



①9



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA

①1 Número de publicación: **2 327 161**

⑤1 Int. Cl.:
G01N 33/68 (2006.01)

①2

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

⑨6 Número de solicitud europea: **06780108 .4**

⑨6 Fecha de presentación : **17.07.2006**

⑨7 Número de publicación de la solicitud: **1907862**

⑨7 Fecha de publicación de la solicitud: **09.04.2008**

⑤4 Título: **Uso de la proteína salivar CD14 como un indicador de bajo riesgo de desarrollar caries dental.**

③0 Prioridad: **15.07.2005 IT TO05A0489**

⑦3 Titular/es: **Universita' Degli Studi di Torino**
Via Verdi, 8
10124 Torino, IT

④5 Fecha de publicación de la mención BOPI:
26.10.2009

⑦2 Inventor/es: **Ghigo, Dario y**
Bergandi, Loredana

④5 Fecha de la publicación del folleto de la patente:
26.10.2009

⑦4 Agente: **Justo Bailey, Mario de**

ES 2 327 161 T3

Aviso: En el plazo de nueve meses a contar desde la fecha de publicación en el Boletín europeo de patentes, de la mención de concesión de la patente europea, cualquier persona podrá oponerse ante la Oficina Europea de Patentes a la patente concedida. La oposición deberá formularse por escrito y estar motivada; sólo se considerará como formulada una vez que se haya realizado el pago de la tasa de oposición (art. 99.1 del Convenio sobre concesión de Patentes Europeas).

DESCRIPCIÓN

Uso de la proteína salivar CD14 como un indicador de bajo riesgo de desarrollar caries dental.

5 La presente invención se refiere a un procedimiento de ensayo *in vitro* útil para determinar la receptividad de un individuo a la caries, concretamente a un procedimiento para determinar la predisposición de un individuo al desarrollo de caries dental o para determinar la presencia de una o más caries activas en la cavidad oral.

10 La caries es una enfermedad infecciosa multifactorial, determinada por el balance dinámico entre factores patológicos que producen la desmineralización y factores protectores que producen la remineralización (Featherstone, 2004).

15 Se ha sugerido que muchas proteínas salivares tienen un papel como factores bien cariogénicos o bien anti-cariogénicos, dependiendo de su capacidad para inhibir el crecimiento de bacterias productoras de ácido, para agregarlas, para estimular su adhesión a la superficie del diente o para modificar el balance mineralización/desmineralización (Lenander-Lumikari y Loimaranta, 2000; Nieuw Amerongen y col., 2004).

20 Comprender el papel de las proteínas salivares en el desarrollo de la caries se vuelve más complicado por el hecho que muchas de estas proteínas son multifuncionales (la misma proteína realiza diferentes funciones), redundante (muchas proteínas parecen compartir las mismas funciones), y anfifuncional (la misma proteína puede tener efectos contrarios, dependiendo del ambiente intraoral) (Rudney, 2000; Humphrey y Williamson, 2001).

25 No se han detectado diferencias significativas en la composición de proteínas entre la saliva parótida (Dodds y col., 1997) y la saliva completa (Banderas-Tarabay y col., 2002) entre individuos activos para caries (AC) y libres de caries (LC).

30 En la actualidad, cada banda de electroforesis en gel monodimensional está a menudo compuesta por diferentes tipos de proteínas, lo que dificulta detectar cambios cuantitativos en proteínas específicas. El mapeado de las proteínas salivares humanas mediante electroforesis en gel bidimensional ha revelado la presencia de muchos puntos todavía a identificar (Ghafouri y col., 2003): una de estas proteínas podría resultar principalmente implicada en el desarrollo de caries.

35 Sakurai y col en J. Dent. Res., vol 78 de 10 de octubre de 1999 págs. 1596-1608 detectó inmunohistoquímicamente la proteína CD14 en la superficie (es decir, la CD14 asociada con las células dendríticas de la pulpa (CDP) en dientes cariados humanos: este hallazgo se usó únicamente como un marcador de la presencia de CPD, este documento no describe la presencia de la proteína salivar soluble CD14.

40 La técnica anterior no contiene ninguna indicación de la posible existencia de ninguna proteína salivar específica que se pueda usar como marcador para la predisposición de un individuo a desarrollar caries o como un indicador de la presencia de una caries progresiva.

45 La presente invención está basada en el reconocimiento del hecho de que la expresión de la proteína salivar CD14s (CD14 soluble) está considerablemente reducida en la saliva de individuos AC en comparación con la saliva de individuos LC; en particular, se determinó mediante análisis por transferencia Western de muestras salivares procedentes de pacientes AC jóvenes, que la proteína CD14s estaba ausente de todas las muestras salivares procedentes de pacientes AC jóvenes, mientras que fue claramente detectable en la saliva de todos los individuos LC control de edad similar.

50 La relación inversa entre la presencia de CD14s en la saliva y el inicio del deterioro temprano de los dientes lleva a suponer que esta proteína salivar puede jugar un papel importante en la prevención del desarrollo de la caries o a su desaparición (o reducción marcada) y puede representar un marcador de la presencia de caries activa.

55 De esta manera, el objeto de la presente invención comprende un procedimiento para ensayo pronóstico y diagnóstico para determinar la predisposición de un individuo a desarrollar caries dental o para detectar la existencia de caries activa en la cavidad oral, caracterizada porque comprende la etapa de examinar una muestra salivar procedente del individuo para determinar la presencia de la proteína salivar soluble CD14, en el que la ausencia de dicha proteína de la muestra o su presencia en una cantidad reducida en comparación con un valor umbral determinado en individuos libres de caries, es indicativa de dicha predisposición o de la presencia de caries activa.

60 CD14 es una glicoproteína de la membrana de 55 KDa que se expresa predominantemente sobre la superficie de monocitos/macrófagos y neutrófilos, que juega un papel crucial en el reconocimiento de varios productos microbianos, tales como lipopolisacáridos (LPS, endotoxinas) y peptidoglicanos, que son los componentes principales de las bacterias Gram-negativas y Gram-positivas, respectivamente, participando de esta manera en el inicio de la respuesta inmune (Lien e Ingalls, 2002).

65 El LPS- o peptidoglicano-CD14, junto con otras proteínas complementarias, interactúa con los receptores de la superficie celular denominados como receptores de tipo Toll, y mediante la activación de múltiples rutas de señalización conduce a la síntesis de citoquinas proinflamatorias (Guha y Mackman, 2001).

CD14 se expresa en la superficie celular mediante un anclaje de glicosilfosfatidilinositol, pero también se ha encontrado en forma libre en el plasma, siendo esto denominado como CD14 soluble (CD14s). La CD14s media la activación de los LPS de las células CD14-negativas, tales como las células endoteliales y epiteliales (Frey y col., 1992).

Las principales glándulas salivares humanas expresan y secretan constitutivamente CD14s en la saliva (Sugawara y col., 2002): la CD14s salivar puede mediar la activación de las células del epitelio intestinal que carecen de CD14 mediante LPS vía el receptor de tipo Toll TLR4 (Uehara y col., 2003), y estimula la invasión de las células epiteliales orales por *Actinobacillus actinomycetemcomitans*, incrementando de esta manera la producción de interleucina-8 (Takayama y col., 2003). Aunque esto puede sugerir que la CD14s humana podría jugar un importante papel en la inmunidad innata de la cavidad oral, no hay evidencia en la técnica anterior de una correlación entre la CD14s salivar y la receptividad de un individuo a la caries.

Los resultados obtenidos durante la presente invención muestran que dicha proteína, además de sus propiedades multifuncionales, juega un importante papel como factor anti-cariogénico.

Se pueden formular numerosas hipótesis para explicar dicha función, aunque la presente invención no pretende quedar ligada ni restringida por ninguna explicación particular del mecanismo de acción.

En primer lugar, CD14s podría permitir que las células epiteliales orales se unieran a bacterias (evitando de esta manera su adhesión a la superficie del diente) y la producción de citoquinas capaces de alistar fagocitos en la interfase encía-diente (potenciando de esta manera el aclaramiento de los microbios desde la saliva).

Sin duda, las células epiteliales que carecen de CD14 responden a LPS de forma dependiente de CD14s para producir interleucina-8, que induce la activación y migración de neutrófilos (Uehara y col., 2001).

CD14s podría también modular las propiedades antiinflamatorias de la saliva, uniéndose con elevada afinidad a la lactoferrina humana (Bavey y col., 2000), una glicoproteína quelante de hierro y LPS que se encuentra en secreciones exocrinas de mamíferos (Caccavo y col., 2002).

Adicionalmente, la unión de CD14s a bacterias podría impedir su transición desde la fase planctónica a la fase sésil, retrasando la formación de la placa.

El análisis de la muestra salivar para la determinación de CD14s en dicha muestra se puede realizar mediante análisis por transferencia Western, conocido *per se*; con este fin, están comercialmente disponibles anticuerpos primarios CD14 anti-humanos, por ejemplo, el anticuerpo policlonal CD14 cabra anti-humano de Upstate, D.B.A., Italia.

También están comercialmente disponibles kits ELISA útiles para la determinación cualitativa y cuantitativa de CD14 soluble humana.

Los siguientes ejemplos ilustran los análisis realizados en el ámbito de la presente invención.

Ejemplo 1

Análisis salivar

40 niños italianos sanos no relacionados entre sí, con edades comprendidas entre 6 y 12 años, se examinaron clínicamente por un dentista experimentado, los criterios de inclusión fueron sin enfermedad generalizada, sin medicación y sin dientes extraídos. 20 de ellos (8 varones, 12 mujeres; edad = 8,45 + 0,358 años) estaban libres de caries (LC), y 20 (9 varones, 11 mujeres; edad = 7,9 + 0,341 años) eran activos para caries (AC: definido como teniendo entre 2 y 8 lesiones cariadas con necesidad de empaste).

El estudio fue aprobado por el comité ético local; todos los participantes otorgaron el consentimiento informado de manera oral y por escrito.

Se instruyó a los sujetos para que no comieran, bebieran o usaran productos para aliento fresco durante un mínimo de 2 horas antes de la recogida de saliva. Se recogió saliva humana completa no estimulada (aproximadamente 5 ml) entre las 8 y las 10 a.m. por el mismo examinador antes del examen clínico, para reducir las posibles variaciones circadianas.

Los sujetos fueron invitados a limpiarse los dientes con un cepillo de dientes, aclarando la boca con agua. Tras un tiempo de espera de 10 min, se pidió a los sujetos escupir saliva en tubos de plástico estériles, que se procesaron inmediatamente tras lo anterior, para minimizar la degradación de proteínas (Banderas-Tarabay y col., 2002).

Las muestras se complementaron con el cóctel inhibidor de la proteasa conjunto III (AEBSF 100 mM, 80 μ M de aprotinina, bestatina 5 mM, E-64 1,5 mM, leupeptina 2 mM, y pepstatina 1 mM; Calbiochem-Novabiochem Corporation, AC) y se mantuvo en hielo durante el procesado. La saliva se centrifugó a 12.000 rpm durante 15 min a 4°C para eliminar el material insoluble, células y residuos (Ghafouri y col., 2003). 2 ml de la muestra se desalaron por

filtración en gel (columna PD-10, Amersham International, Piscataway, NJ) en bicarbonato de amonio 12 mM, pH 7,1. Los eluatos se liofilizaron y almacenaron a 70°C hasta análisis electroforético.

Ejemplo 2

Análisis de transferencia Western

Los reactivos para electroforesis se adquirieron de Bio-Rad Laboratories (Richmond, AC). El contenido en proteína de la saliva completa se evaluó mediante el kit BCA de Pierce (Rockford, IL).

Si no se indica otra cosa, el resto de reactivos se adquirieron de Sigma Chemical Co. (St. Louis, MO) y Aldrich (Milán, Italia).

Las muestras se solubilizaron directamente en tampón de lisis (Tris-HCl 125 mM, dodecilsulfato de sodio al 4%, glicerol al 20%, pH 6,8, β -mercaptoetanol al 10%, y azul de bromofenol al 0,002%) y se hirvieron durante 5 min antes de hacerlas correr sobre los geles. Se sometieron las alícuotas conteniendo 30 μ g de proteínas a electroforesis en gel de dodecilsulfato de sodio - poliacrilamida (poliacrilamida al 12%). Las proteínas se transfirieron a un filtro de membrana de PVDF (Immobilon P, Millipore, Bedford, MA) y se incubaron con un anticuerpo policlonal CD14 anti-humano (procedente de cabra; Upstate, D.B.A., Italia), diluido 1:500 en PBS-BSA al 1%.

Tras incubación durante la noche, la membrana se lavó con PBS- Tween al 0,1% y se sometió durante 1 h al anticuerpo de IgG anti-cabra conjugado con peroxidasa (procedente de ratón; Amersham International), diluido 1:1000 en PBS-Tween con bloqueante de leche desnatada seca al 5% (Bio-Rad, AC). La membrana de PVDF se lavó de Nuevo con PBS-Tween y las proteínas se detectaron mediante quimioluminiscencia potenciada (Amersham International).

Se usaron patrones de peso molecular en todos los genes, y la densidad de las bandas de proteína se cuantificó con un densitómetro Gel-Doc (Bio-Rad).

La fig. 1 ilustra la expresión de la CD14 soluble en saliva completa humana, según se determina mediante las pruebas experimentales anteriormente ilustradas: A es el análisis por transferencia Western de muestras de saliva obtenidas de los 20 sujetos LC (muestras 1 a 20) y de los 20 sujetos AC (muestras 21 a 40); B ilustra la cuantificación densitométrica de las bandas obtenidas de los sujetos 1-20.

Se puede observar que el análisis por inmunotransferencia muestra la presencia de la forma soluble de 55 kDa de CD14 en todos los sujetos LC y su ausencia en todos los sujetos AC.

Según la invención, la ausencia de CD14s en un análisis por transferencia Western se puede considerar como un marcador de la predisposición del individuo sometido a examen a desarrollar caries dental o como marcador de diagnóstico de una caries progresiva; además, la determinación de una expresión reducida de CD14s en muestras salivares en comparación con un valor umbral predeterminado en sujetos libres de caries, se debe considerar como predictivo del desarrollo de caries dental o como marcador diagnóstico de caries progresiva.

Con este fin, el análisis cuantitativo de CD14s se lleva a cabo preferiblemente mediante ensayo ELISA. La determinación del valor umbral se lleva a cabo preferiblemente mediante análisis estadístico de sujetos LC sanos, preferiblemente emparejados por edad con el individuo sometido a análisis. En concreto, la predictividad de la prueba debe considerarse como particularmente elevada cuando el valor de la expresión de la CD14s salivar es un 20% inferior al del valor umbral predeterminado.

El inicio de caries en la infancia y juventud es fuertemente sugestivo de la implicación de factores genéticos de predisposición a un deterioro rápido de la dentadura. Puesto que se han asociado varios polimorfismos en la región que flanquea 5' del gen CD14 con niveles mayores de CD14s en suero (Baldini y col., 1999; Vercelli y col., 2001), se espera que la reducción en la expresión salivar de CD14s en pacientes jóvenes con caries múltiples se pueda relacionar con un polimorfismo específico del gen.

A este respecto, los polimorfismos de CD14s se pueden estudiar con la técnica RFLP-PCR, que permite detectar cada nucleótido mutado individual, basándose en el análisis de diferentes modelos electroforéticos obtenidos a partir del fragmento resultante de la escisión mediante enzimas de restricción específicas del ADN anteriormente amplificado mediante PCR.

De esta manera, la investigación como polimorfismo específico del gen que codifica CD14 como marcador de la susceptibilidad genética al desarrollo de caries queda dentro del alcance de la presente invención.

Referencias

• Baldini M, Lohman IC, Halonen M, Erickson RP, Holt PG, Martínez FD (1999). A polymorphism in the 5' flanking region of the CD14 gene is associated with circulating soluble CD14 levels and with total serum immunoglobulin E. *Am J Resp Cell Mol Biol* 20:976-983.

• **Balekjian AY, Meyer TS, Montague ME, Longton RW (1976).** Electrophoretic patterns of parotid fluid from caries-resistant and caries-susceptible individuals. *J Dent Res* 54:850-856.

• **Banderas-Tarabay JA, Zacarias-D'Oleire IG, Garduno-Estrada R, Aceves-Luna E, Gonzalez-Begne M (2002).** Electrophoretic analysis of whole saliva and prevalence of dental caries. A study in Mexican dental students. *Arch Med Res* 33:499-505.

• **Baveye S, Ellass E, Fernig DG, Blanquart C, Mazurier J, Legrand D (2000).** Human lactoferrin interacts with soluble CD14 and inhibits expression of endothelial adhesion molecules, E-selectin and ICAM-I7 induced by the CD14-lipopolysaccharide complex. *Infect Immun* 68:6519- 6525.

• **Caccavo D, Pellegrino NM, Altamura M, Rigon A, Amati L, Amoroso A, y col. (2002).** Antimicrobial and immunoregulatory functions of lactoferrin and its potential therapeutic application. *J Endotoxin Res* 8:403- 417.

• **Dodds MW, Johnson DA, Mobley CC, Hattaway KM (1997).** Parotid saliva protein profiles in caries-free and caries-active adults. *Oral Surg Oral Med Oral Pathol* 83:244-251.

• **Featherstone JDB (2004).** The continuum of dental caries. Evidence for a dynamic disease process . *J Dent Res* 83:C39-C42.

• **Frey EA, Miller DS, Jahr TG, Sundan A, Bazil V, Espevik T, y col. (1992).** Soluble CD14 participates in the response of cells to lipopolysaccharide. *J Exp Med* 176:1665-1671.

• **Ghafouri B, Tagesson C, Lindahl M (2003).** Mapping of proteins in human saliva using two-dimensional gel electrophoresis and peptide mass fingerprinting. *Proteomics* 3:1003-1015.

• **Guha M, Mackman N (2001).** LPS induction of gene expression in human monocytes. *Cell Signal* 13:85-94.

• **Humphrey SP, Williamson RT (2001).** A review of saliva: normal composition, flow, and function . *J Prosthet Dent* 85:162-169.

• **Lenander-Lumikari M, Loimaranta V (2000).** Saliva and dental caries. *Adv Dent Res* 14:40-47.

• **Lien E, Ingalls RR (2002).** Toll-like receptors. *Crit Care Med* 30:S1-S11.

• **Nieuw Amerongen AV, Bolscher JG, Veerman EC (2004).** Salivary proteins: protective and diagnostic value in cariology? *Caries Res* 38:247-253.

• **Rudney JD (2000)** Saliva and dental plaque. *Adv Dent Res* 14:29-39.

• **Schutt C, Schilling T, Grunwald U, Schonfeld W, Kruger C. (1992).** Endotoxin-neutralizing capacity of soluble CD14. *Res Immunol* 143:71-78.

• **Sugawara S, Uehara A, Tamai R, Takada H (2002).** Innate immune responses in oral mucosa. *J Endotoxin Res* 8:465- 468.

• **Takayama A, Satoh A, Ngai T, Nishimura T, Ikawa K, Matsuyama T, y col. (2003).** Augmentation of *Actinobacillus actinomycetemcomitans* invasion of human oral epithelial cells and up-regulation of interleucina-8 production by saliva CD14. *Infect Immun* 71:5598-5604.

• **Uehara A, Sugawara S, Watanabe K, Echigo S, Sato M, Yamaguchi T, y col. (2003).** Constitutive expression of a bacterial pattern recognition receptor, CD14, in human salivary glands and secretion as a soluble form in saliva. *Clin Diagn Lab Immunol* 10:286-292.

• **Uehara A, Sugawara S, Tamai R, Takada H (2001).** Contrasting responses of human gingival and colonic epithelial cells to lipopolysaccharide, lipoteichoic acids and peptidoglycanos in the presence of soluble CD14. *Med Microbiol Immunol* 189:185-192.

• **Vercelli D, Baldini M, Stern D, Lohman IC, Halonen M, Martinez F (2001).** CD14: a bridge between innate immunity and adaptive IgE responses. *J Endotoxin Res* 7:45-48.

REIVINDICACIONES

5 1. Un procedimiento de ensayo para determinar la predisposición de un individuo para desarrollar caries dental o para el diagnóstico de caries progresiva, **caracterizado** porque comprende la etapa de examinar una muestra salivar del individuo para determinar la presencia de la proteína salivar soluble CD14, en el que la ausencia de dicha proteína en dicha muestra, o su presencia en una cantidad reducida comparada con un valor umbral predeterminado en individuos libres de caries, es indicativa de dicha predisposición de la presencia de una caries progresiva.

10 2. El procedimiento de ensayo según la reivindicación 1, **caracterizado** porque el examen de dicha muestra se lleva a cabo mediante la técnica de transferencia Western.

15 3. El procedimiento de ensayo según la reivindicación 1, **caracterizado** porque el examen de la muestra salivar se lleva a cabo mediante la técnica ELISA para obtener la determinación cuantitativa de la expresión de la CD14s soluble en dicha muestra, y en el que dicha determinación cuantitativa se compara con un valor cuantitativo predeterminado para la expresión de CD14s en muestras salivares de individuos libres de caries.

20 4. El procedimiento de ensayo según la reivindicación 3, **caracterizado** porque la predisposición del individuo a desarrollar caries o la existencia de lesiones de caries progresivas se determina como positivo cuando el valor de la expresión de CD14s en la muestra salivar sometida a análisis es inferior en al menos un 20% de dicho valor predeterminado.

25

30

35

40

45

50

55

60

65

