

[19] 中华人民共和国国家知识产权局

[51] Int. Cl.



[12] 发明专利申请公布说明书

[21] 申请号 200780002191.3

G01N 33/569 (2006.01)
G01N 33/50 (2006.01)
G01N 33/68 (2006.01)
C12Q 1/04 (2006.01)

[43] 公开日 2009年2月18日

[11] 公开号 CN 101371141A

[22] 申请日 2007.1.8

[21] 申请号 200780002191.3

[30] 优先权

[32] 2006.1.10 [33] US [31] 60/757,751

[86] 国际申请 PCT/US2007/060222 2007.1.8

[87] 国际公布 WO2007/082181 英 2007.7.19

[85] 进入国家阶段日期 2008.7.10

[71] 申请人 高露洁-棕榄公司

地址 美国纽约州

[72] 发明人 P·斯里尼瓦桑

[74] 专利代理机构 中国专利代理(香港)有限公司
代理人 马崇德 刘 玥

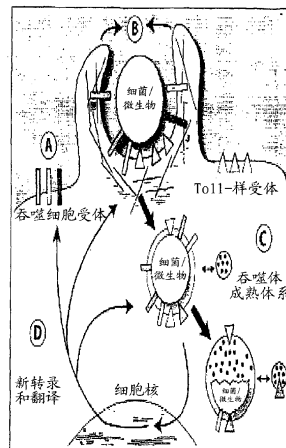
权利要求书2页 说明书5页 附图2页

[54] 发明名称

调节细胞表面受体预防或减少炎症的方法

[57] 摘要

本发明包括区分口腔菌种，以确定该菌种是否口腔有害的方法。该方法包括将一种口腔菌的至少一株细菌或细菌某部位与牙龈细胞接触；然后检测指示化合物是否存在。指示物质基本上不存在，表示该菌种无害。本发明也包括鉴定试剂抗炎效果的方法。该方法包括将细胞与试剂在有害菌或该菌某部位存在情况下进行接触，然后检测指示化合物是否存在。指示物质基本上不存在，表示该试剂是抗炎剂。



- 1、区分口腔菌种的方法，该方法包括：
 - (a) 将一种口腔菌的至少一种细菌或某细菌部位，与牙龈细胞接触；以及
 - (b) 检测指示化合物是否存在其中，指示剂基本上不存在表示该菌种无害。
- 2、权利要求1的方法，其中牙龈细胞是在体外。
- 3、权利要求1的方法，其中牙龈细胞是在哺乳动物的口腔原位。
- 4、权利要求1的方法，其中指示剂选自 toll-样受体调节所产生分子组成的组。
- 5、权利要求1的方法，指示剂选自 TLR2,TLR3 和 TLR4 调节所产生分子组成的组。
- 6、权利要求1的方法，指示剂选自 TLR5,TLR7 和 TLR9 调节所产生分子组成的组。
- 7、权利要求1的方法，其中指示剂选自 NF- κ B 途径分子组成的组。
- 8、权利要求1的方法，其中指示剂选自细胞因子和白介素组成的组。
- 9、权利要求1的方法，其中指示剂选自 IL-1, IL-6, IL-8, IL-12 和 TNF- α 组成的组。
- 10、权利要求1的方法，其中指示剂被直接检测。
- 11、权利要求1的方法，其中指示剂被间接检测。
- 12、权利要求1的方法，其中至少一种细菌获自临床样品。
- 13、鉴定试剂抗炎效果的方法，该方法包括将细胞与试剂在有害菌或该菌某部位存在情况下进行接触，然后检测指示剂化合物是否存在，其中，指示剂基本上不存在表示该试剂是抗炎剂。
- 14、权利要求13的方法，其中细胞是真核细胞。
- 15、权利要求13的方法，其中细胞是原核细胞。
- 16、权利要求13的方法，其中指示剂选自 toll-样受体调节所产生分子组成的组。
- 17、权利要求13的方法，其中指示剂选自 TLR2,TLR3,TLR4,TLR5,TLR7 和 TLR9 调节所产生分子组成的组。

-
- 18、权利要求 13 的方法，其中指示剂选自 NF- κ B 途径分子组成的组。
 - 19、权利要求 13 的方法，其中指示剂选自细胞因子和白介素组成的组。
 - 20、权利要求 13 的方法，其中指示剂选自 IL-1, IL-6, IL-8, IL-12 和 TNF- α 组成的组。
 - 21、权利要求 13 的方法，其中指示剂分子被直接检测。
 - 22、权利要求 13 的方法，其中所述试剂选自 MIC 约少于 20% 的试剂。
 - 23、阻止哺乳动物口腔细胞中 toll-样受体调节的方法，该方法包括将受体与三氯生接触。
 - 24、权利要求 23 的方法，其中所述细胞是牙龈细胞。
 - 25、权利要求 23 的方法，其中 toll-样受体选自 TLR2, TLR3, TLR4, TLR5, TLR7 和 TLR9。
 - 26、减少或预防口腔组织炎症的方法，该方法包括以一定浓度给口腔组织施用含三氯生的组合物，以使对组织施用的三氯生达到次-MIC 水平。

调节细胞表面受体预防或减少炎症的方法

相关申请的交叉参考

本申请要求享有 2006 年 1 月 10 日申请的美国临时专利申请系列号 60/757,751 的相关权益，其内容并入本文作为参考。

发明背景

据认为，哺乳动物口腔软组织显示出最早的炎症迹象。该炎症的总体低水平，可导致牙龈炎和/或牙周炎。据认为，该炎症通常由，或者至少部分由口腔细菌所引起的。此外，口腔组织炎症也能由外科手术、局部损伤、创伤、坏死、不当口腔保健、或者各种系统源而引起。

通常认为，这些疾病和症状所涉及细胞成分包括上皮组织、牙龈成纤维细胞和循环性白细胞，它们都在宿主对细菌产生病原因子的应答中起作用。这些口腔感染所涉及的一些细菌病原是已知的，尽管许多的病原仍未知或仍不明确。虽然某类细菌感染，通常是许多该类口腔疾病的发病原因，但是疾病状态或症状的病理，却是由宿主应答所介导。使用抗菌剂可减少某口腔菌群，同时也可使炎症减轻。然而，该方法也有缺点，因为该杀菌并不加以区分（有益口腔菌和有害口腔菌都被杀灭），而且该杀菌对剂量和时间敏感。

口腔组织的细菌感染可刺激宿主的免疫应答，并通过上调可导致重要组织损伤的炎症介质而减缓治愈过程。这些代谢物作为主要介质而在牙龈炎、牙周炎、骨髓炎、和其它炎症疾病中发生。

据报道炎症机理之一，是通过哺乳动物细胞某跨膜受体介导。例如，toll-样受体(“TLRs”)是糖基化的跨膜蛋白，其一旦被配体诱导的寡聚化激活，将可在细胞内引发免疫应答，并最终导致介导炎症状态的细胞因子、白介素和其它分子的表达。

本领域需要用于这样的炎症效应诊断、治疗和预防的试剂和技术。

附图简述

图 1 是显示细胞表面与微生物接触的示意图。

图 2 显示了 toll-样受体(TLR)1,2,3,4,5,6,7 和 9 的信号途径,以及各 TLR 调节

所产生的各种分子。

发明简述

本发明包括对口腔菌种进行区分，以确定该菌种是否为口腔有害的方法。该方法包括将一种口腔菌的至少一株细菌或细菌某部位与牙龈细胞接触；然后检测指示化合物是否存在。指示物质基本上不存在，表示该菌种无害。

本发明范围也包括确定试剂抗炎效果的方法。该方法包括将细胞与试剂在有害菌或该菌某部位存在情况下进行接触，然后检测指示化合物是否存在。指示物质基本上不存在，表示该试剂是抗炎剂。

发明详述

本发明提供了（1）区分有害菌和有益口腔菌的方法，和（2）确定特定试剂抗炎效果的方法。本发明也提供了在细胞中用三氯生(triclosan)阻止 toll-样受体调节的方法。

本文所用的“炎症”是指由组织损伤或破坏所引发的局部保护反应，其通常可破坏、稀释或掩蔽损伤介质和受损组织。在急性症状中，它以疼痛、发热、红肿和肿胀为特征。在组织学上，炎症涉及一系列复杂事件，包括随着渗透压和血流的增加，小动脉、毛细管和小静脉膨胀；含血浆蛋白的流体渗出，以及白细胞至炎症位点迁移。炎症可相应于，促炎细胞介质或诸如抗原抗体相互作用或抗原与敏化淋巴细胞间作用所释放的物质的水平增加。广而言之，抗炎剂是与不用试剂处理的同样细胞相比，其可减少这些细胞组织效应的性质和/或程度的任何试剂。

一方面，本发明提供了评估细菌的特定种或株，以确定该种或株是否为口腔有害的方法。“有害”，它意味着病原菌，其存在可通过所感染细胞产生炎症介质。一些细菌株/种据报道是有害的，包括下文表I所示：

表 1: 据报道有害的口腔菌

| |
|--|
| 戈氏放线菌(<i>A. gerencseriae</i>) |
| 内氏放线菌 1(<i>A. naeshlundii</i> 1) |
| 内氏放线菌 2(<i>A. naeshlundii</i> 2) |
| 小韦荣球菌(<i>V. parvula</i>) |
| 缓症链球菌(<i>S. mitis</i>) |
| 口腔链球菌(<i>S. oralis</i>) |
| 牙龈二氧化碳嗜纤维菌(<i>C. gingivalis</i>) |
| 生痰二氧化碳嗜纤维菌(<i>C. sputigena</i>) |
| 具核梭杆菌具核亚种(<i>F. nucleatum</i> ss <i>nucleatum</i>) |
| 具核梭杆菌多型亚种(<i>F. nucleatum</i> ss <i>polymorphum</i>) |
| 牙周梭杆菌(<i>F. periodonticum</i>) |
| 中间普雷沃菌(<i>P. intermedia</i>) |
| 连翘坦纳菌(<i>T. forsythia</i>) |
| 口颊纤毛菌(<i>L. buccalis</i>) |
| 粘膜奈瑟氏菌(<i>N. mucosa</i>) |
| 痤疮丙酸杆菌(<i>P. aenes</i>) |
| 产黑色素普雷沃菌(<i>P. melaninogenica</i>) |
| 有毒月单胞菌(<i>S. noxia</i>) |

本方法包括将待测口腔菌种或菌株的至少一个细菌，与至少一个牙龈细胞接触。可选地，将牙龈细胞与细菌某部位，细胞膜，胞浆物，细菌代谢物、终产物或副产物，和/或毒力因子接触。

该步骤可体外进行，例如，维持培养细菌或细菌某组成部位及牙龈细胞，然后将该培养物予以组合。可选地，将细菌培养物以合适递送载体施用于口腔，从而将该接触在体内进行。

在该接触之后，检测一种或多种指示剂物质。这样的指示剂包括常规宿主免疫应答过程所产生的已知或待发现的任何物质，其包括涉及在细胞产生细胞因子和其它促炎介质过程中的中间化合物，酶，蛋白，RNAs，DNAs，和其它

分子。优选地，指示剂是由任何 toll-样受体（例如如图 2 所示），诸如包括 TLRs 2, 3, 4, 5, 7, 和 9 调节所产生的那些指示剂物质；NF κ -B 途径的分子，细胞因子，白介素（例如 1, 6, 8, 12），肿瘤坏死因子（TNF），肽酶，以及白介素或 TNF 亚单位和/或白介素、趋化因子（例如 CCL5, CCL4, CCL3, 和 CC10）及基质金属蛋白酶的编码 mRNAs。

所选指示物质的检测，可用本领域已知或待发展的任何方式进行，并且该检测可以是相对或者绝对的测量。检测可通过直接定量检测所选指示物质进行。可选地，检测可用其它检测系统间接检测完成，例如使用放射性和/或荧光标记，抗体，特异性基因表达水平的改变，mRNA 分析，微阵列分析，和/或抗氧化状态的改变。例如，如果该指示剂是一种酶，那么就可将该样品置于合适的底物，然后检测该酶催化反应的终产物以确定该酶指示剂是否存在。在本发明情况下，所选指示物质基本上不存在，意味着该菌种/菌株无害，即其不以引发任何促炎介质产生的方式影响细胞。

本发明也包括评估特定试剂抗炎能力或效果的方法，即，该试剂减少或消除暴露于病原菌的组织中的炎症的能力。该方法包括对待测试剂进行筛选。这样的试剂可以是蛋白，肽，有机分子，无机分子，或任何所述分子的复合物。

在某些情况下，期望所选待测试剂在口腔环境中不显示显著的杀菌效应。例如，该试剂可从显示最小抑制浓度(MIC)为 0，少于约 5%，少于约 10%，少于约 20%，以及少于约 30%的物质中选取。

MIC 研究通常包括在合适的溶剂中制备活性试剂溶液，以及溶液活性试剂的后续系列稀释。将所选细菌的标准悬液（这可能是某个细菌范围，每种细菌都有其特定生长和处理方案），加至各浓度的稀释活性试剂中。细菌和活性试剂在 37°C 和适宜条件下温育，典型地，温育 48 小时后检测细菌的生长。

MIC 研究对照，包括在任何所加溶剂或赋形剂缺乏情况下，监测细菌生长的生长对照。其它对照，可监测实验所用介质的无菌状态。用于将活性试剂溶解的溶剂对细菌的效应，是在该研究中包括的最后系列对照。

温育后，将培养皿置于微皿光谱光度计 610nm 处读数。以抑制细菌生长的最低活性试剂浓度，读取结果。在高活性浓度下，细菌将不会生长（显示出低光密度读数），在低活性浓度下，细菌则会扩增（显示出高光密度读数）。阻止细菌生长的最低活性浓度，定义为 MIC。对照应该为如下结果：

无菌介质——无细菌生长

所监测细菌的生长——培养基显示出繁密的生长

用于溶解活性试剂的溶剂，不应抑制细菌（因为它们必须本质上无害）。

评估特定试剂抗炎能力或效果的方法，包括将细胞与病原菌或有害菌进行接触的步骤。待接触细胞可以在体外或体内，可以是原核的或真核的，也可获自细胞培养系或临床样品。

用于本方法的合适病原菌或有害菌，可包括以引发免疫应答的方式，影响所选细胞的任何本领域已知或待发现的细菌。这样的细菌可以包括，例如上文表I所示的那些。

评价特定试剂抗炎能力或效果的方法，也包括检测一种或多种指示化合物是否存在的步骤。指示化合物及检测方法和体系，可以是任意上文所述的那些。

本发明也包括含有通过上文实验发现显示抗炎效应的试剂的口控制剂，以及通过将口腔组织细胞与三氯生接触，阻止该口腔组织细胞上 toll-样受体调节的方法。

本发明也包括通过给组织以次-MIC 浓度/据次-MIC 浓度，施用化合物例如三氯生，来减少或预防口腔组织炎症的方法。

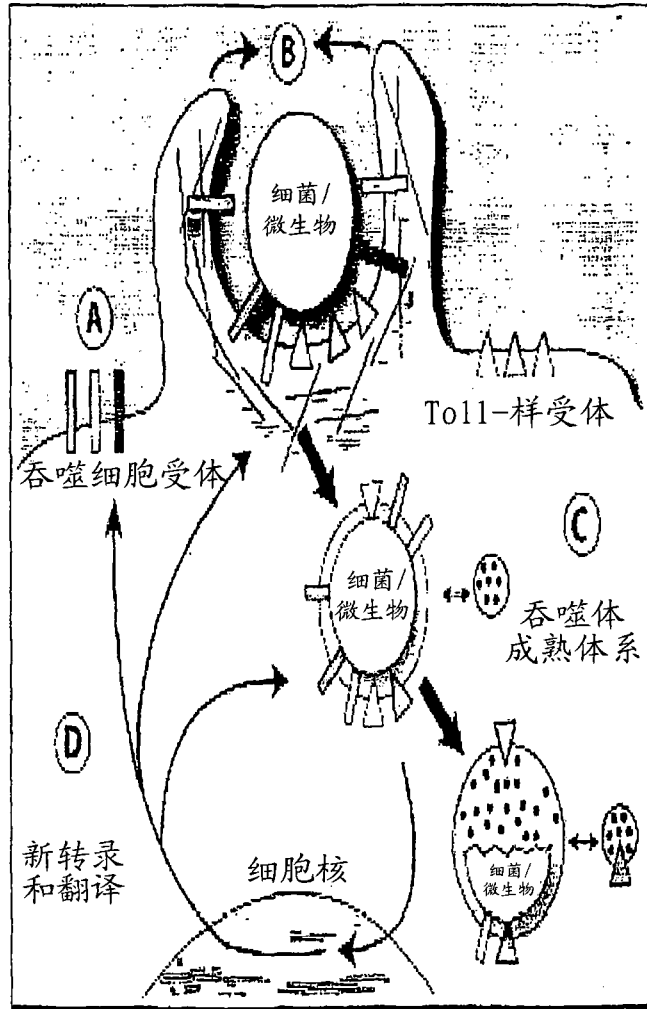


图 1

