

19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 819 284**

51 Int. Cl.:

A61K 6/00 (2010.01)

A61K 49/00 (2006.01)

A61Q 11/00 (2006.01)

A61K 49/04 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

86 Fecha de presentación y número de la solicitud internacional: **18.03.2011 PCT/AU2011/000303**

87 Fecha y número de publicación internacional: **22.09.2011 WO11113107**

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **18.03.2011 E 11755567 (2)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **27.05.2020 EP 2547311**

54 Título: **Kit y método para detectar hidroxiapatita dental porosa**

30 Prioridad:

19.03.2010 AU 2010901171

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

15.04.2021

73 Titular/es:

**INCISIVE TECHNOLOGIES PTY LTD (100.0%)
Level 23, 459 Collins Street
Melbourne, Victoria 3000, AU**

72 Inventor/es:

**HUBBARD, MICHAEL JAMES y
MANGUM, JONATHAN EDWARD**

74 Agente/Representante:

VIDAL GONZÁLEZ, Maria Ester

Observaciones:

**Véase nota informativa (Remarks, Remarques o
Bemerkungen) en el folleto original publicado por
la Oficina Europea de Patentes**

ES 2 819 284 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

Kit y método para detectar hidroxiapatita dental porosa

5 Campo

La invención se refiere a un kit y una sonda para detectar hidroxiapatita dental porosa y a un método para detectar una afección que implica hidroxiapatita dental porosa.

10 Antecedentes

La resistencia de los dientes depende de una interacción compleja entre minerales (denominados hidroxiapatita) y componentes orgánicos (proteínas, células y tejidos). En condiciones normales, la hidroxiapatita en el esmalte y la dentina se organiza en una estructura extraordinariamente densa que confiere la rigidez y la dureza necesarias para mantener la integridad del diente. La pérdida de densidad mineral en el esmalte y la dentina da como resultado una hidroxiapatita anormalmente porosa, que compromete la resistencia física del diente y puede conducir a una falla estructural. La hidroxiapatita porosa es causada por varias afecciones preponderantes, incluidas las caries dentales y los defectos dentales del desarrollo (DDD).

15 La caries dental (erosión de los dientes) es una enfermedad causada por bacterias que secretan ácido. El ácido producido por las bacterias cariogénicas puede disolver la hidroxiapatita en un proceso denominado desmineralización. El proceso inicial de desmineralización (denominado caries incipiente) conduce a distintas regiones de hidroxiapatita porosa denominadas lesiones de mancha blanca. Con el tiempo, una lesión de mancha blanca puede progresar a una cavidad (es decir, pérdida de material dental) o puede detenerse (denominada caries inactiva) y volver a formar una capa densa de hidroxiapatita en un proceso llamado remineralización. Antes de que se forme una cavidad, el proceso es reversible (es decir, remineralización), pero una vez que se pierde el esmalte no se puede regenerar.

20 La caries se diagnostica mediante una combinación de inspección visual, reto físico (por ejemplo, raspado con sonda dental) y radiografía de rayos X (para detectar caries entre los dientes o debajo de la línea de las encías). Es preocupante que estos enfoques de diagnóstico pierdan aproximadamente la mitad de las caries tempranas, y hasta el 13 % de los dientes diagnosticados como cariados con estos métodos, de hecho, no tienen caries. Los intentos recientes para mejorar el diagnóstico incluyen el uso de equipos que miden la impedancia eléctrica, la fluorescencia cuantitativa inducida por la luz (QLF) y la fluorescencia láser infrarroja (DIAGNOdent®), pero ninguno ha encontrado un uso generalizado debido al coste y el tamaño del aparato, y problemas con la variación entre individuos. Otro enfoque ha sido el uso de colorantes para detectar la caries dental en la dentina. Sin embargo, estos colorantes no son selectivos para la hidroxiapatita porosa: se unen a proteínas (que se supone que están asociadas con la infección de bacterias en la dentina) u ocupan el espacio intersticial, lo que reduce la especificidad y la sensibilidad. Además, estos colorantes hacen que la cavidad bucal se decolore, se unen a los dientes sanos o requieren visualización con un radiador.

30 Existen dos tratamientos principales para la caries, cuya selección depende del grado de la enfermedad. Las lesiones de mancha blanca pueden tratarse con enfoques de remineralización (por ejemplo, terapia con fluoruro o fosfato de calcio amorfo estabilizado con moléculas bioactivas). Las cavidades requieren odontología restauradora convencional (es decir, empastes).

35 Los DDD son otra causa común de hidroxiapatita porosa. Son inquietantemente frecuentes y costosos, y afectan potencialmente a más del 50 % de la población con múltiples cargas, incluido el dolor dental, la desfiguración y un mayor riesgo de caries. Los dos DDD más frecuentes son la fluorosis dental (caracterizada por opacidades difusas) y la hipomineralización molar/incisiva (MIH; caracterizada por opacidades demarcadas); ambas son causadas por agentes ambientales (es decir, defectos adquiridos). Otro DDD grave pero poco frecuente que puede producir hidroxiapatita porosa es la enfermedad genética amelogénesis imperfecta.

40 La MIH generalmente afecta al 10-20 % de los niños y es un factor de riesgo importante para las caries, un factor de riesgo para la ortodoncia y es costoso para la sociedad. Se cree que la MIH es el resultado de una alteración sistémica multifactorial de las células formadoras de esmalte. Sin embargo, aparte de no estar asociada al fluoruro y no vincularse con la enfermedad durante la infancia, la causa de MIH sigue siendo un misterio.

45 Actualmente no hay productos disponibles que estén diseñados para diagnosticar y reparar MIH u otro DDD. El diagnóstico diferencial de caries y varios DDD puede ser difícil y depende en gran medida de la experiencia y habilidad de los profesionales de la salud dental. Los procedimientos y/o productos actuales desarrollados para la remineralización de las caries no funcionan bien en MIH. El tratamiento restaurador con frecuencia se ve comprometido porque el esmalte en la MIH es suave, poroso y está mal delineado con relación al tejido dental normal.

60

El documento WO2007/038683 A2 se refiere a una composición que comprende uno o más péptidos de unión a calcio con secuencia (X-Y-Z)_n, en donde X es un aminoácido seleccionado de ácido aspártico, ácido glutámico, asparagina, alanina y glutamina, e Y y Z son aminoácidos seleccionados de alanina, serina, treonina, fosfoserina, fosfotreonina y sus derivados. El documento WO2007/038683 A2 menciona además el uso de dicha composición en la remineralización de dientes y superficies óseas, el diagnóstico de defectos óseos y dentales, el tratamiento de defectos óseos y dentales y el análisis de la presencia y la ubicación de depósitos calcificados tanto *in vitro* como *in vivo* y en aplicaciones industriales, sintéticas, médicas, dentales y de investigación donde se desea la identificación, localización o manipulación de una calcificación.

En consecuencia, existe la necesidad de nuevas herramientas para diagnosticar, delinear y reparar la hidroxiapatita dental porosa causada por caries y DDD. Aquí abordamos esta necesidad al detallar nuevas tecnologías basadas en nuestros descubrimientos recientes de mecanismos patogénicos en afecciones que implican hidroxiapatita porosa.

Resumen

Un primer aspecto proporciona un kit para usar en un método de detección de una afección que implica hidroxiapatita dental porosa, que comprende: una sonda de acuerdo con el segundo aspecto.

Un segundo aspecto proporciona una sonda para usar en un método de detección de hidroxiapatita dental porosa *in vivo*, que comprende: un indicador coloreado conjugado con una proteína seleccionada del grupo: albúmina sérica; cadena beta de C3 del complemento; alfa-1-antitripsina; proteína S100-A9; lactotransferrina; inhibidor de elastasa de leucocitos; antitrombina-III; subunidad alfa de hemoglobina; subunidad beta de hemoglobina; subunidad delta de hemoglobina; proteína inducible por prolactina; alfa amilasa 1; SIE de región V-III de cadena kappa de Ig; región C de cadena alfa 2 de Ig; proteína no caracterizada c6orf58; Serpina B3; amelogenina; osteocalcina; y decorina, en donde la proteína se une específicamente a la hidroxiapatita dental porosa.

Además, en el presente documento se describe un primer método, más particularmente un método para producir la sonda del segundo aspecto que comprende unir (i) una proteína capaz de unirse a la hidroxiapatita dental porosa y (ii) un indicador.

Además, en el presente documento se describe un segundo método, más particularmente un método para detectar una afección que implica hidroxiapatita dental porosa que comprende detectar en o sobre un diente o una muestra del diente de un sujeto una proteína unida a hidroxiapatita dental porosa.

Además, en el presente documento se describe un tercer método, más particularmente un método para detectar un DDD de hipomineralización que comprende detectar una proteína cuya concentración unida a la hidroxiapatita de prueba de un diente o de una muestra del diente aumenta en relación con su concentración unida a la hidroxiapatita de control de un diente control o de una muestra control de un diente, y detectar amelogenina cuya concentración unida a la hidroxiapatita de prueba está cerca de la unida a la hidroxiapatita de control.

Además, en el presente documento se describe un cuarto método, más particularmente un método para detectar esmalte con MIH intacto y/o roto que comprende detectar albúmina y hemoglobina unida a hidroxiapatita con MIH, en donde la detección de albúmina, pero no de hemoglobina es indicativa de esmalte con MIH intacto, y en donde la detección de hemoglobina es indicativa de esmalte con MIH roto.

Además, en el presente documento se describe un segundo kit, más particularmente un kit para eliminar una proteína unida a hidroxiapatita dental porosa que comprende: (a) (i) una o más soluciones de lavado o (ii) componentes secos para preparar una o más soluciones de lavado al mezclarlos con agua, en donde la una o más soluciones de lavado están adaptadas para eliminar una proteína unida a hidroxiapatita dental porosa; y (b) un agente de remineralización o un agente de mineralización de recuperación.

Además, en el presente documento se describe un quinto método, más particularmente un método para eliminar una proteína unida a hidroxiapatita dental porosa que comprende lavar un diente o una muestra del diente con una o más soluciones de lavado.

Además, en el presente documento se describe un tercer kit, más particularmente un kit para eliminar una proteína unida a hidroxiapatita dental porosa que comprende: una o más soluciones de lavado; o uno o más componentes secos para preparar una o más soluciones de lavado al mezclarlos con agua, en donde la una o más soluciones de lavado están adaptadas para eliminar una proteína en o sobre un diente o una muestra del diente la cual se detectó que tenía hidroxiapatita dental porosa con el método del cuarto aspecto.

El kit o la sonda del primer al segundo aspecto o del primer al cuarto método como se describe en este documento permiten la detección *in situ* o el diagnóstico *ex situ*.

El kit o la sonda del primer al segundo aspecto o del primer al cuarto método como se describe en el presente documento son útiles para detectar caries dentales y/o MIH/DDD y delinear los límites cariados y/o de MIH/DDD en

preparación para la restauración de un diente. Después, el médico puede extraer específicamente el tejido cariado o con MIH así revelado, lo que asegura una preparación limpia de los bordes y mejora la probabilidad de éxito de la restauración.

5 El kit del primer aspecto o la sonda del segundo aspecto proporciona herramientas clave o el segundo método como se describe en el presente documento permite el examen sistemático de hidroxiapatita dental porosa. Además, el kit o la sonda del primer al segundo aspecto, del primer al cuarto método, como se describe en el presente documento, pueden usarse para la detección temprana de hidroxiapatita dental expuesta. De esta manera, el kit o la sonda del primer al segundo aspecto o los métodos descritos en este documento pueden usarse para el examen sistemático de cambios dentales que, sin detección, pueden conducir a la caries dental (un precursor de la caries), lo que permite una orientación oportuna y precisa de la restauración y/o remineralización para prevenir la progresión de la caries y/o para promover la remineralización. En algunas modalidades, el kit o la sonda del primer al segundo aspecto o del primer al cuarto método como se describe en el presente documento son particularmente adecuados para el examen sistemático de niños después de la salida del primer molar permanente. De ello se deduce que el kit o la sonda del primer al segundo aspecto o del primer al cuarto método como se describe en el presente documento son adecuados, además, para el examen sistemático de los dientes para la detección temprana de hidroxiapatita porosa. El examen sistemático regular brinda una excelente oportunidad para detectar en el momento práctico más temprano los cambios dentales que pueden conducir a la caries dental.

20 Además, el kit o la sonda del primer al segundo aspecto o del primer al cuarto método como se describe en el presente documento permiten, además, monitorear cualquier tratamiento emprendido, como las terapias de remineralización conocidas que incluyen fluoruro o fosfato de calcio amorfo que pueden estabilizarse con moléculas bioactivas.

25 El quinto método como se describe en el presente documento y el segundo y tercer kit permiten la eliminación suave y/o específica del exceso de proteínas que están fuertemente retenidas en la hidroxiapatita porosa, por ejemplo en lesiones de MIH, para usarse antes de los tratamientos de remineralización o durante estos.

30 La proteína de cualquiera del primero, tercero o quinto métodos como se describe en el presente documento o el segundo o tercer kit como se describe en el presente documento se selecciona del grupo: albúmina sérica; cadena beta de C3 del complemento; alfa-1-antitripsina; proteína S100-A9; lactotransferrina; inhibidor de elastasa de leucocitos; antitrombina-III; subunidad alfa de hemoglobina; subunidad beta de hemoglobina; subunidad delta de hemoglobina; proteína inducible por prolactina; alfa amilasa 1; SIE de región V-III de cadena kappa de Ig; región C de cadena alfa 2 de Ig; proteína no caracterizada c6orf58; y Serpina B3. Además, la proteína de cualquiera del primero, tercero o quinto métodos como se describe en el presente documento o el segundo o tercer kit como se describe en el presente documento puede ser amelogenina.

40 El segundo y tercer kit como se describe en el presente documento puede estar en formas alternativas. Una forma designa idoneidad o restricción para un uso específico y se indica con la palabra "para". Otra forma está restringida a un uso específico solamente y se indica con las palabras "cuando se usa para".

45 Los métodos primero a quinto descritos en este documento pueden presentarse en formas alternativas, por ejemplo, en forma europea ("agente para su uso") o en forma de un segundo uso médico (tipo suizo) ("uso de un agente en la fabricación de un medicamento").

Sin embargo, el alcance de la presente invención está definido, exclusivamente, por las reivindicaciones adjuntas. Cualquier otra descripción en el presente documento, independientemente de si se indica como preferida o ejemplificada, no forma parte de la presente invención.

50 Breve descripción de las figuras

55 La Figura 1 es un gráfico del contenido de proteínas del esmalte con MIH, que es anormalmente alto en relación con el esmalte normal. Las proteínas insolubles en ácido se extrajeron del esmalte normal (normal) y de un grupo de lesiones graves que presentaban una ruptura post-eruptiva (muestras 7-11) y después se cuantificaron mediante análisis densitométrico de membrana de transferencia puntual. Los valores medios (\pm SD) se muestran para ensayos duplicados, cada uno realizado con cargas variadas para garantizar la linealidad cuantitativa ($r^2 > 0,95$). Como se indicó, todas las muestras de MIH diferían significativamente de lo normal cuando se compararon por pares mediante el uso de la prueba t de Student (homocedástica, dos colas). Se usó un patrón de albúmina para derivar los niveles absolutos de proteína a partir de estos datos.

60 La Figura 2 ilustra que las lesiones de MIH intactas y rotas tienen perfiles de proteínas distintos. Las proteínas insolubles en ácido de las lesiones de MIH y el esmalte normal (normal) se sometieron a SDS-PAGE y se tiñeron con azul de Coomassie o se inmunotransfirieron con anticuerpos contra amelogenina (anti-AMG) como se indica. (A) Comparación de lesiones con superficie intacta y con superficie rota (muestras 1-6 y 7-11, respectivamente), que muestran patrones distintos para las principales bandas de proteínas. Se indican las posiciones de albúmina y hemoglobina (Alb, Hb). (B) Comparación de muestras de MIH con matriz de esmalte en fase de secreción, de rata, que sirvió como control para amelogeninas predominantemente intactas (AMG). Las muestras 7 y 11 son

representativas de lesiones con cantidades bajas o apreciables de fragmentos de amelogenina, respectivamente. Para la cuantificación, se normalizó la inmunorreactividad cruzada entre amelogeninas de rata y humana mediante el uso de un patrón de amelogenina humana (de Abnova, ciudad de Taipei, Taiwán). (C) Perfiles de dos lesiones intactas, que comparan la primera corrida en gel con el uso de extractos frescos con una segunda corrida después del almacenamiento de los mismos extractos de SDS durante 16 semanas a -20 °C. Nótese la desaparición de las bandas principales a 66 kDa (albúmina).

La Figura 3 enumera los resultados del análisis proteómico de lesiones de MIH intactas y rotas, que revelan numerosas proteínas de fluidos corporales en el esmalte con MIH. Las principales bandas indicadas en el gel a partir de lesiones intactas y rotas (Fig. 2A, muestras 1-11) fueron sometidas a identificación proteómica, como se documenta más completamente en la Tabla 1. La figura representa las proteínas identificadas en cada banda y las muestras en las que se realizaron estas identificaciones (números de muestra entre paréntesis). Los carriles del gel para las muestras 6 y 7 se reproducen de la Fig. 2A para ilustrar lesiones intactas y rotas, respectivamente.

La Figura 4 representa ensayos de mineralización que revelan que la integridad de la superficie regula la composición de proteínas del esmalte con MIH. (A) Perfiles comparativos de esmalte con MIH y fluidos corporales, que muestran similitudes para lesiones intactas versus suero y para lesiones rotas versus saliva y eritrocitos. (B) Ensayo de unión a hidroxiapatita (afinidad a HAp), que muestra que un subconjunto de proteínas del fluido oral simulado (O-Fluid) se retuvo preferentemente (compare las diferencias entre las fracciones de Carga, Unidas y No Unidas). Observe una gran semejanza entre el perfil Unidas y la lesión rota en el panel A (muestra 7). (C) Un ensayo equivalente de unión a minerales para B, pero con esmalte con MIH en polvo en lugar de hidroxiapatita. Los perfiles muestran el esmalte de una lesión intacta, antes y después de la exposición a un fluido oral simulado (+/- O-Fluid). Obsérvese una semejanza del perfil unido a proteínas (+) con el de las lesiones rotas y la hidroxiapatita en los paneles A y B. Este resultado indica que la pérdida de estructura gruesa (incluida la superficie intacta) conduce a un cambio notable en la capacidad de unión a proteínas de las lesiones intactas. Para legitimar estas comparaciones, ambas matrices de afinidad (hidroxiapatita en partículas, esmalte con MIH) se molieron con mortero para obtener consistencias iguales (polvo grueso) antes del ensayo.

La Figura 5 representa un ensayo de unión a hidroxiapatita (SDS-PAGE teñido con Coomassie) que muestra que la hemoglobina y la albúmina del fluido oral simulado están unidas por hidroxiapatita. Un procedimiento de lavado de tres pasos que comprende lavar secuencialmente en cada uno de $MgCl_2$ 5 mM, $MgCl_2$ 1 M, y NaH_2PO_4 0,4 M cada uno durante 5 min eliminó > 90 % de la proteína de la hidroxiapatita.

La Figura 6 proporciona una secuencia de aminoácidos para la albúmina sérica humana (SEQ ID NO: 1; registro en SwissProt P02768).

La figura 7 proporciona una secuencia de aminoácidos para C3 del complemento humano (SEQ ID NO: 2; registro en SwissProt P01024).

La Figura 8 proporciona una secuencia de aminoácidos para la alfa-1-antitripsina humana (SEQ ID NO: 3; registro en SwissProt P01009).

La Figura 9 proporciona una secuencia de aminoácidos para la proteína humana S100-A9 (SEQ ID NO: 4; registro en SwissProt P06702).

La Figura 10 proporciona una secuencia de aminoácidos para la lactotransferrina humana (SEQ ID NO: 5; registro en SwissProt P02788).

La Figura 11 proporciona una secuencia de aminoácidos para el inhibidor de elastasa de leucocitos humanos (SEQ ID NO: 6; registro en SwissProt P30740).

La Figura 12 proporciona una secuencia de aminoácidos para la antitrombina III humana (SEQ ID NO: 7; registro en SwissProt P01008).

La Figura 13 proporciona una secuencia de aminoácidos para la subunidad alfa de hemoglobina humana (SEQ ID NO: 8; registro en SwissProt P69905).

La Figura 14 proporciona una secuencia de aminoácidos para la subunidad beta de la hemoglobina humana (SEQ ID NO: 9; registro en SwissProt P68871).

La Figura 15 proporciona una secuencia de aminoácidos para la subunidad delta de hemoglobina humana (SEQ ID NO: 10; registro en SwissProt P02042).

La Figura 16 proporciona una secuencia de aminoácidos para la proteína inducible por prolactina humana (SEQ ID NO: 11; registro en SwissProt P12273).

La figura 17 proporciona una secuencia de aminoácidos para la alfa-amilasa 1 humana (SEQ ID NO: 12; registro en SwissProt P04745).

La Figura 18 proporciona una secuencia de aminoácidos para la SIE de región V-III de la cadena kappa de Ig humana (SEQ ID NO: 13; registro en SwissProt P01620).

La Figura 19 proporciona una secuencia de aminoácidos para la región C de la cadena alfa-2 de Ig humana (SEQ ID NO: 14; registro en SwissProt P01877).

La figura 20 proporciona una secuencia de aminoácidos para la proteína humana no caracterizada C6orf58 (SEQ ID NO: 15; registro en SwissProt Q6P5S2).

La Figura 21 proporciona una secuencia de aminoácidos para Serpina B3 humana (SEQ ID NO: 16; registro en SwissProt P29508).

La Figura 22 proporciona una secuencia de aminoácidos para la isoforma X de amelogenina humana (SEQ ID NO: 17; registro en SwissProt Q99217).

La Figura 23 proporciona una secuencia de aminoácidos para la isoforma Y de amelogenina humana (SEQ ID NO: 18; registro en SwissProt Q99218).

La Figura 24 proporciona una secuencia de aminoácidos para la amelogenina de ratón (SEQ ID NO: 19; registro en SwissProt P63277) que también corresponde a la Amelogenina de Ratón recombinante.

La Figura 25 proporciona una secuencia de aminoácidos para la subunidad alfa de hemoglobina bovina (SEQ ID NO: 20; registro en SwissProt P01966).

La Figura 26 proporciona una secuencia de aminoácidos para la subunidad beta de hemoglobina bovina (SEQ ID NO: 21; registro en SwissProt P02070).

La Figura 27 representa la reacción química para la producción de un indicador coloreado activado por maleimida a través de la reacción del éster de N-hidroxisuccinimida (SMCC) con negro amido (amina primaria). El indicador coloreado activado por maleimida es reactivo con sulfhidrilo, listo para la conjugación con grupos tioles de cisteína de las subunidades β de hemoglobina.

La Figura 28 representa la reacción química para la producción de una sonda, en este ejemplo una proteína conjugada con el indicador coloreado, a través de la reacción de un indicador coloreado activado por maleimida de acuerdo con la Figura 28 con grupos tiol de cisteína (SH) de subunidades β de hemoglobina. Cada tetrámero de hemoglobina se une a dos moléculas indicadoras coloreadas y deja dos subunidades sin modificar, lo que probablemente sea importante para preservar la función de unión a hidroxiapatita de la hemoglobina.

La Figura 29 representa la unión *in vitro* a hidroxiapatita de una sonda producida de acuerdo con las Figuras 27 y 28 y el Ejemplo 2. La sonda comprendía hemoglobina (Hb), un indicador coloreado negro azulado (negro amido) y un enlazador. En los 5 minutos posteriores a la aplicación de la sonda, la hidroxiapatita cambió a azul oscuro. La sonda soportó el lavado en agua, mientras que el indicador coloreado solamente (es decir, no vinculado a Hb) se eliminó mediante lavado en agua. La sonda se retiró de la hidroxiapatita por un procedimiento de lavado de tres pasos que comprende lavar secuencialmente en cada uno de MgCl_2 5 mM, MgCl_2 1 M, y NaH_2PO_4 0,4 M cada uno durante 5 min.

La Figura 30 representa los resultados del Ejemplo 3 que demuestran la unión específica de una sonda producida de acuerdo con el Ejemplo 2 al esmalte dental poroso.

La Figura 31 representa los resultados del Ejemplo 4 que demuestran que una sonda producida de acuerdo con el Ejemplo 2 puede detectar específicamente la desmineralización temprana del esmalte superficial (modelo de caries incipiente).

La Figura 32 representa los resultados del Ejemplo 5 que demuestran que el mecanismo de acción de una sonda producida de acuerdo con el Ejemplo 2 es la afinidad por hidroxiapatita.

La Figura 33 representa los resultados del Ejemplo 6 que demuestran que una sonda producida de acuerdo con el Ejemplo 2 marca específicamente el esmalte hipomineralizado y la dentina anormal. El esmalte y la dentina normales no se marcaron. El esmalte hipomineralizado se marcó específicamente y uniformemente como un color violeta intenso. La dentina anormal se marcó específicamente y uniformemente de un color verde intenso.

La Figura 34 representa los resultados del Ejemplo 7 que demuestran que una sonda producida de acuerdo con el Ejemplo 2 puede usarse para guiar la eliminación del esmalte hipomineralizado.

La Figura 35 representa los resultados del Ejemplo 8 que demuestran que una sonda producida de acuerdo con el Ejemplo 2 puede usarse para guiar la remoción de dentina anormal.

La Figura 36 representa los resultados del Ejemplo 9 que demuestran que la detección de dentina anormal de acuerdo con el Ejemplo 8 puede mejorarse mediante el uso de un lavado con blanqueador.

La Figura 37 representa los resultados del Ejemplo 10 que demuestran que la sonda puede ser radiopaca, lo que se puede lograr al sustituir el cromóforo azul (negro amido) del Ejemplo 2 por ácido amino-2,4,6-triyodoisoftálico⁽³¹⁾.

La Figura 38 representa los resultados del Ejemplo 11 que demuestran la efectividad relativa de las soluciones de lavado que comprenden Mg^{2+} o PO_4 en la eliminación de proteínas unidas a hidroxiapatita pura.

La Figura 39 representa los resultados del Ejemplo 12 que demuestran la efectividad relativa de la aplicación separada o secuencial de soluciones de lavado que comprenden Mg^{2+} o PO_4 en la eliminación de proteínas unidas a hidroxiapatita pura.

La Figura 40 representa los resultados del Ejemplo 13 que demuestran la efectividad relativa de la aplicación combinada de una solución de lavado que comprende Mg^{2+} y PO_4 en la eliminación de proteínas unidas a hidroxiapatita pura.

La Figura 41 representa los resultados del Ejemplo 14 que demuestran que la aplicación de soluciones de lavado que comprenden Mg^{2+} o PO_4 elimina proteínas del esmalte hipomineralizado, aunque con una eficacia reducida en comparación con el modelo de hidroxiapatita de los Ejemplos 11 a 13.

La Figura 42 representa los resultados del Ejemplo 15 que demuestran que la eficacia de las soluciones de lavado que comprenden Mg^{2+} o PO_4 en la eliminación de proteínas del esmalte hipomineralizado puede mejorarse en comparación con el Ejemplo 14 al extender el período de aplicación de modo que las proteínas puedan eliminarse cuantitativamente.

Descripción detallada

En el presente documento se describen kits, sondas y métodos para detectar una proteína capaz de unirse a hidroxiapatita porosa. La hidroxiapatita puede estar comprendida en esmalte o dentina. Además, mientras que los productos existentes tiñen la dentina (pero no detectan hidroxiapatita dental porosa), en este documento se describe por primera vez un producto que detecta defectos en el esmalte, específicamente mediante la detección de hidroxiapatita dental porosa.

La proteína capaz de unirse a la hidroxiapatita porosa se selecciona del grupo: albúmina sérica (P02768); cadena beta de C3 del complemento (P01024); alfa-1-antitripsina (P01009); proteína S100-A9 (P06702); lactotransferrina (P02788); inhibidor de elastasa de leucocitos (P30740); antitrombina-III (P01008); subunidad alfa de hemoglobina (P69905); subunidad beta de hemoglobina (P68871); subunidad delta de hemoglobina (P02042); proteína inducible por prolactina (P12273); alfa amilasa 1 (P04745); SIE de región V-III de cadena kappa de Ig (P01620); región C de cadena alfa 2 de Ig (P01877); proteína no caracterizada c6orf58 (Q6P5S2); Serpina B3 (P29508), donde el término entre paréntesis indica el identificador único de registro en SwissProt (como se enumera en la Tabla 1, SEQ ID NOs: 1 a 16 y Figuras 6 a 21, respectivamente). En algunas modalidades, la proteína puede ser una amelogenina. La amelogenina puede ser humana. Por ejemplo, la amelogenina puede ser la isoforma X de la amelogenina humana (SEQ ID NO: 17, Figura 22; registro en SwissProt Q99217) o la amelogenina puede ser la isoforma Y de la amelogenina humana (SEQ ID NO: 18, Figura 23; registro en SwissProt Q99218). Alternativamente, la proteína puede provenir de un sujeto diferente de un ser humano, por ejemplo, un animal como un primate, un caballo, una vaca, una oveja, una cabra, un perro o un gato.

En algunas modalidades del primer al segundo aspecto, el primer, segundo o quinto método como se describe en el presente documento o el segundo o tercer kit como se describe en el presente documento, la proteína puede ser albúmina, hemoglobina o una subunidad de esta, o amelogenina.

En una modalidad del segundo método como se describe en el presente documento, el método comprende detectar la proteína que es distinta de amelogenina y detectar amelogenina, en donde la presencia de la proteína y la ausencia de amelogenina es indicativa de MIH, y la presencia de amelogenina es indicativa de defectos de hipomaduración que incluyen tipos de ** amelogénesis imperfecta o fluorosis dental. La proteína que es "distinta de amelogenina" es cualquiera seleccionada de: albúmina sérica; cadena beta de C3 del complemento; alfa-1-antitripsina; proteína S100-A9; lactotransferrina; inhibidor de elastasa de leucocitos; anti-trombina-III; subunidad alfa de hemoglobina; subunidad beta de hemoglobina; subunidad delta de hemoglobina; proteína inducible por prolactina; alfa amilasa 1; SIE de región V-III de cadena kappa de Ig; región C de cadena alfa 2 de Ig; proteína no caracterizada c6orf58; y Serpina B3.

Como se usa en este documento, "poroso" o "porosidad" se refiere a la hidroxiapatita dental que está hipomineralizada o desmineralizada. El aumento de la "porosidad" se debe a la reducción en el grado de densidad mineral, lo que conduce a un mayor espacio entre los cristales minerales.

La "hipomineralización", como se usa en este documento, se refiere al desarrollo incompleto del esmalte dental, lo que resulta en una disminución de la densidad mineral (aumento de la porosidad del esmalte) y la resistencia mecánica. La "hipomineralización" es causada por una alteración genética (por ejemplo, amelogénesis imperfecta) o adquirida (por ejemplo, MIH, fluorosis) del desarrollo dental. La "hipomineralización" es distinta de la "desmineralización", que ocurre en las caries, por ejemplo. En las caries, el esmalte con desarrollo normal (o anormal) se desmineraliza posteriormente. La "desmineralización" es distinta de la "hipomineralización", que se refiere al esmalte que nunca alcanzó un contenido mineral normal debido a una alteración del desarrollo.

Como se usa en el presente documento, "remineralización" se refiere al retorno de minerales a la estructura molecular del diente. El mineral predominante de los dientes es la hidroxiapatita. En algunos procesos de remineralización, el grupo hidroxilo se sustituye por un grupo flúor para producir fluoroapatita, que es más resistente a los ácidos que la hidroxiapatita.

Como se usa en el presente documento, "mineralización correctiva" se refiere al uso de terapias de remineralización en DDD (es decir, hidroxiapatita porosa causada por mineralización incompleta). El uso del término "remineralización" es inapropiado en el contexto de DDD porque la hidroxiapatita porosa no fue causada por una desmineralización.

Como se usa en este documento, "caries" o "caries dental" se refiere a la reducción o pérdida del esmalte dental y la dentina debido al ácido, particularmente al ácido producido por la infección de bacterias. La "caries" se define por el proceso de desmineralización, y puede corregirse utilizando métodos de desmineralización si se detecta a tiempo.

Como se usa en este documento, una "afección que implica hidroxiapatita dental porosa" incluye caries dental, hipomineralización molar/incisiva (MIH), amelogénesis imperfecta, fluorosis dental y otros DDD que se manifiestan como esmalte hipomineralizado (es decir, opacidades difusas o demarcadas).

Como se usa en el presente documento, "hipomineralización molar/incisiva" o "MIH" se refiere a un DDD que da como resultado un esmalte endurecido de manera incompleta (hipomineralizado), generalmente en el tercio oclusal o incisal de los primeros molares e incisivos permanentes, respectivamente.

La MIH y la fluorosis se caracterizan por una porosidad subsuperficial, mientras que la caries activa puede tener una superficie porosa (la caries inactiva puede formar una superficie sellada debido a la remineralización).

Como se usa en este documento, el esmalte "expuesto" se refiere al tejido debajo de la superficie que se ha puesto al descubierto debido a la pérdida de su capa superficial protectora. El esmalte "expuesto" puede ser normal o poroso; hay muchos casos de ruptura de la superficie de los dientes que no están afectados por MIH, o ninguna otra afección (por ejemplo, los dientes normales pueden fracturarse al morder un objeto duro).

5 Como se usa en el presente documento, "se une", "que se une" o "unido" se refiere a una interacción química entre una proteína y una hidroxiapatita que detiene la proteína en relación con la hidroxiapatita. La interacción puede ser iónica, covalente, no covalente, polar o no polar.

10 Como se usa en el presente documento, el término "detector" se refiere a cualquier sustancia química, bioquímica o biológica que interactúa específicamente con una proteína descrita en el presente documento y genera un efecto en respuesta a la interacción. Por ejemplo, la respuesta puede ser la visualización de un indicador coloreado y, por lo tanto, la visualización de la proteína. Un "detector" puede comprender un "indicador" o un anticuerpo.

15 El término "detectar" o "que detecta" se refiere a identificar la respuesta del detector.

En una modalidad del kit del primer aspecto, el detector comprende un indicador coloreado. En la sonda del segundo aspecto, el detector es un indicador. En una modalidad de la sonda, el indicador comprende un indicador coloreado. Cuando el detector comprende un indicador coloreado, detectar el indicador coloreado implicaría visualizar el indicador coloreado y, por lo tanto, la proteína de interés. Alternativamente, un indicador puede ser radiopaco.

20 Como se usa en el presente documento, el término "sonda" se refiere a un agente tal como una proteína descrita en el presente documento que puede infiltrarse en el esmalte poroso y que puede unirse específica y firmemente a hidroxiapatita y al unirse permite detectar dicha unión. En otras palabras, la sonda comprende una molécula específica "dirigida a hidroxiapatita". Una "sonda" comprende una proteína como se describe en este documento y un indicador. De acuerdo con esta descripción, una "sonda" puede no ser un anticuerpo.

25 De manera similar, el término "específico" o "específicamente" se refiere a la unión donde una sustancia se une a una segunda sustancia particular sin unirse sustancialmente a ninguna otra sustancia. Tal unión es diferente cuantitativamente con respecto a una interacción no específica. La unión específica se puede medir, por ejemplo, mediante la determinación de la unión de una molécula en comparación con la unión de una molécula de control, que generalmente es una molécula de estructura similar que no tiene actividad de unión. Por ejemplo, la unión específica se puede determinar mediante la competencia con una molécula de control que es similar al objetivo, por ejemplo, un exceso de objetivo no marcado. En este caso, se indica unión específica si la unión del objetivo marcado a una sonda se inhibe de forma competitiva por el exceso de objetivo no marcado. Como se usa en el presente documento, la unión "específica" o "específicamente" puede referirse a (i) la proteína que se une específicamente a la hidroxiapatita, (ii) el detector que se une específicamente a la proteína, o (iii) el indicador que se une específicamente al detector o la proteína.

30 En particular, la unión específica se refiere a una sustancia que tiene una K_d al menos 2 veces menor que la de un objetivo no específico, por ejemplo, una sustancia que tiene una K_d al menos 4 veces, 6 veces, 8 veces, 10 veces o más de 10 veces menor que la de un objetivo no específico. Alternativamente, la unión específica se puede expresar como una molécula que tiene una K_d para el objetivo como máximo de aproximadamente 10^{-4} M, por ejemplo, aproximadamente 10^{-5} M, aproximadamente 10^{-6} M, aproximadamente 10^{-7} M, aproximadamente 10^{-8} M, aproximadamente 10^{-9} M, aproximadamente 10^{-10} M, aproximadamente 10^{-11} M, aproximadamente 10^{-12} M, o menos.

En una modalidad del kit del primer aspecto, el detector comprende un indicador.

35 Cuando se usa *in situ*, el detector o la sonda no son tóxicos para el sujeto.

40 Como se usa en este documento, un "indicador" se refiere a cualquier sustancia química, bioquímica o biológica que genera un efecto detectable. El "indicador" puede unirse específicamente o enlazarse al detector o la proteína. El indicador puede comprender biotina o estreptavidina para usar en un enlace biotina-estreptavidina no covalente de alta afinidad. El indicador puede enlazar otro enlace no covalente, de alta afinidad.

45 En el kit del primer aspecto o la sonda del segundo aspecto, el indicador es un indicador coloreado. Además, en el presente documento se describe el kit del primer aspecto o la sonda del segundo aspecto en donde el indicador puede ser un pigmento, o una sustancia luminiscente (que incluye fluorescente o fosforescente), radiactiva, quimioluminiscente, enzima o una molécula de contraste para rayos X. Un indicador que comprende una molécula de contraste de rayos X (por ejemplo, ácido 5-amino-2,4,6-triyodoisofáltico; ³¹I) puede ser útil para detectar de manera sensible una caries interproximal en etapa temprana (un desafío importante para los métodos actuales) mediante el uso del equipamiento radiográfico clínico existente.

50 Como se usa en el presente documento, el término "indicador coloreado" se refiere a cualquier sustancia coloreada que absorbe preferentemente algunas longitudes de onda de luz visible.

Por lo tanto, cuando el indicador es un indicador coloreado, el efecto detectable es la visualización de un color.

El indicador coloreado puede ser cualquier sustancia coloreada que se pueda unir, acoplar o conjugar con la proteína, a la vez que mantiene su característica como indicador coloreado. En una modalidad del kit del primer aspecto o la sonda del segundo aspecto, el indicador coloreado es negro amido. En la presente invención, la sonda comprende la proteína (es decir, una proteína de unión a hidroxapatita) unida o acoplada a un indicador coloreado, en donde se une específicamente a la hidroxapatita dental porosa. Cualquier proteína de la Tabla 1 puede unirse o acoplarse a un indicador coloreado y funcionar para dirigir el indicador coloreado a la hidroxapatita porosa. En un ejemplo, la proteína es la hemoglobina. Así, en un ejemplo, la sonda comprende hemoglobina unida a negro amido.

Una sonda que comprende una proteína como se describe en el presente documento, por ejemplo, hemoglobina, se adsorbe acumulativamente a la hidroxapatita dental porosa. La sonda se unirá de forma competitiva a la hidroxapatita en presencia de otras proteínas porque puede desplazar a cualquier especie que posea una afinidad más baja por la hidroxapatita. Una sonda de este tipo puede comprender amido negro o ³l.

El indicador coloreado puede seleccionarse, sobre la base de las características deseadas que debe conocer una persona experta en la técnica, del grupo: acetil amarillo (Fast yellow); Negro ácido 1 (Amido black 10B); Azul ácido 22 (Water blue I); Azul ácido 93 (Methyl blue); Fucsina ácida (Acid fuchsin); Verde ácido (Light green SF yellowish); Verde ácido 1 (Naftol green B); Verde ácido 5 (Light green SF yellowish); Magenta ácido (Acid fuchsin); Naranja ácido 10 (Orange G); Rojo ácido 4 (Azoeosin); Rojo ácido 26 (Xylidine ponceau); Rojo ácido 29 (Chromotrope 2R); Rojo ácido 44 (Ponceau 6R); Rojo ácido 51 (Erythrosin B); Rojo ácido 52 (Lissamine rhodamine B); Rojo ácido 66 (Biebrich scarlet); Rojo ácido 73 (Woodstain scarlet); Rojo ácido 87 (Eosin Y ws); Rojo ácido 91 (Eosin B); Rojo ácido 92 (Phloxine B); Rojo ácido 94 (Rose bengal); Rojo ácido 101 (Azocarmine G); Rojo ácido 103 (Azocarmine B); Roseina ácida (Acid fuchsin); Rubina ácida (Acid fuchsin); Violeta ácido 19 (Acid fuchsin); Amarillo ácido 1 (Naphthol yellow S); Amarillo ácido 7 (Lissamine flavine FF); Amarillo ácido 9 (Fast yellow); Amarillo ácido 23 (Tartrazine); Amarillo ácido 24 (Martius yellow); Amarillo ácido 36 (Metanil yellow); Amarillo ácido 73 (Fluorescein); Amarillo ácido 85 (Coomassie fast yellow G); Amarillo ácido S (Naphthol yellow S); Amarillo ácido T (Tartrazine); Naranja de acridina (Acridine orange); Rojo de acridina (Acridine red); Acriflavina (Acriflavine); Azul alcian (Alcian blue 8GX); Amarillo alcian (Alcian yellow); Eosina soluble en alcohol (Ethyl eosin); Alizarina (Alizarin); Azul de alizarina (Alizarin blue); Azul de alizarina 2RC (Anthracene blue SWR); Carmín de alizarina (Alizarin red S); Cianina de alizarina BBS (Alizarin cyanin BBS); Cianina alizarol R (Chromoxane cyanin R); Rojo de alizarina S (Alizarin red S); Purpurina alizarina (Purpurin); Azul alcalino 4B, 5B (Alkali blue 5B); Aluminón (Chrome violet CG); Negro amido 10B (Amido black 10B); Rojo de amidonaftol (Azophloxine); Amidoschwarz (Amido black 10B); Azul de anilina WS (Aniline blue WS); Púrpura de anilina (Mauveína); Azul antraceno SWR (Anthracene blue SWR); Azul antraceno SWX (Alizarin cyanin BBS); Auramina O (Auramine O); Azo-eosina (Azo-eosin); Azocarmina B (Azocarmine B); Azocarmina G (Azocarmine G); Azo-eosina G (Azo-eosin); Diazo azoico 5 (Fast red B); Diazo azoico 48 (Fast blue B); Azofloxina (Azophloxine); Azul Azovan (Evans blue); Azure A (Azure A); Azure B (Azure B); Azure C (Azure C); Azul básico 8 (Victoria blue 4R); Azul básico 9 (Methylene blue); Azul básico 12 (azul del Nilo A); Azul básico 15 (Night blue); Azul básico 17 (Toluidine blue O); Azul básico 20 (Methyl green); Azul básico 26 (Victoria blue B); Marrón básico 1 (Bismarck brown Y); Fucsina básica (Basic fuchsin); Verde básico 4 (Malachite green); Verde básico 5 (Methylene green); Naranja básico 14 (Acridine orange); Rojo básico 2 (Safranin O); Rojo básico 5 (Neutral red); Rojo básico 9 (Pararosnilin); Violeta básico 2 (New fuchsin); Violeta básico 3 (Crystal violet); Violeta básico 4 (Ethyl violet); Violeta básico 10 (Rhodamine B); Violeta básico 14 (Rosanilin); Amarillo básico 1 (Thioflavine T); Amarillo básico 2 (Auramine O); Biebrich escarlata (Biebrich scarlet); Biebrich escarlata R (Sudán IV); Marrón Bismarck Y (Bismarck brown Y); Blauschwarz (Naphalene blue black CS); Brasileína (Brazilein); Brazilina (Brazilin); Croceína brillante (Woodstain scarlet); Escarlata cristal brillante 6R (Ponceau 6R); Verde brillante (Brilliant green); Rojo de calcio (Nuclear fast red); Carmín (Carmine); Ácido carmínico (Carmine); Carmoisina 6R (cromotropo 2R); Azul celestina B (Celestine blue B); Azul de China (Aniline blue); Rojo rápido de clorantina 5B (Sirius red 4B); Azul Chicago 4B (Pontamine Sky Blue 5B); Amarillo rápido de cromo 8GL (Chrome fast yellow 8GL); Amarillo de cromo luxine 8G (Chrome fast yellow 8GL); Violeta de cromo CG (Chrome violet CG); Cromotropo 2R (Chromotrope 2R); Cianina de cromoxano R (Chromoxane cyanin R); cochinilla (Carmine); Azul de celestina (Celestine blue B); Congo Corinto (Congo corinth); Rojo Congo (Congo red); Amarillo rápido de Coomassie G (Coomassie fast yellow G); Azul algodón (Methyl blue); Rojo algodón (Congo red); Escarlata de croceína (Biebrich scarlet); Escarlata de croceína 3B (Woodstain scarlet); Escarlata de croceína MOO (Woodstain scarlet); Crocina (azafrán); Cristal Ponceau 6R (Ponceau 6R); Escarlata cristal (Ponceau 6R); Violeta cristal (Crystal violet); Dahlia (violeta de Hoffman); Verde diamante B (Malachite green); Azul directo 14 (Trypan blue); Azul directo 58 (Evans blue); Rojo directo (Congo red); Rojo directo 10 (Congo corinth); Rojo directo 28 (Congo red); Rojo directo 80 (Sirius red F3B); Rojo directo 81 (Sirius red 4B); Amarillo directo 7 (Thioflavine S); Amarillo directo 11 (Sun yellow); Azul Durazol 4R (Durazol blue 4R); Azul Durazol 8G (Durazol blue 8G); Eosina B (Eosin B); Eosina azulada (Eosin B); Eosina (Eosin Y ws); Eosina Y (Eosin Y ws); Eosina amarillenta (Eosin Y ws); Eosinol (Eosinol); Erie garnet B (Congo corinth); Eriocromo cianina R (Chromoxane cyanin R); Eritrosina B (Erythrosin B); Etil eosina (Ethyl eosin); Verde de etilo (Ethyl green); Violeta de etilo (Ethyl violet); Azul de Evans (Evans blue); Azul rápido B (Fast blue B); Verde rápido FCF (Fast green FCF); Rojo rápido B (Fast red B); Amarillo rápido (Fast yellow); Amarillo rápido extra (Fast yellow); Amarillo rápido G (Fast yellow); Negro para grasas HB (Sudan black B); Fluoresceína (Fluorescein); Verde de alimentos 3 (Fast green FCF); Galleína (Gallein); Azul de gallamina (Gallamine blue); Galocianina (Gallocyanin); Violeta genciana (Methyl violet 2B); verde Guinea (Guinee green B); Hemateína (Hematein); Hematina (Hematein); Hematoxilina (Hematoxylin);

rubina rápida de helio BBL (Nuclear fast red); Azul de Helvetia (Methyl blue); Hemateína (Hematein); Hematina (Hematein); Hematoxilina (Hematoxylin); Violeta de Hoffman (Hoffman's violet); Amarillo de hidrazina (Tartrazine); Carmín índigo (Indigo carmine); Rojo imperial (eosin B); Azul Ingrain 1 (Alcian blue 8GX); Amarillo Ingrain 1 (Alcian yellow); INT (yodonitrotetrazolio); Verde yodo (Iodine green); Kermes (Kermes); Ácido kermésico (Kermes); Kernechtrot (Nuclear fast red); Kiton rodamina B (Lissamine rhodamine B); Lac (Laccaic acid); Ácido lacáico (Laccaic acid); violeta de Lauth (Thionin); Verde claro (Light green SF yellowish); Amarillo rápido de Lisamina (Lissamine fast yellow); Lisamina flavina FF (Lissamine flavine FF); Verde lisamina SF (Light green SF yellowish); Lisamina rodamina B (Lissamine rhodamine B); Amarillo puro Luxine 6G (Chrome fast yellow 8GL); Azul rápido Luxol (Luxol fast blue MBS); Magenta 0 (Pararosanilin); Magenta I (Rosanilin); Magenta II (magenta II); Magenta III (New fuchsin); Verde de malaquita (Malachite green); Marrón Manchester (Bismarck brown Y); Amarillo Martius (Martius yellow); Malva (Mauveína); Mauveína (Mauveína); Merbromina (Mercurochrome 220); Mercurocromo (Mercurochrome 220); Amarillo de metanilo (Metanil yellow); Azul de metilo (Methyl blue); Verde de metilo (Methyl green); Violeta de metilo (Methyl violet 2B); Violeta de metilo 2B (Methyl violet 2B); Violeta de metilo 10B (Crystal violet); Azul de metileno A (Azure A); Azul de metileno B (Azure B); Azul de metileno C (Azure C); Azul de metileno (Methylene blue); Verde de metileno (Methylene green); Amarillo molido 3G (Milling yellow 3G); Azul mordiente 3 (Chromoxane cyanin R); Azul mordiente 10 (Gallocyanin); Azul mordiente 14 (Celestine blue B); Azul mordiente 23 (Alizarin cyanin BBS); Azul mordiente 32 (Anthracene blue SWR); Azul mordiente 45 (Gallamine blue); Rojo mordiente 3 (Alizarin red S); Rojo mordiente 11 (Alizarin); Violeta mordiente 25 (Gallein); Violeta mordiente 39 (Chrome violet CG); Amarillo mordiente 33 (Chrome fast yellow 8GL); Negro azul de naftaleno (Naphthalene blue black CS); Negro azul de naftol (Amido black 10B); Verde naftol B (Naphthol green B); Amarillo naftol S (Naphthol yellow S); Negro natural 1 (Hematein); Rojo natural (Purpurin); Rojo natural 3 (Kermes); Rojo natural 4 (Carmine); Rojo natural 8 (Purpurin); Rojo natural 16 (Purpurin); Rojo natural 24 (Brazilin); Rojo natural 25 (Laccaic acid); Rojo natural 28 (Orcein); Amarillo natural 6 (Saffron); NBT (Nitro blue tetrazolium); Rojo neutro (Neutral red); Nueva fucsina (New fuchsin); Azul Niágara 3B (Trypan blue); Azul noche (Night blue); Azul del Nilo (Nile blue A); Azul del Nilo A (Nile blue A); sulfato de azul de Nilo (Nile blue A); Rojo Nilo (Nile red); Nitro BT (Nitro blue tetrazolium); Nitroazul tetrazolio (Nitro blue tetrazolium); rojo rápido nuclear (Nuclear fast red); Aceite rojo O (Oil red O); Naranja G (Orange G); Orceína (Orcein); Pararosanilina (Pararosanilin); Violeta de Perkin (Mauveína); Floxina B (Phloxine B); Ácido pícrico (Picric acid); Ponceau 2R (Xylidine ponceau); Ponceau 6R (Ponceau 6R); Ponceau B (Biebrich scarlet); Ponceau de Xilidina (Xylidine ponceau); Ponceau S (Ponceau S); Pontamina azul cielo 5B (Pontamine sky blue 5B); Primula (violeta de Hoffman); Primulina (Primuline); Purpurina (Purpurin); Pironina B (Pyronin B); Pironina G (Pyronin Y); Pironina Y (Pyronin Y); Rodamina B (Rhodamine B); Rosanilina (Rosanilin); Rosa de bengala (Rose bengal); Azafrán (Saffron); Safranina O (Safranin O); Escarlata R (Sudán IV); Rojo escarlata (Sudán IV); Scharlach R (Sudán IV); Goma laca (Laccaic acid); Rojo Sirio F3B (Sirius red F3B); Rojo Sirio 4B (Sirius red 4B); Azul Sirio supra F3R (Durazol blue 4R); Cianina Solocromo R (Chromoxane cyanin R); Azul soluble (Aniline blue); Negro disolvente 3 (Sudan black B); Azul disolvente 38 (Luxol fast blue MBS); Rojo disolvente 23 (Sudan III); Rojo disolvente 24 (Sudán IV); Rojo disolvente 27 (Oil red O); Rojo disolvente 45 (Ethyl eosin); Amarillo disolvente 94 (Fluorescein); Eosina soluble en alcohol (Ethyl eosin); Sudán III (Sudan III); Sudán IV (Sudan IV); negro Sudán B (Sudan black B); rojo Sudán BK (Sudán III); Amarillo azufre S (Naphthol yellow S); Sulfo rodamina B (Lissamine rhodamine B); Amarillo sol (Sun yellow); Azul suizo (Methylene blue); Tartrazina (Tartrazine); Tioflavina S (Thioflavine S); Tioflavina T (Thioflavine T); Tionina (Thionin); Azul de toluidina (Toluidine blue O); Rojo de toluidina (Neutral red); Tropaeolin G (Metanil yellow); Tripaflavina (Acriflavine); Azul tripán (Trypan blue); uranina (Fluorescein); Azul Victoria 4R (Victoria blue 4R); Azul Victoria B (Victoria blue B); Azul Victoria R (Victoria blue R); Verde Victoria B (Malachite green); Azul agua I (Water blue I); eosina soluble en agua (Eosin Y ws); escarlata Woodstain (Woodstain scarlet); Rojo de xileno B (Lissamine rhodamine B); ponceau de xilidina (Xylidine ponceau); y eosina amarillenta (Eosina Y ws). Las características deseadas que debe considerar el destinatario experto incluyen la compatibilidad con una proteína y/o un enlazador que se utilizará de acuerdo con esta descripción, la no toxicidad y el mantenimiento de la unión de las proteínas a la hidroxiapatita dental porosa, por ejemplo.

En modalidades alternativas del primer al segundo aspecto, del primer al tercer o quinto método como se describe en el presente documento o el segundo o tercer kit como se describe en el presente documento, la proteína no se enumera en los ejemplos de la Tabla 1, pero el destinatario experto conoce que se une a hidroxiapatita, por ejemplo, osteocalcina o decorina. El uso de los dominios de repetición ricos en leucina 4-5 de decorina puede proporcionar un mecanismo de direccionamiento específico para la hidroxiapatita porosa en la dentina.

Alternativamente, en modalidades del primer al segundo aspecto, del primer al tercer o quinto método como se describe en este documento o el segundo o tercer kit como se describe en el presente documento, la proteína puede ser un péptido o fragmento de proteína, siempre que el péptido o fragmento de proteína conserve su capacidad de unirse a la hidroxiapatita dental porosa.

Alternativamente, el destinatario experto estará informado de moléculas pequeñas (o polímeros de estas), por ejemplo, tetraciclina o amino bisfosfonato, que pueden unirse a hidroxiapatita, que pueden ser de mayor utilidad en términos de capacidad para penetrar regiones microporosas, y en términos de estabilidad (por ejemplo, vida útil del producto). El amino-bisfosfonato puede producir un compuesto con cualidades adecuadas para detectar y delinear caries (sonda pequeña de alta afinidad para penetrar en la superficie porosa del esmalte y unirse fuertemente al esmalte desmineralizado).

En algunas modalidades del kit del primer aspecto o la sonda del segundo aspecto, el detector o la sonda comprende, además, un enlazador que une el indicador y el detector o proteína. El enlazador puede ser un reticulador heterobifuncional. Por ejemplo, el enlazador heterobifuncional puede ser N-hidroxisuccinimida éster del ácido succinimidil 4-[N-maleimidometil]ciclohexanocarboxílico (SMCC). Otros ejemplos de agentes de enlace que pueden usarse de acuerdo con esta descripción incluyen succinimidil-6-[β-maleimidopropionamido] hexanoato (SMPH), ácido N-hidroxisuccinimidil-4-azidosalicílico (NHS-ASA) y N,N-diciclohexilcarbodiimida (DCC).

Se pueden usar otros tipos de moléculas como enlazador. Por ejemplo, en este documento también se contemplan enlaces no covalentes de alta afinidad tales como biotina-estreptavidina.

El destinatario experto conocerá muchos agentes de reticulación que están disponibles con diversas químicas reactivas y longitudes del brazo espaciador, lo que aumenta aún más la flexibilidad de este enfoque.

En una modalidad del kit del primer aspecto o la sonda del segundo aspecto, el indicador y la proteína pueden proporcionarse ya unidos. Alternativamente, el indicador y la proteína pueden proporcionarse por separado para la unión posterior. El kit o la sonda pueden comprender un enlazador. La proteína, el indicador y el enlazador del kit o la sonda se pueden presentar en cualquier combinación posible. Por ejemplo, cuando el indicador y la proteína están unidos a través de un enlazador, la sonda puede estar "lista para usar", es decir, los tres componentes pueden estar unidos. Alternativamente, la proteína y el enlazador pueden unirse y proporcionarse por separado del indicador. Alternativamente, el enlazador y el indicador pueden estar unidos y proporcionarse por separado de la proteína. Alternativamente, la proteína, el indicador y el enlazador pueden proporcionarse como componentes separados. En una modalidad del primer aspecto, el kit comprenderá el indicador y el enlazador, pero no la proteína.

En algunas modalidades del kit del primer aspecto, el detector comprende un anticuerpo que se une específicamente a la proteína. En otra modalidad, el detector puede comprender biotina o estreptavidina para usar en un enlace biotina-estreptavidina no covalente de alta afinidad. El detector puede explotar otro enlace no covalente de alta afinidad. Por ejemplo, el detector puede comprender una alternativa de anticuerpo, tal como un ligando proteico basado en péptido. Un ligando proteico basado en péptidos conocido en la técnica es un sincuerpo.

El término "anticuerpo" se usa en el sentido más amplio y cubre específicamente, por ejemplo, anticuerpos policlonales, anticuerpos monoclonales (incluidos anticuerpos antagonistas y neutralizantes), composiciones de anticuerpos con especificidad poliepitópica, anticuerpos de cadena única y fragmentos de anticuerpos, siempre que exhiban la actividad biológica o inmunológica deseada. El anticuerpo puede ser un anticuerpo conjugado o cualquier otro tipo de anticuerpo conocido por el experto en la técnica.

El anticuerpo puede detectarse por cualquier método conocido por el experto en la técnica. El anticuerpo primario puede comprender un indicador. Alternativamente, un anticuerpo secundario dirigido al anticuerpo primario puede comprender un indicador.

El anticuerpo puede ser cualquier anticuerpo conocido por el destinatario experto para unirse específicamente a una proteína seleccionada del grupo: albúmina sérica; cadena beta de C3 del complemento; alfa-1-antitripsina; proteína S100-A9; lactotransferrina; inhibidor de elastasa de leucocitos; antitrombina-III; subunidad alfa de hemoglobina; subunidad beta de hemoglobina; subunidad delta de hemoglobina; proteína inducible por prolactina; alfa amilasa 1; SIE de región V-III de cadena kappa de Ig; región C de cadena alfa 2 de Ig; proteína no caracterizada c6orf58; y Serpina B3. En una modalidad, el anticuerpo puede unirse específicamente a una amelogenina.

En una modalidad del kit del primer aspecto, se puede seleccionar un anticuerpo monoclonal anti-albúmina sérica del grupo: AL-01; 1.B.731; 1A9; 6B11; OCH1E5; 1C8; 1G2; 2B2; 2B3; 2B6; 14E7; 15C7; Alb1; y un anticuerpo monoclonal IgG1 de ratón con código de producto sc-70340 (Santa Cruz Biotechnology Inc). En una modalidad, un anticuerpo monoclonal anti-cadena beta de C3 del complemento puede ser el clon 755. En otra modalidad, puede usarse un anticuerpo monoclonal anti-C3 humano que reacciona de forma cruzada con la cadena beta del C3 del complemento y puede ser el clon 11H9. En una modalidad, un anticuerpo monoclonal anti-alfa-1-antitripsina puede seleccionarse del grupo: 5B12; 703; 704; 8A0; B9; y G11. En una modalidad, un anticuerpo monoclonal anti-proteína S100-A9 se puede seleccionar del grupo: 0.N.390A; 47-8D3; NO.134; NO.19; y S32.2. En una modalidad, un anticuerpo monoclonal anti-lactotransferrina puede seleccionarse del grupo: 1C6; 2B8; B97; CLB-13.17; y 1A1. En una modalidad, un anticuerpo monoclonal anti-Antitrombina-III puede ser 4B3 o BD1205. En una modalidad, un anticuerpo anti-subunidad alfa de hemoglobina puede ser un anticuerpo IgG policlonal de cabra con código de producto sc-70340 (Santa Cruz Biotechnology Inc). En una modalidad, un anticuerpo anti-subunidad beta de hemoglobina puede ser un anticuerpo monoclonal IgG1 de ratón con el código de producto sc-21757 (Santa Cruz Biotechnology Inc). En una modalidad, un anticuerpo monoclonal anti-región C de la cadena alfa-2 de Ig puede ser el clon 14AS (también denominado anti-IgA2 humano). En una modalidad, un anticuerpo anti-Amelogenina X puede ser un anticuerpo IgG policlonal de conejo con código de producto sc-32892 (Santa Cruz Biotechnology Inc). El destinatario experto apreciará que están disponibles otros anticuerpos adecuados.

En una modalidad del kit del primer aspecto, la sonda del segundo aspecto o el segundo método como se describe en el presente documento, una primera proteína se selecciona del grupo: albúmina sérica; cadena beta de C3 del

complemento; alfa-1-antitripsina; proteína S100-A9; lactotransferrina; inhibidor de elastasa de leucocitos; antitrombina-III; subunidad alfa de hemoglobina; subunidad beta de hemoglobina; subunidad delta de hemoglobina; proteína inducible por prolactina; alfa amilasa 1; SIE de región V-III de cadena kappa de Ig; región C de cadena alfa 2 de Ig; proteína no caracterizada c6orf58; y Serpina B3 se puede detectar y una segunda proteína se puede detectar, en donde la segunda proteína es amelogenina. Se deduce que un kit del primer aspecto puede comprender, además, un segundo detector que detecta amelogenina. El segundo detector puede ser un anticuerpo anti-amelogenina.

Alternativamente, la detección puede comprender inmunodetección, cromatografía, electroforesis, espectrometría de masas, o microscopía. La inmunodetección puede comprender un ensayo inmunoabsorbente ligado a enzimas (ELISA), transferencia Western, membrana de transferencia puntual, transferencia por ranuras o citometría de flujo, por ejemplo. La microscopía puede comprender láser confocal, fluorescencia o microscopía electrónica, por ejemplo.

El detector o la sonda pueden aplicarse de diferentes maneras, por ejemplo, en un líquido, gel, cápsula, tableta, solución acuosa, suspensión acuosa u oleosa, pastilla, trocisco, polvo, gránulo, emulsión, jarabe o elixir.

En una modalidad del kit del primer aspecto o la sonda del segundo aspecto, el detector o la sonda comprende un disolvente en el que el detector o la sonda se disuelve, suspende o emulsiona. El disolvente puede ser uno que se usa generalmente en medicina o industria o similar. Los ejemplos incluyen agua, etanol, n-propanol, alcohol 2-butílico, alcohol isobutílico, alcohol n-amílico, alcohol isoamílico, etilenglicol, 2-metoxietanol, dietilenglicol, trietilenglicol, tetraetilenglicol, polietilenglicol, propilenglicol, dipropilenglicol, polipropilenglicol, trimetilenglicol, 1,2-butanodiol, 1,3-butanodiol, 2,3-butanodiol, 1,4-butanodiol, 1,5-pentanodiol, etilenglicol monometil éter, acetato de etilenglicol monometil éter, etilenglicol monoetil éter, etilenglicol dietiléter, etilenglicolmonoetileteracetato, etilenglicol isopropil éter, etilenglicol monobutil éter, etilenglicol dibutil éter, etilenglicol monoacetato, etilenglicol diacetato, dietilenglicol monometil éter, dietilenglicol monoetil éter, acetato de dietilenglicol monoetil éter, dietilenglicol monobutil éter, acetato de dietilenglicolmonobutil éter, dietilenglicol dimetil éter, dietilenglicol metiletil éter, dietilenglicol dietil éter, acetato de dietilenglicol, trietilenglicol monometil éter, trietilenglicol monoetil éter, propilenglicol monometil éter, propilenglicol monoetil éter, dipropilenglicol monometil éter, dipropilenglicol monoetil éter, ee tripropilenglicol monometil éter, glicerina, tetrahidrofurano, dimetilformamida, dioxano, acetona y dimetoxietano.

En algunas modalidades, el disolvente comprende agua, etanol, glicerina, alcohol isobutílico, etilenglicol, dietilenglicol, trietilenglicol, acetona o propilenglicol, que son compatibles con los seres humanos.

Se puede usar un disolvente individualmente o se pueden usar dos o más disolventes mezclados.

El detector puede combinarse con un espesante para aumentar su viscosidad a aproximadamente 50 a aproximadamente 2 000 mPa·s, por ejemplo 100, 200, 300, 400, 500, 750, 1000, 1250, 1500 o 1750 mPa·s (a 25 °C), formando así un gel. En forma de gel, la aplicación del detector con un cepillo de dientes permite la limpieza simultánea del diente y la aplicación del detector.

Los ejemplos de espesantes que pueden usarse incluyen: aditivos sintéticos tales como alginato de sodio, alginato de propilenglicol, carboximetilcelulosa de sodio, carboximetilcelulosa de calcio, carboximetil almidón de sodio, fosfato de almidón de sodio, poliacrilato de sodio, metilcelulosa, hidroxipropilcelulosa y polivinilpirrolidona; espesantes naturales tales como goma de cyamoposis, goma de algarrobo, goma de tara, goma de semilla de tamarindo, goma arábiga, goma de tragacanto, goma de Karaya, ácido algínico, carragenano, goma de xantano, goma gellan, curdlán, quitina, quitosano y quitosamina; y espesantes inorgánicos tales como carbonato de calcio, silicato de calcio, polvo de sílice, silicato hidratado amorfo y sílice hidrófoba.

Para obtener una viscosidad en el intervalo de aproximadamente 50 a aproximadamente 2 000 mPa·s, la cantidad de compuesto del espesante varía según el tipo de espesante. Por ejemplo, cuando la carboximetilcelulosa de sodio tiene un gran efecto espesante, la cantidad de compuesto puede ser de aproximadamente 0,5 a 4 % en peso, y cuando es metilcelulosa, la cantidad de compuesto puede ser de aproximadamente 10 a 30 % en peso.

Además, el detector o la sonda pueden comprender aditivos tales como edulcorantes, sabores y conservantes. Los edulcorantes adecuados incluyen sacarosa, lactosa, glucosa, aspartamo o sacarina. Los agentes saborizantes adecuados incluyen aceite de menta, aceite de gaulteria, cereza, naranja o frambuesa. Los conservantes adecuados incluyen benzoato de sodio, vitamina E, alfa-tocoferol, ácido ascórbico, metil parabeno, propil parabeno o bisulfito de sodio. Los lubricantes adecuados incluyen estearato de magnesio, ácido esteárico, oleato de sodio, cloruro de sodio o talco. Los agentes desintegrantes adecuados incluyen almidón de maíz, metilcelulosa, polivinilpirrolidona, goma de xantano, bentonita, ácido algínico o agar. Una tableta puede contener el detector mezclado con excipientes no tóxicos farmacéuticamente aceptables que son adecuados para la fabricación de tabletas.

En otra modalidad, el kit del primer aspecto comprende además una o más soluciones de lavado.

El segundo o tercer kit como se describe en el presente documento comprende una o más soluciones de lavado.

- Una solución de lavado del kit del primer aspecto o del segundo o tercer kit como se describe en el presente documento puede comprender una solución para eliminar cualquier proteína no unida específicamente a la hidroxiapatita porosa, es decir, sin desorción. Por ejemplo, una solución de lavado que no desorbe una proteína unida a la hidroxiapatita puede ser agua, solución salina, tampón Tris o detergente suave, etc. Como la cavidad bucal contiene abundantes proteínas, incluidas muchas de las proteínas que se unen a la hidroxiapatita, una solución de lavado permite que la proteína que no se une específicamente a la hidroxiapatita sea eliminada del diente o la muestra de este antes de la aplicación del detector.
- En otras modalidades del kit del primer aspecto o el segundo o tercer kit como se describe en este documento, la solución de lavado comprende iones de magnesio (Mg^{2+}), iones dihidrogenofosfato ($H_2PO_4^-$), iones hidrogenofosfato (HPO_4^{2-}), o iones fosfato (PO_4^{3-}) (en conjunto " PO_4 "), o puede comprender una pluralidad de soluciones de lavado que pueden comprender cada una iones de magnesio (Mg^{2+}), iones dihidrogenofosfato ($H_2PO_4^-$), iones hidrogenofosfato (HPO_4^{2-}) o iones fosfato (PO_4^{3-}), que pueden administrarse secuencialmente. Se puede usar cualquier sal de magnesio soluble y se puede usar cualquier dihidrogenofosfato soluble, iones hidrogenofosfato (HPO_4^{2-}) o sal de fosfato, siempre que no sea tóxico si se aplica *in situ*. En una modalidad, la solución de lavado comprende cloruro de magnesio o dihidrogenofosfato de sodio. El destinatario experto apreciará que existe disponibilidad de otras soluciones de lavado capaces de desorber proteínas de la hidroxiapatita.
- Una solución de lavado puede comprender ácido hipocloroso (HOCl), hipoclorito (NaOCl) o hipoclorito de calcio ($Ca(OCl)_2$) (en conjunto "blanqueador").
- Se puede proporcionar una solución de lavado lista para usar. Alternativamente, la solución de lavado puede proporcionarse como un concentrado para preparar la solución de lavado tras la dilución con agua. Alternativamente, la solución de lavado puede proporcionarse como uno o más componentes secos para preparar la solución de lavado tras la mezcla con agua.
- La solución de lavado puede comprender menos de 1 mM, aproximadamente 1 mM, aproximadamente 2 mM, aproximadamente 3 mM, aproximadamente 4 mM, aproximadamente 5 mM, aproximadamente 6 mM, aproximadamente 7 mM, aproximadamente 8 mM, aproximadamente 9 mM, aproximadamente 10 mM o más de 10 mM de iones de magnesio. La solución de lavado puede comprender menos de 0,1 M, aproximadamente 0,1 M, aproximadamente 0,5 M, aproximadamente 0,6 M, aproximadamente 0,7 M, aproximadamente 0,8 M, aproximadamente 0,9 M, aproximadamente 1 M, aproximadamente 1,1 M, aproximadamente 1,2 M, aproximadamente 1,3 M, aproximadamente 1,4 M, aproximadamente 1,5 M, aproximadamente 2 M, aproximadamente 10 M o más de 10 M de iones de magnesio. La solución de lavado puede comprender menos de 0,04 M, aproximadamente 0,04 M, aproximadamente 0,08 M, aproximadamente 0,09 M, aproximadamente 0,1 M, aproximadamente 0,2 M, aproximadamente 0,3 M, aproximadamente 0,4 M, aproximadamente 0,5 M, aproximadamente 0,6 M, aproximadamente 0,7 M, aproximadamente 0,8 M, aproximadamente 0,9 M, aproximadamente 1 M, aproximadamente 1,5 M, aproximadamente 2 M, aproximadamente 4 M, o más de 4 M de iones dihidrogenofosfato, hidrogenofosfato o fosfato.
- La solución de lavado puede comprender aproximadamente 10 % de blanqueador (aproximadamente 0,4 % de $^{\cdot}OCl$), blanqueador puro o sin diluir (aproximadamente 4 % de $^{\cdot}OCl$), o puede comprender aproximadamente 20 % (aproximadamente 0,8 % de $^{\cdot}OCl$), aproximadamente 30 % (aproximadamente 1,2 % de $^{\cdot}OCl$), aproximadamente 40 % (aproximadamente 1,6 % de $^{\cdot}OCl$), aproximadamente 50 % (aproximadamente 2,0 % de $^{\cdot}OCl$), aproximadamente 60 % (aproximadamente 2,4 % de $^{\cdot}OCl$), aproximadamente 70 % (aproximadamente 2,8 % de $^{\cdot}OCl$), aproximadamente 80 % (aproximadamente 3,2 % de $^{\cdot}OCl$), aproximadamente 90 % (aproximadamente 3,6 % de $^{\cdot}OCl$) o aproximadamente 95 % de blanqueador (aproximadamente 3,8 % de $^{\cdot}OCl$).
- Sin desear estar limitados a ninguna teoría en particular, se cree que proporcionar una pluralidad de soluciones de lavado con un gradiente de concentración gradual de magnesio y/o fosfato elimina más proteínas que una solución de magnesio de concentración única. Se cree que el blanqueador ($^{\cdot}OCl$) elimina de forma no específica las proteínas unidas a la hidroxiapatita.
- Por lo tanto, en una modalidad del kit del primer aspecto o el segundo o tercer kit como se describe en el presente documento, la una o más soluciones de lavado, o la pluralidad de soluciones de lavado, pueden comprender una solución de cloruro de magnesio aproximadamente 5 mM, una solución de cloruro de magnesio de aproximadamente 1 M, y/o una solución de dihidrogenofosfato de sodio de aproximadamente 0,4 M.
- Cuando se aplica una o más (una pluralidad) de soluciones de lavado, las soluciones de lavado se pueden aplicar en cualquier orden. Alternativamente, cuando se aplica una o más (una pluralidad) de las soluciones de lavado, las soluciones de lavado se pueden aplicar secuencialmente en el orden de baja concentración de magnesio (por ejemplo, 5 mM), alta concentración de magnesio (por ejemplo, 1 M), dihidrogenofosfato (por ejemplo, 0,4 M; o hidrogenofosfato o fosfato). Alternativamente, una solución de lavado puede comprender en combinación magnesio y fosfato, por ejemplo, una concentración de aproximadamente 1 M de magnesio y aproximadamente 0,4 M de dihidrogenofosfato, hidrogenofosfato o fosfato.

El lavado puede ocurrir antes de la detección, o después de la detección, o antes y después de la detección.

5 Como se usa en el presente documento, "elimina" o "que elimina" se refiere a una reducción en la concentración de proteína unida a la hidroxiapatita.

10 Como se usa en el presente documento, una "muestra" es una porción o parte del diente que se usará para la detección o el diagnóstico de hidroxiapatita porosa. Una "muestra de control" es una porción o parte del diente que se sabe que está sana y libre de hidroxiapatita porosa y se utiliza con fines de referencia cuando se detecta o diagnostica una porosidad en la hidroxiapatita de prueba. Una "muestra" se puede obtener al limpiar, frotar, raspar, romper, taladrar o similar. Un muestreador se puede adaptar para obtener una muestra mediante frotis, limpieza o cualquier otro método de recolección conocido por el destinatario experto.

15 En una modalidad del segundo, tercer o cuarto método como se describe en el presente documento, el diente se limpia primero con un cepillo u otro medio. El diente puede estar seco.

20 En una modalidad del kit del primer aspecto, la sonda del segundo aspecto, o el segundo, tercer o cuarto método como se describe en el presente documento, el detector se aplica mediante el uso de un cepillo, cepillo de dientes, un hisopo de algodón, una bola de algodón o al dejarlo caer desde un recipiente equipado con boquilla.

Como se usa en el presente documento, "aplicado", "aplicar" o "aplicación" tiene su significado común de poner en contacto el detector o la sonda o solución de lavado y el diente o muestra de este, o poner en contacto el indicador y el detector o proteína.

25 Después de la aplicación del detector o la sonda, el detector o la sonda se incuba en el diente durante un período de tiempo suficiente para la unión del detector a la proteína o para la unión de la sonda a la hidroxiapatita. El período de incubación puede ser de 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 15, 20, 25, 30, 35, 40, 45, 50, 55 o 60 s. Alternativamente, el tiempo de incubación puede ser 1, 1,5, 2, 2,5, 3, 3,5, 4, 4,5 o 5 min. Alternativamente, el tiempo de incubación puede ser más de 5 min, como 10, 15 o 20 min. Después de la incubación, el exceso de detector o sonda puede ser expulsado de la boca con o sin lavado con agua o una solución de lavado.

30 El método o uso se puede realizar en o sobre el diente *in situ* en un sujeto. Alternativamente, el método o uso puede realizarse en o sobre el diente o en una muestra del diente después de su extracción de un sujeto.

35 El objetivo incluye un mamífero. El mamífero puede ser un ser humano. El ser humano puede tener cualquier edad. El ser humano puede tener menos de 12 años de edad. El ser humano puede tener entre 2 y 12 años de edad, entre 4 y 10 años de edad, o entre 6 y 10 años de edad. Alternativamente, el sujeto puede tener 12 a 20, 20 a 30, 30 a 40, 40 a 50, 50 a 60, 60 a 70, 70 a 80, 80 a 90 o 90 a 100 años de edad.

40 El sujeto puede desarrollar hidroxiapatita porosa después de que se haya desarrollado hidroxiapatita normal y esmalte normal, o el sujeto puede tener hidroxiapatita porosa durante todo el desarrollo.

45 Alternativamente, el sujeto puede ser un animal doméstico, de zoológico o de compañía. Si bien se contempla particularmente que los métodos y usos en este documento son adecuados para seres humanos, son aplicables, además, a primates, animales de compañía como perros y gatos, animales domésticos como caballos, vacas, ovejas y cabras, animales de zoológico como felinos, cánidos, bóvidos y ungulados, o animales de laboratorio como lagomorfos y roedores. Un sujeto puede estar afectado por un trastorno dental, o no estar afectado por un trastorno dental (es decir, sin enfermedad detectable).

50 El poder diagnóstico de los kits o métodos descritos en este documento se basa en afecciones de la hidroxiapatita porosa (DDD y caries) que tienen perfiles de proteínas distinguibles (por ejemplo, MIH: proteínas abundantes de la Tabla 1, poca o ninguna amelogenina; fluorosis madura: trazas de albúmina y amelogenina; amelogénesis imperfecta con hipomaduración: amelogenina abundante). Diferentes defectos pueden requerir diferentes procedimientos de lavado antes de la mineralización de recuperación, o diferentes métodos y materiales de restauración (o influir en la elección de estos). La concentración de proteínas en el esmalte de prueba de un diente o una muestra de este puede evaluarse por diversos medios, y la afección que implica hidroxiapatita porosa puede diagnosticarse en función de la identidad de proteínas con abundancia elevada en relación con el control.

55 Una aplicación adicional de la presente descripción es categorizar el subtipo de lesión de MIH (por ejemplo, como intacta o rota), lo que puede afectar el tipo de tratamiento requerido (por ejemplo, diferentes composiciones de proteínas pueden necesitar diferentes procedimientos de lavado antes de la mineralización correctiva).

60 Como se usa en el presente documento, "intacto" tiene su significado común de ininterrumpido, sin lesiones o sin alteraciones y se usa en relación con la superficie del esmalte dental. "Intacto" aquí se refiere a una lesión cubierta con una capa de esmalte más duro en la superficie del diente, y se conoce como lesión subsuperficial, que indica una estructura estratificada.

65

Por el contrario, "roto" aquí se refiere a una lesión de MIH cuya cubierta de esmalte duro se ha roto debido a fuerzas mecánicas o no estuvo presente inicialmente (tal vez se perdió durante la salida del diente o no se produjo durante el desarrollo).

Como se usa en este documento, "superficie permeable" se refiere al esmalte intacto o roto que permite el acceso del fluido oral o cualquier otra solución (y componentes asociados, incluidas las proteínas) hacia las regiones por debajo de la superficie. Por el contrario, una "superficie impermeable" se refiere al esmalte intacto o roto que bloquea dicho acceso.

Las lesiones de MIH que comprenden esmalte intacto, a pesar de comprender hidroxiapatita porosa, pueden presentar o no hidroxiapatita dental porosa susceptible de detección (es decir, pueden tener una superficie permeable o impermeable). Por lo tanto, en algunas modalidades del primer aspecto o del segundo o tercer kit como se describe en este documento, un kit puede comprender un agente de permeabilización, o un segundo, tercer o cuarto método como se describe en este documento (por ejemplo, permeabilización mecánica) puede comprender permeabilizar el diente o una muestra del diente. Dicho agente o método se usará en el tratamiento previo de una lesión que tiene una superficie impermeable. Alternativamente, dicho agente puede usarse para acceder a una lesión previamente sujeta a remineralización o mineralización correctiva.

Como se usa en este documento, "permeabilizar" o "que permeabiliza" se refiere a abrir poros en el esmalte impermeable de dimensión suficiente para permitir que el detector y/o la solución de lavado accedan a la hidroxiapatita porosa, y/o para permitir la eliminación de proteínas.

El agente de permeabilización es una formulación capaz de permeabilizar la capa superficial del esmalte (por ejemplo, puede comprender un ácido o algún otro agente conocido por el destinatario experto para permeabilizar el esmalte). El agente de permeabilización puede estar en forma de una solución o un gel, por ejemplo.

En algunas modalidades del primer aspecto o el segundo o tercer kit como se describe en el presente documento, un kit puede comprender un agente de remineralización, o el método puede comprender remineralizar el diente o muestra de este. Un agente de remineralización puede comprender fluoruro, fosfato de calcio soluble o fosfato de calcio amorfo, que puede estabilizarse con moléculas bioactivas.

Ejemplos

Ejemplo 1: La composición proteica del esmalte con MIH depende de la integridad de la superficie

Materiales y métodos

Muestras

Se obtuvieron muestras de seres humanos y de ratas Sprague-Dawley con las aprobaciones éticas necesarias y se almacenaron a -80 °C. La MIH se diagnosticó de acuerdo con los criterios estándar (Weerheijm, 2003). Después de la extracción, los dientes con MIH se enjuagaron con agua para eliminar la sangre visible, después se secaron y se almacenaron congelados inmediatamente. La saliva entera, estimulada masticando cera, se aclaró por centrifugación (20,000 g, 5 min) antes del almacenamiento. El suero y los eritrocitos se prepararon convencionalmente a partir de sangre de ratas de 6 días de edad. Se aisló la matriz secretora del esmalte de los dientes de rata en desarrollo como antes (Hubbard, 1996), excepto con el uso de los primeros molares a los 5 días.

Perfilado de proteínas del esmalte

Se recogieron lesiones abiertas de MIH a partir de muestras recién descongeladas mediante raspado con un bisturí, evitando el esmalte y la dentina cariados. Se tomaron muestras del esmalte normal con el uso de una fresa dental de rotación lenta (núm. 6). Inmediatamente después, las muestras de esmalte (2-5 µl vol. empaquetado) se suspendieron en ácido trifluoroacético al 10 % (10 volúmenes, 10 minutos a temperatura ambiente con agitación con vórtice y sonicación en baño), después se centrifugaron (20 000 g, 4 °C, 5 minutos) para sedimentar la proteína insoluble en ácido. Los sedimentos se solubilizaron en tampón de carga en gel que contenía SDS al 2 % y ditiotreitól 100 mmol/l (Hubbard, 1996), con inhibidores de proteasa adicionales (fluoruro de fenilmetilsulfonilo 1 mmol/l, benzamidina 1 mmol/l, pepstatina 5 µg/ml, leupeptina 5 µg/ml) donde se indique. Los extractos de SDS se cuantificaron mediante transferencia puntual con Negro amido y se sometieron a mini SDS-PAGE con tinción con azul de Coomassie o inmunotransferencia (Hubbard, 1995). El antisuero de amelogenina se levantó convencionalmente en conejos, mediante el uso de amelogenina de ratón recombinante (SEQ ID NO: 19) como inmunógeno.

Análisis proteómico

Las bandas de gel se sometieron a tripsinólisis y espectrometría de masas en tándem como antes (Mangum y otros, 2006), excepto que se utilizó un instrumento de trampa de iones con nanoespray basado en chip (Chip-LC/MSD XCT, de Agilent Technologies, Santa Clara, CA, Estados Unidos). Las proteínas se identificaron utilizando el motor de búsqueda MASCOT y la base de datos humanos SwissProt con estrictos criterios de aceptación (mínimamente dos etiquetas de secuencia (Mangum y otros, 2006)).

Ensayos de unión a minerales

El fluido oral simulado se preparó al agregar empíricamente saliva con suero y lisado de eritrocitos para que las proteínas principales de los tres componentes fueran igualmente abundantes (Figura 4B). Para analizar la unión a proteínas, el fluido oral se incubó con 0,1 volúmenes de hidroxiapatita (de Sigma, St Louis, MO, Estados Unidos) o esmalte con MIH durante 60 minutos a 20 °C y después se centrifugó (2000 g, 2 minutos). Después de lavar en 3 volúmenes de Tris-HCl 20 mM (pH 8,0), el sedimento se extrajo con ácido trifluoroacético y SDS como se describió anteriormente para el esmalte.

Resultados

El esmalte con MIH está enriquecido con proteínas que no son amelogeninas

El perfil de las proteínas del esmalte ha proporcionado información útil sobre la patogénesis de la fluorosis y la amelogénesis imperfecta, particularmente al vincular los niveles de amelogenina con las propiedades clínicas. En consecuencia, las muestras de esmalte con MIH no fijadas se investigaron mediante el uso de un enfoque con SDS-PAGE. A diferencia del esmalte normal, el esmalte con MIH dio precipitados visibles cuando se disolvió en ácido, lo que sugiere un contenido de proteína relativamente alto. Como se muestra en la Figura 1, la cuantificación de proteína insoluble en ácido de cinco lesiones graves arrojó valores de 3 a 15 veces más altos que lo normal (0,3-1,5 % de proteína p/p). Del mismo modo, SDS-PAGE con tinción de Coomassie reveló numerosas bandas de proteínas en el esmalte con MIH, lo que contrasta con las bandas apenas detectables en el esmalte normal (Figura 2A). Como las amelogeninas no se detectaron (Figura 2A, región de 20-25 kDa), se utilizó inmunotransferencia para una mayor sensibilidad. Anti-amelogenina tampoco logró detectar amelogeninas intactas en el esmalte con MIH, pero se observaron fragmentos de degradación en algunas muestras (Figura 2B, muestra 11). Las amelogeninas eran indetectables en el esmalte normal en estas condiciones (no mostradas). La comparación cuantitativa con la matriz de esmalte de la fase de secreción mostró que el esmalte con MIH contenía solo 0,12 % ± 0,06 % (± SE, n = 6) la cantidad de amelogeninas detectables totales (Figura 2B, región de 8 a 25 kDa). Se concluyó que el esmalte con MIH está enriquecido con proteínas y por razones patogénicas distintas de la retención de amelogenina.

Las proteínas del fluido corporal predominan en el esmalte con MIH

Para identificar los principales componentes proteicos del esmalte con MIH, las bandas de SDS-PAGE se sometieron a análisis proteómico. Como se muestra en la Figura 3 y la Tabla 1, se identificaron una variedad de proteínas (16 productos génicos distintos), 13 de las cuales se encuentran en la saliva y el líquido crevicular. Las otras tres (hemoglobina, albúmina, C3 del complemento) son componentes principales de la sangre. En consecuencia, todas las proteínas principales identificadas en el esmalte con MIH se asocian normalmente con fluidos corporales que se encuentran intraoralmente.

Tabla 1. Proteínas identificadas en el esmalte con MIH con superficie intacta (muestras 1 a 6) y con rotura posterior a la erupción (muestras 7 a 11).

	Nombre (registro en UniProt)	Localización en fluidos corporales	Masa (kDa)		Muestras identificadas en	Péptidos (n)	Cobertura (%)	Puntaje MASCOT
			Observada	Teórica				
5	Albúmina sérica (P02768)	Suero, saliva, GCF	70	69	1	16	21	426
10			3	2	4	15	26	89
			4	15	26	471		
			5	10	21	197		
			6	9	15	389		
15			10	7	14	212		
			3	3	8	87		
			5	7	18	323		
			6	12	15	389		
			10	14	24	461		
20		40		10	2	5	47	
		32		10	3	2	50	
		10		7	5	8	136	
25	Cadena beta de C3 del Complemento (P01024)	Suero	70	71	7	2	1	165
	Alfa-1-antitripsina (P01009)	Suero, saliva, GCF	40	44	7	14	33	308
			25-30		7	3	16	122
30	proteína S100-A9 (P06702)	Saliva, GCF	25-30	13	7	3	24	54
			13		7	5	37	212
			12		11	6	56	158
35	Lactotransferrina (P02788)	Saliva, GCF	70	78	11	2	4	155
	Inhibidor de elastasa de leucocitos (P30740)	Sangre, saliva	40	43	7	4	9	172
40	Antitrombina-III (P01008)	Suero, saliva	40	53	7	2	4	121
	Subunidad alfa de hemoglobina (P69905)	Sangre, saliva	13	15	7	6	38	117
			13		11	5	23	115
45	Subunidad beta de hemoglobina (P68871)	Sangre, saliva, GCF	13	16	7	12	63	374
			13		10	2	12	51
			13		11	11	63	207
50	Subunidad delta de hemoglobina (P02042)	Sangre, saliva	13	16	7	8	40	190
			13		11	6	50	145
	Proteína inducible por prolactina (P12273)	Saliva	13	17	11	2	15	85
55	Alfa amilasa 1 (P04745)	Saliva	60	57	8	2	7	131
	SIE de región V-III de cadena kappa de Ig (P01620)	Sangre, saliva	25-30	12	7	2	16	130
			25-30		8	2	16	67
60			25-30		11	2	16	91
	Región C de cadena alfa 2 de Ig (P01877)	Sangre, saliva	60	37	10	3	7	109
65	Proteína no caracterizada c6orf58 (Q6P5S2)	Saliva	32	38	10	4	14	68
	Serpina B3 (P29508)	Sangre, saliva	27	45	10	2	4	48

Las lesiones de MIH intactas y rotas tienen distintos perfiles de proteínas

5 Dada la diversidad clínica de las lesiones de MIH (color, consistencia, tamaño, integridad de la superficie), se investigó si las diferentes presentaciones tienen composiciones proteicas distintas. La evaluación de los perfiles de proteínas (Figura 2A) condujo a la hipótesis de que la integridad de la superficie del esmalte tenía una influencia importante. En particular, cuando las lesiones se agruparon como "intactas" y "rotas", los patrones de bandas de proteínas aparecieron cualitativamente similares dentro de cada grupo, pero se observaron dos diferencias notables entre los grupos (Figura 2A, regiones de 12 kDa y 66 kDa). La banda de 12 kDa, que era obvia en lesiones rotas, pero no intactas, contenía habitualmente la hemoglobina como un componente principal (Figura 3). Por el contrario, en las lesiones intactas, la banda de 66 kDa contenía habitualmente solo albúmina, a diferencia de las lesiones rotas donde la albúmina se encontró con poca frecuencia en niveles más bajos.

15 Además, se consultó la estabilidad de los perfiles de proteínas, donde se observó evidencia de degradación de proteínas (Figura 3: albúmina, C3 del complemento) y el papel clave de la proteólisis en la maduración del esmalte. De hecho, cuando las muestras solubilizadas en SDS de la Figura 2A se volvieron a analizar después del almacenamiento en congelación, las bandas de albúmina habían desaparecido por completo de las muestras intactas (Figura 2C). Sin embargo, las muestras rotas no se vieron afectadas en gran medida (no se muestran). Los inhibidores de proteasa tuvieron poco efecto en los perfiles de muestras de MIH recientes cuando se agregaron durante la etapa inicial de solubilización en SDS (no mostrado). Estos resultados resaltaron el riesgo de proteólisis de artefacto y, por lo tanto, solo se informan las muestras del primer análisis (Figuras 1 a 3). Se concluyó que las lesiones intactas y rotas tienen consistentemente perfiles de proteínas distintos, lo que respalda la hipótesis de que la integridad de la superficie influye en la composición de proteínas del esmalte con MIH.

25 La composición proteica del esmalte con MIH varía con la integridad de la superficie

Se sabe que las lesiones de MIH exhiben porosidad debajo de la superficie y que la albúmina y la hemoglobina se unen ávidamente a la hidroxiapatita. En consecuencia, se postuló que las proteínas del fluido oral penetran el esmalte con MIH y se unen selectivamente a los cristales de hidroxiapatita, sujeto a la ausencia de una capa superficial intacta. Cuando las lesiones rotas se compararon con saliva, suero y eritrocitos, se encontraron similitudes colectivas en los patrones de bandas de proteínas (Figura 4A). En contraste, las lesiones intactas tenían un parecido intrigante con el suero solo. Estos resultados concuerdan con que las proteínas del fluido oral se excluyen de las lesiones intactas pero no de las rotas. A continuación, se modeló una lesión rota exponiendo polvo de hidroxiapatita a líquido oral simulado (combinación de saliva, suero y extracto de eritrocitos). El perfil de la fracción unida a hidroxiapatita (Figura 4B) reveló una notable similitud con las lesiones rotas (Figuras 2A, 4A). Cuando la hidroxiapatita se sustituyó con esmalte en polvo obtenido de una lesión intacta (es decir, para modelar la rotura de la capa superficial), el perfil volvió a ser similar a las lesiones rotas (Figura 4C). Estos resultados indicaron que la composición proteica del esmalte con MIH está fuertemente influenciada por la integridad de la superficie del esmalte.

40 Cuando el fluido oral simulado que comprende albúmina y hemoglobina se aplicó a la hidroxiapatita, la albúmina y la hemoglobina se unieron a la hidroxiapatita (Figura 5). El lavado secuencial en cada uno de $MgCl_2$ 5 mM, $MgCl_2$ 1 M y NaH_2PO_4 0,4 M cada uno durante 5 min eliminó > 90 % de la proteína de la hidroxiapatita (Figura 5).

45 Discusión

Dadas las crecientes preocupaciones sobre MIH en todo el mundo, existe una necesidad apremiante de dilucidar la composición de proteínas del esmalte hipomineralizado. En el presente documento se describe que el esmalte con MIH tiene un contenido de proteínas sustancialmente mayor que el normal, pero un nivel casi normal de amelogeninas residuales. Esta característica distingue la MIH de los defectos de hipomaduración que contienen amelogeninas residuales altas (amelogénesis imperfecta, fluorosis) y, a su vez, tipifica la MIH como un defecto de hipocalcificación. En segundo lugar, se descubrió que el esmalte con MIH había acumulado varias proteínas del fluido oral y la sangre, con una incorporación diferencial que depende de la integridad de la superficie del esmalte. Desde el punto de vista patogénico, estos resultados apuntan a una alteración pre-eruptiva de la mineralización que implica albúmina y, en casos con rotura post-eruptiva, la posterior adsorción de proteínas a la matriz de hidroxiapatita expuesta. Estas ideas sobre la patogénesis y las propiedades del esmalte con MIH tienen importancia para la prevención, el diagnóstico y el tratamiento de la MIH.

60 Los resultados actuales ayudan a explicar las propiedades clínicas y biofísicas del esmalte con MIH. La elevación observada de 3 a 15 veces en el contenido de proteínas es similar a los informes de amelogénesis imperfecta y fluorosis (2,5 a 30 veces) y parece suficiente para explicar la debilidad mecánica característica del esmalte con MIH. El bajo contenido residual de amelogeninas compara el esmalte con MIH con los tipos hipocalcificados de amelogénesis imperfecta. El esmalte de estos últimos trastornos se describe clínicamente como notablemente más suave de lo normal y friable o caseoso, lo que coincide con las descripciones del esmalte con MIH. A nivel de proteínas, el esmalte con MIH parece distinguible de los tipos hipocalcificados de amelogénesis imperfecta y

fluorosis, particularmente debido a su alto contenido único de albúmina. Sin embargo, todas las afecciones se caracterizan por hidroxiapatita porosa.

5 Estos resultados también dilucidan la patogénesis de MIH, apuntando a etapas pre y post-eruptivas que son mecanísticamente distintas. Antes de la erupción, el grosor normal y el bajo contenido de amelogenina del esmalte con MIH (<0,2 % del nivel de la fase de secreción) indica que las amelogeninas son secretadas y después eliminadas de manera efectiva. De ello se deduce que la MIH no es un defecto de maduración principalmente. Por analogía con la amelogénesis imperfecta hipocalcificada, entonces la atención se dirige a un inicio defectuoso de la mineralización. El perfil de proteínas indicó que la albúmina se acumula en el esmalte con MIH a pesar de la
10 eliminación casi completa de las amelogeninas.

En otras palabras, la hipocalcificación es un subtipo de hipomineralización, el otro subtipo es la hipomaduración. Como se muestra en la presente descripción, la MIH y algunos tipos de amelogénesis imperfecta, y probablemente también algunos tipos de fluorosis se distinguen como defectos de hipocalcificación en el sentido de que tienen
15 bajas cantidades de amelogenina. Es decir, se ha producido el proceso normal de eliminación de amelogenina (maduración del esmalte), pero no se ha producido la calcificación. Sin embargo, en los defectos de hipomaduración (tipos inmaduros de amelogénesis imperfecta y fluorosis), la eliminación de amelogenina (maduración del esmalte) no se ha producido en gran medida y es la presencia continua de amelogenina lo que impide la calcificación.

20 Los niveles de amelogenina son relativamente bajos en los tipos de hipocalcificación de DDD/hipomineralización, pero más cercanos a los niveles normales en los tipos de hipomaduración de DDD/hipomineralización (como algunos tipos de amelogénesis imperfecta y fluorosis dental). Por lo tanto, las variaciones en los niveles tanto de amelogenina como de las proteínas restantes descritas en el presente documento, unidas a la hidroxiapatita dental porosa, podrían ser informativas (por ejemplo, diagnósticas) individualmente o en combinación, por ejemplo, como
25 una relación.

Por primera vez, estos resultados demuestran que la albúmina extravasada se acumula en el esmalte humano con malformación. En particular, se encontró que las lesiones intactas contenían albúmina, pero no numerosas proteínas del fluido oral con potencial demostrado de unión a la hidroxiapatita. El hecho de que la albúmina, pero no la hemoglobina, fuera notable puede atribuirse a una fuga vascular menor de suero en lugar de sangre completa, o a una alta estabilidad proteolítica de la albúmina en relación con la hemoglobina y otras proteínas de la sangre durante la maduración del esmalte. De hecho, la albúmina es resistente a la peptidasa 4 relacionada con la calicreína, la principal proteasa implicada en la eliminación de amelogenina.

35 Estos resultados también implican que otra etapa patogénica sigue a la ruptura post-eruptiva de la superficie del esmalte. Esta segunda etapa implica la unión relativamente promiscua de las proteínas del fluido oral a la matriz de hidroxiapatita expuesta.

Las proteínas identificadas en la presente descripción tienen una posible utilidad como biomarcadores para caracterizar clínicamente las lesiones de MIH.

Ejemplo 2: Producción y prueba de una sonda para hidroxiapatita porosa

Materiales y métodos

45 SMCC (N-hidroxisuccinimida éster del ácido succinimidil 4-[N-maleimidometil]ciclohexanocarboxílico; CAS núm.: 64987-85-5) es un reticulante heterobifuncional no escindible con reactividad con amina y sulfhidrilo separada por un brazo espaciador de 8,3 Å. El negro amido (CAS núm.: 1064-48-8) es un colorante azul/negro común que se usa aquí como un indicador coloreado que contiene un grupo amina primaria. La hemoglobina de la vaca (CAS núm.: 9008-02-0) es un heterotetrámero que consiste en 2 pares de cadenas de polipéptidos (α y β ; SEQ ID NOs: 20 y 21, respectivamente). La cadena β tiene un solo residuo de cisteína que contiene sulfhidrilo expuesto al disolvente, mientras que la cadena α no tiene cisteínas.

55 Se añadió SMCC (75 mM en dimetilsulfóxido) a 9 volúmenes de negro amido (37,5 mM en solución salina tamponada con fosfato (PBS, NaCl 137 mM, KCl 2,7 mM, fosfato sódico dibásico 10 mM, pH 7,4)) y se incubó 30 minutos a 21 °C. El exceso molar de 5 veces del negro amido aseguró el marcaje máximo de SMCC (creando un indicador coloreado activado por maleimida, Figura 27). Después de la conjugación, la solución se desecó por centrifugación al vacío y se almacenó a -80 °C.

60 La hemoglobina (20 mg/ml; 0,65 mmol de tior de cisteína/ml) se preparó mediante disolución en PBS que contenía TCEP (tris (2-carboxietil)fosfina 10 mM, un agente reductor sin tior utilizado para mantener el estado de cistina-sulfhidrilo) y EDTA 5 mM (ácido etilendiaminotetraacético, un quelante de metales utilizado para reducir el potencial de catálisis oxidante/radical y posterior oxidación de tior). Después de una incubación de 30 minutos a 21 °C, la hemoglobina reducida se dializó contra 1000 volúmenes de PBS durante 2 horas para agotar TCEP y EDTA (este paso puede ser opcional). La hemoglobina se llevó al siguiente paso inmediatamente para minimizar la oxidación de tior de cisteína.
65

El negro amido activado con maleimida desecado se disolvió en hemoglobina en una relación molar de negro amido:tiol de 10: 1 para asegurar el marcaje máximo de la hemoglobina. Después de incubar durante 2 horas a 21 °C, la hemoglobina conjugada con negro amido se dializó extensamente contra PBS (hasta que el dializado permaneció sin colorear, para 1 ml esto tomó de 24 a 48 horas) para eliminar el negro amido unido de manera no covalente. Después de la diálisis, la sonda estaba lista para usar.

Resultados

Dentro de los 5 minutos posteriores a la aplicación de la sonda, la hidroxiapatita cambió de color de blanco a azul oscuro (Figura 29). La sonda soportó el lavado en agua, mientras que el negro amido solo (es decir, no unido a Hb) se eliminó lavando en agua. La sonda se eliminó de la hidroxiapatita con un procedimiento de lavado de tres etapas que comprendió lavar secuencialmente en cada uno de $MgCl_2$ 5 mM, $MgCl_2$ 1 M, y NaH_2PO_4 0,4 M durante 5 minutos (Figura 29).

Discusión

Un requisito clave del diseño fue la preservación de la función de la hemoglobina para unirse a la hidroxiapatita después de la conjugación al indicador coloreado. Los tioles de cisteína de la hemoglobina fueron el objetivo porque dos de las cuatro subunidades proteicas portan una sola cisteína (no en las interfaces de unión); las otras dos subunidades carecen de cisteína. Por lo tanto, la sonda tetrámero resultante contiene dos subunidades proteicas no modificadas, manteniendo así al menos la mitad de los sitios de unión a hidroxiapatita nativos por unidad funcional. Se ejemplificó un método de 2 etapas: la primera produjo un conjugado indicador coloreado-SMCC (Figura 27); la segunda usó el conjugado indicador coloreado-SMCC para marcar la hemoglobina (Figura 28). Aquí se ha establecido una prueba de principio para el diseño, la producción y las pruebas de una sonda novedosa que detecta hidroxiapatita porosa.

Ejemplo 3: La sonda se une específicamente al esmalte dental poroso (Figura 30)

Métodos

Para probar si la sonda del Ejemplo 2 se une específicamente al esmalte poroso, una lesión cariosa compleja se recubrió con la sonda y después se lavó a fondo.

Un primer molar humano que tenía una gran región de caries (esmalte poroso, región opaca blanca) se fotografió antes y después de la aplicación de la sonda (Figura 30). La sonda se aplicó a toda la región de la corona mediante el uso de un cepillo durante un período de un minuto. Después de la aplicación de la sonda, el diente se enjuagó con agua corriente durante 10 segundos, se fotografió, después se lavó nuevamente durante otros dos minutos y se fotografió.

Resultados

El esmalte normal no estaba marcado.

Las regiones de caries manifiestas se marcaron fuerte y específicamente, pero el marcaje fue irregular en algunos lugares. Las regiones cariadas no marcadas exhibían una superficie brillante que era resistente al raspado, mientras que las regiones marcadas tenían una superficie opaca que podía rasparse fácilmente. Esto indica que las áreas de caries irregulares no marcadas pueden deberse a la remineralización de la capa superficial. Por lo tanto, la sonda es capaz de discriminar entre caries activas e inactivas.

Las regiones de esmalte roto durante la extracción del diente (huellas de fórceps) también se marcaron, lo que indica que la sonda puede detectar regiones del esmalte que tienen una superficie quebrada.

La sonda proporcionó un nivel estable de marcaje, independiente del tiempo de enjuague con agua.

Ejemplo 4: La sonda puede detectar específicamente la desmineralización temprana del esmalte superficial (modelo de caries incipiente) (Figura 31)

Métodos

Para probar si la sonda del Ejemplo 2 puede detectar específicamente caries tempranas, se produjeron lesiones cariosas artificiales en el esmalte de la superficie normal mediante puntos con ácido fuerte (antes de la aplicación de la sonda).

La fotografía muestra que un primer molar humano antes y después de la aplicación de la sonda no tenía caries antes del tratamiento con ácido (Figura 31). Después tres regiones de esmalte se expusieron al ácido (0,5 µl de

H₃PO₄ al 85 %) durante 1, 3 o 10 minutos para introducir lesiones cariosas artificiales antes de lavar en 100 ml de TBS (Tris 25 mM pH 7,2, NaCl 160 mM) durante dos minutos, después bajo agua corriente por otros dos minutos. El diente se secó al aire y la sonda se aplicó a toda el área durante tres minutos con un cepillo. Después de la aplicación, la sonda no unida se retiró mediante limpieza primero con papel absorbente, después enjuague con agua corriente durante 10 segundos. Para eliminar la sonda unida, se aplicó blanqueador al 10 % (NaClO al 0,4 %) con un cepillo durante 10 segundos.

Resultados

La sonda no se unió a ninguna región del esmalte sin caries.

El tratamiento con grabado a base de ácido produjo tres regiones de esmalte ligeramente opaco/sin brillo, que siguió un perfil de gravedad dependiente de la dosis (10 > 3 > 1 min). Las tres regiones grabadas fueron detectadas por la sonda, de una manera dependiente de la gravedad; el esmalte sin grabar no se marcó.

La unión de la sonda resistió el lavado en agua, aunque la intensidad de la señal disminuyó ligeramente. La sonda pudo eliminarse cuantitativamente mediante la aplicación de blanqueador al 10 % durante 10 segundos.

Ejemplo 5: El mecanismo de acción de la sonda es la afinidad por la hidroxiapatita (Figura 32)

El esmalte del Ejemplo 4 (Figura 31) se volvió a tratar con la sonda del Ejemplo 2 para verificar un mecanismo de unión a hidroxiapatita.

Métodos (a)

Para descartar un mecanismo de tinción de proteínas, la sonda se aplicó a esmalte grabado que había sido tratado con blanqueador (es decir, con eliminación de proteínas).

Resultados (a)

El esmalte blanqueado fue marcado por la sonda de manera similar al no blanqueado (Figura 32, compare los paneles A2 y A4). Este hallazgo descarta un mecanismo de tinción de proteínas para el marcaje del esmalte grabado con la sonda.

Métodos (b)

Se propuso que, si el mecanismo de acción de la sonda es la unión a hidroxiapatita, entonces el pretratamiento con BSA debería bloquear la unión de la sonda (inhibición competitiva).

El esmalte del Panel A se expuso a una proteína de unión a hidroxiapatita conocida (albúmina sérica bovina al 10 %, BSA) mediante aplicación con un cepillo durante un minuto, seguido de enjuague con agua durante un minuto. Después del tratamiento con BSA, la sonda se aplicó como antes. BSA se eliminó mediante tratamiento con blanqueador, y la sonda se volvió a aplicar.

Resultados (b)

La aplicación de BSA no alteró la apariencia del esmalte (Figura 32, Panel B2). BSA bloqueó la unión de la sonda (Figura 32, Panel B3). La unión de la sonda se restableció después de eliminar BSA (Figura 32, Panel B6). En conjunto, estos resultados demuestran que el mecanismo de acción de la sonda es la unión a hidroxiapatita, no la unión a proteínas. Dada la posibilidad de inhibición competitiva por otras proteínas de unión a hidroxiapatita, el pretratamiento para eliminar las proteínas podría mejorar la sensibilidad de la sonda y, por lo tanto, minimizar los resultados falsos negativos.

Ejemplo 6: La sonda marca específicamente el esmalte hipomineralizado y la dentina anormal (Figura 33)

Métodos

Para probar si la sonda del Ejemplo 2 podría usarse para delinear tejidos dentales anormales, se trató con la sonda una porción de diente que contenía esmalte y dentina normales y anormales.

Se eligió un diente fracturado que mostraba una región de hipomineralización bajo la superficie para imitar un caso clínicamente difícil donde los límites de la lesión son oscuros y complejos. Una breve exposición previa a la sonda condujo a la demarcación del límite esmalte-dentina. Después se fotografió la muestra antes (izquierda) y después (derecha) de la aplicación de la sonda con un cepillo durante 30 segundos (figura 33). Después de la aplicación, la sonda no unida se eliminó con enjuague en agua durante 30 segundos.

Resultados

Antes de la aplicación de la sonda, se podían identificar varias estructuras: (1) esmalte normal que se superponía (2) esmalte hipomineralizado (color rosado con borde rojo en algunas regiones), (3) dentina aparentemente normal (dura) y (4) dentina anormal (blanda/coriácea). Después de la aplicación de la sonda, los cuatro tipos de tejido pudieron discernirse fácilmente.

El esmalte y la dentina normales no se marcaron. El esmalte hipomineralizado se marcó uniforme y específicamente con un color violeta intenso, que parecía trazar un borde muy complejo en toda la región debajo de la superficie. La dentina anormal (posiblemente debido a caries y/o defectos del desarrollo) se marcó específica y uniformemente de un color verde intenso, que parecía trazar bordes complejos contra la dentina normal. En conjunto, estos datos confirman que la sonda puede marcar específicamente el esmalte hipomineralizado y la dentina anormal.

Ejemplo 7: La sonda se puede utilizar para guiar la extracción del esmalte hipomineralizado (Figura 34)

Métodos

El esmalte hipomineralizado del Ejemplo 6 (Figura 33) se eliminó mediante el uso de una cuchilla de bisturí y se repitió repetidamente con la sonda del Ejemplo 2 para controlar el progreso. Las características físicas del esmalte se observaron en cada etapa (Figura 34, ver descripción debajo de los paneles).

Resultados

Los paneles superiores de la Figura 34 exhiben la muestra después de retirar el esmalte hipomineralizado, mientras que los paneles inferiores exhiben la misma muestra después de la aplicación de la sonda. Los paneles 1 a 3 muestran la eliminación gradual de pequeñas regiones de esmalte hipomineralizado. Los paneles 4 a 6 muestran intentos de eliminación de la región completa y regiones de eliminación incompleta (compare los paneles superiores e inferiores). Tenga en cuenta que a medida que se eliminó el esmalte hipomineralizado, las características físicas cambiaron notablemente en paralelo con el grado de marcaje, hasta el punto final donde el esmalte restante era físicamente uniforme y no se tiñó con la sonda (Panel 6).

La dentina anormal no se abordó en este ejemplo.

Ejemplo 8: La sonda se puede usar para guiar la extracción de dentina anormal (Figura 35)

Métodos

La dentina anormal del Ejemplo 6 (Figura 33) se retiró mediante el uso de una cuchilla de bisturí y se volvió a sondear iterativamente con la sonda del Ejemplo 2 para controlar el progreso de la eliminación. Las características físicas de la dentina se observaron en cada etapa (Figura 35, ver descripción debajo de los paneles).

Resultados

Los paneles superiores de la Figura 35 exhiben la muestra después de extraer la dentina anormal, mientras que los paneles inferiores exhiben la misma muestra después de la aplicación de la sonda. El panel 1 muestra una intensa tinción de dentina anormal, que se reduce bruscamente con la eliminación y el nuevo sondeo (por ejemplo, compare los paneles inferiores 1 y 2). Los niveles reducidos de marcaje por la sonda se correlacionan con el carácter físico mejorado de la dentina (por ejemplo, en el Panel 4, la dureza de la dentina era uniformemente normal por evaluación física y en gran medida sin tinción después de la aplicación de la sonda). Tenga en cuenta que incluso después de la eliminación completa de la dentina anormal, es evidente un bajo nivel de tinción de fondo (presumiblemente debido a la mayor porosidad de la dentina en relación con el esmalte).

Ejemplo 9: La detección de dentina anormal por la sonda se puede mejorar con un lavado con blanqueador (Figura 36)

Métodos

Para probar si la especificidad de la sonda para la dentina, como se muestra en el Ejemplo 8, podría mejorarse, se usó un lavado con blanqueador para reducir la tinción de la dentina normal.

Un molar humano con dentina normal y anormal expuesta se expuso a la sonda del Ejemplo 2 (aplicación con cepillo durante un minuto seguido de enjuague con agua durante un minuto) y posteriormente se expuso a un lavado con blanqueador (aplicado con cepillo durante 10 segundos, después se enjuagó con agua durante un minuto). Después de la aplicación de la sonda/blanqueador, las regiones marcadas se eliminaron con una hoja de bisturí y después se volvió a sondear/blanquear para controlar el progreso (Figura 36).

Resultados

La sonda detectó preferentemente dentina anormal, sin embargo, la tinción de fondo de la dentina normal disminuyó la confianza en la demarcación del borde. La aplicación de blanqueador al 10 % (NaOCl al 0,4 %) durante 10 segundos mejoró la resolución al reducir el marcaje en la dentina normal, pero no en la anormal. La aplicación de blanqueador puro (NaOCl al 4 %) durante 10 segundos eliminó por completo el marcaje de la dentina normal, sin afectar el marcaje de la dentina anormal, lo que resulta en una delineación mucho más clara de la dentina anormal.

Después del blanqueador puro, la dentina anormal se eliminó (Panel 4) y después se volvió a sondear/blanquear (Panel 5), lo que demuestra que se eliminó la mayoría, pero no toda, la dentina anormal. Otra etapa de eliminación/resondeo/blanqueador mostró que la dentina anormal fue eliminada completamente. La dentina restante era físicamente indistinguible de la dentina normal.

En conjunto, estos resultados sugieren que una etapa de eliminación de proteínas después de la aplicación de la sonda puede ayudar a reducir el marcaje de fondo de la dentina normal, reduciendo las posibles lecturas de falsos positivos.

Ejemplo 10: La sonda puede ser opaca a los rayos X (Figura 37)

Métodos

La sonda se hizo radiopaca mediante la sustitución del cromóforo azul (negro amido) del Ejemplo 2 por ácido 5-amino-2,4,6-triyodoisoftálico (^3I), un compuesto precursor usado en radiografía médica (por ejemplo, para angiografía cerebral). Este compuesto se eligió debido a la disponibilidad de una única amina primaria que podría usarse para el acoplamiento con el mismo reticulante usado en la sonda azul.

Para acoplar ^3I a la hemoglobina, se utilizó el siguiente procedimiento:

1. Se disolvieron 1,25 mg de SMCC (reticulante) en 50 μl de DMSO (SMCC 75 mM).
2. ^3I se preparó de la siguiente manera: se disolvieron 30 mg en 1 ml de NaOH 0,1 M (^3I 50 mM), se añadieron 250 μl de HEPES 0,1 M pH 7,0, después se ajustó el pH a 7 con adiciones de 1 μl de NaOH 5 M; tal que la solución final fue ^3I 40 mM, HEPES 20 mM pH 7.
3. Se añadieron 400 μl de solución de ^3I a 50 μl de SMCC 75 mM en DMSO y se incubaron a temperatura ambiente durante 30 minutos para generar SMCC activado por ^3I .
4. El ^3I -SMCC se liofilizó después por centrifugación al vacío.
5. El sedimento resultante se recogió en 20 μl de DMSO y se añadieron 100 μl de hemoglobina a 20 mg/ml, después la solución se incubó a temperatura ambiente durante 60 minutos para acoplar ^3I a los grupos tiol de cisteína en la hemoglobina.
6. El ^3I -Hb resultante se centrifugó después (20 000 xg durante 5 minutos) antes de la diálisis (10-kDa MWCO) durante la noche contra Tris 25 mM pH 7,2, NaCl 160 mM.
7. El dializado resultante se recogió y se almacenó a $-20\text{ }^\circ\text{C}$.

Para evaluar el grado de radioopacidad conferido a la sonda, se sometió a radiografía de rayos X (65 kV, 8 mA, exposición de 0,5 segundos) junto con patrones radiopacos (^3I 1 y 10 mM).

Resultados

La sonda de rayos X era radiopaca en un grado entre 1 y 10 mM ^3I (Figura 37). El análisis de densidad sugirió que la radioopacidad era equivalente a una solución de ^3I de 1,5-2,5 mM. Estos resultados confirman que la sonda puede hacerse opaca a los rayos X.

Ejemplo 11: Análisis de soluciones de lavado con el uso de hidroxiapatita pura (Figura 38)

Métodos

Para examinar la efectividad relativa de cada solución de lavado, se probaron individualmente utilizando un sistema modelo *in vitro* (Figura 38).

La hidroxiapatita pura (5 mg) se cargó con proteínas de sangre de rata (100 μl de Tris 10 mM pH 7,2 que contenía 10 μl de extracto de Hb y 2 μl de suero puro) durante 10 minutos a temperatura ambiente con agitación constante. La hidroxiapatita cargada con proteína se sedimentó mediante centrifugación a 2000 xg durante 30 segundos, el sobrenadante se desechó y el sedimento se lavó con 300 μl de Tris 10 mM, pH 7,2 durante 30 segundos para eliminar los componentes intersticiales no unidos.

La proteína-hidroxiapatita se expuso después a 100 µl de varios componentes de lavado (agua, MgCl₂ 5 mM, MgCl₂ 1 M o NaH₂PO₄ 0,4 M) durante 2 minutos a temperatura ambiente con mezcla antes de la centrifugación. Los lavados se recogieron y la proteína-hidroxiapatita se lavó otras dos veces con la misma solución de lavado. Después de tres etapas de lavado, la proteína-hidroxiapatita se disolvió en 100 µl de ácido trifluoroacético al 10 % (TFA), y las proteínas precipitadas se recogieron mediante centrifugación (2000 x g durante 2 minutos), y los sedimentos se disolvieron en 100 µl de SoB 2X (Tris-HCl 0,125 M, pH 6,8, SDS al 4 %, glicerol al 20 %). El contenido de proteína en todas las fracciones se evaluó mediante densitometría de la membrana de transferencia puntual teñida con negro amido.

10 Resultados

Las capacidades relativas de las soluciones de lavado para eliminar la proteína de la hidroxiapatita fueron: PO₄ 0,4 M > Mg²⁺ 1 M > Mg²⁺ 5 mM (no más efectivo que el agua).

15 Aunque PO₄ pareció proporcionar la mejor eliminación de proteínas, se observó que la hidroxiapatita permaneció de color rosado incluso después de 3 lavados, mientras que la hidroxiapatita tratada con Mg²⁺ 1 M se volvió blanca después de un solo lavado. Siendo este el caso, parece que MgCl₂ 1 M y NaH₂PO₄ 0,4 M son los más efectivos para eliminar las proteínas, y tienen actividades complementarias (probablemente eliminando diferentes clases de proteínas).

20 Ejemplo 12: Análisis de Mg²⁺ y PO₄ por separado o secuencialmente mediante el uso de hidroxiapatita pura (Figura 39)

25 Métodos

La hidroxiapatita pura se cargó con proteínas, después se sometió a 100 µl de diversos componentes de lavado (agua, MgCl₂ 1 M o NaH₂PO₄ 0,4 M) como en el Ejemplo 11, excepto con dos lavados (en lugar de tres) y se omitió MgCl₂ 5 mM. Un tubo recibió Mg²⁺ 1 M seguido de PO₄ 0,4 M. Después de los lavados, los sedimentos de hidroxiapatita se fotografiaron para registrar el color (ver el recuadro), después el contenido de proteína se evaluó como en el Ejemplo 11.

30 Resultados

35 Las tres soluciones de lavado funcionaron de manera similar, eliminando la mayoría de las proteínas después de dos lavados, a diferencia del agua (Figura 39).

40 El lavado secuencial con Mg²⁺ y después PO₄ produjo el mejor resultado evaluado por la eliminación de proteínas y la eliminación de color (recuadro: las flechas indican sedimentos de hidroxiapatita después del lavado). Se puede concluir que el lavado secuencial con Mg²⁺ y PO₄ proporciona una eliminación óptima de las proteínas, en este modelo de hidroxiapatita.

Ejemplo 13: Análisis del lavado combinado con Mg²⁺ más PO₄ con el uso de hidroxiapatita pura (Figura 40)

45 Métodos

La hidroxiapatita pura se cargó con proteína, después se sometió a 100 µl de lavado combinado (MgCl₂ 1 M, NaH₂PO₄ 0,4 M) tres veces como en el Ejemplo 11. El contenido de proteína se evaluó como en el Ejemplo 11. Tenga en cuenta que los resultados del Ejemplo 13 (Figura 40) se presentan en gráficos junto con los datos del Ejemplo 12 para su comparación.

50 Resultados

55 El lavado combinado se realizó de manera similar a PO₄ solo, sin embargo, la hidroxiapatita se volvió blanca después del primer lavado (similar a Mg²⁺ 1 M solo), lo que indica que se retuvo la actividad de cada componente de lavado. Se puede concluir que un lavado combinado puede ser más efectivo en términos del tiempo requerido para lograr la eliminación de proteínas.

Ejemplo 14: Las soluciones de lavado funcionan con esmalte hipomineralizado, aunque con una eficacia reducida en comparación con el modelo de hidroxiapatita (Figura 41)

60 Métodos

65 El esmalte hipomineralizado de las lesiones intactas y rotas se recogió por separado, de modo que se dispuso de 3 tubos de polvo de 5 mg por cada tipo de lesión. El esmalte se expuso a 100 µl de Mg²⁺ 5 mM, Mg²⁺ 1 M, después PO₄ 0,4 M, cada uno durante 5 minutos. Las muestras se trataron después como para la hidroxiapatita pura de los Ejemplos 11 a 13.

Ejemplo 15: Las soluciones de lavado pueden eliminar cuantitativamente las proteínas del esmalte hipomineralizado (Figura 42)

Métodos

5 El esmalte hipomineralizado de una lesión intacta se recogió de manera que se dispuso de 3 tubos de 5 mg. El esmalte se expuso a 1 ml de Mg^{2+} 1 M durante 7 horas, después 1 ml de PO_4 0,4 M durante 16 horas más. Las muestras se trataron después como para la hidroxiapatita pura de los Ejemplos 11 a 13.

10 Resultados

15 Las proteínas se eliminaron cuantitativamente del esmalte hipomineralizado después de dos lavados prolongados con soluciones de lavado (Figura 42B), mientras que el tratamiento con agua durante el mismo período de tiempo tuvo poco efecto. El lavado con PO_4 tuvo el mayor efecto, probablemente debido al perfil proteico de esta lesión en particular (predominantemente albúmina, Figura 42A). Si bien el plazo de tiempo puede ser más largo de lo deseable, las soluciones de lavado son capaces de eliminar todas las proteínas de las muestras clínicas.

Referencias

20 Hubbard MJ (1995). Calbindin 28kDa and calmodulin are hyperabundant in rat dental enamel cells. Identification of the protein phosphatase calcineurin as a principal calmodulin target and of a secretion-related role for calbindin28kDa. *Eur J Biochem* 230:68-79.

25 Hubbard MJ (1996). Abundant calcium homeostasis machinery in rat dental enamel cells. Up-regulation of calcium store proteins during enamel mineralisation implicates the endoplasmic reticulum in calcium transcytosis. *Eur J Biochem* 239:611-623.

Mangum JE, Veith PD, Reynolds EC, Hubbard MJ (2006). Towards second-generation proteome analysis of murine enamel-forming cells. *Eur J Oral Sci* 114 Supl 1:259-265.

30 Weerheijm KL (2003). Molar incisor hypomineralisation (MIH). *Eur J Paediatr Dent* 4:114-120.

Listado de secuencia

- <110> THE UNIVERSITY OF MELBOURNE
- 35 <120> KIT Y MÉTODO PARA DETECTAR HIDROXIAPATITA DENTAL POROSA
- <130> TUM-001-EP
- <140> 11755567.2
- 40 <141> 2011-03-18
- <150> AU2010901171
- <151> 2010-03-19
- 45 <160> 21
- <170> PatentIn versión 3.5
- <210> 1
- 50 <211> 609
- <212> PRT
- <213> Homo sapiens
- <400> 1
- 55
- 60
- 65

ES 2 819 284 T3

1 Met Lys Trp Val Thr Phe Ile Ser Leu Leu Phe Leu Phe Ser Ser Ala
 5 Tyr Ser Arg Gly Val Phe Arg Arg Asp Ala His Lys Ser Glu Val Ala
 10 His Arg Phe Lys Asp Leu Gly Glu Glu Asn Phe Lys Ala Leu Val Leu
 15 Ile Ala Phe Ala Gln Tyr Leu Gln Gln Cys Pro Phe Glu Asp His Val
 20 Lys Leu Val Asn Glu Val Thr Glu Phe Ala Lys Thr Cys Val Ala Asp
 25 Glu Ser Ala Glu Asn Cys Asp Lys Ser Leu His Thr Leu Phe Gly Asp
 30 Lys Leu Cys Thr Val Ala Thr Leu Arg Glu Thr Tyr Gly Glu Met Ala
 35 Asp Cys Cys Ala Lys Gln Glu Pro Glu Arg Asn Glu Cys Phe Leu Gln
 40 His Lys Asp Asp Asn Pro Asn Leu Pro Arg Leu Val Arg Pro Glu Val
 45 Asp Val Met Cys Thr Ala Phe His Asp Asn Glu Glu Thr Phe Leu Lys
 50 145 150 155 160
 55
 60
 65

ES 2 819 284 T3

Lys Tyr Leu Tyr Glu Ile Ala Arg Arg His Pro Tyr Phe Tyr Ala Pro
 165 170 175
 5
 Glu Leu Leu Phe Phe Ala Lys Arg Tyr Lys Ala Ala Phe Thr Glu Cys
 180 185 190
 Cys Gln Ala Ala Asp Lys Ala Ala Cys Leu Leu Pro Lys Leu Asp Glu
 195 200 205
 10
 Leu Arg Asp Glu Gly Lys Ala Ser Ser Ala Lys Gln Arg Leu Lys Cys
 210 215 220
 Ala Ser Leu Gln Lys Phe Gly Glu Arg Ala Phe Lys Ala Trp Ala Val
 225 230 235 240
 15
 Ala Arg Leu Ser Gln Arg Phe Pro Lys Ala Glu Phe Ala Glu Val Ser
 245 250 255
 20
 Lys Leu Val Thr Asp Leu Thr Lys Val His Thr Glu Cys Cys His Gly
 260 265 270
 25
 Asp Leu Leu Glu Cys Ala Asp Asp Arg Ala Asp Leu Ala Lys Tyr Ile
 275 280 285
 Cys Glu Asn Gln Asp Ser Ile Ser Ser Lys Leu Lys Glu Cys Cys Glu
 290 295 300
 30
 Lys Pro Leu Leu Glu Lys Ser His Cys Ile Ala Glu Val Glu Asn Asp
 305 310 315 320
 35
 Glu Met Pro Ala Asp Leu Pro Ser Leu Ala Ala Asp Phe Val Glu Ser
 325 330 335
 Lys Asp Val Cys Lys Asn Tyr Ala Glu Ala Lys Asp Val Phe Leu Gly
 340 345 350
 40
 Met Phe Leu Tyr Glu Tyr Ala Arg Arg His Pro Asp Tyr Ser Val Val
 355 360 365
 45
 Leu Leu Leu Arg Leu Ala Lys Thr Tyr Glu Thr Thr Leu Glu Lys Cys
 370 375 380
 Cys Ala Ala Ala Asp Pro His Glu Cys Tyr Ala Lys Val Phe Asp Glu
 385 390 395 400
 50
 Phe Lys Pro Leu Val Glu Glu Pro Gln Asn Leu Ile Lys Gln Asn Cys
 405 410 415
 55
 Glu Leu Phe Glu Gln Leu Gly Glu Tyr Lys Phe Gln Asn Ala Leu Leu
 60
 65

ES 2 819 284 T3

Ile Leu Arg Leu Glu Ser Glu Glu Thr Met Val Leu Glu Ala His Asp
 35 40 45
 5 Ala Gln Gly Asp Val Pro Val Thr Val Thr Val His Asp Phe Pro Gly
 50 55 60
 10 Lys Lys Leu Val Leu Ser Ser Glu Lys Thr Val Leu Thr Pro Ala Thr
 65 70 75 80
 15 Asn His Met Gly Asn Val Thr Phe Thr Ile Pro Ala Asn Arg Glu Phe
 85 90 95
 20 Lys Ser Glu Lys Gly Arg Asn Lys Phe Val Thr Val Gln Ala Thr Phe
 100 105 110
 25 Gly Thr Gln Val Val Glu Lys Val Val Leu Val Ser Leu Gln Ser Gly
 115 120 125
 30 Tyr Leu Phe Ile Gln Thr Asp Lys Thr Ile Tyr Thr Pro Gly Ser Thr
 130 135 140
 35 Val Leu Tyr Arg Ile Phe Thr Val Asn His Lys Leu Leu Pro Val Gly
 145 150 155 160
 40 Arg Thr Val Met Val Asn Ile Glu Asn Pro Glu Gly Ile Pro Val Lys
 165 170 175
 45 Gln Asp Ser Leu Ser Ser Gln Asn Gln Leu Gly Val Leu Pro Leu Ser
 180 185 190
 50 Trp Asp Ile Pro Glu Leu Val Asn Met Gly Gln Trp Lys Ile Arg Ala
 195 200 205
 55 Tyr Tyr Glu Asn Ser Pro Gln Gln Val Phe Ser Thr Glu Phe Glu Val
 210 215 220
 60 Lys Glu Tyr Val Leu Pro Ser Phe Glu Val Ile Val Glu Pro Thr Glu
 225 230 235 240
 65 Lys Phe Tyr Tyr Ile Tyr Asn Glu Lys Gly Leu Glu Val Thr Ile Thr
 245 250 255
 Ala Arg Phe Leu Tyr Gly Lys Lys Val Glu Gly Thr Ala Phe Val Ile
 260 265 270
 Phe Gly Ile Gln Asp Gly Glu Gln Arg Ile Ser Leu Pro Glu Ser Leu
 275 280 285
 60
 65

ES 2 819 284 T3

Lys Arg Ile Pro Ile Glu Asp Gly Ser Gly Glu Val Val Leu Ser Arg
 290 295 300
 5 Lys Val Leu Leu Asp Gly Val Gln Asn Pro Arg Ala Glu Asp Leu Val
 305 310 315 320
 Gly Lys Ser Leu Tyr Val Ser Ala Thr Val Ile Leu His Ser Gly Ser
 325 330 335
 10 Asp Met Val Gln Ala Glu Arg Ser Gly Ile Pro Ile Val Thr Ser Pro
 340 345 350
 15 Tyr Gln Ile His Phe Thr Lys Thr Pro Lys Tyr Phe Lys Pro Gly Met
 355 360 365
 20 Pro Phe Asp Leu Met Val Phe Val Thr Asn Pro Asp Gly Ser Pro Ala
 370 375 380
 Tyr Arg Val Pro Val Ala Val Gln Gly Glu Asp Thr Val Gln Ser Leu
 385 390 395 400
 25 Thr Gln Gly Asp Gly Val Ala Lys Leu Ser Ile Asn Thr His Pro Ser
 405 410 415
 30 Gln Lys Pro Leu Ser Ile Thr Val Arg Thr Lys Lys Gln Glu Leu Ser
 420 425 430
 Glu Ala Glu Gln Ala Thr Arg Thr Met Gln Ala Leu Pro Tyr Ser Thr
 435 440 445
 35 Val Gly Asn Ser Asn Asn Tyr Leu His Leu Ser Val Leu Arg Thr Glu
 450 455 460
 40 Leu Arg Pro Gly Glu Thr Leu Asn Val Asn Phe Leu Leu Arg Met Asp
 465 470 475 480
 Arg Ala His Glu Ala Lys Ile Arg Tyr Tyr Thr Tyr Leu Ile Met Asn
 485 490 495
 45 Lys Gly Arg Leu Leu Lys Ala Gly Arg Gln Val Arg Glu Pro Gly Gln
 500 505 510
 50 Asp Leu Val Val Leu Pro Leu Ser Ile Thr Thr Asp Phe Ile Pro Ser
 515 520 525
 Phe Arg Leu Val Ala Tyr Tyr Thr Leu Ile Gly Ala Ser Gly Gln Arg
 530 535 540
 55 Glu Val Val Ala Asp Ser Val Trp Val Asp Val Lys Asp Ser Cys Val

ES 2 819 284 T3

Val Ala Asp Pro Phe Glu Val Thr Val Met Gln Asp Phe Phe Ile Asp
 820 825 830
 5 Leu Arg Leu Pro Tyr Ser Val Val Arg Asn Glu Gln Val Glu Ile Arg
 835 840 845
 10 Ala Val Leu Tyr Asn Tyr Arg Gln Asn Gln Glu Leu Lys Val Arg Val
 850 855 860
 15 Glu Leu Leu His Asn Pro Ala Phe Cys Ser Leu Ala Thr Thr Lys Arg
 865 870 875 880
 20 Arg His Gln Gln Thr Val Thr Ile Pro Pro Lys Ser Ser Leu Ser Val
 885 890 895
 25 Pro Tyr Val Ile Val Pro Leu Lys Thr Gly Leu Gln Glu Val Glu Val
 900 905 910
 30 Lys Ala Ala Val Tyr His His Phe Ile Ser Asp Gly Val Arg Lys Ser
 915 920 925
 35 Leu Lys Val Val Pro Glu Gly Ile Arg Met Asn Lys Thr Val Ala Val
 930 935 940
 40 Arg Thr Leu Asp Pro Glu Arg Leu Gly Arg Glu Gly Val Gln Lys Glu
 945 950 955 960
 45 Asp Ile Pro Pro Ala Asp Leu Ser Asp Gln Val Pro Asp Thr Glu Ser
 965 970 975
 50 Glu Thr Arg Ile Leu Leu Gln Gly Thr Pro Val Ala Gln Met Thr Glu
 980 985 990
 55 Asp Ala Val Asp Ala Glu Arg Leu Lys His Leu Ile Val Thr Pro Ser
 995 1000 1005
 60 Gly Cys Gly Glu Gln Asn Met Ile Gly Met Thr Pro Thr Val Ile
 1010 1015 1020
 65 Ala Val His Tyr Leu Asp Glu Thr Glu Gln Trp Glu Lys Phe Gly
 1025 1030 1035
 70 Leu Glu Lys Arg Gln Gly Ala Leu Glu Leu Ile Lys Lys Gly Tyr
 1040 1045 1050
 75 Thr Gln Gln Leu Ala Phe Arg Gln Pro Ser Ser Ala Phe Ala Ala
 1055 1060 1065

ES 2 819 284 T3

	Phe	Val	Lys	Arg	Ala	Pro	Ser	Thr	Trp	Leu	Thr	Ala	Tyr	Val	Val
	1070						1075					1080			
5	Lys	Val	Phe	Ser	Leu	Ala	Val	Asn	Leu	Ile	Ala	Ile	Asp	Ser	Gln
	1085						1090					1095			
10	Val	Leu	Cys	Gly	Ala	Val	Lys	Trp	Leu	Ile	Leu	Glu	Lys	Gln	Lys
	1100						1105					1110			
15	Pro	Asp	Gly	Val	Phe	Gln	Glu	Asp	Ala	Pro	Val	Ile	His	Gln	Glu
	1115						1120					1125			
20	Met	Ile	Gly	Gly	Leu	Arg	Asn	Asn	Asn	Glu	Lys	Asp	Met	Ala	Leu
	1130						1135					1140			
25	Thr	Ala	Phe	Val	Leu	Ile	Ser	Leu	Gln	Glu	Ala	Lys	Asp	Ile	Cys
	1145						1150					1155			
30	Glu	Glu	Gln	Val	Asn	Ser	Leu	Pro	Gly	Ser	Ile	Thr	Lys	Ala	Gly
	1160						1165					1170			
35	Asp	Phe	Leu	Glu	Ala	Asn	Tyr	Met	Asn	Leu	Gln	Arg	Ser	Tyr	Thr
	1175						1180					1185			
40	Val	Ala	Ile	Ala	Gly	Tyr	Ala	Leu	Ala	Gln	Met	Gly	Arg	Leu	Lys
	1190						1195					1200			
45	Gly	Pro	Leu	Leu	Asn	Lys	Phe	Leu	Thr	Thr	Ala	Lys	Asp	Lys	Asn
	1205						1210					1215			
50	Arg	Trp	Glu	Asp	Pro	Gly	Lys	Gln	Leu	Tyr	Asn	Val	Glu	Ala	Thr
	1220						1225					1230			
55	Ser	Tyr	Ala	Leu	Leu	Ala	Leu	Leu	Gln	Leu	Lys	Asp	Phe	Asp	Phe
	1235						1240					1245			
60	Val	Pro	Pro	Val	Val	Arg	Trp	Leu	Asn	Glu	Gln	Arg	Tyr	Tyr	Gly
	1250						1255					1260			
65	Gly	Gly	Tyr	Gly	Ser	Thr	Gln	Ala	Thr	Phe	Met	Val	Phe	Gln	Ala
	1265						1270					1275			
70	Leu	Ala	Gln	Tyr	Gln	Lys	Asp	Ala	Pro	Asp	His	Gln	Glu	Leu	Asn
	1280						1285					1290			
75	Leu	Asp	Val	Ser	Leu	Gln	Leu	Pro	Ser	Arg	Ser	Ser	Lys	Ile	Thr
	1295						1300					1305			

ES 2 819 284 T3

5 His Arg Ile His Trp Glu Ser Ala Ser Leu Leu Arg Ser Glu Glu
 1310 1315 1320
 Thr Lys Glu Asn Glu Gly Phe Thr Val Thr Ala Glu Gly Lys Gly
 1325 1330 1335
 10 Gln Gly Thr Leu Ser Val Val Thr Met Tyr His Ala Lys Ala Lys
 1340 1345 1350
 Asp Gln Leu Thr Cys Asn Lys Phe Asp Leu Lys Val Thr Ile Lys
 1355 1360 1365
 15 Pro Ala Pro Glu Thr Glu Lys Arg Pro Gln Asp Ala Lys Asn Thr
 1370 1375 1380
 20 Met Ile Leu Glu Ile Cys Thr Arg Tyr Arg Gly Asp Gln Asp Ala
 1385 1390 1395
 Thr Met Ser Ile Leu Asp Ile Ser Met Met Thr Gly Phe Ala Pro
 1400 1405 1410
 25 Asp Thr Asp Asp Leu Lys Gln Leu Ala Asn Gly Val Asp Arg Tyr
 1415 1420 1425
 30 Ile Ser Lys Tyr Glu Leu Asp Lys Ala Phe Ser Asp Arg Asn Thr
 1430 1435 1440
 Leu Ile Ile Tyr Leu Asp Lys Val Ser His Ser Glu Asp Asp Cys
 1445 1450 1455
 35 Leu Ala Phe Lys Val His Gln Tyr Phe Asn Val Glu Leu Ile Gln
 1460 1465 1470
 40 Pro Gly Ala Val Lys Val Tyr Ala Tyr Tyr Asn Leu Glu Glu Ser
 1475 1480 1485
 Cys Thr Arg Phe Tyr His Pro Glu Lys Glu Asp Gly Lys Leu Asn
 1490 1495 1500
 45 Lys Leu Cys Arg Asp Glu Leu Cys Arg Cys Ala Glu Glu Asn Cys
 1505 1510 1515
 50 Phe Ile Gln Lys Ser Asp Asp Lys Val Thr Leu Glu Glu Arg Leu
 1520 1525 1530
 Asp Lys Ala Cys Glu Pro Gly Val Asp Tyr Val Tyr Lys Thr Arg
 1535 1540 1545
 55 Leu Val Lys Val Gln Leu Ser Asn Asp Phe Asp Glu Tyr Ile Met

ES 2 819 284 T3

1550 1555 1560

5 Ala Ile Glu Gln Thr Ile Lys Ser Gly Ser Asp Glu Val Gln Val
1565 1570 1575

10 Gly Gln Gln Arg Thr Phe Ile Ser Pro Ile Lys Cys Arg Glu Ala
1580 1585 1590

15 Leu Lys Leu Glu Glu Lys Lys His Tyr Leu Met Trp Gly Leu Ser
1595 1600 1605

20 Ser Asp Phe Trp Gly Glu Lys Pro Asn Leu Ser Tyr Ile Ile Gly
1610 1615 1620

25 Lys Asp Thr Trp Val Glu His Trp Pro Glu Glu Asp Glu Cys Gln
1625 1630 1635

30 Asp Glu Glu Asn Gln Lys Gln Cys Gln Asp Leu Gly Ala Phe Thr
1640 1645 1650

35 Glu Ser Met Val Val Phe Gly Cys Pro Asn
1655 1660

40 <210> 3
<211> 418
<212> PRT
<213> Homo sapiens

45 Met Pro Ser Ser Val Ser Trp Gly Ile Leu Leu Leu Ala Gly Leu Cys
1 5 10 15

50 Cys Leu Val Pro Val Ser Leu Ala Glu Asp Pro Gln Gly Asp Ala Ala
20 25 30

55 Gln Lys Thr Asp Thr Ser His His Asp Gln Asp His Pro Thr Phe Asn
35 40 45

60 Lys Ile Thr Pro Asn Leu Ala Glu Phe Ala Phe Ser Leu Tyr Arg Gln
50 55 60

65 Leu Ala His Gln Ser Asn Ser Thr Asn Ile Phe Phe Ser Pro Val Ser
65 70 75 80

70 Ile Ala Thr Ala Phe Ala Met Leu Ser Leu Gly Thr Lys Ala Asp Thr
85 90 95

75 His Asp Glu Ile Leu Glu Gly Leu Asn Phe Asn Leu Thr Glu Ile Pro
100 105 110

ES 2 819 284 T3

Glu Ala Gln Ile His Glu Gly Phe Gln Glu Leu Leu Arg Thr Leu Asn
 115 120 125
 5
 Gln Pro Asp Ser Gln Leu Gln Leu Thr Thr Gly Asn Gly Leu Phe Leu
 130 135 140
 10
 Ser Glu Gly Leu Lys Leu Val Asp Lys Phe Leu Glu Asp Val Lys Lys
 145 150 155 160
 15
 Leu Tyr His Ser Glu Ala Phe Thr Val Asn Phe Gly Asp Thr Glu Glu
 165 170 175
 20
 Ala Lys Lys Gln Ile Asn Asp Tyr Val Glu Lys Gly Thr Gln Gly Lys
 180 185 190
 25
 Ile Val Asp Leu Val Lys Glu Leu Asp Arg Asp Thr Val Phe Ala Leu
 195 200 205
 30
 Val Asn Tyr Ile Phe Phe Lys Gly Lys Trp Glu Arg Pro Phe Glu Val
 210 215 220
 35
 Lys Asp Thr Glu Glu Glu Asp Phe His Val Asp Gln Val Thr Thr Val
 225 230 235 240
 40
 Lys Val Pro Met Met Lys Arg Leu Gly Met Phe Asn Ile Gln His Cys
 245 250 255
 45
 Lys Lys Leu Ser Ser Trp Val Leu Leu Met Lys Tyr Leu Gly Asn Ala
 260 265 270
 50
 Thr Ala Ile Phe Phe Leu Pro Asp Glu Gly Lys Leu Gln His Leu Glu
 275 280 285
 55
 Asn Glu Leu Thr His Asp Ile Ile Thr Lys Phe Leu Glu Asn Glu Asp
 290 295 300
 60
 Arg Arg Ser Ala Ser Leu His Leu Pro Lys Leu Ser Ile Thr Gly Thr
 305 310 315 320
 65
 Tyr Asp Leu Lys Ser Val Leu Gly Gln Leu Gly Ile Thr Lys Val Phe
 325 330 335
 Ser Asn Gly Ala Asp Leu Ser Gly Val Thr Glu Glu Ala Pro Leu Lys
 340 345 350
 Leu Ser Lys Ala Val His Lys Ala Val Leu Thr Ile Asp Glu Lys Gly
 355 360 365

ES 2 819 284 T3

Thr Glu Ala Ala Gly Ala Met Phe Leu Glu Ala Ile Pro Met Ser Ile
 370 375 380

5

Pro Pro Glu Val Lys Phe Asn Lys Pro Phe Val Phe Leu Met Ile Glu
 385 390 395 400

10

Gln Asn Thr Lys Ser Pro Leu Phe Met Gly Lys Val Val Asn Pro Thr
 405 410 415

Gln Lys

15

<210> 4
 <211> 114
 <212> PRT
 <213> Homo sapiens

20

<400> 4

Met Thr Cys Lys Met Ser Gln Leu Glu Arg Asn Ile Glu Thr Ile Ile
 1 5 10 15

25

Asn Thr Phe His Gln Tyr Ser Val Lys Leu Gly His Pro Asp Thr Leu
 20 25 30

30

Asn Gln Gly Glu Phe Lys Glu Leu Val Arg Lys Asp Leu Gln Asn Phe
 35 40 45

35

Leu Lys Lys Glu Asn Lys Asn Glu Lys Val Ile Glu His Ile Met Glu
 50 55 60

40

Asp Leu Asp Thr Asn Ala Asp Lys Gln Leu Ser Phe Glu Glu Phe Ile
 65 70 75 80

45

Met Leu Met Ala Arg Leu Thr Trp Ala Ser His Glu Lys Met His Glu
 85 90 95

Gly Asp Glu Gly Pro Gly His His His Lys Pro Gly Leu Gly Glu Gly
 100 105 110

Thr Pro

50

<210> 5
 <211> 710
 <212> PRT
 <213> Homo sapiens

55

<400> 5

Met Lys Leu Val Phe Leu Val Leu Leu Phe Leu Gly Ala Leu Gly Leu
 1 5 10 15

60

65

ES 2 819 284 T3

Cys Leu Ala Gly Arg Arg Arg Ser Val Gln Trp Cys Ala Val Ser Gln
 20 25 30
 5
 Pro Glu Ala Thr Lys Cys Phe Gln Trp Gln Arg Asn Met Arg Lys Val
 35 40 45
 10
 Arg Gly Pro Pro Val Ser Cys Ile Lys Arg Asp Ser Pro Ile Gln Cys
 50 55 60
 15
 Ile Gln Ala Ile Ala Glu Asn Arg Ala Asp Ala Val Thr Leu Asp Gly
 65 70 75 80
 20
 Gly Phe Ile Tyr Glu Ala Gly Leu Ala Pro Tyr Lys Leu Arg Pro Val
 85 90 95
 25
 Ala Ala Glu Val Tyr Gly Thr Glu Arg Gln Pro Arg Thr His Tyr Tyr
 100 105 110
 30
 Ala Val Ala Val Val Lys Lys Gly Gly Ser Phe Gln Leu Asn Glu Leu
 115 120 125
 35
 Gln Gly Leu Lys Ser Cys His Thr Gly Leu Arg Arg Thr Ala Gly Trp
 130 135 140
 40
 Asn Val Pro Ile Gly Thr Leu Arg Pro Phe Leu Asn Trp Thr Gly Pro
 145 150 155 160
 45
 Pro Glu Pro Ile Glu Ala Ala Val Ala Arg Phe Phe Ser Ala Ser Cys
 165 170 175
 50
 Val Pro Gly Ala Asp Lys Gly Gln Phe Pro Asn Leu Cys Arg Leu Cys
 180 185 190
 55
 Ala Gly Thr Gly Glu Asn Lys Cys Ala Phe Ser Ser Gln Glu Pro Tyr
 195 200 205
 60
 Phe Ser Tyr Ser Gly Ala Phe Lys Cys Leu Arg Asp Gly Ala Gly Asp
 210 215 220
 65
 Val Ala Phe Ile Arg Glu Ser Thr Val Phe Glu Asp Leu Ser Asp Glu
 225 230 235 240
 Ala Glu Arg Asp Glu Tyr Glu Leu Leu Cys Pro Asp Asn Thr Arg Lys
 245 250 255
 Pro Val Asp Lys Phe Lys Asp Cys His Leu Ala Arg Val Pro Ser His
 260 265 270

ES 2 819 284 T3

5
 Ala Val Val Ala Arg Ser Val Asn Gly Lys Glu Asp Ala Ile Trp Asn
 275 280 285

10
 Leu Leu Arg Gln Ala Gln Glu Lys Phe Gly Lys Asp Lys Ser Pro Lys
 290 295 300

15
 Phe Gln Leu Phe Gly Ser Pro Ser Gly Gln Lys Asp Leu Leu Phe Lys
 305 310 315 320

20
 Asp Ser Ala Ile Gly Phe Ser Arg Val Pro Pro Arg Ile Asp Ser Gly
 325 330 335

25
 Leu Tyr Leu Gly Ser Gly Tyr Phe Thr Ala Ile Gln Asn Leu Arg Lys
 340 345 350

30
 Ser Glu Glu Glu Val Ala Ala Arg Arg Ala Arg Val Val Trp Cys Ala
 355 360 365

35
 Val Gly Glu Gln Glu Leu Arg Lys Cys Asn Gln Trp Ser Gly Leu Ser
 370 375 380

40
 Glu Gly Ser Val Thr Cys Ser Ser Ala Ser Thr Thr Glu Asp Cys Ile
 385 390 395 400

45
 Ala Leu Val Leu Lys Gly Glu Ala Asp Ala Met Ser Leu Asp Gly Gly
 405 410 415

50
 Tyr Val Tyr Thr Ala Gly Lys Cys Gly Leu Val Pro Val Leu Ala Glu
 420 425 430

55
 Asn Tyr Lys Ser Gln Gln Ser Ser Asp Pro Asp Pro Asn Cys Val Asp
 435 440 445

60
 Arg Pro Val Glu Gly Tyr Leu Ala Val Ala Val Val Arg Arg Ser Asp
 450 455 460

65
 Thr Ser Leu Thr Trp Asn Ser Val Lys Gly Lys Lys Ser Cys His Thr
 465 470 475 480

70
 Ala Val Asp Arg Thr Ala Gly Trp Asn Ile Pro Met Gly Leu Leu Phe
 485 490 495

75
 Asn Gln Thr Gly Ser Cys Lys Phe Asp Glu Tyr Phe Ser Gln Ser Cys
 500 505 510

80
 Ala Pro Gly Ser Asp Pro Arg Ser Asn Leu Cys Ala Leu Cys Ile Gly
 515 520 525

85
 Asp Glu Gln Gly Glu Asn Lys Cys Val Pro Asn Ser Asn Glu Arg Tyr

ES 2 819 284 T3

	530		535		540														
5	Tyr 545	Gly	Tyr	Thr	Gly	Ala 550	Phe	Arg	Cys	Leu	Ala 555	Glu	Asn	Ala	Gly	Asp 560			
10	Val	Ala	Phe	Val	Lys 565	Asp	Val	Thr	Val	Leu 570	Gln	Asn	Thr	Asp	Gly 575	Asn			
15	Asn	Asn	Glu	Ala	Trp 580	Ala	Lys	Asp	Leu 585	Lys	Leu	Ala	Asp	Phe 590	Ala	Leu			
20	Leu	Cys	Leu	Asp	Gly 595	Lys	Arg	Lys 600	Pro	Val	Thr	Glu	Ala 605	Arg	Ser	Cys			
25	His	Leu 610	Ala	Met	Ala	Pro	Asn 615	His	Ala	Val	Val	Ser 620	Arg	Met	Asp	Lys			
30	Val	Glu	Arg	Leu	Lys 625	Gln	Val 630	Leu	Leu	His	Gln 635	Gln	Ala	Lys	Phe	Gly 640			
35	Arg	Asn	Gly	Ser	Asp 645	Cys	Pro	Asp	Lys	Phe 650	Cys	Leu	Phe	Gln	Ser 655	Glu			
40	Thr	Lys	Asn	Leu 660	Leu	Phe	Asn	Asp 665	Asn	Thr	Glu	Cys	Leu	Ala 670	Arg	Leu			
45	His	Gly	Lys 675	Thr	Thr	Tyr	Glu	Lys 680	Tyr	Leu	Gly	Pro	Gln 685	Tyr	Val	Ala			
50	Gly	Ile	Thr	Asn	Leu	Lys	Lys 690	Cys 695	Ser	Thr	Ser	Pro 700	Leu	Leu	Glu	Ala			
55	Cys 705	Glu	Phe	Leu	Arg	Lys 710													
60	<210> 6	<211> 379	<212> PRT	<213> Homo sapiens															
65	<400> 6																		
	Met 1	Glu	Gln	Leu	Ser 5	Ser	Ala	Asn	Thr	Arg 10	Phe	Ala	Leu	Asp 15	Leu	Phe			
	Leu	Ala	Leu	Ser 20	Glu	Asn	Asn	Pro	Ala 25	Gly	Asn	Ile	Phe	Ile 30	Ser	Pro			
	Phe	Ser	Ile 35	Ser	Ser	Ala	Met	Ala 40	Met	Val	Phe	Leu	Gly 45	Thr	Arg	Gly			

ES 2 819 284 T3

5 Asn Thr Ala Ala Gln Leu Ser Lys Thr Phe His Phe Asn Thr Val Glu
50 55 60

10 Glu Val His Ser Arg Phe Gln Ser Leu Asn Ala Asp Ile Asn Lys Arg
65 70 75 80

15 Gly Ala Ser Tyr Ile Leu Lys Leu Ala Asn Arg Leu Tyr Gly Glu Lys
85 90 95

20 Thr Tyr Asn Phe Leu Pro Glu Phe Leu Val Ser Thr Gln Lys Thr Tyr
100 105 110

25 Gly Ala Asp Leu Ala Ser Val Asp Phe Gln His Ala Ser Glu Asp Ala
115 120 125

30 Arg Lys Thr Ile Asn Gln Trp Val Lys Gly Gln Thr Glu Gly Lys Ile
130 135 140

35 Pro Glu Leu Leu Ala Ser Gly Met Val Asp Asn Met Thr Lys Leu Val
145 150 155 160

40 Leu Val Asn Ala Ile Tyr Phe Lys Gly Asn Trp Lys Asp Lys Phe Met
165 170 175

45 Lys Glu Ala Thr Thr Asn Ala Pro Phe Arg Leu Asn Lys Lys Asp Arg
180 185 190

50 Lys Thr Val Lys Met Met Tyr Gln Lys Lys Lys Phe Ala Tyr Gly Tyr
195 200 205

55 Ile Glu Asp Leu Lys Cys Arg Val Leu Glu Leu Pro Tyr Gln Gly Glu
210 215 220

60 Glu Leu Ser Met Val Ile Leu Leu Pro Asp Asp Ile Glu Asp Glu Ser
225 230 235 240

65 Thr Gly Leu Lys Lys Ile Glu Glu Gln Leu Thr Leu Glu Lys Leu His
245 250 255

70 Glu Trp Thr Lys Pro Glu Asn Leu Asp Phe Ile Glu Val Asn Val Ser
260 265 270

75 Leu Pro Arg Phe Lys Leu Glu Glu Ser Tyr Thr Leu Asn Ser Asp Leu
275 280 285

80 Ala Arg Leu Gly Val Gln Asp Leu Phe Asn Ser Ser Lys Ala Asp Leu
290 295 300

ES 2 819 284 T3

5 Ser Gly Met Ser Gly Ala Arg Asp Ile Phe Ile Ser Lys Ile Val His
305 310 315 320

Lys Ser Phe Val Glu Val Asn Glu Glu Gly Thr Glu Ala Ala Ala Ala
325 330 335

10 Thr Ala Gly Ile Ala Thr Phe Cys Met Leu Met Pro Glu Glu Asn Phe
340 345 350

15 Thr Ala Asp His Pro Phe Leu Phe Phe Ile Arg His Asn Ser Ser Gly
355 360 365

20 Ser Ile Leu Phe Leu Gly Arg Phe Ser Ser Pro
370 375

<210> 7
<211> 464
<212> PRT
25 <213> Homo sapiens

<400> 7

30 Met Tyr Ser Asn Val Ile Gly Thr Val Thr Ser Gly Lys Arg Lys Val
1 5 10 15

Tyr Leu Leu Ser Leu Leu Leu Ile Gly Phe Trp Asp Cys Val Thr Cys
20 25 30

35 His Gly Ser Pro Val Asp Ile Cys Thr Ala Lys Pro Arg Asp Ile Pro
35 40 45

40 Met Asn Pro Met Cys Ile Tyr Arg Ser Pro Glu Lys Lys Ala Thr Glu
50 55 60

45 Asp Glu Gly Ser Glu Gln Lys Ile Pro Glu Ala Thr Asn Arg Arg Val
65 70 75 80

50 Trp Glu Leu Ser Lys Ala Asn Ser Arg Phe Ala Thr Thr Phe Tyr Gln
85 90 95

55 His Leu Ala Asp Ser Lys Asn Asp Asn Asp Asn Ile Phe Leu Ser Pro
100 105 110

60 Leu Ser Ile Ser Thr Ala Phe Ala Met Thr Lys Leu Gly Ala Cys Asn
115 120 125

65 Asp Thr Leu Gln Gln Leu Met Glu Val Phe Lys Phe Asp Thr Ile Ser
130 135 140

Glu Lys Thr Ser Asp Gln Ile His Phe Phe Phe Ala Lys Leu Asn Cys
145 150 155 160

ES 2 819 284 T3

5 Arg Leu Tyr Arg Lys Ala Asn Lys Ser Ser Lys Leu Val Ser Ala Asn
165 170 175

10 Arg Leu Phe Gly Asp Lys Ser Leu Thr Phe Asn Glu Thr Tyr Gln Asp
180 185 190

15 Ile Ser Glu Leu Val Tyr Gly Ala Lys Leu Gln Pro Leu Asp Phe Lys
195 200 205

20 Glu Asn Ala Glu Gln Ser Arg Ala Ala Ile Asn Lys Trp Val Ser Asn
210 215 220

25 Lys Thr Glu Gly Arg Ile Thr Asp Val Ile Pro Ser Glu Ala Ile Asn
225 230 235 240

30 Glu Leu Thr Val Leu Val Leu Val Asn Thr Ile Tyr Phe Lys Gly Leu
245 250 255

35 Trp Lys Ser Lys Phe Ser Pro Glu Asn Thr Arg Lys Glu Leu Phe Tyr
260 265 270

40 Lys Ala Asp Gly Glu Ser Cys Ser Ala Ser Met Met Tyr Gln Glu Gly
275 280 285

45 Lys Phe Arg Tyr Arg Arg Val Ala Glu Gly Thr Gln Val Leu Glu Leu
290 295 300

50 Pro Phe Lys Gly Asp Asp Ile Thr Met Val Leu Ile Leu Pro Lys Pro
305 310 315 320

55 Glu Lys Ser Leu Ala Lys Val Glu Lys Glu Leu Thr Pro Glu Val Leu
325 330 335

60 Gln Glu Trp Leu Asp Glu Leu Glu Glu Met Met Leu Val Val His Met
340 345 350

65 Pro Arg Phe Arg Ile Glu Asp Gly Phe Ser Leu Lys Glu Gln Leu Gln
355 360 365

70 Asp Met Gly Leu Val Asp Leu Phe Ser Pro Glu Lys Ser Lys Leu Pro
370 375 380

75 Gly Ile Val Ala Glu Gly Arg Asp Asp Leu Tyr Val Ser Asp Ala Phe
385 390 395 400

80 His Lys Ala Phe Leu Glu Val Asn Glu Glu Gly Ser Glu Ala Ala Ala
405 410 415

85

ES 2 819 284 T3

5 Ser Thr Ala Val Val Ile Ala Gly Arg Ser Leu Asn Pro Asn Arg Val
420 425 430

10 Thr Phe Lys Ala Asn Arg Pro Phe Leu Val Phe Ile Arg Glu Val Pro
435 440 445

15 Leu Asn Thr Ile Ile Phe Met Gly Arg Val Ala Asn Pro Cys Val Lys
450 455 460

15
<210> 8
<211> 142
<212> PRT
<213> Homo sapiens
20
<400> 8

25 Met Val Leu Ser Pro Ala Asp Lys Thr Asn Val Lys Ala Ala Trp Gly
1 5 10 15

30 Lys Val Gly Ala His Ala Gly Glu Tyr Gly Ala Glu Ala Leu Glu Arg
20 25 30

35 Met Phe Leu Ser Phe Pro Thr Thr Lys Thr Tyr Phe Pro His Phe Asp
35 40 45

40 Leu Ser His Gly Ser Ala Gln Val Lys Gly His Gly Lys Lys Val Ala
50 55 60

45 Asp Ala Leu Thr Asn Ala Val Ala His Val Asp Asp Met Pro Asn Ala
65 70 75 80

50 Leu Ser Ala Leu Ser Asp Leu His Ala His Lys Leu Arg Val Asp Pro
85 90 95

55 Val Asn Phe Lys Leu Leu Ser His Cys Leu Leu Val Thr Leu Ala Ala
100 105 110

60 His Leu Pro Ala Glu Phe Thr Pro Ala Val His Ala Ser Leu Asp Lys
115 120 125

65 Phe Leu Ala Ser Val Ser Thr Val Leu Thr Ser Lys Tyr Arg
130 135 140

60
<210> 9
<211> 147
<212> PRT
<213> Homo sapiens
65
<400> 9

70 Met Val His Leu Thr Pro Glu Glu Lys Ser Ala Val Thr Ala Leu Trp
1 5 10 15

ES 2 819 284 T3

Gly Lys Val Asn Val Asp Glu Val Gly Gly Glu Ala Leu Gly Arg Leu
 20 25 30

5

 Leu Val Val Tyr Pro Trp Thr Gln Arg Phe Phe Glu Ser Phe Gly Asp
 35 40 45

10

 Leu Ser Thr Pro Asp Ala Val Met Gly Asn Pro Lys Val Lys Ala His
 50 55 60

15

 Gly Lys Lys Val Leu Gly Ala Phe Ser Asp Gly Leu Ala His Leu Asp
 65 70 75 80

20

 Asn Leu Lys Gly Thr Phe Ala Thr Leu Ser Glu Leu His Cys Asp Lys
 85 90 95

25

 Leu His Val Asp Pro Glu Asn Phe Arg Leu Leu Gly Asn Val Leu Val
 100 105 110

30

 Cys Val Leu Ala His His Phe Gly Lys Glu Phe Thr Pro Pro Val Gln
 115 120 125

35

 Ala Ala Tyr Gln Lys Val Val Ala Gly Val Ala Asn Ala Leu Ala His
 130 135 140

40

 Lys Tyr His
 145

<210> 10
 <211> 147
 <212> PRT
 <213> Homo sapiens

45

 Met Val His Leu Thr Pro Glu Glu Lys Thr Ala Val Asn Ala Leu Trp
 1 5 10 15

50

 Gly Lys Val Asn Val Asp Ala Val Gly Gly Glu Ala Leu Gly Arg Leu
 20 25 30

55

 Leu Val Val Tyr Pro Trp Thr Gln Arg Phe Phe Glu Ser Phe Gly Asp
 35 40 45

60

 Leu Ser Ser Pro Asp Ala Val Met Gly Asn Pro Lys Val Lys Ala His
 50 55 60

65

 Gly Lys Lys Val Leu Gly Ala Phe Ser Asp Gly Leu Ala His Leu Asp
 65 70 75 80

ES 2 819 284 T3

Asn Leu Lys Gly Thr Phe Ser Gln Leu Ser Glu Leu His Cys Asp Lys
 85 90 95

5 Leu His Val Asp Pro Glu Asn Phe Arg Leu Leu Gly Asn Val Leu Val
 100 105 110

10 Cys Val Leu Ala Arg Asn Phe Gly Lys Glu Phe Thr Pro Gln Met Gln
 115 120 125

15 Ala Ala Tyr Gln Lys Val Val Ala Gly Val Ala Asn Ala Leu Ala His
 130 135 140

Lys Tyr His
 145

20 <210> 11
 <211> 146
 <212> PRT
 <213> Homo sapiens

25 <400> 11

Met Arg Leu Leu Gln Leu Leu Phe Arg Ala Ser Pro Ala Thr Leu Leu
 1 5 10 15

30 Leu Val Leu Cys Leu Gln Leu Gly Ala Asn Lys Ala Gln Asp Asn Thr
 20 25 30

35 Arg Lys Ile Ile Ile Lys Asn Phe Asp Ile Pro Lys Ser Val Arg Pro
 35 40 45

40 Asn Asp Glu Val Thr Ala Val Leu Ala Val Gln Thr Glu Leu Lys Glu
 50 55 60

45 Cys Met Val Val Lys Thr Tyr Leu Ile Ser Ser Ile Pro Leu Gln Gly
 65 70 75 80

Ala Phe Asn Tyr Lys Tyr Thr Ala Cys Leu Cys Asp Asp Asn Pro Lys
 85 90 95

50 Thr Phe Tyr Trp Asp Phe Tyr Thr Asn Arg Thr Val Gln Ile Ala Ala
 100 105 110

55 Val Val Asp Val Ile Arg Glu Leu Gly Ile Cys Pro Asp Asp Ala Ala
 115 120 125

Val Ile Pro Ile Lys Asn Asn Arg Phe Tyr Thr Ile Glu Ile Leu Lys
 130 135 140

60 Val Glu
 145

65

ES 2 819 284 T3

<210> 12
 <211> 511
 <212> PRT
 <213> Homo sapiens

5

<400> 12

10

Met Lys Leu Phe Trp Leu Leu Phe Thr Ile Gly Phe Cys Trp Ala Gln
 1 5 10 15

15

Tyr Ser Ser Asn Thr Gln Gln Gly Arg Thr Ser Ile Val His Leu Phe
 20 25 30

20

Glu Trp Arg Trp Val Asp Ile Ala Leu Glu Cys Glu Arg Tyr Leu Ala
 35 40 45

25

Pro Lys Gly Phe Gly Gly Val Gln Val Ser Pro Pro Asn Glu Asn Val
 50 55 60

30

Ala Ile His Asn Pro Phe Arg Pro Trp Trp Glu Arg Tyr Gln Pro Val
 65 70 75 80

35

Ser Tyr Lys Leu Cys Thr Arg Ser Gly Asn Glu Asp Glu Phe Arg Asn
 85 90 95

40

Met Val Thr Arg Cys Asn Asn Val Gly Val Arg Ile Tyr Val Asp Ala
 100 105 110

45

Val Ile Asn His Met Cys Gly Asn Ala Val Ser Ala Gly Thr Ser Ser
 115 120 125

50

Thr Cys Gly Ser Tyr Phe Asn Pro Gly Ser Arg Asp Phe Pro Ala Val
 130 135 140

55

Pro Tyr Ser Gly Trp Asp Phe Asn Asp Gly Lys Cys Lys Thr Gly Ser
 145 150 155 160

60

Gly Asp Ile Glu Asn Tyr Asn Asp Ala Thr Gln Val Arg Asp Cys Arg
 165 170 175

65

Leu Ser Gly Leu Leu Asp Leu Ala Leu Gly Lys Asp Tyr Val Arg Ser
 180 185 190

70

Lys Ile Ala Glu Tyr Met Asn His Leu Ile Asp Ile Gly Val Ala Gly
 195 200 205

75

Phe Arg Ile Asp Ala Ser Lys His Met Trp Pro Gly Asp Ile Lys Ala
 210 215 220

80

85

ES 2 819 284 T3

Ile Leu Asp Lys Leu His Asn Leu Asn Ser Asn Trp Phe Pro Glu Gly
 225 230 235 240

5 Ser Lys Pro Phe Ile Tyr Gln Glu Val Ile Asp Leu Gly Gly Glu Pro
 245 250 255

10 Ile Lys Ser Ser Asp Tyr Phe Gly Asn Gly Arg Val Thr Glu Phe Lys
 260 265 270

15 Tyr Gly Ala Lys Leu Gly Thr Val Ile Arg Lys Trp Asn Gly Glu Lys
 275 280 285

20 Met Ser Tyr Leu Lys Asn Trp Gly Glu Gly Trp Gly Phe Met Pro Ser
 290 295 300

25 Asp Arg Ala Leu Val Phe Val Asp Asn His Asp Asn Gln Arg Gly His
 305 310 315 320

30 Gly Ala Gly Gly Ala Ser Ile Leu Thr Phe Trp Asp Ala Arg Leu Tyr
 325 330 335

35 Lys Met Ala Val Gly Phe Met Leu Ala His Pro Tyr Gly Phe Thr Arg
 340 345 350

40 Val Met Ser Ser Tyr Arg Trp Pro Arg Tyr Phe Glu Asn Gly Lys Asp
 355 360 365

45 Val Asn Asp Trp Val Gly Pro Pro Asn Asp Asn Gly Val Thr Lys Glu
 370 375 380

50 Val Thr Ile Asn Pro Asp Thr Thr Cys Gly Asn Asp Trp Val Cys Glu
 385 390 395 400

55 His Arg Trp Arg Gln Ile Arg Asn Met Val Asn Phe Arg Asn Val Val
 405 410 415

60 Asp Gly Gln Pro Phe Thr Asn Trp Tyr Asp Asn Gly Ser Asn Gln Val
 420 425 430

65 Ala Phe Gly Arg Gly Asn Arg Gly Phe Ile Val Phe Asn Asn Asp Asp
 435 440 445

70 Trp Thr Phe Ser Leu Thr Leu Gln Thr Gly Leu Pro Ala Gly Thr Tyr
 450 455 460

75 Cys Asp Val Ile Ser Gly Asp Lys Ile Asn Gly Asn Cys Thr Gly Ile
 465 470 475 480

80 Lys Ile Tyr Val Ser Asp Asp Gly Lys Ala His Phe Ser Ile Ser Asn
 485 490 495

85 Ser Ala Glu Asp Pro Phe Ile Ala Ile His Ala Glu Ser Lys Leu
 500 505 510

ES 2 819 284 T3

<210> 13
 <211> 109
 <212> PRT
 <213> Homo sapiens

5

<400> 13

10 Glu Ile Val Leu Thr Gln Ser Pro Gly Thr Leu Ser Leu Ser Pro Gly
 1 5 10 15

 Glu Arg Ala Thr Leu Ser Cys Arg Ala Ser Gln Ser Val Ser Asn Ser
 20 25 30

15 Tyr Leu Ala Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Gln Ala Pro Arg Leu Leu
 35 40 45

20 Ile Tyr Gly Ala Ser Ser Arg Ala Thr Gly Ile Pro Asp Arg Phe Ser
 50 55 60

25 Gly Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu Thr Ile Ser Arg Leu Glu
 65 70 75 80

 Pro Asp Asp Phe Ala Val Tyr Tyr Cys Gln Gln Tyr Gly Ser Ser Pro
 85 90 95

30 Gln Thr Phe Gly Gln Gly Ser Lys Val Glu Ile Lys Arg
 100 105

<210> 14
 <211> 340
 <212> PRT
 <213> Homo sapiens

35

<400> 14

40

 Ala Ser Pro Thr Ser Pro Lys Val Phe Pro Leu Ser Leu Asp Ser Thr
 1 5 10 15

45 Pro Gln Asp Gly Asn Val Val Val Ala Cys Leu Val Gln Gly Phe Phe
 20 25 30

50 Pro Gln Glu Pro Leu Ser Val Thr Trp Ser Glu Ser Gly Gln Asn Val
 35 40 45

 Thr Ala Arg Asn Phe Pro Pro Ser Gln Asp Ala Ser Gly Asp Leu Tyr
 50 55 60

55

60

65

ES 2 819 284 T3

Thr Thr Ser Ser Gln Leu Thr Leu Pro Ala Thr Gln Cys Pro Asp Gly
 65 70 75 80
 5 Lys Ser Val Thr Cys His Val Lys His Tyr Thr Asn Pro Ser Gln Asp
 85 90 95
 Val Thr Val Pro Cys Pro Val Pro Pro Pro Pro Cys Cys His Pro
 100 105 110
 10 Arg Leu Ser Leu His Arg Pro Ala Leu Glu Asp Leu Leu Leu Gly Ser
 115 120 125
 15 Glu Ala Asn Leu Thr Cys Thr Leu Thr Gly Leu Arg Asp Ala Ser Gly
 130 135 140
 Ala Thr Phe Thr Trp Thr Pro Ser Ser Gly Lys Ser Ala Val Gln Gly
 145 150 155 160
 20 Pro Pro Glu Arg Asp Leu Cys Gly Cys Tyr Ser Val Ser Ser Val Leu
 165 170 175
 25 Pro Gly Cys Ala Gln Pro Trp Asn His Gly Glu Thr Phe Thr Cys Thr
 180 185 190
 Ala Ala His Pro Glu Leu Lys Thr Pro Leu Thr Ala Asn Ile Thr Lys
 195 200 205
 30 Ser Gly Asn Thr Phe Arg Pro Glu Val His Leu Leu Pro Pro Pro Ser
 210 215 220
 35 Glu Glu Leu Ala Leu Asn Glu Leu Val Thr Leu Thr Cys Leu Ala Arg
 225 230 235 240
 Gly Phe Ser Pro Lys Asp Val Leu Val Arg Trp Leu Gln Gly Ser Gln
 245 250 255
 40 Glu Leu Pro Arg Glu Lys Tyr Leu Thr Trp Ala Ser Arg Gln Glu Pro
 260 265 270
 45 Ser Gln Gly Thr Thr Thr Phe Ala Val Thr Ser Ile Leu Arg Val Ala
 275 280 285
 50 Ala Glu Asp Trp Lys Lys Gly Asp Thr Phe Ser Cys Met Val Gly His
 290 295 300
 Glu Ala Leu Pro Leu Ala Phe Thr Gln Lys Thr Ile Asp Arg Met Ala
 305 310 315 320
 55 Gly Lys Pro Thr His Val Asn Val Ser Val Val Met Ala Glu Val Asp
 325 330 335
 60 Gly Thr Cys Tyr
 340

ES 2 819 284 T3

<210> 15
 <211> 330
 <212> PRT
 <213> Homo sapiens

5

<400> 15

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

ES 2 819 284 T3

Ala Ala His Thr Ser Thr Leu Ala Asp Asn Ile Lys Ser Phe Glu Asp
 210 215 220

5 Arg Tyr Asp Tyr Tyr Ser Lys Ala Glu Ala His Phe Glu Arg Ser Trp
 225 230 235 240

10 Val Leu Ala Val Asp His Leu Ala Ala Val Leu Phe Pro Thr Thr Leu
 245 250 255

Ile Arg Ser Tyr Lys Phe Gln Lys Gly Met Pro Pro Arg Ile Leu Leu
 260 265 270

15 Asn Thr Asp Val Ala Pro Phe Ile Ser Asp Phe Thr Ala Phe Gln Asn
 275 280 285

20 Val Val Leu Val Leu Leu Asn Met Leu Asp Asn Val Asp Lys Ser Ile
 290 295 300

25 Gly Tyr Leu Cys Thr Glu Lys Ser Asn Val Tyr Arg Asp His Ser Glu
 305 310 315 320

Ser Ser Ser Arg Ser Tyr Gly Asn Asn Ser
 325 330

30 <210> 16
 <211> 390
 <212> PRT
 <213> Homo sapiens

35 <400> 16

Met Asn Ser Leu Ser Glu Ala Asn Thr Lys Phe Met Phe Asp Leu Phe
 1 5 10 15

40 Gln Gln Phe Arg Lys Ser Lys Glu Asn Asn Ile Phe Tyr Ser Pro Ile
 20 25 30

45 Ser Ile Thr Ser Ala Leu Gly Met Val Leu Leu Gly Ala Lys Asp Asn
 35 40 45

50 Thr Ala Gln Gln Ile Lys Lys Val Leu His Phe Asp Gln Val Thr Glu
 50 55 60

Asn Thr Thr Gly Lys Ala Ala Thr Tyr His Val Asp Arg Ser Gly Asn
 65 70 75 80

55 Val His His Gln Phe Gln Lys Leu Leu Thr Glu Phe Asn Lys Ser Thr
 85 90 95

60 Asp Ala Tyr Glu Leu Lys Ile Ala Asn Lys Leu Phe Gly Glu Lys Thr

ES 2 819 284 T3

<210> 17
 <211> 191
 <212> PRT
 <213> Homo sapiens

5

<400> 17

Met Gly Thr Trp Ile Leu Phe Ala Cys Leu Leu Gly Ala Ala Phe Ala
 1 5 10 15

Met Pro Leu Pro Pro His Pro Gly His Pro Gly Tyr Ile Asn Phe Ser
 20 25 30

Tyr Glu Val Leu Thr Pro Leu Lys Trp Tyr Gln Ser Ile Arg Pro Pro
 35 40 45

Tyr Pro Ser Tyr Gly Tyr Glu Pro Met Gly Gly Trp Leu His His Gln
 50 55 60

Ile Ile Pro Val Leu Ser Gln Gln His Pro Pro Thr His Thr Leu Gln
 65 70 75 80

Pro His His His Ile Pro Val Val Pro Ala Gln Gln Pro Val Ile Pro
 85 90 95

Gln Gln Pro Met Met Pro Val Pro Gly Gln His Ser Met Thr Pro Ile
 100 105 110

Gln His His Gln Pro Asn Leu Pro Pro Pro Ala Gln Gln Pro Tyr Gln
 115 120 125

Pro Gln Pro Val Gln Pro Gln Pro His Gln Pro Met Gln Pro Gln Pro
 130 135 140

Pro Val His Pro Met Gln Pro Leu Pro Pro Gln Pro Pro Leu Pro Pro
 145 150 155 160

Met Phe Pro Met Gln Pro Leu Pro Pro Met Leu Pro Asp Leu Thr Leu
 165 170 175

Glu Ala Trp Pro Ser Thr Asp Lys Thr Lys Arg Glu Glu Val Asp
 180 185 190

50

<210> 18
 <211> 206
 <212> PRT
 <213> Homo sapiens

55

<400> 18

60

65

ES 2 819 284 T3

Met Gly Thr Trp Ile Leu Phe Ala Cys Leu Leu Gly Ala Ala Phe Ala
 1 5 10 15

5 Met Pro Leu Pro Pro His Pro Gly Ser Pro Gly Tyr Ile Asn Leu Ser
 20 25 30

10 Tyr Glu Lys Ser His Ser Gln Ala Ile Asn Thr Asp Arg Thr Ala Leu
 35 40 45

15 Val Leu Thr Pro Leu Lys Trp Tyr Gln Ser Met Ile Arg Gln Pro Tyr
 50 55 60

20 Pro Ser Tyr Gly Tyr Glu Pro Met Gly Gly Trp Leu His His Gln Ile
 65 70 75 80

25 Ile Pro Val Leu Ser Gln Gln His Pro Pro Ser His Thr Leu Gln Pro
 85 90 95

30 His His His Leu Pro Val Val Pro Ala Gln Gln Pro Val Ala Pro Gln
 100 105 110

35 Gln Pro Met Met Pro Val Pro Gly His His Ser Met Thr Pro Thr Gln
 115 120 125

40 His His Gln Pro Asn Ile Pro Pro Ser Ala Gln Gln Pro Phe Gln Gln
 130 135 140

45 Pro Phe Gln Pro Gln Ala Ile Pro Pro Gln Ser His Gln Pro Met Gln
 145 150 155 160

50 Pro Gln Ser Pro Leu His Pro Met Gln Pro Leu Ala Pro Gln Pro Pro
 165 170 175

55 Leu Pro Pro Leu Phe Ser Met Gln Pro Leu Ser Pro Ile Leu Pro Glu
 180 185 190

60 Leu Pro Leu Glu Ala Trp Pro Ala Thr Asp Lys Thr Lys Arg Glu Glu
 195 200 205

65 Val Asp
 210

<210> 20
 <211> 142
 <212> PRT
 <213> Bos Taurus

<400> 20

Met Val Leu Ser Ala Ala Asp Lys Gly Asn Val Lys Ala Ala Trp Gly

ES 2 819 284 T3

Val Asp Pro Glu Asn Phe Lys Leu Leu Gly Asn Val Leu Val Val Val
100 105 110

5

Leu Ala Arg Asn Phe Gly Lys Glu Phe Thr Pro Val Leu Gln Ala Asp
115 120 125

10

Phe Gln Lys Val Val Ala Gly Val Ala Asn Ala Leu Ala His Arg Tyr
130 135 140

15

His
145

REIVINDICACIONES

- 5 1. Una sonda para su uso en un método de detección de una afección in vivo que implica hidroxiapatita dental porosa, que comprende: un indicador coloreado conjugado con una proteína seleccionada del grupo: albúmina sérica; cadena beta de C3 del complemento; alfa-1-antitripsina; proteína S100-A9; lactotransferrina; inhibidor de elastasa de leucocitos; antitrombina III; subunidad alfa de hemoglobina; subunidad beta de hemoglobina; subunidad delta de hemoglobina; proteína inducible por prolactina; alfa amilasa 1; SIE de región V-III de cadena kappa de Ig; región C de cadena alfa 2 de Ig; proteína no caracterizada c6orf58; Serpina B3; amelogenina; osteocalcina; y decorina, en donde la proteína se une específicamente a la hidroxiapatita dental porosa.
- 15 2. La sonda para su uso en un método de acuerdo con la reivindicación 1, en donde la sonda comprende además un enlazador para unir el indicador a la proteína; opcionalmente en donde el enlazador es un reticulador heterobifuncional; opcionalmente en donde el reticulador heterobifuncional es N-hidroxisuccinimida éster del ácido succinimidil 4-[N-maleimidometil]ciclohexanocarboxílico (SMCC).
- 20 3. La sonda para su uso en un método de acuerdo con la reivindicación 1, en donde la sonda comprende además un enlazador para unir el indicador a la proteína, en donde el enlazador es succinimidil-6-[β-maleimidopropionamido]hexanoato (SMPH).
- 25 4. La sonda para su uso en un método de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 3, en donde el indicador coloreado se selecciona del grupo que consiste en negro amido 10B, negro azul de naftaleno, negro Sudán B, azul ácido 22, azul ácido 93, azul alción, azul de alizarina, cianina alizarol R, azul alcalino 4B, azul alcalino 5B, azul de anilina WS, azul de antracina SWR, azur A, azur B, azur C, azul básico B, azul básico 9, azul básico 12, azul básico 15, azul básico 17, azul básico 20, azul básico 26, azul celestina B, azul Chicago 4B, cianina de cromoxano R, azul directo 14, azul directo 58, azul Durazol 4R, azul Durazol 8G, azul rápido B, azul rápido Luxol, azul gallamina, hemateína, hematoxilina, carmín índigo, mauveína, azul de metileno, nitro azul tetrazolio, azul de toluidina, azul tripán, azul noche, azul de Nilo, azul de Nilo A, pontamina azul cielo 5B, azul Victoria 4R, azul Victoria B, azul Victoria R, azul agua I, verde ácido, verde ácido 1, verde ácido 5, verde básico 4, verde básico 5, verde brillante, verde de metilo, verde de etilo, verde rápido FCP, galleína, verde Guinea, verde yodo, verde de malaquita, verde naftol B, magenta 0, magenta I, magenta II, magenta III, fucsina ácida, fucsina nueva, fucsina básica, violeta ácido 19, púrpura de anilina, violeta de cromo CG, violeta de etilo, violeta de metilo, violeta de metilo 2B, violeta de metilo 10B, violeta de Hoffman, violeta de Lauth y primulina.
- 35 5. La sonda para su uso en un método de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 4, en donde el indicador coloreado se conjuga con la proteína a través de un tiol de cisteína.
- 40 6. La sonda para su uso en un método de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 5, en donde la proteína es la subunidad alfa de hemoglobina, la subunidad beta de hemoglobina o la subunidad delta de hemoglobina, el indicador coloreado es negro amido y la proteína y el indicador coloreado se unen covalentemente mediante SMCC.
- 45 7. Un kit para su uso en un método de detección de una afección que implica hidroxiapatita dental porosa, que comprende la sonda de una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 6.
- 50 8. El kit para su uso en un método de acuerdo con la reivindicación 7, que comprende además un agente de permeabilización, una o más soluciones de lavado, uno o más componentes secos para preparar una o más soluciones de lavado tras la mezcla con agua, o un agente de remineralización.
- 55 9. El kit para su uso en un método de acuerdo con la reivindicación 8, en donde la una o más soluciones de lavado comprenden iones de dihidrogenofosfato, iones de hidrogenofosfato, iones de fosfato o blanqueador.
- 60 10. El kit para su uso en un método de acuerdo con la reivindicación 8, en donde la una o más soluciones de lavado comprenden iones de magnesio y/o iones de dihidrogenofosfato.
- 65 11. El kit para su uso en un método de acuerdo con la reivindicación 10, en donde la una o más soluciones de lavado comprenden cloruro de magnesio y/o dihidrogenofosfato de sodio; opcionalmente en donde la una o más soluciones de lavado comprenden aproximadamente 1 M de cloruro de magnesio y/o aproximadamente 0,4 M de dihidrogenofosfato de sodio.
12. El kit para su uso en un método de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 8 u 11, en donde el agente de remineralización comprende fluoruro, fosfato de calcio soluble o fosfato de calcio amorfo.

13. La sonda para su uso en un método de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 6 o el kit para su uso en un método de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 7 a 12, en donde dicho método de detección comprende visualizar el indicador coloreado.

5 14. La sonda para su uso en un método de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 6 o 13 o el kit para su uso en un método de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 7 a 13, en donde dicha afección que implica hidroxapatita dental porosa es una afección seleccionada de caries dental, caries dental incipiente, hipomineralización molar/incisiva (MIH), amelogénesis imperfecta, fluorosis dental u otro defecto dental del desarrollo (DDD).

10

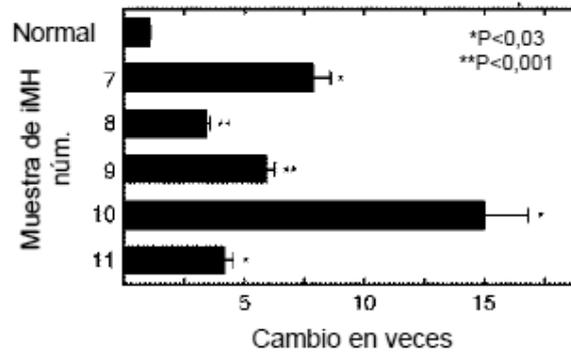


Figura 1.

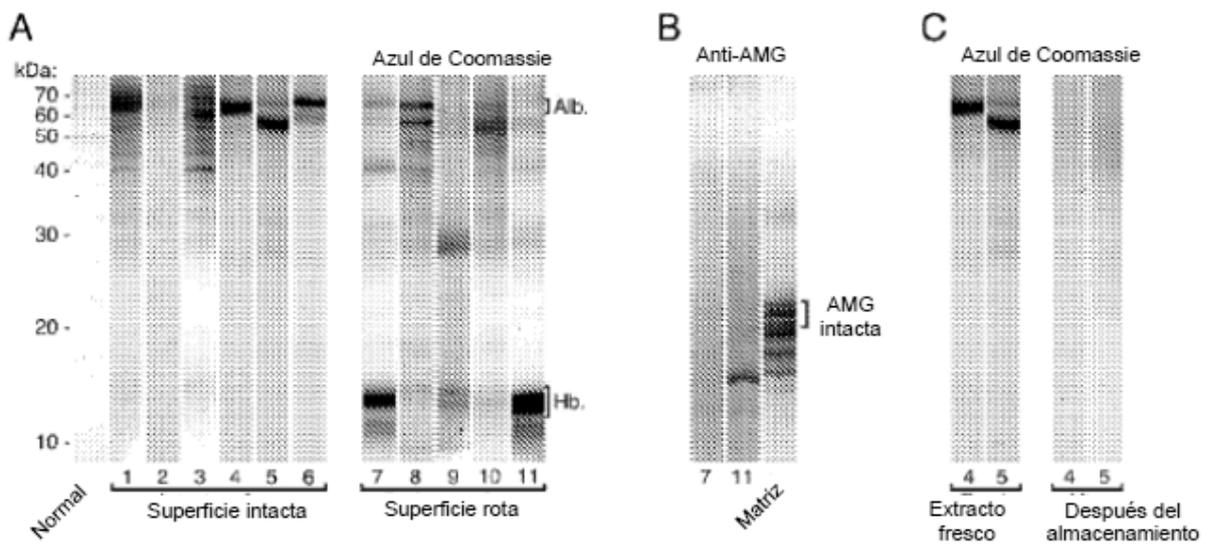


Figura 2.

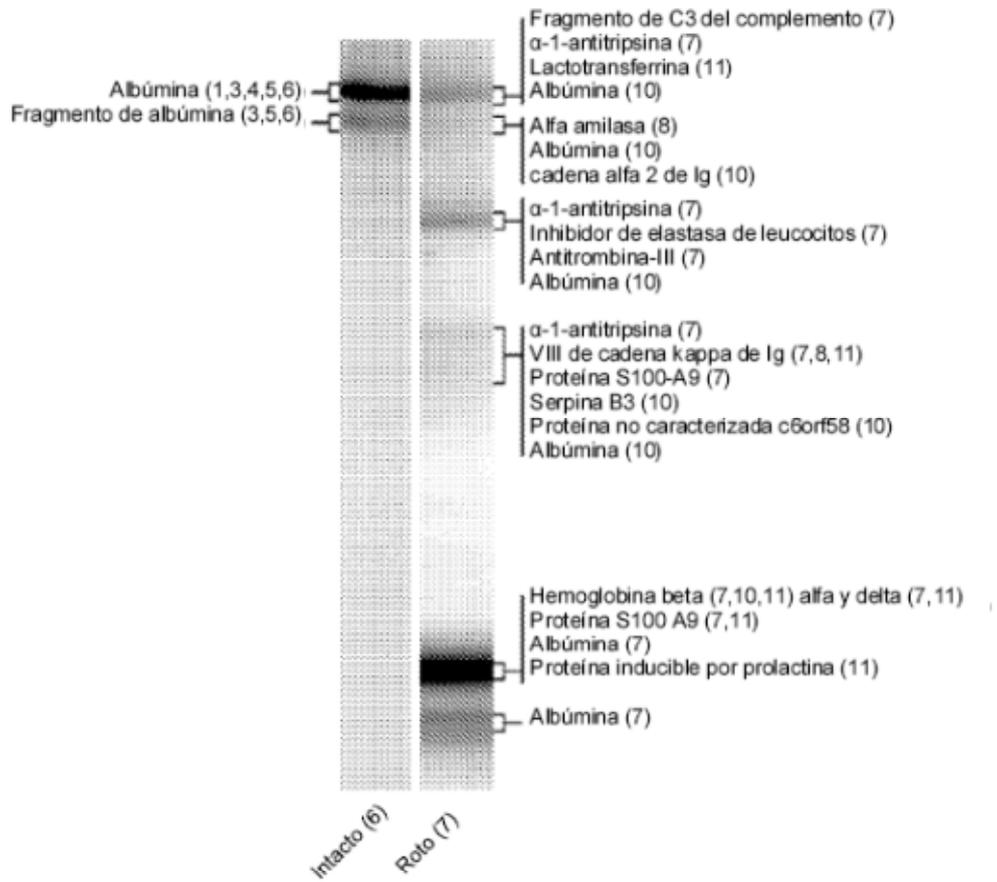


Figura 3.

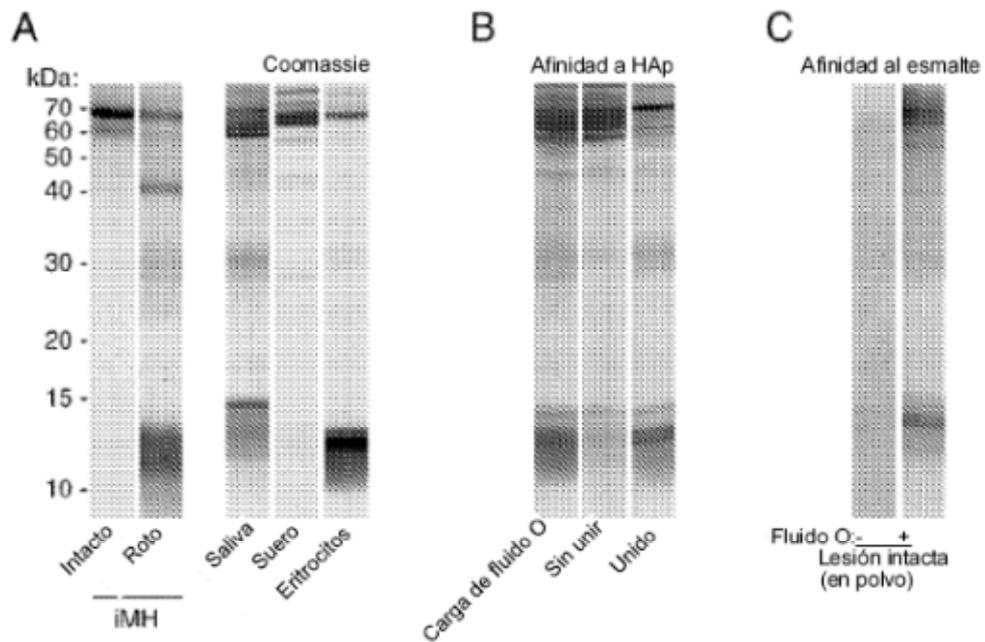


Figura 4.

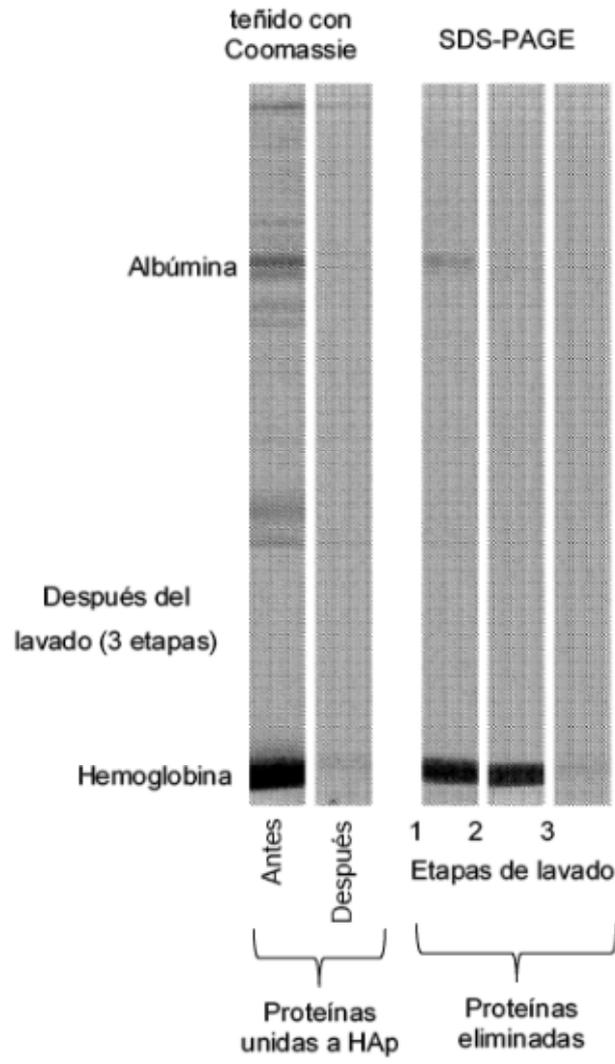


Figura 5.

MKQVTFISLLFLFSSAYSRGVFRDAHKSEVAHRFKDLGEEFKALVLI AFAQYLQQCF
 EDHVKLVNEVTEFAKTCVADESAENCDKSLHTLFGDKLCTVATLRETYGEMADCCAKQEP
 ERNECFIQHKDONENLPRLVREVDVMCTAFHDNEETFLLKYLVEIARRHPYFYAFELLF
 FAKRYKAAFTECCQAADKAACLLPKLDLDRDEGKASSAKQRLKCASLQKFGERAFKAWAV
 ARLSQRFPKAEFAEVSKLVTDLTKVHTECCHGDLLECADDRADLAKYICENQDSISSKLE
 ECCEKPLLEKSHCIAEVENDEMPADLP SLAADFVESKDVCKNYAEAKDVFGLGMFLYFYAR
 RHPDYSVVLLRLAKTYETTLEKCCAAADPHECYAKVFDEFKPLVEEPQNLIKQNCLEFE
 QLGEYKFNALLVRYTKKVPQVSTPTLVEVSRNLGKVGSKCKKHPEAKRMPCAEDYLSV
 LNQLCVLHEKTPVSDRVTKCCTESLVNRRFCFSALEVDETYVPKEFNAETFTFHADICTL
 SEKERQIKKQATLVELVKHKPKATKEQLKAVMDDFAAFVEKCKKADDKETCFAEEGKLV
 AASQAALGL

Figura 6 (SEQ ID NO: 1; registro en SwissProt P02768; ALBU_ albúmina sérica humana OS = Homo sapiens GN = ALB PE = 1 SV = 2).

MGPTSGPSLLLLLTHLPLALGSPMYSIITPNILRLESEETMVL EAHDAQGDVPVTVVH
 DFFGKLVLSSEKTVLTPATNHMGNVTFIIPANREFKSEKGRNKFVTVQATFGTQVVEKV
 VLVSLQSGYLFIQTDKTIYTPGSTVLYRIFTVNHKLLPVGRTVMVNIENPEGIPVKQDSL
 SSQNQLGVLPLSWDIPELVNMGQWKIRAYYENSPOQVVFSTEFENKEYVLPSEFVIVEPTE
 KFYIYNEKGLEVTITARFLYGGKVEGTAFFVIFGIQDGEQRISLPESLKRIPIEDGSSEV
 VLSRKVLLDGVQNPRAEDLVGKSLYVSATVILHSGSDMVQAERSGIPIVTSPYQIHFTKT
 PKYFKPGMPFDLMVFVTNPDGSPAYRVPVAVQGEDTVQSITQGDGVAKLSINTHPSQKPL
 SITVRTKKQELSEAEQATRIMQALPYSTVGNSNNYLHLSVLRTELRFGETLNVNPLLRMD
 RAHEAKIRYYTYLIMNKGRLLKAGRQVREPQGDVVLPLSITTDFLPSFRLVAYTYLIGA
 SGQREVVDADVVDVKDSCVGLSVVKSQSEDRQVPVGGQMTLKI EGDHGARVVLVAVDK
 GVFVLNKKNKLTQSKINDVVEKADIGCTPGSGKDYAGVFS DAGLTFTSSSGQQAQRAEL
 QCPQPAARRRRSVQLTEKRMKVGKYPKELRKCCEDGMRENPMRFSQRRTRFISLGEAC
 KKVFLDCCNYITELRQHPASHLGLARSNLDEDTIAEENIVSRSEFPESWLNWVEDLKE
 PPKNGISTKLMNIFLKDSITWEILAVSMSDKKGCVADPFVTVMQDFIDLRIPYSVV
 RNEQVEIRAVLYNYRQNELKVRVELLHNPAFC SLATTKRRHQQTVTIPPKSSLSVPYVI
 VPLKTGLQEVVKAAYVHHFISDGVKRLKVVPEGIRMNKTVAVRTLDPERLGRGVQKE
 DIPPADLSDQVPDTESETRILLQGTQVAVQMTEDAVDAERLKHILVTPSGCGEQNMIGMTP
 TVIAVHYLDETEQWEKFGLEKROGALELIKKGTYQQLAFRQPSAFAAFVKRAFSTWLT
 YVVKVFLAVNLIAIDSQVLCGAVKWLILEKQKPDGVFQEDAPVIHQEMIGGLRNNNEKD
 MALTAFLVLSLOEAKDICEEQVNSLPGSITKAGDFLEANYMNLQRSYTVAIAGYALACMG
 RLKGPLLNKFLTTAKDKNRWEDPGKQLYNVEATS YALLALLQLKDFDFVPPVVRWLNQQR

YYGGYGSTQATFMVFQALAQYQKDAPDHQELNLDVSLQLFSRSSKITHRIHWESASLLR
 SEETKENEGFTVTAEGKGGTLSVVTMYHAKAKDQLTCNKFDLKVTIKPAPETEKRPQDA
 KNTMLEICTRYRGDQDATMSILDISMMTGFAPDTDDLKQLANGVDRIYSKYELDKAFSD
 RNTLIYLDKVVSHSEDDCLAFKVHQYFNVELIQFGAVKVYAYYNLEESCTRFYHPEKEDG
 KINKLCRDELRCRAEENCFTQKSDDKVTLEERLDKACEBGVDYVYKTRIVKVVQLSNDFDE
 YIMALEQTIKSGSDEVQVGGQRTFISPIKCREALKLEEKKHLYLMWGLSSDFWGEKPNLSY
 IIGKDTWVEHWPEEDECQDEENQKQCQDLGAFTESMVVFGCPN

Figura 7 (SEQ ID NO: 2; registro en SwissProt P01024; CO3_C3 del complemento humano OS = Homo sapiens GN = C3 PE = 1 SV = 2).

MPSSVSWGILLLAGLCCLVFVSLAEDPQGDAAQKTDTSHHQDQDHPTFNKITPNLAEFAPS
 LYRQLAHQSNSTNIFFSPVSIATAFAMLSLGTKADTHDEIILEGLNFNLTETPEAQIHEGF
 QELLRTLNQPSQLQLTTGNGFLFLSEGLKLVDFLEDVKKLYHSEAFTVNFQDTEEAKKO
 INDYVEKGTQGKIVDLVKELDRDITVFALVNYIFFKKGWEREFVVKDTEEEDFHVDQVTTV
 KVPMMKRLGMFNIQHCKKLSSWVLLMKYLGNATAIFFLPDEGKLQHLLENELTHDIITKFL
 ENEDRRSASLHLPKLSITGTYDLKSVLGGQLGITKVFSGADLSGVTEEAPLKLSKAVHKA
 VLTIDEKGTAAAGAMFLEAIPMSIPPEVKFNKPFVFLMIEQNTKSPLEMGKVVNPTQK

Figura 8 (SEQ ID NO: 3; registro en SwissProt P01009; A1AT_ alfa-1-antitripsina humana OS = Homo sapiens GN = SERPINA1 PE = 1 SV = 3).

MTCKMSQLEARNIETIINTFHQYSVKLGHPDTLNQGEFKELVRKDLQNFLLKKNKNEKVIE
 HIMEDLDTNADKQLSFEEFIMLMARLTWASHEKMHEGDEGPGHHHKPGLGEGTP

Figura 9 (SEQ ID NO: 4; registro en SwissProt P06702; S10A9_Proteína humana S100-A9 OS = Homo sapiens GN = S100A9 PE = 1 SV = 1).

MKLVFLVLLFLGALGLCLAGRRRSVQWCAVSQPEATKCFQWQRNMRKVRGPPVSCIKRDS
 PIQCIQAI AENRADAVTL DGGFIYEAGLAPYKLRPVAAEVYGTERRQPRTHYYAVAVVKKG
 GSFQLNELQGLKSCHTGLRRTAGWNVFIGTLRPFNLWTFPEEPIEAAVARFFSASCVPGA
 DKQQFPNLCRLCAGTGENKCAFSSQEPYFSYSGAFKCLRDGAGDVAFIRESTVFEDLSDE
 AERDEYELLCPDNTRKPVDFKDKCHLARVPSHAVVARSVNGKEDAIWNLLRQAQEKFGKO
 KSKPKFQLFGSPSGKDLLFKDSAIGFSRVPPRIDSGLYLGSGYFTAIONLRKSEEEVAAR

RARVVWCAVGEQELRKCQNSGLSEGSVTCSSASTTEDCIALVLKGEADAMSLDGGYVYT
 AGKCGLVFVLAENYKSSQSSDPDFNCVDRPVEGYLAVAVVRRSDTSLTWNSVKGKKSCHT
 AVDRTAGWNIPMGLLFNQTSCKFDEYFSSQSCAPGSDPRSNLCALCIGDEQGENKCVFNS
 NERYYGYTGAFRCLAENAGDVAFVKDVTVLQNTDGNNEAWAKDLKLADFALLCLDGKRR
 PVTEARSCHLAMAPNHAVVSRMDKVERLKQVLLHQQAKFGRNGSDCFDKFCLEFQSETKNL
 LFNDNTECLARLHGKTTYEKYLGPOYVAGITNLKCCSTSPILLEACEFLRK

Figura 10 (SEQ ID NO: 5; registro en SwissProt P02788;

TRFL_Lactotransferrina humana OS = Homo sapiens GN = LTF PE = 1 SV =
 6)

MEQLSSANTRFALDLFLALSENNPAGNIFISPFSSISAMAMVFLGTRGNTAAQLSKTFHF
 NTVEEVHSRFPQSLNADINKRGASYILKLANRLYGEKTYNFLPEFLVSTQKTYGADLASVD
 FQHASEDARKTINQWVKGQTEGKIPELLASGMVDNMTKLVLVNAIYFKGNWKDKFMKEAT
 TNAPPRLNKDRKTVKMMYQKKKPAYGYIEDLKCRVLELPYQGEELSMVILIFDDIEDES
 TGLKKIEEQLTLEKLHEWTKPENLDFIEVNVSLFRFKLEESYTLNSDLARLGVQDLFNSS
 KADLSGMSGARDIFISKIVHKSFVEVNEEGTEAAAATAGIATFCMLMPEENFTADHFFLE
 FIRHNSGSIILFLGRFSSP

Figura 11 (SEQ ID NO: 6; registro en SwissProt P30740; ILEU_inhibidor de
 elastasa de leucocitos humanos OS = Homo sapiens GN = SERPINB1 PE = 1
 SV = 1).

MYSNVIGTVTSGKRKVYLLSLLLIGFWDCVTCGSPVDICTAKPRDIPMNPNCIYRSPEK
 KATEDEGSEQKIPEATNRKRVWELSKANSRFATTFYQHLADSKNDNDNIFLSPLSISTAFA
 MTKLGACNDTLQQLMEVFKFDTISEKTSQIHFFFAKLNCRLYRKANKSSKLVSANRFLG
 DKSLTFNETYQDISELVYGAKLQPLDFKENAEQSRAAINKWVSNKTEGRITDVIPSEAIN
 ELTVLVLVNTIYFKGLWKSFKSPENTRKELFYKADGESCSASMMYQEGKFRYRRVAEGTQ
 VLELPFKGDDITMVLILFKPEKSLAKVEKELTPEVLQEWLDELEEMMLVVMHMPRFIEDG
 FSLKEQLQDMGLVLDLFSPEKSKLPGIVAEGRDDLYVSDAFHKAFLEVNEEGSEAAAATAV
 VIAGRSINPNRVTFKANRPFLVFIREVPLNTIIFMGRVANFCVK

Figura 12 (SEQ ID NO: 7; registro en SwissProt P01008; ANT3_Antitrombina
 III humana OS = Homo sapiens GN = SERPINC1 PE = 1 SV = 1).

MVLSPADKTNVKAAWGKVGAGHAGEYGAEALERMFLSFPTTKTYFPHFDLSHGSAQVKGHG
 KKVADALTNVAHVDDMPNALSALSDLHAHKLRVDPVNFKLLSHCLLVTLAAHLPAEFTF
 AVHASLDKFLASVSTVLTSKYR

Figura 13 (SEQ ID NO: 8; registro en SwissProt P69905; HBA_subunidad alfa de hemoglobina humana OS = Homo sapiens GN = HBA1 PE = 1 SV = 2).

MVHLTPEEKSAVTALWGKVNVDEVGGEALGRLLVVYPWTQRFFESFGDLSTPDAVMGNPK
 VKAHGKKVLGAFSDGLAHLDNLKGTFATLSELHCDKLHVDNFENFRLGNVLCVLAHFFG
 KEFTPPVQAAYQKVVAGVANALAHKYE

Figura 14 (SEQ ID NO: 9; registro en SwissProt P68871; HBB_subunidad beta de hemoglobina humana OS = Homo sapiens GN = HBB PE = 1 SV = 2).

MVHLTPEEKTAVNALWGKVNVDAVGGEALGRLLVVYPWTQRFFESFGDLSSPDAVMGNPK
 VKAHGKKVLGAFSDGLAHLDNLKGTFSQLSELHCDKLHVDNFENFRLGNVLCVLAARNFG
 KEFTPMQAAYQKVVAGVANALAHKYE

Figura 15 (SEQ ID NO: 10; registro en SwissProt P02042; HBD_subunidad delta de hemoglobina humana OS = Homo sapiens GN = HBD PE = 1 SV = 2).

MRLQLLFRASPATLLLVLCQLGANKAQDNTRKIIKNFCDIKSVRENDEVTAVLAVQT
 ELKECMVVKTYLISSIFLQGAFFNYKYTACLCDDNPKTFYWDFYTNRTVQIAAVVDVIREL
 GICPDAAVPIKNNRFYTIIEILKVE

Figura 16 (SEQ ID NO: 11; registro en SwissProt P12273; PIP_proteína humana inducible por prolactina OS = Homo sapiens GN = PIP PE = 1 SV = 1).

MKLFWLLFTIGFCWAQYSSNTQQGRTSIVHLFEWRWVDIALECERYLAPKGFQGVQVSPF
 NEKVAIHNPFRPWERYQPVSYKLCSTRSGNEDEFNMVTRCANNVGVRIYVDAVINHMCGN
 AVSAGTSSSTCGSYFNPGSRDFPAVPYSGWDFNDGKCKTGSGDIENYNDATQVRDCRLSGL
 LDLALGKDYVRSKIAEYMNHLIDIGVAGFRIDASKHMPGDIAKAILDKLHNLNSNWFPEG
 SKPFIYQEVIDLGGPEIKSSDYFGNGRVTEFKYGAKLGTVIRKWNGEKMSYLNWGEQGWG

FMPSDRALVFVDNHDNQRGHGAGGASILTFWDARLYKMAVGFMLAHPYGFTRVMSSYRWP
 RYFENGKVDNDWVGPPNDNGVTKEVTINPDTCGNDWVCEHRWRQIRNMVFNFRNVVDGQP
 FTNWDNGSNQVAFGRGNRGFIVFNDDWTFSLTLQTGLPAGTYCDVISGDKINGNCTGI
 KIYVSDDGKAHFSISNSAEDPFIAIHAESKL

Figura 17 (SEQ ID NO: 12; registro en SwissProt P04745; AMY1_Alfamylasa 1 humana OS = Homo sapiens GN = AMY1A PE = 1 SV = 2).

EIVLTQSPGTLTSLSPGERATLSCRASQSVNSYLAWYQQKPGQAPRLLIYGASSRATGIP
 DRFSGSGSGTDFTLTISRLEPDDFAVYYCQQYGGSSPQTFGGQSKVEIKR

Figura 18 (SEQ ID NO: 13; registro en SwissProt P01620; KV302_SIE de región V-III de la cadena kappa de Ig humana OS = Homo sapiens PE = 1 SV = 1).

ASPTSPKVFPLSLDSTPQDGNVVVACLVQGFPPQEPLSVTWSESGQNVNTARNFPPSQDAS
 GDLYTTSSQLTLPATQCPDGKSVTCHVKHYTNFSQDVTVPVPPFPFCCHPRLSLHRFA
 LEDLLLGSEANLTCTLTGLRDASGATFTWTPSSGKSAVQGFPERDLGCGYSVSSVLPGCA
 QPWNHGETFTCTAAHPELKTPLTANITKSGNTFRPEVHLLFPFSEELALNELVTLTCLAR
 GFSPKDVLRWLQGSQELPREKYLTWASRQEPSQGTTFFAVTSILRVAEDWKKGDTFSC
 MVGHEALPLAFTQKTIDRMAGKPTHVNVSVVMAEVDGTCY

Figura 19 (SEQ ID NO: 14; registro en SwissProt P01877; IGHA2_región C de cadena alfa 2 de Ig humana OS = Homo sapiens GN = IGHA2 PE = 1 SV = 3).

MAFLPSWVCVLVGSFSASLAGTSNLSETEPPLWKESPGQLSDYRVENSMYIINPWYLER
 MGYKIIILNQARYFAKFAPDNEQNILWGLPLQYGWQYRTGRLADPTRRTNCGYESGDHM
 CISVDSWWADLNYFLSSLPFLAAVDSGVMGISSDQVRLPPPKNERKFCYDVSSCRSSFP
 ETMKNWNTFYQYLQSPFSKFDLLKYLWAAHTSTLADNIKSFEDRYDYYSKAEAHFERSW
 VLAVDHLAAVLFPTTLIRSYKFQKGMPPRIILLNTDVAPFISDFTAFQNVVLLNMLDNV
 DKSIGYLCTEKSNVYRDHSESSRSYGNNS

Figura 20 (SEQ ID NO: 15; registro en SwissProt Q6P5S2; CF058_Proteína humana no caracterizada C6orf58 OS = Homo sapiens GN = C6orf58 PE = 1 SV = 2).

MNSLSEANTKFMFDL FQQPRKSKENNIFYSPI SITSALGMVLLGAKDNTAQQIKKVLHFD
 QVTENTTGKAATYHVDRSGNVHHQFQKLLTEFNKSTDAYELKIANKLFGKTYLFLQEYL
 DAIKKFYQTSVESVDFANAPEESRKKINSWVESQTNEKIKNLIPEGNIGSNTTLVIVKAI
 YFKGQWEKKFNKEDTKEEFWPNKNTYKSIQMMRQYTSFHFASLEDVQAKVLEIPYKGGD
 LSMIVLLPNEIDGLQKLEEKLTAEKLMWNTSLQNMRETRVDLHLPRFKVEESYDLKDTLR
 TMGMVDIFNGDADLSGMTGSRGLVLSGVLHKAFVEVTEEGAEAAAACAVVGFSSPTSTN
 EEFHCNHPFLFFIRQNKTNLSILFYGRFSSP

Figura 21 (SEQ ID NO: 16; registro en SwissProt P29508; SPB3_Serpina B3 humana OS = Homo sapiens GN = SERPINB3 PE = 1 SV = 2).

MGTWILFACLLGAAFAMPLPPHPGHPGYINFSYEVLTPLKWKYQSIRPPYPSYGYEPMGGW
 LHHQIIPVLSQQHPPTHTLQPHHHIPVVPAQQPVIPQQPMMPVPGQHSMTPIQHHQPNLP
 PPAQQPYQPQPVQPQPHQPMQPPVHFMQPLPPQPPLPPMFPMQPLPPMLPDLTLEAWP
 STDKTKREEVD

Figura 22 (SEQ ID NO: 17; registro en SwissProt Q99217; AMELX_Amelogenina humana, isoforma X OS = Homo sapiens GN = AMELX PE = 1 SV = 1).

MGTWILFACLVGAAFAMPLPPHPGHPGYINFSYENSHSQAINVDRIALVLTPLKWKYSMI
 RPPYSSYGYEPMGGWLHHQIIPVVSQQHPLTHTLQSHHHIPVVPAQQPRVRQQALMPVPG
 QQSMTPTQHHQPNLPLPAQQPFQPPVQPPHQPMPQPPVQPMQPLLPQPPLPPMFPPLR
 PLPPILPDLHLEAWPATDKTKQEEVD

Figura 23 (SEQ ID NO: 18; registro en SwissProt Q99218; AMELY_Amelogenina humana, isoforma Y OS = Homo sapiens GN = AMELY PE = 2 SV = 2).

MGTWILFACLLGAAPAMPLPPHPGSPGYINLSYEKSHSQAINTRDTALVLTPLKQYQSMI
RQPYPSYGYEPMGGWLHHQIIPVLSQQHPPSHTLQPHHHLEVVPAQQPVAPQQPMPVPG
HHSMTPTQHHQPNIPPSAQQPFQPFQQAIPPQSHQPMQFQSPLHPMQPLAPQPPLPPL
FSMQPLSPILPELPLEAWPATDKTKREEVD

Figura 24 (SEQ ID NO: 19; registro en SwissProt P63277; AMELX_MOUSE Amelogenina, isoforma X
OS = Mus musculus GN = Amelx PE = 2 SV = 1).

MVLSAADKGNVKAANGKVGGHAAEYGAEALERMFLSFPTTKTYFPHFDLSHGSAQVKGHG
AKVAAALTKAVEHLDDIPGALSELSDLHAHKLKRVDPVNFKLLSHSLLVTLASHLPSDFTF
AVEASLDKFLANVSTVLTSKYR

Figura 25 (SEQ ID NO: 20; registro en SwissProt P01966; HBA_BOVIN subunidad alfa de hemoglobina
OS = Bos taurus GN = HBA PE = 1 SV = 2).

MLTAEKAAVTAFWGKVKVDEVGGEALGRLLVVYPWTQRFFESFGDLSTADAVMNNPKVK
AHGKKVLDSPSNGMKHLDDLKGTFAALSELHCDKLVDPENFKLLGNVLVVVVLARNFGKE
FTPVLQADFQKVVAGVANALAHRYH

Figura 26 (SEQ ID NO: 21; registro en SwissProt P02070; HBB_BOVIN Subunidad beta de hemoglobina
OS = Bos taurus GN = HBB PE = 1 SV = 1).

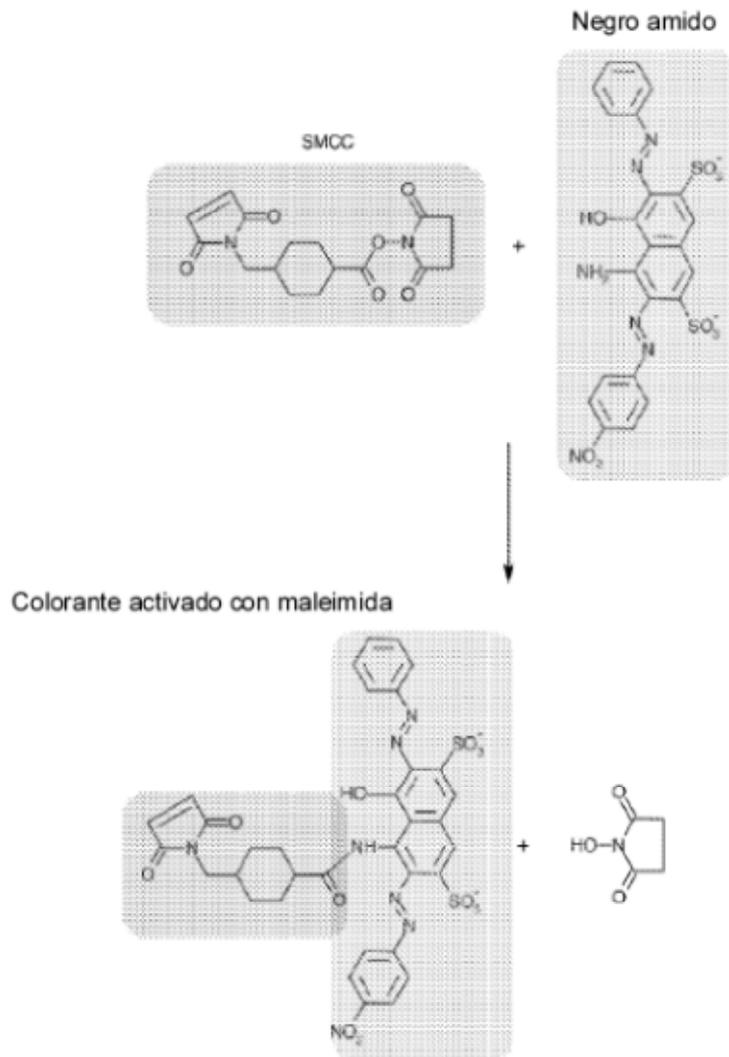


Figura 27. Producción de un indicador coloreado activado por maleimida.

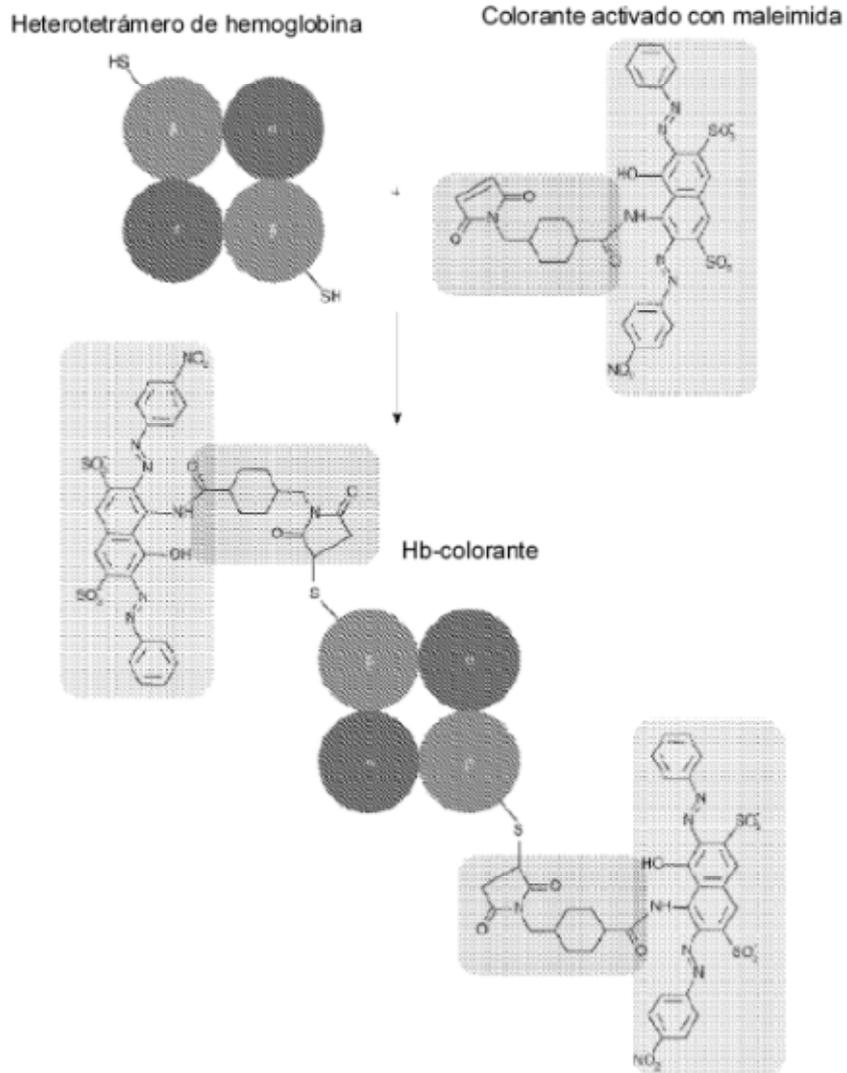


Figura 28. Producción de una proteína conjugada con un indicador coloreado.

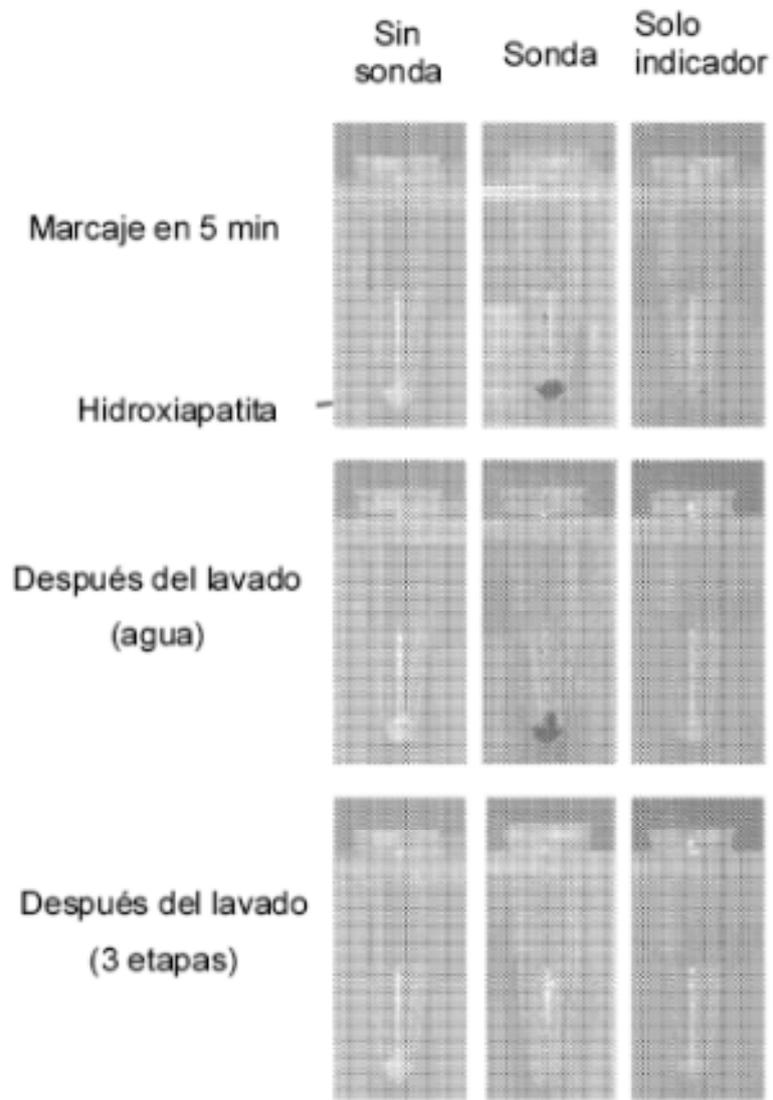


Figura 29.

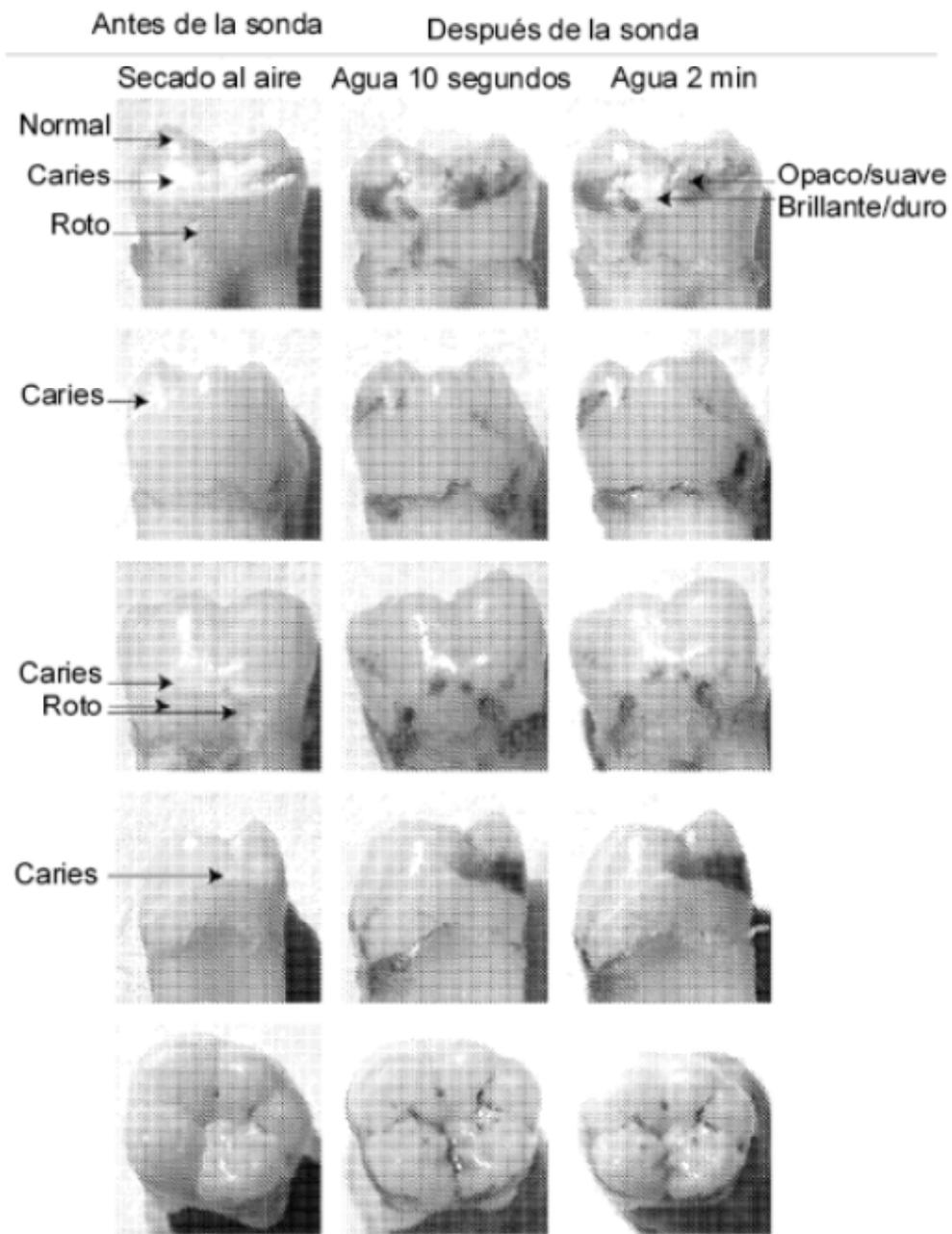


Figura 30.

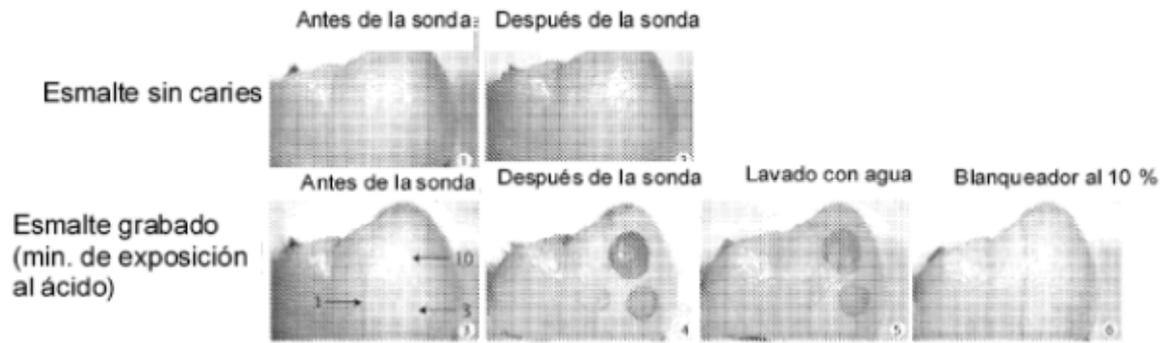


Figura 31.

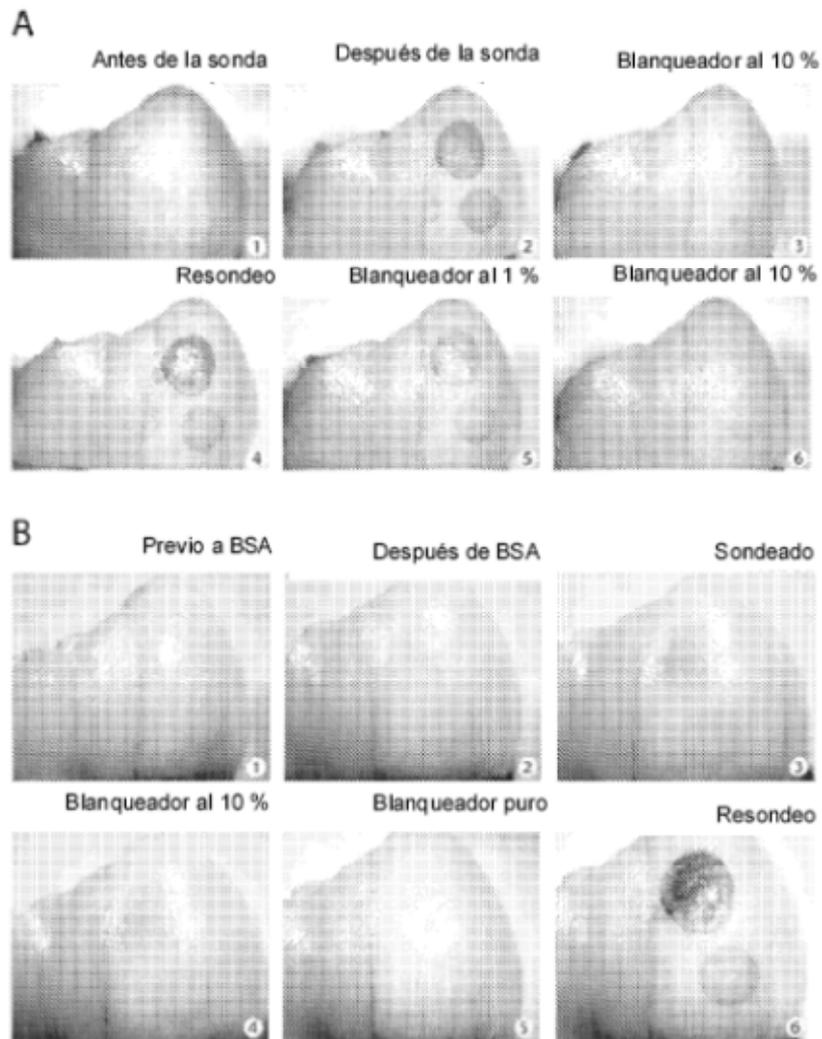


Figura 32.

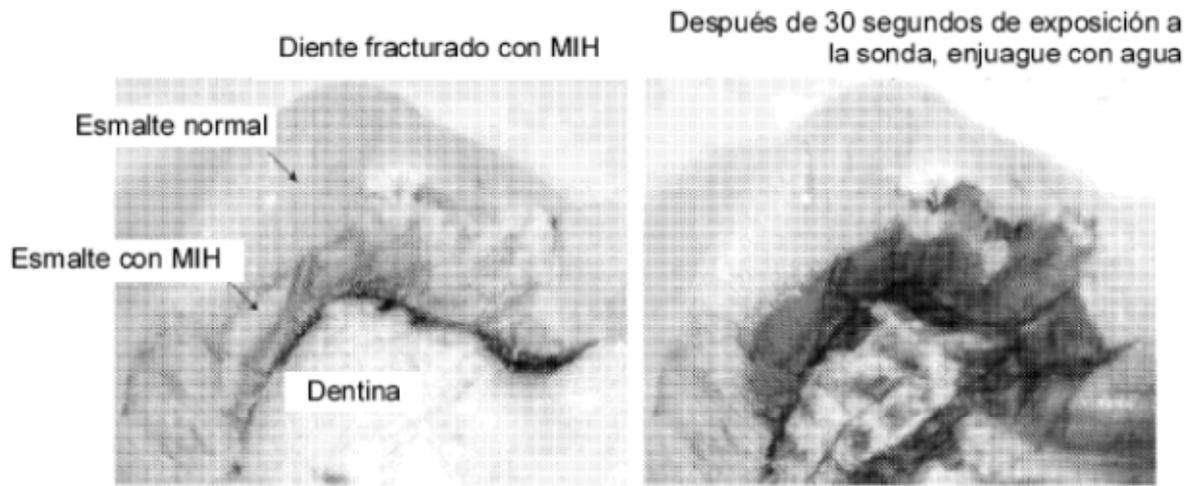


Figura 33.

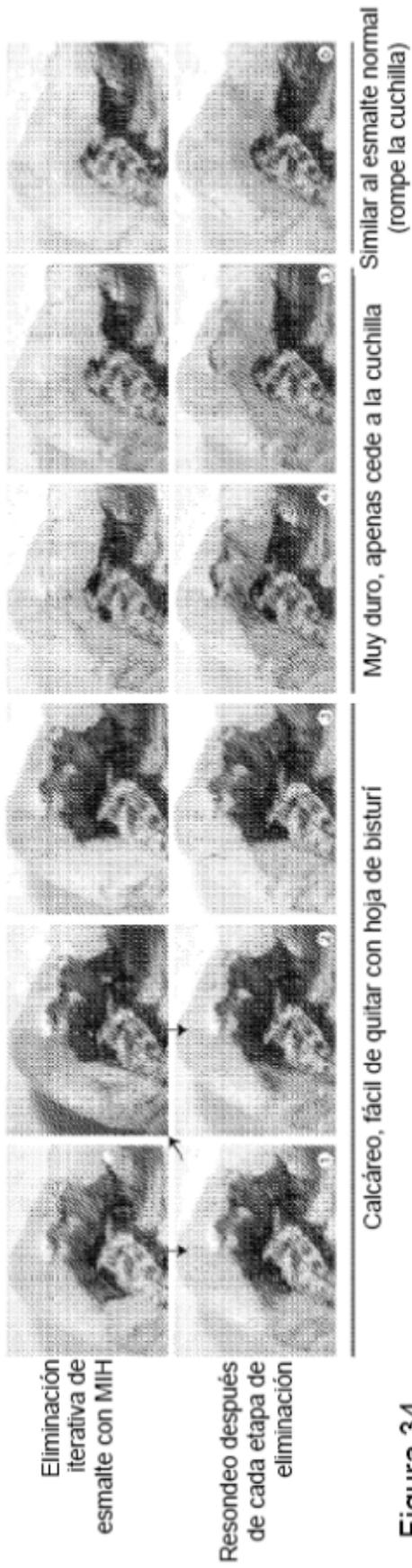


Figura 34.

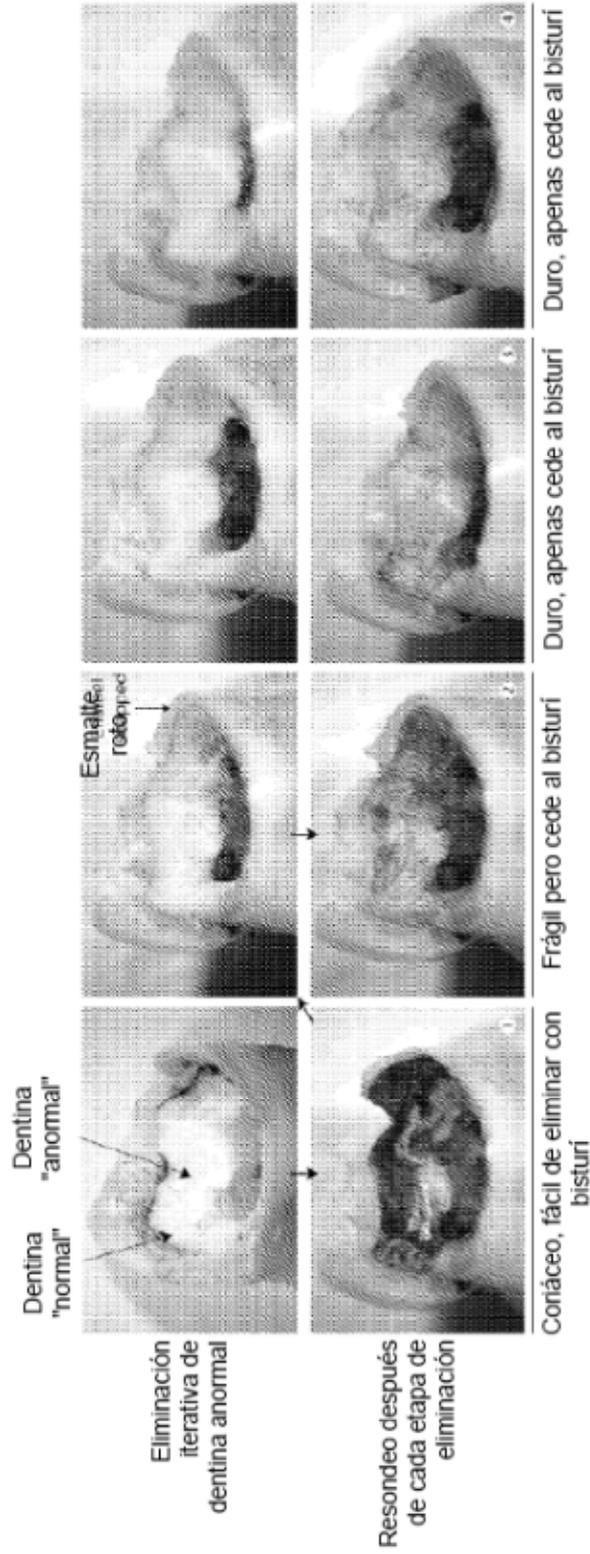


Figura 35.

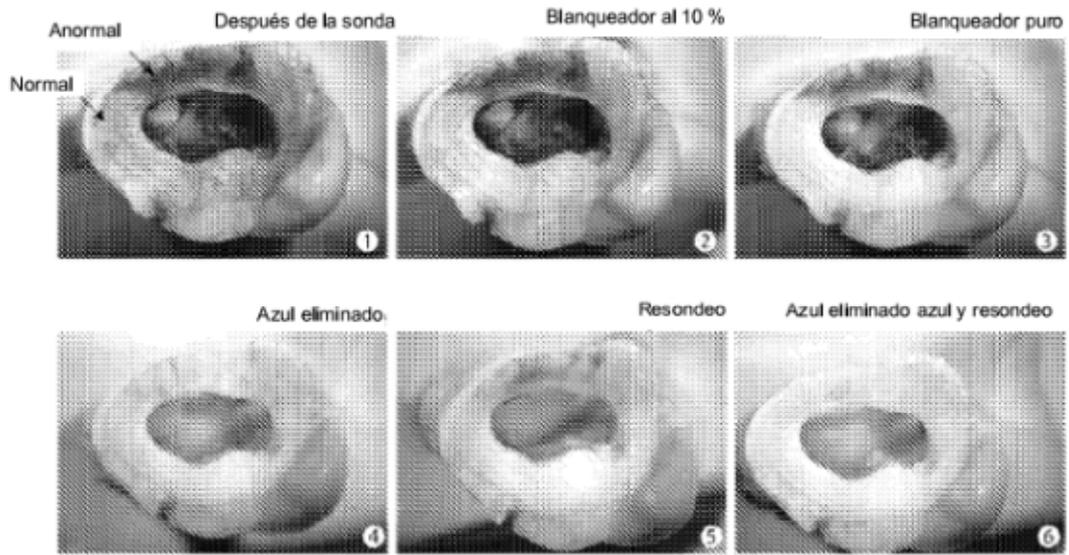


Figura 36.

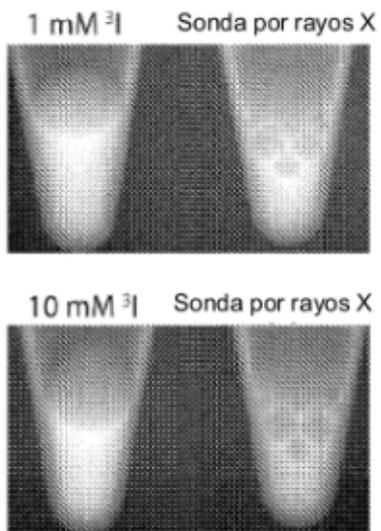


Figura 37.

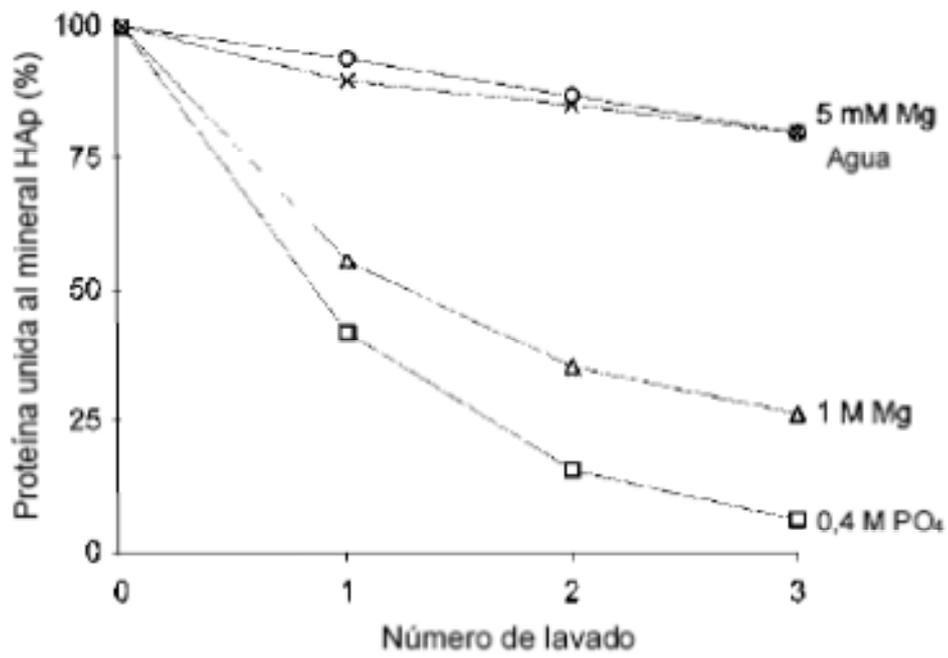


Figura 38.

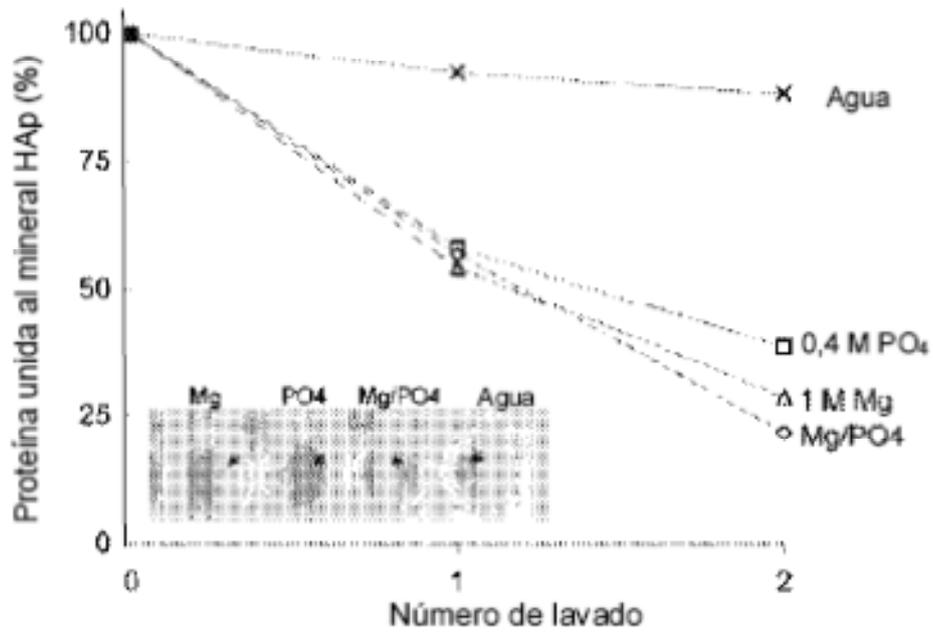


Figura 39.

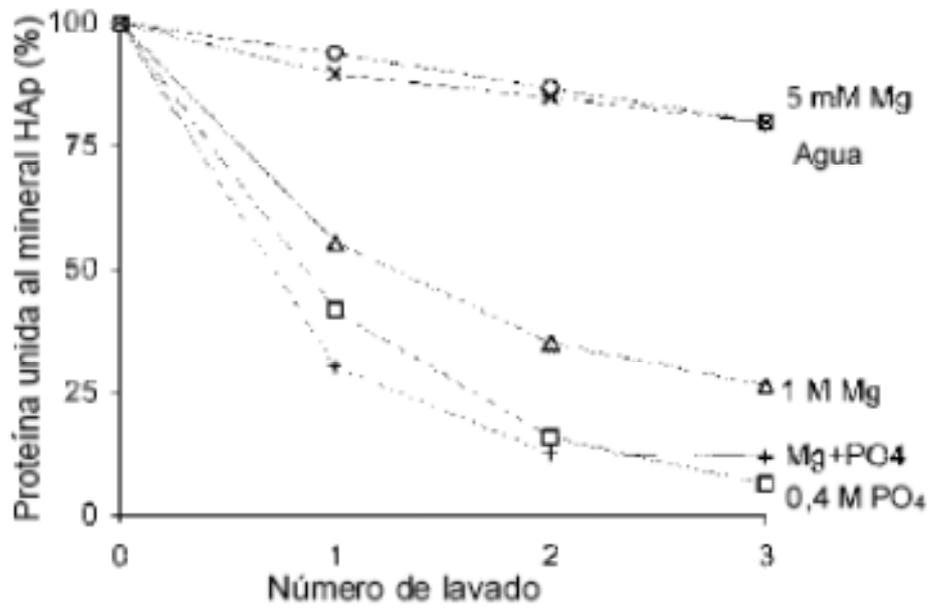


Figura 40.

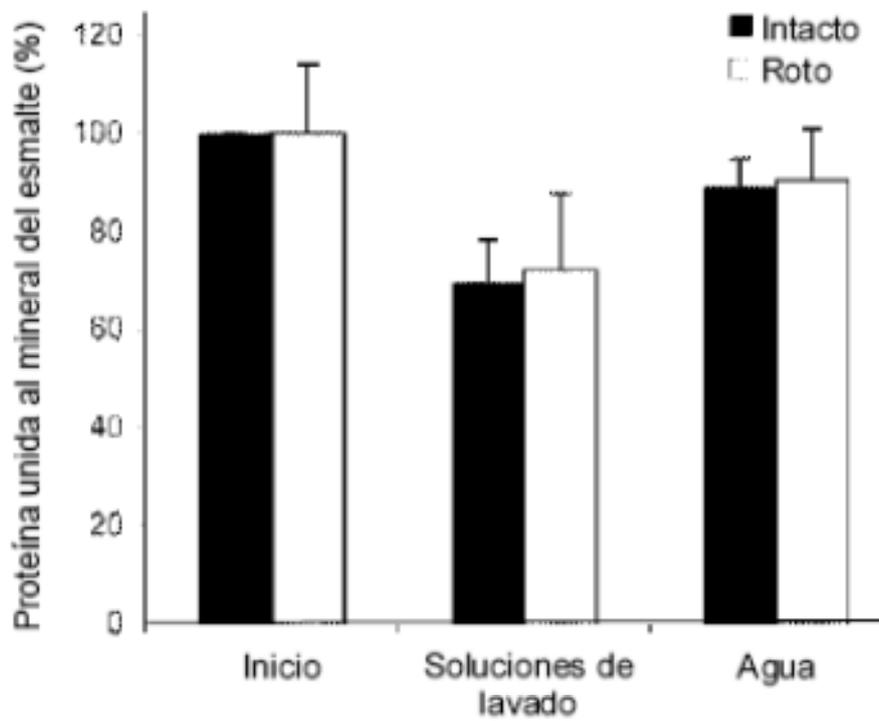


Figura 41.

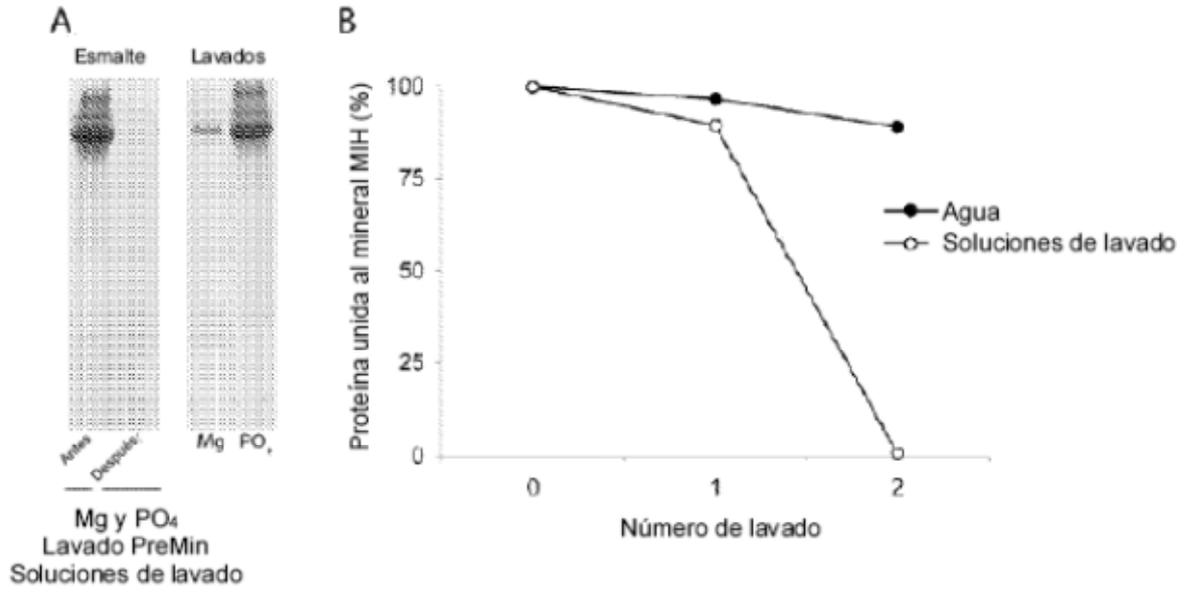


Figura 42.