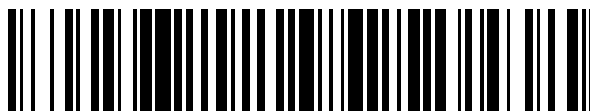


19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 432 864**

51 Int. Cl.:

G01N 33/569 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **01.04.2010 E 10712854 (8)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **28.08.2013 EP 2414838**

54 Título: **Efectos contra la pérdida de dientes y contra la pérdida de soporte de una composición oral**

30 Prioridad:

01.04.2009 US 165685 P

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

05.12.2013

73 Titular/es:

**COLGATE-PALMOLIVE COMPANY (100.0%)
300 Park Avenue
New York, NY 10022-7499, US**

72 Inventor/es:

**BARNES, VIRGINIA;
TRIVEDI, HARSH M.;
WANG, WEI;
XU, TAO;
SHIMIZU, EMI y
PARTRIDGE, NICOLA C.**

74 Agente/Representante:

DE ELZABURU MÁRQUEZ, Alberto

ES 2 432 864 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

Efectos contra la pérdida de dientes y contra la pérdida de soporte de una composición oral

Antecedentes

5 La periodontitis se caracteriza en parte por una degradación anormal y excesiva de la matriz orgánica periodontal. Esta matriz incluye encías, ligamento periodontal, cemento y hueso alveolar. Al menos una parte de la destrucción de la matriz está mediada por la sobreproducción de metaloproteinasas de matriz (MMP), una familia de endopeptidasas dependientes de cinc. Las MMP facilitan también la resorción ósea al degradar el osteoide (concretamente, la matriz ósea no mineralizada y recién sintetizada) y degradar después la matriz. Estos eventos dan como resultado la manifestación clínica de periodontitis, incluyendo retracción gingival, formación de bolsas, pérdida de soporte y eventual pérdida de dientes.

10 El documento WO-A-2005/103071 da a conocer inhibidores peptídicos de la actividad metaloproteínasa. Yoshioka Masami *et al.* dan a conocer en el Journal of Periodontology, vol. 74, nº 8, páginas 1219-1224 el efecto de inhibidores de metaloproteínasa de matriz basados en ácido hidroxámico sobre células gingivales humanas y *Porphyromonas gingivalis*, "Effect of hydroxamic acid-based matrix metalloproteinase inhibitors on human gingival cells and *Porphyromonas gingivalis*". Ruwanpura SM P M *et al.* dan a conocer en el Journal of Dental Research, vol. 83, nº 3, páginas 260-265 que la prostaglandina E₂ regula la producción de metaloproteínasa de matriz 3 inducida por interleucina-1 β en fibroblastos gingivales humanos, "Prostaglandin E₂ regulates interleukin-1 β -induced matrix metalloproteinase-3 production in human gingival fibroblasts".

Sumario

20 La presente invención proporciona un método según la reivindicación 1 de identificación de un compuesto útil para tratar gingivitis o periodontitis. Los rasgos preferidos se definen en las reivindicaciones dependientes.

25 Se da a conocer también en la presente memoria un método para el tratamiento de periodontitis en un mamífero necesitado de ello, que comprende poner en contacto una célula de la boca del mamífero con un agente que regula negativamente al menos una metaloproteínasa de matriz seleccionada del grupo consistente en MMP-9 y MMP-13, en el que la regulación negativa de la metaloproteínasa se correlaciona con una reducción de al menos un síntoma asociado a periodontitis.

30 Se da a conocer también en la presente memoria un método de identificación de un compuesto útil en el tratamiento de periodontitis en un mamífero, comprendiendo el método poner en contacto una célula con un compuesto de ensayo y determinar si el compuesto de ensayo regula negativamente al menos una metaloproteínasa de matriz seleccionada del grupo consistente en MMP-9 y MMP-13, en el que la regulación negativa de al menos una de las metaloproteinasas de matriz es indicativa de que el compuesto de ensayo es útil para tratar periodontitis.

35 Se da a conocer también en la presente memoria un método de tratamiento de periodontitis en un mamífero necesitado de ello que, comprende administrar a la cavidad oral del mamífero una composición oral que comprende 2,4,4'-tricloro-2'-hidroxidifeniléter en una cantidad que sea eficaz para regular negativamente al menos una metaloproteínasa de matriz de la cavidad oral del mamífero, estando seleccionada la metaloproteínasa de matriz del grupo consistente en MMP-9 y MMP-13, en el que la regulación negativa de la metaloproteínasa de matriz da como resultado el tratamiento de periodontitis en el mamífero.

40 Se da a conocer también en la presente memoria un método de reducción de un exceso patológico de actividad metaloproteínasa de matriz en la cavidad oral de un mamífero necesitado de ello, que comprende administrar a la cavidad oral del mamífero una composición oral que comprende 2,4,4'-tricloro-2'-hidroxidifeniléter en una cantidad que sea eficaz para reducir la actividad metaloproteínasa de matriz en la cavidad oral del mamífero, estando seleccionada la metaloproteínasa de matriz del grupo consistente en MMP-9 y MMP-13, en el que la inhibición de la actividad metaloproteínasa de matriz da como resultado la inhibición de una degradación excesiva de los componentes proteicos de la matriz de tejido conectivo.

45 Se da a conocer también en la presente memoria un método de reducción de un exceso patológico de metaloproteínasa de matriz en la cavidad oral de un mamífero necesitado de ello, que comprende administrar a la cavidad oral del mamífero una composición oral que comprende 2,4,4'-tricloro-2'-hidroxidifeniléter en una cantidad que sea eficaz para reducir el nivel de metaloproteínasa de matriz en la cavidad oral del mamífero, en el que la inhibición del nivel de metaloproteínasa de matriz da como resultado la inhibición de una degradación excesiva de los componentes proteicos de la matriz de tejido conectivo, y en el que la metaloproteínasa de matriz se selecciona del grupo consistente en MMP-9 y MMP-13.

50 Se da a conocer también en la presente memoria una composición oral que comprende 0-36% en peso de un agente de pulido silíceo, 0,25-0,35% en peso de un agente antibacteriano no catiónico sustancialmente no hidrosoluble seleccionado del grupo consistente en difeniléteres halogenados, salicilanilidas halogenadas, ésteres benzoicos, carbanilidas y compuestos fenólicos halogenados, y una cantidad eficaz de 0,01-4,0% en peso de un agente potenciador antibacteriano que potencia el suministro y adherencia de dicho agente antibacteriano a, y la

retención del mismo sobre, las superficies orales de dientes y encías, en la que dicho agente potenciador antibacteriano es (i) un copolímero de ácido o anhídrido maleico con otro monómero polimerizable etilénicamente insaturado inerte o (ii) un polímero de poli(ácido β -estirenofosfónico) o poli(ácido α -estirenofosfónico) o un copolímero de cualquier ácido estirenofosfónico con otro monómero etilénicamente insaturado, y adicionalmente la composición comprende opcionalmente una cantidad de una fuente que proporciona ión de flúor suficiente para suministrar de 25 ppm a 5.000 ppm de iones de flúor. La composición oral puede comprender 0,01-36% en peso de un agente de pulido silíceo. Como alternativa, la composición oral no comprende un agente de pulido silíceo.

Se da a conocer también en la presente memoria un método que incluye una composición oral que comprende una cantidad antisarro eficaz de al menos una sal polifosfato deshidratada molecularmente lineal hidrosoluble como agente antisarro esencial, una cantidad antiplaca eficaz de un compuesto antibacteriano no catiónico sustancialmente no hidrosoluble como agente antiplaca esencial y, opcionalmente, una cantidad de una fuente que proporciona ión fluoruro suficiente para suministrar de 25 ppm a 5.000 ppm de iones fluoruro. En un aspecto, está presente 2,4,4'-tricloro-2'-hidroxidifeniléter en la composición a una concentración de 1 ppm a 100 ppm.

La composición oral puede ser un colutorio o enjuague. Preferiblemente, el colutorio o enjuague no comprende un agente de pulido silíceo.

Breve descripción de los dibujos

La Figura 1 ilustra el efecto del 2,4,4'-tricloro-2'-hidroxidifeniléter sobre la producción de MMP-9 inducida por TNF- α en monocitos.

La Figura 2 ilustra el efecto del 2,4,4'-tricloro-2'-hidroxidifeniléter sobre la producción de MMP-13 inducida por PTH en osteoblastos.

La Figura 3 ilustra el efecto de un dentífrico de la presente invención sobre la producción de MMP-13 inducida por PTH en osteoblastos.

Descripción detallada

Las tres MMP destructivas principales en periodontitis son MMP-8, MMP-9 y MMP-13. MMP-8 y MMP-13 son colagenasas, y MMP-9 es una gelatinasa. Las tres enzimas pueden encontrarse en tejido periodontal enfermo y fluido crevicular gingival. Los niveles de estas enzimas se correlacionan positivamente con los indicadores clínicos de periodontitis. Es decir, niveles elevados o "por encima de lo normal" de al menos una de MMP-8, MMP-9 y MMP-13 son indicativos de periodontitis. Pueden realizarse medidas de las enzimas MMP-8, MMP-9 y MMP-13, del ARN o de la actividad biológica.

Como se expone en la presente memoria, se muestra ahora que puede usarse una composición oral que comprende 2,4,4'-tricloro-2'-hidroxidifeniléter (triclosán) para reducir los niveles de al menos una de MMP-8, MMP-9 y MMP-13 en la cavidad oral de un mamífero. La composición oral puede ser un dentífrico o puede comprender un colutorio, un parche o un gel, entre otros. Puede usarse un compuesto antibacteriano para reducir los niveles de al menos una de MMP-8, MMP-9 y MMP-13 en la cavidad oral de un mamífero.

Como se usa en todo el documento, los intervalos se usan como abreviaturas para describir todos y cada uno de los valores que están dentro del intervalo. Cualquier valor dentro del intervalo puede seleccionarse como término del intervalo. En el caso de conflicto entre una definición de la presente divulgación y de una referencia citada, prevalece la presente divulgación.

Como se usa en la presente memoria, el término "periodontitis" hace referencia a una degradación anormal y excesiva de la matriz orgánica periodontal, incluyendo encías, ligamento periodontal, cemento y hueso alveolar. La manifestación clínica de la periodontitis incluye, pero sin limitación, retracción gingival, formación de bolsas, pérdida de soporte de matriz, pérdida de diente y hueso. La periodontitis puede caracterizarse como periodontitis temprana, periodontitis moderada o periodontitis avanzada. Sin embargo, la periodontitis no debería estar limitada a solo aquellos síntomas y secuelas expuestos en la presente memoria, como se entenderá por un especialista en la materia. La periodontitis temprana se manifiesta clínicamente, entre otros síntomas, por uno o más de: hemorragia tras sondeo, presencia de bolsas (de 3 a 4 mm), zonas localizadas de retracción, pérdida de soporte (de 3 a 4 mm), pérdida de hueso (por ejemplo, horizontal) y zonas de invasión furcal de clase I. La periodontitis moderada se manifiesta clínicamente, entre otros síntomas, por uno o más de: presencia de bolsas (de 4 a 6 mm), presencia de pérdida de soporte (de 4 a 6 mm), hemorragia tras sondeo, zonas de invasión furcal de grado I y/o grado II, movilidad dental de clase I, pérdida de hueso (por ejemplo, horizontal y/o vertical) y pérdida de 1/3 del hueso alveolar de soporte (concretamente, relación de corona a raíz de 1:1). La periodontitis avanzada se manifiesta clínicamente por uno o más de: hemorragia tras sondeo, presencia de bolsas (de más de 6 mm), pérdida de soporte (de más de 6 mm), zonas de invasión furcal de grado II y/o grado III, movilidad dental de clase II y/o clase III, pérdida de hueso (por ejemplo, horizontal y/o vertical) y pérdida de más de 1/3 del hueso alveolar de soporte (concretamente, relación de corona a raíz de 2:1 o más). La periodontitis se divide en subdivisiones que incluyen, pero sin limitación, periodontitis adulta (por ejemplo, asociada a placa), periodontitis de inicio temprano (por ejemplo,

prepuberal, juvenil, de progresión rápida y similares), periodontitis asociada a enfermedades sistémicas, periodontitis ulceronecrosante, periodontitis refractaria, periimplantitis y similares.

5 El término “tratar”, como se usa en la presente memoria” hace referencia a una mejora detectable de una afección adversa y/o a un descenso de los síntomas de la afección tras poner en contacto el mamífero con una composición oral de la invención y/o según un método de la invención.

10 El término “tratamiento de periodontitis” se entenderá que incluye la prevención de periodontitis en un mamífero, así como la inhibición de la progresión de una o más afecciones preexistentes asociadas a periodontitis en un mamífero. Como se usan en la presente memoria, los términos “inhibir” e “inhibición” hacen referencia a una inhibición parcial o a una inhibición completa de la periodontitis en comparación con la afección sin tratamiento, de tal modo que dé como resultado un tratamiento terapéutico o profilaxis. El tratamiento de periodontitis según la invención incluye por lo tanto la reducción, inhibición, mejora, rebaja, disminución, cese o eliminación de uno o más de los síntomas y/o secuelas expuestos en la presente memoria.

15 Como se usa en la presente memoria “exceso patológico” hace referencia a una actividad por encima del nivel normal aceptado. Por ejemplo, un “exceso patológico” de actividad metaloproteinasas de matriz es un nivel de actividad metaloproteinasas de matriz que está por encima del nivel encontrado normalmente en un estado no patológico. Como se usa en la presente memoria, un “exceso patológico de actividad metaloproteinasas de matriz” es un nivel de actividad metaloproteinasas de matriz asociada a periodontitis.

20 Como se usa en la presente memoria, el término “regulación negativa” hace referencia a una disminución de la actividad enzimática, a una disminución del nivel de actividad enzimática, a una disminución del nivel de proteína y/o ácido nucleico que codifica dicha proteína o a una disminución del efecto bioquímico de la presencia de una proteína, tal como una o más de MMP-8, MMP-9 y MMP-13.

25 Se describe en la presente memoria un método de reducción de un exceso patológico de al menos una de MMP-8, MMP-9 y MMP-13 en la cavidad oral de un mamífero necesitado de ello, que comprende administrar a la cavidad oral del mamífero una composición oral que comprende 2,4,4'-tricloro-2'-hidroxidifeniléter en una cantidad que sea eficaz para reducir el nivel de metaloproteinasas de matriz en la cavidad oral del mamífero, en el que la inhibición del nivel de metaloproteinasas de matriz da como resultado la inhibición de una degradación excesiva de los componentes proteicos de la matriz de tejido conectivo.

30 Una MMP, tal como MMP-8, MMP-9 o MMP-13, puede reducirse en la cavidad oral mediante uno de múltiples modos, como se expone en la presente memoria. Una MMP puede reducirse en la cavidad oral regulando negativamente la MMP al nivel de ácido nucleico, como se expone en otro lugar de la presente memoria. Dicha reducción puede dar como resultado una reducción de uno o más de los ácidos nucleicos que codifican la MMP (por ejemplo ARNm) y de la enzima MMP expresada en la cavidad oral. La reducción del ARNm que codifica una MMP puede efectuarse, por ejemplo, mediante una o más de múltiples técnicas, como se entenderá por el especialista en la materia, provisto de la divulgación expuesta en la presente memoria. Los ejemplos incluyen reducir la transcripción de ARNm que codifica la MMP y la degradación/eliminación del ARNm que codifica la MMP.

35 Una MMP puede reducirse en la cavidad oral reduciendo directamente la cantidad de enzima MMP. La reducción de la enzima MMP puede efectuarse mediante una o más de múltiples técnicas, como se entenderá por un especialista en la materia, provisto de la divulgación expuesta en la presente memoria. Los ejemplos incluyen la inhibición de la enzima mediante un inhibidor de molécula pequeña, la inhibición mediante una molécula natural o derivada biológicamente, la degradación proteolítica de la enzima y el aclaramiento de la cavidad oral basado en la afinidad de la enzima, entre otros. Un agente que reduce una o más de MMP-8, MMP-9 o MMP-13 puede ser un agente como se describe en la presente memoria, tal como 2,4,4'-tricloro-2'-hidroxidifeniléter (triclosán), o puede ser otro agente antibacteriano. En otro aspecto, un agente puede ser algo distinto de un agente antibacteriano. Como tales, se describen en la presente memoria procedimientos de tratamiento de un individuo aquejado de periodontitis.

45 Se describe en la presente memoria un método para reducir un exceso patológico de actividad metaloproteinasas de matriz en la cavidad oral de un mamífero necesitado de ello, que comprende administrar a la cavidad oral del mamífero una composición oral que comprende 2,4,4'-tricloro-2'-hidroxidifeniléter en una cantidad que sea eficaz para reducir la actividad metaloproteinasas de matriz de al menos una de MMP-8, MMP-9 y MMP-13 en la cavidad oral del mamífero, en el que la inhibición de la actividad metaloproteinasas de matriz da como resultado la inhibición de una degradación excesiva de los componentes proteicos de la matriz de tejido conectivo. En otro aspecto, se realiza la administración a la cavidad oral del mamífero de una composición oral que comprende 2,4,4'-tricloro-2'-hidroxidifeniléter en una cantidad que sea eficaz para reducir el nivel de al menos una de MMP-8, MMP-9 y MMP-13 en la cavidad oral del mamífero, en la que la reducción del nivel de metaloproteinasas de matriz da como resultado la reducción de la actividad enzimática global de la metaloproteinasas, dando como resultado la inhibición de la degradación excesiva de los componentes proteicos de matriz del tejido conectivo. Un exceso patológico de una o más MMP puede reducirse como se describe en otro lugar de la presente memoria con respecto a la reducción de la cantidad de MMP en la cavidad oral de un mamífero. Es decir, una MMP puede reducirse a uno o ambos niveles de ácido nucleico y proteína. Como se describe en otro lugar de la presente memoria, la reducción del exceso patológico de una o más de dichas MMP puede proporcionar el tratamiento de periodontitis en un mamífero.

Se describe también en la presente memoria un método de reducción de la actividad de al menos una de MMP-8, MMP-9 y MMP-13 en la cavidad oral de un mamífero necesitado de ello, que comprende administrar a la cavidad oral del mamífero una composición oral que comprende 2,4,4'-tricloro-2'-hidroxidifeniléter en una cantidad que sea eficaz para reducir el nivel de metaloproteinasa de matriz en la cavidad oral del mamífero, en el que la inhibición del nivel de metaloproteinasa de matriz da como resultado la inhibición de una degradación excesiva de componentes proteicos de la matriz de tejido conectivo. La actividad de una o más MMP puede reducirse como se describe en otro lugar de la presente memoria con respecto a la reducción de la cantidad de proteína MMP en la cavidad oral de un mamífero. Es decir, una MMP puede reducirse a uno o ambos niveles de ácido nucleico y proteína, reduciendo así la actividad de las MMP en la cavidad oral, o bien reduciendo directamente la actividad MMP o indirectamente, reduciendo el nivel de proteína y/o ácido nucleico de MMP.

Se dan a conocer también en la presente memoria métodos de tratamiento de periodontitis en un mamífero necesitado de ello, que comprenden poner en contacto una célula de la cavidad oral del mamífero con un agente que regula negativamente una o ambas de al menos una de MMP-8, MMP-9 y MMP-13. La regulación negativa de la metaloproteinasa se correlaciona con una reducción de al menos un síntoma asociado a periodontitis.

Una MMP, tal como MMP-8, MMP-9 o MMP-13, puede regularse negativamente al nivel de ácido nucleico. A modo de ejemplo no limitante, una MMP puede regularse negativamente regulando negativamente el ARNm que codifica la MMP. Un método puede comprender poner en contacto la cavidad oral de un mamífero con un agente que regule negativamente una o más de MMP-8, MMP-9 o MMP-13. Un agente que regula negativamente una o más de MMP-8, MMP-9 o MMP-13 puede ser un agente como se describe en la presente memoria, tal como triclosán, o puede ser otro agente antibacteriano. En otro aspecto, un agente puede ser algo distinto a un agente antibacteriano. Como tales, se describen en la presente memoria tres métodos de tratamiento de un individuo aquejado de periodontitis.

Se da a conocer también en la presente memoria un método de tratamiento de periodontitis en un mamífero necesitado de ello. Un método de tratamiento de periodontitis en un mamífero necesitado de ello puede comprender administrar a la cavidad oral del mamífero una composición oral que comprende 2,4,4'-tricloro-2'-hidroxidifeniléter en una cantidad que sea eficaz para regular negativamente al menos una de MMP-8, MMP-9 y MMP-13, en el que la regulación negativa de la metaloproteinasa de matriz da como resultado el tratamiento de periodontitis en el mamífero. Un método de tratamiento de periodontitis en un mamífero puede comprender administrar a la cavidad oral del mamífero una composición oral que comprende 2,4,4'-tricloro-2'-hidroxidifeniléter en una cantidad que sea eficaz para reducir el nivel de al menos una de MMP-8, MMP-9 y MMP-13, en el que la reducción del nivel de metaloproteinasa de matriz da como resultado el tratamiento de periodontitis en el mamífero. Un método de tratamiento de periodontitis en un mamífero necesitado de ello puede comprender administrar a la cavidad oral del mamífero una composición oral que comprende 2,4,4'-tricloro-2'-hidroxidifeniléter en una cantidad que sea eficaz para reducir el nivel de actividad de al menos una de MMP-8, MMP-9 y MMP-13, en el que la reducción del nivel de actividad metaloproteinasa de matriz da como resultado el tratamiento de periodontitis en el mamífero.

En un método de tratamiento de periodontitis mediante la administración a la cavidad oral del mamífero de una composición oral, puede reducirse la actividad de una o más MMP como se describe en otro lugar de la presente memoria con respecto a la reducción de la cantidad de MMP en la cavidad oral de un mamífero. Es decir, una MMP puede reducirse a uno o ambos de los niveles de ácido nucleico y proteína, reduciendo así la actividad de las MMP en la cavidad oral. De forma similar, la regulación negativa de una MMP o la reducción del nivel de una MMP pueden efectuarse mediante la acción a cualquiera o ambos de los niveles de ácido nucleico y proteína, como se describe con detalle en otro lugar de la presente memoria.

En otro aspecto, la invención proporciona un método de identificación de un compuesto útil para tratar periodontitis en un mamífero necesitado de ello, que comprende poner en contacto una célula con un compuesto de ensayo y determinar si el compuesto de ensayo regula negativamente una o ambas de al menos una de MMP-8, MMP-9 y MMP-13. La regulación negativa de al menos una de las metaloproteinasas de matriz es indicativa de que el compuesto de ensayo es útil para tratar periodontitis.

Se describe también en la presente memoria un método de tratamiento de periodontitis que comprende administrar un agente identificado por un ensayo de barrido descrito en la presente memoria, o una combinación de agentes, que inhiben uno o más marcadores de periodontitis, en el que al menos uno de los agentes es un agente identificado por un ensayo de barrido descrito en la presente memoria.

Se da a conocer también en la presente memoria un método para el tratamiento de periodontitis que comprende la etapa de administrar una cantidad terapéuticamente eficaz de un agente que inhibe la enfermedad periodontal y/o trastorno periodontal a un sujeto necesitado de dicho tratamiento. Como se define en la presente memoria, una cantidad terapéuticamente eficaz de agente (concretamente, una dosificación eficaz) oscila de 0,001 a 30 mg/kg de peso corporal, preferiblemente de 0,01 a 25 mg/kg de peso corporal, más preferiblemente de 0,1 a 20 mg/kg de peso corporal, y aún más preferiblemente de 1 a 10 mg/kg, de 2 a 9 mg/kg, de 3 a 8 mg/kg, de 4 a 7 mg/kg, o de 5 a 6 mg/kg de peso corporal. El especialista en la materia apreciará que ciertos factores pueden influir en la dosificación requerida para tratar eficazmente un sujeto incluyendo, pero sin limitación, la gravedad de la enfermedad o trastorno, tratamientos previos, la salud en general y/o edad del sujeto y otras enfermedades presentes. Además, el tratamiento de un sujeto con una cantidad terapéuticamente eficaz de un inhibidor puede incluir un único tratamiento

o, preferiblemente, puede incluir una serie de tratamientos. Se apreciará también que la dosificación eficaz de inhibidor usada para tratamiento puede aumentarse o disminuirse durante el transcurso de un tratamiento particular. Pueden dar como resultado cambios en la dosificación los resultados de los ensayos de diagnóstico descritos en la presente memoria.

5 El especialista en la materia sabrá cómo detectar la presencia de periodontitis. Adicionalmente, el especialista en la materia sabrá cómo identificar un nivel elevado de una o más de MMP-8, MMP-9 y MMP-13. Un método ejemplar para detectar la presencia o ausencia de periodontitis en un mamífero comprende obtener una muestra biológica de la cavidad oral de un sujeto de ensayo y poner en contacto la muestra biológica con un compuesto o un agente capaz de detectar uno o más de los marcadores de periodontitis (concretamente MMP-8, MMP-9 o MMP-13) descritos en la presente memoria, por ejemplo, ácido nucleico marcador (por ejemplo, ARNm, ADN genómico, entre otros) o péptido marcador (por ejemplo, fragmento peptídico o proteína, entre otros) codificado por el ácido nucleico marcador, de tal modo que se detecte la presencia de un ácido nucleico marcador o péptido marcador codificado por el ácido nucleico en la muestra biológica. En una realización, un agente para detectar ARNm o ADN genómico marcador es una sonda de ácido nucleico marcada capaz de hibridar con ARNm o ADN genómico marcador. La sonda de ácido nucleico puede ser, por ejemplo, un ácido nucleico marcador completo o una porción del mismo. Se describen en la presente memoria otras sondas adecuadas para uso en los ensayos de diagnóstico de la invención. En otra realización, se usa la actividad de un marcador de periodontitis como vía para detectar el marcador (concretamente, actividad MMP-8, MMP-9 o MMP-13). Está incluido en la presente memoria cualquier ensayo conocido ahora o desarrollado después para detectar la actividad de un marcador.

20 En otra realización, un agente para detectar un péptido marcador es un anticuerpo capaz de unirse a un péptido marcador, tal como un anticuerpo con un marcaje detectable. Los anticuerpos pueden ser policlonales o monoclonales. Puede usarse un anticuerpo intacto, o un fragmento del mismo (por ejemplo, Fab o F(ab')₂). El término “marcado”, con respecto a la sonda o anticuerpo, se pretende que incluya el marcaje directo de la sonda o anticuerpo por acoplamiento (concretamente, ligamiento físico) de una sustancia detectable con la sonda o anticuerpo, así como el marcaje indirecto de la sonda o anticuerpo mediante reactividad con otro reactivo que esté marcado directamente. Los ejemplos de marcaje indirecto incluyen la detección de un anticuerpo primario usando un anticuerpo secundario marcado fluorescentemente y el marcaje terminal de una sonda de ADN con biotina de tal modo que pueda detectarse con estreptavidina marcada fluorescentemente.

30 Como se usa en término en la presente memoria, “muestra biológica” se pretende que incluya tejidos, células y fluidos biológicos aislados de la cavidad oral de un sujeto, así como tejidos, células y fluidos presentes en la cavidad oral de un sujeto. Es decir, el método de detección puede usarse para detectar ARNm, péptido (por ejemplo proteína o ADN genómico marcadores en una muestra biológica *in vitro* así como *in vivo*. A modo de ejemplo no limitante, las técnicas *in vitro* para la detección de ARNm marcador incluyen hibridaciones Northern e hibridaciones *in situ*. Las técnicas *in vitro* para la detección de péptido marcador incluyen ensayos de inmunosorción ligada a enzima (ELISA), transferencias Western, inmunoprecipitaciones e inmunofluorescencia. Las técnicas *in vitro* para la detección de ADN genómico marcador incluyen hibridaciones Southern. Las técnicas *in vivo* para la detección de péptido marcador incluyen introducir en la cavidad oral de un sujeto un anticuerpo antimarcador marcado. Por ejemplo, el anticuerpo puede marcarse con un marcador radiactivo cuya presencia y localización en un sujeto puede detectarse mediante técnicas de imagenología estándares.

40 Los métodos pueden implicar adicionalmente obtener una muestra biológica de control a partir de un sujeto de control, poner en contacto la muestra de control con un compuesto o agente capaz de detectar péptidos, ARNm o ADN genómico marcadores de tal modo que se detecte la presencia de péptido, ARNm o ADN genómico marcadores en la muestra biológica, y comparar la presencia de péptido, ARNm o ADN genómico marcadores en la muestra de control con la presencia de péptido, ARNm o ADN genómico en la muestra de ensayo. Como alternativa, puede compararse la presencia de péptido, ARNm o ADN genómico marcadores en la muestra de ensayo con la información en una base de datos o en un cuadro, dando como resultado la detección o el diagnóstico. Los métodos pueden implicar adicionalmente usar una muestra biológica de control obtenida a partir del sujeto que tiene periodontitis, en los que la muestra de control se obtuvo a partir del sujeto antes del inicio de la periodontitis (concretamente, cuando el sujeto estaba sano o en un estado “normal” sin periodontitis).

50 A modo de ejemplo no limitante, el nivel de MMP-9 puede averiguarse *in vitro* poniendo en contacto una célula con TNF- α . La célula puede ser un monocito. Después de poner en contacto una célula con TNF- α , se detecta el nivel de MMP-9 a cualquiera del nivel de proteína o ácido nucleico. En un aspecto, se averigua también el nivel de MMP-9 *in vitro* poniendo en contacto una célula con TNF- α en presencia de un agente antibacteriano. El agente antibacteriano puede ser 2,4,4'-triclora-2'-hidroxidifeniléter o puede ser doxiciclina. En otro aspecto, un agente puede ser algo distinto de un agente antibacteriano. Un agente puede ser un inhibidor de MMP.

60 Puede averiguarse *in vitro* una medida de la regulación negativa de MMP-9 mediante la detección del nivel de MMP-9 poniendo en contacto una célula con TNF- α en presencia de un agente, tal como un agente antibacteriano, y comparando el nivel de MMP-9 averiguado *in vitro* poniendo en contacto una célula con TNF- α en presencia de un agente antibacteriano en el que las condiciones experimentales son por lo demás idénticas. Un nivel menor de proteína, ácido nucleico o actividad enzimática de MMP-9 en presencia de agente antibacteriano que en ausencia de agente antibacteriano es indicativo de que el compuesto antibacteriano regula negativamente MMP-9. Basándose

en la divulgación expuesta en la presente memoria, se entenderá que pueden usarse los mismos métodos para evaluar MMP-8 y/o MMP-13.

Se entenderá que una medida *in vitro* de la regulación negativa de MMP-8, MMP-9 y/o MMP-13 puede correlacionarse con un efecto, observación o resultado *in vivo*. En un aspecto, la regulación negativa de una metaloproteínasa medida *in vitro* es una confirmación de una observación *in vivo* incluyendo, pero sin limitación, el tratamiento de periodontitis, un método de reducción de un exceso patológico de metaloproteínasa y/o actividad metaloproteínasa *in vivo*, y un método de identificación de un compuesto útil para tratar periodontitis y/o reducir un exceso patológico de metaloproteínasa y/o actividad metaloproteínasa *in vivo*. Véanse, por ejemplo, Golub *et al.*, Inflamm. Res. (1997) 46: 310-9, Preshaw *et al.*, J. Clin. Periodontol. (2004) 31: 697-707; Mantyla *et al.*, J. Periodontol. Res. (2003) 38: 436-439; Lorencini *et al.*, Histol. Histopathol. (2009) 24: 157-166 y Pozo *et al.*, J. Periodontol. Res. (2005) 40: 199-207. En otro aspecto, la regulación negativa de una metaloproteínasa medida *in vitro* es un factor de predicción de un resultado *in vivo* incluyendo, pero sin limitación, el tratamiento de periodontitis, un método de reducción de un exceso patológico de metaloproteínasa y/o actividad metaloproteínasa *in vivo* y un método de identificación de un compuesto útil para tratar periodontitis y/o reducir un exceso patológico de metaloproteínasa y/o actividad metaloproteínasa *in vivo*.

A modo de otro ejemplo no limitante, el nivel de MMP-13 puede averiguarse *in vitro* poniendo en contacto una célula con hormona paratiroidea (PTH). En una realización, una célula es un osteoblasto. Después de poner en contacto una célula con PTH, se detecta el nivel de MMP-13 a cualquiera del nivel de proteína o ácido nucleico. En un aspecto, el nivel de MMP-13 se averigua también *in vitro* poniendo en contacto una célula con PTH en presencia de un agente antibacteriano. En una realización, el agente antibacteriano es 2,4,4'-tricloro-2'-hidroxidifeniléter. Un nivel menor de proteína, ácido nucleico o actividad enzimática de MMP-13 en presencia de agente antibacteriano que en ausencia de agente antibacteriano es indicativo de que el compuesto antibacteriano regula negativamente MMP-13.

En un aspecto, la capacidad de una composición oral como se expone en la presente memoria de tratar periodontitis se averigua mediante comparación del efecto del 2,4,4'-tricloro-2'-hidroxidifeniléter sobre la regulación negativa de metaloproteínasa con el efecto de la composición oral sobre la regulación negativa de metaloproteínasa. La capacidad de cualquier composición oral de tratar periodontitis puede averiguarse mediante comparación del efecto de la composición oral, *in vivo* o *in vitro*, con el efecto de una composición oral como se expone en la presente memoria.

Se da a conocer también en la presente memoria una composición oral, tal como un dentífrico, gel, parche, colutorio o pulverizador, entre otros, para uso en un método como se describe anteriormente. La composición oral puede comprender un agente antibacteriano. El agente antibacteriano puede ser un agente antibacteriano no catiónico. Véase, por ejemplo, la patente de EE.UU. n° 5.288.480. El agente antibacteriano no catiónico está presente en la composición oral en una cantidad antiplaca eficaz de 0,25-0,35% en peso, preferiblemente de 0,3%. El agente antibacteriano es sustancialmente no hidrosoluble, lo que significa que su solubilidad es menor de 1% en peso en agua a 25°C y puede ser incluso menor de 0,1%. Cuando la composición oral es un colutorio, por ejemplo, la concentración de agente antibacteriano puede reducirse hasta 10 veces frente a la usada en otro dentífrico, tal como una pasta de dientes. El agente antibacteriano puede ser 2,4,4'-tricloro-2'-hidroxidifeniléter. La composición oral puede comprender dos o más agentes antibacterianos.

El agente potenciador antibacteriano (APA) puede potenciar el suministro del agente antibacteriano a, y la retención del mismo sobre, superficies orales. Un APA puede comprender un material adherente. Véase la patente de EE.UU. n° 5.288.480 para descripciones de materiales y composiciones útiles para materiales de APA, así como para descripciones generales de composiciones orales tales como composiciones de dentífrico. A modo de ejemplo no limitante, un material adherente en una composición es un polímero que tiene un peso molecular medio numérico de entre 100.000 y 2.500.000 inclusive. El material adherente puede seleccionarse de polímeros de poli(ácido vinilfosfónico), poli(ácido 1-fosfonoprenosulfónico), poli(ácido β-estirenofosfónico), poli(ácido α-estirenofosfónico), policarboxilato polimérico aniónico sintético, anhídrido maleico, ácido maleico y metilviniléter. La molécula adherente puede ser un polímero de metilviniléter y anhídrido maleico. Puede usarse un agente potenciador antibacteriano a un nivel que es de 0,01-4,0% en peso de una composición oral.

Como se usa en la presente memoria, un "grupo potenciador del suministro" hace referencia a aquel que liga o une sustancial, adhesiva, cohesivamente o de otro modo el APA (portador del agente antibacteriano) con superficies orales (por ejemplo, dientes y encías), "suministrando" así el agente antibacteriano a dichas superficies. El grupo orgánico potenciador de la retención, generalmente hidrófobo, liga o une de otro modo el agente antibacteriano con el APA, promoviendo así la retención del agente antibacteriano en el APA e indirectamente sobre las superficies orales. En algunos casos, el ligamiento del agente antibacteriano ocurre mediante atrapamiento físico del mismo por el APA, especialmente cuando el APA es un polímero reticulado cuya estructura proporciona inherentemente numerosos sitios para dicho atrapamiento. La presencia de un resto reticulante de alto peso molecular y más hidrófobo en el polímero reticulado promueve aún más el atrapamiento físico del agente antibacteriano en o por el polímero de APA reticulado.

Es un agente potenciador antibacteriano que potencia el suministro y adherencia de dicho agente antibacteriano a, y la retención del mismo sobre, superficies orales de dientes y encías, (i) un copolímero de ácido o anhídrido maleico

con otro monómero polimerizable etilénicamente insaturado inerte o (ii) un polímero de poli(ácido β -estirenofosfónico) o poli(ácido α -estirenofosfónico) o un copolímero de cualquier ácido estirenofosfónico con otro monómero etilénicamente insaturado. Sin embargo, el especialista en la materia entenderá que la divulgación anterior no está limitada al agente potenciador antibacteriano específico usado, y que están incluidos otros agentes potenciadores antibacterianos.

En un dentífrico ejemplar, está presente un vehículo oralmente aceptable que incluye una fase acuosa con humectante. Está presente típicamente agua en una cantidad de al menos un 3% en peso, generalmente de 3-35%, y humectante, preferiblemente glicerina y/o sorbitol, típicamente a un total de 6,5-75% o 80% en peso del dentífrico, más típicamente de 10-75%. Aunque no se requiere cuando está presente opcionalmente un 0,25-0,35% de agente antibacteriano no catiónico no hidrosoluble, puede incorporarse al vehículo humectante acuoso un ingrediente adicional que ayuda a la solubilización del agente antibacteriano en saliva. Dichos agentes solubilizantes opcionales incluyen polioles humectantes tales como propilenglicol, dipropilenglicol y hexilenglicol, Cellosolve tal como Cellosolve de metilo y Cellosolve de etilo, aceites y ceras vegetales que contienen al menos 12 carbonos en una cadena lineal tales como aceite de oliva, aceite de ricino y vaselina, y ésteres tales como acetato de amilo, acetato de etilo y benzoato de bencilo. Como se usa en la presente memoria, "propilenglicol" incluye 1,2-propilenglicol y 1,3-propilenglicol. Deberían evitarse cantidades significativas de polietilenglicol, particularmente de peso molecular de 600 o más, puesto que el polietilenglicol inhibe eficazmente la actividad antibacteriana del agente antibacteriano no catiónico. Por ejemplo, el polietilenglicol (PEG) 600, cuando está presente con triclosán en una relación en peso de 25 triclosán: 1 PEG 600, reduce la actividad antibacteriana del triclosán por un factor de 10-20 de la reinante en ausencia de polietilenglicol.

El pH de una composición oral está generalmente en el intervalo de 4,5 a 10, y en otro aspecto de 6,5 a 7,5. Es digno de mención que las composiciones pueden aplicarse por vía oral a un pH inferior a 5 sin descalcificar sustancialmente ni dañar de otro modo el esmalte dental. El pH puede controlarse con ácido (por ejemplo, ácido cítrico o ácido benzoico) o base (por ejemplo, hidróxido de sodio) o tamponarse (como con citrato, benzoato, carbonato o bicarbonato de sodio, hidrogenofosfato de disodio, dihidrogenofosfato de sodio, etc.).

Puede usarse cualquier partícula abrasiva y puede seleccionarse de bicarbonato de sodio, fosfato de calcio (por ejemplo, fosfato de dicalcio dihidratado), sulfato de calcio, carbonato de calcio precipitado, sílice (por ejemplo, sílice hidratada), óxido de hierro, óxido de aluminio, perlita, partículas de plástico, por ejemplo, polietileno, y combinaciones de los mismos. En particular, el agente abrasivo puede seleccionarse de fosfatos de calcio (por ejemplo, fosfato de dicalcio dihidratado), sulfato de calcio, carbonato de calcio precipitado, sílice (por ejemplo, sílice hidratada), pirofosfato de calcio y combinaciones. Puede usarse cualquier tipo de sílice, tales como sílices precipitadas o geles de sílice. Se prefieren las sílices comercialmente disponibles tales como INEOS AC43, disponible en Ineos Silicas, Warrington, Reino Unido. Pueden usarse también otros agentes abrasivos de acuerdo con la presente invención. Como se expone en la patente de EE.UU. n° 4.358.437, las formas en polvo de carbonato de calcio en forma abrasiva constituyen una clase importante de dichos agentes abrasivos. Son ejemplos de dichos agentes abrasivos caliza o mármol molidos, margas tales como aragonita, calcita o mezclas de las mismas, y margas precipitadas sintéticamente tales como marga de depuradora. Generalmente, el carbonato de calcio debería tener un diámetro mediano ponderado de menos de 40 μm , preferiblemente de menos de 15 μm . Son una segunda clase de agentes abrasivos las sílices en polvo, particularmente xerogeles de sílice como se definen en la patente de EE.UU. n° 3.538.230.

Una composición oral puede comprender un agente de pulido silíceo. El agente de pulido puede ser un material silíceo tal como un gel de sílice hidratada, un xerogel de sílice o un aluminosilicato o zirconosilicato de metal alcalino amorfo complejo o una sílice precipitada. Los materiales de sílice coloidales incluyen aquellos vendidos con la marca comercial SYLOID tales como aquellos que se han vendido como SYLOID 72 y SYLOID 74. Las sílices precipitadas incluyen aquellas vendidas con el nombre comercial ZEODENT tales como ZEODENT 113 y ZEODENT 115 y ZEODENT 119.

Un colutorio o enjuague no comprenderá generalmente una partícula abrasiva o una partícula de pulido. Un parche no comprenderá generalmente una partícula abrasiva o una partícula de pulido.

Sin ligarse a una teoría mediante la que se consiguen las ventajas, se cree que incluso en ausencia de un material solubilizante especial para un agente antibacteriano (por ejemplo, 2,4,4'-tricloro-2'-hidroxidifeniléter), cuando la cantidad de agente es de 0,25%-0,35% en peso y está presente un policarboxilato, está presente suficiente agente para efectuar el tratamiento de periodontitis mediante la regulación negativa de al menos una de MMP-8, MMP-9 o MMP-13. Esto es igualmente aplicable a otros agentes antibacterianos no catiónicos no hidrosolubles descritos en la presente memoria.

Una composición oral (por ejemplo, dentífrico) puede contener también una fuente de iones fluoruro, o un componente que proporciona flúor, como agente anticaries, en una cantidad suficiente para suministrar de 25 ppm a 5.000 ppm de iones fluoruro. Estos compuestos pueden ser ligeramente solubles en agua o pueden ser totalmente hidrosolubles. Se caracterizan por su capacidad de liberar iones fluoruro en agua y por la ausencia sustancial de reacción indeseada con otros compuestos de la preparación oral. Entre estos materiales están las sales de fluoruro inorgánicas, tales como sales de metal alcalino o metal alcalinotérreo solubles, por ejemplo, fluoruro de sodio,

5 fluoruro de potasio, fluoruro de amonio, fluoruro de calcio, un fluoruro de cobre tal como fluoruro cuproso, fluoruro de cinc, fluoruro de bario, fluorosilicato de sodio, fluorosilicato de amonio, fluorocirconato de sodio, fluorocirconato de amonio, monofluorofosfato de sodio, mono- y difluorofosfato de aluminio y pirofosfato de sodio y calcio fluorado. Se prefieren fluoruros de metal alcalino y estaño, tales como fluoruros de sodio y estannoso, monofluorofosfato de sodio (MFP) y mezclas de los mismos. Típicamente, en caso de fluoruros de metal alcalino, este componente está presente en una cantidad de hasta 2% en peso, basada en el peso de la preparación, y preferiblemente en el intervalo de 0,05 a 1%. En el caso de monofluorofosfato de sodio, el compuesto puede estar presente en una cantidad de 0,1-3%, y en una realización de 0,7-0,8%.

10 Una composición puede comprender adicionalmente un agente seleccionado de un agente iónico estannoso, un compuesto de fluoruro, fluoruro de sodio, clorhexidina, alexidina, hexetidina, sanguinarina, cloruro de benzalconio, salicilanilida, bromuro de domifeno, cloruro de cetilpiridinio (CPC), cloruro de tetradecilpiridinio (TPC), cloruro de *N*-tetradecil-4-etilpiridinio (TDEPC), octenidina, delmopinol, octapinol, nisina, agente iónico de cinc, agente iónico de cobre, aceites esenciales, furanonas, bacteriocinas, arginato de etil-lauroilo, extractos de magnolia, una fuente de iones metálicos, arginina, bicarbonato de arginina, honoquiol, magonol, ácido ursólico, ácido úrsico, morina, extracto de espino amarillo, un peróxido, una enzima, un extracto de *Camellia*, un flavonoide, un flavano, difeniléter halogenado, creatina y propóleo.

15 La presente invención proporciona métodos de identificación de un compuesto útil para tratar una enfermedad o afección de la cavidad oral, comprendiendo el método: poner en contacto una primera muestra gingival, obtenida de un mamífero que padece una enfermedad o afección de la cavidad oral, con un compuesto de ensayo; poner en contacto una segunda muestra gingival, obtenida de la cavidad oral de dicho mamífero, con un control positivo, en el que dicho control positivo es un compuesto conocido por regular negativamente la expresión de una o más metaloproteinasas de matriz; medir la extensión en que la expresión de una o más de dichas metaloproteinasas de matriz se regula negativamente por dicho compuesto de ensayo; medir la extensión en que la expresión de una o más de dichas metaloproteinasas de matriz se regula negativamente por dicho control positivo y comparar la extensión en que la expresión de una o más de dichas metaloproteinasas de matriz se regula negativamente por dicho compuesto de ensayo con la extensión en que la expresión de una o más de dichas metaloproteinasas de matriz se regula negativamente por dicho control positivo; en los que un compuesto de ensayo que regula negativamente la expresión de una o más de dichas metaloproteinasas de matriz en una extensión mayor o igual que dicho control positivo es un compuesto útil en el tratamiento de una enfermedad o afección de la cavidad oral. En métodos de la presente invención, la enfermedad o afección de la cavidad oral es periodontitis o gingivitis.

20 En otras realizaciones, la una o más metaloproteinasas de matriz se seleccionan del grupo consistente en: MMP-8, MMP-9 y MMP-13. En realizaciones adicionales, el control positivo regula negativamente la expresión de MMP-8, MMP-9 y MMP-13.

25 En otras realizaciones, el control positivo es un difeniléter halogenado. En aún otras realizaciones, el control positivo es triclosán.

30 En algunas realizaciones, el compuesto de ensayo regula negativamente la expresión de una o más de dichas metaloproteinasas de matriz en mayor extensión que dicho control positivo. En realizaciones adicionales, el compuesto de ensayo regula negativamente la expresión de MMP-9 y de MMP-13 en mayor extensión que dicho control positivo. Otras realizaciones adicionales proporcionan métodos en los que el compuesto de ensayo regula negativamente la expresión de MMP-8, MMP-9 y MMP-13 en mayor extensión que el control positivo.

35 En algunas realizaciones, el control positivo regula negativamente la expresión de MMP-8. En algunas realizaciones, el control positivo regula negativamente la expresión de MMP-9. En aún otras realizaciones, el control positivo regula negativamente la expresión de MMP-13.

40 La invención se describe adicionalmente en los siguientes ejemplos. Los ejemplos son meramente ilustrativos y no limitan en modo alguno el alcance de la invención como se describe y reivindica.

EJEMPLOS

Ejemplo 1: Preparación y caracterización de MMP-9

45 Se obtuvieron células U937 y medio de cultivo RPMI 1640 de la ATCC. Se obtuvo el kit ELISA de MMP-9 humana (QUANTIKINE) de R&D Systems. Se obtuvo el suero fetal bovino (FBS) de VWR, y se obtuvieron la disolución de penicilina-estreptomicina y factor de necrosis tumoral α (TNF- α) de Sigma.

50 Se cultivaron células de linfoma monocítico U937 de leucemia humana en medio RPMI 1640 suplementado con 10% de FBS y 1% de disolución de penicilina-estreptomicina. Se incubaron las células a 37°C en atmósfera humidificada que contenía 5% de CO₂ y 95% de aire. Antes del tratamiento, se transfirieron las células a RPMI que contenía 1% de FBS durante una noche. Se sembraron las células en una placa de 48 pocillos. El medio de cultivo celular incluía cualquiera de TNF- α (250 ng/ml), triclosán (1 ppm) o ambos agentes conjuntamente o ningún agente (control). Se incubaron las células después de tratamiento durante 24 horas. Se recogieron los medios acondicionados y se

almacenaron a -80°C hasta el análisis. Se sometieron muestras de los medios acondicionados a ensayos de inmunosorción ligada a enzima (ELISA) para MMP-9, según el protocolo de ELISA comercial (Figura 1).

Las células U937 estimuladas con TNF- α producían un aumento del nivel de MMP-9. El triclosán a 1 ppm reducía significativamente el nivel de MMP-9 en células U937 estimuladas con TNF- α .

5 Tabla 1: Datos para la figura 1 que demuestran el efecto del triclosán sobre la producción de MMP-9

	Media (ng/ml)	Desviación estándar (ng/ml)
Control	0,114	0,024333
TNF- α	0,275	0,048665
TNF- α + triclosán 1 ppm	0,155	0,004867

Ejemplo 2: Preparación y caracterización de MMP-13

10 Se adquirió hormona paratiroidea (PTH 1-34 de rata) en Sigma. Se cultivaron células UMR 106-01 en medio esencial mínimo de Eagle (EMEM) suplementado con Hepes 25 mM a pH 7,4, 1% de aminoácidos no esenciales, 100 unidades/ml de penicilina, 100 μ g/ml de estreptomycin y 5% de suero fetal bovino. Se realizó una PCR-FI cuantitativa instantánea según el siguiente método: se sembraron las células UMR 106-01 en placas de 12 pocillos y se cultivaron durante 2-3 días en medios de cultivo celular. Cuando las células alcanzaron la confluencia, se cambiaron los medios de cultivo celular por suero fetal bovino al 1% durante una noche para inanición celular. Se preincubaron las células con triclosán o un dentífrico que contiene triclosán (véanse, por ejemplo, las patentes de EE.UU. n° 4.894.220, 5.032.386 y patentes relacionadas) durante 15 minutos y se incubaron entonces con PTH (10^{-8} M) durante 4 horas.

15 Se aisló el ARN total de células UMR 106-01 estimuladas con o sin PTH con reactivo TRIzol. Se sometió a transcripción inversa el ARN total (0,1 μ g) hasta ADNc usando el kit SUPERSRIPT de Invitrogen según las instrucciones del fabricante. Se efectuó la PCR con ADNc usando cebadores cuyas secuencias se exponen en la Tabla 2. Se amplificaron todos los ADNc añadiendo 2,5 μ l de ADNc a la mezcla de PCR (22,5 μ l) que contenía cada cebador (0,2 μ M) y 12,5 μ l de Platinum SYBR Green qPCR SuperMix UDG (Invitrogen). Se preincubaron las reacciones a 50°C durante 2 minutos para descontaminar el ADN que contiene dU de UDG, y después a 95°C durante 2 minutos para activar la Taq. Se continuó el programa de PCR durante 49 ciclos de desnaturalización a 95°C durante 15 segundos, reasociación y alargamiento de los cebadores a 60°C durante 30 segundos. Se determinó la cuantificación relativa de la expresión génica usando el método de $\Delta\Delta$ Ct en que los cambios en veces de expresión génica se refieren a las muestras de control. Se normalizaron todas las muestras a β -actina.

20 Todos los resultados se expresaron como medias \pm error estándar (ES) de medidas por triplicado, repitiéndose todos los experimentos al menos tres veces. Se llevaron a cabo los análisis estadísticos usando la prueba de t de Student.

25 Las células UMR estimuladas con PTH producían un aumento de la expresión de MMP-13. El triclosán a 10 ppm, 4 ppm y 1 ppm reducía significativamente la expresión de MMP-13 en células UMR estimuladas con PTH. Una suspensión densa de dentífrico que contenía triclosán que contenía 10 ppm de triclosán reducía significativamente la expresión de MMP-13 en células UMR estimuladas con PTH.

Tabla 2: Secuencias cebadoras

Gen de MMP-13 de rata
5'-GCCCTATCCCTTGATGCCATT-3' (codificante)
5'-ACAGTTCAGGCTCAACCTGCTG-3' (anticodificante)
Gen de β -actina de rata
5'-AGCCATGTACGTAGCCATCC-3' (codificante)
5'-ACCCTCATAGATGGGCACAG-3' (anticodificante)

35 Tabla 3: Los datos de la Figura 2 demuestran que el triclosán inhibe la expresión de MMP-13

	Media	Desviación estándar
Control	0,558546	0,388464
PTH	78,84402	14,45422
Triclosán 10 ppm	1,518275	0,702455
Triclosán 4 ppm	1,423882	0,162156
Triclosán 1 ppm	0,416584	0,23855
Triclosán 10 ppm + PTH	3,011772	1,497531
Triclosán 4 ppm + PTH	10,55882	6,868653
Triclosán 1 ppm + PTH	35,38321	3,934183

Tabla 4: Datos de la figura 3 que demuestran que un dentífrico que contiene triclosán inhibe la expresión de MMP-13

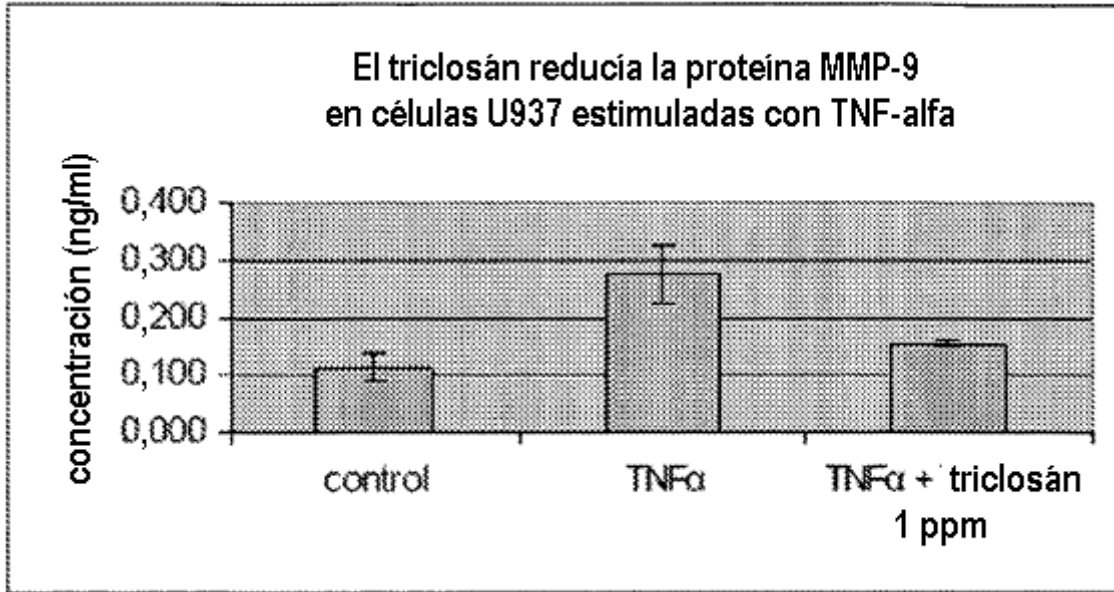
	Media	Desviación estándar
Control	0,917758	0,116307
PTH	370,6579	20,64484
Suspensión densa de dentífrico que contiene triclosán que contiene 10 ppm de triclosán	8,625401	5,675636
PTH + suspensión densa de dentífrico que contiene triclosán que contiene 10 ppm de triclosán	7,904052	3.23775

REIVINDICACIONES

1. Un método de identificación de un compuesto útil para tratar gingivitis o periodontitis, comprendiendo el método:
 - 5 poner en contacto una primera muestra gingival, obtenida de un mamífero que padece gingivitis o periodontitis, con un compuesto de ensayo;
 - poner en contacto una segunda muestra gingival, obtenida de la cavidad oral de dicho mamífero, con un control positivo, en el que dicho control positivo es un compuesto conocido por regular negativamente la expresión de una o más metaloproteinasas de matriz;
 - 10 medir la extensión en que la expresión de una o más de dichas metaloproteinasas de matriz se regula negativamente por dicho compuesto de ensayo;
 - medir la extensión en que la expresión de una o más de dichas metaloproteinasas de matriz se regula negativamente por dicho control positivo y
 - 15 comparar la extensión en que la expresión de una o más de dichas metaloproteinasas de matriz se regula negativamente por dicho compuesto de ensayo con la extensión en que la expresión de una o más de dichas metaloproteinasas de matriz se regula negativamente por dicho control positivo;

en el que un compuesto de ensayo que regula negativamente la expresión de una o más de dichas metaloproteinasas de matriz en una extensión mayor o igual que dicho control positivo es un compuesto útil en el tratamiento de gingivitis o periodontitis.
- 20 2. El método de la reivindicación 1, en el que dicha una o más metaloproteinasas de matriz se seleccionan del grupo consistente en: MMP-8, MMP-9 y MMP-13.
3. El método de las reivindicaciones 1 o 2, en el que dicho control positivo regula negativamente la expresión de MMP-8, MMP-9 y MMP-13.
4. El método de cualquiera de las reivindicaciones precedentes, en el que dicho control positivo es un difeniléter halogenado.
- 25 5. El método de cualquiera de las reivindicaciones precedentes, en el que el control positivo es triclosán.
6. El método de cualquiera de las reivindicaciones precedentes, en el que dicho compuesto de ensayo regula negativamente la expresión de una o más de dichas metaloproteinasas de matriz en mayor extensión que dicho control positivo.
- 30 7. El método de cualquiera de las reivindicaciones precedentes, en el que dicho compuesto de ensayo regula negativamente la expresión de MMP-9 y MMP-13 en mayor extensión que dicho control positivo.
8. El método de cualquiera de las reivindicaciones precedentes, en el que dicho compuesto de ensayo regula negativamente la expresión de MMP-8, MMP-9 y MMP-13 en mayor extensión que dicho control positivo.
9. El método de la reivindicación 2, en el que dicho control positivo regula negativamente la expresión de MMP-8.
- 35 10. El método de la reivindicación 2, en el que dicho control positivo regula negativamente la expresión de MMP-9.
11. El método de la reivindicación 2, en el que dicho control positivo regula negativamente la expresión de MMP-13.

Figura 1:



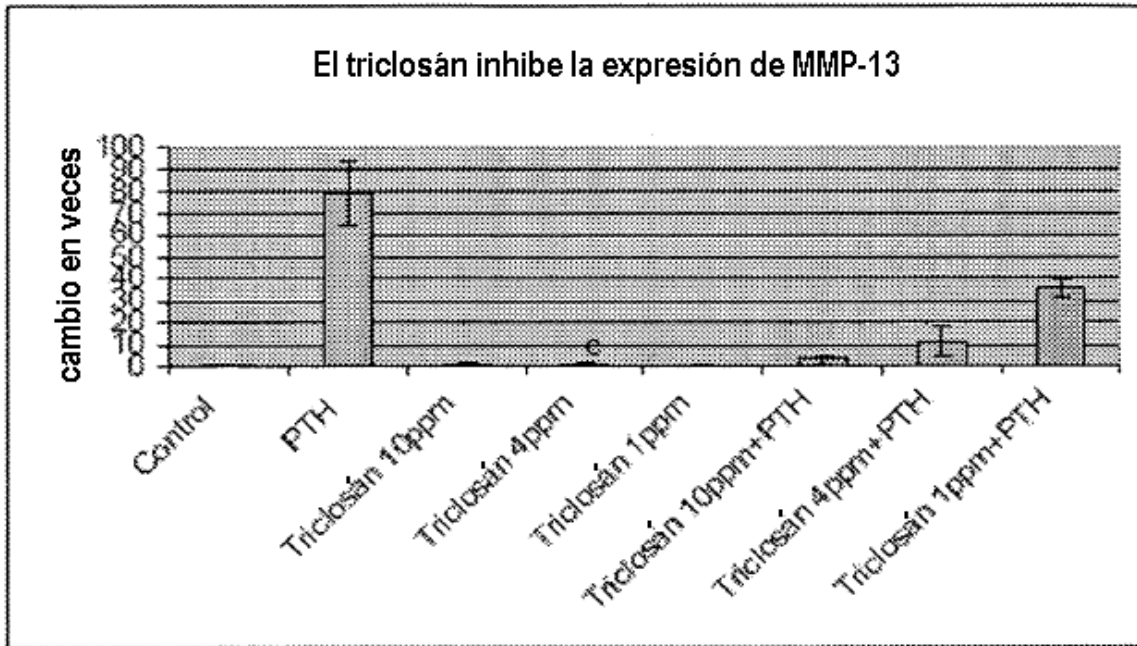


Figura 2

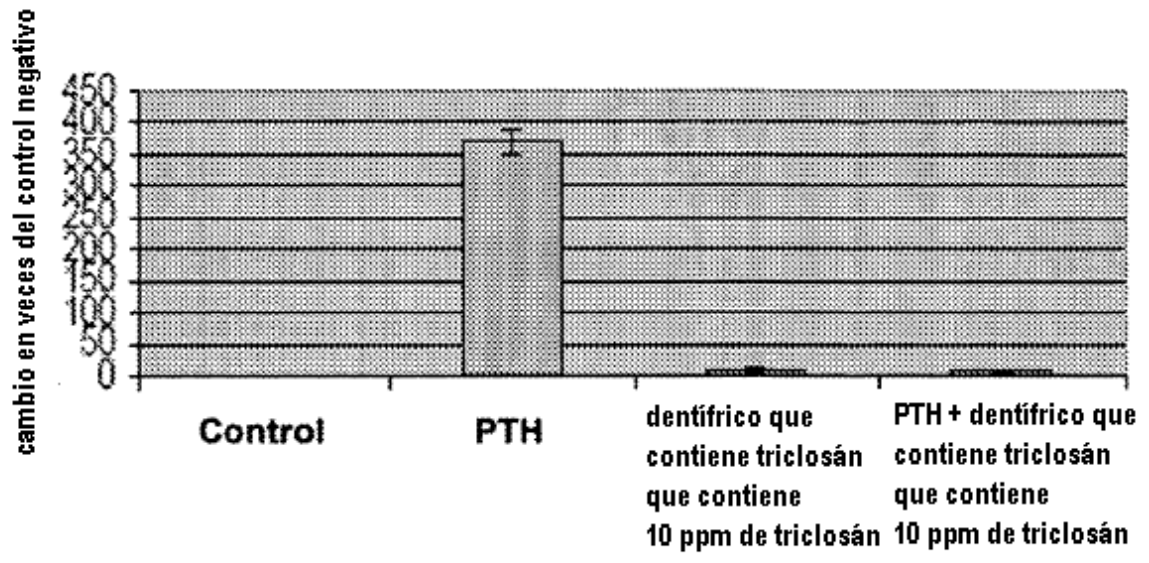


Figura 3