



(19) 대한민국특허청(KR)
(12) 공개특허공보(A)

(11) 공개번호 10-2020-0035807
(43) 공개일자 2020년04월06일

(51) 국제특허분류(Int. Cl.)
C07K 5/09 (2006.01) A61K 38/00 (2006.01)
A61K 8/64 (2006.01) A61P 17/00 (2006.01)
A61Q 19/00 (2006.01) C07K 5/103 (2006.01)
C07K 7/06 (2006.01)
(52) CPC특허분류
C07K 5/0815 (2013.01)
A61K 38/00 (2013.01)
(21) 출원번호 10-2018-0155870
(22) 출원일자 2018년12월06일
심사청구일자 2018년12월06일
(30) 우선권주장
1020180115080 2018년09월27일 대한민국(KR)

(71) 출원인
주식회사 차메디텍
대전광역시 유성구 유성대로 1646, 1동(전민동,
한남대학교 대덕밸리캠퍼스 신기술창업생산집적시
설)
(72) 발명자
이성진
대전광역시 유성구 노은서로266번길 61 리슈빌스
카이 505호
박경용
대전광역시 유성구 문화원로 77 그랑펠리체아파트
702호
(뒷면에 계속)
(74) 대리인
특허법인주원

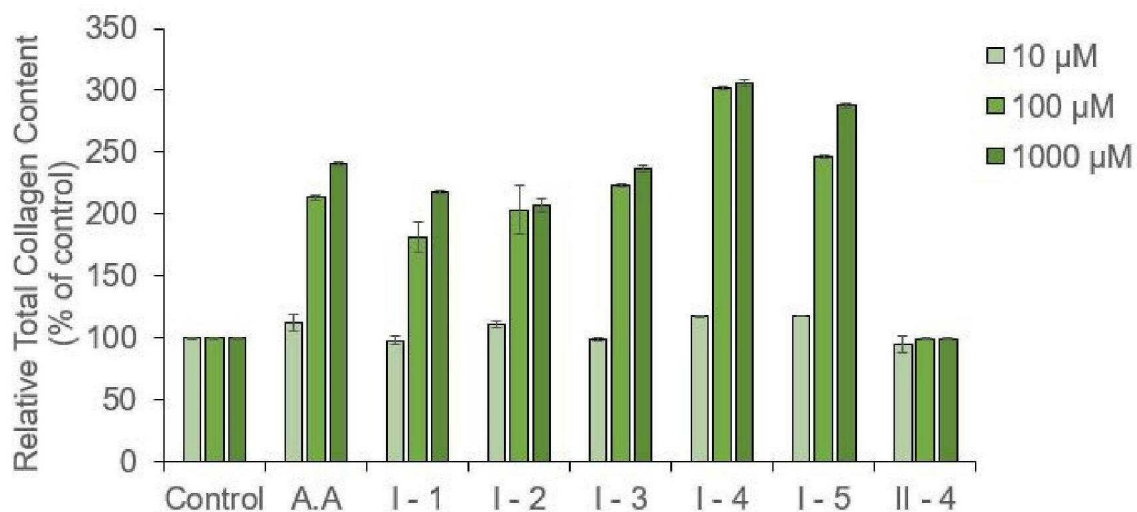
전체 청구항 수 : 총 5 항

(54) 발명의 명칭 **비타민 C가 결합된 펩타이드 유도체 및 이를 포함하는 조성물**

(57) 요약

본 발명은 비타민 C가 결합된 펩타이드 유도체 또는 이의 약학적으로 허용 가능한 염을 포함하는 콜라겐 촉진에 의한 주름개선용 또는 방지용 조성물에 관한 것이다.

대표도 - 도4



(52) CPC특허분류

A61K 8/64 (2013.01)
A61P 17/00 (2018.01)
A61Q 19/00 (2013.01)
C07K 5/1008 (2013.01)
C07K 7/06 (2013.01)

강준구

충청북도 청주시 서원구 천수로 37-1

(72) 발명자

김지연

대전광역시 중구 계룡로771번길 77 을지대학교 범
 석관 708호

이 발명을 지원한 국가연구개발사업

과제고유번호 R0005809

부처명 산업통상자원부

연구관리전문기관 한국산업기술진흥원

연구사업명 경제협력권산업육성사업 (지역주도형 R&D)

연구과제명 인태줄유래 (cord-stem cell) 피부 줄기세포 활성을 유도하는 항노화 기능성 소재 개발

기 여 율 1/1

주관기관 (주)차메디텍

연구기간 2016.10.01 ~ 2018.09.30

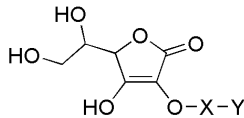
명세서

청구범위

청구항 1

하기 화학식 1로 표시되는 펩타이드-비타민 C 유도체 또는 이의 약학적으로 허용 가능한 염

<화학식 1>



(상기 화학식 1의 주름 개선 조성물에서,

X는 숙시닐기 (succinyl group) 이고,

Y는 글루탐산(Glu), 아스파르트산(Asp), 글루타민(Gln), 아스파라긴 (Asn), 히스티딘(His), 라이신(Lys), 아르기닌(Arg), 세린(Ser), 시스테인(Cys), 알라닌(Ala), 글라이신(Gly), 루이신(Leu), 이소루이신(Ile), 발린(Val), 트레오닌(Thr), 메티오닌(Met), 프롤린(Pro), 페닐알라닌(Phe), 타이로신(Tyr) 및 트립토판(Trp)으로 이루어진 군에서 선택되는 동일하거나 상이한 아미노산이 아마이드 결합하여 1 내지 10 이하의 아미노산으로 이루어진 펩타이드이다.)

청구항 2

제1항에 있어서, 상기 Y는 라이신(Lys), 트레오닌(Thr), 세린(Ser), 발린(Val), 글라이신(Gly), 알라닌(Ala), 프롤린(Pro), 글루탐산(Glu)으로 이루어진 군에서 선택되는 동일하거나 상이한 아미노산이 아마이드 결합하여 1 내지 10 이하의 아미노산으로 이루어진 펩타이드-비타민 C 유도체

청구항 3

제1항에 있어서, 상기 Y는 라이신(Lys), 트레오닌(Thr), 세린(Ser), 발린(Val), 글라이신(Gly), 알라닌(Ala), 프롤린(Pro), 글루탐산(Glu)으로 이루어진 군에서 선택되는 동일하거나 상이한 아미노산이 아마이드 결합하여 1 내지 7 이하의 아미노산으로 이루어진 펩타이드-비타민 C 유도체

청구항 4

제1항에 따른 펩타이드-비타민 C 유도체 또는 이의 약학적으로 허용 가능한 염을 유효성분으로 포함하는 피부 주름개선 또는 방지용 조성물

청구항 5

비타민 C의 2번 탄소 위치의 하이드록시기에 숙시닐기를 도입하는 단계;

상기 숙시닐기의 말단에 글루탐산(Glu), 아스파르트산(Asp), 글루타민(Gln), 아스파라긴 (Asn), 히스티딘(His), 라이신(Lys), 아르기닌(Arg), 세린(Ser), 시스테인(Cys), 알라닌(Ala), 글라이신(Gly), 루이신(Leu), 이소루이신(Ile), 발린(Val), 트레오닌(Thr), 메티오닌(Met), 프롤린(Pro), 페닐알라닌(Phe), 타이로신(Tyr) 및 트립토판(Trp)으로 이루어진 군에서 선택되는 동일하거나 상이한 아미노산이 아마이드 결합하여 1 내지 10 이하의 아미노산으로 이루어진 펩타이드와 결합시키는 단계를 포함하는, 제1항에 따른 펩타이드-비타민 C 유도체 또는

이의 약학적으로 허용 가능한 염의 제조방법

발명의 설명

기술 분야

[0001] 본 발명은 비타민 C가 결합된 펩타이드 유도체 또는 이의 약학적으로 허용 가능한 염을 포함하는 콜라겐 촉진에 의한 주름개선용 또는 방지용 조성물에 관한 것이다.

배경 기술

[0003] 사람의 피부는 크게 표피(epidermis), 진피(dermis), 피하조직(hypodermis)의 3개층으로 나누어지며, 표피는 가장 얇은 층으로 피부의 보습 및 보호를 담당하는 역할을 하고, 각질층은 각질을 만드는 각질형성세포(keratinocyte)와 피부색과 관련된 멜라닌을 만드는 멜라닌 세포(melanocyte)가 존재한다. 피부의 95%를 이루고 있는 진피는, 콜라겐(collagen)과, 엘라스틴(ellastin) 등과 같은 단백질을 포함하고 있으며, 피부 탄력 및 주름에 중요한 역할을 한다. 피하조직은 피하지방층으로 되어 있으며, 표피 및 진피로의 영양공급 및 체온유지 등의 역할을 하고 있다.

[0004] 이와 같은 역할을 하는 사람의 피부는 시간이 지남에 따라, 노화가 진행되면서, 피부 탄력 손실, 주름 생성 등의 변화가 발생되게 됩니다. 특히, 외부의 자외선에 의해 생성된 활성 산소는, 단백질 분해 효소(matrix metalloproteinase-1; MMP-1 등)들을 활성화하여, 피부의 진피층에 존재하는 콜라겐과 엘라스틴 같은 물질을 분해시켜, 피부 주름을 유발시키는 역할을 하고 있다.

[0005] 피부의 탄력과 주름 감소를 유지하기 위하여, 여러 가지 연구가 진행되고 있으며, 그 예로 1) 진피층에 존재하는 콜라겐 및 엘라스틴 합성을 촉진하는 물질 개발; 2) 단백질 분해 효소(MMP-1)를 억제하는 물질 개발; 3) 외부 자극에 의해서 형성된 활성 산소를 제거하는 물질 개발 등을 포함하고 있다.

[0006] 항 노화 물질인 비타민 C는 콜라겐의 생성 촉진, 타이로신에이즈의 억제에 의한 멜라닌 형성 지연, 항산화 작용, 면역 기능 향상 등과 같은 활성을 가지고 있기 때문에, 특히, 화장품 분야에서 노화 방지 및 미백 제품에 많이 사용이 되고 있다. 그러나, 비타민 C는 세포 투과성이나, 열이나 빛 등의 외부 환경에 의한 안정성에 많은 문제점을 가지고 있기 때문에, 이를 극복하기 위해 2번 위치에 (-) 전하가 도입된, 비타민 C 유도체 등이 개발되고 있다. 이와 같은 안정화 된 비타민 C 유도체는 L-ascorbyl-2-phosphate (AA-2P), Magnesium L-ascorbyl-2-phosphate (MAP), L-ascorbyl-2-glucoside (AA-2G), L-ascorbyl-2-sulfate 등을 포함하고 있지만, 비타민 C 자체 화합물 보다 효능 측면에서 떨어지며, 여전히 안전성 및 안정성에 대한 개선 연구가 필요한 사항이다.

[0007] 최근에는 비타민 C에 펩타이드를 결합한 연구 내용이 보고 되고 있다. 대한민국 특허등록 10-2004-0094302 (펩타이드가 결합된 비타민 C 유도체, 이의 제조방법 및 이를 포함하는 조성물)에서는 비타민 C의 2번 위치에 에테르 링커를 도입하고, 6번 위치에 에스터 링커를 도입하여, 펩타이드를 결합하였으며, 대한민국 특허등록 10-0857846 (펩타이드-비타민C 유도체 및 이의 용도)에서는 2번 위치에 포스페이트 그룹 도입과 5번 위치에 에스터 링커 도입 후, 펩타이드 결합을 진행한 연구가 보고되었다. 그러나, 이와 같은 연구는 비타민 C 유도체 합성 및 펩타이드 결합 반응 과정이 복잡하고, 안정성에 문제가 있기 때문에, 경제적인 측면에서 문제가 대두되고 있다.

[0008] 본 발명자는, 생체내 콜라겐 합성 물질 증가에 중점을 두고 연구를 진행하였다. 콜라겐 물질의 합성이 증가하면, 진피 성분이 증가되어, 주름 개선 및 탄력이 증가될 것이라고 기대할 수 있으며, 이와 같은 콜라겐 촉진 화합물은, 비타민 C 화합물과 세포의 메신저 역할을 하는 펩타이드를 결합하여, 이전 보다 콜라겐 합성 능력이 증가된 화합물 개발을 진행하였다. 그 결과 비타민 C의 2번 위치에 결합된 펩타이드 유도체들을 합성하였고, 이와 같은 화합물은 비타민 C 화합물과 비교하여, 매우 우수한 콜라겐 합성 능력과 낮은 독성을 나타냄으로써 본 발명을 완성하였다.

선행기술문헌

특허문헌

[0010] (특허문헌 0001) KR 100691540 B1

발명의 내용

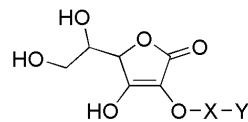
해결하려는 과제

[0011] 본 발명의 목적은, 비타민 C를 포함하면서, 콜라겐 생성 펩타이드가 결합되어 있는 주름 개선용 조성물을 개발하는 것으로서, 비타민 C의 안정성이 개선되면서, 콜라겐 생성 효능을 증가시키는 화합물 제공에 목적이 있다

과제의 해결 수단

[0012] 본 발명은 하기 화학식 1로 표시되는 펩타이드-비타민 C 유도체 또는 이의 약학적으로 허용 가능한 염을 제공한다.

[0013] <화학식 1>



[0014] (상기 화학식 1의 주름 개선 조성물에서,

[0015] X는 숙시닐기 (succinyl group) 이고,

[0016] Y는 글루탐산(Glu), 아스파르트산(Asp), 글루타민(Gln), 아스파라긴 (Asn), 히스티딘(His), 라이신(Lys), 아르기닌(Arg), 세린(Ser), 시스테인(Cys), 알라닌(Ala), 글라이신(Gly), 루이신(Leu), 이소루이신(Ile), 발린(Val), 트레오닌(Thr), 메티오닌(Met), 프롤린(Pro), 페닐알라닌(Phe), 타이로신(Tyr) 및 트립토판(Trp)으로 이루어진 군에서 선택되는 동일하거나 상이한 아미노산이 아마이드 결합하여 1 내지 10 이하의 아미노산으로 이루어진 펩타이드이다.)

[0017] 또한 본 발명은 상기 펩타이드-비타민 C 유도체 또는 약학적으로 허용 가능한 염을 유효성분으로 포함하는 피부 주름개선 또는 방지용 조성물을 제공한다.

[0018] 또 다른 예로, 본 발명은 비타민 C의 2번 탄소 위치의 하이드록시기에 숙시닐기를 도입하는 단계; 상기 숙시닐기의 말단에 글루탐산(Glu), 아스파르트산(Asp), 글루타민(Gln), 아스파라긴 (Asn), 히스티딘(His), 라이신(Lys), 아르기닌(Arg), 세린(Ser), 시스테인(Cys), 알라닌(Ala), 글라이신(Gly), 루이신(Leu), 이소루이신(Ile), 발린(Val), 트레오닌(Thr), 메티오닌(Met), 프롤린(Pro), 페닐알라닌(Phe), 타이로신(Tyr) 및 트립토판(Trp)으로 이루어진 군에서 선택되는 동일하거나 상이한 아미노산이 아마이드 결합하여 1 내지 10 이하의 아미노산으로 이루어진 펩타이드와 결합시키는 단계를 포함하는, 제1항에 따른 펩타이드-비타민 C 유도체 또는 이의 약학적으로 허용 가능한 염의 제조방법을 제공한다.

[0019] 상기 제조된 본 발명의 펩타이드가 결합된 비타민 C 유도체 또는 이의 약학적으로 허용 가능한 염은 우수한 항산화, 항노화, 피부주름 개선을 나타낼 뿐만 아니라, 피부 자극, 감작성, 및 광독성 등을 나타내지 않는다. 또한, 본원 발명의 비타민 C 유도체는 친수성의 비타민 C가 피부와 유사한 친유성을 갖도록 콜라겐 생성 펩타이드 등을 결합시켜 유도체화 되어 있으므로, 피부 침투력도 매우 우수하다. 또한, 이와 같이 콜라겐 생성 펩타이드가 결합된 경우 피부 주름개선 효과에 대하여 상승적인 효과를 나타낼 수 있다.

[0020] 따라서, 본 발명의 또 다른 측면에 있어서, 본 발명은 유효성분으로 화학식 1의 구조를 갖는 화합물 및 이들의 약학적으로 허용 가능한 염으로 이루어진 군 중에서 선택된 1종 이상을 함유하는 피부 개선용 조성물에 관한 것이다. 상기 조성물은 경피 투여를 위하여 피부 외용으로 적용되는 것이 바람직하며, 상기 유효성분의 우수한 경피 흡수성과 안정성으로 인하여, 피부 노화 방지, 주름 개선, 피부 거칠음 개선, 보습 등에 있어서 우수한 효과를 나타내어, 우수한 피부 상태 개선 및 피부 상태 악화 억제 효과를 갖는다.

- [0023] 본원에서 용어, '약학적으로 허용 가능한 염'이란 약학적으로 허용되는 무기산, 유기산, 또는 염기로부터 유도된 염을 포함한다. 적합한 산의 예로는 염산, 브롬산, 황산, 질산, 과염소산, 푸마르산, 말레산, 인산, 글리콜산, 락트산, 살리실산, 숙신산, 톨루엔-p-설폰산, 타르타르산, 아세트산, 시트르산, 메탄설폰산, 포름산, 벤조산, 말론산, 나프탈렌-2-설폰산, 벤젠설폰산 등을 들 수 있다. 적합한 염기로부터 유도된 염은 나트륨 등의 알칼리 금속, 마그네슘 등의 알칼리 토금속, 및 암모늄 등을 포함할 수 있다.
- [0024] 본 명세서에 있어서, 상기 '피부의용'이란 용어는 피부의 보습효과, 주름 억제효과, 피부 거칠음 개선효과, 경피 흡수 촉진효과 등의 다양한 효과를 나타내어 피부 상태를 개선하거나 피부 상태의 악화를 억제하기 위해 사용한다는 것을 의미한다. 본 발명의 피부의용제는 화장품, 의약품, 특히, 연고 등의外用 의약품 등으로 사용될 수 있다. 그 중에서도 화장품 형태의 사용이 바람직하며, 이러한 화장품의 형태는 특별히 한정되지 않는다.
- [0025] 본 발명에 따른 조성물 내의 유효성분으로서의 화학식 1의 구조를 갖는 화합물 및 이들의 약학적으로 허용 가능한 염으로 이루어진 군 중에서 선택된 1 종 이상의 물질의 함량은 조성물의 적용 용도, 형태 및 목적 등에 의하여 적절하게 결정될 수 있다. 상기 유효 함량의 조성물 내 함량이 0.001% 미만인 경우에는 실질적인 피부 개선 효과를 얻을 수 없으므로, 상기 범위 이상인 것이 좋다. 본 발명의 바람직한 구체예에 있어서, 본 발명의 피부 개선용 조성물은 상기 유효 성분을 0.001 내지 50%(ww), 바람직하게는 0.001 내지 5%(w/w), 보다 바람직하게는 0.01 내지 3%(w/w)의 양으로 함유하는 것일 수 있다.
- [0026] 상기 본 발명의 화장품 조성물 및 약학 조성물은 상기 유효성분 이외에, 통상의 제품화 또는 제제화에 사용 가능한 모든 종류의 성분, 예컨대 향료, 색소, 살균제, 산화방지제, 방부제, 보습제, 점증제, 부형제, 희석제, 무기염류 및 합성 고분자 물질 등을 추가로 포함할 수 있으며, 그 종류와 함량은 최종 산물의 용도 및 사용 목적에 따라 적절하게 조절할 수 있다.
- [0027] 또한, 본 발명의 조성물은 적용되는 형태에 통상적으로 포함되는 용매를 포함하는 것일 수 있으며, 예컨대, 에탄올, 글리세린, 부틸렌글리콜, 프로필렌글리콜, 폴리에틸렌글리콜, 1,2,4-부탄트리올, 솔비톨에스테르, 1,2,6-헥산트리올, 벤질알코올, 이소프로판올, 부탄디올, 디에틸렌글리콜 모노에틸에테르, 디메틸이소소르비드, N-메틸-2-피롤리돈, 프로필렌카보네이트, 글리세레스-26, 메틸글루세스-20, 이소세틸미리스테이트, 이소세틸옥타노에이트, 옥틸도데실미리스테이트, 옥틸도데칸올, 이소스테아릴이소스테아레이트, 세틸옥타노에이트 및 네오펜틸글리콜디카프레이트 등 중에서 선택된 1 종 이상을 포함할 수 있다. 이러한 용매를 사용하여 본 발명의 조성물을 제조하는 경우 화합물의 종류에 따라 또는 용매의 혼합비에 따라 용매에 대한 화합물의 용해도가 조금씩 다르나, 본 발명이 속하는 기술 분야의 당업자라면 제품의 특성에 따라 용매의 종류 및 사용량을 알맞게 선택하여 적용할 수 있다.
- [0028] 또한, 본 발명의 조성물은 경피 투여시의 경피 투과를 강화하기 위한 다양한 물질을 포함할 수 있다. 예를 들어, 라우로캡람 유도체 및 올레인산, 모노올레이트 유도체의 에스테르 유도체, 아다팔렌, 트리티노인, 레티알데하이드, 타자로틴, 살리실산, 아질라익산, 글라이콜산, 에톡시다이글라이콜, 트윈 80, 레시틴 올가노겔 등을 포함할 수 있다. 또한, 본 발명의 조성물은 부가적인 기능을 부여하기 위해, 본 발명의 보습 효과를 부여해주는 조성물의 효과를 해치지 않는 범위 내에서 공계면활성제, 계면활성제, 비듬 방지제, 각질 연화제, 혈행 촉진제, 세포 활성제, 청량제, 보습제, 항산화제, pH 조절제, 정제수 등의 보조 성분들을 첨가할 수 있으며, 적용되는 형태에 따라서 적절한 향료, 색소, 방부제, 부형제 등의 첨가제를 함유할 수 있다.

발명의 효과

- [0029] 본 발명의 비타민 C가 결합된 펩타이드 유도체는 피부 자극에 대한 독성이 없이, 주름 개선 효과를 증가시켜 주어서, 약학 및 화장품 조성물 등의 산업 분야에 매우 유용한 물질이다.

도면의 간단한 설명

- [0031] 도 1은 본 발명에 따른 비타민 C가 결합된 펩타이드 유도체 I-4번 화합물의 LC-Mass 데이터를 보여주는 것이다.
- 도 2는 본 발명에 따른 비타민 C가 결합된 펩타이드 유도체 I-4번 화합물의 HPLC 데이터를 보여주는 것이다.
- 도면 3은 본 발명에 따른 비타민 C가 결합된 펩타이드 유도체 I-1~I-5, II-4번 화합물의 세포 독성에 대한 결과를 보여주는 것이다.

도면 4는 본 발명에 따른 비타민 C가 결합된 펩타이드 유도체 I-1~I-5, II-4번 화합물의 콜라겐 생합성 능력에 대한 결과를 보여주는 것이다.

도면 5는 본 발명에 따른 비타민 C가 결합된 펩타이드 유도체 I-4과 I-5번 화합물의 COL1A1, ELN 및 MMP-1 발현 결과를 보여주는 것이다.

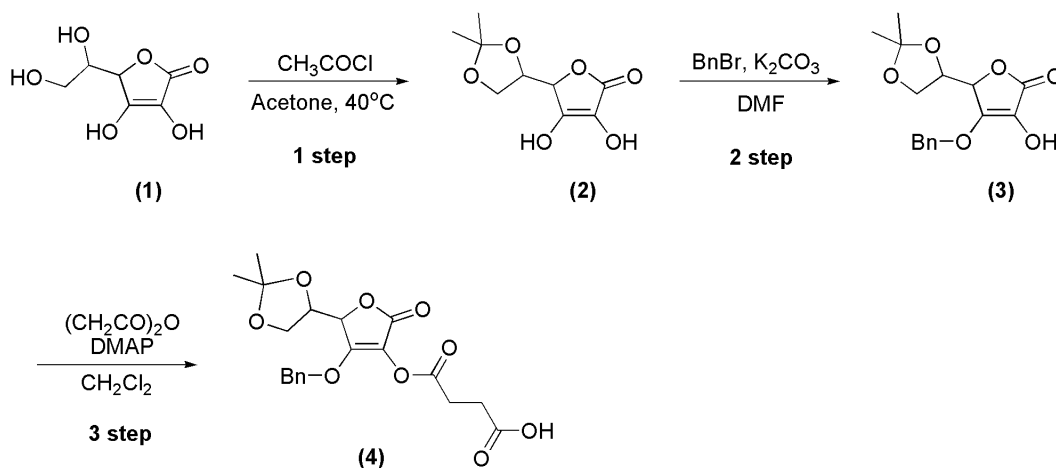
발명을 실시하기 위한 구체적인 내용

이하, 본 발명을 실시예에 의해 상세히 설명한다. 단, 하기 실시예는 본 발명을 예시하는 것일 뿐, 본 발명이 하기 실시예에 의해 한정되는 것은 아니다.

실시예 1. 비타민 C 유도체의 (4) 합성

본 발명에서는 비타민 C 유도체인 (4) 화합물이 반응식1에 의해서 총 3가지 단계로 합성이 되었다. (1단계 - 다이알코올의 acetal 보호기 도입 반응; 2단계 - 3번 위치의 O-benzyl 그룹 도입 반응; 3단계 - 2번 위치의 succinoyl 그룹 도입 반응

<반응식 1>



5,6-O-Isopropylidene-L-ascorbic acid (2) 합성 예시

1000 ml round flask에 L-ascorbic acid (1) 79.25 (450 mmol)와 acetone (400 ml)을 첨가하고, 이용액을 0 ℃로 냉각시킨다. 상기 혼합물에, (2) acetyl chloride 35.19 ml (495 mmol, 1.1 equiv.)을 천천히 첨가한 후에, 반응 온도를 40 ℃로 유지하면서 교반을 한다. 반응물을 0 ℃로 냉각시키고, glass filter를 이용하여, 필터를 한 다음, diethyl ether로 2회 세척을 하여, 최종적으로 희색의 고체 화합물 5,6-O-Isopropylidene-L-ascorbic acid (2)을 89.5 g 얻었다. (수율: 92%)

5,6-O-Isopropylidene-3-O-benzyl-L-ascorbic acid (3) 합성 예시

1000 ml round flask에, N,N-dimethylformamide (DMF) 300 ml에 녹인 5,6-O-Isopropylidene-L-ascorbic acid (2) 86.47 g (400 mmol)을 첨가한다. 상기 혼합물에 potassium carbonate 27.64 g (200 mmol, 0.5 equiv.)을 넣고, 실온에서 10분 동안 교반을 한 다음, benzyl bromide 34.21 g (200 mmol, 0.5 equiv.)을 첨가한다. 실온에서 4시간 동안 교반을 한 후에, 감압하에서 용매를 제거한 다음, 농축 용액을 ethyl acetate로 녹여, NaHSO₄로 3번 정도 세척을 한다. 추출한 유기 용매를 Na₂SO₃로 탈수 및 여과를 하고, 이 여액을 감압하에서 농축한 다음, silica column chromatography [Ethyl acetate:Hexane=1:4 (v/v)]로 정제를 하여, 연한 노란색의 고체 화합물 5,6-O-Isopropylidene-3-O-benzyl-L-ascorbic acid (3)을 43.5 g 얻었다. (수율: 36%)

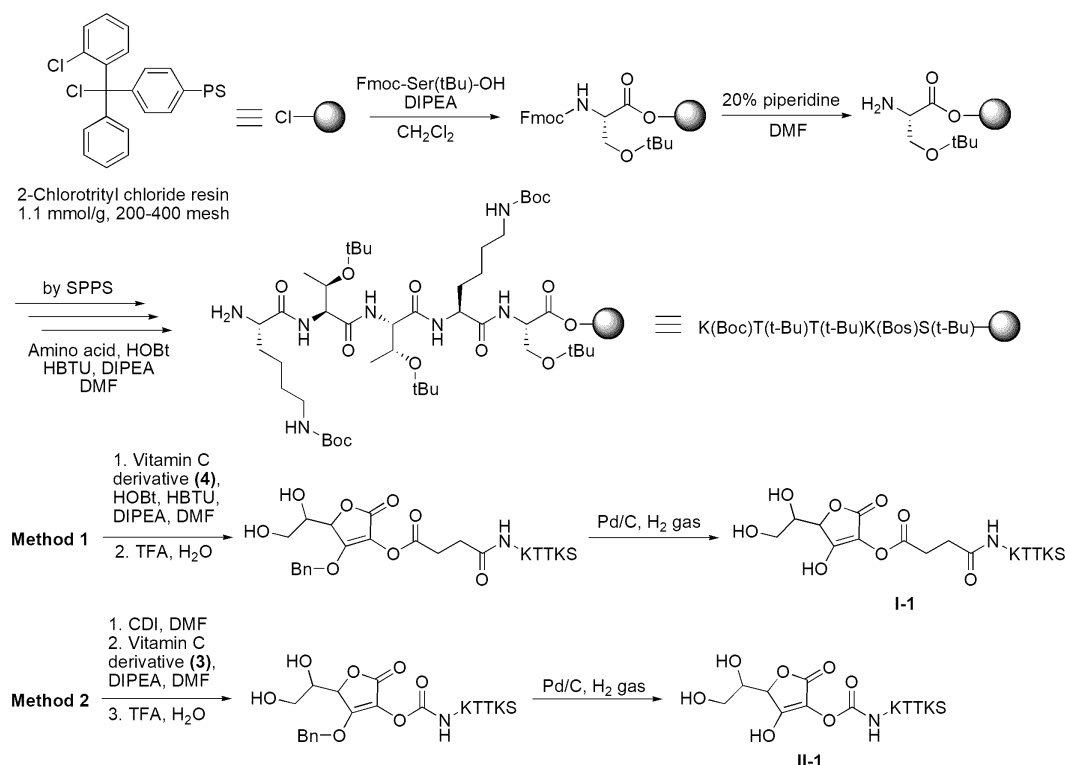
[0046] 5,6-*O*-Isopropylidene-2-*O*-succinyl-3-*O*-benzyl-L-ascorbic acid (4) 합성 예시

[0047] 500 ml round flask에, 5,6-*O*-Isopropylidene-3-*O*-benzyl-L-ascorbic acid (3) 42.88 g (140 mmol)을 넣고, dichloromethane (DCE) 200 ml에 녹인 후에, succinic anhydride 21 g (210 mmol, 1.5 equiv.)와 4-(dimethylamino)pyridine 18.81 g (154 mmol, 1.1 equiv.)을 첨가한다. 실온에서 4 시간 동안 교반한 후에, 감압하에서 용매를 제거한다. 농축된 용매를 ethyl acetate로 다시 녹인 후에, brine으로 3번 세척을 하고, 분리된 유기 용매를 Na₂SO₃로 탈수 및 여과를 하여, 연한 노란색의 고체 화합물 5,6-*O*-Isopropylidene-2-*O*-succinyl-3-*O*-benzyl-L-ascorbic acid (4)을 54.2 g 얻었다. (수율: 95%)

[0049] 실시예 2. 펩타이드와 vitamin C 유도체의 컨쥬게이션 화합물의 합성

[0051] 본 발명에서 구체적인 실시예들은, 고체상 합성 방법인 SPPS (solid phase peptide synthesis)를 이용하여, 합성하였다. I-1~I-5번 화합물은, 합성된 펩타이드 레진과 vitamin C 유도체 (4)와의 커플링 반응을 진행하여, 합성하였으며 (Method 1), II-1~II-5번 화합물은, 합성된 펩타이드 레진에 CDI (1,1'-carbonyldiimidazole)와의 반응과 vitamin C 유도체 (3)과의 커플링 반응을 진행하여, 합성하였다 (Method 2). <반응식 2>는 펩타이드 유도체 I-1과 II-1 화합물의 전체 합성 모식이다. 펩타이드와 vitamin C 유도체의 커플링 반응은 고체상 합성 방법을 이용하여 반응을 진행하였으며, 총 4가지 단계로 합성을 진행하였다. 합성 방법은 1) 펩타이드 합성; 2) 펩타이드와 vitamin C 유도체와의 커플링 반응; 3) 레진 및 보호기 제거 단계; 4) benzyl 그룹의 제거 반응순이다.

[0052] <반응식 2>



[0053]

[0055] 이와 같은 합성 방법은 단계별로 다음과 같이 자세히 설명할 수 있다.

[0057] 1) 펩타이드는, 레진에 아미노산의 로딩 - Fmoc 보호기의 제거 - 아미노산의 커플링 반응 - kaiser test의 4가지 방법으로 합성이 된다. Novabiochem 회사로부터 구입한 2-chlorotrityl chloride resin (1.1 mmol/g) 454

mg (500 μ mol)을 dichloromethane (DCE)를 이용하여 팽윤한 다음 (swelling), 아미노산 (3 당량)과 DIPEA (N,N-Diisopropylethylamine, 6 당량)을 첨가하여, 4 시간 동안 반응을 시킨다. 아미노산 N-term의 Fmoc (9-Fluorenylmethoxycarbonyl) 제거 반응을 진행하기 위하여, 20% piperidine,으로 희석된 DMF를 이용하여, 5 min X 2회 교반을 하였다. 아미노산과의 커플링 반응은, 4 시간 동안 HOBt (1-hydroxybenzotriazole, 3 당량)/HBTU(N,N,N',N'-Tetramethyl-O-(1H-benzotriazol-1-yl)uranium hexafluorophosphate, 3 당량)/DIPEA(N,N-Diisopropylethylamine, 6 당량) 시약을 이용하여 반응을 진행하였다. 반응 진행 여부는, 레진에 Kaiser test 3종 용액을 첨가하고, 120 $^{\circ}$ C에서 3분 동안 열을 가하여, 확인하였다. 레진 색깔이 푸른색을 나타내는 경우에는 커플링 반응을 다시 진행하였으며, 레진 색깔 변화가 없을 경우에는 다음 반응을 진행하였다. 이와 같은 커플링 과정을 반복하여, 원하는 서열을 갖는 펩타이드를 합성하였다.

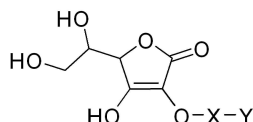
[0058] 2)) 펩타이드와 vitamin C 유도체와의 커플링 반응은, 2가지 방법에 의하여 합성하였다. Method 1 방법은 레진-펩타이드가 함유되어 있는 반응기에 활성화된 vitamin C 유도체 [vitamin C 유도체 (4) (2 당량), HOBt (2 당량), HBTU (2 당량), DIPEA (4 당량)]를 첨가하여, 16 시간 동안 실온에서 반응하였으며, method 2 방법은 레진-펩타이드가 함유되어 있는 반응기에 CDI (10 당량)를 첨가하여, 활성화 시킨 다음, vitamin C 유도체 [vitamin C 유도체 (3) (2 당량), DIPEA (4 당량)]를 첨가하여, 16 시간 동안 실온에서 반응하였다. 반응 여부는 kaiser test로 확인을 진행하였다.

[0059] 3) 레진 및 보호기를 제거하기 위하여, cleavage cocktail 용액을 이용하였다. 이 때, cleavage cocktail은 아미노산의 종류에 따라서 변형이 될 수 있지만, 일반적으로 TFA(trifluoroacetic acid):TIS(triisopropylsilane) : thioanisole : EDT(ethanedithiol) : H₂O = 90:2.5:2.5:2.5:2.5 (v/v/v/v/v) 용액으로 레진 및 보호기를 제거하였다.

[0060] 4) benzyl 그룹의 제거는 Pd/C 촉매를 이용하여 진행을 하였다. 레진 및 보호기가 제거된 vitamin C-펩타이드 결합 화합물을 물에 용해시킨 다음, Pd/C (10 wt%)를 첨가하고, H₂ 가스로 충전하여, 2 시간 동안 실온에서 격렬하게 교반을 하여, 화합물을 얻었다.

[0062] 이와 같은 펩타이드-vitamin C 유도체의 컨쥬게이션 화합물은, prep. HPLC (High-performance liquid chromatography)를 이용하여, 정제를 진행하고, 동결 건조를 하여, 최종적인 화합물을 얻었다.

[0064] [화학식 1]



[0065]

표 1

[0067]

No.	X	Y	이론치 분자량	실험치 분자량
I-1	succinyl	KTTKS	821.8	822.7
I-2	succinyl	VGAPG	756.7	757.5
I-3	succinyl	KVK	631.6	632.5
I-4	succinyl	GEKG	647.6	648.4
I-5	succinyl	AHK	612.2	613.3
II-1	carbamoyl	KTTKS	765.7	766.5
II-2	carbamoyl	VGAPG	700.6	701.5
II-3	carbamoyl	KVK	575.6	576.8
II-4	carbamoyl	GEKG	591.5	592.4
II-5	carbamoyl	AHK	556.1	557.2

[0069] 상기 제시된 합성 방법을 이용하여, 펩타이드-vitamin C 컨쥬게이션 화합물을 (I-1~I-5, II-1~II-5) 합성하였으며, prep. HPLC를 이용하여, 정제를 하였다. 합성된 화합물들의 분자량, 순도를 LC-Mass와 anal. HPLC(High Performance Liquid Chromatography)를 이용하여 확인하였으며, 이에 대한 실험 결과를 상기 표 1에 나타내었다. 또한, I-4 화합물에 대한 합성 결과를 도 1과 도 2에 나타내었다.

[0071] 실시예 3. 인간 피부섬유아세포의 독성 여부 시험

[0073] 펩타이드-vitamin C 컨쥬게이션 화합물인, I-1~I-5 및 II-1~II-5가 콜라겐 합성을 하는 피부 섬유 아세포에서의 독성 여부를 확인하였다. 인간 피부섬유아세포 (Human normal skin fibroblast, CCD-986sk)는 한국세포주은행 (Korea Cell Line Bank, No.21947)에서 구매를 했으며, 세포 배양액은 Iscove's Modified Dulbecco's Medium (IMDM, Gibco, USA)에 10% fetal bovine serum (FBS, Corning, USA), 10% penicillin (100 unit/mL)과 streptomycin (100 g/mL)을 첨가하여 사용하였다. 세포 배양조건은 37°C, 95% 습도, 5% CO₂ incubator에서 진행하였으며, passage 6~8의 섬유아세포를 실험에 사용하였다.

[0074] 인간 피부섬유아세포에 펩타이드-vitamin C 컨쥬게이션 화합물을 처리하였을 때, 세포 독성여부를 확인하기 위하여, 3차 증류수에 녹인 각각의 펩타이드를 1, 10, 100 및 1000 µM 농도로 처리한 후에 72시간 동안 배양하였다. CCK-8 assay 방법을 이용하여 cell의 viability를 측정하였으며, 그 결과는 다음과 같이 하기 표 2와 도 3에 나타내었다.

표 2

구분	처리 물질	처리 농도 (µM)	Cell viability (%)
실시예	I -1	1	99.3
		10	98.4
		100	95.8
		1000	95.1
	I -2	1	96.3
		10	96.7
		100	96.9
		1000	95.5
	I -3	1	98.3
		10	97.7
		100	99.2
		1000	101.2
	I -4	1	97.0
		10	96.3
		100	98.7
		1000	98.3
	I -5	1	99.0
		10	99.5
		100	101.1
		1000	101.4
	II-4	1	99.1
		10	99.9
		100	102.0
		1000	101.9

[0078] 상기 제시된 펩타이드-vitamin C 컨쥬게이션 화합물을 농도(1 ~ 1000 µM)에 따라 처리한 결과, 인간 피부섬유아세포 성장에 영향을 주지 않았다. 따라서, 합성된 화합물들이 독성 없이 우수한 안정성을 나타낸다는 것을 확인할 수 있었다.

[0080] 실시예 4. 인간 피부섬유아세포의 콜라겐 생합성 유도 시험

[0082] 인간 피부섬유아세포의 펩타이드-vitamin C 컨주게이션 화합물 처리에 따른 콜라겐 합성 촉진 여부를 확인하였다. 5×10^4 cells/mL 농도로 인간 피부섬유아세포를 96-well plate에 100 μ l씩 분주하고, 37°C, 95% 습도, 5% CO₂ incubator에서 24시간 동안 배양하였다. 배양 후, 배지를 10% FBS를 포함하는 IMDM으로 교환하고, 상기 실시예의 펩타이드-vitamin C 컨주게이션 화합물을 10 μ M, 100 μ M 또는 1000 μ M 농도로 처리하고 72시간 동안 배양하였다. 상기 화합물을 처리하지 않고 3차 증류수를 첨가한 것을 대조군 (Control)으로 사용하였으며, 아스코르빈산 (Ascorbic acid; A.A)을 첨가한 것을 양성 대조군으로 사용하였다.

[0083] 상기 세포를 72시간 동안 배양한 후 배양액을 채취하여 총 콜라겐 (type I, II, III)의 양을 비색측정법 (Total Collagen Assay Kit; Biovision 제조, #K218)을 통해 배양액 중 분비된 총 콜라겐의 농도를 정량 하였다. 대조군의 총 콜라겐 양을 기준 (100%)으로 하여, 각각의 화합물을 처리한 시험군의 배양액 중의 총 콜라겐 양을 산출하였으며, 측정결과는 표 3 및 도 4에 나타내었다.

표 3

구분	처리 물질	처리 농도 (μ M)	총 콜라겐 생산량 (%)
실시예	Ascorbic acid (A.A)	10	112.3
		100	213.5
		1000	240.8
	I -1	10	98.2
		100	181.5
		1000	218.5
	I -2	10	111.2
		100	203.8
		1000	207.2
	I -3	10	99.4
		100	223.8
		1000	237.3
	I -4	10	117.7
		100	301.8
		1000	306.7
	I -5	10	118.6
		100	246.6
		1000	287.9
	II-4	10	104.0
		100	107.9
		1000	110.8

[0087] 상기 실시예의 펩타이드 처리에 따라 생산된 총 콜라겐의 양은 양성대조군인 아스코르빈산 (A.A) 을 처리한 결과와 비교하였을 때, 10 μ M 에서는 크게 차이가 없었으나 100과 1000 μ M 을 처리할 경우 I-1, I-2, I-3, I-4 및 I-5 모두 총 콜라겐 합성량을 증가시키는 것을 확인할 수 있었다. 또한, vitamin C 유도체 골격이 다른 I-4와 II-4를 비교하였을 때, I-4 화합물이 더 효과적인 콜라겐 합성량을 나타내었다.

[0088] 즉, 상기 결과는 처리한 상기 펩타이드들이 피부 또는 인체 세포에 대해 독성 없이 우수한 안정성을 보이며 콜라겐 합성량을 증가시켜 피부세포의 개선을 필요로 하는 미용 등의 용도에 활용할 수 있음을 나타내었다.

[0090] 실시예 5. COL1A1, ELN 및 MMP-1의 mRNA 발현 측정 시험

[0092] 인간 피부섬유아세포 (CCD-986sk)가 발현하는 대표적인 콜라겐 (collagen) 중 하나인 collagen-1 의 유전자인 COL1A1, 탄력단백질 중 하나인 Elastin의 유전자인 ELN 및 콜라겐 분해 효소인 MMP-1 의 유전자인 MMP-1 의 mRNA 발현 변화를 측정하였다.

[0093] 펩타이드에 의한 COL1A1, ELN 및 MMP-1 의 mRNA 발현 정도를 확인하기 위해 인간 피부섬유아세포에 펩타이드를 100 μ M 및 1000 μ M 의 농도로 처리하고 72 시간 동안 배양하였다.

[0094] 유전자 발현 변화는 중합효소 연소 반응 (Polymerase chain reaction, PCR) 에서 증폭되는 DNA 산물에 형광물질 결합 후 지속적으로 형광물질을 검출하는 qRT-PCR (quantitative real-time PCR) 로 측정하였다.

[0095] COL1A1, ELN 및 MMP-1의 mRNA 발현의 변화를 정량하기 위해서, 펩타이드 처리 후 배양된 인간 피부섬유아세포에서 총 RNA 를 분리한 후 (AccuPrep® RNA Extraction Kit, Bioneer Corp., Korea) oligo (dT) primer (프라이머)를 사용하여 1 μ g 의 총 RNA 로부터 cDNA 를 합성하였다 (RocketScript™ Reverse Transcriptase Kit, Bioneer Corp., Korea).

[0096] qRT-PCR 은 ExcelTaq 2X Q-PCR Master Mix (SMOBiO, Hsinchu, Taiwan) 및 CFX96™ Real-Time System (Bio-Rad, USA) 을 통해 수행하였으며, 수행 조건은 95℃에서 3분 동안 예비적 변성 (primary denaturation) 시킨 후 변성 (denaturation), 어닐링 (annealing), 중합 (polymerization) 을 각각 95℃ 에서 15초, 60℃에서 30초, 72℃에서 30초로 총 40 cycle 을 수행하였고, 매 cycle 이 종료된 후 형광강도를 측정하였다.

[0097] qRT-PCR 의 결과는 각 결과별 melting curve로 검증하였다. 각 유전자의 threshold cycle (Ct) 값을 internal standard 인 GAPDH 의 Ct 값으로 표준화한 후, Ct 값의 변화량을 비교하여 분석하였다. 실험에 사용한 프라이머 서열은 하기 표 4 와 같다.

표 4

[0098]

Gene Name	정방향 프라이머	역방향 프라이머
COL1A1	CTGGGGCAAGACAGTGATTG	GGGTTCAGTTTGGGTTCCTT
ELN	CAAGACCTGGCTTCGGATTG	TTCCTTGCCCTGTGGATCT
MMP-1	TGACTTTCCTGGAATTGGCC	TTCCTGCAGTTGAACCAGC
GAPDH	GAGTCAACGGATTGGTCGT	GATCTCGCTCTGGAAGATG

[0100] 상기 펩타이드의 처리에 따른 각 유전자의 mRNA 발현량 측정 결과는 하기 표 5와 같다. 즉, COL1A1 및 ELN 의 mRNA 발현량은 농도 의존적으로 증가한 반면, MMP-1 의 mRNA 발현량은 농도 의존적으로 감소하였다.

[0101] 상기 결과는 상기 펩타이드가 콜라겐 생성과 관련된 유전자의 발현을 증가시켜 총 콜라겐의 생성을 촉진하고 이를 통해 피부 탄력 및 주름 개선에 도움을 주는 피부 미용 관련 제품의 활용에 도움을 줄 수 있을 것을 시사한다.

표 5

[0103]

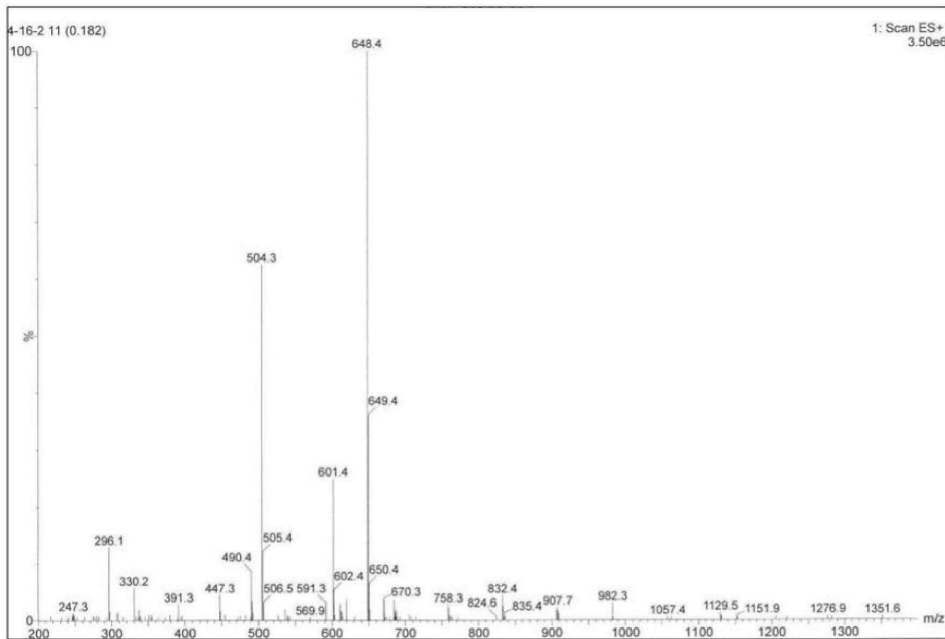
구분			COL1A1 발현량	ELN 발현량	MMP-1 발현량
실시예	I -4	0 μ M	1.00	1.00	1.00
		100 μ M	9.16	9.00	0.31
		1000 μ M	14.96	9.81	0.16
	I -5	0 μ M	1.00	1.00	1.00
		100 μ M	6.68	6.96	0.25
		1000 μ M	7.97	9.30	0.18

[0105] 이상의 설명은 본 발명을 예시적으로 설명한 것에 불과한 것으로, 본 발명이 속하는 기술분야에서 통상의 지식을 가지는 자라면 본 발명의 본질적인 특성에서 벗어나지 않는 범위에서 다양한 변형이 가능할 것이다. 따라서, 본 명세서에 개시된 실시 예들은 본 발명을 한정하기 위한 것이 아니라 설명 하기 위한 것이고, 이러한 실시 예에 의하여 본 발명의 사상과 범위가 한정되는 것은 아니다.

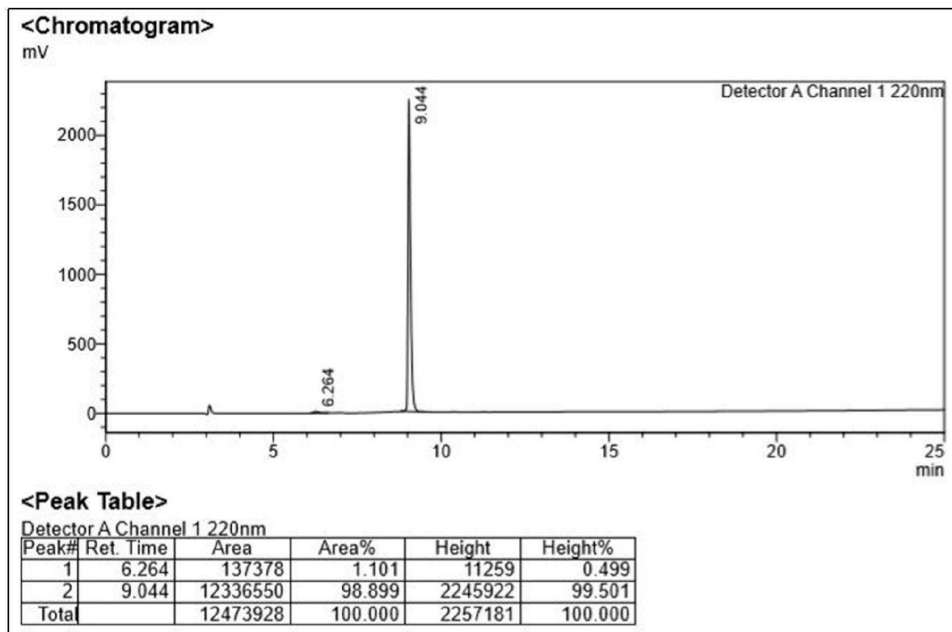
[0106] 본 발명의 보호범위는 아래의 청구범위에 의하여 해석되어야 하며, 그와 동등한 범위 내에 있는 모든 기술은 본 발명의 권리범위에 포함하는 것으로 해석되어야 할 것이다.

도면

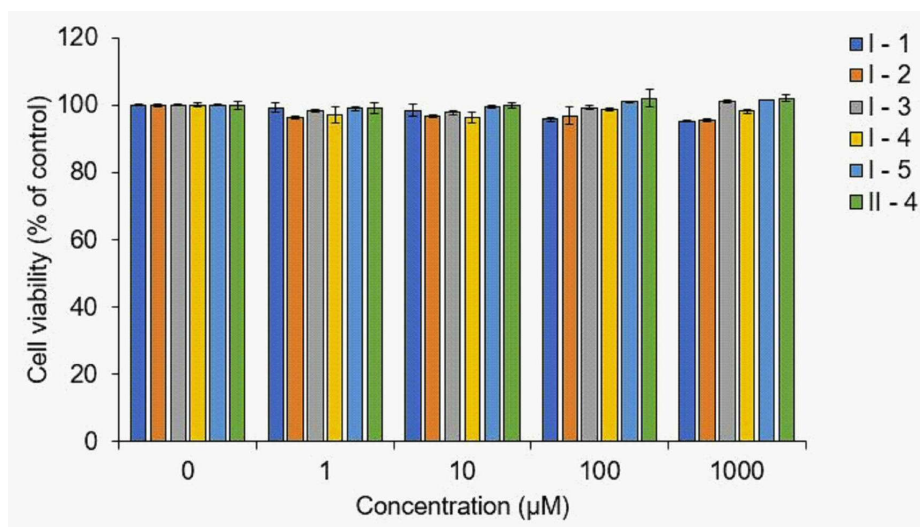
도면1



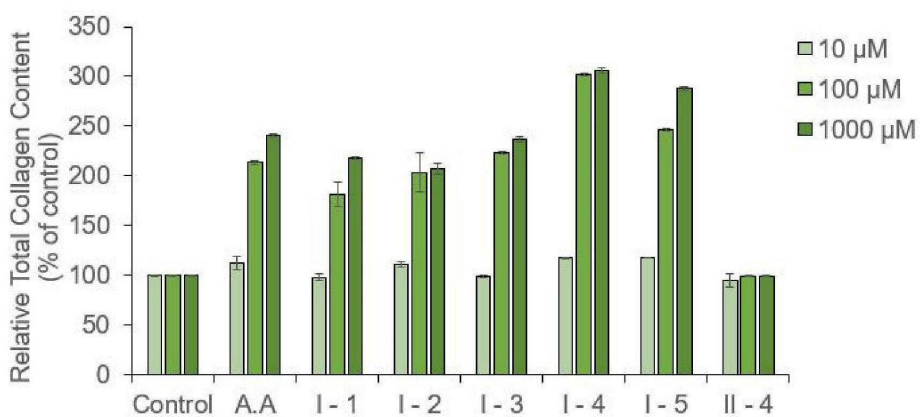
도면2



도면3



도면4



도면5

