



(19) 대한민국특허청(KR)
(12) 공개특허공보(A)

(11) 공개번호 10-2015-0137486
(43) 공개일자 2015년12월09일

(51) 국제특허분류(Int. Cl.)

A61K 31/352 (2006.01) A61K 8/49 (2006.01)

A61P 17/00 (2006.01) A61Q 17/04 (2006.01)

(21) 출원번호 10-2014-0065427

(22) 출원일자 2014년05월29일

심사청구일자 2014년05월29일

(71) 출원인

건국대학교 산학협력단

서울특별시 광진구 능동로 120, 건국대학교내 (화양동)

(72) 발명자

김양미

서울특별시 서초구 서초중앙로 200 삼풍아파트 17-601

이은정

서울특별시 중랑구 봉화산로26길 67 승우그린빌 402호

(74) 대리인

한양특허법인

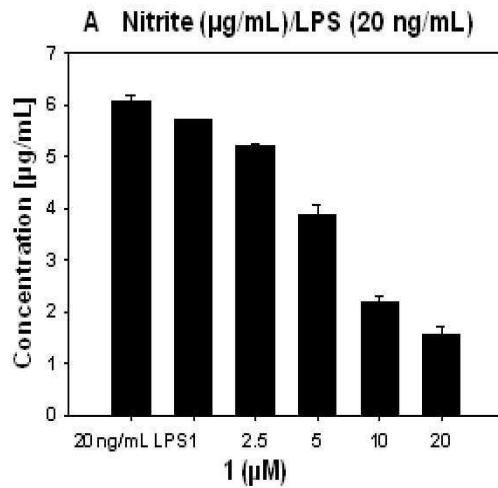
전체 청구항 수 : 총 6 항

(54) 발명의 명칭 람네틴을 유효성분으로 포함하는 자외선 자극에 의한 노화 및 염증에 대한 억제 활성을 동시에 가지는 조성물

(57) 요약

본 발명은 천연물질인 O-메틸레이티드 플라보놀인 2-(3,4-디하이드록시페닐)-3,5-디하이드록시-7-메소실크로멘-4-온의 낮은 세포 독성을 보이면서 동시에 염증 유도물질인 나이트라이트 옥사이드와 사이토카인의 생성을 억제함으로 우수한 항염 활성을 나타내는 물질의 용도 및 신호작용기작에 관한 것이다. 또한 자외선 조사후 콜라겐의 분해요소인 MMPs 생성을 억제하는 것을 확인하여 노화개선 및 주름개선 효과를 가지며, 어크, p38 맵카이네이스, 준카이네이스등의 phosphorylation을 억제함으로서 염증 억제 효과를 확인하여 염증 억제 효과를 나타냄으로써 화장품의 조성품으로의 사용 가능성을 제시한다.

대표도 - 도3a



이 발명을 지원한 국가연구개발사업

과제고유번호 2013A0020071

부처명 미래창조과학부

연구관리전문기관 교육부 한국연구재단

연구사업명 대학중점연구소지원사업

연구과제명 [단독](5차)생명분자 정보학 센터-기술융합 flavonoids 연구의 심화

기여율 1/1

주관기관 건국대학교 산학협력단

연구기간 2013.09.01 ~ 2014.08.31

명세서

청구범위

청구항 1

람네틴을 유효성분으로 포함하는 자외선 자극에 의한 노화 및 염증에 대한 억제 활성을 동시에 가지는 약학 조성물.

청구항 2

제 1항에 있어서, 상기 조성물은 쥐의 대식세포와 인간의 상피세포에 대하여 독성을 가지지 않는 것을 특징으로 하는 약학 조성물.

청구항 3

람네틴을 유효성분으로 포함하는 자외선 자극에 의한 노화 및 염증에 대한 개선 활성을 동시에 가지는 화장료 조성물.

청구항 4

제 3항에 있어서, 상기 조성물은 스킨, 로션, 크림, 파운데이션, 에센스, 젤, 팩, 폼클링징, 립스틱, 메이크업 베이스 또는 비누 형태의 화장료 조성물.

청구항 5

람네틴을 유효성분으로 포함하는 LPS 자극에 의한 염증에 대한 억제 활성을 가지는 약학 조성물.

청구항 6

제 5항에 있어서, 상기 조성물은 나이트레이트 옥사이드 생성 억제 활성, MIP-2 발현 억제 활성 및 TNF- α 발현 억제 활성으로 이루어진 군에서 선택되는 1 이상의 활성을 나타내는 것을 특징으로 하는 약학 조성물.

발명의 설명

기술 분야

[0001] 본 발명은 람네틴을 유효성분으로 포함하는 자외선 자극에 의한 노화 및 염증에 대한 억제 활성을 동시에 가지는 조성물에 관한 것으로, 본 발명에서는 람네틴의 염증저해 활성과 그 신호전달 작용 매커니즘을 증명하고 항염증 치료제로서의 용도와 자외선에 의한 피부 노화방지, 주름개선의 효능을 가진 물질의 용도에 관한 것이다.

배경 기술

[0002] 예로부터 발적, 종창, 작열, 동통의 4가지 징후를 가진 것을 염증이라고 했다. 현재는 국소 조직의 병원균에 대한 방어적 반응의 일종으로 생각되며, 형태학적으로 조직의 증식이나 순환장애 및 퇴행성 병변을 볼 수 있다. 물리학적, 화학적인 요인과 세균이나 바이러스 등의 미생물이나 기생충이 염증의 원인이 되고 있다고 알려져 있다. 염증은 조직의 변질을 유도하는 변질성염과 삼출액을 유발하는 삼출성염, 결합조직의 증식을 주로 유도하는 증식성염과 매독, 나병 등의 경우에서 볼 수 있는 병원체에 의하여 특이한 육아조직이 증식하는 염증으로 나눌 수 있다.

[0003] 병원성미생물인 E.coli의 독소에서 추출된 Lipopolysaccharide (LPS), 염증반응에 대표적으로 알려진 사이토카인인 tumor-necrosis factor (TNF) 및 interleukin들은 쥐의 대식세포, fibroblast, dendritic cells, lymphocyte등의 세포에서 각종 염증관련 신호전달 체계를 자극하여 염증반응을 유도한다고 알려져 있다.

[0004] 염증을 치료하는 약제로는 스테로이드 계와 비스테로이드계로 나뉘는데 염증치료 약제는 여러 가지 염증성질환과 외과 수술 후 및 외상 시에 사용한다. 이들 약제의 작용기작으로는 스테로이드계 약제의 경우 세포핵에 작용하여 항염증성 단백질을 합성시킨 후에 작용하며, 비스테로이드계 약제는 아라키돈산에서 프로스타글란딘 합성

초기에 작용하는 고리화 산화 효소의 활성을 억제하여 프로글란딘 생산을 억제한다. 스테로이드계의 당질코르티코이드는 24시간 내에 항염효과를 나타내는 반면 장기 복용 시 고혈압, 당뇨, 소화성궤양, 중심성 비만과 감염에 취약해 질 수 있으며 골다공증을 유발하는 부작용이 보고되어 있다. 대표적인 비스테로이드계 진통제인 aspirin (아스피린), indomethacin (인도신), naproxen (낙센), ibuprofen (에드빌, 부루펜시럽), celecoxiv (셀레브렉스), valdecoxib (백스트라) 등은 COX-1 또는 COX-2의 선택적 억제제인데 COX-2를 직접 억제하기에는 부작용이 있어 간접 억제제인 dexibuprofen (제로정-근육통약), ketoprofen (케토프, 케펜택), flubiprofen (스트렙실-인후염), acetaminopen (타이레놀) 등은 선택적 COX-2와 유사한 약리작용이 있으나 그 다음 단계인 프로스타글란딘 생성을 억제하여 말초에 작용하지 않고 중추에만 작용한다.

[0005] 염증 치료제로서 가장 많이 사용되는 화합물종은 코르티코스테로이드이다. 천연 혹은 합성코르티코스테로이드 작용제는 혈압이 상승하고 감염성 미생물의 전염을 증가시키며 장기간 사용 시 소화성 위궤양을 유발하는 여러 가지 심각한 부작용을 초래한다고 알려져 있다.

[0006] 살리실산염의 경우 호흡을 직접적으로 자극하여 증추호흡기 마비뿐만 아니라 혈관 운동을 억제하여 순환 장애를 초래한다. 살리실산염의 위출혈과 간 손상 및 혈액응고 시간의 연장은 널리 알려져 있는 사실이며, 따라서 간 손상, 저프로트롬빈혈증, 비타민K 결핍증 또는 혈우병 환자에게는 아스피린 투여를 피해야 한다. 따라서 현재까지 매우 많은 종류의 염증치료제가 존재함에도 불구하고, 부작용 및 역작용이 없는 안전하고 효과적인 염증 치료제를 개발할 필요성이 여전히 존재하며, 안전한 항염증제의 개발이 시급하다.

[0007] 2002년 323억 달러의 매출을 기록한 세계의 항염증제 시장은 최근 2010년에 7.6% 증가한 578억 달러에 달하였으며, 2017년까지는 5.8% 증가한 859억 달러에 이를 것으로 예상된다.

[0008] 근래 발표된 현대증권의 '2011년 신유망테마' 보고서에 따르면, 천연물신약의 시장규모는 전 세계적으로 1000조 원 수준에 이르고 있으며, 매년 8~10%의 성장세를 보이고 있다. 또한 천연물신약을 1건 개발할 때 전 세계적으로 연간 1조원 이상의 매출을 올리며 매출의 20~50%의 순이익이 창출될 것으로 예상되는 고부가가치산업이라고 보고하고 있다.

[0009] 2010년 8월호 '아시아경제' 보고에 따르면, 국내의 자생한방병원, 이화여대, 서울대 약대의 공동연구팀이 동물 실험을 통하여 6가지 한약재 성분의 염증 기전을 규명하여 'Journal of Ethnopharmacology' 최근호에 게재했다고 밝혔다. 이 연구에서 수백 년간 아시아권에서 염증성 질병에 사용되어 오던 오가피, 우슬, 방풍, 두충, 구척, 흑두 등 6가지 한약재를 이용한 추출물인 GCSB-5를 염증이 유발된 쥐에게 투여해보니, 만성 및 급성 염증이 감소하고 염증 활성화 신호체계가 억제되는 효과를 보임을 확인하였으며, 미국 물질 특허를 획득하여, 제약회사인 '녹십자'와 협력하여 천연물 신약의 개발 단계에 있다. 이 연구는 국내의 천연물을 이용한 염증 치료제 개발의 청신호로 작용할 것으로 예상하고 있다.

[0010] 인간의 수명이 길어지면서 미에 대한 관심이 증가하여 그 산업이 크게 발달하고 있다. 인간의 피부 노화는 유전적인 이유뿐만 아니라 UV에 노출되거나 상처 등의 환경적인 영향 또한 많이 받는 것으로 알려져 있다. 최근 연구 결과에 따르면, 시간에 따라 나타나는 자연적인 노화와 지속적인 스트레스, 흡연, 자외선 노출과 같은 환경적인 노화 모두 콜라겐 분해효소 (MMPs)의 발현을 촉진하여 콜라겐의 합성을 감소시키고 피부 세포내의 조직의 손상과 신호전달 경로를 포함하는 특징을 보인다고 알려져 있다.

[0011] 외부적인 요인 중에 피부에 가장 치명적인 요인은 자외선 노출이다. 자외선에 노출되면 콜라겐 분해효소의 활성이 증가하여 궁극적으로 콜라겐의 합성이 감소되어 피부의 주름을 형성하게 된다. 이러한 효소의 활성과 그 억제제는 피부 세포의 주름을 형성하는 중요한 요인으로 알려져 있다. 자외선은 파장에 따라 UVA (320-400 nm), UVB (280-320 nm), UVC (200-280 nm)로 나뉘는데 이 중에 피부에 직접적으로 해를 주는 자외선의 파장은 UVA와 UVB이다. UVB는 가장 강한 자외선으로 선번 (sunburn)과 홍반뿐만 아니라 유전자 손상을 유발시켜 피부암의 원인이 된다고 알려져 있다. 자외선에 의한 피부 손상은 주름뿐만 아니라 염증 반응도 일으키는 것으로 알려져 있다. 다양한 종류의 염증과 관련된 사이토카인은 피부 세포에서 분비되는 것으로 알려져 있으며, 이렇게 분비된 사이토카인에 의하여 피부에서는 지속적인 염증 반응이 일어나고 만성적인 염증은 암 생성에도 관계된다. 다시 말해서 외부 자극에 의하여 사이토카인들을 생산하도록 유도된 피부세포는 사이토카인 조절 능력을 잃게 되어 여러 피부 질환과 더불어 암의 생성까지도 유발하게 된다.

[0012] 분자량 316.27의 2-(3,4-디하이드록시페닐)-3,5-디하이드록시-7-메소실크로멘-4-온은 람네티나라고도 불리며, 퀘르세틴 (quercetin)의 7위가 메틸화된 구조이며 약물로 사용되는 식물추출물의 일종이다. 갈매기나무 (*Rhamnus amygdalina*)나 정향나무 (*Syzygium aromaticum*)와 고수 (*Coriandrum sativum*)에 배당체인 크산트람닌

으로 존재하고 있으며, 동속의 식물에서 추출한 노랑색 색소를 람네틴이라고 한다.

- [0013] 항염증 효과를 가지는 천연물로부터 유래된 물질이 오랜 기간 동안 전 세계적으로 식품을 통하여 수득되어 왔다면 그 안전성이 증명된 것이며, 투여가 용이하고, 쉽게 언제든지 이용할 수 있기 때문에, 안전한 치료 조성물의 후보가 될 수 있을 것이다.
- [0014] 피부에서, 자연 발생적인 항산화제는 연령에 따라 감소하며, 그 결과로 세포의 정상적인 방어 메카니즘은 자유 라디칼의 생성에 대처하지 못할 수 있다. 이러한 불균형은 유전적 인자들의 결과이며, 피부에서 나타나는 시각적 발현은 생활 노화로 명명될 수 있다. 한편, 불균형은 외부 인자들에 의해 유도된 자유 라디칼 과다생성으로부터 기인할 수 있거나 또는 그에 의해 악화될 수 있다. 예를 들어, UV 노출은 손상 발생 전 세포의 자연적인 방어 메카니즘에 의해 중화될 수 없는 다량의 ROS를 발생시킬 수 있다는 것이 잘 알려져 있다. 그 결과, 다양한 유형의 손상을 갖는 피부 세포가 조직내에 축적된다. UV 노출의 총체적인 유해한 영향은 생활 노화와 달리 광노화로서 알려져 있다. 다른 외부 인자들은 피부에서 과도한 자유 라디칼의 병리학적 증상; 흡연, 오염, 심리적 스트레스, 피부과적 장애, 혈관 장애, 알러지 등을 발생시킬 수 있다.
- [0015] 노화 피부의 특징적 징후는 병인과는 무관하게 콜라겐 생산의 감소 및 기존 콜라겐의 분해로부터 기인하는 탄성 감소이다. 콜라겐은 섬유상 구조 단백질이며, 결합 조직의 세포외 기질의 주요 성분이다. 콜라겐은 인간 피부의 강도 및 탄성에 기여하며, 그의 분해는 피부의 외관 및/또는 기능에서의 변화, 예를 들면 미세한, 표면상의 주름 및 거친, 깊은 주름을 비롯한 주름, 라인, 균열(crevices), 용기부(bumps), 확대된 모공, 비늘 모양(scaliness), 피부 탄성의 박편상 손실(flakiness loss), 처짐(sagging)(눈 부위 및 턱살(jowls)이 부은 것을 포함), 피부 탄력 손실, 손상된 차단 특성, 변색(눈밑 서클(undereye circle) 포함), 얼룩(blotching), 창백함(sallowness), 불규칙한 색소침착(mottled pigmentation), 노인 반점(age spots), 주근깨(freckles), 각화증(keratosis), 비정상적 분화, 케라틴과형성, 탄력섬유증, 모세혈관확장(telangiectasia), 및 각질층(stratum corneum), 피부(dermis), 표피(epidermis), 피부 혈관계에서의 다른 조직학적 변화를 초래한다.
- [0016] 피부에 대한 UV 방사선의 유해한 영향을 감소시키기 위한 수많은 시도들이 행해져 왔다. 선스크린은 태양광에 의한 피부의 광노화를 방지하는데 통상적으로 사용된다. 선스크린은 UV 광을 흡수, 반사 및/또는 산란시키는 성분들을 함유하는 국소 제제이다. 일부 선스크린은 산화아연, 산화티탄, 점토 및 염화철을 비롯한 불투명한 미립자 물질을 기재로 한다. 그러나, 이러한 제제는 가시적이며 폐쇄성이기 때문에, 많은 사람들은 이러한 불투명한 제제들을 화장용으로 허용가능하지 않다고 생각한다. 다른 선스크린들은 피부상에서 투명하거나 또는 반투명한 p-아미노벤조산(PABA), 옥시벤존, 디옥시벤존, 에틸헥실-메톡시 신나메이트, 옥토크릴렌, 옥틸 메톡시신나메이트, 및 부틸메톡시디벤조일메탄과 같은 화학물질을 함유한다. 이들 유형의 선스크린은 화장용으로 보다 허용될 수 있지만, 이러한 선스크린은 여전히 비교적 수명이 짧으며 세척 또는 발한작용에 의해 제거되기 쉽다. 게다가, 당업계에서는 피부에 사용하기 위한 천연 유래의 피부 보호 성분들을 제공하려는 지속적인 추세가 존재한다. 선스크린의 폭넓은 용도에도 불구하고, 광노화는 지속적으로 건강상의 중대한 문제가 되어왔다.
- [0017] MMP-1, 2 및 9 불균형
- [0018] 피부의 세포외 기질(ECM)은 피부에 강도 및 일체성을 부여한다. 매트릭스 메탈로프로테이나제(MMP)는 웨딩트 결합을 절단할 수 있으며, 이에 따라 ECM의 주된 성분인 콜라겐을 분해할 수 있는 프로테아제이다. MMP는 피부의 자체 유지의 일부로서의 정상적인 분해 및 리모델링에서 역할을 수행한다. 그러나, MMP의 과다활성화는 조직 기능 및/또는 구조의 손실을 일으키는 병리학적 증상을 초래하거나 또는 이 증상을 악화시킨다. 다양한 유형의 MMP가 존재하지만, 최근에는 피부 세포외 기질의 리모델링, 상처 치유, 염증, 및 UV 노출과 관련된 산화적 스트레스를 비롯한 산화적 스트레스 분야에서 특정 MMP의 역할에 대해 상당한 주의가 기울여져 왔다.
- [0019] MMP-1, MMP-2 및 MMP-9로서 동정된 세가지 MMP는 피부의 세포외 기질과 특히 관련이 있으며, 정상적 및 병리학적 조직 리모델링에서 역할을 수행한다. 두가지 이유로 인해, MMP-1, 2 및 9는 특별한 관심의 대상이 된다. 첫째, 이들 MMP가 작용하는 기질이 피부의 매우 구조적인 성분들이며, 둘째는 상기 MMP의 병리학적 상태, 즉 염증, 산화적 스트레스 및 UV 노출을 개선하는 작용체에 피부가 계속해서 노출되었기 때문이다. 따라서, 이러한 세가지 MMP의 선택적 억제제는 유익하며 매트탈로프로테이나제의 일반적인 표적화에 비해 더 효율적인 것으로 입증될 수 있다.
- [0020] 피부 세포외 기질의 주요 성분은 당단백질을 포함하며, 세포외 기질내의 대부분의 당단백질은 콜라겐이다.
- [0021] MMP-1(간질(interstitial) 콜라게나제라고도 함)에 의한 콜라겐의 효소적 분해는 수십년 동안 공지되어 왔다. MMP-1은 삼중-나선 콜라겐을 분해하는 능력이 중요하다. MMP-1은 주로 콜라겐 유형 I을 절단하며, 따라서 피

부 콜라겐의 분해 및 상처 치유에 있어서 중요한 역할을 수행한다. 또한, MMP-1의 강한 유도는 비흡연자에 비해 흡연자에서 관찰되었다.

[0022] MMP-2 (젤라티나제 A 또는 72 kDa 유형 IV 콜라게나제) 및 9 (젤라티나제 B 또는 92 kDa 유형 IV 콜라게나제)는 둘 다, 외부 피부에서 상피를 지지하는 치밀판과 관련된 유형 IV 콜라겐을 분해한다. MMP-2 및 MMP-9는 둘 다 산화적 스트레스에 의해 활성화되는 것으로 나타났다. 또한, MMP-2 및 MMP-9는 상처 치유 동안 발현되는 것으로 알려져 있다. 또한, MMP-9는 염증반응 동안 상향조절되지만, MMP-2는 기저막의 특이적 분해 및 기저막 일체성의 과정에서 주요한 역할을 수행한다.

[0023] 또한, MMP-1, 2, 및 9는 UV 방사선에 대한 노출에 의해 활성화될 수 있는 것으로 보고되어 왔다. 구체적으로, MMP-1 및 2는 UVA에 의해 활성화되지만, MMP-1 및 9는 UVB에 의해 활성화된다. 시험관내에서 MMP-2 UVA의 활성화가 주목되었다. UVB 노출은 피부 섬유아세포가 MMP-1을 과생성하도록 유도하는 것으로 보고되어 왔다.

[0024] MMP는 불활성 형태 (즉, 프로MMP, 자이모겐이라고도 함)로 합성되며, 콜라겐 분해가 일어나기 전에 활성화되어야 한다. 일단 활성화되면, MMP는 MMP 효소 활성을 차단할 수 있는 조직 메탈로프로테이나제 억제제 (또는 TIMP)에 의해 조절된다. 건강한 인간 피부 모델에서, MMP 활성화 및 MMP 억제가 조화되어 일어남으로써 피부의 자체 유지의 일부로서 정확한 수준의 콜라겐 파괴를 유지한다. 실제로, 일생을 통해, MMP 활성화와 MMP 억제사이의 균형은 점차적으로 MMP 활성화 쪽으로 이동한다. 이러한 균형의 이동은 외인성 인자들과는 별도로 고유한 (유전적인) 노화 과정의 결과로서 일어난다. 연령에 따라, MMP 활성화 속도는 증가하지만 TIMP-1 및 TIMP-2 생산 속도는 감소된다. 따라서, 연령이 세포의 기질의 일체성의 손실 및 관련된 시각적 노화 징후를 초래한다는 사실은 사실상 피할 수 없는 것으로 보인다.

[0025] 그러나, 추가적으로, 젊은 사람 피부에서도 MMP 활성화와 억제사이의 균형은 외인성 인자들, 예를 들면 산화적 스트레스, UV 노출, 염증 및 담배 사용에 의해 활성화 쪽으로 이동될 수 있다. 언급한 바와 같이, 이들 인자들 중 어느 인자에 대한 만성적인 노출은 MMP-1, 2 및 9 중 하나 이상의 활성화를 유발한다. 이러한 유형의 활성화는 정상적인 조직 리모델링 메커니즘을 벗어나 존재하며, 상응하는 MMP 억제제 보충에 의해서 완전하게 충분히 조절되지 않는다. 상기한 불균형은 조기 노화의 징후로서 시각적으로 나타나는 것처럼 인간 피부에 대해 유해한 영향을 준다.

발명의 내용

해결하려는 과제

[0026] 본 발명은 상기의 필요성에 의해 안출된 것으로서, 본 발명의 목적은 천연물유래의 낮은 세포독성을 보이면서도 자외선 자극에 의한 노화 및 염증에 대한 억제 활성을 동시에 가지는 조성물을 제공하는 것이다.

[0027] 본 발명의 다른 목적은 독성이 낮은 천연물 유래의 LPS 자극에 의한 염증에 대한 항염증 활성을 가지는 물질을 제공하는 것이다.

과제의 해결 수단

[0028] 상기의 목적을 달성하기 위하여 본 발명은 람네틴을 유효성분으로 포함하는 자외선 자극에 의한 노화 및 염증에 대한 억제 활성을 동시에 가지는 약학 조성물을 제공한다.

[0029] 본 발명의 일 구현예에 있어서, 상기 조성물은 쥐의 대식세포와 인간의 상피세포에 대하여 독성을 가지지 않는 것이 바람직하나 이에 한정되지 아니한다.

[0030] 또 본 발명은 람네틴을 유효성분으로 포함하는 자외선 자극에 의한 노화 및 염증에 대한 개선 활성을 동시에 가지는 화장료 조성물을 제공한다.

[0031] 본 발명의 일 구현예에 있어서, 상기 조성물은 스킨, 로션, 크림, 파운데이션, 에센스, 젤, 팩, 폼클링징, 립스틱, 메이크업베이스 또는 비누 형태인 것이 바람직하나 이에 한정되지 아니한다.

[0032] 본 발명은 선스크린을 포함한다. 적합한 선스크린은 수용성 선스크린 (예, 유솔렉스(Eusolox) 232); 지용성(oil soluble) 선스크린 (예, 옥틸 메톡시신나메이트); 무기 선스크린 (예, 이산화티탄, 산화아연) 및 유기 선스크린 (예, 캄포르 유도체, 신나메이트, 살리실레이트, 벤조페논, 트리아진, PABA유도체, 디페닐아크릴레이트 유도체, 및 디벤조일메탄 유도체)을 포함한다. 양은 기재된 제제 및 수형성에 따라 달라질 것이다. 선스크린은 조성물의 0.1 중량% 내지 50 중량%의 양으로 사용될 수 있다. 바람직하게는, 선스크린은 1% 내지 40%의 양, 가장 바람

직하계는 5% 내지 30%의 양으로 사용된다.

- [0033] 조성물은 피부, 모발 및/또는 손톱에 국소 적용하기에 적합한 화장용으로 허용가능한 비히클을 추가로 포함한다. 화장용으로 허용가능한 비히클은 당업계에 잘 알려져 있으며, 최종 적용 용도를 기준으로 선택된다.
- [0034] 예를 들어, 본 발명의 비히클로는 피부에 적용하기에 적합한 것들을 들 수 있지만 이에 한정되지 않는다. 이러한 비히클은 당업자에게 잘 알려져 있으며, 피부에 적용하기에 적합한 하나 이상의 상용성 액체 또는 고체 충전 희석제 또는 비히클을 포함할 수 있다. 비히클의 정확한 양은, 당업자에 의해 비히클과 다른 것으로 분류되는 어떤 다른 활성 성분 (예, 다른 활성 성분)의 수준에 따라 달라질 것이다. 본 발명의 조성물에서, 비히클은 조성물의 약 75 내지 약 99.99 중량%를 차지할 수 있다.
- [0035] 본원에서 비히클 및 조성물은 에멀전을 포함하지만 이에 한정되지 않는 다수의 방식으로 제제화될 수 있다. 예를 들어, 적합한 에멀전은 수중유, 유중수, 수중유중수, 유중수중유, 및 실리콘중수중유 에멀전을 포함한다.
- [0036] 바람직한 조성물은 수중유 에멀전을 포함한다.
- [0037] 본 발명의 조성물은 샴푸, 크림, 왁스, 페이스트, 로션, 밀크, 무스, 젤, 오일, 토닉 및 스프레이를 비롯한 매우 다양한 제품 유형으로 제제화될 수 있다. 바람직한 조성물은 로션, 크림, 젤, 샴푸 및 스프레이로 제제화된다. 이들 제품 형태는 핸드 및 바디 로션, 콜드 크림, 페이스 모이스처라이저, 향-여드름 제제, 국소 진통제, 파운데이션, 아이셰도우, 립스틱을 비롯한 색조 화장품 등을 포함하지만 이에 한정되지 않는 다수의 용도로 사용될 수 있다. 이러한 제품을 제제화하는데 필요한 임의의 추가의 성분들은 제품 유형에 따라 달라지며 당업자에 의해 통상적으로 선택될 수 있다.
- [0038] 본 발명의 제제는 제제의 의도하는 용도 및/또는 담체에 따라 선택되는 성분들을 포함할 수도 있다. 추가의 성분들로는 항산화제, 킬레이트화제, 에멀전 안정화제, 보존제, 방향제, 향미제, 습윤제, 방수제, 수용성 필름-형성제, 지용성 필름 형성제, 보습제, 예를 들면 콜레스테롤, 양이온성 중합체, 음이온성 중합체, 비타민, 추진제 등을 들 수 있지만 이에 한정되지 않는다.
- [0039] 조성물은 화장용 또는 제약 조성물이 되도록 하는 하나 이상의 추가의 활성 성분을 포함할 수 있다. 유용한 활성 물질의 예로는 노인 반점, 각화증 및 주름을 개선시키거나 근질시키는 것들; 진통제, 마취제, 향-여드름 작용제, 항박테리아제, 항효모제, 항진균제, 항바이러스제, 항비듬제, 항피부염제, 항소양제, 항구토제, 항과다각질 용해제, 항-건조 피부 작용제, 항발한제, 항건선제, 항지루제, 헤어 컨디셔너 및 헤어 트리트먼트제, 항노화제, 항주름제, 항진식제, 및 기관계확장제, 선스크린제, 항히스타민제, 색소침착방지제, 상처치유제, 비타민, 코르티코스테로이드, 태닝제(tanning agent)를 들 수 있지만 이에 한정되지 않는다.
- [0040] 본 발명의 제제의 특히 바람직한 실시양태는 항-노화 제품으로 사용되는 피부 보호 로션 또는 크림이다. 이를 위해, 본 발명의 제제는 보습제, 완화제 또는 습윤제인 작용제들과 조합된다. 유용한 조합의 예로는 오일, 지방, 왁스, 에스테르, 지방산 알콜, 지방산 에톡실레이트, 글리콜, 슈가, 히알루론산 및 히알루로네이트, 디메티콘, 시클로메티콘 등이 있다. 추가의 예는 문헌 [International Cosmetic Ingredient Dictionary, CTFA, Eighth Edition, 2000]에서 찾을 수 있다.
- [0041] 본원에 기재된 방법은 피부에 유의한 양의 본 발명의 조성물을 투여하거나 또는 국소적으로 적용하는 것을 포함한다. 적용되는 조성물의 양 및 피부에 대한 국소 적용 빈도는 개인의 요구 및 원하는 조절 수준에 따라 폭넓게 달라질 수 있다. 피부의 노화 징후를 화장 또는 약제로 치료하는 바람직한 방법은 피부에 유의한 양의 신규 조성물을 만성적으로 국소 적용하는 것이다. 환자의 필요에 따라 약제 투여량을 조절하는 것은 피부과 의사 또는 다른 보건의 종사자와 같은 당업자의 인식 범위내에 충분히 든다. 본 발명의 방법은 매일 이용하는 것이 적합하다.
- [0042] 국소 적용 범위의 예로는 1주에 약 1회 내지 1일 약 2회 또는 3회, 바람직하게는 1주당 약 5회 내지 1일 약 3회, 가장 바람직하게는 1일 1회 또는 2회가 제안된다. 하기 실시예는 본 발명을 추가로 예시하지만 본 발명은 이에 한정되지 않는다.
- [0043] 또한 본 발명은 램네티를 유효성분으로 포함하는 LPS 자극에 의한 염증에 대한 억제 활성을 가지는 약학 조성물을 제공한다.
- [0044] 본 발명의 일 구현 예에 있어서, 상기 항염증 활성은 유도물질 나이트레이트 옥사이드와 사이토카인의 생성을 억제함으로써 수행되는 것을 특징으로 하나 이에 한정하지 아니한다.

- [0045] 본 발명의 일 구현 예에 있어서, 상기 항염증 활성화는 준카이네이즈 (c-Jun N-terminal kinase), 어크 (ERK), p38 맵카이네이즈 (MAPK), 콕스-2 (COX-2)의 생성을 억제함으로써 수행되는 것을 특징으로 하나 이에 한정하지 아니한다.
- [0046] 본 발명의 일 구현 예에 있어서, 신호전달 단백질인 준카이네이즈 (c-Jun N-terminal kinase)와 p38 맵카이네이즈 (MAPK)와의 결합상수를 형광분광법을 이용한 측정하여 매우 우수한 결합력을 가지는 것을 특징으로 한다.
- [0047] 이하 본 발명을 설명한다.
- [0048] 본 발명에서는 천연물질에서 분리된 람네티닌의 나이트레이트 옥사이드와 사이토카인의 생성을 억제함으로써 유도되는 항염증 활성화와 이 신호전달 체계 메커니즘을 제시하고 람네티닌과 신호전달 단백질은 준카이네이즈와 p38 맵카이네이즈와 우수한 결합력을 가지는 것을 밝히는 것이다.
- [0049] 이하 본 발명을 단계에 따라 보다 구체적으로 설명하고자 한다.
- [0050] 본 발명에서는 람네티닌을 씨그마알드리치코리아에서 구입하였다.
- [0051] 본 발명에서는 람네티닌에 대하여 쥐의 대식세포 (RAW264.7)와 인간의 표피세포 (HaCaT cells)에 대하여 낮은 독성을 보임을 증명하였으며, LPS 자극에 의해 생성되는 나이트레이트 옥사이드를 억제함을 증명하였으며, 염증유도 사이토카인의 발현량도 저해시키는 것을 확인하였다. 항염증 관련 신호전달체계의 중요한 단백질로 알려진 준카이네이즈, p38맵카이네이즈, 어크의 인산화를 억제 하는 현상과 COX-2의 발현을 억제하는 것으로 신호전달 체계 메커니즘을 증명하였다. 또한 람네티닌과 신호전달 단백질 중에 준카이네이즈와 p38 맵카이네이즈에 우수한 결합력을 가지는 것을 밝힘으로서 본 발명을 완성하였다.
- [0052] 이하 실시예에 의해 본 발명을 보다 구체적으로 설명한다. 이들 실시 예는 오로지 본 발명을 구체적으로 설명하는 것으로, 이들 실시 예에 의해 본 발명의 범위가 제한되지 않는다는 것은 당업계에서 통상적인 지식을 가진 자들에게 있어서 자명할 것이다. 또한 비록 구체적인 실시예로 제시되지는 않았지만, 항염증 작용이 있는 본 발명에 의한 화합물인 람네티닌을 유효성분으로 함유하는 항염증제 약학적 조성물이 가능함이 당업자에게 당연할 것이다.
- [0053] 본 발명에서는 도면1의 람네티닌을 이용하여 정상세포에 대한 독성을 검정하였다.
- [0054] 본 발명의 도면1의 람네티닌을 쥐의 대식세포와 인간의 상피세포에 대한 독성을 조사한 결과 쥐의 대식세포에 대해 25 μ M의 농도의 람네티닌을 처리하였을 때 80%이상의 세포 생존율을 보임을 확인하였으며, 인간의 상피세포에서는 100 μ M의 농도에서도 전혀 세포 독성을 나타내지 않음을 확인하였다 (도 2 참조).
- [0055] 또한 람네티닌은 pathogen인 LPS로 자극된 마우스 대식세포에서 생성되는 염증 유발 물질인 나이트레이트 옥사이드와 염증 유도 사이토카인 MIP-2와 TNF- α 를 농도에 따라 발현을 억제하였으며, 이들 사이토카인을 암호화하는 mRNA의 발현과 신호전달체계에 중요한 단백질인 준카이네이즈, 어크, p38맵카이네이즈의 LPS에 의하여 유도된 인산화를 효과적으로 억제하고 콕스-2 단백질의 발현도 억제되는 것을 확인하였으며, IFN- γ 에 의하여 유도된 준카이네이즈, 어크, p38맵카이네이즈의 인산화와 CD14단백질의 발현도 억제되는 것을 보임으로서 항염증 효과 그 메커니즘을 확인하였다 (도 3, 4, 5 참조).
- [0056] 또한 람네티닌은 형광분광법을 이용하여 신호전달 단백질인 준카이네이즈와 p38 맵카이네이즈와의 결합상수를 측정하였는데 람네티닌은 준카이네이즈와 p38 맵카이네이즈와 강력하게 결합하는 물질임을 확인하였다 (도 6 참조).
- [0057] 상기의 결과로부터 위 발명의 화합물인 람네티닌은 쥐의 대식세포와 인간의 상피세포에 대하여 낮은 세포 독성을 보이며 동시에 항염증 활성을 나타내는 화합물로서 인체에 대한 항염증 치료제의 주요 성분으로서의 후보 물질의 가능성을 보인다.
- [0058] 상기 화합물인 람네티닌은 임상투여시에 비경구로 투여가 가능하며 일반적인 의약품 제제의 형태로 사용될 수 있다.
- [0059] 즉, 본원 발명의 화합물은 실제로 비경구의 여러 가지 제형으로 투여될 수 있는데, 제제화 할 경우에는 보통 사용하는 충전제, 증량제, 결합제, 습윤제, 붕해제, 계면활성제 등의 희석제 또는 부형제를 사용하여 조제된다. 비경구투여를 위한 제제에는 멸균된 수용액, 비수용용제, 현탁제, 유제, 동결건조제, 좌제가 포함된다. 비수용용제, 현탁용제로는 프로필렌글리콜(Propylene glycol), 폴리에틸렌 글리콜, 올리브 오일과 같은 식물성 기름, 에틸올레이트와 같은 주사 가능한 에스테르 등이 사용될 수 있다. 좌제의 기제로는 위텝솔(witepsol),

마크로골, 트윈(tween) 61, 카카오지, 라우린지, 글리세로제라틴 등이 사용 될 수 있다.

[0060] 또한, 상기 화합물은 생리식염수 또는 유기용매와 같이 약제로 허용된 여러 전달체(carrier)와 혼합하여 사용될 수 있고, 안정성이나 흡수성을 증가시키기 위하여 글루코스, 수크로스 또는 텍스트란과 같은 카보하이드레이트, 아스코르브 산(ascorbic acid) 또는 글루타치온과 같은 항산화제(antioxidant), 킬레이팅 물질(chelating agents), 저분자 단백질 또는 다른 안정화제(stabilizers)들이 약제로 사용될 수 있다.

[0061] 상기 화합물의 유효용량은 1 내지 2 mg/kg이고, 바람직하기에는 0.5 내지 1 mg/kg 이며, 하루 1 내지 3회 투여될 수 있다.

[0062] 본 발명의 약학적 조성물에서 상기 화합물의 총 유효량은 거환(bolus) 형태 혹은 상대적으로 짧은 기간 동안 확산(infusion) 등에 의해 단일 투여량(single dose)으로 환자에게 투여될 수 있으며, 다중 투여량(multiple dose)이 장기간 투여되는 분할 치료 방법(fractionated treatment protocol)에 의해 투여될 수 있다. 상기 화합물의 농도는 약의 투여 경로 및 치료 횟수뿐만 아니라 환자의 나이 및 건강상태 등 다양한 요인들을 고려하여 환자의 유효 투여량이 결정되는 것이므로 이러한 점을 고려할 때, 이 분야의 통상적인 지식을 가진 자라면 상기 화합물의 약학적 조성물로서의 특정한 용도에 따른 적절한 유효 투여량을 결정할 수 있을 것이다.

발명의 효과

[0063] 상기에서 살펴본 바와 같이, 본 발명은 천연물 유래한 람네티인이라고 불리는 2-(3,4-디하이드록시페닐)-3,5-디하이드록시-7-메소실크로멘-4-온의 정상 세포인 쥐의 대식세포 (RAW264.7)와 인간의 상피세포 (HaCaT cells)에 대하여 낮은 독성을 보임을 증명하였으며, LPS 자극에 의해 생성되는 나이트레이트 옥사이드를 억제함을 증명하였으며, 염증유도 사이토카인의 발현량도 낮추는 것을 확인하였다.

[0064] 또한 이 항염증 효능은 활성을 나타내는 람네티의 농도 범위에서 전혀 독성을 나타내지 않으므로 항염증 관련 신호전달체계의 중요한 단백질로 알려진 준카이네이즈, p38맵카이네이즈, 어크의 인산화를 억제 하는 현상과 COX-2의 발현을 억제하는 것으로 신호전달 체계 메커니즘을 증명하였다. 또한 람네티와 신호전달 단백질 중에 준카이네이즈와 p38 맵카이네이즈와 우수한 결합력을 가지는 것을 확인하였다. 본 발명에 의해 제공되는 람네티는 활성 농도 범위에서 세포독성을 전혀 나타내지 않으므로 인체에 안전한 항염증제로 유용하게 사용될 수 있으며, 자외선 조사후 콜라겐의 분해요소인 MMPs 생성을 억제하는 것을 확인하여 노화개선 및 주름개선 효과를 가지며, 어크, p38 맵카이네이즈, 준카이네이즈등의 phosphorylation을 억제함으로써 염증 억제 효과를 확인하여 염증 억제 효과를 나타냄으로써 화장품의 조성품으로의 사용 가능성을 제시한다.

도면의 간단한 설명

[0065] 도 1은 0-메틸레이티드 플라보놀인 2-(3,4-디하이드록시페닐)-3,5-디하이드록시-7-메소실크로멘-4-온인 람네티의 구조를 나타낸 그림이다.

도 2는 람네티의 정상세포인 쥐의 대식세포와 인간의 상피세포에 대한 독성을 나타낸 그림이다.

도 3은 람네티를 처리한 마우스 대식세포 RAW264.7 cell에 염증을 일으키는 pathogen으로 알려진 LPS (lipopolysaccharide)로 자극을 주어 생성되는 염증 유발 물질 nitric oxide (NO)양을 펩타이드 농도에 따라 측정하였으며 염증관련 사이토카인인 MIP-2와 TNF-α의 농도를 측정한 그림이다.

도 4는 람네티를 처리한 마우스 대식세포 RAW264.7 cell에 염증을 일으키는 pathogen으로 알려진 LPS (lipopolysaccharide)로 자극을 주어 생성되는 염증관련 단백질의 억제정도를 측정한 그림이다.

도 5는 람네티를 처리한 마우스 대식세포 RAW264.7 cell에 염증을 일으키는 IFN-γ로 자극을 주어 생성되는 염증관련 단백질의 억제정도를 측정한 그림이다.

도 6은 형광분광법을 이용하여 람네티와 준카이네이즈와 p38맵카이네이즈의 해리상수를 계산한 것이다.

본 발명의 도면에서 x축 등에 '1'로 표시되어 있는 것은 본 발명의 화합물 람네티를 의미한다.

발명을 실시하기 위한 구체적인 내용

[0066] 이하, 본 발명을 하기 실시 예에 의해 더욱 상세하게 설명한다.

[0067] 단, 다음 실시 예는 본 발명을 예시하는 것일 뿐, 본 발명의 범위는 다음 실시 예에 의하여 한정되는 것은 아니다.

[0068] 실시 예 1: 쥐의 대식세포와 인간의 상피 세포에 대한 세포독성 측정

[0069] 람네틴에 대한 다음과 같은 방법으로 세포독성을 측정하였다. 마우스 대식세포 (RAW264.7 cell line)는 10% 소태아혈청 (FBS: fetal bovine serum)을 포함하는 RPMI1640배양액으로, 인간의 상피 세포 (HaCaT cell line)는 10% 소태아혈청 (FBS: fetal bovine serum)을 포함하는 DMEM 배양액으로 37°C의 5% CO₂ 배양기에서 배양하였다. 96웰 마이크로 적정플레이트 (microtiter plate)의 각 웰 마다 2 × 10⁴ 세포수가 되도록 각 배양액을 이용하여 100 μl씩 분주한다. 세포가 분주된 플레이트를 37°C의 5% CO₂ 배양기에서 하룻밤 (overnight)동안 배양한 후, 배지를 제거한 플레이트에 100 μM부터 2배의 농도로 희석한 람네틴을 분주한 후, 37°C의 5% CO₂ 배양기에서 하룻밤 (overnight)동안 배양한다. 이때 음성 대조군으로는 람네틴을 처리하지 않고 배양액만을 넣은 것으로 비교하였다. MTT[3-(4, 5-dimethyl-2-thiazolyl)-2,5-diphenyl-2H-tetrazolium bromide]용액 (MTT를 5mg/ml되게 PBS에 녹인 용액) 20 μl를 플레이트의 각 웰 마다 분주하고 37°C의 5% CO₂ 배양기에서 4시간 동안 배양한다.

[0070] 실험 예 2: 쥐의 대식세포에서 LPS자극에 의해 생성되는 나이트라이트 옥사이드의 생산 억제 측정

[0071] 도면 1의 화합물 람네틴에 대하여 항염증 활성 작용에 효과적인지 알아보기 위하여 다음과 같이 실시하였다. 쥐의 대식세포를 10% 소태아혈청, 1% antibiotics (100U/ml penicillin, 100ug/mL streptomycin)를 포함하는 RPMI1640 배양액으로 37°C의 5% CO₂ 배양기에서 배양하였다. 96-웰 마이크로적정 플레이트의 각 웰 마다 2 × 10⁵ 세포수가 되도록 RPMI1640 배양액을 200 μl 씩 분주한다. 이 때 음성 대조군으로는 배양액만을 넣은 것을 사용하였고, 양성 대조군은 LPS 처리한 배양액만 넣은 것을 사용하였다. 96-웰 마이크로적정 플레이트를 37°C의 5% CO₂ 배양기에서 하룻밤 동안 배양한 후, cell proliferation assay에 의하여 람네틴의 세포 독성이 없는 농도인 20 μM에서부터 1 μM까지 한 시간 동안 반응 시키고 이후 LPS로 자극을 주어 24시간동안 배양한다. 24시간 이후에는 배양 상등액 50 μl와 동량의 Griess reagent 시약으로 반응시킴으로 배양 상등액에 있는 나이트라이트 옥사이드의 양을 ELISA판독기 (Molecular Device, Sunnyvale, CA)를 이용하여 540nm에서 흡광도를 측정하였다. 나이트라이트 옥사이드의 양은 standard인 NaNO₃의 흡광도의 양과 비교하여 정량한다.

[0072] 도 3에서 확인할 수 있듯이 1에서 20 μM의 농도의 람네틴을 처리한 후 나이트라이트 옥사이드의 양과 LPS를 처리하지 않은 control의 나이트라이트 옥사이드의 양을 비교 했을때 1 μM에서 20 μM의 농도까지 나이트라이트 옥사이드의 생산을 점차적으로 억제하는 활성을 나타내었으므로 람네틴은 세포독성이 없는 농도에서 나이트라이트 옥사이드에 의한 염증반응에 탁월한 천연물 유래 항염증 치료 물질이 될 수 있을 것이라고 예측할 수 있다.

[0073] 실험 예 3: 쥐의 대식세포에서 Pathogen LPS 자극에 의해 생성되는 염증유도 cytokine의 생산 억제 측정

[0074] 람네틴이 염증유도 사이토카인 MIP-2와 TNF-α를 특이적으로 억제하는지 알아보기 위하여 다음과 같이 실시하였다. 쥐의 대식세포 (Raw264.7세포)를 10% 소태아혈청 (FBS: fetal bovine serum), 1% antibiotics (100U/mL penicillin, 100ug/mL streptomycin)를 포함하는 RPMI1640 배양액으로 5% CO₂ 존재 하에서 37°C에서 배양하였다. 96-웰 마이크로적정 플레이트(microtiter plate)의 각 웰에 1×10⁵ 세포수가 되도록 RPMI1640 배양액 200μl씩 분주한다. 이때 음성 대조군으로는 배양액만을 넣은 것을 사용하였고, 양성 대조군은 LPS 처리한 배양액만 넣은 것을 사용하였다. 96-웰 마이크로적정 플레이트를 5% CO₂ 배양기에서 37°C에서 하룻밤(overnight) 배양 한 후, cell proliferation assay에 의해 1 μM에서 20 μM의 농도의 람네틴을 쥐의 대식세포 에서 3 시간 반응 시키고, 이후 그람 음성균 세포벽을 구성하는 성분이며, 염증을 일으키는 pathogen으로 알려진 LPS (lipopolysaccharide)로 자극을 주어 18~24시간동안 배양한다. 이후, Immuni plate를 MIP-2와 TNF-α를 인식하는 각각의 1차항체로 하룻밤동안 coating하고 PBST로 washing후, 비특이적인 반응의 정지를 위하여 blocking buffer (5% BSA in PBS)로 4°C에서 blocking한다. 1차 항체로 coating처리된 플레이트에 18~24시간 동안 배양을 끝낸 배양 상등 액을 50 μl씩 따서 1차 항체로 coating된 플레이트에 처리하고 2시간 상온에서 배양한다. 이후 MIP-2와 TNF-α를 인식하는 발색 가능한 2차 항체를 처리하고 2시간 후, 발색효소 (streptavidin HRP)를 붙여 40 분 후 TMB (3,3',5,5'-tetramethylbensidine) 용액으로 발색시킨다. 발색을 위하여 10~15분 암흑에서 보관 후 H₂SO₄로 발색을 정지 시킨 후 배양 상등 액에 녹아져 있는 MIP-2와 TNF-α의 양을 ELISA판독기로 540 nm에서 흡광도를 측정하였다. MIP-2와 TNF-α의 양은 standard의 흡광도의 값과 비교하여 정량한다.

- [0075] 도 3에서 확인할 수 있듯이 20ng/ml의 농도의 LPS를 처리하여 유도된 염증 관련 사이토카인인 MIP-2와 TNF- α 는 1 μ M에서 20 μ M의 농도의 람네틴을 처리하였을 때 농도에 따라 점차적으로 사이토카인의 양이 억제되는 것으로 볼 수 있으며, 이것으로써 천연물 유래한 람네틴이 항염증 치료제로서 사용될 수 있음을 시사 할 수 있다.
- [0076] 실험 예 4: 쥐의 대식세포에서 Pathogen LPS 자극에 의해 생성되는 염증유도 cytokine의 mRNA 억제 측정
- [0077] 람네틴이 염증유도 사이토카인을 암호화하는 mRNA를 근본적으로 억제하는지 알아보기 위하여 다음과 같이 실시하였다. 쥐의 대식세포 (Raw264.7 cells)를 10% 소태아혈청 (FBS: fetal bovine serum), 1% antibiotics (100U/mL penicillin, 100ug/mL streptomycin)를 포함하는 RPMI1640 배양액으로 5% CO₂ 존재 하에서 37°C에서 배양하였다. 6-웰 마이크로적정 플레이트(microtiter plate)의 각 웰에 1×10⁶ 세포수가 되도록 RPMI1640 배양액 2ml씩 분주한다. 이때 음성 대조군으로는 배양액만을 넣은 것을 사용하였고, 양성 대조군은 LPS 처리한 배양액만 넣은 것을 사용하였다. 6-웰 마이크로적정 플레이트를 5% CO₂ 배양기에서 37°C에서 하룻밤(overnight) 배양한 후, cell proliferation assay에 의해 20 μ M의 농도의 람네틴을 쥐의 대식세포 에서 3시간 반응 시키고, 이후 LPS (lipopolysaccharide)로 자극을 주어 3시간 동안 배양한다. 이후 쥐의 대식세포를 수거하여 RNeasy Mini Kit (QIAGEN)를 이용하여 total RNA를 추출한다. 추출한 RNA에 50~250ng oligo dT 15mer primer를 넣고 60°C에 10분, ice에 10분후, 5X reverse transcriptase buffer와 reverse transcriptase를 넣고 42°C에서 60분, 70°C에서 15분 두어 cDNA를 합성한다. 이 cDNA를 template로 하여 taq polymerase, dNTP, primer를 넣고 PCR (94°C 1min, 55°C 1min, 72°C 1min, 25 cycles)을 수행한다. PCR로 얻은 샘플을 1% agarose gel에서 전기영동 하여 mRNA발현을 확인한다.
- [0078] 도 4에서 볼 수 있듯이, 람네틴의 무처리군과 비교하였을 때, mMIP-1, mMIP-2, mTNF- α 의 사이토카인을 암호화하는 mRNA 발현을 저해함으로 람네틴이 염증유도 사이토카인의 저해 활성 기작을 가짐을 확인할 수 있었다.
- [0079] 실험 예 5: 쥐의 대식세포에서 Pathogen LPS 자극에 의해 생성되는 염증관련 단백질의 생산 억제 측정
- [0080] 람네틴이 염증유도관련 단백질을 근본적으로 억제하는지 알아보기 위하여 다음과 같이 실시하였다. 쥐의 대식세포 (Raw264.7 cells)를 10% 소태아혈청 (FBS: fetal bovine serum), 1% antibiotics (100U/mL penicillin, 100ug/mL streptomycin)를 포함하는 RPMI1640 배양액으로 5% CO₂ 존재 하에서 37°C에서 배양하였다. 6-웰 마이크로적정 플레이트(microtiter plate)의 각 웰에 3×10⁶ 세포수가 되도록 RPMI1640 배양액 2ml씩 분주한다. 이때 음성 대조군으로는 배양액만을 넣은 것을 사용하였고, 양성 대조군은 LPS 처리한 배양액만 넣은 것을 사용하였다. 6-웰 마이크로적정 플레이트를 5% CO₂ 배양기에서 37°C에서 하룻밤(overnight) 배양 한 후, cell proliferation assay에 의해 20 μ M의 농도의 람네틴을 쥐의 대식세포 에서 3시간 반응 시키고, 이후 LPS (lipopolysaccharide), 또는 IFN- γ 로 자극을 주어 6시간 동안 배양한다. 이후 쥐의 대식세포를 수거하여 lysis 버퍼 (1% Triton X-100, 1% doxylcholate, 0.1% NaN₃)를 이용하여 단백질을 추출하여 Bradford시약을 이용하여 적정 후, 25 μ g의 단백질을 SDS-PAGE를 이용하여 전기영동에 의하여 크기별로 분리된 단백질을 polyvinylidene fluoride (PVDF) 멤브레인으로 전달한 후 콕스-2, 어크, 준카이네이즈, p38 맵카이네이즈의 1차 항체와 그의 특이적인 2차 항체를 이용하여 western blot을 시행하였다. (도 4, 5 참조)
- [0081] 도 4, 5에서 볼 수 있듯이, LPS와 IFN- γ 에 의하여 유도되는 신호전달 단백질인 콕스-2, CD14와 어크, 준카이네이즈, p38 맵카이네이즈의 발현이 람네틴을 처리함으로써 억제되는 것을 확인하였으며, LPS와 IFN- γ 에 의하여 유도되는 신호전달 메커니즘을 규명할 수 있었다.
- [0082] 실험 예 6: 형광분광법을 이용한 해리상수의 계산
- [0083] 10 μ M의 준카이네이즈와 p38 맵카이네이즈를 각각 50mM sodium phosphate buffer (100 mM NaCl, pH8.0)에 녹이고 단백질과 람네틴의 농도가 1:100이 될 때까지 람네틴을 10 μ M, 20 μ M, 40 μ M, 60 μ M, 100 μ M씩 첨가하면서 농도와 형광계를 기록하였다. 다음의 식을 이용하여 해리상수 K_d를 계산하였다.
- [0084]
$$\log((F_0-F)/F)=\log(1/K_d)+n\log[\text{저해제}]$$
- [0085] 상기식에서 F₀와 F는 각각 저해제가 있을 때와 없을 때 324nm에서 검출된 형광신호의 세기이고 n은 단백질에서의 저해제 수이다.
- [0086] 실시 결과, 람네틴과 준카이네이즈와 p38맵카이네이즈와의 해리상수를 측정하였는데 람네틴은 준카이네이즈와

$1.4 \times 10^4 \text{ M}^{-1}$, p38 맵카이네이즈와는 $1.1 \times 10^4 \text{ M}^{-1}$ 의 결합을 보이며 결합하는 물질임을 확인하였다 (도 6 참조).

[0087]

실험 예 7: 카이네이즈 분석법을 통한 IC₅₀의 계산

[0088]

카이네이즈 반응 동안에 생산된 ADP의 양을 정량하는 방법으로 발광 ADP를 검출하는 방법인 ADP-Glo Kanase Assay kit (Promega, WI, USA)을 사용하여 카이네이즈의 활성을 측정하였다. 카이네이즈 버퍼를 사용하여 준카이네이즈와 각 농도별 램네틴을 반응시켜서 카이네이즈 반응을 실온에서 실시한다. 준카이네이즈의 저해제인 SP600125를 사용한 카이네이즈 반응을 이용한 IC₅₀의 값을 대조군으로 한다. ADP-Glo시약을 ADP가 발생하는 카이네이즈 반응이 완결된 시료에 넣은 후 실온에 놓아둔다. 40분 후, 카이네이즈 검출 시약을 시료에 넣은 후 30분 동안 실온에 인큐베이션 한다.

[0089]

실시 결과, 램네틴의 IC₅₀는 41 nM로 준카이네이즈 저해제로 알려진 SP600125의 IC₅₀인 118 nM보다 낮은 농도에서 활성을 나타내는 것으로 보여 램네틴이 준카이네이즈를 저해하여 항염증 활성을 가짐을 규명하여 항염증 후보 물질의 가능성을 제시하였다 (도 7 참조).

[0090]

실험 예 8: 램네틴의 UVB조사에 의한 맵카이네이즈와 MMP-1생성 억제 효과

[0091]

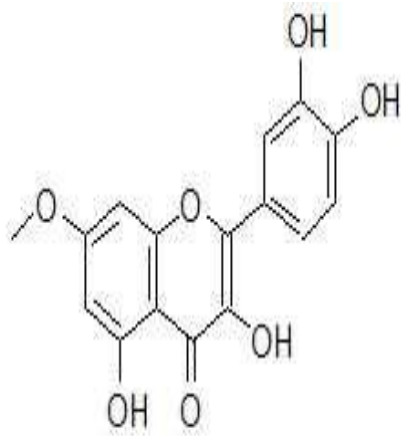
인간 keratinocytes (HaCaT)세포를 각 웰에 3×10^6 세포수가 되도록 분주한 후 37°C에서 5분간 배양하였다. 각 well마다 phosphate buffer saline (PBS)을 넣은 후 UVB 조사장치 (Vilber Lourmat, France)에 40 mJ/cm^2 자외선을 조사하였다. PBS를 제거한 후, 시료를 회석한 무혈청배지를 넣어 24시간 동안 배양한다. 배제를 제거 후 lysis 버퍼 (1% Triton X-100, 1% doxylcholate, 0.1% Na₃)로 세포를 용해시켰다. 용해된 세포를 13000 rpm에서 10분간 원심 분리하여 세포 분리 물을 분리한 Bradford 단백질 측정법을 이용하여 측정하여 25 µg씩의 단백질을 동량을 맞춘 후, 단백질을 가열하여 2분간 변성 시킨 후, 10%의 SDS-PAGE를 이용하여 전기영동에 의하여 크기별로 분리시킨다. 전기영동을 걸어 준 겔의 단백질을 PVDF 맵브레인으로 전달한 후 TBST에 용해시킨 5% BSA에서 1시간 동안 배양시킨 후, TBST버퍼에 1:100으로 용해시킨 MMP-1, 어크, 준카이네이즈, p38 맵카이네이즈의 1차 항체와 그의 특이적인 2차 항체를 이용하여 western blot을 시행하였다. 이 때, 대조군으로는 베타액틴을 이용하였다 (도 8 참조).

[0092]

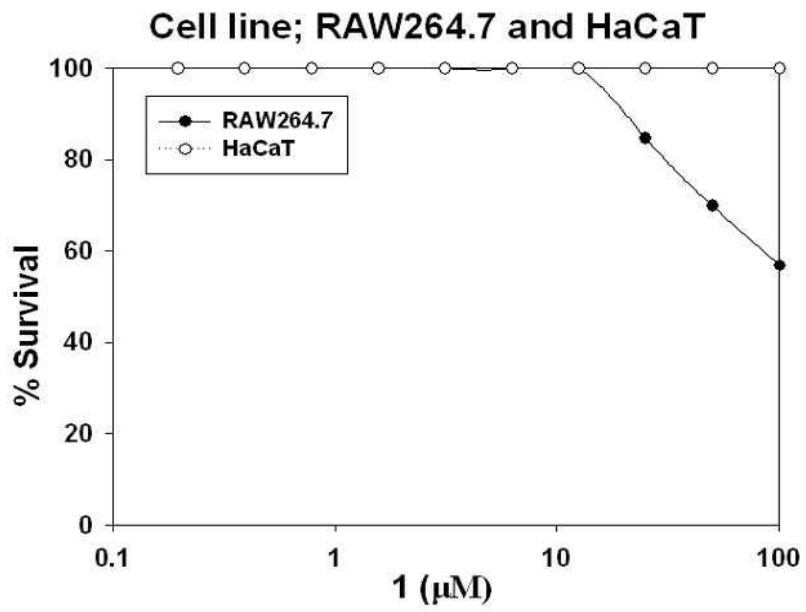
도 8은 본 발명의 일 실시예로서 UVB조사에 의해 음성대조군보다 증가한 MMP-1의 발현과, 어크, 준카이네이즈, p38 맵카이네이즈의 Phosphorylation이 램네틴을 처리한 실험 군에서는 억제되는 것을 확인하였다. 따라서 본 발명에서는 콜라겐 분해효소인 MMPs 생성 억제로 인한 주름개선 효과와 더불어 어크, 준카이네이즈, p38 맵카이네이즈의 Phosphorylation을 억제함으로써 주름 및 염증개선에 탁월한 효능을 가지는 화장품의 재료로서 가능성을 제시한다.

도면

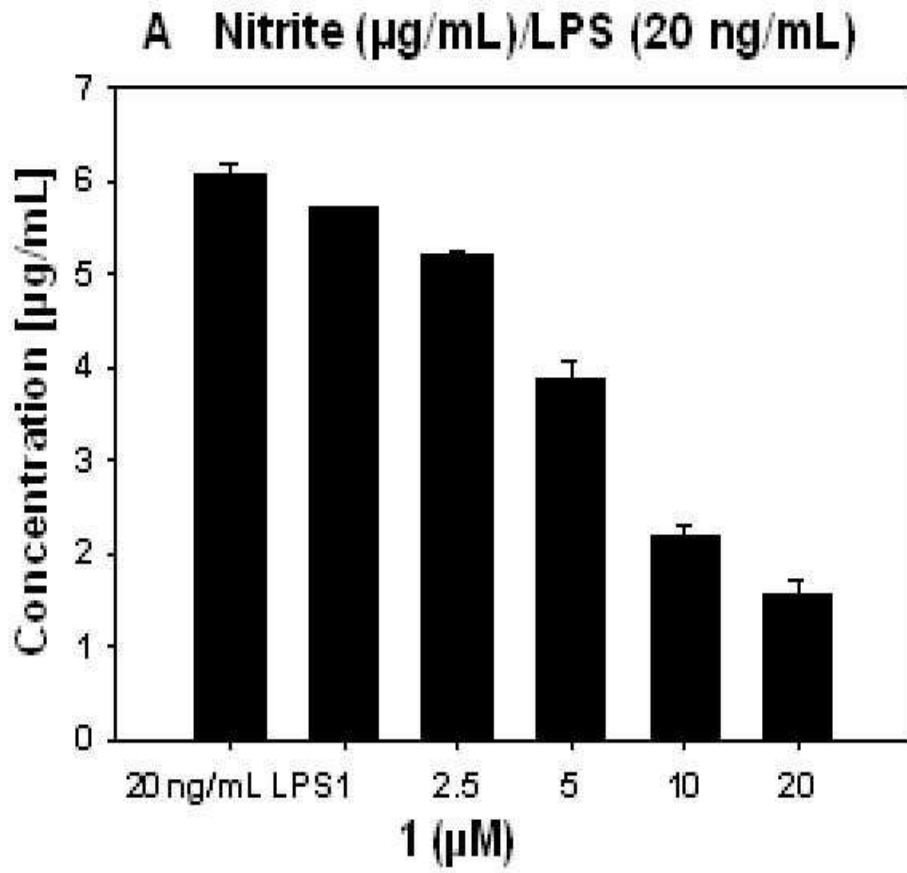
도면1



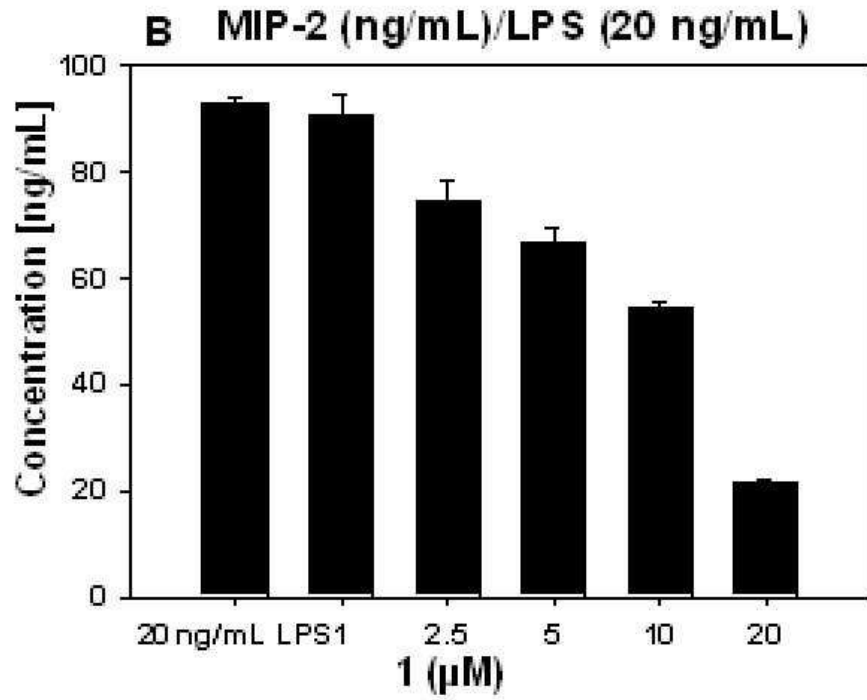
도면2



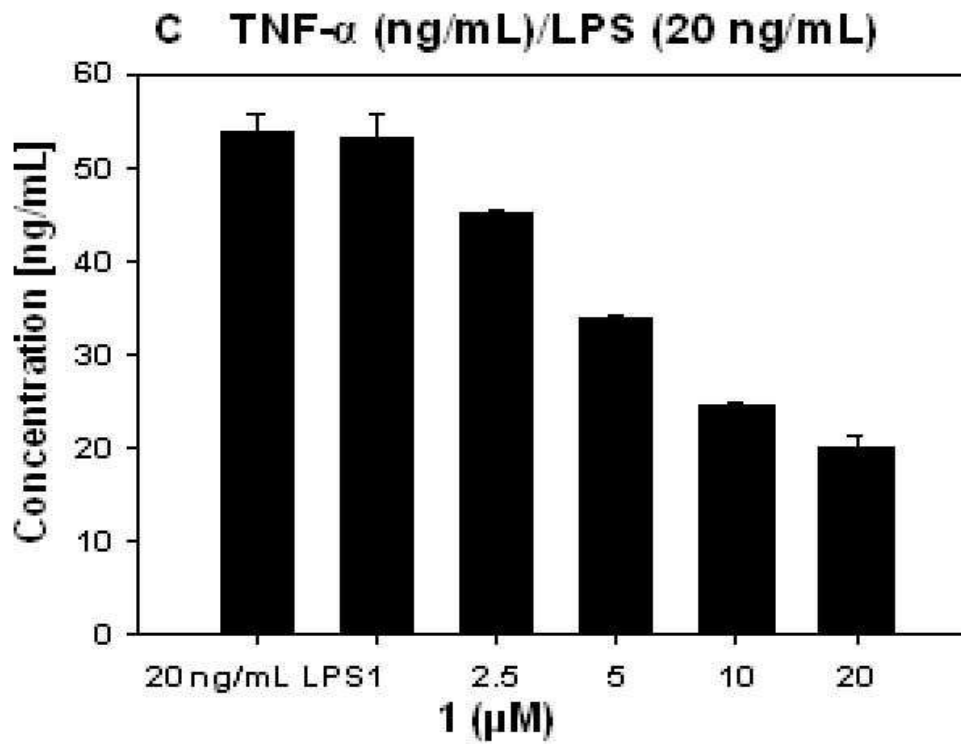
도면3a



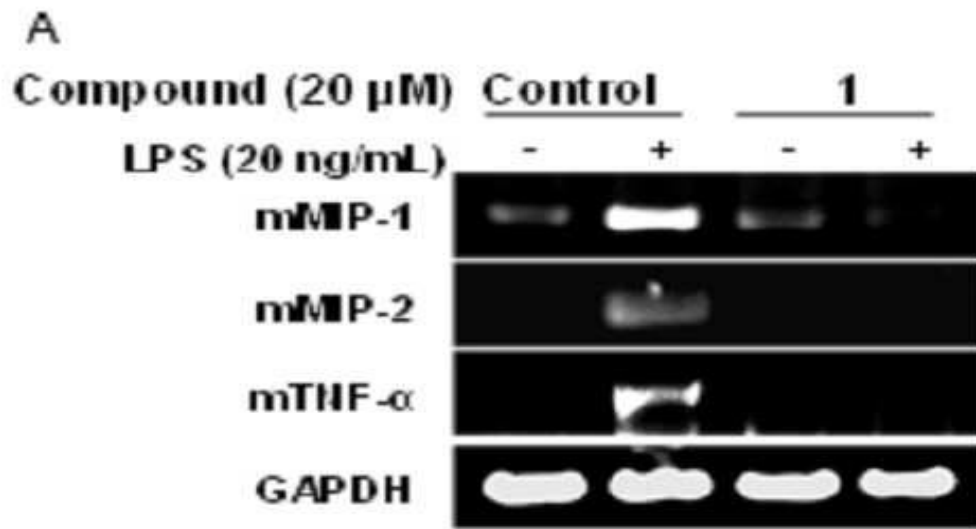
도면3b



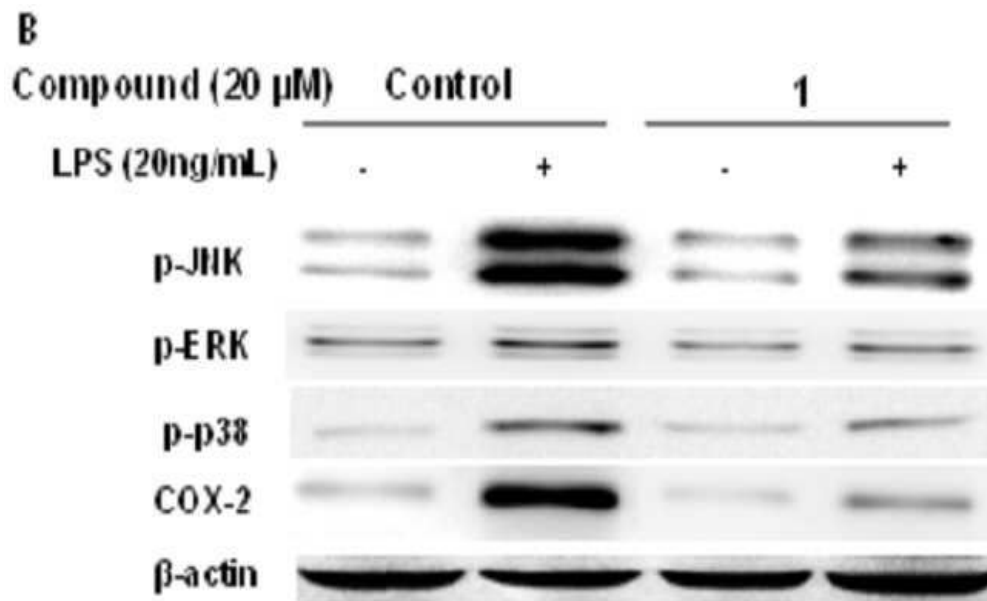
도면3c



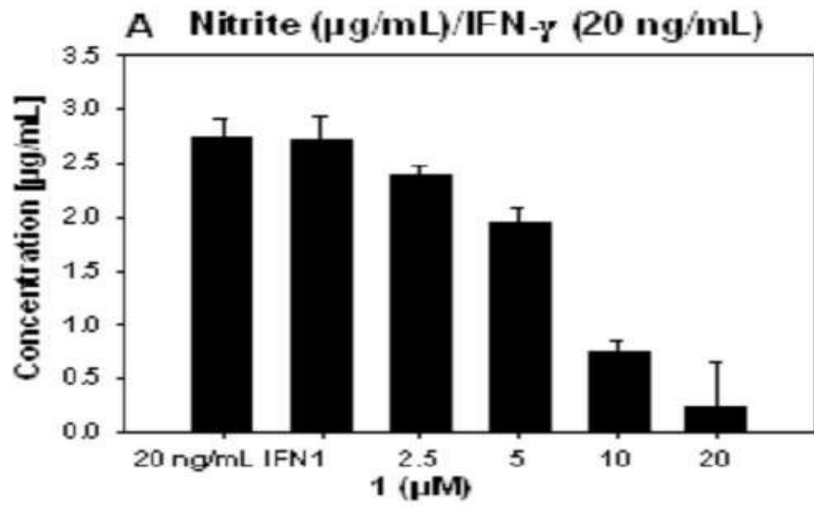
도면4a



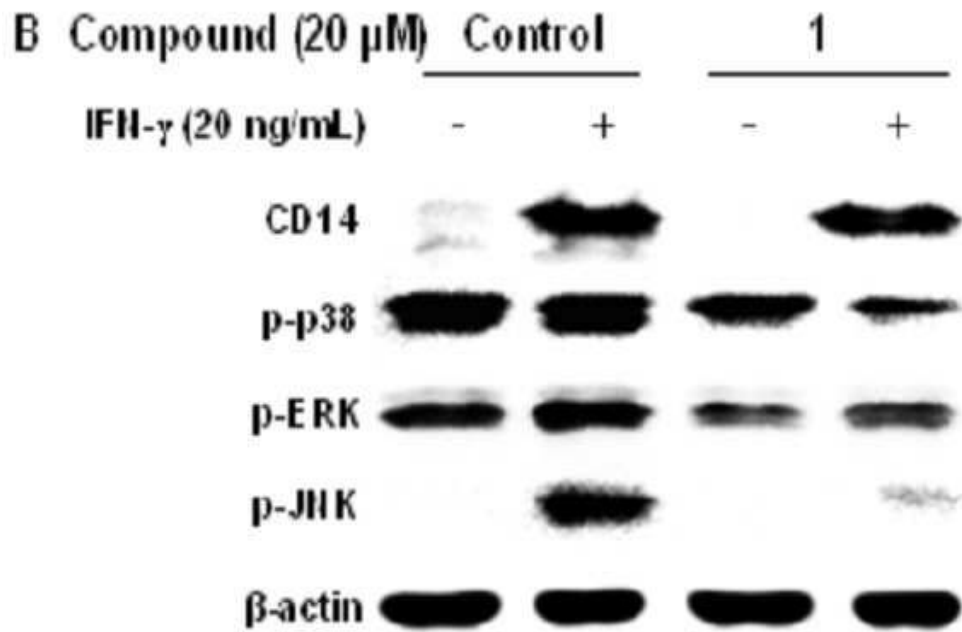
도면4b



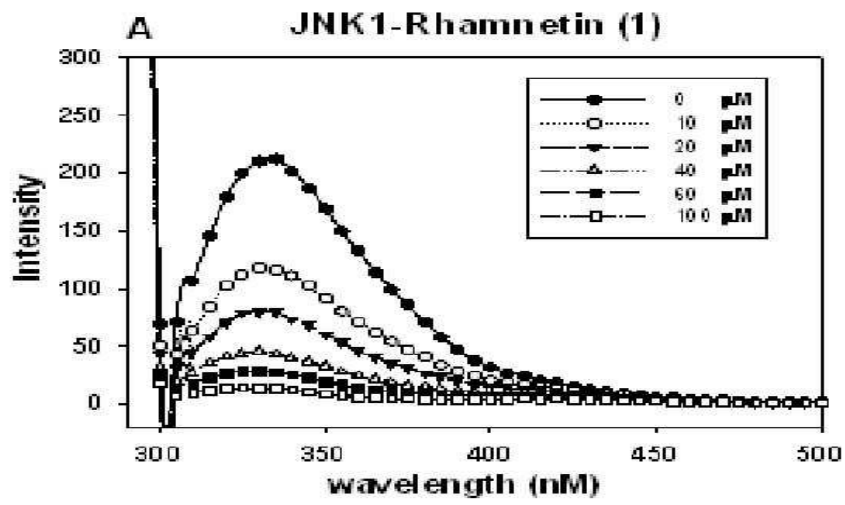
도면5a



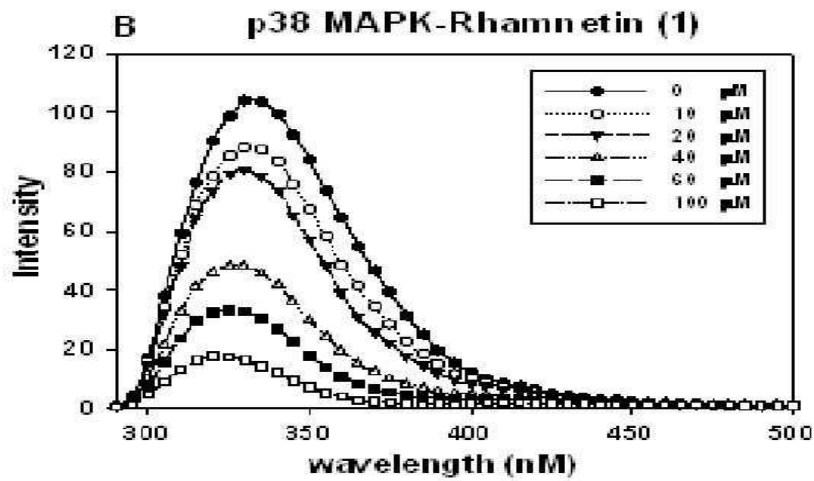
도면5b



도면6a



도면6b



도면7

