(19) 대한민국특허청(KR)
(12) 공개특허공보(A)

(11) 공개번호 10-2016-0047366
(43) 공개일자 2016년05월02일

(51) 국제특허분류(Int. Cl.)
C07K 5/08 (2006.01) *A61K 8/365* (2006.01)
A61K 8/64 (2006.01) *C07K 5/097* (2006.01)
(21) 출원번호 10-2014-0153592
(22) 출원일자 2014년11월06일
심사청구일자 2014년11월06일
(30) 우선권주장
1020140143119 2014년10월22일 대한민국(KR)

(71) 출원인
(주)네이처랜드
서울특별시 노원구 공릉로 232, 서울테크노파크 809 (공릉동, 서울과학기술대학교)
(72) 발명자
나현주
서울특별시 중랑구 동일로 932, 목동자이아파트 201동 3302
(74) 대리인
김윤보

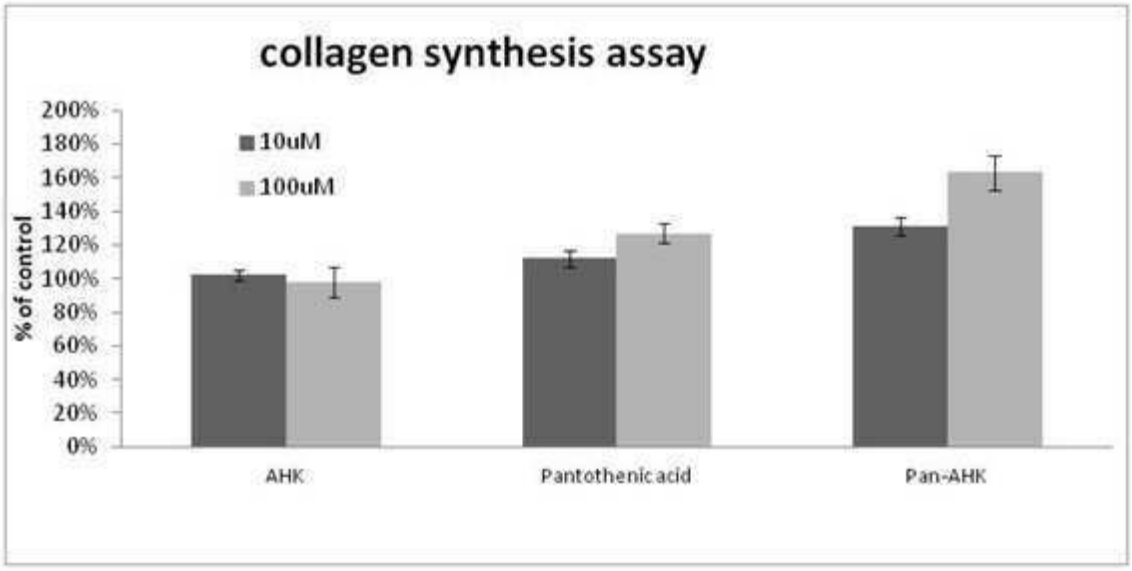
전체 청구항 수 : 총 6 항

(54) 발명의 명칭 **판토텐산이 결합된 AHK 펩타이드, 및 상기 펩타이드를 유효성분으로 포함하는 주름 개선 및 피부 노화 방지용 화장품 조성물**

(57) 요 약

본 발명은 판토텐산이 결합된 AHK 펩타이드 및 상기 펩타이드를 유효성분으로 포함하는 주름 개선 및 피부 노화 방지 효과를 갖는 화장품 조성물에 관한 기술이다.

대 표 도 - 도2



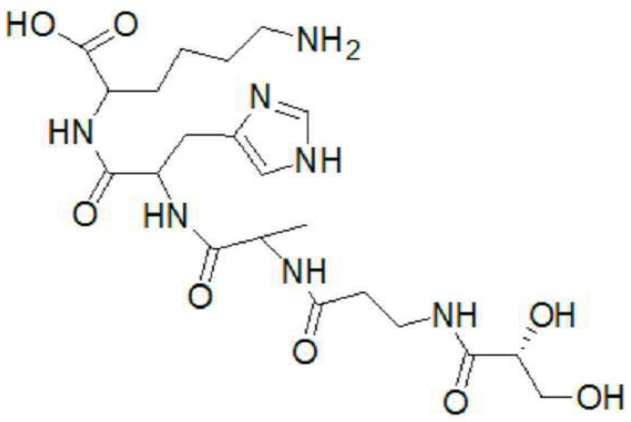
명 세 서

청구범위

청구항 1

하기의 화학식 1의 판토텐산이 결합된 AHK 펩타이드 또는 그 염.

[화학식 1]



청구항 2

제1항의 판토텐산이 결합된 AHK 펩타이드 또는 그 염을 유효성분으로 포함하는 주름 개선 및 피부 노화 방지용 화장품 조성물.

청구항 3

제2항에서, 상기 판토텐산이 결합된 AHK 펩타이드 또는 그 염의 함량은 전체 조성물 중량에 대하여 0.0001 내지 99 중량%인 것을 특징으로 하는 주름 개선 및 피부 노화 방지용 화장품 조성물.

청구항 4

제2항에서, 상기 화장품 조성물의 제형은 기초 화장품, 가슴 및 둔부 전용 크림, 메이크업 화장품, 바디 제품, 면도용 제품, 모발 제품, 경고제, 스프레이제, 현탁액, 유액, 크림, 젤, 폼 중 어느 하나의 제형인 것을 특징으로 하는 주름 개선 및 피부 노화 방지용 화장품 조성물.

청구항 5

제4항에서, 상기 화장료 조성물은 유연화장수, 수렴화장수, 영양화장수, 영양크림, 마사지크림, 아이크림, 아이에센스, 에센스, 클렌징크림, 클렌징로션, 클렌징폼, 클렌징워터, 팩, 파우더, 보디로션, 보디크림, 보디에센스, 보디세정제, 선스크린 크림, 염모제, 샴푸, 린스, 정발제, 양모제, 로션, 연고, 젤, 크림, 패취 및 분무제 중 어느 하나의 제형인 것을 특징으로 하는 주름 개선 및 피부 노화 방지용 화장품 조성물.

청구항 6

제2항에서, 상기 화장료 조성물은 향료, 색소, 살균제, 산화방지제, 방부제, 보습제, 점증제, 부형제, 희석제, 보습제, pH 조절제, 정제수, 항산화제, 세포활성제, 청량제 및 무기염류 중 어느 하나 이상을 더 포함하는 것을 특징으로 하는 주름 개선 및 피부 노화 방지용 화장품 조성물.

발명의 설명

기 술 분 야

[0001] 본 발명은 판토텐산이 결합된 AHK 펩타이드 또는 그 염, 및 상기 펩타이드 또는 그 염을 유효성분으로 하는 주름 개선 및 피부 노화 방지용 화장품 조성물에 관한 기술이다.

배 경 기 술

[0002] 피부는 보호 기능, 장벽 기능, 온도 조절 기능, 배설 기능, 호흡 기능 등을 하는 기관으로, 표피, 진피 및 피하지방으로 이루어진다. 표피는 가장 얇은 층으로 각질 형성 세포와 멜라닌 세포의 유기적인 결합으로 이루어져 있다. 진피는 피부의 약 95%를 차지하며, 피부의 보습 및 보호를 담당하는 층으로, 피부탄력(주름)에 중요한 역할을 하는 대표적인 단백질인 콜라겐 및 엘라스틴이 그물처럼 분포되어 있고, 혈관과 신경이 존재하며, 알레르기 반응에 관여하는 비만세포, 및 Na-PCA 또는 히아루론산 등의 천연 보습 인자도 함유하고 있다. 피하지방은 표피 및 진피로의 영양 공급, 체형 결정, 체온 유지, 외부적인 충격흡수 및 피하지방 하부의 세포 보호 등의 역할을 한다.

[0003] 이러한 피부는 나이가 들면서 내인성 또는 외인성 원인으로 인해 피부기능이 급격히 저하되는 노화를 겪게 된다. 노화가 진행되면서 피부의 구성 성분인 표피, 진피 및 피하 지방의 두께가 얇아지고 콜라겐과 엘라스틴이 가늘어지고 느슨해져 탄력이 떨어지고 주름 등이 생긴다. 또한, 나이가 들거나 자외선에 노출될 경우 피하 지방 세포에서의 지방합성이 억제되어 피부 보호 기능을 잃게 되어 급속한 피부노화를 나타내며, 얼굴, 유방 및 둔부에서는 조직이 처지고 주름이 형성되는 등 미용상의 그 아름다움도 추구할 수 없게 된다.

[0004] 이러한 피부기능 저하를 해결하기 위한 많은 수단이 연구되고 있는데, 그 중에 가장 중요한 부분은 피부 세포의 콜라겐 생합성을 촉진하는 방법을 찾는 데 있다. 이를 위해 비타민 C 및 이의 유도체, AHK 펩타이드, 커퍼 펩타이드 및 각종 천연물 추출물들이 선별되어 사용되고 있는 상황이다. 하지만, 비타민 C 및 이의 유도체는 안정성이 떨어지고 장기적 활성이 낮은 단점을 가지며, AHK 펩타이드 및 커퍼 펩타이드는 콜라겐 생합성 증진 효과가 떨어지는 단점을 가지며, 천연물 추출물의 경우에는 활성도 떨어질 뿐만 아니라 시료 준비 시점에 대한 활성도의 차이가 매우 다른 단점을 갖는다. 이에 이러한 모든 단점을 극복할 수 있는 신개념의 콜라겐 생합성 증진 소재의 발굴이 절실한 실정에 있다.

[0005] 이에 본 발명자들은 상기와 같은 문제점들을 해결하기 위하여, 활성 펩타이드에 다양한 생리활성 물질 접합을 통해 새로운 활성을 부여하는 실험을 수행한 결과, 판토텐산이 결합된 AHK 펩타이드의 경우 섬유아세포에서의 콜라겐 생성능이 뛰어남을 입증하게 되었고, 이러한 펩타이드 유도체를 피부 주름 개선 및 피부노화 개선의 용도로 사용할 수 있음을 밝히게 되었다.

선행기술문헌

[0006] 특허등록 제10-753472호

[0007] 특허등록 제10-1342485호

[0008] 특허등록 제10-789342호

[0009] 특허공개 제10-2013-15603호

발명의 내용

해결하려는 과제

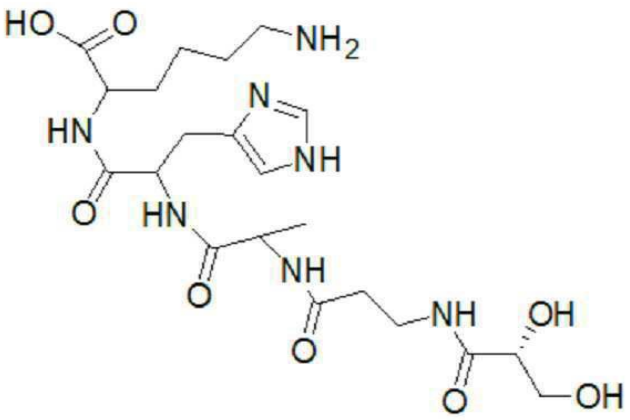
[0010] 본 발명의 목적은 섬유아세포에서의 콜라겐 신생합성 증진 효과가 매우 우수한 신규 펩타이드 유도체 또는 그 염을 제공하는 것이다.

[0011] 또한, 본 발명의 다른 목적은 상기 펩타이드 또는 그 염을 유효성분으로 하는 주름 개선 및 피부 노화 방지의 효과가 있는 화장품 조성물을 제공하는 것이다.

과제의 해결 수단

[0012] 본 발명은 하기의 화학식 1의 판토텐산이 결합된 AHK 펩타이드 또는 그 염을 제공한다.

[0013] [화학식 1]



[0014]

[0015] 또한, 본 발명은 상기 화학식의 판토텐산이 결합된 AHK 펩타이드 또는 그 염을 유효성분으로 포함하는 주름 개선 및 피부 노화 방지용 화장품 조성물을 제공한다.

[0016] 특히, 상기 판토텐산이 결합된 AHK 펩타이드 또는 그 염의 함량은 전체 조성물 중량에 대하여 0.0001 내지 99 중량%인 것이 바람직하다.

[0017] 특히, 상기 화장품 조성물의 제형은 기초 화장품, 가슴 및 둔부 전용 크림, 메이크업 화장품, 바디 제품, 면도용 제품, 모발 제품, 경고제, 스프레이제, 현탁액, 유액, 크림, 젤, 폼 중 어느 하나의 제형인 것이 바람직하다.

[0018] 특히, 상기 화장료 조성물은 유연화장수, 수렴화장수, 영양화장수, 영양크림, 마사지크림, 아이크림, 아이에센스, 에센스, 클렌징크림, 클렌징로션, 클렌징폼, 클렌징워터, 팩, 파우더, 보디로션, 보디크림, 보디에센스, 보디세정제, 선스크린 크림, 염모제, 샴푸, 린스, 정발제, 양모제, 로션, 연고, 젤, 크림, 패취 및 분무제 중 어

느 하나의 제형인 것이 바람직하다.

[0019] 특히, 상기 화장료 조성물은 향료, 색소, 살균제, 산화방지제, 방부제, 보습제, 점증제, 부형제, 희석제, 보습제, pH 조절제, 정제수, 항산화제, 세포활성제, 청량제 및 무기염류 중 어느 하나 이상을 더 포함하는 것이 바람직하다.

발명의 효과

[0020] 본 발명의 판토텐산이 결합된 AHK 펩타이드는 피부 내에서 콜라겐 생합성을 증대시킴으로 주름 개선 및 피부 노화 방지 효과가 우수하며, 인체 적용 시 피부 자극 등의 부작용 없이 본래의 기능을 효과적으로 발휘할 수 있는 바, 상기 펩타이드 또는 그 염을 유효성분으로 주름 개선 및 피부 노화 방지 효과를 갖는 화장품으로 제조될 수 있다.

도면의 간단한 설명

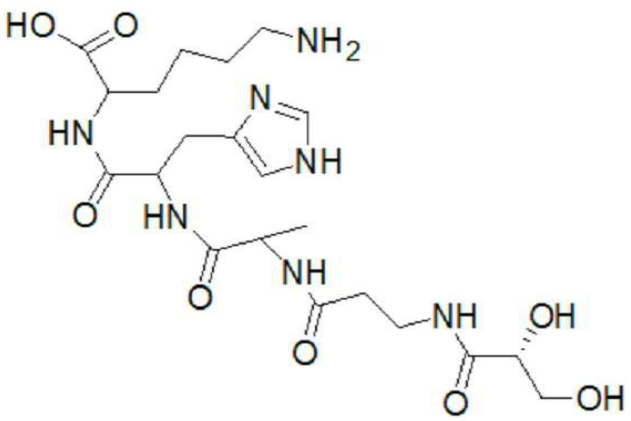
[0021] 도 1은 본 발명에 따른 판토텐산이 결합된 AHK 펩타이드의 세포 독성 측정 결과를 보여주는 것이다.

도 2는 본 발명에 따른 판토텐산이 결합된 AHK 펩타이드의 콜라겐 생합성 증대 효과에 대한 측정 결과를 보여주는 것이다.

발명을 실시하기 위한 구체적인 내용

[0022] 본 발명은 하기 화학식 1의 판토텐산(pantothenic acid)이 결합된 AHK펩타이드(알라닌-히스티딜-라이신) 또는 그 염, 및 상기 펩타이드 또는 그 염을 유효성분으로 하는 주름 개선 및 피부 노화 개선 효과가 있는 화장품 조성물에 관한 기술이다.

[0023] [화학식 1]



[0024]

[0025] 상기 본 발명의 판토텐산이 결합된 AHK 펩타이드는 공지의 고체상 펩타이드 합성(Solid phase peptide synthesis; SPPS)에 따른 Fmoc-chemistry 합성 방법과 solution chemistry 합성 방법을 이용하여 펩타이드 유도체들을 합성할 수 있으나, 상기 방법 이외에 다양한 합성방법으로 본 발명의 판토텐산이 결합된 AHK 펩타이드를 합성할 수 있다.

[0026] 본 발명의 실시예에서 사용한 고체상 펩타이드 합성 방법은 레진에 보호화된 아미노산을 로딩하는 1 단계, 아미노산의 보호기를 제거하는 2 단계, 아미노산의 커플링 반응을 유도하는 3 단계, 반응 여부를 확인하는 4 단계

(예컨대, Kaiser test), 레진 및 보호기를 제거하는 5 단계, 펩타이드를 고형화하는 6 단계를 포함한다.

[0027] 이하, 상기 합성 방법을 단계별로 좀 더 상세히 설명하기로 한다.

[0028] 1 단계는 레진에 아미노산 및 판토텐산을 로딩하는 단계이다. 상기 레진으로 왕레진(wang resin), 클로로트리틸 레진(chlorotrityl resin), 폴리스티렌레진(polystyrene resin) 등을 사용할 수 있으며, 합성의 최적화를 위해 각 반응 잔기에 아민기가 우선 결합되어 있는 레진을 사용하고, 아민레진에 적절한 용매를 첨가하여 레진을 팽윤(swelling) 시킨다. 상기 용매로 예컨대 MC(methylenechloride) 를 사용할 수 있으나, 이에 제한되는 것은 아니다. 다음으로, 감압 하에서 상기 용매를 제거하고, 적절한 용매에 녹인 보호화된 아미노산과 DIC(diisopropylcarbodiimide) 및 DMAP(4-dimethylaminopyridine) 혼합 용액을 용기에 첨가하여 반응시킨다. 상기 용매로는 예컨대 DMF(dimethylformamide)를 사용할 수 있으며, 아미노산의 보호기로 Fmoc(9-Fluorenylmethoxycarbonyl)를 사용할 수 있으나, 이에 제한되는 것은 아니다.

[0029] 2 단계는 아미노산의 보호기를 제거하는 단계이다. 아미노산 보호기의 제거는 당업계에 일반적으로 알려진 방법에 따라 수행할 수 있으며, 본 발명의 하기 실시예에서는 레진에 로딩한 아미노산 용액을 감압 하에서 제거하고 세척한 후, 피페리딘으로 희석된 DMF 용액으로 반응하여 보호기를 제거하였다.

[0030] 3 단계는 아미노산의 커플링 반응을 유도하는 단계이다. 아미노산 커플링 반응은 당업계에 일반적으로 알려진 방법, 예를 들어 HOBt-DCC(N-hydroxybenzotriazole-dicyclohexylcarodiimide) 방법 또는 HOBt-DIC(N-hydroxybenzotriazole- diisopropylcarbodiimide) 방법 등에 따라 수행할 수 있다. 이 외에도 커플링 시약들인 N,N'-디시클로헥실카르보디이미드(DCC), N,N'-디이소프로필카르보디이미드(DIC), O-벤조트리아졸-1-일-N,N,N',N'-테트라메틸우로늄헥사플로로포스페이트(HBTU), 벤조-트리아졸-1-일옥시트리스(디메틸아미노)포스포늄헥사플로로포스페이트(PyBOP), 벤조-트리아졸-1-일옥시트리스(디메틸아미노)포스포늄 헥사플로로포스페이트(BOP), 1H-하이드록시-벤조트리아졸(HOBt), 1H-하이드록시-7-아자벤조트리아졸(HOAt) 등을 이용하여 합성을 진행할 수 있으며, 커플링 시약에 따라 트리플루오로아세트산(TFA), 디이소프로필에틸아민(DIPEA), N-메틸모르폴린(NMM) 등과 같은 유기 염기를 첨가하여 반응을 진행할 수 있으나, 이에 제한되는 것은 아니다.

[0031] 4 단계는 반응 여부를 확인하는 단계이다. 예컨대, 본 발명의 실시예에서는 아미노산의 커플링 반응을 확인하기 위해 카이저 테스트를 이용하였다. 카이저 테스트는 닌하이드린을 이용하여 1차 아민의 관능기 존재 여부를 색깔 변화의 차이로 확인하는 정성적인 확인 방법이다. 구체적으로, 아미노산 커플링 반응 후 세척한 소량의 레진에 카이저 테스트 용액을 2 ~ 3 방울 첨가한 후 일정 시간 동안 레진의 색깔 변화를 관찰하여, 레진의 색깔 변화가 없는 경우 커플링 반응이 진행된 것으로 간주하고 다음 반응을 진행하며, 레진 색깔이 푸른색을 나타내면 미반응한 부분이 남아 있는 것으로 간주하여 아미노산 커플링 반응을 다시 진행할 수 있다.

[0032] 5 단계는 레진 및 보호기를 제거하는 단계이다. 합성된 펩타이드를 레진에서 제거하고, 아미노산 사이드 체인 보호기를 탈보호화시키는 단계이다. 레진 및 아미노산 보호기의 제거는 당업계에 일반적으로 알려진 방법에 따라 수행할 수 있으며, 본 발명의 구체적인 실시예에서는 TFA(trifluoroacetic acid), TIS(triisopropylsilane), 사이오아니졸(thioanisole), H_2O, EDT(ethanedithiol)로 구성된 절단 칵테일 용액(cleavage cocktail solution)을 첨가하여 펩타이드 용액을 얻었다. 상기 용액의 구성은 당업자가 실험조건에 따라 적절히 변형하여 사용할 수 있다.

[0033] 6 단계는 펩타이드를 고형화하는 단계이다. 예를 들어 디에틸에테르 용매를 과량 첨가하여 침전된 고형물을 생성시킬 수 있으나, 이에 제한되는 것은 아니다.

[0034] 또한, 본 발명은 상기 화학식 1의 다양한 염도 본 발명의 화장품 조성물로서 사용 가능하다. 예를 들어, 상기 염은 화장품 조성물에 사용되어야 하기 때문에, '약학적으로 허용 가능한 염'이 바람직하며, 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, 삼불화초산 등을 들 수 있다. 적합한 염기로부터 유도된 염은 나트륨 등의 알칼리 금속, 마그네슘 등의 알칼리 토금속, 및 암모늄 등을 포함할 수 있다.

[0035] 본 발명의 화장품 조성물에 포함되는 상기 화학식 1의 펩타이드 또는 이의 염은 용도, 적용 형태, 사용 목적 및 목표로 하는 효과 등에 따라서 적절히 조절 가능하며, 함량 대비 효과를 고려하여, 예컨대, 전체 화장품 조성물 중량에 대하여 0.0001 내지 99 중량%, 바람직하게는 0.001 내지 50 중량%, 보다 바람직하게는 0.001 내지 1중량%, 가장 바람직하게는 0.005 내지 0.1 중량%인 것이 좋다.

[0036] 본 발명의 화장품 조성물은 피부, 두피 또는 모발에 경피적으로 적용되고, 기초 화장품, 가슴 및 둔부 전용 크림, 메이크업 화장품, 바디 제품, 면도용 제품, 모발 제품 등의 모든 화장품 제품의 제조에 사용 가능한 조성물을 의미하는 것으로, 경고제, 스프레이제, 현탁액, 유액, 크림, 젤, 폼 등의 형태로 제제화된 것일 수 있으나, 그 화장품 제형에 특별한 제한이 없다.

[0037] 바람직하게, 상기 화장료 조성물은 유연화장수, 수렴화장수, 영양화장수, 영양크림, 마사지크림, 아이크림, 아이에센스, 에센스, 클렌징크림, 클렌징로션, 클렌징폼, 클렌징워터, 팩, 파우더, 보디로션, 보디크림, 보디에센스, 보디세정제, 선스크린 크림, 염모제, 샴푸, 린스, 치약, 구강청정제, 정발제, 양모제, 로션, 연고, 젤, 크림, 패취 및 분무제로 이루어진 군으로부터 선택되는 제형을 가지는 것을 포함한다.

[0038] 상기 본 발명의 화장료 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.

[0039] 이하, 본 발명을 실시예에 의해 상세히 설명한다. 단, 하기 실시예는 본 발명을 예시하는 것일 뿐, 본 발명이 하기 실시예에 의해 한정되는 것은 아니다.

[0040] **실시예 1 : 판토텐산이 결합된 AHK 펩타이드의 제조**

[0041] 본 발명에서는 일반적인 펩타이드 합성방법으로 Fmoc(9-luorenylmethoxycarbonyl)을 Nα-아미노산의 보호기로 사용하는 고상 합성법을 이용하여 펩타이드 유도체 얻었으며, 그 구체적인 실시예는 다음과 같다.

[0042] 우선, 아민 레진(1.1 mmol/g, Novabiochem Corporation)의 1 mmol에 대한 양을 측량하여 반응 용기에 넣은 다음, MC 30 ml을 첨가하여, 10분 동안 레진을 팽윤(swelling)시켰다. 감압 하에서 용매를 제거하고, DMF 용매에 녹인 Fmoc-라이신(4 eq.), DIC(2 eq.; Diisopropylcarbodiimide) 및 DMAP(0.1 eq.; 4-Dimethylaminopyridine) 혼합 용액을 용기에 첨가하여, 4시간 동안 반응을 시켰다. 다음으로, 아민 레진에 로딩한 아미노산 용액을 감압하에서 제거하고, 레진을 DMF와 MC로 각각 30 ml X 5회 세척하였다. Fmoc-라이신이 로딩된 레진을 20 %(v/v%) 피페리딘으로 희석된 DMF 용액으로 10 분 동안 반응하여 탈 보호시킨 다음, DMF와 MC로 각각 30 ml X 5회 세척하였다. 다음으로, Fmoc 보호기가 제거된 레진에, DMF 용매에 녹인 Fmoc 펩타이드 및 판토텐산(Fmoc-히스티딘, Fmoc-알라닌, 판토텐산의 순서로 사용)(각각4 eq.), DIC(4 eq.; Diisopropylcarbodiimide), HOBt(4 eq.; N-hydroxybenzotriazole) 커플링 용액을 첨가하고, 각각 4 시간 동안 실온에서 반응을 시켜 아미노산 커플링 반응

을 유도하였다. 아미노산 커플링 반응 후, 세척한 소량의 레진에 카이저 테스트 용액A, B, C[시약 A: 에탄올(100 ml) 내 닌하이드린 5 g), 시약 B: 에탄올(20 ml) 내 페놀(80 g), 시약 C: 피리딘(98 ml) 내 0.1M KCN(2 ml)]를 2-3 방울 첨가한 후, 100℃를 유지하면서 10분 동안 레진의 색깔 변화를 관찰하였다. 레진의 색깔 변화가 없는 경우 커플링 반응이 진행된 것으로 간주하고 다음 반응을 진행하였으며, 레진 색깔이 푸른색을 나타내면 미반응한 부분이 남아 있는 것으로 간주하여 아미노산 커플링 반응을 다시 진행하였다.

[0043] 이와 같은 과정으로 합성된 펩타이드를 레진에서 제거하고 아미노산 사이드 체인 보호기를 탈보호화 시키기 위하여 TFA(trifluoroacetic acid), TIS(triisopropylsilane), 사이오아니졸(thioanisole), H_2O, EDT(ethanedithiol)로 구성된 혼합물을 90:2.5:2.5:2.5:2.5 비율로 첨가하여 침전된 고형물을 생성시켰고, 이렇게 얻어진 침전물을 원심분리시켜, 여액의 TFA, TIS, 사이오아니졸, H_2O, EDT 등을 제거하고, 3회 이상 반복하여 고형화된 판토텐산이 결합된 AHK 펩타이드를 얻었다.

[0044] **실험예 1 : 판토텐산이 결합된 AHK 펩타이드의 세포 독성 측정**

[0045] 실시예 1에서 합성한 판토텐산이 결합된 AHK 펩타이드의 세포 독성을 알아보기 위하여 하기와 같이 실험을 진행하였다. 세포 독성은 MTT 어세이를 이용하여 측정하였고, 대조군으로 시료를 첨가하지 않은 것을 100%로 하여 상대적인 세포 독성을 계산하였다. 상세한 실험방법은 다음과 같다.

[0046] 사람의 정상 섬유아세포(Human Dermal Fibroblast neonatal)를 세포 배양용 96웰 플레이트에 3,000개의 세포수로 일정하게 분주하여 10% FBS(Fetal bovine serum)가 함유된 DMEM(Dulbecco's Modified Eagle Media, Gibco BRL)에서 24시간 동안 37℃, 5% CO_2 조건으로 인큐베이터에서 배양하였다. 시험 물질을 각각 10mM의 농도로 물로 녹여 농축액으로 하고, 이를 0.5% FBS가 함유된 DMEM으로 희석하여 100uM, 10uM의 농도로 희석한 후 각 웰에 100ul의 배지가 우선 들어있는 상태에 각 희석액을 100ul씩 넣어 처리한 후 48 시간 동안 배양한 후 세포 독성을 측정하였다.

[0047] 세포 독성 측정을 위한 MTT 어세이의 경우에는, 각 웰에 5mg/ml로 PBS에 녹여져 있는 3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyltetrazolium bromide (MTT)를 각각 20ul씩 첨가하고, 37℃, 5% CO_2 조건에서 3시간 동안 반응시켰다. 이후 상층액을 조심스럽게 제거하고, 세포 내 침전된 MTT 포르마잔을 100ul DMSO로 녹인 후 ELISA 리더기를 이용하여 OD570에서의 흡광도를 측정하였다.

[0048] 상기에서 얻어진 결과를 도 1 에 나타내었다. 도 1에서 알 수 있는 바와 같이, 본 발명의 화합물인 판토텐산이 결합된 AHK 펩타이드는 세포에 대한 독성이 전혀 없었다.

[0049] **실험예 2: 탄토텐산이 결합된 AHK 펩타이드의 type 1 콜라겐 생합성 촉진 능력 측정**

[0050] 실시예 1에서 합성한 판토텐산이 결합된 AHK 펩타이드의 type 1 콜라겐 생합성의 촉진 능력을 알아보기 위하여 하기와 같이 실험을 진행하였다. 생합성된 type 1 콜라겐의 측정은 ELISA 어세이 방법을 이용하여 콜라겐 생합성 촉진 효과를 측정하였으며 대조군으로 시료를 첨가하지 않은 것을 100%로 하여 상대적인 type 1 콜라겐 생성능을 계산하였다. 상세한 실험방법은 다음과 같다.

[0051] 사람의 정상 섬유아세포(Human Dermal Fibroblast neonatal)를 세포 배양용 96웰 플레이트에 3,000개의 세포수로 일정하게 분주하여 10% FBS(Fetal bovine serum)가 함유된 DMEM(Dulbecco's Modified Eagle Media, Gibco

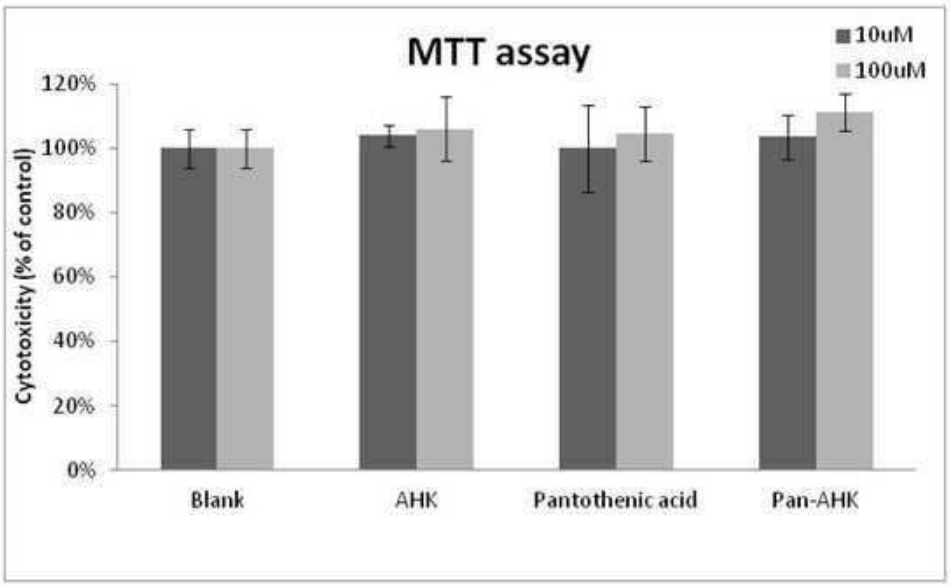
BRL)에서 24시간 동안 37℃, 5% CO_2 조건으로 인큐베이터에서 배양하였다. 시험 물질을 각각 10mM의 농도로 물로 녹여 농축액으로 하고, 이를 0.5% FBS가 함유된 DMEM으로 희석하여 200uM, 100uM, 10uM의 농도로 희석한 후 각 웰에 100ul의 배지가 우선 들어있는 상태에 각 희석액을 100ul씩 넣어 처리한 후 48 시간 동안 배양한 후 세포 독성을 측정하였다.

[0052] ELISA 분석을 위해, type 1 콜라겐에 대한 항체를 96웰 플레이트에 코팅하고 블록킹 버퍼를 이용해 충분히 블록킹을 하였다. 이 후 상층액을 type 1 콜라겐 항체가 코팅되어 있는 96웰 플레이트에 처리하여, 상온에서 2시간 동안 반응시켰다. 반응이 끝난 후, 상층액을 제거하고 0.05% 트윈-20(tween-20)이 포함된 PBS(PBST)를 이용하여 세척해 주었고, 비오틴이 결합된 2차 항체를 96 웰 플레이트에 처리하여 상온에서 1시간 동안 반응시켰다. 반응이 끝나면 이전과 동일한 방법으로 남아 있는 상층액을 제거하고 PBST를 이용하여 세척해 주었으며, 결합된 콜라겐을 측정하기 위하여 SA-HRP(Streptavidin-Horseradish peroxidase, Sigma)를 결합시켰다. 발색반응을 확인하기 위해 기질로 TMB(3,3'-5,5' tetramethylbenzidine, Sigma)를 처리하여 빛이 차단된 상온에서 15분간 반응시킨 후 2N 염산으로 반응을 정지시키고 450 nm에서 흡광도를 측정하였다.

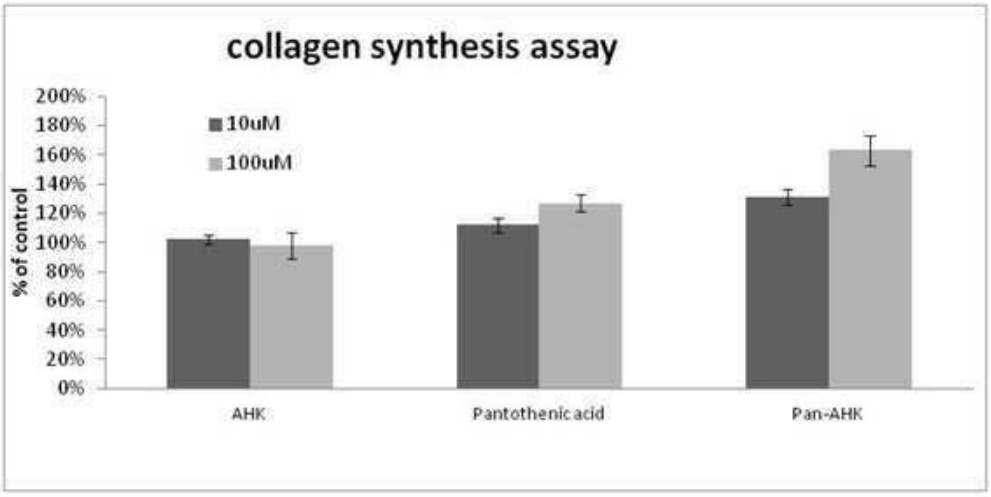
[0053] 상기에서 얻어진 결과를 도 2에 나타내었다. 도 2에서 알 수 있는 바와 같이 판토텐산이 결합된 AHK 펩타이드의 경우 뛰어난 type 1 콜라겐의 생합성 증가의 효능을 보여주고 있다.

도면

도면1



도면2


collagen synthesis assay
200%
180%
160%
140%
120%
100%
80%
60%
40%
20%
0%
% of control
10uM
100uM
AHK
Pantothenic acid
Pan-AHK