



(19) 대한민국특허청(KR)
(12) 등록특허공보(B1)

(45) 공고일자 2024년09월12일
(11) 등록번호 10-2705932
(24) 등록일자 2024년09월06일

(51) 국제특허분류(Int. Cl.)
A61K 35/747 (2015.01) A23L 33/135 (2016.01)
A61P 1/02 (2006.01)
(52) CPC특허분류
A61K 35/747 (2013.01)
A23L 33/135 (2016.08)
(21) 출원번호 10-2024-0091618
(22) 출원일자 2024년07월11일
심사청구일자 2024년07월11일
(56) 선행기술조사문헌
KR102198553 B1
KR102217525 B1

(73) 특허권자
주식회사 비피도
강원도 홍천군 홍천읍 농공단지길 23-16
(72) 발명자
박명수
서울특별시 강남구 학동로 432, 101동 1102호
허건
경기도 수원시 영통구 센트럴타운로 85
Summitplace광고
(뒷면에 계속)
(74) 대리인
특허법인태동

전체 청구항 수 : 총 10 항

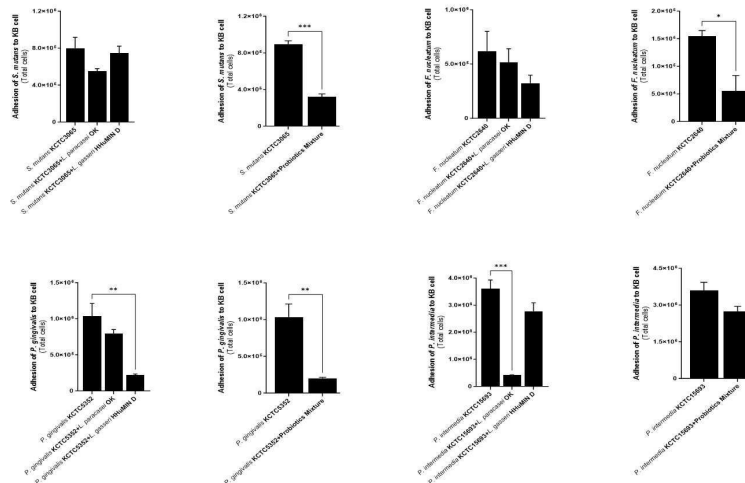
심사관 : 여경숙

(54) 발명의 명칭 락토바실러스 가세리 HHuMIN D 및 락티카제이바실러스 파라카제이 OK 복합 균주를 포함하는 구강질환 개선, 예방 또는 치료용 조성물

(57) 요약

본 발명은 락토바실러스 가세리(*Lactobacillus gasseri*) HHuMIN D 및 락티카제이바실러스 파라카제이(*Lactocaseibacillus paracasei*) OK 복합 균주를 포함하는 구강질환 개선, 예방 또는 치료용 조성물에 관한 것으로, 본 발명에 따른 복합 균주는 우수한 구강 유해균의 저해능을 가져, 구취, 충치 및 치주질환을 포함하는 구강질환의 개선, 예방 및 치료 효과가 탁월한 장점이 있다.

대표도 - 도2



(52) CPC특허분류

A61P 1/02 (2018.01)
A23V 2002/00 (2023.08)
A23V 2200/312 (2013.01)
A23V 2400/145 (2023.08)
A61K 2300/00 (2023.05)

(72) 발명자

문진석

충청북도 청주시 흥덕구 오송읍 오송생명7로 105,
307동 1304호

육경진

경기도 하남시 미사강변남로 91, 837호

이예림

서울특별시 구로구 오리로17길 77-15, 402호

심성록

경기도 하남시 미사강변동로 95, 1208동 1809호

최지혜

경기도 하남시 감일백제로 20, 303동 302호

이 발명을 지원한 국가연구개발사업

과제고유번호	1415182176
과제번호	PGW22003
부처명	산업통상자원부
과제관리(전문)기관명	한국산업단지공단
연구사업명	산업집적지경쟁력강화(R&D)
연구과제명	구강 마이크로바이옴 진단시스템 및 구강 건강 솔루션 제품 개발
과제수행기관명	(주)비피도
연구기간	2022.07.01 ~ 2024.06.30

명세서

청구범위

청구항 1

락토바실러스 가세리(*Lactobacillus gasseri*) HHuMIN D 균주 (KCCM 12724P) 및 락티카제이바실러스 파라카제이(*Lacticaseibacillus paracasei*) OK 균주 (KCCM 13365P)를 포함하는 구강질환 예방 또는 치료용 약학 조성물.

청구항 2

제1항에 있어서,

상기 조성물은,

락토바실러스 가세리(*Lactobacillus gasseri*) HHuMIN D 균주 (KCCM 12724P)의 생균, 사균 또는 이의 배양액 중 선택되는 어느 하나 및 락티카제이바실러스 파라카제이(*Lacticaseibacillus paracasei*) OK 균주 (KCCM 13365P)의 생균, 사균 또는 이의 배양액 중 선택되는 어느 하나의 조합을 함유하는 것인, 약학 조성물.

청구항 3

제1항에 있어서,

상기 구강질환은,

구취, 충치 및 치주질환 중 선택되는 어느 하나인, 약학 조성물.

청구항 4

제3항에 있어서,

상기 구취는,

푸조박테리움 뉴클레아툼(*Fusobacterium nucleatum*)에 의해 유발되는 것인, 약학 조성물.

청구항 5

제3항에 있어서,

상기 충치는,

스트렙토코커스 뮤탄스(*Streptococcus mutans*)에 의해 유발되는 것인, 약학 조성물.

청구항 6

제3항에 있어서,

상기 치주질환은,

푸조박테리움 뉴클레아툼(*Fusobacterium nucleatum*), 포르피로모나스 진지발리스(*Porphyromonas gingivalis*) 및 프리보텔라 인터미디아(*Prevotella intermedia*)로 구성된 군으로부터 선택되는 어느 하나에 의해 유발되는 것인, 약학 조성물.

청구항 7

락토바실러스 가세리(*Lactobacillus gasseri*) HHuMIN D 균주 (KCCM 12724P) 및 락티카제이바실러스 파라카제이(*Lacticaseibacillus paracasei*) OK 균주 (KCCM 13365P)를 포함하는 구강질환 개선용 식품 조성물.

청구항 8

제7항에 있어서,

상기 조성물은,

락토바실러스 가세리(*Lactobacillus gasseri*) HHuMIN D 균주 (KCCM 12724P)의 생균, 사균 또는 이의 배양액 중 선택되는 어느 하나 및 락티카제이바실러스 파라카제이(*Lacticaseibacillus paracasei*) OK 균주 (KCCM 13365P)의 생균, 사균 또는 이의 배양액 중 선택되는 어느 하나의 조합을 함유하는 것인, 식품 조성물.

청구항 9

락토바실러스 가세리(*Lactobacillus gasseri*) HHuMIN D 균주 (KCCM 12724P) 및 락티카제이바실러스 파라카제이(*Lacticaseibacillus paracasei*) OK 균주 (KCCM 13365P)를 포함하는 구취 억제용 조성물.

청구항 10

제9항에 있어서,

상기 조성물은,

락토바실러스 가세리(*Lactobacillus gasseri*) HHuMIN D 균주 (KCCM 12724P)의 생균, 사균 또는 이의 배양액 중 선택되는 어느 하나 및 락티카제이바실러스 파라카제이(*Lacticaseibacillus paracasei*) OK 균주 (KCCM 13365P)의 생균, 사균 또는 이의 배양액 중 선택되는 어느 하나의 조합을 함유하는 것인, 구취 억제용 조성물.

발명의 설명

기술 분야

[0001] 본 발명은 락토바실러스 가세리(*Lactobacillus gasseri*) HHuMIN D 및 락티카제이바실러스 파라카제이(*Lacticaseibacillus paracasei*) OK 복합 균주를 포함하는 구강질환 개선, 예방 또는 치료용 조성물에 관한 것이다.

배경 기술

[0003] 구취는 입을 통해 나오는 호기의 냄새 중 타인으로 하여금 불쾌감을 주는 냄새를 말한다. 구취가 사회활동을 하는데 부정적인 영향을 주고 건강을 반영하는 요소로 보고되면서 수년 전부터 구취에 대한 일반인들의 관심도가 점차 높아지고 있으며 이를 주요 불만(chief complaint)로 하여 치과에 내원하는 환자가 점차 증가하고 있다. 성인에서의 구취 유병률은 25~50%로 이 중 약 25%는 사회적인 기능에 영향을 미칠 정도의 만성적인 심한 구취를 가지고 있다.

[0004] 알려진 구취의 원인은 구강 내 원인과 구강 외 원인으로 구분할 수 있으며 이 중 구강 내 원인이 85~90%를 차지하는 것으로 알려졌다. 구강 내 원인으로 인한 구취는 치아나 타액의 성분 등과 같은 숙주 요인과 음식 잔유물 등이 세균에 의해 부패된 결과로 나타나게 된다. 그 원인으로는 타액분비 감소, 구내염, 치주질환, 부적절한 보철물, 혀 부위에 과도한 미생물 침착 등을 들 수 있으며, 자극성 음식 섭취나 흡연, 음주 그 밖에도 타액 점도의 증가, 수소이온농도 완충능력 감소, 구강 미생물의 양과 활동성 증가 및 혀의 배면에 부착된 실태와 치료되지 않은 치아우식증 및 치주질환과 같은 구강병, 구강암 등이 구취 발생을 유발하는 요인으로 작용된다. 구강 외 원인으로는 당뇨, 간질환, 신장질환, 위장질환과 같은 전신적 요인 외에도 상기도 감염과 같은 질환과 이비

인후과 영역은 축농증, 호흡기계의 폐질환, 소화기 질환과 심리적인 요인 등이 관여하는 것으로 알려졌다.

[0005] 한편, 구취문제가 일상적인 스트레스로 작용할 수 있고 분노, 우울불안, 강박증과 같은 증상이 나타날 뿐 아니라 정서적, 사회적 적응 문제에도 심각한 영향을 줄 수 있다고 알려졌다. 실제로 구취환자는 정상인들보다 강박증, 대인예민, 불안증, 적대감 등 정신적 손상이 더 큰 것으로 밝혀졌으며 구취를 느끼는 사람은 타인이 자신을 부정적으로 본다고 여겨 심리적 위축이나 사회적 회피를 경험하게 되며 자아상 및 신체 이미지 저하에도 악영향을 미칠 수 있다는 연구가 보고되었다.

[0006] 구취 증상을 관리하기 위한 방법은 여러가지가 있는데, 그 중 일반적으로 활용하는 것이 구강함수제이다. 구강함수제는 구취의 유발요인인 휘발성 황화합물(Volatile Sulfur Compounds, VSC)을 화학적으로 제거해주는 역할을 한다. 하지만 이는 대부분 화학적 합성물로 이루어져 장기간 사용 시 구강 조직을 손상시킬 우려가 있다. 다수의 환자들이 구취로 인해 고통받고 있다는 사실에 비해 현재 구취 증상을 개선할 만한 마땅한 치료법이 아직 마련되지 않았으며, 그마저도 일시적으로 냄새를 가리거나 줄이는 정도의 수준에 그치는 실정이다.

[0007] 따라서, 본 발명자는 예의 노력한 끝에 구취를 포함한 각종 구강 질환을 예방하기 위해 선택적 항균력이 우수하면서도 인체 및 환경 독성의 위험이 낮은 복합 균주를 발굴하고, 이의 우수한 구강질환 유발균 억제능 및 구강질환 억제 효능을 확인함으로써 본 발명을 완성하였다.

선행기술문헌

특허문헌

[0009] (특허문헌 0001) 한국 공개특허 제10-2014-0106988호 (2014.09.04.)에는, 김치로부터 분리한 향균치 활성을 갖는 락토바실러스 사케이 CBN U2567에 관하여 개시되어 있다.

(특허문헌 0002) 한국 등록특허 제10-1715163호 (2017.03.06.)에는, 솔잎 및 솔방울 추출물의 김치유산균 발효물을 포함하는 구취 제거용 식품 조성물 및 이의 제조방법에 관하여 개시되어 있다.

발명의 내용

해결하려는 과제

[0010] 본 발명의 목적은 락토바실러스 가세리(*Lactobacillus gasseri*) HHuMIN D (KCCM 12724P) 및 락티카제이바실러스 파라카제이(*Lacticaseibacillus paracasei*) OK (KCCM 13365P) 복합 균주의 구강질환 개선, 예방 또는 치료 용도를 제공하는 것에 있다.

과제의 해결 수단

[0012] 본 발명은 락토바실러스 가세리(*Lactobacillus gasseri*) HHuMIN D 균주 (KCCM 12724P) 및 락티카제이바실러스 파라카제이(*Lacticaseibacillus paracasei*) OK 균주 (KCCM 13365P)를 포함하는 구강질환 예방 또는 치료용 약학 조성물을 제공한다.

[0013] 이때, 상기 조성물은, 바람직하게는 락토바실러스 가세리(*Lactobacillus gasseri*) HHuMIN D 균주 (KCCM 12724P)의 생균, 사균 또는 이의 배양액 중 선택되는 어느 하나 및 락티카제이바실러스 파라카제이(*Lacticaseibacillus paracasei*) OK 균주 (KCCM 13365P)의 생균, 사균 또는 이의 배양액 중 선택되는 어느 하나의 조합을 함유하는 것이다.

[0014] 본 발명에 따른 조성물에 있어, 상기 구강질환은, 일 예로 구취, 충치 및 치주질환 중 선택되는 어느 하나일 수 있다.

[0015] 이때, 상기 구취는 바람직하게는 푸조박테리움 뉴클레아툼(*Fusobacterium nucleatum*)에 의해 유발되는 것이고, 상기 충치는 바람직하게는 스트렙토코커스 뮤탄스(*Streptococcus mutans*)에 의해 유발되는 것이며, 상기 치주질환은 바람직하게는 푸조박테리움 뉴클레아툼(*Fusobacterium nucleatum*), 포르피로모나스 진지발리스(*Porphyromonas gingivalis*) 및 프리보텔라 인터미디아(*Prevotella intermedia*)로 구성된 군으로부터 선택되는 어느 하나에 의해 유발되는 것이다.

[0016] 한편, 본 발명은 락토바실러스 가세리(*Lactobacillus gasseri*) HHuMIN D 균주 (KCCM 12724P) 및 락티카제이바

실러스 파라카제이(*Lactocaseibacillus paracasei*) OK 균주 (KCCM 13365P)를 포함하는 구강질환 개선용 식품 조성물을 제공한다.

[0017] 이때, 상기 조성물은, 바람직하게는 락토바실러스 가세리(*Lactobacillus gasseri*) HHuMIN D 균주 (KCCM 12724P)의 생균, 사균 또는 이의 배양액 중 선택되는 어느 하나 및 락티카제이바실러스 파라카제이(*Lactocaseibacillus paracasei*) OK 균주 (KCCM 13365P)의 생균, 사균 또는 이의 배양액 중 선택되는 어느 하나의 조합을 함유하는 것이다.

[0018] 한편, 본 발명은 락토바실러스 가세리(*Lactobacillus gasseri*) HHuMIN D 균주 (KCCM 12724P) 및 락티카제이바실러스 파라카제이(*Lactocaseibacillus paracasei*) OK 균주 (KCCM 13365P)를 포함하는 구취 억제용 조성물을 제공한다.

[0019] 이때, 상기 조성물은, 바람직하게는 락토바실러스 가세리(*Lactobacillus gasseri*) HHuMIN D 균주 (KCCM 12724P)의 생균, 사균 또는 이의 배양액 중 선택되는 어느 하나 및 락티카제이바실러스 파라카제이(*Lactocaseibacillus paracasei*) OK 균주 (KCCM 13365P)의 생균, 사균 또는 이의 배양액 중 선택되는 어느 하나의 조합을 함유하는 것이다.

발명의 효과

[0021] 본 발명에 따른 복합 균주는 우수한 구강 유해균의 저해능을 가져, 구취, 충치 및 치주질환을 포함하는 구강질환의 개선, 예방 및 치료 효과가 탁월한 장점이 있다.

도면의 간단한 설명

[0023] 도 1은 본 발명의 균주 락티카제이바실러스 파라카제이(*Lactocaseibacillus paracasei*) OK (KCCM 13365P)의 16S rRNA 염기서열에 대한 계보학(genealogy) 결과이다.

도 2는 락토바실러스 가세리(*L. gasseri*) HHuMIN D 및 락티카제이바실러스 파라카제이(*L. Paracasei*) OK 균주 단일 처리 및 균주 복합물 처리에 따른 구강 상피세포에 부착되는 구강 유해균 수를 측정한 결과이다.

도 3은 락토바실러스 가세리(*L. gasseri*) HHuMIN D 및 락티카제이바실러스 파라카제이(*L. Paracasei*) OK 균주 단일 처리 및 균주 복합물 처리에 따른 *P. gingivalis* 균주의 구취 유발원인 *mgl* 유전자 발현 저해 정도를 평가한 결과이다.

도 4는 인체적용시험 방법에 관한 모식도이다.

도 5는 본 발명에 따른 균주 복합물 투여에 따른 H_2S 변화량(PP set)을 확인한 결과이다.

도 6은 본 발명에 따른 균주 복합물 투여에 따른 H_2S 변화량(FA set)을 확인한 결과이다.

도 7은 본 발명에 따른 균주 복합물 투여에 따른 CH_3SH 변화량(PP set)을 확인한 결과이다.

도 8은 본 발명에 따른 균주 복합물 투여에 따른 CH_3SH 변화량(FA set)을 확인한 결과이다.

도 9는 본 발명에 따른 균주 복합물 투여에 따른 $(CH_3)_2S$ 변화량(PP set)을 확인한 결과이다.

도 10은 본 발명에 따른 균주 복합물 투여에 따른 $(CH_3)_2S$ 변화량(FA set)을 확인한 결과이다.

도 11은 본 발명에 따른 균주 복합물 투여에 따른 $H_2S+CH_3SH+(CH_3)_2S$ 변화량(PP set)을 확인한 결과이다.

도 12는 본 발명에 따른 균주 복합물 투여에 따른 $H_2S+CH_3SH+(CH_3)_2S$ 변화량(FA set)을 확인한 결과이다.

도 13은 본 발명에 따른 균주 복합물 투여에 따른 TPI (Tongue Plaque Index) 변화량(PP set)을 확인한 결과이다.

도 14는 본 발명에 따른 균주 복합물 투여에 따른 TPI (Tongue Plaque Index) 변화량(FA set)을 확인한 결과이다.

도 15는 본 발명에 따른 균주 복합물 투여에 따른 GI (Gingival Index) 변화량(PP set)을 확인한 결과이다.

도 16은 본 발명에 따른 군주 복합물 투여에 따른 GI (Gingival Index) 변화량(FA set)을 확인한 결과이다.

도 17은 본 발명에 따른 군주 복합물 투여에 따른 PI (Plaque Index) 변화량(PP set)을 확인한 결과이다.

도 18은 본 발명에 따른 군주 복합물 투여에 따른 PI (Plaque Index) 변화량(FA set)을 확인한 결과이다.

도 19는 본 발명에 따른 군주 복합물 투여에 따른 PHP (Patient Hygiene Performance) Index 변화량(PP set)을 확인한 결과이다.

도 20은 본 발명에 따른 군주 복합물 투여에 따른 PHP (Patient Hygiene Performance) Index 변화량(FA set)을 확인한 결과이다.

도 21은 본 발명에 따른 군주 복합물 투여에 따른 *P. gingivalis* 변화량(PP set)을 확인한 결과이다.

도 22는 본 발명에 따른 군주 복합물 투여에 따른 *P. gingivalis* 변화량(FA set)을 확인한 결과이다.

도 23은 본 발명에 따른 군주 복합물 투여에 따른 *P. intermedia* 변화량(PP set)을 확인한 결과이다.

도 24는 본 발명에 따른 군주 복합물 투여에 따른 *P. intermedia* 변화량(FA set)을 확인한 결과이다.

도 25는 본 발명에 따른 군주 복합물 투여에 따른 *F. nucleatum* 변화량(PP set)을 확인한 결과이다.

도 26은 본 발명에 따른 군주 복합물 투여에 따른 *F. nucleatum* 변화량(FA set)을 확인한 결과이다.

도 27은 본 발명에 따른 군주 복합물 투여에 따른 *S. mutans* 변화량(PP set)을 확인한 결과이다.

도 28은 본 발명에 따른 군주 복합물 투여에 따른 *S. mutans* 변화량(FA set)을 확인한 결과이다.

도 29는 본 발명에 따른 군주 복합물 투여에 따른 구취 관능평가 결과(PP set)를 확인한 결과이다.

도 30은 본 발명에 따른 군주 복합물 투여에 따른 구취 관능평가 결과(FA set)를 확인한 결과이다.

발명을 실시하기 위한 구체적인 내용

- [0024] 하기에서는 중복되는 내용의 혼잡을 방지하기 위하여, 중복되는 내용의 기재를 생략하고자 하였다. 즉, 하기의 내용만으로 발명의 내용이 한정되는 것은 아니고, 전체적인 발명의 내용에 따라 발명의 내용이 해석되어야 할 것이다.
- [0026] 본 발명의 일 구현예에서는 락토바실러스 가세리(*Lactobacillus gasseri*) HHuMIN D 균주 (KCCM 12724P) 및 락티카제이바실러스 파라카제이(*Lactocaseibacillus paracasei*) OK 균주 (KCCM 13365P) 복합물이 구강질환 유해균의 우수한 억제활성을 가지며, 구취가 있는 자를 대상으로 수행한 인체적용시험에서 우수한 구취 유발 유해균의 항균활성, 구취개선 효과 및 안정성을 확인하였다.
- [0027] 본 발명에 따른 락토바실러스 가세리(*Lactobacillus gasseri*) HHuMIN D 균주 (KCCM 12724P)는 한국등록특허 제 10-2198553호 (2020.12.29.)에 개시된 균주이다.
- [0028] 본 발명에 따른 락티카제이바실러스 파라카제이(*Lactocaseibacillus paracasei*) OK 균주는 인체 분변 유래의 유산균 소재로, 한국미생물보존센터(KCCM)에 기탁하여 2023년 06월 30일자로 수탁번호 KCCM 13365P를 부여받았다.
- [0030] 이에, 본 발명의 하나의 양태는 락토바실러스 가세리(*Lactobacillus gasseri*) HHuMIN D 균주 (KCCM 12724P) 및 락티카제이바실러스 파라카제이(*Lactocaseibacillus paracasei*) OK 균주 (KCCM 13365P)를 포함하는 구강질환 예방 또는 치료용 약학 조성물을 제공하는 것이다.
- [0031] 이때, 상기 조성물은, 바람직하게는 락토바실러스 가세리(*Lactobacillus gasseri*) HHuMIN D 균주 (KCCM 12724P)의 생균, 사균 또는 이의 배양액 중 선택되는 어느 하나 및 락티카제이바실러스 파라카제이(*Lactocaseibacillus paracasei*) OK 균주 (KCCM 13365P)의 생균, 사균 또는 이의 배양액 중 선택되는 어느 하나의 조합을 함유하는 것이다.
- [0032] 본 발명에 따른 조성물에 있어, 상기 구강질환은, 일 예로 구취, 충치 및 치주질환 중 선택되는 어느 하나일 수 있다.
- [0033] 이때, 상기 구취는 바람직하게는 푸조박테리움 뉴클레아툼(*Fusobacterium nucleatum*)에 의해 유발되는 것이고, 상기 충치는 바람직하게는 스트렙토코커스 뮤탄스(*Streptococcus mutans*)에 의해 유발되는 것이며, 상기 치주질환은 바람직하게는 푸조박테리움 뉴클레아툼(*Fusobacterium nucleatum*), 포르피로모나스 진지발리스

(*Porphyromonas gingivalis*) 및 프리보텔라 인터미디아(*Prevotella intermedia*)로 구성된 군으로부터 선택되는 어느 하나에 의해 유발되는 것이다.

- [0034] 본 발명의 일 실시예에서는 본 발명에 따른 군주 복합물이 상기 예시한 구강 유해균의 성장 저해 및 이들 구강 유해균의 구강상피세포로의 부착 억제 효능이 우수함을 확인하였다. 또한, 인체적용시험을 통해 본 발명에 따른 군주 복합물의 우수한 구취 개선 효능을 확인하였다.
- [0035] 상기 푸조박테리움 뉴클레아툼(*Fusobacterium nucleatum*)은 황화수소나 메틸 머캡탄을 생성하는 주요 혐기성 세균으로 구강에 정상적으로 존재하면서 치주염을 일으키며 휘발성 유황화합물을 생성하여 구취를 발생하는 그람 음성세균이다.
- [0036] 상기 스트렙토코커스 뮤탄스(*Streptococcus mutans*)는 18~40℃에서 성장하는 중온성(mesophilic) 세균으로, 입 안에서 당류를 발효시켜 산을 생성하는 세균이다. 구강뿐만 아니라 인두(pharynx) 및 장에서도 서식한다. 애나멜에 부착하거나 산성의 부산물을 생성하는 능력 때문에 충치 형성에 중요한 역할을 한다. 스트렙토코커스 뮤탄스는 당분을 분해하여 에너지를 얻고, 이로 인해 젖산이 생성되어 산성 환경이 조성되기 때문에 치아 표면에서 염분을 제거하고, 이러한 작용에 의해 칼슘을 녹여 치아 충치를 유발한다.
- [0037] 상기 포르피로모나스 진지발리스(*Porphyromonas gingivalis*)는 사람의 주요 구강 미생물상(microbiota)의 일부분으로, 그람음성균이며 절대 혐기성이다. 치주 포켓이나 이와 잇몸 사이의 홈에 서식하며, 구강에서 주로 발견되어 치주질환과 관련이 있는 것으로 알려졌다지만, 이외 상부위장관, 기도, 큰창자 등에서도 발견되고, 여성의 세균성 질염과도 관련이 있다. 사람에서 포르피로모나스 진지발리스는 구강의 치근단(subgingiva)과 가장 관련이 있는데, 치태(dental plaque)가 되는 생체막(biofilm)의 일부를 형성한다. 이는 치주질환에서 고통스러운 염증을 유발한다. 이러한 구강 질환은 전 세계적으로 성인의 10~15%가 앓는다고 알려졌다.
- [0038] 상기 프리보텔라 인터미디아(*Prevotella intermedia*)는 치은염 및 치주염을 포함한 치주 감염에 관여하는 그람 음성의 의무 혐기성 병원성 세균이며, 급성 괴사성 궤양성 치은염에서 종종 발견된다. 잇몸병의 주요 원인균으로 알려졌다으며, 단백질 분해 효소를 포함한 여러 효소를 생성하여 주위 유기물을 분해함에 따라 생명활동을 이어간다. 상기 유기물이 잇몸을 이루는 콜라겐일 경우 잇몸병이 발병하는 것이다.
- [0039] 본 발명에서 사용되는 용어, "예방"이란 본 발명에 따른 약학적 조성물의 투여에 의해 구강질환을 억제하거나 발병을 지연시키는 모든 행위를 의미한다.
- [0040] 본 발명에서 사용되는 용어, "치료"란 본 발명에 따른 약학적 조성물의 투여에 의해 구강질환에 의한 증세가 호전되거나 이롭게 변경되는 모든 행위를 의미한다.
- [0041] 본 발명의 군주는 상기 성분에 추가로 동일 또는 유사한 기능을 나타내는 유효성분을 1종 이상 함유할 수 있다.
- [0042] 본 발명의 약학적 조성물은 본 발명에 따른 군주 이외에 약학적으로 허용 가능한 담체를 추가로 포함할 수 있다.
- [0043] 본 발명에서 사용될 수 있는 담체의 종류는 특별히 제한되지 아니하며 당해 기술 분야에서 통상적으로 사용되는 담체라면 어느 것이든 사용할 수 있다. 상기 담체의 비제한적인 예로는, 락토오스, 텍스트로오스, 수크로오스, 솔비톨, 만니톨, 식염수, 멸균수, 링거액, 완충 식염수, 알부민 주사 용액, 자일리톨, 에리스리톨, 말티톨, 말토덱스트린, 글리세롤, 에탄올 등을 들 수 있다. 이들은 단독으로 사용되거나 2종 이상을 혼합하여 사용될 수 있다.
- [0044] 또한, 본 발명의 약학적 조성물은 필요한 경우, 항산화제, 부형제, 희석제, 완충액 또는 정균제 등 기타 약학적으로 허용 가능한 첨가제들을 첨가하여 사용할 수 있으며, 계면 활성제, 결합제, 충전제, 증량제, 습윤제, 붕해제, 분산제 또는 윤활제 등을 부가적으로 첨가하여 사용할 수 있다.
- [0045] 본 발명의 약학적 조성물에 있어서, 본 발명에 따른 군주는 약학적 조성물의 전체의 중량을 기준으로 0.00001중량% 내지 99.99중량%로 포함될 수 있으며, 바람직하게는 0.1중량% 내지 90중량%, 보다 바람직하게는 0.1중량% 내지 70중량%, 더욱 바람직하게는 0.1중량% 내지 50중량%로 포함될 수 있으나, 이에 한정되지 않으며 투여 대상의 상태, 구체적인 병증의 종류, 진행 정도 등에 따라 다양하게 변경될 수 있다. 필요한 경우, 약학적 조성물의 전체 함량으로도 포함될 수 있다.
- [0046] 즉, 본 발명의 약학적 조성물의 약학적 유효량, 유효 투여량은 약학적 조성물의 제제화 방법, 투여 방식, 투여 시간 및/또는 투여 경로 등에 의해 다양해질 수 있으며, 약학적 조성물의 투여로 달성하고자 하는 반응의 종류

와 정도, 투여 대상이 되는 개체의 종류, 연령, 체중, 일반적인 건강 상태, 질병의 증세나 정도, 성별, 식이, 배설, 해당 개체에 동시 또는 이시에 함께 사용되는 약물 기타 조성물의 성분 등을 비롯한 여러 인자 및 의약 분야에서 잘 알려진 유사 인자에 따라 다양해질 수 있으며, 당해 기술 분야에서 통상의 지식을 가진 자는 목적하는 치료에 효과적인 투여량을 용이하게 결정하고 처방할 수 있다. 예를 들어, 본 발명의 약학적 조성물의 일일 투여량은 약 0.01 내지 1,000mg/kg이고, 바람직하게는 0.1 내지 100mg/kg이며, 하루 일회 내지 수회에 나누어 투여할 수 있다.

[0047] 본 발명의 약학적 조성물의 투여는 하루에 1회 투여될 수 있고, 수 회에 나누어 투여될 수도 있다. 본 발명의 약학적 조성물은 개별 치료제로 투여하거나 다른 치료제와 병용하여 투여될 수 있고 종래의 치료제와는 순차적 또는 동시에 투여될 수 있다. 상기 요소를 모두 고려하여 부작용 없이 최소한의 양으로 최대 효과를 얻을 수 있는 양으로 투여할 수 있으며, 이는 당업자에 의해 용이하게 결정될 수 있다.

[0048] 본 발명의 약학적 조성물은 상기한 질환을 예방 또는 치료하기 위하여 추가적으로 호르몬 치료, 약물치료 등의 다양한 방법들과 병용하여 사용될 수 있다.

[0049] 본 발명에서 사용된 용어, "투여"는 어떠한 적절한 방법으로 환자에게 본 발명의 약학적 조성물을 도입하는 것을 의미하며, 본 발명의 약학적 조성물의 투여 경로 및 투여 방식은 각각 독립적일 수 있으며, 목적하는 해당 부위에 상기 약학적 조성물이 도달할 수 있는 한, 특별한 제한 없이 임의의 투여 경로 및 투여 방식에 따를 수 있다.

[0050] 상기 약학적 조성물은 경구 투여 또는 비경구 투여 방식으로 투여할 수 있으며, 경구 투여 또는 비경구 투여를 위한 적합하고 다양한 제형으로 제제화되어 사용될 수 있다. 바람직하게 상기 약학적 조성물은 치약, 구강 세정제, 구강용 스프레이, 구강용 연고제 중에서 선택되는 하나 이상의 제형을 가지도록 제제화할 수 있으나, 이에 제한되지 않는다.

[0051] 본 발명의 약학적 조성물을 이용한 경구 투여용 제제의 비제한적인 예로는, 유성 현탁액, 트로키제(troches), 로젠지(lozenge), 정제, 수용성 현탁액, 조제 분말, 과립, 에멀전, 하드 캡슐, 소프트 캡슐, 시럽 또는 엘릭시르제 등을 들 수 있다.

[0052] 본 발명의 약학적 조성물을 경구 투여용으로 제제화하기 위하여, 솔비톨, 만니톨, 전분, 아밀로펙틴, 셀룰로오스 락토오스, 사카로오스 또는 젤라틴 등과 같은 결합제; 스테아르산 마그네슘, 스테아르산 칼슘, 스테아릴 푸마르산 나트륨 또는 폴리에틸렌 글리콜 왁스 등과 같은 윤활유; 디칼슘 포스페이트 등과 같은 부형제; 옥수수 전분 또는 고구마 전분 등과 같은 붕해제 등을 사용할 수 있으며, 방향제, 시럽제, 감미제 등도 사용할 수 있다. 나아가 캡슐제의 경우에는 상기 언급한 물질 외에도 지방유와 같은 액체 담체 등을 추가로 사용할 수 있다.

[0053] 본 발명의 약학적 조성물의 비경구 투여 방법으로는, 질환 부위로의 근육 내 투여, 경피 투여 또는 피하 투여 등을 이용할 수 있으며, 상기 조성물을 질환 부위에 도포하거나 분무하는 방법 또한 이용할 수 있으나 이에 제한되지 않는다.

[0054] 본 발명의 약학적 조성물을 이용한 비경구용 제제의 비제한적인 예로는, 주사액, 연고, 도포용 파우더, 오일, 스프레이용 에어로졸제, 크림 등을 들 수 있다.

[0055] 본 발명의 약학적 조성물을 비경구 투여용으로 제제화하기 위하여, 멸균된 수용액, 비수성용제, 현탁제, 유제, 동결 건조 제제, 외용제 등을 사용할 수 있으며, 상기 비수성용제, 현탁제로는 올리브 오일과 같은 식물성 기름, 프로필렌글리콜, 폴리에틸렌글리콜, 에틸올레이트와 같은 주사 가능한 에스테르 등이 사용될 수 있다.

[0056] 본 발명의 약학적 조성물을 주사액으로 제제화하는 경우, 본 발명의 약학적 조성물을 안정제 또는 완충제와 함께 물에서 혼합하여 용액 또는 현탁액으로 제조하고 이를 앰플(ampoule) 또는 바이알(vial)의 단위 투여용으로 제제화할 수 있다.

[0057] 본 발명의 약학적 조성물을 에어로졸제로 제제화하는 경우, 수분산된 농축물 또는 습윤 분말이 분산되도록 추진제 등이 첨가제와 함께 배합할 수 있다.

[0058] 본 발명의 약학적 조성물을 연고, 오일, 크림, 도포용 파우더, 피부 외용제 등으로 제제화하는 경우에는, 동물성 유, 식물성 유, 왁스, 파라핀, 폴리에틸렌 글리콜, 실리콘, 벤토나이트, 실리카, 탈크, 전분, 트라칸트, 셀룰로오스 유도체, 산화 아연 등을 담체로 사용하여 제제화할 수 있다.

- [0060] 본 발명의 또 다른 양태는 락토바실러스 가세리(*Lactobacillus gasseri*) HHuMIN D 균주 (KCCM 12724P) 및 락티카제이바실러스 파라카제이(*Lacticaseibacillus paracasei*) OK 균주 (KCCM 13365P)를 포함하는 구강질환 개선용 식품 조성물을 제공하는 것이다.
- [0061] 이때, 상기 조성물은, 바람직하게는 락토바실러스 가세리(*Lactobacillus gasseri*) HHuMIN D 균주 (KCCM 12724P)의 생균, 사균 또는 이의 배양액 중 선택되는 어느 하나 및 락티카제이바실러스 파라카제이(*Lacticaseibacillus paracasei*) OK 균주 (KCCM 13365P)의 생균, 사균 또는 이의 배양액 중 선택되는 어느 하나의 조합을 함유하는 것이다.
- [0062] 본 발명의 일 실시예에서는 본 발명에 따른 균주 복합물이 상기 예시한 구강 유해균의 성장 저해 및 이들 구강 유해균의 구강상피세포로의 부착 억제 효능이 우수함을 확인하였다. 또한, 인체적용시험을 통해 본 발명에 따른 균주 복합물의 우수한 구취 개선 효능을 확인하였다.
- [0063] 본 발명의 식품 조성물에 있어, 균주의 함량은 특별히 제한되지 않으며, 투여 대상의 상태, 구체적인 병증의 종류, 진행 정도 등에 따라 다양하게 변경될 수 있다. 필요한 경우, 식품의 전체 함량으로도 포함될 수 있다.
- [0064] 본 발명의 식품 조성물은 일 예로, 면류, 껌류, 유제품류, 아이스크림류, 육류, 곡류, 카페인 음료, 일반음료, 초콜릿, 빵류, 스낵류, 과자류, 사탕, 피자, 젤리, 알코올성 음료, 술, 비타민 복합제 및 그 밖의 건강보조식품류 중 선택되는 어느 하나일 수 있다. 바람직한 예시로는 껌, 캔디, 정제 중에서 선택되는 어느 하나 이상의 제형을 가지는 것이 좋으나, 반드시 이에 한정되는 것은 아니다.
- [0065] 본 발명의 식품 조성물이 식품 첨가물의 형태로 사용될 경우, 이를 그대로 첨가하거나 다른 식품 또는 식품 성분과 함께 사용될 수 있고, 통상적인 방법에 따라 적절하게 사용될 수 있다.
- [0066] 또한, 본 발명의 "식품 조성물"은 건강기능식품을 포함하는 의미를 포괄하는데, 상기 "건강기능식품"이라 함은 건강기능식품에 관한 법률 제6727호에 따른 인체에 유용한 기능성을 가진 원료나 성분을 사용하여 제조 및 가공한 식품을 의미하며, "기능성"이라 함은 인체의 구조 및 기능에 대하여 영양소를 조절하거나 생리학적 작용 등과 같은 보건 용도에 유용한 효과를 얻을 목적으로 섭취하는 것을 의미한다.
- [0068] 한편, 본 발명은 락토바실러스 가세리(*Lactobacillus gasseri*) HHuMIN D 균주 (KCCM 12724P) 및 락티카제이바실러스 파라카제이(*Lacticaseibacillus paracasei*) OK 균주 (KCCM 13365P)를 포함하는 구취 억제용 조성물을 제공한다.
- [0069] 이때, 상기 조성물은, 바람직하게는 락토바실러스 가세리(*Lactobacillus gasseri*) HHuMIN D 균주 (KCCM 12724P)의 생균, 사균 또는 이의 배양액 중 선택되는 어느 하나 및 락티카제이바실러스 파라카제이(*Lacticaseibacillus paracasei*) OK 균주 (KCCM 13365P)의 생균, 사균 또는 이의 배양액 중 선택되는 어느 하나의 조합을 함유하는 것이다.
- [0070] 본 발명에 있어, 상기 구취 억제용 조성물은, 바람직하게는 치약, 구강 청정제 또는 구강 세정제로 제형화될 수 있으나, 사용방법에 따라 바람직한 제형이라면 그 제형에 제한을 두지 않는다.
- [0071] 일 예로 상기 구강 조성물이 치약으로 제형화되는 경우, 연마제, 습윤제, 기포제, 점증제, 보존제, 감미제, 향료, 기타 첨가물 등을 함유할 수 있다.
- [0072] 상기 연마제는 치아에 부착된 치구, 치석 따위를 제거하기 위한 성분으로서, 콜로이드성이산화규소, 인산일수소칼슘, 탄산칼슘, 수산화알루미늄, 침강실리카, 합수규산 등을 사용할 수 있다.
- [0073] 상기 습윤제는 치약 조성물 내의 물의 증발을 억제하여 상이 공기 중에 노출될 때에 고화되는 것을 방지하기 위한 성분으로서, 글리세린, 소르비톨액, 비결성 소르비톨액, 폴리에틸렌글리콜, 프로필렌글리콜 등 다가 알코올 중에서 1종 내지 2종 이상을 선정하여 사용할 수 있다.
- [0074] 상기 기포제는 치약 조성물 내의 수용성 성분과 유용성 성분과의 유화 및 구강 내에서의 세정 효과를 갖는 성분으로서, 라우릴황산나트륨, N-라우로일살코실산나트륨, N-장쇄아실글루탐산염, 자당지방산에스테르, 폴리옥시에틸렌경화피마자유, 소르비탄 지방산에스테르, 폴리옥시에틸렌폴리옥시프로필렌코폴리머 등의 음이온 및 비이온 계면활성제를 단독 또는 2종 이상 혼합하여 사용할 수 있다.
- [0075] 상기 점증제는 치약 조성물 내의 물에 불용성인 무기분말성분과 액상성분을 결합시켜 시간에 따른 상분리를 방지하며, 조성물에 점성을 부여하는 성분으로서, 카르복시메틸셀룰로오스나트륨, 카라기난, 잔탄검, 폴리비닐 피

몰리돈, 알긴산나트륨, 기타 검류 등을 사용할 수 있다.

- [0076] 상기 보존제는 치약 조성물의 보존 기간을 연장하기 위한 성분으로, 파라옥시안식향산에스테르, 안식향산, 안식향산나트륨 등을 사용할 수 있다.
- [0077] 상기 감미제 및 향료는 양치시 맛을 좋게 하고 양치 후 뒷맛을 상쾌하게 하기 위한 성분으로서, 감미제로는 사카린나트륨, 아스파탐, 스테비오사이드, 감초산 등을 사용할 수 있고, 향료로는 페퍼민트, 스페아민트오일, 멘톨, 카르본, 아네톨, 오이게놀 등을 혼합하여 사용할 수 있다.
- [0078] 기타 첨가제로서 이산화티탄 등의 증백제, 청색 1호와 같은 식용색소를 착색제로 사용할 수 있다.
- [0079] 일 예로 상기 구강 조성물이 구강 청정제로 제형화되는 경우, 습윤제, 감미제, 기포제 및 가용화제, 수렴제, 보존제, 착색제, 향료, 용제 등을 함유할 수 있다.
- [0080] 상기 구강 청정제의 성분들은 수렴제로 염화아연을, 용제로 에탄올, 정제수를 사용할 수 있다는 것을 제외하고는 상기 치약 조성물에서의 각각의 성분들과 동일한 성분을 사용할 수 있다.
- [0081] 일 예로 상기 구강 조성물이 구강 세정제로 제형화되는 경우, 발포제, 습기 제거제, 기포제, 결합제, 활택제, 향료, 용제 등을 함유할 수 있다.
- [0082] 상기 발포제는 구강세정을 위한 성분으로서, 탄산수소나트륨, 탄산수소암모늄, 탄산수소칼륨 및 탄산철로 이루어진 군에서 선택된 1종 이상을 사용할 수 있다.
- [0083] 상기 습기제거제는 구강 세정제를 무수물 형태의 정제로 제형화하기 위한 성분으로, 탄산나트륨을 사용할 수 있다.
- [0084] 상기 결합제로는 수용성 고분자를 사용할 수 있으며, 바람직하게는 카르복실셀룰로오스 또는 폴리비닐 피롤리돈을 사용할 수 있다.
- [0085] 상기 활택제로는 스테아린산마그네슘, 스테아린산, 스테아릴알콜, 자당지방산에스테르, 탈크, 경질무수규산 및 안식향산나트륨으로 이루어진 군으로부터 선택되는 것을 사용할 수 있으며, 바람직하게는 안식향산나트륨을 사용할 수 있다.
- [0087] 이하, 본 발명의 내용을 하기 실시예 또는 실험예를 통해 더욱 상세히 설명하고자 한다. 다만, 본 발명의 권리범위가 하기 실시예 또는 실험예에만 한정되는 것은 아니고, 그와 등가의 기술적 사상의 변형까지도 포함한다.
- [0089] **[실시예 1: 락티카제이바실러스 파라카제이(*Lacticaseibacillus paracasei*) OK 균주의 동정]**
- [0090] 인간 분변 유래 균주인 락티카제이바실러스 파라카제이(*Lacticaseibacillus paracasei*) OK(이하, 'LP OK'라 함) 균주를 유전적으로 동정(genetic Identification)하기 위하여, 16S rRNA의 시퀀싱(sequencing)을 진행한 후 해당 염기서열(base sequence)을 기초로 하여 Molecular Phylogenetic Status를 병행하였다(도 1). 도 1은 본 발명의 균주 락티카제이바실러스 파라카제이(*Lacticaseibacillus paracasei*) OK (KCCM 13365P)의 16S rRNA 염기서열에 대한 계보학(genealogy) 결과이다.
- [0091] 'LP OK' 균주의 16S rRNA base sequence를 GeneBank에 등재된 락티카제이바실러스 속(*Lacticaseibacillus* s p.)의 16S rRNA sequence와 다중 정렬(multiple alignment)하여 유사매트릭스(similarity matrix)를 구하고 계보학(genealogy)을 작성한 결과, 16S rRNA 상동성(homology)의 범위는 모두 100%로 나타났다.
- [0092] 즉, 'LP OK' 균주는 락티카제이바실러스(*Lacticaseibacillus paracasei*)와 100%의 높은 상동성을 보였다.
- [0093] 이에 따라, 본 발명의 락티카제이바실러스 파라카제이(*Lacticaseibacillus paracasei*) OK 균주를 한국미생물보존센터(KCCM)에 2023년 6월 30일자로 기탁하여 수탁번호 KCCM 13365P를 부여받았다.
- [0095] **[실시예 2: 락토바실러스 가세리(*L. gasseri*) HHuMIN D 및 락티카제이바실러스 파라카제이(*L. Paracasei*) OK 균주 복합물의 구강질환 개선 효능 평가]**
- [0096] **1. 구강상피세포에서의 구강 유해균 부착 억제 효능 평가**
- [0097] 락토바실러스 가세리 HHuMIN D 균주 및 락티카제이바실러스 파라카제이 OK 균주 각각을 최적 생장 배지에서 배양하였다. 이후, 4,000 rpm에서 10분 동안 원심분리하여 얻은 펠렛을 RPMI 1640으로 1.0×10^8 CFU/ml 농도로 희석하여 희석액을 제조하였다.

- [0098] 상기 락토바실러스 가세리 HHuMIN D 균주 희석액 및 락티카제이바실러스 파라카제이 OK 균주 희석액을 동량 부피비로 혼합하여 균주 복합물을 제조하였다.
- [0099] 한편, KB cell(human mouth epithelial cells; Korean Cell Line Bank 10017)을 5% CO₂, 37℃에서 RPMI 1640 with 300 mg/L L-glutamine, 10 % fetal bovine serum, 100 µg/ml streptomycin and 100 U/ml penicillin에서 배양하였다.
- [0100] 이후, 24웰 플레이트(SPL Life Sciences Co., Ltd. Pocheon, Korea)에 KB cell을 3.0 X 10⁵ cells/well로 가한 뒤, 5% CO₂, 37℃에서 세포 단층이 형성될 때까지 배양하였다. 그 후, *L. gasseri* HHuMIN D, *L. paracasei* OK, 구강유해균 배양액 각각을 4,000 rpm에서 10분 동안 원심분리하여 얻은 펠렛을 RPMI 1640으로 1.0 X 10⁸ CFU/ml 농도로 희석하였다. 부착 억제 테스트를 위해 *L. gasseri* HHuMIN D 희석액 또는/및 LP OK 균주 희석액과 구강유해균 희석액 (1.0 X 10⁸ CFU/ml)을 동량 혼합한 후, 각 웰의 상등액을 제거한 세포 단층에 2 ml씩 가하였다.
- [0101] 부착을 위해 플레이트를 5% CO₂, 37℃에서 1시간 동안 배양하였다. 이후, 각 웰의 상등액을 제거하고 PBS로 2회 세척한 뒤, 200 µl trypsin-EDTA(Welgene, Daegu, Korea)를 5분 동안 처리하여 세포 및 부착된 박테리아를 수집하였다. 각 KB cell에 부착된 박테리아의 수는 real-time PCR 방법을 이용하여 계산하였다.
- [0102] 구체적으로, 수확된 펠렛에서 부착된 박테리아의 genomic DNA를 추출하기 위해 MagMax Microbiome Ultra Nucleic Acid Isolation Kit (Thermo Fisher Scientific, St. Peters, MO, USA)를 사용하였다. 박테리아의 수를 정량하기 위해 동일한 방법으로 1.0 X 10⁸ CFU의 박테리아의 genomic DNA를 추출하여 연속희석법으로 희석하여 표준곡선을 제작하였다.
- [0103] 한편, 양성대조군으로서 KB cell 세포 단층에 구강유해균 희석액(1.0 X 10⁸ CFU/ml) 2 ml를 가해준 것을 제외하고는 상기와 동일한 방법으로 시험하였다. 부착 억제 효과는 양성대조군에 대한 실험군의 비로 확인하였고, 단일 균주 처리 결과를 하기 표 1, 균주 복합물(복합 균주) 처리 결과를 하기 표 2에 나타내었다.

표 1

Strains	Experimental Groups	Number of bacteria (Total cells)	Inhibitory rate(%)
<i>S. mutans</i>	<i>S. mutans</i> KCTC 3065	799563 ± 95307	
	<i>S. mutans</i> KCTC 3065+ <i>L. paracasei</i> OK	551793 ± 21895	30.99 ± 2.74
	<i>S. mutans</i> KCTC 3065+ <i>L. gasseri</i> HHuMIN D	745153 ± 62340	6.81 ± 7.80
<i>F. nucleatum</i>	<i>F. nucleatum</i> KCTC 2640	619282 ± 147762	
	<i>F. nucleatum</i> KCTC 2640+ <i>L. paracasei</i> OK	515447 ± 102127	16.77 ± 16.49
	<i>F. nucleatum</i> KCTC 2640+ <i>L. gasseri</i> HHuMIN D	322642 ± 60583	47.90 ± 9.78
<i>P. gingivalis</i>	<i>P. gingivalis</i> KCTC 5352	1035773 ± 144433	
	<i>P. gingivalis</i> KCTC 5352+ <i>L. paracasei</i> OK	795904 ± 43994	23.16 ± 4.25
	<i>P. gingivalis</i> KCTC 5352+ <i>L. gasseri</i> HHuMIN D	222903 ± 9557 **	78.48 ± 0.92
<i>P. intermedia</i>	<i>P. intermedia</i> KCTC 15693	3601149 ± 265550	
	<i>P. intermedia</i> KCTC 15693+ <i>L. paracasei</i> OK	423306 ± 1446 ***	88.25 ± 0.04
	<i>P. intermedia</i> KCTC 15693+ <i>L. gasseri</i> HHuMIN D	2778351 ± 250457	22.85 ± 6.95

[0105] 평균 ± 표준 오차로 표현. 통계적 유의성 표시: *p<0.05, **p<0.01, ***p<0.001.

표 2

Strains	Experimental Groups	Number of bacteria (Total cells)	Inhibitory rate(%)
<i>S. mutans</i>	<i>S. mutans</i> KCTC 3065	897246 ± 28537	
	<i>S. mutans</i> KCTC 3065+ <i>L. paracasei</i> OK+ <i>L. gasseri</i> HHuMIN D	319438 ± 27129 ***	64.40 ± 3.02

<i>F. nucleatum</i>	<i>F. nucleatum</i> KCTC 2640	154196 ± 8665	
	<i>F. nucleatum</i> KCTC 2640+ <i>L. paracasei</i> OK+ <i>L. gasseri</i> HHuMIN D	55453 ± 22790 *	64.04 ± 14.78
<i>P. gingivalis</i>	<i>P. gingivalis</i> KCTC 5352	1035773 ± 144433	
	<i>P. gingivalis</i> KCTC 5352+ <i>L. paracasei</i> OK+ <i>L. gasseri</i> HHuMIN D	201798 ± 9960 **	80.52 ± 0.96
<i>P. intermedia</i>	<i>P. intermedia</i> KCTC 15693	3601149 ± 265550	
	<i>P. intermedia</i> KCTC 15693+ <i>L. paracasei</i> OK+ <i>L. gasseri</i> HHuMIN D	2740438 ± 168972	23.90 ± 4.69

[0107] 평균 ± 표준 오차로 표현. 통계적 유의성 표시: *p<0.05, **p<0.01, ***p<0.001.

[0109] 실험 결과, *L. gasseri* HHuMIN D 및 *L. paracasei* OK 균주 단일 처리군 및 균주 복합물 처리군 모두에서 모든 구강 유해균에 대한 부착 억제 효능을 나타내었다.

[0110] 특히, *L. gasseri* HHuMIN D 및 *L. paracasei* OK 균주 복합물 처리군에서는 프리보텔라 인터미디아(*P. intermedia*)를 제외한 모든 구강 유해균에서의 부착 억제 효능이 단일 균주 처리군 대비 유의하게 높게 나타났고, 특히 포르피로모나스 진지발리스(*P. gingivalis*)에 대해서 가장 우수한 부착 억제 효능을 나타냈다 (도 2). 도 2는 락토바실러스 가세리(*L. gasseri*) HHuMIN D 및 락티카제이바실러스 파라카제이(*L. Paracasei*) OK 균주 단일 처리 및 균주 복합물 처리에 따른 구강 상피세포에 부착되는 구강 유해균 수를 측정된 결과이다.

[0112] 2. 구강유해균에 대한 항균활성 평가

[0113] *L. gasseri* HHuMIN D와 *L. paracasei* OK는 0.05% L-cysteine을 첨가한 MRS broth (BD Difco™)에 37℃에서 혐기배양하였다.

[0114] *S. mutans* KCTC 3065는 BHI broth (BD Difco™)에, *F. nucleatum* KCTC 2640은 RCM (BD Difco™)에 37℃에서 혐기배양하였다. *P. gingivalis* KCTC 5352, *P. intermedia* KCTC 15693는 KCOM1 (Tryptic soy broth 7.5 g, yeast extract 5 g, 0.025% resazurin, 0.05% hydrogen chloride, 5 µg/ml hemin, 2 µg/ml vitamin K1)에 37℃에서 혐기배양하였다.

[0115] *L. gasseri* HHuMIN D 및 *L. paracasei* OK 복합 균주에 의한 구강 유해균 생육 억제 정도를 측정하기 위하여, *L. gasseri* HHuMIN D, *L. paracasei* OK와 구강 유해균 4종을 각각 공배양(co-culture)하였다. *L. gasseri* HHuMIN D 및 *L. paracasei* OK 복합 균주와 구강 유해균을 공배양 시 MRS (0.05% L-cysteine)와 각각의 구강 유해균의 최적성장배지를 1:1의 부피비로 혼합하여 사용하였다.

[0116] 이렇게 제작한 혼합 배양액에 *L. gasseri* HHuMIN D 및 *L. paracasei* OK 복합 균주와 구강 유해균을 1 X 10⁷ CFU/ml가 되게 접종한 후 37℃에서 18~24시간 동안 혐기배양하였다. 배양액 1 ml을 샘플링하여 얻은 cell pellet을 사용하여 박테리아 수를 정량하였다. 박테리아의 수는 Real-time PCR Ct 값으로 standard curve를 제작하여 변환하여 계산하였고, *L. gasseri* HHuMIN D 및 *L. paracasei* OK 복합 균주 처리에 의한 구강 유해균의 생육 억제 정도를 하기 표 3에 나타내었다.

표 3

Strains	Experimental Groups	Number of bacteria (cells/ml)	Inhibitory rate(%)
<i>S. mutans</i>	<i>S. mutans</i> KCTC 3065	1.4×10 ¹⁰ ± 1.1×10 ⁹	
	<i>S. mutans</i> KCTC 3065+ <i>L. paracasei</i> OK+ <i>L. gasseri</i> HHuMIN D	2.5×10 ⁸ ± 1.2×10 ^{8**}	98.2
<i>F. nucleatum</i>	<i>F. nucleatum</i> KCTC 2640	3.5×10 ⁴ ± 2.4×10 ⁴	
	<i>F. nucleatum</i> KCTC 2640+ <i>L. paracasei</i> OK+ <i>L. gasseri</i> HHuMIN D	3.0×10 ³ ± 1.1×10 ³	91.2
<i>P. gingivalis</i>	<i>P. gingivalis</i> KCTC 5352	2.4×10 ⁹ ± 3.3×10 ⁷	
	<i>P. gingivalis</i> KCTC 5352+ <i>L. paracasei</i> OK+ <i>L. gasseri</i> HHuMIN D	2.0×10 ⁷ ± 4.2×10 ^{6***}	99.1

<i>P. intermedia</i>	<i>P. intermedia</i> KCTC 15693	$1.3 \times 10^9 \pm 3.9 \times 10^7$	
	<i>P. intermedia</i> KCTC 15693+ <i>L. paracasei</i> OK+ <i>L. paracasei</i> OK	$4.2 \times 10^7 \pm 1.3 \times 10^6$ ***	96.6

[0118] 평균 $\pm$ 표준 오차로 표현. 통계적 유의성 표시: *p<0.05, **p<0.01, ***p<0.001.

[0120] 실험 결과, *L. gasseri* HHuMIN D 및 *L. paracasei* OK 복합 균주와 구강 유해균을 공배양 시 양성대조군 (positive control) 대비 *S. mutans*는 98.2%, *F. nucleatum*은 91.2%, *P. gingivalis*는 99.1%, *P. intermedia*는 96.6%가 생육이 억제됨을 확인함에 따라, *L. gasseri* HHuMIN D 및 *L. paracasei* OK 복합 균주가 구강유해균에 대한 우수한 항균활성을 갖는 것으로 판단하였다.

[0122] 3. *mgI* 유전자(구취 유발원) 발현 저해활성 평가

[0123] *P. gingivalis*는 METase (L-methionine- α -deamino- γ -mercaptomethane-lyase)를 코딩하는 *mgI* 유전자를 보유하고 있어 L-methionine으로부터 휘발성 황화합물을 생성하여 구강 내에서 구취를 유발한다고 알려져 있다.

[0124] 이에, *L. gasseri* HHuMIN D 및 *L. paracasei* OK 복합 균주의 *mgI* 유전자 발현 저해활성을 확인하기 위하여, *L. gasseri* HHuMIN D와 *L. paracasei* OK를 각각 MRS broth (0.05% L-cysteine)에 배양 후 회수하여 얻은 배양 상층액이 20% 함유된 KCOM1 배지에 1×10^7 CFU의 *P. gingivalis* 균체를 혼합하여 37℃에서 18시간 동안 혐기배양하였다.

[0125] *L. gasseri* HHuMIN D와 *L. paracasei* OK 각각의 배양 상층액을 1:1로 혼합하여 혼합 상층액을 제조하였다. 복합 상층액 처리 시에는 이 혼합 상층액 20%가 함유된 KCOM1 배지에 *P. gingivalis* 균체를 혼합하여 37℃에서 18시간 동안 혐기배양하였다. 대조군의 경우 배양 상층액 20%를 MRS broth (0.05% L-cysteine) 20% 희석액으로 대체하여 동일한 조건에서 배양하였다. 배양 후 1 ml의 배양액으로부터 균체를 회수한 후 genomic DNA를 추출한 다음 real-time PCR로 정량하였다. 분석된 Ct 값은 $2^{-\Delta\Delta Ct}$ 법으로 분석하여 대조군 대비 시험군의 *mgI* 유전자의 발현 정도를 relative fold change로 나타내었다.

[0126] 실험 결과, *mgI* 유전자의 발현 정도는 *L. gasseri* HHuMIN D의 배양 상층액 처리 시 60%, *L. paracasei* OK의 배양 상층액 처리 시 86%의 감소율을 보였다.

[0127] 한편, *L. gasseri* HHuMIN D 및 *L. paracasei* OK의 배양 상층액 1:1 혼합물(복합 균주) 처리 시에는 *mgI* 유전자의 발현 정도가 98% 감소되어, *L. gasseri* HHuMIN D 및 *L. paracasei* OK 복합균주는 우수한 구취제거 활성을 갖는 것으로 판단하였다 (도 3). 도 3는 락토바실러스 가세리(*L. gasseri*) HHuMIN D 및 락티카제이바실러스 파라카제이(*L. Paracasei*) OK 균주 단일 처리 및 균주 복합물 처리에 따른 *P. gingivalis* 균주의 구취 유발원인 *mgI* 유전자 발현 저해 정도를 평가한 결과이다.

[0129] [실시예 3: 실시예 2에 따른 균주 복합물을 포함하는 타블렛의 제조]

[0130] - 주성분명: *L. gasseri* HHuMIN D 및 *L. paracasei* OK 복합물

[0131] - 성상 및 제형: 미황색의 분말을 함유한 타블렛

[0132] - 함량: 800 mg/타블렛

[0133] - 보관 방법: 냉장(2-8℃)보관

[0134] - 용법 및 용량: 1일 1회, 1회 1타블렛, 양치 후 취침 전 경구 섭취(입안에서 녹임)

[0135] (*L. gasseri* HHuMIN D 및 *L. paracasei* OK 복합물로써 1.0×10^9 CFU/day)

[0136] - 원료명 및 배합비율: 1타블렛(800 mg) 당

표 4

원료명	배합비율 (%)	함량(mg)
<i>L. gasseri</i> HHuMIN D 및 <i>L. paracasei</i> OK 복합물(실시예 2)	3.600	28,800
이소말트	47.700	381,600
솔비톨	47.700	381,600

스테아린산 마그네슘	1.000	8.000
합 계	100.00	800.000

[비교예 1: 플라시보(placebo) 타블렛의 제조]

- 주성분명: 이소말트 및 솔비톨
- 성상 및 제형: 미황색의 분말을 함유한 타블렛
- 함량: 800 mg/타블렛
- 보관 방법: 냉장(2-8 °C)보관
- 용법 및 용량: 1일 1회, 1회 1타블렛, 양치 후 취침 전 경구 섭취(입안에서 녹임)
- 원료명 및 배합비율: 1타블렛(800 mg) 당

표 5

원료명	배합비율 (%)	함량(mg)
이소말트	49.396	395.168
솔비톨	49.396	395.168
스테아린산 마그네슘	1.000	8.000
황색 FY201017	0.148	1.184
황색 4호 A.L	0.006	0.048
고량색소	0.054	0.432
합 계	100.00	800.000

[실험예 1: 인체적용시험]

1. 인체적용 대상자

인체적용시험 동의서에 자의로 서명한 인체적용시험 대상자를 대상으로, 방문평가를 통해 선정/제외기준 적합 여부를 판정한 뒤, 적합한 인체적용시험 대상자에 한하여 등록된 순서에 따라 시험군 또는 대조군 중 한 군으로 무작위배정하였다. 시험군과 대조군에 배정된 인체적용 대상자는 각 40명으로 정하였다. 배정된 인체적용시험 대상자는 실시예 3(시험군) 및 비교예 1(대조군)에 따른 타블렛을 각각 1일 1회(1 타블렛)으로 12주간 섭취하도록 하였고, 인체적용시험 방법을 나타낸 모식도는 도 4에 나타내었다.

인체적용 대상자의 선정기준 및 제외기준은 하기와 같다.

1) 선정기준

가. 만 19세 이상, 만 70세 이하인 성인 남녀

나. 구강 미생물 측정에서 특정 유해균 3종(*F. nucleatum*, *P. gingivalis*, *P. intermedia*) 중 2종 이상 보유한 자

다. 방문 1과 방문 2에 VSC 검사에서 H₂S, CH₃SH, (CH₃)₂S의 합이 2.0 ng/10 ml 이상인 자

2) 제외기준

가. 중증의 심혈관계, 면역계, 호흡기계, 비뇨기계, 신경계, 근골격계, 감염성 질환 및 악성종양 등으로 현재 치료 중인 자

나. 구취를 유발할 만한 전신질환(간질환, 신질환, 쇼그렌증후군, 류마티스 질환) 등으로 현재 치료 중이거나 과거력이 있는 자(단, 인체적용시험 대상자의 상태를 고려하여 시험자의 판단에 따라 시험에 참여 가능)

다. 심한 치과질환(치주염, 치아우식증, 구강건조증 등)이 있는 자(치아우식증 중 범랑질우식은 시험에 참여 가능하며, 상아질우식이 1개 이상인 경우는 참여 불가능)

- [0161] 라. 현재 축농증, 비염으로 치료 중인 자
- [0162] 마. 현재 만성위염으로 치료 중인 자
- [0163] 바. 현재 흡연자
- [0164] 사. 방문 1 기준 1개월 이내에 우울증, 파킨슨씨병 치료제 등의 정신과적인 약물을 복용하고 있는 자
- [0165] 아. 방문 1 기준 3개월 이내에 치주질환 보조치료제를 복용한 자
- [0166] 자. 방문 1 기준 3개월 이내에 스케일링을 받은 자
- [0167] 차. 방문 1 기준 2주 이내에 항생제, 성장제를 투여한 자
- [0168] 카. 방문 1 기준 2주 이내에 프로바이오틱스, 프리바이오틱스, 지속적으로(주 4회 이상) 유산균 제품을 투여 또는 섭취한 자
- [0169] 타. 조절되지 않는 고혈압 환자(수축기 혈압 160 mmHg 이상 또는 이완기 혈압 100 mmHg 이상, 인체적용시험 대상자 10분 안정 후 측정기준)
- [0170] 파. 조절되지 않는 당뇨병 환자(공복 혈당 180 mg/dL 이상)
- [0171] 하. AST(GOT) 또는 ALT(GPT)가 실시기관 정상 상한치의 3배 이상인 자
- [0172] 가가. 크레아티닌(Creatinine)이 실시기관 정상 상한치의 2배 이상인 자
- [0173] 가나. 임신 중이거나 수유부 또는 본 인체적용시험 기간 동안 임신 계획이 있는 자
- [0174] 가다. 본 인체적용시험용 식품 성분에 민감하거나 알레르기가 있는 자
- [0175] 가라. 방문 1 기준 1개월(30일) 이내에 다른 중재적 임상시험(인체적용시험 포함)에 참여했거나, 본 인체적용시험 시작 이후 다른 중재적 임상시험(인체적용시험 포함)에 참여할 계획이 있는 자
- [0176] 가마. 시험자가 본 인체적용시험에 부적절하다고 판단하는 자
- [0178] **2. 구강 내 항균 및 구취개선 유효성 평가**
- [0179] **1) 1차 유효성 평가 변수**
- [0180] 1차 유효성 평가 변수인 VSC(Volatile Sulfur Compounds)의 섭취 전후 변화에 대한 군내 비교는 Paired t-test를 이용하여 분석하였고, 각 시점에서의 시험군과 대조군 간의 변화의 정도는 정규성 만족 여부에 따라 Two sample t-test 또는 Wilcoxon rank sum test를 실시하여 통계적으로 유의한 차이가 있는지 평가하였다. 해당 유효성 평가 변수의 Baseline을 공변량으로 하는 ANCOVA를 실시하였고, 또한 인구학적 및 생활습관 조사에서 군간에 통계적으로 유의한 차이가 있고 임상적으로 유의한 경우 해당 기저특성을 공변량으로 추가하도록 하였다.
- [0182] **2) 2차 유효성 평가 변수**
- [0183] 2차 유효성 평가 변수인 TPI(Tongue Plaque Index), GI(Gingival Index), PI(Plaque Index), PHP(Parient Hygiene Performance) Index, 구강 미생물 측정의 섭취 전후 변화에 대한 군내 비교는 Paired t-test를 이용하여 분석하였고, 각 시점에서의 시험군과 대조군 간의 변화의 정도는 정규성 만족 여부에 따라 Two sample t-test 또는 Wilcoxon rank sum test를 실시하여 통계적으로 유의한 차이가 있는지 평가하였다. 해당 유효성 평가 변수의 Baseline을 공변량으로 하는 ANCOVA를 실시하였고, 또한 인구학적 및 생활습관 조사에서 군간에 통계적으로 유의한 차이가 있고 임상적으로 유의한 경우 해당 기저특성을 공변량으로 추가하도록 하였다.
- [0185] **3) 유효성 평가 결과**
- [0186] **1) VSC (Volatile Sulfur Compounds)**
- [0187] 방문1, 2, 3, 4, 5에서 Oral Chroma를 통해 H_2S , CH_3SH , $(CH_3)_2S$ 세 종류의 VSC (Volatile Sulfur Compounds, 휘발성 황화합물 농도)를 측정하였다. 각 방문 시 1회 측정하였으며, 5분간 함구 뒤에 측정을 시작하였다. 측정 시간대는 아침 공복(8시간 이상)에 양치나 수분이 없는 상태에서 측정하였다. 입을 다문 상태에서 구강 내 가스 채취용 1 mL 시린지를 이용하여 시린지 끝에 혀나 타액이 닿지 않도록 대상자의 입안 깊숙이 넣고 가스를 채취하였다.

[0189] 가. H_2S 변화량

[0190] PP Set(Per Protocol Set)로 분석한 결과에서 섭취 12주 후 시험군은 1.43 ± 2.39 ng/10 ml 감소하였고 ($p=0.0010$), 대조군은 0.44 ± 1.95 ng/10 ml 감소하였다($p=0.1987$) (도 5). 도 5는 본 발명에 따른 군주 복합물 투여에 따른 H_2S 변화량(PP set)을 확인한 결과이다.

[0191] FA Set(Full Analysis Set)로 분석한 결과에서 섭취 12주 후 시험군은 1.36 ± 2.31 ng/10 ml 감소하였고 ($p=0.0007$), 대조군은 0.69 ± 2.00 ng/10 ml 감소하였다($p=0.0347$) (도 6). 도 6은 본 발명에 따른 군주 복합물 투여에 따른 H_2S 변화량(FA set)을 확인한 결과이다.

[0193] 나. CH_3SH 변화량

[0194] PP Set(Per Protocol Set)로 분석한 결과에서 섭취 12주 후 시험군은 0.83 ± 1.89 ng/10 ml 감소하였고 ($p=0.0122$), 대조군은 0.50 ± 1.26 ng/10 ml 감소하였다($p=0.0281$) (도 7). 도 7은 본 발명에 따른 군주 복합물 투여에 따른 CH_3SH 변화량(PP set)을 확인한 결과이다.

[0195] FA Set(Full Analysis Set)로 분석한 결과에서 섭취 12주 후 시험군은 0.82 ± 1.81 ng/10 ml 감소하였고 ($p=0.0072$), 대조군은 0.52 ± 1.22 ng/10 ml 감소하였다($p=0.0102$) (도 8). 도 8은 본 발명에 따른 군주 복합물 투여에 따른 CH_3SH 변화량(FA set)을 확인한 결과이다.

[0197] 다. $(CH_3)_2S$ 변화량

[0198] PP Set(Per Protocol Set)로 분석한 결과에서 섭취 12주 후 시험군은 0.57 ± 1.35 ng/10 ml 감소하였고 ($p=0.0162$), 대조군은 0.35 ± 0.89 ng/10 ml 감소하였다($p=0.0298$) (도 9). 도 9는 본 발명에 따른 군주 복합물 투여에 따른 $(CH_3)_2S$ 변화량(PP set)을 확인한 결과이다.

[0199] FA Set(Full Analysis Set)로 분석한 결과에서 섭취 12주 후 시험군은 0.52 ± 1.31 ng/10 ml 감소하였고 ($p=0.0168$), 대조군은 0.40 ± 0.89 ng/10 ml 감소하였다($p=0.0066$) (도 10). 도 10은 본 발명에 따른 군주 복합물 투여에 따른 $(CH_3)_2S$ 변화량(FA set)을 확인한 결과이다.

[0201] 라. $H_2S+CH_3SH+(CH_3)_2S$ 변화량

[0202] PP Set(Per Protocol Set)로 분석한 결과에서 섭취 12주 후 시험군은 2.83 ± 4.40 ng/10 ml 감소하였고 ($p=0.0005$), 대조군은 1.28 ± 3.07 ng/10 ml 감소하였다($p=0.0205$) (도 11). 도 11은 본 발명에 따른 군주 복합물 투여에 따른 $H_2S+CH_3SH+(CH_3)_2S$ 변화량(PP set)을 확인한 결과이다.

[0203] FA Set(Full Analysis Set)로 분석한 결과에서 섭취 12주 후 시험군은 2.71 ± 4.25 ng/10 ml 감소하였고 ($p=0.0003$), 대조군은 1.61 ± 3.03 ng/10 ml 감소하였다($p=0.0017$) (도 12). 도 12는 본 발명에 따른 군주 복합물 투여에 따른 $H_2S+CH_3SH+(CH_3)_2S$ 변화량(FA set)을 확인한 결과이다.

[0205] 2) TPI (Tongue Plaque Index) 변화량

[0206] 방문2, 3, 4, 5에 TPI(Tongue Plaque Index, 설태 지수)를 실시하였다. 혀 전체를 뿌리부분부터 혀 끝까지 가로 세로를 각각 3등분하여 9부분으로 구분한 후, 각 부위에 존재하는 설태 유무에 따라 설태가 있는 경우에 1점, 없는 경우를 0점으로 하였다. 총 설태 지수는 0-9점까지 분포되며 설태 지수가 높을수록 설태량이 많은 것을 의미한다. 본 인체적용시험에서는 검사자가 육안으로 혀의 설태량을 체크하였다.

[0207] PP Set(Per Protocol Set)로 분석한 결과에서 섭취 12주 후 시험군은 1.53 ± 1.28 점 감소하였고($p<0.0001$), 대조군은 1.18 ± 1.64 점 감소하였다($p=0.0002$) (도 13). 도 13은 본 발명에 따른 군주 복합물 투여에 따른 TPI (Tongue Plaque Index) 변화량(PP set)을 확인한 결과이다.

[0208] FA Set(Full Analysis Set)로 분석한 결과에서 섭취 12주 후 시험군은 1.62 ± 1.31 점 감소하였고($p<0.0001$), 대조군은 1.10 ± 1.61 점 감소하였다($p=0.0001$) (도 14). 도 14는 본 발명에 따른 군주 복합물 투여에 따른 TPI (Tongue Plaque Index) 변화량(FA set)을 확인한 결과이다.

[0210] 3) GI (Gingival Index) 변화량

[0211] 방문 2, 3, 4, 5에 GI(Gingival Index, 치은 지수)를 실시하였다. Ramfjord 치아(#16, 11, 26, 36, 31, 46)를 협면/설면으로 구분하여, 하기 표 6에 나타난 바와 같은 Loe & Silness의 평점기준에 따라 0-3 Score로 평가하여 검사한 총 치아의 치면의 수로 총점수를 나누어 치은 지수를 산출하였다.

표 6

점수	기준
0	정상 치은
1	치은색조에 경미한 변화가 있고 약간 종창이 되어 있으나 경미한 자극으로는 출혈이 되지 않는 정도의 경미한 염증이 발생되어 있는 치은
2	발적, 종창의 증상이 명확히 나타나고 경한 자극으로도 출혈이 되는 정도의 염증이 발생되어 있는 치은
3	현저한 발적과 종창이 있고 궤양이 있을 수도 있으며 자연출혈이 발생할 정도로 심한 염증이 발생한 치은

[0214] PP Set(Per Protocol Set)로 분석한 결과에서, 섭취 8주 후 시험군은 0.16 ± 0.32 점 감소하였고($p=0.0050$), 대조군은 0.13 ± 0.36 점 감소하였으며($p=0.0424$), 섭취 12주 후 시험군은 0.27 ± 0.35 점 감소하였고($p<0.0001$), 대조군은 0.25 ± 0.39 점 감소하였다($p=0.0005$) (도 15). 도 15는 본 발명에 따른 군주 복합물 투여에 따른 GI (Gingival Index) 변화량(PP set)을 확인한 결과이다.

[0215] FA Set(Full Analysis Set)로 분석한 결과에서 섭취 8주 후 시험군은 0.19 ± 0.33 점 감소하였고($p=0.0010$), 대조군은 0.14 ± 0.43 점 감소하였으며($p=0.0486$), 섭취 12주 후 시험군은 0.28 ± 0.35 점 감소하였고($p<0.0001$), 대조군은 0.26 ± 0.48 점 감소하였다($p=0.0015$) (도 16). 도 16은 본 발명에 따른 군주 복합물 투여에 따른 GI (Gingival Index) 변화량(FA set)을 확인한 결과이다.

[0217] 4) PI (Plaque Index) 변화량

[0218] 방문 2, 3, 4, 5에 PI(Plaque Index, 치태 지수)를 실시하였다. Ramfjord 치아(#16, 11, 26, 36, 31, 46)를 협면/설면으로 구분하여, 하기 표 7에 나타난 바와 같은 Turesky 등이 변형한 Quigley & Hein의 평점기준에 따라 0-5 Score로 평가하여 검사한 총 치아의 치면의 수로 총점수를 나누어 치태 지수를 산출하였다.

표 7

점수	기준
0	치면세균막 불부착
1	치은연부에 점상 부착
2	치은연을 따라 넓이 1 mm 이하로 선상 부착
3	치경부 1/3까지 부착된 치면세균막이 있는 경우
4	치경부 2/3까지 부착된 치면세균막이 있는 경우
5	치경부 2/3 이상 부착된 치면세균막이 있는 경우

[0221] PP Set(Per Protocol Set)로 분석한 결과에서 섭취 4주 후 시험군은 0.29 ± 0.63 점 감소하였고($p=0.0091$), 대조군은 0.15 ± 0.51 점 감소하였으며($p=0.1051$), 섭취 8주 후 시험군은 0.43 ± 0.50 점 감소하였고($p<0.0001$), 대조군은 0.40 ± 0.82 점 감소하였으며($p=0.0077$), 섭취 12주 후 시험군은 0.67 ± 0.56 점 감소하였고($p<0.0001$), 대조군은 0.58 ± 0.86 점 감소하였다($p=0.0004$) (도 17). 도 17은 본 발명에 따른 군주 복합물 투여에 따른 PI (Plaque Index) 변화량(PP set)을 확인한 결과이다.

[0222] FA Set(Full Analysis Set)로 분석한 결과에서 4주 후 시험군은 0.30 ± 0.62 점 감소하였고($p=0.0050$), 대조군은 0.19 ± 0.49 점 감소하였으며($p=0.0212$), 섭취 8주 후 시험군은 0.45 ± 0.50 점 감소하였고($p<0.0001$), 대조군은 0.45 ± 0.77 점 감소하였으며($p=0.0007$), 섭취 12주 후 시험군은 0.69 ± 0.56 점 감소하였고($p<0.0001$), 대조군은 0.59 ± 0.80 점 감소하였다($p<0.0001$) (도 18). 도 18은 본 발명에 따른 군주 복합물 투여에 따른 PI (Plaque Index) 변화량(FA set)을 확인한 결과이다.

[0224] 5) PHP (Patient Hygiene Performance) Index 변화량

[0225] 방문 2, 3, 4, 5에 PHP Index(Patient Hygiene Performance Index, 구강환경관리능력 지수)를 실시하였다. PHP Index는 플라크와 구강 위생 관리를 나타내는 지수이다. 치아를 치면착색제로 착색 후, Ramfjord 치아(#16, 11,

26, 31 치아는 협면, #36, 46 치아는 설면을 측정)를 각각 근심부, 원심부, 치은부, 중앙부, 절단부위 5개부로 나누어, 각부분에 치면세균막이 부착된 경우에 1점, 부착되지 않은 경우는 0점으로 평가하였으며, 각 치면의 점수의 합을 검사치아 수로 나누어 PHP Index를 산출하였다. 인체적용시험 기간 동안 일상적인 구강 위생은 유지하되, 구강위생치료를 하지 않도록 권고하였다(잇솔질에 대한 교육은 시행하지 않음).

[0226] PP Set(Per Protocol Set)로 분석한 결과에서 섭취 8주 후 시험군은 0.50 ± 0.50 점 감소하였고($p < 0.0001$), 대조군은 0.47 ± 0.62 점 감소하였다($p = 0.0001$) (도 19). 도 19는 본 발명에 따른 군주 복합물 투여에 따른 PHP (Patient Hygiene Performance) Index 변화량(PP set)을 확인한 결과이다.

[0227] FA Set(Full Analysis Set)로 분석한 결과에서 섭취 8주 후 시험군은 0.52 ± 0.51 점 감소하였고($p < 0.0001$), 대조군은 0.45 ± 0.60 점 감소하였다($p < 0.0001$) (도 20). 도 20은 본 발명에 따른 군주 복합물 투여에 따른 PHP (Patient Hygiene Performance) Index 변화량(FA set)을 확인한 결과이다.

[0229] 6) 구강 미생물 측정

[0230] 방문 1, 3, 4, 5에 구강 미생물 측정을 실시하였다. 본 인체적용시험에서는 qPCR로 구취유발 원인균 (*Porphyromonas gingivalis*, *Prevotella intermedia*, *Fusobacterium nucleatum*, *Streptococcus mutans*)을 분석하였다. 구강 미생물 측정을 위해 보존액이 담긴 튜브에 타액을 채취하여 냉장($2 \sim 8^{\circ}\text{C}$) 또는 상온보관 후 외부 분석기관에서 분석하였으며, 분석 완료 후 검체는 폐기하였다.

[0232] 가. *P. gingivalis* 변화량

[0233] PP Set(Per Protocol Set)로 분석한 결과에서 섭취 12주 후 시험군은 $6,303,000.00 \pm 47,074,074.92$ CFUs/g 감소하였고($p = 0.4338$), 대조군은 $3,942,212.12 \pm 32,735,987.56$ CFUs/g 감소하였다($p = 0.4941$) (도 21). 도 21은 본 발명에 따른 군주 복합물 투여에 따른 *P. gingivalis* 변화량(PP set)을 확인한 결과이다.

[0234] FA Set(Full Analysis Set)로 분석한 결과에서 섭취 12주 후 시험군은 $11,284,000.00 \pm 46,191,102.86$ CFUs/g 감소하였고($p = 0.1575$), 대조군은 $52,499,090.91 \pm 313,804,155.21$ CFUs/g 감소하였다($p = 0.3437$) (도 22). 도 22는 본 발명에 따른 군주 복합물 투여에 따른 *P. gingivalis* 변화량(FA set)을 확인한 결과이다.

[0236] 나. *P. intermedia* 변화량

[0237] PP Set(Per Protocol Set)로 분석한 결과에서 섭취 12주 후 시험군은 $11,284,000.00 \pm 46,191,102.86$ CFUs/g 감소하였고($p = 0.1575$), 대조군은 $52,499,090.91 \pm 313,804,155.21$ CFUs/g 감소하였다($p = 0.3437$) (도 23). 도 23은 본 발명에 따른 군주 복합물 투여에 따른 *P. intermedia* 변화량(PP set)을 확인한 결과이다.

[0238] FA Set(Full Analysis Set)로 분석한 결과에서 섭취 12주 후 시험군은 $10,558,974.36 \pm 43,802,128.15$ CFUs/g 감소하였고($p = 0.1405$), 대조군은 $44,065,384.62 \pm 288,684,314.48$ CFUs/g 감소하였다($p = 0.3465$) (도 24). 도 24는 본 발명에 따른 군주 복합물 투여에 따른 *P. intermedia* 변화량(FA set)을 확인한 결과이다.

[0240] 다. *F. nucleatum* 변화량

[0241] PP Set(Per Protocol Set)로 분석한 결과에서 섭취 12주 후 시험군은 $688,485,714.29 \pm 3,426,961,202.10$ CFUs/g 감소하였고($p = 0.2429$), 대조군은 $144,757,575.76 \pm 828,219,325.96$ CFUs/g 감소하였다($p = 0.3229$) (도 25). 도 25는 본 발명에 따른 군주 복합물 투여에 따른 *F. nucleatum* 변화량(PP set)을 확인한 결과이다.

[0242] FA Set(Full Analysis Set)로 분석한 결과에서 섭취 12주 후 시험군은 $619,051,282.05 \pm 3,248,312,549.36$ CFUs/g 감소하였고($p = 0.2414$), 대조군은 $115,128,205.13 \pm 779,278,383.46$ CFUs/g 감소하였다($p = 0.3620$) (도 26). 도 26은 본 발명에 따른 군주 복합물 투여에 따른 *F. nucleatum* 변화량(FA set)을 확인한 결과이다.

[0244] 라. *S. mutans* 변화량

[0245] PP Set(Per Protocol Set)로 분석한 결과에서 섭취 8주 후 시험군은 $2,623.53 \pm 22,133.36$ CFUs/g 감소하였고($p = 0.4943$), 대조군은 $484.85 \pm 5,093.63$ CFUs/g 증가하였다($p = 0.5883$) ($p = 0.1800$) (도 27). 도 27은 본 발명에 따른 군주 복합물 투여에 따른 *S. mutans* 변화량(PP set)을 확인한 결과이다.

[0246] FA Set(Full Analysis Set)로 분석한 결과에서 섭취 8주 후 시험군은 $3,400.00 \pm 21,785.79$ CFUs/g 감소하였고($p = 0.3423$), 대조군은 $923.08 \pm 5,630.67$ CFUs/g 증가하였다($p = 0.3124$) (도 28). 도 28은 본 발명에 따른 군주 복합물 투여에 따른 *S. mutans* 변화량(FA set)을 확인한 결과이다.

[0248] 7) 구취 관능평가

[0249] 방문 2, 3, 4, 5에 구취관능평가를 실시하였다. 인체적용시험 대상자에게 2분 동안 입을 다물고 있도록 한 후 가볍게 숨을 내쉬도록 하였다. 이 때 환자의 정면에서 약 10 cm 정도 거리에서 후각에 의해, 하기 표 8에 나타난 바와 같이 0-5점 척도로 구취를 평가하였다. 방문 전날 구취에 영향을 줄 수 있는 특정 음식(마늘, 양파 등)을 먹지 않도록 권고하였다.

표 8

점수	기준
0	구취가 없음
1	거의 느끼지 못할 정도의 구취
2	약한 구취
3	중등도의 구취
4	강한 구취
5	매우 강한 구취

[0252] PP Set(Per Protocol Set)로 분석한 결과에서 섭취 8주 후 시험군은 0.47 ± 0.65 점 감소하였고($p=0.0001$), 대조군은 0.26 ± 0.86 점 감소하였다($p=0.0831$) (도 29). 도 29는 본 발명에 따른 군주 복합물 투여에 따른 구취 관능평가 결과(PP set)를 확인한 결과이다.

[0253] FA Set(Full Analysis Set)로 분석한 결과에서 섭취 8주 후 시험군은 0.54 ± 0.68 점 감소하였고($p<0.0001$), 대조군은 0.30 ± 0.82 점 감소하였다($p=0.0265$) (도 30). 도 30은 본 발명에 따른 군주 복합물 투여에 따른 구취 관능평가 결과(FA set)를 확인한 결과이다.

[0255] 3. 안정성 평가

[0256] 1) 안정성 평가 변수

[0257] 가. 이상사례

[0258] 인체적용시험용 식품 섭취 후 발생한 모든 이상사례를 도표화한 후 발생률을 산출하여 평가하였다. 각 군간 이상사례가 발생한 인체적용시험 대상자의 비율을 계산하였고, 카이제곱검정(chi-square test) 또는 피셔의 정확 검정(Fisher's exact test)을 이용하여 비교 분석하였다.

[0260] 나. 활력징후(혈압, 맥박), 신체계측(체중)

[0261] 활력징후(혈압, 맥박), 신체계측(체중) 측정치에 대하여 섭취 전후 변화에 대한 군내 비교는 Paired t-test를 이용하여 분석하였고, 시험군과 대조군 간의 변화의 정도는 정규성 만족 여부에 따라 Two sample t-test 또는 Wilcoxon rank sum test를 실시하여 통계적으로 유의한 차이가 있는지 평가하였다.

[0263] 다. 임상병리검사(혈액학적/혈액화학적검사, 뇨검사)

[0264] 혈액학적 및 혈액검사항적 검사치에 대하여 섭취 전후 변화에 대한 군내 비교는 Paired t-test를 이용하여 분석하였고, 시험군과 대조군 간의 변화의 정도는 정규성 만족 여부에 따라 Two sample t-test 또는 Wilcoxon rank sum test를 실시하여 통계적으로 유의한 차이가 있는지 평가하였다. 뇨검사는 정상과 비정상으로 나누어 McNemar test를 실시하여 군내 차이를 비교하였다.

[0266] 2) 안정성 평가 결과

[0267] 안전성 평가는 인체적용시험에 무작위배정된 후 인체적용시험용 식품을 한 번이라도 섭취한 인체적용시험 대상자를 분석 대상자(safety Set)로 하였으며, 총 80명(시험군 40명, 대조군 40명)의 인체적용시험 대상자가 분석 대상자에 포함되었다.

[0268] 시험군과 대조군 모두에서 이상사례는 발생하지 않았으며, 섭취 군간 통계적으로 유의한 차이는 나타나지 않았다. 중대한 이상사례는 발생하지 않았으며, 이상사례로 인한 중도탈락자 또한 없었다.

[0269] 본 인체적용시험에서 안정성 평가를 위한 임상병리검사는 방문 1과 방문 5에서 시행되었다. 검사항목은 혈액학적 검사, 혈액화학적검사, 뇨검사로 나누어 평가되었다.

[0270] 가. 혈액화학적 검사

[0271] 혈액화학적 검사 중 Glucose 항목에서 섭취 12주 후 시험군은 4.16 ± 7.07 mg/dL 감소하였고($p=0.0009$), 대조군은 1.82 ± 12.45 mg/dL 증가하여($p=0.3744$) 섭취 군간 통계적으로 유의한 차이가 나타났다($p=0.0094$).

[0272] 혈액화학적검사 중 P 항목에서 섭취 12주 후 시험군은 0.18 ± 0.54 mg/dL 증가하였고($p=0.0447$), 대조군은 0.08 ± 0.60 mg/dL 감소하여($p=0.4041$) 섭취 군간 통계적으로 유의한 차이가 나타났다($p=0.0471$).

[0273] 이외 혈액화학적검사 항목에서 섭취 12주 후 시험군, 대조군 모두 통계적으로 유의한 차이는 나타나지 않았다.

[0274] 즉, 혈액화학적검사, 뇨검사의 모든 항목에서 섭취 12주 후 섭취 군간 통계적으로 유의한 차이는 나타나지 않았다.

[0276] 나. 활력징후(맥박, 혈압) 및 신체계측(체중)

[0277] 활력징후(맥박, 혈압) 및 신체계측(체중)에서 섭취 12주 후 시험군, 대조군 모두 정상이었으며 통계적으로 유의한 차이는 나타나지 않았다.

[0279] 따라서, 실험군 및 대조군의 타블렛은 모두 안정성이 인정된다.

수탁번호

[0281]

기탁기관명 : 한국미생물보존센터(KCCM)

수탁번호 : KCCM13365P

수탁일자 : 20230630

도면

도면1

Standard ID



16S rRNA service report

Order Number : HC00736849
Sample name : OK_contig_1

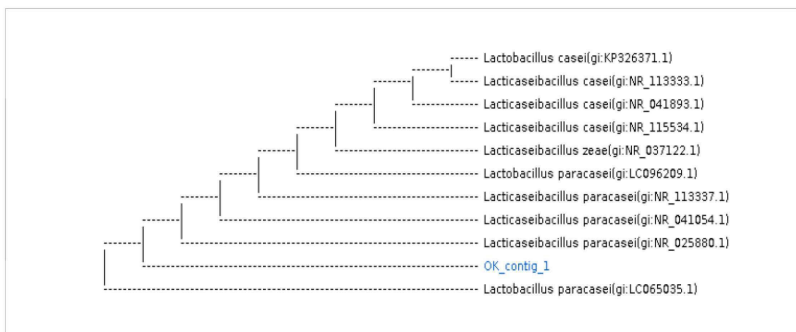
Information

Primer Information

Sequencing Primer Name	Primer Sequences	PCR Primer Name	Primer Sequences
785F	5' (GGA TTA GAT ACC CTG GTA) 3'	27F	5' (AGA GTT TGA TCM TGG CTC AG) 3'
907R	5' (CCG TCA ATT CMT TTR AGT TT) 3'	1492R	5' (TAC GGY TAC CTT GTT ACG ACT T) 3'

Subject						Score		Identities	
Accession	Description	Length	Start	End	Coverage	Bit	E-Value	Match/Total	Pct.(%)
AP012541.1	Lactocaseibacillus paracasei	299587 5	81727 4	81876 5	0	2756	0.0	1492/1492	100.00

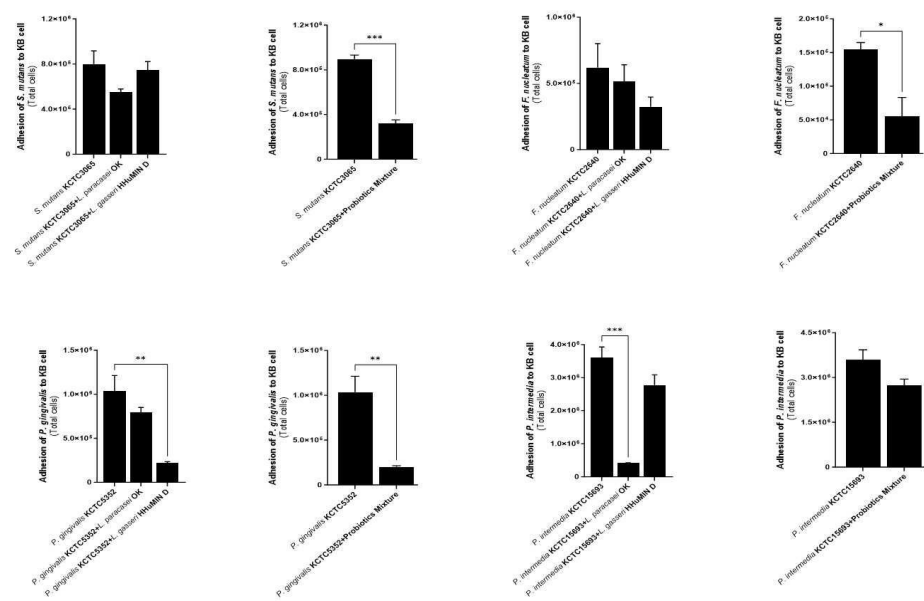
Kingdom	Family	Genus	Species
Bacteria	Lactobacillaceae	Lactocaseibacillus	Lactocaseibacillus paracasei



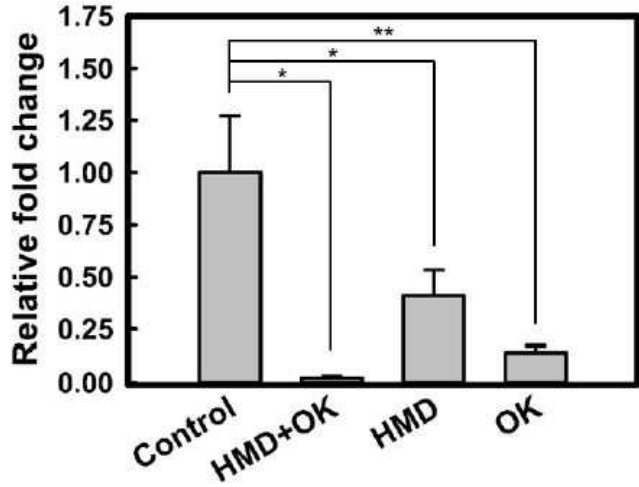
Characterization

under investigation
under investigation

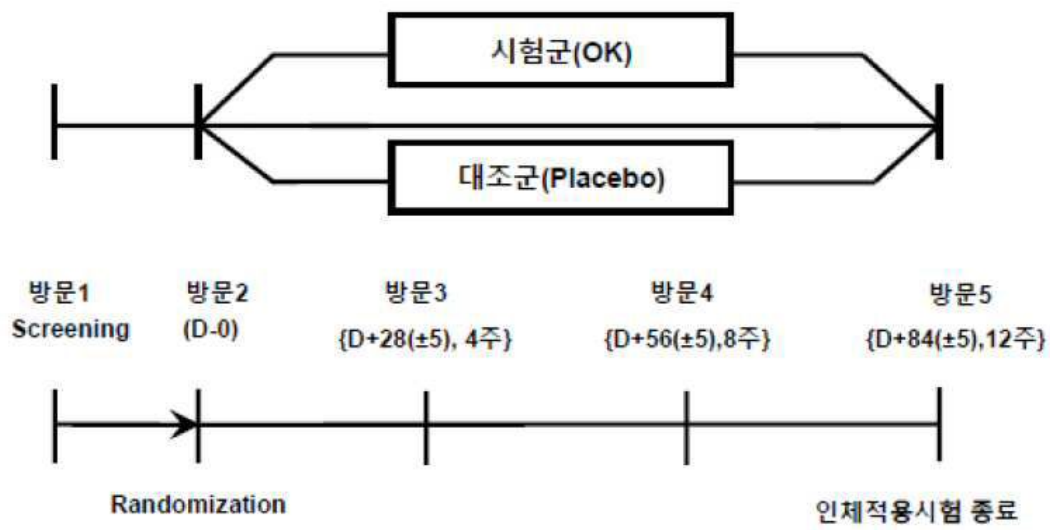
도면2



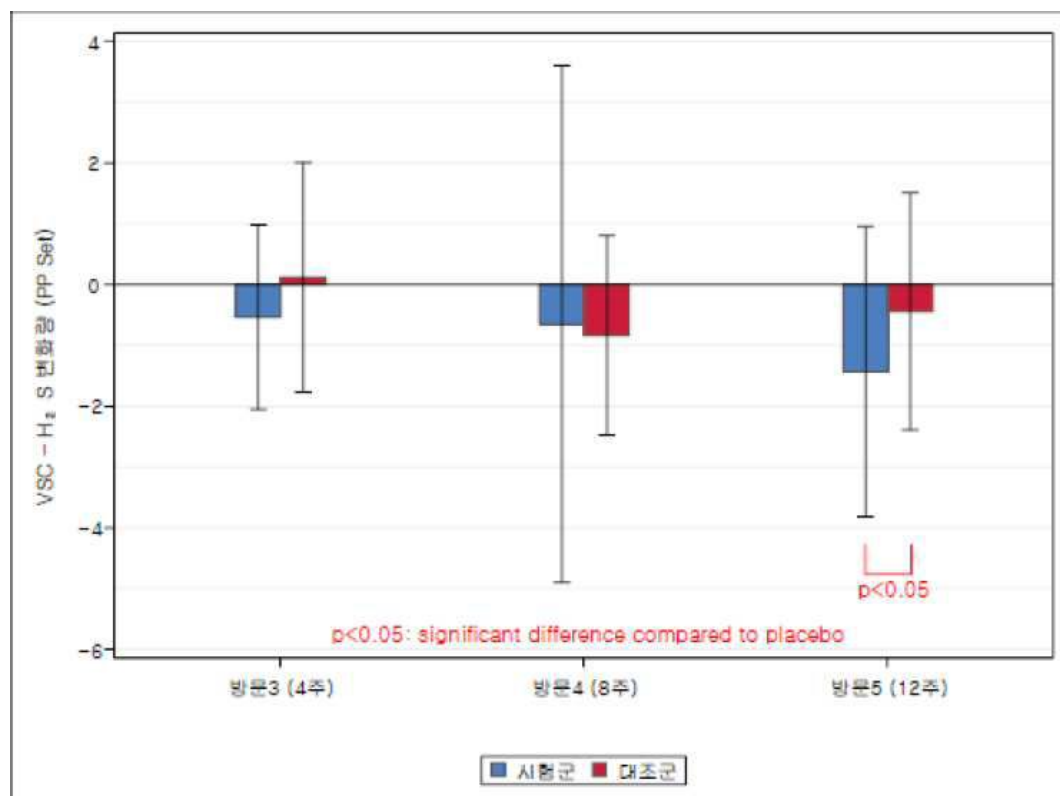
도면3



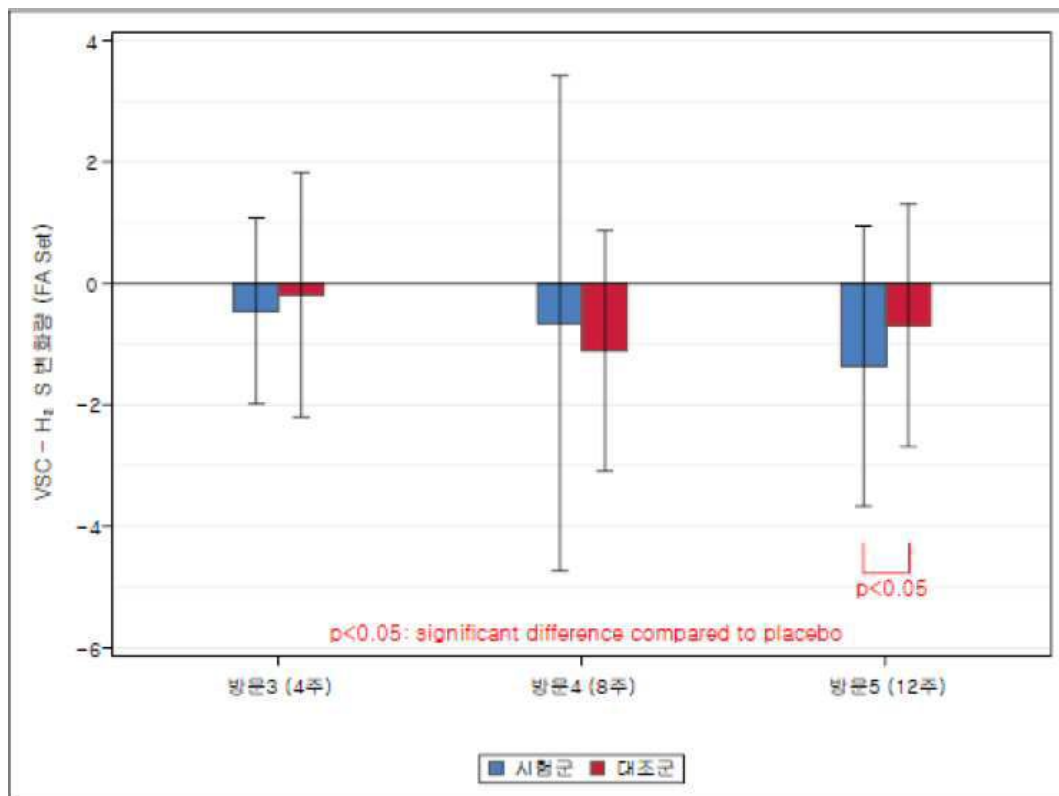
도면4



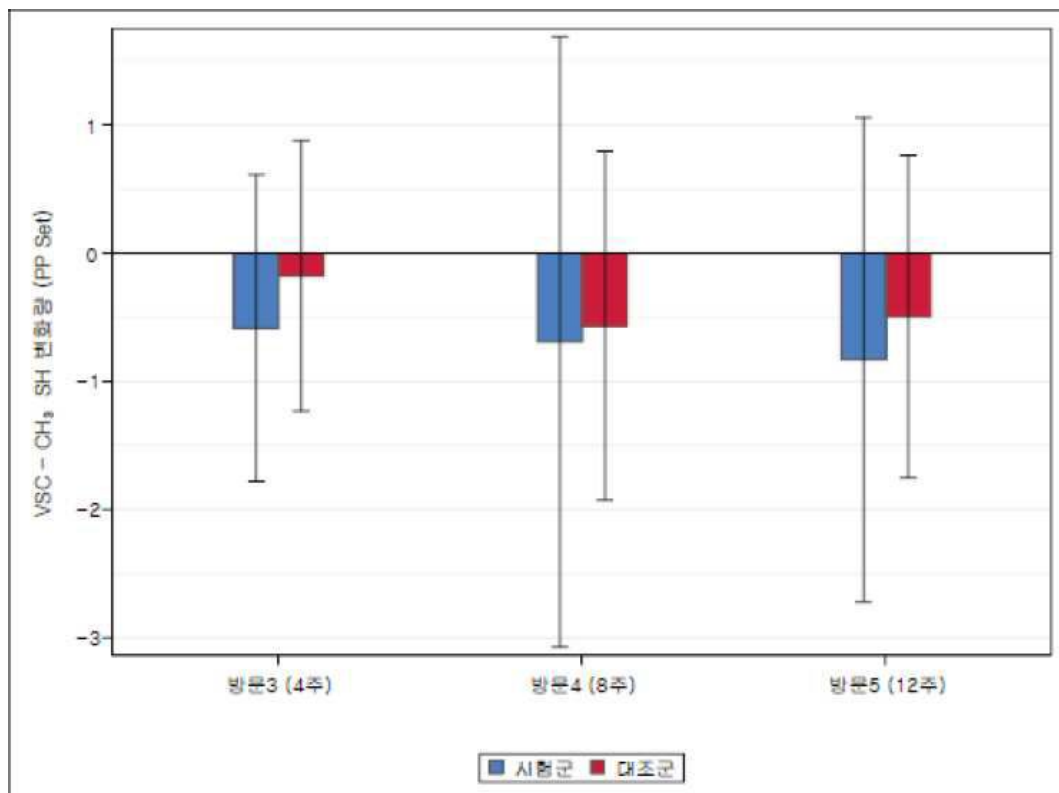
도면5



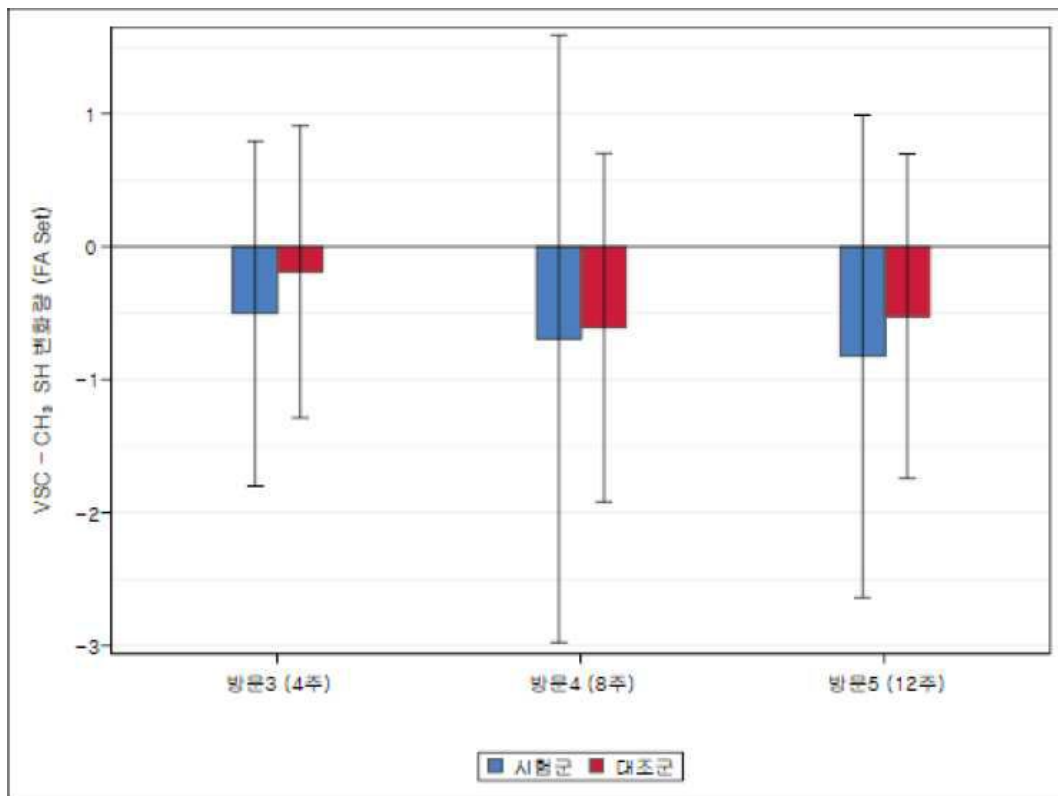
도면6



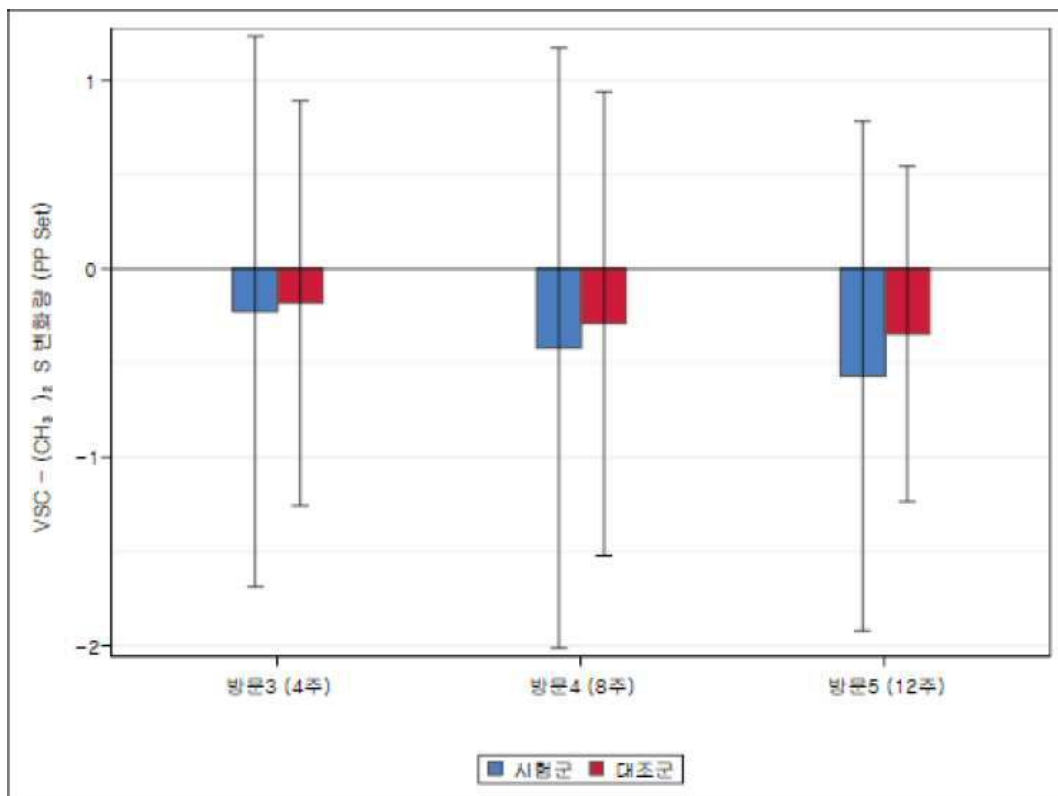
도면7



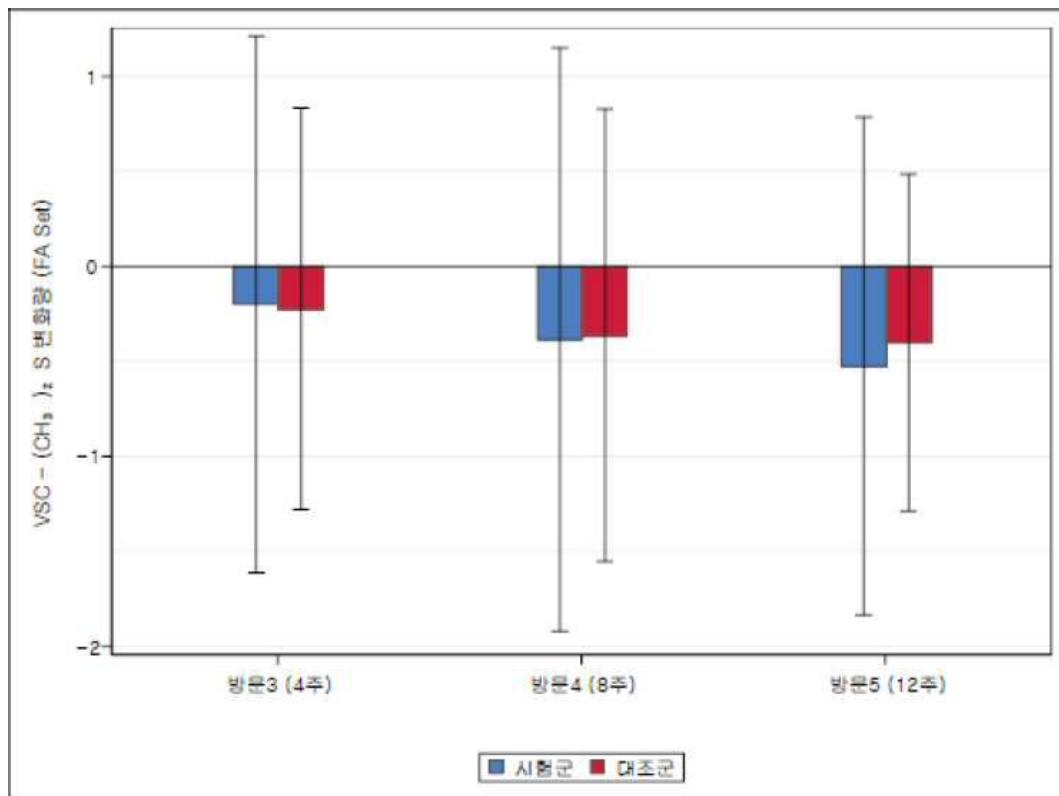
도면8



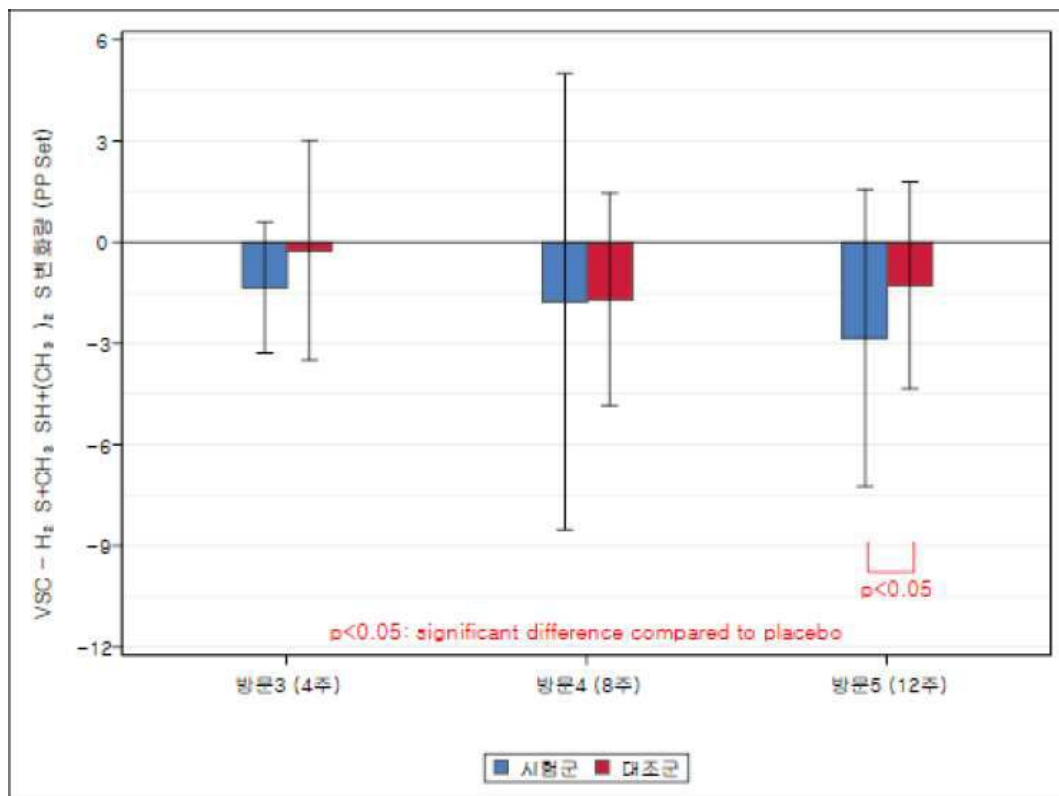
도면9



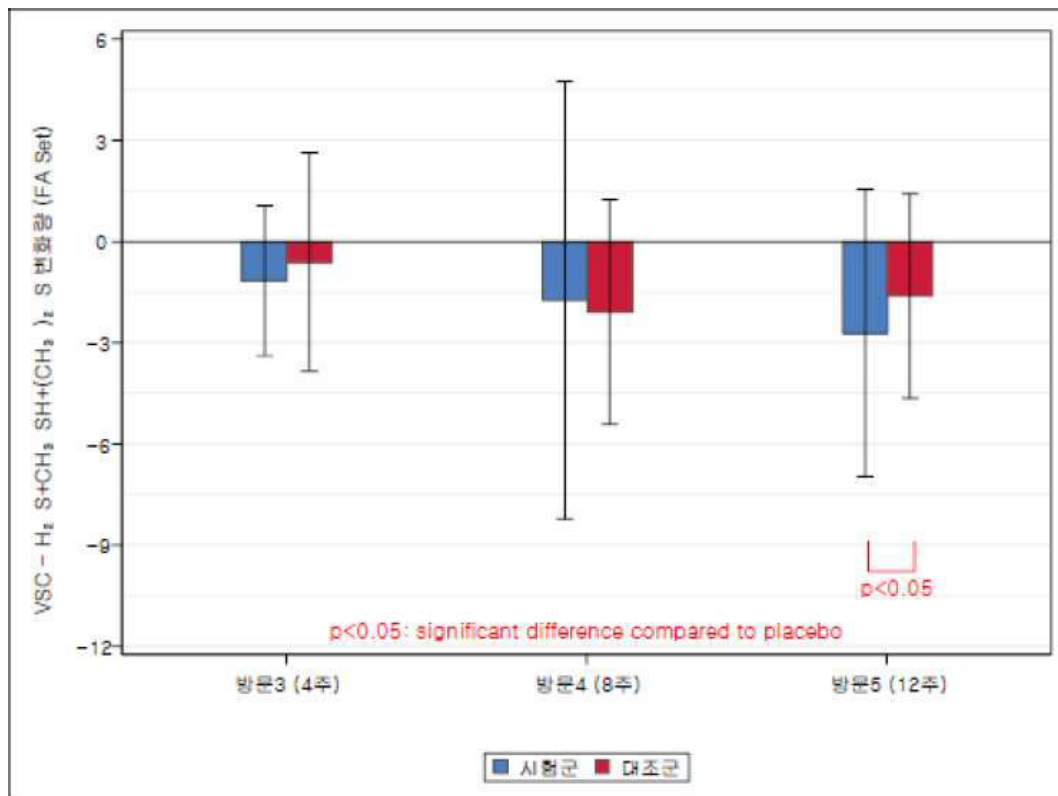
도면10



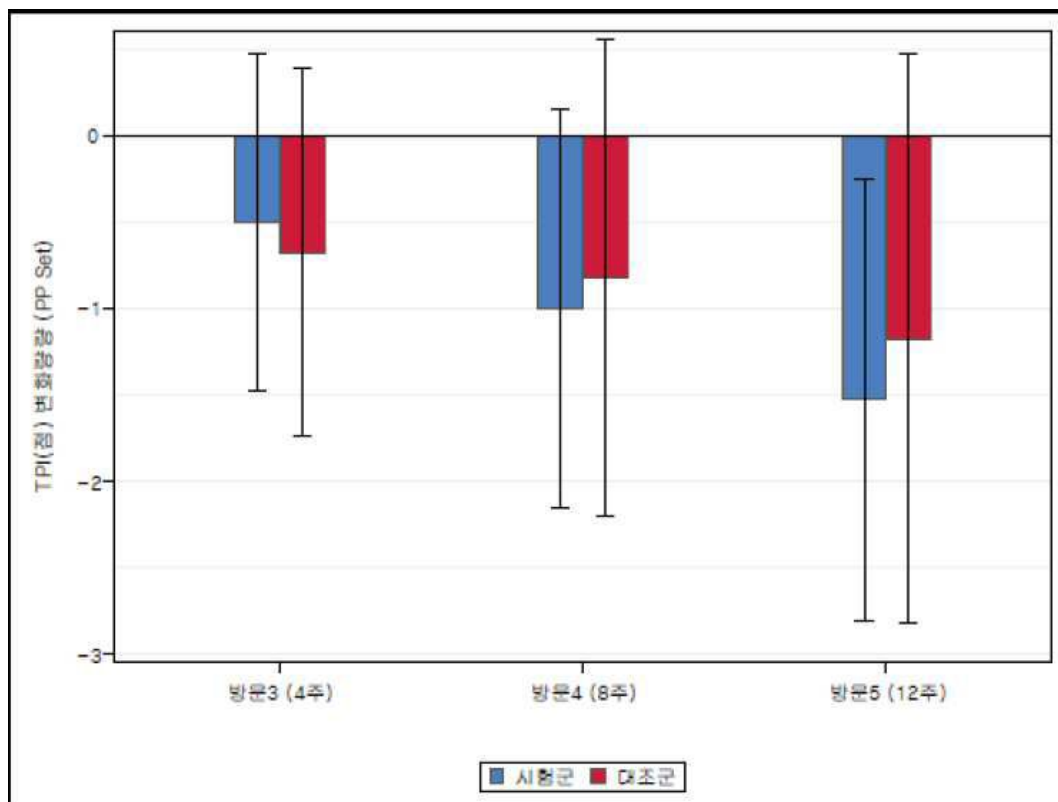
도면11



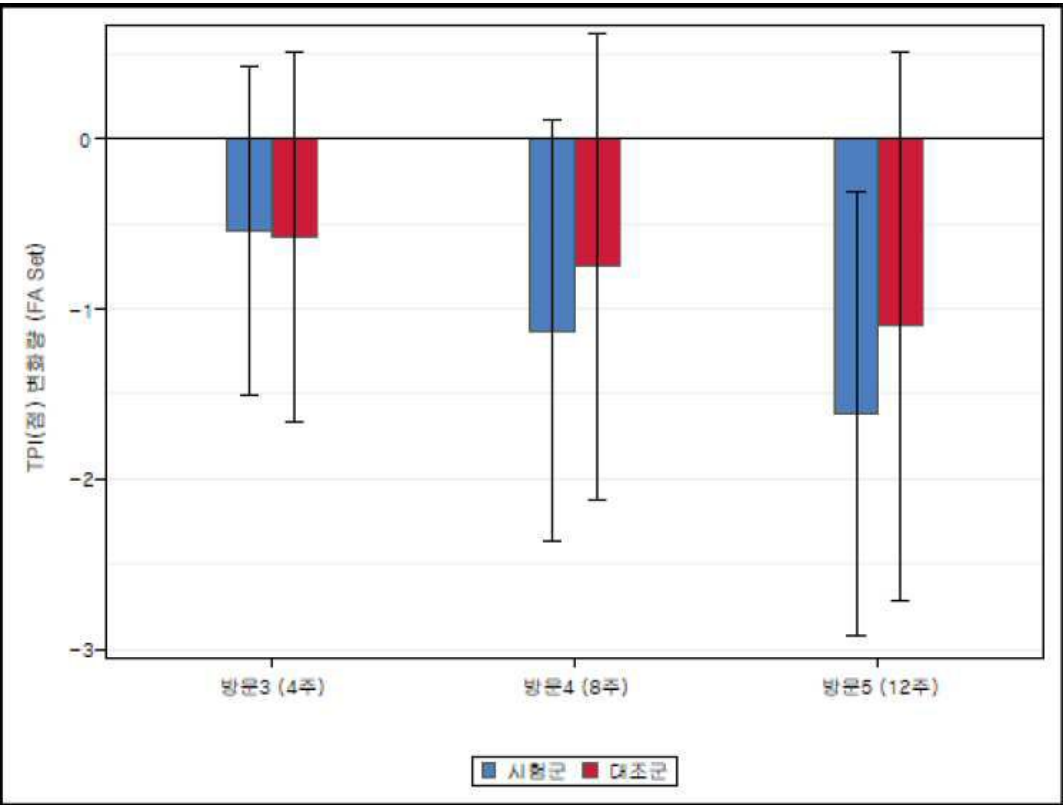
도면12



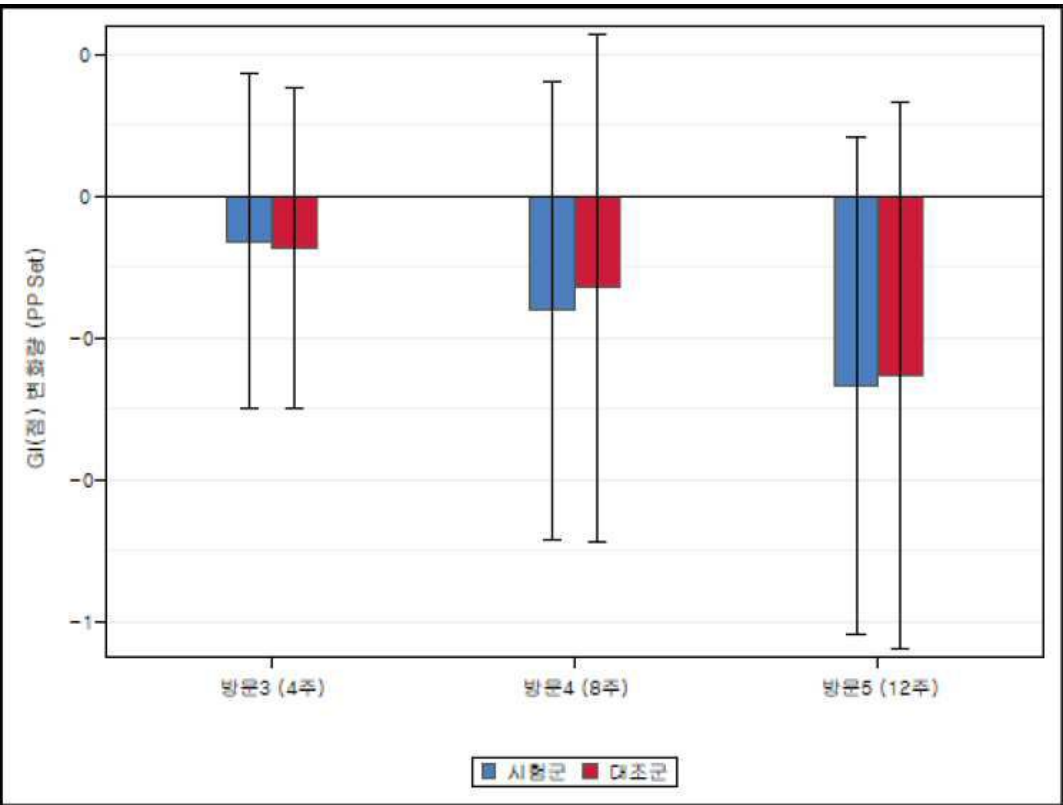
도면13



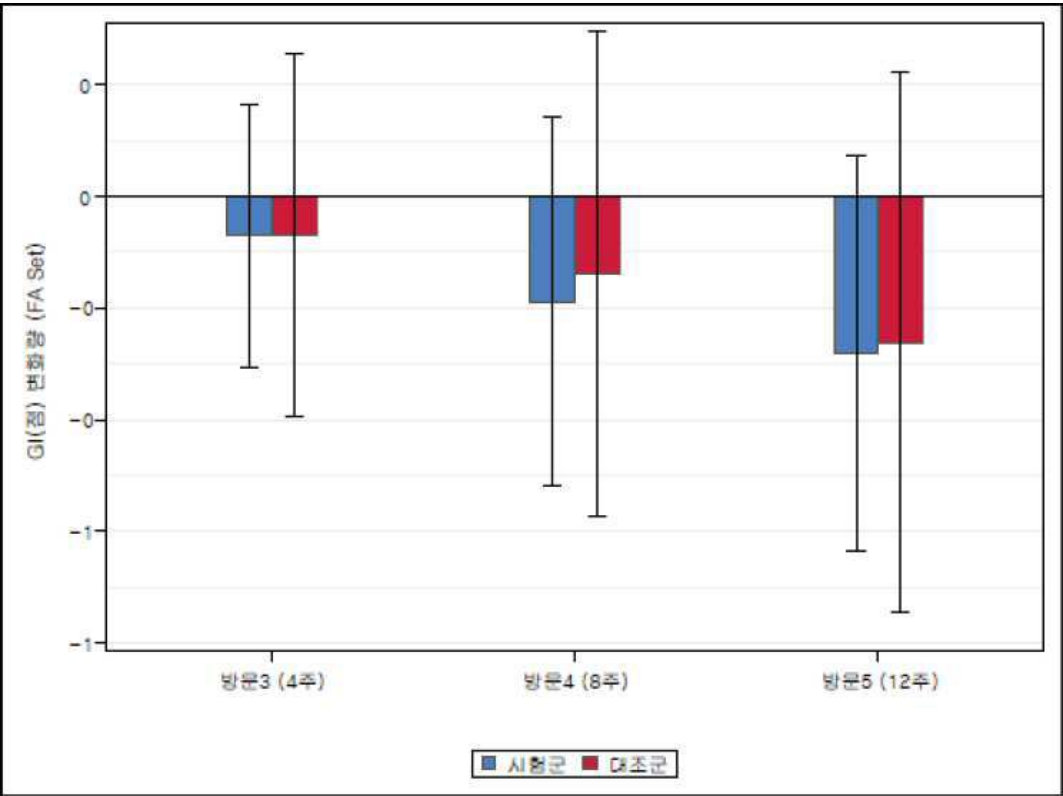
도면14



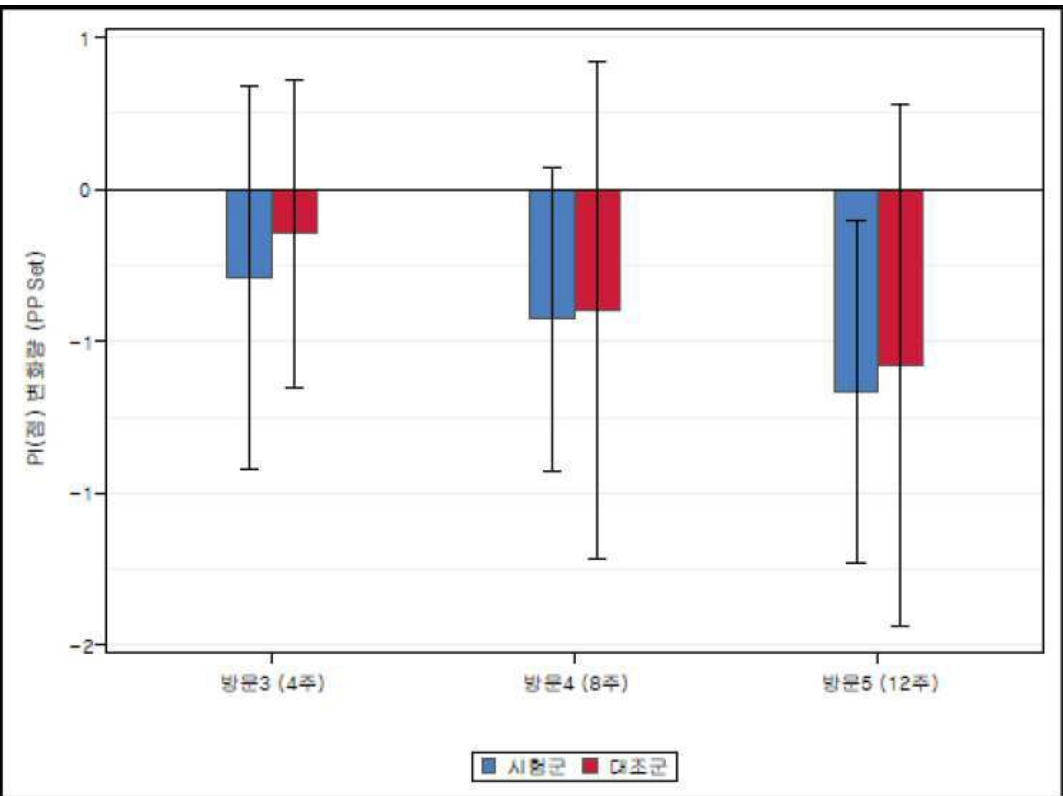
도면15



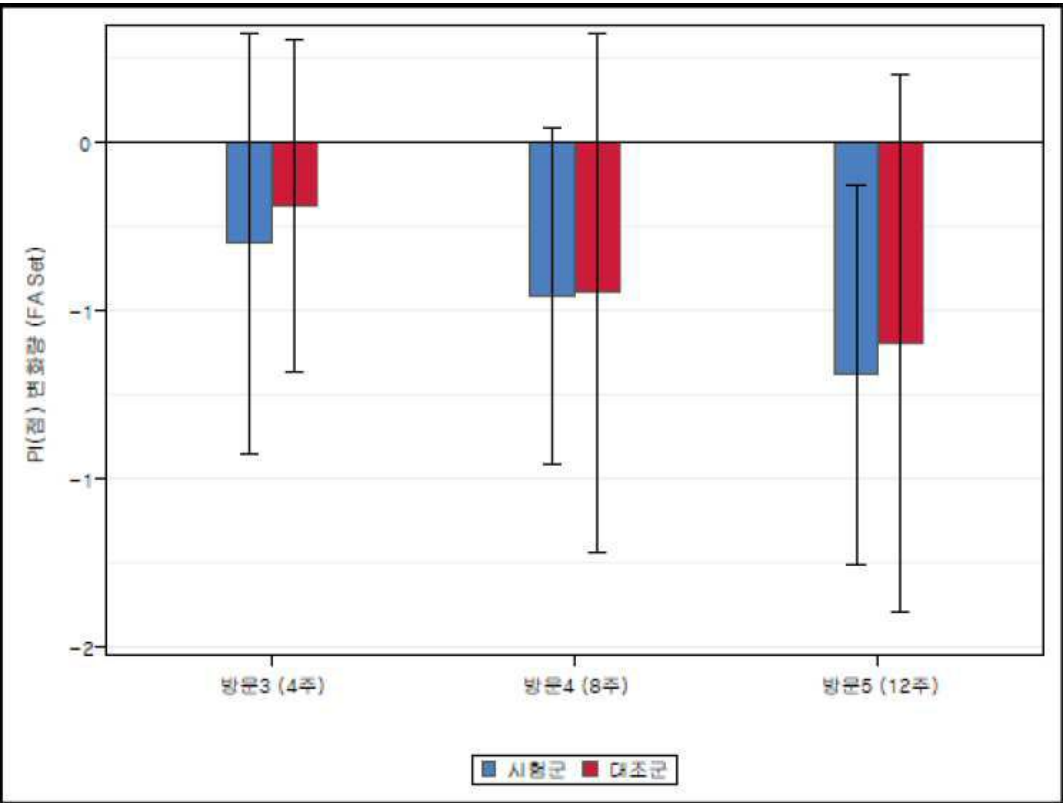
도면16



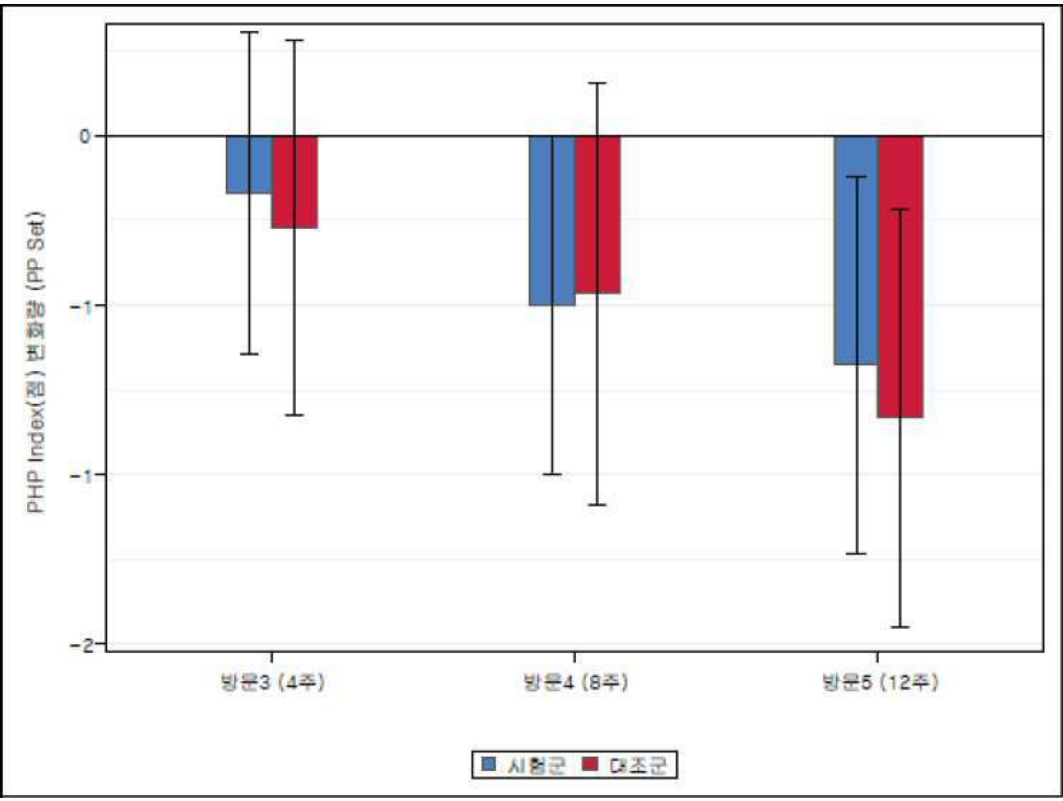
도면17



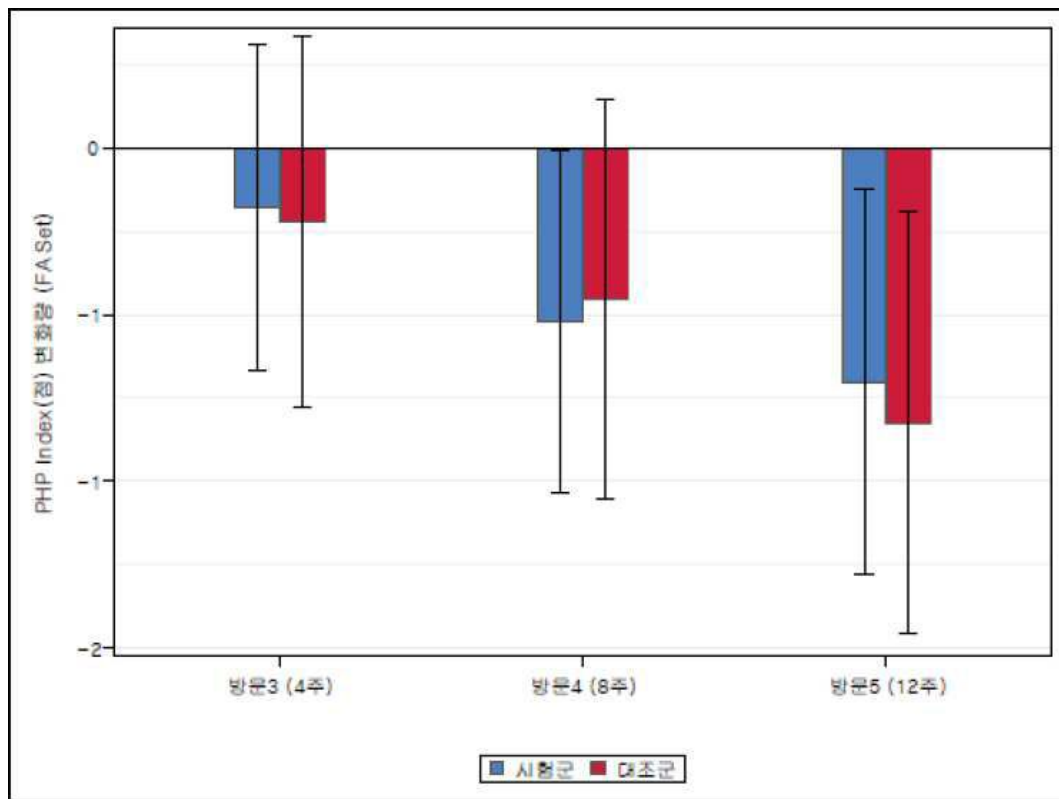
도면18



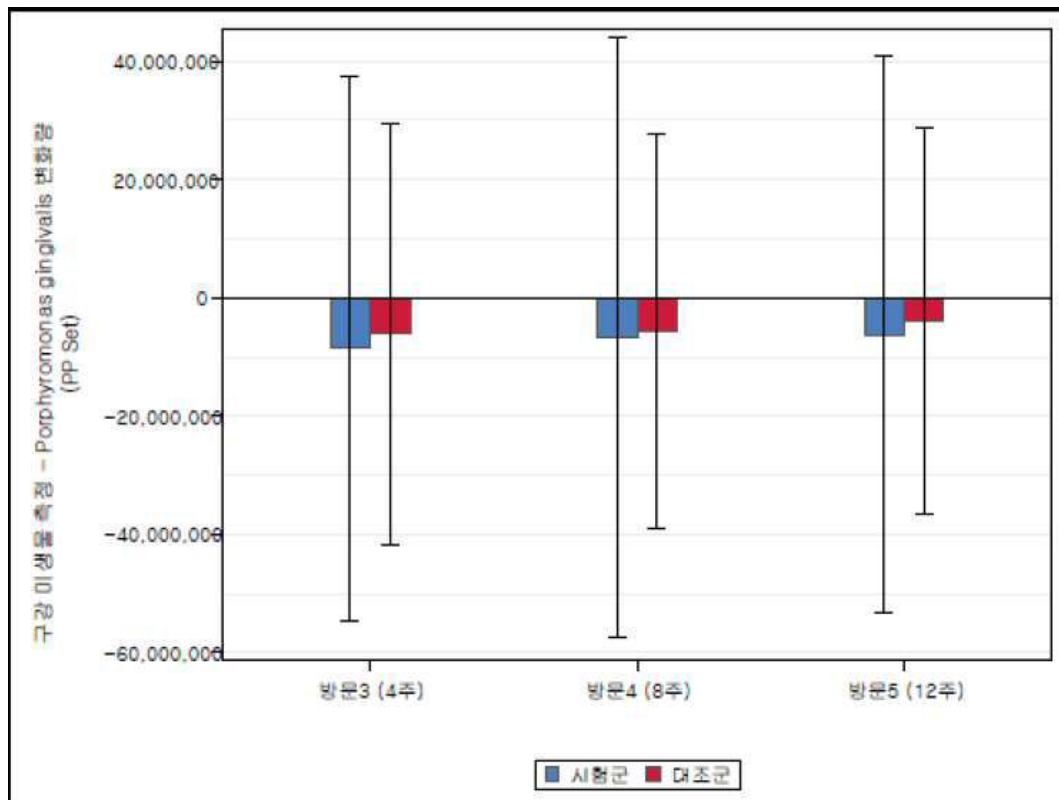
도면19



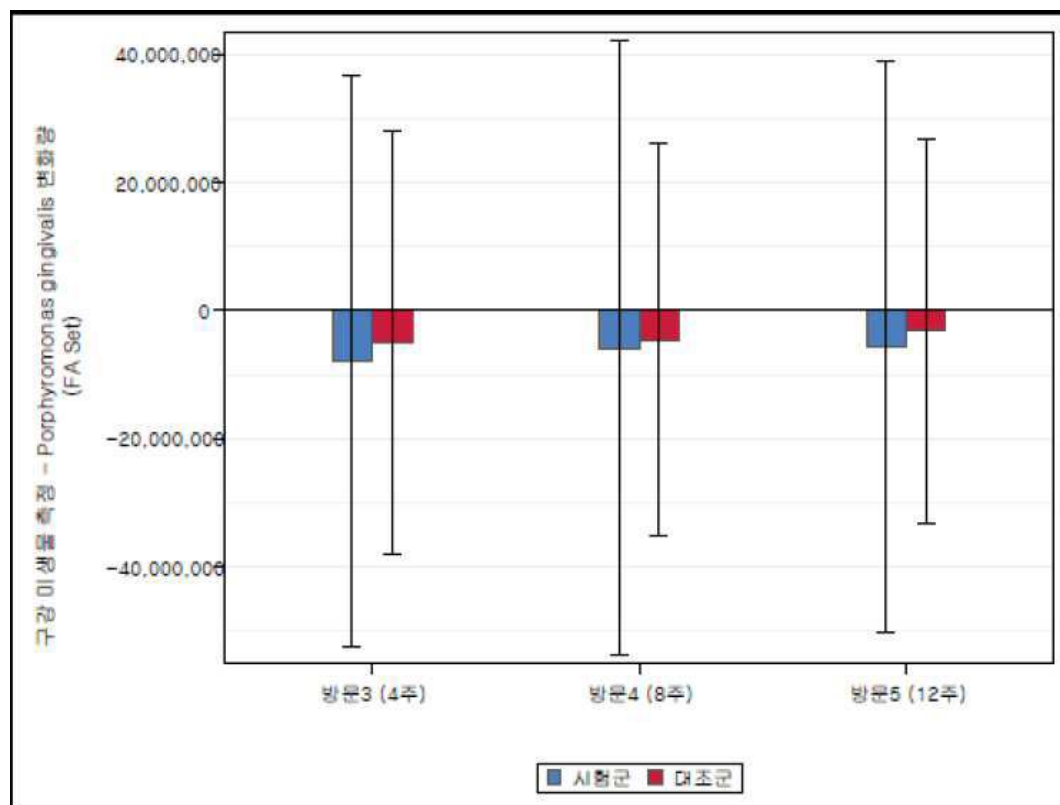
도면20



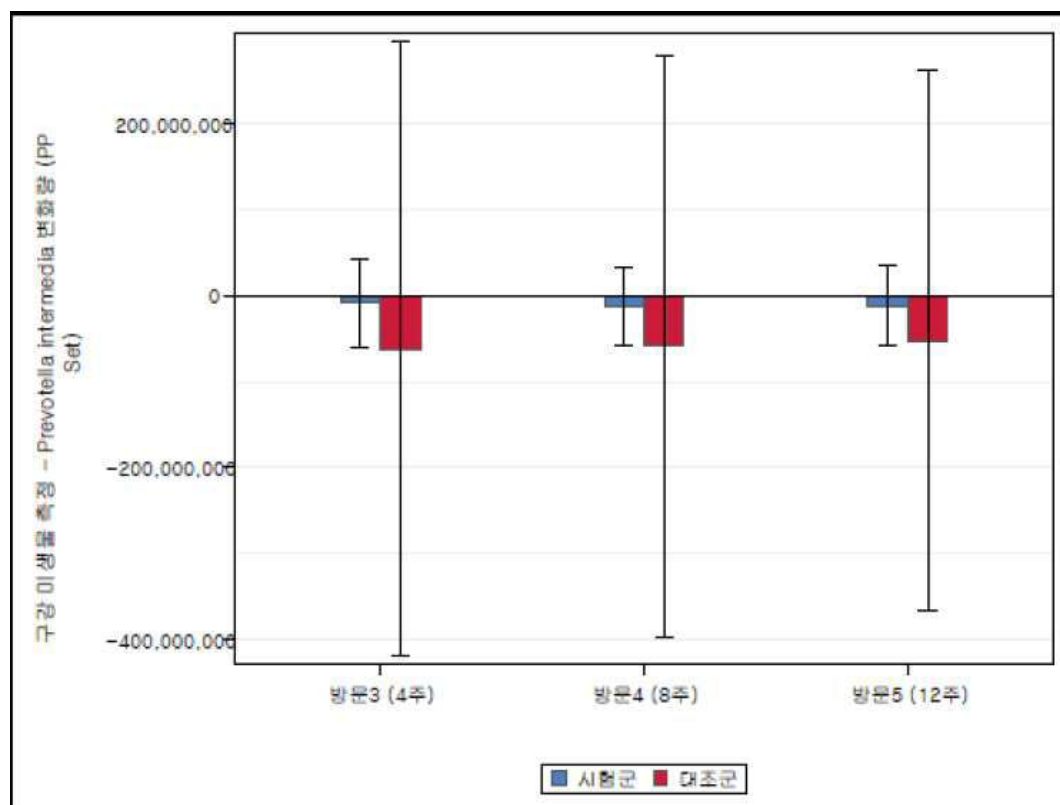
도면21



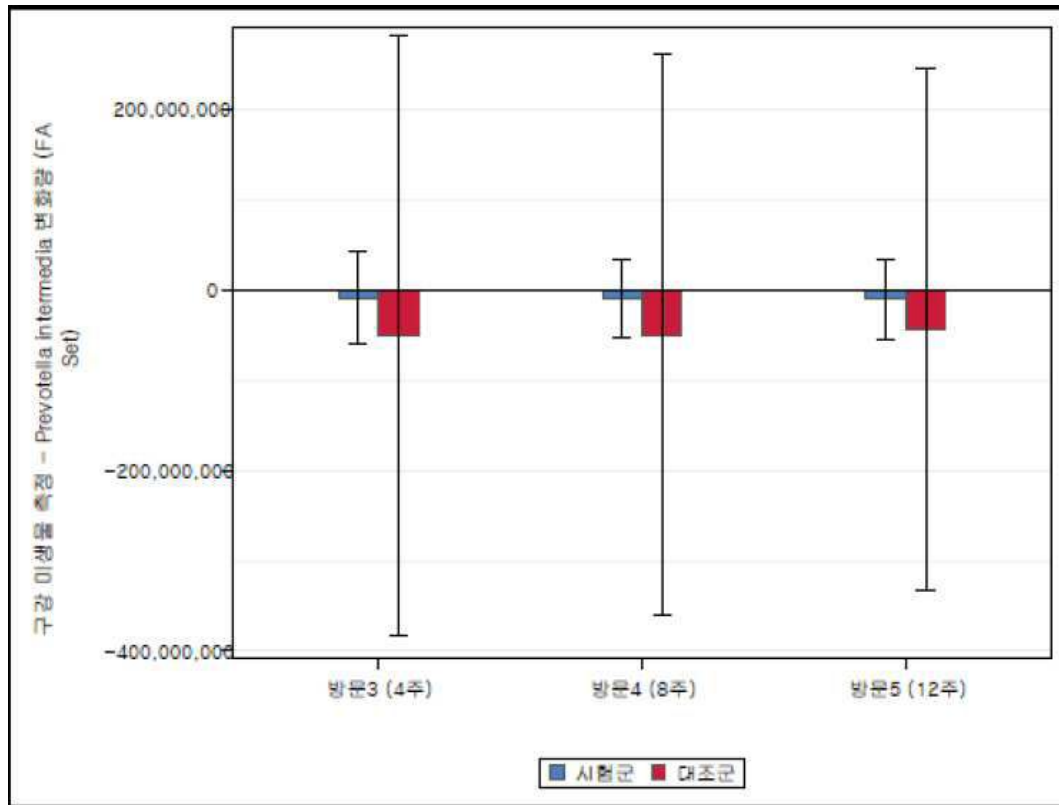
도면22



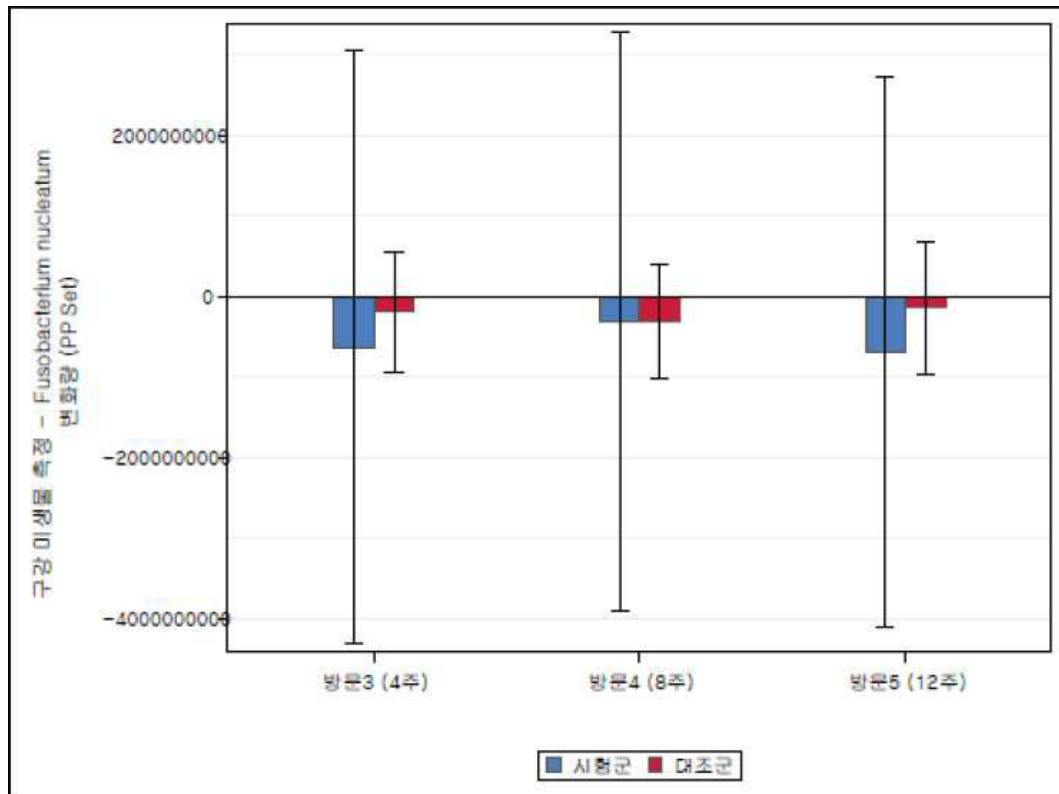
도면23



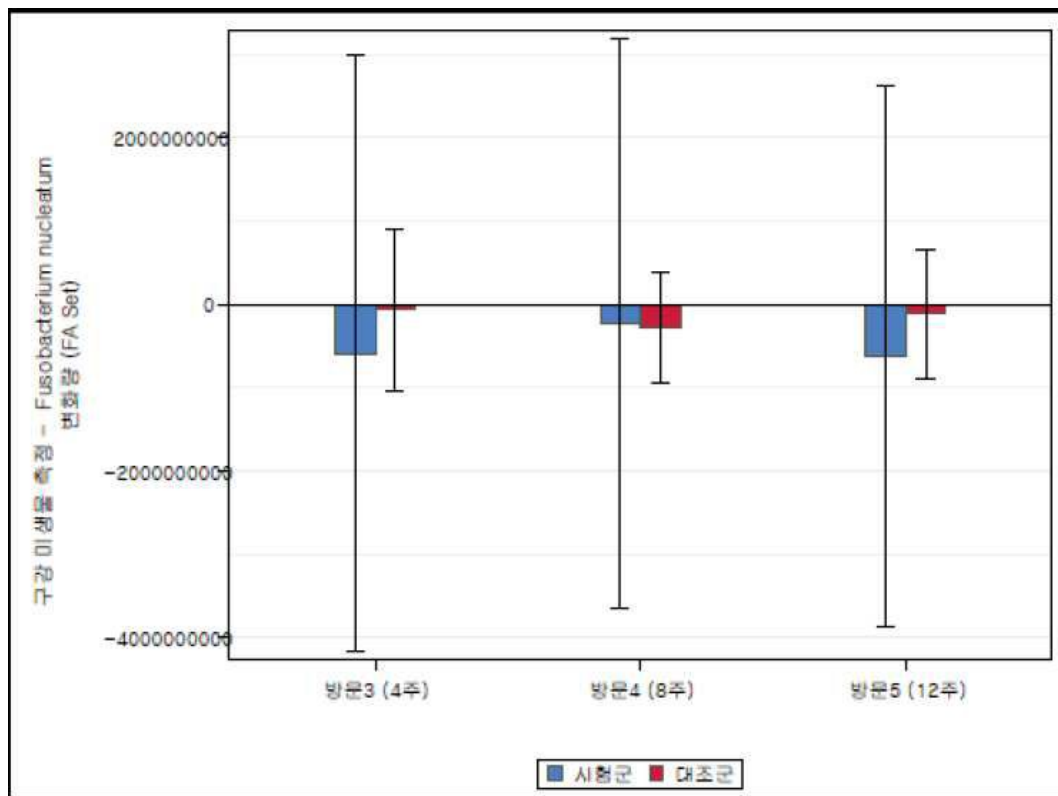
도면24



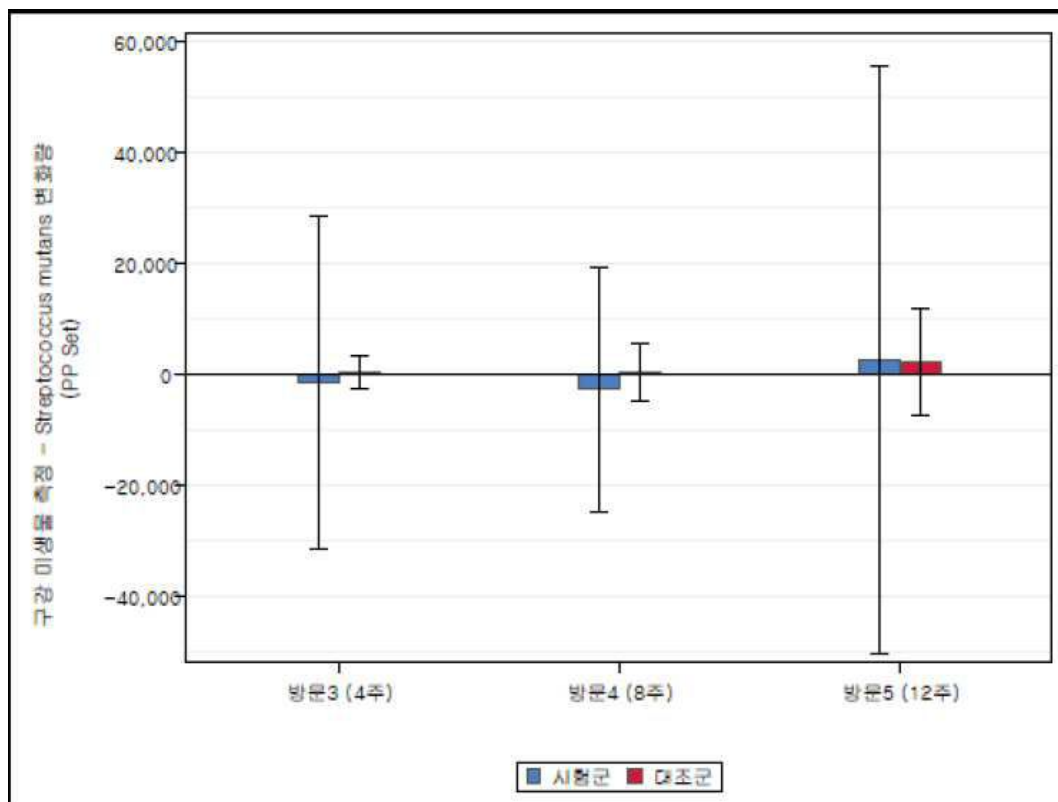
도면25



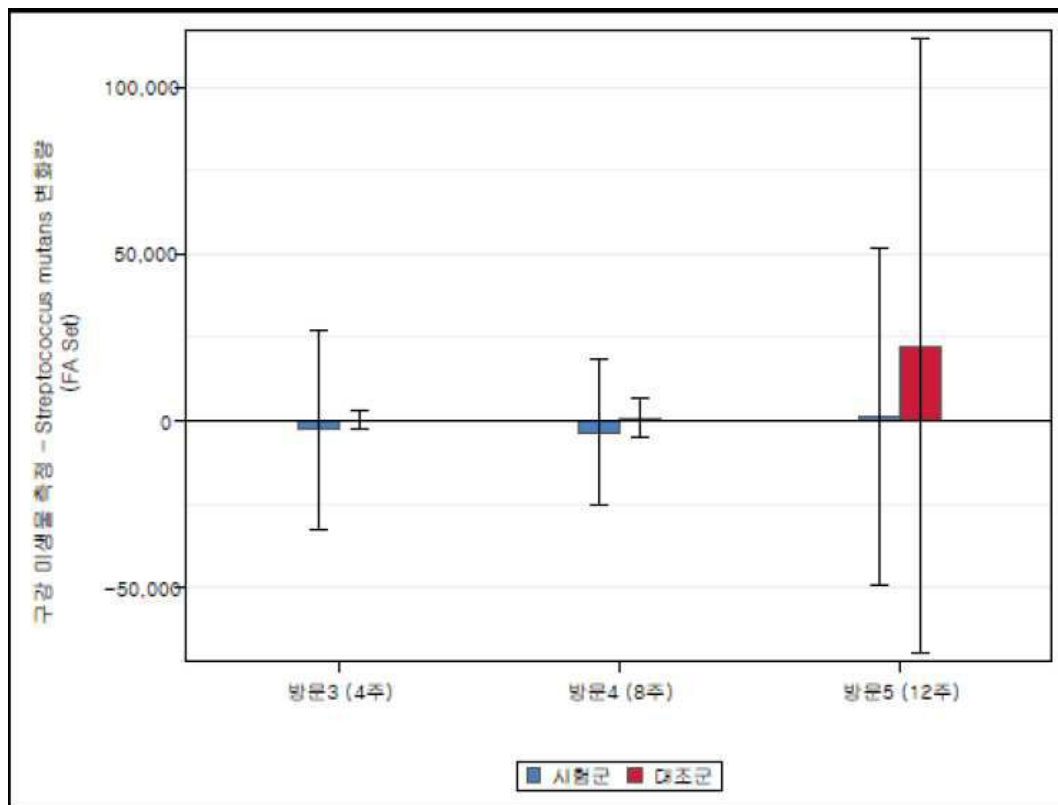
도면26



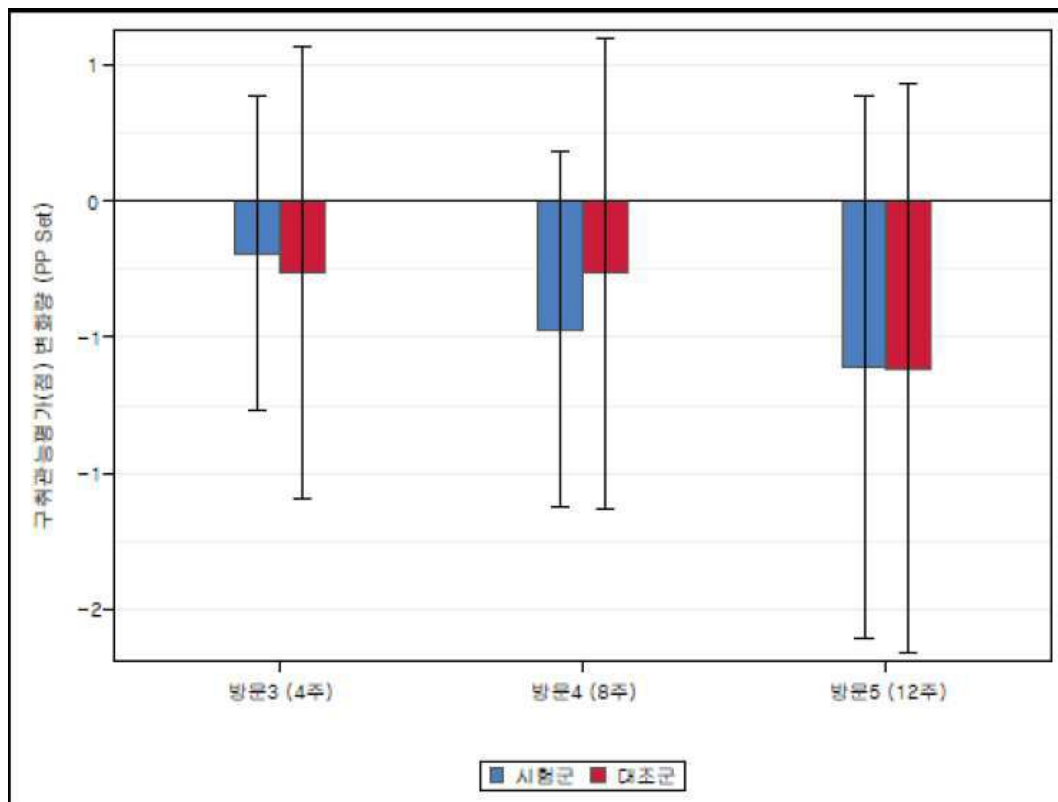
도면27



도면28



도면29



도면30

