



SUPERINTENDENCIA DE INDUSTRIA Y COMERCIO



No. 14-135713- -00000-0000

Fecha: 2014-06-24 13:53:18 Dep. 2020 DIR.NUEVASCR
Tra. 11 PATENTEIYII Eve: 379 FASENACIONALII
Act. 411 PRESENTACION Folios: 5

Industria y Comercio

SUPERINTENDENCIA

SOLICITUD

PATENTE DE INVENCION

21. EXPEDIENTE No.

54. TITULO: COMPOSICIONES DE CUIDADO ORAL

51. CLASIFICACION INTERNACIONAL A61K 8/66

71. SOLICITANTE: COLGATE-PALMOLIVE COMPANY

DOMICILIO: New York, Estados Unidos de América

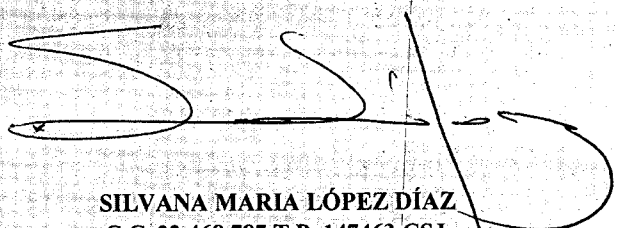
74. APODERADA SILVANA MARIA LÓPEZ DÍAZ

22. BOGOTÁ, D.C.

Industria y Comercio SUPERINTENDENCIA	SUPERINTENDENCIA DE INDUSTRIA Y COMERCIO  No. 14-135713- -00000-0000 Fecha: 2014-06-24 13:53:18 Dep. 2020 DIR.NUEVASCR Tra. 11 PATENTEIYII Eve: 379 FASENACIONALII Act. 411 PRESENTACION Folios: 5
---	---

DIRECCIÓN DE NUEVAS CREACIONES
SOLICITUD FASE NACIONAL – PCT

1	TIPO DE SOLICITUD	☒ Patente de invención ☐ Patente de Modelo de Utilidad ☐ Capítulo I ☒ Capítulo II		
2	DATOS SOLICITUD INTERNACIONAL PCT (86)			
Solicitud Internacional No.		PCT/US2011/066503	Fecha	21 de Diciembre de 2011
Publicación Internacional No.		WO 2013/095439 A1	Fecha	27 de Junio de 2013
3	TÍTULO DE LA INVENCIÓN (200 caracteres o espacios máximos)			
COMPOSICIONES DE CUIDADO ORAL				
4	CLASIFICACIÓN INTERNACIONAL (CIP) A61K 8/66			
5	SOLICITANTE (S) ☐ Esta persona también es inventor. Para datos adicionales utilizar hoja de información complementaria			
APELLIDOS O RAZÓN SOCIAL		NOMBRE	IDENTIFICACIÓN	TIPO
COLGATE-PALMOLIVE COMPANY				
6	DATOS DEL SOLICITANTE			
DIRECCIÓN: 300 Park Avenue New York,		No. TELÉFONO:		
CIUDAD: New York 10022,		CORREO ELECTRONICO:		
PAÍS DE RESIDENCIA: Estados Unidos de América		LUGAR DE CONSTITUCIÓN: Estados Unidos de América		
7	INVENTOR (ES)			
APELLIDOS		NOMBRES	NACIONALIDAD	
1.SCHAEFFER-KORBYLO,		Lyndsay	Estadounidense	
2.NESTA,		Jason	Estadounidense	
3.DU-THUMM,		Laurence	Estadounidense	
DIRECCIÓN DE CORREO ELECTRÓNICO:				
8	DATOS INVENTOR (ES)			
DIRECCIÓN		CIUDAD	PAÍS RESIDENCIA	
1. 24 Clearbrook Lane,		Flemington, New Jersey 08822,	Estados Unidos de América	
2. 30 Boulevard Road,		Cedar Knolls, New Jersey 07927,	Estados Unidos de América	
3. 16 Woodfield Court,		Princeton, New Jersey 08540,	Estados Unidos de América	
OTRO(S) SOLICITANTE(S) Y/O (OTRO(S)) INVENTOR(ES)				
☐ Los demás solicitantes y/o (demás) inventores se indican en una hoja a continuación.				
9	☐ REPRESENTANTE LEGAL ☒ APODERADO			
APELLIDOS		NOMBRES	IDENTIFICACIÓN	
LÓPEZ DÍAZ		SILVANA MARIA	C.C. 22.468.787 T.P. 147463 CSJ	
DIRECCIÓN		Cra. 11 No. 86 – 53, Piso 6	No. TELÉFONO	6181088
CIUDAD		Bogotá, D.C.	CORREO ELECTRÓNICO	notificaciones@clarkemodet.com.co.
PAÍS		Colombia		
10	DECLARACIONES DE PRIORIDAD ☐ SI ☐ NO			
(33) PAÍS DE ORIGEN		CÓDIGO PAÍS	(31) NÚMERO	(32) FECHA AAA/MM/DD

11	DECLARACIÓN SOBRE USO DE RECURSOS GENÉTICOS O BIOLÓGICOS		
Declaro que el objeto de la presente solicitud de patente fue obtenido a partir de recursos genéticos o biológicos de los que cualquiera de los países miembros de la Comunidad Andina es país de origen.			
☐ SI ☐ NO			
Nota: En caso afirmativo deberá anexar copia del contrato de acceso de recursos genéticos o productos derivados, o certificado o número de registro, expedido por la Autoridad competente.			
12	DECLARACIÓN SOBRE USO DE CONOCIMIENTOS TRADICIONALES		
Declaro que el objeto de la presente solicitud de patente fue obtenido a partir de conocimientos tradicionales de comunidades indígenas, afroamericanas o locales de países miembros de la Comunidad Andina.			
☐ SI ☐ NO			
Nota: En caso afirmativo deberá anexar la licencia o autorización de uso de conocimiento tradicional, o certificado, o número de registro expedido por la Autoridad competente.			
13	REDUCCIÓN DE TASAS		
Declaro que carezco de medios económicos para presentar la solicitud de patente.			
☐ SI ☐ NO			
Nota: En caso de ser persona natural y carecer de medios económicos, y por lo tanto, aplique la reducción de tasas a que se refiere la resolución vigente en tarifas, debe firmar la presente solicitud bajo la gravedad de juramento.			
Micro, pequeñas y medianas empresas ☐			
Universidades públicas o privadas ☐			
Entidades sin ánimo de lucro ☐			
Debe aportar los documentos que se indican en el numeral 17 de anexos			
14	AUTORIZACIÓN DE NOTIFICACIÓN EN LÍNEA ☐ SI ☐ NO		
Manifiesto que he leído y entendido perfectamente los términos y condiciones de uso de medios electrónicos para las notificaciones en línea a través de Internet de los actos administrativos proferidos por la Superintendencia de Industria y Comercio que deben ser notificados personalmente y, en consecuencia, autorizo el servicio de notificación a través de internet.			
15	COMPROBANTE DE PAGO O PAGO ELECTRÓNICO	Nº 14-058438 14-062395	Fecha 04/06/2014 12/06/2014
16	FIRMA DEL APODERADO :		
 SILVANA MARIA LÓPEZ DÍAZ C.C. 22.468.787 T.P. 147463 CSJ			
17	ANEXOS		
Documentación Técnica Solicitud Internacional en castellano		Documentación Jurídica	
1. ☒ Descripción Nº de folios 42		9. ☒ Poderes, si fuera el caso.	
2. ☒ Reivindicaciones Nº Reivindicaciones: 18		10. ☒ Documento que legalmente pruebe la cesión del inventor al solicitante o a su causante.	
3. ☐ Dibujos y/o figuras Nº folios:		11. ☐ Copia del contrato de acceso de recursos genéticos o productos derivados, certificado o número de registro, si fuera el caso.	
4. ☒ Resumen.		12. ☐ Copia de la licencia o autorización de Conocimientos Tradicionales, certificado o número de registro, si fuera el caso.	
5. ☐ Certificado de depósito de material biológico si fuera el caso.		13. Reducción de tasas	
6. ☐ Listado de secuencias de nucleótidos y/o aminoácidos en forma digital si fuera el caso.		Micro, pequeñas o medianas empresas	
7. ☐ Arte final 12 x 12.		☐ Copia simple de la declaración de renta del año inmediatamente anterior, o en su defecto prueba documental idónea.	
8. ☐ Anexo formato digital.		☐ Documento de constancia de cumplimiento con lo establecido en la ley 905 de 2004.	
		Universidades públicas o privadas	
		☐ Copia acto de reconocimiento institucional emitido por el Ministerio de Educación	
		Entidades sin ánimo de lucro	
		☐ Copia de registro vigente en Cámara de comercio.	
		☐ Hoja de información complementaria.	
		☐ Otros, especificar	
		14. ☒ Comprobante de pago de la tasa de presentación de la solicitud.	
		15. ☐ Comprobante de pago por reivindicación de prioridad.	
		16. ☐ Comprobante de pago de la tasa por concepto de excedente de palabras en la publicación.	
		17. ☒ Comprobante de pago por reivindicación adicional a 10.	

SUPERINTENDENCIA DE INDUSTRIA Y COMERCIO

NIT : 800.176.089-2

- / -



RECIBO DE CAJA

No. 14 - 0058438

Bogotá D.C., Junio 04 de 2014 - 07:44:01

RECIBIDO DE : CLARKE MODET

NI 830.008.643

*** Soporte del Pago ***

TIPO PAGO	BANCO	CUENTA	No. PAGO	FECHA PAGO	VR. PAGO
CONSIGNACION	BANCO DE BOGOTA	062754387	596597595	03/06/2014	99.651.000.00

*** Conceptos Pagados ***

CANT. RENTISTICO	CONCEPTO	Vr. UNDITARIO	Vr. CONCEPTO
1 50005-01-01 SOLICITUDES	1 TRAMITES DE SOL. DE PATENTE DE INVENCIÓN	515.000.00	515.000.00
			\$515.000.00

SON: **QUINIENTOSQUINCE MIL PESOS MONEDA CORRIENTE**

Responsable: _____

Recibo de Caja Aplicado al Expediente No. _____

SUPERINTENDENCIA DE INDUSTRIA Y COMERCIO



No. 14-135713- -00000-0000

Fecha: 2014-06-24 13:53:18 Dep. 2020 DIR.NUEVASCR
Tra. 11 PATENTEIYII Eve: 379 FASENACIONALII
Act. 411 PRESENTACION Folios: 5

Sede Centro: Carrera 13 No. 27 - 00 Pisos 3,4,5 y 10 Bogotá, D.C.- Colombia

Web: www.sic.gov.co e-mail: info@sic.gov.co Conmutador: (571) 5870000 Fax: (571) 5870284 Línea: 018000-910165 Call Center: (571) 6513240

, Junio 4 de 2014 - 07:44:16

2

SUPERINTENDENCIA DE INDUSTRIA Y COMERCIO

NIT : 800.176.089-2

-/-



RECIBO DE CAJA

No. 14 - 0062395

Bogotá D.C., Junio 12 de 2014 - 10:20:23

RECIBIDO DE : CLARKE MODET

NI 830.008.643

*** Soporte del Pago ***

TIPO PAGO	BANCO	CUENTA	No. PAGO	FECHA PAGO	VR PAGO
CONSIGNACION	BANCO DE BOGOTA	062754387	596597606	12/06/2014	9.393.000.00

*** Conceptos Pagados ***

CANT. RENTISTICO	CONCEPTO	Vr. UNDITARIO	Vr. CONCEPTO
8 50005-01-01 SOLICITUDES	1607 REIVINDICACION PATENTE UNITARIA ADICIONAL A LAS 10 INIC	31.000.00	248.000.00
			\$248.000.00

SON: **DOSCIENTOS CUARENTA Y OCHO MIL PESOS MONEDA CORRIENTE**

Responsable: _____

Recibo de Caja Aplicado al Expediente No. _____

SUPERINTENDENCIA DE INDUSTRIA Y COMERCIO



No. 14-135713- -00000-0000

Fecha: 2014-06-24 13:53:18 Dep. 2020 DIR.NUEVASCR
Tra. 11 PATENTEIYII Eve: 379 FASENACIONALII
Act. 411 PRESENTACION Folios: 5

Sede Centro: Carrera 13 No. 27 - 00 Pisos 3,4,5 y 10 Bogotá, D.C.- Colombia

Web: www.sic.gov.co e-mail: info@sic.gov.co Conmutador: (571) 5870000 Fax: (571) 5870284 Línea: 018000-910165 Call Center: (571) 6513240

Junio 12 de 2014 - 10:20:25

3

4

		PLANILLA DE RADICACIÓN - DIGITALIZACIÓN DIARIA RELACIÓN DE ANEXOS	
Dependencia: 2020		Fecha: <u>14</u> / <u>06</u> / <u>24</u> AAAA MM DD	
		Recorrido: 3	
Tipo de Radicación: Entrada: ☒ Salida: ☐ Traslado: ☐ Convenio: ☐			
Radicador:		Planilla:	

ID	No. Radicación	Consecutivo	Item
1	14-135713-	0	2
2			
3			
4			
5			
6			
7			
8			
9			
10			
11			
12			
13			
14			
15			
16			
17			

Item	Unidad de Conservación
1	Bolsa
2	Caja
3	Libro
4	Sobre
5	Tomo
6	Otro
Item	Soporte Documental
☒	CD
8	Disquete
9	DVD
10	Folleto
11	Foto
12	Periódico
13	Plano
14	Publicación Periódica
15	USB
16	Otro

Observaciones: Solo (4) ANEXA CD, el cual contiene un total de (1) archivo en formato pdf y fue procesado correctamente

ce



No. 14-135713- -00000-0000

Fecha: 2014-06-24 13:53:18 Dep. 2020 DIR.NUEVASCR
Tra. 11 PATENTEIYII Eve: 379 FASENACIONALII
Act. 411 PRESENTACION Folios: 5

PATENTE DE INVENCION ☐

MODELO I

- ☐ Indicación que se solicita una patente.
- ☐ Datos de identificación del solicitante o de la persona que presenta la solicitud
- ☐ Descripción de la invención
- ☐ Dibujos de ser estos pertinentes
- ☐ Comprobante de pago de las tasas establecidas (De ser el caso formato de descuento)
- Completa ☐ Incompleta ☐

PATENTE DE INVENCION PCT ☐

MODELO DE UTILIDAD PCT ☐ Art.33 Decisión 486/00, Circular Única

- ☐ Indicación que se solicita una PCT
- ☐ Copia de la solicitud en español, tal como fue presentada inicialmente (capítulo descriptivo, reivindicatorio, resumen)
- ☐ Dibujos de ser estos pertinentes
- ☐ Comprobante de pago de las tasas establecidas (de ser el caso formato de descuento)
- Completa ☐ Incompleta ☐

DISEÑO INDUSTRIAL ☐

(Art. 119 Decisión 486/00)

- ☐ Indicación que se solicita Diseño industrial
- ☐ Datos de identificación del solicitante o de la persona que presenta la solicitud
- ☐ Representación gráfica y fotográfica del Diseño industrial o muestra del material que incorpora el diseño
- ☐ Comprobante de pago de las tasas establecidas
- Completa ☐ Incompleta ☐

ESQUEMA DE TRAZADO ☐

(Art. 92 Decisión 486/00)

- ☐ Indicación que se solicita un esquema de trazado
- ☐ Datos de identificación del solicitante o de la persona que presenta la solicitud
- ☐ Representación gráfica de un esquema de trazado
- ☐ Comprobante de pago de las tasas establecidas
- Completa ☐ Incompleta ☐

COMPOSICIONES DE CUIDADO ORAL

ANTECEDENTES

[0001] La placa oral consiste de una amplia variedad de especies bacterianas incrustadas en una matriz estructural y funcional que se denomina biopelícula. Además de las bacterias, una variedad de componentes extracelulares son esenciales en la estructura y la función de esta biopelícula. Los componentes extracelulares de la biopelícula de placa abarcan: carbohidratos, ácidos nucleicos, lípidos, proteínas estructurales, adhesinas y moléculas de señalización. Todos estos componentes desempeñan un papel bien sea en mantener la estructura de la biopelícula o facilitar la transferencia de señales y nutrientes a través de la comunidad. Los métodos tradicionales de limpieza bucal se concentran en la eliminación o la destrucción de las bacterias. El desbridamiento mecánico mediante el cepillado y el uso de hilo dental elimina toda o parte de la placa acumulada. Los agentes químicos, como el cloruro de cetilpiridinio o el triclosán, por lo general se centran en aniquilar las bacterias incrustadas dentro de la biopelícula. Sin embargo, los componentes no bacterianos de la matriz son parte integrante de la estructura y la función de las biopelículas orales, y constituyen una diana atractiva para la disrupción de la placa. La alteración de los componentes extracelulares de la biopelícula desintegraría la placa físicamente y, por ende, afectaría la protección brindada por la biopelícula. Esto facilitaría la remoción física de la biopelícula de

superficies que resultan difíciles de alcanzar. Asimismo, las bacterias serían entonces más vulnerables a los métodos tradicionales de extracción mecánica y los tratamientos químicos antibacterianos.

[0002] Numerosos estudios previos han identificado enzimas que son potencialmente valiosas para la eliminación de biopelículas bucales. Sin embargo, la utilización de enzimas en formulaciones de cuidado bucal presenta varios desafíos. Aun cuando hay gran cantidad de enzimas disponibles, algunas enzimas y combinaciones de enzimas son mucho más eficaces que otras para este propósito, y la identificación de combinaciones óptimas es deseable. Es más, las enzimas por lo general están disponibles comercialmente en forma de polvo, ya que en forma líquida las mismas suelen ser inestables. La utilización de enzimas en polvo en un contexto de producción masiva resulta difícil debido a la dificultad en medir y controlar las cantidades de enzimas con precisión y mantener un entorno laboral seguro. Por otra parte, las enzimas pueden presentar problemas en cuanto a la formulación y la estabilidad cuando se incorporan en productos de higiene bucal. La complejidad relativa de formulaciones dentífricas significa que hay una gran cantidad de componentes que tienen el potencial de interferir en la actividad y la estabilidad de las enzimas, y en algunos casos las enzimas también pueden degradar otros componentes de la formulación. Por último, es posible que algunas personas sean alérgicas o sensibles a ciertas enzimas, por lo que se requiere de alternativas a las formulaciones enzimáticas existentes.

[0003] De allí la necesidad de crear preparaciones enzimáticas estables que tengan la capacidad para disolver la placa dental y que se puedan incorporar fácilmente en composiciones para la higiene bucal.

RESUMEN

[0004] Se evalúa un elevado número de distintas enzimas candidatas en diversas combinaciones para comprobar su eficacia y su idoneidad como componentes de productos de cuidado oral, y se seleccionan las combinaciones óptimas. La invención aporta formulaciones de cuidado oral que comprenden una combinación de proteasa alcalina y una segunda enzima elegida entre celulasa, α -glucanasa y combinaciones de las mismas; por ejemplo, productos de cuidado oral que contienen 0,001%-0,1% celulasa/0,002%-0,2% proteasa alcalina ó 0,002%-0,2% α -glucanasa/0,002%-0,2% proteasa alcalina.

[0005] Otras áreas de aplicación de la presente invención se desprenderán a partir de la descripción detallada que se provee a continuación. Ha de quedar claro que la descripción detallada así como los ejemplos específicos, si bien divulgan la realización preferente de la presente invención, están destinados a fines de ilustración solamente y no tienen por objeto limitar el alcance de la presente invención.

DESCRIPCIÓN DETALLADA

[0006] La descripción que sigue de la(s) realización(es) preferente(s) es de naturaleza meramente ejemplar y de modo alguno tiene por objeto limitar el alcance de la presente invención, sus aplicaciones o sus usos.

[0007] Se evalúa una serie de enzimas líquidas a fin de determinar su capacidad para desintegrar la placa dental. A continuación, las enzimas estudiadas y sus dianas:

Enzima	Diana
Proteasa neutra	Proteínas
Proteasa ácida	Proteínas
Proteasa alcalina	Proteínas
Transglucosidasa	Carbohidratos
Celulasa	Carbohidratos
α -glucanasa	Carbohidratos
α -amilasa	Carbohidratos
cutinasa	Lípidos

[0008] La matriz de la biopelícula se compone de una variedad de factores extracelulares que se combinan para crear el andamiaje estructural pegajoso de la placa. Estos componentes extracelulares abarcan: carbohidratos, ácidos nucleicos, lípidos, proteínas estructurales, adhesinas y moléculas señalizadoras. Por lo general, las enzimas tienen una actividad específica y se dirigen sólo a uno de estos componentes, o incluso un reducido subconjunto de ese componente individual. Por consiguiente, se cree que las combinaciones de enzimas potencialmente podrían alcanzar componentes múltiples de la matriz, permitiendo así una ruptura más completa de la matriz de la biopelícula. En primer lugar, las enzimas se examinan en forma individual contra biopelículas formadas por *Actinomyces viscosus*, luego las combinaciones se analizan a fin de determinar su

capacidad para desintegrar las biopelículas conformadas por especies mixtas.

[0009] En una realización, la invención aporta una composición de cuidado oral (Composición 1) que comprende una cantidad eficaz (por ejemplo, en una concentración eficaz para eliminar una biopelícula) de una combinación de proteasa alcalina y una segunda enzima elegida entre celulasa, α -glucanasa, y combinaciones de las mismas, en un vehículo aceptable por vía oral. Por ejemplo, la invención proporciona:

- 1.1. La Composición 1 en la que la proteasa alcalina es una serín proteasa;
- 1.2. La Composición 1 o 1.1 en la que la segunda enzima es celulasa;
- 1.3. La Composición 1 o 1.1 en la que la segunda enzima es α -glucanasa;
- 1.4. Cualquiera de las composiciones precedentes que comprende de 0,002% a 0,2% de proteasa alcalina;
- 1.5. Cualquiera de las composiciones precedentes que comprende de 0,001% a 0,1% de celulasa;
- 1.6. Cualquiera de las composiciones precedentes que comprende de 0,002% a 0,2% de α -glucanasa;
- 1.7. Cualquiera de las composiciones precedentes que comprende de 0,001% a 0,1% de celulasa y de 0,002% a 0,2% de proteasa alcalina;
- 1.8. Cualquiera de las composiciones precedentes que comprende de 0,002% a 0,2% de α -glucanasa y de 0,002% a 0,2% de proteasa alcalina;

- 1.9. Cualquiera de las composiciones precedentes en la que la proteasa alcalina es o se deriva de una proteasa alcalina de origen bacteriano; por ejemplo, una proteasa alcalina derivada del *Bacillus*;
- 1.10. Cualquiera de las composiciones precedentes en la que la proteasa alcalina es una subtilisina;
- 1.11. Cualquiera de las composiciones precedentes en la que la proteasa alcalina es o se deriva de una proteasa alcalina de origen fúngico;
- 1.12. Cualquiera de las composiciones precedentes en la que la proteasa alcalina se hace mediante la fermentación; por ejemplo, se extrae de un caldo de fermentación bacteriana o un caldo de fermentación fúngica.
- 1.13. Cualquiera de las composiciones precedentes en forma de enjuague bucal, pasta de dientes, gel dental, polvo dental, gel no abrasivo, mousse, espuma, atomizador bucal, gragea, cápsula oral, implemento dental, limpiador de la dentadura y otros productos para la higiene bucal.
- 1.14. Cualquiera de las composiciones precedentes en la que la composición es una pasta de dientes o un enjuague bucal que además comprende, de manera opcional, uno o más de uno de los siguientes componentes: agua, abrasivos, tensioactivos, agentes espumantes, vitaminas, polímeros, enzimas adicionales, humectantes, espesantes, agentes

antimicrobianos, conservantes, aromatizantes, colorantes y/o combinaciones de los mismos;

- 1.15. La Composición 1.10 en la que la composición es un enjuague bucal;
- 1.16. La Composición 1.10 en la que la composición es una pasta de dientes;
- 1.17. Cualquiera de las composiciones precedentes en la que el pH es de 4,5 a 6,5; por ejemplo, aproximadamente 5;
- 1.18. Cualquiera de las composiciones precedentes que además comprende un aminoácido básico, como arginina, en forma de sal de adición de ácido o libre; por ejemplo, bicarbonato de arginina, fosfato de arginina o hidrocloreuro de arginina;
- 1.19. Cualquiera de las composiciones precedentes que además comprende una cantidad eficaz de fuente de ión fluoruro;
- 1.20. Cualquiera de las composiciones precedentes que comprende los siguientes ingredientes en peso; por ejemplo, en la forma de un enjuague bucal:

Ingrediente	Rango de Concentración % peso/peso
Agua	50,0-90,0
Humectantes, como los seleccionados entre sorbitol, xilitol, glicerina, propilenglicol y mezclas de los mismos.	5,0-40,0
Tensioactivo; por ejemplo, tensioactivo aniónico como laurilsulfato sódico, y/o	0,01-10,0

tensioactivo no iónico, como por ejemplo poloxámero, aceite de ricino pegilado, y/o mezclas de los mismos.	
Solución Tampón	0,01-10,0
Conservantes y estabilizadores; por ejemplo, benzoatos, quelantes tales como ácido etilendiaminotetracético (EDTA, por sus siglas en inglés) y combinaciones de los mismos	0,01-1,0
Sabor	0,01-1,0
Espesante polimérico	0-2
Fuente de ion fluoruro	0-0,3
Arginina (en forma libre o de sal, en peso de la base libre)	0-2,0
Edulcorante	0,001-0,5
Cloruro de cetilpiridinio	0-1,0
Celulasa y/o α -Glucanasa	0,001-0,1 de celulasa y/o 0,002-0,2 de α - glucanasa
Proteasa alcalina	0,002-0,2

[0010] Asimismo, la invención aporte procedimientos para (i) inhibir la formación de película microbiana en la cavidad bucal; (ii) reducir la acumulación de placa; (iii) reducir o inhibir la desmineralización y estimular la remineralización de los dientes; (iv) disminuir la hipersensibilidad de la dentadura; (v) reducir o inhibir la gingivitis; (vi) estimular la sanación de llagas o cortadas en la boca; (vii) reducir los niveles de bacterias productoras de ácido; (viii) incrementar los niveles relativos de bacterias no cariogénicas y/o bacterias que no forman placa; (ix) reducir o inhibir la formación de caries dental; (x) reducir, corregir o inhibir lesiones precariosas del esmalte dental,

como las que se detectan mediante fluorescencia cuantitativa inducida por luz (QLF, por sus siglas en inglés) o detección electrónica de caries (ECM, por sus siglas en inglés); (xi) tratar, aliviar o reducir la sequedad bucal; (xii) limpiar los dientes y la cavidad bucal; (xiii) reducir la erosión de la dentadura; (xiv) blanquear la dentadura; y/o (xv) promover la salud sistémica, la salud cardiovascular inclusive, por ejemplo mediante la reducción de la posibilidad de infección sistémica a través de los tejidos bucales, lo cual comprende la aplicación a la cavidad bucal de una cantidad eficaz de una composición contentiva de una proteasa alcalina y una segunda enzima elegida entre celulasa y α -glucanasa, como por ejemplo cualquiera de la Composición 1, y subsiguientes.

[0011] Del mismo modo, la invención ofrece la utilización de una proteasa alcalina y una segunda enzima seleccionada entre celulasa y α -glucanasa en la elaboración de una composición de cuidado oral, de acuerdo con cualquiera de la Composición 1, et seq., así como procedimientos para la elaboración de composiciones de cuidado oral que comprenden la combinación de una proteasa alcalina y una segunda enzima seleccionada entre celulasa y α -glucanasa en un vehículo aceptable por vía oral, como por ejemplo una base de dentífrico o de enjuague bucal.

[0012] Asimismo, la invención aporta un preconcentrado a base de enzimas líquidas, por ejemplo, a ser utilizado en la elaboración de una composición de cuidado oral, conforme a cualquiera de la Composición 1, et seq. compuesta de una

proteasa alcalina y una segunda enzima seleccionada entre celulasa y α -glucanasa.

[0013] Tal como se emplea en la presente memoria, el término "proteasa alcalina" se refiere a una proteasa con actividad óptima en condiciones alcalinas, tal como un pH mayor que pH 7, como un pH de 7,5 a 9,5 por ejemplo. La proteasa alcalina puede ser una proteína natural o modificada de origen bacteriano. En una realización, la proteasa alcalina es una serín proteasa, elegida del grupo consistente de proteasas tipo quimotripsina, proteasas tipo subtilisina o subtilasas, proteasas α -líticas mixobacterianas y proteasas procedentes de la bacteria *Bacillus*. Las enzimas de proteasa están comercialmente disponibles, por ejemplo, en productos de fermentación purificados, tales como productos de fermentación bacteriana o fúngica, óptimamente activos a un alto pH alcalino, y estables en una amplia gama de temperaturas (25-70°C), tales como las enzimas Properase®, Properase 400E (Genencor/DuPont).

[0014] En una realización determinada, la proteasa alcalina es una enzima subtilasa. Las subtilasas constituyen una familia de serín proteasas del tipo subtilisina. Las enzimas subtilasas inician el ataque nucleófilo sobre el enlace (amida) peptídico a través de un residuo de serina en el sitio activo. Al parecer, estas han evolucionado de manera independiente y convergente en una triada catalítica Ser/His/Asp, similar a las serín proteasas de tipo tripsina.

[0015] En una realización determinada, la proteasa alcalina es una enzima subtilisina. Las subtilisinas (*serine*

endopeptidasas) constituyen una clase de proteasas no específicas (enzimas que digieren la proteína) originalmente obtenidas a partir del *Bacillus subtilis*. Las subtilisinas pertenecen a la familia de las subtilasas. Típicamente, las subtilisinas tienen pesos moleculares entre 20.000 y 45.000 daltones aproximadamente. Se pueden obtener a partir de las bacterias que habitan en la tierra, por ejemplo *Bacillus amyloliquefaciens*. Las subtilisinas son secretadas en grandes cantidades por muchas especies de la bacteria *Bacillus*.

[0016] Como se emplea en la presente memoria, el término "celulasa" se refiere a una enzima que cataliza la celulolisis (es decir, la hidrólisis de la celulosa). La celulasa se puede seleccionar entre, por ejemplo, endocelulasas, exocelulasas, celobiasis, celulasas oxidativas y celulosa fosforilasa. En una realización, la celulasa es una endocelulasa.

[0017] Tal como se emplea en la presente memoria, el término " α -glucanasa" se refiere a una enzima que cataliza la hidrólisis de 1,3-enlaces- α -D-glucósídicos en un polisacárido y, por ende, es capaz de hidrolizar glucano insoluble.

[0018] pH: El pH de la formulación es, de preferencia, ligeramente ácido; por ejemplo un pH de 4,5 a 6,5, ca. pH 5, sobre todo cuando la formulación contiene iones fluoruro, calcio y/o otros que son más solubles a un pH menor. Mientras que un pH ácido es, por lo general, inferior al pH óptimo para la actividad de la proteasa alcalina, no se pudo determinar que el pH inferior redujera la eficacia de las formulaciones. Por el contrario, la proteasa alcalina resultó

ser sorprendentemente eficaz en las formulaciones con un pH inferior. Sin restringirnos a la teoría, creemos que el pH en el microambiente en el sitio activo puede ser mayor que el pH en la formulación, y que este pH micro ambiental constituye un factor de mayor relevancia en la determinación de la actividad enzimática que el pH global de la formulación.

[0019] Agentes activos: La concentración eficaz de los ingredientes activos que se utilizan en la presente memoria dependerá del agente y del sistema de distribución específico empleados. Se sabe que una pasta dental, por ejemplo, típicamente se diluye en agua cuando se usa, en tanto que un enjuague bucal no se diluye. Por ende, una concentración eficaz de agentes activos en un dentífrico será entre 5 y 15 veces más alta que la requerida para un enjuague bucal. Del mismo modo, la concentración dependerá de la sal o el polímero exacto seleccionado. Por ejemplo, cuando el agente activo se proporciona en forma de sal, el contraíón afectará el peso de la sal, de manera que si el contraíón es más pesado, se necesita más sal en peso a fin de proporcionar la misma concentración de ion activo en el producto final. Los intervalos efectivos para las enzimas en las composiciones de la invención son: 0,001%-0,1% de celulasa/0,002%-0,2% de proteasa alcalina ó 0,002%-0,2% de α -glucanasa/0,002%-0,2% de proteasa alcalina. Otras sustancias activas se proporcionan, asimismo, en cantidades eficaces. La arginina, cuando está presente, puede estar presente en niveles que varían entre 0,1% y 20% en peso aproximadamente, expresado como peso de base libre); entre 0,1% y 3 % en peso aproximadamente para un

enjuague bucal; entre 1% y 10% en peso aproximadamente para una pasta de dientes, o entre 7% y 20% en peso para un producto profesional o un tratamiento con prescripción médica. El fluoruro podría estar presente a niveles de 25 a 25.000 ppm aproximadamente; por ejemplo, entre 25 y 250 ppm aproximadamente para un enjuague bucal; entre 750 y 2.000 ppm aproximadamente para una pasta dental de consumo masivo, o entre 2.000 y 25.000 ppm aproximadamente para un producto profesional o tratamiento con prescripción médica. Los niveles de agentes antibacterianos, además de la sal de galio y el polímero de aminoácido básico, variarán de manera similar; por ejemplo, los niveles utilizados en una pasta de diente es de 5 a 15 veces mayor que los empleados en un enjuague bucal. Por ejemplo, un enjuague bucal a base de triclosán puede contener aproximadamente 0,03% en peso de triclosán en tanto que un dentífrico a base de triclosán puede contener aproximadamente 0,3% en peso de triclosán.

[0020] Fuente de ión fluoruro: Las composiciones de cuidado oral puede incluir, asimismo, una o más fuentes de ión fluoruro, como sales de fluoruro soluble. Una amplia variedad de materias que producen iones fluoruro se pueden emplear como fuentes de fluoruro soluble en las composiciones de la presente invención. Ejemplos de materias que producen iones fluoruro adecuadas se divulgan en la patente estadounidense No. 3.535.421, otorgada a Briner et al.; la patente estadounidense No. 4.885.155, otorgada a Parran, Jr. et al., y la patente estadounidense No. 3.678.154, otorgada a Widder et al., las cuales se incorporan aquí por referencia. Las fuentes de ión fluoruro representativas incluyen, mas no se

limitan a, fluoruro de estaño, fluoruro de sodio, fluoruro de potasio, monofluorofosfato sódico, fluorosilicato de sodio, fluorosilicato de amonio, fluoruro de amina, fluoruro de amonioamina, fluoruro de amonio, y combinaciones de los mismos. En ciertas realizaciones, la fuente de ión fluoruro abarca fluoruro de estaño, fluoruro de sodio, monofluorofosfato de sodio, así como sus mezclas. En ciertas realizaciones, la composición de cuidado oral de la invención puede que contenga, asimismo, una fuente de iones fluoruro o un ingrediente que proporcione fluorina en cantidades suficientes para suministrar entre 25 ppm y 25.000 ppm aproximadamente de iones fluoruro, generalmente al menos unas 500 ppm, por ejemplo, entre alrededor de 500 y alrededor de 2000 ppm, alrededor de 1000 a 1600 ppm, alrededor de 1450 ppm. El nivel apropiado de fluoruro dependerá de la aplicación específica. Un enjuague bucal, por ejemplo, normalmente tendría entre 100 y 250 ppm aproximadamente de fluoruro. Una pasta dental para el consumo general normalmente tendría entre unas 1000 y unas 1500 ppm, en tanto que una pasta dental pediátrica tendría un poco menos. Un dentífrico o revestimiento de uso profesional podría tener tantas como 5.000 o hasta 25.000 ppm de fluoruro. Se puede añadir fuentes de ión fluoruro a las composiciones de la invención a un nivel de 0,01% en peso aproximadamente a 10% en peso aproximadamente en una realización, o de 0,03% en peso aproximadamente a 5% en peso aproximadamente, y en otra realización de 0,1% en peso aproximadamente a 1% en peso aproximadamente. Los pesos de las sales de fluoruro de modo

de aportar el nivel apropiado de ión fluoruro obviamente variará con base en el peso del contraión en la sal.

[0021] Abrasivos: Las composiciones de la invención, por ejemplo la Composición 1 et seq., pueden contener un abrasivo de fosfato cálcico, tal como fosfato tricálcico ($\text{Ca}_3(\text{PO}_4)_2$), hidroxiapatita ($\text{Ca}_{10}(\text{PO}_4)_6(\text{OH})_2$), o dihidrato del fosfato dicálcico ($\text{CaHPO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$, también referido a veces como DiCal en el presente documento) o pirofosfato de calcio. Las composiciones pueden incluir uno o más abrasivos adicionales, tales como abrasivos de silicato tales como silicatos precipitados que tienen un tamaño de partícula medio de hasta unos 20 micrones, como Zeodent 115® comercializado por J. M. Huber. Otros abrasivos útiles son: metafosfato de sodio, metafosfato de potasio, silicato de aluminio, alúmina calcinada, bentonita u otros materiales silíceos, o combinaciones de los mismos. Los materiales de pulido abrasivos compuestos por sílices que son útiles en la práctica de la presente invención, así como los otros abrasivos, por lo general tienen un tamaño de partícula promedio que varía entre aproximadamente 0,1 y aproximadamente 30 micras; y aproximadamente 30 micras, entre 5 y aproximadamente 15 micras. Los abrasivos de sílice pueden ser de sílice precipitada o geles de sílice, tales como las xerogeles de sílice descritos en la patente estadounidense No. 3.538.230, concedida a Pader et al., y la patente estadounidense No. 3.862.307, concedida a Digiulio, ambas incorporadas aquí por referencia. Algunos xerogeles de sílice en particular se venden bajo la marca registrada Syloid® distribuida por W. R. Grace & Co., de Davison Chemical

Division. Los materiales de sílice precipitada abarcan los comercializados por J. M. Huber Corporation bajo la marca registrada Zeodent®, incluso la sílice que lleva la designación Zeodent 115 y 119. Estos abrasivos de sílice se describen en la patente estadounidense No. 4.340.583, concedida a Wason, la cual se incorpora aquí por referencia. En ciertas realizaciones, los materiales abrasivos útiles en la aplicación de las composiciones de cuidado oral de acuerdo con la invención incluyen geles de sílice y sílice amorfa precipitada que tienen un valor de absorción de aceite menor de aproximadamente 100cc/100g de sílice y en el intervalo de aproximadamente 45cc/100g a aproximadamente 70cc/100g de sílice. Los valores de absorción de aceite se miden mediante el método ASTA Rub-Out Method D281 ("Standard Test Method for Oil Absorption of Pigments by Spatula Rub-Out"). En ciertas realizaciones, las sílices son partículas coloidales que poseen un tamaño medio de partícula de aproximadamente 3 micras a aproximadamente 12 micras; y de aproximadamente 5 a aproximadamente 10 micras. Los abrasivos de sílice de baja absorción de aceite particularmente útiles en la práctica de la presente invención se venden bajo la denominación comercial Sylodent XWA® distribuida por Davison Chemical Division de W.R. Grace & Co., Baltimore, Md. 21203. El Sylodent 650 XWA®, un hidrogel de sílice compuesto de partículas de sílice coloidal que tienen un contenido de agua de 29% en peso, un diámetro promedio de aproximadamente 7 a aproximadamente 10 micras y una absorción de aceite menor de 70 cc/100 g de sílice, constituye un ejemplo de un abrasivo de sílice de baja absorción de aceite útil en la práctica de

la presente invención. El abrasivo está presente en la composición dentífrica de la presente invención en una concentración de aproximadamente 10% a aproximadamente 60% en peso; de aproximadamente 20% a aproximadamente 45% en peso en otra realización, y de aproximadamente 30% a aproximadamente 50% en peso, en otra realización.

[0022] Agentes reforzadores de la formación de espuma: Las composiciones de cuidado oral de la presente invención pueden incluir, asimismo, un agente para aumentar la cantidad de espuma que se produce cuando se cepilla la cavidad bucal. Ejemplos ilustrativos de agentes que incrementan la formación de espuma incluyen, mas no se limitan a, polioxietileno y ciertos polímeros tales como polímeros alginato. El polioxietileno puede aumentar la cantidad y el espesor de la espuma generada por el componente vehículo de la composición oral de la presente invención. El polioxietileno también se conoce comúnmente como polietilenglicol ("PEG") u óxido de polietileno. Los polioxietilenos adecuados para la presente invención tendrán un peso molecular de aproximadamente 200.000 a aproximadamente 7.000.000. En una realización, el peso molecular variará entre aproximadamente 600.000 y aproximadamente 2.000.000, y en otra realización variará entre aproximadamente 800.000 y aproximadamente 1.000.000. Polyox® es la marca registrada del polioxietileno de alto peso molecular producido por Union Carbide. El polioxietileno puede estar presente en una cantidad de aproximadamente 1% a aproximadamente 90%; en una realización estará presente en una cantidad de aproximadamente 5% a aproximadamente 50%, y en otra realización de aproximadamente 10% a aproximadamente

20% en peso del componente portador de las composiciones orales de la presente invención. La dosificación del agente espumante en la composición de cuidado oral (es decir, una dosis única) es de aproximadamente 0,01% a aproximadamente 0,9% en peso; de aproximadamente 0,05% a aproximadamente 0,5% en peso, y en otra realización de aproximadamente 0,1% a aproximadamente 0,2% en peso.

[0023] Tensioactivos: Las composiciones útiles para la práctica de la presente invención pueden contener tensioactivos aniónicos, como por ejemplo:

- i. sales solubles en agua de monosulfatos de monoglicérido de ácido graso superior, tales como la sal de sodio del monosulfato de monoglicérido de los ácidos grasos del aceite de coco hidrogenado, N-metil N-cocoil taurato de sodio, cocomo-glicédido sulfato de sodio,
- ii. sulfatos de alquilo superiores, tal como laurilsulfato de sodio,
- iii. alquilétersulfatos superiores; por ejemplo, que tengan la fórmula estructural $\text{CH}_3(\text{CH}_2)_m\text{CH}_2(\text{OCH}_2\text{CH}_2)_n\text{OSO}_3\text{X}$, en la cual m es un número entero de 6 a 16, por ejemplo 10; n es un número entero de 1 a 6, por ejemplo 2, 3 ó 4; y X es Na o K, por ejemplo Lauril éter sulfato sódico $(\text{CH}_3(\text{CH}_2)_{10}\text{CH}_2(\text{OCH}_2\text{CH}_2)_2\text{OSO}_3\text{Na})$.
- iv. alquil-aril sulfonatos superiores, como el dodecil benceno sulfonato de sodio (lauril benceno sulfonato de sodio)

v. alquil-sulfoacetatos superiores, tales como lauril-sulfoacetato sódico (dodecil sulfoacetateo sódico; ésteres de ácidos grasos superiores de 1,2 dihidroxi propano sulfonato, sulfocolaurato (N-2-etil laurato potásico sulfoacetamida) y lauril sarcosinato sódico.

[0024] Por "alquil superior" se entiende, por ejemplo, un alquil de 6 a 30 átomos de carbono. En realizaciones concretas, el tensioactivo aniónico se elige entre lauril sulfato de sodio y lauril éter sulfato de sodio. El tensioactivo aniónico puede estar presente en una cantidad que es eficaz, por ejemplo, >0,01% en peso de la formulación, mas no a una concentración que pueda irritar el tejido bucal, por ejemplo <10%; las concentraciones óptimas dependen de la formulación específica y el tensioactivo específico. Por ejemplo, las concentraciones que se emplean para un enjuague bucal normalmente están por el orden de la décima parte de las que se utilizan en una pasta de dientes. En una realización, el tensioactivo aniónico en una pasta de dientes está presente en una concentración de aproximadamente 0,3% a aproximadamente 4,5% en peso, por ejemplo, aproximadamente 1,5%. De manera opcional, las composiciones de la invención pueden contener mezclas de tensioactivos; es decir, pueden comprender tensioactivos aniónicos y otros tensioactivos que pueden ser aniónicos, catiónicos, zwitteriónicos o no iónicos. Por lo general, los agentes tensioactivos son aquellos que son razonablemente estables a través de un amplio intervalo de pH. Los tensioactivos se describen en mayor detalle en la patente de Estados Unidos No. 3.959.458, concedida a Agricola et al.; la patente de Estados Unidos No.

3.937.807, concedida a Haefele; y la patente de Estados Unidos No. 4.051.234, concedida a Gieske et al., las cuales se incorporan aquí por referencia. En ciertas realizaciones, los tensioactivos aniónicos satisfactorios para la práctica de la presente invención abarcan las sales solubles en agua de alquilsulfatos que tienen entre 10 y 18 átomos de carbono en el radical alquilo y las sales solubles en agua de monoglicéridos sulfonados de ácidos grasos que tienen entre 10 y 18 átomos de carbono. El lauril sulfato de sodio, el lauroil sarcosinato de sodio y la sal de los sulfonatos de monoglicérido del aceite de coco son ejemplos de tensioactivos aniónicos de este tipo. En una realización en particular, la composición de la invención, como por ejemplo la Composición 1 et seq., contiene lauril sulfato de sodio.

[0025] En otra realización, los tensioactivos catiónicos adecuados en la práctica de la presente invención se pueden definir en líneas generales como derivados de compuestos alifáticos de amonio cuaternario que tienen una cadena alquílica de cadena larga que contiene de 8 a 18 átomos de carbono aproximadamente, tales como cloruro de lauril trimetil amonio, cloruro de cetilpiridinio, bromuro de cetil trimetil amonio, cloruro de diisobutilfenoxietoxietildimetilbencilamonio, nitrito de alquiltrimetilamonio de coco, fluoruro de cetilpiridinio, y mezclas de los mismos. Tensioactivos catiónicos ilustrativos son los fluoruros de amonio cuaternario descritos en la patente de Estados Unidos No. 3.535.421, concedida a Briner et al., incorporada aquí por referencia. Ciertos

tensioactivos catiónicos también pueden actuar como germicidas en las composiciones.

[0026] Los tensioactivos no iónicos ilustrativos que se pueden emplear en las composiciones de la presente invención se pueden definir, en líneas generales, como compuestos que se producen mediante la condensación de grupos de óxido de alquileo (de naturaleza hidrófila) con un compuesto hidrófobo orgánico que puede ser de naturaleza alifática o alquilaromática. Los ejemplos de tensioactivos no iónicos adecuados incluyen, mas no se limitan a: plurónicos; condensados del óxido de polietileno de alquil fenoles; productos derivados de la condensación del óxido de etileno con el producto de la reacción del óxido de propileno y etilendiamina; condensados de óxido de etileno de alcoholes alifáticos; óxidos de amina terciaria de cadena larga; óxidos de fosfina terciaria de cadena larga; sulfóxidos de dialquilo de cadena larga, y mezclas de estos materiales.

[0027] En ciertas realizaciones, los tensioactivos sintéticos zwitteriónicos adecuados en la presente invención se pueden describir, en líneas generales, como derivados de compuestos alifáticos de amonio, fosfonio y sulfonio cuaternarios, en los cuales los radicales alifáticos pueden ser de cadena lineal o ramificada, y en donde uno de los sustituyentes alifáticos contiene desde aproximadamente 8 hasta aproximadamente 18 átomos de carbono, y uno contiene un grupo aniónico hidrosoluble, por ejemplo, carboxi, sulfonato, sulfato, fosfato o fosfonato. Ejemplos ilustrativos de los tensioactivos adecuados para su inclusión en la composición

incluyen, mas no se limitan a, alquil sulfato de sodio, lauroil sarcosinato de sodio, cocoamidopropil betaína y polisorbato 20, y sus mezclas.

[0028] El tensioactivo o las mezclas de tensioactivos compatibles pueden estar presentes en las composiciones de la presente invención desde aproximadamente 0,1% hasta aproximadamente 5,0%; en otra realización, desde aproximadamente 0,3% hasta aproximadamente 3,0%; y en otra realización, desde aproximadamente 0,5% hasta aproximadamente 2,0% en peso de la composición completa.

[0029] Agentes saborizantes: Las composiciones de cuidado oral de la invención pueden contener, asimismo, un agente saborizante. Los agentes saborizantes que se emplean en la práctica de la presente invención abarcan, mas no se limitan a: aceites esenciales así como diversos aldehídos aromatizantes, ésteres, alcoholes e ingredientes similares. Entre los ejemplos de aceites esenciales se encuentran los aceites de hierbabuena, menta, gaulteria, sasafrás, clavo, salvia, eucalipto, mejorana, canela, limón, lima, pomelo y naranja. Químicos como mentol, carvona y anetol también son adecuados. Ciertas realizaciones emplean los aceites de menta y hierbabuena. El agente saborizante se puede incorporar en la composición oral a una concentración de aproximadamente 0,1% a aproximadamente 5% en peso, y de aproximadamente 0,5% a aproximadamente 1,5% en peso. La dosificación del agente saborizante en la composición de cuidado oral individual (es decir, una dosis única) es de aproximadamente 0,001% a

aproximadamente 0,05% en peso, y en otra realización es de aproximadamente 0,005% a aproximadamente 0,015% en peso.

[0030] Polímeros: Las composiciones de cuidado oral de la invención también podrían incluir, de manera opcional, uno o más polímeros, tales como: polietilenglicoles, copolímeros de polivinilmetil éter de ácido maleico, polisacáridos (como los derivados de celulosa; por ejemplo, carboximetil celulosa, o gomas de polisacárido como goma xantano o goma de carragenano). Los polímeros ácidos, por ejemplo geles de poliacrilato, generalmente son empleados en forma de sus ácidos libres o como una sal de metal alcalino soluble en agua parcial o totalmente neutralizada (por ejemplo, sales de sodio, potasio o amonio).

[0031] En particular, cuando agentes antibacterianos no catiónicos o agentes antibacterianos, como el triclosán, se incluyen en cualquiera de los componentes dentífricos, también se incluye preferiblemente desde un 0,05% hasta un 5% de un agente que potencia el suministro y la retención de los agentes en las superficies de la cavidad bucal. Estos agentes útiles en la presente invención se describen en las patentes estadounidenses Nos. 5.188.821 y 5.192.531; e incluyen policarboxilatos poliméricos aniónicos sintéticos tales como copolímeros de 1:4 a 4:1 de ácido o anhídrido maleico etilénicamente polimerizable insaturado con otro monómero, preferiblemente metil-vinil-éter/anhídrido maleico con un peso molecular (P.M.) de aproximadamente 30.000 a aproximadamente 1.000.000; más preferiblemente de aproximadamente 30.000 a aproximadamente 800.000. Estos

copolímeros están disponibles bajo la marca registrada Gantrez; por ejemplo, Gantrez AN 139 (P.M. 500.000), AN 119 (M P.M. 250.000) y preferiblemente Gantrez S-97 Calidad Farmacéutica (P.M. 700.000) distribuido por ISP Technologies, Inc., Bound Brook, N.J. 08805. En caso de estar presentes, los agentes potenciadores se incorporan a las composiciones en cantidades de aproximadamente 0,05% a aproximadamente 3% en peso. Otros polímeros operativos incluyen los copolímeros de 1:1 de anhídrido maleico con etil acrilato, hidroxietil metacrilato, N-vinil-2-pirolidona, o etileno, este último disponible bajo la marca Monsanto EMA No. 1103, P.M. 10.000 y EMA Grade 61, y copolímeros de 1:1 de ácido acrílico con metil o hidroxietil metacrilato, metil o etil acrilato, isobutil vinil éter o N-vinil-2-pirrolidona. Generalmente adecuados son los ácidos carboxílicos olefínicamente o etilénicamente polimerizados insaturados que contienen un doble enlace olefínico entre carbono activado y carbono y al menos un grupo carboxilo, es decir, un ácido que contiene un doble enlace olefínico que actúa fácilmente en la polimerización a causa de su presencia en la molécula de monómero, ya sea en la posición alfa-beta con respecto a un grupo carboxilo o como parte de un agrupamiento metileno terminal. Ejemplos ilustrativos de tales ácidos son los ácidos y anhídridos acrílico, metacrílico, etacrílico, alfa-cloroacrílico, crotonico, beta-acriloxi propionico, sorbico, alfa-clorosorbico, cinamico, beta-stirilacrílico, muconico, itaconico, citraconico, mesaconico, glutaconico, aconitico, alfa-fenilacrílico, 2-bencil acrílico, 2-ciclohexilacrílico, angelico, umbelico, fumarico y maleico. Otros monómeros

olefínicos distintos copolimerizables con tales monómeros carboxílicos incluyen vinilacetato, vinil cloruro, dimetil maleato y afines. Los copolímeros contienen suficientes grupos de sales carboxílicas para la hidrosolubilidad. Una clase adicional de agentes poliméricos incluye una composición que contiene homopolímeros de acrilamidas sustituidas y/o homopolímeros de ácidos sulfónicos insaturados y sus sales; específicamente donde los polímeros se basan en ácidos sulfónicos insaturados seleccionados entre ácidos sulfónicos acrilamidoalcanos tales como ácido sulfónico 2-acrilamida 2 metilpropano con un peso molecular de aproximadamente 1.000 a aproximadamente 2.000.000, como se describe en la patente estadounidense No. 4.842.847, de fecha 27 de junio de 1989 y concedida a Zahid, la cual se incorpora aquí por referencia. Otra clase de agentes poliméricos útiles incluyen los poliaminoácidos que contienen proporciones de aminoácidos de superficie activa aniónicos tales como ácido aspártico, ácido glutámico y fosfoserina (además de los polímeros de amionácidos básicos), como los divulgados en la patente estadounidense No. 4.866.161 concedida a Sikes et al., la cual se incorpora aquí por referencia. Al preparar las composiciones de cuidado oral, a veces resulta necesario añadir alguna sustancia espesante a fin de proporcionar una consistencia deseable o estabilizar o mejorar el rendimiento de la formulación. En ciertas realizaciones, los agentes espesantes son polímeros de carboxivinil, carragenina, hidroxietil celulosa y sales solubles en agua de éteres de celulosa tales como carboximetil celulosa sódica y carboximetil hidroxietil celulosa. También se pueden

incorporar gomas naturales como karaya, goma arábiga y goma de tragacanto. Se puede emplear silicato de magnesio y aluminio coloidal o sílice dividido finamente como componente de la composición espesante a fin de mejorar aún más la textura de la composición. En ciertas realizaciones, los agentes espesantes se incorporan en una cantidad de aproximadamente 0,5% a aproximadamente 5,0% en peso de la composición.

[0032] Agua: Puede que las composiciones orales de la invención también contengan agua. El agua empleada en la preparación de composiciones orales comerciales debe ser desionizada y libre de impurezas inorgánicas. Normalmente, el agua constituye el equilibrio de las composiciones y conforma aproximadamente de 10% al aproximadamente 90%, de aproximadamente 20% a aproximadamente 60% o aproximadamente 10% a aproximadamente 30% en peso de las composiciones orales. Esta cantidad de agua incluye el agua libre que se añade más la cantidad que se incorpora junto con otras sustancias tales como sorbitol o cualesquier componentes de la invención.

[0033] Humectantes: En ciertas realizaciones de las composiciones orales, es también deseable incorporar un agente humectante con el propósito de evitar el endurecimiento de la composición por exposición al aire. Ciertos humectantes pueden impartir, asimismo, dulzor o sabor a las composiciones dentífricas. El humectante, con base en un humectante puro, generalmente conforma entre 15% y 70% aproximadamente en una realización, o entre 30% y 65% aproximadamente en peso de la composición dentífrica en otra

realización. Los humectantes adecuados incluyen alcoholes polihidroxilados comestibles como glicerina, sorbitol, xilitol, propilenglicol así como otros polioles y mezclas de estos humectantes. En ciertas realizaciones se puede emplear mezclas de glicerina y sorbitol como el componente humectante de las composiciones dentífricas descritas en el presente documento.

[0034] Otros ingredientes opcionales: Además de los componentes antes descritos, las realizaciones de esta invención pueden contener una variedad de ingredientes dentífricos opcionales, algunos de los cuales se describen más adelante. Los ingredientes opcionales abarcan, mas no se limitan a; adhesivos, agentes de baja espumabilidad, agentes aromatizantes, agentes edulcorantes, agentes antisarro adicionales, abrasivos y agentes colorante. Estos y otros componentes adicionales se describen en mayor detalle en la patente de Estados Unidos No. 5.004.597, concedida a Majeti; la patente de Estados Unidos No. 3.959.458 concedida a Agricola et al., y la patente de Estados Unidos No. 3.937.807, concedida a Haefele, las cuales se incorporan aquí por referencia.

[0035] En una realización, las composiciones de la invención, por Ejemplo la Composición 1, et seq., son enjuagues bucales que utilizan formulaciones de base como se conoce en la técnica, por ejemplo como se describe en la patente de Estados Unidos No. 6.692.726, con la mejora de que los enjuagues bucales contienen enzimas, tal como se ha descrito anteriormente para las composiciones 1, et seq., que tienen

rangos efectivos de 0,001% a 0,1% celulasa/ de 0,002% a 0,2% proteasa alcalina ó de 0,002% a 0,2% α -glucanasa/de 0,002% a 0,2% proteasa alcalina.

[0036] En algunas realizaciones, el pH de la formulación de enjuague bucal es de aproximadamente 5, que es sustancialmente menor que el pH que normalmente se considera óptimo para la actividad de la proteasa alcalina. En algunas realizaciones, un pH elevado no es necesario para la actividad de la proteasa alcalina. En algunas realizaciones, el pH en el sitio de acción enzimática en el microambiente del biofilm es distinto al pH de la formulación.

[0037] Para los fines de la presente memoria descriptiva, se utilizan rangos como esquemas para describir todos y cada uno de los valores que están dentro del rango. Cualquier valor dentro del rango puede ser seleccionado como el término del rango. En adición, todas las referencias aquí citadas se incorporan en su totalidad como referencias.

[0038] En caso de discordancia entre una definición en la presente memoria descriptiva y aquélla de una referencia citada, la presente memoria descriptiva prevalece.

[0039] A menos que se especifique lo contrario, todos los porcentajes y las cantidades expresados aquí o en cualquier otra parte de la memoria descriptiva deben interpretarse como referencia a porcentajes en peso. Las cantidades proporcionadas se basan en el peso activo de la sustancia o compuesto.

EJEMPLOS

Ejemplo 1: *Evaluación de enzimas contra una biopelícula conformada por un solo organismo*

[0040] Los sistemas enzimáticos estudiados con anterioridad presentaban retos considerables en términos de formulación y estabilidad. Por consiguiente, se examinó una serie de enzimas producidas mediante la utilización de procesos de fermentación bacteriana por lotes. Estas enzimas proporcionan mayor estabilidad líquida y, potencialmente, mayor actividad debido a dianas divergentes, como se describe a continuación:

Tabla 1
Enzimas para el estudio

<i>Enzima</i>	<i>Diana</i>
Proteasa neutra	Proteínas
Proteasa ácida	Proteínas
Proteasa alcalina	Proteínas
Transglucosidasa	Carbohidratos
Celulasa	Carbohidratos
α -glucanasa	Carbohidratos
α -amilasa	Carbohidratos
Cutinasa	Lípidos

[0041] Las enzimas se estudian por separado y en cócteles conformados por dos o tres enzimas de especies únicas y combinadas en sistemas *in vitro*. Además, los dos cócteles más eficaces y de fácil acceso se formulan en enjuagues bucales y se prueban en un estudio clínico de la placa que dura cuatro días.

[0042] Cepas bacterianas y condiciones de cultivo: Se cultiva *Actinomyces viscosus* (ATCC#31346) en caldo de tripticasa de soja complementado con 0,6% de extracto de levadura (CTS-EL, o TSB-YE, por sus siglas en inglés) a 37°C, cultivo estacionario. Para los estudios de especies mixtas, la fuente de bacterias es un quimiostato de cultivo continuo inoculado con *A. viscosus*, *Lactobacillus casei* (ATCC#334), *Streptococcus oralis* (ATCC #35037), *Fusobacterium nucleatum* (ATCC#10953) y *Veillonella parvula* (ATCC#17745). Este cultivo mixto se mantiene en un caldo complejo especializado en un quimiostato de cultivo continuo a 37°C.

[0043] Recubrimiento salival de discos de hidroxiapatita: Los estudios de la inhibición del crecimiento y la inhibición del biofilm conformado por especies mixtas se llevan a cabo por medio de discos de hidroxiapatita (HAP, por sus siglas en inglés) como el sustrato superficial. Se obtiene saliva estimulada con parafina de un solo donante y se centrifuga de modo de sedimentar los residuos. A continuación, se esteriliza la saliva mediante incubación bajo luz ultravioleta durante 45 minutos. La saliva esterilizada y desobstruida se inocula en los pocillos de placas estériles de 24 pocillos para cultivos que contienen los discos HAP. Las placas se incuban durante toda una noche a 4°C a fin de permitir la formación de la película.

[0044] Eliminación de las biopelículas conformadas por una sola especie: Las biopelículas conformadas por una sola especie de *A. viscosus* se forman en placas para cultivos de 96 o 384 pocillos fabricadas en poliestireno. Las bacterias se

cultivan en estado natural a partir de una colonia congelada en 20 ml de TSB-YE a 37°C durante toda la noche. Los cultivos de una noche se diluyen a una densidad óptica a 610 nm (OD_{610}) de ~0,2 en caldo de tripticasa de soya diluido a la concentración al medio (0,5x TSB). Se añade 100 µl de este cultivo diluido a cada pocillo de la placa de cultivo estéril apropiada y las placas se incuban durante toda la noche a 37°C. Tras la incubación de una noche, se decantan los sobrenadantes de los pocillos dejando atrás una biopelícula firme en el fondo de cada pocillo. Se agregan soluciones de ensayo a la primera columna de cada pocillo y se realizan diluciones seriadas/en serie con un factor de dilución 2 en 0,5x TSB a lo largo y ancho de toda la placa. A menos que se indique lo contrario, las placas se incuban durante una hora a 37°C. Después del tratamiento, se decantan los sobrenadantes, los cuales no sólo eliminaron el tratamiento sino también cualquier biopelícula desprendida. Se añade 50 µl de cristal violeta en solución al 0,3% según el método de Gram a cada pocillo y se deja teñir por 15 min. Se eliminan los residuos de decolorante y se lavan los pocillos con una solución tampón de 10 mM de Tris y 1 mM de Tetrasodio a un pH de 8,0 y luego se deja secar. Las placas teñidas se leen en un lector de microplacas EnVision de Perkin Elmer para medir la absorbancia a 590 nm. Las absorbancias se comparan con a absorbancia de los pocillos tratados solo con el medio y los resultados se registran como una reducción porcentual en la formación de biofilms con relación al control medio.

[0045] El estudio de la eliminación de biofilm formados por una sola especie se emplea para analizar soluciones de una sola

enzima a fin de determinar una variedad de propiedades. Las ocho enzimas de prueba se reciben como soluciones al 3 ó 4% y 1% de glicerol y todas se analizan a objeto de determinar su capacidad para eliminar los biofilms compuestos de una sola especie que son formados por el colonizador bucal temprano *A. viscosus*. Además de servir para el estudio de la eficacia potencial de las enzimas, esta investigación se utiliza para determinar las curvas dosis-efecto para cada enzima por separado. Esta información se utiliza para encauzar la selección de concentraciones tanto para ensayos de especies mixtas como para la combinación de enzimas en cócteles.

[0046] Definimos la Concentración de Erradicación de la Biopelícula (*Biofilm Eradication Concentration*) (BEC_{50}) como la concentración mínima a la cual se erradica más del 50% de la biopelícula. Esto permite la asignación de una medida numérica de eficacia para cada enzima analizada. Estos valores se muestran en la Tabla 2.

Tabla 2
 BEC_{50} para biopelículas conformadas por una sola especie de *A. viscosus*

<u>Enzima</u>	<u>Diana</u>	<u>BEC_{50}</u> (ppm)
Proteasa neutra	Proteínas	0,61
Proteasa ácida	Proteínas	39,06
Proteasa alcalina	Proteínas	0,08
Transglucosidasa	Carbohidratos	**
Celulasa	Carbohidratos	1250
α -glucanasa	Carbohidratos	39,06
α -amilasa	Carbohidratos	5000
cutinasa	Lípidos	2500

** Se observa una erradicación <50% de la biopelícula incluso en la concentración más alta (10000 ppm) de la enzima examinada.

[0047] Las proteasas neutras y alcalinas son las más eficaces de las enzimas examinadas en la disrupción de biopelículas formadas a partir de un colonizador temprano.

[0048] Aun cuando las enzimas individuales pueden ser muy efectivas en la disrupción de las biopelículas, un enfoque más amplio consiste en emplear cócteles de múltiples clases distintas de enzimas. La ventaja del enfoque de cóctel es que se puede tener como diana a más de un componente de la matriz de la biopelícula. La descomposición de componentes múltiples de la matriz garantiza una disrupción de la biopelícula más completa. Por consiguiente, evaluamos dos o tres cócteles enzimáticos. Puesto que las dos enzimas más eficaces son proteasas, en nuestros cócteles incorporamos algunas enzimas que tenían valores BEC_{50} más altos. Elegimos dos enzimas que tienen las proteínas como diana (proteasa neutra y proteasa alcalina), dos que tienen a los carbohidratos como diana (celulosa y α -glucanasa) y una que tiene como diana a los lípidos (cutinasa). Diez cócteles de dos o tres enzimas se formulan utilizando estas cinco enzimas en las concentraciones y las combinaciones indicadas en la Tabla 3. Las concentraciones para cada enzima se determinan con base en la BEC_{50} .

Tabla 3
Composición de cócteles de enzimas

	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10
Proteasa neutra (100 ppm)	X	X	X	X	X					
Proteasa alcalina (100 ppm)						X	X	X	X	X
α -glucanasa (200 ppm)	X			X	X	X			X	X
Celulasa (1000 ppm)		X		X			X		X	
Cutinasa (1000 ppm)			X		X			X		X

La "X" indica que una enzima dada está presente en el cóctel.

[0049] Estos cócteles primero se estudian en el ensayo de disrupción de biopelículas conformadas por una sola especie, de la misma manera como se hace para las enzimas individuales antes descrita. Con base en los resultados de este ensayo, se seleccionan los cócteles 2, 3, 7, 8, 9 y 10 para su posterior análisis de su eficacia potencial.

[0050] Hasta este punto todos los experimentos se realizan en caldos de cultivo. Sin embargo, la saliva constituye una mezcla compleja de proteínas, sales y otros nutrientes, así como enzimas digestivas, incluso proteasas. Es posible que uno o más componentes de esta mezcla compleja de hecho puedan inactivar las enzimas antes de que éstas puedan romper la placa. Con la finalidad de confirmar que estas enzimas seguirían siendo eficaces en el ambiente bucal, se llevó a cabo ensayos paralelos de disrupción de la biopelícula mediante la dilución de un conjunto de muestras en caldos de cultivo, tal como se había hecho previamente, y diluyendo un conjunto de muestras en saliva humana. Para este experimento, se prueban los seis cócteles antes identificados además de

las cinco enzimas individuales que componen esos cócteles. Los seis cócteles se comportan en forma prácticamente idéntica si se diluyen en caldo de cultivo o saliva. Esto indica que las enzimas son estables en la saliva el tiempo suficiente para alterar la biopelícula.

[0051] Hasta este punto todos los ensayos se llevan a cabo con una duración del tratamiento de una hora. Sin embargo, las administraciones estándares de composiciones de cuidado oral duran de 30 segundos a 2 minutos. Por consiguiente, es importante determinar si las enzimas son capaces de destruir las biopelículas dentro este lapso de tiempo más corto. El ensayo de biopelículas conformadas por una sola especie se realiza con tiempos de tratamiento tan breves como 30 segundos. En todos los casos, se observa una disrupción similar a la observada en una hora cuando los períodos de incubación se acortan.

Ejemplo 2: *Disrupción de biopelículas conformadas por especies mixtas*

[0052] Si bien los ensayos de especies únicas son buenos para la pronta detección de un número de opciones, el ambiente bucal real aloja más de 700 especies de bacterias. Con el propósito de obtener un panorama más cabal de la eficacia potencial en la boca, es importante estudiar el efecto de agentes activos en poblaciones mixtas de bacterias. Usamos un consorcio de cinco especies de bacterias como modelo para las interacciones entre especies. Esta mezcla de bacterias incluye cinco bacterias que están estrechamente relacionadas con los principales componentes de la biopelícula bucal. Las

cinco especies abarcan una mezcla de bacterias grampositivas y gramnegativas, aeróbicas y anaeróbicas, así como colonizadores tempranos y tardíos. Las bacterias que se emplean en este modelo son *A. viscosus*, *L. casei*, *S. oralis*, *F. nucleatum* y *V. parvula*. Este modelo ofrece un indicio de la eficacia de un tratamiento específico en una población más diversa que el estudio con especies individuales. Más importante aún, en este caso, proporciona una biopelícula más variada y resistente.

[0053] Las biopelículas conformadas por especies se preforman en discos de HAP recubiertos de saliva (schAP). Luego del recubrimiento salival, los discos se inoculan con 1 ml de cultivo de especies mixtas a partir del cultivo continuo descrito en el ejemplo 1 diluido a una OD₆₁₀ de ~0,2 en 0,5x TSB. Las placas se incuban durante 24 horas a 37°C a fin de permitir la formación de las biopelículas. Los discos que contienen las biopelículas preformadas se transfieren a una nueva placa de cultivo de 24 pocillos y se añade 0,5 ml de la solución de prueba a cada disco. Las placas se incuban durante una hora a 37°C con una agitación suave. Después del tratamiento los discos se retiran a una placa que contiene una solución fresca de 0,5x TSB a objeto de enjuagar la solución de tratamiento y cualquier segmento de biopelícula que se haya aflojado. Luego se transfieren los discos a tubos de poliestireno de 15 ml que contienen 1 ml de una solución de tripsina al 0,25%. Los discos se incuban a 37°C agitándolos por 45 min. Los tubos de ensayo se golpean en un movimiento hacia adelante y hacia abajo a objeto de re-suspender las bacterias, y los sobrenadantes se transfieren a

otra placa de 24 pocillos. Las placas se someten a sonicación durante 2 minutos a fin de sedimentar cualquier HAP residual, y los sobrenadantes se retiran a placas nuevas de manera de poder leer la absorbancia a 610 nm. Todas las muestras se prueban por triplicado y se determina el promedio de los tres pocillos. Los resultados se registran como una reducción porcentual en la formación de la biopelícula con relación a los discos tratados con caldos de cultivo solamente.

[0054] Previos estudios que utilizan esta mezcla de cinco especies de bacterias se han centrado en la capacidad de los compuestos para inhibir la formación de biopelículas. Ciertos ajustes fueron necesarios para examinar la disrupción de las biopelículas existentes. Las biopelículas conformadas por especies mixtas se preforman en discos HAP recubiertos de saliva durante 48 horas. Los discos se retiran a caldos de cultivo frescos y se tratan durante 1 hora con 1 ml de la solución experimental con una agitación suave. Esta agitación permitió la remoción mecánica de la biopelícula que se despega enzimáticamente del disco HAP. Después del tratamiento, la biopelícula remanente se retira del disco mediante tratamiento con tripsina y se cuantifica. Los resultados se representan como una reducción porcentual de la biopelícula con relación a un control incubado en caldos de cultivo solamente.

[0055] Los cócteles 2, 7 y 9, y las enzimas individuales relevantes, se analizan en términos de la disrupción de biopelículas de especies mixtas preformadas por parte de enzimas individuales y dos cócteles enzimáticos. Los

resultados se registran como la reducción porcentual en la biopelícula con relación a los discos incubados en caldos de cultivo solamente. Una combinación de glucoamilasa (0,044%) y una papaína (0,226%) con una actividad óptima a un pH de 5 a 7, cuya acción eficaz ha sido demostrada con anterioridad, se utiliza como un control positivo.

Tabla 4
Disrupción de la biopelícula conformada por especies mixtas
relativa al caldo de cultivo (%)

Caldo de cultivo	0
Glucoamilasa/papaína (control positivo)	23
Proteasa neutra	19
Proteasa alcalina	11
Celulasa	16
Cóctel 2	17
Cóctel 7	39
Cóctel 9	22

[0056] El cóctel 7, que contiene 100 ppm de proteasa alcalina y 200 ppm de celulasa, supera en gran medida a cualquiera de las enzimas individuales o los cócteles, incluso el control positivo conformado por glucoamilasa y papaína.

Ejemplo 3: *Formulación*

[0057] La relativa complejidad de las formulaciones dentífricas implica que existe un gran número de componentes que tienen el potencial de interferir en la actividad y la estabilidad de las enzimas. Esto, combinado con el hecho de que las enzimas ya han demostrado ser estables en soluciones líquidas

simples, nos motiva a intentar formular las enzimas en un enjuague bucal.

[0058] Aunque el cóctel compuesto por la proteasa alcalina/celulosa superó en gran medida a los demás cócteles que se probaron, cierta preocupación por el uso de celulasa indujo a explorar la formulación de una enzima alternativa en un enjuague bucal para estudios adicionales. La celulasa es una enzima que hidroliza las vinculaciones 1,4- β -D-glicosídicas en moléculas de celulosa. Las gomas de celulosa se utilizan comúnmente como agentes espesantes en formulaciones dentífricas y, en ocasiones, en enjuagues bucales. La presencia de incluso cantidades minúsculas de celulasa en las proximidades del equipo que forma el dentífrico podría dar lugar a una fluidificación severa, o hasta la licuación, de los dentífricos. En consecuencia, se eligió un Segundo cóctel para la evaluación, el cual podría ser adecuado para su eventual incorporación a una formulación contentiva de gomas de celulosa, si se desea. Con base en una combinación de previos estudios in vitro y consideraciones prácticas, se eligió elaborar enjuagues bucales con las tres enzimas siguientes: 0,1% de celulosa + 0,2% pde roteasa alcalina; 0,2% de α -glucanasa + 0,2% de proteasa alcalina; y 0,044% de glucoamilasa + 0,226% e3 papaína como control positivo:

Tabla 5
Formulaciones de ensayo

Ingrediente	% en peso		
Agua desmineralizada	36,68	6,95	6,95
Sorbitol(solución al 70%)	22,28	22,28	22,28
Glicerina	22,96	22,96	22,96
Propilenglicol	16,07	16,07	16,07
Sacarina sódica	0,05	0,05	0,05
Benzoato de sodio	0,25	0,25	0,25
Ácido benzoico	0,12	0,12	0,12
Cloruro de cetilpiridinio	0,015	0,015	0,015
EDTA Disódico	0,006	0,006	0,006
Cloruro de calcio	0,1	0,1	0,1
Poloxámero 407	0,5	0,5	0,5
Poloxámero 338	0,5	0,5	0,5
Aceite de ricino PEG-40	0,1	0,1	0,1
Sabor	0,1	0,1	0,1
Celulosa (solución al 1%)	---	---	20
α -Glucanasa (solución al 1%)	---	20	---
Proteasa alcalina (solución al 1%)	---	10	10
Glucoamilasa	0,044	---	---
Papaína	0,226	---	---

[0059] Luego de la formulación, el primer paso consiste en confirmar que las enzimas sean estables en las formulaciones y conservan su actividad disruptiva de la biopelícula. Los ingredientes en la base del enjuague bucal tienen un efecto considerable en la eliminación de la biopelícula, incluso sin la adición de enzimas. Por consiguiente, también se probó una formulación libre de enzimas como placebo de control.

[0060] Los tres enjuagues bucales demuestran un alto grado de eliminación de la biopelícula con relación al observado para el placebo. Esto indica que los cócteles de enzimas se mantienen muy activos dentro de la matriz de una fórmula de enjuague bucal. Del mismo modo, se pudo confirmar que el cóctel de enzimas proteasa alcalina / α -glucanasa es efectivo en la eliminación de biopelículas conformadas por especies individuales. Este ensayo se repite en fórmulas de enjuague bucal hasta tres meses después de la incubación a temperatura ambiente. Una actividad similar de disrupción de la biopelícula se mantiene durante este período de tiempo, lo cual indica que las enzimas son relativamente estables en esta fórmula de enjuague bucal.

[0061] También es importante demostrar que estos enjuagues bucales actúan contra biopelículas de especies mixtas. Debido a la alta viscosidad de la formulación base enzimática del enjuague bucal, hay un muy alto grado de eliminación de la biopelícula debido al enjuague bucal placebo solamente. Por lo tanto, las reducciones en biopelícula con relación al placebo son considerablemente inferiores a las observadas para los cócteles de enzimas no formulados. Sin embargo, se observan las mismas tendencias de los resultados previamente observados en este experimento.

Tabla 6

Disrupción de películas conformadas por especies mixtas por parte de enjuagues bucales que contienen enzimas, como una reducción porcentual de la biopelícula con relación al placebo (niveles de reducción de biopelícula menores que en soluciones claras a causa del considerable efecto del placebo observado en este ensayo)

Placebo libre de enzimas	0
Glucoamilasa + papaína (control positivo)	11
Proteasa alcalina/celulasa	36
Proteasa alcalina /alfa-glucanasa	15

[0062] Estos estudios *in vitro* demuestran que ambos enjuagues bucales compuestos de enzimas prototipo se comportan al mismo o por encima del nivel del cóctel glucoamilasa-papaína de referencia, y son mucho mejores que el enjuague bucal de control que no contiene enzimas. Varios estudios previos han demostrado una excelente eficacia clínica de los dentífricos que contienen glucoamilasa-papaína. Tan buen rendimiento, en comparación con este control positivo, resulta alentador.

REIVINDICACIONES

1. Una composición de cuidado oral que contiene una cantidad eficaz de una combinación de una proteasa alcalina y una segunda enzima seleccionada entre celulasa, α -glucanasa y combinaciones de las mismas, en un vehículo aceptable por vía oral.
2. La composición según la reivindicación 1, caracterizada por el hecho de que la proteasa alcalina es una serín proteasa.
3. La composición según la reivindicación 2, caracterizada por el hecho de que la proteasa alcalina es del tipo subtilisina.
4. La composición según cualquiera de las reivindicaciones precedentes, en la que la segunda enzima es celulasa.
5. La composición según cualquiera de las reivindicaciones precedentes, en la que la segunda enzima es α -glucanasa.
6. La composición según cualquiera de las reivindicaciones precedentes, que comprende de 0,001% a 0,1% de celulasa y de 0,002% a 0,2% de proteasa alcalina.
7. La composición según cualquiera de las reivindicaciones precedentes, que comprende de 0,002% a 0,2% de α -glucanasa y de 0,002% a 0,2% de proteasa alcalina.
8. La composición según cualquiera de las reivindicaciones precedentes, caracterizada por el hecho de que la proteasa alcalina es de origen bacteriano o fúngico.

9. La composición según cualquiera de las reivindicaciones precedentes en una forma seleccionada entre enjuague bucal, pasta dental, gel dental, polvo dental, gel no abrasivo, mousse, espuma, atomizador bucal, comprimido, gragea, tableta oral, implemento dental, limpiador de dentadura, y productos preferidos de cuidado oral.
10. La composición según cualquiera de las reivindicaciones precedentes, caracterizada por el hecho de que la composición es una pasta dental o un enjuague bucal que, de manera opcional, comprende además uno o más de uno o más de agua, abrasivos, agentes espumantes, tensioactivos, vitaminas, polímeros, enzimas adicionales, humectantes, espesantes, agentes antimicrobianos, conservantes, aromatizantes, colorantes y/o combinaciones de los mismos.
11. La composición según cualquiera de las reivindicaciones precedentes, en la que el pH de la composición varía entre 4,5 y 6,5.
12. La composición según cualquiera de las reivindicaciones precedentes, que además comprende un aminoácido básico en forma libre o de sal acídica de adición.
13. La composición según cualquiera de las reivindicaciones precedentes, que además comprende una cantidad eficaz de fuente de ión fluoruro.
14. La composición según cualquiera de las reivindicaciones precedentes en la forma de un enjuague bucal que contiene los siguientes ingredientes, en peso:

Ingrediente	Rango de Concentración % peso/peso
Agua	50 - 90
Humectante	5 - 40
Tensioactivo	0,01 - 10
Tampón	0,01 - 10
Conservantes y estabilizantes	0,01 - 10
Sabor	0,01 - 10
Espesante polimérico	0 - 2
Fuente de ión fluoruro	0 - 0,3
Arginina (en forma libre o de sal, en peso de la base libre)	0 - 2
Edulcorante	0,001 - 0,5
Cloruro de cetilpiridinio	0 - 1
Celulasa y/o α -Glucanasa	0,002 - 0,2
Proteasa alcalina	0,002 - 0,2

15. Un procedimiento para (i) inhibir la formación de una biopelícula microbiana en la cavidad bucal; (ii) disminuir la acumulación de placa; (iii) disminuir o inhibir la gingivitis; (iv) reducir o inhibir la formación de caries dentales; (v) limpiar los dientes y la cavidad bucal; y/o (vi) promover la salud corporal integral; consistiendo dicho procedimiento en aplicar a la cavidad bucal una cantidad eficaz de una composición que contiene una proteasa alcalina y una segunda enzima elegida entre celulasa y α -glucanasa.

16. La utilización de una proteasa alcalina y una segunda enzima elegida entre celulasa y α -glucanasa en la elaboración de una composición de cuidado oral.
17. Un preconcentrado de enzima líquido para su uso en la elaboración de una composición de cuidado oral, que comprende una proteasa alcalina y una segunda enzima elegida entre celulasa y α -glucanasa.

RESUMEN

En el presente documento se describe composiciones de cuidado oral que contienen una cantidad eficaz de un cóctel de enzimas, en las que el cóctel enzimático comprende una proteasa alcalina y una segunda enzima elegida entre celulasa, α -glucanasa y combinaciones de las mismas, en un vehículo aceptable por vía oral. Del mismo modo, se describen procedimientos para la preparación y la utilización de las mismas.

(12) INTERNATIONAL APPLICATION PUBLISHED UNDER THE PATENT COOPERATION TREATY (PCT)

(19) World Intellectual Property

Organization

International Bureau



WIPO | PCT



(10) International Publication Number

WO 2013/095439 A1

(43) International Publication Date
27 June 2013 (27.06.2013)

- (51) International Patent Classification:
A61K 8/66 (2006.01) *A61Q 11/00* (2006.01)
- (21) International Application Number:
PCT/US2011/066503
- (22) International Filing Date:
21 December 2011 (21.12.2011)
- (25) Filing Language: English
- (26) Publication Language: English
- (71) Applicant (for all designated States except US): **COLGATE-PALMOLIVE COMPANY** [US/US]; 300 Park Avenue, New York, New York 10022 (US).
- (72) Inventors; and
- (75) Inventors/Applicants (for US only): **SCHAEFFER-KORBYLO, Lyndsay** [US/US]; 24 Clearbrook Lane, Flemington, New Jersey 08822 (US). **NESTA, Jason** [US/US]; 30 Boulevard Road, Cedar Knolls, New Jersey 07927 (US). **DU-THUMM, Laurence** [US/US]; 16 Woodfield Court, Princeton, New Jersey 08540 (US).
- (81) Designated States (unless otherwise indicated, for every kind of national protection available): AE, AG, AL, AM, AO, AT, AU, AZ, BA, BB, BG, BH, BR, BW, BY, BZ, CA, CH, CL, CN, CO, CR, CU, CZ, DE, DK, DM, DO, DZ, EC, EE, EG, ES, FI, GB, GD, GE, GH, GM, GT, HN, HR, HU, ID, IL, IN, IS, JP, KE, KG, KM, KN, KP, KR, KZ, LA, LC, LK, LR, LS, LT, LU, LY, MA, MD, ME, MG, MK, MN, MW, MX, MY, MZ, NA, NG, NI, NO, NZ, OM, PE, PG, PH, PL, PT, QA, RO, RS, RU, RW, SC, SD, SE, SG, SK, SL, SM, ST, SV, SY, TH, TJ, TM, TN, TR, TT, TZ, UA, UG, US, UZ, VC, VN, ZA, ZM, ZW.
- (84) Designated States (unless otherwise indicated, for every kind of regional protection available): ARIPO (BW, GH, GM, KE, LR, LS, MW, MZ, NA, RW, SD, SL, SZ, TZ, UG, ZM, ZW), Eurasian (AM, AZ, BY, KG, KZ, MD, RU, TJ, TM), European (AL, AT, BE, BG, CH, CY, CZ, DE, DK, EE, ES, FI, FR, GB, GR, HR, HU, IE, IS, IT, LT, LU, LV, MC, MK, MT, NL, NO, PL, PT, RO, RS, SE, SI, SK, SM, TR), OAPI (BF, BJ, CF, CG, CI, CM, GA, GN, GQ, GW, ML, MR, NE, SN, TD, TG).
- (74) Agent: **HEBLE, Nikhil, A.**; Colgate-Palmolive Company, Patent Department, 909 River Road, Piscataway, New Jersey 08855 (US).
- Published:
— with international search report (Art. 21(3))

(54) Title: ORAL CARE COMPOSITIONS

(57) Abstract: Described herein are oral care compositions comprising an effective amount of an enzyme cocktail, wherein the enzyme cocktail comprises an alkaline protease and a second enzyme selected from cellulase, α -glucanase, and combinations thereof, in an orally acceptable carrier, together with methods of making and using the same.

WO 2013/095439 A1

PATENT COOPERATION TREATY

RECEIVED
Colgate-Palmolive

APR 22 2014

Patent Department

From the
INTERNATIONAL PRELIMINARY EXAMINING AUTHORITY

PCT

To:

COLGATE-PALMOLIVE COMPANY
Patent Department
909 River Road
Piscataway NJ 08855
ETATS-UNIS D'AMERIQUE

PATENT DOCKETING

APR 22 2014

DOCKETED BY:

NOTIFICATION OF TRANSMITTAL OF
THE INTERNATIONAL PRELIMINARY
REPORT ON PATENTABILITY

(PCT Rule 71.1)

Date of mailing
(day/month/year)

08.04.2014

Applicant's or agent's file reference
9437-00-WO-OC

IMPORTANT NOTIFICATION

International application No.
PCT/US2011/066503

International filing date (day/month/year)
21.12.2011

Priority date (day/month/year)

Applicant
Colgate-Palmolive Company

1. The applicant is hereby notified that this International Preliminary Examining Authority transmits herewith the international preliminary report on patentability and its annexes, if any, established on the international application.
2. A copy of the report and its annexes, if any, is being transmitted to the International Bureau for communication to all the elected Offices.
3. Where required by any of the elected Offices, the International Bureau will prepare an English translation of the report (but not of any annexes) and will transmit such translation to those Offices.

4. REMINDER

The applicant must enter the national phase before each elected Office by performing certain acts (filing translations and paying national fees) within 30 months from the priority date (or later in some Offices) (Article 39(1)) (see also the reminder sent by the International Bureau with Form PCT/IB/301).

Where a translation of the international application must be furnished to an elected Office, that translation must contain a translation of any annexes to the international preliminary report on patentability. It is the applicant's responsibility to prepare and furnish such translation directly to each elected Office concerned.

For further details on the applicable time limits and requirements of the elected Offices, see Volume II of the PCT Applicant's Guide.

The applicant's attention is drawn to Article 33(5), which provides that the criteria of novelty, inventive step and industrial applicability described in Article 33(2) to (4) merely serve the purposes of international preliminary examination and that "any Contracting State may apply additional or different criteria for the purposes of deciding whether, in that State, the claimed inventions is patentable or not" (see also Article 27(5)). Such additional criteria may relate, for example, to exemptions from patentability, requirements for enabling disclosure, clarity and support for the claims.

Name and mailing address of the international
preliminary examining authority:



European Patent Office
D-80298 Munich
Tel. +49 89 2399 - 0
Fax: +49 89 2399 - 4465

Authorized Officer

Ruiz Fernandez, José

Tel. +49 89 2399-7960



PATENT COOPERATION TREATY

PCT

INTERNATIONAL PRELIMINARY REPORT ON PATENTABILITY

(Chapter II of the Patent Cooperation Treaty)

(PCT Article 36 and Rule 70)

Applicant's or agent's file reference 9437-00-WO-OC	FOR FURTHER ACTION		See Form PCT/PEA/416
International application No. PCT/US2011/066503	International filing date (day/month/year) 21.12.2011	Priority date (day/month/year)	
International Patent Classification (IPC) or national classification and IPC INV. A61K8/66			
Applicant Colgate-Palmolive Company			
1. This report is the international preliminary examination report, established by this International Preliminary Examining Authority under Article 35 and transmitted to the applicant according to Article 36. 2. This REPORT consists of a total of <u>8</u> sheets, including this cover sheet. 3. This report is also accompanied by ANNEXES, comprising: a. ☒ (sent to the applicant and to the International Bureau) a total of <u>6</u> sheets, as follows: ☒ sheets of the description, claims and/or drawings which have been amended and/or sheets containing rectifications authorized by this Authority, unless those sheets were superseded or cancelled, and any accompanying letters (see Rules 46.5, 66.8, 70.16, 91.2, and Section 607 of the Administrative Instructions). ☐ sheets containing rectifications, where the decision was made by this Authority not to take them into account because they were not authorized by or notified to this Authority at the time when this Authority began to draw up this report, and any accompanying letters (Rules 66.4bis, 70.2(e), 70.16 and 91.2). ☐ superseded sheets and any accompanying letters, where this Authority either considers that the superseding sheets contain an amendment that goes beyond the disclosure in the international application as filed, or the superseding sheets were not accompanied by a letter indicating the basis for the amendments in the application as filed, as indicated in item 4 of Box No. I and the Supplemental Box (see Rule 70.16(b)). b. ☐ (sent to the International Bureau only) a total of (indicate type and number of electronic carrier(s)) , containing a sequence listing, in electronic form only, as indicated in the Supplemental Box Relating to Sequence Listing (see paragraph 3bis of Annex C of the Administrative Instructions).			
4. This report contains indications relating to the following items: ☒ Box No. I Basis of the report ☐ Box No. II Priority ☐ Box No. III Non-establishment of opinion with regard to novelty, inventive step and industrial applicability ☐ Box No. IV Lack of unity of invention ☒ Box No. V Reasoned statement under Article 35(2) with regard to novelty, inventive step or industrial applicability; citations and explanations supporting such statement ☐ Box No. VI Certain documents cited ☐ Box No. VII Certain defects in the international application ☒ Box No. VIII Certain observations on the international application			
Date of submission of the demand		Date of completion of this report	
18.10.2013		08.04.2014	
Name and mailing address of the international preliminary examining authority:  European Patent Office D-80298 Munich Tel. +49 89 2399 - 0 Fax: +49 89 2399 - 4465		Authorized officer Miller, Bernhard Telephone No. +49 89 2399-8540	



INTERNATIONAL PRELIMINARY REPORT ON PATENTABILITY

International application No.
PCT/US2011/066503

Box No. I Basis of the report

1. With regard to the **language**, this report is based on
- ☒ the international application in the language in which it was filed
 - ☐ a translation of the international application into , which is the language of a translation furnished for the purposes of:
 - ☐ international search (under Rules 12.3(a) and 23.1(b))
 - ☐ publication of the international application (under Rule 12.4(a))
 - ☐ international preliminary examination (under Rules 55.2(a) and/or 55.3(a) and (b))
2. With regard to the **elements*** of the international application, this report is based on *(replacement sheets which have been furnished to the receiving Office in response to an invitation under Article 14 are referred to in this report as "originally filed" and are not annexed to this report)*:

Description, Pages

1-22 as originally filed

Claims, Numbers

1-18 filed with telefax on 18-10-2013

- ☐ a sequence listing - see Supplemental Box Relating to Sequence Listing.
3. ☐ The amendments have resulted in the cancellation of:
- ☐ the description, pages
 - ☐ the claims, Nos.
 - ☐ the drawings, sheets/figs
 - ☐ the sequence listing (*specify*):
 - ☐ any table(s) related to sequence listing (*specify*):
4. ☐ This report has been established as if (some of) the amendments annexed to this report and listed below had not been made, since either they are considered to go beyond the disclosure as filed, or they were not accompanied by a letter indicating the basis for the amendments in the application as filed, as indicated in the Supplemental Box (Rules 70.2(c) and (c-bis)):
- ☐ the description, pages
 - ☐ the claims, Nos.
 - ☐ the drawings, sheets/figs
 - ☐ the sequence listing (*specify*):
5. ☐ This report has been established:
- ☐ taking into account the rectification of an obvious mistake authorized by or notified to this Authority under Rule 91 (Rules 66.1(d-bis) and 70.2(e)).
 - ☐ without taking into account the rectification of an obvious mistake authorized by or notified to this Authority under Rule 91(Rules 66.4bis and 70.2(e)).
6. ☐ Supplementary international search report(s) from Authority(ies) has/have been received and taken into account in establishing this report (Rule 45bis.8(b) and (c)).

**INTERNATIONAL PRELIMINARY REPORT
ON PATENTABILITY**

International application No.
PCT/US2011/066503

Box No. V Reasoned statement under Article 35(2) with regard to novelty, inventive step or industrial applicability; citations and explanations supporting such statement

1. Statement

Novelty (N)	Yes: Claims	<u>1-18</u>
	No: Claims	
Inventive step (IS)	Yes: Claims	
	No: Claims	<u>1-18</u>
Industrial applicability (IA)	Yes: Claims	<u>1-18</u>
	No: Claims	

2. Citations and explanations (Rule 70.7):

see separate sheet

Box No. VIII Certain observations on the international application

The following observations on the clarity of the claims, description, and drawings or on the question whether the claims are fully supported by the description, are made:

see separate sheet

Re Item V

Reasoned statement under Rule 66.2(a)(ii) with regard to novelty, inventive step or industrial applicability; citations and explanations supporting such statement

1 Novelty (Article 33(2) PCT)

- 1.1 The present application meets the criterion set forth in Article 33(2) PCT because the subject-matter of claims 1-18 is new in respect of the prior art as defined in the regulations (Rule 64(1)-(3) PCT).
- 1.2 The following documents disclose already oral care compositions comprising either an alkaline protease or an enzyme selected from cellulases or α -glucanase.
 - 1.2.1 **US-A-0 223 117** (D1, claim 12) discloses an oral care composition comprising α -glucanase and a second enzyme (claim 16). The second enzyme can be a protease (claim 17). The composition is used for preventing and removing a biofilm (claim 23).
 - 1.2.2 **FR-A-2 051 992** (D2, page 2, lines 1-15) discloses an oral care composition comprising various enzymes for degrading the variety of compounds present in a biofilm on teeth such as cellulase for degrading cellulosic stains and protease for degrading proteins. In example 2 a tooth paste is disclosed comprising a protease (alpha-chymotrypsine) and a further enzyme cocktail (polyenzymes).
 - 1.2.3 **US-A-4 364 926** (D3, examples) discloses oral care compositions comprising an alkaline protease.
 - 1.2.4 **JP-A-4 316 512** (D4, table 2) discloses the plaque removal rate of various proteases.
 - 1.2.5 However, an oral care composition comprising alkaline protease and an enzyme selected from cellulases or α -glucanase is not described in the above cited documents.
- 1.3 Moreover, laundry and fabric care compositions comprising an alkaline protease and an enzyme selected from cellulases or α -glucanase are known from documents such as cited in the following.

- 1.3.1 **US-A-2005/0239043** (D5, examples) discloses fabric care and oral care compositions comprising an alkaline protease (subtilisin). In paragraphs [0284]-[0286] granular fabric care compositions are disclosed comprising an alkaline protease (subtilisin) and cellulase.
- 1.3.2 However, laundry and fabric care compositions are not suitable for oral care. Thus, the scope of present claim 1 is also novel with respect to the above cited document.

2 Inventive Step (Article 33(3) PCT)

- 2.1 The present application is directed to oral care compositions which should reduce the formation of biofilm on teeth as described in the examples of the present application.

D1 (claim 23) also proposes enzymes as active ingredients in oral care compositions for their ability to reduce the biofilm on teeth.

D4 (table 2) discloses the plaque removal rate (removal of biofilm) of various proteases.

D1 and D4 therefore deal with the same purpose as the present application and therefore each of these two documents could be regarded as the closest prior art.

- 2.2 D1 discloses an oral care composition comprising α -glucanase and a second enzyme (claim 16) such as a protease (claim 17).

The subject-matter of present claim 1 differs from the teaching of D1 in that the composition comprises an alkaline protease.

Table 4 of the present application seems to suggest that cocktail 7 comprising an alkaline protease is more effective than cocktail 2 comprising a neutral protease. However, cocktail 9 is less effective than cocktail 7 despite the fact that also an alkaline protease is present. Thus, the results are not consistent.

When accepting the test results demonstrated in the examples of the present application the objective technical problem can be formulated as to provide an oral care composition which is more effective against biofilm.

In table 2 of D4 the effect of various proteases on the removal of biofilm (plaque) is shown. From table 2 of D4 it becomes evident that alkaline protease (optimum at pH>7) is more effective (score 77%, 80% and 88% according to the test described in D4) than a neutral protease (score 65%, 68%, 72% according to the test described in D4).

Thus, in the experimental part of D4 the skilled person can find the explicit teaching that alkaline protease (optimum at pH>7) is more effective in removing biofilm.

Since D4 provides a teaching that alkaline protease is more effective than neutral protease, the skilled person knowing these results would select an alkaline protease as the protease addressed in general in D1 in order to provide a more effective composition as hinted at by D4.

The subject-matter of present claim 1 therefore cannot be considered as involving an inventive step (Article 33(3) PCT).

2.3 D4 (examples, table 2) proposes oral care compositions comprising an alkaline protease.

The subject-matter of present claim 1 differs from the teaching of D4 in that the composition comprises a further enzyme selected from cellulase or α -glucanase.

From the teaching of the examples on file it can be concluded that a combination of enzymes is more effective than a single enzyme for disrupting the biofilm on teeth.

The objective technical problem can therefore be formulated as to provide an oral care formulation which is more effective against the biofilm on teeth.

The possibility to use cellulases or α -glucanases for the disruption the biofilm on teeth is also known in the art as evidenced by documents such as D1 or D2 cited above.

The possibility to disrupt the biofilm on teeth by using various enzymes degrading the different components of the biofilm is well known in the art and also stressed in said cited documents.

To combine well known actives for their well known effects and thereby adding up their effect comes within the customary practice. This can be exemplary seen from the above cited documents which propose already to use enzyme cocktails containing various enzymes to more effectively disrupt the biofilm on teeth.

Thus, it is obvious for the skilled person that the combination of enzymes degrading the biofilm is more effective than the use of a single enzyme.

Thus, it is obvious for the skilled person to add a cellulase or α -glucanase into the compositions proposed by D4 in order to make the oral care composition more effective against biofilm on teeth.

The subject-matter of present claim 1 therefore cannot be considered as involving an inventive step (Article 33(3) PCT).

2.4 Dependent claims 2-14 do not appear to contain any additional feature which, in combination with the features of any claim to which they refer, meet the requirements of the PCT with respect to inventive step. The described features come within the scope of the customary practice followed by the man skilled in the art, especially as the advantages thus achieved can be readily contemplated in advance. Furthermore the application is devoid of any further unexpected advantages or surprising effects due to the features mentioned in dependent claims 2-14. Therefore claims 2-14 lack an inventive step, contrary to Article 33(3) PCT.

2.5 The compositions proposed by the above cited documents all address oral care formulations and their use for reducing plaque, caries, etc.

Thus, the argumentation presented above for the subject-matter of present claim 1 equally applies to the subject-matter of present claims 15, 16 and 18.

2.6 Any oral care composition can be diluted. The present application is devoid of any further unexpected advantage or surprising effect which can be achieved by diluting a composition. Thus, the argumentation presented above for the subject-matter of present claim 1 equally applies to the subject-matter of present claim 17.

3 Patentability

The patentability can be dependent upon the formulation of the claims. The EPO, for example, does not recognise as patentable claims to the use of a compound in medical treatment (e.g. reduction of plaque, gingivitis, caries or

promotion of body health as defined in present claim 15), but may allow claims to a product, in particular substances or compositions for use in a first or further medical treatment.

Re Item VIII

Certain observations on the international application

The following observations on the clarity of the claims and description or on the question whether the claims are fully supported by the description are made:

- 1 The term "promote whole body health" in present claims 15 and 18 is vague and has no well defined meaning. Claims 15 and 18 therefore lack clarity (Article 6 PCT). Moreover, it is not credible that a simple enzyme mixture can influence the whole body health. Claims 15 and 18 therefore cannot be reworked over the whole scope (Article 5 PCT).
- 2 When filing amended claims the applicant should at the same time bring the description into conformity with the amended claims. Care should be taken during revision, especially of the introductory portion and any statements of problem or advantage, not to add subject-matter which extends beyond the content of the application as originally filed (Article 34(2)(b) PCT).

The applicant should clearly **identify the amendments carried out**, irrespective of whether they concern amendments by addition, replacement or deletion, and to **indicate accurately the passages** of the application as filed **on which these amendments are based** (Rule 66.8 (a) PCT).

The amendments are preferred to be carried out in handwritten form on a copy of the relevant parts of the application as filed (Rule 66.8 (b) PCT) accompanied by a clean copy of the corresponding pages (Guidelines PCT/GL/ISPE/1, Chapter 20.6-20.8).

Our Ref: 9437-00-WO-OC

Attn. International Preliminary Examining Authority
European Patent Office
P.B. 5818 Patentlaan 2
NL-2280 HV Rijswijk
Netherlands

16 October 2013

BY FAX ONLY

Dear Sirs,

Intl. Patent Appln. No. PCT/US2011/066503
Colgate-Palmolive Company

We refer to the Written Opinion of the International Searching Authority dated 5 October 2012, and to the above-identified application.

We lodge herewith an amended set of claims to replace the claims as presently on file.

Amendments

Claims 1 to 17 as presently on file are maintained.

New claim 18 has been added, which corresponds to original claim 15 amended so as to be in the "medical use" format as required by certain patent offices in the regional/national phases.

Novelty

It is noted that the ISA stated in the Written Opinion that the claims of the present application are considered to be novel over the documents cited in the ISR.

Inventive Step

It is also submitted that claim 1 of the present application involves an inventive step.

The problem which the present inventors sought to solve was how to provide an oral care composition which is more effective against biofilms.

This problem is solved in accordance with claim 1 of the present application, which provides an oral care composition comprising an effective amount of a combination of an alkaline protease and a second enzyme selected from cellulase, α -glucanase, and combinations thereof, in an orally acceptable carrier.

Document D1 discloses an oral care composition comprising an isolated α -glucanase and a second enzyme, which may be a protease (claims 13, 16 and 17 of D1). However, there is no disclosure in D1 of any composition comprising an isolated α -glucanase and an alkaline protease. D1 provides no motivation for the person skilled in the art to select an alkaline protease for combination with the α -glucanase thereof, when seeking to solve the technical problem, above.

Table 2 of D4 shows the effect of various different proteases on the removal of biofilm. The optimum pH for these proteases varies from 6 to 10 (see Table 1 of D4). However, it is submitted that D4 does not show that those proteases of Table 1 for which the optimum pH is greater than 7 necessarily provide greater removal of biofilm than those proteases of Table 1 for which the optimum pH is 7 or below. It is therefore submitted that D4 does not provide the person skilled in the art with any motivation to select in particular an alkaline protease when seeking to solve the technical problem, above.

It is therefore submitted that claim 1 of the present application, and all claims dependent thereon, involve an inventive step.

Re Item VIII

Due to the differing requirements of the various patent offices in the regional and national phases, the applicant does not presently wish to comment on the objections raised in this section of the Written Opinion.

In light of the above, we look forward to receiving a favourable IPRP.

Yours faithfully

Howard C. Lee

Howard C. Lee
Colgate-Palmolive Company

REPLACEMENT SHEET

Attorney Docket No. 9437-00-WO-OC

CLAIMS

1. An oral care composition comprising an effective amount of a combination of an alkaline protease and a second enzyme selected from cellulase, α -glucanase, and combinations thereof, in an orally acceptable carrier.
2. The composition of claim 1 wherein the alkaline protease is a serine protease.
3. The composition of claim 2 wherein the alkaline protease is a subtilisin.
4. The composition of any of the foregoing claims wherein the second enzyme is cellulase.
5. The composition of any of the foregoing claims wherein the second enzyme is α -glucanase.
6. The composition of any of the foregoing claims comprising 0.001%-0.1% cellulase and 0.002%-0.2% alkaline protease.
7. The composition of any of the foregoing claims 0.002%-0.2% α -glucanase and 0.002%-0.2% alkaline protease.
8. The composition of any of the foregoing claims wherein the alkaline protease is of fungal or bacterial origin.
9. The composition of any of the foregoing claims in a form selected from mouthrinse, toothpaste, tooth gel, tooth powder, non-abrasive gel, mousse, foam, mouth spray, lozenge, oral tablet, dental implement, denture cleaner, and pet oral care product.
10. The composition of any of the foregoing claims wherein the composition is a toothpaste or mouthwash optionally further comprising one or more of one or more of water, abrasives, surfactants, foaming agents, vitamins, polymers, additional enzymes, humectants, thickeners, antimicrobial agents, preservatives, flavorings, colorings and/or combinations thereof.
11. The composition of any of the foregoing claims wherein the pH of the composition is 4.5 to 6.5.
12. The composition of any of the foregoing claims further comprising a basic amino acid in free or acid addition salt form.
13. The composition of any of the foregoing claims further comprising an effective amount of fluoride ion source.
14. The composition of any of the foregoing claims in the form of a mouthwash comprising the following ingredients by weight:

REPLACEMENT SHEET

Attorney Docket No. 9437-00-WO-OC

Ingredient	Conc. Range % wt/wt
Water	50 - 90
Humectant	5 - 40
Surfactant	0.01 - 10
Buffer	0.01 - 10
Preservatives and stabilizers	0.01 - 10
Flavor	0.01 - 10
Polymeric thickener	0 - 2
Fluoride ion source	0 - 0.3
Arginine (In free or salt form, by weight of the free base)	0 - 2
Sweetener	0.001 - 0.5
Cetylpyridinium chloride	0 - 1
Cellulase and/or α -Glucanase	0.002 - 0.2
Alkaline Protease	0.002 - 0.2

15. A method to (i) inhibit microbial biofilm formation in the oral cavity, (ii) to reduce plaque accumulation, (iii) reduce or inhibit gingivitis, (iv) reduce or inhibit formation of dental caries, (v) clean the teeth and oral cavity, and/or (vi) promote whole body health; comprising applying to the oral cavity an effective amount of a composition comprising an alkaline protease and a second enzyme selected from cellulase and α -glucanase.
16. Use of an alkaline protease and a second enzyme selected from cellulase and α -glucanase in the manufacture of an oral care composition.
17. A liquid enzyme preconcentrate for use in the manufacture of an oral care composition, comprising an alkaline protease and a second enzyme selected from cellulase and α -glucanase.
18. A composition comprising an alkaline protease and a second enzyme selected from cellulase and α -glucanase, for use in a method of (i) inhibiting microbial biofilm formation in the oral cavity, (ii) reducing plaque accumulation, (iii) reducing or inhibiting gingivitis, (iv) reducing or inhibiting formation of dental caries, (v) cleaning the teeth and

REPLACEMENT SHEET

Attorney Docket No. 9437-00-WO-OC

oral cavity, and/or (vi) promoting whole body health; the method comprising applying to the oral cavity an effective amount of the composition.

COMPOSICIONES DE CUIDADO ORAL

ANTECEDENTES DE LA INVENCION

La placa oral consiste de una amplia variedad de
5 especies bacterianas incrustadas en una matriz estructural y
funcional que se denomina biopelícula. Además de las
bacterias, una variedad de componentes extracelulares son
esenciales en la estructura y la función de esta biopelícula.
Los componentes extracelulares de la biopelícula de placa
10 abarcan: carbohidratos, ácidos nucleicos, lípidos, proteínas
estructurales, adhesinas y moléculas de señalización. Todos
estos componentes desempeñan un papel bien sea en mantener la
estructura de la biopelícula o facilitar la transferencia de
señales y nutrientes a través de la comunidad. Los métodos
15 tradicionales de limpieza bucal se concentran en la
eliminación o la destrucción de las bacterias. El
desbridamiento mecánico mediante el cepillado y el uso de
hilo dental elimina toda o parte de la placa acumulada. Los
agentes químicos, como el cloruro de cetilpiridinio o el
20 triclosán, por lo general se centran en aniquilar las
bacterias incrustadas dentro de la biopelícula. Sin embargo,
los componentes no bacterianos de la matriz son parte
integrante de la estructura y la función de las biopelículas
orales, y constituyen un objetivo atractiva para la

disrupción de la placa. La alteración de los componentes extracelulares de la biopelícula desintegraría la placa físicamente y, por ende, afectaría la protección brindada por la biopelícula. Esto facilitaría la remoción física de la biopelícula de superficies que resultan difíciles de alcanzar. Asimismo, las bacterias serían entonces más vulnerables a los métodos tradicionales de extracción mecánica y los tratamientos químicos antibacterianos.

Numerosos estudios previos han identificado enzimas que son potencialmente valiosas para la eliminación de biopelículas bucales. Sin embargo, la utilización de enzimas en formulaciones de cuidado bucal presenta varios desafíos. Aun cuando hay gran cantidad de enzimas disponibles, algunas enzimas y combinaciones de enzimas son mucho más eficaces que otras para este propósito, y la identificación de combinaciones óptimas es deseable. Es más, las enzimas por lo general están disponibles comercialmente en forma de polvo, ya que en forma líquida las mismas suelen ser inestables. La utilización de enzimas en polvo en un contexto de producción masiva resulta difícil debido a la dificultad en medir y controlar las cantidades de enzimas con precisión y mantener un entorno laboral seguro. Por otra parte, las enzimas pueden presentar problemas en cuanto a la formulación y la estabilidad cuando se incorporan en productos de higiene

bucal. La complejidad relativa de formulaciones dentífricas significa que hay una gran cantidad de componentes que tienen el potencial de interferir en la actividad y la estabilidad de las enzimas, y en algunos casos las enzimas también pueden degradar otros componentes de la formulación. Por último, es posible que algunas personas sean alérgicas o sensibles a ciertas enzimas, por lo que se requiere de alternativas a las formulaciones enzimáticas existentes.

De allí la necesidad de crear preparaciones enzimáticas estables que tengan la capacidad para disolver la placa dental y que se puedan incorporar fácilmente en composiciones para la higiene bucal.

SUMARIO DE LA INVENCION

Se evalúa un elevado número de distintas enzimas candidatas en diversas combinaciones para comprobar su eficacia y su idoneidad como componentes de productos de cuidado oral, y se seleccionan las combinaciones óptimas. La invención aporta formulaciones de cuidado oral que comprenden una combinación de proteasa alcalina y una segunda enzima elegida entre celulasa, α -glucanasa y combinaciones de las mismas; por ejemplo, productos de cuidado oral que contienen 0.001%-0.1% celulasa/0.002%-0.2% proteasa alcalina o 0.002%-0.2% α -glucanasa/0.002%-0.2% proteasa alcalina.

Otras áreas de aplicación de la presente invención se desprenderán a partir de la descripción detallada que se provee a continuación. Ha de quedar claro que la descripción detallada así como los ejemplos específicos, si bien divulgan la realización preferente de la presente invención, están destinados a fines de ilustración solamente y no tienen por objeto limitar el alcance de la presente invención.

DESCRIPCIÓN DETALLADA DE LA INVENCION

La descripción que sigue de la(s) realización(es) preferente(s) es de naturaleza meramente ejemplar y de modo alguno tiene por objeto limitar el alcance de la presente invención, sus aplicaciones o sus usos.

Se evalúa una serie de enzimas líquidas a fin de determinar su capacidad para desintegrar la placa dental. A continuación, las enzimas estudiadas y sus objetivos:

Enzima	Objetivo
Proteasa neutra	Proteínas
Proteasa ácida	Proteínas
Proteasa alcalina	Proteínas
Transglucosidasa	Carbohidratos
Celulasa	Carbohidratos
α -glucanasa	Carbohidratos
α -amilasa	Carbohidratos

cutinasa

Lípidos

La matriz de la biopelícula se compone de una variedad de factores extracelulares que se combinan para crear el andamiaje estructural pegajoso de la placa. Estos componentes extracelulares abarcan: carbohidratos, ácidos nucleicos, lípidos, proteínas estructurales, adhesinas y moléculas señalizadoras. Por lo general, las enzimas tienen una actividad específica y se dirigen sólo a uno de estos componentes, o incluso un reducido subconjunto de ese componente individual. Por consiguiente, se cree que las combinaciones de enzimas potencialmente podrían alcanzar componentes múltiples de la matriz, permitiendo así una ruptura más completa de la matriz de la biopelícula. En primer lugar, las enzimas se examinan en forma individual contra biopelículas formadas por *Actinomyces viscosus*, luego las combinaciones se analizan a fin de determinar su capacidad para desintegrar las biopelículas conformadas por especies mixtas.

En una realización, la invención aporta una composición de cuidado oral (Composición 1) que comprende una cantidad eficaz (por ejemplo, en una concentración eficaz para eliminar una biopelícula) de una combinación de proteasa alcalina y una segunda enzima elegida entre celulasa, α -glucanasa, y combinaciones de las mismas, en un vehículo

aceptable por vía oral. Por ejemplo, la invención proporciona:

1.1 La Composición 1 en la que la proteasa alcalina es una serina proteasa;

5 1.2 La Composición 1 o 1.1 en la que la segunda enzima es celulasa;

1.3 La Composición 1 o 1.1 en la que la segunda enzima es α -glucanasa;

1.4 Cualquiera de las composiciones precedentes que
10 comprende de 0.002% a 0.2% de proteasa alcalina;

1.5 Cualquiera de las composiciones precedentes que comprende de 0.001% a 0.1% de celulasa;

1.6 Cualquiera de las composiciones precedentes que comprende de 0.002% a 0.2% de α -glucanasa;

15 1.7 Cualquiera de las composiciones precedentes que comprende de 0.001% a 0.1% de celulasa y de 0.002% a 0.2% de proteasa alcalina;

1.8 Cualquiera de las composiciones precedentes que comprende de 0.002% a 0.2% de α -glucanasa y de 0.002% a 0.2%
20 de proteasa alcalina;

1.9 Cualquiera de las composiciones precedentes en la que la proteasa alcalina es o se deriva de una proteasa alcalina de origen bacteriano; por ejemplo, una proteasa alcalina derivada del *Bacillus*;

1.10 Cualquiera de las composiciones precedentes en la que la proteasa alcalina es una subtilisina;

1.11 Cualquiera de las composiciones precedentes en la que la proteasa alcalina es o se deriva de una proteasa
5 alcalina de origen fúngico;

1.12 Cualquiera de las composiciones precedentes en la que la proteasa alcalina se hace mediante la fermentación; por ejemplo, se extrae de un caldo de fermentación bacteriana o un caldo de fermentación fúngica.

10 1.13 Cualquiera de las composiciones precedentes en forma de enjuague bucal, pasta de dientes, gel dental, polvo dental, gel no abrasivo, mousse, espuma, atomizador bucal, gragea, cápsula oral, implemento dental, limpiador de la dentadura y otros productos para la higiene bucal.

15 1.14 Cualquiera de las composiciones precedentes en la que la composición es una pasta de dientes o un enjuague bucal que además comprende, de manera opcional, uno o más de uno de los siguientes componentes: agua, abrasivos, tensoactivos, agentes espumantes, vitaminas, polímeros,
20 enzimas adicionales, humectantes, espesantes, agentes antimicrobianos, conservantes, aromatizantes, colorantes y/o combinaciones de los mismos;

1.15 La Composición 1.10 en la que la composición es un enjuague bucal;

1.16 La Composición 1.10 en la que la composición es una pasta de dientes;

1.17 Cualquiera de las composiciones precedentes en la que el pH es de 4.5 a 6.5; por ejemplo, aproximadamente 5;

5 1.18 Cualquiera de las composiciones precedentes que además comprende un aminoácido básico, como arginina, en forma de sal de adición de ácido o libre; por ejemplo, bicarbonato de arginina, fosfato de arginina o clorhidrato de arginina;

10 1.19 Cualquiera de las composiciones precedentes que además comprende una cantidad eficaz de fuente de ion fluoruro;

1.20 Cualquiera de las composiciones precedentes que comprende los siguientes ingredientes en peso; por ejemplo,
15 en la forma de un enjuague bucal:

Ingrediente	Rango de Concentración % peso/peso
Agua	50.0-90.0
20 Humectantes, como los seleccionados entre sorbitol, xilitol, glicerina, propilenglicol y mezclas de los mismos.	5.0-40.0
Tensoactivo; por ejemplo, tensoactivo aniónico como laurilsulfato sódico, y/o tensoactivo no iónico, como por	0.01-10.0

	ejemplo poloxámero, aceite de ricino pegilado, y/o mezclas de los mismos.	
	Solución Amortiguadora	0.01-10.0
5	Conservantes y estabilizadores; por ejemplo, benzoatos, quelantes tales como ácido etilendiaminotetracético (EDTA, por sus siglas en inglés) y combinaciones de los mismos	0.01-1.0
	Sabor	0.01-1.0
	Espesante polimérico	0-2
	Fuente de ion fluoruro	0-0.3
10	Arginina (en forma libre o de sal, en peso de la base libre)	0-2.0
	Edulcorante	0.001-0.5
	Cloruro de cetilpiridinio	0-1.0
15	Celulasa y/o α -Glucanasa	0.001-0.1 de celulasa y/o 0.002-0.2 de α - glucanasa
	Proteasa alcalina	0.002-0.2

Asimismo, la invención aporte procedimientos para (i) inhibir la formación de película microbiana en la cavidad bucal; (ii) reducir la acumulación de placa; (iii) reducir o
 20 inhibir la desmineralización y estimular la remineralización de los dientes; (iv) disminuir la hipersensibilidad de la dentadura; (v) reducir o inhibir la gingivitis; (vi) estimular la sanación de llagas o cortadas en la boca; (vii)

reducir los niveles de bacterias productoras de ácido; (viii) incrementar los niveles relativos de bacterias no cariogénicas y/o bacterias que no forman placa; (ix) reducir o inhibir la formación de caries dental; (x) reducir, 5 corregir o inhibir lesiones precariosas del esmalte dental, como las que se detectan mediante fluorescencia cuantitativa inducida por luz (QLF, por sus siglas en inglés) o detección electrónica de caries (ECM, por sus siglas en inglés); (xi) tratar, aliviar o reducir la resequedad bucal; (xii) limpiar 10 los dientes y la cavidad bucal; (xiii) reducir la erosión de la dentadura; (xiv) blanquear la dentadura; y/o (xv) promover la salud sistémica, la salud cardiovascular inclusive, por ejemplo mediante la reducción de la posibilidad de infección sistémica a través de los tejidos bucales, lo cual comprende 15 la aplicación a la cavidad bucal de una cantidad eficaz de una composición contentiva de una proteasa alcalina y una segunda enzima elegida entre celulasa y α -glucanasa, como por ejemplo cualquiera de la Composición 1, y subsiguientes.

Del mismo modo, la invención ofrece la utilización de 20 una proteasa alcalina y una segunda enzima seleccionada entre celulasa y α -glucanasa en la elaboración de una composición de cuidado oral, de acuerdo con cualquiera de la Composición 1, et seq., así como procedimientos para la elaboración de composiciones de cuidado oral que comprenden la combinación

de una proteasa alcalina y una segunda enzima seleccionada entre celulasa y α -glucanasa en un vehículo aceptable por vía oral, como por ejemplo una base de dentífrico o de enjuague bucal.

5 Asimismo, la invención aporta un preconcentrado a base de enzimas líquidas, por ejemplo, a ser utilizado en la elaboración de una composición de cuidado oral, conforme a cualquiera de la Composición 1, et seq. compuesta de una proteasa alcalina y una segunda enzima seleccionada entre
10 celulasa y α -glucanasa.

Tal como se emplea en la presente memoria, el término “proteasa alcalina” se refiere a una proteasa con actividad óptima en condiciones alcalinas, tal como un pH mayor que pH 7, como un pH de 7.5 a 9.5 por ejemplo. La proteasa alcalina
15 puede ser una proteína natural o modificada de origen bacteriano. En una realización, la proteasa alcalina es una serina proteasa, elegida del grupo consistente de proteasas tipo quimotripsina, proteasas tipo subtilisina o subtilasas, proteasas α -líticas mixobacterianas y proteasas procedentes
20 de la bacteria *Bacillus*. Las enzimas de proteasa están comercialmente disponibles, por ejemplo, en productos de fermentación purificados, tales como productos de fermentación bacteriana o fúngica, óptimamente activos a un alto pH alcalino, y estables en una amplia gama de

temperaturas (25-70°C), tales como las enzimas Properase®, Properase 400E (Genencor/DuPont).

En una realización determinada, la proteasa alcalina es una enzima subtilasa. Las subtilasas constituyen una familia de serina proteasas del tipo subtilisina. Las enzimas subtilasas inician el ataque nucleófilo sobre el enlace (amida) peptídico a través de un residuo de serina en el sitio activo. Al parecer, estas han evolucionado de manera independiente y convergente en una triada catalítica Ser/His/Asp, similar a las serina proteasas de tipo tripsina.

En una realización determinada, la proteasa alcalina es una enzima subtilisina. Las subtilisinas (*serine endopeptidases*) constituyen una clase de proteasas no específicas (enzimas que digieren la proteína) originalmente obtenidas a partir del *Bacillus subtilis*. Las subtilisinas pertenecen a la familia de las subtilasas. Típicamente, las subtilisinas tienen pesos moleculares entre 20,000 y 45,000 daltones aproximadamente. Se pueden obtener a partir de las bacterias que habitan en la tierra, por ejemplo *Bacillus amyloliquefaciens*. Las subtilisinas son secretadas en grandes cantidades por muchas especies de la bacteria *Bacillus*.

Como se emplea en la presente memoria, el término "celulasa" se refiere a una enzima que cataliza la celulolisis (es decir, la hidrólisis de la celulosa). La

celulasa se puede seleccionar entre, por ejemplo, endocelulasas, exocelulasas, celobiasis, celulasas oxidativas y celulosa fosforilasa. En una realización, la celulasa es una endocelulasa.

5 Tal como se emplea en la presente memoria, el término “ α -glucanasa” se refiere a una enzima que cataliza la hidrólisis de 1,3-enlaces- α -D-glucósídicos en un polisacárido y, por ende, es capaz de hidrolizar glucano insoluble.

pH: El pH de la formulación es, de preferencia,
10 ligeramente ácido; por ejemplo un pH de 4.5 a 6.5, ca. pH 5, sobre todo cuando la formulación contiene iones fluoruro, calcio y/u otros que son más solubles a un pH menor. Mientras que un pH ácido es, por lo general, inferior al pH óptimo para la actividad de la proteasa alcalina, no se pudo
15 determinar que el pH inferior redujera la eficacia de las formulaciones. Por el contrario, la proteasa alcalina resultó ser sorprendentemente eficaz en las formulaciones con un pH inferior. Sin restringirnos a la teoría, creemos que el pH en el microambiente en el sitio activo puede ser mayor que el
20 pH en la formulación, y que este pH micro ambiental constituye un factor de mayor relevancia en la determinación de la actividad enzimática que el pH global de la formulación.

Agentes activos: La concentración eficaz de los

ingredientes activos que se utilizan en la presente memoria dependerá del agente y del sistema de distribución específico empleados. Se sabe que una pasta dental, por ejemplo, típicamente se diluye en agua cuando se usa, en tanto que un
5 enjuague bucal no se diluye. Por ende, una concentración eficaz de agentes activos en un dentífrico será entre 5 y 15 veces más alta que la requerida para un enjuague bucal. Del mismo modo, la concentración dependerá de la sal o el polímero exacto seleccionado. Por ejemplo, cuando el agente
10 activo se proporciona en forma de sal, el contraión afectará el peso de la sal, de manera que si el contraión es más pesado, se necesita más sal en peso a fin de proporcionar la misma concentración de ion activo en el producto final. Los intervalos efectivos para las enzimas en las composiciones
15 de la invención son: 0.001%-0.1% de celulasa/0.002%-0.2% de proteasa alcalina o 0.002%-0.2% de α -glucanasa/0.002%-0.2% de proteasa alcalina. Otras sustancias activas se proporcionan, asimismo, en cantidades eficaces. La arginina, cuando está presente, puede estar presente en niveles que varían entre
20 0.1% y 20% en peso aproximadamente, expresado como peso de base libre); entre 0.1% y 3 % en peso aproximadamente para un enjuague bucal; entre 1% y 10% en peso aproximadamente para una pasta de dientes, o entre 7% y 20% en peso para un producto profesional o un tratamiento con prescripción

médica. El fluoruro podría estar presente a niveles de 25 a 25,000 ppm aproximadamente; por ejemplo, entre 25 y 250 ppm aproximadamente para un enjuague bucal; entre 750 y 2,000 ppm aproximadamente para una pasta dental de consumo masivo, o entre 2,000 y 25,000 ppm aproximadamente para un producto profesional o tratamiento con prescripción médica. Los niveles de agentes antibacterianos, además de la sal de galio y el polímero de aminoácido básico, variarán de manera similar; por ejemplo, los niveles utilizados en una pasta de diente es de 5 a 15 veces mayor que los empleados en un enjuague bucal. Por ejemplo, un enjuague bucal a base de triclosán puede contener aproximadamente 0.03% en peso de triclosán en tanto que un dentífrico a base de triclosán puede contener aproximadamente 0.3% en peso de triclosán.

Fuente de ion fluoruro: Las composiciones de cuidado oral puede incluir, asimismo, una o más fuentes de ion fluoruro, como sales de fluoruro soluble. Una amplia variedad de materias que producen iones fluoruro se pueden emplear como fuentes de fluoruro soluble en las composiciones de la presente invención. Ejemplos de materias que producen iones fluoruro adecuadas se divulgan en la patente estadounidense No. 3,535,421, otorgada a Briner et al.; la patente estadounidense No. 4,885,155, otorgada a Parran, Jr. et al., y la patente estadounidense No. 3,678,154, otorgada a Widder

et al., las cuales se incorporan aquí por referencia. Las fuentes de ion fluoruro representativas incluyen, mas no se limitan a, fluoruro de estaño, fluoruro de sodio, fluoruro de potasio, monofluorofosfato sódico, fluorosilicato de sodio, 5 fluorosilicato de amonio, fluoruro de amina, fluoruro de amonioamina, fluoruro de amonio, y combinaciones de los mismos. En ciertas realizaciones, la fuente de ion fluoruro abarca fluoruro de estaño, fluoruro de sodio, monofluorofosfato de sodio, así como sus mezclas. En ciertas 10 realizaciones, la composición de cuidado oral de la invención puede que contenga, asimismo, una fuente de iones fluoruro o un ingrediente que proporcione fluorina en cantidades suficientes para suministrar entre 25 ppm y 25,000 ppm aproximadamente de iones fluoruro, generalmente al menos unas 15 500 ppm, por ejemplo, entre alrededor de 500 y alrededor de 2000 ppm, alrededor de 1000 a 1600 ppm, alrededor de 1450 ppm. El nivel apropiado de fluoruro dependerá de la aplicación específica. Un enjuague bucal, por ejemplo, normalmente tendría entre 100 y 250 ppm aproximadamente de 20 fluoruro. Una pasta dental para el consumo general normalmente tendría entre unas 1000 y unas 1500 ppm, en tanto que una pasta dental pediátrica tendría un poco menos. Un dentífrico o revestimiento de uso profesional podría tener tantas como 5,000 o hasta 25,000 ppm de fluoruro. Se puede

añadir fuentes de ion fluoruro a las composiciones de la invención a un nivel de 0.01% en peso aproximadamente a 10% en peso aproximadamente en una realización, o de 0.03% en peso aproximadamente a 5% en peso aproximadamente, y en otra
5 realización de 0.1% en peso aproximadamente a 1% en peso aproximadamente. Los pesos de las sales de fluoruro de modo de aportar el nivel apropiado de ion fluoruro obviamente variará con base en el peso del contraíón en la sal.

Abrasivos: Las composiciones de la invención, por
10 ejemplo la Composición 1 et seq., pueden contener un abrasivo de fosfato cálcico, tal como fosfato tricálcico ($\text{Ca}_3(\text{PO}_4)_2$), hidroxiapatita ($\text{Ca}_{10}(\text{PO}_4)_6(\text{OH})_2$), o dihidrato del fosfato dicálcico ($\text{CaHPO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$, también referido a veces como DiCal en el presente documento) o pirofosfato de calcio. Las
15 composiciones pueden incluir uno o más abrasivos adicionales, tales como abrasivos de silicato tales como silicatos precipitados que tienen un tamaño de partícula medio de hasta unos 20 micrones, como Zeodent 115® comercializado por J. M. Huber. Otros abrasivos útiles son: metafosfato de sodio,
20 metafosfato de potasio, silicato de aluminio, alúmina calcinada, bentonita u otros materiales silíceos, o combinaciones de los mismos. Los materiales de pulido abrasivos compuestos por sílices que son útiles en la práctica de la presente invención, así como los otros

abrasivos, por lo general tienen un tamaño de partícula promedio que varía entre aproximadamente 0.1 y aproximadamente 30 micras; y aproximadamente 30 micras, entre 5 y aproximadamente 15 micras. Los abrasivos de sílice pueden ser de sílice precipitada o geles de sílice, tales como las xerogeles de sílice descritos en la patente estadounidense No. 3,538,230, concedida a Pader et al., y la patente estadounidense No. 3,862,307, concedida a Digiulio, ambas incorporadas aquí por referencia. Algunos xerogeles de sílice en particular se venden bajo la marca registrada Syloid® distribuida por W. R. Grace & Co., de Davison Chemical Division. Los materiales de sílice precipitada abarcan los comercializados por J. M. Huber Corporation bajo la marca registrada Zeodent®, incluso la sílice que lleva la designación Zeodent 115 y 119. Estos abrasivos de sílice se describen en la patente estadounidense No. 4,340,583, concedida a Wason, la cual se incorpora aquí por referencia. En ciertas realizaciones, los materiales abrasivos útiles en la aplicación de las composiciones de cuidado oral de acuerdo con la invención incluyen geles de sílice y sílice amorfa precipitada que tienen un valor de absorción de aceite menor de aproximadamente 100cc/100g de sílice y en el intervalo de aproximadamente 45cc/100g a aproximadamente 70cc/100g de sílice. Los valores de absorción de aceite se miden mediante

el método ASTA Rub-Out Method D281 ("Standard Test Method for Oil Absorption of Pigments by Spatula Rub-Out"). En ciertas realizaciones, las sílices son partículas coloidales que poseen un tamaño medio de partícula de aproximadamente 3 micras a aproximadamente 12 micras; y de aproximadamente 5 a aproximadamente 10 micras. Los abrasivos de sílice de baja absorción de aceite particularmente útiles en la práctica de la presente invención se venden bajo la denominación comercial Sylodent XWA® distribuida por Davison Chemical Division de W.R. Grace & Co., Baltimore, Md. 21203. El Sylodent 650 XWA®, un hidrogel de sílice compuesto de partículas de sílice coloidal que tienen un contenido de agua de 29% en peso, un diámetro promedio de aproximadamente 7 a aproximadamente 10 micras y una absorción de aceite menor de 70 cc/100 g de sílice, constituye un ejemplo de un abrasivo de sílice de baja absorción de aceite útil en la práctica de la presente invención. El abrasivo está presente en la composición dentífrica de la presente invención en una concentración de aproximadamente 10% a aproximadamente 60% en peso; de aproximadamente 20% a aproximadamente 45% en peso en otra realización, y de aproximadamente 30% a aproximadamente 50% en peso, en otra realización.

Agentes reforzadores de la formación de espuma: Las composiciones de cuidado oral de la presente invención pueden

incluir, asimismo, un agente para aumentar la cantidad de espuma que se produce cuando se cepilla la cavidad bucal. Ejemplos ilustrativos de agentes que incrementan la formación de espuma incluyen, mas no se limitan a, polioxietileno y ciertos polímeros tales como polímeros alginato. El polioxietileno puede aumentar la cantidad y el espesor de la espuma generada por el componente vehículo de la composición oral de la presente invención. El polioxietileno también se conoce comúnmente como polietilenglicol ("PEG") u óxido de polietileno. Los polioxietilenos adecuados para la presente invención tendrán un peso molecular de aproximadamente 200.000 a aproximadamente 7,000,000. En una realización, el peso molecular variará entre aproximadamente 600,000 y aproximadamente 2,000,000, y en otra realización variará entre aproximadamente 800,000 y aproximadamente 1,000,000. Polyox® es la marca registrada del polioxietileno de alto peso molecular producido por Union Carbide. El polioxietileno puede estar presente en una cantidad de aproximadamente 1% a aproximadamente 90%; en una realización estará presente en una cantidad de aproximadamente 5% a aproximadamente 50%, y en otra realización de aproximadamente 10% a aproximadamente 20% en peso del componente portador de las composiciones orales de la presente invención. La dosificación del agente espumante en la composición de cuidado oral (es decir, una

dosis única) es de aproximadamente 0.01% a aproximadamente 0.9% en peso; de aproximadamente 0.05% a aproximadamente 0.5% en peso, y en otra realización de aproximadamente 0.1% a aproximadamente 0.2% en peso.

5 Tensoactivos: Las composiciones útiles para la práctica de la presente invención pueden contener tensoactivos aniónicos, como por ejemplo:

 i. sales solubles en agua de monosulfatos de monoglicérido de ácido graso superior, tales como la sal de
10 sodio del monosulfato de monoglicérido de los ácidos grasos del aceite de coco hidrogenado, N-metil N-cocoil taurato de sodio, cocomo-glicédido sulfato de sodio,

 ii. sulfatos de alquilo superiores, tal como laurilsulfato de sodio,

15 iii. alquilétersulfatos superiores; por ejemplo, que tengan la fórmula estructural $\text{CH}_3(\text{CH}_2)_m\text{CH}_2(\text{OCH}_2\text{CH}_2)_n\text{OSO}_3\text{X}$, en la cual m es un número entero de 6 a 16, por ejemplo 10; n es un número entero de 1 a 6, por ejemplo 2, 3 o 4; y X es Na o K, por ejemplo Lauril éter sulfato sódico
20 $(\text{CH}_3(\text{CH}_2)_{10}\text{CH}_2(\text{OCH}_2\text{CH}_2)_2\text{OSO}_3\text{Na})$.

 iv. alquil-aril sulfonatos superiores, como el dodecil benceno sulfonato de sodio (lauril benceno sulfonato de sodio)

 v. alquil-sulfoacetatos superiores, tales como lauril-

sulfoacetato sódico (dodecil sulfoacetateo sódico; ésteres de ácidos grasos superiores de 1,2 dihidroxi propano sulfonato, sulfocolaurato (N-2-etil laurato potásico sulfoacetamida) y lauril sarcosinato sódico.

5 Por "alquil superior" se entiende, por ejemplo, un alquil de 6 a 30 átomos de carbono. En realizaciones concretas, el tensoactivo aniónico se elige entre lauril sulfato de sodio y lauril éter sulfato de sodio. El tensoactivo aniónico puede estar presente en una cantidad que
10 es eficaz, por ejemplo, $>0.01\%$ en peso de la formulación, mas no a una concentración que pueda irritar el tejido bucal, por ejemplo $<10\%$; las concentraciones óptimas dependen de la formulación específica y el tensoactivo específico. Por ejemplo, las concentraciones que se emplean para un enjuague
15 bucal normalmente están por el orden de la décima parte de las que se utilizan en una pasta de dientes. En una realización, el tensoactivo aniónico en una pasta de dientes está presente en una concentración de aproximadamente 0.3% a aproximadamente 4.5% en peso, por ejemplo, aproximadamente
20 $1,5\%$. De manera opcional, las composiciones de la invención pueden contener mezclas de tensoactivos; es decir, pueden comprender tensoactivos aniónicos y otros tensoactivos que pueden ser aniónicos, catiónicos, zwitteriónicos o no iónicos. Por lo general, los agentes tensoactivos son

aquellos que son razonablemente estables a través de un amplio intervalo de pH. Los tensoactivos se describen en mayor detalle en la patente de Estados Unidos No. 3,959,458, concedida a Agricola et al.; la patente de Estados Unidos No. 3,937,807, concedida a Haefele; y la patente de Estados Unidos No. 4,051,234, concedida a Gieske et al., las cuales se incorporan aquí por referencia. En ciertas realizaciones, los tensoactivos aniónicos satisfactorios para la práctica de la presente invención abarcan las sales solubles en agua de alquilsulfatos que tienen entre 10 y 18 átomos de carbono en el radical alquilo y las sales solubles en agua de monoglicéridos sulfonados de ácidos grasos que tienen entre 10 y 18 átomos de carbono. El lauril sulfato de sodio, el lauroil sarcosinato de sodio y la sal de los sulfonatos de monoglicérido del aceite de coco son ejemplos de tensoactivos aniónicos de este tipo. En una realización en particular, la composición de la invención, como por ejemplo la Composición 1 et seq., contiene lauril sulfato de sodio.

En otra realización, los tensoactivos catiónicos adecuados en la práctica de la presente invención se pueden definir en líneas generales como derivados de compuestos alifáticos de amonio cuaternario que tienen una cadena alquílica de cadena larga que contiene de 8 a 18 átomos de carbono aproximadamente, tales como cloruro de lauril

trimetil amonio, cloruro de cetilpiridinio, bromuro de cetil
trimetil amonio, cloruro de
diisobutilfenoxietoxietildimetilbencilamonio, nitrito de
alquiltrimetilamonio de coco, fluoruro de cetilpiridinio, y
5 mezclas de los mismos. Tensoactivos catiónicos ilustrativos
son los fluoruros de amonio cuaternario descritos en la
patente de Estados Unidos No. 3,535,421, concedida a Briner
et al., incorporada aquí por referencia. Ciertos tensoactivos
catiónicos también pueden actuar como germicidas en las
10 composiciones.

Los tensoactivos no iónicos ilustrativos que se pueden
emplear en las composiciones de la presente invención se
pueden definir, en líneas generales, como compuestos que se
producen mediante la condensación de grupos de óxido de
15 alquileo (de naturaleza hidrófila) con un compuesto
hidrófobo orgánico que puede ser de naturaleza alifática o
alquilaromática. Los ejemplos de tensoactivos no iónicos
adecuados incluyen, mas no se limitan a: plurónicos;
condensados del óxido de polietileno de alquil fenoles;
20 productos derivados de la condensación del óxido de etileno
con el producto de la reacción del óxido de propileno y
etilendiamina; condensados de óxido de etileno de alcoholes
alifáticos; óxidos de amina terciaria de cadena larga; óxidos
de fosfina terciaria de cadena larga; sulfóxidos de dialquilo

de cadena larga, y mezclas de estos materiales.

En ciertas realizaciones, los tensoactivos sintéticos zwitteriónicos adecuados en la presente invención se pueden describir, en líneas generales, como derivados de compuestos alifáticos de amonio, fosfonio y sulfonio cuaternarios, en los cuales los radicales alifáticos pueden ser de cadena lineal o ramificada, y en donde uno de los sustituyentes alifáticos contiene desde aproximadamente 8 hasta aproximadamente 18 átomos de carbono, y uno contiene un grupo aniónico hidrosoluble, por ejemplo, carboxi, sulfonato, sulfato, fosfato o fosfonato. Ejemplos ilustrativos de los tensoactivos adecuados para su inclusión en la composición incluyen, mas no se limitan a, alquil sulfato de sodio, lauroil sarcosinato de sodio, cocoamidopropil betaína y polisorbato 20, y sus mezclas.

El tensoactivo o las mezclas de tensoactivos compatibles pueden estar presentes en las composiciones de la presente invención desde aproximadamente 0.1% hasta aproximadamente 5.0%; en otra realización, desde aproximadamente 0.3% hasta aproximadamente 3.0%; y en otra realización, desde aproximadamente 0.5% hasta aproximadamente 2.0% en peso de la composición completa.

Agentes saborizantes: Las composiciones de cuidado oral de la invención pueden contener, asimismo, un agente

saborizante. Los agentes saborizantes que se emplean en la práctica de la presente invención abarcan, mas no se limitan a: aceites esenciales así como diversos aldehídos aromatizantes, ésteres, alcoholes e ingredientes similares.

5 Entre los ejemplos de aceites esenciales se encuentran los aceites de hierbabuena, menta, gaulteria, sasafrás, clavo, salvia, eucalipto, mejorana, canela, limón, lima, pomelo y naranja. Químicos como mentol, carvona y anetol también son adecuados. Ciertas realizaciones emplean los aceites de menta
10 y hierbabuena. El agente saborizante se puede incorporar en la composición oral a una concentración de aproximadamente 0.1% a aproximadamente 5% en peso, y de aproximadamente 0.5% a aproximadamente 1.5% en peso. La dosificación del agente saborizante en la composición de cuidado oral individual (es
15 decir, una dosis única) es de aproximadamente 0.001% a aproximadamente 0.05% en peso, y en otra realización es de aproximadamente 0.005% a aproximadamente 0.015% en peso.

Polímeros: Las composiciones de cuidado oral de la invención también podrían incluir, de manera opcional, uno o
20 más polímeros, tales como: polietilenglicoles, copolímeros de polivinilmetil éter de ácido maleico, polisacáridos (como los derivados de celulosa; por ejemplo, carboximetil celulosa, o gomas de polisacárido como goma xantano o goma de carragenano). Los polímeros ácidos, por ejemplo geles de

poliacrilato, generalmente son empleados en forma de sus ácidos libres o como una sal de metal alcalino soluble en agua parcial o totalmente neutralizada (por ejemplo, sales de sodio, potasio o amonio).

5 En particular, cuando agentes antibacterianos no catiónicos o agentes antibacterianos, como el triclosán, se incluyen en cualquiera de los componentes dentífricos, también se incluye preferiblemente desde un 0.05% hasta un 5% de un agente que potencia el suministro y la retención de los
10 agentes en las superficies de la cavidad bucal. Estos agentes útiles en la presente invención se describen en las patentes estadounidenses Nos. 5,188,821 y 5,192,531; e incluyen policarboxilatos poliméricos aniónicos sintéticos tales como copolímeros de 1:4 a 4:1 de ácido o anhídrido maleico
15 etilénicamente polimerizable insaturado con otro monómero, preferiblemente metil-vinil-éter/anhídrido maleico con un peso molecular (P.M.) de aproximadamente 30,000 a aproximadamente 1,000,000; más preferiblemente de aproximadamente 30,000 a aproximadamente 800,000. Estos
20 copolímeros están disponibles bajo la marca registrada Gantrez; por ejemplo, Gantrez AN 139 (P.M. 500,000), AN 119 (M P.M. 250,000) y preferiblemente Gantrez S-97 Calidad Farmacéutica (P.M. 700,000) distribuido por ISP Technologies, Inc., Bound Brook, N.J. 08805. En caso de estar presentes,

los agentes potenciadores se incorporan a las composiciones en cantidades de aproximadamente 0.05% a aproximadamente 3% en peso. Otros polímeros operativos incluyen los copolímeros de 1:1 de anhídrido maleico con etil acrilato, hidroxietil metacrilato, N-vinil-2-pirolidona, o etileno, este último disponible bajo la marca Monsanto EMA No. 1103, P.M. 10,000 y EMA Grade 61, y copolímeros de 1:1 de ácido acrílico con metil o hidroxietil metacrilato, metil o etil acrilato, isobutil vinil éter o N-vinil-2-pirrolidona. Generalmente adecuados son los ácidos carboxílicos olefínicamente o etilénicamente polimerizados insaturados que contienen un doble enlace olefínico entre carbono activado y carbono y al menos un grupo carboxilo, es decir, un ácido que contiene un doble enlace olefínico que actúa fácilmente en la polimerización a causa de su presencia en la molécula de monómero, ya sea en la posición alfa-beta con respecto a un grupo carboxilo o como parte de un agrupamiento metileno terminal. Ejemplos ilustrativos de tales ácidos son los ácidos y anhídridos acrílico, metacrílico, etacrílico, alfa-cloroacrílico, crotonico, beta-acriloxi propionico, sorbico, alfa-clorosorbico, cinamico, beta-stirilacrílico, muconico, itaconico, citraconico, mesaconico, glutaconico, aconitico, alfa-fenilacrílico, 2-bencil acrílico, 2-ciclohexilacrílico, angelico, umbelico, fumarico y maleico. Otros monómeros

olefínicos distintos copolimerizables con tales monómeros carboxílicos incluyen vinilacetato, vinil cloruro, dimetil maleato y afines. Los copolímeros contienen suficientes grupos de sales carboxílicas para la hidrosolubilidad. Una

5 clase adicional de agentes poliméricos incluye una composición que contiene homopolímeros de acrilamidas sustituidas y/o homopolímeros de ácidos sulfónicos insaturados y sus sales; específicamente donde los polímeros se basan en ácidos sulfónicos insaturados seleccionados entre

10 ácidos sulfónicos acrilamidoalcanos tales como ácido sulfónico 2-acrilamida 2 metilpropano con un peso molecular de aproximadamente 1,000 a aproximadamente 2,000,000, como se describe en la patente estadounidense No. 4,842,847, de fecha 27 de junio de 1989 y concedida a Zahid, la cual se incorpora

15 aquí por referencia. Otra clase de agentes poliméricos útiles incluyen los poliaminoácidos que contienen proporciones de aminoácidos de superficie activa aniónicos tales como ácido aspártico, ácido glutámico y fosfoserina (además de los polímeros de amionácidos básicos), como los divulgados en la

20 patente estadounidense No. 4,866,161 concedida a Sikes et al., la cual se incorpora aquí por referencia. Al preparar las composiciones de cuidado oral, a veces resulta necesario añadir alguna sustancia espesante a fin de proporcionar una consistencia deseable o estabilizar o mejorar el rendimiento

de la formulación. En ciertas realizaciones, los agentes espesantes son polímeros de carboxivinil, carragenina, hidroxietil celulosa y sales solubles en agua de éteres de celulosa tales como carboximetil celulosa sódica y carboximetil hidroxietil celulosa. También se pueden incorporar gomas naturales como karaya, goma arábica y goma de tragacanto. Se puede emplear silicato de magnesio y aluminio coloidal o sílice dividido finamente como componente de la composición espesante a fin de mejorar aún más la textura de la composición. En ciertas realizaciones, los agentes espesantes se incorporan en una cantidad de aproximadamente 0.5% a aproximadamente 5.0% en peso de la composición.

Agua: Puede que las composiciones orales de la invención también contengan agua. El agua empleada en la preparación de composiciones orales comerciales debe ser desionizada y libre de impurezas inorgánicas. Normalmente, el agua constituye el equilibrio de las composiciones y conforma aproximadamente de 10% al aproximadamente 90%, de aproximadamente 20% a aproximadamente 60% o aproximadamente 10% a aproximadamente 30% en peso de las composiciones orales. Esta cantidad de agua incluye el agua libre que se añade más la cantidad que se incorpora junto con otras sustancias tales como sorbitol o cualesquier componentes de la invención.

Humectantes: En ciertas realizaciones de las composiciones orales, es también deseable incorporar un agente humectante con el propósito de evitar el endurecimiento de la composición por exposición al aire.

5 Ciertos humectantes pueden impartir, asimismo, dulzor o sabor a las composiciones dentífricas. El humectante, con base en un humectante puro, generalmente conforma entre 15% y 70% aproximadamente en una realización, o entre 30% y 65% aproximadamente en peso de la composición dentífrica en otra

10 realización. Los humectantes adecuados incluyen alcoholes polihidroxilados comestibles como glicerina, sorbitol, xilitol, propilenglicol así como otros polioles y mezclas de estos humectantes. En ciertas realizaciones se puede emplear mezclas de glicerina y sorbitol como el componente humectante

15 de las composiciones dentífricas descritas en el presente documento.

Otros ingredientes opcionales: Además de los componentes antes descritos, las realizaciones de esta invención pueden contener una variedad de ingredientes dentífricos opcionales,

20 algunos de los cuales se describen más adelante. Los ingredientes opcionales abarcan, mas no se limitan a; adhesivos, agentes de baja espumabilidad, agentes aromatizantes, agentes edulcorantes, agentes antisarro adicionales, abrasivos y agentes colorante. Estos y otros

componentes adicionales se describen en mayor detalle en la patente de Estados Unidos No. 5,004,597, concedida a Majeti; la patente de Estados Unidos No. 3,959,458 concedida a Agricola et al., y la patente de Estados Unidos No. 3,937,807, concedida a Haefele, las cuales se incorporan aquí por referencia.

En una realización, las composiciones de la invención, por Ejemplo la Composición 1, et seq., son enjuagues bucales que utilizan formulaciones de base como se conoce en la técnica, por ejemplo como se describe en la patente de Estados Unidos No. 6,692,726, con la mejora de que los enjuagues bucales contienen enzimas, tal como se ha descrito anteriormente para las composiciones 1, et seq., que tienen rangos efectivos de 0.001% a 0.1% celulasa/ de 0.002% a 0.2% proteasa alcalina o de 0.002% a 0.2% α -glucanasa/de 0.002% a 0.2% proteasa alcalina.

En algunas realizaciones, el pH de la formulación de enjuague bucal es de aproximadamente 5, que es sustancialmente menor que el pH que normalmente se considera óptimo para la actividad de la proteasa alcalina. En algunas realizaciones, un pH elevado no es necesario para la actividad de la proteasa alcalina. En algunas realizaciones, el pH en el sitio de acción enzimática en el microambiente del biopelícula es distinto al pH de la formulación.

Para los fines de la presente memoria descriptiva, se utilizan rangos como esquemas para describir todos y cada uno de los valores que están dentro del rango. Cualquier valor dentro del rango puede ser seleccionado como el término del
5 rango. En adición, todas las referencias aquí citadas se incorporan en su totalidad como referencias.

En caso de discordancia entre una definición en la presente memoria descriptiva y aquélla de una referencia citada, la presente memoria descriptiva prevalece.

10 A menos que se especifique lo contrario, todos los porcentajes y las cantidades expresados aquí o en cualquier otra parte de la memoria descriptiva deben interpretarse como referencia a porcentajes en peso. Las cantidades proporcionadas se basan en el peso activo de la sustancia o
15 compuesto.

EJEMPLOS

Ejemplo 1: *Evaluación de enzimas contra una biopelícula conformada por un solo organismo*

20 Los sistemas enzimáticos estudiados con anterioridad presentaban retos considerables en términos de formulación y estabilidad. Por consiguiente, se examinó una serie de enzimas producidas mediante la utilización de procesos de fermentación bacteriana por lotes. Estas enzimas proporcionan

mayor estabilidad líquida y, potencialmente, mayor actividad debido a objetivos divergentes, como se describe a continuación:

Tabla 1

5 **Enzimas para el estudio**

	<i>Enzima</i>	<i>Objetivo</i>
	Proteasa neutra	Proteínas
	Proteasa ácida	Proteínas
	Proteasa alcalina	Proteínas
	Transglucosidasa	Carbohidratos
10	Celulasa	Carbohidratos
	α -glucanasa	Carbohidratos
	α -amilasa	Carbohidratos
	Cutinasa	Lípidos

Las enzimas se estudian por separado y en cócteles conformados por dos o tres enzimas de especies únicas y combinadas en sistemas *in vitro*. Además, los dos cócteles más eficaces y de fácil acceso se formulan en enjuagues bucales y se prueban en un estudio clínico de la placa que dura cuatro días.

20 Cepas bacterianas y condiciones de cultivo: Se cultiva *Actinomyces viscosus* (ATCC#31346) en caldo de tripticasa de soja complementado con 0.6% de extracto de levadura (CTS-EL, o TSB-YE, por sus siglas en inglés) a 37°C, cultivo estacionario. Para los estudios de especies mixtas, la fuente

de bacterias es un quimiostato de cultivo continuo inoculado con *A. viscosus*, *Lactobacillus casei* (ATCC#334), *Streptococcus oralis* (ATCC #35037), *Fusobacterium nucleatum* (ATCC#10953) y *Veillonella parvula* (ATCC#17745). Este cultivo
5 mixto se mantiene en un caldo complejo especializado en un quimiostato de cultivo continuo a 37°C.

Recubrimiento salival de discos de hidroxiapatita: Los estudios de la inhibición del crecimiento y la inhibición del biopelícula conformado por especies mixtas se llevan a cabo
10 por medio de discos de hidroxiapatita (HAP, por sus siglas en inglés) como el sustrato superficial. Se obtiene saliva estimulada con parafina de un solo donante y se centrifuga de modo de sedimentar los residuos. A continuación, se esteriliza la saliva mediante incubación bajo luz
15 ultravioleta durante 45 minutos. La saliva esterilizada y desobstruida se inocula en los pocillos de placas estériles de 24 pocillos para cultivos que contienen los discos HAP. Las placas se incuban durante toda una noche a 4°C a fin de permitir la formación de la película.

20 Eliminación de las biopelículas conformadas por una sola especie: Las biopelículas conformadas por una sola especie de *A. viscosus* se forman en placas para cultivos de 96 o 384 pocillos fabricadas en poliestireno. Las bacterias se cultivan en estado natural a partir de una colonia congelada

en 20 ml de TSB-YE a 37°C durante toda la noche. Los cultivos de una noche se diluyen a una densidad óptica a 610 nm (OD_{610}) de ~0.2 en caldo de tripticasa de soya diluido a la concentración al medio (0.5x TSB). Se añade 100 µl de este cultivo diluido a cada pocillo de la placa de cultivo estéril apropiada y las placas se incuban durante toda la noche a 37°C. Tras la incubación de una noche, se decantan los sobrenadantes de los pocillos dejando atrás una biopelícula firme en el fondo de cada pocillo. Se agregan soluciones de ensayo a la primera columna de cada pocillo y se realizan diluciones seriadas/en serie con un factor de dilución 2 en 0.5x TSB a lo largo y ancho de toda la placa. A menos que se indique lo contrario, las placas se incuban durante una hora a 37°C. Después del tratamiento, se decantan los sobrenadantes, los cuales no sólo eliminaron el tratamiento sino también cualquier biopelícula desprendida. Se añade 50 µl de cristal violeta en solución al 0.3% según el método de Gram a cada pocillo y se deja teñir por 15 min. Se eliminan los residuos de decolorante y se lavan los pocillos con una Solución Amortiguadora de 10 mM de Tris y 1 mM de Tetrasodio a un pH de 8,0 y luego se deja secar. Las placas teñidas se leen en un lector de microplacas EnVision de Perkin Elmer para medir la absorbancia a 590 nm. Las absorbancias se comparan con la absorbancia de los pocillos tratados solo con

el medio y los resultados se registran como una reducción porcentual en la formación de biopelículas con relación al control medio.

El estudio de la eliminación de biopelícula formados por una sola especie se emplea para analizar soluciones de una sola enzima a fin de determinar una variedad de propiedades. Las ocho enzimas de prueba se reciben como soluciones al 3 o 4% y 1% de glicerol y todas se analizan a objeto de determinar su capacidad para eliminar los biopelículas compuestos de una sola especie que son formados por el colonizador bucal temprano *A. viscosus*. Además de servir para el estudio de la eficacia potencial de las enzimas, esta investigación se utiliza para determinar las curvas dosis-efecto para cada enzima por separado. Esta información se utiliza para encauzar la selección de concentraciones tanto para ensayos de especies mixtas como para la combinación de enzimas en cócteles.

Definimos la Concentración de Erradicación de la Biopelícula (*Biofilm Eradication Concentration*) (BEC_{50}) como la concentración mínima a la cual se erradica más del 50% de la biopelícula. Esto permite la asignación de una medida numérica de eficacia para cada enzima analizada. Estos valores se muestran en la Tabla 2.

Tabla 2

BEC₅₀ para biopelículas conformadas por una sola especie de

A. viscosus

	<u>Enzima</u>	<u>Objetivo</u>	<u>BEC₅₀</u> (ppm)
5	Proteasa neutra	Proteínas	0.61
	Proteasa ácida	Proteínas	39,06
	Proteasa alcalina	Proteínas	0.08
	Transglucosidasa	Carbohidratos	**
	Celulasa	Carbohidratos	1250
	α -glucanasa	Carbohidratos	39,06
10	α -amilasa	Carbohidratos	5000
	cutinasa	Lípidos	2500

** Se observa una erradicación <50% de la biopelícula incluso en la concentración más alta (10000 ppm) de la enzima examinada.

Las proteasas neutras y alcalinas son las más eficaces de las enzimas examinadas en la disrupción de biopelículas formadas a partir de un colonizador temprano.

Aun cuando las enzimas individuales pueden ser muy efectivas en la disrupción de las biopelículas, un enfoque más amplio consiste en emplear cócteles de múltiples clases distintas de enzimas. La ventaja del enfoque de cóctel es que se puede tener como objetivo a más de un componente de la matriz de la biopelícula. La descomposición de componentes múltiples de la matriz garantiza una disrupción de la biopelícula más completa. Por consiguiente, evaluamos dos o

tres cócteles enzimáticos. Puesto que las dos enzimas más eficaces son proteasas, en nuestros cócteles incorporamos algunas enzimas que tenían valores BEC_{50} más altos. Elegimos dos enzimas que tienen las proteínas como objetivo (proteasa neutra y proteasa alcalina), dos que tienen a los carbohidratos como objetivo (celulosa y α -glucanasa) y una que tiene como objetivo a los lípidos (cutinasa). Diez cócteles de dos o tres enzimas se formulan utilizando estas cinco enzimas en las concentraciones y las combinaciones indicadas en la Tabla 3. Las concentraciones para cada enzima se determinan con base en la BEC_{50} .

Tabla 3
Composición de cócteles de enzimas

15

	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10
Proteasa neutra (100 ppm)	X	X	X	X	X					
Proteasa alcalina (100 ppm)						X	X	X	X	X
α -glucanasa (200 ppm)	X			X	X	X			X	X
Celulasa (1000 ppm)		X		X			X		X	
Cutinasa (1000 ppm)			X		X			X		X

20

La "X" indica que una enzima dada está presente en el cóctel.

Estos cócteles primero se estudian en el ensayo de disrupción de biopelículas conformadas por una sola especie, de la misma manera como se hace para las enzimas individuales antes descrita. Con base en los resultados de este ensayo, se

seleccionan los cócteles 2, 3, 7, 8, 9 y 10 para su posterior análisis de su eficacia potencial.

Hasta este punto todos los experimentos se realizan en caldos de cultivo. Sin embargo, la saliva constituye una
5 mezcla compleja de proteínas, sales y otros nutrientes, así como enzimas digestivas, incluso proteasas. Es posible que uno o más componentes de esta mezcla compleja de hecho puedan inactivar las enzimas antes de que éstas puedan romper la placa. Con la finalidad de confirmar que estas enzimas
10 seguirían siendo eficaces en el ambiente bucal, se llevó a cabo ensayos paralelos de disrupción de la biopelícula mediante la dilución de un conjunto de muestras en caldos de cultivo, tal como se había hecho previamente, y diluyendo un conjunto de muestras en saliva humana. Para este experimento,
15 se prueban los seis cócteles antes identificados además de las cinco enzimas individuales que componen esos cócteles. Los seis cócteles se comportan en forma prácticamente idéntica si se diluyen en caldo de cultivo o saliva. Esto indica que las enzimas son estables en la saliva el tiempo
20 suficiente para alterar la biopelícula.

Hasta este punto todos los ensayos se llevan a cabo con una duración del tratamiento de una hora. Sin embargo, las administraciones estándares de composiciones de cuidado oral duran de 30 segundos a 2 minutos. Por consiguiente, es

importante determinar si las enzimas son capaces de destruir las biopelículas dentro este lapso de tiempo más corto. El ensayo de biopelículas conformadas por una sola especie se realiza con tiempos de tratamiento tan breves como 30 segundos. En todos los casos, se observa una disrupción similar a la observada en una hora cuando los períodos de incubación se acortan.

Ejemplo 2: *Disrupción de biopelículas conformadas por especies mixtas*

Si bien los ensayos de especies únicas son buenos para la pronta detección de un número de opciones, el ambiente bucal real aloja más de 700 especies de bacterias. Con el propósito de obtener un panorama más cabal de la eficacia potencial en la boca, es importante estudiar el efecto de agentes activos en poblaciones mixtas de bacterias. Usamos un consorcio de cinco especies de bacterias como modelo para las interacciones entre especies. Esta mezcla de bacterias incluye cinco bacterias que están estrechamente relacionadas con los principales componentes de la biopelícula bucal. Las cinco especies abarcan una mezcla de bacterias gram positivas y gram negativas, aeróbicas y anaeróbicas, así como colonizadores tempranos y tardíos. Las bacterias que se emplean en este modelo son *A. viscosus*, *L. casei*, *S. oralis*,

F. nucleatum y *V. parvula*. Este modelo ofrece un indicio de la eficacia de un tratamiento específico en una población más diversa que el estudio con especies individuales. Más importante aún, en este caso, proporciona una biopelícula más
5 variada y resistente.

Las biopelículas conformadas por especies se preforman en discos de HAP recubiertos de saliva (schAP). Luego del recubrimiento salival, los discos se inoculan con 1 ml de cultivo de especies mixtas a partir del cultivo continuo
10 descrito en el ejemplo 1 diluido a una OD₆₁₀ de ~0.2 en 0.5x TSB. Las placas se incuban durante 24 horas a 37°C a fin de permitir la formación de las biopelículas. Los discos que contienen las biopelículas preformadas se transfieren a una nueva placa de cultivo de 24 pocillos y se añade 0.5 ml de la
15 solución de prueba a cada disco. Las placas se incuban durante una hora a 37°C con una agitación suave. Después del tratamiento los discos se retiran a una placa que contiene una solución fresca de 0.5x TSB a objeto de enjuagar la solución de tratamiento y cualquier segmento de biopelícula
20 que se haya aflojado. Luego se transfieren los discos a tubos de poliestireno de 15 ml que contienen 1 ml de una solución de tripsina al 0.25%. Los discos se incuban a 37°C agitándolos por 45 min. Los tubos de ensayo se golpean en un movimiento hacia adelante y hacia abajo a objeto de re-

suspender las bacterias, y los sobrenadantes se transfieren a otra placa de 24 pocillos. Las placas se someten a sonicación durante 2 minutos a fin de sedimentar cualquier HAP residual, y los sobrenadantes se retiran a placas nuevas de manera de poder leer la absorbancia a 610 nm. Todas las muestras se prueban por triplicado y se determina el promedio de los tres pocillos. Los resultados se registran como una reducción porcentual en la formación de la biopelícula con relación a los discos tratados con caldos de cultivo solamente.

Previos estudios que utilizan esta mezcla de cinco especies de bacterias se han centrado en la capacidad de los compuestos para inhibir la formación de biopelículas. Ciertos ajustes fueron necesarios para examinar la disrupción de las biopelículas existentes. Las biopelículas conformadas por especies mixtas se preforman en discos HAP recubiertos de saliva durante 48 horas. Los discos se retiran a caldos de cultivo frescos y se tratan durante 1 hora con 1 ml de la solución experimental con una agitación suave. Esta agitación permitió la remoción mecánica de la biopelícula que se despega enzimáticamente del disco HAP. Después del tratamiento, la biopelícula remanente se retira del disco mediante tratamiento con tripsina y se cuantifica. Los resultados se representan como una reducción porcentual de la biopelícula con relación a un control incubado en caldos de

cultivo solamente.

Los cócteles 2, 7 y 9, y las enzimas individuales relevantes, se analizan en términos de la disrupción de biopelículas de especies mixtas preformadas por parte de 5 enzimas individuales y dos cócteles enzimáticos. Los resultados se registran como la reducción porcentual en la biopelícula con relación a los discos incubados en caldos de cultivo solamente. Una combinación de glucoamilasa (0.044%) y una papaína (0.226%) con una actividad óptima a un pH de 5 a 10 7, cuya acción eficaz ha sido demostrada con anterioridad, se utiliza como un control positivo.

Tabla 4

Disrupción de la biopelícula conformada por especies mixtas
15 **relativa al caldo de cultivo (%)**

20	Caldo de cultivo	0
	Glucoamilasa/papaína (control positivo)	23
	Proteasa neutra	19
	Proteasa alcalina	11
	Celulasa	16
	Cóctel 2	17
	Cóctel 7	39
	Cóctel 9	22

El cóctel 7, que contiene 100 ppm de proteasa alcalina y 200 ppm de celulasa, supera en gran medida a cualquiera de

las enzimas individuales o los cócteles, incluso el control positivo conformado por glucoamilasa y papaína.

Ejemplo 3: *Formulación*

5 La relativa complejidad de las formulaciones dentífricas implica que existe un gran número de componentes que tienen el potencial de interferir en la actividad y la estabilidad de las enzimas. Esto, combinado con el hecho de que las enzimas ya han demostrado ser estables en soluciones líquidas
10 simples, nos motiva a intentar formular las enzimas en un enjuague bucal.

 Aunque el cóctel compuesto por la proteasa alcalina/celulosa superó en gran medida a los demás cócteles que se probaron, cierta preocupación por el uso de celulasa
15 indujo a explorar la formulación de una enzima alternativa en un enjuague bucal para estudios adicionales. La celulasa es una enzima que hidroliza las vinculaciones 1,4- β -D-glicosídicas en moléculas de celulasa. Las gomas de celulosa se utilizan comúnmente como agentes espesantes en
20 formulaciones dentífricas y, en ocasiones, en enjuagues bucales. La presencia de incluso cantidades minúsculas de celulasa en las proximidades del equipo que forma el dentífrico podría dar lugar a una fluidificación severa, o hasta la licuación, de los dentífricos. En consecuencia, se

eligió un Segundo cóctel para la evaluación, el cual podría ser adecuado para su eventual incorporación a una formulación contentiva de gomas de celulosa, si se desea. Con base en una combinación de previos estudios in vitro y consideraciones

prácticas, se eligió elaborar enjuagues bucales con las tres

enzimas siguientes: 0.1% de celulosa + 0.2% de proteasa

alcalina; 0.2% de α -glucanasa + 0.2% de proteasa alcalina; y

0.044% de glucoamilasa + 0.226% e3 papaína como control

positivo:

10

Tabla 5**Formulaciones de ensayo**

	Ingrediente	% en peso		
	Agua desmineralizada	36.68	6.95	6.95
15	Sorbitol(solución al 70%)	22.28	22.28	22.28
	Glicerina	22.96	22.96	22.96
	Propilenglicol	16.07	16.07	16.07
	Sacarina sódica	0.05	0.05	0.05
	Benzoato de sodio	0.25	0.25	0.25
	Ácido benzoico	0.12	0.12	0.12
	Cloruro de cetilpiridinio	0.015	0.015	0.015
20	EDTA Disódico	0.006	0.006	0.006
	Cloruro de calcio	0.1	0.1	0.1
	Poloxámero 407	0.5	0.5	0.5
	Poloxámero 338	0.5	0.5	0.5
	Aceite de ricino PEG-40	0.1	0.1	0.1
	Sabor	0.1	0.1	0.1

5	Celulasa (solución al 1%)	---	---	20
	α -Glucanasa (solución al 1%)	---	20	---
	Proteasa alcalina (solución al 1%)	---	10	10
	Glucoamilasa	0.044	---	---
	Papaína	0.226	---	---

10 Luego de la formulación, el primer paso consiste en confirmar que las enzimas sean estables en las formulaciones y conservan su actividad disruptiva de la biopelícula. Los ingredientes en la base del enjuague bucal tienen un efecto considerable en la eliminación de la biopelícula, incluso sin la adición de enzimas. Por consiguiente, también se probó una formulación libre de enzimas como placebo de control.

15 Los tres enjuagues bucales demuestran un alto grado de eliminación de la biopelícula con relación al observado para el placebo. Esto indica que los cócteles de enzimas se mantienen muy activos dentro de la matriz de una fórmula de enjuague bucal. Del mismo modo, se pudo confirmar que el cóctel de enzimas proteasa alcalina / α -glucanasa es efectivo
20 en la eliminación de biopelículas conformadas por especies individuales. Este ensayo se repite en fórmulas de enjuague bucal hasta tres meses después de la incubación a temperatura ambiente. Una actividad similar de disruptión de la biopelícula se mantiene durante este período de tiempo, lo

cual indica que las enzimas son relativamente estables en esta fórmula de enjuague bucal.

También es importante demostrar que estos enjuagues bucales actúan contra biopelículas de especies mixtas. Debido a la alta viscosidad de la formulación base enzimática del enjuague bucal, hay un muy alto grado de eliminación de la biopelícula debido al enjuague bucal placebo solamente. Por lo tanto, las reducciones en biopelícula con relación al placebo son considerablemente inferiores a las observadas para los cócteles de enzimas no formulados. Sin embargo, se observan las mismas tendencias de los resultados previamente observados en este experimento.

Tabla 6

Disrupción de películas conformadas por especies mixtas por parte de enjuagues bucales que contienen enzimas, como una reducción porcentual de la biopelícula con relación al placebo (niveles de reducción de biopelícula menores que en soluciones claras a causa del considerable efecto del placebo observado en este ensayo)

Placebo libre de enzimas	0
Glucoamilasa + papaína (control positivo)	11
Proteasa alcalina/celulasa	36
Proteasa alcalina /alfa-glucanasa	15

Estos estudios *in vitro* demuestran que ambos enjuagues bucales compuestos de enzimas prototipo se comportan al mismo o por encima del nivel del cóctel glucoamilasa-papaína de referencia, y son mucho mejores que el enjuague bucal de control que no contiene enzimas. Varios estudios previos han demostrado una excelente eficacia clínica de los dentífricos que contienen glucoamilasa-papaína. Tan buen rendimiento, en comparación con este control positivo, resulta alentador.

10

15

20

NOVEDAD DE LA INVENCION

Habiendo descrito la presente invención, se considera como novedad, y por lo tanto se reclama como propiedad lo contenido en las siguientes:

5

REIVINDICACIONES

1. Una composición de cuidado oral que contiene una cantidad eficaz de una combinación de una proteasa alcalina y una segunda enzima seleccionada entre celulasa, α -glucanasa y combinaciones de las mismas, en un portador oralmente aceptable.

2. La composición de conformidad con la reivindicación 1, caracterizada porque la proteasa alcalina es una serina proteasa.

15 3. La composición de conformidad con la reivindicación 2, caracterizada porque la proteasa alcalina es una subtilisina.

4. La composición de conformidad con cualquiera de las reivindicaciones precedentes, caracterizada porque la segunda enzima es celulasa.

20

5. La composición de conformidad con cualquiera de las reivindicaciones precedentes, caracterizada porque la segunda enzima es α -glucanasa.

6. La composición de conformidad con cualquiera de las

reivindicaciones precedentes, caracterizada porque comprende de 0.001% a 0.1% de celulasa y de 0.002% a 0.2% de proteasa alcalina.

7. La composición de conformidad con cualquiera de las
5 reivindicaciones precedentes, caracterizada porque comprende de 0.002% a 0.2% de α -glucanasa y de 0.002% a 0.2% de proteasa alcalina.

8. La composición de conformidad con cualquiera de las
reivindicaciones precedentes, caracterizada porque la
10 proteasa alcalina es de origen bacteriano o fúngico.

9. La composición de conformidad con cualquiera de las
reivindicaciones precedentes, caracterizada porque está en una forma seleccionada entre enjuague bucal, pasta dental, gel dental, polvo dental, gel no abrasivo, mousse, espuma,
15 atomizador bucal, pastilla para chupar, comprimido oral, implemento dental, limpiador de dentadura, y productos de cuidado oral de mascotas.

10. La composición de conformidad con cualquiera de las
reivindicaciones precedentes, caracterizada porque la
20 composición es una pasta dental o un enjuague bucal que, de manera opcional, comprende además uno o más de uno o más de agua, abrasivos, tensoactivos, agentes espumantes, vitaminas, polímeros, enzimas adicionales, humectantes, espesantes, agentes antimicrobianos, conservadores, edulcorantes,

colorantes y/o combinaciones de los mismos.

11. La composición de conformidad con cualquiera de las reivindicaciones precedentes, caracterizada porque el pH de la composición es 4.5 hasta 6.5.

5 12. La composición de conformidad con cualquiera de las reivindicaciones precedentes, caracterizada además porque comprende un aminoácido básico en forma libre o de sal de adición ácida.

13. La composición de conformidad con cualquiera de las
10 reivindicaciones precedentes, caracterizada además porque comprende una cantidad eficaz de fuente de ion fluoruro.

14. La composición de conformidad con cualquiera de las reivindicaciones precedentes en la forma de un enjuague bucal, caracterizada porque contiene los siguientes
15 ingredientes en peso:

Ingrediente	Rango de Concentración % peso/peso
Agua	50 - 90
Humectante	5 - 40
Tensoactivo	0.01 - 10
Tampón	0.01 - 10
Conservantes y estabilizantes	0.01 - 10
Sabor	0.01 - 10
Espesante polimérico	0 - 2
Fuente de ion fluoruro	0 - 0.3

20

5	Arginina (en forma libre o de sal, en peso de la base libre)	0 - 2
	Edulcorante	0.001 - 0.5
	Cloruro de cetilpiridinio	0 - 1
	Celulasa y/o α -Glucanasa	0.002 - 0.2
	Proteasa alcalina	0.002 - 0.2

15. Un método para (i) inhibir la formación de una biopelícula microbiana en la cavidad bucal; (ii) reducir la acumulación de placa; (iii) reducir o inhibir la gingivitis; (iv) reducir o inhibir la formación de caries dentales; (v) limpiar los dientes y la cavidad bucal; y/o (vi) promover la salud corporal integral; caracterizado porque comprende aplicar a la cavidad bucal una cantidad eficaz de una composición que comprende una proteasa alcalina y una segunda enzima elegida entre celulasa y α -glucanasa.

16. El uso de una proteasa alcalina y una segunda enzima elegida entre celulasa y α -glucanasa en la elaboración de una composición de cuidado oral.

17. Un preconcentrado de enzima líquido para su uso en la elaboración de una composición de cuidado oral, caracterizado porque comprende una proteasa alcalina y una segunda enzima elegida entre celulasa y α -glucanasa.

18. Una composición, caracterizada porque comprende una alcalina proteasa y una segunda enzima elegida entre celulasa

y α -glucanasa, para uso en para un método para (i) inhibir la formación de una biopelícula microbiana en la cavidad bucal; (ii) reducir la acumulación de placa; (iii) reducir o inhibir la gingivitis; (iv) reducir o inhibir la formación de caries dentales; (v) limpiar los dientes y la cavidad bucal; y/o (vi) promover la salud corporal integral; el método comprende aplicar a la cavidad bucal una cantidad eficaz de la composición.

10

15

20

RESUMEN DE LA INVENCIÓN

En el presente documento se describen composiciones de cuidado oral que contienen una cantidad eficaz de un cóctel de enzimas, en las que el cóctel enzimático comprende una proteasa alcalina y una segunda enzima elegida entre celulasa, α -glucanasa y combinaciones de las mismas, en un vehículo aceptable por vía oral. Del mismo modo, se describen procedimientos para la preparación y la utilización de las mismas.

10

15

20

Clarke, Modet & C^o

COLOMBIA

Carrera 11 N° 86-53 Piso 6 Bogotá Colombia Tel: (57 1) 6181088 -Fax: (57 1) 6350824 -Email: info@clarkemodet.com.co

PODER

Yo (nosotros), abajo firmante(s)

en mi (nuestro) carácter de representante(s) legales de

COLGATE-PALMOLIVE COMPANY

una sociedad organizada y existente de acuerdo con las leyes de

y en actual cumplimiento de su objeto social, con domicilio en **300 Park Avenue, New York, New York 10022 Estados Unidos de América**

por el presente instrumento confiero (conferimos) poder especial a favor de **SILVANA MARIA LÓPEZ DÍAZ**, con Cédula de Ciudadanía No. 22.468.787 de Barranquilla, y tp. 147463 y/o **CAROLINA MERCEDES DAZA MONTALVO**, con Cédula de Ciudadanía No. 66.783.790 de Palmira Valle, y tp. 141563 con domicilio en Bogotá, Colombia, para que actuando en su orden en nombre del (de la) otorgante le (la) representen ante cualquier entidad, autoridad y/o persona, especialmente ante las del orden Administrativo, Contencioso Administrativo, Judicial, Tribunales de Arbitramento y/o cualquier otro en lo referente a los siguientes asuntos:

- 1) Solicitar, tramitar, obtener y/o registrar cualquiera de las modalidades de Propiedad Industrial, tales como: patentes de invención, modelos de utilidad; diseños industriales, variedades vegetales; así como sus renovaciones, prórrogas, transferencias, cambios de nombre y/o domicilio, contratos y licencias.
- 2) Solicitar, tramitar, obtener y/o registrar secretos industriales y know-how.
- 3) Ejercer acciones de oposición, observación, reclamos, reconsideración, reposición, apelación, cancelación administrativa o judicial, nulidad, protección al consumidor, concesión de licencias, protección de secretos industriales y demás acciones y recursos relacionados con derechos derivados de los asuntos arriba indicados y en contra de la competencia desleal, acciones derivadas de la obtención o explotación de licencias, acciones de indemnización de perjuicios. También podrá(n) intervenir en juicios civiles, comerciales, penales, contencioso-administrativos, tutelas y de policía; en acciones o juicios promovidos por el (la) mandante o en contra el (ella).
- 4) En el ejercicio de este mandato los mandatarios arriba mencionados quedan facultados para: conciliar, cancelar, transigir, comprometer en árbitros, desistir, recibir y tomar posesión de la cosa objeto de litigio y renunciar o desistir a derechos concedidos o en curso de concesión, admitir los hechos del proceso.
- 5) Ratificar o no la agencia oficiosa.
- 6) Así mismo faculta (facultamos) a los mencionados apoderados para recibir notificaciones y designar apoderados judiciales o extrajudiciales, sustituir el presente poder y revocar las sustituciones que hicieren.

Dado y firmado en

a los días de

POWER OF ATTORNEY

I (we), the undersigned
Michael F. Morgan

legal representative(s) of

COLGATE-PALMOLIVE COMPANY

an organization existing under the laws of
Delaware

and in present execution of its business activity, domiciled at **300 Park Avenue, New York, New York 10022 U.S.A.**

do hereby grant POWER OF ATTORNEY to **SILVANA MARIA LÓPEZ DÍAZ**, identification card No. 22.468.787 of Barranquilla, and tp. 147463 and/or **CAROLINA MERCEDES DAZA MONTALVO**, identification card No. 66.783.790 of Palmira Valle, and tp. 141563 residing in Bogotá Colombia, to act in the order of their appointment in behalf of grantor before any entity, authority and/or natural or juridical person, specially before those Administrative, Administrative-Contentious, Judicial, arbitration courts, and/or any other, in all matters concerning the following:

- 1) To apply, process, obtain and/or register any of the modalities of Industrial Property, such as: Patents of Invention, Utility Models; Designs, plant varieties; as well as their renewals, assignments, changes of name and/or domicile, agreements and licenses.
- 2) To apply, process, obtain and/or register secrets or know-how.
- 3) To bring actions of opposition, observations, claims, reconsideration, appeal or legal remedies, cancellations, nullity, protection to the consumer, granting of licenses, protection of trade secrets and other actions related with rights derived from the above-mentioned matters and against the unfair competition, actions resulting from the obtaining or exploitation of licenses, recovering damages actions. They can also intervene or participate in Civil, Commercial, Criminal or Contentious-Administrative Trials; the actions for writ mandamus, police actions; in actions, lawsuits or litigations instituted by the grantor or against him.
- 4) To the effect of this mandate the above-named proxy are empowered to: conciliate, cancel, settle, submit to arbitration, withdraw and to receive and take possession of the litigation related objet and waive or renounce the rights granted or in process of granting, admit the facts of the case.
- 5) To ratify or not the officious agency.
- 6) I (we) hereby appoint the afore mentioned attorneys with powers to receive notifications and to designate judicial and extrajudicial attorneys, substitute this Power of Attorney and to revoke such substitutions.

Granted and signed at Piscataway, NJ USA

on this 25 day of July of 2013


Michael F. Morgan
Associate Patent Counsel

ASSIGNMENT

WHEREAS, WE, **Lyndsay Schaeffer-Korbylo, Jason Nesta and Laurence Du-Thumm** (below referred to as ASSIGNORS), residing, respectively, as set forth hereinafter, have made an invention for which application for Letters Patent was filed in the United States Patent and Trademark Office as International Receiving Office for International Application No. PCT/US2011/66503, filed December 21, 2011, naming the ASSIGNOR(S) as inventor(s), and entitled **ORAL CARE COMPOSITIONS**; and

WHEREAS, Colgate-Palmolive Company, a corporation duly organized and existing under the laws of the State of Delaware, United States of America and having its principal office and place of business at 300 Park Avenue, New York, New York 10022, and offices and place of business at 909 River Road, Piscataway, New Jersey 08854 (below referred to as "ASSIGNEE"), is desirous of obtaining the entire right, title and interest in and to the aforesaid invention and patent application and corresponding patent rights worldwide;

NOW, THEREFORE, in consideration of good and valuable consideration, the receipt and sufficiency of which is hereby acknowledged, ASSIGNOR(S), by these presents do sell, assign and transfer to ASSIGNEE, the full and exclusive right, title and interest in and to the aforesaid invention, the aforesaid International Patent Application and all corresponding foreign patent applications, all divisional, continuation, continuation-in-part, reissue, reexamination, and any additional United States Patent applications which claim priority to the aforesaid International application, and all Letters Patent or comparable rights issuing thereon in the United States and in all foreign countries, together with the right(s) of priority under the International Convention for the Protection of Industrial Property, Inter-American Convention Relating to Patents, Designs and Industrial Models, and any other international agreements to which the United States of America adheres, and the ASSIGNOR(S) hereby authorize and request the United States Commissioner of Patents and Trademarks and all foreign Patent Offices to issue all Letters Patent or comparable rights issuing on any application as aforesaid to ASSIGNEE, or to its successors, assigns or legal representatives;

ASSIGNOR(S) hereby covenant that ASSIGNOR(S) have full right to convey the entire interest herein assigned, and that ASSIGNOR(S) have not executed, and will not execute, any agreement in conflict herewith;

ASSIGNOR(S) agree to communicate to ASSIGNEE or to its successors, assigns or legal representatives any and all facts known to them or any of them respecting said invention, and without further remuneration to testify in any legal proceeding, sign all lawful papers, execute all divisional, continuation, continuation-in-part, reissue and reexamination applications, make all rightful oaths and generally do all lawful acts to aid ASSIGNEE or its successors, assigns or legal representatives to obtain and enforce proper patent protection for said invention in all countries and to enhance or perfect ASSIGNEE's title in and to the invention and patent rights therein.

ASSIGNOR(S) hereby authorize attorneys for ASSIGNEE to enter on this document any applicable serial numbers and filing dates after ASSIGNOR(S)' execution of this document.

This Assignment is effective as of: December 21, 2011
(date of filing)

IN TESTIMONY WHEREOF, I hereunto set my hand and seal this 3 day of January 2012.

EMILY R. RHODEN
NOTARY PUBLIC OF NEW JERSEY
My Commission Expires 7/28/2015

Lyndsay Schaeffer-Korbylo
Lyndsay Schaeffer-Korbylo

Address: 24 Clearbrook Lane
Flemington, New Jersey 08822
United States of America

State of New Jersey
County of Middlesex

On this 3rd day of January 2012, before me, a Notary Public in and for the State and County aforesaid, personally appeared the above signatory, known to me to be the person of that name, who executed the foregoing instrument in my presence.

[Signature]
NOTARY PUBLIC

IN TESTIMONY WHEREOF, I hereunto set my hand and seal this 3 day of January 2012.

EMILY R. RHODEN
NOTARY PUBLIC OF NEW JERSEY
My Commission Expires 7/28/2015

[Signature]
Jason Nesta

Address: 30 Boulevard Road
Cedar Knolls, New Jersey 07927
United States of America

State of New Jersey
County of Middlesex

On this 3rd day of January 2012, before me, a Notary Public in and for the State and County aforesaid, personally appeared the above signatory, known to me to be the person of that name, who executed the foregoing instrument in my presence.

[Signature]
NOTARY PUBLIC

IN TESTIMONY WHEREOF, I hereunto set my hand and seal this 21 day of
December 2011.



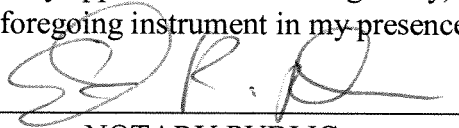
Laurence Du-Thumm

EMILY R. RHODEN
NOTARY PUBLIC OF NEW JERSEY
My Commission Expires 7/28/2015

Address: 16 Woodfield Court
Princeton, New Jersey 08540
United States of America

State of New Jersey
County of Middlebury

On this 21st day of December 2011, before me, a Notary Public in
and for the State and County aforesaid, personally appeared the above signatory, known to me to
be the person of that name, who executed the foregoing instrument in my presence.



NOTARY PUBLIC

CESIÓN

CONSIDERANDO QUE, NOSOTROS, **Lyndsay Schaeffer-Korbylo, Jason Nesta y Laurence D-Thumm** (abajo referidos como CEDENTES),
residiendo, respectivamente, como se expone a partir de ahora,
habiendo hecho una invención para la cual la solicitud para Título
de Patente se presentó en la Oficina de Patentes y Marcas de los
Estados Unidos como la Solicitud Internacional con No. de Serie
PCT/US2011/66503, presentada el 21 de Diciembre de 2011, nombrando
al (los) CEDENTE(S) como inventor(es), y titulada **COMPOSICIONES
PARA EL CUIDADO ORAL**; y

CONSIDERANDO QUE, Colgate-Palmolive Company, una
corporación debidamente organizada y existente bajo las leyes del
Estado de Delaware, Estados Unidos de América y teniendo su
oficina principal y lugar de negocios en 300 Park Avenue, Nueva
York, Nueva York 10022, y oficinas y domicilio social en 909 River
Road, Piscataway, Nueva Jersey 08855 (abajo referido como
"CESIONARIO", está deseoso de obtener el derecho entero, título e
interés en y para la invención anteriormente mencionada y
solicitud de patente y los derechos de la patente correspondientes
internacionalmente;

AHORA, POR LO TANTO, como contraprestación válida y
efectiva, la recepción y suficiencia de la cual por la presente es
reconocida, el CESIONARIO(S), por estos documentos vende, cede y
transfiere al CESIONARIO, el derecho, título e interés completo y

exhaustivo en y para la invención antedicha, la Solicitud de Patente Internacional antedicha y todas las solicitudes de patente extranjeras, todas las divisionales, continuación, continuación en parte, reexpedición, re-examen, y cualquiera de las solicitudes de Patente de los Estados Unidos que reclamen la prioridad a la solicitud Internacional antedicha, y todos los Títulos de Patente o derechos comparables que se emitan de la misma en los Estados Unidos y en todos los países extranjeros, junto con el derecho(s) de prioridad bajo la Convención Internacional para la Protección de Propiedad Industrial, Convención Inter-Americana Con Respecto a las Patentes, Diseños y Modelos Industriales, y cualquiera de los acuerdos internacionales a los cuales los Estados Unidos de América se adhiere, y el (los) CEDENTE(S) por la presente autoriza y solicita al Comisionado de Patentes y Marcas de los Estados Unidos y todas las Oficinas de Patentes expedir todos los Títulos de Patente o derechos comparables que se expiden en cualquier solicitud como se menciona por el CESIONARIO, o a sus sucesores, cesionarios o representantes legales;

el (los) CEDENTE(S) por la presente acuerda (n) que el (los) CEDENTE(S) tiene (n) el completo derecho de transmitir todo el derecho cedido en la presente, y que el (los) CESIONARIO(S) no ha (n) ejecutado, y no ejecutará (n), ningún acuerdo en conflicto con la misma;

el (los) CEDENTE(S) acuerda(n) comunicar al CESIONARIO o a sus sucesores, cesionarios o representantes legales cualquiera y todos los hechos conocidos por ellos o a cualquiera de ellos con respecto a la invención, y sin remuneración adicional, testificar

en cualquier procedimiento legal, firmar todos los documentos legales, ejecutar todas las solicitudes divisionales, continuación, de continuación en parte, reexpedición, y re-examen; hacer todos los juramentos legítimos y hacer generalmente todos los actos legales para ayudar al CESIONARIO o sus sucesores, cesionarios o representantes legales para obtener y hacer cumplir la protección de patente apropiada para dicha invención en todos los países y mejorar o perfeccionar el título del CESIONARIO en y para la invención y derechos de patente de la misma.

El (los) CEDENTE(S) por la presente autoriza(n) a los apoderados del CESIONARIO ingresar en este documento cualquiera de los números de serie y fechas de presentación después de la ejecución de este documento por el (los) CESIONARIO(S).

Esta Cesión es efectiva a partir de: 21 de Diciembre de 2011

(fecha de presentación)

Expediente del Apoderado No.: 9437-00-OC

EN TESTIMONIO DE LO CUAL, estampo mi firma y sello
este día 3 de enero de 2012.

(rúbrica)
Lyndsay Schaeffer-Korbylo
Dirección: 24 Clearbrook Lane
Flemington, Nueva Jersey 08822
Estados Unidos de América

EMILY R. RHODEN
NOTARIO PÚBLICO DE NUEVA JERSEY
Mi Comisión Expira el 28/7/2015

Estado de Nueva Jersey
Condado de Middlesex

Este día 3 de enero de 2012, ante mí, un Notario
Público en y para el Estado y Condado antedicho, se presentó
personalmente el firmante anterior, conocido por mí que es la
persona de ese nombre, quien ejecutó el documento anterior en
mi presencia.

(rúbrica)
NOTARIO PÚBLICO

EN TESTIMONIO DE LO CUAL, estampo mi firma y sello este día
3 de enero de 2012.

(rúbrica)
Jason Nesta
Dirección: 30 Boulevard Road
Cedar Knolls, Nueva Jersey 07927
Estados Unidos de América

EMILY R. RHODEN
NOTARIO PÚBLICO DE NUEVA JERSEY
Mi Comisión Expira el 28/7/2015

Estado de Nueva Jersey
Condado de Middlesex

Este día 3 de enero de 2012, ante mí, un Notario
Público en y para el Estado y Condado antedicho, se presentó
personalmente el firmante anterior, conocido por mí que es la
persona de ese nombre, quien ejecutó el documento anterior en
mi presencia.

(rúbrica)
NOTARIO PÚBLICO

Expediente del Apoderado No.: 9437-00-OC

EN TESTIMONIO DE LO CUAL, estampo mi firma y sello
este día 21 de diciembre de 2011.

(rúbrica)

Laurence Du-Thumm

**Dirección: 16 Woodfield Court
Princeton, Nueva Jersey 08540
Estados Unidos de América**

EMILY R. RHODEN
NOTARIO PÚBLICO DE NUEVA JERSEY
Mi Comisión Expira el 28/7/2015

Estado de Nueva Jersey
Condado de Middlesex

Este día 21 de diciembre de 2011, ante mí, un
Notario Público en y para el Estado y Condado antedicho, se
presentó personalmente el firmante anterior, conocido por mí
que es la persona de ese nombre, quien ejecutó el documento
anterior en mi presencia.

(rúbrica)

NOTARIO PÚBLICO

- / -



No. 14 - 0058438

Bogotá D.C., Junio 04 de 2014 - 07:44:01

RECIBIDO DE : CLARKE MODET

NI 830.008.643

*** Soporte del Pago ***

TIPO PAGO	BANCO	CUENTA	No. PAGO	FECHA PAGO	VR PAGO
CONSIGNACION	BANCO DE BOGOTA	062754387	596597595	03/06/2014	99.651.000.00

*** Conceptos Pagados ***

CANT.	RENTISTICO	CONCEPTO	Vr.UNDITARIO	Vr.CONCEPTO
1	50005-01-01	SOLICITUDES	1	TRAMITES DE SOL. DE PATENTE DE INVENCIÓN
			515.000.00	515.000.00
				\$515.000.00

SON: **QUINIENTOSQUINCE MIL PESOS MONEDA CORRIENTE***

Responsable: _____

Recibo de Caja Aplicado al Expediente No. _____

Sede Centro: Carrera 13 No. 27 - 00 Pls 3,4,5 y 10 Bogotá, D.C.- Colombia

Web: www.sic.gov.co e-mail: info@sic.gov.co Conmutador: (571) 5870000 Fax: (571) 5870284 Línea: 018000-910165 Call Center: (571) 6513240

Junio 4 de 2014 - 07:44:16

SUPERINTENDENCIA DE INDUSTRIA Y COMERCIO
NIT : 800.176.089-2
- / -



RECIBO DE CAJA

No. 14 - 0062395

Bogotá D.C., Junio 12 de 2014 - 10:20:23

RECIBIDO DE : CLARKE MODET NI 830.008.643

*** Soporte del Pago ***

TIPO PAGO	BANCO	CUENTA	No. PAGO	FECHA PAGO	VR PAGO
CONSIGNACION	BANCO DE BOGOTA	062754387	596597606	12/06/2014	9.393.000.00

*** Conceptos Pagados ***

CANT.	RENTISTICO	CONCEPTO	Vr.UNDITARIO	Vr.CONCEPTO
8 50005-01-01	SOLICITUDES	1607 REIVINDICACION PATENTE UNITARIA ADICIONAL A LAS 10 INIC	31.000.00	248.000.00
				\$248.000.00

SON: **DOSCIENTOS CUARENTA Y OCHO MIL PESOS MONEDA CORRIENTE**

Responsable: _____

Recibo de Caja Aplicado al Expediente No. _____

Sede Centro: Carrera 13 No. 27 - 00 Pisos 3,4,5 y 10 Bogotá, D.C.- Colombia

Web: www.slc.gov.co e-mai: Info@slc.gov.co Conmutador: (571) 5870000 Fax: (571) 5870284 Línea: 018000-910165 Call Center: (571) 6513240

Junio 12 de 2014 - 10:20:25