



(19) 대한민국특허청(KR)
(12) 등록특허공보(B1)

(45) 공고일자 2024년08월16일
(11) 등록번호 10-2696078
(24) 등록일자 2024년08월13일

- (51) 국제특허분류(Int. Cl.)
A61K 33/42 (2006.01) A61K 33/16 (2006.01)
A61K 6/00 (2020.01) A61K 6/838 (2020.01)
A61K 8/21 (2006.01) A61K 8/24 (2006.01)
A61P 1/02 (2006.01) A61P 31/04 (2006.01)
A61Q 11/00 (2006.01)
- (52) CPC특허분류
A61K 33/42 (2013.01)
A61K 33/16 (2013.01)
- (21) 출원번호 10-2019-7030173
- (22) 출원일자(국제) 2018년03월14일
심사청구일자 2021년02월19일
- (85) 번역문제출일자 2019년10월14일
- (65) 공개번호 10-2019-0126141
- (43) 공개일자 2019년11월08일
- (86) 국제출원번호 PCT/AU2018/050231
- (87) 국제공개번호 WO 2018/165708
국제공개일자 2018년09월20일
- (30) 우선권주장
2017900893 2017년03월14일 오스트레일리아(AU)
- (56) 선행기술조사문헌
British Dental Journal, Vol. 221, pp.
657-666(2016) 1부.*
Clin. Oral Invest., Vol. 18, pp.
589-598(2014) 1부.*
*는 심사관에 의하여 인용된 문헌

- (73) 특허권자
더 유니버시티 오브 멜버른
오스트레일리아, 빅토리아 3010, 파크빌, 그라탄 스트리트, 더 유니버시티 오브 멜버른
- (72) 발명자
레이놀즈, 에릭 찰스
오스트레일리아, 3010 빅토리아, 더 유니버시티 오브 멜버른, 리서치, 이노베이션 앤드 커머셜라이제이션, 인텔렉츠크얼 프로퍼티 앤드 라이선스, 더 유니버시티 오브 멜버른 씨/-
- (74) 대리인
이원희

전체 청구항 수 : 총 13 항

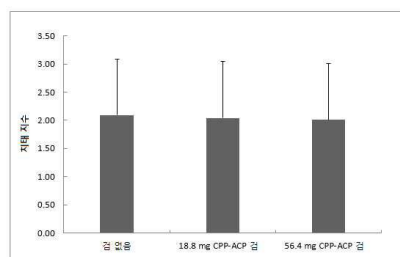
심사관 : 김범수

(54) 발명의 명칭 치은염을 위한 치료

(57) 요약

본 발명은 조성물 및 구강 케어를 위한 이의 용도에 관한 것이다. 특히, 조성물 및 방법은 구강 건강을 유지하고/유지하거나 치은염과 같은 다양한 구강 질환을 치료하기 위한 것이다. 본 발명은 개체의 구강 부위에서 병원성 구강 세균을 감소시키고; 개체의 구강 부위에서 공생 구강 세균을 증가시키고; 개체의 구강 부위에서 병원성 구강 세균의 비율을 감소시키고; 구강 세균 불균형을 억제하고; 치은 염증을 감소시킬 필요가 있는 개체에서 치은 염증을 감소시키고; 치은염 치료를 필요로 하는 개체에서 치은염을 치료하고; 만성 치은염 치료를 필요로 하는 개체에서 만성 치은염을 치료하는 방법 및 이를 위한 의약의 제조에서의 안정화된 무정형 칼슘 포스페이트(ACP) 및/또는 안정화된 무정형 칼슘 플루오라이드 포스페이트(ACFP)의 용도에 관한 것이다.

대표도



(52) CPC특허분류

- A61K 6/20* (2020.01)
 - A61K 6/838* (2020.01)
 - A61K 8/21* (2013.01)
 - A61K 8/24* (2013.01)
 - A61P 1/02* (2018.01)
 - A61P 31/04* (2018.01)
 - A61Q 11/00* (2013.01)
-

명세서

청구범위

청구항 1

삭제

청구항 2

삭제

청구항 3

삭제

청구항 4

삭제

청구항 5

삭제

청구항 6

삭제

청구항 7

삭제

청구항 8

삭제

청구항 9

삭제

청구항 10

카세인 포스포펩티드 안정화 무정형 칼슘 포스페이트(CPP-ACP) 또는 카세인 포스포펩티드 안정화 무정형 칼슘 플루오라이드 포스페이트(CPP-ACFP)를 포함하는, 구강 내 치은 염증 감소용 약학적 조성물.

청구항 11

삭제

청구항 12

제10항에 있어서,

상기 치은 염증은 경미한 수준, 중등도 수준, 또는 심각한 수준인 것인, 구강 내 치은 염증 감소용 조성물.

청구항 13

삭제

청구항 14

삭제

청구항 15

제10항에 있어서,

상기 치은 염증은 변형 치은 지수 점수(Modified Gingival Index score) 1내지 4로 나타나는 것인, 구강 내 치은 염증 감소용 조성물.

청구항 16

삭제

청구항 17

삭제

청구항 18

삭제

청구항 19

삭제

청구항 20

카세인 포스포펩티드 안정화 무정형 칼슘 포스페이트(CPP-ACP) 또는 카세인 포스포펩티드 안정화 무정형 칼슘 플루오라이드 포스페이트(CPP-ACFP)를 포함하는, 치은염 치료용 약학적 조성물.

청구항 21

카세인 포스포펩타이드 안정화 무정형 칼슘 포스페이트(CPP-ACP) 또는 카세인 포스포펩타이드 안정화 무정형 칼슘 플루오라이드 포스페이트(CPP-ACFP)를 포함하는, 만성 치은염 치료용 약학적 조성물.

청구항 22

삭제

청구항 23

카세인 포스포펩티드 안정화 무정형 칼슘 포스페이트(CPP-ACP) 또는 카세인 포스포펩티드 안정화 무정형 칼슘 플루오라이드 포스페이트(CPP-ACFP)를 포함하는, 치주염 치료용 약학적 조성물.

청구항 24

삭제

청구항 25

삭제

청구항 26

삭제

청구항 27

삭제

청구항 28

삭제

청구항 29

삭제

청구항 30

삭제

청구항 31

삭제

청구항 32

삭제

청구항 33

삭제

청구항 34

제10항, 제 20항, 제21항, 및 제23항 중 어느 한 항에 있어서,

상기 CPP-ACP 또는 CPP-ACFP는 5분 내지 60분 동안 투여되도록 제형화되는 것을 특징으로 하는, 약학적 조성물.

청구항 35

제10항, 제20항, 제21항 및 제23항 중 어느 한 항에 있어서,

상기 CPP-ACP 또는 CPP-ACFP는 1일 4회 내지 6회 투여되도록 제형화되는 것을 특징으로 하는, 조성물.

청구항 36

제10항, 제20항, 제21항 및 제23항 중 어느 한 항에 있어서,

상기 CPP-ACP 또는 CPP-ACFP는 1 내지 2주 동안의 투여를 위해 제형화되는 것을 특징으로 하는, 조성물.

청구항 37

제10항, 제20항, 제21항 및 제23항 중 어느 한 항에 있어서,

상기 CPP-ACP 또는 CPP-ACFP는 크림형 치약, 치분 및 액상 치약, 구강 세정제, 구강 청정제, 구강 스프레이, 바니시(vernish), 치과용 시멘트, 트로키, 씹임 검(chewing gum), 치과용 페이스트, 치은 마사지용 크림, 가글용 정제, 및 유제품 중 어느 하나로 제형화되는 것을 특징으로 하는, 조성물.

청구항 38

제37항에 있어서,

상기 CPP-ACP 또는 CPP-ACFP는 슈잉 겜으로 제형화되는 것을 특징으로 하는, 조성물.

청구항 39

제38항에 있어서,

상기 슈잉 겜은 15 mg 내지 60 mg의 CPP-ACP 또는 CPP-ACFP를 함유하는 것을 특징으로 하는, 조성물.

청구항 40

제38항에 있어서,

상기 슈잉 겜은 18.8 또는 56.4 mg의 CPP-ACP 또는 CPP-ACFP를 함유하는 것을 특징으로 하는, 조성물.

청구항 41

삭제

청구항 42

삭제

발명의 설명

기술 분야

[0001] 관련 출원에 대한 상호 참조

[0002] 본 출원은 오스트레일리아 가출원 제2017900893호로부터 우선권을 주장하며, 이 출원의 전체 내용은 그 전체가 참고로 포함된다.

[0003] 본 발명은 조성물 및 구강 케어를 위한 이의 용도에 관한 것이다. 특히, 조성물 및 방법은 구강 건강을 유지하고/유지하거나 치은염과 같은 다양한 구강 질환을 치료하기 위한 것이다.

배경 기술

[0004] 구강 미생물은 대부분 조화로운 공생 관계에서 수백만 년 동안 그의 숙주와 함께 공진화하고 공존해왔다. 숙주와 구강 마이크로바이옴(microbiome)은 별개의 엔티티들(entities)이 아니라 함께 "슈퍼유기체" 또는 홀로비온트(holobiont)를 형성하며, 구강 마이크로바이옴은 구강의 유지 및 건강에서 중요한 역할을 한다. 입은 치아의 딱딱한 표면과 구강 점막의 연질 조직에 콜로니를 형성하는 700종이 넘는 상주 세균이 있는 체내에서 두 번째로 가장 다양한 미생물 군집을 위한 환경을 제공한다. DNA 시퀀싱 기술의 최근 진보를 통해 구강 마이크로바이옴의 복잡성이 밝혀졌으며, 이는 건강과 질병 모두에서 상이한 구강내 복수미생물 바이오필름(polymicrobial biofilm)의 역할에 대해 새로운 통찰력을 제공하였다.

[0005] 건강과 관련된 많은 세균 종은 공생 유기체로서만 생각되었지만, 이 더 큰 통찰력을 통해 많은 세균이 실제로 그의 숙주에게 유익하다는 것이 이제 분명하다. 이러한 공생/유익 종은 건강을 개선하는 필수 인자를 제공하고/제공하거나 병원성 종이 콜로니를 형성하여 질병을 유발하는 것을 방지한다는 점에서 그의 숙주와 진정한 공생 관계에 있기 때문에 현재 공생균(symbiont)으로 지칭된다. 그러나, 현대 생활 방식(예를 들어, 식이 당, 흡연, 불량한 구강 위생 등) 또는 기타 요인(예를 들어, 유전적 소인)을 통한 구강 마이크로바이옴의 교란은 일반 및 구강 건강에 해로운 결과를 가져올 수 있다. 이어서 구강 생태계의 미세-조율된 평형(항상성 또는 공생)이 붕괴될 수 있으며, 이는 질병-촉진 세균(유해균(pathobiont))이 유익/공생 공생균을 능가하게 하여 세균 불균형(dysbiosis)을 나타내며 치주 질환(치은염 및 치주염)과 같은 질병을 유발할 수 있다. 그러므로, 구강 건강을 효과적으로 유지하거나 회복시키기 위해서는 균형잡힌 구강 마이크로바이옴을 촉진하는 것이 필수적이다. 균형잡힌 구강 마이크로바이옴 및 항상성을 가져오기 위한 유익/공생 공생균의 촉진 과정은 프리바이오티스(prebiosis)로 지칭된다. 이에 따라, 공생 세균의 비율을 증가시켜 균형잡힌 구강 마이크로바이옴 및 항상성을 촉진하는 물질은 프리바이오티스(prebiotics)로 지칭된다.

[0006] 카제인 포스포펩티드-무정형 칼슘 포스페이트(CPP-ACP)는 법랑질과 상아질에서 치아 우식의 초기 병기를 재광화시키기 위해 생체이용가능한 칼슘 및 포스페이트 이온을 제공하는 타액 생체모방체이다. 카제인 포스포펩티드 및 무정형 칼슘 포스페이트의 특정 복합체("CPP-ACP", 리칼덴트(Recaldent)TM로서 구매가능함)는 시험관 내에서 그리고 원위치에서 법랑질 표면하 병소를 재광화시키는 것으로 밝혀졌다.

[0007] 더 유니버시티 오브 멜버른(The University of Melbourne)의 명의의 국제 공개 제98/40408호(이의 내용은 완전히 참고로 포함됨)에는 카제인 포스포펩티드-무정형 칼슘 포스페이트 복합체(CPP-ACP) 및 CPP-안정화된 무정형 칼슘 플루오라이드 포스페이트 복합체(CPP-ACFP)(이는 알칼리 pH에서 생성됨)가 기술되어 있다. 그러한 복합체는 동물 및 인간의 원위치 우식 모델에서 법랑질 표면하 병소의 재광화를 촉진하는 것으로 밝혀졌다. 게다가, 이러한 조성물에서의 개선이 국제 공개 제2006/066013호 및 국제 공개 제2007/090242호에 개시되어 있고 특정 용도 면에서 개시되어 있다(이들의 내용은 본원에 완전히 참고로 포함됨).

[0008] 치은의 질병에 대한 새롭거나 개선된 치료법이 필요하다. 또한, 치은 건강을 유지하거나 회복시키기 위한 새롭거나 개선된 요법이 필요하다.

[0009] 본 명세서에서 임의의 종래 기술의 언급은 이러한 종래 기술이 임의의 관할권에서 보통의 일반적인 지식의 일부를 형성한다는, 또는 이러한 종래 기술이 당업자에 의해 이해되고/이해되거나, 관련 있는 것으로서 간주되고/간주되거나 다른 선행 기술과 조합될 것으로 합리적으로 예상될 수 있다는 것을 인정하거나 이를 제안하는 것이 아니다.

발명의 내용

[0010] 일 측면에서, 본 발명은 개체의 구강 부위에서 병원성 구강 세균을 감소시키는 방법을 제공하며, 이 방법은 안정화된 무정형 칼슘 포스페이트(ACP) 및/또는 안정화된 무정형 칼슘 플루오라이드 포스페이트(ACFP)를 개체의 구강에 투여함으로써 구강 부위에서 병원성 세균을 감소시키는 단계를 포함한다.

[0011] 또 다른 측면에서, 본 발명은 개체의 구강 부위에서 공생 구강 세균을 증가시키는 방법을 또한 제공하며, 이 방법은 안정화된 무정형 칼슘 포스페이트(ACP) 및/또는 안정화된 무정형 칼슘 플루오라이드 포스페이트(ACFP)를 개체의 구강에 투여함으로써 구강 부위에서 공생 구강 세균을 증가시키는 단계를 포함한다.

[0012] 또 다른 측면에서, 본 발명은 개체의 구강 부위에서 병원성 구강 세균의 비율을 감소시키는 방법을 또한 제공하며, 이 방법은 안정화된 무정형 칼슘 포스페이트(ACP) 및/또는 안정화된 무정형 칼슘 플루오라이드 포스페이트(ACFP)를 개체의 구강에 투여함으로써 구강 부위에서 병원성 구강 세균의 비율을 감소시키는 단계를 포함한다.

[0013] 본원에 기재된 본 발명의 임의의 측면에서, 병원성 구강 세균은 치은 염증, 치은염, 만성 치은염, 치주염 또는 치주 질환과 관련된 임의의 하나 이상일 수 있다. 전형적으로, 병원성 구강 세균은 산발생성 및/또는 내산성 및/또는 염증발생성이다. 바람직하게는, 세균은 염증발생성이다. 지질다당류(LPS)를 생성하고 LPS로서 조직 내로 LPS를 방출하는 세균은 매우 염증발생성이다.

[0014] 바람직하게는, 세균은 스트렙토코커스 뮤탄스(*Streptococcus mutans*), 액티노마이세스 나에슬룬디(*Actinomyces naeslundii*), 베일로넬라 파르블라(*Veillonella parvula*), 락토바실러스 카제이(*Lactobacillus casei*), 포르피로모나스 강기발리스(*Porphyromonas gingivalis*), 타너렐라 포르시티아(*Tannerella forsythia*), 트레포네마 덴티콜라(*Treponema denticola*), 렙토티리치아 와데이(*Leptotrichia wadei*), 렙토티리치아 샤히이(*Leptothrichia shahii*), 렙토티리치아 부칼리스(*Leptotrichia buccalis*) 및 라우트로피아 미라빌리스(*Lautropia mirabilis*)로부터 선택된 임의의 하나 이상이다.

[0015] 본원에 기재된 본 발명의 임의의 측면에서, 공생 구강 세균은 아르기닌 탈아민효소 및/또는 니트레이트 환원효소를 발현하는 임의의 하나 이상의 종일 수 있다. 전형적으로, 세균은 코리네박테리움 듀룸(*Corynebacterium durum*), 로티아 덴토카리오사(*Rothia dentocariosa*), 스트렙토코커스 미티스(*Streptococcus mitis*), 스트렙토코커스 상귀니스(*Streptococcus sanguinis*) 및 푸소박테리움 뉴클레아툼(*Fusobacterium nucleatum*) 중 임의의 하나 이상이다.

[0016] 일 측면에서, 본 발명은 구강 세균 불균형을 억제하는 방법을 제공하며, 이 방법은 안정화된 무정형 칼슘 포스페이트(ACP) 및/또는 안정화된 무정형 칼슘 플루오라이드 포스페이트(ACFP)를 개체의 구강에 투여함으로써 구강 세균 불균형을 억제하는 단계를 포함한다.

[0017] 또 다른 측면에서, 본 발명은 치은 염증 감소를 필요로 하는 개체에서 치은 염증을 감소시키는 방법을

제공하며, 이 방법은 안정화된 무정형 칼슘 포스페이트(ACP) 및/또는 안정화된 무정형 칼슘 플루오라이드 포스페이트(ACFP)를 개체의 구강에 투여함으로써 치은 염증을 감소시키는 단계를 포함한다. 바람직하게는, 방법은 치은 염증을 갖는 개체를 확인하는 초기 단계를 추가로 포함한다.

- [0018] 또 다른 측면에서, 본 발명은 치은염 치료를 필요로 하는 개체에서 치은염을 치료하는 방법을 제공하며, 이 방법은 안정화된 무정형 칼슘 포스페이트(ACP) 및/또는 안정화된 무정형 칼슘 플루오라이드 포스페이트(ACFP)를 개체의 구강에 투여함으로써 치은염을 치료하는 단계를 포함한다. 바람직하게는, 방법은 치은염을 갖는 개체를 확인하는 초기 단계를 추가로 포함한다.
- [0019] 또 다른 측면에서, 본 발명은 만성 치은염 치료를 필요로 하는 개체에서 만성 치은염을 치료하는 방법을 제공하며, 이 방법은 안정화된 무정형 칼슘 포스페이트(ACP) 및/또는 안정화된 무정형 칼슘 플루오라이드 포스페이트(ACFP)를 개체의 구강에 투여함으로써 만성 치은염을 치료하는 단계를 포함한다. 바람직하게는, 방법은 만성 치은염을 갖는 개체를 확인하는 초기 단계를 추가로 포함한다.
- [0020] 또 다른 측면에서, 본 발명은 치주염 치료를 필요로 하는 개체에서 치주염을 치료하는 방법을 제공하며, 이 방법은 안정화된 무정형 칼슘 포스페이트(ACP) 및/또는 안정화된 무정형 칼슘 플루오라이드 포스페이트(ACFP)를 개체의 구강에 투여함으로써 치주염을 치료하는 단계를 포함한다. 바람직하게는, 방법은 치주염을 갖는 개체를 확인하는 초기 단계를 추가로 포함한다.
- [0021] 본 발명의 임의의 측면에서, 방법은 안정화된 무정형 칼슘 포스페이트(ACP) 및/또는 안정화된 무정형 칼슘 플루오라이드 포스페이트(ACFP)를 개체의 구강에 투여하기 전에 치과 시술을 수행하는 단계를 추가로 포함한다. 치과 시술의 예는 죽은조직제거술(debridement), 스케일링, 치근활택술(root planning) 또는 치은연하 또는 치은연상 세균을 제거하기 위한 임의의 기타 시술을 포함한다.
- [0022] 또 다른 측면에서, 본 발명은 하기 의약의 제조에서의 안정화된 무정형 칼슘 포스페이트(ACP) 및/또는 안정화된 무정형 칼슘 플루오라이드 포스페이트(ACFP)의 용도를 제공한다:
- [0023] - 개체의 구강 부위에서 병원성 구강 세균을 감소시키기 위한 의약;
- [0024] - 개체의 구강 부위에서 공생 구강 세균을 증가시키기 위한 의약;
- [0025] - 개체의 구강 부위에서 병원성 구강 세균의 비율을 감소시키기 위한 의약
- [0026] - 구강 세균 불균형을 억제하기 위한 의약;
- [0027] - 치은 염증 감소를 필요로 하는 개체에서 치은 염증을 감소시키기 위한 의약;
- [0028] - 치은염 치료를 필요로 하는 개체에서 치은염을 치료하기 위한 의약; 또는
- [0029] - 만성 치은염 치료를 필요로 하는 개체에서 만성 치은염을 치료하기 위한 의약.
- [0030] 또 다른 측면에서, 본 발명은 하기에 사용하기 위한 안정화된 무정형 칼슘 포스페이트(ACP) 및/또는 안정화된 무정형 칼슘 플루오라이드 포스페이트(ACFP)를 제공한다:
- [0031] - 개체의 구강 부위에서 병원성 구강 세균을 감소시키는 것;
- [0032] - 개체의 구강 부위에서 공생 구강 세균을 증가시키는 것;
- [0033] - 개체의 구강 부위에서 병원성 구강 세균의 비율을 감소시키는 것
- [0034] - 구강 세균 불균형을 억제하는 것;
- [0035] - 치은 염증 감소를 필요로 하는 개체에서 치은 염증을 감소시키는 것;
- [0036] - 치은염 치료를 필요로 하는 개체에서 치은염을 치료하는 것; 또는
- [0037] - 만성 치은염 치료를 필요로 하는 개체에서 만성 치은염을 치료하는 것.
- [0038] 또 다른 측면에서, 본 발명은 개체에서 치아 법랑질의 탈광화를 감소시키는 방법을 제공하며, 이 방법은 안정화된 무정형 칼슘 포스페이트(ACP) 및/또는 안정화된 무정형 칼슘 플루오라이드 포스페이트(ACFP)를 개체의 구강에 투여함으로써 개체에서 치아 법랑질의 탈광화를 감소시키는 단계를 포함한다. 바람직하게는, 안정화된 ACP 복합체는 제1주석-결부된 포스포펩티드(PP) 안정화된 무정형 칼슘 포스페이트(ACP) 복합체이고, 안정화된 ACFP 복합체는 제1주석-결부된 포스포펩티드(PP) 안정화된 무정형 칼슘 플루오라이드 포스페이트(ACFP) 복합체이다.

바람직하게는, 탈광화의 감소는 탈광화율의 감소이다.

- [0039] 바람직하게는, 안정화된 무정형 칼슘 포스페이트(ACP) 및/또는 무정형 칼슘 플루오라이드 포스페이트(ACFP)는 포스포펩티드 안정화된다. 바람직하게는, 포스포펩티드(하기에 정의된 바와 같음)는 카제인 포스포펩티드이다.
- [0040] 본 발명의 임의의 방법 또는 용도에서, 안정화된 ACP 또는 ACFP 복합체는 5 내지 60분, 10 내지 45분, 10 내지 30분 또는 20분 동안 개체에 투여될 수 있다. 또한, 안정화된 ACP 또는 ACFP 복합체는 1일당, 또는 24시간 기간당 4, 5 또는 6회 투여될 수 있다. 바람직하게는, 안정화된 ACP 또는 ACFP 복합체는 1 내지 2주 기간 동안 투여된다.
- [0041] 임의의 측면에서, 조성물은 크립형 치약, 치분 및 액상 치약을 포함하는 치약, 구강 세정제, 구강 청정제, 구강 스프레이, 바니시(varnish), 치과용 시멘트, 트로키, 씹임 검(chewing gum), 치과용 페이스트, 치은 마사지용 크림, 가글용 정제, 유제품 및 요거트를 포함하는 기타 식품과 같이 입에 적용가능한 다양한 형태로 제조되어 사용될 수 있다. 바람직하게는, 조성물은 씹임 검이다. 바람직하게는, 씹임 검은 적어도 약 15 mg, 20 mg, 25 mg, 30 mg, 35 mg, 40 mg, 45 mg, 50 mg, 55 mg 또는 60 mg의 안정화된 ACP 또는 ACFP 복합체를 함유한다. 씹임 검은 약 18.8 또는 56.4 mg의 안정화된 ACP 또는 ACFP 복합체를 함유할 수 있다.
- [0042] 임의의 측면에서, 안정화된 ACP 또는 ACFP 복합체의 칼슘 이온 함량은 PP 1몰당 약 30몰 초과이다. 바람직하게는, 칼슘 이온 함량은 PP 1몰당 약 30 내지 100몰의 범위의 칼슘이다. 더 바람직하게는, 칼슘 이온 함량은 PP 1몰당 약 30 내지 약 50몰의 범위의 칼슘이다.
- [0043] 임의의 측면에서, 안정화된 ACP 복합체는 제1주석-결부된 포스포펩티드(PP) 안정화된 무정형 칼슘 포스페이트(ACP) 복합체이고, 안정화된 ACFP 복합체는 제1주석-결부된 포스포펩티드(PP) 안정화된 무정형 칼슘 플루오라이드 포스페이트(ACFP) 복합체이다.
- [0044] 임의의 측면에서, ACP 및/또는 ACFP 복합체는 카제인 포스포펩티드 안정화된 ACP 및/또는 ACFP 복합체의 형태로 존재한다.
- [0045] 바람직하게는, ACP의 상은 주로(즉, >50%) 염기성 상이며, 여기서, ACP는 주로 화학종 Ca^{2+} , PO_4^{3-} 및 OH^- 를 포함한다. ACP의 염기성 상은 일반 화학식 $[Ca_3(PO_4)_2]_x[Ca_2(PO_4)(OH)]_y$ 를 가질 수 있으며, 여기서, $x \geq 1$ 이다. 바람직하게는 $x = 1$ 내지 5이다. 더 바람직하게는, $x = 1$ 이며, 즉, 상기 화학식의 두 구성 요소는 동일한 비율로 존재한다. 따라서, 일 실시 양태에서, ACP의 염기성 상은 화학식 $Ca_3(PO_4)_2Ca_2(PO_4)(OH)$ 를 갖는다.
- [0046] 바람직하게는, ACFP의 상은 주로(즉, >50%) 염기성 상이며, 여기서, ACFP는 주로 화학종 Ca^{2+} , PO_4^{3-} 및 F^- 를 포함한다. ACFP의 염기성 상은 일반 화학식 $[Ca_3(PO_4)_2]_x[Ca_2(PO_4)F]_y$ 를 가질 수 있으며, 여기서, $y = 1$ 일 때에는 $x \geq 1$ 이거나 $x = 1$ 일 때에는 $y \geq 1$ 이다. 바람직하게는, $y = 1$ 이며, $x = 1$ 내지 3이다. 더 바람직하게는, $y = 1$ 이고, $x = 1$ 이며, 즉, 상기 화학식의 두 구성 요소는 동일한 비율로 존재한다. 따라서, 일 실시 양태에서, ACFP의 염기성 상은 화학식 $Ca_3(PO_4)_2Ca_2(PO_4)F$ 를 갖는다.
- [0047] 일 실시 양태에서, ACP 복합체는 본질적으로 포스포펩티드, 칼슘, 포스페이트 및 히드록시드 이온 및 물로 이루어진다. 바람직하게는, 복합체는 제1주석 이온을 추가로 포함한다.
- [0048] 일 실시 양태에서, ACFP 복합체는 본질적으로 포스포펩티드, 칼슘, 포스페이트, 플루오라이드 및 히드록시드 이온 및 물로 이루어진다. 바람직하게는, 복합체는 제1주석 이온을 추가로 포함한다.
- [0049] 본 발명은 또한 본 발명의 방법 또는 용도에 사용하기 위한 키트에 관한 것으로, 이 키트는 하기를 포함한다:
- [0050] (a) 본원에 기술된 조성물, 또는
- [0051] (b) 본원에 기술된 안정화된 ACP 또는 ACFP 복합체.
- [0052] 본원에서 사용되는 바와 같이, 그 맥락이 달리 요구하는 경우를 제외하고는, "포함하다"라는 용어 및 이 용어의 변이형, 예컨대 "포함하는", "포함하고 있다" 및 "포함되는"은 추가의 첨가제, 성분, 정수 또는 단계를 배제하고자 하는 것이 아니다.
- [0053] 본 발명의 추가의 측면 및 전술한 단락에 기술된 측면들의 추가의 실시 양태가 예로서 주어진 하기 설명으로부터 그리고 첨부 도면을 참고하면 자명해질 것이다.

도면의 간단한 설명

- [0054] **도 1.** 무작위 대조 임상 시험에서의 치태 지수에 대한 CPP-ACP의 영향.
- 도 2.** 무작위 대조 임상 시험에서의 치은 지수에 대한 CPP-ACP의 영향.
- 도 3.** 1% 수크로스로 1일당 4회 펄스된 일정한 깊이의 필름 발효기에서 인간 법랑질 기층(substratum)과 함께 배양된 6종의 복수미생물 바이오필름의 평균 종 조성. 모든 6종, 즉, 액티노마이세스 나에슬룬다이(An), 푸소박테리움 뉴클레아툼(Fn), 락토바실러스 카제이(Lc), 스트렙토코커스 뮤탄스(Sm), 스트렙토코커스 상귀니스(Ss) 및 베일로넬라 파르볼라(Vp)가 매 시점에서 검출되었다. 스트렙토코커스 뮤탄스는 19일에 걸쳐 상대적으로 일정하게 유지되었으며 가장 풍부한 종이였다. 액티노마이세스 나에슬룬다이 및 락토바실러스 카제이는 시간이 지남에 따라 존재비가 증가한 반면, 스트렙토코커스 상귀니스는 감소하였다. 이는 복수미생물 바이오필름이 시간이 지남에 따라 더욱 산성화되는 것과 일치한다. 각각의 종 표시 위의 3개의 막대는 접종 후 6일(검정색), 12일(회색) 및 19일(줄무늬)째에서의 상대적 존재비를 나타낸다.
- 도 4.** 복수미생물 바이오필름 우식 모델에서의 법랑질 표면하 탈광화. 도 4a. 복수미생물 우식 모델에서의 19일 기간에 걸친 법랑질 기층의 통합 광물 손실(vol% min. μm). 데이터는 대조군(무처리)의 4가지 생물학적 복제물을 나타내며 평균 \pm SD로 제시된다. 도 4b. 6일, 12일 및 19일째의 표면하 탈광화를 나타내는 법랑질 기층의 대표적인 횡방향 현미경 사진. 도 4c. 세균 바이오필름의 긴밀한 회합 및 치은연상 치태 유사 구조를 나타내는 12일째로부터의 복수미생물 바이오필름의 대표적인 전자 현미경 사진.
- 도 5.** 19일째의 CDF에서의 복수미생물 바이오필름 세균 종 조성에 대한 1일 2회 SnF₂, 2% CPP-ACP 및 2% CPP-ACP-SnF₂ 첨가의 영향. 도 5a. 바이오필름에서의 총 세균의 백분율로서의 세균 종 조성(표 7에 제시된 데이터 및 통계 분석). 도 5b. 대조군에 비한 처리 후 각각의 종의 존재비의 변화. 푸소박테리움 뉴클레아툼은 4,981%의 2% CPP-ACP-SnF₂로 처리된 복수미생물 바이오필름에서의 극도로 높은 상대적 증가로 인해 도시되어 있지 않다. SnF₂ 처리는 푸소박테리움 뉴클레아툼 존재비(-2%)에 영향을 미치지 않는 반면, CPP-ACP 처리는 19일째에 355% 증가를 가져왔다. 줄무늬 막대 = 대조군, 검정색 = SnF₂, 회색 = 2% CPP-ACP 및 흰색 = 2% CPP-ACP-SnF₂. 도 5c. 19일째의 CPP-ACP-SnF₂로 처리된 복수미생물 바이오필름의 대표적인 3D 렌더링 CLSM 영상. 세균 세포를 4가지 중 특이적 FISH 프로브(보라색 - 푸소박테리움 뉴클레아툼; 청색 - 액티노마이세스 나에슬룬다이; 적색 - 스트렙토코커스 뮤탄스; 녹색 - 스트렙토코커스 상귀니스)로 염색하였다.

발명을 실시하기 위한 구체적인 내용

- [0055] 본 명세서에 개시되고 정의된 발명은 언급된 또는 본문 또는 도면으로부터 명백한 개별 특징 중 2가지 이상의 모든 대안적인 조합까지 연장됨이 이해될 것이다. 이러한 상이한 조합 전부는 본 발명의 다양한 대안적인 측면을 구성한다.
- [0056] 본 발명의 추가의 측면 및 전술한 단락에 기술된 측면들의 추가의 실시 양태가 예로서 주어진 하기 설명으로부터 그리고 첨부 도면을 참고하면 자명해질 것이다.
- [0057] 이제 본 발명의 특정 실시 양태에 대한 언급이 상세하게 이루어질 것이다. 본 발명은 실시 양태와 함께 기술될 것이지만, 본 발명을 이러한 실시 양태에 한정하고자 하는 것은 아님이 이해될 것이다. 이와는 대조적으로, 본 발명은 청구범위에 의해 정의되는 본 발명의 범주 내에 포함될 수 있는 모든 대안, 변형 및 등가물을 커버(cover)하고자 한다.
- [0058] 당업자라면 본 발명의 실시에서 사용될 수 있는, 본원에 기술된 것과 유사하거나 등가인 많은 방법 및 재료를 인지할 것이다. 본 발명은 어떠한 방식으로든지 기술된 방법 및 재료에 한정되지 않는다.
- [0059] 본원에서 참고되는 특허 및 간행물 전부는 그 전체가 참고로 포함된다.
- [0060] 본 명세서를 해석하기 위하여, 단수형으로 사용되는 용어는 복수형을 또한 포함하며 그 역도 그러하다.
- [0061] 본원에서 사용되는 바와 같이, 그 맥락이 달리 요구하는 경우를 제외하고는, "포함하다"라는 용어 및 이 용어의 변이형, 예컨대 "포함하는", "포함하고 있다" 및 "포함되는"은 추가의 첨가제, 성분, 정수 또는 단계를 배제하고자 하는 것이 아니다. 본원에서 사용되는 바와 같이, 그 맥락이 달리 요구하는 경우를 제외하고는, "포함하다" 및 "함유하다"는 상호교환가능하게 사용될 수 있다.

- [0062] 본 발명은 CPP-ACP, CPP-ACFP 또는 제1주석-결부된 ACP 또는 ACFP와 같은 안정화된 무정형 칼슘 포스페이트 형태가 치은 염증을 감소시키고 치은염과 같은 다양한 치은 질환을 치료할 수 있다는 예상치 못한 발견에 기초한다. 안정화된 무정형 칼슘 포스페이트 형태는 치아 병소에서 결정성 히드록시아파타이트 또는 플루오르아파타이트를 형성하기 위해 칼슘 및 포스페이트를 전달함으로써 치아 병소를 재광화하는 것으로 이미 밝혀졌지만, 이러한 안정화된 무정형 칼슘 포스페이트 형태가 놀랍게도 구강 및 구강 내의 조직(즉, 치은)에 존재하는 유익한 구강 세균 및 병원성 구강 세균에 영향을 미치는 것으로 이제 밝혀졌다. 더 놀랍게도, 안정화된 무정형 칼슘 포스페이트 형태는 유익한 구강 세균의 상대적 존재비를 증가시키는 한편 병원성 구강 세균의 상대적 존재비를 감소시킨다. 임의의 이론 또는 작용 기작에 의해 구애됨이 없이, 구강 세균에 대한 이러한 차별적 영향이 치은 염증의 감소를 가져오는 것으로 보인다.
- [0063] 본 발명의 임의의 방법은 개체의 구강 부위의 처리를 포함할 수 있으며, 구강 부위는 원심-협측, 정중-협측, 근심-협측, 근심-구개측, 정중-구개측 및 원심-구개측 및 원심-설측, 정중-설측 및 근심-설측을 포함하는 치아 주위의 임의의 하나 이상의 영역이다. 처리는 치은에 직접 적용될 수 있고 구강 내 다른 부위에는 적용되지 않을 수 있다. 처리는 다수의 구강 부위일 수 있다. 대안적으로, 전체 구강이 처리될 수 있다. 또한, 처리의 효능은 하나 이상의 구강 부위 또는 전체 구강의 분석에 의해 결정될 수 있다. 예를 들어, 병원성 세균의 감소 또는 공생 세균의 증가는 본원에 기술된 하나 이상의 구강 부위의 분석 또는 전체 구강의 분석에 의해 결정될 수 있다.
- [0064] 본 발명의 임의의 측면에서, 개체는 치료 또는 예방을 필요로 하는 개체이다. 구체적으로, 본 발명의 임의의 측면에서, 방법 또는 용도는 치료 또는 예방을 필요로 하는 개체를 확인하는 단계를 추가로 포함한다.
- [0065] 병원성 구강 세균을 감소시키거나 공생 구강 세균을 증가시키기 위해 치료를 필요로 하는 개체는 현대 생활 양식(예를 들어, 과도한 식이 당 섭취, 흡연, 불량한 구강 위생) 또는 다른 요인(예를 들어, 유전적 소인)을 통해 구강 마이크로바이옴의 교란이 있거나 이를 경험하고 있는 개체일 수 있다.
- [0066] 본 발명의 임의의 측면에서, 개체는 임의의 치아 병소를 갖지 않을 수 있다. 예를 들어, 개체는 치은 염증 또는 치은염을 가지고 있지만 검출가능한 치아 표면 또는 표면하 병소는 갖지 않는 것으로 확인될 수 있다.
- [0067] 용어 "치료하다" 또는 "치료"는 요망되지 않는 생리학적 변화 또는 장애를 늦추는(감소시키는) 것을 목적으로 하는 치료학적 처리를 지칭한다. 본 발명의 목적을 위해, 유리한 또는 요망되는 임상 결과는, 검출가능한 지 또는 검출불가능한 지에 관계없이, 증상의 경감, 질환 정도의 감소, 질환의 안정화된(즉, 악화하지 않는) 상태, 질환 진행의 지연 또는 둔화, 질병 상태의 개선 또는 완화, 및 관해(부분적이든 전체적이든)를 포함하지만, 이에 한정되는 것은 아니다. 치료가 반드시 질환의 검출가능한 증상의 완전한 부재를 가져올 수 있는 것은 아니지만 질환의 합병증과 부작용을 줄이거나 최소화할 수 있다. 치료의 성공 등은 개체의 신체 검사, 세포병리학적, 혈청학적 DNA, mRNA 검출 기법, 또는 본원에 기술된 임의의 다른 기법에 의해 모니터링될 수 있다.
- [0068] 용어 "예방하다" 및 "예방"은 일반적으로 치은 염증 또는 본원에 기술된 임의의 다른 질환을 갖지 않는 개체가 그 합병증으로 진행되는 것을 막거나 진행되지 못하게 하기 위한 예방적 또는 방지적 조치를 지칭한다. 예방이 필요한 개체는 세균 불균형이 있는 개체를 포함한다.
- [0069] 문구 "제약상 허용가능한"은 물질 또는 조성물이 제형을 구성하는 다른 성분들, 및/또는 그로 처리되는 개체와 화학적으로 및/또는 독성학적으로 양립가능해야 함을 나타낸다.
- [0070] 본 발명의 방법은 본원에 기술된 구강 조직의 질병 또는 질환의 아임상적 또는 임상적 증상을 나타내는 개체에 게 적용가능하다.
- [0071] 개체에서의 세균 불균형은 개체가 무작위로 선택된 개체의 코호트의 문맥에서 구강 내 미생물 병원체의 비정상적인 총 양 또는 상대적 존재비를 갖는다는 것을 의미한다. 예를 들어, 개체는 치은 염증, 치은염, 만성 치은염, 치주염 또는 치주 질환과 관련된 하나 이상의 병원성 세균의 증가된 양 또는 비율을 가질 수 있다. 전형적으로, 병원성 세균은 산발생성 및/또는 내산성 및/또는 염증발생성이다. 바람직하게는, 세균은 스트렙토코커스 류탄스, 액티노마이세스 나에슬룬디이, 베일로넬라 파르불라, 락토바실러스 카제이, 포르피로모나스 킹기발리스, 타너렐라 포르시티아 및 트레포넬라 덴티콜라로부터 선택된 임의의 하나 이상이다.
- [0072] 치은 염증의 증상은 하나 이상의 구강 부위에서 상기 개체의 구강 조직에서 나타날 수 있다. 존재할 수 있는 염증의 세포 특징은 혈액으로부터 손상된 조직 내로의 혈장 및 백혈구의 증가된 이동을 포함한다. 조홍(rubor)(발적), 열(color)(열 증가), 종양(팽화), 동통(dolor)(통증), 및 펑티오 라에사(funcitio laesa)(기능 상실)를 포함하는 치은 염증의 임상적 징후가 또한 존재할 수 있다. 만성 염증은 백혈구 세포(단핵구, 대식세포, 림프구,

혈장 세포) 침윤을 특징으로 할 수 있다. 조직과 뼈 손실이 관찰될 수 있다. 염증의 예는 치은염을 포함한다.

- [0073] 치은 염증을 감소시키는 것은 치은 염증의 발생률 및/또는 중증도의 감소일 수 있다. 이는 바로 위에 개설된 것과 같은 본원에 기술된 임의의 임상적, 세포성 또는 생화학적 특성의 발생률 또는 중증도의 감소에 의해 결정될 수 있다.
- [0074] 추가의 실시 양태에서, 개체는 구강 조직의 만성 염증을 나타낼 수 있다. 일 예에서, 개체는 치은염(예컨대, 만성 치은염), 치조골의 재흡수 및 치조골로의 치아의 콜라겐 부착의 점진적인 손실로 인한 궁극적인 치아 손실을 나타낼 수 있다. 점막 또는 관련 구강 조직의 다른 병소가 가능하다.
- [0075] 임의의 측면에서, 이를 필요로 하는 개체는 경증, 중등도 또는 중증의 치은 염증을 갖는 것으로 확인된 개체일 수 있다. 만성 치은염이 더 심각한 치주염을 초래할 수 있기 때문에, 본 발명은 또한 문헌[Eke et al J Dent Res 91:914-920 (2012)]에 기술된 CDC-AAP 방법론에 의해 결정된 경증, 중등도 및 중증의 치주염을 갖는 개체에 게 적용가능할 수 있다. 본 발명은 변형 치은 지수(Modified Gingival Index)(문헌[Lobene et al 1986 Clin Prev Dent. Jan-Feb;8(1):3-6])를 사용하여 확인된 치은 염증을 가진 개체에 게 또한 적용가능하다. 이 지수는 뢰(Löe) 및 실니스(Silness) 치은 지수의 변형이며 경증 및 중등도의 치은염에 대한 더 큰 차별을 허용한다. 개체는 하나 이상의 부위(예를 들어, 근심 및 원심의 협측, 설측)와 관련된 치은 조직에 대해 0 내지 4의 척도로 치은 염증을 갖는 것으로 결정될 수 있다. 바람직하게는, 이를 필요로 하는 개체는 1, 2, 3 또는 4의 변형 치은 지수 점수를 갖는다. 따라서, 본 발명의 임의의 측면에서, 본원에 기술된 치은 염증의 정도를 갖는 개체가 제공된다. 본 발명의 임의의 측면에서, 방법 또는 용도는 개체가 본원에 기술된 치은 염증의 정도를 갖는지 여부를 결정하는 단계를 추가로 포함한다.
- [0076] 병원성 구강 세균의 감소, 공생 구강 세균의 증가를 필요로 하는 개체 또는 구강 세균 불균형이 있는 개체를 확인하는 것은 구강에서 채취한 구강액으로부터 수득된 샘플 내의 세균의 양 또는 상대적 비율에 의해 결정될 수 있다. 특히, 구강액은 타액, 치은 열구액 또는 혈액일 수 있다. 구강액, 예를 들어 타액은 이하선, 악하선, 설하선, 부속선, 치은 점막 및 협측 점막과 같은 다수의 공급원으로부터의 분비물의 조합인 것으로 인지되며, 구강액이라는 용어는 이들 공급원 각각의 분비물을 개별적으로 또는 조합하여 포함한다. 타액은 자극될 수 있거나 바람직한 실시 양태에서는 자극되지 않을 수 있다. 개체에서의 타액의 자극은 개체가 무설탕 껌, 파라핀 필름 또는 타르트 캔디(tart candy) 조각을 씹게함으로써 발생할 수 있다. 자극되지 않은 타액은 개체가 타액 흐름의 자극없이 수집 용기 내로 침을 뱉을 것임을 의미한다.
- [0077] 시험을 위한 타액 시편은 본 기술 분야에 공지된 다양한 방법에 따라 수집될 수 있으며, 예를 들어 자극되거나 자극되지 않은 타액은 수집 용기 내로 침을 뱉는 개체에 의해 또는 면봉 또는 주사기를 사용하여 타액을 추출함으로써 샘플링될 수 있다. 자극되지 않은 타액을 수득하는 다른 방법은 본 기술 분야에 공지되어 있다.(문헌 [Nazaresh and Christiansen, J. Dent. Res. 61: 1158- 1162 (1982)]). 타액을 수집하는 방법 및 장치가 또한 기술되었다.(또한, 미국 특허 제5,910,122호 참조).
- [0078] 자극된 타액을 분석함으로써 본 발명의 방법이 또한 실시될 수 있는 것으로 고려된다.
- [0079] 또한, 본 발명의 방법은 샘플 수집 직후 타액 분석을 수행하는 것에 한정되지 않는다. 특정 실시 양태에서, 본 발명의 방법에 따른 타액 분석은 보관된 타액 샘플 상에서 수행될 수 있다. 시험을 위한 타액 샘플은 본 기술 분야에 공지된 방법 및 장치를 사용하여 보존될 수 있다.(예를 들어, 미국 특허 제5,968,746호 참조).
- [0080] 본 발명의 방법은 점도를 감소시키도록 처리된 타액 샘플 상에서 타액 분석을 수행하는 데 사용되는 것으로 또한 고려된다.
- [0081] 타액의 점성 특성은, 점액다당류의 특성으로 인해, 이러한 유체의 시험을 어렵게 한다. 임의의 실험실 시험 절차를 위해 타액을 준비하기 위해, 타액이 충분히 유동적이고(즉, 점도가 감소되어야 함) 잔해가 없게 할 수 있다. 잔해를 제거하는 데 사용되는 기법은 원심분리 및 여과를 포함한다. 타액 샘플을 양이온성 4차 암모늄 시약과 혼합함으로써 타액의 점도가 또한 감소될 수 있다.(미국 특허 제5,112,758호 참조).
- [0082] 또 다른 실시 양태에서, 개체로부터의 샘플은 혀의 등(dorsum)의 움(crypt)으로부터 채취될 수 있다.
- [0083] 개체로부터의 샘플은 특정 치주 부위로부터 채취될 수 있다. 치주 부위는 구강 내 영역이다. 바람직하게는, 치주 부위는 원심-협측, 정중-협측, 근심-협측, 근심-구개측, 정중-구개측 및 원심-구개측 및 원심-설측, 정중-설측 및 근심-설측을 포함하는 치아 주위의 영역이다. 샘플은 염증의 임상적 징후를 나타내는 치주 부위로부터 채취될 수 있다.

- [0084] 또 다른 실시 양태에서, 개체로부터의 샘플은 조직의 샘플일 수 있다. 조직 또는 이의 일부는 구강으로부터의 것일 수 있다. 특정 실시 양태에서, 조직은 치은이다. 치은 조직은 원심-협축, 정중-협축, 근심-협축, 근심-구개측, 정중-구개측 및 원심-구개측 및 원심-설측, 정중-설측 및 근심-설측을 포함하는 치아 주위의 다양한 부위로부터의 것일 수 있다. 조직은 정상적인 생검에 의해 취득될 수 있거나 받치된 치아로부터 취득될 수 있다.
- [0085] 또 다른 실시 양태에서, 개체로부터의 샘플은 치아 치태일 수 있다. 치태는 치은연하 또는 치은연상 치태일 수 있다. 치은연하 치태는 멸균 큐렛(curette) 또는 페이퍼 포인트(paper point)를 사용하여 샘플링될 수 있다. 치은연상 치태는 본 기술 분야에 공지된 표준 기법을 이용하여 분리될 수 있다. 치은연하 치태는 원심-협축, 정중-협축, 근심-협축, 근심-구개측, 정중-구개측 및 원심-구개측 및 원심-설측, 정중-설측 및 근심-설측 치주 부위를 포함하는 치아 주위의 다양한 부위로부터 수집될 수 있다. 치은연하 치태 샘플은 자격을 갖춘 치과 의사 또는 치주 전문가에 의해 제공되는 정상적인 치과 검사 중에 취득될 수 있다. 치태 샘플은 그대로 분석될 수 있거나 추출 완충액을 사용하여 관심있는 단백질, 펩티드 또는 이의 단편을 추출하도록 처리될 수 있다. 추출 완충액은 pH 완충제(예를 들어, 포스페이트, HEPES 등), 이온 강도를 유지하기 위한 염(예를 들어, NaCl) 및 단백질 가용화제(예를 들어, 세제(SDS, Triton X100 등)), 환원제(예를 들어, 디티오트레이톨, 시스테인HCl) 및/또는 카오트로픽제(chaotropic agent)(예를 들어, 우레아, 구아니디늄 클로라이드, 리튬 퍼클로레이트)를 함유할 수 있다.
- [0086] 세균 불균형은 개체로부터의 샘플 내의 병원성 및/또는 공생 구강 세균의 양 또는 상대적 비율을 비교하고, 이를 세균 불균형이 있는 개체의 속성을 갖지 않는 개체로부터 이전에 정의된 일련의 파라미터 또는 치은 염증의 임의의 임상적, 세포성 또는 생화학적 특성과 비교함으로써 결정될 수 있다. 건강한 구강을 갖는 개체는 낮은 수준으로 존재하는 병원성 세균을 함유할 수 있는 것으로 고려된다. 이 낮은 수준 또는 정상 수준의 병원성 세균 콜로니 형성은 세균 불균형을 나타내지 않는다. 이러한 대조군을 사용하여 이를 시험 샘플과 비교할 때, 개체가 세균 불균형을 갖는지 여부의 결정은 (1) 대조 샘플과 비교하여 개체로부터 취한 샘플 내의 본원에 기술된 하나 이상의 병원성 세균의 상승된 수준, 또는 (2) 대조 샘플 내의 세균의 총 수준과 비교하여 개체로부터 채취된 샘플 내의 하나 이상의 병원성 세균의 증가된 비율, 또는 (3) 대조 샘플과 비교할 때 개체로부터 채취된 샘플 내의 하나 이상의 다른 세균 중에 비한 하나 이상의 병원성 세균의 증가된 비율을 포함한다.
- [0087] 본원에서 언급된 안정화된-ACP 또는 ACFP 복합체는 그 내용이 참고로 포함된 국제 특허 제PCT/AU2005/001781호에 기술된 안정화된-ACP 또는 ACFP 복합체를 포함한다.
- [0088] 바람직한 실시 양태에서, 포스포펩티드 안정화된 무정형 칼슘 포스페이트(ACP) 또는 무정형 칼슘 플루오라이드 포스페이트(ACFP) 복합체는 단단히 결합된 그리고 느슨하게 결합된 칼슘을 가지며, 여기서, 복합체 중의 상기 결합된 칼슘은 7.0의 pH에서 형성된 ACP 또는 ACFP 복합체 중 단단히 결합된 칼슘보다 더 적다. 임의선택적으로, ACP 또는 ACFP는 주로 염기성 형태로 존재한다.
- [0089] 본원에서 언급되는 안정화된-ACP 또는 ACFP 복합체는 7.0 미만의 pH에서 형성된 안정화된-ACP 또는 ACFP 복합체를 포함한다. 바람직하게는 복합체는 약 5.0에서 7.0 미만까지의 범위의 pH에서 형성된다. 더 바람직하게는 복합체는 약 5.0 내지 약 6.0의 pH 범위에서 형성된다. 바람직한 실시 양태에서, 복합체는 약 5.5의 pH에서 형성된다. 바람직하게는, 복합체 중 ACP 또는 ACFP는 주로 염기성 형태로 존재한다.
- [0090] 안정화된-ACP는 하기 단계를 포함하는 방법에 의해 생성될 수 있다:
- [0091] (i) 1가지 이상의 포스포펩티드를 포함하는 용액을 취득하는 단계; 및
- [0092] (ii) pH를 약 7.0 이하에서 유지하면서 칼슘 이온, 포스페이트 이온 및 히드록시드 이온을 포함하는 용액들을 혼합하는 단계.
- [0093] 안정화된 ACFP는 하기 단계를 포함하는 방법에 의해 생성될 수 있다:
- [0094] (i) 1가지 이상의 포스포펩티드를 포함하는 용액을 취득하는 단계; 및
- [0095] (ii) pH를 약 7.0 이하에서 유지하면서 칼슘 이온, 포스페이트 이온, 히드록시드 이온 및 플루오라이드 이온을 포함하는 용액들을 혼합하는 단계.
- [0096] 포스포펩티드 안정화된 무정형 칼슘 포스페이트(ACP) 또는 무정형 칼슘 플루오라이드 포스페이트(ACFP) 복합체는 또한 하기 단계를 포함하는 방법에 의해 취득가능하거나 취득되는 것을 포함할 수 있으며, 여기서, 복합체 중 ACP는 단단히 결합된 그리고 느슨한 칼슘을 가지며, 복합체 중 단단히 결합된 칼슘은 7.0의 pH에서 형성된

ACP 또는 ACFP 복합체 중 단단히 결합된 칼슘보다 더 적고, ACP 또는 ACFP는 주로 염기성 형태로 존재한다:

- [0097] a) 칼슘 이온을 포함하는 제1 용액, 포스페이트 이온을 포함하는 제2 용액, 및 임의선택적으로, 플루오라이드 이온을 포함하는 제3 용액을 약 5 내지 7 미만까지의 pH를 갖는, 포스포펩티드 및 용매를 포함하는 용액에 혼합시키는 단계; 및
- [0098] b) 혼합 동안 용액의 pH를 히드록시드 이온의 첨가에 의해 약 5.0 내지 7.0 미만에서 유지하는 단계.
- [0099] ACP 또는 ACFP 중의 "단단히" 그리고 "느슨하게" 결합된 칼슘 및 포스페이트는 분석적 한외여과를 이용하여 결정될 수 있다. 간략하게는, pH를 약 7.0 이하에서 유지하면서 혼합된 포스포펩티드, 칼슘, 포스페이트 및 임의선택적으로 플루오라이드의 용액을 먼저 0.1 마이크로미터 필터를 통하여 여과하여 복합체와 결부되지 않은 유리 칼슘 및 포스페이트를 제거할 수 있다. 이러한 유리 칼슘 및 포스페이트는 여과액에 존재하며 이는 버려진다. 어떠한 방식으로든지 복합체와 결부되지 않은 임의의 유리 칼슘 또는 포스페이트는 생체이용성이 아니며, 즉, 포스포펩티드에 의해 치아로 전달된다. 0.1 마이크로미터 여과로부터의 보유액은 1,000 g에서 15분 동안 3000 mw 컷오프 필터를 통한 원심분리에 의해 추가로 분석될 수 있다. 생성된 여과액은 복합체와 느슨하게 결합된 또는 결부된 칼슘 및 포스페이트를 함유한다. 이러한 원심력에서, 복합체에 단단히 결합되지 않은 칼슘 및 포스페이트는 유리되어 여과액 내로 이동한다. 복합체 중의 단단히 결합된 Ca 및 Pi는 보유액 중에 보유된다. 그 후 보유액 중의 단단히 결합된 Ca 및 Pi의 양은 0.1 마이크로미터 여과의 보유액 중의 Ca 및 Pi의 총 양으로부터 여과액 중의 Ca 및 Pi의 양을 차감함으로써 결정될 수 있다.
- [0100] 본원에서 언급된 안정화된-ACP 또는 ACFP 복합체는 그 내용이 참고로 포함된 국제 특허 제PCT/AU2006/000885호에 기술된 안정화된-ACP 또는 ACFP 복합체를 포함한다.
- [0101] "수퍼로딩된(super loaded)" 포스포펩티드 또는 포스포단백질(PP) 안정화된-무정형 칼슘 포스페이트(ACP) 또는 무정형 칼슘 플루오라이드 포스페이트(ACFP) 복합체. 복합체는 임의의 pH(예를 들어, 3 내지 10)에서 형성될 수 있다. 바람직하게는 포스포펩티드는 서열 -A-B-C-를 포함하며, 여기서, A는 포스포아미노산, 바람직하게는 포스포세린이고, B는 포스포아미노산을 포함하는 임의의 아미노산이며, C는 글루탐산, 아스파르트산 또는 포스포아미노산이다. 포스포아미노산은 포스포세린일 수 있다. PP에는 칼슘 및 포스페이트 이온이 수퍼로딩된다. 칼슘 이온은 PP 1몰당 Ca 30 내지 1000 mol의 범위, 또는 PP 1몰당 Ca 30 내지 100 또는 30 내지 50몰의 범위일 수 있다. 또 다른 실시 양태에서, PP 1몰당 Ca의 mol은 적어도 25, 30, 35, 40, 45 또는 50이다.
- [0102] 포스포펩티드 또는 포스포단백질(PP) 안정화된 무정형 칼슘 포스페이트 또는 무정형 칼슘 플루오라이드 포스페이트 복합체는 PP 1몰당 칼슘 약 30몰 초과인 칼슘 이온 함량을 가질 수 있다. 바람직한 실시 양태에서, 칼슘 이온 함량은 PP 1몰당 칼슘 약 30 내지 100몰의 범위이다. 더 바람직하게는, 칼슘 이온 함량은 PP 1몰당 칼슘 약 30 내지 약 50몰의 범위이다.
- [0103] 포스포펩티드 또는 포스포단백질(PP) 안정화된-무정형 칼슘 포스페이트(ACP) 또는 무정형 칼슘 플루오라이드 포스페이트(ACFP) 복합체는 하기 단계를 포함하는 방법에 의해 생성될 수 있다:
- [0104] (i) 칼슘, 무기 포스페이트 및 플루오라이드(임의적)를 포함하는 용액들을 수득하는 단계; 및
- [0105] (ii) (i)을 PP-ACP를 포함하는 용액과 혼합하는 단계.
- [0106] 바람직한 실시 양태에서, PP는 카제인 포스포펩티드(CPP)이다.
- [0107] PP 안정화된 ACP 및/또는 ACFP 복합체는 적어도 중량 기준으로 동일한 양의 칼슘 포스페이트를 추가로 포함할 수 있다. 바람직하게는 칼슘 포스페이트는 CaHPO₄이다. 바람직하게는, 칼슘 포스페이트(예를 들어, CaHPO₄)는 PP 안정화된 ACP 및/또는 ACFP 복합체와 건식 블렌딩된다. 바람직한 실시 양태에서, PP-ACP 및/또는 PP-ACFP 복합체:칼슘 포스페이트의 비는 약 1:1 내지 50, 더 바람직하게는 약 1:1 내지 25, 더 바람직하게는 약 1:5 내지 15이다. 일 실시 양태에서, PP-ACP 및/또는 PP-ACFP 복합체:칼슘 포스페이트의 비는 약 1:10이다.
- [0108] 구강에서 사용될 때 PP 1몰당 칼슘 약 30몰 초과인 칼슘 이온 함량을 갖는 포스포펩티드 또는 포스포단백질(PP) 안정화된 무정형 칼슘 포스페이트(ACP) 및/또는 무정형 칼슘 플루오라이드 포스페이트(ACFP) 복합체를 포함하는 구강 케어 제형은 하기 단계를 포함하는 방법에 의해 생성될 수 있다:
- [0109] (i) PP-ACP 및/또는 PP-ACFP 복합체를 포함하는 분말을 수득하는 단계;
- [0110] (ii) 유효량의 칼슘 포스페이트와 건식 블렌딩하는 단계; 및

- [0111] (iii) 건식 블렌딩된 PP-ACP 및/또는 PP-ACFP 및 칼슘 포스페이트의 혼합물을 구강 케어 제형으로 제형화하는 단계.
- [0112] 바람직하게는, 건식 블렌딩을 위한 칼슘 포스페이트의 형태는 CaHPO_4 , Ca_2HPO_4 및 락트산칼슘을 포함하지만 이에 한정되는 것은 아닌 임의의 용해성 칼슘 포스페이트이다.
- [0113] 본원에 기술된 조성물은 유리 플루오라이드 이온을 추가로 포함할 수 있다. 플루오라이드 이온은 임의의 적합한 공급원으로부터의 것일 수 있다. 플루오라이드 이온의 공급원은 유리 플루오라이드 이온 또는 플루오라이드 염을 포함할 수 있다. 플루오라이드 이온의 공급원의 예는 하기를 포함하지만, 이에 한정되는 것은 아니다: 플루오르화나트륨, 모노플루오로인산나트륨, 플루오르화제1주석, 규불화나트륨 및 아민 플루오라이드. 이들은 용액(전형적으로 수성 용액) 또는 현탁액으로 제공될 수 있다.
- [0114] 플루오라이드 이온은 바람직하게는 조성물에 1 ppm 초과로 존재한다. 더 바람직하게는, 양은 3 ppm 초과이다. 또 다른 실시 양태에서, 양은 바람직하게는 10 ppm 초과이다. 하기에 기술된 전형적인 실시 양태에서, 양은 수 백 또는 수 천 ppm일 수 있다. 전형적으로 플루오라이드 함량은 본 기술 분야에서 일반적으로 사용되는 방식으로 구강용 조성물 중 ppm으로서 측정된다. 플루오라이드가 안정화된 ACP를 포함하는 공급원으로부터 제공될 경우, ppm은 그 공급원, 전형적으로, 생체이용가능한 플루오라이드의 용액 또는 현탁액 중의 플루오라이드의 농도를 나타낸다.
- [0115] 본원에서 언급된 제1주석-결부된 ACP 또는 ACFP 복합체는 그 전체 내용이 참고로 포함된 국제 특허 제 PCT/AU2014/050447호에 기술된 임의의 것을 포함한다.
- [0116] 본 발명의 사용 방법에 사용하기 위한 본원에 기술된 조성물은 제1주석-결부된 ACP 또는 ACFP 복합체를 포함할 수 있다. 조성물은 2% CPP-ACP 및 플루오르화제1주석으로서의 220 ppm의 플루오라이드 및 플루오르화나트륨으로서의 70 ppm을 갖는 290 ppm의 플루오라이드를 포함할 수 있다.
- [0117] 본 발명의 설명의 맥락에서 "포스포펩티드"는 1개 이상의 아미노산이 포스포릴화된 아미노산 서열을 의미한다. 바람직하게는, 포스포펩티드는 아미노산 서열 -A-B-C- 중 하나 이상을 포함하며, 여기서, A는 포스포아미노 잔기이고, B는 포스포아미노 잔기를 포함하는 임의의 아미노 아실 잔기이며, C는 글루타밀, 아스파르틸 또는 포스포아미노 잔기로부터 선택된다. 포스포아미노 잔기 중 임의의 것은 독립적으로 포스포세릴 잔기일 수 있다. B는 바람직하게는 측쇄가 상대적으로 크지도 않고 소수성이지도 않은 잔기이다. 이것은 Gly, Ala, Val, Met, Leu, Ile, Ser, Thr, Cys, Asp, Glu, Asn, Gln 또는 Lys일 수 있다.
- [0118] 또 다른 실시 양태에서, 본 서열 중 포스포아미노산 중 적어도 2개는 바람직하게는 연결한다. 바람직하게는 포스포펩티드는 서열 A-B-C-D-E를 포함하며, 여기서, A, B, C, D 및 E는 독립적으로 포스포세린, 포스포트레오닌, 포스포티로신, 포스포히스티딘, 글루탐산 또는 아스파르트산이고, A, B, C, D 및 E 중 적어도 2개, 바람직하게는 3개는 포스포아미노산이다. 바람직한 실시 양태에서, 포스포아미노산 잔기는 포스포세린, 가장 바람직하게는 3개의 연결 포스포세린 잔기이다. D 및 E가 독립적으로 글루탐산 또는 아스파르트산인 것이 또한 바람직하다.
- [0119] 일 실시 양태에서, ACP 또는 ACFP는 온전한 카제인 또는 카제인의 단편의 형태로 존재하는 카제인 포스포펩티드(CPP)에 의해 안정화되며, 형성된 복합체는 바람직하게는 화학식 $[\text{CPP}(\text{ACP})_8]_n$ 또는 $[(\text{CPP})(\text{ACFP})_8]_n$ 을 갖고, 여기서, n은 1 이상, 예를 들어 6이다. 형성된 복합체는 콜로이드성 복합체일 수 있으며, 여기서, 코어 입자는 물에 현탁되는 큰(예를 들어, 100 nm) 콜로이드성 입자를 형성하도록 응집된다. 따라서, PP는 카제인 단백질 또는 포스포펩티드일 수 있다.
- [0120] PP는 임의의 공급원으로부터의 것일 수 있으며; 이것은 전장 카제인 폴리펩티드를 포함하는 더 큰 폴리펩티드의 맥락에서 존재할 수 있거나, 이것은 카제인, 또는 다른 포스포아미노산 풍부 단백질, 예컨대 포스포티닌의 트립신 분해 또는 다른 효소적 또는 화학적 분해에 의해, 또는 화학적 또는 재조합적 합성에 의해 단리될 수 있되, 단, 이것은 상기에 기술된 바와 같이 서열 -A-B-C- 또는 A-B-C-D-E를 포함한다. 이 코어 서열의 측면에 있는 서열은 임의의 서열일 수 있다. 그러나, $\alpha_{s1}(59-79)$, $\beta(1-25)$, $\alpha_{s2}(46-70)$ 및 $\alpha_{s2}(1-21)$ 의 측면 서열이 바람직하다. 측면 서열은 임의선택적으로, 1개 이상의 잔기의 결실, 부가 또는 보존적 치환에 의해 변형될 수 있다. 측면 영역의 아미노산 조성 및 서열은 결정적이지 않다.
- [0121] 보존적 치환의 예는 하기 표 A에 예시되어 있다.

[0122] [표 A]

원래의 잔기	예시적인 보존적 치환	비람직한 보존적 치환
Ala	Val, Leu, Ile	Val
Asn	Gln Lys His Phe	Gln
Gln	Asn	Asn
Gly	Pro	Pro
Ile	Leu, Val, Met, Ala, Phe	Leu
Leu	Ile, Val, Met, Ala, Phe	Ile
Lys	Arg, Gln, Asn	Arg
Phe	Leu, Val, Ile, Ala	Leu
Pro	Gly	Gly
Ser	Thr	Thr
Val	Ile, Leu, Met, Phe, Ala	Leu
Asp	Glu	Glu
Thr	Ser	Ser
Trp	Tyr	Tyr
Tyr	Trp Phe Thr Ser	Phe

[0123]

[0124] 측면 서열은 또한 비천연 아미노산 잔기를 포함할 수 있다. 유전 암호에 의해 코딩되지 않는 일반적으로 조우되는 아미노산은 하기를 포함한다:

[0125]

Glu 및 Asp에 있어서 2-아미노 아디프산(Aad);

[0126]

Glu 및 Asp에 있어서 2-아미노피멜산(Apm);

[0127]

Met, Leu, 및 기타 지방족 아미노산에 있어서 2-아미노부티르산(ABu);

[0128]

Met, Leu 및 기타 지방족 아미노산에 있어서 2-아미노헵탄산(Ahe);

[0129]

Gly에 있어서 2-아미노이소부티르산(Aib);

[0130]

Val, 및 Leu 및 Ile에 있어서 시클로헥실알라닌(Cha);

[0131]

Arg 및 Lys에 있어서 호모아르기닌(Har);

[0132]

Lys, Arg 및 His에 있어서 2, 3-디아미노프로피온산(Dpr);

[0133]

Gly, Pro, 및 Ala에 있어서 N-에틸글리신(EtGly);

[0134]

Asn, 및 Gln에 있어서 N-에틸아스파리긴(EtAsn);

[0135]

Lys에 있어서 히드록실라이신(Hy1);

[0136]

Lys에 있어서 알로히드록실라이신(AHy1);

[0137]

Pro, Ser, 및 Thr에 있어서 3-(및 4) 히드록시프롤린(3Hyp, 4Hyp);

[0138]

Ile, Leu, 및 Val에 있어서 알로이소류신(AlIe);

- [0139] Ala에 있어서 p-아미디노페닐알라닌;
- [0140] Gly, Pro, Ala에 있어서 N-메틸글리신(MeGly, 사르코신);
- [0141] Ile에 있어서 N-메틸이소류신(MeIle);
- [0142] Met 및 기타 지방족 아미노산에 있어서 노르발린(Nva);
- [0143] Met 및 기타 지방족 아미노산에 있어서 노르류신(Nle);
- [0144] Lys, Arg 및 His에 있어서 오르니틴(Orn);
- [0145] Thr, Asn 및 Gln에 있어서 시트룰린(Cit) 및 메티오닌 술폭시드(MSO);
- [0146] Phe에 있어서 N-메틸페닐알라닌(MePhe), 트리메틸페닐알라닌, 할로(F, Cl, Br 및 I) 페닐알라닌, 트리플루오릴 페닐알라닌.
- [0147] 일 실시 양태에서, PP는 $\alpha_{s1}(59-79)[1]$, $\beta(1-25)[2]$, $\alpha_{s2}(46-70)[3]$ 및 $\alpha_{s2}(1-21)[4]$ 로 이루어진 군으로부터 선택되는 1가지 이상의 포스포펩티드이다:
- [0148] [1] $\text{Gln}^{59}\text{-Met-Glu-Ala-Glu-Ser(P)-Ile-Ser(P)-Ser(P)-Ser(P)-Glu-Glu-Ile-Val-Pro-Asn-Ser(P)-Val-Glu-Gln-Lys}^{79} \alpha_{s1}(59-79)$
- [0149] [2] $\text{Arg}^1\text{-Glu-Leu-Glu-Glu-Leu-Asn-Val-Pro-Gly-Glu-Ile-Val-Glu-Ser(P)-Leu-Ser(P)-Ser(P)-Ser(P)-Glu-Glu-Ser-Ile-Thr-Arg}^{25} \beta(1-25)$
- [0150] [3] $\text{Asn}^{46}\text{-Ala-Asn-Glu-Glu-Glu-Tyr-Ser-Ile-Gly-Ser(P)-Ser(P)-Ser(P)-Glu-Glu-Ser(P)-Ala-Glu-Val-Ala-Thr-Glu-Glu-Val-Lys}^{70} \alpha_{s2}(46-70)$
- [0151] [4] $\text{Lys}^1\text{-Asn-Thr-Met-Glu-His-Val-Ser(P)-Ser(P)-Ser(P)-Glu-Glu-Ser-Ile-Ile-Ser(P)-Gln-Glu-Thr-Tyr-Lys}^{21} \alpha_{s2}(1-21)$
- [0152] 본 발명의 또 다른 실시 양태에서, 안정화된 ACP 및/또는 안정화된 ACFP 복합체는 치은염 또는 치주염의 예방 및/또는 치료를 돕기 위하여 구강용 조성물, 예컨대 크림형 치약, 구강 세정제 또는 구강용 제형 내로 포함된다. 구강용 조성물은 치아 표면 상에 층을 형성하기에 충분한 양의 안정화된 ACP 및/또는 ACFP를 포함하는 층으로서, 바람직하게는 상기 층은 정상 아파타이트와 동등한 칼슘 : 포스페이트 비를 가지며, 예를 들어, 상기 비는 약 2:1이다. 상기 층은 약 20 중량%인 양의 칼슘을 함유할 수 있다. 안정화된 ACP 및/또는 ACFP 복합체는 조성물의 중량을 기준으로 0.01 내지 50%, 바람직하게는 1.0 내지 50%, 바람직하게는 1.0 내지 30%, 바람직하게는 1.0 내지 20%, 바람직하게는 1.0 내지 10%, 바람직하게는 2 내지 10%로 포함될 수 있다. 특히 바람직한 실시 양태에서, 본 발명의 구강용 조성물은 약 2%의 안정화된 ACP 또는 ACFP 복합체 또는 이들 둘 모두의 혼합물을 함유한다. 상기 에이전트를 함유하는 본 발명의 구강용 조성물은 크림형 치약, 치분 및 액상 치약을 포함하는 치약, 구강 세정제, 구강 청정제, 구강 스프레이, 바니시, 치과용 시멘트, 트로키, 츄잉 검, 치과용 페이스트, 치은 마사지용 크림, 가글용 정제, 유제품 및 기타 식품과 같이 입에 적용가능한 다양한 형태로 제조되어 사용될 수 있다. 본 발명에 따른 구강용 조성물은 특별한 구강용 조성물의 유형 및 형태에 따라 추가의 잘 알려진 성분을 추가로 포함할 수 있다. 본 발명의 특정 조성물, 예컨대 크림형 치약, 치분 및 액상 치약, 구강 세정제, 구강 청정제 및 구강 스프레이는 상대적으로 낮은 점도를 가지며, 구강에서의 상당한 체류 시간 없이 치료 또는 예방에 긍정적인 영향을 미친다.
- [0153] 본 발명의 특정한 바람직한 형태에서, 구강용 조성물은 구강 세정제, 구강 청정제 또는 구강 스프레이와 같이 특정 면에서 실질적으로 액체일 수 있다. 그러한 제제에서, 비히클은 전형적으로, 하기에 기술된 바와 같이 바람직하게는 휴멕탄트(humectant)를 포함하는 물-알코올 혼합물이다. 일반적으로, 물:알코올의 중량비는 약 1:1 내지 약 20:1의 범위이다. 전형적으로 이러한 유형의 제제 중 물-알코올 혼합물의 총 양은 제제의 중량을 기준으로 약 70 내지 약 99.9%의 범위이다. 알코올은 전형적으로 에탄올 또는 이소프로판올이다. 에탄올이 바람직하다.
- [0154] 본 발명의 다른 바람직한 형태에서, 조성물은 치분, 치과용 정제 또는 크림형 치약(치과용 크림) 또는 겔형 치

약과 같이 특정 면에서 실질적으로 고체이거나 페이스트형일 수 있다. 그러한 고형 또는 페이스트형 구강용 제제의 비히클은 일반적으로 치과용으로 허용가능한 폴리싱 재료를 함유한다. 폴리싱 재료의 예로는 수불용성 메타인산나트륨, 메타인산칼륨, 인산삼칼슘, 2수화 인산칼슘, 무수 인산이칼슘, 피로인산칼슘, 오르토인산마그네슘, 인산삼마그네슘, 탄산칼슘, 수화 알루미늄, 하소 알루미늄, 규산알루미늄, 규산지르코늄, 실리카, 벤토나이트 및 이들의 혼합물이 있다. 다른 적합한 폴리싱 재료는 미립자형 열경화성 수지, 예컨대 벨라민-, 페놀, 및 우레아-포름알데히드, 및 가교결합된 폴리에폭시드 및 폴리에스테르를 포함한다. 바람직한 폴리싱 재료는 입자 크기가 약 5 마이크로미터 이하이고 평균 입자 크기가 약 1.1 마이크로미터 이하이고 표면적이 약 50,000 cm²/g. 이하인 결정성 실리카, 실리카 겔 또는 콜로이드성 실리카, 및 복합 무정형 알칼리 금속 알루미늄실리케이트를 포함한다.

- [0155] 시각적으로 투명한 겔이 이용될 때, 콜로이드성 실리카의 폴리싱제, 예컨대 실로이드(Syloid) 72 및 실로이드 74로서 상표명 실로이드로 팔리는 것, 또는 산토셀(Santocel) 100으로서 상표명 산토셀로 팔리는 것, 알칼리 금속 알루미늄실리케이트 복합체가 특히 유용하며, 그 이유는 이들이 치약에서 일반적으로 사용되는 겔화제-액체 (물 및/또는 휴백턴트를 포함함) 시스템의 굴절률에 가까운 굴절률을 갖기 때문이다.
- [0156] 소위 "수불용성" 폴리싱 재료 중 많은 것은 특정 면에서 음이온성이며, 이는 소량의 용해성 재료를 또한 포함한다. 따라서, 불용성 메타인산나트륨이 임의의 적합한 방식으로, 예를 들어 문헌[Thorpe's Dictionary of Applied Chemistry, Volume 9, 4th Edition, pp. 510-511]에 예시된 바와 같이 형성될 수 있다. 마드렐 염(Madrell's salt) 및 쿠롤 염(Kurrol's salt)으로 공지된 불용성 메타인산나트륨의 형태가 적합한 재료의 추가의 예이다. 이러한 메타포스페이트 염은 물에서 단지 극미한 용해도를 나타내며, 따라서 일반적으로 불용성 메타포스페이트(insoluble metaphosphate; IMP)로 칭해진다. 그 안에는 불순물로서 소량의, 일반적으로 4 중량% 이하와 같은 몇%의 용해성 포스페이트 재료가 존재한다. 불용성 메타포스페이트의 경우 용해성 트리메타인산나트륨을 포함하는 것으로 생각되는 용해성 포스페이트 재료의 양은 요망될 경우 물을 이용한 세척에 의해 감소되거나 제거될 수 있다. 불용성 알칼리 금속 메타포스페이트는 전형적으로 상기 재료 중 1% 이하가 37 마이크로미터보다 더 커지도록 하는 입자 크기의 분말 형태로 이용된다.
- [0157] 일반적으로 폴리싱 재료는 고형 또는 페이스트형 조성물에 약 10% 내지 약 99%의 중량 농도로 존재한다. 바람직하게는, 이것은 크림형 치약 중에 약 10% 내지 약 75%의 양으로, 그리고 치분 중에 약 70% 내지 약 99%의 양으로 존재한다. 크림형 치약에서, 폴리싱 재료가 사실상 규질일 때, 이것은 일반적으로 약 10 내지 30 중량%의 양으로 존재한다. 다른 폴리싱 재료는 전형적으로 약 30 내지 75 중량%의 양으로 존재한다.
- [0158] 크림형 치약에서, 액상 비히클은 물 및 휴백턴트를 전형적으로 제제의 중량을 기준으로 약 10% 내지 약 80%의 범위의 양으로 포함할 수 있다. 글리세린, 프로필렌 글리콜, 소르비톨 및 폴리프로필렌 글리콜이 적합한 휴백턴트/담체를 예시한다. 또한 유리한 것은 물, 글리세린 및 소르비톨의 액상 혼합물이다. 굴절률이 중요한 고려 사항인 투명 겔에서, 약 2.5 내지 30%(w/w)의 물, 0 내지 약 70%(w/w)의 글리세린 및 약 20 내지 80%(w/w)의 소르비톨이 바람직하게 이용된다.
- [0159] 크림형 치약, 크림 및 겔은 전형적으로 천연 또는 합성 증점제 또는 겔화제를 약 0.1 내지 약 10, 바람직하게는 약 0.5 내지 약 5%(w/w)의 비율로 함유한다. 적합한 증점제는 합성 핵토라이트, 합성 콜로이드성 마그네슘 알칼리 금속 실리케이트 복합 점토(예를 들어, 라포르테 인더스트리즈 리미티드(Laporte Industries Limited)에 의해 판매되는 라포나이트(Laponite)(예를 들어, CP, SP 2002, D)로서 입수가능함)이다. 라포나이트 D는 대략적으로 중량 기준으로 58.00%의 SiO₂, 25.40%의 MgO, 3.05%의 Na₂O, 0.98%의 Li₂O, 및 약간의 물과 미량의 금속이다. 그의 참비중은 2.53이며, 이것은 8%의 수분에서 1.0 g/ml의 겔보기 벌크 밀도를 갖는다.
- [0160] 다른 적합한 증점제는 아이리쉬 모스(Irish moss), 이오타 카라기난, 검 트래거캔스, 전분, 폴리비닐피롤리돈, 히드록시에틸프로필셀룰로오스, 히드록시부틸 메틸 셀룰로오스, 히드록시프로필 메틸 셀룰로오스, 히드록시에틸셀룰로오스(예를 들어, 나트로졸(Natrosol)로서 입수가능함), 소듐 카르복시메틸 셀룰로오스, 및 콜로이드성 실리카, 예컨대 미분화된 실로이드(예를 들어, 244)를 포함한다. 가용화제, 예컨대 휴백턴트 폴리올, 예컨대 프로필렌 글리콜, 디프로필렌 글리콜 및 헥실렌 글리콜, 셀로솔브, 예컨대 메틸 셀로솔브 및 에틸 셀로솔브, 직쇄 중에 약 12개 이상의 탄소를 함유하는 야채 오일 및 왁스, 예컨대 올리브유, 피마자유 및 바셀린 및 에스테르, 예컨대 아밀 아세테이트, 에틸 아세테이트 및 벤질 벤조에이트가 또한 포함될 수 있다.
- [0161] 통상적인 바와 같이 구강용 제제는 일반적으로 적합한 라벨링된 패키지로 판매되거나 또는 달리 유통됨이 이해될 것이다. 따라서, 구강 청정제의 병(jar)은 사실상 구강 청정제 또는 구강 세정제로서의 이것을 설명하는 그

리고 그의 사용에 대한 지시 사항을 갖는 라벨을 가질 것이며; 크림형 치약, 크림 또는 젤은 일반적으로, 사실상 크림형 치약, 젤 또는 치과용 크림으로서 이것을 설명하는 라벨을 갖는, 압출 튜브, 전형적으로 알루미늄, 라이닝된(lined) 납 또는 플라스틱, 또는 다른 스퀴즈(squeeze), 펌프 또는 가압 디스펜서(dispenser)(내용물을 미터아웃(metering out)하기 위한 것임) 내에 존재할 것이다.

[0162] 유기 표면 활성제를 본 발명의 조성물에서 사용하여 증가된 예방 작용을 성취하고 구강 전체에 걸친 상기 활성제의 철저하고 완전한 분산을 성취하는 것을 돕고 본 발명의 조성물이 더 많이 미용적으로 허용가능해지게 할 수 있다. 유기 표면 활성 재료는 바람직하게는 사실상 음이온성, 비이온성 또는 양쪽성이며, 바람직하게는 활성제와 상호작용하지 않는다. 표면 활성제로서 조성물에 세제 특성 및 발포 특성을 부여하는 세제 재료를 이용하는 것이 바람직하다. 음이온성 계면활성제의 적합한 예로는 고급 지방산 모노글리세라이드 모노술페이트의 수용성 염, 예컨대 수소화 코코넛유 지방산의 모노술페이트화(monosulfated) 모노글리세라이드의 나트륨 염, 고급 알킬 술페이트, 예컨대 소듐 라우릴 술페이트, 알킬 아릴 술포네이트, 예컨대 소듐 도데실 벤젠 술포네이트, 고급 알킬술포-아세테이트, 1,2-디히드록시 프로판 술포네이트의 고급 지방산 에스테르, 및 저급 지방족 아미노 카르복실산 화합물의 실질적으로 포화된 고급 지방족 아실 아마이드, 예컨대 지방산, 알킬 또는 아실 라디칼 내에 12 내지 16개의 탄소를 갖는 것 등이 있다. 마지막에 언급된 아마이드의 예로는 N-라우로일 사르코신, 및 N-라우로일, N-미리스토일, 또는 N-팔미토일 사르코신의 나트륨, 칼륨 및 에탄올아민 염(이것에는 비누 또는 유사 고급 지방산 재료가 실질적으로 없어야 함)이 있다. 본 발명의 구강용 조성물에서의 이러한 사르코나이트 화합물의 사용은 특히 유리하며, 그 이유는 이러한 재료가 산 용액에서의 치아 법랑질의 용해도의 일부 감소를 발휘하는 것에 더하여 탄수화물 분해로 인한 구강에서의 산 형성의 억제에 있어서 장시간의 뚜렷한 효과를 나타내기 때문이다. 사용하기에 적합한 수용성 비이온성 계면활성제의 예로는 에틸렌 옥사이드와, 이와 반응성인, 긴 소수성 사슬(예를 들어, 약 12 내지 20개의 탄소 원자의 지방족 사슬)을 갖는 다양한 반응성 수소-함유 화합물의 축합 생성물이 있는데, 상기 축합 생성물("에톡사머(ethoxamer)")은 친수성 폴리옥시에틸렌 모이어티(moiety), 예컨대 폴리(에틸렌 옥사이드)와 지방산, 지방 알코올, 지방 아마이드, 다가 알코올(예를 들어, 소르비탄 모노스테아레이트) 및 폴리프로필렌옥사이드(예를 들어, 플루로닉(Pluronic) 재료)의 축합 생성물을 함유한다.

[0163] 전형적으로 표면 활성제는 약 0.1 내지 5 중량%의 양으로 존재한다. 표면 활성제는 본 발명의 활성제의 용해를 돕고 이에 의해 필요한 가용화 휴백턴트의 양을 감소시키는 것을 도울 수 있음이 주목할 만하다.

[0164] 다양한 다른 재료, 예컨대 미백제, 보존제, 실리콘, 염록소 화합물 및/또는 암모니아 처리된(ammoniated) 재료, 예컨대 우레아, 인산이암모늄 및 이들의 혼합물이 본 발명의 구강용 제제 내에 포함될 수 있다. 이러한 아쥬반트(adjutant)는 존재할 경우, 요망되는 특성 및 특징에 실질적으로 불리하게 영향을 주지 않는 양으로 제제 내에 포함된다.

[0165] 임의의 적합한 착향제 또는 감미제가 또한 이용될 수 있다. 적합한 착향 성분의 예로는 착향 오일, 예를 들어, 스피어민트(spearmint), 페퍼민트(peppermint), 윈터그린(wintergreen), 사사프라스(sassafras), 정향, 세이지, 유칼립투스, 마요라나(marjoram), 계피, 레몬, 및 오렌지의 오일, 및 메틸 살리실레이트가 있다. 적합한 감미제는 수크로스, 락토스, 말토스, 소르비톨, 자일리톨, 소듐 시클라메이트, 페릴라르틴, AMP(아스파르틸 페닐 알라닌, 메틸 에스테르), 사카린 등을 포함한다. 적합하게는, 착향제 및 감미제는 각각 또는 함께, 제제의 약 0.1% 내지 5%로 또는 이보다 더 많이 포함될 수 있다.

[0166] 본 발명의 조성물은 또한 로젠지 내에 또는 츄잉 검 또는 기타 제품 내에, 예를 들어 가운 검 베이스 내로 교반하여 넣거나 검 베이스(이의 예시적인 것으로는 젤루통(jelutong), 고무 라텍스, 비닐라이트 수지 등이 있음)의 외부 표면을 코팅함으로써, 바람직하게는 통상적인 가소제 또는 연화제, 설탕 또는 기타 감미제 또는 예컨대 글루코스, 소르비톨 등과 함께 포함될 수 있다. 본 발명의 조성물은 이중 상 조성물일 수 있으며, 여기서, 각각의 상은 상이한 시간 기간에 걸친 성분들의 방출을 가능케 한다.

[0167] 대안적인 조성물은 안정화된 ACP 또는 ACFP 및 제1주석 화합물을 제공하는 것일 수 있으며 이는 그 후 원위치에서, 예컨대 구강에서 제1주석-결부된 안정화된 ACP 또는 ACFP를 형성한다. 예시적인 조성물은 펠렛 내에 안정화된 ACP 또는 ACFP, 그리고 중앙 츄 내에 제1주석 화합물을 함유하는 츄잉 검일 수 있다.

[0168] 추가의 측면에서, 본 발명은 상기에 기술된 안정화된 ACP 또는 ACFP 복합체를 포함하는 조성물을 용액의 pH를 증가시키거나 유지할 수 있는 화합물 및 제약상 허용가능한 담체와 함께 포함하는 제약 조성물을 포함하는 조성물을 제공한다. 그러한 조성물은 치과용, 항우식 조성물 및 치료용 조성물로 이루어진 군으로부터 선택될 수 있다. 치과용 조성물 또는 치료용 조성물은 젤, 액체, 고체, 산제, 크림 또는 로젠지의 형태로 존재할 수 있다. 치료용 조성물은 또한 정제 또는 캡슐의 형태로 존재할 수 있다. 일 실시 양태에서, 안정화된 ACP 또는 ACFP 복

합체는 그러한 조성물의 실질적으로 유일한 활성 성분이다. 예를 들어, 하기를 함유하는 크림 제형이 이용될 수 있다: 물; 글리세롤; CPP-ACP/SnF₂; D-소르비톨; 이산화규소; 소듐 카르복시메틸셀룰로오스(CMC-Na); 프로필렌 글리콜; 이산화티타늄; 자일리톨; 인산; 구아 검; 소듐 사카린; 에틸 p-히드록시벤조에이트; 산화마그네슘; 부틸 p-히드록시벤조에이트 및 프로필 p-히드록시벤조에이트.

- [0169] 본 발명은 추가로, 상기에 기술된 제형에 치아 우식 또는 충치, 치아 침식 및 불소증, 상아질 과민증, 치태, 치은염 또는 치주염 중 임의의 1가지 이상을 치료 또는 예방하기 위한 그의 사용 설명서가 함께 제공된 것을 포함한다.
- [0170] 또 다른 실시 양태에서, 본원에 기술된 본 발명의 조성물은 포스페이트 완충제 및/또는 칼슘 킬레이팅제를 포함하지 않는다. 예를 들어, 본원에 기술된 임의의 치약은 포스페이트 완충제 및/또는 칼슘 킬레이팅제를 포함하지 않을 수 있다.
- [0171] 본 발명의 소정 실시 양태에서, 조성물이 제공되며, 여기서, 조성물은 포스페이트 완충제 및/또는 칼슘 킬레이팅제를 포함하지 않는다.
- [0172] 또 다른 실시 양태에서, 본원에 기술된 본 발명의 조성물은 점도 조절제, 또는 0.5 내지 50%의 점도 조절제를 포함하지 않는다.
- [0173] 또 다른 실시 양태에서, 본원에 기술된 본 발명의 조성물은 소듐 카르복시메틸셀룰로오스, 또는 에스테르화도가 0.7 내지 1.0인 0.01 내지 10%의 소듐 카르복시메틸셀룰로오스를 포함하지 않는다.
- [0174] 일 실시 양태에서, 조성물의 활성 성분은 본질적으로 안정화된 ACP 또는 ACFP 복합체로 이루어진다.
- [0175] 본 명세서는 구체적으로 인간에서의 응용을 언급하지만, 본 발명은 수의학적 목적에 또한 유용함이 명백하게 이해될 것이다. 따라서, 모든 측면에서 본 발명은 가축, 예컨대 소, 양, 말 및 가금류; 반려 동물, 예컨대 고양이 및 개; 및 동물원 동물에 유용하다.
- [0176] 광화 조성물의 1가지 예는 하기를 포함한다(감소하는 비율 순서대로):
- [0177] 물
- [0178] 글리세롤
- [0179] CPP-ACP/SnF₂
- [0180] D-소르비톨
- [0181] 이산화규소
- [0182] 소듐 카르복시메틸셀룰로오스(CMC-Na)
- [0183] 프로필렌 글리콜
- [0184] 이산화티타늄
- [0185] 자일리톨
- [0186] 인산
- [0187] 구아 검
- [0188] 소듐 사카린
- [0189] 에틸 p-히드록시벤조에이트
- [0190] 산화마그네슘
- [0191] 부틸 p-히드록시벤조에이트
- [0192] 프로필 p-히드록시벤조에이트
- [0193] 본 발명은 또한 안정화된 무정형 칼슘 포스페이트(ACP) 및/또는 안정화된 무정형 칼슘 플루오라이드 포스페이트(ACFP)를 포함하는 키트를 제공하며, 상기 키트는 상기 기술된 방법에 사용하기에 적합하도록 된다.

- [0194] **키트는 하기를 포함할 수 있다:**
- [0195] - 안정화된 부정형 칼슘 포스페이트(ACP) 및/또는 안정화된 부정형 칼슘 플루오라이드 포스페이트(ACFP)를 포함하는 조성물을 수용하는 용기;
- [0196] -사용 설명서가 있는 라벨 또는 패키지 삽입물.
- [0197] 특정 실시 양태에서, 키트는 질병 또는 질환의 치료를 위한 하나 이상의 추가의 활성 요소 또는 성분을 함유할 수 있다.
- [0198] 키트는 용기 및 용기 상의 또는 용기와 결부된 라벨 또는 패키지 삽입물을 포함할 수 있다. 적합한 용기는 예를 들어 병, 바이알, 주사기, 블리스터 팩 등을 포함한다. 용기는 유리 또는 플라스틱과 같은 다양한 재료로 형성될 수 있다. 용기는 질환을 치료하는 데 효과적인 치료 조성물을 수용하며, 멸균 접근 포트를 가질 수 있다(예를 들어, 용기는 정맥 내 용액 백 또는 피하 주사 바늘에 의해 관통될 수 있는 마개를 갖는 바이알일 수 있음). 라벨 또는 패키지 삽입물은 치료 조성물이 선택된 질환을 치료하는 데 사용됨을 나타낸다. 일 실시 양태에서, 라벨 또는 패키지 삽입물은 사용 설명서를 포함하며, 치료 조성물이 주어진 질병 또는 질환의 치료에 사용될 수 있음을 나타낸다.
- [0199] 키트는 (a) 치료 조성물; 및 (b) 제 2 활성 요소 또는 성분이 함유된 제2 용기를 포함할 수 있다. 본 발명의 이 실시 양태에서의 키트는 조성물 및 다른 활성 요소가 본원에 기술된 장애 또는 질환을 치료하거나 세균 불균형으로 인한 합병증을 예방하는 데 사용될 수 있음을 나타내는 패키지 삽입물을 추가로 포함할 수 있다. 대안적으로 또는 추가로, 키트는 제약상 허용가능한 완충제, 예컨대 주사용 정균수(BWFI), 포스페이트 완충 식염수, 링거액 및 텍스트로스 용액을 포함하는 제2(또는 제3) 용기를 추가로 포함할 수 있다. 이것은 다른 완충제, 희석제, 필터, 바늘, 및 주사기를 포함하는 상업적 및 사용자 관점으로부터 바람직한 다른 재료를 추가로 포함할 수 있다.
- [0200] 이제 본 발명을 하기 비제한적 실시예를 참고하여 추가로 설명할 것이다.
- [0201] **실시예**
- [0202] **실시예 1**
- [0203] **임상 연구: 치은연상 치태 및 구강 건강에 대한 CPP-ACP의 프리바이오틱 효과**
- [0204] **연구 목표**
- [0205] **1차 목표**
- [0206] 상악 어금니 상에 형성된 치은연상 치태의 미생물 조성에 대한, 각각 14일에 걸친 정상적인 구강 위생 시술과 함께, 56.4 mg CPP-ACP를 함유한 무설탕 껌을 씹는 것, 18.8 mg CPP-ACP를 함유한 무설탕 껌을 씹는 것, 및 껌을 씹지 않는 것의 영향을 비교하기 위한 것이다.
- [0207] **2차 목표**
- [0208] A. 치은연상 치태의 발생에 대한, 각각 14일에 걸친 정상적인 구강 위생 시술과 함께, 56.4 mg CPP-ACP를 함유한 무설탕 껌을 씹는 것, 18.8 mg CPP-ACP를 함유한 무설탕 껌을 씹는 것, 및 껌을 씹지 않는 것의 영향을 비교하기 위한 것이다.
- [0209] B. 치은염의 발생에 대한, 각각 14일에 걸친 정상적인 구강 위생 시술과 함께 이루어진, 56.4 mg CPP-ACP를 함유한 무설탕 껌을 씹는 것, 18.8 mg CPP-ACP를 함유한 무설탕 껌을 씹는 것, 및 껌을 씹지 않는 것의 영향을 비교하기 위한 것이다.
- [0210] **인간 윤리 승인**
- [0211] 인간 윤리 승인은 연구를 시작하기 전에 더 유니버시티 오브 멜버른의 인간 연구 윤리 위원회로부터 받았다. 모든 참여자는 연구를 시작하기 전에 고지된 서면 동의서를 제공할 필요가 있었다.
- [0212] **연구 계획**
- [0213] **연구 설계**
- [0214] 이 조사관-맹검, 무작위 대조 임상 시험은, 정상적인 구강 위생 시술의 존재 하에 치은연상 치태의 발생 및 이

의 조성 변화뿐만 아니라 치은염의 발생에 대한 14일에 걸친 56.4 mg CPP-ACP를 함유한 무설탕 껌을 씹는 것, 18.8 mg CPP-ACP를 함유한 무설탕 껌을 씹는 것, 및 껌을 씹지 않는 것의 영향을 평가하기 위해 3가지-처리, 3회-기간 교차 설계를 사용하였다. 참여자들은 3가지 처리 중 하나에 무작위로 배정되었으며, 각 처리 기간은 14일을 포함하였다. 3가지 처리는 하기와 같았다:

- [0215] A. 56.4 mg CPP-ACP를 함유하는 무설탕 껌을 연속 14일 동안 1일당 6회 20분 동안 씹는 것;
- [0216] B. 18.8 mg CPP-ACP를 함유하는 무설탕 껌을 연속 14일 동안 1일 6회 20분 동안 씹는 것;
- [0217] C. 껌을 씹지 않는 것.

[0218] 처리 기간 동안, 각 대상체는 플루오라이드 크림형 치약(공급됨) 및 칫솔(공급됨)로 1일 2회 양치질하는 것으로 이루어지는 구강 위생 행위를 계속하였다. 껌 제품을 씹는 참여자는 처리 기간 동안 향미생물성 민트, 로젠지, 필름 및 기타 비-연구용 츄잉 껌을 소비하지 않도록 요청받았다. 유사하게, 처리 기간 동안 껌을 씹지 않는 참여자는 처리 기간 동안 향미생물성 민트, 로젠지, 필름 및 기타 비-연구용 츄잉 껌을 소비하지 않도록 요청받았다.

[0219] **참여자의 원천**

[0220] 참여자는 더 유니버시티 오브 멜버른의 멜버른 덴탈 스쿨(Melbourne Dental School) 및 멜버른 덴탈 클리닉(Melbourne Dental Clinic)의 스태프로부터 모집하였다. 모든 연구 참여자는 참여 전에 서명된 고지된 동의서를 제공하였다.

[0221] **참여자 선정 기준**

[0222] **포함 기준:**

[0223] 이 연구에 참여하기에 적격이 되기 위하여, 개체는 하기 기준을 모두 충족하였다.

- [0224] 1. 고지된 동의서 양식을 이해할 수 있는 능력, 및 그러한 양식을 읽고 서명할 의지 및 능력.
- [0225] 2. 연령 범위: 18 내지 55세.
- [0226] 3. 양호한 일반 건강.
- [0227] 4. 최소 20개의 자연치.
- [0228] 5. 1.0 ml/분 이상의 검-자극된 전체 타액 유속 및 0.2 ml/분 이상의 자극되지 않은 전체 타액 유속.
- [0229] 6. 모든 연구 절차를 준수하고 연구 지속 기간 동안 응할 수 있는 의지.

[0230] **제외 기준:**

[0231] 무작위화시에 하기 배제 기준 중 임의의 것을 나타내는 개체는 연구에 부적격이었다:

- [0232] 1. 껌 제품 내의 유 단백질 또는 기타 성분에 대한 알레르기.
- [0233] 2. 치아교정 용구 또는 탈착가능한 보철물.
- [0234] 3. 베니어(veneer), 또는 보철 크라운이 있는 하나 초과 의 절차.
- [0235] 4. 심한 구강 병증(치주 질환(CPITN \geq 3) 및 연질 또는 경질 구강 조직의 종양을 포함함).
- [0236] 5. 구강 소견을 수반하는 만성 질환(예를 들어, 당뇨병[통제 수준과 무관함], 인간 면역 결핍 바이러스 감염 또는 후천성 면역 결핍 증후군, 치은 과형성과 관련된 약물의 사용).
- [0237] 6. 회복되지 않은 치아 우식.
- [0238] 7. 연구 시작 전 1개월 내의 항생제 또는 항염증 약물에 의한 치료.
- [0239] 8. 시험 약물과 상호 작용할 수 있는 약물과의 병용 약물요법.
- [0240] 9. 침습적 치과 시술 전의 항생제 커버리지(coverage)를 필요로 하는 질환의 이력.
- [0241] 10. 임신/수유.

[0242] **시험 제품**

- [0243] **시험 제품의 설명**
- [0244] 각 참여자는 하기 3가지 처리 중 하나에 무작위로 할당되었다:
- [0245] A. 연속 14일 동안 1일당 6회 20분 동안의 56.4 mg CPP-ACP를 함유하는 무설탕 츄잉 검;
- [0246] B. 연속 1일 동안 1일 6회 20분 동안의 18.8 mg CPP-ACP를 함유하는 무설탕 츄잉 검;
- [0247] C. 검을 씹지 않음.
- [0248] **분배 방법**
- [0249] 각 레그(leg)의 시작시에, 참여자에게 그 기간 동안 할당된 처리, 플루오라이드 크립형 치약 튜브 및 칫솔을 함유한 패키지를 지급하였다. 참여자는 각 처리 기간의 종료시에 14일 평가에 참석했을 때 임의의 사용하지 않은 검과 모든 사용한 검 포장지를 반환하였다. 분배되고 반환된 검의 양을 기록하였다.
- [0250] **적용 방법 및 시기**
- [0251] 검 시험 제품을 할당받았을 때, 참여자는 하기 시간에 연속 14일 동안 1일당 6회 20분 동안 할당된 검을 씹었다: 아침 식사 후, 모닝 티(morning tea) 후, 점심 식사 후, 애프터눈 티(afternoon tea) 후, 저녁 식사 후 및 취침 전.
- [0252] **무작위화 및 맹검 방법**
- [0253] 6가지 처리 조합(ABC, ACB, BAC, BCA, CAB, CBA)이 모두 동일하게 가능해지도록 블록 무작위화 스케줄을 생성하였다.
- [0254] 연구는 조사관-맹검이었다. 연구 전반에 걸쳐, 치태 샘플을 처리하는 임상 조사관 및 실험실 스태프는 참여자가 어떤 처리 아암(arm)에 할당되었는지 알지 못했다. 츄잉 검이 동일한 코딩된 패키지로 제공되었기 때문에 참여자 및 연구 직원도 어떤 츄잉 검이 할당되었는지 알지 못했다. 참여자가 1회 처리 기간 동안 검을 씹지 않은 경우, 참여자를 처리 할당에 대해 완전 맹검이 되게 하는 것은 불가능했다. 시험 재료를 분배하거나 그의 사용을 감독하는 직원은 잠재적 편향을 최소화하기 위해 참여자의 검사 또는 치태 샘플의 분석에 참여하지 않았다.
- [0255] 어떠한 분석에도 관여하지 않은 연구원이 코드 확인의 마스터 목록을 간수하였다.
- [0256] 처리로의 참여자의 배정: 기준선 검사 후, 참여자에게 참여자 번호를 배정하였다. 참여자를 3가지 처리 중 하나에 무작위로 배정하였다. 병행 연구에서의 처리 횟수에 대한 표준 무작위화 표로부터 무작위화를 결정하였다.
- [0257] **처리 지속 기간**
- [0258] 3회 처리 기간 각각은 연속 14일 동안이었다. 처리 기간은 14일 세척 기간에 의해 구분되었다.
- [0259] **수반 절차**
- [0260] 참여자는 공급된 플루오라이드 크립형 치약과 칫솔로 1일 2회 양치질을 계속하도록 지시받았다. 참여자는 각 14일 처리 기간 동안 구강 청정(물 제외); 치실; 기타 구강 위생 보조제의 사용; 향미생물성 민트, 로젠지, 필름 및 기타 비-연구용 츄잉 검의 소비를 하지 않도록 지시받았다.
- [0261] **측정 및 관찰**
- [0262] **효능 종점**
- [0263] **임상 검사**
- [0264] 처리 기간의 시작과 끝에서, 참여자는 치은염과 치태에 대한 검사를 받았으며, 상악 어금니의 협측 표면으로부터 치은연상 치태를 수집하였다. 검사 및 치은연상 치태 수집의 완료 후, 참여자는 모든 치아의 치은연상 스케일링, 소제 및 예방을 받았다. 레그 3에 대한 마지막 검사의 완료 후, 각 참여자는 전문적인 플루오라이드 처리를 받았다.
- [0265] **치태 및 치은염의 측정**
- [0266] 치은연상 치태는 퀴글레이-하인 인덱스(Quigley-Hein Index)의 투레스키(Turesky) 변형을 이용하여 평가하였다(문헌[Turesky et al 1970 J Periodontol 41(1):41-43]). 이 지수는 치태로 덮인 치아 영역의 신뢰할 수 있는 추정치로 인지되며 치태방지제를 평가하기 위해 자주 사용된다. 치태 지수는 각 치아에 대한 점수를 더하고 검

사된 표면의 수로 나눔으로써 수득하였다. 세 번째 대구치를 제외한 모든 치아의 회복되지 않은 순측, 협측 및 실측 표면과 관련된 치태 점수를 평가하였다. 각 표면에 0 내지 5의 점수를 배정하였다.

[0267] 치은염은 변형 치은 지수(문헌[Lobene et al 1986])를 사용하여 측정하였다. 이 지수는 퇴 및 실니스 치은 지수의 변형이며 경증 및 중등도의 치은염에 대한 더 큰 차별을 허용한다. 이 연구에서, 모든 치아의 4개 부위(근심 및 원심의 협측, 실측)와 관련된 치은 조직에 대해 0 내지 4의 척도로 치은 염증을 점수매겼다.

[0268] **치은연상 치태 수집**

[0269] 참여자 모두는 멸균 스케일링 기구를 사용하여 상악 어금니(17번, 16번, 26번 및 27번 치아)의 협측 표면으로부터 수집된 치은연상 치태를 가졌다. 각 치아로부터의 치태 샘플을 별도의 멸균 튜브에 넣어, 참여자당 4개의 샘플을 제공하였다.

[0270] 각 참여자로부터 수집된 치태의 각 용기에 1-부분(one-part) 라벨을 부착하였다. 라벨은 하기 정보를 담고 있었다:

- [0271] · 참여자 번호
- [0272] · 처리 코드(A, B 또는 C)
- [0273] · 치아(17 번, 16번, 26번 또는 27번)
- [0274] · 처리 기간(레그 1, 레그 2 또는 레그 3)
- [0275] · 시간(0 또는 14일)

[0276] 각 참여자로부터의 4개의 샘플 각각에 대한 치태 질량을 기록하여 DNA 추출 절차(DNA 추출에 필요한 샘플 당 0.2 mg)를 표준화할 수 있도록 하였다. 균질화된 치태 샘플은 필요할 때까지 -80°C에서 보관 하였다.

[0277] **치태 미생물 분석**

[0278] 프리셀리스(Precellys) 균질기를 통한 세포의 기계적 파괴 및 파워라이저 파워소일 DNA 아이솔레이션 키트(PowerLyzer PowerSoil DNA Isolation kit)(MoBio)를 통한 게놈 DNA의 화학적 추출 및 정제의 조합을 사용하여 치태로부터 게놈 DNA를 추출하였다. 추출된 DNA의 정량을 큐빗 dsDNA 하이 센서티비티 어세이 키트(Qubit dsDNA High Sensitivity Assay kit)(ThermoFisher)를 사용하여 달성한 후, 16S 리보솜 RNA 유전자의 V4 가변 영역을 증폭하고 각 샘플로부터의 PCR 생성물을 개별적으로 바코드화하는 PCR 반응에서 5 ng DNA를 주형으로 사용하였다. 이어서 바코드화된 DNA를 이온 토렌트 퍼스널 게놈 머신(Ion Torrent Personal Genome machine)과 토렌트 스위트™ 소프트웨어(Torrent Suite™ Software)(ThermoFisher)를 사용하여 시퀀싱하였다.

[0279] 결과적인 16S 리보솜 RNA 유전자의 서열의 분석은 각 샘플에 존재하는 세균 개체군을 중 수준까지 확인가능하게 하였다. 토렌트 스위트™ 소프트웨어로 생성된 BAM 파일을 이온 토렌트로부터 로컬 이온 리포터(Ion Reporter) 서버로 전송하였고, 여기서 이온 리포터 소프트웨어 16S 메타게노믹스 워크플로우(Ion Reporter Software 16S metagenomics workflow)를 이용하여, 프리미엄 큐레이팅된(premium curated) MicroSEQ™ ID 16S rRNA 참조 데이터베이스와 큐레이팅된 그린젠스(Greengenes) 데이터베이스를 모두 사용하여 복합 다중세균 샘플에 존재하는 미생물을 속 또는 종 수준에서 확인하였다. 데이터를 마이크로소프트 엑셀에서 정렬하였다.

[0280] **통계 방법**

[0281] **표본 크기 결정**

[0282] 하기 표 1은 1.5%, 2.0%, 2.5% 및 3.0%의 스트렙토코커스 상귀니스의 존재비에서의 평균 차이, 3.5% 내지 5.5% 범위의 표준 편차 및 80%의 검정력에 대한 각 그룹에 대한 추정 표본 크기를 보여준다. 이는 양측 쌍 t-검정 및 $\alpha = 0.05$ 를 가정한다. 표본 크기 계산에 사용된 평균 및 표준 편차의 범위는 이전 파일럿 연구를 기반으로 하였다.

[0283] [표 1] 처리 그룹당 추정 표본 크기

평균 차이	표준 편차					
	3.0	3.5	4.0	4.5	5.0	5.5
1.5	34	45	58	73	90	108
2.0	20	27	34	42	52	62
2.5	14	18	23	28	34	40
3.0	10	13	16	20	24	29
3.5	8	10	13	16	19	22

[0284]

[0285] 표 2는 연구 추적 기간 동안 10%의 퍼센트 감소율을 허용하는 각 그룹에 대한 추정 크기를 보여준다.

[0286] [표 2] 처리 그룹당 추정 표본 크기

평균 차이	표준 편차					
	3.0	3.5	4.0	4.5	5.0	5.5
1.5	38	50	64	81	100	120
2.0	22	30	38	47	58	69
2.5	16	20	26	31	38	44
3.0	11	14	18	22	27	32
3.5	9	11	14	18	21	24

[0287]

[0288] 4.5%의 표준 편차 및 10%의 퍼센트 감소율을 가정하면, 18명의 참여자 표본을 모집하여 3.5%의 스트렙토코커스 상귀니스의 존재비에서의 평균 차이가 80%의 검정력으로 검출되도록 하였다.

[0289] 통계 일반 고려 사항

[0290] 무작위화 및 맹검

[0291] 2개의 추잉 검을 각각 코드로 라벨링된 것을 제외하고는 동일한 패키징으로 제공하였다. 추잉 검의 개별 조각은 유사한 외관을 가졌다. 코드는 모든 통계 분석이 완료될 때까지 공개되지 않았다.

[0292] 각 참여자가 참가 기준을 충족한 후 참여자에게 ID를 순차적으로 배정하였다.

[0293] 연구는 검사관-맹검이었다. 연구 전반에 걸쳐, 치태 샘플을 처리하는 치아 조사관 및 실험실 스태프는 참여자가 어떤 치료 아암에 할당되었는지 알지 못했다. 추잉 검이 동일한 코딩된 패키지로 제공되었기 때문에 참여자 및 연구 직원도 어떤 추잉 검이 할당되었는지 알지 못했다. 참여자가 1회 처리 기간 동안 검을 씹지 않은 경우, 참여자를 처리 할당에 대해 완전 맹검이 되게 하는 것은 불가능했다. 모든 참여자가 연구를 완료하였다.

[0294] **순응도 기준:** 순응도는 제품 사용에 관한 참여자의 일기 및 잔여 임상 공급품의 기록을 검토하여 판단하였다.

[0295] 인구 통계 및 기준선 특성의 통계적 분석

[0296] 1차 분석 세트는 유의한 프로토콜 위반없이 시험을 완료한 모든 참여자였다.

[0297] 모든 연속 변수 및 모든 순위 변수에 대한 빈도에 대해 기술적 통계(평균, 표준 편차 및 범위)를 계산하였다. 모든 통계적 시험은 양측이었고, $\alpha = 0.05$ 의 유의성 수준을 사용하였다. 통계 패키지 스타타(Stata)(미국 텍사스주 칼리지 스테이션 소재의 StataCorp LP) 통계 소프트웨어를 사용하여 모든 분석을 수행하였다.

[0298] 효능 데이터의 통계 분석

[0299] 각 샘플에 대해 생성된 개별 16S rDNA 서열을 사용하여 존재하는 미생물 계통을 분류하고(중 수준 분류군으로

그룹화됨) 각 분류군의 존재비를 결정하였다. 시간이 지남에 따른 세균 군집의 차이는 각 개체에 대한 상대적 분류군 존재비의 변화를 측정함으로써 결정되었다.

[0300] 이는 치태의 세균 조성에 대한 CPP-ACP의 영향의 비교를 가능하게 하였다. 각각의 개체로부터의 4개의 샘플은 치태의 세균 조성에서 대상체내 변동의 결정을 가능하게 하였다.

[0301] **결과**

[0302] 모든 대상체는 연구를 완료하였고 프로토콜에 순응하는 것으로 간주되었다. 위해 사건은 보고되지 않았다. CPP-ACP를 사용한 처리는 참여자의 치태 지수에서 유의한 변화를 가져오지 않았다(도 1). CPP-ACP는 치태 지수에 영향을 미치지 않았지만, 공생/유익 공생균의 비율을 촉진함으로써 실질적인 프리바이오틱 효과를 나타내는 세균 조성에 유의한 영향을 미쳤다.

[0303] 전체적으로, 300가지가 넘는 상이한 세균 분류군이 54개의 샘플로부터 확인되었다. 처리 그룹들에 걸쳐 치은연상 치태의 세균 조성을 조사한 결과, CPP-ACP 처리 레그를 무처리와 비교할 때 유의한 변화가 있었음이 명백하였다. 18.8 mg CPP-ACP는 하기 세균 분류군의 비율의 통계적으로 유의한 증가를 가져왔다: 코리네박테리움 듀럼 (80% 증가); 로티아 덴토카리오사(127% 증가); 스트렙토코커스 미티스(55% 증가) 및 스트렙토코커스 상귀니스 (112% 증가)(표 3). 이들 종은 모두 숙주에게 유익한 것으로 알려진 효소 시스템들[아르기닌 탈아민효소 및/또는 니트레이트 환원효소] 중 하나 또는 둘 모두를 갖기 때문에 유익한 공생균으로 현재 간주된다. 공생/유익 종의 이러한 유의한 증가는 56.4 mg CPP-ACP 투여량의 경우 증가가 유의하게 더 높았기 때문에 CPP-ACP 투여량과 관련이 있었다. 유익한 종의 증가는 병원성 종(병원균)의 비율의 수반되는 감소와 관련이 있었다. 유익한 공생균의 존재비의 이러한 증가는, 치은 지수의 유의한 CPP-ACP 투여량-관련 개선에 의해 입증된 바와 같이 치은 건강의 증가에서 또한 반영되었다(도 2).

[0304] **[표 3]** 18.8 mg CPP-ACP에 의해 유의하게 증가된 구강 종은 항상성을 촉진하는 아르기닌 탈아민효소 및 니트레이트 환원효소 시스템 중 하나 또는 둘 다를 갖는 그람-양성 공생체이다

속	종	아르기닌 탈아민효소	니트레이트 환원효소	상대적 존재비의 증가 %
코리네박테리움	듀럼	유(부분적)	유	80%(p<0.001)
로티아	덴토카리오사	무	유	127%(p<0.001)
스트렙토코커스	고르도니아/미티스	유	무	55%(p<0.05)
스트렙토코커스	상귀니스	유	무	112%(p<0.01)

[0305]

[0306] **[표 4]** 18.8 mg CPP-ACP에 의해 유의하게 감소된 구강 종은 세균 불균형과 관련된 그람-음성, 염증발생성 혐기성생물이다

속	종	아르기닌 탈아민효소	니트레이트 환원효소	상대적 존재비의 감소 %
렙토티리치아	와데이	무	무	91% (p<0.001)
렙토티리치아	샤하이	무	무	73% (p<0.01)
렙토티리치아	부칼리스	무	무	76% (p<0.05)
라우트로피아	미라빌리스	무	유	70%(p<0.05)

[0307]

[0308]

결론적으로, 이 무작위화된 대조 임상 연구는 CPP-ACP 처리가 건강-관련 공생균의 비율의 유의한 증가 및 CPP-ACP가 프리바이오틱임을 나타내는 구강 건강의 개선을 가져온다는 것을 보여주었다.

[0309]

실시예 2

[0310]

SnF₂는 복수미생물 모델에서 CPP-ACP 프리바이오틱스를 촉진한다

[0311]

다수종 구강 바이오필름 배양

[0312]

치은연상 치태를 모델링하기 위해, 6가지 대표적인 구강 세균 종인 스트렙토코커스 상귀니스(NCTC 7863), 스트렙토코커스 뮤탄스 잉브리트(*Streptococcus mutans* Ingbritt), 액티노마이세스 나에슬룬디이(NCTC 10301), 베일로넬라 파르볼라(ATCC 17745), 락토바실러스 카제이(NCDO 161) 및 푸소박테리움 뉴클레아툼(ATCC 108953)(표 5)을 일정-깊이의 필름 발효기(CDFF; 영국 소재의 카디프 유니버시티(Cardiff University))에서 인간 범랑질 기층 상에서 복수미생물 바이오필름으로 배양하였다. CDFF를 혐기성 조건 하에서 37°C 인큐베이터에 수용하였고, 이 조건은 1 L/h로 N₂ 중 5% CO₂의 일정한 흐름에 의해 유지되었다. CDFF에는 3 rpm의 일정한 속도로 회전하는 원형 플랫폼 상에 15개의 탈착가능한 폴리테트라플루오로에틸렌(PTFE) 팬이 들어 있었다. 바이오필름을 30 mL/h의 일정한 유속으로 인공 타액 배지(ASM, 2.5 g/L의 뮤신 타입 II(돼지, 위, Sigma), 2.0 g/L의 세균학적 펩톤(Oxoid), 2.0 g/L의 트립톤(Oxoid), 1.0 g/L의 효모 추출물(Oxoid), 0.35 g/L의 NaCl, 0.2 g/L의 KCl, 0.2 mg/L의 비타민 K, 1 mg/L의 헤민(haemin) 및 0.1 g/L의 시스테인 히드로클로라이드)를 사용하여 각각의 PTFE 팬에서 3개의 범랑질 블록(아래 참조) 상에서 성장시켰다. 접종 전에, CDFF 팬 표면을 10 mL/h의 유속으로 ASM으로 24시간 동안 컨디셔닝하였다(문헌[McBain et al (2003) J Appl Microbiol. 94(4):655-66]). 식이 당 섭취로 구강에서의 생체 내 세균 성장 조건을 모방하고 높은 우식유발 공격을 제공하기 위해, ASM 중의 1%(w/v) 수크로스 용액을 4 시간 간격으로 1일 4회 10분 동안 30 mL/h의 유속으로 CDFF 내로 펌핑하였다.

[0313] [표 5] 이 연구에 사용된 세균 균주, 접종물의 16S rRNA 유전자 카피 수 및 종 조성.

세균 균주 ^a	게놈 크기 (bp)	16S rRNA 유전자 카피 수 ^b	접종물 중의 세포 수 (x 10 ⁷) ^c
액티노마이세스 나에슬룬디이 NCTC 10301	3,091,654	2	9.90 ± 8.32
푸소박테리움 뉴클레아툼 종 폴리모르프(<i>polymorphum</i>) ATCC 10953	2,428,298	5	11.5 ± 8.79
락토바실러스 카제이 (NCDO 161)	2,851,896	5	5.10 ± 2.40
스트렙토코커스 뮤탄스 (잉브리트)	2,030,511	5	13.7 ± 5.77
스트렙토코커스 상귀니스 (NCTC 7863) ATCC 10556	2,303,750	5	21.7 ± 10.9
베일로넬라 파르블라 ATCC 17745	2,163,473	4	5.44 ± 3.08

[0314]

[0315] ^a 모든 균주는 멜버른 덴탈 스쿨의 오랄 헬스 코오퍼레이티브 리서치 센터(Oral Health Cooperative Research Centre)를 원천으로 한다

[0316] ^b 16S rRNA 유전자 카피 수는 본 발명자들의 실험실에서 진행된 게놈의 서열 분석에 의해 결정되었으며, 데이터는 제시되지 않는다.

[0317] ^c qPCR에 의해 결정되는 이 연구에서 사용된 접종물의 세포 수의 평균 및 표준 편차.

[0318] 3가지 처리를 복수미생물 바이오필름에 적용하였다: SnF₂로서의 220 ppm 플루오라이드와 NaF(SnF₂로 지칭됨)로서의 70 ppm 플루오라이드를 갖는 290 ppm 플루오라이드, 2% CPP-ACP 및 2% CPP-ACP-SnF₂. 이들 처리를 시험 용액이 ASM으로 대체된 대조군과 비교하였다. 각각의 처리는 30 mL/h의 유속으로 ASM 중의 시험 용액의 2회의 10분 펄스를 사용하여 적용하였다. 제1 펄스는 아침의 제1 수크로스 펄스 30분 전에 시작하였고, 제2 펄스는 그 날 최종 수크로스 펄스 3시간 30분 후에 시작하였다.

[0319] 접종 후 6, 12 및 19일째에, 4개의 팬을 무균적으로 CDFD로부터 분리하고 블랭크 멸균 팬으로 교체하였다. 팬으로부터의 법랑질 블록을 세균 계수 및 횡방향 현미경 촬영을 위해 분리하였다.

[0320] 법랑질 블록 준비

[0321] 유니버시티 오브 멜버른의 윤리 승인(HREC # 1237616) 하에 3백 6십개의 발치된 인간의 세 번째 대구치를 수득하였고, 이를 4.1 kGy의 감마 방사선에 노출하여 멸균시켰다. 법랑질 블록은 수냉식 다이아몬드 블레이드 톱(Minitom, Struers)을 사용하여 대략 6 x 3 x 3 mm 크기의 치아로부터 잘라 내고, 1200, 2400, 4000 그릿 랩핑 페이퍼(Struers)와 3 및 1 μm 다이아몬드 폴리싱 페이스트(Struers)와 함께 RotoPol/RotoForce 랩핑 기기를 사용하여 폴리싱하였다. 블록을 맞춤형 CDFD 팬에 100 μm의 깊이로 위치시키고, 황색 점착성 왁스(Kemdent)로 적소에 밀봉하고, 4.1 kGy 감마 방사선에 노출하여 멸균시켰다.

[0322] 샘플링

[0323] 부유성 및 느슨하게 부착된 세균 세포를 먼저 100 μL의 ASM으로 가볍게 세척하여 법랑질 블록으로부터 제거하였다. 각각의 블록 상의 바이오필름 세포를 수거하기 위해, 표면을 1 mL의 ASM을 사용하여 멸균 스크레이퍼로 긁어내었다. 바이오필름 세균 세포를 원심분리(10,000 g, 10분)에 의해 침강시키고, 상청액을 조심스럽게 디캔팅하고, 세포 펠렛을 DNA 추출에 필요할 때까지 -80°C에서 보관하였다. 이어서 법랑질 블록을 절편화 및 미세방사선 촬영에 사용하였다.

[0324] 바이오필름 샘플의 DNA 추출 및 시퀀싱

- [0325] 각 시점에 대해, Precellys® 비드 균질기(Bertin Technologies)를 사용하는 제조업체의 "배큘 프로토콜 (Vacuum Protocol)"에 따라 파워라이저 파워소일 DNA 아이솔레이션 키트(MoBio Laboratories)를 사용하여 8 내지 9개의 범랑질 블록으로부터 별도로 DNA를 추출하였다. -80℃에서 보관하기 전에 큐비트 dsDNA HS 어세이 키트 (Life Technologies)를 사용하여 샘플을 정량하였다.
- [0326] 이온 앰플리콘 라이브러리 프리퍼레이션 퓨전 메소드(Ion Amplicon Library Preparation Fusion Method)(Thermo Fisher Scientific)를 16S rRNA 유전자의 V4 영역의 증폭에 적합하도록 하였다. PCR은 5 ng의 DNA, 1X Q5 반응 완충액, 0.3 μM PAGE-정제 맞춤형 바코드화된 프라이머(Thermo Fisher Scientific), 0.2mM dNTP 및 1 유닛의 Q5 핫 스타트 하이-피델리티(Hot Start High-Fidelity) DNA 중합효소(Genesearch)를 함유하는 50 μL 반응 부피로 수행하였다. DNA를 변성시키기 위해 반응을 98℃에서 3분 동안 유지한 후, 98℃에서 10 초 동안, 48℃에서 10초 동안, 및 72℃에서 15초 동안의 17 사이클의 증폭을 수행하였다. 바코드 1 내지 62를 갖는 정방향-프라이머는 GA 스페이서 및 결합 영역 서열로서의 GTGCCAGCMGCCGCGGT를 사용하여 퓨전 메소드에 대해 명시된 바와 같이 설계하였다. 역방향 어댑터, TC 스페이서 및 GGACTACHVGGGTWCTCTAA의 결합 영역 서열로 이루어진 단일 역방향-프라이머를 사용하였다.
- [0327] 앰플리콘 라이브러리의 멀티플렉스 시퀀싱은 Ion OneTouch™ 2200 키트, 및 535 사이클로 확장된 Ion PGM™ 시퀀싱 200 키트 v2 화학(Thermo Fisher Scientific)을 이용하는 이온 토렌트 퍼스널 게놈 머신을 사용하여 수행하였다.
- [0328] 시퀀싱 데이터는 6 종 각각에 대한 공지된 16S V4 서열에 대한 맵핑에 의해 이온 토렌트 소프트웨어로 분석하였다. 시퀀싱 깊이의 차이를 조정하기 위해, 총 판독 수를 가장 낮게 발생하는 판독 수로 다운 샘플링하여 정규화하였다.
- [0329] 공초점 레이저 주사 현미경검사
- [0330] 부착된 복수미생물 바이오필름을 갖는 범랑질 기층을 PBS에 침지시켜 배양 배지 및 부착되지 않은 세균 세포를 행구어 낸 후, 실온에서 30분 고정 동안 4% 파라포름알데히드에 침지시켰다. 이어서, 파라포름알데히드를 제거하기 위해 PBS에 침지시켰다. 원위치 하이브리드화를 위한 준비에서, 바이오 필름을 0.02% 암모늄 퍼셀레이트 및 0.8% N,N,N',N'- 테트라메틸에틸렌디아민(TEMED)과 함께 20% 아크릴아미드에 포매한 후, 4℃에서 PBS 중에 보관하였다.
- [0331] 복수미생물 바이오필름은 하기 맞춤형 중-특이적 프로브를 사용하여 형광 원위치 하이브리드화(FISH)에 적용하였다. 5' 검출된 스트렙토코커스 뮤탄스에서 Alexa594로 표지된 프로브 서열 ACT CCA GAC TTT CCT GAC, 5' 검출된 V. 디스 파르(*dispar*)에서 Alexa405로 표지된 AGA CGC AAT CCC CTC CTT, 5' 검출된 락토바실러스 카제이에서 Alexa647로 표지된 ACT CTG CCG ACC ATT CTT CT, 5' 검출된 스트렙토코커스 상귀니스에서 Alexa488로 표지된 AGA GAT AGA GTT TCT CTT CGG, 5' 검출된 액티노마이세스 나에슬룬다에서 Alexa405로 표지된 CGG TTA TCC AGA AGA AGG GG, 및 5' 검출된 푸소박테리움 뉴클레아툼에서 Alexa647로 표지된 CTA ATG GGA CGC AAA GCT CTC(오스트레일리아 소재의 Thermofisher). 바이오필름을 전술한 바와 같이 각 프로브 및 10% 포름아미드를 함유하는 하이브리드화 완충액과 함께 46℃에서 2.5시간 동안 인큐베이션하였다(문헌[Zainal-Abidin et al (2012). J Proteome Res. 11(9):4449-4464]). 이어서 하이브리드화된 바이오필름을 세척 완충액(0.45 M NaCl, 20mM Tris-HCl, 5 mM EDTA, 0.01% SDS)에 48℃에서 25분 동안 침지시키고 영상화를 위해 준비하였다. 바이오필름은 이전과 같이(문헌[Zainal-Abidin et al (2012). J Proteome Res. 11(9):4449-4464]) 자이스 공초점 레이저 주사 현미경(Zeiss Confocal Laser Scanning Microscope) 상에서 시각화하였고, COMSTAT 소프트웨어로 분석하여 생물측정용 파라미터를 결정하였다.
- [0332] 주사 전자 현미경검사
- [0333] 바이오필름 샘플을 전술한 바와 같이(상기 문헌[Zainal-Abidin et al 2012]; 문헌[Zhu et al (2013) PLoS One. 8(8):e71727]) 주사 전자 현미경검사 분석을 위해 준비하였다.
- [0334] 횡방향 미세방사선 촬영
- [0335] 횡방향 미세방사선 촬영은 본질적으로 전술한 바와 같이(문헌[Shen et al 2011]) 수행하였다. 병소의 방사선 촬영 영상 및 그 옆의 무손상 범랑질을 각각 6회 스캔하고 평균을 구하여 탈광화된 밀도측정용 프로파일을 제공하고 대조 무손상-범랑질 밀도측정용 프로파일 및 부피% 광물(vol% min) 함량 프로파일을 계산하였다. 병소 깊이 (μm)는 광물 함량이 무손상 범랑질 값의 95%에 도달하는 지점까지의 거리로 결정되었다. ΔZd로 표현된 통합 광

물 손실(IML)은 vol% min. μm 의 무손상-범랑질 밀도측정용 프로파일과 탈광화된 범랑질 밀도측정용 프로파일 사이의 면적으로서 사다리꼴 적분에 의해 계산되었다.

[0336] *바이오필름 이온 분석*

[0337] 복수미생물 바이오필름 샘플의 칼슘, 인 및 주석 함량을 본질적으로 전술한 바와 같이(문헌[Dashper et al 2005]) 유도-결합 질량 분석법에 의해 결정하였다.

[0338] *통계 분석*

[0339] *세균 종 및 병소 파라미터 비교.* Q-Q 플롯을 사용하여 잔차의 정규성을 확인하고, 분산의 정규성과 균일성에 대한 샤피로-윌크(Shapiro-Wilk) 검정을 레빈(Levene)의 검정을 사용하여 시험하였다. Minitab 버전 17 소프트웨어(미국 펜실베이니아주 주립대학 소재의 Minitab Inc.)를 사용한 Box-Cox 변환 후에도 세균 종 조성에 대한 잔차가 정규 분포에 근접하지 않기 때문에, 종 비율의 차이는 크루스칼-윌리스(Kruskal-Wallis) 검정을 이용하여 2개 초과 샘플에 대해 분석하였다. 본페로니(Bonferroni) 보정을 사용한 사후 윌콕슨 랭크 썸(Wilcoxon Rank Sum) 검정을 이용하여 처리들 사이의 차이를 측정하였다(문헌[Sokal and Rohlf (1969). Biometry San Francisco: WH Freeman and Co.]). 병소 파라미터 차이에 대해, 6일째의 LD를 일원 분산 분석을 사용하여 Box-Cox 변환된 데이터 상에서 측정하였고, 사후 투키(Tukey) 검정을 이용하여 쌍별 차이를 측정하였다. 6일째의 ΔZ_d 값 및 12일 및 19일째의 LD 및 ΔZ_d 값 모두의 차이를 본페로니 보정과 함께 크루스칼-윌리스 검정 및 사후 윌콕슨 랭크 썸 검정을 이용하여 측정하였다. 모든 통계 시험은 SPPS 버전 22 소프트웨어(미국 일리노이주 소재의 IBM SPSS Inc.)를 사용하여 수행하였다. 모든 경우에, α 는 0.05로 설정되었다.

[0340] **결과**

[0341] *복수미생물 바이오필름 모델의 개발*

[0342] 모든 6가지 세균 종 중 많은 수가 16s rRNA 유전자 분석에 의해 결정된 바와 같이 복수미생물 집중물에 존재하였다(표 5). 복수미생물 바이오필름은 수크로스의 빈번한 노출과 함께 인공 타액 배지(ASM)의 존재 하에 성장할 때 접종 후 일정-깊이의 필름 발효기(CDFE)의 무손상 인간 범랑질 기층 상에서 신속히 확립되었다. 푸소박테리움 뉴클레아툼은 존재하는 총 세균의 0.01%를 초과하여 존재하지 않았지만, 6가지 세균 종 모두는 모든 시점에서 대조군의 4개의 생물학적 복제물 모두의 복수미생물 바이오필름에서 검출가능하였다. 액티노마이세스 나에슬룬디이는 6일째의 2% 미만에서 19일째의 총 세균의 18% 초과로 시간이 지남에 따라 증가하였다(도 3). 락토바실러스 카제이의 비율은 실험 과정에 걸쳐 급격히 증가했으며 19일째까지 총 세균 개체군의 평균 16%로 존재하였다. 스트렙토코커스 상귀니스의 비율은 6 일째의 총 바이오필름 세균의 36%에서 19일째까지 11% 미만으로 감소하였다. 시간이 지남에 따라 스트렙토코커스 뮤탄스의 비율에는 분명한 경향이 없었으며, 이 종은 상대적으로 안정하게 유지되었을 가능성이 있다. 스트렙토코커스 뮤탄스는 바이오필름에서 가장 풍부한 종으로 총 세균 개체군의 48 내지 64%를 차지하였다(도 3).

[0343] 초기에 무손상인 인간 범랑질 기층의 탈광화는 범랑질 블록의 수크로스 펄스된 복수미생물 바이오필름으로의 노출에 의해 생성되었다. 온전한 표면층을 유지하고 생체 내에서 보이는 초기 우식 병소와 관련하여 유사한 범랑질 병소가 생성되었다(도 4). 복수미생물 바이오필름은 주사 전자 현미경검사에 의해 영상화될 때 치은연상 치태와 유사한 구조를 또한 가졌다(도 4). 병소 형성은 6일째부터 19일째까지의 광물 손실의 평균 일정 속도가 225.1 vol% min. μm /일인 초기 지연기 후에 선형 방식으로 진행되었다(도 4). 19일째의 평균 병소 깊이는 87.1 \pm 8.4 μm 이고 평균 통합 광물 손실(ΔZ_d)은 3575.6 \pm 562.0 vol% min. μm 였다(표 6).

[0344] **[표 6] 복수미생물 바이오필름 우식 모델의 범랑질 기층에 형성된 표면하 병소의 통합 광물 손실(ΔZ_d) 및 병소 깊이(LD)에 대한 SnF₂, CPP-ACP 및 CPP-ACP/SnF₂의 영향.**

그룹	6일째		12일째		19일째	
	ΔZd (vol%min. μm)	LD (μm)	ΔZd (vol%min. μm)	LD (μm)	ΔZd (vol%min. μm)	LD (μm)
대조군	641.5 \pm 139.0 ^a	18.0 \pm 3.0 ^{ab}	2155.2 \pm 407.2 ^{abc}	49.9 \pm 8.0 ^{abc}	3575.6 \pm 562.0 ^{abc}	87.1 \pm 8.4 ^{abc}
CPP-ACP	572.9 \pm 97.80	15.0 \pm 2.1 ^a	1075.3 \pm 148.0 ^{ad}	26.3 \pm 4.4 ^{ade}	2105.4 \pm 346.2 ^{bd}	52.3 \pm 3.2 ^{ad}
SnF ₂	636.7 \pm 129.4	17.6 \pm 1.2 ^c	1352.1 \pm 147.3 ^{bde}	37.1 \pm 5.3 ^{bdf}	2096.3 \pm 66.7 ^{ae}	46.1 \pm 4.7 ^{bc}
CPP-ACP + SnF ₂	552.6 \pm 109.2 ^a	14.3 \pm 2.6 ^{bc}	1091.3 \pm 138.2 ^{ce}	28.9 \pm 1.9 ^{cef}	1395.5 \pm 263.2 ^{cde}	38.0 \pm 3.4 ^{cde}

[0345]

[0346]

[0347]

[0348]

[0349]

[0350]

[0351]

[0352]

[0353]

6일째: LD 컬럼 내의 동일한 위치자는 유의한 차이를 나타내고; (^a p < 0.05; ^b p < 0.001): ΔZd 컬럼 내의 동일한 위치자는 유의한 차이를 나타낸다(^a p < 0.05). 모든 다른 차이는 유의하지 않다(p > 0.05).

12일째: 컬럼 내의 동일한 위치자는 유의한 차이를 나타낸다. LD - 모든 차이는 유의하게 상이하다(p < 0.05). ΔZd - 모든 차이는 CPP-ACP와 CPP-ACP+SnF₂ 사이(p > 0.05)를 제외하고는 유의하게 상이하함(p < 0.05).

19일째: 컬럼 내의 동일한 위치자는 유의한 차이를 나타낸다 - LD 및 ΔZd - 모든 차이는 SnF₂와 CPP-ACP 사이(p > 0.05)를 제외하고는 유의하게 상이하함(p < 0.05).

복수미생물 바이오필름의 조성에 대한 SnF₂와 CPP-ACP의 영향

SnF₂에 의한 1일 2회 복수미생물 바이오필름의 처리는, 19일째에 대조군에 비해 액티노마이세스 나에슬룬디의 존재비를 유의하게 감소시키고 스트렙토코커스 상귀니스의 존재비를 증가시켰다(도 5, 표 7). CPP-ACP에 의한 1일 2회 복수미생물 바이오필름의 처리는, 특히 접종 후 19일째까지, 복수미생물 바이오필름의 조성에 더 유의한 변화를 가져왔다. 스트렙토코커스 뮤탄스와 베일로넬라 파르볼라 비율은 상대적으로 일정하게 유지되었지만, 락토바실러스 카제이는 급격히 감소했고, 스트렙토코커스 상귀니스와 푸소박테리움 뉴클레아툼 둘 모두는 대조군과 비교하여 유의하게 증가하였다(도 5). 상대적 존재비의 가장 큰 변화는 락토바실러스 카제이에서의 일관된 >95% 감소인 반면, 푸소박테리움 뉴클레아툼은 19일째에 355%의 가장 큰 평균 증가를 보여주었다(도 5b, 표 7). CPP-ACP와 SnF₂의 조합은 복수미생물 바이오필름의 세균 조성에 대해 더욱 현저한 효과를 가져왔다(도 5 및 표 7). 산발생성 및 내산성 종인 스트렙토코커스 뮤탄스, 액티노마이세스 나에슬룬디 및 락토바실러스 카제이뿐만 아니라 베일로넬라 파르볼라의 주목할 만한 감소가 있었다. 산-민감성 종인 푸소박테리움 뉴클레아툼은 총 세균의 34%로 급격히 증가하여 복수미생물 바이오필름에서 두 번째로 가장 풍부한 종이 되었고, 스트렙토코커스 상귀니스도 존재비가 50% 증가하였다. 처리된 바이오필름에서 6가지 세균 중 모두가 항상 검출가능하였다. 4가지 세균 중에 대한 특정 염료를 사용한 CPP-ACP/SnF₂ 처리된 복수미생물 바이오필름의 공 초점 레이저 주사 현미경검사는 균집의 주요 구성 요소로서의 푸소박테리움 뉴클레아툼의 출현을 확인하였다(도 5).

[표 7] 바이오필름 내 총 세균의 백분율로서 세균 종 조성에 대한 4 가지 처리의 영향.

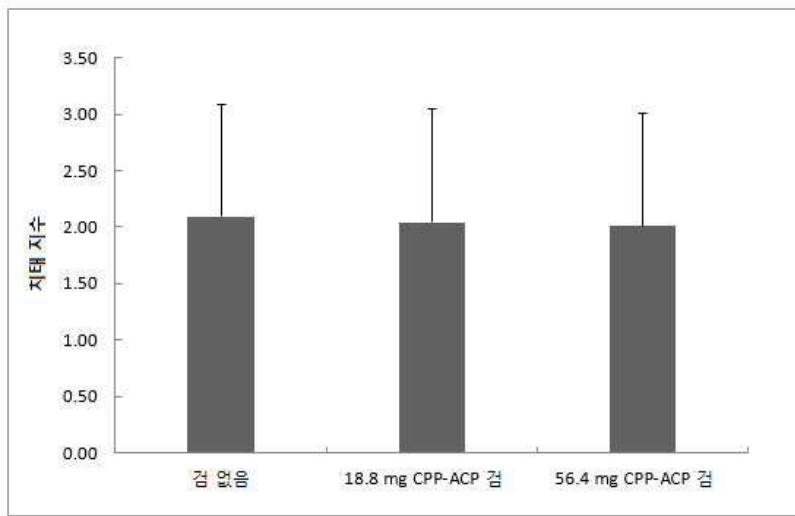
처리	A.나에슬룬디	F.뉴클레아툼	L.카제이	S.뮤탄스	S.상귀니스	V.파르볼라
대조군	18.11 \pm 8.96 ^{*a}	0.01 \pm 0.01 ^{ab}	16.21 \pm 13.64 ^{ab}	48.56 \pm 15.23	10.37 \pm 5.79 ^{ab}	6.75 \pm 4.12 ^a
SnF ₂ /NaF	5.54 \pm 1.74 ^{abc}	0.02 \pm 0.01 ^{cd}	10.67 \pm 6.92 ^{cd}	59.82 \pm 4.59 ^a	17.47 \pm 3.44 ^a	6.50 \pm 1.48 ^b
CPP-ACP	11.93 \pm 2.34 ^b	2.43 \pm 1.21 ^{ace}	0.38 \pm 0.23 ^{ac}	58.70 \pm 5.47 ^b	19.85 \pm 2.86 ^{bc}	6.71 \pm 0.89 ^c
CPP-ACP+ SnF ₂ /NaF	9.76 \pm 2.01 ^c	34.13 \pm 4.88 ^{bcd}	0.18 \pm 0.07 ^{bd}	37.95 \pm 2.64 ^{ab}	15.61 \pm 1.76 ^c	2.37 \pm 0.45 ^{abc}
전체 p-값	< 0.001	< 0.001	< 0.001	0.004	< 0.001	0.019

* 평균 \pm 표준 편차. 19일째의 4가지 처리에 노출된 복수미생물 바이오필름에서의 세균 종의 비율.

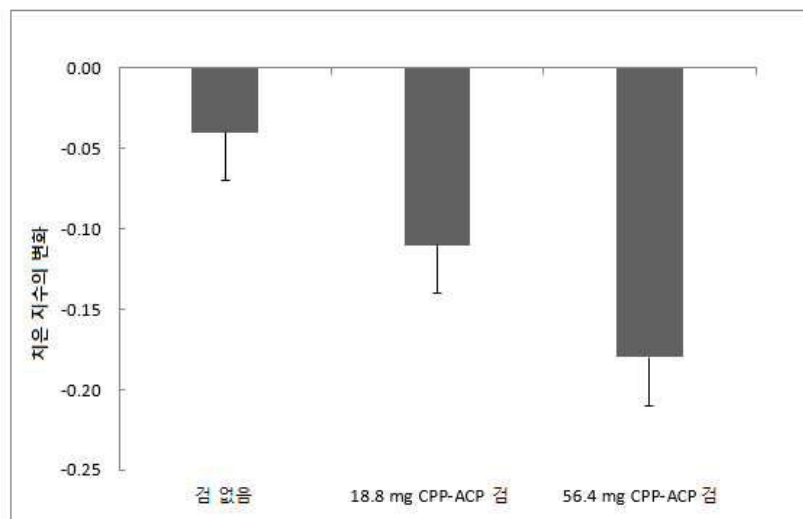
- [0354] ^{abcde} 컬럼 내의 동일한 위치자는 유의한 차이를 나타낸다($p < 0.05$). $n = 5$ 내지 21.
- [0355] 크러스칼-윌리스 검정으로 수행한 처리들에 걸친 모든 비교(전체 p -값 참조)와 처리들 간의 쌍별 차이는 본페로니 보정을 사용한 사후 윌콕슨 랭크 검정을 이용하여 측정하였다.
- [0356] **법랑질 탈광화에 대한 SnF₂ 및 CPP-ACP 제제의 영향**
- [0357] SnF₂에 의한 복수미생물 바이오필름의 처리는 6일째와 19일째 사이에 112.1 vol% min./mm/일로의 탈광화율의 유의한 50.2% 감소를 가져왔다(표 6). 이 감소는, 동일한 기간에 걸쳐 탈광화율의 50.2% 감소(112.1 vol% min./mm/일)를 또한 가져온 CPP-ACP 처리에서 보이는 것과 통계적으로 상이하지 않았다. 그러나, 64.1 vol% min./mm/일로의 탈광화율의 감소는 조합된 SnF₂/CPP-ACP 처리의 경우 유의하게 더 높았다(72%)(표 6). 바이오필름의 ICP-MS 분석은 CPP-ACP가 SnF₂와 함께 사용될 때 칼슘의 4배 증가 및 인의 3배 증가를 보여주었다. 흥미롭게도 SnF₂ 처리는 대조군에 비해 칼슘 및 인 모두의 2배 증가를 가져왔다. 제1 주석 농도는 SnF₂ 제제 및 CPP-ACP-SnF₂ 처리 둘 모두 동안 1.0 nmol/mg 바이오필름 습윤 중량에서 피크를 이루었다. 그러나, 이 농도는 CPP-ACP-SnF₂ 처리로 더 이르게 도달되었다.
- [0358] **토의**
- [0359] 1일당 4회 펄스의 수크로스에 의해 CDF에서 생성된 6종의 세균 바이오필름 군집은 더 많은 산발생 및 내산성 종이 우세하였고, 이에 따라 19일째에 우식유발 종인 스트렙토코커스 뮤탄스, 액티노마이세스 나에슬룬디이 및 락토바실러스 카제이가 복수 미생물 바이오필름의 85%를 함께 구성하였다. 이 비율은 6일째의 55%로부터 증가한 것이었다. 대조 바이오필름에서 액티노마이세스 나에슬룬디이와 락토바실러스 카제이의 비율만을 조사했을 때, 6일째부터 19일째까지 총 세균 세포의 2.5%로부터 34%로의 증가가 있었다(도 3). 이것은 고도로 산성이고 우식 유발성인 환경을 나타내며, 이는 호중구 종인 푸소박테리움 뉴클레아툼의 낮은 수준 및 이 모델에서의 빠르고 일정하고 재현가능한 탈광화율과 일치한다(도 4).
- [0360] 모델의 재현성을 확립한 후, SnF₂(220 ppm F): NaF(70 ppm F)의 혼합물로서의 290 ppm 플루오라이드의 1일 2회 첨가의 효과를 연구하였으며, 이는 SnF₂/NaF를 사용한 현재의 1450 ppm F 치약의 타액 중의 5배 희석을 나타내도록 선택되었다. 연구에서, SnF₂ 처리 동안 복수미생물 바이오필름에서의 상대적 존재비 면에서 액티노마이세스 나에슬룬디이는 유의하게 감소하였고 스트렙토코커스 상귀니스는 유의하게 증가하였다. Sn은 복수미생물 바이오필름에서 119 ppm의 농도까지 측정되었다. SnF₂는 이 연구에서 1일 2회 노출의 19일에 걸쳐 법랑질 탈광화율을 50% 감소시켰고, 주요 메커니즘은 F 이온 촉진 재광화의 작용과 관련이 있는 것으로 보인다.
- [0361] CPP-ACP 첨가는 탈광화율의 유의한 50% 감소를 가져왔을 뿐만 아니라, 고도로 산발생성인 락토바실러스 카제이의 출현을 또한 억제하였다. 또한, 산-민감성이고 유익한 공생균인 푸소박테리움 뉴클레아툼과 스트렙토코커스 상귀니스의 존재비의 재현가능한 증가가 있었다(도 5, 표 7). 이는 CPP-ACP가 이 모델에서 바이오필름 발생에 대해 프리바이오틱 효과를 가졌음을 나타낸다.
- [0362] CPP-ACP 및 SnF₂에 의한 복수미생물 바이오필름의 세균 구성에 대한 향상된 프리바이오틱 효과가 존재비가 감소하는 3가지 산발생성이고 내산성인 종 모두와 관련하여 주목되었다. 해당작용의 억제로 인한 락테이트의 감소를 나타낼 수 있는 베일로넬라 파르불라가 또한 감소하였고, 푸소박테리움 뉴클레아툼은 바이오필름의 주요 구성 요소가 되었다. 이러한 변화는 법랑질 탈광화율의 매우 유의한 72% 억제와 관련이 있었으며, 이는 구강 건강의 유의한 개선으로 해석될 것이다. 프리바이오틱을 촉진시키는 데 있어서 SnF₂ 및 CPP-ACP의 상가적 효과는 실시예 3에서 입증된 바와 같이 CPP-ACP를 가교 결합시키고 프리바이오틱을 복수미생물 바이오필름 및 구강내/치아 표면에 더 잘 전달하는 제1 주석 이온(Sn²⁺)의 능력에 기인하였다.
- [0363] 본 명세서에 개시되고 정의된 발명은 언급되거나 본문 또는 도면으로부터 명백한 개별 특징 중 2가지 이상의 모든 대안적인 조합까지 연장됨이 이해될 것이다. 이러한 상이한 조합들 전부는 본 발명의 다양한 대안적인 측면을 구성한다.

도면

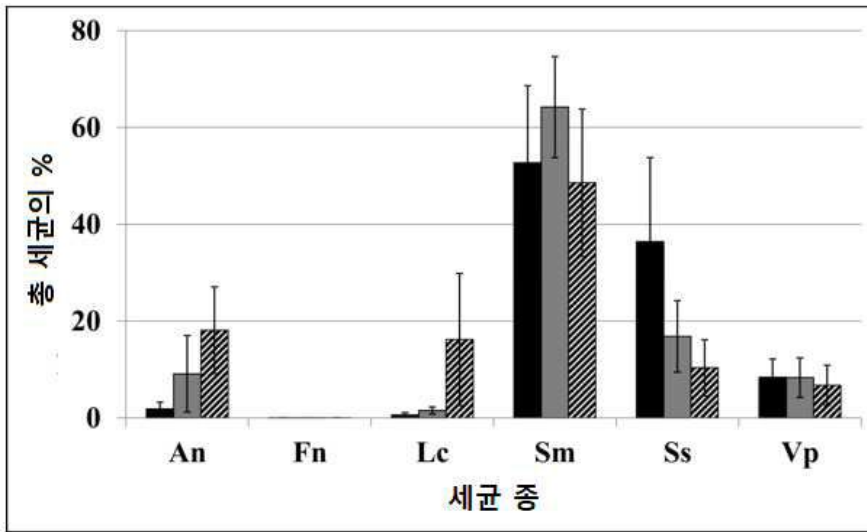
도면1



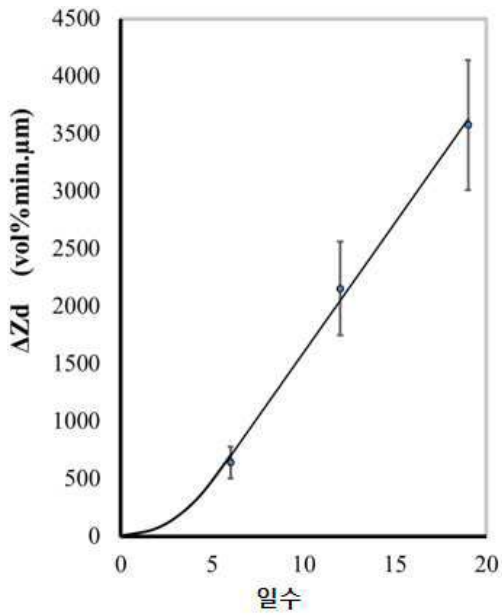
도면2



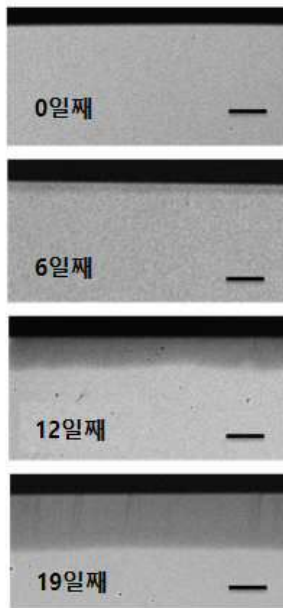
도면3



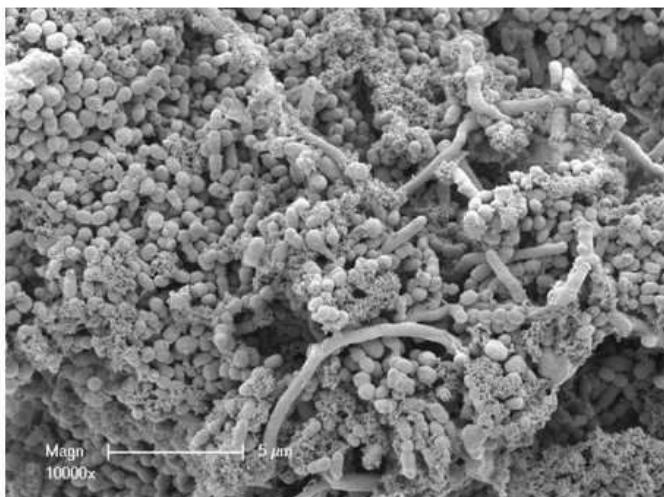
도면4a



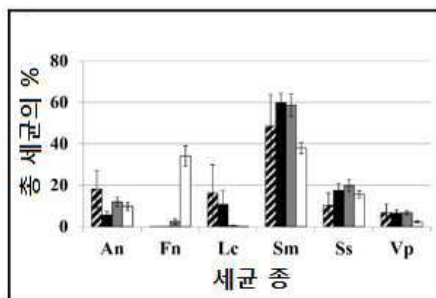
도면4b



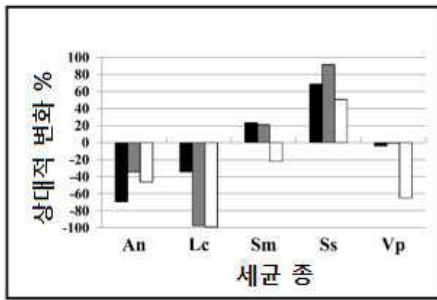
도면4c



도면5a



도면5b



도면5c

