



(19) 대한민국특허청(KR)
(12) 공개특허공보(A)

(11) 공개번호 10-2025-0061600

(43) 공개일자 2025년05월08일

(51) 국제특허분류(Int. Cl.)

A61K 33/00 (2006.01) A61P 1/02 (2006.01)

A61P 29/00 (2023.01)

(52) CPC특허분류

A61K 33/00 (2013.01)

A61P 1/02 (2018.01)

(21) 출원번호 10-2024-0058097

(22) 출원일자 2024년04월30일

심사청구일자 2024년04월30일

(30) 우선권주장

1020230145036 2023년10월26일 대한민국(KR)

(71) 출원인

조선대학교산학협력단

광주광역시 동구 조선대길 126(서석동, 산학협력단)

(72) 발명자

박정선

광주광역시 북구 평교로 40, 301동 703호 (문흥동, 대주아파트)

김병훈

광주광역시 북구 삼정로 108 현대아파트 107동 1601호

(74) 대리인

특허법인아이엠

전체 청구항 수 : 총 9 항

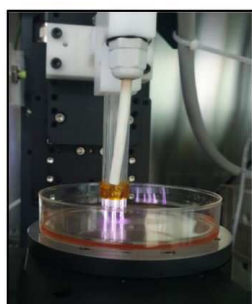
(54) 발명의 명칭 헬륨 플라즈마 처리액을 이용한 구강연조직 염증 완화 예방 및 치료용 조성물

(57) 요약

본 발명은 구강연조직 염증 예방 및 치료 기술과 관련된 것으로, 보다 구체적으로는 구강 연조직의 염증 예방과 치료에 효과적인 헬륨 플라즈마 처리액의 새로운 용도 및 이를 이용한 구강연조직 염증 완화 예방 및 치료용 조성물에 대한 것이다.

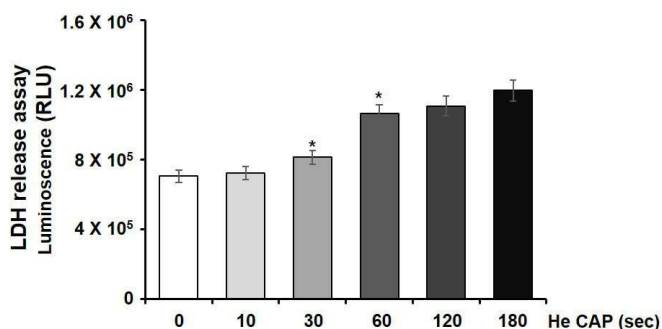
대표도 - 도1

A



8 Plasma lines

B



(52) CPC특허분류

A61P 29/00 (2023.02)

이 발명을 지원한 국가연구개발사업

과제고유번호	1711197926
과제번호	00222390
부처명	과학기술정보통신부
과제관리(전문)기관명	한국연구재단
연구사업명	집단연구지원
연구과제명	구강연조직 질환극복 융복합 연구센터
과제수행기관명	조선대학교
연구기간	2024.03.01 ~ 2025.02.28

이 발명을 지원한 국가연구개발사업

과제고유번호	100331015
과제번호	2020R1A2C100331015
부처명	과학기술정보통신부
과제관리(전문)기관명	한국연구재단
연구사업명	중견연구자지원사업
연구과제명	Ferroptosis 조절을 통한 분자 수준의 신장 질환 제어 시스템 개발
과제수행기관명	조선대학교
연구기간	2024.03.01 ~ 2025.02.28

명세서

청구범위

청구항 1

헬륨 플라즈마 처리액을 유효 성분으로 포함하는 구강 연조직 염증 완화 예방 및 치료용 조성물.

청구항 2

제 1 항에 있어서,

상기 헬륨 플라즈마 처리액은 저온 대기압 플라즈마 장치(Cold atmospheric plasma)에서 주파수 및 전압을 30 kHz 이상 및 5kV 이상으로 설정하여 전력이 생성되도록 한 후 He(헬륨) 가스 3~5L/min, O₂(산소) 40~60 SCCM으로 물 또는 수용액에 통과시켜 얻어지는 것을 특징으로 하는 구강 연조직 염증 완화 예방 및 치료용 조성물.

청구항 3

제 2 항에 있어서,

상기 물 또는 수용액이 5ml일 때 상기 저온 대기압 플라즈마 장치에 의한 플라즈마 처리는 10 ~ 60초 동안 수행되는 것을 특징으로 하는 구강 연조직 염증 완화 예방 및 치료용 조성물.

청구항 4

제 3 항에 있어서,

상기 물 또는 수용액이 5ml일 때 상기 저온 대기압 플라즈마 장치의 주파수 및 전압은 40 kHz 및 6kV이고, 상기 He(헬륨) 가스는 4L/min, O₂(산소)는 50 SCCM이며, 상기 플라즈마 처리는 15초 동안 수행되는 것을 특징으로 하는 구강 연조직 염증 완화 예방 및 치료용 조성물.

청구항 5

헬륨 플라즈마 처리액을 포함하는 구강청정용 조성물.

청구항 6

제 5 항에 있어서,

상기 헬륨 플라즈마 처리액은 저온 대기압 플라즈마 장치(Cold atmospheric plasma)에서 주파수 및 전압을 30 kHz 이상 및 5kV 이상으로 설정하여 전력이 생성되도록 한 후 He(헬륨) 가스를 3~5L/min, O₂(산소)를 40~60 SCCM으로 물 또는 수용액에 통과시켜 얻어지는 것을 특징으로 하는 구강청정용 조성물.

청구항 7

제 6 항에 있어서,

상기 물 또는 수용액이 5ml일 때 상기 저온 대기압 플라즈마 장치에 의한 플라즈마 처리는 10 ~ 60초 동안 수행

되는 것을 특징으로 하는 구강청정용 조성물.

청구항 8

제 7 항에 있어서,

상기 물 또는 수용액이 5ml일 때 상기 저온 대기압 플라즈마 장치의 주파수 및 전압은 40 kHz 및 6kV이고, 상기 He(헬륨) 가스는 4L/min, O₂(산소)는 50 SCCM이며, 상기 플라즈마 처리는 15초 동안 수행되는 것을 특징으로 하는 구강청정용 조성물.

청구항 9

제 5 항 내지 제 8 항 중 어느 한 항에 있어서,

상기 헬륨 플라즈마 처리액은 전체 조성물 부피 대비 50%이하로 포함되는 것을 특징으로 하는 구강청정용 조성물.

발명의 설명

기술 분야

[0001] 본 발명은 구강연조직 염증 예방 및 치료 기술과 관련된 것으로, 보다 구체적으로는 구강 연조직의 염증 예방과 치료에 효과적인 헬륨 플라즈마 처리액의 새로운 용도 및 이를 이용한 구강연조직 염증 완화 예방 및 치료용 조성물에 대한 것이다.

배경 기술

[0002] 구강 연조직 세포의 염증 발현은 구강 궤양의 종류와 원인에 따라 다양하다. 구강 궤양은 감염, 전신성 질환, 물리적 또는 화학적 자극, 알레르기 반응 등으로 인해 발생할 수 있다. 그러나 많은 경우에 원인 파악이 어렵다. 또한 침의 정상적인 분비가 구강 내막 보호를 돕는 기능을 하는데 침 분비량이 감소하는 상태가 되면 구강 궤양이 발생할 확률이 높아진다. 알려진 구강 궤양의 가장 흔한 원인으로는 재발 아프타 구내염(구강 궤양), 바이러스성 감염(단순 헤르페스 및 대상 포진), 기타 감염(곰팡이나 박테리아 감염), 손상, 자극적인 음식, 화학물질, 흡연, 약물(화학요법 약물), 방사선 치료 등이 있다.

[0003] 또한 구강 염증을 유발시키는 원인 중의 하나는 철분의 불균형으로 점액막의 변화를 일으키며 치조병 발병 위험을 높이고 체내의 산소 공급에 영향을 미칠 수 있다. 구강 내 조직은 산소 공급에 민감하며, 적절한 산소 공급이 부족하면 구강 내 조직이 손상될 수 있고, 이로 인해 치조병이나 구강 염증이 발생할 위험이 증가할 수 있다. 철분은 면역 세포 및 세균의 성장과 제어에 중요한 영향을 미칠 수 있는데 철분 부족이나 과잉으로 인한 불균형은 면역 세포의 활성화를 억제하고 세균의 증식을 촉진하여 면역력을 저하시킬 수 있으며, 면역력이 약화되면 구강 내 감염에 대한 저항력이 낮아질 수 있다. 이로 인해 구강 내 세균의 증식이나 염증이 발생할 가능성이 높아질 수 있다. 따라서 철분 불균형은 구강 건강에 부정적인 영향을 미칠 수 있으며, 이러한 영향은 구강 내 염증 및 질환의 발생 가능성을 높일 수 있다. 철로 인한 지질 과산화 메커니즘은 시스테인/글루타메이트의 xc- 교환기를 통한 경로로 환원 글루타티온(GSH) 생산을 포함하여 일련의 대사 변형에 관여한다. 글루타티온(GSH) 생산이 불균형을 일으키면 세포의 산화 환원 반응이 깨지고 지질 과산화로 인해 세포막에 damage가 발생하여 ferroptosis 메커니즘에 의한 세포 사멸이 일어난다. 세포 사멸에 의해 구강 연조직에 염증이 발생한다.

[0004] 구강 연조직 염증으로 인하여 발생하는 질병은 의학적 용어로는 치주염(Gingivitis), 치주병(Periodontal Disease), 구강점막염(Oral Mucositis), 구강경혼질환(Oral Lichen Planus), 구강 백내장(Oral Thrush) 등으로 명명되고 이러한 염증은 구강 내 다양한 부위에서 발생할 수 있으며 면역 반응과 관련이 있다.

[0005] 구강 연조직 염증은 내막이 붓거나 붉어질 수 있으며 통증성 궤양으로 치료가 진행될 때까지 통증을 수반하여 음식 섭취가 어렵고 이로 인해 탈수 및 영양결핍이 유발되는 경우도 있다. 일부 궤양은 사라졌다가 다시 재발하는 경우가 많다. 현재 사용되는 구내염 치료제는 항생제나 항바이러스제를 먹거나, 점막에 직접 발라서 치료하는 소염진통제나 국소 스테로이드제 및 강산성 약물로 구강 점막에 치료했을 때 강한 자극을 나타낸다. 그 외 레이저를 이용한 치료 방법 등도 있다. 이러한 물질들은 액상, 연고, 가글, 패치등의 종류에 따라 임신 및 수유부, 소아, 고령, 구강 바이러스성 환자, 진균증 환자, 비스테로이드 소염진통제 알레르기 반응 환자 등의 치료에 적

합하지 않은 금기 사항들이 있다.

[0006] 염증성 구강 조직은 NOS(질소산화물 합성효소, Nitric Oxide Synthase) 발현이 높다고 알려져 있다. 이 효소는 질소산화물(NO)을 생성하는데 관여하며, 세포 내에서 L-아르기닌(L-Arginine)과 산소를 이용하여 NO를 생성한다. NOS는 세 가지 주요 유형이 있고, 각각 다른 조직 및 생리적 프로세스에서 활성화된다. 뉴런(신경 세포)에서 발현되는 nNOS는 신경 전달물질로 작용하고, 혈관 내피 세포에서 발현되는 eNOS는 혈관을 확장 시키고 혈액 순환을 조절하며, 염증과 면역 반응에서 활성화되는 iNOS는 염증성 화학 물질의 생성 및 면역 반응에 관여한다. iNOS는 NO의 과잉 생산에 관여하며 혈관 투과성 및 부종 등의 염증 반응을 촉진 시키고, 염증 매개체의 생합성을 촉진하여 염증을 심화시키는 것으로 알려져 있다.

[0007] iNOS (질소산화물 합성효소, Inducible Nitric Oxide Synthase)의 과도한 발현은 주로 염증 상황에서 활성화되는데 과도한 iNOS 활성화는 높은 수준의 질소산화물 (NO)을 생성하게 되며, 이는 염증 반응을 강화시킬 수 있다. 적절한 경계에서 조절되지 못하는 iNOS의 과도한 활성화는 지속적인 염증을 유발할 수 있다. 그로 인하여 라디칼과 반응하여 산화 스트레스를 유발하므로 세포 손상을 초래하고, 이로 인해 자체 면역 공격이나 면역 기능의 저하와 관련된 질환의 위험이 증가하며 조직 손상 및 기능 장애가 발생할 수 있다. 또한 자율 면역 질환과 관련된 연구에서 iNOS가 과도하게 발현되므로 면역 매개 질환의 발생과 진행에 영향을 미칠 수 있다. 이러한 이유로 iNOS 활성화는 조절이 중요하고, 과도한 활성화가 방지되어야 한다.

[0008] 지금까지 구강 연조직 세포와 관련하여 구강 연조직 염증으로 인한 통증 감소와 재발 억제를 위한 적당한 치료법이 없으므로, 약물로 인한 부작용을 줄이며, 최대한 통증을 약화 시키고 염증 재발이 없애는 효과적인 기술이 개발될 필요가 있다.

[0009]

선행기술문헌

특허문헌

[0010] (특허문헌 0001) 국내특허등록번호 제10-1319453호

발명의 내용

해결하려는 과제

[0011] 따라서, 본 발명의 목적은 저온 대기압 플라즈마 장치(atmospheric pressure plasma)를 이용하여 헬륨(He) 가스를 사용한 저온 대기압 플라즈마 처리된 액체가 구강 연조직의 염증 예방과 치료에 효과적이라는 헬륨 플라즈마 처리액의 새로운 용도를 확인하고, 이를 이용하여 헬륨 플라즈마 처리액을 포함하는 구강연조직 염증 완화 예방 및 치료용 조성물을 제공하는 것이다.

[0012] 본 발명의 다른 목적은 헬륨 플라즈마 처리액을 포함하는 구강청정용 조성물을 제공하는 것이다.

[0013] 본 발명의 목적들은 이상에서 언급한 목적들로 제한되지 않으며, 언급되지 않은 또 다른 목적들은 아래의 기재로부터 당업자에게 명확하게 이해될 수 있을 것이다.

과제의 해결 수단

[0014] 상술된 본 발명의 목적을 달성하기 위해, 본 발명은 헬륨 플라즈마 처리액을 유효 성분으로 포함하는 구강 연조직 염증 완화 예방 및 치료용 조성물을 제공한다.

[0015] 바람직한 실시예에 있어서, 상기 헬륨 플라즈마 처리액은 저온 대기압 플라즈마 장치(Cold atmospheric plasma)에서 주파수 및 전압을 30 kHz 이상 및 5kV 이상으로 설정하여 전력이 생성되도록 한 후 He(헬륨) 가스 3~5L/min, O₂(산소) 40~60 SCCM으로 물 또는 수용액에 통과시켜 얻어진다.

[0016] 바람직한 실시예에 있어서, 상기 물 또는 수용액이 5ml일 때 상기 저온 대기압 플라즈마 장치에 의한 플라즈마 처리는 10 ~ 60초 동안 수행된다.

[0017] 바람직한 실시예에 있어서, 상기 물 또는 수용액이 5ml일 때 상기 저온 대기압 플라즈마 장치의 주파수 및 전압

은 40 kHz 및 6kV이고, 상기 He(헬륨) 가스는 4L/min, O₂(산소)는 50 SCCM이며, 상기 플라즈마 처리는 15초 동안 수행되는 것이다.

[0018] 또한, 본 발명은 헬륨 플라즈마 처리액을 포함하는 구강청정용 조성물을 제공한다.

[0019] 바람직한 실시예에 있어서, 상기 헬륨 플라즈마 처리액은 저온 대기압 플라즈마 장치(Cold atmospheric plasma)에서 주파수 및 전압을 30 kHz 이상 및 5kV 이상으로 설정하여 전력이 생성되도록 한 후 He(헬륨) 가스를 3~5L/min, O₂(산소)를 40~60 SCCM으로 물 또는 수용액에 통과시켜 얻어진다.

[0020] 바람직한 실시예에 있어서, 상기 물 또는 수용액이 5ml일 때 상기 저온 대기압 플라즈마 장치에 의한 플라즈마 처리는 10 ~ 60초 동안 수행된다.

[0021] 바람직한 실시예에 있어서, 상기 물 또는 수용액이 5ml일 때 상기 저온 대기압 플라즈마 장치의 주파수 및 전압은 40 kHz 및 6kV이고, 상기 He(헬륨) 가스는 4L/min, O₂(산소)는 50 SCCM이며, 상기 플라즈마 처리는 15초 동안 수행된다.

[0022] 바람직한 실시예에 있어서, 상기 헬륨 플라즈마 처리액은 전체 조성물 부피 대비 50%이하로 포함된다.

발명의 효과

[0023] 상술된 본 발명에 의하면, 항염증 효과가 있는 대기압 플라즈마를 이용하여 iNOS의 발현을 낮추어 정상적인 면역 반응을 유도하여 질소산화물에 의한 세포 독성을 낮추고 과도한 염증과 면역 반응을 약화시켜 정상적인 세포 간 신호 전달을 유도함으로써 구강 연조직의 염증 예방과 치료에 효과적이다.

[0024] 따라서, 본 발명에 의하면 약물로 인한 부작용을 줄이며, 최대한 통증을 완화 시키고 염증 재발이 없애는 효과적인 기술을 확보할 수 있다.

[0025] 본 발명의 효과는 이상에서 언급한 효과로 제한되지 않으며, 언급되지 않은 또 다른 효과들은 아래의 기재로부터 당업자에게 명확하게 이해될 수 있을 것이다.

도면의 간단한 설명

[0026] 도 1 중 A는 8개의 노즐을 통하여 플라즈마를 발생시키는 사진이고, B는 인간 치은 섬유아세포에 시간 의존적으로 He plasma를 노출시킨 후 죽은 세포에서 분비되는 Lactate dehydrogenase(LDH)를 관찰한 결과를 도시한 그래프이다.

도 2a는 헬륨 플라즈마를 생성하는 저온 대기압 플라즈마 장치(Cold atmospheric plasma: CAP)의 전류-전압 과형의 전기적 특성을 6kV/40kHz에서 오실로스코프를 사용하여 표시된 것이고, 도 2b는 280~860nm 범위의 He, O₂⁺, O⁺, O₂ 및 O의 방출선을 보여주는 헬륨 및 산소에 대한 광학 방출 스펙트럼(OES)을 나타낸 것이고, 도 2c는 He CAP 처리 시간에 따른 이미지 센서 전자 온도 측정을 보여준다.

도 3a 내지 도 3c는 구강 섬유아세포의 세포 생존력을 LPS와 Erastin을 처리하여 시간, 농도에 대한 조건을 확립한 결과를 도시한 것이고, 도 3d는 LPS와 Erastin을 처리한 후 IL-1 β , TNF α , IL-6의 mRNA 발현 결과를 확인한 결과를 도시한 것이며, 도 3e 및 도 3f는 구강 세포의 염증 증가시 발현되는 iNOS와 COX-2의 mRNA와 단백질 발현 결과를 관찰한 결과를 도시한 것이다.

도 4a 및 도 4b는 LPS와 Erastin을 처리한 후 Bax, Atg5, P62의 mRNA 발현 및 단백질 발현 결과를 확인한 것이고, 도 4c 및 도 4d는 Erastin 처리에 의해 현저히 증가된 Atg5에 의해 Ferroptosis와 관련하여 GPX4의 발현을 확인한 결과를 도시한 것이며, 도 4e는 Erastin 처리에 의해 GPX4의 mRNA 발현 및 단백질 발현이 감소된 결과를 확인한 것이고, 도 4f는 시간, 농도 의존적으로 Erastin을 처리 후 세포내 철과 결합하여 철 분해에 관련된 단백질인 NCOA4의 발현을 확인한 결과이다.

도 5a 및 도 5b는 구강 세포의 염증 억제 조건을 찾기 위해 헬륨 CAP의 처리 시간과 헬륨 가스의 흐름 농도를 조절하여 얻어진 헬륨플라즈마처리액을 처리한 후 iNOS와 IL-1 β , TNF α , IL-6 사이토카인들의 mRNA 발현 결과를 관찰한 결과를 도시한 것이고, 도 5c는 헬륨 CAP의 처리 시간과 헬륨 가스의 흐름 농도를 조절하여 얻어진 헬륨플라즈마처리액을 처리한 후 Bax, Atg5, P62 mRNA 발현 결과를 관찰한 결과를 도시한 것이며, 도 5d는 헬륨 CAP으로 4 L/min 헬륨 가스 흐름에서 15초 처리하여 얻어진 헬륨플라즈마처리액을 사용하여 염증과 세포 사멸

증가와 관련된 단백질 발현을 관찰한 결과를 도시한 것이다.

도 6a 및 도 6b는 헬륨플라즈마처리액에 의한 염증과 세포 사멸 감소에 따른 이유를 Ferroptosis와 관련하여 확인한 결과를 도시한 것이고, 도 6c는 헬륨 CAP으로 4 L/min 조건에서 시간 의존적으로 처리하여 얻어진 헬륨플라즈마처리액을 사용하여 미토콘드리아의 세포막 전위를 관찰한 결과를 도시한 것이다.

도 7a 내지 도 7c는 인간 치은 섬유아세포-1 세포에서 Erastin 처리에 의해 증가된 iNOS와 IL-1 β , TNF α , IL-6, COX-2의 mRNA 발현이 헬륨플라즈마처리액에 의해 감소되는 것을 보여주는 결과를 도시한 것으로, 도 7c 중 E는 Erastin 처리에 의해 증가된 Atg5와 P62가 헬륨 플라즈마처리액에 의하여 감소되는 것을 보여주는 결과이며, 도 7d는 Erastin 처리에 의해 증가된 ferroptosis가 헬륨 플라즈마처리액에 의하여 회복되는 것을 관찰한 결과를 도시한 것이다.

도 8a는 Erastin 처리에 의해 감소된 미토콘드리아 막 전위가 헬륨 플라즈마처리액에 의해 회복되는 것을 JC-1 염색을 통해 관찰한 결과(적색 염색 : 건강한 세포는 미토콘드리아 막 전위가 높아서 JC-1 염색시 J-aggregate를 형성하여 붉은 형광을 나타냄)이고, 도 8b 내지 도 8d는 미토콘드리아 외막에 위치하여 미토콘드리아와 세포질 간의 이온 및 대사물질 교환을 조절하는 데 중요한 역할을 하는 VDAC1의 발현에 대한 헬륨 플라즈마처리액의 효과를 관찰한 결과를 도시한 것이다.

도 9a는 헬륨 플라즈마처리액에 의한 세포내 반응을 관찰하기 위해 세포질과 미토콘드리아 ROS를 각각 측정하는 결과를 나타낸 것이고, 도 9b 및 도 9c는 헬륨 플라즈마처리액에 대한 VDAC1의 mRNA 및 단백질 발현 관찰한 결과를 도시한 것이며, 도 9d는 헬륨 플라즈마처리액에 의해 회복된 미토콘드리아의 상태를 확인한 결과이고, 도 9e는 헬륨 플라즈마 처리에 의한 ferroptosis 세포 사멸 감소에 대한 지질 과산화물을 확인한 결과이다.

발명을 실시하기 위한 구체적인 내용

- [0027] 본 발명에서 사용되는 용어는 본 발명에서의 기능을 고려하면서 가능한 현재 널리 사용되는 일반적인 용어들을 선택하였으나, 이는 당 분야에 종사하는 기술자의 의도 또는 판례, 새로운 기술의 출현 등에 따라 달라질 수 있다. 또한, 특정한 경우는 출원인이 임의로 선정한 용어도 있으며, 이 경우 해당되는 발명의 설명 부분에서 상세히 그 의미를 기재할 것이다.
- [0028] 본 발명에서 언급한 '포함한다', '갖는다', '이루어진다' 등이 사용되는 경우 '~만'이 사용되지 않는 이상 다른 부분이 추가될 수 있다. 구성 요소를 단수로 표현한 경우에 특별히 명시적인 기재 사항이 없는 한 복수를 포함하는 경우를 포함한다.
- [0029] 구성 요소를 해석함에 있어서, 별도의 명시적 기재가 없더라도 오차 범위를 포함하는 것으로 해석한다.
- [0030] 본 발명의 여러 구현 예들 각각의 특징적인 부분들은 부분적으로 또는 전체적으로 서로 결합 또는 조합 가능하고, 기술적으로 다양한 연동 및 구동이 가능하며, 각 구현 예들은 서로에 대하여 독립적으로 실시 가능할 수도 있고 연관 관계로 함께 실시할 수도 있다.
- [0031] 이하, 첨부한 도면 및 바람직한 실시예들을 참조하여 본 발명의 기술적 구성을 상세하게 설명한다.
- [0032] 그러나, 본 발명은 여기서 설명되는 실시 예에 한정되지 않고 다른 형태로 구체화 될 수도 있다. 명세서 전체에 걸쳐 본 발명을 설명하기 위해 사용되는 동일한 참조번호는 동일한 구성 요소를 나타낸다.
- [0033] 본 발명의 기술적 특징은 헬륨(He) 가스를 사용한 저온 대기압 플라즈마 처리된 액체가 iNOS의 발현을 낮추어 정상적인 면역 반응을 유도하여 질소산화물에 의한 세포 독성을 낮추고 과도한 염증과 면역 반응을 약화시켜 정상적인 세포 간 신호 전달을 유도함으로써 구강 연조직의 염증 예방과 치료에 효과적임을 확인하고, 이를 이용하여 헬륨(He) 가스를 사용한 대기압 플라즈마에 의해 생성된 헬륨 플라즈마 처리액을 유효성분으로 포함하는 구강 연조직 세포의 염증 완화 및 치료용 조성물을 개발한 것에 있다.
- [0034] 즉, 저온 대기압 플라즈마가 염증 반응 인자로서의 역할은 여러 보고에서 알려져 있지만, 플라즈마처리액 자체에 대해서는 연구된 바 없으며, 특히 헬륨(He) 가스를 사용한 저온 대기압 플라즈마에 의해 생성된 헬륨 플라즈마 수용액이 질소 산화물과 관련되어 구강 연조직 세포의 염증 완화에 관련된 효과가 있다는 사실이 아직까지 밝혀진바 없기 때문이다.
- [0035] 따라서, 본 발명의 구강 연조직 염증 완화 예방 및 치료용 조성물은 헬륨 플라즈마 처리액을 유효성분으로 포함한다.

- [0036] 헬륨 플라즈마에서 생성되는 이온은 헬륨 이온 (He^+)이 가장 흔하게 생성되는 이온 중 하나이고 이온화된 헬륨은 전기적으로 활성화되어 있으며, 이온화된 상태에서 화학적 반응에 참여할 수 있다. 또한 일부 헬륨 원자 (He)가 생성되고 이온화되지 않은 상태로 남아 있을 수 있으며, 화학 반응 및 물리적인 상호 작용에 참여할 수 있다. 그 외 전기적으로 활성화된 상태에서 자유 전자 (Free Electrons)가 생성되며 이들은 전기적인 에너지를 전달하거나 다른 물질과 상호 작용하는데 중요하다. 특히 저온 대기압 플라즈마는 개방된 공기중에서 방전이 가능하여 방전 기체의 고유한 여기종외에도 산소나 물, 질소와 반응하여 다양한 활성산소종이나 준안정 여기상태의 에너지를 갖는 화학종을 발생시킬 수 있다. 따라서 헬륨 플라즈마는 물질이 충돌 및 화학적 상호 작용에 의해 다양한 이온 및 원자 형성 물질을 생성하고, 이러한 물질은 주변 환경과의 상호 작용을 통해 다양한 화학 반응을 일으킬 수 있다.
- [0037] 본 발명의 헬륨 플라즈마 처리액은 저온 대기압 플라즈마 장치(Cold atmospheric plasma)에서 주파수 및 전압을 30 kHz 이상 및 5kV 이상으로 설정하여 전력이 생성되도록 한 후 He (헬륨) 가스 3~5L/min 및 O_2 (산소) 40~60 SCCM으로 물 또는 수용액에 통과시켜 얻었다. 주파수 및 전압을 30 kHz 미만 및 5kV 미만으로 설정하면 염증 억제 관련된 Cytokines들의 발현 감소가 줄어들었고, He (헬륨) 가스를 3L/min 미만으로 처리하면 헬륨 가스 방출량이 감소하여 플라즈마 발생이 약해졌으며, 5L/min 초과하여 처리하면 플라즈마 방출이 불안정한 상태를 나타내었다. 여기서, 주파수 및 전압을 40 kHz 및 6kV로 설정하여 7.5W의 전력을 생성하여 얻어진 헬륨 플라즈마 처리액과 비교하여 주파수 및 전압을 60 kHz 및 8kV로 설정하여 얻어진 헬륨 플라즈마 처리액이 더 나은 특성을 나타내지 않았으므로, 주파수 및 전압을 30 kHz 이상 및 5kV 이상이지만 하면 원하는 특성을 갖는 헬륨 플라즈마 처리액을 얻을 수 있으나, 에너지 절감을 위해 주파수 및 전압을 30~50 kHz 및 5~7kV 범위로 설정하여 사용할 수 있을 것이다.
- [0038] 본 발명의 헬륨 플라즈마 처리액은 처리되는 물 또는 수용액이 5ml일 때 저온 대기압 플라즈마 장치에 의한 플라즈마 처리를 10 ~ 60초 동안 수행하여 얻을 수 있는데, 10초 미만이면 염증 억제 감소가 약화되는 문제가 있고, 60초를 초과하게 되면 구강 세포의 세포 damage를 증가시키는 문제가 있기 때문이다.
- [0039] 특히, 본 발명의 헬륨 플라즈마 처리액은 물 또는 수용액이 5ml일 때 저온 대기압 플라즈마 장치의 주파수 및 전압은 40 kHz 및 6kV이고, He (헬륨) 가스는 4L/min, O_2 (산소)는 50 SCCM이며, 플라즈마 처리는 15초 동안 수행되어 얻어질 수 있다.
- [0040] 다음으로, 본 발명의 구강청정용 조성물은 헬륨 플라즈마 처리액을 유효성분으로 포함한다. 여기서, 헬륨 플라즈마 처리액은 상술된 바와 동일한 특성을 갖는 것이 사용되므로 상세한 설명은 생략한다. 다만, 본 발명의 구강청정용 조성물은 평상시 예방적으로 사용되는 것이므로 헬륨 플라즈마 처리액을 그대로 사용하지 않고 희석하여 즉 헬륨 플라즈마 처리액을 전체 조성물 부피 대비 50% 이하로 포함시켜 사용할 수도 있음은 물론이다.
- [0041] 실시예
- [0042] DMEM(high 글루코오스)+10% FBS로 구성된 배지 조성물 5ml를 준비하고, 저온 대기압 플라즈마(Cold atmospheric plasma)장치에서 주파수 및 전압을 40kHz 및 6kV 로 설정하여 7.5W 전력이 생성되도록 한 후 He (헬륨) 가스 4L/min, O_2 (산소) 50 SCCM를 상기 배지 조성물에 통과시키면서 15초 동안 처리하여 헬륨플라즈마처리액(He CAP)을 얻었다.
- [0043] 실험예 1
- [0044] 인간 치은 섬유 아세포(HGF, Human Gingival Fibroblast)에서 헬륨 저온 플라즈마(He CAP) 처리에 의한 세포 생존력을 분석하고 그 결과를 도 1에 나타내었다.
- [0045] 도 1의 A에 도시된 바와 같이 8개의 노즐을 통하여 헬륨 플라즈마를 발생시켰는데, 사용된 주파수는 40kHz, 전압은 6kV, 전력은 7.5W로 진행하였다. He gas 의 흐름은 4 L/min 및 O_2 는 50 sccm으로 결정하여 수행하였다.
- [0046] 도 1의 B에 도시된 바와 같이, 인간 치은 섬유 아세포에 시간 의존적으로 헬륨 플라즈마를 노출시킨 후 죽은 세포에서 분비되는 Lactate dehydrogenase(LDH)를 관찰한 결과 시간 의존적으로 증가하는 것을 확인하였다. 젖산 탈수소효소(LDH)의 방출은 LDH-Glo 세포독성 분석을 사용하여 분석되었으며, 이는 처리 시간에 따라 발광 신호의 증가를 보여준다. Mann-Whitney test를 이용하여 통계적 유의성을 측정하였는데, 모든 값은 평균 $\pm$ SD로 표시되었고, *는 $P<0.05$ 를 의미하며, 대조군과 비교하였다.
- [0047] Bioluminescence-based로 한 LDH-Glo™ Cytotoxicity Assay를 수행한 결과 헬륨 플라즈마 노출 30초가 지나면

세포의 생존력이 감소하는 것을 확인하였다.

- [0048] 도 1에 도시된 바와 같이 60초 이상 플라즈마 처리하면 세포독성이 현저하게 나타나는 것을 알 수 있으므로, 헬륨 플라즈마 처리액 제조시 처리시간은 60초 이하일 수 있다.
- [0049] 실험예 2
- [0050] 헬륨 CAP 처리 조건에 대한 저온 대기압 플라즈마 장치의 전기적 특성을 오실로스코프 및 광학 방출 스펙트럼(OES)을 사용하여 분석하고 그 결과를 도 2a 내지 도 2c에 나타내었다.
- [0051] 도 2a에는 저온 대기압 플라즈마 장치의 전류-전압 파형의 전기적 특성은 6kV/40kHz에서 오실로스코프를 사용하여 표시되었다. 도 2b는 280~860nm 범위의 He, O_2^+ , O^+ , O_2 및 O의 방출선을 보여주는 헬륨 및 산소에 대한 광학 방출 스펙트럼(OES)을 나타낸 것이다. 도 3a는 He CAP 처리 시간에 따른 이미지 센서 전자 온도 측정을 보여주는데, He CAP은 0초, 10초, 30초, 180초 동안 측정되었으며, 시간이 지남에 따라 온도가 증가하는 것으로 나타났다.
- [0052] 실험예 3
- [0053] 인간 치은 섬유아세포-1 세포(HGF-1, Human Gingival Fibroblast-1)에서 LPS 및 Erastin 처리에 대한 염증성 사이토카인의 반응을 관찰하고 그 결과를 도 3a 내지 도 3f에 나타내었다.
- [0054] 구강 섬유아세포의 세포 생존력을 LPS와 Erastin을 처리하여 시간, 농도에 대한 조건을 확립하기 위해, 0, 0.5, 1, 3, 6시간 동안 200 ng/ml의 LPS와 10 μ M Erastin을 처리한 후 IL-1 β , TNF α , IL-6의 mRNA 발현 결과를 확인하여 도 3a 내지 도 3c에 나타내었다. 도 3d의 결과는 세포 생존력이 유지되면서 염증을 증가시키는 조건을 찾기 위한 것이고, 도 3e 내지 도 3f는 구강 세포의 염증 증가시 발현되는 iNOS와 COX-2의 mRNA와 단백질 발현 결과를 관찰한 것이다.
- [0055] 실험예 4
- [0056] 인간 치은 섬유아세포-1 세포에서 LPS와 Erastin 처리에 의한 세포 사멸 관련 유전자의 발현을 관찰하고 그 결과를 도 4a 내지 도 4f에 나타내었다.
- [0057] 도 4a 및 도 4b는 염증 증가 원인과 관련된 세포 사멸 조건을 찾기 위해 0, 0.5, 1, 3, 6 시간 동안 200 ng/ml의 LPS와 10 μ M Erastin을 처리한 후 Bax, Atg5, P62의 mRNA 발현 및 단백질 발현 결과를 확인한 결과로서, Atg5가 Erastin 처리에 의해 현저히 증가됨을 확인할 수 있다.
- [0058] 도 4c 내지 도 4e는 염증과 세포 사멸 증가에 따른 세포 사멸 원인인 Erastin 처리에 의해 증가된 Atg5에 의해 Ferroptosis와 관련하여 GPX4의 발현을 확인한 결과로서, Erastin 처리에 의해 GPX4의 mRNA 발현 및 단백질 발현이 감소된 결과를 확인할 수 있다.
- [0059] 도 4f는 시간, 농도 의존적으로 Erastin을 처리 후 세포내 철과 결합하여 철 분해에 관련된 단백질인 NCOA4의 발현을 확인한 결과로서, 철 이온의 자극을 통해 세포 내 철 이용을 조절하는 NCOA4의 mRNA와 단백질 발현을 통해 구강 세포의 ferroptosis 관련 메커니즘을 확인하였다.
- [0060] 실험예 5
- [0061] 인간 치은 섬유아세포-1 세포에서 He CAP 처리에 의한 염증성 사이토카인 및 세포 사멸 관련 유전자의 발현을 관찰하고 그 결과를 도 5a 내지 도 5b에 나타내었다.
- [0062] 헬륨 플라즈마 처리액의 제조 조건을 확립하기 위하여 헬륨 플라즈마의 초당 처리 시간과 플라즈마를 발생시키는 헬륨 가스의 흐르는 속도를 조절하여 (standard liters per minute (slm) flow rate) iNOS의 mRNA 발현을 관찰하였다. 도 5a는 헬륨 플라즈마가 분당(min) 4L의 (4 slm, 4 L/min) 헬륨 가스 흐름 조건에서 0, 15, 30, 60, 120, 180초 동안 측정된 iNOS의 mRNA 발현량을 나타낸 것이다. 또한, 헬륨 가스 흐름을 0, 1, 2, 3, 4, 5 slm 조건에서 각각 15초 동안 측정하여 iNOS의 mRNA 발현을 관찰하였다. 이러한 결과에서 헬륨 플라즈마가 iNOS의 mRNA 발현을 최소화하는 조건은 4 slm 헬륨 가스 흐름 조건에서 15초 동안 플라즈마에 노출시키는 것이다. 도 5b에서도 IL-1 β , TNF α , IL-6 사이토카인들의 mRNA 발현이 최소화 되는 조건을 찾기 위해 헬륨 가스 흐름 4 slm 조건에서 0, 15, 30, 60, 120, 180초 동안 측정된 결과 IL-1 β , TNF α , IL-6의 mRNA이 발현이 가장 많이 감소하는 시간은 15초와 30초이며, 15초로 고정 후 헬륨 가스 흐름을 0, 1, 2, 3, 4, 5 slm 조건으로 흘려 보냈을 때 4 slm 조건에서 사이토카인들의 mRNA 발현이 최소화가 되었다. 따라서 구강 세포의 염증 억제 조건을 찾

기 위해 헬륨 CAP의 처리 시간과 헬륨 가스의 흐름 농도를 조절하여 iNOS와 IL-1 β , TNF α , IL-6 사이토카인들의 mRNA 발현 결과를 관찰한 결과가 도시된 도 5a 및 도 5b로부터, 4 L/min 헬륨 가스 흐름에서 15초 처리하여 얻어진 헬륨플라즈마처리액에 의해 iNOS와 IL-1 β , TNF α , IL-6의 발현이 현저히 감소되는 것을 확인할 수 있다.

[0063] 도 5c는 도 5a 및 5b와 같은 조건으로 헬륨 CAP의 처리 시간과 헬륨 가스의 흐름 농도를 조절하여 Bax, Atg5, P62 mRNA 발현 결과를 관찰한 결과로서, P62 발현이 증가하는 것으로 관찰되었다.

[0064] 도 5d는 4 L/min 헬륨 가스 흐름에서 15 초 처리된 헬륨 CAP 즉 실시예에서 얻어진 헬륨플라즈마처리액에 의한 염증과 세포 사멸 증가와 관련된 단백질 발현을 관찰한 결과로서, P62의 발현을 확인할 수 있고, Erastin 처리에 의해 감소된 GPX4의 mRNA 발현 및 단백질 발현이 증가되는 것을 확인하였다.

[0065] 실험예 6

[0066] 인간 치은 섬유 아세포-1 세포에서 GPX4 발현 및 미토콘드리아 막 잠재력에 대한 He CAP 처리의 효과를 확인하고 그 결과를 도 6a 내지 도 6c에 나타내었다.

[0067] 도 6a는 항산화 조절의 주요한 인자로 GPX4의 mRNA 발현을 관찰하였다. 도 5a 내지 도 5d에서 염증 사이토카인의 발현을 감소시키는 조건을 찾기 위해 수행한 헬륨 플라즈마 조건이 GPX4의 mRNA 발현에 영향을 있는지 관찰하였다. 헬륨 플라즈마를 분당(min) 4L의 (4 slm, 4 L/min) 헬륨 가스 흐름 조건에서 0, 15, 30, 60, 120, 180 초 동안 측정된 GPX4의 mRNA 발현은 15초 노출 시 높은 발현을 나타냈으며, 헬륨 가스 흐름을 0, 1, 2, 3, 4, 5 slm 조건에서 각각 15초 동안 측정하였을 때 GPX4의 mRNA 발현이 3L와 4L에서 가장 높게 관찰 되었다. 이러한 결과로부터 GPX4의 mRNA 발현을 증가시키는 조건이 4 slm 헬륨 가스 흐름에서 15초 동안 처리하여 얻어진 헬륨 플라즈마 처리액으로 처리하는 것임을 알 수 있다. 도 6b는 헬륨 CAP 처리에 의한 염증과 세포 사멸 감소에 따른 이유를 Ferroptosis와 관련하여 확인한 결과로서, Ferroptosis 진행에 따른 GPX4의 발현이 실시예에서 얻어진 헬륨 플라즈마처리액과 동일한 조건 즉 4 L/min 헬륨 가스 흐름에서 15초 동안 처리했을 때 GPX4의 발현이 증가된 것을 보여준다. 그러나 60초가 넘어서면 세포의 GPX4의 발현이 사라짐을 알 수 있다.

[0068] 도 6c는 헬륨 CAP를 4 L/min 조건에서 시간 의존적으로 처리후 미토콘드리아의 세포막 전위를 관찰한 결과로서, 30초 부터 미토콘드리아 세포막 전위가 낮아지며 세멸 사멸이 확인된다(녹색 형광 : JC-1 염색으로 막전위가 낮은 상태의 미토콘드리아에 monomer 상태로 존재하는 세포에 염색되며 cell death로 나타남). 오른쪽 그래프는 세포 사멸을 나타내는 녹색 형광의 강도를 나타낸 막대 그래프이다.

[0069] 실험예 7

[0070] 인간 치은 섬유아세포-1 세포에서 Erastin 유발 염증성 사이토카인 및 세포사멸 관련 유전자의 발현에 대한 Helium CAP 처리의 효과를 확인하고 그 결과를 도 7a 내지 도 7d에 나타내었다.

[0071] 도 7a 내지 도 7c는 헬륨 CAP의 처리에 의한 구강 세포의 염증 억제를 확인한 결과로서, Erastin 처리에 의해 증가된 iNOS와 IL-1 β , TNF α , IL-6, COX-2의 mRNA 발현이 4 L/min, 15 초 헬륨 CAP 처리로 얻어진 헬륨 플라즈마처리액에 의하여 감소되는 것을 관찰할 수 있는데, 특히 도 7c의 E는 Erastin 처리에 의해 증가된 Atg5와 P62가 헬륨 CAP에 의하여 감소되는 것을 보여준다.

[0072] 도 7d는 Erastin 처리에 의해 증가된 ferroptosis가 헬륨 CAP에 의하여 회복되는 것을 GPX4의 단백질 발현 증가와 GSH/GSSG의 비율 증가를 통해 관찰한 것으로, NCOA4의 단백질 발현 감소가 철 이온의 분해 감소를 가져와 얻어진 결과로 관찰된다.

[0073] 실험예 8

[0074] 인간 치은 섬유 아세포-1 세포에서 미토콘드리아 막 전위 및 VDAC1 발현에 대한 He CAP 처리의 효과를 확인하고 그 결과를 도 8a 내지 도 8d에 나타내었다.

[0075] 도 8a는 Erastin 처리에 의해 감소된 미토콘드리아 막 전위가 헬륨 CAP 처리에 의해 회복되는 것을 JC-1 염색을 통해 관찰한 결과인데, 도면 중 적색은 건강한 세포를 의미한다. 즉 건강한 세포는 미토콘드리아 막 전위가 높아서 JC-1 염색시 J-aggregate를 형성하여 붉은 형광을 나타내기 때문이다.

[0076] 도 8b 내지 도 8d는 미토콘드리아 외막에 위치하여 미토콘드리아와 세포질 간의 이온 및 대사물질 교환을 조절하는 데 중요한 역할을 하는 VDAC1의 발현에 대한 헬륨 CAP 효과를 관찰한 결과로서, 헬륨 CAP 처리시 VDAC1의 단백질 발현이 증가하고 20초 이후에 현저히 증가되는 것을 적색 형광 발현을 통해 알 수 있다. 도 8c에서는 헬

를 플라즈마 4slm 조건에서 0, 15, 30, 60, 120초 동안 플라즈마 노출 후 얻어진 헬름 플라즈마처리액을 처리한 후 VDAC1의 단백질 발현을 관찰하였다. VDAC1의 단백질 발현이 15초에서 크게 증가하였으며 30초가 지나면서 서서히 감소되는 것으로 나타났다. 또한 VDAC1이 Erastin 처리에 의해 감소되는 것으로 보아 ferroptosis 세포 사멸과 관련이 있고 이를 헬름 CAP가 회복시킨다는 것을 알 수 있다.

[0077] 실험예 9

[0078] 인간 치은 섬유아세포-1에서 He CAP 처리에 대한 VDAC1의 반응을 도 9a 내지 도 9e에 나타내었다.

[0079] 도 9a에 도시된 바와 같이, 헬름 CAP에 의한 세포내 반응을 관찰하기 위해 세포질과 미토콘드리아 ROS를 각각 측정된 결과, Erastin으로 증가된 세포질 ROS가 헬름 CAP에 의해 감소되는 것과 비교하여 미토콘드리아 ROS 감소 비율이 더 높음을 알 수 있다. 이것은 헬름 CAP이 미토콘드리아 회복에 더 큰 영향을 주는 것을 확인시켜준다.

[0080] 도 9b 및 도 9c는 헬름 CAP 처리에 대한 VDAC1의 mRNA 및 단백질 발현 관찰한 결과로서, Erastin으로 감소된 VDAC1의 발현이 헬름 플라즈마 처리액에 의해 회복됨을 보여준다.

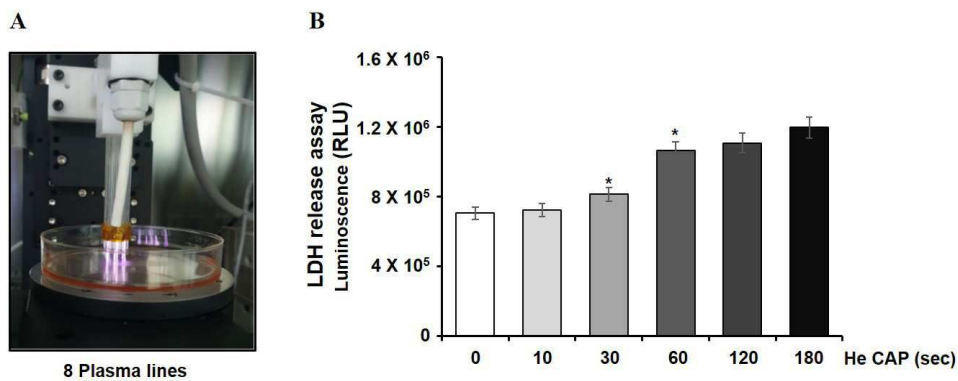
[0081] 도 9d는 헬름 CAP 처리에 의해 회복된 미토콘드리아의 상태를 확인한 것이다. 즉 Rhod-2는 칼슘을 특이적으로 결합하여 미토콘드리아 내에서 칼슘 농도를 시각화하는 데 사용되는데, 적색 형광의 증가로 미토콘드리아 기능 회복이 확인됨을 알 수 있기 때문이다.

[0082] 도 9e는 헬름 CAP 처리에 의한 ferroptosis 세포 사멸 감소에 대한 지질 과산화를 확인한 것으로, Erastin으로 증가한 지질 과산화가 헬름 CAP 처리에 의해 감소됨을 알 수 있다.

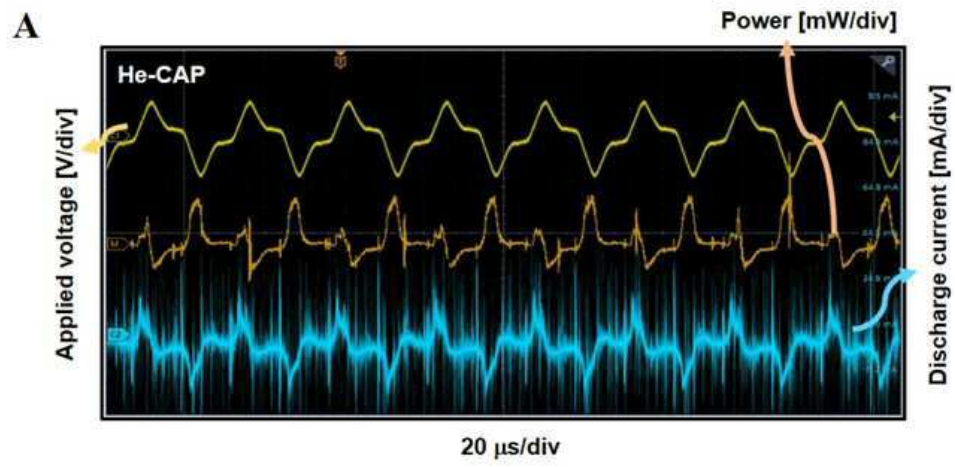
[0083] 본 발명은 이상에서 살펴본 바와 같이 바람직한 실시 예를 들어 도시하고 설명하였으나, 상기한 실시 예에 한정되지 아니하며 본 발명의 정신을 벗어나지 않는 범위 내에서 당해 발명이 속하는 기술 분야에서 통상의 지식을 가진 자에 의해 다양한 변경과 수정이 가능할 것이다.

도면

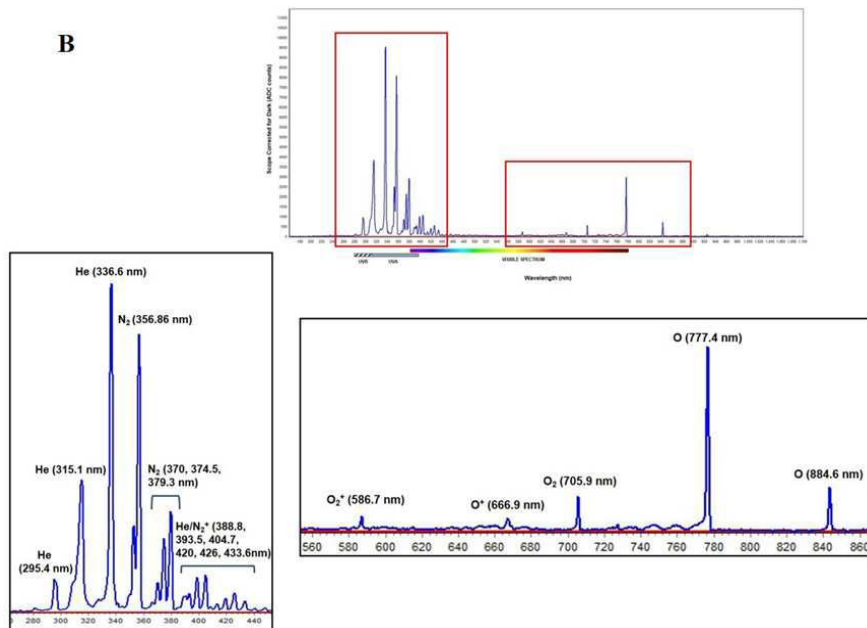
도면1



도면2a

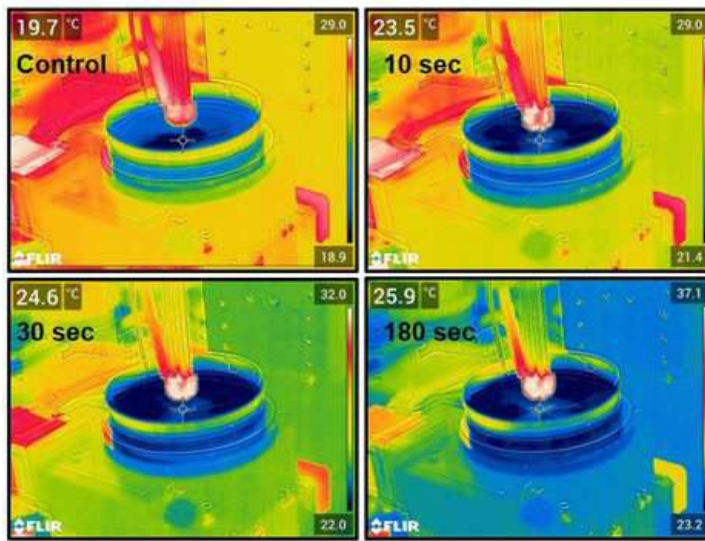


도면2b



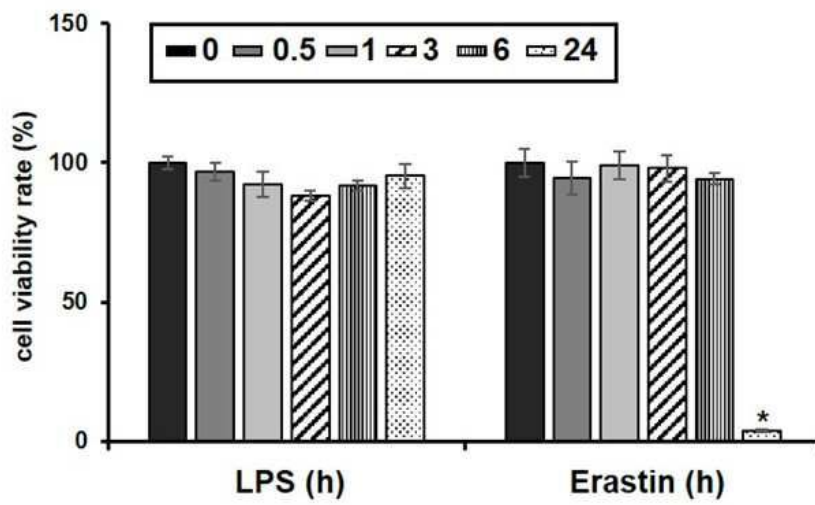
도면2c

C



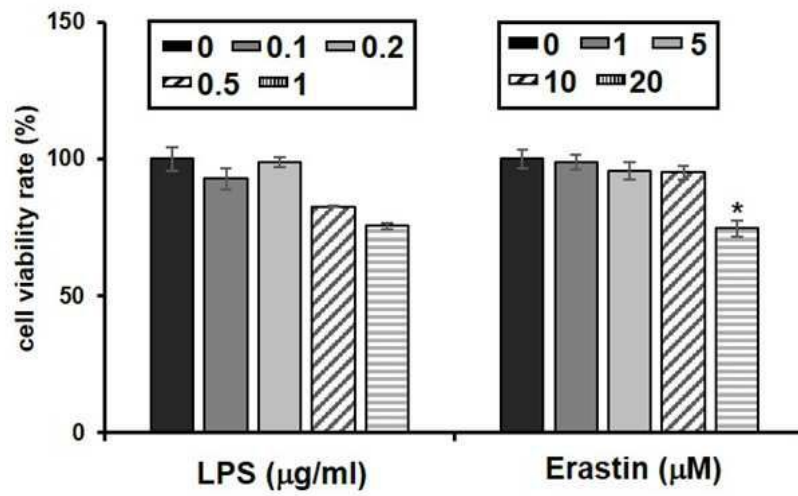
도면3a

A



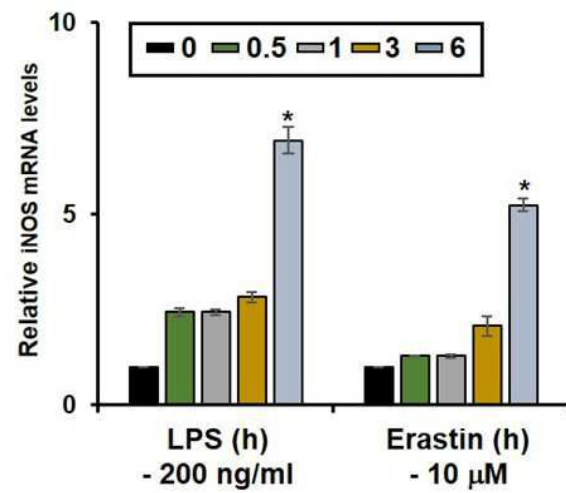
도면3b

B



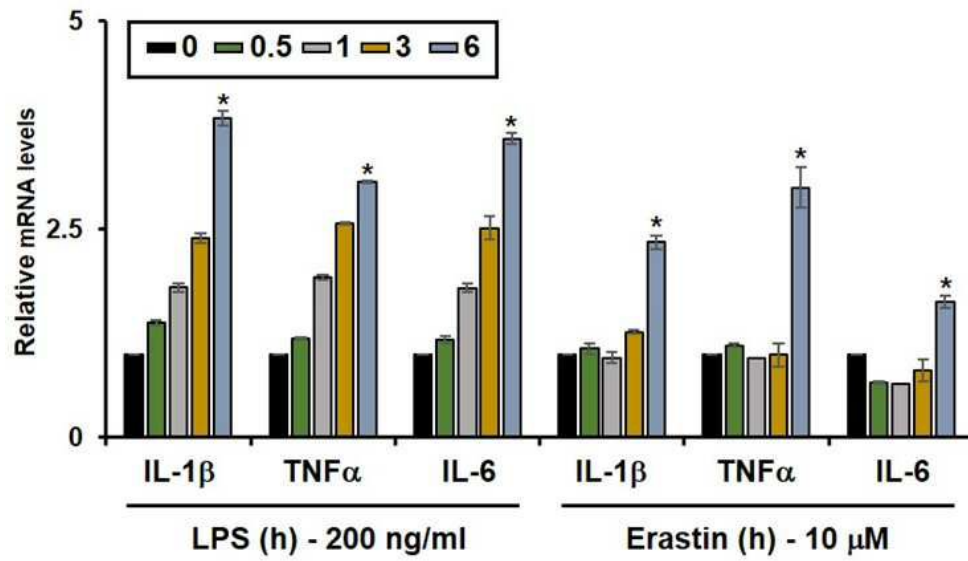
도면3c

C



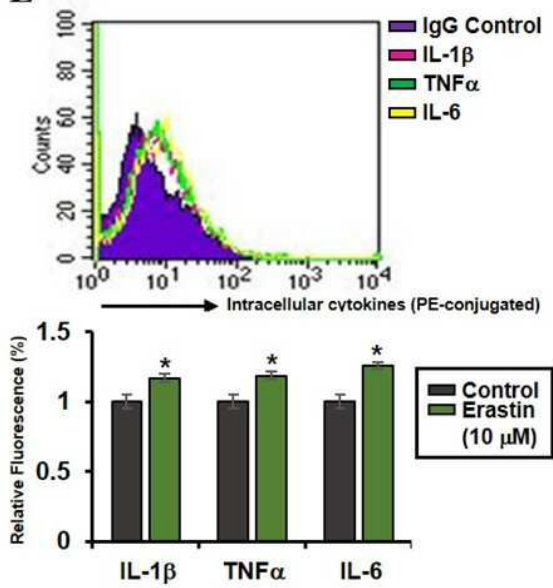
도면3d

D



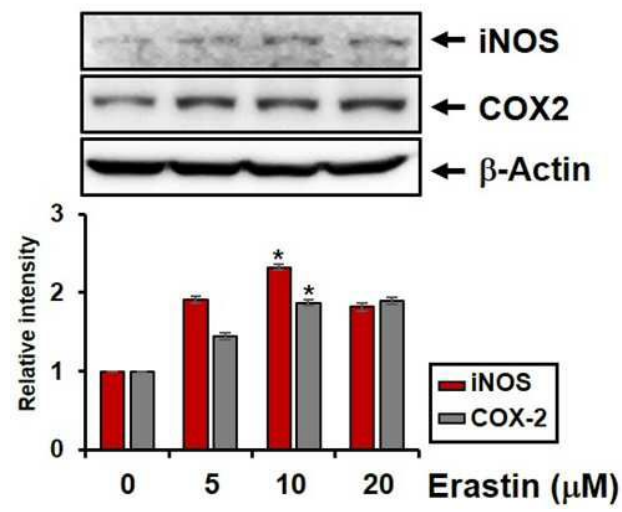
도면3e

E



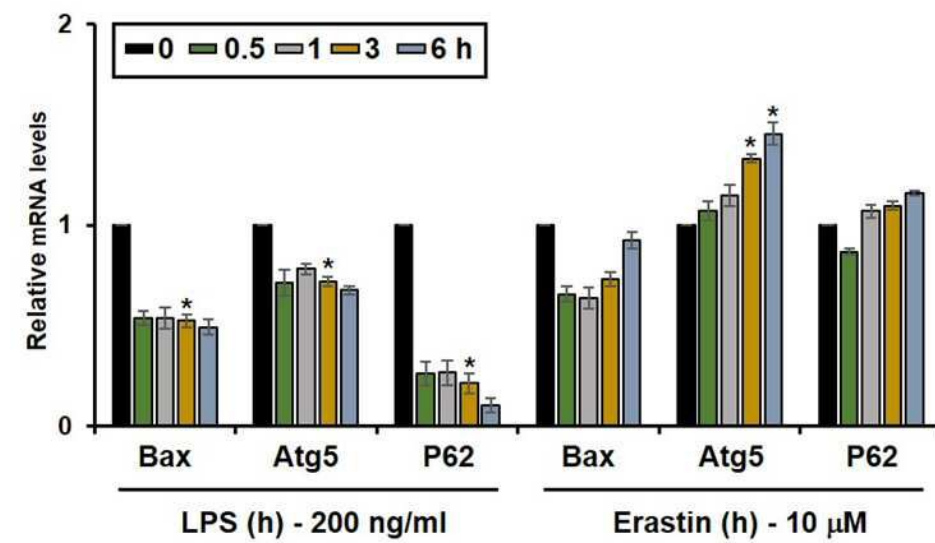
도면3f

F

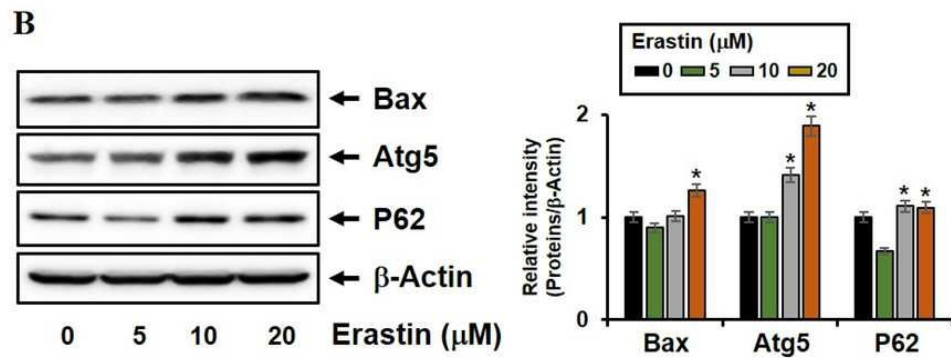


도면4a

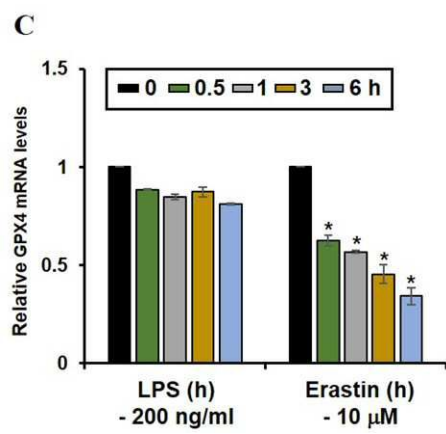
A



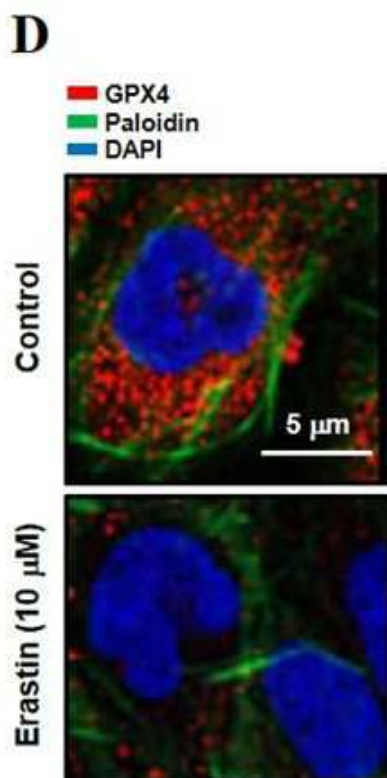
도면4b



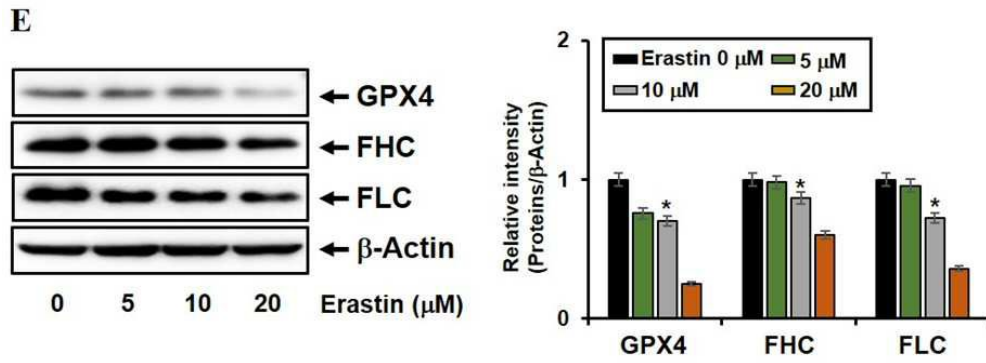
도면4c



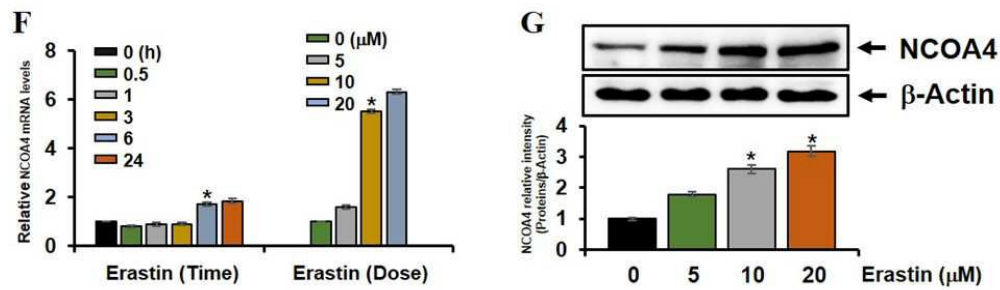
도면4d



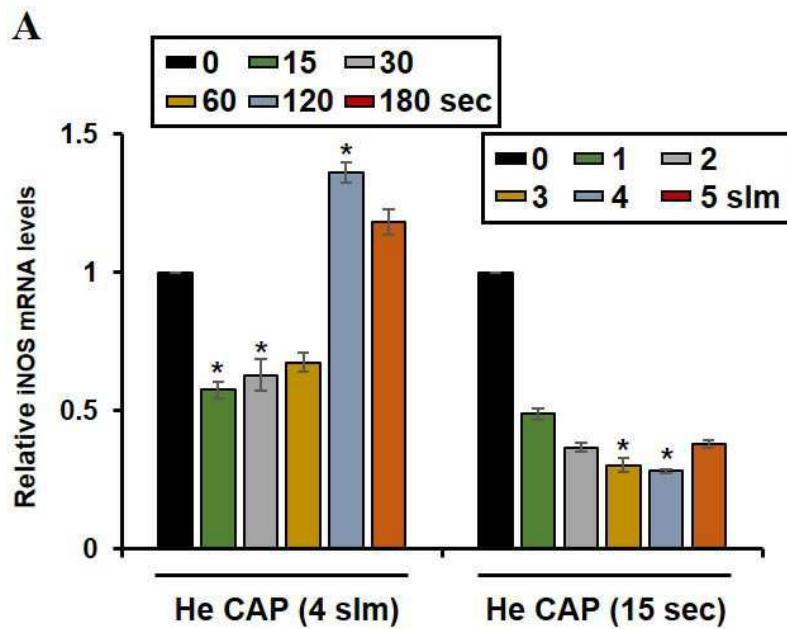
도면4e



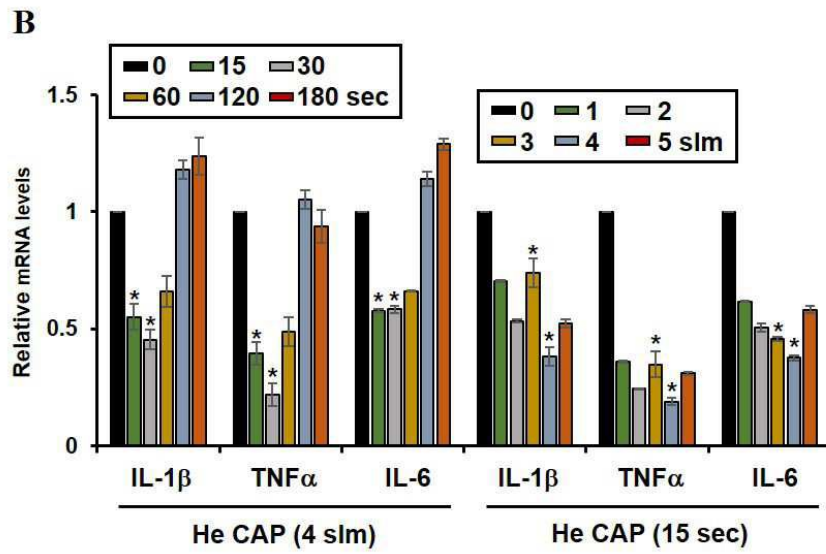
도면4f



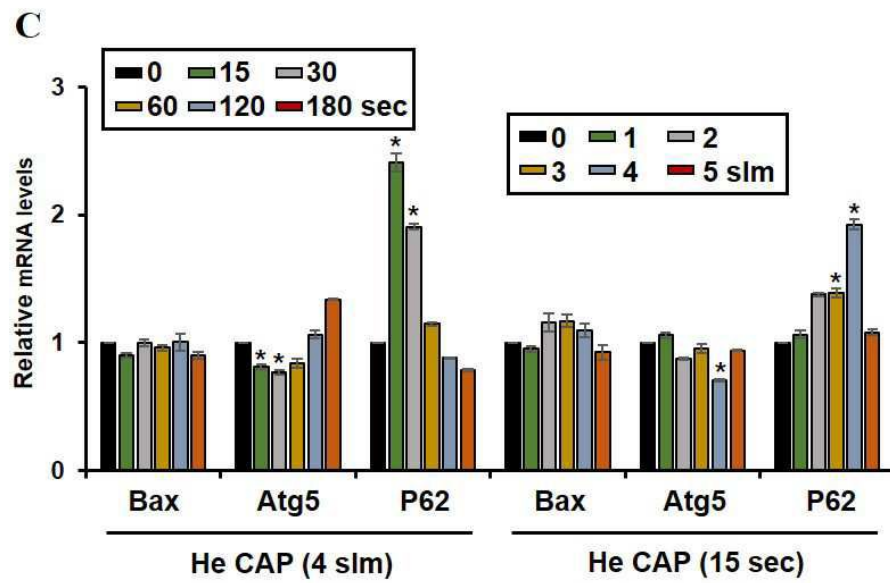
도면5a



도면5b

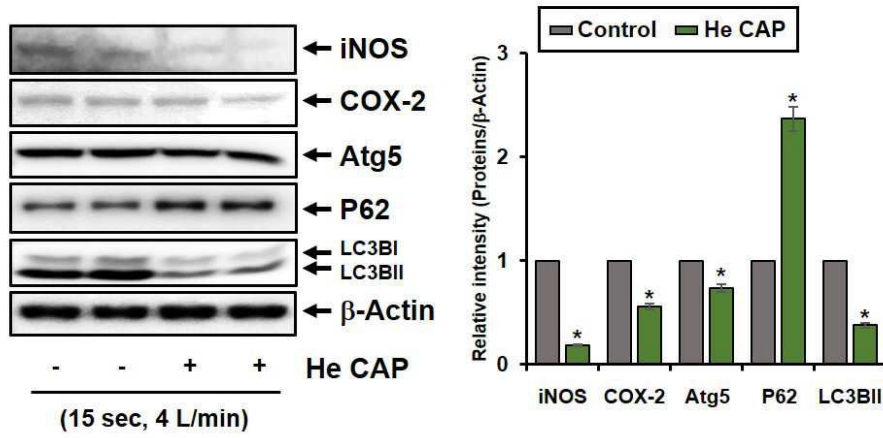


도면5c



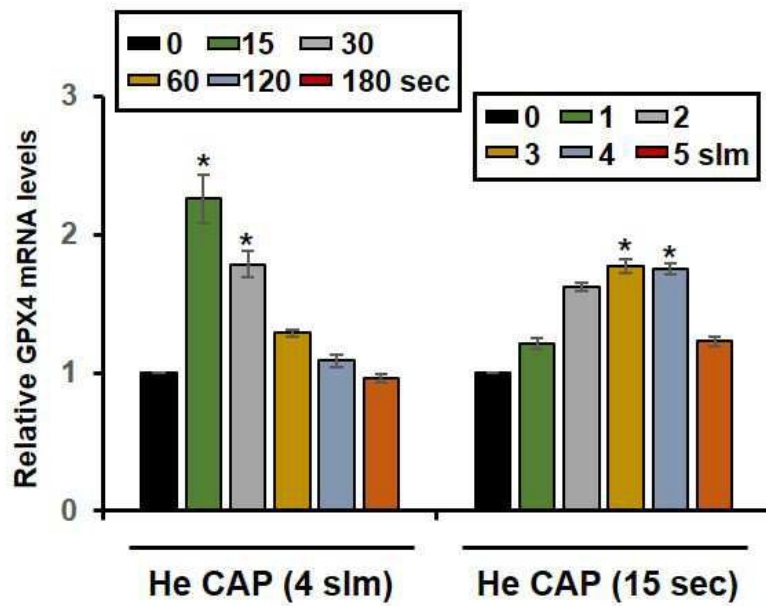
도면5d

D

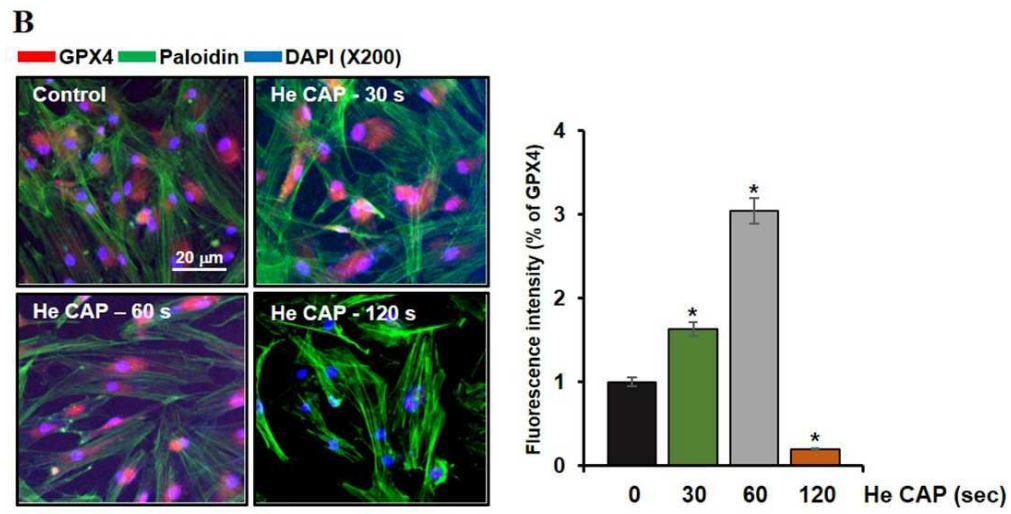


도면6a

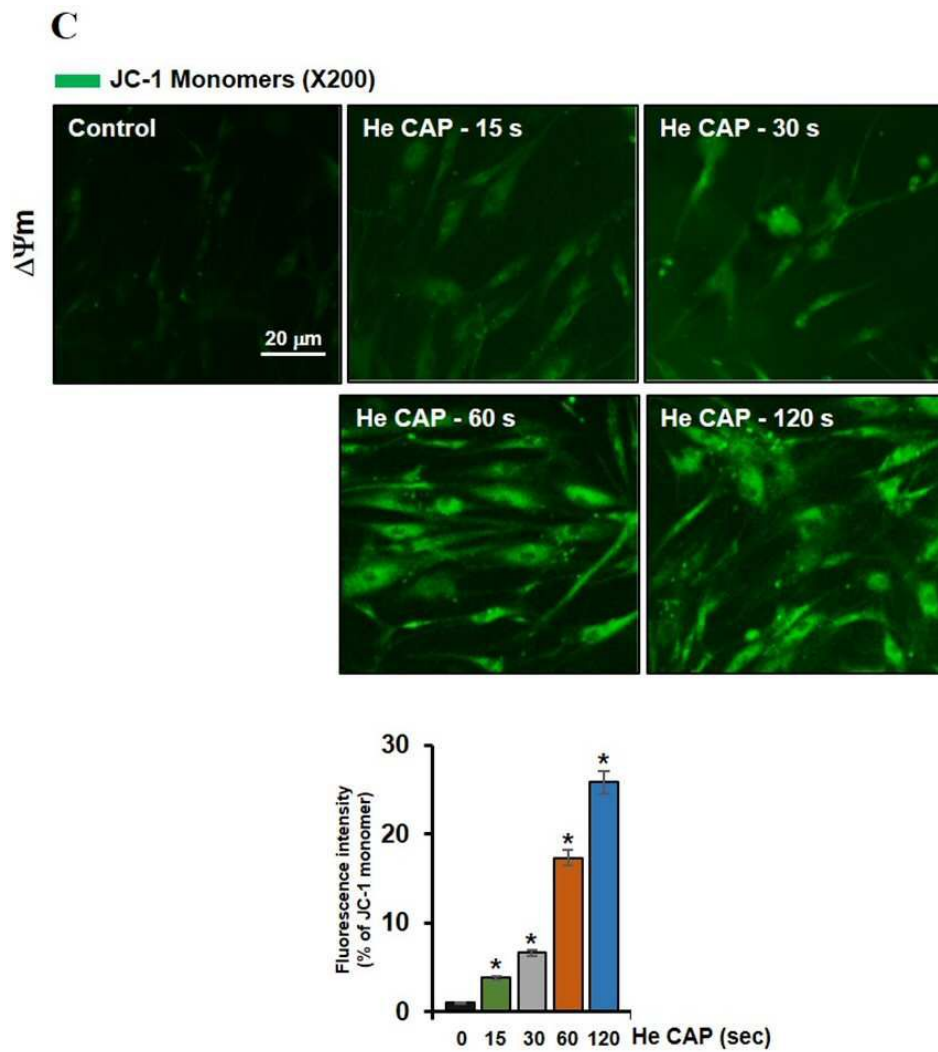
A



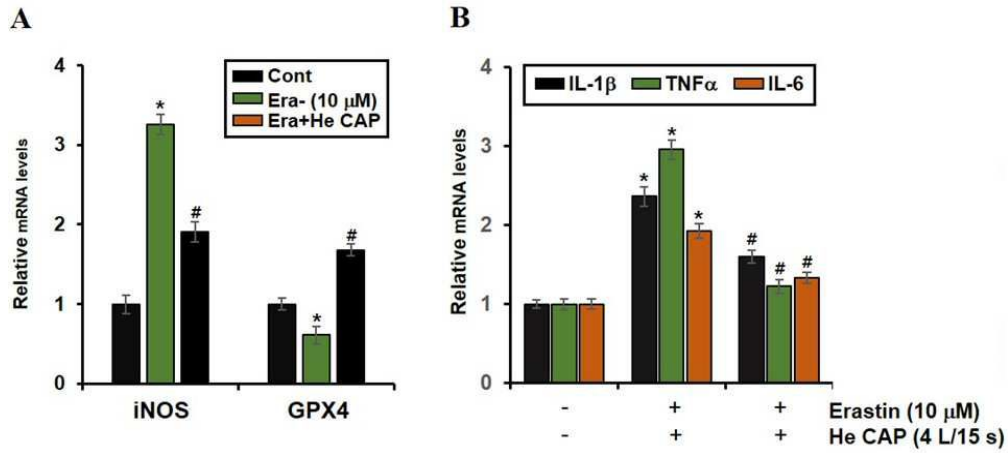
도면6b



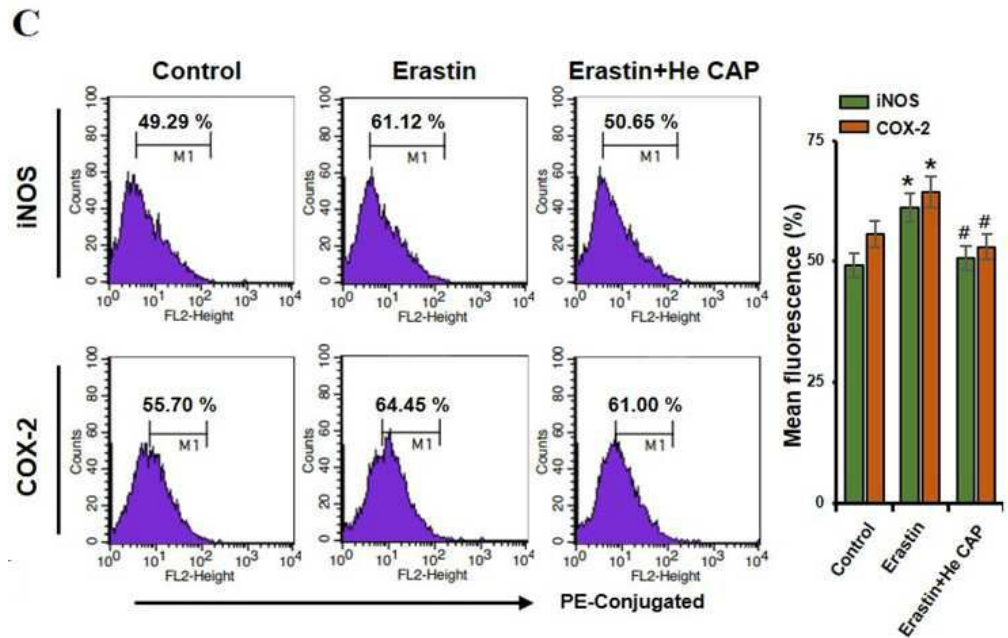
도면6c



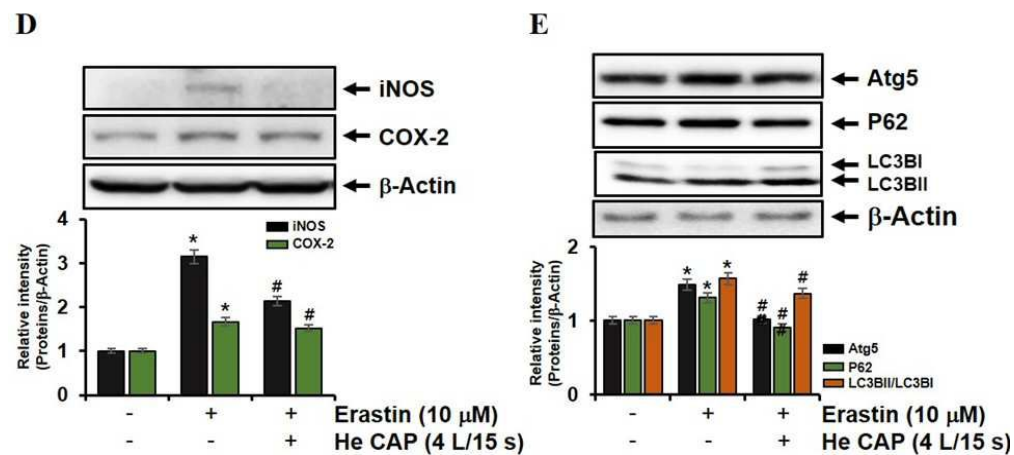
도면7a



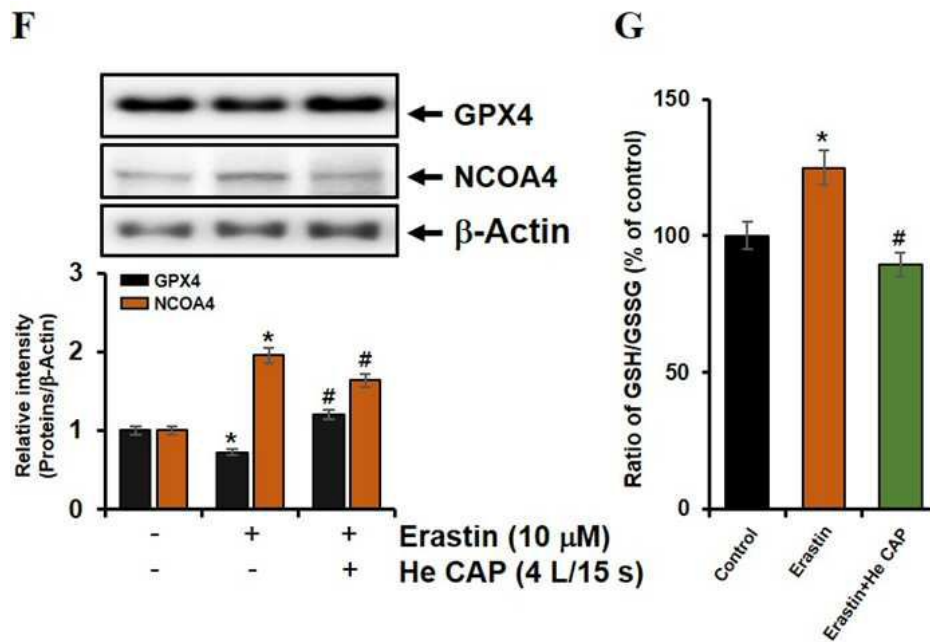
도면7b



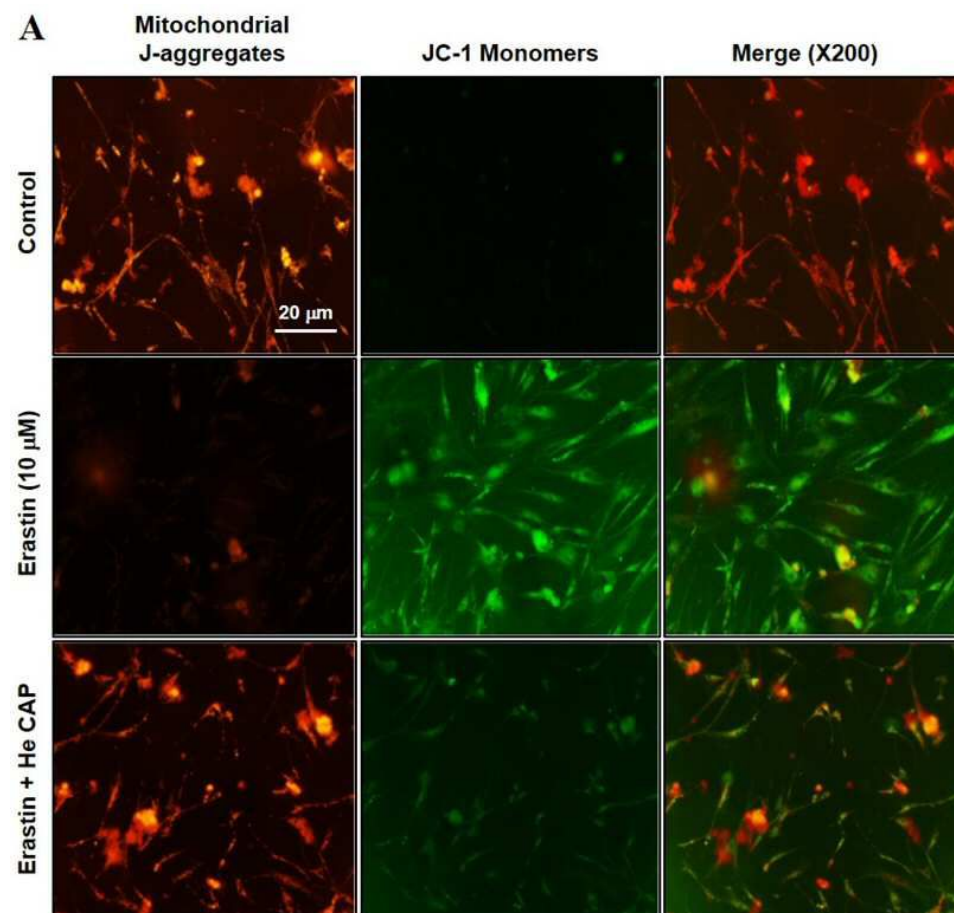
도면7c



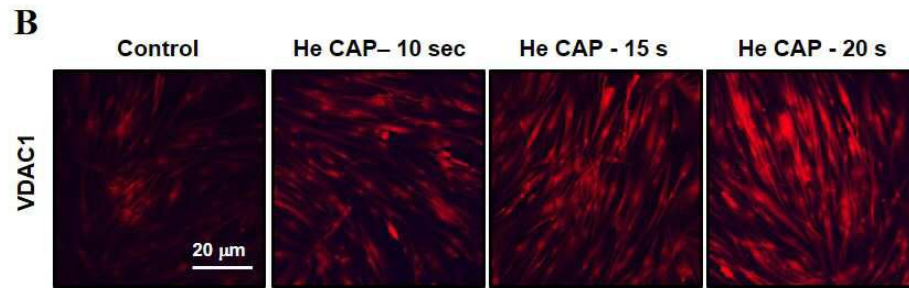
도면7d



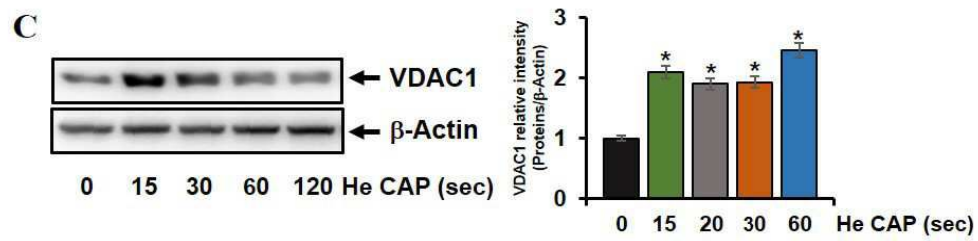
도면8a



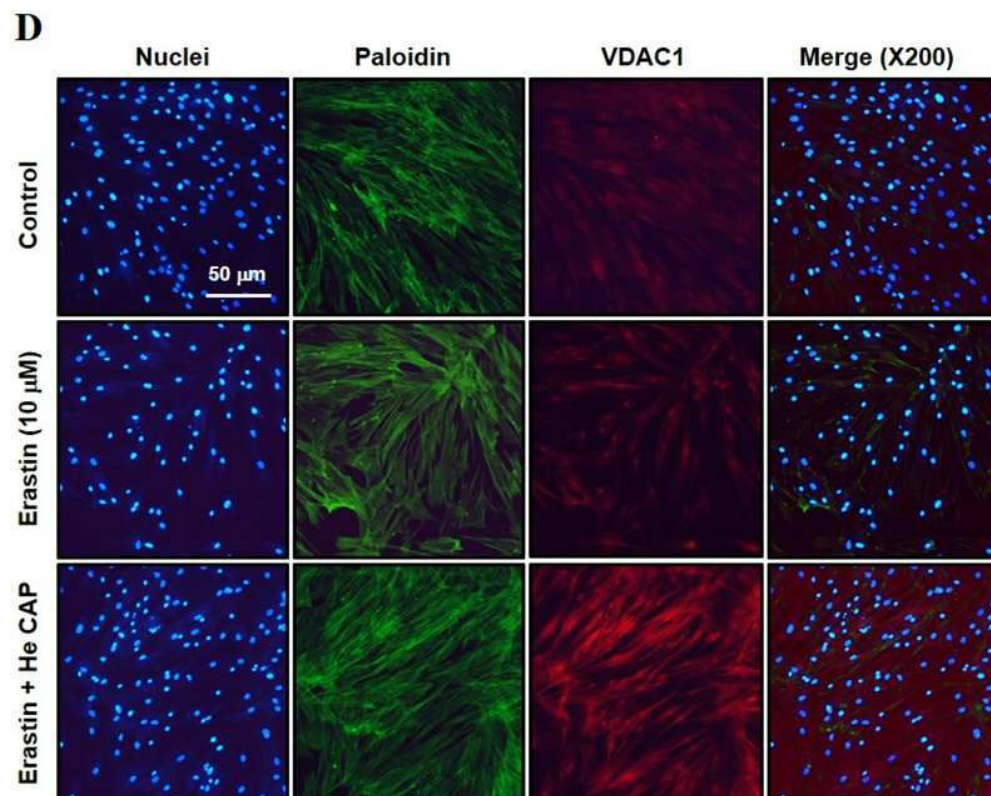
도면8b



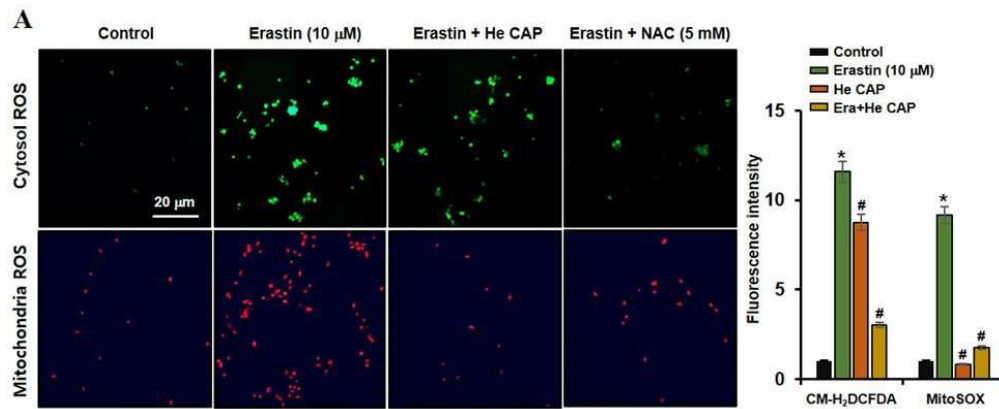
도면8c



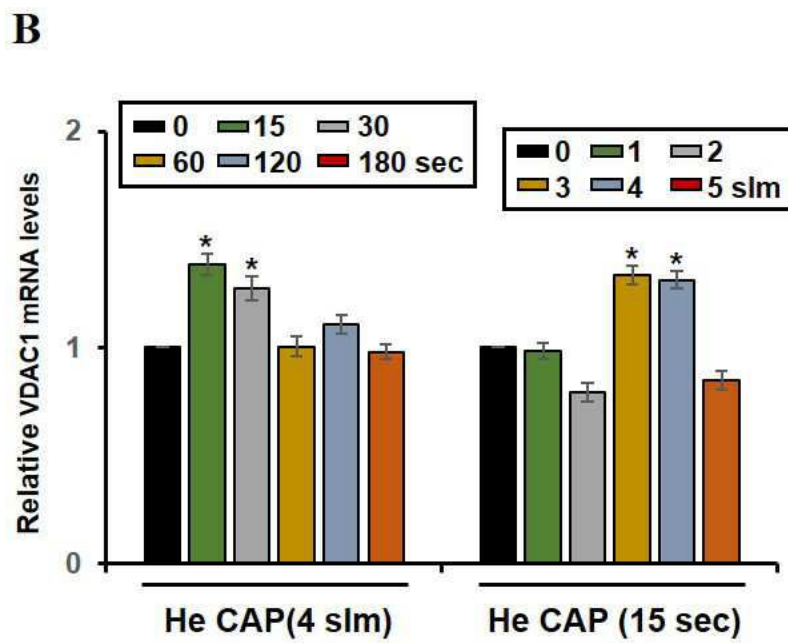
도면8d



도면9a

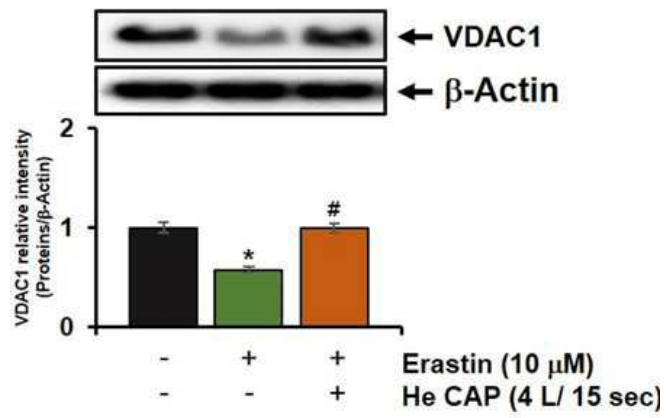


도면9b



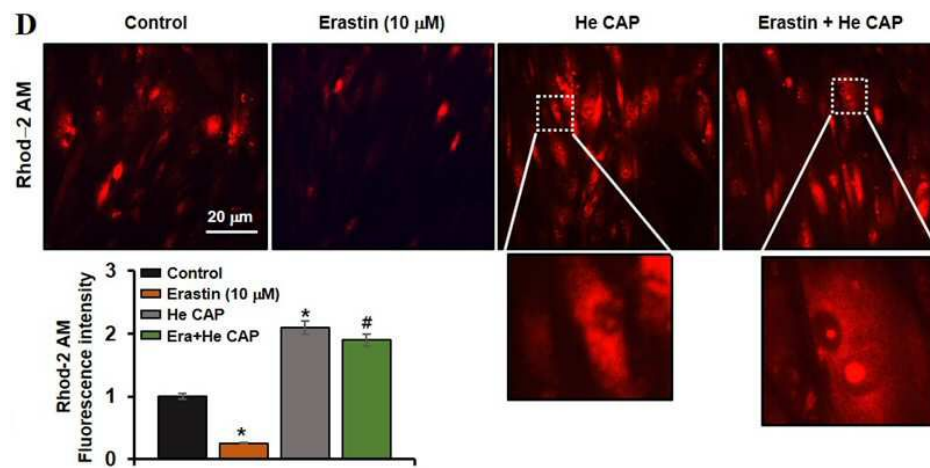
도면9c

C



도면9d

D



도면9e

