



(12) 发明专利

(10) 授权公告号 CN 111000747 B

(45) 授权公告日 2021.06.15

(21) 申请号 201811650996.5

A61K 8/55 (2006.01)

(22) 申请日 2018.12.31

A61Q 11/00 (2006.01)

(65) 同一申请的已公布的文献号

申请公布号 CN 111000747 A

(56) 对比文件

Chen Li, Lu Xu, Yi Y. Zuo and Peng Yang. Tuning protein assembly pathways through superfast amyloid-like aggregation.《Biomaterials Science》.2018, 836-841.

(43) 申请公布日 2020.04.14

(73) 专利权人 美釉(西安)生物技术有限公司

地址 710075 陕西省西安市雁塔区高新一路25号创新大厦S503室

Peng Yang. Direct biomolecule binding on nonfouling surfaces via newly discovered supramolecular self-assembly of lysozyme under physiological conditions.《Macromolecular Bioscience》.2012,1053-1059.

(72) 发明人 杨鹏 王咚

(74) 专利代理机构 西安永生专利代理有限责任公司 61201

代理人 高雪霞

审查员 张珮明

(51) Int. Cl.

A61K 8/64 (2006.01)

A61K 8/24 (2006.01)

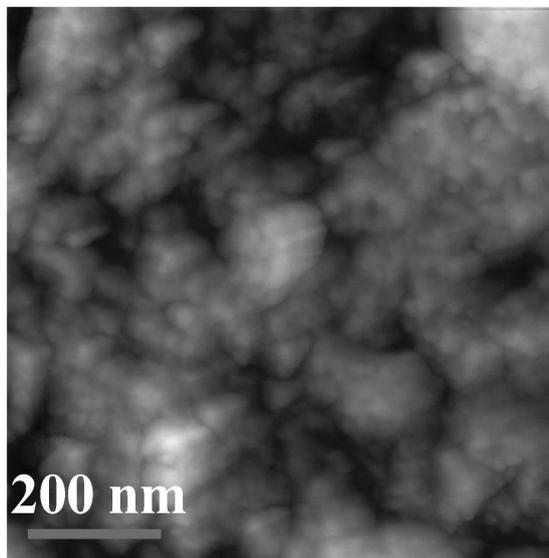
权利要求书1页 说明书4页 附图3页

(54) 发明名称

一种防牙釉质脱矿的矿化材料及其应用

(57) 摘要

本发明公开了一种防牙釉质脱矿的矿化材料及其应用,该矿化材料包括成膜蛋白质(溶菌酶、牛血清蛋白、胰岛素、 $\alpha$ -乳白蛋白等)、釉原蛋白肽、水溶性磷酸盐、三(2-羧乙基)膦酸盐、pH调节剂。本发明矿化材料与超纯水稀释的HEPES缓冲液混合可制成漱口水,辅以制作牙膏的辅料可制成牙膏,还可制作成其他用于防止牙釉质脱矿的产品。本发明利用成膜蛋白质分子与三(2-羧乙基)膦酸盐发生相转变在牙釉质表面形成包覆釉原蛋白肽的生物蛋白质二维纳米薄膜,该薄膜可以快速的粘附在牙釉质表面,通过薄膜介导在唾液里进行生物矿化,在牙釉质表面生长出新的高取向度的羟基磷灰石,再矿化的羟基磷灰石与天然牙釉质相似,修复因酸蚀脱矿的牙釉质从而预防龋齿形成。



1. 一种防牙釉质脱矿的矿化材料,其特征在于该矿化材料包含下述质量百分比的成分:

5%~50%成膜蛋白质、5%~40%釉原蛋白肽、5%~30%水溶性磷酸盐、4%~20%三(2-羧乙基)膦酸盐、1%~10%pH调节剂;

上述的成膜蛋白质为溶菌酶、牛血清蛋白、胰岛素、 $\alpha$ -乳白蛋白中任意一种或多种。

2. 根据权利要求1所述的防牙釉质脱矿的矿化材料,其特征在于:该矿化材料包含下述质量百分比的成分:

20%~40%成膜蛋白质、20%~30%釉原蛋白肽、20%~30%水溶性磷酸盐、10%~15%三(2-羧乙基)膦酸盐、6%~8%pH调节剂。

3. 根据权利要求1或2所述的防牙釉质脱矿的矿化材料,其特征在于:所述的水溶性磷酸盐是磷酸氢二钠、磷酸二氢钠中任意一种或两种。

4. 根据权利要求1或2所述的防牙釉质脱矿的矿化材料,其特征在于:所述的pH调节剂为碳酸钠、碳酸氢钠、碳酸钾、碳酸氢钾、磷酸氢二钾、磷酸氢二钠、苯甲酸钠、柠檬酸钠中任意一种或多种。

5. 一种采用权利要求1的矿化材料制备的漱口水,其特征在于:所述的漱口水包括权利要求1所述的矿化材料和超纯水稀释的HEPES缓冲液,使用时将矿化材料和超纯水稀释的HEPES缓冲液按质量-体积比为1mg:4~15mL混合均匀,即得漱口水。

6. 根据权利要求5所述的漱口水,其特征在于:所述漱口水的pH值为7~7.5。

7. 根据权利要求5所述的漱口水,其特征在于:所述漱口水中还含有糖精钠和山梨糖。

8. 一种采用权利要求1的矿化材料制备的牙膏,其特征在于:向防牙釉质脱矿的矿化材料中加入制作牙膏的辅料,矿化材料与辅料的质量比为1:2~5,按照牙膏的制作工艺制备成牙膏。

9. 根据权利要求8所述的牙膏,其特征在于:所述的辅料为摩擦剂、保湿剂、增稠剂、防腐剂、色素、香精中任意一种或多种。

## 一种防牙釉质脱矿的矿化材料及其应用

### 技术领域

[0001] 本发明属于防止牙釉质脱矿技术领域,具体涉及一种利用溶菌酶、牛血清蛋白、胰岛素、 $\alpha$ -乳白蛋白等成膜蛋白质和釉原蛋白肽制备的防牙釉质脱矿以及具有牙釉质再矿化功能的材料,以及采用该材料制备的漱口水及牙膏等产品。

### 背景技术

[0002] 牙釉质是牙齿的最外层,是牙齿结构中最坚硬的部分,也是保护牙齿的重要部分。牙釉质的主要成分是羟基磷灰石,该物质在正常口腔pH条件下,极难溶解,然而,当糖在各种口腔细菌作用下发生糖酵解时,所产生的酸作用于牙齿,最外层的牙釉质表面会脱矿,破坏牙釉质中的釉柱的规整程度,继而形成龋齿。这是因为羟基磷灰石在酸性条件下比较容易溶解。唾液含有的钙及磷酸根离子处于过饱和状态,因此唾液有助于保护牙釉质抵抗脱矿作用,还可以使酸影响脱矿的牙齿缓慢再矿化。一般的保健品利用氟化物离子,来强化再矿化过程,从而预防龋齿。

[0003] 自然界的多种生理功能中,蛋白质聚集体的自组装尤为常见。例如:牙釉蛋白能够自组装形成纳米球,这些纳米球系统组装起来形成了一种带状结构,这种自组装结构扮演了很关键的模板作用,通过控制羟基磷灰石晶体的生长以达到牙釉质的生物矿化。当今由自组装形成的蛋白质二维纳米薄膜引起了科学界的广泛关注。特别是在相转变过程中,由疏水微粒自发聚集形成超分子聚集体,从而形成二维纳米尺寸的蛋白质薄膜。溶菌酶是一种天然生物大分子,可从人、鸡、牛、鼠或者骆驼中提取,具有廉价易得的优点。此外,溶菌酶是由129个氨基酸构成的单纯碱性球蛋白,化学性质稳定,易于改性,并具有丰富的相转变行为。

### 发明内容

[0004] 本发明的目的是提供一种防牙釉质脱矿的矿化材料,及采用其制作的漱口水或牙膏。

[0005] 针对上述目的,本发明所采用的防牙釉质脱矿的矿化材料包含下述质量百分比的成分:

[0006] 5%~50%成膜蛋白质、5%~40%釉原蛋白肽、5%~30%水溶性磷酸盐、4%~20%三(2-羧乙基)膦盐酸盐、1%~10%pH调节剂。

[0007] 本发明防牙釉质脱矿的矿化材料优选包含下述质量百分比的成分:

[0008] 20%~40%成膜蛋白质、20%~30%釉原蛋白肽、20%~30%水溶性磷酸盐、10%~15%三(2-羧乙基)膦盐酸盐、6%~8%pH调节剂。

[0009] 上述的成膜蛋白质为溶菌酶、牛血清蛋白、胰岛素、 $\alpha$ -乳白蛋白中任意一种或多种。

[0010] 上述的水溶性磷酸盐是磷酸氢二钠、磷酸二氢钠中任意一种或两种。

[0011] 上述的pH调节剂为碳酸钠、碳酸氢钠、碳酸钾、碳酸氢钾、磷酸氢二钾、磷酸氢二

钠、苯甲酸钠、柠檬酸钠中任意一种或多种。

[0012] 本发明的漱口水包括上述的矿化材料和超纯水稀释的HEPES缓冲液,使用时将矿化材料和超纯水稀释的HEPES缓冲液按质量-体积比为1mg:4~15mL混合均匀,即得漱口水。

[0013] 上述漱口水的pH值为7~7.5。

[0014] 上述漱口水中还含有糖精钠和山梨糖等其他漱口水常用的添加剂。

[0015] 本发明的牙膏是向上述防牙釉质脱矿的矿化材料中加入制作牙膏的辅料,其中矿化材料与辅料的质量比为1:2~5,然后按照牙膏的制作工艺制备成牙膏。

[0016] 上述牙膏中,所述的辅料为摩擦剂、保湿剂、增稠剂、防腐剂、色素、香精中任意一种或多种。

[0017] 本发明的有益效果如下:

[0018] 本发明利用成膜蛋白质(溶菌酶、牛血清蛋白、胰岛素、 $\alpha$ -乳白蛋白等)的相转变在气液、固液界面形成二维纳米尺寸的蛋白质薄膜,该薄膜表面带有大量的功能性基团,并且薄膜表面的电位为正,可以将唾液中过饱和的钙和磷酸根离子通过静电作用力吸附在薄膜表面,通过吸附在纳米薄膜上的釉原蛋白肽和磷酸根对酸蚀的牙釉质表面进行再矿化,生成再矿化涂层,从而预防龋齿的形成,釉原蛋白肽来调控表面结晶的羟基磷灰石的取向,矿化出与天然牙釉质相似的再矿化涂层。

[0019] 本发明的漱口水利用成膜蛋白质分子与三(2-羧乙基)膦盐酸盐发生相转变反应生成的纳米颗粒在酸蚀的牙釉质界面通过表界面诱导自组装形成厚度约为30~50nm左右的蛋白质薄膜,该薄膜表面粗糙度小,透明度高,具有较好的粘附性,且具有和氟化物离子相同的加强牙釉质表面再矿化新的羟基磷灰石的功能,并且所用主要成分是蛋白质和盐,有效防止牙釉质的酸蚀脱矿,预防龋齿的形成。本发明注重牙釉质表面的再矿化效果,由于龋齿最初表现为牙釉质表面的脱矿质,因此,对表面进行再矿化能够在牙齿出现永久性结构损害之前阻止并修复龋蚀,在一段时期使用该漱口水,因酸蚀而脱矿质的牙釉质的表面可以再矿化,或使正常牙齿发生矿化从而预防龋齿形成并抑制牙本质过敏,漱口水与牙齿的接触时间要在30s~50s左右,溶液的pH值在进入口腔后保持不变,在漱口的时间里,可以在牙釉质表面形成吸附了釉原蛋白肽和磷酸盐的蛋白质相转变二维纳米薄膜,之后牙齿表面可以在唾液中发生再矿化。

[0020] 本发明的牙膏用水浸湿后,与牙釉质表面接触,生成防脱矿、诱导再矿化的蛋白质层。在刷牙过程中,与牙齿接触的牙膏,成分中的蛋白质和三(2-羧乙基)膦盐酸盐会发生反应,使蛋白质在牙釉质表面发生相转变,在牙齿表面生成包裹釉原蛋白肽的生物蛋白质二维纳米薄膜。

[0021] 采用本发明矿化材料制成的漱口水和牙膏以蛋白质为主成分,水溶性磷酸盐、三(2-羧乙基)膦盐酸盐含量较低,用于保健品,对人体没有任何危害。本发明矿化材料还可以制作成其他用于防止牙釉质脱矿的其他类型产品。

## 附图说明

[0022] 图1是用实施例8制备的防牙釉质脱矿的漱口水漱口后,在牙釉质表面形成的生物蛋白质二维纳米薄膜的原子力图。

[0023] 图2是使用实施例8制备的防牙釉质脱矿的漱口水一段时间后,在人工唾液矿化一

段后,在牙釉质表面形成的再矿化涂层的扫描电镜图。

[0024] 图3是使用实施例8制备的防牙釉质脱矿的漱口水一段时间后,在人工唾液矿化一段后,在牙釉质表面形成的再矿化的涂层的能谱分析。

[0025] 图4是使用实施例8制备的防牙釉质脱矿的漱口水一段时间后,在人工唾液矿化一段后,在牙釉质表面形成的再矿化涂层的横断面的扫描电镜图。

[0026] 图5是使用实施例8制备的防牙釉质脱矿的漱口水的细胞毒性试验结果。

[0027] 图6是使用实施例8制备的防牙釉质脱矿的漱口水的动物口腔实验结果。

## 具体实施方式

[0028] 下面结合附图和实施例对本发明进一步详细说明,但本发明的保护范围不仅限于这些实施例。

[0029] 实施例1

[0030] 将20mg溶菌酶、10mg釉原蛋白肽、10mg磷酸氢二钠、5.2mg三(2-羧乙基)膦酸盐、3.5mg碳酸氢钠混合均匀,得到防牙釉质脱矿的矿化材料。

[0031] 实施例2

[0032] 将100mg溶菌酶、50mg釉原蛋白肽、40mg磷酸氢二钠、10.5mg三(2-羧乙基)膦酸盐、4.5mg碳酸氢钠混合均匀,得到防牙釉质脱矿的矿化材料。

[0033] 实施例3

[0034] 将200mg溶菌酶、100mg釉原蛋白肽、80mg磷酸氢二钠、18.3mg三(2-羧乙基)膦酸盐、5.1mg碳酸氢钠混合均匀,得到防牙釉质脱矿的矿化材料。

[0035] 实施例4

[0036] 将20mg溶菌酶、30mg釉原蛋白肽、30mg磷酸氢二钠、15mg三(2-羧乙基)膦酸盐、5mg碳酸氢钠混合均匀,得到防牙釉质脱矿的矿化材料。

[0037] 实施例5

[0038] 将30mg溶菌酶、20mg釉原蛋白肽、20mg磷酸氢二钠、20mg三(2-羧乙基)膦酸盐、10mg碳酸氢钠混合均匀,得到防牙釉质脱矿的矿化材料。

[0039] 实施例6

[0040] 将5mg溶菌酶、40mg釉原蛋白肽、30mg磷酸氢二钠、20mg三(2-羧乙基)膦酸盐、5mg碳酸氢钠混合均匀,得到防牙釉质脱矿的矿化材料。

[0041] 实施例7

[0042] 将50mg溶菌酶、5mg釉原蛋白肽、15mg磷酸氢二钠、20mg三(2-羧乙基)膦酸盐、10mg碳酸氢钠混合均匀,得到防牙釉质脱矿的矿化材料。

[0043] 实施例8

[0044] 本实施的漱口水由实施例1得到的矿化材料和用超纯水稀释3倍的HEPES缓冲液组成,使用时将2mg矿化材料加入10mL用超纯水稀释3倍的HEPES缓冲液中,并加入8mg糖精钠和2mg山梨糖,混合均匀,得到防牙釉质脱矿的漱口水。

[0045] 实施例9

[0046] 本实施的漱口水由实施例2得到的矿化材料和用超纯水稀释3倍的HEPES缓冲液组成,使用时将2mg矿化材料加入20mL用超纯水稀释3倍的HEPES缓冲液中,并加入12mg糖精钠

和4mg山梨糖,混合均匀,得到防牙釉质脱矿的漱口水。

[0047] 实施例10

[0048] 本实施的漱口水由实施例3得到的矿化材料和用超纯水稀释3倍的HEPES缓冲液组成,使用时将2mg矿化材料加入30mL用超纯水稀释3倍的HEPES缓冲液中,并加入14.8mg糖精钠和6.3mg山梨糖,混合均匀,得到防牙釉质脱矿的漱口水。

[0049] 本发明中也可用牛血清白蛋白、胰岛素、 $\alpha$ -乳白蛋白替换上述实施例1~9中的溶菌酶,该方案均在本发明的保护范围内。

[0050] 为了证明本发明的有益效果,发明人对实施例4得到的漱口水进行了性能测试,具体试验如下:

[0051] 将打磨抛光的牙釉质切片酸蚀,之后放入到漱口水中,浸泡1min,模仿漱口的过程。由图1可见,1min后在牙釉质表面生成生物蛋白质二维纳米薄膜,其厚度约为30~50nm。然后将表面覆膜的牙釉质放入人工唾液中,在37℃下进行生物矿化,每天更换一次人工唾液。在矿化的过程中,每天把牙釉质从人工唾液中取出,用超纯水洗,并浸泡在上述漱口水中1min,之后再转移到人工唾液中,每天重复两次该过程。两周之后,用扫描电镜观察牙釉质再矿化涂层的平面形貌,并用能谱仪对再矿化涂层进行面扫描,分析再矿化涂层的元素,结果见图2和3。将牙釉质用努谱仪压断,用扫描电镜观察牙釉质再矿化涂层的断面形貌,结果见图4。

[0052] 由图2~4可见,生物蛋白质二维纳米薄膜通过原位生长的方法长在牙釉质上,覆膜的牙釉质可以在人工唾液中生物矿化,生成良好取向的羟基磷灰石,钙磷比也与天然牙釉质的钙磷比一致,在酸蚀的牙釉质表面再矿化出新的羟基磷灰石,防止牙釉质脱矿,预防龋齿。

[0053] 由于在此漱口水的成分中,是蛋白质为主的成分,所以只控制漱口水中三(2-羧乙基)膦酸盐(TECP)的浓度,以MTT法测量细胞毒性,在490nm的波长下用酶标仪测定吸光度,吸光度的大小与细胞成活率的大小相近,用细胞成活率来判断细胞毒性,细胞成活率越高,细胞毒性越低,细胞成活率 $=100\% \times ([A]_{\text{test}}/[A]_{\text{control}})$ , $[A]_{\text{test}}$ 表示测试的溶菌酶(多肽)膜(即在不同三(2-羧乙基)膦酸盐浓度下所成的膜)的吸光度, $[A]_{\text{control}}$ 表示没有溶菌酶(多肽)膜(即没有三(2-羧乙基)膦酸盐,也就无法成膜)的吸光度,每一个浓度下的样品,测三次,结果见图5。由图可见,在0.5mmol/L到100mmol/L这个范围内的TCEP下,细胞相对活性变化不大,在小浓度或者大浓度下,细胞活性都能保持在80%以上,证明细胞毒性较小。

[0054] 将上述表面覆膜的牙釉质固定在小鼠口腔的牙齿上,让覆膜的牙釉质在小鼠的口腔中进行生物矿化。30天之后,观察牙釉质的表面形貌,结果见图6。由图可见,在老鼠牙齿上固定的覆膜的牙釉质,在老鼠的口腔中,矿化出取向度较高的再生羟基磷灰石,证明在体内,蛋白质膜也可以发挥矿化的作用,可以应用于人体的口腔环境。

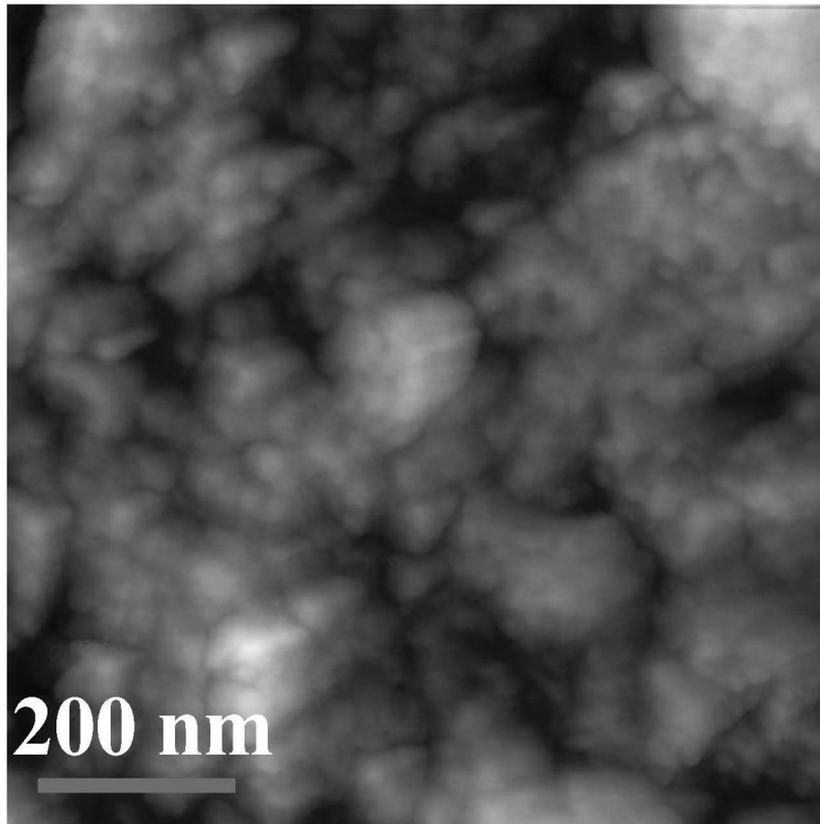


图1

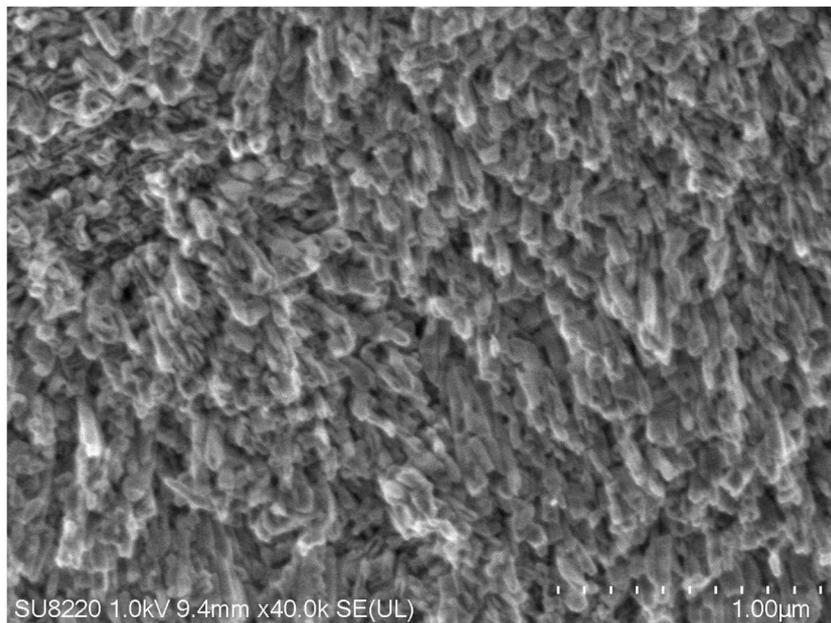


图2

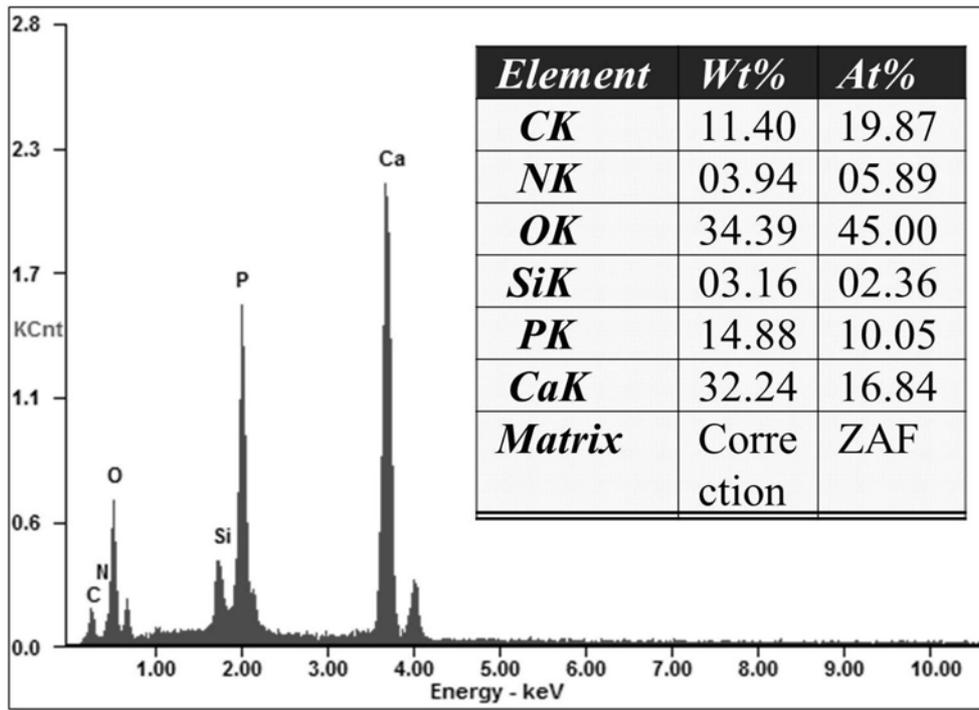


图3

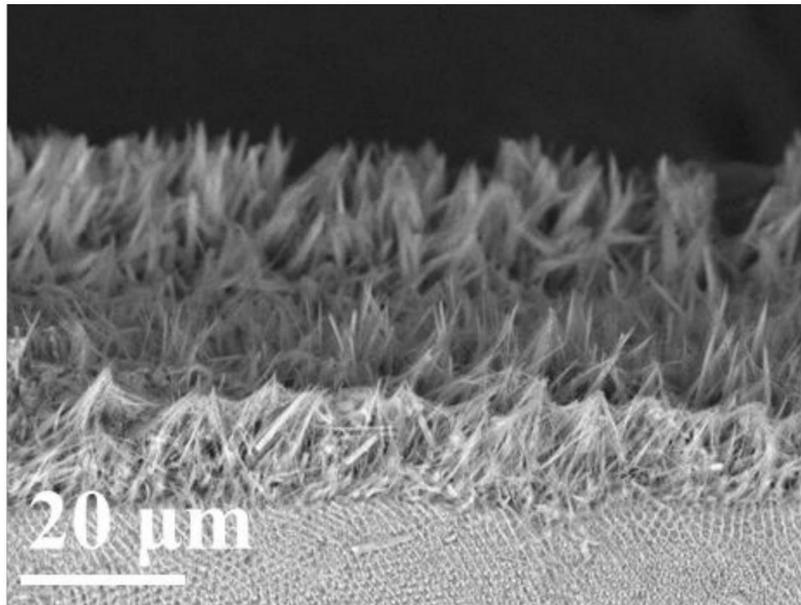


图4

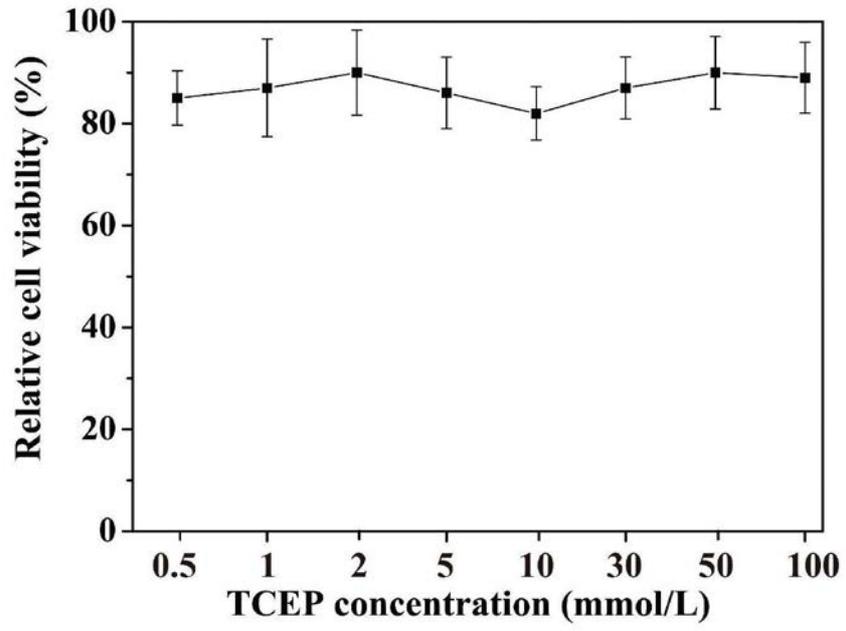


图5

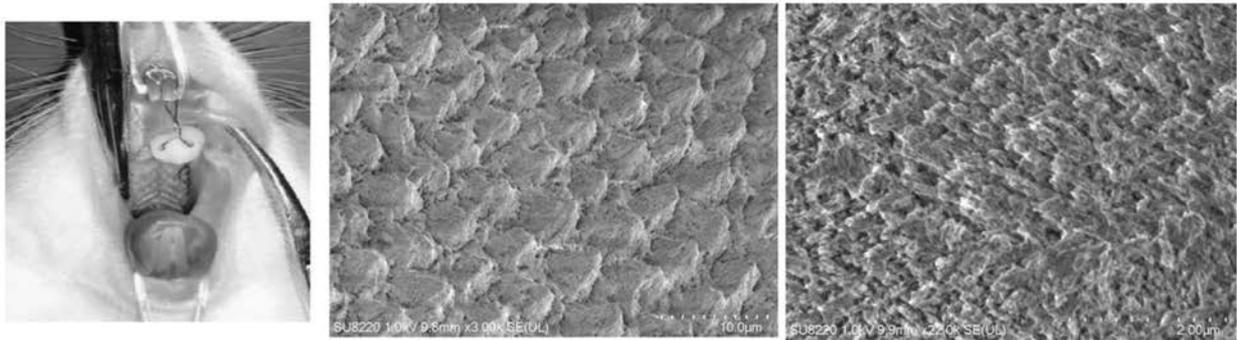


图6