(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 105228447 B
(45)授权公告日 2018.07.20

(21)申请号 201480028812.5

(22)申请日 2014.05.16

(65)同一申请的已公布的文献号
申请公布号 CN 105228447 A

(43)申请公布日 2016.01.06

(30)优先权数据
1308926.3 2013.05.17 GB

(85)PCT国际申请进入国家阶段日
2015.11.17

(86)PCT国际申请的申请数据
PCT/GB2014/051515 2014.05.16

(87)PCT国际申请的公布数据
WO2014/184582 EN 2014.11.20

(73)专利权人 布里斯托大学
地址 英国布里斯托

(72)发明人 米歇尔·艾米丽·雷德蒙

(74)专利代理机构 北京中博世达专利商标代理有限公司 11274
代理人 申健

(51)Int.Cl.
A61K 31/155(2006.01)
A61K 31/16(2006.01)

审查员 赵奇奇

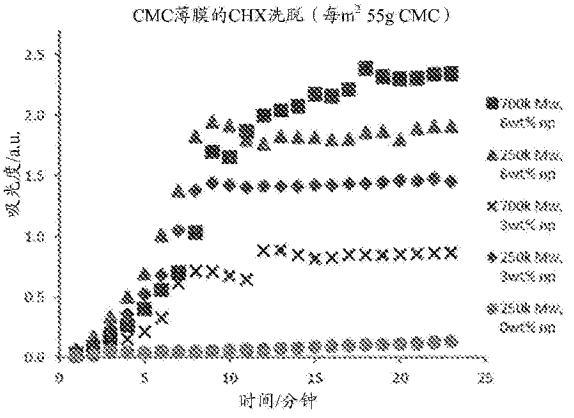
权利要求书1页 说明书31页 附图32页

(54)发明名称

包含氯己定盐的抗菌微米和纳米颗粒及其制备方法和用途

(57)摘要

公开了包含氯己定盐和阴离子的抗微生物微米或纳米颗粒，以及所述抗微生物微米或纳米颗粒的制备方法。所述盐的阴离子选自磷、碳、氮和硫的含氧酸阴离子及部分氢化的磷、碳、氮和硫的含氧酸阴离子。



CN 105228447 B

1.一种包含氯己定盐的抗微生物微米或纳米颗粒，其中，所述盐的阴离子选自：

磷酸根，所述磷酸根选自以三偏磷酸根为起始的环状偏磷酸根的同源系列和以焦磷酸根为起始的聚磷酸根的同源系列。

2.根据权利要求1所述的抗微生物微米或纳米颗粒，其中，所述盐的阴离子：

要么选自焦磷酸根、三磷酸根、和六偏磷酸根；

要么选自环状偏磷酸根的同源系列。

3.根据前述任一项权利要求所述的抗微生物微米或纳米颗粒，其中，所述盐为六偏磷酸氯己定。

4.根据权利要求1或2所述的抗微生物微米或纳米颗粒，其中，所述微米或纳米颗粒的至少一个尺寸为20到200nm。

5.一种胶体悬浮液，所述胶体悬浮液包含前述任一项权利要求所述的抗微生物微米或纳米颗粒。

6.根据权利要求5所述的胶体悬浮液，其中，所述胶体分散在水中或水溶液中。

7.根据权利要求5或6所述的胶体悬浮液，其中，zeta(ζ)电势的绝对值为至少20mV。

8.一种医用制品，所述医用制品包含根据权利要求1-4任一项所述的抗微生物微米或纳米颗粒。

9.根据权利要求8所述的医用制品，其中，所述医用制品为静脉导管、导尿管、牙种植体、牙托、义齿、创伤敷料或医用包材。

10.一种复合材料，所述复合材料包含根据权利要求1-4任一项所述的抗微生物微米或纳米颗粒。

11.根据权利要求10所述的复合材料，所述复合材料为牙科水门汀、涂料或口腔护理组合物。

12.根据权利要求10或11所述的复合材料，所述复合材料包含含量占全部复合材料1wt%～60wt%的抗微生物微米或纳米颗粒。

13.根据权利要求10或11所述的复合材料，所述复合材料包括玻璃离子体水门汀(GIC)。

14.一种抗微生物微米或纳米颗粒的制备方法，所述方法包括：

以1:100～100:1的比例使包含氯己定阳离子的水溶液与阴离子反应，以制备微米或纳米颗粒的胶体悬浮液，所述阴离子选自：

磷酸根，所述磷酸根选自以三偏磷酸根为起始的环状偏磷酸根的同源系列和以焦磷酸根为起始的聚磷酸根的同源系列。

包含氯己定盐的抗菌微米和纳米颗粒及其制备方法和用途

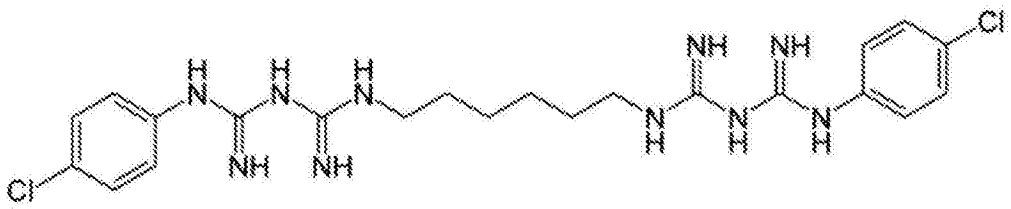
技术领域

[0001] 本发明涉及抗微生物微米或纳米颗粒(MNP)领域。更具体地,本发明涉及一种包含氯己定盐的抗微生物微米或纳米颗粒及其制备方法和使用方法;用于控制氯己定释放的包含这种抗微生物MNP的医用制品和复合材料。

背景技术

[0002] 氯己定(CHX)是一种公知的使用在各种医学应用上的抗微生物剂。这些医学应用包括皮肤清洁制剂、手消毒剂和含漱液。CHX是一种有益的抗微生物剂,因为它对革兰氏阳性菌和革兰氏阴性菌以及许多酵母菌都有效。相比其他抗微生物剂,氯己定进一步的优势是令人满意的与CHX有关的抗生素耐药性。尽管个别微生物种群当其经历递增的环境浓度时能够变得对CHX不再那么敏感,但研究已经表明这种耐药性是暂时的并且当去除CHX刺激时该耐药性会下降。

[0003] CHX的学名为N',N""'-己烷-1,6-二基二[N-(4-氯苯基)(亚氨二羧酸亚氨联胺(imidodicarbonimidic diamide))],具有下述化学式。

[0004] 

[0005] 最常见的CHX抗微生物剂为易溶盐CHX二葡萄糖酸盐的水溶液。也使用稍微不那么易溶的醋酸CHX(CHX diacetate,CHA),有时作为干燥的结晶粉末添加到材料中以便为那些材料添加一些抗微生物特性。

[0006] 这些CHX化合物的问题在于当以抗微生物组合物使用时,它们仅向靶向区域提供了含水CHX的非常短暂的释放。例如,在口服卫生应用中,含漱液中的CHX二葡萄糖酸盐可以释放到口腔中,但几分钟内,这一水溶液中的CHX水平严重降低。为了向靶向区域持续释放足够水平的抗微生物剂,需要重复该处理。

[0007] 进一步的限制是能够从处理的基质中释放的CHX的量(例如每单位表面积的量)是有限的,并且当所述表面用可溶性CHX盐的溶液处理时与CHX溶液的浓度有关,因此这些溶液的抗微生物作用也是有限的、不易于控制的,并且可能是不充分的。

[0008] EP 2462960 A2公开了一种诸如具有抗微生物剂的导管的医用留置装置。该装置包括基础材料和生物活性试剂,所述基础材料是硅酮-尿烷共聚物,所述生物活性试剂诸如CHX或其适用的药用盐,例如CHA。CHX以取决于特定共聚物组合物的速率从所述基础材料中释放。观察到了为期14天的CHX缓慢释放。然而,所述应用仅限于在聚合物导管上的涂层,因为基础聚合物是保持CHX所必须的。此外,将CHX释放提供到甚至更大的程度将是令人满意的。

[0009] US 2007/0212419 A1公开了用于在牙周感染的处理中使用的包含基质凝胶、纳米颗粒(NP)以及CHX的纳米复合材料的生物相容性水凝胶(NCHG)。所述NP为由2-甲基丙烯酸

羟乙酯(HEMA)和聚乙二醇二甲基丙烯酸酯(PEGDMA)共聚而制备的聚合物。相同的单体用于制备交联的基质。CHX二葡萄糖酸盐用作活性试剂。NP吸收CHX并观察到超过200个小时的缓释。再一次,这些应用受到所存在的基质凝胶的限制,并且CHX的释放曲线对于一些应用仍是不令人满意的。NCHG不能被用于把抗微生物特性给予现有的医用制品或组合物。

[0010] 本发明通过提供包含CHX盐的抗微生物微米或纳米颗粒(MNP)探讨了上述问题。本文提出的一些特别的CHX盐提供了微溶性MNP,在某些方面,这些CHX盐在数月的很长期间内、而不是仅在数天或数周中体现了极好的CHX释放曲线。在一些实施例中,本文所述的CHXMNP可以逐渐释放CHX长达80多天。本文所述的其他CHX盐具有较短的CHX释放期,但能在数小时或数天内释放非常高剂量的可溶性CHX。在一些方面,CHX从用这些CHX盐的MNP处理的样品中的释放要比从只用CHX溶液处理的样品中获得的释放更快,且释放量更大。这些快速释放方面在去污染应用中、或者处理特别顽固的或急性的感染或发作中可能是有用的。此外,MNP可以使用在各种各样的应用中,例如涂在医用制品上或嵌入到医用制品内以给予附加的抗微生物特性,或者作为复合材料的组分,所述复合材料能够用于通过使可溶性CHX从抗微生物MNP中逐渐浸出的方式在很长一段时间内向靶向区域释放稳定剂量的抗微生物CHX,或者能够用于比从CHX溶液处理的样品中释放CHX更快地释放更高剂量的CHX。此外,本发明的MNP还可以显示迟释释放曲线或者通过改变环境条件而引发的CHX的释放曲线。

发明内容

[0011] 在某些方面,本发明提供了包含CHX盐的抗微生物微米或纳米颗粒。特别地,本发明提供了包含CHX盐的抗微生物微米或纳米颗粒,其中所述盐的阴离子选自磷、碳、氮和硫的含氧酸阴离子及部分氢化的磷、碳、氮和硫的含氧酸阴离子。优选地,所述阴离子选自磷、碳、氮和硫的含氧酸阴离子,更优选地,所述阴离子选自磷酸根、碳酸根、硝酸根或硫酸根中的至少一种。更优选地,所述阴离子选自:磷酸根,所述磷酸根选自以焦磷酸根为起始的聚磷酸根的同源系列和以三偏磷酸根为起始的环状偏磷酸根的同源系列;以及氮和硫的含氧酸阴离子及部分氢化的氮和硫的含氧酸阴离子。更优选地,所述阴离子选自从以焦磷酸根为起始的聚磷酸根的同源系列和以三偏磷酸根为起始的环状偏磷酸根的同源系列中选择的磷酸根。更优选地,所述阴离子选自以三偏磷酸根为起始的环状偏磷酸根的同源系列,尤其是六偏磷酸根。

[0012] 在优选方面,MNP是纳米尺寸,即该结构具有从1nm到1μm范围内的至少一个尺寸。

[0013] 本发明还提供了如本文所述的抗微生物MNP的胶体悬浮液。

[0014] 本申请还提供了包含如本文所述的抗微生物MNP的医用制品和包含如本文所述的抗微生物MNP的复合材料。

[0015] 本发明还考虑了如本文所述的抗微生物MNP的制备方法和使用方法。

[0016] “抗微生物剂”是指一种作用为杀死微生物或至少抑制其生长的物质。术语“微生物”用于描述诸如细菌、古生菌和/或真菌的微观可见的生物体。因此,本文的抗微生物化合物和组合物可以杀死这些微观可见的生物体,或者至少抑制它们的生长。

[0017] 本文所使用的术语“磷酸根”是指任何基于磷和氧的阴离子。磷酸根通常由四配位的正磷酸根自由基构成。磷酸根可以为直线型的、支链的或环状的。典型的磷酸根包括以正磷酸根和焦磷酸根为起始的线型磷酸根和聚磷酸根的同源系列、以及以三偏磷酸根为起始

的环状偏磷酸根的同源系列的磷酸根。有机磷酸根也包括在这一定义内。典型的有机磷酸根包括烷基磷酸根，例如C1-6烷基磷酸根。

[0018] “微米或纳米颗粒”是指尺寸在大约1nm到100μm之间的颗粒。

[0019] 在本发明说明中，“微米或纳米颗粒”也意图包括其他适用的微米或纳米结构，例如管(单壁或多壁)、丝盘、棒、锥体、“刺猬”形、晶体(例如细长晶体)和无定形形式。这样的结构展示了至少一个空间尺寸为从大约1nm到100μm，优选从1nm到10μm，优选从1nm到小于1μm(即“纳米结构”或“纳米规模”尺寸)，更优选从5nm到500nm，更优选从20nm到200nm，甚至更优选从20nm到140nm。所述结构的所有三维尺寸也可以都落到这一尺寸范围内。

附图说明

[0020] 注释：对每个电镜(SEM)在方括号内给出了比例尺大小和图像放大率。

[0021] 图1示出了硼硅酸盐玻璃玻片在浸渍到下述组合物后的SEM显微图像。(a)水或含水CHX(25μM和5mM)[220μm，540×]；(b)5/5CHX-正磷酸根[10μm，6200×]；(c)5/5CHX-焦磷酸根[20μm，5350×]；(d)5/5CHX-三磷酸根[20μm，5150×]。

[0022] 图2示出了硼硅酸盐玻璃玻片在浸渍到下述组合物后的SEM显微图像。(e)5/5CHX-HMP[10μm，6500×]；(f)5/5CHX-硝酸根[10μm，6400×]；(g)5/5CHX-碳酸根[10μm，7800×]。

[0023] 图3示出了正磷酸盐、焦磷酸盐和三磷酸盐样品的CHX洗脱图。

[0024] 图4示出了硝酸盐和碳酸盐样品、连同分别暴露于25μM和5mM的CHX溶液的对照样品的CHX洗脱图。

[0025] 图5示出了海藻酸盐创伤敷料的下述SEM显微图像。(a)对照样品，无MNP[60μm，2000×]；(b)CHX-HMP-0.5MNP[10μm，10400×]；(c)CHX-HMP-5MNP[10μm，10000×]。

[0026] 图6示出了硼硅酸盐玻璃玻片的下述SEM显微图像。(a)对照样品，无MNP[60μm，1980×]；(b)CHX-HMP-0.5MNP[10μm，9900×]；(c)CHX-HMP-5MNP[10μm，10000×]。

[0027] 图7示出了乙烯乙酸乙烯酯(EVA)聚合物的下述SEM显微图像，其中一些乙烯乙酸乙烯酯(EVA)聚合物包含有MNP。(a)对照样品，无MNP[10μm，9900×]；(b)CHX-HMP-0.5MNP[10μm，9800×]；(c)CHX-HMP-5MNP[10μm，10200×]。

[0028] 图8示出了钛表面的下述SEM显微图像，其中一些钛表面已用MNP处理。(a)对照样品，无MNP[50μm，2080×]；(b)CHX-HMP-0.5MNP[10μm，10000×]；(c)CHX-HMP-5MNP[10μm，10000×]。

[0029] 图9示出了下述钛表面的原子力显微镜(AFM)图像(水平尺寸1μm，垂直尺寸55nm)，其中一些钛表面已用MNP处理。(a)抛光的Ti表面；(b)CHX-HMP-0.5MNP；(c)CHX-HMP-5MNP。

[0030] 图10示出了下述玻璃表面的AFM图像(水平尺寸1μm，垂直尺寸60nm)，其中一些玻璃表面已用MNP处理。(a)清洁的未处理的玻璃；(b)CHX-HMP-0.5MNP；(c)CHX-HMP-5MNP。

[0031] 图11示出了下述云母(超平)表面的AFM图像(水平尺寸1μm，垂直尺寸20nm)，其中一些云母已用MNP处理。(a)清洁的未处理的玻璃；(b)CHX-HMP-0.5MNP。

[0032] 图12示出了用对照溶液(25μM CHX)、CHX-HMP-0.5和CHX-HMP-5处理的海藻酸盐敷料的CHX洗脱图。

[0033] 图13示出了用对照溶液(25μM CHX)、CHX-HMP-0.5和CHX-HMP-5处理的玻璃的CHX洗脱图。

[0034] 图14示出了用对照溶液(25μM CHX)、CHX-HMP-0.5和CHX-HMP-5处理的EVA聚合物的CHX洗脱图。

[0035] 图15示出了用对照溶液(25μM CHX)、CHX-HMP-0.5和CHX-HMP-5处理的钛的CHX洗脱图。

[0036] 图16示出了用不同水平的CHX-HMP-MNP处理的各玻璃离子体水门汀(GIC)的累积CHX释放图。

[0037] 图17示出了用不同水平的CHX-HMP-MNP处理的各GIC样品的累积氟化物释放。

[0038] 图18示出了显示GIC样品的断裂表面的下述SEM显微图像。(a)未改性的GIC[20μm,5000×];(b)1wt%MNP[20μm,5050×];(c)2wt%MNP[20μm,5000×];(d)5wt%MNP[20μm,5000×];(e)10wt%MNP[20μm,5000×];(f)20wt%MNP[20μM,5050×]。

[0039] 图19示出了对抗MRSA的CHX和CHX-HMP-5在620nm下的光密度(OD)测量值。从这些测量值可以计算最小抑制浓度。深灰色条:25μM CHX;浅灰色条:CHX-HMP-5。

[0040] 图20示出了对抗铜绿假单胞菌(P.aeruginosa)的CHX和CHX-HMP-5在620nm下的光密度(OD)测量值。从这些测量值可以计算最小抑制浓度。深灰色条:25μM CHX;浅灰色条:CHX-HMP-5。

[0041] 图21示出了用CHX或CHX-HMP-5对抗MRSA处理后在595nm下的光密度(OD)测量值。从这些测量值可以判定生物膜的抑制。深灰色条:25μM CHX;浅灰色条:CHX-HMP-5。

[0042] 图22示出了用CHX或CHX-HMP-5对抗铜绿假单胞菌处理后在595nm下的光密度(OD)测量值。从这些测量值可以判定生物膜的抑制。深灰色条:25μM CHX;浅灰色条:CHX-HMP-5。

[0043] 图23示出了CHX-HMP-0.5NP(上)和CHX-HMP-5NP(下)的透射电子显微镜(TEM)显微图像。箭头指示了单独NP的例子。比例尺=500nm。

[0044] 图24示出了显示CHX-HMP-5(上)和CHX-HMP-0.5(下)的尺寸分布的动态光散射(DLS)数据。这三组数据指出了每个浓度处一式三份所制成的测量值。

[0045] 图25示出了显示CHX-HMP-5(上)和CHX-HMP-0.5NP(下)的电荷分布的ζ-电势数据。这三组数据指出了每个浓度处一式三份所制成的测量值。

[0046] 图26示出了包含特定量的CHX-HMP-5NP的CMC薄膜(每$m^2$55gCMC)的CHX洗脱图。方块表示CMC Mw为700kDa且6wt%的NP;三角形表示CMC Mw为250kDa且6wt%的NP;十字形表示CMC Mw为700kDa且3wt%的NP;菱形表示CMC Mw为250kDa且3wt%的NP;圆圈表示CMC Mw为250kDa且0wt%的NP。

[0047] 图27示出了包含特定量的CHX-HMP-5MNP的海藻酸盐薄膜的CHX洗脱图。方块表示6wt%的MNP;菱形表示3wt%的MNP。

[0048] 图28示出了以1次浸涂涂覆有CHX-HMP-5NP的聚氨酯(菱形)和用25μM的CHX水溶液处理的聚氨酯(横杠)的CHX洗脱图。

[0049] 图29示出了显示使用5次浸涂法[50μm,2000×](左)和10次浸涂法[50μm,2020×](右)涂覆有CHX-HMP-5的聚氨酯的SEM显微图像。右侧区域示出了NP沉积。

[0050] 图30示出了在聚氨酯基质上生长的4种微生物的活-死染色图像:(从左到右)用无MNP(未处理)、CHX-HMP-5MNP和CHX-HMP-50MNP处理的(从上到下)MRSA、大肠杆菌、铜绿假单胞菌和肺炎克雷伯氏菌(K.pneumonia)。

[0051] 图31示出了对于本体(B)硅酮(上)以及密封剂(S)硅酮(下)以1分钟(菱形)、30分

钟(方块)、2小时(三角形)或6小时(圆圈)的浸涂时间涂覆有CHX-HMP-5NP和涂覆有对照CHX溶液(折线)的各硅酮的CHX释放。在第8周更新介质以解释任何饱和度。

[0052] 图32示出了对于本体(body)(B)硅酮(上)以及密封剂(S)硅酮(下)以1分钟(菱形)、30分钟(方块)、2小时(三角形)或6小时(圆圈)的浸涂时间涂覆有CHX-TP-5NP及涂覆有对照CHX溶液(折线)的硅酮的CHX释放。在第8周更新介质以解释任意饱和度。

[0053] 图33示出了对于本体(B)硅酮(上)以及密封剂(S)硅酮(下)以1分钟(菱形)、30分钟(方块)、2小时(三角形)或6小时(圆圈)的浸涂时间涂覆有CHX-TMP-5NP及涂覆有对照CHX溶液(折线)的硅酮的CHX释放。在第8周更新介质以解释任意饱和度。

[0054] 图34示出了具有CHX-HMP-5NP涂层(左侧,浅灰色条)和不具有CHX-HMP NP涂层(右侧,深灰色条)的钛表面上格氏链球菌(S.gordonii)的生长。

[0055] 图35示出了用含水CHX的溶液或用将同等浓度的CHX HMP加入到去离子水中的悬浮液处理的羟基磷灰石圆片的CHX释放。含水CHX的数据示出为虚线,而NP悬浮液数据示出为实线。5mM的浓度以黑色示出;2.2mM的浓度以中灰色示出;1mM的浓度以浅灰色示出。从下到上:含水CHX 1mM;含水CHX 2.2mM;NP悬浮液1mM;含水CHX 5mM;NP悬浮液2.2mM;NP悬浮液5mM。

[0056] 图36示出了钻石哑光乳胶涂料表面的SEM图像[240μm,530×](左)以及包含以质量计25%CHX-HMP-5NP浆体(paste)的钻石哑光乳胶涂料表面的SEM图像[220μm,530×](右)。

[0057] 图37示出了MRSA(左)和大肠杆菌(右)在培养24小时后在钻石哑光涂料(阴性对照,左侧条)、Sterishield涂料(阳性对照,中间条)以及“纳米涂料”(包含CHX-HMP-MNP的涂料,右侧条)上的生长。Y轴单位为菌落形成单位(cfu)。

具体实施方式

[0058] 抗微生物纳米颗粒

[0059] 根据本发明的第一方面,提供了包含氯己定盐的抗微生物微米或纳米颗粒,其中,所述盐的阴离子选自磷、碳、氮和硫的含氧酸阴离子及部分氢化的磷、碳、氮和硫的含氧酸阴离子。优选地,所述阴离子选自磷、碳、氮和硫的含氧酸阴离子,更优选地,所述阴离子是选自磷酸根、碳酸根、硝酸根或硫酸根中的至少一种。当选自这一清单中的至少一种阴离子被用于CHX的化合物中时,可以形成微溶性MNP。这种很小的溶解度意味着本发明的MNP能够展示耐受释放曲线。在一些方面中,该曲线为缓释释放曲线,在很长的期间内将稳定水平的CHX释放到周围液体环境中。在其他方面中,如上所述CHX的释放要更快和/或以更大的量进行,例如在一些情况下,所述CHX的释放要比从只有CHX的溶液处理的表面中所实现的CHX的释放更快且以更大的量进行。

[0060] 在本发明中,“磷酸根”包括任何由通过共享氧原子而连接的四配位正磷酸盐自由基构成的、并从磷酸的去质子化衍生而来的、基于磷的阴离子。

[0061] 本发明中可以使用的具体的磷酸根阴离子没有特别限制,其可以包括任何具有磷原子和氧原子的阴离子。优选地,磷酸根阴离子为单磷酸根(monophosphates)或聚磷酸根。优选地,磷酸根阴离子具有直线型、支链或环状结构。优选地,磷酸根阴离子是通过从具有通式$HO(PO_2OH)_nH$的聚磷酸中去除一个或多个氢原子而衍生的,其中,n可以是任何整数,但

通常为从1到几百，优选为1-10，更优选为1-6。

[0062] 更加优选地是，磷酸根选自正磷酸根、焦磷酸根、三磷酸根或六偏磷酸根中的至少一种。偏磷酸根、尤其是六偏磷酸根是尤其优选的。

[0063] 在一些方面，本发明的抗微生物MNP包括微溶性CHX盐。当MNP包括这样的具有低溶解度的盐时，CHX从MNP到周围液体环境中的释放被延长了。此外，当所述盐为这种方式的微溶性时，MNP趋向于在水中形成胶体悬浮液，这对通过浸涂将MNP沉积到表面上是有利的，因为它通过液体提供了MNP更均一的分布，并且因为纳米颗粒上的电荷会促进他们吸附到材料表面上。

[0064] 在一些方面，本发明的抗微生物MNP证明了可溶性CHX在很长期间内在液体环境中的持续释放。这可能是至少90天。在其他方面，本发明的抗微生物MNP证明了CHX以更高的水平释放，该水平高于使用简单的CHX溶液处理的表面所实现的水平。这可以是只经历短暂的时间段(例如达5天、达1天、达12小时、达6小时、达1小时、达30分钟、达10分钟或达1分钟的时间段)，或者可以在较长的时间段(例如达90天、达60天、达30天或者达10天的时间段)内缓释。

[0065] 尤其优选地，氯己定盐为六偏磷酸氯己定(chlorhexidine hexametaphosphate，CHX-HMP)。CHX-HMP为微溶性的，因此形成了MNP的胶体悬浮液。这些MNP随后可以用于涂覆制品，或者可以被包含到复合材料中。CHX-HMP的相对不溶性意味着CHX被缓慢地且稳定地释放到周围环境中。CHX-HMP示出了CHX释放的缓释释放曲线。

[0066] 优选地，本发明的抗微生物MNP示出了可溶性CHX缓释或延释到液体环境(优选水溶液环境)中，整个时间期间至少7天、优选至少20天、优选至少30天、更优选至少50天、更优选至少60天、更优选至少100天，在一些情况下至少六个月或至少12个月。这种缓释或延释意味着在整个期间内CHX从MNP中持续释放。优选地，尽管在设计的实施例中该释放速率发生了改变，例如，随着时间的增加减小了，但在这一期间内释放速率是大约恒定的。该缓释释放曲线使MNP的抗微生物特性在很长的时间段内充分发挥作用，而无需外界介入。

[0067] 优选地，抗微生物MNP主要由CHX盐构成，其中，所述盐的阴离子选自磷酸根、碳酸根、硝酸根和硫酸根中的至少一种。这意味着特定MNP中存在有CHX盐，但也可以存在有其他成分。优选地，CHX盐占抗微生物MNP的至少40wt％、更优选至少60wt％、更优选至少90wt％、尤其优选至少99wt％。在一些情况下，CHX盐可以占抗微生物MNP的100wt％。MNP中的其他成分可以包括聚合物(例如聚乙烯乙二醇)、填料、着色剂和试剂(例如硅烷或多熔素)中一种或多种，它们可以促进MNP结合到表面或被包含到复合材料内。MNP中CHX盐的较高水平提供了提高的(例如更强和/或持续更长)抗微生物作用。

[0068] 特定阴离子的组合也可以用于生成抗微生物MNP，例如通过使CHX阳离子与不同阴离子的混合物共沉淀。例如，导致MNP展现出CHX的快速、高水平释放的阴离子可以与导致MNP展现出CHX以较低水平释放但在更加延长的时段内释放的阴离子相组合。这样的颗粒例如在尤其是那些手术植入的医用装置中可能是有益的，其中，CHX释放的初始高水平将会抗衡由于手术自身而存在的细菌，而CHX更长、更低水平的释放将会在延长时段内维持洁净位点。优选地，抗微生物MNP包括CHX和选自上述列出的那些阴离子中的一种阴离子的盐。例如，本申请包括包含六偏磷酸CHX盐的MNP与包含阴离子选自正磷酸根、焦磷酸根、三磷酸根、碳酸根和硝酸根的CHX盐的MNP的混合物。

[0069] 在一些方面，除了CHX阳离子，在抗微生物MNP中可以存在一种或多种附加的阳离子，例如，一种或多种金属阳离子，例如铜或银。

[0070] 在一些情况中，本发明的抗微生物MNP是迟释颗粒，即，在将MNP应用到基质表面或将它们包含到复合物中后，CHX的释放被延迟一段时间。在这一延迟时间段期间，优选没有CHX从MNP中释放，或者在一些情况下，在这一延迟时间段期间CHX以较低的速率从MNP中释放，例如小于延迟时间段后立即释放的最终释放速率的10％、优选小于5％、更优选小于1％。在优选情况下，MNP对环境条件的改变很敏感。在这种情况下，MNP可以说示出了“灵敏”特性。优选地，CHX从MNP中的释放通过环境条件的改变而引发。例如，pH的改变、某些引发剂成分浓度的改变或者周围环境温度的改变。更加优选地，MNP将展现CHX的延迟释放，CHX的释放由例如pH的下降(即酸度增加)的环境改变而引发。一旦细菌的生物膜形成，就会发生pH的这种下降，因此MNP响应于细菌生物膜的存在而释放CHX。这可以通过例如在MNP中包含的成分、或者通过MNP上的涂层来实现，该涂层响应于如上所述的环境条件的改变。可选地，延迟释放的特征可以通过选择适宜的CHX盐来定制，例如通过选择适宜的阴离子，该阴离子根据诸如pH降低的环境条件的所需改变展现了诸如质子化或去质子化的改变。优选地，MNP示出了由细菌生物膜的存在或形成而导致的pH降低所引发的CHX的固有延迟释放。

[0071] 在一些情况下，本发明的抗微生物MNP具有固有的抗微生物特性。换言之，MNP证明了抗微生物特性，此外还增大了与将可溶性CHX释放到环境中有关的作用。所观察到的抗微生物作用不仅是由于CHX被释放到溶液中，还由于MNP自身的存在。例如，在一些情况中，六偏磷酸CHX的MNP似乎示出了固有的抗微生物特性。如此，本发明的抗微生物MNP提供的抗微生物特性可以超过或优于抗微生物CHX水溶液的抗微生物特性，或者超过或优于简单地将抗微生物CHX释放到环境中而没有释放展示任何抗微生物效果的介质的组合物的抗微生物特性。

[0072] 本发明的抗微生物MNP可以具有多种结构形式。他们可以选自颗粒、管(单壁和多壁)、丝盘、棒、锥体、刺猬形、晶体和不定形。优选地，MNP为颗粒或晶体。

[0073] 本发明的抗微生物MNP具有的尺寸为1nm到100μm、优选1nm到10μm、优选1nm到1μm(即纳米尺寸)，更优选5nm到500nm、更优选20nm到200nm、更加优选20nm到140nm。

[0074] 抗微生物纳米颗粒的胶体悬浮液

[0075] 根据本发明的另一方面，提供了包含本文所述的抗微生物微米或纳米颗粒的胶体悬浮液。

[0076] 优选地，本发明的胶体悬浮液为水中的胶体悬浮液。水是有效的、简单且安全的溶剂，其生物相容性使得悬浮液能安全使用在敏感应用中。

[0077] 更加优选地，本发明的胶体悬浮液为水溶液中的胶体悬浮液。这可以是CHX的水溶液。该溶液还可以包括其他溶解的离子或附加成分(例如表面活性剂、稳定剂、防腐剂等)。

[0078] 优选地，本发明的胶体悬浮液具有的zeta(ζ)电势的绝对值大小要大于或等于15mV、更优选大于或者等于20mV、更加优选大于或者等于40mV、尤其优选大于或者等于50mV。ζ-电势是胶体悬浮液的稳定性以及它们形成聚集体的趋势的量度。高的ζ-电势绝对值指示不太可能发生凝结或者凝聚的稳定的悬浮液。这是制作易于通过基质的浸涂来制备具有较高均一性的涂层所需的特性。

[0079] 当胶状分散体的ζ-电势的绝对值或模量为至少30mV时，该分散体证明了相对于凝

结物的可接受的稳定性。当ζ-电势的绝对值为至少40mV时，悬浮液的稳定性是卓越的，且该悬浮液将不会凝结并且在很长时间段后将只示出沉降行为。此外，当ζ-电势的绝对值为至少20mV时，MNP展现出所需的涂料特性，并且可以粘附到制品表面以提供抗微生物MNP的表面涂层。

[0080] 医用制品

[0081] 在本发明的进一步方面中，提供了包含如本文所述的抗微生物MNP的医用制品。

[0082] 本发明的医用制品不是特别限制的，并且可以是任何用于与身体(外部或内部)接触、或者在诸如医院或医生手术室的医疗环境中使用的制品。这样的制品对本领域技术人员是已知的。在本申请中，典型的制品包括：多种类型的导管；诸如牙种植体、义齿和牙托的口腔制品；创伤敷料或医用包材。

[0083] 优选地，本发明的医用制品为静脉导管、导尿管、牙种植体、牙托、义齿、创伤敷料或医用包材。通过用本文所述的抗微生物MNP对这些制品进行功能化，可以有利地为这些制品提供附加的抗微生物特性，例如通过表面处理以在制品上建立包含MNP的表面涂层，或者通过将MNP包含进制品自身的材料中。

[0084] 优选地，本发明的医用制品为导管。在一些方面，导管通过表面涂层来用抗微生物MNP进行功能化。在其他方面，抗微生物MNP在制备用于制作导管的材料期间被包含进导管的至少部分中。诸如耐甲氧西林金黄色葡萄球菌(MRSA)的细菌在导管表面和周围组织的定殖是主要的健康问题。在本发明的导管中，导管用抗微生物MNP进行功能化，由于MNP的抗微生物活性，从而阻止了或降低了细菌的定殖。

[0085] 优选地，本发明的医用制品为牙种植体。牙种植体为用于取代或增加下颌骨或上颌骨(颌骨)中的自然骨骼的装置。种植体的桥基部分从牙龈上突出，并且假牙连接到该桥基部分。与这样的种植体相关的问题是由于种植体表面细菌的定殖和致病性细菌生物膜的形成，它们不能长期在介质中。在本发明的牙种植体中，牙种植体包含抗微生物MNP(或者作为表面涂层或者包含进牙种植体自身的材料内)，这阻止了或降低了生物膜形成的可能性，并在没有更可能的感染风险的情况下使种植体成功种植。

[0086] 优选地，牙种植体包括表面涂层形式的抗微生物MNP。更加优选地，牙种植体的表面稀薄地涂覆有抗微生物MNP。例如，25％或者更少的面积覆盖是优选的，优选15％或者更少，更优选10％或者更少，更加优选5％或者更少。因为钛具有与骨结合(在材料与骨骼之间形成与骨骼自身一样强壮的接合点)的有益特性，钛通常用于制作牙种植体。MNP在钛表面上稀薄的涂层是有利的，因为骨结合既能够发生到显著的程度，同时仍能提供与MNP有关的抗微生物特性。如果使用太厚的涂层，则骨结合是不太完整的且种植体与骨骼之间的接合是较弱的。如果使用太稀薄的涂层，则MNP的抗微生物特性是不太明显的。

[0087] 医用制品还可以是创伤敷料。本发明的包含抗微生物MNP的创伤敷料要比普通的创伤敷料和其他已知的抗微生物敷料提供了持续更长的抗微生物作用。这在创伤的敷料中是重要的，这些创伤包括急性和手术创伤以及慢性或不愈创伤。本发明的抗微生物MNP，尤其是六偏磷酸CHX的MNP，可有效对抗烧伤感染中最常见病原体的铜绿假单胞菌，还可以对抗MRSA和格氏链球菌(Streptococcus gordonii)。当本发明功能化的创伤敷料用于包扎包括烧伤和其他相似创伤的伤口时，有助于降低感染的风险。

[0088] 本发明的医用制品可以是包括义齿或颚填充体(palatal obturator)的义齿产

品。义齿产品或义齿是在口腔中使用的装置，以取代缺失的牙齿和/或上颚区域并恢复牙齿功能。毗邻上颚的义齿的下侧易于感染，尤其是受到酵母白色念珠菌(candida albicans)的感染。在一些方面，本发明的MNP，尤其是六偏磷酸CHX的MNP，可有效对抗包括白色念珠菌在内的多种酵母菌。当使用本发明的包含抗微生物MNP的义齿产品时，极大地降低了感染风险。

[0089] 本发明的医用制品可以是牙托。牙托使用在多种应用中，包括在运动中使用以保护牙齿，和预防磨牙症。这些牙托通常由诸如乙烯乙酸乙烯酯(EVA)的聚合物制成并且易于在表面上形成细菌生物膜。本发明的牙托包含本文所述的抗微生物MNP(或者作为表面涂层或者被包含进EVA聚合物中)，可有效预防或减慢这种生物膜的形成，保护佩戴者免受感染。

[0090] 本发明的医用制品可以是医用包材、手术室托盘(operating theatre tray)或医用盖布。医用包材是用于包裹或保护医用设备是任何种类的包材。手术室托盘常常由不锈钢制成并用于装载无菌手术设备。医用盖布可以是在医疗环境中使用的任何盖布、窗帘或其他纺织品。根据本发明，任意这些医用制品均可有利地包括本文所述的抗微生物MNP以降低或预防细菌的定殖。

[0091] 抗微生物MNP可以以非特别限制的多种方式被包含进医用制品中。

[0092] 在一些情况下，医用制品包括抗微生物MNP的表面涂层。表面涂层可以容易地通过浸涂或喷涂的方式被涂覆。表面涂层在保护常常被细菌定殖的制品的外表面中是有效的。

[0093] 在一些情况下，MNP被整体包含进制品内。优选地，医用制品包括嵌入在制品的至少一部分外表面内的抗微生物MNP。MNP可以在制作期间被包含进用于制作制品的材料中，例如在导管的聚合物加工处理期间或在导管管子的挤出期间。

[0094] 在一些方面，能够制作医用制品的一种或多种材料中可以提供有MNP；例如，它们可以浸涂有MNP。在一些方面，该材料包括：诸如医用硅酮、EVA和聚氨酯的医用聚合物及关联消费的聚合物，诸如钛、玻璃的种植材料，或者商业化的创伤敷料。

[0095] 复合材料

[0096] 在进一步方面中，本发明提供了包含本文所述的抗微生物MNP的复合材料。包含这些抗微生物MNP的复合材料可以如上所述相对于MNP自身在很长的时间段内释放CHX。这为这些材料给予了抗微生物特性。

[0097] 本发明的复合材料是非特别限制的，且可以包括包含了抗微生物MNP的任何材料，以为该材料给予抗微生物特性。典型的材料包括但不限于涂料、浆体、聚合物、水凝胶和牙科水门汀。

[0098] 优选地，本发明的复合材料为玻璃离子体水门汀、涂料或口腔护理组合物。这些材料可以通过在其内包含抗微生物MNP而有利地被提供有附加的抗微生物特性。下述包含MNP的复合物已经成功地被创建：玻璃离子体水门汀、海藻酸盐薄膜、羧甲基纤维素膜、涂料和口腔含漱液/口腔局部处理。

[0099] 优选地，抗微生物MNP以多达60wt％、50wt％、40wt％、或30wt％存在于复合材料中。在大于60wt％的水平处，由于高含量的MNP，复合物可能丢失一些其预期的功能性或结构特性。优选地，抗微生物MNP以大于或等于1wt％、5wt％或10wt％存在于复合材料中。在低于大约1wt％的水平处，因MNP存在而具有的抗微生物特性显著降低，但对于某些目的仍是足够的。

[0100] 优选地，本发明的复合材料为玻璃离子体水门汀(GIC)。GIC出于许多目的在牙科学中使用，这些目的包括作为着色牙齿填充材料(tooth-coloured filling material)、作为粘结剂和衬剂、用于非创伤性充填技术(ART)、用于靠近牙龈边缘的修复和作为窝沟封闭剂。GIC已知能够以离子交换与口腔环境相接触。当包含本文所述的抗微生物MNP的复合材料为GIC时，CHX从GIC中滤出并且CHX从MNP中的缓释可以有助于预防GIC处理周围区域中的继发性龋齿。CHX释放要比包含诸如醋酸CHX或CHX二葡萄糖酸盐的可溶性CHX盐的其他GIC持续了相当长时间。在一些方面，本发明的GIC可以以长于30天、优选长于60天、更优选长于90天将CHX滤出到环境中。

[0101] 传统的GIC缺乏抗微生物作用，继发性龋齿(在填料周围或底部处龋齿的复发)为常见问题。当GIC包含本发明的抗微生物MNP时，给予GIC的抗微生物特性可以有助于预防继发性龋齿。

[0102] 优选地，本发明的GIC能够从环境中吸收CHX。在这种方式中，当现有的供应被耗尽时，GIC可以“再填充”CHX以在GIC中再形成原始CHX盐MNP。就从口腔中吸收氟化物而言，GIC已知以这种方式起作用。以这种方式，GIC的抗微生物作用可以在GIC的整个使用期内无限期连续，当需要CHX盐MNP时补充CHX盐MNP的供应。使用本发明的抗微生物MNP意味着，由于CHX的缓释，这些补充之间的间隔可以是相当长的，例如至少60天或者100天，或者更长。

[0103] 优选地，抗微生物MNP以1wt％到30wt％、更优选1wt％到20wt％、更优选1wt％到10wt％存在于GIC中。在MNP水平大于30wt％处，GIC的操作特性和拉伸强度可能受到不利影响，而在水平低于1wt％处，因MNP存在而具有的抗菌作用降低。

[0104] 本发明的复合材料可以是涂料。抗微生物涂料可以用于手术室、牙科和医学诊所、婴儿室、疗养院和其他相似环境中。提供具有本发明的抗微生物MNP所证明的持久的抗微生物特性的涂料是极其有利的。本发明的抗微生物MNP可有效对抗包括耐甲氧西林金黄色葡萄球菌(MRSA)在内的多种微生物。包含本发明的抗微生物MNP的涂料提供了对在其他感染性微生物中的MRSA的抵抗性，当用于上述环境中时这是极其有利的。

[0105] 本发明的复合材料可以是包含本文所述的抗菌MNP的口腔护理组合物。口腔护理组合物是倾向于出于通用卫生、或者处理龋齿或者特定牙周感染原因用于口腔的一种材料。优选地，口腔护理组合物为牙膏、保护性浆体或者含漱液。

[0106] 抗微生物纳米颗粒的制备方法

[0107] 在本发明的进一步方面，提供了如本文所述的抗微生物MNP的制备方法，所述方法包括：使CHX阳离子的水溶液与选自磷、碳、氮和硫的含氧酸阴离子及部分氢化的磷、碳、氮和硫的含氧酸阴离子中的一种或多种阴离子进行反应。优选地，所述阴离子选自磷、碳、氮和硫的含氧酸阴离子，更优选地，所述阴离子选自磷酸根、碳酸根、硝酸根和硫酸根中的至少一种。优选以CHX阳离子与所选阴离子的摩尔比为1:100到100:1进行混合以制备微米或纳米颗粒的胶体悬浮液。

[0108] 优选地，两种反应物以等摩尔浓度存在，即50:50。在等摩尔的反应物浓度处，产物胶体悬浮液具有符合要求的胶体尺寸和ζ-电势。优选地，反应混合物中CHX阳离子的浓度为大约5mM。优选地，反应混合物中如上所述的阴离子的浓度为大约5mM。

[0109] 优选地，所述方法包括：使CHX阳离子的水溶液与选自正磷酸根、焦磷酸根、三磷酸根和六偏磷酸根的磷酸根阴离子进行反应。更加优选地，所述方法包括：使CHX阳离子水溶

液与六偏磷酸根阴离子进行反应。使用HMP生成的胶体悬浮液具有良好的ζ-电势和尺寸特性、以及良好的溶解度。

[0110] 优选地，HMP反应物是新鲜制备的HMP，例如在使用前60分钟或更短时间内制备，以避免在使用前不期望的反应物水解的风险。在一些方面，一种或多种附加的阴离子可以存在于反应混合物中。在一些方面，一种或多种附加的阳离子(除CHX之外)也可以存在于反应混合物中。

[0111] 附加成分也可以存在于反应混合物中。这些成分可以是倾向于被包含进MNP的成分、或者是有助于预防MNP凝聚的成分，例如通过MNP形成后涂覆MNP来预防MNP凝聚。优选地，聚乙二醇(PEG)存在于反应混合物中作为防凝聚剂。在一些情况中，PEG在MNP形成后涂覆到MNP的表面。

[0112] 优选地，反应混合物在整个混合及MNP形成过程中被快速搅拌。

[0113] 在某些方面，在进一步步骤中，MNP从胶体悬浮液中被取出。这可以通过在大约21000g离心60分钟，然后去除上清液并在40-60℃下干燥几天而实现。得到的颗粒然后可以被移出并研磨成精细粉末以给出MNP聚集体。

[0114] 可选地，可以将浓度为大约1M的KCl溶液添加到悬浮液中，并静置大约15分钟。这建立了电荷层的压缩，导致MNP沉降。去除悬浮液，然后在大约5000g离心10分钟，去除上清液，给出浆体。该浆体可以可选地被干燥以生成MNP。

[0115] 抗微生物纳米颗粒的使用方法

[0116] 根据本发明的进一步方面，提供了形成如本文所述的抗微生物MNP的表面涂层的方法，所述方法包括：将制品浸渍到MNP的胶体悬浮液中，从悬浮液中移出制品，然后可选地用去离子水清洗所述制品并干燥。

[0117] 优选地，在将制品浸渍到悬浮液期间，悬浮液例如以大约150rpm被快速搅拌。

[0118] 优选地，制品浸渍在胶体悬浮液中的时间段为从1秒到30分钟。所获得的MNP覆盖与浸渍时间有关，因此如果需要较厚的覆盖，则浸渍时间应该相应地延长。

[0119] 可选地，制品在浸渍后用去离子水清洗。通过清洗从制品的表面上去除过多的MNP。优选地，清洗制品1秒到30秒。所获得的MNP覆盖与清洗时间有关，因此如果需要较厚的覆盖，则清洗时间应该相应地减少或者可以去除清洗步骤。

[0120] CHX-HMP MNP和/或用CHX-HMP MNP功能化的材料具有对抗多种微生物的功效，所述多种微生物包括：MRSA、大肠杆菌、铜绿假单胞菌、肺炎克雷伯氏菌、鲍曼不动杆菌(A.baumanii)、格氏链球菌、牙龈卟啉单胞菌(P.gingivalis)和白色念珠菌。已经使用大量的方法和试验来评估抗微生物功效，例如总活菌计数法(菌落形成单位)、时间杀菌试验(time-kill assay)、抑菌圈、存活/死亡活性测试和使用一系列显微镜技术的图像。

[0121] 关于本说明所公开的数值范围，显然可以理解的是，在正常方式中，上限的技术标准不同于下限的技术标准，即上限和下限本质上是不同的协议。

[0122] 为了避免疑惑，确认的是，在上述的一般说明中，在通常的方式中，关于MNP、制品、复合物和方法的不同特征的一般优选及可选都是独立描述地，并且可以在特征相兼容的情况下以特征的其他组合相互结合。

[0123] 实施例

[0124] 下述实施例是本发明的示意性说明。

[0125] 实施例1-6;对比例1-3:CHX从功能化的硼硅酸盐玻璃表面洗脱

[0126] 通过在室温和快速搅拌下、使100mL氯己定(像浓度为10mM的二葡萄酸盐水溶液)和100mL的一系列阴离子水溶液中的一种(初始浓度也为10mM,以使产生的每种成分的最终总浓度都为5mM)相结合来制备基于氯己定的盐。使用的阴离子如表1所示。

[0127] 表1

[0128]

简称	反应物	供应商
正磷酸根	磷酸氢二钠(Disodium hydrogen orthophosphate)	飞世尔科技(Fisher Scientific),拉夫堡,英国
焦磷酸根	五元焦磷酸四钠(Tetrasodium pyrophosphate pentabasic)	飞世尔科技
三磷酸根	五元三磷酸钠	西格玛-奥德里奇,吉灵厄姆(Gillingham),英国
六偏磷酸根	六偏磷酸钠	西格玛-奥德里奇
碳酸根	碳酸钙	飞世尔科技
硝酸根	四水硝酸钙	西格玛-奥德里奇

[0129]

[0130] 随后使沉淀物粘附在硼硅酸盐玻璃玻片上。通过在丙酮中超声10分钟,然后在工业用甲基化酒精中超声10分钟来清洗玻片(阿加尔科技(Agar Scientific),斯坦斯特德(Stansted),英国),然后在空气中干燥。这些玻片被浸渍到如上所述的200mL悬浮液中,同时使用磁力搅拌器快速搅拌该悬浮液。浸渍玻片30秒、移出、浸渍于去离子水中10秒以清洗、吸除过多的液体并在空气中干燥。

[0131] 使用扫描电子显微镜(SEM)和原子力显微镜(AFM)研究了产生的具有CHX基沉积物的玻璃表面。以轻敲模式用氮化硅悬臂操作的台式SEM(飞纳(Phenom),埃因霍恩(Eindhoven),荷兰)和AFM(纳米显微镜(Nanoscope)Ⅲa,数字仪表(Digital Instruments),加利福尼亚州,美国)被用于检查表面。在SEM之前,使用溅射镀膜仪在样品上涂覆金-钯层。

[0132] 使用紫外分光光度计检查了可溶性CHX从功能化的玻璃表面的洗脱。将每个类型的8个样品放置到适用于紫外分光光度计的各个被标记的比色皿中。向各比色皿中添加2.5mL去离子水,然后使用比色皿盖将其紧密密封。将这些比色皿在150rpm旋转的轨道式振荡器上振动。使这些比色皿保持密封,并在14天的时间段内每个间隔处取样测定氯己定浓度。制备对照组:样品只被浸渍到去离子水中,和样品只被浸渍到25μM或5mM的CHX溶液中;

25μM是CHX-HMP悬浮液中残余的可溶性CHX的浓度，5mM是制剂中(可溶性和结合的)CHX的总浓度。

[0133] 图1-2示出了各样品的SEM图像。

[0134] 图3-4示出了各样品的CHX洗脱图。所有的样品均释放可溶性CHX。

[0135] 表2示出了已测试的多种CHX盐的CHX释放特性。

[0136] 表2

[0137]

	涂层介质	CHX 释放期
实施例 1	5/5 CXH-正磷酸根	仅仅立即释放，没有持续释放
实施例 2	5/5 CHX-焦磷酸根	仅仅立即释放，没有持续释放
实施例 3	5/5 CHX-三磷酸根	仅仅立即释放，没有持续释放
实施例 4	5/5 CHX-六偏磷酸根	>14 天
实施例 5	5/5 CHX-碳酸根	48-72 小时
实施例 6	5/5 CHX-硝酸根	48-72 小时
对比例 1	去离子水	不适用
对比例 2	25 μM CHX	48-72 小时
对比例 3	5 mM CHX	48-72 小时

[0138] 实施例1——CHX-正磷酸根

[0139] CHX-正磷酸根(CHX-OP)功能化的样品显示了某些区域具有自组装多孔基质沉积，而且在图1b和图3a中还示出了不同寻常的结构。这些结构都是由起源于中心点并从该点径向延伸(“刺猬”形)的细长晶体的排列构成的。这些结构的直径通常为30-50μm且单独的晶体大约0.50-1μm宽。这些晶体常常是稍微弯曲的。

[0140] 实施例2——CHX-焦磷酸根；实施例3——CHX-三磷酸根；实施例4——CHX-六偏磷酸根

[0141] CHX-焦磷酸根(CHX-PP)、CHX-三磷酸根(CHX-TP)和CHX-HMP功能化的样品都展现了相似的自组装多孔基质的沉积。在CHX-PP和CHX-TP及CHX-HMP上出现了浓厚的覆盖，且CHX-PP和CHX-TP上的覆盖要比CHX-HMP上的更宽广。

[0142] CHX的正磷酸盐、焦磷酸盐和三磷酸盐均展现了最高的CHX释放。它们能够在短时间内产生非常大的CHX释放，这远远要比从仅暴露于CHX溶液的样品所观察到的释放更高且更快。从焦磷酸盐见到了最高的释放，从三磷酸盐见到了中等水平，从正磷酸盐见到了最低释放，尽管这甚至是从其他已测样品中所见到的CHX释放量级的4倍。所有情况的释放都发生在没有持续释放迹象的初始时间处。这些颗粒能够用于通常需要大剂量抗微生物剂的材

料中。一个例子可以是用于诸如颚填充体或义齿的医用装置的净化处理。

[0143] CHX的六偏磷酸盐展现了任何阴离子的最低总释放，但这在实验期间(14天)是持续的且在测量结束时仍在继续。换言之，实验CHX六偏磷酸盐示出了至少90天期间的更长释放期。这些颗粒可能在诸如留置导管、插管和种植体的那些需要在更长时段内具有抗微生物作用的材料中具有应用。

[0144] 实施例5——CHX-碳酸根；实施例6——CHX-硝酸根

[0145] 暴露于CHX-碳酸根制剂的样品展现了自发形成的以大致球状形式排列的纳米管结构(图2g)。它们主要是单壁管，但在一些区域也可以看到双壁纳米管、或者纳米管套纳米管。

[0146] 在SEM中观察到CHX-硝酸根功能化的样品上的沉积物稀薄分布并且在大部分区域似乎是无特征的。

[0147] CHX的硝酸盐和碳酸盐展现的CHX释放要低于正磷酸盐、焦磷酸盐和三磷酸盐，且该释放继续了几天。硝酸盐和碳酸盐样品释放了CHX且该释放持续了大约48-72小时；在该时间后，CHX的浓度稳定且该释放可以认为是接近完成。这些盐可能在需要在这一时段内具有抗微生物作用的产品中得到应用，例如创伤敷料或缝合线。

[0148] 对比例1-3

[0149] 用水或者含水CHX溶液处理的玻璃表面似乎是无特征的且平坦的(图1a)。用CHX处理的样品都释放了CHX且该释放持续了大约48-72小时；在该时间之后，CHX的浓度稳定且该释放可以被认为已经接近完成(图4)。

[0150] 实施例7-14；对比例4-7：CHX从CHX-HMP功能化的材料中的洗脱

[0151] 纳米颗粒的合成及表征

[0152] 通过在室温并在快速搅拌下、使CHX(例如水溶液中的二葡萄糖酸盐)和HMP(例如水溶液中的钠盐)相结合来制备CHX-HMP纳米颗粒，以实现每种成分的最终浓度为5mM和5mM或者0.5mM和0.5mM。这些产物将自此被称作为CHX-HMP-5和CHX-HMP-0.5。

[0153] 将两种反应物混合以形成胶体悬浮液。使用动态光散射法(DLS)以时间和电泳迁移率的函数来表征胶体悬浮液中纳米颗粒的颗粒尺寸和ζ-电势(马尔文(Malvern)激光粒度仪，马尔文，英国)。

[0154] 纳米颗粒功能化材料的制备及表征

[0155] 一系列材料的样品被涂覆有纳米颗粒。所用的这些样品示出于表3中。

[0156] 表3

[0157]

实施例	简称	描述	制备	供应商
7，8	玻璃	直径 12 mm 圆形 硼硅酸盐玻璃玻片	在丙酮中超声 10 分钟，在工业用甲基化酒精中超声 10 分钟，在空气中干燥	阿加尔科技，斯坦斯特德，英国
9，10	海藻酸盐创伤敷料	包含海藻酸盐纤维的市售创伤敷料的 10 × 7 mm 的截面	以供应样使用	“沙威龙（Savlon）海藻酸盐敷料”，诺华消费者健康部（Novartis Consumer Health），霍舍姆（Horsham），英国
11，12	EVA 聚合物	7×7×3 mm 的乙烯乙烯乙酸酯截面	在工业用甲基化酒精中超声 10 分钟，在空气中干燥	数据塑料（Data Plastics），威特尼（Witney），英国
13，14	钛	二级商业纯钛的 10×10×1 mm 的正方形截面	使用 80 目碳化硅纸进行抛光，在丙酮中超声 10 分钟，在工业用甲基化酒精中超声 10 分钟，在空气中干燥	泰克（Titek），萨顿科尔菲尔德（Sutton Coldfield），英国

[0158] 使用新鲜制备的反应物(以预防HMP的水解)制备了200mL的胶体悬浮液。在快速搅拌的胶体中将样品浸渍30秒，随后移出，然后浸渍于去离子水中10秒以清洗，然后吸除过多的液体并在空气中干燥。

[0159] 使用原子力显微镜(AFM;纳米显微镜IIIa，数字仪表，加利福尼亚州，美国)检查那些具有合适表面(玻璃，钛)的纳米颗粒的功能化表面，但不检查那些具有粗糙或不均匀表面(海藻酸盐敷料，EVA聚合物)的纳米颗粒的表面。在使用溅射镀膜仪单元(SC7620，艾米泰克(Emitech)，台湾)涂覆金-钯合金后，使用扫描电子显微镜(SEM)(飞纳，埃因霍恩，荷兰)检查所有的样品。由于玻璃或钛都不是原子级平坦的表面，所以很难将小表面(＜20nm)特征与小纳米颗粒相区分;由于这一原因，将CHX-HMP-5纳米颗粒和CHX-HMP-0.5纳米颗粒也沉积在新裂开的云母上以区分出这些颗粒中最小的颗粒。

[0160] 将每种涂覆有CHX-HMP-5纳米颗粒和CHX-HMP-0.5纳米颗粒的材料的8个样品都放

置到适用于紫外分光光度计的各个被标记的比色皿中。向各比色皿中添加去离子水，然后使用比色皿盖将其紧密密封。将比色皿置于以150rpm旋转的轨道式振荡器上振动。使这些比色皿保持密封，并在60-90天期间内每个间隔处取样测氯己定浓度。制备对照组：样品浸渍于去离子水中，和样品浸渍于25μM CHX溶液中，该25μM是CHX-HMP-5胶体悬浮液中残余的含水CHX的浓度。

[0161] 从胶体悬浮液中可选地取出NP

[0162] 可选地，可以在反应已经执行之后从悬浮液中取出NP。这在本实施例的事件中并没有进行，然而通过下述选项中的一种可以实现：

[0163] 1)置于高耐受力(high-g)离心管或艾本德离心机(Eppendorfs)中并在21000g下离心60分钟。这给出了中等的分离；仍旧有NP残留在看起来稍微浑浊的液体的上清液中的迹象。移出上清液并弃掉，然后使用NP浆体或者在40-60度的烘箱中干燥几天，刮出并研磨成精细的白色粉末，给出了NP的聚集体。这些例如可以添加到牙科水门汀或其他材料中。

[0164] 2)可替代地，将25mL的1M KCl添加到250mL 5/5胶体悬浮液中，静置15分钟，然后由于电荷层压缩，大量的NP将在容器底部沉积。倒出并弃掉上清液，然后将底部的粒子密集的液体收集到离心管中。在5000g下离心10分钟。由于NP周围电荷层的压缩，这给出了更加有效的分离，且能够用于以更典型的实验设备加工处理更大量的NP。将上清液弃掉后，刮出浆体；该浆体可以用于例如添加到涂料或其他材料中。可选地，可以按照如上所述那样干燥并使用该浆体。

[0165] 表4示出了CHX-HMP-0.5悬浮液和CHX-HMP-5悬浮液的主要粒径和Zeta-电势。

[0166] 表4

[0167]

纳米颗粒制备	粒径[nm](标准偏差)	ζ-电势[mV](标准偏差)
CHX-HMP-0.5	122(47)	-39.6(3.2)
CHX-HMP-5	141(44)	-47.5(6.5)

[0168] DLS表明一些样品的双模态尺寸分布，其中在大约20-60nm处观察到更小尺寸的第二峰。纳米颗粒功能化表面的SEM图像示出于图5-8中，且功能化玻璃、钛和云母表面的AFM示出于图9-11中。钛和玻璃样品展现了纳米尺度的粗糙度，这使得有可能将基质表面与尺寸小于约40nm的纳米颗粒相区分，但对照的云母表面是原子级平坦的，且这些图像给出了清楚指示，表明了尺寸通常为20-100nm的纳米颗粒的融合层。

[0169] 图12-15示出了氯己定从纳米颗粒功能化表面的洗脱。

[0170] 所研究的不同材料样品均成功地用CHX-HMP抗微生物纳米颗粒功能化，并展现了在高达90天的期间内的可溶性CHX的逐渐洗脱。图5-11的SEM和AFM图像给出了单独的纳米颗粒和在大多数表面上自发地自组装的多孔纳米颗粒聚集体的清楚的可视化。

[0171] 表5示出了不同功能化材料的CHX释放期。对于CHX的释放量，参见图12-15。

[0172] 表5

[0173]

	材料	涂层介质	CHX 释放期
实施例 7	玻璃	CHX-HMP-5	>90 天
实施例 8	玻璃	CHX-HMP-0.5	20-25 天
实施例 9	海藻酸盐敷料	CHX-HMP-5	>50 天
实施例 10	海藻酸盐敷料	CHX-HMP-0.5	>50 天
实施例 11	EVA 聚合物	CHX-HMP-5	>80 天
实施例 12	EVA 聚合物	CHX-HMP-0.5	~20 天
实施例 13	钛	CHX-HMP-5	>60 天
实施例 14	钛	CHX-HMP-0.5	5 天

[0174]

对比例 4	玻璃	25μM CHX 溶液	无释放
对比例 5	海藻酸盐敷料	25μM CHX 溶液	>60 天
对比例 6	EVA 聚合物	25μM CHX 溶液	无释放
对比例 7	钛	25μM CHX 溶液	少量或者没有显著释放

[0175] 实施例7——用CHX-HMP-5功能化的玻璃

[0176] 实施例8——用CHX-HMP-0.5功能化的玻璃

[0177] 对比例4——暴露于25μM CHX溶液的玻璃

[0178] 纳米颗粒功能化的玻璃表面在整个实验期间释放了CHX(图13),且该CHX释放与纳米颗粒或纳米颗粒聚集体的初始密度有关,更加密集涂覆CHX-HMP-5的表面要比不太密集涂覆CHX-HMP-0.5的表面展现了更高且更加延长的释放(图6)。对于CHX-HMP-0.5样品,可溶性CHX的释放在大约20-25天后停止,然而对于CHX-HMP-5样品,该释放在90天时间点时仍然继续。用25μM CHX溶液处理的对照组并未显示任何CHX释放,表明可溶性CHX完全通过清洗步骤被去除了,因此在纳米颗粒功能化的样品中观察到的CHX释放归功于这些纳米颗粒的存在。这一发现可以在将得益于延长的抗微生物功能的含玻璃和玻璃状生物医学产品及消费产品中具有应用,例如玻璃离子体水门汀、包含埋植于水门汀基质中的玻璃颗粒的牙齿充填材料。

[0179] 实施例9——用CHX-HMP-5功能化的海藻酸盐创伤敷料

[0180] 实施例10——用CHX-HMP-0.5功能化的海藻酸盐创伤敷料

[0181] 对比例5——暴露于对照25μM CHX溶液的海藻酸盐创伤敷料

[0182] 当归一化为表面面积时,最高的CHX释放来自海藻酸盐创伤敷料(图12)。SEM图像

清楚地示出了CHX-HMP-5纳米颗粒在几乎所有纤维上的纳米颗粒聚集体的密集涂层，以及涂覆有CHX-HMP-0.5纳米颗粒的样品上的稀疏分布(图5)。用对照25μM CHX溶液处理的样品也有一些CHX释放，表明材料从溶液中吸收了一些可溶性CHX，但对照样品中CHX释放的量要远小于从纳米颗粒功能化的样品中释放的量(图12)。具有剂量-响应关系，因此CHX-HMP-5样品比CHX-HMP-0.5样品展现了更大的释放，且这与CHX-HMP-5制剂的纳米颗粒的较宽广的覆盖有关(图5)。对于CHX-HMP-5样品和CHX-HMP-0.5样品，二者的释放在实验结束时都还在继续，表明纳米颗粒在这时并未耗尽。这些发现在研发保护慢性或不愈性创伤免受感染的创伤敷料中可能是很有用的。

[0183] 实施例11——用CHX-HMP-5功能化的EVA聚合物

[0184] 实施例12——用CHX-HMP-0.5功能化的EVA聚合物

[0185] 对比例6——暴露于对照25μM CHX溶液的EVA聚合物

[0186] 涂覆有CHX-HMP-5纳米颗粒的EVA聚合物表面示出了与在玻璃和海藻酸盐创伤敷料上观察到的相同特征的纳米颗粒聚集体，尽管其覆盖通常有点不像在其他基质上那样密集(图7)。

[0187] EVA CHX-HMP-0.5样品示出了非常低且短暂的可溶性CHX释放。然而，CHX-HMP-5样品示出了直到至少80天的延长的CHX释放(图14)，并且当归一化为表面面积时，这与从玻璃样品中见到的释放是具有可比性的，但稍高于从玻璃样品中见到的释放。这些发明在研发诸如静脉导管和导尿管的以抗微生物聚合物为基础的医用设备中、以及在诸如运动牙托和磨牙症牙托的可移动性聚合物产品的抗微生物涂层的周期性局部应用中可以发现应用。

[0188] 实施例13——用CHX-HMP-5功能化的钛

[0189] 实施例14——用CHX-HMP-0.5功能化的钛

[0190] 对比例7——暴露于对照25μM CHX溶液的钛

[0191] 钛表面示出了CHX纳米颗粒聚集的清楚迹象，如图8所示。CHX-HMP-5功能化的样品示出了在整个实验期间连续的且持续的可溶性CHX释放；在数值上这一释放是从玻璃和聚合物表面上所见到的CHX释放的大约两倍。CHX-HMP-0.5功能化表面释放了很少的CHX，且该释放在大约5天后就停止了。CHX-HMP-5纳米颗粒可以在研发由钛和钛合金制造的牙种植体和骨科种植体的抗微生物涂层中具有应用，并提供了优于传统抗微生物涂层的优势，该优势为纳米颗粒产生了具有大量钛的仍暴露的并且可用于成骨细胞定殖的非连续涂层。

[0192] 实施例15-18；对比例8-10：微生物学研究

[0193] 微生物学：细菌菌株

[0194] 耐甲氧西林金黄色葡萄球菌(MRSA；NCTC13142)在米勒-亨顿(Mueller-Hinton；MH)培养基中培养。铜绿假单胞菌NCIMB 8626(ATCC 9027)在营养肉汤(NB)或营养琼脂(NA)中培养。所有的培养在整个研究中均在37℃下有氧培育中进行。

[0195] 微生物学：最小抑制浓度

[0196] 在96孔微量滴定板中以总体积为100μL的适宜介质中通过系列双倍稀释法(0-25μm)测定了对照含水25μM氯己定和CHX-HMP-5胶体对浮游菌的最小抑制浓度(MIC)(根据英国学会(British Society)的抗微生物化学疗法的MIC测定法)。培养在有氧条件下在37℃下培育16小时，使用标准微量滴定板读出器(SpectroStar Nano；伯齐实验技术(BMG Labtech))在620nm(A_{620})下测量了光密度(OD)读数。

[0197] 微生物学:总活菌计数

[0198] 样品取自微量滴定板的各个孔并且以磷酸盐缓冲液(PBS)系列稀释(10^{-1}-10^{-6});用MH或NA作为非选择性培养基,使用麦尔斯(Miles)和米斯拉(Misra)总活菌细胞(TVC)计数法(见卫生年鉴(HYg(Lond),卷38,页732-749,1938))计算了10μL等份。回收的细胞数量计算为cfu ml^{-1}。

[0199] 微生物学:静态生物膜模型

[0200] 细菌菌株最初生长16小时,然后通过离心收获这些稳定期的培养,然后调整至OD_{650}=0.1。生物膜在50μL适宜介质中在37℃下有氧生长48小时,然后移出并弃掉该介质。通过用100μL的PBS清洗该生物膜两次去除松散粘附的细菌。使用如上所述(0-25μM)的双倍稀释将以PBS稀释的氯己定或氯己定纳米颗粒添加到生物膜中。该板在37℃下培育2小时;为估算生物量,一般吸除并弃掉未粘附的细胞,然后使用PBS两次清洗粘附的细胞,并用结晶紫(0.25%w/v)染色10分钟;然后进一步用PBS清洗两次,用7%乙酸重新溶解结合结晶紫的细胞,然后在595nm下测量吸光度(A_{595})。

[0201] 微生物学:在纳米功能化的EVA聚合物样品上的生物膜

[0202] MRSA和铜绿假单胞菌的预培养在适宜介质中在37℃下有氧初始生长16小时。通过将聚合物片的每个方块置于24孔MTP的各孔中,然后添加1ml适宜的液体介质(足以覆盖该聚合物样品)来确定聚合物片上的生长分析。聚合物样品是表3所指定的EVA聚合物,这些聚合物样品在IMS中超声10分钟进行清洗,然后:不处理(对照),或者在搅拌的CHX-HMP-5中浸渍30秒,然后在去离子水中浸渍10秒(低NP),以及在搅拌的CHX-HMP-5中浸渍30秒,但没有清洗(高NP)。每个孔均培育有10μl MRSA或者铜绿假单胞菌的预培养,然后在37℃下培育24小时。使用无菌钳从孔中移出聚合物样品,然后转移到含有1ml PBS的微型离心机的管中。漩涡震荡该管1分钟以移除粘附的细菌,然后将细胞悬浮液系列稀释(10^{-1}-10^{-6}),并使用Miles Misra法计算细菌。

[0203] 表6示出了对照的和CHX-HMP-5介质的MIC。

[0204] 表6

[0205]

	介质	MIC,总CHX浓度(可溶性CHX浓度)
实施例15	CHX-HMP-5悬浮液	MRSA: 0.625 mM (3.12 μM); 铜绿假单胞菌: 0.312 mM (1.56 μM) (检测的最小值)
对比例8	25μM CHX	MRSA: 未确定(不是有效的) 铜绿假单胞菌: (25μM)

[0206] 表7示出了不同介质对MRSA和铜绿假单胞菌的静态细菌生物膜的作用。

[0207] 表7

[0208]

	介质	对生物膜的作用
实施例 16	CHX-HMP-5	MRSA:严重分解 铜绿假单胞菌:严重分解
对比例 9	25μM CHX	MRSA: 轻微分解 铜绿假单胞菌:轻微分解

[0209] 表8示出了纳米功能化EVA聚合物样品的抗微生物作用。

[0210] 表8

[0211]

	样品	**结果**
实施例 17	EVA 上高 NP CHX-HMP-5	MRSA: 没有细菌 铜绿假单胞菌: 没有细菌
实施例 18	EVA 上低 NP CHX-HMP-5	MRSA: 没有细菌 铜绿假单胞菌: 高水平的细菌，低浑浊度的液体培养基

[0212]

对比例 10	未处理的 EVA	MRSA: 被回收了 5×10^{5} cfu ml^{-1} 铜绿假单胞菌: 高水平的被回收的细菌，高浑浊度的液体培养基

[0213] 发现CHX-HMP-5胶体悬浮液对MRSA的MIC是胶体的8倍稀释，这相当于总(可溶性的和结合的)CHX浓度为0.625mM且可溶性CHX浓度为3.12μM。25μM氯己定对MRSA的MIC不能确定，表明该溶液不能有效抵抗MRSA(图19)。对于铜绿假单胞菌，CHX-HMP-5的MIC被发现是胶体的16倍稀释，这是检测的最小浓度；这相当于总CHX浓度为0.312mM且可溶性CHX浓度为1.56μM。25μM氯己定的MIC浓度是未稀释的溶液，即25μM，表明铜绿假单胞菌对纳米颗粒比MRSA对纳米颗粒更敏感(图20)。TVC证实了MIC数据，未处理对照有1.5×10^{12}cfu ml^{-1}的MRSA回收，在CHX-HMP-5胶体的8倍稀释液和4倍稀释液生长的样品中没有细菌回收，表明MIC也是杀菌浓度。相似地，对于铜绿假单胞菌，与未处理对照中回收1.34×10^{9}cfu ml^{-1}相比，不能从在CHX-HMP-5胶体的16倍稀释液和8倍稀释液生长的样品中回收到细菌。

[0214] MRSA的生物膜被CHX-HMP-5胶体分解了，但被含水的25μM氯己定分解的程度较轻(图21)。CHX-HMP-5胶体还在16倍和4倍的稀释之间比含水的25μM氯己定更加有效地分解了铜绿假单胞菌的生物膜(图22)；在2倍稀释和未稀释水平处，25μM氯己定与纳米颗粒是同等

效果。关于在纳米功能化的EVA聚合物上生长的生物膜，对于对照聚合物，在所有所用的稀释液中从样品中回收的铜绿假单胞菌细胞多到不能计数；以5×10^5cfu ml^{-1}回收了MRSA。对于涂覆有低浓度纳米颗粒的聚合物片，对于铜绿假单胞菌，细菌细胞在所有稀释处多至不能计数；但对于MRSA，没有细胞是可回收的。应该注意的是，对于铜绿假单胞菌，尽管回收了高数量的细菌，但周围液体介质没有对照那样浑浊(表明较少的生长)，而对于MRSA，周围介质是清澈的，表明没有生长。对于涂覆有高浓度纳米颗粒的聚合物片，对于MRSA和铜绿假单胞菌都没有细菌是可回收的，两种情形下周围介质都是清澈的。

[0215] 微生物学实验表明CHX-HMP-5胶体在体外对浮游生长的MRSA和铜绿假单胞菌都是有效的，并且表明这一作用不是由于在容纳有胶体的溶液中存在有残余的25μM可溶性CHX。此外，生物膜研究表明CHX-HMP-5胶体在体外对MRSA和铜绿假单胞菌的生物膜都是有效的。此外，涂覆有CHX-HMP-5纳米颗粒的EVA聚合物样品展现了对抗MRSA和铜绿假单胞菌的生物膜的作用。

[0216] 实施例19-24；对比例11：CHX-HMP NP替代的玻璃离子体水门汀

[0217] CHX-HMP纳米颗粒的合成及制备

[0218] 使氯己定二葡萄糖酸盐(西格玛-奥德里奇)的含水储备液和六偏磷酸钠(西格玛-奥德里奇)的含水储备液在去离子水中混合，以便最终浓度为4mM CHX和5mM。产生的胶体悬浮液被彻底混合，然后在21000g下离心60分钟。移出并弃掉上清液，然后使NP浆体在40℃下至少干燥48小时。然后从离心管中移出该浆体，并使用研钵和研杵研磨至精细的白色粉末。将该粉末替代玻璃粉末添加到GIC中。

[0219] 纳米功能化的玻璃离子体水门汀

[0220] 市售GIC(钻石切割(Diamond Carve)(TM)，开普敦(Kemdent)，珀顿(Purton)，英国)被用作起始物料。根据制造商指示通过混合GIC并将其填充到涂覆有一薄层用于辅助移除的凡士林的有机玻璃模具中，形成直径6mm且高3mm的正常尺寸的圆柱形GIC样品。通过对GIC制备具有丰富经验的个人执行该混合。使用卡尺测量每个样品的精确尺寸并记录。NP粉末以0、1、2、5、10、20和30wt％的替代与等份的GIC玻璃粉末混合。每个替代建立十个样品，共给出了70个样品。在60分钟内将这些样品从模具中去除，并置于单独的小的、密封的塑料容器中，这些容器包含有不与样品直接接触的湿的棉纸，以实现100％湿度的氛围，但防止样品与液体水接触而导致的在设置的关键早期期间的溶解。这些样品都在37℃下储存7天。

[0221] 在这一时间后，将样品分为两组，每组5个样品。为了拉伸强度测试和形态测试，每个替代都预留一组，然后其他组被用于研究氯己定和氟化物从水门汀中的浸出。

[0222] 对于氯己定和氟化物释放的研究，每个样品都浸渍于37℃下单独标记的小管中的1ml人工唾液中。人工唾液由0.103gL^{-1}的$CaCl_2\cdot2H_2O$、0.019gL^{-1}的$MgCl_2$、0.544gL^{-1}的KH_2PO_4、4.77gL^{-1}的$C_8H_{18}N_2O_4S$(4-羟乙基哌嗪乙磺酸(HEPES)缓冲液的酸性形式)、2.24gL^{-1}的KCl、1.80mL 1M HCl构成，滴定KOH以获得pH为6.8。定期将样品移出并一式两份置于含有新鲜人工唾液的管中，以便使培育有样品的人工唾液能够被取样以测定氯己定和氟化物的浓度。进行了试点研究以确立该容器内氟化物浓度的饱和限度，以确保适宜地选择了取样周期，以及确定由于在读数之间留下过大的间隙而并没有获得由氟化物盐洗脱液的饱和度导致的错误读数。使用这一试点研究的发现，在第一天期间的各小时间隔处进行取样，然后在4小时的间隔处、然后每天、然后每周。只包含人工唾液而不包含GIC样品的对照实验也以相

同方式取样。

[0223] 氯己定的测量

[0224] 使用紫外(UV)分光光度计测量人工唾液中的氯己定浓度。将1mL人工唾液置于在UV波长下透明的半微量比色皿中，然后使用分光光度计在255nm下测量吸光度。参照在各测量周期的开始和结束时测量的5、10、20、30、40、50μmol.l^{-1}氯己定下的校准标准将读数转换为氯己定浓度。对于每个样品，参照单独的尺寸测量将该浓度转换为GIC样品每单位表面面积释放的氯己定的摩尔数。

[0225] 氟化物的测量

[0226] 使用离子选择性电极，通过将0.5mL的人工唾液与0.5mL的总离子强度调节缓冲溶液(TISAB)的溶液相混合来测量人工唾液中的氟化物浓度。参照也用等量的TISAB稀释的0.1、0.5、1、2和5mg/LF^{-1}的校准标准将输出数据转换为mg/L氟离子。

[0227] 拉伸强度的测量

[0228] 通过向圆柱形样品施加径向压缩力直到发生断裂，记录断裂时的压力，然后使用该压力计算拉伸强度，从而测量间接拉伸强度。

[0229] 统计学分析

[0230] 使用杜克真实显著性差异事后检验(a Tukey honestly significant difference post-hoc test)的单因素方差分析(ANOVA)对比了1小时、24小时、8天、15天和33天这些时间点处的CHX累积释放和氟化物累积释放、以及间接拉伸强度。

[0231] 形态和结构

[0232] 已经测试了拉伸强度的样品被涂覆一薄层金-钯(SC7620，艾米泰克，台湾)并在扫描电子显微镜(飞纳，埃因霍恩，荷兰)下进行检查。在400、1000和5000倍的标称放大倍率下获得图像。

[0233] 表9示出了替代GIC和未替代GIC的特性。

[0234] 表9

[0235]

	NP 含量 (wt%)	操作特性	CHX 释放期	F 释放期	径向拉伸强度 (MPa) (括号中为标准偏差)
实施例 19	1	良好	>33 天	>33 天	14.3 (4.9)
实施例 20	2	良好	>33 天	>33 天	15.7 (4.3)
实施例 21	5	良好	>33 天	>33 天	15.5 (1.1)
实施例 22	10	良好	>33 天	>33 天	11.5 (2.8)
实施例 23	20	良好	>33 天	>33 天	9.4 (2.6)
实施例 24	30	差(弃掉)	不适用	不适用	不适用
对比例 11	0	良好	>33 天	>33 天	14.1 (3.7)

[0236] 表10示出了CHX累积释放。在每个时间点内，字母指示了统计学上的同质组，因此，带有不同字母的数字是在那个时间处在统计学上显著差异至95％置信水平。

[0237] 表10

[0238]

	CHX 累积释放 [nmol.mm-2] (括号中为标准偏差)				
	1 小时	24 小时	8 天	15 天	33 天
实施例 19	0.16 (0.08)a,b	0.20 (0.09)a,b	0.48 (0.15)a,b	0.56 (0.16)a,b	0.65 (0.17)a,b
实施例 20	0.66 (0.18)b	0.70 (0.19)b	1.04 (0.21)b	1.17 (0.22)b	1.30 (0.24)b
实施例 21	1.30 (0.24)c	1.39 (0.25)c	2.03 (0.34)c	2.30 (0.36)c	2.51 (0.38)c
实施例 22	2.52 (0.38)d	2.65 (0.40)d	3.40 (0.43)d	3.73 (0.44)d	4.01 (0.45)d
实施例 23	4.02 (0.48)e	4.20 (0.50)e	5.09 (0.55)e	5.46 (0.59)e	5.94 (0.67)e

[0239]

对比例 11	0.01 (0.003)a	0.01 (0.02)a	0.11 (0.06)a	0.12 (0.07)a	0.16 (0.08)a

[0240] 表11示出了氟化物累积释放。在每个时间点内，字母指示了统计学上的同质组，因此，带有不同字母的数字是在那个时间处在统计学上显著差异至95％置信水平。

[0241] 表11

[0242]

	氟化物累积释放 [ng.mm-2] (括号中为标准偏差)				
	1 小时	24 小时	8 天	15 天	33 天
实施例 19	2.61 (1.11)b	18.59 (3.12)a,b	70.72 (8.40)a	106.9 (14.1)a	148.1 (16.6)a
实施例 20	1.68 (0.73)b	17.10 (2.33)b	64.30 (7.68)a	101.1 (12.2)a	147.5 (15.7)a
实施例 21	1.74 (0.70)b	19.31 (4.32)a,b	82.67 (7.49)a	124.2 (9.2)a	181.4 (14.0)a,b
实施例 22	1.83 (0.96)b	18.73 (9.50)a,b	81.73 (30.22)a	122.8 (39.3)a	184.4 (49.8)a,b
实施例 23	2.09 (0.34)b	23.74 (5.89)a,b	81.73 (13.15)a	134.6 (19.2)a	204.4 (23.4)b
对比例 11	7.38 (1.69)a	27.65 (0.85)a	85.82 (5.68)a	119.9 (11.0)a	154.5 (14.3)a,b

[0243] 综述

[0244] 成功建立了用1、2、5、10和20wt％的CHX-HMP纳米颗粒替代玻璃粉末的GIC样品，并将其与未改性GIC(0wt％替代)进行了对比。具有30wt％的CHX-HMP纳米颗粒替代的那些GIC样品更加易碎且难于操作，因此被丢弃了。

[0245] 氯己定的释放

[0246] 归一化为表面面积的、在791小时(33天)内的CHX释放如图16所示。CHX释放在研究期间一直持续并且在最终测量时间点还未达到完全停止。剂量-响应在具有较高CHX-NP替代的样品中是明显的，展现了更大的CHX释放，尽管其相关性不是直接成比例的。

[0247] 6个样品组在1小时、24小时、8天、15天和33天处的CHX累积释放及统计分析结果示出于表10中。每个时间点的结果是相同的，其中，0wt％和1wt％与彼此在统计学上不是显著差异的，以及1wt％和2wt％与彼此在统计学上不是显著差异的，但所有的其他各对儿是显著差异的，指示了在所有测量时间处与纳米颗粒替代相关的氯己定释放的明显增加。

[0248] 氟化物的释放

[0249] 归一化为表面面积的、在791小时(33天)内的氟化物释放如图17所示。所有的GIC

样品在实验期间均连续地释放氟化物。初始释放速率是最快的，且速率在实验期间逐渐减慢。

[0250] 6个样品组在1小时、24小时、8天、15天和33天处的氟化物累积释放及统计分析结果示出于表11中。在1小时处，未改性的GIC要比替代的氟化物显著释放了更多的氟化物，但在统计学上没有显著差异。在后续时间处，在不同替代之间具有很小的差异，且所有GIC样品的氟化物释放都非常相似，并且没有随着纳米颗粒替代的变化而变化。

[0251] 拉伸强度

[0252] 6个样品组的径向拉伸强度示出于表3中。ANOVA给出p值为0.054，表明尽管对于10wt％和20wt％替代的水门汀具有朝着较低拉伸强度的数值趋势，但在这些数值之间以及在其他水门汀的数值之间均不具有统计学上的显著差异。

[0253] 形态和结构

[0254] 代表GIC样品的扫描电子显微图像示于图18中。具有不同纳米颗粒替代的GIC样品的形貌是无法区分的，而玻璃填充颗粒和周围基质是清晰可见的。只有20wt％的纳米颗粒替代展现了稍微不同的形貌(图18f)，其迹象为更小的颗粒或纳米聚集体。

[0255] 总结

[0256] 通过向市售GIC中添加CHX-HMP纳米颗粒，已经证明有可能建立以剂量依赖方式在延长的期间内释放CHX的材料。由于CHX可有效对抗一系列细菌和酵母菌，这为这些新颖的纳米功能化牙齿填充材料给予了抗菌或防龋特性。直到5wt％的替代似乎对水门汀的拉升强度没有显著的有害影响(表9)。尽管在统计学上是不显著的，但更高的替代可能导致拉升强度降低；当20wt％时，有可能在水门汀结构内见到一些不同的形态(图18)，表明纳米颗粒或纳米聚集体的存在。这些更高的替代能够导致强度降低，因为它们不能被假定为以和玻璃填充颗粒相同的方式与缩多酸接触。纳米功能化GIC示出了与未改性水门汀相同的氟化物释放曲线。

[0257] 与诸如使用磨成粉的醋酸CHX或者使用CHX二葡萄糖酸盐的水溶液等其他方式截然相反的是，使用本文所述的CHX-HMP纳米颗粒提供了这样的优势：GIC中的CHX释放持续地相当更长(图16)。与本文所见的至少33天的连续释放相比，添加有研磨成粉的醋酸CHX的复合树脂示出了在大约7天后达到高峰的CHX释放(牙科材料(Dent Mater)，卷28，页573-583，2012)。

[0258] 已经报道了添加有醋酸CHX粉末或CHX二葡萄糖酸盐溶液的GIC(美学和修复学杂志(J Esthet Restor Dent)，卷20，页29-44；讨论部分45，2008)，并且这些GIC抑制了一些口腔微生物的生长。没有直接测量从这些GIC中的CHX释放。大多数样品示出在60-90天后没有抗微生物行为。对于所有的GIC样品，这些已知GIC的作用高峰是前24小时，表明大多数CHX在这一初始期间就释放了。在包含有本方案MNP的GIC中所观察到的更加延长的CHX释放导致更加延长的抗微生物作用。

[0259] 实施例25——用CHX纳米颗粒功能化的EVA样品上的微生物

[0260] 通过在CHX-HMP-5在水中的胶体悬浮液中浸渍30秒，然后在去离子水中浸渍10秒(“低浓度”)或者随后不在去离子水中浸渍(“高浓度”)使EVA样品功能化。这些样品随后暴露于MRSA细菌的培养中。随后将其浸渍于1mL生长培养基中并培育18小时。根据这一时间内的释放实验，EVA样品应该释放大约每m^2材料6μM。样品的表面面积是0.000182m^2，因此期望

的总释放应该是1.1nM CHX除以1mL得到结果为1.1μM CHX的浓度。

[0261] 这些导致CHX浓度为大约1.1μM的样品没有可回收的MRSA。然而，使用25μM CHX溶液的相似处理没有有效对抗MRSA(与CHX-HMP-5悬浮液截然相反)。这些结果表明纳米颗粒能够有效对抗MRSA，并且纳米颗粒自身可以展现一些高于且优于因释放CHX而导致的抗菌作用的附加抗菌作用。这可能是由于最接近材料表面的局部较高的CHX浓度，和/或纳米颗粒具有固有的抗微生物活性。

[0262] 实施例26——用CHX纳米颗粒功能化的钛样品上的微生物

[0263] 用CHX-HMP-5功能化的钛样品也暴露于格氏链球菌细菌的培养中。将样品浸渍于2mL生长培养基中并培育最长48小时。根据释放实验，这应该产生大约每$m^2$7μM的释放。样品的表面面积是0.00024m^2，因此期望的释放应该是1.7nM CHX除以2mL得到结果为0.8μM CHX的浓度。

[0264] 纳米颗粒功能化的钛表面淘汰了样品中的细菌。

[0265] 已经报道了变形链球菌(S.mutans)(是与格氏链球菌相似的一种革兰氏炎性链球菌，也和龋齿有关联)的MIC是质量计0.125％的CHX二葡萄糖酸盐，相当于大约1.4mM，即比本样品所实现的CHX浓度高出4个数量级。

[0266] 这些结果暗示了纳米颗粒自身展现了一些固有的抗微生物作用，该作用超出了向大量溶液中释放的可溶性CHX的抗微生物作用。

[0267] 实施例27——CHX-HMP MNP的特性

[0268] 本文提供了关于CHX-HMP MNP的组成、化学计量、尺寸和聚集特性的直接证据。

[0269] 已经对MNP、尤其是CHX-HMP-5和CHX-HMP-0.5组合物进行分析(图23)。将CHX-HMP-5和CHX-HMP-0.5NP沉积在碳覆盖的铜网(琼脂科技有限公司(Agar Scientific Ltd.)，埃塞克斯，英国)上，然后经受透射电子显微镜(TEM)和能散X射线分析(EDX)(日本电子株式会社(Jeol)120kV 1200Mk2；日本电子株式会社，东京，日本)。将TEM铜网浸渍于NP悬浮液中2秒，以去离子水清洗2秒，然后在空气中干燥。

[0270] 通常发现MNP为广泛范围尺寸的聚集体。图23示出了左侧为CHX-HMP-0.5样品、右侧为CHX-HMP-5样品的例子。较高浓度样品的图像示出了在聚集体的周围可以见到MNP(图像的右上方)，具有单个纳米颗粒的良好可见性。分离的、单个纳米颗粒的两个例子如箭头所示。TEM表明MNP常常熔合在一起，而不是只由静电保持的(尤其参见较低浓度样品的图像)。还观察到一些非常小的聚集体。

[0271] 对TEM铜网上的CHX-HMP MNP进行了EDX，以研究MNP的组成。在能谱中观察到了Cl(来自CHX)和P(来自HMP)，证明MNP由CHX和HMP构成。Cu和Au的信号归因于沉积有MNP的TEM铜网。

[0272] 已经进行了动态光散射(DLS)和ζ-电势测量(Zetasizer NanoZS；马尔文仪器有限公司，马尔文城，英国)(分别是图24和图25)。CHX-HMP-5悬浮液包含有一些沉降聚集体，因此在分析上清液之前使样品沉降。报道的每个数值均是图中表示的3次测量的平均值；每次测量均对不同的纳米颗粒悬浮液进行。对于CHX-HMP-5和CHX-HMP-0.5，使用DLS测量的颗粒尺寸是不同的，得出的平均值分别为202nm和140nm。DLS获得的值略大于TEM显示的值(TEM分析显示的值为大约40-80nm)，这被认为是TEM所观察到的聚集的结果(如上所述)。这得到了颗粒通常在较高浓度悬浮液中形成更大的聚集体的这种观察结果的支持。ζ-电势的测量

结果显示MNP的浓度都是带负电荷的;CHX-HMP-5要比CHX-HMP-0.5具有更大的净电荷(分别为-50.8mV和-42.2mV)。

[0273] CHX-HMP-5沉淀物的要素分析表明纳米颗粒由3个CHX离子比1个HMP离子的比例构成。

[0274] 实施例28-29和对比例12-13——复合材料:创伤敷料薄膜

[0275] 已经建立了天然多糖CMC薄膜(对比例12)和海藻酸盐薄膜(对比例13)。CHX-HMP-5纳米颗粒已经以不同的剂量包含进各等分的薄膜中(实施例28-29)。这些薄膜示出了在新颖的抗微生物创伤敷料中使用的前景。

[0276] 通过将干燥的海藻酸盐(Protanal LF 10/60FT,富美实(FMC)生物聚合物)添加到快速搅拌的、等于6wt%、3wt%或0wt%的六偏磷酸氯己定纳米颗粒的含水悬浮液中来制备5wt%的海藻酸盐水溶液。这些溶液被倒入陪替氏(petri)培养皿(Φ=90mm),然后在室温下3天以蒸发水。向陪替式培养皿中添加$CaCl_2$(30mL,2wt%水溶液(aq.)),然后允许发生交联25分钟。随后从该陪替式培养皿中移出交联的海藻酸盐薄膜,用去离子水清洗,然后在保鲜膜上空气干燥。

[0277] 通过将干燥的羧甲基纤维素(CMC)(三种类型:M_w=90,000、250,000、700,000,每脱水葡萄糖单位分别有0.7、0.7&0.9CM基团)添加到快速搅拌的、等于6wt%、3wt%或0wt%的六偏磷酸氯己定纳米颗粒的含水悬浮液中来制备5wt%的CMC水溶液。这些溶液被倒入陪替氏培养皿(Φ=90mm),然后在室温下3天以蒸发水。添加15mL乙醇以覆盖每个薄膜,然后在室温下蒸发去除。向陪替式培养皿中添加15mL乙醇以再次覆盖,这允许薄膜被取出。随后置于保鲜膜上然后空气干燥。

[0278] 将3.32mm^2(海藻酸盐)或5.00mm^2(CMC)的薄膜截面置于半微量比色皿中,用水(2.2mL)覆盖,然后用盖和保鲜膜密封比色皿。通过轨道式振荡器(150rpm)振动该比色皿,然后每隔24小时测量吸光度(255nm),然后根据标准协议与氯己定二葡萄糖酸盐标准品的吸光度相对比。CHX-HMP NP被示出为幸免于海藻酸盐薄膜内的交联过程,这通过傅里叶变换红外光谱(FT-IR)中在1492cm^{-1}处存在峰并在1530cm^{-1}处存在肩峰得到证实,对应于CHX-HMP光谱中的两个主要峰。

[0279] CMC被发现在浸渍于水中时快速溶解了,在大约10分钟的期间内分解并释放所有的CHX。CHX释放在数分钟内实现完成,并且是这样的剂量依赖:包含越高wt%的MNP的薄膜示出了越长的时间完成释放(图26)。

[0280] 与之相反,海藻酸盐在7天的期间内对CHX的释放没有衰减(图27)。CHX释放持续了5-7天的期间,并且是这样的剂量依赖:包含越高的MNP以越高的CHX释放进行释放。这为通过选择适宜剂量的MNP来控制释放提供了可能。

[0281] 实施例30和对比例14——创伤敷料的抗微生物作用

[0282] 已经在抗微生物分析试验中测试了实施例28的海藻酸盐MNP薄膜。测试微生物被认为与创伤感染非常相关:MRSA、大肠杆菌、铜绿假单胞菌、肺炎克雷伯氏菌和鲍曼不动杆菌。[鲍曼不动杆菌是报道的通过细胞膜中离子运输通道的方式抵抗CHX的第一种微生物。它不是一种普遍的致病菌,但尤其发现在军队医院中]。

[0283] 还针对包含银纳米颗粒的市售敷料部分测试了薄膜(对比例14)。

[0284] 表12示出了与市售基于银的敷料相比,实验的CHX-HMP MNP海藻酸盐复合敷料对5

种与致病菌有关的创伤的抑菌圈，表明对于MRSA、大肠杆菌、铜绿假单胞菌和肺炎克雷伯氏菌，MNP敷料抑制细菌生长的程度大于市售敷料。

[0285] 对于鲍曼不动杆菌，尽管银敷料具有比MNP敷料更大的抑菌圈，但这被认为是鼓舞人心的，因为在已经认可该微生物抵抗CHX的情况下，NP薄膜竟然抑制了它的生长。

[0286] 表12

[0287]

	MRSA	*大肠杆菌*	*铜绿假单胞菌*	*肺炎克雷伯氏菌*	*鲍曼不动杆菌*
0 wt% MNP	0	0	0	0	0

[0288]

3 wt% MNP	21.0 (0.9)	18.4 (1.5)	13.5 (0.4)	15.6 (0.7)	13.0 (0.7)
6 wt% MNP	22.6 (1.9)	19.9 (1.6)	14.2 (0.4)	16.5 (0.6)	14.9 (1.0)
Ag 敷料	15.4 (0.5)	12.1 (0.7)	12.1 (0.7)	11.9 (0.7)	16.1 (2.4)

[0289] 实施例31——复合材料：玻璃离子体水门汀

[0290] 已经生产了包含CHX-HMP MNP的玻璃离子体水门汀。已经研发了两种使MNP汇集并使其表现的适合包含在GIC内的方法：

[0291] (i)湿法，其中，使MNP从胶体中沉淀出，然后使用离心以使操作者轻轻倒出上清液，留下浓厚的白色浆体；以及

[0292] (ii)干燥，然后球磨以产生白色粉末。

[0293] 这些方法的产物均被包含进市售GIC中以测量多种特性。

[0294] 实施例32——包覆表面的材料：已经涂覆有CHX-HMP-5MNP的聚氨酯导管、聚氨酯基质和导管。

[0295] 期望这一应用去证明CHX的长期(>3个月)释放。已经证明了至少85天的CHX释放(图28)。

[0296] 已经通过改变反应物浓度(50mM的CHX和HMP)和浸涂方式(重复1、5和10次浸渍)研究了涂层密度。已经发现越长的浸涂时间产生越多的释放，50mM的NP浓度在多数情况下比5mM的浓度释放的更多。越多的浸涂产生越大的涂层密度(图29)。初始数据表明在一些情况中越密集的涂覆样品观察到越低的CHX释放，在不期望受理论约束的情况下，这可以由下述内容解释：有可能越厚重涂覆的样品可能具有越少的孔，因此活性材料向环境呈现越少的表面面积；或者可能与涂层脱落有关，尽管这还未被直接观察到。

[0297] 似乎重复浸涂和/或改变浸涂时间会允许控制MNP的剂量。

[0298] 实施例33-36和对比例15-22——包含聚氨酯的样品的微生物抑制作用

[0299] 也已经完成了大量的微生物学工作。表13示出了具有不同表面处理的聚氨酯样品上在细菌生长培养基中培育24小时后的微生物生长。符号：-完全抑制；+轻微生长(在10^{-1}-10^{-3}之间的稀释液中观察到生长)；++中等生长(在10^{-4}-10^{-6}之间的稀释液中观察到生长)；+++大量生长(在10^{-7}-10^{-12}之间的稀释液中观察到生长)。与用水(对比例15-18)或者含水CHX

溶液(对比例19-22)处理的对照相比，涂覆有CHX-HMP-50的聚氨酯样品展现了没有生长MRSA、大肠杆菌和铜绿假单胞菌，以及肺炎克雷伯氏菌生长降低(实施例33-36)。

[0300] 表13

[0301]

	MRSA	*大肠杆菌*	*铜绿假单胞菌*	*肺炎克雷伯氏菌*
对照	++	++	+++	+++
CHX-HMP-50涂覆的聚氨酯（PU）	-	-	-	++
80 μM CHX	++	++	++	++

[0302] 实施例37-44和对比例23-26——活-死染色

[0303] 也使用上述实施例33-36中列举的微生物进行了活-死染色。首先通过浸涂30秒、然后清洗10秒使聚氨酯截面涂覆有NP(CHX-HMP-5和CHX-HMP-50)，然后浸渍于相关细菌的悬浮液中24小时。使用SYTO9和碘化丙啶(propidium iodide)活/死染色剂进行染色。

[0304] 图30的较浅区域表示微生物生长的区域。这样，在未处理的对照中见到了高水平的微生物生长(对比例23-26，图30的最左侧列)。这些图像显示了MNP对微生物生长的作用(图30中间列和右侧列)，并表明MNP以任一浓度存在均彻底降低了微生物的生长(实施例37-44)。应注意，MNP自身吸收了一些荧光染料，这可以看作为CHX-HMP-50图像中的亮区(实施例41-44)。

[0305] 实施例45-50和对比例27-32——表面涂覆的材料:医用硅酮

[0306] 硅酮被用作体内的假体和其他生物材料装置。这一实施例尤其关注的是在口腔中使用的、构建颚填充体(用于校正由于手术或进展性异常导致的偏差的装置)和义齿的硅酮。

[0307] 这些硅酮易于被致病性细菌和酵母菌定殖，尤其是白色念珠菌。已经研究了CHX-XMNP在医用硅酮上的粘附。负载到这些装置上的微生物尤其很高，出于这一原因，可能需要较高剂量的CHX。因此，已经研发了不同于CHX-HMP的其他配方。

[0308] 在口腔用硅酮浸涂1分钟到6小时的系列时间之后，已经研究了三个配方(CHX-HMP-5、CHX-TMP-5和CHX-TP-5)的CHX释放。本体(B)和密封剂(S)代表两种不同类型供应的硅酮。在第8周更新洗脱介质以说明任意饱和度。

[0309] 具体地，使用测量为5×8×2.5mm的硅酮模具建立了在义齿软衬和填充体结构(Mucopren Soft;Kettenbach，埃申堡，德国)中使用的“本体”和“密封剂”硅酮的样品。使用凡士林对该模具进行润滑，将硅酮填到该模具中，然后允许在室温下处理15分钟。随后从模具中移出样品，然后在70％乙醇中超声10分钟，在空气中干燥15分钟，然后在密封容器中干燥储存。

[0310] 在口腔用硅酮浸涂1分钟到6小时的系列时间之后，研究了三个配方(CHX-HMP-5、CHX-TMP-5、CHX-TP-5)的CHX释放。将样品在搅拌的NP悬浮液中浸渍(除了TMP，其形成了无法搅拌的粘性的、粘稠的基质)规定的时间，以去离子水清洗10秒然后在空气中干燥。将更多组的n＝10的样品浸渍于25μM氯己定二葡萄糖酸盐溶液中(形成纳米颗粒之后水溶液中残余的氯己定浓度)6小时以提供阳性对照。这表示为CHX-C。

[0311] 如图31所示，CHX-HMP MNP涂覆的样品展现了在实验期间CHX的逐渐释放。释放速率随时间降低，但当更换人工唾液时，速率再次增加，表明相对于CHX盐，人工唾液的饱和程度在更换该人工唾液之前妨碍了CHX的释放。如下所述，与其他两组盐相比，CHX的释放是持续的。从CHX-HMP涂覆的样品中的CHX释放根据涂覆时间而变化，在较长的涂覆时间观察到CHX的增加(但所述相关性不是线性的)。从本体硅酮中比从密封剂硅酮中观察到更多的CHX释放。

[0312] 如图32所示，CHX-TP涂覆的样品展现了与CHX-HMP MNP相当不同的CHX释放曲线，其在第一个24小时期间观察到大部分或所有的CHX释放。在改变人工唾液后，观察到小的额外的CHX释放，但再一次，该小的释放在引进人工唾液后在第一个24小时内达到完全。因此这一配方的MNP示出了比CHX-HMP更高的释放，大约是它的3倍的CHX释放，但这一释放是短暂的。从CHX-TP涂覆的样品中的CHX释放根据涂覆时间而变化，随着较长的涂覆时间CHX增加(但再一次，所述相关性不是线性的)。从本体硅酮中与从密封剂硅酮中的CHX释放是类似的。

[0313] 如图33所示，像涂覆有CHX-TP MNP的那些样品一样，CHX-TMPMNP涂覆的样品在暴露于人工唾液的第一个24小时内展现了大部分或所有的CHX释放，在最初的人工唾液中以及在更换人工唾液之后均是这种情况。涂覆时间影响CHX释放，但是以不同于其他盐的方式：对那些涂覆了30分钟的样品观察到最高的CHX释放；而2小时和6小时涂覆的样品示出了中等的CHX释放，而1分钟涂覆的样品具有最小的CHX释放。从密封剂硅酮中比从本体硅酮中观察到更高的CHX释放。

[0314] 应该注意的是，似乎通过选择不同的阴离子(HMP、TMP、TP)和浸渍时间能控制剂量及CHX释放期的范围。还应注意的是，用MNP涂覆硅酮并没有显著增加它们的吸水性；吸水性有害于这些硅酮的性能并且已被观察到作为为它们给予抗微生物特性的其他尝试的副作用。这是由本发明MNP证实的进一步优势。

[0315] 已经研究了MNP的抗真菌特性。初步实验研究已经一致地示出了在散播CHX-HMP MNP之后，对白色念珠菌生长的剂量依赖性抑制，在1小时见到真菌生长的减少，在4小时处没有生长。

[0316] 实施例51和对比例33——表面涂覆的材料：钛种植体

[0317] CHX-HMP MNP已经用于涂覆钛以研发种植体的抗微生物涂层。

[0318] CHX-HMP-5MNP涂覆的钛基质(通过浸渍于CHX-HMP-5悬浮液中30秒，以去离子水清洗10秒，然后干燥制备而来)已经示出了能抑制格氏链球菌和牙龈卟啉单胞菌(Porphyromonas gingivalis)的生长。此外，当该钛基质被涂覆有唾液薄膜时，抗微生物作用没有受阻碍，其中，所述唾液薄膜是涂覆在置于口腔中的任何材料上的蛋白薄膜。格氏链球菌在有(实施例51)或者没有(对比例33)CHX-HMP MNP的钛表面上的菌落形成单位的代表性数据示出于图34中。

[0319] 实施例52-54和对比例34-36——口腔护理产品和局部处理

[0320] CHX的水溶液已经在牙科中使用。它可以发现在超级市场和药店作为适用于控制斑块和牙周炎/牙龈发炎的2.2mM口腔含漱液中。它也在诸如更严重的牙周炎、在口腔手术过程中、在牙髓处理过程中等的许多应用中被用作局部抗微生物剂。

[0321] 该实施例示出了将CHX作为CHX-HMP MNP释放而不是以水溶液释放，这改变了CHX的释放形式。羟基磷灰石圆片(每组n＝6)被用作牙组织的替代物。制备了1、2.2和5mM的三个CHX二葡萄糖酸盐的水溶液(分别是对比例34-36)。制备了具有相配总浓度的三个CHX-HMP MNP悬浮液，因此具有CHX和HMP为1、2.2和5mM(分别是实施例52-54)。将羟基磷灰石圆片浸渍于制剂中15秒，清洗，然后观察CHX释放随时间的函数(图35)。

[0322] 从用MNP悬浮液处理的圆片中比从用水溶液处理的圆片中观察到更加延长的、整体更大量的CHX释放。CHX-HMP MNP处理的圆片展示了更加延长的且更大量的CHX释放表明当以MNP形式时比以溶液释放保留了更多的CHX。这在研发不需处方可以出售的运动员口腔护理产品和/或局部试剂中具有潜力，用于给予更加长久持续的抗微生物口腔环境。

[0323] 实施例55和对比例37——抗微生物涂料

[0324] 已经实施了将MNP汇集为在抗微生物涂料中使用的适用浆体的方法，并且已经用质量计25％的MNP乳剂浆体建立了原型，并与市场主导的抗微生物涂料(多乐士(Dulux)Sterishield)进行了对比。

[0325] 通过在有力混合期间在室温和常压下混合200mL的10mM CHX二葡萄糖酸盐与200mL的10mM六偏磷酸钠来制备400mL的CHX-HMP-5NP浆体从而建立了NP浆体。添加大约50mL的1M KCl，然后停止搅拌。使产生的混合物沉降，然后弃掉上部～300mL的清澈上清液。剩余液体在台式离心机中在5000rpm下离心20分钟，这导致上清液与粘性白色浆体的分离，该白色涂料具有涂料和牙膏之间的稠度。再次弃掉上清液，然后从试管中移出该浆体并使用。

[0326] 实验涂料是可行的(实施例55，图36，右图)、显然正常干燥的(用肉眼)、与未改性涂料(对比例37，图36，左图)具有相似的表面抛光。

[0327] 实施例56-57和对比例38-41——抗微生物涂料的细菌抑制效果

[0328] 对在细菌培养中培育24小时的阴性对照涂料(未改性的乳浊液，对比例38-39)、实验涂料(NP掺杂的)和阳性对照涂料(Sterishield，对比例40-41)研究了MRSA和大肠杆菌的生长。玻璃玻片的两侧均涂覆了单层的涂料，然后进行干燥。

[0329] 对于MRSA，Sterishield实现了MRSA生长的10倍减少，而MNP涂料实现了1000倍的同样减少(图37)。

[0330] 对于大肠杆菌，Sterishield对细菌生长没有影响，而MNP涂料消除了大肠杆菌的生长，没有可回收的细菌(图37)。

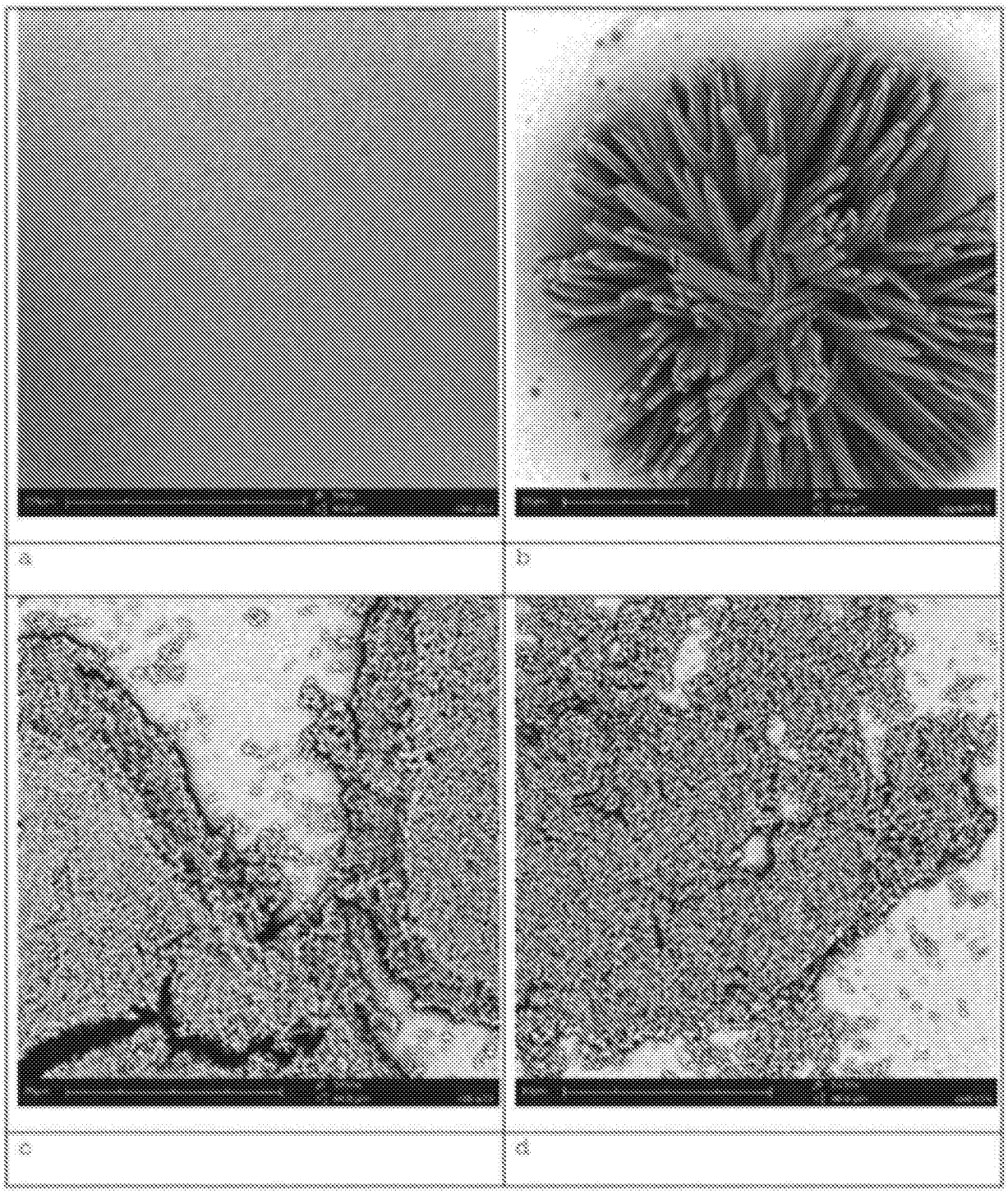


图1

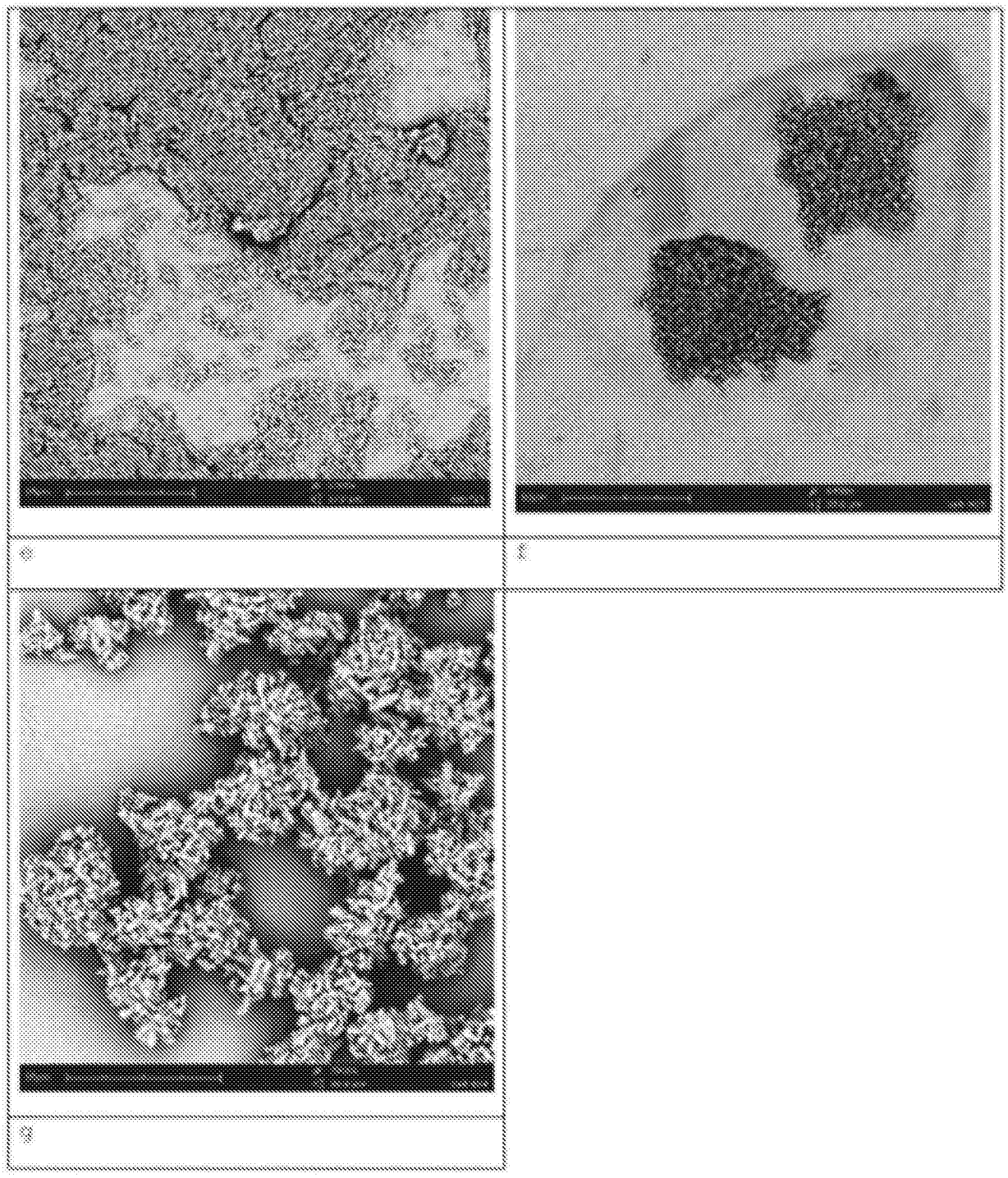


图2

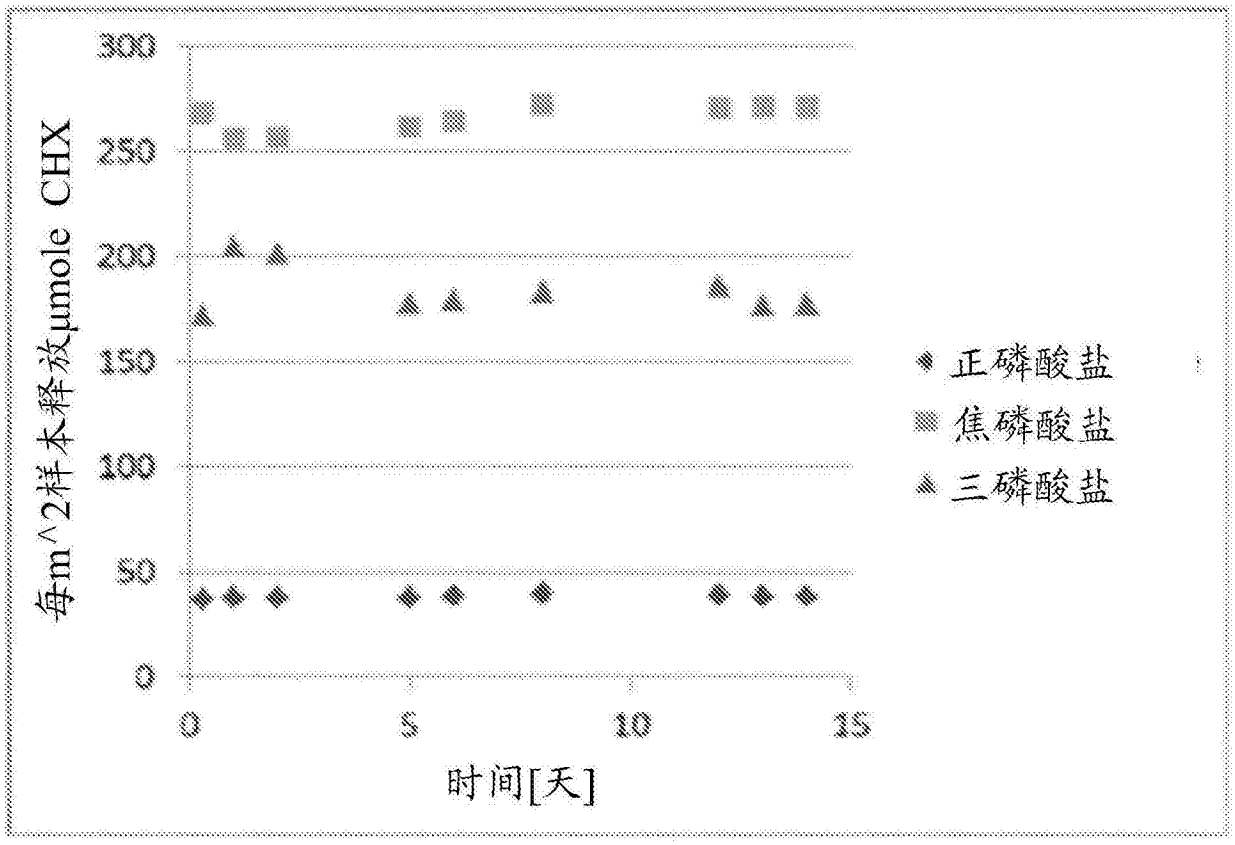

每m^2样本释放μmole CHX
300
250
200
150
100
50
0
0
5
10
15
时间[天]
正磷酸盐
焦磷酸盐
三磷酸盐

图3

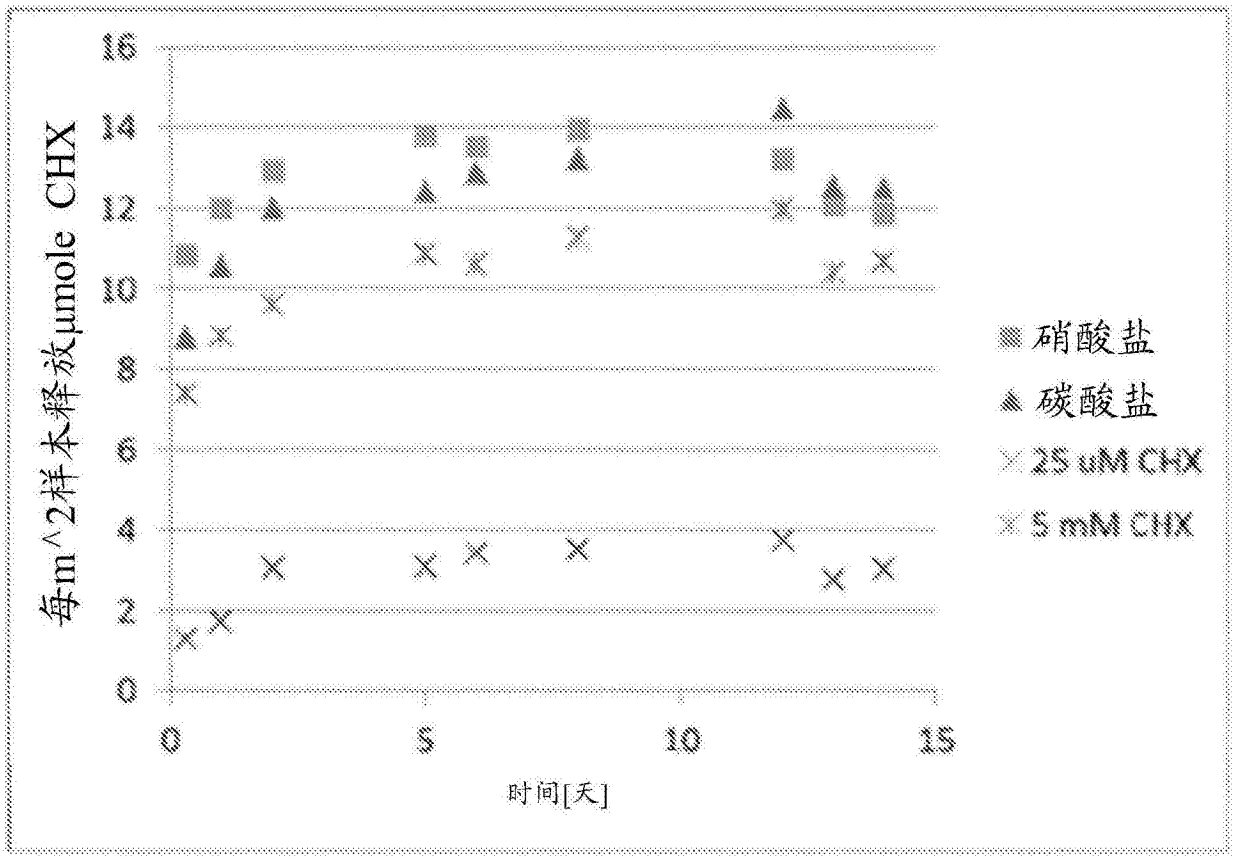

每m^2样本释放μmole CHX
16
14
12
10
8
6
4
2
0
0
5
10
15
时间[天]
硝酸盐
碳酸盐
25 uM CHX
5 mM CHX

图4

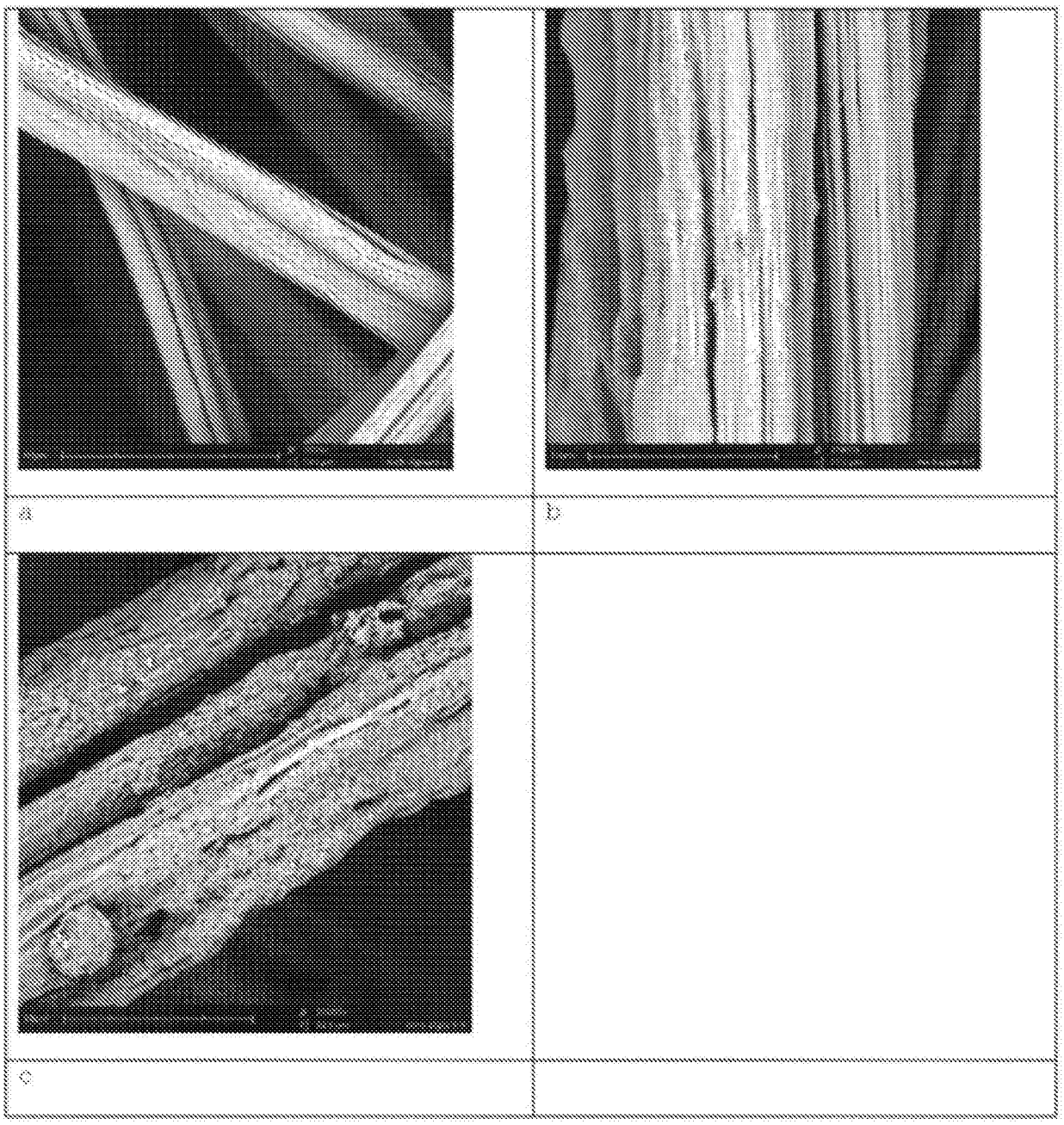


图5

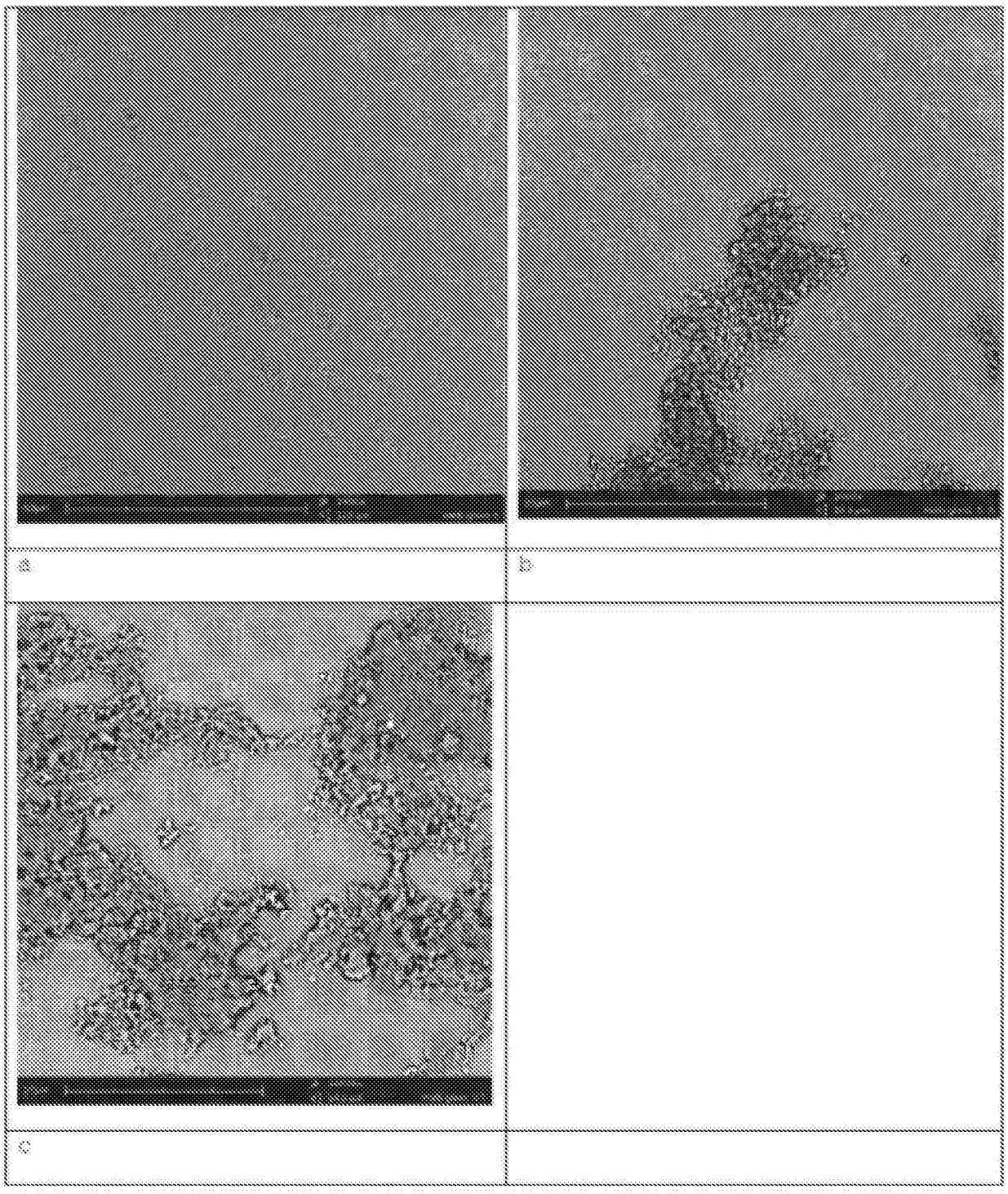


图6

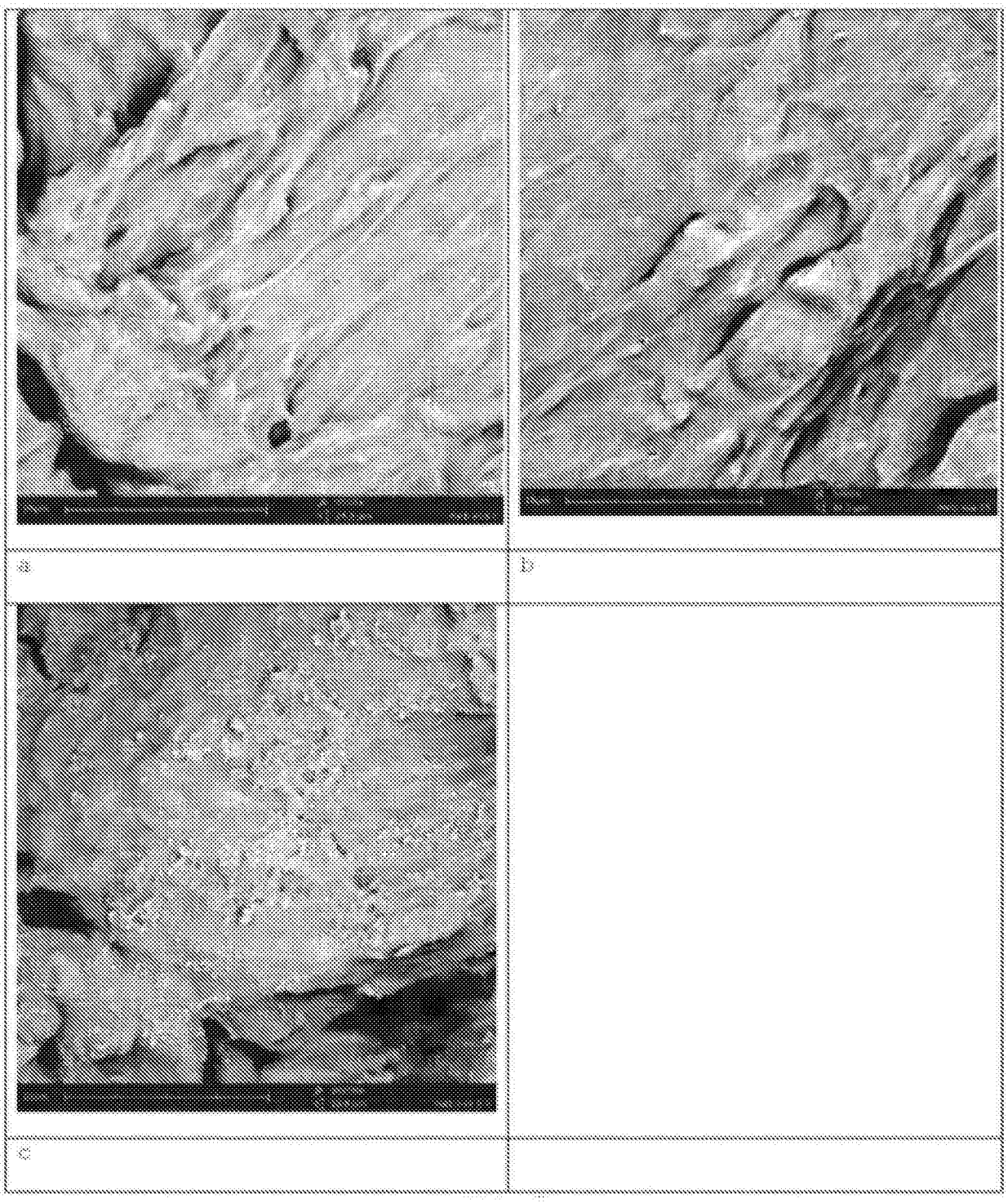


图7

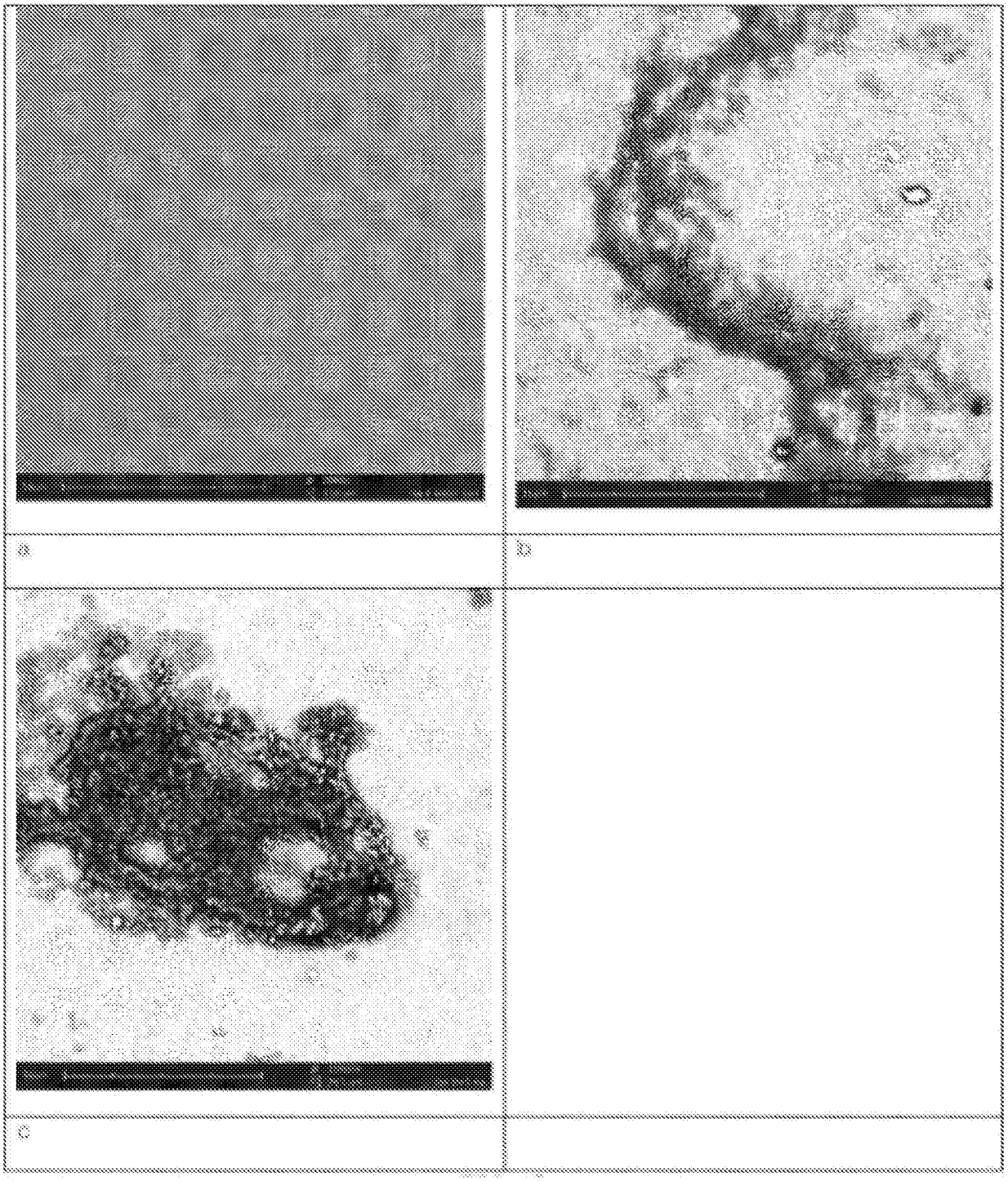


图8

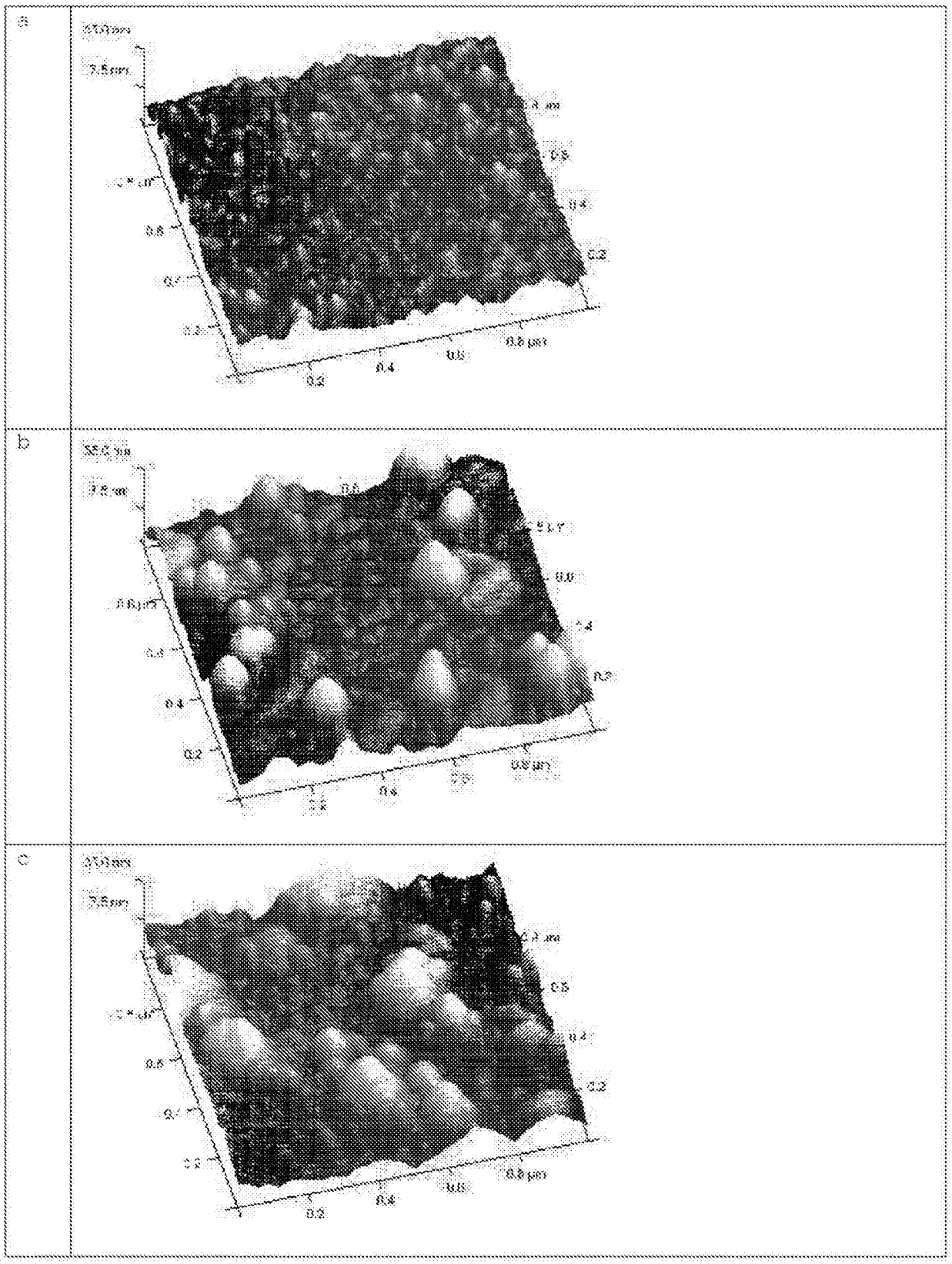


图9

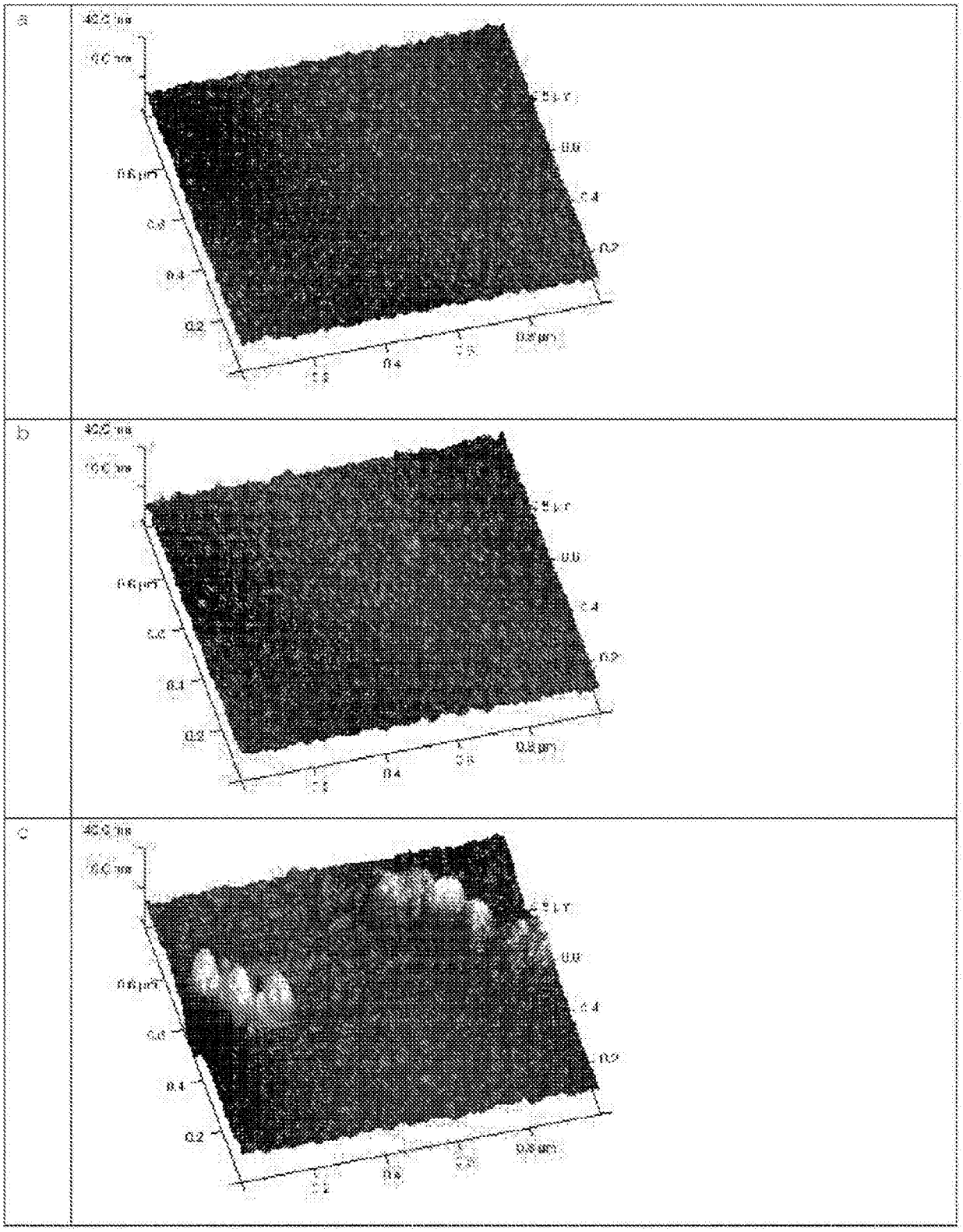


图10

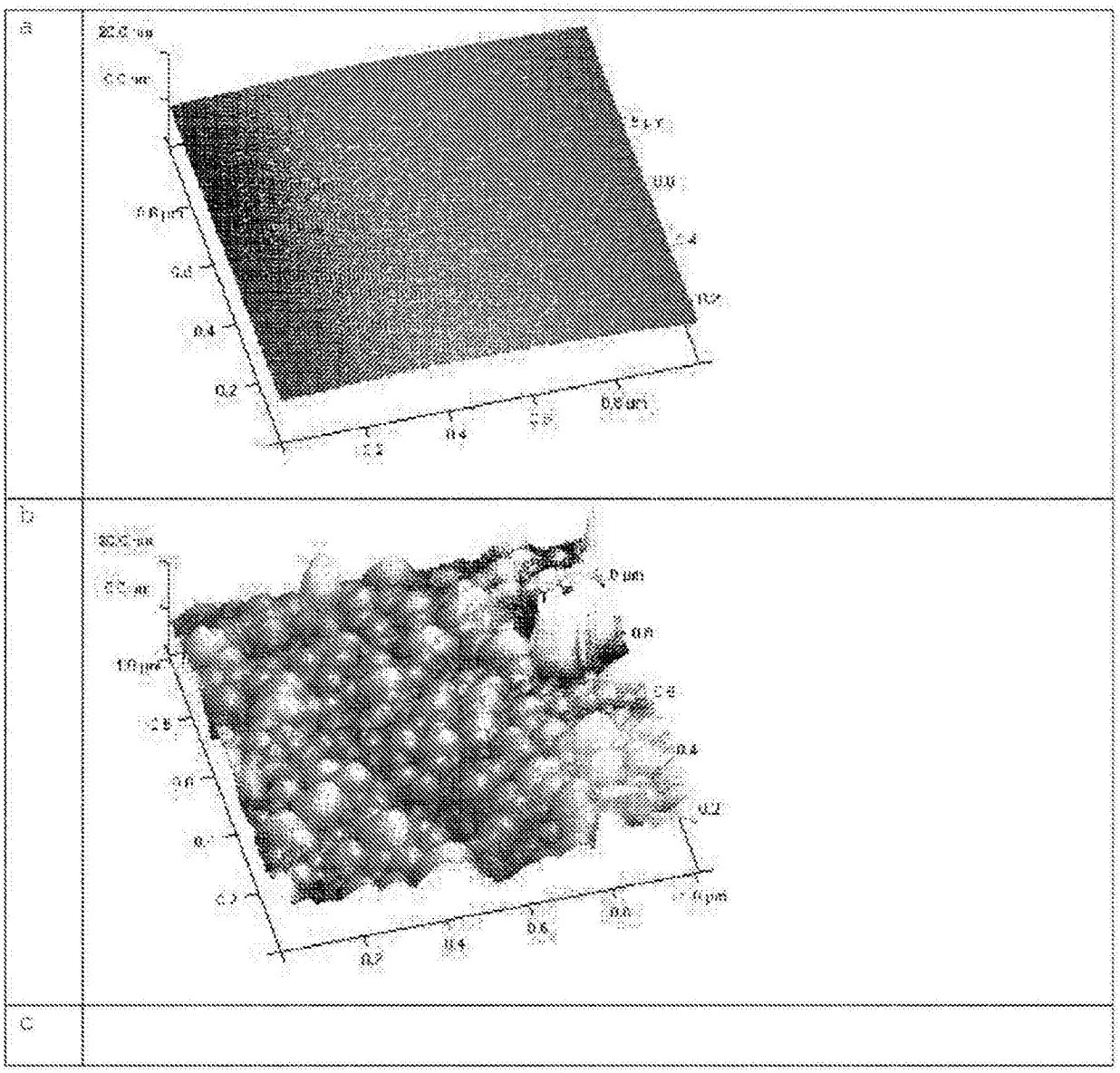


图11

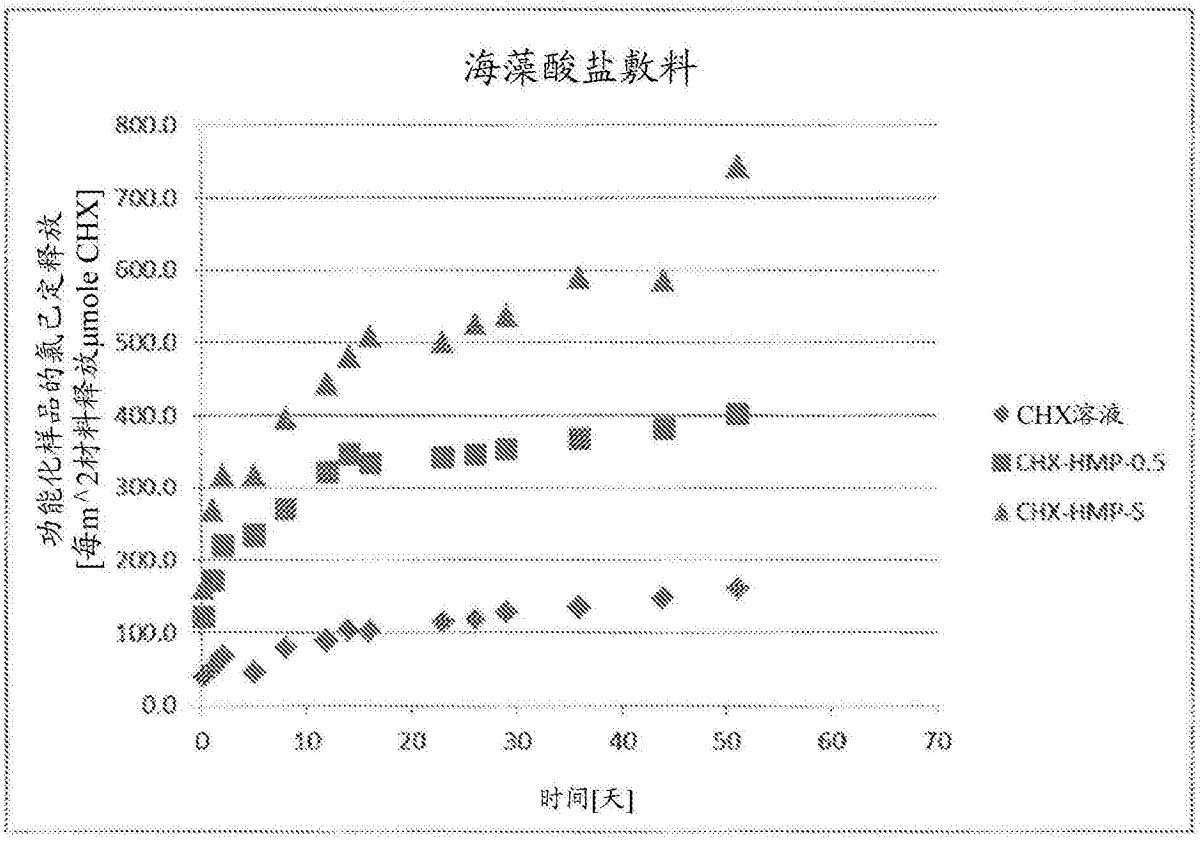

海藻酸盐敷料
功能化样品的氯己定释放
[每m^2材料释放μmole CHX]
800.0
700.0
600.0
500.0
400.0
300.0
200.0
100.0
0.0
0
10
20
30
40
50
60
70
时间[天]
CHX溶液
CHX-HMP-0.5
CHX-HMP-5

图12

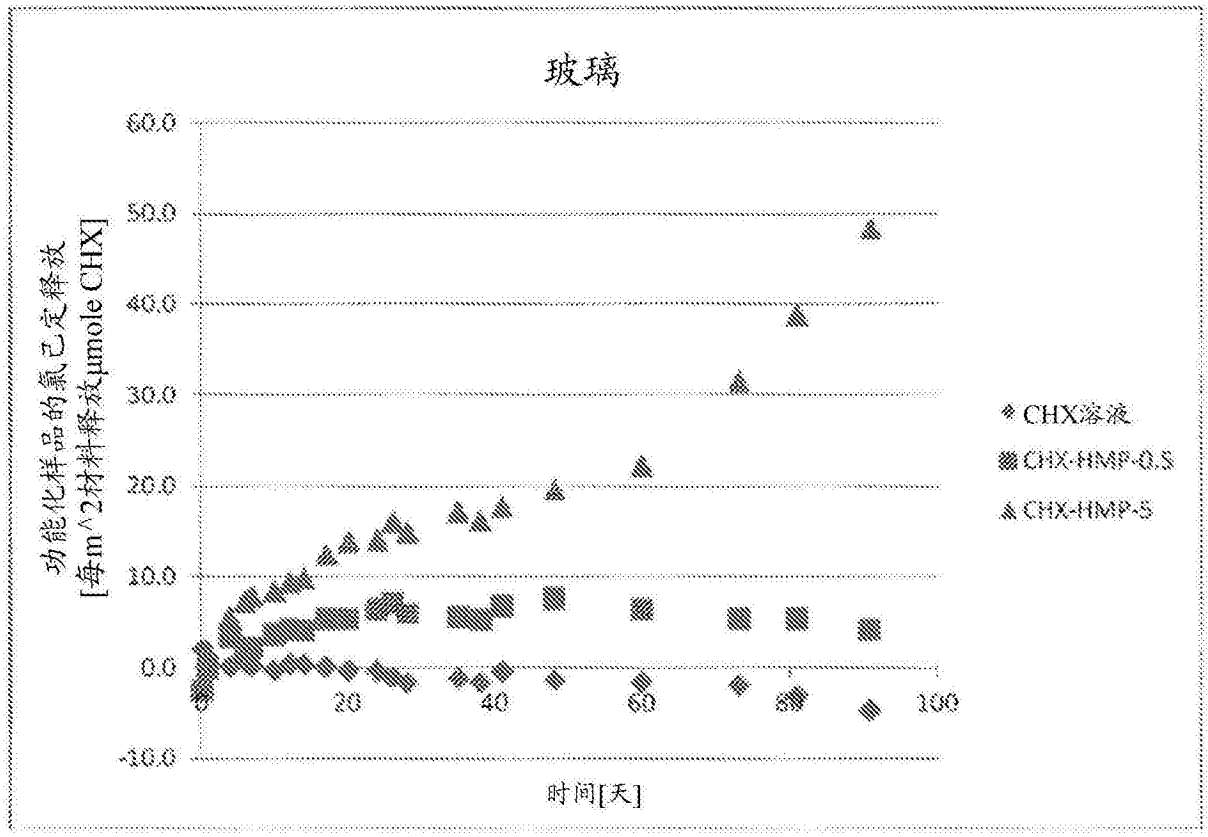

玻璃
功能化样品的氯己定释放
[每m^2材料释放μmole CHX]
60.0
50.0
40.0
30.0
20.0
10.0
0.0
-10.0
20
40
60
80
100
时间[天]
CHX溶液
CHX-HMP-0.5
CHX-HMP-5

图13

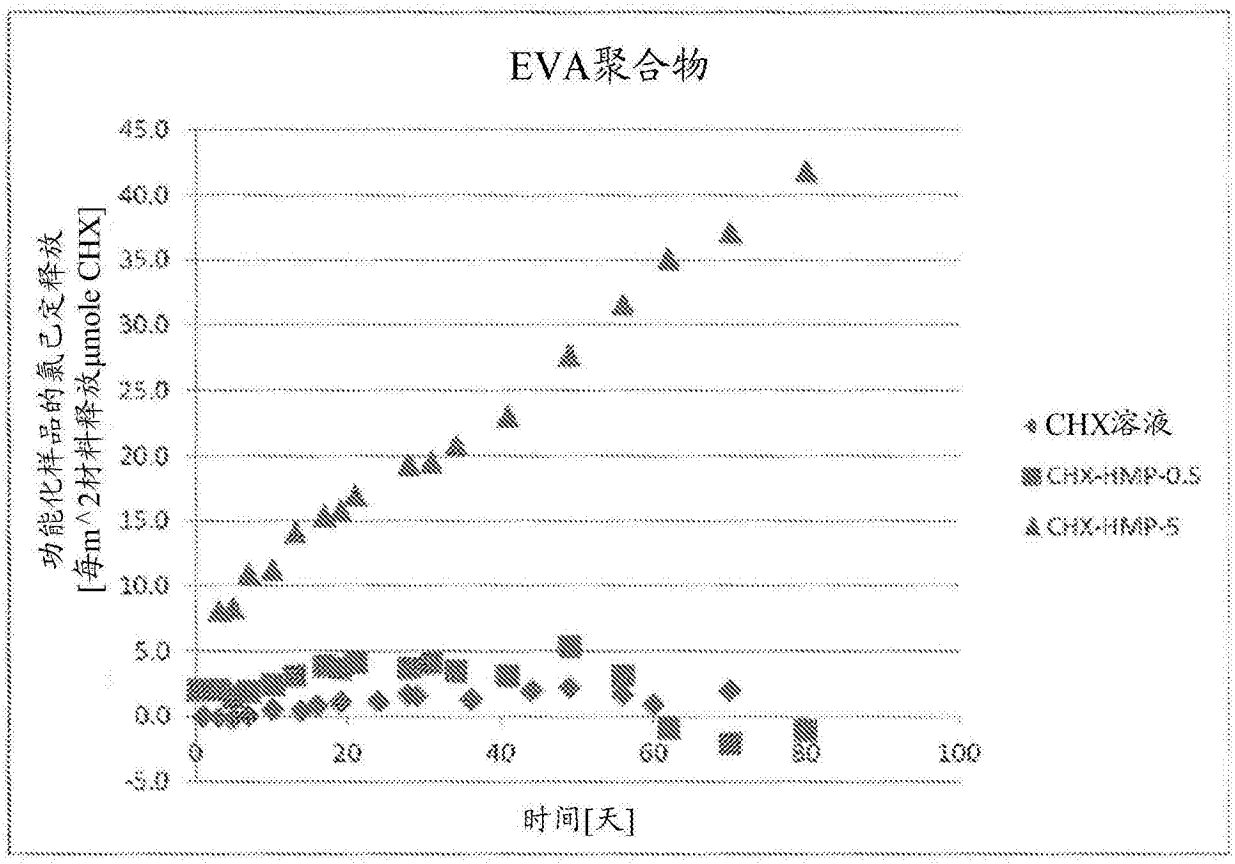

EVA聚合物
功能化样品的氯己定释放
[每m^2材料释放μmole CHX]
45.0
40.0
35.0
30.0
25.0
20.0
15.0
10.0
5.0
0.0
-5.0
0
20
40
60
80
100
时间[天]
CHX溶液
CHX-HMP-0.5
CHX-HMP-5

图14

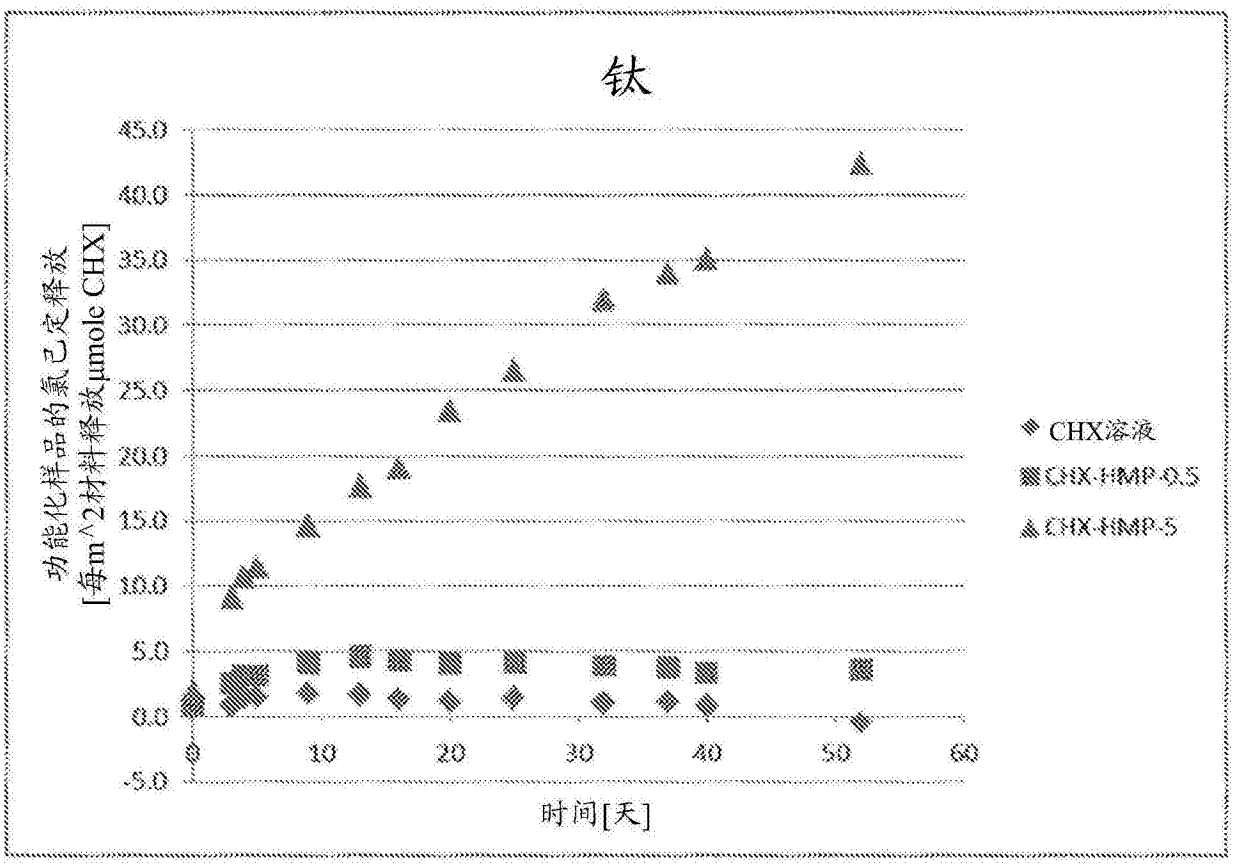

钛
功能化样品的氯己定释放
[每m^2材料释放μmole CHX]
45.0
40.0
35.0
30.0
25.0
20.0
15.0
10.0
5.0
0.0
-5.0
0
10
20
30
40
50
60
时间[天]
CHX溶液
CHX-HMP-0.5
CHX-HMP-5

图15

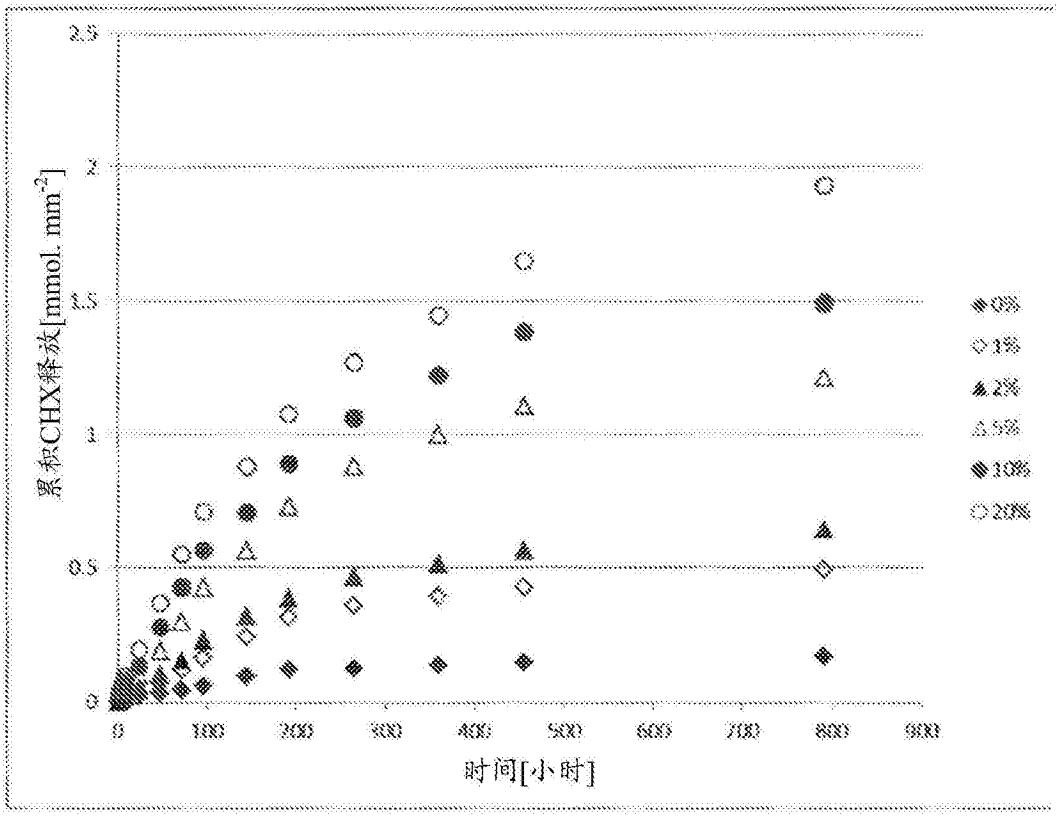

累积CHX释放[mmol. mm-2]
2.5
2
1.5
1
0.5
0
0
100
200
300
400
500
600
700
800
900
时间[小时]
0%
1%
2%
5%
10%
20%

图16

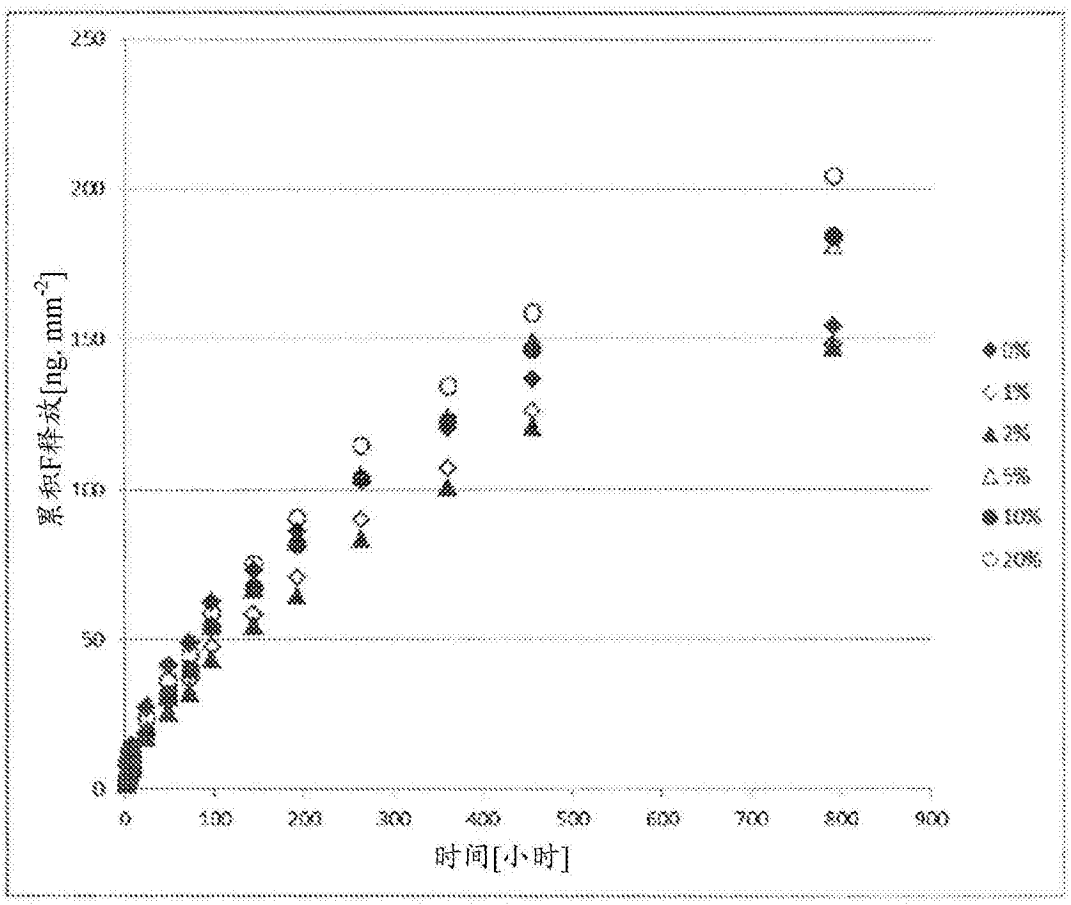

250
200
150
100
50
0
累积F释放[ng, mm-2]
0
100
200
300
400
500
600
700
800
900
时间[小时]
0%
1%
2%
5%
10%
20%

图17

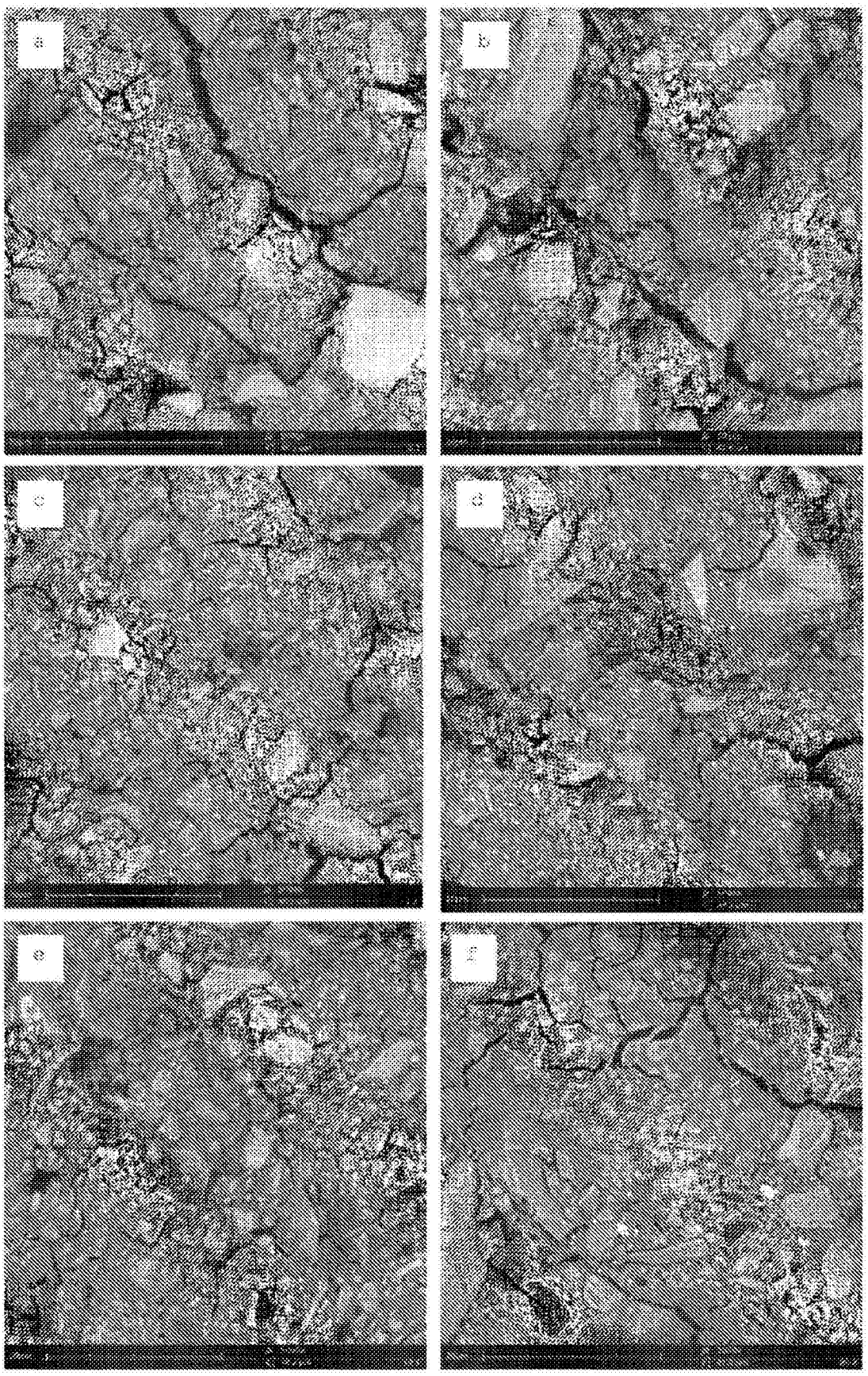


图18

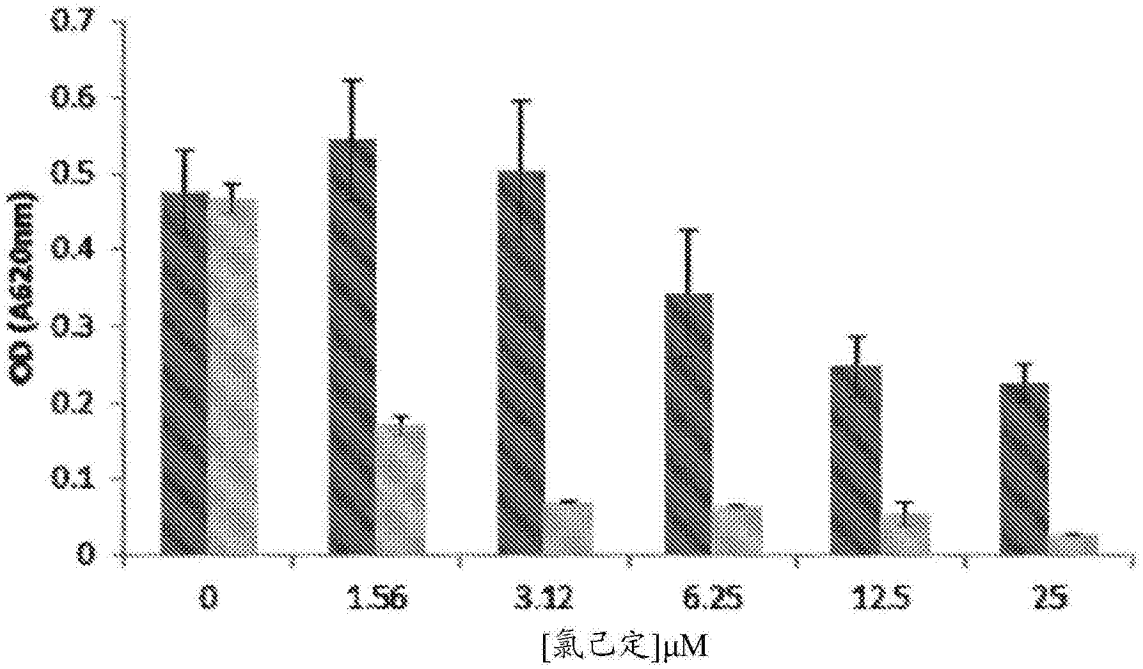

0.7
0.6
0.5
0.4
0.3
0.2
0.1
0
OD (A620nm)
0
1.56
3.12
6.25
12.5
25
[氯己定]μM

图19

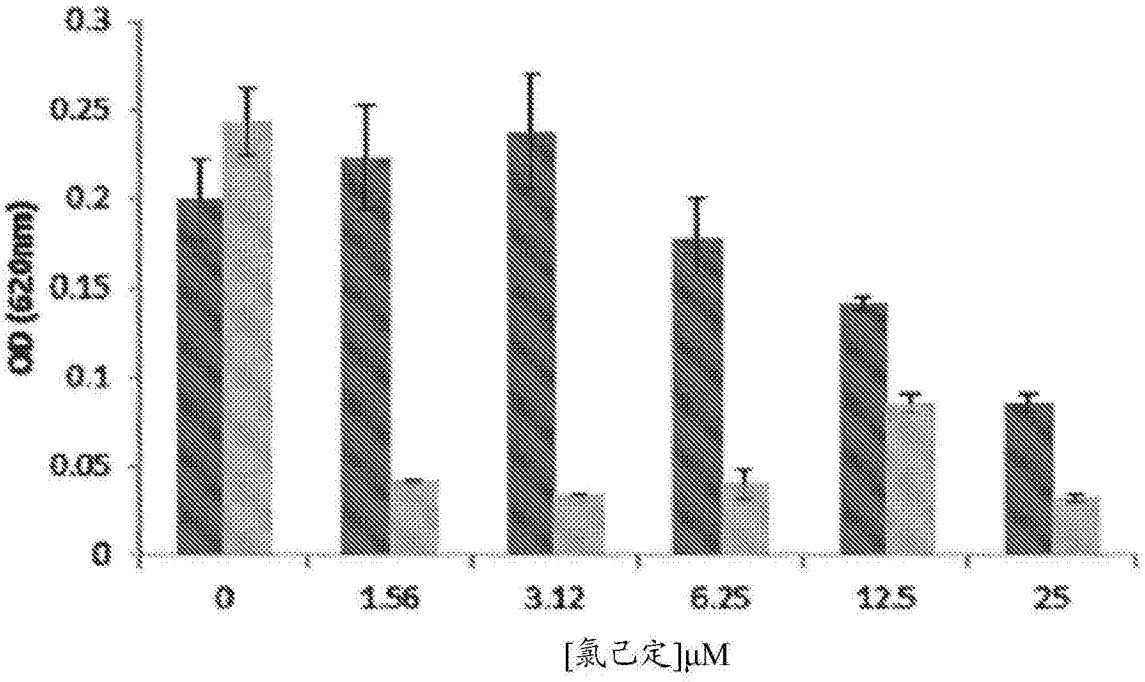

0.3
0.25
0.2
0.15
0.1
0.05
0
OD (620nm)
0
1.56
3.12
6.25
12.5
25
[氯己定]μM

图20

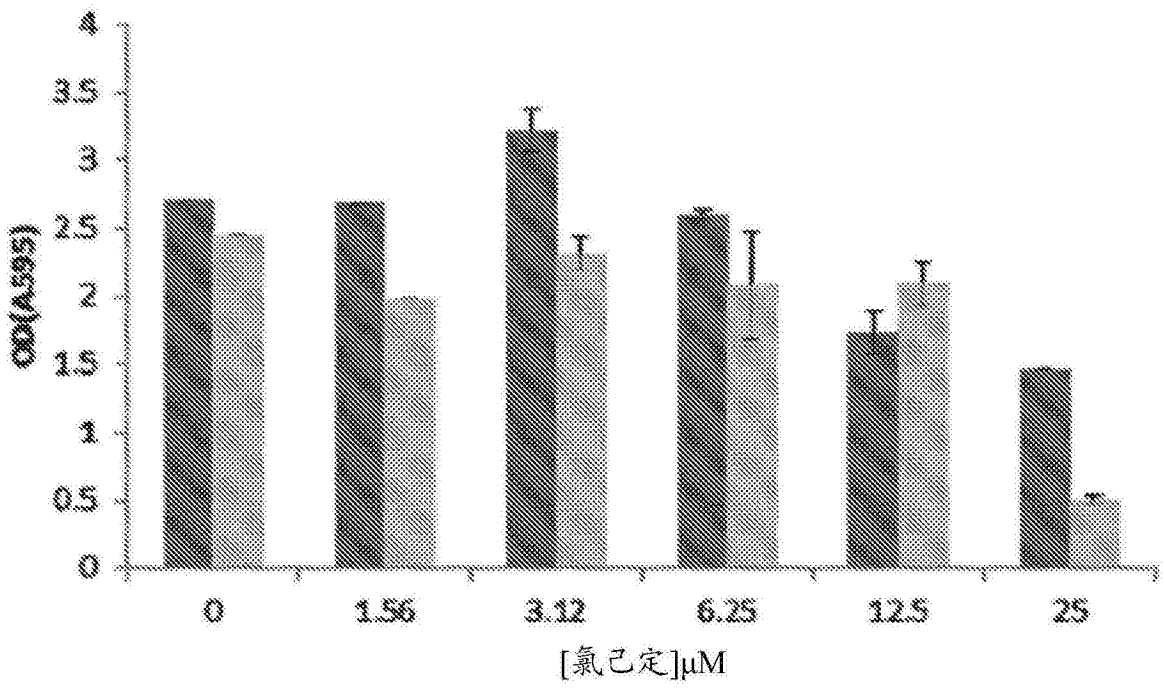

OD(A595)
4
3.5
3
2.5
2
1.5
1
0.5
0
0
1.56
3.12
6.25
12.5
25
[氯己定]μM

图21

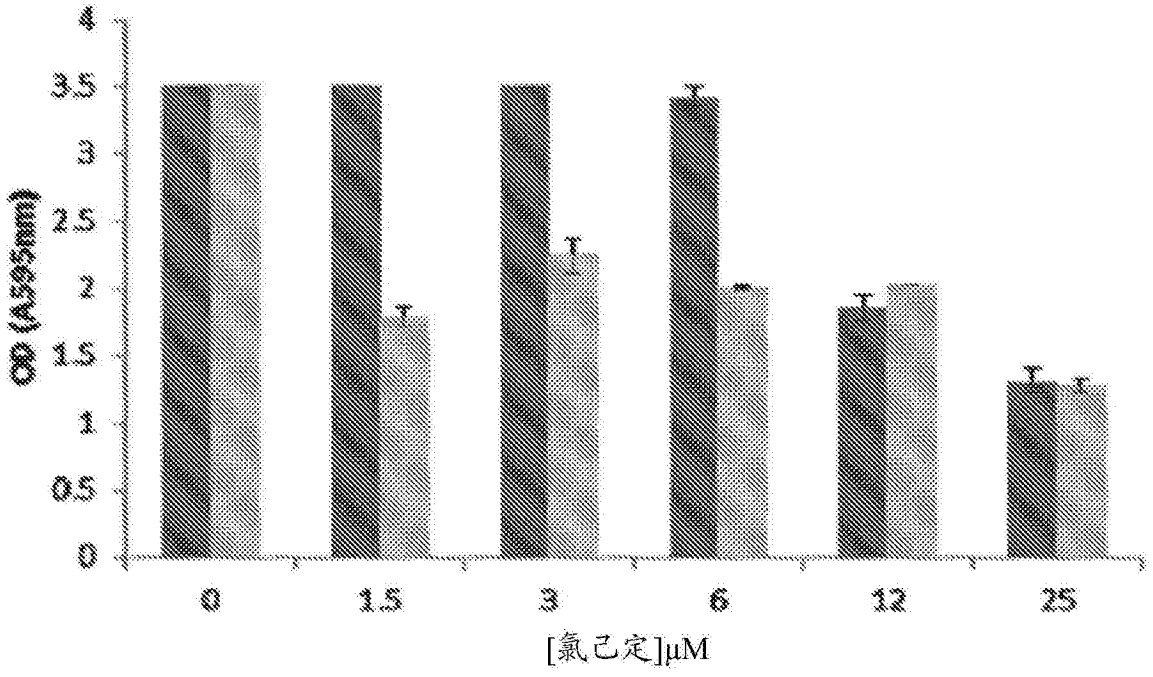

OD (A595nm)
4
3.5
3
2.5
2
1.5
1
0.5
0
0
1.5
3
6
12
25
[氯己定]μM

图22

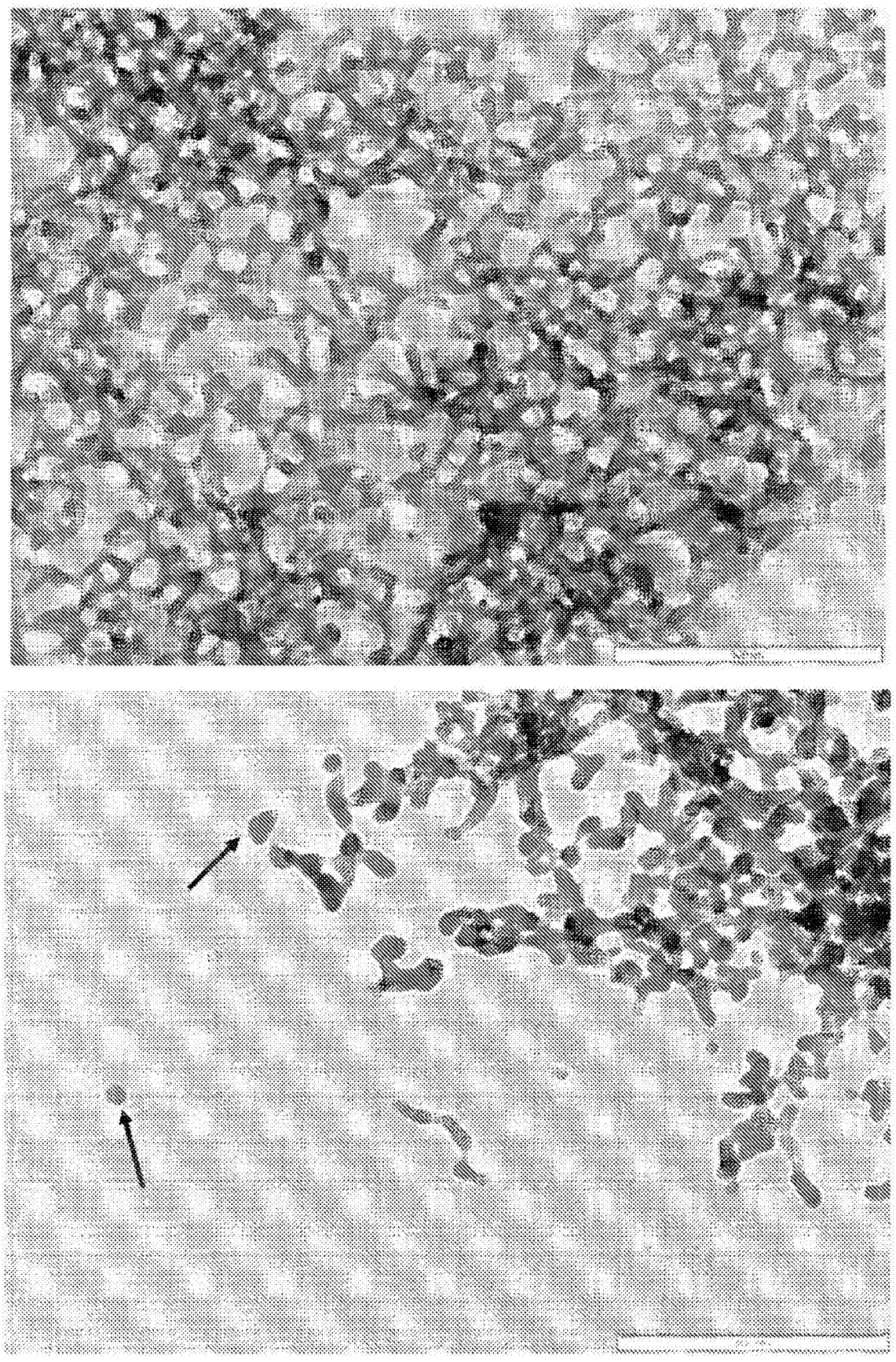


图23

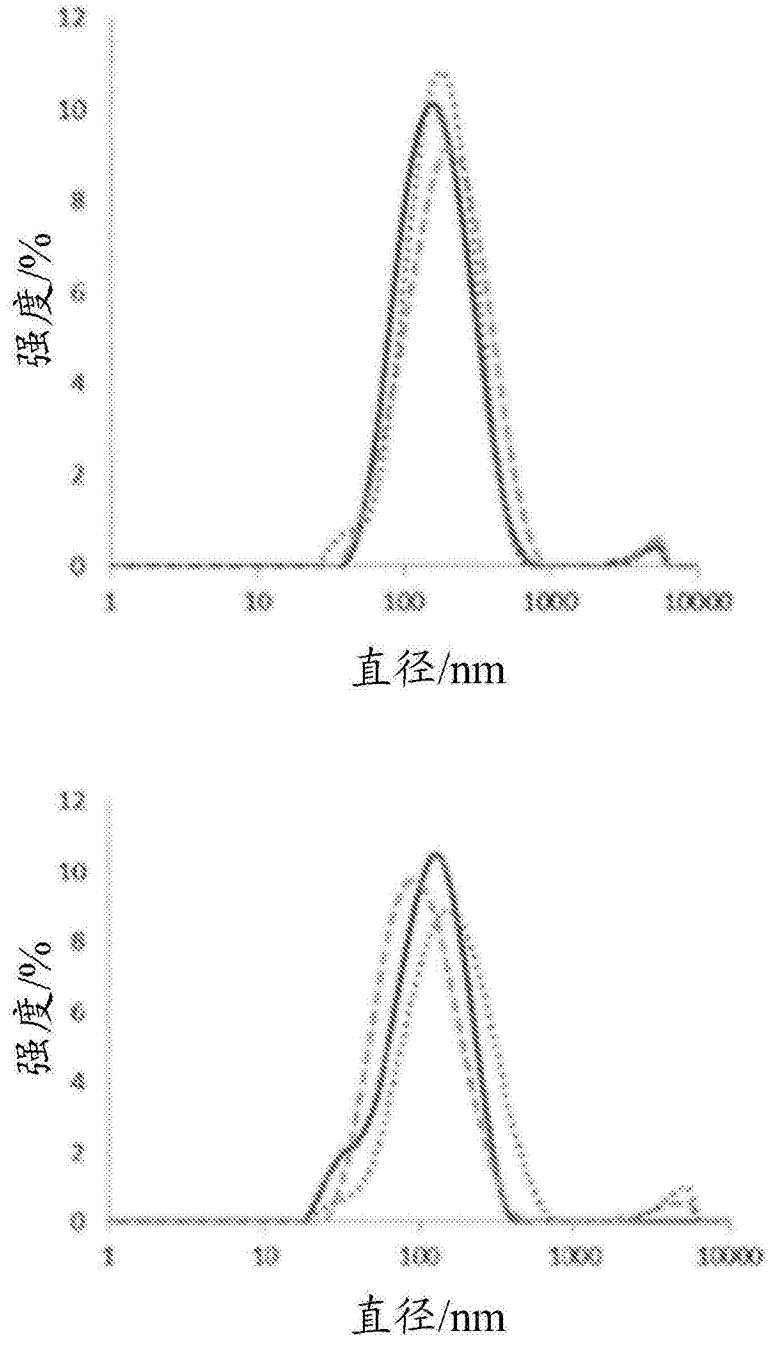


图24

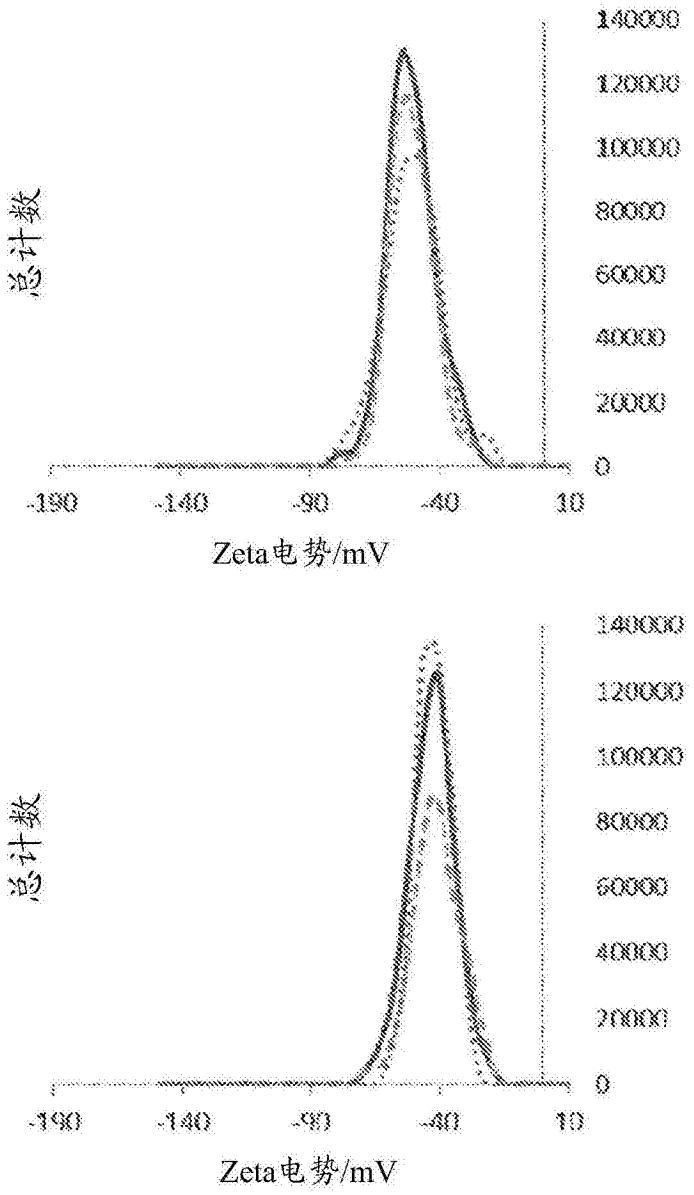

总计数
140000
120000
100000
80000
60000
40000
20000
0
-190
-140
-90
-40
10
Zeta电势/mV
总计数
140000
120000
100000
80000
60000
40000
20000
0
-190
-140
-90
-40
10
Zeta电势/mV

图25

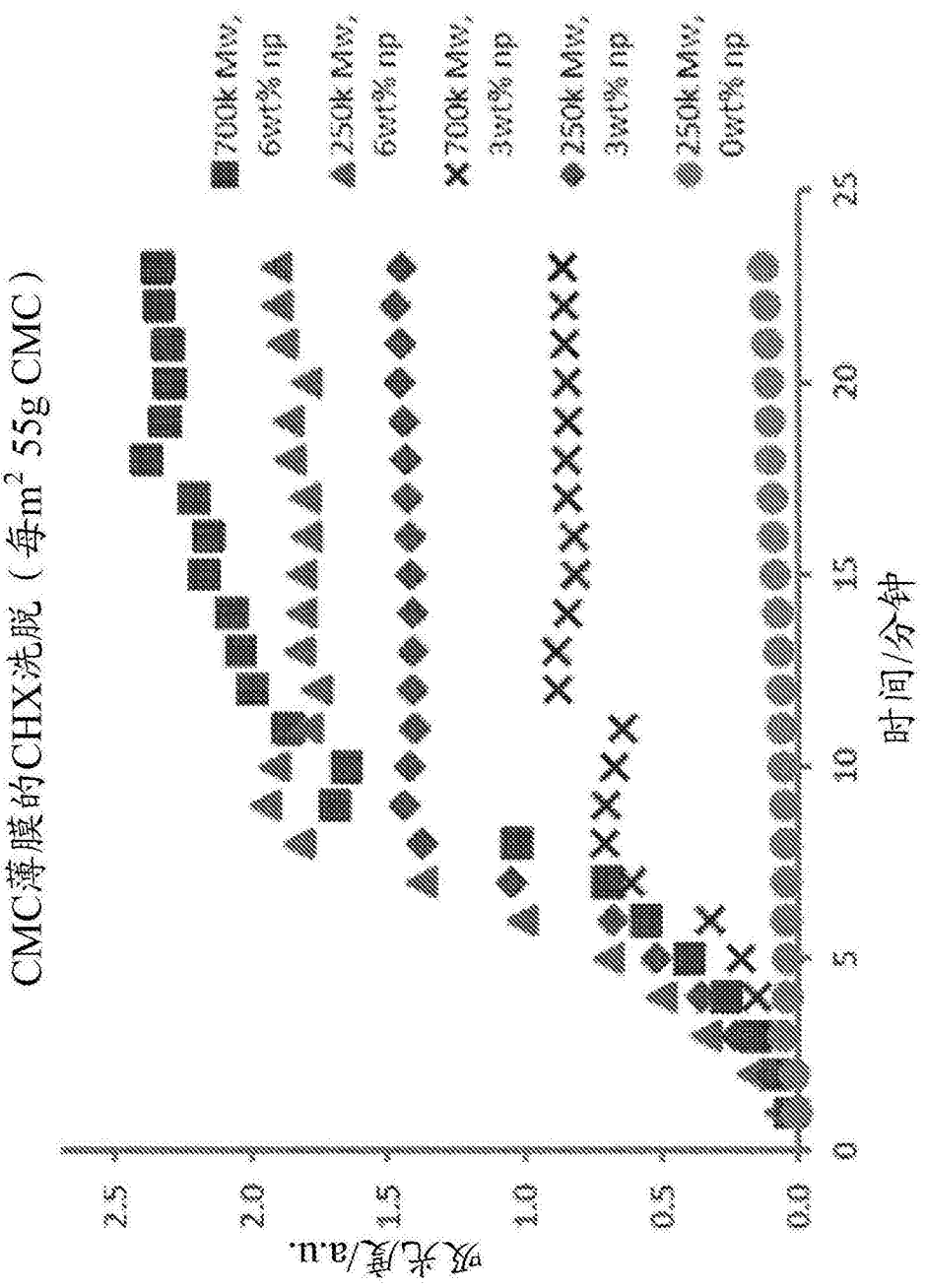

CMC薄膜的CHX洗脱（每m² 55g CMC）
700k Mw, 6wt% np
250k Mw, 6wt% np
700k Mw, 3wt% np
250k Mw, 3wt% np
250k Mw, 0wt% np
荧光强度/a.u.
时间/分钟
0.0
0.5
1.0
1.5
2.0
2.5
0
5
10
15
20
25

图26

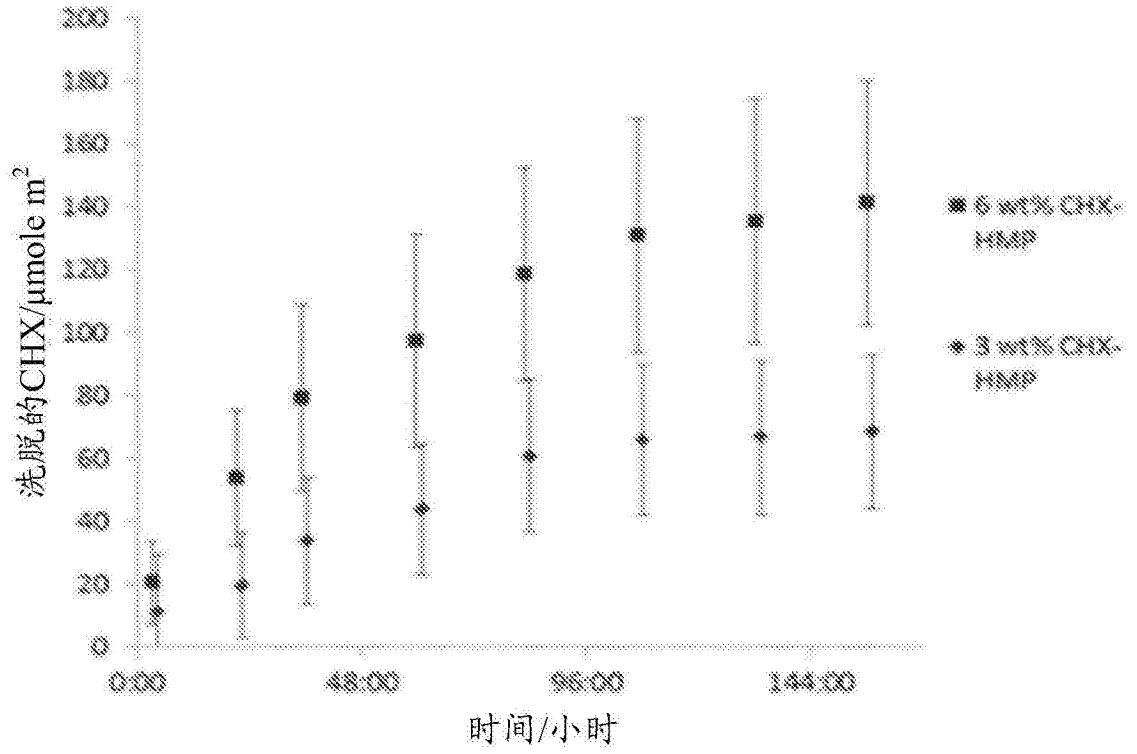

洗脱的CHX/μmole m2
200
180
160
140
120
100
80
60
40
20
0
0:00
48:00
96:00
144:00
时间/小时
6 wt% CHX-HMP
3 wt% CHX-HMP

图27

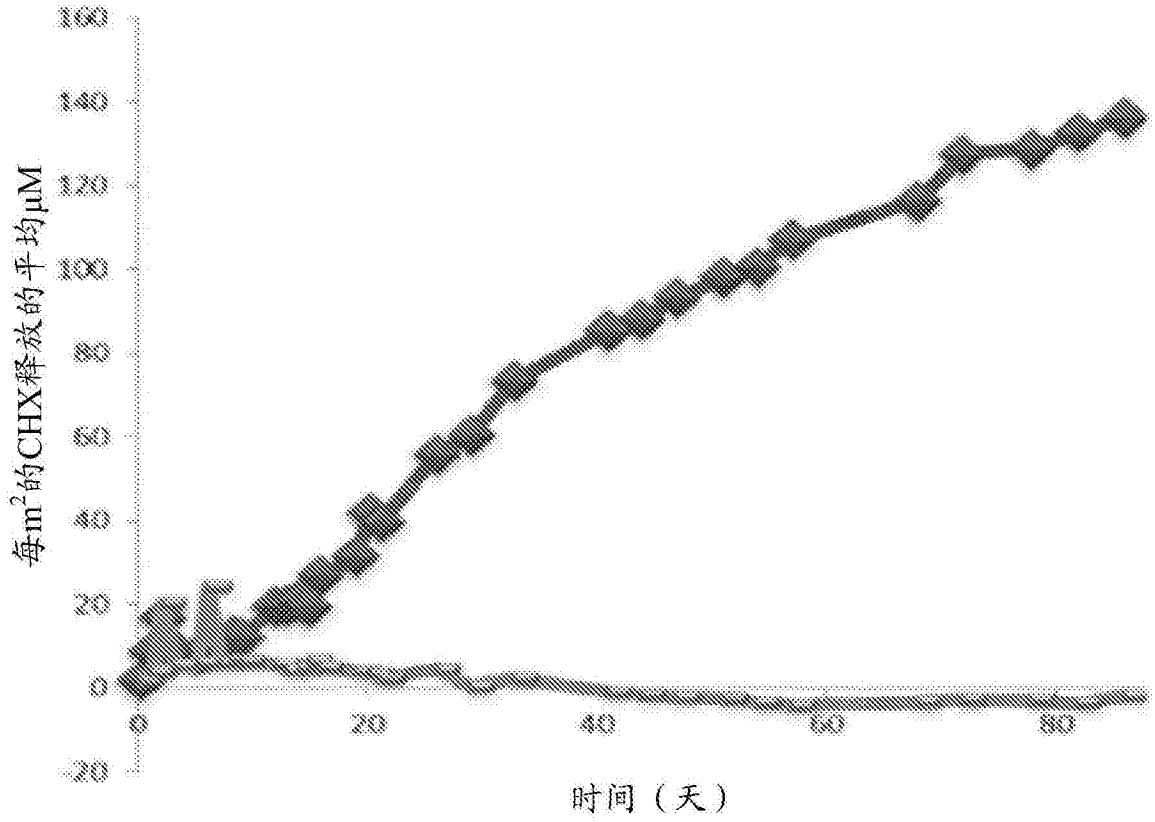

每m2的CHX释放的平均μM
160
140
120
100
80
60
40
20
0
-20
0
20
40
60
80
时间（天）

图28

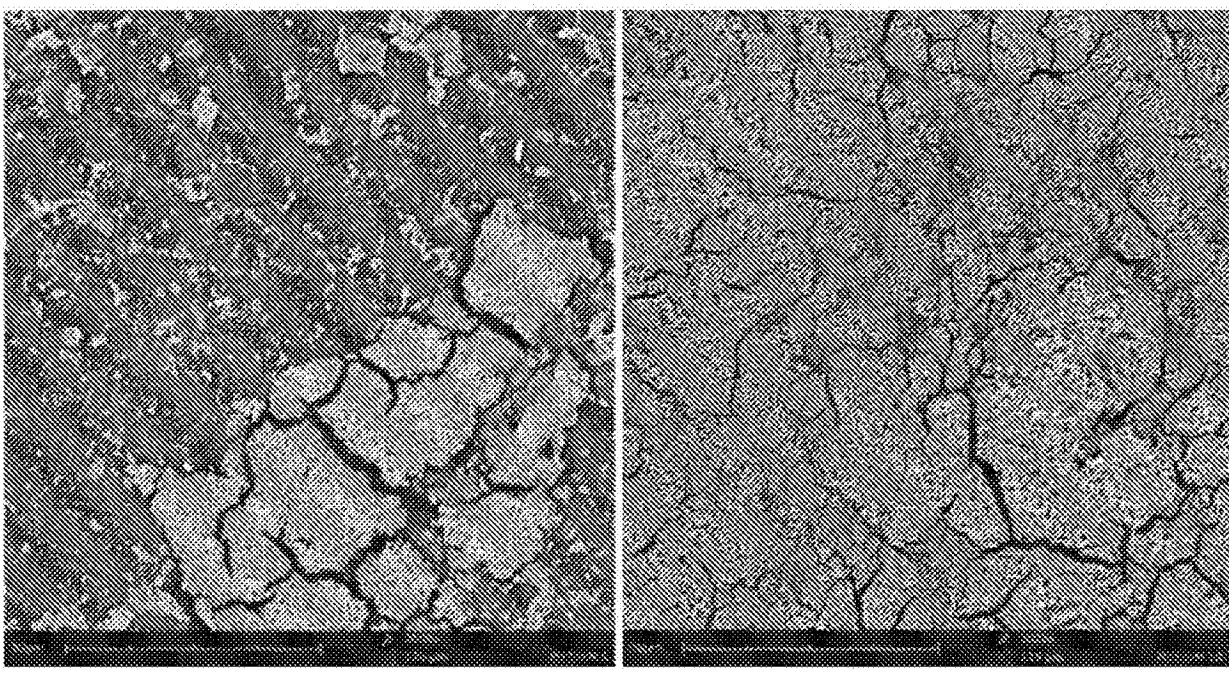


图29

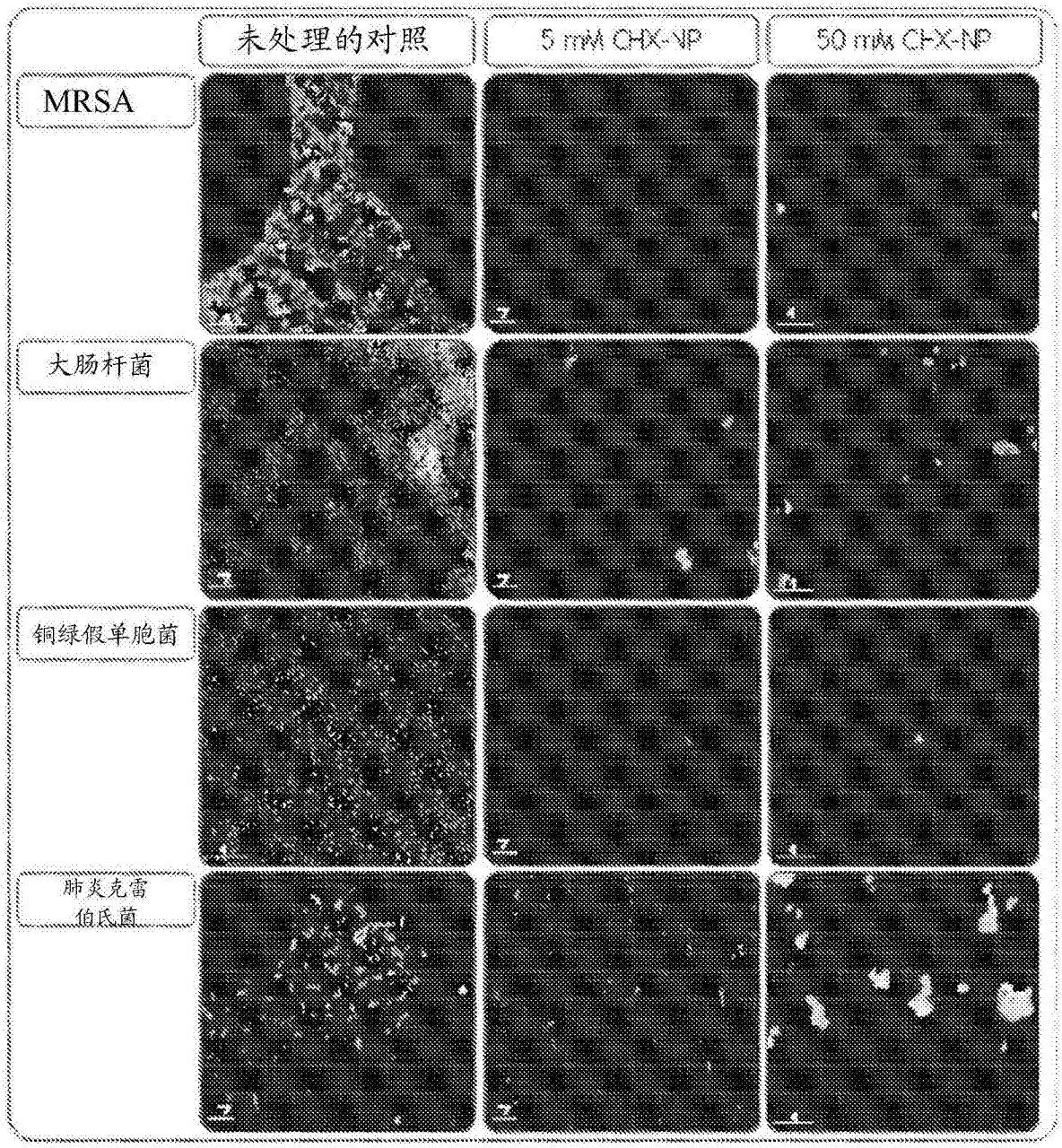


图30

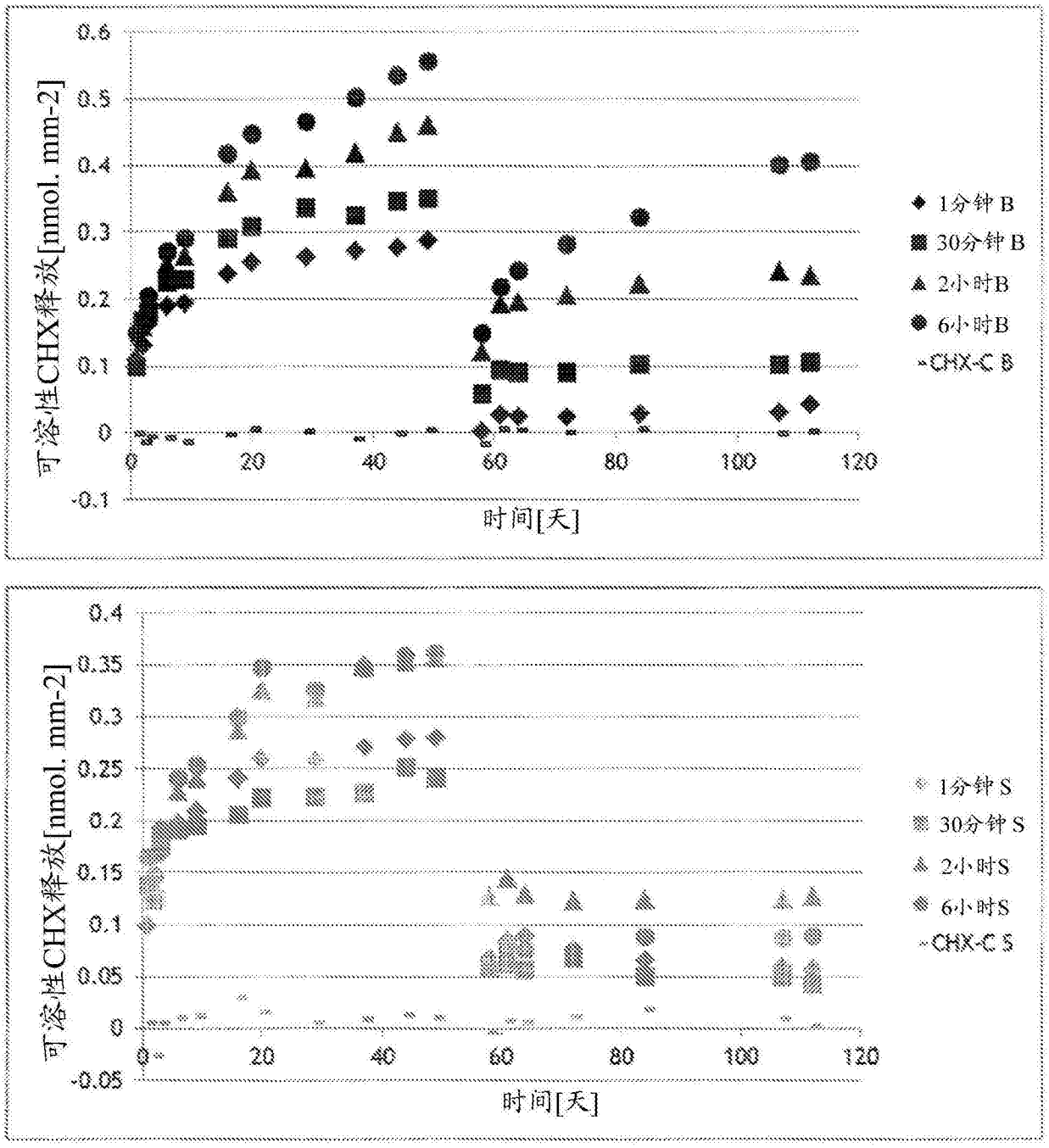

可溶性CHX释放[nmol. mm-2]
0.6
0.5
0.4
0.3
0.2
0.1
0
-0.1
0
20
40
60
80
100
120
时间[天]
1分钟 B
30分钟 B
2小时B
6小时B
CHX-C B
可溶性CHX释放[nmol. mm-2]
0.4
0.35
0.3
0.25
0.2
0.15
0.1
0.05
0
-0.05
0
20
40
60
80
100
120
时间[天]
1分钟 S
30分钟 S
2小时S
6小时S
CHX-C S

图31

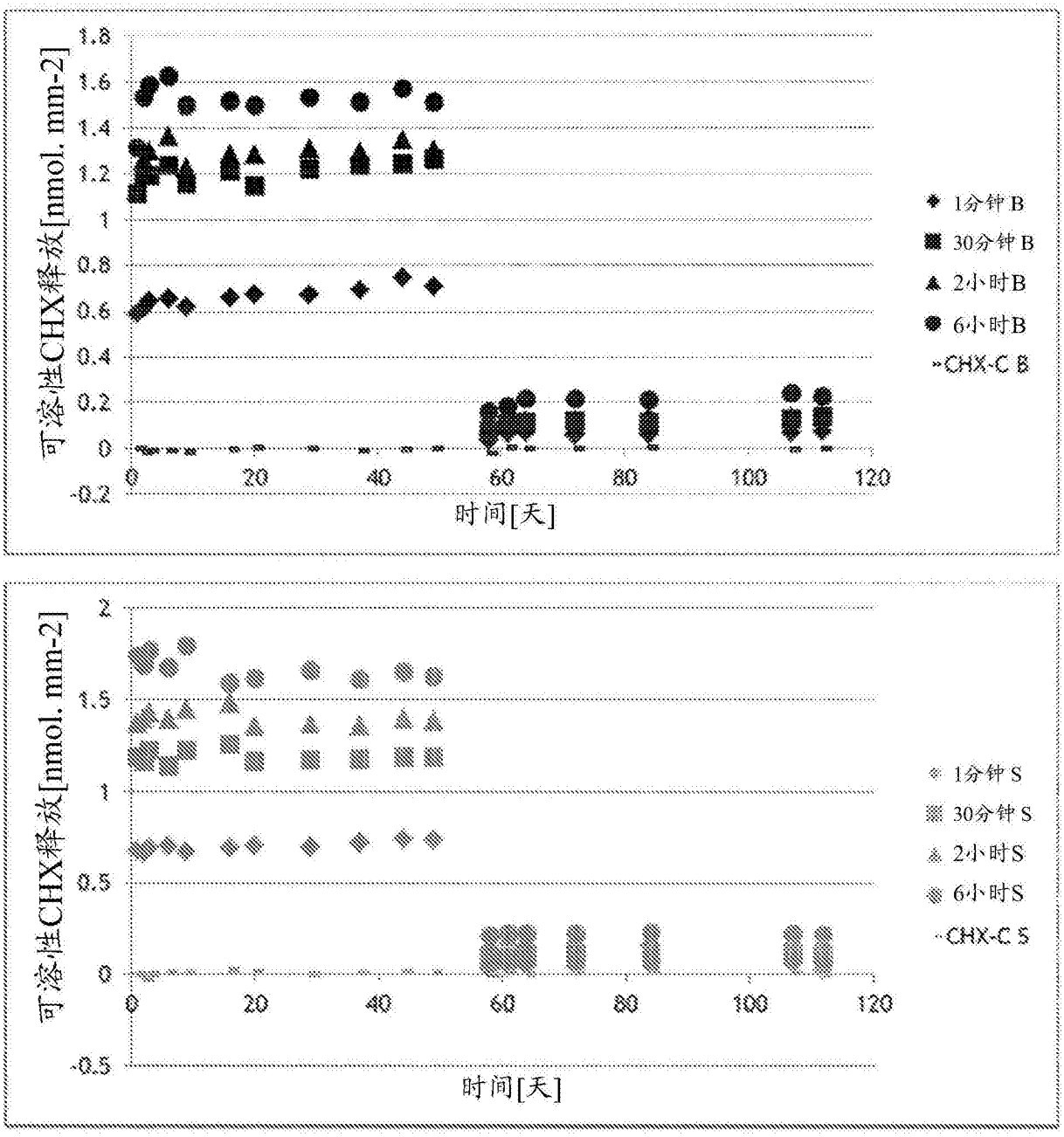

可溶性CHX释放[nmol. mm-2]
1.8
1.6
1.4
1.2
1
0.8
0.6
0.4
0.2
0
-0.2
0
20
40
60
80
100
120
时间[天]
1分钟B
30分钟B
2小时B
6小时B
CHX-C B
可溶性CHX释放[nmol. mm-2]
2
1.5
1
0.5
0
-0.5
0
20
40
60
80
100
120
时间[天]
1分钟S
30分钟S
2小时S
6小时S
CHX-C S

图32

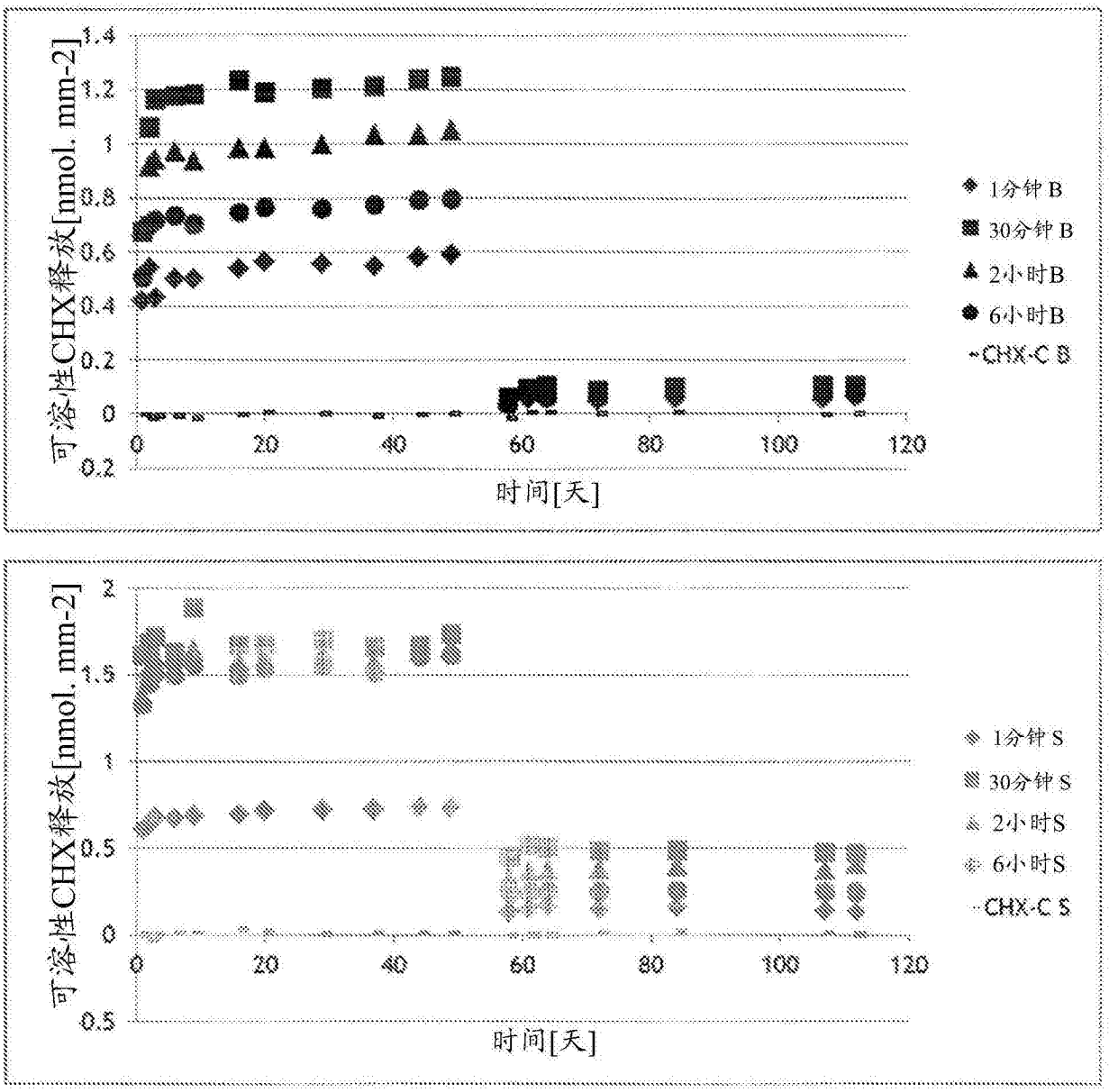

可溶性CHX释放[nmol. mm-2]
1.4
1.2
1
0.8
0.6
0.4
0.2
0
0.2
0
20
40
60
80
100
120
时间[天]
1分钟 B
30分钟 B
2小时B
6小时B
CHX-C B
可溶性CHX释放[nmol. mm-2]
2
1.5
1
0.5
0
0.5
0
20
40
60
80
100
120
时间[天]
1分钟 S
30分钟 S
2小时S
6小时S
CHX-C S

图33

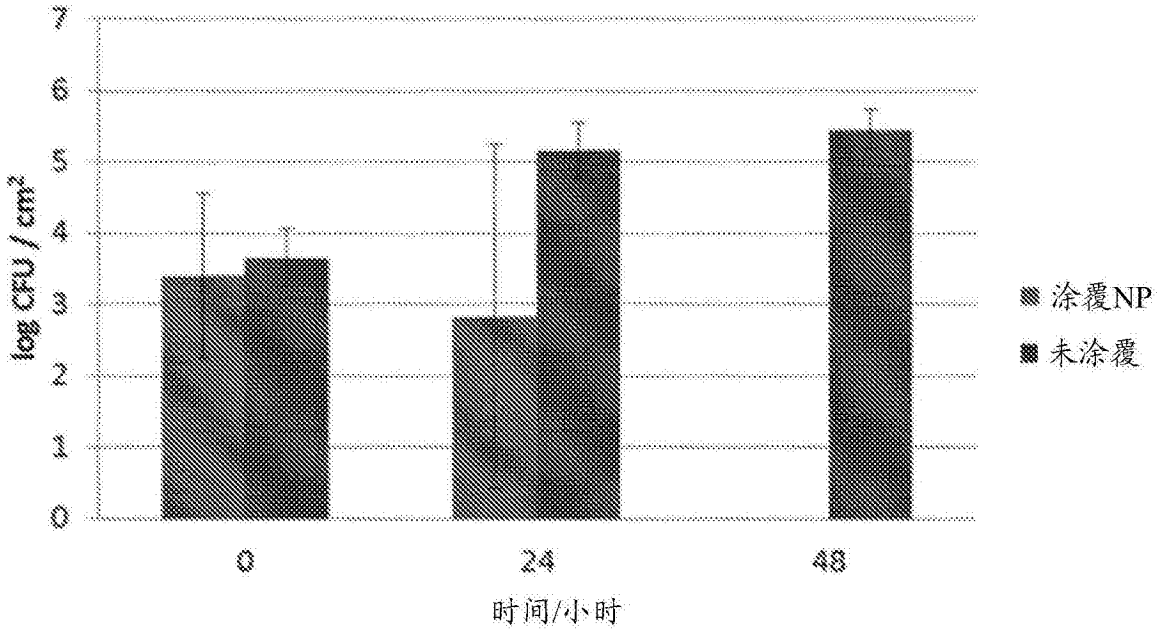

log CFU / cm²
0
1
2
3
4
5
6
7
0
24
48
时间/小时
涂覆NP
未涂覆

图34

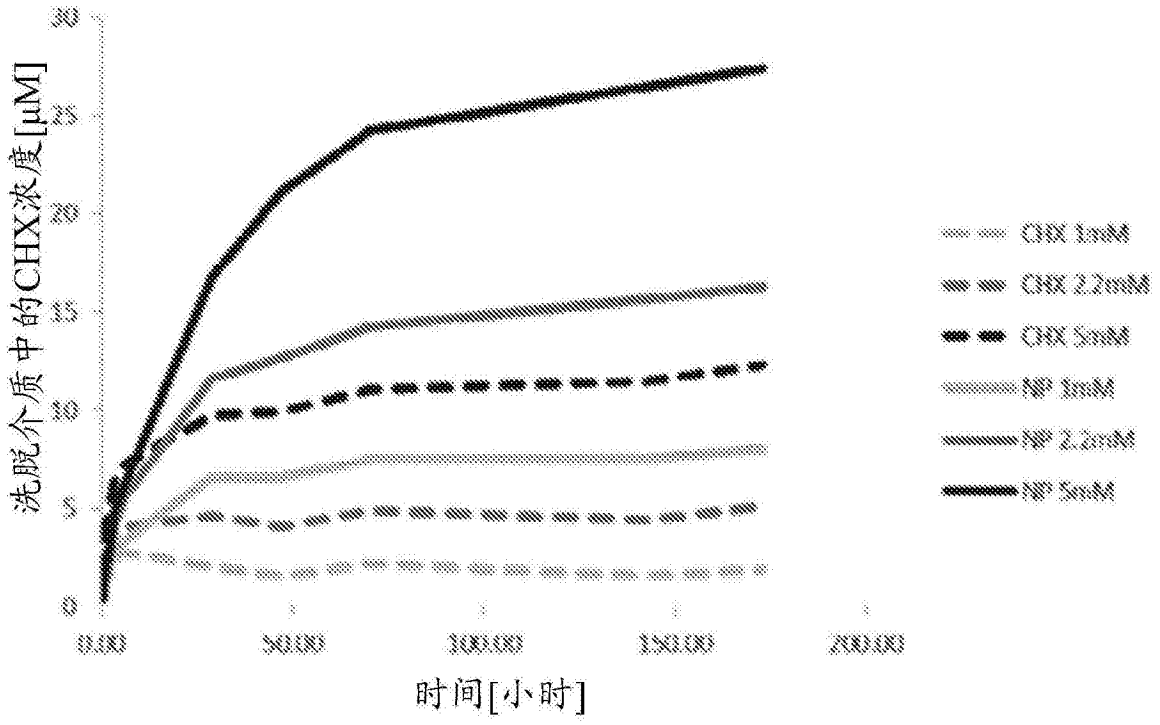

洗脱介质中的CHX浓度[μM]
0
5
10
15
20
25
30
0.00
50.00
100.00
150.00
200.00
时间[小时]
CHX 1mM
CHX 2.2mM
CHX 5mM
NP 1mM
NP 2.2mM
NP 5mM

图35

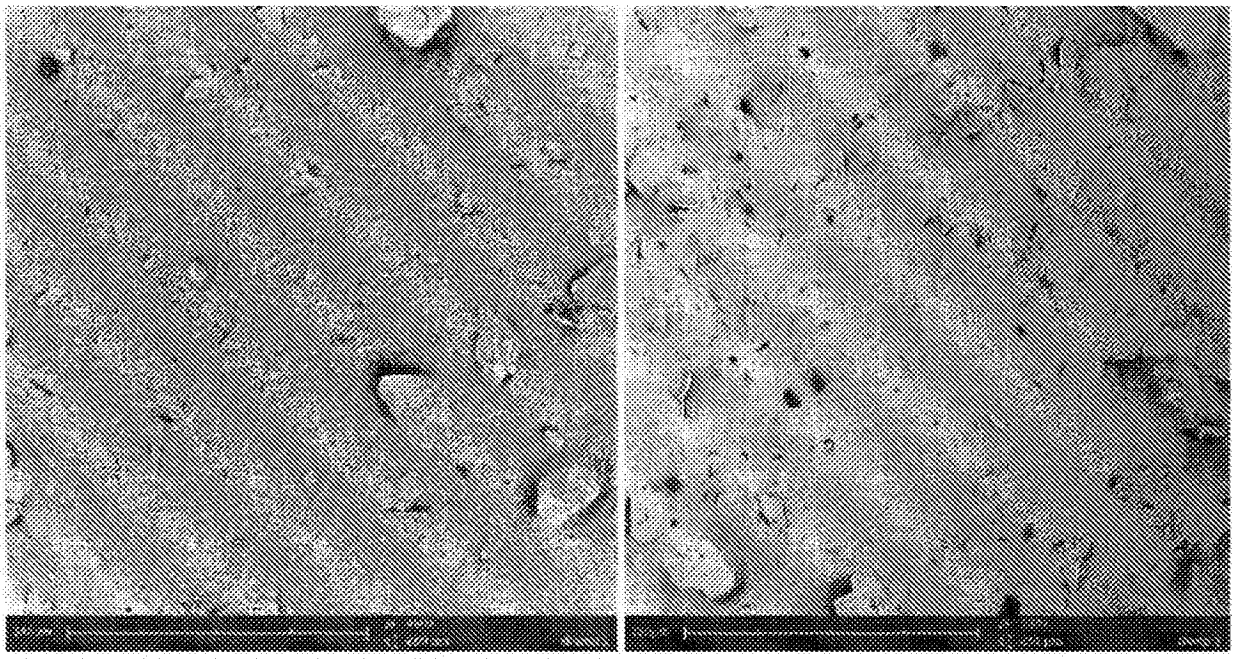


图36

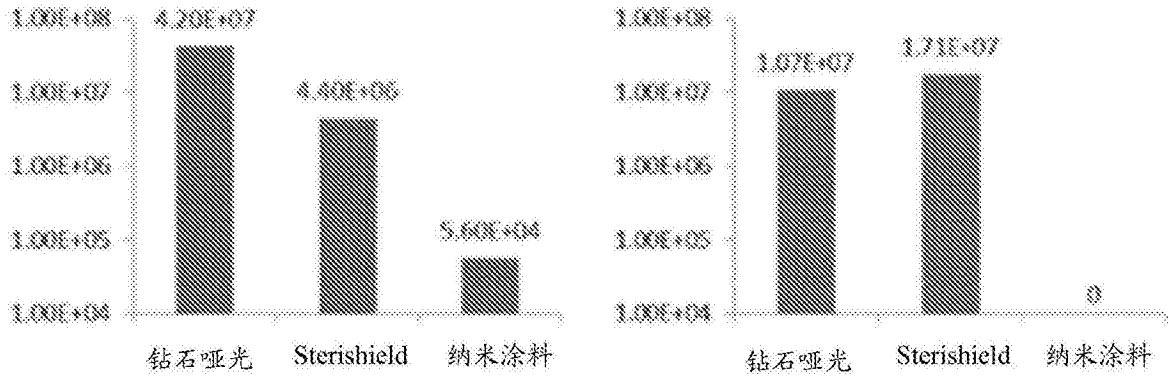

1.00E+08
1.00E+07
1.00E+06
1.00E+05
1.00E+04
4.20E+07
4.60E+06
5.60E+04
钻石哑光
Sterishield
纳米涂料
1.00E+08
1.00E+07
1.00E+06
1.00E+05
1.00E+04
1.07E+07
1.71E+07
0
钻石哑光
Sterishield
纳米涂料

图37