(19)国家知识产权局

(12)发明专利申请

(10)申请公布号 CN 118871077 A
(43)申请公布日 2024.10.29

(21)申请号 202380024420.0
(22)申请日 2023.02.03
(30)优先权数据
2201484.9 2022.02.04 GB
(85)PCT国际申请进入国家阶段日
2024.08.29
(86)PCT国际申请的申请数据
PCT/EP2023/052641 2023.02.03
(87)PCT国际申请的公布数据
WO2023/148307 EN 2023.08.10
(71)申请人 西格丽德治疗公司
地址 瑞典斯德哥尔摩
(72)发明人 珍哈·贝克 托尔·本特松
安娜·约安尼杜
埃里克·约翰斯顿
吉莱纳·莫妮可·妮科尔·罗伯特-尼库
(74)专利代理机构 北京三聚阳光知识产权代理有限公司 11250
专利代理师 邱俊霞
(51)Int.Cl.
A61K 8/02(2006.01)
A61Q 11/00(2006.01)
A61K 8/25(2006.01)

权利要求书1页 说明书22页 附图10页

(54)发明名称

包含多孔二氧化硅颗粒的口腔护理组合物

(57)摘要

本文提供了一种口腔护理组合物,其包含具有在中孔范围内的孔的多孔二氧化硅颗粒,其中在所述中孔范围内的所述孔的平均孔径为约7.0至约25.0nm。

CN 118871077 A

1.一种口腔护理组合物,其包含具有在中孔范围内的孔的多孔二氧化硅颗粒,其中在所述中孔范围内的所述孔的平均孔径为约7.0至约25.0nm。

2.根据权利要求1所述的组合物,其中所述口腔护理组合物是洁齿剂。

3.根据权利要求1所述的组合物,其中所述组合物是牙膏、牙粉或漱口水。

4.根据权利要求1至3中任一项所述的组合物,其中所述组合物基本上不含表面活性剂。

5.根据权利要求1至4中任一项所述的组合物,其中在所述中孔范围内的所述孔的所述平均孔径为约7.0至约22.0nm。

6.根据权利要求1至5中任一项所述的组合物,其中在所述中孔范围内的所述孔的所述平均孔径为约7.0至约20.0nm。

7.根据权利要求1至6中任一项所述的组合物,其中在所述中孔范围内的所述孔的所述平均孔径为约8.0至约13.0nm。

8.根据权利要求1至7中任一项所述的组合物,其中按体积计至少约40%的所述孔在所述中孔范围内。

9.根据权利要求1至8中任一项所述的组合物,其中所述二氧化硅颗粒具有至少约200m^2/g的BET表面积。

10.根据权利要求1至9中任一项所述的组合物,其中所述二氧化硅颗粒具有约0.1至约20.0μm的平均粒径。

11.根据权利要求1至10中任一项所述的组合物,其中所述二氧化硅颗粒具有约1.0至约5.0μm的平均粒径。

12.根据权利要求1至11中任一项所述的组合物,其中所述二氧化硅颗粒具有约0.7至约1.3cm^3/g的总孔体积。

13.根据权利要求1至12中任一项所述的口腔护理组合物在以下方面的用途:

预防龋齿、牙菌斑的积聚、牙龈疾病、牙周炎和/或牙齿缺失;或者

治疗或预防口腔感染。

14.根据权利要求1至12中任一项所述的口腔护理组合物,其用于:

预防龋齿、牙菌斑的积聚、牙龈疾病、牙周炎和/或牙齿缺失;或者

治疗或预防口腔感染。

15.一种方法,其在有此需要的受试者中:

预防龋齿、牙菌斑的积聚、牙龈疾病、牙周炎和/或牙齿缺失;或者

治疗或预防口腔感染,

所述方法包括使用有效量的根据权利要求1至12中任一项所述的口腔护理组合物的步骤。

16.根据权利要求1至12中任一项所述的组合物作为口腔护理产品的用途。

17.根据权利要求1至12中任一项所述的组合物在清洁口腔的方法中的用途。

包含多孔二氧化硅颗粒的口腔护理组合物

技术领域

[0001] 本发明涉及含有二氧化硅的口腔护理组合物。具体地,本发明涉及包含多孔二氧化硅颗粒的口腔护理组合物,该组合物可用于预防牙齿腐烂和龋齿的形成。

[0002] 发明背景

[0003] 本说明书中对任何先前公开的文献的列举或论述不必应视为承认该文献是现有技术的一部分或者是公知常识。

[0004] 当牙齿的牙釉质受损时,就会发生牙齿(牙齿的)腐烂或龋齿的发展,从而导致牙齿内的病变,进而发展成蛀牙。由此产生的蛀牙的感染可能会导致并发症,包括牙齿周围组织的炎症、牙齿缺失、感染和脓肿形成。

[0005] 龋齿的发展可能有多种原因。具体地,当口中的细菌代谢糖以产生使牙齿的硬组织(牙釉质和牙本质)脱矿质的酸时,它们就可能会发展。这些糖可以作为食物消耗的直接结果而存在于口中,或者可以原位产生,诸如通过唾液淀粉酶将淀粉分解成糖(例如麦芽糖)的作用。然后,细菌参与这些糖的发酵以产生酸(例如乳酸),其进而对牙齿牙釉质造成损害。

[0006] 减少龋齿的形成通常是通过改善口腔卫生来实现的,其目的是从口中去除食物材料,并且由此去除淀粉和糖的来源,并减少口腔细菌的数量,从而减少通过发酵产生的酸。用牙膏产品刷洗牙齿通常是为了去除食物,尽管也可能产生一些抗菌作用。细菌数量的减少也可以通过使用漱口水产品来实现,诸如含有抗菌剂和/或变性剂(例如酒精)的那些漱口水产品。

[0007] 牙膏通常以糊剂或凝胶的形式提供,并且通常含有一种或多种研磨剂,以允许从牙齿的表面去除食物材料和牙菌斑。此类产品中可以包括其他试剂,以增强牙齿的牙釉质(例如氟化物)、改善气味、改变产品的外观(例如着色剂)和防治口臭。

[0008] 牙膏产品中常用的研磨剂包括氢氧化铝($Al(OH)_3$)、碳酸钙($CaCO_3$)、各种磷酸氢钙、羟基磷灰石($Ca_5(PO_4)_3OH$)和二氧化硅材料(SiO_2)的颗粒,通常为其固体颗粒的形式。

[0009] 多孔二氧化硅颗粒已经用于许多医疗保健应用中,诸如用于提供用于药物装载和治疗剂递送的介质。它们具有热稳定性和化学稳定性,并且仅由纯二氧化硅组成。

[0010] 这些二氧化硅颗粒可以拥有具有可控孔尺寸的有序孔隙率,这使得它们具有高表面积和大的总孔体积。这些特性,尤其是诸如稳定性和生物相容性,使它们特别适合于生物医学应用(参见,例如,Wang,Y.等人,Nanomedicine Nanotechnology,Biol.Med.11,313-327(2015))。此外,类似的材料此前已被批准作为食品添加剂(欧洲化学品合成无定形二氧化硅生态毒理学和毒理学中心(CAS号7631-86-9),JACC第51号,第14页(ECETOC,2006))。

[0011] WO 2014/072363讨论了具有在中孔范围内的孔的特定平均孔径的高度结构化的多孔二氧化硅材料在治疗诸如肥胖症和血脂异常的病症中的用途。它没有提供任何关于口腔卫生或预防或减少龋齿的教导。

具体实施方式

[0012] 我们现已发现,具有在中孔范围内的孔的特定平均孔径的某些多孔二氧化硅材料能够在体内有效地充当某些生物分子的分子筛,并且因此具有使它们可用于口腔护理的特性,诸如用于预防或减少龋齿的形成。

[0013] 具体地,根据本发明的多孔二氧化硅颗粒被设计为具有如本文所述的某些理化特性,从而允许与上述应用相关的显著生物效应。已经出乎意料地发现,控制某些颗粒特性(诸如平均孔径)可以提供这些生物效应,诸如通过允许唾液淀粉酶在口中的吸收,这进而可能导致对口腔(例如牙齿)健康有害的致龋细菌产生的酸减少。

[0014] 口腔护理组合物

[0015] 在本发明的第一方面,提供了一种口腔护理组合物,其包含具有在中孔范围内的孔的多孔二氧化硅颗粒,其中在中孔范围内的孔的平均孔径为约7.0至约25.0nm。

[0016] 为了避免疑义,如在本发明的第一方面(包括其所有实施例和特征)中定义的二氧化硅颗粒也可称为“本发明(或本发明的第一方面)的二氧化硅(或二氧化硅材料或二氧化硅颗粒)”等。类似地,如在本发明的第一方面(包括其所有实施例和特征)中定义的组合物也可称为“本发明(或本发明的第一方面)的组合物”等。

[0017] 除非另有说明,否则本文使用的所有技术和科学术语将具有本发明所属领域的普通技术人员所理解的共同含义。

[0018] 当在本文中关于特定值(诸如量)使用时,术语“约”(或类似术语,诸如“大约”)将被理解为指示此类值可以在所定义值的至多10%(具体地,至多5%,诸如至多4%、3%、2%或1%)内变化。设想到在每种情况下此类术语可以用符号“±10%”等替代(或者通过指示基于相关值计算的具体量的方差)。还设想到在每种情况下此类术语可以被删除。

[0019] 为了避免疑义,技术人员将理解,在某个特征的百分比被定义为属于不同(即非重叠)组的情况下,这些百分比的总和不能超过100%。类似地,在这些特征可能属于其他非指定组的情况下,不要求指定特征的总和等于100%。

[0020] 技术人员将理解,如在本发明的第一方面的组合物中提供的多孔二氧化硅颗粒可称为其多个,该多个可称为多孔二氧化硅材料。

[0021] 技术人员将理解,本发明的第一方面的口腔护理组合物包括适合于清洁(例如通过用于刷洗、抛光、漂洗和/或冲洗)口腔表面的一般类型的组合物。

[0022] 因此,技术人员将理解,出于本发明的目的,对口腔护理组合物的提及可以包括对呈糊剂、粉末、液体、口香糖、精华液形式的组合物或呈适合于清洁(例如通过刷洗、抛光、漂洗、冲洗等)牙齿和/或口腔中的其他表面的形式的其他制剂的提及。

[0023] 在具体实施例中,本发明的第一方面的口腔护理组合物可以以洁齿剂(其可以是半固体形式,例如糊剂、粉末或凝胶)或液体的形式递送。

[0024] 具体地,技术人员将理解,对洁齿剂的提及将包括对呈可挤出半固体形式的组合物,诸如糊剂(即牙膏)和凝胶的提及,以及对粉末(即牙粉)的提及,包括松散和压缩(例如松散)粉末,该组合物可适用于牙齿的刷洗和/或抛光(例如刷洗)(例如使用合适的牙齿清洁工具,诸如牙刷)。因此,术语洁齿剂可以表示如上所述的用于清洁口腔(的表面)的口腔组合物。

[0025] 技术人员还将理解,对凝胶的提及可以指具有液体的物理特性但基本上零流动的

物质。

[0026] 在具体实施例中,口腔护理组合物可以呈洁齿剂的形式,诸如牙膏或牙粉(例如牙膏),这些术语是本领域技术人员已知的。

[0027] 在此类实施例中,根据此类产品的使用者的典型理解,洁齿剂可以被称为用于口腔表面(例如牙齿)的刷洗和/或抛光(例如刷洗),诸如与合适的清洁工具(例如牙刷)结合。

[0028] 在具体实施例中,洁齿剂可以呈糊剂的形式,即牙膏(或类似地,凝胶),如本领域技术人员已知的。在此类实施例中,除了如本文所述的多孔二氧化硅颗粒之外,组合物还可以包含通常为形成此类组合物而提供的一种或多种附加组分,其将包括如本文所述的那些。

[0029] 因此,在具体实施例中,对口腔护理组合物的提及可以用对牙膏的提及来代替,该术语技术人员将理解为是指与合适的牙齿清洁工具诸如牙刷一起使用的组合物(例如用于通过与此类组合物组合刷洗来清洁牙齿,诸如持续约一至两分钟的时间)。

[0030] 在进一步的实施例中,组合物可以呈液体的形式,在这种情况下,组合物可以呈漱口水(或口/牙齿冲洗液)的形式。在此类实施例中,除了如本文所述的多孔二氧化硅颗粒之外,组合物还可以包含通常为形成此类组合物而提供的一种或多种附加组分,包括如本文所述的那些。

[0031] 因此,在具体实施例中,对口腔护理组合物的提及可以用对漱口水(或口冲洗液等)的提及来代替,该术语技术人员将理解为是指用于冲洗和/或漂洗(例如冲洗)口腔(例如牙齿的表面)的组合物,诸如通过将组合物保持在口中一段时间(例如约一分钟),并且然后将组合物从口中排出(吐出)。

[0032] 因此,本发明的具体实施例提供了一种包含本发明的二氧化硅的漱口水。

[0033] 在进一步的实施例中,组合物可以呈凝胶的形式,其可以适合于如本文关于洁齿剂和/或漱口水所述的用途。对凝胶的提及可以包括糊剂、摩丝、霜剂等。

[0034] 本领域技术人员应当理解,此类组合物通常不是为了治疗剂的全身施用的目的而有意吞咽,而是施加至口腔,并且然后经由口从身体排出(例如吐出)。因此,如本文所述的组合物可以被称为非全身性的、局部的(因为其涉及口腔,例如口腔局部的)、不用于吞咽、不用于消耗等。当与清洁工具诸如牙刷结合使用时,此类组合物可以以需要施加至牙刷的刷毛上然后刷洗口腔的可触及表面(例如牙齿的可触及表面)的方式使用。

[0035] 为了避免疑义,使用漱口水和如本文所述的其他产品(诸如糊剂、凝胶、摩丝、霜剂等)之后,可能会或可能不会冲洗口腔。

[0036] 如本文所讨论的,口腔护理组合物可以包含通常存在于相关类型的组合物中的附加组分,这些组分是本领域技术人员已知的。

[0037] 例如,在口腔护理组合物以牙膏形式提供的情况下,口腔护理组合物可以进一步包含包括以下的组分:

[0038] 结构剂,诸如粘合剂和增稠剂,该结构剂可以以基于组合物的总重量的按重量计约0.1至1.0wt%的量存在。可以提及的合适的粘合剂或增稠剂包括羧基乙烯基聚合物(诸如与聚烯丙基蔗糖或聚烯丙基季戊四醇交联的聚丙烯酸)、羟乙基纤维素、羟丙基纤维素、天然树胶(诸如角叉菜胶、刺梧桐树胶、瓜尔胶、黄原胶、阿拉伯树胶和黄蓍胶)。也可以提及基于天然树胶的增稠剂,特别是角叉菜胶;

[0039] 水性连续相诸如可以由水和多元醇(以各种相对量)的混合物形成,其中水的量通常在基于组合物的总重量的约10至约60wt%(例如约40%)的范围内,并且多元醇的量通常在组合物的总重量的约5至约70wt%(例如约30%)的范围内。可以提及的多元醇包括湿润剂,诸如甘油、山梨糖醇、聚乙二醇、聚丙二醇、丙二醇、木糖醇(和其他可食用多元醇)、氢化的部分水解的多糖及其混合物。可以提及的更具体的多元醇包括甘油和山梨糖醇,诸如山梨糖醇。在某些实施例中,水和/或多元醇的量通常为基于组合物的总重量的按水和/或多元醇的总重量计至少约10wt%,诸如至少约30wt%,例如至少约50wt%。在此类实施例中,水和/或多元醇可以小于总组合物的约90wt%,诸如小于约85wt%;

[0040] 研磨材料,该材料可以以基于洁齿剂的总重量的约0.5至约75.0wt%,诸如约3.0至约60wt%的量存在。可以提及的具体研磨材料(即研磨清洁剂)包括二氧化硅干凝胶、水凝胶和气凝胶以及沉淀微粒二氧化硅(除了本发明的第一方面中所需的多孔二氧化硅材料之外,还存在这些二氧化硅)、碳酸钙、磷酸二钙、磷酸三钙、煅烧氧化铝、偏磷酸钠和偏磷酸钾、焦磷酸钠和焦磷酸钾、三偏磷酸钠、六偏磷酸钠、微粒羟基磷灰石及其混合物。为了避免疑义,技术人员将理解,本发明的第一方面的基本二氧化硅组分也可用作研磨剂;

[0041] 增稠剂和/或胶凝剂(在每种情况下,无机的、天然的或合成的),这些试剂可以以总组合物的约0.1至约15.0wt%的量存在。技术人员将理解,将选择增稠剂的量(和比例)以形成可挤出的形状保持产品,该产品可以从管挤出到牙刷上并且不会落在牙刷的刷毛之间,而是,将基本上保持其在牙刷上的形状。可以提及的具体增稠剂和胶凝剂包括细碎二氧化硅(除了本发明的第一方面中所需的多孔二氧化硅材料之外,还存在这些二氧化硅)、锂蒙脱石、碳酸钙、胶体硅酸镁铝和它们的混合物和/或树胶诸如爱尔兰苔藓、ι-角叉菜胶、黄蓍胶和聚乙烯吡咯烷酮。为了避免疑义,技术人员将理解,本发明的第一方面的基本二氧化硅组分也可以用作增稠剂;

[0042] 金属离子,诸如锡或锌(例如锌)。可以提及的具体金属离子包括锌离子,为氯化锌、乙酸锌、葡萄糖酸锌、硫酸锌、氟化锌、柠檬酸锌、乳酸锌、氧化锌、单甘油酸锌、酒石酸锌、焦磷酸锌、马来酸锌及其混合物;

[0043] 氟化物来源。可以提及的具体氟化物来源包括氟化钠、氟化亚锡、单氟磷酸钠、氟化锌铵、氟化锡铵、氟化钙、氟化钴铵及其混合物;以及

[0044] 本领域常规的其他任选成分,诸如:抗微生物剂,诸如氯己定、血根碱提取物、甲硝唑、季铵化合物(例如氯化十六烷基吡啶);双胍(例如氯己定二葡糖酸盐、海克替啶、奥替尼啶和阿来西定)和卤代双酚化合物(例如2,2'亚甲基双-(4-氯-6-溴苯酚));抗炎剂,诸如布洛芬、氟比洛芬、阿司匹林和吲哚美辛;抗龋剂,诸如氟化钠和氟化亚锡、氟化胺、单氟磷酸钠、三偏钠磷酸盐和酪蛋白;牙菌斑缓冲剂,诸如尿素、乳酸钙、甘油磷酸钙和聚丙烯酸锶;维生素,诸如维生素A、C和E;植物提取物;植物源抗氧化剂,诸如类黄酮、儿茶素、多酚和单宁化合物及其混合物;脱敏剂,诸如柠檬酸钾、氯化钾、酒石酸钾、碳酸氢钾、草酸钾、硝酸钾和锶盐;抗牙垢剂,诸如碱金属焦磷酸盐、含次磷酸盐的聚合物、有机膦酸盐和磷酸柠檬酸盐;生物分子,诸如细菌素、抗体和酶;调味剂,诸如薄荷油和留兰香油;蛋白质材料,诸如胶原蛋白;防腐剂;遮光剂;氨基酸,诸如精氨酸;着色剂;甜味剂;药学上可接受的载体,诸如淀粉、蔗糖(除了上面提到的水或水/醇系统之外);pH调节剂,包括缓冲口腔护理组合物的pH和离子强度的缓冲剂和盐;漂白剂,诸如过氧化合物(例如过氧二磷酸钾)、泡腾系统,诸

如碳酸氢钠/柠檬酸系统;以及变色系统。

[0045] 类似地,在口腔护理组合物以液体形式(例如漱口水)提供的情况下,口腔护理组合物可以进一步包含包括水、润肤剂(例如甘油)、甜味剂(例如木糖醇)、防腐剂(例如苯甲酸钠)和/或氟化钠的组分。

[0046] 技术人员还将理解,此类漱口水配制品可以包含在情况下可能需要的其他成分,诸如抗菌剂(例如酒精)、着色剂和/或调味剂(例如薄荷醇)。

[0047] 不希望受理论的束缚,据认为表面活性剂(诸如口腔护理组合物(例如牙膏)中常用的那些)的存在可以抑制或降低二氧化硅颗粒的作用,并因此降低组合物的有益效果。

[0048] 因此,在具体实施例中,口腔护理组合物(例如洁齿剂,诸如牙膏或漱口水)基本上不含表面活性剂。

[0049] 可以提及的具体表面活性剂包括:

[0050] 阴离子表面活性剂,诸如月桂基硫酸钠;

[0051] 两性离子(零净电荷)表面活性剂,例如椰油酰胺丙基甜菜碱;以及

[0052] 非离子表面活性剂,诸如聚乙氧基化脂肪酸脱水山梨糖醇酯(例如聚山梨醇酯80)、乙氧基化脂肪酸、聚乙二醇酯、脂肪酸乙氧基化物、甘油单酯和甘油二酯、以及环氧乙烷/环氧丙烷嵌段聚合物、以及脂肪醇的聚乙二醇醚,特别是每单元具有2至200个(例如20至40个)环氧乙烷基团的聚乙二醇醚,诸如聚氧乙烯(2-100,例如4)月桂基醚,和"硬脂醇聚醚"表面活性剂,诸如硬脂醇聚醚30。

[0053] 如本文所用,技术人员将理解,提及基本上不含表面活性剂可以指分类为表面活性剂的组分(诸如本文提及的那些)以等于或低于总组合物的约0.5wt%的浓度存在,诸如等于或低于总组合物的约0.4wt%、0.3wt%、0.02wt%或特别是0.1wt%(例如等于或低于总组合物的约0.09wt%、0.08wt%、0.07wt%、0.06wt%或0.05wt%,特别是低于总组合物的约0.04wt%、0.03wt%、0.02wt%或0.01wt%)。

[0054] 在具体实施例中,技术人员将理解,提及基本上不含表面活性剂可以指不存在(即不存在可检测水平的)分类为表面活性剂的组分,这可以表明此类组合物的制备不涉及添加任何此类组分。

[0055] 如本文所用,基本上不含某种组分可以通过分别说明该组合物"不含显著浓度的"或"不含"该组分来表示。

[0056] 技术人员还应当理解,可以存在的表面活性剂的最大量可以根据表面活性剂组分的性质而变化,其中使用常规技术测定此类水平。

[0057] 例如:

[0058] 关于阴离子表面活性剂诸如月桂基硫酸钠,表面活性剂可以以等于或低于约0.05wt%(例如低于约0.04wt%、0.03wt%、0.02wt%或特别是0.01wt%)的水平存在,或者可以就其不存在而言;

[0059] 关于两性离子(零净电荷)表面活性剂,诸如椰油酰胺丙基甜菜碱,表面活性剂可以以等于或低于约0.05wt%的水平存在;

[0060] 非离子表面活性剂,例如聚乙氧基化脂肪酸脱水山梨糖醇酯(例如聚山梨醇酯80),表面活性剂可以以等于或低于约0.1(或特别是0.05)wt%的水平存在,或者可以就其不存在而言。

[0061] 在具体实施例中,当提及特定表面活性剂的量时,组合物将基本上不含其他表面活性剂。

[0062] 技术人员将理解,口腔护理组合物可以以其各种组分的混合物的形式提供。具体地,技术人员将理解,此类混合物可以包含液相(或凝胶)和固相(例如作为固体颗粒)两者中的组分,在这种情况下,在使用中,固体组分可以基本上均匀地分布在液体(或凝胶)组分中,在液体组合物的情况下可能需要在使用前搅拌(例如摇动)组合物。

[0063] 为了避免疑义,在液体组合物(例如漱口水)的情况下,二氧化硅颗粒可能与液体组合物是异质的,导致颗粒在储存期间沉降。因此,组合物的使用可能需要在使用前混合(例如通过将其摇动和/或倒置)。

[0064] 为了避免疑义,技术人员将理解,本文中提及的形成组合物的一部分的颗粒可以仅包括被认为是形成组合物的一部分的合适尺寸的颗粒(即能够用作组合物的组分的颗粒)。

[0065] 技术人员将能够确定本发明的组合物中所需的本发明的二氧化硅的量,以提供如本文所述的效果,该量可取决于所用组合物的类型。

[0066] 在具体实施例中,本发明的二氧化硅可以以约0.1wt%至约20.0wt%的量存在于本发明的组合物中。

[0067] 例如,本发明的二氧化硅可以以约0.5wt%(例如约0.44wt%)的量存在于本发明的组合物中。

[0068] 如本文所用,术语"基本上由……组成"可以表示相关组合物由按重量计至少90%(例如按重量计至少95%,诸如按重量计至少99%或特别是至少99.9%)的相关物质组成。

[0069] 在本发明的第一方面的某些实施例中,诸如其中组合物呈牙科粉末的形式,组合物由(或基本上由)如本文所定义的多孔二氧化硅颗粒(即多个此类颗粒)组成。

[0070] 在本发明的第一方面的替代实施例中,组合物的多孔二氧化硅颗粒含量(或者可替代地,二氧化硅颗粒含量)由(或基本上由)如本文所定义的二氧化硅颗粒组成(即使得可以存在除多孔二氧化硅材料之外的组分)。

[0071] 技术人员将理解,本发明的二氧化硅的特性可以使得不需要使用其他酶抑制/变性和/或吸附材料/物质(即本发明的组合物可以产生如本文所述的效果,而不需要此类试剂的存在)。

[0072] 在本发明的第一方面的具体实施例中,组合物包含多孔二氧化硅材料(如本发明的第一方面中所定义)作为仅有(即唯一)能够吸附酶的成分。

[0073] 因此,在本发明的第一方面的进一步实施例中,组合物基本上不含其他酶吸附成分。

[0074] 当与其他酶吸附成分相关地使用时,术语基本上不含是指基本材料(例如所提及的组合物)不包含显著(即临床上显著)量的所提及的其他材料(例如其他治疗活性成分),这可以表明存在按重量计小于10%(例如小于5%,诸如小于2%、小于1%、小于0.5%或特别是小于0.1%、小于0.01%或小于0.001%)的其他材料,或者更具体地,不存在可检测量的其他材料。

[0075] 多孔二氧化硅颗粒

[0076] 技术人员将理解,本文提及的具有一定尺寸的孔将是指相关孔的平均直径(即考

虑其尺寸,每个单独的孔的平均直径)。为了避免疑义,技术人员将理解,对平均孔径的提及可以具体指地每个孔的开口的平均尺寸(或者,在孔的情况下,其通道在内部横穿颗粒的主体,指孔的所有开口的平均尺寸),其可以被称为孔窗口(或孔的窗口)。

[0077] 为了避免疑义,除非另有说明,否则本文提及的平均值将计算为中值平均值。。

[0078] 除非另有说明,否则如本文所述的孔径通过氮吸附测量并使用密度泛函理论(DFT)方法计算(参见,例如,Landers,J.等人,Colloids and Surfaces A:Physicochem.Engineering Aspects,437,3-32(2013)中所述的方法)。因此,除非另有说明,否则本文提及的平均孔径将是指通过氮吸附测量并使用密度泛函理论(DFT)计算的孔径。

[0079] 可替代地,孔径可以通过氮吸附测量并使用Barrett-Joyner-Halenda(BJH)模型计算(参见Barrett,E.P.;Joyner,L.S.;和Halenda,P.P.,J.Am.Chem.Soc.73,373-380(1951)),本文中以这种方式计算的任何孔径测量值均如此表示。

[0080] 技术人员将理解,对存在于具体范围内的孔的百分比的提及可以理解为对此类颗粒的孔径分布(PSD)的提及。因此,对存在于具体范围内的孔的百分比的提及将是指存在于每个范围内的孔的组合体积占相关孔组(例如中孔范围内的孔)的总孔体积的百分比。

[0081] 为了避免疑义,对具有具体平均孔径的颗粒的提及在某些情况下可以包括对与具有此类平均孔径的颗粒在功能上等同(例如当以本文描述的方式使用时)的孔的提及。

[0082] 技术人员将理解,二氧化硅材料的孔径分布可以使用DFT孔径分布曲线来测量,这是本领域技术人员充分理解的技术(参见,例如,Olivier,J.P.、Conklin,W.B.和Szombathely,M.V.,Studies in Surface Science and Catalysis,87,81-89(1994))。由DFT累积孔径分布曲线计算孔的百分比。

[0083] 技术人员将理解,对具有在中孔范围内的孔的多孔二氧化硅颗粒的提及将采用其在本领域中的通常含义,即是指具有(或含有/包含)直径在2至50nm范围内的孔的多孔二氧化硅颗粒,这些材料可以被称为是中孔的并且孔可以被称为中孔。

[0084] 为了避免疑义,技术人员将理解,在本发明的第一方面中提及的多孔二氧化硅材料还可以具有(即进一步含有/包含)直径在中孔范围之外的孔,诸如通过具有微孔(即直径小于2nm的孔)和/或大孔(即直径大于50nm的孔)。

[0085] 为了避免疑义,除非另有说明,否则如本文所用的孔的百分比的提及将是指按体积计的百分比。

[0086] 在具体实施例中,本发明的二氧化硅材料中存在的至少约40%(即,按体积计40%)的孔在中孔范围内。

[0087] 在更具体的实施例中,本发明的二氧化硅材料中存在的至少约50%、诸如至少约60%、特别是至少约70%的孔在中孔范围内。

[0088] 技术人员将理解,关于给定范围内的孔,还可以计算平均(即中值平均)孔径。如本文所述,此类平均孔径可以通过氮吸附技术测量并使用密度泛函理论(DFT)计算,这对于本领域技术人员来说是熟知的(参见:Olivier,J.P.、Conklin,W.B.和Szombathely,M.V.,Studies in Surface Science and Catalysis,87,81-89(1994);Landers,J.等人,Colloids and Surfaces A:Physicochem.Eng.Aspects,437,3-32(2013))。因此,除非另有说明,否则本文提及的平均孔径将是指通过氮吸附测量并使用DFT计算的平均孔径。

[0089] 在具体实施例中,在中孔范围内的孔的平均孔径为约7.0至约22.0nm。

[0090] 在更具体的实施例中,在中孔范围内的孔的平均孔径为约7.0至约21.0nm。

[0091] 在又更具体的实施例中,在中孔范围内的孔的平均孔径为约7.0至约20.0nm。

[0092] 例如,在某些实施例中,在中孔范围内的孔的平均孔径为:

[0093] 约7.0至约19.0nm;

[0094] 约7.0至约18.0nm;

[0095] 约7.0至约17.0nm;

[0096] 约7.0至约16.0nm;

[0097] 约7.0至约15.0nm;

[0098] 约7.0至约14.0nm;

[0099] 约7.0至约13.0nm;或者

[0100] 约7.0至约12.0nm。

[0101] 在某些实施例中,在中孔范围内的孔的平均孔径为约8.0至约13.0nm。

[0102] 在更具体的实施例中,在中孔范围内的孔的平均孔径为约8.0至约12.0nm。

[0103] 在更具体的实施例中,在中孔范围内的孔的平均孔径为约8.0至约11.0nm。

[0104] 在替代实施例中,在中孔范围内的孔的平均孔径为约9.0至约11.0nm。

[0105] 在又更具体的实施例中,在中孔范围内的孔的平均孔径为约9.2至约11.0nm。

[0106] 在又更具体的实施例中,在中孔范围内的孔的平均孔径为约9.4至约10.8nm。

[0107] 在又更具体的实施例中,在中孔范围内的孔的平均孔径为约9.5至约10.7nm。

[0108] 在又更具体的实施例中,在中孔范围内的孔的平均孔径为约9.6至约10.7nm。

[0109] 在又更具体的实施例中,在中孔范围内的孔的平均孔径为约9.5至约10.6nm。

[0110] 在最具体的实施例中,在中孔范围内的孔的平均孔径为约9.6至约10.6nm。

[0111] 技术人员将理解,除了提及如本文所述的(中值)平均孔径之外,本发明的二氧化硅材料还可以通过提及孔径分布(诸如中孔范围内的孔的孔径分布)来定义。

[0112] 在本发明的第一方面的具体实施例中,至少21%(诸如至少22%、至少23%、至少24%、至少25%、至少26%、至少27%、至少28%或至少29%)的中孔范围(按体积计)内的孔具有在平均孔径的指定范围(即指定的平均孔径范围)内的直径。

[0113] 在本发明的第一方面的更具体的实施例中,至少约30%的中孔范围内的孔具有在平均孔径范围内的直径。

[0114] 在本发明的第一方面的又更具体的实施例中,至少约35%(诸如至少40%或至少45%)的中孔范围内的孔具有在平均孔径范围内的直径。

[0115] 在本发明的第一方面的还更具体的实施例中,至少约50%(诸如至少55%、至少60%、至少约65%、至少约70%或特别是至少约72%)的中孔范围内的孔具有在平均孔径范围内的直径(即如本文所定义的针对中孔范围内的孔的平均孔径给出的范围)。

[0116] 例如,在某些实施例中,至少约50%(诸如至少55%、至少60%、至少约65%、至少约70%或特别是至少约72%)的中孔范围内的孔具有在约7.0至约25.0nm范围内的直径。

[0117] 在某些实施例中,至多约100%(或至多约99%、约95%或约90%)的中孔范围内的孔具有在平均孔径范围(即如本文所指定的平均孔径范围)内的直径。

[0118] 在某些实施例中,约21%至约100%(或特别是约25%至约99%或100%)的中孔范

围内的孔具有在平均孔径范围内的直径。

[0119] 在本发明的第一方面的又更具体的实施例中,至少约30%(例如约30%至约99%或100%)的中孔范围内的孔具有在平均孔径范围内的直径。

[0120] 在本发明的第一方面的又更具体的实施例中,至少约35%(例如约35%至约99%)的中孔范围内的孔具有在平均孔径范围内的直径。

[0121] 在本发明的第一方面的又更具体的实施例中,约40%至约90%(或至约99%或100%)的中孔范围内的孔具有在平均孔径范围内的直径。

[0122] 在本发明的第一方面的某些实施例中,约50%至约90%(或至约99%或100%)的中孔范围内的孔具有在平均孔径范围内的直径。

[0123] 在本发明的第一方面的某些实施例中,约55%至约90%(或至约99%或100%)的中孔范围内的孔具有在平均孔径范围内的直径。

[0124] 在本发明的第一方面的某些实施例中,约60%至约90%(或至约99%或100%)的中孔范围内的孔具有在平均孔径范围内的直径。

[0125] 例如,在具体实施例(即本发明的第一方面的具体实施例)中,二氧化硅颗粒的至少约25%(例如约25%至约99%,诸如约50%至约99%或100%)的孔是尺寸在约7.0至约25.0nm(诸如约7.0至约18.0nm,或约7.0至约13.0nm)范围内的中孔。

[0126] 类似地,在具体实施例中,二氧化硅颗粒的至少约50%(例如约50%至约99%,诸如约50%至约90%)的孔是尺寸在约7.0至约25.0nm(诸如约7.0至约18.0nm,或约7.0至约13.0nm)范围内的中孔。

[0127] 在具体实施例(即本发明的第一方面的具体实施例)中,二氧化硅颗粒的至少约50%(例如约50%至约99%)的孔是尺寸在约9.0至约12.0nm范围内的中孔。

[0128] 在进一步的实施例中,二氧化硅颗粒的至少约25%(例如至少约50%、约60%或约70%)的孔是尺寸在约9.0至约10.2nm范围内的中孔。

[0129] 在进一步的实施例中,二氧化硅颗粒的至少约25%(例如至少约50%、约55%、约60%、约65%或约70%)的孔是尺寸在约9.0至约11.0nm范围内的中孔。

[0130] 在更具体的实施例中,二氧化硅颗粒的至少约25%(例如约25%至约99%)的孔是尺寸在约9.0至约11.0nm范围内的中孔。

[0131] 在又一个更具体的实施例中,二氧化硅颗粒的至少约25%(例如约25%至约99%)的孔是尺寸在约9.0至约10.2nm范围内的中孔。

[0132] 技术人员将理解,对具有在中孔范围内的孔的多孔二氧化硅颗粒的提及将必然要求此类颗粒是多孔的,这将包括以多孔方式表现的颗粒。因此,多孔二氧化硅颗粒将是指具有显著程度的孔隙率的颗粒,其在某些实施例中可以通过提及诸如颗粒的孔体积和/或表面积的特征来定义,诸如通过提及如本文所定义的那些参数来定义(此处所描述的特征可以与此处所描述的其他特征一样单独地或组合地使用)。

[0133] 技术人员还将理解,每个颗粒中的孔的总体积可能影响颗粒的表面积。因此,具有更大孔体积的颗粒的制备可以允许更大的颗粒表面积,并且可以根据更大的颗粒表面积来定义。

[0134] 技术人员将理解,颗粒(或颗粒样品)的表面积可以使用Brunauer Emmett Teller(BET)理论来计算,该理论是本领域技术人员熟知的技术(参见,例如,Brunauer,S.、

Emmett,P.H.和Teller,E.,J.Am.Chem.Soc.,60(2),309-319(1938))。

[0135] 在具体实施例中,二氧化硅颗粒具有至少约150m^2/g的BET表面积。

[0136] 在更具体的实施例中,二氧化硅颗粒具有至少约200m^2/g的BET表面积。

[0137] 在又一个更具体的实施例中,二氧化硅颗粒具有至少约300m^2/g(诸如至少约350m^2/g)的BET表面积。

[0138] 在还更具体的实施例中,二氧化硅颗粒具有至少约400m^2/g(诸如至少约450m^2/g)的BET表面积。

[0139] 在具体实施例中,二氧化硅颗粒具有至少约500m^2/g的BET表面积。

[0140] 在具体实施例中,BET表面积为至多约1500m^2/g(诸如至多约1200m^2/g或1000m^2/g)。

[0141] 例如,在具体实施例中,二氧化硅颗粒具有约200至约1500m^2/g的BET表面积。

[0142] 在进一步的实施例中,二氧化硅颗粒具有约500至约1200m^2/g的BET表面积。

[0143] 在又一个更具体的实施例中,二氧化硅颗粒具有约600至约1200m^2/g的BET表面积。

[0144] 在替代实施例中,二氧化硅颗粒具有约600至约1000m^2/g的BET表面积。

[0145] 在进一步的替代实施例中,二氧化硅颗粒具有约500至约900m^2/g、诸如约550至约900m^2/g的BET表面积。

[0146] 在又一替代实施例中,二氧化硅颗粒具有约600至约850m^2/g的BET表面积。

[0147] 技术人员将理解,多孔二氧化硅颗粒可以以各种形状提供。

[0148] 在具体实施例中,二氧化硅颗粒具有基本上非球形的形态(即长径比大于1:1,诸如大于1.1:1)。

[0149] 在更具体的实施例中,二氧化硅颗粒具有大于1.5:1、诸如大于1.8:1的长径比。

[0150] 在又一个更具体的实施例中,二氧化硅颗粒具有等于或大于2:1的长径比。

[0151] 如本文所用,术语“长径比”应理解为是指二氧化硅颗粒的最大横截面直径与最小横截面直径之间的比率。

[0152] 可替代地,此类颗粒(即具有基本上非球形形态的颗粒)可以被描述为具有至少一个不对称(即使得颗粒的形态关于该平面不同)的平面(即平分颗粒的等分平面)。

[0153] 在更具体的实施例中,二氧化硅颗粒具有基本上棒状的形态。因此,在具体实施例中,多孔二氧化硅颗粒的特征可以在于具有基本上棒状的形态,如通过电子显微镜(诸如通过扫描电子显微镜(SEM)或透射电子显微镜(TEM),使用本领域技术人员已知的技术)观察到的,诸如具有约0.5至约5.0μm的棒长度。

[0154] 如本文所用,术语“基本上棒状”将被理解为是指类似棒的细长形式的颗粒,其中棒可以是直的或弯曲的(例如此类棒状颗粒可以是基本上直的)。

[0155] 在替代实施例中,本发明的二氧化硅颗粒可以是基本上球形的(或称为球形)。因此,在具体实施例中,本发明的二氧化硅颗粒可以具有约1:1的长径比(或平均长径比)。

[0156] 在进一步的实施例中,本发明的二氧化硅颗粒可以是无定形形状的。

[0157] 技术人员将理解,如本文所用的术语平均粒径是指颗粒在其最大点处的平均直径(例如在棒状颗粒的情况下,其长度;或者在球形颗粒的情况下,其直径。),其可以使用本领域技术人员熟知的技术来测量,例如使用电子显微镜技术(诸如通过本领域技术人员已知

的扫描电子显微镜(SEM)或透射电子显微镜(TEM)技术)。在具体实施例中,使用电子显微镜(例如使用SEM)测定粒径。

[0158] 在具体实施例中,诸如其中颗粒为球形的那些实施例中,颗粒的尺寸可以通过参考其直径来定义。

[0159] 在具体的此类实施例中,二氧化硅颗粒具有约0.1至约20.0μm的平均粒径。

[0160] 在更具体的实施例中,二氧化硅颗粒具有约0.1至约15.0μm的平均粒径。

[0161] 在又一个更具体的实施例中,二氧化硅颗粒具有约0.1至约10.0μm的平均粒径。

[0162] 在又一个更具体的实施例中,二氧化硅颗粒具有约0.5至约10.0μm的平均粒径。

[0163] 在还更具体的实施例中,二氧化硅颗粒具有约0.5至约5.0μm的平均粒径。

[0164] 在某些实施例中,二氧化硅颗粒具有约0.5至约4.5μm的平均粒径。

[0165] 在具体实施例中,二氧化硅颗粒具有约1.0至约10.0μm的平均粒径。

[0166] 在具体实施例中,二氧化硅颗粒具有约1.0至约5.0μm的平均粒径。

[0167] 在更具体的实施例中,二氧化硅颗粒具有约1.0至约4.0μm的平均粒径。

[0168] 在更具体的实施例中,二氧化硅颗粒具有约1.0至约4.0μm的平均粒径。

[0169] 在又更具体的实施例中,二氧化硅颗粒具有约2.0至约4.0μm的平均粒径。

[0170] 在还更具体的实施例中,二氧化硅颗粒具有约3.0至约4.0μm的平均粒径。

[0171] 在进一步的实施例中,诸如其中颗粒为棒状的那些实施例中,颗粒的尺寸可以通过参考其宽度(其将是指最窄点处的直径)来定义(或也定义)。

[0172] 在具体的此类实施例中,二氧化硅颗粒具有约0.05至约0.6μm的平均宽度。

[0173] 在更具体的实施例中,二氧化硅颗粒具有约0.1至约0.6μm的平均宽度。

[0174] 在又一个更具体的实施例中,二氧化硅颗粒具有约0.1至约0.4μm的平均宽度。

[0175] 在又一个更具体的实施例中,二氧化硅颗粒具有约0.2至约0.4μm的平均宽度。

[0176] 技术人员将理解,本发明中描述的类型的多孔二氧化硅材料通常是非结晶的。因此,在某些实施例中,多孔二氧化硅颗粒可以被描述为基本上非结晶的多孔二氧化硅颗粒(并且可以以相同的方式描述由多个此类颗粒形成的材料)。因此,多孔二氧化硅颗粒可以被描述为非结晶多孔二氧化硅颗粒。

[0177] 在替代实施例中,如本发明的第一方面中所述的存在于颗粒中的二氧化硅材料可以被描述为无定形的。在此类实施例中,应当理解,术语无定形将表示二氧化硅材料的结构(不包括其中存在的孔)没有实质上的有序性,诸如可能存在于结晶物质中的有序性(即多孔二氧化硅颗粒或二氧化硅材料可以被称为非晶体)。

[0178] 如本文所述,技术人员将理解本发明的二氧化硅材料是多孔的。因此,本发明的二氧化硅颗粒可被称为具有一定的最小总孔体积,如使用氮吸附测量的(例如取为在P/P_0的最高值处吸附的体积,例如,$P/P_0=0.995$),或一定范围的此类体积。

[0179] 在具体实施例中,总孔体积为至少约0.2cm^3/g(诸如至少约0.3、0.4、0.5、0.6或0.7cm^3/g)。

[0180] 在具体实施例中,总孔体积为约0.2至约2.5cm^3/g。

[0181] 在更具体的实施例中,总孔体积为约0.2至约2.0cm^3/g。

[0182] 在又更具体的实施例中,总孔体积为约0.5至约1.5cm^3/g。

[0183] 在还更具体的实施例中,总孔体积为约0.6至约1.4cm^3/g。

[0184] 例如,在某些实施例中,总孔体积为约0.7至约1.3cm^3/g。

[0185] 用途及工艺

[0186] 如本文所述,本发明的第一方面的口腔护理组合物可用于口腔护理,诸如用于在有此需要的受试者中预防(或防治)龋齿、牙菌斑的积聚、牙龈疾病、牙周炎和/或牙齿缺失。

[0187] 在一些实施例中,本发明的第一方面的口腔护理组合物可用于口腔护理,诸如用于在有此需要的受试者中预防(或防治)龋齿、牙菌斑的积聚、牙龈疾病和/或牙齿缺失。

[0188] 在本发明的第二方面,提供了如本发明的第一方面所定义的口腔护理组合物在预防(或防治)龋齿、牙菌斑的积聚、牙龈疾病、牙周炎和/或牙齿缺失中的用途。

[0189] 在一些实施例中,口腔护理组合物的用途是预防(或防治)龋齿、牙菌斑的积聚、牙龈疾病和/或牙齿缺失。

[0190] 在本发明的替代的第二方面,提供了如本发明的第一方面所定义的口腔护理组合物,其用于预防(或防治)龋齿、牙菌斑的积聚、牙龈疾病、牙周炎和/或牙齿缺失。

[0191] 在一些实施例中,口腔护理组合物用于预防(或防治)龋齿、牙菌斑的积聚、牙龈疾病和/或牙齿缺失。

[0192] 在本发明的进一步替代的第二方面,提供了一种在有此需要的受试者中预防(或防治)龋齿的形成、牙菌斑的积聚、牙龈疾病、牙周炎和/或牙齿缺失的方法,该方法包括使用(或施用/施加,诸如至口腔,即口,例如牙齿和牙龈的表面)有效量的如本发明的第一方面所定义的口腔护理组合物的步骤。

[0193] 在一些实施例中,提供了一种在有此需要的受试者中预防(或防治)龋齿的形成、牙菌斑的积聚、牙龈疾病和/或牙齿缺失的方法,该方法包括使用(或施用/施加,诸如至口腔,即口,例如牙齿和牙龈的表面)有效量的如本发明的第一方面所定义的口腔护理组合物。

[0194] 如本文所用,术语预防(以及类似地,预防(preventing))将包括对病症的防治(反之亦然)的提及。具体地,此类术语可以指实现受试者发展病症的可能性的降低(例如,至少10%的降低,诸如至少20%、30%或40%的降低,例如至少50%的降低)。

[0195] 为了避免疑义,技术人员将理解,此类用途和方法将在有此需要的受试者中进行。本领域技术人员可以使用常规技术评定受试者对此类用途和方法的需求。

[0196] 如本文所用,对受试者的提及是指接受治疗的活体受试者,包含哺乳动物(例如人)患者。具体地,对受试者的提及将是指人,诸如成年年龄的人(即18岁或以上的人)。

[0197] 技术人员将理解,与本发明的第一方面的口腔护理组合物有关的用途和方法可以进一步包括可能适合其以所提供的形式使用的步骤。

[0198] 例如,在口腔护理组合物以洁齿剂形式提供的情况下,此类用途和方法可以包括使用该组合物刷洗或抛光(即清洁,例如通过刷洗)牙齿的步骤,诸如通过将组合物施加至合适的清洁工具(例如牙刷)上,然后使用其清洁(刷洗或抛光,诸如刷洗)牙齿。

[0199] 类似地,在口腔护理组合物以液体(例如漱口水)形式提供的情况下,此类用途和方法可以包括使用该组合物冲洗或漂洗(例如冲洗)口腔的步骤,诸如通过将合适量的组合物放入口中,含在口中(并且任选地在口周围移动)一段时间(例如约30秒至约60秒),并且然后从口中排出组合物。

[0200] 如本文所述,本发明的组合物还可以采用粉末或凝胶的形式,诸如摩丝,其可以根

据本领域已知的此类产品的常见用法来使用。例如,当呈摩丝形式时,可以将组合物施加至口腔一段时间(诸如约一分钟),随后可以用水或可以不用水冲洗口腔(例如不冲洗口腔,在这种情况下该组合物可以被称为非冲洗型)。

[0201] 如本文所述,如本发明的第一方面所述的组合物通常可用于口腔护理,诸如用于清洁口腔(例如牙齿的表面,诸如通过刷洗、抛光、冲洗、漂洗等)。

[0202] 在本发明的第三方面,提供了如本发明的第一方面所述的组合物作为口腔护理产品的用途。

[0203] 技术人员将理解,对口腔护理产品的提及将包括对口腔保健产品(即用于促进口腔健康的产品)的提及,诸如用于预防或防治牙菌斑的积聚、牙龈疾病、牙周炎和/或牙齿缺失的产品,以及用于治疗或预防(或防治)口腔感染的产品。

[0204] 在本发明的第四方面,提供了如本发明的第一方面所述的组合物在清洁(例如通过刷洗、抛光、冲洗或漂洗)口腔(例如牙齿,诸如其表面)的方法中的用途。

[0205] 技术人员将理解,如本文所述的清洁口腔(即口的内部,诸如牙齿和牙龈的表面)的方法可以包括将如本发明的第一方面所述的组合物施加至口腔的步骤。

[0206] 技术人员将理解,如本发明的第一方面所述的口腔护理组合物可以使用本领域已知的标准技术来制备,诸如通过混合其组分。

[0207] 因此,在本发明的进一步方面,提供了一种用于制备口腔护理组合物的工艺,该工艺包括使组合物的组分呈其混合物(诸如基本上均匀的混合物)的形式。

[0208] 在本发明的又一方面,提供了如关于本发明的第一方面所定义的二氧化硅材料在制造如本文(例如在本发明的第一方面和第二方面中)所定义的组合物中的用途。

[0209] 不希望受理论的束缚,认为使用具有在中孔范围内的孔的特定平均孔径的某些多孔二氧化硅材料能够在体内有效地充当生物分子的分子筛,使得能够制备在减少龋齿形成和改善口腔卫生的其他方面具有改善的特性的口腔护理组合物。

[0210] 具体地,认为使用如本文所述的具有在中孔范围内的孔的特定平均孔径的中孔二氧化硅颗粒允许唾液淀粉酶在口中的有效吸收,这在缺少此类孔的二氧化硅颗粒中未观察到,并且因此提供了优于本领域已知的口腔护理组合物的优点。此外,认为使用此类中孔二氧化硅颗粒可以减少致龋细菌生物膜的形成,这在改善口腔健康方面具有进一步的益处。

附图说明

[0211] 图1.1(A)-(D):氮吸附分析。实例1中描述的不同类型的二氧化硅的吸附-解吸等温线(图1.1(A)和1.1(B))以及使用DFT模型从吸附曲线得出的孔径分布(图1.1(C)和1.1(D))。

[0212] 图1.2:实例1中二氧化硅的SEM显微照片

[0213] 图2.1:牙膏中的二氧化硅有效减少碳水化合物的消化。在不含表面活性剂(TP1)的牙膏中配制各种类型的二氧化硅,并测试它们在减少人唾液淀粉酶对碳水化合物消化方面的功效。包括不含任何二氧化硅的相同牙膏配制品(无二氧化硅)作为对照,其代表基础消化水平(虚线)。数据呈现为平均值±标准误差(SE)(n=2)。

[0214] 图2.2:不含表面活性剂的漱口水配制品中的二氧化硅有效减少碳水化合物的消化。在不含表面活性剂(MW1)的漱口水中配制各种类型的二氧化硅,并测试它们在减少人唾

液淀粉酶对碳水化合物消化方面的功效。不含任何二氧化硅的相同漱口水配制品(无二氧化硅)作为对照,其代表基础消化水平(虚线)。数据呈现为平均值±SE(n=2)。

[0215] 图2.3:含有表面活性剂的漱口水降低二氧化硅在减少碳水化合物消化方面的功效。在含有聚山梨醇酯80(A,MW2)或PEG-40蓖麻油(B,MW3)的漱口水配制品中制备各种类型的二氧化硅,并测试它们在减少人唾液淀粉酶对碳水化合物消化方面的功效。数据呈现为平均值±SE(n=2)。

[0216] 图2.4:椰油酰胺丙基甜菜碱在碳水化合物消化测定中的影响。将二氧化硅3悬浮在不同浓度的椰油酰胺丙基甜菜碱溶液(表面活性剂)中,并评定其在减少人唾液淀粉酶对碳水化合物消化方面的功效。还评定了相同浓度的不含二氧化硅的椰油酰胺丙基甜菜碱溶液(无二氧化硅),以获得那些浓度下的基础消化水平。数据呈现为平均值±SE(n=2)。

[0217] 图2.5:聚山梨醇酯80在碳水化合物消化测定中的影响。将二氧化硅3悬浮在不同浓度的聚山梨醇酯80溶液(表面活性剂)中,并评定其在减少人唾液淀粉酶对碳水化合物消化方面的功效。还评定了相同浓度的不含二氧化硅的聚山梨醇酯80溶液(无二氧化硅),以获得那些浓度下的基础消化水平。数据呈现为平均值±SE(n=2)。

[0218] 图2.6:聚氧乙烯(4)月桂基醚在碳水化合物消化测定中的影响。将二氧化硅3悬浮在不同浓度的聚氧乙烯(4)月桂基醚溶液(表面活性剂)中,并评定其在减少人唾液淀粉酶对碳水化合物消化方面的功效。还评定了相同浓度的不含二氧化硅的聚氧乙烯(4)月桂基醚溶液(无二氧化硅),以获得那些浓度下的基础消化水平。数据呈现为平均值±SE(n=2)。

[0219] 图2.7:具有与本发明的二氧化硅类似的平均孔径但具有宽孔径分布的二氧化硅(二氧化硅8)不能减少碳水化合物消化。"无二氧化硅"样品代表基础消化水平,并且二氧化硅8的消化水平与基础水平没有差异。数据呈现为平均值±SE(n=2)。

[0220] 图3:二氧化硅减少人唾液中唾液淀粉酶对碳水化合物的消化。将两种不同类型的二氧化硅与人唾液一起孵育,以测定它们在减少碳水化合物消化方面的功效。数据呈现为平均值±标准差(SD)(n=4)。

[0221] 图4.1(A)-(E):不同二氧化硅对致龋细菌生长的影响。将二氧化硅3和4与人唾液淀粉酶预孵育,并随后进行碳水化合物消化测定。酶失活后,将淀粉的消化产物喂入变形链球菌培养物中。进行了几项测量:前8小时的细菌生长(A、B)、在不同时间点唾液淀粉酶失活后消化混合物中未消化淀粉的量(C)、暴露于消化产物后24小时的细菌质量(D),以及暴露于消化产物后24小时培养基中未消化淀粉的量(E)。数据呈现为平均值±SE(n=28)。

[0222] 图4.2(A)-(E):在1%淀粉培养基中不同二氧化硅对致龋细菌生长的影响。将二氧化硅3和4与人唾液淀粉酶预孵育。将预孵育混合物添加到含有1%淀粉的变形链球菌培养物中。进行了几项测量:细菌生长(A、B)、在不同时间点暴露于预孵育混合物后培养基中未消化淀粉的量(C)、暴露于预孵育混合物后24小时的细菌质量(D)、暴露于预孵育混合物后24小时培养基中未消化淀粉的量(E)。数据呈现为平均值±SE(n=28)。

[0223] 图4.3(A)-(E):在含有1%淀粉的培养基中不同二氧化硅对致龋细菌生长的影响。将二氧化硅3、5和7与人唾液淀粉酶预孵育。将预孵育混合物添加到含有1%淀粉的变形链球菌培养物中。进行了几项测量:前8小时的细菌生长(A-C)、添加预孵育混合物后24小时的细菌质量(D)、添加预孵育混合物后24小时培养基中未消化淀粉的量(E)。数据呈现为平均值±SE(n=11)。

[0224] 图5:不同二氧化硅对致龋细菌生物膜形成的影响。将二氧化硅3、5和7与人唾液淀粉酶预孵育。将预孵育混合物中的淀粉酶添加到含有1%淀粉的变形链球菌培养物中。进行了几项测量:添加预孵育混合物后24小时的细菌生长(A)、添加预孵育混合物后24小时培养基中未消化淀粉的量(B),以及添加预孵育混合物后24小时形成的生物膜的量(C)。数据呈现为平均值±SE(n=22)。

[0225] 实例

[0226] 将通过参考以下实例进一步描述本发明,这些实例并非旨在限制本发明的范围。

[0227] 实例1:多孔二氧化硅材料的制备/表征

[0228] 材料

[0229] 二氧化硅1、二氧化硅2和二氧化硅3根据先前描述的工艺制造(参见Waara,ER等人,Adv.Healthcare Mater.9(11),e2000057(2020)和Baek,J等人,Nanomedicine(2021),特别是其中描述的实验程序)。

[0230] 简而言之,将中孔结构模板剂(P123,平均分子量=5800g mol^{-1}的三嵌段共聚物,$PEO_{20}PPO_{70}PEO_{20}$)溶解在盐酸(HCl)水溶液中,酸浓度相当于1.6M。P123完全溶解,然后在40℃在剧烈搅拌下添加原硅酸四乙酯(TEOS)。溶液中P123:TEOS的最终摩尔比为0.02:1.00,并且TEOS:HCl:H_2O的摩尔比为1:6:235(二氧化硅1)、1:7:250(二氧化硅2)或1:7:230(二氧化硅3)。将合成在40℃下保持静止20小时,并进一步在100℃下水热处理20小时(二氧化硅1),在85℃下水热处理1.3小时(二氧化硅2)或在100℃下水热处理10小时(二氧化硅3)。

[0231] 二氧化硅4是Kromasil 100-13-SIL,购自Nouryon Pulp and Performance Chemicals AB。

[0232] 二氧化硅5(Sylodent)是Sylodent SM850C,一种常用于牙膏的无孔二氧化硅,获自W.R.Grace&Co.。

[0233] 二氧化硅6是获自AGC Si-Tech的Sunsphere H-31。

[0234] 二氧化硅7是获自AGC Si-Tech的Sunsphere NP-30。

[0235] 二氧化硅8是获自PPG Industries,Inc.的LO-VEL 6200。

[0236] 氮吸附分析

[0237] Brunauer-Emmett-Teller(BET)表面积是根据<0.2的相对压力(p/p°)下的吸附等温线计算的(图1.1A和图1.1B中的曲线)。在相对压力(p/p°)=0.995下记录总孔体积。平均孔径和孔径分布由使用密度泛函理论(DFT)方法的吸附曲线或使用Barrett-Joyner-Halenda(BJH)方法的解吸曲线得出。图1.1C和图1.1D显示了使用DFT和圆柱孔-氧化物表面模型从吸附曲线得出的二氧化硅颗粒的孔径分布数据。使用TriStar II体积吸附分析仪在液氮温度(-196℃)下进行测量,并使用TriStar II软件MicroActive 2.03版(Micromeritics Instrument Corp.,美国佐治亚州)进行数据分析。

[0238] 粒径

[0239] 使用JSM-7401F(JEOL Ltd.,日本东京)的扫描电子显微镜用于表征SEM显微照片中的粒径和形态(图1.2)。≥50个颗粒的平均粒径(棒状颗粒二氧化硅1、二氧化硅2和二氧化硅3的长度和宽度以及球形颗粒二氧化硅4、二氧化硅6和二氧化硅7的直径)使用ImageJ(Fiji;参见Schindelin J、Arganda-Carreras I、Frise E等人,Fiji:an open-source platform for biological-image analysis.,Nat.Methods,9(7),676-682(2012))进行分

析。

[0240] 表1:材料特性

[0241] 使用上面列出的技术在操作条件下测量所研究的二氧化硅材料的各种特性。下表1描述了所识别的特征。

[0242]

	BET 表面积 (m^2/g)	总孔体积 (cm^3/g)	平均孔径-所有孔[1] (nm)	中孔范围内的平均孔径-DFT (nm)[2]	中孔范围内的平均孔径-BJH (nm)[3]	平均粒径 (μm)	中孔范围内的孔百分比[4]	7-25 nm范围内的中孔百分比[5]	7-18 nm范围内的中孔百分比[6]
二氧化硅1	**687**	**0.87**	**5.1**	**8.8**	**6.3**	**0.9(长度) 0.6(宽度)**	**91**	**75**	**74**
二氧化硅2(阴性对照)	695	0.52	3.0	5.2	3.9	1.4(长度) 0.2(宽度)	66	2	2
二氧化硅3	**925**	**1.19**	**5.2**	**10.2**	**6.6**	**1.1(长度) 0.3(宽度)**	**80**	**73**	**71**
二氧化硅4	**315**	**0.91**	**11.4**	**16.4**	**10.0**	**12.6 (直径)**	**98**	**97**	**59**
二氧化硅5(Sylodent,阴性对照)	26					*未测量*			
二氧化硅6(阴性对照)	746	0.77	4.1	6.8	4.6	4.1(直径)	90	42	42
二氧化硅7(阴性对照)	30					2.3(直径)			
二氧化硅8(阴性对照)	596	1.61	10.7	16.4	10.1	*未测量*	67	53	39

[0243] [1][4x总孔体积(cm^3/g)/BET表面积(m^2/g)]x 1000

[0244] [2]根据吸附曲线计算,使用DFT模型并假设圆柱孔几何形状

[0245] [3]根据解吸曲线计算,使用BJH模型

[0246] [4]根据DFT孔径分布和总孔体积计算:[(50nm处的孔体积-2nm处的孔体积)/总孔体积]x 100

[0247] [5]根据DFT孔径分布计算:[(25nm处的孔体积-7nm处的孔体积)/(50nm处的孔体积-2nm处的孔体积)]x 100

[0248] [6]根据DFT孔径分布计算:[(18nm处的孔体积-7nm处的孔体积)/(50nm处的孔体积-2nm处的孔体积)]x 100

[0249] 如本文所述,图1.1(A)-(D)和图1.2中还提供了对这些二氧化硅材料的特性的分析。

[0250] 实例2:碳水化合物消化测定

[0251] 工作溶液和标准曲线样品的制备

[0252] 在测定之前,制备了几种工作溶液。首先,称取60-80mg中孔二氧化硅或对照二氧化硅并在120℃下干燥过夜。第二天,再次称重二氧化硅以获得精确的干燥后重量,并使用双蒸水(ddH_2O)制备20mg/mL二氧化硅悬浮液。对于二氧化硅3,超声处理对于均匀的悬浮液

是必要的。简而言之,将2mm微尖端(Vibra cell)装入超声波仪(Vibra cell)中,并将二氧化硅悬浮液在无脉冲的情况下以40%振幅超声处理3分钟。超声处理后,通过倒置将二氧化硅悬浮液混合若干次并目视检查。如果二氧化硅团块仍然存在,则再次重复超声处理。一般而言,两轮超声处理产生分散体,没有或有最少的团块残留。通过将1个PBS片剂(Medicago,09-2052-100)溶解在200mL ddH_2O中来制备1x PBS。一旦溶解,将pH调节至5.4。将冻干的人唾液淀粉酶在ddH_2O中再水合,制成40mg/mL储备溶液。在实验当天通过用1x PBS(pH 5.4)稀释必要量的储备溶液来新鲜制备工作溶液(8mg/mL)。通过在1x PBS(pH 5.4)中混合纯淀粉粉末(Generation Ucan)来制备淀粉储备溶液(6mg/mL)。淀粉不易溶解在PBS中,因此将淀粉溶液微波加热数次(每次10-20秒)直至其开始沸腾并且不再有淀粉粉末沉降在底部。当全部溶解后,淀粉溶液保持不透明。当进行测定的消化部分时,在开始消化之前将淀粉储备溶液平衡至室温。使用1xPBS(pH 5.4)通过连续稀释制备淀粉标准曲线样品(每个300μL)。标准曲线样品的浓度为:1.5、0.75、0.375、0.1875、0.0938、0.0465和0mg/mL。在连续稀释后,将75μL的1N HCl(Sigma Aldrich,1090571000)添加到每个标准曲线样品中。使用ddH_2O制备表面活性剂(椰油酰胺丙基甜菜碱、聚山梨醇酯80和聚氧乙烯(4)月桂基醚)的储备溶液(1.0wt%)。

[0253] 测试配制品的制备

[0254] 通过将40μl二氧化硅在水中的悬浮液(20mg/mL)与140μl储备溶液或储备凝胶(浓度根据表2)混合来制备测试配制品。

[0255] 表2:碳水化合物消化测定中测试的配制品

[0256]

成分	浓度(wt%)					
	漱口水 1 (MW1)		漱口水 2/漱口水 3 (MW2/MW3)		牙膏 1 (TP1)	
	储备溶液	二氧化硅悬浮液	储备溶液	二氧化硅悬浮液	储备凝胶	二氧化硅悬浮液
水(ddH_2O)	69.50	75.83	68.50	75.06	48.60	59.58
甘油	20.00	15.56	20.00	15.56	20.00	15.56
木糖醇	10.00	7.78	10.00	7.78	10.00	7.78
无孔二氧化硅 - 二氧化硅 5 (Sylodent)	-	-	-	-	20.00	15.56
表面活性剂*	-	-	1.00	0.78	-	-
黄原胶	-	-	-	-	1.00	0.78
苯甲酸钠	0.20	0.16	0.20	0.16	0.10	0.08
氟化钠	0.30	0.23	0.30	0.23	0.30	0.23
活性二氧化硅‡ 如指定	-	0.44	-	0.44	-	0.44

[0257] *MW2中的聚山梨醇酯80,MW3中的PEG-40蓖麻油。

[0258] ‡活性二氧化硅是指本发明的二氧化硅材料,如实例1中所述并在结果中指定。

[0259] 二氧化硅对唾液淀粉酶的吸附

[0260] 在淀粉消化步骤之前,首先将每个样品与唾液淀粉酶在37℃下孵育15分钟,以进行酶吸附/截留。

[0261] 对于漱口水配制品,通过在1.5mL微量离心管中混合20μL唾液淀粉酶溶液(8mg/mL)和180μL含有二氧化硅的漱口水配制品(根据表2制备)来制备孵育混合物。然后使用旋转器(Harvard Apparatus,74-2302)垂直旋转将该孵育混合物在37℃下孵育15分钟。

[0262] 对于牙膏配制品,通过在1.5mL微量离心管中混合15μL唾液淀粉酶溶液(8mg/mL)和135μL含有二氧化硅的牙膏配制品(根据表2制备)来制备孵育混合物。然后将该孵育混合物在37℃水浴中水平振荡(200rpm)进行孵育。

[0263] 为了测试各个表面活性剂溶液,使用ddH_2O将表面活性剂(椰油酰胺丙基甜菜碱、聚山梨醇酯80和聚氧乙烯(4)月桂基醚)的储备溶液(1.0wt%)稀释以得到以下浓度:0.5、0.25、0.1、0.05wt%,并将二氧化硅以4mg/mL的浓度分散在每种溶液中。通过在1.5mL微量离心管中混合20μL唾液淀粉酶溶液(8mg/mL)和180μL含有二氧化硅的稀释表面活性剂溶液(4mg/mL)来制备孵育混合物。然后使用旋转器(Harvard Apparatus,74-2302)垂直旋转将该孵育混合物在37℃下孵育15分钟。

[0264] 为了测试二氧化硅8,将40μl二氧化硅在水中的悬浮液(20mg/mL)与140μl 1x PBS溶液混合,得到4mg/mL的二氧化硅分散体。通过在1.5mL微量离心管中混合20μL唾液淀粉酶溶液(8mg/mL)和180μL二氧化硅悬浮液(4mg/mL)来制备孵育混合物。然后使用旋转器(Harvard Apparatus,74-2302)垂直旋转将该孵育混合物在37℃下孵育15分钟。

[0265] 孵育后,将150μL孵育混合物与1.45mL ddH_2O和3.4mL 1x PBS(pH 5.4)混合来制备稀释的孵育混合物。对于每个碳水化合物消化测定,始终包括空白样品(无二氧化硅样品)以监测基础消化水平。对于该样品,将ddH_2O而不是二氧化硅悬浮液添加到测试配制品中。

[0266] 淀粉消化

[0267] 淀粉消化进行不同的持续时间:0、5或20分钟。为每个时间点制备反应混合物(800μL),其含有1:1比例的淀粉(6mg/mL)和稀释的孵育混合物。对于每个时间点,将400μL淀粉储备溶液(6mg/mL)等分到1.5mL微量离心管中。然后,将400μL稀释的孵育混合物添加到每个管中。对于0分钟时间点,首先将200μL 1N HCl添加到淀粉溶液中,然后添加400μL稀释的孵育混合物。通过倒置立即混合每种反应混合物,然后在37℃的水浴中以水平振荡(200rpm)孵育每个相应的持续时间。孵育完成后,立即添加200μL 1NHCl以终止消化。

[0268] 消化淀粉的比色测定

[0269] 使用5mM碘(Merck,1.09099.1003)在不同时间点对消化淀粉的量进行定量。将每种反应混合物短暂涡旋,然后等分到96孔板(Corning,CLS3370)中。将75μL每种反应混合物(二氧化硅样品以及标准曲线样品)一式两份等分。使用多通道移液器将75μL的5mM碘溶液等分到每个孔中,然后在570nm处读取吸光度。

[0270] 消化淀粉的量的计算

[0271] 消化淀粉的量说明了给定二氧化硅减少消化的功效。从淀粉标准曲线的斜率和截距外推每个样品中未消化淀粉的浓度。然后通过将0分钟时间点作为100%未消化淀粉来计算未消化淀粉的百分比。通过从100中减去未消化淀粉的百分比来计算消化淀粉的百分比。

将5分钟(除了测试二氧化硅8之外的所有消化测定)或20分钟(测试二氧化硅8)时间点的消化淀粉的百分比绘制为条形图。对于每个消化测定,不包括代表基础消化水平的二氧化硅样品。

[0272] 这些实验的结果也呈现在图2.1、图2.2、图2.3(A)-(B)、图2.4、图2.5、图2.6和图2.7中,如本文所述。

[0273] 实例3:使用人唾液的碳水化合物消化测定

[0274] 2x PBS的制备

[0275] 通过将2个PBS片剂(Medicago,09-2052-100)溶解在200mL双蒸水(ddH_2O)中来制备2x PBS。一旦溶解,将pH调节至5.4。

[0276] 人唾液的收集和制备

[0277] 将人唾液(2-3mL)收集在试管中。收集后,立即将唾液样品以5000rpm离心5分钟,以去除任何颗粒或沉淀物。收集上清液(每个样品250μL)并储存在-20℃下直至分析。分析当天,将唾液样品解冻并使用2x PBS(pH 5.4)进行1:50稀释。这被称为唾液工作溶液。

[0278] 二氧化硅及其工作溶液的制备

[0279] 称取大约60-80mg中孔二氧化硅并在120℃下干燥过夜。第二天,再次称重二氧化硅以获得精确的干燥后重量,并使用ddH_2O制备20mg/mL二氧化硅悬浮液。为了二氧化硅的均匀分散,需要对二氧化硅悬浮液进行超声处理。将微尖端(Vibra cell,630-0423)装入超声波仪(Vibra cell,VCX 130)中,并将二氧化硅悬浮液在无脉冲的情况下以40%振幅超声处理3分钟。一般而言,两轮超声处理产生均匀的溶液,没有或有最少的团块残留。

[0280] 淀粉溶液和DNS试剂的制备

[0281] 通过在1x PBS(pH 7.4)中混合纯淀粉粉末(Sigma Aldrich,33615)来制备淀粉溶液(3mg/mL)。淀粉不易溶解在PBS中,因此将淀粉溶液微波加热数次(每次10-20秒)直至其开始沸腾并且不再有淀粉粉末沉降在底部。当全部溶解后,淀粉溶液保持不透明。当进行测定的消化部分时,在开始消化之前将淀粉溶液平衡至室温。3,5-二硝基水杨酸(DNS,Sigma Aldrich,D0550;0.2μM)通过将1g DNS溶解在20mL的2M NaOH中来制备。向该溶液中添加30g酒石酸钠。用ddH_2O将溶液加满至最终体积为100mL。使用磁力搅拌器不断搅拌溶液并在50℃下加热2小时。将最终溶液过滤并储存在4℃下。

[0282] 二氧化硅对唾液淀粉酶的吸附

[0283] 通过使用ddH_2O在96孔PCR板(VWR,732-2387)中进行连续稀释,制备不同的二氧化硅浓度(0.312-20mg/mL,每种60μL)。将60μL唾液工作溶液等分到每个孔中。将板密封(Bio-rad,MSB1001)并在37℃下使用旋转器(Harvard Apparatus,74-2302)旋转孵育30分钟。孵育完成后,将板在室温下以2000x g离心5分钟。将每个孔的上清液(30μL)转移至新的96孔PCR板中。

[0284] 还原糖的比色测定

[0285] 向含有上清液的每个孔中添加30μL淀粉溶液(3mg/mL)。将板密封并在37℃下使用旋转器旋转孵育30分钟。孵育完成后,将60μL DNS溶液(0.2μM)添加到每个孔中。将板密封并使用PCR仪在95℃下再次孵育7分钟。最终孵育后,将100μL溶液转移至96孔板(Corning,CLS3370),并在540nm处读取吸光度。

[0286] 这些实验的结果也呈现在图3中,如本文所述。

[0287] 实例4:致龋细菌生长测量

[0288] 工作溶液的制备

[0289] 1x PBS:通过将1个PBS片剂(Medicago,09-2052-100)溶解在200mL双蒸水(ddH_2O)中来制备1x PBS。一旦溶解,将pH调节至5.4。随后将溶液高压灭菌(121℃,20分钟)。

[0290] 脑心浸液(BHI)肉汤:将37g BHI粉末(BD Diagnostic Systems,237500)溶解在1LddH_2O中。为了制备含有1%淀粉的BHI肉汤,在BHI肉汤溶液中添加10g淀粉粉末(Generation Ucan)。随后将肉汤高压灭菌(121℃,20分钟)。

[0291] 淀粉储备溶液(6mg/mL):为了制备淀粉储备溶液,通过在120℃下加热6小时对淀粉粉末进行灭菌。将灭菌的淀粉粉末添加到高压灭菌的1x PBS(pH 5.4)中,制成6mg/mL储备溶液。由于淀粉不易溶解在PBS中,因此将溶液微波加热数次(每次10-20秒)直至其开始沸腾并且不再有淀粉粉末沉降在底部。当全部溶解后,淀粉溶液保持不透明。

[0292] 二氧化硅(20mg/mL):称取60-80mg中孔二氧化硅或对照二氧化硅并在120℃下干燥过夜。第二天,再次称重二氧化硅以获得精确的干燥后重量,并使用高压灭菌的ddH_2O制备20mg/mL二氧化硅悬浮液。对于二氧化硅3,超声处理对于均匀的悬浮液是必要的。简而言之,将2mm微尖端(Vibra cell)装入超声波仪(Vibra cell)中,并将二氧化硅悬浮液在无脉冲的情况下以40%振幅超声处理3分钟。超声处理后,通过倒置将二氧化硅悬浮液混合若干次并目视检查。如果二氧化硅团块仍然存在,则再次重复超声处理。一般而言,两轮超声处理产生分散体,没有或有最少的团块残留。

[0293] 人唾液淀粉酶:将冻干的人唾液淀粉酶(Sigma Aldrich,A1031)在ddH_2O中再水合,制成40mg/mL储备溶液。在实验当天通过在高压灭菌的1x PBS(pH 5.4)中稀释必要量的储备溶液来新鲜制备工作溶液(8mg/mL)。

[0294] 变形链球菌培养物的制备

[0295] 变形链球菌(S.mutans)是在口腔中发现的主要致龋细菌之一,其对龋齿有显著影响。将冻干的变形链球菌(美国典型培养物保藏中心(ATCC),25175)在5mL BHI肉汤中再水合。将0.5mL悬浮液等分到四个高压灭菌的试管中,并且随后将4.5mL BHI肉汤添加到所有试管中。将接种的管在37℃下在持续搅拌(振荡器设定在120rpm)下孵育至少30小时。孵育后,将培养的样品储存在-80℃的10%或20%甘油(Sigma Aldrich,G9012)中。在BHI肉汤或含有1%淀粉的BHI肉汤中培养变形链球菌。使用10%甘油原液中的变形链球菌接种45mL的相应肉汤,并在37℃下在持续搅拌下培养24-30小时。将培养物保持在4℃直到实验当天,但不超过48小时。实验当天,将40mL的相应肉汤添加到培养物中,并在旋转平台上于37℃孵育1小时。在该孵育后,使用相应的肉汤稀释细菌培养物,以将OD600调节至大约0.1(对数生长期早期)。

[0296] 二氧化硅对唾液淀粉酶的吸附

[0297] 在淀粉消化步骤之前,首先将每个二氧化硅样品与唾液淀粉酶孵育,以进行酶吸附。通过在1.5mL微量离心管中混合140μL 1x PBS(pH 5.4)、40μL二氧化硅(4mg/mL)和20μL唾液淀粉酶工作溶液(8mg/mL)来制备孵育混合物。作为对照,始终包括空白样品(无二氧化硅样品),其中添加ddH_2O而不是二氧化硅。使用旋转器(Harvard Apparatus,74-2302)垂直旋转将孵育混合物在37℃下孵育15分钟。孵育后,将150μL孵育混合物稀释在1.48mL ddH_2O和3.4mL 1x PBS(pH 5.4)中。

[0298] 淀粉消化和用淀粉消化产物喂养变形链球菌

[0299] 将400μL稀释的孵育混合物与400μL高压灭菌的淀粉储备溶液(6mg/mL)混合,并在37℃的水浴中水平振荡(200rpm)孵育10分钟。随后,将样品在95℃下孵育45分钟以使唾液淀粉酶失活。失活后,将样品在室温下以5000rpm离心5分钟。然后将上清液转移至新的1.5mL微量离心管中。该反应混合物中的最终浓度为:60μg/mL二氧化硅、12μg/mL唾液淀粉酶、3mg/mL淀粉。

[0300] 将150μL细菌培养物等分到96孔板(Corning,CLS3370)中,并将50μL反应混合物添加到每个孔中。作为对照,添加100μL 1x PBS,而不是反应混合物。将培养物在37℃下在持续搅拌下孵育24小时。在前8小时期间,每30分钟通过OD600测量来监测细菌生长。24小时后,测量最终OD600。24小时后还通过使用碘的比色测量对未消化淀粉的量进行定量。

[0301] 生长变形链球菌,同时淀粉消化在培养物中实时发生

[0302] 在此设置中,变形链球菌在含有1%淀粉的BHI肉汤中生长。当将稀释的唾液淀粉酶-二氧化硅孵育混合物添加到细菌培养物中时,BHI肉汤中的淀粉消化实时发生。如上所述进行二氧化硅对唾液淀粉酶的吸附。二氧化硅吸附酶后,将孵育混合物在室温下以5000rpm离心5分钟。然后将150μL上清液稀释在1.48mL ddH_2O和3.4mL 1x PBS(pH5.4)中,以制备稀释的唾液淀粉酶-二氧化硅孵育混合物。在96孔板中,将150μL细菌培养物(在含有1%淀粉的BHI肉汤中)等分到每个孔中,然后添加50μL稀释的唾液淀粉酶-二氧化硅孵育混合物。作为对照,添加50μL 1x PBS(pH 5.4),而不是孵育混合物。将培养物在37℃下在持续搅拌下培养24小时。在前8小时期间,每30分钟通过OD600测量来监测细菌生长,并在24小时后读取最终OD600测量值。为了定量整个孵育期间培养液中未消化淀粉的量,为每个代表性孵育时间点(0、4、8和24小时)准备了一块板。通过使用碘的比色测量对未消化淀粉的量进行定量。

[0303] 未消化淀粉的比色测定

[0304] 通过使用碘(Merck,1.09099.1003)对培养肉汤中未消化淀粉的量进行定量。简而言之,将30μL培养肉汤转移至新的96孔板中,然后将45μL ddH_2O等分到每个孔中。然后,向所有孔中添加75μL的5mM碘,并在570nm处读取吸光度。

[0305] 这些实验的结果也呈现在图4.1(A)-(E)、图4.2(A)-(E)和图4.3(A)-(E)中,如本文所述。

[0306] 实例5:生物膜形成测定

[0307] 用于生物膜形成的细菌培养物的制备

[0308] 制备变形链球菌细菌培养物并铺板于96孔板(Corning,CLS3370)中。如细菌生长评定中所述,在每个孔中添加50μL预孵育反应混合物。在不搅拌的情况下将培养物在37℃下孵育24小时。

[0309] 生物膜质量的比色测定

[0310] 孵育24小时后,通过倒置板去除变形链球菌培养基,并用150μL 1x PBS洗涤孔。将板倒置以丢弃PBS,并使用200μL移液器去除每个孔中的任何残留溶液。在所有孔中添加200μL甲醇(Sigma Aldrich,179957)以固定生物膜,并将板在室温下静态孵育20分钟。通过板倒置去除甲醇后,将板在室温下打开大约10分钟,以使每个孔中任何残留的甲醇蒸发。蒸发甲醇并干燥孔后,在每个孔中添加200μL的0.002%结晶紫溶液对生物膜进行染色。通过用

ddH_2O稀释1％结晶紫储备溶液(Sigma Aldrich,V5265)来制备0.002％结晶紫溶液。添加0.002％结晶紫后,将板用铝箔覆盖并在室温下静态孵育40分钟。孵育后,通过板倒置丢弃0.002％结晶紫溶液,并使用200μL移液器去除任何残留的溶液。向每个孔中添加200μL 98％乙醇(Sigma Aldrich,1009831011),然后将板用铝箔覆盖,并在室温下在振荡平台上孵育30分钟。通过在590nm波长下用乙醇进行脱色步骤后立即测量孔中的OD来评定形成的生物膜的量。

[0311] 其他测量

[0312] 孵育24小时后,如上所述评定细菌的生长(通过测量600nm处的OD)。测量后,将30μL培养基转移至新的96孔板中,并将45μL ddH_2O等分在每个孔中。为了定量培养基中残留的未消化淀粉水平,添加75μL的5mM碘,并如上所述进行比色测量。

[0313] 这些实验的结果也呈现在图5(A)-(C)中,如本文所述。

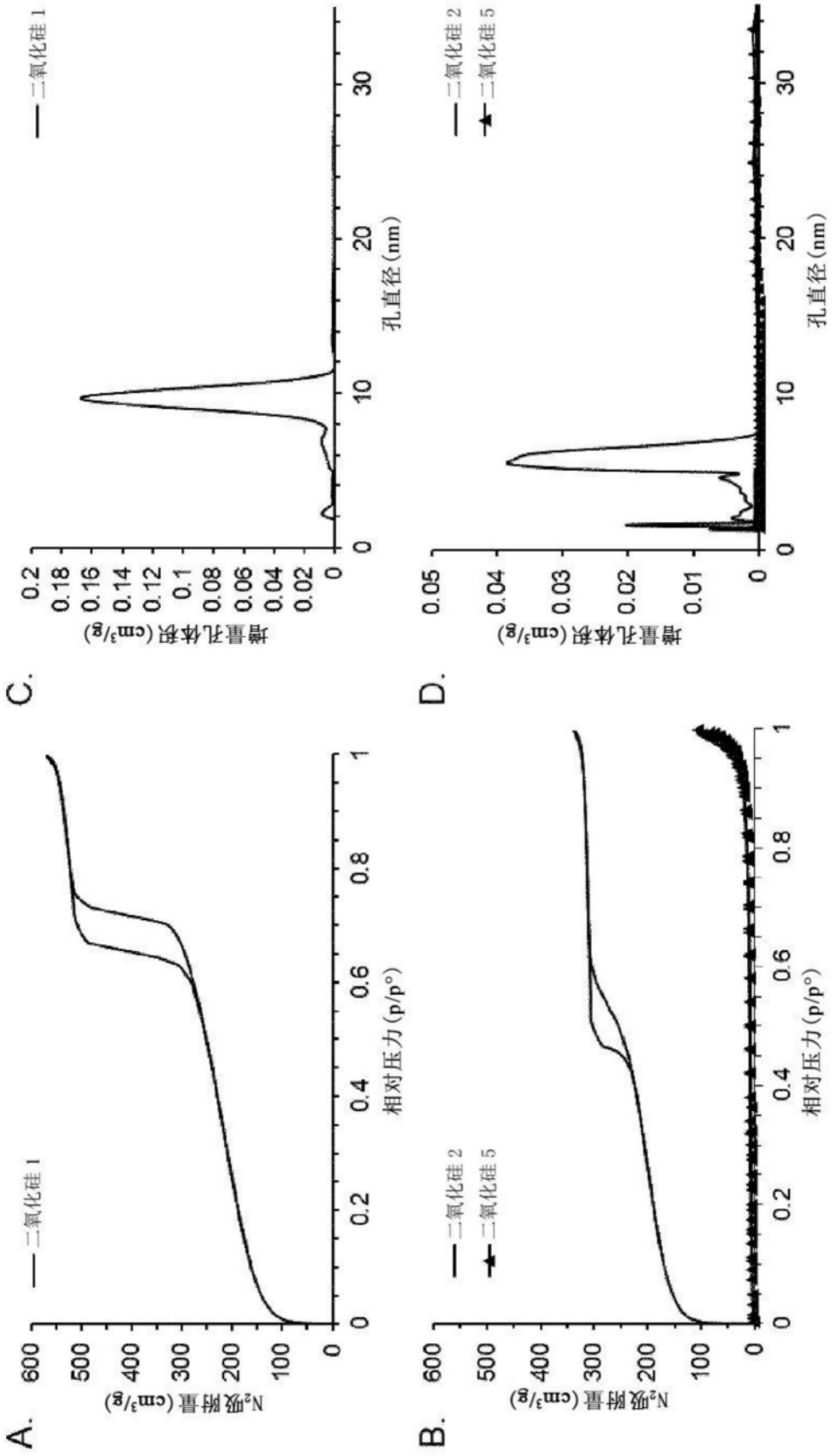


图1.1

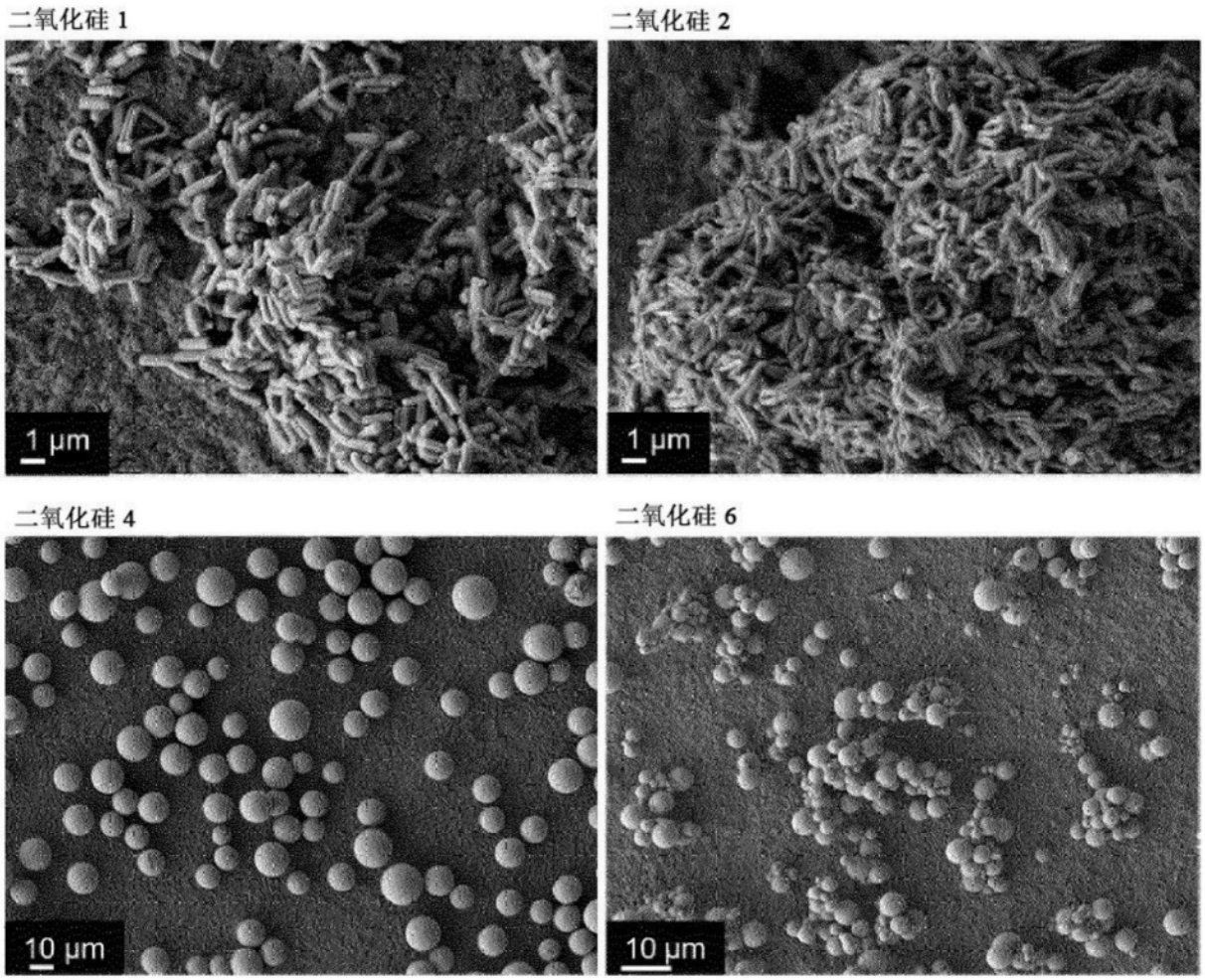


图1.2

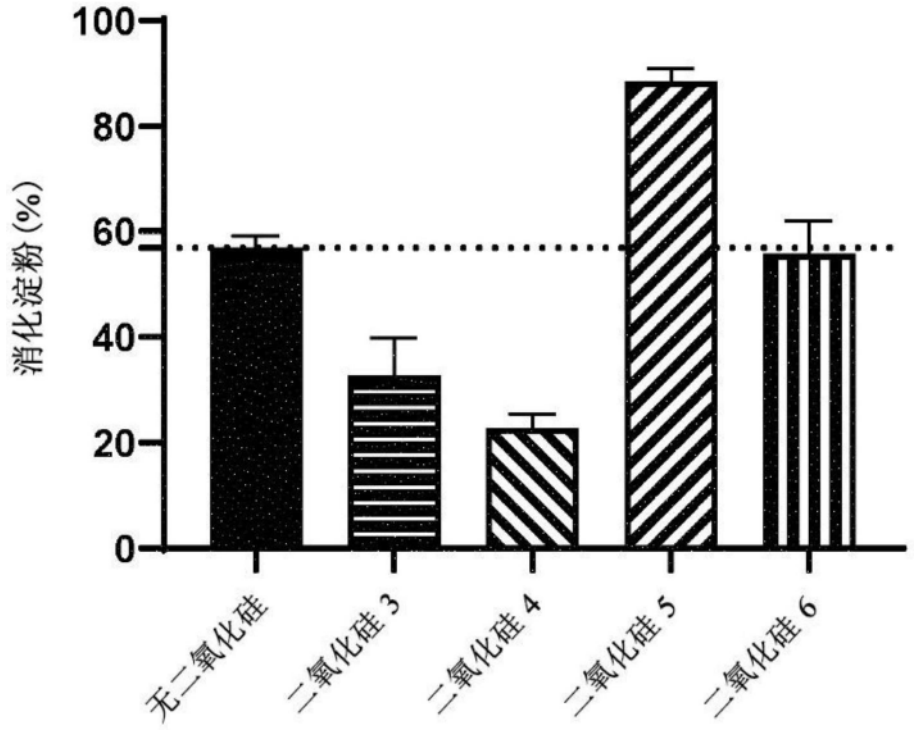

100
80
60
40
20
0
消化淀粉(%)
无二氧化硅
二氧化硅 3
二氧化硅 4
二氧化硅 5
二氧化硅 6

图2.1

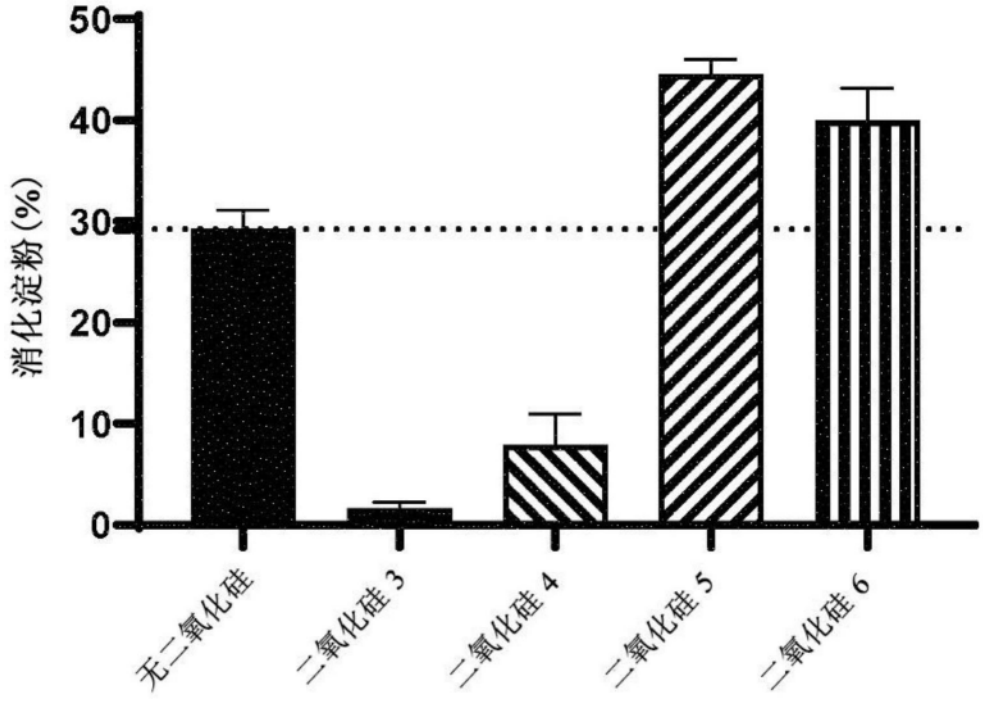

50
40
30
20
10
0
消化淀粉(%)
无二氧化硅
二氧化硅 3
二氧化硅 4
二氧化硅 5
二氧化硅 6

图2.2

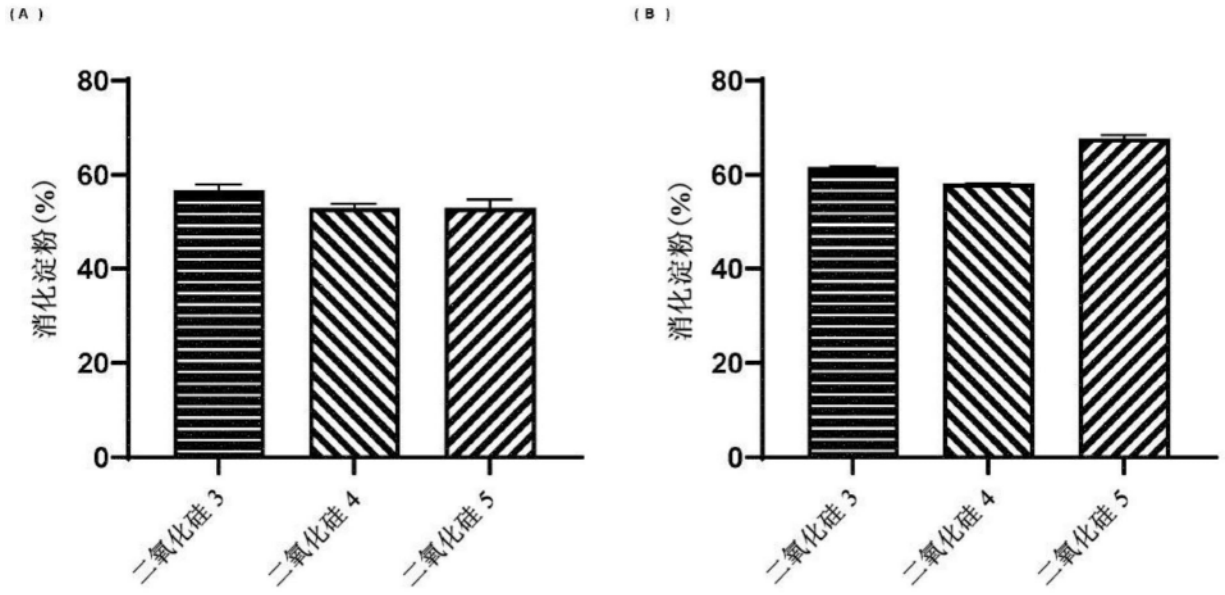

(A)
(B)
消化淀粉(%)
80
60
40
20
0
二氧化硅 3
二氧化硅 4
二氧化硅 5

图2.3

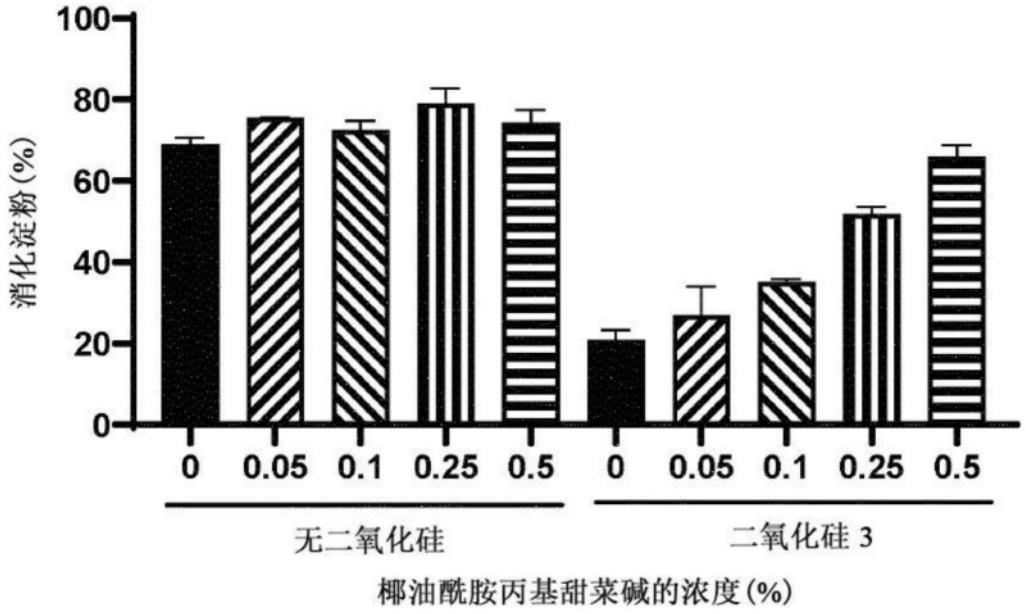

消化淀粉(%)
100
80
60
40
20
0
0
0.05
0.1
0.25
0.5
无二氧化硅
二氧化硅 3
椰油酰胺丙基甜菜碱的浓度(%)

图2.4

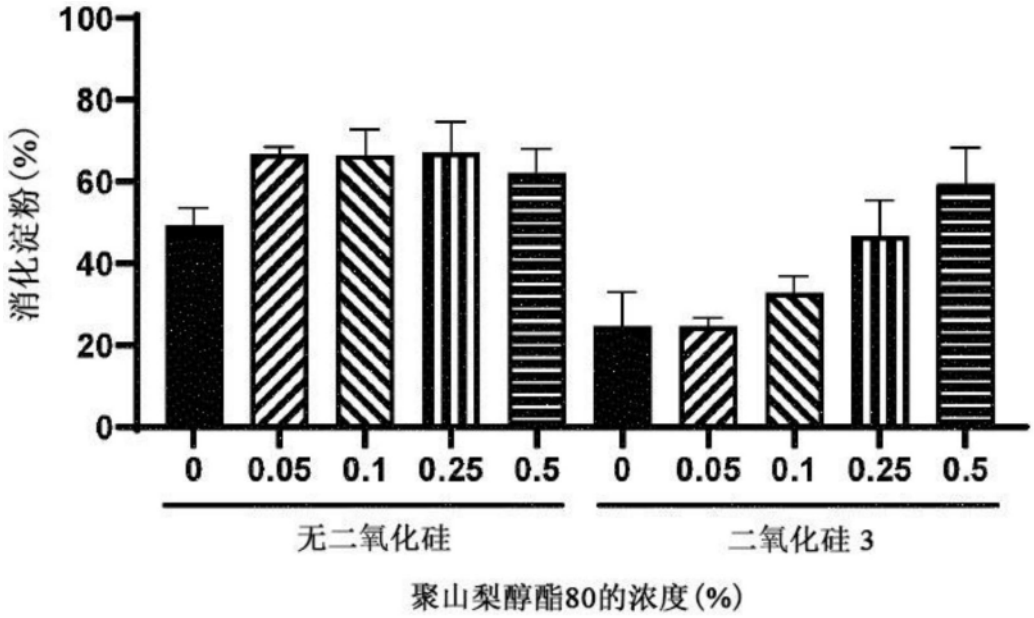

100
80
60
40
20
0
消化淀粉(%)
0
0.05
0.1
0.25
0.5
0
0.05
0.1
0.25
0.5
无二氧化硅
二氧化硅 3
聚山梨醇酯80的浓度(%)

图2.5

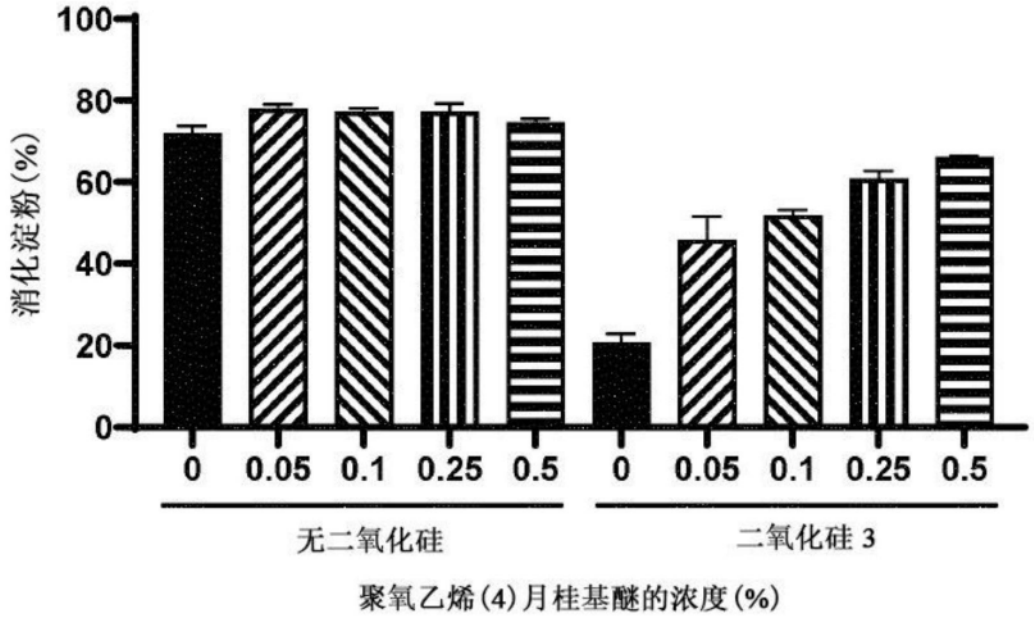

100
80
60
40
20
0
消化淀粉(%)
0
0.05
0.1
0.25
0.5
0
0.05
0.1
0.25
0.5
无二氧化硅
二氧化硅 3
聚氧乙烯(4)月桂基醚的浓度(%)

图2.6

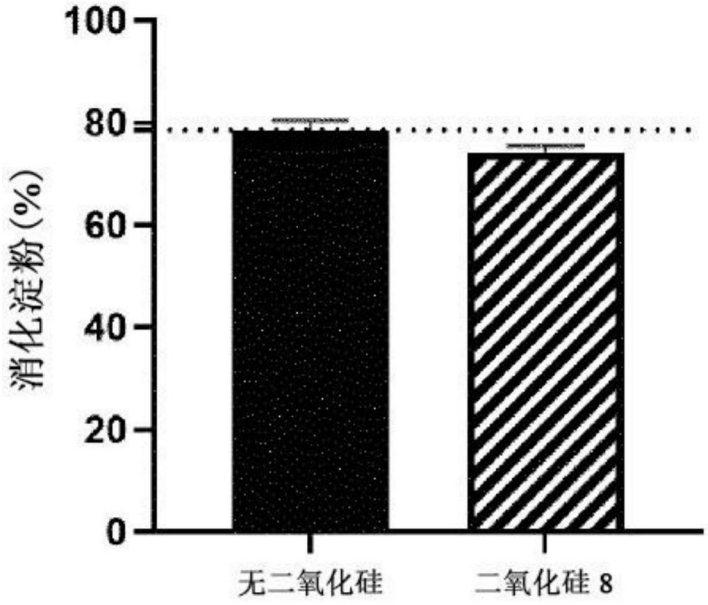

100
80
60
40
20
0
消化淀粉(%)
无二氧化硅
二氧化硅 8

图2.7

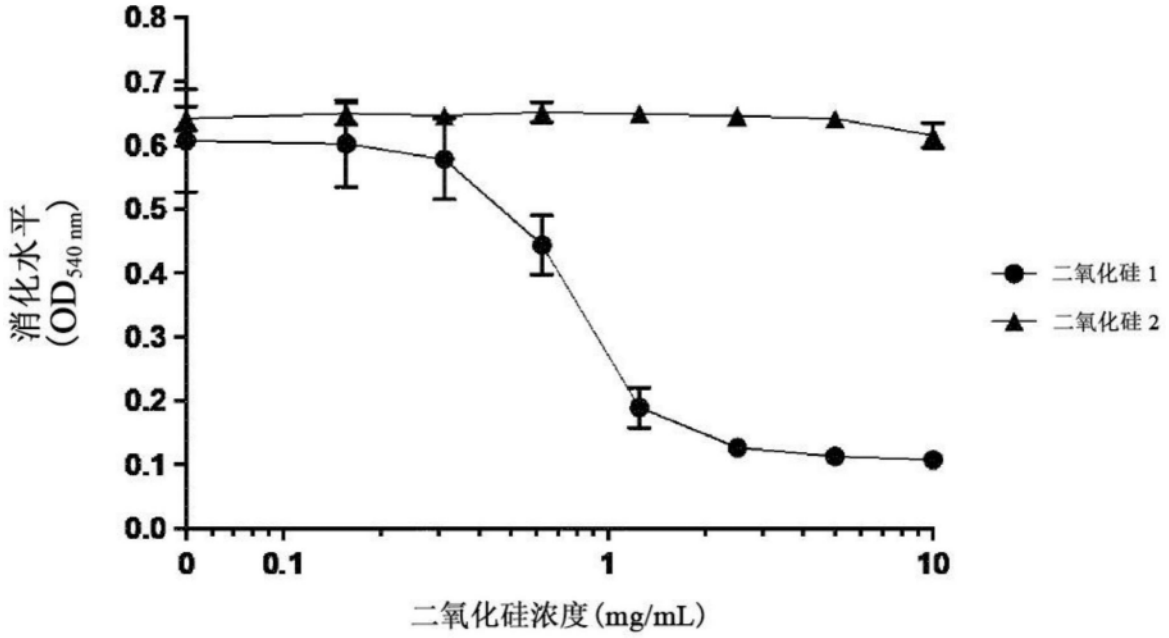

0.8
0.7
0.6
0.5
0.4
0.3
0.2
0.1
0.0
消化水平
(OD540 nm)
0
0.1
1
10
二氧化硅浓度(mg/mL)
二氧化硅 1
二氧化硅 2

图3

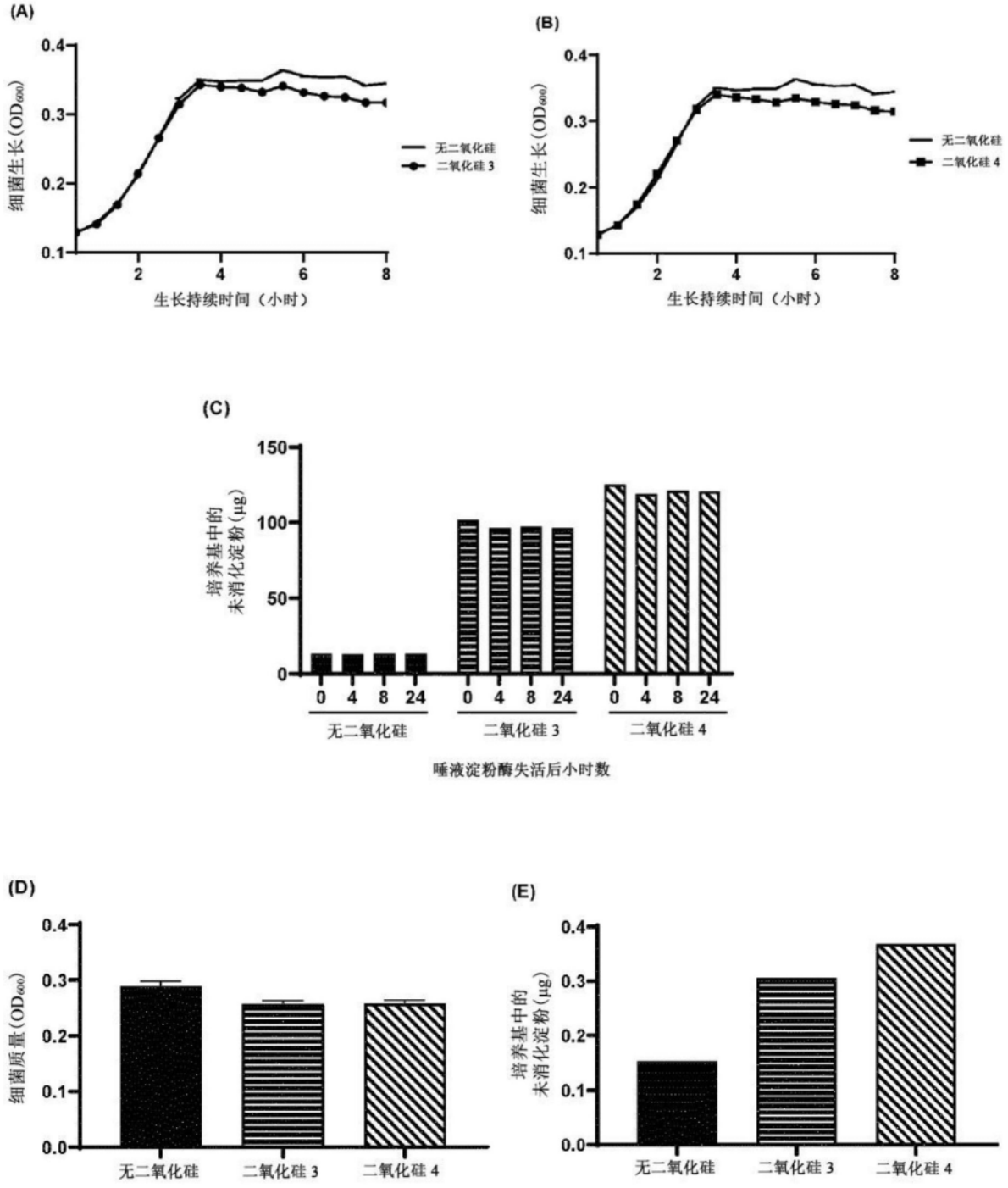

(A)
细菌生长(OD600)
0.4
0.3
0.2
0.1
2
4
6
8
生长持续时间（小时）
无二氧化硅
二氧化硅 3
(B)
细菌生长(OD600)
0.4
0.3
0.2
0.1
2
4
6
8
生长持续时间（小时）
无二氧化硅
二氧化硅 4
(C)
培养基中的
未消化淀粉(μg)
150
100
50
0
0 4 8 24 0 4 8 24 0 4 8 24
无二氧化硅
二氧化硅 3
二氧化硅 4
唾液淀粉酶失活后小时数
(D)
细菌质量(OD600)
0.4
0.3
0.2
0.1
0.0
无二氧化硅
二氧化硅 3
二氧化硅 4
(E)
培养基中的
未消化淀粉(μg)
0.4
0.3
0.2
0.1
0.0
无二氧化硅
二氧化硅 3
二氧化硅 4

图4.1

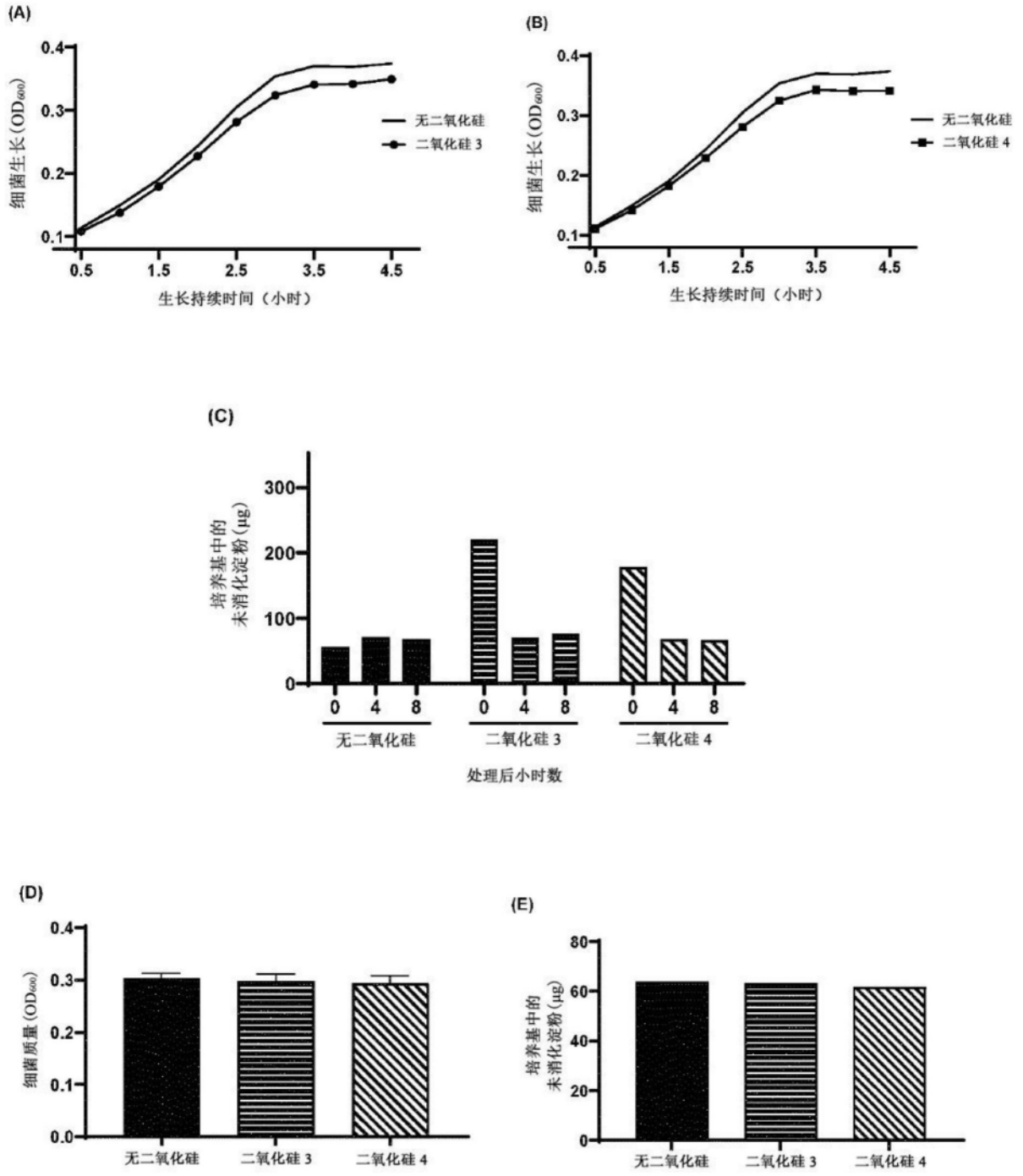

(A)
细菌生长(OD600)
0.4
0.3
0.2
0.1
0.5
1.5
2.5
3.5
4.5
生长持续时间（小时）
无二氧化硅
二氧化硅 3
(B)
细菌生长(OD600)
生长持续时间（小时）
无二氧化硅
二氧化硅 4
(C)
培养基中的
未消化淀粉(μg)
300
200
100
0
0 4 8 0 4 8 0 4 8
无二氧化硅
二氧化硅 3
二氧化硅 4
处理后小时数
(D)
细菌质量(OD600)
0.4
0.3
0.2
0.1
0.0
无二氧化硅
二氧化硅 3
二氧化硅 4
(E)
培养基中的
未消化淀粉(μg)
80
60
40
20
0
无二氧化硅
二氧化硅 3
二氧化硅 4

图4.2

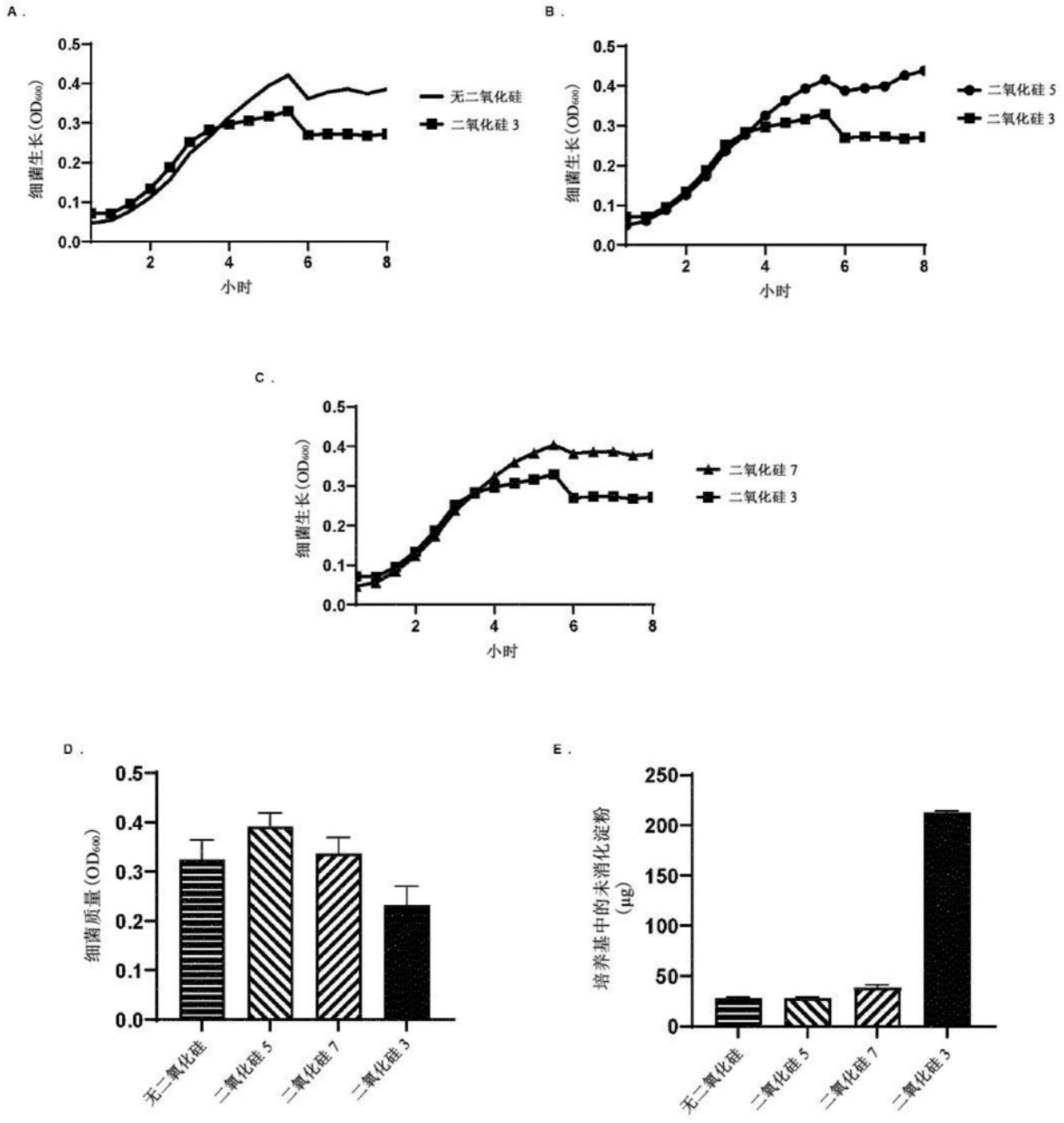

A.
细菌生长(OD600)
0.5
0.4
0.3
0.2
0.1
0.0
2
4
6
8
小时
无二氧化硅
二氧化硅 3
B.
细菌生长(OD600)
小时
二氧化硅 5
二氧化硅 3
C.
细菌生长(OD600)
小时
二氧化硅 7
二氧化硅 3
D.
细菌质量(OD600)
无二氧化硅
二氧化硅 5
二氧化硅 7
二氧化硅 3
E.
培养基中的未消化淀粉(μg)
250
200
150
100
50
0
无二氧化硅
二氧化硅 5
二氧化硅 7
二氧化硅 3

图4.3

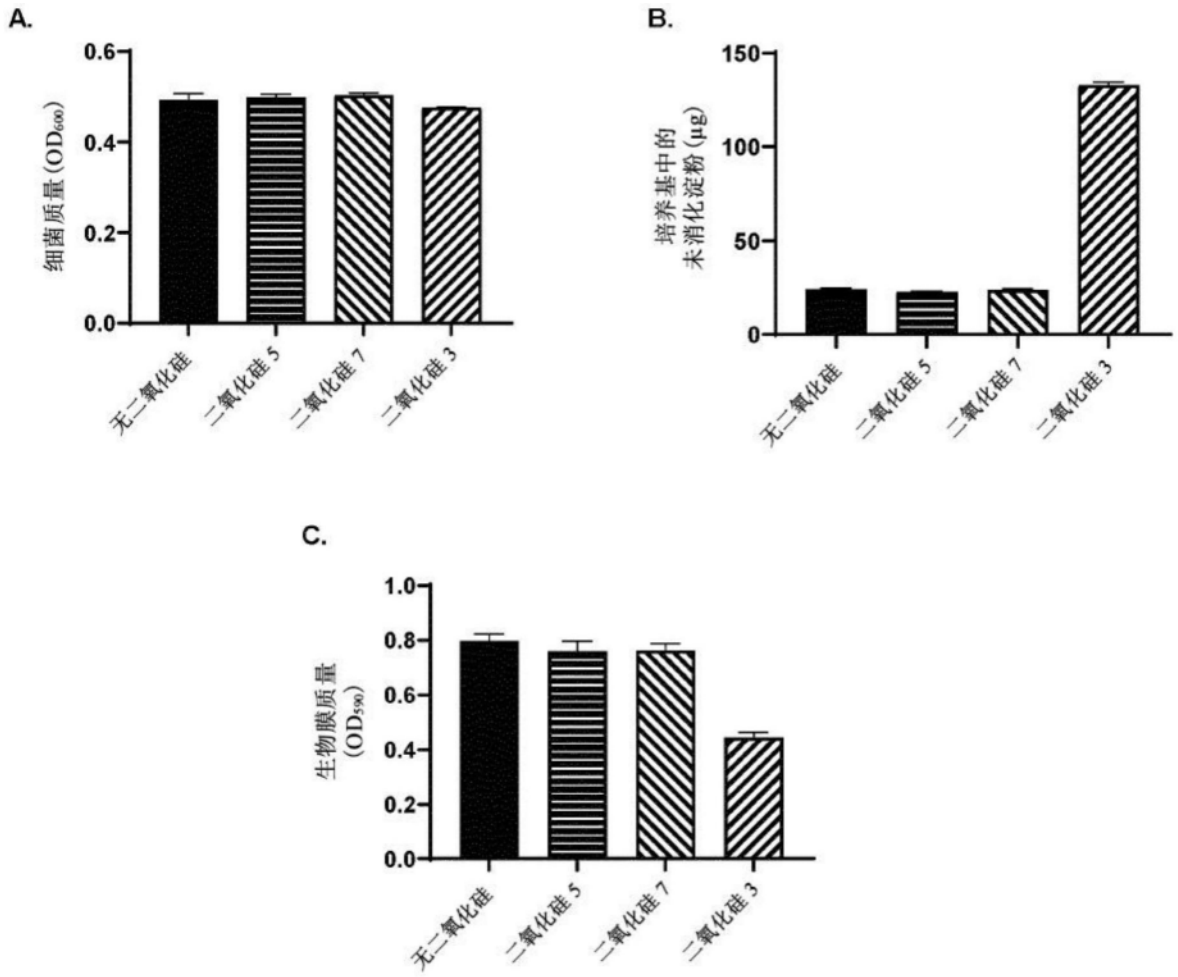

A.
细菌质量 (OD600)
0.6
0.4
0.2
0.0
无二氧化硅
二氧化硅 5
二氧化硅 7
二氧化硅 3
B.
培养基中的
未消化淀粉 (μg)
150
100
50
0
无二氧化硅
二氧化硅 5
二氧化硅 7
二氧化硅 3
C.
生物膜质量
(OD590)
1.0
0.8
0.6
0.4
0.2
0.0
无二氧化硅
二氧化硅 5
二氧化硅 7
二氧化硅 3

图5