



(12) 发明专利申请

(10) 申请公布号 CN 112618802 A

(43) 申请公布日 2021.04.09

(21) 申请号 202011424135.2

A61L 31/16 (2006.01)

(22) 申请日 2020.12.08

A61C 7/08 (2006.01)

(71) 申请人 南方医科大学口腔医院

地址 510288 广东省广州市海珠区江南大道南366号

(72) 发明人 张超 代丹妮 陈培铭 王健蓉 何龙文 邵龙泉

(74) 专利代理机构 广州粤高专利商标代理有限公司 44102

代理人 冯振宁

(51) Int. Cl.

A61L 31/10 (2006.01)

A61L 31/08 (2006.01)

A61L 31/06 (2006.01)

A61L 31/14 (2006.01)

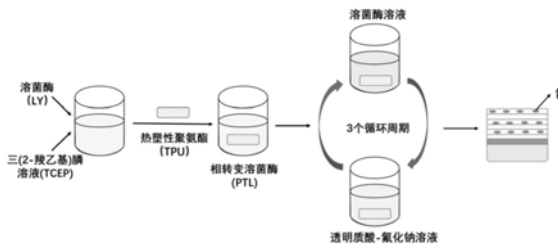
权利要求书1页 说明书6页 附图2页

(54) 发明名称

一种改善牙釉质脱矿的含氟抗菌隐形矫治器及其制备方法

(57) 摘要

本发明公开了一种改善牙釉质脱矿的含氟抗菌隐形矫治器及其制备方法,该矫治器可有效释放氟,促进脱矿牙面再矿化,且抗菌性能良好稳定,具有良好的生物相容性与理想的外观。本发明通过层层自主装法固定溶菌酶和含氟透明质酸,得到兼具溶菌酶抗菌性能和氟的促再矿化性能的含氟抗菌隐形矫治器,且溶菌酶和透明质酸生物相容性好、成本低和效率高。本发明制作的含氟抗菌矫治器可促进牙釉质再矿化,亦可抑制与细菌相关的牙龈炎、龋病、牙髓病、牙周炎的发生发展,且制备过程简易高效无污染,具有广阔的临床应用前景。



1. 一种改善牙釉质脱矿的含氟抗菌隐形矫治器,其特征在于,其制备方法包括以下步骤:

S1. 将基材浸泡在含还原剂和溶菌酶的混合溶液中,得到表面具有相转变溶菌酶的基材,洗涤干燥;

S2. 将表面具有相转变溶菌酶的基材浸泡于含氟化物的带负电生物大分子溶液中,洗涤干燥;

S3. 将上述所得基材浸泡于溶菌酶溶液中,洗涤干燥后,再次浸泡于含氟化物的带负电生物大分子溶液中;

S4. 重复步骤S3的操作3~7次,干燥后得含氟抗菌隐形矫治器;

其中,步骤S2和步骤S3所述带负电生物大分子溶液中,氟化物的浓度为0.5~2.0mg/L。

2. 根据权利要求1所述含氟抗菌隐形矫治器,其特征在于,步骤S2和步骤S3所述带负电生物大分子溶液中,氟化物的浓度为1.0~2.0mg/L。

3. 根据权利要求1所述含氟抗菌隐形矫治器,其特征在于,步骤S2和步骤S3所述带负电生物大分子溶液中,氟化物为氟化钙或氟化钠。

4. 根据权利要求1所述含氟抗菌隐形矫治器,其特征在于,步骤S2和步骤S3所述带负电生物大分子溶液中,带负电生物大分子为透明质酸。

5. 根据权利要求1所述含氟抗菌隐形矫治器,其特征在于,步骤S2和步骤S3所述带负电生物大分子溶液中,带负电生物大分子溶液浓度为0.5~2mg/mL。

6. 根据权利要求1所述含氟抗菌隐形矫治器,其特征在于,步骤S3中所述溶菌酶溶液的浓度为0.5~2mg/mL。

7. 根据权利要求1所述含氟抗菌隐形矫治器,其特征在于,步骤S1中所述混合溶液pH为6~8。

8. 根据权利要求1所述含氟抗菌隐形矫治器,其特征在于,步骤S1中所述混合溶液中还原剂浓度为30~60mmol/L。

9. 根据权利要求1所述含氟抗菌隐形矫治器,其特征在于,步骤S1中所述混合溶液中溶菌酶浓度为2~20mg/mL。

10. 根据权利要求1所述含氟抗菌隐形矫治器,其特征在于,步骤S4重复步骤S3的操作3次。

## 一种改善牙釉质脱矿的含氟抗菌隐形矫治器及其制备方法

### 技术领域

[0001] 本发明属于材料改性及口腔医学技术领域。更具体地,涉及一种改善牙釉质脱矿的含氟抗菌隐形矫治器及其制备方法。

### 背景技术

[0002] 隐形矫治器由于可自行摘戴、便于清洁、美观、舒适等优点,现已逐渐成为主流矫治手段之一。然而,随着佩戴隐形矫治器患者群体的扩大,隐形矫治所带来的并发症亦逐渐显露,例如隐形矫治器包裹牙面面积大且佩戴时间长,可影响口腔微环境使菌群丰度显著增加;隐形矫治器的附件粘接过程中对牙面的酸蚀及附件周围的粗糙表面亦可引起菌斑堆积;在口腔卫生控制不佳时,菌斑大量堆积在矫治器与牙面形成的相对密闭空间中,从而增加牙龈炎、釉质脱矿、甚至牙髓病和牙周病的风险,尤其是自我约束力和自我口腔健康意识较差的青少年人群。研究表明缺乏健康指导和口腔卫生干预的青少年患者在佩戴隐形矫治器后,牙釉质脱矿发生率高于60%。

[0003] 迄今为止,已经报道许多具有抗菌作用的矫治器以用于防治矫治过程中细菌引起的相关疾病,如中国专利申请201110192472.8公开了一种射频磁控溅射法在金属托槽表面附着掺氮TiO<sub>2</sub>-xN<sub>x</sub>薄膜的方法,但该方法反应温度高,难以在隐形矫治器中推广;中国专利申请201911357625.2提供了一种在隐形矫治器上制作银掺杂二氧化钛纳米抗菌复合涂层的方法,但使用的磁控溅射离子镀设备价格昂贵且程序复杂,而且由于无机纳米材料的引入,难以保证矫治器良好的生物相容性;中国专利申请202010062403.4提供的由叔铵化和原位季铵化形成的抗菌隐形矫治器,虽然避免了抗菌剂释放进入人体代谢而影响生物安全性,但接枝基团仍为外源性物质,与理想的生物相容性仍存在差距,且制作过程涉及多种化学反应,步骤较为复杂。然而,上述公开的抗菌矫治器产品的制作方法存在设备昂贵、操作复杂、成本较高等缺点,且采用的抗菌原材料为生物相容性欠佳的无机金属及其复合物。此外,以上技术只考虑了抗菌问题而未涉及促进牙釉质矿化层面,功能单一,无法全面满足消费者的需求。因此,急需设计一种制作简便、生物安全性好、抗菌效果持久稳定且可以促进脱矿牙面再矿化的隐形矫治器。

### 发明内容

[0004] 本发明旨在为龋病易感患者提供一种改善牙釉质脱矿的含氟抗菌隐形矫治器。该含氟抗菌隐形矫治器可有效释放氟离子,促进脱矿牙面再矿化,且抗菌性能良好稳定,可用于改善牙釉质脱矿水平并防治隐形矫治过程中与菌斑相关性疾病。

[0005] 本发明的目的是提供一种改善牙釉质脱矿的含氟抗菌隐形矫治器。

[0006] 本发明的另一目的是提供一种改善牙釉质脱矿的含氟抗菌隐形矫治器制备方法。

[0007] 本发明上述目的通过以下技术方案实现:

[0008] 一种改善牙釉质脱矿的含氟抗菌隐形矫治器,其制备方法包括以下步骤:

[0009] S1.将基材浸泡在含还原剂和溶菌酶的混合溶液中,得到表面具有相转变溶菌酶

的基材,洗涤干燥;

[0010] S2.将表面具有相转变溶菌酶的基材浸泡于含氟化物的带负电生物大分子溶液中,洗涤干燥;

[0011] S3.将上述所得基材浸泡于溶菌酶溶液中,洗涤干燥后,再次浸泡于含氟化物的带负电生物大分子溶液中;

[0012] S4.重复步骤S3的操作3~7次,干燥后得含氟抗菌隐形矫治器;

[0013] 其中,步骤S2和步骤S3所述带负电生物大分子溶液中,氟化物的浓度为0.5~2mg/L。

[0014] 溶菌酶是人体先天免疫的基础,生物相容性高,可参与维持口腔环境的稳态,而带负电的生物大分子和氟化物在临床中已经广泛使用,氟化物不仅可以防止牙釉质脱矿,还可以促进其再矿化。本发明通过静电作用力可将带负电荷的含氟生物大分子和带正电的溶菌酶层层堆积于相转变溶菌酶,该方法一方面可固定天然抗菌成分溶菌酶,另一方面固定了可有效释放氟离子的带负电生物大分子,从而得到一种具有改善牙面脱矿作用的含氟抗菌隐形矫治器。

[0015] 上述步骤S1中得到表面具有相转变溶菌酶的基材的方法是本领域技术人员熟知的方法,例如发明专利申请CN 105039953 A中已经公开详细的方法。

[0016] 优选地,步骤S1中所述混合溶液pH为6~8,浸泡温度为15~30℃。

[0017] 优选地,步骤S1中所述还原剂浓度为30~60mmol/L。

[0018] 更优选地,步骤S1中所述还原剂浓度为50mmol/L。

[0019] 优选地,步骤S1中所述溶菌酶浓度为2~20mg/mL。

[0020] 更优选地,步骤S1中所述溶菌酶浓度为10mg/mL。

[0021] 相转变溶菌酶可以提供丰富的正电荷和C-H键,有利于进一步结合含氟化物的带负电生物大分子溶液。

[0022] 优选地,步骤S2和步骤S3所述带负电生物大分子溶液中,氟化物为氟化钙或氟化钠。

[0023] 更优选地,步骤S2和步骤S3所述带负电生物大分子溶液中,氟化物为氟化钠。

[0024] 由于氟浓度过高对人体健康有害,因此步骤S2和步骤S3所述带负电生物大分子溶液中,氟化物的浓度为0.5~2mg/L。

[0025] 优选地,步骤S2和步骤S3所述带负电生物大分子溶液中,氟化物的浓度为1.0~2.0mg/L。

[0026] 本发明含氟化物的带负电生物大分子溶液的制备方法为:将带负电生物大分子粉末加入0.2%冰醋酸溶液,搅拌至完全溶解,得到带负电生物大分子溶液,再加氟化物粉末,直至粉末完全溶解,最终配制成含氟化物的带负电生物大分子溶液。发明人研究发现,透明质酸具有良好生物相容性,且能有效负载氟化物,而其他带负电生物大分子,例如海藻酸,其制备的水溶液具有较高的黏度,易形成水凝胶而增加制备难度;卵清蛋白虽然具有良好生物相容性,但不能用于负载或释放氟。因此,本发明步骤S2和步骤S3所述带负电生物大分子溶液中,带负电生物大分子优选为透明质酸。

[0027] 优选地,步骤S2和步骤S3所述带负电生物大分子溶液中,带负电生物大分子溶液浓度为0.5~2mg/mL。

[0028] 由于亲水性表面抗细菌黏附能力比疏水性表面更强,因此本发明通过在基材表面引入透明质酸和溶菌酶,增加基材表面的氨基(-NH<sub>2</sub>)、羧基(-COOH),从而提高基材的亲水性,提高含氟抗菌隐形矫治器的抗菌效果。

[0029] 优选地,步骤S3中所述溶菌酶溶液的浓度为0.5~2mg/mL。

[0030] 考虑亲水性和操作复杂性之间的平衡,优选地,步骤S4重复步骤S3的操作3次,操作次数与形成的层数相关,对释放氟的性能有影响。发明人研究发现,经过3次后,形成组装3个溶菌酶和含氟化物带负电生物大分子的双分子层,且最外层为含氟化物带负电生物大分子的含氟抗菌矫治器,其释放氟的效果最好。

[0031] 与现有技术相比,本发明具有以下有益效果:

[0032] 本发明提供了一种改善牙釉质脱矿的含氟抗菌隐形矫治器,该矫治器可有效释放氟离子,促进脱矿牙面再矿化,且抗菌性能良好稳定,具有良好的生物相容性和理想的外观。本发明以相转变溶菌酶为基层,通过层层堆积法和静电作用力,将溶菌酶和含氟透明质酸固定于基体表面,获得具有良好稳定抗菌和有效释放氟效果的含氟抗菌隐形矫治器,且制备工艺简单、原材料便宜易得、所需种类较少、成本低和效率高等。因此,本发明的含氟抗菌隐形矫治器可改善牙釉质脱矿水平,亦可防治正畸治疗过程中的牙龈炎、龋病、牙髓病、牙周病等与细菌相关的口腔疾病,且制备过程简易、高效无污染,具有广阔的临床应用前景。

## 附图说明

[0033] 图1为本发明含氟抗菌隐形矫治器的制备工艺图;

[0034] 图2为本发明含氟抗菌隐形矫治器的长效抗菌试验结果图;

[0035] 图3为本发明含氟抗菌隐形矫治器的促再矿化试验结果图。

## 具体实施方式

[0036] 以下结合说明书附图和具体实施例来进一步说明本发明,但实施例并不对本发明做任何形式的限定。除非特别说明,本发明采用的试剂、方法和设备为本技术领域常规试剂、方法和设备。

[0037] 除非特别说明,以下实施例所用试剂和材料均为市购。

[0038] 实施例1

[0039] 1. 热塑性聚氨酯表面相转变溶菌酶薄膜的制备

[0040] 在室温下,首先配制10mM,pH为7.4的4-羟乙基哌嗪乙磺酸(HEPES)溶液作为溶剂,然后分别配制成10mg/ml的溶菌酶溶液(10mM的HEPES溶液,溶液pH7.4)和50mM的三(2-羧乙基)膦(TCEP)溶液(10mM的HEPES溶液,溶液pH6.2),将等体积的溶菌酶和TCEP溶液混合均匀制备相转变溶菌酶(PTL)。将热塑性聚氨酯(TPU)浸泡在相转变溶菌酶溶液中,在潮湿的环境中孵育2个小时后,用无菌去离子水冲洗TPU基材表面以洗去残留物质,N<sub>2</sub>吹干,将获得的样品简记为TPU-PTL,放置在无菌培养皿中用保鲜膜封住备用。

[0041] 2. 含氟透明质酸及溶菌酶溶液的配置

[0042] 透明质酸(HA)溶液的配置:将0.69mL冰醋酸和19.31mL去离子水倒入烧杯,磁力搅拌配制成0.2%的冰醋酸溶液,将0.06g的透明质酸钠粉末放入配置好的溶液中,磁力搅拌

至透明质酸钠粉末完全溶解,即配制成为1mg/mL的透明质酸(HA)溶液。

[0043] 含氟透明质酸(HA/NaF)溶液的配制:电子天平分别称取三份不同质量的氟化钠(NaF)粉末,将上述配好的1g/L的透明质酸溶液分为三组,以透明质酸溶液为溶剂,在磁力搅拌器的搅拌下往烧杯中分别加入不同质量的氟化钠粉末,直至粉末完全溶解,最终配制成为三组浓度为0.5mg/L、1mg/L、2mg/L的含氟透明质酸(HA/NaF)溶液。

[0044] 溶菌酶溶液的配制:电子天平称取溶菌酶粉末加入去离子水配置为1mg/mL的溶菌酶溶液,加入0.05M的氯化钠以保持离子强度。

[0045] 3.含氟抗菌矫治器的制备

[0046] 此前制得的TPU-PTL具备一层稳定带正电荷薄膜,以此作为层层自组装的启动基础。在室温下,将样品TPU-PTL浸入浓度为0.5mg/L的氟化钠透明质酸溶液(HA/NaF)中30min,表面即吸附了一层带负电荷的薄膜,取出样品,用醋酸洗涤,真空干燥后,再将样品置入1mg/mL溶菌酶溶液(LY)中浸泡30min,表面再次吸附了一层带正电荷的薄膜,用无菌去离子水洗涤。LY和HA/NaF分别作为一个单层,LY-HA/NaF作为一个双层,如此循环操作3次,得到由三个双层组成的多层聚电解质复合涂层,其中最外层为HA/NaF,干燥后即可得到含氟抗菌矫治器。

[0047] 实施例2

[0048] 取实施例1制得的TPU-PTL作为层层自组装的启动基础。在室温下,将样品TPU-PTL浸入浓度为1mg/L的氟化钠透明质酸溶液(HA/NaF)中30min,表面即吸附了一层带负电荷的薄膜,取出样品,用醋酸洗涤,真空干燥后,再将样品置入1mg/mL溶菌酶溶液(LY)中浸泡30min,表面再次吸附了一层带正电荷的薄膜,用无菌去离子水洗涤。LY和HA/NaF分别作为一个单层,LY-HA/NaF作为一个双层,如此循环操作3次,得到由三个双层组成的多层聚电解质复合涂层,其中最外层为HA/NaF,干燥后即可得到含氟抗菌矫治器。

[0049] 实施例3

[0050] 取实施例1制得的TPU-PTL作为层层自组装的启动基础。在室温下,将样品TPU-PTL浸入浓度为2mg/L的氟化钠透明质酸溶液(HA/NaF)中30min,表面即吸附了一层带负电荷的薄膜,取出样品,用醋酸洗涤,真空干燥后,再将样品置入1mg/mL溶菌酶溶液(LY)中浸泡30min,表面再次吸附了一层带正电荷的薄膜,用无菌去离子水洗涤。LY和HA/NaF分别作为一个单层,LY-HA/NaF作为一个双层,如此循环操作3次,得到由三个双层组成的多层聚电解质复合涂层,其中最外层为HA/NaF,干燥后即可得到含氟抗菌矫治器。

[0051] 实验例1长效性抗菌验证

[0052] 1.配制培养基:取两个最大刻度为400mL的干净玻璃瓶为容器,按照琼脂(Agar)20g/L的浓度配制。称取琼脂8g倒入装有一个400mL去离子水的干净玻璃瓶,用干净的玻璃棒搅匀直至粉末完全溶解,溶液呈透明状。将配好后的培养基进行高温高压蒸汽灭菌消毒后(120℃,1h),培养基待冷却至室温,用封口胶封好,最后放入4℃冰箱保存。

[0053] 2.建立金黄色葡萄球菌模型:取出在-20℃保存的金黄色葡萄球菌菌种,复苏,置于37℃恒温箱中24h。将上述已复苏的金黄色葡萄球菌菌液离心(4℃,10000rpm,10min),用无菌生理盐水洗涤沉淀物2次,离心后调整菌悬液的浓度约为 $5 \times 10^7 \sim 5 \times 10^8$ CFU/mL。分别取1mL的菌悬液加入装有人工唾液的50个小锥形瓶中,随机分成两组,每组25个。

[0054] 建立抗菌样品模型:取25个实施例1制备的含氟抗菌隐形矫治器和25个普通隐形

矫治器分为两组分别浸泡在含有菌悬液人工唾液的小锥形瓶中,然后放置在37℃恒温箱中,在预定的时间点(1、3、5、7、14天)分别取出浸泡液样品并收集起来。

[0055] 3. 抗菌率测定:用移液管吸取上述浸泡液样品0.1mL至第一个培养皿中,然后用小试管稀释10倍,稀释后再取0.1mL至第二个培养皿中,依次稀释直至第四个培养皿。其他组依次重复。

[0056] 抗菌率计算公式为: $R = (B - A) \div B \times 100\%$

[0057] 其中R代表抗菌率,A代表含氟抗菌隐形矫治器浸泡液中的平均回收菌落数(CFU/mL),B代表普通隐形矫治器浸泡液中的平均回收菌落数(CFU/mL)。将各组测定的抗菌率取平均值,绘制抗菌率曲线。

[0058] 实验结果如图2所示,本发明的含氟抗菌隐形矫治器在模拟口腔环境中,在14天内一直保持较高的抗菌率,到14天节点的抗菌率亦不少于95%,本发明的抗菌率和持久性明显优于普通矫治器,因此本发明的含氟抗菌隐形矫治器具有优异的长效抗菌性能。

[0059] 实验例2促再矿化能力验证

[0060] 1. 离体牙准备:收集12-28岁患者因正畸治疗需要而于口腔外科拔除的健康前磨牙25颗(要求釉质发育正常,无缺损,无裂纹)。去净表面残余组织,抛光、流动水洗净后储存于生理盐水中,置于4℃的冰箱保存备用。随机分为四组:

[0061] A组:不作任何处理,作为脱矿前的样本;

[0062] B组:制作脱矿模型,不进行再矿化处理,作为脱矿后的样本;

[0063] C组:制作脱矿模型,固定于普通隐形矫治器,进行体外脱矿循环;

[0064] D组:制作脱矿模型,固定于实施例1制备的含氟抗菌隐形矫治器,进行体外脱矿循环;

[0065] E组:制作脱矿模型,固定于实施例2制备的含氟抗菌隐形矫治器,进行体外脱矿循环;

[0066] F组:制作脱矿模型,固定于实施例3制备的含氟抗菌隐形矫治器,进行体外脱矿循环。

[0067] 2. 制作脱矿模型:取B、C、D、E、F组的25颗离体牙模拟口内隐形矫治器附件粘接方法,用酸蚀剂酸蚀牙齿颊面并涂布粘接剂将附件粘接在牙齿颊面中心位置,清除附件周围多余的粘接剂。将样本每天浸泡在脱矿液中1小时,在恒温水浴箱中进行2周的脱矿,脱矿液每天更换,2周后去除离体牙上的托槽及粘接剂,抛光备用。

[0068] 3. 将脱矿处理后的离体牙用去离子水冲洗,清洁干燥牙齿颊面,用5个离体牙分别与D、E、F组不同氟浓度的含氟抗菌隐形矫治器各5个和5个普通隐形矫治器的内侧面同一位置并用无菌薄膜包裹固定,然后放回人工唾液中。将固定后的样品每日浸泡在人工脱矿液中1小时,模拟通常情况下口腔环境中每日的脱矿时间,然后再用去离子水冲洗后放回人工唾液中。上述过程均在37℃的恒温水浴箱中进行,其中,人工唾液和人工脱矿液每日更换。如此循环进行14天。

[0069] 4. 釉质硬度测量:显微硬度仪测量所有样本颊面釉质的显微硬度值。通过测量压痕的对角线长度并换算成硬度值,取三点测量值的平均值作为该样本的硬度值结果。

[0070] 实验结果如图3所示,A组的显微硬度值最高,B组的显微硬度值最低,D组(实施例1组)、E组(实施例2组)、F组(实施例3组)的显微硬度值明显高于C组(普通隐形矫治器组)。说

明D组、E组、F组的含氟抗菌隐形矫治器相比于C组的普通隐形矫治器可有效使脱矿釉质再矿化,釉质表面显微硬度值增高。F组的显微硬度值高于D组和E组,说明含氟抗菌矫治器的促矿化作用有一定氟浓度依赖性。

[0071] 上述实施例为本发明较佳的实施方式,但本发明的实施方式并不受上述实施例的限制,其他的任何未背离本发明的精神实质与原理下所作的改变、修饰、替代、组合、简化,均应为等效的置换方式,都包含在本发明的保护范围之内。

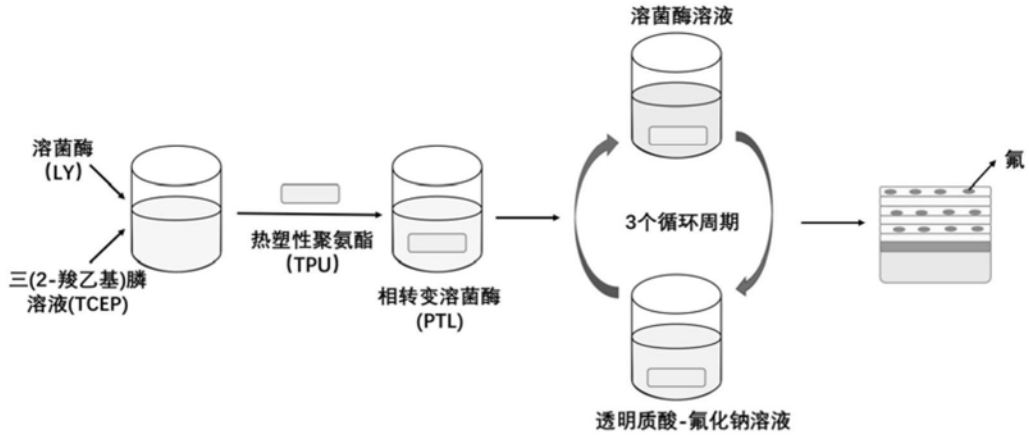


图1

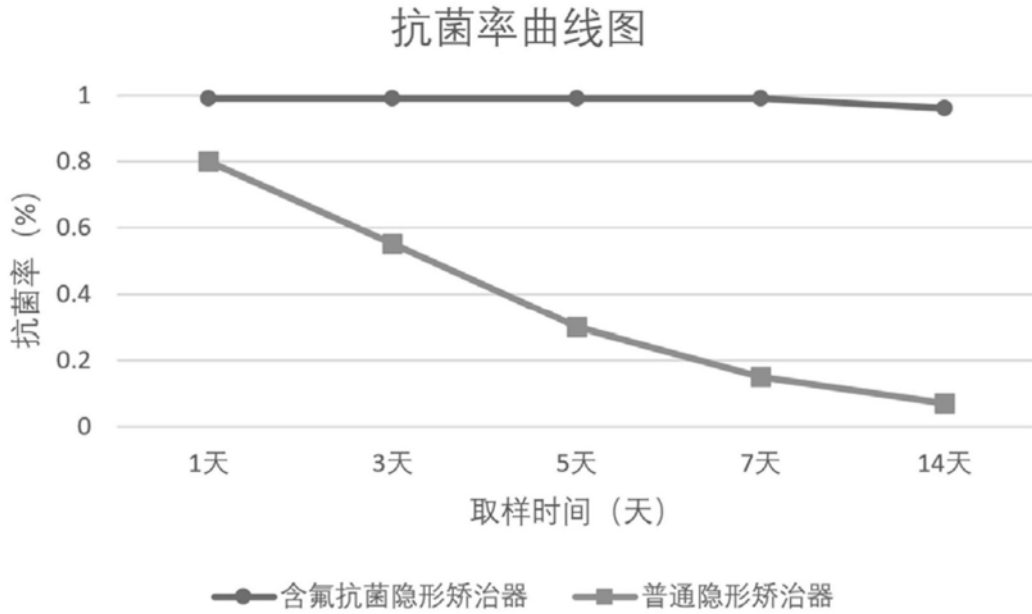


图2

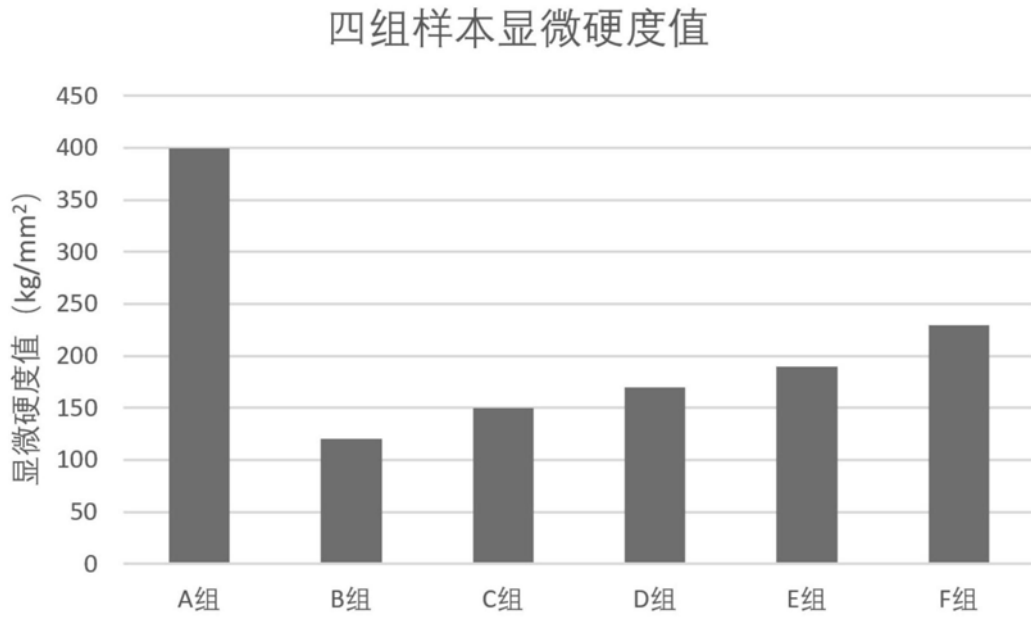


图3