



(19)中華民國智慧財產局

(12)發明說明書公告本 (11)證書號數：TW I405565B1

(45)公告日：中華民國 102 (2013) 年 08 月 21 日

(21)申請案號：099109773

(22)申請日：中華民國 99 (2010) 年 03 月 31 日

(51)Int. Cl. : A61K31/085 (2006.01)

A61P1/02 (2006.01)

(30)優先權：2009/04/01 美國

61/165,685

(71)申請人：美國棕欖公司 (美國) COLGATE-PALMOLIVE COMPANY (US)
美國(72)發明人：巴納斯 維吉納 BARNES, VIRGINIA (US)；崔費迪 哈許 TRIVEDI, HARSH M.
(US)；王煒 WANG, WEI (CN)；徐韜 XU, TAO (US)；清水映美 SHIMIZU, EMI
(JP)

(74)代理人：黃慶源；陳彥希

(56)參考文獻：

WO 2005/103071A1

審查人員：傅玉妃

申請專利範圍項數：10 項 圖式數：3 共 0 頁

(54)名稱

口腔用組成物之抗一骨質流失及抗一牙周附連喪失之功效

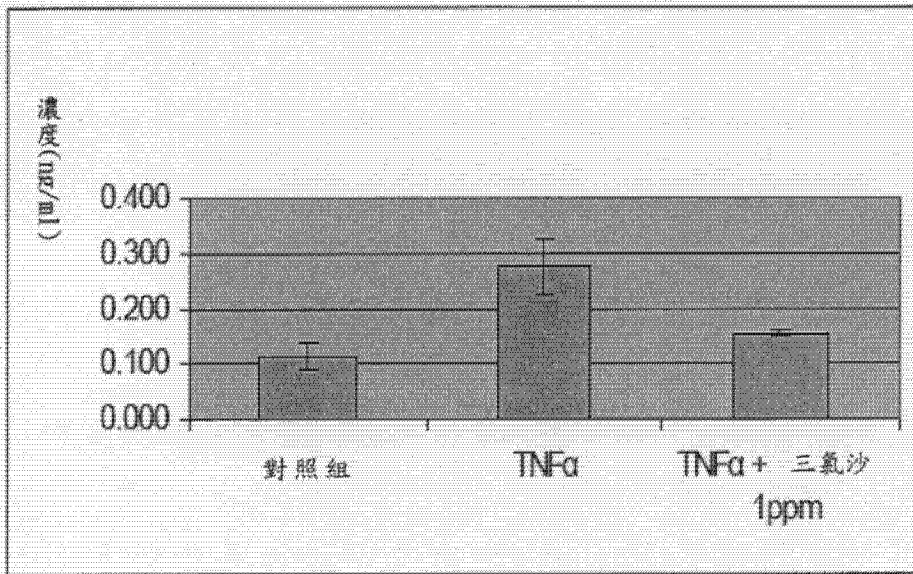
ANTI BONE-LOSS AND ANTI ATTACHMENT-LOSS EFFECTS OF AN ORAL COMPOSITION

(57)摘要

本文係描述用於鑑別供治療口腔疾病和症狀之化合物的方法。

Methods for identifying compounds useful for treating diseases and conditions of the oral cavity are described herein.

圖 1



六、發明說明：

【發明所屬之技術領域】

本文係描述用於鑑別供治療口腔疾病和症狀之化合物的方法。

【先前技術】

牙周炎其特徵為(部分)牙周有機基質不正常及過度降解。此基質包括牙齦、牙周膜、牙骨質及牙槽骨。至少一部分的基質破壞係由基質的金屬蛋白酶(MMPs，一種鋅依賴的內肽酶家族)過度產生所引起。MMPs亦藉由降解類骨質(亦即非礦化及新合成骨基質)，然後降解基質幫助骨質再吸收。這些作用導致了臨床上牙周炎的顯現症狀，包括牙齦萎縮、囊袋形成、附連喪失及最後牙齒掉落。

【發明內容】

本發明包括用於治療有此需要的哺乳動物之牙周炎的方法，其包括將哺乳動物嘴中的細胞與下調至少一種由MMP-9和MMP-13組成群組中選出之基質金屬蛋白酶之藥劑接觸，其中金屬蛋白酶之下調作用係與減低至少一種牙周炎相關症狀有關。

本發明亦包括鑑別可用於治療哺乳動物牙周炎之化合物之方法，該方法包括將細胞與試驗化合物接觸並測定此試驗化合物是否能下調至少一種由MMP-9和MMP-13組成群組中選出之基質金屬蛋白酶，其中該至少一種基質金屬蛋白酶之下調作用為此試驗可用於治療牙周炎之指標。

本發明亦包括治療有此需要的哺乳動物之牙周炎的方法。

法，其包括投予哺乳動物之口腔一種包含有效下調至少一種哺乳動物口腔中之基質金屬蛋白酶之量的 2,4,4'-三氯-2'-羥基二苯醚之口腔用組成物，該基質金屬蛋白酶係由 MMP-9 和 MMP-13 組成之群組中所選出的，其中該基質金屬蛋白酶之下調作用使得哺乳動物之牙周炎得以治療。

本發明進一步係包括降低有此需要的哺乳動物口腔中基質金屬蛋白酶活性病理性過量的方法，其包括投予哺乳動物之口腔一種包含有效降低哺乳動物口腔中基質金屬蛋白酶活性之量的 2,4,4'-三氯-2'-羥基二苯醚之口腔用組成物(該基質金屬蛋白酶係由 MMP-9 和 MMP-13 組成群組中選出)，其中因抑制該基質金屬蛋白酶的活性而抑制了結締組織基質蛋白質組份的過度降解作用。

本發明包括降低有此需要的哺乳動物口腔中基質金屬蛋白酶病理性過量的方法，其包括投予哺乳動物之口腔一種包含有效降低哺乳動物口腔中基質金屬蛋白酶之量的 2,4,4'-三氯-2'-羥基二苯醚之口腔用組成物，其中因抑制該基質金屬蛋白酶的量而抑制了結締組織基質蛋白質組份的過度降解作用，且其中該基質金屬蛋白酶係由 MMP-9 和 MMP-13 組成群組中選出。

在一實施例中，此方法包括一口腔用組成物，其包含 0-36%重量比之矽質拋光劑；0.25%-0.35%重量比之由鹵化二苯醚、鹵化水楊酸苯胺、苯甲酸酯、鹵化羰基胺苯及酚系化合物組成群組中選出之實質上不溶於水的非陽離子抗菌劑；有效量為 0.01%-4.0%重量比之抗菌促進劑，其係用

以促進該抗菌劑遞送和黏附至口腔和牙齦表面或停留在其上，其中該抗菌促進劑為(i)馬來酸或酸酐與另一惰性乙烯化不飽和聚合單體或(ii)聚(β -苯乙烯膦酸)或聚(α -苯乙烯膦酸)聚合物或苯乙烯膦酸與另一乙烯化不飽和單體的共聚物，且此組合物視需要進一步包含足以供應 25 ppm 至 5,000 ppm 氟化物離子的氟化物離子提供來源。在一實施例中，口腔用組成物係包含 0.01-36%重量比之矽質拋光劑。在另一實施例中，口腔用組成物不包含矽質拋光劑。

在一實施例中，此方法包括一口腔用組成物，其包含一有效抗結石量之至少一種水溶性直鏈分子脫水多磷酸鹽作為基本的抗結石劑，一有效抗斑量之實質上不溶於水的非陽離子抗菌化合物作為基本的抗斑劑，以及視需要足以供應 25 ppm 至 5,000 ppm 氟化物離子的氟化物離子提供來源。在一方面，2,4,4'-三氯-2'-羥基二苯醚係以 1 ppm 至 100 ppm 濃度存在於組成物中。

在一實施例中，口腔用組成物為一漱口水或潤口液。在一方面，漱口水或潤口液不包含矽質拋光劑。

詳細說明

牙周炎中三種主要的破壞性 MMPs 為 MMP-8、MMP-9 及 MMP-13。MMP-8 和 MMP-13 為膠原酶，而 MMP-9 為明膠酶。此三種酵素皆可在牙周病的組織及齦溝液中發現。這些酵素的量與牙周炎臨床徵象具有正相關。亦即，升高或「高於正常」量的至少一種 MMP-8、MMP-9 和 MMP-13 即為牙周炎之指標。可測量 MMP-8、MMP-9 和

MMP-13 酵素、RNA 或生物活性。

如文中所述，目前顯示包含 2,4,4'-三氯-2'-羥基二苯醚(三氯沙)之口腔用組成物可降低哺乳動物口腔中至少一種 MMP-8、MMP-9 和 MMP-13 之量。在一實施例中，口腔用組成物為牙粉。在另一實施例中，除了別的以外，口腔用組成物包括漱口水、貼片或凝膠。在另一方面抗菌化合物可用於降低哺乳動物口腔中 MMP-8、MMP-9 和 MMP-13 至少一種之量。

如全文所用，範圍係用於簡略表達以供描述在此範圍內的各個和每個值。在此範圍內的任何值皆可選作此範圍的最終值，此外，所有文中所引述的參考文獻其全文係以引用的方式併入本文中。在本文揭示文與所引述的參考文獻的定義有衝突時，則以本揭示文為主。

如文中所用，用語「牙周炎」係指牙周有機基質，包括牙齦、牙周膜、牙骨質及牙槽骨不正常及過度降解。臨床上牙周炎的顯現症狀，包括(但不限於)牙齦萎縮、囊袋形成、附連喪失及最後牙齒和骨質流失。牙周炎可依特徵分為初期牙周炎、中度牙周炎或重度牙周炎。然而，所屬技術領域中具有通常知識者應了解，牙周炎應不只限於文中所述的這些症狀和續發症。初期的牙周炎，除了其他的症狀外，其一或多個下列臨床表徵為：牙齦探測出血；出現有囊袋(3 至 4 mm)；局部區域萎縮；附連喪失(3 至 4 mm)；骨質流失(例如水平的)；及第 I 級根叉侵犯區域。中度的牙周炎，除了其他的症狀外，其一或多個下列臨床表徵為：

出現囊袋(4 至 6 mm)；出現附連喪失(4 至 6 mm)；牙齦探測出血；第 I 級及/或第 II 級根叉侵犯區域；骨質流失(例如水平及/或垂直)；以及流失 1/3 支撐牙槽骨(亦即，1:1 的牙冠和牙根比例)。重度的牙周炎，其一或多個下列臨床表徵為：牙齦探測出血；出現囊袋(超過 6 mm)；附連喪失(超過 6 mm)；第 II 級及/或第 III 級根叉侵犯區域；第 II 級及/或第 III 級牙齒鬆動；骨質流失(例如水平及/或垂直)；以及流失超過 1/3 支撐牙槽骨(亦即，2:1 或更大的牙冠和牙根比例)。牙周炎可再細分為包括(但不限於)：成人牙周炎(例如與牙菌斑有關)；早發型牙周炎(例如青春期、幼年、快速進行性等)；與全身性疾病有關的牙周炎；壞死性潰瘍性牙周炎；頑固性牙周炎；植體牙周炎等。

如文中所用，用語「治療」係指不利症狀之可查覺改善及/或因哺乳動物與本發明之口腔用組成物接觸及/或根據本發明方法使得症狀之徵狀減少。

用語「治療牙周炎」應了解，係包括預防哺乳動之牙周炎以及抑制一或多項與哺乳動物早已存在的牙周炎有關的症狀之惡化。如文中所用，用語「抑制(inhibit 及 inhibition)」係指相較於無治療的情況(如治療性治療及/或預防性治療)，部份抑制或完全抑制牙周炎。根據本發明牙周病之治療因此包括降低、抑制、改善、減少、變少、中止或消除一或多個文中所述之徵狀及/或續發症。

如文中所用，用語「病理性過量」係指活性超過可接受的正常量。例如，基質金屬蛋白酶活性「病理性過量」

為基質金屬蛋白酶活性超過非疾病狀態所發現之正常量。如文中所用，「基質金屬蛋白酶活性病理性過量」為牙周病有關的基質金屬蛋白酶活性之量。

如文中所用，用語「下調」係指降低酵素活性、降低酵素活性量、降低蛋白及/或編碼此蛋白之核酸的量、降低蛋白質（例如一或多種 MMP-8、MMP-9 和 MMP-13）出現的生化效應。

在一方面，本發明係提供降低有此需要的哺乳動物口腔中至少一種 MMP-8、MMP-9 和 MMP-13 病理性過量之方法，其包括投予此哺乳動物之口腔一種包含降低哺乳動物口腔中基質金屬蛋白酶之有效量的 2,4,4'-三氯-2'-羥基二苯醚之口腔用組成物，其中因抑制該基質金屬蛋白酶的量而抑制了結締組織基質蛋白質組份的過度降解。

MMP，例如 MMP-8、MMP-9 或 MMP-13 在口腔中可如前述，以多種方法之其中之一使其降低。在一實施例中，如文中他處所述，可藉由下調 MMP 在核酸中的量，降低口腔中的 MMP。此降低可使一或多種編碼 MMP 的核酸（例如 mRNA）及表現在口腔的 MMP 酵素減少。所屬技術領域中具有通常知識者應了解，當熟讀文中所述之揭示文時，減少編碼 MMP 的 mRNA，例如可用一或更多種多重技術來進行。實例包括降低編碼 MMP 的 mRNA 之轉錄及將編碼 MMP 的 mRNA 降解及/或消除。

在另一實施例中，可藉由直接降低 MMP 酵素的量來減少口腔中的 MMP。所屬技術領域中具有通常知識者應了

解，當熟讀文中所述之揭示文時，降低 MMP 酵素，例如可用一或更多種多重技術來進行。實例(其中)包括經由小分子抑制劑來抑制酵素，經由天然的或生物性衍生分子來抑制，酵素的蛋白質降解以及口腔酵素之親和力清除。降低一或多種 MMP-8、MMP-9 或 MMP-13 之藥劑可為文中所述之藥劑，例如 2,4,4'-三氯-2'-羥基二苯醚(三氯沙)，或可為另外的抗菌劑。在另一方面，可為抗菌劑以外的藥劑。因此，本發明係提供治療患有牙周炎個體之方法。

在本發明一方面，係提供降低有此需要的哺乳動物口腔中基質金屬蛋白酶活性病理性過量的方法，其包括投予哺乳動物之口腔一種包含有效降低哺乳動物口腔中至少一種 MMP-8、MMP-9 和 MMP-13 基質金屬蛋白酶活性之量的 2,4,4'-三氯-2'-羥基二苯醚之口腔用組成物，其中因抑制該基質金屬蛋白酶的活性而抑制了結締組織基質蛋白質組份的過度降解。在另一方面，係投予哺乳動物之口腔一種包含有效降低哺乳動物口腔中 MMP-8、MMP-9 和 MMP-13 至少一種基質金屬蛋白酶活性之量的 2,4,4'-三氯-2'-羥基二苯醚之口腔用組成物，其中降低基質金屬蛋白酶活性之量使得整體的金屬蛋白酶的酵素活性下降，而抑制了結締組織基質蛋白質組份的過度降解。在一實施例中，一或多種病理性過量的 MMP 可如文中其他處所述有關降低哺乳動物口腔中 MMP 之量，予以降低。亦即，降低核酸及蛋白質其一或二者之量可降低 MMP。如文中其他處所述，降低一或多種此等 MMP 病理性過量可提供哺乳動物牙周炎之

治療。

在一方面，本發明係提供降低有此需要的哺乳動物口腔中至少一種 MMP-8、MMP-9 和 MMP-13 活性之方法，其包括投予哺乳動物之口腔一種包含有效降低哺乳動物口腔中基質金屬蛋白酶活性之量的 2,4,4'-三氯-2'-羥基二苯醚之口腔用組成物，其中因抑制該基質金屬蛋白酶的活性而抑制了結締組織基質蛋白質組份的過度降解。在一實施例中，一或多種 MMP 的活性可如文中其他處所述有關降低哺乳動物口腔中 MMP 之量，予以降低。亦即，藉由直接降低 MMP 的活性或間接降低 MMP 蛋白及/或核酸的量，可降低 MMP 於核酸及蛋白質其一或二者之量，因而降低 MMP 在口腔中的活性。

在另一方面，本發明係提供治療有此需要的哺乳動物牙周炎之方法，其包括將哺乳動物口腔中的細胞與下調至少一種 MMP-8、MMP-9 和 MMP-13 中一或二種之藥劑接觸。根據本發明，下調金屬蛋白酶係與減少至少一種牙周炎有關的徵狀相關連。

MMP，如 MMP-8、MMP-9 或 MMP-13 可於核酸階段中下調。非限定實例如，根據本發明可藉由下調編碼 MMP 的 mRNA 來下調 MMP。在一實施例中，本發明之方法包括將哺乳動物的口腔與下調一或多種 MMP-8、MMP-9 或 MMP-13 之藥劑接觸。下調一或多種 MMP-8、MMP-9 或 MMP-13 之藥劑可為文中所述之藥劑(如 TRICLOSAN)或可為另外的抗菌劑。在另一方面，可為抗菌劑以外的藥劑。

因此，本發明係提供治療患有牙周炎個體之方法。

在另一方面，本發明係提供治療有此需要的哺乳動物牙周炎之方法。在一實施例中，治療此需要的哺乳動物牙周炎之方法包括投予哺乳動物之口腔一種包含有效下調至少一種 MMP-8、MMP-9 和 MMP-13 之量的 2,4,4'-三氯-2'-羥基二苯醚之口腔用組成物，其中下調基質金屬蛋白酶使得哺乳動物的牙周炎得以治療。在另一實施例中，治療有此需要的哺乳動物牙周炎之方法包括投予哺乳動物之口腔一種包含有效降低至少一種 MMP-8、MMP-9 和 MMP-13 之量的 2,4,4'-三氯-2'-羥基二苯醚之口腔用組成物，其中降低基質金屬蛋白酶之量使得哺乳動物的牙周炎得以治療。又在另一實施例中，治療有此需要的哺乳動物牙周炎之方法包括投予哺乳動物之口腔一種包含有效降低至少一種 MMP-8、MMP-9 和 MMP-1 活性量之量的 2,4,4'-三氯-2'-羥基二苯醚之口腔用組成物，其中降低基質金屬蛋白酶活性量使得哺乳動物的牙周炎得以治療。

在一藉由投予哺乳動物之口腔一種口腔用組成物來治療牙周炎的方法中，一或多種 MMP 的活性可如文中他處所述有關降低哺乳動物口腔中 MMP 之量，予以降低。亦即，降低核酸及蛋白質其一或二者之量可降低 MMP，因而降低 MMP 在口腔中的活性。同樣地，下調 MMP 或降低 MMP 的量可藉由在核酸及蛋白質其一或二者中的作用而產生效果，如文中他處所述。

在另一方面，本發明係提供鑑別可用於治療有此需要

的哺乳動物牙周炎之化合物的方法，其包括將細胞與試驗化合物接觸並測定此試驗化合物是否能下調一或二種至少一種 MMP-8、MMP-9 和 MMP-13。該至少一種基質金屬蛋白酶之下調作用為此試驗可用於治療牙周炎之指標。

在一實施例中，治療牙周炎之方法包括投予一經文中所述的篩選分析鑑別過的藥劑，或抑制一或多種牙周炎標記的藥劑組合，其中至少一種藥劑為經文中所述的篩選分析鑑別過的藥劑。

在一實施例中，本發明係提供治療牙周炎之方法，其包括投予治療上有效量的抑制牙周病及/或牙周病症之藥劑至需要此治療的對象中之步驟。如文中所定義，治療上有效量的藥劑(亦即有效劑量)範圍係從 0.001 至 30 毫克/公斤體重，較佳地 0.01 至 25 毫克/公斤體重，更佳地 0.1 至 20 毫克/公斤體重及甚佳地 1 至 10 毫克/公斤體重，2 至 9 毫克/公斤體重，3 至 8 毫克/公斤體重，4 至 7 毫克/公斤體重或 5 至 6 毫克/公斤體重。所屬技術領域中具有通常知識者應了解特定的因素可能影響有效治療此對象所需之劑量，其包括(但不限於)疾病或病症的嚴重度、之前的治療、此對象的一般健康狀況及/或年齡及其他存在的疾病。再者，以治療上有效量的抑制劑治療一對象，可包括單一治療，或較佳地可包括一系列的治療。應了解，用於治療的有效劑量在特定的治療期間內可增加或減少。可如文中所述的診斷分析結果而改變劑量。

所屬技術領域中具有通常知識者應了解如何偵查牙周

炎的存在。此外，所屬技術領域中具有通常知識者應了解如何鑑別一或多種 MMP-8、MMP-9 和 MMP-13 之升高的量。偵測哺乳動物有或無牙周炎之示例方法包括由受試對象的口腔中取得一生物樣本，並將此生物樣本與能偵測一或多種如文中所述的牙周炎標記(亦即 MMP-8、MMP-9 或 MMP-13)之化合物或試劑接觸，例如標記核酸(其中例如 mRNA、基因體 DNA)或標記核酸所編碼的標記胜肽(其中例如胜肽片段或蛋白質)，使得可在生物樣本中偵測到標記核酸或核酸所編碼的標記胜肽之存在。在一實施例中，用於偵測標記 mRNA 或基因體 DNA 之藥劑為能與 mRNA 或基因體 DNA 雜交之經標定的核酸探針。核酸探針可為，例如全長的標記核酸或其一部分。其他適合用於本發明診斷分析之探針係如文中所述。在另一實施例中，牙周炎標記之活性係用作為偵測標記(亦即 MMP-8、MMP-9 或 MMP-13)之一種方式。目前已知或以後發展出用以偵測標記活性的任何分析皆涵蓋在本文中。

在另一實施例中，偵測標記胜肽之試劑為能與標記胜肽結合之抗體，例如帶有可偵測標記之抗體。抗體可為多株或單株。可使用完整的抗體或其片段(例如 Fab 或 F(ab').sub.2)。有關探針或抗體之用語「標定」，係意欲涵蓋藉由將可偵測物質與探針或抗體偶合(例如物理上連接)而直接標定探針或抗體，以及藉由與另一直接標定的試劑反應而間接標定探針或抗體。間接標定之實例包括使用螢光標定第二抗體及以生物素末端標定的 DNA 探針來偵測初

級抗體，而使得其能以螢光標定的鏈黴親和素(streptavidin)偵測出。

如文中所用的用語「生物樣本」意欲包括自受試對象口腔中分離出的組織、細胞及生物體液，以及存在受試對象口腔中的組織、細胞及體液。亦即，本發明之偵測方法可用於活體外及活體內偵測生物樣本中的標記 mRNA、胜肽(例如蛋白)或基因體 DNA。非限定實例如，用於偵測標記 mRNA 之活體外技術包括北方雜交法及原位雜交法。用於偵測標記胜肽之活體外技術包括酵素連結免疫吸附分析法(ELISAs)、西方墨點法、免疫沉澱法及免疫螢光法。用於偵測標記基因體 DNA 之活體外技術包括南方雜交法。用於偵測標記胜肽之活體內技術包括將一經標定的抗體導入受試對象的口腔中。例如抗體可經放射線標記標定，可用標準顯影技術於受試對象中偵測其存在和位置。

在一實施例中，該等方法進一步涉及由對照組對象中取得一對照的生物樣本，並將此對照樣本與能偵測標記胜肽、mRNA、基因體 DNA 之化合物或藥劑接觸，使得可在生物樣本中偵測到標記胜肽、mRNA 或基因體 DNA 之存在，並與對照樣本中存在的標記胜肽、mRNA 或基因體 DNA 與試驗樣本中存在的標記胜肽、mRNA 或基因體 DNA 相比較。另外，試驗樣本中存在的標記胜肽、mRNA 或基因體 DNA 可與數據的資料或圖相比較產生偵測結果或診斷。在另一實施例中，該等方法進一步涉及使用由具有牙周炎對象所取得的對照樣本，其中該對照樣本係在該對象牙周炎

發作之前所取得(亦即，當該對象為健康或在「正常」、無牙周炎的狀態下)。

非限定的實例如，MMP-9 之量可於體外藉由將細胞與 TNF α 接觸來確定。在一實施例中，細胞為單核細胞。在細胞與 TNF α 接觸後，於蛋白質或核酸量偵測 MMP-9 的量。在一方面，MMP-9 之量亦可於體外在一抗菌劑的存在下，藉由將細胞與 TNF α 接觸來確定。在一實施例中，此抗菌劑為 2,4,4'-三氯-2'-羥基二苯醚。在另一實施例中，藥劑為多西環素(doxycycline)。在另一實施例中，藥劑可為抗菌劑以外的物質。在一實施例中，藥劑為 MMP 抑制劑。

在本發明一實施例中，藉由偵測 MMP-9 之量測量 MMP-9 的下調作用係在體外於藥劑(例如抗菌劑)的存在下藉由將細胞與 TNF α 接觸來確定，並與於體外在抗菌劑的存在下藉由將細胞與 TNF α 接觸所確認的 MMP-9 量相比較，其中實驗條件是相同的。在抗菌劑的存在下 MMP-9 蛋白之量、核酸或酵素活性較無抗菌劑者低，其顯示抗菌劑化合物下調 MMP-9。就文中所述的揭示文而言，應了解，相同的方法可用於評估 MMP-8 及/或 MMP-13。

應了解，於體外測量 MMP-8、MMP-9 及/或 MMP-13 之下調作用可與體內效用、觀察或結果相關連。在一方面，於體外所測量的金屬蛋白酶之下調作用係確認體內的觀察，其包括(但不限於)牙周炎之治療、降低體內金屬蛋白酶及/或金屬蛋白酶活性病理性過量之方法，以及鑑別可用於治療牙周炎及/或降低體內金屬蛋白酶及/或金屬蛋白酶活

性病理性過量之化合物的方法。參見，例如 Golub 等人, *Inflamm. Res.* (1997) 46:310-9, Preshaw 等人, *J. Clin. Periodontol.* (2004) 31:697-707; Mantyla 等人, *J. Periodontal. Res.* (2003) 38:436-439; Lorencini 等人, *Histol. Histopathol.* (2009) 24:157-166; and Pozo 等人, *J. Periodontal Res.* (2005) 40:199-207。在另一方面，於體外所測量的金屬蛋白酶之下調為體內結果之預測，其包括(但不限於)牙周炎之治療、降低體內金屬蛋白酶及/或金屬蛋白酶活性病理性過量之方法，以及鑑別可用於治療牙周炎及/或降低體內金屬蛋白酶及/或金屬蛋白酶活性病理性過量之化合物的方法。

非限定的實例如，MMP-13 之量可於體外藉由將細胞與副甲狀腺素(PTH)接觸來確定。在一實施例中，細胞為骨母細胞。在細胞與 PTH 接觸後，以蛋白質或核酸量偵測 MMP-13 的量。在一方面，MMP-13 之量亦可於體外在一抗菌劑的存在下，藉由將細胞與 PTH 接觸來確定。在一實施例中，此抗菌劑為 2,4,4'-三氯-2'-羥基二苯醚。在抗菌劑的存在下 MMP-13 蛋白之量、核酸或酵素活性較無抗菌劑者低，其顯示抗菌劑化合物下調 MMP-13。

在一方面，如文中前述之口腔用組成物治療牙周炎之能力可藉由將 2,4,4'-三氯-2'-羥基二苯醚對金屬蛋白酶下調之效用與口腔用組成物對金屬蛋白酶下調之效用相比較來確認。在另一方面，口腔用組成物治療牙周炎之能力可藉由口腔用組成物於體內或體外的效用與文中所述的口腔用組成物之效用相比較來確認。

本發明進一步係包括用於本發明方法中之口腔用組成物例如(其中)牙粉(dentifrice)、凝膠、貼片、漱口水或噴霧。在一方面，口腔用組成物係包括一抗菌劑。在一示例的實施例中，此抗菌劑為非陽離子抗菌劑。參見，例如美國專利第 5,288,480 號，其全文係以引用的方式併入本文中。此非陽離子抗菌劑係以 0.25-0.35%重量比，較佳的 0.3%-有效抗斑量存在於口腔用組成物中。此抗菌劑實質上不溶於水，意指其水溶性在 25°C 係低於水重之 1%重量比且可能甚至低於 0.1%。當口腔用組成物為漱口水時，例如抗菌劑的濃度可降至用於另一種牙粉時(例如牙膏)之 10 倍。在一實施例中，此抗菌劑為 2,4,4'-三氯-2'-羥基二苯醚。在另一實施例中，口腔用組成物包括二或多種抗菌劑。

在一實施例中，抗菌劑促進劑(AEA)促進抗菌劑遞送至口腔表面及停留在其上。在一方面，AEA 包含一黏附物質。參見美國專利第 5,288,480 號對用於本發明之 AEA 物質的物質及組成物之說明，以及對用於本發明之口腔用組成物(例如牙粉)的一般性說明。非限定的實例如，組成物中的黏附物質為含具有平均分子量介於 100,000 至 2,500,000 間之聚合物。在一方面，黏附物質係選自聚乙烯磷酸之聚合物、聚(1-膦醯基丙烯)磺酸之聚合物、聚(β -苯乙烯膦酸)之聚合物、 α -苯乙烯膦酸之聚合物、合成的陰離子聚合性聚羧酸之聚合物、馬來酸酐之聚合物、馬來酸之聚合物及甲基乙烯基醚之聚合物。在另一方面，黏附分子為甲基乙烯基醚和馬來酸酐之聚合物。抗菌劑促進劑可以佔口腔用組成物

重 0.01%-4.0%重量比之量來使用。

如文中所用，「遞送促進基團」係指與口腔(例如牙齒或牙齦)表面連結或實質上、連附地、黏附地或另結合 AEA(攜帶抗菌劑)，因而「遞送」抗菌劑至此等表面。有機的駐留-促進基團，一般為親水性，係將抗菌劑與 AEA 附連或另結合，因而促進抗菌劑駐留至 AEA 並間接地留在口腔表面。在某些情況下，抗菌劑的附連係經由 AEA 的物理性包覆所產生，尤其是當 AEA 為交鏈的聚合物時，其結構本來就能提供此包覆更多的位置。交鏈聚合物有較高分子量、較親水性的交鏈基團存在能更進一步促進交鏈 AEA 聚合物對抗菌劑物理性包覆。

在一實施例中，促進該抗菌劑遞送以及黏附在牙齒和牙齦表面或駐留在其上之抗菌劑促進劑為(i)馬來酸或酸酐與另一惰性乙烯化不飽和聚合單體或(ii)聚(β -苯乙烯膦酸)或聚(α -苯乙烯膦酸)聚合物或苯乙烯膦酸與另一乙烯化不飽和單體的共聚物。然而，所屬技術領域中具有通常知識者應了解，本發明並不限於所用的特定抗菌劑促進劑，且其他的抗菌劑促進劑係涵蓋在本發明中。

在一示例的牙粉中，係存有口腔可接受的媒劑包括具保濕劑的水相。通常水係以至少 3%重量比，一般 3-35%之量存在，及保濕劑，較佳地甘油及/或山梨糖醇，通常係以牙粉的重量計 6.5-75%或 80%，更典型地 10-75%。雖然在本發明中並不需要，但其中 0-25-0.35%的不溶於水的非陽離子抗菌劑係視需要需要，另一種幫助抗菌劑溶於唾液中

之成份可併入水性保濕媒劑中。此視需要的增溶劑包括保濕多醇例如丙二醇、二丙二醇及己二醇，溶纖劑(cellosolve)例如甲基溶纖劑及乙基溶纖劑、蔬菜油及於直鏈上含至少12個碳之蠟，例如橄欖油、芥花油及軟蠟及酯例如乙酸戊酯、乙酸乙酯及苯甲酸苯甲酯。如文中所述，「丙二醇」包括1,2-丙二醇及1,3-丙二醇。大量的聚丙二醇，特別是分子量600或600以上，應避免，因為丙二醇有效抑制非陽離子抗菌劑之抗菌活性。例如，聚乙醇(PEG)600當與三氯沙以25三氯沙：1PEG600之重量比存在時，三氯沙的抗菌活性較在無聚乙二醇時降低了10-20倍。

口腔用組合物的pH一般是在4.5至10的範圍中，而在另一方面，6.5至7.5。值得注意的，本發明之組成物可以低於5之pH施用於口部，而不會實質地去除石灰質或傷害牙齒琺瑯質。pH可用酸(例如檸檬酸或苯甲酸)或鹼(例如氫氧化鈉)或緩衝劑(如以檸檬酸鈉、苯甲酸鹽、碳酸鹽或碳酸氫鹽、磷酸氫二鈉、磷酸二氫鈉等)來控制。

任何的研磨粒子皆可使用並可選自碳酸氫鈉、磷酸鈣(例如磷酸氫鈣二水合物)、硫酸鈣、沉澱性碳酸鈣、矽氧(例如水合矽氧)、氧化鐵、氧化鋁、珍珠岩、塑膠粒例如聚乙烯及其組合物。特言之，研磨劑可選自磷酸鈣(例如，磷酸氫鈣二水合物)、硫酸鈣、沉澱性碳酸鈣、矽氧(例如水合矽氧)、焦磷酸鈣及其組合物。任何種類的矽氧皆可使用，例如沉澱性矽氧或矽膠。較佳的為市售矽氧例如英國沃林頓Ineos Silicas公司之INEOS AC43。依照本發明亦可使用其

他的研磨劑。如美國專利第 4,358,437 號中所述，碳酸鈣之粉末形式，一種重要的此類研磨劑形式。這些研磨劑的實例有磨碎的石灰石或大理石、白堊土例如霰石(aragonite)、方解石(calcite)或其混合物，以及合成的沉澱性白堊土例如水工白堊土。一般而言，碳酸鈣應具有低於 40 微米之平均直徑，較佳的低於 15 微米。第二類的研磨劑為粉末狀的矽氧，特別是如美國專利第 3,538,230 號之矽氧水凝膠。

在一實施例中，口腔用組合物包含一矽質拋光劑。此拋光劑可為矽質材料例如水性矽膠、矽氧水凝膠或複合的非晶鹼金屬矽酸鋁或矽酸鋯或沉澱性矽氧。膠體矽氧物質包括以商標名稱 SYLOID 販售者，例如已銷售的 SYLOID 72 和 SYLOID 74。沉澱性矽氧包括以商標名稱 ZEODENT 販售的(例如)ZEODENT 113 和 ZEODENT 115 以及 ZEODENT 119。

漱口水或潤口液一般不包含研磨劑微粒或拋光劑微粒。貼片一般不包含研磨劑微粒或拋光劑微粒。

不受限於理論，藉此可達到本發明之利益，咸信即使抗菌劑(例如 2,4,4'-三氯-2'-羥基二苯醚)在無特定的增溶物質下，當試劑的量為 0.25%-0.35%重量比且有聚羧酸存在時，有足夠的試劑存在即能藉由下調至少一種 MMP-8、MMP-9 或 MMP-13 來進行牙周炎之治療。其同樣地可應用於其他文中所述的水溶性非陽離子抗菌劑。

口腔用組成物(例如牙粉)亦可含有足以供應 25 ppm 至 5,000 ppm 氟化物離子之氟化物離子來源，或提供氟組份，

作為抗齲蝕劑。這些化合物可些微地溶於水或可完全溶於水。其特徵為彼等能於水中釋放氟化物離子且與口腔製備物的其他組份無實質的不欲反應。在這些物質中有無機氟化鹽類，例如可溶性的鹼金屬、鹼土金屬鹽類或例如氟化鈉、氟化鉀、氟化鋁、氟化鈣、銅氟化物例如氟化亞銅、氟化鋅、氟化鋇、氟矽酸鈉、氟矽酸鉍、氟鋇酸鈉、氟鋇酸鉍、單氟磷酸鈉、單及二氟磷酸鋁及氟化焦磷酸鈉鈣。鹼金屬及錫的氟化物，例如氟化鈉和氟化亞錫、單氟磷酸鈉(MFP)及其混合物為較佳。通常在鹼金屬氟化物的案例中，這些組份以製備物的總重量計，係以至高 2% 重量比之量存在，且較佳的係在 0.05% 至 1% 的範圍內。在單氟磷酸鈉的案例中，化合物係以 0.1-3% 之量存在，且在一實施例中為 0.7-0.8%。

在一方面，組成物進一步包含由下列選出之試劑：亞錫離子劑；氟化物化合物；氟化鈉；氯己定(chlorhexidine)；雙胍啶(alexidine)；雙辛氫啶(hexetidine)；血根鹼(sanguinarine)；氯化苯二甲烴鉍(benzalkonium chloride)；水楊苯胺(salicylanilide)；度米芬(domiphen bromide)；西吡氯鉍(cetylpyridinium chloride)(CPC)；十四烷基氯化吡啶(TPC)；N-十四烷基-4-乙基氯化吡啶(TDEPC)；奧替尼啶(octenidine)；地莫匹醇(delmopinol)；辛哌醇(octapinol)；乳酸鏈球菌素(nisin)；鋅離子劑；銅離子劑；精油；呋喃酮(furanones)；細菌素 bacteriocins)、月桂醯精胺酸(ethyllauroyl arginate)、木蘭花萃取物、金屬離子來源、精

胺酸、精胺酸碳酸氫鹽、厚朴酚(honokiol)、厚朴酚(magonol)、熊果酸(ursolic acid)、尤西酸(ursic acid)、桑色素(morin)、沙棘萃取物、過氧化物、酵素、山茶花萃取物、類黃酮、黃烷、鹵化二苯醚、肌酸、蜂膠。

本發明某些實施例係提供鑑別用於治療口腔疾病或症狀之化合物的方法，該方法包括：由患有口腔疾病或症狀之哺乳動的口腔中取得第一牙齦樣本；由該哺乳動物之口腔得到第二牙齦樣本；將該第一樣本與試驗化合物接觸；將該第二樣本與正對照接觸，其中該正對照為一已知的下調一或多種基質金屬蛋白酶表現之化合物；測量一或多種該基質金屬蛋白酶之表現被該試驗化合物下調之程度；測量一或多種該基質金屬蛋白酶之表現被該正對照下調之程度；以及將一或多種該基質金屬蛋白酶之表現被該試驗化合物下調之程度與一或多種該基質金屬蛋白酶之表現被該正對照下調之程度相比較；其中試驗化合物下調一或多種該基質金屬蛋白酶之表現程度係與該正對照下調之程度相等或更佳，試驗化合物為一可用於治療口腔疾病或症狀之化合物。

在其他的實施例中，一或多種基質金屬蛋白酶係由下列組成之群中選出：MMP-8、MMP-9 及 MMP-13。在另外的實施例中，正對照下調了 MMP-8、MMP-9 及 MMP-13 之表現。

在某些實施例中，口腔之疾病或症狀為牙齦炎或牙周炎。在其他的實施例中，正對照為鹵化二苯醚。又在其他

的實施例中，正對照為三氯沙。

在某些實施例中，試驗化合物下調一或多種該基質金屬蛋白酶之表現的程度較該正對照組佳。在另外的實施例中，試驗化合物下調 MMP-9 和 MMP-13 之表現的程度較該正對照組佳。又另外的實施例係提供其中試驗化合物下調 MMP-8、MMP-9 和 MMP-13 之表現的程度較該正對照組佳之方法。

在某些實施例中，正對照下調了 MMP-8 之表現。在某些實施例中，正對照下調了 MMP-9 之表現。又在其他的實施例中，正對照下調了 MMP-13 之表現。

本發明進一步以下列實例來描述。該等實例僅為說明之用且不應在任何方面限制本發明範圍於所述的範圍及申請專利範圍內。

【實施方式】

實例

實例 1：MMP-9 製備及定性

U937 細胞及 RPMI 1640 培養基係得自 ATCC。人類 MMP-9 ELISA 套組(QUANTIKINE)係得自 R&D Systems。胎牛血清(FBS)係得自 VWR，而青黴素-鏈黴素溶液以及腫瘤凋亡因子 α (TNF α)係得自 Sigma。

將人類白血病 U937 單核細胞淋巴瘤細胞置於添加有 10% FBS 及 1% 青黴素-鏈黴素溶液的 RPMI 1640 培養基中並於 37°C 含 5% CO₂ 和 95% 空氣的濕化大氣下培養。在處理前，將細胞轉置於含 1% FBS 之 RPMI 中至隔夜。將細胞

放入 48 孔盤。細胞培養基中包含一種 TNF α (250ng/mL)或三氯沙(1ppm)，或二種試劑共同或無試劑(對照組)。處理後將細胞培養 24 小時。收集條件受限的培養基並儲存於-80°C 直到進行分析。根據市售的 ELISA 方法，將條件受限的培養基樣本，針對 MMP-9 進行酵素連結免疫吸附分析(ELISA)(圖 1)。

經 TNF α 刺激的 U937 細胞中 MMP-9 的產生量增加。1 ppm 的三氯沙在經 TNF α 刺激的 U937 細胞中明顯地降低 MMP-9 的量。

表 1：圖 1 之數據，說明了三氯沙對 MMP-9 產生之效用

	平均(ng/ml)	標準差 (ng/ml)
對照	0.114	0.024333
TNF α	0.275	0.048665
TNF α +三氯沙1ppm	0.155	0.004867

實例 2：MMP-13 之製備及定性

副甲狀腺素(大鼠 PTH 1-34)係購自 Sigma。將 UMR 106-01 細胞置於添加有 25 mM Hepes pH 7.4、1%非必須胺基酸、100 單位/毫升青黴素、100 微克/毫升鏈黴素、5%胎牛血清之依格氏最小必須培養基(Eagle’s minimal essential medium)(EMEM)中培養。根據下列方法進行實時定量(Real Time Quantitative)RT-PCR：將 UMR 106-01 細胞接種至 12-孔盤中並於細胞培養基中培養 2-3 天。當細胞長滿時，以



1%胎牛血清交換細胞培養基至隔夜讓細胞飢餓。以三氯沙或含三氯沙的牙粉預培養細胞(參見，例如美國專利第4,894,220、5,032,386 號及相關專利)15 分鐘及然後以 PTH (10^{-8} M)培養 4 小時。

從經 PTH 刺激的 UMR 106-01 細胞或無 PTH 但含 TRIzol 試劑之細胞中分離出總 RNA。將總 RNA (0.1 微克)使用 Invitrogen SUPERSCRIPT 套組，根據製造商的指示反轉錄為 cDNA。於 cDNA 上使用引子進行 PCR，其序列係說明於表 2 中。藉由將 2.5 微升的 cDNA 加到各含引子(0.2 μ M)及 12.5 微升 Platinum SYBR Green qPCR SuperMix UDG(Invitrogen)之 PCR 混合物(22.5 微升)中，將所有的 cDNA 增幅。將反應於 50°C 預培養 2 分鐘以 UDG 將含 dU-DNA 去污染，然後於 95°C 培養 2 分鐘使 UDG 不活化及活化 Taq。PCR 作業以 95°C 進行 15 秒的變性循環持續 49 次，於 60°C 進行 30 秒將引子黏合(annealing)及增長(elongation)。基因表現之相對定量係使用 $2^{-\Delta\Delta CT}$ 法來測定，其中基因表現之倍數變化係相對於對照樣本。所有的樣本皆常規化至 β -肌動蛋白。

所有的結果皆以三重複之平均值 $\pm$ 標準誤差(S.E.)(所有的實驗至少重複三次)來表示。使用學生 t 試驗進行統計分析。

經 PTH 刺激的 UMR 細胞其 MMP-13 表現增加。10 ppm、4 ppm 及 1 ppm 之三氯沙明顯地降低經 PTH 刺激的 UMR 細胞中 MMP-13 的表現。含有 10 ppm 三氯沙之含三

氯沙牙粉漿液降低了經 PTH 刺激的 UMR 細胞中 MMP-13 的表現。

表 2：引子序列

大鼠 MMP-13 基因
5'-GCCCTATCCCTTGATGCCATT-3'(同義)
5'-ACAGTTCAGGCTCAACCTGCTG-3'(反義)
大鼠激動蛋白基因
5'-AGCCATGTACGTAGCCATCC-3'(同義)
5'-ACCCTCATAGATGGGCACAG-3'(反義)

表 3：圖 2 之數據，說明了三氯沙抑制 MMP-13 之表現

	平均	標準差
對照組	0.558546	0.388464
PTH	78.84402	14.45422
三氯沙 10 ppm	1.518275	0.702455
三氯沙 4 ppm	1.423882	0.162156
三氯沙 1 ppm	0.416584	0.23855
三氯沙 10 ppm + PTH	3.011772	1.497531
三氯沙 4 ppm + PTH	10.55882	6.868653
三氯沙 1 ppm + PTH	35.38321	3.934183

表 4：圖 3 之數據，說明了含三氯沙之牙粉抑制了 MMP-13 之表現

	平均	標準差
--	----	-----

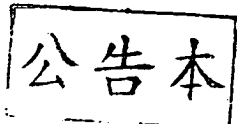
對照	0.917758	0.116307
PTH	370.6579	20.64484
含 10 ppm 三氯沙之含三 氯沙牙粉漿液	8.625401	5.675636
PTH + 含有 10 ppm 三氯 沙之含三氯沙牙粉漿液	7.904052	3.23775

【圖式簡單說明】

圖 1 係說明 2,4,4'-三氯-2'-羥基二苯醚對 $\text{TNF}\alpha$ -引起的單核細胞製造 MMP-9 作用之效用。

圖 2 係說明 2,4,4'-三氯-2'-羥基二苯醚對 PTH-引起的骨母細胞製造 MMP-13 作用之效用。

圖 3 係說明本發明之牙粉對 PTH-引起的骨母細胞製造 MMP-13 作用之效用。



發明專利說明書

(本說明書格式、順序，請勿任意更動，※記號部分請勿填寫)

※ 申請案號：99109773

A61K31/085 (2006.01)

※ 申請日：99 3 31

※IPC 分類：

A61P 1/02 (2006.01)

一、發明名稱：(中文/英文)

口腔用組成物之抗-骨質流失及抗-牙周附連喪失之功效/ANTI
BONE-LOSS AND ANTI ATTACHMENT-LOSS EFFECTS OF AN
ORAL COMPOSITION

二、中文發明摘要：

本文係描述用於鑑別供治療口腔疾病和症狀之化合物的方法。

三、英文發明摘要：

Methods for identifying compounds useful for treating diseases and conditions of the oral cavity are described herein.

四、指定代表圖：

(一)本案指定代表圖為：第（ 一 ）圖。

(二)本代表圖之元件符號簡單說明：無

五、本案若有化學式時，請揭示最能顯示發明特徵的化學式：

無

七、申請專利範圍：

1. 一種鑑別可用於治療牙齦炎或牙周炎之化合物的方法，該方法包括：

由患有牙齦炎或牙周炎之哺乳動物的口腔中取得第一牙齦樣本；

由該哺乳動物之口腔得到第二牙齦樣本；

將該第一樣本與一試驗化合物接觸；

將該第二樣本與一正對照接觸，其中該正對照為一已知的下調一或多種基質金屬蛋白酶表現之鹵化二苯醚；

測量一或多種該基質金屬蛋白酶之表現被該試驗化合物下調之程度；

測量一或多種該基質金屬蛋白酶之表現被該正對照下調之程度；

將一或多種該基質金屬蛋白酶之表現被該試驗化合物下調之程度與一或多種該基質金屬蛋白酶之表現被該正對照下調之程度相比較；

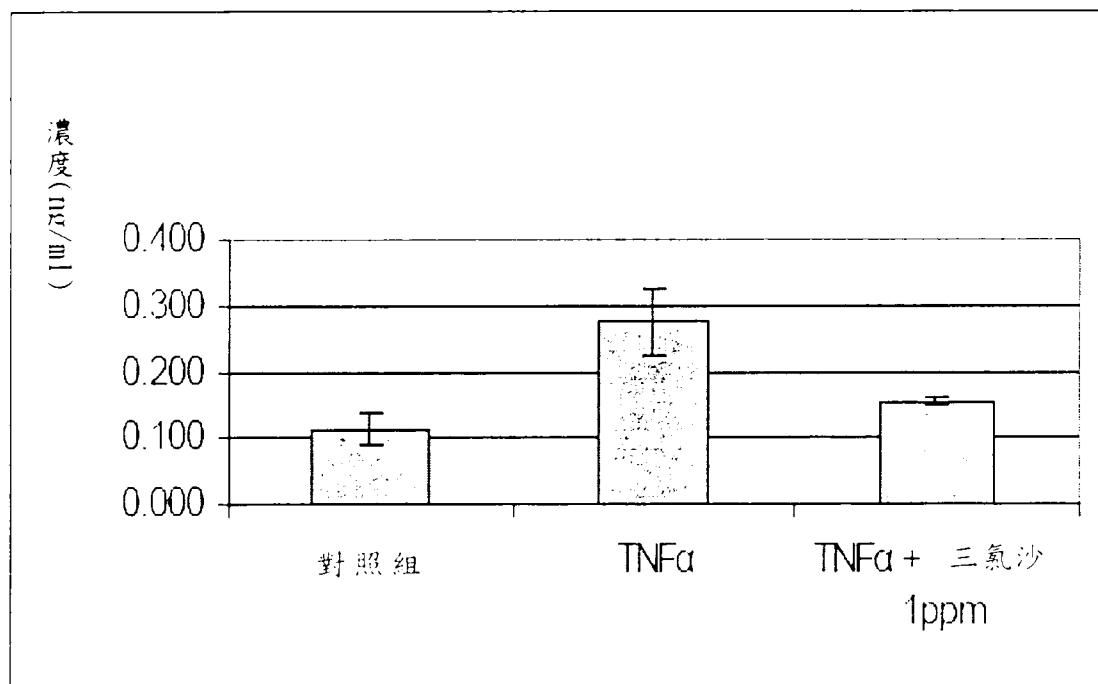
其中試驗化合物下調一或多種該基質金屬蛋白酶之表現程度係與該正對照下調之程度相等或更佳，則試驗化合物為一可用於治療牙齦炎或牙周炎之化合物。

2. 如申請專利範圍第 1 項之方法，其中該一或多種該基質金屬蛋白酶係由下列組成群組中選出：MMP-8、MMP-9 及 MMP-13。
3. 如申請專利範圍第 1 或 2 項之方法，其中該正對照下調 MMP-8、MMP-9 及 MMP-13 之表現。

4. 如申請專利範圍第 1 項之方法，其中該正對照為三氯沙。
5. 如申請專利範圍第 1 項之方法，其中該試驗化合物下調一或多種該基質金屬蛋白酶之表現至高於該正對照組的程度。
6. 如申請專利範圍第 1 項之方法，其中該試驗化合物下調 MMP-9 及 MMP-13 之表現至高於該正對照組的程度。
7. 如申請專利範圍第 1 項之方法，其中該試驗化合物下調 MMP-8、MMP-9 及 MMP-13 之表現至高於該正對照組的程度。
8. 如申請專利範圍第 2 項之方法，其中該正對照下調 MMP-8 之表現。
9. 如申請專利範圍第 2 項之方法，其中該正對照下調 MMP-9 之表現。
10. 如申請專利範圍第 2 項之方法，其中該正對照下調 MMP-13 之表現。

八、圖式：

圖 1



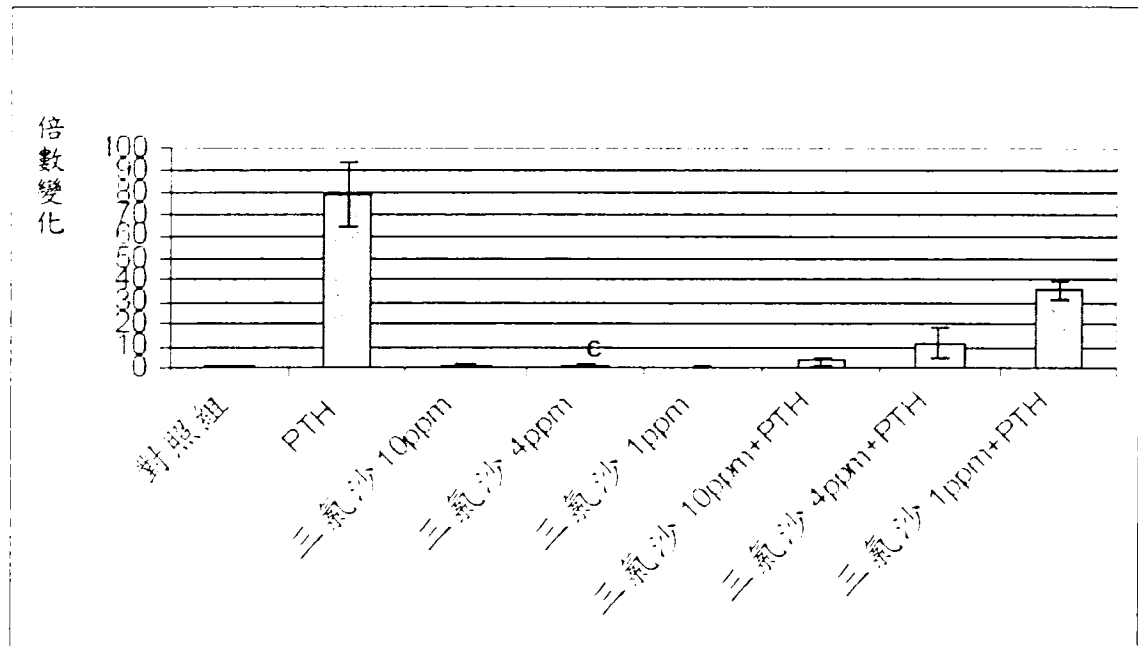


圖 2

負性對照之倍數變化

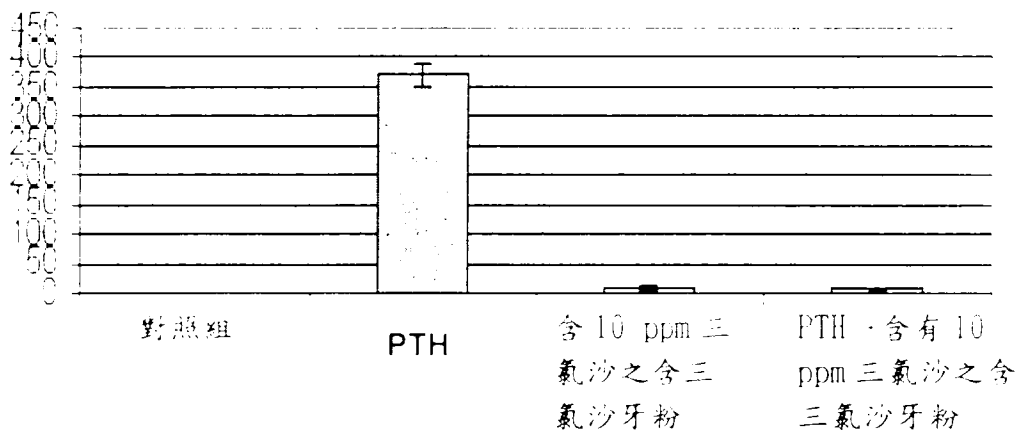


圖 3