



(12)发明专利申请

(10)申请公布号 CN 111479555 A

(43)申请公布日 2020.07.31

(21)申请号 201880080755.3

(74)专利代理机构 北京正理专利代理有限公司  
11257

(22)申请日 2018.12.12

代理人 邹欢

(30)优先权数据

102017000143342 2017.12.13 IT

(51)Int.Cl.

A61K 8/64(2006.01)

(85)PCT国际申请进入国家阶段日

2020.06.15

A61K 8/25(2006.01)

A61Q 11/00(2006.01)

(86)PCT国际申请的申请数据

PCT/IB2018/059937 2018.12.12

(87)PCT国际申请的公布数据

W02019/116258 EN 2019.06.20

(71)申请人 L.I.瑞思有限公司

地址 意大利博洛尼亚

(72)发明人 亚斯纳·伊莎贝尔·西斯特纳斯·

西斯特纳斯

权利要求书2页 说明书8页 附图2页

(54)发明名称

乳铁蛋白和二氧化硅的复合物、制备方法和  
口腔卫生组合物

(57)摘要

一种包含至少一种乳铁蛋白和至少一种二氧化硅的复合物,其比表面积在 $100\text{m}^2/\text{g}$ 和 $1000\text{m}^2/\text{g}$ 之间(BET面积,根据标准ISO 9277-2010测量),所述复合物可通过将所述乳铁蛋白加入含有水性溶剂的溶胶-凝胶形式的所述二氧化硅中,随后干燥所述溶胶-凝胶而获得。该复合物特别适合用于口腔护理产品,特别是牙膏、漱口水、凝胶、口香糖、用于口腔护理的片剂、牙龈染料等。该复合物具有高度的稳定性和生物有效性,因此在口腔内具有有效、持久的抗菌和抗氧化作用。该复合物特别适合用于预防或治疗牙科器官疾病,特别是用于预防或治疗牙周炎或种植体周围炎,优选用于患有糖尿病的患者。

1. 至少一种乳铁蛋白和至少一种二氧化硅的复合物,其比表面积在 $100\text{m}^2/\text{g}$ 和 $1000\text{m}^2/\text{g}$ 之间,优选在 $150\text{m}^2/\text{g}$ 和 $700\text{m}^2/\text{g}$ 之间(BET面积,根据标准ISO 9277-2010测量),所述复合物可通过将所述乳铁蛋白加入含有水性溶剂的溶胶-凝胶形式的所述二氧化硅中,随后干燥所述溶胶-凝胶而获得。

2. 根据前述权利要求中任一项所述的复合物,其中所述至少一种二氧化硅为选自热解法二氧化硅和沉淀法二氧化硅的合成二氧化硅。

3. 根据前述权利要求中任一项所述的复合物,其中所述至少一种二氧化硅为气凝胶形式。

4. 根据权利要求3所述的复合物,其中所述至少一种气凝胶形式的二氧化硅的孔隙率大于85%,并且密度范围为 $0.003\text{g}/\text{cm}^3$ 至 $0.8\text{g}/\text{cm}^3$ ,优选 $0.005\text{g}/\text{cm}^3$ 至 $0.3\text{g}/\text{cm}^3$ 。

5. 根据权利要求3或4所述的复合物,其中所述至少一种二氧化硅从植物废料中获得,特别是从源自谷物,优选大米的加工中的外壳中获得。

6. 根据前述权利要求中任一项所述的复合物,其中所述至少一种乳铁蛋白和所述至少一种二氧化硅以0.05:1至10:1,优选0.1:1至5:1的重量比存在。

7. 根据前述权利要求中任一项所述的复合物,其为用至少一种多元醇,优选甘油或山梨糖醇表面处理过的颗粒的形式。

8. 根据权利要求1至7中任一项所述的用于制备复合物的方法,其包含:

制备含有水性溶剂的溶胶-凝胶形式的比表面积为 $100\text{m}^2/\text{g}$ 至 $1000\text{m}^2/\text{g}$ ,优选 $150\text{m}^2/\text{g}$ 至 $700\text{m}^2/\text{g}$ (BET面积,根据标准ISO 9277-2010测量)的二氧化硅;

将至少一种乳铁蛋白加入溶胶-凝胶形式的所述二氧化硅中;

使如此获得的混合物进行干燥步骤。

9. 根据权利要求8所述的方法,其还包含通过加入至少一种多元醇,优选甘油或山梨糖醇来处理所述干燥的混合物。

10. 根据权利要求8或9所述的方法,其中所述干燥步骤通过用超临界 $\text{CO}_2$ 处理来进行。

11. 根据权利要求8或9所述的方法,其中所述干燥步骤通过冻干进行。

12. 根据权利要求10所述的方法,其中所述用超临界 $\text{CO}_2$ 的干燥步骤在高压釜中,在 $15^\circ\text{C}$ 至 $60^\circ\text{C}$ 的温度和80巴至150巴的压力下进行。

13. 根据权利要求11所述的方法,其中通过冻干的所述干燥步骤通过在 $-80^\circ\text{C}$ 和 $-30^\circ\text{C}$ 之间的温度下真空冷却并随后再次在不高于 $60^\circ\text{C}$ ,优选在 $20^\circ\text{C}$ 和 $50^\circ\text{C}$ 之间的温度下真空加热来进行。

14. 根据权利要求13所述的方法,其中所述冻干在0.1巴和0.8巴之间的压力下进行。

15. 一种用于口腔卫生的组合物,其包含至少一种根据权利要求1至7中任一项所述的复合物和至少一种生理上可接受的赋形剂。

16. 根据权利要求15所述的组合物,其中所述至少一种复合物与至少一种不与乳铁蛋白复合的亲水性二氧化硅,优选亲水性热解法二氧化硅混合。

17. 根据权利要求16所述的组合物,其包含:

10重量%至70重量%,优选20重量%至50重量%的至少一种二氧化硅;

0.05重量%至15重量%,优选0.2重量%至10重量%的至少一种乳铁蛋白;

25重量%至80重量%,优选40重量%至75重量%的水相。

18. 根据权利要求15至17中任一项所述的组合物,其中所述水相包含水和多元醇,优选甘油或山梨糖醇的混合物。

19. 根据权利要求1至7中任一项所述的复合物,其通过在口腔内局部施用而用于预防或治疗牙科器官疾病,特别是用于预防或治疗牙周炎或种植体周围炎,优选用于糖尿病患者。

## 乳铁蛋白和二氧化硅的复合物、制备方法和口腔卫生组合物

### 技术领域

[0001] 本发明涉及一种包含一种乳铁蛋白和一种二氧化硅的复合物、其制备方法,以及其用于口腔卫生的组合物,特别是在口腔的氧化应激增加的情况下。

### 背景技术

[0002] 众所周知,口腔卫生是预防诸如龋齿、牙龈炎、牙周炎、种植体周围炎等牙科器官疾病的决定性因素。

[0003] 已知牙周炎是一种慢性炎症性疾病,其特征在于牙齿的支撑结构(牙周韧带、牙槽骨)的破坏。牙周炎在普通人群中发病率较高(约10%至15%的成人),并且对生活质量产生许多负面影响。

[0004] 另一方面,种植体周围炎是一种炎症过程,会影响到种植体与骨结合的种植体周围的组织,从而导致骨组织的损失,从而导致种植体本身的损失。原因可能是传染性的,也可能是由于不正确的植入假体钝化(咬合创伤)引起的,尽管在临床上均可找到这两种原因。影像学检查使得很容易地区分种植体周围炎与细菌引起的咬合创伤。

[0005] 为了预防或减缓这些病理的发展,对于患有功能障碍或疾病,特别是糖尿病的人来说,特别精确的口腔卫生变得至关重要,这增加了口腔中的氧化应激。

[0006] 从临床角度来看,糖尿病是一组临床上和遗传上不同的代谢紊乱,其特征存在于血液中的葡萄糖水平高(高血糖症)。高血糖可能是由于胰腺 $\beta$ 细胞功能异常或肝-肌组织对相同激素的抗性引起的胰岛素分泌不足的直接结果,也可能是上述现象的组合。这种代谢紊乱通常与脂肪细胞代谢的改变有关,并且可被认为是一种综合症。从长期来看,慢性高血糖会对不同器官造成多种损害,例如心脏、眼睛、肾脏、神经、血管系统。

[0007] 最近的许多流行病学研究证实,糖尿病可被认为是牙周病发展的一个重要危险因素。最近15至20年的科学证据支持牙周炎症和血糖状态之间存在显著的独立关联。糖尿病患者对牙周炎发病的敏感性是正常人的三倍。

[0008] 世界卫生组织提供的最新数据表明,糖尿病病理的发生率正在急剧增加。该数据的一个直接结果是,患有牙周病的患者数量的并行增加,因为不管吸烟习惯的减少和口腔卫生的改善,糖尿病均是患牙周炎的一个危险因素。

[0009] 糖尿病和牙周疾病均以全身性炎症状态为特征。慢性高血糖症以及牙周炎诱导免疫系统的过度激活,导致促炎分子(TNF- $\alpha$ 、IL6、IL1)的过度产生。进入体循环,这些会对生物体产生负面影响。从这个意义上讲,牙龈组织的慢性炎症会恶化患有糖尿病的患者血糖和临床体征。因此,鉴于上述情况,这种关系必须被认为是双向的。

[0010] 与慢性牙周炎有关的另一方面是免疫系统的改变,即抗氧化剂和对抗氧化剂与氧气反应之间的平衡,后者更受青睐。氧化应激会加重糖尿病患者的临床表现。另一方面,糖尿病反过来又是氧化应激的一个原因,这可证明以下事实是合理的事实:源自牙周炎的临床情况在糖尿病患者中特别具有攻击性。糖尿病患者中牙周疾病的高患病率和严重程度可被认为是由慢性高血糖症状态和晚期糖基化终产物(AGEs)积累引起的并发症。牙龈组织中

长期的氧化应激证明糖尿病患者牙周组织的侵蚀性破坏是合理的。AGEs及它们的细胞受体之间的相互作用诱导氧化应激的增加,这种氧化应激可导致慢性单核细胞过度激活,从而激活NF-Kb系统,导致促炎性mRNA的表达。

[0011] 乳铁蛋白是一种抗微生物的铁载糖蛋白,天然存在于哺乳动物的各种生物体液中,诸如牛奶、唾液、眼泪。它也存在于嗜中性粒细胞中,中性粒细胞是具有防御细菌和真菌感染的功能的免疫细胞。

[0012] 乳铁蛋白因其抗氧化、免疫调节和抗感染性能而被认为是一种特别有用的产品。乳铁蛋白的抗微生物特性主要是由于其结合铁的能力,即将其从那些细菌种类(诸如大肠杆菌)的代谢中减去铁,而这些细菌种类依赖于铁进行自身增殖和对肠粘膜的粘附(抑菌作用)。它还具有直接的抗菌作用(杀菌),这要归功于它能够破坏一些革兰氏阴性细菌的细胞膜外层。

[0013] 乳铁蛋白在口腔护理产品领域中的使用目前尚未得到广泛使用,这主要是因为它的稳定性差,并且与口腔护理产品中通常使用的赋形剂(诸如牙膏、凝胶或漱口水)的相容性差。乳铁蛋白局部施用时也具有相对较低的生物利用度,并且容易发生氧化降解现象。

[0014] 因此,申请人提出了获得含有乳铁蛋白的组合物的问题,该组合物特别适合于口腔卫生,特别是以牙膏、凝胶或漱口水的形式使用,并且具有高的稳定性和生物利用度,从而在口腔内发挥有效和持久的抗菌和抗氧化作用。

[0015] 通过将一种乳铁蛋白与至少一种具有高比表面积的二氧化硅结合在一起,可解决该问题以及以下将更好说明的其他问题,该二氧化硅能够与蛋白质复合形成稳定的复合物,该复合物增加并保持乳铁蛋白的长期抗氧化和抗菌活性。

## 发明内容

[0016] 因此,根据第一方面,本发明涉及至少一种乳铁蛋白和至少一种二氧化硅的复合物,其比表面积在 $100\text{m}^2/\text{g}$ 和 $1000\text{m}^2/\text{g}$ 之间,优选在 $150\text{m}^2/\text{g}$ 和 $700\text{m}^2/\text{g}$ 之间(BET面积,根据标准ISO 9277-2010测量),所述复合物可通过将所述乳铁蛋白加入含有水性溶剂的溶胶-凝胶形式的所述二氧化硅中,随后干燥所述溶胶-凝胶而获得。

[0017] 优选地,干燥通过用超临界 $\text{CO}_2$ 处理或通过冻干进行,如下面更好地说明。

[0018] 根据另一方面,本发明涉及一种用于口腔卫生,特别是用于糖尿病患者的口腔卫生的组合物,其包含所述复合物和至少一种生理上可接受的赋形剂。

[0019] 根据另一方面,本发明涉及如上所定义的复合物,其通过在口腔内局部施用而用于预防或治疗牙科器官疾病,特别是用于预防或治疗牙周炎或种植体周围炎,优选用于糖尿病患者。

[0020] 至于乳铁蛋白,其可为天然或合成来源的,并且可包括不同的形式,单体的和低聚的,可能已结合铁(乳铁蛋白)或未结合铁(脱铁蛋白)。

[0021] 关于二氧化硅,这可通过合成或通过天然来源的材料加工而获得,如下文更好地说明。在合成二氧化硅中,特别优选的形式为热解法二氧化硅或沉淀二氧化硅。优选地,二氧化硅为亲水性二氧化硅。

[0022] 出于本发明的目的,气凝胶形式的二氧化硅为特别优选的。这些为无定形二氧化硅,其特征在于高的比表面积,以及非常高的孔隙率和非常低的密度。孔隙率通常大于

85%，甚至可达到95%至99%的值，并且密度通常为 $0.003\text{g}/\text{cm}^3$ 至 $0.8\text{g}/\text{cm}^3$ ，优选为 $0.005\text{g}/\text{cm}^3$ 至 $0.3\text{g}/\text{cm}^3$ 。

[0023] 从植物废料获得的气凝胶形式的二氧化硅为特别优选的，特别是从谷物（诸如大米、燕麦、小麦、黑麦、斯佩尔特小麦（spelt））的加工产生的外壳中获得。从可再生资源获得的这种二氧化硅具有高生物相容性，具有高表面积和高度多孔的开孔结构，有利于与乳铁蛋白的相互作用。从稻壳获得的二氧化硅为特别优选的。

[0024] 从植物废料中获得气凝胶形式的二氧化硅可通过多阶段方法获得，该方法包含：燃烧植物废料，用碱性溶液（NaOH）处理由此获得的灰分以获得（钠）硅酸盐，后者用酸性溶液（HCl）处理以形成湿溶胶-凝胶，最后干燥湿溶胶-凝胶，优选通过超临界CO<sub>2</sub>处理。关于这种二氧化硅形式的制备的进一步细节报告在例如专利申请WO 2016/193877和由R.S.Kumar等人的文章（《国际化学杂志：工程和应用》，第4卷，第5期，2013年10月（Int.J.Chem.Eng.and Appls.,Vol.4,No.5,October 2013））中。

[0025] 优选地，在根据本发明的复合物中，所述至少一种乳铁蛋白和所述至少一种二氧化硅以0.05:1至10:1，更优选0.1:1至5:1的重量比存在。

[0026] 优选地，根据本发明的组合物包含：

[0027] 10重量%至70重量%的至少一种二氧化硅；

[0028] 0.05重量%至15重量%的至少一种乳铁蛋白；

[0029] 25重量%至80重量%的水相。

[0030] 更优选地，根据本发明的组合物包含：

[0031] 20重量%至50重量%的至少一种二氧化硅；

[0032] 0.2重量%至10重量%的至少一种乳铁蛋白；

[0033] 40重量%至75重量%的水相。

[0034] 应当指出，以上指出的二氧化硅量是指组合物中存在的全部二氧化硅的量，无论其是否与乳铁蛋白复合。

## 具体实施方式

[0035] 根据一个优选的实施方案，根据本发明的组合物包含至少一种乳铁蛋白和至少一种如上定义的二氧化硅的复合物，其与未与乳铁蛋白复合的亲水性二氧化硅，特别是合成二氧化硅，优选亲水性热解法二氧化硅混合。加入非复合的二氧化硅的主要目的是进一步稳定二氧化硅和乳铁蛋白复合物，基本上作为与组合物中可能破坏复合物本身稳定的其它成分相互作用的屏障。

[0036] 与乳铁蛋白复合的二氧化硅和未与乳铁蛋白复合的亲水性二氧化硅的重量比优选在1:200和1:1之间，更优选在1:150和1:5之间。

[0037] 至于水相，其优选包含水和多元醇，更优选甘油或山梨糖醇的混合物。水与多元醇的重量比优选在1:20和1:1之间，更优选在1:10和1:2之间。

[0038] 申请人已发现，根据本发明的乳铁蛋白和二氧化硅复合物使得有可能获得相对于单独使用的相同浓度的乳铁蛋白的改善的抗菌和抗氧化作用，该作用可以持续更长的时间，以便延长效果，而不必过于频繁地重复施用组合物。

[0039] 根据本发明的复合物优选通过以下方法制备，该方法包含：制备含有水性溶剂的

溶胶-凝胶形式的比表面积为 $100\text{m}^2/\text{g}$ 至 $1000\text{m}^2/\text{g}$ ,优选 $150\text{m}^2/\text{g}$ 至 $700\text{m}^2/\text{g}$  (BET面积,根据标准ISO 9277-2010测量)的二氧化硅;

[0040] 将至少一种乳铁蛋白加入溶胶-凝胶形式的二氧化硅中;

[0041] 使如此获得的混合物进行干燥步骤。

[0042] 将乳铁蛋白加入溶胶-凝胶形式的二氧化硅中可通过将蛋白质逐渐加入溶胶-凝胶中并机械混合直到获得均匀的分散体来进行。混合温度通常维持在 $15^\circ\text{C}$ 和 $50^\circ\text{C}$ 之间。

[0043] 优选地,干燥通过用超临界 $\text{CO}_2$ 处理或通过冻干进行。以这种方式,确保了二氧化硅和乳铁蛋白的复合作用,而不会使后者变性或进行其他结构修饰,从而损害其功能。

[0044] 根据本发明的乳铁蛋白和二氧化硅复合物可用至少一种多元醇,优选甘油或山梨糖醇进行处理。多元醇具有覆盖负载有乳铁蛋白的二氧化硅颗粒的功能,从而进一步稳定了结构。

[0045] 可将水用作水性溶剂,任选与至少一种水溶性有机溶剂(例如乙酸乙酯或丙酮)混合。

[0046] 优选地,使用超临界 $\text{CO}_2$ 的干燥步骤在高压釜中在 $15^\circ\text{C}$ 至 $60^\circ\text{C}$ 的温度和80巴至150巴的压力下进行。为了避免乳铁蛋白的降解,优选使用不大于 $60^\circ\text{C}$ 的温度。处理进行的时间优选为2小时至10小时,更优选为4小时至8小时。

[0047] 优选地,通过冻干(冷冻干燥)的干燥步骤是通过在 $-80^\circ\text{C}$ 和 $-30^\circ\text{C}$ 之间的温度下真空冷却并随后再次在不高于 $60^\circ\text{C}$ ,优选在 $20^\circ\text{C}$ 和 $50^\circ\text{C}$ 之间的温度下真空加热而进行。冻干期间的压力优选维持在0.1巴和0.8巴之间。

[0048] 根据本发明的口腔卫生组合物除了复合物之外,还包含至少一种生理上可接受的赋形剂。这是为了获得不同形式的口腔卫生产品,例如牙膏、漱口水、凝胶、口香糖、口腔用片剂、牙龈染色等。

[0049] 为此,根据本发明的组合物可包含在牙齿卫生产品领域中常用的成分,例如:颗粒形式的研磨剂、湿润剂、粘合剂、增稠剂、粘度调节剂、表面活性剂、甜味剂、调味剂、防腐剂、抗牙斑剂、染料等。

[0050] 提供以下实施例示例仅出于说明本发明的目的,而无意于限制由所附权利要求书限定的保护范围。

[0051] 实施例1-3。

[0052] 制备表1所示的组合物(占总组合物的重量%):

[0053] 表1

[0054]	实施例	1	2	3 (*)
--------	-----	---	---	-------

	甘油	51.6	51.0	74.0
	水	7.0	15.0	25.0
[0055]	亲水二氧化硅	40.0	30.0	--
	稻壳二氧化硅	0.4	3.0	--
	乳铁蛋白	1.0	1.0	1.0

[0056] (\*) 比较

[0057] 亲水性二氧化硅:比表面积为约200m<sup>2</sup>/g (BET面积,根据标准ISO 9277-2010测量)的亲水性气相二氧化硅 (Evonik的商业产品Aerosil TM 200);

[0058] 稻壳二氧化硅:比表面积为约550m<sup>2</sup>/g (BET面积,根据标准ISO 9277-2010测量)且密度为约0.050g/cm<sup>3</sup>的气凝胶形式的二氧化硅。

[0059] 稻壳二氧化硅和乳铁蛋白预先通过以下方法复合。稻壳二氧化硅的制备如W0 2016/193877的实施例1中所述,不同之处在于,在获得二氧化硅溶胶-凝胶后,将其加入乳铁蛋白中,然后如同一实施例1中所述用超临界CO<sub>2</sub>干燥,不同之处在于,在高压釜中在50℃的温度和100巴的压力下处理加入乳铁蛋白的二氧化硅溶胶-凝胶,处理时间等于6小时,以获得溶胶-凝胶的干燥而不引起乳铁蛋白的降解。

[0060] 在磁力棒的帮助下,将由此获得的复合物和组合物的其他成分在烧瓶中混合,直到获得均匀的制剂。应该注意的是,亲水性二氧化硅已这样加入,即没有与乳铁蛋白复合。

[0061] 验证了这些组合物的抗氧化和抗菌性能,评估了功效随时间的变化。

[0062] 抗氧化活性(清除剂)。

[0063] 通过测量在人角质形成细胞的细胞培养物中抵消自由基(ROS)形成的能力来评估上述组合物的抗氧化活性(清除自由基的能力)。为此,用标量浓度的产品(从1.0mg/ml开始以1:2的稀释度)处理角质形成细胞,然后在室温下暴露于UVA射线以刺激ROS的产生。未经处理的细胞代表阴性对照。同时,在照射之前和之后进行中性红吸收(NRU)测定,以验证在实验条件下细胞活力没有显著降低。暴露于UVA射线之前的NRU测试结果表明,在所有使用浓度下均不存在细胞活力抑制作用。因此,ROS剂量应考虑所有浓度。

[0064] 通过ROS剂量获得的结果证明了抗氧化作用,表示为相对于阴性对照的ROS减少百分比。

[0065] 更详细地,所使用的材料和操作条件在下文中报告。

[0066] 使用人角质形成细胞(Huker),使其在含有10%胎牛血清(FBS)和1%抗生素(青霉素和链霉素)的DMEM(Dulbecco改良Eagle培养基)中生长,并在标准培养条件(37℃,5%CO<sub>2</sub>)下孵育。应用了良好的细胞培养方法。

[0067] 为了模拟能够诱导ROS形成的环境胁迫条件,对细胞进行UVA射线照射。实验中使

用的灯是一个阳光模拟器,该模拟器可复制太阳光谱,其恒定UVA发射范围在315nm和400nm之间,辐射度为1.7mW/cm<sup>2</sup>。适当筛选UVB的发射,以避免针对细胞培养的细胞毒性损害。

[0068] 在不同照射时间(4min、8min、12min、16min和20min)评估对ROS产生的影响。

[0069] 将测试组合物的每个样品溶解在水中,然后在生长培养基中稀释至在0.0156mg/ml和1.0mg/ml之间(1:2稀释度)的期望的最终浓度。2',7'-二氯荧光黄双乙酸盐(DCFDA)用作荧光示踪剂,以50mM的浓度溶于二甲基亚砷(DMSO)中,然后在适当的缓冲液中稀释至250mM的使用浓度。

[0070] 将每种细胞样品(人角质形成细胞)接种到96孔板中。达到半融合单层后,将细胞用磷酸盐缓冲液(PBS)洗涤,然后在标准培养条件下与DCFDA溶液孵育20min。然后除去DCFDA,将细胞用PBS洗涤,用不同浓度的测试组合物和阳性对照处理,在标准条件下孵育20min,然后用UVA照射4min、8min、12min、16min和20min。在每个照射周期结束时,用荧光计在485nm的激发波长和530nm的发射波长下进行测量。

[0071] 为了验证在所检查的组合物的存在下以及在所施加的实验条件下细胞活力没有显著变化,在照射细胞之前和之后进行中性红吸收(NRU)测定。中性红(NR)是一种弱阳离子探针,通过非离子被动扩散穿过细胞膜并集中在溶酶体中,在溶酶体中它通过静电相互作用与基质的阴离子位点结合。NR的吸收取决于细胞产生pH梯度的能力,而pH梯度又由ATP的产生决定。因此,NR仅在活细胞中积累,然后用酸性乙醇溶液将其提取出来:溶液的吸光度,在分光光度计上测量,与细胞活力成正比。

[0072] 轻轻除去培养基后,将细胞用中性红(NR)(50pg/ml)处理,并在标准条件下孵育3小时。随后用PBS洗涤细胞以除去染料残留物,并提取NR。将板轻轻搅拌至少10min(以促进NR的溶解),并通过分光光度法在540nm处测定吸光度(光学密度,OD)。在540nm处测得的吸光度与细胞活力成正比。基于540nm处的吸光度值并且以阴性对照(未处理的细胞)的吸光度为100%来计算百分比。在没有UVA照射的情况下,对于所有测试浓度,用该产品处理的角质形成细胞的细胞活力与未处理的角质形成细胞相当,因此在ROS剂量中考虑了所有浓度。

[0073] 抗菌活性。

[0074] 测试每种组合物以验证对大肠杆菌的抗微生物活性。将等于9g组合物的量添加到1ml大肠杆菌接种物中(ATCC 8739),以便获得约10<sup>5</sup>CFU的最终进料。在增加接触时间(1小时、4小时、8小时和24小时)之后,取0.5ml的悬浮液进行板计数(表面剥落法)。因此,相对于初始细菌计数确定了细菌计数的%变化。

[0075] 结果显示在下表中,其中左列显示时间(表2以分钟为单位,表3以小时为单位)。在如图1和图2所附的图表中报告了相同的结果。

[0076] 表2(抗氧化作用:%ROS减少)

[0077]

实施例	1	2	3(*)
t=8	50	40	60
t=12	65	65	30
t=16	40	50	20
t=20	25	30	10

[0078] (\*)比较

[0079] 表3

[0080] (抗菌作用:%细菌负荷减少)

实施例	1	2	3 (*)
[0081] t=1	30	25	45
t=4	45	35	55
[0082] t=8	70	75	58
t=24	70	77	60

[0083] (\*)比较

[0084] 从获得的结果来看,与单独使用的乳铁蛋白相比,包含乳铁蛋白和二氧化硅的复合物使得有可能以更渐进的方式提高抗氧化剂和抗菌作用的功效并随着时间的推移维持它们。

[0085] 实施例4-6。

[0086] 实施例2和3在相同的条件下,用上述相同的成分重复进行(实施例4和5)。再次以相同的程序和相同的成分进行另一个比较例(实施例6),其中将乳铁蛋白简单地与亲水性二氧化硅混合,即不制备根据本发明的复合物,其中二氧化硅以溶胶-凝胶形式制备,加入乳铁蛋白,然后干燥。组合物在表4中报告(占总组合物的重量%):

[0087] 表4

实施例	4	5 (*)	6 (*)
甘油	51.0	74.0	51.0
水	15.0	25.0	15.0
亲水二氧化硅	30.0	--	33.0
稻壳二氧化硅	3.0	--	--
乳铁蛋白	1.0	1.0	1.0

[0089] (\*)比较

[0090] 如实施例1-3中所述,验证了这些组合物的抗氧化和抗菌性能,评估了效力随时间的变化。

[0091] 结果报告在下表中,其中左列显示时间(表5以分钟为单位,表6以小时为单位)。在如图3和图4所附的图表中报告了相同的结果。

[0092] 表5(抗氧化作用:%ROS减少)

实施例	4	5 (*)	6 (*)
t=4	35	60	55
t=8	38	58	50

t=12	60	35	30
t=16	55	25	20
t=20	48	15	10

[0094] (\*) 比较

[0095] 表6

[0096] (抗菌作用:%细菌负荷减少)

[0097]

实施例	4	5 (*)	6 (*)
t=1	26	45	50
t=4	42	55	55
t=8	60	58	60
t=24	77	60	63

[0098] (\*) 比较

[0099] 从获得的结果来看,显然,与单独使用乳铁蛋白相比,以及不形成根据本发明的复合物的乳铁蛋白与二氧化硅的简单混合物相比,包含乳铁蛋白和二氧化硅的复合物使得有可能以更渐进的方式提高抗氧化剂和抗菌作用的功效并随着时间的推移维持它们。

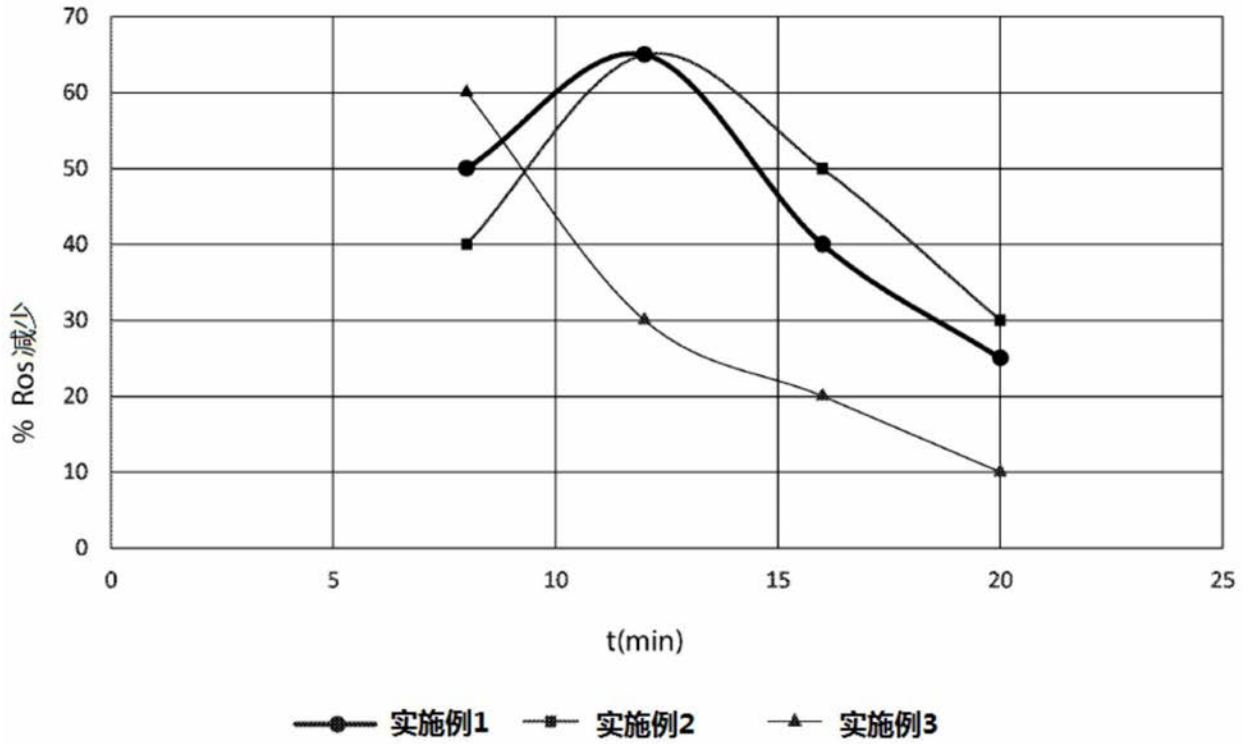


图1

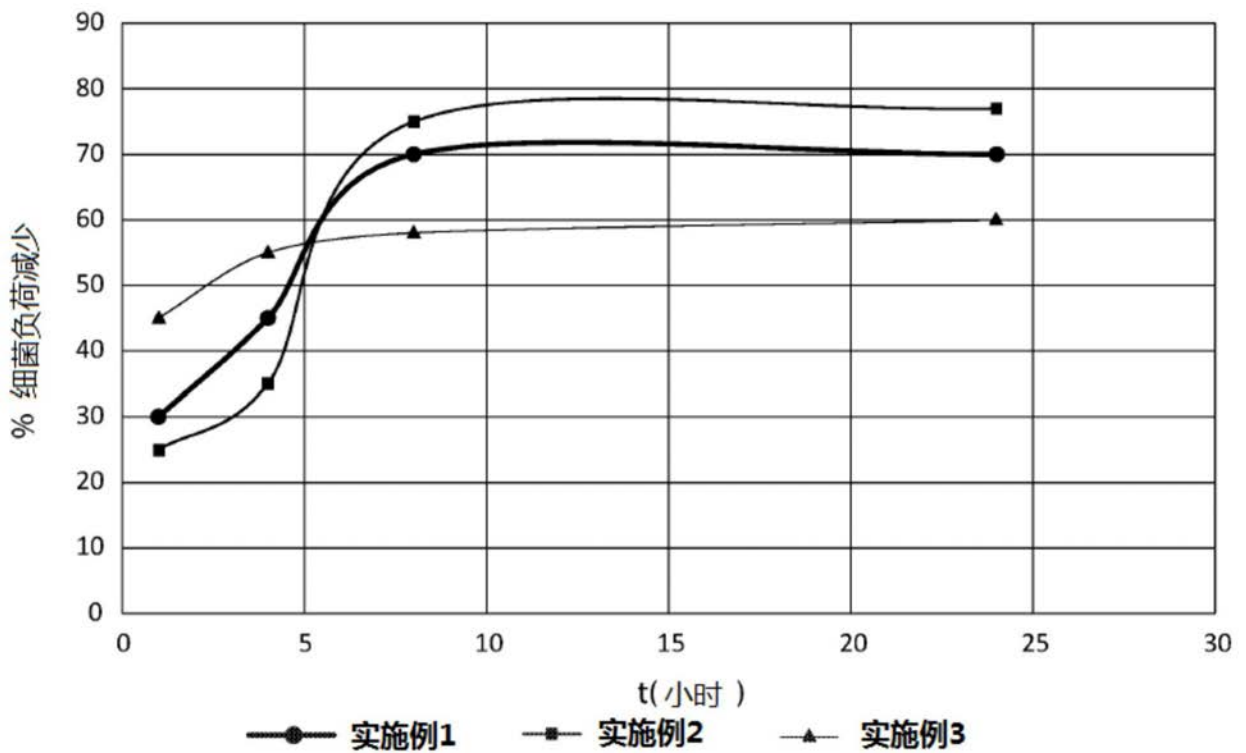


图2

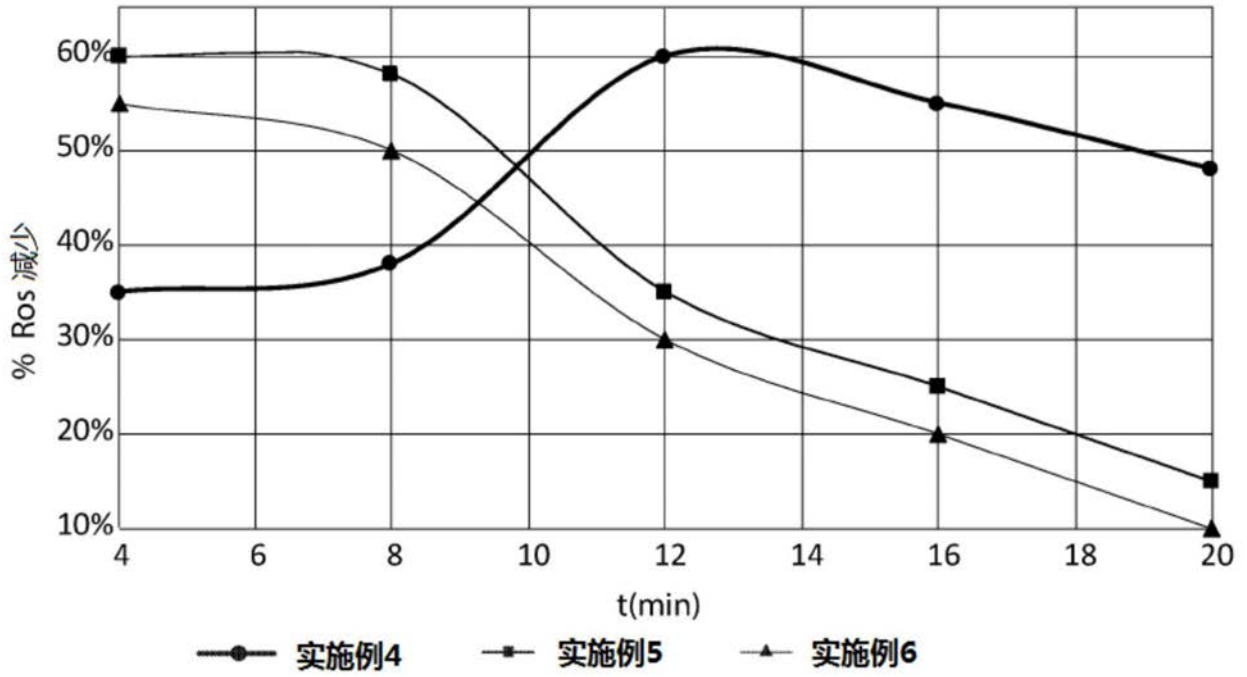


图3

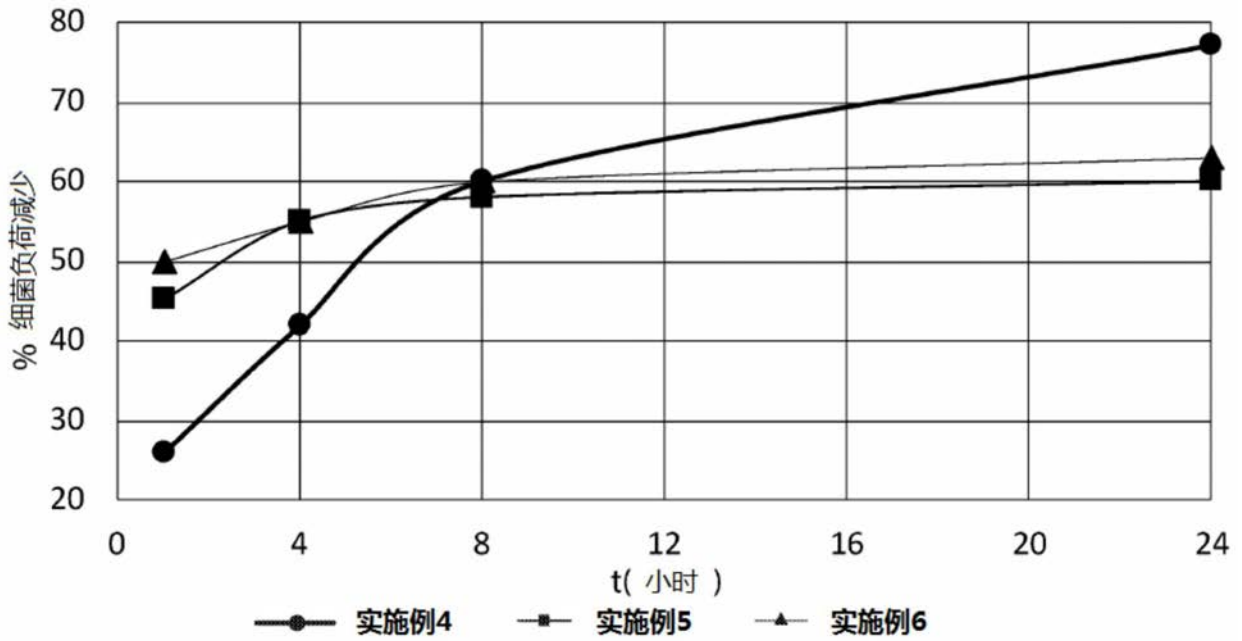


图4