명세서

발명의 명칭: 상아질 지각과민증 완화를 위한 구강 청결용 조성물

기술분야

[1] 본 발명은 구강 청결용 조성물에 관한 것으로, 보다 구체적으로 본 발명은 치아를 구성하는 상아질 결손부의 생리적 재광화를 유도하여 지각과민증을 방지 또는 완화하기 위한 구강 청결용 조성물에 대한 것이다.

배경기술

[2] 흔히 '시린이'라 불리우는 상아질 지각과민증은 성인 인구의 8%에서 57%가 경험하는 흔한 증상이다. 특히 우리나라에서 가장 많이 발생하는 질환인 치주질환의 경우 환자들의 72.5%에서 98%가 시린이로 고통 받고 있다(출처: 국가건강정보포털 의학정보; http://health.cdc.go.kr/health/Main.do).

[3] 상아질 지각과민증은 상아세관이 외부의 모든 자극을 그대로 치수내 신경으로 전달하여 똑같은 자극에 대해서도 평소보다 민감하게 반응하게 함으로써 유발되는 통증으로 정의될 수 있다. 상아질 자체에는 신경이 없지만 우리가 이가 시리다고 느끼는 것은 찬 온도자극이 상아세관을 거쳐 치수 내부의 신경까지 전달되기 때문이다.

[4] 치아의 가장 많은 부분을 차지하는 상아질에는 치수에서부터 법랑질까지 이어지는 상아세관들이 존재한다. 이 관의 내부는 액체로 차 있으며 치수쪽으로 갈수록 직경이 커지고 밀집된 구조를 갖는데, 이러한 구조적 특징 때문에 외부 자극이 내부의 치수 신경으로 빠르게 전달될 수 있다. 외부와 접한 상아질이 손상되어 상아세관이 외부와 접하는 면적이 넓어지면 똑같은 자극에 대해서도 평소보다 민감하게 반응하게 되는 원인이 될 수 있다.

[5] 현재 시린이를 치료하기 위한 접근 방법은 크게 작용원리에 따라 두 종류로 나뉘는데 하나는 통증을 전달하는 신경의 신호전달을 방해하는 것이고, 다른 하나는 노출된 상아세관을 막아 주어 그 증상을 완화 시키는 방법이다.

[6] 우선, 통증을 전달하는 신경의 신호전달을 방해하기 위한 방법에 제이인산칼륨염(K_2HPO_4) 성분이 많이 사용되고 있다. 그러나 제이인산칼륨염은 통증차단의 효과가 낮을 뿐 아니라 계속적으로 반복해서 사용해야 하며, 저작과정에서의 씹는 감각을 제한하므로 효율적인 치료방법으로 보기 어렵다.

[7] 다음으로, 상아세관을 봉쇄하기 위한 방법을 위하여 칼슘 포스페이트($CaHPO_4$), 불소(fluorine), 옥살레이트(oxalate), 아미노산인 알지닌(arginine)과 칼슘 카보네이트($CaCO_3$)등이 사용되고 있다. 그러나 상아세관 봉쇄 방법도 상아질과는 다른 이질적 물질을 이용하게 되므로 주변 경계부위에 틈이 생기거나 또는 봉쇄부로부터 이탈하여 다시 신경이 노출되어 시린 증상이 재발하게 된다. 현재 상아질 지각과민증(시린이) 완화를 위한 구강청결제는 대부분 불소가 함유된 제품이 많은데, 불소는 치아를 코팅하고, 타액내에

존재하는 칼슘 성분과 결합력이 강하여 노출된 상아세관을 봉쇄함으로써 시린 증상을 완화 시키는 효과를 가진다고 알려져 있다. 그러나 불소는 장기간 사용하였을 때 인체 면역체계를 손상시키거나, 관절염, 요통, 골다공증 등을 유발할 수 있는 부작용이 있다고 알려져 있다.

발명의 상세한 설명

기술적 과제

[8] 본 발명은 상아질의 생리적인 재광화(remineralization)에 의하여 노출된 상아세관의 결손부를 폐쇄함으로써 지각 과민증을 방지 또는 완화하는 펩타이드(peptide)를 포함한 구강 청결용 조성물을 제공하는 것을 목적으로 한다.

[9] 본 발명의 목적은 이상에서 언급한 것으로 제한되지 않으며, 언급되지 않은 또 다른 목적들은 아래의 기재로부터 본 발명이 속하는 기술 분야의 통상의 지식을 가진 자에게 명확하게 이해될 수 있을 것이다.

과제 해결 수단

[10] 상기 기술적 과제를 해결하기 위한 본 발명의 일양상에 따른 상아질 지각과민증 완화를 위한 구강 청결용 조성물은 하기 일반식 1의 아미노산 서열로 구성된 펩타이드를 포함하는 상아질 지각과민증 완화를 위한 구강 청결용 조성물을 제공한다.

[11] K-Y-R1-R2-R3-R4-R5-R6-R7-R8 (일반식 1)

[12] 상기 일반식 1에서,

[13] R1은 아르기닌(R), 리신(K) 또는 글루타민(Q)이고;

[14] R2는 아르기닌(R) 또는 글루타민(Q)이며;

[15] R3, R4 및 R5는 각각 아르기닌(R) 또는 리신(K)이고;

[16] R6는 아스파라긴(N) 또는 세린(S)이며; 및

[17] R7 및 R8은 리신(K) 또는 타이로신(Y)임.

[18] 여기서, 상기 펩타이드는 서열번호 1 내지 96 중 어느 하나의 아미노산 서열로 구성된 것일 수 있다.

[19] 여기서, 상기 조성물 100 중량부에 대하여 상기 펩타이드 0.00005-0.00015 중량부가 포함될 수 있다.

[20] 여기서, 상기 조성물 100 중량부에 대하여에 대하여 염화세틸피리디늄 0.0545-0.0555 중량부가 포함될 수 있다.

[21] 예시적인 실시예에서, 구강 청결용 조성물은 상기 조성물 100 중량부에 대하여 정제수 85-87 중량부, 계면활성제 1.7-2.9 중량부, 및 시트르산수화물 0.0045-0.0055 중량부를 포함할 수 있다.

[22] 예시적인 실시예에서, 상기 계면활성제는 폴록사머 및/또는 폴리소르베이트20일 수 있다.

[23] 예시적인 실시예에서, 상기 계면활성제는 상기 폴록사머407 12-14 중량%, 폴리소르베이트20 86-88 중량%를 포함할 수 있다.

[24] 예시적인 실시예에서, 구강 청결용 조성물은 상기 조성물 100중량부에 대하여 습윤제 9-11 중량부를 포함할 수 있다.

[25] 예시적인 실시예에서, 상기 습윤제는 D-소르비톨액 및/또는 농글리세린일 수 있다.

[26] 예시적인 실시예에서, 상기 습윤제는 상기 D-소르비톨액 45-55 중량%, 상기 농글리세린 45-55 중량%를 포함할 수 있다.

발명의 효과

[27] 본 발명은 상아질의 생리적인 재광화에 의하여 노출된 상아세관의 결손부를 폐쇄함으로써 지각 과민증을 방지 또는 완화하는 펩타이드를 포함한 구강 청결용 조성물을 제공할 수 있다.

[28] 본 발명의 효과는 이상에서 언급한 것으로 제한되지 않으며, 언급되지 않은 또 다른 효과들은 아래의 기재로부터 본 발명이 속하는 기술 분야의 통상의 지식을 가진 자에게 명확하게 이해될 수 있을 것이다.

도면의 간단한 설명

[29] 도 1a는 본 발명의 실시예에 따른 상아질 지각과민증 완화를 위한 구강 청결용 조성물에 포함된 펩타이드가 상아모세포 분화 마커 유전자인 DSPP 발현에 미치는 영향을 그룹별로 비교한 결과를 나타내는 그래프이다.

[30] 도 1b는 본 발명의 실시예에 따른 상아질 지각과민증 완화를 위한 구강 청결용 조성물에 포함된 펩타이드가 처리된 MDPC-23 세포에서 상아모세포 분화마커인 DSPP 유전자의 발현수준을 비교한 결과를 나타내는 그래프이다.

[31] 도 1c는 본 발명의 실시예에 따른 상아질 지각과민증 완화를 위한 구강 청결용 조성물에 포함된 그룹 11 및 12의 펩타이드가 처리된 MDPC-23 세포에서 상아모세포 분화마커 유전자인 DSPP, Dmp1 및 Nestin 유전자의 발현수준을 비교한 결과를 나타내는 그래프이다.

[32] 도 1d는 본 발명의 실시예에 따른 상아질 지각과민증 완화를 위한 구강 청결용 조성물에 포함된 펩타이드의 치수조직 세포에 대한 세포독성을 평가한 결과를 나타내는 그래프이다.

[33] 도 2는 본 발명의 실시예에 따른 상아질 지각과민증 완화를 위한 구강 청결용 조성물의 상아세관 투과도를 나타낸 것으로, 형광염색 시약(Rhodamine B)을 혼합하여 상아세관이 노출된 치아에 1분간 처리한 후 형광현미경으로 관찰한 결과를 도시한 것이다.

[34] 도 3은 비교예 3-1 및 비교예 3-2와 본 발명의 실시예에 따른 상아질 지각과민증 완화를 위한 구강 청결용 조성물의 상아세관 봉쇄능을 비교한 결과를 도시한 것이다.

[35] A-C는 정제수로만 처리한의 상아질의 상아세관을 도시한 것(비교예 3-1)이고, D-F는 본 발명의 실시예에 따른 상아질 지각과민증 완화를 위한 구강 청결용 조성물의 구성 중 펩타이드가 미함유된 구강 청결용 조성물과 반응한

상아세관을 도시한 것(비교예 3-2)이고, G-I는 본 발명의 실시예에 따른 상아질 지각과민증 완화를 위한 구강 청결용 조성물과 반응한 상아세관을 도시한 것이다(크기바: A, D, G, 100 ㎛; B, E, H, 20 ㎛; C, F, I, 10 ㎛). 각각의 경우 상아세관이 노출된 상아질 시편에 1일, 1번, 1분간 반응 시킨 후 인공타액에 보관하였으며, 이 과정을 2주간 반복한 후 상아세관 봉쇄능을 주사전자현미경으로 관찰하였음.

[36] 도 4는 본 발명의 실시예에 따른 상아질 지각과민증 완화를 위한 구강 청결용 조성물에 의하여 상아세관이 봉쇄된 부분을 확대한 것으로, 봉쇄된 상아세관과 상아질 표면에서 재광화가 일어난 결과를 도시한 것이다.

발명의 실시를 위한 형태

[37] 본 발명의 목적 및 효과, 그리고 그것들을 달성하기 위한 기술적 구성들은 첨부되는 도면과 함께 상세하게 후술되어 있는 실시예들을 참조하면 명확해질 것이다. 본 발명을 설명함에 있어서 공지 기능 또는 구성에 대한 구체적인 설명이 본 발명의 요지를 불필요하게 흐릴 수 있다고 판단되는 경우에는 그 상세한 설명을 생략할 것이다. 그리고 후술되는 용어들은 본 발명에서의 기능을 고려하여 정의된 용어들로서 이는 사용자 등의 의도 또는 관례 등에 따라 달라질 수 있다.

[38] 그러나, 본 발명은 이하에서 개시되는 실시예들에 한정되는 것이 아니라 서로 다른 다양한 형태로 구현될 수 있다. 단지 본 실시예들은 본 발명의 개시가 완전하도록 하고, 본 발명이 속하는 기술분야에서 통상의 지식을 가진 자에게 발명의 범주를 완전하게 알려주기 위해 제공되는 것이며, 본 발명은 청구항의 범주에 의해 정의될 뿐이다. 그러므로 그 정의는 본 명세서 전반에 걸친 내용을 토대로 내려져야 할 것이다.

[39] 명세서 전체에서, 어떤 부분이 어떤 구성요소를 "포함" 또는 "구비"한다고 할 때, 이는 특별히 반대되는 기재가 없는 한 다른 구성요소를 제외하는 것이 아니라 다른 구성요소를 더 포함할 수 있는 것을 의미한다.

[40] 이하 본 발명을 실시예를 통하여 보다 상세하게 설명한다.

[41] 본 발명을 설명함에 있어, 상아모세포(또는 상아질모세포)(odontoblast)는 상아질의 기질을 구성하는 단백질, 다당체를 세포내에서 합성, 분비하는 세포를 의미할 수 있다. 상아전질(미석회화의 상아질)에 접하여, 치수의 주변부에 한 층의 세포층을 구성하는 원주모양의 세포로서, 치아유두의 세포 중 에나멜기에 면하고 있는 것(외배엽계 중간엽에 유래하는 세포가 됨)이 분화한 세포로, 또한 상아질의 석회화에도 관여하는 세포를 의미할 수 있다.

[42] 본 발명의 실시예에 따른 상아질 지각과민증 완화를 위한 구강 청결용 조성물에 포함된 펩타이드(이하 '상아모세포 분화촉진 펩타이드')는 세포독성을 나타내지 않으면서도, 상아모세포 분화마커 유전자인 DSPP, Dmp1 및 Nestin 유전자의 발현수준을 증가시킬 수 있으며, 치수조직 세포와 함께 생체내에

이식할 경우, 상기 치수조직 세포가 상아질/치수조직-유사 조직을 형성하는 특징을 나타낼 수 있다.

[43] 상아모세포 분화촉진 펩타이드에는, 상아질의 재생촉진 또는 상아질 지각과민증 치료효과를 나타낼 수 있는 한, 이를 구성하는 아미노산 서열과 하나 이상의 아미노산 잔기가 상이한 서열을 가지는 변이체 펩타이드도 포함된다.

[44] 일반적으로, 분자의 활성을 전체적으로 변경시키지 않는 단백질 및 폴리펩타이드에서의 아미노산 교환은 당해 분야에 공지되어 있다. 가장 통상적으로 일어나는 교환은 아미노산 잔기 Ala/Ser, Val/Ile, Asp/Glu, Thr/Ser, Ala/Gly, Ala/Thr, Ser/Asn, Ala/Val, Ser/Gly, Thy/Phe, Ala/Pro, Lys/Arg, Asp/Asn, Leu/Ile, Leu/Val, Ala/Glu, Asp/Gly 간의 교환이다. 또한, 아미노산 서열상의 변이 또는 수식에 의해서 펩타이드의 열, pH 등에 대한 구조적 안정성이 증가하거나 상아질 또는 치수조직의 재생촉진능이 증가한 펩타이드를 포함할 수 있다.

[45] 예를 들어, 본 발명에서 제공하는 서열번호 1의 펩타이드의 3번에 위치한 산성 아미노산인 글루타민은 염기성 아미노산인 리신 또는 아르기닌으로 치환되어도 본 발명에서 제공하는 펩타이드의 효과를 그대로 나타낼 수 있고; 서열번호 1의 펩타이드의 4번 또는 5번에 위치한 염기성 아미노산인 아르기닌은 산성 아미노산인 글루타민 또는 염기성 아미노산인 리신으로 치환되어도 본 발명에서 제공하는 펩타이드의 효과를 그대로 나타낼 수 있으며; 서열번호 1의 펩타이드의 6번, 7번 또는 9번에 위치한 염기성 아미노산인 리신은 염기성 아미노산인 아르기닌 또는 방향족 아미노산인 타이로신으로 치환되어도 본 발명에서 제공하는 펩타이드의 효과를 그대로 나타낼 수 있고; 서열번호 1의 펩타이드의 8번에 위치한 산성 아미노산인 아스파라긴은 중성 아미노산인 세린으로 치환되어도 본 발명에서 제공하는 펩타이드의 효과를 그대로 나타낼 수 있으며; 서열번호 1의 펩타이드의 10번에 위치한 방향족 아미노산인 타이로신은 염기성 아미노산인 리신으로 치환되어도 본 발명에서 제공하는 펩타이드의 효과를 그대로 나타낼 수 있다.

[46] 이처럼, 상아모세포 분화촉진 펩타이드를 구성하는 산성 아미노산, 염기성 아미노산 또는 방향족 아미노산은 각각 이와 다른 산성 아미노산, 염기성 아미노산, 중성 아미노산 또는 방향족 아미노산으로 치환되어도 효과를 그대로 나타낼 수 있으므로, 상아모세포 분화촉진 펩타이드를 구성하는 아미노산 서열과 하나 이상의 아미노산 잔기가 상이한 서열을 가지는 변이체 펩타이드도 상아모세포 분화촉진 펩타이드의 범주에 포함됨은 자명하다.

[47] 또한, 상아모세포 분화촉진 펩타이드는 그의 N-말단 또는 C-말단에 임의의 아미노산이 부가된 형태를 갖더라도, 본 발명에서 제공하는 펩타이드의 효과를 그대로 나타낼 수 있으므로, 본 발명에서 제공하는 펩타이드의 범주에 포함된다. 일 예로서, 상기 펩타이드의 N-말단 또는 C-말단에 1 내지 300개의 아미노산이 부가된 형태가 될 수 있고, 다른 예로서, 상기 펩타이드의 N-말단 또는 C-말단에 1 내지 100개의 아미노산이 부가된 형태가 될 수 있으며, 또 다른 예로서, 상기

펩타이드의 N-말단 또는 C-말단에 1 내지 24개의 아미노산이 부가된 형태가 될 수 있다.

[48] 상아모세포 분화촉진 펩타이드를 처리하지 않은 MDPC-23 세포(대조군)에서 측정된 상아모세포 분화마커인 DSPP 유전자의 mRNA 수준에 비하여, 상아모세포 분화촉진 펩타이드를 처리한 MDPC-23 세포에서 상기 DSPP 유전자의 mRNA 수준이 모두 1.3배 이상의 값을 나타냄을 확인하였다(표 13 내지 24).

[49] 지금까지 보고된 바에 의하면, DSPP의 mRNA발현 수준이 증가되면, 상아모세포 분화 및 상아질 재생이 촉진된다고 알려져 있으므로, 상기 DSPP 유전자의 mRNA 수준을 증가시키는 효과를 나타내는 상아모세포 분화촉진 펩타이드는 상아모세포 분화 및 상아질 재생을 촉진하는 효과를 나타냄을 알 수 있다(Taduru Sreenath et al., THE JOURNAL OF BIOLOGICAL CHEMISTRY, Vol. 278, No. 27, Issue of July 4, pp. 24874-24880, 2003; William T. Butler et al, Connective Tissue Research, 44(Suppl. 1): 171-178, 2003).

[50] 본 발명의 실시예에 따른 상아질 지각과민증 완화를 위한 구강 청결용 조성물에 포함되는 펩타이드는 펩타이드 단독의 형태로 사용될 수도 있고, 상기 펩타이드가 2회 이상 반복되어 연결된 폴리펩타이드의 형태로 사용될 수도 있으며, 상기 펩타이드의 N-말단 또는 C-말단에 상아모세포 분화 또는 상아질 재생 효과를 나타내는 약물이 결합된 복합체 형태로 사용될 수도 있다.

[51]

[52] **실시예 1:**

[53] **상아모세포 분화촉진을 위한 펩타이드의 합성**

[54] 펩타이드(서열번호 1)를 9-플루오르닐메틸옥시카보닐(9-fluorenylmethyloxycarbonyl, Fmoc) 방법으로 합성하고, 상기 합성된 펩타이드의 아미노산을 치환하여 각 그룹의 펩타이드를 합성하였다(표 1 내지 12).

[55] N-KYQRRKKNKY-C(서열번호 1)

[56] 먼저, 그룹 1의 펩타이드는 서열번호 1의 펩타이드 또는 상기 서열번호 1의 펩타이드의 5번 내지 7번 아미노산을 리신 또는 아르기닌으로 치환하여 합성하였다(표 1).

[57]

[58] [표1]

그룹 1의 펩타이드

서열번호	아미노산 서열(N-C)
12345678	KYQRRKKNKYKYQRRKRNKYKYQRRRKNKYKY QRRRRNKYKYQRKKKNKYKYQRKRKNKYKYQR KKRNKYKYQRKRRNKY

[59] 다음으로, 그룹 2의 펩타이드는 서열번호 1의 펩타이드의 5번 내지 7번 아미노산을 리신 또는 아르기닌으로 치환하고, 8번 아미노산을 세린으로 치환하여 합성하였다(표 2).

[60] [표2]

그룹 2의 펩타이드

서열번호	아미노산 서열(N-C)
910111213141516	KYQRRKKSKYKYQRRKRSKYKYQRRRKSKYKYQRRRRSKYKYQRKKKSKYKYQRKRKSKYKYQRKKRSKYKYQRKRRSKY

[61] 다음으로, 그룹 3의 펩타이드는 서열번호 1의 펩타이드의 5번 내지 7번 아미노산을 리신 또는 아르기닌으로 치환하고, 9번 아미노산을 타이로신으로 치환하여 합성하였다(표 3).

[62] [표3]

그룹 3의 펩타이드

서열번호	아미노산 서열(N-C)
1718192021222324	KYQRRKKNYKKYQRRKRNYKKYQRRRKNYKKYQRRRRNYKKYQRKKKNYKKYQRKRKNYKKYQRKKRNYKKYQRKRRNYK

[63] 다음으로, 그룹 4의 펩타이드는 서열번호 1의 펩타이드의 5번 내지 7번 아미노산을 리신 또는 아르기닌으로 치환하고, 8번 아미노산을 세린으로 치환하며, 9번 아미노산을 타이로신으로 치환하고, 10번 아미노산을 리신으로 치환하여 합성하였다(표 4).

[64] [표4]

그룹 4의 펩타이드

서열번호	아미노산 서열(N-C)
2526272829303132	KYQRRKKSYKKYQRRKRSYKKYQRRRKSYKKYQRRRRSYKKYQRKKKSYKKYQRKRKSYKKYQRKKRSYKKYQRKRRSYK

[65] 다음으로, 그룹 5의 펩타이드는 서열번호 1의 펩타이드의 3번 아미노산을 아르기닌으로 치환하고, 4번 아미노산을 글루타민으로 치환하며, 5번 내지 7번 아미노산을 리신 또는 아르기닌으로 치환하여 합성하였다(표 5).

[66] [표5]

그룹 5의 펩타이드

서열번호	아미노산 서열(N-C)
3334353637383940	KYRQRKKNKYKYRQRKRNKYKYRQRRKNKYKYRQRRRNKYKYRQKKKNKYKYRQKRKNKYKYRQKKRNKYKYRQKRRNKY

[67] 다음으로, 그룹 6의 펩타이드는 서열번호 1의 펩타이드의 3번 아미노산을 아르기닌으로 치환하고, 4번 아미노산을 글루타민으로 치환하며, 5번 내지 7번 아미노산을 리신 또는 아르기닌으로 치환하고, 8번 아미노산을 세린으로 치환하여 합성하였다(표 6).

[68] [표6]

그룹 6의 펩타이드

서열번호	아미노산 서열(N-C)
4142434445464748	KYRQRKKSKYKYRQRKRSKYKYRQRRKSKYKYRQRRRSKYKYRQKKKSKYKYRQKRKSKYKYRQKKRSKYKYRQKRRSKY

[69] 다음으로, 그룹 7의 펩타이드는 서열번호 1의 펩타이드의 3번 아미노산을 아르기닌으로 치환하고, 4번 아미노산을 글루타민으로 치환하며, 5번 내지 7번 아미노산을 리신 또는 아르기닌으로 치환하고, 9번 아미노산을 타이로신으로 치환하며, 10번 아미노산을 리신으로 치환하여 합성하였다(표 7).

[70] [표7]

그룹 7의 펩타이드

서열번호	아미노산 서열(N-C)
4950515253545556	KYRQRKKNYKKYRQRKRNYKKYRQRRKNYKKYRQRRRNYKKYRQKKKNYKKYRQKRKNYKKYRQKKRNYKKYRQKRRNYK

[71] 다음으로, 그룹 8의 펩타이드는 서열번호 1의 펩타이드의 3번 아미노산을 아르기닌으로 치환하고, 4번 아미노산을 글루타민으로 치환하며, 5번 내지 7번 아미노산을 리신 또는 아르기닌으로 치환하고, 8번 아미노산을 세린으로 치환하며, 9번 아미노산을 타이로신으로 치환하고, 10번 아미노산을 리신으로 치환하여 합성하였다(표 8).

[72] [표8]

그룹 8의 펩타이드

서열번호	아미노산 서열(N-C)
5758596061626364	KYRQRKKSYKKYRQRKRSYKKYRQRRKSYKKYRQRRRSYKKYRQKKKSYKKYRQKRKSYKKYRQKKRSYKKYRQKRRSYK

[73] 다음으로, 그룹 9의 펩타이드는 서열번호 1의 펩타이드의 3번 아미노산을 리신으로 치환하고, 4번 아미노산을 글루타민으로 치환하며, 5번 내지 7번 아미노산을 리신 또는 아르기닌으로 치환하여 합성하였다(표 9).

[74] [표9]

그룹 9의 펩타이드

서열번호	아미노산 서열(N-C)
6566676869707172	KYKQRKKNKYKYKQRKRNKYKYKQRRKNKYKYKQRRRNKYKYKQKKKNKYKYKQKRKNKYKYKQKKRNKYKYKQKRRNKY

[75] 다음으로, 그룹 10의 펩타이드는 서열번호 1의 펩타이드의 3번 아미노산을 리신으로 치환하고, 4번 아미노산을 글루타민으로 치환하며, 5번 내지 7번 아미노산을 리신 또는 아르기닌으로 치환하고, 8번 아미노산을 세린으로 치환하여 합성하였다(표 10).

[76] [표10]

그룹 10의 펩타이드

서열번호	아미노산 서열(N-C)
7374757677787980	KYKQRKKSKYKYKQRKRSKYKYKQRRKSKYKYKQRRRSKYKYKQKKKSKYKYKQKRKSKYKYKQKKRSKYKYKQKRRSKY

[77] 다음으로, 그룹 11의 펩타이드는 서열번호 1의 펩타이드의 3번 아미노산을 리신으로 치환하고, 4번 아미노산을 글루타민으로 치환하며, 5번 내지 7번 아미노산을 리신 또는 아르기닌으로 치환하고, 9번 아미노산을 타이로신으로 치환하며, 10번 아미노산을 리신으로 치환하여 합성하였다(표 11).

[78] [표11]

그룹 11의 펩타이드

서열번호	아미노산 서열(N-C)
8182838485868788	KYKQRKKNYKKYKQRKRNYKKYKQRRKNYKKY KQRRRNYKKYKQKKKNYKKYKQKRKNYKKYKQ KKRNYKKYKQKRRNYK

[79] 끝으로, 그룹 12의 펩타이드는 서열번호 1의 펩타이드의 3번 아미노산을 리신으로 치환하고, 4번 아미노산을 글루타민으로 치환하며, 5번 내지 7번 아미노산을 리신 또는 아르기닌으로 치환하고, 8번 아미노산을 세린으로 치환하며, 9번 아미노산을 타이로신으로 치환하고, 10번 아미노산을 리신으로 치환하여 합성하였다(표 12).

[80] [표12]

그룹 12의 펩타이드

서열번호	아미노산 서열(N-C)
8990919293949596	KYKQRKKSYKKYKQRKRSYKKYKQRRKSYKKY KQRRRSYKKYKQKKKSYKKYKQKRKSYKKYKQ KKRSYKKYKQKRRSYK

[81] **실시예 2: 상아모세포를 이용한 상아질의 재생촉진 효과검증실시예 2-1: DSPP(dentin sialophosphoprotein) 프로모터 활성에 미치는 펩타이드의 영향 검증**먼저, 마우스 유래 상아모세포인 MDPC-23 세포를 10% FBS를 포함하는 DMEM 배지에서, 5%의 CO_2 및 37℃ 조건으로 배양하였다.

[82] 다음으로, 상기 배양된 MDPC-23 세포를 24웰 플레이트에 각 웰당 5 X 10^4 세포수로 분주하고, 24시간 동안 배양한 다음, 리포펙타민 Plus™ 시약을 이용하여 상기 배양된 세포에, pGL3 벡터에 DSPP 프로모터와 루시퍼라제 유전자가 도입된 재조합 벡터를 도입하여 형질전환시켰다. 상기 형질전환된 MDPC-23 세포에 상기 실시예 1에서 합성된 그룹 1 내지 12의 펩타이드를 각각 처리하고 48시간 동안 배양한 다음, 상기 각각의 형질전환된 MDPC-23 세포에서 루시퍼라제 활성을 측정하고, 각 그룹별로 산출된 평균수준을 비교하였다(도 1a). 이때, 대조군으로는 상아모세포 분화촉진 펩타이드를 처리하지 않은 형질전환된 MDPC-23 세포를 사용하였다.

[83] 도 1a는 본 발명에서 제공하는 각 펩타이드가 상아모세포 분화 마커 유전자인 DSPP 발현에 미치는 영향을 그룹별로 비교한 결과를 나타내는 그래프이다. 도 1a에서 보듯이, 본 발명에서 제공하는 각 펩타이드는 전체적으로 대조군에서 측정된 루시퍼라제(luciferase) 활성수준의 약 1.3 배이상의 값을 나타내었으나, 각 그룹별로 차이를 나타내며, 그룹 12의 펩타이드가 가장 높은 수준의 루시퍼라제 활성을 나타내고, 다음으로 높은 수준의 루시퍼라제 활성을

나타내는 펩타이드는 그룹 11의 펩타이드임을 확인하였다.

[84] 따라서, 본 발명에서 제공하는 펩타이드는 DSPP 프로모터를 활성화시키는 효과를 나타냄을 알 수 있었다.

[85]

[86] **실시예 2-2: 상아모세포 분화마커 유전자인 DSPP 유전자의 발현수준에 미치는 펩타이드의 영향 검증**

[87] 상기 실시예 2-1에서 배양한 MDPC-23 세포에 상기 실시예 1에서 합성된 각 그룹의 펩타이드를 처리하고, 48시간 동안 배양한 다음, 상기 MDPC-23 세포에서 발현되는 상아모세포 분화마커 유전자인 DSPP 유전자의 mRNA 수준을 측정하고, 상기 측정된 각각의 DSPP 유전자의 mRNA 수준을, 대조군에서 측정된 DSPP 유전자의 mRNA 수준에 대한 상대적 비율로 환산하였다(표 13 내지 24). 또한, 각 그룹의 펩타이드에 따라 측정된 DSPP 유전자의 mRNA 수준의 평균값을 각 그룹별로 비교하였다(도 1b). 이때, 대조군으로는 상아모세포 분화촉진 펩타이드를 처리하지 않은 MDPC-23 세포를 사용하였다.

[88] 상기 DSPP 유전자의 발현수준은 RT-PCR 및 실시간 PCR 분석을 통해 측정하였다: 구체적으로, TRIzol 시약을 이용하여 상기 MDPC-23 세포로부터 전체(total) RNA를 분리하였다. 2 ㎍의 전체 RNA와 역전사효소 1 ul와 0.5 ㎍의 올리고(oligo; dT)를 이용하여 cDNA를 합성하였다. 합성된 cDNA를 실시간 중합효소 연쇄반응에 이용하였다. 실시간 중합효소 연쇄반응은 하기 각 프라이머와 SYBR GREEN PCR Master Mix(Takara, 일본)를 이용하여 ABI PRISM 7500 시퀀스 검출 시스템(sequence detection system)(Applied Biosystems)에서 진행되었다. 실시간 중합효소 연쇄반응은 94℃, 1 분 ; 95℃, 15 초 - 60℃, 34 초를 40 사이클(cycles) 반복하는 조건으로 진행하였다. 결과의 분석은 comparative cycle threshold(CT) 방법을 이용하여 평가하였다. 이때, 내부대조군으로는 Gapdh 유전자를 사용하였고, 측정값은 3회 반복실험을 수행한 후, 이의 평균값 및 표준편차 값을 사용하였다.

[89]

[90] Dspp_F: 5'-ATTCCGGTTCCCCAGTTAGTA-3'(서열번호 97)

[91] Dspp_R: 5'-CTGTTGCTAGTGGTGCTGTT-3'(서열번호 98)

[92] Gapdh_F: 5'-AGGTCGGTGTGAACGGATTTG-3'(서열번호 99)

[93] Gapdh_R: 5'-TGTAGACCATGTAGTTGAGGTCA-3'(서열번호 100)

[94]

[95] [표13]

그룹 1의 펩타이드가 DSPP 유전자의 mRNA 수준에 미치는 효과

서열번호	DSPP 유전자의 mRNA 수준	
	평균	표준편차
12345678	1.7541.6461.4641.8551.6391.7461.8641.639	0.1320.0920.2210.1020.0570.0910.1320.032

[96] [표14]

그룹 2의 펩타이드가 DSPP 유전자의 mRNA 수준에 미치는 효과

서열번호	DSPP 유전자의 mRNA 수준	
	평균	표준편차
910111213141516	1.8541.7461.6391.5481.6851.8461.9641.739	0.0320.0520.2010.0270.0770.1410.2790.092

[97] [표15]

그룹 3의 펩타이드가 DSPP 유전자의 mRNA 수준에 미치는 효과

서열번호	DSPP 유전자의 mRNA 수준	
	평균	표준편차
1718192021222324	2.1172.3191.9312.5531.8932.4122.1712.212	0.2090.0920.1020.0990.1320.0720.2810.111

[98] [표16]

그룹 4의 펩타이드가 DSPP 유전자의 mRNA 수준에 미치는 효과

서열번호	DSPP 유전자의 mRNA 수준	
	평균	표준편차
2526272829303132	2.3712.1931.9932.4531.8832.5122.3712.219	0.0890.0520.2020.1920.1010.2090.1390.302

[99] [표17]

그룹 5의 펩타이드가 DSPP 유전자의 mRNA 수준에 미치는 효과

서열번호	DSPP 유전자의 mRNA 수준	
	평균	표준편차
3334353637383940	1.7121.9311.9832.3191.5972.1161.7122.219	0.0910.1720.1020.2920.3010.2110.1910.212

[100] [표18]

그룹 6의 펩타이드가 DSPP 유전자의 mRNA 수준에 미치는 효과

서열번호	DSPP 유전자의 mRNA 수준	
	평균	표준편차
4142434445464748	1.5461.5861.6691.7931.5321.8871.6971.558	0.0910.1030.0950.2030.3100.0770.0090.201

[101] [표19]

그룹 7의 펩타이드가 DSPP 유전자의 mRNA 수준에 미치는 효과

서열번호	DSPP 유전자의 mRNA 수준	
	평균	표준편차
4950515253545556	1.9231.8871.6012.0191.5921.4371.6631.701	0.1920.0070.0820.1350.2220.3410.0940.109

[102] [표20]

그룹 8의 펩타이드가 DSPP 유전자의 mRNA 수준에 미치는 효과

서열번호	DSPP 유전자의 mRNA 수준	
	평균	표준편차
5758596061626364	2.0391.9981.7922.1072.3011.6721.7691.967	0.0820.1720.0070.2010.0190.3080.0850.039

[103] [표21]

그룹 9의 펩타이드가 DSPP 유전자의 mRNA 수준에 미치는 효과

서열번호	DSPP 유전자의 mRNA 수준	
	평균	표준편차
6566676869707172	1.7231.6271.7771.4322.0111.9271.8792.011	0.0720.2910.0270.4100.0810.1050.0600.009

[104] [표22]

그룹 10의 펩타이드가 DSPP 유전자의 mRNA 수준에 미치는 효과

서열번호	DSPP 유전자의 mRNA 수준	
	평균	표준편차
7374757677787980	2.0352.0111.9972.3511.7292.6352.2311.837	0.0210.0630.0590.1090.1110.0910.0770.201

[105] [표23]

그룹 11의 펩타이드가 DSPP 유전자의 mRNA 수준에 미치는 효과

서열번호	DSPP 유전자의 mRNA 수준	
	평균	표준편차
8182838485868788	3.0923.3613.5723.7023.6703.7053.8884.021	0.1520.0980.2090.3010.0880.1370.0720.301

[106] [표24]

그룹 12의 펩타이드가 DSPP 유전자의 mRNA 수준에 미치는 효과

서열번호	DSPP 유전자의 mRNA 수준	
	평균	표준편차
8990919293949596	4.2114.8114.3624.2114.5253.8364.6205.211	0.4130.3020.1820.2870.2500.0990.4010.371

[107] 상기 표 13 내지 24에서 보듯이, 상아모세포 분화촉진 펩타이드를 처리하지 않은 MDPC-23 세포(대조군)에서 측정된 상아모세포 분화마커인 DSPP 유전자의 mRNA 수준에 비하여, 상아모세포 분화촉진 펩타이드를 처리할 경우, 상기 DSPP 유전자의 mRNA 수준이 모두 1.3배 이상의 값을 나타냄을 확인하였다. 특히, 그룹 11의 모든 펩타이드는 DSPP 유전자의 mRNA 수준에 비하여 3배 이상의 값을 나타내었고, 그룹 12의 모든 펩타이드는 DSPP 유전자의 mRNA 수준에 비하여 3.8배 이상의 값을 나타냄을 확인하였다.

[108] 아울러, 도 1b는 상아모세포 분화촉진 펩타이드가 처리된 MDPC-23 세포에서 상아모세포 분화마커인 DSPP 유전자의 발현수준을 비교한 결과를 나타내는 그래프이다. 도 1b에서 보듯이, 상아모세포 분화촉진 펩타이드를 처리할 경우, 상아모세포 분화마커인 DSPP 유전자의 mRNA 수준이 증가되고, 도 1a의 것과 비슷하게, 대조군에서 측정된 DSPP 유전자 mRNA 수준의 약 1.3 베이상의 값을 나타냄을 확인하였다.

[109]

[110] **실시예 2-3: 상아모세포 분화마커 유전자인 DSPP, Dmp1 및 Nestin 유전자의 발현수준에 미치는 펩타이드의 영향검증**

[111] 상기 실시예 2-2의 결과로부터, 상아모세포 분화촉진 펩타이드는 DSPP 유전자의 mRNA 수준을 증가시킬 수 있고, 특히, 그룹 11 및 12의 펩타이드는 DSPP 유전자의 mRNA 수준을 적어도 3배 이상 증가시킬 수 있음을 확인하였다.

[112] 이에 따라, 상기 그룹 11 및 12의 펩타이드가 다른 상아모세포 분화마커 유전자인 Dmp1 및 Nestin 유전자의 mRNA 수준도 증가시킬 수 있는지 확인하였다.

[113] 대략적으로, 하기 각 프라이머를 사용하고, 펩타이드로서 그룹 11 및 12의

펩타이드를 사용하는 것을 제외하고는, 상기 실시예 2-2와 동일한 방법을 수행하여, Dmp1 및 Nestin 유전자의 발현수준에 미치는 상아모세포 분화촉진 펩타이드의 효과를 측정하고, 각 그룹별로 산출된 평균수준을 비교하였다(도 1c). 이때, 대조군으로는 상아모세포 분화촉진 펩타이드를 처리하지 않은 MDPC-23 세포를 사용하였고, 비교군으로서 DSPP 유전자의 mRNA 수준을 사용하였다.

[114]

[115] Dmp1_F: 5'-CATTCTCCTTGTGTTCCTTTGGG-3'(서열번호 101)

[116] Dmp1_R: 5'-TGTGGTCACTATTTGCCTGTG-3'(서열번호 102)

[117] Nestin_F: 5'-CCCTGAAGTCGAGGAGCTG-3'(서열번호 103)

[118] Nestin_R: 5'-CTGCTGCACCTCTAAGCGA-3'(서열번호 104)

[119]

[120] 도 1c는 그룹 11 및 12의 펩타이드가 처리된 MDPC-23 세포에서 상아모세포 분화마커 유전자인 DSPP, Dmp1 및 Nestin 유전자의 발현수준을 비교한 결과를 나타내는 그래프이다. 도 1c에서 보듯이, 상아모세포 분화촉진 펩타이드를 처리하면, 상아모세포 분화마커 유전자인 DSPP, Dmp1 및 Nestin 유전자의 발현수준이 모두 증가되었으나, 각 유전자별로 증가수준에 차이를 나타내고, 그룹 11의 펩타이드 보다는 그룹 12의 펩타이드가 더욱 높은 수준으로 증가시킴을 확인하였다.

[121] 상기 각 분화마커 유전자는 상아모세포 분화와 상아질의 석회화 과정에 관여하는 유전자로 알려져 있으므로, 본 발명에서 제공하는 펩타이드는 상아질 재생을 촉진하는 효과를 나타낼 것으로 분석되었다.

[122]

[123] **실시예 2-4: 치수조직 세포에 대한 상아질 또는 치수조직의 재생촉진 및 상아질 지각과민증 치료용 펩타이드의 세포독성 평가**

[124] 먼저, 사람 치수 줄기세포는 서울대학교 치과병원에서 성인 10명(18-22세)의 사랑니에서 치수조직 세포를 분리하였다. 구체적으로, 모든 실험은 임상연구심의위원회(hospital's Institutional Review Board)에서 승인을 받은 후 환자의 동의를 받아 실험을 수행하였으며, Jung HS et al(J Mol Histol.(2011))의 방법에 따라 사랑니는 절단하여, 치수를 노출시켜 포셉으로 치수조직을 분리하였다. 상기 분리된 치수조직을 양면도로 잘게 세절하고, 60 mm 접시에 넣고, 커버 슬립으로 덮은 후, DMEM 배지에서 배양하여, 배양된 치수조직 세포를 수득하였다.

[125] 다음으로, 상기 수득한 치수조직 세포를 96웰 플레이트에 각 웰당 약 3×10^3 세포수가 되도록 분주하고, 24시간 동안 배양한 다음, 그룹 11 또는 12의 펩타이드를 10 또는 50㎍/㎖ 농도로 처리하고, 다시 1, 3 또는 5일 동안 배양하였다. 상기 배양이 종료된 후, 배양된 세포를 PBS로 세척하고, 20㎕의 MTT 용액을 가하였으며, 이후 약 37℃에서 4시간 반응시켰다. 반응이 종료된 후,

MTT 용액을 제거하고, 100㎕의 DMSO를 가한 후, 540nm 파장에서 흡광도를 측정하였다(도 1d). 이때, 대조군으로는 상기 펩타이드를 처리하지 않고 배양한 치수조직 세포를 사용하였다.

[126] 도 1d는 치수조직 세포에 대한 상아모세포 분화촉진 펩타이드의 세포독성을 평가한 결과를 나타내는 그래프이다. 도 1d에서 보듯이, 상아모세포 분화촉진 펩타이드를 가하여도 치수조직 세포의 생존율은 대조군과 동일한 수준을 나타냄을 확인하였다.

[127]

[128] **실시예 3: 상아질 지각과민증 완화를 위한 구강 청결용 조성물의 제조**

[129] **1 단계:**

[130] 폴록사머 407을 정제수에 첨가하여 교반기에서 약 30분간 교반 (교반 조건: PADDLE 15~20 rpm, DISPERSE 400~500 rpm)

[131] **2 단계:**

[132] 소르빈산 칼륨, 염화세틸피리디늄, 자일리톨, 아세설팜카륨 착색제(청색 1호), D-소르비톨액, 농글리세린을 첨가하여 교반기에서 약 30 분간 교반 (교반 조건: PADDLE 15~20 rpm, DISPERSE 400~500 rpm)

[133] **3 단계:**

[134] 폴리소르베이트 20 (Tween 20), 황금추출물, 녹차액스, 카모마일추출물, 로즈마리엑스, 민트향 (HF-3585)을 가온 하여 첨가하여 교반기에서 약 30 분간 교반 (교반 조건: PADDLE 15~20 rpm, DISPERSE 400~500 rpm)

[135] **4 단계:**

[136] 상아모세포 분화촉진 펩타이드(서열번호 96)를 약 0.0001%로 혼합한 후 시트르산수화물(구연산 수화물)을 첨가하여 pH 5.5~6.0 사이로 맞추어 제조

[137]

[138] [표25]

본 발명의 실시예 3에 따른 상아질 지각과민증 완화를 위한 구강 청결용 조성물의 조성표

구 분		원 료 명	중 량 (Wt%)
1	용제	정제수	86.25
	계면활성제	폴록사머407	0.3
	펩타이드	상아모세포 분화촉진 펩타이드	0.0001
2	보존제	소르빈산 칼륨	0.1
	주성분	염화세틸피리디늄	0.055
	감미제	자일리톨	1
		아세설팜칼륨	0.05
	pH조절제	시트르산수화물 (구연산수화물)	0.005
	착색제	청색 1호	0.00025
	습윤제	D-소르비톨액	5
		농글리세린	5
3	계면활성제	폴리소르베이트20	2
		(Tween 20)	
	착향제	황금추출물	0.01
		녹차엑스(유기농)	0.01
		카모마일추출물(유기농)	0.01
		로즈마리엑스(유기농)	0.01
		민트향 HF-6585	0.2
	합 계		100

[139] 비교예에 사용되기 위한 조성물의 준비

[140] **비교예 3-1:**

[141] 실시예 3과 같은 부피의 정제수를 준비하였음.

[142]

[143] *

[144] **비교예 3-2:**

[145] 실시예 3의 성분 중 정제수 이외에 상아모세포 분화촉진 펩타이드(서열번호 96)이 포함되지 않도록 한 이외의 성분은 모두 동일하게 함유되도록 준비하였음

[146]

[147] **실험예 1:**

[148] **실시예 3에 따른 상아질 지각과민증 완화를 위한 구강 청결용 조성물의 상아세관 투과도 관찰**

[149]

[150] **가. 상아세관이 노출되도록 치아를 절단**

[151] 발치된 사람의 치아의 치관부를 다이아몬드 톱을 이용하여 가로로 절단하여 상아세관을 노출한 다음, 인산염 완충 용액으로 약 5분간 2회 세척

[152]

[153] **나. 절단된 치아를 세척**

[154] 앞서 절단한 치아를 0.5 M 에틸렌다이아민테트라아세트산(ethylenediaminetetraacetic acid, EDTA, pH 7.4) 용액에 약 5분간 반응 시킨 후 인산염 완충용액으로 약 5분간 2회 세척

[155]

[156] *

[157] **다. 실시예 3에 따른 상아질 지각과민증 완화를 위한 구강 청결용 조성물에 형광염색시약 첨가**

[158] 상아모세포 분화촉진 펩타이드(서열번호 96)가 함유된 상아질 지각과민증 완화를 위한 구강 청결용 조성물에 형광염색시약이 0.1%가 포함되도록 첨가하여 잘 혼합한 다음 상아세관이 노출된 절단 치아를 약 1분간 반응시킴

[159]

[160] **라. 상아질 지각과민증 완화를 위한 구강 청결용 조성물의 침투정도 관찰**

[161] 반응시킨 절단 치아를 인산염 완충용액에 약 5분간 2회 세척한 다음 다이아몬드 톱을 이용하여 절단 치아의 상아세관이 길게 보이도록 세로로 약 0.5 mm 두께로 자른 후 형광현미경으로 침투 정도를 관찰 (도 2 참조).

[162]

[163]

[164] **실험예 2:**

[165] **실시예 3에 따른 상아질 지각과민증 완화를 위한 구강 청결용 조성물의 상아세관 봉쇄능 관찰**

[166]

[167] **가. 인공타액의 제조**

[168] 인공타액의 조성은 하기 표 26와 같음.

[169] ※정제수에 하기 표2의 각 성분의 최종 농도가 되도록 첨가하여 혼합하였으며, 인산칼륨(K_2HPO_4)은 마지막에 첨가하였음.

[170] ※인공타액의 pH는 사람의 타액과 유사한 7.2 부근에서 측정됨.

[171]

[172] [표26]

성분	농도(mM)
$CaCl_2$	0.7
$Mgcl_2$	0.2
K_2HPO_4	4
KCl	30
NaN_3	0.3
HEPES	20

[173] **나. 상아세관 시편의 제작**

[174] 발치된 사람의 치아를 다이아몬드 톱을 이용하여 가로로 절단하여, 1mm 두께의 상아세관이 노출된 상아질 시편을 제작하였음.

[175] ※상아질 시편은 상아세관을 완전히 노출 시키기 위하여 약 32% 인산(phosphoric acid) 용액에 약 5분간 반응시킨 후 정제수로 약 5분간 3회 세척하였음. 그런 다음, 상아질 시편은 초음파 세척기에서 약 5분간 6회 세척하여 상아세관을 완전히 노출되도록 하였음.

[176] 이후, 인산염 완충 용액으로 3회 세척하여 보관함.

[177]

[178] **다. 상아질 지각과민증 완화를 위한 구강 청결용 조성물의 상아세관 봉쇄능 관찰**

[179] 실시예 3에 따른 상아질 지각과민증 완화를 위한 구강 청결용 조성물을 이용하여 상아세관 시편에 약 1분간 반응 시킨 다음 인공타액에 약 24 시간 반응 시킴.

[180] 이 과정을 2 주 동안 반복한 후, 증류수로 3회 세척한 다음 건조하여 주사전자현미경(S-4700, HITACHI, Tokyo, Japan)으로 상아세관 봉쇄 정도를 관찰함(도 3, G-I).

[181]

[182]

[183] **<u>비교실험예 2-1:</u>**

[184] 비교예 3-1에서 준비된 정제수를 이용하여 상아세관 시편에 약 1분간 반응 시킨 다음 인공타액에 약 24 시간 반응 시킴.

[185] 이 과정을 2 주 동안 반복한 후, 증류수로 3회 세척한 다음 건조하여 주사전자 현미경으로 상아세관 봉쇄 정도를 관찰함(도 3, A-C).

[186]

[187] **비교실험예 2-2:**

[188] 비교예 3-2에서 준비된 구강 청결용 조성물을 이용하여 상아세관 시편에 약 1분간 반응 시킨 다음 인공타액에 약 24 시간 반응 시킴.

[189] 이 과정을 2 주 동안 반복한 후, 증류수로 3회 세척한 다음 건조하여 주사전자 현미경으로 상아세관 봉쇄 정도를 관찰함(도 3, D-F).

[190]

[191]

[192] 상기 실험예 1에 의하면, 실시예 3에 따른 상아질 지각과민증 완화를 위한 구강 청결용 조성물의 상아세관 투과도를 형광 현미경으로 관찰한 결과, 도 2에서와 같이 상아모세포 분화촉진 펩타이드가 함유된 구강 청결용 조성물이 처리된 치아의 경우 상아질 표면에서 형광이 강하게 관찰 되었다. 뿐만 아니라 노출된 상아세관의 하방을 따라 형광 염색 시약의 침투가 관찰되었다.

[193] 다음으로, 상기 실험예 2와 비교실험예 2-1 및 2-2를 비교한 결과는 도 3에 도시된 바와 같다. 도 3은 비교예 3-1 및 비교예 3-2와 본 발명의 실시예에 따른 상아질 지각과민증 완화를 위한 구강 청결용 조성물의 상아세관 봉쇄능을 비교한 결과를 도시한 것으로, 보다 상세하게는, A-C는 정제수로만 처리한의 상아질의 상아세관을 도시한 것(비교예 3-1)이고, D-F는 본 발명의 실시예에 따른 상아질 지각과민증 완화를 위한 구강 청결용 조성물의 구성 중 펩타이드가 미함유된 구강 청결용 조성물과 반응한 상아세관을 도시한 것(비교예 3-2)이고, G-I는 본 발명의 실시예에 따른 상아질 지각과민증 완화를 위한 구강 청결용 조성물과 반응한 상아세관을 도시한 것이다(크기바: A, D, G, 100 ㎛; B, E, H, 20 ㎛; C, F, I, 10 ㎛).

[194] 도 3을 통해 알 수 있는 바와 같이 본 발명의 실시예에 따른 상아질 지각과민증 완화를 위한 구강 청결용 조성물에 반응시킨 상아질의 상아세관에 재광화가 일어나 상아세관이 봉쇄되어 되어 있음을 관찰할 수 있었다.

[195] 도 4는 본 발명의 실시예에 따른 상아질 지각과민증 완화를 위한 구강 청결용 조성물에 의하여 상아세관이 봉쇄된 부분을 확대한 것으로, 봉쇄된 상아세관과 상아질 표면에서 재광화가 일어난 결과를 도시한 것이다.

[196] 도 4를 참고하면, 실험예 3에 의한 상아세관의 모습을 보다 자세히 관찰할 수 있는데, 상아세관과 상아질 표면 모두에서 재광화가 일어난 것을 알 수 있다. 본 발명의 실시예에 따른 지각과민증 완화를 위한 구강 청결용 조성물은 상아질에 얇은 막을 형성함과 동시에 상아세관 안쪽 및 타액에 존재하는 인산-칼슘 이온과 강하게 결합하여 노출된 상아세관 및 상아질 표면에 재광화를 유도하여 상아세관을 효과적으로 봉쇄하게 된다. 즉, 본 발명의 실시예에 따른 상아질 지각과민증 완화를 위한 구강 청결용 조성물은 노출된 상아세관의 표면뿐만

아니라 상아세관 내부에서 재광화를 유도하여 시린이 증상을 완화 및/또는 방지할 수 있는 효과를 나타낼 수 있다.

[197] 본 명세서와 도면에는 본 발명의 바람직한 실시예에 대하여 개시하였으며, 비록 특정 용어들이 사용되었으나, 이는 단지 본 발명의 기술 내용을 쉽게 설명하고 발명의 이해를 돕기 위한 일반적인 의미에서 사용된 것이지, 본 발명의 범위를 한정하고자 하는 것은 아니다. 여기에 개시된 실시예 외에도 본 발명의 기술적 사상에 바탕을 둔 다른 변형예들이 실시 가능하다는 것은 본 발명이 속하는 기술 분야에서 통상의 지식을 가진 자에게 자명한 것이다.

[198] "본 연구는 2017년도 중소벤처기업부의 기술개발사업 지원에 의한 연구임 [S2462696]"