



(19) 대한민국특허청(KR)
(12) 등록특허공보(B1)

(45) 공고일자 2009년01월28일
(11) 등록번호 10-0818010
(24) 등록일자 2008년03월24일

- (51) Int. Cl.⁹
A61K 36/48 (2006.01) A61K 8/97 (2006.01)
A61Q 19/02 (2006.01)
- (21) 출원번호 10-2001-7013229
(22) 출원일자 2001년10월17일
심사청구일자 2004년06월08일
번역문제출일자 2001년10월17일
- (65) 공개번호 10-2002-0030263
(43) 공개일자 2002년04월24일
(86) 국제출원번호 PCT/FR2000/001007
국제출원일자 2000년04월18일
(87) 국제공개번호 WO 2000/62789
국제공개일자 2000년10월26일
- (30) 우선권주장
99/04875 1999년04월19일 프랑스(FR)
- (56) 선행기술조사문헌
MARK E. HINES ET AL. : "SCREENING FOR
CYSTEINE PROTEINASE INHIBITOR ACTIVITY IN
LEGUME SEEDS" JOURNAL OF THE SCIENCE OF FOOD
AND AGRICULTURE., VOL59, 1992, PAGES 555-557
- 전체 청구항 수 : 총 13 항
- (73) 특허권자
라보라프와르 엑스팡상스
프랑스, 꾸르베브와 92419, 아브뉴 드 라르쉬, 10
- (72) 발명자
시까렐립
프랑스파리에프-75018뤼마르카데226
삐쉴리앙돈느
프랑스에빠르농에프-28230썩-또마뤼뒤쁘리의레비
스52
뿔프랑스와
프랑스뿔르즈에프-31400쉬맹드말르뿔레69
- (74) 대리인
김성기, 김진희, 김태홍
- 심사관 : 강춘원

(54) 루핀의 펩티드 추출물 및 이를 함유하는 약학 조성물, 화장 조성물 또는 영양 조성물

(57) 요약

본 발명은 루핀(루피너스(*lupinus*))의 펩티드 추출물에 관한 것인데, 이는 메탈로프로테아제 억제 활성, 구체적으로 콜라게나제 및 젤라티나제 억제 활성을 보유하는 것을 특징으로 한다. 또한, 본 발명은 펩티드 추출물 및 필요에 따라 불활성 담체를 포함하는 약학 조성물, 화장 조성물 또는 영양 조성물에 관한 것인데, 이들 조성물은 특히 메탈로프로테아제에 의한 지지체의 과도한 변성과 관련된 질환 또는 질병을 앓고 있는 인간 또는 포유동물을 치료하기 위해 사용된다.

(81) 지정국

국내특허 : 브라질, 일본, 대한민국, 미국

EP 유럽특허 : 오스트리아, 벨기에, 스위스, 독일,
덴마크, 스페인, 프랑스, 영국, 그리스, 아일랜드,
이탈리아, 룩셈부르크, 모나코, 네덜란드, 포르투
갈, 스웨덴, 핀란드, 사이프러스

특허청구의 범위

청구항 1

루핀(루피너스(*lupinus*))의 펩티드 추출물을 포함하고, 관절증, 치주 질환, 피부 손상, 염증성 질환, 전신홍색증, 여드름 홍반, 모세혈관확장증, 주사비, 건선, 궤양, 피부 가피, 노화, 여드름, 화상, 상처, 수포성 질환, 치석에 의한 치아 법랑질 및 상아질의 손상을 겪고 있는 인간 또는 포유동물을 치료하기 위한 약학 조성물.

청구항 2

루핀(루피너스)의 펩티드 추출물을 포함하고, 노화, 광노화, 피부의 내인성 유해 효과 또는 담배의 유해 효과로 인한 피부 손상을 겪고 있는 인간 또는 포유동물의 피부 건강을 유지 및 증진하기 위한 화장 조성물.

청구항 3

제1항에 있어서, 불활성 비히클을 포함하는 것인 조성물.

청구항 4

제1항에 있어서, 국소 외용제인 조성물.

청구항 5

제1항에 있어서, 경구 투여용인 조성물.

청구항 6

루핀의 단백질 분획의 효소적 가수분해에 의해 얻어지는 것을 특징으로 하는 제1항 또는 제2항의 조성물에 사용되는 루핀의 펩티드 추출물.

청구항 7

펩티드를 50% 이상 포함하는 것을 특징으로 하는 제1항 또는 제2항의 조성물에 사용되는 루핀의 펩티드 추출물.

청구항 8

제7항에 있어서, 루핀의 단백질 분획의 가수분해에 의해 얻어지는 것인 루핀의 펩티드 추출물.

청구항 9

제6항에 있어서,

- 지질이 제거되고 분쇄된 루핀 밀(meal) 또는 미분화된 루핀 분말(지질 함유)을 제조하는 단계;
- 가용성 단백질 및 당류 분획을 추출하거나 등전점에서 단백질을 침전시키는 단계; 및
- 단백질 분획을 가수분해하고, 단백질 추출물을 회수하는 단계

를 포함하는 방법을 이용하여 얻을 수 있는 것인 루핀의 펩티드 추출물.

청구항 10

제9항에 있어서, 펩티드의 분자량이 10,000 Da 미만인 루핀의 펩티드 추출물.

청구항 11

제7항에 있어서, 하기 아미노산 조성(아미노산 총 중량에 대한 중량%로 나타냄)을 보유하는 것인 루핀의 펩티드 추출물:

아미노산	%/총 아미노산
ASP	11.3
GLU	23.2

SER	5.1
HIS	1.7
GLY	3.4
THR	3.2
ALA	2.8
ARG	10.3
TYR	6.1
CYS-CYS	2.4
VAL	3.8
MET	0.2
PHE	7.0
ILE	3.3
LEU	7.9
LYS	3.7
PRO	4.4

청구항 12

제2항에 있어서, 불활성 비히클을 포함하는 것인 조성물.

청구항 13

제2항에 있어서, 국소 외용제인 조성물.

명세서

기술분야

- <1> 본 발명은 항메탈로프로테아제 활성, 구체적으로 항콜라게나제 및 항젤라티나제 활성을 보유한 신규한 펩티드 추출물에 관한 것이다. 또한, 본 발명은 이러한 추출물을 포함하는 약학 조성물, 화장 조성물 또는 영양 조성물에 관한 것이며, 특히 염증성 질환, 예를 들어 관절증, 치주염, 궤양 치료용으로 의도된 약학 조성물, 또는 화학방사선 노화될 수 있거나 그렇지 않을 수 있는 노화 또는 외부 공격(담배, 공해 등)에 의해 촉진되는 노화에 대항하는 것으로 의도된 화장 조성물에 관한 것이다.
- <2> 또한, 상기 약학 조성물, 화장 조성물 또는 영양 조성물은 병리학적인 신생혈관형성(혈관 증식) 또는 보기 흉한(건선, 종양, 전신흡색증, 여드름 홍반, 주사비, 레타노산과 같은 자극제를 이용한 국소 치료), 반흔형성 결함, 화상 또는 치아법랑질의 손상을 치료하기 위해 의도된다[참조: Ch. M. Lapiere, Skin biology course, COBIP INSERM U 346, Lyon 1999].

배경기술

- <3> 메탈로프로테아제는 결합 조직 매트릭스의 여러 가지 성분들을 분해하는 조합 특성을 보유하는 한 부류의 아연 의존성 및 칼슘 의존성 엔도펩티다제이다[참조: S. Charvat, *Metalloproteinases and epidermis*, pages 101-113, No. 248-98, 1998, Lyon I].
- <4> 이들은 그들의 기질의 성질에 따라 다음과 같이 분류된다: 콜라게나제(원섬유성 콜라겐: 예, MMP-1, MMP-13, MMP-8); 젤라티나제(변성 콜라겐, 젤라틴: 예, MMP-2, MMP-9); 스트로멜라이신(피브로넥틴, 프로테오글리신: 예, MMP-3, MMP-10). 이들은 세포외 매트릭스의 생리학적 리모델링(저 발현) 또는 병리학적 리모델링(강한 유도)에 사용된다.
- <5> 메탈로프로테아제는 특히 손상된 조직을 제거하는 반흔형성 과정과 관련이 있다.
- <6> MMP는 제한없이 작용할 수 있으며, 그들의 활성이 조절되지 않는다면, 심각한 손상을 유발할 수 있다.
- <7> 게다가, 메탈로프로테아제는 어떤 생물학적 장애, 예를 들어 염증성 질환, 특히 관절증 및 치주염[참조: H. BIRKEDAL-HANSEN 등, *Critical Reviews in Oral Biology and Medicine*, 4(2): 197: 250 (1993)], 노화, 특히 태양 광선의 작용과 연계된 노화의 진행[참조: MARTIN RIEGER; Allured's Cosmetics & Toiletries(등록상표),

Vol. 114, No. 1999년 1월 1일 또는 G.J. FISHER 등, *The New England Journal of Medicine*, Vol. 337, No. 20 pp. 1419-1428, "Pathophysiology of premature skin aging induced by ultraviolet light" 및 G.J. FISHER 등, the Society for Investigative Dermatology, Inc. 1998, pp. 61-68 "Molecular mechanism of photoaging and its prevention by retinoic acid: ultraviolet irradiation induces MAP kinase signal transduction cascades that induce A-1-regulated matrix metalloproteinases that degrade human skin in vivo"] 또는 급성 및 만성 염증[참조: XIE 등; *J. Biol. Chem.* 273: pp. 11576-11582 (1998)] 및 수포성 질환(독성 표피 괴사증), 염증 또는 자극 진행중의 세포 과증식, 욕창, 화상 및 궤양과 관련되어 있다.

- <8> 동일한 내용이 염증성 과정 또는 병리학적 과정(건선, 종양) 중 신생혈관형성 내피 세포의 증식기에서 다른 부위를 향해 이동하여 미소관 및 미세혈관을 형성하기 위해 MMP로 하여금 결합 조직을 파괴하도록 할 필요가 있는 신생혈관형성 내피 세포의 증식에도 적용된다[참조: *Controlling the vasculature: angiogenesis, anti-angiogenesis and vascular targeting of gene therapy* - T.P.D. FAN, R. JAGGER 및 R. BICKNELL, *TIPS* - 1995년 2월, Vol. 16; *Natural Products as angiogenesis inhibitors*, D.H. PAPER, *Planta Medica* 64 (1998) pp. 686-695; *Membrane-type matrix metalloproteinases in human dermal microvascular endothelial cells: expression and morphogenetic correlation* - V.T. CHAN 등, *J.I.D.* 111, pp. 1153-1159 (1998); *Matrix metalloproteinases in blood vessel development in human fetal skin and in cutaneous tumors* - T.V. KARELINA 등, *J.I.D.*; 105, 411-417 (1995); *Vascular proliferation and angiogenic factors in psoriasis*, J.D. CREAMER 및 J.N.W.N. BARKER, *Clinical and Experimental Dermatology*, 20, pp. 6-9 (1995)].

- <9> 상기한 질병에 대한 특정 치료에 있어서의 메탈로프로테아제, 특히 콜라게나제, 젤라티나제의 억제제 및 스트로멜라이신의 억제제의 역할은 공지되어 있다.

발명의 상세한 설명

- <10> 본 발명의 목적은 콜라겐 또는 다른 세포외 지지 거대단백질의 과도한 분해 또는 병리학적 분해와 연계된 질환 또는 질병, 또는 이들 단백질 분해 효소의 과도한 발현과 연계된 다른 질병을 앓고 있는 인간 또는 포유동물의 치료를 가능하게 하는 콜라게나제 또는 젤라티나제 형 메탈로프로테아제의 신규한 광범위 억제제를 제공하는 것이다.
- <11> 본 발명은 메탈로프로테아제, 특히 콜라게나제 또는 젤라티나제를 억제하는 활성을 보유하는 것을 특징으로 하는 루핀(루피너스)의 펩티드 추출물에 관한 것이다. 여러 가지 루핀으로서, 특히 알칼로이드 함량이 낮은 아레스(Ares) 종과 같은 스위트 화이트 루핀속(루피너스 알버스(*lupinus albus*))을 들 수 있다.
- <12> 특히, 본 발명은 DQ-젤라틴 상에서 0.1%(w/v) 이상의 농도로, 구체적으로 24 시간에서 50% 이상, 정제된 클로스트리디움 히스토리쿰(*Clostridium histolyticum*) 콜라게나제를 억제하는 활성을 보유하는 것을 특징으로 하는 루핀(루피너스)의 신규한 펩티드 추출물에 관한 것이다.
- <13> 한 변형에 따르면, 상기 루핀의 펩티드 추출물은 지질이 제거된 것이다.
- <14> 상기 펩티드 추출물은 50% 이상, 바람직하게는 70% 이상, 더 바람직하게는 80% 이상의 펩티드를 포함하는 것이 이롭다.
- <15> 이들 펩티드는 루핀 단백질 분획의 가수분해에 의해 얻는다.
- <16> 상기 가수분해는 임의의 적합한 방법, 구체적으로 효소적 가수분해에 의해 수행될 수 있다.
- <17> 이러한 루핀의 펩티드 추출물을 제조하는 방법은 하기 단계를 포함한다:
- <18> - 지질이 제거되고 연마된 루핀 밀(meal) 또는 미분화된 루핀 분말(지질 함유)을 제조하는 단계;
- <19> - 가용성 단백질 및 당류 분획을 추출하거나 등전점에 따라 산성 pH(4 또는 5)를 이용하여 침전시키는 단계;
- <20> - 필요에 따라 단백질 분획을 분리하는 단계;
- <21> - 단백질 분획을 가수분해하고, 필요에 따라 여과 후에 단백질 추출물을 회수하는 단계.
- <22> 또한, 본 발명은 상기한 방법으로 얻을 수 있는 단백질 추출물에 관한 것이다.
- <23> 일반적으로, 본 발명은 지질 함유 루핀 분말 및 당을 포함하는 펩티드 추출물을 포함한다.
- <24> 상기 단백질 추출물은 하기 아미노산 조성을 보유하는 것이 바람직하다(중량%는 아미노산의 총 중량에 대한 것

이다).

<25>

아미노산	%/총 아미노산
ASP	11.3
GLU	23.2
SER	5.1
HIS	1.7
GLY	3.4
THR	3.2
ALA	2.8
ARG	10.3
TYR	6.1
CYS-CYS	2.4
VAL	3.8
MET	0.2
PHE	7.0
ILE	3.3
LEU	7.9
LYS	3.7
PRO	4.4

<26>

또한, 본 발명은 상기한 펩티드 추출물 및 필요에 따라 적합한 생리학적으로 허용가능한 불활성 비히클을 포함하는 약학 조성물, 화장 조성물 또는 영양 조성물에 관한 것이다.

<27>

이러한 약학 조성물 또는 피부화장 조성물 및 영양 조성물은 특히 콜라겐의 과도한 파괴 및/또는 지지 조직의 과도한 파괴와 연계된 질환 또는 질병을 앓고 있는 인간 또는 포유동물을 치료하기 위해 의도된 것이다. 이러한 조성물은 예방 또는 치료용으로 사용할 수 있다.

<28>

이들 질환 또는 질병으로 언급할 수 있는 것은, 예를 들어 관절증, 치주 질환, 피부 손상과 관련된 질환, 염증성 질환, 종양과 관련된 또는 병리학적 신생혈관형성(전신흡색증, 여드름 홍반, 모세혈관확장증, 주사비, 건선 등), 반흔형성 결함, 궤양, 화상, 수포성 질환 및 치아 법랑질의 손상이 있다.

<29>

또한, 본 발명은 노화에 기인한 피부 손상, 예를 들어 태양 광선의 작용에 의한 노화(광노화), 피부의 내인성 유해 효과 또는 담배의 유해 효과를 치료하기 위한 화장 조성물에 관한 것이다.

<30>

한 변형에 따라 약학 조성물, 피부화장 조성물 또는 화장 조성물은 국소 도포용 제제의 형태이다. 따라서, 본 발명은 화장 치료 방법에 관한 것인데, 이 방법은 개체의 피부 표면에 본 발명의 조성물을 도포하는 단계를 포함한다.

<31>

또한, 본 발명에 따른 펩티드 추출물은 국소 또는 국부적인 사용을 위해 중합체 비히클 또는 전달 시스템내에 혼입되거나, 중합체 비히클 또는 전달 시스템으로 제형화될 수 있는데, 예를 들어 치주 질환을 치료하는 경우, 치주 포켓 내로 전달되도록 하기 위해 상기한 바와 같이 제형화될 수 있다.

<32>

다른 변형에 따라, 약학 조성물은 경구 투여용 제제의 형태이다.

<33>

일반적으로 이들 조성물은 정제, 캡슐 또는 연고의 형태로 제형화된다.

<34>

영양 조성물 또는 식품 조성물의 경우, 통상적으로 사용되는 형태로 제형화할 수 있다.

<35>

이하, 예시를 위한 실시예를 통해 본 발명을 기술한다.

실시예

<37>

I - 루핀의 펩티드 추출물의 제조

<38>

I.1. - 추출물 A

<39>

- 루핀 단백질의 추출 및 정제

- <40> 이 단계는 알칼리성 pH에서 가용성인 분획의 수성 용해 및 불용성 성분들로부터의 후속 분리를 포함한다:
- <41> 지질이 제거된 연마된 루핀 밀을 이용하여, 단백질은 분말/물 비 1/10(w/w)으로 pH 9.0(수산화나트륨을 첨가하여 조정된 pH)에서 추출하였다. 상기 용액은 실온에서 교반하면서 1 시간 동안 항온처리하였다. 이어서, 상기 밀의 불용성 부분은 스핀 건조에 의해 가용성 부분으로부터 분리하였다. 얻어진 케이크는 세척하였다. 가용성 당 및 단백질을 함유하는 가용성 분획은 컷오프 한계치가 10,000 Da인 한외여과 모듈 상에서 다이아여과(diafiltration)하여 가용성 당(한외여과물)으로부터 단백질(보유물)을 분리하였다.
- <42> - 효소적 가수분해에 의한 펩티드의 생성 및 정제
- <43> 단백질을 함유하는 한외여과 보유물은 100 g/l의 농도로 조정하고, 이어서 알칼라제(등록상표; 노보 노르디스크) 존재 하의 pH 8.0 및 55℃에서 약 3 시간 동안 가수분해하였다. 가수분해 후, 상기 효소는 85℃에서 15분 동안의 가수분해에 의해 변성시켰다. 상기 용액이 냉각되자마자, 염산을 첨가하여 중화시켰다. 얻어진 펩티드는 컷오프 한계치가 10,000 Da인 한외여과 모듈 상에서 다이아여과에 의해 정제하였다. 이어서, 얻어진 용액은 나노여과(nanofiltration)하여 탈염(염화나트륨의 제거)하고, 펩티드 분획을 농축시켰다. 최종적으로 상기 펩티드 용액은 3% 활성탄을 이용하여 탈색하고(50℃에서 1 시간), 활성탄은 여과로 제거하였다.
- <44> - 펩티드 분획의 멸균 및 포장
- <45> 포장 전에, 상기 용액은 멸균 미세여과(0.2 μ m)하고, 보존제 존재 하에서 멸균 분배 용기 내로 10%의 농도로 분배하였다.
- <46> **I.2. - 추출물 B**
- <47> 펩티드 추출물 B는 상기 펩티드 추출물 A를 얻기 위해 수행한 방법에 따라 얻었으나, 상기한 과정 중 탈색 단계는 수행하지 않았다.
- <48> **I.3. - 추출물 C**
- <49> 루핀의 펩티드 추출물 C는 상기 펩티드 추출물 A를 얻기 위해 수행한 방법에 따라 얻었으나, 상기한 과정 중 정제, 한외여과 및 탈색 단계는 수행하지 않았다.
- <50> **II. - 펩티드 추출물 A의 분석**
- <51> 건조 추출물을 분석하였다.
- <52> 개요:
- <53> - 외관: 비흡습성의 균질한 분말
- <54> - 색상: 회색
- <55> - 양: 5 g
- <56> · 화학 조성:
- <57> - 당의 총 함량(안트론을 이용하여 테스트함): <1%
- <58> - 염화물 함량(시그마 키트 ref: 955-30): 6%
- <59> - 함수량(100℃, 4 시간): 최대 8%
- <60> - 펩티드 함량: 85%
- <61> · 특성
- <62> - pH(20 g/l 용액): 7.06
- <63> - 용해도(삼투수): >100 g/l

표 1

<64> 가수분해물의 아미노산 조성

아미노산	아미노산 분자량	농도(mM)	농도(mg/l)	분말내 %	%/총 아미노산
ASP	133.1	2.078	276.582	9.9	11.3
GLU	147.1	3.858	567.438	20.3	23.2
SER	105.1	1.196	125.647	4.5	5.1
HIS	155.2	0.270	41.904	1.5	1.7
GLY	75.1	1.114	83.624	3.0	3.4
THR	119.1	0.664	79.023	2.8	3.2
ALA	89.1	0.763	67.983	2.4	2.8
ARG	174.2	1.447	251.980	9.0	10.3
TYR	181.2	0.829	150.215	5.4	6.1
CYS-CYS	240.3	0.247	59.234	2.1	2.4
VAL	117.1	0.792	92.743	3.3	3.8
MET	149.2	0.029	4.327	0.2	0.2
PHE	165.2	1.044	172.469	6.2	7.0
ILE	131.2	0.621	81.410	2.9	3.3
LEU	131.2	1.481	194.307	6.9	7.9
LYS	146.2	0.626	91.448	3.3	3.7
PRO	115.1	0.935	107.619	3.8	4.4

<65> 합계 2447.952 87.4%

<66> **III. - 루핀 펩티드 - 추출물 A의 시험관내 항콜라게나제 및 항젤라틴분해 활성**

<67> 항콜라게나제 활성은 시험관내에서 스크리닝 타입의 생화학적 모델에서 측정하였는데, 이는 정제된 콜라게나제 및 이의 기질인 플루오레세인에 접합된 젤라틴의 이용을 기초로 한다(EnzChek(상표명) 젤라티나제/콜라게나제 키트, 몰리콜러 프로브스). 클로스트리디움 히스토리티킴으로부터 정제된 콜라게나제를 상기 EnzChek(상표명) 젤라티나제/콜라게나제 키트 내에 공급하였다. 이 효소는 콜라겐 IV(상피/표피 기저막) 및 젤라틴에 대한 이중 작용성을 보유하고 있다.

<68> 돼지 피부로부터 정제하고 플루오레세인에 접합된 DQ-젤라틴을 EnzChek(상표명) 젤라티나제/콜라게나제 키트(몰리콜러 프로브스) 내에 공급하였다.

<69> 0.05 M 트리스-HCl, 0.15 M NaCl, 5 mM CaCl₂, 및 0.2 mM 나트륨 아지드(pH 7.6)로 이루어지는 반응 완충액을 EnzChek(상표명) 젤라티나제/콜라게나제 키트(몰리콜러 프로브) 내에 공급하였다.

<70> 펩티드 추출물은 상기 반응 완충액 내에 용해시켰다. 이는 0.004%; 0.02%; 0.04%; 0.2% 및 0.4%(w/v)에서 테스트하였다.

<71> 테스트 추출물의 희석액은 1 mg/ml의 DQ-콜라겐 및 0.2 Ru/ml의 콜라게나제와 함께 실온에서 1 시간, 2 시간 및 24 시간 동안 항온처리하였다.

<72> "콜라게나제 + DQ-젤라틴" 혼합물에 상응하는 대조용 혼합물도 동일하게 항온처리하였다.

<73> 각각의 실험 조건에서, 샘플, 이하 "효소 비함유 샘플"이라 칭하는 샘플은 DQ-젤라틴 존재 및 콜라게나제 부재 하에서 항온처리하였다.

<74> 각각의 실험은 3회 수행하였다.

<75> 1 시간, 2 시간 및 24 시간 후, DQ-젤라틴의 분해에 상응하는 신호는 형광측정기(여기: 485 nm, 방출: 595 nm)로 측정하였다. 각각의 샘플에서 "효소 비함유 샘플"에 대해 얻어진 수치는 감하였다.

<76> 결과는 샘플당 형광 단위 및 대조군에 대한 편차(%)로 나타내었다.

<77> 상기 군들(대조군 및 처리군)의 데이터는 1 요인 분산분석(아노바 1, p<0.05) 및 후속 두넷 검정(Dunnett's test)에 의해 비교하였다. 따라서, 추출물의 효과도 대조군에서 얻어진 효과와 비교하였다.

<78> 0.004~0.2%(w/v)에서 테스트한 펩티드 추출물은 용량 의존성 항콜라게나제 및 항젤라틴분해 활성을 보유하였다. 상기 효과는 하기 표 2에서 확인할 수 있는 바와 같이 24 시간에서 최대치를 나타내었다.

표 2

<79>

항온처리 시간 = 1 시간					
대조군	0.004	0.02	0.04	0.2	0.4
16237	14161	11890	11205	11249	9434
14329	13561	11161	10863	9840	7544
15636	13965	11757	11344	11387	8878
15401	13896*	11603*	11137*	10825*	8619*
+/-	+/-	+/-	+/-	+/-	+/-
976	306	388	248	856	971
100%	89	75	73	73	57
항온처리 시간 = 2 시간					
24776	20526	13689	11000	7617	6853
22516	19579	6710	10406	6072	4933
23779	20144	13148	11349	7824	6467
23690	20089*	11182*	10918*	7171*	6084*
+/-	+/-	+/-	+/-	+/-	+/-
1133	467	3883	477	957	1016
100%	85	55	48	33	27
항온처리 시간 = 3 시간					
31653	12655	2583	2378	524	1154
29536	11531	1487	1442	484	467
29745	13008	2657	2713	693	927
30311	12398*	2242*	2178*	567*	849*
+/-	+/-	+/-	+/-	+/-	+/-
1167	771	655	659	111	350
100%	41	7	7	2	3

<80> 상기 결과는 플루오레세인 단위/샘플로 나타내었다.

<81> 진한 숫자는 평균 및 표준 편차를 나타낸다.

<82> *는 대조군과 유의적인 차이가 있는 평균을 나타낸다(p<0.05).

<83> 결론적으로, 선택된 실험 조건 하에서, 0.004~0.4%(w/v)에서 테스트된 단백질 추출물은 용량 의존성 항젤라티나제/콜라게나제 활성을 보유하였다. 비특이성 콜라게나제와 비교하여 루핀 펩티드에 대한 탁월한 효과/용량/시간 비는 특히 주목할만하다: 예를 들어, 24 시간에서 0.04%는 클로스트리디움 콜라게나제의 젤라틴분해 활성의 93%를 억제하였으며, 2 시간에서는 52%를 억제하였다.

<84> 동일한 펩티드 추출물을 이용하는 다른 테스트를 0.01%; 0.05%; 0.1%; 0.5% 및 1%(w/v)의 농도에서 수행하였으며, 그 결과는 하기 표 3 및 도 1에 나타내었다. 도 1은 비특이성 콜라게나제의 억제 - 펩티드 추출물의 농도의 영향간의 역학 관계를 나타내고 있다. 상기 도면에서 y 축은 젤라틴분해 활성(%)을 나타내고, x 축은 항온처리 시간(시)을 나타내고 있다.

표 3

<85>

항온처리 시간(시)	추출물 A의 농도(% w/v)/젤라틴분해 활성(%)				
	0.01	0.05	0.1	0.5	1
1	89	75	73	73	57
2	85	55	48	33	27

4	79	38	29	14	12
6	69	27	21	8	9
24	41	7	7	2	3

<86> 선택된 실험 조건 하에서, 0.01~0.5%(w/v) 사이에서 테스트된 펩티드 추출물은 용량 의존성 및 시간 의존성 항 젤라티나제/콜라게나제 활성을 보유하였다.

<87> 모든 테스트에서 비특이성 억제제인 1,10-페난트롤린을 참조용 항-MMP 생성물로 사용하였다. 얻어진 결과는 예상 결과에 부합하였으며, 유효한 테스트임을 입증시켜 주었다.

<88> IV. - 인간 기관형(organotypic) 모델에 대한 루핀 펩티드 - 추출물 A의 특이성 항콜라게나제 활성

<89> 피부 노화는 특히 표피의 콜라겐 섬유 및 기타 거대단백질의 분해를 수반하는 피부의 피부 기계적 특성의 변경을 특징으로 한다. 이 분해는 내인성 콜라게나제와 관련되어 있다[참조: Grymes, R.A., Kronberger A. 및 Bauer E.A. - Collagenases in disease - in "Connective Tissue Diseases of the skin" Eds. Lapiere C.M. 및 Krieg T., 69-85 (1993); G. Fischer 및 J. Voorhees "Pathiophysiology of premature skin aging induced by ultraviolet light" and "Molecular mechanisms of photoaging and its prevention by retinoic acid: ultraviolet irradiation induces MAP kinase signal transduction cascades that induce A-1-regulated matrix metalloproteinases that degrade human skin in vivo".]

<90> 항콜라게나제 활성을 보유하는 생성물은 피부 노화의 징후에 대항하도록 고안할 수 있다.

<91> 테스트 생성물의 항콜라게나제 활성은 인간 피부의 기관형 모델에서 시험관내에서 연구할 수 있다. 테스트의 원칙은 다음과 같다: 정제된 콜라게나제를 절편에 도포하여 내인성 콜라겐 섬유를 분해시킨다. 이어서, 콜라겐 섬유를 매스 트리크롬(Masson trichrome)으로 염색한다. 정제된 콜라게나제에 의한 내인성 콜라겐 섬유의 분해는 정성적으로는 형태의 관찰에 의해 평가하고, 정량적으로는 상 분석에 의해 평가한다. 항콜라게나제 활성을 보유하는 생성물은 효소 존재 하에 배치된 콜라겐 섬유 본래의 모습을 부분적으로 또는 완전히 보존시키게 된다.

<92> 테스트 생성물은 사용할 때까지 +4℃에서 저장하였다.

<93> 3개의 희석물, 즉 0.01%(v/v), 0.1%(v/v) 및 1%(v/v)의 희석물을 테스트하였다.

<94> 참고용 생성물로서 사용된 포스포라미돈은 시그마(SIGMA)로부터 입수하였다.

<95> 정제된 콜라게나제(유형 III, 분획 A)는 시그마로부터 입수하였다.

<96> 인간 피부 절편을 항온처리하기 위한 매질(이하, "비히클"이라 칭함)은 0.01 M의 염화칼슘을 함유하는 0.15 M 트리스 HCl 완충제(pH 7.5)였다.

<97> 분석용 시약은 특별한 언급이 없는 한 카를로 어바(CARLO ERBA), 킵코(GIBCO) 또는 시그마(SIGMA)로부터 입수하였다.

<98> 피부 절편은 복부 성형 수술 후에 수거한 수술 폐기물로부터 준비하였다. 개체는 30세의 여성이었다. 직경이 4 cm인 피부 외식편을 제조하였다. 이것을 코르크 지지체 상에 배치하고 -80℃에서 동결시켰다. 크라이오마이크로 톰(cryomicrotome)을 사용하여 6 μm 두께의 횡절편을 제조하였다. 이들을 유리 슬라이드 상에 고정시키고, 비히클을 사용하여 테스트 중에 수화된 상태로 유지시켰다.

<99> 테스트 샘플은 모두 테스트 완충제에 희석시키기 전에 에탄올에 침지시켰다.

<100> · 에탄올의 최종 농도는 일정하게 유지시켰고, 펩티드 추출물(0.01 %v/v 및 0.1% v/v) 중 2개의 가장 묽은 희석액 중에서 0.1%(v/v)였다.

<101> · 이는 일정하게 유지시켰고, 가장 진한 희석액(1% v/v) 중에서 1%(v/v)였다.

<102> · 0.1%(v/v) 및 1%(v/v)의 "에탄올 대조군"을 제조하였다.

<103> · 포스포라미돈은 비히클에 직접 침지시켰다.

<104> 펩티드 추출물은 0.01 %(w/v), 0.1 %(w/v) 및 1 %(w/v)에서 테스트하였다.

<105> 포스포라미돈은 10⁻³ M에서 테스트하였다.

- <106> 따라서, 이하의 샘플이 존재하였다.
- <107> 추출물: 완충제; 에탄올(0.1% v/v 또는 1% v/v); 추출된 효소(0.01%; 0.1% 및 1%, w/v);
- <108> 효소 대조군: 완충제; 에탄올(0.1%, v/v); 효소;
- <109> 에탄올 대조군(효소 비함유): 완충제; 에탄올(0.1% 또는 1%, v/v);
- <110> 참고용 생성물: 완충제; 에탄올; 효소; 10^{-3} M 포스포라미돈.
- <111> 테스트 생성물의 희석액, 에탄올의 희석액 및 참고용 생성물의 희석액을 피부 절편 상에 절편당 100 μ l로 배치하고, 37°C에서 10분간 예비 항온처리하였다. 이어서, 비히클에만 침지시킨 여과지 조각(0.16 cm² 표면적)(효소 부재의 대조군) 또는 50 국제 단위(IU)/ml로 콜라게나제를 함유하는 비히클에 침지시킨 여과지(효소 대조군)를 상기 피부 절편 상에 위치시켰다. 이어서, 상기 슬라이드를 습식 챔버 내에 37°C에서 3 시간 동안 위치시켰다.
- <112> 항온처리 후, 상기 절편을 항온처리 매질로 세정하고, 매슨 트릭로姆으로 염색하였다. 추출물, 에탄올 또는 참고용 생성물 존재 및 부재 하에 효소의 활성을 현미경에 의한 관찰을 통해 평가하고, 이하의 기준에 따라 평가하였다.
- <113> 0: 효소적 분해 없음
- <114> +: 약한 효소 분해
- <115> ++: 평균적인 효소 분해
- <116> +++: 강한 효소 분해
- <117> 상기 절편의 사진을 찍었다.
- <118> 테스트 생성물, 에탄올, 또는 참고용 생성물 존재 및 부재 하에서의 콜라게나제의 활성을 상 분석 방법에 의해 평가하였다. 염색한 절편의 상은 비디오 스크린 상에 디지털화하였고, 상 분석 소프트웨어(IMAGENIA 2000, BIOCOM(등록상표))에 의해 무결한 콜라겐 섬유가 점유한 표면적을 계산할 수 있다. 그 결과는 광학적 영역당 무결한 콜라겐 섬유의 백분율로 나타내었다.
- <119> 다양한 농도의 에탄올에서의 추출물 및 참고용 생성물의 콜라게나제 활성의 억제율(%)은 이하의 식을 이용하여 계산하였다.
- <120> 참고용 생성물(비히클에 직접 침지시킨 것)의 경우, 이하의 식을 이용하여 억제율을 계산한다.
- $$\frac{[\text{참고용 생성물의 콜라겐 섬유 함유율}(\%) - \text{효소 대조군의 콜라겐 섬유 함유율}(\%)] \times 100}{\text{에탄올 대조군의 콜라겐 섬유 함유율}(\%) - \text{효소 대조군의 콜라겐 섬유 함유율}(\%)}$$
- <121>
- <122> 0.1 %(v/v)의 에탄올을 함유하는 비히클에 희석된 추출물의 경우, 억제율은 이하의 식을 이용하여 계산한다.
- $$\frac{[\text{참고용 생성물의 콜라겐 섬유 함유율}(\%) - \text{효소 대조군의 콜라겐 섬유 함유율}(\%)] \times 100}{\text{에탄올 대조군의 콜라겐 섬유 함유율}(\%) - \text{효소 대조군의 콜라겐 섬유 함유율}(\%)}$$
- <123>
- <124> 1 %(v/v)의 에탄올을 함유하는 비히클에 희석된 추출물의 경우, 억제율은 이하의 식을 이용하여 계산한다.
- $$\frac{[\text{참고용 생성물의 콜라겐 섬유 함유율}(\%) - \text{효소 대조군의 콜라겐 섬유 함유율}(\%)] \times 100}{\text{에탄올 대조군의 콜라겐 섬유 함유율}(\%) - \text{효소 대조군의 콜라겐 섬유 함유율}(\%)}$$
- <125>
- <126> 다양한 농도에서의 추출물의 항콜라게나제 활성은 인간 피부의 기관형 모델에서 연구하였다.
- <127> 콜라게나제 부재 하에(비히클 대조군), 콜라겐 섬유는 무결한 상태 그대로였다. 콜라게나제 존재 하에(효소 대조군), 콜라겐 섬유는 거의 완전히 분해되었다. 이러한 결과는 예상 결과에 부합하였으며, 유효한 테스트임을 입증시켜 주었다.
- <128> 참고용 생성물로 사용된 10^{-3} M의 포스포라미돈은 콜라게나제 활성을 16%만큼 억제하였다. 이러한 결과는 예상

결과에 부합하였으며, 유효한 테스트임을 입증시켜 주었다.

- <129> 테스트 생성물의 중간 회석액으로서 사용된 에탄올은 0.1%(v/v) 및 1%(v/v)에서 테스트하였다. 이것은 콜라게나제에 의한 콜라겐 섬유의 분해에는 어떠한 영향도 미치지 않았다.
- <130> 0.01%, 0.1% 및 1%(w/v)에서 테스트한 펩티드 추출물은 콜라게나제 활성을 각각 2%, 24% 및 65%만큼 억제하였다. 형태 관찰 결과도 동일하였다.
- <131> 결론적으로, 선택된 실험 조건 하에서는, 펩티드 추출물 A가 낮은 농도에서 상당한 항콜라게나제 활성을 나타내 보였다.
- <132> 펩티드 추출물, 에탄올 및 포스포라미돈의 경우, 콜라게나제에 의한 피부 콜라겐 섬유의 분해에 대한 억제 결과는 이하의 표 4에 제시하였다.

표 4

실험 조건	농도	효소적 분해 (형태 관찰)	콜라게나제 활성의 억제율(%) (상 분석)
비히클 대조군	-	0	-
효소 대조군	50 IU/ml	+++	0
포스포라미돈(M)	10^{-3}	+	+
에탄올(% , v/v)	0.1	+++	0
	1	+++	0
펩티드 추출물 (% , v/v)	0.01	+++	2
	0.1	++	24
	1	+	65

<134> 0: 효소적 분해 없음

<135> +: 약한 효소 분해

<136> ++: 평균적 효소 분해

<137> +++: 강한 효소 분해

<138> V. - 루편 펩티드- 추출물 A, B 및 C의 항메탈로프로테아제 MMP-2 및 MMP-9 활성

<139> MMP-2 또는 젤라티나제 A, 그리고 MMP-9 또는 젤라티나제 B는 세포외 매트릭스의 특이적 성분을 분해하는 메탈로프로테아제로서, MMP-2는 젤라틴(변성된 콜라게나제), 콜라겐 I, IV, VII 및 XI, 그리고 피브로넥틴, 라미닌 및 엘라스틴을 분해하고, MMP-9는 젤라틴, 콜라겐 IV, V 및 엘라스틴을 분해한다. 이들은 내피 세포의 광노화 및 증식에 중요한 작용을 한다.

<140> 테스트 생성물의 항-MMP-2 및 항-MMP-9 활성은, 정제된 인간 MMP-2 및 재조합 인간 MMP-9, 그리고 재조합 인간 MMP-9의 기질, 즉 플루오레세인(EnzChek(상표명) 젤라티나제/콜라게나제 키트, 몰리큘러 프로브)에 결합된 젤라틴의 사용에 근거한 스크리닝 유형의 생화학적 모델에서 시험관내에서 측정하였다.

<141> 인간의 섬유육종으로부터 정제된 MMP-2는 뇌링거 만하임으로부터 입수하였다.

<142> 재조합 인간 MMP-9는 R&D 시스템스로부터 입수하였다.

<143> 돼지의 피부로부터 정제하여 플루오레세인에 결합시킨 DQ-젤라틴을 EnzChek(상표명) 젤라티나제/콜라게나제 키트(몰리큘러 프로브) 내에 공급하였다.

<144> MMP-2의 활성을 연구하기 위한 반응 완충제(RBf1)는 50 mM의 트리스-HCl, 0.05%(w/v)의 트리톤 X 100 및 5 mM의 CaCl_2 (pH 7.5)로 구성되었다.

<145> MMP-9의 활성을 연구하기 위한 반응 완충제(RBf2)는 50 mM의 트리스-HCl, 0.05%(w/v)의 Brij 35 및 5 mM의 CaCl_2 (pH 7.4)로 구성되었다.

<146> **테스트 생성물 및 참고용 생성물의 제조**

<147> 1,10-페난트롤린을 반응 완충제 RBf1 및 RBf2에 용해시켰다. 이것은 8 $\mu\text{g/ml}$ 및 80 $\mu\text{g/ml}$ 에서 테스트하였다.

<148> 펩티드 추출물 A, B 및 C는 반응 완충제 RBf1 및 RBf2에 용해시켰다. 이들은 0.01%; 0.1% 및 1 % (w/v)에서 테스트하였다.

<149> **MMP-2**

<150> MMP-2는, 사용하기 전에, 완충제 RBf1에서 2.5 mM로 희석시킨 APMA 존재 하에 37°C에서 30분간 항온처리함으로써 활성화시켰다.

<151> 테스트 생성물의 희석액 또는 참고용 생성물의 희석액은 25 $\mu\text{g/ml}$ 로 희석된 DQ-젤라틴과, 1.25 $\mu\text{g/ml}$ 로 희석된 활성화된 MMP-2와 함께 24 시간 동안 37°C에서 항온처리하였다.

<152> "MMP-2 + DQ-젤라틴"에 상응하는 대조군도 함께 항온처리하였다.

<153> 각 실험 조건의 경우, 샘플(이하, "효소 비함유 샘플"이라 칭함)을 DQ-젤라틴 존재 하에, 그리고 활성화된 MMP-2 부재 하에 항온처리하였다. 이들 샘플에 의하면, 그 효과를 평가하는 방법(형광측정법)을 이용하여 테스트 화합물의 간섭성을 측정할 수 있다.

<154> 각 실험 조건은 3회씩 수행하였다,

<155> **MMP-9**

<156> 테스트 생성물의 희석물 또는 참고용 생성물의 희석물을 25 $\mu\text{g/ml}$ 로 희석한 DQ-젤라틴, 그리고 0.25 $\mu\text{g/ml}$ 로 희석한 MMP-9와 함께 24 시간 동안 37°C에서 항온처리하였다.

<157> "MMP-9 + DQ-젤라틴"에 상응하는 대조군도 함께 항온처리하였다.

<158> 각 실험 조건의 경우, 샘플(이하, "효소 비함유의 샘플")을 DQ-젤라틴 존재 하에, 그리고 MMP-9 부재 하에 항온처리하였다. 이들 샘플에 의하면, 그 효과를 평가하는 방법(형광측정법)을 이용하여 테스트 생성물의 간섭성을 측정할 수 있다.

<159> 각 실험 조건은 3회씩 수행하였다.

<160> 24 시간 후, DQ-젤라틴의 분해에 상응하는 신호를 형광측정법(여기: 485 nm 및 방출 595 nm)으로 측정하였다. 각 샘플의 경우, "효소 비함유 샘플"에 대해 산출된 값은 감하였다.

<161> 그 결과는 샘플당 형광 단위로서, 그리고 대조군에 대한 편차(%)로서 나타내었다.

<162> 데이터 군(대조군 및 처리군)은 1 요인 분산분석법(ANOVA 1, $p < 0.05$) 및 후속 두넛 검정에 의해 비교하였다,

<163> 그 결과는 이하에 제시하였다.

<164> **V.1. - 항MMP-2 활성**

<165>

펩티드 추출물	대조군	MMP-2 활성(%) (1)/펩티드 추출물의 10 중량% 용액의 농도(% v/v)		
		0.01	0.1	1
C	100	119	111	43
A	100	152	151	68
B	100	110	98	77

<166> (1) 활성은 MMP-2 억제제 부재 하에 대조군과 비교하여 나타내었다.

<167> **결론:**

<168> - 0.01 % (v/v) 및 0.1 % (v/v)에서 테스트한 루핀 추출물 C의 10 중량% 용액은 항 MMP-2 활성을 전혀 갖지 않았다. 1% (v/v)에서 테스트하였을 때, 이것은 MMP-2를 57%만큼 억제하였다.

<169> - 0.01 % (v/v) 및 0.1 % (v/v)에서 테스트한 루핀 추출물 A의 10 중량% 용액은 항 MMP-2 활성을 전혀 갖지 않았다. 1% (v/v)에서 테스트하였을 때, 이것은 MMP-2를 32%만큼 억제하였다.

- 1 %(v/v)에서 테스트한 추출물 B의 10 중량% 용액은 MMP-2를 23%만큼 억제하였다.

- 8 $\mu\text{g/ml}$ 및 80 $\mu\text{g/ml}$ 에서 테스트한 페난트롤린은 MMP-2의 활성을 각각 32% 및 73%만큼 억제하였다. 얻어진 결과는 예상 결과에 부합하였으며, 유효한 테스트임을 입증시켜 주었다.

V.2. - 항 MMP-9 활성

펩티드 추출물	대조군	MMP-9 활성(1)/펩티드 추출물의 10 중량% 용액의 농도(% v/v)		
		0.01	0.1	1
A	100	143	143	61
B	100	146	129	27

(1) 활성은 MMP-9 억제제 부재 하에 대조군과 비교하여 나타내었다.

결론:

- 0.01 %(v/v) 및 0.1 %(v/v)에서 테스트한 루핀 추출물 A의 10 중량% 용액은 항 MMP-9 활성을 전혀 갖지 않았다. 1%(v/v)에서 테스트하였을 때, 이것은 MMP-9를 39%만큼 억제하였다.

- 0.01 %(v/v) 및 0.1 %(v/v)에서 테스트한 루핀 추출물 B의 10 중량% 용액은 항 MMP-9 활성을 전혀 갖지 않았다. 1%(v/v)에서 테스트하였을 때, 이것은 MMP-9를 73%만큼 억제하였다.

8 $\mu\text{g/ml}$ 및 80 $\mu\text{g/ml}$ 에서 테스트한 페난트롤린은 MMP-9의 활성을 각각 80% 및 76%만큼 억제하였다. 얻어진 결과는 예상 결과에 부합하였으며, 유효한 테스트임을 입증시켜 주었다.

VI. - UVA 선을 조사한 인간 섬유아세포에 있어 루핀 펩티드가 MMP-1-9 및 MMP-1-3의 양에 미치는 영향에 대한 평가

연구는 단층 배양물 내 인간의 피부 섬유아세포에 대해 실시하였다. 세포는 참고용 생성물 및 테스트 생성물 존재 하에 37°C에서 1 시간 동안 미리 항온처리하였다. 이어서, 세포에 대해, 테스트하고자 하는 생성물 및 참고용 생성물 존재 하에 10 J/cm²의 1회 조사량으로 UVA를 조사하였다.

조사 직후, 세포를 여전히 테스트하고자 하는 생성물 및 참고용 생성물 존재 하에 37°C에서 48 시간 동안 항온처리하였다.

특이적 ELISA 키트(애머샴 제품)를 사용하여 배양 배지 내에서 여러 MMP를 테스트하였다.

참고용 생성물 및 테스트 생성물

MMP의 비특이적 억제제인 1,10-페난트롤린을 참고용 생성물로 사용하였으며, 이것은 80 $\mu\text{g/ml}$ 에서 테스트하였다.

TIMP1(TIMPI, MMP의 조직 억제제, MMP의 생리학적 억제제)을 유도하는 능력을 갖춘 10 $\mu\text{g/ml}$ 레티노산 + 10 ng/ml의 EGF 혼합물을 사용하였다.

10%(w/v)의 루핀 펩티드를 함유한 원료 용액을 탈이온수 중에 제조하였다. 이 용액을 사용하여, 섬유아세포 배양 배지 내에서 희석물을 제조하였다. 루핀의 펩티드 추출물은 0.5%(v/v), 1%(v/v) 및 2%(v/v)에서 테스트하였다.

조사된, 그리고 비조사된 대조군 배양물을 참고용 생성물 및 테스트 생성물 부재 하에 함께 항온처리하였다.

데이터 처리

데이터 군(대조군 및 처리군)은 1 요인 분산분석법(ANOVA 1, $p < 0.05$) 및 후속 두넷 검정에 의해 비교하였다. 따라서, 참고용 생성물 및 테스트 생성물의 효과는 "조사된 세포" 군에서 얻어진 것과 비교하였다.

결과 :

<191> 결과는 하기 표에 제시하였으며, "조사된 세포" 군에 대한 %로서 나타내었다.

<192>

	MMP의 제조(%)				
	대조군 세포	조사된 세포	조사된 세포 + 루핀 펩티드(%, v/v)		
			0.5	1	2
MMP-1	24	100	4	3	3
MMP-9	41	100	17	2	0
MMP-3	88	100	3	0	2

<193> 결론:

<194> 80 $\mu\text{g/ml}$ 에서 테스트한 1,10-펜탄트롤린은 조사된 섬유아세포에 의한 MMP-1의 분비를 99%만큼, MMP-9의 분비는 92%만큼, 그리고 MMP-3의 분비는 97%만큼 억제하였다.

<195> 10 μM 의 레티노산 + 10 ng/ml의 EGF 혼합물은 조사된 섬유아세포에 의한 MMP-1의 분비를 58%만큼, MMP-9의 분비는 67%만큼, 그리고 MMP-3의 분비는 44%만큼 억제하였다.

<196> 얻어진 결과는 예상 결과에 부합하였으며, 테스트 시스템의 유효성을 입증시켜 주었다.

<197> 10 J/cm²의 조사량으로 조사한 결과, 섬유아세포에 의해 분비된 MMP-1, MMP-9 및 MMP-3의 각각의 양이 4.10, 2.42 및 1.13배 만큼 증가하였다. 이들 결과는 예상했던 바이며, UVA 조사에 의한 MMP-1, MMP-9 및 MMP-3의 유도과 관련된 테스트 시스템의 유효성을 입증시켜 주었다.

<198> 0.5%, 1% 및 2%(v/v)에서 테스트한 루핀의 펩티드 추출물은 섬유아세포에 의해 분비된 MMP-1의 양을 각각 96%, 97% 및 97%만큼 감소시켰다(p < 0.05).

<199> 0.5%, 1% 및 2%(v/v)에서 테스트한 루핀의 펩티드 추출물은 섬유아세포에 의해 분비된 MMP-9의 양을 각각 83%, 98% 및 100%만큼 감소시켰다(p < 0.05).

<200> 0.5%, 1% 및 2%(v/v)에서 테스트한 루핀의 펩티드 추출물은 섬유아세포에 의해 분비된 MMP-3의 양을 각각 97%, 100% 및 98%만큼 감소시켰다(p < 0.05).

<201> 따라서, 선택된 실험 조건 하에, 루핀의 펩티드 추출물은 UVA 조사된 인간 피부의 섬유아세포에 의한 MMP-1, MMP-9 및 MMP-3의 생성과 관련하여 상당한 억제 특성을 나타내 보인다.

<202> VII. - 국소용 제제예

<203> 백분율(%)은 조성물의 총중량으로서 나타내었다. 루핀의 펩티드 추출물은 본 발명에 따른 10 중량%의 수용액 형태, 또는 동결 건조 분말로 칭해지는 분말형 펩티드 추출물의 형태로 사용한다.

<204> 1. 정상 피부의 붉은 반점에 작용하는 크림

<205>	펜타에리트리톨 테트라옥타노에이트	15.0~5.0(%)
<206>	글리세릴 스테아레이트	10.0~2.0
<207>	이소데실 네오펜타노에이트	10.0~2.0
<208>	프로필렌 글리콜	1.0~3.0
<209>	텍스트린	1.0~3.0
<210>	시클로메티콘	1.0~3.0
<211>	대두(대두 글리신) 추출물	0.1~10.0
<212>	루핀의 펩티드 추출물(10% 수용액)	0.1~10.0
<213>	이산화티탄	1.0~3.0
<214>	칸데릴라 왁스	
<215>	(유포비아 세리포라(<i>Euphorbia Cerifora</i>))	1.0~3.0

<216>	쌀 전분(오리자 사티바(<i>Oriza Sativa</i>))	1.0~3.0
<217>	비(非) 비누화 대두(대두 글리신)오일	0.01~10.0
<218>	카프릴산/카프르산 트리글리세라이드	0.5~5.0
<219>	PEG-100 스테아레이트	0.5~5.0
<220>	소포라 자포니카(<i>Sophora Japonica</i>) 추출물	0.1~10.00
<221>	스테아르산	0.5~1.0
<222>	토코페릴 아세테이트	0.1~1.0
<223>	페녹시에탄올	0.1~1.0
<224>	CI 77891	0.1~1.0
<225>	잔탄검	0.1~0.5
<226>	디메티코놀	0.1~0.5
<227>	폴리아크릴아미드	0.1~0.5
<228>	운모	0.1~0.5
<229>	세테아레스(Ceteareth)-20	0.1~0.5
<230>	클로르페네신	0.1~0.5
<231>	카르보머	0.1~0.5
<232>	옥틸 팔미테이트	0.1~0.5
<233>	트로메타민	0.1~0.5
<234>	틸랍	0.1~0.5
<235>	C ₁₃ ~C ₁₄ 이소파라핀	0.1~0.5
<236>	DEA 세틸 포스페이트	0.1~0.5
<237>	세틸 알콜	0.1~0.5
<238>	글루코스	0.1~0.5
<239>	향료	0.1~0.5
<240>	이나트륨 EDTA	0.1~0.5
<241>	물	적당량
<242>	총	100.000
<243>	2. 노화 방지 크림	
<244>	펜타에리트리톨 테트라옥타노에이트	3.0~15.0(%)
<245>	이소데실 네오펜타노에이트	3.0~15.0
<246>	스쿠알란	1.0~10.0
<247>	텍스트린	1.0~10.0
<248>	시클로메티콘	1.0~10.0
<249>	세테아릴 알콜	1.0~10.0
<250>	루핀의 펩티드 추출물(10% 수용액)	0.1~10.0

<251>	아스코르빌 글루코시드	0.1~10.0
<252>	글리세롤	1.0~10.0
<253>	라우레스(Laureth)-23	1.0~10.0
<254>	미리스틸 미리스테이트	1.0~10.0
<255>	시클로펜타실록산	1.0~10.0
<256>	나일론-6	1.0~10.0
<257>	아보카도 푸란	0.01~10.0
<258>	페녹시에탄올	0.1~1.0
<259>	세테아릴 글루코시드	0.1~1.0
<260>	향료	0.1~1.0
<261>	밀랍	0.1~1.0
<262>	메틸파라벤	0.1~0.5
<263>	구연산나트륨	0.1~0.5
<264>	디메티코놀	0.1~0.5
<265>	글리세릴 스테아레이트	0.1~0.5
<266>	이나트륨 EDTA	0.1~0.5
<267>	프로필렌파라벤	0.1~0.5
<268>	수산화나트륨	0.1~0.5
<269>	아크릴레이트/C ₁₀ ~C ₃₀ 알킬 아크릴레이트 가교중합체	0.1~0.5
<270>	잔탄검	0.1~0.5
<271>	글루코스	0.1~0.5
<272>	물	적당량
<273>	총	100.000
<274>	3. 성숙한 피부의 노화 방지 크림	
<275>	펜타에리트리톨 테트라옥타노에이트	1.0~10.0(%)
<276>	이소데실 네오펜타노에이트	1.0~10.0
<277>	수소화된 코코글리세라이드	1.0~10.0
<278>	시몬드시아 치넨시스(<i>Simmondsia Chinensis</i>)(호호바)	
<279>	종자유	1.0~10.0
<280>	스쿠알란	1.0~10.0
<281>	글리세롤	1.0~10.0
<282>	시클로메티콘	1.0~5.0
<283>	세테아릴 알콜	1.0~5.0
<284>	미리스틸 미리스테이트	1.0~5.0
<285>	라우레스(Laureth)-23	1.0~5.0

<286>	실리카	1.0~5.0
<287>	루핀의 펩티드 추출물(10% 수용액)	0.1~10.0
<288>	스클러로툼 검(Sclerotium gum)	0.1~1.0
<289>	아보카도 푸란	0.01~10.0
<290>	살리실산	0.1~10.0
<291>	밀랍	0.1~10.0
<292>	폴리아크릴아미드	0.1~1.0
<293>	페녹시에탄올	0.1~1.0
<294>	글리세릴 스테아레이트	0.1~1.0
<295>	레티놀 팔미테이트	0.01~5.0
<296>	세테아릴 글루코시드	0.01~5.0
<297>	나일론-6	0.01~5.0
<298>	이산화티탄	0.01~5.0
<299>	향료	0.1~5.0
<300>	토코페릴 아세테이트	0.1~5.0
<301>	칼륨 소르베이트	0.1~5.0
<302>	메틸파라벤	0.1~5.0
<303>	C ₁₃ ~C ₁₄ 이소파라핀	0.1~5.0
<304>	CI 77891	0.1~5.0
<305>	디메티코놀	0.1~5.0
<306>	프로필파라벤	0.1~5.0
<307>	수산화나트륨	0.1~5.0
<308>	라우레스(Laureth)-7	0.1~5.0
<309>	세테아릴 알콜	0.1~5.0
<310>	세틸 팔미테이트	0.1~5.0
<311>	코코글리세라이드	0.1~5.0
<312>	디나트륨 EDTA	0.1~0.5
<313>	CI 77491	0.1~0.5
<314>	구연산	0.1~0.5
<315>	물	적당량
<316>	총	100.000
<317>	4. 건성 내지 약건성 피부의 붉은 반점에 작용하는 크립	
<318>	바셀린	1.0~10.0(%)
<319>	수소화된 코코글리세라이드	1.0~10.0
<320>	이소데실 네오펜타노에이트	1.0~10.0

<321>	시몬드시아 치넨시스(호호바) 오일	1.0~2.0
<322>	부틸렌 글리콜	1.0~5.0
<323>	세테아릴 알콜	1.0~5.0
<324>	글리세롤	1.0~10.0
<325>	스쿠알란	1.0~10.0
<326>	루핀의 펩티드 추출물(10% 수용액)	0.1~10.0
<327>	라우레스(Laureth)-23	1.0~10.0
<328>	이산화티탄	1.0~10.0
<329>	비(非) 비누화 대두 글리신(대두) 오일	0.1~10.0
<330>	카프릴산/카프르산 트리글리세라이드	1.0~5.0
<331>	페녹시에탄올	0.1~1.0
<332>	세테아릴 글루코시드	0.1~1.0
<333>	대두 종자 추출물	0.1~10.0
<334>	향료	0.1~1.0
<335>	소포라 자포니카(<i>Sophora Japonica</i>)	0.1~10.0
<336>	토코페릴 아세테이트	0.1~1.0
<337>	칸데틸라 왁스	0.1~1.0
<338>	CI 77891	0.1~0.5
<339>	메틸파라벤	0.1~0.5
<340>	운모	0.1~0.5
<341>	프로필 파라벤	0.1~0.5
<342>	에틸헥실 팔미테이트	0.1~0.5
<343>	클로르페네신	0.1~0.3
<344>	아크릴레이트/C ₁₀ ~C ₃₀ 알킬 아크릴레이트 가교 중합체	0.1~0.3
<345>	잔탄검	0.1~0.3
<346>	이나트륨 EDTA	0.1~0.3
<347>	수산화나트륨	0.1~0.3
<348>	물	적당량
<349>	총	100.000
<350>	VIII. 양치액의 예	
<351>	백분율(%)은 조성물의 총중량으로 나타내었다. 루핀의 펩티드 추출물은 본 발명에 따른 10 중량% 수용액의 형태, 또는 동결건조 분말로 칭해지는 분말형 펩티드 추출물의 형태로 사용한다.	
<352>	1. 루핀의 10% 펩티드 추출물 수용액 + 방부제(트리클론산) + 안티플라그제(Gantrez S97BF(등록상표))	
<353>	루핀의 펩티드 추출물	2
<354>	에틸 알콜	10
<355>	글리세롤	10

<356>	40 몰 E0로 에톡시화된 수소화 피마자유	
<357>	(Cremophor co410)	0.5
<358>	폴리(메틸 비닐 에테르/말레산)(Gantrez S97BF(등록상표))	0.2
<359>	수산화나트륨	0.15
<360>	플루오르화나트륨	0.05
<361>	계피 민트 향료	0.1
<362>	트리클로산	0.03
<363>	염화아연	0.01
<364>	나트륨 사카린	0.01
<365>	색소 C.I. 16255(E 124)	0.0025
<366>	정제수	적당량
<367>	총	100
<368>	2. 루핀의 10% 펩티드 추출물 수용액 + 방부제(트리클론산)	
<369>	루핀의 펩티드 추출물	2
<370>	에틸 알콜	10
<371>	글리세롤	10
<372>	40 몰 E0로 에톡시화된 수소화 피마자유	
<373>	(Cremophor co410)	0.3
<374>	플루오르화나트륨	0.05
<375>	계피 민트 향료	0.1
<376>	트리클로산	0.03
<377>	염화아연	0.01
<378>	나트륨 사카린	0.01
<379>	색소 C.I. 16255(E 124)	0.0025
<380>	정제수	적당량
<381>	총	100
<382>	3. 루핀의 분말형 펩티드 추출물 + 방부제(세틸피리디늄 클로라이드)	
<383>	루핀의 펩티드 추출물	1
<384>	에틸 알콜	10
<385>	글리세롤	8
<386>	40 몰 E0로 에톡시화된 수소화 피마자유	
<387>	(Cremophor co410)	0.1
<388>	플루오르화나트륨	0.05
<389>	계피 민트 향료	0.01
<390>	세틸피리디늄 클로라이드	0.05
<391>	염화아연	0.01

<392>	나트륨 사카린	0.01
<393>	색소 C.I. 16255(E 124)	0.0025
<394>	정제수	적당량
<395>	총	100
<396>	IX. 치약의 예	
<397>	백분율(%)은 조성물의 총중량으로 나타내었다. 루핀의 펩티드 추출물은 본 발명에 따른 10 중량% 수용액의 형태, 또는 동결건조 분말로 칭해지는 분말형 펩티드 추출물의 형태로 사용한다.	
<398>	1. 루핀의 분말형 펩티드 추출물 + 플루오르화물	
<399>	루핀의 펩티드 추출물	1
<400>	나트륨 모노플루오로포스페이트	0.75
<401>	플루오르화나트륨	0.10
<402>	70% 솔비톨	35
<403>	강한 연마력을 가진 합성 실리카	13
<404>	약한 연마력을 가진 합성 실리카	5
<405>	나트륨 카르복시메틸셀룰로스	1.6
<406>	나트륨 라우릴 설페이트	1
<407>	멘톨 함유 향료	0.85
<408>	산화티탄	0.5
<409>	수산화나트륨 알칼리액	0.5
<410>	나트륨 시클라메이트	0.3
<411>	멘톨	0.15
<412>	나트륨 사카린	0.07
<413>	정제수	적당량
<414>	총	100
<415>	2. 루핀의 10% 펩티드 추출물 수용액 + 플루오르화물	
<416>	루핀의 펩티드 추출물	2
<417>	나트륨 모노플루오로포스페이트	0.75
<418>	플루오르화나트륨	0.10
<419>	70% 솔비톨	35
<420>	강한 연마력을 가진 합성 실리카	13
<421>	약한 연마력을 가진 합성 실리카	5
<422>	나트륨 카르복시메틸셀룰로스	1.6
<423>	나트륨 라우릴 설페이트	1
<424>	멘톨 함유 향료	0.85
<425>	산화티탄	0.5
<426>	수산화나트륨 알칼리액	0.5

<427>	나트륨 시클라메이트	0.3	
<428>	멘톨	0.15	
<429>	나트륨 사카린	0.07	
<430>	정제수	적당량	
<431>	총		100

도면의 간단한 설명

도 1은 비특이성 콜라게나제의 억제 - 펩티드 추출물의 농도의 영향간의 역학 관계를 나타내는 도면이다.

도면

도면1

