

(19)



**Евразийское
патентное
ведомство**

(11) **042241**

(13) **B1**

(12) **ОПИСАНИЕ ИЗОБРЕТЕНИЯ К ЕВРАЗИЙСКОМУ ПАТЕНТУ**

(45) Дата публикации и выдачи патента
2023.01.26

(51) Int. Cl. **A61K 6/033** (2006.01)

(21) Номер заявки
201991933

(22) Дата подачи заявки
2018.03.14

(54) **ЛЕЧЕНИЕ ГИНГИВИТА**

(31) **2017900893**

(32) **2017.03.14**

(33) **AU**

(43) **2020.03.05**

(86) **PCT/AU2018/050231**

(87) **WO 2018/165708 2018.09.20**

(71)(73) Заявитель и патентовладелец:
**ДЕ ЮНИВЕРСИТИ ОФ МЕЛЬБУРН
(AU)**

(72) Изобретатель:
Рейнольдс Эрик Чарльз (AU)

(74) Представитель:
**Поликарпов А.В., Соколова М.В.,
Путинцев А.И., Черкас Д.А., Игнатьев
А.В., Билык А.В., Дмитриев А.В. (RU)**

(56) MARIA C. MARTINEZ-PABLON et al "COMPARISON OF THE EFFECT OF TWO SUGAR-SUBSTITUTED CHEWING GUMS ON DIFFERENT CARIES- AND GINIGIVITIS-RELATED VARIABLES: A DOUBLE-BLIND, RANDOMIZED, CONTROLLED CLINICAL TRIAL. 'Clinical Oral Investigations (2014) 18:589-598. Whole document, especially abstract and page 596.

F. CAI et al "EFFECT OF ADDITION OF CITRIC ACID AND CASEIN PHOSPHOPEPTIDE-AMORPHOUS CALCIUM PHOSPHATE TO A SUGAR-FREE CHEWING GUM ON ENAMEL REMINERALIZATION IN SITU." Caries Research 2007; 41:377-383. Whole document, especially abstract.

WO-A1-2002094204

WO-A1-2003059304

WO-A1-2015095932

(57) Настоящее изобретение относится к композициям и их применению для ухода за полостью рта. В частности, эти композиции и способы предназначены для поддержания здоровья полости рта и/или лечения различных состояний полости рта, таких как гингивит. Настоящее изобретение относится к способам и применениям стабилизированного аморфного фосфата кальция (ACP) и/или стабилизированного аморфного фторида-фосфата кальция (ACFP) в изготовлении лекарственного средства для уменьшения количества патогенных бактерий полости рта на участке полости рта у индивида; увеличения количества комменсальных бактерий полости рта на участке полости рта у индивида; уменьшения доли патогенных бактерий полости рта на участке полости рта у индивида; ингибирования дисбиоза полости рта; уменьшения воспаления десен у индивида, нуждающегося в этом; лечения гингивита у индивида, нуждающегося в этом; и лечения хронического гингивита у индивида, нуждающегося в этом.

B1

042241

042241 B1

Перекрестная ссылка на родственные заявки

Данная заявка притязает на приоритет предварительной заявки на патент Австралии № 2017900893, все содержание которой полностью включено в данную заявку посредством ссылки.

Область изобретения

Настоящее изобретение относится к композициям и их применению для ухода за полостью рта. В частности, эти композиции и способы предназначены для поддержания здоровья полости рта и/или лечения различных состояний полости рта, таких как гингивит.

Предшествующий уровень техники

Микробы, обитающие в полости рта, эволюционировали и сосуществовали вместе со своими хозяевами на протяжении миллионов лет, и, в большинстве случаев, между ними устанавливались гармоничные симбиотические отношения. Хозяин и микробном полости рта не являются отдельными сущностями, а формируют вместе "суперорганизм" или голобионт, где микробном полости рта играет существенную роль в поддержании здоровья полости рта. Полость рта обеспечивает среду для второго по своему разнообразию микробного сообщества в организме, в которое входят более 700 резидентных видов бактерий, колонизирующих твердые поверхности зубов и мягкие ткани слизистой оболочки полости рта. Благодаря недавним успехам в технологии секвенирования ДНК, была продемонстрирована сложность микробиома полости рта и были получены новые данные о роли различных полимикробных биопленок, присутствующих в полости рта, как в норме, так и при патологии.

Многие из видов бактерий, встречающиеся в норме, рассматривали исключительно как комменсальные микроорганизмы, но сейчас, с учетом этих новых данных, очевидно, что многие из них фактически полезны для своих хозяев. Теперь эти комменсальные/полезные виды называют симбионтами, поскольку они действительно находятся в симбиотических отношениях со своими хозяевами, обеспечивая их незаменимыми факторами, способствующими поддержанию здоровья, и/или препятствуя колонизации патогенными видами, приводящими к развитию заболеваний. Тем не менее, изменения микробиома полости рта, вызванные современным образом жизни (например, употребление сахара, курение, недостаточная гигиена полости рта и так далее) или другими факторами (например, генетическая предрасположенность), могут приводить к негативным последствиям для состояния здоровья в целом и здоровья полости рта в частности. В результате, хрупкое равновесие (гомеостаз или симбиоз) в экосистеме полости рта может нарушиться, что позволит болезнетворным бактериям (патобионтам) вытеснить полезных/комменсальных симбионтов и приведет к проявлениям дисбиоза и развитию заболеваний, таких как заболевания пародонта (гингивит и пародонтит). Поэтому сбалансированный микробиом полости рта необходим для эффективного поддержания или восстановления здоровья полости рта. Процесс, способствующий поддержанию или восстановлению баланса и гомеостаза микробиома полости рта полезными/комменсальными симбионтами, называют пребиозом. Поэтому вещества, способствующие поддержанию или восстановлению баланса и гомеостаза микробиома полости рта посредством увеличения доли симбиотических бактерий, называют пребиотиками.

Комплекс "казеиновый фосфопептид-аморфный фосфат кальция" (CPP-ACP) является присутствующим в слюне биомиметиком, который обеспечивает биодоступные ионы кальция и фосфата для реминерализации эмали и дентина на ранних стадиях зубного кариеса. Было показано, что определенные комплексы казеиновых фосфопептидов и аморфного фосфата кальция ("CPP-ACP", имеющиеся в продаже под названием Recaldent™) реминерализуют подповерхностные повреждения эмали *in vitro* и *in situ*.

В заявке WO 98/40408, поданной от имени Мельбурнского университета (содержание которой полностью включено в данную заявку посредством ссылки), описаны комплексы казеиновых фосфопептидов с аморфным фосфатом кальция (CPP-ACP) и CPP-стабилизированные комплексы аморфного фторида-фосфата кальция (CPP-ACFP), полученные при щелочном pH. Было показано, что такие комплексы способствуют реминерализации подповерхностных повреждений эмали в моделях кариеса животных и человека *in situ*. Более того, усовершенствованные варианты этих композиций и их конкретные применения раскрыты в WO 2006/066013 и WO 2007/090242 (содержание которых полностью включено в данную заявку посредством ссылки).

Существует потребность в новых или улучшенных вариантах лечения заболеваний десен. Кроме того, существует потребность в новых или улучшенных вариантах терапии для поддержания или восстановления здоровья десен.

В данной заявке ссылка на какой-либо элемент предшествующего уровня техники не является признанием или предположением того, что этот элемент предшествующего уровня техники является частью общего знания в любой юрисдикции, или того, что есть разумные основания ожидать, что специалист в данной области поймет этот элемент предшествующего уровня техники, посчитает его релевантным и/или будет сочетать его с другими элементами предшествующего уровня техники.

Краткое изложение сущности изобретения

В одном аспекте согласно настоящему изобретению предложен способ уменьшения количества патогенных бактерий полости рта на участке полости рта у индивида, включающий введение стабилизированного аморфного фосфата кальция (ACP) и/или стабилизированного аморфного фторида-фосфата

кальция (ACFP) в полость рта индивида, приводящее к уменьшению количества патогенных бактерий на участке полости рта.

В другом аспекте согласно настоящему изобретению также предложен способ увеличения количества комменсальных бактерий полости рта на участке полости рта у индивида, включающий введение стабилизированного аморфного фосфата кальция (ACP) и/или стабилизированного аморфного фторида-фосфата кальция (ACFP) в полость рта индивида, приводящее к увеличению количества комменсальных бактерий полости рта на участке полости рта.

В другом аспекте согласно настоящему изобретению также предложен способ уменьшения доли патогенных бактерий полости рта на участке полости рта у индивида, включающий введение стабилизированного аморфного фосфата кальция (ACP) и/или стабилизированного аморфного фторида-фосфата кальция (ACFP) в полость рта индивида, приводящее к уменьшению доли патогенных бактерий полости рта на участке полости рта.

В любом аспекте изобретения, описанном здесь, патогенные бактерии полости рта могут представлять собой любую одну или более чем одну бактерию, ассоциированную с воспалением десен, гингивитом, хроническим гингивитом, периодонтитом или заболеванием периодонта. Обычно патогенные бактерии полости рта являются кислотообразующими, и/или кислотоустойчивыми, и/или провоспалительными. Предпочтительно, бактерии являются провоспалительными.

Бактерии, продуцирующие липополисахарид (LPS) и высвобождающие LPS в ткани в форме LPS, обладают высоким провоспалительным потенциалом.

Предпочтительно, бактерии представляют собой одну или более чем одну бактерию, выбранную из *Streptococcus mutans*, *Actinomyces naeslundii*, *Veillonella parvula*, *Lactobacillus casei*, *Porphyromonas gingivalis*, *Tannerella forsythia*, *Treponema denticola*, *Leptotrichia wadei*, *Leptothrichia shahii*, *Leptotrichia buccalis* и *Lautropia mirabilis*.

В любом аспекте изобретения, описанном здесь, комменсальные бактерии полости рта могут представлять собой любой один или более чем один вид, экспрессирующий аргининдезиминазу и/или нитратредуктазу. Обычно бактерии представляют собой одно или более из *Corynebacterium durum*, *Rothia dentocariosa*, *Streptococcus mitis*, *Streptococcus sanguinis* и *Fusobacterium nucleatum*.

В одном аспекте согласно настоящему изобретению предложен способ ингибирования дисбиоза полости рта, включающий введение стабилизированного аморфного фосфата кальция (ACP) и/или стабилизированного аморфного фторида-фосфата кальция (ACFP) в полость рта индивида, приводящее к ингибированию дисбиоза полости рта.

В другом аспекте согласно настоящему изобретению предложен способ уменьшения воспаления десен у индивида, нуждающегося в этом, включающий введение стабилизированного аморфного фосфата кальция (ACP) и/или стабилизированного аморфного фторида-фосфата кальция (ACFP) в полость рта индивида, приводящее к уменьшению воспаления десен. Предпочтительно, способ дополнительно включает начальную стадию идентификации индивида с воспалением десен.

В другом аспекте согласно настоящему изобретению предложен способ лечения гингивита у индивида, нуждающегося в этом, включающий введение стабилизированного аморфного фосфата кальция (ACP) и/или стабилизированного аморфного фторида-фосфата кальция (ACFP) в полость рта индивида, обеспечивающее лечение гингивита. Предпочтительно, способ дополнительно включает начальную стадию идентификации индивида с гингивитом.

В другом аспекте согласно настоящему изобретению предложен способ лечения хронического гингивита у индивида, нуждающегося в этом, включающий введение стабилизированного аморфного фосфата кальция (ACP) и/или стабилизированного аморфного фторида-фосфата кальция (ACFP) в полость рта индивида, обеспечивающее лечение хронического гингивита. Предпочтительно, способ дополнительно включает начальную стадию идентификации индивида с хроническим гингивитом.

В другом аспекте согласно настоящему изобретению предложен способ лечения периодонтита у индивида, нуждающегося в этом, включающий введение стабилизированного аморфного фосфата кальция (ACP) и/или стабилизированного аморфного фторида-фосфата кальция (ACFP) в полость рта индивида, обеспечивающее лечение периодонтита. Предпочтительно, способ дополнительно включает начальную стадию идентификации индивида с периодонтитом.

В любом аспекте изобретения способ дополнительно включает проведение стоматологической процедуры перед введением стабилизированного аморфного фосфата кальция (ACP) и/или стабилизированного аморфного фторида-фосфата кальция (ACFP) в полость рта индивида. Примеры стоматологических процедур включают санацию полости рта, удаление зубного камня, сглаживание корней или любую другую процедуру удаления поддесневых или наддесневых бактерий.

В другом аспекте согласно настоящему изобретению предложено применение стабилизированного аморфного фосфата кальция (ACP) и/или стабилизированного аморфного фторида-фосфата кальция (ACFP) в изготовлении лекарственного средства для:

- уменьшения количества патогенных бактерий полости рта на участке полости рта у индивида;
- увеличения количества комменсальных бактерий полости рта на участке полости рта у индивида;
- уменьшения доли патогенных бактерий полости рта на участке полости рта у индивида;

ингибирования дисбиоза полости рта;
 уменьшения воспаления десен у индивида, нуждающегося в этом;
 лечения гингивита у индивида, нуждающегося в этом; или
 лечения хронического гингивита у индивида, нуждающегося в этом.

В другом аспекте согласно настоящему изобретению предложен стабилизированный аморфный фосфат кальция (АСР) и/или стабилизированный аморфный фторид-фосфат кальция (АСФР) для применения в:

уменьшении количества патогенных бактерий полости рта на участке полости рта у индивида;
 увеличении количества комменсальных бактерий полости рта на участке полости рта у индивида;
 уменьшении доли патогенных бактерий полости рта на участке полости рта у индивида;
 ингибировании дисбиоза полости рта;
 уменьшении воспаления десен у индивида, нуждающегося в этом;
 лечении гингивита у индивида, нуждающегося в этом; или
 лечении хронического гингивита у индивида, нуждающегося в этом.

В другом аспекте согласно настоящему изобретению предложен способ уменьшения деминерализации зубной эмали у индивида, включающий введение стабилизированного аморфного фосфата кальция (АСР) и/или стабилизированного аморфного фторида-фосфата кальция (АСФР) в полость рта индивида, приводящее к уменьшению деминерализации зубной эмали у индивида. Предпочтительно, стабилизированный комплекс АСР представляет собой олово-ассоциированный комплекс аморфного фосфата кальция (АСР), стабилизированный фосфопептидом (РР), и стабилизированный комплекс АСФР представляет собой олово-ассоциированный комплекс аморфного фторида-фосфата кальция (АСФР), стабилизированный фосфопептидом (РР). Предпочтительно, уменьшение деминерализации представляет собой снижение скорости деминерализации.

Предпочтительно, стабилизированный аморфный фосфат кальция (АСР) и/или аморфный фторид-фосфат кальция (АСФР) стабилизирован фосфопептидом. Предпочтительно, фосфопептид (как определено ниже) представляет собой казеиновый фосфопептид.

В любом способе или применении по изобретению стабилизированный комплекс АСР или АСФР можно вводить индивиду в течение 5-60 мин, 10-45 мин, 10-30 мин или 20 мин. Кроме того, стабилизированный комплекс АСР или АСФР можно вводить 4, 5 или 6 раз в сутки или в 24-часовой период. Предпочтительно, стабилизированный комплекс АСР или АСФР вводят в течение периода продолжительностью от 1 до 2 недель.

В любом аспекте композиция может быть изготовлена и использована в различных формах, подходящих для полости рта, таких как средства для чистки зубов, включая зубные пасты, зубные порошки и жидкие средства для чистки зубов, жидкости для полоскания рта, жидкости для промывания полости рта, спреи для полости рта, стоматологический лак, стоматологический цемент, пастилки, жевательные резинки, стоматологические пасты, кремы для массажа десен, таблетки для полоскания рта, молочные продукты и другие продукты питания, включая йогурт. Предпочтительно, композиция представляет собой жевательную резинку. Предпочтительно, жевательная резинка содержит по меньшей мере приблизительно 15, 20, 25, 30, 35, 40, 45, 50, 55 или 60 мг стабилизированного комплекса АСР или АСФР. Жевательная резинка может содержать приблизительно 18,8 или 56,4 мг стабилизированного комплекса АСР или АСФР.

В любом аспекте содержание ионов кальция в стабилизированном комплексе АСР или АСФР составляет более чем приблизительно 30 моль на моль РР. Предпочтительно, содержание ионов кальция входит в диапазон от приблизительно 30 до 100 моль кальция на моль РР. Более предпочтительно, содержание ионов кальция входит в диапазон от приблизительно 30 до приблизительно 50 моль кальция на моль РР.

В любом аспекте стабилизированный комплекс АСР представляет собой олово-ассоциированный комплекс аморфного фосфата кальция (АСР), стабилизированный фосфопептидом (РР), и стабилизированный комплекс АСФР представляет собой олово-ассоциированный комплекс аморфного фторида-фосфата кальция (АСФР), стабилизированный фосфопептидом (РР).

В любом аспекте комплекс АСР и/или АСФР имеет форму комплекса АСР и/или АСФР, стабилизированного казеиновым фосфопептидом.

Предпочтительно, фаза АСР представляет собой преимущественно (т.е. более чем на 50%) основную фазу, где АСР содержит главным образом ионы Ca^{2+} , PO_4^{3-} и OH^- . Основная фаза АСР может иметь общую формулу $[\text{Ca}_3(\text{PO}_4)_2]_x[\text{Ca}_2(\text{PO}_4)(\text{OH})]$, где x составляет 1 или более. Предпочтительно, x составляет от 1 до 5. Более предпочтительно, x составляет 1, т.е. два компонента указанной формулы присутствуют в равных долях. Соответственно, в одном воплощении основная фаза АСР имеет формулу $\text{Ca}_3(\text{PO}_4)_2\text{Ca}_2(\text{PO}_4)(\text{OH})$.

Предпочтительно, фаза АСФР представляет собой преимущественно (т.е. более чем на 50%) основную фазу, где АСФР содержит главным образом ионы Ca^{2+} , PO_4^{3-} и F^- . Основная фаза АСФР может иметь общую формулу $[\text{Ca}_3(\text{PO}_4)_2]_x[\text{Ca}_2(\text{PO}_4)\text{F}]_y$, где x составляет 1 или более, когда y составляет 1, или где y составляет 1 или более, когда x составляет 1. Предпочтительно, y составляет 1 и x составляет от 1 до 3.

Более предпочтительно, у составляет 1 и х составляет 1, т.е. два компонента указанной формулы присутствуют в равных долях. Соответственно, в одном воплощении основная фаза АСФР имеет формулу $\text{Ca}_3(\text{PO}_4)_2\text{Ca}_2(\text{PO}_4)\text{F}$.

В одном воплощении комплекс АСР состоит главным образом из фосфопептидов, ионов кальция, фосфата и гидроксид-ионов и воды. Предпочтительно, комплекс дополнительно содержит ионы олова.

В одном воплощении комплекс АСФР состоит главным образом из фосфопептидов, ионов кальция, фосфата, фторид-ионов и гидроксид-ионов и воды. Предпочтительно, комплекс дополнительно содержит ионы олова.

Изобретение также относится к набору для использования в способе или применении по изобретению, включающему:

- (a) композицию, как описано в данном описании; или
- (b) стабилизированный комплекс АСР или АСФР, как описано в данном описании.

При использовании в данном описании, за исключением случаев, когда контекст требует иного, термин "содержать" и варианты этого термина, такие как "содержащий", "содержит" и "содержащийся", не подразумевают исключения других добавок, компонентов, элементов или стадий.

Другие аспекты настоящего изобретения и другие воплощения аспектов, описанных в предшествующих абзацах, станут ясны, исходя из последующего описания, приведенного в качестве примера и со ссылкой на приложенные графические материалы.

Краткое описание графических материалов

Фиг. 1. Влияние CPP-АСР на индекс налета в рандомизированном контролируемом клиническом исследовании.

Фиг. 2. Влияние CPP-АСР на десневой индекс в рандомизированном контролируемом клиническом исследовании.

Фиг. 3. Среднее содержание разных видов в полимикробной биопленке из шести видов, культивированной на подповерхностном слое зубной эмали человека в пленочном ферментере постоянной глубины с внесением 1%-ной сахарозы четыре раза в сутки. Проводили выявление всех шести видов, *A. naeslundii* (An), *F. nucleatum* (Fn), *L. casei* (Lc), *S. mutans* (Sm), *S. sanguinis* (Ss) и *V. parvula* (Vp), в каждой временной точке. Содержание *S. mutans* на протяжении 19 суток было относительно постоянным и превышало содержание других видов. Содержание *A. naeslundii* и *L. casei* со временем возрастало, в то время как содержание *S. sanguinis* уменьшалось. Это соответствует повышению кислотности полимикробной биопленки с течением времени. Три столбца над обозначением каждого вида соответствуют их относительному содержанию на 6 сутки (черные), 12 сутки (серые) и 19 сутки (заштрихованные) после инокуляции.

Фиг. 4. Подповерхностная деминерализация эмали в модели кариеса с полимикробной биопленкой. А: общая деминерализация (об.% мин мкм) подповерхностного слоя эмали за период продолжительностью 19 суток в полимикробной модели кариеса. Данные соответствуют четырем биологическим репликам контроля (без обработки) и представлены как среднее плюс/минус стандартное отклонение (S.D.). В: типичные поперечные рентгеновские микрофотографии подповерхностного слоя эмали, на которых показана подповерхностная деминерализация на 6, 12 и 19 сутки. С: типичная электронная микрофотография полимикробной биопленки на 12 сутки, на которой показана плотная структура бактериальной биопленки, сходная с наддесневым налетом.

Фиг. 5. Эффект добавления SnF_2 , 2% CPP-АСР и 2% CPP-АСР- SnF_2 , два раза в сутки, на бактериальный видовой состав полимикробной биопленки в CDFF на 19 сутки. А: бактериальный видовой состав как процент от общего числа бактерий в биопленке (данные и статистический анализ представлены в табл. 7). В: изменение содержания каждого вида после обработки в сравнении с контролем. *F. nucleatum* не показана из-за очень большого относительного повышения ее содержания в полимикробных биопленках, обработанных 2% CPP-АСР- SnF_2 , на 4981%. Обработка SnF_2 не влияла на содержание *F. nucleatum* (-2%), в то время как обработка CPP-АСР приводила к его повышению на 355% на 19 сутки. Заштрихованные столбцы - контроль, черные - SnF_2 , серые - 2% CPP-АСР и белые - 2% CPP-АСР- SnF_2 . С: типичное трехмерное CLSM-изображение (CLSM - конфокальная лазерная сканирующая микроскопия) полимикробной биопленки, обработанной CPP-АСР- SnF_2 , на 19 сутки. Бактериальные клетки окрашивали четырьмя видоспецифичными FISH-зондами (фиолетовый - *F. nucleatum*; синий - *A. naeslundii*; красный - *S. mutans*; зеленый - *S. sanguinis*) (FISH - флуоресцентная гибридизация in situ).

Подробное описание воплощений

Следует понимать, что изобретение, раскрытое и определенное в данном описании, охватывает все альтернативные комбинации двух или более отдельных признаков, указанных или очевидных из представленного текста или графических материалов. Все эти различные комбинации составляют различные альтернативные аспекты изобретения.

Другие аспекты настоящего изобретения и другие воплощения аспектов, описанных в предшествующих абзацах, станут ясны, исходя из последующего описания, приведенного в качестве примера и со ссылкой на приложенные графические материалы.

Далее будут подробно описаны определенные воплощения изобретения. Несмотря на то, что изо-

бретение будет описано в связи с конкретными воплощениями, следует понимать, что эти воплощения приведены не для ограничения изобретения. Наоборот, подразумевают, что изобретение охватывает все альтернативы, модификации и эквиваленты, которые могут быть включены в объем настоящего изобретения, как определено формулой изобретения.

Специалисту в данной области будет известно множество методов и материалов, сходных с описанными здесь или эквивалентных им, которые могут быть использованы при практическом применении настоящего изобретения. Настоящее изобретение никоим образом не ограничено описанными методами и материалами.

Все патенты и публикации, упомянутые здесь, полностью включены в данную заявку посредством ссылки.

В целях правильной интерпретации данной заявки термины, использованные в единственном числе, также включают множественное число, и наоборот.

При использовании здесь, за исключением случаев, когда контекст требует иного, термин "содержать" и варианты этого термина, такие как "содержащий", "содержит" и "содержащийся", не подразумевают исключения других добавок, компонентов, элементов или стадий. При использовании здесь, за исключением случаев, когда контекст требует иного, термин "содержать" и "включать" могут быть использованы взаимозаменяемо.

Настоящее изобретение основано на неожиданном обнаружении того, что стабилизированные формы аморфного фосфата кальция, такие как CPP-ACP, CPP-ACFP или олово-ассоциированные ACP или ACFP, могут уменьшать воспаление десен и лечить различные состояния десен, такие как гингивит. Несмотря на то, что ранее было показано, что стабилизированные формы аморфного фосфата кальция приводят к реминерализации поврежденных зубов, доставляя кальций и фосфат для образования кристаллического гидроксиапатита или фторапатита в очаге повреждения зуба, сейчас было показано, что эти стабилизированные формы аморфного фосфата кальция оказывают неожиданное влияние на полезные и патогенные бактерии полости рта, присутствующие в полости рта, и ткани полости рта (т.е. на десны). Еще более неожиданно, стабилизированные формы аморфного фосфата кальция приводят к увеличению относительного содержания полезных бактерий полости рта, уменьшая в то же время относительное содержание патогенных бактерий полости рта. Без ограничения какой-либо теорией или механизмом действия, именно этот дифференциальный эффект на бактерии полости рта, по-видимому, приводит к уменьшению воспаления десен.

Любой способ по изобретению может включать лечение участка полости рта у индивида, где участок полости рта представляет собой одну или более чем одну из областей, расположенных вокруг зуба, включая дистобуккальную, медиобуккальную, мезиобуккальную, мезиопалатинальную, медиопалатинальную, дистопалатинальную, дистолингвальную, медиолингвальную и мезиолингвальную. Лечение может быть направлено непосредственно на десны и не на другой участок полости рта. Возможно лечение, направленное на множество участков полости рта. Альтернативно, возможно лечение всей полости рта. Кроме того, эффективность лечения можно определять анализом одного или более чем одного участка полости рта или всей полости рта. Например, уменьшение количества патогенных бактерий или увеличение количества комменсальных бактерий можно определять анализом одного или более чем одного участка полости рта, как описано в данном описании, или анализом всей полости рта.

В любом аспекте изобретения индивид представляет собой индивида, нуждающегося в лечении или профилактике. Конкретно, в любом аспекте изобретения способ или применение дополнительно включает стадию идентификации индивида, нуждающегося в лечении или профилактике.

Индивид, нуждающийся в лечении для уменьшения количества патогенных бактерий полости рта или увеличения количества комменсальных бактерий полости рта, может представлять собой индивида, у которого произошли или происходят изменения микробиома полости рта, вызванные современным образом жизни (например, избыточное употребление сахара, курение, плохая гигиена полости рта) или другими факторами (например, генетическая предрасположенность).

В любом аспекте изобретения у индивида может не быть никаких повреждений зубов. Например, индивид может быть идентифицирован как индивид с воспалением десен или гингивитом, но без поддающихся выявлению поверхностных или подповерхностных повреждений зубов.

Слова "лечить" или "лечение" относятся к терапевтическому лечению, цель которого состоит в замедлении (уменьшении) нежелательного физиологического изменения или расстройства. Для задач данного изобретения полезные или желаемые клинические результаты включают, без ограничения, облегчение симптомов, уменьшение степени выраженности заболевания, стабилизированное (т.е. не ухудшающееся) состояние заболевания, задержку или замедление прогрессирования заболевания, облегчение или ослабление болезненного состояния и ремиссию (частичную или полную), поддающиеся или не поддающиеся выявлению. Лечение не обязательно приводит к полному отсутствию симптомов состояния, поддающихся выявлению, но может уменьшать или минимизировать осложнения и побочные эффекты этого состояния. Мониторинг эффективности или неэффективности лечения можно проводить с применением физикального обследования индивида, цитопатологических, серологических методик, методик выявления ДНК и мРНК или любых других методик, описанных в данном описании.

Слова "предупреждать" и "предупреждение" или "профилактика" обычно относятся к профилактическим или превентивным мерам, предпринимаемым с целью защитить или оградить индивида, у которого нет воспаления десен или любого другого состояния, описанного в данном описании, от развития этого осложнения. Индивиды, нуждающиеся в профилактике, включают индивидов с дисбиозом.

Фраза "фармацевтически приемлемый" указывает на то, что вещество или композиция должны быть химически и/или токсикологически совместимы с другими ингредиентами, содержащимися в композиции, и/или с индивидом, которому их вводят.

Способы по изобретению применимы к индивидам, демонстрирующим субклинические или клинические симптомы заболевания или состояния тканей полости рта, как описано здесь.

Дисбиоз у индивида означает наличие у этого индивида, в сравнении со случайной выборкой индивидов, аномального общего количества или относительного содержания микробных патогенов в полости рта. Например, у индивида может быть повышено количество или доля одной или более чем одной патогенной бактерии, ассоциированной с воспалением десен, гингивитом, хроническим гингивитом, периодонтитом или заболеванием периодонта. Обычно патогенные бактерии являются кислотообразующими, и/или кислотоустойчивыми, и/или провоспалительными. Предпочтительно, бактерии представляют собой одну или более чем одну бактерию, выбранную из *Streptococcus mutans*, *Actinomyces naeslundii*, *Veillonella parvula*, *Lactobacillus casei*, *Porphyromonas gingivalis*, *Tannerella forsythia* и *Treponema denticola*.

Симптомы воспаления десен могут проявляться в ткани полости рта указанного индивида на одном или более чем одном участке полости рта. Возможные клеточные признаки воспаления включают усиленное перемещение плазмы и лейкоцитов из крови в поврежденные ткани. Также могут присутствовать клинические признаки воспаления десен, включая покраснение (rubor), повышение их температуры (color), припухлость (tumor), боль (dolor) и нарушение функции (functio laesa). Хроническое воспаление может характеризоваться лейкоцитарной (моноциты, макрофаги, лимфоциты, плазматические клетки) инфильтрацией. Возможны дефекты ткани и кости. Примеры воспаления включают гингивит.

Уменьшение воспаления десен может представлять собой снижение частоты и/или выраженности воспаления десен. Его можно определять по снижению частоты или выраженности любых клинических, клеточных или биохимических характеристик, как описано в данном описании, таких как указанные выше.

В других воплощениях у индивида может быть хроническое воспаление тканей полости рта. В одном примере у индивида может быть гингивит (такой как хронический гингивит), резорбция альвеолярной кости и, в конечном счете, выпадение зубов, обусловленное прогрессирующим сокращением числа коллагеновых волокон, связывающих зуб с альвеолярной костью. Возможны другие повреждения слизистой оболочки или связанных с ней тканей полости рта.

В любом аспекте индивид, нуждающийся в этом, может представлять собой индивида, идентифицированного как индивид с легким, умеренным или тяжелым воспалением десен. Поскольку хронический гингивит может приводить к более тяжелому периодонтиту, изобретение может также быть применимо к индивидам с легким, умеренным и тяжелым периодонтитом, как определено по методологии CDC-AAP, описанной в Eke et al J Dent Res 91: 914-920 (2012). Изобретение также применимо к индивидам с воспалением десен, идентифицированным с применением модифицированного десневого индекса (Modified Gingival Index; Lobene et al 1986 Clin Prev Dent. Jan-Feb; 8(1): 3-6). Этот индекс является модификацией десневого индекса Löe и Silness и позволяет лучше дифференцировать легкий и умеренный гингивит. У индивида может быть определено воспаление десен по шкале от 0 до 4 для десневых тканей, ассоциированных с одним или более чем одним участком (например, буккальным, лингвальным, мезиальным и дистальным). Предпочтительно, модифицированный десневой индекс у индивида, нуждающегося в этом, составляет 1, 2, 3 или 4. Соответственно, любой аспект изобретения предусматривает индивида с описанной в данном описании степенью выраженности воспаления десен. В любом аспекте изобретения способ или применение дополнительно включает стадию определения наличия у индивида описанной в данном описании степени выраженности воспаления десен.

Идентификация индивида, нуждающегося в уменьшении количества патогенных бактерий полости рта, увеличении количества комменсальных бактерий полости рта, или индивида с дисбиозом полости рта может быть проведена по количеству или относительным долям бактерий в образце, полученном из жидкости полости рта, взятой из полости рта. В частности, жидкость полости рта может представлять собой слюну, десневую жидкость или кровь. Известно, что жидкости полости рта, например слюна, являются комбинацией секретов из ряда источников, таких как околоушные, поднижнечелюстные, подъязычные, добавочные железы, слизистая оболочка десен и слизистая оболочка щек, и термин "жидкости полости рта" включает секреты из каждого из этих источников, по отдельности или в комбинации. Слюна может быть получена при стимуляции или, в предпочтительном воплощении, без стимуляции. Стимуляция слюноотделения у индивида может быть проведена жеванием жевательной резинки без сахара, парафиновой пленки или кислого леденца. Получение слюны без стимуляции означает, что индивид будет сплевывать слюну в емкость для ее сбора без стимуляции слюноотделения.

Образцы слюны для анализа могут быть получены различными методами, известными в данной области, например образцы слюны могут быть получены со стимуляцией или без нее, когда индивид сплевывает слюну в емкость для ее сбора, или с использованием тампона или шприца для сбора слюны. В

данной области известны и другие способы получения слюны без стимуляции (Nazareth and Christiansen, J. Dent. Res. 61: 1158-1162 (1982)). Также описаны способы и устройства для сбора слюны (см. также патент США № 5910122).

Подразумевается, что способы по настоящему изобретению могут также быть практически применены посредством анализа слюны, полученной при стимуляции.

Кроме того, способы по настоящему изобретению не ограничены проведением анализа слюны сразу после получения образца. В определенных воплощениях анализ слюны способами по настоящему изобретению может быть проведен с использованием образца слюны после его хранения. Образец слюны для анализа можно хранить с применением способов и устройств, известных в данной области (см., например, патент США № 5968746).

Также подразумевается, что способы по настоящему изобретению будут применяться для проведения анализа образцов слюны, обработанных для снижения их вязкости.

Естественная вязкость слюны, обусловленная свойствами мукополисахаридов, затрудняет анализ этих жидкостей. Для подготовки слюны к любой процедуре лабораторного анализа, ей необходимо придать достаточную текучесть (т.е. необходимо снизить ее вязкость) и удалить из нее детрит. Методики, применяемые для удаления детрита, включают центрифугирование и фильтрацию. Вязкость слюны может также быть снижена смешиванием образца слюны с реагентом, содержащим четвертичные аммониевые катионы (см. патент США № 5112758).

В другом воплощении образец индивида может быть получен из крипт дорсальной поверхности языка.

Образец индивида может быть получен из определенного участка периодонта. Участок периодонта представляет собой область в полости рта. Предпочтительно, участок периодонта представляет собой область, расположенную рядом с зубом, включая дистобуккальную, медиобуккальную, мезиобуккальную, мезиопалатинальную, медиопалатинальную, дистопалатинальную, дистолингвальную, медиолингвальную и мезиолингвальную. Образец может быть взят из участка периодонта с клиническими признаками воспаления.

В другом воплощении образец индивида может представлять собой образец ткани. Ткань или ее часть может быть взята из полости рта. В определенных воплощениях ткань представляет собой десневую ткань. Предпочтительно, десневая ткань может быть взята из различных участков, расположенных вокруг зуба, включая дистобуккальный, медиобуккальный, мезиобуккальный, мезиопалатинальный, медиопалатинальный, дистопалатинальный, дистолингвальный, медиолингвальный и мезиолингвальный. Ткань может быть получена обычной биопсией или может быть получена из удаленного зуба.

В другом воплощении образец индивида может представлять собой зубной налет. Налет может быть поддесневым или наддесневым. Образец поддесневого налета может быть получен с использованием стерильной кюретки или бумажного штифта. Наддесневой налет может быть удален с применением стандартных методик, известных в данной области. Поддесневой налет может быть взят из различных участков, расположенных вокруг зуба, включая дистобуккальный, медиобуккальный, мезиобуккальный, мезиопалатинальный, медиопалатинальный, дистопалатинальный, дистолингвальный, медиолингвальный и мезиолингвальный участки периодонта. Образцы поддесневого налета могут быть получены при обычном стоматологическом обследовании, проводимом квалифицированным стоматологом или пародонтологом. Образец налета может быть проанализирован, как есть, или обработан экстракционным буфером для выделения интересующего белка, пептида или его фрагмента. Экстракционный буфер может содержать рН-буфер (например, фосфат, HEPES и так далее), соли (например, NaCl) для поддержания ионной силы и агенты, повышающие растворимость белков (например, детергенты (SDS, Triton X100 и так далее)), восстанавливающие агенты (например, дитиотреитол, цистеин-HCl) и/или разобщающие агенты (например, мочевины, гуанидинхлорид, перхлорат лития).

Дисбиоз можно диагностировать, определяя количество или относительную долю патогенных и/или комменсальных бактерий полости рта в образце индивида и сравнивая их с рядом параметров, определенных ранее у индивидов без признаков дисбиоза или каких-либо клинических, клеточных или биохимических характеристик воспаления десен. Предполагается, что у индивидов со здоровой ротовой полостью может быть отмечен низкий уровень патогенных бактерий. Этот низкий уровень или нормальный уровень колонизации патогенными бактериями не является признаком дисбиоза. При применении такого контроля и его сравнении с анализируемым образцом, определение наличия дисбиоза у индивида включает (1) повышенный уровень одной или более чем одной патогенной бактерии, как описано в данном описании, в образце, взятом у индивида, по сравнению с контрольным образцом, или (2) увеличенную долю одной или более чем одной патогенной бактерии в образце, взятом у индивида, по сравнению с общим уровнем бактерий в контрольном образце, или (3) увеличенную долю одной или более чем одной патогенной бактерии относительно одного или более чем одного другого вида бактерий в образце, взятом у индивида, по сравнению с контрольным образцом.

При упоминании здесь стабилизированный комплекс АСР или АСФР включает стабилизированный комплекс АСР или АСФР, как описано в РСТ/AU2005/001781, содержание которой включено в данную заявку посредством ссылки.

В предпочтительном воплощении комплекс аморфного фосфата кальция (АСР) или аморфного фторида-фосфата кальция (АСФР), стабилизированный фосфопептидом, имеет прочно связанный и непрочно связанный кальций, при этом связанного кальция в этом комплексе меньше, чем прочно связанного кальция в комплексе АСР или АСФР, образованном при рН 7,0. Возможно, АСР или АСФР представлен преимущественно в основной форме.

При упоминании здесь стабилизированный комплекс АСР или АСФР включает стабилизированный комплекс АСР или АСФР, образованный при рН менее 7,0. Предпочтительно, комплекс образован при рН в диапазоне от приблизительно 5,0 до немногим менее 7,0. Более предпочтительно, комплекс образован при рН в диапазоне от приблизительно 5,0 до приблизительно 6,0. В предпочтительном воплощении комплекс образован при рН приблизительно 5,5. Предпочтительно, АСР или АСФР в комплексе представлен преимущественно в основной форме.

Стабилизированный АСР может быть получен способом, включающим стадии: (i) получения раствора, содержащего по меньшей мере один фосфопептид; и (ii) примешивания растворов, содержащих ионы кальция, ионы фосфата и гидроксид-ионы при поддержании рН приблизительно 7,0 или менее.

Стабилизированный АСФР может быть получен способом, включающим стадии: (i) получения раствора, содержащего по меньшей мере один фосфопептид; и (ii) примешивания растворов, содержащих ионы кальция, ионы фосфата, гидроксид-ионы и фторид-ионы при поддержании рН приблизительно 7,0 или менее.

Комплекс аморфного фосфата кальция (АСР) или аморфного фторида-фосфата кальция (АСФР), стабилизированный фосфопептидом, может также включать комплекс, в котором АСР имеет прочно связанный и непрочно связанный кальций, где прочно связанного кальция в комплексе меньше, чем прочно связанного кальция в комплексе АСР или АСФР, образованном при рН 7,0, и АСР или АСФР представлен преимущественно в основной форме, получаемый или полученный способом, включающим:

а) смешивания первого раствора, содержащего ионы кальция, второго раствора, содержащего ионы фосфата, и, возможно, третьего раствора, содержащего фторид-ионы, с раствором, содержащим фосфопептиды и растворитель с рН от приблизительно 5 до немногим менее 7; и

б) поддержания рН раствора во время смешивания от приблизительно 5,0 до немногим менее 7,0 посредством добавления гидроксид-ионов.

"Прочно" и "непрочно" связанные кальций и фосфат в АСР или АСФР можно определить с применением аналитической ультрафильтрации. Кратко, раствор фосфопептида, кальция, фосфата и, возможно, фторида, смешанный при поддержании рН приблизительно 7,0 или менее, можно сначала профильтровать через 0,1 мкм фильтр для удаления свободных кальция и фосфата, не связанных с комплексами. Свободные кальций и фосфат, присутствующие в фильтрате, удаляют. Любой свободный кальций или фосфат, никак не связанный с комплексами, не будет биологически доступным, т.е. фосфопептид не сможет обеспечить его доставку к зубу. Ретентат, полученный после фильтрации через 0,1 мкм фильтр, можно затем анализировать центрифугированием через фильтр с отсечкой 3000 по молекулярной массе при 1000 г на протяжении 15 мин. Полученный фильтрат содержит кальций и фосфат, непрочно связанные с комплексами. При такой центробежной силе кальций и фосфат, которые связаны с комплексами непрочно, высвобождаются и переходят в фильтрат. Са и Рi, прочно связанные с комплексами, остаются в ретентате. Количество прочно связанного Са и Рi в ретентате затем можно определить, вычитая количество Са и Рi в фильтрате из общего количества Са и Рi в ретентате, полученном после фильтрации через 0,1 мкм фильтр.

При упоминании в данном описании стабилизированный комплекс АСР или АСФР включает стабилизированный комплекс АСР или АСФР, как описано в РСТ/AU2006/000885, содержание которой включено в данную заявку посредством ссылки.

Комплекс аморфного фосфата кальция (АСР) или аморфного фторида-фосфата кальция (АСФР), стабилизированный "сверхнагруженным" фосфопептидом или фосфопротеином (РР). Комплекс может быть образован при любом рН (например, 3-10). Предпочтительно, фосфопептид содержит последовательность -А-В-С-, где А представляет собой фосфоаминокислоту, предпочтительно, фосфосерин, В представляет собой любую аминокислоту, включая фосфоаминокислоту, и С представляет собой глутаминовую кислоту, аспарагиновую кислоту или фосфоаминокислоту. Фосфоаминокислота может представлять собой фосфосерин. Данный РР сверхнагружен ионами кальция и фосфата. Содержание ионов кальция может быть в диапазоне 30-1000 моль Са на моль РР или в диапазоне 30-100 или 30-50 моль Са на моль РР. В другом воплощении содержание кальция составляет по меньшей мере 25, 30, 35, 40, 45 или 50 моль Са на моль РР.

Содержание ионов кальция в комплексе аморфного фосфата кальция или аморфного фторида-фосфата кальция, стабилизированном фосфопептидом или фосфопротеином (РР), может составлять более чем приблизительно 30 моль кальция на моль РР. Предпочтительно, содержание ионов кальция входит в диапазон от приблизительно 30 до 100 моль кальция на моль РР. Более предпочтительно, содержание ионов кальция входит в диапазон от приблизительно 30 до приблизительно 50 моль кальция на моль РР.

Комплекс аморфного фосфата кальция (АСР) или аморфного фторида-фосфата кальция (АСФР),

стабилизированный фосфопептидом или фосфопротеином (PP), может быть получен способом, включающим стадии:

- (i) получения растворов, содержащих кальций, неорганический фосфат и (возможно) фторид; и
- (ii) смешивания (i) с раствором, содержащим PP-АСР.

В предпочтительном воплощении PP представляет собой казеиновый фосфопептид (CPP).

PP-стабилизированный комплекс АСР и/или АСФР может дополнительно содержать по меньшей мере равное количество по массе фосфата кальция. Предпочтительно, фосфат кальция представляет собой СаНРО₄. Предпочтительно, проводят сухое смешивание фосфата кальция (например, СаНРО₄) с PP-стабилизированным комплексом АСР и/или АСФР. В предпочтительном воплощении отношение "комплекс PP-АСР и/или PP-АСФР: фосфат кальция" составляет приблизительно 1:1-50, более предпочтительно, приблизительно 1:1-25, более предпочтительно, приблизительно 1:5-15. В одном воплощении отношение "комплекс PP-АСР и/или PP-АСФР: фосфат кальция" составляет приблизительно 1:10.

Композиция для ухода за полостью рта, содержащая комплекс аморфного фосфата кальция (АСР) и/или аморфного фторида-фосфата кальция (АСФР), стабилизированный фосфопептидом или фосфопротеином (PP), с содержанием ионов кальция более чем приблизительно 30 моль кальция на моль PP при использовании в полости рта, может быть получена способом, включающим стадии:

- (i) получения порошка, содержащего комплекс PP-АСР и/или PP-АСФР;
- (ii) сухого смешивания с эффективным количеством фосфата кальция; и
- (iii) приготовление смеси PP-АСР и/или PP-АСФР с фосфатом кальция, полученной сухим смешиванием, в виде композиции для ухода за полостью рта.

Предпочтительно, форма фосфата кальция для сухого смешивания представляет собой любой растворимый фосфат кальция, включая, без ограничения, СаНРО₄, Са₂НРО₄ и лактат кальция.

Композиция, как описано в данном описании, может дополнительно содержать свободные фторид-ионы. Фторид ионы могут быть из любого подходящего источника. Источник фторид-ионов может включать свободные фторид-ионы или фторидные соли. Примеры источников фторид-ионов включают, без ограничения, следующее: фторид натрия, монофторфосфат натрия, фторид олова, фторсиликат натрия и аминоксид фтора. Они могут быть представлены в растворе (обычно в водном растворе) или в суспензии.

Фторид-ионы предпочтительно присутствуют в композиции в количестве более 1 миллионной доли (м.д.). Более предпочтительно, это количество составляет более 3 м.д. В другом воплощении оно предпочтительно составляет более 10 м.д. В типичных воплощениях, описанных ниже, это количество может составлять несколько сотен или тысяч м.д. Содержание фторидов в композициях для перорального применения чаще всего измеряют в м.д. методами, обычно используемыми в данной области. Там, где фторид представлен из источника со стабилизированным АСР, м.д. относится к концентрации фторида в этом источнике, обычно в растворе или суспензии биодоступного фторида.

При упоминании в данном описании олово-ассоциированный комплекс АСР или АСФР включает любой комплекс, описанный в РСТ/AU2014/050447, все содержание которой полностью включено в данную заявку посредством ссылки.

Композиция, как описано здесь, для использования в способе или применении по изобретению может содержать олово-ассоциированный комплекс АСР или АСФР. Композиция может содержать 2% CPP-АСР и 290 м.д. фторида, из которых 220 м.д. представлены в форме фторида олова и 70 м.д. - в форме фторида натрия.

В контексте описания данного изобретения "фосфопептид" обозначает аминокислотную последовательность, в которой фосфорилирована по меньшей мере одна аминокислота. Предпочтительно, фосфопептид содержит одну или более чем одну аминокислотную последовательность -А-В-С-, где А представляет собой фосфоаминокислотный остаток, В представляет собой любой аминокислотный остаток, включая фосфоаминокислотный остаток, и С выбран из глутамила, аспартила или фосфоаминокислотного остатка. Любой из фосфоаминокислотных остатков может независимо представлять собой фосфосериновый остаток. В, желателно, представляет собой остаток, боковая цепь которого не является ни относительно большой, ни гидрофобной. Он может представлять собой Gly, Ala, Val, Met, Leu, Ile, Ser, Thr, Cys, Asp, Glu, Asn, Gln или Lys.

В другом воплощении по меньшей мере две из фосфоаминокислот, присутствующих в последовательности, расположены, предпочтительно, друг за другом. Предпочтительно, фосфопептид содержит последовательность А-В-С-D-E, где А, В, С, D и E независимо представляют собой фосфосерин, фосфотиреонин, фосфотирозин, фосфогистидин, глутаминовую кислоту или аспарагиновую кислоту, и по меньшей мере две, предпочтительно три, из А, В, С, D и E представляют собой фосфоаминокислоты. В предпочтительном воплощении фосфоаминокислотные остатки представляют собой фосфосериновые остатки, наиболее предпочтительно - три фосфосериновых остатка, расположенные друг за другом. Также предпочтительно, чтобы D и E независимо представляли собой глутаминовую или аспарагиновую кислоту.

В одном воплощении АСР или АСФР стабилизирован казеиновым фосфопептидом (CPP), представленным в форме интактного казеина или фрагмента казеина, и образованный комплекс предпочтительно

имеет формулу $[(CPP)(ACFP)_8]_n$ или $[(CPP)(ACFP)_8]_n$, где n равен 1 или более, например, 6. Образованный комплекс может представлять собой коллоидный комплекс, где происходит агрегация основных частиц с образованием крупных (например, 100 нм) коллоидных частиц, суспендированных в воде. Таким образом, PP может представлять собой казеиновый белок или фосфопептид.

PP может иметь происхождение от любого источника; он может присутствовать в контексте более крупного полипептида, включая полноразмерный казеиновый полипептид, или он может быть выделен триптическим или другим ферментативным или химическим расщеплением казеина или других белков с высоким содержанием фосфоаминокислот, таких как фосфитин, или химическим или рекомбинантным синтезом, при условии, что он содержит последовательность -A-B-C- или A-B-C-D-E, как описано выше. Последовательность, фланкирующая эту центральную последовательность, может быть любой. Тем не менее, предпочтительны фланкирующие последовательности α_{s1} (59-79), β (1-25), α_{s2} (46-70) и α_{s2} (1-21). Фланкирующие последовательности могут, возможно, быть модифицированы делецией, добавлением или консервативной заменой одного или более чем одного остатка. Аминокислотный состав и последовательность фланкирующей области не имеют решающего значения.

Примеры консервативных замен показаны в табл. А ниже.

Таблица А

Исходный остаток	Примеры консервативных замен	Предпочтительные консервативные замены
Ala	Val, Leu, Ile	Val
Asn	Gln Lys His Phe	Gln
Gln	Asn	Asn
Gly	Pro	Pro
Ile	Leu, Val, Met, Ala, Phe	Leu
Leu	Ile, Val, Met, Ala, Phe	Ile
Lys	Arg, Gln, Asn	Arg
Phe	Leu, Val, Ile, Ala	Leu
Pro	Gly	Gly
Ser	Thr	Thr
Val	Ile, Leu, Met, Phe, Ala	Leu
Asp	Glu	Glu
Thr	Ser	Ser
Trp	Tyr	Tyr
Tyr	Trp Phe Thr Ser	Phe

Фланкирующие последовательности могут также содержать аминокислотные остатки, не встречающиеся в природе. Часто используемые аминокислоты, не кодируемые генетическим кодом, включают:

- 2-аминоадипиновую кислоту (Aad) вместо Glu и Asp;
- 2-аминопимелиновую кислоту (Apm) вместо Glu и Asp;
- 2-аминомасляную (Abu) кислоту вместо Met, Leu и других алифатических аминокислот;
- 2-аминогептановую кислоту (Ahe) вместо Met, Leu и других алифатических аминокислот;
- 2-аминоизомаляную кислоту (Aib) вместо Gly;
- циклогексилаланин (Cha) вместо Val, Leu и Ile;
- гомоаргинин (Har) вместо Arg и Lys;
- 2,3-диаминопропионовую кислоту (Dpr) вместо Lys, Arg и His;
- N-этилглицин (EtGly) вместо Gly, Pro и Ala;
- N-этиласпарагин (EtAsn) вместо Asn и Gln;
- гидроксилизин (Hyl) вместо Lys;
- аллогидроксилизин (AHyl) вместо Lys;
- 3-(и 4-) гидроксипролин (3Hyp, 4Hyp) вместо Pro, Ser и Thr;
- аллоизолейцин (Alle) вместо Ile, Leu и Val;
- ρ -амидинофенилаланин вместо Ala;
- N-метилглицин (MeGly, саркозин) вместо Gly, Pro, Ala;
- N-метилизололейцин (Melle) вместо Ile;
- норвалин (Nva) вместо Met и других алифатических аминокислот;
- норлейцин (Nle) вместо Met и других алифатических аминокислот;

орнитин (Orn) вместо Lys, Arg и His;
 цитруллин (Cit) и метионинсульфоксид (MSO) вместо Thr, Asn и Gln;
 N-метилфенилаланин (MePhe), триметилфенилаланин, галоген- (F, Cl, Br и I) фенилаланин, трифлуорилфенилаланин вместо Phe.

В одном воплощении PP представляет собой один или более чем один фосфопептид, выбранный из группы, состоящей из $\alpha_{s1}(59-79)$ [1], $\beta(1-25)$ [2], $\alpha_{s2}(46-70)$ [3] и $\alpha_{s2}(1-21)$ [4]:

[1] Gln⁵⁹-Met-Glu-Ala-Glu-Ser(P)-Ile-Ser(P)-Ser(P)-Ser(P)-Glu-Glu-Ile-Val-Pro-Asn-Ser(P)-Val-Glu-Gln-Lys⁷⁹ $\alpha_{s1}(59-79)$;

[2] Arg¹-Glu-Leu-Glu-Glu-Leu-Asn-Val-Pro-Gly-Glu-Ile-Val-Glu-Ser(P)-Leu-Ser(P)-Ser(P)-Ser(P)-Glu-Glu-Ser-Ile-Thr-Arg²⁵ $\beta(1-25)$;

[3] Asn⁴⁶-Ala-Asn-Glu-Glu-Glu-Tyr-Ser-Ile-Gly-Ser(P)-Ser(P)-Ser(P)-Glu-Glu-Ser(P)-Ala-Glu-Val-Ala-Thr-Glu-Glu-Val-Lys⁷⁰ $\alpha_{s2}(46-70)$;

[4] Lys¹-Asn-Thr-Met-Glu-His-Val-Ser(P)-Ser(P)-Ser(P)-Glu-Glu-Ser-Ile-Ile-Ser(P)-Gln-Glu-Thr-Tyr-Lys²¹ $\alpha_{s2}(1-21)$.

В другом воплощении изобретения стабилизированный комплекс АСР и/или стабилизированный комплекс АСФР включен в композиции для перорального применения, такие как зубная паста, жидкости для полоскания рта или композиции для полости рта для содействия предотвращению и/или лечению гингивита или периодонтита. Композиции для перорального применения, содержащие количество стабилизированного АСР и/или АСФР, достаточное для образования слоя на поверхности зуба, предпочтительно, соотношение кальций:фосфат в указанном слое эквивалентно обычному апатиту, например, это соотношение составляет 2:1. Количество кальция в указанном слое может составлять приблизительно 20 мас.%. Стабилизированные комплексы АСР и/или АСФР могут составлять от 0,01 до 50% композиции по массе, предпочтительно, от 1,0 до 50%, предпочтительно, от 1,0 до 30%, предпочтительно, от 1,0 до 20%, предпочтительно, от 1,0 до 10%, предпочтительно, от 2 до 10% композиции по массе. В особенно предпочтительном воплощении композиция для перорального применения по настоящему изобретению содержит приблизительно 2% стабилизированных комплексов АСР или АСФР или их смеси. Композиция для перорального применения по данному изобретению, содержащая указанные выше агенты, может быть изготовлена и использована в различных формах, применимых к полости рта, таких как средства для чистки зубов, включая зубные пасты, зубные порошки и жидкие средства для чистки зубов, жидкости для полоскания рта, жидкости для промывания полости рта, спреи для полости рта, стоматологический лак, стоматологический цемент, пастилки, жевательные резинки, стоматологические пасты, кремы для массажа десен, таблетки для полоскания рта, молочные продукты и другие продукты питания. Композиция для перорального применения по данному изобретению может дополнительно содержать хорошо известные дополнительные ингредиенты, в зависимости от типа и формы конкретной композиции для перорального применения. Определенные композиции по изобретению, такие как зубные пасты, зубные порошки и жидкие средства для чистки зубов, жидкости для полоскания рта, жидкости для промывания полости рта и спреи для полости рта, имеют относительно низкую вязкость и оказывают положительное влияние на лечение или предотвращение, присутствуя в полости рта непродолжительное время.

В определенных предпочтительных формах изобретения композиция для перорального применения может быть по существу жидкой, такой как жидкость для полоскания рта, жидкость для промывания или спрей. В таком препарате наполнитель обычно представляет собой водно-спиртовую смесь, желателен, содержащую увлажнитель, как описано ниже. Обычно соотношение воды и спирта по массе входит в диапазон от приблизительно 1:1 до приблизительно 20:1. Общее количество водно-спиртовой смеси в препарате такого типа обычно входит в диапазон от приблизительно 70 до приблизительно 99,9% по массе препарата. Спирт обычно представляет собой этанол или изопропанол. Этанол предпочтителен.

В других предпочтительных формах данного изобретения композиция для перорального применения может быть по существу твердой или пастообразной, такой как зубной порошок, стоматологическая таблетка, или зубная паста (стоматологический крем), или гелевое средство для чистки зубов. Наполнитель таких твердых или пастообразных препаратов для перорального применения обычно содержит стоматологически приемлемое полирующее вещество. Примерами полирующих веществ являются водонерастворимые метафосфат натрия, метафосфат калия, трикальцийфосфат, дигидрат фосфата кальция, безводный гидрофосфат кальция, пирофосфат кальция, ортофосфат магния, тримагнийфосфат, карбонат кальция, гидрат окиси алюминия, кальцинированная окись алюминия, силикат алюминия, силикат циркония, диоксид кремния, бентонит и их смеси. Другие подходящие полирующие вещества включают частицы терморезистивных смол, таких как меламина-, фенол- и карбаминоформальдегидные смолы, и попеременно сшитые полиэпоксиды и полиэфир. Предпочтительные полирующие вещества включают кристаллический диоксид кремния с размерами частиц до приблизительно 5 мкм, средним размером частиц до приблизительно 1,1 мкм и площадью поверхности до приблизительно 50000 см²/г, силикагель или

коллоидный диоксид кремния и комплексы аморфных алюмосиликатов щелочных металлов.

При использовании прозрачных гелей особенно полезны полирующие вещества из коллоидного диоксида кремния, такие как имеющиеся в продаже под товарным знаком SYLOID Syloid 72 и Syloid 74 или имеющийся в продаже под товарным знаком SANTOCEL Santocel 100, и комплексы алюмосиликатов щелочных металлов, поскольку коэффициент преломления у них близок к коэффициенту преломления систем "гелеобразующий агент-жидкость" (содержащих воду и/или увлажнитель), обычно используемых в средствах для чистки зубов.

Многие из так называемых "водонерастворимых" полирующих веществ имеют анионную природу и также содержат небольшие количества растворимых веществ. Так, нерастворимый метафосфат натрия может быть получен любым подходящим способом, например, как показано в Thorpe's Dictionary of Applied Chemistry, Volume 9, 4th Edition, pp. 510-511. Другими примерами подходящих веществ являются формы нерастворимого метафосфата натрия, известные как соль Мадрелла и соль Каррола. Эти метафосфатные соли демонстрируют лишь незначительную растворимость в воде, и поэтому их обычно называют нерастворимыми метафосфатами (ИМР). Они присутствуют в незначительном количестве в растворимых фосфатах в виде примесей, обычно в количестве нескольких процентов, например, до 4% по массе. Если желательно, количество растворимых фосфатов, которые в случае нерастворимого метафосфата предположительно включают растворимый триметафосфат натрия, можно уменьшить или нивелировать промывкой в воде. Нерастворимые метафосфаты щелочных металлов обычно используют в форме порошка с таким размером частиц, что размер более 37 мкм имеет не более 1% вещества.

Полирующие вещества обычно присутствуют в твердых или пастообразных композициях в концентрациях от приблизительно 10 до приблизительно 99% по массе. Предпочтительно, в зубной пасте они присутствуют в количествах от приблизительно 10 до приблизительно 75%, а в зубном порошке - от приблизительно 70 до приблизительно 99%. В зубных пастах, при использовании кремниевых полирующих веществ, они обычно присутствуют в количестве приблизительно 10-30% по массе. Другие полирующие вещества обычно присутствуют в количестве приблизительно 30-75% по массе.

В зубной пасте жидкий наполнитель может обычно содержать воду и увлажнитель в количестве от приблизительно 10 до приблизительно 80% по массе препарата. Примерами подходящих увлажнителей/носителей являются глицерин, пропиленгликоль, сорбит и полипропиленгликоль. Также полезны жидкие смеси воды, глицерина и сорбита. В прозрачных гелях, где важен коэффициент преломления, предпочтительно используют приблизительно 2,5-30% мас./мас. воды, от 0 до приблизительно 70% мас./мас. глицерина и приблизительно 20-80% мас./мас. сорбита.

Зубная паста, кремы и гели обычно содержат природный или синтетический загуститель или гелеобразующий агент, доля которых составляет от приблизительно 0,1 до приблизительно 10, предпочтительно от приблизительно 0,5 до приблизительно 5% мас./мас. Подходящим загустителем является синтетический гекторит, синтетическая глина с коллоидным комплексом силикатов магния и щелочных металлов, доступная, например, в форме лапонита (например, CP, SP 2002, D), имеющегося в продаже от Laporte Industries Limited. Лапонит D представляет собой приблизительно 58,00% по массе, SiO₂, 25,40% MgO, 3,05% Na₂O, 0,98% Li₂O с некоторым количеством воды и следовыми количествами металлов. Его истинная плотность составляет 2,53, а кажущаяся насыпная плотность - 1,0 г/мл при влажности 8%.

Другие подходящие загустители включают ирландский мох, йота-каррагинан, трагакантовую камедь, крахмал, поливинилпирролидон, гидроксипропилпропилцеллюлозу, гидроксипропилметилцеллюлозу, гидроксипропилметилцеллюлозу, гидроксипропилцеллюлозу (например, доступную в форме натрозола), карбоксиметилцеллюлозу натрия и коллоидный диоксид кремния, такой как тонкоизмельченный силоид (например, 244). Могут также быть включены такие солюбилизующие агенты, как увлажняющие полиолы, такие как пропиленгликоль, дипропиленгликоль и гексиленгликоль, целлозолы, такие как метилцеллозоль и этилцеллозоль, растительные масла и воски, содержащие по меньшей мере приблизительно 12 атомов углерода в прямой цепи, такие как оливковое масло, касторовое масло и вазелиновое масло, и сложные эфиры, такие как амилацетат, этилацетат и бензилбензоат.

Следует понимать, что, согласно общепринятой практике, препараты для перорального применения будут обычно продаваться или иным образом распространяться в подходящей маркированной упаковке. Так, на емкости с жидкостью для промывания рта будет этикетка с ее описанием, по существу, как жидкости для промывания или полоскания рта и инструкциями по ее применению; а зубная паста, крем или гель будут обычно в гибкой тубе, в типичных случаях из алюминия, тонкого свинца или пластика, или другом дозаторе, насосе или диспенсере под давлением, для дозирования содержимого, имеющем этикетку с их описанием, по существу, как зубной пасты, геля или стоматологического крема.

Органические поверхностно-активные агенты могут быть использованы в композициях по настоящему изобретению для достижения большего профилактического действия, содействия достижению полного распределения активного агента по всей полости рта и повышения косметической приемлемости этих композиций. Органическое поверхностно-активное вещество предпочтительно является анионным, неионным или амфолитным по своей природе и предпочтительно не взаимодействует с активным агентом. В качестве поверхностно-активного вещества предпочтительно использовать детергент, обеспечивающий вспенивание композиции и ее очищающий эффект. Подходящими примерами анионных по-

верхностно-активных веществ являются водорастворимые соли моносulfатированных моноглицеридов высших жирных кислот, такие как натриевая соль моносulfатированного моноглицерида жирных кислот гидрогенизированного кокосового масла, высшие алкилсульфаты, такие как лаурилсульфат натрия, алкиларилсульфонаты, такие как додецилбензолсульфонат натрия, высшие алкилсульфоацетаты, сложные эфиры высших жирных кислот и 1,2-дигидроксипропансульфоната и преимущественно насыщенные высшие алифатические ациламиды низших алифатических аминокислот, например, где жирная кислота имеет от 12 до 16 атомов углерода, алкильные или ацильные радикалы и тому подобное. Примерами последних указанных амидов являются N-лауроилсаркозин и натриевые, калиевые и этаноламиновые соли N-лауроил-, N-миристоил- или N-пальмитоилсаркозина, который должен быть практически свободен от мыла или аналогичных соединений высших жирных кислот. Использование этих саркозиновых соединений в композициях для перорального применения по настоящему изобретению особенно полезно, поскольку эти вещества оказывают длительное и выраженное действие, ингибируя образование кислот в полости рта, обусловленное расщеплением углеводов, а также в некоторой степени снижая растворимость зубной эмали в кислых растворах. Примерами подходящих водорастворимых неионных поверхностно-активных веществ являются продукты конденсации этиленоксида с различными реакционноспособными водородсодержащими соединениями, обладающими реакционной способностью в отношении этиленоксида и имеющими длинные гидрофобные цепи (например, алифатические цепи из приблизительно из 12-20 атомов углерода), при этом эти продукты конденсации ("этоксамеры") содержат гидрофильные полиоксиэтиленовые группировки, такие как продукты конденсации полиэтиленоксида с жирными кислотами, жирными спиртами, амидами жирных кислот, многоатомными спиртами (например, сорбитанмоностеарат) и полипропиленоксидом (например, плуроники).

Поверхностно-активный агент обычно присутствует в количестве приблизительно 0,1-5% по массе. Следует отметить, что поверхностно-активный агент может способствовать растворению активного агента по изобретению и посредством этого уменьшать необходимое количество солубилизирующего увлажнителя.

В препараты для перорального применения по данному изобретению могут быть включены различные другие вещества, такие как отбеливающие агенты, консерванты, силиконы, хлорофилловые соединения и/или аммонизированные вещества, такие как мочевины, гидрофосфат аммония и их смеси. Эти вспомогательные вещества, там, где они присутствуют, включены в препараты в количествах, которые по существу не оказывают отрицательного влияния на желаемые свойства и характеристики.

Также могут быть использованы любые корригенты и подсластители. Примерами подходящих корригентов являются ароматические масла, например, масло мяты колосистой, мяты перечной, гаультерии, сассафраса, гвоздики, шалфея, эвкалипта, душицы, корицы, лимона и апельсина, и метилсалицилат. Подходящие подсластители включают сахарозу, лактозу, мальтозу, сорбит, ксилит, цикламат натрия, периллартин, АМР (метилловый эфир аспартилфенилаланина), сахарин и тому подобное. Подходящим образом, корригент и подсластитель могут, по отдельности или вместе, составлять от приблизительно 0,1 до 5% препарата или более.

Композиции по данному изобретению могут также быть включены в леденцы, или в жевательную резинку, или в другие продукты, например, смешиванием с теплой жевательной основой или покрытием наружной поверхности жевательной основы, примерами которой являются джелутонг, каучуковый латекс, винилитовая смола и так далее, желателно с традиционными пластификаторами или смягчающими веществами, сахаром или другими подсластителями, такими как глюкоза, сорбит и тому подобное. Композиция по изобретению может представлять собой двухфазную композицию, где каждая фаза позволяет высвобождать компоненты на протяжении различных периодов времени.

Альтернативная композиция может представлять собой композицию, обеспечивающую стабилизированный АСР или АСФР и соединение олова, которые затем образуют олово-ассоциированный стабилизированный АСР или АСФР *in situ*, например, в полости рта. Типичная композиция может представлять собой жевательную резинку, содержащую стабилизированный АСР или АСФР в подушечке и соединение олова в центральной части.

В другом аспекте согласно изобретению предложены композиции, включая фармацевтические композиции, содержащие стабилизированные комплексы АСР или АСФР, как описано выше, вместе с соединением, способным повышать или поддерживать рН раствора, и фармацевтически приемлемым носителем. Такие композиции могут быть выбраны из группы, состоящей из стоматологических противокариозных композиций и терапевтических композиций. Стоматологические композиции или терапевтические композиции могут быть в форме геля, жидкости, твердого вещества, порошка, крема или леденца. Терапевтические композиции могут также быть в форме таблеток или капсул. В одном воплощении стабилизированные комплексы АСР или АСФР являются, по сути, единственными активными компонентами такой композиции. Например, может быть использована композиция в форме крема, содержащая: воду; глицерин; СРР-АСР/SnF₂; D-сорбит; диоксид кремния; карбоксиметилцеллюлозу натрия (СМС-Na); пропиленгликоль; диоксид титана; ксилит; фосфорную кислоту; гуаровую камедь; сахарин натрия; этил-п-гидроксibenзоат; оксид магния; бутил-п-гидроксibenзоат; и пропилен-п-гидроксibenзоат.

Изобретение также включает композицию, описанную выше, представленную вместе с инструк-

циями по ее применению для лечения или предупреждения любого одного или более из зубного кариеса, патологической стираемости зубов и флюороза, повышенной чувствительности зубов, зубного налета, гингивита или периодонтита.

В другом воплощении композиции по изобретению, как описано здесь, не содержат фосфатный буфер и/или хелатор кальция. Например, любое средство для чистки зубов, описанное здесь, может не содержать фосфатный буфер и/или хелатор кальция.

В одном воплощении настоящего изобретения предложена композиция, не содержащая фосфатный буфер и/или хелатор кальция.

В другом воплощении композиции по изобретению, как описано здесь, не содержат регулятор вязкости или содержат регулятор вязкости в количестве от 0,5 до 50%.

В другом воплощении композиции по изобретению, как описано здесь, не содержат карбоксиметилцеллюлозу натрия или содержат от 0,01 до 10% карбоксиметилцеллюлозы натрия со степенью этерификации от 0,7 до 1,0.

В одном воплощении активные компоненты композиции состоят главным образом из стабилизированных комплексов АСР или АСФР.

Следует понимать, что, несмотря на то, что данное описание относится к конкретным вариантам применения изобретения у людей, оно может также быть использовано для ветеринарных целей. Таким образом, во всех аспектах изобретение применимо к сельскохозяйственным животным, таким как крупный рогатый скот, овцы, лошади и домашняя птица, к домашним животным, таким как кошки и собаки, и к животным, содержащимся в зоопарках.

Один пример минерализующей композиции содержит следующее (в порядке уменьшения доли):

- вода;
- глицерин;
- СРР-АСР/SnF₂;
- D-сорбит;
- диоксид кремния;
- карбоксиметилцеллюлоза натрия (СМС-Na);
- пропиленгликоль;
- диоксид титана;
- ксилит;
- фосфорная кислота;
- гуаровая камедь;
- сахарин натрия;
- этил-п-гидроксibenзоат;
- оксид магния;
- бутил-п-гидроксibenзоат;
- пропил-п-гидроксibenзоат.

Согласно изобретению также предложен набор, содержащий стабилизированный аморфный фосфат кальция (АСР) и/или стабилизированный аморфный фторид-фосфат кальция (АСФР), где указанный набор адаптирован для применения в описанных выше способах.

Набор может содержать:

- контейнер для композиции, содержащей стабилизированный аморфный фосфат кальция (АСР) и/или стабилизированный аморфный фторид-фосфат кальция (АСФР);
- этикетку или вкладыш в упаковке с инструкциями по применению.

В определенных воплощениях набор может содержать один или более чем один дополнительный активный компонент или ингредиент для лечения заболевания или состояния.

Набор может содержать контейнер и этикетку или вкладыш на контейнере или вместе с ним. Подходящие контейнеры включают, например, бутылки, флаконы, шприцы, блистерную упаковку и так далее. Контейнеры могут быть изготовлены из множества веществ, таких как стекло или пластик. Контейнер содержит терапевтическую композицию, эффективную для лечения состояния, и может иметь стерильное входное отверстие (например, контейнер может представлять собой пакет с раствором для внутривенного введения или флакон с пробкой, прокалываемой иглой для подкожных инъекций). На этикетке или вкладыше указано, что терапевтическая композиция применяется для лечения выбранного состояния. В одном воплощении этикетка или вкладыш содержит инструкции по применению с указанием того, что терапевтическая композиция может быть применена для лечения заданного заболевания или состояния.

Набор может содержать (а) терапевтическую композицию и (b) второй контейнер, содержащий второй активный компонент или ингредиент. В данном воплощении набор по изобретению может дополнительно содержать вкладыш с указанием того, что композиция и другой активный компонент могут быть применены для лечения расстройства или состояния, как описано здесь, или предупреждения осложнения, вызванного дисбиозом. Альтернативно или дополнительно, набор может дополнительно содержать второй (или третий) контейнер, содержащий фармацевтически приемлемый буфер, такой как бактерио-

статическая вода для инъекций (BWFI), забуференный фосфатом физиологический раствор, раствор Рингера и раствор декстрозы. Он может дополнительно содержать другие материалы, желательные с коммерческой точки зрения и точки зрения пользователя, включая другие буферы, разбавители, фильтры, иглы и шприцы.

Теперь изобретение будет описано со ссылкой на следующие неограничивающие примеры.

Примеры

Пример 1.

Клиническое исследование: пребиотический эффект CPP-АСР на наддесневой зубной налет и здоровье полости рта.

Задачи исследования.

Основная задача.

Сравнить эффект жевания жевательной резинки без сахара, содержащей 56,4 мг CPP-АСР, жевания жевательной резинки без сахара, содержащей 18,8 мг CPP-АСР, и неиспользования жевательной резинки, что в каждом случае сопровождалось обычными процедурами по поддержанию гигиены полости рта на протяжении 14 суток, на микробный состав наддесневого налета, образующегося на молярах верхней челюсти.

Дополнительные задачи.

А. Сравнить эффект жевания жевательной резинки без сахара, содержащей 56,4 мг CPP-АСР, жевания жевательной резинки без сахара, содержащей 18,8 мг CPP-АСР, и неиспользования жевательной резинки, что в каждом случае сопровождалось обычными процедурами по поддержанию гигиены полости рта на протяжении 14 суток, на образование наддесневого налета.

В. Сравнить эффект жевания жевательной резинки без сахара, содержащей 56,4 мг CPP-АСР, жевания жевательной резинки без сахара, содержащей 18,8 мг CPP-АСР, и неиспользования жевательной резинки, что в каждом случае сопровождалось обычными процедурами по поддержанию гигиены полости рта на протяжении 14 суток, на развитие гингивита.

Утверждение исследования этическим комитетом.

Перед началом исследования оно было утверждено Этическим комитетом Мельбурнского университета по исследованиям, проводимым у людей. Перед началом исследования все его участники должны были дать письменное информированное согласие.

План исследования.

Дизайн исследования.

В данном слепом для исследователей, рандомизированном контролируемом клиническом исследовании применялась перекрестная схема с тремя видами лечения и тремя периодами для оценки эффектов жевания жевательной резинки без сахара, содержащей 56,4 мг CPP-АСР, жевания жевательной резинки без сахара, содержащей 18,8 мг CPP-АСР, и неиспользования жевательной резинки на протяжении 14 суток на развитие и изменения состава наддесневого зубного налета, а также на развитие гингивита при проведении обычных процедур по поддержанию гигиены полости рта. Участников случайным образом распределяли в одну из трех групп лечения, при этом продолжительность каждого периода лечения составляла 14 суток. Три варианта лечения представляли собой следующее:

А) жевание жевательной резинки без сахара, содержащей 56,4 мг CPP-АСР, по 20 мин, шесть раз в сутки, на протяжении 14 суток подряд;

В) жевание жевательной резинки без сахара, содержащей 18,8 мг CPP-АСР, по 20 мин, шесть раз в сутки, на протяжении 14 суток подряд;

С) неиспользование жевательной резинки.

На протяжении периода лечения каждый субъект продолжал принимать меры по поддержанию гигиены полости рта, состоящие из чистки зубов два раза в сутки с использованием фторидной зубной пасты (выдавалась) и зубной щетки (выдавалась). Участникам, жевавшим жевательные резинки, не разрешалось использовать антиминокробные леденцы, пастилки, пленки и другие жевательные резинки на протяжении периода лечения. Сходным образом, участникам, не использовавшим жевательные резинки на протяжении периода лечения, не разрешалось использовать антиминокробные леденцы, пастилки, пленки и другие жевательные резинки на протяжении периода лечения.

Происхождение участников.

Участников набирали из сотрудников Мельбурнской стоматологической школы и Мельбурнской стоматологической клиники при Мельбурнском университете. Перед участием в исследовании все участники подписывали информированное согласие.

Критерии отбора участников.

Критерии включения.

Чтобы соответствовать критериям отбора для участия в данном исследовании, индивид должен был соответствовать ВСЕМ из следующих критериев.

1) Способность понять и готовность и способность прочесть и подписать форму информированного согласия.

2) Возрастной диапазон: от 18 до 55 лет.

- 3) Хорошее общее состояние здоровья.
- 4) Не менее 20 естественных зубов.
- 5) Общая скорость слюноотделения при стимуляции жевательной резинкой не менее 1,0 мл в минуту, и общая скорость слюноотделения без стимуляции не менее 0,2 мл в минуту.
- 6) Готовность соблюдать процедуры исследования и быть доступным на всем протяжении исследования.

Критерии исключения.

Индивиды с любыми из следующих критериев исключения на момент рандомизации не могли быть включены в исследование.

- 1) Аллергия на белок молока или другие ингредиенты жевательной резинки.
- 2) Ортодонтические аппараты или съемные протезы.
- 3) Вениры или более одного резца с коронкой.
- 4) Серьезные заболевания полости рта (включая заболевание пародонта (СРІТN 3 или более) и опухоли мягких или твердых тканей полости рта).
- 5) Хроническое заболевание с сопутствующими проявлениями в полости рта (например, диабет (независимо от уровня контроля), инфекция, вызванная вирусом иммунодефицита человека, или синдром приобретенного иммунодефицита, применение лекарственных средств, ассоциированных с гиперплазией десен).
- 6) Невосстановленный кариес дентина.
- 7) Лечение антибиотиками или противовоспалительными лекарственными средствами за месяц до начала исследования.
- 8) Сопутствующая фармакотерапия лекарственными средствами, которые могут взаимодействовать с исследуемым препаратом.
- 9) Состояния, требующие применения антибиотиков перед инвазивными стоматологическими процедурами, в анамнезе.
- 10) Беременность/кормление грудью.

Исследуемые препараты.

Описание исследуемых препаратов.

Каждого участника случайным образом распределяли в одну из следующих групп лечения:

- А) жевательная резинка без сахара, содержащая 56,4 мг CPP-ACP, по 20 мин, шесть раз в сутки, на протяжении 14 суток подряд;
 - В) жевательная резинка без сахара, содержащая 18,8 мг CPP-ACP, по 20 мин, шесть раз в сутки, на протяжении 14 суток подряд;
 - С) неиспользование жевательной резинки.
- Методика выдачи препарата.

В начале каждого периода лечения участникам выдавали пакет, содержащий препарат для применения на протяжении этого периода, тубу с фторидной зубной пастой и зубную щетку. Участники возвращали все неиспользованные жевательные резинки и все обертки от использованных жевательных резинок на осмотре, проводимом на 14 сутки в конце каждого периода лечения. Количество выданных и возвращенных жевательных резинок записывали.

Методика и график применения препарата.

После получения исследуемого препарата в форме жевательных резинок участники жевали их по 20 минут шесть раз в сутки на протяжении 14 суток подряд в следующее время: после завтрака, после второго завтрака, после обеда, после полдника, после ужина и перед сном.

Методика рандомизации и заслепления.

Была разработана схема блок-рандомизации, обеспечивавшая равную вероятность всех шести комбинаций вариантов лечения (ABC, ACB, BAC, BCA, CAB, CBA).

Исследование было слепым для исследователей. На всем протяжении исследования клинический исследователь и сотрудники лаборатории, работавшие с образцами налета, не знали, в какую группу лечения был распределен участник. Участники и исследовательский персонал также не знали, какую жевательную резинку применяет участник, и жевательные резинки выдавались в идентичных упаковках, снабженных кодами. Поскольку в одном из периодов лечения участники не применяли жевательную резинку, обеспечить полное заслепление распределения по группам лечения для участников исследования было невозможно. Сотрудники, выдававшие исследуемый препарат или следившие за его применением, не участвовали в осмотре участников или анализе образцов налета, чтобы минимизировать возможное искажение результатов.

Основной список идентификационных кодов хранился у исследователя, никак не вовлеченного в анализ.

Распределение участников по группам лечения: После исходного осмотра участнику присваивали номер. Участников случайным образом распределяли в одну из трех групп лечения. Рандомизация определялась по стандартной рандомизационной таблице для нескольких вариантов лечения в параллельном исследовании.

Продолжительность лечения.

Каждый из трех периодов лечения длился 14 суток подряд. Периоды лечения были разделены периодами выведения препарата продолжительностью 14 суток.

Сопутствующие процедуры.

Участникам были даны указания продолжать чистить зубы выданной зубной пастой и зубной щеткой два раза в сутки. Участникам были даны указания воздержаться от полоскания рта (кроме полоскания водой); чистки зубной нитью; использования других средств поддержания гигиены полости рта; использования antimicrobных леденцов, пастилок, пленок и других жевательных резинок на протяжении каждого периода лечения продолжительностью 14 суток.

Измерения и наблюдения.

Конечные точки эффективности.

Клинический осмотр.

В начале и в конце периода лечения участники проходили осмотр на предмет гингивита и налета, и проводился сбор наддесневого налета с буккальных поверхностей верхнечелюстных моляров. После завершения осмотра и сбора наддесневого налета участникам проводили удаление наддесневого зубного камня, чистку и профилактическую обработку всех зубов. По завершении последнего осмотра после 3 периода лечения каждому участнику исследования проводили профессиональное фторирование зубов.

Оценка налета и гингивита.

Наддесневой налет оценивали по индексу Quigley-Hein в модификации Turesky (Turesky et al 1970 J Periodontol 41(1): 41-43). Этот индекс считается надежным показателем состояния области зуба, покрытой налетом, и его часто используют для оценки противоналетных агентов. Индекс налета получали, суммируя показатели по каждому зубу и деля их сумму на число обследованных поверхностей. Показатели налета оценивали на невосстановленных лабиальных, буккальных и лингвальных поверхностях всех зубов, за исключением третьих моляров. Каждую поверхность оценивали по шкале от 0 до 5.

Гингивит оценивали с применением модифицированного десневого индекса [Lobene et al 1986]. Этот индекс является модификацией десневого индекса Loe и Silness и позволяет лучше дифференцировать легкий и умеренный гингивит. В данном исследовании воспаление десен по шкале от 0 до 4 оценивали для десневых тканей четырех участков (буккальный, лингвальный, мезиальный и дистальный) всех зубов.

Сбор наддесневого налета.

У всех участников проводили сбор наддесневого налета с буккальных поверхностей верхнечелюстных моляров (17, 16, 26 и 27 зубы), используя стерильный инструмент для снятия налета. Образцы налета с каждого зуба помещали в отдельные стерильные пробирки, получая по четыре образца от каждого участника.

На каждый контейнер с налетом, собранным у каждого участника, наклеивали одинарную этикетку. Этикетка содержала следующую информацию:

номер участника;

код лечения (А, В или С); зуб (17, 16, 26 или 27);

период лечения (1, 2 или 3);

время (0 или 14 суток).

Отмечали массу налета в каждом из четырех образцов, полученных от каждого участника, чтобы провести стандартизацию процедур выделения ДНК (для выделения ДНК необходимо было по 0,2 мг каждого образца). До того, как они потребуются, гомогенизированные образцы налета хранили при -80°C.

Микробиологический анализ налета.

Геномную ДНК выделяли из налета, применяя сочетание механического разрушения клеток с использованием гомогенизатора Precellys и химического выделения и очистки геномной ДНК с использованием набора PowerLyzer PowerSoil DNA Isolation Kit (MoBio). Количество выделенной ДНК определяли с использованием набора Qubit dsDNA High Sensitivity Assay kit (ThermoFisher), после чего 5 нг ДНК использовали в качестве матрицы в реакции ПЦР, позволявшей амплифицировать переменную область V4 гена 16S рибосомальной РНК, и по отдельности штрихкодировали продукты ПЦР, полученный из каждого образца. Затем штрихкодированные ДНК секвенировали с использованием прибора Ion Torrent Personal Genome и программного обеспечения Torrent Suite™ Software (ThermoFisher).

Анализ полученной последовательности 16S рибосомальной РНК позволял идентифицировать бактериальную популяцию, присутствовавшую в каждом образце, вплоть до вида. BAM-файлы, полученные с использованием программного обеспечения Torrent Suite™ Software, переносили из Ion Torrent на локальный сервер Ion Reporter, на котором проводили метагеномный анализ с применением программного обеспечения Ion Reporter Software 16S для идентификации, на уровне рода или вида, микроорганизмов, присутствовавших в сложных полибактериальных образцах, используя специальную референсную базу данных MicroSEQ™ ID 16S rRNA и специальную базу данных Greengenes. Полученные данные анализировали в Microsoft Excel.

Статистические методы.

Определение размера выборки.

В табл. 1 ниже показаны расчетные размеры выборок для каждой группы, исходя из различий средних значений содержания *S. sanguinis* 1,5, 2,0, 2,5 и 3,0%, стандартного отклонения от 3,5 до 5,5% и мощности анализа 80%. Эти значения предполагают двухсторонний парный критерий Стьюдента и α 0,05. Диапазон средних значений и стандартных отклонений, использованных при расчете размеров выборок, был основан на предшествующем пилотном исследовании.

Таблица 1. Расчетные размеры выборок для каждой группы

Различие средних значений	Стандартное отклонение					
	3,0	3,5	4,0	4,5	5,0	5,5
1,5	34	45	58	73	90	108
2,0	20	27	34	42	52	62
2,5	14	18	23	28	34	40
3,0	10	13	16	20	24	29
3,5	8	10	13	16	19	22

В табл. 2 показан расчетный размер выборки по каждой группе, допускающий выбывание 10% участников исследования в периоде последующего наблюдения.

Таблица 2. Расчетные размеры выборок для каждой группы

Различие средних значений	Стандартное отклонение					
	3,0	3,5	4,0	4,5	5,0	5,5
1,5	38	50	64	81	100	120
2,0	22	30	38	47	58	69
2,5	16	20	26	31	38	44
3,0	11	14	18	22	27	32
3,5	9	11	14	18	21	24

Исходя из стандартного отклонения 4,5% и коэффициента выбывания 10%, в исследование были включены 18 участников, что позволило определить среднее различие в содержании *S. sanguinis* 3,5% с мощностью 80%.

Общие статистические методы.

Рандомизация и заслепление.

Две жевательные резинки выдавались в одинаковых упаковках, за исключением того, что каждая из них была отмечена кодом. Отдельные жевательные резинки имели сходный внешний вид. Код не раскрывался до завершения всех статистических анализов.

Идентификаторы присваивались участникам последовательным образом после подтверждения ответственности каждого участника критериям отбора.

Исследование было слепым для исследователей. На всем протяжении исследования стоматолог-исследователь и сотрудники лаборатории, работавшие с образцами налета, не знали, в какую группу лечения был распределен участник. Участники и исследовательский персонал также не знали, какую жевательную резинку применял участник, и жевательные резинки выдавались в идентичных упаковках, снабженных кодами. Поскольку в одном из периодов лечения участники не применяли жевательную резинку, обеспечить полное заслепление распределения по группам лечения для участников исследования было невозможно. Все участники завершили исследование.

Критерии приверженности лечению: приверженность лечению оценивали, изучая дневники применения препарата участниками и отмечая неиспользованные остатки.

Статистический анализ демографических и исходных данных.

Основной анализируемой популяцией были все участники, завершившие исследование без существенных нарушений протокола.

Определяли описательные статистические параметры (среднее значение, стандартное отклонение и разброс) по всем непрерывным переменным и частоты по всем порядковым переменным. Все статистические критерии были двухсторонними с уровнем значимости α , равным 0,05. Все статистические анализы проводили с использованием пакета статистического программного обеспечения Stata (StataCorp LP, Колледж-Стейшн, штат Техас, США).

Статистический анализ данных по эффективности.

Отдельные последовательности 16S рДНК, полученные из каждого образца, использовали как для классификации присутствовавших микробных линий (на видовом таксономическом уровне), так и для определения содержания каждого вида. У каждого индивида определяли изменения в бактериальном сообществе с течением времени, оценивая динамику относительного содержания видов.

Это позволяло оценивать влияние СРР-АСР на бактериальный состав налета. Наличие четырех образцов от каждого индивида позволяло оценивать вариабельность бактериального состава налета у одного и того же субъекта.

Результаты.

Все субъекты завершили исследование и соблюдали его протокол. Нежелательных явлений отмечено не было. Применение СРР-АСР не привело к существенным изменениям индекса налета у участников (фиг. 1). Несмотря на то, что СРР-АСР не влиял на индекс налета, он оказывал существенное влияние на его бактериальный состав, демонстрируя значительный пребиотический эффект и увеличивая доли комменсальных/полезных симбионтов.

В общей сложности, в 54 образцах было идентифицировано более 300 различных таксономических групп бактерий. При сравнении бактериального состава наддесневого налета в группах лечения были очевидны его изменения в группах СРР-АСР в сравнении с группой, не применявшей препарат. 18,8 мг СРР-АСР приводили к статистически значимому увеличению долей следующих видов бактерий:

Corynebacterium durum (увеличение на 80%); *Rothia dentocariosa* (увеличение на 127%); *Streptococcus mitis* (увеличение на 55%) и *Streptococcus sanguinis* (увеличение на 112%) (табл. 3). Все эти виды теперь рассматриваются как полезные симбионты, поскольку они обладают одной или обеими ферментативными системами (аргининдезиминая и/или нитратредуктаза), которые, как известно, полезны для хозяина. Этот рост комменсальных/полезных видов зависел от дозы СРР-АСР, поскольку при дозе СРР-АСР 56,4 мг он был значимо больше. Увеличение доли полезных видов сопровождалось одновременным уменьшением доли патогенных видов (патобионтов). Это увеличение содержания полезных симбионтов также отражалось улучшением состояния здоровья десен, что было продемонстрировано значительным улучшением десневого индекса, зависевшим от дозы СРР-АСР (фиг. 2).

Таблица 3. Виды бактерий полости рта, количество которых значимо увеличивалось при применении СРР-АСР в дозе 18,8 мг, являются грамположительными комменсалами, обладающими одной или обеими из аргининдезиминой и нитратредуктазной систем, способствующих поддержанию гомеостаза

Род	Вид	Аргинин-дезиминая	Нитрат-редуктаза	% увеличения относительного содержания
<i>Corynebacterium</i>	<i>durum</i>	Да (частично)	Да	80% (p<0,001)
<i>Rothia</i>	<i>dentocariosa</i>	Нет	Да	127% (p<0,001)
<i>Streptococcus</i>	<i>gordonii/mitis</i>	Да	Нет	55% (p<0,05)
<i>Streptococcus</i>	<i>sanguinis</i>	Да	Нет	112% (p<0,01)

Таблица 4. Виды бактерий полости рта, количество которых значимо уменьшалось при применении СРР-АСР в дозе 18,8 мг, являются грамотрицательными провоспалительными анаэробами, ассоциированными с дисбиозом

Род	Вид	Аргинин-дезиминая	Нитрат-редуктаза	% уменьшения относительного содержания
<i>Leptotrichia</i>	<i>wadei</i>	Нет	Нет	91% (p<0,001)
<i>Leptotrichia</i>	<i>shahii</i>	Нет	Нет	73% (p<0,01)
<i>Leptotrichia</i>	<i>buccalis</i>	Нет	Нет	76% (p<0,05)
<i>Lautropia</i>	<i>mirabilis</i>	Нет	Да	70% (p<0,05)

В завершение, данное рандомизированное контролируемое клиническое исследование продемонстрировало, что применение СРР-АСР приводило к существенному увеличению доли симбионтов, ассоциированных со здоровым состоянием, и улучшению состояния здоровья полости рта, указывая на пребиотическое действие СРР-АСР.

Пример 2.

SnF₂ способствует пребиотическому действию СРР-АСР в полимикробной модели.

Культивирование многовидовых биопленок полости рта.

Для моделирования наддесневого налета шесть типичных видов бактерий полости рта, *Streptococcus sanguinis* (NCTC 7863), *Streptococcus mutans* Ingbritt, *Actinomyces naeslundii* (NCTC 10301), *Veillonella parvula* (ATCC 17745), *Lactobacillus casei* (NCDO 161) и *Fusobacterium nucleatum* (ATCC 10953) (табл. 5) куль-

тивировали в форме полимикробной биопленки на подповерхностном слое зубной эмали человека в пленочном ферментере постоянной глубины (constant-depth film fermenter, CDFF; Кардиффский университет, Великобритания). CDFF помещали в инкубатор при 37°C в анаэробных условиях, которые поддерживали постоянным потоком 5%-го CO₂ в N₂ со скоростью 1 л/ч. CDFF содержал 15 съёмных политетрафторэтиленовых (PTFE) кюветы на круглой платформе, вращавшейся с постоянной скоростью три оборота в минуту. Биопленки выращивали в трех эмалевых блоках (см. ниже) в каждой PTFE-кювете с использованием среды из искусственной слюны (ASM, 2,5 г/л муцина II типа (свиной желудочный, Sigma), 2,0 г/л бактериологического пептона (Oxoid), 2,0 г/л триптона (Oxoid), 1,0 г/л дрожжевого экстракта (Oxoid), 0,35 г/л NaCl, 0,2 г/л KCl, 0,2 мг/л витамина К, 1 мг/л гемина и 0,1 г/л гидрохлорида цистеина) при постоянной скорости потока 30 мл/ч. Перед инокуляцией поверхности кювет CDFF подготавливали на протяжении 24 ч с использованием ASM при скорости потока 10 мл/ч (McBain et al (2003) J Appl Microbiol. 94(4): 655-66). Для имитации условий роста бактерий *in vivo* в полости рта при употреблении в пищу сахара и для воспроизведения условий высокого риска развития кариеса в CDFF вносили 1%-ный (масс/об.) раствор сахарозы в ASM, по четыре раза в сутки с четырехчасовыми интервалами и скоростью потока 30 мл/ч на протяжении 10 мин.

Таблица 5. Бактериальные штаммы, использованные в данном исследовании, число копий гена 16S рРНК и видовой состав инокулята

Бактериальный штамм ^а	Размер генома (п.о.)	Число копий гена 16S рРНК ^б	Число клеток в инокуляте (x10 ⁷) ^с
<i>Actinomyces naeshundii</i> NCTC 10301	3 091 654	2	9,90 ± 8,32
<i>Fusobacterium nucleatum ssp.</i> <i>polymorphum</i> ATCC 10953	2 428 298	5	11,5 ± 8,79
<i>Lactobacillus casei</i> (NCDO 161)	2 851 896	5	5,10 ± 2,40
<i>Streptococcus mutans</i> (Ingbritt)	2 030 511	5	13,7 ± 5,77
<i>Streptococcus sanguinis</i> (NCTC 7863) ATCC 10556	2 303 750	5	21,7 ± 10,9
<i>Veillonella parvula</i> ATCC 17745	2 163 473	4	5,44 ± 3,08

^а все штаммы были получены из Кооперативного исследовательского центра здоровья полости рта при Мельбурнской стоматологической школе;

^б число копий гена 16S рРНК определяли секвенированием геномов, которое проводилось в лаборатории авторов изобретения, данные не показаны;

^с средние значения и стандартное отклонение числа клеток в инокулятах, использованных в данном исследовании, как определено количественной ПЦР.

Полимикробные биопленки обрабатывали тремя способами: 290 м.д. фторида, из которых 220 м.д. были представлены в форме SnF₂ и 70 м.д. - в форме NaF (далее - SnF₂); 2% CPP-ACP; и 2% CPP-ACP-SnF₂. Эти варианты обработки сравнивали с контролем, где раствор препарата заменяли на ASM. При каждом варианте обработки раствор препарата в ASM вносили два раза по 10 мин при скорости потока 30 мл/ч. Первое внесение начинали за 30 мин до первого внесения сахарозы утром, а второе - через 3 ч 30 мин после последнего внесения сахарозы в этот день.

На 6, 12 и 19 сутки после инокуляции четыре кюветы асептически извлекали из CDFF, заменяя их пустыми стерильными кюветами. Эмалевые блоки доставали из кювет для определения количества бактерий и получения поперечных рентгеновских микрофотографий.

Подготовка эмалевых блоков.

Триста шестьдесят третьих моляров, удаленных у людей, были получены с разрешения этического комитета Мельбурнского университета (HREC #1237616) и простерилизованы гамма-излучением (4,1 кГр). Из зубов вырезали эмалевые блоки размерами приблизительно 6×3×3 мм с использованием алмазной пилы с водяным охлаждением (Minitom, Struers) и полировали их с использованием шлифовального инструмента RotoPol/RotoForce и шлифовальной бумаги с зернистостью 1200, 2400, 4000 (Struers) и 3 и 1 мкм алмазных полировальных паст (Struers). Блоки помещали в специально изготовленные кюветы для CDFF на глубине 100 мкм, закрепляли на месте желтым клейким воском (Kemdent) и стерилизовали гамма-излучением (4,1 кГр).

Получение образцов.

Сначала с эмалевых блоков удаляли планктонные и непрочно прикрепленные бактериальные клетки легкой промывкой блоков с использованием 100 мкл ASM. Для сбора клеток биопленки с каждого блока их соскребали с его поверхности скребком в 1 мл ASM. Бактериальные клетки биопленки осаждали центрифугированием (10000 g, 10 мин), супернатант осторожно выливали и клеточные осадки храни-

ли при -80°C до выделения ДНК. После этого эмалевые блоки использовали для получения срезов и рентгенологических микрофотографий.

Выделение и секвенирование ДНК из образцов биопленок.

Для каждой временной точки ДНК выделяли отдельно из 8-9 эмалевых блоков с использованием наборов PowerLyzer® PowerSoil® DNA Isolation (MoBio Laboratories), следуя "вакуумному протоколу" ("Vacuum Protocol") изготовителя и используя шариковый гомогенизатор Precellys® (Bertin Technologies). Перед замораживанием и хранением образцов при -80°C проводили их количественный анализ с использованием набора Qubit™ dsDNA HS assay kit (Life Technologies).

Для амплификации области V4 гена 16S рПНК применяли метод слияния с получением библиотек (Ion Amplicon Library Preparation Fusion Method; Thermo Fisher Scientific). ПНР проводили в реакционном объеме 50 мкл, содержащем 5 нг ДНК, 1X реакционный буфер Q5, 0,3 мкМ специальных PAGE-очищенных штрихкодированных праймеров (Thermo Fisher Scientific), 0,2 мМ dNTP и 1 единицу высокоточной ДНК-полимеразы Q5 Hot Start (Genesearch). Реакционные смеси держали при 98°C на протяжении 3 мин для денатурации ДНК с последующими 17 циклами амплификации при 98°C на протяжении 10 с, 48°C на протяжении 10 с и 72°C на протяжении 15 с.

Прямые праймеры со штрихкодами 1-62 были разработаны для метода слияния с использованием спейсера GA и GTGCCAGCMGCCGCGGT в качестве последовательности области связывания. Единственный использованный обратный праймер состоял из обратного адаптера, спейсера TC и последовательности области связывания GGACTACHVGGGTWTCTAA.

Мультиплексное секвенирование библиотек ампликонов проводили с использованием Ion Torrent Personal Genome Machine и наборов Ion OneTouch™ 2 200 Kit и Ion PGM™ Sequencing 200 Kit v2 с увеличением числа циклов до 535 (Thermo Fisher Scientific).

Данные, полученные при секвенировании, анализировали с использованием программного обеспечения Ion Torrent Software картированием в сравнении с известной последовательностью V4 16S для каждого из 6 видов. Для внесения поправок на глубину секвенирования общее число считываний нормализовали уменьшением анализируемых выборок до наименьшего фактического числа считываний.

Конфокальная лазерная сканирующая микроскопия.

Подповерхностные слои эмали с прикрепленными к ним биопленками погружали в PBS для отмывки от культуральной среды и неприкрепленных бактериальных клеток, после чего погружали их в 4%-ный параформальдегид на 30 мин для фиксации при комнатной температуре. Затем их погружали в PBS для удаления параформальдегида. При подготовке к гибридизации *in situ* биопленки погружали в 20%-ный акриламид с 0,02% персульфата аммония и 0,8% N,N,N',N'-тетраметилэтилендиамина (TEMED) и затем хранили в PBS при 4°C .

Полимикробные пленки подвергали флуоресцентной гибридизации *in situ* (FISH) с использованием следующих специальных видоспецифичных зондов. Зондовая последовательность ACT CCA GAC TTT CCT GAC, меченная Alexa594 на 5'-конце, позволяла выявлять *S. mutans*, AGA CGC AAT CCC CTC CTT, меченная Alexa405 на 5'-конце, позволяла выявлять *V. dispar*, ACT CTG CCG ACC ATT CTT CT, меченная Alexa647 на 5'-конце, позволяла выявлять *L. casei*, AGA GAT AGA GTT TCT CTT CGG, меченная Alexa488 на 5'-конце, позволяла выявлять *S. sanguis*, CGG TTA TCC AGA AGA AGG GG, меченная Alexa405 на 5'-конце, позволяла выявлять *A. naeslundii*, и CTA ATG GGA CGC AAA GCT CTC, меченная Alexa647 на 5'-конце, позволяла выявлять *F. nucleatum* (ThermoFisher, Австралия). Биопленки инкубировали при 46°C на протяжении 2,5 ч с гибридизационным буфером, содержащим каждый зонд, и 10%-ным формамидом, как описано ранее (Zainal-Abidin et al (2012). J Proteome Res. 11(9): 4449-4464). Гибридизованные биопленки затем погружали в отмывочный буфер (0,45 М NaCl, 20 мМ трис-HCl, 5 мМ EDTA, 0,01% SDS) на 25 мин при 48°C и подготавливали к визуализации. Биопленки визуализировали на конфокальном лазерном сканирующем микроскопе Zeiss, как описано ранее (Zainal-Abidin et al (2012). J Proteome Res. 11(9): 4449-4464), и анализировали с использованием программного обеспечения COMSTAT для определения биометрических параметров.

Сканирующая электронная микроскопия.

Образцы биопленок подготавливали к сканирующей электронной микроскопии, как описано ранее (Zainal-Abidin et al 2012 выше; Zhu et al (2013) PLoS One. 8(8): e71727).

Поперечная микрорентгенография.

Поперечную микрорентгенографию проводили, в основном, как описано ранее [Shen et al 2011]. Рентгенологические изображения повреждений эмали и соседней интактной эмали получали шестикратным сканированием и усредняли для определения денситометрического профиля деминерализованной и контрольной интактной эмали и рассчитывали профили содержания минералов в объемных процентах (об.% мин). Глубину повреждения (мкм) определяли как расстояние до точки, где содержание минералов достигает 95% соответствующего значения интактной эмали. Общую деминерализацию (integrated mineral loss, IML), представленную как ΔZ_d , рассчитывали вычислением интеграла по формуле трапеций как площадь между денситометрическим профилем интактной эмали и денситометрическим профилем деминерализованной эмали в об.% мин мкм.

Анализ ионного состава биопленок.

Содержание кальция, фосфора и олова в образцах полимикробных биопленок определяли масс-спектрометрией с индуктивно связанной плазмой, главным образом как описано ранее [Dashper et al 2005].

Статистический анализ.

Сравнение видов бактерий и параметров повреждений. Нормальность различий проверяли с применением графиков Q-Q и критерия нормальности Шапиро-Уилка, а однородность дисперсии анализировали критерием Левена. Поскольку различия по видовому составу бактерий не приближались к нормальному распределению даже после трансформации Бокса-Кокса с использованием программного обеспечения Minitab версии 17 (Minitab Inc. State College, штат Пенсильвания, США), различия доле видов анализировали с применением критерия Краскела-Уоллиса для более чем двух независимых выборок. Для оценки различий по вариантам обработки применялся апостериорный критерий суммы рангов Уилкоксона с поправкой Бонферрони (Sokal and Rohlf (1969). Biometry San Francisco: W.H. Freeman and Co.). Для определения различий в параметрах повреждений оценивали значения LD на 6 сутки по данным, трансформированным методом Бокса-Кокса, с применением однофакторного ANOVA с оценкой попарных различий с использованием апостериорных критериев Тьюки. Различия значений ΔZd на 6 сутки и значений LD и ΔZd на 12 и 19 сутки измеряли с применением критерия Краскела-Уоллиса и апостериорного критерия суммы рангов Уилкоксона с поправкой Бонферрони. Все статистические анализы проводили с использованием программного обеспечения SPSS версии 22 (IBM SPSS Inc., штат Иллинойс, США). Во всех случаях α был задан как 0,05.

Результаты.

Разработка модели полимикробной биопленки.

По данным анализа гена 16S рРНК, все шесть видов бактерий присутствовали в полимикробном инокуляте в большом количестве (табл. 5). После инокуляции при культивировании в присутствии среды из искусственной слюны (ASM) и с частым внесением сахарозы на подповерхностном слое интактной эмали зубов человека в пленочном ферментере постоянной глубины (CDFF) быстро образовывались полимикробные биопленки. В каждой временной точке во всех контрольных биологических репликатах выявлялись все шесть видов бактерий, однако количество *F. nucleatum* никогда не превышало 0,01% от общего количества присутствовавших бактерий. Количество *A. naeslundii* со временем увеличивалось от менее чем 2% на 6 сутки до более чем 18% от общего количества бактерий на 19 сутки (фиг. 3). Доля *L. casei* значительно увеличивалась по ходу эксперимента и на 19 сутки составляла в среднем 16% всей бактериальной популяции. Доля *S. sanguinis* уменьшалась с 36% всех бактерий биопленки на 6 сутки до менее чем 11% на 19 сутки. Тенденции к каким-либо очевидным изменениям доли *S. mutans* с течением времени не было, и, вероятно, доля этого вида была относительно стабильной. *S. mutans* был наиболее распространенной бактерией в биопленках, составляя от 48 до 64% всей бактериальной популяции (фиг. 3).

Деминерализация исходно интактного подповерхностного слоя зубной эмали человека была обусловлена воздействием полимикробной пленки на эмалевые блоки под действием периодического внесения сахарозы. Возникавшие повреждения эмали оставляли поверхностный слой интактным и были сходны с повреждениями эмали на ранних стадиях кариеса *in vivo* (фиг. 4). Кроме того, при сканирующей электронной микроскопии полимикробная биопленка была сходна по своей структуре с наддесневым налетом (фиг. 4). После исходного периода задержки образование повреждений прогрессировало линейным образом со средней постоянной скоростью деминерализации с 6 суток по 19 сутки 225,1 об.% мин мкг/сутки (фиг. 4). На 19 сутки средняя глубина повреждений составляла 87,1 плюс/минус 8,4 мкм при средней общей деминерализации (ΔZd) 3575,6 плюс/минус 562,0 об.% мин мкг (табл. 6).

Таблица 6. Влияние SnF₂, CPP-ACP и CPP-ACP/SnF₂ на общую деминерализацию (ΔZd) и глубину повреждений (LD) подповерхностного слоя зубной эмали в модели кариеса с полимикробной биопленкой

Группа	6 сутки		12 сутки		19 сутки	
	ΔZd (об. % мин.мкг)	LD (мкм)	ΔZd (об. % мин.мкг)	LD (мкм)	ΔZd (об. % мин.мкг)	LD (мкм)
Контроль	641,5 ± 139,0 ^a	18,0 ± 3,0 ^{ab}	2155,2 ± 407,2 ^{abc}	49,9 ± 8,0 ^{abc}	3575,6 ± 562,0 ^{abc}	87,1 ± 8,4 ^{abc}
CPP-ACP	572,9 ± 97,80	15,0 ± 2,1 ^a	1075,3 ± 148,0 ^{ad}	26,3 ± 4,4 ^{ade}	2105,4 ± 346,2 ^{bd}	52,3 ± 3,2 ^{ad}
SnF ₂	636,7 ± 129,4	17,6 ± 1,2 ^c	1352,1 ± 147,3 ^{bde}	37,1 ± 5,3 ^{bdf}	2096,3 ± 66,7 ^{ae}	46,1 ± 4,7 ^{be}
CPP-ACP + SnF ₂	552,6 ± 109,2 ^a	14,3 ± 2,6 ^{bc}	1091,3 ± 138,2 ^{ce}	28,9 ± 1,9 ^{cef}	1395,5 ± 263,2 ^{cde}	38,0 ± 3,4 ^{cde}

6 сутки: те же надстрочные индексы в столбце LD указывают на значимые различия; (^{ac} p менее 0,05; ^b p менее 0,001): тот же надстрочный индекс в столбце ΔZd указывает на значимое различие (^a p менее 0,05). Все другие различия незначимы (p более 0,05).

12 сутки: те же надстрочные индексы в столбце указывают на значимые различия. LD - все различия значимы (p менее 0,05). ΔZd - все различия значимы (p менее 0,05), за исключением различия между CPP-ACP и CPP-ACP+SnF₂ (p более 0,05).

19 сутки: те же надстрочные индексы в столбце указывают на значимые различия - LD и ΔZd - все различия значимы (p менее 0,05), за исключением различия между SnF₂ и CPP-ACP (p более 0,05).

Влияние SnF₂ и CPP-ACP на состав полимикробной биопленки На 19 сутки обработка полимикробной биопленки SnF₂ два раза в сутки значимо снижала содержание *A. naeslundii* и повышала содержание *S. sanguinis* по сравнению с контролем (фиг. 5, табл. 7). Обработка полимикробной пленки CPP-ACP два раза в сутки приводила к более существенным изменениям состава полимикробной пленки, особенно к 19 суткам после инокуляции. Несмотря на то, что доли *S. mutans* и *V. parvula* были относительно постоянными, доля *L. casei* значительно уменьшалась, а доли *S. sanguinis* и *F. nucleatum* значимо увеличивались по сравнению с контролем (фиг. 5). Наибольшие изменения относительного содержания соответствовали уменьшению количества *L. casei* более чем на 95%, в то время как *F. nucleatum* продемонстрировала наибольшее среднее повышение, составившее 355% на 19 сутки (фиг. 5B, табл. 7). Комбинация CPP-ACP и SnF₂ оказывала более выраженное влияние на бактериальный состав полимикробной биопленки (фиг. 5 и табл. 7). Было отмечено существенное уменьшение количества кислотообразующих и кислотоустойчивых видов *S. mutans*, *A. naeslundii* и *L. casei*, а также *V. parvula*. Доля кислотоустойчивого вида *F. nucleatum* значительно возрастала, достигая 34% от общего количества бактерий, что сделало этот вид вторым по распространенности в полимикробной биопленке, а содержание *S. sanguinis* также увеличивалось на 50%. Во всех обработанных биопленках все шесть видов бактерий поддавались выявлению во всех временных точках. Конфокальная лазерная сканирующая микроскопия полимикробной биопленки, обработанной CPP-ACP/SnF₂ с использованием специфичных красителей для четырех видов бактерий, подтвердила, что *F. nucleatum* стала основным компонентом сообщества (фиг. 5).

Таблица 7. Влияние четырех вариантов обработки на бактериальный видовой состав как процент от общего количества бактерий в биопленке

Лечение	<i>A. naeslundii</i>	<i>F. nucleatum</i>	<i>L. casei</i>	<i>S. mutans</i>	<i>S. sanguinis</i>	<i>V. parvula</i>
Контроль	18,11 ± 8,96 ^{*a}	0,01 ± 0,01 ^{ab}	16,21 ± 13,64 ^{ab}	48,56 ± 15,23	10,37 ± 5,79 ^{ab}	6,75 ± 4,12 ^a
SnF ₂ /NaF	5,54 ± 1,74 ^{abc}	0,02 ± 0,01 ^{cd}	10,67 ± 6,92 ^{cd}	59,82 ± 4,59 ^a	17,47 ± 3,44 ^a	6,50 ± 1,48 ^b
CPP-ACP	11,93 ± 2,34 ^b	2,43 ± 1,21 ^{ace}	0,38 ± 0,23 ^{ac}	58,70 ± 5,47 ^b	19,85 ± 2,86 ^{bc}	6,71 ± 0,89 ^c
CPP-ACP+ SnF ₂ /NaF	9,76 ± 2,01 ^c	34,13 ± 4,88 ^{bcde}	0,18 ± 0,07 ^{bd}	37,95 ± 2,64 ^{ab}	15,61 ± 1,76 ^c	2,37 ± 0,45 ^{abc}
Общее p-значение	< 0,001	< 0,001	< 0,001	0,004	< 0,001	0,019

* среднее плюс/минус стандартное отклонение. Доля видов бактерий в полимикробной биопленке после четырех вариантов обработки на 19 сутки;
^{abcde} те же надстрочные индексы в столбце указывают на значимые различия (p менее 0,05), n равно 5-21.

Все сравнения вариантов обработки проводили с применением критерия Краскела-Уоллиса (см. общее p-значение), а попарные различия вариантов обработки оценивали с применением апостериорного критерия суммы рангов Уилкоксона с поправкой Бонферрони.

Влияние препарата SnF₂ и CPP-ACP на деминерализацию эмали.

Обработка полимикробной биопленки SnF₂ приводила к значительному снижению скорости деминерализации в период с 6 суток по 19 сутки на 50,2% до 112,1 об.% мин мкм/сутки (табл. 6). Это снижение статистически не отличалось от снижения, отмеченного при обработке CPP-ACP, которая также приводила к значительному снижению скорости деминерализации на 50,2% (112,1 об.% мин мкм/сутки) за тот же период времени. Тем не менее, при комбинированной обработке SnF₂/CPP-ACP снижение скорости деминерализации до 64,1 об.% мин мкм/сутки было значимо больше (72%) (табл. 6). Анализ биопленок посредством ICP-MS продемонстрировал четырехкратное повышение содержания кальция и трехкратное повышение содержания фосфора при использовании CPP-ACP вместе с SnF₂. Интересно, что обработка SnF₂ приводила к двукратному повышению содержания кальция в сравнении с контролем. Как при обработке SnF₂, так и при обработке CPP-ACP-SnF₂ максимальная концентрация олова составляла 1,0 нмоль на мг невысушенной биопленки. Однако при обработке CPP-ACP-SnF₂ эта концентрация достигалась раньше.

Обсуждение.

В шестивидовых бактериальных сообществах в форме биопленок, полученных в CDFF при внесении сахарозы четыре раза в сутки, преобладали кислотопродуцирующие и кислотоустойчивые, и поэто-

му более кариогенные, виды *S. utans*, *A. naeslundii* и *L. casei*, которые, вместе взятые, составляли 85% полимикробной биопленки на 19 сутки. Их доля возрастала с 55% на 6 сутки. При анализе долей *A. naeslundii* и *L. casei* в контрольной биопленке было отмечено их увеличение с 2,5% общего количества бактерий на 6 сутки до 34% на 19 сутки (фиг. 3). Это указывает на сильно закисленную и кариогенную среду и согласуется с низкими уровнями нейтрофильного вида *F. nucleatum* и высокой, постоянной и воспроизводимой скоростью деминерализации в данной модели (фиг. 4).

После подтверждения воспроизводимости данной модели были изучены эффекты внесения 290 м.д. фторида в форме смеси SnF_2 (220 м.д. F):NaF (70 м.д. F) два раза в сутки, что было выбрано как аналог пятикратного разведения используемых на сегодняшний день средств для чистки зубов с SnF_2/NaF , содержащих 1450 м.д. F, в слюне. В данном исследовании при обработке SnF_2 относительное содержание *A. naeslundii* в полимикробной биопленке существенно снижалось, а содержание *S. sanguinis* существенно возрастало. Sn накапливалось в полимикробных биопленках в концентрации до 119 м.д. За 19 суток применения SnF_2 два раза в сутки он снижал скорость деминерализации эмали в данном исследовании на 50%, что, вероятно, связано с действием ионов F, стимулирующих реминерализацию.

Внесение CPP-ACP не только существенно снижало скорость деминерализации на 50%, но также препятствовало увеличению доли *L. casei*, обладающей выраженными кислотопродуцирующими свойствами. Кроме того, было отмечено воспроизводимое повышение содержания кислоточувствительных и полезных симбионтов *F. nucleatum* и *S. sanguinis* (фиг. 5, табл. 7). Это показывает, что CPP-ACP оказывает пребиотический эффект на развитие биопленки в данной модели.

Отмеченный усиленный пребиотический эффект CPP-ACP и SnF_2 на бактериальный состав полимикробной биопленки приводил к снижению содержания всех трех кислотопродуцирующих и кислотоустойчивых видов. Содержание *V. parvula* также снижалось, что может указывать на уменьшение количества лактата из-за ингибирования гликолиза, и основным компонентом биопленки стала *F. nucleatum*. Эти изменения сопровождалось значительным снижением скорости деминерализации эмали на 72%, что может привести к значительному улучшению состояния полости рта. Аддитивный пребиотический эффект SnF_2 и CPP-ACP был связан со способностью ионов олова (Sn^{2+}) к перекрестному связыванию с CPP-ACP и повышению эффективности доставки этого пребиотика в полимикробную биопленку и на поверхности полости рта и зубов, что продемонстрировано в Примере 3.

Следует понимать, что изобретение, раскрытое и определенное в данном описании, охватывает все альтернативные комбинации двух или более отдельных признаков, указанных или очевидных из представленного текста или графических материалов. Все эти различные комбинации составляют различные альтернативные аспекты изобретения.

ФОРМУЛА ИЗОБРЕТЕНИЯ

1. Способ увеличения количества комменсальных бактерий полости рта на участке полости рта у индивида, включающий введение комплекса аморфного фосфата кальция (CPP-ACP), стабилизированного казеиновым фосфопептидом, и/или комплекса аморфного фторида-фосфата кальция (CPP-ACFP), стабилизированного казеиновым фосфопептидом, в полость рта индивида, приводящее к увеличению количества комменсальных бактерий полости рта на участке полости рта.

2. Способ по п.1, где комменсальные бактерии полости рта могут представлять собой любой один или более чем один вид, экспрессирующий аргининдезимиразу и/или нитратредуктазу.

3. Способ по п.2, где бактерии представляют собой любое одно или более из *Corynebacterium durum*, *Rothia dentocariosa*, *Streptococcus mitis*, *Streptococcus sanguinis* и *Fusobacterium nucleatum*.

4. Способ по любому из пп.1-3, который дополнительно уменьшает количество патогенных бактерий на участке полости рта.

5. Способ по п.4, где патогенные бактерии полости рта могут представлять собой любую одну или более чем одну бактерию, ассоциированную с воспалением десен, гингивитом, хроническим гингивитом или заболеванием периодонта.

6. Способ по п.5, где патогенные бактерии полости рта являются кислотообразующими, и/или кислотоустойчивыми, и/или провоспалительными.

7. Способ по п.4 или 5, где патогенные бактерии полости рта представляют собой любую одну или более чем одну бактерию, выбранную из *Streptococcus mutans*, *Actinomyces naeslundii*, *Veillonella parvula*, *Lactobacillus casei*, *Porphyromonas gingivalis*, *Tannerella forsythia*, *Treponema denticola*, *Leptotrichia wadei*, *Leptothrichia shahii*, *Leptotrichia buccalis* и *Lautropia mirabilis*.

8. Способ лечения болезненного состояния десен, выбранного из дисбиоза полости рта, воспаления десен, гингивита и периодонтита, у индивида, нуждающегося в этом, включающий введение комплекса аморфного фосфата кальция (CPP-ACP), стабилизированного казеиновым фосфопептидом, и/или комплекса аморфного фторида-фосфата кальция (CPP-ACFP), стабилизированного казеиновым фосфопептидом, в полость рта индивида, приводящее к лечению указанного болезненного состояния.

9. Способ по п.8, дополнительно включающий начальную стадию идентификации индивида либо с дисбиозом полости рта, воспалением десен, гингивитом, либо периодонтитом.

10. Способ по любому из пп.1-9, дополнительно включающий проведение стоматологической процедуры перед введением комплекса аморфного фосфата кальция (CPP-ACP), стабилизированного казеиновым фосфопептидом, и/или комплекса аморфного фторида-фосфата кальция (CPP-ACFP), стабилизированного казеиновым фосфопептидом, в полость рта индивида.

11. Способ по п.10, где стоматологическая процедура выбрана из санации полости рта, удаления зубного камня, сглаживания корней и любой другой процедуры удаления поддесневых или наддесневых бактерий.

12. Способ по любому из пп.1-11, где комплекс включен в любую из следующих композиций: зубные пасты, зубные порошки и жидкие средства для чистки зубов, жидкости для полоскания рта, жидкости для промывания полости рта, спреи для полости рта, стоматологический лак, стоматологический цемент, пастилки, жевательные резинки, стоматологические пасты, кремы для массажа десен, таблетки для полоскания рта, молочные продукты и другие продукты питания.

13. Применение комплекса аморфного фосфата кальция (CPP-ACP), стабилизированного казеиновым фосфопептидом, и/или комплекса аморфного фторида-фосфата кальция (CPP-ACFP), стабилизированного казеиновым фосфопептидом, для увеличения количества комменсальных бактерий полости рта на участке полости рта у индивида, нуждающегося в этом.

14. Применение по п.13, дополнительно уменьшающее количество патогенных бактерий полости рта на участке полости рта у индивида, нуждающегося в этом.

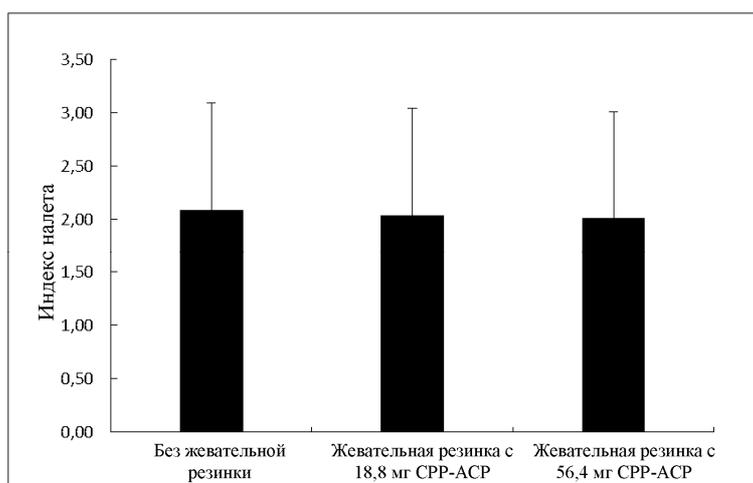
15. Применение комплекса аморфного фосфата кальция (CPP-ACP), стабилизированного казеиновым фосфопептидом, и/или комплекса аморфного фторида-фосфата кальция (CPP-ACFP), стабилизированного казеиновым фосфопептидом, в лечении болезненного состояния десен, где это болезненное состояние выбранно из дисбиоза полости рта, воспаления десен, гингивита и хронического гингивита.

16. Применение комплекса аморфного фосфата кальция (CPP-ACP), стабилизированного казеиновым фосфопептидом, и/или комплекса аморфного фторида-фосфата кальция (CPP-ACFP), стабилизированного казеиновым фосфопептидом, в изготовлении лекарственного средства для увеличения количества комменсальных бактерий полости рта на участке полости рта у индивида, нуждающегося в этом.

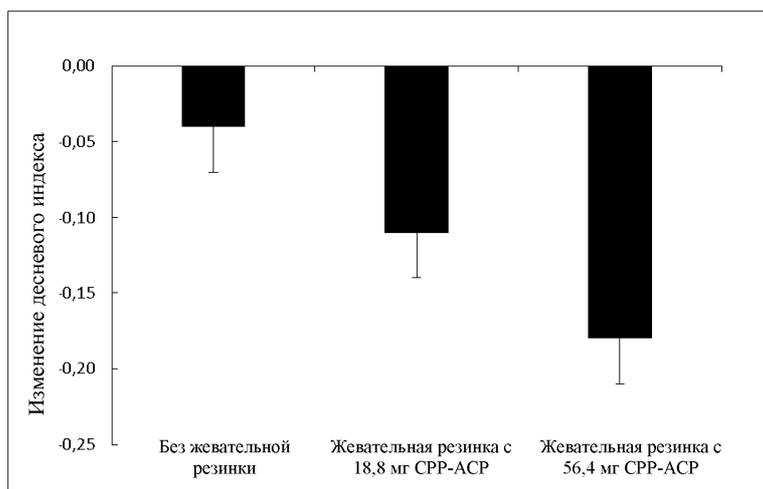
17. Применение по п.16, дополнительно уменьшающее количество патогенных бактерий полости рта на участке полости рта у индивида, нуждающегося в этом.

18. Применение комплекса аморфного фосфата кальция (CPP-ACP), стабилизированного казеиновым фосфопептидом, и/или комплекса аморфного фторида-фосфата кальция (CPP-ACFP), стабилизированного казеиновым фосфопептидом, в изготовлении лекарственного средства для лечения болезненного состояния десен, где это болезненное состояние выбранно из дисбиоза полости рта, воспаления десен, гингивита и хронического гингивита.

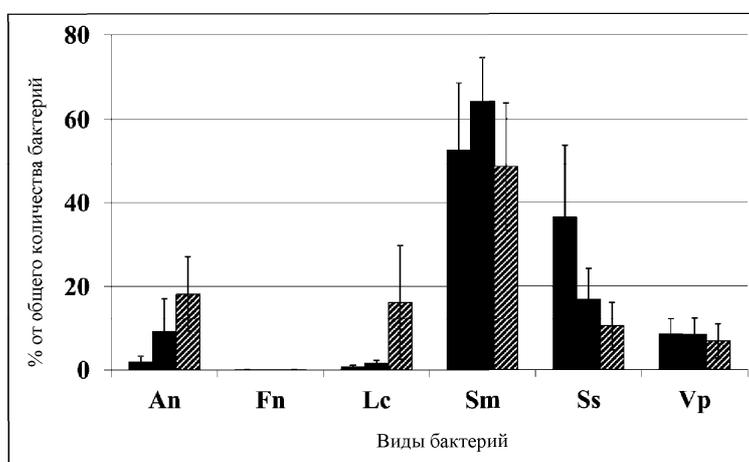
19. Применение по любому из пп.16-18, где комплекс включен в любую из следующих композиций: зубные пасты, зубные порошки и жидкие средства для чистки зубов, жидкости для полоскания рта, жидкости для промывания полости рта, спреи для полости рта, стоматологический лак, стоматологический цемент, пастилки, жевательные резинки, стоматологические пасты, кремы для массажа десен, таблетки для полоскания рта, молочные продукты и другие продукты питания.



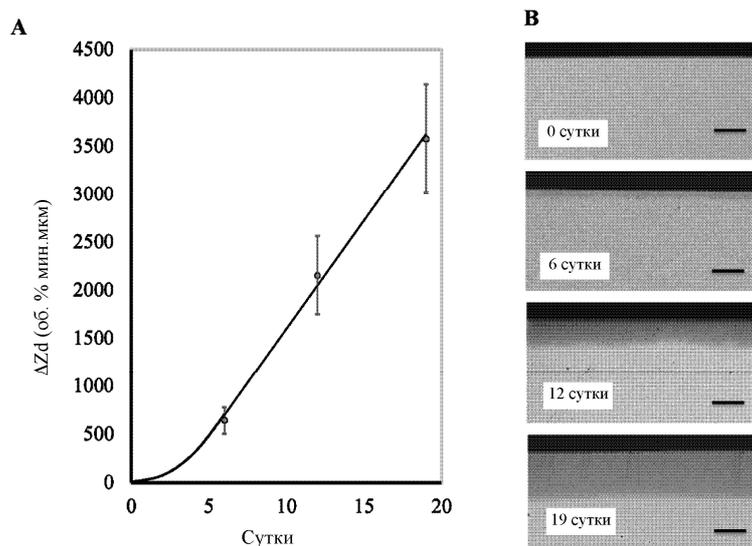
Фиг. 1



Фиг. 2

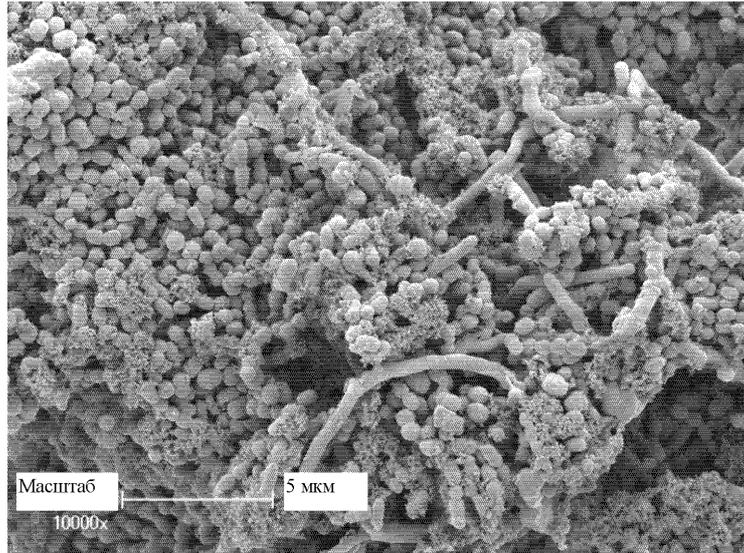


Фиг. 3

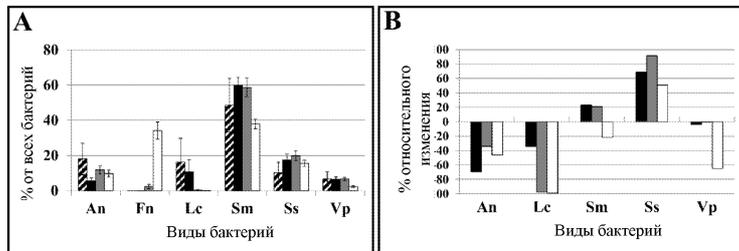


Фиг. 4А, В

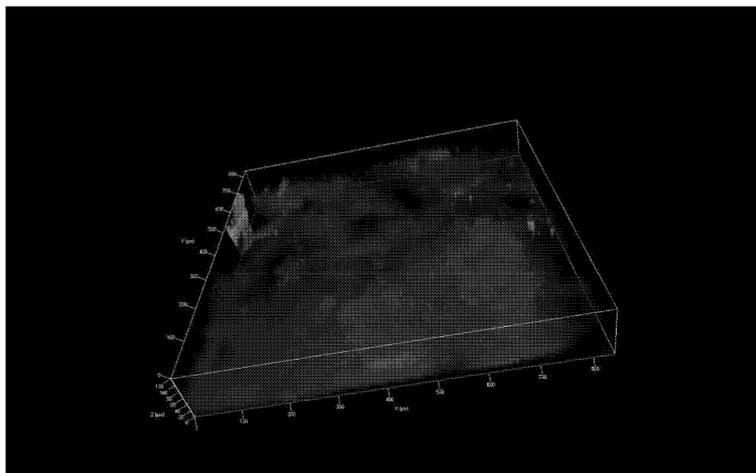
С



Фиг. 4С



С



Фиг. 5



Евразийская патентная организация, ЕАПВ

Россия, 109012, Москва, Малый Черкасский пер., 2