

	(19) 대한민국특허청(KR) (12) 공개특허공보(A)	(11) 공개번호 10-2014-0056196 (43) 공개일자 2014년05월09일
(51) 국제특허분류(Int. Cl.) A61K 31/185 (2006.01) A61P 9/10 (2006.01) A61P 27/02 (2006.01)	(71) 출원인 고려대학교 산학협력단 서울특별시 성북구 안암로 145, 고려대학교 (안암동5가)	
(21) 출원번호 10-2014-0034271(분할)	(72) 발명자 이광원 경기 성남시 분당구 양현로 220, 1104동 1901호 (이매동, 이매촌아파트)	
(22) 출원일자 2014년03월24일 심사청구일자 2014년03월24일	이지영 경북 울진군 울진읍 월변3길 11-17, (뒷면에 계속)	
(62) 원출원 특허 10-2012-0031986 원출원일자 2012년03월28일 심사청구일자 2012년03월28일	(74) 대리인 특허법인이지	

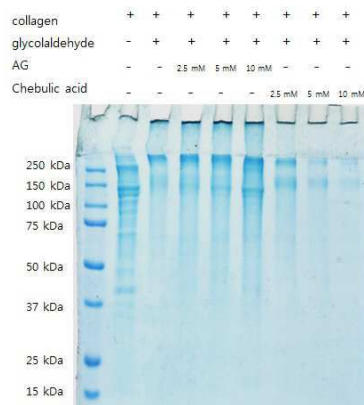
전체 청구항 수 : 총 4 항

(54) 발명의 명칭 **체불릭산을 유효성분으로 함유하는 최종당화산물의 교차결합 억제제 및 분해제**

(57) 요약

본 발명은 체불릭산을 유효성분으로 함유하며, 최종당화산물과 단백질 사이에 교차결합이 형성되는 것을 억제하고 형성된 교차결합을 분해하는 교차결합 억제제 및 분해제 약학적 조성물에 관한 것이다. 본 발명에 의하면, 체불릭산이 이미 형성된 최종당화산물과 단백질 사이의 교차결합 형성을 억제할 뿐만 아니라 분해하는 효능을 지니고 있기 때문에 조직 내 단백질, 예를 들어 콜라겐, 엘라스틴과 같은 단백질의 구조 변화를 억제하고 개선하여 이로 인한 질병의 발병을 감소시키거나 치료할 수 있는 이점이 있다.

대표도 - 도2



(72) 발명자

홍충의

서울 성북구 안암로 145, CJ 식품안전관 203호 (안암동5가, 고려대학교이과대학)

구윤창

서울 마포구 연남로 63-4, (연남동)

남미현

대구 동구 안심로22길 55, 712동 1206호 (율하동, 율하휴먼시아7단지)

양성용

서울 성북구 보문로 61, 606호 (보문동7가, 에이스오피스텔)

특허청구의 범위

청구항 1

체블릭산을 유효성분으로 함유하며, 최종당화산물과 단백질과의 교차결합 형성을 억제하는 것을 특징으로 하는 교차결합 억제제.

청구항 2

체블릭산을 유효성분으로 함유하며, 최종당화산물과 단백질과의 교차결합을 분해하는 것을 특징으로 하는 교차결합 분해제.

청구항 3

체블릭산을 유효성분으로 함유하며, 최종당화산물과 단백질과의 교차결합 형성을 억제하거나 분해하여 교차결합으로 매개된 노화, 백내장, 동맥경화, 치매, 또는 암을 예방 또는 치료하는 것을 특징으로 하는 약학적 조성물.

청구항 4

체블릭산을 유효성분으로 함유하며, 최종당화산물과 단백질과의 교차결합을 억제하거나 분해하여 교차결합으로 매개된 노화, 백내장, 동맥경화, 치매, 암, 피부탄력감소 또는 주름생성을 예방 또는 개선하는 것을 특징으로 하는 식품 조성물.

명세서

기술 분야

[0001] 본 발명은 체블릭산을 유효성분으로 함유하는 최종당화산물의 교차결합 억제제 및 분해제의 약학적 조성물에 관한 것이다. 더욱 상세하게, 본 발명은 체블릭산이 이미 형성된 최종당화산물과 단백질 사이의 교차결합 형성을 억제할 뿐만 아니라 분해하는 효능을 지니고 있기 때문에 조직 내 단백질, 예를 들어 콜라겐, 엘라스틴과 같은 단백질의 구조 변화를 억제하고 개선하여 이로 인한 질병의 발병을 감소시키거나 치료할 수 있는 체블릭산을 유효성분으로 함유하는 최종당화산물의 교차결합 억제제 및 분해제에 관한 것이다.

배경 기술

[0002] 단백질의 비효소적 당화반응 (Nonenzymatic glycation reaction)이란, 단백질의 리신 잔기 등의 아미노산 그룹과 환원당이 효소의 작용 없이 일어나는 반응으로, 이 반응의 결과로 최종당화산물 (Advanced glycation endproducts, AGEs)이 형성된다. 단백질의 비효소적 당화반응은 단백질의 유리 아미노기인 리신 (lysine)이나, 알기닌(arginine)과 환원당의 카르보닐기 (carbonyl group)가 반응하여 초기 당화반응 생성물인 슈프 염기 (Schiff base)를 형성하고 이때 형성된 화합물들이 계속적으로 축합, 재전위, 산화, 분열, 고리화 등의 일련의 복잡한 반응을 통하여 갈색의 화합물 (melanoidine)을 만들어 총체적인 개념의 비가역적 최종당화산물을 형성하는 반응이다.

[0003] 가역적인 아마도리형 초기당화산물과 달리 최종당화산물은 비가역적인 반응산물이므로 일단 생성되면 혈당이 정상적으로 회복되어도 분해되지 않고 단백질의 생존기간 동안 조직에 축적되어 조직의 구조와 기능을 비정상적으로 변화시킨다. 비교적 반감기가 긴 콜라겐 (collagen)은 쉽게 당화반응이 일어나고 이미 형성된 최종당화산물과 콜라겐의 교차결합 (cross-linking)을 형성하여 체내의 구조 및 기타 단백질 결합 조직 등의 비정상적인 물리화학적 변화를 초래한다. 또한, 다양한 세포 타입에 대한 특이적 수용체에 의해 인식되어 당뇨병성 망막병증 (retinopathy), 당뇨병성 백내장 (cataract), 당뇨병성 신증 (nephropathy) 및 노화를 일으킨다.

[0004] 합성 의약품인 아미노구아니딘 (aminoguanidine)은 친핵성 히드라진 (hydrazine)으로 축합반응의 산물과 결합하여 최종당화산물의 생성을 억제하여 합병증으로 진전되는 것을 방지한다. 아미노구아니딘은 당뇨병병증의 예방 및 치료에 가장 유망한 의약품으로 제 3상 임상시험까지 진행되었으나, 장기간 투여 시 독성이 유발되는 문제점이 있어 더욱 안전한 약제의 개발이 필요한 실정이다.

- [0005] ALT-711은 이미 형성된 최종당화산물의 교차결합을 분해하는 약물로 개발되었다. ATL-711은 친핵성 물질로서 이미 형성된 최종당화산물 교차결합의 친전자성인 디카르보닐기 (dicarbonyl group) 등을 공격한다. 스트렙토조토신 (streptozotocin, STZ)으로 유도한 당뇨쥐에서 ALT-711을 투여하면 당뇨로 인한 합병증을 완화해준다는 보고가 있다.
- [0006] 가자(Terminalia chebula)는 인도 등에 분포하며 아시아 지역에서 사용되는 전통약재로서 출혈, 후두염, 설사, 구토 등의 치료에 사용되고 있다. 또한 가자 열매는 항당뇨, 항산화, 항암 효과가 있다고 알려져 있고, 최종당화산물로 인한 혈관내피세포 장애 예방에 효과가 있다고 알려져 있다(Lee HS *et al.*, Inhibitory effects of Terminalia chebula extract on glycation and endothelial cell adhesion., Planta Med. 2011 Jul;77(10):1060 7. Epub 2011 Feb 9.) 가자는 안전성이 입증된 천연식물로서 이로부터 분리해낸 체블릭산의 최종당화산물의 교차결합 억제 및 분해에 관한 연구사례는 전혀 보고된 바가 없다.
- [0007] 이에 본 발명자들은 부작용이 없고 안전성이 확보되면서도 최종당화산물로 인한 교차결합 억제 및 분해 효과에 우수한 효능을 나타내는 소재를 천연물로부터 개발하고자 연구를 거듭하였으며, 그 결과 체블릭산이 최종당화산물로 인한 교차결합 억제 및 분해제로서 이용가능성을 확인함으로써 본 발명을 완성하게 되었다.
- [0008] 본 발명의 배경이 되는 기술로는, 대한민국 등록 특허 10-0814368(2008.03.18)에 체블릭산을 유효성분으로 함유하는 당뇨/당뇨합병증 예방또는 치료용 조성물이 기재되어 있고, 대한민국 공개특허 10-2008-0092664(2008.10.16)에는 체블릭 산을 유효성분으로 함유하는 당뇨 및 당뇨합병증예방/치료용 조성물이 기재되어 있으나, 최종당화산물(AGE, advanced glycation end-product)의 생성을 억제하는 기작으로 작용한다고 기재되어 있을 뿐, 최종당화산물과 콜라겐의 교차결합 억제 및 분해 효능으로 콜라겐, 엘라스틴과 같은 단백질 구조 변화를 개선하는 것에 대해서는 전혀 기재되어 있지 않습니다.

선행기술문헌

특허문헌

- [0009] (특허문헌 0001) 대한민국 등록 특허 10-0814368(2008.03.18)
(특허문헌 0002) 대한민국 공개특허 10-2008-0092664(2008.10.16)

비특허문헌

- [0010] (비특허문헌 0001) Lee HS *et al.*, Inhibitory effects of Terminalia chebula extract on glycation and endothelial cell adhesion., Planta Med. 2011 Jul;77(10):1060 7. Epub 2011 Feb 9.

발명의 내용

해결하려는 과제

- [0011] 본 발명의 목적은 독성 및 부작용이 없으면서도 우수한 효능을 나타내는 체블릭산을 유효성분으로 함유하는 최종당화산물의 교차결합 억제 및 분해를 위한 약학적 조성물을 제공하고자 하는 것이다.
- [0012] 본 발명의 다른 목적 및 이점은 하기의 발명의 상세한 설명, 청구범위 및 도면에 의해 더욱 명확하게 된다.

과제의 해결 수단

- [0013] 본 발명의 일 측면에 따르면, 본 발명은 체블릭산을 유효성분으로 함유하며, 콜라겐으로 인한 최종당화산물 형성을 억제하는 것을 특징으로 하는 당화저해제를 제공한다.
- [0014] 본 발명에 의하면 체블릭산은 콜라겐으로 인한 최종당화산물 생성 저해 효능이 매우 우수하다. 특히 도 1 및 도 2에 나타난 바와 같이, 양성대조군으로서 사용된 아미노구아니딘 보다 더 우수한 최종당화산물 생성 저해 효능

을 보여주었다.

- [0015] 본 발명의 다른 측면에 따르면, 본 발명은 체불릭산을 유효성분으로 함유하며, 최종당화산물과 단백질과의 교차결합 형성을 억제하는 것을 특징으로 하는 교차결합 억제제를 제공한다.
- [0016] 본 발명에 의하면 체불릭산은 최종당화산물과 단백질과의 교차결합 형성을 억제하는 효능이 매우 우수한 것으로 나타났다. 특히 도 3 및 도 4에 나타난 바와 같이 체불릭산이 양성 대조군으로서 아미노구아니딘 보다 교차결합 형성 억제 효능이 월등히 높았다.
- [0017] 본 발명의 또 다른 측면에 따르면, 본 발명은 체불릭산을 유효성분으로 함유하며, 최종당화산물과 단백질과의 교차결합을 분해하는 것을 특징으로 하는 교차결합 분해제를 제공한다.
- [0018] 본 발명에 의하면 체불릭산이 이미 형성된 최종당화산물과 단백질과의 사이의 교차결합을 분해하는 효능을 지니고 있음을 확인되었다. 특히 도 5 ~ 도 7에 나타난 바와 같이 체불릭산이 양성대조군인 ALT-711 보다 높은 교차결합 분해 효능을 나타냄을 확인할 수 있다.
- [0019] 본 발명의 또 다른 측면에 따르면, 본 발명은 체불릭산을 유효성분으로 함유하며, 최종당화산물과 단백질과의 교차결합 형성을 억제하거나 분해하여 교차결합으로 매개된 노화, 백내장, 동맥경화, 치매, 또는 암을 예방 또는 치료하는 것을 특징으로 하는 약학적 조성물을 제공한다.
- [0020] 본 발명의 또 다른 측면에 따르면, 본 발명은 체불릭산을 유효성분으로 함유하며, 최종당화산물과 단백질과의 교차결합을 억제하거나 분해하여 교차결합으로 매개된 노화, 백내장, 동맥경화, 치매, 암, 피부탄력감소 또는 주름생성을 예방 또는 개선하는 것을 특징으로 하는 식품 조성물을 제공한다.
- [0021] 상술한 바와 같이, 체불릭산은 최종당화산물과 단백질과의 교차결합 형성을 억제하거나 분해하는 효능이 우수하므로, 교차결합으로 매개된 노화, 백내장, 동맥경화, 치매, 또는 암을 예방, 또는 치료할 수 있는 체불릭산을 유효성분으로 함유하는 약학적 조성물을 제공할 수 있다. 또한, 교차결합으로 매개된 노화, 백내장, 동맥경화, 치매, 암, 피부탄력감소 또는 주름생성을 예방 또는 개선하기 위해 가자로부터 분리된 천연추출물인 체불릭산을 함유하는 기능성 식품 조성물을 제공할 수 있다(Age-related changes in the content of the collagen crosslink, pyridinoline, The Journal of Biochemistry volume 87, Issue 4, Pp. 933-935 Received May 25, 1978; Urinary excretion of the hydroxypyridinium cross links of collagen in patients with rheumatoid arthritis. Annals of the Rheumatic Disease The Euler Journal 1989;48:641-644 doi:10.1136/ard.48.8.641; The Effect of Ascorbic Acid on the Enzyme Reaction in Pyridinoline Formation during Soluble Collagen Maturation, 한국식품영양과학회지 제27권 제2호, 1998.4, 305-312 (8 pages); 자외선에 의해 피부가 손상된 hairless mouse에서의 hydroxyproline, Pro-Hyp 경구반복투여시 피부 상태 개선 효과, 한국식품과학회지 vol. 40, No. 4, pp. 436-442 (2008); Quantitative Changes of Collagen and Malonedialdehyde as the Parameters of Skin Alteration, Journal of the society of cosmetic scientists of Korea / v.30 no.1, 2004년, pp.135-140 등).
- [0022] 본 발명에서 상기 단백질은 특별한 제한은 없으나, 바람직하게는 콜라겐 또는 엘라스틴이다.
- [0023] 본 발명의 체불릭산은 가자로부터 분리, 정제될 수도 있으며, 상기 화합물을 함유하는 다른 여러 식물에서 분리할 수도 있고, 천연물에서 분리하는 것만이 아니라 화학적으로 합성하여 사용하여도 무방하다.
- [0024] 본 발명의 당화저해제, 교차결합 억제제 또는 교차결합 분해제는 약학적 조성물로서, 상기 체불릭산에 추가로 동일 또는 유사한 기능을 나타내는 유효성분을 1종 이상 함유할 수 있고, 임상 투여시에 경구 또는 비경구 투여가 가능하며, 일반적인 의약품 제제 형태로 사용될 수 있다. 이 경우 약제학적으로 허용되는 담체를 함께 사용할 수 있는데, 상기 약제학적으로 허용되는 담체는 멸균용액, 정제, 코팅정 및 캡슐과 같은 공지된 제형들에 사용될 수 있는 표준의 약제학적 담체라면 어느 것이든 가능하다. 통상적으로 담체는 전분, 밀크, 당, 특정 종류의 클레이, 젤라틴, 스테아린산, 탈크, 식물성 기름 또는 오일, 검, 글리콜류 등의 부형제 또는 기타 다른 공지의 부형제를 포함할 수 있으며 또한 풍미제, 색소 첨가제 및 다른 성분들이 포함될 수 있다.
- [0025] 본 발명의 체불릭산을 유효성분으로 함유한 조성물을 투여하기 위한 제제는 통상적인 방법으로 경구, 정맥내, 근육내, 경피 투여의 방법에 의해 투여할 수 있지만, 이들 방법에만 한정되는 것은 아니다. 실제 임상투여시에 경구 및 비경구의 여러 가지 제형으로 투여될 수 있는데, 제제화할 경우에는 보통 사용하는 충전제, 증량제, 결합제, 습윤제, 분해제, 계면활성제 등의 희석제 또는 부형제를 사용하여 조제된다. 경구투여를 위한 고형제제는 정제, 환제, 산제, 과립제 및 캡슐제 등이 포함되며, 이러한 고형제제는 적어도 하나 이상의 부형제 예를 들

면, 전분, 칼슘카보네이트, 수크로스 또는 락토오스, 젤라틴 등을 섞어 조제한다. 또한 단순한 부형제 이외에, 마그네슘 스티레이트 탈크 같은 윤활제들도 사용된다. 경구를 위한 액상제제로는 현탁제, 내용액제, 유제, 시럽제 등이 해당되는데 흔히 사용되는 단순 희석제인 물, 리퀴드 파라핀 이외에 여러 가지 부형제, 예를 들면 습윤제, 감미제, 방향제 및 보존제가 포함될 수 있다. 또한, 본 발명의 조성물은 비경구로 투여할 수 있으며, 비경구 투여는 피하주사, 정맥주사 또는 근육내 주사에 의한다. 비경구 투여용 제형으로 제제화하기 위해서는 상기 체불리산을 포함하여 안정제 또는 완충제와 함께 물에서 혼합하여 용액 또는 현탁액으로 제조하고 이를 앰플 또는 바이알의 단위 투여형으로 제제한다.

[0026] 본 약학적 조성물의 투여량은 체내에서 활성성분의 흡수도, 불활성화율, 배설속도, 환자의 연령, 성별 및 상태, 치료할 질병의 중증 정도에 따라 적절히 선택되나, 일반적으로 1일에 1회 내지 5회 나누어 투여할 수 있다. 본 발명의 조성물에서 상기 체불리산을 유효성분으로 함유하는 경우, 그 유효용량은 1~2000 mg/kg/day 이고, 바람직하기로는 1~100 mg/kg/day 이다. 상기 제제의 정확한 양, 투여경로 및 횟수는 제제의 특성, 투여 대상의 체중 및 상태, 그리고 사용하고자 하는 특정 유도체의 특성에 따라 용이하게 결정할 수 있다.

[0027] 본 발명에서 상기 체불리산을 실험용 랫트를 대상으로 한 급성독성검사 결과, 경구투여시 최소치사량(LD50)은 적어도 1g/kg 이상으로 전혀 독성효과를 나타내지 않음으로써 생체 안전성이 매우 높다는 것을 알 수 있다.

[0028] 본 발명의 체불리산을 식품 첨가물로 사용할 경우, 상기 체불리산을 그대로 첨가하거나 다른 식품 또는 식품 성분과 함께 사용될 수 있고, 통상적인 방법에 따라 적절하게 사용될 수 있다. 유효 성분의 혼합량은 그의 사용 목적(예방, 건강 또는 치료적 처치)에 따라 적합하게 결정될 수 있다.

[0029] 본 발명의 또 다른 측면에 따르면, 본 발명은 체불리산 또는 이를 포함하는 가자 추출물(또는 분획물)을 유효성분으로 함유하며, 피부노화, 피부 탄력 감소 또는 주름 생성을 방지하거나 개선하는 기능성 화장품 조성물을 제공한다.

[0030] 상술한 바와 같이, 체불리산은 최종당화산물의 교차결합 억제 및 분해 효과가 있으므로, 콜라겐 등의 단백질 구조의 물리화학적 변화를 억제 또는 개선하여, 피부노화, 피부 탄력 감소 또는 주름 생성을 방지하거나 개선하는 기능성 화장품 조성물로 유용하게 이용될 수 있다.

[0031] 본 발명에 있어서 체불리산을 포함하는 가자 추출물 또는 분획물은 예를 들어 본 발명자의 특허 등록 제10-0814368호에 기재된 방법에 의해 추출될 수 있다.

[0032] 화장품 조성물에 포함되는 성분은 체불리산 또는 가자 추출물(또는 분획물) 이외에 화장품 조성물에 통상적으로 이용되는 성분들을 포함하며, 예를 들어 향산화제, 안정화제, 용제, 비타민, 안료 및 향료와 같은 통상적인 보조제, 그리고 담체를 포함할 수 있다. 또한 상기 화장품 조성물은 그 효과를 증진시키기 위해 피부 흡수 촉진제를 추가로 포함할 수 있다.

[0033] 본 발명의 화장품 조성물은 당업계에서 통상적으로 제조되는 어떠한 제형으로도 제조될 수 있으며, 예를 들어 용액, 현탁액, 유탁액, 페이스트, 젤, 크림, 로션, 파우더, 비누, 오일, 분말 파운데이션, 유탁액 파운데이션, 왁스 파운데이션 또는 스프레이 등으로 제형화 될 수 있다. 보다 상세하게는 유연 화장수, 영양 화장수, 영양 크림, 마사지 크림, 에센스, 아이 크림, 클렌징 크림, 클렌징 폼, 클렌징 워터, 팩, 스프레이 또는 파우더의 제형으로 제조될 수 있다.

[0034] 본 발명에 따른 체불리산 또는 가자 추출물(또는 분획물)은 화장품 총 중량에 대해 0.001 ~ 50 중량%의 양으로 첨가되어 사용될 수 있지만 이에 한정되는 것은 아니다.

발명의 효과

[0035] 본 발명에 따르면, 가자로부터 분리해 낸 체불리산을 유효성분으로 하는 조성물은 천연물을 원료로 하여 인체에 대한 독성, 부작용의 문제를 해결할 수 있을 뿐만 아니라 우수한 최종당화산물의 교차결합 억제 및 분해 효능을 나타낸다.

[0036] 또한, 상기 화합물은 이미 형성된 최종당화산물과 단백질 사이의 교차결합 형성을 억제할 뿐만 아니라 분해하는 효능을 지니고 있기 때문에 조직 내 단백질, 예를 들어 콜라겐, 엘라스틴과 같은 단백질의 구조 변화 억제 및 개선하여 이로 인한 당뇨병 망막병증, 백내장, 당뇨병 신장병, 당뇨병 신경병증, 피부의 탄력 감소 및 주름 등의 발생을 감소시킬 수 있다. 나아가, 본 발명에 의한 체불리산을 함유하는 조성물은 진행 노화 또는 상기 언급

한 병리 중 하나로 고생하는 환자들에게서 상기 질환 및 관련 질환의 치료효과를 도모할 수 있다.

도면의 간단한 설명

[0037] 도 1은 본 발명에 의한 체불릭산의 당화 저해 활성을 보인 도면이다.

도 2는 본 발명에 따른 체불릭산에 의한 최종당화산물 형성 저해 효능을 평가한 결과를 나타낸 도면이다.

도 3은 본 발명에 따른 체불릭산에 의한 최종당화산물과 콜라겐 사이의 교차결합 형성 억제 효능을 ELISA법으로 평가한 결과를 나타낸 도면이다.

도 4는 본 발명에 따른 체불릭산에 의한 최종당화산물과 콜라겐 사이의 교차결합 형성 억제 효능을 SDS-PAGE로 평가한 결과를 나타낸 도면이다.

도 5는 본 발명에 따른 체불릭산에 의한 최종당화산물과 콜라겐 사이의 교차결합 형성 분해 효능을 ELISA법으로 평가한 결과를 나타낸 도면이다.

도 6은 본 발명에 따른 체불릭산에 의한 최종당화산물과 콜라겐 사이의 교차결합 형성 분해 효능을 SDS-PAGE로 평가한 결과를 나타낸 도면이다.

도 7은 본 발명에 따른 체불릭산에 의한 최종당화산물과 콜라겐 사이의 교차결합 형성 분해 효능을 웨스턴-블롯 분석(Western-blot assay)으로 평가한 결과를 나타낸 도면이다.

발명을 실시하기 위한 구체적인 내용

[0038] 이하, 첨부된 도면을 참조하여 실시예를 통하여 본 발명을 더욱 상세하게 설명하고자 한다. 이들 실시예는 오로지 본 발명을 보다 구체적으로 설명하기 위한 것으로, 본 발명의 요지에 따라 본 발명의 범위가 이들 실시예만 국한되지 않는다는 것은 당업계에서 통상의 지식을 가진 자에 있어서 자명할 것이다.

실시예 1. 콜라겐을 이용한 당화반응 저해 능력의 평가 (in vitro)

[0040] 본 실시예에서는 단백질을 1.5 mg/ml 콜라겐을 이용하여 체불릭산의 당화 저해 능력을 측정하였다. 당뇨병으로 인해 콜라겐은 광범위하게 화학적인 변화를 일으켜 그 결과 용해도가 감소하며 효소에 대한 반응성이 줄어들고 교차결합을 형성하게 된다. 콜라겐은 조직을 구성하는 중요한 단백질 중의 하나로 당뇨병으로 인해 화학적 구조 변화로 조직에 손상을 주기 때문에 중요하다. 10 mM 글리코알데히드(glycolaldehyde), 1 mM DTPA와 0.1 M 인산염 완충액(phosphate buffer, pH 7.4), 미생물 억제제로 아지드화나트륨(sodium azide) 0.02%와 체불릭 산을 사용하여 37℃에서 7일간 암소 보관하였다.

[0041] 당화 반응이 진행되면 일련의 산화, 축합 등의 복합적인 과정을 거쳐 여러 화합물이 혼재되어 있는 최종당화산물이 만들어진다. 이 최종당화산물은 중 일부는 형광을 띄게 되어 당화 반응의 정도를 가늠할 수 있다. 본 발명자들은 체불릭산이 가지는 최종당화산물 생성 억제 정도를 여기 (excitation) 파장 370 nm, 발광 (emission) 파장 440 nm에서 형광광도계를 이용하여 측정하였다. 최종당화산물의 생성 억제능은 당이 전혀 없는 대조군(control)의 값을 100% 억제능으로 하고, 당과 단백질이 모두 있는 당화반응 군의 값을 0%로 하여 나타내었으며 양성 대조군으로서 아미노 구아니딘을 사용하였다. 아래 표 1에서 자세한 조성을 나타내었다. 그 결과는 도 1에 나타내었다.

[0042] 도 1에서 나타내는 바와 같이, 체불릭산은 양성대조군인 아미노구아니딘 보다 더 우수한 최종당화산물 생성 저해 효능을 보여주었다.

표 1

Component (final concentration)	Control	Glycation	Positive control	sample
collagen (1.5 mg/ml)	●	●	●	●
Glycolaldehyde (10 mM)		●	●	●
DTPA (1 mM)	●	●	●	●
Sodium azide (0.02%)	●	●	●	●

0.1 M Phosphate buffer (pH 7.4)	●	●	●	●
Sample or inhibitor			Aminoguanidine	Chebolic acid

[0044] 또한 도 2에서 나타내는 바와 같이 SDS-PAGE를 수행하여 체블릭산의 최종당화산물 형성 저해 효능을 보였다. Laemmli의 SDS-PAGE 법을 이용하여 실험을 진행하였으며 당화반응 혼합물(mixture)은 SDS-PAGE sample buffer(60 mM Tris-HCl, pH 6.8; 2% (w/v) SDS; 10% (v/v) glycerol; 5% (v/v) 2-mercaptoethanol; 0.01% (w/v) bromophenol blue)에 섞어 100℃에서 5분간 끓인 다음, 4% stacking gel, 10% separating gel에 동량의 샘플을 로딩하였다. 이는 파워 서플라이를 통해 100 V, 70 mA로 전원을 공급하여 러닝하여 쿠마시블루 염색을 실시하였다.

[0045] 도 2를 통해 그 결과를 나타내었으며, 당화 반응을 일으킨 콜라겐은 고분자의 물질을 형성하게 되므로 젤(gel)의 윗부분의 밴드가 진해지는 것을 확인할 수 있으며, 체블릭산을 처리한 그룹은 윗부분의 밴드가 감소함으로 보아 최종당화산물 형성 억제 효능을 나타냄을 확인할 수 있다.

[0046] 실시예 2. 최종당화산물과 콜라겐 사이의 교차결합 형성 억제효능 평가 (in vitro)

[0047] 2-1. ELISA (Enzyme linked immunosorbant assay)를 이용한 교차결합 형성 억제 효능 평가

[0048] ELISA 법을 이용하여 다음과 같이 최종당화산물의 교차결합 억제 효능에 대해 평가하였다. 콜라겐(collagen)이 코팅된 96-웰 플레이트 (96-well plate)에 서양고추냉이 과산화효소가 표지된 AGE (horseradish peroxidase labeled AGE)와 함께 양성대조군인 아미노구아니딘 (Aminoguanidine)과 다양한 농도의 체블릭산을 37℃에서 4시간 동안 인큐베이션 (incubation)하였다. 0.05% PBST에 5번 세척 (washing) 하여 미부착 AGE-BSA (unattached AGE-BSA)를 제거하였다. AGE-BSA의 교차결합(cross-linking) 정도를 확인하기 위해, TMB를 기질 (substrate)로 하여 발색 후 450 nm에서 흡광도를 측정하였다. AGE의 교차결합 저해 (cross-linking inhibition) %는 다음 수학적 식 1과 같이 계산한다.

수학적 식 1

$$\text{Inhibition of AGE induced cross-linking(\%)} = 100 - \left\{ \frac{\text{absorbance of sample treated well}}{\text{absorbance of sample untreated well}} \times 100 \right\}$$

[0049]

[0050] 그 결과, 도 3에서 나타내는 바와 같이 체블릭산이 양성 대조군인 아미노구아니딘 보다 교차결합 형성 억제 효능이 월등히 높게 나타났다.

[0051] 2-2. SDS-PAGE를 이용한 교차결합 형성 억제 효능 평가

[0052] 본 실험에서는 상기 실시예 1에 기재한 방법과 마찬가지로 SDS-PAGE를 통해 체블릭산의 교차결합 형성 억제 효능에 대해 실험하였다. 그 결과는 도 4에 나타내었다. 교차결합을 형성한 처리군은 gel의 위치상 위쪽에서 밴드를 확인할 수 있으나 체블릭산을 처리하였을 때는 밴드의 세기가 감소하는 것으로 보아 교차결합 형성을 억제하는 것을 확인할 수 있다.

[0053] 실시예 3. 최종당화산물과 콜라겐 사이의 교차결합 형성 분해효능 평가 (in vitro)

[0054] 3-1. ELISA (Enzyme linked immunosorbant assay)Enzyme linked immunosorbant assay를 이용한 교차결합 형성 분해 효능 평가

[0055] 본 실험에서는 이미 형성된 교차결합의 분해 효능을 알아보기 위해 ELISA 법을 이용하여 실험을 수행하였다. 콜라겐(collagen)이 코팅된 96-웰 플레이트 (96-well plate)에 서양고추냉이 과산화효소가 표지된 AGE (horseradish peroxidase labeled AGE)를 분주한 후 37℃에서 4시간 동안 인큐베이션 (incubation)하여 AGE와 콜라겐 (collagen)을 교차결합 (cross-linking) 시켰다. 0.05% PBST에 5번 세척 (washing) 하여 미부착 AGE

(unattached AGE)를 제거하고 AGE 교차결합 분해제 (cross-link breaker)로 잘 알려진 ALT-711과 다양한 농도의 체불릭산을 처리하여 37℃에서 16시간 반응시켰다. 이후, 0.05% PBST에 5번 세척 (washing) 한 후 남아있는 콜라겐 (collagen)과 교차결합 (cross-link) 된 AGE-BSA를 확인하기 위해 TMB를 기질 (substrate)로 하여 발색 후 450 nm에서 흡광도를 측정하였다. AGE의 교차결합 분해 (cross-linking breaking) %는 상기 수식식 1과 동일한 방법으로 계산한다. 그 결과는 도 5에 나타내었다.

[0056] 도 5에서 나타나는 바와 같이 체불릭산이 양성대조군인 ALT-711 보다 높은 교차결합 분해 효능을 나타냄을 확인할 수 있다.

[0057] 3-2. SDS-PAGE를 이용한 교차결합 분해 효능 평가

[0058] 본 실험에서는 상기 실시예 1에서 기재한 방법과 마찬가지로 SDS-PAGE를 통해 체불릭산의 교차결합 분해 효능에 대해 실험하였다. 그 결과는 도 6에 나타내었다.

[0059] 도 6에서 나타나는 바와 같이 체불릭산을 처리하였을 때 밴드의 세기가 감소하는 것으로 보아 이미 형성된 교차결합을 분해하였음을 확인할 수 있다.

[0060] 3-3. 웨스턴 블롯 분석 (Western-blot assay)을 통한 교차결합 분해 효능 평가

[0061] 본 실험에서는 교차결합 분해 효능을 AGE 항체의 특이적인 반응을 통해 알아보기 위하여 웨스턴 블롯 분석 (western-blot assay)를 수행하였다. 상기 실시예 1에서와 마찬가지로 SDS-PAGE를 수행한 후 PVDF membrane에 전이시키고 nonspecific binding을 줄이기 위해 5% skim milk에 30분 반응시킨 후, 4℃에서 1차 항체인 AGEs monoclonal antibody로 overnight 시켰다. TBST로 세척 후 2차 항체로 1시간 반응 시킨 뒤 ECL solution을 이용하여 밴드를 검출하였다. 그 결과는 도 7에서 나타내었다.

[0062] 도 7에서 나타내는 바와 같이 체불릭산을 처리하였을 경우 밴드의 세기가 감소하는 것을 확인할 수 있다. 이것으로 보아 체불릭산이 이미 형성된 최종당화산물과 콜라겐 사이의 교차결합을 분해하는 효능을 지니고 있음을 확인할 수 있다.

[0063] 제제예 1 : 정제의 제조

[0064] 체불릭산 100mg, 옥수수전분 90.0mg, 유당 175.0mg, 엘-히드록시프로필셀룰로오스 15.0mg, 폴리비닐피롤리돈 905.0mg 및 에탄올 적량의 원료를 균질하게 혼합하여 습식과립법으로 과립화하고 스테아린산 마그네슘 1.8mg을 가하여 혼합한 후 1정이 400mg이 되도록 타정하였다.

[0065] 제제예 2. 유연 화장수(스킨)의 제조

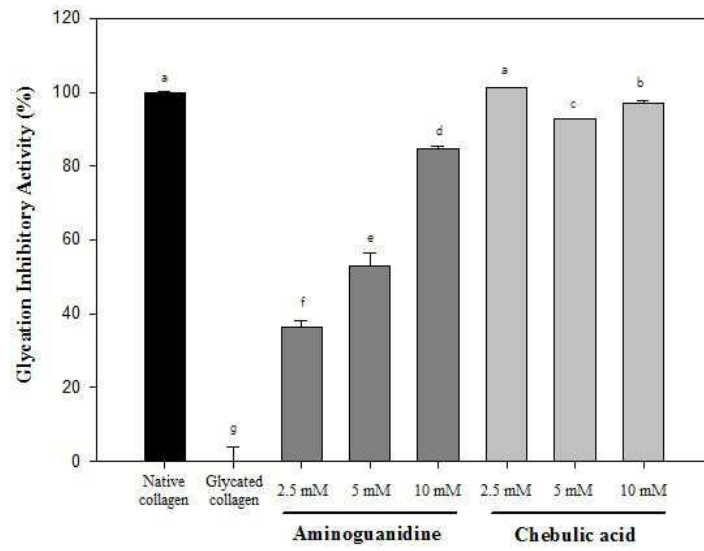
[0066] 체불릭산을 함유한 유연 화장수의 성분과 함량은 하기에 나타내었다. 수성 성분에 정제수를 가하고 실온에서 용해시켜 수상을 제조하였다. 체불릭산, 유성성분, 유화제, 방부제, 향을 실온에서 용해시킨 후, 수상에 첨가하여 혼합하고 여과하였다.

[0067] 유연 화장수는 체불릭산 0.1(중량%), EDTA 0.05(중량%), PEG 1500 4.00(중량%), 카보머 0.16(중량%), 1,3-부틸렌글리콜 3.00(중량%), 폴리옥시에틸렌 하이드로제네이티드 캐스터 오일 0.45(중량%), 트리에탄올아민 0.12(중량%), 방부제, 향, 색소 미량, 정제수 잔량으로 합계 100으로 제조하였다.

[0068] 이상으로 본 발명의 특정한 부분을 상세히 기술하였으나, 당업계의 통상의 지식을 가진 자에게 있어 이러한 구체적인 기술은 단지 바람직한 구현예일 뿐이며, 이에 본 발명의 범위가 제한되는 것이 아닌 점은 명백하다. 따라서 본 발명의 실질적인 범위는 첨부된 청구항과 그의 균등물에 의하여 정의된다고 할 것이다.

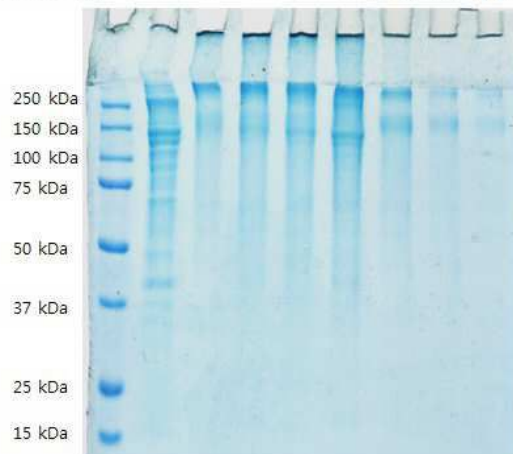
도면

도면1

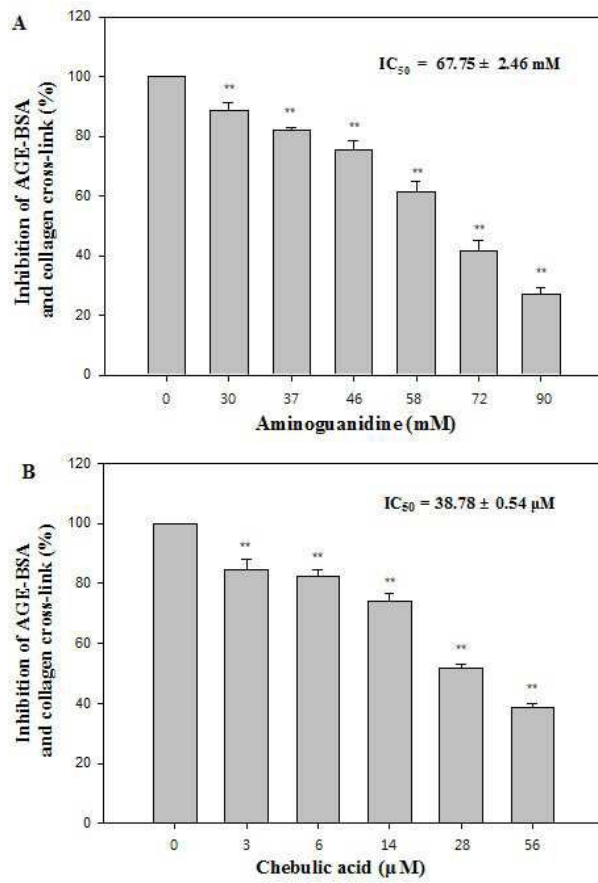


도면2

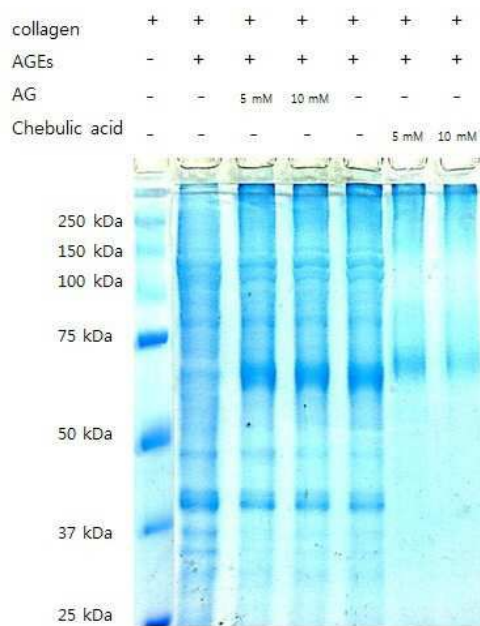
collagen	+	+	+	+	+	+	+	+
glycolaldehyde	-	+	+	+	+	+	+	+
AG	-	-	2.5 mM	5 mM	10 mM	-	-	-
Chebulic acid	-	-	-	-	-	2.5 mM	5 mM	10 mM



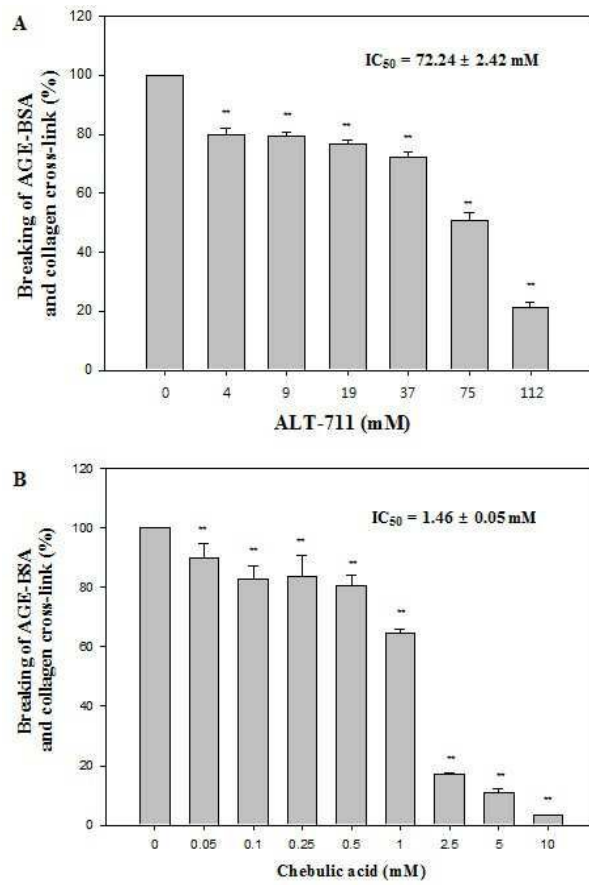
도면3



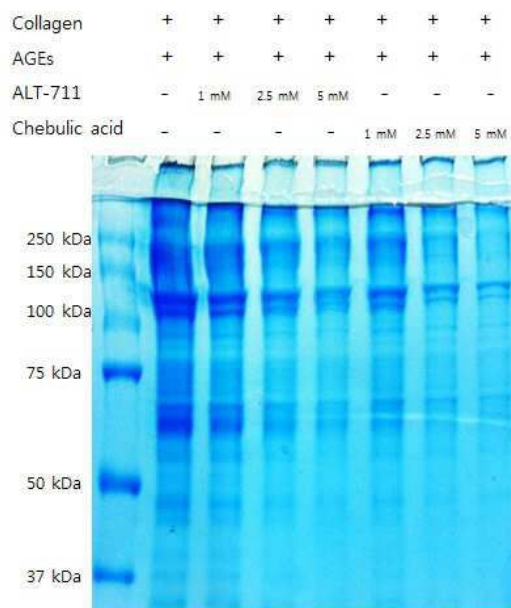
도면4



도면5



도면6



도면7

