

(12) **FASCÍCULO DE PATENTE DE INVENÇÃO**

(22) Data de pedido: 1998.03.13	(73) Titular(es): THE UNIVERSITY OF MELBOURNE
(30) Prioridade(s): 1997.03.13 AU PO566297	GRATTAN STREET PARKVILLE, VICTORIA 3052
(43) Data de publicação do pedido: 2000.01.05	AU
(45) Data e BPI da concessão: 2013.08.21 208/2013	(72) Inventor(es): ERIC C. REYNOLDS AU
	(74) Mandatário: MANUEL ANTÓNIO DURÃES DA CONCEIÇÃO ROCHA PT AV LIBERDADE, Nº. 69 - 3º D 1250-148 LISBOA

(54) Epígrafe: **COMPLEXOS DE CÁLCIO E FOSFOPEPTÍDEOS**

(57) Resumo:

FOSFOPEPTÍDEOS CONTENDO O MOTIVO DE SEQUÊNCIA DE GRUPOS SER(P), SER(P)-SER(P)-SER(P)-GLU-GLU-, PODEM ESTABILIZAR O SEU PRÓPRIO PESO DE FOSFATO DE CÁLCIO AMORFO (ACP) $[CA_3(PO_4)_{1,87}(HPO_4)_{0,2} \times H_2O]$ E FLUORETO FOSFATO DE CÁLCIO AMORFO (ACFP) $[CA_8(PO_4)_5 F \times H_2O]$. AS FASES AMORFAS ESTABILIZADAS PELOS FOSFOPEPTÍDEOS SÃO UM EXCELENTE VEÍCULO DE FORNECIMENTO PARA CO-LOCALIZAR CA, F E FOSFATO, NA SUPERFÍCIE DO DENTE NUMA FORMA AMORFA DE LIBERTAÇÃO LENTA, PRODUZINDO UMA EFICÁCIA ANTICÁRIE SUPERIOR. ESTAS FASES AMORFAS ESTABILIZADAS PELOS FOSFOPEPTÍDEOS SÃO TAMBÉM ÚTEIS COMO SUPLEMENTOS DE DIETA, PARA AUMENTAR A BIODISPONIBILIDADE DO CÁLCIO E PARA AJUDAR A PREVENIR DOENÇAS ASSOCIADAS A DEFICIÊNCIAS DE CÁLCIO.

RESUMO

"COMPLEXOS DE CÁLCIO E FOSFOPEPTÍDEOS"

Fosfopeptídeos contendo o motivo de sequência de grupos Ser(P), Ser(P)-Ser(P)-Ser(P)-Glu-Glu-, podem estabilizar o seu próprio peso de fosfato de cálcio amorfo (ACP) $[\text{Ca}_3(\text{PO}_4)_{1,87}(\text{HPO}_4)_{0,2} \times \text{H}_2\text{O}]$ e fluoreto fosfato de cálcio amorfo (ACFP) $[\text{Ca}_8(\text{PO}_4)_5 \text{ F} \times \text{H}_2\text{O}]$. As fases amorfas estabilizadas pelos fosfopeptídeos são um excelente veículo de fornecimento para co-localizar Ca, F e fosfato, na superfície do dente numa forma amorfa de libertação lenta, produzindo uma eficácia anticárie superior. Estas fases amorfas estabilizadas pelos fosfopeptídeos são também úteis como suplementos de dieta, para aumentar a biodisponibilidade do cálcio e para ajudar a prevenir doenças associadas a deficiências de cálcio.

DESCRIÇÃO

"COMPLEXOS DE CÁLCIO E FOSFOPEPTÍDEOS"

A presente invenção refere-se a novos complexos em que fosfatos de cálcio amorfos são estabilizados por fosfopeptídeos. Estes complexos têm efeitos anticariogénios e também podem ser utilizados como suplementos de dieta, para aumentar a biodisponibilidade de cálcio, e para curar ou prevenir doenças associadas a deficiências de cálcio. São também apresentados os processos para a preparação dos complexos da invenção e métodos de tratamento ou de prevenção de cáries dentárias, má absorção de cálcio e de doenças dos ossos.

ANTECEDENTES

Cáries dentárias

As cáries dentárias são iniciadas pela desmineralização do tecido duro sobre os dentes, por ácidos orgânicos produzidos por fermentação do açúcar da dieta por bactérias odontopatogénicas da placa dentária.

Muito embora a prevalência das cáries dentárias tenha diminuído devido à utilização de fluoretos, na maior parte dos países desenvolvidos, a doença continua a ser um importante problema de saúde pública. O encargo económico estimado do tratamento das cáries dentárias na Austrália em 1991 foi de \$ 471 milhões, sendo mais elevado do que o de outras doenças relacionadas com a dieta, incluindo as doenças cardíacas das coronárias, hipertensão ou choque.

Nos países em vias de desenvolvimento, onde a disponibilidade de produtos alimentares industrializados está a aumentar, a prevalência das cáries dentárias está também a aumentar. Estudos recentes puseram em destaque um certo número de variáveis sociodemográficas associadas ao risco do desenvolvimento de cáries; os altos riscos estão associados a questões étnicas e a um baixo estatuto sócio-económico. O nível de indivíduos em alto risco tem permanecido constante, ainda que a gravidade global e a prevalência da doença na comunidade tenha diminuído. A cárie dentária é ainda, por consequência, um grave problema de saúde pública, em particular em grupos étnicos e de baixa condição socioeconómica. Isto põe em relevo a necessidade de um agente anticariogénico não tóxico que possa suplementar os efeitos dos fluoretos para baixar ainda mais a incidência das cáries dentárias. Seria particularmente desejável um agente que pudesse reduzir a dose de fluoretos necessária para reduzir a incidência de cáries face à ansiedade das comunidades acerca dos fluoretos e tendo em conta o facto de a fluorose se poder desenvolver, mesmo com as doses correntemente usadas.

O grupo de alimentos mais reconhecido como exibindo atividade anticáries são os laticínios (leite, concentrados lácteos, pós e queijos). A patente dos EUA nº 5,130,123 aponta o componente responsável por esta atividade anticariogénica como sendo a caseína. No entanto, o uso da caseína como agente anticariogénico está excluído, em virtude das propriedades organoléticas adversas e dos níveis muito altos necessários para a atividade.

Investigações preliminares demonstraram que fosfopeptídeos triptícos da caseína contribuíam para a atividade anticariogénica e isso constitui o objeto da patente dos EUA nº 5,015,628. Em particular, foram revelados na patente US 5,015,628 os peptídeos Bos α_{s1} -caseína X-5P (f59-79) [1], Bos β -caseína X-4P (f1-25) [2], Bos α_{s2} -caseína X-4P (f46-70) [3] e Bos α_{s2} -caseína X-4P (f1-21) [4], como se segue:

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

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

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

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

A determinação preliminar dos fosfopeptídeos acima para utilização em combinação com CaHPO₄ e hidroxiapatite revelou novos peptídeos que têm propriedades anticariogénicas. No entanto, investigações posteriores determinaram que o motivo de sequência de grupos de Ser(P) dentro dos fosfopeptídeos anteriormente revelados têm a capacidade inesperada de estabilizar o seu próprio peso em fosfato de cálcio amorfo. A capacidade dos fosfopeptídeos

acima e, em particular, do motivo Ser(P), para estabilizar fosfato de cálcio amorfo foi bastante inesperada e não foi apresentada nem desenvolvida em qualquer publicação conhecida dos Requerentes. Descobrimos agora que a forma amorfa do fosfato de cálcio $\text{Ca}_3(\text{PO}_4)_{1,87}(\text{HPO}_4)_{0,2} \times \text{H}_2\text{O}$, em que $x \geq 1$, estabilizada pelos fosfopeptídeos da caseína, é a forma básica mais solúvel do fosfato de cálcio não cristalino e é uma forma superior de fosfato de cálcio que previne a cárie e aumenta a biodisponibilidade do cálcio. O fosfato amorfo de cálcio (ACP) tem que ser formado por uma cuidadosa titulação dos iões de cálcio (p. ex., CaCl_2) e dos iões fosfato (p. ex., NaHPO_4), mantendo ao mesmo tempo o pH acima de 7 (de preferência 9,0), na presença do fosfopeptídeo. Como se forma o ACP, o fosfopeptídeo liga-se aos núcleos nascentes e estabiliza o ACP na forma de um complexo fosfopeptídeo-ACP. Sem o fosfopeptídeo, o ACP precipita, separando-se da solução, e transforma-se, em escassos minutos, na fase mais estável do fosfato de cálcio, a hidroxiapatite cristalina (HA). Por ser insolúvel, a HA tem uma atividade anticariogénica limitada e apresenta o cálcio numa forma com fraca biodisponibilidade. A forma ácida do fosfato de cálcio CaHPO_4 , sendo embora certamente mais solúvel do que a hidroxiapatite, está fracamente ligada ao fosfopeptídeo e está fracamente localizada à superfície dos dentes e, por consequência, também tem uma atividade anticariogénica limitada. A inesperada capacidade dos fosfopeptídeos acima mencionados e, em particular, do motivo em grupos Ser(P), para estabilizar o fosfato de cálcio amorfo, não foi revelada nem exposta na patente US nº 5,015,628 e fornece, pela primeira vez, um método fiável e eficaz para a produção de um complexo estabilizado de fosfato de cálcio amorfo, possuindo vantagens distintas e novas nos

tratamentos com cálcio e no seu fornecimento. A patente US nº 5,015,628 não faz referência à fase singular de fluoreto fosfato de cálcio amorfo $\text{Ca}_8(\text{PO}_4)_5\text{F}\times\text{H}_2\text{O}$, em que $x \geq 1$, que, como descobrimos agora, é estabilizada pelos fosfopeptídeos acima e pode ser localizada na superfície dos dentes para proporcionar uma eficácia anticáries superior. Esta inesperada capacidade para estabilizar o fosfato de cálcio amorfo constitui a base da presente invenção.

Reynolds EC (Proceedings of the Nutrition Society of Australia (1995), 05-102) descreve um processo para a produção de complexos ácidos CPP-ACP contendo principalmente iões HPO_4^{2-} e H_2PO_4^- , por dissolução de complexos já formados em soluções com diferentes valores de pH.

O Documento WO 93/03707 descreve fosfato ácido de cálcio ligado a peptídeos, formado a partir de peptídeos postos em suspensão numa solução de tris/CHES a vários valores de pH, antes de serem misturados com soluções que contêm iões de cálcio e de fosfato.

O Documento WO 94/00146 descreve o uso de fosfato ácido de cálcio ligado a peptídeos para o tratamento de hipersensibilidade dental.

SUMÁRIO DA INVENÇÃO

Num seu aspeto, a presente invenção revela um complexo estável de fosfato de cálcio, compreendendo fosfato de cálcio amorfo, ou um derivado do mesmo, estabilizado com um fosfopeptídeo, em que o referido fosfopeptídeo contém a sequência -Ser(P)-Ser(P)-Ser(P)-Glu-Glu-.

O fosfato de cálcio amorfo (ACP) tem de preferência a fórmula $[\text{Ca}_3(\text{PO}_4)_{1,87}(\text{HPO}_4)_{0,2} \times \text{H}_2\text{O}]$, em que $x \geq 1$. O derivado de fosfato de cálcio pode ser o fluoreto fosfato de cálcio, que tem a fórmula $[\text{Ca}_8(\text{PO}_4)_5 \text{ F} \times \text{H}_2\text{O}]$, em que $x \geq 1$, que fornece fluoreto fosfato de cálcio amorfo (ACFP).

O fosfopeptídeo (PP) pode ser proveniente de qualquer origem; pode ser obtido por digestão triptica da caseína ou de outras proteínas ricas em ácido fosfórico, tais como a fosfitina, ou por síntese química ou recombinante, desde que contenha a sequência núcleo -Ser(P)-Ser(P)-Ser(P)-Glu-Glu-. A sequência que flanqueia esta sequência núcleo pode ser qualquer sequência. São, no entanto, preferidas as sequências de flanco em α_{s1} (59-79) [1], β (1-25) [2], α_{s2} (46-70) [3] e α_{s2} (1-21) [4]. As sequências de flanco podem eventualmente ser modificadas por deleção, adição ou substituição com conservação de um ou mais resíduos. A composição de aminoácidos e a sequência da região de flanco não são críticas, desde que seja mantida a conformação do peptídeo e que todos os grupos fosforilo e carboxilo que interagem com os iões de cálcio sejam mantidos, uma vez que as regiões de flanco preferidas parecem contribuir para a ação estrutural do motivo.

O complexo formado tem de preferência a fórmula $[(\text{PP})(\text{CP})_8]_n$, em que n é igual ou maior do que 1, por exemplo, 6. O complexo formado pode ser um complexo coloidal.

O fosfopeptídeo liga-se ao grupo ACP para produzir uma solução metastável em que é prevenido o crescimento do ACP até um tamanho que inicie a nucleação e a precipitação.

Desta forma, as iões de cálcio e outras iões, tais como iões fluoreto, podem estar localizados, por exemplo, na superfície de um dente, para prevenir a desmineralização e impedir a formação de cáries dentárias.

Em conformidade, num segundo aspeto, a invenção revela um complexo estável de fosfato de cálcio, como foi descrito acima, complexo esse que atua como um veículo de fornecimento que, combinado, localiza iões, incluindo, mas sem estar limitado a estes, iões de cálcio, fluoreto e fosfato, num local alvo. Numa forma de realização preferida, o complexo encontra-se numa forma amorfa de libertação lenta, que produz uma eficácia anticárie superior.

Numa forma de realização particularmente preferida da invenção, o complexo estável de cálcio é incorporado em dentífricos, tais como pastas de dentes, solutos de lavagem bucal ou formulações para a boca, para auxiliar a prevenção e/ou o tratamento de cáries dentárias ou da deterioração do dente. O complexo de cálcio pode conter 0,05-50% em peso da composição, de preferência 1,0-50% em peso. Para composições orais, é preferível que a quantidade do CPP-ACP e/ou CPP-ACFP administrado seja de 0,05-50% em peso, de preferência 1,0%-50% em peso da composição. A composição oral da presente invenção, que contém os agentes mencionados acima, pode ser preparada e usada em várias formas aplicáveis à boca, tais como dentífricos, incluindo pastas de dentes, pós dentários e dentífricos líquidos, solutos de colutórios, pastilhas, gomas de mascar, pastas de dentes, cremes para massagem das gengivas, comprimidos para gargarejos, laticínios e outros produtos alimentares. A composição oral de acordo com a presente invenção pode

incluir ainda ingredientes adicionais bem conhecidos, consoante o tipo e a forma de uma composição oral particular.

Em certas formas altamente preferidas da invenção, a composição oral pode ter carácter essencialmente líquida, tal como um colutório ou uma composição de enxaguamento da boca. Geralmente, a relação em peso de água para álcool situa-se no intervalo de cerca de 1:1 até cerca de 20:1. A quantidade total da mistura água-álcool neste tipo de composição está compreendida tipicamente no intervalo entre cerca de 70 e cerca de 99,9% em peso da composição. O álcool é tipicamente etanol ou isopropanol. É preferido o etanol.

O pH desta preparação líquida e de outras preparações da invenção encontra-se em geral numa gama de cerca de 5 até cerca de 9 e tipicamente entre cerca de 7,0 - 9,0. O pH pode ser controlado com ácido (por exemplo, ácido cítrico ou ácido benzóico) ou com bases (por exemplo, hidróxido de sódio), ou ser tamponizado (tal como com citrato, benzoato, carbonato ou bicarbonato de sódio, hidrogenofosfato disódico, dihidrogenofosfato de sódio, etc.).

Noutras formas igualmente desejáveis da invenção, a composição oral pode ser essencialmente sólida ou pastosa no seu carácter, tal como um pó dental, um comprimido dental, ou uma pasta de dentes (creme dental) ou gel dentífrico. A substância veicular destas preparações orais sólidas ou pastosas contém geralmente material de polimento dentalmente aceitável. Os exemplos de materiais de polimento são o metafosfato de sódio, metafosfato de potássio, fosfato tricálcico, fosfato de cálcio

dihidratado, fosfato dicálcico anidro, pirofosfato de cálcio, ortofosfato de magnésio, trifosfato de magnésio, carbonato de cálcio, alumina hidratada, alumina calcinada, silicato de alumínio, silicato de zircônio, sílica, bentonite, insolúveis em água, e misturas dos mesmos. Outros materiais de polimento apropriados incluem as resinas termoendurecíveis granulares, tais como, resinas de melamina, fenólicas e de ureia-formaldeído, e poliepóxidos e poliésteres reticulados. Os materiais de polimento preferidos incluem sílica cristalina, possuindo um tamanho de partículas até cerca de 5 micrones, um tamanho de partículas médio até cerca de 1,1 micrones, e uma área de superfície até cerca de 50 000 cm²/g, sílica-gel ou sílica coloidal, e aluminossilicatos de metais alcalinos complexos, amorfos.

Quando se empregam geles visualmente claros, são particularmente úteis agentes de polimento de sílica coloidal, tais como os que são comercializados com a marca comercial SYLOID, como Syloid 72 e Syloid 74, ou sob a marca SANTOCEL, como Santocel 100, complexos de aluminossilicatos de metais alcalinos, visto que têm índices de refração próximos dos sistemas de agente gelificante-líquido (incluindo água e/ou humectante) correntemente utilizados em dentífricos.

Muitos dos chamados materiais de polimento "insolúveis em água" têm carácter aniónico e também incluem pequenas quantidades de material solúvel. Deste modo, pode ser formado metafosfato de sódio insolúvel de qualquer maneira apropriada, como é ilustrado por Dicionário Thorpe de Química Aplicada, Volume 9, 4^a edição, pp. 510-511. As formas de metafosfato de sódio insolúvel conhecidas como

sal de Madrell e sal de Kurrol são outros exemplos de materiais apropriados. Estes sais de metafosfatos exibem apenas uma solubilidade mínima em água e, por conseguinte, são correntemente designados por metafosfatos insolúveis (IMP). Encontra-se presente naqueles, como impurezas, uma quantidade mínima de fosfatos solúveis, geralmente uma pequena percentagem, tal como até 4% em peso. A quantidade de material de fosfato solúvel, que se crê incluir um trimetafosfato de sódio solúvel no caso dos metafosfatos insolúveis, pode ser reduzida ou eliminada por lavagem com água, se desejado. O metafosfato insolúvel de metal alcalino é tipicamente empregue na forma de pó, com um tamanho de partículas tal que o material maior do que 37 micrones não excede 1%.

O material de polimento está geralmente presente nas composições sólidas ou em pasta em concentrações em peso de cerca de 10% até cerca de 99%. Está de preferência presente em quantidades de cerca de 10% até cerca de 75% nas pastas de dentes, e de cerca de 70% até cerca de 99% no pó dentário. Nas pastas de dentes, quando o material de polimento é de natureza siliciosa, está geralmente presente em quantidades de cerca de 10-30% em peso. Outros materiais de polimento estão presentes tipicamente em quantidades de cerca de 30-75% em peso.

Numa pasta dentífrica, o veículo líquido pode compreender água e um humectante, tipicamente numa quantidade que varia de cerca de 10% até cerca de 80% em peso da composição. A glicerina, propilenoglicol, sorbitol e polipropilenoglicol são exemplos de humectantes/veículos apropriados. São também vantajosas misturas líquidas de água, glicerina e sorbitol. Em geles claros, em que o índice de refração

merece uma consideração importante, são empregues de preferência cerca de 2,5 - 30% p/p de água, 0 até cerca de 70% p/p de glicerina e cerca de 20-80% p/p de sorbitol.

As pastas de dentes, cremes e geles contêm tipicamente um espessante ou agente gelificante natural ou sintético em proporções de cerca de 0,1 até cerca de 10%, de preferência cerca de 0,5 até cerca de 5% p/p. Um espessante sintético adequado é a hectorite, uma argila sintética de complexo de magnésio coloidal e silicato de metal alcalino, disponível por exemplo como Laponite (por exemplo, CP, SP 2002, D), comercializada por Laporte Industries Limited. A Laponite D tem aproximadamente, em peso, 58,00% de SiO_2 , 25,40% de MgO , 3,05% de Na_2O , 0,98% de Li_2O , e alguma água e vestígios de metais. A sua densidade real é de 2,53 e tem uma densidade aparente a granel de 1,0 g/mL e 8% de humidade.

Outros espessantes apropriados incluem musgo da Irlanda, carragenano iota, goma de tragacanto, amido, polivinilpirrolidona, hidroxietilpropilcelulose, hidroxibutil-metilcelulose, hidroxipropil-metilcelulose, hidroxietilcelulose (disponível, por exemplo, como Natrosol), carboximetilcelulose de sódio, e sílica coloidal, tal como Syloid (p. ex., 244) finamente moído. Podem ser também incluídos agentes solubilizantes, tais como polióis humectantes, como propilenoglicol, dipropilenoglicol e hexilenoglicol, "cellosolves", tais como metil-celosolve e etil-celosolve, óleos vegetais e ceras contendo pelo menos cerca de 12 átomos de carbono numa cadeia linear, tais como azeite, óleo de rícino e petrolato, e ésteres, tais como acetato de amilo, acetato de etilo e benzoato de benzilo.

É de notar que, como é convencional, as preparações orais devem ser comercializadas, ou de alguma forma distribuídas, em embalagens convenientemente rotuladas. Deste modo, um frasco de soluto de lavagem bucal deve ter um rótulo que o descreva, em substância, como soluto de lavagem bucal ou colutório, e deve ter instruções para a sua utilização; e uma pasta de dentes, creme ou gel está geralmente embalada num tubo deformável, tipicamente de alumínio, chumbo revestido ou plástico, ou outro dispositivo fornecedor de pressionar, de bomba ou pressurizado, para a medição do conteúdo, com um rótulo que o descreve, em substância, como pasta dentífrica, gel ou creme dental.

São usados agentes tensioativos orgânicos nas composições da presente invenção para se obter uma ação profilática aumentada, para ajudar à obtenção de uma dispersão perfeita e completa do agente ativo em toda a cavidade oral, e tornar as composições em causa mais aceitáveis cosmeticamente. O material tensioativo orgânico tem, de preferência, uma natureza aniónica, não iónica ou anfófila, e de preferência não interage com o agente ativo. É preferível empregar como agente tensioativo um material detergente que confira à composição propriedades detergentes e de espumação. Os exemplos apropriados de meios tensioativos aniónicos são sais solúveis em água de monossulfatos de monoglicéridos de ácidos gordos superiores, tais como o sal de sódio de monoglicérido monossulfatado de ácidos gordos hidrogenados de óleo de coco, sulfatos de alquilo superiores, tais como laurilsulfato de sódio, sulfonatos de alquil-arilo, tais como dodecilbenzenossulfonato de sódio, sulfoacetatos de alquilo superiores, ésteres de ácidos gordos superiores de sulfonato de 1,2-dihidroxipropano, e as acilamidas

alifáticas superiores, essencialmente saturadas, de compostos de ácidos aminocarboxílicos inferiores, tais como os que têm 12 a 16 átomos de carbono no ácido gordo, radicais alquilo ou arilo, e semelhantes. Os exemplos destas amidas acabadas de referir são N-lauroil-sarcosina, e os sais de sódio, potássio e etanolamina de N-lauroil-, N-miristoil- ou N-palmitoil-sarcosina, que devem estar substancialmente isentos de material tipo sabão ou de ácidos gordos superiores semelhantes. O uso destes compostos de sarconite nas composições orais da presente invenção é particularmente vantajoso, visto que estes materiais exibem um efeito marcadamente prolongado na inibição da formação de ácidos na cavidade oral, devido à desagregação dos hidratos de carbono, além de exercerem alguma redução na solubilidade do esmalte dos dentes em soluções ácidas. Os exemplos de agentes tensioativos não iónicos, solúveis em água, apropriados para utilização, são produtos de condensação de óxido de etileno com vários compostos reativos que contêm hidrogénio, reativos com os próprios, possuindo longas cadeias hidrofóbicas (por exemplo, cadeias alifáticas com cerca de 12 a 20 átomos de carbono), cujos produtos de condensação ("etoxâmeros") contêm frações hidrofílicas de polioxietileno, tais como produtos de condensação de poli-(óxido de etileno) com ácidos gordos, álcoois gordos, amidas gordas, álcoois polihídricos (p. ex., monoestearato de sorbitano) e polióxido de propileno (por exemplo, materiais Pluronic).

O agente tensioativo está tipicamente presente numa quantidade de cerca de 0,1-5% em peso. É de notar que o agente tensioativo pode auxiliar a dissolução do agente ativo da invenção e, por conseguinte, diminuir a quantidade de humectante solubilizador necessária.

Podem ser incorporados nas composições orais da invenção vários outros materiais, tais como agentes branqueadores, conservantes, silicones, compostos de clorofila e/ou material amoniacal, tal como ureia, fosfato de diamónio, e misturas dos mesmos. Estes adjuvantes, quando estão presentes, são incorporados nas composições em quantidades que não afetem adversamente as propriedades e as características desejadas.

Pode ser também empregue qualquer produto aromatizante ou adoçante adequado. Os exemplos de constituintes aromatizantes apropriados são óleos aromatizantes, por exemplo, óleo de hortelã, hortelã-pimenta, gaultéria, sassafrás, cravinho, salva, eucalipto, orégãos, canela, limão e laranja, e salicilato de metilo. Os agentes edulcorantes apropriados incluem sacarose, lactose, maltose, sorbitol, xilitol, ciclamato de sódio, "perillartine", AMP (éster metílico de aspartil-fenil-alanina), sacarina e semelhantes. Os agentes aromatizantes e adoçantes apropriados podem constituir, cada um ou em conjunto, desde cerca de 0,1% até 5% ou mais da composição.

Na prática preferida da presente invenção, uma composição oral de acordo com a invenção, tal como um colutório ou dentífrico que contém a composição de acordo com a invenção, é preferivelmente aplicada regularmente nas gengivas e dentes, tal como todos os dias ou a cada dois ou três dias, ou de preferência uma a três vezes por dia, a um pH de cerca de 4,5 até cerca de 9, geralmente de cerca de 7,0 até cerca de 9, durante pelo menos duas semanas até oito semanas ou por toda a vida.

As composições da invenção também podem ser incorporadas em pastilhas, ou em gomas de mascar, ou em outros produtos, por exemplo, agitando numa base de goma tépida ou revestindo a superfície de uma base de goma, podendo ser mencionadas como exemplos das mesmas jelutong, látex de borracha, resinas de vinilite, etc., desejavelmente com plastificantes ou amaciadores convencionais, açúcar ou outros adoçantes, ou tais como glucose, sorbitol e semelhantes.

Numa outra variante de realização, o complexo da invenção é formulado de modo a formar um suplemento dietético, compreendendo preferivelmente 0,1-100% p/p, mais preferivelmente 1-50% p/p, muito preferivelmente 1-10% e em particular 2% p/p. O complexo também pode ser incorporado em produtos alimentares.

Em conformidade, num terceiro aspeto, a invenção revela composições, incluindo composições farmacêuticas, que contêm o complexo de cálcio, tal como foi descrito, conjuntamente com uma substância veicular farmaceuticamente aceitável. Estas composições podem ser escolhidas do grupo que consiste em composições dentais anticariogénicas, composições terapêuticas e suplementos dietéticos. As composições dentais ou composições terapêuticas podem apresentar-se na forma de uma gel, líquido, sólido, pó, creme ou pastilha. As composições terapêuticas também podem estar na forma de comprimidos ou cápsulas.

Num quarto aspeto, é apresentado um método para o tratamento ou a prevenção de cáries dentárias, ou da deterioração de dentes, compreendendo o passo de administração de um complexo ou composição da invenção aos

dentes ou gengivas de um paciente que necessite dos referidos tratamentos. É preferida a administração tópica do complexo.

Num quinto aspeto, a invenção refere-se a métodos de tratamento de uma ou mais patologias relacionadas com a perda de cálcio do corpo, em especial dos ossos, deficiência de cálcio, má absorção de cálcio, ou semelhantes. Os exemplos destas patologias incluem, sem estarem limitados a estas, osteoporose ou osteomalacia. De um modo geral, é contemplada qualquer patologia que possa ser melhorada pela biodisponibilidade de cálcio.

Num sexto aspeto, a invenção também revela um processo para a produção de um complexo estável de fosfato de cálcio, como foi descrito acima, compreendendo os passos de:

- (i) a obtenção de uma solução de fosfopeptídeo possuindo um pH de cerca de 9,0;
- (ii) a mistura de (i) com soluções que contêm cálcio, um fosfato inorgânico e eventualmente fluoretos, a um pH de cerca de 9,0;
- (iii) a filtração da mistura resultante do passo (ii), e
- (iv) a secagem, para se obter o referido complexo.

Os complexos da invenção são úteis como suplementos de cálcio em pacientes que necessitem de estimulação do crescimento dos ossos, por exemplo, pacientes submetidos ao tratamento de fraturas, substituição de articulações, enxertos ósseos, ou cirurgia craniofacial.

Estes complexos são também úteis como suplementos dietéticos em pacientes que, por qualquer razão, tal como

intolerância dietética, alergia, ou fatores religiosos ou culturais, sejam incapazes, ou não queiram consumir laticínios numa quantidade suficiente para fornecer a sua necessidade dietética de cálcio.

Deverá ser perfeitamente entendido que, embora a presente descrição se refira concretamente a aplicações em humanos, a invenção é também útil para fins veterinários. Deste modo, a invenção é útil em todos os aspetos para animais domésticos, tais como gado, ovelhas, cavalos e aves domésticas; para animais de companhia, tais como gatos e cães; e para animais de jardins zoológicos.

DESCRIÇÃO PORMENORIZADA DA INVENÇÃO

A invenção será agora descrita em pormenor, através da referência apenas aos seguintes exemplos não limitativos.

Exemplo 1 Preparação de CPP-ACP e CPP-ACFP

A. Preparação de CPP-ACP

Foi preparada uma solução a 10% p/v de caseína (Murray Goulbum, Victoria, Austrália) ou de caseinato, a pH 8,0, e em seguida foi digerida com tripsina a 0,2% p/p da caseína, durante 2 horas, a 50°C, com o pH controlado a $8,0 \pm 0,1$ por adição de NaOH. Após a digestão, a solução foi ajustada a pH 4,6 por adição de HCl e o precipitado foi removido por centrifugação ou microfiltração. No entanto, a solução também pode ser clarificada por microfiltração a pH 8,0 sem acidificação. O sobrenadante ou microfiltrado foi depois ajustado a pH 9,0 com NaOH, em seguida foram adicionados lentamente ($\leq 1\%$ em volume por minuto) CaCl_2 (1,6 M) e

Na_2PO_4 (1 M) a pH 9,0, com agitação constante, sendo o pH mantido constante a $9,0 \pm 0,1$ por adição de NaOH. Foram adicionados CaCl_2 e fosfato de sódio até concentrações finais de 10 mM e 60 mM, respetivamente. Depois da adição das soluções de cálcio e de fosfato, a solução foi microfiltrada através de um microfiltro de 0,1 ou 0,2 μm (cerâmica ou orgânico) para concentrar a solução cinco vezes. A fração retida foi depois diafiltrada com um a cinco volumes de água destilada. O retido depois da diafiltração foi seco por pulverização, produzindo-se um pó branco que tinha 50% de CPP e 40% de ACP e água residual. A análise do CPP e do complexo CPP-ACP por HPLC em fase inversa, análise sequencial e espectrometria de massa revelou que os únicos peptídeos que são capazes de estabilizar o fosfato de cálcio amorfo e são retidos durante a microfiltração e diafiltração são Bos α_{s1} -caseína X-5P (f59-79) [1], Bos β -caseína X-4P (f1-25) [2], Bos α_{s2} -caseína X-4P (f46-70) [3] e Bos α_{s2} -caseína X-4P (f1-21) [4], e formas destes peptídeos truncadas e modificadas pelo calor.

B. Preparação de CPP-ACFP

Foi preparada uma solução a 10% p/v de caseína ou de caseinato, a pH $8,0 \pm 0,1$, e em seguida foi digerida com tripsina a 0,2% p/p da caseína, durante 2 horas, a 50°C. Após a digestão, a solução foi ajustada a pH 4,6 por adição de HCl e o precipitado foi removido por centrifugação ou microfiltração. No entanto, a solução também pode ser clarificada por microfiltração a pH 8,0 sem acidificação. O sobrenadante ou microfiltrado foi depois ajustado a pH 9,0 com NaOH, em seguida foram adicionados lentamente ($\leq 1\%$ em volume por minuto) CaCl_2 (1,6 M), Na_2PO_4 (1 M) e 200 mM de

NaF a pH 9,0, com agitação constante, sendo o pH mantido constante a $9,0 \pm 0,1$ por adição de NaOH. Foram adicionados CaCl_2 , fosfato de sódio e NaF até concentrações finais de 100 mM, 60 mM e 12 mM, respetivamente. Depois da adição das soluções de cálcio, de fosfato e de fluoreto, a solução foi microfiltrada através de um microfiltro de 0,1 ou 0,2 μm (cerâmica ou orgânico) para concentrar a solução cinco vezes. A fração retida foi depois diafiltrada com um a cinco volumes de água destilada. O retido depois da diafiltração foi seco por pulverização, produzindo-se um pó branco que tinha 50% de CPP e 40% de ACP e água residual.

O CPP-ACFP em pó foi depois reconstituído com água destilada, para se produzirem soluções altamente concentradas. Por exemplo, foi preparada uma solução de CPP-ACFP a 10% p/v, contendo 640 mM de Ca, 400 mM de fosfato e 80 mM de F (1520 ppm de F) a pH 9,0, assim como um gel a 20% de CPP contendo 1,28 M de Ca, 800 mM de fosfato e 160 mM de F (3040 ppm de F^-) a pH 9,0. Esta solução e o gel exibiam uma anticariogenicidade significativamente maior relativamente ao fluoreto isoladamente, e, por conseguinte, são aditivos superiores para pastas de dentes e colutórios e para aplicação profissional, para aumentar a eficácia dos dentífricos correntes que contêm fluoreto e dos produtos aplicados profissionalmente.

Exemplo 2 Estudos Estruturais de CCP-ACP

A. Estrutura e interação de CCP-ACP

Fosfopeptídeos de caseína contendo o grupo Ser(P), isto é, o motivo de sequência de núcleo -Ser(P)-Ser(P)-Ser(P)-Glu-

Glu-, têm uma acentuada capacidade para estabilizar o fosfato de cálcio em solução. Foram usadas soluções contendo 0,1% p/v de $\alpha_{s1}(59-79)$ [1], a vários valores de pH e de concentrações de cálcio e de fosfato, mas com forças iônicas constantes, para caracterizar a interação do peptídeo com o fosfato de cálcio. O peptídeo mostrou um máximo de ligação de 24 Ca e 16 Pi por molécula, como se mostra na Tabela 1.

Os produtos de atividade iônica para as várias fases de fosfato de cálcio [hidroxiapatite (HA); fosfato octacálcico (OCP); fosfato tricálcico (TCP); fosfato amorfo de cálcio (ACP); e fosfato dicálcico dihidrato (DCPD)] foram determinados a partir das concentrações de cálcio livre e de fosfato a cada valor de pH, usando um programa de computador que calcula os coeficientes de atividade iônica através do uso da equação de Debye-Hückel expandida e tem em conta os pares de iões CaHPO_4^0 , $\text{CaH}_2\text{PO}_4^+$, CaPO_4^- e CaOH^+ , a dissociação de H_3PO_4 e H_2O e a força iônica. O único produto de atividade iônica que apresentou uma correlação significativa com o fosfato de cálcio ligado ao peptídeo, independentemente do pH, foi o que correspondia ao ACP $[\text{Ca}_3(\text{PO}_4)_{1,87}(\text{HPO}_4)_{0,2} \times \text{H}_2\text{O}]$, indicando que esta é a fase estabilizada por $\alpha_{s1}(59-79)$. O peptídeo $\alpha_{s1}(59-79)$ liga-se para formar grupos ACP, produzindo uma solução metastável que impede o crescimento do ACP até ao tamanho crítico necessário para a nucleação e precipitação. A ligação de $\alpha_{s1}(59-79)$ ao CPP tem como resultado a formação de complexos coloidais com a fórmula unitária $[\alpha_{s1}(59-79)(\text{ACP})_8]_n$, em que $\underline{n}$ é igual ou maior do que 1. É provável que a forma predominante seja $n = 6$, uma vez que o $\alpha_{s1}(59-79)$ reticulado com glutaraldeído na presença de ACP se comporta como um hexâmero em eletroforese por gel de

poliacrilamida. Curiosamente, o octapeptídeo sintético α_{s1} (63-70) AcGlu-Ser(P)-Ile-Ser(P)-Ser(P)-Ser(P)-Glu-Glu-NHMe apenas se liga a 12 Ca e 8 Pi por molécula, isto é, $(ACP)_4$, e os peptídeos sintéticos correspondentes ao terminal N α_{s1} (59-63), Gln-Met-Ala-Glu, e ao terminal C α_{s1} (71-78), Ile-Val-Pro-Asn-Ser(P)-Val-Glu-Gln de α_{s1} (59-79) não se ligam ao fosfato de cálcio, como se mostra na Tabela 1. Estes resultados indicam que a especificidade conformacional é essencial para a ligação total do ACP.

B. Estudos por RMN

A flexibilidade da proteína em solução é a característica importante para se salientar de estudos espectroscópicos sobre proteínas que contêm a sequência de grupos Ser(P) (-Ser(P)-Ser(P)-Ser(P)-), tais como fosvitina da gema de ovo e fosfoforina da dentina dos dentes. A fosforilação parece desestabilizar estruturas secundárias e terciárias, em vez de promover níveis superiores de ordenação. No entanto, as sequências fosforiladas flexíveis adaptam-se a conformações mais regulares quando ligadas a fosfato de cálcio. As medições de dispersão rotatória óptica (ORD), dicroísmo circular (CD), hidrodinâmica e ressonância magnética nuclear com ^{31}P (RMN), das caseínas, indicam todas que a α_{s1} -caseína e a β -caseína têm uma estrutura bastante aberta em solução, com muitas cadeias laterais de aminoácidos expostas aos solventes e relativamente flexíveis. As medições de relaxação por ^{31}P -RMN indicam que os resíduos Ser(P) são relativamente móveis em β -caseína.

Demonstrámos aumentos nucleares de Overhauser (nOes) de gama média e longa em espectros 2D ^1H RMN de α_{s1} (59-79) [1] na presença de Ca^{2+} , indicando uma preferência

conformacional. Foram identificadas duas regiões estruturadas. Os resíduos Val72 a Val76 estão implicados numa conformação de rotação- β . Os resíduos Glu61 a Ser(P)67, que se estendem sobre parte do motivo de grupos Ser(P) -Ser(P)-Ser(P)-Ser(P)-Glu-Glu-, estão envolvidos numa estrutura tipo anel. Os estudos em 2D RMN sobre a β -caseína (1-25), na presença de cálcio, mostraram uma gama média de nOe na região do motivo -Ser(P)¹⁷-Ser(P)-Ser(P)-Glu-Glu²¹-, entre C α H de Ser(P)¹⁸ e NH de Glu²⁰. Outros nOes em gama média incluem um entre o C α H de Ser²² e NH de Thr²⁴. Evidências dos espectros de ¹H-RMN de α_{s2} -caseína(1-21) [4] mostraram que vários resíduos, incluindo os situados em torno de -Ser(P)-Ser(P)-Ser(P)-Glu-Glu-, são perturbados. Além disso, há nOes de gama média entre NH de Ser(P)⁸ e NH de Glu¹⁰. Isto é ainda um outro exemplo de um nOe de gama média no motivo -Ser(P)-Ser(P)-Ser(P)-Glu-Glu-. Outros exemplos de nOes de gama média incluem os situados entre NH de Ile¹⁴ e NH de Ser(P)¹⁶.

Em resumo, os dados de RMN indicam que existem conformações preferidas para estes peptídeos na presença de iões de cálcio. Os modelos moleculares tanto de α_{s1} (59-79) como de β (1-25), usando os constrangimentos derivados da espectroscopia por RMN, indicaram que os peptídeos adotam conformações que permitem que tanto as cadeias laterais de glutamilo como as de fosfoserilo do motivo do grupo -Ser(P)-Ser(P)-Ser(P)-Glu-Glu- interajam coletivamente com iões de cálcio do ACP.

Foi investigada a relação entre a estrutura de CPP e a interação com o fosfato de cálcio amorfo, utilizando-se uma série de homólogos e análogos de peptídeos sintéticos indicados na Tabela 1. Estes estudos mostraram que a

sequência de grupos -Ser(P)-Ser(P)-Ser(P)-Glu-Glu- era principalmente responsável pela interação com ACP e que todos os três resíduos Ser(P) contíguos são necessários para a interação máxima com o ACP.

TABELA 1.

Ligação de Fosfato de Cálcio por CPP e Homólogos e Análogos Sintéticos			
	V _{Ca} mol/mol	V _{Pi} mol/mol	Ca/P
ΣΣΣEE	9	6	1,5
SΣΣEE	2	1	2,0
EΣΣEE	2	1	2,0
DΣΣEE	2	1	2,0
θθθEE	9	6	1,5
SθθEE	2	1	2,0
AΣAE	0	0	
IAΣAEA	0	0	
EAIASAEA	0	0	
AΣAΣAE	0	0	
AΣAΣAΣAE	2	1	1,5
AΣAΣAΣAΣAE	6	4	1,5
α _{s1} (59-79) QMEAEIΣΣΣEEIVPNΣVEQK	24	16	1,5
α _{s1} (63-70) EΣIΣΣΣEE	12	8	1,5
α _{s1} (66-70) ΣΣΣEE	9	6	1,5
α _{s1} (71-78) IVPNΣVEQK	0	0	
α _{s1} (59-63) QMEAE	0	0	
β(1-25) RELEELNVPGEIVEΣLΣΣΣEESITR	24	16	1,5
β(14-21) EΣLΣΣΣEE	12	8	1,5

Σ = Ser(P), θ = Thr(P), E = Glu, D = Asp, S = Ser, A = Ala, I = Ile, Q = Gln, M = Met, V = Val, P = Pro, K = Lys, L = Leu, T = Thr, G = Gly e R = Arg.

Exemplo 3 Estudos Estruturais Usando Hidroxiapatite (HA)

Analogamente, investigámos a adsorção do CPP e de homólogos e análogos sintéticos sobre HA (Tabela 2). Estes dados

também confirmam que a sequência de grupos Ser(*P*) é o principal determinante para a ligação de alta afinidade e que os três resíduos Ser(*P*) contíguos são todos essenciais, uma vez que a perda de qualquer um, mesmo quando substituído por um Glu ou Asp, teve como resultado uma constante de afinidade *K* consideravelmente menor, como se mostra na tabela 2.

TABELA 2.

Ligação de CPP e Peptídeos Sintéticos a HA a 37°C				
		K mL/ μ mol	N μ mol/m ²	Área Molecular nm ²
α_{s1} (59-79)	QMEAEIΣΣΣEEIVPNΣVEQK	415	0,35	4,75
α_{s1} (63-70)	EΣIΣΣΣEE	10 370	0,47	3,56
α_{s1} (66-70)	ΣΣΣEE	12 845	0,52	3,27
α_{s1} (71-78)	IVPNΣVEQK	-	-	-
α_{s1} (59-63)	QMEAE	-	-	-
	ΣΣΣEE	12 845	0,52	3,27
	EΣΣEE	1513	0,96	1,74
	DΣΣEE	6 579	0,81	2,04
	θθθEE	12 234	0,51	3,27
	TθθEE	1013	0,55	3,03
	θTθEE	837	0,44	3,77
	θθTEE	1799	0,46	3,61

Σ = Ser(*P*), θ = Thr(*P*)

Curiosamente, a repetição destas experiências de adsorção de HA com HA revestido com saliva (sHA) revelou que o motivo de grupos Ser(*P*) ainda era o principal determinante da adsorção, embora as afinidades dos peptídeos para o sHA fosse ligeiramente reduzida pela presença das proteínas salivares. Estes resultados sugerem que é provável que a interação predominante do CPP com a película e a placa seja eletrostática e mediada pelo motivo de grupos Ser(*P*) de CPP.

Estudámos também o acoplamento do peptídeo -Ser(P)-Ser(P)-Ser(P)-Glu-Glu- sobre três planos cristalográficos de HA, {100}, {010} e {001}, usando técnicas de simulação em computador e as coordenadas da célula unitária de HA sintético. Estes estudos de simulação revelaram que o peptídeo -Ser(P)-Ser(P)-Ser(P)-Glu-Glu- tem maior probabilidade de se ligar à superfície {100}, seguida pela superfície {010}. O motivo de grupo Ser(P) pode, por conseguinte, ligar-se a ambas as superfícies {100} e {010}, permitindo assim a deposição de iões de cálcio, fosfato e hidroxilo sobre a superfície {001}, permitindo o crescimento do cristal HA apenas ao longo do eixo $\underline{c}$. Por conseguinte, estes resultados permitem agora explicar o crescimento segundo o eixo $\underline{c}$ dos cristais de HA no esmalte e na dentina. Um exame minucioso dos dados da simulação em computador mostra que o conformador de -Ser(P)-Ser(P)-Ser(P)-Glu-Glu- com a maior energia de ligação relativa está posicionado sobre a superfície de HÁ, de tal modo que os grupos carboxilo dos resíduos de glutamilo e os grupos fosforilo dos resíduos fosfoserilo estão na proximidade da superfície de HÁ, com o máximo contacto entre estes grupos e os átomos de cálcio da superfície.

Exemplo 4 Estudos *in situ* da Atividade Anticariogénica de CPP-ACP em Humanos

A capacidade da solução a 1,0% p/v de CPP-ACP, pH 7,0, para impedir a desmineralização do esmalte foi estudada num modelo humano de cáries *in situ*. O modelo consiste num dispositivo removível, contendo um par esquerdo e direito de lâminas de esmalte colocadas de modo a produzirem um sítio de retenção da placa. A placa entre esmaltes que se

desenvolveu (3-5 mg) era bacteriologicamente semelhante à normal placa supragingival. Por exposição frequente a soluções de sacarose durante um período de três semanas, o aumento dos níveis de mutantes de estreptococos e bacilo lácteos e da desmineralização do esmalte subsuperficial teve como resultado a formação de lesões "tipo cáries" incipientes.

Duas exposições por dia, à solução de CPP-ACP do par direito de lâminas de esmalte, em 12 pacientes, produziu uma redução de $51\% \pm 19\%$ da perda mineral do esmalte em relação ao lado esquerdo, o esmalte de controle. A placa exposta à solução de CPP-ACP continha $78 \pm 22 \mu\text{mol/g}$ de cálcio, $52 \pm 25 \mu\text{mol/g}$ de P_i e $2,4 \pm 0,7 \mu\text{mol/g}$ de CPP, em comparação com $32 \pm 12 \mu\text{mol/g}$ de cálcio e $20 \pm 11 \mu\text{mol/g}$ de P_i na placa de controle. O nível do CPP foi determinado por ELISA competitivo, usando um anticorpo que reconhece tanto $\alpha_{s1}(59-79)$ como $\beta(1-25)$. Micrografias eletrônicas de secções da placa, coradas imunocitoquimicamente, revelaram a localização do peptídeo predominantemente sobre a superfície de microrganismos, mas também na matriz extracelular.

Embora estes resultados indiquem que os CPP são incorporados na placa dental em desenvolvimento, o nível real determinado por ELISA não seria uma representação verdadeira do que é incorporado, devido à decomposição do CPP na placa através da ação das atividades de fosfatase e peptidase. A incorporação de CPP-ACP na placa teve como resultado um aumento de 2,4 vezes do cálcio da placa e um aumento de 2,6 vezes no P_i da placa, com uma relação Ca/P_i consistente com o ACP.

Exemplo 5 Potencial Anticariogênico de CPP-ACP num Estudo em Colutório

Uma experiência clínica de um colutório usado três vezes por dia, contendo 3,0% de CPP-ACP, pH 9,0, mostrou que o teor de cálcio da placa supragengival (dentes anteriores inferiores excluídos) aumentou de $169 \pm 103 \mu\text{mol/g}$, peso seco, para $610 \pm 234 \mu\text{mol/g}$ depois da utilização do colutório durante um período de três dias, e o fosfato inorgânico aumentou de $242 \pm 60 \mu\text{mol/g}$, peso seco, para $551 \pm 164 \mu\text{mol/g}$. Estes níveis de cálcio e de fosfato inorgânico após o colutório são os mais elevados alguma vez apresentados para a placa supragengival não mineralizada.

Sem que se pretenda estar vinculado a qualquer mecanismo proposto para as vantagens observadas, crê-se que o mecanismo da anticariogenicidade para o CPP-ACP é a incorporação de fosfato de cálcio amorfo na placa, fazendo baixar desta forma a desmineralização do esmalte e favorecendo a remineralização. Na placa, o CPP-ACP atuaria como um reservatório de fosfato e de cálcio, tamponizando as atividades dos íons de cálcio e fosfato livres, auxiliando deste modo a manter um estado de sobressaturação em relação ao esmalte do dente. A ligação do ACP ao CPP depende do pH, com uma ligação muito fraca abaixo de pH 7,0.

Exemplo 6 Remineralização de Lesões do Esmalte por CPP-ACP

A. Estudos in vitro

Foi usado um sistema *in vitro* de remineralização do esmalte para estudar a remineralização de lesões artificiais em terceiros molares humanos, por meio de soluções de CPP-ACP. Usando este sistema, uma solução a 1,0% de CPP-ACP restaurou $56 \pm 21\%$ da perda mineral. Uma solução a 0,1% de CPP-ACP restaurou $34 \pm 18\%$ da perda mineral. Foram preparadas algumas outras soluções contendo várias quantidades de CPP (0,1-1,0%), de cálcio (6-60 mM) e de fosfato (3,6-36 mM) a diferentes valores de pH (7,0-9,0). Foram então determinadas as associações entre as atividades das várias espécies de fosfato de cálcio em solução e a taxa de remineralização da lesão do esmalte, para esta série de soluções.

Descobriu-se que a atividade da espécie iônica neutra CaHPO_4^0 , nas várias soluções de remineralização, estava altamente correlacionada com a taxa de remineralização da lesão. O coeficiente de difusão para o processo de remineralização foi estimado a $3 \times 10^{-10} \text{ m}^2\text{s}^{-1}$, que é consistente com os coeficientes de difusão para moléculas neutras através de uma matriz carregada. A taxa de remineralização do esmalte obtida com a solução a 1,0% de CPP-ACP foi de $3,3 \times 10^{-2} \text{ mol HA/m}^2/10 \text{ dias}$, que é a mais alta taxa de remineralização jamais obtida. Os iões de fosfato de cálcio, em particular o par de iões neutros CaHPO_4^0 , depois da difusão na lesão do esmalte, dissocia-se e deste modo aumenta o grau de saturação em relação ao HA. A formação de HA na lesão conduz à criação de H_3PO_4 , que, sendo ele próprio neutro, se difunde para fora da lesão num gradiente de concentração decrescente.

Os resultados indicam que o ACP ligado a CPP, $\text{CPP}[\text{Ca}_3(\text{PO}_4)_{1,87}(\text{HPO}_4)_{0,2} \times \text{H}_2\text{O}]_8$, atua como um reservatório da

espécie iónica neutra, CaHPO_4^0 , que é formada na presença de ácido. O ácido pode ser produzido por bactérias da placa dental; nestas condições, o ACP ligado a CPP vai tamponizar o pH da placa e produz iões de cálcio e de fosfato, em particular CaHPO_4^0 . O aumento do CaHPO_4^0 na placa vai afastar qualquer queda do pH, impedindo deste modo a desmineralização do esmalte. É também produzido ácido na placa como H_3PO_4 , pela formação de HA na lesão do esmalte durante a remineralização. Isto explica, por conseguinte, por que razão as soluções de CPP-ACP são soluções de remineralização tão eficientes, visto que vão consumir o H_3PO_4 produzido durante a remineralização da lesão do esmalte, produzindo mais CaHPO_4^0 , e mantendo assim o seu gradiente de concentração na lesão. Estes resultados são, por conseguinte, consistentes com o facto de o mecanismo anticariogénico proposto do CPP ser a inibição da desmineralização do esmalte e o aumento da remineralização através da localização do ACP na superfície do dente.

B. Estudos da remineralização humana in situ

Foi investigada a capacidade de CPP-ACP, adicionado a goma de mascar sem açúcar (sorbitol), para remineralizar lesões subsuperficiais do esmalte, num estudo aleatório duplamente cego, de passagem. Dez pacientes usaram dispositivos palatais removíveis, com seis insertos de metades de lâminas de esmalte humano, contendo lesões desmineralizadas subsuperficiais. A outra metade de cada lâmina de esmalte foi guardada num recipiente humidificado e foi usada como controle da lesão desmineralizada. Havia quatro grupos de tratamento no estudo, goma sem açúcar, contendo 3,0% p/p de CPP-ACP, goma sem açúcar contendo 1,0% p/p de CPP-ACP, goma sem açúcar sem CPP-ACP, e um controle sem goma de mascar.

As gomas foram mascadas por períodos de 20 minutos, quatro vezes por dia. Os dispositivos foram usados durante este período de 20 minutos e durante um período adicional de 20 minutos depois de mascarem a goma. Cada tratamento teve uma duração de 14 dias e cada um dos dez pacientes realizou cada tratamento com uma semana de repouso entre os tratamentos. Ao completar-se cada tratamento, as lâminas de esmalte foram removidas, foram colocadas a par com o seu respectivo controle desmineralizado, foram engastadas, seccionadas e submetidas a análises de imagiologia de microrradiografia e densitometria assistida por computador, para se determinar o nível de remineralização. O tratamento com goma sem açúcar teve como resultado $9,82 \pm 1,81\%$ de remineralização relativamente ao controle sem goma de mascar, ao passo que a goma que continha 1,0% de CPP-ACP produziu $17,06 \pm 2,48\%$ de remineralização, e a goma com 3,0% de CPP-ACP produziu $22,70 \pm 3,40\%$ de remineralização, sendo todos os valores significativamente diferentes. Estes resultados mostraram que a adição de 1,0% e 3,0% de CPP-ACP à goma sem açúcar produziu um aumento de 74% e 131%, respetivamente, na remineralização do esmalte subsuperficial.

Exemplo 7 Estudo de Colutório de CPP-ACFP

Foi realizado um estudo de um colutório para se determinar a capacidade de um colutório de 3,0% de CPP-ACFP, usado três vezes por dia, de aumentar os iões de cálcio, fosfato inorgânico e fluoreto da placa supragengival. A solução a 3,0% de CPP-ACFP, usada como colutório durante quatro dias, continha 192 mM de iões de cálcio ligados, 120 mM de iões de fosfato ligados e 24 mM (456 ppm) de iões de F ligados,

estabilizados por CPP. O uso do colutório teve como resultado um aumento de 1,9 vezes do cálcio da placa, um aumento de 1,5 vezes do fosfato da placa e um aumento surpreendente de 18 vezes de iões fluoreto da placa, como se mostra na Tabela 3.

TABELA 3

Efeito de CPP-ACFP nos Níveis de Ca, P_i e F na Placa			
	Ca $\mu\text{mol/g}$	P _i $\mu\text{mol/g}$	F $\mu\text{mol/g}$
Controle	177 $\pm$ 53	306 $\pm$ 82	1,1 $\pm$ 0,9
CPP-ACPF a 3%	336 $\pm$ 107	471 $\pm$ 113	19,9 $\pm$ 14,1
F a 1000 ppm	185 $\pm$ 54	287 $\pm$ 29	1,9 $\pm$ 1,0
CaCPP a 3%	193 $\pm$ 56	343 $\pm$ 102	1,5 $\pm$ 0,8

Embora tenham sido encontrados estes pronunciados aumentos dos teores de cálcio, fosfato e fluoreto da placa, não foram observados em qualquer dos pacientes cálculos dentários, sugerindo que o fluoreto fosfato de cálcio da placa permaneceu estabilizado como fase amorfa pelo CPP e não se transformou numa fase cristalina. Estes aumentos nos níveis de iões de Ca, fosfato e fluoreto da placa supragengival, produzidos por CPP-ACP, são nitidamente maiores do que os que foram obtidos num estudo semelhante utilizando pastas dentífricas com CaCPP e 1000 ppm de F (MFP e NaF), duas vezes por dia, durante um período de tempo semelhante, como é indicado na Tabela 3. Estes resultados mostram um marcado efeito sinérgico entre os iões fluoreto e o CPP-ACP. Isto é particularmente vantajoso, tendo em vista o facto de o nível de fluoreto em composições orais, tais como pastas de dentes, poder então ser reduzido, resultando em economia de custos e risco

diminuído de fluorose para indivíduos que vivam em áreas com altos teores de fluoreto.

Exemplo 8 Interação de CPP-ACP com Fluoretos

Foi observado um efeito sinérgico anticariogénico do CPP-ACP a 1,0% em conjunto com 500 ppm de F num modelo de cáries em ratos. A análise da solução contendo 1,0% CPP, 60 mM de CaCl_2 , 36 mM de fosfato de sódio e 500 ppm de F (26,3 mM de NaF), pH 7,0, após a ultrafiltração revelou que quase metade do ião fluoreto tinha sido incorporado na fase de ACP estabilizada com CPP, para produzir uma fase de fluoreto fosfato de cálcio com a composição $\text{Ca}_8(\text{PO}_4)_5 \text{F} \times \text{H}_2\text{O}$, com 24 moléculas de Ca, 15 de PO_4 e 3 de F por molécula de CPP.

Sem se pretender estar limitado por qualquer mecanismo proposto para o efeito benéfico observado, consideramos que o mecanismo anticariogénico do CPP-ACP é a localização do ACP na superfície do dente, de tal forma que, na presença de um ácido, o ACP se dissocia para libertar iões de Ca e fosfato, aumentando o grau de saturação em relação ao HA, impedindo a desmineralização do esmalte e promovendo a remineralização. O mecanismo anticariogénico do fluoreto é a localização do ião fluoreto na superfície do dente, em particular na placa, na presença dos iões Ca e fosfato. Esta localização aumenta o grau de saturação em relação à fluorapatite (FA), promovendo deste modo a remineralização do esmalte com FA. É evidente que para a formação da FA $[\text{Ca}_{10}(\text{PO}_4)_6\text{F}_2]$, os iões cálcio e fosfato têm que estar localizados na placa, na superfície do dente, juntos com o ião fluoreto. O efeito sinérgico anticariogénico de CPP-ACP e F é atribuível, por conseguinte, à localização de ACP na

superfície do dente pelo CPP, que de facto localiza em conjunto Ca, Pi e F.

Isto foi demonstrado no estudo do colutório descrito no exemplo 7.

Foram preparadas soluções metastáveis de CPP a pH 7,0, contendo fluoreto fosfato de cálcio amorfo em concentrações notavelmente altas. Por exemplo, foi preparada uma solução a 10% p/v de CPP-ACFP, contendo 640 mM de CA, 400 mM de fosfato e 80 mM de F (1520 ppm F⁻) a pH 7,0, assim como um gel a 20% de CPP contendo 1,28 M de Ca, 800 mM de fosfato e 160 mM de F (3 040 ppm F⁻) a pH 7,0. Esta solução e o gel exibem uma anticariogenicidade significativamente maior em relação ao fluoreto isoladamente, e, por conseguinte, são aditivos superiores para pastas de dentes e colutórios e para aplicação profissional, para melhorar a eficácia dos dentífricos correntes que contêm fluoreto e dos produtos aplicados profissionalmente.

São apresentados abaixo exemplos concretos de formulações que contêm os complexos da invenção.

Exemplo 9 Formulações de pastas dentífricas contendo CPP-ACP

Formulação 1

<u>Ingrediente</u>	<u>% p/p</u>
Fosfato dicálcico dihidrato	50,0
Glicerina	20,0
Carboximetilcelulose de sódio	1,0
Lauril-sulfato de sódio	1,5

Lauroil-sarcosinato de sódio	0,5
Aroma	1,0
Sacarinato de sódio	0,1
Gluconato de clorohexidina	0,01
Dextranase	0,01
CPP-ACFP	1,00
Água	o resto

Formulação 2

<u>Ingrediente</u>	<u>% p/p</u>
Fosfato dicálcico dihidrato	50,0
Sorbitol	10,0
Glicerina	10,0
Carboximetilcelulose de sódio	1,0
Lauril-sulfato de sódio	1,5
Lauroil-sarcosinato de sódio	0,5
Aroma	1,0
Sacarinato de sódio	0,1
Monofluorfosfato de sódio	0,3
Gluconato de clorohexidina	0,01
Dextranase	0,01
CPP-ACFP	2,00
Água	o resto

Formulação 3

<u>Ingrediente</u>	<u>% p/p</u>
Fosfato dicálcico dihidrato	50,0
Sorbitol	10,0
Glicerina	10,0
Carboximetilcelulose de sódio	1,0

Lauroil-dietanolamida	1,0
Monolaurato de sacarose	2,0
Aroma	1,0
Sacarinato de sódio	0,1
Monofluorfosfato de sódio	0,3
Gluconato de clorohexidina	0,01
Dextranase	0,01
CPP-ACFP	5,0
Água	o resto

Formulação 4

<u>Ingrediente</u>	<u>% p/p</u>
Sorbitol	22,0
Musgo Irlandês	1,0
Hidróxido de sódio (50%)	1,0
Gantrez	19,0
Água (desionizada)	2,69
Monofluorfosfato de sódio	0,76
Sacarinato de sódio	0,3
Pirofosfato	2,0
Alumina hidratada	48,0
Óleo aromatizante	0,95
CPP-ACFP	1,0
Laurilsulfato de sódio	2,00

Formulação 5

<u>Ingrediente</u>	<u>% p/p</u>
Poliacrilato de sódio	50,0
Sorbitol	10,0
Glicerina	20,0
Aroma	1,0

Sacarinato de sódio	0,1
Monofluorfosfato de sódio	0,3
Gluconato de clorohexidina	0,01
Etanol	3,0
CPP-ACFP	2,00
Ácido linólico	0,05
Água	o resto

Exemplo 10 Formulações de colutório

Formulação 1

<u>Ingrediente</u>	<u>% p/p</u>
Etanol	20,0
Aroma	1,0
Sacarinato de sódio	0,1
Monofluorfosfato de sódio	0,3
Gluconato de clorohexidina	0,01
Lauroil-dietanolamida	0,3
CPP-ACFP	2,00
Água	o resto

Formulação 2

<u>Ingrediente</u>	<u>% p/p</u>
Gantrez S-97	2,5
Glicerina	10,0
Óleo aromatizante	0,4
Monofluorfosfato de sódio	0,05
Gluconato de clorohexidina	0,01
Lauroil-dietanolamida	0,2
CPP-ACFP	2,0
Água	o resto

Exemplo 11 Formulação de pastilhas

<u>Ingrediente</u>	<u>% p/p</u>
Açúcar	75-80
Xarope de milho	1-20
Óleo aromatizante	1-2
NaF	0,01-0,05
CPP-ACFP	3,0
Estearato de magnésio	1-5
Água	o resto

Exemplo 12 Formulação de Creme para Massagens das Gengivas

<u>Ingrediente</u>	<u>% p/p</u>
Petrolato branco	8,0
Propilenoglicol	4,0
Álcool estearílico	8,0
Polietilenoglicol 4000	25,0
Polietilenoglicol 400	37,0
Monoestearato de sacarose	0,5
Gluconato de clorohexidina	0,1
CPP-ACFP	3,0
Água	o resto

Exemplo 13 Formulação de Goma de Mascar

<u>Ingrediente</u>	<u>% p/p</u>
Goma de base	30,0
Carbonato de cálcio	2,0
Sorbitol cristalino	53,0
Glicerina	0,5
Óleo aromatizante	0,1
CPP-ACFP	2,0

Água

o resto

Exemplo 14 Suplemento Dietético

Foi adicionado CPP-ACP, como 1,0% p/p da dieta de galinhas raquíticas, para determinar a capacidade do CPP-ACP para proporcionar cálcio biodisponível para a acreção aos ossos. O CPP-ACP, a 1,0% p/p na dieta, produziu uma redução de 34% na incidência de anomalias da placa de crescimento, um aumento de 17% de cinzas das tíbias e uma redução de 22% da placa de crescimento cartilagíneo nos animais, que foi significativamente maior do que o do CPP isolado (Tabela 4), indicando que o CPP-ACP é superior ao CPP para promover a biodisponibilidade do cálcio de dieta e para facilitar a acreção óssea.

TABELA 4.

Efeito da adição de 1,0% de CPP-ACP à dieta de galinhas raquíticas sobre a incidência de anomalias da placa de crescimento, cinzas das tíbias e largura da placa de crescimento cartilaginosa			
	% de anomalias de crescimento %	% de cinzas das tíbias %	Largura da placa de crescimento (mm)
Controle	53 ± 5	30 ± 2	5,4 ± 0,2
1,0% de CPP	47 ± 9	30 ± 2	5,3 ± 0,2
1,0% de CPP-ACP	35 ± 3	35 ± 1	4,2 ± 0,2

REIVINDICAÇÕES

1. Processo para a produção de um complexo estabilizado de fosfato de cálcio amorfo, de uma forma básica de fosfato de cálcio amorfo estabilizado por um fosfopeptídeo de caseína, em que o referido fosfopeptídeo inclui a sequência de aminoácidos Ser(P)-Ser(P)-Ser(P)-Glu-Glu, formada por titulação de iões de cálcio e iões fosfato, mantendo ao mesmo tempo o pH acima de 7, na presença do referido fosfopeptídeo.
2. Processo de acordo com a reivindicação 1, em que o pH é de 9,0.
3. Processo para a produção de um complexo estável de fosfato de cálcio, incluindo uma forma básica de fosfato de cálcio amorfo estabilizada por um fosfopeptídeo, em que o referido fosfopeptídeo inclui a sequência de aminoácidos Ser(P)-Ser(P)-Ser(P)-Glu-Glu, incluindo os passos de:
 - (i) obtenção de uma solução de fosfopeptídeo possuindo um pH de 9,0;
 - (ii) mistura de (i) com soluções que contêm cálcio e fosfato inorgânico, e mantendo o pH de 9,0.
4. Complexo, incluindo uma forma básica de fosfato de cálcio amorfo, estabilizada por um fosfopeptídeo, em que o referido fosfopeptídeo inclui a sequência de aminoácidos Ser(P)-Ser(P)-Ser(P)-Glu-Glu, que é produzida diretamente com o processo de acordo com qualquer uma das reivindicações 1 a 3.

5. Complexo de acordo com a reivindicação 4, em que o referido fosfopeptídeo inclui uma sequência de aminoácidos escolhida de qualquer uma de:

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

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

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

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

6. Veículo de fornecimento adaptado para localizar, em conjunto, iões, incluindo iões de cálcio e fosfato num local alvo, incluindo o referido veículo de fornecimento, como ingrediente ativo, o complexo de acordo com uma qualquer das reivindicações 4 a 5.
7. Veículo de fornecimento de acordo com a reivindicação 6, que é um qualquer do grupo que consiste em pasta dentífrica, pó dentífrico, líquido dentífrico, colutório, pastilhas, goma de mascar, pasta dental, creme de massagem das gengivas, comprimidos para gargarejos, laticínios e outros produtos alimentares.

8. Composição farmacêutica, incluindo um complexo de acordo com qualquer uma das reivindicações 4 a 5, em combinação com um veículo farmacêutico.
9. Composição anticariogénica, incluindo a composição de acordo com a reivindicação 8 ou o veículo de fornecimento de acordo com as reivindicações 6 ou 7, adaptado para uso anticariogénico.
10. Composição terapêutica, incluindo a composição de acordo com a reivindicação 8, adaptada para uma utilização terapêutica.
11. Composição de acordo com qualquer uma das reivindicações 8 a 10, possuindo um pH de cerca de 4,5 a cerca de 9.
12. Suplemento dietético, incluindo um complexo de acordo com qualquer uma das reivindicações 4 a 5.
13. Suplemento dietético de acordo com a reivindicação 12 em que o referido suplemento compreende 0,1 a 100% p/p do referido complexo.
14. Suplemento dietético de acordo com a reivindicação 13 em que o referido suplemento compreende 2% p/p do referido complexo.
15. Complexo de acordo com qualquer uma das reivindicações 4 a 5 para utilização no tratamento ou na prevenção de cáries dentárias ou da deterioração dos dentes.

16. Complexo para utilização no tratamento ou na prevenção de cáries dentárias ou da deterioração dos dentes, de acordo com a reivindicação 15, em que a referida composição farmacêutica é administrada aos dentes ou gengivas de um sujeito que necessite do mesmo.
17. Complexo para utilização no tratamento ou na prevenção de cáries dentárias ou da deterioração dos dentes, de acordo com as reivindicações 15 ou 16, em que a referida composição farmacêutica é administrada por via tópica.
18. Complexo de acordo com qualquer uma das reivindicações 4 a 5 para utilização no tratamento de uma ou mais patologias relacionadas com a perda de cálcio do corpo, incluindo os ossos, deficiência de cálcio ou má absorção de cálcio.