

[19] 中华人民共和国国家知识产权局



[12] 发明专利申请公布说明书

[21] 申请号 200780044173.1

[51] Int. Cl.

A61Q 11/00 (2006.01)

A61K 8/97 (2006.01)

[43] 公开日 2009 年 12 月 30 日

[11] 公开号 CN 101616714A

[22] 申请日 2007. 11. 27

[21] 申请号 200780044173.1

[30] 优先权

[32] 2006. 11. 27 [33] GB [31] 0623619.4

[86] 国际申请 PCT/GB2007/004532 2007. 11. 27

[87] 国际公布 WO2008/065382 英 2008. 6. 5

[85] 进入国家阶段日期 2009. 5. 27

[71] 申请人 马尔斯公司

地址 美国弗吉尼亚州

[72] 发明人 佐伊·马绍尔-琼斯

玛丽-路易斯·巴隆

凯瑟琳·巴克利

[74] 专利代理机构 北京三友知识产权代理有限公司

代理人 丁香兰 谭 辉

权利要求书 2 页 说明书 18 页 附图 3 页

[54] 发明名称

包含香桃木属植物的口腔卫生组合物

[57] 摘要

本发明涉及口腔健康应用中使用的香桃木属植物、包含香桃木属植物的口腔组合物、以及香桃木属植物或所述组合物在动物口腔健康的改善或保持中的应用，所述应用优选通过减少或控制动物口腔中的牙菌斑和/或改变牙菌斑的细菌含量来进行，本发明还包括用于预防或治疗动物的龋炎的香桃木属植物，本发明还提供了改善或保持动物口腔健康的方法。

1. 香桃木属植物, 所述香桃木属植物用于保持或改善动物的口腔健康。
2. 如权利要求 1 所述的香桃木属植物, 所述香桃木属植物用于预防或治疗动物的龈炎。
3. 如权利要求 1 或 2 所述的香桃木属植物, 其中所述香桃木属植物减少、抑制或控制由动物口腔的菌斑和/或牙菌斑产生的致病因子。
4. 如权利要求 1~3 中任一项所述的香桃木属植物, 其中所述香桃木属植物改变动物口腔中牙菌斑的细菌含量。
5. 如权利要求 4 所述的香桃木属植物, 其中所述香桃木属植物通过减少所述细菌含量来改变所述细菌含量。
6. 如权利要求 1~5 中任一项所述的香桃木属植物, 其中所述香桃木属植物改善动物口腔中存在的牙菌斑的健康。
7. 如权利要求 1~6 中任一项所述的香桃木属植物, 其中所述香桃木属植物抑制或减少牙菌斑中的炎性蛋白酶和/或病源细菌。
8. 如权利要求 7 所述的香桃木属植物, 其中所述病源细菌包括产黑色素的厌氧菌。
9. 如权利要求 7 所述的香桃木属植物, 其中所述病源细菌包括消化链球菌。
10. 如权利要求 1~9 中任一项所述的香桃木属植物, 其中所述香桃木属植物是香桃木。
11. 如权利要求 1~10 中任一项所述的香桃木属植物, 其中所述动物是猫、狗或人。
12. 一种口腔组合物, 所述口腔组合物包含香桃木属植物。
13. 如权利要求 12 所述的组合物, 所述组合物用于如权利要求 1~11 中任一项所提及的应用。
14. 如权利要求 12 或 13 所述的组合物, 其中所述香桃木属植物以所述组合物的 0.1 重量%~20 重量%的浓度存在。

15. 如权利要求 12~14 中任一项所述的组合物, 其中所述组合物是食品。

16. 香桃木属植物在组合物的制造中的应用, 所述组合物用于改善或保持动物的口腔健康。

17. 香桃木属植物在组合物的制造中的应用, 所述组合物用于预防或治疗动物的龋炎。

18. 如权利要求 16 或 17 所述的应用, 其中所述组合物减少或控制所述动物的牙菌斑。

19. 一种保持或改善动物口腔健康的方法, 所述方法包括对所述动物施用有效量的香桃木属植物或如权利要求 12~15 中任一项所述的组合物。

20. 香桃木属植物, 所述香桃木属植物用于基本上如实施例所述的应用。

21. 一种口腔组合物, 所述组合物基本上如实施例所述。

22. 一种保持或改善动物口腔健康的方法, 所述方法基本上如实施例所述。

包含香桃木属植物的口腔卫生组合物

技术领域

本发明涉及口腔健康应用中使用的香桃木属植物(myrtle)、包含香桃木属植物的口腔组合物、以及香桃木属植物或所述组合物在改善或保持所述动物的口腔健康中的应用,所述应用优选通过减少或控制动物口腔的牙菌斑和/或改变牙菌斑的细菌含量来进行。本发明还包括用于预防或治疗动物的牙龈炎的香桃木属植物。本发明还提供了改善或保持动物口腔健康的方法。

背景技术

对保持或改善动物的口腔健康的需求非常大。不良的口腔健康可导致牙龈疾病(牙龈炎)并最终导致牙齿脱落,这会对动物的良好状态的保持产生严重的影响。

多种疾病和病状可引起不良的口腔健康。猫和狗中最常见的疾病之一是牙周疾病。所有的猫和狗在其生命中的某些阶段都会受到牙周疾病的影响。所有的牙周疾病的发病原因都是菌斑。

现有的用于减少或控制伴侣动物的菌斑形成(并因而减少或控制相关的病状,如牙龈炎)的膳食疗法通常采用机械工具(mechanical means),例如坚硬的咀嚼物(chew)或治疗物(treat),当动物咀嚼或食用时,所述咀嚼物或治疗物可将菌斑从牙齿上刮掉。所述机械工具的效力依赖于质地,优选的是耐嚼性质地而不是脆性质地,从而防止所述工具的破裂,因而还可增加咀嚼过程中清洁牙齿的时间。狗比猫更热衷于长时间咀嚼。因而用于各种动物的产品在质地上存在差异,以满足这些不同的偏好。

还可以采用粗糙(textured)的玩具来将菌斑从牙齿表面上机械性地去除,而动物无需摄取任何具有粗糙表面的产品。

然而,通过如粗糙的食品或玩具等机械物质去除菌斑要依赖于动物

花费足够的时间来咀嚼该机械物质，以将菌斑从牙齿表面刮掉。所需的时间量难以评估和监测。另外，仅经由机械摩擦难以实现对口腔中所有牙齿表面上的菌斑进行控制，某些牙齿得到比其他牙齿更有效的清洁。

还可以通过刷拭来清洁牙齿，从而去除或减少菌斑。然而，主人对刷牙的依从性较差，结果很少有狗和猫接受刷牙的日常口腔护理方案。

作为去除菌斑的机械物质的替代方式，可以将某些合成化合物如洗必泰和三氯生用作抗菌剂来减少菌斑。然而，这些化合物是广谱抗菌剂，因而在定期服用时可导致有益于健康的肠道微生物丛群落的失衡。此外，已有将某些菌斑细菌与牙周健康关联起来，以广谱抗菌药治疗可能杀死这些群落，实际上，这种治疗将产生更不卫生的口腔微生物丛，从而引起口腔健康下降。

细菌生物膜在牙齿表面上的累积如果未被充分处理可导致龈炎。龈炎是齿龈线(gum line)上累积的细菌菌斑引起的齿龈炎症。它可引起齿龈的酸痛、发红和出血。

导致口腔健康欠佳的另一因素是牙垢。通常情况下，由于通过刷牙不能去除牙垢，因此牙垢累积在牙齿表面上并刺激齿龈组织，从而引起龈炎。这是口腔健康欠佳或恶化的另一标志。

在宠物食品或人类口腔护理产品中添加牙垢形成抑制剂如三聚磷酸钠有助于预防牙垢累积。然而，这不能处理牙菌斑内的细菌群落复合体(bacterial community composition)，所述细菌群落复合体可促进牙周疾病对动物口腔健康的有害影响。

因而，需要减少牙菌斑在动物中的影响，特别是通过天然方法，而不单依靠机械物质或合成化学物或化合物并且不使动物紧张。另外，还需要预防和治疗动物的龈炎。

发明内容

因此，本发明提供了用于改善或保持动物口腔健康的香桃木属植物。

香桃木属植物(香桃木(*Myrtus communis*))是桃金娘科的一种开花植物，原产于南欧和北非。

本发明人出乎意料地发现香桃木属植物能够改善和/或保持动物的口腔健康。

优选的是，所述香桃木属植物通过控制或减少动物的牙菌斑来改善或保持该动物的口腔健康，由此意味着在动物口腔中由菌斑和/或牙菌斑产生的致病因子得到了减少或抑制。

牙菌斑是由需氧细菌和厌氧细菌组成的混合微生物群落。虽然菌斑可能随着个体而改变，但可将形成过程分为3个关键事件：(i) 初级建群(粘附)；(ii) 二级建群(共聚集)；和(iii) 成熟(致病力)。

菌斑发展由包被有膜的牙齿表面开始，所述膜是被称为牙齿唾液薄膜的蛋白膜和糖蛋白膜。先驱细菌物种(pioneer bacterial species)与唾液薄膜内的分子附着，首先形成单层，随后形成垂直于牙齿表面的细菌的垢床(pallisade)。

微生物在短时间内由较弱的吸引力维持，在此期间，多种特定附着机制使细胞在相当长的时间内与表面保持临近。这些特定的相互作用可以是凝集素样相互作用、静电相互作用和疏水相互作用的组合，在一些情况下，可能涉及从细胞表面突出的称为原纤维或菌毛的精细结构。此后，细胞外聚合物的产生使得初始附着变得无法有效逆转。

在人体内，链球菌是最常见的初级菌落，构成附着于唾液薄膜的所有细菌的47%~52%。

在这一初始期的过程中和初始期之后，发生多种细菌的二级建群，导致细菌多样性的大幅增加。二级建群的事件中最重要的是共聚集的过程，此时可以借此将初级群菌作为用于建群的基质。

可将共聚集描述为“两种不同细菌细胞类型上的表面分子之间的识别，从而形成混合的细胞聚集体”。还可以将其描述为“悬液中伙伴细胞(partner cell)之间的附着”。

共聚集是发生在特定细菌“伙伴”之间的高度特异性过程。每种菌株具有其自己的伙伴组(set of partners)和细胞-细胞识别机制。还存在能够与其它数种菌株共聚集的菌株群。基于人类研究，在这些后期菌落中占优势的一种所述生物是具核梭杆菌(*Fusobacterium nucleatum*)，它是成熟

牙菌斑中的优势生物。

已知的是，共聚集在人的菌斑形成中发挥重要的作用。已经体外确定了犬类动物口腔细菌的不同菌株之间的共聚集，提示这一习性在其它动物的牙菌斑形成和发展中具有相似作用。

在菌斑生物膜发展过程中的某些时刻，整个复合体的变化速率缓慢下来。当前对这种现象出现的时刻还不清楚，不过据认为生物膜要花数天来达到这一状态。

在人的菌斑中，作为革兰氏阳性的球菌和杆菌出现的一系列细菌物种逐渐地被革兰氏阴性的丝菌和有鞭毛生物所替代。随着厚度增加，成熟的生物膜还会趋向于变得更加厌氧。

此时可以说生物膜已经达到了顶级群落，其中多种细菌为了其生存而依赖于生物膜内的其它细菌。就是在这一期，存在与牙周疾病相关的多种生物。这些细菌产生许多作为牙周疾病的引发因子的化合物，例如蛋白酶和溶血素。据报道，蛋白酶尤其是胰蛋白酶具有多种能力，包括降解免疫球蛋白、使细胞因子及其受体失活、降解宿主组织并促使口腔出血。所述菌斑的细菌已知是菌斑生物物质。

牙菌斑中通常存在病原细菌，例如消化链球菌(*Peptostreptococcus*)，以及产黑色素的厌氧菌(*black pigmented anaerobes*)，例如卟啉单胞菌(*Porphyromonas*)、拟杆菌(*Bacteroides*)和普雷沃氏菌(*Prevotella*)，所有这些都认为对疾病状态有帮助。

本发明的香桃木属植物可有效抑制所述生物膜的形成和/或抑制生物膜的有害活性，从而通过控制或减少动物的牙菌斑来改善或保持口腔健康。还可以提供本发明的香桃木属植物来预防或治疗动物的龈炎。

通过减少生物膜中病原细菌的水平，可以改善牙菌斑健康。因此，本发明的香桃木属植物可用于改变菌斑的细菌含量，优选通过减少动物口腔中菌斑的病原细菌含量来改变菌斑的细菌含量。所述香桃木属植物还可以促进菌斑的有益于健康的细菌。本发明的香桃木属植物可用于改善存在于动物口腔中的牙菌斑健康。

本发明的香桃木属植物优选降低动物牙菌斑中的炎性蛋白酶和/或

产黑色素的厌氧菌的水平。这些是见于牙菌斑中的关键致病媒介物。

最优选的是，香桃木属植物抑制或减少牙菌斑中的病源细菌，所述病源细菌优选包括消化链球菌(*Peptostreptococcus* sp)。

本发明的香桃木属植物适合于包括人类在内的任何动物。然而，在一个优选的实施方式中，所述动物是伴侣动物或人。伴侣动物是指作为宠物饲养的任何动物，其包括猫、狗、马、兔或豚鼠。优选的是，所述组合物用于猫、狗或人。

香桃木属植物变种优选为香桃木(*Myrtus communis*)，已知其还有其它数个名称，包括 *Myrtus baetica*(贝提卡香桃木)、*Myrtus italica* (意大利香桃木)、*Myrtus romanifolia*(罗马叶香桃木)、*Myrtus macrofilia* (大叶香桃木)、*Myrtus littoralis*(叶树香桃木)、*Myrtus minima*(小香桃木)。本领域的普通技术人员可理解的是用来指这个种香桃木属植物的其它名称包括 *Myrtus baetica* var. *vidalii*(贝提卡香桃木尖头变种)、*Myrtus communis* var. *christinae*(香桃木黄叶变种)、*Myrtus communis* var. *eusebii* (香桃木尤西比变种)、*Myrtus communis* var. *gervasii*(香桃木柘瓦西变种)、*Myrtus italica* var. *briquetii* (意大利香桃木布里夔缇变种)、*Myrtus italica* var. *petri-ludovici* (意大利香桃木佩奇-卢多维奇变种)、*Myrtus communis* var. *acutifolia*(香桃木尖叶变种)、*Myrtus communis* var. *angustifolia*(香桃木狭叶变种)、*Myrtus communis* var. *baetica*(香桃木贝提卡变种)、*Myrtus communis* var. *belgica*(香桃木比利时变种)、*Myrtus communis* var. *mucronata*(香桃木圆叶变种)、*Myrtus communis* var. *romana*(香桃木罗马变种)、*Myrtus major* Garsault(大加尔索香桃木)、*Myrtus minor* Garsault(小加尔索香桃木)、*Myrtus acuta* Mill (锐叶香桃木)、*Myrtus baetica* Mill (贝提卡香桃木)、*Myrtus belgica* Mill(比利时香桃木)、*Myrtus italica* Mill (意大利香桃木)、*Myrtus minima* Mill (小香桃木)、*Myrtus littoralis* Salisb(叶树香桃木)、*Myrtus macrophylla* (大叶香桃木)、*Myrtus microphylla* (小叶香桃木)、*Myrtus romanifolia* (罗马叶香桃木)、*Myrtus communis* subsp. *Mucronata*(香桃木圆叶亚种)、*Myrtus media* (中叶香桃木)、*Myrtus romana* Hoffmanns (罗马香桃木)、*Myrtus angustifolia* (狭叶香桃木)、*Myrtus*

buxifolia Raf (黄杨叶香桃木)、Myrtus lanceolata Raf. (杉木型香桃木)、Myrtus latifolia Raf. (叶冬青香桃木)、Myrtus oerstediana (奥尔斯缇德亚纳香桃木)、Myrtus sparsifolia (骆驼刺香桃木)、Myrtus veneris Bubani (线型香桃木)、Myrtus communis var. Acuminata (香桃木尖锐变种)、Myrtus communis var. italica (Mill.) (香桃木意大利变种)、Myrtus communis var. Lusitanica (香桃木柏型变种)、Myrtus borbonis Sennen (伯波尼斯香桃木)、Myrtus acutifolia (L.) (尖叶香桃木)、Myrtus augustinii (窄叶香桃木)、Myrtus baui (高直香桃木)、Myrtus briquetii (布里夔缇香桃木)、Myrtus christinae (黄叶香桃木)、Myrtus communis var. Balearica (香桃木冠鹤变种)、Myrtus communis var. foucaudii (香桃木弗高蒂变种)、Myrtus communis var. Grandifolia (香桃木大二叶变种)、Myrtus communis var. Joussetii (香桃木耐西缇变种)、Myrtus communis var. neapolitana (香桃木尼亚泊利塔娜变种)、Myrtus eusebii (尤西比香桃木)、Myrtus gervasii (柘瓦西香桃木)、Myrtus josephi (尤西非香桃木)、Myrtus mirifolia (奇叶香桃木)、Myrtus petri-ludovici (佩奇-卢多维奇香桃木)、Myrtus rodesi (罗得西香桃木)、Myrtus theodori (西奥多里香桃木) 和 Myrtus vidalii (尖头香桃木)。

本发明的香桃木属植物可以是整个植株或其部分。它可以是根、皮、茎、叶、汁液、花或它们的任意组合。可以将所述香桃木属植物干燥、碾碎、研磨或切碎。优选的是，待使用的香桃木属植物是香桃木属植物的叶。

作为一个附加或替代方案，可以使用香桃木属植物的提取物。适合的提取物包括甲醇提取物、乙醇提取物、氯仿提取物或水提取物。本领域的普通技术人员可以理解，可以使用其它任何适合的提取物。

本发明的第二方面提供了包含香桃木属植物的口腔组合物。

香桃木属植物可以占该组合物的 0.1 重量%~20 重量%，较优选占 1 重量%~15 重量%，更优选占 3 重量%~10 重量%，或者占 1 重量%、2 重量%、3 重量%、4 重量%、5 重量%、6 重量%、7 重量%、8 重量%、9 重量%、或 10 重量%。最优选的是，所述香桃木属植物占该组合物的

约3重量%。

香桃木属植物可以是所述组合物所包含的改善或保持口腔健康的唯一活性成分。作为选择，该组合物可以包含作为混合物的一部分的香桃木属植物，所述混合物包括一种或多种其它的改善或保持口腔健康、或者减少或控制菌斑的组分。

下文中，术语“口腔组合物”覆盖了与动物的口腔、优选与动物的牙齿表面接触的所有组合物，所述组合物包括食品、膳食和增补剂(supplement)。所有这些形式可以是固体、半固体或液体。所述组合物可以是糊状物或凝胶。

作为所述组合物可以是增补剂的形式，所述增补剂待添加到所有未含有足够水平的香桃木属植物的食品中，从而通过减少或抑制菌斑中的致病因子和/或生物物质来改善或保持口腔健康、或者控制或减少动物的牙菌斑，所述改善或保持口腔健康包括预防或治疗龈炎。

可以使用处于增补剂形式的浓缩的香桃木属植物来添加到动物的主要膳食或食品中。这可以通过使动物膳食包含一定量的所述增补剂或者通过对动物补充饲喂一定量的所述增补剂来进行。可以使所述增补剂形成具有极高含量的本发明的香桃木属植物组合物的食品，所述食品在对动物饲喂前需要进行稀释。所述增补剂可以是任何形式，包括固体(例如粉末)、半固体(例如食物样稠化物/凝胶)、液体、糊状物，或者作为选择，其可以处于片剂或胶囊剂的形式。所述液体可以方便地混入食物或者例如通过匙或通过吸管类装置而直接对动物饲喂。所述增补剂可以具有较高的一种或多种本发明的组分，或者可以是至少两个部分的组合包的形式，每个部分含有所需水平的一种或多种组分。

优选将所述香桃木属植物或包含香桃木属植物的组合物加入到商售宠物食物产品组合物或商售膳食增补剂组合物中。所述宠物食物产品可以是干燥、半干燥、湿润或液体(饮料)产品。湿润产品包括在罐或箔质容器中的固体的并且具有70%~90%的含水量的食物。干燥产品包括具有相似组成但具有5%~15%的水并且作为饼干类粗磨食物而存在的食物。当组合物包含膳食、食品或增补剂时，优选将其包装。这样消费者能够

由包装确定该食物中的成分并且确定其适合于所关注的动物。该包装可以是金属(通常为锡或挠性箔(flexifoil)的形式)、塑料、纸张或卡片。任何产品中的水含量均可能影响到所能够使用的或所要求的包装类型。

本发明的组合物涵盖了动物可以在其膳食中食用的任何产品。因此,本发明覆盖了用于人或其它动物的标准食物产品,以及宠物食物小吃(pet food snack)(例如小吃棒(snack bar)、饼干和甜味产品)。该组合物可以是已烹制的产品。它可以包含肉或动物源材料(例如牛肉、鸡肉、火鸡肉、羊肉、血浆、髓骨等、或者其中的两种以上)。作为选择,该组合物可以不含肉(优选包括肉代用品,例如大豆、玉米面筋或大豆产品)从而提供蛋白质源。该组合物可以含有附加性蛋白质源,例如大豆蛋白浓缩物、乳蛋白、面筋等。该组合物还可以含有淀粉源例如一种或多种谷物(例如小麦、玉米、大米、燕麦、大麦等),也可以不含淀粉。典型的干燥商售狗食和猫食含有约30%的粗蛋白、约10%~20%的脂肪,其余为糖类(包括膳食纤维)和灰分。典型的潮湿或湿润的产品含有(以干物质计)约40%的脂肪、50%的蛋白质,其余为纤维和灰分。本发明的组合物特别是涉及此处所述的食物,其可作为用于猫、狗或任何其他伴侣动物或者人的膳食、食品或增补剂而销售。

本文中术语“驯养的”狗和“驯养的”猫是指狗和猫,尤其是家猫(*Felis domesticus*)和家狗(*Canis domesticus*)。

可以将所述组合物施加到或掺入于咀嚼物或治疗物中,除了正餐食品之外,动物还可以食用所述咀嚼物或治疗物。可以将该组合物以正餐食品上涂层的形式提供或加入到正餐食品之中。

作为选择,该组合物可以是液体、凝胶或糊状物等,其可被应用为非食用产品(如动物用玩具)的涂层。可以将该组合物加入到所述产品中。当动物啃该玩具时,该组合物与该动物口腔的部分或全部接触,并改善或保持该动物的口腔健康。

当将该组合物加入到耐嚼产品或坚硬产品中或涂覆在所述产品上时,通过所述产品对动物牙齿的机械作用来去除菌斑、以及该组合物中香桃木属植物的作用,从而实现改善或保持动物的口腔健康的额外益处。

香桃木属植物对形成某些菌斑生物膜的细菌的抑制可降低牙菌斑中的细菌含量从而导致对动物牙菌斑的控制或降低。

该组合物可用于任何口腔健康水平的动物以改善或保持该动物的口腔健康。

可以对具有良好或可接受的口腔健康的动物使用该组合物以保持口腔健康。在此情况下，所述组合物可以控制牙菌斑形成，并将某些菌斑细菌对动物的牙周健康的破坏性影响降到最小。

作为选择，可以对口腔健康欠佳的动物使用该组合物以改善该动物的口腔健康。可以通过控制牙菌斑的进一步积累来改善口腔健康，而口腔健康的改善会减慢疾病向最严重阶段的发展。它还可以减少已经存在于动物牙齿表面上的牙菌斑。在中度至重度牙周疾病的情况下，在使用所述组合物之前，动物可能需要让兽医和/或牙医检查，从而实现口腔健康的益处并减少将来兽医和/或牙医干预的频率。

所述组合物是口腔组合物。口腔组合物表示使用期间动物的口腔与该组合物接触，并且优选的是所述组合物与动物的牙齿表面直接接触。最优选的是，牙齿表面与本组合物的香桃木属植物直接接触。

这样一种口腔组合物可以包括牙膏、漱口水或任何其他形式，例如凝胶、液体或糊状物。如上所述，所述口腔组合物可以是食品。

本发明的第三方面提供了香桃木属植物在改善或保持动物的口腔健康用组合物的制造中的应用。优选的是，通过控制或减少所述动物的牙菌斑来改善或保持口腔健康，所述控制或减少包括减少和/或抑制致病因子、生物物质或病原细菌。还提供了香桃木属植物在预防或治疗牙龈炎用组合物的制造中的应用。

作为第四方面，本发明还提供了改善或保持动物的口腔健康的方法，所述方法包括对该动物施用香桃木属植物或本发明的第二方面的组合物。优选的是，该方法通过减少或控制该动物的牙菌斑来改善或保持该动物的口腔健康，如上所述。

在第四方面的方法中，借助于通过包含在食品中而食用所述组合物、或者借助于在动物所啃玩具上涂覆包含所述组合物的涂层，使所述动物

的口腔与所述组合物接触。

优选的是，该方法应用于口腔健康容易变差或者容易受到牙菌斑、龈炎或牙周疾病影响的动物。

可以将所述组合物施用于口腔健康较差的动物从而减少牙菌斑或其中所含因子的量，随后可以进行连续的饲喂，从而控制、减少或抑制更多牙菌斑或者其中所含的任何一种或多种因子的形成。在使用所述组合物之前或使用所述组合物期间，动物可能需要兽医和/或牙医治疗来去除牙垢沉积物，以观察所述香桃木属植物或所述组合物的有益效果。

本领域的普通技术人员可以理解，较差的口腔健康是指存在这一状态的多种指标，所述指标包括牙垢和菌斑累积、龈炎、口臭、存在牙龈萎缩和/或牙周袋。

本领域的普通技术人员可以理解，本发明的各个方面的所有特征可以比照用于其他方面。

附图说明

现在通过参考以下的非限制性实施例和附图来描述本发明，其中：

图 1 显示了香桃木属植物对由经处理的生物膜培养的兼性厌氧菌的影响，其中以未经处理的对照的百分比表示。未经处理的 CFU (100%) = 4.05×10^7 /ml;

图 2 显示了香桃木属植物对由经处理的生物膜培养的苛求厌氧菌的影响，其中以未经处理的对照的百分比表示。未经处理的 CFU (100%) = 2.96×10^7 ;

图 3 显示了香桃木属植物对由经处理的单物种生物膜培养的口腔消化链球菌(*Peptostreptococcus stomatis*)菌落的影响，其中以未经处理的对照的百分比表示。未经处理的 CFU (100%) = 1.34×10^7 。

具体实施方式

实施例

通过以下的体外实验来检测香桃木属植物控制或减少动物牙菌斑的

能力。从狗获得了龈缘上菌斑，并进行下述各种测试，以确定香桃木属植物是否具有改善或保持动物口腔健康的能力。

实施例 1

建立(set up)初始测试来确定香桃木属植物是否适合为了改善或保持口腔健康而在动物中应用。

这些测试包括抑制菌斑形成细菌的附着的能力、抑制口腔细菌生长的能力、抑制口腔细菌蛋白酶生成的能力和抑制口腔细菌菌株所引起的溶血的能力。

香桃木属植物对附着的抑制高达 100%、对生长的抑制高达 93%、对蛋白酶生成的抑制高达 57%，并且在所检测的 8 株口腔细菌中的 5 株中显示了抑制溶血的能力。

这些结果显示，香桃木属植物有能力抑制非所需的口腔细菌，因而在进一步的测试中对其保持或改善动物口腔健康的能力进行了检测。

实施例 2

测试接种物：取样自狗的菌斑和唾液

该测试需要新鲜的龈缘上犬牙菌斑和唾液来接种。接种物由牙菌斑和未过滤的唾液合并组成，所述接种物取样自一组 14 条在年龄、品种和口腔健康状况上均不相同的狗。

将菌斑和唾液重悬在人造唾液中，从而形成具有约 15%的菌斑和 30%的唾液的接种物。

测试建立

平板生物膜测试(PBA)采用 24 孔板形式，其中在羟基磷灰石(HA)盘上培养的生物膜（一种代表性犬牙菌斑）。在导入到 24 孔测试板之前，将每个 HA 盘在下述溶液中预处理 2 小时，所述下述溶液为在人造犬唾液中的 50%的过滤除菌的犬唾液的溶液。所述预处理步骤刺激唾液薄膜在 HA 盘表面上的形成。预处理后，将每个 HA 盘分别放置在 24 孔板上的孔中。将接种物分为 2 份等分试样，向一份等分试样加入浓度适当的活性物。另一份等分试样为对照(无活性物)。向每孔加入 1 ml 的接种物，通过摇荡将测试平板在 38℃有氧温育 48 小时。24 小时和 30 小时后，将

所述盘转移到含有如上所述的适当浓度的活性物的新鲜的人造唾液中。48 小时后, 从测试平板中取出被生物膜包覆的 HA 盘以进行分析。将除了用于生物质定量的那些 HA 盘之外的每个 HA 盘放置在 500 μ l PBS 中并涡旋混合 30 秒, 以将由该盘生长的生物膜移到溶液中。随后利用生物膜悬液来进行分析。将用于生物质定量的被生物膜包覆的 HA 盘从 24 孔测试板中取出并直接用于结晶紫测试。

实施例 3

在 PBA 中检测的香桃木属植物提取物

将香桃木属植物的甲醇提取物用于犬 PBA 的测试。按照此前所描述的的进行提取。

在犬 PBA 中以 500 μ g/ml 和 5000 μ g/ml 检测香桃木属植物的叶的粗制植物药, 以丁香(经干燥的花蕾)、欧芹(叶)和桉树(叶)为对照。在 500 μ g/ml 和 5000 μ g/ml 的情况中, 香桃木属植物在蛋白酶和生物质抑制中均显示了比欧芹和桉树更高的性能。在 5000 μ g/ml 的情况中, 香桃木属植物在产黑色素的菌落和蛋白酶抑制中与丁香表现得一样好。

另外, 包含了洗必泰(Lloyds Pharmacy)作为黄金标准参考(gold standard reference)或阳性对照。然而, 洗必泰不适合在动物组合物中使用, 这是因为它是合成化学物, 并且由于它是以其最纯形式使用的化学物, 因而可能具有潜在的毒性效果。

实施例 4

生物膜测量

采用下述分析来评估犬 PBA 中生成的生物膜以及香桃木属植物与非植物药化合物对生物膜形成的影响:

生物质定量(结晶紫测试)

蛋白酶活性

细菌存活计数

以下给出每一测试的简要说明

生物质

采用结晶紫染色法来定量 HA 盘上生长的生物膜的总量。生物质显

示为与样品的在 595nm 读取(与对照相比)的 OD(OD_{595})成正比。结果可表示为与无活性物对照相比经活性物处理的样品中所观察到的 OD_{595} 的减少,这反映了活性物处理对盘上生长的生物膜的量的影响。

香桃木属植物使生物量减少了 59.5%。

蛋白酶活性

采用液相 BAPNA 测试测量了胰蛋白酶样蛋白酶活性,液相 BAPNA 测试是这样的一种比色测试:其中样品中存在的胰蛋白酶的量与所显示的颜色强度成正比。对照胰蛋白酶标准曲线来定量样品,结果表示为经活性物处理的样品中蛋白酶活性的抑制百分比(与对照相比)。

香桃木属植物使蛋白酶产量下降了 74.34%。

细菌计数

使用补充有氯高铁血红素和甲萘醌的哥伦比亚血琼脂平板(Columbia blood agar plate)来进行细菌存活数量的定量。温育 2 天后对需氧菌进行计数,在适宜条件下温育 9 天后,对包括产黑色素的菌落(BPC)在内的厌氧菌进行计数。可将平板计数表示为每毫升的菌落形成单位(cfu),以对数(log)表示对照和活性物平板之间的差异。

与对照相比,香桃木属植物使产黑色素的细菌菌落的平板计数的对数下降了 3.75。这一特定细菌组被认为对牙周疾病很重要。

实施例 5

数据的统计分析

测试中将每个样品重复 5 次。除非另外声明,测试中所检测的所有提取物的浓度为 500 $\mu\text{g/ml}$ 。对于每个样品,所获得的所有值均换算为对数,由对数值计算平均值。

随后进行具有不等方差的 2 尾 t 检验。选择不等方差分析是因为个体分析(individual analyses)是独立的,即,测量值相互之间没有可比性。获得每个数据组的 p 值,这些值表示了数据的再现性。

结果

下面给出的表归纳了香桃木属植物在所述检测中的表现:

表 1

常用名	需氧菌 (Log 10 减少)	厌氧菌 (Log 10 减少)	BPC (Log 10 减少)	蛋白酶 (减少%)	生物物质 (减少%)
洗必泰	2.87	2.48	2.74	95.76	94.40
香桃木属植物叶	0.05	-0.10	3.75	75.34	59.50
鸡脚参	-0.09	0.02	2.59	24.53	14.60
墨西哥皮树 (Tepezcohuite)	0.25	-0.42	-0.51	80.25	-27.40

可以看到, 香桃木显著降低了产黑色素的菌落计数并且对蛋白酶和生物物质有显著的抑制作用。

实施例 6

原料的检测

与上述提取物一样, 还在平板生物膜测试中检测了香桃木属植物的植物原料。通过 250 μm 孔径大小的筛来制备植物原料并在测试中以 5000 $\mu\text{g/ml}$ 进行检测。该原料与此前检测的提取物一样, 能够有效地抑制生物膜形成。

实施例 7

人类菌斑的抑制

在人的平板生物膜测试的形式中检测了香桃木属植物叶的粉末对生物膜形成的抑制。每种检测试剂(test agent)的终浓度为 250 $\mu\text{g/ml}$ 。将检测在不同的测试中重复 5 次。

室温下将羟基磷灰石盘在 20%的合并人唾液中温育 2 小时。收集 10 ml 量的合并人唾液并与刮取自人类志愿者牙齿表面的菌斑接种物混合。以 1:3(v/v, 体积比)的比例将接种物加入到 20%的合并唾液中, 将 1.33 ml 所得悬液与 2.0 ml 人造唾液(Pratten 等, 1998)和 0.175 ml 的在无菌水中的浓度为 5 mg/ml 的适当的检测试剂(香桃木、钩藤(*Uncaria tomentosa*)、鸡脚参(*Orthosiphon spicatus*)、欧芹或桉树)或水(作为阴性对照用于与每种检测试剂比较)混合。使用欧芹和桉树作为阳性对照是因为它们对口腔健康的积极效果而均被公认为是口腔健康产品的天然成分。

将每种溶液的三份等分试样(1 ml)置于无菌 24 孔板的单独的孔中, 孔中有单一的经唾液包被的羟基磷灰石盘。在厌氧条件(10% H_2 , 10% CO_2 , 80% N_2)下将所述盘在 37°C 温育 1 小时, 使在齿龈下隐窝中所发现的与牙周炎相关的专性厌氧菌生长。之后在有氧条件下在 37°C 进行 24 小时的温

育。

将生物膜分散、连续稀释，随后在 CBA (+ 氯高铁血红素、甲萘醌) 上铺板并在厌氧条件下温育，或者在 BHY 上铺板并在有氧条件下温育。24 小时~48 小时后对菌落计数。结果在图 1 中显示，其中可以看到，与未经处理的(水)对照相比，香桃木属植物(香桃木)在体外抑制了人类菌斑生物膜中兼性厌氧细菌的数量。令人惊讶的是，香桃木属植物比已知的口腔卫生促进剂(欧芹和桉树)更有效地降低了所述生物的水平。

还对苛求厌氧菌的数量进行计数，如图 2 所示，可以看到所述苛求厌氧菌的数量与未经处理的对照相比也出现下降。出乎意料的发现还有，香桃木属植物在抑制苛求厌氧菌方面比欧芹和桉树表现得更好。

在上述菌斑生物膜测试条件下(试剂的终浓度为 0.25 mg/ml)还检测了香桃木属植物叶的粉末对人造唾液中口腔消化链球菌(*Peptostreptococcus stomatis*)生长的抑制。在厌氧橱中生长 24 小时后对菌落进行计数。

与未经处理的对照和以桉树叶粉末处理的对照相比，香桃木属植物叶处理显著减少了消化链球菌生物膜中的细菌数量(图 3)。消化链球菌是已知与龈炎、牙周炎和口腔健康问题相关的病原细菌。

实施例 8

各种产品应用均要求在暴露于高达 120℃ 的温度后仍具有原料活性。为了对此进行检验，将香桃木属植物的叶原料在 120℃ 加热 10 分钟，并将平板生物膜测试中检测其活性(与未经热处理的对照比较)。

如上所述的香桃木的热处理并不影响其性能。经热处理的香桃木使生物物质减少 94.4%，相比之下未经热处理的对照为 97.7%。在经热处理和未经热处理的对照中，蛋白酶均被完全抑制(100%)。

实施例 9

为了评价产品的接受性，将香桃木属植物的叶以 3% 的含量包含在 25 g 的咀嚼剂(chew format)中，并在和 3 种其他类型咀嚼剂在交叉研究(crossover study)中将其饲喂给小种鬃狗、獾猎犬和拉布拉多犬。咀嚼物每天饲喂 1 次，为时 4 天，在开始下一饲喂阶段之前，留出 3 天的冲洗(washout)时间。与不含香桃木属植物的标准咀嚼物相比，香桃木属植物

咀嚼物的接受性在所有的狗中均相似。

实施例 10

为了评估香桃木属植物在保持和改善伴侣动物的口腔健康方面的效能,将香桃木属植物的叶以 2.65%的含量包含在咀嚼剂中,并将其饲喂给小种髯狗(17 g 咀嚼物)、獾猎犬(25 g 咀嚼物)和拉布拉多犬(40 g 咀嚼物)。评估了香桃木属植物组合物对口腔健康的影响(与由标准咀嚼物、第二牙科咀嚼物(second dental chew)获得的结果以及与干燥粗磨食物基础膳食相比)。将 32 条健康的成年狗分为 4 组之一,其中有 12 条拉布拉多巡回犬、12 条獾猎犬和 8 条小种髯狗。将动物在加权区(weighted block)内随机分组从而确保品种、性别和近似年龄匹配。

动物成对生活对环境设施齐备的双房舍(environmentally enriched two roomed housing)中,可以 24 小时与外面相通,白天时间可自由进出活动场(exercise paddock)。全部动物健康考虑均到位。该研究由宠物营养伦理评审委员会沃尔瑟姆中心(WALTHAM Centre for Pet Nutrition ethical review committee)依照英国家庭办公室动物法案(科学规程, 1986) (UK Home Office Animals (Scientific Procedures) Act 1986)批准。让狗群处、正常散步并在所有时间内均可饮用淡水。以保持体重所需的能量水平(热量值)按每天一词饲喂动物。

该研究采用了重复测定的四期拉丁方设计(four phase Latin square design)。在这一清洁牙齿模型中,在第 1 天对狗给予牙科除垢和抛光,使狗接受标准的商售干燥粗磨食物膳食和每日刷牙(为时 2 周)(基线期),从而将龈炎降低到基线水平。对龈炎评分,随后通过第二次牙科除垢和抛光来去除任何已累积的牙沉积物,接下来让动物接受为时 5 周的同样的商售干燥粗磨食物基础膳食加测试产品,之后重复对龈炎评分以及测量菌斑和牙垢沉积物。第 1 组(对照动物)仅以基础膳食饲喂;第 2 组除了基础膳食外还接受每日标准牙科咀嚼物;第 3 组每日接受含有 2.65%的香桃木属植物叶的同样牙科咀嚼物,而第 4 组接受不含活性成分的替代性咀嚼剂(替代性咀嚼剂的数据未显示)。

上述第 1 期结束后,将每一组转到下一膳食方案,并在后续每一期

中进行重复测量，直到所有的狗都已经接受了所有的膳食。在 5 周测试周期的开始和结束时，采用经改进的 Logan & Boyce 技术(Logan & Boyce technique, Hennet 等, 2006)来对龈炎、菌斑和牙垢评分进行评估。

使用以下的牙齿来评价口腔健康。

上颌牙(maxilla): I3 (103,203)、C (104,204)、P2 (106,206)、P3 (107,207)、P4 (108,208)和 M1 (109,209)。

下颌牙 (mandible): C (304,404)、P2 (306,406)、P3 (307,407)、P4 (308,408)和 M1 (309、409)。

沿着龈沟处的颊面测定龈炎。将齿龈分为 3 部分(中间、颊部和远端)，并对每一部分进行打分。牙齿评分由 3 部分的平均分算得，总分由所有受评估的牙齿的平均值算得。

标准

- 0 - 无龈炎(粉红色(或有颜色)健康齿龈、无炎症、探测时无出血)
- 1 - 极轻微的龈炎(红色、肿胀但探测时无出血)
- 2 - 轻微龈炎(红色、肿胀且探测时有延迟性出血)
- 3 - 中度龈炎(红色、肿胀且探测时立即出血)
- 4 - 重度龈炎(形成溃疡、自发溢血、探测时大量出血)

通过施用未经稀释的显示溶液(disclosing solution) (赤藓红)并立即以水冲洗，在牙齿的颊面上显示菌斑。按照 Hennet 等(2006)的方法对每颗已评分的牙齿进行齿冠(coronal)和齿龈的菌斑水平的评估。依次对齿冠的两个部分(齿冠和齿龈)进行菌斑覆盖度的评估，并使用厚度评估用染料参比溶液比色板来评估未经覆盖部分上的厚度。将最接近于所显示表面的色调的色调(shade)指定为厚度评分。将齿冠和齿龈部分的评分求和，从而得到总的牙齿评分。所有牙齿评分的平均值是总的口腔评分。

牙垢经空气干燥并使用牙科探头来轻柔地检查覆盖度和厚度的外观。对齿龈给出覆盖度和厚度评分，并将齿龈的覆盖度和厚度评分与牙齿的齿冠面积相乘，从而得到总的牙齿评分，计算口腔的菌斑覆盖度评分。

除了临床口腔健康评估之外，在测试期的第 2 周期间，从每条狗的牙齿上刮取了龈缘上菌斑样品。之后对每条狗进行彻底刷牙，以确保所

有残留的牙沉积物均被去除。

利用一般线性模型(GLM)对响应变量菌斑、龈炎和牙垢进行分析，以检验治疗、期次和顺序的效应。报道了显著性水平并估计了治疗效果。将数据编入 Excel 工作簿并采用专用统计软件程序(Minitab Verion 14)分析。

结果

与基础膳食相比，含有香桃木属植物叶的粉末的牙科咀嚼物显著地($P \leq 0.05$)降低了平均龈炎水平，而标准咀嚼物与基础膳食相比未显示出显著性降低。以含有香桃木属植物的牙科咀嚼物饲喂的狗得到的平均龈炎评分低于 2 周的刷牙后在基线所观察到的平均龈炎评分。

与标准膳食相比，平均菌斑($P \leq 0.1$)和牙垢($P \leq 0.05$)的评分出现下降，但稍高于从接受标准牙科咀嚼物的狗所观测到的评分。

表 2. 3 种膳食程序对口腔健康的临床测定值的影响

膳食	平均龈炎评分 (测试期结束时)	平均龈炎评分(测试 期结束时减基线)	平均菌斑评分	平均牙垢评分
标准膳食	1.31	0.12	9.08	1.12
标准膳食和牙科 咀嚼物	1.24	0.01	8.04	0.72
标准膳食和含香 桃木属植物的牙 科咀嚼物	1.20	-0.01	8.27	0.79

参考文献

Hennet P, Servet E, Salesse H, Soulard Y: Evaluation of the Logan and Boyce Plaque Index for the Study of Dental Plaque Accumulation in Dogs(用于狗的牙菌斑积累研究的洛根和博伊斯菌斑指数). Res Vet Sci, 80, 175-180, 2006.

Pratten, J., Smith, A.W. and Wilson, M. (1998) Response of single species biofilms and microcosm dental plaques to pulsing with chlorhexidine(单一物种生物膜与微管牙菌斑对洗必泰脉冲的响应). J Antimicrob Chem 42, 453-459.

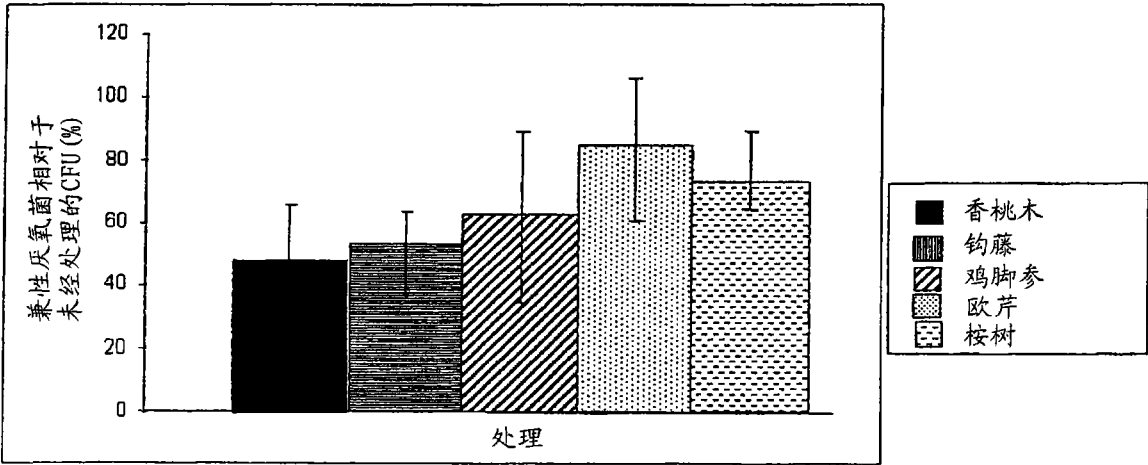


图1

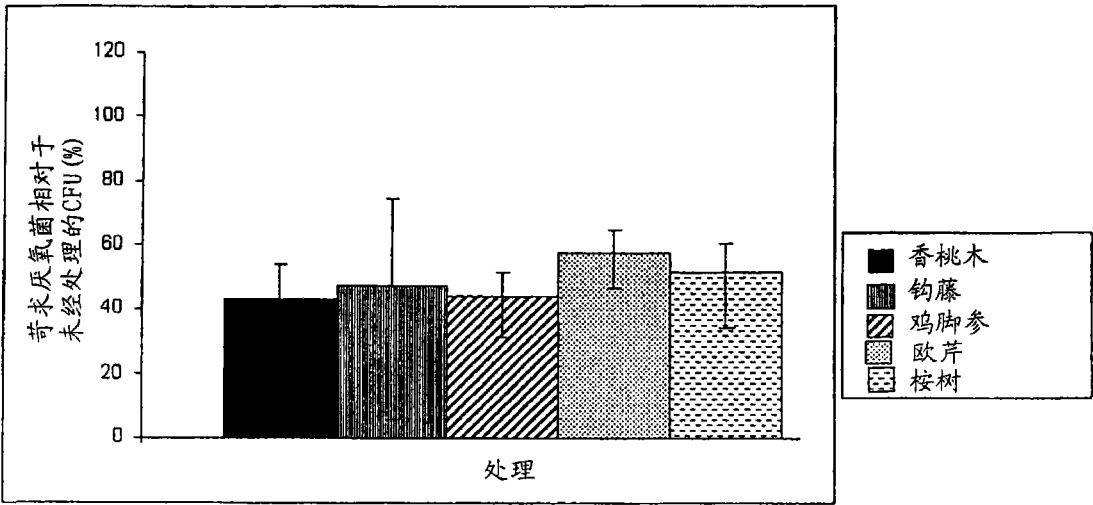


图2

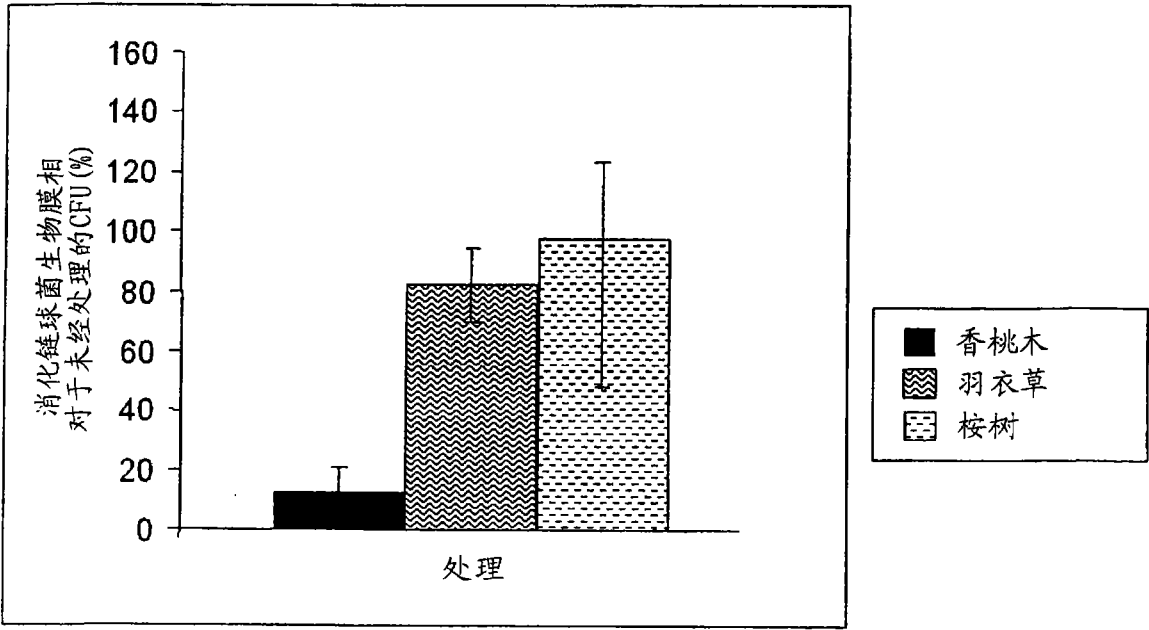


图3