



(19) 대한민국특허청(KR)
(12) 공개특허공보(A)

(11) 공개번호 10-2013-0000007
(43) 공개일자 2013년01월02일

(51) 국제특허분류(Int. Cl.)
A61K 8/60 (2006.01) A61Q 19/08 (2006.01)
A61Q 19/00 (2006.01)
(21) 출원번호 10-2011-0057678
(22) 출원일자 2011년06월14일
심사청구일자 2011년06월14일

(71) 출원인
부경대학교 산학협력단
부산광역시 남구 신선로 365 (용당동, 부경대학교)
(72) 발명자
김세권
부산광역시 동래구 사직로 80, 125동 1402호 (사직동, 사직쌍용예가)
공창숙
부산광역시 연제구 해맞이로 23, 유럽아시아드아파트 114동 2004호 (거제동)
(74) 대리인
이덕록

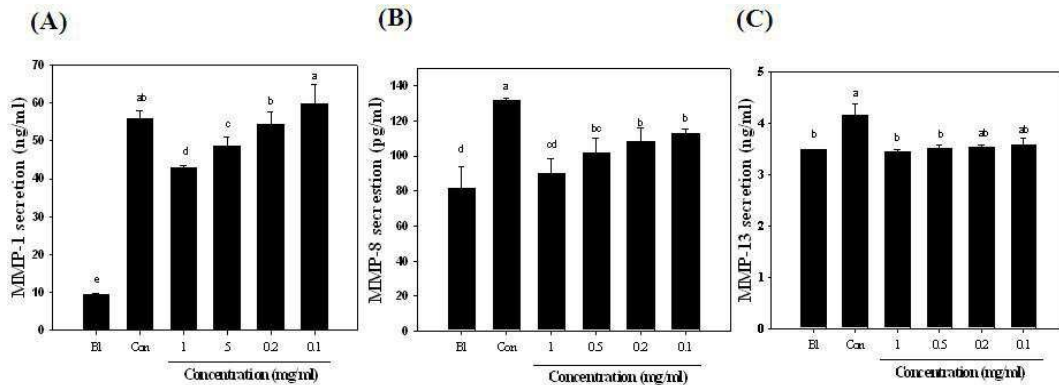
전체 청구항 수 : 총 3 항

(54) 발명의 명칭 3-5 k D a 분자량 범위를 갖는 키토올리고당을 포함하는 피부 노화 방지용 화장품 조성물

(57) 요약

본 발명은 키토올리고당을 유효성분으로 포함하는 주름개선용 조성물에 관한 것으로, 좀더 상세하게는 자외선 UV-A에 의한 콜라겐 분해를 방지하는 주름개선용 화장품 조성물에 관한 것이다.

대표도 - 도2



(72) 발명자

박순선

부산광역시 서구 꽃마늘로 43, 남성한빛아파트 10
2동 1003호 (서대신동3가)

김정애

부산광역시 남구 전포대로76번길 17-8 (문현동)

안별님

부산광역시 부산진구 백양관문로 7, 개금신주공아
파트 211동 104호 (개금동)

특허청구의 범위

청구항 1

키토올리고당을 유효성분으로 포함하는, 주름개선용 화장품 조성물

청구항 2

제1항에 있어서, 상기 키토올리고당은 3 kDa 내지 5 kDa의 분자량을 갖는 것을 특징으로 하는 주름개선용 화장품 조성물.

청구항 3

키토올리고당을 유효성분으로 포함하는, 자외선 UV-A에 의한 콜라겐 분해 저해 효과를 갖는 조성물.

명세서

기술분야

[0001] 본 발명은 키토올리고당을 유효성분으로 포함하는 주름개선용 조성물에 관한 것으로, 좀더 상세하게는 자외선 UV-A에 의한 콜라겐 분해를 방지하는 주름개선용 화장품 조성물에 관한 것이다.

배경기술

[0002] 피부 노화는 시간의 경과(만성 또는 자연적 노화) 및 태양으로부터의 자외선에 의한 손상(광피부노화)의 결과로서 야기되는 다양한 과정에 관련되어 있다. UV 노출은 피부 표피의 케라틴세포의 이형성증과 같은 피부의 내부 구조의 변화 및 진피의 세포의 매트릭스 성분의 손상을 야기한다. 피부에 나타나는 광피부노화에 의한 이러한 변화는 탄력 감소, 피부 처짐, 주름, 색소침착 및 전암성 병변(precancerous lesions)의 축적을 나타낸다. 광피부노화는 감소된 콜라겐 합성 및 증가된 콜라겐 분해 매트릭스 메탈로프로테나아제(matrix metalloproteinases; MMP) 발현에 의한 피부 결합 조직의 손상에 의해 부분적으로 발생할 수 있다. 특히, 콜라겐 분해 MMP의 수준은 노화의 기능으로서 섬유아세포에서 증가하는 것으로 알려져 있으며 산화 스트레스 또한 피부의 광노화에 관련되어 있다.

[0003] 콜라겐은 세포의 매트릭스의 주요 진피 성분이며 UV 조사에 의해 발생하는 콜라겐 분해는 피부 진피 변화에서의 키포인트이다. 자외선은 파장에 따라 UV-A (400-315 nm), UV-B (315-280 nm) 및 UV-C (280-100 nm)로 나누어진다. 무엇보다도, UV-A 영역이 가장 강한 피부 침투 능력을 가지며 98.7%의 UV가 UV-A로서 지표면에 도달한다. 과도한 UV-A 노출은 주름 형성뿐만 아니라 피부암을 발생시킬 수 있다. 그러므로, 콜라겐 합성의 증가 및 UV 노출의 차단으로 콜라겐 분해 MMP 발현을 저해하는 것이 광손상 피부를 회복하는데 가장 좋은 전략일 것이다.

[0004] 키토올리고당(Chitooligosaccharide; COS)은 화학적 또는 효소적 가수분해 방식으로 키틴 또는 키토산으로부터 만들어진 수용성 키토산이다. COS는 수용성, 생체적합성 및 생분해성과 같은 많은 이점으로 인해 널리 사용되고 있다. COS는 또한 항-노화, 화이트닝 및 수분개선 기능을 가지고 있어 화장품 물질로서도 사용될 수 있다. 게다가, COS의 분자량 크기에 따라 항균, 항종양, 항진균, 항바이러스 및 항산화 활성을 갖는다는 것이 이전 연구를 통해 보고되었다.

[0005] 키토올리고당과 관련한 종래 기술을 살펴보면, 대한민국 등록특허번호 제 10-0861415호에서는 몰약, 지유, 가시오가피, 산초, 비파엽 및 고삼 추출물과 키토올리고당을 함유하는 화장품 조성물에 대하여 기재하고 있으며, 대한민국 공개특허번호 제 10-2001-0060436호에서는 1만 내지 150만 단위의 고분자 수용성 키토산을 포함하는 화장품 조성물에 관하여 기재하고 있으나, 진피 세포에서의 UV-A 유도 콜라겐 분해에 대한 COS의 효과는 아직까지 보고된 바 없다.

발명의 내용

해결하려는 과제

[0006] 본 발명은 상기와 같은 점들을 감안하여 안출된 것으로, 키토올리고당을 유효성분으로 포함하는 주름개선용 조성물을 제공하는 것을 목적으로 한다.

과제의 해결 수단

[0007] 본 발명의 상기 목적은 키토올리고당의 UV 흡광능을 측정하고, RT-PCR 및 웨스턴 블롯 분석을 통해 UV-A 조사된 HDF 세포의 콜라게나아제 MMP 발현 및 콜라겐 합성에 대한 키토올리고당의 효과를 확인함으로써 달성하였다.

발명의 효과

[0008] 본 발명은 키토올리고당의 UV-A 유도 콜라겐 분해에 대한 보호 효과를 규명하고 이를 이용하여 우수한 주름개선 효능을 나타내는 조성물을 제공하는 뛰어난 효과가 있다.

도면의 간단한 설명

[0009] 도 1은 UV 흡광 스펙트럼으로부터 수득된 UV 보호에 대한 COS의 효과를 나타낸 것이다.
 도 2는 6 J/cm²의 UV-A 조사에 노출된 인간 진피 섬유아세포의 콜라겐 분해 MMP 분비에 대한 COS의 효과를 나타낸 것이다. MMP-1 (A), MMP-8 (B) 및 MMP-13 (C)와 같은 콜라겐 분해 MMP 분비 수준은 ELISA 검정으로 측정하였다. ^{a-c}각 농도에서 시료 및 블랭크 또는 대조 사이의 유의차(p<0.05)는 다른 문자로 나타낸 평균치이다. B1: UV-A 조사하지 않음, Con: UV-A 단독 조사 그룹.
 도 3은 UV-A 조사 HDF 세포에서의 콜라겐 분해 MMP의 수준에 대한 COS의 효과를 나타낸 것이다. 유전자 (A) 및 단백질 (B) 발현 수준을 각각 RT-PCR 및 웨스턴 블롯 분석으로 결정하였다.
 도 4는 UV-A 조사 HDF 세포에서 콜라겐 합성에 대한 COS의 효과를 나타낸 것이다.

발명을 실시하기 위한 구체적인 내용

[0010] 본 발명은 키토올리고당(Chitooligosaccharide; COS)을 유효성분으로 포함하는 자외선, 특히 UV-A에 의한 콜라겐 분해를 예방 또는 치료하는, 주름개선용 화장품 조성물을 제공한다.

[0011] 통상적으로 화장품 조성물에 이용되는 성분, 예컨대 향산화제, 안정화제, 용해화제, 비타민, 안료 및 향료와 같은 통상적인 보조제, 그리고 담체를 포함할 수 있다.

[0012] 본 발명의 화장품 조성물은 당업계에서 통상적으로 제조되는 어떠한 제형으로도 제조될 수 있으며, 예를 들어, 용액, 현탁액, 유탁액, 페이스트, 젤, 크림, 로션, 파우더, 비누, 계면활성제-함유 클렌징, 오일, 분말 파운데이션, 유탁액 파운데이션, 왁스 파운데이션 및 스프레이 등으로 제형화될 수 있으나, 이에 한정되는 것은 아니다. 보다 상세하게는, 유연 화장수, 수렴 화장수, 영양 화장수, 영양 크림, 마사지 크림, 에센스, 아이 크림, 클렌징 크림, 클렌징 폼, 클렌징 워터, 팩, 스프레이 또는 파우더의 제형으로 제조될 수 있다.

[0013] 본 발명의 조성물이 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.

[0014] 본 발명의 조성물이 파우더 또는 스프레이인 경우에는 담체 성분으로서 락토스, 탈크, 실리카, 알루미늄 히드록시드, 칼슘 실리케이트 또는 폴리아미드 파우더가 이용될 수 있고, 스프레이인 경우에는 클로로플루오로히드로카본, 프로판/부탄 또는 다이메틸 에테르와 같은 추진제를 추가로 함유할 수 있다.

[0015] 본 발명의 조성물이 용액 또는 유탁액인 경우에는 담체 성분으로서 용매, 용해화제 또는 유탁화제가 이용된다.

[0016] 본 발명의 조성물이 현탁액인 경우에는 담체 성분으로서 물, 에탄올 또는 프로필렌 글리콜과 같은 액상 희석제, 폴리옥시에틸렌 소르비톨 에스테르와 같은 현탁제, 미소결정질 셀룰로오스 등이 이용될 수 있다.

[0017] 본 발명의 제형이 계면활성제 함유 클렌징인 경우에는 담체 성분으로서 지방족 알코올 설페이트, 지방족 알코올 에테르 설페이트 등이 이용될 수 있다.

[0018] 이하, 본 발명을 실시예를 들어 보다 구체적으로 설명한다. 그러나, 실시예는 본 발명을 예시하기 위한 것일 뿐

이므로, 본 발명을 이에 한정하는 것으로 해석해서는 안 된다.

[0019] 데이터는 평균 \pm SD (n=3)로 나타냈으며 Statistical Analysis System (SAS v9.1, SAS Institute Inc., Cary, NC, USA)의 분산 분석(ANOVA) 방법을 사용하여 분석하였다. 처리 평균 간의 유의차는 $p < 0.05$ 수준에서 Duncan's multiple range tests를 사용하여 결정하였다.

[0020] **실시예 1. 세포배양**

[0021] 3-5 kDa의 키토올리고당(COS)은 Kitto Life Co. (Seoul, Korea)로부터 입수하였다. 성인 피부의 진피로부터 분리한 인간 진피 섬유아세포(Human dermal fibroblasts; HDF)는 Promo cell (Heidelberg, Germany)로부터 구입하였다. HDF 세포를 37 °C, 5% CO₂ 대기 습도 하에서 10% 우태아 혈청(FBS), 2 mM 글루타민 및 100 µg/ml 페니실린-스트렙토마이신(Gibco-BRL, Gaithersburg, MD, USA)을 함유하는 돌베코 변형 이글 배지(DMEM, Gibco-BRL, Gaithersburg, MD USA)에 배양하였다. HDF 세포 (passage 2)를 6회의 추가 passage 동안 유지한 후 약 90-95% 컨플루언스에서 트립신-EDTA 용액으로 분리하여 실험을 위해 아-배양하였다.

[0022] **실시예 2. COS의 UV 흡광 스펙트럼**

[0023] COS를 1mg/ml의 농도로 D.W.에 용해시킨 후 190 nm 및 500 nm 사이의 COS의 UV 스펙트럼을 실온에서 UV-Vis spectrophotometers (Varian USA, Walnut Creek, CA) 상에서 기록하였으며 1 cm 경로길이의 큐벳을 사용하였다. 각 스펙트럼은 1.0 nm의 밴드폭 및 600 nm/min의 스캔 속도에서 0.5 nm의 용해도를 갖는 적어도 3회의 평균 시그널이다.

[0024] **실시예 3. UV-A 조사**

[0025] HDF 세포를 37 °C, 5% CO₂ 대기 습도 하에서 10% FBS, 2 mM 글루타민 및 100 µg/ml 페니실린-스트렙토마이신을 함유하는 DMEM과 함께 1×10^5 cells/well의 밀도로 24-웰 플레이트에 접종하였다. 24시간 동안 배양한 후, 각 웰의 200 µL 인산염 완충용액 식염수(PBS) 내에서 세포를 6 J/cm^2 (365 nm UV-A 광원, Bio-Sun lamp, Vilber Lourmat, Marine, France)에서 UV-A 에너지에 노출시켰다. UV-A 조사 후에, 세포를 무혈청 DMEM에 배양하였다.

[0026] **실시예 4. ELISA에 의한 콜라겐 분해 MMP 농도**

[0027] 콜라겐 분해 MMP 농도를 결정하기 위해, HDF 세포를 UV-A 조사 후에 FBS 없이 다양한 농도의 COS와 함께 배양하였다. 24시간 후에, HDF 세포의 무세포 상청액을 수집하여 MMP 검정에 사용하였다. 이 검정은 Biotrak™ ELISA 키트(Amersham Pharmacia Biosciences)를 제조업자의 지시에 따라 사용하여 MMP-1, MMP-8 and MMP-13 농도를 평가하고 정량하기 위해 설계된 것이다.

[0028] 100 µl의 각 표준 및 시료를 적절한 웰에 3배로 첨가하였다. 2시간 동안 실온에서 배양한 후, 웰을 비우고 400 µl의 세척 완충용액으로 4회 세척하여 결합하지 않은 기타 불순물들을 제거하였다. 그런 다음, 100 µl의 퍼옥시 다아제 결합물을 1시간 동안 웰에 첨가하였다. 배양한 후에, TMB 기질(100 µl)을 각 웰에 첨가하고 실온에서 30 분 동안 배양한 후 100 µl의 정지 용액(stop-solution)을 블랭크 웰을 포함한 모든 웰에 첨가하였다. 마이크로 플레이트 판독기(GENios microplate reader; Tecan, Austria GmbH, Austria)를 사용하여 410 nm에서 흡광도를 측정하였다. MMP-1, MMP-8 및 MMP-13의 표준 곡선을 표준 웰의 pg/ml 농도 대 흡광도 수치를 플로팅(plotting)하여 확립하였다. 이를 세포로부터 분비된 MMP-1, MMP-8 및 MMP-13의 양을 정량하는 데 사용하였다.

[0029] **실시예 5. RT-PCR 분석**

[0030] 총 세포성 RNA를 Trizol 시약(Invitrogen Co., CA, USA)을 사용하여 분리하였다. 2 µg의 분리된 RNA를 올리고-(dT) 프라이머(Promega, Madison, WI, USA)를 사용하여 cDNA로 역전사시켰다. 표적 cDNA를 포워드 및 리버스 프라이머 서열을 사용하여 증폭시켰다: MMP-1에 대하여 포워드 프라이머 5'-GAT-GTG-GAG-TGC-CTG-ATG-TG-3' 및

리버스 프라이머 5'-TGC-TTG-ACC-CTC-AGA-GAC-CT-3'; MMP-8에 대하여 포워드 프라이머 5'-TCT-GCA-AGG-TTA-TCC-CAA-GG-3' 및 리버스 프라이머 5'-TAT-TCC-TGG-AAA-GGC-ACC-TG-3'; MMP-13에 대하여 포워드 프라이머 5'-GGA-GCC-TCT-CAG-TCA-TGG-AG-3' 및 리버스 프라이머 5'-TTG-AGC-TGG-ACT-CAT-TGT-CG-3'; MMP-2에 대하여 포워드 프라이머 5'-TGA-AGG-TCG-GTG-TGA-ACG-GA-3' 및 리버스 프라이머 5'-CAT-GTA-GCC-ATG-AGG-TCC-ACC-AC-3'; MMP-9에 대하여 포워드 프라이머 5'-CAC-TGT-CCA-CCC-CTC-AGA-GC-3' 및 리버스 프라이머 5'-CAC-TTG-TCG-GCG-ATA-AGG; TIMP-1에 대하여 포워드 프라이머 5'-AAT-TCC-GAC-CTC-GTC-ATC-AG-3' 및 리버스 프라이머 5'-TGC-AGT-TTT-CCA-GCA-ATG-AG-3'; TIMP-2에 대하여 포워드 프라이머 5'-TGA-TCC-ACA-CAC-GTT-GGT-CT-3' 및 리버스 프라이머 5'-TTT-GAG-TTG-CTT-GCA-GGA-TG-3'; β-액틴에 대하여 포워드 프라이머 5'-GAG-TCA-ACG-GAT-TTG-GTC-GT-3' 및 리버스 프라이머 5'-GAC-AAG-CTT-CCC-GTT-CTC-AG-3'. 그런 다음, 95 °C에서 45초, 60 °C에서 50초 및 72 °C에서 60초의 사이클 35사이클 수행하여 증폭을 실시하였다. 증폭 단계 후에, 72 °C에서 5분 동안 연속적으로 연장 단계를 실행하였다. PCR 산물을 100V에서 10분 동안 1.5% 아가로스겔 상에서 전기영동하여 분리하였다. 겔을 1 mg/ml의 EtBr로 염색한 후 AlphaEase[®] 겔 이미지 분석 소프트웨어 (Alpha Innotech., San Leandro, CA, USA)를 사용하여 UV 조명 하에서 사진촬영하였다.

[0031] **실시예 6. 웨스턴 블롯 분석**

[0032] 총 세포를 RIPA 완충용액(Sigma-Aldrich Corp., St. Louis, USA)에 용균시켰다. 원심분리 후에, 세포 용균물의 총 단백질량을 Lowry method (BioRad Laboratories, Hercules, CA)을 사용하여 측정하였다. 동량의 단백질(15 μg)을 함유하는 분취량의 상청액을 10% 또는 12% SDS-PAGE 겔에 전기영동하고 니트로셀룰로소막 (Amersham Pharmacia Biotech., England, UK)으로 옮긴 후, 0.1% Tween 20 (TBS-T)을 함유하는 TBS에 용해된 5% 스킴밀크로 적어도 1시간 동안 차단시키고 일차 항체(Santa Cruz Biotechnology Inc., CA, USA)와 혼성화시켰다. 모든 일차 모노클로날 항체를 1:1000 비율로 TBS-T로 희석시켰다. 결합된 항체를 실온에서 1시간 동안 호스래디쉬 퍼옥시다아제-결합 이차 항체로 검출하고 면역반응성 단백질을 화학형광 ECL 검정 키트(Amersham Pharmacia Biosciences, England, UK)를 제조업자의 지시사항에 따라 사용하여 검출하였다. 웨스턴 블롯 밴드를 LAS3000[®] 발광 이미지 분석(Fujifilm Life Science, Tokyo, Japan)을 사용하여 시각화하였다.

[0033] **결과**

[0034] COS의 UV 흡광능을 평가하기 위해, 흡광 스펙트럼을 스펙트로미터를 사용하여 측정하였다. UV 범위를 UV-A (400-315 nm), UV-B (315-280 nm) 및 UV-C (280-100 nm)와 같은 세 그룹으로 나눌 수 있다. UV 노출, 특히 UV-A 및 UV-B는 콜라겐 섬유뿐만 아니라 피부 성분의 파괴를 유발한다. 따라서, UV 조사에 대한 피부의 보호는 광피부노화의 예방을 위한 좋은 전략이다. 도 1에서 도시된 바와 같이, COS는 UV-A 뿐만 아니라 UV-B 범위도 흡수할 수 있다. 그러므로, COS는 UV 광을 차단하여 피부의 광손상을 감소시킬 수 있다. 이러한 결과로부터, COS가 UV광을 흡수하여 태양 차단 보호용 화장품 물질로서 사용될 수 있음을 확인할 수 있다.

[0035] 콜라겐은 피부의 주요 성분으로 알려져 있으며 콜라게나아제 MMP에 의해 분해된다. MMP 중에서, MMP-1, MMP-8 및 MMP-13은 콜라게나아제과로서 삼중-헬릭스 섬유상 콜라겐을 분해할 수 있다. 피부 콜라겐의 손실은 주름 형성의 원인이다. 그러므로, UV-A 조사 HDF 세포로부터의 콜라게나아제 MMP 분비에 대한 COS의 저해 효과를 ELISA 검정을 사용하여 평가하였다. 도 2에서 도시된 바와 같이, MMP-1, MMP-8 및 MMP-13 분비는 투여량-의존 방식으로 COS의 존재 하에서 감소되었다. 이러한 결과는 COS가 UV-A 조사에 의한 콜라겐 분해에 대해 충분한 보호 효과를 나타냄을 확인시켜준다.

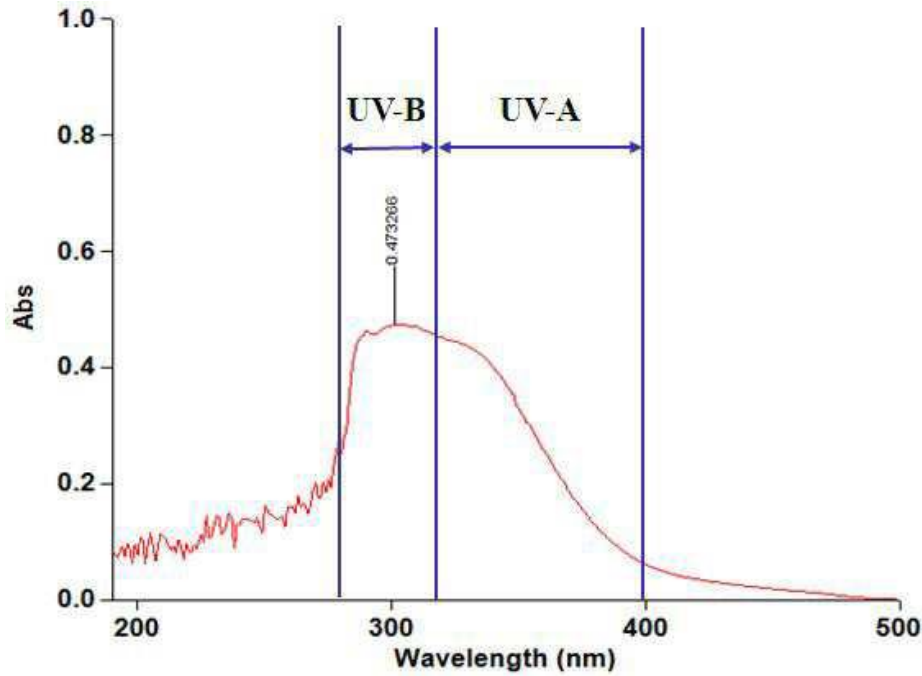
[0036] UV-A 조사 세포에서의 콜라게나아제 MMP 발현에 대한 COS의 효과를 RT-PCR 및 웨스턴 블롯팅 분석을 통해 결정하였다(도 3). MMP-1, MMP-8 및 MMP-13의 콜라게나아제 MMP 유전자 발현 수준은 농도-의존 방식으로 COS 처리에 의해 감소되었다. 게다가, IV 유형 콜라게나아제로서, MMP-2 및 MMP-9 발현 수준 또한 평가하였다. 결과는 MMP-2 및 MMP-9의 발현 수준이 COS 처리에 의해 UV-A만을 조사한 세포보다 감소되었음을 나타낸다. 또한, 이러한 콜라게나아제 수준은 TIMP 유전자에 의해 조절되는데, TIMP-1 및 TIMP-2 유전자 수준은 UV-A 조사에 의해 감소하고 COS 처리에 의해 증가한다. 이러한 결과에 따라, COS가 UV-A 유도 콜라겐 분해에 대해 보호 효과를 나타냄을 알 수 있다.

[0037] COS가 UV-A 조사 세포에서 콜라겐 합성에 영향을 미치는지를 평가하기 위해, 콜라겐 합성 마커를 웨스턴 블롯

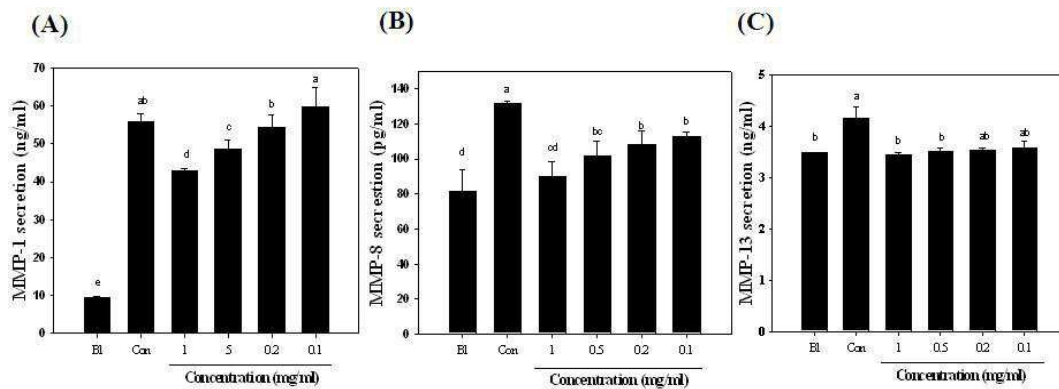
분석으로 평가하였다(도 4). 콜라겐은 대부분의 결합 조직의 주요 성분이다. 콜라겐 중에서, I, III 및 IV 유형 콜라겐이 인간 피부에 가장 풍부하며 이러한 콜라겐들은 UV 노출에 의해 유의성있게 분해되어 피부 주름을 야기한다. COS의 처리는 투여량 의존 방식으로 I, III 및 IV 수준을 증가시켰다. 게다가, 조직간 콜라겐(interstitial collagens)은 프로콜라겐으로서 합성되어 세포 외부로 분비되는데, 프로콜라겐의 조절은 UV-A 단독 노출된 세포에서 감소되었다. 그러나, 이러한 UV-A 노출에 의한 프로콜라겐의 감소된 세포성 수준은 COS 존재 하에서 증가된다. 이러한 결과는 콜라겐 분해 MMP 발현의 감소에 의해 COS가 콜라겐 생산을 증가시킬 수 있음을 나타내는 것이다.

도면

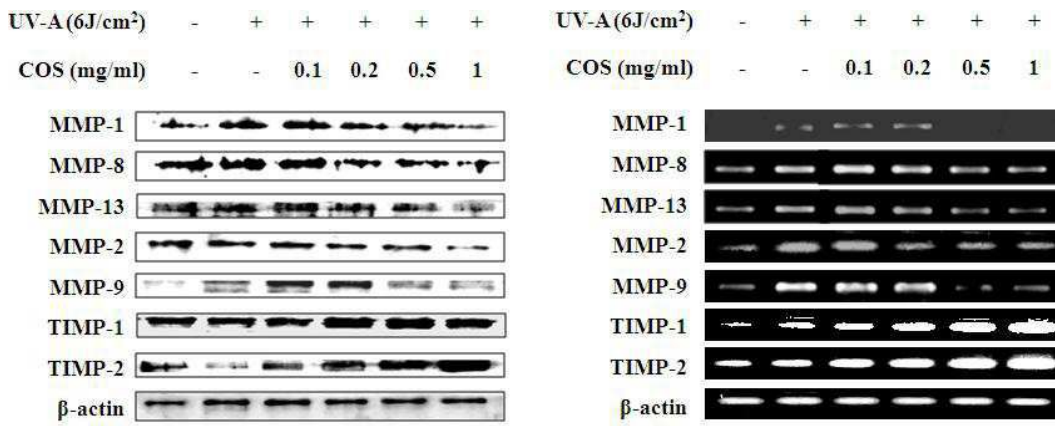
도면1



도면2



도면3



도면4

