

ФЕДЕРАЛЬНАЯ СЛУЖБА
ПО ИНТЕЛЛЕКТУАЛЬНОЙ СОБСТВЕННОСТИ

(12) ОПИСАНИЕ ИЗОБРЕТЕНИЯ К ПАТЕНТУ

(21)(22) Заявка: 2011144032/15, 01.04.2010

(24) Дата начала отсчета срока действия патента:
01.04.2010

Приоритет(ы):

(30) Конвенционный приоритет:
01.04.2009 US 61/165,674

(43) Дата публикации заявки: 10.05.2013 Бюл. № 13

(45) Опубликовано: 20.07.2014 Бюл. № 20

(56) Список документов, цитированных в отчете о поиске: EJEIL AL et.al. Expression of matrix metalloproteinases (MMPs) and tissue inhibitors of metalloproteinases (TIMPs) in healthy and diseased human gingival. // J Periodontol. " 2003 Feb " V. 74(2) " P.188-195. GAMONAL J. et.al. Apoptosis in chronic adult periodontitis analyzed by in situ DNA breaks, electron microscopy, and immunohistochemistry. // (см. прод.)

(85) Дата начала рассмотрения заявки РСТ на национальной фазе: 01.11.2011

(86) Заявка РСТ:
US 2010/029674 (01.04.2010)(87) Публикация заявки РСТ:
WO 2010/115034 (07.10.2010)Адрес для переписки:
129090, Москва, ул. Б. Спасская, 25, строение 3,
ООО "Юридическая фирма Городисский и
Партнеры"

(72) Автор(ы):

ТРИВЕДИ Харш М. (US),
СЮЙ Tao (US),
ЯН Ин (US)(73) Патентообладатель(и):
КОЛГЕЙТ-ПАЛМОЛИВ КОМПАНИ (US)C 2
3 3
8 3
3 2
2 5 2
U
RR U
2 5 2 3 3 8 3

C 2

(54) ПРОТЕИНОВЫЕ БИОМАРКЕРЫ ДЛЯ ДИАГНОСТИКИ ЗАБОЛЕВАНИЯ МЯГКИХ ТКАНЕЙ И В КАЧЕСТВЕ ТЕРАПЕВТИЧЕСКИХ МИШЕНЕЙ ДЛЯ ВМЕШАТЕЛЬСТВА В ГИГИЕНУ ПОЛОСТИ РТА

(57) Реферат:

Изобретение относится к фармацевтике и представляет собой способ идентификации соединения, пригодного для лечения заболевания пародонта, включающий: получение первого гингивального образца у млекопитающего, страдающего от заболевания или состояния

ротовой полости; получение второго гингивального образца из ротовой полости млекопитающего; взаимодействие первого образца с исследуемым соединением; взаимодействие второго образца с положительным контролем - соединением,

RU 2 5 2 3 3 8 3 C 2

известным для подавления экспрессии одного или более биомаркеров, выбранных из группы, состоящей из DEFB4, CTSS, BGN, BF и IL-12A (галогенированный дифениловый эфир); измерение степени, с которой экспрессия одного или более биомаркеров подавляется с помощью исследуемого соединения; измерение степени, с которой экспрессия одного или более из биомаркеров подавляется с помощью положительного контроля; и сравнение степени, с которой экспрессия одного или более из

биомаркеров подавляется с помощью исследуемого соединения, со степенью, с которой экспрессия одного или более из биомаркеров подавляется с помощью положительного контроля; в котором исследуемое соединение, которое подавляет экспрессию одного или более из биомаркеров в равной или большей степени, чем вышеуказанный положительный контроль, является соединением, пригодным для лечения пародонта. 3 з.п. ф-лы, 4 пр., 2 табл., 1 ил.

(56) (продолжение):

Periodontol. 2001 Apr. " V.72(4) " P.517-525 . BODET C. et.al. Modulation of cytokine production by Porphyromonas gingivalis in a macrophage and epithelial cell co-culture model. // Microbes Infect. 2005 Mar " V.7(3) " P.448-456. WO 2005/107464 A2, 17.11.2005. OKSALA O. et.al. Expression of heparan sulphate and small dermatan/chondroitin sulphate proteoglycans in chronically inflamed human periodontium. // J Dent Res. 1997 Jun " V.76(6) " P.1250-1259. WADDINGTON RJ et.al. Immunoochemical detection of the proteoglycans decorin and biglycan in human gingival crevicular fluid from sites of advanced periodontitis. // Arch Oral Biol. 1998 Apr " V.43(4) " P.287-295. VARDAR-SENGUL S et.al. Human beta defensin-1 and -2 expression in the gingiva of patients with specific periodontal diseases. // J Periodontal Res. 2007 Oct " V.42(5) " P.429-437. THOMAS BEIKLER et.al. Gene expression in periodontal tissues following treatment. // BMC Med Genomics. 2008 - V.1(30) " P.1-9. БЕРЗЕГОВА Л.Ю. и др. Новый англо-русский словарь для стоматологов: учебное пособие. " М.: ГЭОТАР " Медиа, 2009. " 400 с. Н.Ф.ДАНИЛЕВСКИЙ и др. Заболевания пародонта. " Киев: Здоровье, 2000. " 464 с

R U 2 5 2 3 3 8 3 C 2

FEDERAL SERVICE
FOR INTELLECTUAL PROPERTY

(12) ABSTRACT OF INVENTION

(21)(22) Application: 2011144032/15, 01.04.2010

(24) Effective date for property rights:
01.04.2010

Priority:

(30) Convention priority:
01.04.2009 US 61/165,674

(43) Application published: 10.05.2013 Bull. № 13

(45) Date of publication: 20.07.2014 Bull. № 20

(85) Commencement of national phase: 01.11.2011

(86) PCT application:
US 2010/029674 (01.04.2010)(87) PCT publication:
WO 2010/115034 (07.10.2010)Mail address:
129090, Moskva, ul. B. Spasskaja, 25, stroenie 3,
OOO "Juridicheskaja firma Gorodisskij Partnery"(72) Inventor(s):
TRIVEDI Kharsh M. (US),
SJUJ Tao (US),
JaN In (US)(73) Proprietor(s):
KOLGEJT-PALMOLIV KOMPANI (US)C 2
3 8
3 3 2
2 5 2 3 3 8
R UR
U
2 5 2 3 3 8 3
C 2

(54) PROTEIN BIOMARKERS FOR DIAGNOSING SOFT TISSUE DISEASES AND AS THERAPEUTIC TARGETS FOR ORAL HYGIENE INTERVENTION

(57) Abstract:

FIELD: medicine, pharmaceutics.

SUBSTANCE: invention refers to pharmaceutics and represents a method for identifying a compound applicable for treating periodontal diseases, involving: preparing the first gingival sample from a mammal suffering from an oral disease or condition; preparing the second gingival sample from the mammalian oral cavity; conducting a reaction of the first sample and the analysed compound; conducting a reaction of the second sample and a positive reference that is a compound known as inhibiting an expression of one or more biomarkers specified in a group consisting of DEFB4, CTSS, BGN, BF and IL-12A (halogenated diphenyl ester); measuring a degree of inhibiting the expression

of one or more biomarkers by the analysed compound; measuring a degree of inhibiting the expression of one or more biomarkers by the positive reference; and comparing the degree of inhibiting the expression of one or more biomarkers by the analysed compound to the degree of inhibiting the expression of one or more biomarkers by the positive reference; wherein the analysed compound which inhibits the expression of one or more biomarkers equally or more than the above positive reference, is a compound applicable for treating periodontitis.

EFFECT: developing the method for identifying the compound applicable for treating a periodontal disease.

4 cl, 4 ex, 2 tbl, 1 dwg

УРОВЕНЬ ТЕХНИКИ

Заболевание пародонта характеризуется, частично, неправильной и чрезмерной деградацией пародонтального органического матрикса. Этот матрикс включает десну, пародонтальную связку, цементное вещество зубов и альвеолярную кость. Эти явления 5 приводят к клиническому проявлению пародонтита, включая атрофию десен, образование патологического десневого кармана, потерю прикрепления и возможную потерю зуба. Множество различных воспалительных медиаторов производится пародонтальными тканями, поврежденными заболеванием пародонта. Некоторые из 10 этих медиаторов, вероятно, играют центральную роль в разрушительных процессах, наблюдаемых в случаях заболеваний пародонта, которые заставили некоторых исследователей изучить возможность использования определенных воспалительных медиаторов в качестве биомаркеров для прогрессирующих поражений (Sorsa, T. et al. Arch. Oral. Biol. 35: 193S-196S, 1990; Page, R.C., J. Periodont. Res. 26: 230-242, 1991).

СУЩНОСТЬ ИЗОБРЕТЕНИЯ

15 Изобретение включает способ диагностики заболевания пародонта у млекопитающего, включающий: получение гингивального образца и/или образца слюны у млекопитающего, детектирование присутствия биомаркера в гингивальном образце, детектирование уровня биомаркера в образце и диагностику организма с заболеванием пародонта, основываясь на уровне детектированного биомаркера.

20 Биомаркер представляет собой, по меньшей мере, один член, выбранный из группы, состоящей из FAS, IL-1B, IL-8, MMP-9, DEFB4, CTSS, IL-17B, CARD10, BGN, BE, IL-12A, IL-6, LCN8, LPO и MMP-13.

25 Изобретение также включает способ диагностики заболевания пародонта у млекопитающего, включающий получение гингивального образца и/или образца слюны у млекопитающего, детектирование присутствия биомаркера в образце, детектирование уровня биомаркера в образце, сравнение уровня биомаркера в образце с предварительно определенным справочным значением, коррелирующим уровень биомаркера с 30 заболеванием пародонта, и диагностику млекопитающего с заболеванием пародонта, когда уровень биомаркера в образце соответствует уровню биомаркера, где справочное значение коррелируется с заболеванием пародонта.

35 Изобретение также включает способ диагностики заболевания пародонта у млекопитающего, включающий получение гингивального образца и/или образца слюны у млекопитающего, детектирование присутствия биомаркера в образце, детектирование уровня биомаркера в образце, сравнение уровня биомаркера в образце с уровнем того же биомаркера в контрольном образце, в котором у млекопитающего диагностировано 40 заболевание пародонта, когда измененный уровень биомаркера детектирован в образце относительно контрольного образца.

В одном аспекте уровень биомаркера выше в образце относительно контрольного образца.

45 Изобретение включает набор биомаркеров для детектирования заболевания пародонта у млекопитающего, содержащий два или более биомаркеров, выбранных из группы, состоящей из FAS, IL-1B, IL-8, MMP-9, DEFB4, CTSS, IL-17B, CARD10, BGN, BE, IL-12A, IL-6, LCN8, LPO и MMP-13, в котором биомаркеры получены из гингивального образца и/или образца слюны млекопитающего, у которого диагностировано заболевание пародонта.

Изобретение дополнительно включает способ контролирования заболевания пародонта у млекопитающего, включающий получение первого гингивального образца и/или образца слюны у млекопитающего в первый момент времени, получение второго

гингивального образца и/или образца слюны у млекопитающего во второй момент времени, детектирование присутствия, по меньшей мере, одного биомаркера в первом и втором образцах, детектирование уровня, по меньшей мере, одного биомаркера в первом и втором образцах и сравнение уровня биомаркера в первом и втором образцах, 5 в котором снижение уровня биомаркера во втором образце относительно первого образца указывает на уменьшение заболевания пародонта у млекопитающего.

Изобретение включает способ лечения заболевания пародонта у млекопитающего, включающий взаимодействие клетки с агентом, который подавляет, по меньшей мере, один биомаркер, выбранный из группы, состоящей из FAS, IL-1B, IL-8, MMP-9, DEFB4, 10 CTSS, IL-17B, CARD10, BGN, BE, IL-12A, IL-6, LCN8, LPO и MMP-13, в котором подавление биомаркера(ов) коррелируется с сокращением, по меньшей мере, одного симптома, связанного с заболеванием пародонта.

Изобретение также включает способ идентификации соединения, пригодного для лечения заболевания пародонта у млекопитающего, способ, включающий

15 взаимодействие клетки с исследуемым соединением и определение, подавляет ли исследуемое соединение, по меньшей мере, один биомаркер, выбранный из группы, состоящей из FAS, IL-1B, IL-8, MMP-9, DEFB4, CTSS, IL-17B, CARD10, BGN, BE, IL-12A, IL-6, LCN8, LPO и MMP-13, в котором подавление биомаркера(ов) является показателем, что исследуемое соединение является пригодным для лечения заболевания пародонта.

20 Изобретение дополнительно включает способ диагностики гингивита у млекопитающего, включающий получение гингивального образца и/или образца слюны у млекопитающего, детектирование присутствия биомаркера в образце, детектирование уровня биомаркера в образце, диагностику организма с гингивитом, основываясь на уровне детектированного биомаркера.

25 Изобретение также включает способ диагностики гингивита у млекопитающего, включающий получение гингивального образца и/или образца слюны у млекопитающего, детектирование присутствия биомаркера в образце, детектирование уровня биомаркера в образце, сравнение уровня биомаркера в образце с предварительно определенным справочным значением, коррелирующим уровень биомаркера с гингивитом, и

30 диагностику млекопитающего с гингивитом, когда уровень биомаркера в образце соответствует уровню биомаркера, где справочное значение коррелируется с гингивитом.

Изобретение также включает способ диагностики гингивита у млекопитающего, включающий получение гингивального образца и/или образца слюны у млекопитающего, детектирование присутствия биомаркера в образце, детектирование уровня биомаркера 35 в образце и сравнение уровня биомаркера в образце с уровнем того же биомаркера в контрольном образце, в котором у млекопитающего диагностирован гингивит, когда увеличенный уровень биомаркера детектирован в гингивальном и/или образце слюны относительно контрольного образца.

Изобретение включает способ контролирования гингивита у млекопитающего, 40 включающий получение первого гингивального образца и/или образца слюны у млекопитающего в первый момент времени, получение второго гингивального образца и/или образца слюны у млекопитающего во второй момент времени, детектирование присутствия, по меньшей мере, одного биомаркера в первом и втором образцах, детектирование уровня, по меньшей мере, одного биомаркера в первом и втором 45 образцах и сравнение уровня биомаркера в первом и втором образцах, в котором снижение уровня биомаркера во втором образце относительно первого образца указывает на уменьшение гингивита у млекопитающего.

Изобретение также включает способ лечения гингивита у млекопитающего,

включающий взаимодействие клетки с агентом, который подавляет, по меньшей мере, один биомаркер, выбранный из группы, состоящей из FAS, IL-1B, IL-8, MMP-9, DEFB4, CTSS, IL-17 B, CARD10, BGN, BE, IL-12A, IL-6, LCN8, LPO и MMP-13, в котором подавление, по меньшей мере, одного биомаркера коррелируется с сокращением, по меньшей мере, одного симптома, связанного с гингивитом. В одном аспекте уровень биомаркера возвращается к уровню, принятому в качестве нормального. В другом аспекте уровень биомаркер возвращается к исходному уровню.

Изобретение дополнительно включает способ идентификации соединения, пригодного для лечения гингивита у млекопитающего, способ, включающий взаимодействие клетки с исследуемым соединением и определение, подавляет ли исследуемое соединение, по меньшей мере, один биомаркер, выбранный из группы, состоящей из FAS, IL-1B, IL-8, MMP-9, DEFB4, CTSS, IL-17B, CARD10, BGN, BE, IL-12A, IL-6, LCN8, LPO и MMP-13, в котором подавление, по меньшей мере, одного биомаркера является показателем, что исследуемое соединение является пригодным для лечения гингивита.

15 КРАТКОЕ ОПИСАНИЕ ЧЕРТЕЖЕЙ

Фигура 1 иллюстрирует эффект 2,4,4'-трихлор-2'-гидроксидифенилового эфира на TNF α -индукцированную MMP-9 выработку моноцитов.

ПОДРОБНОЕ ОПИСАНИЕ ИЗОБРЕТЕНИЯ

В данной области техники необходимы диагностические и/или прогностические

20 тесты для уровней биомаркеров, включая биомаркеры, уровень которых повышается в состоянии заболевания пародонта. Такие биомаркеры включают FAS, IL-1B, IL-8, MMP-9, DEFB4, CTSS, IL-17B, CARD10, BGN, BE, IL-12A, IL-6, LCN8, LPO и MMP-13. В данной области техники также необходимы диагностические и/или прогностические тесты для заболевания пародонта, которые оценили бы уровень воспалительных 25 медиаторов в гингивальном образце, таком как гингивальная десневая жидкость (GCF) или образец слюны. Дополнительно необходимы методы лечения заболевания пародонта у пациентов, нуждающихся в таком лечении, включающие ингибирование повышенных уровней одного или более из FAS, IL-1B, IL-8, MMP-9, DEFB4, CTSS, IL-17B, CARD10, BGN, BE, IL-12A, IL-6, LCN8, LPO и MMP-13.

30 Например, матриксная металлопротеиназа 13 (MMP-13; также известная как CLG3) представляет собой главную разрушительную коллагеназу при пародонтите и заболевании пародонта. MMP-13 может быть найдена в пораженной пародонтальной ткани и гингивальной десневой жидкости, так же как в слюне. Уровень этого фермента положительно коррелируется с клиническими показателями пародонтита. Таким 35 образом, повышенные или «выше нормального» уровни MMP-13 являются показателем заболевания пародонта. Измерение можно провести, используя ферменты MMP-13, РНК, или биологической активности. Ингибирование активности и/или присутствия MMP-13 является полезным для лечения заболевания пародонта.

Следующие биомаркеры заболевания пародонта, изложенные в настоящем описании, 40 можно также детектировать и/или измерить уровни, используя соответствующие ферменты, протеины, РНК или биологическую активность. Повышенные или «выше нормального» уровни следующих биомаркеров или одного, или в соединении с одним или более из других, также являются показателем заболевания пародонта. В отношении MMP-13 ингибирование активности и/или присутствия MMP-13 является полезным для 45 лечения заболевания пародонта:

FAS (также известный как ALPS1A и APO-1) вовлечен в апоптоз и образует «DISC» сигнальный комплекс, индуцирующий смерть, после связывания лиганда.

Интерлейкин 1-бета (IL-1B) представляет собой воспалительный цитокин,

вовлеченный в иммунный ответ млекопитающего в отношении инфекции.

Интерлейкин 8 (IL-8; также известный как 3-10C и AMCF-1) представляет собой член семейства С-Х-С хемокинов и вовлечен в индукцию хемотаксиса целевых нейтрофильных гранулоцитов в рамках врожденного иммунного ответа.

5 Матриксная металлопротеиназа 9 (MMP-9; также известная как GELB и CLG4B) представляет собой желатиназу, которая также является главной разрушительной матриксной металлопротеиназой при заболевании пародонта.

10 Бета-дефензин-4 (DEFB4; также известный как BETA2 и DEFB-2) представляет собой дефензин. DEFB4 представляет собой антибиотический пептид, регулируемый локально при воспалении.

Катепсин S (CTSS; также известный как MGC3886) член семейства пептидаз С1 представляет собой цистеиновую протеазу, которая играет роль в презентировании аллергенных протеинов/пептидов молекулам класса МНСII.

15 Интерлейкин 17В (IL-17В; также известный как IL-20) представляет собой IL-17- связанный цитокин. IL-17В стимулирует выработку IL-1В и TNF-альфа из моноцитов.

Член семейства домена активации и рекрутирования каспазы 10 (CARD10; также известный как BIMP1 и CARMA3) вовлечен в активацию апоптоза. CARD10 также активизирует NF-кappa-В и принадлежит к семейству мембраноассоциированных гуанилаткиназ.

20 Бигликан (BGN; также известный как DSPG1 и PG-S1) представляет собой матриксный протеогликан, содержащий две присоединенные цепи гликозаминогликана, и относится к декорину. Полагают, что он связывается с фибриллами коллагена и переносит бета-фактор роста.

25 В-фактор, пропердин (BF; также известный как CFAB и GBG) представляет собой компонент альтернативного пути активации комплемента. Активная субъединица представляет собой серинпротеазу, которая вовлечена в пролиферацию предварительно активированных В-лимфоцитов.

30 Интерлейкин 12А (IL-12A; также известный как CLMF) представляет собой цитокин, который действует на Т-клетки и естественные клетки-киллеры и вовлечен в дифференциацию как Th1, так и Th2 клеток, так же как Т-клеточную-независимую индукцию интерферона гамма.

35 Интерлейкин 6 (IL-6; также известный как BSF2 и HGF) представляет собой иммунорегуляторный цитокин, который активирует сигнальный комплекс на поверхности клетки. Он действует и как про-, и как противовоспалительный цитокин, и стимулирует иммунный ответ на травму, включая ответ на чужеродные патогенные факторы.

Липокалин 8 (LCN8) принадлежит к семейству протеинов, вовлеченных в процессы воспаления и детоксикации, осуществляемые с помощью активации иммунной системы у млекопитающих.

40 Лактопероксидаза (LPO; также известная как SPO) представляет собой антиокислительный фермент, вовлеченный в защиту хозяина в отношении инфекции.

45 Во всей заявке используется, что диапазоны применяют в качестве условного обозначения для описания всех без исключения величин, которые находятся в пределах диапазона. Любая величина в пределах диапазона может быть выбрана как конец диапазона. Кроме того, все ссылки, процитированные в настоящем описании, включены в настоящее описание в полном объеме посредством ссылки. В случае противоречия в определениях в настоящем раскрытии и определениях в процитированной ссылке, настоящее раскрытие имеет преимущественную силу.

Используемый в настоящем описании термин «заболевание пародонта» охватывает пародонтит, гингивит и заболевание десен.

Используемый в настоящем описании термин «гингивит» означает воспаление гингивальных тканей, состояние, при котором воспаление локализуется в пределах

5 десны и не происходит никакого повреждения в кости и пародонтальной связке.

Используемый в настоящем описании термин «пародонтит» относится к неправильному и чрезмерному разрушению пародонтального органического матрикса, включая десну, пародонтальную связку, цементное вещество зубов и альвеолярную кость. Клиническое проявление пародонтита включает, но не ограничивается ими,

10 атрофию десен, образование патологического десневого кармана, потерю прикрепления матрикса, потерю зуба и костной массы. Пародонтит может быть охарактеризован как начальный пародонтит, умеренный пародонтит или осложненный пародонтит. Однако пародонтит не должен быть ограничен только теми симптомами и

осложнениями, изложенными в настоящем описании, как будет очевидно специалисту 15 в данной области техники. Начальный пародонтит клинически проявляется, среди других симптомов, одним или более из: кровотечение при зондировании; присутствие карманов (3-4 мм); локализованные области рецессии мягких тканей; потеря прикрепления (3-4 мм); потеря костной массы (например, горизонтальная); и класс I инвазии зоны разделения корней многокорневых зубов. Умеренный пародонтит

20 клинически проявляется, среди других симптомов, одним или более из: присутствие карманов (4-6 мм); присутствие потери прикрепления (4-6 мм); кровотечение при зондировании; степень I и/или степень II инвазии зоны разделения корней многокорневых зубов; класс I подвижности зуба; потеря костной массы (например, горизонтальная и/или вертикальная); и потеря 1/3 поддерживающей альвеолярной кости (то есть,

25 отношение коронки к корню 1:1). Осложненный пародонтит клинически проявляется одним или более из: кровотечение при зондировании; присутствие карманов (более чем 6 мм); потеря прикрепления (более чем 6 мм); степень II и/или степень III инвазии зоны разделения корней многокорневых зубов; класс II и/или класс III подвижности зуба; потеря костной массы (например, горизонтальная и/или вертикальная); и потеря более 30 1/3 поддерживающей альвеолярной кости (то есть, отношение коронки к корню 2:1 или более). Пародонтит делится на формы, включая, но не ограничиваясь ими, пародонтит взрослых (например, связанный с налетом); ранний пародонтит (например, препубертатный, ювенильный, быстро развивающийся и подобные); пародонтит, связанный с системными заболеваниями; некротический язвенный пародонтит;

35 устойчивый пародонтит; периимплантит и подобные.

Используемый в настоящем описании термин «лечение» относится к обнаруживаемому улучшению неблагоприятного состояния и/или сокращению симптомов состояния после взаимодействия млекопитающего с пероральной композицией изобретения и/или согласно способу изобретения.

40 Следует понимать, что термин «лечение пародонтита» включает предотвращения пародонтита у млекопитающего, так же как ингибирование развития одного или более существующих ранее состояний, связанных с пародонтитом у млекопитающего.

Используемые в настоящем описании термины «ингибировать» и «ингибиование» 45 относятся к частичному ингибированию или полному ингибированию пародонтита по сравнению с состоянием без лечения, такого как терапевтическое лечение и/или профилактика результатов. Лечение пародонтита согласно изобретению, следовательно, включает сокращение, ингибирование, улучшение, уменьшение, снижение, прекращение или устранение одного или более симптомов и/или осложнений, изложенных в настоящем

описании.

Используемый в настоящем описании «патологический избыток» относится к активности выше принятого нормального уровня. Например, «патологический избыток» активности матриксной металлопротеиназы представляет собой уровень активности 5 матриксной металлопротеиназы, который является выше уровня, обычно обнаруживаемого при здоровом состоянии. Используемый в настоящем описании «патологический избыток активности матриксной металлопротеиназы» является уровнем активности матриксной металлопротеиназы, связанным с пародонтитом.

Используемый в настоящем описании термин «исходный уровень» относится к

10 уровню агента (например, биомаркера), который существует у субъекта до нежелательного явления, или к уровню, который существовал бы после терапевтического лечения. «Исходный уровень» биомаркера, например, может быть уровнем рассматриваемого биомаркера, который отражает «нормальное» или «здравое» состояние субъекта. Альтернативно, «исходный уровень» биомаркера может отражать 15 уровень биомаркера, который существует до начала заболевания пародонта, при котором уровень биомаркера был уже поднят выше «нормального» или «здравого» уровня до начала заболевания пародонта, вследствие состояния, возможно не связанного с заболеванием пародонта. Во втором примере лечение субъекта для возвращения уровня биомаркера назад к «исходному уровню» может отражать «лечение 20 пародонтиза», несмотря на то, что исходный уровень в этом примере поднят выше принятого «здравого» уровня.

Используемый в настоящем описании термин «подавление» относится к сокращению ферментативной активности, сокращению уровня ферментативной активности, сокращению уровня протеина и/или нуклеиновой кислоты, кодирующей такой протеин, 25 или сокращению биохимического эффекта присутствия протеина, такого как один или более из MMP-8, MMP-9 и MMP-13.

Используемый в настоящем описании термин «гингивальный образец» относится к тканям, клеткам, жидкостям, полученным из, при или около десны.

Используемая в настоящем описании «гингивальная десневая жидкость» и «GCF»

30 относится к транссудату плазмы крови, собирающемуся в зубодесневом кармане, полученному с помощью просачивания из капилляров в свободной десне.

Используемый в настоящем описании термин «диагностирование» относится к определению или детектированию присутствия определенного заболевания, нарушения, медицинского состояния или риска.

35 Используемый в настоящем описании термин «состояние начального гингивита» относится к состоянию, которое не полностью подразумевает гингивит, но представляет собой любое состояние кроме «нормального», имеющее тенденцию к гингивиту, и состояние, из которого гингивит мог бы развиться, если оставить без надлежащего внимания.

40 Используемый в настоящем описании термин «детектирующий реагент» относится к биологическому или химическому объекту. «Детектирующий агент» может быть дополнительным реагентом, добавленным к композиции, или он может быть исходным компонентом композиции, которая действует как детектирующий агент (например, визуальные методы для антител FRET).

45 Некоторые варианты осуществления настоящего изобретения обеспечивают способы идентификации соединения, пригодного для лечения заболевания или состояния ротовой полости, способ, включающий получение первого гингивального образца от млекопитающего, страдающего от заболевания или состояния ротовой полости;

получение второго гингивального образца из ротовой полости вышеуказанного млекопитающего; взаимодействие вышеуказанного первого образца с исследуемым соединением; взаимодействие вышеуказанного второго образца с положительным контролем, в котором вышеуказанный положительный контроль представляет собой

5 соединение, известное для подавления экспрессии одного или более биомаркеров; измерение степени, с которой экспрессия одного или более из вышеуказанных биомаркеров подавляется с помощью вышеуказанного исследуемого соединения; измерение степени, с которой экспрессия одного или более из вышеуказанных биомаркеров подавляется с помощью вышеуказанного положительного контроля; и

10 сравнение степени, с которой экспрессия одного или более из вышеуказанных биомаркеров подавляется с помощью вышеуказанного исследуемого соединения, со степенью, с которой экспрессия одного или более из вышеуказанных биомаркеров подавляется с помощью вышеуказанного положительного контроля; в котором исследуемое соединение, которое подавляет экспрессию одного или более из

15 вышеуказанных биомаркеров в равной или большей степени, чем вышеуказанный положительный контроль, является соединением, пригодным для лечения заболевания или состояния ротовой полости.

В некоторых вариантах осуществления один или более биомаркеров выбраны из группы, состоящей из FAS, IL-1B, IL-8, MMP-9, DEFB4, CTSS, IL-17B, CARD10, BGN, BE, IL-12A, IL-6, LCN8, LPO и MMP-13. В дополнительных вариантах осуществления положительный контроль подавляет экспрессию FAS, IL-1B, IL-8, MMP-9, DEFB4, CTSS, IL-17B, CARD10, BGN, BE, IL-12A, IL-6, LCN8, LPO и MMP-13.

В некоторых вариантах осуществления заболевания или состояние ротовой полости представляет собой гингивит или пародонтит.

25 В некоторых вариантах осуществления положительный контроль представляет собой галогенированный дифениловый эфир. В других вариантах осуществления положительный контроль представляет собой триклозан.

В еще других вариантах осуществления обеспечивают способы, в которых исследуемое соединение подавляет экспрессию одного или более из вышеуказанных биомаркеров в большей степени, чем вышеуказанный положительный контроль. В некоторых вариантах осуществления исследуемое соединение подавляет экспрессию FAS, IL-1B, IL-8, MMP-9, DEFB4, CTSS, IL-17B, CARD10, BGN, BE, IL-12A, IL-6, LCN8, LPO и MMP-13 в большей степени, чем вышеуказанный положительный контроль. В дополнительных вариантах осуществления положительный контроль подавляет экспрессию MMP-9. В еще других вариантах осуществления положительный контроль подавляет экспрессию MMP-13.

В одном аспекте изобретение обеспечивает способ диагностики заболевания пародонта у млекопитающего, включающий получение гингивального образца у млекопитающего, детектирование присутствия биомаркера в гингивальном образце, 40 детектирование уровня биомаркера в гингивальном образце, диагностика организма с заболеванием пародонта, основываясь на уровне детектированного биомаркера. Биомаркер представляет собой, по меньшей мере, один член, выбранный из группы, состоящей из FAS, IL-1B, IL-8, MMP-9, DEFB4, CTSS, IL-17B, CARD10, BGN, BE, IL-12A, IL-6, LCN8, LPO и MMP-13. В одном варианте осуществления млекопитающее является

45 человеком.

Гингивальный образец можно получить с помощью любого способа, известного в настоящее время в данной области техники или который будет открыт. Таким образом, изобретение не ограничивается способом получения гингивального образца.

Посредством неограничивающего примера гингивальный образец можно достать с помощью получения образца ротовой ткани из ротовой полости. Гингивальные образцы, включающие гингивальные биопсии, являются доступными с помощью стандартных зубных методик. Ткани ротовой полости включают, но не ограничиваются ими, 5 фибробласты и эпителиальные клетки, полученные из ротовой полости, так же как образцы ткани и/или клеток, полученные из пародонта и десны.

Специалист в данной области техники поймет, как идентифицировать биомаркер в гингивальном образце, включая биомаркер, который связан с и/или секретирован с помощью гингивального образца. Характерный способ детектирования присутствия 10 биомаркера включает получение гингивального образца из ротовой полости исследуемого субъекта и взаимодействие образца с соединением или агентом, способным к детектированию одного или более биомаркеров (например, MMP-9 или MMP-13), описанных в настоящей заявке, например, биомаркерная нуклеиновая кислота (например, в том числе мРНК, геномная ДНК) или биомаркерный пептид (например, 15 в том числе фрагмент пептида или протеин), кодируемый биомаркерной нуклеиновой кислотой так, что присутствие биомаркерной нуклеиновой кислоты или биомаркерного пептида, кодируемого нуклеиновой кислотой, детектируют в биологическом образце. В одном варианте осуществления агент для детектирования биомаркерной мРНК или 20 биомаркерной геномной ДНК представляет собой меченный зонд нуклеиновой кислоты, способный к гибридизации с биомаркерной мРНК или геномной ДНК. Зонд нуклеиновой кислоты может быть, например, биомаркерной нуклеиновой кислотой по всей длине или ее частью. Другие подходящие зонды для применения в диагностических 25 исследованиях изобретения описаны в настоящей заявке.

В другом варианте осуществления агент для детектирования биомаркерного пептида 30 представляет собой антитело, способное к связыванию с биомаркерным пептидом, такое как антитело с определяемой меткой. Антитела могут быть поликлональными или моноклональными. Можно использовать интактное антитело или его фрагмент (например, Fab или F(ab')₂). Полагают, что термин «меченный» относительно зонда или 35 антитела охватывает прямое мечение зонда или антитела с помощью связывания (то есть, физического соединения) детектируемого вещества с зондом или антителом, так же как непрямое мечение зонда или антитела с помощью взаимодействия с другим реагентом, который непосредственно метят. Примеры непрямого мечения включают детектирование первичного антитела, используя флуоресцентно меченое вторичное 40 антитело и меченный на конце ДНК-зонд с биотином, так что он может быть детектирован флуоресцентно меченным стрептавидином.

Полагают, что используемый в настоящем описании термин «гингивальный образец» (так же как термин «биологический образец») включает ткани, клетки и биологические 45 жидкости, выделенные из ротовой полости субъекта, так же как ткани, клетки и жидкости, находящиеся в пределах ротовой полости субъекта. Образец слюны может содержать или не содержать некоторые или все компоненты как гингивальный. Таким образом, способ детектирования изобретения можно использовать для детектирования биомаркерной мРНК, пептида (например, протеина) или геномной ДНК в биологическом образце *in vitro* так же как *in vivo*. Посредством неограничивающего примера методы *in vitro* для детектирования биомаркерной мРНК включают Нозерн-гибридизации и гибридизации *in situ*. Методы *in vitro* для детектирования биомаркерного пептида включают твердофазный иммуноферментный анализ (ELISAs), вестерн-блоттинг, иммунопреципитацию и иммунофлуоресценцию. Методы *in vitro* для детектирования биомаркерной геномной ДНК включают Саузерн-гибридизации.

Методы *in vivo* для детектирования биомаркерного пептида включают введение в ротовую полость субъекта меченого анти-биомаркерного антитела. Например, антитело может быть мечено радиоактивным биомаркером, присутствие которого и местоположение у субъекта можно детектировать с помощью стандартных методов воспроизведения изображения.

Уровень биомаркера можно определить количественно, используя любой способ, известный в настоящее время в данной области техники или который будет открыт. Таким образом, изобретение не ограничивается способом для количественного определения биомаркера. Способы для количественного определения биомаркера могут включать способы, изложенные в другом месте в настоящем описании, для детектирования биомаркера, или соответствующую модификацию таких способов, как будет очевидно специалисту в данной области техники. В одном варианте осуществления используют анализ на основе ELISA для количественного определения биомаркера (например, использование PGE₂ для количественного определения IL-1B). В другом варианте осуществления используют метод проточной цитометрии для количественного определения биомаркера (например, технология LUMINEX, включая проточную цитометрию и лазерное детектирование).

В одном аспекте у млекопитающего диагностируют заболевание пародонта, когда уровень биомаркера, выбранного из группы, состоящей из FAS, IL-1B, IL-8, MMP-9, DEFB4, CTSS, IL-17B, CARD10, BGN, BE, IL-12A, IL-6, LCN8, LPO и MMP-13 поднят выше уровня, который рассматривают как «нормальный» в данной области техники. Следует понимать, что «нормальный» уровень любого данного биомаркера может быть сингулярным числом или он может фактически быть диапазоном концентраций биомаркера. «Нормальный» уровень биомаркера представляет собой уровень, который связан со здоровым состоянием, или состоянием, свободным или по существу свободным от заболевания пародонта. Такие значения и диапазоны могут быть известны в данной области техники или могут быть установлены специалистом в данной области техники, используя способы, известные в данной области, включая, но не ограничиваясь ими, проведение анализов детектирования биомаркера в гингивальных образцах, полученных от субъекта популяции млекопитающих, который, как известно, не имеет заболевания пародонта или, альтернативно, симптомов заболевания пародонта. В другом варианте осуществления «нормальный» уровень/диапазон биомаркера для определенного млекопитающего субъекта можно определить для этого определенного млекопитающего субъекта во время, когда известно, что млекопитающий субъект не имеет заболевания пародонта или, альтернативно, симптомов заболевания пародонта.

«Нормальный» уровень, значение или диапазон биомаркера можно использовать как предварительно определенное справочное значение при отсутствии или существенном отсутствии заболевания пародонта у млекопитающего. В другом аспекте значение выше нормального значения или диапазона биомаркера можно использовать как предварительно определенное справочное значение при наличии заболевания пародонта у млекопитающего.

В одном варианте осуществления способ диагностирования заболевания пародонта у млекопитающего включает получение гингивального образца и/или образца слюны у млекопитающего, детектирование присутствия биомаркера в образце, детектирование уровня биомаркера в образце и сравнение уровня биомаркера в образце с предварительно определенным справочным значением, коррелирующим уровень биомаркера с заболеванием пародонта; и диагностирование млекопитающего с заболеванием пародонта, когда уровень биомаркера в образце соответствует уровню

биомаркера, где справочное значение коррелируется с заболеванием пародонта, в котором биомаркер представляет собой, по меньшей мере, один член, выбранный из группы, состоящей из FAS, IL-1B, IL-8, MMP-9, DEFB4, CTSS, IL-17B, CARD10, BGN, BE, IL-12A, IL-6, LCN8, LPO и MMP-13. В одном варианте осуществления заболевания пародонта представляет собой пародонтит. В другом варианте осуществления заболевания пародонта представляет собой гингивит.

В другом варианте осуществления способа диагностирования заболевания пародонта у млекопитающего включает получение гингивального образца и/или образца слюны у млекопитающего, детектирование присутствия биомаркера в образце, детектирование уровня биомаркера в образце, сравнение уровня биомаркера в гингивальном и/или образце слюны с уровнем того же самого биомаркера в контрольном образце, в котором у млекопитающего диагностировано заболевание пародонта, когда измененный уровень биомаркера детектирован в гингивальном и/или образце слюны относительно контрольного образца, в котором биомаркер представляет собой, по меньшей мере, один член, выбранный из группы, состоящей из FAS, IL-1B, IL-8, MMP-9, DEFB4, CTSS, IL-17B, CARD10, BGN, BE, IL-12A, IL-6, LCN8, LPO и MMP-13. В одном аспекте уровень биомаркера выше в гингивальном и/или образце слюны относительно контрольного образца. В одном варианте осуществления заболевания пародонта представляет собой пародонтит. В другом варианте осуществления заболевания пародонта представляет собой гингивит.

Изобретение также обеспечивает набор биомаркеров для детектирования заболевания пародонта у млекопитающего, содержащий два или более биомаркеров, выбранных из группы, состоящей из FAS, IL-1B, IL-8, MMP-9, DEFB4, CTSS, IL-17B, CARD10, BGN, BE, IL-12A, IL-6, LCN8, LPO и MMP-13, в котором биомаркеры получены из гингивального образца и/или образца слюны млекопитающего, у которого диагностировано заболевание пародонта. В одном варианте осуществления заболевания пародонта представляет собой пародонтит. В другом варианте осуществления заболевания пародонта представляет собой гингивит.

Изобретение также включает способ контроляирования заболевания пародонта у млекопитающего, включающий получение первого гингивального образца и/или образца слюны у млекопитающего в первый момент времени, получение второго гингивального образца и/или образца слюны у млекопитающего во второй момент времени, детектирование присутствия, по меньшей мере, одного биомаркера в первом и втором образцах, детектирование уровня, по меньшей мере, одного биомаркера в первом и втором образцах и сравнение уровня биомаркера в первом и втором образцах, в котором снижение уровня биомаркера во втором образце относительно первого образца указывает на уменьшение заболевания пародонта у млекопитающего и в котором, по меньшей мере, один биомаркер выбран из группы, состоящей из FAS, IL-1B, IL-8, MMP-9, DEFB4, CTSS, IL-17B, CARD10, BGN, BE, IL-12A, IL-6, LCN8, LPO и MMP-13. В одном варианте осуществления заболевания пародонта представляет собой пародонтит. В другом варианте осуществления заболевания пародонта представляет собой гингивит.

В одном аспекте изобретение обеспечивает способ лечения заболевания пародонта у млекопитающего, в котором млекопитающее имеет повышенный уровень, по меньшей мере, одного биомаркера, выбранного из группы, состоящей из FAS, IL-1B, IL-8, MMP-9, DEFB4, CTSS, IL-17B, CARD10, BGN, BE, IL-12A, IL-6, LCN8, LPO и MMP-13. В другом месте в настоящем описании изложено, что уровни выше нормальных одного или более таких биомаркеров можно определить, используя любой способ, раскрытый в настоящем описании или известный в данной области техники и коррелированный с заболеванием

пародонта в зависимости от конкретного случая. Изобретение, следовательно, обеспечивает способ лечения заболевания пародонта у млекопитающего, имеющего заболевание пародонта, способ, включающий взаимодействие клетки с агентом, который подавляет, по меньшей мере, один биомаркер, выбранный из группы, состоящей из 5 FAS, IL-1B, IL-8, MMP-9, DEFB4, CTSS, IL-17B, CARD10, BGN, BE, IL-12A, IL-6, LCN8, LPO и MMP-13, в котором подавление биомаркера коррелируется с сокращением, по меньшей мере, одного симптома, связанного с заболеванием пародонта.

В одном варианте осуществления агент, подавляющий биомаркер, содержится в пределах пероральной композиции и пероральную композицию вводят млекопитающему 10 для лечения заболевания пародонта.

В другом месте в настоящей заявке описано, что в способе лечения пародонтита с помощью введения в ротовую полость млекопитающего пероральной композиции можно уменьшить активность одного или более биомаркеров. Один или более биомаркеров можно сократить, как описано в другом месте в настоящей заявке, 15 например, как изложено для сокращения количества MMP-9 в ротовой полости млекопитающего относительно сокращения количества MMP-9 в ротовой полости млекопитающего. Таким образом, MMP можно уменьшить в одном или обоих уровнях нуклеиновой кислоты и протеина, таким образом, уменьшая активность MMP-9 в ротовой полости. Подобным образом, подавление MMP-9 или снижение уровня MMP- 20 9 можно получить с помощью действия в одном или обоих уровнях нуклеиновой кислоты и протеина, как описано подробно в другом месте в настоящей заявке.

В другом аспекте изобретение обеспечивает способ идентификации соединения, пригодного для лечения заболевания пародонта у млекопитающего, нуждающегося в таком лечении, включающий взаимодействие клетки с исследуемым соединением и 25 определение, подавляет ли исследуемое соединение один или более из биомаркеров FAS, IL-1B, IL-8, MMP-9, DEFB4, CTSS, IL-17B, CARD10, BGN, BE, IL-12A, IL-6, LCN8, LPO и MMP-13. Подавление, по меньшей мере, одного из биомаркеров является показателем, что исследуемое соединение является пригодным для лечения заболевания пародонта у млекопитающего, пораженного заболеванием пародонта, в котором 30 увеличенный уровень биомаркера связан с и/или клиническими проявлениями заболевания пародонта. В одном варианте осуществления заболевание пародонта представляет собой пародонтит. В другом варианте осуществления заболевание пародонта представляет собой гингивит.

В одном варианте осуществления способа лечения заболевания пародонта включает 35 введение агента, идентифицированного с помощью анализа скрининга, описанного в настоящей заявке, или комбинации агентов, которые ингибируют один или более биомаркеров заболевания пародонта, в котором, по меньшей мере, один из агентов представляет собой агент, идентифицированный с помощью анализа скрининга, описанного в настоящей заявке.

40 В одном варианте осуществления изобретение обеспечивает способ лечения заболевания пародонта, включающий стадию введения терапевтически эффективного количества агента, которое ингибирует заболевание пародонта у субъекта, нуждающегося в таком лечении. В настоящей заявке определено, что терапевтически эффективное количество агента (то есть, эффективная дозировка) располагается в 45 диапазоне от 0,001 до 30 мг/кг массы тела, предпочтительно от 0,01 до 25 мг/кг массы тела, более предпочтительно от 0,1 до 20 мг/кг массы тела и еще более предпочтительно от 1 до 10 мг/кг, от 2 до 9 мг/кг, от 3 до 8 мг/кг, от 4 до 7 мг/кг или от 5 до 6 мг/кг массы тела. Специалист в данной области техники оценит, что определенные факторы могут

влиять на дозировку, необходимую для эффективного лечения субъекта, включая, но не ограничиваясь ими, тяжесть заболевания или нарушения, предыдущие методы лечения, общее состояние здоровья и/или возраст субъекта и другие присутствующие заболевания. Кроме того, лечение субъекта с помощью терапевтически эффективного количества ингибитора может включать единичный курс лечения или, предпочтительно, может включать серию курсов лечения. Следует также отметить, что эффективная дозировка, используемая для лечения, может увеличиться или уменьшиться в течение курса определенного лечения. В настоящей заявке описано, что изменения в дозировке могут следовать из результатов диагностических исследований. Посредством примера агент вводят отдельно, как часть фармацевтической композиции или как часть пероральной композиции, среди других композиций.

Посредством неограничивающего примера уровень MMP-9 можно определить *in vitro* с помощью взаимодействия клетки с TNF α . В одном варианте осуществления клетка представляет собой моноцит. После взаимодействия клетки с TNF α уровень MMP-9 детектируют или при уровне протеина, или нуклеиновой кислоты. В одном аспекте уровень MMP-9 также определяют *in vitro* с помощью взаимодействия клетки с TNF α в присутствии антибактериального агента. В одном варианте осуществления антибактериальный агент представляет собой 2,4,4'-трихлор-2'-гидроксидифениловый эфир. В одном аспекте изобретения 2,4,4'-трихлор-2'-гидроксидифениловый эфир представляет собой агент, пригодный для подавления биомаркера, изложенного в настоящем описании. Исследования, пригодные для определения уровня биомаркера, включают любое исследование, пригодное, например, для связывания и/или определений функциональной активности. Примеры таких исследований включают, но не ограничиваются ими, исследования на основе LUMINEX, исследования антиген-антитело, исследования расщепления пептида, колориметрические исследования.

В одном варианте осуществления изобретения измерение подавления MMP-9 с помощью детектирования уровня MMP-9 определяют *in vitro* при взаимодействии клетки с TNF α в присутствии антибактериального агента и с помощью сравнения уровня MMP-9, установленного *in vitro*, при взаимодействии клетки с TNF α при отсутствии антибактериального агента, такого как 2,4,4'-трихлор-2'-гидроксидифениловый эфир, в котором экспериментальные условия являются иным образом идентичными. Более низкий уровень MMP-9 протеина, нуклеиновой кислоты или ферментативной активности в присутствии антибактериального агента, чем при отсутствии антибактериального агента, является показателем, что антибактериальное соединение подавляет MMP-9. Следует понимать, что другие биомаркеры изобретения могут быть оценены подобным способом. Дополнительно, MMP-9 или любой другой биомаркер можно оценить для подавления, используя любого агента, пригодный для этой цели, включая, но не ограничиваясь ими, агенты, идентифицированные в качестве пригодных для лечения пародонтита, как изложено в другом месте в настоящем описании.

Следует понимать, что *in vitro* измерение подавления биомаркера может коррелироваться с *in vivo* эффектом, наблюдением или результатом. Посредством неограничивающего примера следует понимать, что *in vitro* измерение подавления MMP-9 может коррелироваться с *in vivo* эффектом, наблюдением или результатом. В одном аспекте подавление MMP-9, измеренное *in vitro*, является подтверждением наблюдения *in vivo*, включая, но не ограничиваясь ими, лечение заболевания пародонта, способ сокращения патологического избытка биомаркера и/или активности биомаркера *in vivo* и способ идентификации соединения, пригодного для лечения заболевания пародонта и/или уменьшения патологического избытка биомаркера и/или активности

биомаркера *in vivo*. См., например, Modeer et al. (1996) *J. Clin. Periodont.*, 23: 927-933. В другом аспекте подавление биомаркера, измеренное *in vitro*, является прогнозирующим параметром результата *in vivo*, включая, но не ограничиваясь ими, лечение заболевания пародонта, способ сокращения патологического избытка биомаркера и/или активности биомаркера *in vivo* и способ идентификации соединения, пригодного для лечения заболевания пародонта и/или уменьшения патологического избытка биомаркера и/или активности биомаркера *in vivo*.

В одном аспекте изобретение обеспечивает способ сокращения патологического избытка, по меньшей мере, одного из биомаркеров в ротовой полости млекопитающего, нуждающегося в таком лечении, включающий введение в ротовую полость млекопитающего агента пероральной композиции, который подавляет, по меньшей мере, один биомаркер, выбранный из группы, состоящей из FAS, IL-1B, IL-8, MMP-9, DEFB4, CTSS, IL-17B, CARD10, BGN, BE, IL-12A, IL-6, LCN8, LPO и MMP-13, в количестве, которое является эффективным для снижения уровня биомаркера в ротовой полости млекопитающего, в котором ингибирирование уровня биомаркера приводит к лечению заболевания пародонта. В одном варианте осуществления изобретение обеспечивает способ сокращения патологического избытка, по меньшей мере, одного биомаркера, например, MMP-9 или MMP-13 в ротовой полости млекопитающего, нуждающегося в таком лечении, включающий введение в ротовую полость млекопитающего пероральной композиции, включающей 2,4,4'-трихлор-2'-гидроксидифениловый эфир в количестве, которое является эффективным для снижения уровня MMP-9 или MMP-13 в ротовой полости млекопитающего, в котором ингибирирование уровня MMP-9 или MMP-13 приводит к ингибирированию чрезмерного разрушения компонентов соединительной ткани матриксного протеина.

В настоящем описании изложено, что биомаркер можно уменьшить в ротовой полости с помощью одного из многочисленных путей. В одном варианте осуществления биомаркер можно уменьшить в ротовой полости с помощью подавления биомаркера на уровне нуклеиновой кислоты, как изложено в другом месте в настоящем описании. Такое сокращение может привести к сокращению одной или более нуклеиновых кислот, кодирующих биомаркер (например, мРНК), и биомаркерного протеина/фермента, экспрессированного в ротовой полости. Сокращение мРНК, кодирующей биомаркер, например, можно производить с помощью одного или более из многочисленных способов, как будет очевидно специалисту в данной области техники при использовании раскрытия, изложенного в настоящем описании. Примеры включают сокращение транскрипции мРНК, кодирующей биомаркер, и разрушение/удаление мРНК, кодирующей биомаркер.

В другом варианте осуществления биомаркер можно уменьшить в ротовой полости, непосредственно уменьшая количество биомаркерного протеина. Уменьшение биомаркерного протеина можно производить с помощью одного или более из многочисленных способов, как будет очевидно специалисту в данной области техники при использовании раскрытия, изложенного в настоящем описании. Примеры включают, например, связывание/комплексообразование биомаркера с низкомолекулярным ингибитором, ингибирирование с помощью природной или биологически-полученной молекулы, протеолитическое разрушение биомаркера и основанное на сродстве очищение биомаркера из ротовой полости. В настоящей заявке описано, что агент, который уменьшает уровень биомаркера, может быть агентом, таким как 2,4,4'-трихлор-2'-гидроксидифениловый эфир (ТРИКЛОЗАН), или он может быть другим антибактериальным агентом. Также изобретение обеспечивает способы лечения

субъекта, пораженного заболеванием пародонта.

В другом аспекте изобретение обеспечивает способы лечения заболевания пародонта у млекопитающего, нуждающегося в таком лечении, включающие взаимодействие клетки в ротовой полости млекопитающего с агентом, который подавляет биомаркер, как изложено в настоящем описании. Согласно изобретению подавление биомаркера коррелируется с сокращением, по меньшей мере, одного симптома, связанного с заболеванием пародонта.

В одном аспекте способность пероральной композиции, описанной в настоящей заявке, лечить заболевание пародонта определяют при сравнении эффекта 2,4,4'-трихлор-2'-гидроксидифенилового эфира при подавлении биомаркера с эффектом пероральной композиции при подавлении биомаркера. В другом аспекте способность любой пероральной композиции лечить пародонтит определяют при сравнении эффекта пероральной композиции или *in vivo*, или *in vitro* с эффектом пероральной композиции, как описано в настоящей заявке.

В одном аспекте подавление биомаркера (например, металлопротеиназы), измеренное *in vitro*, является подтверждением наблюдения *in vivo*, включая, но не ограничиваясь ими, лечение пародонтита, способ сокращения патологического избытка биомаркера (например, металлопротеиназы или активности металлопротеиназы) *in vivo* и способ идентификации соединения, пригодного для лечения пародонтита и/или сокращения патологического избытка биомаркера и/или активности биомаркера *in vivo*. См., например, Golub et al., *Inflamm. Res.* (1997) 46: 310-9, Preshaw et al., *J. Clin. Periodontol.* (2004) 31: 697-707; Mantyla et al., *J. Periodontal. Res.* (2003) 38: 436-439; Lorencini et al., *Histol. Histopathol.* (2009) 24: 157-166; и Pozo et al., *J. Periodontal Res.* (2005) 40: 199-207.

Изобретение дополнительно включает пероральную композицию, такую как средство для ухода за зубами, для применения в способе изобретения. В одном аспекте пероральная композиция содержит агент, пригодный для лечения заболевания пародонта. В типичном варианте осуществления агент представляет собой некатионный антибактериальный агент. См., например, патент США №5288480, который включен в настоящее описание в полном объеме посредством ссылки. Некатионный антибактериальный агент присутствует в пероральной композиции в эффективном против налета количестве 0,25-0,35% вес., предпочтительно 0,3%. Антибактериальный агент является, по существу, нерастворимым в воде, подразумевая, что его растворимость является менее чем 1% вес. в воде при 25°C и может быть даже менее чем 0,1%. В одном варианте осуществления антибактериальный агент представляет собой 2,4,4'-трихлор-2'-гидроксидифениловый эфир. В одном варианте осуществления антибактериальный агент представляет собой доксициклин. В другом варианте осуществления пероральная композиция содержит два или более антибактериальных агентов. В другом варианте осуществления пероральная композиция содержит агент, отличный от антибактериального агента, и может содержать или не содержать один или более дополнительных агентов, которые являются антибактериальными агентами.

В одном варианте осуществления агент, усиливающий антибактериальную активность (AEA), увеличивает доставку антибактериального агента и удерживание его на поверхностях рта. В одном аспекте АЕА содержит вязкий материал. См. патент США №5288480 для описаний материалов и композиций, пригодных для материалов АЕА настоящего изобретения, так же как для общих описаний пероральных композиций, таких как композиции средства для ухода за зубами, пригодные в настоящем изобретении. Посредством неограничивающего примера клейкий материал в композиции представляет собой полимер, имеющий среднечисловую молекулярную массу между

100000 и 2500000 включительно. В одном аспекте клейкий материал выбран из полимеров поливинилфосфоновой кислоты, поли(1-фосфонопропен)сульфоновой кислоты, поли (бета-стиролфосфоновой кислоты), альфа-стиролфосфоновой кислоты, синтетического анионного полимерного поликарбоксилата, малеинового ангидрида, малеиновой 5 кислоты и метилвинилового эфира. В другом аспекте клейкая молекула представляет собой полимер метилвинилового эфира и малеинового ангидрида.

Используемая в настоящем описании «увеличивающая доставку группа» относится к группе, которая присоединяет или, по существу, адгезионно, когезионно или иначе связывает АЕА (несущий антибактериальный агент) с ротовыми (например, зуб и десна) 10 поверхностями, таким образом «доставляя» антибактериальный агент к таким поверхностям. В другом варианте осуществления «увеличивающая доставку группа» относится к группе, которая необязательно присоединяет или, по существу, адгезионно, когезионно или иначе связывает агент, отличный от антибактериального агента, с ротовыми 15 поверхностями, таким образом «доставляя» антибактериальный агент к таким поверхностям. В еще другом варианте осуществления «увеличивающая доставку группы» доставляет, по меньшей мере, один антибактериальный агент и, по меньшей мере, один не антибактериальный агент к зубу. Органическая увеличивающая 20 удерживание группы, обычно гидрофобная, присоединяет или иначе связывает агент и/или антибактериальный агент с АЕА, таким образом, способствуя удерживанию антибактериального агента с АЕА и косвенно на поверхностях рта. В некоторых случаях 25 присоединение антибактериального агента происходит через его физическое удерживание с помощью АЕА, особенно когда АЕА представляет собой поперечно сшитый полимер, структура которого неотъемлемо обеспечивает увеличенные области для такого удерживания. Присутствие с более высокой молекулярной массой более гидрофобной поперечно сшитой части в поперечно сшитом полимере еще дополнительно 30 обеспечивает физическое удерживание антибактериального агента к или с помощью поперечно сшитого АЕА полимера.

В типичном средстве для ухода за зубами присутствует перорально приемлемый наполнитель, включающий водную фазу с увлажняющим веществом. Вода присутствует 30 обычно в количестве, по меньшей мере, 3% вес., обычно 3-35%, и увлажняющее вещество, предпочтительно глицерин и/или сорбит, обычно в общем количестве 6,5-75% или 80% вес. средства для ухода за зубами, более типично 10-75%. Несмотря на то, что не требуется в настоящем изобретении, в котором необязательно присутствует 0,25-0,35% нерастворимого в воде некатионного антибактериального агента, в водный 35 увлажняющий наполнитель можно включить дополнительный ингредиент, который помогает солюбилизации антибактериального агента в слюне. Такие необязательные солюбилизирующие агенты включают увлажняющие полиолы, такие как пропиленгликоль, дипропиленгликоль и гексиленгликоль, целлозольвы, такие как метилцеллозольв и этилцеллозольв, растительные масла и воски, содержащие, по 40 меньшей мере, 12 углеродов в прямой цепи, такие как оливковое масло, касторовое масло и петролатум и сложные эфиры, такие как амилацетат, этилацетат и бензилбензоат. Используемый в настоящем описании «пропиленгликоль» включает 1,2-пропиленгликоль и 1,3-пропиленгликоль. Следует избегать значительных количеств 45 полиэтиленгликоля, особенно с молекулярной массой 600 или более, так как полиэтиленгликоль эффективно ингибирует антибактериальную активность некатионного антибактериального агента. Например, полиэтиленгликоль (ПЭГ) 600, когда находится с триклозаном в весовом отношении 25 триклозан : 1 ПЭГ 600, снижает антибактериальную активность триклозана в 10-20 раз от существующей при отсутствии

полиэтиленгликоля.

pH пероральной композиции находится обычно в диапазоне от 4,5 до 10 и в другом аспекте от 6,5 до 7,5. Примечательно, что композиции изобретения можно применять перорально при pH ниже 5, по существу, без декальцинирования или иного повреждения 5 зубной эмали. pH можно контролировать с помощью кислоты (например, лимонная кислота или бензойная кислота), или основания (например, гидроксид натрия), или буферного раствора (цитрат натрия, бензоат, карбонат или бикарбонат, натрия фосфат двузамещенный, натрия фосфат однозамещенный и подобное).

Любые абразивные твердые частицы могут быть использованы и могут быть выбраны

10 из бикарбоната натрия, фосфата кальция (например, дикальцийфосфат дигидрат), сульфата кальция, осажденного карбоната кальция, диоксида кремния (например, гидратированный диоксид кремния), оксида железа, оксида алюминия, перлита, полимерных частиц, например, полиэтилена, и их комбинаций. В частности, абразивное 15 вещество может быть выбрано из фосфата кальция (например, дикальцийфосфат дигидрат), сульфата кальция, осажденного карбоната кальция, диоксида кремния (например, гидратированный диоксид кремния), пирофосфата кальция и комбинаций. Можно использовать любой тип диоксида кремния, такой как осажденные диоксиды кремния или силикагели. Предпочтительными являются коммерчески доступные диоксиды кремния, такие как INEOS AC43, доступные от Ineos Silicas, Warrington, United 20 Kingdom. Другие абразивные вещества можно также использовать в соответствии с настоящим изобретением. В патенте США №4358437 изложено, что порошковые формы карбоната кальция в абразивной форме составляют один важный класс таких абразивных веществ. Примеры этих абразивных веществ представляют собой 25 измельченный известняк или мрамор, карбонаты кальция (мелы), такие как арагонит, кальцит или их смеси и синтетически осажденные карбонаты кальция, такие как карбонат кальция системы водоснабжения. Обычно карбонат кальция должен иметь весовой медианный диаметр менее чем 40 микрон, предпочтительно менее чем 15 микрон. Второй класс абразивных веществ представляет собой порошковые диоксиды кремния, в частности, ксерогели на основе диоксида кремния, как определено в патенте США 30 №3538230. Компонент на основе диоксида кремния может содержать частицы диоксида кремния, имеющие средний размер частицы от 1 до 100 мкм, включая любой определенный размер частицы в пределах такого диапазона.

В одном варианте осуществления пероральная композиция необязательно содержит кремнийсодержащий полирующий агент. Полирующий агент может быть

35 кремнийсодержащим материалом, таким как содержащий воду силикагель, ксерогель на основе диоксида кремния, или сложный аморфный алюмосиликат или цирконосиликат щелочного металла, или осажденный диоксид кремния. Коллоидные материалы диоксида кремния включают продаваемые под торговой маркой SYLOID, такие как материалы, которые были проданы как SYLOID 72 и SYLOID 74. Осажденные диоксиды кремния 40 включают продаваемые под торговой маркой ZEODENT, такие как ZEODENT 113, ZEODENT 115 и ZEODENT 119. Пероральная композиция может содержать кремнийсодержащий полирующий агент в количестве от 0 до 36%. В другом варианте осуществления пероральная композиция может содержать кремнийсодержащий полирующий агент в количестве от 0,01 до 36%.

45 Не будучи привязанным к теории, на основании чего достигают преимущества этого изобретения, полагают, что даже при отсутствии специального солюбилизирующего материала для антибактериального агента (например, 2,4,4'-трихлор-2'-гидроксидифениловый эфир), когда количество агента представляет собой 0,25% вес.

- 0,35% вес. и присутствует поликарбоксилат, присутствует достаточный агент для эффективного лечения пародонтита посредством подавления, по меньшей мере, одной из MMP-8, MMP-9 или MMP-13. Это одинаково применимо к другим нерастворимым в воде некатионным антибактериальным агентам, описанным в настоящей заявке.

5 Пероральная композиция (например, средство для ухода за зубами) может также содержать источник ионов фторида или компонент, обеспечивающий фтор, в качестве противокарисного агента, в количестве, достаточном для обеспечения от 25 ч/млн до 5000 ч/млн ионов фторида. Эти соединения могут быть слабо растворимыми в воде или могут быть полностью растворимыми в воде. Они характеризуются их способностью 10 высвобождать ионы фторида в воде и существенным освобождением от нежелательной реакции с другими соединениями перорального лекарственного средства. К числу этих соединений относятся неорганические соли фторида, такие как растворимые соли щелочных металлов, щелочноземельных металлов или, например, фторид натрия, фторид калия, фторид аммония, фторид кальция, фторид меди, такой как фторид 15 одновалентной меди, фторид цинка, фторид бария, фторсиликат натрия, фторсиликат аммония, фторцирконат натрия, фторцирконат аммония, монофторфосфат натрия, моно- и дифторфосфат алюминия и фторированный пирофосфат натрия-кальция. Предпочтительны фториды щелочного металла и олова, такие как фториды натрия и олова, монофторфосфат натрия (MFP) и их смеси. Как правило, в случае фторидов 20 щелочных металлов этот компонент присутствует в количестве не более 2% вес., основываясь на весе лекарственного средства, и предпочтительно в диапазоне от 0,05% до 1%. В случае монофторфосфата натрия соединение может присутствовать в количестве 0,1-3% и в одном варианте осуществления 0,7-0,8%.

В одном аспекте композиция дополнительно содержит агент, выбранный из агента 25 ионов олова; соединения фторида; фторида натрия; хлоргексидина; алексидина; гексетидина; сангвинарина; бензалкония хлорида; салициланилида; домифена бромида; цетилпиридиния хлорида (CPC); тетрадецилпиридиния хлорида (TPC); N-тетрадецил-4-этапиридиния хлорида (TDEPC); октенидина; делмопинола; октапинола; низина; агента ионов цинка; агента ионов меди; эфирных масел; фуранонов; бактериоцинов, 30 этиллаурила аргината, экстрактов магнолии, источника ионов металла, бикарбоната аргинина, гонокиола, магонола, урсоловой кислоты, урсиновой кислоты, морина, экстракта облепихи крушинной, пероксида, фермента, экстракта камелии, флавоноида, флавана, галогенированного дифенилового эфира, креатина и прополиса.

ПРИМЕРЫ

35 Изобретение дополнительно описано с помощью следующих примеров. Примеры являются просто иллюстративными и никаким образом не ограничивают объем изобретения, как описано и заявлено.

Пример 1: Получение MMP-9 и характеристика

Клетки U937 и культуральную среду RPMI 1640 получали от ATCC. Набор с MMP-40 9 человека для ELISA (QUANTIKINE) получали от R&D Systems. Эмбриональную бычью сыворотку (ЭБС) получали от VWR и раствор пенициллина-стрептомицина и фактор некроза опухоли а (TNF α) получали от Sigma.

Клетки лимфомы моноцита лейкемии человека U937 культивировали в среде RPMI 1640, дополненной 10% ЭБС и 1% раствором пенициллина-стрептомицина. Клетки 45 инкубировали при 37°C в увлажненной атмосфере, содержащей 5% CO₂ и 95% воздуха.

Перед обработкой клетки переносили в RPMI, содержащую 1% ЭБС в течение ночи. Клетки помещали на 48-лунечный планшет. Клеточная культуральная среда включала или TNF α (250 нг/мл), Триклозан (1 ч/млн), или оба агента вместе, или агент отсутствовал

(контроль). Клетки инкубировали после обработки в течение 24 часов.

Кондиционированные среды собирали и хранили при -80°C до анализа. Образцы кондиционированных сред подвергали твердофазному иммуноферментному анализу (ELISA) для MMP-9, согласно промышленному протоколу ELISA (фигура 1).

5 Клетки U937, стимулируемые TNF α , производили увеличение уровня MMP-9.

Триклозан при 1 ч/млн значительно снижал уровень MMP-9 в клетках U937, стимулируемых TNF α .

10 Таблица 1

Данные для фигуры 1, демонстрирующие эффект триклозана на выработку MMP-9

	Среднее значение (нг/мл)	Стандартное отклонение (нг/мл)
контроль	0,114	0,024333
TNF α	0,275	0,048665
TNF α + Триклозан 1 ч/млн	0,155	0,004867

15 Пример 2: Получение и характеристика MMP-13

Паратиреоидный гормон (крысиный ПТГ 1-34) получали от Sigma. Клетки UMR 106-01 культивировали в минимальной поддерживающей среде Игла (EMEM), дополненной 25 мМ Нерес pH 7,4, 1% заменимыми аминокислотами, 100 един/мл пенициллина, 100 мкг/мл стрептомицина, 5% эмбриональной бычьей сывороткой. ПЦР в режиме реального времени проводили согласно следующему способу: клетки UMR 106-01 засевали в 12-луночные планшеты и культивировали в течение 2-3 дней в клеточной культуральной среде. Когда клетки сливались, культуральную клеточную среду меняли на 1% эмбриональную бычью сыворотку в течение ночи для выращивания клеток на минимальной среде. Клетки предварительно инкубировали со средством для ухода за зубами в течение 15 минут и затем инкубировали с ПТГ (10^{-8} М) в течение 4 часов.

20 Тотальную РНК выделяли из клеток UMR 106-01, стимулируемых с или без ПТГ с реагентом TRIzol. Тотальную РНК (0,1 мкг) подвергали обратной транскрипции с кДНК, используя набор Invitrogen SUPERSCRIPT согласно инструкциям изготовителя. ПЦР проводили на кДНК, используя праймеры, последовательности которых изложены в таблице 2. Все сДНК амплифицировали с помощью добавления 2,5 мкл кДНК к смеси ПЦР (22,5 мкл), содержащей каждый праймер (0,2 мкМ) и 12,5 мкл Platinum SYBR Green qPCR SuperMix UDG (Invitrogen). Реакции предварительно инкубировали при 50°C в течение 2 минут для очистки от dU-содержащей ДНК с помощью UDG, затем при 95°C в течение 2 минут для инактивации UDG и активации Таq. Программу ПЦР продолжали 49 циклов денатурации при 95°C в течение 15 секунд, отжига и элонгации праймеров при 60°C в течение 30 секунд. Относительное количество экспрессии гена определяли при использовании способа 2-delta delta CT, где кратные изменения в экспрессии гена относятся к контрольным образцам. Все образцы нормализовали по отношению к β -актину.

25 Все результаты выражали как среднее значение \pm стандартная ошибка (S.E.) тройных измерений всех экспериментов, повторяемых, по меньшей мере, три раза. Статистические исследования проводили, используя t-критерий Стьюдента.

30 Клетки UMR, стимулируемые ПТГ, производили увеличение экспрессии MMP-13.

Триклозан при 10 ч/млн, 4 ч/млн и 1 ч/млн значительно уменьшал экспрессию MMP-13 в клетках UMR, стимулируемых ПТГ. Суспензия средства для ухода за зубами, содержащая 10 ч/млн триклозана, значительно уменьшала экспрессию MMP-13 в клетках UMR, стимулируемых ПТГ.

Таблица 2

Последовательности праймера	
Крысиный MMP-13 ген	
5'-GCCCTATCCCTTGATGCCATT-3' (смысловой)	
5'-ACAGTTCAAGCTAACCTGCTG-3' (антисмысловой)	
Крысиный - актин ген	
5'-AGCCATGTACGTAGCCATCC-3' (смысловой)	
5'-ACCCCTCATAGATGGGCACAG-3' (антисмысловой)	

Пример 3: Исследование противовоспалительных активных веществ

Соединения оценивали в отношении потенциальной противовоспалительной активности с помощью исследования способности ингибировать IL-1B, IL-6, IL-8, GM-CSF и/или TNF- α . Оценивали цитокины и/или другие воспалительные маркеры, обнаруженные в биологических образцах (например, слюна) или в образцах *In vitro* (например, супернатант клеточной культуры). Например, получали и использовали процент ингибирования при определенной концентрации маркера для сравнения других маркеров, оцененных подобным способом.

Супернатант клеточной культуры получали из клеточной культуры, связанной с *Rorphyromonas gingivalis*. Клеточную культуру получали согласно любому способу, известному в данной области техники. Например, гингивальные клетки культивировали в течение ночи на 96-луночном планшете, содержащем 0,5% сыворотку, включающую эмбриональную бычью сыворотку (ЭБС). На следующий день среды удаляли, и добавляли свежую среду без ЭБС и планшет инкубировали при 37°C до дальнейшего использования. Другой исходный раствор среды получали, используя убитый нагреванием *Rorphyromonas gingivalis* (HKPG), с помощью добавления 100 мкл HKPG (10^{10} /мл исходного раствора) к 10 мл среды.

Исследуемый агент (например, маркер) предварительно разбавляли из 1% исходного раствора с помощью добавления 2 мкл агента к 198 мкл среды, содержащей 10^8 /мл HKPG. Исследуемый агент затем разбавляли до конечной концентрации 1 ч/мл и 0,5 ч/мл, используя среду, содержащую HKPG (зеркальный планшет). Отрицательный контроль был средой без HKPG или исследуемого агента. Положительный контроль был средой, содержащей HKPG.

Микропланшет, содержащий разбавления исследуемого агента, промывали один раз средой. Кондиционированную среду из зеркального планшета добавляли к тому же самому положению образца на клеточном планшете и инкубировали в течение ночи. На следующий день 50 мкл среды удаляли из каждой лунки для использования в исследовании на основе проточной цитометрии (например, LUMINEX).

Реактивы готовили для исследования LUMINEX 5-PLEX. Промывающий раствор получали с помощью добавления 285 мл дистиллированной воды к 15 мл исходного промывающего раствора. Гранулы для исследования готовили в разбавленном растворе с помощью добавления 2,25 мл промывающего раствора к 0,25 мл 10x исходного раствора гранул. Биотинилированное антитело 1x готовили с помощью добавления 9 мл дейонизированной воды к 1 мл 10x биотинилированного детектора. Стрептавидин-RPE 1x готовили с помощью добавления 9 мл дейонизированной воды к 1 мл 10x исходного раствора стрептавидина-RPE.

Для 5-PLEX исследования стандарт получали с помощью следующих инструкций для продукта и восстановленного раствора для разведения (например, слюна) или при использовании 50% раствора для разведения / 50% культуральной среды. Стандартный протеин повторно гидратировали в течение 10 минут при комнатной температуре (должен использоваться в течение одного часа). Градуировочную кривую строили с

помощью последовательного разбавления восстановленного стандарта в растворе для разведения (слюна), или 50% растворе для разведения / 50% культуральной среде, проводя серию разбавлений для получения 1:729 разбавленного образца.

Для 5-PLEX исследования лунки планшета предварительно смачивали с помощью 5 капания из пипетки 0,2 мл промывающего раствора в каждую лунку, ожидания 15-30 секунд, затем аспирации раствора, используя вакуумный коллектор. Разбавленный раствор гранул перемешивали на вортексе в течение 30 секунд, затем обрабатывали с помощью ультразвука в течение, по меньшей мере, 30 секунд непосредственно перед использованием в исследовании. Разбавленный раствор гранул (25 мкл) помещали в 10 каждую лунку и хранили в темном месте. В каждую лунку добавляли промывающий раствор (0,2 мл) и через 15-30 секунд промывающий раствор аспирировали, используя вакуумный коллектор. Стадию промывания повторяли, затем остаточную жидкость 15 блотировали со дна планшета. В каждую лунку добавляли буфер для инкубирования (50 мкл) с последующим разбавлением 100 мкл соответствующего стандарта в каждую определяемую лунку, с последующим добавлением 50 мкл раствора для разведения, 20 затем 50 мкл образца в лунку с определяемым образцом. Планшет инкубировали в течение 2 часов при комнатной температуре на орбитальном шейкере со скоростью встряхивания 500-600 об/мин.

Жидкость удаляли из лунок планшета, используя вакуумный коллектор, и в лунки 20 добавляли 0,2 мл промывающего раствора, инкубировали в течение 15-30 секунд, затем повторяли стадию промывания с последующим блотированием дна планшета до высушивания. В каждую лунку добавляли биотинилированное детекторное антитело 25 (1×, 100 мкл) и планшет инкубировали в течение одного часа при комнатной температуре на орбитальном шейкере со скоростью встряхивания 500-600 об/мин. Жидкость удаляли из лунок, используя вакуумный коллектор, с последующим промыванием, как описано выше. В каждую лунку добавляли стрептавидин-RPE (1×, 100 мкл). Планшет затем инкубировали в течение 30 минут при комнатной температуре на орбитальном шейкере со скоростью встряхивания 500-600 об/мин.

В то время как планшет инкубировали, устройство LUMINEX100 готовили к 30 исследованию. Жидкость удаляли из лунок планшета, используя вакуумный коллектор, и в лунки добавляли 0,2 мл промывающего раствора, инкубировали в течение 10 секунд, затем дважды повторяли стадию промывания. В каждую лунку добавляли промывающий раствор (100 мкл) и планшет инкубировали в течение 2-3 минут при комнатной 35 температуре на орбитальном шейкере со скоростью встряхивания 500-600 об/мин. Планшет затем раскрывали и вставляли в устройство LUMINEX для прочтения и анализа.

Концентрацию образцов из калибровочной кривой определяли, используя 40 программное обеспечение, соответствующее подбору кривой. Ингибиование цитокинов из каждой концентрации исследуемого агента вычисляли с помощью первого вычитания уровня цитокина с агентом из уровня цитокина при положительном контроле. Полученную величину затем делили на уровень цитокина при положительном контроле и умножали на 100 с получением процента ингибиции с каждым определенным агентом.

Калибровочную кривую можно также получить для любого маркера с помощью 45 нанесения на график абсорбционной способности различных образцов маркеров известной концентрации. Калибровочную кривую может затем использовать для облегчения определения концентрации маркера в последующих исследованиях и анализах.

Пример 4: Иммунохимический анализ маркеров и состояния заболевания

Антитела вырабатывались в отношении следующих маркеров: FAS, IL-1B, IL-8, MMP-9, DEFB4, CTSS, IL-17B, CARD10, BGN, IL-12A, IL-6, LCN8, В-фактор и LPO. Выбор домена для выработки антител проводили с помощью критериев, включая

5 специфичность, иммуногенность, гидрофобность и кДНК доступность. Каждую целевую последовательность амплифицировали с помощью ПЦР из кДНК матрицы и вставляли в два прокариотических экспрессионных вектора, один для выработки антигена и один для выработки аффинного лиганда.

Проводили также исследование с коммерчески доступными антителами. Вестерн-блоттинг коммерчески доступных антител указал, что IL-6 и MMP-9 были хорошими кандидатами для дополнительного анализа и испытания.

Курицам-несушкам (леггорн и красный род-айленд) вводили антигены. Исследуемые образцы собирали 10 дней после первого стимулирования и пять дней после второго стимулирования. Образцы испытывали, используя исследования вестерн-блоттинг или 15 ELISA с рекомбинантными протеинами/пептидами. Антитела очищали, используя аффинную очистку. Клеточные экстракты из клеток Jurkat, A549, HEA и HEK293 использовали для исследования антител.

Антитела в отношении IL-6, MMP-9 и BFa (В-фактор) использовали в иммуногистохимическом (ИГХ) анализе для идентификации присутствия 20 биомаркера и/или уровня в тканях, коррелируемого с различными здоровыми и состояниями заболевания. Образцы гингивальной ткани получали у трех субъектов, имеющих гингивит (две легкие степени заболевания и одна умеренная степень заболевания). Гингивальные ткани также получали у пяти субъектов, имеющих здоровые десны. Заключенные в парафин зафиксированные формалином срезы ткани получали 25 для исследования. Многочисленные фрагменты собирали из источника гингивальной ткани с клиническими проявлениями воспаления, кровотечением, набуханием и изменениями структуры поверхности. Здоровый гингивальный источник был от удаления зуба или восстановления коронки. Информация об образце включает глубину зондирования, номер зуба, область и количество собранной десны. Контрольная ткань 30 была тканью нормального костного мозга для IL-6 и BFa и тканью рака молочной железы для MMP-9.

MMP-9 показал сильное окрашивание и в здоровой ткани, и в тканях с гингивитом. Результаты MMP-9 можно, например, объединить с данными от других биомаркеров, описанных в настоящей заявке (например, данные, полученные для других MMP), для 35 получения определенного диагноза заболевания пародонта у пациента. IL-6, только окрашенный в мононуклеарах, сопоставим с результатами вестерн-блоттинга (то есть, реагирует с клетками Jurkat). Коррелятивные тенденции также наблюдали для сравнений здоровой ткани и ткани с заболеванием, используя антитела анти-IL-6 и антитела анти-BFa с тканями, заключенными в парафин, но не такие явно выраженные, как полученные 40 для MMP-9.

Изобретение было описано в настоящей заявке в отношении определенных предпочтительных вариантов осуществлений. Однако, поскольку очевидные изменения вслед за тем станут очевидными специалисту в данной области техники, изобретение 45 нельзя рассматривать как их ограничение. Все патенты, заявки на патент и процитированные ссылки включены в настоящее описание в полном объеме посредством ссылки.

Формула изобретения

1. Способ идентификации соединения, пригодного для лечения заболевания или состояния ротовой полости, представляющего собой заболевание пародонта, включающий

- 5 получение первого гингивального образца у млекопитающего, страдающего от заболевания или состояния ротовой полости;
- 10 получение второго гингивального образца из ротовой полости вышеуказанного млекопитающего;
- 15 взаимодействие вышеуказанного первого образца с исследуемым соединением; взаимодействие вышеуказанного второго образца с положительным контролем, в котором вышеуказанный положительный контроль представляет собой соединение, известное для подавления экспрессии одного или более биомаркеров, выбранных из группы, состоящей из DEFB4, CTSS, BGN, BF и IL-12A;
- 20 измерение степени, с которой экспрессия одного или более из вышеуказанных биомаркеров подавляется с помощью вышеуказанного исследуемого соединения;
- 25 измерение степени, с которой экспрессия одного или более из вышеуказанных биомаркеров подавляется с помощью вышеуказанного положительного контроля; и сравнение степени, с которой экспрессия одного или более из вышеуказанных биомаркеров подавляется с помощью вышеуказанного исследуемого соединения, со степенью, с которой экспрессия одного или более из вышеуказанных биомаркеров подавляется с помощью вышеуказанного положительного контроля;
- 30 в котором исследуемое соединение, которое подавляет экспрессию одного или более из вышеуказанных биомаркеров в равной или большей степени, чем вышеуказанный положительный контроль, является соединением, пригодным для лечения заболевания или состояния ротовой полости;
- 35 в котором вышеуказанный положительный контроль представляет собой галогенированный дифениловый эфир.

2. Способ по п.1, в котором положительный контроль представляет собой триклозан.

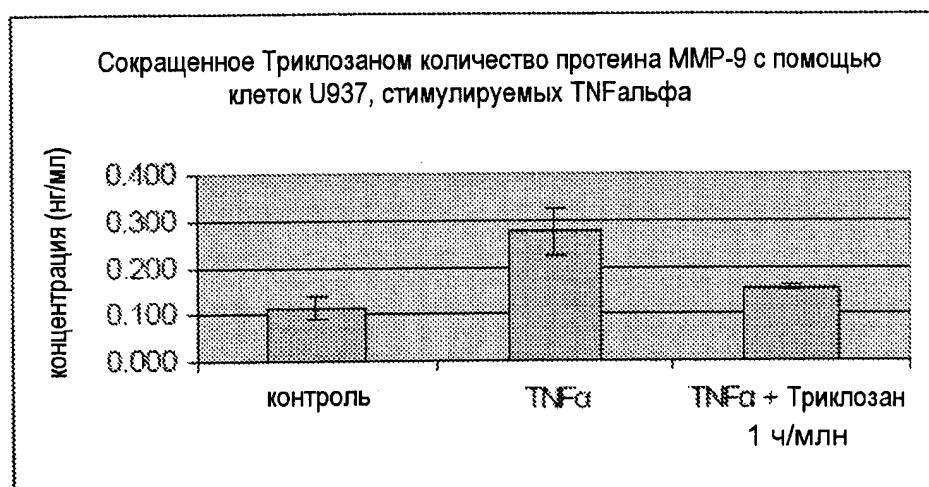
- 3. Способ по п.1, в котором вышеуказанное исследуемое соединение подавляет экспрессию одного или более из вышеуказанных биомаркеров в большей степени, чем вышеуказанный положительный контроль.

4. Способ по п.1, в котором вышеуказанное исследуемое соединение подавляет экспрессию DEFB4, CTSS, BGN, BF и IL-12A в большей степени, чем вышеуказанный положительный контроль.

35

40

45



Фиг. 1

СПИСОК ПОСЛЕДОВАТЕЛЬНОСТЕЙ

<110> Colgate-Palmolive Company
 TRivedi, Harsh M.
 Xu, Tao
 Yang, Ying

<120> ПРОТЕИНОВЫЕ БИОМАРКЕРЫ ДЛЯ ДИАГНОСТИКИ ЗАБОЛЕВАНИЯ МЯГКИХ ТКАНЕЙ И В
 КАЧЕСТВЕ ТЕРАПЕВТИЧЕСКИХ МИШЕНЕЙ ДЛЯ ВМЕШАТЕЛЬСТВА В ГИГИЕНУ ПОЛОСТИ РТА

<130> 8468-00-WO-OC

<140> PCT/US10/29674
 <141> 2010-04-01

<150> 61/165, 674
 <151> 2009-04-01

<160> 4

<170> PatentIn version 3.5

<210> 1
 <211> 21
 <212> ДНК
 <213> Rattus norvegicus

<400> 1
 gcccttatccc ttgatgccat t

21

<210> 2
 <211> 22
 <212> ДНК
 <213> Rattus norvegicus

<400> 2
 acagttcagg ctcaacctgc tg

22

<210> 3
 <211> 20
 <212> ДНК
 <213> Rattus norvegicus

<400> 3
 agccatgtac gtagccatcc

20

<210> 4
 <211> 20
 <212> ДНК
 <213> Rattus norvegicus

<400> 4
 accctcatag atgggcacag

20