



ФЕДЕРАЛЬНАЯ СЛУЖБА
ПО ИНТЕЛЛЕКТУАЛЬНОЙ СОБСТВЕННОСТИ

(12) ОПИСАНИЕ ИЗОБРЕТЕНИЯ К ПАТЕНТУ

(21)(22) Заявка: 2011144028/15, 01.04.2010

(24) Дата начала отсчета срока действия патента:
01.04.2010

Приоритет(ы):

(30) Конвенционный приоритет:
01.04.2009 US 61/165,685

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

(45) Опубликовано: 27.07.2014 Бюл. № 21

(56) Список документов, цитированных в отчете о поиске: US 6814958 B1, 09.11.2004.
T.SADOWSKI et.al. Effects of tetracyclines on the production of matrix metalloproteinases and plasminogen activators as well as of their natural inhibitors, tissue inhibitor of metalloproteinases-1 and plasminogen activator inhibitor-1.// Inflamm Res. - 2001 Mar -V.50(3) - P.175-82. YOSHIOKA M. et.al. Effect of hydroxamic (см. прод.)

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

(86) Заявка РСТ:
US 2010/029670 (01.04.2010)(87) Публикация заявки РСТ:
WO 2010/115031 (07.10.2010)

Адрес для переписки:
129090, Москва, ул. Б. Спасская, 25, строение 3,
ООО "Юридическая фирма Городиский и
Партнеры"

(72) Автор(ы):

БАРНС Вирджиния (US),
ТРИВЕДИ Харш М. (US),
ВАН Вэй (US),
СЮЙ Тао (US),
СИМИДЗУ Эми (US),
ПАРТРИДЖ Никола К. (US)

(73) Патентообладатель(и):

КОЛГЕЙТ-ПАЛМОЛИВ КОМПАНИ (US)

(54) СПОСОБ ИДЕНТИФИКАЦИИ СОЕДИНЕНИЯ, ПРИГОДНОГО ДЛЯ ЛЕЧЕНИЯ ВОСПАЛИТЕЛЬНОГО СОСТОЯНИЯ РОТОВОЙ ПОЛОСТИ

(57) Реферат:

Изобретение относится к области фармацевтики и представляет собой способ идентификации соединения, пригодного для лечения гингивита, включающий: взаимодействие первого гингивального образца, полученного от млекопитающего, страдающего от гингивита, с исследуемым соединением; взаимодействие

второго гингивального образца из ротовой полости млекопитающего с положительным контролем - соединением, подавляющим экспрессию одной или более матричных металлопротеиназ (галогенированный дифениловый эфир); измерение степени, с которой экспрессия одной или более матричных

металлопротеиназ подавляется с помощью исследуемого соединения; измерение степени, с которой экспрессия одной или более из матричных металлопротеиназ подавляется с помощью положительного контроля; и сравнение степени, с которой экспрессия одной или более из матричных металлопротеиназ подавляется с помощью исследуемого соединения, со степенью, с которой экспрессия одной или более из матричных металлопротеиназ подавляется с

помощью положительного контроля; в котором исследуемое соединение, которое подавляет экспрессию одной или более из матричных металлопротеиназ в равной или большей степени, чем положительный контроль, является соединением, пригодным для лечения гингивита; где одна или более матричных металлопротеиназ, для которых измеряют экспрессию, включают, по меньшей мере, MMP-9 и MMP-13. 6 з.п. ф-лы, 2 пр., 4 табл., 3 ил.

(56) (продолжение):

acid-based matrix metalloproteinase inhibitors on human gingival cells and Porphyromonas gingivalis. // J Periodontol. - 2003. Aug - 74(8). P.1219-1224 . MARCELA HERNANDEZ et.al. Matrix Metalloproteinase-13 is highly expressed in destructive periodontal disease activity. // J Periodontol - November. 2006. V.77. N11. P.1863-1870. Е.В.БОРОВСКИЙ и др. Терапевтическая стоматология: Учебник для студентов медицинских вузов/ Под ред. Е.В.Боровского. " М.: "Медицинское информационное агенство", 2004. 840 с. F.S.PANAGAKOS et.al. Triclosan inhibition of cytokine-stimulated MMP production by osteoblast-like cells. // 81st General Session of the International Association for Dental research (June 25-28, 2003) Seq#227 " Biologic Response modifiers and Tissue Formation. [он-лайн] [найдено 12.10.12]. Найдено в Интернет). WO 2005103071 A1, 03.11.2005. 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

RU 2524629 C2

RU 2524629 C2



FEDERAL SERVICE
FOR INTELLECTUAL PROPERTY

(12) **ABSTRACT OF INVENTION**(21)(22) Application: **2011144028/15, 01.04.2010**(24) Effective date for property rights:
01.04.2010

Priority:

(30) Convention priority:
01.04.2009 US 61/165,685(43) Application published: **10.05.2013** Bull. № 13(45) Date of publication: **27.07.2014** Bull. № 21(85) Commencement of national phase: **01.11.2011**(86) PCT application:
US 2010/029670 (01.04.2010)(87) PCT publication:
WO 2010/115031 (07.10.2010)

Mail address:

**129090, Moskva, ul. B. Spasskaja, 25, stroenie 3,
OOO "Juridicheskaja firma Gorodisskij i Partnery"**

(72) Inventor(s):

**BARNS Virdzhinija (US),
TRIVEDI Kharsh M. (US),
VAN Vehj (US),
SJuJ Tao (US),
SIMIDZU Ehmi (US),
PARTRIDZh Nikola K. (US)**

(73) Proprietor(s):

KOLGEJT-PALMOLIV KOMPANI (US)(54) **METHOD OF IDENTIFYING COMPOUND, SUITABLE FOR TREATING INFLAMMATORY CONDITION OF ORAL CAVITY**

(57) Abstract:

FIELD: medicine, pharmaceuticals.

SUBSTANCE: invention relates to the field of pharmaceuticals and represents a method of identifying a compound, suitable for treatment of gingivitis, which includes an interaction of the first gingival sample, obtained from a mammal, suffering from gingivitis, with an analysed compound; an interaction of the second gingival sample from the oral cavity of a mammal with a positive control - a compound, suppressing the expression of one or more matrix metalloproteinases (halogenated diphenyl ether); measurement of a degree, with which an expression of one or more matrix metalloproteinases is suppressed by means of the analysed compound; measurement of a degree, with which the expression of one or more matrix metalloproteinases is suppressed by means of the positive control; and compari-

son of a degree, with which the expression of one or more matrix metalloproteinases is suppressed by means of the analysed compound, with a degree, with which the expression of one or more matrix metalloproteinases is suppressed by means of the positive control; in which the analysed compound, which suppresses the expression of one or more matrix metalloproteinases in an equal or a higher degree than the positive control, is a compound, suitable for treatment of gingivitis; where one or more matrix metalloproteinases, for which the expression is measured, include, at least, MMP-9 and MMP-13.

EFFECT: elaboration of the method of identifying the compound, suitable for treatment of gingivitis.

7 cl, 2 ex, 4 tbl, 3 dwg

УРОВЕНЬ ТЕХНИКИ

Периодонтит характеризуется, частично, неправильной и чрезмерной деградацией периодонтального органического матрикса. Этот матрикс включает десну, периодонтальную связку, цементное вещество зубов и альвеолярную кость. По меньшей мере, часть разрушения матрикса опосредована сверхсинтезом матриксных металлопротеиназ (ММП), семейства цинк-зависимых эндопептидаз. ММП также способствуют резорбции костной ткани, разрушая остеонидную ткань (то есть деминерализованный и недавно синтезированный костный матрикс), затем разрушая матрикс. Эти явления приводят к клиническому проявлению периодонтита, включая атрофию десен, образование патологического десневого кармана, потерю прикрепления и возможную потерю зуба.

СУЩНОСТЬ ИЗОБРЕТЕНИЯ

Изобретение включает способ лечения периодонтита у млекопитающего, нуждающегося в таком лечении, включающий взаимодействие клетки во рту млекопитающего с агентом, который подавляет, по меньшей мере, одну матриксную металлопротеиназу, выбранную из группы, состоящей из ММП-9 и ММП-13, в котором подавление металлопротеиназы коррелируется с сокращением, по меньшей мере, одного симптома, связанного с периодонтитом.

Изобретение также включает способ идентификации соединения, пригодного для лечения периодонтита у млекопитающего, способ, включающий взаимодействие клетки с исследуемым соединением и определение, подавляет ли исследуемое соединение, по меньшей мере, одну матриксную металлопротеиназу, выбранную из группы, состоящей из ММП-9 и ММП-13, в котором подавление, по меньшей мере, одной матриксной металлопротеиназы является показателем, что исследуемое соединение является пригодным для лечения периодонтита.

Изобретение также включает способ лечения периодонтита у млекопитающего, нуждающегося в таком лечении, включающий введение в ротовую полость млекопитающего пероральной композиции, содержащей 2,4,4'-трихлор-2'-гидроксидифениловый эфир в количестве, которое является эффективным для подавления, по меньшей мере, одной матриксной металлопротеиназы в ротовой полости млекопитающего, причем матриксная металлопротеиназа выбрана из группы, состоящей из ММП-9 и ММП-13, в котором подавление матриксной металлопротеиназы приводит к лечению периодонтита у млекопитающего.

Изобретение дополнительно включает способ сокращения патологического превышения активности матриксной металлопротеиназы в ротовой полости млекопитающего, нуждающегося в таком лечении, включающий введение в ротовую полость млекопитающего пероральной композиции, содержащей 2,4,4'-трихлор-2'-гидроксидифениловый эфир в количестве, которое является эффективным для уменьшения активности матриксной металлопротеиназы в ротовой полости млекопитающего, причем матриксная металлопротеиназа выбрана из группы, состоящей из ММП-9 и ММП-13, в котором ингибирование активности матриксной металлопротеиназы приводит к ингибированию чрезмерного разрушения компонентов соединительной ткани матриксного протеина.

Изобретение включает способ сокращения патологического избытка матриксной металлопротеиназы в ротовой полости млекопитающего, нуждающегося в таком лечении, включающий введение в ротовую полость млекопитающего пероральной композиции, содержащей 2,4,4'-трихлор-2'-гидроксидифениловый эфир в количестве, которое является эффективным для уменьшения уровня матриксной металлопротеиназы

в ротовой полости млекопитающего, в котором ингибирование уровня матриксной металлопротеиназы приводит к ингибированию чрезмерного разрушения компонентов соединительной ткани матриксного протеина и в котором матриксная металлопротеиназа выбрана из группы, состоящей из MMP-9 и MMP-13.

5 В одном варианте осуществления способ включает пероральную композицию, содержащую 0-36% вес. кремнийсодержащего полирующего компонента; 0,25-0,35% вес., по существу, нерастворимого в воде некаатионного антибактериального агента, выбранного из группы, состоящей из галогенированных дифениловых эфиров, галогенированных салициланилидов, бензойных эфиров, галогенированных карбанилидов и фенольных соединений; и эффективное количество 0,01-4,0% вес. агента, увеличивающего антибактериальную активность, который улучшает доставку и плотное соединение вышеуказанного антибактериального агента и удержание его на поверхности зуба и десны, в котором вышеуказанный агент, увеличивающий антибактериальную активность, представляет собой (i) сополимер малеиновой кислоты или ангидрида с 10 другим инертным этиленненасыщенным полимеризующимся мономером или (ii) полимер поли(бета-стиролфосфоновой кислоты) или поли(альфа-стиролфосфоновой кислоты) или сополимер любой стиролфосфоновой кислоты с другим этиленненасыщенным мономером, и композицию, необязательно дополнительно содержащую источник, обеспечивающий количество фторид-ионов, достаточное для доставки от 25 ч./млн до 20 5000 ч./млн фторид-ионов. В одном варианте осуществления пероральная композиция содержит 0,01-36% вес. кремнийсодержащего полирующего компонента. В другом варианте осуществления пероральная композиция не содержит кремнийсодержащего полирующего компонента.

В одном варианте осуществления способ включает пероральную композицию, 25 содержащую эффективное количество против зубного налета, по меньшей мере, одной растворимой в воде линейной молекулярно дегидратированной полифосфатной соли в качестве необходимого агента против зубного налета, эффективное количество против зубного камня, по существу, нерастворимого в воде некаатионного антибактериального соединения в качестве необходимого агента против зубного камня, и необязательно 30 источник, обеспечивающий количество фторид-ионов, достаточное для доставки от 25 ч./млн до 5000 ч./млн фторид-ионов. В одном аспекте 2,4,4'-трихлор-2'-гидроксидифениловый эфир присутствует в композиции в концентрации от 1 ч./млн до 100 ч./млн.

В одном варианте осуществления пероральная композиция представляет собой 35 жидкость для полоскания ротовой полости или средство для полоскания ротовой полости. В одном аспекте жидкость для полоскания ротовой полости или средство для полоскания ротовой полости не содержит кремнийсодержащего полирующего агента.

КРАТКОЕ ОПИСАНИЕ ЧЕРТЕЖЕЙ

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

Фигура 2 иллюстрирует эффект 2,4,4'-трихлор-2'-гидроксидифенилового эфира на ПТГ-индуцированную MMP-13 выработку остеобластов.

Фигура 3 иллюстрирует эффект средства для ухода за зубами настоящего изобретения на выработку MMP-13, индуцированную ПТГ, в остеобластах.

ПОДРОБНОЕ ОПИСАНИЕ ИЗОБРЕТЕНИЯ

45 Три основные разрушительные MMP при периодонтите представляют собой MMP-8, MMP-9 и MMP-13. MMP-8 и MMP-13 представляют собой коллагеназы и MMP-9 представляет собой желатиназу. Все три фермента могут быть обнаружены в

пораженной корневой оболочке и гингивальной десневой жидкости. Уровни этих ферментов положительно коррелируются с клиническими признаками периодонтита. Таким образом, повышенные или «выше нормального» уровни, по меньшей мере, одной из MMP-8, MMP-9 и MMP-13 представляют собой признак периодонтита.

5 Измерения можно проводить, используя ферменты MMP-8, MMP-9 и MMP-13, РНК или биологической активности.

В настоящем описании далее теперь показано, что пероральную композицию, содержащую 2,4,4'-трихлор-2'-гидроксидифениловый эфир (триклозан), можно использовать для уменьшения уровней, по меньшей мере, одной из MMP-8, MMP-9 и MMP-13 в ротовой полости млекопитающего. В одном варианте осуществления пероральная композиция представляет собой средство для ухода за зубами. В другом варианте осуществления пероральная композиция включает, например, жидкость для полоскания ротовой полости, накладку или гель. В другом аспекте антибактериальное соединение можно использовать для уменьшения уровней, по меньшей мере, одной из MMP-8, MMP-9 и MMP-13 в ротовой полости млекопитающего.

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 «периодонтит» относится к неправильному и чрезмерному разрушению периодонтального органического матрикса, включая десну, периодонтальную связку, цементное вещество зубов и альвеолярную кость. Клиническое проявление периодонтита включает, но не ограничивается ими, атрофию десен, образование патологического десневого кармана, потерю прикрепления матрикса, потерю зуба и костной массы. Периодонтит может быть охарактеризован как начальный периодонтит, умеренный периодонтит или осложненный периодонтит. Однако периодонтит не должен быть ограничен только теми симптомами и осложнениями, изложенными в настоящем описании, как будет очевидно специалисту в данной области техники. Начальный периодонтит 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 периодонтит 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 отношение коронки к корню 1:1). Осложненный периодонтит 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 1/3 поддерживающей альвеолярной кости (то есть отношение коронки к корню 2:1 или более). Периодонтит делится на формы, включая, но не ограничиваясь ими: периодонтит

взрослых (например, связанный с налетом); ранний периодонтит (например, препубертатный, ювенильный, быстро развивающийся и подобные); периодонтит, связанный с системными заболеваниями; некротический язвенный периодонтит; устойчивый периодонтит; периимплантит и подобные.

5 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.

10 Следует понимать, что термин «лечение периодонтита» включает предотвращение периодонтита у млекопитающего, так же как ингибирование развития одного или более существующих ранее состояний, связанных с периодонтитом у млекопитающего. Используемые в настоящем описании термины «ингибировать» и «ингибирование» относятся к частичному ингибированию или полному ингибированию периодонтита по сравнению с состоянием без лечения, такому как терапевтическое лечение и/или 15 профилактика результатов. Лечение периодонтита 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 20 активности выше принятого нормального уровня. Например, «патологический избыток» активности матриксной металлопротеиназы представляет собой уровень активности матриксной металлопротеиназы, который является выше уровня, обычно обнаруживаемого при здоровом состоянии. Используемый в настоящем описании «патологический избыток активности матриксной металлопротеиназы» является 25 уровнем активности матриксной металлопротеиназы, связанным с периодонтитом.

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, или сокращению биохимического эффекта присутствия протеина, такого как один или 30 более из MMP-8, MMP-9 и MMP-13.

В одном аспекте изобретение обеспечивает способ сокращения патологического избытка, по меньшей мере, одной из MMP-8, MMP-9 и MMP-13 в ротовой полости млекопитающего, нуждающегося в таком лечении, включающий введение в ротовую полость млекопитающего пероральной композиции, содержащей 2,4,4'-трихлор-2'- 35 гидроксидифениловый эфир в количестве, которое является эффективным для уменьшения уровня матриксной металлопротеиназы в ротовой полости млекопитающего, в котором ингибирование уровня матриксной металлопротеиназы приводит к ингибированию чрезмерного разрушения компонентов соединительной ткани матриксного протеина.

40 В настоящем описании изложено, что MMP, такие как MMP-8, MMP-9 или MMP-13, можно уменьшить в ротовой полости с помощью одного из многочисленных путей. В одном варианте осуществления MMP можно уменьшить в ротовой полости с помощью подавления MMP на уровне нуклеиновой кислоты, как изложено в другом месте в настоящем описании. Такое сокращение может привести к сокращению одной или 45 более нуклеиновых кислот, кодирующих MMP (например, мРНК), и фермента MMP, экспрессированного в ротовой полости. Сокращение мРНК, кодирующей MMP, 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 ММР, и разрушение/удаление мРНК, кодирующей ММР.

5 В другом варианте осуществления ММР можно уменьшить в ротовой полости, непосредственно уменьшая количество фермента ММР. Сокращение фермента ММР 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, ингибирование фермента с помощью низкомолекулярного ингибитора, ингибирование с помощью 10 природной или биологически-полученной молекулы, протеолитическое разрушение фермента и основанное на средстве очищение фермента из ротовой полости. В настоящей заявке описано, что агент, который уменьшает одну или более из ММР-8, ММР-9 или ММР-13, может быть агентом, таким как 2,4,4'-трихлор-2'-гидроксифениловый эфир (ТРИКЛОЗАН) или он может быть другим 15 антибактериальным агентом. В другом аспекте агент может быть отличным от антибактериального агента. Также изобретение обеспечивает способы лечения субъекта, пораженного периодонтитом.

В одном аспекте изобретения способ обеспечивает сокращение патологического избытка активности матриксной металлопротеиназы в ротовой полости 20 млекопитающего, нуждающегося в таком лечении, включающий введение в ротовую полость млекопитающего пероральной композиции, содержащей 2,4,4'-трихлор-2'-гидроксифениловый эфир в количестве, которое является эффективным для уменьшения активности матриксной металлопротеиназы, по меньшей мере, одной из ММР-8, ММР-9 и ММР-13 в ротовой полости млекопитающего, в котором ингибирование 25 активности матриксной металлопротеиназы приводит к ингибированию чрезмерного разрушения компонентов соединительной ткани матриксного протеина. В другом аспекте введение в ротовую полость млекопитающего пероральной композиции, содержащей 2,4,4'-трихлор-2'-гидроксифениловый эфир, проводят в количестве, которое является эффективным для снижения уровня, по меньшей мере, одной из ММР- 30 8, ММР-9 и ММР-13 в ротовой полости млекопитающего, в котором снижение уровня матриксной металлопротеиназы приводит к сокращению полной ферментативной активности металлопротеиназы, приводящему к ингибированию чрезмерного разрушения компонентов соединительной ткани матриксного протеина. В одном варианте осуществления патологический избыток одной или более ММР можно 35 уменьшить, как описано в другом месте в настоящей заявке, относительно сокращения количества ММР в ротовой полости млекопитающего. Таким образом, ММР можно уменьшить в одном или обоих уровнях нуклеиновой кислоты и протеина. Как описано в другом месте настоящей заявки, сокращение патологического избытка одного или более таких ММР может обеспечить лечение периодонтита у млекопитающего.

40 В другом аспекте изобретение обеспечивает способ сокращения активности, по меньшей мере, одной из ММР-8, ММР-9 и ММР-13 в ротовой полости млекопитающего, нуждающегося в таком лечении, включающий введение в ротовую полость млекопитающего пероральной композиции, содержащей 2,4,4'-трихлор-2'-гидроксифениловый эфир в количестве, которое является эффективным для 45 уменьшения уровня матриксной металлопротеиназы в ротовой полости млекопитающего, в котором ингибирование уровня матриксной металлопротеиназы приводит к ингибированию чрезмерного разрушения компонентов соединительной ткани матриксного протеина. В одном варианте осуществления активность одного или

более MMP можно уменьшить, как описано в другом месте в настоящей заявке, относительно сокращения количества протеина MMP в ротовой полости млекопитающего. Таким образом, MMP можно уменьшить в одном или обоих уровнях нуклеиновой кислоты и протеина, таким образом, уменьшая активность MMP в ротовой полости, или непосредственно уменьшая активность MMP, или косвенно уменьшая уровень MMP протеина и/или нуклеиновой кислоты.

В другом аспекте изобретение обеспечивает способы лечения периодонтита у млекопитающего, нуждающегося в таком лечении, включающие взаимодействие клетки в ротовой полости млекопитающего с агентом, который подавляет одну или обе, по меньшей мере, одной из MMP-8, MMP-9 и MMP-13. Согласно изобретению подавление металлопротеиназы коррелируется с сокращением, по меньшей мере, одного симптома, связанного с периодонтитом.

MMP, такие как MMP-8, MMP-9 или MMP-13, можно подавлять на уровне нуклеиновой кислоты. Посредством неограничивающего примера MMP можно подавлять согласно изобретению с помощью подавления мРНК, кодирующей MMP. В одном варианте осуществления способ изобретения включает взаимодействие ротовой полости млекопитающего с агентом, который подавляет одну или более из MMP-8, MMP-9 или MMP-13. В настоящей заявке описано, что агент, который подавляет одну или более из MMP-8, MMP-9 или MMP-13, может быть агентом, таким как ТРИКЛОЗАН, или он может быть другим антибактериальным агентом. В другом аспекте агент может быть отличным от антибактериального агента. Также, изобретение обеспечивает способы лечения индивида, пораженного периодонтитом.

В другом аспекте изобретение обеспечивает способ лечения периодонтита у млекопитающего, нуждающегося в таком лечении. В одном варианте осуществления способ лечения периодонтита у млекопитающего, нуждающегося в таком лечении, включает введение в ротовую полость млекопитающего пероральной композиции, содержащей 2,4,4'-трихлор-2'-гидроксидифениловый эфир в количестве, которое является эффективным для подавления, по меньшей мере, одной из MMP-8, MMP-9 и MMP-13, в котором подавление матриксной металлопротеиназы приводит к лечению периодонтита у млекопитающего. В другом варианте осуществления способ лечения периодонтита у млекопитающего, нуждающегося в таком лечении, включает введение в ротовую полость млекопитающего пероральной композиции, содержащей 2,4,4'-трихлор-2'-гидроксидифениловый эфир в количестве, которое является эффективным для снижения уровня, по меньшей мере, одной из MMP-8, MMP-9 и MMP-13, в котором снижение уровня матриксной металлопротеиназы приводит к лечению периодонтита у млекопитающего. В еще другом варианте осуществления способ лечения периодонтита у млекопитающего, нуждающегося в таком лечении, включает введение в ротовую полость млекопитающего пероральной композиции, содержащей 2,4,4'-трихлор-2'-гидроксидифениловый эфир в количестве, которое является эффективным для снижения уровня активности, по меньшей мере, одной из MMP-8, MMP-9 и MMP-13, в котором снижение уровня активности матриксной металлопротеиназы приводит к лечению периодонтита у млекопитающего.

В способе лечения периодонтита с помощью введения в ротовую полость млекопитающего пероральной композиции активность одной или более MMP может быть уменьшена, как описано в другом месте настоящей заявки, относительно сокращения количества MMP в ротовой полости млекопитающего. Таким образом, MMP может быть снижена при уровне одного или обоих из нуклеиновой кислоты и протеина, таким образом, уменьшая активность MMP в ротовой полости. Подобно

этому, подавление ММР или сокращение уровня ММР может быть затронуто действием уровней или нуклеиновой кислоты, или протеина, как описано подробно в другом месте в настоящей заявке.

5 В другом аспекте изобретение обеспечивает способ идентификации соединения, пригодного для лечения периодонтита у млекопитающего, нуждающегося в таком лечении, включающий взаимодействие клетки с исследуемым соединением и определение, подавляет ли исследуемое соединение одну или обе, по меньшей мере, из одной из ММР-8, ММР-9 и ММР-13. Подавление, по меньшей мере, одной из матричных металлопротеиназ является показателем, что исследуемое соединение является
10 пригодным для лечения периодонтита.

В одном варианте осуществления способ лечения периодонтита включает введение агента, идентифицированного с помощью анализа скрининга, описанного в настоящей заявке, или комбинации агентов, которые ингибируют один или более маркеров периодонтита, в котором, по меньшей мере, один из агентов представляет собой агент,
15 идентифицированный с помощью анализа скрининга, описанного в настоящей заявке.

В одном варианте осуществления изобретение обеспечивает способ лечения периодонтита, включающий стадию введения терапевтически эффективного количества агента, которое ингибирует периодонтальное заболевание и/или периодонтальное нарушение у субъекта, нуждающегося в таком лечении. В настоящей заявке определено,
20 что терапевтически эффективное количество агента (то есть эффективная дозировка) располагается в 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
25 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
30 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 диагностического исследования.

35 Специалист в данной области техники определит, как обнаружить присутствие периодонтита. Дополнительно, специалист в данной области техники определит, как идентифицировать повышенный уровень одной или более из ММР-8, ММР-9 и ММР-13. Характерный способ для детектирования присутствия или отсутствия периодонтита у млекопитающего включает получение биологического образца из ротовой полости
40 исследуемого субъекта и взаимодействие биологического образца с соединением или агентом, способным определить один или более маркеров периодонтита (то есть ММР-8, ММР-9 или ММР-13), описанных в настоящей заявке, например, маркерная нуклеиновая кислота (например, в том числе мРНК, геномная ДНК) или маркерный пептид (например, в том числе фрагмент пептида или протеин), кодируемый маркерной
45 нуклеиновой кислотой, так что присутствие маркерной нуклеиновой кислоты или маркерного пептида, кодируемого нуклеиновой кислотой, детектируют в биологическом образце. В одном варианте осуществления агент для детектирования маркерной мРНК или геномной ДНК представляет собой меченый зонд нуклеиновой кислоты, способный

к гибридизации с маркерной мРНК или геномной ДНК. Зонд нуклеиновой кислоты может быть, например, маркерной нуклеиновой кислотой по всей длине или ее частью. Другие подходящие зонды для применения в диагностических исследованиях изобретения описаны в настоящей заявке. В другом варианте осуществления активность маркера периодонтита используют как способ детектирования маркера (то есть активность ММР-8, ММР-9 или ММР-13). Любое известное на данный момент или позже разработанное исследование для детектирования активности маркера охвачено в настоящем описании.

В другом варианте осуществления агент для детектирования маркерного пептида представляет собой антитело, способное к связыванию с маркерным 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').sub.2). Полагают, что термин «меченый» относительно зонда или антитела охватывает прямое мечение зонда или антитела с помощью связывания (то есть, физического соединения) детектируемого вещества с зондом или антителом, так же как не прямое мечение зонда или антитела с помощью взаимодействия с другим реагентом, который непосредственно метят. Примеры непрямого мечения включают детектирование первичного антитела, используя флуоресцентно меченное вторичное антитело и меченый на конце ДНК-зонд с биотином, так что он может быть детектирован флуоресцентно меченным стрептавидином.

Полагают, что используемый в настоящем описании термин «биологический образец» включает ткани, клетки и биологические жидкости, выделенные из ротовой полости субъекта, так же как ткани, клетки и жидкости, находящиеся в пределах ротовой полости субъекта. Таким образом, способ детектирования изобретения можно использовать для детектирования маркерной 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 маркерной мРНК включают Нозерн-гибридизации и гибридизации *in situ*. Методы *in vitro* для детектирования маркерного пептида включают твердофазный иммуноферментный анализ (ELISA), вестерн-блоттинг, иммунопреципитацию и иммунофлуоресценцию. Методы *in vitro* для детектирования маркерной геномной ДНК включают Саузерн-гибридизацию. Методы *in vivo* для детектирования маркерного пептида включают введение в ротовую полость субъекта меченого антимаркерного антитела. Например, антитело может быть мечено радиоактивным маркером, присутствие которого и местоположение у субъекта можно детектировать с помощью стандартных методов воспроизведения изображения.

В одном варианте осуществления способы дополнительно включают получение контрольного биологического образца от контрольного субъекта, взаимодействие контрольного образца с соединением или агентом, способным детектировать маркерные пептиды, мРНК или геномную ДНК, так что присутствие маркерного пептида, мРНК или геномной ДНК детектируют в биологическом образце, и сравнение присутствия маркерных пептидов, мРНК или геномной ДНК в контрольном образце с присутствием маркерного пептида, мРНК или геномной ДНК в исследуемом образце. Альтернативно, присутствие маркерного пептида, мРНК или геномной ДНК в исследуемом образце можно сравнить с информацией в базе данных или на диаграмме для проведения детектирования или диагноза. В другом варианте осуществления способы дополнительно включают использование контрольного биологического образца, полученного от субъекта, имеющего периодонтит, в которых контрольный образец получали от субъекта

до начала заболевания периодонтитом (то есть когда субъект был здоров или в «нормальном» состоянии без периодонтита).

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 другом варианте осуществления агент представляет собой доксициклин. В другом аспекте агент может быть отличным от антибактериального агента. В одном варианте осуществления агент представляет собой ингибитор MMP.

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 агента, такого как антибактериальный агент, и с помощью сравнения уровня MMP-9, установленного *in vitro*, при взаимодействии клетки с TNF α при отсутствии антибактериального агента, 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. Основываясь на раскрытии, изложенном в настоящем описании, следует понимать, что одинаковые способы могут быть использованы для оценки MMP-8 и/или MMP-13.

Следует понимать, что *in vitro* измерение подавления MMP-8, MMP-9 и/или MMP-13 может коррелироваться с *in vivo* эффектом, наблюдением или результатом. В одном аспекте подавление металлопротеиназы, измеренное *in vitro*, является подтверждением наблюдения *in vivo*, включая, но не ограничиваясь ими, лечение периодонтита, способ сокращения патологического избытка металлопротеиназы и/или активности металлопротеиназы *in vivo* и способ идентификации соединения, пригодного для лечения периодонтита и/или уменьшения патологического избытка металлопротеиназы и/или активности металлопротеиназы *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. В другом аспекте подавление металлопротеиназы, измеренное *in vitro*, является прогнозирующим параметром результата *in vivo*, включая, но не ограничиваясь ими, лечение периодонтита, способ сокращения патологического избытка металлопротеиназы и/или активности металлопротеиназы *in vivo* и способ идентификации соединения, пригодного для лечения периодонтита и/или уменьшения патологического избытка металлопротеиназы и/или активности металлопротеиназы *in vivo*.

Посредством другого неограничивающего примера уровень MMP-13 может быть определен *in vitro* при взаимодействии клетки с паратиреоидным гормоном (ПТГ). В одном варианте осуществления клетка представляет собой остеобласт. После взаимодействия клетки с ПТГ уровень MMP-13 детектируют или при уровне протеина, или нуклеиновой кислоты. В одном аспекте уровень MMP-13 также определяют *in vitro* с помощью взаимодействия клетки с ПТГ в присутствии антибактериального агента. В одном варианте осуществления антибактериальный агент представляет собой 2,4,4'-трихлор-2'-гидроксидифениловый эфир. Более низкий уровень MMP-13 протеина,

нуклеиновой кислоты или ферментативной активности в присутствии антибактериального агента, чем при отсутствии антибактериального агента, является показателем, что антибактериальное соединение подавляет ММР-13.

5 В одном аспекте способность пероральной композиции, описанной в настоящей заявке, лечить периодонтит определяют при сравнении эффекта 2,4,4'-трихлор-2'-гидроксиdifенилового эфира при подавлении металлопротеиназы с эффектом пероральной композиции при подавлении металлопротеиназы. В другом аспекте способность любой пероральной композиции лечить периодонтит определяют при сравнении эффекта пероральной композиции или *in vivo*, или *in vitro* с эффектом пероральной композиции, описанной в настоящей заявке.

10 Изобретение дополнительно включает пероральную композицию, такую как, например, средство для ухода за зубами, гель, накладку, жидкость для полоскания полости рта или спрей для применения в способе изобретения. В одном аспекте пероральная композиция содержит антибактериальный агент. В типичном варианте осуществления антибактериальный 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%. Например, когда пероральная композиция представляет собой жидкость для полоскания полости рта, концентрацию антибактериального агента можно уменьшить до 10 раз по сравнению с той, которую используют в другом средстве для ухода за 20 зубами, таком как зубная паста. В одном варианте осуществления антибактериальный агент представляет собой 2,4,4'-трихлор-2'-гидроксиdifениловый эфир. В другом варианте осуществления пероральная композиция содержит два или более антибактериальных агентов.

30 В одном варианте осуществления агент, усиливающий антибактериальную активность (АЕА), увеличивает доставку антибактериального агента и удержание 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 35 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 поликарбоната, малеинового ангидрида, малеиновой 40 кислоты и метилвинилового эфира. В другом аспекте клейкая молекула представляет собой полимер метилвинилового эфира и малеинового ангидрида. Агент, усиливающий антибактериальную активность, можно использовать при уровне, который представляет собой 0,01% вес.-4,0% вес. пероральной композиции.

45 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) поверхностями, таким образом «доставляя» антибактериальный агент таким

поверхностям. Органическая увеличивающая удерживание группа, обычно гидрофобная, присоединяет или иначе связывает антибактериальный агент с АЕА, таким образом способствуя удерживанию антибактериального агента с АЕА и косвенно на поверхностях рта. В некоторых случаях 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 обеспечивает физическое удерживание антибактериального агента к или с помощью поперечно сшитого АЕА полимера.

В одном варианте осуществления агент, усиливающий антибактериальную активность, который улучшает доставку и плотное соединение вышеуказанного антибактериального агента и удержание его на поверхности зуба и десны, представляет собой (i) сополимер малеиновой кислоты или ангидрида с другим инертным этиленненасыщенным полимеризующимся мономером или (ii) полимер поли(бета-стиролфосфоновой кислоты) или поли(альфа-стиролфосфоновой кислоты) или сополимер любой стиролфосфоновой кислоты с другим этиленненасыщенным мономером. Однако специалист в данной области техники поймет, что настоящее изобретение не ограничивается используемым определенным агентом, усиливающим антибактериальную активность, и что другие агенты, усиливающие антибактериальную активность, охвачены в соответствии с настоящим изобретением.

В типичном средстве для ухода за зубами присутствует перорально приемлемый наполнитель, включающий водную фазу с увлажняющим веществом. Вода присутствует 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 характерно 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 увлажняющий наполнитель может быть включен дополнительный ингредиент, который помогает солюбилизации антибактериального агента в слюне. Такие необязательные солюбилизующие агенты включают увлажняющие полиолы, такие как пропиленгликоль, дипропиленгликоль и гексиленгликоль, целлозольвы, такие как метилцеллозольв и этилцеллозольв, растительные масла и воски, содержащие, по 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 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 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 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 вещество может быть выбран из фосфата кальция (например, дикальцийфосфат дигидрат), сульфата кальция, осажденного карбоната кальция, диоксида кремния (например, гидратированный диоксид кремния), пирофосфата кальция и комбинаций. Может быть использован 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 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 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 № 3538230.

В одном варианте осуществления пероральная композиция содержит кремнийсодержащий полирующий агент. Полирующий агент может быть 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 включают продаваемые под торговой маркой ZEODENT, такие как ZEODENT 113, и ZEODENT 115, и ZEODENT 119.

Жидкость для полоскания полости рта или средство для полоскания полости рта не будут обычно содержать абразивные частицы или полирующие частицы. Накладка не будет обычно содержать абразивные частицы или полирующие частицы.

Не будучи привязанным к теории, на основании чего достигают преимуществ этого изобретения, полагают, что даже при отсутствии специального солубилизирующего материала для антибактериального агента (например, 2,4,4'-трихлор-2'-гидроксифениловый эфир), когда количество агента представляет собой 0,25% вес.-0,35% вес. и присутствует поликарбоксилат, присутствует достаточный агент для эффективного лечения периодонтита 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.

Пероральная композиция (например, средство для ухода за зубами) может также содержать источник ионов фторида или компонент, обеспечивающий фтор, в качестве противокариесного 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 высвободить 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 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.

Предпочтительными являются фториды щелочного металла и олова, такие как фториды натрия и олова, монофторфосфат натрия (MFP) и их смеси. Как правило, в случае фторидов 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 ионов олова; соединения фторида; фторида натрия; хлоргексидина; алексидина; гексетидина; сангвинарина; бензалкония хлорида; салициланилида; домифена бромид; цетилпиридиния хлорида (CPC); тетрадецилпиридиния хлорида (TPC); N-тетрадецил-4-этилпиридиния хлорида (TDEPC); октенидина; делмопинола; октапинола; низина; агента ионов цинка; агента ионов меди; эфирных масел; фуранонов; бактерицинов, этиллауроила аргината, экстрактов магнолии, источника ионов металла, аргинина, бикарбоната аргинина, гонокиола, магонола, урсоловой кислоты, урсиновой кислоты, морина, экстракта облепихи крушиновой, пероксида, фермента, экстракта камелии, флавоноида, флавана, галогенированного дифенилового эфира, креатина и прополиса.

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 соединение, известное для подавления экспрессии одной или более матриксных металлопротеиназ; измерение степени, с которой экспрессия одной или более из вышеуказанных матриксных металлопротеиназ подавляется с помощью вышеуказанного исследуемого соединения; измерение степени, с которой экспрессия одной или более из вышеуказанных матриксных металлопротеиназ подавляется с помощью вышеуказанного положительного контроля; и сравнение степени, с которой экспрессия одной или более из вышеуказанных матриксных металлопротеиназ подавляется с помощью вышеуказанного исследуемого соединения, со степенью, с которой экспрессия одной или более из вышеуказанных матриксных металлопротеиназ подавляется с помощью вышеуказанного положительного контроля; в котором исследуемое соединение, которое подавляет экспрессию одной или более из вышеуказанных матриксных металлопротеиназ в равной или большей степени, чем вышеуказанный положительный контроль, является соединением, пригодным для лечения заболевания или состояния ротовой полости.

В других вариантах осуществления одну или более матриксных металлопротеиназ

выбирают из группы, состоящей из: MMP-8, MMP-9 и MMP-13. В дополнительных вариантах осуществления положительный контроль подавляет экспрессию MMP-8, MMP-9 и MMP-13.

В некоторых вариантах осуществления заболевание или состояние ротовой полости представляет собой гингивит или периодонтит. В других вариантах осуществления положительный контроль представляет собой галогенированный дифениловый эфир. В еще других вариантах осуществления положительный контроль представляет собой триклозан.

В некоторых вариантах осуществления исследуемое соединение подавляет экспрессию одной или более из вышеуказанных матриксных металлопротеиназ в большей степени, чем вышеуказанный положительный контроль. В дополнительных вариантах осуществления исследуемое соединение подавляет экспрессию MMP-9 и MMP-13 в большей степени, чем вышеуказанный положительный контроль. Еще дополнительные варианты осуществления обеспечивают способы, в которых исследуемое соединение подавляет экспрессию MMP-8, MMP-9 и MMP-13 в большей степени, чем положительный контроль.

В некоторых вариантах осуществления положительный контроль подавляет экспрессию MMP-8. В некоторых вариантах осуществления положительный контроль подавляет экспрессию MMP-9. В еще других вариантах осуществления положительный контроль подавляет экспрессию MMP-13.

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

ПРИМЕРЫ

Пример 1: Получение MMP-9 и характеристика

Клетки U937 и культуральную среду RPMI 1640 получали от ATCC. Набор с MMP-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 α (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 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-луночный 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 иммуоферментному анализу (ELISA) для MMP-9, согласно промышленному протоколу ELISA (фигура 1).

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 .

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 1ч./млн	0,155	0,004867

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 Neres pH 7,4, 1% заменимыми аминокислотами, 100 ед./мл пенициллина, 100 мкг/мл стрептомицина, 5% эмбриональной бычьей сывороткой. ПЦР в режиме реального времени проводили согласно следующему способу: клетки UMR 106-01 помещали 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 с триклозаном или содержащим триклозан средством для ухода за зубами (см., например, патенты США № 4894220, 5032386 и родственные патенты) в течение 15 минут и затем инкубировали с ПТГ (10^{-8} М) в течение 4 часов.

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 кДНК 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 Taq. 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.

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.

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. Включающая триклозан 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'-ACAGTTCAGGCTCAACCTGCTG-3' (антисмысловой)	
Крысиный - актин ген	
5'-AGCCATGTACGTAGCCATCC-3' (смысловой)	
5'-ACCCTCATAGATGGGCACAG-3' (антисмысловой)	

Таблица 3
Данные для фигуры 2, демонстрирующие, что триклозан ингибирует экспрессию MMP-13

	Среднее значение	Стандартное отклонение
Контроль	0,558546	0,388464
ПТГ	78,84402	14,45422
Триклозан 10 ч./млн	1,518275	0,702455

Триклозан 4 ч./млн	1,423882	0,162156
Триклозан 1 ч./млн	0,416584	0,23855
Триклозан 10 ч./млн + ПТГ	3,011772	1,497531
Триклозан 4 ч./млн + ПТГ	10,55882	6,868653
Триклозан 1 ч./млн + ПТГ	35,38321	3,934183

5

Таблица 4 Данные для фигуры 3, демонстрирующие, что содержащее триклозан средство для ухода за зубами ингибирует экспрессию MMP-13		
	Среднее значение	Стандартное отклонение
контроль	0,917758	0,116307
ПТГ	370,6579	20,64484
Включающая триклозан суспензия средства для ухода за зубами, содержащая 10 ч/млн Триклозана	8,625401	5,675636
ПТГ + включающая триклозан суспензия средства для ухода за зубами, содержащая 10 ч/млн Триклозана	7,904052	3,23775

10

15

Формула изобретения

1. Способ идентификации соединения, пригодного для лечения гингивита, включающий:

взаимодействие первого гингивального образца, полученного от млекопитающего, страдающего от гингивита, с исследуемым соединением;

20

взаимодействие второго гингивального образца, полученного из ротовой полости вышеуказанного млекопитающего, с положительным контролем, в котором вышеуказанный положительный контроль представляет собой соединение, известное для подавления экспрессии одной или более матричных металлопротеиназ;

25

измерение степени, с которой экспрессия одной или более из вышеуказанных матричных металлопротеиназ подавляется с помощью вышеуказанного исследуемого соединения;

измерение степени, с которой экспрессия одной или более из вышеуказанных матричных металлопротеиназ подавляется с помощью вышеуказанного положительного контроля; и

30

сравнение степени, с которой экспрессия одной или более из вышеуказанных матричных металлопротеиназ подавляется с помощью вышеуказанного исследуемого соединения, со степенью, с которой экспрессия одной или более из вышеуказанных матричных металлопротеиназ подавляется с помощью вышеуказанного положительного контроля;

35

в котором исследуемое соединение, которое подавляет экспрессию одной или более из вышеуказанных матричных металлопротеиназ в равной или большей степени, чем вышеуказанный положительный контроль, является соединением, пригодным для лечения гингивита;

40

где вышеуказанная одна или более матричных металлопротеиназ, для которых измеряют экспрессию, включают, по меньшей мере, MMP-9 и MMP-13; и

где вышеуказанный положительный контроль представляет собой галогенированный дифениловый эфир.

2. Способ по п.1, в котором вышеуказанная одна или более матричных металлопротеиназ выбраны из группы, состоящей из MMP-8, MMP-9 и MMP-13.

45

3. Способ по п.1 или 2, в котором вышеуказанный положительный контроль подавляет экспрессию MMP-8, MMP-9 и MMP-13.

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

5. Способ по п.1, в котором вышеуказанное исследуемое соединение подавляет

экспрессию одной или более из вышеуказанных матричных металлопротеиназ в большей степени, чем вышеуказанный положительный контроль.

6. Способ по п.2, в котором вышеуказанное исследуемое соединение подавляет экспрессию ММР-9 и ММР-13 в большей степени, чем вышеуказанный положительный контроль.

7. Способ по п.2, в котором вышеуказанное исследуемое соединение подавляет экспрессию ММР-8, ММР-9 и ММР-13 в большей степени, чем вышеуказанный положительный контроль.

10

15

20

25

30

35

40

45

СПИСОК ПОСЛЕДОВАТЕЛЬНОСТЕЙ

<110> COLGATE-PALMOLIVE COMPANY
 BARNES, Virginia
 TRIVEDI, Harsh M.
 WANG, Wei
 XU, Tao
 SHIMIZU, Emi

<120> ЭФФЕКТЫ ПЕРОРАЛЬНОЙ КОМПОЗИЦИИ ПРОТИВ ПОТЕРИ КОСТНОЙ МАССЫ И ПОТЕРИ ПРИКРЕПЛЕНИЯ

<130> 8467-00-WO-OC

<140> PCT/US2010/029670
 <141> 2010-04-01

<150> US 61/165,685
 <151> 2009-04-01

<160> 4

<170> PatentIn version 3.5

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

<400> 1
 gccctatccc ttgatgcat t 21

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

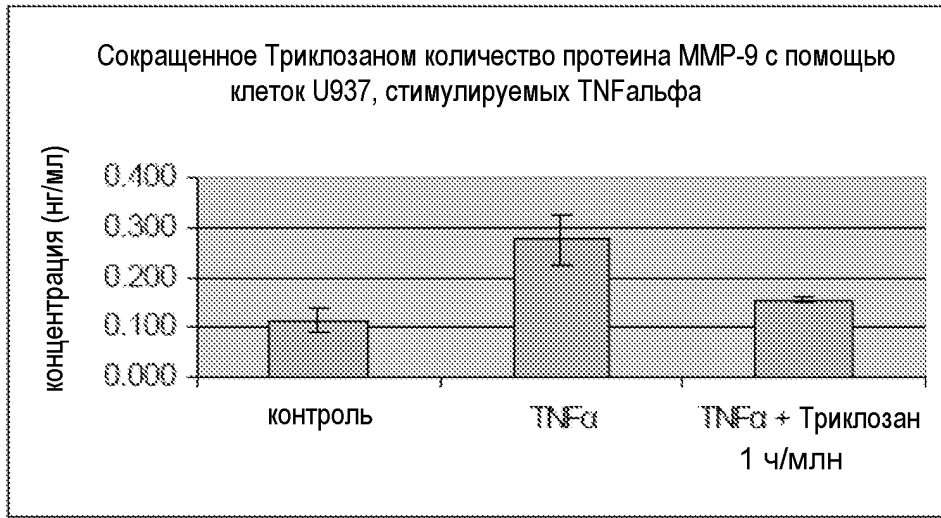
<400> 2
 acagttcagg ctcaacctgc tg 22

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

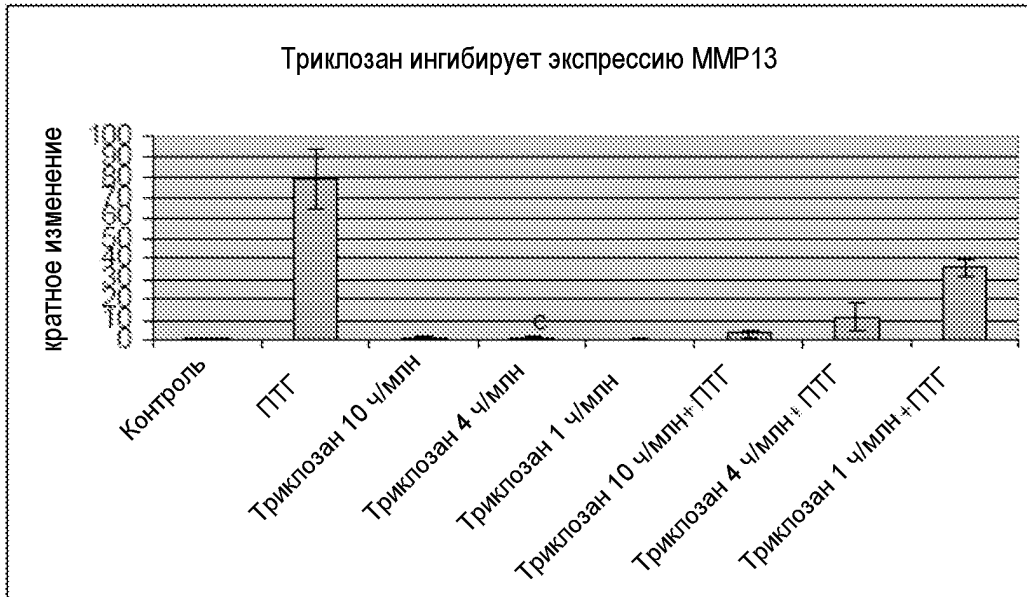
<400> 3
 agccatgtac gtagccatcc 20

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

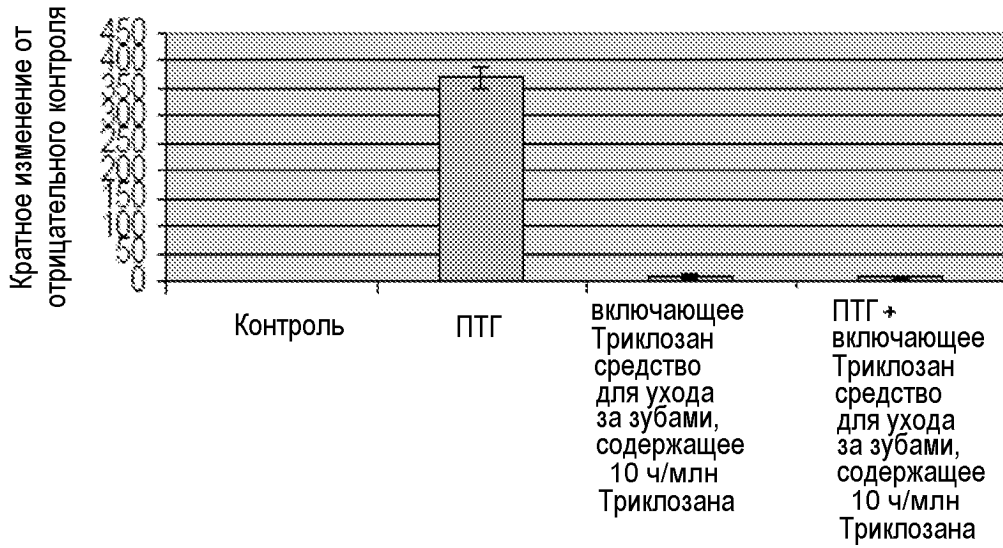
<400> 4
 accctcatag atgggcacag 20



Фиг. 1



Фиг.2



Фиг. 3