(19)中华人民共和国国家知识产权局

(12)发明专利

(10)授权公告号 CN 1767805 B
(45)授权公告日 2010.05.26

(21)申请号 200480008769.2

(22)申请日 2004.02.11

(30)优先权数据
10/364,241 2003.02.11 US

(85)PCT申请进入国家阶段日
2005.09.29

(86)PCT申请的申请数据
PCT/US2004/003842 2004.02.11

(87)PCT申请的公布数据
WO2004/071475 EN 2004.08.26

(73)专利权人 高露洁-棕榄公司
地址 美国纽约州

(72)发明人 A·M·摩根 L·H·塞莱斯
M·威廉斯 S·M·赫莱斯
C·L·马西亚斯 R·德安布罗吉奥
T·J·博伊德 J·G·马斯特斯

(74)专利代理机构 中国专利代理(香港)有限公司 72001
代理人 张轶东 王景朝

(51)Int.Cl.
A61K 8/66(2006.01)
A61K 8/49(2006.01)
A61Q 11/00(2006.01)

(56)对比文件
GB 1255284 A,1971.12.01, 实施例 10.
US 3681197 A,1972.08.01, 说明书第2栏第10行至第5栏第20行和实施例 1.
US 5711937 A,1998.01.27, 实施例 29.

审查员 陈红霞

权利要求书 2 页 说明书 13 页

(54)发明名称

具有增强的稳定性的含酶口腔组合物

(57)摘要

一种具有增强的口腔卫生和防齿菌斑性能的口腔护理组合物,其包括口腔可接受的运载体,该运载体包含酶、十六烷基吡啶鎓氯化物和还原剂的组合。

CN 1767805 B

1. 一种具有增强的稳定性和防齿菌斑性能的口腔护理组合物，其包括口腔可接受的运载体，该运载体包含酶、十六烷基吡啶鎓氯化物和还原剂的组合，其中所述酶包括葡糖糖化酶和木瓜蛋白酶

2. 根据权利要求 1 的组合物，其中木瓜蛋白酶以占组合物重量的 0.1-5.0％的浓度存在于组合物中。

3. 根据权利要求 1 的组合物，其中葡糖糖化酶以 0.1-5.0％重量的浓度存在于口腔组合物中。

4. 根据权利要求 1 的组合物，其中十六烷基吡啶鎓氯化物以 0.005-2％的重量浓度存在于组合物中。

5. 根据权利要求 1 的组合物，其中还原剂是锡酸钾。

6. 根据权利要求 1 的组合物，其中还原剂是硫酸铵。

7. 根据权利要求 1 的组合物，其中还原剂以占组合物的重量的 0.05-2.0％的浓度存在于组合物中。

8. 根据权利要求 1 的组合物，其中组合物是牙膏。

9. 根据权利要求 1 的组合物，其中组合物是漱口水。

10. 根据权利要求 1 的组合物，其中组合物是用纤维素聚合物增稠的牙膏。

11. 根据权利要求 10 的组合物，其中纤维素聚合物是羧甲基纤维素。

12. 根据权利要求 9 的组合物，其中漱口水中水的重量浓度超过 45％。

13. 根据权利要求 12 的组合物，其中水的重量浓度是 50-85％。

14. 一种增强含酶口腔组合物中稳定性的方法，其包括制备含有口腔可接受的运载体的组合物，该运载体含有酶、十六烷基吡啶鎓氯化物和还原剂的组合，其中所述酶包括葡糖糖化酶和木瓜蛋白酶；并且然后将组合物用在口腔上。

15. 根据权利要求 14 的方法，其中木瓜蛋白酶以占组合物重量的 0.1-5.0％的浓度存在于组合物中。

16. 根据权利要求 14 的方法，其中葡糖糖化酶以 0.1-5.0％重量的浓度存在于口腔组合物中。

17. 根据权利要求 14 的方法，其中以木瓜蛋白酶和葡糖糖化酶的水分散液形式将所述的酶掺入组合物中。

18. 根据权利要求 14 的方法，其中还原剂是锡酸钾。

19. 根据权利要求 14 的方法，其中还原剂是硫酸铵。

20. 根据权利要求 14 的方法，其中还原剂以占组合物重量以 0.05-2.0％的浓度存在于组合物中。

21. 根据权利要求 14 的方法，其中组合物是用纤维素聚合物增稠的牙膏。

22. 根据权利要求 14 的方法，其中纤维素聚合物是羧甲基纤维素。

23. 根据权利要求 14 的方法，其中十六烷基吡啶鎓氯化物以 0.005-2％的重量浓度存在于组合物中。

24. 根据权利要求 14 的方法，其中组合物是漱口水。

25. 根据权利要求 24 的方法，其中漱口水中水的重量浓度超过 45％。

26. 根据权利要求 25 的方法，其中漱口水中水的重量浓度是 50-85％。

27. 一种制备含稳定的酶化合物的水性口腔护理组合物的方法，其中所述酶包括葡糖糖化酶和木瓜蛋白酶，其包括首先将酶溶解在十六烷基吡啶鎓氯化物和还原剂的水溶液中以制备预混合物；并且然后将预混合物加入到口腔护理组合物的运载体中。

28. 根据权利要求 27 的方法，其中酶以 0.1-10％的重量浓度存在于预混合物中。

29. 根据权利要求 27 的方法，其中还原剂以 0.05-3％的重量浓度存在于口腔护理组合物中。

具有增强的稳定性的含酶口腔组合物

[0001] 发明背景

1 发明领域

[0002] 本发明一般地涉及一种用于加强口腔卫生的口腔组合物，并且更具体地涉及一种具有增强的稳定性和防齿菌斑效力的含酶的口腔组合物。

2 现有技术

[0003] 设计口腔组合物如牙膏、凝胶和漱口剂与定期的刷牙方法结合，使齿菌斑松动并将其除去。齿菌斑在一定程度上以膜的形式出现在基本上所有牙的表面上。它是细菌生长的副产物，并且含有很厚的细菌层，该细菌层是由大量嵌入多聚糖基质中的细菌组成的。齿菌斑本身很牢固地粘附在牙表面上，并且即使通过很严格的刷牙方式将其除去也是很困难的。而且在将齿菌斑除去之后，它又很快地形成在牙表面上。齿菌斑可以形成在牙表面的任何部位上，并且发现尤其在牙龈边缘、牙釉质的裂缝和牙结石的表面上。牙齿上形成齿菌斑的危险在于以下趋势：齿菌斑增加并最终产生齿龈炎、牙周炎和其他类型的牙周疾病以及牙蛀蚀和牙结石。

[0004] 本领域已知在口腔组合物中包含抗菌剂，其中这些试剂消灭或抑制口腔细菌。口腔组合物中还可以包含其他试剂用来加强抗菌剂的效力。例如，已知将酶如蛋白酶加入到口腔组合物中，其中酶破坏或妨碍齿菌斑的形成及细菌粘附在牙表面。

[0005] 商业化生产酶如蛋白酶时面对的问题是它们经常含有很宽范围的不需要的副产物或杂质，其在制造时很难除去。一种上述酶的副产物是纤维素酶，它是一种可以通过水解β(1-4)键使纤维素分解成单糖的酶。口腔组合物中常规使用的增稠剂如羧甲基纤维素在纤维素酶的存在下分解，这对牙膏产品的流变能力产生不利的影响。这样，一种通过纤维素酶抑制上述增稠剂降解的方法对于获得含有稳定的酶的口腔护理制剂是关键的。

[0006] 本领域用于抑制或分离纤维素酶的一般方法在口腔组合物领域中并不实用。抑制纤维素酶的方法如盐析、热处理或调节pH都会损害酶的活性。酶分离的传统方法是基于酶的尺寸、电荷、溶解度和结合位点，由于特定的纤维素酶和酶如淀粉酶之间的相似性，这些方法的成本太高昂并且效率低。可以通过用重金属或重金属络合物如与酶活性部位结合的汞、银和氯化钯处理来抑制酶的活性，但这种方法也是不可以接受的，因为上述材料对人体是有毒的并且一定不能用在口腔护理产品中。

[0007] 发明概述

[0008] 根据本发明，已经出乎意料地确定了少量但有效量的十六烷基吡啶鎓氯化物和还原剂可以在含酶口腔组合物中提供增强的稳定性和抗齿菌斑的效力。

[0009] 优选实施例的描述

[0010] 十六烷基吡啶鎓氯化物

[0011] 本发明的含酶口腔护理组合物中十六烷基吡啶鎓氯化物的浓度占口腔护理组合物的重量的约0.005到约1.0％，优选约0.50到约1.0％。

[0012] 酶

[0013] 本发明实践中所用的酶包括糖酶如葡糖糖化酶和从天然水果产品中提取的酶如可以分解或水解蛋白质的蛋白酶。

[0014] 葡糖糖化酶是发酵培养黑曲霉得到的糖化葡糖糖化酶。该酶可以水解葡糖基寡糖的 α-D-1,6 葡糖苷枝点和 α-1,4 葡糖苷键。根据本发明所用的其他糖酶是 α 和 β-淀粉酶、葡聚糖酶和 mutan 酶。葡糖糖化酶是优选的酶并且以约 0.001 到 2%，优选约 0.01 到 0.55%的重量浓度包含在本发明的口腔组合物中。

[0015] 用于本发明实践的蛋白酶包括那些从天然水果产品中提取的。水解蛋白酶是从天然来源得到的或通过具有氮源和碳源的微生物作用得到的。用于本发明实践的水解蛋白酶的例子包括天然存在的木瓜蛋白酶（来自木瓜）、菠罗蛋白酶（来自菠萝）和丝氨酸蛋白酶如胰凝乳蛋白酶。其他的酶包括无花果蛋白酶和碱性蛋白酶 (alcalase)。木瓜蛋白酶是优选用于本发明的蛋白酶，木瓜蛋白酶具有的活性为每毫克 150 到 939MCU，如 Biddle Sawyer Group 的 Milk Clot Assay Test（见 J.Biol.Chem. 第 121 卷，737-745 页）所确定的。本发明组合物中所合的蛋白酶的重量浓度为约 0.1 到约 3%，优选约 0.2 到约 2%。

[0016] 可以与水解蛋白酶及葡糖糖化酶有益地组合的酶包括糖酶如 α-淀粉酶、β-淀粉酶、鞣酸酶和脂肪酶如植物脂肪酶、胃脂肪酶和胰脂肪酶。

[0017] 脂肪酶是从黑曲霉的选择株得到的，显示了随机地切割脂肪和油脂的 1、3 位。当用橄榄油分析时，pH 为 5.0 到 7.0 时该酶具有分解脂肪的最大活性。酶测量得到的活性是 120,000 脂肪酶单元 / 每克。包括在牙膏组合物中的脂肪酶的重量浓度为约 0.010 到约 5.0%，优选约 0.02 到约 0.10%。

[0018] 鞣酸酶的存在可以更加有益地促进外部色斑的分解。鞣酸酶可以从黑曲霉和洋葱曲霉被纯化并且用于水解丹宁酸，已知丹宁酸使牙齿表面变色。

[0019] 可以组成本发明的其他合适的酶包括来卵白的溶菌酶，其含有一个被四个二硫键交联的单独的多肽链，其分子量为 14,600 道尔顿。该酶可以通过促进细菌细胞壁的水解而显示出抗菌特性，其在活的有机体内分裂 N- 乙酰基胞壁酸的碳 1 与 N- 乙酰基 -D- 氨基葡萄糖的碳 4 之间的糖苷键，上述两种糖类聚合生成细胞壁多聚糖。另外，果胶酶，一种存在于大部分植物中的酶，促进多聚糖果胶水解成糖和半乳糖醛酸。最后，葡聚糖酶用于催化复杂的糖类分解成葡聚糖并且将 β 葡聚糖水解为葡萄糖。

[0020] 酶稳定剂

[0021] 可以避免使酶与口腔组合物中的金属杂质螯合而失去活性的酶稳定剂包括乙二胺四乙酸 (EDTA) 和葡萄糖酸钠，其重量浓度为 0.01 到 1%，优选 0.1 到约 0.5%。避免使酶氧化的酶稳定剂包括还原剂如亚硫酸氢钠、金属五倍子酸盐、锡酸钾、锡酸钠、硫酸铵、3,5- 二叔丁基 -4- 羟基甲苯 (BHT)、维生素 E（α、β、γ 型）/ 维生素 E 的乙酸盐和抗坏血酸。锡酸钾是用于本发明实践的优选酶稳定剂。存在于本发明的口腔组合物中的还原剂的重量浓度为约 0.05 到约 1.5%，优选约 0.1 到约 0.75%。

[0022] 预混合物

[0023] 当将十六烷基吡啶鎓氯化物加入到本发明的口腔护理组合物中，有利的是首先将十六烷基吡啶鎓氯化物和要加入口腔组合物中的任何酶在保湿剂的水溶液中预混合，从而使十六烷基吡啶鎓氯化物与杂质互相作用、结合并使其失活，该杂质包含在加入口腔组合

物中的酶中。

[0024] 预混合产物通常包括以下四种组分：(1) 十六烷基吡啶鎓氯化物 (2) 一种或一种以上加入到口腔组合物中的酶 (3) 还原剂 (4) 平衡的水和保湿剂。

[0025] 通常，预混合物中十六烷基吡啶鎓氯化物的浓度占预混合物重量的约 0.15 到约 1.0%，并且优选约 0.2 到约 0.6%。酶的浓度占预混合物重量的约 0.5 到约 10.0%，并且优选约 0.75 到约 8.0%。当在预混合物中包括酶如葡糖糖化酶和木瓜蛋白酶的混合物时，木瓜蛋白酶的重量浓度为约 2 到约 10%，并且葡糖糖化酶的重量浓度为约 0.5 到约 2%。

[0026] 在预混合物溶液中优选包括还原剂如锡酸钾，其重量浓度为约 0.5 到约 40%，并且优选为约 1.0 到约 3%，当随后将还原剂加入到口腔组合物运载体中时，它的存在进一步增强了十六烷基吡啶鎓氯化物对酶杂质活性的抑制。

[0027] 水和保湿剂是预混合物的其他组分。其重量浓度可以为约 85 到约 95%。

[0028] 为了制备预混合物，首先将水和保湿剂的混合物装入反应器，接着加入有效量的十六烷基吡啶鎓氯化物，其在那里被混合和溶解，然后将酶和还原剂加入到溶液中。在不高于约 40℃，优选约 30℃下将上述组分一起混合。将 pH 调节到约 1.5 到约 8.0，并优选约 6.0 到约 7.5。然后将如此制备的预混合物封装在合适的容器中，等待与运载体及口腔护理组合物的其他组分混合。

[0029] 口腔护理组合物

[0030] 在制备口腔组合物时，将预混合物与口腔护理组合物运载体的组分混合来制备产品，其中酶保持有效地稳定并且其显示了抗齿菌斑和抗齿龈炎的活性。

[0031] 牙膏运载体

[0032] 用于制备本发明牙膏组合物的口腔可接受的运载体包括含有保湿剂的水相。保湿剂优选为甘油、山梨糖醇、木糖醇和 / 或分子量为约 200 到 1,000 的丙二醇；但还可以使用其他保湿剂及其混合物。保湿剂的总浓度一般占口腔组合物重量的约 5 到约 70%，并且优选占约 30 到约 60%。牙膏中水的重量浓度为约 10 到约 30%，并且优选为约 15 到约 25%。

[0033] 研磨剂

[0034] 在制备牙膏组合物时，可以用于本发明实践的研磨剂包括硅研磨剂如具有至多约 20 微米的平均粒度的沉淀二氧化硅，如 J.M.Huber 出售的 Zeodent 115。其他可用的牙膏研磨剂包括偏磷酸钠、偏磷酸钾、磷酸三钙、磷酸二钙二水合物、硅酸铝、煅烧氧化铝、膨润土或其他硅土材料或其组合。

[0035] 制备根据本发明的牙膏组合物实践中所用的优选研磨材料包括硅胶和吸油量低于 100cc/100g 硅的沉淀无定形二氧化硅，并且优选约 45cc/100g 到低于约 70cc/100g 二氧化硅。用 ASTA 磨去方法 D281 测量吸油值。上述二氧化硅是平均粒度为约 3 微米到约 12 微米，并且优选约 5 到约 10 微米的胶体微粒，并且作为重量浓度为 5%的浆液测量时，pH 范围为 4 到 10，优选 6 到 9。

[0036] 尤其用于本发明实践中的低吸油值的二氧化硅研磨剂是以商品名称 Sylodent XWA 被 W.R.Grace & Co. 的 Dayison ChemicalDivision,Baltimore,MD 21203 出售的。用于本发明实践中的低吸油值的二氧化硅研磨剂的优选例子是 Sylodent 650 XWA，是一种含有硅胶颗粒的水凝胶，该硅胶颗粒中所含水的重量含量为 29%，平均直径为约 7 到约 10 微米，并且吸油量低于 70cc/100g 硅。存在于本发明牙膏组合物中的研磨剂的重量浓度为约

10 到约 40%，并且优选重量浓度为约 15 到约 30%。

[0037] 增稠剂

[0038] 本发明牙膏组合物中所用的增稠剂包括天然和合成的胶并且胶体包括纤维素增稠剂如羧甲基纤维素、羟烷基纤维素如羟丙基纤维素和羟乙基纤维素，胶如黄原胶，以商品名称 Polyox 和聚乙二醇出售的具有不同分子量的聚乙二醇。可以用于本发明实践中的无机增稠剂包括无定形的硅化合物如由 Cabot Corporation 制造并由 LenapeChemical，Bound Brook，New Jersey 经销的可以以商品名称 Cab-o-sil 获得的硅胶化合物，来自 J.M.Huber Chemicals Dixision，Havre de Grace，Maryland 21078 的 Zedoent 165 和可从 W.R.GraceCorporation，Baltimore，MD 21203 的 Davison Chemical Division 获得的 Sylodent 15。其他的无机增稠剂包括天然和合成的粘土、硅酸锂镁 (Laponite) 和硅酸镁铝 (Veegum)。

[0039] 增稠剂以约 0.1 到约 10%，优选约 0.5 到约 4.0%的重量含量存在于牙膏组合物中。

[0040] 表面活性剂

[0041] 在本发明的口腔组合物中使用的表面活性剂是为了获得增强的预防作用并且使组合物在美容上更加能接受。表面活性剂优选是有清净力的材料，其使组合物具有去污和起泡沫的特性。

[0042] 阴离子表面活性剂如高级烷基硫酸盐如十二烷基硫酸钠是口腔组合物中有效的表面活性剂，但其通常不与酶相容并且促进酶变性而使酶失去活性。然而，根据本发明的实践，将浓缩量的酶如葡糖糖化酶和十六烷基吡啶鎓氯化物预混合，使十六烷基吡啶鎓氯化物与葡糖糖化酶中的任何纤维素酶杂质相互作用并结合，从而防止了纤维素酶和任何以纤维素为基础的增稠剂之间的相互作用，该增稠剂可以用于制备牙膏并抑制与阴离子表面活性剂的相互作用。与酶相容的表面活性剂可以在口腔组合物中用于提供必需的起泡沫的特性。与酶相容的表面活性剂的例子包括非离子聚氧化乙烯表面活性剂如 Polyoxamer 407、Pluronic 127、聚山梨酸酯 20，和两性表面活性剂如 tauranol、柯卡酰胺基丙基三甲铵乙内酯（酚醛树脂三甲铵乙内酯）和柯卡酰胺基丙基三甲铵乙内酯十二烷基葡糖苷。存在于本发明的口腔组合物中的表面活性剂的重量浓度为约 2 到约 10%并且优选为约 0.5 到约 5.0%。

[0043] 氟化物加其他活化剂

[0044] 本发明的口腔组合物也可以含有氟化物离子的来源或提供氟的组分作为防龋剂，其量足以提供约 25ppm 到 5,000ppm 的氟化物离子并且包括无机氟化物盐，如可溶性碱金属盐。优选的与酶相容的氟化物来源包括氟化钠、氟化钾、氟硅酸钠、单氟磷酸钠 (MFP)、氟硅酸铵和锡的氟化物，如氟化锡和氯化锡。优选氟化钠或 MFP。

[0045] 除了氟化物化合物，本发明的口腔组合物中还可以包括抗牙垢剂如焦磷酸盐，其包括二碱金属或四碱金属焦磷酸盐如 $Na_4P_2O_7$、$K_4P_2O_7$、$Na_2K_2P_2O_7$、$Na_2H_2P_2O_7$ 和 $K_2H_2P_2O_7$，多磷酸盐如三磷酸钠、六偏磷酸钠和环磷酸盐如三磷酸钠三偏磷酸钠。包含在牙膏组合物中上述抗牙垢剂的重量浓度是约 1.0 到约 5.0%。

[0046] 可用于本发明牙膏组合物的其他活性剂是抗菌剂，其可以是口腔组合物重量的 0.2 到 1.0%。上述可用的抗菌剂包括基于酚醛或二酚醛化合物的非阳离子抗菌剂，如卤化

的二苯基醚如三氯生 (2,4,4' - 三氯 -2' - 羟基二苯基醚)。

[0047] 阴离子聚碳酸酯

[0048] 还可以在本发明的口腔组合物中使用合成的阴离子聚碳酸酯作为牙膏组合物中任何抗菌剂、抗牙垢剂或其他活性剂的功效增强剂。一般以其自由酸的形式或优选部分或更优选全部被中和的水溶性碱金属 (如钾和优选钠) 或铵盐的形式使用上述阴离子聚碳酸酯。优选是 1 ∶ 4 到 4 ∶ 1 马来酸酐或酸与其他可聚合的乙烯基不饱和单体的共聚物,优选具有分子量 (M.W.) 为约 30,000 到约 1,800,000,最优选约 30,000 到约 700,000 的甲基乙烯基醚 / 马来酸酐的共聚物。上述共聚物的例子是可从 GAF Corporation 以商品名称 Gantrez 获得的,如 AN 139(M.W. 500,000)、AN 119(M.W. 250,000) ;S-97 药品级 (M.W. 700,000)、AN 169(M.W. 1,200,000-1,800,000) 和 AN 179(M.W. 超过 1,800,000) ;其中优选的共聚物是 S-97 药品级 (M.W. 700,000)。

[0049] 当存在阴离子聚碳酸酯时,它的用量足以合乎需要地增强牙膏组合物中任何抗菌剂、抗牙垢剂或其他活性剂的功效。一般地,口腔组合物中阴离子聚碳酸酯的重量为约 0.05% 到约 4%,优选为约 0.5% 到约 2.5%。

[0050] 香料

[0051] 本发明的口腔组合物中还可以含有香料。用于本发明实践中的香料包括香精油和各种香料醛、酯、醇和类似的材料。香精油的例子包括留兰香油、薄荷油、鹿蹄草油、黄樟油、丁香油、鼠尾草绿油、按树油、马郁兰油、肉桂油、柠檬油、酸橙油、柚油和橙油。还可以使用的化合物是薄荷醇、香芹酮和茴香脑。在这些当中,最常使用的是薄荷油和留兰香油。

[0052] 口腔组合物中香料的重量浓度为约 0.1 到约 5% 并且优选为约 0.5 到约 1.5%。

[0053] 其他组分

[0054] 本发明的口腔组合物中还可以含有多种其他材料,包括脱敏剂,如硝酸钾 ;增白剂,如过氧化氢、过氧化钙和过氧化脲 ;防腐剂 ;硅酮和叶绿素化合物。当本发明的口腔组合物中存在上述添加剂时,它们的含量基本上不会对所需的特性和性质产生不利的影响。

[0055] 制备牙膏组合物

[0056] 为了制备本发明的口腔组合物,一般在常规混合器中将保湿剂如甘油、山梨糖醇在搅拌下分散在水中。在分散体系中加入有机增稠剂,如羧甲基纤维素 ;抗牙垢剂如焦磷酸四钠、三磷酸钠和任何甜味剂。将得到的混合物搅拌直到形成均匀的胶相。将胶相中加入颜料如 TiO_2 和调节 pH 到 6.4 到 7.3 所需的任何酸或碱。混合上述组分直到得到均匀相。然后加入由十六烷基吡啶鎓氯化物、酶和还原剂如在运载体水溶液中的锡酸钾组成的预混合物,并且将其与均匀的胶相混合。然后将得到的混合物转移到高速 / 真空混合器中 ;在那里,将增稠剂和表面活性剂组分加入到混合物中。然后加入研磨剂。将任何水溶性抗菌剂如三氯生溶解在组合物中所含的香精油中,并且将溶液与表面活性剂一起加入到混合物中,接着在真空度为约 20 到 50 毫米汞柱,优选约 30 毫米汞柱下高速搅拌 5 到 30 分钟。得到的产物在任何情况下都是均匀、半固体、可挤压的软膏或胶产品。

[0057] 制备液体口腔组合物

[0058] 在本发明的一个方面,其中口腔组合物其性质基本上是液体,与如漱口剂或漱口水,运载体一般是水、保湿剂、醇混合物。醇是无毒性的醇如乙醇或异丙醇。保湿剂如甘油、山梨糖醇或亚烷基二醇如聚乙二醇或聚丙二醇,它的重量为约 10 到 30%,漱口水含有超

过重量为约 45％的水并且优选约 50 到 85％的水、重量为约 0 到 20％的无毒性的醇和重量为约 10 到 40％的保湿剂。增稠剂如 Pluronic 的重量浓度为约 1.0 到约 3.0％，十六烷基吡啶鎓氯化物的重量浓度为约 0.02 到约 1.0％，还原剂如锡酸钾或硫酸铵的重量浓度为约 0.05 到 1.0％，酶的重量浓度为约 0.02 到约 0.2％并且香料组分的重量浓度为约 0.3 到约 1.0％。

[0059] 在制备漱口水的过程中，将含有十六烷基吡啶鎓氯化物、还原剂、水、保湿剂和酶的酶预混合物分散在漱口水组分的混合物中，例如然后将醇、保湿剂、表面活性剂和香料加入并且混合。然后在真空下混合组分约 15-30 分钟。接着将得到的漱口水产品包装。

[0060] 漱口水是将活性成分释放到口腔的有利的运载体，因为它能够到达口腔中难以到达的区域，如邻间的区域和舌头的缝隙。在水的含量超过 50％时，将酶加入到漱口水中的困难是保持酶的稳定性和活性，一般其不适合含酶的组合物。在本发明中，当漱口水中水的含量保持在占其混合物的重量的 45％以上，并且优选为约 50 到约 85％时，发现酶活性的稳定性是合乎需要的并且出乎意料地是最佳的，发现正如以下所显示的，作为抗齿菌斑试剂的酶活性增加了。

[0061] 以下的例子进一步描述并显示了本发明范围内的优选实施例。例子只是为了说明，并不应被解释成构成对本发明的限制，因为这里许多变化是可能的，并没有偏离本发明的精神和范围。

[0062] 例 I

[0063] 制备含酶（木瓜蛋白酶、葡糖糖化酶）的牙膏组合物，该组合物含有作为酶预混合物而加入的少量但有效量的十六烷基吡啶鎓氯化物和还原剂（锡酸钾、硫酸铵），并用纤维素增稠剂（羧甲基纤维素）增稠。被称为“组合物 A”的组合物的组分列在以下的表 I 中。

[0064] 为了比较，按照例 I 的方法制备被称为组合物“B，C 和 D”的牙膏组合物。所有的组合物含有与组合物 A 所含的相同的酶，即葡糖糖化酶和木瓜蛋白酶。组合物 B 和 C 不含有十六烷基吡啶鎓氯化物。

[0065] 组合物 B 含有还原剂硫酸铵和金属螯合剂 EDTA。组合物 C 含有还原剂锡酸钾和防腐剂 Nipastat。组合物 D 在牙膏组合物中含有十六烷基吡啶鎓氯化物，但不含有还原剂，并且羧甲基纤维素钠作为增稠剂代替了合成的锂皂石。

[0066] 使用被称为“组合物 E”的商品化的牙膏作为对照，其不含有十六烷基吡啶鎓氯化物和酶。

[0067]

表 I				
组合物的组分	A Wt.%	B Wt.%	C Wt.%	D Wt.%
水	18.25	17.75	18.25	18.25
Fluronic F127	1.5	1.5	1.5	0.75
甘油	20.0	20.0	20.0	22.0
焦磷酸四钠	2.0	2.0	2.0	--
三磷酸钠	3.0	3.0	3.0	--
磷酸单钠	0.026	0.026	0.026	--
磷酸二钠	0.079	0.079	0.079	--

[0068]

羧甲基纤维素钠	0.65	0.65	0.65	--
合成的锂皂石	--	--	--	0.7
黄原胶	0.55	0.55	0.55	0.6
磷酸单氟钠	0.76	0.76	0.76	0.76
糖精钠	0.50	0.50	0.50	0.40
山梨糖醇（70%溶液）	18.9434	19.6999	19.2024	22.8049
硅 XWA 650	20.0	20.0	20.0	20.0
Zeodent 115	5.0	5.0	5.0	5.0
Zeodent 165	2.25	2.0	2.0	2.25
二氧化钛	0.40	0.40	0.40	0.50
十二烷基硫酸钠	0.50	0.50	0.50	--
Tauranol	--	--	--	1.2
三甲铵乙内酯	1.0	1.0	1.0	-
PEG 600	3.0	3.0	3.0	3.0
Polyoxomer 407	0.10	0.10	0.10	0.10
香料	1.10	1.10	1.10	1.10
木瓜蛋白酶	0.2266	0.2266	0.2266	0.2266
葡糖糖化酶	0.044	0.044	0.044	0.044
锡酸钾	0.10	--	0.10	--
硫酸铵	--	0.10	--	--
十六烷基吡啶鎓氯化物	0.015	--	--	0.3
EDTA 二钠二水合物	0.006	0.006	0.006	0.006
Nipastat	--	--	0.006	--
苯甲酸钠	--	0.0025	--	0.0025
山梨酸钾	--	0.006	--	0.006

[0069] 通过在 23℃下将还原剂锡酸钾和防腐剂 (EDTA) 与十六烷基吡啶鎓氯化物预混合来制备组合物 A。被称为“预混合物 A1”的预混合物在 23℃下的组分被纪录在以下的表 II 中。

[0070] 按照用于预混合物 A1 的方法制备被称为 B1、C1 和 D1 的预混合物，并且将它们加入到各自的牙膏组合物 B、C 和 D 中。用于制备组合物 A、B、C 和 D 的预混合组合物的组分列在以下的表 II 中。

[0071]

表Ⅱ 预混合物组分				
组合物的组分	A1 Wt.%	B1 Wt.%	C1 Wt.%	D1 Wt.%
山梨糖醇	67.168	76.848	67.348	76.848
水	25	15	25	15
木瓜蛋白酶	4.532	4.532	4.532	4.532
葡糖糖化酶	0.88	0.88	0.88	0.88
锡酸钾	2.0	--	2.0	2.0
硫酸铵	--	2.0	--	--
十六烷基吡啶鎓氯化物	0.3	--	--	--
EDTA 二钠二水合物	0.12	0.12	0.12	0.12
Nipastat	--	--	0.12	--
苯甲酸钠	--	0.5	--	0.5
山梨酸钾	--	0.12	--	0.12

[0072] 分别将预混合组合物A1、B1、C1和D1以1：4的比例加入到不含酶而含有表I中所列组分的牙膏中，观察对纤维素酶活性的影响。通过牙膏组合物A、B、C和D中粘度和糖水平随着时间的变化来监测纤维素酶的活性。

[0073] 在测定粘度时，当羧甲基纤维素增稠剂分解代谢的纤维素酶被用于制备牙膏组合物时，通过牙膏粘度更快的减少，可以看出纤维素酶活性更大。用具有轴#95的布氏模型RVDTV-11粘度计在5转数/分下测量以厘泊/每秒(CPS)为单位的粘度。每天测量每个样品直到发现粘度减少了80％。

[0074] 用Accucheck血糖数字分析仪监测副产品糖的浓度。当纤维素酶作用在纤维素上时，产生糖作为副产品。纤维素酶的活性越大，产生的糖的量越大。用糖水平和粘度方法比较十六烷基吡啶鎓氯化物、还原剂硫酸铵和锡酸钾及防腐剂苯甲酸钠和对羟基苯甲酸酯类对纤维素酶活性的影响。将粘度和糖浓度的结果纪录在以下的表III中。

[0075]

表Ⅲ				
组合物的组分	初始粘度（CPS）	最终粘度（CPS）	%粘度的减少（14天之后）	糖浓度（MG/DL）（7天之后）
A	25	17	32	28
B	20	10	50	62
C	20	5	75	62
D	30	15	50	62
E	28	32	0	0

[0076] 表 III 所示的结果显示了糖的生成趋势与粘度减少的结果一致。所有的测试表明组合物 A 对于牙膏组合物抑制纤维素酶的活性是最有效的，该组合物 A 是由锡酸钾 / 十六烷基吡啶鎓氯化物 / 酶预混合物溶液配制的。

[0077] 舌微生物群落的减少

[0078] 测试一些组合物对于舌微生物群落的减少，其重点在于那些造成口臭的物种。为了收集基线处的细菌和处理后 4 小时时的细菌，患者拭抹舌头。将上述试样沉积在琼脂介质上并进行无氧培养。四天之后，计算造成恶臭的细菌的菌落形成单位和总的舌细菌。用平均的菌落形成单位计算与基线相比减少的百分率。

[0079] 表 IV 和 V 代表在活的有机体内关于在基线和在用组合物 D 清洗后四个小时时的细菌样品的舌微生物群落研究。为了比较，也评价组合物 F 和 G 对口臭和舌微生物的减少。组合物 F 是含有十六烷基吡啶鎓氯化物但不含有酶的商品化的牙膏，并且组合物 G 是不含有十六烷基吡啶鎓氯化物和酶的商品氟化物牙膏。表 I V 显示通过将组合物 D 中所含的酶和十六烷基吡啶鎓氯化物结合，使造成口臭的细菌减少得更多。表 V 表示当稳定的酶预混合物与牙膏体系结合时，它提供了在活的有机体内对舌头上存在的所有种类细菌的抗菌效力，包括造成恶臭的物种。在处理后四个小时之后，含有十六烷基吡啶鎓氯化物和酶的配方 D 与作为对比的牙膏 F 和 G 相比，明显地减少了更多的细菌。

[0080]

表IV 处理后 4 个小时时的臭味舌细菌的减少			
组合物	基线的平均菌落	4 个小时后的平均菌落	臭味细菌菌落的减少%
D	$3.8*10^5$	$1.4*10^5$	63
F	$2.3*10^5$	$2.3*10^5$	0
G	$2.0*10^5$	$2.3*10^5$	0

[0081]

表 V 处理后 4 个小时时总的舌细菌的减少			
组合物	基线的平均菌落	4 个小时后的平均菌落	臭味细菌菌落的减少%
D	$5.2*10^5$	$2.4*10^5$	53
F	$5.0*10^5$	$3.1*10^5$	38
G	$4.3*10^5$	$3.9*10^5$	10

[0082] 例 II

[0083] 制备具有以下表 VI 所列组分的被称为“组合物 K 和 L”的漱口水。

[0084]

表VI		
组合物的组分	K (Wt. %)	L (Wt. %)
水	57.8	70.3
甘油	16.25	10.0
山梨糖醇	16.25	10.0
乙醇	5.00	5.00
Gantrez	1.92	1.92
Fluronic F127	0.75	0.75
Fluronic F108	0.75	0.75
焦磷酸四钠	0.45	0.45
香料	0.30	0.30
木瓜蛋白酶	0.21	0.21
锡酸钾	0.05	0.05
糖精钠	0.070	0.070
十六烷基吡啶鎓氯化物	0.050	0.050
Nipastat	0.050	0.050

[0085]

磷酸单钠	0.035	0.035
丁基羟基甲苯	0.015	0.015
磷酸二钠	0.010	0.010
磷酸	0.04	0.04
总量	100.0	100.0

[0086] 木瓜蛋白酶的稳定性

[0087] 用平板视频电子记录装置蛋白酶活性试剂盒监测漱口水的木瓜蛋白酶活性。使用荧光素硫代氨基甲酰基 (FTC)-酪蛋白基质活性试剂盒确定蛋白酶活性的量。FTC-酪蛋白受到蛋白酶的进攻,并将酪蛋白分解为 TC-肽。通过测量产生的 FTC-肽的荧光来确定蛋白酶活性的量。以下的表 VII 比较了组合物 K 和 L 与被称为“组合物 N”的安慰剂的活性百分率和荧光,该安慰剂与组合物 K 相同但并不含酶。用相对荧光单位 RFU’s 表示荧光值。相对于安慰剂从荧光确定活性百分率。通过活性检测,在室温下 4 周之后保持了超过 70%的酶活性。

[0088]

表VII 蛋白酶活性			
漱口水	初始荧光（RFU）	四周之后的荧光（RFU）	减少%
K	25983	21518	74%
L	26548	21297	72%
N	10360	11563	0

[0089] 除齿菌斑的效果

[0090] 为了评价木瓜蛋白酶漱口水组合物K和L的除牙菌斑的能力，进行了唾液流动细胞研究，其中使牙菌斑生长在模型的表面上，接着用漱口水处理表面并测量牙菌斑的减少。在研究中，首先通过连续地将细菌生长的介质用泵喷到棱镜上约18个小时，使牙菌斑生物薄膜形成在锗棱镜上。接着，为了促进除去牙菌斑，用漱口水组合物处理棱镜，即用泵将漱口水喷到棱镜上几分钟。用光衰减全反射傅里叶变换红外光谱（ATR FTIR）在3300、1650、1545和1080cm^{-1}处的吸收带强度从如下的红外线光谱计算牙菌斑的指数：

[0091] 牙菌斑记分＝$abs_{3300}+abs_{1650}+abs_{1545}+abs_{1080}$

[0092] 其中abs是在不同波数处的最大吸收。所选的波数代表唾液组分和红外－透明的锗棱镜上的细菌的红外线吸收。然后将漱口水处理的棱镜的牙菌斑指数与基线（只用盐水清洗的棱镜）比较，并且纪录为牙菌斑的减少百分率。

[0093] 以下表IX所纪录的结果比较了本发明的漱口水组合物K和L与被称为组合物M的商品化的漱口水和被称为“组合物N”的安慰剂的减少牙菌斑的能力，其中组合物M含有重量为0.05％的十六烷基吡啶鎓氯化物但不含有酶。作为高含水量的漱口水，漱口水L的牙菌斑减少率比漱口水K高17％。结果表明具有含高水量并且低粘度的配方在将活性物质传送到牙菌斑的表面上方面有了更大的改善，然而当与安慰剂组合物N比较时，所有的漱口水可以有效地比商品化的漱口水组合物M更大程度地减少牙菌斑。

[0094] 结果纪录在以下的表IX中。

[0095]

表IX		
组合物	牙菌斑的指数	牙菌斑减少的%
K	2.320	20
L	1.832	37
M	2.864	1
N	2.529	13
只用盐水溶液清洗	2.901	--

[0096] 抑制牙菌斑的形成

[0097] 用唾液流动细胞评价酶漱口水抑制形成牙菌斑的能力，其中用上述除牙菌斑相同的方法进行研究，除了用漱口水预处理锗棱镜几分钟外，还接着用细菌生长介质进行18个小时的后处理来促进牙菌斑生物薄膜在锗棱镜上的形成。再次用ATR FTIR通过测量总的

酰胺吸收来确定棱镜上形成的牙菌斑的量（牙菌斑指数）。将处理棱镜的漱口水的牙菌斑指数与安慰剂组合物 N 比较并且纪录为牙菌斑抑制率。

[0098] 表 X 比较了漱口水 K 和 L 相对于商品化的漱口水 M 和安慰剂组合物 N 的牙菌斑抑制率，该漱口水 M 含有十六烷基吡啶鎓氯化物但不含有酶，该安慰剂组合物 N 与组合物 K 相同，除了它不含有酶。纪录在表 X 中的结果显示具有较少水并且较粘稠的组合物 K 比组合物 L 在涂敷牙菌斑自由表面比上是更有效的，并且形成的用于抑制形成牙菌斑的保护屏蔽也是更好的。

[0099]

表X

漱口水	牙菌斑的指数	牙菌斑的抑制%
K	0.683	35
L	0.801	24
M	0.968	8
N	1.053	--

[0100] 除去牙内部的牙菌斑

[0101] 用生物体外的清洗模式表示酶漱口水除去牙内部的牙菌斑的倾向。模式包括用漱口水预处理假牙，使牙菌斑在牙内部的表面上生长，接着用漱口水后处理假牙。在这个模式中，为了提供干净的假牙表面，首先用浮石打磨可移动的假牙，并用水清洗，并且在除尘机的槽中用乙醇消毒 10 分钟。接着，将假牙浸没在漱口水溶液中，并且在室温下培养一整夜。在一整夜的处理之后，用水清洗假牙并将其在 37℃下浸没在细菌生长的介质中 6 个小时。最后用水对模型进行简单的清洗，接着用漱口水配方进行简单的清洗。然后用显示液将假牙暴露 30 秒种，用水进行简单的清洗并且然后用 Quigley Hein 牙菌斑方法测定的牙菌斑记分进行评价。

[0102] 用生物体外的清洗模式检测高含水量的漱口水组合物 L。纪录在表 XI 中的结果显示与含有十六烷基吡啶鎓氯化物但不含有酶的商品化的漱口水 M 和安慰剂 N 比较，酶漱口水 L 明显地减少了 67％的总牙菌斑和邻间牙菌斑，这表明组合物 L 不仅有效地减少了邻接的牙菌斑，在清洗邻间区域方面也是有效的，显示了“牙线类型”的作用。

[0103]

表XI 牙内部的牙菌斑

漱口水	牙菌斑的指数（邻间的）	牙菌斑的指数（总的）	总牙菌斑的减少%	邻间牙菌斑的减少%
L	1.00	1.50	67	67
M	3.00	4.58	--	--
N	3.00	4.58	--	--