

19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 431 291**

51 Int. Cl.:

G01N 33/569 (2006.01)

G01N 33/50 (2006.01)

C12Q 1/04 (2006.01)

G01N 33/68 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **08.01.2007 E 10153338 (8)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **09.10.2013 EP 2177621**

54 Título: **Métodos para modular receptores de superficie celular para prevenir o reducir la inflamación**

30 Prioridad:

10.01.2006 US 757751 P

45 Fecha de publicación y mención en BOPI de la traducción de la patente:

25.11.2013

73 Titular/es:

**COLGATE-PALMOLIVE COMPANY (100.0%)
300 PARK AVENUE
NEW YORK, NY 10022-7499, US**

72 Inventor/es:

SREENIVASAN, PREM

74 Agente/Representante:

UNGRÍA LÓPEZ, Javier

ES 2 431 291 T3

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

DESCRIPCIÓN

Métodos para modular receptores de superficie celular para prevenir o reducir la inflamación

5 Antecedentes de la invención

Se sabe que los tejidos blandos de la cavidad oral de los mamíferos muestran las indicaciones más tempranas de inflamación. Este bajo nivel generalizado de inflamación puede conducir a gingivitis y/o periodontitis. Generalmente se cree que dicha inflamación es el resultado, al menos en parte, de las bacterias presentes en la cavidad oral. Además, la inflamación del tejido oral puede estar causada por cirugía, lesión localizada, traumatismo, necrosis, higiene oral inapropiada o diversos orígenes sistémicos.

Generalmente se cree que los componentes celulares implicados por estas enfermedades y afecciones incluyen el tejido epitelial, los fibroblastos gingivales, y los leucocitos en circulación, todos los cuales contribuyen a la respuesta del hospedador a factores patogénicos generados por las bacterias. Se conocen algunos patógenos bacterianos implicados en estas infecciones orales aunque muchos pueden seguir siendo desconocidos o sin caracterizar. Aunque la infección por ciertos tipos de bacterias a menudo es el acontecimiento etiológico en muchas de estas enfermedades orales, la patogénesis de la enfermedad o afección está mediada por la respuesta del hospedador. El uso de agentes anti-bacterianos reduce la población bacteriana de una cavidad oral dada y pueden provocar una reducción de la inflamación. Sin embargo, este enfoque es desventajoso ya que dicha eliminación se consigue de forma indiscriminada (pueden perecer tanto bacterias orales beneficiosas como bacterias orales perjudiciales) y es sensible a la dosis y al tiempo.

La infección bacteriana del tejido oral estimula la respuesta inmune del hospedador y disminuye el proceso de curación regulando positivamente los mediadores inflamatorios que causan un daño tisular significativo. Estos metabolitos se han implicado como los mediadores principales en gingivitis, periodontitis, osteomielitis y otras enfermedades inflamatorias.

Se ha informado de que un mecanismo de inflamación está mediado a través de ciertos receptores transmembrana de las células de mamífero. Por ejemplo, los receptores tipo toll ("TLR"), son proteínas transmembrana glucosiladas y una vez activadas por la oligomerización inducida por ligando inician una respuesta inmune dentro de la célula, provocando finalmente la expresión de citoquinas, interleuquinas, y otras moléculas que median el estado de la inflamación.

Existe la necesidad en la técnica de agentes y técnicas útiles en el diagnóstico, tratamiento, y prevención de dichos efectos inflamatorios.

El documento WO-A-95/13094 desvela el tratamiento de enfermedades inflamatorias inducidas de forma bacteriana. El documento WO-A-01/55386 desvela un receptor tipo toll. El documento WO-A-2005/057222 desvela el uso de T-cadherina como diana.

Breve descripción de los dibujos

La Figura 1 es un diagrama esquemático que muestra la superficie de una célula en contacto con un microbio.

La Figura 2 muestra las vías de señalización de los receptores tipo toll (TLR) 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7 y 9, así como las diversas moléculas generadas por la modulación de cada TLR.

Breve resumen de la invención

La invención incluye un método de acuerdo con la reivindicación 1 para determinar el efecto anti-inflamatorio de un agente, que comprende poner en contacto la célula con el agente en presencia de una bacteria perjudicial o parte de dicha bacteria y detectar la presencia de un compuesto indicador, donde la ausencia sustancial de un material indicador significa que el agente es un agente anti-inflamatorio.

Las características preferidas se definen en las reivindicaciones adjuntas.

Descripción detallada de la invención

La invención proporciona métodos para determinar el efecto anti-inflamatorio de un agente específico. También se describen en el presente documento métodos para prevenir la modulación de un receptor tipo toll en una célula usando triclosán.

"Inflamación" como se usa en el presente documento se refiere a la respuesta protectora localizada provocada por lesión o destrucción de tejidos que sirve para destruir, diluir, o secuestrar tanto al agente dañino como al tejido lesionado. En la forma aguda, puede caracterizarse por dolor, calor, rojez, e hinchamiento. Histológicamente, la

5 inflamación implica una compleja serie de acontecimientos, incluyendo la dilatación de arteriolas, capilares, y vénulas, con permeabilidad y flujo sanguíneo aumentados; exudación de fluidos, incluyendo proteínas plasmáticas, y migración de leucocitos en el locus inflamatorio. La inflamación corresponde a niveles potenciados de mediadores celulares pro-inflamatorios, o sustancias que se liberan, por ejemplo, como resultado de la interacción de un antígeno con un anticuerpo o por la acción del antígeno con un linfocito sensibilizado. Por extensión, un agente anti-inflamatorio es cualquiera que reduzca la calidad y/o cantidad de estos efectos biológico en una célula, con relación a una célula similar no tratada con el agente.

10 En el presente documento se describe un método para evaluar una especie específica o cepa de bacterias para determinar si dicha especie o cepa es perjudicial en la cavidad oral. Por "perjudicial" se entiende bacterias patogénicas cuya presencia provoca la generación de mediadores inflamatorios por parte de las células afectadas. Se ha informado de que algunas cepas/especies de bacterias son perjudiciales, incluyendo aquellas de la Tabla I, a continuación:

Tabla 1: Bacterias orales presentadas como perjudiciales

| |
|---|
| <i>A. gerencseriae</i> |
| <i>A. naeslundii</i> 1 |
| <i>A. naeslundii</i> 2 |
| <i>V. parvula</i> |
| <i>S. mitis</i> |
| <i>S. oralis</i> |
| <i>C. gingivalis</i> |
| <i>C. sputigena</i> |
| <i>F. nucleatum</i> ss <i>nucleatum</i> |
| <i>F. nucleatum</i> ss <i>polymorphum</i> |
| <i>F. periodonticum</i> |
| <i>P. intermedia</i> |
| <i>T. forsythia</i> |
| <i>L. buccalis</i> |
| <i>N. mucosa</i> |
| <i>P. acnes</i> |
| <i>P. melaninogenica</i> |
| <i>S. noxia</i> |

15 El método incluye poner en contacto al menos una bacteria de la especie o cepa de bacteria oral a evaluar con al menos una célula gingival. Como alternativa, la célula gingival puede ponerse en contacto con una parte de la bacteria, la membrana celular, los contenidos citoplasmáticos, los productos metabólicos, finales o subproductos de la bacteria y/o factores de virulencia.

20 Esta etapa puede suceder *in vitro*, por ejemplo, manteniendo un cultivo de bacterias o partes bacterianas y de células gingivales y combinando dichos cultivos. Como alternativa, el contacto puede suceder *in vivo*, por aplicación del cultivo bacteriano en un vehículo de suministro apropiado a la cavidad oral.

25 Después de dicho contacto, puede detectarse uno o más materiales indicadores. Dichos materiales indicadores incluyen cualquiera que sea conocido o esté por descubrirse que se generan en el transcurso ordinario de la respuesta inmune de un hospedador incluyendo compuestos intermedios, enzimas, proteínas, ARN, ADN, y otras moléculas que están implicadas en la producción celular de citoquinas y otros mediadores pro-inflamatorios. Se prefieren materiales indicadores que se generan por la modulación de cualquiera de los receptores tipo toll (por ejemplo, como se muestra en la Figura 2), incluyendo, por ejemplo, TLR 2, 3, 4, 5, 7, y 9; moléculas de la vía NFK-B, citoquinas, interleuquinas (por ejemplo, 1, 6, 8, 12), factor de necrosis tumoral (TNF), peptidasas, y ARNm que codifican las subunidades de interleuquinas o TNF y/o interleuquinas, quimioquinas (por ejemplo, CCL5, CCL4, CCL3, y CC10), y metaloproteinasas de matriz.

35 La detección del material indicador seleccionado puede realizarse de cualquier modo conocido o por desarrollar en la técnica y puede ser una medición relativa o absoluta. La detección puede conseguirse por medición directa de la cantidad de material o materiales indicadores seleccionados. Como alternativa, puede conseguirse por medición indirecta usando sistemas de detección adicionales, tales como marcadores radiactivos y/o fluorescentes, anticuerpos, alteraciones en el nivel de expresión génica de genes específicos, análisis de ARNm, análisis de microserie, y/o cambios en el estado antioxidante. Por ejemplo, si el material indicador es una enzima, se puede

someter a la muestra a un sustrato apropiado y medir el producto final de una reacción catalizada por enzima para determinar la presencia o ausencia del material indicador enzimático. En la práctica de este aspecto de la invención, la ausencia sustancial del material indicador seleccionado demuestra que la especie/cepa de bacteria no es perjudicial - es decir, no afecta a la célula de tal modo que inicie la producción de ningún mediador pro-inflamatorio.

5 La presente invención proporciona un método para evaluar la capacidad o efecto anti-inflamatorio de un agente específico, es decir, la capacidad del agente para reducir o eliminar la inflamación en un tejido expuesto a la bacteria patogénica. El método incluye la selección de un agente a evaluar. Dicho agente puede ser una proteína, péptido, molécula orgánica, molécula inorgánica o conjugado de cualquiera de las mismas.

10 En algunas circunstancias, puede ser deseable que el agente seleccionado a evaluar no muestre efectos bacterianos significativos en el contexto oral. Por ejemplo, el agente puede seleccionarse entre aquellos que muestra una concentración inhibitoria mínima (CIM) de 0, menos de aproximadamente el 5%, menos de aproximadamente el 10%, menos de aproximadamente el 20% y menos de aproximadamente 30%.

15 Los estudios de CIM generalmente incluyen la preparación de una solución del agente activo en un disolvente apropiado y la posterior dilución en serie del activo solubilizado. Se añade una suspensión convencional de las bacterias seleccionadas (éstas podrían ser un intervalo de bacterias cada una de las cuales requiere su propio protocolo especializado de cultivo y manipulación) a cada concentración del activo diluido. Las bacterias + activo se incuban en condiciones apropiadas a 37°C y se controla el crecimiento bacteriano típicamente después de 48 horas de incubación.

20 Los controles para los estudios de CIM incluyen un control de cultivo que controla el crecimiento bacteriano en ausencia de cualquiera de los disolventes o excipientes añadidos. Controles adicionales controlan la esterilidad de los medios usados para los ensayos. Los efectos del disolvente o disolventes usados para solubilizar los agentes activos sobre las bacterias son la serie final de controles incluidos para estos estudios.

25 Después de incubación, las placas se leen en un espectrofotómetro de microplaca a 610 nm. Los resultados se interpretan como la concentración más baja del agente activo que inhibe el crecimiento bacteriano. A elevadas concentración del activo, las bacterias no crecerían (se muestra como una lectura de densidad óptica baja) y a bajas concentraciones de activo las bacterias proliferarían (se muestra como una lectura de densidad óptica elevada). La concentración más baja de activo para detener el crecimiento bacteriano se define como la CIM. Los controles deben resultar del siguiente modo:

35 Esterilidad de los medios - sin crecimiento bacteriano

Control del crecimiento bacteriano - los cultivos muestran un crecimiento sin trabas manifiesto

40 Los disolventes usados para solubilizar los agentes activos no deben inhibir las bacterias (ya que deben ser esencialmente inocuos).

45 El método para evaluar la capacidad o efecto anti-inflamatorio de un agente específico incluye la etapa de poner en contacto una célula con una bacteria patogénica o perjudicial. La célula a poner en contacto puede estar *in vitro* o *in vivo*, puede ser procariota o eucariota, y puede obtenerse de una línea de cultivo celular o una muestra clínica.

Las bacterias patogénicas o perjudiciales adecuadas para su uso en el método incluyen cualquiera conocida o por describir en la técnica que afecte a la célula seleccionada de tal modo que provoque una respuesta inmune. Dichas bacterias pueden incluir, por ejemplo, las enumeradas en la Tabla I, anteriormente.

50 El método para evaluar la capacidad o efecto anti-inflamatorio de un agente específico incluye la etapa de detectar la presencia o ausencia de uno o más compuestos indicadores. Los compuestos indicadores y los métodos y sistemas de detección pueden ser cualquiera de los descritos anteriormente.

55 También se describen en el presente documento formulaciones orales que contienen los agentes hallados que muestran efecto anti-inflamatorio por el ensayo descrito anteriormente, así como métodos para prevenir la modulación de receptores tipo toll sobre células de tejido oral poniendo en contacto dicha célula con triclosán.

60 También se desvelan en el presente documento métodos para reducir o prevenir la inflamación de un tejido oral mediante la aplicación de un compuesto, tal como triclosán, al tejido a niveles sub-CIM. Mediante niveles sub-CIM.

REIVINDICACIONES

- 5 1. Un método para determinar el efecto anti-inflamatorio de un agente que comprende poner en contacto la célula con el agente en presencia de una bacteria perjudicial o parte de dicha bacteria y detectar la presencia de un compuesto indicador, donde la ausencia sustancial de un material indicador significa que el agente es un agente anti-inflamatorio.
2. El método de la reivindicación 1, donde la célula es una célula eucariota.
- 10 3. El método de la reivindicación 1, donde la célula es una célula procariota.
4. El método de la reivindicación 1, donde el material indicador se selecciona entre el grupo que consiste en moléculas generadas por la modulación de un receptor tipo toll.
- 15 5. El método de la reivindicación 1, donde el material indicador se selecciona entre el grupo que consiste en moléculas generadas por la modulación de TLR 2, TLR 3, TLR 4, TLR 5, TLR 7, y TLR 9.
- 20 6. El método de la reivindicación 1, donde el material indicador se selecciona entre el grupo que consiste en moléculas de la vía NF- κ B.
7. El método de la reivindicación 1, donde el material indicador se selecciona entre el grupo que consiste en citoquinas e interleuquinas.
- 25 8. El método de la reivindicación 1, donde el material indicador se selecciona entre el grupo que consiste en IL-1, IL-6, IL-8, IL-12, y TNF- α .
9. El método de la reivindicación 1, donde la molécula indicadora se detecta directamente.
- 30 10. El método de la reivindicación 1, donde el se selecciona entre agentes que muestran una CIM de menos de aproximadamente el 20%.

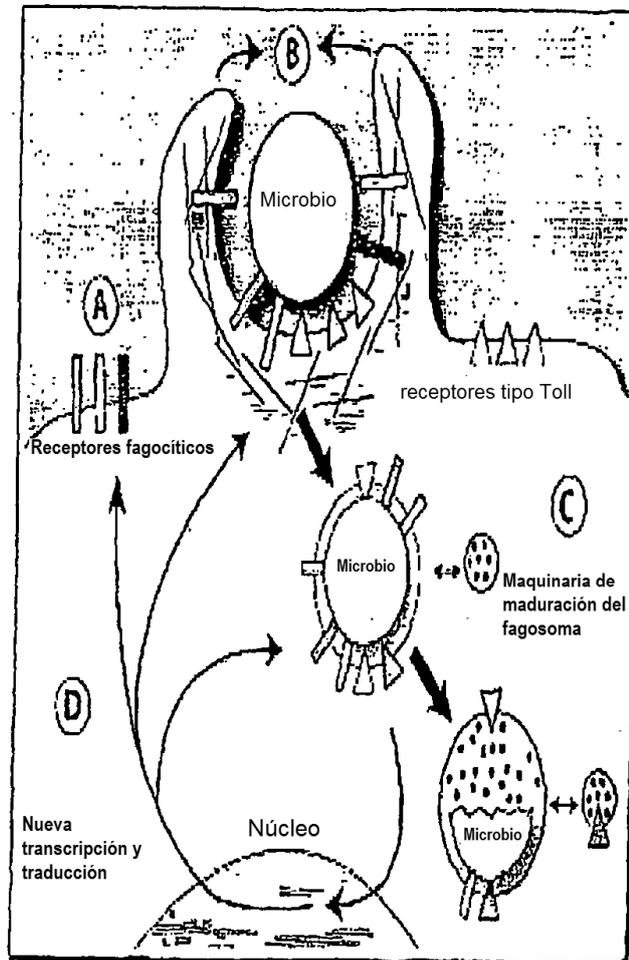


FIGURA 1

