



(19) 대한민국특허청(KR)
(12) 공개특허공보(A)

(11) 공개번호 10-2013-0103945
(43) 공개일자 2013년09월25일

(51) 국제특허분류(Int. Cl.)

A61K 31/37 (2006.01) A61K 31/35 (2006.01)
A61P 25/28 (2006.01) A61P 35/00 (2006.01)

(21) 출원번호 10-2012-0024994

(22) 출원일자 2012년03월12일

심사청구일자 2012년03월12일

(71) 출원인

조선대학교산학협력단

광주광역시 동구 서석동 375 조선대학교 내

(72) 발명자

최철희

광주광역시 동구 서석동 조선대학교 의과대학

조훈

광주광역시 남구 진월동 금광하늘연가 104동 601호

(뒷면에 계속)

(74) 대리인

이원희

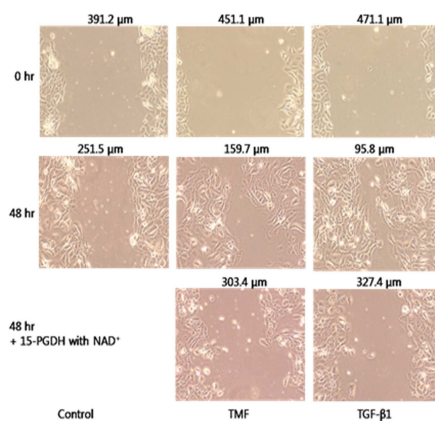
전체 청구항 수 : 총 10 항

(54) 발명의 명칭 플라본 화합물의 15-하이드록시프로스타글란딘 탈수소효소 활성의 억제 효능 및 그의 용도

(57) 요약

본 발명은 플라본 화합물을 유효성분으로 함유하는 PGE₂ 증가를 필요로 하는 질환의 예방 및 치료용 조성물, 탈모, 두피 개선 및 피부 재생용 화장품 조성물, 및 피부 미용 조성물에 관한 것으로, 더욱 구체적으로는 본 발명의 7, 3', 4'-트리메톡시플라본은 세포독성이 적으며, PGE₂를 대사시키는 효소인 15-PGDH를 효과적으로 억제하고, 상처 치유에 관련된 PGE₂의 세포 내외의 수준을 조절하는 분자인 COX-1/2, MRP4 및 PGT의 mRNA 발현을 조절하여 세포 내외의 PGE₂ 수준을 조절하여 상처 치유능을 향상시키고 PGE₂ 증가와 관련된 질환을 치료하는 효과를 가짐으로써 PGE₂ 증가를 필요로 하는 질환의 예방 및 치료용 조성물, 탈모, 두피 개선 및 피부 재생용 화장품 조성물, 및 피부 미용 조성물의 유효성분으로 유용하게 사용될 수 있다.

대표도 - 도3



(72) 발명자

샌딥 카나

광주광역시 북구 용봉동 전남대학교 치과대학 치과
학연구센터

문영숙

광주광역시 동구 서석동 375번지 조선대학교 의과
대학

이선영

강원도 강릉시 내곡동 한라아파트 103동 601호

이 발명을 지원한 국가연구개발사업

과제고유번호 R13-2003-009

부처명 교육과학기술부

연구사업명 선도연구센터 육성사업 기초의약학분야

연구과제명 항암 및 호르몬내성기전의 규명 및 극복전략개발에 관한 연구

주관기관 조선대학교 산학협력단

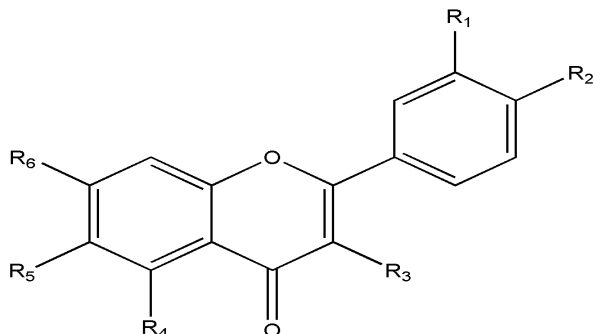
연구기간 2003.09.01 ~ 2012.08.31

특허청구의 범위

청구항 1

상기 화학식 1의 화합물을 유효성분으로 함유하는 염증 반응 질환, 종양 질환, 알츠하이머병 및 아테롬성 동맥 경화증으로 이루어지는 군으로부터 선택되는 PGE₂ 증가를 필요로 하는 질환의 예방 및 치료용 약학적 조성물:

[화학식 1]



상기 화학식 1에서, R₁, R₂, R₃, R₄, R₅, 및 R₆는 각각 독립적으로 수소(H), 하이드록시기(OH), 또는 메톡시기(OCH₃)이다.

청구항 2

제 1항에 있어서, 상기 질환은 탈모, 두피 질환, 소화성 궤양, 구내염, 구강궤양, 골절, 말초혈관질환, 피부 상처(wound) 및 화상으로 이루어진 군으로부터 선택되는 것을 특징으로 하는 약학적 조성물.

청구항 3

제 2항에 있어서, 상기 피부 상처는 자상, 창상, 절상, 찰과상 및 위궤양으로 이루어진 군으로부터 선택되는 것을 특징으로 하는 약학적 조성물.

청구항 4

제 1항에 있어서, 상기 화학식 1의 화합물에서, R₁이 메톡시기 또는 수소;

R₂가 메톡시기;

R₃가 메톡시기, 수소 또는 하이드록시기;

R₄가 메톡시기 또는 수소;

R₅가 메톡시기 또는 수소; 및

R₆가 메톡시기, 수소 또는 하이드록시기인 것을 특징으로 하는 약학적 조성물.

청구항 5

제 1항에 있어서, 상기 화학식 1의 화합물에서 R₁이 메톡시기;

R_2 가 메톡시기; 및

R_5 가 메톡시기인 것을 특징으로 하는 약학적 조성물.

청구항 6

제 1항에 있어서, 화학식 1의 화합물이 15-하이드록시프로스타글란딘 탈수소효소(15-hydroxyprostaglandin dehydrogenase, 15-PGDH)를 억제하는 활성을 가지는 것을 특징으로 하는 약학적 조성물.

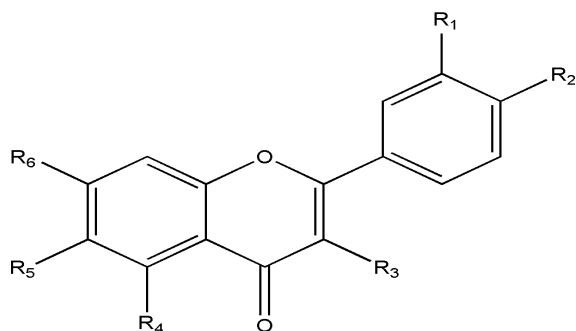
청구항 7

제 1항에 있어서, 화학식 1의 화합물이 PGE_2 증가 활성을 가지는 것을 특징으로 하는 약학적 조성물.

청구항 8

하기 화학식 1의 화합물을 유효성분으로 함유하는 탈모, 두피 개선 및 피부 재생용 화장품 조성물:

[화학식 1]



상기 화학식 1에서, R_1 , R_2 , R_3 , R_4 , R_5 , 및 R_6 는 각각 독립적으로 수소(H), 하이드록시기(OH), 또는 메톡시기(OCH_3)이다.

청구항 9

제 8항에 있어서, 상기 화학식 1의 화합물에서, R_1 이 메톡시기 또는 수소;

R_2 가 메톡시기;

R_3 가 메톡시기, 수소 또는 히드록시기;

R_4 가 메톡시기 또는 수소;

R_5 가 메톡시기 또는 수소; 및

R_6 가 메톡시기, 수소 또는 히드록시기인 것을 특징으로 하는 탈모, 두피 개선 및 피부 재생용 화장품 조성물.

청구항 10

제 8항에 있어서, 상기 화학식 1의 화합물에서 R_1 이 메톡시기;

R₂가 메톡시기; 및

R₅가 메톡시기인 것을 특징으로 하는 탈모, 두피 개선 및 피부 재생용 화장품 조성물.

명세서

기술분야

[0001] 본 발명은 플라본(flavone) 화합물을 함유한 PGE₂ 증가를 필요로 하는 질환의 예방 및 치료용 조성물 및 상처치료, 혈류개선, 뼈 형성, 궤양치료, 탈모, 두피 개선 및 피부 재생용 화장품 조성물에 관한 것이다.

배경기술

[0002] 프로스타글란딘(PG) E₂는 각막의 상피세포에 의해 생성되는 주요 에이코사노이드(eicosanoid)이며, 이 프로스타노이드는 EP2 수용체를 통해 체세포 분열, 이동, 및 형태를 조절한다(Joyce et al., 1989; Jumblatt, 1994; Jumblatt and Paterson, 1991). 아라키돈산은 포스포리파제 A₂에 의해 막인지질에서 형성된다. PGE₂는 사이클로옥시게나아제(cyclooxygenase, COX)에 의한 아라키돈산에서 유래된 PGH₂로부터 PG 합성효소에 의해 형성된다(Dey et al., 2006). PGE₂는 여러 가지 생리적인 기능 조절에 핵심적인 물질이며, 염증의 주요 매개체라고 여겨진다(Coleman et al., 1994; Griffiths, 1999). 두 가지 형태의 COX 아형이 밝혀진 바 있다. COX-1은 위장을 포함한 여러 가지 조직에서 지속적으로 발현되는 반면, COX-2는 사이토카인, 성장 인자, 발암프로모터 및 다른 물질들에 의해 유도된다(Crofford, 1997). 프로스타글란딘(PG)은 세포 내에 저장되지 않고 세포 외로 방출되어 자기세포(autocrine)에 또는 이웃하는 다른 세포(paracrine)에 작용을 한다. 새로 합성된 PGE₂는 확산방법으로 또는 ATP-의존 조건에서 효과적으로 PGE₂를 운반한다고 알려진 MRP4(multidrug resistance 4)에 의해 세포밖으로 분출된다(Reid et al., 2003; Schuster, 2002). 세포 외의 PGE₂는 여러 신호전달과정을 활성화시키는 세포 표면의 G 단백질-결합 수용체(G protein-coupled receptors)인 EP 수용체를 통해 활성을 나타낸다(Zhu et al., 2006). 그 후, 세포 주위의(pericellular) PGE₂는 PG 운반체(PG transporter, PGT)를 통해 재흡수되고(Schuster, 1998), 그 다음에 세포질 효소인 NAD⁺-의존 15-하이드록시프로스타글란딘 탈수소효소(15-hydroxyprostaglandin dehydrogenase, 15-PGDH)에 의해 빠르게 대사된다(Anggard and Samuelsson, 1964)(도 1 참조).

[0003] 15-PGDH(15-hydroxyprostaglandin dehydrogenase)는 포유동물의 조직에 편재하는 PGE₂와 같은 PG의 생물학적 불활성화에 관련된 중요한 효소이다(Anggard, 1966). NAD⁺ 특이적인 Type I 및 NADP⁺ 특이적인 Type II의 15-PGDH 효소가 밝혀졌다. 그러나, type II는 나중에 카보닐 환원효소로 밝혀져(Wermuth, 1981) type I이 PG의 생물학적 불활성화에 관련된 중요한 효소라고 여겨지고 있다.

[0004] 또한, PGE₂는 위궤양 치유(Araki et al., 2002; Gudis and Sakamoto, 2005; Halter et al., 2001; Hatazawa et al., 2007; Miura et al., 2004; Mizuno et al., 1997; Shigeta et al., 1998; Ukawa et al., 1998; Wallace, 2008), 피부 상처 치유(Choung et al., 1998; Futagami et al., 2002; Kohyama et al., 2001; Parekh et al., 2009; Watanabe et al., 1996; Wilgus et al., 2004) 및 인간 모낭 세포에서(Colombe et al., 2008; Michelet et al., 2008)의 중요한 매개체로 밝혀져 있다. 상처치유는 많은 형태의 세포들, 수용성 매개체 및 세포외 기질(extracellular matrix) 등이 관여하여 일어나는 복잡한 과정이다. 성인의 진피에서, 치유과정은 지혈 및 염증으로 시작하여, 원래 상태의 조직을 만들게 되나, 흔히 흉터를 남긴다(Singer and Clark, 1999). PGE₂는 4 개의 EP 수용체를 통해 각질세포(keratinocytes)(Konger et al., 1998), 수지상 세포(dendritic cells)(Harizi et al., 2003), 및 섬유아세포(fibroblasts)(Kolodnick et al., 2003)를 포함하는 여러 가지 세포의 활성을 조

절한다. 따라서 염증유발 또는 항염증 효능을 지닌 PGE₂의 총괄적인 효과 결정에 수용체의 정교한 발현은 중요하다. 또한 EP는 태아 또는 성인의 상처 치유 동안 다르게 조절된다(Li et al., 2000).

[0005] 상처 치유 과정은 3 단계로 이루어진다. 그 단계는 염증 단계, 증식 단계 및 성숙 단계로, 염증 단계는 지혈과 염증이 특징이다. 상처 치유의 두 번째 단계는 증식 단계로 상피화, 혈관신생, 육아 조직(granulation tissue) 형성 및 콜라겐 침착이 이루어지며 상처 치유의 동화 작용에 주된 단계이다. 상피화는 상처 재생 초기에 이루어지며 섬유모세포가 분화되고 피부 기질(ground substance)이 생성되며 콜라겐이 생성된다. 피부 기질은 상처 부위에 침착되고, 상처 부위가 재생 마지막 단계를 거치면서 콜라겐이 침착된다. 이러한 상처 치유의 단계에는 세포와, 그와 함께 작용하는 사이토카인의 복잡한 상호 작용이 관여하며, 현재 시험관 내 연구중인 그외 다수 사이토카인으로는 TGF- β , EGF 및 IGF-1이 있다. 최근, 보다 많은 상처 치유에 관여하는 화학적 매개체(mediator integral)가 확인되고 있다.

[0006] 상처 치유 과정에서 재-상피화(re-epithelialization)는 상처 치유에서 중요한 작용이다. 상처의 치유는 응혈 형성, 염증 반응, 육아조직의 축적, 세포외 기질(ECM)의 퇴적 및 리모델링이 관련된 복잡한 과정이다(Clark, 1996). 상처의 치유는 표피 및 진피에서의 세포의 상호작용뿐 아니라 염증 세포, 섬유아세포, 및 각질 세포에서 방출되는 매개체를 필요로 한다(Martin, 1997). 각질세포의 재-상피화는 상처 부위의 표피로 세포가 이동하여 유사분열하는 과정에 의해 이루어진다(Santoro 및 Gaudino, 2005). 상처 치유에 영향을 주는 많은 인자들은, 성장 인자, 사이토카인, 메탈로프로티네이즈(metalloproteinase), 및 세포외 기질(ECM) 단백질을 포함하며(Coulombe, 2003; Martin, 1997; Santoro and Gaudino, 2005), 이러한 인자의 몇몇의 외인성 작용은 치유 과정에 이로운 것으로 밝혀졌다(Werner and Grose, 2003). 많은 연구에서 PGE₂를 피부 상처 치유의 중요한 매개체로 보고한 바 있으며, PGE₂가 EP2 수용체 경로를 통한 섬유아세포의 근섬유모세포로의 분화를 억제할 수 있다고 보고하였다(Kolodsick et al., 2003).

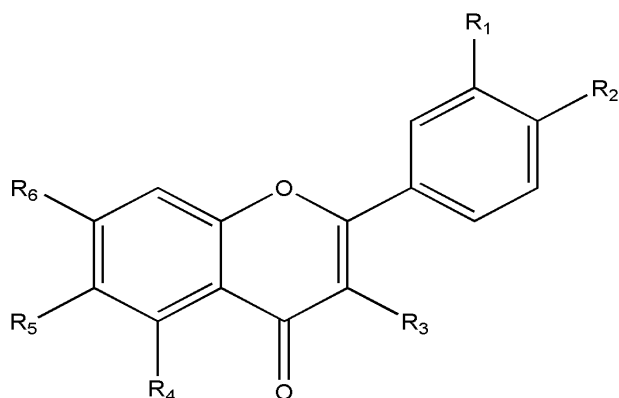
[0007] 따라서, 본 발명자들은 상처 치유용 물질을 개발하기 위해 연구한 결과, 7, 3', 4'-트리메톡시플라본이 15-PGDH의 억제를 통해 PGE₂를 증가시켜서 PGE₂가 관련된 피부 자상, 창상, 절상, 찰과상 및 위궤양과 같은 상처 치유를 위한 약학적 조성물, 피부 재생 및 상처 치유용 화장품 조성물, 및 모발 밀도 증가, 모발 성장 및 속눈썹 성장을 위한 피부 미용 조성물에 유용하게 사용할 수 있음을 밝힘으로써 본 발명을 완성하였다.

발명의 내용

해결하려는 과제

[0008] 본 발명의 목적은, 하기 화학식 1의 화합물을 유효성분으로 함유하는 염증 반응 질환, 종양 질환, 알츠하이머병 및 아테롬성 동맥 경화증으로 이루어지는 군으로부터 선택되는 PGE₂ 증가를 필요로 하는 질환의 예방 및 치료용 조성물을 제공하는 것이다:

[0009] [화학식 1]

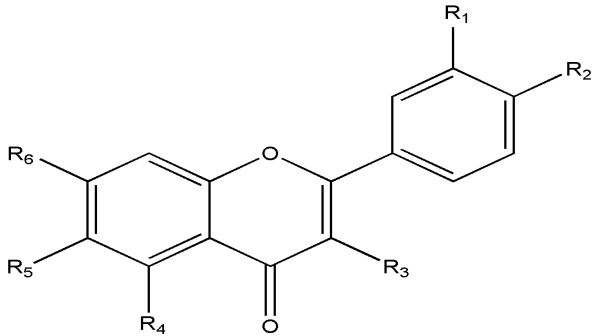


[0010]

[0011] 상기 화학식 1에서, R_1 , R_2 , R_3 , R_4 , R_5 , 및 R_6 는 각각 독립적으로 수소(H), 하이드록시기(OH), 또는 메톡시기(OCH_3)이다.

[0012] 아울러, 본 발명의 목적은, 하기 화학식 1의 화합물을 유효성분으로 함유하는 탈모, 두피 개선 및 피부 재생용 화장품 조성물을 제공하는 것이다:

[0013] [화학식 1]



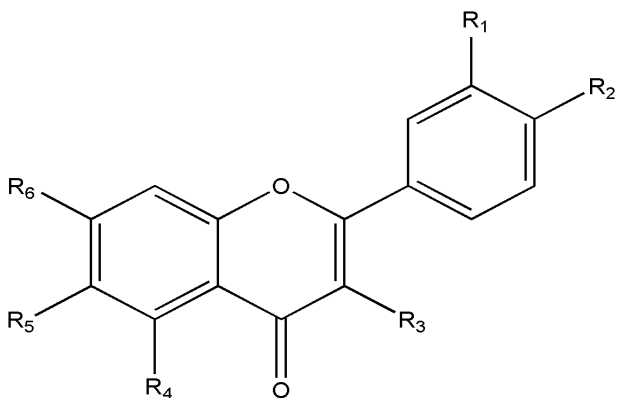
[0014]

[0015] 상기 화학식 1에서, R_1 , R_2 , R_3 , R_4 , R_5 , 및 R_6 는 각각 독립적으로 수소(H), 하이드록시기(OH), 또는 메톡시기(OCH_3)이다.

과제의 해결 수단

[0016] 상기 목적을 달성하기 위하여, 본 발명은 하기 화학식 1의 화합물을 유효성분으로 함유하는 염증 반응 질환, 종양 질환, 알츠하이머병 및 아테롬성 동맥 경화증으로 이루어지는 군으로부터 선택되는 PGE_2 증가를 필요로 하는 질환의 예방 및 치료용 조성물을 제공한다:

[0017] [화학식 1]

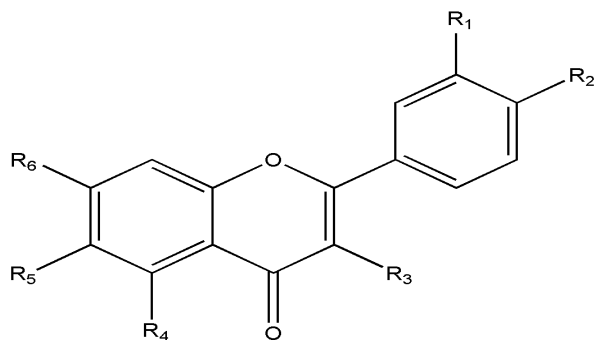


[0018]

[0019] 상기 화학식 1에서, R_1 , R_2 , R_3 , R_4 , R_5 , 및 R_6 는 각각 독립적으로 수소(H), 하이드록시기(OH), 또는 메톡시기(OCH_3)이다.

[0020] 아울러, 상기 목적을 달성하기 위하여, 본 발명은 하기 화학식 1의 화합물을 유효성분으로 함유하는 탈모, 두피 개선 및 피부 재생용 화장품 조성물을 제공한다:

[0021] [화학식 1]



[0022]

[0023]

상기 화학식 1에서, R₁, R₂, R₃, R₄, R₅, 및 R₆는 각각 독립적으로 수소(H), 하이드록시기(OH), 또는 메톡시기(OCH₃)이다.

발명의 효과

[0024]

본 발명의 플라본 화합물은 세포독성이 적고, PGE₂를 대사시키는 15-PGDH를 억제하여 PGE₂를 증가시키며, PGE₂의 수준과 관련된 MRP4, PGT, COX-1 및 COX-2의 mRNA 발현량을 조절함으로써 세포 내 PGE₂를 증가시켜 상처 치유를 효과적으로 할 수 있으므로, PGE₂ 증가를 필요로 하는 질환의 예방 및 치료용 조성물 및 상처치료, 혈류개선, 뼈형성, 레이저치료, 탈모, 두피 개선 및 피부 재생용 화장품 조성물의 유효성분으로 유용하게 사용될 수 있다.

도면의 간단한 설명

[0025]

도 1은 세포 내외의 PGE₂와 관련된 분자들의 작용을 개괄적으로 보여주는 그림이다;

AA: 아라키돈산(arachidonic acid);

●: PGE₂;

PL: 포스포리피드(phospholipid);

PLA₂: 포스포리파아제 A₂(phospholipase A₂); 및

PGT: 프로스타글란딘 트랜스포터(prostaglandin transporter).

도 2는 인간 각질 세포인 HaCaT 세포에서 7, 3', 4'-트리메톡시플라본에 의한 COX-1/2, MRP4 및 PGT의 mRNA 발현량을 나타낸 그래프이다;

Statistically significant p<0.05.

도 3은 인간 각질 세포인 HaCaT 세포에서 7, 3', 4'-트리메톡시플라본에 의한 상처 치료 분석을 나타내는 역상 현미경(×100) 사진이다;

control: 약물 미처리 음성 대조군;

TMF: 7, 3', 4'-트리메톡시플라본 처리 실험군; 및

TGF-β1: TGF-β1 처리 양성 대조군.

발명을 실시하기 위한 구체적인 내용

[0026]

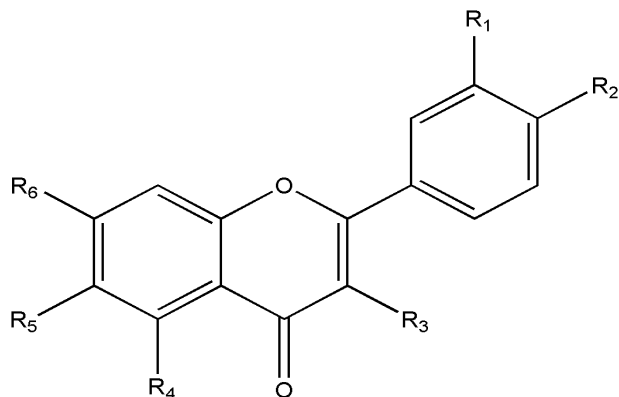
이하, 본 발명을 상세히 설명한다.

[0027]

본 발명은 하기 화학식 1의 화합물을 유효성분으로 함유하는 염증 반응 질환, 중양 질환, 알츠하이머병 및 아테

롬성 동맥 경화증으로 이루어지는 군으로부터 선택되는 PGE₂ 증가를 필요로 하는 질환의 예방 및 치료용 조성물을 제공한다:

[0028] [화학식 1]



[0029]

[0030] 상기 화학식 1에서, R₁, R₂, R₃, R₄, R₅, 및 R₆는 각각 독립적으로 수소(H), 하이드록시기(OH), 또는 메톡시기(OCH₃)이다.

[0031] 상기 질환은 탈모, 두피 질환, 소화성 궤양, 구내염, 구강궤양, 골절, 말초혈관질환, 피부 상처(wound) 및 화상으로 이루어진 군으로부터 선택되는 것을 특징으로 하는 것이 바람직하나, 이에 한정되지 않는다.

[0032] 상기 피부 상처는 자상, 창상, 절상, 찰과상 및 위궤양으로 이루어진 군으로부터 선택되는 것을 특징으로 하는 것이 바람직하나, 이에 한정되지 않는다.

[0033] 상기 화학식 1의 화합물에서, R₁이 메톡시기 또는 수소;

[0034] R₂가 메톡시기;

[0035] R₃가 메톡시기, 수소 또는 하이드록시기;

[0036] R₄가 메톡시기 또는 수소;

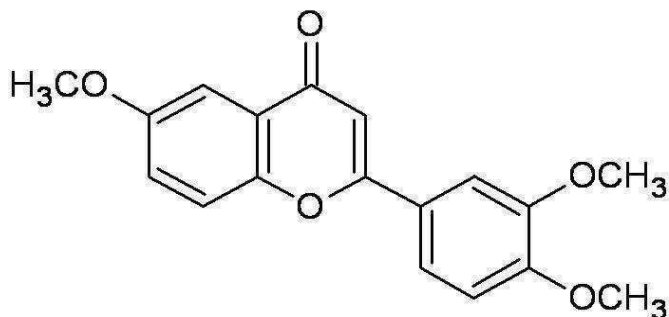
[0037] R₅가 메톡시기 또는 수소; 및

[0038] R₆가 메톡시기, 수소 또는 하이드록시기인 것을 특징으로 하는 것이 바람직하고, 상기 화학식 1의 화합물에서 R₁이 메톡시기;

[0039] R₂가 메톡시기; 및

[0040] R₅가 메톡시기인 하기 화학식 2의 화합물인 것이 더욱 바람직하나, 이에 한정되지 않는다.

[0041] [화학식 2]



[0042]

[0043] 상기 화학식 1의 메톡시 기는 구조-활성관계(structure-activity relation, SAR)에 의해 플라본(flavone)의 백본(backbone)에 7, 3' 및 4'의 위치에 모두 존재하는 것이 가장 바람직한 15-PGDH 억제 효과를 갖는다.

- [0044] 상기 화학식 1의 화합물은 PGE_2 증가 활성을 가지는 것이 바람직하나, 이에 한정되지 않는다.
- [0045] 상기 화학식 1의 화합물은 15-PGDH를 억제하는 활성을 가지는 것이 바람직하나, 이에 한정되지 않는다.
- [0046] 본 발명의 구체적인 실시예에서, 본 발명자들은 7 가지의 플라본들 중 PGE_2 를 대사시켜 감소시키는 15-PGDH 억제 활성이 높으면서 세포독성이 적은 물질을 찾기 위하여, 7, 3', 4'-트리메톡시플라본을 선별하였고, 이의 15-PGDH 억제 활성 및 세포독성을 확인하였다. 그 결과, 7 가지 7, 3', 4'-트리메톡시플라본(TMf), 3', 4'-디메톡시플라본(dimethoxyflavone), 5, 7, 4'-트리메톡시플라본(trimethoxyflavone), 3, 6, 3', 4'-테트라메톡시플라본(tetramethoxyflavone), 3, 7-디하이드록시(dihydroxy)-3', 4'-디메톡시플라본(dimethoxyflavone), 3, 5, 7, 3', 4'-펜타메톡시플라본(pentamethoxyflavone) 및 5, 7, 3', 4'-테트라메톡시플라본(tetramethoxyflavone)들이 모두 15-PGDH의 활성을 억제하였으며, 그 중에 특히, 7, 3', 4'-트리메톡시플라본이 15-PGDH 억제 활성이 가장 좋으면서 세포독성은 매우 적음을 확인하였다(표 1 참조).
- [0047] 또한, 본 발명의 또 다른 구체적인 실시예에서, 본 발명자들은 7, 3', 4'-트리메톡시플라본에 의한 15-PGDH의 억제를 통해 기질인 PGE_2 의 세포 외 수준을 알아보기 위하여 효소면역분석법을 통해 확인한 결과, 7, 3', 4'-트리메톡시플라본에 의해 농도의존적으로 PGE_2 가 10배 정도 증가된 것을 확인할 수 있었다(표 2 참조).
- [0048] 또한, 본 발명의 또 다른 구체적인 실시예에서, 본 발명자들은 7, 3', 4'-트리메톡시플라본이 세포 내외의 PGE_2 수준을 결정하는 분자인 COX-1/2, MRP4 및 PGT의 mRNA 발현량에 미치는 영향을 알아보기 위하여 실시간 PCR을 수행한 결과, PGE_2 를 생성하는 COX-2의 mRNA 발현량은 감소했으며, PGE_2 의 세포 외 수송에 관여하는 MRP4의 mRNA 발현량은 증가한 것을 확인하여, 7, 3', 4'-트리메톡시플라본에 의한 15-PGDH 억제를 통한 PGE_2 대사 억제 효과가 세포의 PGE_2 수준을 증가시키는데 중요함을 알 수 있었다(도 2 참조).
- [0049] 아울러, 본 발명의 또 다른 구체적인 실시예에서, 본 발명자들은 PGE_2 가 피부의 상처 및 위궤양 등 상처 치유와 연관된다고 보고된 바 있으므로, PGE_2 의 수준을 증가시키는 7, 3', 4'-트리메톡시플라본이 상처 치유에 효과가 있는지 알아보기 위하여, 인간 각질 세포인 HaCaT 세포에 상처를 낸 후, 7, 3', 4'-트리메톡시플라본에 의해 치유되는 과정을 살펴보고자 상처 치유 분석을 수행하였고, 그 결과, 양성 대조군과 유사할 만큼의 효과가 있음을 확인하였다(도 3 참조).
- [0050] 따라서, 본 발명의 7, 3', 4'-트리메톡시플라본이 세포독성이 적으며, PGE_2 를 대사시키는 효소인 15-PGDH를 효과적으로 억제하고, 상처 치유에 관련된 PGE_2 의 세포 내외의 수준을 조절하는 분자인 COX-1/2, MRP4 및 PGT의 mRNA 발현을 조절하며, 이를 통해 7, 3', 4'-트리메톡시플라본이 상처 치유 효과를 가지므로, PGE_2 증가가 요구되는 관련 질환의 예방 및 치료용 조성물의 유효성분으로 유용하게 사용될 수 있음을 알 수 있다.
- [0051] 본 발명의 플라본을 유효성분으로 함유하는 PGE_2 증가를 필요로 하는 관련 질환의 예방 및 치료용 조성물은 약제학적으로 허용 가능한 첨가제를 더 포함할 수 있으며, 이때 약제학적으로 허용 가능한 첨가제로는 전분, 젤라틴화 전분, 미결정셀룰로오스, 유당, 포비돈, 콜로이드알실리콘디옥사이드, 인산수소칼슘, 락토스, 만니톨, 엿, 아라비아고무, 전호화전분, 옥수수전분, 분말셀룰로오스, 히드록시프로필셀룰로오스, 오파드라이, 전분글리콜산나트륨, 카르나우바 납, 합성규산알루미늄, 스테아린산, 스테아린산마그네슘, 스테아린산알루미늄, 스테아린산칼슘, 백당, 텍스트로스, 소르비톨 및 탈크 등이 사용될 수 있다. 본 발명에 따른 약제학적으로 허용 가능한 첨가제는 상기 조성물에 대해 0.1 ~ 90 중량부 포함되는 것이 바람직하나, 이에 한정되는 것은 아니다.
- [0052] 즉, 본 발명의 조성물은 실제 임상 투여 시에 경구 및 비경구의 여러 가지 제형으로 투여될 수 있는데, 제제화할 경우에는 보통 사용하는 충전제, 증량제, 결합제, 습윤제, 붕해제, 계면활성제 등의 희석제 또는 부형제를 사용하여 조제될 수 있다. 경구투여를 위한 고형 제제에는 정제, 환제, 산제, 과립제, 캡슐제 등이 포함되며, 이러한 고형 제제는 갈화 추출물에 적어도 하나 이상의 부형제 예를 들면, 전분, 칼슘카보네이트(Calcium carbonate), 수크로스(Sucrose), 락토스(Lactose) 또는 젤라틴 등을 섞어 조제될 수 있다. 또한, 단순한 부형제 이외에 마그네슘 스티레이트 탈크 같은 윤활제들도 사용될 수 있다. 경구를 위한 액상 제제로는 현탁제, 내용액제, 유제 및 시럽제 등이 해당되는데 흔히 사용되는 단순 희석제인 물, 리퀴드 파라핀 이외에 여러 가지

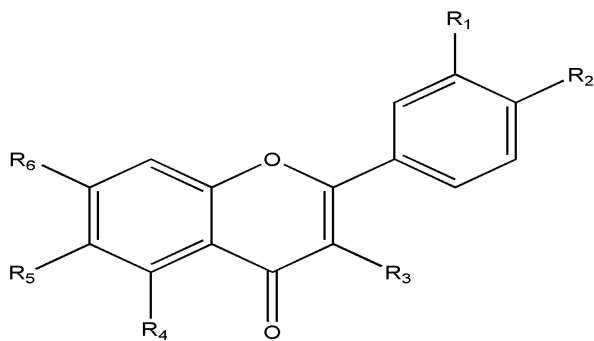
부형제, 예를 들면 습윤제, 감미제, 방향제, 보존제 등이 포함될 수 있다. 비경구 투여를 위한 제제에는 멸균된 수용액, 비수성 용제, 현탁제, 유제, 동결 건조 제제, 좌제가 포함될 수 있다. 비수성 용제, 현탁 용제로는 프로필렌글리콜(Propylene glycol), 폴리에틸렌 글리콜, 올리브 오일과 같은 식물성 기름, 에틸올레이트와 같은 주사 가능한 에스테르 등이 사용될 수 있다. 좌제의 기제로는 위텡솔(witepsol), 마크로골, 트윈(tween) 61, 카카오지, 라우린지, 클리세로제라틴 등이 사용될 수 있다.

[0053] 본 발명의 조성물은 목적하는 방법에 따라 경구 투여하거나 비경구 투여할 수 있으며, 비경구 투여시 피부 외용 또는 복강내 주사, 직장내 주사, 피하주사, 정맥주사, 근육내 주사 또는 흉부내 주사 주입방식을 선택하는 것이 바람직하다. 투여량은 환자의 체중, 연령, 성별, 건강상태, 식이, 투여시간, 투여방법, 배설률 및 질환의 중증도 등에 따라 그 범위가 다양하다.

[0054] 본 발명의 조성물의 투여량은 환자의 체중, 연령, 성별, 건강상태, 식이, 투여시간, 투여방법, 배설률 및 질환의 중증도에 따라 그 범위가 다양하며, 일일 투여량은 갈화 추출물의 양을 기준으로 0.0001 내지 100 mg/kg이고, 바람직하게는 0.001 내지 10 mg/kg이며, 하루 1 ~ 6 회 투여될 수 있다.

[0055] 아울러, 본 발명은 하기 화학식 1의 화합물을 유효성분으로 함유하는 탈모, 두피 개선 및 피부 재생용 화장품 조성물을 제공한다:

[0056] [화학식 1]



[0058] 상기 화학식 1에서, R₁, R₂, R₃, R₄, R₅, 및 R₆는 각각 독립적으로 수소(H), 하이드록시기(OH), 또는 메톡시기(OCH₃)이다.

[0059] 상기 화학식 1의 화합물에서, R₁이 메톡시기 또는 수소;

[0060] R₂가 메톡시기;

[0061] R₃가 메톡시기, 수소 또는 히드록시기;

[0062] R₄가 메톡시기 또는 수소;

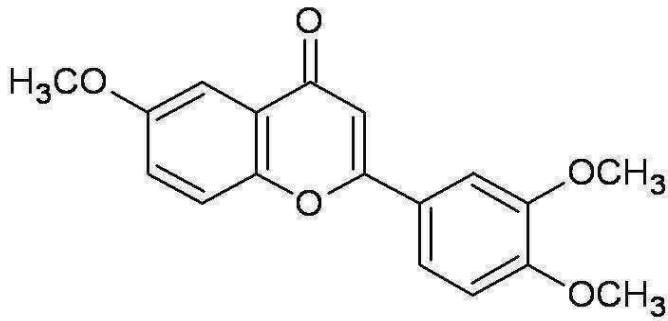
[0063] R₅가 메톡시기 또는 수소; 및

[0064] R₆가 메톡시기, 수소 또는 히드록시기인 것을 특징으로 하는 것이 바람직하고, 상기 화학식 1의 화합물에서 R₁이 메톡시기;

[0065] R₂가 메톡시기; 및

[0066] R₅가 메톡시기인 하기 화학식 2의 화합물인 것이 더욱 바람직하나, 이에 한정되지 않는다.

[0067] [화학식 2]



[0068]

[0069] 본 발명의 구체적인 실시예에서, 본 발명자들은 플라보노이드들 중 PGE₂를 대사시켜 감소시키는 15-PGDH 억제 활성이 높으면서 세포독성이 적은 7, 3', 4'-트리메톡시플라본을 선별하였고, 7, 3', 4'-트리메톡시플라본에 의한 15-PGDH의 억제를 통해 기질인 PGE₂가 10배 정도 증가된 것을 확인할 수 있었다.

[0070] 아울러, 본 발명의 또 다른 구체적인 실시예에서, 본 발명자들은 7, 3', 4'-트리메톡시플라본이 세포 내외의 PGE₂ 수준을 결정하는 분자인 COX-1/2, MRP4 및 PGT의 mRNA 발현량에 영향을 미치는 것을 확인하여, 7, 3', 4'-트리메톡시플라본에 의한 15-PGDH 억제를 통한 PGE₂ 대사 억제 효과가 세포의 PGE₂ 수준을 증가시키는데 중요함을 알 수 있었으며, 이를 통해 PGE₂의 수준을 증가시키는 7, 3', 4'-트리메톡시플라본이 상처 치유에 효과가 있음을 확인하였고, 머리카락의 성장 및 생존의 중요한 매개체인 PGE₂의 비활성화시키는 15-PGDH를 매우 우수하게 억제하는 효과를 나타내어 탈모 치료 또는 예방용 조성물로 유용하게 사용될 수 있음을 확인하였다.

[0071] 따라서, 본 발명의 7, 3', 4'-트리메톡시플라본이 세포독성이 적으며, PGE₂를 대사시키는 효소인 15-PGDH를 효과적으로 억제하고, PGE₂의 세포 내외의 수준을 조절하는 분자인 COX-1/2, MRP4 및 PGT의 mRNA 발현을 조절하여 머리카락의 성장 및 생존의 중요한 매개체인 PGE₂ 수준을 효과적으로 증가시키므로, 탈모 예방, 두피 개선, 피부 재생을 위한 조성물로 유용하게 이용될 수 있다.

[0072] 본 발명의 플라본을 유효성분으로 함유하는 화장품 조성물은 수용성 비타민, 유용성 비타민, 고분자 펩티드, 고분자 다당 및 스펅고 지질로 이루어진 군에서 선택된 조성물을 포함할 수 있으며, 상기 성분과 더불어 필요에 따라 통상 화장품 조성물에 배합되는 유지 성분, 보습제, 에멀리언트제, 계면 활성제, 유기 및 무기 안료 유기 분체, 자외선 흡수제, 방부제, 살균제, 산화 방지제, 식물 추출물, pH 조정제, 알콜, 색소, 향료, 혈행 촉진제, 냉감제, 제한(制汗)제, 정제수 등의 다른 성분을 배합할 수 있다. 또한, 본 발명의 화장품 조성물은 통상 화장품 조성물이 제조되는 어떠한 제형으로도 제조될 수 있으며, 예를 들어 유액, 크림, 화장수, 팩, 파운데이션, 로션, 미용액, 모발화장료 등이 될 수 있다.

[0073] 또한, 본 발명의 피부를 위한 플라본을 유효성분으로 함유하는 화장품 조성물은 스킨로션, 스킨소프너, 스킨토너, 아스트린젠트, 로션, 밀크로션, 모이스처 로션, 영양로션, 맛사지크림, 영양크림, 모이스처크림, 핸드크림, 파운데이션, 에센스, 영양에센스, 팩, 비누, 클렌징폼, 클렌징로션, 클렌징크림, 바디로션 및 바디클린저의 제형이 포함될 수 있다. 본 발명의 제형이 페이스트, 크림 또는 겔인 경우에는 담체 성분으로서 동물섬유, 식물섬유, 왁스, 파라핀, 전분, 트라칸트, 셀룰로오스 유도체, 폴리에틸렌 글리콜, 실리콘, 벤토나이트, 실리카, 탈크 또는 산화아연 등이 이용될 수 있고, 본 발명의 제형이 용액 또는 유탁액의 경우에는 담체 성분으로서 용매, 용매화제 또는 유탁화제가 해당되는데, 예를 들어, 물, 에탄올, 이소프로판올, 에틸 카보네이트, 에틸 아세테이트, 벤질 알코올, 벤질 벤조에이트, 프로필렌 글리콜, 1,3-부틸글리콜 오일, 글리세롤 지방족 에스테르, 폴리에틸렌 글리콜 또는 소르비탄의 지방산 에스테르가 포함될 수 있다. 본 발명의 제형이 현탁액인 경우에는 담체 성분으로서 물, 에탄올 또는 프로필렌 글리콜과 같은 액상 희석제, 에톡실화 이소스테아릴 알코올, 폴리옥시에틸렌 소르비톨 에스테르 및 폴리옥시에틸렌 소르비탄 에스테르와 같은 현탁제, 미소결정성 셀룰로오스, 알루미늄 메타히드록시드, 벤토나이트, 아가 또는 트라칸트 등이 이용될 수 있다. 본 발명의 제형이 계면-활성제 함유 클린징인 경우에는 담체 성분으로서 지방족 알코올 설페이트, 지방족 알코올 에테르 설페이트, 설포숙신산

모노에스테르, 이세티오네이트, 이미다졸리늄 유도체, 메틸타우레이트, 사르코시네이트, 지방산 아마이드 에테르 설페이트, 알킬아미도베타인, 지방족 알코올, 지방산 글리세리드, 지방산디에탄올아미드, 식물성 유, 리놀린 유도체 또는 에톡실화 글리세롤 지방산 에스테르 등이 이용될 수 있다.

[0074] 또한, 본 발명의 플라본을 유효성분으로 함유하는 조성물은 모발에 도포하기에 적당한 캐리어 또는 캐리어 혼합물을 포함할 수 있다. 캐리어는 용매와 다른 캐리어 또는 모발 보호 조성물에 통상적으로 사용되는 비히클(vehicle) 성분을 포함하며, 전체 모발 조성물의 조성물 중 약 0.5% 내지 99.5%, 바람직하게는 약 5.0% 내지 99.5%, 가장 바람직하게는 약 10.0% 내지 90.0%로 존재한다. 캐리어로서 용매는 제형화된 모발 조성물이 헤어스프레이, 무스, 토닉 등과 같이 사용 후 모발에 남는 것이거나 샴푸, 컨디셔너 등과 같이 세정되는 것에 관계없이 사용하는 공중합체에 의해 선택된다. 본 발명에서 사용하는 적합한 용매는 물, 저급 알코올(에탄올, 이소프로판올 등), 하이드로알콜계 혼합물, 탄화수소(이소부탄, 헥산, 테센등), 아세톤, 할로젠화 탄화수소(프레온 등), 탄화수소 에스테르(에틸 아세테이트, 디부틸 프탈레이트 등), 휘발성 실리콘 유도체, 실록산(페닐 펜타메틸 디실록산, 메톡시프로필 헵타메틸 사이클로테트라실록산, 클로로프로필 펜타메틸 디실록산, 하이드록시프로필 펜타메틸 디실록산, 옥타메틸 사이클로테트라실록산, 데카메틸 사이클로펜타실록산 등) 및 이들의 혼합물을 포함하는 것이 바람직하다.

[0075] 이하, 본 발명을 실시예에 의하여 상세히 설명한다.

[0076] 단, 하기 실시예는 본 발명을 구체적으로 예시하는 것일 뿐, 본 발명의 내용이 실시예에 의해 한정되는 것은 아니다.

[0077] <실시예 1> 15-PGDH 발현 및 정제

[0078] 본 발명자들은 15-PGDH를 정제하기 위해 15-PGDH 백터를 제조하여 15-PGDH를 정제하였다.

[0079] 구체적으로, 15-PGDH cDNA 서열을 지닌 PGEX-2T 발현 백터(Pharmacia Crop, USA)를 대장균 BL-21 lysS 균주에 형질도입하였다. 형질도입한 균주는 50 ug/ml의 엠포실린을 포함한 500 ml의 배지로 37 °C 및 220 rpm 조건에서 OD₆₀₀ 값이 0.6에 도달할 때까지 배양되었다. 그 후, 1 mM의 이소프로필-1-티오-베타-D-갈락토시드(Isopropyl-1-thio-β-D-galactopyranoside, IPTG)를 첨가하여 25 °C에서 12시간 동안 배양하였다. 배양한 대장균을 4 °C 및 4000 g에서 30분 동안 원심분리하여 수득하고, 수득한 세포들을 20 ml의 차가운 세포 용해 버퍼(1 mM EDTA 및 0.1 mM DTT를 포함한 pH 7.4의 1 x PBS 버퍼)로 재부유하여 4 °C에서 10초씩 4회 초음파 처리하였다. 초음파 처리한 세포들을 4 °C 및 4000 g에서 20분 동안 원심분리하여 그 상등액을 4 °C에서 용해 버퍼로 조정된 글루타티온-세파로오스 4B 컬럼(Sigma, USA)에 통과시켰다. 상기 컬럼을 용해 버퍼로 OD₂₈₀ 값이 0.005 이하가 되도록 씻은 후, 용리 버퍼(10 mM 환원된 글루타티온(Sigma, USA)을 포함한 50 mM Tris-HCl pH 8.0, 1 mM EDTA(Sigma, USA) 및 0.1 mM DTT)를 넣고 상온에서 5분 동안 인큐베이션 하여 15-PGDH를 컬럼에서 용리하였다.

[0080] 이를 통해 정제된 15-PGDH를 SDS-PAGE 겔(Sigma, USA) 전기영동을 통해 그 농도와 순도를 확인하였다.

[0081] <실시예 2> 7, 3', 4'-트리메톡시플라본(trimethoxyflavone, TMF)의 15-PGDH 억제 활성 및 AML 세포에서의 세포독성 분석

[0082] 본 발명자들은 플라보노이드들 중 PGE₂를 대사하여 감소시키는 15-PGDH에 대한 억제 활성이 높으면서 세포독성이 적은 물질을 찾고자, 세포외 실험을 이용한 15-PGDH 억제 활성 분석 및 AML-2 세포를 이용해 7 가지 플라보노이드(Hillsborough, New Jersey, USA)의 세포독성 효과를 알아보았다.

[0083] 구체적으로, 본 발명자들은 0.1 mM DTT(Sigma, USA), 0.25 mM NAD⁺(Sigma, USA), 상기 <실시예 1>에서 정제된 15-PGDH(10 ug), 21 uM PGE₂(Sigma, USA) 및 여러 농도의 플라보노이드가 혼합된 Tris-HCl 버퍼(50 mM, pH 7.5)와 인큐베이션한 뒤, 형광분광광도계(fluorescence spectrophotometer)로 340 nm 여기광(excitation) 조사에 따른 468 nm 방출광에서의 NADH의 형성을 측정한 NADH의 표준 곡선을 이용하여 15-PGDH 억제 활성을 측정하였다(모든 실험은 3회 반복하였다.).

[0084] 또한, AML 세포를 이용한 약물의 시험관내(*in vitro*) 세포독성을 측정하기 위하여, AML-2 세포 8×10^4 개의 세포를 96웰 플레이트의 90 μ l α -MEM 배지에 분주하여 12시간 동안 배양한 뒤, 7 가지의 플라보노이드를 처리하였다. 플라보노이드 처리 72시간 뒤, MTT 10 μ l를 첨가하여 4시간 동안 인큐베이션 하였다. 4시간 후, ELISA 마이크로플레이트 리더(Perkin-Elmer, Gly., USA)를 이용해 540 nm에서의 흡광도를 측정하였다.

[0085] 그 결과, 7, 3', 4'-트리메톡시플라본(TMf), 3', 4'-디메톡시플라본(dimethoxyflavone), 5, 7, 4'-트리메톡시플라본(trimethoxyflavone), 3, 6, 3', 4'-테트라메톡시플라본(tetramethoxyflavone), 3, 7-디하이드록시(dihydroxy)-3', 4'-디메톡시플라본(dimethoxyflavone), 3, 5, 7, 3', 4'-펜타메톡시플라본(pentamethoxyflavone) 및 5, 7, 3', 4'-테트라메톡시플라본(tetramethoxyflavone)이 15-PGDH의 활성을 억제하였으며, 특히, 7, 3', 4'-트리메톡시플라본이 다른 플라보노이드에 비해 15-PGDH 활성에 대한 50% 저해 농도(IC₅₀)는 0.41 μ M로 효과가 컸으며 AML-2에서의 세포독성은 50% 저해 농도(IC₅₀) > 400 μ M로 가장 낮게 나타났다(표 1).

표 1

[0086] 플라보노이드의 15-PGDH 억제 활성 및 세포 독성

플라보노이드(flavonoid)	15-PGDH IC ₅₀ (μ M)	억제 세포독성 IC ₅₀ (μ M)
7, 3', 4'-트리메톡시플라본(7, 3', 4'-TMf)	0.41	>400
3', 4'-디메톡시플라본(dimethoxyflavone)	1.76	386
5, 7, 4'-트리메톡시플라본(trimethoxyflavone)	1.94	72.6
3, 6, 3', 4'-테트라메톡시플라본(tetramethoxyflavone)	3.10	>400
3, 7-디하이드록시(dihydroxy)-3', 4'-디메톡시플라본(dimethoxyflavone)	3.67	7.4
3, 5, 7, 3', 4'-펜타메톡시플라본(pentamethoxyflavone)	4.10	61
5, 7, 3', 4'-테트라메톡시플라본(tetramethoxyflavone)	7.82	37.2

[0087] <실시예 3> 7, 3', 4'-트리메톡시플라본(trimethoxyflavone, 7, 3', 4'-TMf)의 PGE₂ 방출 분석

[0088] 본 발명자들은 15-PGDH를 억제하는 7, 3', 4'-트리메톡시플라본에 의해 세포에서 PGE₂가 어떤 영향을 받는지 확인하기 위하여 PGE₂ 효소면역분석을 수행하였다.

[0089] 구체적으로, 폐암세포주인 A549 세포(5×10^5 개)를 6-웰 플레이트에 분주하여 DMEM 배지에서 37 °C, 5%의 CO₂ 인큐베이터에서 배양하였다. 배양한 세포에 <실시예 2>의 <표 1>에서 찾아낸 플라보노이드 중 15-PGDH 억제 활성이 좋은 7, 3', 4'-트리메톡시플라본(TMf) 또는 3', 4'-디메톡시플라본(dimethoxyflavone)을 15-PGDH 억제를 위한 IC₅₀값의 10배($10 \times IC_{50}$) 및 100배($100 \times IC_{50}$)의 농도로 처리한 후, 6시간 뒤에 배지를 수득하였다. 대조군(약물처리군)에 비하여 HaCaT 세포에서 수득한 배지의 PGE₂의 증가율은 PGE₂ 효소면역분석 키트(Thermo Scientific, USA)를 사용하여 측정하였다.

[0090] 그 결과, 7, 3', 4'-트리메톡시플라본 및 3', 4'-디메톡시플라본(dimethoxyflavone)을 처리한 경우 농도의존적으로 세포 외 PGE₂ 수준이 10배 이상 증가하였으며, 특히, 7, 3', 4'-트리메톡시플라본에 의한 억제 효과가 월등함을 알 수 있었다(표 2).

[0091] 이에 따라, 본 발명자들은 7, 3', 4'-트리메톡시플라본을 PGE₂ 수준을 증가시키는 강력한 15-PGDH 억제제로서 선택하였다.

표 2

15-PGDH 억제제	대조군에 대한 PGE ₂ 증가%	
	$10 \times IC_{50}$	$100 \times IC_{50}$
7, 3', 4'-트리메톡시플라본	23.93	314.24
3', 4'-디메톡시플라본	2.84	30.94

[0093] <실시예 4> 7, 3', 4'-트리메톡시플라본에 의한 HaCaT 세포주에서 세포 내외의 PGE₂의 수준 및 COX, PGT 및 MRP4의 발현 확인

[0094] <4-1> 7, 3', 4'-트리메톡시플라본에 의한 세포 내외의 PGE₂의 수준 확인

[0095] 본 발명자들은 7, 3', 4'-트리메톡시플라본에 의한 세포 내외의 PGE₂의 수준을 확인하기 위하여 PGE₂ 효소면역분석을 수행하였다.

[0096] 구체적으로, HaCaT 세포(5×10^5 개)를 6-웰 플레이트에 분주하여 DMEM 배지에서 37 °C, 5%의 CO₂ 인큐베이터에서 배양하였다. 배양한 세포에 7, 3', 4'-트리메톡시플라본을 15-PGDH 억제제를 위한 IC₅₀값의 50배($50 \times IC_{50}$)의 농도로 처리한 후, 6시간 뒤에 세포 및 배지를 수득하였다. HaCaT 세포 내외의 PGE₂의 증가율은 PGE₂ 효소면역분석 키트(Thermo Scientific, USA)를 사용하여 그에 따른 프로토콜에 따라 측정하였다.

[0097] 그 결과, 7, 3', 4'-트리메톡시플라본을 처리한 경우 세포 내외의 PGE₂ 수준이 증가하였으며, 특히, 세포 내의 PGE₂ 수준이 월등히 증가하였다(표 3).

표 3

[0098] 7, 3', 4'-트리메톡시플라본 처리 후의 HaCaT 세포 내 및 외의 PGE₂ 수준

시료 이름	세포 내(ng/mg 단백질) (평균±SD)	세포 외(pg/ml) (평균±SD)
대조군	4.46±2.34	251.7±1.13
7, 3', 4'-트리메톡시플라본($50 \times IC_{50}$)	8.80±0.51	291.0±1.96

[0099] <4-2> COX, PGT 및 MRP4의 mRNA 발현에 대한 7, 3', 4'-트리메톡시플라본(trimethoxyflavone, 7, 3', 4'-TMF)의 효과

[0100] 본 발명자들은 7, 3', 4'-트리메톡시플라본이 세포 내외의 PGE₂ 농도에 영향을 주는 COX, PGT 및 MRP4의 mRNA 발현에 미치는 영향을 실시간 PCR을 수행하여 확인하였다.

[0101] 구체적으로, HaCaT 세포에 7, 3', 4'-트리메톡시플라본을 15-PGDH 억제제를 위한 IC₅₀값의 50배($50 \times IC_{50}$)의 농도(20.5 μM)로 처리한 후, 12시간 뒤에 TRI 시약(RNAiso Plus, Takara) 및 그에 따른 프로토콜을 이용하여 총 RNA를 추출하였다. 추출한 RNA 20ul를 Super Script First Strand 키트(invitrogen) 및 그에 따른 프로토콜을 이용하여 cDNA로 합성하였다. 상기 합성한 cDNA를 1:5로 희석한 용액 4 ul, 4 mM MgCl₂, Fast Starter Mix 버퍼(dNTP, SYBR Green dye 및 Tag 중합효소) 4 ul 및 하기 <표 4>의 인간 PGT, MRP4, COX-1, COX-2 및 베타-액틴의 프라이머 10 pmol을 섞어, Light Cyber 2.0(Roche, Germany)을 이용하여 실시간 PCR을 수행하였다.

표 4

[0102] PGE₂ 농도에 영향을 주는 유전자 증폭을 위한 프라이머 서열

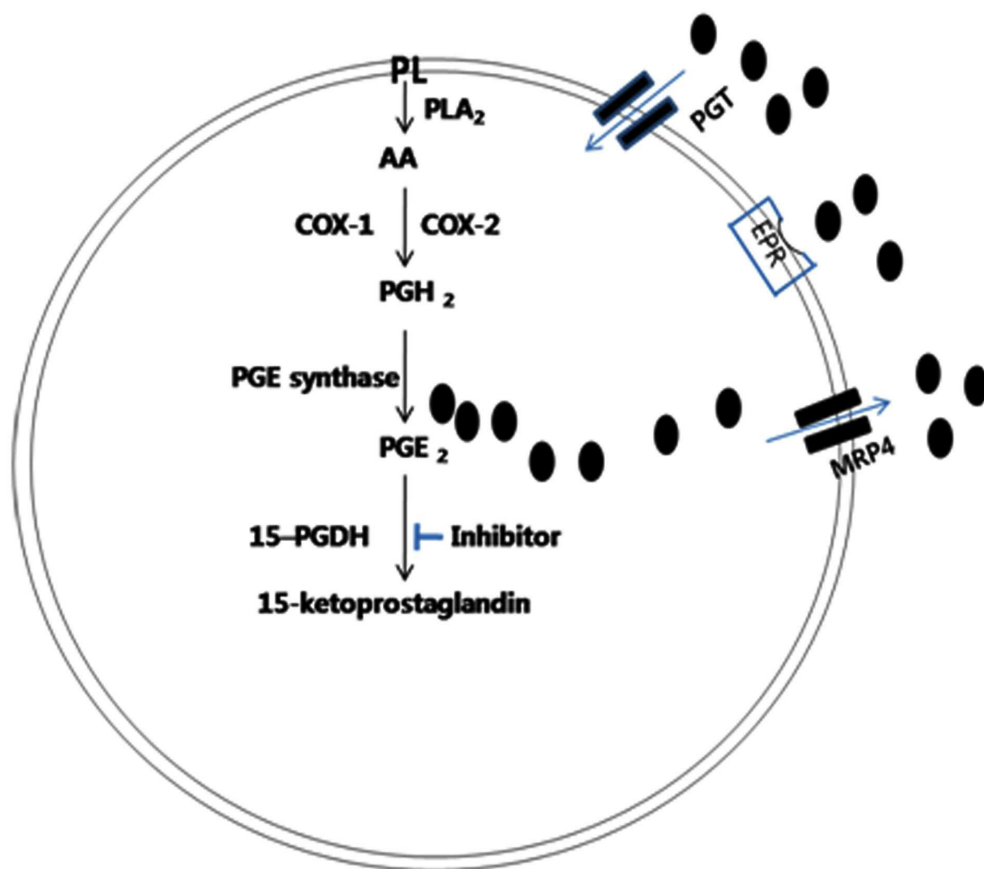
		서열	서열번호
PGT	정방향 프라이머	5'-GGATGCTG TTTGGAGGAATCCTCA-3'	1
	역방향 프라이머	5'-GCACGATCCTGTCCTTGCTGAA-3'	2
MRP4	정방향 프라이머	5'-AACCTCTAACCGACATTCCTG-3'	3
	역방향 프라이머	5'-TCAACATA TTACAGCCACCATC-3'	4
COX-1	정방향 프라이머	5'-CCTCATGTTTGCCTTCTTGC-3'	5
	역방향 프라이머	5'-GGC GGGTACATTCTCCATC-3'	6
COX-2	정방향 프라이머	5'-GATCTA CCTCCTCAA-3'	7
	역방향 프라이머	5'-GAACAACCTGCTCATCAC-3'	8

베타-액틴	정방향 프라이머	5'-GACTATGACTTAGTTGCGTTA-3'	9
	역방향 프라이머	5'-GTTGAACTCTCTACATAC TTCCG-3'	10

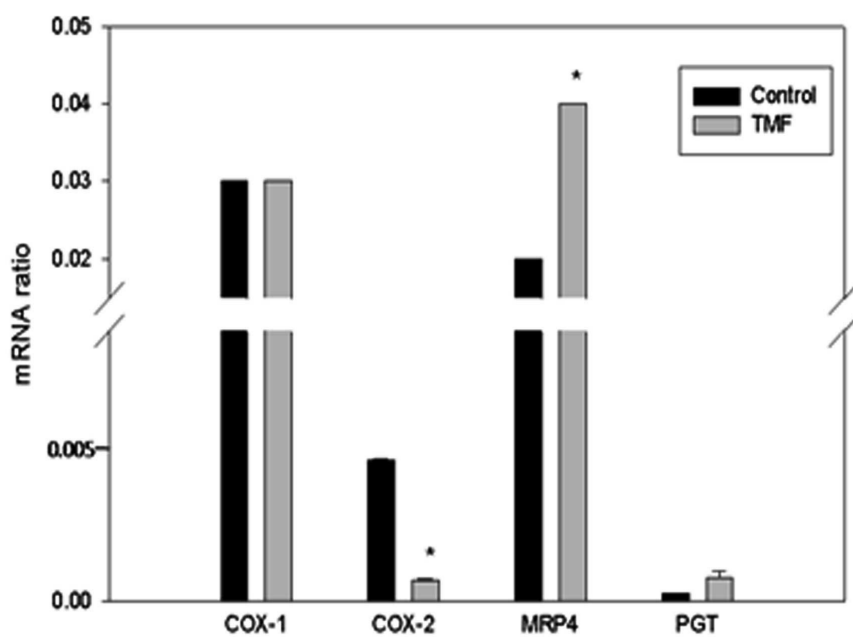
- [0103] 그 결과, COX-1 및 PGT의 mRNA 발현량은 거의 변하지 않은 반면, PGE₂를 생합성하는 COX-2의 mRNA 발현량이 7, 3', 4'-트리메톡시플라본에 의해 감소하였으며, 세포 외로 방출하는 MRP4의 mRNA 발현량은 증가함을 확인하였다(도 3).
- [0104] 따라서, 7, 3', 4'-트리메톡시플라본에 의한 15-PGDH 억제를 통한 PGE₂ 대사 억제 효과가 세포의 PGE₂ 수준을 증가시키는데 중요함을 알 수 있었다.
- [0105] <실시예 5> 7, 3', 4'-트리메톡시플라본에 의한 상처 치유 효과 확인
- [0106] 본 발명자들은 7, 3', 4'-트리메톡시플라본에 의한 PGE₂-매개 상처 치유 효과를 확인하기 위해 상처 치유 분석을 수행하였다.
- [0107] 구체적으로, HaCaT 세포를 웰당 5×10^5 이 되도록 분주한 후, 80%가 되도록 배양하고, 10 ug/ml의 미토마이신(mitomycin)(Sigma, USA)을 포함하는 무혈청 DMEM 배지로 바꾸어 2 시간 동안 배양하였다. 그 후, 세포를 PBS 용액으로 씻어주고 200 uL의 소독한 파이펫 팁으로 세포를 긁고 긁어진 세포를 씻어냈다. 상처를 낸 세포에 음성 대조군인 약물을 첨가하지 않은 배지, 양성대조군인 TGF- β 1(BioVision, USA)을 100 pg/ml 첨가한 배지 또는 이에 상기 <실시예 1>에서 정제한 15-PGDH와 NAD⁺를 함께 첨가한 배지, 및 실험군인 7, 3', 4'-트리메톡시플라본을 20.5 uM 첨가한 배지 또는 이에 15-PGDH와 NAD⁺를 함께 첨가한 배지를 각각 0 시간 또는 48 시간 동안 가한 후 역상현미경($\times 100$)(H-7600; Hitachi, Japan)으로 관찰하였다(도 4).
- [0108] 그 결과, 양성대조군인 TGF- β 1을 첨가한 세포와 비교하여 7, 3', 4'-트리메톡시플라본을 첨가한 세포의 상처 치유 효과가 현저한 것을 확인하였으며, 이는 PGE₂ 억제제인 15-PGDH를 첨가한 경우 상처 치유 효과가 저해됨을 확인함으로써, 7, 3', 4'-트리메톡시플라본의 상처 치유 효과는 15-PGDH의 억제를 통한 것임을 확인할 수 있었다.

도면

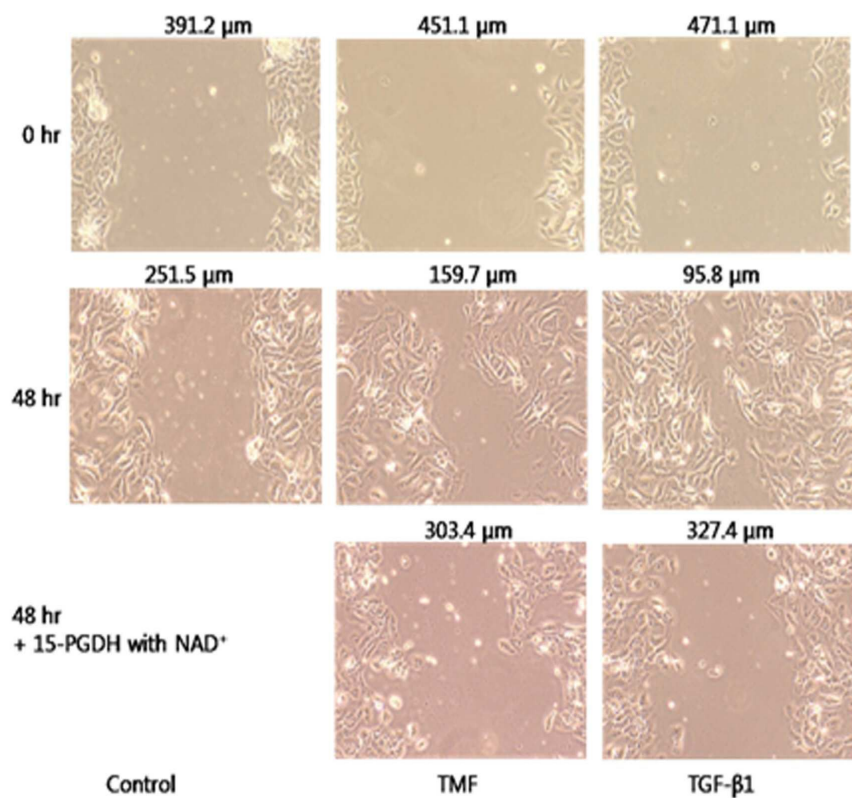
도면1



도면2



도면3



서열 목록

<110> Industry-Academic Cooperation Foundation, Chosun University

<120> FLAVONE COMPOUNDS WITH 15-HYDROXYPROSTAGLANDIN DEHYDROGENASE
INHIBITORY ACTIVITY AND USES THEREOF

<130> 11p-10-10

<160> 10

<170> KopatentIn 1.71

<210> 1

<211> 24

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> human PGT forward primer

<400> 1

ggatgctgtt tggaggaatc ctca

24

<210> 2

<211> 22

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> human PGT reverse primer

<400> 2

gcacgacacct gtctttgctg aa 22

<210> 3

<211> 21

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> MRP4 forward primer

<400> 3

aacctctaac cgacattcct g 21

<210> 4

<211> 22

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> MRP4 reverse primer

<400> 4

tcaacatatt acagccacca tc 22

<210> 5

<211> 21

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> COX-1 forward primer

<400> 5

cctcatgttt gccttctttg c 21

<210> 6

<211> 20

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> COX-1 reverse primer

<400> 6

ggcgggtaca tttctccatc 20

<210> 7

<211> 16
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence
 <220><223> COX-2 forward primer

<400> 7
 gatctaccct cctcaa 16

<210> 8
 <211> 17
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence
 <220><223> COX-2 reverse primer

<400> 8
 gaacaactgc tcatcac 17

<210> 9
 <211> 21
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence
 <220><223> beta-actin forward primer

<400> 9
 gactatgact tagttgcgtt a 21

<210> 10

<211> 23
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence
 <220><223> beta-actin reverse primer

<400> 10
 gttgaactct ctacatactt ccg 23