



(19) 대한민국특허청(KR)
(12) 공개특허공보(A)

(11) 공개번호 10-2018-0056237
(43) 공개일자 2018년05월28일

(51) 국제특허분류(Int. Cl.)
C07K 5/083 (2006.01) A61K 38/06 (2006.01)
A61K 8/64 (2006.01) A61Q 19/08 (2006.01)
C07C 53/126 (2006.01) C07K 1/04 (2006.01)
C07K 1/06 (2006.01) C07K 1/20 (2006.01)
C07K 1/30 (2006.01) C07K 19/00 (2006.01)

(52) CPC특허분류
C07K 5/0808 (2013.01)
A61K 38/06 (2013.01)

(21) 출원번호 10-2016-0154235

(22) 출원일자 2016년11월18일

심사청구일자 2016년11월18일

(71) 출원인

건양대학교산학협력단

충청남도 논산시 대학로 121 (내동)

(72) 발명자

김광환

대전광역시 서구 관저동로90번길 15 관저리슈빌아파트 107동 1701호

모상현

경기도 성남시 분당구 성남대로 449, 로얄팰리스 A동 806호

(뒷면에 계속)

(74) 대리인

김대영

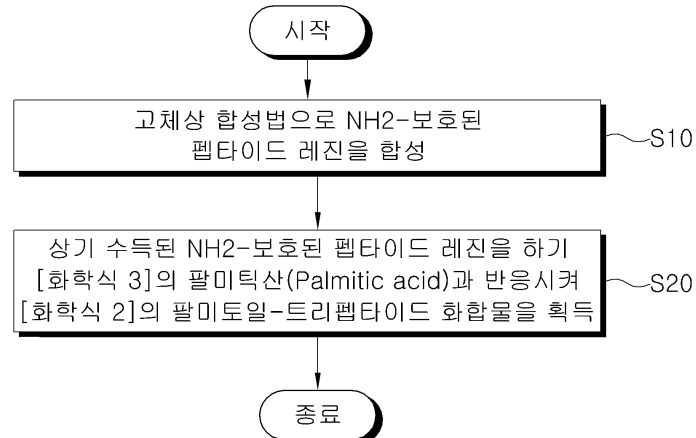
전체 청구항 수 : 총 6 항

(54) 발명의 명칭 펩타이드 화합물 및 이의 제조방법과, 이를 함유하는 주름개선용 화장품 조성물

(57) 요약

본 발명은 펩타이드 화합물 및 이의 제조방법과, 이를 함유하는 피부 외용제 조성물에 관한 것으로, 합성이 용이하고, 피부 독성에 대한 염려가 없으며, 피부 세포에 대한 투과율이 향상 및 피부에 대한 자극이 없어 안전한 화장품 소재로 활용가능하고, 또한 피부 세포에 대한 생리활성을 증가시키고, 콜라겐 생합성 증가 및 상처 치유능을 가지고 있어 피부 재생 및 주름 개선에 유용한 특징이 있다.

대표도 - 도1



(52) CPC특허분류

A61K 8/64 (2013.01)
A61Q 19/08 (2013.01)
C07C 53/126 (2013.01)
C07K 1/04 (2013.01)
C07K 1/061 (2013.01)
C07K 1/20 (2013.01)
C07K 1/30 (2013.01)
C07K 19/00 (2013.01)

서효현

인천광역시 연수구 송도과학로27번길 55, 103동
 3103호 (송도동, 롯데캐슬캠퍼스타운)

(72) 발명자

김형식

인천광역시 연수구 학나래로46번길 15, 329호(선학
 동, 정인빌딩)

이 발명을 지원한 국가연구개발사업

과제고유번호	2016-B-0014-010117
부처명	교육부
연구관리전문기관	한국연구재단
연구사업명	산학공동기술개발지원사업
연구과제명	보름달 물해파리 유래 펩타이드를 이용한 기능성 화장품 소재 개발
기 여 율	1/1
주관기관	건양대학교산학협력단
연구기간	2016.06.01 ~ 2016.11.30

명세서

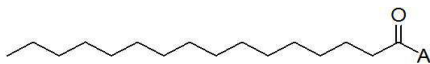
청구범위

청구항 1

주름 개선 효능을 가지고 있으면서, 피부 침투능이 우수한 신규한 화합물에 관한 것으로,

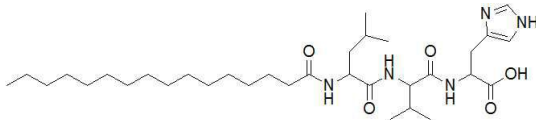
하기 [화학식 1]로 표기되고 약학적으로 허용 가능한 유효성분을 포함하는 N-팔미토일 펩타이드 화합물 또는 [화학식 2]로 표시되고 약학적으로 허용 가능한 유효성분을 포함하는 팔미토일-트리펩타이드(팔미토일-루실-발릴-히스티딘) 중 어느 하나로 이루어지는 것을 특징으로 하는 펩타이드 화합물.

[화학식 1]



A는 루실-발릴-히스티딘으로 구성된 트리펩타이드이고, 보름달물 해파리에서 유래된 펩타이드

[화학식 2]



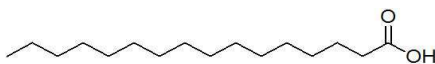
청구항 2

제 1항의 펩타이드 화합물의 제조방법에 있어서,

고체상 합성법으로 NH₂-보호된 펩타이드 레진을 합성하는 S10단계;

상기 수득된 NH₂-보호된 펩타이드 레진을 하기 [화학식 3]의 팔미틱산(Palmitic acid)과 반응시켜 [화학식 2]의 팔미토일-트리펩타이드 화합물을 얻는 S20단계;로 이루어지는 것을 특징으로 하는 펩타이드 화합물의 제조방법.

[화학식 3]



청구항 3

제 2항에 있어서,

상기 S10단계는,

Fmoc(9-플루오렌일메톡시카르보닐(9-fluorenylmethoxycarbonyl))을 N α -아미노산의 보호기로 사용하는 고체상 합성법(Solid-Phase Peptide Synthesis; SPPS)에 의해 합성되되,

HOBt(N-히드록시벤조트리아졸)-DCC(N,N-디시클로헥실카보디이미드) 활성제를 사용하여 아미노산 잔기를 연장하여 이루어지는 것을 특징으로 하는 펩타이드 화합물의 제조방법.

청구항 4

제 2항에 있어서,

상기 S20단계는,

NH₂-보호된-펩타이드(라이실-글루타밀-시스테인-글리신)-레진에 20% 피페리딘(Piperidine)/N-메틸피롤리돈 용액을 가하여 아미노기(-NH)에 붙어있는 Fmoc(9-플루오레닐메톡시카르보닐)기를 제거하는 S21단계와,

N-메틸피롤리돈과 디클로로메탄으로 세척 후 팔미틱산(Palmitic Acid, Aldrich 사)을 반응시키는 S22단계와,

커플링이 끝난 후 N-메틸피롤리돈과 디클로로메탄으로 여러 번 세척한 다음 건조시키는 S23단계와,

트리플루오로아세트산 : 페놀 : 티오아니솔 : 물 : 에탄디티올(82.5 : 5 : 5 : 5 : 2.5(v/v))의 혼합 용액으로 2~3시간 반응시켜 펩타이드를 구성하고 있는 아미노산의 보호기인 트리틸(트리페닐메틸)을 제거하는 S24단계와,

레진으로부터 팔미토일-트리펩타이드를 분리시킨 다음, 차가운 디에틸에테르로 펩타이드를 침전시켜 팔미토일-트리펩타이드를 수득하는 S25단계와,

팔미토일-트리펩타이드를 0.1% 트리플루오로아세트산이 포함된 물과 아세토니트릴을 용매로 하여 역상 고성능액체크로마토그래피 컬럼(reverse phase high performance liquid chromatography column, Gemini, C18 110A 250×21.2mm)을 이용하여 정제함으로써, 팔미토일-트리펩타이드를 합성하는 S26단계로 이루어지는 것을 특징으로 하는 펩타이드 화합물의 제조방법.

청구항 5

제 1항의 팔미토일-트리펩타이드 화합물을 함유하는 콜라겐 증식, 피부 주름 개선 및 상처 치유용 피부 외용제 조성물.

청구항 6

제 5항에 있어서,

상기 피부 외용제 조성물은 용액, 현탁액, 유탁액, 페이스트, 젤, 크림, 로션, 파우더, 비누, 계면활성제-함유 클렌징, 오일, 분말 파운데이션, 유탁액 파운데이션, 왁스 파운데이션 및 스프레이 등 어느 하나로 제형화되는 것을 특징으로 하는 피부 외용제 조성물.

발명의 설명

기술 분야

[0001] 본 발명은 펩타이드 화합물 및 이의 제조방법과, 이를 함유하는 피부 외용제 조성물에 관한 것으로, 보다 상세하게는 합성이 용이하고, 피부 독성에 대한 염려가 없으며, 피부 세포에 대한 투과율이 향상 및 피부에 대한 자극이 없어 안전한 화장품 소재로 활용가능하고, 또한 피부 세포에 대한 생리활성을 증가시키고, 콜라겐 생합성 증가 및 상처 치유능을 가지고 있어 피부 재생 및 주름 개선에 유용한 펩타이드 화합물 및 이의 제조방법과, 이를 함유하는 피부 외용제 조성물에 관한 것이다.

배경 기술

[0002] 피부는 체내의 모든 기관을 기온 및 습도의 변화와 자외선 등 외부환경 자극으로부터 보호해 주는 기능을 갖고 있다.

[0003] 그러나, 외부로부터의 물리적, 화학적 자극은 피부 기능을 저하시키고 주름 생성을 유발시키는 등 피부 노화현상을 촉진시킬 수 있고, 또한 피부의 노화는 피부 구성 성분의 전체적인 기능 약화를 수반하여 결과적으로 피부가 쉽게 갈라지거나, 섬유아 세포(Fibroblast) 감소 및 세포 활성화도 손상 역시 피부 노화 과정에서 중요한 부분을 차지한다.

[0004] 피부 주름생성 등의 노화현상을 방지하고 보다 건강하고 아름다운 피부를 유지하기 위하여 종래에는 각종 식물, 동물, 미생물, 독소(Toxins), 인체 유래 펩타이드 및 식물세포등에서 얻은 생리활성물질들을 함유한 화장품을 사용함으로써, 피부 고유의 기능을 유지시키고, 피부세포를 활성화 시켜 피부 노화를 효과적으로 억제하기 위한 노력이 꾸준히 이루어져 왔다. 대표적으로 아지렐린(Argireline), 상피세포성장인자(EGF)와 같은 폴리펩타이드

류와 캘러스라 불리는 식물세포 추출물등이 최근에 개발되어지고 있다.

[0005] 또한, 해양 생물인 해파리에서 유래된 항노화 성분으로 3개의 아미노산으로 구성된 펩타이드 서열이 밝혀졌으며 (공개번호: 10-2014-0015756), 이를 이용한 천연물이 결합된 신규한 소재가 개발되었다.

[0006] 하지만, 이러한 펩타이드는 피부 세포막이라는 거대한 장벽으로 인해 세포안으로 침투하기가 어려우며, 세포막 수용체로 인한 엔도사이토시스(endocytosis)라는 생리적 기작으로 세포안으로 들어온다고 하더라도 세포의 리소좀(lysosomal compartment)와 융합되어 결국 분해되고, 이들 바이오 활성 소재를 외부에서 전달하는 데 많은 제약이 따르는 게 일반적인 이론이다.

[0007] 현재까지 지방산을 활용한 피부 세포로의 침투를 용이하게 하기 위해 개발된 펩타이드로 콜라겐의 일부 서열인 KTTKS, GHK등의 펩타이드와 팔미트산을 결합시켜 응용한 항노화 소재로 활용되고 있을 뿐이다. 하지만, 해양생물인 해파리 유래 펩타이드인 LVH에 지방산을 결합시켜 피부 침투능을 향상시키고, 주름 개선 효과를 보이는 소재를 화장품 핵심 소재로 개발하고자 하는 시도는 아직까지 없었다.

선행기술문헌

특허문헌

[0008] (특허문헌 0001) 대한민국 특허공개 제10-2014-0015756호

발명의 내용

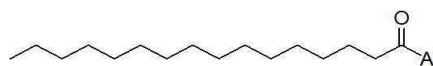
해결하려는 과제

[0009] 본 발명은 상기와 같은 문제점을 감안하여 안출된 것으로, 본 발명은 합성이 용이하고, 피부 독성에 대한 염려가 없으며, 피부 세포에 대한 투과율이 향상 및 피부에 대한 자극이 없어 안전한 화장품 소재로 활용가능하고, 또한 피부 세포에 대한 생리활성을 증가시키고, 콜라겐 생합성 증가 및 상처 치유능을 가지고 있어 피부 재생 및 주름 개선에 유용한 펩타이드 화합물 및 이의 제조방법과, 이를 함유하는 피부 외용제 조성물을 제공하는데 있다.

과제의 해결 수단

[0010] 상기한 바와 같은 목적을 달성하기 위한 특징에 따르면, 제 1발명은, 주름 개선 효능을 가지고 있으면서, 피부 침투능이 우수한 신규한 펩타이드 화합물에 관한 것으로, 이를 위해 하기 [화학식 1]로 표기되고 약학적으로 허용 가능한 유효성분을 포함하는 N-팔미토일 펩타이드 화합물 또는 [화학식 2]로 표시되고 약학적으로 허용 가능한 유효성분을 포함하는 팔미토일-트리펩타이드(팔미토일-루실-발릴-히스티딘) 중 어느 하나로 이루어지는 것을 특징으로 한다.

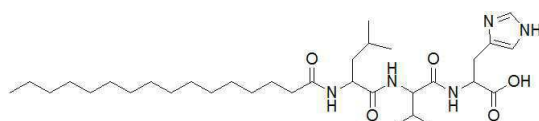
[0011] [화학식 1]



[0012]

[0013] A는 루실-발릴-히스티딘으로 구성된 트리펩타이드이고, 보름달물 해파리에서 유래된 펩타이드

[0014] [화학식 2]

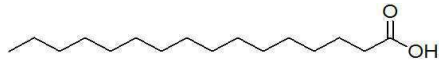


[0015]

[0017] 제 2발명은, 제 1발명의 펩타이드 화합물의 제조방법에 관한 것으로, 이를 위해 고체상 합성법으로 NH₂-보호된 펩타이드 레진을 합성하는 S10단계;와, 상기 수득된 NH₂-보호된 펩타이드 레진을 하기 [화학식 3]의 팔미틱산 (Palmitic acid)과 반응시켜 [화학식 2]의 팔미토일-트리펩타이드 화합물을 얻는 S20단계;로 이루어지는 것을

특징으로 한다.

[화학식 3]



제 3발명은, 제 2발명에서, 상기 S10단계는, Fmoc(9-플루오레닐메톡시카르보닐(9-fluorenylmethoxycarbonyl))을 N α -아미노산의 보호기로 사용하는 고체상 합성법(Solid-Phase Peptide Synthesis; SPPS)에 의해 합성되되, HOBt(N-히드록시벤조트리아졸)-DCC(N,N-디시클로헥실카보디이미드) 활성화제를 사용하여 아미노산 잔기를 연장하여 이루어지는 것을 특징으로 한다.

제 4발명은, 제 2발명에서, 상기 S20단계는 NH₂-보호된-펩타이드(라이실-글루타밀-시스테인-글리신)-레진에 20% 피페리딘(Piperidine)/N-메틸피롤리돈 용액을 가하여 아미노기(-NH)에 붙어있는 Fmoc(9-플루오레닐메톡시카르보닐)기를 제거하는 S11단계와, N-메틸피롤리돈과 디클로로메탄으로 세척 후 팔미틱산(Palmitic Acid, Aldrich 사)을 반응시키는 S12단계와, 커플링이 끝난 후 N-메틸피롤리돈과 디클로로메탄으로 여러 번 세척한 다음 건조시키는 S13단계와, 트리플루오로아세트산 : 페놀 : 티오아니솔 : 물 : 에탄디탈올(82.5 : 5 : 5 : 5 : 2.5(v/v))의 혼합 용액으로 2~3시간 반응시켜 펩타이드를 구성하고 있는 아미노산의 보호기인 트리틸(트리페닐메틸)을 제거하는 S14단계와, 레진으로부터 팔미토일-트리펩타이드를 분리시킨 다음, 차가운 디에틸에테르로 펩타이드를 침전시켜 팔미토일-트리펩타이드를 수득하는 S15단계와, 팔미토일-트리펩타이드를 0.1% 트리플루오로아세트산이 포함된 물과 아세트오니트릴을 용매로 하여 역상 고성능액체크로마토그래피 컬럼(reverse phase high performance liquid chromatography column, Gemini, C18 110A 250×21.2mm)을 이용하여 정제함으로써, 팔미토일-트리펩타이드를 합성하는 S16단계로 이루어지는 것을 특징으로 한다.

제 5발명은, 제 1발명의 팔미토일-트리펩타이드 화합물을 함유하는 콜라겐 증식, 피부 주름 개선 및 상처 치유용 피부 외용제 조성물에 관한 것이다.

제 6발명은, 제 5발명에서, 상기 피부 외용제 조성물은 용액, 현탁액, 유탁액, 페이스트, 젤, 크림, 로션, 파우더, 비누, 계면활성제-함유 클렌징, 오일, 분말 파운데이션, 유탁액 파운데이션, 왁스 파운데이션 및 스프레이 등 어느 하나로 제형화되는 것을 특징으로 한다.

발명의 효과

본 발명에 따른 펩타이드 화합물 및 이의 제조방법과, 이를 함유하는 피부 외용제 조성물에 따르면, 합성이 용이하고, 피부 독성에 대한 염려가 없으며, 피부 세포에 대한 투과율이 향상 및 피부에 대한 자극이 없어 안전한 화장품 소재로 활용가능한 효과가 있다.

또한 피부 세포에 대한 생리활성을 증가시키고, 콜라겐 생합성 증가 및 상처 치유능을 가지고 있어 피부 재생 및 주름 개선에 유용한 효과가 있다.

도면의 간단한 설명

도 1은 본 발명의 펩타이드 화합물의 제조방법에 따른 순서도,

도 2는 도 1에서 S20단계의 세부 순서도,

도 3은 본 발명의 펩타이드 화합물의 상처 치유 효능을 나타내는 그래프,

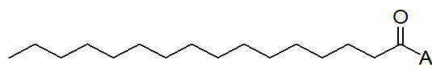
도 4는 본 발명의 펩타이드 화합물의 피부 자극을 나타내는 그래프,

도 5는 본 발명의 펩타이드 화합물의 피부 투과도 실험을 나타내는 그래프이다.

발명을 실시하기 위한 구체적인 내용

- [0031] 이하의 본 발명의 목적들, 다른 목적들, 특징들 및 이점들은 첨부된 도면과 관련된 이하의 바람직한 실시예들을 통해서 쉽게 이해될 것이다. 그러나 본 발명은 여기서 설명되는 실시예들에 한정되지 않고 다른 형태로 구체화될 수도 있다.
- [0032] 오히려, 여기서 소개되는 실시예들은 개시된 내용이 철저하고 완전해질 수 있도록 그리고 당업자에게 본 발명의 사상이 충분히 전달될 수 있도록 하기 위해 제공되는 것이다.
- [0033] 여기에 설명되고 예시되는 실시예들은 그것의 상보적인 실시예들도 포함한다.
- [0034] 본 명세서에서, 단수형은 문구에서 특별히 언급하지 않는 한 복수형도 포함한다. 명세서에서 사용되는 '포함한다(comprise)' 및/또는 '포함하는(comprising)'은 언급된 구성요소는 하나 이상의 다른 구성요소의 존재 또는 추가를 배제하지 않는다.
- [0035] 이하, 도면을 참조하여 본 발명을 상세히 설명하도록 한다. 아래의 특정 실시예들을 기술하는데 있어서, 여러가지의 특정적인 내용들은 발명을 더 구체적으로 설명하고 이해를 돕기 위해 작성되었다. 하지만 본 발명을 이해할 수 있을 정도로 이 분야의 지식을 갖고 있는 독자는 이러한 여러 가지의 특정적인 내용들이 없어도 사용될수 있다는 것을 인지할 수 있다. 어떤 경우에는, 발명을 기술하는 데 있어서 혼히 알려졌으면서 발명과 크게 관련 없는 부분들은 본 발명을 설명하는 데 있어 혼돈을 막기 위해 기술하지 않음을 미리 언급해 둔다.
- [0037] 이하에서는 본 발명에 따른 펩타이드 화합물 및 이의 제조방법과, 이를 함유하는 피부 외용제 조성물에 관하여 설명하기로 한다.
- [0038] 본 발명의 펩타이드 화합물은 주름 개선 효능을 가지고 있으면서, 피부 침투능이 우수한 신규한 화합물에 관한 것으로, 하기 [화학식 1]로 표기되고 약학적으로 허용 가능한 유효성분을 포함하는 N-팔미토일 펩타이드 화합물 또는 [화학식 2]로 표시되고 약학적으로 허용 가능한 유효성분을 포함하는 팔미토일-트리펩타이드(팔미토일-루실-발릴-히스티딘) 중 어느 하나로 이루어진다.

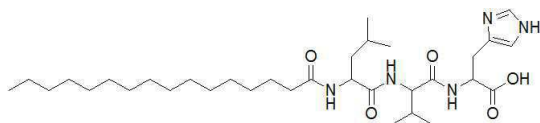
화학식 1



[0039]

[0040] A는 루실-발릴-히스티딘으로 구성된 트리펩타이드이고, 보름달물 해파리에서 유래된 펩타이드

화학식 2

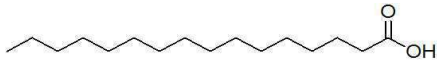


[0041]

[0043] 한편, 본 발명은 도 1에 도시된 바와 같이, 팔미토일-트리펩타이드(팔미토일-루실-발릴-히스티딘)로 이루어지는 펩타이드 화합물의 제조방법에 관한 것이다.

[0044] 이러한 펩타이드 화합물의 제조방법은, 고체상 합성법으로 NH₂-보호된 펩타이드 레진을 합성하는 S10단계;와, 상기 수득된 NH₂-보호된 펩타이드 레진을 하기 [화학식 3]의 팔미틱산(Palmitic acid)과 반응시켜 [화학식 2]의 팔미토일-트리펩타이드 화합물을 얻는 S20단계;로 이루어진다.

화학식 3



[0045]

[0046]

상기에서 S10단계는 Fmoc(9-플루오레닐메톡시카르보닐(9-fluorenylmethoxycarbonyl))을 N α -아미노산의 보호기로 사용하는 고체상 합성법(Solid-Phase Peptide Synthesis; SPPS)에 의해 합성하였으며, HOBT(N-히드록시벤조트리아졸)-DCC(N,N-디시클로헥실카보디이미드) 활성제를 사용하여 아미노산 잔기를 연장하여 NH₂-보호된 펩타이드 레진을 합성할 수 있다.

[0047]

아울러 S20단계의 팔미토일-트리펩타이드(팔미토일-루실-발릴-히스티딘)화합물은 도 2의 단계를 거쳐 획득할 수 있다.

[0048]

먼저 NH₂-보호된-펩타이드(라이실-글루타밀-시스테인-글리신)-레진에 20% 피페리딘(Piperidine)/N-메틸피롤리돈 용액을 가하여 아미노기(-NH)에 붙어있는 Fmoc(9-플루오레닐메톡시카르보닐)기를 제거 한다.(S21단계)

[0049]

그리고 N-메틸피롤리돈과 디클로로메탄으로 세척 후 팔미틱산(Palmitic Acid, Aldrich 사)을 반응시킨다.(S22단계)

[0050]

그리고 커플링이 끝난 후 N-메틸피롤리돈과 디클로로메탄으로 여러 번 세척한 다음 건조시킨다.(S23단계)

[0051]

그리고 트리플루오로아세트산 : 페놀 : 티오아니솔 : 물 : 에탄디티올(82.5 : 5 : 5 : 5 : 2.5(v/v))의 혼합 용액으로 2~3시간 반응시켜 펩타이드를 구성하고 있는 아미노산의 보호기인 트리틸(트리페닐메틸)을 제거한다.(S24단계)

[0052]

그리고 레진으로부터 팔미토일-트리펩타이드를 분리시킨 다음, 차가운 디에틸에테르로 펩타이드를 침전시켜 팔미토일-트리펩타이드를 수득한다.(S25단계)

[0053]

그리고 팔미토일-트리펩타이드를 0.1% 트리플루오로아세트산이 포함된 물과 아세트오니트릴을 용매로 하여 역상 고성능 액체크로마토그래피 컬럼(reverse phase high performance liquid chromatography column, Gemini, C18 110A 250×21.2mm)을 이용하여 정제함으로써, 팔미토일-트리펩타이드 화합물을 합성하여 획득한다.(S26단계)

[0055]

한편 본 발명은 팔미토일-트리펩타이드 화합물을 함유하는 콜라겐 증식, 피부 주름 개선 및 상처 치유용 피부 외용제 조성물에 관한 것이다.

[0056]

이러한 피부 외용제 조성물은 용액, 현탁액, 유탁액, 페이스트, 겔, 크림, 로션, 파우더, 비누, 계면활성제-함유 클렌징, 오일, 분말 파운데이션, 유탁액 파운데이션, 왁스 파운데이션 및 스프레이 중 어느 하나로 제형화되어 구성될 수 있다.

[0057]

또한 유연 화장수, 영양 화장수, 영양 크림, 마사지 크림, 에센스, 아이 크림, 클렌징크림, 클렌징폼, 클렌징 워터, 팩, 스프레이 또는 파우더의 제형으로 제조될 수 있다.

[0058]

본 발명의 피부 외용제 조성물은 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.

[0059]

또한 본 발명의 피부 외용제 조성물은 제형이 파우더 또는 스프레이인 경우에는 담체 성분으로서 락토스, 탈크, 실리카, 알루미늄 히드록시드, 칼슘 실리케이트 또는 폴리아미드 파우더가 이용될 수 있고, 특히 스프레이인 경우에는 추가적으로 클로로, 플루오로 히드로카본, 프로판/부탄 또는 디메틸 에테르와 같은 추진체를 포함할 수 있다.

[0060]

또한 본 발명의 피부 외용제 조성물은 제형이 용액 또는 유탁액인 경우에는 담체 성분으로서 용매, 용해화제 또는 유탁화제가 이용되고, 예컨대 물, 에탄올, 이소프로판올, 에틸 카보네이트, 에틸 아세테이트, 벤질 알코올, 벤질 벤조에이트, 프로필렌글리콜, 1,3-부틸글리콜 오일, 글리세롤 지방족 에스테르, 폴리에틸렌 글리콜 또는 소르비탄의 지방산 에스테르가 있다.

[0061] 또한 본 발명의 피부 외용제 조성물은 제형이 현탁액인 경우에는 담체 성분으로서 물, 에탄올 또는 프로필렌글리콜과 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.

[0062] 또한 본 발명의 피부 외용제 조성물은 제형이 계면-활성제 함유 클린징인 경우에는 담체 성분으로서 지방족 알코올 설페이트, 2지방족 알코올 에테르 설페이트, 설포숙신산 모노에스테르, 이세티오네이트, 이미다졸리늄 유도체, 메틸타우레이트, 사르코시네이트, 지방산 아마이드 에테르 설페이트, 알킬아미도베타인, 지방족 알코올, 지방산 글리세리드, 지방산 디에탄올아미드, 식물성 유, 라놀린 유도체 또는 에톡실화 글리세롤 지방산 에스테르 등이 이용될 수 있다.

[0063] 본 발명의 피부 외용제 조성물은 단독 또는 중복 도포하여 사용하거나, 본 발명 이외의 다른 화장품 조성물과 중복도포하여 사용할 수 있다.

[0064] 또한 본 발명에 따른 피부 외용제 조성물은 통상적인 사용방법에 따라 사용될 수 있으며, 사용자의 피부 상태 또는 취향에 따라 그 사용횟수를 달리할 수 있다.

[0066] [실험예 1]

[0067] 본원 발명의 팔미토일-트리펩타이드(pal-LVH)와, 종래의 펩타이드(LVH)와 함께 세포독성실험을 실시하였다.

[0068] 본 발명의 팔미토일-트리펩타이드(pal-LVH)의 피부 세포의 증식 활성을 알아보기 위하여, 인간각질형성 세포(human keratinocyte cell, HaCaT)는 ATCC(American Type Culture Collection)에서 분주 받아서 배양하였다.

[0069] 그리고 각 세포를 1×10^4 cells/ml의 농도로 하여 24 well 배양판에 접종하였다. 배지는 10% FBS를 함유한 DMEM(Dubelcco'S Modified Eagle Medium, BRL, USA)을 사용하였다. 10% FBS를 함유하는 DMEM에서 48시간 배양하여 배양용기 표면적의 25 ~ 30%만큼 배양되면, 3-(4,5-디메틸티아졸-2-일)-2,5-디페닐 테트라졸리움 브롬화물(MTT, Sigma M5655, USA) 용액 (2.5 mg/ml)을 $50 \mu\text{l}$ 첨가하고 3시간동안 추가로 배양한 후 상등액을 제거하고, 각 well 당 $200 \mu\text{l}$ 의 Dimethylsulfoxide (DMSO, Sigma D2650, USA)용액을 가한 후 20분간 교반하여 형성된 포르마잔(formazan) 결정을 녹인 다음, $100 \mu\text{l}$ 씩을 96 well로 취하여 Enzyme-Linked Immunosorbent Assay(ELISA)로 570nm에서 흡광도를 측정하였다. 피부 세포의 증식 활성 정도는 순수한 물을 사용한 대조군의 흡광도를 기준으로 하기 수학적식에 따라 계산하여 백분율로 표시하였고, 결과는 아래 [표 1]에 나타난 바와 같았다.

[0070] [수학적식 1]

[0071] 세포생존율(Cell Viability)효과 (%) = [(실험군 흡광도 - 대조군 흡광도)/대조군의 흡광도] $\times$ 100

표 1

[0072] 본 발명의 팔미토일-트리펩타이드(pal-LVH)의 피부 세포 생존율

처리군	Cell viability (% of control)		
	C	$10 \mu\text{m}$	$100 \mu\text{m}$
대조군	100		
LVH	125	123	115
pal-LVH	100	101	105

[0073] 피부세포독성에 미치는 영향시험 결과, [표 1]에 나타난 바와 같이, 1, 10, $100 \mu\text{m}$ 농도에서 해파리 유래 펩타이드인 LVH와 Palmitoyl-LVH에서 세포독성은 보이지 않았다. 즉, 세포생존율에 영향을 미치지 않음을 확인하였고, 본 발명에 따른 팔미토일-트리펩타이드(pal-LVH) 화합물은 화장품 소재로써 안전하게 사용 될 수 있음을 확인하였다.

[0075] [실험예 2]

[0076] 인간섬유아세포(Human Skin Fibroblast)를 37°C , 5% CO2배양기에서 일정한 습도를 유지하는 세포 배양기 내에서

10% FBS, Penicillin(50 μ /ml), Streptomycin(50/ml)를 함유하는 DMEM(Dulbecco's Modified Eagle's Medium, Gibco, USA)으로 배양하여, 1×10^5 개/ml로 24 well plate에 500 μ l 씩 분주한 다음 24시간 배양하였다. 음성 대조군(DMEM 배지) 및 양성 대조군(TGF- β)과 1, 10, 100 μ m 농도의 LVH 및 Palmitoyl-LVH 펩타이드를 함유한 배지를 넣고 48시간 동안 37 $^{\circ}$ C, 5% CO₂배양기에서 배양하였다. 48시간 후, 배지의 상층액을 각각 20 μ l을 취해 Procollagen Type I C-Peptide EIA Kit(PICP, Takara, Cat No. MK101)를 이용하여 측정함으로써 새로 합성된 콜라겐 양을 측정하였다. PICP양은 ng/ 1×10^5 세포로 환산하였으며, 하기 [수학식 2]에 따라 계산하여 그 결과는 [표 2]에 나타나 있다.

[0077] [수학식 2]

[0078] 콜라겐 합성 증가율 (%) = [시험군 콜라겐양/대조군 콜라겐 양] $\times$ 100

표 2

[0079]

처리군	콜라겐 합성 증가율 (%)		
	1 μ m	10 μ m	100 μ m
양성대조군(TGF- β)	180		
음성 대조군(DMEM 배지)	100		
LVH	230	120	60
pal-LVH	200	100	105

[0080]

본 발명의 팔미토일-트리펩타이드(pal-LVH) 화합물의 콜라겐 합성 증진 결과, 1, 10, 100 μ m 해파리 유래 펩타이드의 처리 농도가 증가함에 따라 Procollagen 생합성량이 증가함을 알 수 있어, 우수한 콜라겐 합성 증진 효과를 나타냄을 알 수 있다.

[0082] [실험예 3]

[0083]

본 발명의 팔미토일-트리펩타이드(pal-LVH) 화합물의 상처 치유 효능을 평가하기 위해 마우스 섬유아세포(NIH3T3 cell)를 96-well plate에 3×10^4 cell/well씩 분주하고 10% FBS 포함 DMEM 배지에서 24시간 배양하여 섬유아세포 monolayer를 형성시켰다. 이후 배양액을 제거하고 wound maker를 이용하여 각 well에 cell-free zone (scratch wound)을 형성시키고 인산염완충액 (pH 7.4) 100 μ l로 4회 세척한 뒤 serum free DMEM으로 희석한 LVH와 Palmitoyl-LVH 각각 1, 10, 100 μ m 용액을 각 well에 100 μ l씩 처리하였다. CO₂ incubator에서 Incucyte Zoom microscope (Essen Bioscience)로 4시간 간격으로 24시간 동안 각 well의 scratch wound의 회복(재생)율을 측정하였다.

[0084]

그 결과, 도 3에 나타난 바와 같이, 상기 in vitro scratch wound assay에서도 LVH와 Palmitoyl-LVH에서는 그 처리 농도가 증가할수록 상처 회복 속도가 증가하였다.

[0086] [실험예 4]

[0087]

본 발명에 따른 팔미토일-트리펩타이드 화합물의 피부 자극 시험(Skin-irritation test)을 측정하였다.

[0088]

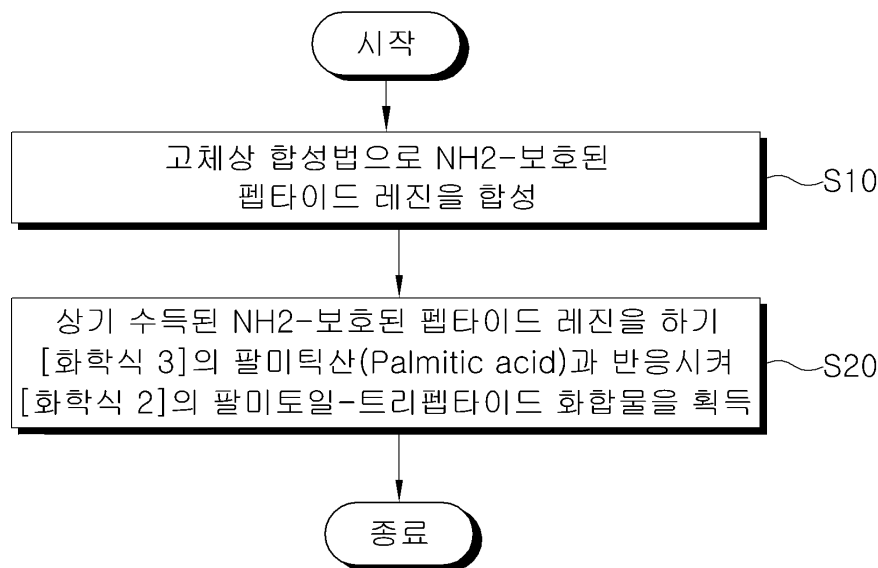
여기서 피험자 4명(평균연령 35세, 연령분포 20세 -50세)을 대상으로 finn chamber를 이용하여 상박에 피부 첩포시험(patch test)을 실시하였다. 단 건선(Psoriasis), 습진(Eczema), 기타 피부병변 보유자나 임신, 수유부 또는 피임제, 항히스타민제 등을 복용하고 있는 사람은 본 실험에서 제외하였다. 피험자 50명을 대상으로 시험부위인 상박 부위를 1차 증류수로 닦아내고 건조시킨 다음, LVH, Palmitoyl-LVH 용액을 각각 25 μ l씩 finn chamber에 적하시킨 후 상박 부위에 얹어 고정시켰다. 양성대조군으로 10% SLS(Sodium Lauryl Sulfate)를 사용하였다. 48시간 동안 피부에 첩포를 적용하였으며, 첩포를 제거한 후에는 marking pen으로 시험부위를 표시하여 4시간 경과 후 다음 육안으로 피부상태 변화를 관측하여 그 결과를 도 4에 도시된 바와 같이, 본 발명의 Palmitoyl-LVH는 피부 자극을 나타내지 않았으며, 다양한 화장품 조성물로서 적용 가능성을 확인하였다.

[0090] [실험예 5]

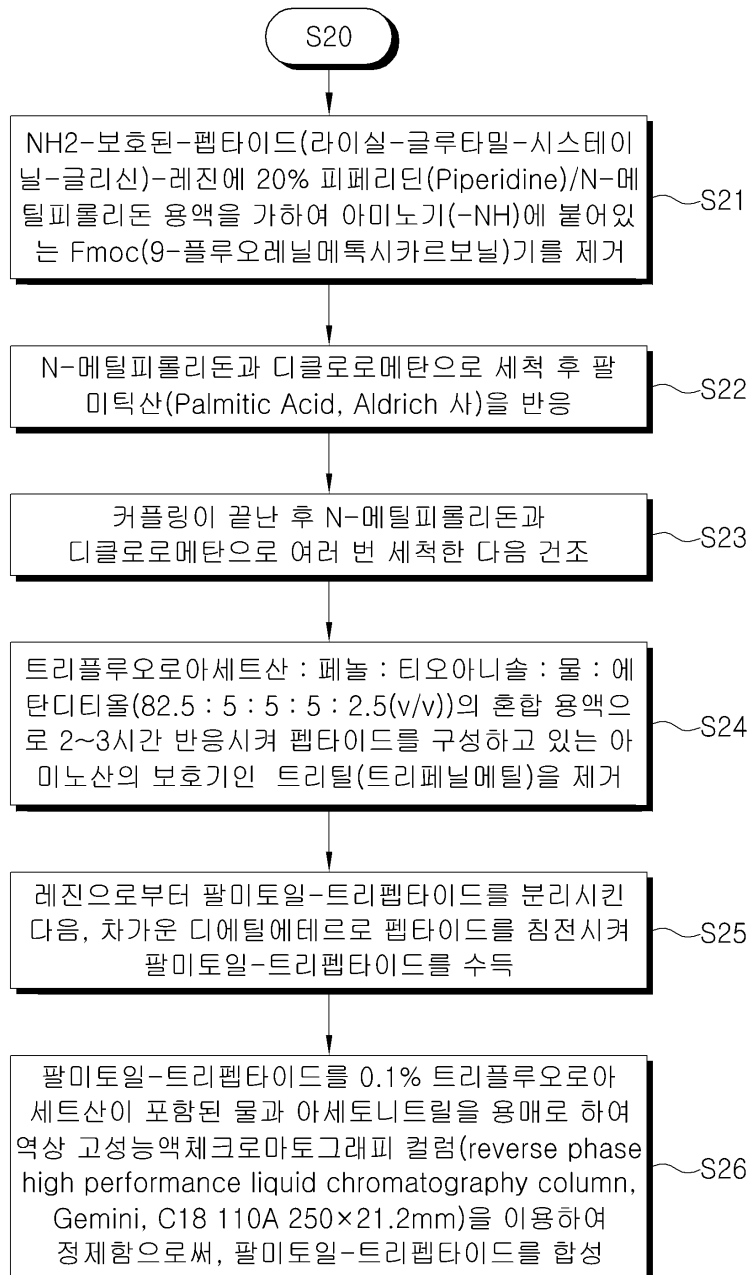
- [0091] Porcine skin을 이용한 Franz diffusion 실험법을 통하여 상기 실시예 1에서 제조된 팔미토일 펩타이드인 Palmitoyl-LVH와 LVH의 피부 투과도 실험을 실시하였다.
- [0092] 피하지방이 제거된 porcine skin을 각질층이 위로 향하도록 하여 Franz diffusion cell의 donor와 receptor phase사이에 고정시킨 후 20% 에탄올 용액 5ml를 receptor chamber에 넣고 37℃로 유지하였으며 24h 동안 일정하게 교반하였다. 펩타이드 용액과 vehicle 용액 0.5ml를 각각 피부에 적하한 후 8h 간격으로 0.75ml의 receptor phase를 취하였다.
- [0093] 채취 직후 동량의 receptor solution을 보충하였고, 피부를 통과한 펩타이드 함량을 UV spectrophotometer로 분석하였다. 24h 후 피부 표면을 PBS로 3회 세척한 후 각질층에 존재하는 펩타이드를 정량하기 위해, tape stripping을 3회 실시하여 각질층을 떼어내었고, 이를 에탄올에 넣고 초음파 처리하였다. Tape에서 추출한 펩타이드 용액을 감압하여 에탄올을 제거한 다음 동량의 receptor solution에 용해한 후 분석하였다. 분석 결과, 도 5와 같이, 팔미틱산이 결합된 펩타이드인 palmitoyl LVH가 LVH보다 약 20% 높은 피부 투과율을 확인하였다.
- [0095] 본 명세서에 기재된 실시예와 도면에 도시된 구성은 본 발명의 가장 바람직한 일 실시예에 불과할 뿐이고 본 발명의 기술적 사상을 모두 대변하는 것은 아니므로, 본 출원 시점에 있어서 이들을 대체할 수 있는 다양한 균등물과 변형 예들이 있을 수 있음을 이해하여야 한다.

도면

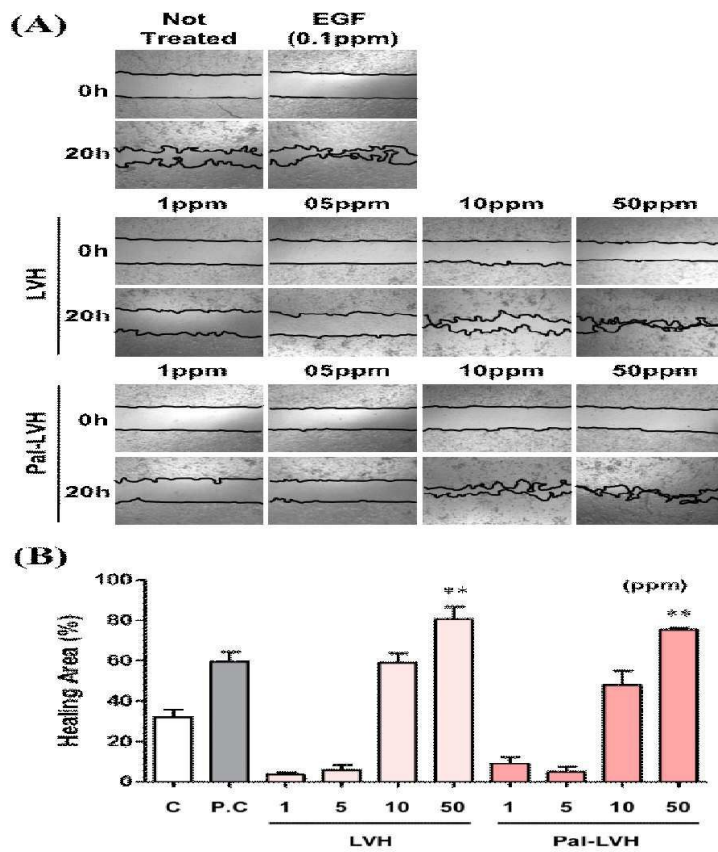
도면1



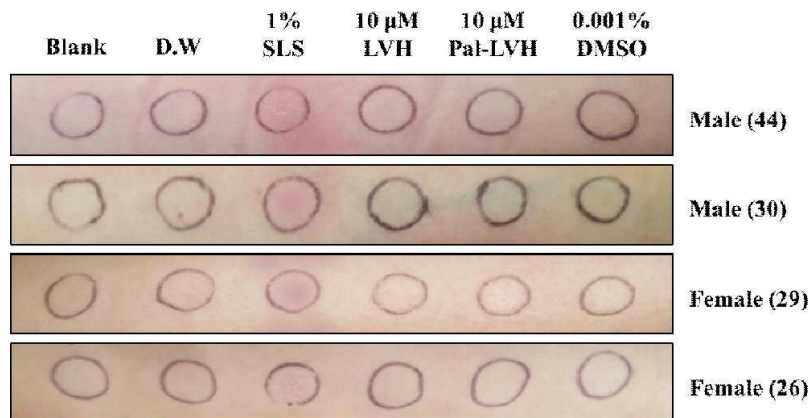
도면2



도면3



도면4



도면5

