



(19) 대한민국특허청(KR)  
(12) 공개특허공보(A)

(11) 공개번호 10-2020-0044055  
(43) 공개일자 2020년04월28일

(51) 국제특허분류(Int. Cl.)  
A61K 8/73 (2006.01) A61K 31/728 (2006.01)  
A61P 1/02 (2006.01) A61Q 11/00 (2006.01)  
(52) CPC특허분류  
A61K 8/735 (2013.01)  
A61K 31/728 (2013.01)  
(21) 출원번호 10-2020-7008162  
(22) 출원일자(국제) 2018년08월21일  
심사청구일자 없음  
(85) 번역문제출일자 2020년03월20일  
(86) 국제출원번호 PCT/EP2018/072514  
(87) 국제공개번호 WO 2019/038261  
국제공개일자 2019년02월28일  
(30) 우선권주장  
1713362.0 2017년08월21일 영국(GB)

(71) 출원인  
지보당 에스아  
스위스 체하-1214 베르니에 슈멩 드 라 파르뤼르  
리 5  
(72) 발명자  
스강돌레라 아망딘  
프랑스 51100 랭스 뒤 질베르 28  
레이노 로맹  
프랑스 31400 툴루즈 뒤 몬드랑 8  
(74) 대리인  
제일특허법인(유)

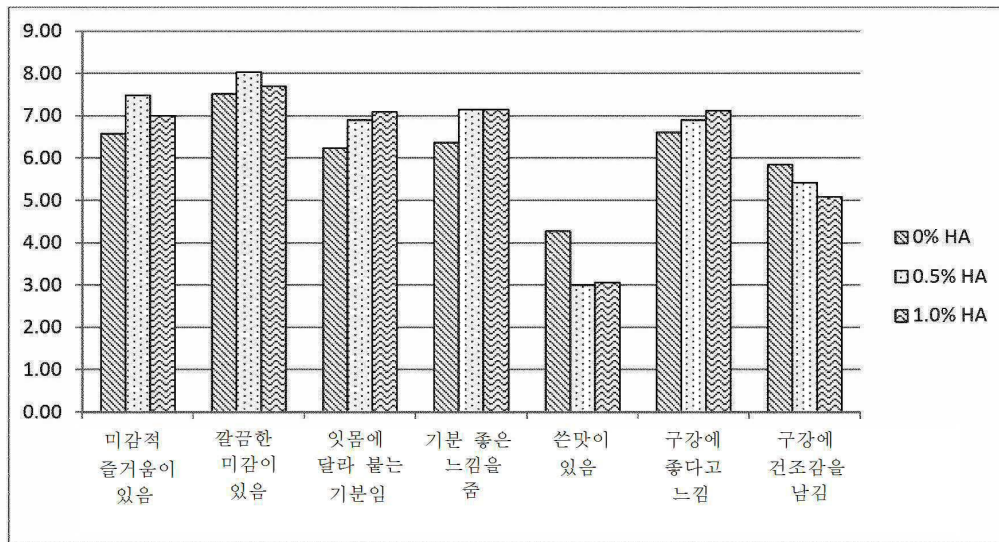
전체 청구항 수 : 총 10 항

(54) 발명의 명칭 유기 화합물의 개선 또는 이에 관한 개선

(57) 요약

본 발명은 구강 점막 회복 촉진 및/또는 생물막 형성 감소에 유용한 히알루론산을 포함하는 구강 관리 조성물에 관한 것이다.

대표도 - 도15



(52) CPC특허분류

*A61P 1/02* (2018.01)

*A61Q 11/00* (2013.01)

*A61K 2300/00* (2013.01)

---

## 명세서

### 청구범위

#### 청구항 1

500 kDa 미만의 평균 분자량을 갖는 히알루론산을 포함하는 구강 관리 조성물.

#### 청구항 2

제1항에 있어서,

히알루론산이 100 내지 300 kDa의 평균 분자량을 갖는, 구강 관리 조성물.

#### 청구항 3

제1항에 있어서,

히알루론산이 20 내지 50 kDa의 평균 분자량을 갖는, 구강 관리 조성물.

#### 청구항 4

제1항 내지 제3항 중 어느 한 항에 있어서,

히알루론산이 미립자 표면 상에 흡착된 캡슐화되거나 미셀화된 형태이거나 분포된 히알루론산 그 자체, 용액 또는 현탁액으로서 제공되는, 구강 관리 조성물.

#### 청구항 5

제1항 내지 제4항 중 어느 한 항에 있어서,

소독제, 수렴제, 지혈제, 구취 반작용제 및 이의 혼합물로 이루어진 군으로부터 선택되는 하나 이상의 활성 성분을 추가로 포함하는 구강 관리 조성물.

#### 청구항 6

제1항 내지 제5항 중 어느 한 항에 있어서,

하나 이상의 티몰 글리코시드, 특히 티몰  $\alpha$ -글루코시드를 추가로 포함하는 구강 관리 조성물.

#### 청구항 7

제1항 내지 제6항 중 어느 한 항에 있어서,

히알루론산을 0.1 내지 1.0%(w/v), 보다 바람직하게는 0.2 내지 0.5%(w/v)의 농도로 포함하는 구강 관리 조성물.

#### 청구항 8

500 kDa 미만의 평균 분자량을 갖는 히알루론산을 포함하는 구강 점막 회복 촉진용 구강 관리 조성물.

#### 청구항 9

100 내지 300 kDa의 평균 분자량을 갖는 히알루론산을 포함하는 생물막 형성 감소용 구강 관리 조성물.

#### 청구항 10

제1항 내지 제9항 중 어느 한 항에 따른 구강 관리 조성물을 구강 표면에 도포하는 단계를 포함하는, 구강 표면에 생물막 형성을 감소시키는 방법.

## 발명의 설명

### 기술 분야

[0001] 본 발명은 구강 점막 회복 및/또는 생물막 형성 감소에 유용한 히알루론산을 포함하는 구강 관리 조성물에 관한 것이다.

### 배경 기술

[0002] 구강 관리는 구강 깨끗하고 질환 없이 유지하는 행위이다. 전형적으로, 이는 구강, 특히 치아의 규칙적인 솔질, 헹굼 및 세척을 수반한다. 치아 질환의 발생을 예방하기 위해, 구강 위생은 규칙적으로 성취되는 것이 중요하다. 치아 질환의 가장 흔한 유형은 치아의 썩음(충치로도 알려져 있음), 치은염 및 치주염이다.

[0003] 치아를 관리하는 것이 건강을 유지하는데 필수적임은 널리 인식되어 있다. 치아 위생의 결여는 치통, 치아의 썩음, 치아-손실, 및 중재 없이는 궁극적으로 보다 더 심각한 전신성 건강 문제를 야기할 수 있다. 불량한 치아 위생과 결부되는 명백한 육체적 건강 문제 이외에도, 치아의 외양과 기분, 및 사회적 및 정신적 건강 사이의 관계는 아마 덜 인식되는 것으로 보인다. 좋은 치아 상태는 더 미소짓게 하는 자신감 및 의지를 고취시킴에 기여하여, 기분에 큰 영향을 줄 수 있다.

[0004] 현재, 매우 다양한 구강 관리 소비자 제품, 예컨대 치약, 구강 세척제, 츄잉껌, 구강 스프레이 및 기타 등등이 이용가능하다. 세척과는 별개로, 이러한 제품은, 예컨대 상쾌감 또는 미백과 같은 다른 효과들도 제공할 수 있다.

[0005] 구강 조직은 다수의 스트레스 출처, 예컨대 저작, 말하기, 호흡 및 구강인두를 통한 세균 침입, 영양 및 외부 환경 등에 빈번히 노출된다. 이러한 요인들은 구강 상처 회복을 지연시키고 감염 위험을 높인다.

[0006] 구강 점막 손상은 종종 칫솔질, 치석 제거, 저작, 말하기, 껌양 또는 수술(예컨대 치아 임플란트 이식 또는 발치를 위한 수술)과 연관된다. 또한, 구강 위생 제품, 예컨대 구강 세척제의 과도한 사용은 구강 조직의 분열을 증가시킬 수 있다.

[0007] WO 2004/056346에는 상처 관리를 위한 방법 및 조성물이 개시되어 있고, 여기서 상기 조성물은 킬레이트제, pH 완충제, 항미생물제, 비타민 E, 담체 및 계면활성제를 포함한다. 특히, 구강 점막의 상처 회복용 구강 헹굼제가 개시되어 있다.

[0008] EP 1 908 457에는 상피조직 병변 치료를 위한 히알루론산의 염을 기재로 하는 조성물이 개시되어 있다.

[0009] 히알루론산은 비함유황(sulfurated) 뮤코폴리사카라이드이고, 연결 조직의 기본 구성 요소이다. 인간 및 동물에서, 히알루론산은 연결 조직에는 존재할 뿐 아니라, 중요한 생물적 유체, 예컨대 유리체액, 안방수 및 탯줄에 존재하는데, 이는 독성이 없고 인간 또는 동물에게 사용하는데 금지되지 않는다.

[0010] 히알루론산은 천연 물질, 예를 들어 콕스 크레스트(cocks' crests)로부터 추출에 의해 수득되거나 생명공학 방법에 의해 제조될 수 있다. 이는 이의 제조 방법에 따라 15,000 kDa에 달할 수 있는 광범위한 분자량 스펙트럼을 갖는다. 히알루론산은 인간 치료 및 미용 분야에서 나트륨 또는 칼륨으로서 사용되는 것으로 공지되어 있고, 히알루론산의 외용은 연결 조직에 바람직한 유익한 효과를 갖고, 히알루로나제를 생성하는 미생물에 의해 유도되는 염증 과정을 감소 또는 제거하는데도 효과적이는데, 이는 염증 성분의 분해를 용이하게 하고, 과도한 모세관 투과성을 감소시키고, 조직 회복 과정을 촉진하고, 자유수를 이의 분자 구조에 대사적으로 결합시킴으로써 항-부종생성 작용을 발달시킨다.

[0011] 미용 분야에서, 히알루론산은 활력 부여(invigorating), 강장(tonic), 피부 회복 및 수화 특성에 사용된다.

[0012] EP 0 138 572에는 조직 상처의 치유에 사용하기 위한 약 50 내지 약 100 kDa의 평균 분자량을 갖는 히알루론산 분획의 사용이 개시되어 있다.

[0013] EP 0 444 492에는 구강 점막의 염증 상태를 치료 및 예방하기 위한 고 분자량(88 내지 4,000 kDa)의 히알루론산의 용도가 설명되어 있다.

[0014] 전형적으로, 건강한 구강 균총은 700종 초과인 세균으로 구성된다. 세균의 분포는 구강의 표면, 치주, 치은, 치석, 구개 및 침에 따라 다르다. 통상적으로, 스트렙토코커스 종(*Streptococcus spp.*)이 가장 우세한 세균이다. 특정 영역, 주로 치아, 치은상 및 치은하 치석의 균열에서, 스태필로코커스 종이 통상적으로 발견되지만,

스타필로코커스 종은 단지 일시적으로 거주하는 미균총(microflora)일 뿐이다. 특히, 스타필로코커스 아우레우스(*Staphylococcus aureus*)가 구강에서 발견된다. 이는 구강에 일시적이지만 빈번히 거주하고, 성인의 건강한 구강의 약 24 내지 84%에서, 의치-착용 인구의 약 48%에서 발생한다.

[0015] 추측상, 구강 감염은 다양한 출처로부터의 교차-감염을 통해 발생한다. 이는 병변, 예컨대 입술염, 이하선염 또는 스타필로코커스 점막염을 야기할 수 있다. 이러한 영역에서, 스타필로코커스 아우레우스가 발견된다.

[0016] 본 발명의 목적은 구강 조직을 보호하고 더 나아가 상처를 치유하는 향상된 구강 관리 조성물을 제공하는 것이다.

### 발명의 내용

[0017] 제1 양상에서, 본 발명은 500 kDa 미만의 평균 분자량을 갖는 히알루론산을 포함하는 구강 관리 조성물을 제공한다.

[0018] 놀랍게도, 저 분자량 및 중간 분자량의 히알루론산이 구강 조직을 회복하고 이를 생물막으로부터 보호하는데 매우 효과적임이 밝혀졌다.

[0019] 제2 양상에서, 본 발명은 본 발명에 따른 구강 관리 조성물을 구강 표면에 도포함으로써 구강 표면 상 생물막 형성을 감소시키는 방법을 제공한다.

### 발명을 실시하기 위한 구체적인 내용

[0020] 본 발명은 500 kDa 미만의 평균 분자량을 갖는 히알루론산을 포함하는 구강 관리 조성물을 제공한다.

[0021] 본원 전체에서, 용어 "평균 분자량"은 달리 제시되지 않는 한 중량 평균 분자량으로 지칭된다.

[0022] 본원에 사용된 용어 "구강 관리 조성물"은 비식품 조성물을 지칭하고, 이는 다양한 유익함을 구강에 가져다 준다. "구강 관리 조성물"은 즉시 사용가능한 소비자 제품 뿐만 아니라 소비자 제품의 전구물(예컨대 사용전 희석되어야 하는 원료 용액) 및 이러한 소비자 제품의 활성 부분도 포함한다. 본질적으로는, 구강 치료에 적합하고 유용한 임의의 조성물이 상기 용어로 다뤄진다.

[0023] 이러한 조성물은 결치제(dentifrice), 구강 세척제, 구강 스프레이 및 가글 조성물, 브레스 스트립(breath strip)(활성제, 예컨대 향미료 또는 브레스-리프레싱제(breath-freshening agent)가 구강에 투여되도록 구강에 넣는 식용 필름), 및 츄잉껌을 포함한다.

[0024] 본원에 사용되는 용어 "결치제"는 달리 특정되지 않는 한, 치약, 구강 관리 젤 또는 액상을 의미한다. 결치제 조성물은 단일상 조성물일 수 있거나, 2개 이상의 별개의 결치제 조성물의 조합일 수 있다. 결치제 조성물은 임의의 목적하는 형태, 예컨대 심도 스트립화(deep striped)된 것, 표면 스트립화된 것, 다층화된 것, 페이스트를 둘러싸는 젤을 갖는 것, 또는 이의 임의의 조합일 수 있다.

[0025] 구강 관리 제품은, 예를 들어 치약, 구강 행굼제, 구강 세척제 및 휴대용 온 더 고(on the go) 구강 악취 제어 제품, 예컨대 츄잉껌, 캔디, 파스티유(pastille), 식용 필름 및 구강 스프레이를 포함한다. 전술한 구강 관리 제품을 위한 제형은 당업계에 주지되어 있다. 구강 관리 제품은, 예를 들어 계면활성제, 유화제, 용매, 착색제, 보존제, 항산화제, 향미생물제, 효소, 식물성 오일 또는 미네랄 오일, 지방, 단백질, 가용화제, 당 유도체, 비타민, 폴리올, 예컨대 솔비톨, 유기산, 인공 감미료, 중합체, 증점제, 츄잉껌의 겔베이스, 구강 관리 활성제, 예컨대 불소 화합물 및 아연 염(예를 들어 아연 글루코네이트, 아연 아세테이트, 아연 시트레이트)를 함유한다. 일부 구강 관리 제품은 알코올, 특히 저급 알코올(C1-C4)을 함유한다.

[0026] 저 분자량 및 중간 분자량 둘다의 히알루론산이 처리 24시간 후, 미처리된 점막에 비해 구강 점막 회복을 촉진할 수 있음이 밝혀졌다. 상기 효과는 손상의 완전한 회복과 결부된 상처 치유의 활성 기작을 수반하였다. 손상 후 재상피화를 평가하기 위해 수행된 실험의 자세한 설명은 하기 실시예 1 내지 4에서 찾을 수 있다.

[0027] 이와는 대조적으로, 고 분자량(1,000 내지 1,400 kDa)의 히알루론산은 단지 피부 표면 상에서 막을 형성함으로써 조직 회복 촉진에 기전적 효과만을 나타냈다.

[0028] 결론적으로, 본 발명의 구강 관리 조성물은 500 kDa 미만, 바람직하게는 400 kDa 미만, 보다 바람직하게는 300 kDa 미만의 평균 분자량을 갖는 히알루론산을 포함한다.

[0029] 또한, 본 발명의 구강 관리 조성물은 상화된 점막 촉지(tactile) 특성을 제공하는 것으로 밝혀졌다. 특히, 껌

의 매끄러움이 향상되었고, 조성물이 "건강한 느낌(healthy feel)"을 제공하였다.

- [0030] 비교 시험(하기 실시예 11 참고)에서, 본 발명의 구강 관리 조성물은 보다 즐겁고, 깔끔하고, 덜한 건조감을 제공하고, 구강 및 잇몸에 좋은 느낌을 주는 것으로 지각되었다. 또한, 히알루론산의 혼입은 치약의 맛에 유리한 효과를 주어, 이를 덜 쓰게하고, 달게하고, 덜 짜게하였다. 또한, 거품 형성, 탄맛, 건조감이 덜했고, 깔끔한 느낌을 제공하였다.
- [0031] 본 발명의 구강 관리 조성물은 (특히 아연 염을 함유하는 것에서) 뚱은 맛을 감소시킨다. 통상적으로, 아연 염은 구강 관리 제형에 사용되고, 다수의 경우 관련된 뚱은 맛에 기인하여 구강 관리 제품 소비자에게 문제가 되는 것으로 여겨진다. 현재, 본원에 정의된 히알루론산을 혼입함으로써, 치약, 구강 세척제 및 기타 구강 관리 제품의 뚱은 맛 및/또는 건조감의 효과가 감소되거나 심지어는 완전히 제거될 수 있음이 밝혀졌다.
- [0032] 바람직하게는, 본 발명의 구강 관리 조성물은 약 5 kDa 이상의 평균 분자량을 갖는 히알루론산을 포함한다.
- [0033] 평균 분자량의 바람직한 범위는 저 분자량 히알루론산에 대해 약 20 내지 약 50 kDa이고 중간 분자량 히알루론산에 대해 약 100 내지 약 300 kDa이다.
- [0034] 저 분자량 히알루론산은 구강 점막 회복에 특히 효과적인 것으로 밝혀졌다.
- [0035] 결과적으로, 바람직한 양태에서, 본 발명의 구강 관리 조성물은 약 80 kDa 미만, 바람직하게는 약 10 내지 약 65 kDa, 가장 바람직하게는 약 20 내지 약 50 kDa의 평균 분자량을 갖는다.
- [0036] 저 분자량 히알루론산의 생물적 활성은 세포 응집(타이(Tigh) 연결(ZO-1/오클루딘)의 발현을 증가시킴), 플럼핑(I형 콜라겐의 생성을 촉진함), 수화(피부의 수분량을 증가시킴), 역학적 특성(견고함 및 긴장성의 향상) 및 피부 투과(유의한 피부 투과(120  $\mu$ M))와 관련된다.
- [0037] 또한, 중간 분자량 히알루론산은 감소시키고, 군락화된 구강 점막 모델로부터 조직으로의 세균의 접촉 및 이의 투과를 감소시킨다. 주사 전자 현미경에 의한 생물막 분석은 중간 분자량 히알루론산으로 처리된 구강 점막이 더 적은 세균 클러스터를 나타내고 부유 생물 표현형으로부터 생물막으로의 전환(기질 폴리사카라이드 생성에 의해 관찰됨)을 차단함을 나타냈다. 이에 따라, 중간 분자량 히알루론산은 구강 점막의 조직 회복을 촉진할 뿐만 아니라 병원성 세균이 생물막을 형성함을 방지한다.
- [0038] 결과적으로, 바람직한 양태에서, 본 발명의 구강 관리 조성물은 약 80 내지 약 500 kDa, 바람직하게는 약 90 내지 약 400 kDa, 가장 바람직하게는 약 100 내지 약 300 kDa의 평균 분자량을 갖는 히알루론산을 포함한다.
- [0039] 중간 분자량 히알루론산의 생물적 활성은 항미생물 방어(실험관내 및 생체외에서 TRL2 및 TRL4에 따른 디펜신 생성을 증가시키고, *E.Coli*의 세균 억제에 의한 피부 면역성을 제어함), 세포 증식 및 세포 이동(세포 증식 및 세포 이동(각질세포 및 섬유아세포)을 촉진함) 및 피부 투과(피부의 유의한 투과(40  $\mu$ M))와 관련된다.
- [0040] 수행된 실험의 상세 결과는 하기 실시예 5 내지 9에 기재된다. 결론적으로, 중간 분자량 히알루론산이
- [0041] - 군락화 없이 TEER 수준을 회복하고(장벽 기능);
- [0042] - 총 세균수를 감소시키고(-50%, 세균 증식);
- [0043] - 재구축된 인간 구강 상피(RHO)에서 세균 침입을 제한하고(세균 투과);
- [0044] - 세균에서 부유 생물 표현형을 보존하고(생물막 형성);
- [0045] - 생물막 형성을 억제함(폴리사카라이드 기질, 생물막 형성)
- [0046] 이 밝혀졌다.
- [0047] 전반적으로, 구강 조직 회복을 활성적으로 촉진하고 세균 생물막에 대한 효율적인 보호를 나타냄에 기인하여, 중간 분자량 히알루론산이 가장 우수한 구강 관리 적용임이 밝혀졌다. 따라서, 특히 바람직한 양태에 따라, 본 발명의 구강 관리 조성물은 중간 분자량 히알루론산을 포함하고, 특히 약 100 내지 약 300 kDa의 평균 분자량을 갖는 히알루론산을 포함한다.
- [0048] 본 발명의 구강 관리 조성물에서, 히알루론산은 통상의 기술자에게 공지되어 있는 임의의 적합한 형태로 제공될 수 있다. 특히, 히알루론산은 미립자 표면 상에 흡착된 캡슐화되거나 미셀화된 형태이거나 분포된 히알루론산 그 자체, 용액 또는 현탁액으로서 제공될 수 있다. 히알루론산이 그 자체의 형태로 사용되는 경우, 이는 전형적으로 분말이고, 구강 관리 조성물에 직접 혼입될 수 있다. 다르게는, 히알루론산은 용액 또는 현탁액, 바람

직하게는 수성 또는 알코올성 용액 또는 현탁액의 형태로 사용될 수 있다. 또한, 히알루론산은 캡슐화되거나 미셀화된 형태, 바람직하게는 슬러리 형태로 제공될 수 있다. 다르게는, 히알루론산은 미립자 표면 상, 예컨대 티타늄 옥사이드 상에 흡착되거나 분포된다.

- [0049] 본 발명의 구강 관리 조성물은 통상의 기술자에게 일반적으로 공지되어 있는 기타 활성 성분 및 첨가제를 함유할 수 있다. 특히, 이는 봉해제, 수렴제, 지혈제, 구취 반작용제 및 이의 혼합물을 추가로 포함할 수 있다.
- [0050] 또한, 본 발명의 구강 관리 조성물은 우세한 향미 또는 냄새를 사용함으로써 구취 또는 구취의 지각을 차폐하는 한편, 악취가 존재하지만 조합으로는 덜 감지가능하게 하는 강렬한 향미료를 함유할 수 있다. 예를 들어, JP 2004018431에는 민트 오일 또는 민트 식물에 포함되는 것으로 공지되어 있는 화합물을 포함하는 다양한 향미 조성물이 기재되어 있는데, 이는 차폐 향미 화합물과의 조합으로 구취에 대항하는 활성제인 것으로 공지되어 있다 (예를 들어 멘톨).
- [0051] 또한, 본 발명의 구강 관리 조성물은 고전적인 항세균제, 예컨대 트라이클로산, 세틸-피리디늄 클로라이드 및 클로르헥시딘을 함유할 수 있다. 또한, 천연 성분 또는 향미 화합물의 항세균 효과가 사용될 수 있다. 예를 들어, 티몰, 노루발풀 오일, 메틸 살리실레이트, 유칼립톨 및 민트 오일 및 민트 식물에서 발생하는 화합물, 특히 멘톨을 포함한다. 악취 반작용 효과를 갖는 것으로 공지되어 있는 추가의 천연 성분은 파슬리, 이오논(알파-이오논, 베타-이오논, 감마-이오논, 다이하이드로-이오논, 알파-메틸이오논, 이론(irone))과 아연 염의 조합 및, 특정 고급 알코올(특히 노난올)과 C1-C4 알코올의 조합을 포함한다(WO 99/51093).
- [0052] 다른 대안은, 특히 반응성 화합물에 의해 악취 휘발물질을 화학적으로 포획함에 의해 구강 세균을 매우 온전하게 방지함으로써 구강 악취를 감소시키는 것이다. 예를 들어, 페놀계 화합물, 예컨대 녹차 추출물 또는 아연 염에 함유된 것이 휘발성 향 화합물을 포획하는데 사용될 수 있다. 추가의 화학적 접근법은 악취 향 휘발물질을 산화제를 적용함으로써 분해시키는 것이다.
- [0053] 또 다른 접근법은 관련 효소를 효소적으로 억제함으로써, 악취 향 휘발물질이 먼저 형성되지 않도록 하는 것이다. 예를 들어, 특정 식물 추출물(토마토, 운카리아 감비어(Uncaria gambier), 퀴라자 사포나리아(Quillaja saponaria), 하마멜리스 버지니아나(Hamelis virginiana), 에리오보트리아 자포니카(Eriobotrya japonica), 에퀴세툼 아르벤스(Equisetum arvense), 크라태거스 옥시아칸타(Crataegus oxyacantha), 다이오스포로스 카키(Diospyros kaki), 커쿠마 도메스티카(Curcuma domestica), 정코 빌로바, 녹차, 홍차 및/또는 우롱차)가 MeSH를 생성하는 메티오니나제 효소를 억제하는데 사용될 수 있다.
- [0054] 또한, 본 발명의 구강 관리 조성물은 옥트-2-인산 메틸 에스터, 논-2-인산 메틸 에스터, 옥트-2-엔산 에틸 에스터, 옥트-2-엔산 메틸 에스터, 논-2-엔산 메틸 에스터, 헥스-2-엔산 에틸 에스터, 헥스-2-엔산 메틸 에스터, 논-2-인산 에틸 에스터, 논-2-엔산 에틸 에스터, 헵트-2-엔산 에틸 에스터 및 헵트-2-엔산 메틸 에스터를 포함할 수 있다.
- [0055] 본 발명의 구강 관리 조성물을 이오논, 알파 이오논, 베타 이오논, 아연 염, 폴리페놀계 화합물 및 항세균제를 추가로 포함할 수 있다.
- [0056] 항세균제는 트라이클로산, 세틸피리디늄 클로라이드, 폴리헥시딘 비스구나이드, 클로르헥시딘 및 항세균 향미 물질로 이루어진 군으로부터 선택될 수 있다. 항세균 향미 물질은, 특히 티몰, 카바크롤, 유지놀, 이소유지놀, 신남 알데히드 및 멘톨을 포함한다. 향미 물질은 상기 성분을 함유하는 에센셜 오일의 형태로 제공될 수 있다. 바람직한 에센셜 오일은 사향초, 오레가눔, 정향, 계피 잎, 계피나무 껍질, 파슬리 씨앗, 파슬리 잎, 민트, 스피어민트 및 페퍼민트를 포함한다.
- [0057] 유용한 폴리페놀계 화합물은, 예를 들어 갈레이트 잔기를 포함하는 것, 특히 에피갈로카테킨 갈레이트이다. 이는 특정한 천연 성분의 형태, 특히 녹차 및 이의 추출물, 예를 들어 에피갈로카테킨 갈레이트가 풍부화된 녹차 추출물일 수 있다. 특히, 미립자 형태의 OMC 향미료는 OMC 향미 조성물을 분사-건조시키고 이를 녹차 입자와 혼합하여 녹차와 OMC 향미 조성물의 건조 배합물을 형성함으로써 형성될 수 있다. 생성되는 미립자 물질은 OMC 제품 제형에 용이하게 혼합될 수 있다.
- [0058] 본 발명의 구강 관리 조성물은 5-이소프로필-2-메틸-페놀, 옥탄-1-올, 3,7-다이메틸-옥트-6-엔-1-올, 3,7-다이메틸-옥탄-1-올, 1-이소프로필-4-메틸-사이클로헥스-3-엔올, 3,7-다이메틸-옥타-2,6-다이엔-1-올, 2-(4-메틸-사이클로헥스-3-엔일) 프로판-2-올, 3,7-다이메틸-옥타-1,6-다이엔-3-올, 노나-2,4-다이엔알, 논-2-엔알, 2,6,6-트라이메틸-사이클로헥스-1-엔카발데히드, 3-(4-이소프로필-페닐)-2-메틸-프로피온알데히드, 4-이소프로펜일-사이클로헥스-1-엔카발데히드, 5-메틸-2-페닐-헥스-2-엔알, 4-메톡시-벤즈알데히드, 2,6-다이메틸-헵트-5-엔알,

데크-2-엔알, 페닐-아세트알데히드, 2-페닐-프로피온알데히드, 3,7,11-트라이메틸-도데카-1,3,6,10-테트라엔, 3,7-다이메틸-옥타-1,3,6-트라이엔, 1-이소프로필-4-메틸-사이클로헥사-1,3-다이엔, 1-메틸-4-(5-메틸-1-메틸렌-헥스-4-엔일)-사이클로헥센, 1-이소프로필-4-메틸벤젠, 데크-3-엔-2-온, 3-메틸-2-펜틸-사이클로펜트-2-엔온, 6-메틸-헵타-3,5-다이엔-2-온, 아세트산 옥틸 에스터, 아세트산 옥트-2-엔일 에스터, 2-메틸-부트-2-엔산 헥스-3-엔일 에스터, 아세트산 노닐 에스터, 아세트산 헵틸 에스터, 부티르산 3-페닐-알릴 에스터, 아세트산 1,7,7-트라이메틸-바이사이클로[2.2.1]헵트-2-일 에스터, 아세트산 4-알릴-2-메톡시-페닐 에스터, 아세트산 1-메틸-1-(4-메틸-사이클로헥스-3-엔일)-에틸 에스터, 아세트산 2-이소프로펜일-5-메틸-사이클로헥실 에스터, 5-옥틸-다이하이드로-퓨란-2-온, 1,1-다이메톡시-3,7-다이메틸-옥타-2,6-다이엔, 1-알릴-4-메톡시-벤젠, 6-헥실-테트라하이드로-피란-2-온, 3-부틸-3H-이소벤조퓨란-1-온, 2-펜틸-퓨란, (2E, 5E/Z)-5,6,7-트라이메틸옥타-2,5-다이엔-4-온, 4-메틸-데크-3-엔-5-올, 1-사이클로프로필메틸-4-메톡시-벤젠, 오레가눔 에센셜 오일, 칼바눔 에센셜 오일, 리트시 쿠베바(*Litsea cubeba*) 에센셜 오일, 타게테스(*Tagetes*) 에센셜 오일, 자스민 앵솔루트(*jasmin absolute*), 라벤더 에센셜 오일, 라바딘 에센셜 오일, 로즈마리 에센셜 오일 및 베티베르 에센셜 오일로 이루어진 군으로부터 선택되는 하나 이상의 활성제를 추가로 포함할 수 있다.

[0059] 효소-억제 구강 약취 반작용제 물질과 특정한 향세균 향미료의 조합이 특히 유익하고 매우 효과적이고 즐거운 맛을 조성물에 야기하는 것으로 밝혀졌다. 본 발명의 구강 관리 조성물은 50(w/w)% 이하 또는 90(w/w)% 이하의 전체 향미 성분, 즉 멘톨, 티몰, 유지놀, 5-이소프로필-2-메틸-페놀, 옥탄-1-올, 3,7-다이메틸-옥트-6-엔-1-올, 3,7-다이메틸-옥탄-1-올, 1-이소프로필-4-메틸-사이클로헥스-3-엔올, 3,7-다이메틸-옥타-2,6-다이엔-1-올, 2-(4-메틸-사이클로헥스-3-엔일) 프로판-2-올 및 3,7-다이메틸-옥타-1,6-다이엔-3-올로 이루어진 군으로부터 선택되는 하나 이상의 향미료를 추가로 포함할 수 있다. 상기 화합물은 순수 화합물 형태 또는 천연 성분의 형태(예컨대 식물로부터의 에센셜 오일, 예컨대 민트 오일, 페퍼민트 오일, 또는 멘톨에 대해 스피어민트 오일 또는 티몰에 대해 사향초 오일)로 첨가될 수 있다.

[0060] 예를 들어, 치약 조성물은 치약에 통상적으로 사용되는 기타 화합물, 예컨대 구강용 붕해제, 연마제, 습윤제, 세제, 결합제, 거품 형성제, 감미제, 보존제, 완충제, 향미료 및 청량제(cooling agent)를 추가로 포함할 수 있고, 통상의 기술자에게 공지되어 있는 절차에 따라 제조될 수 있다.

[0061] 또한, 본 발명의 구강 관리 조성물은 구강 관리 조성물과 통상적으로 결합되어 사용되는 하나 이상의 추가의 성분 또는 부형제, 예컨대 향미 화합물, 부형제, 상쾌한 미감을 제공하기 위한 청량제 및/또는 당업계에 통상적으로 사용되는 기타 보조제를 포함할 수 있다.

[0062] 공지된 향미 성분의 예는 FEMA(미국의 향미료 및 추출물 제조자 협회)의 공보 또는 이의 편집물 중 하나(FEMA로부터 이용가능하고 이에 의해 출판되고, 1965년부터 현재까지의 모든 FEMA GRAS(일반적으로 안전하다고 의제되는 물질)의 공보 포함), 또는 알루어드 퍼블리싱 인코포레이티드(Allured Publishing Inc.)에 의해 출판된 문헌[Allured's Flavor and Fragrance Materials 2004]에서 찾을 수 있다.

[0063] 구강 관리 제품의 공지된 부형제의 예는 문헌[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], 및 문헌[Cosmetics: Science and technology, 2nd edition, p.423 - 563. Edited by M.S. Balsam and E. Sagarin, Wiley Interscience, 1972]에서 찾을 수 있다.

[0064] 청량제의 예는 비한정적으로 멘톨, 멘톤 이소폴레골(이소pulegol), N-에틸 p-멘탄카복사아미드(WS-3), N,2,3-트라이메틸-2-이소프로필부탄아미드(WS-23), 멘틸 락테이트, 멘톤 글리세린 아세트알(프레스콜라트(Frescolat: 등록상표) MGA), 모노-멘틸 숙시네이트(피스쿨(Physcool: 등록상표)), 모노-메틸 글루타레이트, 0-멘틸 글리세린(쿨액트(CoolAct: 등록상표) 10), 2-sec-부틸사이클로헥산온(프레스코멘테(Freskomenthe: 등록상표)) 및 2-이소프로필-5-메틸-사이클로헥산카복시산 (2-피리딘-2-일-에틸)-아미드를 포함할 수 있다. 청량제의 추가의 예는 참조로 혼입되는, 예컨대 WO 2006/125334 및 WO 2005/049553에서 찾을 수 있다.

[0065] 바람직한 양태에서, 본 발명의 구강 관리 조성물은 하나 이상의 티몰 글리코시드, 특히 티몰 α-글루코시드를 추가로 포함한다. 동일자 출원된 상응하는 영국 특허가 이에 참조로 혼입된다. 티몰 글리코시드는 티몰에 비해 장기 지속성 살균 효과 및 향상된 기호성을 제공한다. 또한, 이의 수용해도는 티몰의 수용해도보다 현저히 더 우수하다.

- [0066] 본 발명의 구강 관리 조성물은 히알루론산을 효과적인 농도로 포함하여야 한다. 특히 구강 관리 조성물은 히알루론산을 0.1%(w/v) 이상, 보다 바람직하게는 0.2%(w/v) 이상의 농도로 포함할 수 있다. 바람직한 양태에서, 구강 관리 조성물은 히알루론산을 0.1 내지 1.0%(w/v), 보다 바람직하게는 0.2 내지 0.5%(w/v)의 농도로 포함한다. 더 높은 농도도 가능하지만 비용의 증가가 야기된다. 저 분자량 히알루론산이 0.5%(w/v)의 농도로 사용되고 중간 분자량 히알루론산이 0.2%(w/v)의 농도로 사용되는 것이 특히 바람직하다.
- [0067] 본 개시 전체에서, 달리 언급되지 않는 한, 농도는 부피당 중량의 %(% w/v)로서 지시된다.
- [0068] 추가의 양상에서, 또한, 본 발명은 구강 점막 회복을 촉진하는 구강 관리 조성물을 제공한다. 바람직하게는, 상기 조성물은 500 kDa 미만의 평균 분자량을 갖는 히알루론산을 포함한다.
- [0069] 보다 바람직하게는, 구강 점막 회복을 촉진하는 구강 관리 조성물은 약 10 내지 약 400 kDa, 보다 바람직하게는 약 20 내지 약 300 kDa의 평균 분자량을 갖는 히알루론산을 포함한다. 특히, 구강 점막 회복을 촉진하는 구강 관리 조성물은 약 20 내지 약 50 kDa(저 분자량 히알루론산) 또는 약 100 내지 약 300 kDa(중간 분자량 히알루론산)의 평균 분자량을 갖는 히알루론산을 포함한다. 저 분자량 히알루론산이 특히 바람직하다.
- [0070] 따라서, 본 발명은 점막 회복을 촉진하는 구강 관리 조성물의 제조를 위해 500 kDa 미만의 평균 분자량을 갖는 히알루론산의 용도에 관한 것이다.
- [0071] 추가의 양상에서, 또한, 본 발명은 구강 점막 회복(특히 비치료적인 것)을 촉진하는 방법을 제공한다. 상기 방법은 본 발명에 따른 구강 관리 조성물을 구강 점막에 도포함을 포함한다.
- [0072] 추가의 양상에서, 또한, 본 발명은 생물막 형성을 감소시키기 위한 구강 관리 조성물을 제공한다. 바람직하게는, 상기 조성물은 500 kDa 미만의 평균 분자량을 갖는 히알루론산을 포함한다.
- [0073] 보다 바람직하게는, 생물막 형성을 감소시키기 위한 구강 관리 조성물은 약 10 내지 약 400 kDa, 보다 바람직하게는 약 20 내지 약 300 kDa의 평균 분자량을 갖는 히알루론산을 포함한다. 특히, 구강 점막 손상을 촉진하는 구강 관리 조성물은 약 20 내지 약 50 kDa(저 분자량 히알루론산) 또는 약 100 내지 약 300 kDa(중간 분자량 히알루론산)의 평균 분자량을 갖는 히알루론산을 포함한다. 중간 분자량 히알루론산이 특히 바람직하다.
- [0074] 따라서, 또한, 본 발명은 점막 회복을 촉진하는 구강 관리 조성물의 제조를 위해 500 kDa 미만의 평균 분자량을 갖는 히알루론산의 용도에 관한 것이다.
- [0075] 추가의 양상에서, 또한, 본 발명은 구강 점막 회복(특히 비치료적인 것)을 촉진하는 방법을 제공한다. 상기 방법은 본 발명에 따른 구강 관리 조성물을 구강 점막에 도포함을 포함한다.
- [0076] 본 발명은 하기 비한정적인 실시예에 의해 추가로 예시된다.
- [0077] **실시예**
- [0078] 실시예 1: 샘플 제조 및 히알루론산 처리
- [0079] 실험을 재구성된 인간 구강 상피(RHO)에서 수행하였다.
- [0080] 실험실 도착 직후, 멸균 기류 캐빈(cabin)하에 아가로스 영양 용액으로부터 RHO를 제거하였다. 삽입물을 6-웰 플레이트에 신속히 넣은 후, 실온에서 유지 배지(maintenance medium) 1 mL로 채웠다. 37°C 및 5% CO<sub>2</sub>에서 웰을 항온배양기에 넣고 밤새 습도 포화시켰다.
- [0081] 다음날, 손상을 유리 모세관에 의해 수행하였다.
- [0082] 이어서, RHO 샘플을 저 분자량(20 내지 50 kDa), 중간 분자량(100 내지 300 kDa) 또는 고 분자량(1,000 내지 1,400 kDa)을 갖는 히알루론산을 함유하는 용액으로 처리하였다. 미처리 RHO를 처리없이 대조군으로서 사용하였다.
- [0083] 실시예 2: TEER(상피 통과 전기 저항)에 의한 손상 후 재상피화의 평가
- [0084] 본 평가를 위한 RHO 샘플을 실시예 1의 절차에 따라 제조하였다.
- [0085] 히알루론산으로 처리한지 24시간 후, 상피 통과 전기 저항(TEER)을 하기와 같이 측정하였다.
- [0086] 생리 식염 용액 0.5 mL를 염수 용액 5 mL를 함유하는 6-웰 플레이트에 위치한 조직에 직접 도포하였다. 밀리셀-ERS 볼륨미터(Millicell-ERS Voltammeter)(0 내지 20 kΩ)의 2개의 전극을 조직의 2개의 구획 각각의 면에

위치시킴으로써 상기 조직을 통한 전기 선속을 측정하였다. 측정 결과는 디스플레이에 바로 나타났다.

[0087] 조직 내에서의 가변성에 기인하여, 각각의 조직에 대한 3개의 측정을 수행하였다. 공시험 값(blank value)(조직 없는 삽입)을 샘플 값(3개의 특징으로부터의 평균)에서 제하였다. 이어서, 상기 결과를 조직 표면의 크기( $0.5 \text{ cm}^2$ )를 고려하여 보정하였다.

[0088] [수학식 1]

$$\Omega_{\text{샘플}} - \Omega_{\text{공시험}} = \Omega * 0.5 \text{ cm}^2$$

[0090] 결과를 도 1에 도시하였다.

[0091] 도 1에서 볼 수 있듯이, 히알루론산으로 처리된 샘플에 대해 측정된 TEER 값은 손상 후 처리된 대조군 샘플보다 현저히 높았다.

[0092] TEER은 피부 장벽 기능을 반영한다.

[0093] 결론적으로, 저 분자량 및 중간 분자량 히알루론산이 손상 후 장벽 기능을 손상 전 값에 도달하는 점까지 향상 시킴을 발견하였다. 이론에 얽매어는 것은 아니되, 장벽 기능의 향상은 히알루론산에 의해 야기되는 조직 회복의 증가에 기인하는 것으로 보인다.

[0094] 실시예 3: 주사 전자 현미경 관찰(x10,000)에 의한 손상 후 재상피화의 평가

[0095] 본 평가를 위한 RHO 샘플을 실시예 1의 절차에 따라 제조하였다.

[0096] 히알루론산 처리 24시간 후, 주사 전자 현미경 관찰(SEM)을 위한 샘플을 포스페이트로 완충된 염수(PBS) 중 2.5% 글루타알데히드에 침지하고 0.1 M 나트륨 카코딜레이트 완충액(pH 7.4)으로 세척한 후, 동일한 완충액 중 1% 오스뮴 테트라옥사이드( $\text{OsO}_4$ )에서 수행하여(2시간 동안 실온) 즉시 고정하였다. 상기 샘플을 실온에서 증가하는 수준의 에탄올 및 헥사메틸다이실라잔으로 밤새 탈수시켰다.

[0097] 상기 샘플을 탄소 탭(tab)(폴라론 이큅먼트 리미티드 SEM 코팅 유닛 E5100(Polaron Equipment limited SEM coating unit E5100))을 사용하여 금속 층으로 코팅됨을 갖는 핀(pin)에 위치시킨 후, 관찰 및 촬영을 위해 SEM 자이스 시그마 일렉트론 마이크로스코프(SEM Zeiss Sigma Electron Microscope)에 옮겼다. 10,000 배율로 수행하였다.

[0098] 결과를 하기 도면에 나타냈다.

[0099] 도 2: 손상 없는 대조군, 0시간;

[0100] 도 3: 손상 있는 대조군, 24시간;

[0101] 도 4: 손상 후 저 분자량(20 내지 50 kDa) 히알루론산으로 처리, 24시간;

[0102] 도 5: 손상 후 중간 분자량(100 내지 300 kDa, 0.2%) 히알루론산으로 처리, 24시간; 및

[0103] 도 6: 손상 후 고 분자량(1,000 내지 1,400 kDa, 0.2%) 히알루론산으로 처리.

[0104] 도 4에서 볼 수 있듯이, 저 분자량 히알루론산은 상처의 회복을 야기한다. 다수의 신규 세포외 기질(ECM) 섬유가 상처를 거의 완전히 덮었다. 미세융모가 나타나는데(청색 화살표), 이는 조직 습윤화에 있어서 항상성 회복을 나타낸다. 전반적으로, 조직 회복의 우수한 진전이 관찰되었다.

[0105] 도 5에서 볼 수 있듯이, 중간 분자량 히알루론산은 편평화된 세포가 상처 근처로 이동함을 야기하였다. 상기 세포는 기질 섬유의 가교의 재증식 및 형성에 참여한다. 전반적으로, 본 도면은 조직 회복의 능동적 과정을 나타냈다.

[0106] 이와는 대조적으로, 도 6에서 볼 수 있듯이, 회복 과정은 고 분자량 히알루론산에 대해 현저히 덜 진행되었다. 대신, 막 형성이 관찰되었다.

[0107] 실시예 4: ZO-1 및 인테그린 B1에서 면역조직화학에 의한 손상 후 재상피화의 평가

[0108] 본 평가를 위한 RHO 샘플을 실시예 1에 따른 절차에 따라 제조하였다.

[0109] 노출(적어도 밤새) 종료시, 조직 샘플을 완충된 10% 포르말린에 고정하였다. 샘플은 파라핀 블록을

포함하였고, 5  $\mu\text{m}$ 의 절편을 제조하였다. 슬라이드를 헤마톡실린 및 에오신으로 염색하였다.

- [0110] 사용된 기법은 특정 항체를 형광 염료와 화학적으로 접합시킴으로써 세포 또는 조직 절편에서 특정 단백질 또는 항원의 가시화를 가능하게 하는데, 여기서 형광색소로 표지된 2차 항체가 1차 항체를 인식하는데 사용된다. 면역형광 염색은 슬라이드에 고정된 세포 및 조직 절편에서 수행될 수 있다. 면역형광 염색된 샘플은 형광 현미경 또는 공초점 현미경으로 관찰된다. 면역-국소화의 특이성이 1차 및 2차 항체가 염수 용액으로 대체된 슬라이드에서 나타난다.
- [0111] 하기 항체를 사용하였다.
- [0112] ZO-1: 토끼 다클론 항체 항-ZO-1(인비트로젠(Invitrogen), 61-7300), 5  $\mu\text{g/mL}$ 로 희석되어 PBS 중 1% 소 혈청 알부민(BSA)에서 4 $^{\circ}\text{C}$ 로 밤새 항온 처리되고, 2차 항체는 알렉사 플루오르 555 당나귀 항-토끼(Alexa Fluor 555 donkey anti-rabbit)(인비트로젠, A31572)임. 핵을 4',6-다이아미디노-2-페닐인돌(다피(Dapi))로 염색하였다.
- [0113] 인테그린(ITGB1): 마우스 다클론 항체 항-인테그린 베타 1(아브캄(Abcam), ab3167), 2  $\mu\text{g/mL}$ 로 희석되어 PBS 중 1% BSA에서 실온으로 2시간 동안 항온배양되고, 2차 항원은 알렉사 플루오르 488 염소 항-마우스(인비트로젠, A10680)임. 핵을 다피로 염색하였다.
- [0114] 절편을 레이카(Leica) DM 2500 FLUO 현미경으로 관찰하고 레이카 LAS 소프트웨어로 분석하였다.
- [0115] 결과를 도 7에 도시하였다.
- [0116] 실시예 1로부터의 대조군을 손상 부재 조직 대조군으로서 사용하였다.
- [0117] "손상된"은 임의의 치료 없이 정상적인 상처 치유가 일어나는 샘플을 지칭한다. 손상이 ITGB1 및 ZO-1 발현을 증가시키는 것으로 밝혀졌고, 이는 정상적인 상처 치유 과정에 상응한다.
- [0118] 저 분자량 히알루론산에 의한 항온배양은 ZO-1 및 인테그린 베타 1(상처 치유 과정에서 2개의 주요 인자)의 과발현을 유도하였다. 상기 결과는 조직 회복 과정이 손상된 대조군에 비해 촉진됨을 입증한다.
- [0119] 중간 분자량 히알루론산에 의해 수득된 효과는 배타적으로 인테그린 베타 1의 과발현에 의해 상처 치유 과정을 촉진함을 나타냈다. 이러한 효과는 저 분자량 히알루론산에 의한 것보다 덜 현저하다.
- [0120] 이에 따라, 저 분자량 및 중간 분자량 히알루론산이 인테그린 B1 및 ZO-1의 과발현을 수반하는 상처 치유의 능동 기작을 유도하였음을 발견하였다.
- [0121] 실시예 5: 인간 구강 상피(RHO) 샘플의 배양
- [0122] 실험실 도착 직후, 멸균 기류 캐빈하에 아가로스 영양 용액으로부터 RHO를 제거하였다. 삽입물을 6-웰 플레이트에 신속히 넣은 후, 실온에서 유지 배지 1 mL로 채웠다. 37 $^{\circ}\text{C}$  및 5%  $\text{CO}_2$ 에서 웰을 항온배양기에 넣고 밤새 습도 포화시켰다.
- [0123] 추가의 형태학적 분석(SEM 및 H&E)을 위해 세균 부하에 대해 복제된 조직 및 단일 조직에서 과정을 수행하였다.
- [0124] 스타필로코커스 아우레우스 MRSA ATCC 33591을 해동하고 교반하에 37 $^{\circ}\text{C}$ 로 영양액에서 배양하였다.
- [0125] 중간 분자량 히알루론산 용액(0.2% w/v) 30  $\mu\text{L}$  또는 클로르헥시딘(CHL) 0.2%(양성 대조군) 30  $\mu\text{L}$  각각을 RHO 샘플에 국소 도포하고 24시간 동안 항온배양하였다. 이어서, 마이크로피펫에 의해, 생물물 잔류 부피를 상피 표면으로부터 제거하였다.
- [0126] 이어서, RHO 샘플을 스타필로코커스 아우레우스 세균 현탁액(O.D. 0.1 약  $10^6$  UFC/조직)으로 균락화하고, 이를 4시간 동안 국소 도포하였다. 4시간 후, 남은 스타필로코커스 아우레우스 세균 용액을 제거하고, RHO 조직 샘플을 37 $^{\circ}\text{C}$  및 5%  $\text{CO}_2$ 에서 16시간 동안 항온배양하였다.
- [0127] 실시예 6: TEER에 의한 생물막 형성의 평가
- [0128] 본 평가를 위한 샘플을 실시예 5에 따라 제조하였다.
- [0129] TEER을 이후로 기재되는 바와 같이 측정하였다. 생리 식염 용액 0.5 mL를 염수 용액 5 mL를 함유하는 6-웰 플레이트에 위치된 조직에 직접 도포하였다.
- [0130] 밀리셀-ERS 볼탐미터(Millicell-ERS Voltammeter)(0 내지 20  $\text{k}\Omega$ )의 2개의 전극을 조직의 2개의 구획 각각의

면에 위치시킴으로써 상기 조직을 통한 전기 선속을 측정하였다. 측정 결과는 디스플레이에 바로 나타났다.

[0131] 조직 내에서의 가변성에 기인하여, 각각의 조직에 대한 3개의 측정을 수행하였다.

[0132] 공시험 값(조직 없는 삽입)을 샘플 값(3개의 특징으로부터의 평균)에서 제하였다. 이어서, 상기 결과를 조직 표면의 크기( $0.5 \text{ cm}^2$ )를 고려하여 보정하였다.

[0133] [수학식 1]

$$[0134] \Omega_{\text{샘플}} - \Omega_{\text{공시험}} = \Omega * 0.5 \text{ cm}^2$$

[0135] 결과를 도 8에 도시하였다.

[0136] 스태필로코커스 아우레우스에 의한 균락화는 TEER의 약간의 증가를 유도하였다. 이론에 얽매이려는 것은 아니 되, 이는 RHO 두께가 균락화에 기인하여 증가된 것으로 추측된다.

[0137] CHL로 처리된 샘플에 대해, TEER이 감소하였는데, 이는 장벽 기능이 변경되었음을 의미한다(독성에 기인할 수 있음).

[0138] 중간 분자량 히알루론산의 첨가는 TEER에 영향을 주지 않았고, 결과는 대조군과 유사하였다.

[0139] 결론적으로, 중간 분자량 히알루론산은 세균 성장을 억제하였고 장벽 기능에 영향을 주지 않았다.

[0140] 실시예 7: 세균수에 의한 생물막 형성의 평가

[0141] 본 평가를 위한 샘플을 실시예 5의 절차에 따라 제조하였다.

[0142] 상단, 기저층 및 균질 구획의 세균수를 측정하기 위해, 하기 절차를 사용하였다.

[0143] - 기저층 구획에 대해, 각각의 웰로부터 배양 배지 1 mL를 샘플화하였다.

[0144] - 상단 구획에 대해, 실시예 6에 따른 TEER 측정으로부터의 샘플을 사용하였다. 각각의 상기 샘플은 생리 식염 용액 500  $\mu\text{L}$ 를 함유하였다. 상기 샘플을 사전에 2 mL/웰의 염수 용액으로 채워진 새로운 6-웰 플레이트로 옮 기고 초음파 욕에서 7분 동안 40 kHz로 두었다. 초음파 처리 후, 염수 용액 500  $\mu\text{L}$ 를 상단 부분에 대해 샘플 화하고 RHO 조직을 염수 용액 200  $\mu\text{L}$ 로 2회 행구었다. 이어서, 용액의 총량(900  $\mu\text{L}$ )을 한데로 풀링(pooling)하여 수확된 상단 구획을 수득하였다.

[0145] - 균질 구획에 대해, 멸균 메스 날을 사용하여 삽입물로부터 조직을 수확하고, 이를 멸균 증류수에서 제조된 0.5% 트라이톤(Triton) X-100 용액 500  $\mu\text{L}$ 를 함유하는 에펜도르프(Eppendorf) 관에 10분 이상 두었다.

[0146] 상기 3개 구획의 세균수 측정을 뉴트리언트 아가(Nutrient Agar) 플레이트에 각각의 구획 현탁액의 약 10배 희 석액(10에서 7로 희석되지 않음)을 플레이트팅하여 수행하였다(각각의 희석액에 대해 10  $\mu\text{L}$  적하). 37°C에서 1 일 동안 항온배양 후, 균락을 육안으로 계수하였다.

[0147] 세균수 측정의 결과를 도 9(상단 구획) 및 도 10(균질 조직)에 도시하였다.

[0148] 스태필로코커스 아우레우스에 의한 균락화는 상단 구획 및 균질 구획 둘다에서 세균수의 증가를 유도하였다.

[0149] CHL에 의한 처리는 강한 세균사멸 특성을 나타냈다.

[0150] 히알루론산에 의한 처리는 상단 구획 및 균질 구획 둘다에서 약 50%의 세균수 감소를 야기하였다. 이에 따라, 이는 세균 증식에 영향을 주고 세균 부착 및 투과를 제한하였다.

[0151] 결론적으로, 히알루론산은 세균 투과에 대항하여 우수한 보호를 생성할 수 있었다.

[0152] 실시예 9: 주사 전자 현미경 관찰에 의한 생물막 시각화

[0153] 본 실험을 위한 샘플을 실시예 5의 절차에 따라 제조하였다.

[0154] 처리 후, SEM을 위한 샘플을 PBS 중 2.5% 글루타알데히드에 침지시킴에 의해 즉시 고정하였다. 슬라이드를 0.065 M 포스페이트 완충액에서 3회 세척한 후, 0.064 M(pH 7.4)로 포스페이트 완충액 중 1% OsO<sub>4</sub>에 두었다. 샘플을 일련 수준의 에탄올을 통해 탈수시킨 후, CO<sub>2</sub> 액체 베마르(Bemar) SPC 1500 장치에서 임계점 건조시켰다. 샘플을 스템(stub)에 장착하고 수작업으로 금칠하고 캠브리지 마크(Cambridge Mark) 250 SEM으

로 관찰하였다. 10,000 배율로 수행하였다.

[0155] 결과를 하기 도면에 나타냈다.

[0156] 도 11: 군락화 없는 대조군;

[0157] 도 12: 4시간 후 스타필로코커스 아우레우스에 의한 군락화; 및

[0158] 도 13: 스타필로코커스 아우레우스에 의한 군락화 및 중간 분자량(100 내지 300 kDa; 0.2% w/v) 히알루론산에 의한 처리, 4시간 후.

[0159] 도 11은 세균 군락화 없는 RHO를 나타낸다.

[0160] 도 12는 클러스터 및 부유 생물 형태의 군락을 나타낸다. 세균은 폴리사카라이드를 생성하기 시작하여 부유 생물 표현형으로부터 생물막 표현형으로 변환된다.

[0161] 도 13은 더 적은 군락이 클러스터 및 부유 생물 형태에 있음을 나타낸다. 세균은 생물막 형성에 반작용한다. 관찰되는 폴리사카라이드 기질이 없다. 이에 따라, 부유 생물 표현형이 보존된다.

[0162] 실시예 10: 구강 점막에서 히알루론산의 침착

[0163] 히알루론산이 있는 및 없는 구강 세척제를 하기 과정에 따라 3명의 지원자에게 시험하였다.

[0164] 1. 미처리 점막을 샘플화함.

[0165] 2. 물 20 mL로 30초 동안 구강을 행균.

[0166] 3. 기본 구강 세척제(히알루론산 미함유)로 30초 동안 처리함.

[0167] 4. 점막을 샘플화함.

[0168] 5. 물 20 mL로 30초 동안 구강을 행균.

[0169] 6. 본 발명에 따른 히알루론산을 0.5%(w/v)로 함유하는 구강 세척제로 30초 동안 처리함.

[0170] 7. 점막을 샘플화함.

[0171] 8. 물 20 mL로 30초 동안 구강을 행균.

[0172] 9. 본 발명에 따른 히알루론산을 1%(w/v)로 함유하는 구강 세척제로 30초 동안 처리함.

[0173] 10. 점막을 샘플화함.

[0174] 구강 점막을 멸균 접종 루프로 15초 동안 긁어내고, 유리 슬라이드 상에서 상기 루프를 물 50  $\mu$ L로 문지름으로써 샘플을 취하였다.

[0175] 유리 슬라이드를 환기되는 오븐에서 1시간 동안 37°C에서 건조시켰다. 침착물을 20분 동안 실온에서 메탄올로 고정하였다. 이어서, 과량을 제거하고, 유리 슬라이드를 실온에서 건조시켰다. 히알루론산을 30분 동안 실온에서 알시안 블루로 염색하고, 염료를 물로 수회 행구었다. 칼날이 건조될 때, 광학 현미형 20배율로 사적을 찍고 정량적으로 분석하였다.

[0176] 지원자 1에 대해, 기본 구강 세척제 및 미처리 조건에 비해 0.5% 히알루론산을 함유하는 구강 세척제에 의해 히알루론산 염색의 증가를 관찰하였다. 1% 히알루론산에 의해, 염색의 강한 증가가 있음으로써 본 지원자의 구강 점막에 히알루론산의 침착이 입증되었다.

[0177] 지원자 2에 대해, 염색은 더 열렸지만, 구강 세척제 중 히알루론산의 농도와 상호관련된 증가가 마찬가지로 있었다.

[0178] 지원자 3에 대해, 미처리 조건에서 구강 점막에서 히알루론산의 수준은 다른 2명의 지원자보다 현저히 높았다. 이 염색은 물 행균 및 기본 구강 세척제에 의한 처리 후에 감소하였지만, 히알루론산을 함유하는 구강 세척제에 의한 처리 후 히알루론산의 증가가 다시 있었다.

[0179] 실시예 11: 치약의 평가

[0180] 완전 블록 설계(complete block design)에 의해, 완전 회전된 순차적 단일 제품 배치(sequential monadic product placement)를 사용하여 3개의 치약 제형을 33명의 미수련 평가자들에게 시험하였다.

[0181] 각각 0% 히알루론산, 0.5% 히알루론산 및 1.0% 히알루론산을 함유하는 3개의 치약 제형을 맹검 코드화하였다. 각각의 평가자들에게 각각의 치약을 단 1회만 시험하였다. 솔질 시간은 90초였다. 각각의 솔질 후, 평가자들은 표준 폐쇄 규모 회상 설문(standard closed scale recall questionnaire)을 완료하였다.

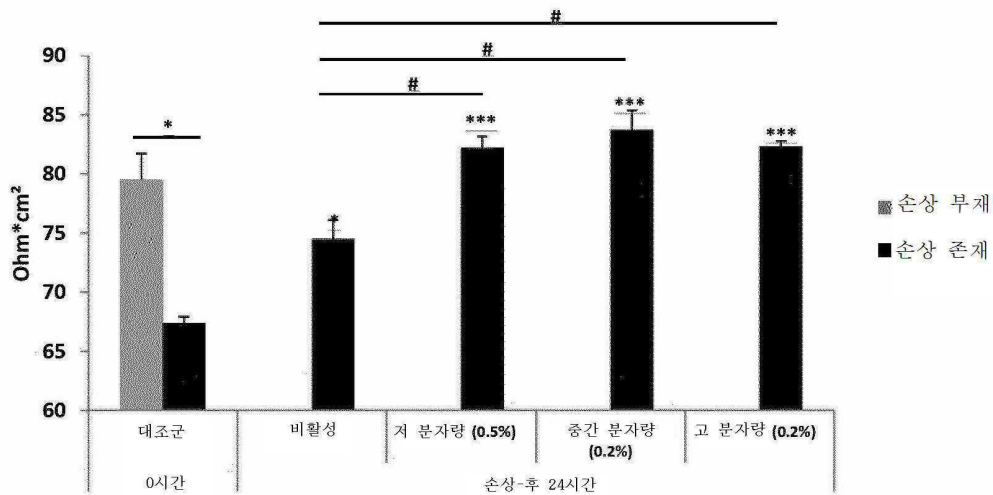
[0182] 결과를 도 14 및 도 15에 도시하였다.

[0183] 도 14에서 볼 수 있듯이, 히알루론산을 함유하는 치약은 히알루론산을 함유하지 않는 치약보다 덜 쓰고, 더 달고, 덜 짠 것으로 평가되었다. 또한, 포말이 더 적게 형성되고, 탄맛 및 건조한 맛이 적고, 깔끔한 기분을 제공하였다.

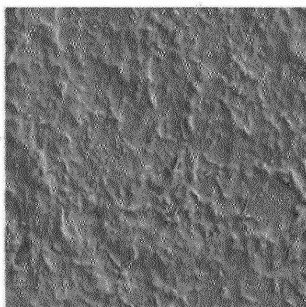
[0184] 도 15는 상이한 제품의 보다 특정한 지각을 나타낸다. 특히, 히알루론산을 함유하는 치약은 보다 즐거운 미감을 갖고, 더 깔끔한 기분을 주고, 잇몸에 더 좋다고 느끼고, 더 기분좋은 느낌을 주고, 덜 쓴 맛을 갖고, 구강에 더 좋다고 느끼고, 구강에 덜한 건조감을 남기는 것을 알 수 있었다.

## 도면

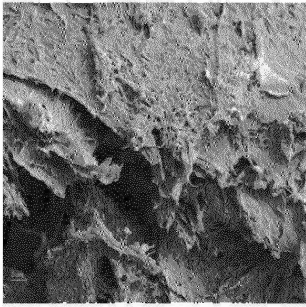
### 도면1



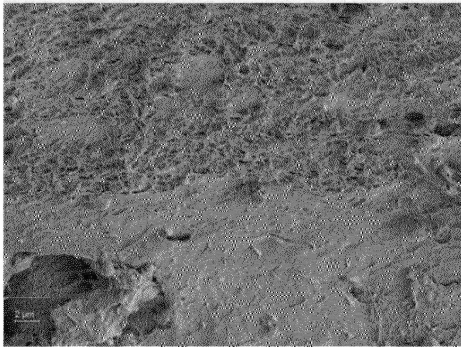
### 도면2



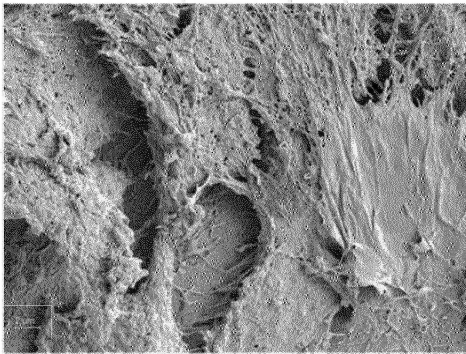
도면3



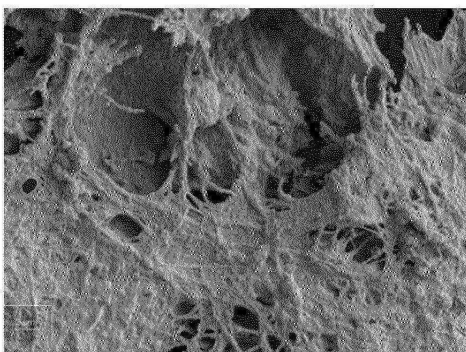
도면4



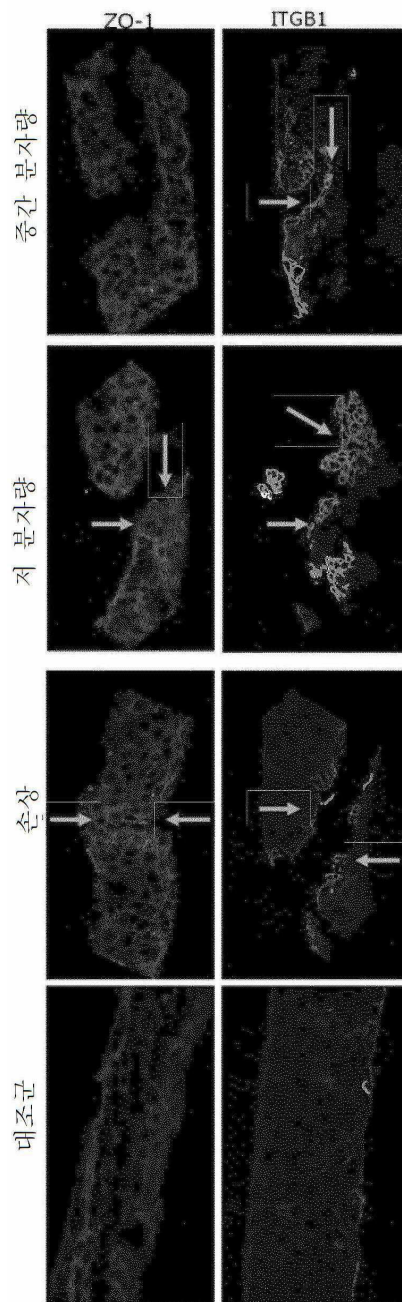
도면5



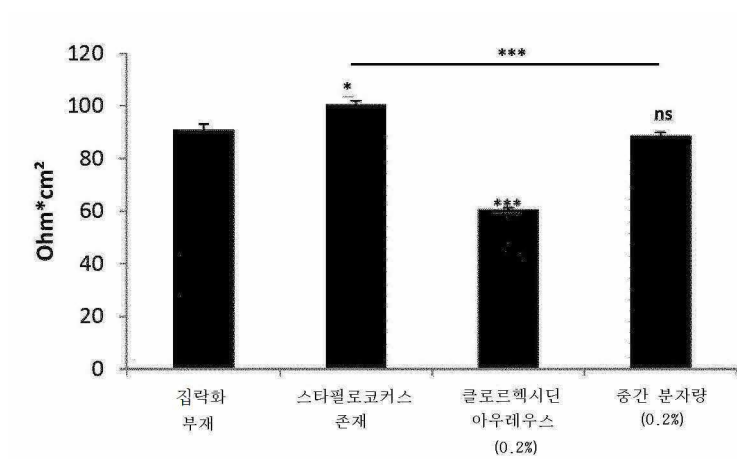
도면6



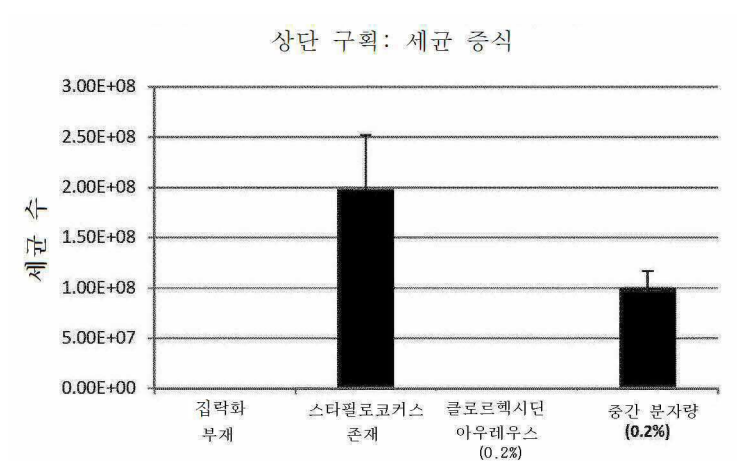
도면7



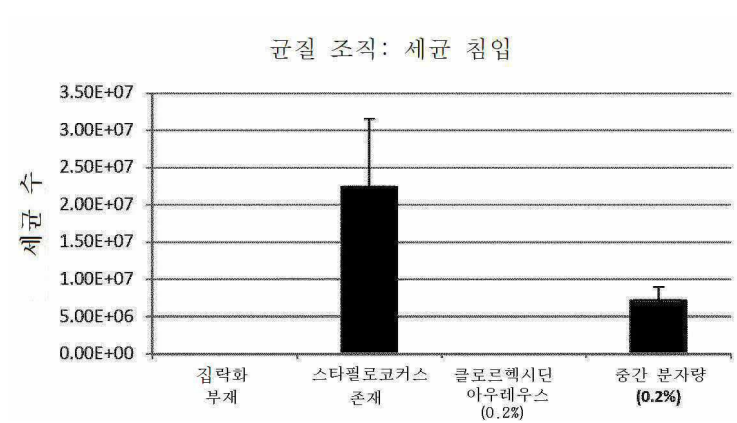
도면8



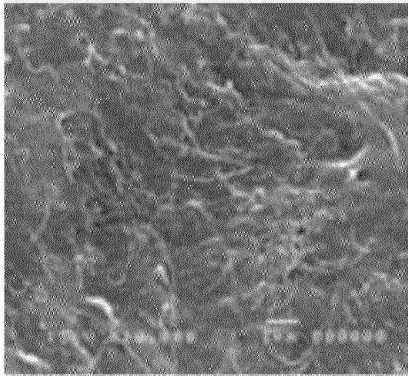
도면9



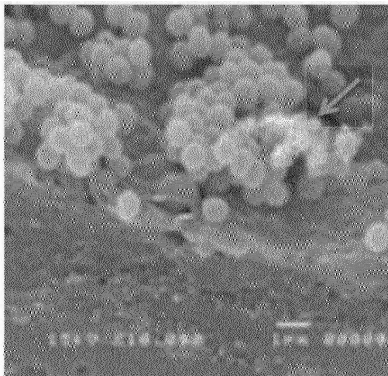
도면10



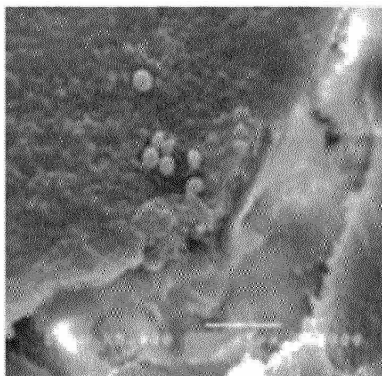
도면11



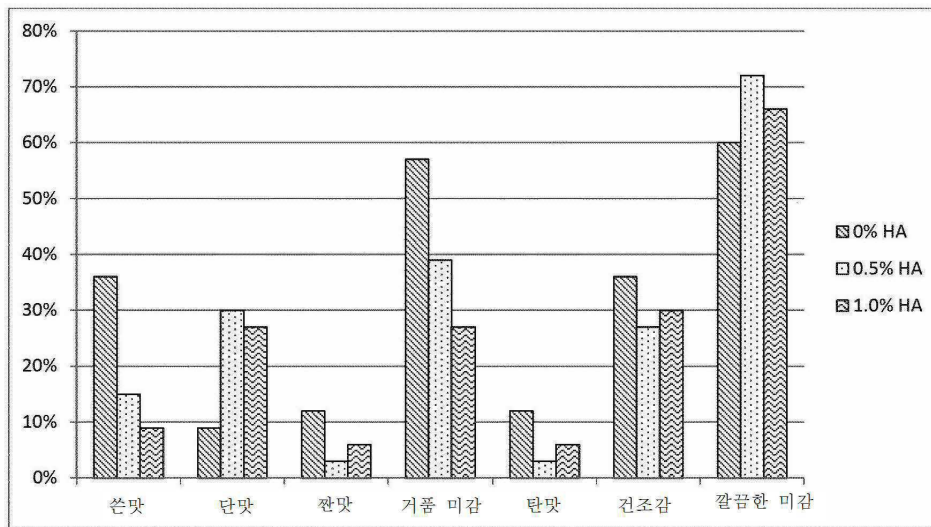
도면12



도면13



도면14



도면15

