



(12)发明专利申请

(10)申请公布号 CN 111032159 A

(43)申请公布日 2020.04.17

(21)申请号 201880053741.2

(22)申请日 2018.08.21

(30)优先权数据

1713362.0 2017.08.21 GB

(85)PCT国际申请进入国家阶段日

2020.02.19

(86)PCT国际申请的申请数据

PCT/EP2018/072514 2018.08.21

(87)PCT国际申请的公布数据

W02019/038261 EN 2019.02.28

(71)申请人 奇华顿股份有限公司

地址 瑞士韦尔涅

(72)发明人 A·斯康多勒拉 R·雷诺

(74)专利代理机构 中国国际贸易促进委员会专利商标事务所 11038

代理人 王贵杰

(51)Int.Cl.

A61Q 11/00(2006.01)

A61K 8/73(2006.01)

A61K 31/729(2006.01)

A61P 1/02(2006.01)

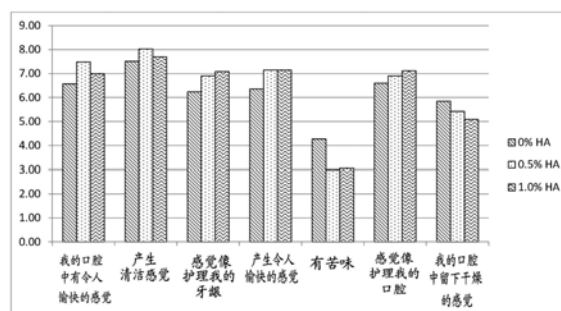
权利要求书1页 说明书12页 附图7页

(54)发明名称

有机化合物中或与之相关的改进

(57)摘要

本发明涉及包含透明质酸的口腔护理组合，其用于促进口腔粘膜修复和/或减少生物膜形成。



1. 包含透明质酸的口腔护理组合物,其中所述透明质酸具有小于500kDa的平均分子量。
2. 权利要求1的口腔护理组合物,其中所述透明质酸具有100-300kDa的平均分子量。
3. 权利要求1的口腔护理组合物,其中所述透明质酸具有20-50kDa的平均分子量。
4. 权利要求1-3之一的口腔护理组合物,其中将透明质酸以以下形式提供:纯净形式,溶液或悬浮液形式,包囊或胶束化形式,吸附在颗粒表面上,或者以其它方式分布。
5. 权利要求1-4之一的口腔护理组合物,还包含至少一种活性成分,其选自消毒剂、收敛剂、止血剂、口腔恶臭抵消剂及其混合物。
6. 权利要求1-5之一的口腔护理组合物,还包含至少一种百里酚糖苷,且特别是百里酚 α -葡萄糖苷。
7. 权利要求1-6之一的口腔护理组合物,包含浓度为0.1-1.0% (w/v)、更优选浓度为0.2-0.5% (w/v)的透明质酸。
8. 用于促进口腔粘膜修复的口腔护理组合物,包含具有小于500kDa的平均分子量的透明质酸。
9. 用于减少生物膜形成的口腔护理组合物,包含具有100-300kDa的平均分子量的透明质酸。
10. 减少在口腔表面上的生物膜形成的方法,包括将权利要求1-9之一的口腔护理组合物施用于所述口腔表面。

有机化合物中或与之相关的改进

发明领域

[0001] 本发明涉及包含透明质酸的口腔护理组合物,其用于促进口腔粘膜修复和/或减少生物膜形成。

[0002] 发明背景

[0003] 口腔护理是保持口腔清洁和无病的实施方式。这典型地牵涉定期刷牙、清洗和清洁口腔,且特别是牙齿。定期完成口腔卫生很重要,因为它可以防止牙齿疾病的发生。牙齿疾病的最常见类型是蛀牙(也称为龋齿)、牙龈炎和牙周炎。

[0004] 人们普遍认为,保护牙齿对于保持健康至关重要。众所周知,缺乏牙齿卫生会逐渐导致牙齿疼痛,蛀牙,牙齿脱落,最终在没有干预的情况下,甚至会导致更严重的全身健康问题。除了与牙齿卫生差相关的明显的身体健康问题外,我们的牙齿外观与情绪之间的关系以及我们的社会和精神健康之间的关系也许不那么受人重视。良好的牙齿质量会对我们的情绪产生巨大影响,因为它激发了人们的自信和愿意多微笑的意愿。

[0005] 目前,存在各种各样的口腔护理消费产品可供使用,包括牙膏,漱口水,口香糖,口腔喷雾剂等。除了清洁之外,这些产品还可能提供其它效果,例如提神或增白。

[0006] 口腔组织经常暴露于多种压力源,例如咀嚼,言语,呼吸和细菌通过口咽、营养、外部环境等的侵袭。这些因素会延迟口腔伤口的愈合并增加感染的风险。

[0007] 口腔粘膜损伤通常与刷牙,去除牙菌斑,咀嚼,讲话,溃疡或手术有关(例如用于放置牙齿植入物或拔牙)。此外,过度使用口腔牙齿卫生产品,例如漱口水,可能会增加口腔组织的破坏。

[0008] W02004/056346公开了用于伤口处置的方法和组合物,其中所述组合物包含螯合剂,pH缓冲剂,抗微生物剂,维生素E,载体和表面活性剂。其中,公开了一种用于修复口腔粘膜伤口的漱口水。

[0009] EP1908457公开了用于治疗上皮病变的基于透明质酸盐的组合物。

[0010] 透明质酸是酸性非硫化粘多糖,其为结缔组织的基本成分。在人和动物中,透明质酸不仅存在于结缔组织中,而且还存在于重要的生物流体中,例如玻璃体液、房水和脐带中:它没有毒性,也没有对人或动物使用的禁忌症。

[0011] 透明质酸可以通过从天然物质例如从公鸡冠上中提取得到,也可以通过生物技术方法生产。根据生产方法的不同,它的分子量范围很广,可以达到15' 000kDa。透明质酸已知在人类疗法和化妆品中作为钠盐或钾盐使用:透明质酸的外源应用具有有利于结缔组织化的有益作用,并且还有效减少或消除了由产生透明质酸酶的细菌诱导的炎症过程,它有利于发炎成分的分解,降低毛细血管的过度通透性,加速组织修复过程,并通过将游离水代谢结合到其分子结构上而产生抗水肿作用。

[0012] 在化妆品领域,透明质酸因其提神、滋补、皮肤修复和水化性能而被利用。

[0013] EP0138572公开了具有平均分子量为约50至约100kDa的透明质酸级分在组织伤口的愈合中的用途。

[0014] EP0444492示例了高分子量透明质酸(88至4' 000kDa)在治疗和预防口腔粘膜炎症

状态中的用途。

[0015] 健康的口腔菌群典型地由700种以上细菌种类组成。细菌的分布取决于口腔表面：牙周，牙龈，牙菌斑，腭，唾液等。通常，链球菌属(*Streptococcus* spp.)是最主要的细菌。在某些区域，主要在牙齿裂缝、龈上菌斑和龈下菌斑中，有规律地发现葡萄球菌属(*Staphylococcus* spp.)，但葡萄球菌属仅是口腔微生物区系的暂时居留者。其中，在口腔中发现金黄色葡萄球菌(*Staphylococcus aureus*)。这是口腔中的一种暂时性、但频繁的细菌居留者，在健康的成人齿状口腔中的发生率为约24-84%，而在佩戴假牙的人群中的发生率为约48%。

[0016] 口腔感染可能是通过多种来源的交叉感染发生的。它们可能会引起病理学情况，例如口角炎，腮腺炎或葡萄球菌粘膜炎。在这些区域，发现了金黄色葡萄球菌。

[0017] 本发明的目的在于提供一种保护口腔组织和进一步伤口愈合的改进的口腔护理组合物。

[0018] 发明概述

[0019] 在第一方面，本发明提供包含具有小于500kDa的平均分子量的透明质酸的口腔护理组合物。

[0020] 令人惊讶地，发现低和中等分子量透明质酸在口腔组织修复和针对生物膜的防护中非常有效。

[0021] 在第二方面，本发明提供了通过将本发明的口腔护理组合物施用于口腔表面来减少在口腔表面上的生物膜形成的方法。

[0022] 发明详述

[0023] 本发明提供了包含透明质酸的口腔护理组合物，其中所述透明质酸具有小于500kDa的平均分子量。

[0024] 在整个本公开中，除非另外指出，否则术语“平均分子量”是指重均分子量。

[0025] 如本文所用，术语“口腔护理组合物”是指被设计成摄入口腔以递送各种益处的非食品组合物。“口腔护理组合物”不仅包括即用型消费品，而且还包括消费品的前体(例如，使用前需要稀释的储备溶液)和此类消费品的活性部分。实际上，该术语涵盖适用于口腔治疗且对口腔治疗有用的任何组合物。

[0026] 这样的组合物包括洁齿剂，漱口剂，口腔喷雾剂和含漱剂组合物，呼吸条(可食用的膜，置于口腔中以向其施用活性剂，例如香料或口气清新剂)和口香糖。

[0027] 除非另有说明，否则本文所用的术语“洁齿剂”是指牙膏、口腔护理凝胶或液体。洁齿剂组合物可以是单相组合物，或者可以是两种或更多种单独的洁齿剂组合物的组合。洁齿剂组合物可以是任何期望的形式，例如深条纹、表面条纹、多层、具有围绕糊状物的凝胶或其任意组合。

[0028] 口腔护理产品包括，例如，牙膏，漱口水，漱口剂和便携式“旅途中”可用的口腔恶臭控制产品，包括口香糖、糖果、锭剂、可食用薄膜和口腔喷雾剂。上述举出的口腔护理产品的制剂是本领域众所周知的。口腔护理产品包含赋形剂，包括，例如，表面活性剂，乳化剂，溶剂，着色剂，防腐剂，抗氧化剂，抗微生物剂，酶，植物或矿物油，脂肪，蛋白质，增溶剂，糖衍生物，维生素，多元醇(包括山梨醇)，有机酸，人造甜味剂，聚合物，增稠剂，口香糖胶基，口腔护理活性剂(包括氟化合物)和锌盐(例如葡萄糖酸锌，乙酸锌，柠檬酸锌)。一些口腔护

理产品包含醇,尤其是低级醇(C1-C4)。

[0029] 发现与未处理的粘膜相比,低分子量和中等分子量透明质酸在处理24h后均能够促进口腔粘膜修复。效果牵涉伤口愈合的主动机制结合损伤的完全恢复。在下面的实施例1-4中可以找到对评价损伤后上皮再形成的实验的详细描述。

[0030] 与此相反,高分子量(1'000-1'400kDa)的透明质酸仅通过在皮肤表面形成薄膜而对组织修复具有机械作用。

[0031] 因此,本发明的口腔护理组合物包含具有小于500kDa、更优选小于400kDa且甚至更优选小于300kDa的平均分子量的透明质酸。

[0032] 还发现本发明的口腔护理组合物提供增强的粘膜触觉特性。特别地,牙龈的光滑度得到改善,并且该组合物提供了“健康的感觉”。

[0033] 在对比试验中(参见下面的实施例11),认为本发明的口腔护理组合物提供了更令人愉快的感觉、更清洁的感觉和更少的干燥的感觉,并且感觉像它们在护理人的口腔和牙龈。还发现透明质酸的掺入对牙膏的味道具有有利的影响,使它们苦味较少、更甜且咸味更少。它们还经历了较少的起泡、较少的烧灼感和较少的干燥,并提供了更清洁的感觉。

[0034] 进一步发现,本发明的口腔护理组合物表现出减少的涩味,特别是那些含有锌盐的涩味。锌盐通常用于口腔护理制剂中,并且由于相关的涩味,在许多情况下被口腔护理消费者视为问题。现已发现,通过掺入本文所定义的透明质酸,可以减少或乃至完全消除牙膏、漱口水和其它口腔护理产品的涩味和/或干燥作用。

[0035] 优选地,本发明的口腔护理组合物包含具有至少约5kDa的平均分子量的透明质酸。

[0036] 对于低分子量透明质酸,平均分子量的优选范围为约20至约50kDa,而对于中等分子量透明质酸,平均分子量的优选范围为约100至约300kDa。

[0037] 发现低分子量透明质酸对于促进口腔粘膜修复特别有效。

[0038] 因此,在一个优选的实施方案中,本发明的口腔护理组合物包含透明质酸,其具有小于约80kDa、优选为约10至约65kDa且最优选为约20至约50kDa的平均分子量。

[0039] 低分子量透明质酸的生物活性与细胞内聚力(增加紧密连接(Tigh junction)(ZO-1/Occludine)的表达)、饱满度(促进I型胶原蛋白的产生)、水合作用(增加皮肤的含水量)、机械性能(改善坚固度和张力)和皮肤渗透性(显著的皮肤渗透性(120μM))相关。

[0040] 进一步发现,中等分子量透明质酸还降低了细菌的粘附及其从定植的口腔粘膜模型向组织中的渗透。通过扫描电子显微镜检查对生物膜的分析表明,用中等分子量透明质酸处理的口腔粘膜呈现较少的细菌簇,并阻止了通过基质多糖生产所观察到的从浮游生物表型向生物膜的转换。因此,中等分子量透明质酸不仅促进口腔粘膜的组织修复,而且还防止了由致病性细菌形成的生物膜。

[0041] 因此,在一个优选的实施方案中,本发明的口腔护理组合物包含具有约80至约500kDa、优选约90至约400kDa且最优选约100至约300kDa的平均分子量的透明质酸。

[0042] 中等分子量透明质酸的生物活性牵涉抗菌防御(体外和离体的依赖于TRL2和TRL4的防御素产生的增加;通过对大肠杆菌(E.Coli)的细菌抑制作用控制皮肤的免疫力),细胞增殖和迁移(促进细胞增殖和迁移(角质形成细胞和成纤维细胞)和皮肤渗透(显著渗透入皮肤(40μM))。

[0043] 进行的实验的详细结果在下面的实施例5-9中描述。总之,发现中等分子量透明质酸

[0044] -恢复TEER水平而无定植(屏障功能)

[0045] -减少总细菌计数(-50%;细菌增殖)

[0046] -限制RHO中的细菌侵入(细菌渗透)

[0047] -保留细菌中的浮游生物表型(生物膜形成)

[0048] -抑制生物膜形成(多糖基质;生物膜形成)

[0049] 总的来说,发现中等分子量透明质酸是口腔护理应用的最佳选择,因为它能够积极促进口腔组织的修复并显示出对细菌生物膜的有效防护。因此,根据特别优选的实施方案,本发明的口腔护理组合物包含中等分子量透明质酸,且特别地包含具有约100至约300kDa的平均分子量的透明质酸。

[0050] 在本发明的口腔护理组合物中,透明质酸可以以本领域技术人员已知的任何适合形式提供。特别地,可以将它以以下形式提供:纯净形式,溶液或悬浮液形式,包囊或胶束化(myellized)形式,吸附在颗粒表面上,或者以其它方式分布。如果透明质酸以纯净形式使用,则它典型地为粉末,其可以直接掺入到口腔护理组合物中。或者,透明质酸可以以溶液或悬浮液形式使用,优选为水或醇溶液或悬浮液形式。透明质酸也可以以包囊或胶束化形式、优选以浆液形式提供。或者,透明质酸可以吸附在颗粒表面上,例如在二氧化钛上,或者以其它方式分布。

[0051] 本发明的口腔护理组合物可以进一步包含其它活性成分,以及本领域技术人员通常已知的添加剂。特别地,它可以进一步包含消毒剂,收敛剂,止血剂,口腔恶臭抵消剂及其混合物。

[0052] 本发明的口腔护理组合物还可以通过使用主要的香料或气味剂而包含强烈的香味以掩盖口腔的恶臭,或者更确切地其感觉,尽管所述恶臭仍然存在但是在组合中更少地被检测到。例如,JP2004018431描述了各种香料组合物,其包含薄荷油或已知包含在薄荷植物中的化合物与掩蔽用香料化合物的组合,所述薄荷油已知是针对口臭的活性成分(例如薄荷醇)。

[0053] 本发明的口腔护理组合物还可包含经典的抗菌剂,例如三氯生、氯化十六烷基吡啶鎓和氯己定。此外,可以使用天然成分或香料化合物的抗菌作用。它们包括,例如,百里酚,冬青油,水杨酸甲酯,桉叶素和薄荷油以及薄荷植物中存在的化合物,特别是薄荷醇。已知具有恶臭抵消作用的其它天然成分包括欧芹,紫罗兰酮(α -紫罗兰酮, β -紫罗兰酮, γ -紫罗兰酮,二氢紫罗兰酮, α -甲基紫罗兰酮,鸢尾酮)与锌盐的组合,某些高级醇(尤其是壬醇))与C1-C4醇的组合(W099/51093)。

[0054] 一种可替代选择是通过使口腔细菌基本上保持完整的方式来减少口腔恶臭,特别是通过用活性化学物质化学捕获恶臭挥发物。例如,可以使用多酚化合物例如绿茶提取物中所含的那些多酚化合物或锌盐来捕获挥发性的硫化物。另一种化学方法是通过使用氧化剂降解恶臭的硫挥发物。

[0055] 另一种方法在于通过相关细菌酶的酶抑制来进行,以便首先不会形成恶臭的硫挥发物。例如,某些植物提取物(番茄,儿茶(*Uncaria gambier*),皂树(*Quillaja saponaria*),北美金缕梅(*Hamamelis virginiana*),枇杷叶(*Eriobotrya japonica*),问荆(*Equisetum*

arvense), 锐刺山楂 (*Cretagus oxyacantha*), 柿 (*Diospyros kaki*), 姜黄 (*Curcuma domestica*), 银杏 (*Ginkgo biloba*), 绿茶, 红茶和/或乌龙茶) 可以用于抑制产生MeSH的甲硫氨酸酶。

[0056] 本发明的口腔护理组合物还可以包含选自以下的口腔恶臭抵消活性成分: 辛-2-炔酸甲基酯, 非-2-壬酸甲基酯, 辛-2-烯酸乙基酯, 辛-2-羟烯酸甲基酯, 壬-2-炔酸甲基酯, 己-2-烯酸乙基酯, 己-2-烯酸甲基酯, 壬-2-炔酸乙基酯, 壬-2-烯酸乙基酯, 庚-2-烯酸乙基酯和庚-2-烯酸甲基酯。

[0057] 本发明的口腔护理组合物可以进一步包含一种或多种选自紫罗兰酮, α 紫罗兰酮, β 紫罗兰酮, 锌盐, 多酚化合物和抗菌剂的活性成分。

[0058] 抗菌剂可以选自三氯生, 氯化十六烷基吡啶鎓, 多己定双胍, 氯己定和抗菌香料材料。抗菌香料材料尤其包括百里酚, 香芹酚, 丁香酚, 异丁香酚, 肉桂醛, 薄荷醇。香料材料可以以包含这些成分的精油的形式提供。优选的精油包括来自百里香, 牛至, 丁香, 肉桂叶, 肉桂皮, 欧芹籽, 欧芹叶, 薄荷, 留兰香和椒样薄荷的油。

[0059] 有用的多酚化合物为, 例如包含没食子酸酯部分, 特别是表没食子儿茶素没食子酸酯的那些。这些可以是某些天然成分的形式, 特别是在绿茶及其提取物中, 例如, 富含表没食子儿茶素没食子酸酯的绿茶提取物。特别地, 可以通过喷雾干燥OMC香料组合物并将其与绿茶颗粒混合以形成绿茶和OMC香料组合物的干混物来形成颗粒形式的OMC香料。所得的颗粒材料可以容易地与OMC产品配方混合。

[0060] 本发明的口腔护理组合物可进一步包含一种或多种选自如下的活性成分: 5-异丙基-2-甲基苯酚, 辛-1-醇, 3,7-二甲基-辛-6-烯-1-醇, 3,7-二甲基-辛-1-醇, 1-异丙基-4-甲基-环己-3-烯醇, 3,7-二甲基-辛-2,6-二烯-1-醇, 2-(4-甲基-环己-3-烯基)丙-2-醇, 3,7-二甲基-辛-1,6-二烯-3-醇, 壬-2,4-二烯醛, 壬-2-烯醛, 2,6,6-三甲基-环己-1-烯甲醛, 3-(4-异丙基-苯基)-2-甲基丙醛, 4-异丙烯基-环己-1-烯甲醛, 5-甲基-2-苯基-己-2-烯醛, 4-甲氧基-苯甲醛, 2,6-二甲基-庚-5-烯醛, 癸-2-烯醛, 苯基-乙醛, 2-苯基-丙醛, 3,7,11-三甲基-十二烷-1,3,6,10-四烯, 3,7-二甲基-辛-1,3,6-三烯, 1-异丙基-4-甲基-环己-1,3-二烯, 1-甲基-4-(5-甲基-1-亚甲基-己-4-烯基)-环己烯, 1-异丙基-4-甲基苯, 癸-3-烯-2-酮, 3-甲基-2-戊基-环戊-2-烯酮, 6-甲基-庚-3,5-二烯-2-酮, 乙酸辛基酯, 乙酸辛-2-烯基酯, 2-甲基-丁-2-烯酸己-3-烯基酯, 乙酸壬基酯, 乙酸庚基酯, 丁酸3-苯基烯丙基酯, 乙酸1,7,7-三甲基-二环[2.2.1]庚-2-基酯, 乙酸4-烯丙基-2-甲氧基-苯基酯, 乙酸1-甲基-1-(4-甲基-环己-3-烯基)-乙基酯, 乙酸2-异丙烯基-5-甲基-环己基酯, 5-辛基-二氢-呋喃-2-酮, 1,1-二甲氧基-3,7-二甲基-辛-2,6-二烯, 1-烯丙基-4-甲氧基-苯, 6-己基-四氢-吡喃-2-酮, 3-丁基-3H-异苯并呋喃-1-酮, 2-戊基-呋喃, (2E,5E/Z)-5,6,7-三甲基辛-2,5-二烯-4-酮, 4-甲基-癸-3-烯-5-醇, 1-环丙基甲基-4-甲氧基-苯, 牛至精油, 格蓬精油, 山苍子精油, 万寿菊精油, 茉莉净油, 薰衣草精油, 杂薰衣草精油, 迷迭香精油和香根精油。

[0061] 已经发现抑制酶的口腔恶臭抵消物质与某些抗菌香料的组合特别有益, 并且导致组合物既高效又具有令人愉快的味道。因此, 本发明的口腔护理组合物可进一步包含至多50%或至多90% (w/w) 的总香料成分, 一种或多种具有抗菌特性的香料, 其选自: 薄荷醇, 百里酚, 丁香酚, 5-异丙基-2-甲基苯酚, 辛-1-醇, 3,7-二甲基辛-6-烯-1-醇, 3,7-二甲基辛-

1-醇,1-异丙基-4-甲基-环己-3-烯醇,3,7-二甲基-辛-2,6-二烯-1-醇,2-(4-甲基-环己-3-烯基)丙-2-醇和3,7-二甲基-辛-1,6-二烯-3-醇。可以以纯化合物的形式或以天然成分的形式(例如来自植物的精油,如用于薄荷醇的薄荷油,椒样薄荷油或留兰香油或用于百里酚的百里香油)添加化合物。

[0062] 例如,牙膏组合物可进一步包含在牙膏中常用的其它化合物,例如口腔消毒剂,研磨剂,湿润剂,洗涤剂,粘合剂,发泡剂,甜味剂,防腐剂,缓冲剂,香料和清凉剂,并且可以按照本领域技术人员公知的方法制备。

[0063] 本发明的口腔护理组合物还可包含一种或多种常规与口腔护理组合物结合使用的附加成分或赋形剂,例如香料化合物,赋形剂,溶剂,提供新鲜的口感的清凉剂和/或其它本领域常用的辅剂。

[0064] 已知香料成分的实例可在FEMA (Flavour and Extracts Manufacturers Association of the United States)出版物或其汇编之一中找到,所述汇编得自FEMA并由其出版,并且包含从1965年至今的所有FEMA GRAS (通常被认为是安全的)出版物,例如2003年出版的GRAS 21,或在Allured Publishing Inc.出版的Allured's Flavor and Fragrance Materials 2004中找到。

[0065] 用于口腔护理产品的已知赋形剂的实例可以在如下文献中找到:Gaffar,Abdul, Advanced Technology,Corporate Technology,Department of Oral Care,Colgate-Palmolive Company,Piscataway,NJ,USA.Editor(s):Barel,Andre O.;Paye,Marc;Maibach,Howard I.,Handbook of Cosmetic Science and Technology(2001),p.619-643.Publisher:Marcel Dekker,Inc.,New York,N.Y.,和Cosmetics:Science and technology,第2版,p.423-563.M.S.Balsam和E.Sagarin编辑,Wiley Interscience,1972。

[0066] 清凉剂的具体实例可包括但不限于薄荷醇,薄荷酮,异胡薄荷醇,N-乙基对薄荷烷甲酰胺(WS-3),N,2,3-三甲基-2-异丙基丁酰胺(WS-23),乳酸薄荷酯,薄荷酮甘油缩醛(**Frescolat®**MGA),琥珀酸单薄荷酯(**Physcool®**),戊二酸薄荷酯,0-薄荷基甘油(**CoolAct®**10),2-仲丁基环己酮(**Freskomenthe®**)和2-异丙基-5-甲基-环己烷甲酸(2-吡啶-2-基-乙基)-酰胺。清凉剂的另外的实例可以例如在W02006/125334和W02005/049553中找到,其通过引用并入。

[0067] 在一个优选的实施方案中,本发明的口腔护理组合物还包含至少一种百里酚糖苷,特别是百里酚 β -葡糖苷。在同一天提交的相应的英国专利申请通过引用并入本文。已发现与百里酚相比,百里酚糖苷提供了持久的杀菌作用并改善了喜好。此外,它们的水溶性明显优于百里酚。

[0068] 本发明的口腔护理组合物应包含有效浓度的透明质酸。特别地,所述口腔护理组合物可包含浓度为至少0.1% (w/v),更优选浓度为至少0.2% (w/v)的透明质酸。在一个优选的实施方案中,所述口腔护理组合物包含浓度为0.1-1.0% (w/v),更优选浓度为0.2-0.5% (w/v)的透明质酸。更高的浓度也是可能的,但是导致成本增加。特别优选低分子量透明质酸以0.5% (w/v)的浓度使用,并且中等分子量透明质酸以0.2% (w/v)的浓度使用。

[0069] 在本公开的上下文中,除非另有说明,否则浓度以每体积重量百分比(%w/v)表示。

[0070] 在另一方面,本发明还提供了用于促进口腔粘膜修复的口腔护理组合物。所述组合物优选包含具有小于500kDa的平均分子量的透明质酸。

[0071] 更优选地,用于促进口腔粘膜修复的口腔护理组合物包含平均分子量为约10至约400kDa,更优选为约20至约300kDa的透明质酸。特别地,用于促进口腔粘膜修复的口腔护理组合物包含平均分子量为约20至约50kDa (低分子量透明质酸) 或约100至约300kDa (中等分子量透明质酸) 的透明质酸。低分子量透明质酸是特别优选的。

[0072] 因此,本发明还涉及具有小于500kDa的平均分子量的透明质酸在制备用于促进粘膜修复的口腔护理组合物中的用途。

[0073] 在另一方面,本发明还提供了促进口腔粘膜修复的方法,尤其是非治疗性的促进口腔粘膜修复的方法。所述方法涉及将本发明的口腔护理组合物施用于口腔粘膜。

[0074] 在另一方面,本发明还提供了用于减少生物膜形成的口腔护理组合物。所述组合物优选包含具有小于500kDa的平均分子量的透明质酸。

[0075] 更优选地,用于减少生物膜形成的口腔护理组合物包含具有平均分子量为约10至约400kDa,更优选为约20至约300kDa的透明质酸。特别地,用于促进口腔粘膜修复的口腔护理组合物包含具有平均分子量为约20至约50kDa (低分子量透明质酸) 或约100至约300kDa (中等分子量透明质酸) 的透明质酸。中等分子量透明质酸是特别优选的。

[0076] 因此,本发明还涉及平均分子量小于500kDa的透明质酸在制备用于减少生物膜形成的口腔护理组合物中的用途。

[0077] 在另一方面,本发明还提供了减少在口腔表面上的生物膜形成的方法,尤其是非治疗性的减少在口腔表面上的生物膜形成的方法。所述方法涉及将本发明的口腔护理组合物施用于口腔表面。

[0078] 通过以下非限制性实施例进一步示例本发明:

[0079] 实施例1:样品制备和用透明质酸处理

[0080] 实验在重组人口腔上皮细胞(RHO)进行。

[0081] 到达实验室后,立即在无菌气流室中从琼脂糖营养液中取出RHO。将插入物快速放置在6-孔板中,该板预先在室温下充满1ml的维持培养基。将孔放在37℃、5%CO₂和饱和湿度的温育箱中过夜。

[0082] 第二天,用玻璃毛细管进行损伤。

[0083] 然后将RHO样品用含有具有低分子量(20-50kDa)、中等分子量(100-300kDa)或高分子量(1'000-1'400kDa)的透明质酸的溶液处理。未经处理的RHO用作未经处理的对照。

[0084] 实施例2:根据TEER(跨上皮电阻)评价损伤后上皮再形成

[0085] 根据实施例1的方法制备用于本评价的RHO样品。

[0086] 用透明质酸处理后24h,如下测量跨上皮电阻(TEER):

[0087] 将0.5ml生理盐水溶液直接施加到放置在也包含5ml盐水溶液的6-孔板中的组织上。将Millicell-ERS伏特计的两个电极(范围为0-20kΩ)放置在组织两侧的两个隔室中,以使电通量穿过组织。测量结果直接显示在显示屏上。

[0088] 由于组织内的变异性,对每个组织进行三次测量。从样品值(3次测量的平均值)中减去空白值(无组织插入物)。然后根据组织表面积的大小(0.5cm²)校正此结果:

[0089] $\Omega_{\text{样品}} - \Omega_{\text{空白}} = \Omega * 0.5\text{cm}^2$

[0090] 结果如图1所示。

[0091] 正如从图1中可以看出的,用透明质酸处理过的样品测定的TEER值明显高于损伤后未处理过的对照样品。

[0092] TEER反映了皮肤屏障功能。

[0093] 总之,发现低和中等分子量透明质酸改善了损伤后的屏障功能,直至达到损伤前的值的点。不受理论束缚,认为屏障功能的改善归因于透明质酸引起的组织修复的增加。

[0094] 实施例3:通过扫描电子显微镜检查(X 10000)评价损伤后的上皮再形成

[0095] 根据实施例1的方法制备用于本评价的RH0样品。

[0096] 用透明质酸处理后24h,将用于扫描电子显微镜检查(SEM)的样品立即固定在2.5%戊二醛的磷酸缓冲盐水(PBS)中浸泡24h,然后在0.1M的二甲基胍酸钠缓冲液(pH 7.4)中洗涤,然后在相同缓冲液中的1%四氧化锇(OsO_4)中进行(室温下2h)。将样品在升级乙醇中在室温下和在六甲基二硅氮烷中过夜进行脱水。

[0097] 将样品放置在带有碳标签的销钉上,使用Polaron Equipment限定的SEM涂层单元E5100涂上一层金,然后转移到SEM Zeiss Sigma电子显微镜进行观察和照相。进行10000x的放大。

[0098] 结果如在下图中所示:

[0099] 图2:在时间T0h时的无损伤的对照;

[0100] 图3:在时间T24h时的有损伤的对照;

[0101] 图4:在T24h时损伤并用低分子量透明质酸(20-50kDa;0.5%)处理后;

[0102] 图5:在T24h时损伤并用中等分子量透明质酸(100-300kDa;0.2%)处理后;和

[0103] 图6:在T24h时损伤并用高分子量透明质酸(1'000-1'400kDa;0.2%)处理后。

[0104] 正如从图4可以看出的,低分子量透明质酸导致伤口恢复。许多新的胞外基质(ECM)纤维几乎完全覆盖了伤口。存在微绒毛(蓝色箭头),从组织保湿的角度表明体内稳态的恢复。总体而言,观察到组织修复的良好进展。

[0105] 正如从图5可以看出的,中等分子量透明质酸导致扁平的细胞在伤口附近迁移。这些细胞参与基质纤维桥的重建和形成。总体而言,照片显示了组织修复的活跃过程。

[0106] 与此相反,正如可以从图6可以看出的,对于高分子量透明质酸,修复过程的进行明显进展较慢。相反,观察到膜形成。

[0107] 实施例4:通过使用ZO-1和整联蛋白B1的免疫组织化学评价损伤后上皮再形成

[0108] 根据实施例1的方法制备用于本评价的RH0样品。

[0109] 在暴露结束时(至少过夜),将组织样品固定在缓冲的10%福尔马林中。将样品包括在石蜡块中,并制备5 μm 的切片。将这些载玻片用苏木精和曙红染色。

[0110] 通过结合与荧光染料化学缀合的特异性抗体,所使用的技术允许可视化细胞或组织切片中的特定蛋白质或抗原。间接免疫荧光染色是使用荧光染料标记的二抗识别一抗的方法。可以对固定在载玻片和组织切片上的细胞进行免疫荧光染色。在荧光显微镜或共聚焦显微镜下检查免疫荧光染色的样品。两种免疫定位的特异性都在载玻片中得到了证实,其中一抗和二抗被盐水溶液替代。

[0111] 使用如下抗体:

[0112] ZO-1:家兔多克隆抗体抗-ZO-1(Invitrogen,61-7300),以5 $\mu\text{g}/\text{ml}$ 稀释过夜,在PBS

中1%牛血清白蛋白(BSA)中于4℃温育;和Alexa Fluor 555驴抗-兔中的二抗(Invitrogen,A31572)。将细胞核用(4',6-二脒基-2-苯基吡啶)(Dapi)染色。

[0113] INTEGRIN(ITGB1):小鼠单克隆抗体抗整联蛋白β1(Abcam,ab3167)以2μg/ml稀释,在室温下于PBS中1%BSA中温育2h;和Alexa Fluor 488山羊抗-小鼠中的二抗(Invitrogen,A10680)。将细胞核用Dapi染色。

[0114] 在Leica DM 2500FLUO显微镜下检查切片,并通过Leica LAS软件进行分析。

[0115] 结果如图7所示。

[0116] 来自实施例1的对照用作无损伤组织对照。

[0117] “损伤的”是指未经任何处理出现正常伤口愈合的样品。发现损伤增加了ITGB1和ZO-1的表达,这相当于正常的伤口愈合过程。

[0118] 与低分子量透明质酸一起温育可诱导ZO-1和整联蛋白β1过表达,这是伤口愈合过程中的两个关键因素。这些结果启示与损伤的对照相比,组织修复过程得到加强。

[0119] 用中等分子量透明质酸获得的效果表明,这可以仅通过过表达整联蛋白β1来加强伤口愈合过程。这些效果不如具有低分子量透明质酸的效果明显。

[0120] 因此,发现低和中等分子量透明质酸诱导伤口愈合的活性机制,其牵涉整联蛋白β1和ZO-1的过表达。

[0121] 实施例5:重构的人口腔上皮细胞(RHO)样品的培养

[0122] 到达实验室后,立即在无菌气流室中从琼脂糖营养液中取出RHO。将插入物快速置于室温下预先装有1ml含抗生素的维持培养基的6-孔板中。将孔放在37℃、5%CO₂和饱和湿度的温育箱中过夜。

[0123] 该方案对一式两份的组织进行,以减轻细菌的负担,而对单一组织进行进一步的形态分析(SEM,H&E)。

[0124] 将金黄色葡萄球菌MRSA ATCC 33591解冻,并在搅拌下在37℃在营养肉汤中培养。

[0125] 将30μL中等分子量透明质酸溶液(0.2%w/v)或氯己定(CHL)0.2%(阳性对照)分别局部应用于RHO样品,并温育24h。然后,用微量移液管从上皮细胞表面除去产品残留体积。

[0126] 然后用金黄色葡萄球菌细菌悬浮液(0.D.0.1约10⁶UFC/组织)定植RHO样品,将其局部应用4h。4h后,除去剩余的金黄色葡萄球菌溶液,并将RHO组织样品在37℃、5%CO₂下温育16h。

[0127] 实施例6:根据TEER(跨上皮电阻)评价生物膜形成

[0128] 根据实施例5的方法制备用于本评估的样品。

[0129] 如下所述测量TEER:将0.5ml生理盐水溶液直接施加到放置在也包含5ml盐水溶液的6-孔板中的组织上。

[0130] 将Millicell-ERS伏特计的两个电极(范围为0-20kΩ)放置在组织两侧的两个隔室中,以使电通量穿过组织。由于组织内的变异性,对每个组织样品进行三次测量。

[0131] 从样品值(3次测量的平均值)中减去空白值(无组织插入物)。然后考虑组织表面积的大小(0.5cm²)校正此结果:

[0132] $\Omega_{\text{样品}} - \Omega_{\text{空白}} = \Omega * 0.5\text{cm}^2$

[0133] 结果如图8所示:

- [0134] 金黄色葡萄球菌的定植诱导TEER的轻微增加。不受理论的束缚,推定RH0的厚度由于定植而增加。
- [0135] 对于用CHL处理的样品,TEER降低,这意味着屏障功能已改变(可能是由于毒性)。
- [0136] 添加中等分子量透明质酸不会影响TEER;结果与对照相似。
- [0137] 总之,中等分子量透明质酸限制了细菌的生长,并且不影响屏障功能。
- [0138] 实施例7:根据细菌计数评价生物膜形成
- [0139] 根据实施例5的方法制备用于本评价的样品。
- [0140] 为了在顶端、基底外侧和匀浆隔室中进行细菌计数,使用了以下方法:
- [0141] -对于基底外侧隔室:对来自每个孔的1ml培养基采样。
- [0142] -对于顶端隔室,使用来自根据实施例6的TEER测量的样品:每个样品包含500 μ l的生理盐水溶液。将这些样品移至新的6-孔板中,该板先前已充满2ml/孔的盐水溶液,并在40kHz的超声浴中放置7分钟。超声处理后,将500 μ l盐水溶液取样用于顶端隔室,并将RH0组织用200 μ l盐UI溶液冲洗2次。然后将溶液的总量(900 μ l)合并在一起,得到收获的顶端隔室。
- [0143] -对于匀浆隔室:已使用无菌手术刀刀片从插入物中收集组织并将其放置在包含500 μ l在无菌蒸馏水中制备的0.5%Triton X-100溶液的Eppendorf管中至少10分钟。
- [0144] 在营养琼脂平板上进行三个隔室的细菌计数,将每个隔室混悬液的适当10倍稀释液(从未稀释到10⁻⁷倍)进行铺板(每种稀释液一滴10 μ l)。在37 $^{\circ}$ C下温育1天后,对菌落进行目视编号。
- [0145] 细菌计数结果如图9(顶端隔室)和10(匀浆组织)中所示。
- [0146] 金黄色葡萄球菌的定植诱导了顶端和匀浆隔室中细菌计数的增加。
- [0147] 用CHL处理显示出很强的杀菌性能。
- [0148] 用透明质酸处理可导致顶端和匀浆隔室中的细菌计数减少约50%。因此,它对细菌增殖有影响,并限制了细菌的粘附和渗透。
- [0149] 总之,透明质酸能够对细菌的渗透产生良好的保护作用。
- [0150] 实施例9:通过扫描电子显微镜检查使生物膜可视化
- [0151] 根据实施例5的方法制备用于本实验的样品。
- [0152] 处理后,将用于SEM的样品立即浸入PBS中的2.5%戊二醛中进行固定。将载玻片在0.065M磷酸盐缓冲液中洗涤3次,然后置于0.064M(pH 7.4)的磷酸盐缓冲液中的1%OsO₄中。样品通过一系列分级的乙醇进行脱水,然后在CO₂液体Bemar SPC 1500设备中进行临界点干燥。将样品固定在存根(stub)上,手工涂金,并用Cambridge Mark 250SEM观察。进行10000x的放大。
- [0153] 结果如下图所示:
- [0154] 图11:无定植的对照;
- [0155] 图12:4h后用金黄色葡萄球菌定植;和
- [0156] 图13:在4h后时,用金黄色葡萄球菌定植并用中等分子量透明质酸(100-300kDa; 0.2%w/v)处理。
- [0157] 图11显示了没有细菌定植的重组口腔上皮细胞(RH0)。
- [0158] 图12显示簇状和浮游生物形态的菌落。细菌开始产生多糖基质,从浮游生物表型

转变为生物膜表型。

[0159] 图13显示簇状和浮游生物形态的菌落较少。细菌抵消了生物膜的形成。没有可见的多糖基质。因此,浮游生物表型是保守的。

[0160] 实施例10:透明质酸在口腔粘膜上的沉积

[0161] 根据以下方案,对三名志愿者测试包含和不含透明质酸的漱口水:

[0162] 1.采样未经处理的粘膜

[0163] 2.用20ml水漱口30秒

[0164] 3.用基本漱口水(不含透明质酸)处理30秒

[0165] 4.采样粘膜

[0166] 5.用20ml水漱口30秒

[0167] 6.用含有0.5% (w/v) 的本发明透明质酸的漱口水处理30秒

[0168] 7.采样粘膜

[0169] 8.用20ml水漱口30秒

[0170] 9.用含有1% (w/v) 的本发明透明质酸的漱口水处理30秒

[0171] 10.采样粘膜

[0172] 通过在15秒期间用无菌接种环刮擦口腔粘膜并在载玻片上的50 μ l水中擦洗环来获取样品。

[0173] 使载玻片在通风烘箱中于37 $^{\circ}$ C干燥1小时。在室温下用甲醇将沉积物固定20分钟。然后除去过量的部分,并将载玻片在室温下干燥。将透明质酸在室温下用阿尔辛蓝染色30分钟,并将染料在水中冲洗几次。当刀片干燥时,通过光学显微镜x 20拍照并进行定性分析。

[0174] 对于志愿者1,观察到与基本漱口水和未经处理的情况相比,包含0.5%透明质酸的漱口水的透明质酸染色增加。使用1%的透明质酸,染色明显增加,证明透明质酸会沉积在该志愿者的口腔粘膜上。

[0175] 对于志愿者2,染色较浅,但与漱口水中透明质酸浓度相关的染色也有所增加。

[0176] 对于志愿者3,在未经处理的情况下口腔粘膜上的透明质酸水平显著高于其它两名志愿者。在用水冲洗并用基本漱口水处理后,这种染色减少,但是在用包含透明质酸的漱口水处理后,透明质酸的染色又增加。

[0177] 实施例11:牙膏的评价

[0178] 由33名未经培训的小组成员使用顺序型单一产品测试放置与完全旋转的完全区组设计,对三种牙膏制剂进行了测试。

[0179] 三种牙膏制剂均为盲法编码,并且分别包含0%透明质酸、0.5%透明质酸和1.0%透明质酸。每个小组成员仅对每种牙膏进行一次测试。刷牙时间为90s。每次刷牙后,小组成员填写一份标准的封闭式召回问卷。

[0180] 结果如图14和15中所示。

[0181] 正如可以从图14中观察到的,与不含透明质酸的牙膏相比,包含透明质酸的牙膏被认为苦味更少,更甜且咸味更少。它们还经历了较少的起泡、较少的烧灼感和较少的干燥,并提供了更清洁的感觉。

[0182] 图15显示了对不同产品的更具体的感知。特别地,发现含有透明质酸的牙膏在口

腔中具有更令人愉快的感觉,产生更清洁的感觉,感觉更像是它们在护理人的牙龈,产生更令人愉快的感觉,具有更少的苦味,给人更像是它们在护理人的口腔的感觉,并在人的口腔中留下较少的干燥的感觉。

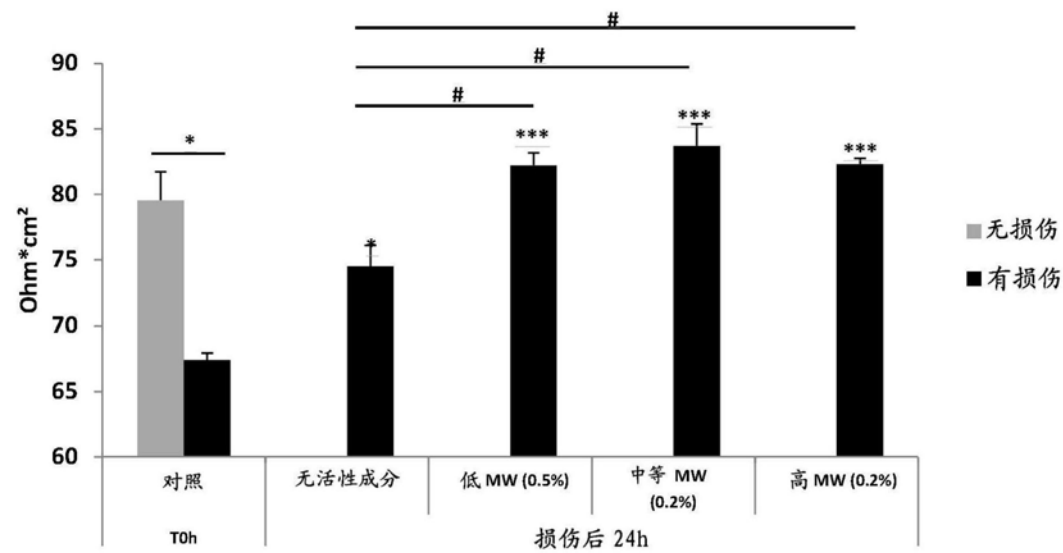


图1

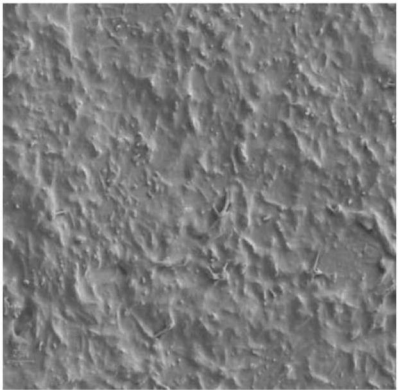


图2

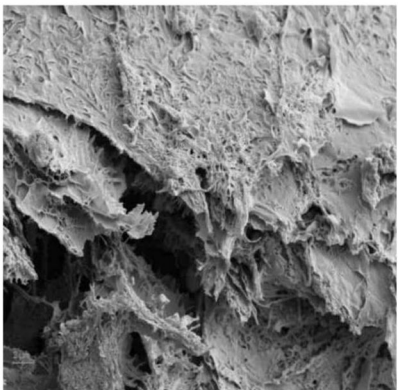


图3

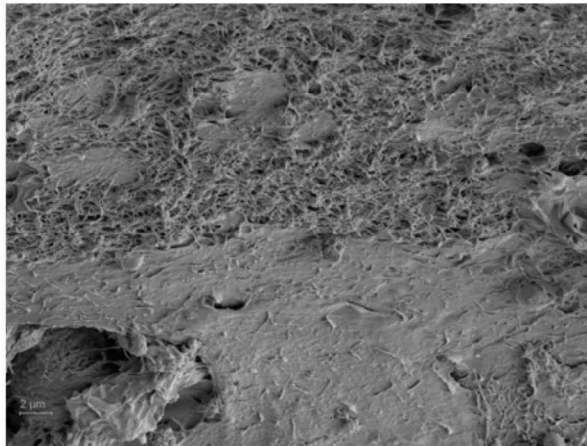


图4

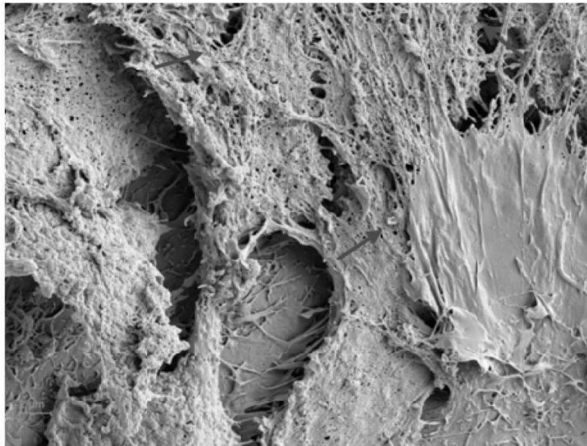


图5

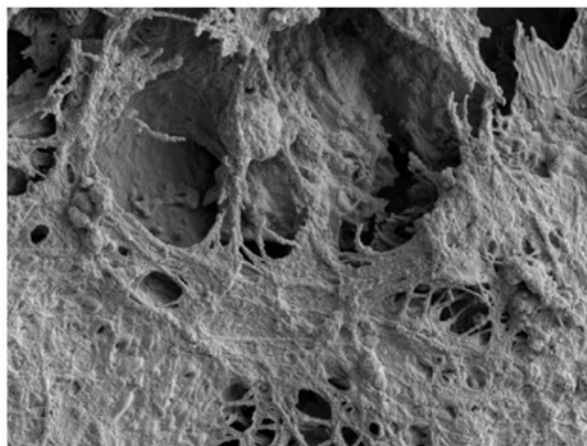


图6

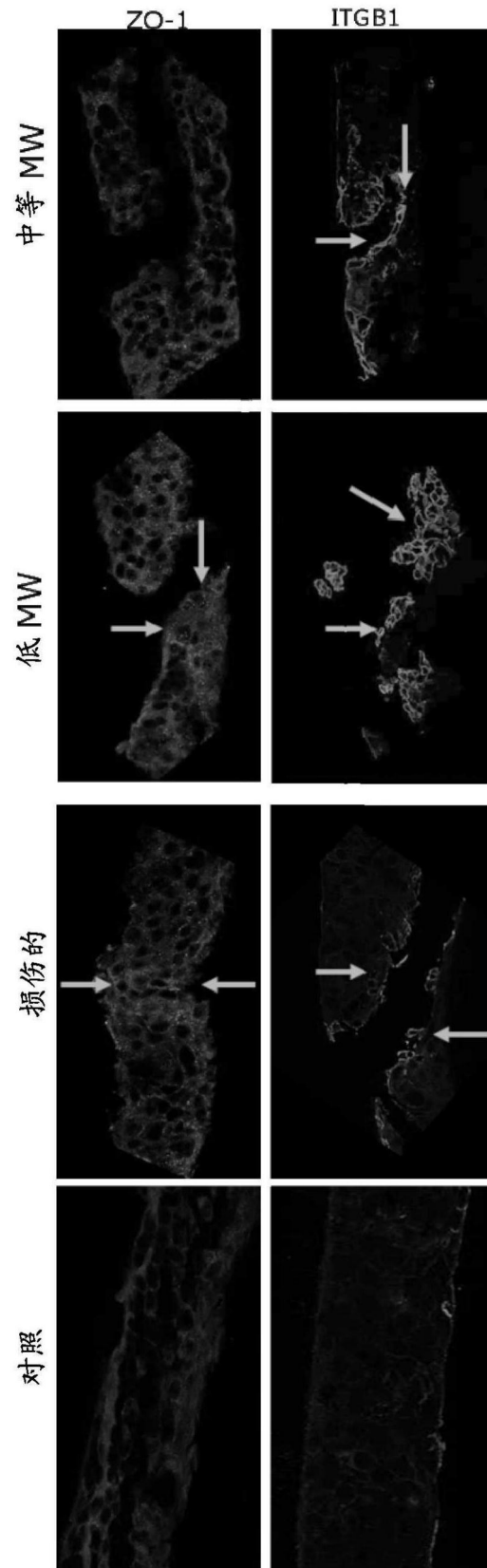


图7

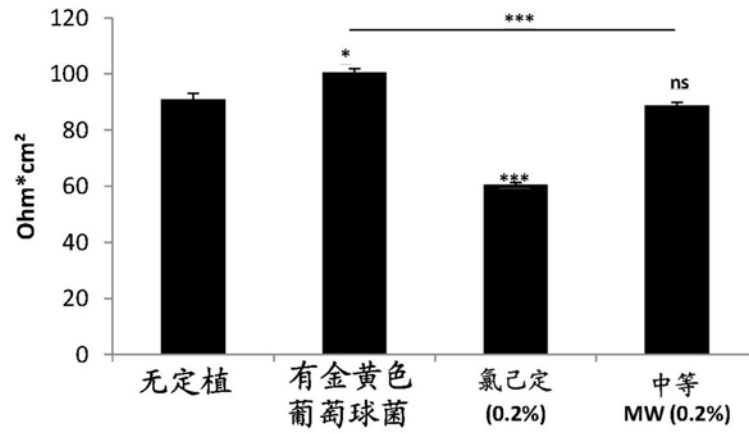


图8

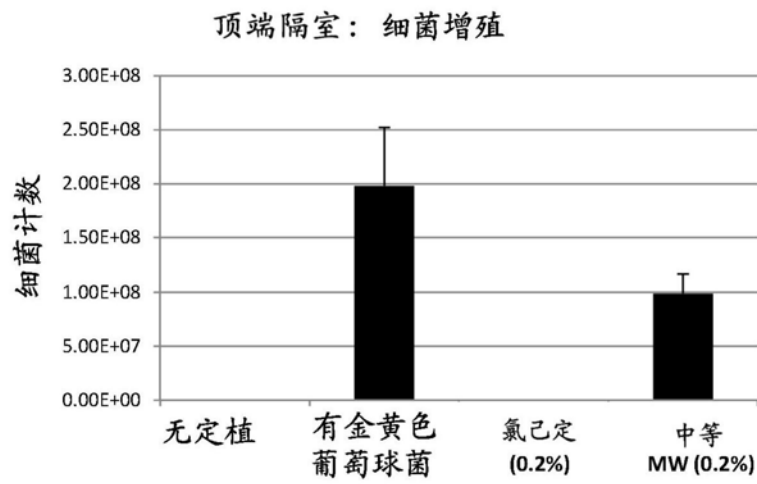


图9

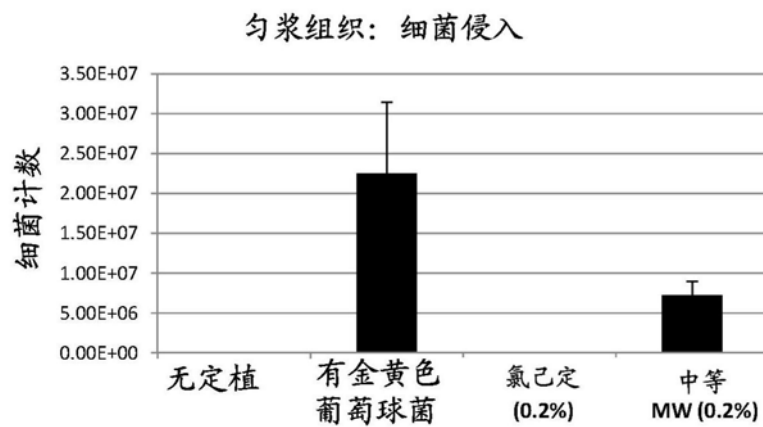


图10

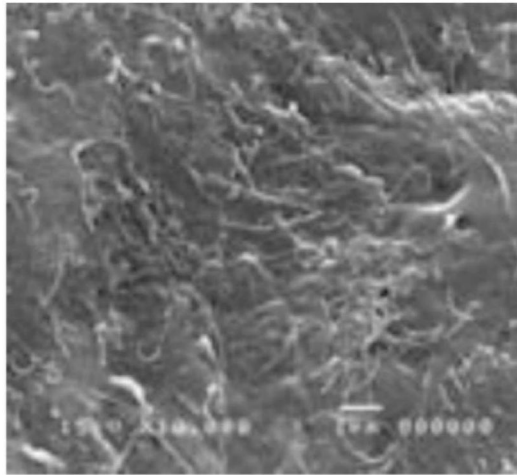


图11

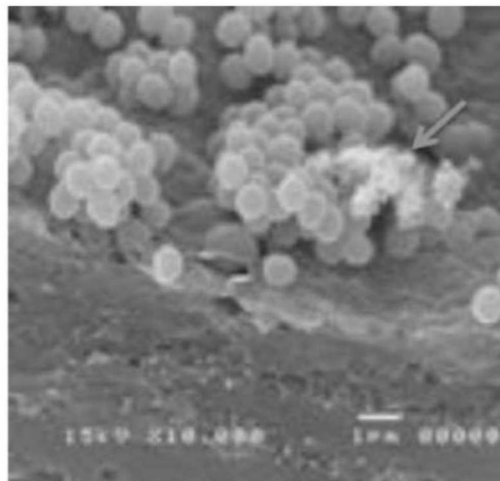


图12

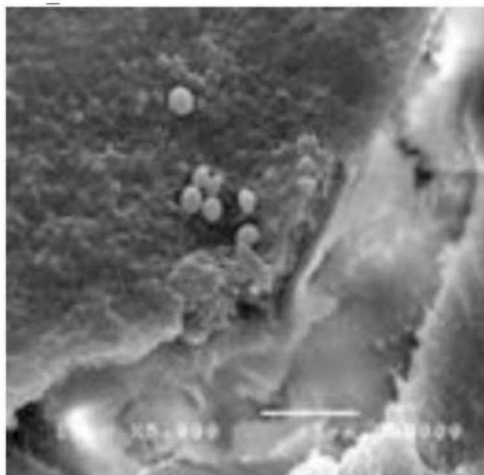


图13

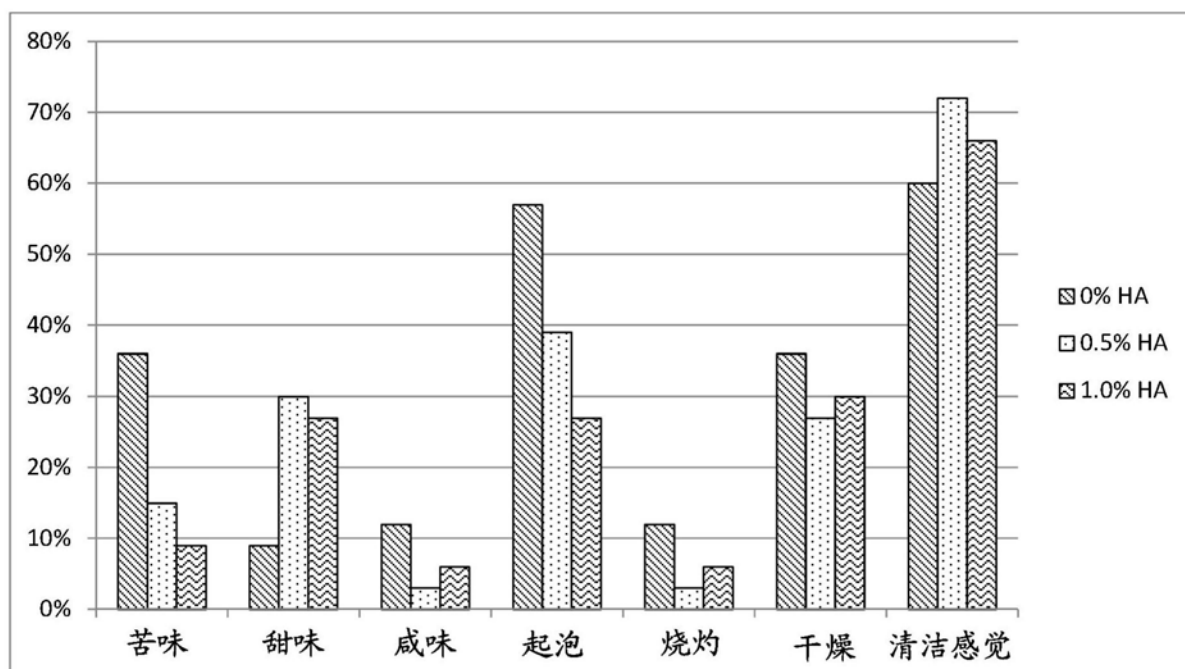


图14

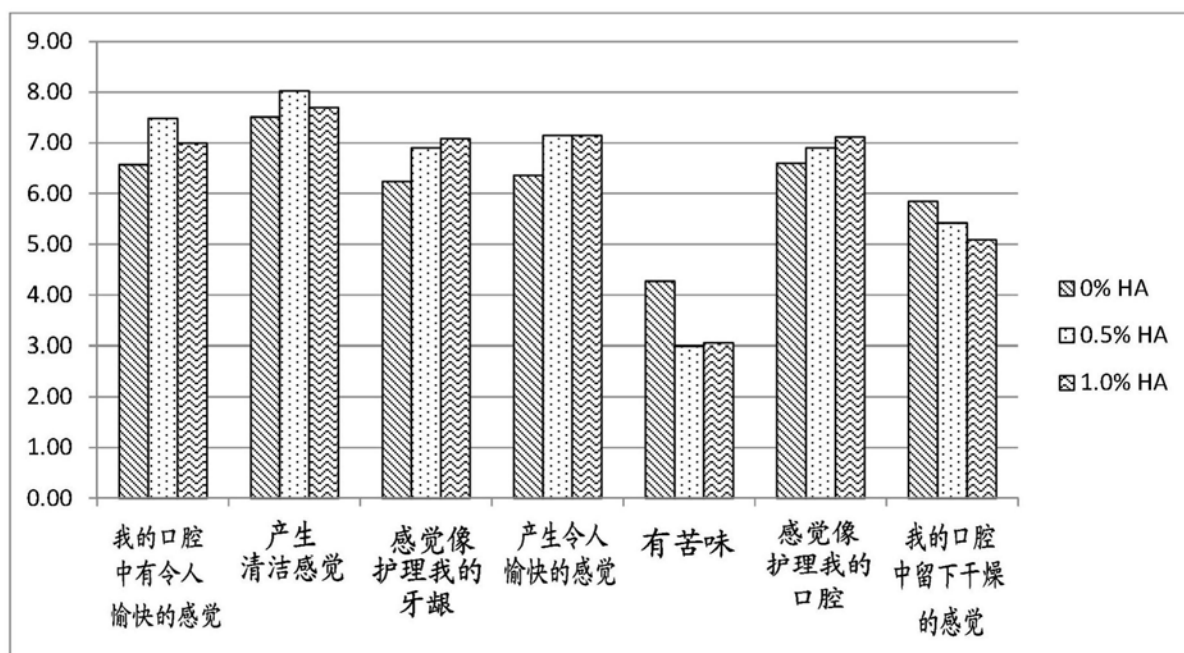


图15