

(12) 특허협력조약에 의하여 공개된 국제출원

(19) 세계지식재산권기구
국제사무국

(43) 국제공개일
2020년 10월 8일 (08.10.2020)



(10) 국제공개번호
WO 2020/204409 A1

(51) 국제특허분류:

A61K 31/728 (2006.01)

A61K 38/46 (2006.01)

A61K 38/47 (2006.01)

A61K 47/26 (2006.01)

A61P 1/02 (2006.01)

(21) 국제출원번호:

PCT/KR2020/003746

(22) 국제출원일:

2020년 3월 19일 (19.03.2020)

(25) 출원언어:

한국어

(26) 공개언어:

한국어

(30) 우선권정보:

10-2019-0038962 2019년 4월 3일 (03.04.2019) KR

(71) 출원인: 서울대학교산학협력단 (SEOUL NATIONAL UNIVERSITY R&DB FOUNDATION) [KR/KR]; 08826
서울시 관악구 관악로 1, Seoul (KR).

(72) 발명자: 고흥섭 (KHO, Hong-Seop); 03075 서울시 종로
구 창경궁로 265, 102-1501, Seoul (KR).

(74) 대리인: 박원미 (PARK, Weonmee); 06228 서울시 강남
구 논현로 318, 4층, Seoul (KR).

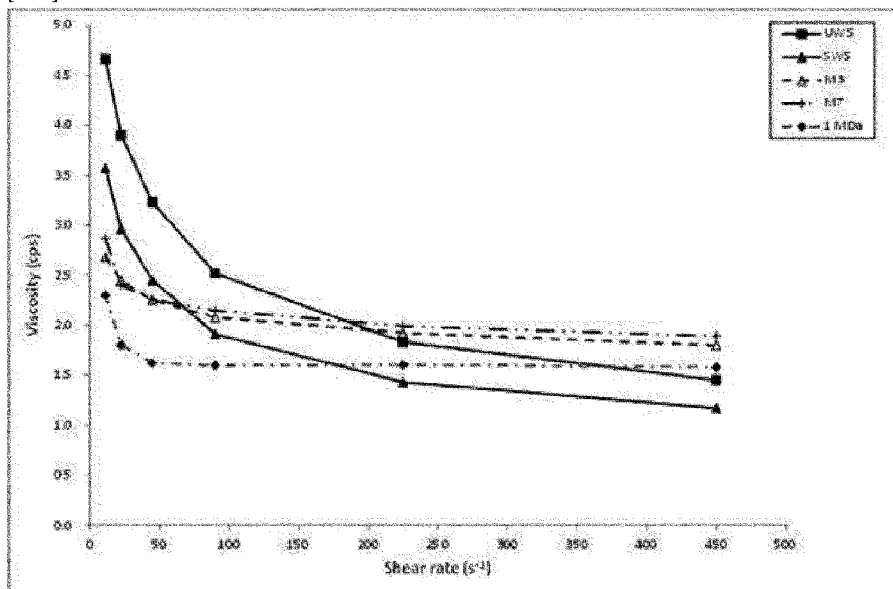
(81) 지정국 (별도의 표시가 없는 한, 가능한 모든 종류의 국내 권리의 보호를 위하여): AE, AG, AL, AM, AO, AT, AU, AZ, BA, BB, BG, BH, BN, BR, BW, BY, BZ, CA, CH, CL, CN, CO, CR, CU, CZ, DE, DJ, DK, DM, DO, DZ, EC, EE, EG, ES, FI, GB, GD, GE, GH, GM, GT, HN, HR, HU, ID, IL, IN, IR, IS, JO, JP, KE, KG, KH, KN, KP, KW, KZ, LA, LC, LK, LR, LS, LU, LY, MA, MD, ME, MG, MK, MN, MW, MX, MY, MZ, NA, NG, NI, NO, NZ, OM, PA, PE, PG, PH, PL, PT, QA, RO, RS, RU, RW, SA, SC, SD, SE, SG, SK, SL, ST, SV, SY, TH, TJ, TM, TN, TR, TT, TZ, UA, UG, US, UZ, VC, VN, WS, ZA, ZM, ZW.

(84) 지정국 (별도의 표시가 없는 한, 가능한 모든 종류의 국내 권리의 보호를 위하여): ARIPO (BW, GH, GM, KE, LR, LS, MW, MZ, NA, RW, SD, SL, ST, SZ, TZ, UG, ZM, ZW), 유라시아 (AM, AZ, BY, KG, KZ, RU, TJ, TM), 유럽 (AL, AT, BE, BG, CH, CY, CZ, DE, DK, EE, ES, FI, FR, GB, GR, HR, HU, IE, IS, IT, LT, LU, LV, MC, MK, MT, NL, NO, PL, PT, RO, RS, SE, SI, SK, SM, TR), OAPI

(54) Title: ARIFICIAL SALIVA COMPRISING TWO DIFFERENT MOLECULAR WEIGHTS OF HYALURONIC ACID

(54) 발명의 명칭: 두 가지의 상이한 분자량의 히알루론산을 포함하는 인공타액

[도3]



(57) Abstract: The present application discloses an artificial saliva composition comprising two different molecular weights of hyaluronic acid. The artificial saliva composition according to the present application has a viscoelasticity that is more similar to that of human saliva due to a marked increase in viscosity at a low shear rate and a small increase in viscosity at a high shear rate as compared to a composition comprising a single molecular weight of hyaluronic acid. In addition, in comparison with a composition comprising a single molecular weight of hyaluronic acid, the inhibitory effect on a main antibacterial substance in human saliva is not increased, and therefore, the artificial saliva composition can be effectively used in treatment of diseases requiring artificial saliva.

[다음 쪽 계속]



(BF, BJ, CF, CG, CI, CM, GA, GN, GQ, GW, KM, ML,
MR, NE, SN, TD, TG).

공개:

— 국제조사보고서와 함께 (조약 제21조(3))

(57) 요약서: 본원은 두 종류의 상이한 분자량의 히알루론산을 포함하는 인공타액 조성물을 개시한다. 본원에 따른 인공타액 조성물은 단일 분자량의 히알루론산을 포함하는 조성물과 비교하여, 낮은 전단 속도에서 점도는 뚜렷히 증가하고, 높은 전단 속도에서의 점도 상승은 적어 인체 타액과 더욱 유사한 점탄성도를 가진다. 또한 단일 분자량의 히알루론산을 포함하는 조성물과 비교하여 인체 타액 주요 항균 물질에 대한 저해 작용이 증가하지 않아 인공 타액이 필요한 질환에 효과적으로 사용될 수 있다.

명세서

발명의 명칭: 두 가지의 상이한 분자량의 히알루론산을 포함하는 인공타액

기술분야

- [1] 본원은 타액 분비 저하와 관련된 질환을 치료 또는 예방할 수 있는 인공 타액 조성물에 관한 것이다.

배경기술

- [2] 타액의 감소로 구강이 건조해지면, 구강건조감 뿐만 아니라 치아우식증(충치)이 급속하게 일어나고, 구강 캔디다증(진균 감염)과 구강 궤양이 빈번하게 발생하며, 노인의 경우 폐렴의 위험성도 높아지게 된다. 또한, 구강건조증 환자는 음식물을 씹거나 삼키기 힘들고 자다가 물을 마시기 위해 자주 일어나야 하는 등 삶의 질에 심각한 타격을 받게 되며, 노인 인구의 증가로 인해, 치료가 필요한 환자수도 급증하는 추세이다. 이를 해결하기 위한 방법으로 인체 타액을 대체할 수 있는 인공타액의 개발 요구가 지속적으로 있어 왔으며 이에 따라 개발되어 시판되고 있는 제품들도 있다.
- [3] 인체 타액은 힘을 받지 않고 있을 때(구강이 움직이지 않을 때)는 높은 점도를 발휘하여 치아와 구강점막을 보호하고, 구강이 움직여서 힘을 받으면 점도가 떨어져서 음식물과 섞이고, 유희를 가능하게 하는 비뉴턴 유체(non-Newtonian fluid)의 특성을 가지고 있다. 기존의 인공 타액은 이러한 특성을 가지고 있지 못할 뿐만 아니라, 셀룰로오스를 주성분으로 하여 인체 타액보다 너무 높은 점탄성이 얻어져 실제 구강에 적용하였을 때 환자의 만족도가 낮다는 문제가 있었다. 이를 극복하기 위하여 동물의 뮤신을 주성분으로 하는 인공타액이 유럽에서 개발되었지만 이것도 기대하는 바의 점탄성에 이르지 못하였을 뿐만 아니라 FDA 허가 역시 얻지 못하였다.
- [4] 대한민국 공개특허공보 2012-0079560는 히알루론산에 라이소자임과 펌프시다제를 포함하는 인공타액을 개시한다.
- [5] 대한민국 공개특허공보 2014-0006136은 히알루론산에 라이소자임, 락토펜시다아제, 글루코스옥시다제, SCN- 또는 I-, 당알코올 및 완충제를 포함하는 인공타액을 개시한다. 상기 2개의 특허는 히알루론산을 주 성분으로하고, 고향균 단백질을 추가하여 인공타액을 개시한다. 하지만 히알루론산은 인체 타액과 유사한 점탄성을 가지고 있어 인공타액으로의 활용 가능성이 있으나, 낮은 전단속도에서는 점도가 상대적으로 낮고, 높은 전단속도에서는 점도가 상대적으로 높아 인체 타액의 유동성을 잘 반영하지 못하는 한계를 가지고 있다. 구체적으로, 구강이 움직이지 않는 (즉, 입안이 운동하지 않는 상태) 낮은 전단 속도에서는 인체 타액보다 점도가 낮아 인체 타액의 보호 작용에 미치지 못하고, 구강 기능이 발휘되는 (즉, 말을 하거나,

썩거나, 삼키거나 하는 상태) 높은 전단 속도에서는 점도가 상대적으로 높아 유허기능이 원활하지 못한 단점이 있다.

- [6] 선행 논문(Kang et al., Influences of 히알루론산 on the anticandidal activities of 라이소자임 and the 퍼옥시다제 system. Oral Diseases 2011;17(6, Sep):577-583)은 히알루론산과 항균 물질의 상호작용 결과, 항균물질의 살진균 활성이 감소함을 개시하고 있으며, 환자의 감소된 항균 기능을 보충해 주지 못하는 경우가 빈번하였다.
- [7] 현재까지 개발된 인공타액은 점도와 유허력 등의 물리적 특성뿐만 아니라 항균, 항진균 활성과 같은 생물학적 특성의 측면에서도 인체 타액에 크게 미치지 못하여 이들에 대한 환자의 만족도는 미미한 실정이다.

발명의 상세한 설명

기술적 과제

- [8] 본원은 인체 타액과 유동학적 특성(점도)은 더욱 유사하면서 생물학적 기능이 유지되는 히알루론산을 포함하는 인공타액을 제공하고자 한다.

과제 해결 수단

- [9] 한 양태에서 본원은 고분자량과 저분자량의 히알루론산의 혼합물을 포함하는 인공타액 조성물을 제공한다.
- [10] 일 구현예에서 1 내지 2 MDa의 고분자량의 히알루론산; 및 10 또는 100 kDa의 저분자량의 히알루론산의 혼합물을 포함한다.
- [11] 일 구현예에서 상기 혼합물은 1 MDa의 고분자량의 히알루론산 및 10 kDa 또는 100 kDa의 저분자량의 히알루론산; 또는 상기 혼합물은 2 MDa의 고분자량의 히알루론산 및 10 kDa 또는 100 kDa의 저분자량의 히알루론산;을 포함한다.
- [12] 다른 구현예에서 상기 1 MDa의 고분자량의 히알루론산 및 10 kDa의 저분자량의 히알루론산은 1:4의 중량비(mg/ml); 상기 1 MDa의 고분자량의 히알루론산 및 100 kDa의 저분자량의 히알루론산은 5:1의 중량비(mg/ml); 상기 2 MDa의 고분자량의 히알루론산 및 10 kDa의 저분자량의 히알루론산은 1:10의 중량비(mg/ml); 그리고 상기 2 MDa의 고분자량의 히알루론산 및 100 kDa의 저분자량의 히알루론산은 2:1의 중량비(mg/ml)로 포함될 수 있다.
- [13] 본원에 따른 두 가지 상이한 분자량의 히알루론산을 포함하는 인공타액은 인체 타액과 유사한, 전단속도 $60s^{-1}$ 에서 1.30 내지 3.70, 그리고 $160s^{-1}$ 에서 1.12 내지 2.57의 점탄성도를 갖는다.
- [14] 본원에 따른 인공타액 조성물은 인공타액의 제조에 사용되는 물질 예를 들면 라이소자임, 락토펜옥시다아제, 글루코스옥시다아제, SCN⁻ 또는 I⁻, 당알코올 및 완충제를 더 포함할 수 있다.
- [15] 본원에 따른 인공타액 조성물은 인공타액이 필요한 다양한 질환, 예를 들면 구강건조증, 치아우식증, 치주염, 구강 진균감염, 혀통증, 혀주름, 구강 궤양, 구강점막 통증, 미각 장애, 치아마모 및 교모 증가 또는 구취의 치료 또는

예방용으로 사용될 수 있다.

발명의 효과

- [16] 두 종류의 상이한 분자량의 히알루론산을 포함하는 본원에 따른 인공타액 조성물은 단일 분자량의 히알루론산을 포함하는 조성물과 비교하여, 낮은 전단 속도에서 점도는 뚜렷히 증가하고, 높은 전단 속도에서의 점도 상승은 적어, 점탄성도가 개선된 것이다. 즉, 인체 타액과 더욱 유사한 점도를 가져 인체 타액의 유동학적 특성을 더욱 잘 반영한 것이며, 또한 단일 분자량의 히알루론산을 포함하는 조성물과 비교하여 인체 타액 주요 항균 물질에 대한 저해 작용이 증가하지 않는다. 보통 히알루론산 분자량이 증가하면 항균물질에 대한 저해작용이 증가하는데 큰 분자량과 작은 분자량의 히알루론산 혼합물에서는 큰 분자량 단독으로 있을 때와 비해 항균물질에 대한 저해작용은 유사하였다.
- [17] 일반적으로 히알루론산을 포함하는 인공 타액에 사용되는 히알루론산의 분자량은 1 MDa - 2 MDa이고, 일반적으로 저분자량의 히알루로산은 인공타액에 사용되지 않는다. 하지만 본원에서는 이와 저분자량의 히알루론산을 혼합하여 사용함으로써, 항균물질의 활성은 추가적으로 저해하지 않으면서 인체 타액과 더욱 유사한 점도를 가지는 인공 타액을 가능하게 한다.

도면의 간단한 설명

- [18] 도 1은 분자량 1 MDa 히알루론산과 분자량 10 kDa 혹은 100 kDa 히알루론산 혼합물의 점도 측정 결과(농도는 최종 농도 기준)(표 2)를 그래프로 나타낸 것이다. 그래프에서 약어는 다음과 같다: M1, 분자량 1 MDa 히알루론산 0.1 mg/mL와 분자량 10 kDa 히알루론산 2.0 mg/mL 혼합물; M2, 분자량 1 MDa 히알루론산 0.2 mg/mL와 분자량 10 kDa 히알루론산 2.0 mg/mL 혼합물; M3, 분자량 1 MDa 히알루론산 0.5 mg/mL와 분자량 10 kDa 히알루론산 2.0 mg/mL 혼합물; M4, 분자량 1 MDa 히알루론산 1.0 mg/mL와 분자량 10 kDa 히알루론산 2.0 mg/mL 혼합물; M5, 분자량 1 MDa 히알루론산 0.1 mg/mL와 분자량 100 kDa 히알루론산 0.1 mg/mL 혼합물; M6, 분자량 1 MDa 히알루론산 0.2 mg/mL와 분자량 100 kDa 히알루론산 0.1 mg/mL 혼합물; M7, 분자량 1 MDa 히알루론산 0.5 mg/mL와 분자량 100 kDa 히알루론산 0.1 mg/mL 혼합물; M8, 분자량 1 MDa 히알루론산 1.0 mg/mL와 분자량 100 kDa 히알루론산 0.1 mg/mL 혼합물; UWS, 비자극성 전타액; SWS, 자극성 전타액. 상기 그래프에서 비자극성 전타액과 자극성 전타액의 점도 결과는 본 발명자의 선행연구 결과를 활용하였다(Park et al., 2010, Oral Dis 16:382-387).
- [19] 도 2는 분자량 2 MDa 히알루론산과 분자량 10 kDa 혹은 100 kDa 히알루론산 혼합물의 점도 측정 결과(농도는 최종 농도 기준)(표 3)를 그래프로 작성한 것이다. 그래프에서 약어는 다음과 같다: M9, 분자량 2 MDa 히알루론산 0.1 mg/mL와 분자량 10 kDa 히알루론산 2.0 mg/mL 혼합물; M10, 분자량 2 MDa

히알루론산 0.2 mg/mL와 분자량 10 kDa 히알루론산 2.0 mg/mL 혼합물; M11, 분자량 2 MDa 히알루론산 0.5 mg/mL와 분자량 10 kDa 히알루론산 2.0 mg/mL 혼합물; M12, 분자량 2 MDa 히알루론산 0.1 mg/mL와 분자량 100 kDa 히알루론산 0.1 mg/mL 혼합물; M13, 분자량 2 MDa 히알루론산 0.2 mg/mL와 분자량 100 kDa 히알루론산 0.1 mg/mL 혼합물; M14, 분자량 2 MDa 히알루론산 0.5 mg/mL와 분자량 100 kDa 히알루론산 0.1 mg/mL 혼합물; UWS, 비자극성 전타액; SWS, 자극성 전타액. 비자극성 전타액과 자극성 전타액의 점도 결과는 우리의 선행연구 결과를 활용하였다(Park et al., *ibid*).

- [20] 도 3은 분자량 1 MDa 히알루론산과 이를 활용한 혼합물 중 인체 타액과 유사한 점도를 보인 혼합물(M3와 M7)의 점도 측정 결과(농도는 최종 농도 기준)(표 4)를 그래프로 작성한 것이다. 그래프에서 약어는 다음과 같다: 1 MDa, 분자량 1 MDa 히알루론산 0.5 mg/mL; M3, 분자량 1 MDa 히알루론산 0.5 mg/mL와 분자량 10 kDa 히알루론산 2.0 mg/mL 혼합물; M7, 분자량 1 MDa 히알루론산 0.5 mg/mL와 분자량 100 kDa 히알루론산 0.1 mg/mL 혼합물; UWS, 비자극성 전타액; SWS, 자극성 전타액. 1 MDa 히알루론산과 전타액의 점도 결과는 우리의 선행연구 결과를 활용하였다(Park et al., *ibid*; Kim et al., 2018, Arch Oral Biol 89:55-64).

- [21] 도 4는 분자량 2 MDa 히알루론산과 이를 활용한 혼합물 중 인체 타액과 유사한 점도를 보인 혼합물(M10과 M13)의 점도 측정 결과(농도는 최종 농도 기준)(표 5)를 그래프로 작성한 것이다. 그래프에서 약어는 다음과 같다: 2 MDa, 분자량 2 MDa 히알루론산 0.2 mg/mL; M10, 분자량 2 MDa 히알루론산 0.2 mg/mL와 분자량 10 kDa 히알루론산 2.0 mg/mL 혼합물; M13, 분자량 2 MDa 히알루론산 0.2 mg/mL와 분자량 100 kDa 히알루론산 0.1 mg/mL 혼합물; UWS, 비자극성 전타액; SWS, 자극성 전타액. 2 MDa 히알루론산과 전타액의 점도 결과는 우리의 선행연구 결과를 활용하였다(Park et al., 2010, *ibid*; Kim et al., 2018, *ibid*).

발명의 실시를 위한 형태

- [22] 본원에서는 히알루론산이 인체 타액과의 유사성을 보이기는 하지만 제대로 모방하지 못한다는 단점을 분자량이 다른 단일 물질(HA)의 혼합물로 극복하였다. 구체적으로 본원은 고분자량의 히알루론산과 저분자량의 히알루론산을 혼합하여 사용하는 경우, 낮은 전단 속도에서는 점도를 뚜렷하게 상승시키나, 높은 전단 속도에서는 점도 상승 효과가 크지 않아 인간 타액과 유사한 특징을 가져, 기존 단일 분자량만의 히알루론산을 포함하는 인공타액의 단점을 보완할 수 있다는 발견에 근거한 것이다. 기존의 단일 분자량의 히알루론산을 포함하는 인공 타액은 인체 전타액과 비교하여 낮은 전단 속도에서는 점도가 더 낮고, 높은 전단 속도에서는 점도가 더 높은 단점이 있었다. 또한 단일 분자량의 히알루론산을 포함하는 조성물과 비교하여 인체 타액 주요 항균 물질에 대한 저해 작용이 증가하지 않는다.

- [23] 이에 한 양태에서 본원은 상이한 고분자량의 히알루론산; 및 저분자량의

- 히알루론산의 혼합물을 포함하는 인공타액 조성물에 관한 것이다.
- [24] 본원에서 사용되는 히알루론산(히알루론산, HA)은 D-글루쿠론산 및 N-아세틸-D-글루코사민 단위로 이루어진 글리코사미노글리칸(glycosaminoglycan)이다. 글루쿠론산 및 N-아세틸-D-글루코사민은 $\beta(1\rightarrow3)$ 연결되어 있으며, N-아세틸-D-글루코사민 및 글루쿠론산은 $\beta(1\rightarrow4)$ 로 연결되어 있다.
- [25] 히알루론산은 안구 유리액, 관절의 윤활액 및 세포외 기질(extracellular matrix)에 풍부하다. 이것의 고유의 생체적합성 및 독특한 물리적 특성에 의하여 히알루론산은 약물 전달, 안구 건조 환자를 위한 인공 눈물 및 골관절염의 증상 완화를 위한 물질의 제조에 사용돼왔다(O'Brien and Collum, 2004; Almond, 2007; Fam et al.2007).
- [26] 본원에서 히알루론산은 히알루론산 자체와 그것의 염을 모두 포함하는 개념으로, 용어 "히알루론산"은 히알루론산, 히알루론산 염을 포함한다. 상기 히알루론산 염에는, 히알루론산 나트륨, 히알루론산 칼륨, 히알루론산 칼슘, 히알루론산 마그네슘, 히알루론산 아연, 히알루론산 코발트등과 같은 무기염과, 히알루론산 테트라부틸암모늄 등과 같은 유기염이 포함된다. 경우에 따라서는, 이들의 둘 또는 그 이상의 조합이 사용될 수도 있다.
- [27] 또한, 히알루론산은 분자량이 약 5 kDa 내지 20 MDa으로, 본원에서는 고분자량의 히알루론산에 저분자량의 히알루론산이 혼합되어 사용된다.
- [28] 일 구현예에서 저분자량은 500 kDa 이하 그리고 고분자량은 1 MDa 이상이다.
- [29] 다른 구현예에서 고분자량은 약 1 내지 약 2 MDa이다.
- [30] 또 다른 구현예에서 저분자량은 약 10 내지 약 100 kDa이다.
- [31] 일 구현예에서 두 가지 상이한 분자량의 HA 혼합물은 1 MDa의 고분자량 및 10 kDa 또는 100 kDa의 저분자량의 HA를 포함한다.
- [32] 다른 구현예에서 상이한 분자량의 HA 혼합물은 2 MDa의 고분자량 및 10 kDa 또는 100 kDa의 저분자량의 HA를 포함한다.
- [33] 본원에 따른 혼합물에 포함되는 각 HA는 본원에 개시된 효과를 발휘할 수 있는 최적의 농도비로 혼합된다.
- [34] 일 구현예에서 1 MDa의 고분자량의 HA 및 10 kDa의 저분자량의 HA는 1:4의 중량비(mg/ml)로 포함된다.
- [35] 다른 구현예에서 1 MDa의 고분자량의 HA 및 100 kDa의 저분자량의 HA는 5:1의 중량비(mg/ml)로 포함된다.
- [36] 또 다른 구현예에서 2 MDa의 고분자량의 HA 및 10 kDa의 저분자량의 HA는 1:10의 중량비(mg/ml)로 포함된다.
- [37] 또 다른 구현예에서 2 MDa의 고분자량의 HA 및 100 kDa의 저분자량의 HA는 2:1의 중량비(mg/ml)로 포함된다.
- [38] 혼합물에 포함되는 각 히알루론산의 최적의 농도는 다음과 같이 결정하였다. 주가 되는 고분자량의 히알루론산은 타액의 점도와 유사한 점도를 갖는 농도의

범위를 선택하기 위해, 분자량 1 MDa의 히알루론산은 최종 농도를 0.1, 0.2, 0.5, 및 1.0 mg/mL로 하였으며 분자량 2 MDa의 히알루론산은 최종 농도를 0.1, 0.2, 및 0.5 mg/mL로 하였다. 이러한 농도 범위는 인체 전타액의 점도 수치를 포함하는 범위이기 때문이다. 혼합되는 저분자량의 히알루론산의 경우에는 농도가 너무 낮으면 일정 수준의 점도를 거의 나타내지 못하는 문제점이 있으나, 농도를 올리는 경우 용해시키는데 문제점이 생긴다. 이를 고려하여 본원에서는 분자량 10 kDa의 히알루론산은 최종 농도를 2.0 mg/mL으로 하여 추가하였다. 2.0 mg/mL 농도에서 10 kDa 히알루론산의 점도는 5.0 mg/mL 농도에서의 점도와 거의 같지만 5.0 mg/mL 농도 시에 비해 용해의 어려움은 없기 때문이다. 분자량이 100 kDa HA의 경우에는 큰 분자량의 점도를 추가적으로 보완해 주는 농도로서, 0.2 mg/mL 이상이 되면 높은 전단율에서 점도가 상승하여 높은 전단율에서 점도 증가를 더욱 악화시키는 것으로 나타났다. 이를 고려하여, 분자량 100 kDa의 히알루론산은 최종 농도를 0.1 mg/mL으로 하여 추가하였다. 분자량 100 kDa의 히알루론산의 점도는 0.1, 0.2, 및 0.5 mg/mL 농도에서 유의하게 다르지 않았지만 0.1 mg/mL에 비해 0.2 mg/mL 및 0.5 mg/mL 농도에서 점도가 높았으며, 특히 높은 전단율에서 뚜렷하여 0.1 mg/mL 농도를 선택하였다.

- [39] 최종적으로 14가지의 혼합물(분자량 1 MDa과 10 kDa 혼합물 4가지, 분자량 1 MDa과 100 kDa 혼합물 4가지, 분자량 2 MDa과 10 kDa 혼합물 3가지, 분자량 2 MDa과 100 kDa 혼합물 3가지)을 만들고 (표 1) 각각의 점도를 측정하였다.
- [40] HA를 포함하는 기존의 인공 타액은 인체 전타액과 비교하여 낮은 전단 속도(전단율)에서는 점도가 더 낮고, 높은 전단 속도에서는 점도가 더 높은 단점이 있다. 하지만 본원에 따른 두 가지의 상이한 분자량의 히알루론산의 혼합물은 낮은 전단 속도에서는 점도를 뚜렷하게 상승시키나, 높은 전단 속도에서는 점도 상승 효과가 크지 않아 인체 타액과 유사한 특징을 가진다.
- [41] 구강이 가장 평범한 운동을 할 때인 ‘말하거나 삼킬 때’ 전단율이 60-160s⁻¹이다. 이를 기준으로 그 이하일 때는 낮은 전단율, 그 보다 높을 때는 높은 전단율이다. 본원에서 측정된 11.3, 22.5, 45.0, 90.0, 225.0, 450.0 s⁻¹ 전단율에서 11.2, 22.5, 45.0s⁻¹는 낮은 전단율로 225.0, 450.0 s⁻¹는 높은 전단율이다.
- [42] 일 구현예에서 본원의 조성물에 포함되는 히알루론산 혼합물의 점도는 전단속도에 따라 변화한다. 일 구현예에서 본원에 따른 인공타액은 전단속도 60sec⁻¹에서는 점도값이 1.3 ~ 3.7 사이, 전단속도 160sec⁻¹에서는 점도값이 1.12 ~ 2.57 사이로 인체타액의 점도와 유사한 것으로 나타났다.
- [43] 본원에 따른 상이한 두 가지 분자량의 HA 혼합물을 포함하는 인공 타액 조성물은 또한 항균 효소 활성과 관련된 성분을 포함한다.
- [44] 통상 인간의 타액에는 10 여종의 소화효소를 비롯하여 비타민, 무기원소, 호르몬, 단백질, 포도당, 요소 및 뮤신 등 많은 성분들이 함유되어 있다. 이 중에는 구강 내 세균의 번식을 막아주는 성분도 있으며, 특히 효소인 퍼옥시다아제는 활성산소를 제거하며, 침의 소독효과를 크게 해준다. 또한,

침속의 항균성분에는 단백질 분해효소의 일종인 라이소자임, 항체기능을 하는 감마 글로불린, 기타 시안화황 등이 포함되어 우리 몸을 방어한다.

[45] 일 구현예에서 라이소자임, 락토퍼옥시다아제, 글루코스옥시다아제, SCN- 또는 I-, 당알코올 및 완충제를 더 포함한다.

[46] 라이소자임은 세균 및 기타 미생물의 세포벽을 용해할 수 있는 효소 그룹의 구성요소로, 식품 첨가제로 그리고 기타 목적으로 널리 사용되어 왔다.

[47] 본원에 사용된 용어 "라이소자임"은 세균 세포벽의 특정 뮤코다당류의 가수분해를 촉매화하고 세균 용해를 일으키는 효소의 부류를 의미한다. 용어 "라이소자임"은 천연 라이소자임, 예컨대 계란 흰자 라이소자임, 합성 라이소자임 및 재조합 라이소자임, 예컨대 인간 재조합 라이소자임 및 라이소자임 염, 예컨대 유기 및 무기 산, 특히 생리학적으로 허용되는 산, 예를 들어 클로리드 산(chloridic acid), 황산, 인산, 락트산, 아세트산, 말산, 푸마르산, 시트르산, 아스코르빈산을 단독으로 또는 조합하여 얻은 것을 포함한다. 원칙상 모든 라이소자임이 본원의 조성물에 유용하다. 한 구현예에서, 라이소자임은 인간 재조합 라이소자임이다. 다른 바람직한 구현예에서 라이소자임은 비-인간 라이소자임, 특히 계란 흰자 라이소자임이다.

[48] 본원의 조성물에서, 라이소자임의 농도는 약 10~100 μ g/mL의 범위 내이며, 특히 약 20~50 μ g/mL로 포함될 수 있다.

[49] 본원의 조성물에는 글루코스 옥시다아제에 의해서 매개되는 락토퍼옥시다아제 시스템이 사용된다. 일반적인 락토퍼옥시다아제 시스템은 락토퍼옥시다아제, 과산화수소(H_2O_2), 티오시아네이트(SCN-)로 구성되어 항균 작용을 발휘한다. 반면 본원에 따른 글루코스 옥시다아제 매개 락토퍼옥시다아제 시스템은 글루코스 옥시다아제가 환자의 구강에 있는 글루코스를 활용하여 과산화수소(H_2O_2)를 공급함으로써 완성되는 것이다. 따라서 본원에 사용되는 글루코스 옥시다아제 매개 락토퍼옥시다아제 시스템은 락토퍼옥시다아제, 글루코스 옥시다아제, 티오시아네이트(SCN-), 및 글루코스를 이용하여 작용하는 것으로, 본원의 조성물은 글루코스를 포함하지 않고도 환자의 타액에 남아 있는 글루코스를 활용하여 락토퍼옥시다아제 시스템을 작동할 수 있는 것이다.

[50] 본원에 사용되는 "글루코스 옥시다아제"는 포도당(β -D-글루코스)을 공기 중 산소로 산화시켜 D-글루콘산(D-글루코노락톤)을 생성하는 반응의 촉매효소이다. 포도당의 산화에 따라 과산화수소가 생성되어 살균력을 가진다. 다양한 유래의 글루코스 옥시다아제가 사용될 수 있으며, 예를 들면 *페니실리움 노테이텀* (*Penicillium notatum*), 또는 *아스퍼질러스 니거* (*Aspergillus niger*) 유래의 것이 사용될 수 있으나, 이로 제한하는 것은 아니다.

[51] 본원의 "퍼옥시다아제"는 산화제(수소 수용체)로서 과산화수소를 이용해 기질을 탈수소화시키는 반응을 촉매하는 효소로 보통 과산화효소라고도 한다. "락토퍼옥시다아제"는 유선, 침샘 및 다른 점막샘 등에서 분비되는, 헴(heme)

퍼옥시다아제 패밀리를 구성하는 일원이다. 락토퍼옥시다아제 시스템은 우유 및 점막 분비(mucosal secretion)에서 박테리아를 사멸시켜, 선천적면역계(innate immune system)에서 중요한 역할을 한다. 구체적으로 락토퍼옥시다아제는 티오시아네이트(SCN⁻), 브로마이드(Br⁻)와 같은 수용체 물질을 과산화수소를 이용하여 산화시키는 반응을 촉매한다. 상대적으로 짧게 존재하는 이들 산화된 중간체들은 강력한 항균 작용을 하므로, 락토퍼옥시다아제는 항균 방어 시스템의 일부를 구성한다. 본원에는 다양한 유래, 특히 포유류, 특히 인간 또는 소(bovine)유래의 천연 또는 재조합 락토퍼옥시다아제가 사용될 수 있으나, 이로 제한하는 것은 아니다.

- [52] 상술한 바와 같이 본원의 글루코스옥시다아제에 의해서 매개되는 락토퍼옥시다아제 시스템은 항균 기능을 나타내기 위해서 H_2O_2 가 필요하며, 이는 글루코스와 글루코스옥시다아제에 의해 생성된다. 본원의 일 구성성분으로 첨가되는 글루코스옥시다아제는 인체 타액에 원래 존재하는 수준의 글루코스를 활용하여 H_2O_2 를 만들고, 이어 락토퍼옥시다아제가 항균 기능과 관련된 중간체를 제조할 수 있게 한다.
- [53] 본원의 구체적인 구현예에서 글루코스옥시다아제는 본원의 조성물에 약 10 내지 200 μ g/mL, 특히 20 내지 80 μ g/mL의 농도로 첨가될 수 있으며, 락토퍼옥시다아제는 10 내지 70 μ g/mL, 특히 약 12.5 내지 50 μ g/mL의 농도로 첨가될 수 있다.
- [54] SCN⁻ (thiocyanate)은 상기 락토퍼옥시다아제 시스템에서 과산화수소의 산소 원자를 수용함으로써 항균 기능을 나타내기 위해 본원의 조성물에 첨가되며, KSCN(Potassium thiocyanate) 또는 NaSCN(Sodium thiocyanate)의 형태로 사용될 수 있으며, 농도는 약 0.5 내지 3 mM, 특히 약 0.5 내지 1.5 mM의 농도로 첨가될 수 있다.
- [55] 또한 SCN⁻ 대신에 또는 이와 함께 요오드이온(I⁻)이 본원의 조성물에 첨가될 수 있으며, 포타슘요오드(KI) 또는 나트륨요오드(NaI)의 형태로 사용될 수 있다. 농도는 약 5 μ M 내지 0.5 mM, 특히 약 5 μ M 내지 50 μ M의 농도로 첨가될 수 있다.
- [56] 상기 농도 범위는 생산 단가의 경제적인 면과 함께 원하는 수준의 항균 및 항진균 효과를 고려하여 선택되었다.
- [57] 본원에서는 실시예에 제시된 바와 같이 본원에 따른 두 가지 상이한 분자량을 갖는 HA 혼합물을 사용하는 경우 HA에 의한 라이소자임 및 퍼옥시다아제 활성의 저해가 단일 분자량의 HA를 사용하는 경우와 비교하여 증가하지 않아, 추가적인 저해작용은 없었다.
- [58] 본원의 조성물은 또한 항-충치제로 기능할 수 있는 당알코올을 일 구성성분으로 포함한다. "당알코올"은 단당류의 카보닐기를 환원하여 만들어지는 히드록시기가 두 개 이상인 알코올이나, 그와 같은 계열에 속하는 화합물을 통틀어 일컫는 것이다. 일반적으로 $HOCH_2(CHOH)_nCH_2OH$ ($n=2\sim5$)의 화학식을 가지며, 히드록시기의 수에 따라 4가 당알코올(tetritol), 5가

당알코올(pentitol), 6가 당알코올(hexitol) 및 7가 당알코올(heptitol)로 분류된다. 이들은 모두 자연계에 천연적으로 존재하나 시판되는 것은 대부분 합성에 의해 얻어진다. 일반적으로 당알코올은 우수한 보습성, 용해열의 특성에 힘입어 주로 식품첨가물로 사용되어온 소재로 식품의 이용범위가 제한되어 왔으나, 최근에 당알코올이 비만, 당뇨 등의 원인이 되지 않는 생리적 기능이 밝혀지면서 새로운 감미료 및 증점제로 각종 식품의 주원료로 광범위하게 사용되고 있으며 또한 껌이나 치약, 의약품 등에도 다량 사용되고 있다.

- [59] 본원의 조성물은 상기 당알코올로서, 특히 자일리톨, 솔비톨, 및 만니톨로부터 선택된 하나 이상의 당알코올을 포함할 수 있으나, 이로 제한하는 것은 아니다. 특히 자일리톨 및/또는 솔비톨이 사용될 수 있다. 본원의 구현예에서 상기 당알코올은 본원의 조성물에 약 50 내지 300 mM, 특히 약 100 내지 200 mM의 농도로 첨가될 수 있다. 상기 농도 범위는 생산 단가의 경제적인 면과 함께 원하는 수준의 항균 효과를 고려하여 선택되었다.
- [60] 본원의 다른 구현예에 따르면, 본원의 조성물은 완충제 또는 완충용액을 포함한다. 본원에 사용되는 "완충제" 또는 "완충용액"이라는 용어는 구강 내 pH 완충 작용을 나타내는 용액으로 인체 타액과 유사한 이온강도를 가지며, 특히 본원 조성물에 포함된 각 성분들이 고유의 활성을 유지하도록 하거나 상승 작용을 갖도록 한다. 구강 내 완충제의 존재는 구강 내 pH를 안정화시킬 수 있다. 완충제는 타액내의 인산 이온 및 칼슘 이온을 안정화시킬 수 있기 때문에 인산 이온 및 칼슘 이온의 존재 시 우수한 pH 완충 작용을 나타내는 것이 바람직하다.
- [61] 본원에 사용될 수 있는 pH 완충제는 널리 알려진 완충제들을 인산 이온 및 칼슘 이온 함유 중성 수용액(즉, pH 6~8의 수용액)에 첨가하여 침전의 유무를 관찰하고 이러한 실험에서 침전물을 형성하지 않는 것을 선택하여 사용할 수 있다.
- [62] 완충제가 존재하지 않는다면 구강은 구강 박테리아에 의해 생성된 유기산의 효과에 의해 산성화되고, 치아나 플라크가 산성화되면 치아의 칼슘 및 인광체(phosphor)는 Ca 및 P 이온으로 용출되어 충치의 발달을 초래하게 된다. 그러나, 완충제가 존재하게 되면 구강 내 타액 및 치아 플라크의 pH가 중성 pH 상태로 안정하게 되어 충치 형성이 쉽게 진행되지 않는다. 타액의 pH는 일반적으로 중성 상태이다. 따라서 중성 pH에서 완충 작용을 지닌 완충제가 바람직하다.
- [63] 한 구현예에서 사람 타액과 유사한 완충 용액이 사용되며, 예를 들면 NaCl 및 $\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ 및 $\text{Na}_2\text{HPO}_4/\text{NaH}_2\text{PO}_4$ 를 포함하는 완충용액 또는 KCl, NaCl, $\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ 및 K_2HPO_4 를 포함하는 완충용액을 제시하나, 이들로 제한되는 것이 아니다. 상기 완충제의 농도 및 종류는 당업계에 공지된 것 및 이를 변형하여 사용할 수 있다.
- [64] 본원의 인공 타액 조성물은 상술한 성분 이외에도 필요한 경우 당업계에 공지된, 방부제, 향, 향미 증진제 등을 더 포함할 수 있으며, 그 종류와 농도는

당업자의 통상의 지식에 의한다.

- [65] 본원의 인공 타액 조성물은 인체 타액과 유사한 점탄성, 항균 활성, 살진균 활성을 보유하므로, 구강건조증 및 그 관련 질환 예를 들면 치아우식증, 치주염, 구강 진균감염, 특히 구강 칸디다 증, 혀통증, 혀주름, 구강 궤양, 구강점막 통증, 미각 장애, 치아마모 또는 교모 증가 또는 구취의 예방이나 치료에 유용하다. 뿐만 아니라, 구강 이외의 다른 부위의 다양한 면역성, 염증성 질환 치료제로서도 응용, 개발 가능하다. 본원의 조성물은 생체 물질 및 안정성이 입증된 물질을 활용하므로, 시장 진입이 용이하여 산업적 효과가 신속하게 나타날 것으로 기대되어 관련 산업 예를 들면 노인 보건의료 분야, 치의학 분야, 난치성 질환 치료 분야, 제약 산업 분야 발전에 크게 이바지할 수 있을 것으로 기대된다.
- [66] 이하, 본 발명을 하기의 실시예에 의해 상세히 설명한다. 단, 하기 실시예는 본 발명을 예시하는 것일 뿐, 본 발명의 내용이 하기 실시예에 의해 한정되는 것은 아니다.
- [67] 실 시 예
- [68] 실험방법
- [69] **2.1. 히알루론산 혼합물(mixtures)의 제조**
- [70] 서로 상이한 분자량을 가진 4종류의 히알루론산(10 kDa, 100 kDa, 1 MDa, 및 2 MDa; Lifecore Biomedical, LLC, Chaska, MN, USA)를 타액모방 완충용액[simulated salivary buffer (SSB; 0.021 M $\text{Na}_2\text{HPO}_4/\text{NaH}_2\text{PO}_4$, pH7.0, containing 36 mM NaCl and 0.96 mM CaCl_2)]에 용해시켜 사용하였다.
- [71] 이 중 고분자량의 히알루론산(1 MDa 혹은 2 MDa)를 저분량의 히알루론산(10 kDa 혹은 100 kDa)와 혼합하였다. 분자량 1 MDa의 히알루론산은 최종 농도를 0.1, 0.2, 0.5, 및 1.0 mg/mL로 하였으며 분자량 2 MDa의 히알루론산은 최종 농도를 0.1, 0.2, 및 0.5 mg/mL로 하였다. 이러한 농도 범위는 인체 전타액(human whole saliva)의 점도 수치를 포함하는 범위이기 때문이다. 분자량 10 kDa의 히알루론산은 최종 농도를 2.0 mg/mL으로 하여 추가하였다. 2.0 mg/mL 농도에서 10 kDa 히알루론산의 점도는 5.0 mg/mL 농도에서의 점도와 거의 같다. 최종 농도를 2.0 mg/mL로 선택한 이유는 5.0 mg/mL 농도 시 용해의 어려움이 있기 때문이다. 분자량 100 kDa의 히알루론산은 최종 농도를 0.1 mg/mL으로 하여 추가하였다. 분자량 100 kDa의 히알루론산의 점도는 0.1, 0.2, 및 0.5 mg/mL 농도에서 유의하게 다르지 않았지만 0.1 mg/mL에 비해 0.2 mg/mL 및 0.5 mg/mL 농도에서 점도가 높았으며, 특히 높은 전단율(higher shear rates)에서 뚜렷하여 0.1 mg/mL 농도를 선택하였다. 최종적으로 14가지의 혼합물(분자량 1 MDa과 10 kDa 혼합물 4가지, 분자량 1 MDa과 100 kDa 혼합물 4가지, 분자량 2 MDa과 10 kDa 혼합물 3가지, 분자량 2 MDa과 100 kDa 혼합물 3가지)을 만들고 (표 1) 각각의 점도를 측정하였다.
- [72] [표 1] 저분자량 및 고분자량의 히알루론산 혼합물

[73]

Name	Hyaluronic acid with high-molecular-weight	Hyaluronic acid with low-molecular-weight	Hyaluronic acid mixture used for the enzyme experiments
M1	1 MDa, 0.1 mg/mL	10 kDa, 2.0 mg/mL	
M2	1 MDa, 0.2 mg/mL	10 kDa, 2.0 mg/mL	
M3	1 MDa, 0.5 mg/mL	10 kDa, 2.0 mg/mL	O
M4	1 MDa, 1.0 mg/mL	10 kDa, 2.0 mg/mL	
M5	1 MDa, 0.1 mg/mL	100 kDa, 0.1 mg/mL	
M6	1 MDa, 0.2 mg/mL	100 kDa, 0.1 mg/mL	
M7	1 MDa, 0.5 mg/mL	100 kDa, 0.1 mg/mL	O
M8	1 MDa, 1.0 mg/mL	100 kDa, 0.1 mg/mL	
M9	2 MDa, 0.1 mg/mL	10 kDa, 2.0 mg/mL	
M10	2 MDa, 0.2 mg/mL	10 kDa, 2.0 mg/mL	O
M11	2 MDa, 0.5 mg/mL	10 kDa, 2.0 mg/mL	
M12	2 MDa, 0.1 mg/mL	100 kDa, 0.1 mg/mL	
M13	2 MDa, 0.2 mg/mL	100 kDa, 0.1 mg/mL	O
M14	2 MDa, 0.5 mg/mL	100 kDa, 0.1 mg/mL	

[74]

2.2. 점도 측정

[75]

점도는 cone-and-plate 형태의 디지털 점도계[LVT Wells-Brookfield cone-and-plate digital viscometer (Brookfield Engineering Laboratories, Stoughton, MA, USA)]를 사용하여 6단계(11.3, 22.5, 45, 90, 225, 및 450 s⁻¹)의 전단율(shear rates)에서 측정하였으며 낮은 단계 전단율부터 점진적으로 증가시키면서 측정하였다. 측정은 37°C에서 시행하였으며 각 시료마다 10회 측정하였다. 히알루론산 혼합물의 점도 결과를 이전 우리의 선행연구에서 확보한 인체 전타액의 점도 및 단일분자량 히알루론산 점도와 비교하였다(Park et al., 2010; Kim et al., 2018).

[76]

2.3. 타액의 채취 및 라이소자임과 퍼옥시다제

[77]

4명의 건강한 성인(남자 2명, 여자 2명, 평균연령 29.1±3.2년)의 전타액(whole saliva) 검체를 채취하여 효소 활성 실험에 사용하였다. 모든 연구참여자는 중증 질환의 병력이 없었으며 최근 3개월 동안 타액분비에 영향을 줄 수 있는 약물의 복용 병력이 없었다. 그리고 모든 연구참여자의 구강위생상태 및 치주상태는 양호하였다. 타액 검체는 타액조성의 일중변화를 최소화하기 위해 오전 8시에서 오전 10시 사이에 채취하였다. 연구참여자로 하여금 타액채취 1시간 전부터 음식 및 음료의 섭취와 양치질을 제한하였다. 비자극시 분비되는 전타액(비자극성 전타액, unstimulated whole saliva, UWS)은 spitting 법(spitting method)으로 채취하였다. 타액 검체를 냉각 상태의 원심분리용 튜브(chilled centrifuge tube)를 활용하여 채취한 후 4°C에서 3,500 x g로 15분 동안 원심분리하였다. 원심분리 후 즉시 상층액(clarified supernatant fluid)을 분리하여 효소활성 분석에 사용하였다. 4명의 참여자로부터 채취한 비자극성 전타액을 동일한

양만큼씩 합친 검체(pooled saliva sample)를 매 실험에 사용하였다. 본 연구계획은 서울대학교치과병원 연구윤리심의위원회[Institutional Review Board of Seoul National University Dental Hospital (#CRI18004)]의 승인을 받았으며 연구참여자로부터 연구참여에 대한 동의서(informed consent)를 받았다.

- [78] 인체 타액과 함께 hen egg-white 라이소자임(HEWL; 최종 농도, 30 μ g/mL; Sigma-Aldrich Chemical Co., St. Louis, MO, USA)과 보바인 락토퍼옥시다제(bLPO; 최종 농도, 25 μ g/mL; Sigma-Aldrich Chemical Co.)를 각각 효소 활성 실험에 사용하였다.

[79] **2.4. 라이소자임 효소 활성의 측정**

- [80] 라이소자임 활성은 the EnzCheck 라이소자임 assay kit(Molecular Probes, Eugene, OR, USA)를 활용하여 측정하였다. 활성 측정은 fluorescein-labeled *Micrococcus lysodeikticus*의 용해(hydrolysis) 정도를 fluorescence microplate reader(Synergy H1 Hybrid Multi-Mode Microplate Reader, BioTek instruments Inc., Winooski, VT, USA)를 사용하여 여기 파장 $\lambda = 485$ nm와 방출파장 $\lambda = 535$ nm 상태에서 측정하는 방법을 활용하였다. HEWL과 타액 라이소자임의 효소 활성을 측정하는 실험은 한번에 2회씩 중복 측정하여 평균치를 활용하고, 각각 총 8회 측정하였다.

[81] **2.4.1. 용액 상태(solution phase)에서 분자량이 다른 히알루론산 혼합물이 라이소자임 활성에 미치는 영향 분석**

- [82] 용액 상태에서 분자량이 다른 히알루론산 혼합물이 HEWL 및 타액 라이소자임 활성에 미치는 영향은 각 히알루론산 혼합물 500 μ L와 HEWL 혹은 원심분리한 전타액 검체 500 μ L를 실온에서 30분 동안 혼합하는(incubation) 방법으로 분석하였다. 30분 동안 혼합한 검체를 fluorescein-labeled *M. lysodeikticus* 현탁액(suspension)에 첨가하여 효소 활성을 분석하였다. 이때 완충용액과 HEWL 혹은 원심분리한 전타액 검체의 혼합물, 1 MDa 혹은 2 MDa의 단일분자량 히알루론산과 HEWL 혹은 원심분리한 전타액 검체의 혼합물은 대조군으로 활용되었다. 분자량이 다른 히알루론산 혼합물과 완충용액의 혼합물(incubated mixture)과 완충용액 자체(incubated buffer alone)는 블랭크로 활용하였다.

[83] **2.4.2. 표면 상태(surface phase)에서 분자량이 다른 히알루론산 혼합물이 라이소자임 활성에 미치는 영향 분석**

- [84] 분자량이 다른 히알루론산 혼합물이 하이드록시 아파타이트 표면에 흡착(adsorption)된 상태의 라이소자임 활성에 미치는 영향은 두 가지 방법으로 조사하였다. 첫 번째 방법은 먼저 분자량이 다른 히알루론산 혼합물을 하이드록시 아파타이트 비드 표면에 흡착시킨 후 HEWL 혹은 원심분리한 전타액 검체를 흡착시켜 그 영향을 조사하는 것이다(표면 분석 I). 다음으로는 분자량이 다른 히알루론산 혼합물과 HEWL 혹은 원심분리한 전타액 검체를 먼저 혼합시켜 반응을 유도한 후 이 혼합물을 하이드록시 아파타이트 비드 표면에 흡착시켜 그 영향을 조사하는 것이다(표면 분석 II). 이 상태에서의 분석

결과를 분자량이 다른 히알루론산 혼합물이 없는 상태 혹은 단일분자량의 히알루론산(1 MDa 혹은 2 MDa)이 있는 상태와 비교하였다. 그리고 분자량이 다른 히알루론산 혼합물만을 동일한 양의 하이드록시 아파타이트 비드에 흡착시킨 상태 혹은 완충용액만을 하이드록시 아파타이트 비드에 흡착시킨 상태를 블랭크로 활용하였다.

[85] 각 분석 시 마다 ceramic 하이드록시 아파타이트 비드(Macro-prep type I, Bio-Rad, Hercules, CA, USA) 10 mg을 표면 물질(surface medium)로 활용하였다.

[86] **2.5. 퍼옥시다제 효소 활성의 측정**

[87] 퍼옥시다제 활성은 선행연구에 기술된 방법을 사용하여 측정하였다(Hannig et al., 2008, Kim et al., 2018; Proctor & Chan, 1994). 퍼옥시다제와 하이드로젠 퍼옥시다제의 존재 하에 LDCF(fluorogenic 2',7'-dichlorofluorescein)는 DCF(fluorescent dichlorofluorescein)로 산화한다. 이때 DCF가 생성하는 형광 신호를 형광신호 마이크로 플레이트 판독기(Synergy H1 Hybrid Multi-Mode Microplate Reader, BioTek instruments Inc.)를 활용하여 여기 파장 $\lambda = 488 \text{ nm}$ 와 방출 파장 $\lambda = 530 \text{ nm}$ 상태에서 측정하였다. 퍼옥시다제 활성 1 unit은 1분당 방출하는 DCF $1 \mu\text{mol}$ 로 정의되었다. bLPO와 타액 퍼옥시다제의 효소 활성을 측정하는 실험은 한번에 2회씩 중복 측정하여 평균치를 활용하고, 각각 총 8회 측정하였다.

[88] **2.5.1. 용액 상태(solution phase)에서 분자량이 다른 히알루론산 혼합물이 퍼옥시다제 활성에 미치는 영향**

[89] 용액 상태에서 분자량이 다른 히알루론산 혼합물이 bLPO 및 타액 퍼옥시다제 활성에 미치는 영향은 각 히알루론산 혼합물 $500 \mu\text{L}$ 와 bLPO 혹은 원심분리한 전타액 검체 $500 \mu\text{L}$ 를 실온에서 30분 동안 혼합하는(incubation) 방법으로 분석하였다. 혼합한 용액 $4 \mu\text{L}$ 를 $200 \mu\text{L}$ phosphate 완충용액(0.15 M, 1 mM KSCN, pH 6.0)에 첨가하고 37°C 에서 10분동안 반응(incubation)시켰다. 이어서 2.2 mM 하이드로젠 퍼옥사이드 용액 $20 \mu\text{L}$ 와 LDCF 시약 $20 \mu\text{L}$ 를 추가하고 4분동안 반응을 시킨 후 1 M 소듐 하이드록사이드 $100 \mu\text{L}$ 를 추가하여 반응을 종료시켰다.

[90] 이때 완충용액과 bLPO 혹은 원심분리한 전타액 검체의 혼합물, 1 MDa 혹은 2 MDa의 단일분자량 히알루론산과 bLPO 혹은 원심분리한 전타액 검체의 혼합물은 대조군으로 활용되었다. 분자량이 다른 히알루론산 혼합물과 완충용액의 혼합물(incubated mixture)과 완충용액 자체(incubated buffer alone)는 블랭크로 활용하였다.

[91] **2.5.2. 표면 상태(surface phase)에서 분자량이 다른 히알루론산 혼합물이 퍼옥시다제 활성에 미치는 영향**

[92] 라이소자임 실험과 같이 분자량이 다른 히알루론산 혼합물이 하이드록시 아파타이트 표면에 흡착(adsorption)된 상태의 퍼옥시다제 활성에 미치는 영향은 두 가지 방법으로 조사하였다. 첫 번째 방법은 먼저 분자량이 다른 히알루론산

혼합물을 하이드록시 아파타이트 비드 표면에 흡착시킨 후 bLPO 혹은 원심분리한 전타액 검체를 흡착시켜 그 영향을 조사하는 것이다(표면 분석 I). 다음으로 분자량이 다른 히알루론산 혼합물과 bLPO 혹은 원심분리한 전타액 검체를 먼저 혼합시켜 반응을 유도한 후 이 혼합물을 하이드록시 아파타이트 비드 표면에 흡착시켜 그 영향을 조사하는 것이다(표면 분석 II). 대조군과 블랭크는 같은 방법으로 활용하였다.

[93] **2.6. 통계**

[94] 점도 결과의 통계학적 분석을 위해 Kruskal-Wallis 검사법 및 Mann-Whitney U 검사법을 활용하였다. 효소 활성 결과의 통계학적 분석을 위해 Friedman 검사법 및 Wilcoxon signed rank 검사법을 활용하였다. 통계적 유의수준(*P*-value)은 0.05 미만으로 하였다.

[95] **실시예 1. 상이한 분자량의 히알루론산을 포함하는 혼합물의 점도 변화**

[96] 인체 타액, 특히 일상적인 구강 기능을 반영하는 전단속도 60 - 160 s⁻¹에서 인체 타액과 가장 유사한 점도를 갖는 혼합물을 찾기 위해 표 1에서와 같이 상이한 분자량의 히알루론산을 포함하는 혼합물을 제조하고 점도를 측정하고, 아래에 표 2 내지 표 5로 나타냈다.

[97] [표 2] 1 MDa 히알루론산과 분자량 10 kDa 혹은 100 kDa 히알루론산 혼합물의 점도 측정 결과

[98]

	11.3 s ⁻¹	22.5 s ⁻¹	45.0 s ⁻¹	90.0 s ⁻¹	225.0 s ⁻¹	450.0 s ⁻¹
UWS (cps)	4.66	3.9	3.23	2.52	1.83	1.45
SWS (cps)	3.57	2.96	2.45	1.91	1.43	1.17
M1 (cps)	3.61	2.38	1.47	1.35	1.22	1.11
M2 (cps)	1.73	1.49	1.26	1.24	1.20	1.16
M3 (cps)	2.68	2.45	2.25	2.08	1.92	1.79
M4 (cps)	3.94	3.68	3.54	3.43	3.23	3.10
M5 (cps)	1.50	1.31	1.03	1.04	1.04	1.01
M6 (cps)	1.74	1.48	1.25	1.23	1.19	1.16
M7 (cps)	2.87	2.40	2.25	2.15	1.99	1.89
M8 (cps)	4.61	4.15	3.69	3.53	3.23	3.09

[99] [표 3] 2 MDa 히알루론산과 분자량 10 kDa 혹은 100 kDa 히알루론산 혼합물의 점도 측정 결과

[100]

	11.3 s ⁻¹	22.5 s ⁻¹	45.0 s ⁻¹	90.0 s ⁻¹	225.0 s ⁻¹	450.0 s ⁻¹
UWS (cps)	4.66	3.9	3.23	2.52	1.83	1.45
SWS (cps)	3.57	2.96	2.45	1.91	1.43	1.17
M9 (cps)	3.47	2.49	1.65	1.52	1.39	1.29
M10 (cps)	2.50	2.40	2.21	2.00	1.72	1.56
M11 (cps)	5.00	4.68	4.14	3.82	3.23	2.84
M12 (cps)	1.99	1.85	1.57	1.48	1.35	1.27
M13 (cps)	2.97	2.64	2.39	2.13	1.82	1.64
M14 (cps)	4.99	4.54	4.07	3.74	3.15	2.73

[101] [표 4] 1 MDa 히알루론산과 혼합물(M3와 M7)의 점도 측정 결과

[102]

	11.3 s ⁻¹	22.5 s ⁻¹	45.0 s ⁻¹	90.0 s ⁻¹	225.0 s ⁻¹	450.0 s ⁻¹
UWS (cps)	4.66	3.9	3.23	2.52	1.83	1.45
SWS (cps)	3.57	2.96	2.45	1.91	1.43	1.17
M3 (cps)	2.68	2.45	2.25	2.08	1.92	1.79
M7 (cps)	2.87	2.40	2.25	2.15	1.99	1.89
1 MDa (cps)	2.30	1.80	1.62	1.60	1.60	1.58

[103] [표 5] 2 MDa 히알루론산과 혼합물(M10과 M13)의 점도 측정 결과

[104]

	11.3 s ⁻¹	22.5 s ⁻¹	45.0 s ⁻¹	90.0 s ⁻¹	225.0 s ⁻¹	450.0 s ⁻¹
UWS (cps)	4.66	3.9	3.23	2.52	1.83	1.45
SWS (cps)	3.57	2.96	2.45	1.91	1.43	1.17
M10 (cps)	2.50	2.40	2.21	2.00	1.72	1.56
M13 (cps)	2.97	2.64	2.39	2.13	1.82	1.64
2 MDa (cps)	2.52	2.42	2.28	2.17	1.97	1.81

[105] 상기 표 2 내지 표 5를 그래프로 나타낸 결과는 도 1 내지 도 4에 개시되어 있다. 이에 나타난 바와 같이 4가지 혼합물(M4, M8, M11, M14)의 점도는 UWS(unstimulated whole saliva, 비자극성 전타액)의 점도보다 훨씬 높았다. 여섯가지 혼합물(M1, M2, M5, M6, M9 및 M12)의 점도는 SWS(stimulated whole saliva, 자극성 전타액)의 점도보다 훨씬 낮았다. 네 가지 혼합물(M3, M7, M10 및 M13)은 인체 전타액과 유사한 점도를 나타냈다(도 1 및 도 2). 1 MDa-HA와 10 kDa HA (M3) 또는 100 kDa-HA (M7)의 혼합물은 1 MDa-HA만을 포함하는 경우와 비교하여 조사된 모든 전단 속도 범위에서 점도 값이 유의적으로 향상되었다($P < 0.01$). 이들 혼합물(M3 및 M7)은 60-160 s⁻¹의 전단 속도에서 인체 전타액과 유사한 점도 값을 가지는 것으로 나타났다(아래 표 12 참조). 구체적으로 M3의 경우에는 60.0 s⁻¹에서 2.21, 160 s⁻¹에서 1.99를 보였고, M7의 경우에는 60.0 s⁻¹에서 2.27, 160 s⁻¹에서 2.05를 보였다. M3과 M7 혼합물 사이의 점도값의 유의한 차이는 없었다(도 3).

[106] 2 MDa-HA와 100 kDa-HA (M13)의 혼합물은 2 MDa-HA만을 포함하는 경우와 비교하여 낮은 전단 속도에서는 점도가 향상되었으나 그 차이는 유의하지 않았다. 2 MDa-HA를 포함하는 혼합물(M10 및 M13)의 점도 값은 조사된 모든 전단 속도 범위에서 2 MDa-HA 만을 포함하는 경우와 비교하여 유의한 변화가 없었다(도 4).

[107] 실시예 2. 상이한 분자량의 히알루론산을 포함하는 혼합물이 라이소자임 활성화에 미치는 영향 분석

[108] 효소 활성 실험은 인체 전타액과 유사한 점도를 갖는 4가지 혼합물(M3, M7, M10, 및 M13)에 대하여 수행되었다. 1 MDa HA, 2 MDa HA 및 이들의 혼합물의 HA는 용액상태 및 HA-부착된 하이드록시아파타이드 표면(표면 분석 I)상의 HEWL 효소 활성화에 영향을 미치지 않았다(표 6).

[109] [표 6] HA 혼합물이 용액상 및 하이드록시 아파타이트 표면상의 HEWL 효소활성에 미치는 영향

[110]

n = 8	HEWL (Group I)	With hyaluronic acid			Sig. among groups	Sig. between groups
Type of assay		1 MDa (Group II)	Mixture 3 (Group III)	Mixture 7 (Group IV)		
Solution (Units/mL)	2588.7 ± 179.6	2636.1 ± 174.8	2615.0 ± 197.2	2663.7 ± 209.5	0.896	n.s.
Ratio to Group I (%)		102.2 ± 8.9	101.3 ± 9.4	103.5 ± 12.5		
Surface I (Units)	52.5 ± 1.3	52.1 ± 1.3	51.7 ± 1.9	51.5 ± 2.3	0.369	n.s.
Ratio to Group I (%)		99.2 ± 2.2	98.5 ± 1.9	98.1 ± 3.4		
Surface II (Units)	51.8 ± 1.0	49.3 ± 1.9	48.2 ± 1.2	48.0 ± 1.1	0.003**	*(I,II) (I,III) (I,IV)
Ratio to Group I (%)		95.2 ± 4.4	93.1 ± 2.7	92.6 ± 1.7		

n = 8	HEWL (Group I)	With hyaluronic acid			Sig. among groups	Sig. between groups
Type of assay		2 MDa (Group II)	Mixture 10 (Group III)	Mixture 13 (Group IV)		
Solution (Units/mL)	2605.6 ± 202.0	2546.7 ± 231.2	2559.6 ± 295.6	2570.4 ± 364.4	0.648	n.s.
Ratio to Group I (%)		97.7 ± 2.7	98.1 ± 6.1	98.4 ± 8.0		
Surface I (Units)	48.9 ± 3.8	47.4 ± 4.2	48.2 ± 3.7	47.6 ± 3.0	0.307	n.s.
Ratio to Group I (%)		96.9 ± 3.5	98.6 ± 2.7	97.6 ± 4.9		
Surface II (Units)	52.7 ± 3.6	45.7 ± 4.6	45.3 ± 2.3	46.2 ± 2.6	0.002**	*(I,II) (I,III) (I,IV)
Ratio to Group I (%)		86.9 ± 9.0	86.3 ± 7.0	87.7 ± 3.2		

HEWL, hen egg-white lysozyme; 1 MDa, 0.5 mg/mL of 1 MDa hyaluronic acid; Mixture 3, mixture of 0.5 mg/mL of 1 MDa and 2.0 mg/mL of 10 kDa hyaluronic acids; Mixture 7, mixture of 0.5 mg/mL of 1 MDa and 0.1 mg/mL of 100 kDa hyaluronic acids; 2 MDa, 0.2 mg/mL of 2 MDa hyaluronic acid; Mixture 10, mixture of 0.2 mg/mL of 2 MDa and 2.0 mg/mL of 10 kDa hyaluronic acids; Mixture 13, mixture of 0.2 mg/mL of 2 MDa and 0.1 mg/mL of 100 kDa hyaluronic acids

Surface assay I, Hyaluronic acid was adsorbed to hydroxyapatite beads first, and HEWL was incubated on the hyaluronic acid-adsorbed beads next.

Surface assay II, Hyaluronic acid was pre-incubated with HEWL, and the mixture was adsorbed to hydroxyapatite beads.

The statistical significances among the groups and between the groups were tested by the Friedman and Wilcoxon signed rank tests, respectively.

* $P < 0.05$, ** $P < 0.01$

[111] HEWL의 효소 활성은 HA와 HEWL의 미리 배양된 혼합물이 하이드록시 아파타이트 표면에 흡착된 경우 1 MDa HA, 2 MDa HA, 및 이들의 혼합물에 의해 유의하게 억제되었다($P < 0.05$)(표면 분석 II). 1 MDa 또는 2 MDa 만을 포함하는 경우와 이들의 혼합물 사이의 억제 수준에 있어서는 유의한 차이가 없었다. 억제 수준은 1MDa HA (92.6 - 95.2%)를 포함하는 경우와 비교하여 2 MDa-HA (86.3 - 87.7%)를 포함하는 경우에 더 컸다(표 6).

[112] 타액의 라이소자임에 미치는 HA와 그 혼합물의 영향은 HEWL에 미치는 효과와 거의 동일하였다. 그러나 2 MDa-HA (89.4 - 91.8%)와 비교하여 1 MDa-HA (90.2 - 92.5%) 사이의 억제 수준에는 유의한 차이가 없었다(표 7).

[113] [표 7] HA 혼합물이 용액상 및 하이드록시 아파타이트 표면상의 라이소자임 효소활성에 미치는 영향

[114]

n = 8 Type of assay	Human saliva (Group I)	With hyaluronic acid			Sig. among groups	Sig. between groups
		1 MDa (Group II)	Mixture 3 (Group III)	Mixture 7 (Group IV)		
Solution (Units/mL)	561.2 ± 64.6	556.5 ± 61.4	574.7 ± 50.9	568.1 ± 45.3	0.583	n.s.
Ratio to Group I (%)		99.3 ± 4.0	102.8 ± 6.1	101.8 ± 7.7		
Surface I (Units)	32.1 ± 4.3	32.2 ± 4.9	32.8 ± 4.7	32.0 ± 5.5	0.789	n.s.
Ratio to Group I (%)		100.2 ± 6.1	102.5 ± 10.9	99.8 ± 12.3		
Surface II (Units)	31.0 ± 5.1	27.9 ± 4.2	28.8 ± 6.3	27.7 ± 4.2	0.027*	*(I,II) (I,III) (I,IV)
Ratio to Group I (%)		90.3 ± 7.7	92.5 ± 8.5	90.2 ± 13.3		
n = 8 Type of assay	Human saliva (Group I)	With hyaluronic acid			Sig. among groups	Sig. between groups
		2 MDa (Group II)	Mixture 10 (Group III)	Mixture 13 (Group IV)		
Solution (Units/mL)	540.9 ± 74.2	526.1 ± 61.4	540.8 ± 65.5	527.8 ± 62.7	0.327	n.s.
Ratio to Group I (%)		97.7 ± 7.7	100.3 ± 6.6	97.8 ± 3.2		
Surface I (Units)	31.9 ± 3.7	31.1 ± 4.9	30.8 ± 5.3	32.7 ± 5.8	0.129	n.s.
Ratio to Group I (%)		97.1 ± 5.5	96.0 ± 7.7	102.4 ± 11.2		
Surface II (Units)	27.1 ± 2.8	24.3 ± 2.9	24.8 ± 2.1	24.5 ± 1.6	0.017*	*(I,II) (I,III) (I,IV)
Ratio to Group I (%)		89.4 ± 5.6	91.8 ± 9.0	91.1 ± 12.0		

1 MDa, 0.5 mg/mL of 1 MDa hyaluronic acid; Mixture 3, mixture of 0.5 mg/mL of 1 MDa and 2.0 mg/mL of 10 kDa hyaluronic acids; Mixture 7, mixture of 0.5 mg/mL of 1 MDa and 0.1 mg/mL of 100 kDa hyaluronic acids; 2 MDa, 0.2 mg/mL of 2 MDa hyaluronic acid; Mixture 10, mixture of 0.2 mg/mL of 2 MDa and 2.0 mg/mL of 10 kDa hyaluronic acids; Mixture 13, mixture of 0.2 mg/mL of 2 MDa and 0.1 mg/mL of 100 kDa hyaluronic acids
Surface assay I, Hyaluronic acid was adsorbed to hydroxyapatite beads first, and saliva was incubated on the hyaluronic acid-adsorbed beads next.
Surface assay II, Hyaluronic acid was pre-incubated with saliva, and the mixture was adsorbed to hydroxyapatite beads.
The statistical significances among the groups and between the groups were tested by the Friedman and Wilcoxon signed rank tests, respectively.
*P < 0.05

[115] 실시예 3. HA 혼합물이 퍼옥시다제 효소 활성에 미치는 영향 분석

[116] 1 MDa, 2 MDa 및 이들의 혼합물의 HA는 용액상에서의 bLPO 효소 활성 및 양쪽 유형의 표면 분석(I 및 II)의 효소 활성에 영향을 미치지 않았다(표 8). bLPO 결과와 유사하게, 1 MDa, 2 MDa 및 이들의 혼합물의 HA는 표면 분석 I 및 용액에서 타액 퍼옥시다제의 효소 활성에 영향을 미치지 않았다(표 9).

[117] 그러나, HA와 전타액의 사전 배양된 혼합물이 하이드록시 아파타이트 표면에 부착된 경우(표면 분석 II), 타액 퍼옥시다제의 효소 활성은 M3의 경우를 제외하고는(P = 0.069) 1 MDa, 2 MDa 및 이들의 혼합물의 HA에 의해 유의하게 억제되었다(P < 0.05). 그러나 1 MDa-HA (88.6 - 96.5%)와 2 MDa-HA (91.8 - 94.7%) 사이에 유의한 차이는 발견되지 않았다(표 9).

[118] [표 8] HA 혼합물이 용액상 및 하이드록시 아파타이트 표면상의 bLPO의 효소활성에 미치는 영향

[119]

n = 8 Type of assay	bLPO (Group I)	With hyaluronic acid			Sig. among groups	Sig. between groups
		1 MDa (Group II)	Mixture 3 (Group III)	Mixture 7 (Group IV)		
Solution (Units/mL)	8.65 ± 0.68	8.67 ± 0.47	8.45 ± 0.96	8.49 ± 0.71	0.062	n.s.
Ratio to Group I (%)		100.5 ± 5.6	98.1 ± 13.4	98.2 ± 4.7		
Surface I (mUnits)	4.68 ± 0.23	4.59 ± 0.24	4.69 ± 0.13	4.60 ± 0.25	0.615	n.s.
Ratio to Group I (%)		98.1 ± 2.7	100.4 ± 5.6	98.5 ± 5.8		
Surface II (mUnits)	5.03 ± 0.64	4.92 ± 0.47	4.88 ± 0.42	4.96 ± 0.45	0.783	n.s.
Ratio to Group I (%)		98.3 ± 4.8	97.5 ± 5.2	99.2 ± 6.0		
n = 8 Type of assay	bLPO (Group I)	With hyaluronic acid			Sig. among groups	Sig. between groups
		2 MDa (Group II)	Mixture 10 (Group III)	Mixture 13 (Group IV)		
Solution (Units/mL)	6.99 ± 0.44	6.92 ± 0.62	6.72 ± 0.40	7.26 ± 0.54	0.070	n.s.
Ratio to Group I (%)		99.0 ± 7.9	96.3 ± 5.1	103.9 ± 6.6		
Surface I (mUnits)	4.66 ± 0.35	4.70 ± 0.34	4.70 ± 0.33	4.70 ± 0.34	0.960	n.s.
Ratio to Group I (%)		101.0 ± 2.7	101.0 ± 7.1	101.0 ± 5.6		
Surface II (mUnits)	5.16 ± 0.25	5.00 ± 0.38	4.94 ± 0.24	4.95 ± 0.46	0.466	n.s.
Ratio to Group I (%)		96.8 ± 3.7	96.0 ± 5.8	95.9 ± 6.4		

bLPO, bovine lactoperoxidase; 1 MDa, 0.5 mg/mL of 1 MDa hyaluronic acid; Mixture 3, mixture of 0.5 mg/mL of 1 MDa and 2.0 mg/mL of 10 kDa hyaluronic acids; Mixture 7, mixture of 0.5 mg/mL of 1 MDa and 0.1 mg/mL of 100 kDa hyaluronic acids; 2 MDa, 0.2 mg/mL of 2 MDa hyaluronic acid; Mixture 10, mixture of 0.2 mg/mL of 2 MDa and 2.0 mg/mL of 10 kDa hyaluronic acids; Mixture 13, mixture of 0.2 mg/mL of 2 MDa and 0.1 mg/mL of 100 kDa hyaluronic acids.
 Surface assay I, Hyaluronic acid was adsorbed to hydroxyapatite beads first, and bLPO was incubated on the hyaluronic acid-adsorbed beads next.
 Surface assay II, Hyaluronic acid was pre-incubated with bLPO, and the mixture was adsorbed to hydroxyapatite beads.
 The statistical significances among the groups and between the groups were tested by the Friedman and Wilcoxon signed rank tests, respectively.

[120] [표 9] HA 혼합물이 용액상 및 하이드록시 아파타이트 표면상의 타액
 펌프시다제의 효소활성에 미치는 영향

[121]

n = 8 Type of assay	Human saliva (Group I)	With hyaluronic acid			Sig. among groups	Sig. between groups
		1 MDa (Group II)	Mixture 3 (Group III)	Mixture 7 (Group IV)		
Solution (Units/mL)	0.499 ± 0.041	0.502 ± 0.043	0.497 ± 0.053	0.499 ± 0.037	0.583	n.s.
Ratio to Group I (%)		100.7 ± 2.2	99.4 ± 4.9	100.0 ± 2.7		
Surface I (mUnits)	8.12 ± 0.63	7.99 ± 0.72	8.18 ± 0.55	7.59 ± 0.66	0.376	n.s.
Ratio to Group I (%)		99.7 ± 6.4	103.0 ± 10.8	98.3 ± 11.7		
Surface II (mUnits)	7.64 ± 0.62	7.36 ± 0.66	7.36 ± 0.63	6.75 ± 0.77	0.021*	*(I,II) (I,IV)
Ratio to Group I (%)		96.3 ± 2.6	96.5 ± 4.7	88.6 ± 10.0		

n = 8 Type of assay	Human saliva (Group I)	With hyaluronic acid			Sig. among groups	Sig. between groups
		2 MDa (Group II)	Mixture 10 (Group III)	Mixture 13 (Group IV)		
Solution (Units/mL)	0.494 ± 0.035	0.495 ± 0.034	0.499 ± 0.037	0.492 ± 0.040	0.789	n.s.
Ratio to Group I (%)		100.1 ± 2.9	101.0 ± 4.3	99.5 ± 2.7		
Surface I (mUnits)	7.91 ± 0.64	7.90 ± 0.46	8.05 ± 0.58	8.08 ± 0.74	0.583	n.s.
Ratio to Group I (%)		100.1 ± 5.2	101.9 ± 5.6	102.3 ± 7.8		
Surface II (mUnits)	8.06 ± 0.85	7.66 ± 1.16	7.44 ± 1.25	7.42 ± 1.13	0.016*	*(I,II) (I,III) (I,IV)
Ratio to Group I (%)		94.7 ± 6.1	91.9 ± 8.2	91.8 ± 7.4		

1 MDa, 0.5 mg/mL of 1 MDa hyaluronic acid; Mixture 3, mixture of 0.5 mg/mL of 1 MDa and 2.0 mg/mL of 10 kDa hyaluronic acids; Mixture 7, mixture of 0.5 mg/mL of 1 MDa and 0.1 mg/mL of 100 kDa hyaluronic acids; 2 MDa, 0.2 mg/mL of 2 MDa hyaluronic acid; Mixture 10, mixture of 0.2 mg/mL of 2 MDa and 2.0 mg/mL of 10 kDa hyaluronic acids; Mixture 13, mixture of 0.2 mg/mL of 2 MDa and 0.1 mg/mL of 100 kDa hyaluronic acids; Surface assay I, Hyaluronic acid was adsorbed to hydroxyapatite beads first, and saliva was incubated on the hyaluronic acid-adsorbed beads next.

Surface assay II, Hyaluronic acid was pre-incubated with saliva, and the mixture was adsorbed to hydroxyapatite beads.

The statistical significances among the groups and between the groups were tested by the Friedman and Wilcoxon signed rank tests, respectively.

*P < 0.05

- [122] 실시예 4. 상이한 분자량의 히알루론산을 포함하는 혼합물의 전단속도에 따른 점도 변화
- [123] 우선 인체타액의 11.3, 22.5, 45, 90, 225, 및 450 s⁻¹ 전단속도에서 점도를 다음과 같이 측정하였다.
- [124] [표 10]
- [125]

전단속도 s^{-1}	11.3	22.5	45.0	90.0	225.0	450.0
UWS (비자극성 전타액) 점도 (cps) 평균 $\pm$ 표준편차	4.66 $\pm$ 1.81	3.90 $\pm$ 1.59	3.23 $\pm$ 1.10	2.52 $\pm$ 0.71	1.83 $\pm$ 0.39	1.45 $\pm$ 0.27
SWS (자극성 전타액) 점도 (cps) 평균 $\pm$ 표준편차	3.57 $\pm$ 1.86	2.96 $\pm$ 1.48	2.45 $\pm$ 1.08	1.91 $\pm$ 0.68	1.43 $\pm$ 0.35	1.17 $\pm$ 0.23

[126] 점도가 낮은 상태인 자극성 전타액의 점도와 점도가 높은 상태인 비자극성 전타액의 점도 사이가 인체 타액의 적정 점도이므로 아래와 같이 인체타액이 가지는 적정 점도수치 범위를 얻었다.

[127] [표 11]

[128]

	11.3	22.5	45.0	90.0	225.0	450.0
인체 타액	3.57 - 4.66	2.96 - 3.90	2.45 - 3.23	1.91 - 2.52	1.43 - 1.83	1.17 - 1.45

[129] 위와 같이 비자극성 전타액의 점도값과 자극성 전타액의 점도 값을 포괄한 다음, 회귀분석을 위해 전체 결과(모든 전단속도)에 대하여 낮은 수치 결과 6개를 이용하여 회귀분석을 하고, 여기에서 60과 160 s^{-1} 에서 점도를 계산하고, 다시 높은 수치 6개로 회귀분석을 하여, 60과 160 s^{-1} 에서 점도를 계산하여 다음의 점도값을 수득하였다. 이 결과치를 같은 방법으로 회귀분석하여 확보한 HA 혼합물 및 단일분자량 HA와 비교하였다.

[130] [표 12]

[131]

	60.0 s^{-1}	160.0 s^{-1}
인체타액 점도 (cps)	2.18 - 2.82	1.61 - 2.06
M3 (cps)	2.21	1.99
M7 (cps)	2.27	2.05
1 MDa 단일 (cps)	1.61	1.60
M10 (cps)	2.08	1.82
M13 (cps)	2.26	1.93
2 MDa 단일 (cps)	2.20	2.01

[132] 위의 표를 보면 1 MDa 단일 HA에 비해 1 MDa를 포함하고 있는 HA 혼합물인 M3와 M7은 인체타액에 매우 가까운 점도를 보임을 알 수 있다. 2 MDa 단일 HA와 2 MDa를 포함하고 있는 HA 혼합물인 M10와 M13은 모두 인체타액 점도 범위에 있지만 M13의 경우 낮은 전단율에서는 좀 더 높고, 높은 전단율에서는 좀 더 낮은 점도를 보여 좀 더 유리한 점탄성을 보임을 알 수 있다.

[133] 본원에 따른 인공타액은 전단속도 60sec^{-1} 에서는 점도값이 1.3 ~ 3.7 사이, 전단속도 160sec^{-1} 에서는 점도값이 1.12 ~ 2.57 사이로 인체타액에 유사한 것으로 나타났다.

[134] [표 13]

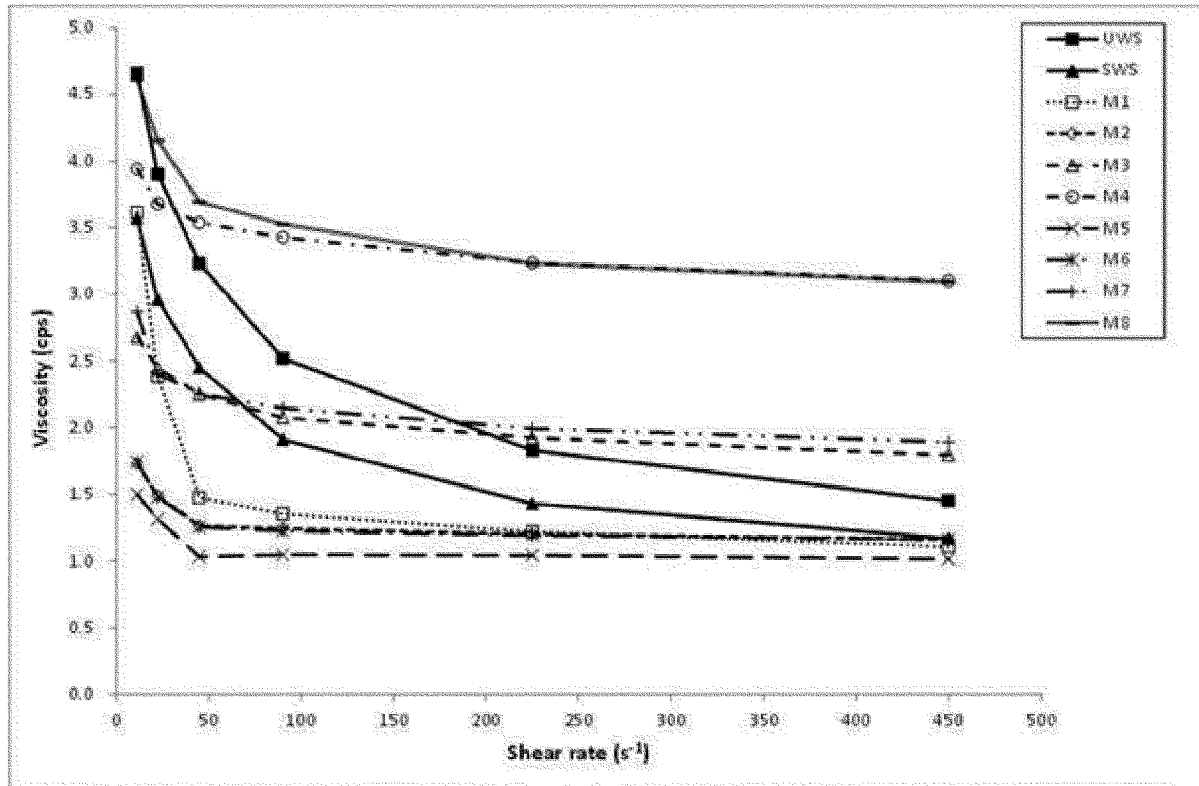
[135]

전 단 속 도 s^{-1}	60.0	160.0
점도 (CPS)	1.30 - 3.70	1.12 - 2.57

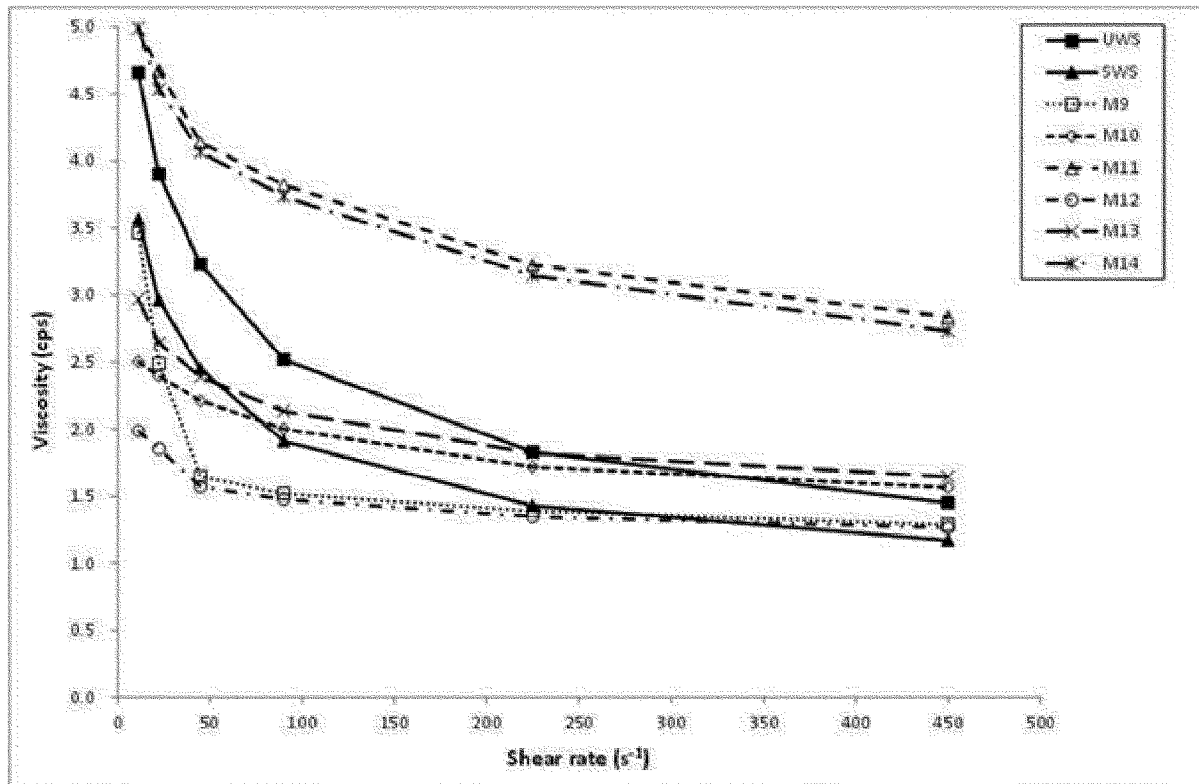
청구범위

- [청구항 1] 1 내지 2 MDa의 고분자량의 히알루론산; 및
10 또는 100 kDa의 저분자량의 히알루론산의 혼합물을 포함하는
인공타액 조성물.
- [청구항 2] 제 1 항에 있어서,
상기 혼합물은 1 MDa의 고분자량의 히알루론산 및 10 kDa 또는 100
kDa의 저분자량의 히알루론산; 또는
상기 혼합물은 2 MDa의 고분자량의 히알루론산 및 10 kDa 또는 100
kDa의 저분자량의 히알루론산;을 포함하는 것인, 인공타액 조성물.
- [청구항 3] 제 2 항에 있어서,
상기 1 MDa의 고분자량의 히알루론산 및 10 kDa의 저분자량의
히알루론산은 1:4의 중량비(mg/ml);
상기 1 MDa의 고분자량의 히알루론산 및 100 kDa의 저분자량의
히알루론산은 5:1의 중량비(mg/ml);
상기 2 MDa의 고분자량의 히알루론산 및 10 kDa의 저분자량의
히알루론산은 1:10의 중량비(mg/ml); 그리고
상기 2 MDa의 고분자량의 히알루론산 및 100 kDa의 저분자량의
히알루론산은 2:1의 중량비(mg/ml)로 포함되는 것인, 인공타액 조성물.
- [청구항 4] 제 1 항 내지 제 3 항 중 어느 한 항에 있어서,
상기 인공타액은 전단속도 $60s^{-1}$ 에서 1.30 내지 3.70, 그리고 $160s^{-1}$ 에서
1.12 내지 2.57의 점탄성도를 갖는 것인, 인공타액 조성물.
- [청구항 5] 제 1 항 내지 제 4 항 중 어느 한 항에 있어서,
라이소자임, 락토퍼옥시다아제, 글루코스옥시다아제, SCN⁻ 또는 I⁻,
당알코올 및 완충제를 더 포함하는 것인, 인공타액 조성물.
- [청구항 6] 제 1 항 내지 제 4 항 중 어느 한 항에 있어서,
상기 인공타액 조성물은 구강건조증, 치아우식증, 치주염, 구강 진균감염,
혀통증, 혀주름, 구강 궤양, 구강점막 통증, 미각 장애, 치아마모 및 교모
증가 또는 구취의 치료 또는 예방용인, 인공타액 조성물.

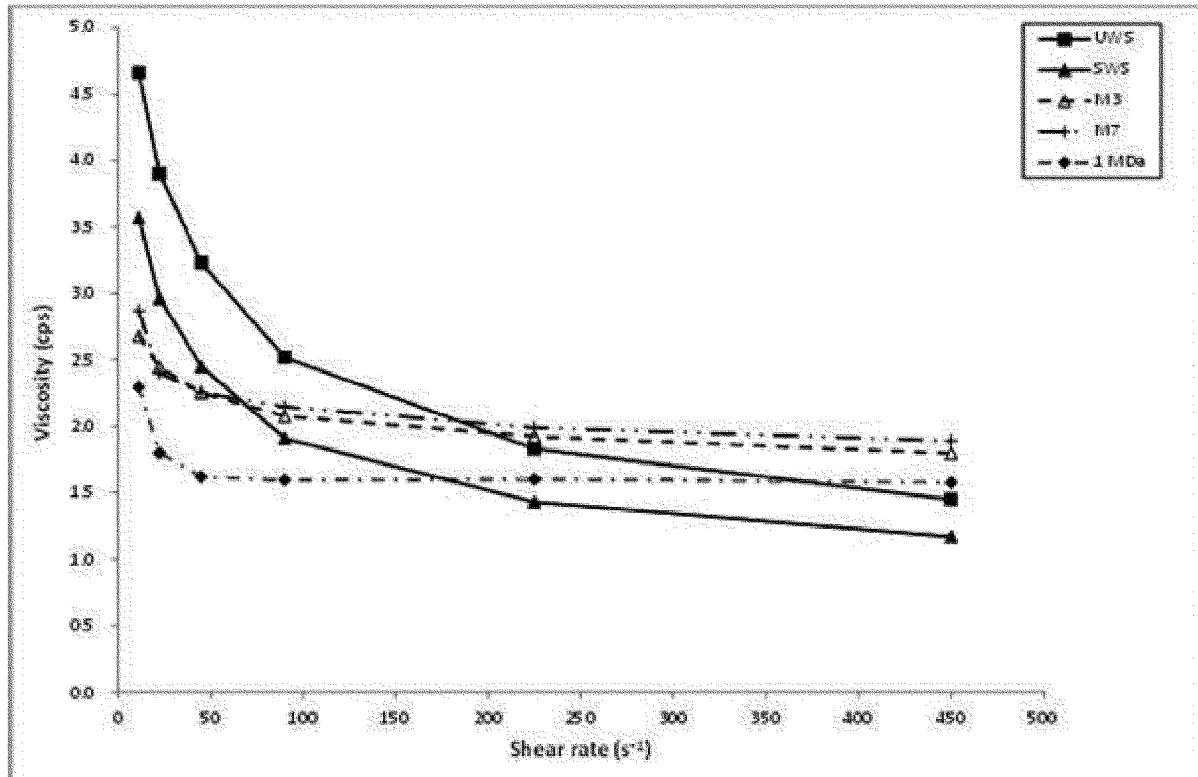
[도1]



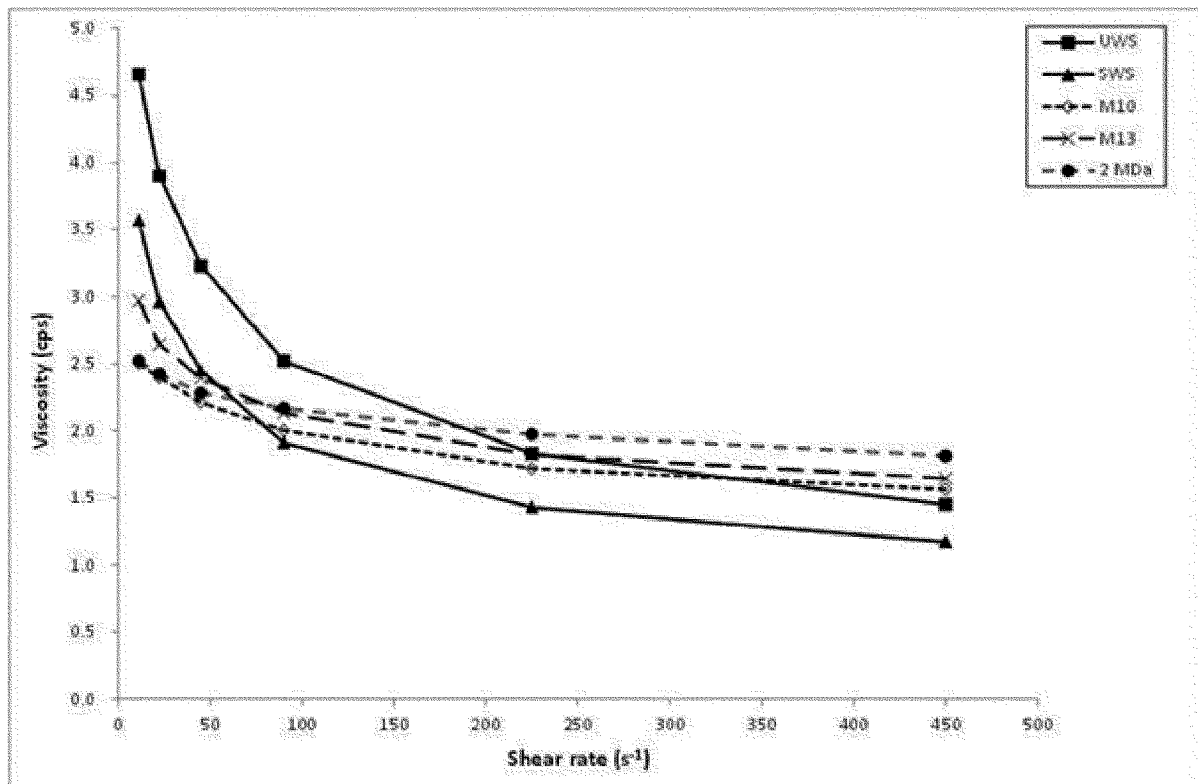
[도2]



[도3]



[도4]



INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/KR2020/003746

A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER

A61K 31/728(2006.01)i, A61K 38/46(2006.01)i, A61K 38/47(2006.01)i, A61K 47/26(2006.01)i, A61P 1/02(2006.01)i

According to International Patent Classification (IPC) or to both national classification and IPC

B. FIELDS SEARCHED

Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols)

A61K 31/728; A61K 38/47; A61K 9/08; A61K 9/12; A61P 19/02; A61P 37/08; A61K 38/46; A61K 47/26; A61P 1/02

Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched

Korean utility models and applications for utility models: IPC as above

Japanese utility models and applications for utility models: IPC as above

Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practicable, search terms used)

eKOMPASS (KIPO internal) & Keywords: artificial salivary, hyaluronic acid, molecular weight

C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
Y	KR 10-2014-0006136 A (SEOUL NATIONAL UNIVERSITY R&DB FOUNDATION) 16 January 2014 See claims 1-13; paragraphs [0034]-[0036]; example 1; table 2.	1-4
Y	KR 10-2013-0099193 A (AIHOL CORPORATION) 05 September 2013 See claims 1-25; paragraphs [0015], [0016], [0029]-[0032].	1-4
A	KR 10-2009-0011021 A (GOBBO, Sandra et al.) 30 January 2009 See the entire document.	1-4
A	KR 10-2012-0079560 A (SEOUL NATIONAL UNIVERSITY R&DB FOUNDATION) 13 July 2012 See the entire document.	1-4
A	JP 2007-291117 A (SEIKAGAKU CORPORATION) 08 November 2007 See the entire document.	1-4



Further documents are listed in the continuation of Box C.



See patent family annex.

* Special categories of cited documents:

“A” document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance

“E” earlier application or patent but published on or after the international filing date

“L” document which may throw doubts on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified)

“O” document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means

“P” document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed

“T” later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention

“X” document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step when the document is taken alone

“Y” document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other such documents, such combination being obvious to a person skilled in the art

“&” document member of the same patent family

Date of the actual completion of the international search

15 JULY 2020 (15.07.2020)

Date of mailing of the international search report

15 JULY 2020 (15.07.2020)

Name and mailing address of the ISA/KR

Korean Intellectual Property Office
Government Complex Daejeon Building 4, 189, Cheongsu-ro, Seo-gu,
Daejeon, 35208, Republic of Korea

Facsimile No. +82-42-481-8578

Authorized officer

Telephone No.

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/KR2020/003746

Box No. II Observations where certain claims were found unsearchable (Continuation of item 2 of first sheet)

This international search report has not been established in respect of certain claims under Article 17(2)(a) for the following reasons:

1. ☐ Claims Nos.:
because they relate to subject matter not required to be searched by this Authority, namely:

2. ☐ Claims Nos.:
because they relate to parts of the international application that do not comply with the prescribed requirements to such an extent that no meaningful international search can be carried out, specifically:

3. ☒ Claims Nos.: 5, 6
because they are dependent claims and are not drafted in accordance with the second and third sentences of Rule 6.4(a).

Box No. III Observations where unity of invention is lacking (Continuation of item 3 of first sheet)

This International Searching Authority found multiple inventions in this international application, as follows:

1. ☐ As all required additional search fees were timely paid by the applicant, this international search report covers all searchable claims.
2. ☐ As all searchable claims could be searched without effort justifying additional fees, this Authority did not invite payment of additional fees.
3. ☐ As only some of the required additional search fees were timely paid by the applicant, this international search report covers only those claims for which fees were paid, specifically claims Nos.:

4. ☐ No required additional search fees were timely paid by the applicant. Consequently, this international search report is restricted to the invention first mentioned in the claims; it is covered by claims Nos.:

Remark on Protest

- ☐ The additional search fees were accompanied by the applicant's protest and, where applicable, the payment of a protest fee.
- ☐ The additional search fees were accompanied by the applicant's protest but the applicable protest fee was not paid within the time limit specified in the invitation.
- ☐ No protest accompanied the payment of additional search fees.

INTERNATIONAL SEARCH REPORT
Information on patent family members

International application No.

PCT/KR2020/003746

Patent document cited in search report	Publication date	Patent family member	Publication date
KR 10-2014-0006136 A	16/01/2014	KR 10-1498510 B1 WO 2014-003307 A1	04/03/2015 03/01/2014
KR 10-2013-0099193 A	05/09/2013	CN 103702671 A CN 200482190 Y EP 2545925 A1 EP 2545925 B1 JP 2014-523435 A US 2014-0010847 A1 US 2016-0361347 A1 WO 2013-009519 A2 WO 2013-009519 A3	02/04/2014 13/03/2002 16/01/2013 14/02/2018 11/09/2014 09/01/2014 15/12/2016 17/01/2013 07/03/2013
KR 10-2009-0011021 A	30/01/2009	CN 101437527 A EP 2026821 A1 EP 2026821 B1 JP 2009-536625 A US 2009-0163441 A1 WO 2007-131546 A1	20/05/2009 25/02/2009 26/08/2009 15/10/2009 25/06/2009 22/11/2007
KR 10-2012-0079560 A	13/07/2012	CN 103491967 A CN 105056219 A EP 2661272 A1 EP 2661272 B1 JP 2014-505051 A JP 5822949 B2 KR 10-1304766 B1 US 2012-0321605 A1 US 8506937 B2 WO 2012-093753 A1	01/01/2014 18/11/2015 13/11/2013 31/08/2016 27/02/2014 25/11/2015 05/09/2013 20/12/2012 13/08/2013 12/07/2012
JP 2007-291117 A	08/11/2007	JP 2002-056344 A1 JP 2007-269805 A JP 2007-269806 A JP 4804420 B2 JP 4909809 B2	02/07/2002 18/10/2007 18/10/2007 02/11/2011 04/04/2012

A. 발명이 속하는 기술분류(국제특허분류(IPC)) A61K 31/728(2006.01)i, A61K 38/46(2006.01)i, A61K 38/47(2006.01)i, A61K 47/26(2006.01)i, A61P 1/02(2006.01)i																				
B. 조사된 분야 조사된 최소문헌(국제특허분류를 기재) A61K 31/728; A61K 38/47; A61K 9/08; A61K 9/12; A61P 19/02; A61P 37/08; A61K 38/46; A61K 47/26; A61P 1/02 조사된 기술분야에 속하는 최소문헌 이외의 문헌 한국등록실용신안공보 및 한국공개실용신안공보: 조사된 최소문헌란에 기재된 IPC 일본등록실용신안공보 및 일본공개실용신안공보: 조사된 최소문헌란에 기재된 IPC 국제조사에 이용된 전산 데이터베이스(데이터베이스의 명칭 및 검색어(해당하는 경우)) eKOMPASS(특허청 내부 검색시스템) & 키워드: 인공타액(artificial salivary), 히알루론산(hyaluronic acid), 분자량(molecular weight)																				
C. 관련 문헌 <table border="1"> <thead> <tr> <th>카테고리*</th> <th>인용문헌명 및 관련 구절(해당하는 경우)의 기재</th> <th>관련 청구항</th> </tr> </thead> <tbody> <tr> <td>Y</td> <td>KR 10-2014-0006136 A (서울대학교산학협력단) 2014.01.16 청구항 1-13; 단락 [0034]-[0036]; 실시예 1; 표 2</td> <td>1-4</td> </tr> <tr> <td>Y</td> <td>KR 10-2013-0099193 A (아이홀 코포레이션) 2013.09.05 청구항 1-25; 단락 [0015], [0016], [0029]-[0032]</td> <td>1-4</td> </tr> <tr> <td>A</td> <td>KR 10-2009-0011021 A (고보 산드라 등) 2009.01.30 전문</td> <td>1-4</td> </tr> <tr> <td>A</td> <td>KR 10-2012-0079560 A (서울대학교산학협력단) 2012.07.13 전문</td> <td>1-4</td> </tr> <tr> <td>A</td> <td>JP 2007-291117 A (SEIKAGAKU CORPORATION) 2007.11.08 전문</td> <td>1-4</td> </tr> </tbody> </table>			카테고리*	인용문헌명 및 관련 구절(해당하는 경우)의 기재	관련 청구항	Y	KR 10-2014-0006136 A (서울대학교산학협력단) 2014.01.16 청구항 1-13; 단락 [0034]-[0036]; 실시예 1; 표 2	1-4	Y	KR 10-2013-0099193 A (아이홀 코포레이션) 2013.09.05 청구항 1-25; 단락 [0015], [0016], [0029]-[0032]	1-4	A	KR 10-2009-0011021 A (고보 산드라 등) 2009.01.30 전문	1-4	A	KR 10-2012-0079560 A (서울대학교산학협력단) 2012.07.13 전문	1-4	A	JP 2007-291117 A (SEIKAGAKU CORPORATION) 2007.11.08 전문	1-4
카테고리*	인용문헌명 및 관련 구절(해당하는 경우)의 기재	관련 청구항																		
Y	KR 10-2014-0006136 A (서울대학교산학협력단) 2014.01.16 청구항 1-13; 단락 [0034]-[0036]; 실시예 1; 표 2	1-4																		
Y	KR 10-2013-0099193 A (아이홀 코포레이션) 2013.09.05 청구항 1-25; 단락 [0015], [0016], [0029]-[0032]	1-4																		
A	KR 10-2009-0011021 A (고보 산드라 등) 2009.01.30 전문	1-4																		
A	KR 10-2012-0079560 A (서울대학교산학협력단) 2012.07.13 전문	1-4																		
A	JP 2007-291117 A (SEIKAGAKU CORPORATION) 2007.11.08 전문	1-4																		
☐ 추가 문헌이 C(계속)에 기재되어 있습니다. ☒ 대응특허에 관한 별지를 참조하십시오.																				
* 인용된 문헌의 특별 카테고리: “A” 특별히 관련이 없는 것으로 보이는 일반적인 기술수준을 정의한 문헌 “D” 본 국제출원에서 출원인이 인용한 문헌 “E” 국제출원일보다 빠른 출원일 또는 우선일을 가지나 국제출원일 이후 “X” 특별한 관련이 있는 문헌. 해당 문헌 하나만으로 청구된 발명의 신규성 또는 진보성이 없는 것으로 본다. “L” 우선권 주장에 의문을 제기하는 문헌 또는 다른 인용문헌의 공개일 또는 다른 특별한 이유(이유를 명시)를 밝히기 위하여 인용된 문헌 “Y” 특별한 관련이 있는 문헌. 해당 문헌이 하나 이상의 다른 문헌과 조합하는 경우로 그 조합이 당업자에게 자명한 경우 청구된 발명은 진보성이 없는 것으로 본다. “O” 구두 개시, 사용, 전시 또는 기타 수단을 언급하고 있는 문헌 “P” 우선일 이후에 공개되었으나 국제출원일 이전에 공개된 문헌 “&” 동일한 대응특허문헌에 속하는 문헌																				
국제조사의 실제 완료일 2020년 07월 15일 (15.07.2020)		국제조사보고서 발송일 2020년 07월 15일 (15.07.2020)																		
ISA/KR의 명칭 및 우편주소  대한민국 특허청 (35208) 대전광역시 서구 청사로 189, 4동 (둔산동, 정부대전청사) 팩스 번호 +82-42-481-8578		심사관 허주형 전화번호 +82-42-481-8150 																		

제2기재란 일부 청구항을 조사할 수 없는 경우의 의견(첫 번째 용지의 2의 계속)

PCT 제17조(2)(a)의 규정에 따라 다음과 같은 이유로 일부 청구항에 대하여 본 국제조사보고서가 작성되지 아니하였습니다.

1. ☐ 청구항:
이 청구항은 본 기관이 조사할 필요가 없는 대상에 관련됩니다. 즉,
2. ☐ 청구항:
이 청구항은 유효한 국제조사를 수행할 수 없을 정도로 소정의 요건을 충족하지 아니하는 국제출원의 부분과 관련됩니다. 구체적으로는,
3. ☒ 청구항: 5, 6
이 청구항은 종속청구항이나 PCT규칙 6.4(a)의 두 번째 및 세 번째 문장의 규정에 따라 작성되어 있지 않습니다.

제3기재란 발명의 단일성이 결여된 경우의 의견(첫 번째 용지의 3의 계속)

본 국제조사기관은 본 국제출원에 다음과 같이 다수의 발명이 있다고 봅니다.

1. ☐ 출원인이 모든 추가수수료를 기간 내에 납부하였으므로, 본 국제조사보고서는 모든 조사 가능한 청구항을 대상으로 합니다.
2. ☐ 추가수수료 납부를 요구하지 않고도 모든 조사 가능한 청구항을 조사할 수 있었으므로, 본 기관은 추가수수료 납부를 요구하지 아니하였습니다.
3. ☐ 출원인이 추가수수료의 일부만을 기간 내에 납부하였으므로, 본 국제조사보고서는 수수료가 납부된 청구항만을 대상으로 합니다. 구체적인 청구항은 아래와 같습니다.
4. ☐ 출원인이 기간 내에 추가수수료를 납부하지 아니하였습니다. 따라서 본 국제조사보고서는 청구범위에 처음 기재된 발명에 한정되어 있으며, 해당 청구항은 아래와 같습니다.

이의신청에
관한 기재

- ☐ 출원인의 이의신청 및 이의신청료 납부(해당하는 경우)와 함께 추가수수료가 납부되었습니다.
- ☐ 출원인의 이의신청과 함께 추가수수료가 납부되었으나 이의신청료가 보정요구서에 명시된 기간 내에 납부되지 아니하였습니다.
- ☐ 이의신청 없이 추가수수료가 납부되었습니다.

국제조사보고서에서 인용된 특허문헌	공개일	대응특허문헌	공개일
KR 10-2014-0006136 A	2014/01/16	KR 10-1498510 B1 WO 2014-003307 A1	2015/03/04 2014/01/03
KR 10-2013-0099193 A	2013/09/05	CN 103702671 A CN 200482190 Y EP 2545925 A1 EP 2545925 B1 JP 2014-523435 A US 2014-0010847 A1 US 2016-0361347 A1 WO 2013-009519 A2 WO 2013-009519 A3	2014/04/02 2002/03/13 2013/01/16 2018/02/14 2014/09/11 2014/01/09 2016/12/15 2013/01/17 2013/03/07
KR 10-2009-0011021 A	2009/01/30	CN 101437527 A EP 2026821 A1 EP 2026821 B1 JP 2009-536625 A US 2009-0163441 A1 WO 2007-131546 A1	2009/05/20 2009/02/25 2009/08/26 2009/10/15 2009/06/25 2007/11/22
KR 10-2012-0079560 A	2012/07/13	CN 103491967 A CN 105056219 A EP 2661272 A1 EP 2661272 B1 JP 2014-505051 A JP 5822949 B2 KR 10-1304766 B1 US 2012-0321605 A1 US 8506937 B2 WO 2012-093753 A1	2014/01/01 2015/11/18 2013/11/13 2016/08/31 2014/02/27 2015/11/25 2013/09/05 2012/12/20 2013/08/13 2012/07/12
JP 2007-291117 A	2007/11/08	JP 2002-056344 A1 JP 2007-269805 A JP 2007-269806 A JP 4804420 B2 JP 4909809 B2	2002/07/02 2007/10/18 2007/10/18 2011/11/02 2012/04/04