingivitis; y goma de xantano, un agente de viscosidad.

La divulgación proporciona una pasta de dientes que comprende un abrasivo dental, un surfactante, un agente espesante, un humectante y un compuesto de esfingosina como se describe en este documento.

Los abrasivos dentales apropiados incluyen, por ejemplo, sílices que incluyen geles y precipitados, polimetafosfato de sodio insoluble, alúmina hidratada, carbonato de calcio, dihidrato de ortofosfato dicálcico, pirofosfato de calcio, fosfato tricálcico, polimetafosfato de calcio y materiales abrasivos resinosos tales como productos de condensación de partículas de urea y formaldehído.

El surfactante más común usado actualmente en las pastas de dientes es el dodecil sulfato de sodio (SDS). Hemos encontrado que SDS reduce en gran medida los efectos protectores de los compuestos de esfingosina. Por lo tanto, SDS no se debe usar preferiblemente en las composiciones para el cuidado bucal, en particular cuando la fitoesfingosina es el compuesto de esfingosina. Las pastas de dientes sin SDS están disponibles comercialmente, en las cuales, por ejemplo, la glicirricina (Tom's of Maine Clean & Gentle Care Toothpaste™) o el lauroil sarcosinato de sodio (Dr. Katz PerioTherapy Treatment Gel™) se sustituye por SDS. Más preferiblemente, la composición para el cuidado bucal está libre de SDS, SLS y glicirricina. Preferiblemente, el surfactante es un detergente no iónico tal como Tween 20 (monolaurato de polioxietilensorbitano), Triton X-100, Tween 80 y otros detergentes Tween. Los detergentes no iónicos adicionales se enumeran en 19. Preferiblemente, la composición oral no contiene un detergente iónico.

Los agentes espesantes apropiados incluyen polímeros de carboxivinilo, carragenano, hidroxietilcelulosa, laponita y sales solubles en agua de éteres de celulosa tales como carboximetilcelulosa de sodio y carboximetilhidroxietilcelulosa de sodio, polietilenoóxido, vora ácido hialurónico glucano, goma karaya, goma de xantano y goma arábiga.

Los humectantes apropiados incluyen alcoholes polihídricos comestibles tales como glicerina, sorbitol, xilitol, butilenglicol, polietilenglicol y propilenglicol, especialmente sorbitol y glicerina.

Los agentes aromatizantes apropiados incluyen aceite de gaulteria, aceite de menta, aceite de hierbabuena, aceite de clavo de olor, mentol, anetol, salicilato de metilo, eucaliptol, casia, acetato de 1-mentilo, salvia y eugenol.

Una composición de enjuague bucal de ejemplo incluye, por ejemplo, etanol (aproximadamente 10% y aproximadamente 20% en peso), propilenglicol (aproximadamente 5% y aproximadamente 15% en peso), glicerol (aproximadamente 5% y aproximadamente 20% en peso) y en cantidades menores, agentes aromatizantes y colorantes.

Los ingredientes activos de las composiciones de enjuague bucal son generalmente alcohol, gluconato de clorhexidina, cloruro de cetilpiridinio, hexetidina, ácido benzoico (actúa como una solución reguladora), salicilato de metilo, cloruro de benzalconio, metilparabeno, peróxido de hidrógeno, bromuro de domifeno y, a veces, fluoruro, enzimas, y calcio.

También pueden incluir aceites esenciales que tienen algunas propiedades antibacterianas, como fenol, timol, eugenol, eucalipto] o mentol. Los ingredientes también incluyen agua, edulcorantes tales como sorbitol, sucralosa, sacarina de sodio y xilitol (que también funciona como inhibidor bacteriano). Como se describió anteriormente, se prefiere que se incluya un surfactante no iónico en el enjuague bucal.

- 5 Las composiciones de goma de mascar por lo general incluyen una o más de una base de goma (desde 50% a 99%), un agente aromatizante (desde 0.4% a 2%) y un agente edulcorante (desde 0.01% a 20%).

Los comprimidos para deshacer en la boca incluyen mentas para el aliento, tabletas, pastillas, microcápsulas y comprimidos.

- 10 La saliva artificial, también conocida como un sustituto de la saliva tal como Oralube™, es una solución que simula la saliva. La saliva artificial normalmente contiene agua y electrolitos (por ejemplo, potasio, sodio, calcio, cloruro, fosfato) y también puede contener enzimas, derivados de celulosa y agentes aromatizantes. Las formulaciones apropiadas se conocen en la técnica y se describen, por ejemplo, en la Patente de los Estados Unidos Nos. 5,541,165 y 5,128,132, que se incorporan en este documento por referencia en su totalidad.

- 15 Preferiblemente, el compuesto de esfingosina se proporciona en un producto alimenticio suplementado con dicho compuesto. Los productos alimenticios apropiados incluyen productos lácteos, productos alimenticios procesados, aceites, suplementos alimenticios y/o vitamínicos, productos de bocadillos y productos de bebidas (tales como bebidas deportivas).

- 20 Preferiblemente, el compuesto de esfingosina se proporciona en bebidas suplementadas con dicho compuesto. Las bebidas apropiadas incluyen agua, bebidas alcohólicas (tales como cerveza, vino), bebidas refrescantes (tales como cola, té helado, limonada, ponche de frutas, agua con gas), jugos de frutas (tales como zumo de naranja, zumo de mandarina, zumo de toronja, zumo de piña, zumo de manzana, zumo de uva, zumo de lima y limón), zumo de verduras (tales como bebida de zanahoria y bebida de tomate), bebidas calientes (tales como bebidas a base de café, té, chocolate caliente, gluhwein,). Preferiblemente, el compuesto de esfingosina se proporciona en una composición alimenticia ácida, preferiblemente dicha composición alimenticia tiene un pH menor que 7, menor que 6 o
25 preferiblemente menor que 5. El pH del refresco es de alrededor de 3.

- Los productos alimenticios también incluyen comida para animales (por ejemplo, alimentos para perros, alimentos para gatos) y suplementos (por ejemplo, galletas, masticables). Tales productos son bien conocidos en la técnica y se describen, por ejemplo, en la Patente de los Estados Unidos Nos. 5,405,836; 6,379,725 y las Publicaciones de las Solicitudes de las Patentes de los Estados Unidos Nos. 2002/0119241 y 20050123585, todas las cuales se incorporan
30 en este documento por referencia en su totalidad.

- Preferiblemente, el compuesto de esfingosina está presente en el producto alimenticio a una concentración de más de 5 ug/ml, preferiblemente al menos 10 ug/ml, más preferiblemente al menos 20 ug/ml, más preferiblemente al menos 50 ug/ml y lo más preferido al menos 100 ug/ml. En el caso de un producto alimenticio sólido, el compuesto de
35 esfingosina está presente en una concentración de al menos 1 µg/gramo, al menos 2.5 µg/gramo, al menos 5 µg/gramo, o al menos 100 µg/gramo.

Definiciones

- Como se usa en este documento, "comprender" y sus conjugaciones se usa en su sentido no limitativo para significar que los elementos que siguen a la palabra están incluidos, pero los elementos no mencionados específicamente no
40 están excluidos. Además, el verbo "consistir" puede reemplazarse por "consistir esencialmente en", lo que significa que un compuesto o compuesto adjunto como se define en este documento puede comprender componente (s) adicional (es) que los específicamente identificados, dicho (s) componente (s) adicional (es) no altera (n) la característica única de la invención.

Los artículos "un" y "una" se usan en este documento para referirse a uno o más de uno (esto es, al menos uno) del objeto gramatical del artículo. A modo de ejemplo, "un elemento" significa un elemento o más de un elemento.

- 45 La palabra "aproximadamente" o "alrededor de" cuando se usa en asociación con un valor numérico (aproximadamente 10, aproximadamente 10) significa preferiblemente que el valor puede ser el valor dado de 10 más o menos 1% del valor.

La invención se explica adicionalmente en los siguientes ejemplos. Estos ejemplos no limitan el alcance de la invención, sino que simplemente sirven para aclarar la invención.

- 50 Referencias

Anderson P, Bollet-Quivogne FRG, Dowker SEP, Elliott JC. Demineralization in enamel and hydroxyapatite aggregates at increasing ionic strengths. Arch Oral Biol 2004;49:199-207.

Jensdottir T, Arnadottir IB, Thorsdottir I, et al. Relationship between dental erosion, soft drink consumption, and gastroesophageal reflux among Icelanders. *Clin Oral Investig* 2004;8:91-96.

Veerman ECI, Valentijn-Benz M, van 't Hof W, Nazmi K, van Marle J, Nieuw Amerongen AV. Phytosphingosine kills *Candida albicans* by disrupting its cell membrane. *Biol. Chem* 2010;391:65-71.

- 5 Navazesh M, Mulligan RA, Kipnis V, Denny PA, Denny PC. Comparison of whole saliva flow rates and mucin concentration in healthy Caucasian young and aged adults. *J Dent Res*; 1992; 71:1275-1278.

Ejemplos

Determinación de los efectos protectores de la fitoesfingosina.

10 El esmalte dental consiste en gran parte en cristales de hidroxiapatita ($\text{Ca}_{10}(\text{PO}_4)_6(\text{OH})_2$). Sinterizados a altas temperaturas, los discos de hidroxiapatita se pueden producir con características físicas (por ejemplo, dureza y densidad) similares a las del esmalte (Anderson *et al*, 2004), que se puede usar para determinar las propiedades erosivas de las soluciones (Jensdottir *et al*, 2005) midiendo la pérdida de peso de la hidroxiapatita después de la inmersión en una solución erosiva (ácida). Los discos de hidroxiapatita sinterizados a 1250 °C y con una densidad relativa de 98 % se obtuvo de Swerea, Estocolmo, Suecia. Las superficies laterales e inferiores de los discos se cubrieron con esmalte de uñas para que un lado permaneciera sin recubrir. Luego, los discos se limpiaron lijando con papel de lija (3M734 P600) enjuagados con agua desmineralizada, secados a 37 °C, durante la noche y se pesó para determinar la masa inicial. Se colocaron discos de hidroxiapatita en los pocillos de placas de cultivo celular de 12 pocillos (Greiner bio-one, Frickenhausen, Alemania), a las que se agregaron 1.5 ml de fitoesfingosina (PHS en diversas concentraciones disuelta en solución reguladora de saliva (fosfato de potasio 2 mM, KCl 50 mM, CaCl_2 1 mM, MgCl_2 0.1 mM, pH 6.8) bajo agitación suave durante 3 horas a 37 °C. Después de enjuagar tres veces con 4 ml de solución reguladora de saliva para eliminar la PHS no unida, los discos se colocaron en nuevos pocillos con 4 ml de ácido cítrico 0.1 M (pH = 3.0). Después de 30 minutos, se separó con pipeta el ácido cítrico y los discos se enjuagaron 3 veces con 4 ml de agua desmineralizada, se secaron durante la noche a 37 °C y se pesaron. La diferencia de peso antes y después del tratamiento erosivo se tomó como una medida para la erosión. Los experimentos se realizaron por triplicado y se repitieron al menos dos veces. La formación de la película de saliva en los discos de HAP se logró de la siguiente manera: la saliva se recogió sin estimulación consciente, como se describió anteriormente (Navazesh, 1993). La saliva se eliminó de los residuos celulares mediante centrifugación a 10,000 g durante 10 minutos. El sobrenadante (HWS) se recogió y se usó para recubrir discos de HAP con una película salival. Para este propósito, los discos de HAP se incubaron con 4 ml de HWS a 37 °C. Después de 3 horas, los discos se enjuagaron 3 veces con agua destilada para eliminar la proteína no unida. Posteriormente, el efecto protector de PHS sobre HAP recubierta de saliva se probó como se describió anteriormente para HAP descubierta.

Resultados

Absorción a HAP

35 Se predijo que la adsorción de PHS en HAP puede dar lugar a la formación de una película protectora que impide la difusión de compuestos polares y modula la adherencia microbiana. Primero se verificó si PHS realmente se une a HAP. Para esto, los discos de HAP sinterizados, como modelo para el esmalte dental, se trataron con PHS a concentraciones entre 0 y 500 $\mu\text{g/ml}$. Como la PHS es moderadamente soluble en agua, realizamos los experimentos de unión en Tris-Tween. La PHS es completamente soluble en Tris-Tween como se verificó mediante la determinación de la concentración de PHS antes y después de una etapa de centrifugación de 10 minutos a 10,000 g. La adsorción máxima se produjo a concentraciones de 60 $\mu\text{g/ml}$ de PHS y superiores. En estas condiciones, se adsorbieron aproximadamente 12 μg de PHS en la superficie del disco. Después de la incubación durante la noche de los discos de HAP con saliva, seguido de la incubación con PHS, se adsorbieron cantidades aún mayores de PHS en comparación con el control (discos de HAP incubados con solución reguladora de saliva) (Figura 14B). La figura 12 muestra la adsorción a lo largo del tiempo a una concentración fija de PHS. En un minuto ya se absorbió una cantidad sustancial de PHS. En general, la unión siguió un curso de tiempo bifásico, con una fase rápida inicial que alcanzó el equilibrio dentro de 1 hora, seguido de un aumento gradual durante las siguientes 15 horas.

Protección contra la desmineralización/erosión.

Los discos de HAP, después del tratamiento con una variedad de agentes (véase la figura 1) fueron expuestos a un desafío erosivo de ácido cítrico 0.1 M (pH = 3) durante 30 minutos. El tratamiento previo de los discos con albúmina de suero bovino o con saliva no dio lugar a una protección significativa. A pesar de que la PHS es poco soluble en la solución reguladora de saliva (Veerman *et al.*, 2010), la incubación con discos de HAP aún resultó en una protección sustancial (70 - 80% menos de pérdida de peso en comparación con los discos de control no tratados) contra un desafío erosivo posterior. El pretratamiento con PHS dio como resultado una protección de más del 80% contra la disolución por ácido cítrico en relación con los discos de control, que se trataron previamente con solución reguladora de saliva solo o solución reguladora de saliva que contenía DMSO, que se usó para preparar la solución de PHS. Por otro lado, el pretratamiento de los discos de HAP con 1 mg/ml de BSA o saliva entera proporcionó poca o ninguna protección contra un ataque erosivo duradero de 30 minutos. Para examinar si los efectos protectores fueron causados

por la precipitación de agregados insolubles de PHS en los discos de HAP, repetimos el experimento con PHS disuelto en Tris-Tween. Esto produjo esencialmente la misma protección, corroborando que la protección observada en la solución reguladora de saliva no se debió a la precipitación de agregados insolubles de PHS en la superficie de HAP. Esto sugiere que PHS formó una capa protectora sobre HAP que protegía contra los ataques ácidos del ácido cítrico.

5 A continuación, se probó la concentración mínima a la que PHS proporcionaba protección (Figura 2 y 13). Esto reveló una protección comparable a 500 y 50 $\mu\text{g/ml}$. A concentraciones de PHS $> 20 \text{ pg/ml}$, se logró una protección prácticamente máxima. Al reducir aún más la concentración de PHS a 5 $\mu\text{g/ml}$, que es aproximadamente la concentración de micelas críticas de PHS (Veerman *et al*, 2007), se produjo una fuerte disminución de la protección. Luego se probó la duración del efecto (Figura 3). Esto demostró que después de 1 hora de exposición al ácido cítrico, la PHS aún estaba protegido. El tratamiento previo de los discos con el detergente aniónico SDS (1%), un compuesto que se encuentra comúnmente en las pastas de dientes, no protegió contra la exposición posterior al ácido cítrico (no se muestra), lo que indica que la protección fue causada por las propiedades moleculares específicas de la PHS.

15 Para examinar el efecto del disolvente usado para la preparación de la solución madre de PHS, PHS se disolvió en DMSO y etanol a una concentración de 5 mg/ml . Estas soluciones madre se diluyeron 10 veces en solución reguladora de saliva, con o sin sonicación. Posteriormente, los discos de HAP se incubaron durante 3 horas con las soluciones de trabajo resultantes, se enjuagaron y se expusieron a ácido cítrico. No se encontraron diferencias entre las diversas condiciones usadas para la preparación de las soluciones madre (Figura 4). Dado que el esmalte dental *in situ* está cubierto con un recubrimiento de proteínas de saliva, se probó en qué medida esto podría influir en la protección de PHS. Por lo tanto, se probó el efecto protector de la PHS en los discos de HAP que se habían preincubado con saliva humana, para producir una película de proteínas salivales firmemente adheridas (la película salival) en la superficie de los discos. Esto reveló que PHS protegió HAP recubierta de saliva en la misma medida que protegió HAP no recubierta (Figura 5).

25 Para explorar más a fondo los requisitos estructurales de los efectos observados, se probó la protección con otras dos esfingosinas estructuralmente relacionadas, la esfingosina-fosfato y la esfinganina (Figura 6). El tratamiento de los discos de HAP con fosfato de esfingosina (solución reguladora de saliva 200 $\mu\text{g/ml}$) no proporcionó protección contra un ataque erosivo posterior por el ácido cítrico. El tratamiento de HAP con esfinganina, que en comparación con la fitoesfingosina carece de un grupo hidroxilo en C_4 (Figura 6), protegió contra el ácido cítrico cuando se usa en una solución reguladora Tris (Figura 8), pero no cuando se usa en una solución reguladora que contiene iones fosfato. El tratamiento con esfingosina, esfinganina y fosfato de fitoesfingosina a 100 $\mu\text{g/ml}$ en Tris-Tween produjo una protección comparable a la de PHS. Los otros lípidos probados, incluida la esfingomielina, la fosfatidilcolina y diversas N-alquil esfingosinas, no protegieron la HAP.

Efecto sobre la adherencia bacteriana

35 Además, se probó el efecto de la PHS sobre la adherencia bacteriana inicial a los discos de HAP *in vitro* con *S. mutans* como organismo modelo. Los discos recubiertos con PHS y los discos de control se sumergieron en una suspensión de *S. mutans* y después de 2 horas se determinó el número de bacterias adheridas mediante recubrimiento. Esto reveló una disminución de > 100 veces en el número de bacterias adheridas a la HAP recubierta con PHS, en comparación con la HAP base (Figura 11)).

Efectos protectores de los esfingolípidos cuando están presentes en el ácido cítrico durante el ataque erosivo.

40 Los discos de HA se trataron previamente con solución reguladora o 100 $\mu\text{g/ml}$ de PHS durante 3 horas (Figura 15, dos barras a la izquierda) seguido de un tratamiento con ácido cítrico 0.1 M ($\text{pH} = 3.0$) durante 30 minutos. El pretratamiento con PHS protege contra los efectos erosivos del ácido cítrico. Los discos de HA se trataron previamente con ya sea solución reguladora o con 100 $\mu\text{g/ml}$ de PHS y luego se expusieron a ácido cítrico 0.1 M en presencia de 100 $\mu\text{g/ml}$ de PHS durante 30 minutos (Figura 15, dos barras a la derecha). La PHS presente en un fluido erosivo protege contra la erosión incluso con discos de HAP no tratados. (PHS no tiene ningún efecto sobre el pH del ácido cítrico).

Propiedades antiincrustantes de las esfingosinas.

Se probaron seis esfingolípidos diferentes que incluyen PHS, fosfato de PHS, esfingosina, esfinganina, estearoil PHS y esfingomielina por sus propiedades antiincrustantes contra dos colonizadores primarios, esto es, *Streptococcus sanguinis* y *Streptococcus gordonii* y un colonizador tardío, *Streptococcus mutans*.

50 Se incubaron discos de HA O/N con 100 $\mu\text{g/ml}$ de lípidos a 37 °C. Posteriormente, los discos se lavaron para eliminar los lípidos no unidos. Luego, los discos de HA recubiertos con lípidos se incubaron durante 2 horas con 1.5 ml de $\sim 10^7$ células/ml. Después del lavado, las células bacterianas adherentes se desorbieron por sonicación y se transfirieron a placas de agar. Después de 48 h se contaron las CFU.

55 Para el *S. mutans* fosfato de PHS y estearoil PHS mostraron una clara actividad antiincrustante en casi 2 log CFU/ml. La esfinganina mostró una reducción de 3 log (Figura 1).

Para *S. sanguinis*, la esfingomielina mostró una reducción en la adherencia bacteriana de 1 valor logarítmico, mientras que la esfinganina mostró una reducción de 2 valores logarítmicos (Figura 2). En el caso de *S. gordonii*, el fosfato de PHS y la esfinganina mostraron una reducción de 1.5 valores logarítmicos (Figura 3).

Materiales y métodos

5 La fitoesfingosina (de Doosan Corporation, Francia) fue un obsequio amable del Dr P. Ekhardt (Innopact BV) esfinganina, 4-hidroxi esfinganina-1-fosfato, N-acetoil 4-hidroxi esfinganina, N-octanoil 4-hidroxi esfinganina, N-estearoil 4-4-hidroxi esfinganina (todas de *Saccharomyces cerevisiae*), la esfingomielina y la esfingosina se obtuvieron de Avanti Polar Lipids (Alabaster, Alabama). Se obtuvo Di-miroistil fosfatidilcolina de Sigma-Aldrich. Se obtuvieron discos de hidroxiapatita (diámetro 15 mm, altura 3 mm), sinterizados a 1250 °C y con una densidad relativa del 98% de Swerea (Estocolmo, Suecia). Los discos de HAP fabricados de esta manera tienen características físicas (por ejemplo, dureza y densidad) similares a las del esmalte (Anderson *et al*, 2004) y se pueden usar para determinar las propiedades erosivas de las soluciones.

Prueba de erosión

15 La protección de HAP contra la erosión se determinó esencialmente según lo descrito por Jensdottir *et al*, (2005), midiendo la pérdida de peso de los discos de HAP antes y después de la inmersión en una solución erosiva (ácida) usando una escala de precisión analítica Sartorius GD503. Para los experimentos de erosión, las superficies laterales e inferiores de los discos se cubrieron con esmalte de uñas dejando la superficie superior circular sin recubrimiento. A continuación, los discos se limpiaron lijando con papel de lija fino (3M734 P600), se enjuagaron con agua desmineralizada, se secaron a 37 °C, durante la noche y se pesaron para determinar la masa inicial. Se prepararon 20 soluciones madre de lípidos en etanol a una concentración de 5 mg/ml. Estas soluciones madre se diluyeron más a la concentración deseada en la solución reguladora de trabajo. Las soluciones de trabajo de PHS se prepararon en solución reguladora de saliva (fosfato de potasio 2 mM, KCl 50 mM, CaCl₂ 1 mM, MgCl₂ 0.1 mM, pH 6.8) o en Tris 20 mM (pH 6.8) suplementado con Tween 20 al 0.1% (Tris-Tween). Se colocaron discos de HAP en los pocillos de placas de cultivo celular de 12 pocillos (Greiner bio-one, Frickenhausen, Alemania), a las que se agregaron 1.5 ml de las 25 soluciones lipídicas y se incubaron bajo agitación suave durante 3 horas a 37 °C. Después de enjuagar tres veces con 4 ml de la solución reguladora de incubación para eliminar los lípidos no unidos, los discos se incubaron con 4 ml de ácido cítrico 0.1 M (pH = 3.0). Después de 30 minutos de incubación a 37 °C bajo agitación suave, se separó con pipeta el ácido cítrico y los discos se enjuagaron 3 veces con 4 ml de agua desmineralizada, se secaron durante la noche a 37 °C y se pesaron. La diferencia de peso antes y después del tratamiento erosivo se tomó como una medida 30 para la erosión. Todas las incubaciones se realizaron por triplicado y cada experimento se repitió al menos dos veces.

Película de saliva

La formación de película de saliva en discos de HAP se logró de la siguiente manera: se recogió saliva sin estimulación consciente, como se describió previamente (Navazesh *et al*, 1993). Los discos de HAP se incubaron con 4 ml de saliva entera humana (HWS) a 37 °C. Después de 3 horas, los discos se enjuagaron 3 veces con agua destilada para 35 eliminar la proteína no unida. Posteriormente, el efecto protector de los lípidos sobre HAP recubierta de saliva se probó como se describió anteriormente para discos de HAP no recubiertos. El estudio fue aprobado por the Institutional Ethical Board of the Academic Hospital Vrije Universiteit de Amsterdam y se obtuvo el consentimiento informado del donante.

Adsorción de PHS a HAP

40 La PHS se disolvió en concentraciones que varían de 0 a 500 µg/ml en solución reguladora Tris 20 mM suplementada con Tween 20 al 0.1% (pH 6.8) (Tris-Tween). Se agregó Tween 20 para mantener la PHS en solución. Los discos se incubaron con las soluciones de PHS durante 18 h, y luego se enjuagaron con agua desmineralizada (3 veces) para eliminar la PHS no unida. La PHS unida a HAP se extrajo por incubación con 1.5 ml de metanol durante 90 minutos. Como el esmalte de uñas se disolvió en metanol, en los experimentos de unión se usaron discos de HAP sin esmalte 45 de uñas. Se verificó que no se adsorbió PHS al plástico, al realizar incubaciones de control sin discos. Después de la evaporación, el residuo se disolvió en 250 µl de metanol. A 100 µl de esta solución, 25 µl de reactivo de orto-ftaldialdehído (OPA, Sigma-Aldrich) para permitir la cuantificación fluorimétrica de PHS unida. La fluorescencia se midió en un lector de microplacas Fluostar a longitudes de onda de excitación/emisión de 380 nm/450 nm. Las cantidades absolutas se determinaron por referencia a una curva estándar de PHS. Todas las incubaciones se 50 realizaron por triplicado y el experimento se repitió dos veces.

Adhesión bacteriana

Se investigó la adhesión de bacterias a los discos de HAP usando el modelo de unión activa, esencialmente como se describió previamente (Exterkate *et al*, 2010). Este modelo consiste en una tapa de acero inoxidable hecha a medida con 24 abrazaderas que contenían los discos de HAP tratados con PHS y con solución reguladora como sustrato para 55 la adhesión de *S. mutans*. Los discos de HAP (diámetro: 9.7 mm de diámetro; espesor: 1.7 mm Himed, NY, EE. UU.) Se incubaron durante la noche a 30 °C en Tris 20 mM, Tween 20 al 0.1%, pH 6.8, con o sin 100 µg/ml de PHS. Posteriormente, los discos de HAP se lavaron tres veces transfiriendo la tapa a una placa de 24 pocillos que contenía

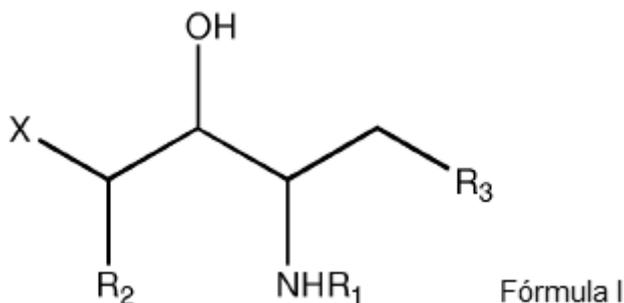
5 1.6 ml de solución reguladora y se movieron 10 veces hacia arriba y hacia abajo para eliminar el exceso de PHS. Se cultivó *S. mutans* durante la noche en medio BHI y se diluyó 1:10 en BHI de potencia media (18.5 g de BHI/l, PIPES de 50 Mm/l, pH 7.0) hasta una densidad final de aproximadamente 10^8 células/ml. La tapa con los discos de HAP se colocó en la parte superior de la placa de 24 pocillos que contenía 1.5 ml de suspensión bacteriana diluida y se incubó anaeróticamente durante 2 horas a 37 °C. Los discos de HAP se lavaron dos veces transfiriendo la tapa a la placa que contenía 1.6 ml de agua con cisteína peptona (CPW), para eliminar las bacterias no adherentes. Posteriormente, los discos se retiraron de la tapa y se transfirieron a 2 ml de CPW y la capa de bacterias unida se dispersó mediante baño de ultrasonidos durante 2 minutos con pulsos de 1 s. La suspensión resultante se sembró en placas en diferentes diluciones en placas BHI y se incubó anaeróticamente durante 48 horas a 37 °C antes de contar las CFU.

10

REIVINDICACIONES

1. A

(a) compuesto de esfingosina que tiene la fórmula I:



5 en la que X es un alquilo o alquenilo que tiene 8-24 carbonos, preferiblemente 10 a 20 carbonos, más preferiblemente un alquilo lineal;

R₁ se selecciona entre H y C(=O)C₁₋₂₀, preferiblemente R₁ es H;

R₂ se selecciona entre H y OH, preferiblemente R₂ es OH; y

R₃ se selecciona de fosfato, OH o F, preferiblemente OH,

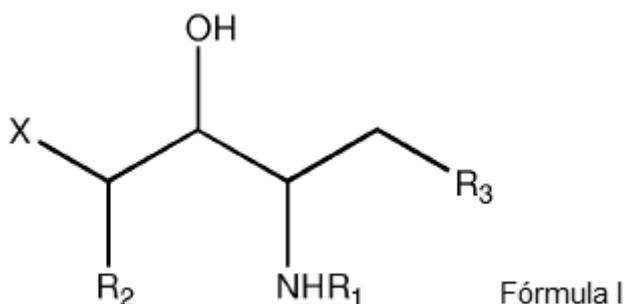
10 (b) un conjugado de dicho compuesto, o

(c) una composición para el cuidado bucal que comprende dicho compuesto;

para su uso en el tratamiento, reducción o prevención de la erosión dental o hipersensibilidad de la dentina.

2. El compuesto de esfingosina para su uso según la reivindicación 1, en la que el compuesto de esfingosina es fitoesfingosina.

15 3. Una composición para el cuidado bucal que comprende un compuesto de esfingosina que tiene la fórmula I:



en la que X es un alquilo o alquenilo que tiene 8-24 carbonos, preferiblemente 10 a 20 carbonos, más preferiblemente un alquilo lineal;

R₁ se selecciona entre H y C(=O)C₁₋₂₀, preferiblemente R₁ es H;

20 R₂ se selecciona entre H y OH, preferiblemente R₂ es OH; y

R₃ se selecciona de fosfato, OH o F, preferiblemente OH,

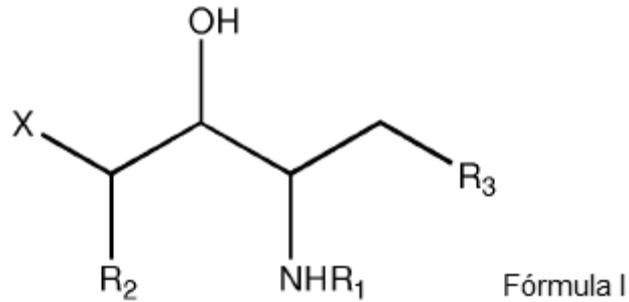
o un conjugado de dicho compuesto, en el que la composición es una pasta de dientes que comprende un abrasivo dental, un surfactante no iónico, un agente espesante y un humectante, en el que la pasta de dientes no comprende un detergente iónico.

25 4. La composición para el cuidado bucal de la reivindicación 3, en la que el compuesto de esfingosina es fitoesfingosina.

5. La composición para el cuidado bucal de la reivindicación 3 o 4, en la que dicha composición comprende además nanopartículas de hidroxiapatita.

6. La composición para el cuidado bucal de una cualquiera de las reivindicaciones 3-5 para su uso en la prevención o reducción de la erosión dental o hipersensibilidad de la dentina.

5 7. Una composición alimenticia que comprende a) un compuesto de esfingosina que tiene la fórmula I:



en la que X es un alquilo o alquenilo que tiene 8-24 carbonos, preferiblemente 10 a 20 carbonos, más preferiblemente un alquilo lineal;

R₁ se selecciona entre H y C(=O)C₁₋₂₀, preferiblemente R₁ es H;

10 R₂ se selecciona entre H y OH, preferiblemente R₂ es OH; y

R₃ se selecciona de fosfato, OH o F, preferiblemente OH,

o un conjugado de dicho compuesto y b) nanopartículas de hidroxiapatita.

Figura 1

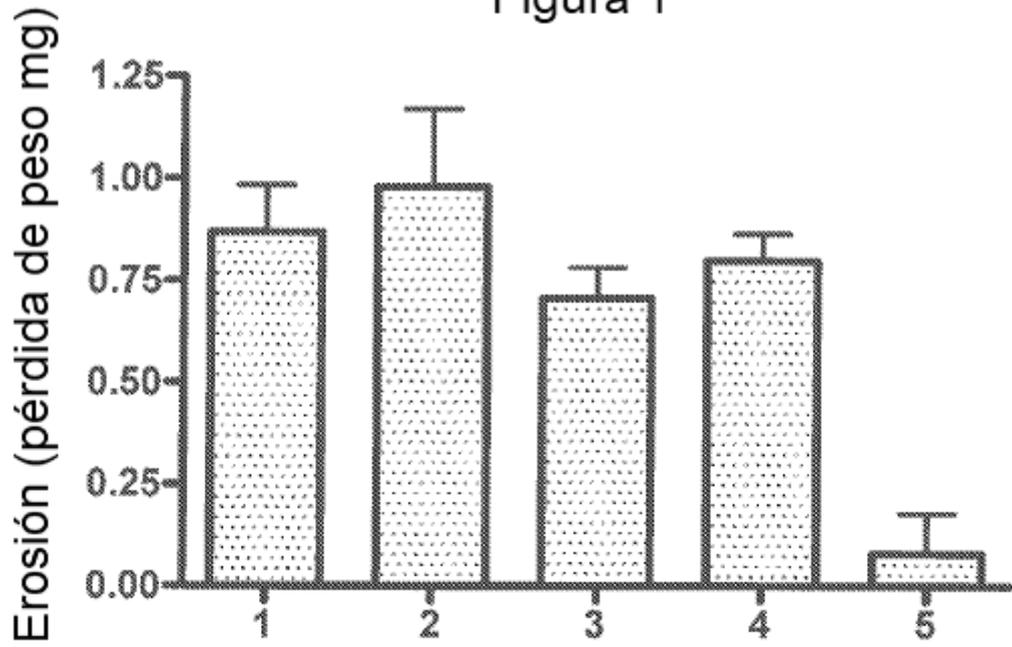


Figura 2

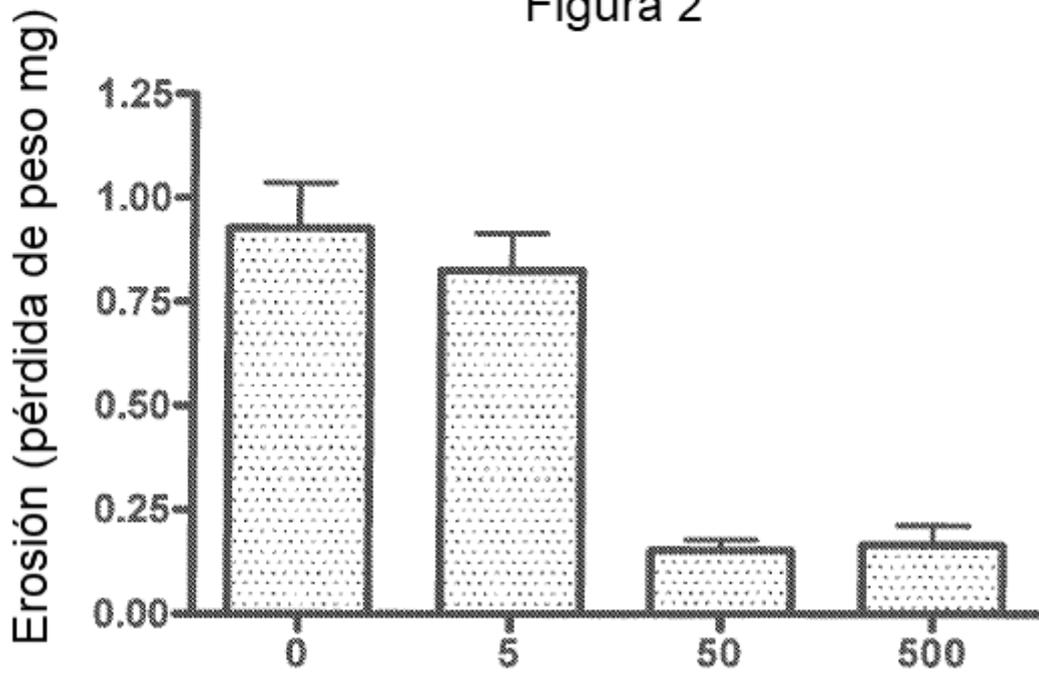


Figura 3

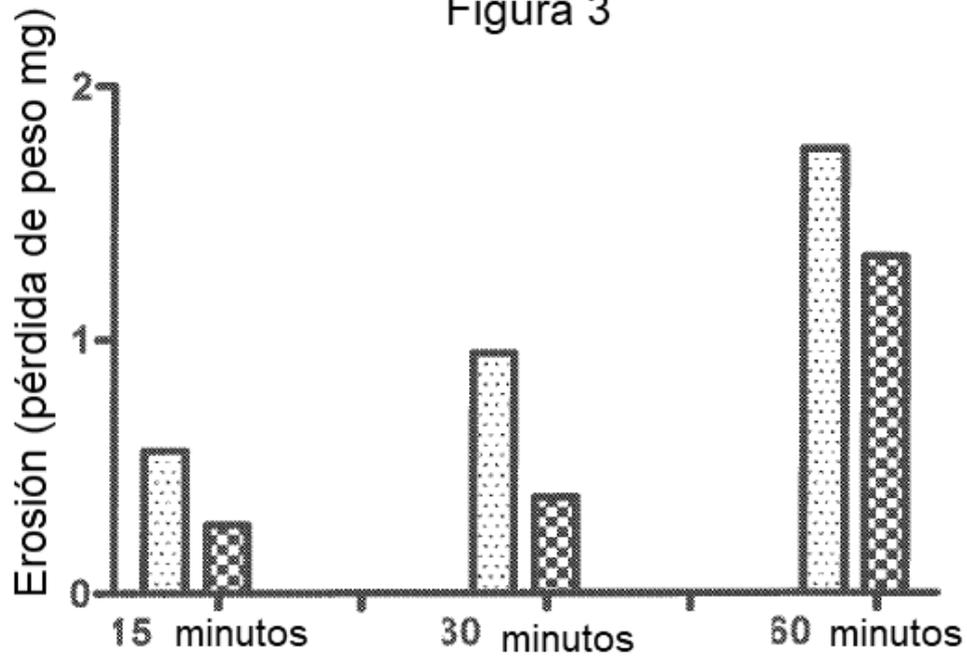


Figura 4

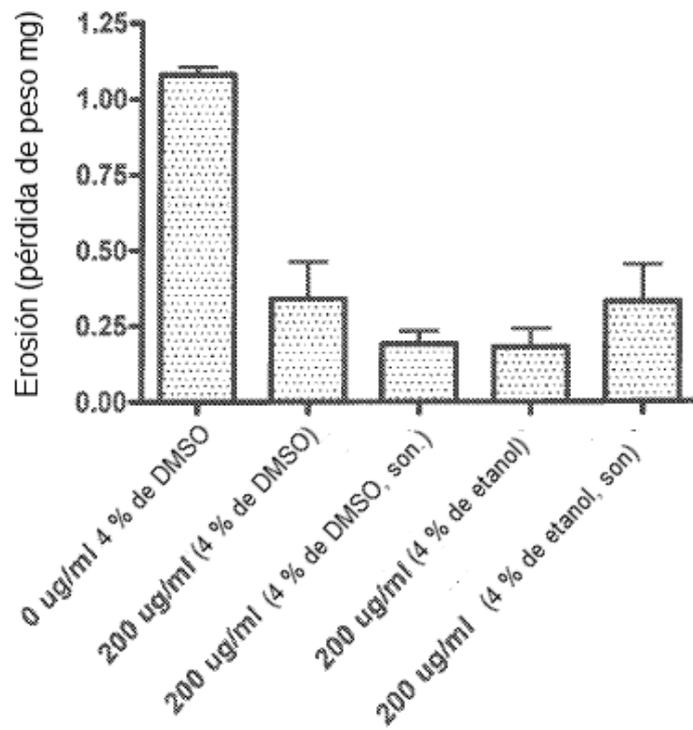


Figura 5

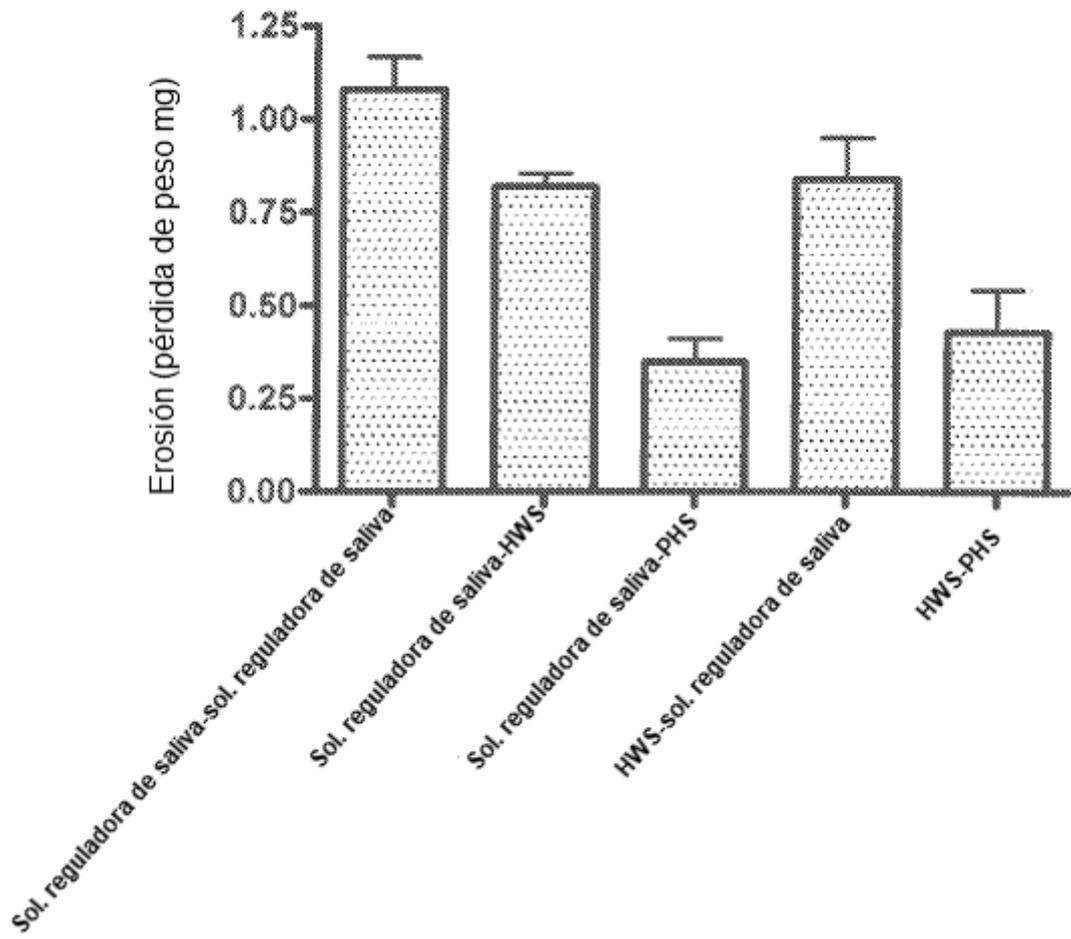


Figura 6

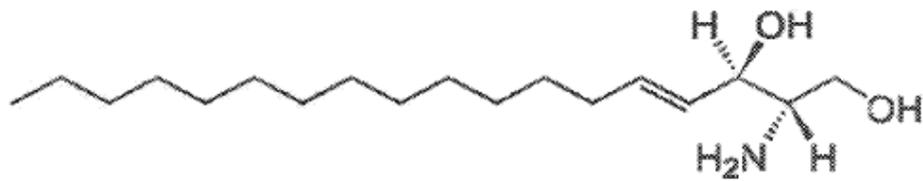
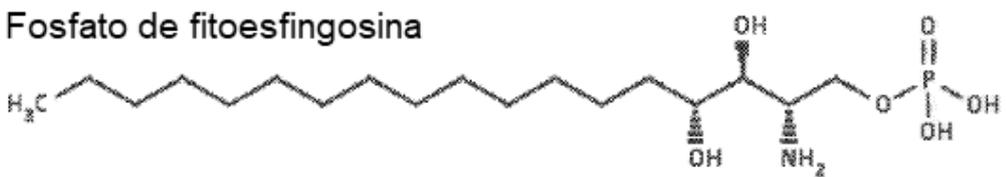
Fitoesfingosina



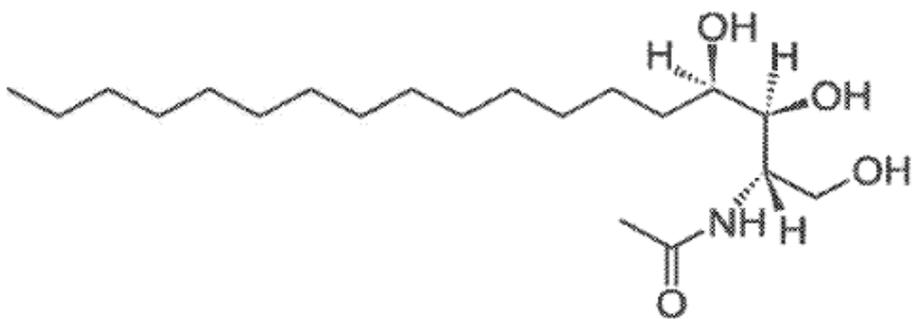
Esfinganina



Fosfato de fitoesfingosina

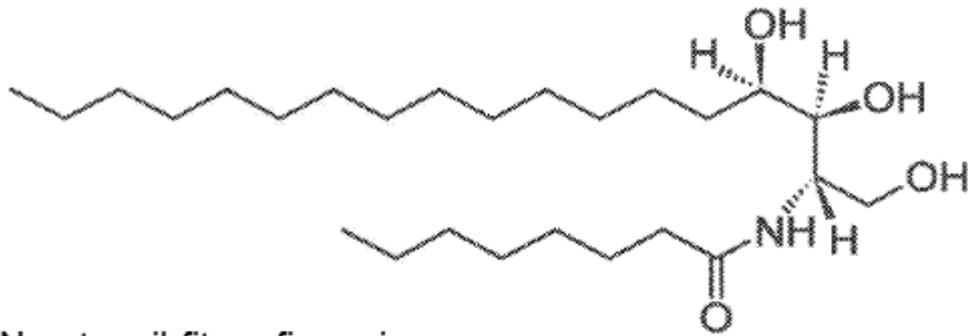


Esfingosina

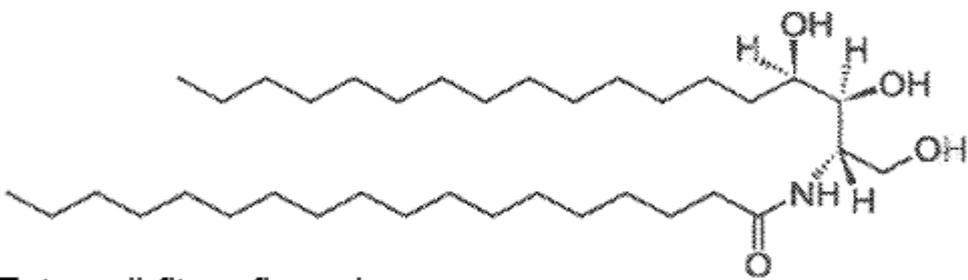


N-acetil-fitoesfingosina

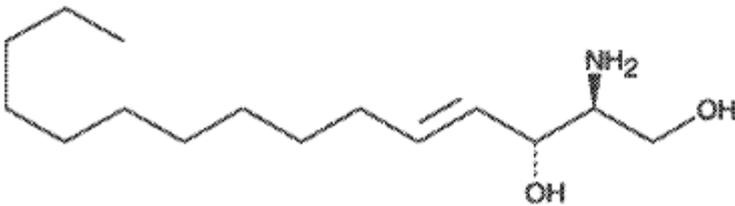
Figura 6 continuación



N-octanoyl-fitoesfingosina



Estearoil-fitoesfingosina



D-eritro-esfingosina C15

Figura 7

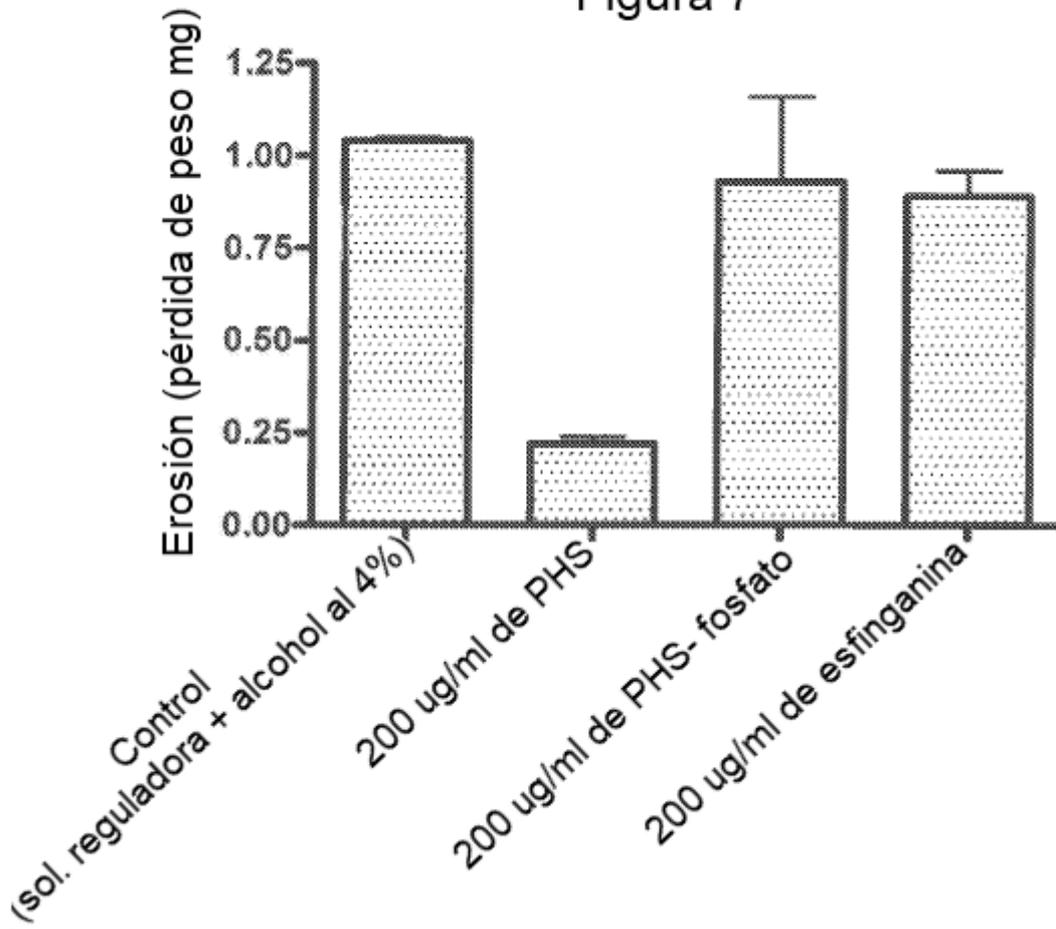


Figura 8

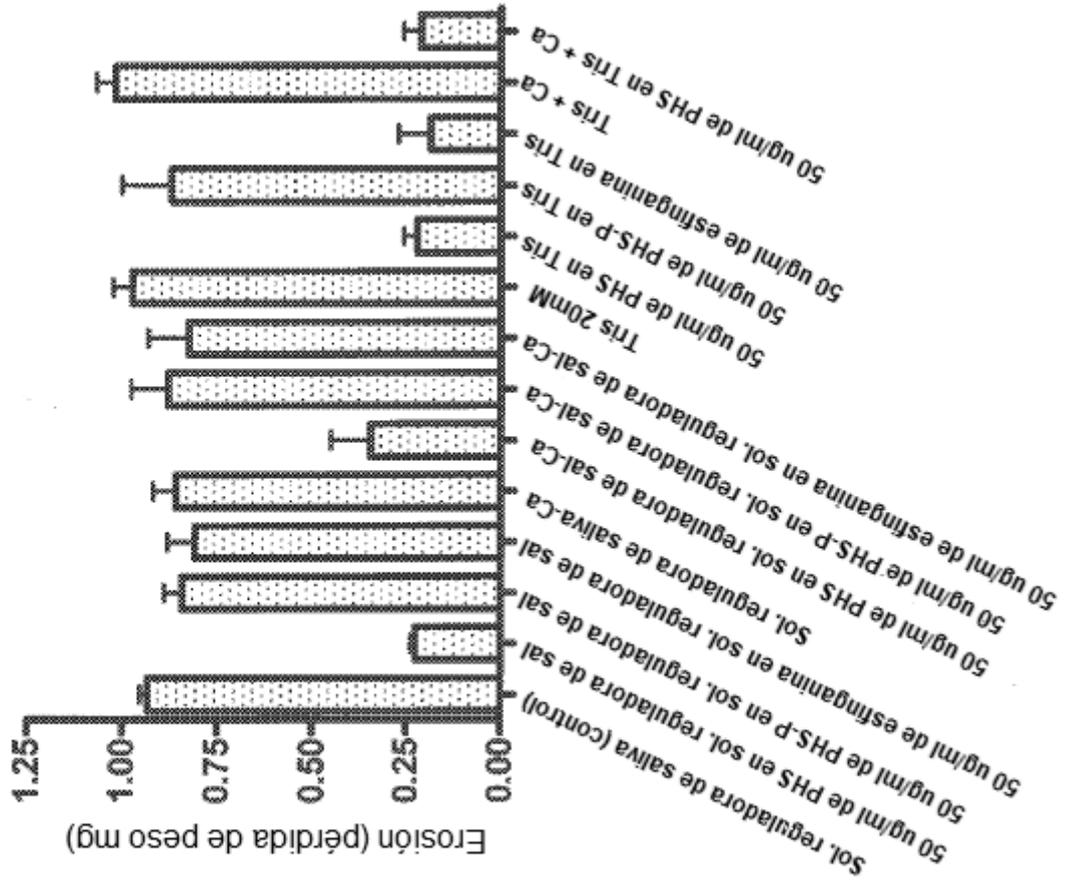


Figura 9

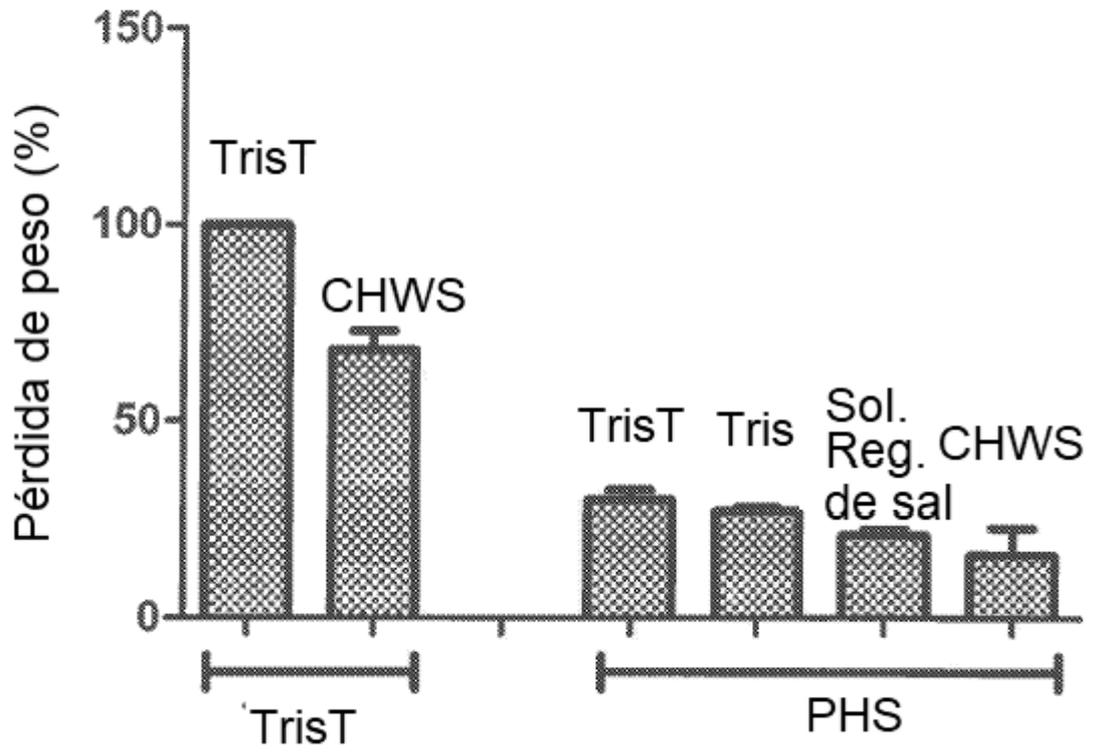


Figura 10

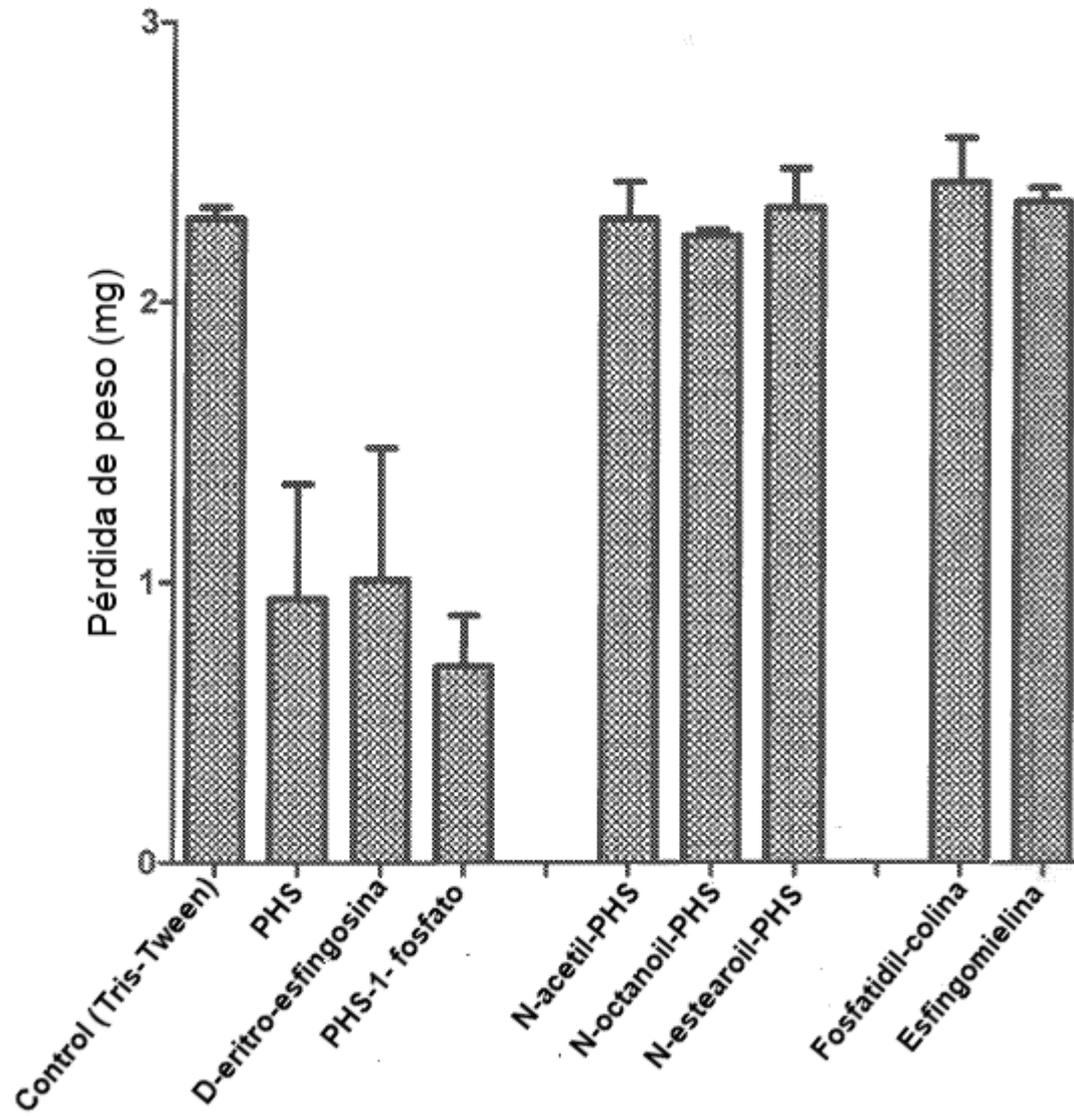


Figura 11

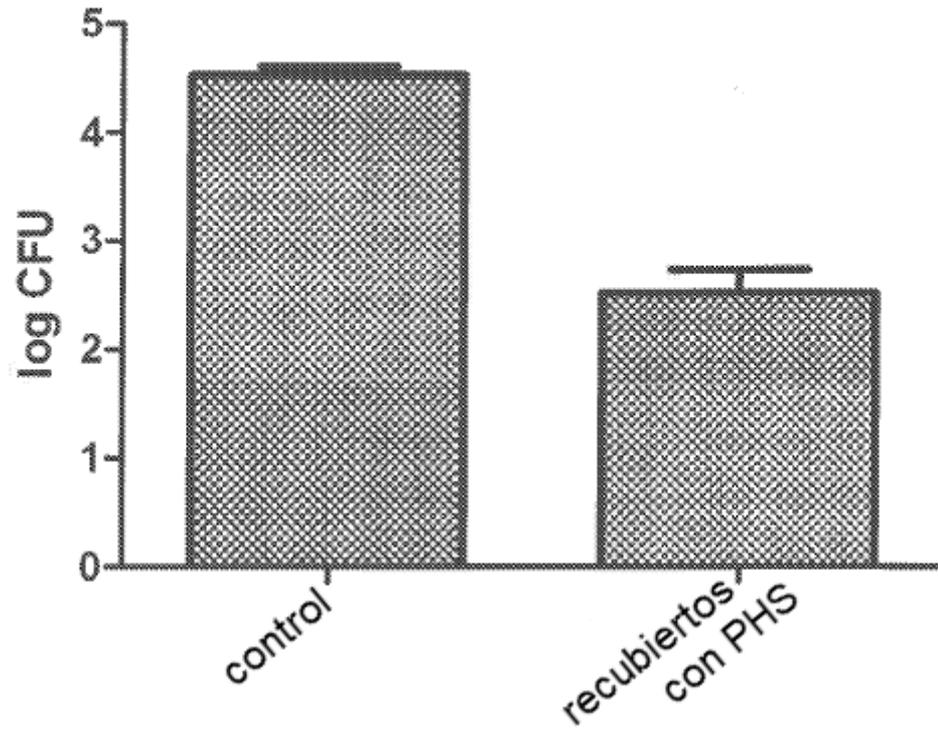


Figura 12

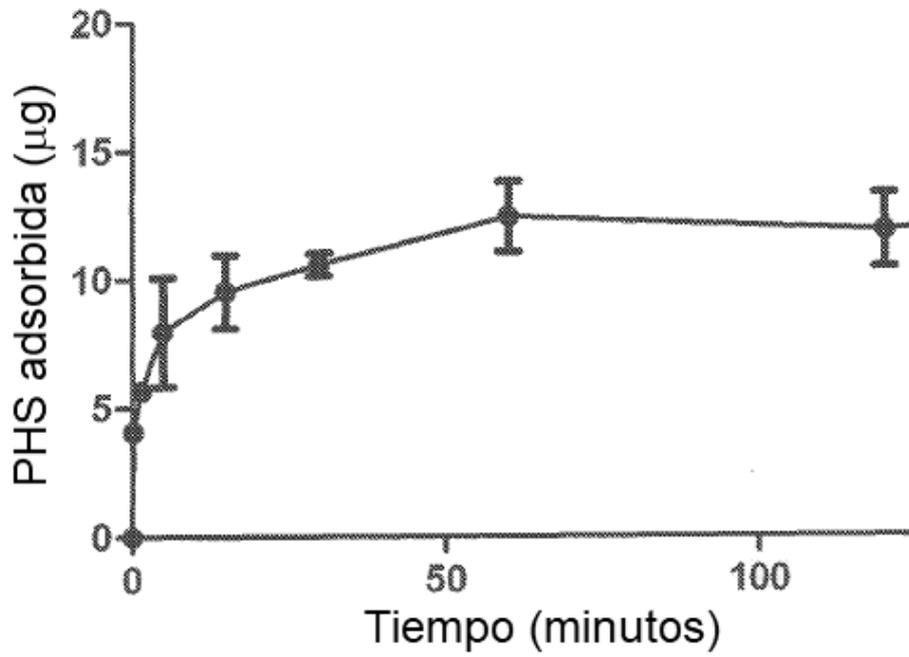


Figura 13

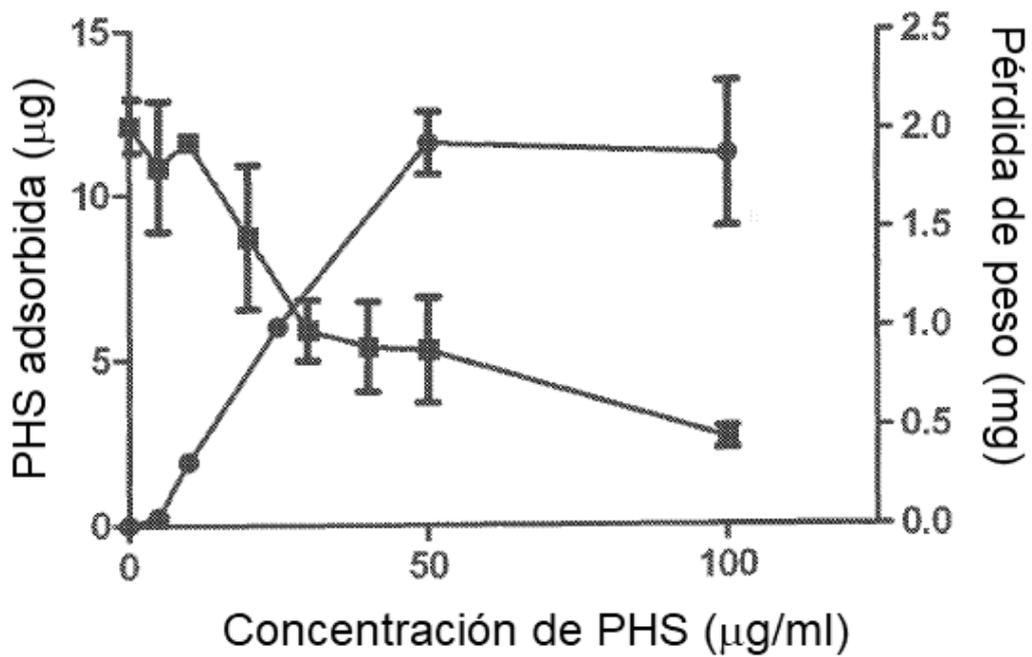


Figura 14

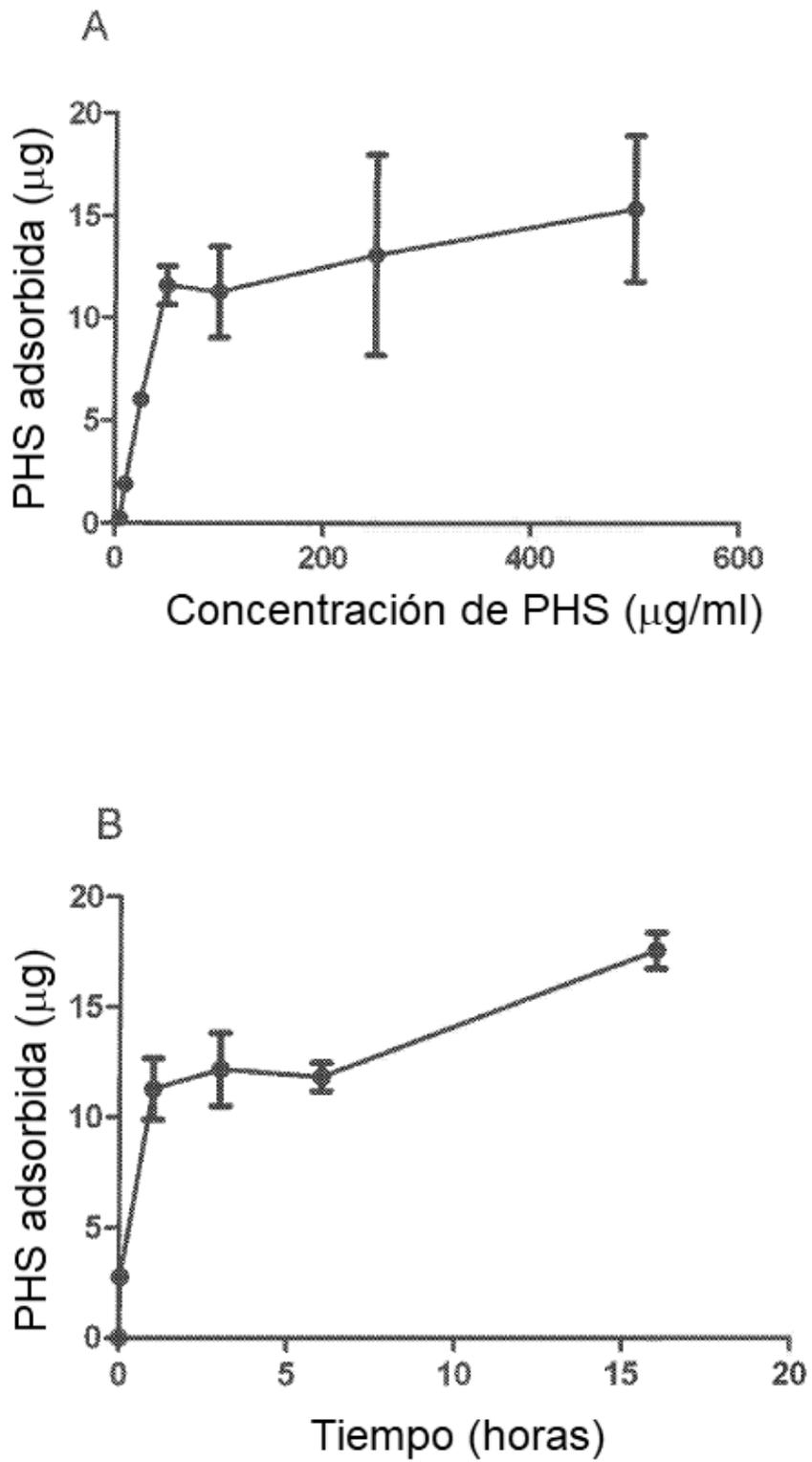


Figura 15

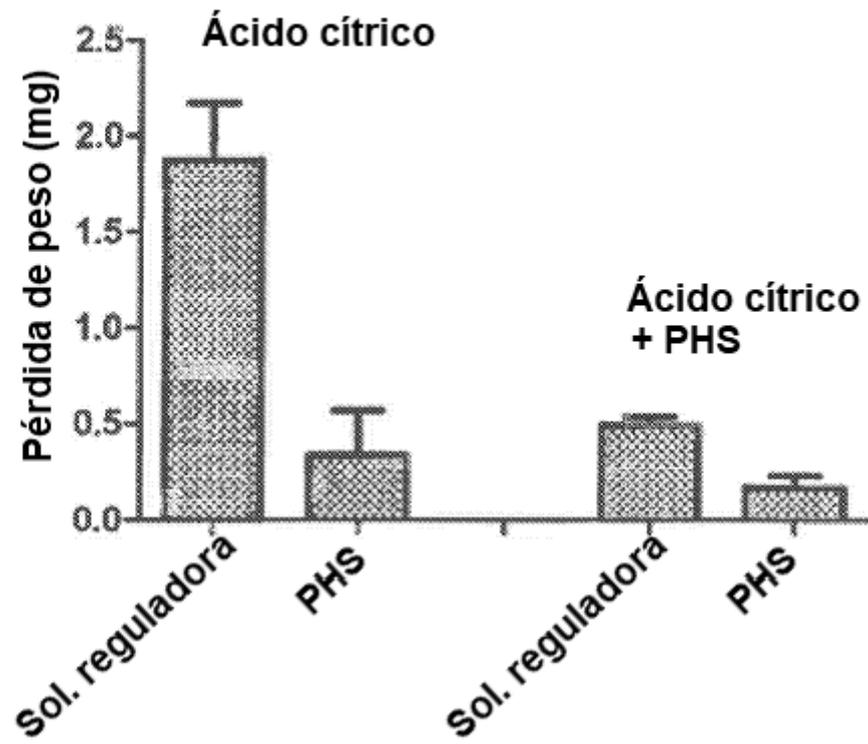


Figura 16

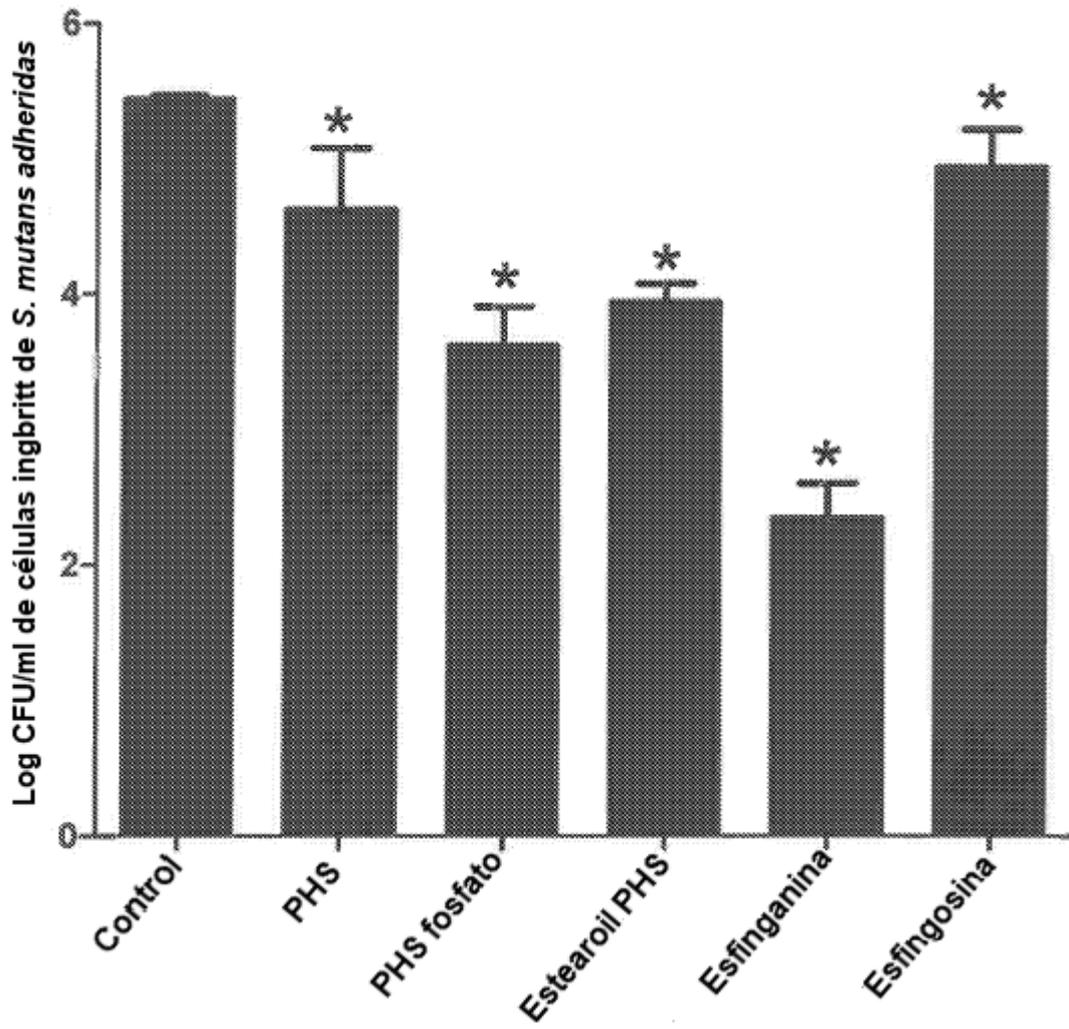


Figura 17

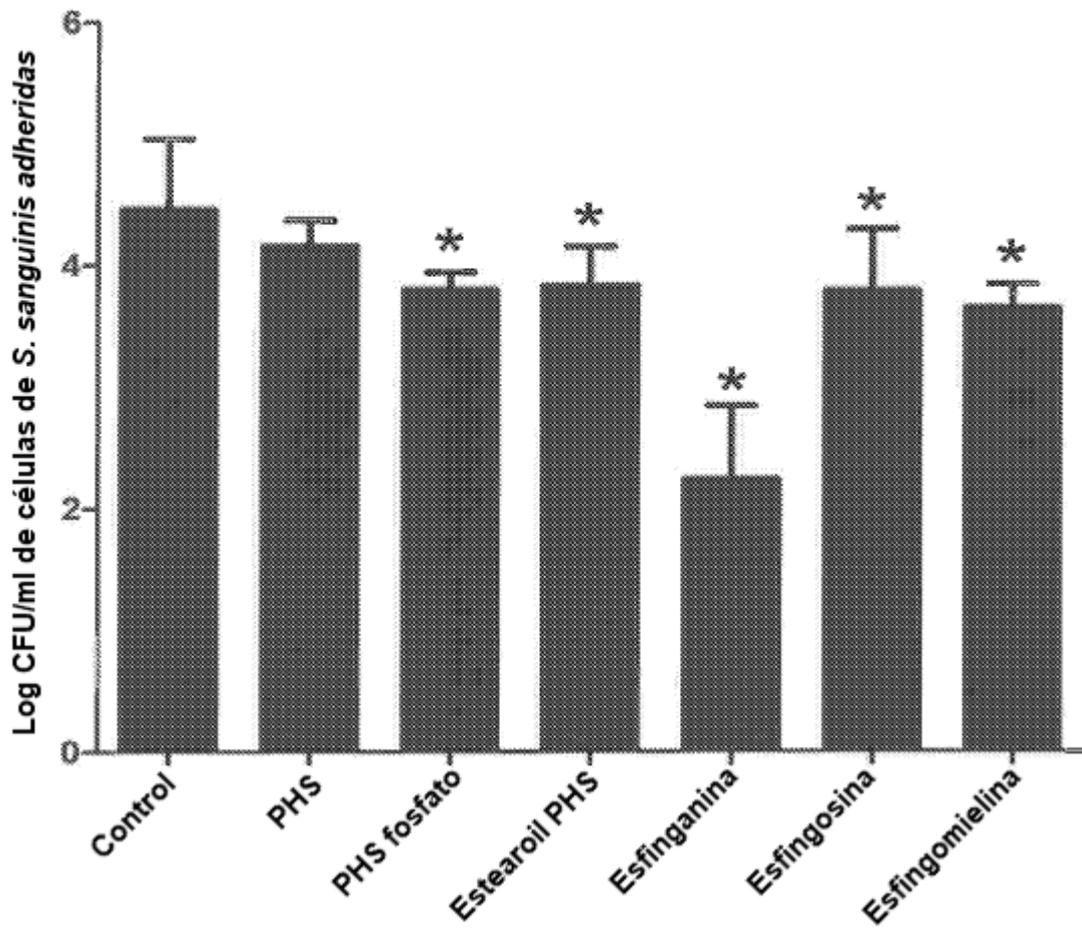


Figura 18

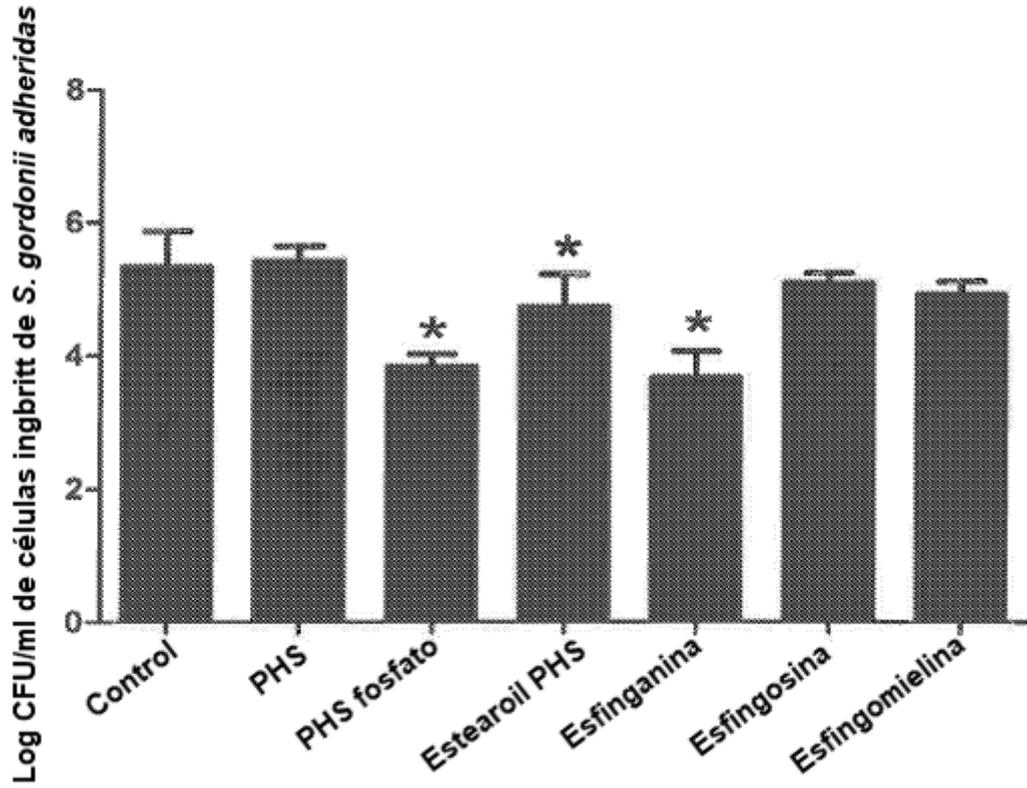


Figura 19

Detergentes no iónicos						
Detergente	Cat. No.	M.W. (anhidro) ^b	CMC (mg) ^b	No. Agregación	Peso micelar Promedio	Tamaño
APO-10	178375	218.3	4.6	131	28,000	1 g
APO-12	178377	245.4	0.568	2232	500,000	1 g
Big CHAP	200965	878.1	3.4	10	8,800	1 g
Big CHAP, Desoxi	256455	862.1	1.1-1.4	8-16	10,500	250 mg
Detergente, solución al 30 % BRIJ® 35, PROTEIN GRADE™	203724	---	0.09	40	48,000	1 g
Detergente, solución al 10 %, filtrado estéril BRIJ® 35, PROTEIN GRADE™	203728	---	0.09	40	48,000	1 L
C ₁₂ E ₆	205524	---	---	---	---	1 g
C ₁₂ E ₈	205527	450.7	0.087	---	---	1 g
C ₁₂ E ₁₀	205528	538.8	0.11	123	66,000	1 g
C ₁₂ E ₁₄	205529	582.8	0.08	---	---	1 g
Ciclohexil-n-etil-β-D-maltosido, ULTROL™ Grade	239774	452.5	120	---	---	1 g
Ciclohexil-n-hexil-β-D-maltosido, ULTROL™ Grade	239775	508.6	0.56	63	32,000	500 mg
Ciclohexil-n-metil-β-D-maltosido, ULTROL™ Grade	239776	438.5	340	---	---	1 g
n-Decanoilsucrosa	252721	496.6	2.5	---	---	1 g
n-Decil-β-D-maltopiranosido, ULTROL™ Grade	252718	482.6	1.6	---	---	5 g
n-Decil-β-D-tiomaltosido, ULTROL™ Grade	252725	498.6	0.9	---	---	5 g
Digitonina, Alta Pureza	300410	1229.3	---	5-6	7,000	500 mg
Digitonina, soluble en alcohol, Alta Pureza	300411	1229.3	---	5-6	7,000	250 mg
n-Dodecanoilsucrosa	324374	524.6	0.3	---	---	1 g
n-Dodecil-β-D-glucopiranosido	324351	348.5	0.13	200	70,000	1 g
n-Dodecil-β-D-maltósido ULTROL™ Grade	324355	510.6	0.1-0.6	98	50,000	500 mg
Detergente, solución al 50% ELUGENT™	324707	---	---	---	---	1 g
Detergente, solución al 10 % GENAPOL™ C-100, PROTEIN GRADE®	345794	627.0	---	---	---	5 g
Detergente, solución al 10 % GENAPOL™ X-80, PROTEIN GRADE®	345796	533.0	0.06-0.15	---	---	100 ml
Detergente, solución al 10 % GENAPOL™ X-100, PROTEIN GRADE®	345798	641.0	0.15	88	56,000	50 ml
n-Heptil-β-D-glucopiranosido	375655	278.3	79	---	---	50 ml
n-Heptil-β-D-tioglucopiranosido, solución al 10 % ULTROL™ Grade	375659	294.4	30	---	---	1 g
n-Hexil-β-D-glucopiranosido	376965	264.3	250	---	---	10 ml
						50 ml
						1 g

Figura 19 (continuación)

ULTROL® Grade							
MEGA-8, ULTROL® Grade	444926	321.5	58	---	---	---	1 g
MEGA-9, ULTROL® Grade	444930	335.5	19-25	---	---	---	5 g
MEGA-10, ULTROL® Grade	444934	349.5	56-7	---	---	---	1 g
n-Nonil-β-D-glucopiranosido NP-40	488285 492015	306.4 603.0	6.5 0.05-0.3	---	---	---	5 g 1 g 100 ml 500 ml
Detergente, solución al 10 % NP-40, PROTEIN GRADE® n-Octanoil-β-D-glucosilamina (NOGA)	492017 488100	603.0 305.4	0.05-0.3 80	---	---	---	1000 ml 50 ml 500 mg
n-Octanoilsucrosa	494466	468.5	24.4	---	---	---	1 g 5 g 1 g
n-Octil-β-D-glicopiranosido	494459	292.4	2025	84	25,000	---	5 g 1 g 5 g 25 g
n-Octil-β-D-glucopiranosido, ULTROL® Grade	494460	292.4	20-25	84	25,000	---	250 mg 1 g 5 g 1 g 5 g
n-Octil-β-D-maltopiranosido n-Octil-β-D-tioglicopiranosido, ULTROL® Grade	494465 494461	454.5 308.4	23.4 9	84	38,000	---	5 g 1 g 5 g
Detergente, solución al 10 % FLURONIC® F-127, PROTEIN GRADE® TRITON® X-100	540025 648462	---	4-11 0.2-0.9	---	---	---	25 g 50 ml 1 kg
Detergente, solución al 10 % TRITON® X-100, PROTEIN GRADE®	648463	625 (avg.)	0.2-0.9	100-155	80,000	---	50 ml
TRITON® X-100, Grado Biología Molecular	648466	625 (avg.)	0.2-0.9	100-155	80,000	---	50 ml
TRITON® X-100, Hidrogenado	648465	631 (avg.)	0.25	100-155	80,000	---	10 g
Detergente, solución al 10 % TRITON® X-100, Hidrogenado, PROTEIN GRADE®	648464	631 (avg.)	0.25	100-155	80,000	---	10 ml
Detergente, solución al 10 % TRITON® X-114, PROTEIN GRADE®	648468	537 (avg.)	0.35	---	---	---	50 ml
TWEEN® 20	655205	1328 (avg.)	0.059	---	---	---	50 ml
TWEEN® 20, Grado Biología Molecular	655204	---	0.059	---	---	---	250 ml
Detergente, solución al 10 % TWEEN® 20, PROTEIN GRADE®	655206	1228 (avg.)	0.059	---	---	---	100 ml
Detergente, solución al 10 % TWEEN® 80, PROTEIN GRADE®	655207	1310 (avg.)	0.012	58	76,000	---	50 ml
n-Undecil-β-D-maltosido, ULTROL® Grade	662085	496.6	0.59	---	---	---	50 ml 500 mg

*Los pesos promedio moleculares se dan para detergentes compuestos de mezclas de longitudes de cadena. Temperatura: 20-25 °C.

MARCAS COMERCIALES

BRIJ® y TWEEN® son marcas registradas de ICI Americas Inc.
 LUBROL® es una marca registrada de Imperial Chemical Inc.
 EMPIGEN BB® es una marca registrada de Albright & Wilson
 FLURONIC® es una marca registrada de Wymadotte Chemicals Corporation.
 GENAPOL® es una marca registrada de Hoechst AG.
 TRITON® es una marca registrada de Rohm and Hass.
 ULTROL, PROTEIN GRADE®, y ZWITTERGENT® son marcas registradas de Calbiochem-Novachem Corporation.
 Adsorbente CALBIOSOR® y Detergente ELUGENT® son marcas registradas de Calbiochem-Novachem Corporation.
 Reimpreso de DETERGENTS: Una guía de las propiedades y usos en sistemas biológicos (2001 por Calbiochem-Novachem Corporation).