(19) 대한민국특허청(KR)
(12) 공개특허공보(A)

(11) 공개번호 10-2020-0051868
(43) 공개일자 2020년05월14일

(51) 국제특허분류(Int. Cl.)
A61K 31/726 (2006.01) *A23L 33/10* (2016.01)
A61K 31/192 (2006.01) *A61K 31/65* (2006.01)
A61K 31/7048 (2006.01) *A61K 31/7056* (2006.01)
A61K 8/04 (2006.01) *A61K 8/368* (2006.01)
A61K 8/73 (2006.01) *A61K 9/06* (2006.01)
A61P 17/10 (2006.01)
(52) CPC특허분류
A61K 31/726 (2013.01)
A23L 33/10 (2016.08)
(21) 출원번호 10-2018-0134247
(22) 출원일자 2018년11월05일
심사청구일자 2018년11월05일

(71) 출원인
부경대학교 산학협력단
부산광역시 남구 신선로 365 (용당동, 부경대학교)
(72) 발명자
정원교
부산광역시 남구 분포로 111, 128동 2101호(용호동, 엘지메트로시티)
김영목
부산광역시 남구 분포로 111, 109동 1103호(용호동, 엘지메트로시티)
(뒷면에 계속)
(74) 대리인
위병갑

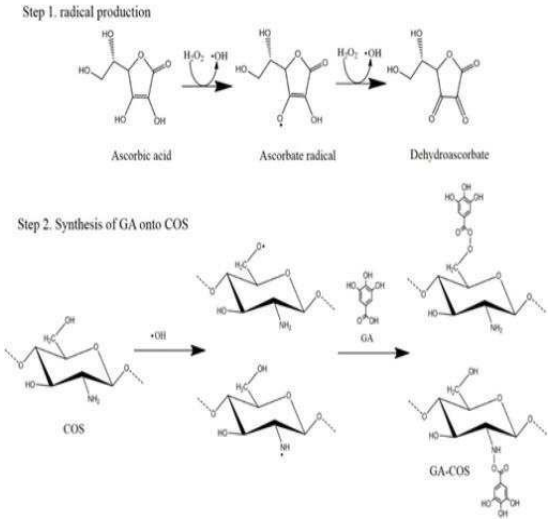
전체 청구항 수 : 총 6 항

(54) 발명의 명칭 **키토올리고당-갈산 유도체를 유효성분으로 포함하는 여드름 치료 또는 예방용 조성물**

(57) 요 약

본 발명은 키토올리고당-갈산 유도체를 유효성분으로 포함하는 여드름 치료 또는 예방용 조성물에 관한 것이다. 본 발명의 키토올리고당-갈산 유도체는 합성하지 않은 키토올리고당보다 여드름균인 프로피오니박테리움 아크네스(*Propionibacterium acnes*)에 대한 높은 항균 효과가 있어, 이를 약학적 조성물, 식품 조성물, 화장료 조성물 및 항여드름용 하이드로겔의 용도로 유용하게 사용할 수 있는 효과가 있다.

대 표 도 - 도1



(52) CPC특허분류
A61K 31/192 (2013.01)
A61K 31/65 (2013.01)
A61K 31/7048 (2013.01)
A61K 31/7056 (2013.01)
A61K 8/042 (2013.01)
A61K 8/368 (2019.05)
A61K 8/73 (2013.01)
A61K 9/06 (2013.01)
A61P 17/10 (2018.01)
(72) 발명자
고석천
제주특별자치도 제주시 선덕로3길 12
박현호
경상남도 창원시 의창구 원이대로222번길 28-1(명서동)
오건우
부산광역시 남구 유엔로157번나길 84, 205호(대연동, 프리빌)

이 발명을 지원한 국가연구개발사업
과제고유번호 20150220
부처명 해양수산부
연구관리전문기관 해양수산과학기술진흥원
연구사업명 해양수산생명공학기술개발
연구과제명 해양융복합 바이오닉스 소재 상용화 기술 개발
기 여 율 1/2
주관기관 부경대학교 산학협력단
연구기간 2018.01.01 ~ 2018.12.31
이 발명을 지원한 국가연구개발사업
과제고유번호 20170326
부처명 해양수산부
연구관리전문기관 해양수산과학기술진흥원
연구사업명 해양수산생명공학기술개발
연구과제명 용암해수 기반 청정원료소재 융합 기술개발
기 여 율 1/2
주관기관 부경대학교 산학협력단
연구기간 2018.01.01 ~ 2018.12.31

명 세 서

청구범위

청구항 1

키토올리고당-갈산 유도체를 유효성분으로 포함하는, 여드름 예방 또는 치료용 약학적 조성물.

청구항 2

제1항에 있어서,

상기 조성물은 테트라사이클린(tetracycline), 에리트로마이신(erythromycin) 및 린코마이신(lincomycin)으로 이루어지는 군으로부터 선택되는 1종의 항생제를 추가로 더 사용하는 것을 특징으로 하는, 약학적 조성물.

청구항 3

키토올리고당-갈산 유도체를 유효성분으로 포함하는, 여드름 예방 또는 개선용 식품 조성물.

청구항 4

키토올리고당-갈산 유도체를 유효성분으로 포함하는, 여드름 예방 또는 개선용 화장료 조성물.

청구항 5

키토올리고당-갈산 유도체를 포함하는 하이드로겔.

청구항 6

제5항에 있어서,

상기 하이드로겔은 항여드름 효과가 있는 것을 특징으로 하는, 하이드로겔.

발명의 설명

기 술 분 야

[0001] 본 발명은 키토올리고당-갈산 유도체를 유효성분으로 포함하는 여드름 치료 또는 예방용 조성물에 관한 것이다.

배 경 기 술

[0002] 여드름(심상성 좌창; Acne vulgaris, pimples)은 청소년기부터 중년에 이르기까지 가장 흔한 피부질환 중 하나이며, 의학적으로 피부 속의 모낭(hair follicle)과 피부의 기름샘인 피지선(sebaceous gland)의 염증성 병변이다 (Farrar, M. D. et al., Clin. Dermatol. 22(5):380-4(2004)). 일반적으로 여드름은 피부 진피 층에 존재하는 피지선 피지분비가 증가하여 모공이 막히거나, 여드름 원인균 *P. acnes*에 의해 염증이 발생되어 생성된다. 피지선은 여드름이 흔히 발생하는 얼굴, 등, 가슴 부위에 많이 존재한다. 피지선은 모낭이라 불리는 모발을 포함한 관과 연결되어 있으며, 이들 피지선에서 피지라 불리는 기름 물질이 생성된다. 이 피지는 모낭의 개구를 통해 피부 표면으로 배출된다. 피지는 모낭의 내벽을 자극하여 내벽 세포가 더 빨리 탈락하게 만들고, 탈락된 세포들은 엉겨서 모낭의 구멍을 막아서 여드름의 기본 병변인 면포(comedone, 모낭 속에 고여 딱딱해진 피지)가 형성된다. 화장에 의해서 피지 배출이 잘되지 않거나, 스트레스, 수면 부족 등에 의하여 부신피질 호르몬이 증가하면서 피지선을 자극하여 여드름이 발생하기도 한다. 증상의 특징으로는 좁쌀크기의 발진으로 내부에 피지(sebum)가 들어있고, 피부에 300만개 이상의 피지선에서 일어나며, 얼굴, 등, 앞가슴에 주로 발생한다 (Zoulboulis, C. C. et al., Clin. Dermatol. 22(5):360-6(2004)). 여드름은 흔하게 발생하는 피부 질환이기 때문에 증상이 가벼울 때는 일시적인 생리 현상으로 간주하기도 하지만, 여러 가지 세균의 감염으로 주위조직의 손상과 염증세포 침윤을 보이는 경우 염증이 심해서 화농이 생기고 흉터나 색소 침착 등을 남기기 쉽다.

[0003] 피지의 증가로 피지선 안에 살고 있는 프로피오니박테리움 아크네스(*Propionibacterium acnes*)에 의한 자극 인자가 모낭 상피벽을 자극하기 때문에, 상피내면의 각질이 두꺼워지고, 이 시기에 모낭의 이상각화로 인한 폐색

이 일어나고 모낭 내로 산소유입이 감소한다. 이 현상은 여드름 발병 원인균인 혐기성 *P. acnes*에 있어서 매우 양호한 발육조건이 되어 여드름 병소에서 증식이 촉진된다 (Bojar, R. A. et al., Clin. Dermatol. 22(5):375-9(2004)). 모낭 내에 상주하는 균인 프로피오니박테리움 아크네스는 지방분해효소를 분비하며, 이 효소가 피지 중의 중성지방을 분해하여 유리 지방산을 형성하는데, 형성된 유리 지방산은 다시 모낭을 자극하여 모낭벽을 터트린다. 결국 피지, 세균, 탈락된 세포들이 피부로 방출되어 홍반, 부종, 고름, 즉 여드름을 생기게 한다.

[0004] *P.* acnes는 그람 양성균으로 포자를 형성하지 않으며, 막대(rod) 형태의 혐기성 박테리아로서 여드름 간균이라고도 불리고 있다(McGinley, K. J. et al., J. Clin. Microbiol. 12:672-675(1980)). 코리네박테리움(Corynebacterium)과 형태학적으로 유사하며 독소를 발생하지 않는다. 제한적으로 호기성(microaerobic) 증식도 가능하며, 여드름을 유발하는 피부와 모낭의 대표적인 상재균(skin flora)이다. *P. acnes*의 증식은 지방이 많은 부위, 모피지선(pilosebaceous gland)에 한정되어 있는데, 이는 *P. acnes*가 호지성(lipophilic)인 특성으로 피지가 없이는 거의 발육할 수 없기 때문이다. 따라서 *P. acnes*의 균수와 피지 분비량은 상관관계가 있으며, 피지가 많은 부위 즉 지루 부위가 여드름의 호발인 동시에 이 부위는 *P. acnes*의 균수가 많은 부위이기도 하다. *P. acnes*는 프로피온산(propionic acid)을 생성하는 균으로서 리파아제 효소를 세포 밖으로 배출하여 과다한 피지를 분해하고 생성되는 지방산이나 균 항원이 피부 모낭에 염증을 일으키고 손상을 입히게 되어 여드름의 형태(pustule)로 피부 표면에 형성되는 것이다. 프로피오니박테리움 아크네스는 낮은 분자량의 펩타이드를 생산하는데 이것은 다형핵백혈구(polymorphonuclear leukocyte; PMNK)를 화학적으로 유인하여 염증을 유발시키고 프로피오니박테리움 아크네스가 생산하는 다양한 염증성 연결인자들에 의해 면역세포를 자극하여 인터루킨(IL)-8, IL-1β, TNF-α 등의 싸이토카인(cytokine)을 생산하여 피부 내 염증반응을 심화시키는 것으로 알려져 있다. *P. acnes*가 생성하는 리파아제 효소는 피지를 중성지방(트리글리셀리드)과 유리 지방산으로 가수 분해하고, 유리지방산은 모낭에서 여드름 유발 작용을 하는 것으로 보인다. *P. acnes*의 균수는 미소면포(micro comedo), 폐쇄면포(closed comedo), 개방면포(opencomedo)의 순으로 많으며 미소면포 내의 세균은 거의 대부분 *P. acnes*이다. *P. acnes* 균은 기름기가 많은 피지선에서 면포 안의 기름을 분해해 자극성 있는 유리 지방산으로 전환시키며, 면역 세포들이 몰려들어 염증을 일으켜 여드름을 유발하게 된다.

[0005] 이러한 기전에 의해 발생한 여드름을 치료하기 위해 경구 항생제와 레티노이드의 복용 등의 방법들이 보편적으로 이용되고 있다. 특히, 세균 감염에 의해 생성되는 염증성 여드름의 경우 항생제 처리를 통해 증상을 완화시킬 수 있으나 여러 부작용이 보고되고 있으며, 대다수의 이러한 항생제에 대한 세균 내성이 급속하게 나타나고 있다. 최근 테트라사이클린(tetracycline), 에리트로마이신(erythromycin) 등은 프로피오니박테리움 아크네스 증식 억제와 염증 반응을 감소에 이용되는 항생제이지만 항생제 내성 발생으로 인하여 지속적인 사용이 어렵고 다량 사용시 간독성이 심한 것으로 알려져 있다. 또한, 국소 치료요법으로 주로 사용되는 과산화 벤조일(Benzoyl peroxide)은 프로피오니박테리움 아크네스에 대해 강한 항균작용이 있고, 항염 및 면포 용해작용이 있다. 하지만 피부에 심각한 자극을 주어 홍진, 발진, 건조등 등 여러 부작용의 위험성이 있다. 따라서 이러한 문제점을 극복하기 위해 비교적 피부에 자극이 적고 부작용이 적은 천연물질을 이용한 치료제제 개발에 관한 연구가 활발하게 이루어지고 있다.

[0006] 한편, 키토올리고당(chitooligosaccharide)은 키토산을 분자량을 10 kDa 이하로 분리한 것으로, 이러한 키토올리고당은 물에 대한 높은 용해성, 생분해성 및 생체적합성을 보유하고 있어 키토산보다 제약 및 의료분야에서 더 많은 활용이 이루어지고 있다. 이러한 키토산과 키토올리고당의 항균활성은 일반적으로 분자량 및 탈아세틸화 정도에 좌우되는 것으로 알려져 있는데, 키토올리고당의 항균활성이 키토산보다 높다고 알려져 있다. 또한, 키토올리고당은 항산화같은 다양한 생리활성효과를 보유하고 있는데, 상대적으로 항산화 억제농도가 상대적으로 높은 편에 속한다. 이러한 문제들을 해결하고, 기존의 생리활성효과를 높이고자 기존 키토산이나 키토올리고당에 페놀성 물질들을 결합하는 연구들이 많은 관심을 받고 있으나, 아직까지 그 연구가 미미한 실정이다.

선행기술문헌

특허문헌

[0007] (특허문헌 0001) 한국공개특허 제2015-0131951호

발명의 내용

해결하려는 과제

[0008] 이에 본 발명자들은 키토올리고당 분자량별 1-3, 3-5 및 5-10kDa에 갈산을 결합시켜 키토올리고당-갈산 유도체를 제조하였으며, 이렇게 제조된 유도체는 합성하지 않은 키토올리고당보다 여드름균인 프로피오니박테리움 아크네스(*Propionibacterium acnes*)에 대한 높은 항균 효과가 있음을 확인하고 본 발명을 완성하였다.

[0009] 따라서, 본 발명은 키토올리고당-갈산 유도체를 유효성분으로 포함하는, 여드름 예방 또는 치료용 약학적 조성물을 제공하는데 그 목적이 있다.

[0010] 본 발명은 키토올리고당-갈산 유도체를 유효성분으로 포함하는, 여드름 예방 또는 개선용 식품 조성물을 제공하는데 그 목적이 있다.

[0011] 또한, 본 발명은 키토올리고당-갈산 유도체를 유효성분으로 포함하는, 여드름 예방 또는 개선용 화장료 조성물을 제공하는데 그 목적이 있다.

[0012] 나아가, 본 발명은 키토올리고당-갈산 유도체를 포함하는 하이드로겔을 제공하는데 그 목적이 있다.

과제의 해결 수단

[0013] 상기와 같은 목적을 달성하기 위하여, 본 발명은 키토올리고당-갈산 유도체를 유효성분으로 포함하는, 여드름 예방 또는 치료용 약학적 조성물을 제공한다.

[0014] 본 발명의 일실시예에 있어서, 상기 조성물은 테트라사이클린(tetracycline), 에리트로마이신(erythromycin) 및 린코마이신(lincomycin)으로 이루어지는 군으로부터 선택되는 1종의 항생제를 추가로 더 사용할 수 있다.

[0015] 본 발명은 키토올리고당-갈산 유도체를 유효성분으로 포함하는, 여드름 예방 또는 개선용 식품 조성물을 제공한다.

[0016] 또한, 본 발명은 키토올리고당-갈산 유도체를 유효성분으로 포함하는, 여드름 예방 또는 개선용 화장료 조성물을 제공한다.

[0017] 나아가, 본 발명은 키토올리고당-갈산 유도체를 포함하는 하이드로겔을 제공한다.

[0018] 본 발명의 일실시예에 있어서, 상기 하이드로겔은 항여드름 효과가 있을 수 있다.

발명의 효과

[0019] 본 발명의 키토올리고당-갈산 유도체는 합성하지 않은 키토올리고당보다 여드름균인 프로피오니박테리움 아크네스(*Propionibacterium acnes*)에 대한 높은 항균 효과가 있어, 이를 약학적 조성물, 식품 조성물, 화장료 조성물 및 항여드름용 하이드로겔의 용도로 유용하게 사용할 수 있는 효과가 있다.

도면의 간단한 설명

[0020] 도 1은 키토올리고당-갈산 유도체를 합성하는 메카니즘을 나타낸 모식도이다.

도 2는 키토올리고당(COS I; 1-5 kDa, COS II; 3-5 kDa, COS III; 5-10 kDa), 갈산(GA) 및 키토올리고당-갈산(GA-COS)의 UV 스펙트럼 결과이다.

도 3은 키토올리고당 III, 키토올리고당-갈산 I, II 및 III의 ^{1}H-NMR 스펙트럼 결과이다.

도 4는 키토올리고당-갈산 III의 ^{13}C-NMR 스펙트럼 결과이다.

도 5는 제작된 하이드로겔의 수분흡수율 측정 결과이다(PPVA; PVA hydrogel, COS/PVA; 5-10 kDa/PVA hydrogel, GA-COS/PVA; 5-10 kDa-COS-GA/PVA hydrogel).

도 6은 제작된 하이드로겔의 겔 분율을 확인한 결과이다(PPVA; PVA hydrogel, COS/PVA; 5-10 kDa/PVA hydrogel, GA-COS/PVA; 5-10 kDa-COS-GA/PVA hydrogel).

도 7은 제작된 하이드로겔의 레오미터(rheometer) 측정 결과이다.

도 8은 제작된 하이드로겔의 피부세포(NHDF-neo), 각질세포(HaCaT) 및 대식세포(Raw264.7)에서의 세포독성 측정

결과이다.

도 9는 제작된 하이드로겔의 세포내 ROS소거능 형광실험 사진 및 그래프 결과이다.

도 10은 제작된 하이드로겔의 항균효능 실험 사진 및 그래프 결과이다.

발명을 실시하기 위한 구체적인 내용

[0021] 본 발명은 (a) 키토올리고당을 탈이온수(deionized water)에 녹이는 단계; (b) 상기 (a)단계에서 얻은 용액에 갈산이 포함되어 있는 H_2O_2 용액을 첨가하여 상온에 방치하는 단계; (c) 상기 (b)단계에서 얻은 용액에 갈산을 첨가하여 20 ~ 28시간동안 반응시키는 단계; 및 (d) 상기 (c)단계의 키토올리고당-갈산 화합물을 동결건조를 통해 분말화시키는 단계;를 포함하는, 키토올리고당-갈산 유도체 제조방법에 관한 것이다.

[0022] 상기 (a)단계는 상기 수치에 제한되는 것은 아니지만, 바람직하게는 키토올리고당 0.1 내지 5g을 10 내지 1,000mL의 탈이온수에 녹일 수 있으며, 가장 바람직하게는 키토올리고당 1g을 100mL의 탈이온수에 녹일 수 있다.

[0023] 상기 (a)단계의 키토올리고당은 0.1 내지 13kDa의 분자량을 가질 수 있으며, 바람직하게는 1 내지 10kDa의 분자량, 가장 바람직하게는 1 내지 3kDa, 3 내지 5kDa 및 5 내지 10kDa인 키토올리고당으로 구성된 군으로부터 선택되는 하나 이상의 키토올리고당을 사용할 수 있다.

[0024] 또한, 상기 (b)단계는 H_2O_2 용액을 0.1 내지 5mL의 양으로 첨가할 수 있으며, 이에 제한되는 것은 아니지만 바람직하게는 2mL의 양으로 첨가할 수 있다.

[0025] 본 발명은 상기 방법으로 제조된 키토올리고당-갈산 유도체를 유효성분으로 포함하는, 여드름 예방 또는 치료용 약학적 조성물을 제공한다.

[0026] 본 발명에서 상기 여드름은 여드름 유발 세균에 의해 발생하는 염증을 포함할 수 있고, 특히 프로피오니박테리움(*Propionibacterium*) 속에 의해 발생하는 염증일 수 있으며, 상기 프로피오니박테리움 속은 프로피오니박테리움 아크네스(*Propionibacterium acnes*)일 수 있고, 프로피오니박테리움 아크네스 표준 균주 KCTC 3314, 분리 균주 KCTC 2874, KCTC 2875, KCTC 2876, KCTC 2877 및 KCTC 2878로 이루어진 군으로부터 선택되는 하나 이상인 것이 더욱 바람직하다.

[0027] 또한, 본 발명의 여드름 예방 또는 치료용 약학적 조성물은 키토올리고당-갈산 유도체에 항생제를 추가로 더 함유할 수 있다.

[0028] 상기 항생제는 여드름 유발 세균인 프로피오니박테리움 아크네스에서 내성을 나타내는 항생제일 수 있으며, 테트라사이클린(tetracycline)계 및 마크로라이드(Macrolides)계의 항생제로 이루어진 군으로부터 선택되는 하나 또는 그 이상일 수 있고, 테트라사이클린(tetracycline) 및 에리스로마이신(erythromycin)일 수 있다.

[0029] 본원발명의 약학적 조성물의 키토올리고당-갈산 유도체 및 항생제의 함량은 1:0.02 내지 1:2의 중량비일 수 있으며, 상기 항생제가 테트라사이클린인 경우 키토올리고당-갈산 유도체:항생제는 1:0.125 내지 1:0.625 중량비일 수 있으며, 상기 항생제가 에리스로마이신인 경우 키토올리고당-갈산 유도체:항생제는 1:0.125 중량비로 함유될 수 있다.

[0030] 본 발명에서 사용된 용어 "치료"란 본원발명의 약학적 조성물의 투여로 여드름 또는 이와 관련된 염증 증세를 호전시키거나 이롭게 변경하는 모든 행위를 의미한다. 본 발명이 속하는 기술분야에서 통상의 지식을 가진 자라면, 대한의학협회 등에서 제시된 자료를 참조하여 본원의 조성물이 효과가 있는 질환의 정확한 기준을 알고, 개선, 향상 및 치료된 정도를 판단할 수 있을 것이다.

[0031] 상기 약학조성물은 경구형 제형, 외용제, 좌제, 멸균 주사용액 및 분무제를 포함하는 군으로부터 선택되는 하나 이상의 제형일 수 있다.

[0032] 본 발명의 조성물의 치료적으로 유효한 양은 여러 요소, 예를 들면 투여방법, 목적부위, 환자의 상태 등에 따라 달라질 수 있다. 따라서, 인체에 사용 시 투여량은 안전성 및 효율성을 함께 고려하여 적정량으로 결정되어야한다. 동물실험을 통해 결정한 유효량으로부터 인간에 사용되는 양을 추정하는 것도 가능하다. 유효한 양의 결정 시 고려할 이러한 사항은, 예를 들면 Hardman and Limbird, eds., Goodman and Gilman's The Pharmacological Basis of Therapeutics, 10th ed.(2001), Pergamon Press; 및 E.W. Martin ed., Remington's Pharmaceutical

Sciences, 18th ed.(1990), Mack Publishing Co.에 기술되어있다.

[0033] 본 발명의 조성물은 또한 생물학적 제제에 통상적으로 사용되는 담체, 희석제, 부형제 또는 둘 이상의 이들의 조합을 포함할 수 있다. 약제학적으로 허용 가능한 담체는 조성물을 생체 내 전달에 적합한 것이면 특별히 제한되지 않으며, 예를 들면, Merck Index, 13th ed., Merck & Co. Inc. 에 기재된 화합물, 식염수, 멸균수, 링거액, 완충 식염수, 덱스트로스 용액, 말토 덱스트린 용액, 글리세롤, 에탄올 및 이들 성분 중 1 성분 이상을 혼합하여 이용할 수 있으며, 필요에 따라 항산화제, 완충액, 정균제 등 다른 통상의 첨가제를 첨가할 수 있다. 또한, 희석제, 분산제, 계면활성제, 결합제 및 윤활제를 부가적으로 첨가하여 수용액, 현탁액, 유탁액 등과 같은 주이용 제형, 환약, 캡슐, 과립 또는 정제로 제제화할 수 있다. 더 나아가 당 분야의 적정한 방법으로 또는 Remington's Pharmaceutical Science(Mack Publishing Company, Easton PA, 18th, 1990)에 개시되어 있는 방법을 이용하여 각 질환에 따라 또는 성분에 따라 바람직하게 제제화할 수 있다.

[0034] 본 발명의 조성물에 추가로 동일 또는 유사한 기능을 나타내는 유효성분을 1종 이상 함유할 수 있다. 본 발명의 조성물은, 조성물 총 중량에 대하여 상기 키토올리고당-갈산 유도체를 0.0001 내지 10 중량%로, 바람직하게는 0.001 내지 1 중량%를 함유한다.

[0035] 본 발명의 약학 조성물은 약제학적으로 허용 가능한 첨가제를 더 포함할 수 있으며, 이때 약제학적으로 허용 가능한 첨가제로는 전분, 젤라틴화 전분, 미결정셀룰로오스, 유당, 포비돈, 콜로이달실리콘디옥사이드, 인산수소칼슘, 락토스, 만니톨, 엿, 아라비아고무, 전호화전분, 옥수수전분, 분말셀룰로오스, 히드록시프로필셀룰로오스, 오파드라이, 전분글리콜산나트륨, 카르나우바 납, 합성규산알루미늄, 스테아린산, 스테아린산마그네슘, 스테아린산알루미늄, 스테아린산칼슘, 백당, 덱스트로스, 소르비톨 및 탈크 등이 사용될 수 있다. 본 발명에 따른 약제학적으로 허용 가능한 첨가제는 상기 조성물에 대해 0.1 중량부 내지 90 중량부 포함되는 것이 바람직하나, 이에 한정되는 것은 아니다.

[0036] 본 발명의 조성물은 목적하는 방법에 따라 비 경구 투여(예를 들어 정맥 내, 피하, 복강 내 또는 국소에 적용) 하거나 경구 투여할 수 있으며, 투여량은 환자의 체중, 연령, 성별, 건강상태, 식이, 투여시간, 투여방법, 배설률 및 질환의 중증도 등에 따라 그 범위가 다양하다. 본 발명에 따른 조성물의 일일 투여량은 0.0001 ~ 10 ㎎/㎖이며, 바람직하게는 0.0001 ~ 5 ㎎/㎖이며, 하루 일 회 내지 수회에 나누어 투여하는 것이 더욱 바람직하다.

[0037] 본 발명의 조성물의 경구 투여를 위한 액상 제제로는 현탁제, 내용액제, 유제, 시럽제 등이 해당되는데, 통상적으로 사용되는 단순 희석제인 물, 액체 파라핀 이외에 다양한 부형제, 예컨대 습윤제, 감미제, 방향제, 보존제 등이 함께 포함될 수 있다. 비경구 투여를 위한 제제에는 멸균된 수용액, 비수성 용제, 현탁제, 유제, 동결건조제제, 좌제 등이 포함된다.

[0038] 일 측면에서, 본 발명은 키토올리고당-갈산 유도체를 유효성분으로 포함하는, 여드름 예방 또는 개선용 화장료 조성물에 관한 것이다.

[0039] 상기 여드름 예방 또는 개선용 화장료 조성물은 키토올리고당-갈산 유도체와항생제를 함께 더 포함할 수 있으며, 상기 항생제는 여드름 유발 세균인 프로피오니박테리움 아크네스에서 내성을 나타내는 항생제일 수 있고, 테트라사이클린(tetracycline)계 및 마크로라이드(Macrolides)계의 항생제로 이루어진 군으로부터 선택되는 하나 또는 그 이상일 수 있으며, 테트라사이클린(tetracycline) 및 에리스로마이신(erythromycin)일 수 있다.

[0040] 본 발명의 화장료 조성물은 상술한 본 발명의 유효성분인 키토올리고당-갈산 유도체의 화장품학적 유효량(cosmetically effective amount) 및 화장품학적으로 허용되는 담체를 포함하여 제조할 수 있다.

[0041] 본 명세서에서 용어 “화장품학적 유효량”은 상술한 본 발명의 조성물의 여드름 유발균에 대한 항균 효능 또는 항염증 효능을 달성하는 데 충분한 양을 의미한다.

[0042] 본 발명의 화장료 조성물은 당업계에서 통상적으로 제조되는 어떠한 제형으로도 제조될 수 있으며, 예를 들어, 용액, 현탁액, 유탁액, 페이스트, 겔, 크림, 로션, 파우더, 비누, 계면활성제-함유 클린싱, 오일, 분말 파운데이션, 유탁액 파운데이션, 왁스 파운데이션 및 스프레이 등으로 제형화될 수 있으나, 이에 한정되는 것은 아니다. 보다 상세하게는, 유연 화장수, 영양 화장수, 영양 크림, 마사지 크림, 에센스, 아이 크림, 클렌징 크림, 클렌징 포옴, 클렌징 워터, 팩, 스프레이 또는 파우더의 제형으로 제조될 수 있다.

[0043] 본 발명의 제형이 페이스트, 크림 또는 겔인 경우에는 담체 성분으로서 동물성유, 식물성유, 왁스, 파라핀, 전분, 트라칸트, 셀룰로오스 유도체, 폴리에틸렌 글리콜, 실리콘, 벤토나이트, 실리카, 탈크 또는 산화아연 등이 이용될 수 있다.

[0044] 본 발명의 제형이 파우더 또는 스프레이인 경우에는 담체 성분으로서 락토스, 탈크, 실리카, 알루미늄히드록시드, 칼슘 실리케이트 또는 폴리아미드 파우더가 이용될 수 있고, 특히 스프레이인 경우에는 추가적으로 클로로플루오로히드로카본, 프로판/부탄 또는 디메틸 에테르와 같은 추진체를 포함할 수 있다.

[0045] 본 발명의 제형이 용액 또는 유탁액인 경우에는 담체 성분으로서 용매, 용해화제 또는 유탁화제가 이용되고, 예컨대 물, 에탄올, 이소프로판올, 에틸 카보네이트, 에틸 아세테이트, 벤질 알코올, 벤질 벤조에이트, 프로필렌 글리콜, 1,3-부틸글리콜 오일, 글리세롤 지방족 에스테르, 폴리에틸렌 글리콜 또는 소르비탄의 지방산에스테르가 있다.

[0046] 본 발명의 제형이 현탁액인 경우에는 담체 성분으로서 물, 에탄올 또는 프로필렌 글리콜과 같은 액상의 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.

[0047] 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 아미드 에테르 설페이트, 알킬아미도베타인, 지방족 알코올, 지방산 글리세리드, 지방산 디에탄올아미드, 식물성 유, 라놀린 유도체 또는 에톡실화 글리세롤 지방산 에스테르 등이 이용될 수 있다.

[0048] 본 발명의 화장료 조성물에 포함되는 성분은 상기 유효 성분 및 담체 성분 이외에, 피부 외용제 조성물에 통상적으로 이용되는 성분들을 포함하며, 예컨대 항산화제, 안정화제, 용해화제, 비타민, 안료 및 향료와 같은 통상적인 보조제를 포함할 수 있다.

[0049] 일 측면에서, 본 발명은 키토올리고당-갈산 유도체를 유효성분으로 함유하는 여드름 예방 또는 개선용 식품 조성물에 관한 것이다.

[0051] 본 발명에서 사용된 용어 "식품"이란 영양소를 한 가지 또는 그 이상 함유하고 있는 천연물 또는 가공품을 의미하며, 바람직하게는 어느 정도의 가공 공정을 거쳐 직접 먹을 수 있는 상태가 된 것을 의미하며, 통상적인 의미로서, 식품, 식품 첨가제, 기능성식품 및 음료를 모두 포함하는 의도이다.

[0052] 본 발명의 식품 조성물은, 비제한적으로 각종 음료, 껌, 차, 과자, 비타민 복합체, 건강 보조식품 등의 형태로 제조될 수 있다.

[0053] 본 발명의 식품 조성물의 바람직한 섭취량은 섭취자의 상태 및 체중, 증상의 정도, 식품 형태, 섭취 기간에 따라 다르며 적절하게 선택될 수 있다. 본 발명의 식품 조성물은 유효 성분이 1일 0.2mg/kg 내지 200mg/kg으로 섭취되도록 하는 것이 최적의 효과를 위해 바람직하다.

[0054] 일 측면에서, 본 발명은 키토올리고당-갈산 유도체를 포함하는 하이드로겔을 제공한다.

[0056] 이하, 본 발명을 실시예에 의해 상세히 설명하기로 한다. 그러나 이들 실시예는 본 발명을 보다 구체적으로 설명하기 위한 것으로서, 본 발명의 범위가 이들 실시예에 한정되는 것은 아니다.

[0058] **<실시예 1>**

[0059] **실험재료 및 실험방법**

[0061] **<1-1> 재료준비**

[0062] COS (분자량 : 1-3, 3-5, 5-10 kDa, 탈 아세틸화 ≥80%)는 Kitto Life Co. (Seoul, Korea)에서 구입하였다. GA, PVA (분자량 : 89,000-98,000; 99+% hydrolyzed), 2,2-diphenyl-1-picrylhydrazyl(DPPH), 2,2'-azino-bis(3ethylbenzothiazoline-6-sulfonic acid)(ABTS), Hydrogen peroxide (H_2O_2), 페록시다아제(peroxidase), 3-(4, 5-dimethylthiazol-2-yl)-2, 5-diphenyltetrazolium bromide) (MTT)와 deuterium oxide (D_2O)는 Sigma-Aldrich(Saint Louis, MO, USA)에서 구입하였다. Dulbecco's minimum Eagle's medium (DMEM), Fetal bovine

serum (FBS), trypsin/ethylenediaminetetraacetic acid(EDTA) 용액, 항생제/항균 용액, phosphate buffer saline (PBS)와 기타 물질은 GIBCO™ (Gaithersburg, MD, USA)에서 구입하였다. 다른 모든 화학 물질과 용매는 분석 등급이었으며 실험에 사용된 물은 탈 이온화하여 사용하였다.

[0064] **<1-2> 키토올리고당-갈산 유도체(GA-COS) 준비**

[0065] 키토올리고당-갈산 유도체(GA-COS)는 과산화수소 중재 방법에 의해 약간의 수정을 통해 합성되었다(도 1 참조). 키토올리고당-갈산 유도체(GA-COS) 합성 방법에 대해 간단히 설명하면, 1-3kDa의 분자량을 갖는 키토올리고당(COS), 3-5 또는 5-10 kDa의 분자량을 갖는 키토올리고당(COS I, COS II 및 COS III) 각각 1g을 100 mL의 탈 이온수 (DW)에 용해시키고 0.108 g의 아스코르브산(ascorbic acid)을 함유하는 1.0 M H_2O_2 2 mL를 첨가하였다. 실온에서 30 분 후, 0.5 몰비의 COS를 갖는 GA의 양을 혼합물에 첨가하고, 반응을 24 시간 동안 수행 하였다. 생성된 용액을 48 시간 투석 튜브 (MWCO 1000 Da)로 투석하고 동결 건조시켰다. 1-3, 3-5 및 5-10 kDa의 GA-COS는 각각 GA-COS I, GA-COS II 및 GA-COS III로 명명하였다.

[0067] **<1-3> 키토올리고당-갈산 유도체(GA-COS)의 특성**

[0069] **<1-3-1> 키토올리고당-갈산 유도체(GA-COS)의 분석적 결정**

[0070] UV-vis 스펙트럼은 UV-vis 마이크로 플레이트 판독기 (BioTek Instruments, Winooski, VT, USA)에 의해 200 내지 600 nm에서 스캐닝함으로써 결정되었다.

[0071] 샘플을 D_2O에 용해시켰으며, 이어서, JEOL JNM ECP-600 FT-NMR 스펙트로 미터 (일본)에 의해 샘플의 양성자 및 탄소 핵 자기 공명 (^{1}H-NMR, ^{13}C-NMR) 스펙트럼을 600 MHz의 정적 자기장하에 기록하였다.

[0073] **<1-3-2> 키토올리고당-갈산 유도체(GA-COS)에서 접목도 측정**

[0074] 키토올리고당-갈산 유도체(GA-COS)의 갈산(GA) 함량은 Folin-Ciocalteu 방법을 일부 수정하여 측정하였다. 이에 대해 간단히 설명하면, 모든 GA-COS (1mg / mL) 20 μL를 Folin-Ciocalteau 시약 100 μL와 혼합한 다음 7.5% Na_2CO_3 80 μL를 첨가하였다. 혼합물을 흔든다음 30 분 동안 실온하에 유지시키고, 혼합물의 흡광도를 UV-vis 마이크로 플레이트 판독기를 사용하여 750 nm에서 판독 하였다. GA가 표준으로 사용되었다.

[0076] **<1-4> 키토올리고당-갈산 유도체(GA-COS)의 항산화 작용**

[0078] **<1-4-1> DPPH 라디칼 소거 활성**

[0079] DPPH 라디칼 소거 활성은 약간의 변형을 가한 이전의 방법에 따라 분석 하였다. 샘플 (COS I, II, III, GA-COS I, II 및 III)은 IC_{50} 값을 얻기 위한 일련의 농도를 준비하기 위해 DW에 용해시켰다. 그런 다음 100 μL의 샘플을 96- 웰 마이크로 플레이트에서 100 μL과 혼합하였다. 실온에서 30 분 동안 인큐베이션한 후. 혼합물의 흡광도를 UVvis 마이크로 플레이트 판독기로 517 nm에서 측정하였다.

[0081] **<1-4-2> ABTS 라디칼 소거 활성**

[0082] ABTS 라디칼 소거 활성의 분광 광도계 분석은 약간의 변형을 가한 이전의 방법에 따라 분석 하였다. 이에 대해 간단히 설명하면, 7 mM ABTS 용액을 2.45 mM과 황산 암모늄과 반응시키고, 혼합물을 암부에서 12 시간 동안 배양하여 ABTS 라디칼을 생성시켰다.

[0083] 그런 다음, 745 nm에서의 흡광도 값이 0.7 ± 0.02에 도달할 때까지 혼합물을 DW로 희석시켰다. ABTS 라디칼 용

액 150 μL를 96- 웰 마이크로 플레이트에서 샘플 50 μL와 혼합하고 혼합물의 흡광도를 745 nm에서 모니터링하였다.

[0085] **<1-4-3> H_2O_2 라디칼 소거 활성**

[0086] H_2O_2 소거 활성 측정은 이전에 기술된 절차를 사용하여 수행하였다. 100 μL의 0.1M 인산염 완충액 및 샘플을 96-웰 마이크로 플레이트에서 혼합하였다. 37℃에서 5 분 동안 H_2O_2 20 μL와 배양 후, 혼합물은 37 ℃에서 10 분 동안 1.25 mM ABTS와 peroxidase (1 unit/mL) 30 μL와 반응하였으며, 흡광도는 405 nm에서 판독하였다.

[0088] **<1-5> 키토올리고당-갈산 유도체(GA-COS)의 항균 활성**

[0090] **<1-5-1> 사용한 균주 및 균주 배양 조건**

[0091] *P. acnes*는 KCTC(Korean Collection for Type Cultures)에서 *P. acnes* KCTC 3314를 수득하였다. 상기 균주는 1.0% 덱스트로오스(dextrose)가 보충된 뇌 심장 주입 브로쓰(brain heart infusion broth; BHI)에서 혐기성으로 배양되었고, 37 ℃에서 72 시간 동안 CO_2 배양기에서 배양하였다. 사용된 샘플은 $1x10^{-5}$ N HCl(pH 5)에서 용해되었다.

[0093] **<1-5-2> 최소 억제 농도의 측정**

[0094] MIC(Measurement of minimum inhibitoryconcentration) 분석은 Clinical and Laboratory Standards Institute (CLSI, 2012)의 가이드 라인에 따라 수행되었다.

[0095] MIC 값은 미생물의 가시적인 성장을 억제하는 최저 농도로 결정되었다. *P. acnes* 균주를 37 ℃에서 24 시간 동안 BHI로 시료를 접종 하였다.

[0097] **<1-5-3> 디스크 확산 분석**

[0098] *P. acnes*에 대한 키토올리고당(COS) 및 키토올리고당-갈산 유도체(GA-COS)의 항 박테리아 활성은 디스크 확산 분석에 의해 수행되었다. *P. acnes* 균주를 5 mg의 샘플을 함유한 종이 디스크 (직경 6 mm)로 혈액 한천 기반의 플레이트에 뿌렸다. 37 ℃에서 24 시간 동안 배양한 후, Vernier 캘리퍼스에 의해 성장 억제 지름의 직경을 측정 하였다.

[0100] **<1-6> 하이드로 겔 제조방법**

[0101] COSIII와 GA-COSIII를 혼합한 PVA 하이드로 겔을 동결 융해 방법으로 제조 하였다. 수성 10 wt% PVA 용액은 PVA를 DW에 70 ℃의 수조에서 2 시간 동안 용해시킨 후 실온에서 1 시간 동안 냉각시켜 제조하였다.

[0102] 2 중량%의 COS III 및 GA-COS III 용액을 제조하고 2×10^{-5} N HCl에 용해시켰다. PVA 용액을 COSIII 및 GA-COSIII 용액과 1 : 1의 비율로 혼합 하였다. 혼합 후, 각 혼합물을 웰 당 0.5 ml의 부피로 24- 웰 플레이트에 붓고 -80 ℃에서 18 시간 동안 동결시키고 실온에서 6 시간 동안 해동시키는 단계로 이루어진 3 회의 반복된 동결 - 해동 사이클을 수행 하였다.

[0103] 결과적으로, 순수한 5 중량% PVA 하이드로 겔 (PPVA), 1 중량%의 COS III (COS / PVA)를 갖는 5 중량% PVA 하이드로 겔 및 5 중량% PVA 하이드로 겔 GA-COS III(GA-COS / PVA)을 제조하였다.

[0105] **<1-7> 하이드로 겔의 특성**

[0107] **<1-7-1> 수분 흡수율 분석**

[0108] 건조한 하이드로 겔(PPVA, COS / PVA, GA-COS / PVA)을 초기에 칭량하고 수분 흡수 분석을 위해 평형 상태에 도달할 때까지 DW 37℃에 담그었다. 하이드로 겔의 건조 중량 (Wd)은 동결 건조에 의해 결정되었고, 하이드로 겔의 팽창된 중량 (Ws)은 표백수로 블로팅하여 결정하였다. 하이드로 겔의 수분 흡수율은 하기 식 1과 같다.

[0110] [식1]

$$\text{Swelling ratio (\%)} = [(Ws-Wd)/Wd] \times 100\%$$

[0112] **<1-7-2> 겔 분율 분석**

[0113] 하이드로 겔은 진공 상태에서 50 ℃에서 건조시키고 중량 (Wo)으로 제조하였다. 건조된 하이드로 겔을 DW에 24 시간 동안 담그었다. 그 다음, 하이드로 겔을 다시 건조시켜 가용성 부분을 제거하고 수적 후 건조된 하이드로 겔을 중량 측정했다(We). 겔 분율은 하기 식 2로 결정하였다.

[0115] [식2]

$$\text{Gel fraction (\%)} = [We/Wo] \times 100$$

[0117] **<1-7-3> 유변학적 특성**

[0118] 동적 기계 분석(dynamic mechanical analysis)은 20 mm 평행 판 형상 (TA Instruments, USA)을 갖는 Discovery HR-2 Hybrid Rheometer에 의해 수행되었다. 하이드로 젤은 25℃에서 0.05 N의 정적 하중으로 로드되고 저장 탄성률 (G ')을 측정하기 위해 주파수 범위 (0.1 Hz -10 Hz)에서 일정한 진폭으로 변형된다.

[0120] **<1-8> 세포 실험**

[0122] **<1-8-1> 세포 배양**

[0123] 정상 인간 피부 섬유 아세포 (NHDF), 인간 각질 형성 세포 (HaCaT) 및 마우스 대식세포 (RAW 264.7)를 사용하여 세포 실험을 수행 하였다.

[0124] 세포를 37 ℃에서 5% CO_2의 가습 분위기의 배양기에서 10% FBS 및 1% 항생제 / 항균액이 보충된 DMEM에서 배양하였다. 세포를 70-80%의 컨플루언스(confluence)에 도달할 때까지 배양 하였다. NHDF 및 HaCaT는 트립신 / EDTA 용액의 첨가에 의해 분리되는 반면, RAW 264.7은 스크레이퍼에 의해 분리되었다. 혈구 계수계를 사용하여 세포를 계수하고 세포 배양 판에 분주하였다.

[0126] **<1-8-2> 하이드로 겔의 세포 독성 시험**

[0127] 하이드로 겔의 세포 독성은 국제기구 표준화(ISO) 10993-5에 따라 평가하였다. 추출 배지를 얻기 위해 UV 조사에 의해 1 시간 동안 멸균한 하이드로 겔을 37 ℃에서 24 시간 동안 배양 배지에 담갔다. 세포를 1 x 10^4(NHDF

및 HaCaT) 및 1 x 10^5 세포 / 벽 (RAW 264.7)의 밀도로 96 웰 플레이트에 접종하고 추출 배지 및 신선한 배지 (대조군)와 함께 24 시간 동안 배양 하였다. 세포 생존력은 alamar blue assay에 의해 결정되었다.

[0129] **<1-8-3> 세포 내 ROS 측정**

[0130] 세포 내 ROS의 생성은 세포 투과성 형광 염료, 5-(and-6)-carboxy-2´,7´-dichlorofluorescin diacetate(DCFH-DA, Sigma-Aldrich)에 의해 검출되었다. 각각의 추출 배지는 하이드로 겔과 함께 1 시간 동안 배양하여 준비되었다. 추출 배지를 주사하기 24 시간 전에, RAW 264.7을 5 x 10^5 세포 / 벽의 농도로 24- 웰 플레이트 상에 분주하였다. 각각의 추출 배지 및 신선한 배지 (blank 및 대조군)를 1 시간 동안 처리한 후 블랭크를 제외하고 0.5 mM H_2O_2를 첨가하여 30 분 동안 세포를 배양 하였다. 그 후, 세포를 각각 20 μM DCFH-DA 및 6 μg / mL에서 30분간 배양하였다. 이미지는 형광 현미경 (Zeiss, Germany)으로 촬영하였다.

[0132] **<1-9> 하이드로 겔의 항균 활성**

[0133] 동적 접촉 조건 하에서 고정화된 항균제의 *P. acnes* 에 대한 하이드로 겔 항균 활성은 표준 방법인 ASTM E2149-01에 의해 수행되었다.

[0134] 이에 대해 간단히 설명하면, 하이드로 겔을 UV 조사에 의해 멸균시키고 *P. acnes* 현탁액(10^5 CFU / mL)을 37℃에서 함유한 용액에 함침시켰다. 살아있는 세포 계수 방법을 평가하기 위해 부분표본(Aliquot)을 용액에서 가져왔다. 생존한 미생물을 3 콜로니 형성 단위 (CFU)로 계수하였다.

[0136] **<1-10> 통계분석**

[0137] 모든 정량적 데이터는 평균 ± 표준 편차 (SD)로 제시되며, 새로운 시약을 사용하여 수행된 3 가지 개별 실험이 있다. 통계 분석 소프트웨어인 PASW Statistics 21.0 (SPSS Inc.)을 사용하여 Duncan의 검정에 이어 일원 분산 분석 (ANOVA)을 사용하여 각 그룹 간의 유의 한 차이를 평가하였다. 차이는 $p < 0.05$에서 통계적으로 유의하다고 간주하였다.

[0139] **<실시예 2>**

[0140] **실험결과**

[0142] **<2-1> 키토올리고당-갈산 유도체(GA-COS)의 특성**

[0144] **<2-1-1> 구조분석**

[0145] GA-COS I, II 및 III의 흡광도 피크는 과산화수소 중재를 통해 GA와 함께 잘 합성되었음을 보여 주며, GA-COS와 GA-COS의 UV-vis 스펙트럼은 도 2에 나타내었다. 키토올리고당(COS)은 200 내지 600 nm 범위의 흡광 피크를 가지지 않았지만, 모든 키토올리고당-갈산 유도체(GA-COS)는 212 및 262 nm에서 2 개의 흡광 피크를 가졌다. 그것은 벤젠 고리의 π- 시스템에 할당 되어야만하는 갈산(GA)의 특징적인 흡수 피크와 동일하다.

[0146] 성공적인 합성은 ^{1}H-NMR 및 ^{13}C-NMR 분석에 의해 확인되었다. 도 3에 도시 된 바와 같이, 모든 GA-COS의 공명 피크는 H-Ac, H2, H3-H6, β-H1, D20, α에 기인하는 2.04, 3.09, 3.32-3.91, 4.53, 4.80, 5.41 및 7.03ppm GA-COS III는 109.43, 127.75, 135.75 및 144.34 ppm에서 방향족 탄소의 특성 공진 피크를 보였다 (도 4).

[0148] **<2-1-2> 키토올리고당-갈산 유도체(GA-COS)에서 갈산(GA) 함량 측정 결과**

[0149] 합성 제품의 항산화 작용은 폴리머 백본의 이식된 항산화 물질의 양에 따라 다르며 Folin-Ciocalteu 방법으로

예측할 수 있다. GA-COS I, II 및 III의 GA 함량은 거의 차이가 없었으며, 각각 80.95, 88.58 및 85.35mg GA / g GA-COS를 보였다 (표 1 참조).

[표 1] GA-COS I, II 및 III의 GA 함량

Samples	mg GA / g GA-COS
GA-COS I	80.95±0.53
GA-COS II	88.58±8.12
GA-COS III	85.35±7.54

[0151]

[0153] **<2-2> 키토올리고당-갈산 유도체(GA-COS)의 항산화작용 결과**

[0154] 이 실험 결과는 모든 키토올리고당-갈산 유도체(GA-COS) 처리군의 항산화제 활성이 모든 키토올리고당(COS) 처리군에 비해 합성을 통해 크게 개선되었음을 보여 주었지만, GA-COS II의 IC50 값 GA-COS II는 GA-COS I 및 III에 비해 유의한 차이를 나타내지 않았다(표 2 참조).

[표 2] 갈산 합성 전/후 키토올리고당의 항산화 측정 결과

Samples	IC_{50}values(μg/ml)		
	DPPH radical	ABTS radical	Hydrogen peroxide
COS I	> 500	> 500	> 500
COS II	> 500	> 500	> 500
COS III	> 500	> 500	> 500
GA-COS I	33.32±0.96	19.30±0.36	212.40±7.01
GA-COS II	32.49±0.70	18.95±0.61	207.03±5.60
GA-COS III	35.77±0.03	21.44±0.14	209.67±3.54

[0156]

[0158] **<2-3> 키토올리고당-갈산 유도체(GA-COS)의 항균활성 결과**

[0159] MIC 값은 모든 GA-COS 및 COS의 *P.acnes*에 대한 정량 항균 활성을 나타내었다(표 3 참조). 모든 키토올리고당-갈산 유도체(GA-COS) 처리군 및 키토올리고당(COS) 처리군은 모두 256 μg / mL 미만의 MIC 값이 나타나 *P.acnes*의 생장을 강력하게 억제하는 것으로 나타났다. 또한, GA-COS II 및 III은 다른 것보다 약간 감소된 MIC 값을 보였다.

[0160] 키토올리고당이 갈산으로 합성된 경우는 고 분자량을 갖는 COS 및 GA-COS 및 COS가 *P. acnes*의 성장을 억제하는 것보다 항균 활성을 향상 시킨다는 것을 알 수 있었다. 그리고, 1 x 10^{-5} N HCl (대조군)은 항균 활성을 나타내지 않았다.

[표 3] 갈산 합성 전/후 키토올리고당의 여드름균인 프로피오니박테리움 아크네스에 대한 최소억제농도 및 항균력 확인 결과

[0162]

Strains	Control	COS I	COS II	COS III	GA-COS I	GA-COS II	GA-COS III
MIC (μg/mL)	-	256	128	128	128	64	64
Clear zone (mm)	-	13.73±1.15	13.51±1.11	15.05±0.72	14.22±0.41	15.58±0.18	17.59±0.61

[0164] **<2-4> 하이드로 겔의 물리적 성질**

[0166] **<2-4-1> 수분 흡수율 결과**

[0167] 하이드로 겔의 시간에 따른 수분 흡수율은 도 5에서 볼 수 있듯이 COS / PVA와 GA-COS / PVA는 PPVA에 비해 수분 흡수율이 높았다. 특히 COS / PVA와 GA-COS / PVA는 초기 1 시간 동안 PPVA보다 많은 양의 물을 빠르게 흡수하였음을 알 수 있었다.

[0169] **<2-4-2> 겔 분율 결과**

[0170] 겔 분율에 대한 COS 및 GA-COS의 영향이 관찰되었다(도 6 참조). 겔 분율 데이터는 하이드로 겔의 상대적인 결정화도를 시사한다. COS와 GA-COS를 첨가하면 겔 분율이 감소하여 다음과 같은 결과가 나타난다. PPVA의 겔 분율은 81.50%이었고 COS / PVA와 GA-COS / PVA의 겔 분율은 73.10과 73.15%임을 알 수 있었다.

[0172] **<2-4-3> 하이드로 겔 레오미터 측정 결과**

[0173] 하이드로 겔의 상대적 기계적 성질은 도 7에서 볼 수 있다. 이 시험은 주파수를 변경하여 점탄성의 변화 속성을 평가한다. 결과적으로, 하이드로 겔의 G '주파수에 거의 의존하지 않아 하이드로 겔의 안정성이 우수함을 보여주었다. 또한, PPVA는 측정된 주파수에서 가장 높은 G '를 보였다.

[0175] **<2-5> 세포 실험**

[0177] **<2-5-1> 하이드로 겔의 세포 독성 결과**

[0178] NHDF, HaCaT 및 RAW 264.7에서 하이드로 겔에 대한 추출 가능하고 침출 가능한 연구는 세포 독성의 증거를 보이지 않았다(도 8 참조). 대조군의 세포 생존율은100%이고, PPVA, COS / PVA 및 GA-COS / PVA의 상대 세포 생존율은 90% 이하로 떨어지지 않았다. 이 결과는 본 발명의 방법으로 제조된 하이드로 겔이 생체 적합하다는 것을 나타낸다.

[0180] **<2-5-2> 세포 내 ROS 생성에 대한 억제 효과**

[0181] H_2O_2의 존재 하에서 배양된 RAW 264.7의 ROS 생성의 이미지를 모니터하여 세포 내 ROS 억제 효과를 확인 하였다. 도시 된 바와 같이 도 9에서, 대조군, PPVA 및 COS / PVA와 비교할 때, DC-COS / PV는 DCF의 형광 강도를 현저하게 감소시켰다. 또한, Hoechst 33342로 염색된 세포는 PPVA, COS / PVA 및 GA-COS / PVA가 세포 독성이 없음을 보여 주었다.

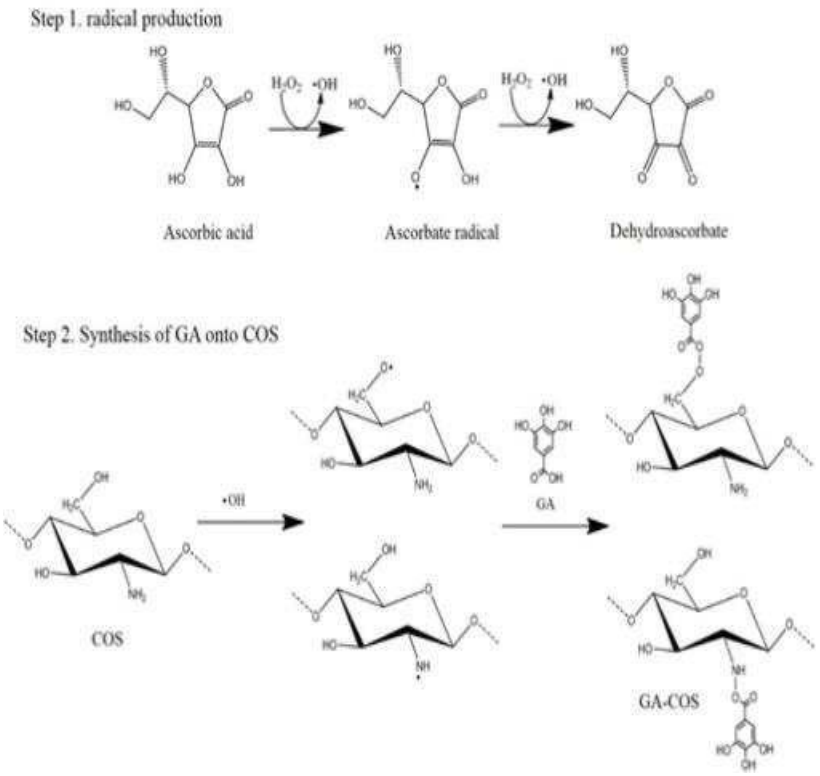
[0183] **<2-6> 하이드로 겔의 항균활성 확인**

[0184] COS / PVA 및 GA-COS / PVA의 항균 활성은 ASTM E2149-01에 의해 평가되었다. 도 10은 일정 시간 동안 하이드로 겔과 함께 배양한 후에 존재하는 생존 가능한 미생물의 수를 나타냈다. 대조군과 PPVA는 *P. acnes*에 대해 어떠한 활성도 보이지 않았다. 그러나 COS / PVA와 GA-COS / PVA는 점차적으로 생존 미생물 수를 감소시켰다. 특히, GA-COS / PVA는 *P. acnes*에 대해 우수한 항균성을 보였으나 통계적으로 유의한 차이는 보이지 않았다.

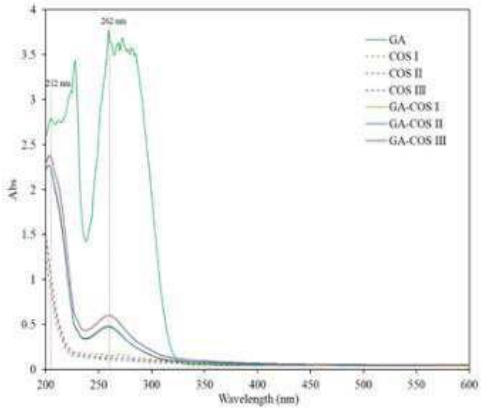
[0186] 이제까지 본 발명에 대하여 그 바람직한 실시예들을 중심으로 살펴보았다. 본 발명이 속하는 기술 분야에서 통상의 지식을 가진 자는 본 발명이 본 발명의 본질적인 특성에서 벗어나지 않는 범위에서 변형된 형태로 구현될 수 있음을 이해할 수 있을 것이다. 그러므로 개시된 실시예들은 한정적인 관점이 아니라 설명적인 관점에서 고려되어야 한다. 본 발명의 범위는 전술한 설명이 아니라 특허청구범위에 나타나 있으며, 그와 동등한 범위 내에 있는 모든 차이점은 본 발명에 포함된 것으로 해석되어야 할 것이다.

도면

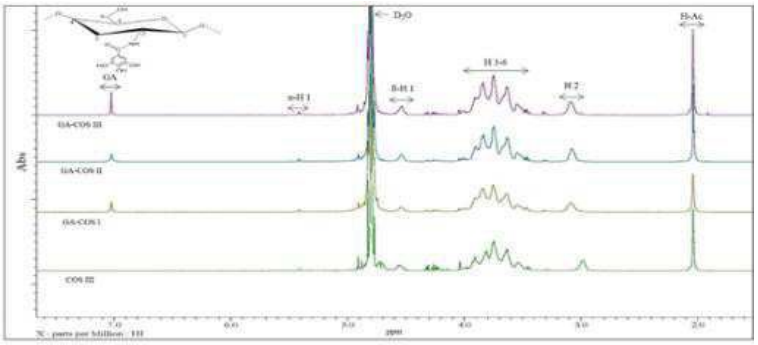
도면1



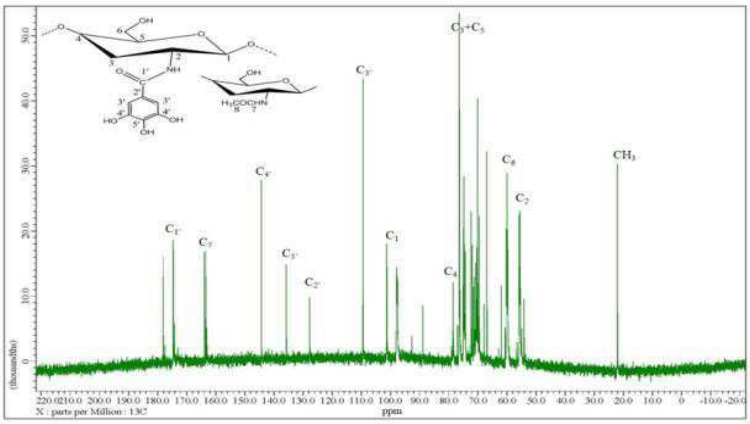
도면2


GA
COS I
COS II
COS III
GA-COS I
GA-COS II
GA-COS III
Abs
Wavelength (nm)

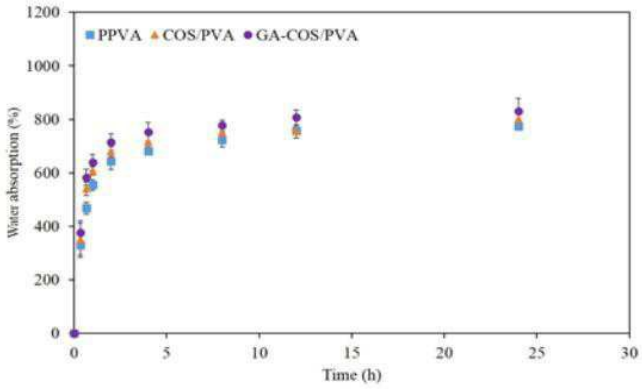
도면3


GA
GA-COS III
GA-COS II
GA-COS I
COS III
Abs
ppm

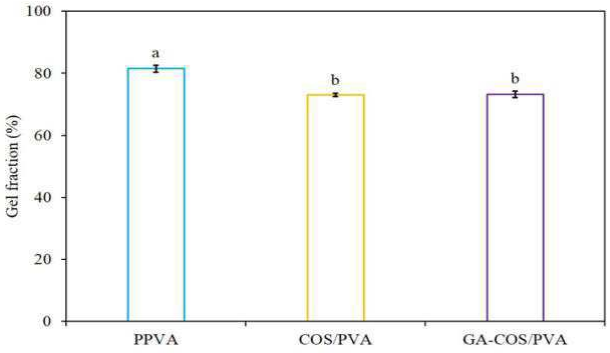
도면4


ppm

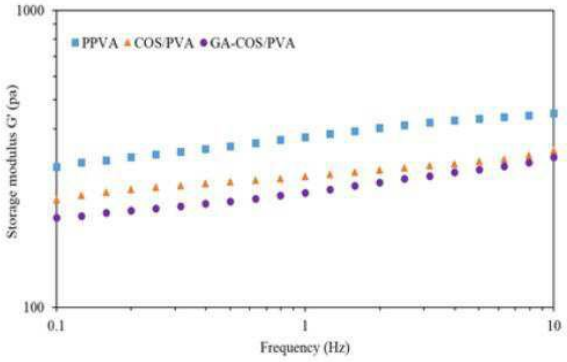
도면5


PPVA
COS/PVA
GA-COS/PVA
Water absorption (%)
Time (h)
0
200
400
600
800
1000
1200
0
5
10
15
20
25
30

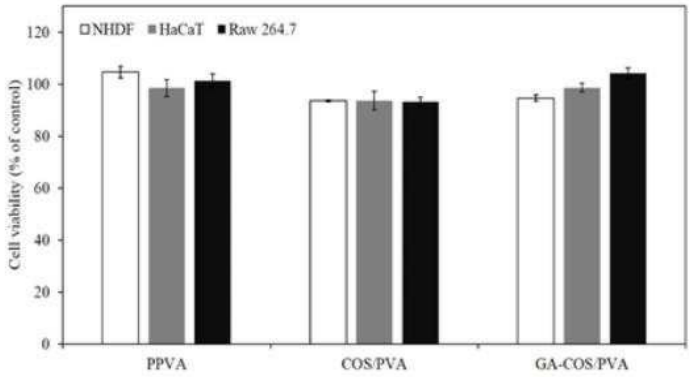
도면6


Gel fraction (%)
a
b
b
PPVA
COS/PVA
GA-COS/PVA
0
20
40
60
80
100

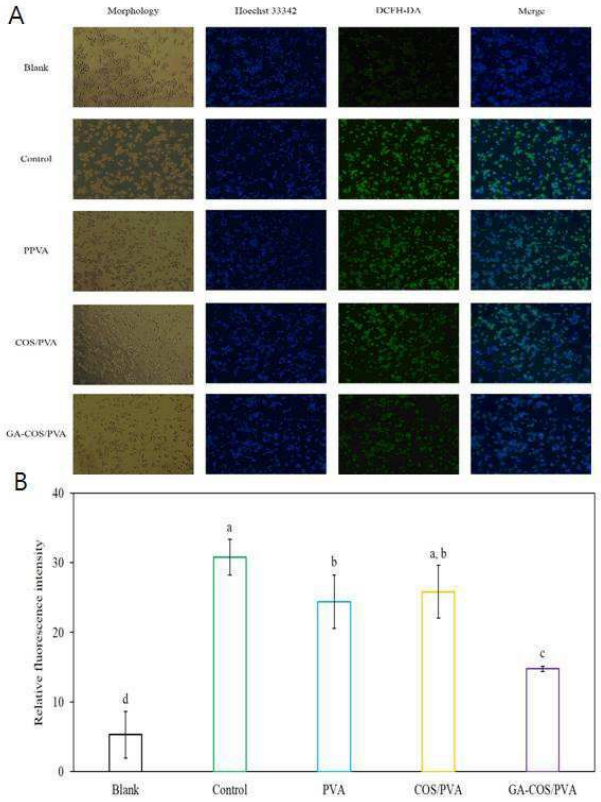
도면7


PPVA
COS/PVA
GA-COS/PVA
Storage modulus G' (pa)
Frequency (Hz)
100
1000
0.1
1
10

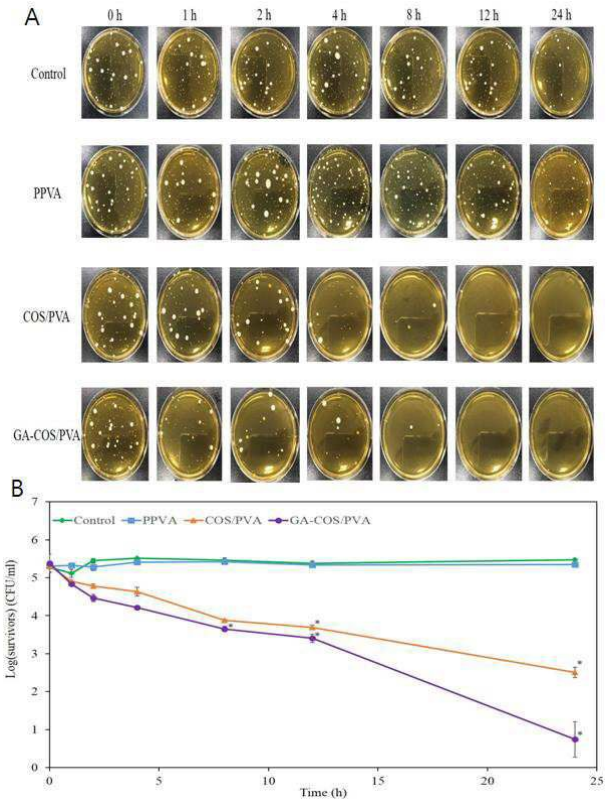
도면8


NHDF
HaCaT
Raw 264.7
Cell viability (% of control)
120
100
80
60
40
20
0
PPVA
COS/PVA
GA-COS/PVA

도면9


A
Morphology
Hoechst 33342
DCFH-DA
Merge
Blank
Control
PPVA
COS/PVA
GA-COS/PVA
B
Relative fluorescence intensity
40
30
20
10
0
a
b
a, b
c
d
Blank
Control
PVA
COS/PVA
GA-COS/PVA

도면10


A
0 h
1 h
2 h
4 h
8 h
12 h
24 h
Control
PPVA
COS/PVA
GA-COS/PVA
B
Control
PPVA
COS/PVA
GA-COS/PVA
Log(survivors) (CFU/ml)
Time (h)
0
1
2
3
4
5
6
7
0
5
10
15
20
25