



(12)发明专利申请

(10)申请公布号 CN 107427700 A

(43)申请公布日 2017. 12. 01

(21)申请号 201580076846.6

(22)申请日 2015.12.24

(30)优先权数据

2014905281 2014.12.24 AU

(85)PCT国际申请进入国家阶段日

2017.08.23

(86)PCT国际申请的申请数据

PCT/AU2015/050843 2015.12.24

(87)PCT国际申请的公布数据

W02016/101041 EN 2016.06.30

(71)申请人 墨尔本大学

地址 澳大利亚维多利亚州

(72)发明人 埃里克·查尔斯·雷诺兹

(74)专利代理机构 北京超凡志成知识产权代理
事务所(普通合伙) 11371

代理人 王晖 李洁

(51)Int.Cl.

A61Q 11/00(2006.01)

A61K 33/42(2006.01)

A61K 38/08(2006.01)

A61K 38/17(2006.01)

A61K 6/033(2006.01)

A61K 8/24(2006.01)

A61K 8/64(2006.01)

权利要求书1页 说明书28页 附图2页

(54)发明名称

矿化氟化物组合物

(57)摘要

本发明涉及用于矿化牙表面尤其是牙齿釉质的组合物。还提供了使由龋齿、牙齿腐蚀和氟中毒引起的牙齿釉质中矿化不全性损伤(包括亚表面损伤)矿化的方法。

1. 一种用于矿化牙表面或亚表面的组合物,包括单氟磷酸钙和矿化剂。
2. 根据权利要求1所述的组合物,其中所述单氟磷酸钙的量是约200ppm至约5000ppm F。
3. 根据权利要求2所述的组合物,其中所述单氟磷酸钙的量是约400ppm至约1500ppm F。
4. 根据权利要求3所述的组合物,其中所述单氟磷酸钙的量是约1000ppm至约1450ppm F。
5. 根据权利要求1至4中任一项所述的组合物,其中所述矿化剂是稳定化的无定形磷酸钙 (ACP) 和/或无定形磷酸氟化钙 (ACFP)。
6. 根据权利要求1至5中任一项所述的组合物,其中所述组合物选自由牙膏、牙粉、液体洁齿剂、漱口剂、口腔清洗剂、口腔喷雾剂、涂剂、牙科粘固剂、含片、口香糖、锭剂、牙科糊剂、牙龈按摩霜、含漱片剂、乳制品和其他食品组成的组。
7. 根据权利要求6所述的组合物,其中所述组合物是牙膏。
8. 根据权利要求6所述的组合物,其中所述组合物是涂剂。
9. 根据权利要求6所述的组合物,其中所述组合物是牙科粘固剂。
10. 根据权利要求6所述的组合物,其中所述组合物是漱口剂。
11. 根据权利要求1至10中任一项所述的组合物,所述组合物用于家畜、陪伴动物或动物园动物。
12. 一种矿化牙表面或亚表面的方法,包括使牙表面或亚表面与单氟磷酸钙和矿化剂接触。
13. 根据权利要求12所述的方法,其中所述单氟磷酸钙的量是约200ppm至约5000ppm F。
14. 根据权利要求12所述的方法,其中所述单氟磷酸钙的量是约400ppm至约1500ppm F。
15. 根据权利要求12所述的方法,其中所述单氟磷酸钙的量是约1000ppm至约1450ppm F。
16. 根据权利要求12至15中任一项所述的方法,其中所述单氟磷酸钙在组合物中提供,并且在向口腔施用之前,所述单氟磷酸钙存在于所述组合物中。
17. 根据权利要求12至16中任一项所述的方法,其中所述牙表面是牙釉质。
18. 根据权利要求12至16中任一项所述的方法,其中所述牙表面是由龋齿、牙侵蚀症或氟中毒引起的釉质损伤。
19. 根据权利要求12至18中任一项所述的方法,其中所述矿化剂是稳定化的无定形磷酸钙 (ACP) 和/或无定形磷酸氟化钙 (ACFP)。
20. 根据权利要求19所述的方法,其中所述矿化剂是酪蛋白磷酸肽稳定化的无定形磷酸钙 (ACP) 和/或无定形磷酸氟化钙 (ACFP)。
21. 根据权利要求12至20中任一项所述的方法,其中所述牙表面亚表面属于家畜、陪伴动物或动物园动物。

矿化氟化物组合物

技术领域

[0001] 本发明涉及用于包括矿化牙表面(尤其是牙齿釉质)的用途的组合物。还提供了矿化由包括龋齿、牙齿腐蚀和氟中毒的各种方式引起的牙齿釉质中矿化不全性损伤(hypomineralized lesion)(包括亚表面损伤(次表面损伤, subsurface lesion))的方法。

[0002] 相关申请的交叉引用

[0003] 本申请要求来自申请号为2014905281的澳大利亚临时专利申请的优先权,该澳大利亚临时专利申请的全部公开内容通过引用并入本文。

背景技术

[0004] 矿化不全性损伤的常见原因是龋齿和氟中毒。

[0005] 由牙齿硬组织的脱矿(去矿化, demineralization)造成的龋齿通常是由于饮食糖分被牙菌斑牙齿致病细菌发酵。龋齿仍是主要的公众健康问题。此外,修复的牙齿表面在修复边缘周围可能易患进一步的龋齿。虽然在大部分发达国家中通过使用氟化物,龋齿的流行已经减少,但是该疾病仍旧是主要的公众健康问题。牙侵蚀症或牙齿腐蚀是由饮食或回流的酸造成的牙齿矿物质损失。牙齿过敏症起因于由保护性矿化层牙骨质的损失造成的暴露的牙本质小管。牙结石是磷酸钙矿物质在牙齿表面上的有害堆积。因此,所有这些病症:龋齿、牙侵蚀症、牙齿过敏症和牙结石,均与磷酸钙水平不平衡有关。

[0006] 釉质氟中毒(斑点)已经被认识将近一个世纪了,然而,直到1942年,才确定氟化物的病原学作用。氟中毒的特征外观可以与其他釉质失调区别开。釉质的氟斑(fluorotic)损伤(FLE)的临床特征表现为从沿着釉面横纹的细小不透明的线到白垩色、白色的釉质的连续变化。氟斑损伤中相当高度矿化的釉质外表面和矿化不全的亚表面的存在刺激了初期釉质“白斑”龋性损伤。随着严重性增加,涉及损伤的釉质深度和矿化不全程度两者均增加。氟中毒的发展高度依赖于氟化物暴露的计量、持续时间和时机,并且被认为与升高的血清氟化物浓度有关。白垩色“白斑”损伤也可以形成在儿童正在发育的牙齿上,诸如,在用抗生素治疗或发烧之后。这样的损伤表明牙齿釉质矿化不全(即,过少矿化)的区域。

[0007] 取决于损伤严重性,氟中毒已经通过外部釉质的修复性替换或微磨损来临床管控。这些治疗并不令人满意,因为它们涉及牙齿组织的修复或移除。符合期望的是一种会使矿化不全的釉质矿化以产生自然的外观和结构的治疗。

[0008] 酪蛋白磷酸肽与无定形磷酸钙的特定复合物(“CPP-ACP”,作为Recaldent™在商业上可获得的)已经显示在体外和原位再矿化釉质亚表面损伤(Reynolds, 1998; Shen等人, 2001; Reynolds等人, 2003)。

[0009] 墨尔本大学名下的W0 98/40406(其内容通过引用全部并入本文)描述了已经在碱性pH下制备的酪蛋白磷酸肽-无定形磷酸钙复合物(CPP-ACP)和CPP稳定化的无定形磷酸氟化钙(calcium fluoride phosphate)复合物(CPP-ACFP)。这样的复合物已经显示防止釉质脱矿并促进动物和人原位龋齿模型中釉质亚表面损伤的再矿化(Reynolds, 1998)。改进的酪蛋白磷酸肽-无定形磷酸钙复合物(CPP-ACP)和CPP稳定化的无定形磷酸氟化钙复合物

(CPP-ACFP) 也已经描述在W02006/056013和W02006/135982中,其包括在5至6.5的pH下形成的优选的复合物。

[0010] 在形成复合物中有效的CPP均是如此,无论它们是否是全长酪蛋白的一部分。在全长酪蛋白的胰蛋白酶消化之后可以被分离的活性物(CPP)的实例已经在美国专利5,015,628号中详细说明,并且包括肽Bos α_{s1} -酪蛋白X-5P(f59-79)、Bos β -酪蛋白X-4P(f1-25)、Bos α_{s2} -酪蛋白X-4P(f46-70)和Bos α_{s2} -酪蛋白X-4P(f1-21)。

[0011] WO 2010/068359描述了用至少一种糖醇和/或至少一种甘油磷酸化合物处理磷酸钙颗粒。

[0012] 存在提供对矿化不全性损伤改进或替代的治疗的需求。

[0013] 说明书中对任何现有技术的引用不被认为,且不应被认为是承认或任何形式的暗示该现有技术形成澳大利亚或任何其他管辖范围中的公知常识的一部分,或者该现有技术可以被合理地认为是被本领域技术人员确定为、理解为和认为相关的。

发明内容

[0014] 在一方面,本发明提供包括使牙表面或亚表面与单氟磷酸钙和矿化剂接触的矿化牙表面或亚表面的方法。

[0015] 单氟磷酸钙(本文中也称为CaMFP或CaFPO₃⁰)可以以下文中概述的量存在或提供。举例来说,单氟磷酸钙可以以约200ppm至5000ppm F存在于本发明的组合物中或用于本发明的方法中。如下文进一步解释的,用ppm指明氟化物含量是常见的——因为每个CaMFP具有一个氟离子(fluoride),相同的量度方法是适当的。在优选的实施方式中,单氟磷酸钙是以约200ppm至约3000ppm F、400ppm至约1500ppm F或约1000ppm至1450ppm F的量存在。在另外的优选的实施方式中,单氟磷酸钙是以约高于500、900、1000、1100、1200、1300、1400或1500ppm F的量存在。

[0016] 优选地,矿化剂是稳定化的无定形磷酸钙(ACP)和/或无定形磷酸氟化钙(ACFP)。牙表面优选地是牙釉质。在一个实施方式中,牙齿亚表面是釉质中的损伤部位,诸如由龋齿、牙侵蚀症或氟中毒引起的损伤。

[0017] ACP和ACFP可以在治疗浓度下沉淀,所以优选地ACP和/或ACFP是磷酸肽(PP)稳定化的。优选地,磷酸肽(如下文所定义的)是酪蛋白磷酸肽。优选地,ACP或ACFP是酪蛋白磷酸肽稳定化的ACP或ACFP复合物形式的。

[0018] 在优选的实施方式中,磷酸肽稳定化的无定形磷酸钙(ACP)或无定形磷酸氟化钙(ACFP)复合物具有紧密结合的钙和松散结合的钙,其中该复合物中松散结合的钙少于在7.0的pH下形成的ACP或ACFP复合物中紧密结合的钙。可选地,ACP或ACFP主要是碱性形式的。

[0019] 在优选的实施方式中,稳定化的ACP或ACFP复合物中的钙离子含量是在每摩尔PP约30至100摩尔钙的范围内。更优选地,钙离子含量是在每摩尔PP约30至约50摩尔钙的范围内。

[0020] 在如本文所描述的任意方面或实施方式中,稳定化的ACP和/或ACFP可以是在具有附加钙盐(例如,乳酸盐、碳酸盐、磷酸盐、氯化物等)的制剂中。典型地,制剂包括PP稳定化的ACP和/或ACFP复合物连同按重量计至少等量的可溶磷酸钙。

[0021] 优选地, ACP相(存在状态, phase)主要是碱性相, 其中ACP主要包括种类 Ca^{2+} 、 PO_4^{3-} 和 OH^- 。ACP的碱性相可以具有通式 $[\text{Ca}_3(\text{PO}_4)_2]_x[\text{Ca}_2(\text{PO}_4)(\text{OH})]_y$, 其中 $x \geq 1$ 。优选地 $x=1-5$ 。更优选地, $x=1$ 。优选地, 该式的两种组分以等比例存在。因此, 在一个实施方式中, ACP的碱性相具有式 $\text{Ca}_3(\text{PO}_4)_2\text{Ca}_2(\text{PO}_4)(\text{OH})$ 。

[0022] 优选地, ACFP相主要是碱性相, 其中ACFP主要包括种类 Ca^{2+} 、 PO_4^{3-} 和 F^- 。ACFP的碱性相可以具有通式 $[\text{Ca}_3(\text{PO}_4)_2]_x[\text{Ca}_2(\text{PO}_4)\text{F}]_y$, 其中当 $y=1$ 时 $x \geq 1$, 或者当 $x=1$ 时 $y \geq 1$ 。优选地, $y=1$ 且 $x=1-3$ 。更优选地, $y=1$ 且 $x=1$ 。优选地, 该式的两种组分以等比例存在。因此, 在一个实施方式中, ACFP的碱性相具有式 $\text{Ca}_3(\text{PO}_4)_2\text{Ca}_2(\text{PO}_4)\text{F}$ 。

[0023] 在一个实施方式中, ACP复合物主要由磷酸肽、钙离子、磷酸根离子和氢氧根离子以及水组成。

[0024] 在一个实施方式中, ACFP复合物主要由磷酸肽、钙离子、磷酸根离子、氟离子和氢氧根离子, 以及水组成。

[0025] 在本发明的另外的方面, 提供了矿化牙表面的方法, 该方法包括提供单氟磷酸钙和ACP源或ACFP源。在优选的实施方式中, 牙表面是釉质。

[0026] 在本发明的另外的方面, 提供了治疗氟中毒的方法, 该方法包括使牙齿釉质中的氟斑损伤与单氟磷酸钙和稳定化的ACP和/或ACFP接触。

[0027] 在本发明的另外的方面, 提供了治疗龋齿的方法, 该方法包括使牙齿釉质中的龋性损伤与单氟磷酸钙和稳定化的ACP和/或ACFP接触。

[0028] 在本发明的另外的方面, 提供了治疗牙侵蚀症的方法, 该方法包括使由侵蚀导致的牙齿釉质中的损伤与单氟磷酸钙和稳定化的ACP和/或ACFP接触。

[0029] 在本发明的另外的方面, 提供了减少牙齿釉质上白斑损伤的方法, 该方法包括使白斑损伤与单氟磷酸钙和稳定化的ACP和/或ACFP接触。

[0030] 在本发明的另外的方面, 提供了再矿化牙齿釉质中损伤的方法, 该方法包括使损伤与单氟磷酸钙和稳定化的ACP和/或ACFP接触。

[0031] 在本发明的另外的方面, 提供了再矿化牙齿釉质中损伤的方法, 该方法包括:

[0032] 使损伤与单氟磷酸钙和ACP源或ACFP源接触; 并且

[0033] 施用能够提高或维持溶液pH的组合物。

[0034] 优选地, 能够提高或维持溶液pH的组合物含有碳酸氢钠或尿素。优选地, 该组合物是口腔清洗剂(mouthrinse)或漱口剂(mouthwash)。

[0035] 在一个实施方式中, 能够提高或维持溶液pH的化合物不是 NaOCl , 即, 本发明的组合物是不含 NaOCl 的。

[0036] 在本文描述的发明的任意方面或实施方式中, 能够提高或维持溶液pH的化合物与稳定化的ACP源或ACFP源和单氟磷酸钙被同时施用, 作为对于稳定化的ACP源或ACFP源和单氟磷酸钙的预处理被施用或作为对于稳定化的ACP源或ACFP源和单氟磷酸钙的后处理被施用。

[0037] 在本文描述的发明的任意方面或实施方式中, ACP和/或ACFP是磷酸肽(PP)稳定化的。优选地, 磷酸肽(如下文所定义的)是酪蛋白磷酸肽。优选地, ACP或ACFP是酪蛋白磷酸肽稳定化的ACP或ACFP复合物形式的。

[0038] 在另一个方面, 提供包括稳定化的无定形磷酸钙(ACP)和/或无定形磷酸氟化钙

(ACFP) 和单氟磷酸钙的组合物。该组合物优选地还包括如本文所描述的提高或维持溶液pH的化合物。

[0039] 稳定化的ACP和/或ACFP和/或单氟磷酸钙可以与牙表面接触约1分钟至2小时,或5分钟至60分钟,或约10分钟的一段时间。稳定化的ACP和/或ACFP可以在1天至若干个月的一段时期内被重复施加在牙表面。

[0040] 在一个实施方式中,在使牙表面与稳定化的ACP和/或ACFP接触之前,单氟磷酸钙与牙表面接触1至60分钟,或1至30分钟,或1至5分钟。

[0041] 在一个实施方式中,在使牙表面与稳定化的ACP和/或ACFP接触之后,单氟磷酸钙与牙表面接触1至60分钟,或1至30分钟,或1至5分钟。

[0042] 在本发明的另外的方面,提供了矿化牙齿表面的方法,该方法包括向牙齿表面施加稳定化的ACP和/或ACFP复合物和单氟磷酸钙。优选地,牙齿表面是牙齿釉质或牙本质。典型地,牙齿表面是包含损伤的牙齿釉质,所述损伤选自白斑损伤;氟斑损伤;龋性损伤;或由牙齿侵蚀造成的损伤中的一种或多种组成的组。优选地,稳定化的ACP和/或ACFP复合物和单氟磷酸钙被包含在被施加于牙齿表面的同一组合物中。

[0043] 本发明还提供矿化牙表面或亚表面的方法,该方法包括使牙表面或亚表面与含有单氟磷酸根的化合物、钙源和矿化剂接触,其中含有单氟磷酸根的化合物和钙源在允许形成单氟磷酸钙的条件下被提供于口腔。优选地,含有单氟磷酸根的化合物是如本文所描述的,更加优选地,含有单氟磷酸根的化合物是单氟磷酸二钠。优选地,钙源是如本文所描述的,更加优选地,钙源是氯化钙。

[0044] 本发明还提供矿化牙表面或亚表面的方法,该方法包括提供一组合物来与牙表面或亚表面接触,其中在接触牙表面或亚表面之前,该组合物包括单氟磷酸钙和矿化剂。换言之,单氟磷酸钙在组合物接触牙表面或亚表面之前或施用于口腔之前就存在于该组合物中。优选地,矿化剂是磷酸肽稳定化的ACP和/或ACFP,诸如CPP-ACP和/或CPP-ACFP。

[0045] 在本发明的任意方法或组合物中,单氟磷酸钙可以通过包括以下步骤的方法形成:

[0046] 在约5.0至约7.0之间的pH下,混合单氟磷酸根源和钙源,

[0047] 从而形成单氟磷酸钙。

[0048] 优选地,单氟磷酸根源是如本文所描述的,更优选地,单氟磷酸根源是单氟磷酸二钠。优选地,钙源是如本文所描述的,更优选地,钙源是氯化钙。典型地,pH是约7.0。

[0049] 单氟磷酸根源和钙源可以以约等量混合。举例来说,约80 μ mol单氟磷酸二钠每克可以与80.0 μ mol氯化钙(CaCl_2)每克彻底混合。在一个实施方式中,76.3 μ mol单氟磷酸二钠每克与80.0 μ mol氯化钙(CaCl_2)每克彻底混合。

[0050] 在本发明的任意方法或组合物中,单氟磷酸钙可以通过实施例9中描述的方法形成。

[0051] 在本发明的任意方法或组合物中,ACP或ACFP由CPP稳定化。优选地,CPP-ACP复合物主要由磷酸肽、钙离子、磷酸根离子和氢氧根离子以及水组成。优选地,CPP-ACFP复合物主要由磷酸肽、钙离子、磷酸根离子、氟离子和氢氧根离子,以及水组成。

[0052] 在任何实施方式中,牙表面需要这样的治疗。因此,除本文所描述的任何方法的步骤之外,本发明还包括识别受试者患有氟中毒、龋齿、牙本质过敏症或牙结石、白斑损伤;氟

斑损伤;龋性损伤;或由牙齿侵蚀造成的损伤的步骤。

[0053] 本发明提供包括单氟磷酸钙和稳定化的无定形磷酸钙 (ACP) 和/或无定形磷酸氟化钙 (ACFP) 的、用于矿化牙表面或亚表面的组合物。

[0054] 本发明提供包括单氟磷酸钙和稳定化的无定形磷酸钙 (ACP) 和/或无定形磷酸氟化钙 (ACFP) 的组合物、用于矿化牙表面或亚表面的用途。

[0055] 在另外的方面,提供治疗或预防龋齿、蛀牙、牙侵蚀症和氟中毒的每个中的一种或多种的方法,该方法包括将单氟磷酸钙施用于受试者的牙齿,然后施用ACP或ACFP复合物或组合物的步骤。复合物的局部施用是优选的。该方法优选地包括施用如本文所描述的制剂中的复合物。

[0056] 在另外的方面,提供单氟磷酸钙和稳定化的无定形磷酸钙 (ACP) 或无定形磷酸氟化钙 (ACFP) 在制造用于治疗 and/或预防龋齿、蛀牙、牙侵蚀症和氟中毒中一种或多种的组合物中的用途。

[0057] 在另外的方面,提供用于矿化牙表面或亚表面的包括单氟磷酸钙和稳定化的无定形磷酸钙 (ACP) 或无定形磷酸氟化钙 (ACFP) 作为活性试剂的组合物。典型地,矿化牙表面或亚表面是用于治疗 and/或预防龋齿、蛀牙、牙侵蚀症和氟中毒中的一种或多种。

[0058] 在另外的方面,或在本发明的上述任何方法或用途中,还提供施加游离氟离子源的步骤。游离氟离子源可以随着单氟磷酸钙和ACP源或ACFP源同时施加。作为替代,游离氟离子源可以在单氟磷酸钙或ACP源或ACFP源之前或之后施加。示例性的游离氟离子源包括氟化钠、氟化锡和氟化胺。不束缚于任何理论,在与牙齿表面接触时,这些游离氟离子可以与ACP或ACFP相互作用以形成氟磷灰石,其可能比正常牙齿釉质对酸刺激 (acid challenge) 更加耐受。

[0059] 本发明还提供包括单氟磷酸钙和矿化剂的组合物。优选地,矿化剂是稳定化的无定形磷酸钙 (ACP) 或稳定化的无定形磷酸氟化钙 (ACFP)。优选地,该组合物还包括药学上可接受的载体、稀释剂或赋形剂。

[0060] 在优选的实施方式中,组合物中磷酸肽稳定化的无定形磷酸钙 (ACP) 或无定形磷酸氟化钙 (ACFP) 复合物具有紧密结合的钙和松散结合的钙,其中复合物中结合的钙少于在 pH 7.0 下形成的ACP或ACFP复合物中紧密结合的钙。可选地,ACP或ACFP主要是碱性形式的。

[0061] 在另一个优选的实施方式中,组合物中的稳定化的ACP或ACFP复合物的钙离子含量是在每摩尔PP约30至100摩尔钙的范围内。更优选地,钙离子含量是每摩尔PP约30至约50摩尔钙的范围内。

[0062] 在任一实施方式中,组合物中的ACP和/或ACFP可以是酪蛋白磷酸肽稳定化的ACP和/或ACFP复合物形式的。

[0063] 本发明还涉及用于治疗或预防龋齿、氟中毒和牙侵蚀症中的一种或多种的试剂盒,其包括 (a) 单氟磷酸钙,和 (b) 在药学上可接受的载体中的稳定化的ACP和/或稳定化的ACFP复合物。符合期望的是,该试剂盒还包括用于矿化需要这种治疗的患者的牙表面的用途的说明。该说明可描述该试剂盒治疗或预防龋齿、蛀牙、牙侵蚀症和氟中毒的每个中的一种或多种的用途。在一个实施方式中,试剂和复合物以对于治疗患者合适的量存在。优选地,稳定化的ACP和/或ACFP是磷酸肽 (PP) 稳定化的。优选地,磷酸肽 (如下文所定义的) 是酪蛋白磷酸肽。优选地,ACP或ACFP是酪蛋白磷酸肽稳定化的ACP或ACFP复合物形式的。

[0064] 本发明的组合物或试剂盒还可以包括游离氟离子源。游离氟离子可以来自任何合适的源。游离氟离子源可以包括游离氟离子或氟化物盐。氟离子源的实例包括,但不限于以下物质:氟化钠、氟化锡、氟硅酸钠、氟化银、氟化胺或任何金属离子氟化物盐。氟离子源可以是次氟酸盐。这些氟离子源可以被提供于溶液(典型的是水溶液),或者悬浮液中。

附图说明

[0065] 图1:依照实施例8的描述制备的、在实施例10中描述的临床试验中使用的矫治器(装置,appliance)。

[0066] 图2:在具有和不具有CPP-ACP的情况下,用氟化钠(NaF)与单氟磷酸钙(CaMFP)的原位釉质亚表面损伤的再矿化的比较。上部矫治器结果以左边的柱显示,下部矫治器结果以右边的柱显示。相比于含有氟化钠的那些,含有单氟磷酸钙的组合物导致在统计学上显著更大的再矿化。*用重复测量方差分析的统计学分析,且显著性水平是 $p<0.05$ 。

具体实施方式

[0067] 本发明的另外的方面和在前述段落中描述的各个方面的另外的实施方式将从通过实例的方式给出并参考附图的以下描述而变得明显。将被理解的是,在本说明书中所公开和定义的本发明扩及由正文或附图提及或证明的两个或更多个单独特征的所有替代性组合。所有这些不同的组合构成本发明的各种替代方面。

[0068] 现在将详细涉及本发明的某些实施方式。虽然本发明将结合实施方式来描述,但是,将被理解的是,其目的并非将本发明限制于那些实施方式。相反,本发明意在涵盖所有替代物、修改物和等价物,该替代物、修改物和等价物可以被包括在如权利要求所定义的本发明的范围内。

[0069] 本领域技术人员将识别可以被用于本发明的实践中的类似于本文所描述的方法和材料的许多方法和材料。本发明决不限制于所描述的方法和材料。本文所引用的所有专利和出版物都通过引用以其全文并入本文。

[0070] 出于解释本说明书的目的,以单数使用的术语将还包括复数,反之亦然。正如本文所使用的,除了语境另有要求的地方外,术语“包括(comprise)”及该术语的变式,诸如“包括(comprising)”、“包括(comprises)”和“包括(comprised)”,无意于排除其他添加剂、组分、整数(integer)或步骤。正如本文所使用的,除了语境另有要求的地方外,“包括(comprise)”和“包含(include)”可以互换使用。

[0071] 本发明提供矿化牙表面或亚表面的方法,其包括使牙表面或亚表面与单氟磷酸钙和矿化剂接触。该牙齿亚表面典型地是矿化不全性损伤,以致接触到牙表面的化合物和矿化剂穿过任何表面层(即,菌膜(pellicle)和/或菌斑(plaque)),穿过多孔的牙表面迁移到需要矿化的区域。优选地,矿化剂是稳定化的无定形磷酸钙(ACP)和/或无定形磷酸氟化钙(ACFP)。牙表面优选地是牙釉质。牙表面可以是釉质中的损伤,诸如由龋齿、牙侵蚀症或氟中毒造成的损伤。

[0072] 除非另有明确指出,本文提及单氟磷酸钙还包括含有单氟磷酸根和钙,或者在暴露于水溶液时可以产生单氟磷酸钙的化合物或组合物。换言之,在本发明的任何方法或任何组合物中,单氟磷酸钙可以在向口腔施用之前形成,或者单氟磷酸钙可以通过单氟磷酸

盐的化合物或单氟磷酸根源(例如,单氟磷酸二钠)和钙的化合物或钙源(例如,氯化钙)在口腔中形成。提供单氟磷酸钙或允许单氟磷酸钙形成的优选化合物包括单氟磷酸钠加钙源(例如,钙盐)。当暴露于下文描述的和实施例中描述的适当条件(诸如,量和pH)时,单氟磷酸钠加钙源(例如,钙盐)可以形成单氟磷酸钙。仅通过添加CPP-ACP和单氟磷酸钠,将不形成单氟磷酸钙,因为ACP已经处于稳定化的形式。另外,从与通常见于牙膏中的不溶于水的磨光材料(诸如,磷酸三钙、二水合磷酸钙、无水磷酸二钙或焦磷酸钙)混合的单氟磷酸钠将不会形成单氟磷酸钙。此外,当(例如)单氟磷酸钠或任何其他含单氟磷酸根的化合物存在于口腔中时,在口腔中不存在足够的钙(更别提生物可利用形式的钙)来形成治疗有效量的单氟磷酸钙。尽管口腔中存在一些钙,但这仅是形成如本文所描述的治疗有效量的单氟磷酸钙所需要的钙的一小部分。

[0073] 本发明出乎意料地确定了中性离子对 CaFPO_3^0 在促进釉质再矿化中是优于 F^- 的。这是出乎意料的,因为以前人们认为表面或亚表面损伤的再矿化需要游离氟离子,并且人们相信单氟磷酸盐,特别是单氟磷酸钙不释放游离氟离子。因此,单氟磷酸盐,特别是同磷酸肽稳定化的ACP和/或ACFP协同的单氟磷酸盐,不被认为是用于表面或亚表面损伤再矿化的适当化合物。不束缚于任何理论或作用方式,人们相信单氟磷酸根与钙离子形成中性离子对, $\text{Ca}^{2+} + \text{FPO}_3^{2-} \leftrightarrow \text{CaFPO}_3^0$,并且该中性离子对促进在表面或亚表面损伤中氟磷灰石的产生。不像单氟磷酸钠,单氟磷酸钙不易于在口内、损伤外水解,这是有益的,因为单氟磷酸钙被保持为中性离子,从而更易于进入损伤,然而单氟磷酸钠解离以形成负离子,例如 FPO_3^{2-} 或 HPFPO_3^{1-} ,并且负离子被釉质/菌斑的带电表面吸引/排斥,限制其进入损伤。中性离子对 CaFPO_3^0 可以沿浓度梯度向下扩散进入亚表面釉质损伤,并且通过提供钙离子、氟离子和磷酸根离子实现再矿化。 CaFPO_3^0 优于中性离子对 CaHPO_4^0 ,因为其提供Ca、F和磷酸根,而另一中性离子对仅提供钙离子和磷酸根离子。

[0074] 在本发明的领域中,组合物中氟化物的量通常以百万分率(ppm)来描述。因此,本领域技术人员通过提及由含氟离子(fluoride,氟化物)的化合物(诸如单氟磷酸盐)释放的氟离子(fluoride,氟化物)的ppm来谈及氟化物(fluoride,氟离子)含量。具有生理学重要意义的是生物可利用的氟化物,即,其含有和释放的氟离子(fluoride,氟化物)的量。在本发明的任何方面,单氟磷酸钙以下文所概述的量存在。举例来说,单氟磷酸钙可以以约200ppm至5000ppm F存在于本发明的组合物中或用于本发明的方法中。在优选的实施方式中,单氟磷酸钙以约200ppm至约3000ppm F、400ppm至约1500ppm F,或约1000ppm至1450ppm F的量存在。在更优选的实施方式中,单氟磷酸钙以约高于500、900、1000、1100、1200、1300、1400或1500ppm F的量存在。

[0075] 在本发明的任何组合物或方法中,单氟磷酸钙以大于约1mM、5mM、10mM、20mM、40mM、50mM、60mM或70mM存在。优选地,单氟磷酸钙以约1mM、5mM、10mM、20mM、40mM、50mM、60mM、70mM或75mM存在。

[0076] 本发明的任何组合物或方法包括如下量的单氟磷酸钙:接触到牙表面或亚表面时产生相比于单氟磷酸钙不存在时临床可观察量的再矿化。

[0077] 在本文所描述的发明的任意方面,提到提供单氟磷酸根的化合物包括单氟磷酸钙。

[0078] 如在当前说明书中描述的稳定化的ACP或ACFP复合物是示于Cross等人,2007的图

2中的“闭合的 (closed)”复合物。由Cross等人已经证明于pH 7下产生的CPP-ACP复合物是“开放的 (open)”，然而伴随连续添加氢氧根离子而产生的CPP-ACP是“闭合的”复合物。该“闭合的”复合物显著不同于“开放的”复合物，因为其具有完全不同的结构并含有碱性磷酸钙相。临床上，其已经被证明具有大幅改进的效果并向牙齿递送更多磷酸钙。

[0079] 如本文所提及的稳定化的ACP或ACFP复合物包括如W02006/056013中描述的稳定化的ACP或ACFP复合物，其内容通过引用并入本文。

[0080] 在优选的实施方式中，磷酸肽稳定化的无定形磷酸钙 (ACP) 或无定形磷酸氟化钙 (ACFP) 复合物具有紧密结合的钙和松散结合的钙，其中复合物中结合的钙少于在7.0的pH下形成的ACP或ACFP复合物中紧密结合的钙。可选地，ACP或ACFP主要是碱性形式的。

[0081] 如本文所提及的稳定化的ACP或ACFP复合物包括在低于7.0的pH下形成的稳定化的ACP或ACFP复合物。优选地，复合物是在约5.0直至但低于7.0的范围内的pH下形成的。更优选地，复合物是在约5.0至约6.0的pH范围下形成的。在优选的实施方式中，复合物是在约5.0或约5.5的pH下形成的。优选地，复合物中的ACP或ACFP主要是碱性形式的。

[0082] 稳定化的ACP可以由包括以下步骤的方法制得：

[0083] (i) 获得包括至少一种磷酸肽的溶液，并且；

[0084] (ii) 掺混包括钙离子、磷酸根离子和氢氧根离子的溶液，同时保持pH在约7.0或以下。

[0085] 稳定化的ACFP可以由包括以下步骤的方法制得：

[0086] (i) 获得包括至少一种磷酸肽的溶液，并且；

[0087] (ii) 掺混包括钙离子、磷酸根离子、氢氧根离子和氟离子的溶液，同时保持pH在约7.0或以下。

[0088] 氢氧根离子可以被滴定到溶液中以将磷酸肽溶液保持在基本上恒定的pH。钙离子和磷酸根离子可以伴随着不断搅拌并且以避免在磷酸肽溶液中形成磷酸钙沉淀的速率滴定到磷酸肽溶液中。

[0089] 正如本文所使用的，磷酸肽稳定化的无定形磷酸钙 (ACP) 或无定形磷酸氟化钙 (ACFP) 复合物还可以包括如下复合物中的ACP，该复合物具有紧密结合的钙和松散结合的钙，其中复合物中紧密结合的钙少于形成于pH 7.0的ACP或ACFP复合物中的紧密结合的钙，并且ACP或ACFP主要是碱性形式的，通过包括以下步骤的方法可获得或获得：

[0090] a) 将包括钙离子的第一溶液、包括磷酸根离子的第二溶液，和可选地，包括氟离子的第三溶液掺混到包括磷酸肽和溶剂、具有约5直至但低于7的pH的溶液；并且

[0091] b) 在掺混期间通过添加氢氧根离子将溶液的pH保持在约5.0直至但低于7.0。

[0092] “紧密”和“松散”结合的钙和磷酸根可以使用如实施例2中所示的分析超滤来确定。简言之，在维持pH为约7.0或更低的条件下掺混的磷酸肽、钙、磷酸根和可选地氟离子的溶液可以首先通过0.1微米过滤器过滤以去除未与复合物缔合的游离钙和磷酸根。该游离钙和磷酸根存在于滤液中并被弃去。未以任何方式与复合物缔合的任何游离钙或磷酸根将不是生物可利用的 (即，通过磷酸肽向牙齿递送)。来自0.1微米过滤的滤余物可以通过借助3000mw截留过滤器、在1,000g下离心15min，来进一步进行分析。所得滤液含有与复合物松散结合或缔合的钙和磷酸根。在该离心力下，未与复合物紧密结合的钙和磷酸根被释放并移动到滤液中。紧密结合于复合物的Ca和Pi保留在滤余物中。滤余物中紧密结合的Ca和Pi

的量随后可以通过从0.1微米过滤的滤余物中的Ca和Pi的总量中减掉滤液中的Ca和Pi的量来确定。

[0093] 如本文所提及的稳定化的ACP或ACFP复合物包括如W02006/135982中所描述的稳定化的ACP或ACFP复合物,其内容通过引用而被并入本文。

[0094] “超负载的(superloaded)”磷酸肽或磷蛋白(PP)稳定化的无定形磷酸钙(ACP)或无定形磷酸氟化钙(ACFP)复合物。复合物可以在任意pH(例如,3-10)下形成。优选地,磷酸肽包括序列-A-B-C-,其中A是磷酸氨基酸,优选地是磷酸丝氨酸,B是包括磷酸氨基酸的任意氨基酸,且C是谷氨酸、天冬氨酸或磷酸氨基酸。磷酸氨基酸可以是磷酸丝氨酸。PP被超负载有钙离子和磷酸根离子。钙离子可以在每摩尔PP 30-1000mol Ca的范围内,或在每摩尔PP 30-100或30-50摩尔Ca的范围内。在另一个实施方式中,每摩尔PP的mol Ca是至少25、30、35、40、45或50。

[0095] 本发明包括具有大于每摩尔PP约30摩尔钙的钙离子含量的磷酸肽或磷蛋白(PP)稳定化的无定形磷酸钙或无定形磷酸氟化钙复合物。在优选的实施方式中,钙离子含量是在每摩尔PP约30至100摩尔钙的范围内。更优选地,钙离子含量是在每摩尔PP约30至约50摩尔钙的范围内。

[0096] 本发明还提供由包括以下步骤的方法制得的磷酸肽或磷蛋白(PP)稳定化的无定形磷酸钙(ACP)或无定形磷酸氟化钙(ACFP)复合物:

[0097] (i) 获得包括钙、无机磷酸盐和氟化物(可选)的溶液;和

[0098] (ii) 将(i)与包括PP-ACP的溶液掺混。

[0099] 在优选的实施方式中,PP是酪蛋白磷酸肽(CPP)。

[0100] 在另外的方面,本发明还包括具有(a) PP稳定化的ACP和/或ACFP复合物连同按重量计至少等量的磷酸钙,和(b)提供单氟磷酸根的化合物的制剂的用途。优选地,钙磷酸盐(calcium phosphate)是 CaHPO_4 或乳酸钙或任何其他可溶钙磷酸盐化合物。优选地,钙磷酸盐(例如, CaHPO_4)与PP稳定化的ACP和/或ACFP复合物干燥共混。在优选的实施方式中,PP-ACP和/或PP-ACFP复合物:钙磷酸盐的比例是约1:1-50。更优选地,约1:1-25,更优选地,约1:5-15。在一个实施方式中,PP-ACP和/或PP-ACFP复合物:钙磷酸盐的比例是约1:10。

[0101] 包括磷酸肽或磷蛋白(PP)稳定化的无定形磷酸钙(ACP)和/或无定形磷酸氟化钙(ACFP)复合物(当被用于口腔时,该复合物具有大于每摩尔PP约30摩尔钙的钙离子含量)的口腔护理制剂可以由包括以下步骤的方法制得:

[0102] (i) 获得包括PP-ACP和/或PP-ACFP复合物的粉末;

[0103] (ii) 与有效量的钙磷酸盐和提供单氟磷酸钙的化合物干燥共混;和

[0104] (iii) 将干燥共混的混合物配制到口腔护理制剂中。

[0105] 优选地,用于干燥共混的钙磷酸盐的形式是任何可溶的钙磷酸盐,其包括但不限于, CaHPO_4 、 Ca_2HPO_4 和乳酸钙。

[0106] 如本文所提及的稳定化的ACP或ACFP复合物还可以包括如以墨尔本大学的名义,在2014年12月24日递交的PCT申请PCT/AU2014/050447中描述的亚锡缔合的稳定化的无定形磷酸钙(ACP)和/或无定形磷酸氟化钙(ACFP)复合物。如使用实施例2中的实验方案确定的,亚锡可以被结合到稳定化的无定形磷酸钙(ACP)和/或无定形磷酸氟化钙(ACFP)。在一个实施方式中,亚锡缔合的稳定化的无定形磷酸钙(ACP)和/或无定形磷酸氟化钙(ACFP)复

合物由本文描述的方法制备,该方法包括但不限于实施例1中的描述的方法。

[0107] 酪蛋白磷酸肽可以在水性环境中和在稳定化的无定形磷酸钙 (ACP) 和稳定化的无定形磷酸氟化钙 (ACFP) 的存在下,稳定化亚锡化合物,这些复合物在再矿化釉质亚表面损伤中优于其他形式的氟化物和稳定化的ACP或ACFP。在由稳定化的ACP和/或稳定化的ACFP矿化过程期间,牙表面的矿化可以通过提供亚锡化合物而显著提高。尤其是,已经发现,与未缔合亚锡的稳定化的ACP和氟化物相比,借助稳定化的可溶形式的亚锡缔合的ACP复合物和亚锡缔合的ACFP复合物的釉质的矿化被提高。换言之,亚锡离子与CPP-ACP和/或CPP-ACFP复合物复合,并且这些Sn缔合的CPP-AC(F)P复合物随后体现出优越的性质。用于施用的加入这些复合物的各种组合物都是有用的。在使用氟化亚锡盐的情况下,在具有亚锡缔合的ACP/ACFP复合物的组合物中,可获得额外的氟离子。额外的氟离子还可以通过在组合物中包括NaF来提供。

[0108] 亚锡缔合的稳定化的ACP或ACFP可以具有每摩尔磷酸肽至少1摩尔亚锡的亚锡离子含量。优选地,亚锡缔合的稳定化的ACP或ACFP具有每摩尔磷酸肽至少2、3、4、5、6、7、8、9或10摩尔亚锡的亚锡离子含量。甚至更加优选地,亚锡离子含量是在每摩尔磷酸肽1至100、1至50、1至20或1至10摩尔亚锡的范围内。

[0109] 亚锡缔合的稳定化的ACP或ACFP可以由以下方式制备。酪蛋白磷酸肽-无定形磷酸钙 (CPP-ACP) 是从吉百利企业私人有限公司 (Cadbury Enterprises Pte Ltd) 以商品名 Recaldent™ 获得的。用CPP-ACP、SnF₂和NaF制备溶液以产生0.4%w/v CPP-ACP、220ppm为SnF₂形式的F和70ppm为NaF形式的F, pH 5.6。具体而言,亚锡缔合的稳定化的ACP复合物可以通过以下方式制备:将CPP-ACP添加至蒸馏/去离子水,并且然后添加SnF₂ (固体) 和NaF,同时添加1M HCl以将pH保持在4.0-6.5。可不允许pH高于6.5。添加的酸的总体积少于亚锡缔合的稳定化的ACP溶液体积的1%。尽管在该方法中可以添加NaF,其是次要组分,而大多数氟离子 (fluoride) 源自SnF₂。该方法可以仅使用SnF₂ (而无NaF) 来进行。

[0110] 本发明还提供包括以下步骤的矿化牙表面或亚表面的方法:

[0111] (i) 使牙表面与蛋白质干扰剂接触,和

[0112] (ii) 使牙表面与本发明的组合物接触。牙表面优选地是牙釉质。在一个实施方式中,牙表面是釉质中的损伤,诸如由龋齿、牙侵蚀症或氟中毒引起的损伤。任何合适的蛋白质干扰剂可以用于本发明的方法。需要该试剂来减少形成于将被治疗的表面之上的蛋白质屏障,诸如牙齿之上的菌膜。合适的试剂的实例包括漂白剂、清洁剂、促溶剂 (chaotropic agents) (诸如尿素)、高磷酸盐浓度、蛋白酶混合物 (cocktail) (例如,肽链内切酶、蛋白酶和外肽酶) 以及任何其他蛋白质增溶、干扰或水解试剂。合适的漂白剂的实例包括次氯酸钠 (NaOCl) 和过氧化脲 (cabamide peroxide) 漂白剂。在优选的实施方式中,漂白剂是碱性漂白剂。在更优选的实施方式中,碱性漂白剂是NaOCl。蛋白质干扰剂起作用来从牙表面溶解蛋白质和部分或全部地去除蛋白质,尤其是菌膜的蛋白质。

[0113] 如本文描述的组合物还可以包括游离氟离子。游离氟离子可以来自任何合适的源。游离氟离子源可以包括游离氟离子或氟化物盐。氟离子源的实例包括但不限于以下物质:氟化钠、氟化亚锡、氟硅酸钠和氟化胺。这些可以在溶液 (典型地是水溶液) 或悬浮液中提供。

[0114] 游离氟离子优选地以大于1ppm的量存在于组合物中。更优选地,该量是多于3ppm。

在另一个实施方式中,其优选地是多于10ppm。在下文描述的典型实施方式中,该量可以是几百或几千ppm。游离氟化物含量在口腔组合物中,以本领域通常使用的方式典型地以ppm量度。在氟化物由稳定化的ACP的源提供的情况下,ppm指的是在该源(典型地是生物可利用的氟化物的溶液或悬浮液)中氟化物的浓度。

[0115] 牙表面的矿化可以通过在矿化过程中升高损伤的pH来显著提高。特别地,已经发现,通过升高内部损伤pH(如果内部损伤是酸性的)或者保持内部损伤的pH(如果内部损伤是中性或碱性的)的化合物,借助稳定化的可溶形式的ACP(CPP-ACP)和ACFP(CPP-ACFP)的釉质的矿化被提高。举例来说,在龋齿的发展期间,内部损伤液的pH可以是6或更低。

[0116] 能够升高或保持溶液pH的化合物可以与牙表面接触约1至60分钟,或约1至30分钟的一段时间。在一个实施方式中,能够升高或保持溶液pH的化合物与牙表面接触约20分钟。如何实现该接触的实例是将该化合物配制到口腔组合物(诸如膏剂)中,并且然后使组合物接触牙表面或将组合物施加到牙表面。口腔组合物(诸如膏剂)具有足够的黏性以在牙齿上保持所需时间阶段。

[0117] 优选地,稳定化的ACP和/或ACFP与牙表面接触约1分钟至2小时,或5分钟至60分钟或约10分钟的一段时间。在1天至数月的一段时期内,稳定化的ACP和/或ACFP可以被重复地施加至牙表面。

[0118] 在一个实施方式中,在使牙表面与稳定化的ACP和/或ACFP接触之前,使能够升高或保持溶液pH的化合物与牙表面接触1至60分钟,或1至30分钟,或1至5分钟。

[0119] 在一个实施方式中,在使牙表面与稳定化的ACP和/或ACFP接触之后,使能够升高或保持溶液pH的化合物与牙表面接触1至60分钟,或1至30分钟,或1至5分钟。

[0120] 在本发明的另外的方面,提供了矿化牙齿表面的方法,其包括将ACP和/或ACFP复合物、提供单氟磷酸根的化合物和能够升高或保持溶液pH的化合物施加至牙齿表面。优选地,牙齿表面是牙齿釉质。典型地,牙齿表面是包含选自自由白斑损伤;氟斑损伤;龋性损伤;或由牙齿侵蚀引起的损伤中一种或多种组成的组的损伤的牙齿釉质或牙本质。

[0121] 在一个实施方式中,牙表面需要这样的治疗。因此,在另一方面,除了本文所描述的任何方法的步骤之外,本发明还包括识别患有氟中毒、龋齿、牙本质过敏症或牙结石、白斑损伤;氟斑损伤;龋性损伤;或由牙齿侵蚀引起的损伤的受试者的步骤。

[0122] 本发明提供一种用于矿化牙表面或亚表面的组合物,其包括:

[0123] (a) 能够升高或保持溶液pH的化合物;

[0124] (b) 稳定化的ACP和/或ACFP; 和

[0125] (c) 提供单氟磷酸根的化合物。

[0126] 能够升高或保持溶液pH的化合物包括可以接受氢阳离子(质子)或者,更普遍地,提供一对价电子的化合物。优选地,该化合物通常可以是碱。该化合物能够升高具有酸性pH(即,低于pH 7)的溶液的pH。优选地,该化合物能够将牙齿损伤的内部损伤液的pH从6上升至7.5。在一个实施方式中,能够升高或保持溶液pH的化合物是具有释放氢氧根离子的能力的碱。

[0127] 能够升高或保持溶液pH的化合物还包括当中性或碱性溶液暴露于酸时,可以作为缓冲剂保持中性或碱性(即,pH大于或等于7)的溶液的pH的化合物。典型地,该化合物能够将溶液pH保持在7至9之间,优选地约7.5。

[0128] 被描述为碱的任何药学上可接受的化合物均适合用于本发明。典型地,该碱适于口腔使用。优选地,化合物充当碱,即,在酸的存在下,仅释放氢氧根离子或提供电子。碱可以是游离碱形式,或是药学上可接受的盐形式。适合用于本发明的碱的非限制性实例包括氢氧化物、氯化物、硼酸盐、磷酸盐(包括磷酸氢盐和磷酸二氢盐)、柠檬酸盐、碳酸盐、碳酸氢盐、次氯酸盐、胺及包括碱金属盐形式的其任何盐形式。更具体地,合适的药学上可接受的碱的非限制性实例包括氢氧化铵、氢氧化钠、氢氧化钾、氢氧化锂、氢氧化钙、氢氧化镁、氢氧化亚铁、氢氧化锌、氢氧化铜、氢氧化铝、氢氧化铁、异丙基胺、三甲基胺、二乙基胺、三乙基胺、三丙基胺、乙醇胺、2-二甲基氨基乙醇、2-二乙基氨基乙醇、赖氨酸、精氨酸、组氨酸。如本文所描述的能够充当碱的次氟酸盐作为用于升高或保持pH的试剂在本发明中也是有用的。合适的次氟酸盐将会原位反应产生氟离子和氢氧根(或其他碱)离子。本领域技术人员将领会,氟离子可以在磷灰石的晶体结构中代替氢氧根以形成氟磷灰石。

[0129] 在如本文所描述的任意方面或实施方式中,稳定化的ACP和/或ACFP是磷酸肽(PP)稳定化的。优选地,磷酸肽(如下文所定义的)是酪蛋白磷酸肽。优选地,ACP或ACFP是酪蛋白磷酸肽稳定化的ACP或ACFP复合物形式的。

[0130] 本发明说明书的上下文中的“磷酸肽”意指一种其中至少一个氨基酸被磷酸化的氨基酸序列。优选地,磷酸肽包括一个或多个氨基酸序列-A-B-C-,其中A是磷酸氨基残基,B是包括磷酸氨基残基的任意氨基酰基残基,且C选自谷氨酰基、天冬氨酰基或磷酸氨基残基。任何磷酸氨基残基可以独立地是磷酸丝氨酰基残基。B符合期望地是侧链既相对不大又不疏水的残基。其可以是Gly、Ala、Val、Met、Leu、Ile、Ser、Thr、Cys、Asp、Glu、Asn、Gln或Lys。优选地,序列中的磷酸氨基酸中至少两个优选地是连续的(邻接的,contiguous)。优选地,磷酸肽包括序列A-B-C-D-E,其中A、B、C、D和E独立地是磷酸丝氨酸、磷酸苏氨酸、磷酸酪氨酸、磷酸组氨酸、谷氨酸或天冬氨酸,A、B、C、D和E中至少两者,优选三者是磷酸氨基酸。在优选的实施方式中,磷酸氨基酸残基是磷酸丝氨酸,最优选为三个连续的磷酸丝氨酸残基。同样优选的是,D和E独立地是谷氨酸或天冬氨酸。

[0131] 在一个实施方式中,ACP或ACFP是由酪蛋白磷酸肽(CPP)稳定化的,该酪蛋白磷酸肽是完整的酪蛋白或酪蛋白的片段形式的,并且形成的复合物优选地具有式 $[\text{CPP}(\text{ACP})_8]_n$ 或 $[(\text{CPP})(\text{ACFP})_8]_n$,其中n等于或大于1,例如6。形成的复合物可以是胶体复合物,其中核心颗粒聚集以形成悬浮于水中的大的(例如100nm)胶体颗粒。因此,PP可以是酪蛋白或磷酸肽。

[0132] PP可以来自任何来源;其可以存在于较大多肽(包括全长酪蛋白多肽)的情况下,或者,其可以通过对酪蛋白或其他富含磷酸氨基酸的蛋白质(诸如富丝非廷(phosphitin))的胰蛋白酶或其他酶消化或化学消化或通过化学合成或重组合成来分离得到,前提是其包括如上文所述的序列-A-B-C-或A-B-C-D-E。在该核心序列侧翼的序列可以是任何序列。然而,在 α_{s1} (59-79)、 β (1-25)、 α_{s2} (46-70)和 α_{s2} (1-21)中的那些侧翼序列是优选的。通过一个或多个残基的缺失、添加或保守取代可以可选地对侧翼序列进行修饰。侧翼区域的氨基酸组成和序列不是重要的。

[0133] 磷酸肽可以选自W02006/056013、W02006/135982或US专利5,015,628号中描述的任何磷酸肽。

[0134] 保守取代的实例示于以下表1中。

[0135] 表1

[0136]

原始残基	示例性保守取代	优选的保守取代
Ala	Val, Leu, Ile	Val
Asn	Gln Lys His Phe	Gln
Gln	Asn	Asn
Gly	Pro	Pro

[0137]

原始残基	示例性保守取代	优选的保守取代
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

[0138] 侧翼序列也可以包括非天然存在的氨基酸残基。通常遇到的不由遗传密码编码的氨基酸包括：

[0139] 取代Glu和Asp的2-氨基己二酸 (Aad) ；

[0140] 取代Glu和Asp的2-氨基庚二酸 (Apm) ；

- [0141] 取代Met、Leu和其他脂肪族氨基酸的2-氨基丁酸(Abu)；
- [0142] 取代Met、Leu和其他脂肪族氨基酸的2-氨基庚酸(Ahe)；
- [0143] 取代Gly的2-氨基异丁酸(Aib)；
- [0144] 取代Val和Leu和Ile的环己基丙氨酸(Cha)；
- [0145] 取代Arg和Lys的高精氨酸(Har)；
- [0146] 取代Lys、Arg和His的2,3-二氨基丙酸(Dpr)；
- [0147] 取代Gly、Pro和Ala的N-乙基甘氨酸(EtGly)；
- [0148] 取代Asn和Gln的N-乙基天冬酰胺(N-ethylasparagine)(EtAsn)；
- [0149] 取代Lys的羟基赖氨酸(Hy1)；
- [0150] 取代Lys的别羟基赖氨酸(AHy1)；
- [0151] 取代Pro、Ser和Thr的3-(和4-)羟基脯氨酸(3Hyp,4Hyp)；
- [0152] 取代Ile、Leu和Val的别异亮氨酸(AlIle)；
- [0153] 取代Ala的p-脒基苯丙氨酸；
- [0154] 取代Gly、Pro、Ala的N-甲基甘氨酸(MeGly,肌氨酸)。
- [0155] 取代Ile的N-甲基异亮氨酸(MeIle)；
- [0156] 取代Met和其他脂肪族氨基酸的正缬氨酸(Nva)；
- [0157] 取代Met和其他脂肪族氨基酸的正亮氨酸(Nle)；
- [0158] 取代Lys、Arg和His的鸟氨酸(Orn)；
- [0159] 取代Thr、Asn和Gln的瓜氨酸(Cit)和蛋氨酸亚砷(MSO)；
- [0160] 取代Phe的N-甲基苯基丙氨酸(MePhe)、三甲基苯基丙氨酸、卤代(F、Cl、Br和I)苯基丙氨酸、三氟苯基丙氨酸。
- [0161] 在一个实施方式中,PP是选自由 α_{s1} (59-79)、 β (1-25)、 α_{s2} (46-70)和 α_{s2} (1-21)组成的组的一种或多种磷酸肽。
- [0162] 在本发明的另一个实施方式中,稳定化的ACFP或ACP复合物和提供单氟磷酸根的化合物被加入口腔组合物(诸如牙膏、漱口剂或用于口腔的制剂)以帮助预防和/或治疗龋齿、蛀牙、牙侵蚀症或氟中毒。ACFP或ACP复合物可以组成组合物重量的0.01-50%,优选地1.0-50%。对于口腔组合物,优选的是,施用的CPP-ACP和/或CPP-ACFP的量是组合物重量的0.01-50%,优选地是组合物重量的1.0%-50%。在特别优选的实施方式中,本发明的口腔组合物含有约2%CPP-ACP、CPP-ACFP或两者的混合物。含有上述药剂的本发明的口腔组合物可以以适用于口腔的各种形式(诸如包括牙膏、牙粉和液体洁齿剂的洁齿剂、漱口剂、口腔清洗剂、口腔喷雾剂、涂剂(varnish)、牙科粘固剂(dental cement)、含片(troches)、口香糖、牙科糊剂(dental paste)、牙龈按摩霜(gingival message cream)、含漱片剂(gargle tablet)、乳制品和其他食品)来制备或使用。取决于具体口腔组合物的类型和形式,按照本发明的口腔组合物还可以包括另外的公知成分。
- [0163] 在本发明的某些优选的形式中,口腔组合物在特征上可以基本上是液体,诸如漱口剂、清洗剂或喷雾剂。在这样的制品中,媒介物(vehicle,载体)典型地是符合期望地包括如下文所描述的湿润剂的水-醇混合物。一般来说,水与醇的重量比是在约1:1至约20:1的范围内。按制品的重量计,该类型制品中的水-醇混合物的总量典型地在约70%至约99.9%范围内。醇典型地是乙醇或异丙醇。乙醇是优选的。

[0164] 在本发明的另外的符合期望的形式中,组合物在特征上可以基本上是固体或糊(pasty),诸如牙粉、牙用片剂或牙膏(牙用霜剂)或凝胶洁齿剂。这样的固体或糊的口腔制品的媒介物一般含有牙可接受的磨光材料(抛光材料, polishing material)。磨光材料的实例是水不溶性偏磷酸钠、偏磷酸钾、磷酸三钙、二水合磷酸钙、无水磷酸二钙、焦磷酸钙、正磷酸镁、磷酸三镁、碳酸钙、水合氧化铝、煅烧氧化铝、硅酸铝、硅酸锆、二氧化硅、膨润土及其混合物。其他合适的磨光材料包括颗粒状热固树脂(诸如三聚氰胺甲醛树脂、酚醛树脂(phenolic formaldehydes)和尿素甲醛树脂),以及交联的聚环氧化物和聚酯。优选的磨光材料包括具有直至约5微米的粒径、直至约1.1微米的平均粒径和直至约50,000cm²/g的面积的结晶二氧化硅、硅胶(silica gel)或胶态硅石(colloidal silica),以及复合无定形碱金属铝硅酸盐。

[0165] 当采用了外观上清澈的凝胶时,胶态硅石磨光剂(诸如在商标SYLOID下以Syloid 72和Syloid 74,或者在商标SANTOCEL下以Santocel 100出售的那些)碱金属硅铝酸盐复合物特别有用,因为其折射指数接近于通常用于洁齿剂的胶凝剂-液体(包括水和/或湿润剂)体系的折射指数。

[0166] 许多所谓“水不溶性”磨光材料在特征上是阴离子的,并且还包括小量的可溶材料。因此,不溶性偏磷酸钠可以以任意合适的方式形成,例如,如由索普应用化学辞典(Thorpe's Dictionary of Applied Chemistry),第9卷,第4版,第510-511页所说明的。被称为麦德尔氏盐(Madrell's salt)和库罗尔氏盐(Kurrol's salt)的不溶性偏磷酸钠的形式是合适的材料的另外的实例。这些偏磷酸盐在水中仅显示微弱的溶解性,并因而通常被称为不溶性偏磷酸盐(IMP)。其中有极小量的可溶磷酸盐材料作为杂质存在,通常是百分之几,如,至多4重量%。被认为在不溶性偏磷酸盐的情况下包括可溶三偏磷酸钠的可溶磷酸盐材料的量可以通过水洗来减少或消除(如果需要)。不溶性碱金属偏磷酸盐典型地以具有一粒径的粉末形式采用,所述粒径使不多于1%的材料大于37微米。

[0167] 磨光材料通常以约10%至约99%的重量浓度存在于固体或糊组合物中。优选地,在牙膏中其以约10%至约75%的量存在,并且在牙粉中以约70%至约99%的量存在。在牙膏中,当磨光材料在本质上为硅质的时,其通常以按重量计约10-30%的量存在。其他磨光材料典型地以按重量计约30-75%的量存在。

[0168] 在牙膏中,液体媒介物可以典型地以制品的约10重量%至约80重量%的量包括水和湿润剂。甘油、丙二醇、山梨糖醇和聚丙二醇例示了合适的湿润剂/载体。水、甘油和山梨糖醇的液体混合物也是有益的。在清澈的凝胶中(其中折射率是重要的考虑因素),优选地采用约2.5-30%w/w的水、0至约70%w/w的甘油和约20-80%w/w的山梨糖醇。

[0169] 牙膏、霜剂和凝胶典型地以约0.1至约10%w/w,优选地约0.5至约5%w/w的比例含有天然或合成的增稠剂或胶凝剂。合适的增稠剂是合成的锂蒙脱石(水辉石,hectorite),一种合成的胶态镁碱金属硅酸盐复合物黏土(colloidal magnesium alkali metal silicate complex clay),例如可以作为拉波特工业有限公司(Laporte Industries Limited)销售的Laponite(例如,CP,SP 2002,D)购得。按重量计,Laporte D是大约58.00%SiO₂、25.40%MgO、3.05%Na₂O、0.98%Li₂O,以及一些水和痕量金属。其绝对比重是2.53并且其在8%的湿度下具有1.0g/ml的表观体积密度(apparent bulk density)。

[0170] 其他合适的增稠剂包括爱尔兰苔藓(Irish moss)、阿尔塔卡拉胶(iota

carrageenan)、黄芪胶、淀粉、聚乙烯吡咯烷酮、羟乙基丙烯纤维素、羟丁基甲基纤维素、羟丙基甲基纤维素、羟乙基纤维素(例如,作为Natrosol可获得的)、羧甲基纤维素钠和胶态硅石(诸如,细磨Syloid(例如,244))。还可以包括增溶剂(如湿润剂多元醇(诸如丙二醇、二丙二醇和己二醇))、溶纤剂(诸如甲基溶纤剂和乙基溶纤剂)、植物油和直链中含有至少约12个碳的蜡(诸如橄榄油、蓖麻油和矿脂),以及酯(诸如醋酸戊酯、乙酸乙酯和苯甲酸苄酯)。

[0171] 将被理解的是,按常规,口腔制品通常将在合适的带标签的包装中贩售或以其他方式分配。因此,口腔清洗剂的罐子将具有描述其实质上作为口腔清洗剂或漱口剂并具有对于其用途的说明的标签;并且牙膏、霜剂或凝胶通常会在可折皱管中(典型地是铝质的、衬铅的(lined lead)或塑料的),或者在用于量出内含物的其他挤压、泵压或按压分配器中,其具有描述其实质上作为牙膏、凝胶或牙用霜剂的标签。

[0172] 有机表面活性剂可以用于本发明的组合物中以实现提高的预防功能、帮助实现活性试剂在整个口腔中彻底且完全的分散,并且致使即用(instant)组合物从外观上更加可接受。有机表面活性材料本质上优选地是阴离子的、非离子的或两性的,并且优选地不与活性试剂相互作用。优选的是,采用赋予组合物去污和发泡性质的去污材料作为表面活性剂。阴离子表面活性剂的合适的实例是高级脂肪酸单甘油单硫酸酯的水溶性盐(诸如,氢化椰子油脂肪酸的单硫酸单甘油酯的钠盐)、高级烷基硫酸盐(诸如月桂醇硫酸钠)、烷基芳基磺酸盐(诸如十二烷基苯磺酸钠)、高级烷基磺酸-醋酸盐、1,2-二羟基丙烷磺酸的高级脂肪酸酯,以及低级脂族氨基酸化合物的基本饱和的高级脂族酰胺(诸如在脂肪酸、烷基或酰基自由基中具有12至16个碳的那些)等等。最后提到的酰胺的实例是N-月桂酰肌氨酸,以及N-月桂酰肌氨酸、N-豆蔻酰肌氨酸或N-棕榈酰肌氨酸的钠盐、钾盐和乙醇胺盐,它们基本上应当不含皂或类似的高级脂肪酸材料。在本发明的口腔组合物中使用这些肌氨酸类(sarconite)化合物是特别有益的,因为除了牙齿釉质在酸溶液中的溶解度有所降低之外,这些材料在抑制口腔中由于碳水化合物分解导致的酸形成中显示了持久显著的作用。适合使用的水溶性非离子表面活性剂的实例是环氧乙烷和与之反应的各种具有长疏水链(例如,具有约12至20个碳原子的脂肪链)的含氢反应性化合物的缩合产物,该缩合产物(“乙氧氧化物(ethoxamers)”)含有亲水聚氧乙烯部分,诸如聚(氧化乙烯)与脂肪酸、脂肪醇、脂肪酰胺、多羟基醇(例如,山梨醇酐单硬脂酸酯)和聚环氧丙烷(例如,普朗尼克(Pluronic)材料)的缩合产物。

[0173] 表面活性剂典型地以约0.1-5重量%的量存在。值得注意的是,表面活性剂可以帮助本发明的活性试剂溶解,并且因而减少所需的增溶湿润剂的量。

[0174] 各种其他材料可以加入本发明的口腔制品中,诸如增白剂、防腐剂、硅酮、叶绿素化合物和/或氮化材料(诸如尿素、磷酸联胺),以及其混合物。这些佐剂(在其存在的情况下)以基本上不会不利影响所期望的性质和特性的量加入制品中。

[0175] 也可以采用任何合适的调味或甜味材料。合适的调味组分的实例是调味油,例如留兰香薄荷、椒样薄荷、冬青、黄樟、丁香、鼠尾草、桉树、马郁兰、肉桂、柠檬和橙(橘)的油,以及水杨酸甲酯。合适的甜味剂包括蔗糖、乳糖、麦芽糖、山梨糖醇、木糖醇、环氨酸钠、紫苏萆(perillartine)、AMP(天门冬氨酸苯丙氨酸,甲酯)、糖精等等。适当地,调味料和甜味剂可以各自或一起组成制剂的约0.1%至5%以上。

[0176] 本发明的组合物还可以被加入锭剂,或者例如通过搅拌进温热的胶基或涂覆胶基

的外表面而加入口香糖或其他产品中(示例性的胶基是节路顿胶、橡胶乳液、乙烯基树脂等),符合期望的是伴以常规增塑剂或软化剂、糖或其他甜味剂或诸如葡萄糖、山梨糖醇等等。本发明的组合物可以是双相组合物,其中每一相允许组分在不同时间段释放。举例来说,在使用中,双相组合物可以从第一相以比从第二相释放提供单氟磷酸根的化合物更快的速率释放稳定化的ACP和/或ACFP,优选地CPP-ACP和/或CPP-ACFP。优选地,双相组合物是双相口香糖。

[0177] 在另外的方面,本发明提供一种包括药学组合物(包括如上文所述的任何ACFP和/或ACP复合物)、连同提供单氟磷酸根的化合物和药学上可接受的载体的组合物。这样的组合物可以选自由牙用、防龋组合物和治疗组合物组成的组。牙用组合物或治疗组合物可以是凝胶、液体、固体、粉末、霜剂或锭剂形式的。治疗组合物也可以是片剂或胶囊形式的。在一个实施方式中,ACP和/或ACFP复合物和提供单氟磷酸钙的化合物基本上是这样的组合物的仅有的再矿化活性组分。举例来说,可以采用乳霜(*crème*)制剂,其含有:水;甘油;CPP-ACP;单氟磷酸钙;D-山梨糖醇;二氧化硅;羧甲基纤维素钠(CMC-Na);丙二醇;二氧化钛;木糖醇;磷酸;瓜尔豆胶;氧化锌;糖精钠;对羟苯甲酸乙酯;氧化镁;对羟苯甲酸丁酯和对羟苯甲酸丙酯。

[0178] 本发明还包括连同关于用于其治疗或预防龋齿或蛀牙、牙侵蚀症、过敏症和氟中毒中的任意一种或多种的使用的说明书一起提供的上文所述的制剂。

[0179] 在一个实施方式中,组合物的活性组分主要由提供单氟磷酸钙的化合物和稳定化的ACP和/或ACFP组成。不受任何理论或作用模式的束缚,人们认为,稳定化的ACP和/或ACFP和提供单氟磷酸钙的化合物对于本发明的上述实施方式的治疗或预防作用是极其重要的,并因此,主要由那些组分(根据需要具有载体、赋形剂等等)组成的实施方式被包括在本发明的范围内。

[0180] 本发明还涉及用于治疗或预防龋齿、氟中毒和牙侵蚀症中的一种或多种的试剂盒,其包括(a)提供单氟磷酸钙的化合物和(b)在药学上可接受的载体中的CPP-ACP或CPP-ACFP复合物。符合期望地,试剂盒还包括关于其针对需要该种治疗的患者的牙表面的矿化的使用的说明书。说明书可以描述试剂盒治疗或预防龋齿、蛀牙、牙侵蚀症和氟中毒中的每个的一种或多种的用途。在一个实施方式中,试剂和复合物以对于治疗患者合适的量存在。

[0181] 在另外的方面,提供了治疗或预防龋齿、蛀牙、牙侵蚀症和氟中毒中的每个中的一种或多种的方法,其包括向受试者牙齿施用提供单氟磷酸钙的化合物,随后施用ACP或ACFP复合物或组合物的步骤。复合物的局部施用是优选的。方法优选地包括在上文所述的制剂中的复合物的施用。

[0182] 在另外的方面,提供了提供单氟磷酸钙的化合物和稳定化的无定形磷酸钙(ACP)或无定形磷酸氟化钙(ACFP)在制造用于治疗 and/或预防龋齿、蛀牙、牙侵蚀症和氟中毒中一种或多种的组合物中的用途。

[0183] 在另外的方面,提供了用于矿化牙表面或亚表面的组合物,其包括作为活性试剂的提供单氟磷酸钙的化合物和稳定化的无定形磷酸钙(ACP)或无定形磷酸氟化钙(ACFP)。典型地,矿化牙表面或亚表面是为了治疗和/或预防龋齿、蛀牙、过敏症、牙侵蚀症和氟中毒中的一种或多种。

[0184] 按照本发明的另外的方面,提供了用于牙齿修复的组合物,其包括已被加入本发

明的组合物的牙齿修复材料。牙齿修复材料的基料可以是玻璃离子粘固剂、复合材料或任何其他相容的修复材料。优选的是,包括在牙齿修复材料中的稳定化的ACP或ACFP(优选地CPP-ACP复合物或CPP-ACFP复合物)的量是0.01-80重量%,优选地是0.5-10重量%,并且更优选地是1-5重量%。含有上述试剂的本发明的牙齿修复材料可以以适用于牙科实践的各种形式来制备和使用。取决于特定牙齿修复材料的类型和形式,按照该实施方式的牙齿修复材料还可以包括其他离子,例如抗菌离子 Zn^{2+} 、 Ag^{+} 等,或者其他附加的组分。优选的是,按照该实施方式的牙齿修复材料的pH是2-10,更优选地是5-9,且更加优选地是5-7。优选的是,含有CPP-ACP复合物或ACFP复合物的牙齿修复材料的pH是在约2至10范围内,更优选地在约5至9范围内,并且更加优选地在约5至7范围内。

[0185] 按照本发明的另外的方面,提供了包括提供单氟磷酸根的化合物和矿化剂的涂剂(varnish)。优选地,矿化剂是如本文所描述的任何稳定化的ACP和/或ACFP复合物和提供单氟磷酸钙的化合物。

[0186] 将被清楚地理解的是,尽管本说明书具体涉及人类中的应用,本发明针对兽医目的也是有用的。因此,在所有方面中,本发明对于家畜(诸如牛、羊、马和家禽);对于陪伴动物(诸如猫和狗);以及对于动物园动物都是有用的。

[0187] 现在将参考下列非限制性实例进一步描述本发明。

[0188] 矿化组合物或矿化剂的一个实例包括以下物质(以占比降序排列):

[0189] 水

[0190] 甘油

[0191] CPP-ACP

[0192] D-山梨糖醇

[0193] 二氧化硅

[0194] 羧甲基纤维素钠(CMC-Na)

[0195] 丙二醇

[0196] 二氧化钛

[0197] 木糖醇

[0198] 磷酸

[0199] 瓜尔豆胶

[0200] 氧化锌

[0201] 糖精钠

[0202] 对羟苯甲酸乙酯

[0203] 氧化镁

[0204] 对羟苯甲酸丁酯

[0205] 对羟苯甲酸丙酯

[0206] 这样的组合物从GC公司以名称Tooth Mousse™可获得。该组合物适于在加入提供单氟磷酸钙的化合物之后使用,并且该组合物是膏或乳霜形式的以便于其在牙齿上持续合适时间段的保留。可替代地,该矿化组合物可以含有提供单氟磷酸钙的化合物。

[0207] 实施例1

[0208] CPP-ACFP和CPP-ACP溶液的制备

[0209] 将3.25M CaCl_2 、1.25M Na_2HPO_4 、1M NaOH 和1M NaF 的储备溶液以大约三十等分部分 (aliquot) 加至10-15%w/v酪蛋白的胰蛋白酶消化物中,直至达到最终浓度——大约78mM Ca^{2+} 、48mM磷酸盐和12mM氟化物浓度。缓慢加入溶液(即,每分钟加入少于大约1%体积)。首先加入一等分部分的磷酸盐溶液,然后是一等分部分的钙溶液。使用 NaOH 并彻底搅拌,将pH维持在约pH 9.0和5.5之间。氢氧化钠溶液由pH值稳定器(pH stat)自动加入,其中氢氧根离子的加入通常是在每次加入钙离子之后。在加入钙离子、磷酸根离子、氢氧根离子和氟离子之后,溶液通过0.1微米过滤器过滤而浓缩1-2倍。如果需要,滤余物可以用水洗涤以去除盐和非活性(且有苦味)肽。CPP-ACP溶液可以依上述制备而不添加氟化物。

[0210] 实施例2

[0211] 确定松散和紧密结合的钙和磷酸根

[0212] 在实施例1中的针对每一pH的滴定和过滤结束时,取每种滤余物的样品并且用3000分子量截留(3000molecular weight cut-off)Centriprep 3超滤膜收集少于10%的样品作为滤液。包含样品的Centriprep在使用JA 10.5转子的Beckman J2-21离心机中在1,000g下离心15min。取Centriprep离心之前的原始样品和Centriprep离心之后的滤液样品用于钙、磷酸根和氟离子浓度的分析。对原始样品的分析给出总钙离子、磷酸根离子和氟离子浓度,而对滤液的分析给出松散结合的钙、磷酸根和氟离子浓度。总浓度和松散结合的浓度之间的差是由CPP紧密结合的Ca、Pi和F的浓度。

[0213] 实施例3

[0214] CPP-ACFP溶液和CPP-ACP溶液的制备

[0215] 从澳大利亚维多利亚州的叶卡顿私人有限公司(Recaldent Pty Ltd)购买Recaldent™(CPP-ACP)。按重量计,产品(#841117)含有14.3%钙、22.3%磷酸根和47%酪蛋白磷酸肽。使产品以0.5%溶解,并通过添加HCl调节至pH 5.5。然后,通过滴定3.25M CaCl_2 和2M NaH_2PO_4 来添加钙和磷酸根离子,同时用添加2.5M NaOH 将pH保持在5.5。钙和磷酸根离子的滴定一直持续到溶液变得半透明。记录加入的钙和磷酸根的浓度。还可以通过滴定钙和磷酸根离子将溶液形成0.5%CPP-ACP溶液,并通过加入另外的磷酸钙让pH降至5.5。

[0216] 表2. 标准CPP-ACP和超负载CPP-ACP的钙和磷酸根水平

[0217]

	钙		磷酸根	
	mmol/L	mol/mol CPP	mmol/L	mol/mol CPP
标准的 0.5% w/v CPP-ACP	17.8	22.8	11.6	14.8
超负载的 0.5 w/v CPP-ACP (sCPP-ACP)	37.8	48.3	23.6	30.2

[0218] 这些结果证明,CPP-ACP可以用钙离子和磷酸根离子超负载以在亚稳溶液中产生热力学稳定的复合物。

[0219] 实施例4

[0220] CPP-ACP和磷酸钙的制剂的制备

[0221] 在另一个实施例中,将Recaldent™(CPP-ACP)粉末与CaHPO₄粉末以按重量计CPP-ACP:CaHPO₄等于1:10的比例干燥共混。该粉末然后以1-5%w/w被加入无糖口香糖制剂和牙膏制剂。

[0222] 实施例5

[0223] 该实施例和以下那些实施例描述示例性制剂,其包括提供单氟磷酸钙的化合物——这可以是单氟磷酸钙本身或暴露于水溶液时产生单氟磷酸钙的化合物或组合物。

[0224] 可以按照本发明制造具有以下组分的局部乳霜:

[0225] 水

[0226] 甘油

[0227] 稳定化的ACP和/或ACFP

[0228] 提供单氟磷酸钙的化合物

[0229] D-山梨糖醇

[0230] 羧甲基纤维素钠(CMC-Na)

[0231] 丙二醇

[0232] 二氧化硅

[0233] 二氧化钛

[0234] 木糖醇

[0235] 磷酸

[0236] 氟化钠

[0237] 调味料

[0238] 糖精钠

[0239] 对羟苯甲酸乙酯

[0240] 对羟苯甲酸丙酯

[0241] 对羟苯甲酸丁酯

[0242] 实施例6

[0243] 按照本发明制造具有以下组成的口腔清洗剂制剂:

[0244] 水

[0245] 醇

[0246] 泊洛沙姆(Poloxamer) 407

[0247] 月桂基磺酸钠

[0248] 稳定化的ACP和/或ACFP

[0249] 提供单氟磷酸钙的化合物

[0250] 氟化钠

[0251] 调味料

[0252] 糖精钠

[0253] 对羟苯甲酸乙酯

[0254] 对羟苯甲酸丙酯

[0255] 对羟苯甲酸丁酯

[0256] 实施例7

[0257] 按照本发明制造具有以下组成的无糖口香糖制剂:

[0258] 结晶山梨糖醇/甘露糖醇/木糖醇

[0259] 胶基

[0260] 碳酸钙

[0261] 甘油

[0262] 稳定化的ACP和/或ACFP

[0263] 提供单氟磷酸钙的化合物

[0264] 氟化钠

[0265] 调味油

[0266] 水

[0267] 实施例8

[0268] 准备釉质亚表面损伤和制造口腔内矫治器

[0269] 由从墨尔本皇家牙科医院 (Royal Dental Hospital of Melbourne) 获得并在 10% 磷酸盐缓冲的 (pH 7.0) 福尔马林中处理至少两周的拔出的人第三臼齿中选择无裂缝、污渍和氟斑损伤 (如在解剖显微镜下观察到的) 的健康的相对较平坦的颊面和舌面。牙齿用 Milli-Q 水清洗三次并使用低速反角牙科手持机 (slow speed contra-angle dental handpiece) 上的 Soflex (3M) 盘湿磨光至镜面光洁度。然后, 使用水冷金刚石叶片锯 (司特尔 (Struers) 公司, 丹麦), 将每个磨光的表面都从牙齿锯下, 成为尺寸为大约 $8 \times 4\text{mm}$ 的板 (厚片, slab)。然后, 用耐酸指甲油盖覆整个板, 除了如 Shen 等人 (2001) 所描述的两个 (咬合面的和齿龈的) 近远中窗口 (每个窗口尺寸为 $1 \times 7\text{mm}$, 彼此隔开 1mm)。通过将每个板在 40mL 、pH 4.8 的无搅动的脱矿缓冲液 (美国俄亥俄州克利夫兰的路博润先进材料股份有限公司 (Lubrizol Advanced Materials Inc)) (White, 1987)、 500mg/L 羟磷灰石 (Bio-Gel HTP, Bio-Rad 实验室, 加利福尼亚州里士满)、 0.1mol/L 乳酸 (埃贾克斯化学品公司 (Ajax Chemicals), 新南威尔士奥本)。两天之后, 将板从缓冲液移除, 用 Milli-Q 水清洗三次, 擦拭干并在新鲜的脱矿缓冲液中放置另外两天, 然后再次清洗并干燥。脱矿之后, 将每个釉质板通过每个窗口的中线锯成两个 $4 \times 4\text{mm}$ 的半板, 并且切掉每个半板盖覆有指甲油的表面。每对中的一块半板被保留为脱矿对照并与造成湿润环境的一滴 Milli-Q 水一起保存于标签 1.7mL 微型离心管中。该对中的另一块釉质半板被插入如下文所描述的口腔内矫治器中, 其中亚表面釉质损伤被暴露但嵌入矫治器表面以下 1mm 以产生菌斑阱 (trap)。小心照管以保持窗口无蜡。每个双半板对被随机分配为对照或治疗组。每个矫治器中插入四块釉质半板, 双边槽中每侧两个 (Reynolds 等人, 2003)。

[0270] 如先前所描述的 (Iijima 等人, 2004) 为每位受试者制作覆盖从第一前臼齿至齿弓中最后一颗牙齿的颚部分的可移除的颚中 (mid-palatal) 丙烯酸矫治器。矫治器的基部通过四个窄规格不锈钢周向钩扣保持在口中。矫治器被设计为具有切入基部的双边槽 (bilateral trough) (15mm 长, 7mm 宽, 3mm 深) 并且被设计来容纳釉质板。如由 Iijima 等人 (2004) 所描述的, 通过粘蜡 (sticky wax) 保持釉质板, 以便在釉质表面上方产生 1mm 深的槽, 以允许菌斑建立并保持。在下文的临床试验中使用的矫治器示于图 1 中。

[0271] 实施例9

[0272] 含有CPP-ACP和单氟磷酸钙的制剂的制备

[0273] 现在解释下文表3和4以及图2中使用的制品和术语。这些研究中使用的制品是基于含有10%CPP-ACP的pH 7.0的Tooth Mousse(TM) 制剂而制备的。举例来说,如表3中所示, TM 1450MFP,是含10%CPP-ACP、pH 7.0的Tooth Mousse制剂,其被改变以致除了1450ppm F的单氟磷酸钙以外不含有任何其他含氟化物的化合物。换言之,MFP指的是1450ppm F的量的单氟磷酸钙。单氟磷酸钙这样形成:通过在pH 7.0下添加每克76.3 μ mol单氟磷酸二钠以及每克80.0 μ mol氯化钙(CaCl_2),并彻底混合以产生单氟磷酸钙。单氟磷酸根的其他来源(例如本文中所描述的)和钙的其他来源(例如本文所描述的)可以被用于产生单氟磷酸钙。另外,单氟磷酸钙可以在其他pH下形成,例如,4.0至9.0,优选地,5.0至7.0,更加优选地约7.0。此外,参见例如表3中的MFP 1450,其是Tooth Mousse制剂被改变以致其不含有CPP-ACP并且除了单氟磷酸钙之外不含有任何其他含氟化物的化合物。

[0274] 实施例10

[0275] 临床研究是双盲、随机、对照、交叉原位试验,以评估实验试剂再矿化釉质亚表面损伤的能力。

[0276] 从墨尔本大学人类研究伦理委员会获得对研究的批准。该研究在澳大利亚的墨尔本进行。为该研究招募年龄范围在30-50岁的十二个健康的参与者(6名男性和6名女性),并且提供知情同意。研究所需的参与者的最小数量是基于使用相同原位模型和交叉设计的我们的早先的研究(Cai等人,2009;Walker等人,2010)。所有参与者具有至少22颗天然牙齿且无活动性龋齿、牙周疾病或其他口腔病状,并且无人正在使用抗生素或已知影响唾液流速的药物。通过在两分钟的时间段内倾斜头部并允许唾液流入15ml预先称重的管中,从每个参与者收集唾液(未受刺激的)。相对于未受刺激的唾液,通过咀嚼无糖口香糖两分钟来刺激唾液,并在该时间段期间收集。唾液体积由重量称量来确定。

[0277] 产品随机分入编号的治疗。一位研究者生成随机分配顺序、入选参与者并将参与者分配到编号的产品。随机化编号独立于参与者和研究人员保存。在每天治疗前,在编号的塑料管中新鲜制备产品对水的浆液(1g产品加上4ml蒸馏、去离子水,涡旋5min)。具有插入的矫治器的每个参与者用5ml浆液冲洗60秒。这每天在以下时间进行4次,持续10天:10:00am、11:30am、2:00pm和3:30pm。指示参与者在餐饮和进行口腔卫生程序前移除矫治器。当矫治器被移除时,其被保存在室温下的密封的潮湿塑料袋中。指示参与者在每次治疗后的至少一个小时内不得移除其矫治器。当佩戴着矫治器时,参与者被指示除水之外不得吃或喝任何东西。仅用蒸馏水清洁矫治器,并且不没过插入的釉质板。参与者在至少一周的清洗期之后换用每一种治疗。参与者记录产品使用日记。在研究持续期间,参与者的饮食和口腔卫生程序不做改变。在研究期间,除了研究产品之外,给参与者供应1000ppm F(NaF)牙膏(高露洁(Colgate))和牙刷(高露洁)用于其正常口腔卫生程序,但不使用其他氟化物产品。每个治疗周期完成之后,从矫治器移除釉质板,用Milli-Q水清洗并在分析之前保存在湿润环境中。

[0278] 实施例11

[0279] 切片和显微放射照相术

[0280] 再矿化的釉质半板与其脱矿的对照半板以损伤窗口平行(Iijima等人,2004)的方

式一起放入新鲜倒入的透明的冷固化甲基丙烯酸树脂 (Paladur, Heraeus Kulzer, 德国)。在顶部拐角处对树脂小瓶做记号, 以便识别测试块和对照块, 并且树脂被允许在室温下过夜固化。使用内部环锯切片刀 (Leica1600, 德国莱卡) 通过损伤的中线垂直于损伤表面从嵌入的块切割大约200 μm 厚的切片。然后, 使用带有1200和2400砂砾 (grit, 粗砂) 打磨纸的 RotoPol-21/RotoForce4 打磨设备 (司特尔公司, 丹麦) 将切片打磨薄至 $80 \pm 5 \mu\text{m}$ 。使用 Microchrome 高分辨玻璃板 (1A型, Microchrome, 美国) 和20kV、10mA的镍过滤铜K辐射 (nickel filtered copper K radiation), 对含有来自同一釉质板的再矿化损伤和脱矿对照损伤的每片切片连同厚度增量为 $10 \times 14 \mu\text{m}$ 的铝质梯级楔板 (stepwedge) 一起拍摄射线照片6分钟。所使用的射线照相设备先前已由 Malcolm (1972) 描述过。每块玻璃板均在 Microchrome 显影剂D5 (1:4稀释, Microchrome, 美国) 中显影4分钟, 置于冰醋酸停显液中30秒, 然后在 Microchrome 定影液F4 (1:4稀释, Microchrome, 美国) 定影4分钟。

[0281] 显微光密度测定法

[0282] 用 Dialux 20 显微镜 (Ernst Leitz Wetzlar, 德国) 通过透射光观察损伤的射线照相图像。然后用数码相机 (Spot Insight, 诊断工具有限公司 (Diagnostic Instruments, Inc.), 美国密歇根州) 获得图像, 并用图像软件 Optimate 5.2 版进行分析。使用给予0至256之间的灰度值读数的程序的线亮度功能 (line luminance function) 扫描损伤和健康釉质的邻区的图像。选择无人工痕迹或裂缝的区域用于分析。每次扫描包括采集自贯穿损伤至健康釉质的牙齿表面的200个读数。扫描每次滑动时的铝质梯级楔板图像, 并且将平均梯级灰度值读数对铝厚度作图。牙齿切片图像的读数位于梯级楔板曲线的线性部分之内, 并且使用线性回归将灰度值数据转化为等同的铝厚度值。测量切片厚度, 并且使用安格玛 (Angmar) 公式 (1963) 以及铝、有机物质加水 and 磷灰石矿物的线性吸收系数 (分别是131.5、11.3和260.5) 计算vol%矿物数据。两处损伤 (齿龈和咬合面) 之间的正中面健康釉质的图像被扫描六次, 并计算其平均数以给出对照健康釉质密度曲线。正中面健康釉质的齿龈和咬合面侧的损伤图像 (再矿化窗口和脱矿对照窗口) 类似地被扫描六次, 尽可能接近正中面条带但避免通常见于损伤边缘处的任何不平顺。计算多次扫描的值的平均值, 并且用计算机确定体积%矿物曲线。针对每次治疗的每位参与者使用的四个釉质块重复这些测量, 并且然后计算平均值以提供针对该参与者和治疗的单个值。

[0283] 实施例12

[0284] 再矿化数据分析

[0285] 将每个釉质块的脱矿损伤和再矿化的损伤的%矿物曲线与同一切片的正中面健康釉质%矿物曲线相比较。由梯形积分法计算的脱矿的损伤和正中面健康釉质的显像密度曲线下的面积之间的差值用 ΔZ_d 表示。由梯形积分法计算的再矿化的损伤与正中面健康釉质的显像密度曲线下的面积之间的差值用 ΔZ_r 表示。这些参数然后被转换为再矿化之后的%改变值, 照此, %再矿化 (%R) 表示 ΔZ 值的%改变: $\%R = (\Delta Z_d - \Delta Z_r) / \Delta Z_d \times 100$ 。

[0286] 主要结局指标 (primary outcome measure) 是矿物增加百分比 (%R)。这是使用具有针对治疗顺序、治疗周期和治疗类型的因子的重复测量方差分析 (ANOVA) 模型 (Jones 和 Kenward, 2003) 在多种治疗之间比较的。次要结局指标是产品清洗后 (post-product rinse) / 唾液钙、无机磷酸盐和氟化物浓度, 并且是使用具有针对治疗顺序、治疗周期和治疗类型的因子的重复测量 ANOVA 模型在多种治疗产品之间比较的。使用针对多重比较的

Sidak校正,关于边际均值进行治疗差异的事后比较 (SPSS, 2008)。使用剩余概率图和正态概率图检验ANOVA假设。分析单元是参与者。确定结局指标并且按参与者和治疗周期计算结果值的平均值。小于0.05的p值被认为是统计学上显著的。所有分析均使用SPSS (第17版, SPSS Inc, 美国伊利诺州芝加哥市) 或Stata (第10版, Stata Corp LP, 美国德克萨斯州大学城) 统计学软件进行。

[0287] 来自实施例10中描述的临床试验的清洗后样品在1,000g下离心15min。上清液的样品用蒸馏/去离子水稀释,并用0.01N HNO₃酸化,彻底混合并转移到配有0.2μm过滤器 (Minisart, Sartorius, 澳大利亚维多利亚) 的10ml注射器中。结果示于表5。

[0288] 实施例13

[0289] 产品分析

[0290] 通过将1g产品添加到50ml离心管中的19ml的1N HNO₃并混合过夜,来确定产品的总(酸可溶的)钙、磷酸根和氟化物水平。如下文所描述的,该浆液随后酌情用0.01N HNO₃进一步稀释,并在离心和过滤后用离子色谱系统针对离子进行分析。通过将1g产品加入50ml离心管中的19ml去离子水中并混合过夜,来确定水溶性钙、磷酸根和氟化物水平。然后,在室温下将样品在1000g下离心15分钟。将上清液的样品加入到等体积的0.01N HNO₃并且通过0.2μm过滤器过滤。

[0291] 使用原子吸收光谱或使用两个传导探测器 (ICS 3000)、装备有用于阳离子 (IonPac CS12) 和阴离子 (IonPac AS18) 两者分析的两根柱的自动离子色谱系统 (Dionex公司, 美国加利福尼亚州), 针对无机离子 (钙、无机磷酸根和氟离子) 对滤液进行分析。

[0292] 使用七种阴离子混合标准溶液 (combined seven anion standard) 和六种阳离子混合标准溶液 (combined six cation standard) 来校正设备。

[0293] 表3: 实验产品的可溶的和总的钙、无机磷酸根、氟离子含量

[0294]

产品	μmol/g 膏剂		
	Ca	Pi	氟离子
F 1450 (可溶)	nd	nd	69.37 ± 1.32
F 1450 (总)	nd	nd	73.07 ± 1.36

[0295]

MFP 1450 (可溶)	80*	nd	70.08 ± 4.94
MFP 1450 (总)	80*	nd	68.95 ± 0.80
TM 1450 NaF (可溶)	405.63 ± 16.76	180.61 ± 4.86	67.47 ± 1.08
TM 1450 NaF (总)	413.48 ± 14.30	210.18 ± 8.49	72.16 ± 3.04
TM 1450 MFP (可溶)	418.55 ± 20.32	180.81 ± 12.08	68.24 ± 3.87
TM 1450 MFP (总)	483.49 ± 28.20	244.35 ± 2.04	67.60 ± 1.55

[0296] nd, 在检测条件下未检出。

[0297] *近似地。

[0298] 实施例14

[0299] 临床试验结果

[0300] 临床试验的结果呈现在表4、表5和图2中。这些结果显示, 在相同的氟化物浓度 (1450ppm F) 下, 含有单氟磷酸钙 (CaMFP) 的产品 (即, Tooth Mousse (TM)) 在原位釉质亚表面损伤再矿化中显著好于 (重复测量方差分析显著性: $p < 0.05$) 含有氟化钠的那些。

[0301] 对用于每次治疗和用于组合的所有治疗的上部和下部矫治器分别测量对于LDd、LDr、LDd-LDr、 ΔZd 、 $\Delta Zd - \Delta Zr$ 和再矿化百分比 (%R) 的平均和标准误差 $\bar{S}$ 。除了那些标*的, 使用配对t-检验分析两个矫治器 (图1) 的参数之间的差值, 其中使用了带有Bonferroni校正 (Bonferroni correction) 的Wilcoxon符号秩和检验 (Wilcoxon Signed Ranks Sum tests)。对于每个参数, 上部和下部矫治器之间不存在差异 ($p > 0.05$)。

[0302] 表4: 在具有或不具有CPP-ACP的情况下用NaF或CaMFP的原位釉质亚表面损伤的再矿化

[0303]

治疗	测试器	LDd	LDr	LDd-LDr	AZd	AZd-AZr	%R
1450 ppm F 的 NaF	上部	103.55 ± 3.86	101.59 ± 3.71	1.97 ± 1.23	2728.90 ± 204.64	290.73 ± 17.17	10.76 ± 0.26*
	下部	109.10 ± 2.97	103.46 ± 2.41	5.64 ± 1.47	3002.24 ± 130.46	306.33 ± 16.32	10.19 ± 0.22*
1450 ppm F 的 NaF 加上 CPP-ACP (TM NaF)	上部	121.26 ± 1.90	102.21 ± 1.94*	19.05 ± 1.29	3587.25 ± 156.96	1146.46 ± 55.51	31.92 ± 0.38
	下部	120.16 ± 3.14	100.35 ± 1.85*	19.81 ± 1.47	3443.09 ± 138.22	1104.28 ± 48.21	32.04 ± 0.19
1450 ppm F 的 CaMFP	上部	115.05 ± 2.60	111.44 ± 2.39	3.61 ± 1.13	3035.93 ± 151.79	377.06 ± 19.54	12.44 ± 0.30
	下部	114.57 ± 1.99	108.20 ± 1.78	6.37 ± 0.85	3297.01 ± 99.45	420.86 ± 15.28	12.77 ± 0.30
1450 ppm F 的 CaMFP 加上 CPP- ACP (TM CaMFP)	上部	116.64 ± 2.28	98.02 ± 2.21	18.62 ± 1.98	3102.27 ± 100.68	1078.14 ± 27.47	34.83 ± 0.63
	下部	120.08 ± 3.37	100.73 ± 2.46	19.35 ± 2.03	3267.39 ± 163.61	1136.16 ± 59.99	34.75 ± 0.23

[0304] 表5:对于原位测试的膏状产品的清洗后唾液的钙、无机磷酸盐、氟离子和单氟磷酸盐含量。

[0305]

产品	Ca ($\mu\text{mol/ml}$)	Pi ($\mu\text{mol/ml}$)	F ⁻ (ppm)	MFP (ppm)	总(F+MFP) (ppm)
F 1450 (NaF)	2.90 ± 1.52	1.01 ± 0.48	151.11 ± 12.79	nd	151.11 ± 12.79
MFP 1450 (CaMFP)	0.73 ± 0.45	1.32 ± 0.53	11.87 ± 3.32	180.22 ± 20.07	192.08 ± 20.08

[0306] nd,在检测条件下未检出。

[0307] 表5中的结果显示,作为单氟磷酸钙存在于产品中的单氟磷酸根在口腔中保持为单氟磷酸根,然而氟化钠在受试者的口腔中完全解离为游离氟离子。具体地,在使用含有单氟磷酸钙的Tooth Mousse产品的个体的清洗后唾液中,几乎所有的单氟磷酸根都保持为单氟磷酸根而未解离为游离氟离子(即,在产品中探测到的 $192.08 \pm 20.08\text{ppm}$ 氟化物中,在冲洗后唾液中探测到 $180.22 \pm 20.07\text{ppm}$ 单氟磷酸根)。

[0308] 参考文献

[0309] • Reynolds EC(1998).Anticariogenic complexes of amorphous calcium phosphate stabilized by casein phosphopeptides:a review(由酪蛋白磷酸肽稳定化的无定形磷酸钙的防龋复合物:综述).Spec Care Dentist18:8-16.

[0310] • Shen P,Cai F,Nowicki A,Vincent J,Reynolds EC(2001).Remineralization of enamel subsurface lesions by sugar-free chewing gum containing casein phosphopeptide-amorphous calcium phosphate(用含有酪蛋白磷酸肽-无定形磷酸钙的无糖口香糖的釉质亚表面损伤的再矿化).J Dent Res 80:2066-70.

[0311] • Angmar B,Carlstrom D,Glas JE(1963).Studies on the ultrastructure of dental enamel.IV.The mineralization of normal human enamel(牙釉质亚显微结构研究.IV.正常人釉质的矿化).J Ultrastruct Res 8:12-23.

[0312] • Cai F,Shen P,Walker GD,Reynolds C,Yuan Y,Reynolds EC(2009).Remineralization of enamel subsurface lesions by chewing gum with added calcium(用具有添加的钙的口香糖的釉质亚表面损伤的再矿化).J Dent 37:763-768.

[0313] • Iijima Y,Cai F,Shen P,Walker G,Reynolds C,Reynolds EC(2004).Acid resistance of enamel subsurface lesions remineralized by a sugar-free chewing gum containing casein phosphopeptide-amorphous calcium phosphate(由含有酪蛋白磷酸肽-无定形磷酸钙的无糖口香糖再矿化的釉质亚表面损伤的耐酸性).Caries Res 38:551-556.

[0314] • Jones B,Kenward MG(2003).Design and analysis of cross-over trials(交叉试验的设计与分析).2nd ed.Boca Raton,Florida,USA:Chapman and Hall/CRC.

[0315] • Malcolm AS(1972).A microradiographic apparatus(显微放射照相设备)

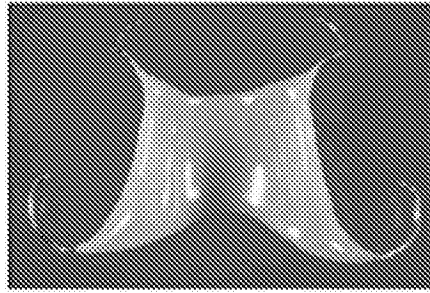
.Aust Dent J 17:454-460.

[0316] • Reynolds EC,Cai F,Shen P,Walker GD(2003).Retention in plaque and remineralization of enamel lesions by various forms of calcium in a mouthrinse or sugar-free chewing gum(借助口腔清洗剂或无糖口香糖中的各种形式的钙的菌斑滞留和釉质损伤的再矿化).J Dent Res82:206-211.

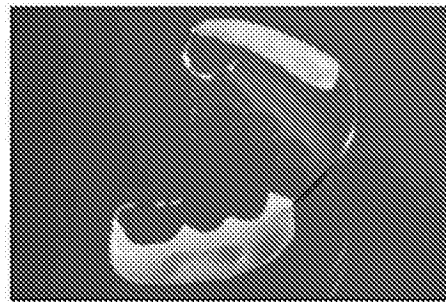
[0317] • SPSS(2008).Statistics Base 17.0User's Guide(Statistics Base 17.0用户指南)Chicago,Illinois,USA:SPSS Inc.

[0318] • Walker GD,Cai F,Shen P,Adams GG,Reynolds C,Reynolds EC(2010).Casein phosphopeptide-amorphous calcium phosphate incorporated into sugar confections inhibits the progression of enamel subsurface lesions in situ(加入含糖糖食中的酪蛋白磷酸肽-无定形磷酸钙原位抑制釉质亚表面损伤发展).Caries Res 44:33-40.

[0319] • White DJ(1987).Use of synthetic polymer gels for artificial carious lesion preparation(用于人造龋性损伤制品的合成聚合物凝胶的用途).Caries Res 21: 228-242。



上部矫治器



下部矫治器

图1

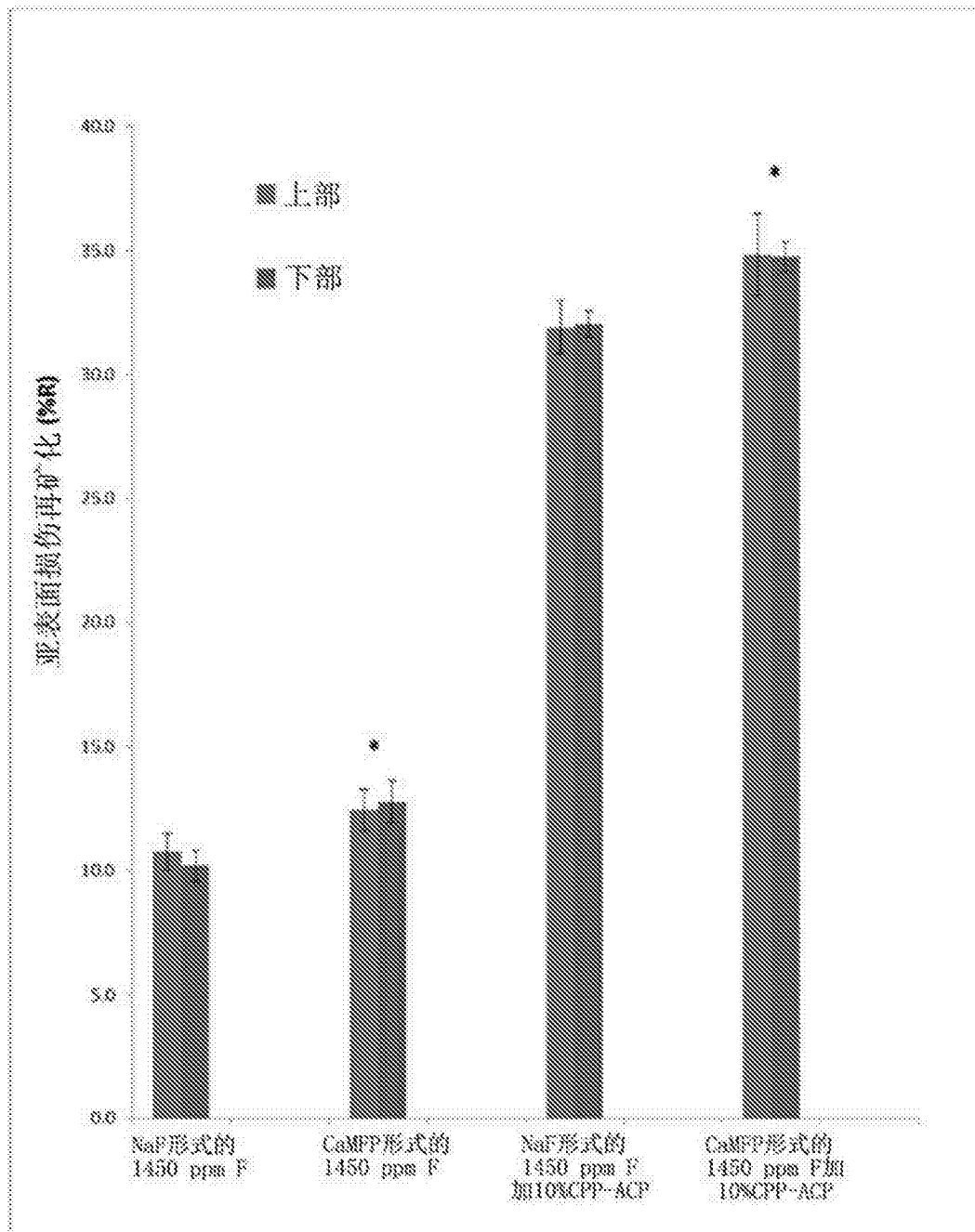


图2