



(19) 대한민국특허청(KR)
(12) 공개특허공보(A)

(11) 공개번호 10-2020-0128266
(43) 공개일자 2020년11월12일

(51) 국제특허분류(Int. Cl.)
A61K 31/352 (2006.01) A23L 33/10 (2016.01)
A61K 8/49 (2006.01) A61P 17/00 (2006.01)
A61P 35/00 (2006.01) A61P 9/00 (2006.01)
A61P 9/10 (2006.01) A61Q 19/08 (2006.01)
(52) CPC특허분류
A61K 31/352 (2013.01)
A23L 33/10 (2016.08)
(21) 출원번호 10-2019-0051553
(22) 출원일자 2019년05월02일
심사청구일자 2019년05월02일

(71) 출원인
연세대학교 산학협력단
서울특별시 서대문구 연세로 50 (신촌동, 연세대학교)
이화여자대학교 산학협력단
서울특별시 서대문구 이화여대길 52 (대현동, 이화여자대학교)
(72) 발명자
이승택
서울특별시 서대문구 연세로 50, 과학원 s310호(신촌동)
이영훈
서울특별시 서대문구 연세로 50, 과학원 s304호(신촌동)
서은경
서울특별시 성북구 솔샘로1길 9(정릉동)
(74) 대리인
특허법인충현

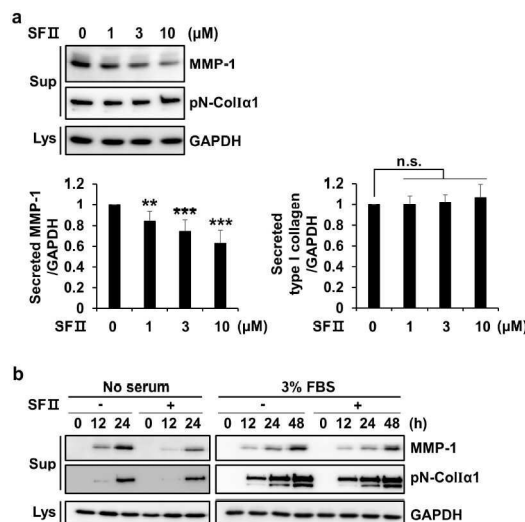
전체 청구항 수 : 총 19 항

(54) 발명의 명칭 스컬캡플라본 II 및 이의 유도체를 유효성분으로 함유하는 MMP 고발현에 의한 질환의 예방 또는 치료용 약학조성물

(57) 요약

본 발명은 스컬캡플라본 II 및 이의 유도체를 유효성분으로 함유하는, MMP-1을 비롯한 다양한 MMP 고발현을 원인으로 하는 질환의 예방 또는 치료용 약학조성물에 관한 것으로, 보다 상세하게는 스컬캡플라본 II가 3 μ M 이하의 농도에서도 MMP-1 등의 발현을 저해함으로써 이의 고발현을 원인으로 하는 다양한 질환의 예방 또는 치료용 약학조성물, 건강기능식품 및 화장품 조성물로 효율적으로 이용될 수 있다.

대표도 - 도1



(52) CPC특허분류

A61K 8/498 (2013.01)
A61P 17/00 (2018.01)
A61P 35/00 (2018.01)
A61P 9/00 (2018.01)
A61P 9/10 (2018.01)
A61Q 19/08 (2013.01)
A23V 2002/00 (2013.01)
A23V 2200/318 (2013.01)
A23V 2250/30 (2013.01)

이 발명을 지원한 국가연구개발사업

과제고유번호	2014M3C9A2064597
부처명	과학기술정보통신부
과제관리(전문)기관명	한국연구재단
연구사업명	포스트게놈 다부처유전체 사업
연구과제명	자연 노화 및 폐경 노화의 동물 모델에서 표적 유전자 발굴 및 기능 연구
기 여 율	1/1
과제수행기관명	연세대학교 산학협력단
연구기간	2018.06.01 ~ 2018.09.30

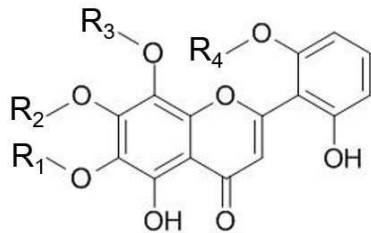
명세서

청구범위

청구항 1

하기 화학식 1로 표시되는 화합물을 유효성분으로 함유하는 피부 노화, 섬유증, 종양, 심장비대 또는 관상동맥 질환의 예방 또는 치료용 약학조성물:

[화학식 1]



상기 화학식에서, R₁ 내지 R₄는 각각 독립적으로 수소 또는 C₁-C₃ 알킬이다.

청구항 2

제1항에 있어서,

상기 R₁ 내지 R₄는 C₁ 알킬인 스컬캡플라본 II인 것을 특징으로 하는 약학조성물.

청구항 3

제1항에 있어서,

상기 피부 노화, 섬유증, 종양, 심장비대 또는 관상동맥질환은 MMP-1 고발현에 의한 질환인 것을 특징으로 하는 약학조성물.

청구항 4

제3항에 있어서,

상기 화학식 1로 표시되는 화합물은 JNK 및 ERK 중에서 선택되는 키나아제(kinase)의 인산화를 감소시켜 MMP-1 고발현을 저해하는 것을 특징으로 하는 약학조성물.

청구항 5

제3항에 있어서,

상기 화학식 1로 표시되는 화합물은 NF-κB의 활성을 억제하여 MMP-1 고발현을 저해하는 것을 특징으로 하는 약학조성물.

청구항 6

제1항에 있어서,

상기 피부 노화는 외인성 노화 또는 내인성 노화인 것을 특징으로 하는 약학조성물.

청구항 7

제1항에 있어서,

상기 섬유증은 간섬유증, 지방 섬유증, 신장 섬유증, 폐 섬유증, 피부 섬유증, 심장 섬유증, 관절 섬유증, 신경 섬유증, 근 섬유증 및 복막 섬유증 중에서 선택되는 어느 하나인 것을 특징으로 하는 약학조성물.

청구항 8

제1항에 있어서,

상기 종양은 전립선암, 신장 세포암종, 간암, 폐암, 유방암, 대장암, 신경아세포종, 다형성신경교아종(glioblastoma multiforme), NUT 정중선 종양(NUT midline carcinoma) 및 NUT 재배열과 관련된 편평 상피암 중에서 선택되는 어느 하나인 것을 특징으로 하는 약학조성물.

청구항 9

제1항에 있어서,

상기 심장비대는 좌심실 비대증, 심부전증, 승모판막 폐쇄부전증, 대동맥판막 폐쇄부전증, 고혈압, 확장성 심근병증, 허혈성 심장 질환, 심실 중격 결손증, 삼첨판막 폐쇄부전증, 폐동맥판막 폐쇄부전증, 폐동맥 고혈압, 우심실 심근경색, 우심실을 침범하는 심근병증, 심방중격 결손증, 심방 세동, 비후성 심근증 및 침윤성 심근증 중에서 선택되는 어느 하나인 것을 특징으로 하는 약학조성물.

청구항 10

제1항에 있어서,

상기 관상동맥질환은 협심증 또는 심근경색증인 것을 특징으로 하는 약학조성물.

청구항 11

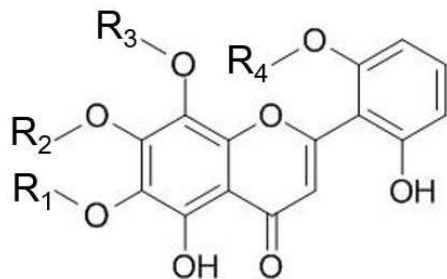
제1항에 있어서,

상기 화학식 1로 표시되는 화합물의 농도는 10 μm 이하인 것을 특징으로 하는 약학조성물.

청구항 12

하기 화학식 1로 표시되는 화합물을 유효성분으로 함유하는, 대상체 내 MMP-1 발현억제용 건강기능식품:

[화학식 1]



상기 화학식에서, R₁ 내지 R₄는 각각 독립적으로 수소 또는 C₁-C₃ 알킬이다.

청구항 13

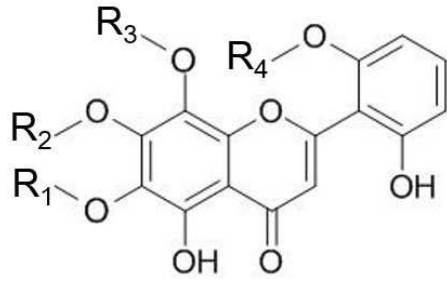
제12항에 있어서,

상기 R₁ 내지 R₄는 C₁ 알킬인 스컬캡플라본 II인 것을 특징으로 하는 건강기능식품.

청구항 14

하기 화학식 1로 표시되는 화합물을 유효성분으로 함유하는 피부 노화, 섬유증, 종양, 심장비대 또는 관상동맥 질환의 예방 또는 개선용 건강기능식품:

[화학식 1]



상기 화학식에서, R₁ 내지 R₄는 각각 독립적으로 수소 또는 C₁-C₃ 알킬이다

청구항 15

제14항에 있어서,

상기 피부 노화, 섬유증, 종양, 심장비대 또는 관상동맥질환은 MMP-1 고발현에 의한 질환인 것을 특징으로 하는 건강기능식품.

청구항 16

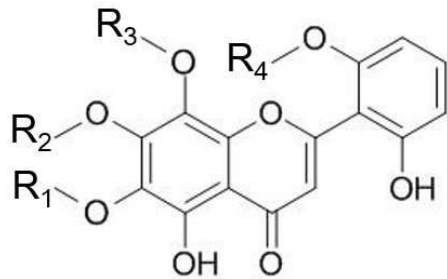
제14항에 있어서,

상기 R₁ 내지 R₄는 C₁ 알킬인 스컬캡플라본 II인 것을 특징으로 하는 건강기능식품.

청구항 17

하기 화학식 1로 표시되는 화합물을 유효성분으로 함유하는 피부 노화 방지용 화장품 조성물:

[화학식 1]

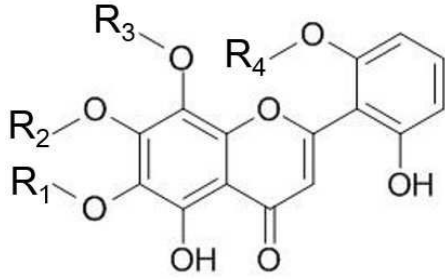


상기 화학식에서, R₁ 내지 R₄는 각각 독립적으로 수소 또는 C₁-C₃ 알킬이다.

청구항 18

하기 화학식 1로 표시되는 화합물을 유효성분으로 함유하는 MMP-3, MMP-7, MMP-8, MMP-10, MMP-11, MMP-12, MMP-13, MMP-14, MMP-15, MMP-17, MMP-19, MMP-23, MMP-25 및 MMP-26로 구성된 군으로부터 선택되는 하나 이상의 MMP의 고발현으로 인한 질환의 예방 또는 치료용 약학조성물:

[화학식 1]



상기 화학식에서, R₁ 내지 R₄는 각각 독립적으로 수소 또는 C₁-C₃ 알킬이다.

청구항 19

제18항에 있어서,

상기 질환은 종양, 관상동맥질환, 치주질환, 당뇨병성 망막병증, 관절질환, 골다공증, 알포트 증후군, 만성 폐쇄성 폐 질환(COPD), 염증성 장 질환, 건선, 다발성 경화증, 죽상경화증, 심부전증, 천식, 연령-관련 황반 변성(ARMD), 뇌졸중, 만성 창상, 외상성 뇌상해, 척수 손상, 지주막하 출혈, 결핵, 고호모시스테인혈증 후유증(sequelae of hyperhomocystinemia), 동맥류(aneurism), 뇌부종, 지발성 운동장애(dyskinesia), AIDS 유발성 치매, 간질, 알츠하이머병, 헌팅톤병, 파킨슨병, 근위축성 측색경화증 및 자간전증(Preeclampsia)으로 구성된 군으로부터 선택되는 1종 이상의 질환인 것을 특징으로 하는 약학조성물.

발명의 설명

기술 분야

[0001]

본 발명은 스컬캡플라본 II 및 이의 유도체를 유효성분으로 함유하는 MMP, 구체적으로는 MMP-1을 비롯하여 AP-1 또는 NF-κB에 의해 발현이 조절되는 MMP의 고발현을 원인으로 하는 질환의 예방 또는 치료용 약학조성물에 관한 것으로, 보다 상세하게는 MMP-1의 발현을 저해하는 스컬캡플라본 II 및 이의 유도체를 함유하는, MMP-1 발현에 의한 피부 노화(skin aging), 섬유증(fibrosis), 종양(tumor), 심장비대(cardiomegaly) 또는 관상동맥질환(coronary artery disease)의 예방 또는 치료용 약학조성물 및 건강기능식품에 관한 것이다.

배경 기술

[0002]

스컬캡플라본(skullcapflavone) II는 폴리페놀 구조를 가진 자연 발생적인 플라보노이드 화합물로서 Neobaicalein으로도 알려져 있으며, 황금(*Scutellaria baicalensis*), *S. litwinowii* 및 *S. pinnatifida*의 뿌리에서 유래한다. 특히, 스컬캡플라본 II에 기인한 생물학적 기능에는 염증의 감소, 파골세포 형성의 억제, 세포 성장의 감소, 세포 자멸사의 유도 및 콜레스테롤의 감소가 포함된다. 스컬캡플라본 II는 종양증식인자(TGF)-β1 발현의 감소와 SMAD2/3 활성화의 후속 억제를 통해 오발부민-유도 기도염증(ovalbumin-induced airway inflammation)을 억제한다. 스컬캡플라본 II는 ROS 감소를 통해 유사분열물질-활성화 단백질 인산화효소(MAPK; mitogen-activated protein kinase), Src 및 cAMP 반응요소 결합(CREB) 신호전달 과정을 저해하여 파골세포 형성을 억제하며, 인테그린 β3, Src, p130Cas의 발현 감소를 통해 Rho GTPase의 활성을 하향 조절하여 파골세포의 생존과 뼈의 흡수를 감소시킨다. 또한 스컬캡플라본 II는 LNCaP, PC-3 및 HeLa 세포를 비롯한 다양한 암 세포주에서 세포 증식을 억제한다. 이밖에도 스컬캡플라본 II는 스테롤 조절 요소-결합 단백질 1(SREBP-1)의 mRNA 발현을 감소시키고, SREBP-1 발현 감소에 의해 프로틴 전환 효소 서브틸리신/케신 9형(PCSK9)의 mRNA 발현을 억제한다. PCSK9의 발현 감소는 세포 표면의 저밀도 지단백 수용체(LDLR)의 내포작용을 저해하여, 세포 표면에 LDLR 수준이 높아짐으로써 혈중 콜레스테롤 수준을 감소시킨다고 알려져 있다.

[0003]

한편, 콜라겐은 포유 동물의 세포 외 공간에서 중요한 구조 단백질이며 힘줄, 인대, 뼈 및 피부와 같은 다양한 결합 조직을 강화하고 지지한다. 콜라겐 분자는 반복 아미노산 서열 (Gly-X-Y)_n을 갖는 3 개의 α-사슬로 이루어진 3 중 나선형 구조를 형성한다. 이 콜라겐 3중 나선이 모여서 콜라겐 원섬유(fibril)를 형성한다. 인간에서 콜라겐은 총 28 종류가 확인되었으며, type I 콜라겐이 가장 많이 존재하다.

- [0004] 콜라겐은 장기 형태 형성, 상처 치유, 피부 노화와 같은 조직 개조(remodeling)를 포함한 다양한 정상적인 생리학 과정에 관여한다. 또한 콜라겐은 염증, 관절염, 죽상경화성 심혈관 질환 및 종양 형성과 같은 많은 병리학 과정에서도 분해된다. 기질금속단백질분해효소(MMP; matrix metalloprotease)는 콜라겐을 포함한 세포외 기질 성분을 절단하여 조직을 개조하는 과정에서 중요한 역할을 하는 아연-의존 엔도캡티다아제이다. 이들 중 기질금속단백질분해효소-1(MMP-1)은 섬유성 콜라겐인 type I, II, III 콜라겐을 절단하며, type I 콜라겐의 경우 $\alpha 1$ 사슬의 Gly⁷⁷⁵↓Ile⁷⁷⁶과 $\alpha 2$ 사슬의 Gly⁷⁷⁵↓Leu⁷⁷⁶를 절단하여 3/4 및 1/4 길이의 콜라겐 단편을 생성한다.
- [0005] 콜라겐은 염증 병변에서도 빈번히 분해된다. 예를 들어 염증성 여드름 병변에서 염증성 사이토카인 및 MMP 발현의 상향 조절 결과 콜라겐 분해가 증가한다. 각막 기질 상처 치유 과정에서 플라스미노겐 및 MMP의 활성화로 인해 우로키나제형플라스미노겐활성제(urokinase-type plasminogen activator)에 의한 콜라겐 파괴가 증가한다. 이에 따라, MMP-1의 발현을 저해하여 콜라겐 분해를 억제하면, 콜라겐 분해에 의해 발생하는 질환을 예방 또는 치료할 수 있다.
- [0006] 그러나, 현재 MMP-1의 발현을 저해할 수 있는 안전한 화합물 발굴은 미진한 상태이다. 현재 MMP-1의 발현을 저해하는 천연물 추출물로는 가야보리수 잎의 에탄올 추출물 또는 열수추출물이 공지된 바 있고, MMP-1의 효소 활성을 저해하는 화합물로 (S)-2-([1,1'-비페닐]-4-일설폰닐)-1,2,3,4-테트라하이드로이소퀴놀린-3-카르복실산이 공지된 바 있다. 또한 퀘르세틴(quercetin), 캠퍼롤(kaempferol), 오고닌(wogonin), 아피제닌(apigenin) 및 루테올린(luteolin)과 같은 일부 천연 플라보노이드는 AP-1 활성화를 감소시킴으로써 MMP-1 발현을 억제하는 효능이 이미 입증된 바 있다. 그러나, 인간의 피부 섬유아세포에서 MMP-1 발현을 억제하기 위해서는 상대적으로 높은 농도(> 10 μ M)의 플라보노이드를 필요로 하므로, 보다 낮은 농도로도 MMP-1 발현을 억제할 수 있는 새로운 약물의 개발이 필요한 실정이다.
- [0007] 따라서, 본 발명자는 스컬갑플라본 II가 3 μ M 이하의 농도에서도 AP-1과 NF- κ B의 활성화를 억제함으로써 이들에 의해 발현이 조절되는 MMP-1을 비롯한 다양한 MMP들의 발현을 저해하여 이의 기질인 콜라겐의 분해를 억제함을 밝힘으로써, 스컬갑플라본 II 및 이의 유도체를 유효성분으로 하여 MMP-1을 비롯한 다양한 MMP들의 고발현을 원인으로 하는 질환의 예방 또는 치료용 약학조성물 및 건강기능식품을 제공할 수 있음에 착안하여 본 발명을 완성하기에 이르렀다.

선행기술문헌

특허문헌

- [0008] (특허문헌 0001) 특허문헌 1. 한국 등록특허 공보 제10-1914866호

비특허문헌

- [0009] (비특허문헌 0001) 비특허문헌 1. Jang, Ha-Young, et al. International immunopharmacology 12.4 (2012): 666-674.
- (비특허문헌 0002) 비특허문헌 2. Lee, Jiae, et al. The FASEB Journal (2018): fj-201800866RR.

발명의 내용

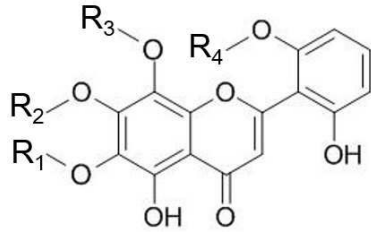
해결하려는 과제

- [0010] 본 발명은 상기와 같은 문제점을 고려하여 안출된 것으로, 본 발명의 목적은 독성 및 부작용 없이 인체에 안전하게 사용할 수 있는, 스컬갑플라본 II 및 이의 유도체를 유효성분으로 함유하는, MMP-1을 비롯한 다양한 MMP의 고발현을 원인으로 하는 질환의 예방 또는 치료용 약학조성물, 건강기능식품 및 화장료 조성물을 제공하고자 하는 것이다.

과제의 해결 수단

[0011] 상기한 바와 같은 목적을 달성하기 위한 본 발명은 하기 화학식 1로 표시되는 화합물을 유효성분으로 함유하는 피부 노화, 섬유증, 종양, 심장비대 또는 관상동맥질환의 예방 또는 치료용 약학조성물을 제공한다.

[0012] [화학식 1]



[0013]

[0014] 상기 화학식에서, R_1 내지 R_4 는 각각 독립적으로 수소 또는 C_1 - C_3 알킬이다.

[0015] 상기 R_1 내지 R_4 는 C_1 알킬인 스킴플라본 II일 수 있다.

[0016] 상기 피부 노화, 섬유증, 종양, 심장비대 또는 관상동맥질환은 MMP-1 고발현에 의한 질환일 수 있다.

[0017] 상기 화학식 1로 표시되는 화합물은 JNK 및 ERK 중에서 선택되는 키나아제(kinase)의 인산화를 감소시켜 MMP-1 고발현을 저해하는 것일 수 있다.

[0018] 상기 화학식 1로 표시되는 화합물은 NF- κ B의 활성을 억제하여 MMP-1 고발현을 저해하는 것일 수 있다.

[0019] 상기 피부 노화는 자외선에 의한 광노화와 추위, 바람, 스트레스를 포함하는 환경적 요인에 의한 외인성 노화와, 나이의 증가에 따른 여성 호르몬 감소, 신진 대사의 저하, 염증의 증가를 포함하는 내인성 요인에 의한 내인성 노화 중에서 선택되는 어느 하나일 수 있으나, 이에 제한되는 것은 아니다.

[0020] 상기 섬유증은 간섬유증, 지방 섬유증, 신장 섬유증, 폐 섬유증, 피부 섬유증, 심장 섬유증, 관절 섬유증, 신경 섬유증, 근 섬유증 및 복막 섬유증 중에서 선택되는 어느 하나일 수 있다.

[0021] 상기 종양은 전립선암, 신장 세포암종, 간암, 폐암, 유방암, 대장암, 신경아세포종, 다형성신경교아종(glioblastoma multiforme), NUT 정중선 종양(NUT midline carcinoma) 및 NUT 재배열과 관련된 편평 상피암 중에서 선택되는 어느 하나일 수 있다.

[0022] 상기 심장비대는 좌심실 비대증, 심부전증, 승모판막 폐쇄부전증, 대동맥판막 폐쇄부전증, 고혈압, 확장성 심근병증, 허혈성 심장 질환, 심실 중격 결손증, 삼첨판막 폐쇄부전증, 폐동맥판막 폐쇄부전증, 폐동맥 고혈압, 우심실 심근경색, 우심실을 침범하는 심근병증, 심방중격 결손증, 심방 세동, 비후성 심근증 및 침윤성 심근증 중에서 선택되는 어느 하나일 수 있다.

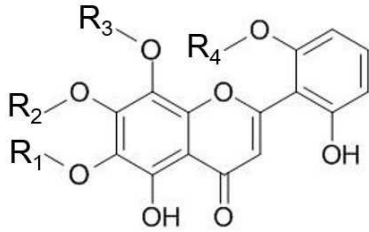
[0023] 상기 관상동맥질환은 협심증 또는 심근경색증일 수 있다.

[0024] 상기 화학식 1로 표시되는 화합물의 농도는 10 μ m 이하일 수 있다.

[0025] 상기 화학식 1로 표시되는 화합물의 농도는 3 μ m 이하일 수 있다.

[0026] 또한, 본 발명은 하기 화학식 1로 표시되는 화합물을 유효성분으로 함유하는, 대상체 내 MMP-1 발현억제용 건강 기능식품을 제공한다.

[0027] [화학식 1]



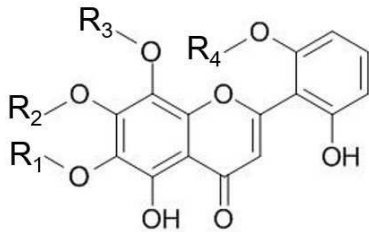
[0028]

[0029] 상기 화학식에서, R₁ 내지 R₄는 각각 독립적으로 수소 또는 C₁-C₃ 알킬이다.

[0030] 상기 R₁ 내지 R₄는 C₁ 알킬인 스컬캡플라본 II일 수 있다.

[0031] 또한, 본 발명은 하기 화학식 1로 표시되는 화합물을 유효성분으로 함유하는 피부 노화, 섬유증, 종양, 심장비대 또는 관상동맥질환의 예방 또는 개선용 건강기능식품을 제공한다.

[0032] [화학식 1]



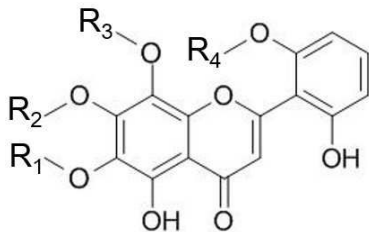
[0033]

[0034] 본 발명의 화학식 1 화합물에 대해서는 이미 상술하였으므로, 과도한 중복을 피하기 위해 그 기재를 생략한다.

[0035] 상기 피부 노화, 섬유증, 종양, 심장비대 또는 관상동맥질환은 MMP-1 고발현에 의한 질환일 수 있다.

[0036] 또한, 본 발명은 하기 화학식 1로 표시되는 화합물을 유효성분으로 함유하는 피부 노화 방지용 화장품 조성물을 제공한다.

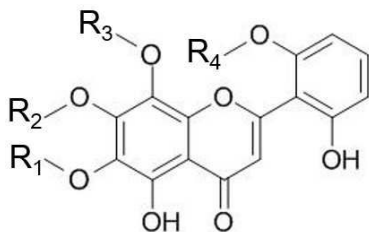
[0037] [화학식 1]



[0038]

[0039] 또한, 본 발명은 하기 화학식 1로 표시되는 화합물을 유효성분으로 함유하는, MMP-3, MMP-7, MMP-8, MMP-10, MMP-11, MMP-12, MMP-13, MMP-14, MMP-15, MMP-17, MMP-19, MMP-23, MMP-25 및 MMP-26로 구성된 군으로부터 선택되는 하나 이상의 MMP의 고발현으로 인한 질환의 예방 또는 치료용 약학조성물을 제공한다.

[0040] [화학식 1]



[0041]

[0042] 구체적으로는, 상기 질환은 종양, 관상동맥질환, 치주질환, 당뇨병성 망막병증, 관절질환, 골다공증, 알포트 증후군, 만성 폐쇄성 폐 질환(COPD), 염증성 장 질환, 건선, 다발성 경화증, 죽상경화증, 심부전증, 천식, 연령-

관련 황반 변성(ARMD), 뇌졸중, 만성 창상, 외상성 뇌상해, 척수 손상, 지주막하 출혈, 결핵, 고호모시스테인혈증 후유증(sequelae of hyperhomocystinemia), 동맥류(aneurism), 뇌부종, 지발성 운동장애(dyskinesia), AIDS 유발성 치매, 간질, 알츠하이머병, 헌팅톤병, 파킨슨병, 근위축성 측색경화증 및 자간전증(Preeclampsia)으로 구성된 군으로부터 선택되는 1종 이상의 질환이다.

발명의 효과

[0043]

본 발명에 따르면, 독성 및 부작용 없이 인체에 안전하게 사용할 수 있는, 스컬캅플라본 II 및 이의 유도체를 유효성분으로 함유하는, MMP-1을 비롯한 다양한 MMP의 고발현을 원인으로 하는 질환의 예방 또는 치료용 약학조성물, 건강기능식품 및 화장품 조성물을 제공할 수 있다.

도면의 간단한 설명

[0044]

도 1은 포피 섬유아세포에서 MMP-1과 I형 콜라겐의 발현에 대한 스컬캅플라본 II의 효과를 나타낸 것으로, 도 1(a)는 포피 섬유아세포를 표시된 농도의 스컬캅플라본 II(SF II)를 함유하는 무혈청 DMEM에서 24 시간 동안 배양한 후의 웨스턴블롯 측정 결과이고[* $p < 0.01$ 및 *** $p < 0.001$ vs. 0 μ M 스컬캅플라본 II로 배양한 샘플; n.s., 유의하지 않음.], 도 1(b)는 포피 섬유아세포를 3 μ M 스컬캅플라본 II를 함유한 3 % FBS를 포함하는 DMEM 또는 무혈청 DMEM에서 지시된 시간 동안 배양하고, 조건배지(conditioned medium) 및 세포 용해물을 항-MMP-1, 항-pN-ColI α 1 및 항-GAPDH 항체로 9 % SDS-PAGE 및 웨스턴 블롯으로 분석한 결과 이미지이다.

도 2는 포피 섬유아세포의 증식과 세포독성에 대한 스컬캅플라본 II의 효과를 나타낸 것으로, 도 2(a)는 MTT 시약을 사용하여 파장 565 nm에서의 흡광도를 기준으로 생존 세포 수를 측정한 결과 그래프이고[0 day의 생존 세포 수에 비해 각 day 별로 살아있는 세포의 수를 상대적인 값으로 나타냄; ** $p < 0.01$ vs. 0 μ M 스컬캅플라본 II와 함께 배양한 샘플], 도 2(b)는 스컬캅플라본 II와 함께 24 시간 배양한 후, FITC annexin V와 7-AAD로 사멸 세포를 염색한 후의 유세포 분석 결과 이미지이다.

도 3은 포피 섬유아세포에서 MMP-1 전사에 대한 스컬캅플라본 II의 효과를 나타낸 것으로, 도 3(a)는 실시간 RT-PCR을 사용하여 DMSO 또는 스컬캅플라본 II 처리 포피 섬유아세포에서 MMP-1 mRNA 수준을 측정한 그래프이고[* $p < 0.05$ vs. 0 μ M 스컬캅플라본 II와 함께 배양한 샘플], 도 3(b)는 포피 섬유아세포를 프로모터가 없는 루시페라아제(luciferase) 발현 벡터인 pGL3-Basic과 MMP-1 유전자의 프로모터에 의하여 파이어플라이 루시페라아제를 발현하는 벡터인 pGL3-MMP-1 프로모터 및 형질 감염 효율을 측정하기 위한 레닐라 루시페라아제 발현 벡터인 pRL-TK로 일시적으로 형질 감염시키고, 세포를 3 μ M 스컬캅플라본 II(SF II)로 밤새 처리한 후의 루시페라아제 활성을 나타낸 그래프로서, 루시페라아제 활성은 파이어플라이/레닐라 루시페라아제 활성의 비로 결정하였다[스컬캅플라본 II가 없을 때 루시페라아제 값에 비해 스컬캅플라본 II의 존재 하에 루시페라아제 활성을 나타냄; ** $p < 0.05$ vs. 0 μ M 스컬캅플라본 II와 함께 배양한 샘플].

도 4는 포피 섬유아세포에서 신호전달물질의 인산화에 미치는 스컬캅플라본 II(SF II)의 효과를 나타낸 것으로, 포피 섬유아세포를 24 시간 동안 무혈청 배지에서 배양한 후, 도 4(a-b)는 세포를 표시된 농도의 스컬캅플라본 II(SF II)와 함께 30 분 동안 미리 배양한 다음 10 % FBS로 10 분간 자극한 후, 세포 용해물을 항-포스포티로신(4G10) (a), 항-포스포-ERK, 항-포스포-JNK, 항-포스포-p38 MAPK 및 항-포스포-NF- κ B p65 항체(b)로 9 % SDS-PAGE 및 웨스턴블롯 분석한 결과이고, (c) 세포를 3 μ M 스컬캅플라본 II와 함께 30 분간 예비 배양한 후 FBS를 최종 농도 10 %가 되도록 첨가하고 30 분간 배양한 후, 세포 용해물을 항-포스포 c-Jun 및 항-c-Jun 항체로 웨스턴 블롯하여 분석한 결과이다[* $p < 0.05$ vs. 스컬캅플라본 II 없이 10 % FBS만으로 배양된 샘플].

도 5는 포피 섬유아세포에서의 TNF- α 에 의해 유도된 MMP-1 발현 및 세포 ROS 수준에 대한 스컬캅플라본 II의 효과를 나타낸 것으로, 도 5(a)는 포피 섬유아세포를 3 μ M 스컬캅플라본 II와 1 ng/ml TNF- α 로 24 시간 동안 배양한 후, 무혈청 조건배지 및 세포 용해물을 항-MMP-1, 항-pN-ColI α 1 및 항-GAPDH 항체로 9 % SDS-PAGE 및 웨스턴 블롯으로 분석한 결과이고, 도 5(b)는 H₂O₂ 유발 ROS 생산을 분석하기 위해, 세포를 3 μ M 스컬캅플라본 II 및 DCF-DA와 함께 30 분 동안 항온 배양하고, HBSS로 2 회 세척한 다음, 최종 농도로 100 μ M의 H₂O₂와 함께 10 분 동안 배양한 결과이며, 도 5(c)는 세포를 3 μ M 스컬캅플라본 II와 1 ng/ml TNF- α 로 24 시간 동안 처리하고 세포 용해액을 표시된 항체를 사용하여 웨스턴블롯으로 분석한 결과이다[††† $p < 0.001$ vs. TNF- α 또는

H₂O₂ 처리없이 배양된 샘플; * $p < 0.05$ 및 ** $p < 0.01$ vs. 스컬캡플라본 II 없이 배양한 시료; n.s., 유의하지 않음].

도 6은 포피 섬유아세포의 3D 배양에서 TNF- α 에 의해 유도된 I형 콜라겐 분해에 대한 스컬캡플라본 II의 효과를 나타낸 것으로, 도 6(a)는 3 차원 배양된 조건배지를 항-MMP-1 항체로 9% SDS-PAGE 및 웨스팅블롯으로 분석한 결과이고[+++ $p < 0.001$ vs. TNF- α 처리없이 배양된 샘플; * $p < 0.05$ 및 *** $p < 0.001$ vs. 스컬캡플라본 II 없이 배양된 샘플], 도 6(b)는 포피 섬유아세포를 함유하는 3D 매트릭스를 항-I형 콜라겐 절단 부위 항체 및 Alexa Fluor[®] 488 염소 항-토끼 IgG(H+L), 팔로이딘-로다민(phalloidin-rhodamine) 및 Hoechst 33258로 염색하고, 세포를 공초점 형광 현미경($\times 200$)으로 분석한 이미지이다.

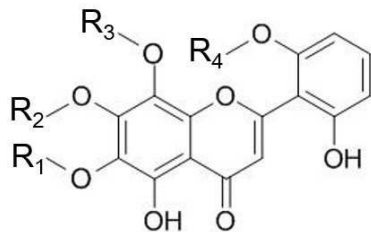
도 7은 MMP-1의 발현 저해를 통한 콜라겐 분해 억제에 대한 스컬캡플라본 II의 역할을 설명하는 모델이다.

발명을 실시하기 위한 구체적인 내용

[0045] 이하에서, 본 발명의 여러 측면 및 다양한 구현 예에 대해 더욱 구체적으로 설명한다.

[0046] 본 발명은 하기 화학식 1로 표시되는 화합물을 유효성분으로 하는 피부 노화(skin aging), 섬유증(fibrosis), 종양(tumor), 심장비대(cardiomegaly) 또는 관상동맥질환(coronary artery disease)의 예방 또는 치료용 약학 조성물에 관한 것이다.

[화학식 1]



[0048] 상기 화학식에서, R₁ 내지 R₄는 각각 독립적으로 수소 또는 C₁-C₃ 알킬이다.

[0049] 본 명세서에서 용어 "알킬"은 직쇄 또는 분쇄의 포화 탄화수소기를 의미하며, C₁-C₃ 알킬은 탄소수 1 내지 3의 알킬 유닛을 가지는 알킬기를 의미하며, C₁-C₃ 알킬이 치환된 경우 치환체의 탄소수는 포함되지 않은 것이다.

[0050] 상기 화학식 1로 표시되는 화합물은 구체적으로 상기 R₁ 내지 R₄가 C₁ 알킬인 스컬캡플라본 II일 수 있으며, 이는 황금(Scutellaria baicalensis)등의 천연물로부터 유래된 플라보노이드이다.

[0051] 본 명세서에서 용어 "치료"는 (a) 질환, 질병 또는 증상의 발전의 억제; (b) 질환, 질병 또는 증상의 경감; 또는 (c) 질환, 질병 또는 증상을 제거하는 것을 의미한다. 본 발명의 조성물은 MMP-1의 발현을 억제함으로써 피부 노화, 섬유증, 종양, 심장비대 또는 관상동맥질환에서 과도한 콜라겐 분해를 개선시켜 증상의 발전을 억제하거나, 이를 제거하거나 또는 경감시키는 역할을 한다. 따라서, 본 발명의 조성물은 그 자체로 이들 질환 치료의 조성물이 될 수도 있고, 혹은 다른 약리성분과 함께 투여되어 상기 질환에 대한 치료 보조제로 적용될 수도 있다. 이에, 본 명세서에서 용어 "치료" 또는 "치료제"는 "치료 보조" 또는 "치료 보조제"의 의미를 포함한다.

[0052] 상기 피부 노화, 섬유증, 종양, 심장비대 또는 관상동맥질환은 MMP-1 고발현에 의한 질환일 수 있다.

[0053] 상기 MMP-1(matrix metalloprotease-1; 기질금속단백질분해효소)은 세포외 기질을 분해하는 금속단백질분해효소로서, 세포외 기질의 제1형, 제2형, 제3형 콜라겐 등 원섬유(fibrillary) 콜라겐을 분해하여 피부 노화, 섬유증, 종양, 심장비대, 관상동맥질환, 피부노화, 관절염, 염증 및 면역반응 등과 같은 생리적 과정에 중요한 역할을 한다.

[0054] 본 명세서에서 용어 "고발현(overexpression)"이란 개체에서 콜라겐이 과도하게 분해됨으로써 콜라겐 소실로 인한 질환이 진행되거나 그 위험이 증가할 정도로 MMP-1의 발현량이 증가하는 경우를 의미한다. 구체적으로는 정상인(대조군)에 비하여 MMP-1의 발현 정도가 20% 이상 증가한 상태, 보다 구체적으로는 40% 이상 증가한 상태, 더욱 구체적으로는 60% 이상 증가한 상태를 의미할 수 있다.

[0055] 상기 화학식 1로 표시되는 화합물은 JNK 및 ERK 중에서 선택되는 키나아제(kinase)의 인산화를 감소시켜 MMP-1

고발현을 저해하는 것일 수 있다. AP-1(Activator Protein-1)은 c-Jun 및 c-Fos의 복합체로 구성되고, JNK의 활성화는 c-Jun 인산화를 유도하며, ERK의 활성화는 c-Fos의 전사촉진(transactivation)을 유도한다. 하기 실시예에 상세하게 기재된 바와 같이, 본 발명의 화학식 1 화합물은 JNK 및 ERK 중에서 어느 하나의 키나아제(kinase)의 인산화를 감소시키므로, AP-1의 활성을 효율적으로 억제할 수 있다.

[0057] 아울러, 상기 화학식 1 화합물은 NF-κB의 활성을 억제하여 MMP-1 고발현을 저해하는 것일 수 있다.

[0058] 상기 피부 노화는 자외선에 의한 광노화와 추위, 바람, 스트레스를 포함하는 환경적 요인에 의한 외인성 노화와, 나이의 증가에 따른 여성 호르몬 감소, 신진 대사의 저하, 염증의 증가를 포함하는 내인성 요인에 의한 내인성 노화 중에서 선택되는 어느 하나일 수 있으나, 이에 한정되는 것은 아니다.

[0059] 상기 섬유증은 세포외 기질(ECM, extracellular matrix)의 과잉 축적으로 인해 기관이나 조직에 과도한 섬유성 결합조직이 형성되는 것으로, 복잡한 세포, 세포외 기질, 사이토카인 및 성장 인자의 상호 작용을 통해 발달한다. 상기 섬유증은 간섬유증, 지방 섬유증, 신장 섬유증, 폐 섬유증, 피부 섬유증, 심장 섬유증, 관절 섬유증, 신경 섬유증, 근 섬유증 및 복막 섬유증을 포함할 수 있으나, 이에 한정되는 것은 아니다.

[0060] 상기 종양은 체내의 세포가 자율성을 가지고 과잉으로 발육한 비정상적인 상태 또는 병태를 의미하며, 상기 종양은 전립선암, 신장 세포암종, 간암, 폐암, 유방암, 대장암, 신경아세포종, 다형성신경교아종(glial blastoma multiforme), NUT 정중선 종양(NUT midline carcinoma) 및 NUT 재배열과 관련된 편평 상피암을 포함할 수 있으나, 이에 한정되는 것은 아니다.

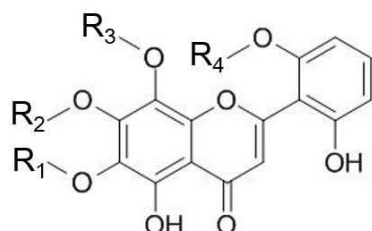
[0061] 상기 심장비대는 심근세포의 크기, 단백질의 합성속도 증가 등으로 인하여, 심장이 커진 상태를 의미하며, 상기 심장비대 관련 질환은 좌심실 비대증, 심부전증, 승모판막 폐쇄부전증, 대동맥판막 폐쇄부전증, 고혈압, 확장성 심근병증, 허혈성 심장 질환, 심실 중격 결손증, 삼첨판막 폐쇄부전증, 폐동맥판막 폐쇄부전증, 폐동맥 고혈압, 우심실 심근경색, 우심실을 침범하는 심근병증, 심방중격 결손증, 심방 세동, 비후성 심근증 및 침윤성 심근증을 포함할 수 있으나, 이에 한정되는 것은 아니다.

[0062] 상기 관상동맥질환은 심장에 혈액을 공급하는 혈관이 동맥경화 등의 원인에 의하여 막히거나 좁아져 심장 근육에 혈액을 충분하게 공급하지 못하는 것과 관련된 질환이 포함될 수 있다. 상기 관상동맥질환으로는 협심증 및 심근경색증이 포함될 수 있으나, 이에 한정되는 것은 아니다. 상기 협심증은 관상동맥이 좁아짐으로써 심장근육으로 가는 혈액량이 감소하면서 발생하는 질환으로, 부정맥, 빈혈, 심장관막질환, 동맥경화증, 혈압이 갑자기 떨어지는 등 관상동맥이 좁아지는 여러 상황에서 유발될 수 있으며, 협심증을 계속 방치할 경우 관상동맥이 갑자기 막혀 심근경색증으로 진행될 가능성이 있다. 상기 심근경색증은 심장에 혈액을 공급해주는 관상동맥 혈관이 갑자기 막힘으로써 심장 근육이 죽는 상태를 의미한다.

[0063] 상기 화학식 1로 표시되는 화합물의 농도는 10 μm 이하일 수 있고, 구체적으로는 0.1 내지 10 μm일 수 있다. 0.1 μm 미만의 농도에서는 상기한 질환의 치료 효율이 저하될 수 있고, 10 μm 초과 농도에서는 세포의 증식이 감소할 수 있다. 이러한 측면에서 상기 화학식 1로 표시되는 화합물의 농도는 더욱 구체적으로는 0.1 내지 3 μm일 수 있으나, 이에 한정되는 것은 아니다.

[0064] 또한, 본 발명은 하기 화학식 1로 표시되는 화합물을 유효성분으로 함유하는, 대상체 내 MMP-1 발현억제용 건강기능식품을 제공한다.

[0065] [화학식 1]

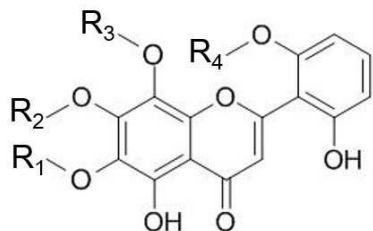


[0066]

[0067] 본 발명의 화학식 1 화합물에 대해서는 이미 상술하였으므로, 과도한 중복을 피하기 위해 그 기재를 생략한다.

[0068] 또한, 본 발명은 하기 화학식 1로 표시되는 화합물을 유효성분으로 함유하는 피부 노화, 섬유증, 종양, 심장비대 또는 관상동맥질환의 예방 또는 개선용 건강기능식품을 제공한다.

[0069] [화학식 1]

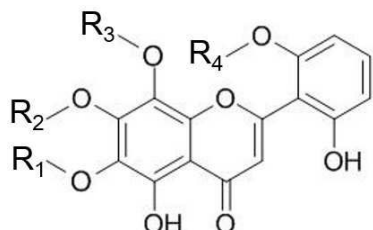


[0070]

[0071] 상기 피부 노화, 섬유증, 종양, 심장비대 또는 관상동맥질환은 MMP-1 고발현에 의한 질환일 수 있다.

[0072] 또한, 본 발명은 하기 화학식 1로 표시되는 화합물을 유효성분으로 함유하는 피부 노화 방지용 화장품 조성물을 제공한다.

[0073] [화학식 1]

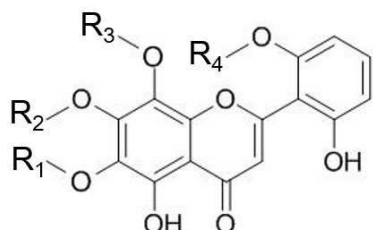


[0074]

[0075] 상기 피부 노화는 피부 진피조직의 교원질 중 대부분을 차지하는 단백질인 콜라겐 함량이 감소하면서 진행되고, 콜라겐은 피부의 장력과 강도를 부여하기 때문에 콜라겐의 감소는 피부 노화 및 주름 생성을 유발한다. 피부 노화는 크게 생리학적 노화에 의한 내인성 노화, 그리고 지속적인 자외선(ultraviolet radiation, UV) 노출에 의해 일어나는 광노화로 구분되는데, 반복적인 자외선 노출은 콜라겐 분해효소를 증가시키고 콜라겐 섬유의 변성 및 파괴를 유발하여 피부의 탄력을 감소시키고 주름의 생성을 촉진한다. AP-1은 세포의 성장과 분화에 관련되는 수많은 유전자의 발현을 조절하고 일부 MMP의 발현을 강력히 조절한다. AP-1에 의해 발현이 조절되는 MMP 중 MMP-1은 collagenase 1으로 알려져 있으며, 타입 1과 3 콜라겐을 기질로 한다. 따라서, AP-1의 활성을 억제하는 본 발명의 화장품 조성물은 인간의 피부 섬유아세포에서 MMP-1의 발현을 저해하여 콜라겐 분해를 효율적으로 억제함으로써, 피부 노화를 지연 또는 방지하는 효과가 있음을 확인하였다.

[0076] 또한, 본 발명은 하기 화학식 1로 표시되는 화합물을 유효성분으로 함유하는 MMP-3, MMP-7, MMP-8, MMP-10, MMP-11, MMP-12, MMP-13, MMP-14, MMP-15, MMP-17, MMP-19, MMP-23, MMP-25 및 MMP-26로 구성된 군으로부터 선택되는 하나 이상의 MMP의 고발현으로 인한 질환의 예방 또는 치료용 약학조성물을 제공한다.

[0077] [화학식 1]



[0078]

[0079] 하기 실시예에서 상세하게 기재하는 바와 같이, 본 발명의 조성물은 AP-1과 NF-κB의 활성화를 효율적으로 억제한다. AP-1은 MMP-1 뿐만 아니라, MMP-3, MMP-7, MMP-9, MMP-10, MMP-12, MMP-13, MMP-19 및 MMP-26의 발현을 조절한다는 사실이 당업계에 잘 알려져 있다[Benbow and Brinckerhoff, 1997; Clark et al., 2008], NF-κB가 MMP-9을 활성화하는 것이 처음 알려진 이후, MMP-1, MMP-2, MMP-8, MMP-11, MMP-13, MMP-14, MMP-15, MMP-17, MMP-19, MMP-23, MMP-25, MMP-26도 NF-κB에 의하여 발현이 조절될 것으로 제안된 바 있을 뿐 아니라[Clark et al., 2008.], 본 발명자들 역시 AP-1과 NF-κB 활성화에 의해 MMP-9 발현이 조절됨을 규명한 바 있다[Choi et al., 2015; Shin et al., 2016]. 이에 따라, 스켈라플라본 II가 AP-1과 NF-κB 활성화를 저해한다는 본 발명의 실시예 기재로부터 MMP-1 뿐 아니라 상술한 MMP들의 발현 역시 억제할 수 있다는 사실은 당업자에게 자명한 사

실이므로, 본 발명에서 스컬갑플라본 II의 효과는 MMP-1 고발현에 의한 질환 뿐 아니라 상술한 MMP들의 고발현을 병인으로 하는 질환의 예방 또는 치료도 포함된다.

- [0080] 구체적으로는, 상기 질환은 종양, 관상동맥질환, 치주질환, 당뇨병성 망막병증, 관절질환, 골다공증, 알포트 증후군, 만성 폐쇄성 폐 질환(COPD), 염증성 장 질환, 건선, 다발성 경화증, 죽상경화증, 심부전증, 천식, 연령-관련 황반 변성(ARMD), 뇌졸중, 만성 창상, 안과 질환, 외상성 뇌상해, 척수 손상, 지주막하 출혈, 결핵, 고호 모시스테인혈증 후유증(sequelae of hyperhomocystinemia), 동맥류(aneurism), 뇌부종, 지발성 운동장애(dyskinesia), AIDS 유발성 치매, 간질, 알츠하이머병, 헌팅톤병, 파킨슨병, 근위축성 측색경화증 및 자간전증(Preeclampsia) 중에서 선택되는 1종 이상의 질환이다.
- [0081] 보다 구체적으로, 상기 종양은 췌장암, 방광암, 위암, 결장암, 유방암, 유선암, 두부암, 경부암, 난소암, 자궁암, 전립선암, 피부암, 폐암, 후두편평상피암, 담낭암, 식도 편평상피세포의 암, 세포종 및 림프계 종양을 포함할 수 있으나, 이에 한정되는 것은 아니다.
- [0082] 상기 관상동맥질환은 아테롬성 동맥경화증을 포함할 수 있으나, 이에 한정되는 것은 아니다.
- [0083] 상기 치주질환은 치주 염증, 치주 조직 소실(분해), 치은염, 치주염, 임플란트 주위염, 임플란트 주위 점막염(perimplant mucositis), 치아 소실, 치과 임플란트 차도(remission), 치조골 소실, 점막염, 점막 변경, 치근부 치주 염증, 치근관 염증, 충치, 수직 턱뼈 파열, 교정적 치아 이동(orthodontic tooth movement), 알레르기성 염증 반응 및 구강 박테리아에 의해 유발되는 균혈증(bacteraemia)을 포함할 수 있으나, 이에 한정되는 것은 아니다.
- [0084] 상기 관절질환은 관절염, 퇴행성 디스크, 류마티드 관절염 및 골관절염을 포함할 수 있으나, 이에 한정되는 것은 아니다.
- [0085] 상기 안과 질환은 망막증, 녹내장, 망막허혈, 허혈성 시신경증 및 황반변성증을 포함할 수 있으나, 이에 한정되는 것은 아니다.
- [0086] 구체적으로, 상기 MMP-3 고발현에 의한 질환으로는 관상동맥질환 및 류마티스관절염을 포함하고[Lamblin, Nicolas, et al. Journal of the American College of Cardiology 40.1 (2002): 43-48.; Green, M. J., et al. Rheumatology 42.1 (2003): 83-88.], 상기 MMP-7 고발현에 의한 질환으로는 췌장암, 방광암, 위암 및 대장결장암을 포함하며[한국 공개특허 공보 제10-2013-0034505호], 상기 MMP-8 고발현에 의한 질환으로는 치주질환을 포함하고[한국 공개특허 공보 제10-2016-0146668호], 상기 MMP-10 고발현에 의한 질환으로는 당뇨병성 망막증, 세포종 및 림프계 종양을 포함하며[일본 공개특허 공보 제2010-519327호], 상기 MMP-11 고발현에 의한 질환으로는 유방암, 결장암, 두부암, 경부암, 폐암, 난소암, 췌장암, 전립선암, 피부암(기저 세포암) 및 자궁암(자궁목암 및 자궁 내막암) 중에서 선택되는 침윤성 암을 포함하며[일본 공개특허 공보 제2009-509553호], 상기 MMP-12 고발현에 의한 질환으로는 관절염, 아테롬성 동맥경화증, 알포트 증후군 및 만성 폐쇄성 폐 질환(COPD)을 포함하고[미국 공개특허 공보 제2011-0112076호], 상기 MMP-13 고발현에 의한 질환으로는 류마티드 관절염, 골관절염, 골다공증, 치주질환, 염증성 장 질환, 건선, 다발성 경화증, 심부전증, 죽상경화증, 천식, 만성 폐쇄 폐 질환(COPD), 연령-관련 황반 변성(ARMD) 및 암을 포함할 수 있으며[국제 공개특허 공보 제2002-064572호], 상기 MMP-14 고발현에 의한 질환으로는 암, 뇌졸중, 만성 창상, 안과 질환, 외상성 뇌상해, 척수 손상, 지주막하 출혈, 결핵, 천식, 고호 모시스테인혈증 후유증(sequelae of hyperhomocystinemia), 동맥류(aneurism), 뇌부종, 지발성 운동장애(dyskinesia), AIDS 유발성 치매, 간질, 알츠하이머병, 헌팅톤병, 파킨슨병, 다발성 경화증 및 근위축성 측색경화증을 포함하며[일본 공개특허 공보 제2017-506645호], 상기 MMP-15 고발현에 의한 질환으로는 폐선암(human lung adenocarcinoma), 후두편평상피암, 비만 및 자간전증을 포함하고[Abraham, Reimar, et al. Journal of Biological Chemistry 280.40 (2005): 34123-34132.; Bodnar, Magdalena, et al. Journal of Oral Pathology & Medicine 42.3 (2013): 267-274.; Strong, Amy L., et al. Stem Cells 30.12 (2012): 2774-2783.; Kaitu'u-Lino, Tu'uhevaha J., et al. PloS One 7.6 (2012): e39864.], 상기 MMP-17과 MMP-23 고발현에 의한 질환으로는 퇴행성 디스크를 포함하며[미국 공개특허 공보 제2007-0190149호], 상기 MMP-19 고발현에 의한 질환으로는 유선암 및 담낭암을 포함하고[Djonov, Valentin, et al. The Journal of Pathology 195.2 (2001): 147-155; 한국 등록특허 공보 제10-1666598호], 상기 MMP-25 고발현에 의한 질환으로는 치주질환을 포함하며[Kuula, Heidi, et al. Archives of Oral Biology 53.2 (2008):

175-186.], 상기 MMP-26 고발현에 의한 질환으로는 자궁내막, 폐, 전립선, 유선 및 식도편평상피세포의 암과 치주질환을 포함한다[Bister, V-O., et al. Digestive Diseases and Sciences 49.4 (2004): 653-661.; Kuula, Heidi, et al. Archives of Oral Biology 53.2 (2008): 175-186.]. 상기한 각 종류의 MMP 고발현에 의한 질환들은 예시로서 나열된 것일 뿐 상기의 질환들로만 한정되는 것은 아니다.

[0087] 본 발명에서는 상기 화학식 1로 표시되는 스컬캅플라본 II가 포피(foreskin) 섬유아세포에서 I형 콜라겐과 I형 콜라겐을 분해하는 효소인 MMP-1의 발현을 조절하는지 여부를 확인한 결과, 스컬캅플라본 II가 MMP-1의 분비를 감소시켰지만 포피 섬유아세포에 의한 I형 콜라겐의 분비에는 영향을 미치지 않는다는 것을 확인하였다. 스컬캅플라본 II는 포피 섬유아세포의 증식에 3 μ M 까지의 농도에서는 영향을 미치지 않았으나 10 μ M 농도에서는 세포의 증식을 억제하였다. 그러나 10 μ M의 농도에서 스컬캅플라본 II는 포피 섬유아세포의 세포 사멸을 유도하지 않았음을 확인하였다. 따라서 이러한 결과를 통하여, 스컬캅플라본 II를 10 μ M의 농도로 처리해도 섬유아세포에서 세포 독성없이 MMP-1의 분비를 감소시킨다는 것을 확인하였다.

[0088] 본 발명에서는 스컬캅플라본 II가 전사 수준에서 MMP-1의 발현을 억제한다는 것을 확인하였다. MMP-1 전사의 유도는 전사인자 AP-1 및 NF- κ B의 활성화에 의존한다. MMP-1 프로모터는 전사 시작 사이트의 상류(upstream)에서 -70, -186 및 -1602 bp에 세 개의 AP-1 결합 사이트를 가지고 있고, -2886 bp에 NF- κ B 결합 사이트를 가지고 있다. AP-1은 폴리펩티드 c-Jun 및 c-Fos의 복합체로 구성된다. JNK의 활성화는 c-Jun 인산화를 유도하는 반면, ERK의 활성화는 c-Fos의 전사촉진(transactivation)을 유도한다. 본 발명에서, 혈청(즉, FBS) 자극으로 세포 단백질의 티로신 인산화 및 ERK, JNK, p38 및 c-Jun의 인산화를 유도하였다. 스컬캅플라본 II 처리는 혈청에 의하여 유도된 세포 단백질, ERK, JNK 및 c-Jun의 인산화를 감소시켰다. 이러한 결과는 스컬캅플라본 II가 혈청 유도 조건 하에서 AP-1 활성화를 억제함으로써 MMP-1 발현을 감소시킨다는 것을 입증할 수 있다.

[0089] 또한, AP-1은 MMP-1 발현을 유도하는 것 외에도 세포 증식을 상향 조절한다. 본 발명의 실험에서, 특이하게도, 스컬캅플라본 II는 10 μ M 이상의 농도에서 세포 증식을 감소시켰지만 세포 사멸을 유도하지 않았음을 확인하였다. 본 발명에서 스컬캅플라본 II가 AP-1의 활성화를 억제한다는 것을 상술하였듯이, 10 μ M 이상의 농도에서 스컬캅플라본 II는 세포 사멸을 일으키지 않으면서 세포주기의 진행을 늦추는 것을 알 수 있다.

[0090] MMP-1 발현은 다양한 염증성 사이토카인 및 TNF- α , 인터루킨-1, -4, -5, -6, -8 및 -10, 섬유아세포 성장인자-1, -2, -7 및 -9, 상피세포 성장인자(EGF) 및 혈소판 유도 성장인자와 같은 성장인자에 의해 상향 조절되는 것으로 알려져 있다. 피부 섬유아세포는 박테리아, 바이러스 또는 곰팡이와 관련된 감염, 자외선 또는 이온화된 방사선 노출의 결과로 종종 염증 상태에 노출된다. 염증 상태를 모방하기 위해 TNF- α 로 섬유아세포를 처리하면 MMP-1의 분비가 증가되고 NF- κ B p65 뿐 아니라 ERK1/2 및 JNK의 인산화가 증가함을 확인하였다. ERK와 JNK는 TNF- α 에 의한 단기 자극 후에 활성화되었으며, NF- κ B p65의 활성화는 TNF- α 의 장기 자극에 의해 지속되었다. 스컬캅플라본 II는 TNF- α 에 의해 유도된 MMP-1 분비를 감소시켰고, 또한 NF- κ B p65, ERK1/2 및 JNK의 인산화를 감소시켰다. 이러한 결과를 통하여, 스컬캅플라본 II가 전염증성 조건 하에서 AP-1과 NF- κ B 신호 전달 경로 모두를 억제함으로써 MMP-1의 전사촉진을 억제함을 확인할 수 있다.

[0091] 한편, 스컬캅플라본 II는 또한 항산화 활성을 갖는다고 보고되어 있다[Lee, Jiae, et al. *The FASEB Journal* (2018): fj-201800866RR.]. H₂O₂ 및 일중항 산소(¹O₂)와 같은 활성 산소종(ROS; reactive oxygen species)은 다양한 환경 하에서 NF- κ B를 활성화시킬 수 있다. 예를 들어, ROS는 I κ B 키나아제에 존재하는 활성화 루프의 세린 및 티로신 잔기를 인산화시켜 I κ B 키나아제를 활성화시켜서 I κ B를 인산화 및 분해함으로써 NF- κ B를 활성화시키거나, I κ B α 를 분해하지 않고 I κ B α 의 티로신 인산화를 야기시켜 NF- κ B를 활성화시킬 수 있다. 또한 ROS는 염증 및 종양 형성과 같은 다양한 생리적 조건 하에서 AP-1을 활성화시킬 수 있다. ROS는 시스테인 SH 그룹의 특정 산화에 의해 구조 변화를 유도하여 단백질 티로신 키나아제를 활성화시킨다. 따라서, ROS는 EGF 수용체와 같은 수용체 단백질 티로신 키나아제의 자가인산화 및 Src과 같은 하류 신호전달 단백질의 티로신 인산화를 유도하여 AP-1의 활성화를 촉진시킨다. 본 발명에서는 스컬캅플라본 II가 H₂O₂에 의해 유도된 세포 ROS 생성을 감소시키고, TNF- α 에 의해 유도된 NF- κ B의 활성화, 세포 단백질의 혈청 유도 티로신 인산화 및 ERK1/2 및 JNK의 활성화를 억제한다는 것을 증명하였다. 따라서, 본 발명에서는 스컬캅플라본 II에 의한 NF- κ B와 AP-1의 활성화 감소가 항산화제 활성화에 의해 매개된다고 가정하였다.

[0092] 또한, MMP-1에 의한 콜라겐의 분해는 조직 개조, 발달 및 형태 형성의 조절에서 중요한 과정이다. 스컬캅플라본 II가 I형 콜라겐의 분해에 미치는 영향을 분석하기 위해, 포피 섬유아세포의 생체 내 유사 모방(in vivo-

mimicking) 3D 배양 시스템을 사용하였고, I형 콜라겐의 절단된 3/4 단편의 검출을 가능하게 하는 항-I형 콜라겐 절단 부위 항체를 이용하여 콜라겐의 분해 여부를 분석하였다. 본 발명에서는 스컬갑플라본 II가 포피 섬유아세포의 3D 배양에서 TNF- α 에 의하여 유도된 MMP-1 발현 및 I형 콜라겐의 분해를 감소시키는 것을 발견하였다. 따라서 스컬갑플라본 II는 세포외 기질의 완전성(integrity)을 유지하거나 세포외 기질의 노화 유발 및 염증 관련 열화를 치료하기 위한 치료에 유용할 수 있다.

[0093] 또한, 퀘르세틴(quercetin), 캠퍼롤(kaempferol), 오고닌(wogonin), 아피제닌(apigenin) 및 루테올린(luteolin)과 같은 일부 천연 플라보노이드는 AP-1 활성화를 감소시킴으로써 MMP-1 발현을 억제하는 효능이 이미 입증된 바 있다. 그러나 인간의 피부 섬유아세포에서 MMP-1 발현을 억제하기 위해서는 10 μ M 이상의 농도의 플라보노이드를 필요로 한다. 본 발명에서 MMP-1의 발현을 현저히 하향 조절하기 위하여 스컬갑플라본 II의 농도를 상대적으로 낮은 3 μ M 이하의 농도로 사용해도 충분함을 확인할 수 있었다. 또한, 스컬갑플라본 II는 A 환의 6, 7 및 8 위치 및 B 환의 6' 위치에 메톡시($O-CH_3$)기를 갖고 있는 폴리메톡시플라본으로, 이러한 구조는 세포막을 통과하여 혈액 순환을 통해 쉽게 운반된다는 보고가 있기 때문에 기능적으로 중요하다. 그러므로 본 발명에서는 이들 $O-CH_3$ 그룹이 다른 플라보노이드와 비교하여 스컬갑플라본 II의 생체 이용률을 높이는 데 중요한 역할을 한다고 가정하였다.

[0094] 요약하자면, 본 발명은 포피 섬유아세포에서 MMP-1의 발현과 I형 콜라겐의 분해에 대한 스컬갑플라본 유도체의 억제 효과를 입증한 최초 발명이다(도 7 참조). 본 발명에서는 스컬갑플라본 유도체가 MMP-1의 상향 조절 및 세포외 기질 완전성(integrity)의 상실과 관련된 생리학적 변화 및 질환을 치료하는데 유용한 화학적 예방 화합물이 될 것이라고 판단하였고, 이에 따라 본 발명에 따른 스컬갑플라본 II 및 이의 유도체는 MMP-1 발현을 저해하여 이의 기질인 콜라겐의 분해를 억제함으로써, MMP-1 발현에 의한 콜라겐 분해에 의해 발생하는 피부 노화, 섬유증, 종양, 심장비대 또는 관상동맥질환을 예방, 치료 또는 개선하는 효과를 갖을 수 있음을 확인하였다.

[0095] 상기 화학식 1로 표시되는 화합물을 유효성분으로 함유하는 피부 노화, 섬유증, 종양, 심장비대 또는 관상동맥질환의 예방 또는 치료용 약학조성물은 다양한 경구 또는 비경구 투여 형태로 제형화할 수 있다.

[0096] 경구 투여용 제형으로는 예를 들면 정제, 환제, 경질, 연질 캡셀제, 액제, 현탁제, 유화제, 시럽제, 과립제 등이 있는데, 이들 제형은 유효성분 이외에 희석제(예: 락토즈, 텍스트로즈, 수크로즈, 만니톨, 솔비톨, 셀룰로즈 및/또는 글리신), 활택제(예: 실리카, 탈크, 스테아르산 및 그의 마그네슘 또는 칼슘염 및/또는 폴리에틸렌 글리콜)를 추가로 포함할 수 있다. 또한, 상기 정제는 마그네슘 알루미늄 실리케이트, 전분, 페이스트, 젤라틴, 트라가칸스, 메틸셀룰로즈, 나트륨 카복시메틸셀룰로즈 및/또는 폴리비닐피롤리딘과 같은 결합제를 함유할 수 있으며, 경우에 따라 전분, 한천, 알긴산 또는 그의 나트륨 염과 같은 붕해제 또는 비등 혼합물 및/또는 흡수제, 착색제, 향미제 및 감미제를 함유할 수 있다. 상기 제형은 통상적인 혼합, 과립화 또는 코팅 방법에 의해 제조될 수 있다.

[0097] 또한, 비경구 투여용 제형의 대표적인 것은 주사용 제제이며, 주사용 제제의 용매로서 물, 링거액, 등장성 생리식염수 또는 현탁액을 들 수 있다. 상기 주사용 제제의 멸균 고정 오일은 용매 또는 현탁 매질로서 사용할 수 있으며 모노-, 디-글리세라이드를 포함하여 어떠한 무자극성 고정오일도 이러한 목적으로 사용될 수 있다. 또한, 상기 주사용 제제는 올레산과 같은 지방산을 사용할 수 있다.

[0098] 상기 화학식 1로 표시되는 화합물을 유효성분으로 함유하는 피부 노화, 섬유증, 종양, 심장비대 또는 관상동맥질환의 예방 또는 치료용 약학조성물의 투여량은 환자의 연령, 성별, 체중, 질환의 중증도에 따라 달라지나, 본 발명의 약학조성물은 환자의 무게 1 kg 당 300 mg 이하, 바람직하게는 100 내지 200 mg을 1 일 1 내지 4 회 투여하나 이에 한정되는 것은 아니다.

[0099] 상기 화학식 1로 표시되는 화합물을 유효성분으로 함유하는, 대상체 내 MMP-1 발현억제용 건강기능식품, 또는 상기 화학식 1로 표시되는 화합물을 유효성분으로 함유하는 피부 노화, 섬유증, 종양, 심장비대 또는 관상동맥질환의 예방 또는 개선용 건강기능식품은 일상식사에서 부족할 수 있는 영양소를 보충하거나 인체에 유용한 기능성 원료를 보충할 목적으로 캡슐, 정제, 분말, 과립, 액상, 환, 편상, 페이스트상, 시럽, 젤, 젤리 및 바로 이루어진 군에서 선택되어 1회 섭취가 용이하게 제조 및 가동된 것이다.

[0100] 또한, 상기 건강기능식품은 제형에 따라 포도당, 구연산, 액상 올리고당, 옥수수 시럽(corn syrup), 대두 레시틴, 버터, 식물성 경화유, 탈지우유, 설탕, 마가린, 식염, 전분, 밀가루, 물엿, 맥아당, 증조 및 당 에스테르 등의 통상적으로 사용되는 성분들을 이용하여 제조될 수 있다.

- [0101] 상기 화학식 1로 표시되는 화합물을 유효성분으로 함유하는 화장료 조성물은 용액, 분말, 에멀션, 로션, 분사, 연고, 에어로졸, 크림 또는 거품의 형태일 수 있다. 또한, 본 발명의 화장료 조성물에 있어서는, 화장품 제제에 있어서 수용가능한 담체를 포함할 수 있다. 여기서 "화장품 제제에 있어서 수용가능한 담체"란 화장품 제제에 포함될 수 있는 이미 공지되어 사용되고 있는 화합물 또는 조성물이거나 앞으로 개발될 화합물 또는 조성물로서 피부와의 접촉시 인체가 적응 가능한 정도 이상의 독성, 불안정성 또는 자극성이 없는 것을 말한다.
- [0102] 상기 담체는 본 발명의 화장료 조성물에 그것의 전체 중량에 대하여 약 1중량% 내지 약 99.99중량%, 바람직하게는 조성물의 중량의 약 90중량% 내지 약 99.99중량%로 포함될 수 있다. 상기 담체로서는 알코올, 오일, 계면활성제, 지방산, 실리콘 오일, 습윤제, 보습제, 점성 변형제, 유제, 안정제, 자외선 산란제, 자외선흡수제, 발색제 및 향료가 예시될 수 있다. 상기 알코올, 오일, 계면활성제, 지방산, 실리콘 오일, 습윤제, 보습제, 점성 변형제, 유제, 안정제, 자외선산란제, 자외선흡수제, 발색제 또는 향료로 사용될 수 있는 화합물 또는 조성물은 이미 당업계에 공지되어 있기 때문에 당업자라면 적절한 해당물질 또는 조성물을 선택하여 사용할 수 있다.
- [0103] 또한, 본 발명에 따른 화장료 조성물은 상기 화학식 1로 표시되는 화합물 외에 글리세린, 부틸렌글리콜, 프로필렌글리콜, 폴리옥시에틸렌 경화피마자유, 에탄올, 트리에탄올아민 등을 포함할 수 있으며, 방부제, 향료, 착색료 또는 정제수가 필요에 따라 미량 포함할 수 있으나, 이에 한정되는 것은 아니다.
- [0104] 본 발명에 있어서의 피부는 얼굴뿐만 아니라, 두피, 전신도 포함되는 개념으로, 이러한 두피에 적용될 수 있는 화장료 조성물로서, 샴푸, 린스, 트리트먼트 또는 발모제가 있고, 전신에 적용될 수 있는 바디클렌저의 용도로서 다양한 형태로 제조될 수 있다.
- [0105] 이하에서는 본 발명에 따른 제조에 및 실시예를 첨부된 도면과 함께 구체적으로 설명한다.

[0106] <실험재료 및 방법>

[0107] 1. 시약 및 항체

[0108] 스컬캡플라본 II (5-하이드록시-2-[2-하이드록시-6-메톡시페닐]-6,7,8-트리메톡시크로멘-4-온)는 ChemFaces(Wuhan, Hubei, China)에서 구입하였다. phospho-ERK, ERK2, p38 및 NF- κ B p65에 대한 항체는 Santa Cruz Biotechnology(Santa Cruz, CA, USA)에서 구입하였다. phospho-NF- κ B p65(Ser536), phospho-JNK, JNK, phospho-p-38, phospho-c-Jun 및 c-Jun에 대한 항체는 Cell Signaling Technology(Danvers, MA, USA)에서 구입하였다. 항-포스포티로신 항체(clone 4G10)는 Millipore(Billerica, MA, USA)에서 구입하였다. 항-콜라겐 타입 I 절단 부위 항체는 ImmunoGlobe(Himmelstadt, Germany)로부터 구입하였다. 항-GAPDH 항체는 AbClone(Seoul, Korea)에서 구입하였다. 겨자무과산화효소 결합된 염소 항-마우스 IgG 및 토끼 IgG는 KOMA Biotec(Seoul, Korea)로부터 수득구입하였다. 항-MMP-1과 프로-콜라겐 α 1(I) N-프로펩티드(pN-Col1 α 1) 항체는 정진호 교수(서울대학교 의과대학)로부터 기증 받았다. Alexa Fluor[®] 488 염소 항-토끼 IgG(H+L)과 팔로이딘-로다민은 Thermo Fisher Scientific(Waltham, MA, USA)에서 구입하였다.

[0109] 2. 리포터 플라스미드에서 인간 MMP-1 프로모터의 클로닝

[0110] 인간 MMP-1 프로모터(GenBank Accession No. NM_000011.10)의 리포터 벡터를 제작하기 위하여, 인간 피부 섬유아세포의 게놈 DNA를 주형으로 하여 *Nhe*I 사이트를 포함하는 5'-GAAGCTAGCTCCCTCACAGTCGAGTATATCTGCCAC-3' 및 *Hind*III 사이트를 포함하는 5'-GAAAGCTTGCAGGTAAGTGATGGCTTCCAG-3' 프라이머 쌍과 PrimeSTAR[®] GXL DNA 증합 효소(TaKaRa, Shiga-ken, Japan)를 사용하여 인간 MMP-1 유전자의 프로모터(-1880에서 +40)를 포함하는 1,938-bp의 DNA 단편을 PCR 증폭하였다. pGL3-MMP-1 프로모터를 생성하기 위해 PCR 생성물을 *Nhe*I 및 *Hind*III로 절단하여 *Nhe*I 및 *Hind*III로 절단한 pGL3-Basic 루시페라아제 리포터 벡터(Promega, Madison, WI, USA)에 클로닝시켰다.

[0111] 3. 세포 배양

[0112] 인간 포피 섬유아세포를 10 % 소태아혈청(FBS, Gibco/ Thermo Fisher Scientific), 100 U/ml 페니실린 및 100

$\mu\text{g/ml}$ 스트렙토마이신이 첨가된 둘베코수정글루세리(DMEM)(Gibco/Thermo Fisher Scientific)에서 5 % CO_2 및 95 % 공기 분위기에서 37 °C로 유지하였다.

4. RNA 분리 및 역전사 (RT)-PCR 분석

포피 섬유아세포에서 TRIzol 시약(Invitrogen, Carlsbad, CA, USA)을 사용하여 총 RNA를 분리하였다. cDNA는 총 RNA($2\mu\text{g}$)로부터 AMV RT 시스템(Promega) 및 oligo(dT)₁₅ 프라이머를 사용하여 합성하였다. 실시간 PCR은 QuantiTect SYBR Green PCR 키트(Qiagen, Hilden, Germany)와 QuantStudio 3 Real-Time PCR 시스템(Applied Biosystems, Foster City, CA, USA)을 사용하여 수행하였다. 프라이머 서열 및 어닐링 온도는 하기 표 1에 나타내었다.

표 1

MMP-1 및 GAPDH mRNA 발현에 대한 RT-qPCR 분석용 프라이머 서열.

유전자	뉴클레오타이드 서열	위치	어닐링 온도(°C)	진뱅크 접근번호
MMP-1	F: 5'-GTACTGATATAATTTAGTTC-3'	1656-1675	45	NM_002421
	R: 5'-GTTATCCCTTGCTATCTAG-3'	1889-1908		
GAPDH	F: 5'-ACTGCTTAGCACCCCTGGCCA-3'	488-508	62	BC023632
	R: 5'-TTGGCAGTGGGGACACGGAAG-3'	720-740		

5. 조건배지(conditioned medium)와 세포 용해물의 제조 및 웨스턴 블롯(Western blot) 분석

인간 포피 섬유아세포를 무혈청 배지에서 24 시간 동안 배양하고, 생성된 조건배지는 2,000 ×g에서 3 분간 원심분리하여 수집하였다. 세포 펠렛은, 시그널 단백질 분석의 경우 1 mM NaF, 1 mM Na_3VO_4 , SIGMAFASTTM 프로테아제 억제제(Sigma-Aldrich)를 함유한 RIPA 용해 완충액(50 mM Tris-HCl, pH7.4, 150 mM NaCl, 1% NP-40, 0.5% sodium deoxycholate, and 0.1% SDS)에 용해시켰고, GAPDH 분석의 경우에는 1x SDS 샘플 버퍼로 용해시켰다. 웨스턴 블롯 분석은 통상적인 방법으로 수행하였다.

6. 세포 성장 분석

포피 섬유아세포(0.5×10^4 cells/well)를 96-웰 플레이트에 도말하고, 10 % FBS 및 다양한 농도의 스크립플라본 II를 첨가한 배지에서 2 일 동안 배양하였다. 생존 세포를 측정하기 위해 3-(4,5-디메틸티아졸-2-일)-2,5-디페닐테트라졸륨 브로마이드(MTT)를 처리하고 디메틸설폭시드(DMSO)로 가용화하여 마이크로플레이트 리더를 사용하여 565 nm에서 흡광도를 측정하였다.

7. 유세포 분석

포피 섬유아세포(0.5×10^4 cells/well)를 6-웰 플레이트에 접종하고, 10 % FBS 및 다양한 농도의 스크립플라본 II를 첨가한 DMEM에서 24 시간 동안 배양하였다. 배양한 세포를 차가운 PBS로 2 회 세척한 후, 결합 완충액(10 mM HEPES, pH 7.4, 140 mM NaCl 및 2.5 mM CaCl_2)에 1×10^6 cells/ml의 최종 밀도로 재현탁시켰다. 분리된 세포의 총 부피 100 μl 에 5 μl 의 FITC annexin V(BD Biosciences, Bedford, MA, USA)와 5 μl 의 50 $\mu\text{g/ml}$ 7-aminoactinomycin D(7-AAD, Invitrogen)을 가하고 실온에서 15 분 동안 배양하였다. 사멸세포의 수준은 유동 세포 계측법(BD FACSCalibur, BD Biosciences)으로 분석하였다.

8. 이중 루시페라아제 리포터 분석(Dual-luciferase)

[0123] 포피 섬유아세포로의 루시퍼라아제 리포터 벡터의 형질주입(transfection)은 Lipofectamine LTX(Thermo Fisher Scientific)를 사용하여 수행하였다. 포피 섬유아세포(5×10^4 cells/well)를 24-웰 플레이트에 접종하고, 10 % FBS가 보충된 새로운 DMEM 배지로 대체하였다.

[0124] 25 μ l의 OptiMEM 배지에 *MMP-1* 프로모터에 의해 구동되는 파이어플라이 루시퍼라아제(firefly luciferase)를 코딩하는 pGL3-*MMP1* 프로모터 벡터(0.5 μ g) 또는 프로모터가 없는 pGL3-Basic 벡터(0.36 μ g)와 헤르페스 심플렉스 바이러스 티미딘 키나아제 프로모터에 의해 구동되는 *Renilla* 루시퍼라아제를 코딩하는 pRL-TK 벡터(0.05 μ g)를 가한 용액과 25 μ l의 OptiMEM 배지에 Lipofectamine LTX(0.75 μ l) 및 PLUSTM 시약 (0.25 μ l)을 가한 용액을 혼합하고 실온에서 20 분 동안 배양하였다. 상기 혼합물을 포피 섬유아세포에 5 시간 동안 처리한 다음 10 % FBS가 보충된 DMEM으로 24 시간 배양하였다. 상기 배지를 무혈청 배지로 대체한 다음, 세포에 스킨캡플라본 II 또는 DMSO를 가하여 12 시간 동안 처리하였다. 루시퍼라아제 활성은 듀얼 루시퍼라아제 리포터 분석 시스템(Promega)을 사용하여 측정하였고, 형질전환된 세포의 루시퍼라아제 활성은 레닐라(Renilla) 대조군의 것으로 표준화하였다.

[0125] 9. 활성 산소종(ROS) 측정

[0126] 이전에 보고된 바와 같이 세포 내 ROS를 분석하였다[Sittisart, Patcharawan, and Benjamart Chitsomboon. *Evidence-Based Complementary and Alternative Medicine* (2014).]. 포피 섬유아세포를 검정색 벽과 투명한 바닥으로 된 96-웰 플레이트에 접종하고 밤새 배양했다. 세포를 헝크의 평형 염 용액(HBSS)으로 2 회 세척한 후, HBSS에 10 μ M 2',7'-디클로로플루오렌스디아세테이트(DCF-DA, Sigma-Aldrich)를 포함한 용액에 배양하였다. DCF 관련 형광은 각각 485 및 525 nm의 여기 및 방출 파장에서 SpectraMax M3(Molecular Devices, San Jose, CA, USA) 분광 광도계를 사용하여 측정하였다.

[0127] 10. 3D 배양에서의 콜라겐 분해

[0128] 포피 섬유아세포(5×10^5 cells/ml)를 트립신 처리하고, 2.8 mg/ml의 랫트 꼬리 콜라겐 I 용액(Corning Inc., Corning, NY, USA) : 5 \times DMEM : 10 \times 재구성 완충액(260 mM NaHCO₃, 200 mM HEPES 및 50 mM NaOH) = 7 : 2 : 1에 재현탁시킨 후, 세포 혼합액 0.15ml를 유리 바닥(35mm \times 10mm, 구멍 13 ϕ) 접시(SPL Life Sciences, 경기도, 한국)에 투입하였다. 37 $^{\circ}$ C에서 1 시간 동안 응고시킨 후에 TNF- α 및/또는 스킨캡플라본 II가 포함되거나 포함되지 않은 페놀레드-프리 DMEM(Hyclone, South Logan, UT, USA) 2ml를 첨가하고 콜라겐-내장된 세포를 5 % CO₂ 및 95 % 공기 분위기 조건의 37 $^{\circ}$ C에서 24 시간 동안 배양하였다. 핵 염색을 위해 세포를 Hoechst 33258(2 μ g/ml)과 함께 30 분 동안 항온 처리한 다음 3.7 % 파라포름알데히드에서 30 분 동안 고정시키고, 0.2 % Triton-X 100에서 10 분 동안 침투시키고, 3 % 소혈청 알부민을 30 분 동안 처리한 후, 토끼 항-콜라겐 I 형 질단 부위 항체 (2.5 μ g/ml)로 4 $^{\circ}$ C에서 밤새 반응시켰다. 그 다음 세포를 PBS로 세척하고 Alexa Fluor[®] 488 염소 항-토끼 IgG(H+L) 및 팔로이딘-로다민(1 U/ml)과 함께 배양하였다. 이미지는 공초점 현미경(LSM700, 자이스)으로 획득하였다.

[0129] 11. 통계 분석

[0130] 모든 데이터는 적어도 세 번의 독립적인 실험의 평균 \pm S.D.로 표현하였다. 통계적 유의성은 Student 's *t*-test를 사용하여 분석하였고, *p* 값 <0.05는 통계적 유의성을 나타내는 것으로 간주하였다.

[0131] <결과>

[0132] 실험예 1. 포피 섬유아세포에서의 MMP-1과 I형 콜라겐의 발현에 대한 스킨캡플라본 II의 효과

[0133] 도 1은 포피 섬유아세포에서 MMP-1과 I형 콜라겐의 발현에 대한 스킨캡플라본 II의 효과를 나타낸 것으로, 도 1(a)는 포피 섬유아세포를 표지된 농도의 스킨캡플라본 II(SF II)를 함유하는 무혈청 DMEM에서 24 시간 동안 배양한 후의 웨스턴블롯 측정 결과이고[** *p* <0.01 및 *** *p* <0.001 vs. 0 μ M 스킨캡플라본 II로 배양한 샘플;

n.s., 유의하지 않음.], 도 1(b)는 포피 섬유아세포를 3 μ M 스컬캅플라본 II를 함유한 3 % FBS를 포함하는 DMEM 또는 무혈청 DMEM에서 지시된 시간 동안 배양하고, 조건배지 및 세포 용해물을 항-MMP-1, 항-pN-ColI α 1 및 항-GAPDH 항체로 9 % SDS-PAGE 및 웨스턴 블롯으로 분석한 결과 이미지이다.

[0134] 도 1(a)를 참조하면, 포피 섬유아세포에서 MMP-1과 I형 콜라겐의 분비에 대한 스컬캅플라본 II의 효과를 분석할 수 있었다. 스컬캅플라본 II는 농도 의존적으로 MMP-1의 분비를 감소시켰지만 I형 콜라겐의 분비에는 유의미한 영향을 미치지 않음을 확인할 수 있다.

[0135] 도 1(b)를 참조하면, 포피 섬유아세포는 미처리 시료와 비교해 볼 때, 스컬캅플라본 II(3 μ M)를 처리했을 때 유의하게 더 적은 양의 MMP-1을 분비하였으며, MMP-1 분비는 무혈청 DMEM에서 24 시간까지 감소하고, 3 % FBS가 첨가된 DMEM에서 48 시간까지 감소함을 확인할 수 있다.

[0136] 실험예 2. 포피 섬유아세포의 증식과 세포 독성에 미치는 스컬캅플라본 II의 영향

[0137] 도 2는 포피 섬유아세포의 증식과 세포독성에 대한 스컬캅플라본 II의 효과를 나타낸 것으로, 포피 섬유아세포를 10 % FBS를 함유하는 DMEM에 지시된 농도의 스컬캅플라본 II(SF II)를 가하여 배양하였다. 도 2(a)는 MTT 시약을 사용하여 파장 565 nm에서의 흡광도를 기준으로 생존 세포 수를 측정한 결과 그래프이고[0 dat의 생존 세포 수에 비해 각 day 별로 살아있는 세포의 수를 상대적인 값으로 나타냄; ** $p < 0.01$ vs. 0 μ M 스컬캅플라본 II와 함께 배양한 샘플], 도 2(b)는 스컬캅플라본 II와 함께 24 시간 배양한 후, FITC annexin V와 7-AAD로 사멸 세포를 염색한 후의 유세포 분석 결과 이미지이다.

[0138] 도 2(a)를 참조하면, 세포 성장은 3 μ M까지의 농도에서는 스컬캅플라본 II의 영향을 받지 않았지만, 10 μ M의 농도에서는 2 일째에 15 %까지 성장이 감소하였음을 확인할 수 있다.

[0139] 도 2(b)를 참조하면, 유세포 분석에서 10 μ M 농도의 스컬캅플라본 II의 존재 하에 포피 섬유아세포의 성장 감소가 세포 독성 효과 때문이 아니라는 것을 확인할 수 있다.

[0140] 따라서 이후의 실험에서 세포 성장에 영향을 미치지 않는 농도인 3 μ M의 스컬캅플라본 II를 사용하였다.

[0141] 실험예 3. 포피 섬유아세포에서 MMP-1 전사에 대한 스컬캅플라본 II의 효과

[0142] 도 3은 포피 섬유아세포에서 MMP-1 전사에 대한 스컬캅플라본 II의 효과를 나타낸 것으로, 도 3(a)는 실시간 RT-PCR을 사용하여 DMSO 또는 스컬캅플라본 II 처리 포피 섬유아세포에서 MMP-1 mRNA 수준을 측정한 그래프이고 [* $p < 0.05$ vs. 0 μ M 스컬캅플라본 II와 함께 배양한 샘플], 도 3(b)는 포피 섬유아세포를 프로모터가 없는 루시페라아제(luciferase) 발현 벡터인 pGL3-Basic과 MMP-1 유전자의 프로모터에 의하여 파이어플라이 루시페라아제를 발현하는 벡터인 pGL3-MMP-1 프로모터 및 형질 감염 효율을 측정하기 위한 레닐라 루시페라아제 발현 벡터인 pRL-TK로 일시적으로 형질 감염시키고, 세포를 3 μ M 스컬캅플라본 II(SF II)로 밤새 처리한 후의 루시페라아제 활성을 나타낸 그래프로서, 루시페라아제 활성은 파이어플라이/레닐라 루시페라아제 활성의 비로 결정하였다 [스컬캅플라본 II가 없을 때 루시페라아제 값에 비해 스컬캅플라본 II의 존재 하에 루시페라아제 활성을 나타냄; ** $p < 0.05$ vs. 0 μ M 스컬캅플라본 II와 함께 배양한 샘플].

[0143] 도 3에서, 관찰된 스컬캅플라본 II 매개 MMP-1 분비 억제에 MMP-1 전사 억제에 의한 것인지 여부를 확인하기 위해 포피 섬유아세포를 사용하여 실시간 RT-PCR 및 리포터 유전자 분석을 수행하였다.

[0144] 도 3(a)를 참조하면, MMP-1 단백질 수준의 분석에서와 같이, MMP-1 mRNA 수준은 스컬캅플라본 II로 처리한 세포에서 용량 의존적으로 감소하였다.

[0145] 도 3(b)를 참조하면, 스컬캅플라본 II로 처리한 결과, MMP-1 프로모터에 의해 유도된 루시페라아제 활성이 대조군의 70 %로 감소되었음을 확인할 수 있다.

[0146] 이러한 결과는 스컬캅플라본 II가 전사 수준에서 MMP-1 유전자의 발현을 억제한다는 것을 입증한다.

[0147] 실험예 4. 포피 섬유아세포에서 신호전달물질의 인산화에 미치는 스컬캅플라본 II의 영향

[0148] 도 4는 포피 섬유아세포에서 신호전달물질의 인산화에 미치는 스컬캅플라본 II(SF II)의 효과를 나타낸 것으로,

포피 섬유아세포를 24 시간 동안 혈청 배지에서 배양한 후, 도 4(a-b)는 세포를 표시된 농도의 스컬캅플라본 II (SF II)와 함께 30 분 동안 미리 배양한 다음 10 % FBS로 10 분간 자극한 후, 세포 용해물을 항-포스포티로신 (4G10) (a), 항-포스포-ERK, 항-포스포-JNK, 항-포스포-p38 MAPK 및 항-포스포-NF- κ B p65 항체(b)로 9 % SDS-PAGE 및 웨스턴블롯 분석한 결과이고, (c) 세포를 3 μ M 스컬캅플라본 II와 함께 30 분간 예비 배양한 후 FBS를 최종 농도 10 %가 되도록 첨가하고 30 분간 배양한 후, 세포 용해물을 항-포스포 c-Jun 및 항 -c-Jun 항체로 웨스턴 블롯하여 분석한 결과이다[* p <0.05 vs. 스컬캅플라본 II 없이 10 % FBS만으로 배양된 샘플].

[0149] MMP-1 유전자 발현은 ERK, JNK, p38 MAPK 및 NF- κ B 신호전달 경로의 활성화에 의해 조절된다. 스컬캅플라본 II가 MMP-1 전사촉진(transactivation)을 억제하는 기전을 분석하기 위해 스컬캅플라본 II 유무에 따른 배양 포피 섬유아세포에서 다양한 신호전달 단백질의 인산화를 분석하였다.

[0150] 도 4(a)를 참조하면, 포피 섬유아세포에서 FBS에 의하여 유도된 세포 단백질의 티로신 인산화는 스컬캅플라본 II의 농도 의존적으로 유의하게 감소하였다.

[0151] 도 4(b)를 참조하면, FBS의 처리는 ERK1/2의 인산화를 강력하게 강화시켰고 JNK의 인산화를 적당히 강화시켰으며 p38 MAPK의 인산화를 약하게 향상시켰다. 스컬캅플라본 II은 FBS에서 유도된 ERK1/2와 JNK의 인산화를 농도 의존적으로 감소시켰지만 p38 MAPK의 인산화에는 영향을 미치지 않음을 확인할 수 있다. 또한, NF- κ B p65의 인산화는 FBS의 존재에 의해 영향을 받지 않았고 스컬캅플라본 II의 존재에도 변화되지 않았다.

[0152] 도 4(c)를 참조하면, 스컬캅플라본 II는 FBS에 의하여 유도된 c-Jun의 인산화를 유의하게 감소시켰다.

[0153] 이러한 결과는 스컬캅플라본 II가 ERK 및 JNK 경로의 활성화를 감소시키고 MMP-1의 전사 조절에 중요한 역할을 하는 전사인자 AP-1의 활성화를 감소시킴으로써 MMP-1 발현을 하향 조절함을 입증할 수 있다.

[0154] 실험예 5. 포피 섬유아세포에서의 TNF- α 유도된 MMP-1 발현 및 세포 ROS 수준에 대한 스컬캅플라본 II의 영향

[0155] 도 5는 포피 섬유아세포에서의 TNF- α 에 의해 유도된 MMP-1 발현 및 세포 ROS 수준에 대한 스컬캅플라본 II의 효과를 나타낸 것으로, 도 5(a)는 포피 섬유아세포를 3 μ M 스컬캅플라본 II와 1 ng/ml TNF- α 로 24 시간 동안 배양한 후, 무혈청 조건배지(conditioned medium) 및 세포 용해물을 항-MMP-1, 항-pN-ColI α 1 및 항-GAPDH 항체로 9 % SDS-PAGE 및 웨스턴 블롯으로 분석한 결과이고, 도 5(b)는 H₂O₂ 유발 ROS 생산을 분석하기 위해, 세포를 3 μ M 스컬캅플라본 II 및 DCF-DA와 함께 30 분 동안 항온 배양하고, HBSS로 2 회 세척한 다음, 최종 농도로 100 μ M의 H₂O₂와 함께 10 분 동안 배양한 결과이며, 도 5(c)는 세포를 3 μ M 스컬캅플라본 II와 1 ng/ml TNF- α 로 24 시간 동안 처리하고 세포 용해액을 표시된 항체를 사용하여 웨스턴블롯으로 분석한 결과이다[+++ p <0.001 vs. TNF- α 또는 H₂O₂ 처리없이 배양된 샘플; * p <0.05 및 ** p <0.01vs. 스컬캅플라본 II 없이 배양한 시료; n.s., 유의하지 않음].

[0156] 전 염증성 사이토카인 중양 피사 인자 (TNF)- α 는 피부 섬유아세포를 포함한 다양한 세포 유형에서 MMP-1 발현을 상향 조절한다. 도 5(a)를 참조하면, 예상대로 포피 섬유아세포에 TNF- α 로 자극했을 때 MMP-1 분비를 유의하게 증가시켰음을 확인할 수 있다. 스컬캅플라본 II 처리는 TNF- α 에 의해 유도된 MMP-1 발현을 감소시켰다. 그러나, FBS 처리 세포에서와 마찬가지로, TNF- α 처리 세포에서도 스컬캅플라본 II 처리는 I형 콜라겐 분비에 영향을 미치지 않았다.

[0157] TNF- α 는 적어도 부분적으로 ROS 의존적 방식으로 NF- κ B 신호전달을 활성화시킨다. 따라서 우리는 포피 섬유아세포에서 스컬캅플라본 II가 MMP-1의 하향 조절을 위해 세포 ROS 수준과 NF- κ B 활성화를 억제하는지 여부를 조사했다. 도 5(b)를 참조하면, 포피 섬유아세포에 H₂O₂를 처리하여 세포 ROS를 생성시켰을 때, 스컬캅플라본 II는 H₂O₂에 의하여 유도된 세포 ROS를 유의하게 감소시킴을 확인할 수 있다.

[0158] 도 5(c)를 참조하면, 스컬캅플라본 II 처리는 TNF- α 에 의해 유도된 NF- κ B p65의 인산화도 감소하였음을 확인할 수 있다. 또한, 무혈청 배지에서 TNF- α 를 24 시간 동안 처리했을 때에는 ERK1/2 및 JNK의 인산화가 유의하게 증가하지는 않았지만, TNF- α 자극이 있거나 없을 때에도 ERK1/2의 인산화를 감소시켰다.

[0159] 또한 도 5(d)를 참조하면, 무혈청 배지에서 TNF- α 로 10 분 동안 자극했을 때 ERK1/2 및 JNK의 인산화는 증가되었지만, 스컬캅플라본 II로 처리한 결과 이들의 증가를 유의하게 감소함을 확인할 수 있다.

[0160] 도면으로는 명시하지 않았으나, ROS 스캐빈저인 NAC는 NF- κ B p65, ERK1/2 및 JNK의 TNF- α 유도된 인산화를 감

소시켰다. 이러한 결과를 통하여, 스컬캡플라본 II가 항산화 활성을 통하여 NF- κ B와 AP-1의 활성을 감소시킴으로써 TNF- α 유도성 MMP-1 발현을 감소시킨다는 것을 확인할 수 있다.

[0161] **실험예 6. 포피 섬유아세포의 3D 배양에서 TNF- α 유도된 I형 콜라겐 분해에 대한 스컬캡플라본 II의 효과**

[0162] 도 6은 포피 섬유아세포의 3D 배양에서 TNF- α 에 의해 유도된 I형 콜라겐 분해에 대한 스컬캡플라본 II의 효과를 나타낸 것으로, 포피 섬유아세포를 I형 콜라겐의 3D 매트릭스 내에 삽입하였고, 37 °C에서 1 시간 동안 중합한 후, 3 μ M 스컬캡플라본 II 및 1 ng/ml TNF- α 를 함유하는 무혈청 DMEM에서 24 시간 동안 배양하였다.

[0163] 도 6(a)는 3 차원 배양된 조건배지(conditioned medium)를 항-MMP-1 항체로 9% SDS-PAGE 및 웨스팅블롯으로 분석한 결과이고[+++ $p < 0.001$ vs. TNF- α 처리없이 배양된 샘플; * $p < 0.05$ 및 *** $p < 0.001$ vs. 스컬캡플라본 II 없이 배양된 샘플], 도 6(b)는 포피 섬유아세포를 함유하는 3D 매트릭스를 항-I형 콜라겐 절단 부위 항체 및 Alexa Fluor[®] 488 염소 항-토끼 IgG(H+L), 팔로이딘-로다민 및 Hoechst 33258로 염색하고, 세포를 공초점 형광 현미경($\times 200$)으로 분석한 이미지이다.

[0164] 도 6(a)를 참조하면, MMP-1이 I형 콜라겐의 분해에 관여하는 중심 효소이기 때문에, 포피 섬유아세포의 3D 배양을 이용하여 스컬캡플라본 II가 MMP-1 발현을 하향 조절함으로써 I형 콜라겐의 분해에 영향을 주는지 여부를 조사하였다. 스컬캡플라본 II는 2 차원(2D) 배양 조건과 마찬가지로 3D 배양에서도 TNF- α 에 의해 유도된 MMP-1의 분비를 하향 조절함을 확인하였다.

[0165] 도 6(b)를 참조하면, I형 콜라겐 절단 부위 항체를 이용한 실험에서 TNF- α 자극에 의해 I형 콜라겐의 절단된 3/4 단편 생성이 증가함이 밝혀졌다. 흥미롭게도 스컬캡플라본 II를 처리하면 포피 섬유아세포의 3D 배양에서 I형 콜라겐의 3/4 분절 단편의 양이 현저히 감소하였다.

[0166] 이러한 결과를 통하여, 스컬캡플라본 II가 MMP-1 발현의 하향 조절을 통해 콜라겐 분해를 억제한다는 것을 입증할 수 있다.

[0167] 도 7은 MMP-1의 발현 저해를 통한 콜라겐 분해 억제에 대한 스컬캡플라본 II의 역할을 설명하는 모델이다.

[0168] 도 7을 참조하면, 혈청 내 성장인자는 ERK 및 JNK 경로의 활성화를 통해 전사인자 AP-1을 활성화시킨다. TNF- α 는 AP-1뿐만 아니라 전사 인자 NF- κ B를 활성화시킨다. 스컬캡플라본 II는 MMP-1 발현에 필요한 AP-1 및 NF- κ B의 활성화를 억제한다. 따라서 스컬캡플라본 II는 MMP-1 발현을 억제함으로써 세포외 기질의 완전성을 유지할 수 있다.

[0169] 그러므로 본 발명에 따르면, 스컬캡플라본 II가 3 μ M 이하의 농도에서도 MMP-1 발현을 저해하여 이의 기질인 콜라겐의 분해를 억제함을 밝힘으로써, 스컬캡플라본 II 및 이의 유도체를 유효성분으로 함유하는, MMP-1 발현에 의한 콜라겐 분해에 의해 발생하는 피부 노화, 섬유증, 종양, 심장비대 또는 관상동맥질환의 예방 또는 치료용 약학조성물 및 건강기능식품을 제공할 수 있다.

[0170] 하기에 본 발명의 스컬캡플라본 유도체를 함유하는 조성물의 제제예를 설명하나, 본 발명은 이를 한정하고자 함이 아닌 단지 구체적으로 설명하고자 함이다.

[0171] **제제예 1. 산제의 제조**

[0172] 스컬캡플라본 유도체 500 mg

[0173] 유당 100 mg

[0174] 탈크 10 mg

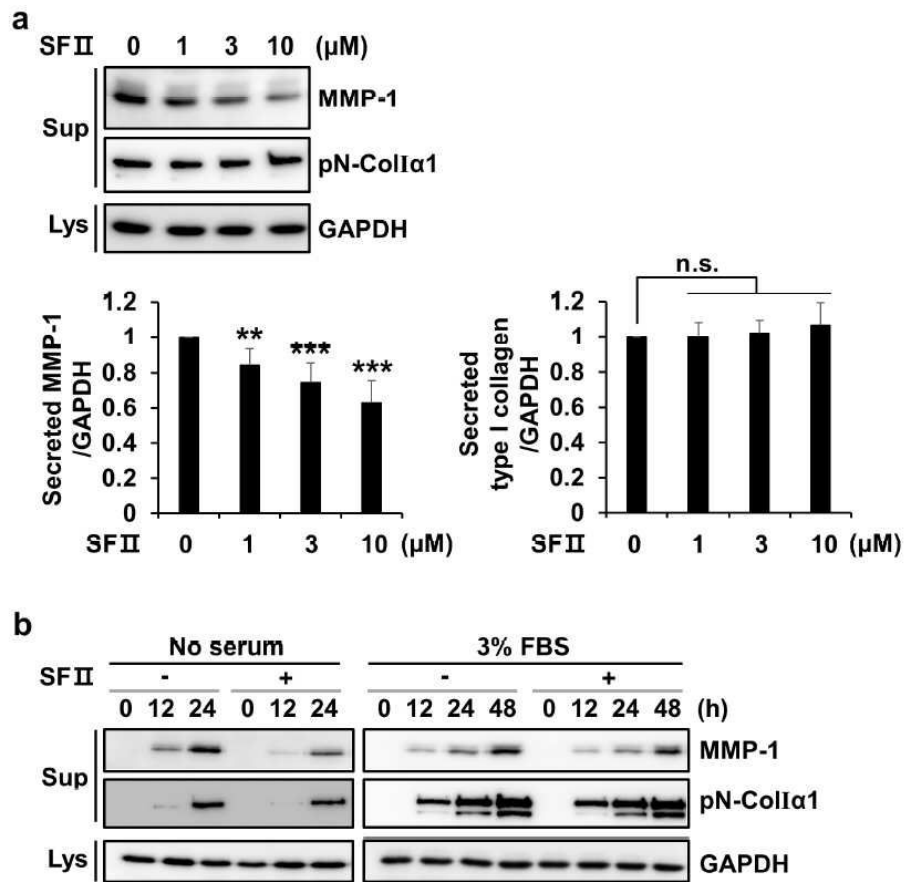
[0175] 상기의 성분들을 혼합하고 기밀포에 충전하여 산제를 제조한다.

[0176]	<u>제제예 2. 정제의 제조</u>	
[0177]	스컬캅플라본 유도체	300 mg
[0178]	옥수수전분	100 mg
[0179]	유당	100 mg
[0180]	스테아린산 마그네슘	2 mg
[0181]	상기의 성분들을 혼합한 후 통상의 정제의 제조방법에 따라서 타정하여 정제를 제조한다.	
[0182]	<u>제제예 3. 캡슐제의 제조</u>	
[0183]	스컬캅플라본 유도체	200 mg
[0184]	결정성 셀룰로오스	3 mg
[0185]	락토오스	14.8 mg
[0186]	마그네슘 스테아레이트	0.2 mg
[0187]	통상의 캡슐제 제조방법에 따라 상기의 성분을 혼합하고 젤라틴 캡슐에 충전하여 캡슐제를 제조한다.	
[0188]	<u>제제예 4. 주사제의 제조</u>	
[0189]	스컬캅플라본 유도체	600 mg
[0190]	만니톨	180 mg
[0191]	주사용 멸균 증류수	2974 mg
[0192]	Na ₂ HPO ₄ ·12H ₂ O	26 mg
[0193]	통상의 주사제의 제조방법에 따라 1 앰플 당 상기의 성분 함량으로 제조한다.	
[0194]	<u>제제예 5. 액제의 제조</u>	
[0195]	스컬캅플라본 유도체	4 g
[0196]	이성화당	10 g
[0197]	만니톨	5 g
[0198]	정제수	적량
[0199]	통상의 액제의 제조방법에 따라 정제수에 각각의 성분을 가하여 용해시키고 레몬향을 적량 가한 다음 상기의 성분을 혼합한 다음 정제수를 가하여 전체를 정제수를 가하여 전체 100 g으로 조절한 후 갈색병에 충전하여 멸균시켜 액제를 제조한다.	
[0200]	<u>제제예 6. 과립제의 제조</u>	
[0201]	스컬캅플라본 유도체	1,000 mg
[0202]	비타민 혼합물	적량
[0203]	비타민 A 아세테이트	70 μg
[0204]	비타민 E	1.0 mg
[0205]	비타민 B1	0.13 mg

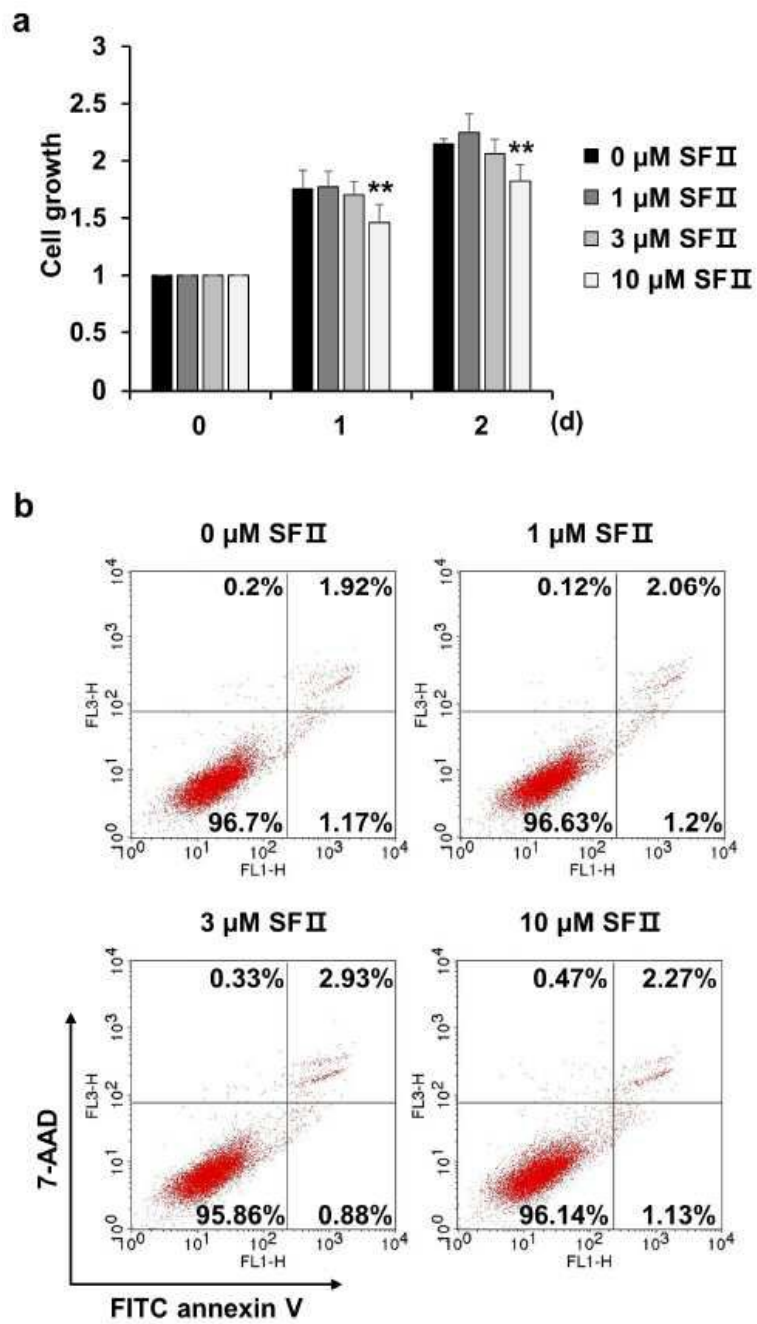
[0206]	비타민 B2	0.15 mg
[0207]	비타민 B6	0.5 mg
[0208]	비타민 B12	0.2 μ g
[0209]	비타민 C	10 mg
[0210]	비오틴	10 μ g
[0211]	니코틴산아미드	1.7 mg
[0212]	엽산	50 μ g
[0213]	판토텐산 칼슘	0.5 mg
[0214]	무기질 혼합물	적량
[0215]	황산제1철	1.75 mg
[0216]	산화아연	0.82 mg
[0217]	탄산마그네슘	25.3 mg
[0218]	제1인산칼륨	15 mg
[0219]	제2인산칼슘	55 mg
[0220]	구연산칼륨	90 mg
[0221]	탄산칼슘	100 mg
[0222]	염화마그네슘	24.8 mg
[0223]	상기의 비타민 및 미네랄 혼합물의 조성비는 비교적 과립제에 적합한 성분을 바람직한 실시예로 혼합 조성하였지만, 그 배합비를 임의로 변형 실시하여도 무방하며, 통상의 과립제 제조방법에 따라 상기의 성분을 혼합한 다음, 과립을 제조하고, 통상의 방법에 따라 건강기능식품 조성물 제조에 사용할 수 있다.	
[0224]	<u>제제예 7. 기능성 음료의 제조</u>	
[0225]	스컬캡플라본 유도체	1,000 mg
[0226]	구연산	1,000 mg
[0227]	올리고당	100 g
[0228]	매실농축액	2 g
[0229]	타우린	1 g
[0230]	정제수를 가하여	전체 900 mL
[0231]	통상의 건강음료 제조방법에 따라 상기의 성분을 혼합한 다음, 약 1 시간 동안 85 ℃에서 교반 가열한 후, 만들어진 용액을 여과하여 멸균된 2 L 용기에 취득하여 밀봉 멸균한 뒤 냉장 보관한 다음 본 발명의 기능성 음료 조성물 제조에 사용한다.	
[0232]	상기 조성비는 비교적 기호음료에 적합한 성분을 바람직한 실시예로 혼합 조성하였지만, 수요계층, 수요국가, 사용용도 등 지역적, 민족적 기호도에 따라서 그 배합비를 임의로 변형 실시하여도 무방하다.	

도면

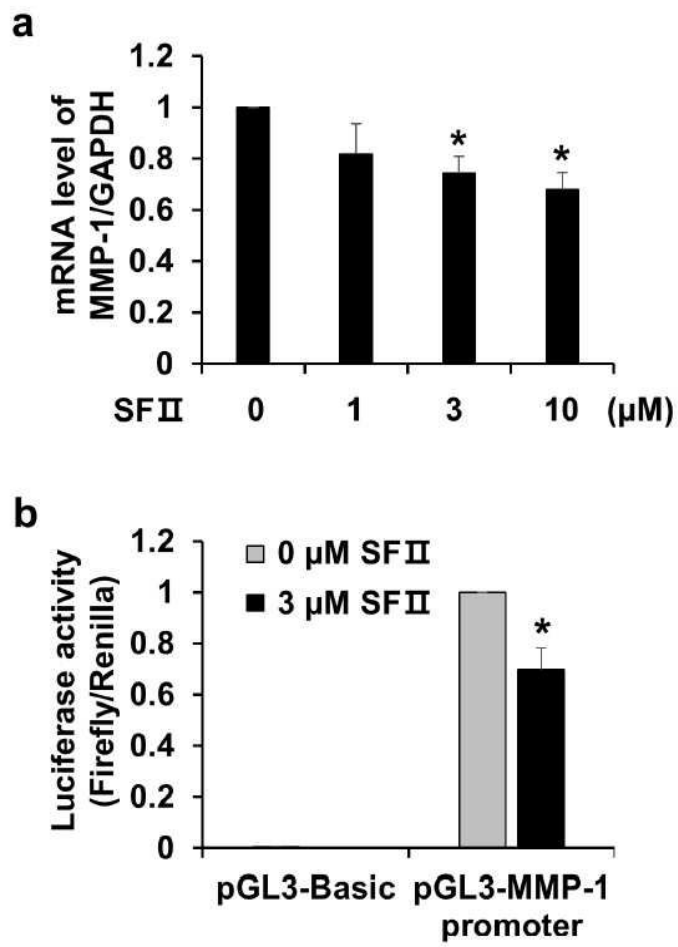
도면1



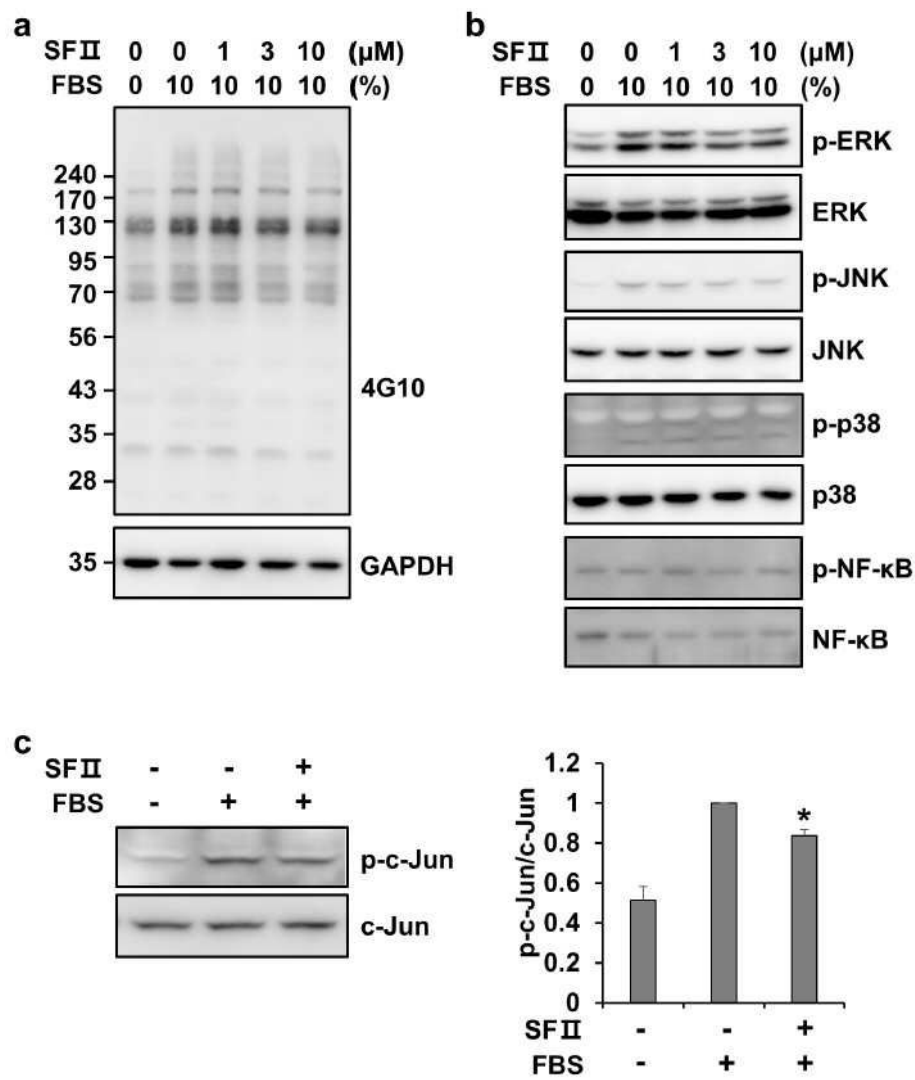
도면2



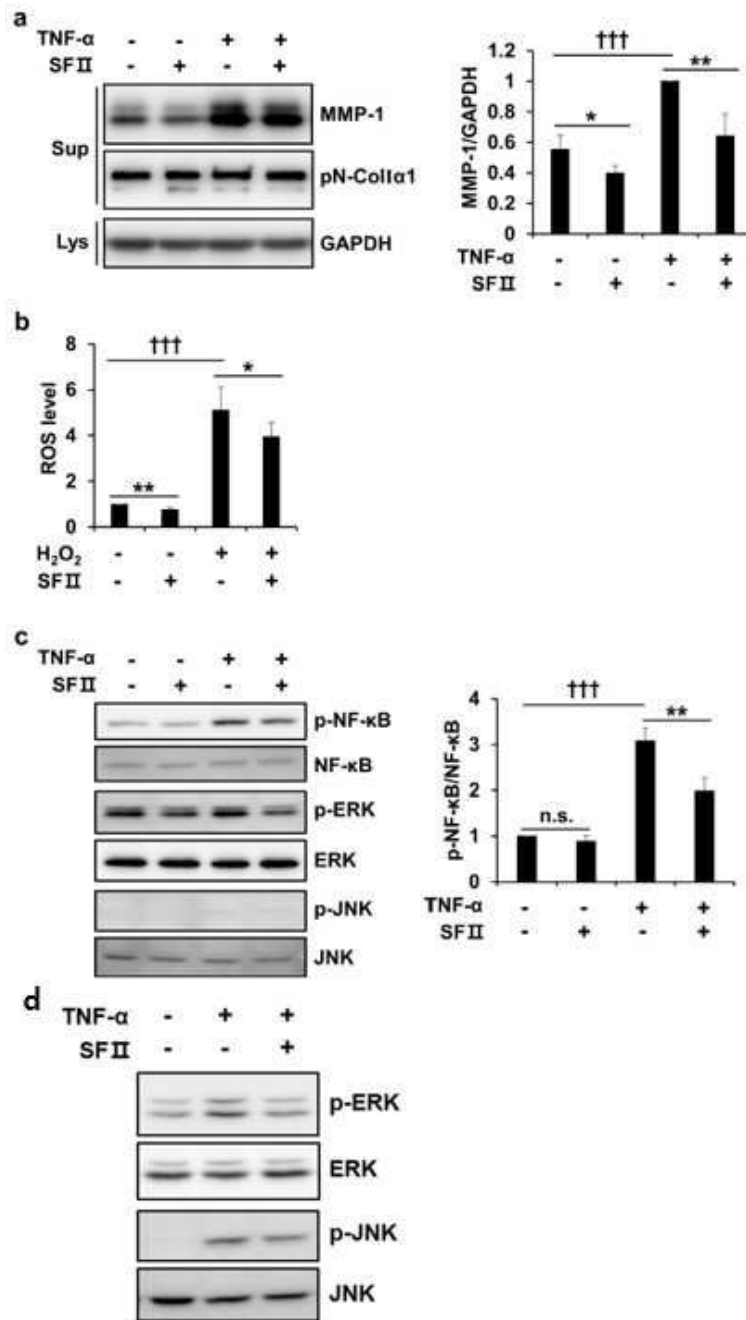
도면3



도면4



도면5



도면6

