



(12)发明专利申请

(10)申请公布号 CN 110475533 A

(43)申请公布日 2019.11.19

(21)申请号 201880017808.7

(22)申请日 2018.03.14

(30)优先权数据

2017900893 2017.03.14 AU

(85)PCT国际申请进入国家阶段日

2019.09.12

(86)PCT国际申请的申请数据

PCT/AU2018/050231 2018.03.14

(87)PCT国际申请的公布数据

W02018/165708 EN 2018.09.20

(71)申请人 墨尔本大学

地址 澳大利亚维多利亚

(72)发明人 埃里克·查尔斯·雷诺兹

(74)专利代理机构 北京英赛嘉华知识产权代理
有限责任公司 11204

代理人 王达佐 洪欣

(51)Int.Cl.

A61K 6/033(2006.01)

权利要求书3页 说明书28页 附图5页

(54)发明名称

治疗牙龈炎

(57)摘要

本发明涉及组合物及其在口腔护理中的用途。具体地,该组合物和方法用于保持口腔健康和/或治疗各种口腔病况如牙龈炎。本发明涉及稳定的无定形磷酸钙(ACP)和/或稳定的无定形氟磷酸钙(ACFP)在制备药物中的方法和用途,所述药物用于减少个体口腔部位的致病性口腔细菌;增加个体口腔部位的共生口腔细菌;降低个体口腔部位的致病性口腔细菌的比例;抑制口腔生态失调;减少有需要的个体中的牙龈炎症;治疗有需要的个体中的牙龈炎;以及治疗有需要的个体中的慢性牙龈炎。

1. 用于减少个体口腔部位的致病性口腔细菌的方法,所述方法包括将稳定的无定形磷酸钙 (ACP) 和/或稳定的无定形氟磷酸钙 (ACFP) 施用至所述个体的口腔,从而减少口腔部位的致病菌。

2. 用于增加个体口腔部位的共生口腔细菌的方法,所述方法包括将稳定的无定形磷酸钙 (ACP) 和/或稳定的无定形氟磷酸钙 (ACFP) 施用至所述个体的口腔,从而增加口腔部位的共生口腔细菌。

3. 降低个体口腔部位的致病性口腔细菌的比例的方法,所述方法包括将稳定的无定形磷酸钙 (ACP) 和/或稳定的无定形氟磷酸钙 (ACFP) 施用至所述个体的口腔,从而减少口腔部位的致病性口腔细菌的比例。

4. 根据权利要求3所述的方法,其中所述致病性口腔细菌可以是与牙龈炎症、牙龈炎、慢性牙龈炎或牙周病相关的任何一种或多种。

5. 根据权利要求4所述的方法,其中所述致病性口腔细菌是产酸的和/或耐酸的和/或致炎性的。

6. 根据权利要求5所述的方法,其中所述致病性口腔细菌是致炎性的。

7. 根据权利要求5或6所述的方法,其中所述细菌是选自以下的任何一种或多种:变形链球菌 (*Streptococcus mutans*)、内氏放线菌 (*Actinomyces naeslundii*)、小韦荣球菌 (*Veillonella parvula*)、干酪乳杆菌 (*Lactobacillus casei*)、牙龈卟啉单胞菌 (*Porphyromonas gingivalis*)、福赛斯坦纳菌 (*Tannerella forsythia*)、齿垢密螺旋体 (*Treponema denticola*)、韦德纤毛菌 (*Leptotrichia wadei*)、沙氏纤毛菌 (*Leptothrichia shahii*)、口腔纤毛菌 (*Leptotrichia buccalis*) 和奇异劳特普罗菌 (*Lautropia mirabilis*)。

8. 根据权利要求2所述的方法,其中所述共生口腔细菌可以是表达精氨酸脱亚胺酶和/或硝酸还原酶的任何一种或多种物种。

9. 根据权利要求8所述的方法,其中所述细菌是以下的任何一种或多种:坚硬棒状杆菌 (*Corynebacterium durum*)、齍齿罗氏菌 (*Rothia dentocariosa*)、缓症链球菌 (*Streptococcus mitis*)、血链球菌 (*Streptococcus sanguinis*) 和具核梭杆菌 (*Fusobacterium nucleatum*)。

10. 抑制口腔生态失调的方法,所述方法包括将稳定的无定形磷酸钙 (ACP) 和/或稳定的无定形氟磷酸钙 (ACFP) 施用至所述个体的口腔,从而抑制口腔生态失调。

11. 减少有需要的个体中的牙龈炎症的方法,所述方法包括将稳定的无定形磷酸钙 (ACP) 和/或稳定的无定形氟磷酸钙 (ACFP) 施用至所述个体的口腔,从而减少牙龈炎症。

12. 根据权利要求11所述的方法,其中所述方法还包括鉴定患有牙龈炎症的个体的初始步骤。

13. 根据权利要求11或12所述的方法,其中所述个体患有轻度的牙龈炎症。

14. 根据权利要求11或12所述的方法,其中所述个体患有中度的牙龈炎症。

15. 根据权利要求11或12所述的方法,其中所述个体患有中度的牙龈炎症。

16. 根据权利要求11或12所述的方法,其中所述个体的改良牙龈指数评分为1。

17. 根据权利要求11或12所述的方法,其中所述个体的改良牙龈指数评分为2。

18. 根据权利要求11或12所述的方法,其中所述个体的改良牙龈指数评分为3。

19. 根据权利要求11或12所述的方法, 其中所述个体的改良牙龈指数评分为4。

20. 治疗有需要的个体中的牙龈炎的方法, 所述方法包括将稳定的无定形磷酸钙 (ACP) 和/或稳定的无定形氟磷酸钙 (ACFP) 施用至所述个体的口腔, 从而治疗牙龈炎。

21. 根据权利要求20所述的方法, 其中所述方法还包括鉴定患有牙龈炎的个体的初始步骤。

22. 治疗有需要的个体中的慢性牙龈炎的方法, 所述方法包括将稳定的无定形磷酸钙 (ACP) 和/或稳定的无定形氟磷酸钙 (ACFP) 施用至所述个体的口腔, 从而治疗慢性牙龈炎。

23. 根据权利要求22所述的方法, 其中所述方法还包括鉴定患有慢性牙龈炎的个体的初始步骤。

24. 治疗有需要的个体中的牙周炎的方法, 所述方法包括将稳定的无定形磷酸钙 (ACP) 和/或稳定的无定形氟磷酸钙 (ACFP) 施用至所述个体的口腔, 从而治疗牙周炎。

25. 根据权利要求24所述的方法, 其中所述方法还包括鉴定患有牙周炎的个体的初始步骤。

26. 根据权利要求1-25中任一项所述的方法, 其中所述方法还包括在将稳定的无定形磷酸钙 (ACP) 和/或稳定的无定形氟磷酸钙 (ACFP) 施用至所述个体的口腔之前进行牙齿操作。

27. 根据权利要求26所述的方法, 其中所述牙齿操作选自清创术、洁治术、根面平整术以及去除龈下或龈上细菌的任何其他操作。

28. 根据权利要求1-27中任一项所述的方法, 其中所述个体没有任何可检测出的牙齿表面或亚表面损伤。

29. 稳定的无定形磷酸钙 (ACP) 和/或稳定的无定形氟磷酸钙 (ACFP) 在制备药物中的用途, 所述药物用于:

- 减少个体口腔部位的致病性口腔细菌;
- 增加个体口腔部位的共生口腔细菌;
- 降低个体口腔部位的致病性口腔细菌的比例;
- 抑制口腔生态失调;
- 减少有需要的个体中的牙龈炎症;
- 治疗有需要的个体中的牙龈炎; 或者
- 治疗有需要的个体中的慢性牙龈炎。

30. 稳定的无定形磷酸钙 (ACP) 和/或稳定的无定形氟磷酸钙 (ACFP), 其用于以下用途:

- 减少个体口腔部位的致病性口腔细菌;
- 增加个体口腔部位的共生口腔细菌;
- 降低个体口腔部位的致病性口腔细菌的比例;
- 抑制口腔生态失调;
- 减少有需要的个体中的牙龈炎症;
- 治疗有需要的个体中的牙龈炎; 或者
- 治疗有需要的个体中的慢性牙龈炎。

31. 用于减少个体牙釉质的脱矿的方法, 所述方法包括将稳定的无定形磷酸钙 (ACP) 和/或稳定的无定形氟磷酸钙 (ACFP) 施用至所述个体的口腔, 从而减少个体牙釉质的脱矿。

32. 根据权利要求31所述的方法, 其中所述稳定的ACP复合物是亚锡缔合的磷酸肽 (PP) 稳定的无定形磷酸钙 (ACP) 复合物, 并且所述稳定的ACFP复合物是亚锡缔合的磷酸肽 (PP) 稳定的无定形氟磷酸钙 (ACFP) 复合物。

33. 根据权利要求31或32所述的方法, 其中所述脱矿的减少是脱矿速率的降低。

34. 根据权利要求1-30中任一项所述的方法、用途或复合物, 其中所述稳定的无定形磷酸钙 (ACP) 和/或无定形氟磷酸钙 (ACFP) 是磷酸肽稳定的。

35. 根据权利要求34所述的方法、用途或复合物, 其中所述磷酸肽是酪蛋白磷酸肽。

36. 根据权利要求1-35中任一项所述的方法、用途或复合物, 其中将所述稳定的ACP或ACFP复合物施用至所述个体保持5至60分钟、10至45分钟、10至30分钟或20分钟。

37. 根据权利要求1-36中任一项所述的方法、用途或复合物, 其中将所述稳定的ACP或ACFP复合物每天或每24小时施用4、5或6次。

38. 根据权利要求1-37中任一项所述的方法、用途或复合物, 其中将所述稳定的ACP或ACFP复合物施用1至2周。

39. 根据权利要求1-38中任一项所述的方法、用途或复合物, 其中所述复合物被配制成为以下中的任何一种: 牙膏、牙粉和液体洁齿剂、漱口水、含漱液、口腔喷雾剂、涂剂、牙科粘固剂、锭剂、口香糖、牙科糊剂、牙龈按摩霜、漱口片剂、乳制品和其他食品。

40. 根据权利要求39所述的方法、用途或复合物, 其中所述组合物是口香糖。

41. 根据权利要求40所述的方法、用途或复合物, 其中所述口香糖含有至少约15mg、20mg、25mg、30mg、35mg、40mg、45mg、50mg、55mg或60mg稳定的ACP或ACFP复合物。

42. 根据权利要求41所述的方法、用途或复合物, 其中所述口香糖含有约18.8或56.4mg稳定的ACP或ACFP复合物。

治疗牙龈炎

[0001] 相关申请的交叉引用

[0002] 本申请要求澳大利亚临时申请第2017900893号的优先权,该临时申请的全部内容通过引用整体并入本文中。

发明领域

[0003] 本发明涉及组合物及其在口腔护理中的用途。具体地,该组合物和方法用于保持口腔健康和/或治疗各种口腔病况如牙龈炎。

[0004] 发明背景

[0005] 口腔微生物与它们的宿主以主要和谐的共生关系共同进化并共存数百万年。宿主和口腔微生物组不是不同的存在,而是一起形成“超级有机体(superorganism)”或全功能体(holobiont),其中口腔微生物组在口腔的保持和健康中起重要作用。口腔为体内第二最多多样化的微生物群落提供了环境,具有700多种常驻细菌种类,其定殖在牙齿的硬表面和口腔粘膜的软组织。通过DNA测序技术的最新进展,已经揭示了口腔微生物组的复杂性,这为在健康和疾病期间口腔内多种微生物的生物膜的作用提供了新的见解。

[0006] 与健康有关的许多细菌物种被认为只是共生有机体,但通过这种更大的见解,现在很清楚的是许多实际上对它们的宿主有益。这些共生/有益物种现在被称为共生体,因为它们与它们的宿主处于真正的共生关系中,提供了改善健康的要素和/或防止致病物种定植以引起疾病。然而,通过现代生活方式(例如饮食糖、吸烟、口腔卫生不良等)或其他因素(例如遗传易感性)对口腔微生物组的扰乱可对一般和口腔健康具有不良后果。然后可以破坏口腔生态系统的微调平衡(体内平衡或共生),使得促进疾病的细菌(致病共栖菌谱)超过有益/共生的共生体,从而表现出生态失调并引起诸如牙周病(牙龈炎和牙周炎)的疾病。因此,需要促进平衡的口腔微生物组以有效地保持或恢复口腔健康。促进有益/共生共生体产生平衡的口腔微生物组和体内平衡的过程被称为益生菌形成(prebiosis)。因此,通过增加共生菌的比例来促进平衡的口腔微生物组和体内平衡的物质被称为益生元。

[0007] 酪蛋白磷酸肽-无定形磷酸钙(CPP-ACP)是一种唾液仿生物,其提供生物可利用的钙和磷酸盐离子,以使牙釉质和牙本质中龋齿的早期阶段再矿化。已经显示酪蛋白磷酸肽和无定形磷酸钙的特异性复合物(“CPP-ACP”,可以以RecaldentTM商购获得)在体外和原位对牙釉质亚表面损伤进行再矿化。

[0008] 墨尔本大学名下的W0 98/40408(其内容通过引用完全并入本文)描述了已经在碱性pH下产生的酪蛋白磷酸肽-无定形磷酸钙复合物(CPP-ACP)和CPP稳定的无定形氟磷酸钙复合物(CPP-ACFP)。已经显示这种复合物促进动物和人原位龋齿模型中牙釉质亚表面损伤的再矿化。此外,这些组合物的改良公开于W0 2006/066013和W02007/090242和具体用途(其内容通过引用完全并入本文)。

[0009] 存在针对牙龈疾病的新的或改进的治疗的需求。此外,存在针对新的或改进的疗法来保持或恢复牙龈健康的需求。

[0010] 本说明书中对任何现有技术的引用不是承认或暗示该现有技术在任何管辖权中

形成公知常识的一部分,或者该现有技术能够被合理地预期为被本领域技术人员理解、认为是相关的和/或与其他部分的现有技术组合。

[0011] 发明概述

[0012] 在一个方面,本发明提供用于减少个体口腔部位的致病性口腔细菌的方法,所述方法包括将稳定的无定形磷酸钙 (ACP) 和/或稳定的无定形氟磷酸钙 (ACFP) 施用至所述个体的口腔,从而减少口腔部位的致病菌。

[0013] 在另一个方面,本发明还提供用于增加个体口腔部位的共生口腔细菌的方法,所述方法包括将稳定的无定形磷酸钙 (ACP) 和/或稳定的无定形氟磷酸钙 (ACFP) 施用至所述个体的口腔,从而增加口腔部位的共生口腔细菌。

[0014] 在另一个方面,本发明还提供降低个体口腔部位的致病性口腔细菌的比例的方法,所述方法包括将稳定的无定形磷酸钙 (ACP) 和/或稳定的无定形氟磷酸钙 (ACFP) 施用至所述个体的口腔,从而减少口腔部位的致病性口腔细菌的比例。

[0015] 在本文描述的本发明的任何方面,所述致病性口腔细菌可以是与牙龈炎症、牙龈炎、慢性牙龈炎、牙周炎或牙周病相关的任何一种或多种。通常,所述致病性口腔细菌是产酸的和/或耐酸的和/或致炎性的。优选地,所述细菌是致炎性的。产生脂多糖 (LPS) 并将 LPS 以 LPS 释放到组织中的细菌是高致炎性的。

[0016] 优选地,所述细菌为选自以下的任何一种或多种:变形链球菌 (*Streptococcus mutans*)、内氏放线菌 (*Actinomyces naeslundii*)、小韦荣球菌 (*Veillonella parvula*)、干酪乳杆菌 (*Lactobacillus casei*)、牙龈卟啉单胞菌 (*Porphyromonas gingivalis*)、福赛斯坦纳菌 (*Tannerella forsythia*)、齿垢密螺旋体 (*Treponema denticola*)、韦德纤毛菌 (*Leptotrichia wadei*)、沙氏纤毛菌 (*Leptothrichia shahii*)、口腔纤毛菌 (*Leptotrichia buccalis*) 和奇异劳特普罗菌 (*Lautropia mirabilis*)。

[0017] 在本文描述的本发明的任何方面,所述共生口腔细菌可以是表达精氨酸脱亚胺酶和/或硝酸还原酶的任何一种或多种物种。通常,所述细菌是以下的任何一种或多种:坚硬棒状杆菌 (*Corynebacterium durum*)、龋齿罗氏菌 (*Rothia dentocariosa*)、缓症链球菌 (*Streptococcus mitis*)、血链球菌 (*Streptococcus sanguinis*) 和具核梭杆菌 (*Fusobacterium nucleatum*)。

[0018] 在一个方面,本发明提供抑制口腔生态失调的方法,所述方法包括将稳定的无定形磷酸钙 (ACP) 和/或稳定的无定形氟磷酸钙 (ACFP) 施用至所述个体的口腔,从而抑制口腔生态失调。

[0019] 在另一个方面,本发明提供减少有需要的个体中的牙龈炎症的方法,所述方法包括将稳定的无定形磷酸钙 (ACP) 和/或稳定的无定形氟磷酸钙 (ACFP) 施用至所述个体的口腔,从而减少牙龈炎症。优选地,所述方法还包括鉴定患有牙龈炎症的个体的初始步骤。

[0020] 在另一个方面,本发明提供治疗有需要的个体中的牙龈炎的方法,所述方法包括将稳定的无定形磷酸钙 (ACP) 和/或稳定的无定形氟磷酸钙 (ACFP) 施用至所述个体的口腔,从而治疗牙龈炎。优选地,所述方法还包括鉴定患有牙龈炎的个体的初始步骤。

[0021] 在另一个方面,本发明提供治疗有需要的个体中的慢性牙龈炎的方法,所述方法包括将稳定的无定形磷酸钙 (ACP) 和/或稳定的无定形氟磷酸钙 (ACFP) 施用至所述个体的口腔,从而治疗慢性牙龈炎。优选地,所述方法还包括鉴定患有慢性牙龈炎的个体的初始步

骤。

[0022] 在另一个方面,本发明提供治疗有需要的个体中的牙周炎的方法,所述方法包括将稳定的无定形磷酸钙 (ACP) 和/或稳定的无定形氟磷酸钙 (ACFP) 施用至所述个体的口腔,从而治疗牙周炎。优选地,所述方法还包括鉴定患有牙周炎的个体的初始步骤。

[0023] 在本发明的任何方面,所述方法还包括在将稳定的无定形磷酸钙 (ACP) 和/或稳定的无定形氟磷酸钙 (ACFP) 施用至所述个体的口腔之前进行牙齿操作。牙齿操作的实例包括清创术、洁治术、根面平整术或去除龈下或龈上细菌的任何其他操作。

[0024] 在另一个方面,本发明提供稳定的无定形磷酸钙 (ACP) 和/或稳定的无定形氟磷酸钙 (ACFP) 在制备药物中的用途,所述药物用于以下用途:

[0025] -减少个体口腔部位的致病性口腔细菌;

[0026] -增加个体口腔部位的共生口腔细菌;

[0027] -降低个体口腔部位的致病性口腔细菌的比例;

[0028] -抑制口腔生态失调;

[0029] -减少有需要的个体中的牙龈炎症;

[0030] -治疗有需要的个体中的牙龈炎;或者

[0031] -治疗有需要的个体中的慢性牙龈炎。

[0032] 在另一个方面,本发明提供稳定的无定形磷酸钙 (ACP) 和/或稳定的无定形氟磷酸钙 (ACFP),其用于:

[0033] -减少个体口腔部位的致病性口腔细菌;

[0034] -增加个体口腔部位的共生口腔细菌;

[0035] -降低个体口腔部位的致病性口腔细菌的比例;

[0036] -抑制口腔生态失调;

[0037] -减少有需要的个体中的牙龈炎症;

[0038] -治疗有需要的个体中的牙龈炎;或者

[0039] -治疗有需要的个体中的慢性牙龈炎。

[0040] 在另一个方面,本发明提供用于减少个体牙釉质的脱矿的方法,所述方法包括将稳定的无定形磷酸钙 (ACP) 和/或稳定的无定形氟磷酸钙 (ACFP) 施用至所述个体的口腔,从而减少个体牙釉质的脱矿。优选地,所述稳定的ACP复合物是亚锡缔合的磷酸肽 (PP) 稳定的无定形磷酸钙 (ACP) 复合物,并且所述稳定的ACFP复合物是亚锡缔合的磷酸肽 (PP) 稳定的无定形氟磷酸钙 (ACFP) 复合物。优选地,所述脱矿的减少是脱矿速率的降低。

[0041] 优选地,所述稳定的无定形磷酸钙 (ACP) 和/或无定形氟磷酸钙 (ACFP) 是磷酸肽稳定的。优选地,所述磷酸肽(如下定义)是酪蛋白磷酸肽。

[0042] 在本发明的任何方法或用途中,所述稳定的ACP或ACFP复合物可以施用至个体保持5至60分钟、10至45分钟、10至30分钟或20分钟。而且,所述稳定的ACP或ACFP复合物可以每天或者每24小时施用4、5或6次。优选地,将所述稳定的ACP或ACFP复合物施用1至2周。

[0043] 在任何方面,所述组合物可以以适用于口腔的各种形式进行制备和使用,例如洁齿剂包括牙膏、牙粉和液体洁齿剂、漱口水、含漱液、口腔喷雾剂、涂剂、牙科粘固剂、锭剂、口香糖、牙科糊剂、牙龈按摩霜、漱口片剂、乳制品和其他食品(包括酸乳)。优选地,所述组合物是口香糖。优选地,所述口香糖含有至少约15mg、20mg、25mg、30mg、35mg、40mg、45mg、

50mg、55mg或60mg稳定的ACP或ACFP复合物。所述口香糖可含有约18.8或56.4mg稳定的ACP或ACFP复合物。

[0044] 在任何方面,所述稳定的ACP或ACFP复合物的钙离子含量大于约30摩尔/摩尔PP。优选地,所述钙离子含量在约30至100摩尔钙/摩尔PP的范围内。更优选地,所述钙离子含量在约30至约50摩尔钙/摩尔PP的范围内。

[0045] 在任何方面,所述稳定的ACP复合物是亚锡缔合的磷酸肽(PP)稳定的无定形磷酸钙(ACP)复合物,并且所述稳定的ACFP复合物是亚锡缔合的磷酸肽(PP)稳定的无定形氟磷酸钙(ACFP)复合物。

[0046] 在任何方面,ACP和/或ACFP复合物呈酪蛋白磷酸肽稳定的ACP和/或ACFP复合物的形式。

[0047] 优选地,ACP的相主要是(即>50%)碱性相,其中所述ACP主要包括物质 Ca^{2+} 、 PO_4^{3-} 和 OH^- 。ACP的碱性相可具有通式 $[\text{Ca}_3(\text{PO}_4)_2]_x[\text{Ca}_2(\text{PO}_4)(\text{OH})]_y$,其中 $x \geq 1$ 。优选地 $x=1-5$ 。更优选地, $x=1$,即该式的两种组分以等比例存在。因此,在一个实施方案中,ACP的碱性相具有式 $\text{Ca}_3(\text{PO}_4)_2\text{Ca}_2(\text{PO}_4)(\text{OH})$ 。

[0048] 优选地,ACFP的相主要是(即>50%)碱性相,其中所述ACFP主要包括物质 Ca^{2+} 、 PO_4^{3-} 和 F^- 离子。ACFP的碱性相可具有通式 $[\text{Ca}_3(\text{PO}_4)_2]_x[\text{Ca}_2(\text{PO}_4)\text{F}]_y$,其中当 $y=1$ 时 $x \geq 1$,或者其中当 $x=1$ 时 $y \geq 1$ 。优选地, $y=1$ 且 $x=1-3$ 。更优选地, $y=1$ 且 $x=1$,即该式的两种组分以等比例存在。因此,在一个实施方案中,ACFP的碱性相具有式 $\text{Ca}_3(\text{PO}_4)_2\text{Ca}_2(\text{PO}_4)\text{F}$ 。

[0049] 在一个实施方案中,所述ACP复合物基本上由磷酸肽、钙、磷酸根离子和氢氧根离子以及水组成。优选地,所述复合物还包含亚锡离子。

[0050] 在一个实施方案中,所述ACFP复合物基本上由磷酸肽,钙,磷酸根离子、氟离子和氢氧根离子以及水组成。优选地,所述复合物还包含亚锡离子。

[0051] 本发明还涉及用于本发明的方法或用途的试剂盒,所述试剂盒包含:

[0052] (a) 如本文所述的组合物,或者

[0053] (b) 如本文所述的稳定的ACP或ACFP复合物。

[0054] 如本文所使用的,除非上下文另有要求,否则术语“包含(comprise)”和该术语的变型(如“包含(comprising)”、“包含(comprises)”和“包含(comprised)”),并不旨在排除其他添加剂、组分、整数或步骤。

[0055] 从以下通过实例并参考附图给出的描述中,本发明的其他方面以及前面段落中描述的方面的其他实施方案将变得显而易见。

[0056] 附图简述

[0057] 图1:在随机对照临床试验中CPP-ACP对菌斑指数的影响。

[0058] 图2:在随机对照临床试验中CPP-ACP对牙龈指数的影响。

[0059] 图3:在每天用1%蔗糖脉冲4次的恒定深度薄膜发酵器中用人牙釉质基质培养的6种多微生物生物膜的平均种类组成。在每个时间点检测所有6个物种:内氏放线菌(An)、具核梭杆菌(Fn)、干酪乳杆菌(Lc)、变形链球菌(Sm)、血链球菌(Ss)和小韦荣球菌(Vp)。变形链球菌在19天内保持相对恒定并且为最丰富的物种。随着时间的推移,内氏放线菌和干酪乳杆菌的丰度均增加,而血链球菌降低。这与多微生物生物膜随着时间的推移变得更加酸性是一致的。在每个物种名称上方的三个柱条是指在接种后第6天(黑色)、第12天(灰色)和

第19天(条纹)的相对丰度。

[0060] 图4:多微生物生物膜龋齿模型中的牙釉质亚表面脱矿。A.在多微生物龋齿模型中,在19天时间内的牙釉质基质的综合矿物质损失(vol%min.μm)。数据表示对照(未处理)的4个生物学重复,并表示为平均值±S.D。B.显示在第6天、第12天和第19天的亚表面脱矿的牙釉质基质的代表性横断显微放射照相。C.来自第12天的多微生物生物膜的代表性电子显微照片,其显示细菌生物膜的紧密结合和龋上菌斑样结构。

[0061] 图5:每日两次添加SnF₂、2%CPP-ACP和2%CPP-ACP-SnF₂对第19天CDFF中的多微生物生物膜细菌种类组成的影响。A.细菌种类组成占生物膜中总细菌的百分比(数据和统计分析呈现在表7中)。B.相对于对照,处理后每个物种的丰度变化。由于用2%CPP-ACP-SnF₂处理的多微生物生物膜的4,981%的非常高的相对增加,因此未描述具核梭杆菌。在第19天,SnF₂处理对具核梭杆菌丰度无影响(-2%),而CPP-ACP处理引起355%的增加。有条纹的柱条=对照、黑色=SnF₂、灰色=2%CPP-ACP和白色=2%CPP-ACP-SnF₂。C.在第19天,用CPP-ACP-SnF₂处理的多微生物生物膜的代表性3D渲染的CLSM图像。细菌细胞用四种物种特异性FISH探针染色(紫色-具核梭杆菌;蓝色-内氏放线菌;红色-变形链球菌;绿色-血链球菌)。

具体实施方式

[0062] 应当理解,本说明书中公开和限定的本发明延伸到从文本或附图中提及或显而易见的两个或更多个单独特征的所有替代组合。所有这些不同的组合构成本发明的各个替代方面。

[0063] 从以下通过实例并参考附图给出的描述中,本发明的其他方面以及前面段落中描述的方面的其他实施方案将变得显而易见。

[0064] 现在将详细参考本发明的某些实施方案。虽然将结合实施方案描述本发明,但应当理解,本发明并不将本发明限于那些实施方案。相反,本发明旨在涵盖可以包括在如权利要求所限定的本发明的范围内的所有替代、修改和等同物。

[0065] 本领域技术人员将认识到与本文中所描述的方法和材料类似或等效的许多方法和材料,其可用于本发明的实践中。本发明决不限于所描述的方法和材料。

[0066] 本文提及的所有专利和出版物通过引用整体并入本文。

[0067] 为了解释本说明书的目的,以单数形式使用的术语也将包括复数,反之亦然。

[0068] 如本文所使用的,除非上下文另有要求,否则术语“包含(comprise)”和该术语的变型(如“包含(comprising)”、“包含(comprises)”和“包含(comprised)”)不旨在排除其他添加剂、组分、整数或步骤。如本文所使用的,除非上下文另有要求,否则“包含(comprise)”和“包括(include)”可互换使用。

[0069] 本发明基于出乎意料的发现:稳定的无定形磷酸钙形式,例如CPP-ACP、CPP-ACFP或亚锡缔合的ACP或ACFP,可以减少牙龈炎症并治疗各种牙龈病况,例如牙龈炎。虽然先前已显示稳定的无定形磷酸钙形式在牙齿损伤中通过递送钙和磷酸盐以形成结晶羟基磷灰石或氟磷灰石来使牙齿损伤再矿化,但这些稳定的无定形磷酸钙形式现在已经显示出令人惊讶地对口腔和口腔中的组织(即牙龈)中存在的有益和致病性口腔细菌具有影响。更令人惊讶的是,稳定的无定形磷酸钙形式增加了有益口腔细菌的相对丰度,同时降低了致病性

口腔细菌的相对丰度。不受任何理论或作用方式的束缚,正是这种对口腔细菌的差异化作用似乎导致牙龈炎症的减少。

[0070] 本发明的任何方法可涉及治疗个体口腔部位,其中所述口腔部位是牙齿周围的任何一个或多个区域,包括远中颊、中颊、近中颊、近中腭、中腭和远中腭,以及远中舌、中舌和近中舌的区域。治疗可直接施加到牙龈,而不是口腔中的其他部位。治疗可以是多个口腔部位。或者,可治疗整个口腔。此外,可通过分析一个或多个口腔部位或整个口腔来确定治疗的功效。例如,可以通过分析如本文所述的一个或多个口腔部位或通过分析整个口腔来确定致病菌的减少或共生菌的增加。

[0071] 在本发明的任何方面,所述个体是需要治疗或预防的个体。具体地,在本发明的任何方面中,所述方法或用途还包括确认需要治疗或预防的个体的步骤。

[0072] 需要治疗以减少致病性口腔细菌或增加共生口腔细菌的个体可以通过现代生活方式(例如,饮食糖摄入过量、吸烟、口腔卫生不良)或其他因素(例如遗传易感性)而具有或正在经历口腔微生物组扰乱的个体。

[0073] 在本发明的任何方面,所述个体可不具有任何牙齿损伤。例如,所述个体可以被确认为具有牙龈炎症或牙龈炎,但没有可检测出的牙齿表面或亚表面损伤。

[0074] 词语“治疗(treat)”或“治疗(treatment)”是指治疗性治疗,其中目标是减缓(减轻)不期望的生理变化或病症。出于本发明的目的,有益的或期望的临床结果包括但不限于症状的缓解、疾病程度的减弱、疾病状态的稳定(即,不恶化)、疾病进展的延迟或减缓、疾病状态的改善或减轻以及缓解(无论是部分还是全部),无论是可检测出的还是不可检测出的。治疗不一定导致完全没有可检测出的病况的症状,但可减少病况的并发症和副作用或使其最小化。治疗的成功或其他方面可以通过对个体的身体检查、细胞病理学、血清学DNA、mRNA检测技术或本文所述的任何其他技术来监测。

[0075] 词语“预防(prevent’)”和“预防(prevention)”通常是指保护不患有牙龈炎症或本文所述的任何其他病况的个体免于进展到该并发症或阻止不患有牙龈炎症或本文所述的任何其他病况的个体进展到该并发症的预防性或防止性措施。需要预防的个体包括具有生态失调的个体。

[0076] 短语“药学上可接受的”表示该物质或组合物必须在化学和/或毒理学上与包含制剂的其他成分和/或与其一起治疗的个体相容。

[0077] 本发明的方法适用于表现如本文所述的口腔组织的疾病或病况的亚临床或临床症状的个体。

[0078] 个体中的生态失调意指在随机选择的个体群组的背景下,个体在口腔中具有异常总量或相对丰度的微生物病原体。例如,个体可具有与牙龈炎症、牙龈炎、慢性牙龈炎、牙周炎或牙周病相关的一种或多种致病菌的升高的量或比例。通常,致病菌是产酸的和/或耐酸的和/或致炎性的。优选地,所述细菌为选自以下的任何一种或多种:变形链球菌、内氏放线菌、小韦荣球菌、干酪乳杆菌、牙龈卟啉单胞菌、福赛斯坦纳菌和齿垢密螺旋体。

[0079] 牙龈炎症的症状可表现在所述个体在一个或多个口腔部位的口腔组织中。可能存在的炎症的细胞标志包括来自血液的血浆和白细胞进入受损组织的移动增加。还可存在牙龈炎症的临床体征,包括红肿(发红)、发热(热量增加)、肿瘤(肿胀)、疼(痛)和功能障碍(功能丧失)。慢性炎症的特征可为白细胞(单核细胞、巨噬细胞、淋巴细胞、浆细胞)浸润。可观

察到组织和骨损失。炎症的实例包括牙龈炎。

[0080] 减少牙龈炎症可以是降低牙龈炎症的发病率和/或严重性。这可以通过降低如本文所述的任何临床、细胞或生物化学特性(例如上文刚刚概述的那些)的发病率或严重性来确定。

[0081] 在进一步的实施方案中,所述个体可能出现口腔组织的慢性炎症。在一个实例中,个体可能出现牙龈炎(例如慢性牙龈炎)、牙槽骨的再吸收和源于牙齿与牙槽骨的胶原附着的逐渐损失的最后牙齿脱落。粘膜或相关口腔组织的其他损伤是可能的。

[0082] 在任何方面,有需要的个体可以是被确认为具有轻度、中度或重度牙龈炎症的个体。由于慢性牙龈炎可导致更严重的牙周炎,本发明也可适用于患有轻度、中度和重度牙周炎的个体,如通过Eke等人在J Dent Res 91:914-920(2012)中所述的CDC-AAP方法测定的。本发明还可适用于使用改良牙龈指数确定的具有牙龈炎症的个体(Lobene等人,1986Clin Prev Dent,Jan-Feb;8(1):3-6)。该指数是对Löe和Silness牙龈指数的改良,并且允许更好地区分轻度和中度牙龈炎。对于与一个或多个部位(例如颊、舌、近中和远的)相关的牙龈组织,可以确定个体具有0至4量级的牙龈炎症。优选地,有需要的个体的改良牙龈指数评分为1、2、3或4。因此,在本发明的任何方面,提供了具有如本文所述的一定程度的牙龈炎症的个体。在本发明的任何方面,所述方法或用途还包括确定个体是否具有如本文所述的一定程度的牙龈炎症的步骤。

[0083] 确认需要减少致病性口腔细菌、增加共生口腔细菌或具有口腔生态失调的个体可通过从口腔取出的口腔液中获得样品中细菌的量或相对比例来确定。具体地,口腔液可以是唾液、龈沟液或血液。应认识到,口腔液,例如唾液,是来自多种来源的分泌物的组合,所述来源例如腮腺、下颌下、舌下、附属腺、牙龈粘膜和颊粘膜,并且术语“口腔液”包括这些来源中的每一种的单独或组合的分泌物。唾液可被刺激或在优选实施方案中未被刺激。个体中的唾液刺激可以通过允许个体咀嚼无糖口香糖、一片石蜡膜或酸糖果而发生。“未刺激的唾液”意指个体将在不刺激唾液流动的情况下吐到收集容器中。

[0084] 可按照本领域已知的各种方法收集用于测试的唾液样本,例如,可通过个体吐到收集容器中或者使用拭子或注射器提取唾液来取样刺激的或未刺激的唾液。用于获得未刺激的唾液的方式是本领域已知的(Nazareth和Christiansen,J.Dent.Res.61:1158-1162(1982))。也描述了用于收集唾液的方法和装置。(也可参见美国专利第5,910,122号)。

[0085] 预期本发明的方法也可以通过分析刺激的唾液来实施。

[0086] 此外,本发明的方法不限于在收集样品之后立即进行唾液分析。在某些实施方案中,可对储存的唾液样品进行按照本发明方法的唾液分析。可以使用本领域已知的方法和设备来保存用于测试的唾液样本。(参见例如美国专利第5,968,746号)。

[0087] 还预期本发明的方法用于对唾液样品进行唾液分析,所述唾液样品已被处理以降低其粘度。

[0088] 由于粘多糖的性质,唾液的粘性性质使得难以测试这些液体。为了制备用于任何实验室测试程序的唾液,可以使唾液充分地流动(即,必须降低粘度)并且没有杂物。用于去除杂物的技术包括离心和过滤。唾液的粘度也可通过将唾液样品与阳离子季铵试剂混合而降低。(参见美国专利第5,112,758号)。

[0089] 在另一个实施方案中,来自个体的样品可以取自舌背的隐窝。

[0090] 来自个体的样品可以取自特定的牙周部位。牙周部位是口腔内的区域。优选地，牙周部位是牙齿周围的区域，包括远中颊、中颊、近中颊，近中腭、中腭和远中腭，以及远中舌、中舌和近中舌的区域。样品可以取自表现出炎症的临床体征的牙周部位。

[0091] 在另一个实施方案中，来自个体的样品可以是组织样品。组织或其部分可以来自口腔。在某些实施方案中，组织为牙龈。牙龈组织可以来自牙齿周围的各部位，包括远中颊、中颊、近中颊，近中腭、中腭和远中腭，以及远中舌、中舌和近中舌。组织可以通过正常活检获得，或者可以从拔出的牙齿获得。

[0092] 在另一个实施方案中，来自个体的样品可以是菌斑。菌斑可以龈下或龈上的。龈下菌斑可使用无菌刮匙或纸尖来取样。龈上菌斑可使用本领域已知的标准技术去除。龈下菌斑可从牙齿周围的各部位收集，包括远中颊、中颊、近中颊，近中腭、中腭和远中腭，以及远中舌、中舌和近中舌牙周部位。龈下菌斑样本可以在由合格牙医或牙周病医生提供的正常牙科检查期间获得。可原样分析菌斑样品，或者可使用提取缓冲液处理菌斑样品以提取目的蛋白质、肽或其片段。提取缓冲液可含有pH缓冲剂（例如磷酸盐、HEPES等）、盐（例如NaCl）以保持离子强度和蛋白质增溶剂（例如洗涤剂（SDS、Triton X100等））、还原剂（例如二硫苏糖醇、半胱胺盐酸盐）和/或离液剂（例如尿素、氯化胍、高氯酸锂）。

[0093] 生态失调可通过比较来自个体的样品的致病性和/或共生口腔细菌的量或相对比例，并将其与先前由不具有生态失调或牙龈炎症的任何临床、细胞或生化特征的个体属性的个体定义的一组参数进行比较来确定。预期具有健康口腔的个体可含有低水平存在的致病细菌。这种低水平或正常水平的致病性细菌定植不表示生态失调。当使用这样的对照并将其与测试样品进行比较时，确定个体是否具有生态失调包括：(1) 与对照样品相比，取自个体的样品中如本文所述的一种或多种致病菌的水平升高；或(2) 与对照样品中的细菌的总水平相比，取自个体的样品中一种或多种致病菌的比例增加；或(3) 与对照样品相比时，取自个体的样品中的一种或多种致病菌相对于一种或多种其他细菌种类的比例增加。

[0094] 本文提及的稳定的ACP或ACFP复合物包括如在PCT/AU2005/001781中所述的稳定的ACP或ACFP复合物，其内容通过引用并入本文。

[0095] 在优选的实施方案中，磷酸肽稳定的无定形磷酸钙（ACP）或无定形氟磷酸钙（ACFP）复合物具有紧密结合和松散结合的钙，其中复合物中的结合钙少于在pH 7.0形成的ACP或ACFP复合物中的紧密结合的钙。任选地，所述ACP或ACFP主要是碱性形式。

[0096] 本文提及的稳定的ACP或ACFP复合物包括在低于7.0的pH下形成的稳定的ACP或ACFP复合物。优选地，所述复合物在约5.0直至但低于7.0的pH范围内形成。更优选地，所述复合物在约5.0至约6.0的pH范围形成。在优选的实施方案中，所述复合物在约5.5的pH下形成。优选地，所述复合物中的ACP或ACFP主要是碱性形式。

[0097] 稳定的ACP可以通过包括以下步骤的方法产生：

[0098] (i) 获得包含至少一种磷酸肽的溶液；以及

[0099] (ii) 混合包含钙离子、磷酸根离子和氢氧根离子的溶液，同时将pH保持在约7.0或以下。

[0100] 稳定的ACFP可以通过包括以下步骤的方法产生：

[0101] (i) 获得包含至少一种磷酸肽的溶液；以及

[0102] (ii) 混合包含钙离子、磷酸根离子、氢氧根离子和氟离子的溶液，同时将pH保持在

约7.0或以下。

[0103] 磷酸肽稳定的无定形磷酸钙 (ACP) 或无定形氟磷酸钙 (ACFP) 复合物还可包括其中复合物中的ACP具有紧密结合和松散的钙,其中复合物中的紧密结合的钙少于在pH 7.0形成的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,可通过包括以下步骤的方法获得或获得:

[0104] a) 将包含钙离子的第一溶液、包含磷酸根离子的第二溶液和任选的包含氟离子的第三溶液混合到包含磷酸肽且pH为约5直至但低于7的溶剂的溶液中;以及

[0105] b) 在混合过程中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。

[0106] 可以使用分析超滤来确定ACP或ACFP中的“紧密”和“松散”结合的钙和磷酸盐。简言之,可以将磷酸肽、钙、磷酸盐和任选的氟化物预混合同时pH保持在约7.0或以下的溶液首先通过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盐。该游离钙和磷酸盐存在于滤液中并被丢弃。以任何方式未与复合物缔合的任何游离钙或磷酸盐不是生物可利用的,即不能由磷酸肽递送到牙齿。来自0.1微米过滤的截留物可以通过3000mw截止过滤器以1,000g离心15分钟来进一步分析。所得滤液含有与复合物松散结合或缔合的钙和磷酸盐。在该离心力下,未与复合物紧密结合的钙和磷酸盐被释放并移动到滤液中。紧密结合在复合物中的Ca和Pi保留在截留物中。然后可以通过从0.1微米过滤的截留物中的Ca和Pi的总量减去滤液中的Ca和Pi的量来测定截留物中紧密结合的Ca和Pi的量。

[0107] 本文提及的稳定的ACP或ACFP复合物包括如PCT/AU2006/000885中所述的稳定的ACP或ACFP复合物,其内容通过引用并入本文。

[0108] “超负载”磷酸肽或磷蛋白 (PP) 稳定的无定形磷酸钙 (ACP) 或无定形氟磷酸钙 (ACFP) 复合物。所述复合物可以在任何pH (例如3-10) 下形成。优选地,所述磷酸肽包括序列-A-B-C-,其中A是磷酸氨基酸,优选磷酸丝氨酸,B是包括磷酸氨基酸在内的任何氨基酸,以及C是谷氨酸、天冬氨酸或磷酸氨基酸。所述磷酸氨基酸可以是磷酸丝氨酸。PP超负载有钙和磷酸根离子。钙离子可在30-1000摩尔Ca/摩尔PP的范围内,或在30-100或30-50摩尔Ca/摩尔PP的范围内。在另一个实施方案中,每摩尔PP的摩尔Ca为至少25、30、35、40、45或50。

[0109] 所述磷酸肽或磷蛋白 (PP) 稳定的无定形磷酸钙或无定形氟磷酸钙复合物可具有大于约30摩尔钙/摩尔PP的钙离子含量。在优选的实施方案中,所述钙离子含量在约30至100摩尔钙/摩尔PP的范围内。更优选地,所述钙离子含量在约30-至约50摩尔钙/摩尔PP的范围内。

[0110] 所述磷酸肽或磷蛋白 (PP) 稳定的无定形磷酸钙 (ACP) 或无定形氟磷酸钙 (ACFP) 复合物可以通过包括以下步骤的方法产生:

[0111] (i) 获得包含钙、无机磷酸盐和氟化物(任选的)的溶液;以及

[0112] (ii) 将(i)与包含PP-ACP的溶液混合。

[0113] 在优选的实施方案中,PP是酪蛋白磷酸肽 (CPP)。

[0114] PP稳定的ACP和/或ACFP复合物还可以包括至少等重量的磷酸钙。优选地,磷酸钙为 CaHPO_4 。优选地,磷酸钙(例如 CaHPO_4)与所述PP稳定的ACP和/或ACFP复合物干混。在优选的实施方案中,PP-ACP和/或PP-ACFP复合物:磷酸钙比为约1:1-50,更优选约1:1-25,更优选约1:5-15。在一个实施方案中,PP-ACP和/或PP-ACFP复合物:磷酸钙比为约1:10。

[0115] 口腔护理制剂可以通过包括以下步骤的方法产生,当用于口腔时,所述口腔护理制剂包括具有大于约30摩尔钙/摩尔PP的钙离子含量的磷酸肽或磷蛋白(PP)稳定的无定形磷酸钙(ACP)和/或无定形氟磷酸钙(ACFP)复合物,:

[0116] (i) 获得包括PP-ACP和/或PP-ACFP复合物的粉末;

[0117] (ii) 与有效量的磷酸钙干混;以及

[0118] (iii) 将干混的PP-ACP和/或PP-ACFP和磷酸钙混合物配制成口腔护理制剂。

[0119] 优选地,用于干混的磷酸钙形式是任何可溶性磷酸钙,包括但不限于 CaHPO_4 、 Ca_2HPO_4 和乳酸钙。

[0120] 如本文所述的组合物还可以包括游离氟离子。所述氟离子可以来自任何合适的来源。氟离子源可包括游离氟离子或氟化盐。氟离子源的实例包括但不限于以下:氟化钠、单氟磷酸钠、氟化亚锡、氟硅酸钠和氟化胺。这些可以以溶液(通常为水溶液)或悬浮液来提供。

[0121] 所述氟离子优选以大于1ppm的量存在于组合物中。更优选地,所述量大于3ppm。在另一个实施方案中,其优选大于10ppm。在下面描述的典型实施方案中,该量可以是几百或几千ppm。氟化物含量通常以现有技术中常用的方式在口腔组合物中以ppm测量。在氟化物从具有稳定的ACP的来源提供的情况下,ppm是指该来源中的氟化物的浓度,通常是生物可利用氟化物的溶液或悬浮液。

[0122] 本文提及的亚锡缔合的ACP或ACFP复合物包括在PCT/AU2014/050447中所述的任何复合物,其全部内容通过引用整体并入本文。

[0123] 如本文所述的用于本发明的方法或用途中的组合物可以包括亚锡缔合的ACP或ACFP复合物。组合物可以包含2%的CPP-ACP和290ppm的氟化物,其中220ppm的氟化物为氟化亚锡和70ppm的氟化物为氟化钠。

[0124] 在本发明的描述的上下文中,“磷酸肽”意指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在内的任何氨基酰基残基,以及C选自谷氨酰、天冬氨酰或磷酸氨基残基。任何磷酸氨基残基可以独立地是磷酸丝氨酰残基。B理想地为既不相对较大也不疏水的侧链残基。其可为Gly、Ala、Val、Met、Leu、Ile、Ser、Thr、Cys、Asp、Glu、Asn、Gln或Lys。

[0125] 在另一个实施方案中,序列中的至少两个磷酸氨基酸优选是连续的。优选地,所述磷酸肽包括序列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,并且A、B、C、D和E中的至少两个,优选三个是磷酸氨基酸。在优选的实施方案中,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。还优选D和E独立地为谷氨酸或天冬氨酸。

[0126] 在一个实施方案中,所述ACP或ACFP由酪蛋白磷酸肽(CPP)稳定,所述酪蛋白磷酸肽为完整酪蛋白或酪蛋白的片段的形式,并且形成的复合物优选具有式 $[\text{CPP}(\text{ACP})_8]_n$ 或 $[(\text{CPP})(\text{ACFP})_8]_n$,其中n等于或大于1,例如为6。形成的复合物可以是胶体复合物,其中核心颗粒聚集形成悬浮在水中的大的(例如100nm)胶体颗粒。因此,PP可以是酪蛋白或磷酸肽。

[0127] 所述PP可以来自任何来源;其可存在于较大肽的背景中,包括全长酪蛋白多肽,或者其可通过对酪蛋白或其他富含磷酸氨基酸的蛋白质如phosphitin进行胰蛋白酶或其他酶或化学消化,或者通过化学或重组合成进行分离,条件是其包括如上所述的序列-A-B-

C-或A-B-C-D-E。该核心序列侧翼的序列可为任何序列。然而， 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。侧翼序列可以任选地通过一个或多个残基的缺失、添加或保守取代进行修饰。侧翼区的氨基酸组成和序列并非关键的。

[0128] 保守取代的实例示于下表A中。

[0129] 表A

[0130]

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
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

[0131]

原始残基	示例性保守取代	优选的保守取代
Val	Ile, Leu, Met, Phe, Ala	Leu
Asp	Glu	Glu
Thr	Ser	Ser
Trp	Tyr	Tyr
Tyr	Trp Phe Thr Ser	Phe

[0132] 侧翼序列还可以包括非天然存在的氨基酸残基。通常遇到的不是由遗传密码编码的氨基酸包括：

[0133] 取代Glu和Asp的2-氨基己二酸 (Aad) ；

[0134] 取代Glu和Asp的2-氨基庚二酸 (Apm) ；

[0135] 取代Met、Leu和其他脂肪族氨基酸的2-氨基丁酸 (Abu) ；

[0136] 取代Met、Leu和其他脂肪族氨基酸的2-氨基庚酸 (Ahe) ；

- [0137] 取代Gly的2-氨基异丁酸(Aib)；
- [0138] 取代Val及Leu和Ile的环己基丙氨酸(Cha)；
- [0139] 取代Arg和Lys的高精氨酸(Har)；
- [0140] 取代Lys、Arg和His的2,3-二氨基丙酸(Dpr)；
- [0141] 取代Gly、Pro和Ala的N-乙基甘氨酸(EtGly)；
- [0142] 取代Asn和Gln的N-乙基天冬酰胺(N-ethylasparagine)(EtAsn)；
- [0143] 取代Lys的羟基赖氨酸(Hyl)；
- [0144] 取代Lys的别羟基赖氨酸(AHyl)；
- [0145] 取代Pro、Ser和Thr的3-(和4-)羟基脯氨酸(3Hyp,4Hyp)；
- [0146] 取代Ile、Leu和Val的别异亮氨酸(Alle)；
- [0147] 取代Ala的p-脒基苯丙氨酸；
- [0148] 取代Gly、Pro、Ala的N-甲基甘氨酸(MeGly,肌氨酸)。
- [0149] 取代Ile的N-甲基异亮氨酸(MeIle)；
- [0150] 取代Met和其他脂肪族氨基酸的正缬氨酸(Nva)；
- [0151] 取代Met和其他脂肪族氨基酸的正亮氨酸(Nle)；
- [0152] 取代Lys、Arg和His的鸟氨酸(Orn)；
- [0153] 取代Thr、Asn和Gln的瓜氨酸(Cit)和蛋氨酸亚砷(MSO)；
- [0154] 取代Phe的N-甲基苯丙氨酸(MePhe)、三甲基苯丙氨酸、卤代(F、Cl、Br和I)苯丙氨酸、三氟苯丙氨酸。
- [0155] 在一个实施方案中,所述PP是选自 α_{s1} (59-79) [1]、 β (1-25) [2]、 α_{s2} (46-70) [3]和 α_{s2} (1-21) [4]中的一种或更多种磷酸肽：
- [0156] [1]Gln⁵⁹-Met-Glu-Ala-Glu-Ser(P)-Ile-Ser(P)-Ser(P)-Ser(P)-Glu-Glu-Ile-Val-Pro-Asn-Ser(P)-Val-Glu-Gln-Lys⁷⁹ α_{s1} (59-79)
- [0157] [2]Arg¹-Glu-Leu-Glu-Glu-Leu-Asn-Val-Pro-Gly-Glu-Ile-Val-Glu-Ser(P)-Leu-Ser(P)-Ser(P)-Ser(P)-Glu-Glu-Ser-Ile-Thr-Arg²⁵ β (1-25)
- [0158] [3]Asn⁴⁶-Ala-Asn-Glu-Glu-Glu-Tyr-Ser-Ile-Gly-Ser(P)-Ser(P)-Ser(P)-Glu-Glu-Ser(P)-Ala-Glu-Val-Ala-Thr-Glu-Glu-Val-Lys⁷⁰ α_{s2} (46-70)
- [0159] [4]Lys¹-Asn-Thr-Met-Glu-His-Val-Ser(P)-Ser(P)-Ser(P)-Glu-Glu-Ser-Ile-Ile-Ser(P)-Gln-Glu-Thr-Tyr-Lys²¹ α_{s2} (1-21)。
- [0160] 在本发明的另一个实施方案中,将稳定的ACP和/或稳定的ACFP复合物掺入口腔组合物中,例如牙膏、漱口水或用于口腔的制剂,以帮助预防和/或治疗牙龈炎或牙周炎。口腔组合物包含足以在牙齿表面上形成层的一定量的稳定的ACP和/或ACFP,优选地,该层具有相当于正常磷灰石的钙:磷酸盐比率,例如比率为约2:1。该层可以含有约20wt%的量的钙。稳定的ACP和/或ACFP复合物可以占组合物的0.01至50重量%,优选组合物的1.0至50重量%,优选1.0至30重量%,优选1.0至20重量%,优选1.0至10重量%,优选2至10重量%。在特别优选的实施方案中,本发明的口腔组合物含有约2%的稳定的ACP或ACFP复合物或两者的混合物。含有上述试剂的本发明的口腔组合物可以以适用于口腔的各种形式进行制备和使用,例如洁齿剂包括牙膏、牙粉和液体洁齿剂、漱口水、含漱液、口腔喷雾剂、涂剂、牙科粘固剂、锭剂、口香糖、牙科糊剂、牙龈按摩霜、漱口片剂、乳制品和其他食品。根据本发明的口

腔组合物还可包含另外的熟知成分,这取决于特定口腔组合物的类型和形式。本发明的某些组合物,例如牙膏、牙粉和液体洁齿剂、漱口水、含漱液和口腔喷雾剂具有相对低的粘度,并且对治疗或预防具有积极的作用,而不会在口腔中产生显著的停留时间。

[0161] 在本发明的某些优选形式中,口腔组合物可以基本上为适当的液体,例如漱口水、清洗剂或喷雾剂。在这样的制剂中,媒介物通常是水-醇混合物,理想地包括如下所述的保湿剂。通常,水与醇的重量比在约1:1至约20:1的范围内。在这种类型的制剂中,水-醇混合物的总量通常在制剂的约70至约99.9重量%的范围内。所述醇通常为乙醇或异丙醇。乙醇是优选的。

[0162] 在本发明的其他理想形式中,所述组合物可以基本上为适当的固体或糊状,例如牙粉、牙科片剂或牙膏(牙科乳膏)或凝胶洁齿剂。这种固体或糊状口服制剂的媒介物通常含有牙齿可接受的抛光材料。抛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。其他合适的抛光材料包括颗粒状热固性树脂,例如三聚氰胺-酚醛树脂和脲醛,以及交联的聚环氧化物和聚酯。优选的抛光材料包括具有高达约5微米的粒径、高达约1.1微米的平均粒径和高达约50,000cm²/g的表面积 of 结晶二氧化硅、硅胶或胶态二氧化硅以及复合无定形碱金属铝硅酸盐。

[0163] 当使用外观透明的凝胶时,胶态二氧化硅的抛光剂,例如以商标SYLOID作为Syloid 72和Syloid 74或以商标SANTOCEL作为Santocel 100出售的那些,碱金属铝硅酸盐复合物是特别有用的,因为它们具有接近通常用于洁齿剂中的胶凝剂-液体(包括水和/或保湿剂)体系的折射率的折射率。

[0164] 许多所谓的“水不溶性”抛光材料是适当的阴离子型的,并且还包括少量的可溶性材料。因此,不溶性偏磷酸钠可以以任何合适的方式形成,例如,如由索普斯应用化学辞典(Thorpe's Dictionary of Applied Chemistry),第9卷,第4版,第510-511页所示。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材料的另外的实例。这些偏磷酸盐在水中仅表现出微弱的溶解度,因此通常被称为不溶性偏磷酸盐(IMP)。其中存在少量可溶性磷酸盐材料作为杂质,通常为百分之几,例如高达4重量%。如果需要,可以通过用水洗涤来减少或消除在不溶性偏磷酸盐的情况下认为包括可溶性三偏磷酸钠的可溶性磷酸盐材料的量。不溶性碱金属偏磷酸盐通常以使得不超过1%的材料大于37微米的粒径的粉末形式使用。

[0165] 抛光材料通常以约10%至约99%的重量浓度存在于固体或糊状组合物中。优选地,牙膏中以约10%至约75%的量 and 牙粉中以约70%至约99%的量存在。在牙膏中,当抛光材料在本质上为硅质的时,其通常以约10-30重量%的量存在。其他抛光材料通常以约30-75重量%的量存在。

[0166] 在牙膏中,液体媒介物可包含水和保湿剂,其量通常为制剂约10重量%至约80重量%。甘油、丙二醇、山梨糖醇和聚丙二醇例示了合适的保湿剂/载体。水、甘油和山梨糖醇的液体混合物也是有利的。在折射率是重要的考虑因素的透明凝胶中,优选使用约2.5-30%w/w的水、0-约70%w/w的甘油和约20-80%w/w的山梨糖醇。

[0167] 牙膏、乳膏和凝胶通常含有比例为约0.1-约10,优选约0.5-约5%w/w的天然或合成增稠剂或胶凝剂。合适的增稠剂为合成的锂蒙脱石、合成的胶态镁碱金属硅酸盐复合粘

土,例如由拉波特工业有限公司(Laporte Industries Limited)出售的Laponite(例如CP, SP 2002,D)购得。Laponite D是按重量计大约58.00%的 SiO_2 、25.40%的 MgO 、3.05%的 Na_2O 、0.98%的 Li_2O 及一些水和痕量金属。其真比重为2.53,且其在8%湿度下具有1.0g/ml的表现堆密度。

[0168] 其他合适的增稠剂包括爱尔兰苔藓(Irish moss)、iota卡拉胶、黄蓍胶、淀粉、聚乙烯吡咯烷酮、羟乙基丙基纤维素、羟丁基甲基纤维素、羟丙基甲基纤维素、羟乙基纤维素(例如,可以以Natrosol获得)、羧甲基纤维素钠和胶态二氧化硅(例如细磨Syloid(例如244))。还可以包括增溶剂,例如保湿剂多元醇如丙二醇、二丙二醇和己二醇,溶纤剂例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个碳的蜡例如橄榄油、蓖麻油和凡士林,以及酯例如乙酸戊酯、乙酸乙酯和苯甲酸苄酯。

[0169] 应当理解,按常规,口服制剂通常将在合适的标签包装中出售或以其他方式分布。因此,口腔清洗剂的瓶将具有将其实质上描述为口腔清洗剂或漱口水并具有对其用途说明的标签;并且牙膏、乳膏或凝胶通常将在可折皱管,通常是铝、内衬铅或塑料,或者用于计量内容物的其他挤压、泵或加压分配器中,其具有将其实质上描述为牙膏、凝胶或牙科用乳膏的标签。

[0170] 有机表面活性剂可以用于本发明的组合物中以实现增强的预防作用,帮助实现活性剂在整个口腔中的彻底且完全的分散,并且使本发明的组合物在外观上更加可接受。有机表面活性材料在性质上优选为阴离子型、非离子型或两性型,并且优选不与活性剂相互作用。优选使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实例是高级脂肪酸单甘油酯单硫酸盐的水溶性盐例如氢化椰子油脂肪酸的单硫酸化单甘油酯的钠盐,高级烷基硫酸盐例如月桂基硫酸钠,烷基芳基磺酸盐例如十二烷基苯磺酸钠,高级烷基硫代乙酸酯,1,2-二羟基丙烷磺酸酯的高级脂肪酸酯,以及低级脂肪族氨基羧酸化合物的基本饱和的高级脂肪族酰基酰胺例如在脂肪酸、烷基或酰基基团等中具有12至16个碳的那些。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-肉豆蔻酰肌氨酸或N-棕榈酰肌氨酸的钠盐、钾盐和乙醇胺盐,其应基本上不含肥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盐(sarconite)化合物是特别有利的,因为除了牙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表现出持久显著的作用。适用于使用的水溶性非离子表面活性剂的实例是环氧乙烷与具有长疏水性链(例如约12至20个碳原子的脂肪族链)反应的各种反应性含氢化合物的缩合产物,该缩合产物(“乙沙姆(ethoxamer)”)含有亲水性聚氧乙烯部分,例如聚(环氧乙烷)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。

[0171] 表面活性剂通常以约0.1-5重量%的量存在。值得注意的是,表面活性剂可有助于溶解本发明的活性剂,从而减少所需的增溶保湿剂的量。

[0172] 各种其他材料可掺入到本发明的口服制剂中,例如增白剂、防腐剂、硅酮、叶绿素化合物和/或含氮材料例如脲、磷酸氢二铵及其混合物。这些佐剂(如果存在的话)以基本上不会不利地影响所期望的性质和特性的量掺入制剂中。

[0173] 也可以使用任何合适的调味剂或甜味材料。合适的调味剂成分的实例是调味油,例如绿薄荷、薄荷、冬青、黄樟、丁香、鼠尾草、桉树、马郁兰、肉桂、柠檬和橙子的油,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(天门冬氨酰苯丙氨酸,甲酯)、糖精等。适当地,调味料和甜味剂可以各自或一起占制剂的约0.1%至5%以上。

[0174] 本发明的组合物还可以掺入锭剂,或者例如通过搅拌进温热的胶基或涂覆胶基的外表面而掺入口香糖或其他产品中,示例性的胶基是节路顿胶、橡胶胶乳、乙烯基树脂等,期望伴有常规增塑剂或软化剂、糖或其他甜味剂或例如葡萄糖、山梨糖醇等。本发明的组合物可以是双相组合物,其中每个相允许在不同时间段内释放组分。

[0175] 可选的组合物可以是这样的组合物,其提供稳定的ACP或ACFP和然后原位(例如口腔)形成亚锡缔合的稳定的ACP或ACFP的亚锡化合物。示例性的组合物可以是口香糖,其丸粒中含有稳定的ACP或ACFP和中心咀嚼物中含有亚锡化合物。

[0176] 在其他方面,本发明提供这样的组合物,其包含含有如上所述的稳定的ACP或ACFP复合物以及能够增加或保持溶液pH的化合物和药学上可接受的载体的药物组合物。这样的组合物可以选自牙科、抗龋组合物和治疗组合物。牙科组合物或治疗组合物可以是凝胶、液体、固体、粉末、乳膏或锭剂的形式。治疗组合物也可以是片剂或胶囊的形式。在一个实施方案中,稳定的ACP或ACFP复合物基本上这种组合物的唯一活性组分。例如,可以使用乳霜(crème)制剂,其含有:水;甘油;CPP-ACP/SnF₂;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;瓜尔胶;糖精钠;对羟基苯甲酸乙酯;氧化镁;对羟基苯甲酸丁酯和对羟基苯甲酸丙酯。

[0177] 本发明还包括提供的上述制剂以及其用于治疗或预防龋齿或蛀牙、牙侵蚀症和氟中毒、牙本质过敏、牙菌斑、牙龈炎或牙周炎中的任何一种或多种的说明。

[0178] 在另一个实施方案中,本文所述的本发明的组合物不包含磷酸盐缓冲液和/或钙螯合剂。例如,本文所述的任何洁齿剂可以不包括磷酸盐缓冲液和/或钙螯合剂。

[0179] 在本发明的实施方案中,提供了组合物,其中所述组合物不包含磷酸盐缓冲液和/或钙螯合剂。

[0180] 在另一个实施方案中,本文所述的本发明的组合物不包含粘度调节剂或0.5-50%的粘度调节剂。

[0181] 在另一个实施方案中,本文所述的本发明的组合物不包含羧甲基纤维素钠或0.01-10%的酯化度为0.7-1.0的羧甲基纤维素钠。

[0182] 在一个实施方案中,组合物的活性组分基本上由稳定的ACP或ACFP复合物组成。

[0183] 将清楚地理解,尽管本说明书具体涉及人类中的应用,但是本发明也可用于兽医目的。因此,在所有方面,本发明可用于家畜例如牛、绵羊、马和家禽;用于伴侣动物例如猫和狗;以及用于动物园动物。

[0184] 矿化组合物的一个实例包括以下(按比例的降序):

[0185] 水

[0186] 甘油

[0187] CPP-ACP/SnF₂

[0188] D-山梨糖醇

[0189] 二氧化硅

[0190] 羧甲基纤维素钠(CMC-Na)

[0191] 丙二醇

[0192] 二氧化钛

[0193] 木糖醇

[0194] 磷酸

[0195] 瓜尔胶

[0196] 糖精钠

[0197] 对羟苯甲酸乙酯

[0198] 氧化镁

[0199] 对羟苯甲酸丁酯

[0200] 对羟苯甲酸丙酯

[0201] 本发明还提供试剂盒,其包含稳定的无定形磷酸钙 (ACP) 和/或稳定的无定形氟磷酸钙 (ACFP),所述试剂盒适用于上述方法。

[0202] 该试剂盒可以包含:

[0203] -容纳组合物的容器,所述组合物包含稳定的无定形磷酸钙 (ACP) 和/或稳定的无定形氟磷酸钙 (ACFP);

[0204] -具有使用说明的标签或包装说明书。

[0205] 在某些实施方案中,所述试剂盒可含有一种或多种用于治疗疾病或病况的其他活性组分或成分。

[0206] 试剂盒可包含容器和在容器上或与容器相关的标签或包装说明书。合适的容器包括例如瓶子、小瓶、注射器、泡罩包装等。容器可由多种材料形成,所述材料例如玻璃或塑料。容器容纳有效治疗病况的治疗组合物,并且可以具有无菌入口(例如,容器可以是静脉内溶液袋或具有可由皮下注射针刺穿的塞子的小瓶)。标签或包装说明书表示治疗组合物用于治疗选择的病况。在一个实施方案中,标签或包装说明书包括使用说明书,并且指示治疗组合物可用于治疗给定疾病或病况。

[0207] 所述试剂盒可包含(a)治疗组合物和(b)第二容器,所述第二容器具有包含在其中的第二活性组分或成分。本发明的该实施方案中的试剂盒还可包含包装说明书,其指示组合物和其他活性组分可用于治疗如本文所述的病症或病况或预防源于生态失调的并发症。可选地或另外地,所述试剂盒还可包含第二(或第三)容器,其包含药学上可接受的缓冲剂,例如抑菌性注射用水(BWFI)、磷酸盐缓冲盐水、林格氏溶液和葡萄糖溶液。它还可包含从商业和用户立场所需的其他材料,包括其他缓冲剂、稀释剂、过滤器、针头和注射器。

[0208] 现在将参照以下非限制性实施例进一步描述本发明。

[0209] 实施例

[0210] 实施例1

[0211] 临床研究:CPP-ACP对龈上牙菌斑和口腔健康的益生元效果

[0212] 研究目的

[0213] 主要目的

[0214] 比较咀嚼含56.4mg CPP-ACP的无糖口香糖、咀嚼含18.8mg CPP-ACP的无糖口香糖和不咀嚼口香糖对于在上颌磨牙上形成的龈上菌斑的微生物组成的影响,各项均结合历经14天的正常口腔卫生程序。

[0215] 次要目的

[0216] A.比较咀嚼含56.4mg CPP-ACP的无糖口香糖、咀嚼含18.8mg CPP-ACP的无糖口香糖和不咀嚼口香糖的对于龈上菌斑发展的影响,各项均结合历经14天的正常口腔卫生程序。

[0217] B.比较咀嚼含56.4mg CPP-ACP的无糖口香糖、咀嚼含18.8mg CPP-ACP的无糖口香糖和不咀嚼口香糖对于牙龈炎发展的影响,各项均结合历经14天的正常口腔卫生程序。

[0218] 人类伦理批准

[0219] 在开始研究之前,从墨尔本大学人类研究伦理委员会获得了人类伦理批准。在开始研究之前,要求所有参与者都提供书面知情同意书。

[0220] 研究计划

[0221] 研究设计

[0222] 此项检查者设盲的、随机对照临床试验使用三种处理、三期交叉设计来评估在正常口腔卫生程序的存在下历经14天咀嚼含56.4mg CPP-ACP的无糖口香糖、咀嚼含18.8mg CPP-ACP的无糖口香糖和不咀嚼口香糖,对于龈上牙菌斑发展和组成变化以及牙龈炎发展的影响。将参与者随机分配到三种处理之一,其中每个处理期包括14天。

[0223] 三种处理如下:

[0224] A.咀嚼含56.4mg CPP-ACP的无糖口香糖20分钟,每天6次,持续连续14天;

[0225] B.咀嚼含18.8mg CPP-ACP的无糖口香糖20分钟,每天6次,持续连续14天;

[0226] C.不咀嚼口香糖。

[0227] 在处理期间,每个对象继续进行口腔卫生操作,包括用氟化物牙膏(供应的)和牙刷(供应的)每天刷牙两次。要求咀嚼口香糖产品的参与者在处理期间不要食用抗菌的薄荷糖、锭剂、薄片及其他非研究的口香糖。类似地,要求在处理期间不咀嚼口香糖的参与者在处理期间不要食用抗菌的薄荷糖、锭剂、薄片及其他非研究的口香糖。

[0228] 参与者来源

[0229] 参与者从墨尔本大学的墨尔本牙科学院和墨尔本牙科诊所的工作人员中招募。所有研究参与者在参与之前提供签署的知情同意书。

[0230] 参与者选择标准

[0231] 入选标准:

[0232] 有资格参与本研究,个体符合所有以下标准:

[0233] 1.能够理解并且愿意并且能够阅读及签署知情同意书。

[0234] 2.年龄范围:18至55岁。

[0235] 3.身体健康。

[0236] 4.最少有20颗天然牙齿。

[0237] 5.口香糖刺激的全唾液流速 $\geq 1.0\text{ml/分钟}$,未刺激的全唾液流速 $\geq 0.2\text{ml/分钟}$ 。

[0238] 6.愿意遵守所有研究程序并且在研究期间有空。

[0239] 排除标准:

[0240] 在随机化时表现出以下排除标准中任一个的个体不符合研究资格:

[0241] 1.对口香糖产品中的乳蛋白或其他成分的过敏。

[0242] 2.正畸矫正器或可移除假体。

- [0243] 3.贴面,或一个以上门牙具有假冠。
- [0244] 4.总的口腔病理学(包括牙周疾病(CPITN $\geq$ 3)及软口腔组织或硬口腔组织的肿瘤)。
- [0245] 5.伴随口腔临床表现的慢性疾病(例如,糖尿病[不考虑控制水平]、人免疫缺陷病毒感染或获得性免疫缺陷综合征、使用与牙龈增生相关的药物)。
- [0246] 6.未修复的牙本质龋齿。
- [0247] 7.在开始研究前一个月用抗生素或抗炎药治疗。
- [0248] 8.可能与试验药物相互作用的药物同时进行药物治疗
- [0249] 9.在侵入性牙齿操作之前需要抗生素覆盖的病史。
- [0250] 10.妊娠/哺乳。
- [0251] 测试产品
- [0252] 测试产品的说明
- [0253] 将每个参与者随机分配到以下三种处理之一:
- [0254] A.咀嚼含56.4mg CPP-ACP的无糖口香糖20分钟,每天6次,持续连续14天;
- [0255] B.咀嚼含18.8mg CPP-ACP的无糖口香糖20分钟,每天6次,持续连续1天;
- [0256] C.不咀嚼口香糖。
- [0257] 分配方法
- [0258] 在每个处理期开始时,发给参与者含有其在该段时间被分配的处理的包装,一管氟化物牙膏和一只牙刷。当在每个处理期结束时参加第14天评估时,参与者归还任何未使用的口香糖和所有使用的口香糖包装纸。记录分配和返回的口香糖的量。
- [0259] 施用方法与时间
- [0260] 当分配口香糖测试产品时,参与者在以下时间咀嚼分配给他们的口香糖20分钟,每天6次,持续连续14天:早餐后、早茶后、午餐后、下午茶后,晚餐后和休息前。
- [0261] 随机化与设盲的方法
- [0262] 生成区块随机化安排,其确保所有六种处理组合(ABC、ACB、BAC、BCA、CAB、CBA)是等可能的。
- [0263] 本研究是检查者设盲的。在整个研究中,临床检查者和处理菌斑样品的实验室工作人员不知道参与者已经被分配到哪个处理组。参与者和研究人员也不知道已分配了哪种口香糖,因为口香糖在相同的编码包装中提供。由于参与者在处理期中不咀嚼口香糖,因此不可能将参与者完全设盲处理分配。分配测试材料或监督其使用的人员不参与对参与者的检查或对菌斑样品的分析,以便使潜在的偏差最小化。
- [0264] 没有参与任何分析的研究人员保留了代码识别的总列表。
- [0265] 参与者至处理的分配:在基线检查之后,向参与者分配参与者编号。将参与者随机分配到三种处理之一。由平行研究中处理编号的标准随机化表确定随机化。
- [0266] 处理持续时间
- [0267] 三种处理期中的每一种持续连续14天。处理期由14天冲洗期隔开。
- [0268] 伴随程序
- [0269] 指示参与者继续用供应的氟化物牙膏和牙刷以每天两次刷牙。指示参与者禁止漱口(水除外)、使用牙线、使用其他口腔卫生辅助用品、在每14天的处理期间食用抗菌薄荷

糖、锭剂、薄片及其他非研究的口香糖。

[0270] 测量与观察

[0271] 疗效终点

[0272] 临床检查

[0273] 在处理期的开始和结束时,检查参与者的牙龈炎和菌斑,并且从上颌磨牙的颊面收集龈上菌斑。在完成检查和龈上菌斑收集之后,参与者接受所有牙齿的龈上洁治术、清洁和预防。在完成对Leg 3的最后检查时,每个参与者接受专业的氟化物治疗。

[0274] 菌斑和牙龈炎的测量

[0275] 使用Quigley-Hein指数的Turesky改良法(Turesky等人,1970 J Periodontol 41 (1):41-43)来评估龈上菌斑。该指数被认为是由菌斑覆盖的牙齿区域的可靠估计,并且经常用于评价抗菌斑剂。通过将每个牙齿的得分相加并除以所检查的表面数目来获得菌斑指数。除第三磨牙之外,评估所有牙齿的与未修复唇面、颊面和舌面相关的菌斑得分。每个表面被分配从0到5的得分。

[0276] 牙龈炎使用改良的牙龈指数[Lobene等人,1986]进行测量。该指数是Löe和Silness牙龈指数的改良,并且允许更好地区分轻度和中度牙龈炎。在本研究中,对于与所有牙齿的四个部位(颊的、舌的、近中的和远侧的)相关的牙龈组织,对0至4量级的牙龈炎症进行评分。

[0277] 龈上菌斑收集

[0278] 参与者具有利用无菌洁治术仪器从其上颌磨牙(牙齿17、16、26和27)的颊面收集的所有龈上菌斑。将来自每个牙齿的菌斑样品放置在单独的无菌管中,每个参与者给出四个样品。

[0279] 从每个参与者收集的每个牙菌斑容器上贴有一份标签。标签含有以下信息:

[0280] • 参与者编号

[0281] • 处理代码(A、B或C)

[0282] • 牙齿(17、16、26或27)

[0283] • 处理期(Leg 1、Leg 2或Leg 3)

[0284] • 时间(0或14天)。

[0285] 记录来自每个参与者的四个样品中的每一个的菌斑质量,以允许DNA提取程序的标准化(DNA提取需要每个样品为0.2mg)。将均质的菌斑样品储存在-80℃,直至需要。

[0286] 菌斑微生物分析

[0287] 使用经由Precellys均质器对细胞进行机械破碎和经由PowerLyzer PowerSoil DNA分离试剂盒(Mobio)对基因组DNA进行化学提取和纯化的组合,从菌斑中提取基因组DNA。使用Qubit dsDNA高灵敏度测定试剂盒(ThermoFisher)实现提取的DNA的定量,然后在PCR反应中使用5ng DNA作为模板,所述PCR反应扩增16S核糖体RNA基因的V4可变区,并对来自每个样品的PCR产物进行单独地条形码编码。然后使用Ion Torrent个体化基因组测序仪(Ion Torrent Personal Genome machine)和Torrent Suite™软件(ThermoFisher)对条形码DNA进行测序。

[0288] 对16S核糖体RNA基因的所得序列的分析使得能够鉴定每个样品中存在的细菌群,直至种水平。使用Torrent Suite™软件生成的BAM文件从Ion Torrent传输到本地Ion

Reporter服务器,其中使用高级专业的MicroSEQ™ID 16S rRNA参考数据库和专业的Greengenes数据库,Ion Reporter软件16S宏基因组工作流程用于在属或种水平鉴定复杂多细菌样品中存在的微生物。数据在Microsoft Excel中整理。

[0289] 统计方法

[0290] 样品大小测定

[0291] 下表1显示了对于血链球菌的丰度的均值差为1.5%、2.0%、2.5%和3.0%,标准差在3.5%至5.5%的范围内,以及检验功效为80%的每组估计的样品大小。假设双尾配对t检验和 $\alpha=0.05$ 。样品大小计算中使用的平均值和标准差的范围基于先前的初步研究。

[0292] 表1:每个处理组估计的样品大小

[0293]

均值差	标准差					
	3.0	3.5	4.0	4.5	5.0	5.5
1.5	34	45	58	73	90	108
2.0	20	27	34	42	52	62
2.5	14	18	23	28	34	40
3.0	10	13	16	20	24	29
3.5	8	10	13	16	19	22

[0294] 表2.表2显示了每组的估计大小,允许在研究随访期间10%的损耗率。

[0295] 表2:每个处理组估计的样品大小

[0296]

均值差	标准差					
	3.0	3.5	4.0	4.5	5.0	5.5
1.5	38	50	64	81	100	120
2.0	22	30	38	47	58	69
2.5	16	20	26	31	38	44
3.0	11	14	18	22	27	32
3.5	9	11	14	18	21	24

[0297] 假设标准差为4.5%,损耗率为10%,招募了18名参与者的样品,以允许待检测的血链球菌的丰度的均值差为3.5%,以及功效为80%。

[0298] 统计一般考虑

[0299] 随机化与设盲

[0300] 在相同包装中提供两个口香糖,不同的是每个口香糖用代码标记。单独的口香糖片具有类似的外观。直到所有的统计分析都完成才公开代码。

[0301] 在每个参与者满足进入标准之后,按顺序地向参与者分配ID。

[0302] 研究是检查者设盲的。在整个研究中,牙科检查者和处理菌斑样品的实验室工作人员不知道参与者已经被分配到哪个处理组。参与者和研究人员也不知道已分配了哪种口

香糖,因为口香糖在相同的编码包装提供。由于参与者在同一个处理期中不咀嚼口香糖,因此不可能将参与者完全设盲处理分配。所有参与者均完成了研究。

[0303] 依从标准:通过审查产品使用的参与者日记和剩余临床供应的记录来判断依从性。

[0304] 人口统计学与基线特征的统计分析

[0305] 初步分析集是完成试验而没有重大违反协议的所有参与者。

[0306] 针对所有连续变量和所有有序数变量的频率计算描述性统计(平均值、标准差和范围)。所有统计学检验都是双侧的,并使用 $\alpha=0.05$ 的显著性水平。使用统计软件包Stata (StataCorp LP, College Station, TX, USA) 统计软件进行所有分析。

[0307] 功效数据的统计分析

[0308] 针对每个样品产生的单独16S rDNA序列用于对存在的微生物谱系进行分类(分组为种水平分类群)并确定每个分类群的丰度。通过测量每个个体的相对分类群丰度的变化来确定细菌群落随时间推移的差异。

[0309] 这使得能够比较CPP-ACP对菌斑的细菌组成的影响。来自每个个体的四个样品使得能够确定菌斑的细菌组成中的对象内变异。

[0310] 结果

[0311] 所有对象均完成了研究,并被认为符合方案。未报告不良事件。CPP-ACP处理未使参与者的菌斑指数产生显著变化(图1)。虽然CPP-ACP不影响菌斑指数,但它确实对细菌组成具有显著影响,通过促进共生/有益共生体的比例显示出显著的益生元效果。

[0312] 总共从54个样品中鉴定出超过300种不同的细菌分类群。当在处理组中检查龈上菌斑的细菌组成时,显然当CPP-ACP处理期与未处理相比时存在显著变化。18.8mg CPP-ACP在以下细菌分类群的比例中产生统计学上显著的增加:坚硬棒状杆菌(增加80%);龋齿罗氏菌(增加127%);缓症链球菌(增加55%)和血链球菌(增加112%)(表3)。所有这些物种现在都被认为是有益的共生体,因为它们具有已知有益于宿主的一种或两种酶系统[精氨酸脱亚胺酶和/或硝酸还原酶]。这些共生/有益物种的显著增加是CPP-ACP剂量相关的,因为对于56.4mg CPP-ACP剂量,增加显著地更多。有益物种的增加与致病物种(致病共栖菌谱(pathobionts))的比例相伴减少有关。有益共生体丰度的增加也反映在牙龈健康的增加,如通过牙龈指数的显著的CPP-ACP剂量相关的增加证明的(图2)。

[0313] 表3.通过18.8mg CPP-ACP显著增加的口腔物种是革兰氏阳性共生体,其拥有促进体内平衡的精氨酸脱亚胺酶和硝酸还原酶系统中的一种或两种

[0314]

属	种	精氨酸脱亚胺酶	硝酸还原酶	相对丰度增加%
棒状杆菌 (<i>Corynebacterium</i>)	坚硬(<i>durum</i>)	有(部分)	有	80% (p<0.001)
罗氏菌(<i>Rothia</i>)	龋齿 (<i>dentocariosa</i>)	无	有	127% (p<0.001)
链球菌 (<i>Streptococcus</i>)	格氏(<i>gordonii</i>)/缓 症(<i>mitis</i>)	有	无	55% (p<0.05)
链球菌	血液(<i>sanguinis</i>)	有	无	112%(p<0.01)

[0315] 表4.通过18.8mg CPP-ACP显著减少的口腔物种是与生态失调相关的革兰氏阴性炎性厌氧菌

[0316]

属	种	精氨酸脱亚胺酶	硝酸还原酶	相对丰度减少%
纤毛菌 (<i>Leptotrichia</i>)	韦德(<i>wadei</i>)	无	无	91% (p<0.001)
纤毛菌	沙氏(<i>shahii</i>)	无	无	73% (p<0.01)
纤毛菌	口腔(<i>buccalis</i>)	无	无	76% (p<0.05)
劳特普罗菌 (<i>Lautropia</i>)	奇异(<i>mirabilis</i>)	无	有	70%(p<0.05)

[0317] 总之,这项随机对照临床研究证明, CPP-ACP处理导致健康相关的共生体的比例显著增加和口腔健康的改善,表明CPP-ACP是益生元。

[0318] 实施例2

[0319] SnF₂在多微生物模型中促进CPP-ACP益生菌形成

[0320] 多物种口腔生物膜培养

[0321] 模拟龈上菌斑六种代表性口腔细菌种类,血链球菌(NCTC 7863)、变形链球菌 Ingbritt,内氏放线菌(NCTC 10301)、小韦荣球菌(ATCC 17745)、干酪乳杆菌(NCDO 161)和具核梭杆菌(ATCC 10953)(表5)在恒定深度薄膜发酵器(CDFF;Cardiff University,UK)中的人牙釉质基质上以多微生物生物膜培养。将CDFF置于厌氧条件下的37℃培养箱中,该厌氧条件通过在1L/h的含5%CO₂的N₂的恒定流动保持。CDFF在以3rpm的恒定速度旋转圆形平

台上包含15个可取出的聚四氟乙烯 (PTFE) 盘。使用人工唾液培养基 (ASM, 2.5g/L粘蛋白II型(猪,胃, Sigma)、2.0g/L细菌蛋白胨 (Oxoid)、2.0g/L胰蛋白胨 (Oxoid)、1.0g/L酵母提取物 (Oxoid)、0.35g/L NaCl、0.2g/L KCl、0.2mg/L维生素K, 1mg/L氯化血红素和0.1g/L半胱氨酸盐酸盐), 以30mL/h的恒定流速在每个PTFE盘中的三个牙釉质块上生长生物膜(见下文)。在接种之前, 将CDFS盘表面用ASM以10mL/h的流速调节24小时 (McBain等人, (2003) J Appl Microbiol. 94 (4):655-66)。为了模拟在饮食糖摄入的情况下口腔中的体内细菌生长状况以及提供高致龋性激发, 将ASM中的1% (w/v) 蔗糖溶液每天以4小时的间隔以30mL/h的流速泵入CDFS4次, 持续10分钟。

[0322] 表5. 本研究中使用的细菌菌株、接种物中的16S rRNA基因拷贝数和种类组成。

[0323]

细菌菌株 ^a	基因组大小(bp)	16S rRNA 基因 拷贝数 ^b	接种物中的 细胞数($\times 10^7$) ^c
内氏放线菌 NCTC 10301	3,091,654	2	9.90 $\pm$ 8.32
具核梭杆菌多形亚种 ATCC 10953	2,428,298	5	11.5 $\pm$ 8.79
干酪乳杆菌(NCDO 161)	2,851,896	5	5.10 $\pm$ 2.40
变形链球菌(Ingbritt)	2,030,511	5	13.7 $\pm$ 5.77
血链球菌(NCTC 7863) ATCC 10556	2,303,750	5	21.7 $\pm$ 10.9
小韦荣球菌 ATCC 17745	2,163,473	4	5.44 $\pm$ 3.08

[0324] ^a全部菌株来源于墨尔本牙科学院的口腔健康合作研究中心

[0325] ^b16S rRNA基因拷贝数通过在本实验室中进行的基因组的序列分析确定, 数据未显示。

[0326] ^c通过qPCR测定本研究中使用的接种物中的细胞数的平均值和标准差。

[0327] 将三种处理应用于多微生物生物膜: 290ppm氟化物, 其中220ppm氟化物作为SnF₂和70ppm氟化物作为NaF(被称为SnF₂), 2% CPP-ACP和2% CPP-ACP-SnF₂。将这些处理与其中用ASM代替测试溶液的对照进行比较。使用具有30mL/h的流速的ASM中的测试溶液的两个10分钟脉冲施加每次处理, 第一脉冲在早晨的第一蔗糖脉冲前30分钟开始, 第二脉冲在一天的最后蔗糖脉冲后3小时30分钟开始。

[0328] 在接种后第6天、第12天和第19天, 从CDFS无菌取出四个盘并用空的无菌盘代替。取出盘中的牙釉质块用于细菌计数和横断显微放射照相。

[0329] 牙釉质块准备

[0330] 在墨尔本大学伦理学批准 (HREC#1237616) 下获得360颗拔出的人类第三磨牙, 并通过暴露于4.1kGy的 γ 辐射进行灭菌。使用水冷的金刚石锯片 (Minitom, Struers) 从牙齿上切下约6 $\times$ 3 $\times$ 3mm大小的牙釉质块, 并使用利用1200、2400、4000粒度研磨纸 (Struers) 以及3 μ m和1 μ m金刚石抛光膏 (Struers) 的RotoPol/RotoForce研磨仪器打磨, 将块置于深度为100 μ m的定制的CDFS盘中, 用黄色粘蜡 (Kemdent) 在适当的位置密封, 并通过暴露于4.1kGy的 γ 辐射进行灭菌。

[0331] 取样

[0332] 通过用100 μ L ASM轻轻洗涤, 首先从牙釉质块中去除浮游和松散附着的细菌细胞。

为了收获在每个块上生物膜细胞,在1mL ASM的情况下用无菌刮刀刮擦表面。通过离心(10,000g,10分钟)沉淀生物膜细菌细胞,小心地倾出上清液并将细胞沉淀储存在-80℃直至DNA提取所需。然后将牙釉质块用于切片和显微射线照相。

[0333] 生物膜样品的DNA提取和测序

[0334] 对于每个时间点,使用**PowerLyzer® PowerSoil®**DNA分离试剂盒(MoBio Laboratories),按照制造商“真空方案”使用**Precellys®**磁珠均质器(Bertin Technologies),从8-9个牙釉质块中分别提取DNA。使用Qubit™dsDNA HS测定试剂盒(Life Technologies)定量样品,然后储存在-80℃。

[0335] 离子扩增子文库制备融合方法(Thermo Fisher Scientific)适用于扩增16S rRNA基因的V4区域。PCR在50μL反应体积中进行,所述反应体积含有5ng DNA,1X Q5反应缓冲液,0.3μM PAGE纯化的定制条形码引物(Thermo Fisher Scientific),0.2mM dNTP和1单位Q5热启动高保真DNA聚合酶(Genesearch)。将反应在98℃下保持3分钟以使DNA变性,然后进行在98℃下保持10秒,48℃下保持10秒和72℃下保持15秒的17个循环的扩增。使用GA间隔子和GTGCCAGCMGCCGCGGT作为结合区序列,按照融合方法的规定设计具有条形码1-62的正向引物。使用单反向引物,其由反向适配子、TC间隔子和GGACTACHVGGGTWCTCTAA的结合区序列组成。

[0336] 使用Ion Torrent个体化基因组测序仪,利用Ion OneTouch™ 2 200试剂盒和Ion PGM™测序200Kit v2化学物质延伸至535个循环(Thermo Fisher Scientific),进行扩增子文库的多重测序。

[0337] 使用Ion Torrent软件通过针对6种物种中的每一种的已知16S V4序列作图来分析测序数据。为了调整测序深度的差异,通过下采样将总的读取数归一化至最低发生的读取数。

[0338] 共聚焦激光扫描显微镜

[0339] 将具有附着的多微生物生物膜的牙釉质基质浸入PBS中以冲洗掉培养基和未附着的细菌细胞,然后浸入4%多聚甲醛中,在室温固定30分钟。然后将它们浸入PBS中以去除多聚甲醛。在准备原位杂交时,将生物膜包埋在含有0.02%过硫酸铵和0.8%N,N',N-四甲基乙二胺(TEMED)的20%丙烯酰胺中,随后储存在4℃的PBS中。

[0340] 使用以下定制的物种特异性探针对多微生物生物膜进行荧光原位杂交(FISH)。在5'用Alexa594标记的探针序列ACT CCA GAC TTT CCT GAC检测到变形链球菌,在5'用Alexa405标记的AGA CGC AAT CCC CTC CTT检测到殊异韦荣菌(*V. dispar*),在5'用Alexa647标记的ACT CTG CCG ACC ATT CTT CT检测到干酪乳杆菌,在5'用Alexa488标记的AGA GAT AGA GTT TCT CTT CGG检测到血链球菌,在5'用Alexa405标记的CGG TTA TCC AGA AGA AGG GG检测到内氏放线菌和在5'用Alexa647标记的CTA ATG GGA CGC AAA GCT CTC检测到具核梭杆菌(Thermofisher,Australia)。将生物膜在46℃下孵育2.5小时,其中杂交缓冲液含有如前所述的每种探针和10%甲酰胺(Zainal-Abidin等人,(2012).J Proteome Res.11(9):4449-4464)。然后,在48℃,将杂交的生物膜浸入洗涤缓冲液(0.45M NaCl,20mM Tris-HCl,5mM EDTA,0.01%SDS)保持25m,并为成像作准备。如前所述,使生物膜在Zeiss共聚焦激光扫描显微镜上可视化(Zainal-Abidin等人,(2012).J Proteome Res.11(9):4449-4464),并用COMSTAT软件分析以确定生物计量参数。

[0341] 扫描电子显微镜

[0342] 如前所述制备用于扫描电子显微镜分析的生物膜样品 (Zainal-Abidin等人, 2012, 见上文; Zhu等人, (2013) PLoS One.8 (8) :e71727)。

[0343] 横断显微放射照相术

[0344] 基本上如前所述进行横断显微放射照相术 [Shen等人, 2011]。将损伤和其旁边的无损牙釉质的射线照相图像各自扫描六次并取平均值, 以得到脱矿密度测定曲线和对照无损牙釉质密度测定曲线, 并计算体积%矿物质 ((vol%min)) 含量曲线。损伤深度 (μm) 确定为到矿物质含量达到无损牙釉质数值的95%的点的距离。表示为 ΔZd 的综合矿物质损失 (IML) 通过梯形积分计算为无损牙釉质密度测定曲线与脱矿牙釉质密度测定曲线之间的面积 (以 vol%min. μm 计)。

[0345] 生物膜离子分析

[0346] 基本上如前所述, 通过电感耦合质谱法测定多微生物生物膜样品的钙、磷和锡含量 [Dashper等人, 2005]。

[0347] 统计分析

[0348] 细菌种类和损伤参数比较。使用Q-Q图检查残差的正态性, 并使用Levene检验测试Shapiro-Wilk检验的正态性和方差同质性。由于在甚至使用Minitab 17版本的软件 (Minitab Inc.State College PA, USA) 进行Box-Cox转换后, 细菌种类组成的残差不接近正态分布, 使用Kruskal-Wallis检验分析两个以上独立样品的物种比例差异。使用Bonferroni校正的事后Wilcoxon秩和检验用于测量处理之间的差异 (Sokal和Rohlf (1969). Biometry San Francisco: W.H. Freeman and Co.)。对于损伤参数差异, 使用单向ANOVA在Box-Cox转化数据上测量第6天的LD, 其中使用事后图基 (Tukey) 检验测量成对差异。使用Kruskal-Wallis检验和具有Bonferroni校正的事后Wilcoxon秩和检验, 测量第6天的 ΔZd 值以及第12天和第19天的LD和 ΔZd 值的差异。使用SPSS 22版本的软件 (IBM SPSS Inc., IL, USA) 进行所有统计测试。在所有情况下, α 均设定为0.05。

[0349] 结果

[0350] 多微生物生物膜模型的开发

[0351] 如通过16s rRNA基因分析确定的, 在多微生物接种物中存在大量所有六种细菌种类 (表5)。当在人工唾液培养基 (ASM) 存在下生长伴随频繁暴露于蔗糖时, 在接种后在恒定深度薄膜发酵器 (CDFF) 的无损人牙釉质基质上快速建立多微生物生物膜。在每个时间点, 在对照的所有四个生物学重复的多微生物生物膜中可检测到所有六种细菌种类, 尽管具核梭杆菌从未存在于存在的总细菌的0.01%以上。内氏放线菌随着时间的推移从第6天的2%以下增加至第19天的总细菌的18%以上 (图3)。干酪乳杆菌的比例在实验过程中显著增加, 到第19天平均为总细菌的16%。血链球菌的比例从第6天的总生物膜细菌的36%下降到第19天的小于11%。随着时间的推移, 变形链球菌的比例没有明显的趋势, 该物种可能保持相对稳定。变形链球菌是生物膜中最丰富的物种, 占总细菌群体的48%至64% (图3)。

[0352] 通过将牙釉质块暴露于蔗糖脉冲的多微生物生物膜来产生最初无损的人牙釉质基质的脱矿。产生牙釉质损伤, 其保持完整的表面层, 并且在这方面类似于体内看到的早期龋齿损伤 (图4)。当通过扫描电子显微镜成像时, 多微生物生物膜也具有与龈上菌斑相似的结构 (图4)。在初始迟滞期后, 损伤形成以线性方式进行, 从第6天至第19天的平均恒定矿物

质损失率为 $225.1\text{vol}\%\text{min.}\mu\text{m}/\text{天}$ (图4)。在第19天,平均损伤深度为 $87.1\pm 8.4\mu\text{m}$,平均综合矿物质损失(ΔZd)为 $3575.6\pm 562.0\text{vol}\%\text{min.}\mu\text{m}$ (表6)。

[0353] 表6. SnF_2 、CPP-ACP和CPP-ACP/ SnF_2 对多微生物生物膜龋齿模型的牙釉质基质中形成的亚表面损伤的综合矿物质损失(ΔZd)和损伤深度(LD)的影响。

[0354]

组别	第 6 天		第 12 天		第 19 天	
	ΔZd ($\text{vol}\%\text{min.}\mu\text{m}$)	LD (μm)	ΔZd ($\text{vol}\%\text{min.}\mu\text{m}$)	LD (μm)	ΔZd ($\text{vol}\%\text{min.}\mu\text{m}$)	LD (μm)
对照	641.5 ± 139.0^a	18.0 ± 3.0^{ab}	2155.2 ± 407.2^{abc}	49.9 ± 8.0^{abc}	3575.6 ± 562.0^{abc}	87.1 ± 8.4^{abc}
CPP-ACP	572.9 ± 97.80	15.0 ± 2.1^a	1075.3 ± 148.0^{ad}	26.3 ± 4.4^{ade}	2105.4 ± 346.2^{bd}	52.3 ± 3.2^{ad}
SnF_2	636.7 ± 129.4	17.6 ± 1.2^c	1352.1 ± 147.3^{bde}	37.1 ± 5.3^{bdf}	2096.3 ± 66.7^{ac}	46.1 ± 4.7^{bc}
CPP-ACP+ SnF_2	552.6 ± 109.2^a	14.3 ± 2.6^{bc}	1091.3 ± 138.2^{ce}	28.9 ± 1.9^{cef}	1395.5 ± 263.2^{cde}	38.0 ± 3.4^{cde}

[0355] 第6天:LD列中的相同上标表示显著差异; $(^a p<0.05; ^b p<0.001)$: ΔZd 列中的相同上标表示显著差异($^a p<0.05$)。所有其他差异均不显著($p>0.05$)。

[0356] 第12天:列中的相同上标表示显著差异。LD-所有差异均显著不同($p<0.05$)。 ΔZd -除CPP-ACP和CPP-ACP+ SnF_2 ($p>0.05$)之外,所有差异均显著不同($p<0.05$)。

[0357] 第19天:列中的相同上标表示显著差异-LD和 ΔZd -除了 SnF_2 和CPP-ACP($p>0.05$)之外,所有差异均显著不同($p<0.05$)。。

[0358] SnF_2 和CPP-ACP对多微生物生物膜组成的影响

[0359] 相对于对照,用 SnF_2 每天两次处理多微生物生物膜在第19天显著减少了内氏放线菌的丰度并且增加了血链球菌的丰度(图5,表7)。用CPP-ACP每日两次处理多微生物生物膜导致多微生物生物膜的组成的更显著变化,尤其是在接种后第19天。虽然变形链球菌和小韦荣球菌比例保持相对恒定,但与对照相比,干酪乳杆菌显著减少,血链球菌和具核梭杆菌均显著增加(图5)。相对丰度的最大变化是干酪乳杆菌在第19天的一致的 $>95\%$ 的降低,而具核梭杆菌在第19天显示出 355% 的最大的平均增加(图5B,表7)。CPP-ACP和 SnF_2 的组合对多微生物生物膜的细菌组成产生了更显著的影响(图5和表7)。产酸和耐酸物种、变形链球菌、内氏放线菌和干酪乳杆菌以及小韦荣球菌均显著下降。酸敏感物种具核梭杆菌显著增加至总细菌的 34% ,成为多微生物生物膜中第二丰富的物种,并且血链球菌的丰度也增加了 50% 。在处理过的生物膜中始终可检测到所有六种细菌种类。使用针对四种细菌种类的特异性染色,CPP-ACP/ SnF_2 处理的多微生物生物膜的共聚焦激光扫描显微镜证实了具核梭杆菌作为群落的主要组分的出现(图5)。

[0360] 表7. 四种处理对细菌种类组成占生物膜中总细菌的百分比的影响。

[0361]

处理	内氏放线菌	具核梭杆菌	干酪乳杆菌	变形链球菌	血链球菌	小韦荣球菌
对照	18.11 ± 8.96 ^{*a}	0.01 ± 0.01 ^{ab}	16.21 ± 13.64 ^{ab}	48.56 ± 15.23	10.37 ± 5.79 ^{ab}	6.75 ± 4.12 ^a
SnF ₂ /NaF	5.54 ± 1.74 ^{abc}	0.02 ± 0.01 ^{cd}	10.67 ± 6.92 ^{cd}	59.82 ± 4.59 ^a	17.47 ± 3.44 ^a	6.50 ± 1.48 ^b
CPP-ACP	11.93 ± 2.34 ^b	2.43 ± 1.21 ^{ace}	0.38 ± 0.23 ^{ac}	58.70 ± 5.47 ^b	19.85 ± 2.86 ^{bc}	6.71 ± 0.89 ^c
CPP-ACP+ SnF ₂ /NaF	9.76 ± 2.01 ^c	34.13 ± 4.88 ^{bcde}	0.18 ± 0.07 ^{bd}	37.95 ± 2.64 ^{ab}	15.61 ± 1.76 ^c	2.37 ± 0.45 ^{abc}
总体 P 值	< 0.001	< 0.001	< 0.001	0.004	< 0.001	0.019

[0362] *平均值±标准差。在19天暴露于四种处理的多微生物生物膜中的细菌种类的比例。

[0363] 列中的^{abcde}相同上标表示显著差异 (p<0.05)。n=5-21。

[0364] 使用Bonferroni校正的事后Wilcoxon秩和检验测量用Kruskal-Wallis检验 (参见总体p值) 进行的遍及处理的所有比较和处理之间的成对差异。

[0365] SnF₂和CPP-ACP制剂对牙釉质脱矿的影响

[0366] 用SnF₂处理多微生物生物膜在第6天至第19天导致脱矿速率至112.1vol%min.μm/天的显著50.2%的降低 (表6)。这种减少与用CPP-ACP处理所观察到的无统计学差异, CPP-ACP处理在同一时段也使脱矿速率产生50.2%的降低 (112.1vol%min.μm/天)。然而, 对于组合的SnF₂/CPP-ACP处理, 脱矿速率降低至64.1vol%min.μm/天是显著更多的 (72%) (表6)。生物膜的ICP-MS分析显示, 当CPP-ACP与SnF₂一起使用时, 钙增加4倍, 磷增加3倍。有趣的是, 相对于对照, SnF₂处理导致钙和磷的两倍增加。在SnF₂制剂和CPP-ACP-SnF₂处理期间, 亚锡浓度均在1.0nmol/mg生物膜湿重到达峰值。然而, 用CPP-ACP-SnF₂处理, 可以更早地达到该浓度。

[0367] 讨论

[0368] 在每天用四次蔗糖脉冲的CDEF中产生的六种细菌生物膜群落主要是较为产酸的和耐酸的, 因此致龋物种变形链球菌、内氏放线菌和干酪乳杆菌, 在第19天, 它们一起构成了多微生物生物膜的85%。该比例从第6天的55%增加。当仅检查对照生物膜中的内氏放线菌和干酪乳杆菌的比例时, 从第6天到第19天, 总细菌细胞从2.5%增加到34% (图3)。这表明高度酸性和致龋环境, 这与该模型中低水平的嗜中性物种具核梭杆菌以及快速、恒定和可重复的脱矿速率一致 (图4)。

[0369] 确定了模型的可重复性后, 研究了每日两次添加作为SnF₂ (220ppm F):NaF (70ppm F) 的混合物的290ppm氟化物的效果, 所述290ppm氟化物被选择以代表目前使用SnF₂/NaF的1450ppm F洁齿剂的唾液中的五倍稀释度。。在研究中, 在SnF₂处理期间, 内氏放线菌在多微生物生物膜中的相对丰度显著减少并且血链球菌在多微生物生物膜中的相对丰度显著增加。Sn积聚在多微生物生物膜中, 浓度高达119ppm。在本研究中, SnF₂在历经每天两次暴露的19天使牙釉质脱矿速率降低了50%, 并且主要机制可能与促进再矿化的F离子的作用有关。

[0370] 添加CPP-ACP不仅导致脱矿速率显著减少50%，而且还抑制了高度产酸的干酪乳杆菌的出现。此外，酸敏感和有益的共生体具核梭杆菌和血链球菌的丰度可重复增加(图5，表7)。这表明CPP-ACP在该模型中对生物膜形成具有益生元效果。

[0371] 注意到CPP-ACP和SnF₂对多微生物生物膜的细菌组成的增强的益生元效果，其中所有三种产酸和耐酸物种的丰度都减少。小韦荣球菌也减少，这可能表明由于抑制糖酵解而导致乳酸减少，并且具核梭杆菌成为生物膜的主要成分。这些变化与牙釉质脱矿速率的高度显著的72%抑制相关，这将转化为口腔健康的显著改善。如实施例3中所示，SnF₂和CPP-ACP在促进益生菌形成中的累加效果归因于亚锡离子(Sn²⁺)能够交联CPP-ACP并更好地将益生元递送至多微生物生物膜和口腔内/牙齿表面。

[0372] 应当理解，在本说明书中公开和限定的本发明扩展到所提到的或从文本或附图中显而易见的两个或更多个单独特征的所有替代组合。所有这些不同的组合构成了本发明的各个替代方面。

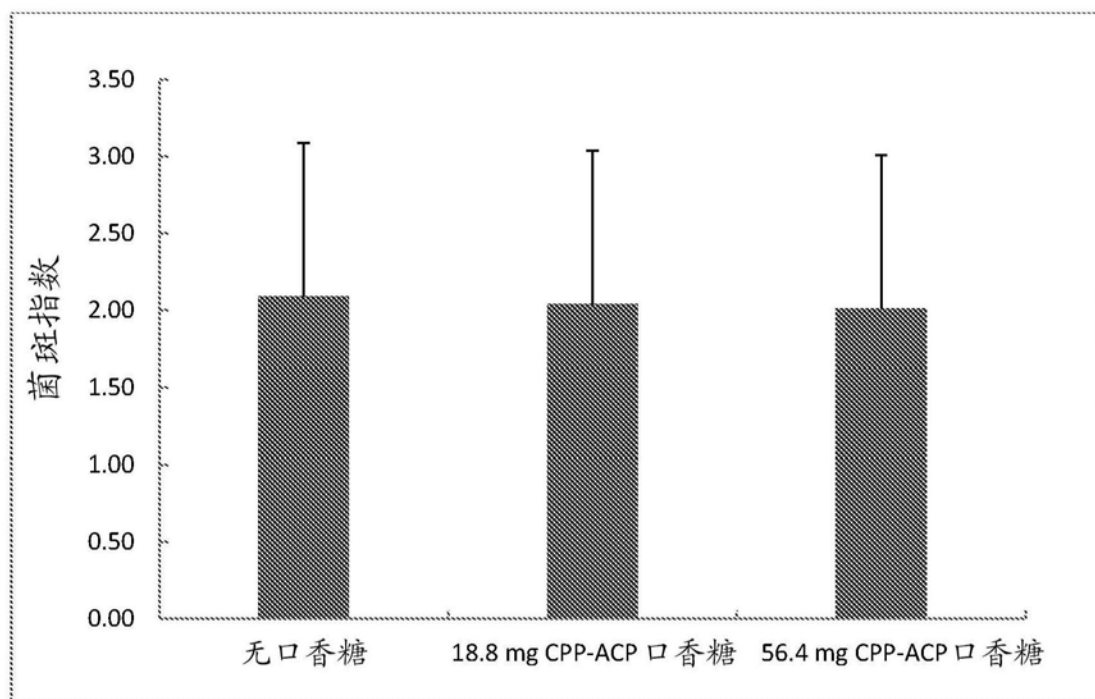


图1

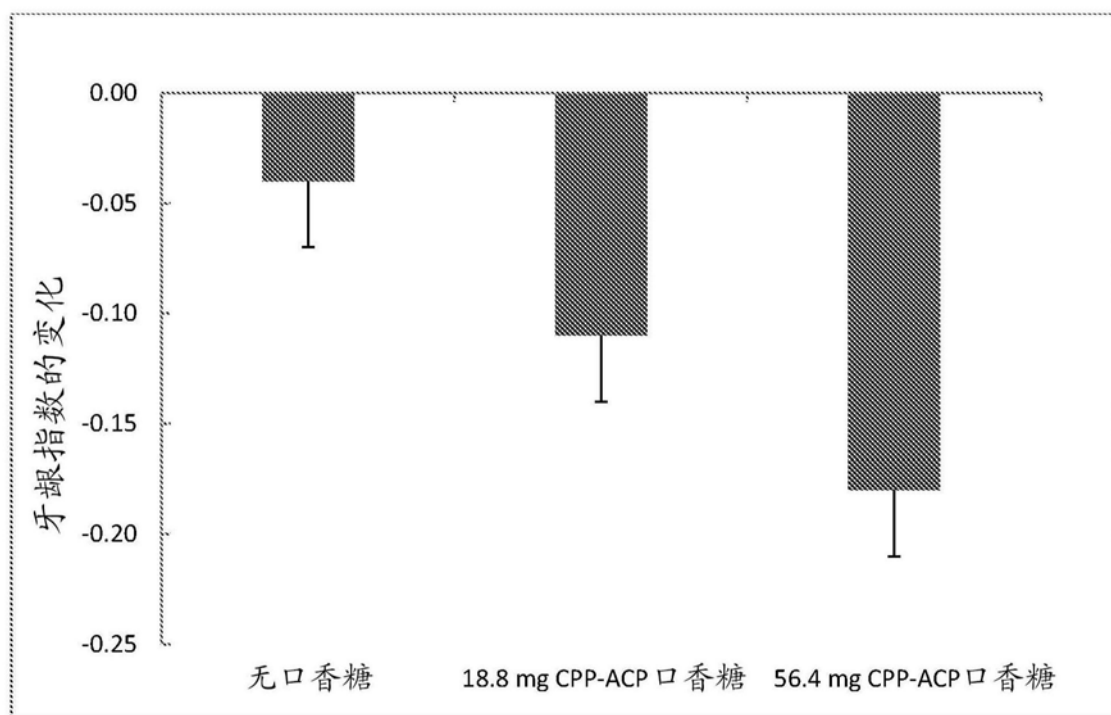


图2

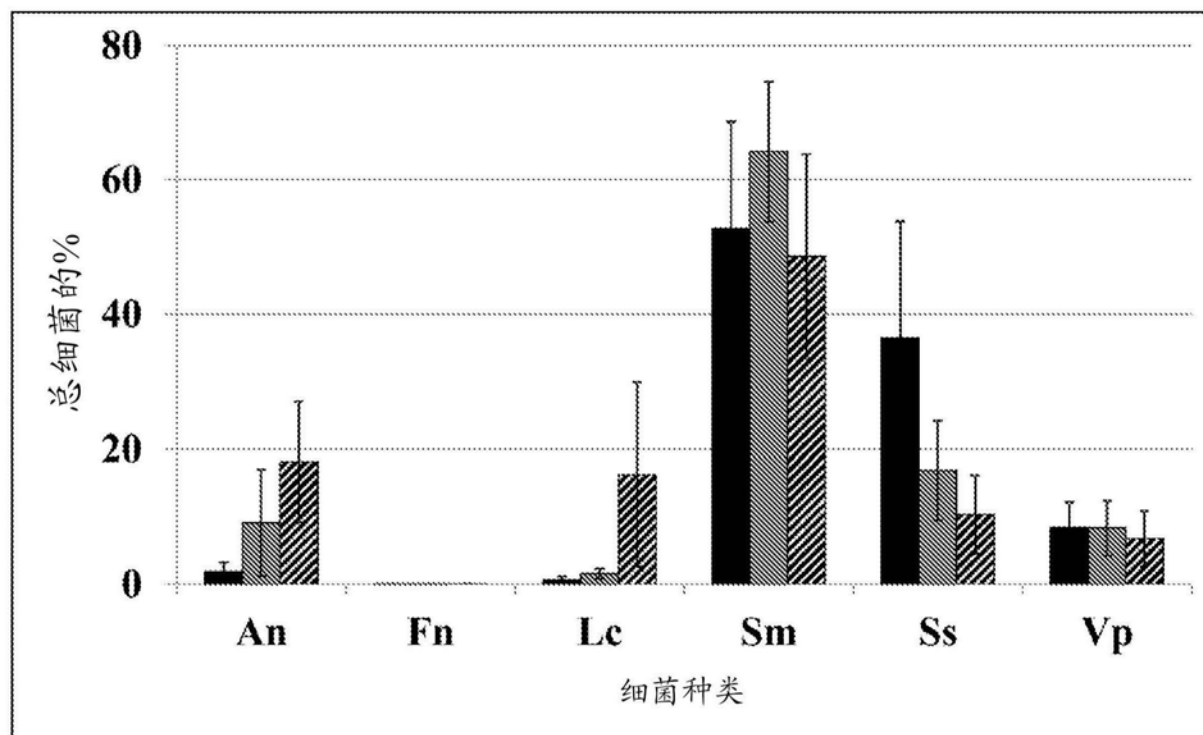


图3

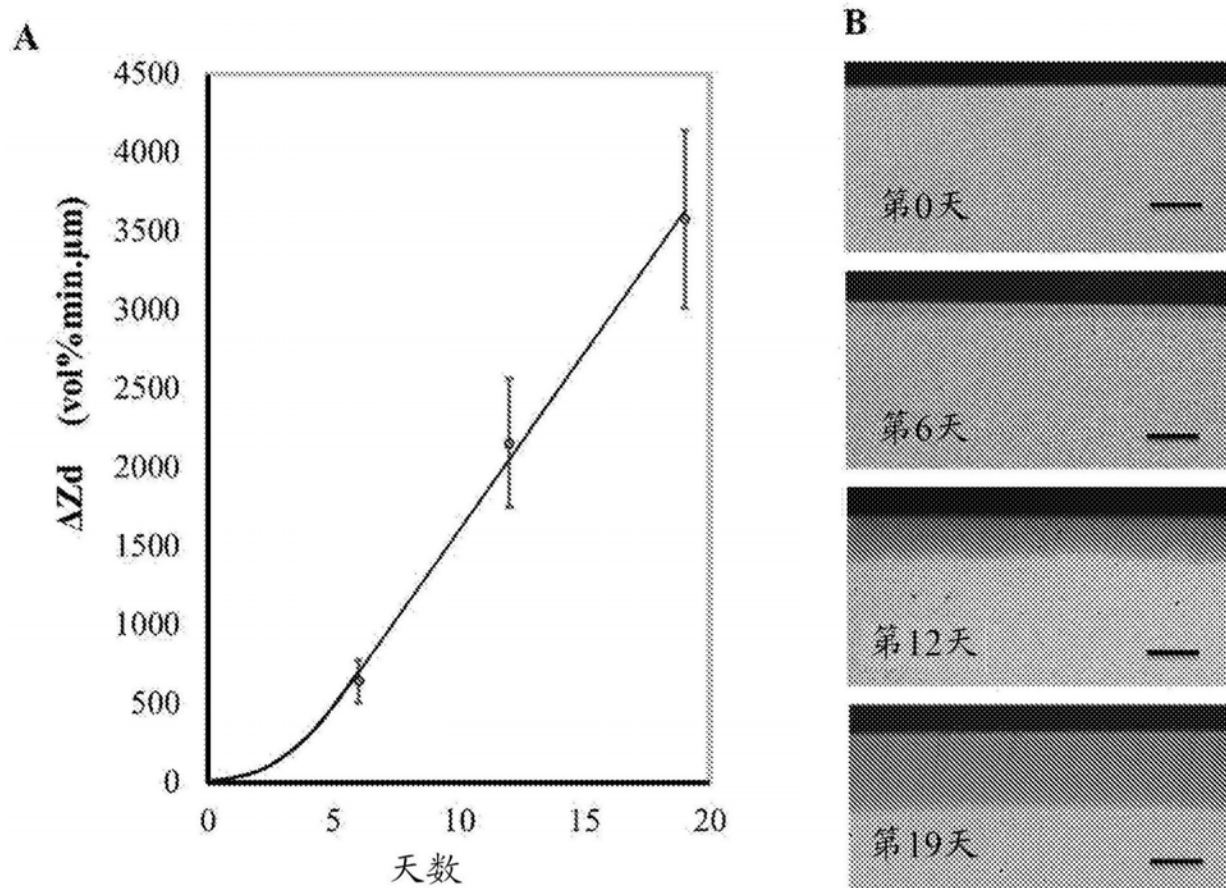


图4

C

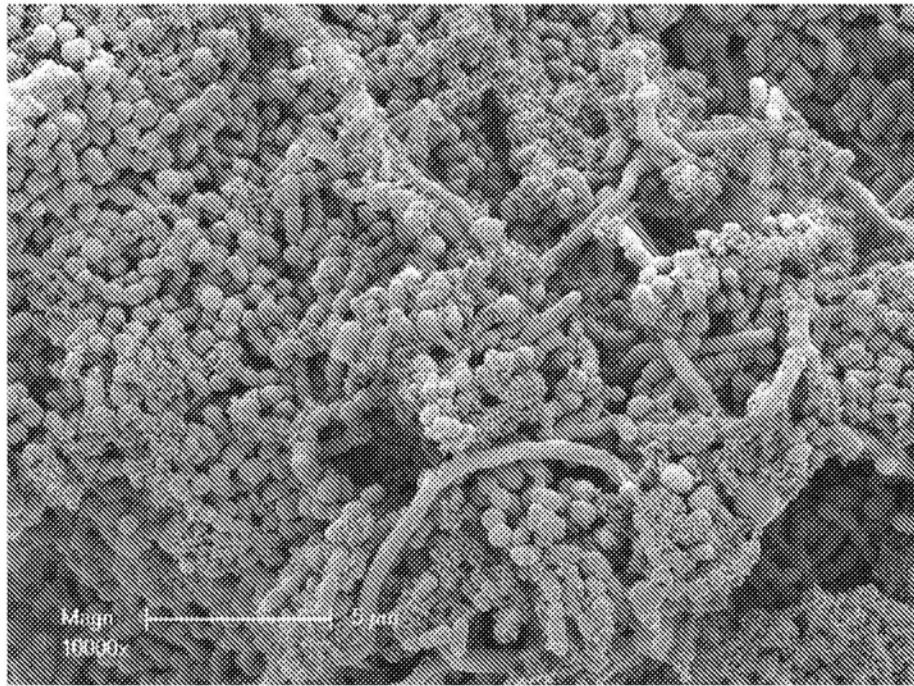


图4(续)

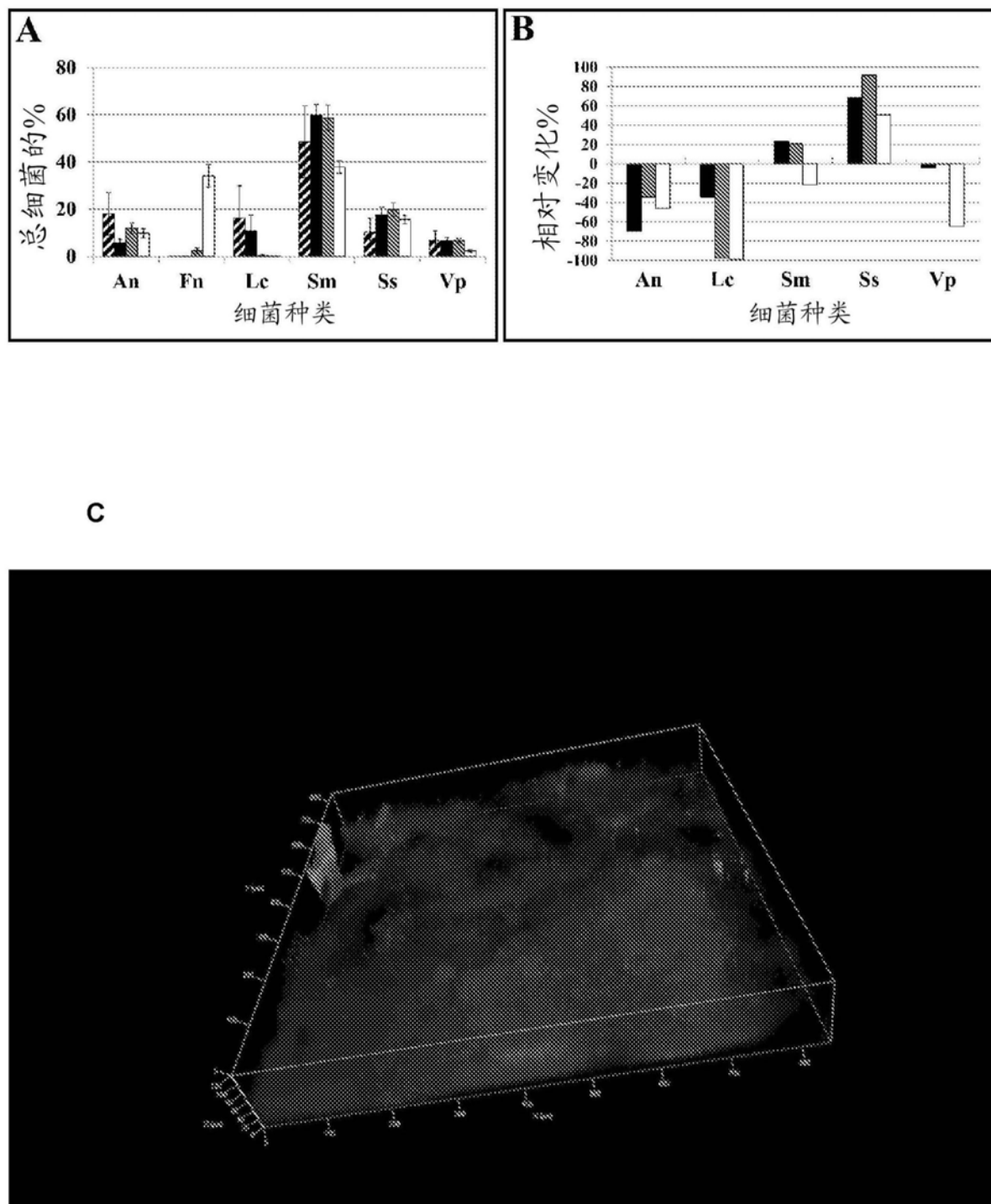


图5