

(12) 특허협력조약에 의하여 공개된 국제출원

(19) 세계지식재산권기구  
국제사무국



(10) 국제공개번호

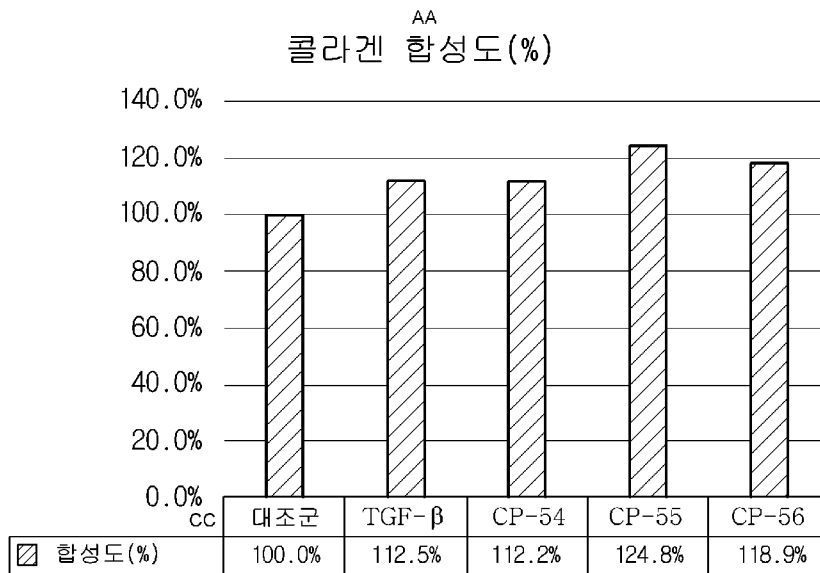
(43) 국제공개일  
2017년 10월 26일 (26.10.2017) WIPO | PCT

WO 2017/183942 A2

- (51) 국제특허분류: *C07K 7/06* (2006.01) *A61Q 19/00* (2006.01)  
*A61K 8/64* (2006.01) *A61Q 19/08* (2006.01)  
*A61K 38/08* (2006.01) *A23L 33/18* (2016.01)
- (21) 국제출원번호: PCT/KR2017/004288
- (22) 국제출원일: 2017년 4월 21일 (21.04.2017)
- (25) 출원언어: 한국어
- (26) 공개언어: 한국어
- (30) 우선권정보: 10-2016-0048749 2016년 4월 21일 (21.04.2016) KR
- (71) 출원인: 주식회사 쥘백스앤카엘 (GEMVAX & KAEL CO., LTD.) [KR/KR]; 34036 대전시 유성구 테크노11로 58, Daejeon (KR).
- (72) 발명자; 겸  
(71) 출원인: 김상재 (KIM, Sang Jae) [KR/KR]; 06360 서울시 강남구 광평로 10길 15, 101동 405호, Seoul (KR).
- (74) 대리인: 김순영 (KIM, Sun-young); 03151 서울시 종로구 종로5길 58 석탄회관빌딩 10층, Seoul (KR).
- (81) 지정국 (별도의 표시가 없는 한, 가능한 모든 종류의 국내 권리의 보호를 위하여): AE, AG, AL, AM, AO, AT, AU, AZ, BA, BB, BG, BH, BN, BR, BW, BY, BZ, CA, CH, CL, CN, CO, CR, CU, CZ, DE, DJ, DK, DM, DO, DZ, EC, EE, EG, ES, FI, GB, GD, GE, GH, GM, GT, HN, HR, HU, ID, IL, IN, IR, IS, JP, KE, KG, KH, KN, KP, KR, KW, KZ, LA, LC, LK, LR, LS, LU, LY, MA, MD, ME, MG, MK, MN, MW, MX, MY, MZ, NA, NG, NI, NO, NZ, OM, PA, PE, PG, PH, PL, PT, QA, RO, RS, RU, RW, SA, SC, SD, SE, SG, SK, SL, SM, ST, SV, SY, TH, TJ, TM, TN, TR, TT, TZ, UA, UG, US, UZ, VC, VN, ZA, ZM, ZW.
- (84) 지정국 (별도의 표시가 없는 한, 가능한 모든 종류의 국내 권리의 보호를 위하여): ARIPO (BW, GH, GM, KE, LR, LS, MW, MZ, NA, RW, SD, SL, ST, SZ, TZ, UG, ZM, ZW), 유라시아 (AM, AZ, BY, KG, KZ, RU, TJ, TM), 유럽 (AL, AT, BE, BG, CH, CY, CZ, DE, DK, EE, ES, FI, FR, GB, GR, HR, HU, IE, IS, IT, LT, LU, LV, MC, MK, MT, NL, NO, PL, PT, RO, RS, SE, SI, SK, SM, TR), OAPI

(54) Title: PEPTIDE HAVING EFFICACY OF INCREASING COLLAGEN GENERATION AND COMPOSITION COMPRISING SAME

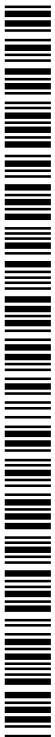
(54) 발명의 명칭: 콜라겐 생성 증가 효능을 가지는 펩티드 및 이를 포함하는 조성물



AA ... Collagen synthesis (%)  
BB ... Synthesis (%)  
CC ... Control

(57) Abstract: The present specification relates to a peptide having novel activity and a composition comprising the same and, more particularly, to a peptide having novel activity exhibiting efficacy in collagen synthesis and a composition for improving wrinkles and preventing aging comprising the same. The peptide having novel activity and the composition comprising the same according to the present invention have a remarkable effect in collagen synthesis, thereby providing a composition for improving wrinkles and preventing aging.

[다음 쪽 계속]



WO 2017/183942 A2

(BF, BJ, CF, CG, CI, CM, GA, GN, GQ, GW, KM, ML,  
MR, NE, SN, TD, TG).

공개:

- 국제조사보고서 없이 공개하며 보고서 접수 후 이를 별도 공개함 (규칙 48.2(g))
- 명세서의 서열목록 부분과 함께 (규칙 5.2(a))

---

**(57) 요약서:** 본 명세서는 신규 활성을 갖는 펩티드 및 이를 포함하는 조성물에 관한 것으로, 보다 구체적으로는 콜라겐 합성 효능을 보이는 신규 활성을 갖는 펩티드 및 이를 포함한 주름개선 및 노화방지용 조성물에 관한 것이다. 본 명세서에 따른 신규 활성을 갖는 펩티드 및 이를 포함하는 조성물은 콜라겐 합성에 탁월한 효과를 나타내어 관련하여 주름개선 및 노화방지용 조성물을 제공한다.

## 명세서

### 발명의 명칭: 콜라겐 생성 증가 효능을 가지는 펩티드 및 이를 포함하는 조성물

#### 기술분야

- [1] 본 명세서는 콜라겐 생성 증가 효능을 가지는 기능성 펩티드 및 이를 포함하는 조성물에 관한 것으로, 보다 구체적으로는 콜라겐 생성 증가 효과를 가지는 기능성 펩티드를 포함하며 콜라겐 생성 저하에 의한 피부 주름 개선 및 피부 노화 방지에 효과적인 기능성 펩티드 조성물에 관한 것이다.

#### 배경기술

- [2] 피부는 노화 과정으로 인하여 여러 가지 대사 활성이 저하되며, 총체적인 피부 세포의 활성도가 떨어진다. 따라서 이러한 노화로 인하여 콜라겐 생성 능력, 콜라겐의 전사 이후의 일어나는 여러 과정에 변화가 일어나 콜라겐 생성의 감소로 이어지게 된다. 따라서 피부 주름의 발생 원인 중 하나로 피부교원질(콜라겐)의 결핍을 들고 있다. 콜라겐과 엘라스틴은 피부에 탄성과 탄력을 주며 이들이 노화로 약해지면 피부는 쉽게 손상되고 늙는다. 반복적인 자외선 노출로 피부에서의 콜라겐 분해효소들(matrix metalloproteinases, MMPs)이 증가하며, 증가된 콜라겐 분해효소는 피부 콜라겐을 분해하게 된다. 이런 현상의 반복으로 피부 주름이 형성되게 된다.
- [3] 조직학적 관점에서 피부노화는 피부의 진피에서 매트릭스를 형성하는 세포 외 조직(extracellular matrix proteins) 조성의 변화로 나타난다. 진피 세포 외 조직 중 콜라겐 단백질들은 피부에 강도와 장력을 부여하며 이로 인해 외부의 자극이나 힘으로부터 피부를 보호하는 역할을 하며 진피층의 90%를 차지하고 있어 콜라겐의 감소는 피부 노화와 주름형성에 밀접한 관련이 있다.
- [4] 피부 주름 개선 물질로 가장 대표적인 것이 레티놀(retinol)과 레티노이드라고 명명되는 그 유도체들으로써 건선, 노화, 암, 여드름 등 다방면에서 좋은 효과를 나타낸다고 알려져 있다. 또한 이 레티노이드는 피부에 도포하였을 때 콜라겐분해효소-1(MMP-1)를 저해 함으로서 콜라겐의 손실을 방지하고 콜라겐 형성을 자극함으로써 내인성 및 광노화를 방지하고 회복시키는 것으로 알려져 있다. 한편, 레티놀 외에는 TGF- $\beta$ (Transforming growth factor), 베틀린산, 야생 참마 추출물(한국공개특허 제2009-0055079호) 등이 주름개선용 조성물로서 알려져 있다. 그러나, 상기에 기술된 피부개선 유효성분들은 피부에 도포하였을 때 홍반, 가려움, 건선, 스케일링 등의 국소적 피부자극 반응을 일으킬 수 있고, 생체 적용시 그 안정성이 검증되어 있지 않다고 알려져 있다.
- [5] 주름개선 및 노화방지를 위한 콜라겐 합성 효능을 갖는 다양한 펩티드들, 그리고 상기 펩티드의 유도체들을 함유한 조성물들이 보고되고 있지만, 부작용이 적으면서도 콜라겐 합성 효능을 지닌 펩티드 및 이를 포함한 조성물은

아직 보고된 바 없다. 따라서, 이에 대한 연구 필요성이 제기되고 있는 실정이다.

- [6] [선행기술문헌]
- [7] [특허문헌]
- [8] (특허문헌 1) KR 2009-0055079 A

## 발명의 상세한 설명

### 기술적 과제

- [9] 이러한 배경하에서 본 발명자들은 신규 활성을 갖는 펩티드를 개발하여 콜라겐 합성 효능이 있음을 발견하고 본 발명을 완성하게 되었다
- [10] 본 명세서의 목적은 콜라겐 합성의 신규 활성을 갖는 펩티드 및 이를 포함하는 주름방지 및 노화방지용 조성물을 제공하는데 있다.

### 과제 해결 수단

- [11] 본 발명의 일측면은 서열 번호 1 내지 3으로 표시되는 아미노산 서열 중 어느 하나로 구성되는 펩티드, 상기 펩티드 서열의 단편인 펩티드, 상기 펩티드 서열 또는 그의 단편인 펩티드와 80% 이상의 서열 상동성을 갖는 펩티드로 구성된 군으로부터 선택되는 콜라겐 합성 활성을 보이는 펩티드 또는 그의 염을 제공한다.
- [12] 본 발명의 다른 일측면은, 상기 펩티드 또는 그의 염을 유효성분으로 포함하는 주름개선 및 노화방지용 조성물을 제공한다.
- [13] 본 발명은 다른 측면에서, 서열 번호 1 내지 3으로 표시되는 아미노산 서열 중 어느 하나로 구성되는 펩티드, 상기 펩티드 서열의 단편인 펩티드, 상기 펩티드 서열 또는 그의 단편인 펩티드 서열과 80% 이상의 서열 상동성을 갖는 펩티드, 및 그들의 염으로 구성된 군으로부터 선택되는 하나 이상을, 이를 필요로 하는 개체에 적용하는 것을 포함하는, 주름개선 및 노화방지 방법을 제공한다.
- [14] 본 발명은 다른 측면에서, 주름개선 및 노화방지에 사용하기 위한, 서열 번호 1 내지 3으로 표시되는 아미노산 서열 중 어느 하나로 구성되는 펩티드, 상기 펩티드 서열의 단편인 펩티드, 상기 펩티드 서열 또는 그의 단편인 펩티드 서열과 80% 이상의 서열 상동성을 갖는 펩티드, 및 그들의 염으로 구성된 군으로부터 선택되는 하나 이상을 제공한다.
- [15] 본 발명은 또 다른 측면에서, 주름개선 및 노화방지를 위한 유효성분으로서 서열 번호 1 내지 3으로 표시되는 아미노산 서열 중 어느 하나로 구성되는 펩티드, 상기 펩티드 서열의 단편인 펩티드, 상기 펩티드 서열 또는 그의 단편인 펩티드 서열과 80% 이상의 서열 상동성을 갖는 펩티드, 및 그들의 염으로 구성된 군으로부터 선택되는 하나 이상의 비치료적 화장 용도를 제공한다.
- [16] 본 발명은 또 다른 측면에서, 주름개선 및 노화방지를 위한 조성물의 제조에 사용하기 위한, 서열 번호 1 내지 3으로 표시되는 아미노산 서열 중 어느 하나로 구성되는 펩티드, 상기 펩티드 서열의 단편인 펩티드, 상기 펩티드 서열 또는 그의 단편인 펩티드 서열과 80% 이상의 서열 상동성을 갖는 펩티드, 및 그들의

염으로 구성된 군으로부터 선택되는 하나 이상의 용도를 제공한다.

[17] 본 발명의 다른 일측면에 따르면, 상기 조성물은 주름개선 및 노화방지용 화장료 조성물인 것을 특징으로 할 수 있다.

[18] 본 발명의 다른 일측면에 따르면, 상기 화장료 조성물은 스킨, 로션, 크림, 파운데이션, 에센스, 젤, 팩, 폼 클렌징, 비누 및 피부외용 연고로 이루어진 군으로부터 선택된 어느 하나의 제형으로 이루어진 것을 특징으로 할 수 있다.

[19] 본 발명의 다른 일측면에 따르면, 상기 조성물은 주름개선 및 노화방지용 약학적 조성물인 것을 특징으로 할 수 있다.

[20] 본 발명의 다른 일측면에 따르면, 상기 조성물은 주름개선 및 노화방지용 건강기능 식품용 조성물인 것을 특징으로 할 수 있다.

### 발명의 효과

[21] 본 발명에 따른 서열번호의 서열을 갖는 펩티드들은 콜라겐 합성 효능을 가져, 콜라겐 합성 활성을 지닌 펩티드를 포함하는 주름개선 및 노화방지용 조성물을 제공할 것으로 예상된다.

[22] 본 발명에 따른 주름개선 및 노화방지 효과는 본 발명에 따른 조성물에 의한 콜라겐 생성 증가를 통해, 피부 주름 생성을 억제 또는 개선하여 피부노화를 방지하는 효과를 말한다.

### 도면의 간단한 설명

[23] 도 1은 인간 피부 섬유아세포(Human skin fibroblast)인 CCD-986SK 세포주에, 아무것도 처리하지 않은 대조군(control), TGF- $\beta$ 를 20ng/ml 처리한 양성대조군, 본 발명에 따른 펩티드(CP-54, CP-55 CP-56)를 각각 50 $\mu$ M 처리한 처리군으로 나누어 콜라겐 합성도 (collagen synthesis)를 측정하여 비교한 결과를 대조군(100%)을 기준으로 상대적(%)으로 나타낸 그래프이다.

### 발명의 실시를 위한 최선의 형태

[24] 본 명세서는 다양한 변환을 가할 수 있고 여러 가지 실시예를 가질 수 있는 바, 이하, 본 명세서를 보다 구체적으로 설명한다. 그러나, 이는 본 명세서를 특정한 실시 형태에 대해 한정하려는 것이 아니며, 본 명세서의 사상 및 기술 범위에 포함되는 모든 변환, 균등물 내지 대체물을 포함하는 것으로 이해되어야 한다. 본 명세서를 설명함에 있어서 관련된 공지 기술에 대한 구체적인 설명이 본 명세서의 요지를 흐릴 수 있다고 판단되는 경우 그 상세한 설명을 생략한다.

[25] 본 발명의 일 측면에서, 서열 번호 1 내지 3의 서열로 구성되는 콜라겐 합성의 신규 활성을 갖는 펩티드를 개시한다.

[26] 본 명세서에 개시된 펩티드는 서열 번호 1 내지 3에서 선택된 어느 하나의 펩티드들 각각과 80% 이상, 85% 이상, 90% 이상, 95% 이상, 96% 이상, 97% 이상, 98% 이상, 99% 이상의 서열 상동성을 갖는 펩티드를 포함할 수 있다.

[27] 또한, 본 명세서에 개시된 펩티드는, 1 내지 3에서 선택된 어느 하나의 펩티드들과 1개 이상의 아미노산, 2개 이상의 아미노산, 3개 이상의 아미노산,

4개 이상의 아미노산, 5개 이상의 아미노산, 6개 이상의 아미노산 또는 7개 이상의 아미노산이 변화된 펩티드를 포함할 수 있다.

[28] 본 발명의 일 측면에서, 아미노산 변화는 펩티드의 물리화학적 특성이 변경되도록 하는 성질에 속한다. 예를 들어, 펩티드의 열안정성을 향상시키고, 기질 특이성을 변경시키고, 최적의 pH를 변화시키는 등의 아미노산 변화가 수행될 수 있다.

[29] 본 발명의 일 측면에 따른 서열 번호 1 내지 3에서 선택된 어느 하나의 펩티드는 세포 내 독성이 낮고, 생체 내 안정성이 높다는 장점을 가진다. 서열번호 1 내지 3에 기재된 펩티드는 아래 표 1과 같다. 아래 표 1의 "이름"은 펩티드를 구별하기 위해 명명한 것이다.

[30] [표1]

서열번호 (SEQ ID NO.)	이름	서열	아미노산 길이
1	CP-54	TSRLRFI	7
2	CP-55	LRFIP	5
3	CP-56	ALSSRLRG	8

[31] 본 발명은 일 측면에서, 상기 펩티드를 코딩하는 뉴클레오티드 서열을 제공한다.

[32] 본 발명의 일 측면에서는 서열번호 1 내지 3에서 선택된 어느 하나의 아미노산 서열을 포함하는 펩티드를 유효 성분으로 포함하는 조성물을 제공한다.

[33] 본 발명의 일 측면에 따른 조성물은 인간, 개, 닭, 돼지, 소, 양, 기니아피그 또는 원숭이를 포함하는 모든 동물에 적용될 수 있다.

[34] 본 발명의 일 측면에 따른 피부 외용제 조성물은 그 제형에 있어서 특별히 한정되는 바가 없으며, 유연화장수, 수렴화장수, 영양화장수, 아이크림, 영양크림, 맛사지크림, 클렌징크림, 클렌징폼, 클렌징위티, 파우더, 에센스, 팩 등의 제형을 가질 수 있다.

[35] 본 발명의 일 측면에 따른 화장료 조성물은 통상의 화장료 제조방법에 따라, 다양한 형태로 제조될 수 있다. 예를 들어, 상기 화장료 조성물은 상기 펩티드를 함유하는 향장 제품, 화장수, 크림, 로션 등의 형태로 제조될 수 있으며, 이는 통상의 클렌징액, 수렴액 및 보습액으로 희석하여 사용될 수 있다. 또한, 상기 화장료 조성물은 화장료 조성물 분야에서 통상적으로 사용되는 안정화제, 용해화제, 비타민, 안료, 및 향료와 같은 통상적인 보조제를 포함할 수 있다.

[36] 본 발명의 일 측면에 따른 서열번호 1 내지 3에서 선택된 어느 하나의 신규 활성 펩티드를 포함하는 화장료 조성물은 이미 알려진 화장료 조성물 제조방법에 의해 화장료 조성물을 제조할 수 있고, 일반적인 피부 화장료에 한정되지 않고 의약부외품, 외용 의약품에도 적용할 수 있다. 이들의 제형은 통상적으로 제조되는 어떠한 제형으로도 제조될 수 있으며, 예를 들어, 스킨, 로션, 크림,

- 파운데이션, 에센스, 젤, 팩, 폼클린징, 바디오일, 립스틱, 마스크라, 메이크업베이스 또는 비누형태로 제조할 수 있으나, 이에 한정되는 것은 아니다.
- [37] 본 발명의 일 측면에 따른 서열번호 1 내지 3에서 선택된 어느 하나의 신규 활성 펩티드를 포함하는 화장료 조성물에 있어서, 서열번호 1 내지 3에서 선택된 어느 하나의 신규 활성 펩티드 이외에 다른 성분들은 기타 화장료의 제형, 사용목적 등에 따라 당업자가 어려움 없이 적의 선정하여 배합할 수 있다.
- [38] 본 발명의 화장료 조성물은 매일 사용할 수 있으며 또한 정해지지 않은 기간 동안에도 사용할 수 있다. 바람직하게는 사용자의 연령, 피부상태 또는 피부타입, 펩티드의 농도에 따라 사용량, 사용횟수 및 기간을 조절할 수 있다.
- [39] 본 명세서의 조성물은 목적하는 바에 따라 모든 방식으로 투여할 수 있는데, 예를 들면, 경구, 직장, 정맥, 동맥, 근육, 피하, 피내, 자궁내경막 또는 뇌실내 주사에 의해 투여될 수 있다. 본 발명의 일 측면에 따른 조성물의 경구 투여를 위한 제형은 정제, 환제, 연질 또는 경질 캡셀제, 과립제, 산제, 액제 또는 유탕제일 수 있고, 비경구 투여를 위한 제형은 주사제, 점적제, 로션, 연고, 젤, 크림, 현탁제, 유제, 좌제, 패취 또는 분무제일 수 있으나, 이에 제한되는 것은 아니다.
- [40] 본 명세서의 조성물의 투여 형태는 이들의 약학적으로 허용 가능한 염의 형태로도 사용될 수 있고, 또한 단독으로 또는 타 약학적 활성 화합물과 결합뿐만 아니라 적당한 집합으로 사용될 수 있다. 상기 염으로는 약학적으로 허용되는 것이면 특별히 한정되지 않으며, 예를 들어 염산, 황산, 질산, 인산, 불화수소산, 브롬화수소산, 포름산 아세트산, 타르타르산, 젯산, 시트르산, 푸마르산, 말레산, 숙신산, 메탄술폰산, 벤젠술폰산, 툴루엔술폰산, 나프탈렌술폰산 등을 사용할 수 있다.
- [41] 본 발명의 일 측면에 따른 약학 조성물 내의 상기 펩티드 또는 그의 염의 농도는 1 내지 100  $\mu\text{M}$ 일 수 있다. 일 구현 예로서, 상기 농도는 1 $\mu\text{M}$  이상, 3 $\mu\text{M}$  이상, 5 $\mu\text{M}$  이상, 7 $\mu\text{M}$  이상, 10 $\mu\text{M}$  이상, 15 $\mu\text{M}$  이상, 20 $\mu\text{M}$  이상, 25 $\mu\text{M}$  이상, 30 $\mu\text{M}$  이상, 35 $\mu\text{M}$  이상, 40 $\mu\text{M}$  이상, 50 $\mu\text{M}$  이상, 60 $\mu\text{M}$  이상, 70 $\mu\text{M}$  이상, 80 $\mu\text{M}$  이상, 85 $\mu\text{M}$  이상, 90 $\mu\text{M}$  이상, 또는 95 $\mu\text{M}$  이상일 수 있다. 다른 예로서, 상기 농도는 100 $\mu\text{M}$  이하, 95 $\mu\text{M}$  이하, 90 $\mu\text{M}$  이하, 85 $\mu\text{M}$  이하, 80 $\mu\text{M}$  이하, 75 $\mu\text{M}$  이하, 70 $\mu\text{M}$  이하, 60 $\mu\text{M}$  이하, 50 $\mu\text{M}$  이하, 40 $\mu\text{M}$  이하, 30 $\mu\text{M}$  이하, 25 $\mu\text{M}$  이하, 20 $\mu\text{M}$  이하, 15 $\mu\text{M}$  이하, 10 $\mu\text{M}$  이하, 7 $\mu\text{M}$  이하, 5 $\mu\text{M}$  이하, 또는 2 $\mu\text{M}$  이하일 수 있다. 상기 농도는 바람직하게는 20 내지 80  $\mu\text{M}$ , 보다 바람직하게는 50 $\mu\text{M}$  일 수 있다.
- [42] 본 발명의 일 측면에 따른 상기 펩티드 또는 그의 염의 투여량은 0.1  $\mu\text{g}/\text{kg}$  내지 10  $\text{mg}/\text{kg}$ 일 수 있다. 일 구현 예로서, 상기 투여량은 0.1 $\mu\text{g}/\text{kg}$  이상, 0.5 $\mu\text{g}/\text{kg}$  이상, 1 $\mu\text{g}/\text{kg}$  이상, 5 $\mu\text{g}/\text{kg}$  이상, 10 $\mu\text{g}/\text{kg}$  이상, 30 $\mu\text{g}/\text{kg}$  이상, 50 $\mu\text{g}/\text{kg}$  이상, 70 $\mu\text{g}/\text{kg}$  이상, 100 $\mu\text{g}/\text{kg}$  이상, 300 $\mu\text{g}/\text{kg}$  이상, 500 $\mu\text{g}/\text{kg}$  이상, 700 $\mu\text{g}/\text{kg}$  이상, 900 $\mu\text{g}/\text{kg}$  이상, 1 $\text{mg}/\text{kg}$  이상, 2 $\text{mg}/\text{kg}$  이상, 3 $\text{mg}/\text{kg}$  이상, 4 $\text{mg}/\text{kg}$  이상, 5 $\text{mg}/\text{kg}$  이상, 6 $\text{mg}/\text{kg}$  이상, 7 $\text{mg}/\text{kg}$  이상, 8 $\text{mg}/\text{kg}$  이상, 9 $\text{mg}/\text{kg}$  이상, 9.5 $\text{mg}/\text{kg}$  이상, 또는 9.8 $\text{mg}/\text{kg}$

이상일 수 있다. 다른 구현 예로서, 상기 투여량은 10mg/kg 이하, 9mg/kg 이하, 8mg/kg 이하, 7mg/kg 이하, 6mg/kg 이하, 5mg/kg 이하, 4mg/kg 이하, 3mg/kg 이하, 2mg/kg 이하, 1mg/kg 이하, 900 $\mu$ g/kg 이하, 700 $\mu$ g/kg 이하, 500 $\mu$ g/kg 이하, 300 $\mu$ g/kg 이하, 100 $\mu$ g/kg 이하, 90 $\mu$ g/kg 이하, 70 $\mu$ g/kg 이하, 50 $\mu$ g/kg 이하, 30 $\mu$ g/kg 이하, 10 $\mu$ g/kg 이하, 7 $\mu$ g/kg 이하, 5 $\mu$ g/kg 이하, 3 $\mu$ g/kg 이하, 1 $\mu$ g/kg 이하, 0.9 $\mu$ g/kg 이하, 0.7 $\mu$ g/kg 이하, 0.5 $\mu$ g/kg 이하, 0.3 $\mu$ g/kg 이하, 0.2 $\mu$ g/kg 이하, 0.15 $\mu$ g/kg 이하, 또는 0.12 $\mu$ g/kg 이하일 수 있다. 상기 투여량은 바람직하게는 0.001 내지 1 mg/kg일 수 있다.

[43] 상기 투여량은 투여 받을 대상의 연령, 성별, 체중, 병리 상태 및 그 심각도, 투여 경로 또는 처방자의 판단에 따라 달라질 수 있다. 이러한 인자에 기초한 적용량 결정은 당업자의 수준 내에 있다.

[44]

[45] 본 발명의 일 측면에 따른 조성물은 필요에 따라 희석제, 부형제, 활택제, 결합제, 붕해제, 완충제, 분산제, 계면 활성제, 착색제, 향료 또는 감미제 등의 첨가제를 포함할 수 있다. 본 발명의 일 측면에 따른 조성물은 당업계의 통상적인 방법에 의해 제조될 수 있다.

[46] 본 발명의 일 측면에 따른 조성물은 콜라겐 생성을 증가시키고, 콜라겐 생성 억제 인자 분비를 저해시켜 피부 주름 생김을 억제 또는 개선시킬 수 있으며 노화를 방지할 수 있다.

[47] 본 명세서에서 사용된 용어들은 특정 구체예들을 설명하기 위한 목적으로만 의도된 것이지 본 발명을 한정하고자 하는 의도가 아니다. 명사 앞에 개수가 생략된 용어는 수량을 제한하고자 하는 것이 아니라 언급된 명사 물품이 하나 이상 존재하는 것을 나타내는 것이다. 용어 "포함하는", "갖는", 및 "함유하는"은 열린 용어로 해석된다(즉, "포함하지만 이에 한정되지는 않는"의 의미).

[48] 수치의 범위를 언급하는 것은 단지 그 범위 내에 속하는 각각의 별개의 수치들을 개별적으로 언급하는 것을 대신하는 쉬운 방법이기 때문이며, 그것이 아님이 명시되어 있지 않는, 각 별개의 수치는 마치 개별적으로 명세서에 언급되어 있는 것처럼 본 명세서에 통합된다. 모든 범위의 끝 값들은 그 범위 내에 포함되며 독립적으로 조합 가능하다.

[49] 본 명세서에 언급된 모든 방법들은 달리 명시되어 있거나 문맥에 의해 명백히 모순되지 않는 한 적절한 순서로 수행될 수 있다. 어느 한 실시예 및 모든 실시예 또는 예시적 언어 (예컨대, "~과 같은")를 사용하는 것은, 청구범위에 포함되어 있지 않는 한, 단지 본 발명의 여러 측면을 더 잘 기술하기 위함이지 본 발명의 범위를 제한하고자 함이 아니다. 명세서의 어떤 언어도 어떤 비청구된 구성요소를 본 발명의 일 측면에 따른 실시예 필수적인 것으로 해석되어서는 아니된다. 다른 정의가 없는 한, 본 명세서에 사용되는 기술적 및 과학적 용어들은 본 발명이 속하는 기술 분야에서 통상의 지식을 갖는 사람에 의해 통상 이해되는 것과 같은 의미를 갖는다.

- [50] 본 발명의 일 측면에 따른 바람직한 구체예들은 본 발명의 일 측면을 수행하기 위해 발명자에게 알려진 가장 최적의 모드를 포함한다. 바람직한 구체예들의 변이들이 앞선 기재를 읽으면 당업자에게 명백하게 될 수 있다. 본 발명자들은 당업자들이 그러한 변이를 적절히 이용하길 기대하고, 발명자들은 본 명세서에 기재된 것과 다른 방식으로 본 발명의 여러 측면이 실시되기를 기대한다. 따라서, 본 명세서는, 특허법에 의해 허용되는 것과 같이, 첨부된 특허청구범위에서 언급된 발명의 요지의 균등물 및 모든 변형들을 포함한다. 더욱이, 모든 가능한 변이들 내에서 상기 언급된 구성요소들의 어떤 조합이라도 여기서 반대로 명시하거나 문맥상 명백히 모순되지 않는 한 본 명세서에 포함된다. 본 명세서는 예시적인 구체예들을 참조하여 구체적으로 나타내어지고 기술되었지만, 당업자들은 하기 청구범위에 의해 정의되는 발명의 정신 및 범위를 벗어나지 않고서도 형태 및 디테일에서 다양한 변화가 행해질 수 있음을 잘 이해할 것이다.
- [51] 이하, 실시예 및 실험예를 들어 본 발명의 일 측면 상 구성 및 효과를 보다 구체적으로 설명한다. 그러나 아래 실시예 및 실험예는 본 발명의 일 측면에 대한 이해를 돕기 위해 예시의 목적으로만 제공된 것일 뿐 본 발명의 범주 및 범위가 그에 의해 제한되는 것은 아니다.
- [52]
- [53] [실시예 1]
- [54] 신규 활성을 갖는 펩티드의 합성
- [55] 서열번호 1의 신규 활성을 지닌 펩티드(이하 CP-54이라 명명함)를 종래에 알려진 고상 펩티드 합성법에 따라 제조하였다. 구체적으로, 펩티드들은 ASP48S(Pepton, Inc., 대한민국 대전)를 이용하여 Fmoc 고상 합성법(solid phase peptide synthesis, SPPS)을 통해 C-말단부터 아미노산 하나씩 커플링함으로써 합성하였다. 다음과 같이, 펩티드들의 C-말단의 첫번째 아미노산이 수지에 부착된 것을 사용하였다. 예컨대 다음과 같다:
- [56]  $\text{NH}_2\text{-S(tBu)-2-chloro-Triyl Resin}$
- [57]  $\text{NH}_2\text{-Ala-2-chloro-Triyl Resin}$
- [58]  $\text{NH}_2\text{-Arg(Pbf)-2-chloro-Triyl Resin}$
- [59] 펩티드 합성에 사용한 모든 아미노산 원료는 N-term이 Fmoc으로 보호(Protection)되고, 잔기는 모두 산에서 제거되는 Trt, Boc, tBu (t-butylester), Pbf (2,2,4,6,7-pentamethyl dihydro-benzofuran-5-sulfonyl) 등으로 보호된 것을 사용하였다. 예컨대 다음과 같다:
- [60] Fmoc-Ala-OH, Fmoc-Arg(Pbf)-OH, Fmoc-Glu(OtBu)-OH, Fmoc-Pro-OH, Fmoc-Leu-OH
- [61] 커플링 시약(coupling reagent)으로는 HBTU[2-(1H-Benzotriazole-1-yl)-1,1,3,3-tetamethylaminium hexafluorophosphate] / HOBt [N-Hydroxybenzotriazole] / NMM [4-Methylmorpholine] 를 사용하였다.

Fmoc 제거는 20%의 DMF 중 피페리딘(piperidine in DMF)을 이용하였다. 합성된 펩티드를 Resin에서 분리 및 잔기의 보호기 제거에는 절단 칵테일(cleavage Cocktail) [TFA (trifluoroacetic acid) / TIS (triisopropylsilane) / EDT (ethanedithiol) / H<sub>2</sub>O=92.5/2.5/2.5/2.5] 를 사용하였다.

- [62] 아미노산 보호기가 결합된 출발 아미노산이 고상 지지체에 결합되어 있는 상태를 이용하여 여기에 해당 아미노산들을 각각 반응시키고 용매로 세척한 후 탈보호하는 과정을 반복함으로써 각 펩티드를 합성하였다. 합성된 펩티드를 수지로부터 끊어낸 후 HPLC로 정제하고, 합성 성공여부를 LC/MS로 확인하고 동결 건조하였다.
- [63] 본 실시예에 사용된 펩티드에 대해 고성능 액체 크로마토그래피 결과, 모든 펩티드의 순도는 95% 이상이었다.
- [64] 예컨대, 펩티드 CP-54 제조에 관한 구체적인 과정을 설명하면 다음과 같다.
- [65] 1) 커플링
- [66] NH<sub>2</sub>-I-2-chloro-Triptyl Resin에 보호된 아미노산(8당량)와 커플링 시약 HBTU(8당량)/HOBt(8당량)/NMM(16당량) 을 DMF에 녹여서 첨가한 후, 상온에서 2시간 동안 반응하고 DMF, MeOH, DMF 순으로 세척하였다.
- [67] 2) Fmoc 탈보호
- [68] 20%의 DMF 중의 피페리딘(piperidine in DMF)을 가하고 상온에서 5분 간 2회 반응하고 DMF, MeOH, DMF 순으로 세척하였다.
- [69] 3) 1과 2의 반응을 반복적으로 하여 펩티드 기본 골격 NH<sub>2</sub>-T-S(tBu)-R(Pbf)-L-R(tBu)-F-I-2-chloro-Triptyl Resin)을 만들었다.
- [70] 4) 절단(cleavage): 합성이 완료된 펩티드 수지(resin)에 절단 칵테일(cleavage cocktail) 을 가하여 펩티드를 수지에서 분리하였다.
- [71] 5) 얻어진 혼합물에 냉각 디에틸 에테르를 가한 후, 원심 분리하여 얻어진 펩티드를 침전시킨다.
- [72] 6) 위의 과정에서 얻어진 조(crude) 펩티드를 Prep HPLC를 이용하여 분리 정제하였다. 컬럼은 Vydac Everest C18 column (250 mm × 22 mm, 10 μm)를 이용하였다. Eluent는 0.1% (v/v) 트리플루오로아세트산(trifluoroacetic acid)가 함유된 10~75% (v/v) 워터-아세토니트릴(water-acetonitrile) 선형 그라디언트(linear gradient)를 이용하였다.
- [73] 7) 분리된 펩티드가 원하는 서열대로 합성이 되었는지를 LC/MS를 (Agilent HP1100 series) 이용하여 확인하였다.
- [74] 8) 분자량이 확인된 펩티드를 다시 분석용 HPLC를 이용하여 95% 순도이상으로 분리 정제된 것을 확인하고 동결건조 과정을 거쳐 흰색 파우더로 제조하였다.
- [75] 펩티드 CP-55와 CP-56도 상기 CP-54 제조와 같은 방법을 기본으로, 펩티드의 기본 골격만 각 펩티드의 해당 서열에 맞게 치환되어 제조하였다.
- [76]

- [77] [실시예 2]
- [78] 신규 활성을 갖는 펩티드들의 콜라겐 생성 증대 효과 측정
- [79] 신규 활성을 갖는 펩티드 CP-54, CP-55 및 CP-56 과 이를 포함한 조성물이 주름개선을 위한 콜라겐 생성 효과가 있는지 검증하기 위하여, 인간 피부 섬유아세포(human skin fibroblast)를 배양하여 콜라겐 합성 효과가 있는 것으로 알려진 TGF- $\beta$ (양성대조군) 및 각각의 펩티드를 처리한 뒤, 흡광도 측정 방법을 통하여, 아무것도 처리하지 않은 대조군을 기준으로 양성대조군과 각 펩티드 처리 실험군의 상대 콜라겐 합성도(collagen synthesis)를 계산하였다.
- [80]
- [81] 실험 세포주 배양
- [82] 세포내의 콜라겐 생성 양을 비교하기 위하여, 인간 피부 섬유아세포주 (human skin fibroblast)인 CCD-986SK (ATCC® CRL-1947™)를 사용하였다. 상기 세포주를 10% FBS와 페니실린-스트렙토마이신(Penicillin-Streptomycin) 항생제가 첨가된 DMEM 배지에 넣어 100mm 배양 접시로 접종(seeding) 한 후, 37°C, 5% CO<sub>2</sub> 인큐베이터 (incubator)에서 배양하였다. 각 세포의 성장 속도 및 상태를 매일 확인하면서 2~3일 간격으로 1:2~1:3의 비율로 계대 배양 (subculture)하여 세포의 상태를 양호하게 유지하였다.
- [83] 실험을 위하여 상기 배양된 CCD-986SK 세포를 24-웰 플레이트에 웰 당 2 x 10<sup>4</sup> 개씩 넣은 후, 24 시간 동안 배양하였다.
- [84]
- [85] 실험 방법
- [86] 배양 배지를 제거하고 PBS로 세척 한 후에 혈청을 첨가하지 않은 무혈청 배지로 2시간 동안 무영양(starvation) 처리하였다. 그 후 아무것도 처리하지 않는 대조군(control), TGF- $\beta$  20ng/ml을 처리한 양성대조군 및 본 발명의 일 측면에 따른 펩티드의 최종 농도가 50 $\mu$ M이 되도록 10mM의 펩티드를 가하여 처리한 실험군으로 나누어 각 군을 5% CO<sub>2</sub>, 37°C에서 24시간 배양하였다.
- [87] 배양액을 수거하여 콜라겐 양을 ELISA (procollagen type IC-peptide EIA kit) 방법을 이용하여 측정하였다.
- [88] ELISA 방법은 ELISA plate에 배양액을 희석하여 20  $\mu$ l를 넣고 항체-POD 컨쥬게이트 용액 100  $\mu$ l를 함께 넣은 다음 37°C에서 3시간 배양하였다.
- [89] 워싱 버퍼(washing buffer)로 4회 세척 한 후에 발색시약 (TMBZ) 100  $\mu$ l를 넣고 상온에서 15분간 배양한 다음 1N 황산 100  $\mu$ l를 넣었다. 그 후에 450 nm에서 ELISA 리더(reader)로 측정하였다.
- [90]
- [91] 실험 결과 및 분석
- [92] 상기 실험 방법을 통하여 도출된 콜라겐 합성도는 대조군(control)을 100%라 했을 때 그 상대적인 값으로 계산하여 나타내었으며 다음 표 2 와 같다.

[93] [표2]

처리군	콜라겐 합성도 (%)
Control	100
TGF- $\beta$ 20 ng/ml	112.5
CP-54 50 $\mu$ M	112.2
CP-55 50 $\mu$ M	124.8
CP-56 50 $\mu$ M	118.9

[94] 측정 및 계산 결과, 본발명에 따른 신규 활성을 갖는 펩티드 CP-54, CP-55, CP-56 처리시, 대조군에 비하여 10% 이상 콜라겐 합성도가 증가하는 것이 나타났다.

[95] 이를 통하여 신규 활성을 갖는 펩티드 CP-54, CP-55, CP-56이 인간 피부 세포에서 콜라겐 생성을 증대시키는 효과가 있는 것을 알 수 있었다.

[96]

[97] 상기 실험 결과를 통하여, 본 발명의 일 측면에 따른 신규 활성을 갖는 펩티드 및 이를 포함하는 조성물은 콜라겐 합성 효과를 보이는 것을 알 수 있다. 이 효과들은 피부의 주름개선 및 노화방지 효과를 줄 수 있는 것으로, 본 발명의 일 측면에 따른 펩티드 및 이를 포함한 조성물이 피부 상태 개선에서 다양하고 우수한 효과를 가질 수 있음을 알 수 있다.

[98] 본 발명의 일 측면에 따른 신규 활성을 갖는 펩티드가 콜라겐 합성 활성이 있음을 알 수 있으며, 이를 이용하여 주름개선 및 노화방지용 기능성 화장품 조성물 개발이 가능할 것으로 기대된다.

## 청구범위

- [청구항 1] 서열 번호 1 내지 3으로 표시되는 아미노산 서열 중 어느 하나로 구성되는 펩티드, 상기 펩티드 서열의 단편인 펩티드, 상기 펩티드 서열 또는 그의 단편인 펩티드와 80% 이상의 서열 상동성을 갖는 펩티드로 구성된 군으로부터 선택되는 콜라겐 합성 활성을 보이는 펩티드 또는 그의 염.
- [청구항 2] 제 1항에 따른 상기 펩티드를 코딩하는 뉴클레오티드 서열.
- [청구항 3] 제 1항에 따른 펩티드 또는 그의 염을 유효성분으로 포함하는 주름개선 및 노화방지 기능성 조성물.
- [청구항 4] 제 3항에 있어서, 상기 기능성 조성물 내의 상기 펩티드 또는 그의 염의 농도는 20 내지 80  $\mu\text{M}$ 인, 기능성 조성물.
- [청구항 5] 제 3항에 있어서, 상기 펩티드 또는 그의 염의 투여량은 0.001 내지 10 mg/kg인, 기능성 조성물.
- [청구항 6] 제 3항에 있어서, 상기 조성물은 주름개선 및 노화방지용 화장품 조성물인 것을 특징으로 하는 주름개선 및 노화방지 기능성 조성물.
- [청구항 7] 제 6항에 있어서, 상기 화장품 조성물은 스킨, 로션, 크림, 파운데이션, 에센스, 젤, 팩, 폼 클렌징, 비누 및 피부외용 연고로 이루어진 군으로부터 선택된 어느 하나의 제형으로 이루어진 것을 특징으로 하는 주름개선 및 노화방지 기능성 조성물.
- [청구항 8] 제 3항에 있어서, 상기 조성물은 주름개선 및 노화방지용 약학적 조성물인 것을 특징으로 하는 주름개선 및 노화방지 기능성 조성물.
- [청구항 9] 제 3항에 있어서, 상기 조성물은 주름개선 및 노화방지용 건강기능 식품용 조성물인 것을 특징으로 하는 주름개선 및 노화방지 기능성 조성물.

[도1]

## 콜라겐 합성도 (%)

