



(19) 대한민국특허청(KR)

(12) 등록특허공보(B1)

(45) 공고일자 2016년10월04일

(11) 등록번호 10-1662004

(24) 등록일자 2016년09월27일

(51) 국제특허분류(Int. Cl.)
A61K 8/65 (2006.01) A61Q 19/00 (2006.01)
A61Q 19/08 (2006.01)

(21) 출원번호 10-2013-7010552

(22) 출원일자(국제) 2013년09월29일

심사청구일자 2013년07월02일

(85) 번역문제출일자 2013년04월25일

(65) 공개번호 10-2013-0102601

(43) 공개일자 2013년09월17일

(86) 국제출원번호 PCT/EP2011/067028

(87) 국제공개번호 WO 2012/065782

국제공개일자 2012년05월24일

(30) 우선권주장

10 2010 060 564.6 2010년11월15일 독일(DE)

(56) 선행기술조사문헌

KR1020080063711 A

KR1020080008339 A

(73) 특허권자

겔리타 아게

독일 에버배쉬 데-69412 우퍼스트라체 7

(72) 발명자

하우스만스, 스테판

독일, 만하임 68199, 프리드리히 슈트라체 50

기센-비세, 모니카

독일, 웨이스트 64739, 임 텐 샤프헤켄 14

오에서, 스테펜

독일, 글뤽스부르크 24960, 다이히베그 17

(74) 대리인

박경제

전체 청구항 수 : 총 17 항

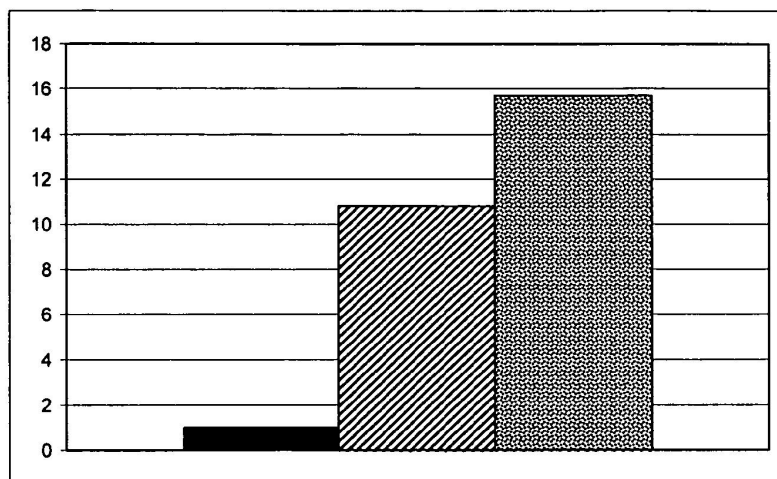
심사관 : 엄금희

(54) 발명의 명칭 인간 피부, 모발 및/또는 손발톱의 건강을 개선하는데 사용된 콜라겐 가수분해물

(57) 요약

본 발명은, 인간 피부, 모발 및/또는 손발톱의 건강을 개선하는데 사용된 콜라겐 가수분해물에 관한 것이다. 상기 콜라겐 가수분해물의 적어도 90 중량%는 3,500 Da 미만의 분자량을 갖고, 상기 콜라겐 가수분해물은 분자량이 600 내지 1,200 Da인 적어도 4개의 특징적인 펩타이드를 갖는다.

대표도 - 도1a



명세서

청구범위

청구항 1

인간 피부, 모발 또는 손발톱의 건강을 개선하는데 사용하기 위한 콜라겐 가수분해물에 있어서,

상기 콜라겐 가수분해물의 90 내지 100 중량%는 0 Da보다 크고 3,500 Da보다 작은 분자량을 갖고, 상기 콜라겐 가수분해물은 분자량이 600 내지 1,200 Da인 4개 이상의 특징적인 펩타이드를 포함하며,

MALDI 질량 분광법에 의해 결정된 분자량 분포에서 4개 이상의 특징적인 펩타이드는 이들의 주변부(surrounding)에 비해 2배 이상의 검출 강도(intensity)를 갖는 것을 특징으로 하되, 상기 분자량 분포는, 0.1% 트리플루오로아세트산 중에 최종 농도 $10\mu\text{g}/\mu\text{l}$ 로 조정되고, μC_{18} -재료를 이용하여 정제되어 MALDI 표적 상 HCCA 기질로 제조된 상기 콜라겐 가수분해물의 시료를 TOF/TOF 질량 분석기로 분석하여 결정되며,

상기 콜라겐 가수분해물은 서로 다른 특이성(specificity)을 갖는 2개의 엔도프로테아제(endoprotease)의 연속 작용으로 제조되는 것으로서, 첫 번째 엔도프로테아제는 *바실러스 서브틸리스*(*Bacillus subtilis*) 또는 *바실러스 아밀로리퀴에파시엔스*(*Bacillus amyloliquefaciens*)의 효소이고, 두 번째 엔도프로테아제는 *바실러스 리케니포르미스*(*Bacillus licheniformis*)의 효소인, 콜라겐 가수분해물.

청구항 2

제 1항에 있어서, 상기 콜라겐 가수분해물의 45 내지 100 중량%는 0 Da보다 크고 1,500 Da보다 작은 분자량을 갖는, 콜라겐 가수분해물.

청구항 3

삭제

청구항 4

제 1항에 있어서, 상기 콜라겐 가수분해물은, 620 내지 690 Da의 펩타이드, 790 내지 860 Da의 펩타이드, 980 내지 1,050 Da의 펩타이드, 및 1,175 내지 1,245 Da의 펩타이드를 포함하는, 콜라겐 가수분해물.

청구항 5

제 1항에 있어서, 상기 콜라겐 가수분해물은, 분자량이 1,500 내지 3,500 Da 범위에 있는 1개 이상의 또 다른 특징적인 펩타이드를 포함하고,

MALDI 질량 분광법에 의해 결정된 분자량 분포에서 1개 이상의 또 다른 특징적인 펩타이드는 이들의 주변부에 비해 2배 이상의 검출 강도를 갖는 것을 특징으로 하되, 상기 분자량 분포는, 0.1% 트리플루오로아세트산 중에 최종 농도 $10\mu\text{g}/\mu\text{l}$ 로 조정되고, μC_{18} -재료를 이용하여 정제되어 MALDI 표적 상 HCCA 기질로 제조된 상기 콜라겐 가수분해물의 시료를 TOF/TOF 질량 분석기로 분석하여 결정되는, 콜라겐 가수분해물.

청구항 6

제 1항에 있어서, 상기 콜라겐 가수분해물은 12 내지 100 중량%의 히드록시프롤린(hydroxyproline) 비율을 갖는, 콜라겐 가수분해물.

청구항 7

제 1항에 있어서, 상기 콜라겐 가수분해물은 젤라틴의 효소 가수분해에 의해 제조되는, 콜라겐 가수분해물.

청구항 8

삭제

청구항 9

삭제

청구항 10

제 1항에 있어서, 상기 콜라겐 가수분해물의 N-말단 아미노산의 50 내지 100%는, 소수성 아미노산인, 콜라겐 가수분해물.

청구항 11

제 1항에 있어서, 피부 세포에 의한 세포외 기질 단백질(extracellular matrix protein)의 생합성을 자극하는데 사용하기 위한, 콜라겐 가수분해물.

청구항 12

제 1항에 있어서, 피부의 탄력성을 증가시키거나 주름 형성을 감소시키는데 사용하기 위한, 콜라겐 가수분해물.

청구항 13

제 1항에 있어서, 피부의 수분 함량을 증가시키는데 사용하기 위한, 콜라겐 가수분해물.

청구항 14

제 1항에 있어서, 피부의 장벽 기능을 개선하는데 사용하기 위한, 콜라겐 가수분해물.

청구항 15

제 1항에 있어서, 상기 콜라겐 가수분해물은 경구 섭취용으로 제공되는, 콜라겐 가수분해물.

청구항 16

제 15항에 있어서, 상기 콜라겐 가수분해물은 영양 보충제인, 콜라겐 가수분해물.

청구항 17

제 15항에 있어서, 상기 콜라겐 가수분해물은 식품에 함유되는, 콜라겐 가수분해물.

청구항 18

제 15항에 있어서, 1.5 내지 5 g의 상기 콜라겐 가수분해물의 1일 섭취량이 제공되는, 콜라겐 가수분해물.

청구항 19

제 1항에 있어서, 상기 콜라겐 가수분해물은 국소 도포를 위해 제공되는, 콜라겐 가수분해물.

청구항 20

제 19항에 있어서, 상기 콜라겐 가수분해물은, 크림, 연고, 로션, 젤 또는 샴푸에 함유되는, 콜라겐 가수분해물.

발명의 설명

기술 분야

[0001] 본 발명은, 인간 피부, 모발 및/또는 손발톱의 건강을 개선하는데 사용하기 위한 콜라겐 가수분해물(collagen hydrolysate)에 관한 것이다.

배경 기술

[0002] 인간의 피부뿐만 아니라 모발 및/또는 손발톱의 건강에 대한 유리한 효과는 콜라겐 가수분해물의 경구 섭취에 의해 이루어질 수 있다는 것이 얼마간 알려져 있다(예를 들어, Vivian Zague: "A new view concerning the

effects of collagen hydrolysate intake on skin properties" in *Arch. Dermatol. Res.* 2008 (9) 479-483 참고). 이러한 맥락에서 피부 건강의 개선은 피부의 천연 특성 및 기능에 대한 모든 긍정적 영향을 의미하는 것으로 간주되며, 이들 특성 및 기능은 노화의 결과 및 추가로 다양한 부정적 환경 영향에 의해 손상될 수 있다. 콜라겐 가수분해물의 섭취는 또한 모발 및/또는 손발톱의 특성에 유리한 효과를 갖는다.

발명의 내용

해결하려는 과제

[0003] 본 발명은 피부, 모발 및/또는 손발톱의 건강에 대한 콜라겐 가수분해물의 긍정적 효과를 더 증가시키고, 이러한 용도를 위해 특히 효과적인 콜라겐 가수분해물을 제안하기 위한 목적을 기초로 한다.

과제의 해결 수단

[0004] 이 목적은, 콜라겐 가수분해물의 적어도 90 중량%는 분자량이 3,500 Da 미만이고, 콜라겐 가수분해물은 분자량이 600 내지 1,200 Da인 적어도 4개의 특징적인 펩타이드를 포함하는 것으로 처음에 언급된 유형의 콜라겐 가수분해물에서 본 발명에 따라 이루어진다.

[0005] 콜라겐 가수분해물은 다른 사슬 길이 또는 분자량을 갖는 펩타이드를 함유하며, 이들은 콜라겐의 단백질 사슬 절단 동안 제조되고, 이들 펩타이드의 분자량 분포는 가수분해물의 제조 조건에 따라 크게 다를 수 있다. 이제, 놀랍게도, 상기 언급된 특성을 갖는 콜라겐 가수분해물이 여러 양상에서 피부 건강에 특히 유리한 효과를 갖는다는 것이, 즉 상당히 더 낮은 비율의 저분자량 펩타이드를 함유하고/함유하거나 특징적인 펩타이드를 함유하지 않는 앞서 사용된 콜라겐 가수분해물에 비해 크게 더 우수한 결과를 보인다는 것으로 나타났다.

[0006] 3,500 Da 미만인 적어도 90 중량%의 한계가 기초로 하는, 콜라겐 가수분해물의 분자량 분포는, 예를 들어, 정의된 콜라겐 단편의 적정 표준을 이용한 겔 투과 크로마토그래피에 의해 매우 정확하고 재현성 있게 결정될 수 있다.

[0007] 바람직하게는, 콜라겐 가수분해물의 적어도 45 중량%의 분자량은 1,500 Da 미만이다, 즉 콜라겐 가수분해물의 일정 비율의 펩타이드는 특히 단쇄이다. 피부 건강에 대한 매우 현저한 효과는, 특히 이러한 저분자량 비율에 의해 달성될 수 있으며, 이는 현재 사용되는 콜라겐 가수분해물에서 상당히 더 적은 양으로만 함유되는 것으로 나타났다.

[0008] 본 발명에 따라 사용되는 콜라겐 가수분해물의 평균 분자량(중량-평균 M_w)은 전형적으로 약 1,700 내지 약 2,300 Da의 범위이다.

[0009] 콜라겐 가수분해물의 특징적인 펩타이드의 존재는 흥미롭게도 그 유효성에 상당히 기여하며, 특히 특징적인 펩타이드가 질량 분광법에서 피크로 나타나는 MALDI 질량 분광법에 의해 결정될 수 있다. MALDI 질량 분광법에 의해 결정되는 분자량 분포에서의 적어도 4개의 특징적인 펩타이드는 바람직하게는 이들의 주변부에 비해 적어도 2배의 검출 강도(intensity), 더욱 바람직하게는 적어도 4배의 검출 강도를 갖는다.

[0010] 본 발명의 바람직한 실시예에서, 콜라겐 가수분해물은 620 내지 690 Da의 펩타이드, 790 내지 860 Da의 펩타이드, 980 내지 1,050 Da의 펩타이드 및 1,175 내지 1,245 Da의 펩타이드를 포함한다. 이들 펩타이드는 본 발명에 기재된 콜라겐 가수분해물을 알려진 콜라겐 가수분해물로부터 특징적인 방식으로 구분한다.

[0011] 콜라겐 가수분해물은 또한 추가로 1,500 내지 3,500 Da의 특징적인 펩타이드를 가질 수 있으며, 이들도 선행 기술에 따른 콜라겐 가수분해물로부터 구분하는 특징이다.

[0012] 콜라겐 가수분해물은 바람직하게는 12 중량% 이상의 히드록시프로린 비율을 갖는다. 프롤린의 후 번역 히드록실화에 의해 형성된 아미노산 히드록시프로린은 배타적으로 콜라겐에서 생성되므로, 콜라겐 가수분해물 중 고비율의 히드록시프로린은 다른 연결 조직 단백질(예를 들어, 엘라스틴 및 프로테오글리칸)의 실질적인 부재의 척도이며, 그 단편도 제조 방법에 따라 콜라겐 가수분해물에 일정량 함유될 수 있다.

[0013] 콜라겐 가수분해물이 젤라틴의 효소 가수분해에 의해 생성되는 것이 바람직하다. 젤라틴은 변성 콜라겐을 포함하고, 연결 조직이나 다양한 유형의 동물의 뼈에서 당업자에게 공지된 다양한 방법에 의해 수득된다. 본 발명의 범위 내에서, 콜라겐 가수분해물을 위한 원료로 사용되는 젤라틴은 바람직하게는 포유류의 피부, 특히 돼지 피부 또는 소 분할부에서 수득되지만, 가금으로부터의 젤라틴 사용을 배제하는 것은 아니다.

- [0014] 일반적으로 젤라틴의 효소 가수분해는 적어도 하나의 엔도프로테아제에 의해 일어나며, 본 발명의 범위 내에서 2개의 서로 다른 엔도프로테아제를 사용하여 그에 따라 생성 콜라겐 가수분해물의 아미노산 프로필에 영향을 주고, 피부, 모발 및/또는 손발톱의 건강 개선 효과를 얻는 것이 바람직하다.
- [0015] 본 발명의 바람직한 실시예에 따르면, 콜라겐 가수분해물은 다른 특이성을 갖는 적어도 2개의 엔도프로테아제, 특히 적어도 2개의 다른 메탈로프로테아제 및/또는 세린 프로테아제, 즉, 매 경우마다 특정 아미노산의 앞 또는 뒤에서 콜라겐 분자의 아미노산 서열을 절단하는 프로테아제의 연속 작용에 의해 생성된다. 메탈로프로테아제 및/또는 세린 프로테아제는 유리하게는 미생물 *바실러스 서브틸리스*(*Bacillus subtilis*), *바실러스 리케니포르미스*(*Bacillus licheniformis*), *바실러스 아밀로리쿠에파시엔스*(*Bacillus amyloliquefaciens*), *아스페르길러스 오리제*(*Aspergillus oryzae*) 및 *아스페르길러스 펠레우스*(*Aspergillus melleus*)의 효소이다.
- [0016] 적합한 엔도프로테아제를 선택함으로써, 콜라겐 가수분해물의 특징적인 분자량 분포가 수득될 수 있을 뿐만 아니라, 가수분해물에 함유되는 펩타이드 말단의 아미노산 유형이 영향을 받는다. 이러한 측면에서, 예를 들어, 콜라겐 가수분해물의 N-말단 아미노산의 적어도 50%가 소수성 아미노산, 특히 알라닌, 류신 및 이소류신인 것이 바람직하다.
- [0017] 본 발명은 특히 피부 세포에 의한 세포의 기질 단백질의 생합성을 자극하기 위한 콜라겐 가수분해물의 용도에 관한 것이다. 피부 세포는 특히 콜라겐(주로 I형), 엘라스틴 및 프로테오글리칸을 합성하는 섬유아세포를 특히 포함한다. 이들 단백질의 적절한 양의 형성은 피부의 세포의 기질의 구축 또는 재생을 위해 결정적이며, 이는 다시 피부의 특성, 예컨대 탄력성 및 탄성과 그 수분 밸런스를 위해 상당히 결정적이다.
- [0018] 피부 세포에는 또한 최외표 피부층의 각질화와 또한 모발 및 손발톱의 형성 두 가지 모두에 관여하는 각질세포가 포함된다. 따라서, 본 발명에 따라 사용된 콜라겐 가수분해물에 의한 이들 세포의 자극은 피부의 장벽 기능 및 모발 및/또는 손발톱의 건강을 개선할 수 있다.
- [0019] 본 발명의 중요한 측면은 피부의 탄력성을 증가시키고/증가시키거나 주름 형성을 감소시키기 위한 콜라겐 가수분해물의 용도에 관한 것이다. 피부의 이러한 특성은 일반적으로 노화의 결과 및 환경적 영향, 예를 들어, UV 선 또는 독성 물질의 결과로 악화된다. 특히, 기질 단백질 콜라겐 및 엘라스틴이 피부의 탄력성 및 탄성에 관여하므로, 본 발명에 따라 사용되는 콜라겐 가수분해물에 의해 특정한 정도로 자극되는 이들의 증강된 합성이 그러한 효과를 상쇄할 수 있고 피부 건강이 크게 개선될 수 있다.
- [0020] 본 발명의 더 중요한 측면은 피부의 수분 함량을 증가시키기 위한 콜라겐 가수분해물의 용도에 관한 것이다. 세포의 기질에 함유된 프로테오글리칸(예를 들어, 베르시칸, 바이글리칸 및 데코린)에 의해 적절한 양의 수분에 결합하는 피부의 능력에 대한 상당한 기여가 이뤄지며, 그 합성도 본 발명에 따라 사용되는 콜라겐 가수분해물에 의해 자극되는 것으로 나타난다. 피부의 수분 함량도 해로운 환경 영향, 예컨대 UV 선에 의해 감소될 수 있으며, 수분 손실에는 종종 피부 거칠음, 갈라짐 및 과도한 각질화가 동반된다.
- [0021] 본 발명의 추가 측면은 피부의 장벽 기능을 개선하기 위한 콜라겐 가수분해물의 용도에 관한 것이다. 이러한 장벽 기능에서의 실질적 역할은 소위 CE-단백질("각질화된 외피" 단백질), 특히 인볼루크린, 로리크린 및 필라그린이 수행하며, 그 생합성은 저분자량 콜라겐 가수분해물에 의해 자극되는 것으로 나타난다. 따라서 콜라겐 가수분해물의 본 발명에 따른 사용으로 인해 수분 손실의 감소, 병원체성 세균 및 독성 물질에 대한 피부의 장벽 기능 및 천연 보호가 개선된다.
- [0022] 콜라겐 가수분해물의 본 발명에 따른 사용은 또한 피부 영역에서 항산화 효과를 일으켜서, 예를 들어, UV 선 또는 돌연변이성 물질로 인한 DNA 손상(돌연변이) 빈도가 감소될 수 있다. 이러한 돌연변이는 세포의 미성숙 노화의 한 원인이며, 따라서 피부의 노화 증상(탄력성 감소, 주름 형성 등)을 촉진하므로, 이 절차가 본 발명에 따른 사용에 의해 저해될 수 있다.
- [0023] 본 발명의 바람직한 실시예에 따르면, 콜라겐 가수분해물은 경구 섭취용으로 제공된다. 경구 섭취의 경우, 국소 도포하는 경우에 비해 콜라겐 가수분해물의 보다 효과적인 수송이 종종 효과적인 부위, 즉 특히 피부 세포로의 혈액 순환에 의해 얻어진다. 또한, 이러한 형태의 적용은 일반적으로 사용자를 위해 실질적으로 더 적은 수고에 연관된다.
- [0024] 콜라겐 가수분해물은 바람직하게는 영양 보충제로 사용된다. 콜라겐 가수분해물은 일반적으로 본원에서 일반 건강 제공이나 다르게는 미용 용도의 관점에서 피부 건강을 개선하기 위해 사용된다; 이러한 영양 보충제는 "영양제" 또는 "영양미용제"로 불릴 수 있다. 그러나, 임상적 장애, 예를 들어, 환자에게 더 큰 정도의 건조하고 갈

라진 피부 경향성을 갖는 아토피성 피부염이 있는 경우, 이를 치료하기 위한 콜라겐 가수분해물의 사용도 본 발명의 범위에서 가능하다.

[0025] 영양 보충제는 임의 형태로, 예를 들어, 정제, 캡슐, 당의정, 향정 또는 다르게는 용액(예를 들어, 개별 앰플 중이나 음료 중)의 형태로 제공될 수 있다.

[0026] 콜라겐 가수분해물은 또한 대안적으로 식품 또는 고급 식품, 예를 들어, 과자류 또는 음료를 제공하기 위한 인스턴트 분말 중에 함유될 수 있다. 따라서, 가수분해물은 정상 영양(소위 "기능성 식품") 과정에서 추가 노력 없이 사용자가 섭취할 수 있다. 이러한 맥락에서, 콜라겐 가수분해물이 맛에 있어서 실질적으로 중성인 것이 특히 유리하다.

[0027] 약 1.5 내지 5 g, 바람직하게는 약 2 내지 3 g, 더욱 바람직하게는 약 2.3 내지 2.7 g의 콜라겐 가수분해물의 1 일 섭취량이 제공되는 것이 바람직하다. 이러한 양의 가수분해물의 경구 섭취에 의해 피부 건강이 개선될 수 있다.

[0028] 본 발명의 더욱 바람직한 실시예는 콜라겐 가수분해물의 국소 도포, 즉, 피부, 모발 및/또는 손발톱에 적용하기 위한 미용 제품 형태의 적용에 관한 것이다. 이 경우, 콜라겐 가수분해물은 특히 크림, 연고, 로션 또는 젤에 함유될 수 있다. 또한, 콜라겐 가수분해물이 바디 케어 제품, 예컨대 샤워 젤 또는 모발 샴푸에 예를 들어, 약 5 내지 10 중량%의 양으로 첨가되는 것이 바람직하다.

[0029] 본 발명의 상기 및 추가 이점은 상세하게는 아래와 같은 도면을 참조로 하기 예의 보조와 함께 더 상세히 기재될 것이다:

발명의 효과

[0030] 본 발명은, 인간 피부, 모발 및/또는 손발톱의 건강을 개선하는데 사용하기 위한 콜라겐 가수분해물을 제공하는 효과를 갖는다.

도면의 간단한 설명

[0031] 도 1a 내지 1c: I형 콜라겐, 바이글리칸 또는 베르시칸의 합성 자극에 관한 그래프를 나타내는 도면.

도 2a 및 2b: 무모 마우스에서 피부 수분의 증가에 관한 그래프를 나타내는 도면.

도 3: CE-단백질의 합성 자극에 관한 그래프를 나타내는 도면.

도 4a 내지 4c: 다양한 콜라겐 가수분해물에 관한 MALDI 질량 분광법을 나타내는 도면.

도 5a 및 5b: I형 콜라겐, 테코린 및 베르시칸의 합성 자극에 관한 그래프를 나타내는 도면.

발명을 실시하기 위한 구체적인 내용

[0032] 예

[0033] 1. 콜라겐 가수분해물의 제조 및 특성

[0034] 본 발명에 따른 콜라겐 가수분해물을 제조하기 위해, 20 내지 40 중량%(건조 물질) 농도의 돼지 피부 젤라틴 수용액(A형, 200 내지 250 g Bloom)을 원료로 사용하였다. 50 내지 60℃에서 120 내지 180분 동안 미생물 기원의 서로 다른 2개의 엔도프로테아제의 연속 작용에 의해 젤라틴을 효소 가수분해하였으며, *바실러스 서브틸리스* 또는 *바실러스 아밀로리쿠에파시엔스*의 엔도프로테아제를 첫 번째 효소로 사용하고 *바실러스 리케니포르미스*의 엔도프로테아제를 두 번째 효소로 사용하였다. 이어서, 효소를 열적으로 비활성화하고 용액을 분무 건조하였다.

[0035] 생성 콜라겐 가수분해물의 분자량 분포는 하기 파라미터를 이용하여 겔 투과 크로마토그래피에 의해 결정할 수 있다:

[0036] 정지상: TSK 2000 SW XL (Tosoh Bioscience GmbH)

[0037] 이동상: 0.4 mol/l 이수소 인산나트륨 pH 5.3

[0038] 유속: 0.5 ml/분

[0039] 적정 표준: 정의된 콜라겐 I형 단편 (FILK, Freiberg)

[0040] 검출: UV-검출기 Knauer K-2501, 214 nm

[0041] 표 1에 따라 본 발명에 따른 콜라겐 가수분해물(아래에서 저분자량 가수분해물로 불림)의 분자량 분포가 결정되었다. 대조를 위해, 동일한 방법으로 결정된 시판 콜라겐 가수분해물의 분자량 분포도 표 1에 나타낸다(아래에서 고분자량 가수분해물로 불림):

표 1

MV-범위	저분자량 가수분해물	고분자량 가수분해물
> 7,500 Da	< 5 중량%	< 10 중량%
3,500 - 7,500 Da	약 12 - 18 중량%	약 25 - 35 중량%
1,500 - 3,500 Da	약 25 - 31 중량%	약 29 - 35 중량%
500 - 1,500 Da	약 40 - 46 중량%	약 24 - 30 중량%
< 500 Da	약 5 - 10 중량%	약 2 - 5 중량%

[0043] 상기 저분자량 가수분해물의 히드록시프롤린 함량은 약 12 내지 13 중량%이며, 클로라민-T로의 산화 및 p-디메틸아미노벤즈알데하이드로의 변환 후 광학측정으로 결정할 수 있다. 가수분해물의 N-말단 아미노산의 50% 초과가 소수성 아미노산, 특히 알라닌, 류신 및 이소류신이다.

[0044] 2. 세포외 기질 단백질의 합성 자극

[0045] 콜라겐(I형) 및 프로테오글리칸 바이글리칸 및 베르시칸의 합성 자극을 인간 진피 섬유아세포(피부 세포)에서 시험관 내 조사하였다. 상기 목적을 위해, 매 경우마다 세포를 0.5 mg/ml의 저분자량 또는 고분자량 가수분해물과 함께 24시간 동안 배양한 후 콜라겐-RNA, 바이글리칸-RNA 및 베르시칸-RNA의 발현을 실시간 PCR로 결정하고 반정량적으로 평가하였다 (가수분해물이 없는 대조군을 기준으로).

[0046] 결과를 I형 콜라겐에 대해서는 도 1a에, 바이글리칸에 대해서는 도 1b에 그리고 베르시칸에 대해서는 도 1c에 막대 차트로 나타내며, 각 경우 그래프는 적어도 18회 측정의 평균값을 나타낸다. 대조군(=1) 대비 RNA 발현을 가로축에 도시한다. 왼쪽으로 채워진 막대는 매 경우 대조군을 나타내며, 가운데 선영이 있는 막대는 고분자량 가수분해물을(대조를 위해) 나타내고, 오른쪽으로 점선으로 표시된 막대는 저분자량 가수분해물(본 발명에 따른 제품)을 나타낸다.

[0047] 모두 세 개의 기질 단백질의 합성이 두 콜라겐 가수분해물에 의해 자극되며, 매 경우 저분자량 가수분해물의 긍정적 효과가 고분자량 가수분해물에 비해 더 현저한 것으로 나타났다. 엘라스틴 이외에 피부의 탄력성 및 탄성에 주로 관여하는 콜라겐의 경우, 그리고 피부의 수분 밸런스에 중요한 역할을 담당하는 베르시칸의 경우, 저분자량 가수분해물의 증가된 효과가 특히 뚜렷하다.

[0048] 3. 피부의 수분 함량 증가

[0049] 콜라겐 가수분해물에 의한 피부 수분에의 영향을 무모 마우스에서 직접 조사하였다. 무모 마우스는 피부학적 조사에 종종 이용되는 구축된 모델 시스템으로, 이들로부터 얻은 지식이 원칙적으로 인간 피부로 전달될 수 있다 (예를 들어, T. Fujimura 등; *J. Dermatol. Sci.* 2000 (24) 105-11 및 Y. Nishimori 등; *J. Invest. Dermatol* 2001 (117) 1458-1463 참고).

[0050] 동물에 체중 1kg당 150 μ g의 콜라겐 가수분해물을, 그리고 대조군에는 대신 BSA를 3주 기간 동안 매일 먹였다. 동시에 모든 동물에 주별 18 mJ/피부 표면적 1cm²의 UV-B 방사선량을 쏘여 피부 수분을 손상시켰다.

[0051] 피부의 수분 함량은 1주 후와 3주 후에 Corneometer CM 825(제조사: Courage & Khazaka)를 이용하여 측정하였다. 본 출원에서 측정 원리는 대부분의 다른 재료의 유전 상수와 크게 다른 상부 피부층에 결합된 물의 유전 상수에 의해 측정 커패시터의 커패시턴스 변화에 근거한다.

[0052] 1주 후 측정에 대해서는 도 2a에 그리고 3주 후 측정은 도 2b에 결과를 막대 그래프로 나타내며, 매 경우 그래프는 7회 측정의 평균값 및 표준 오차를 나타낸다. 대조군(=1) 대비 피부 수분을 가로축에 도시한다. 왼쪽으로 채워진 막대는 매 경우 대조군을 나타내며, 가운데 선영이 있는 막대는 고분자량 가수분해물을(대조를 위해) 나

타내고, 오른쪽으로 점선으로 표시된 막대는 저분자량 가수분해물(본 발명에 따른 제품)을 나타낸다.

[0053] 1주 후와 3주 후 모두에서 저분자량 가수분해물로 인한 피부 수분 증가는 매 경우 고분자량 가수분해물로 인한 것보다 더 크게 나타났다. 이는 피부 건강 개선에서 본 발명에 따라 사용되는 특정 가수분해물의 유효성에 대한 추가 증거이다.

[0054] 4. CE-단백질 합성의 자극

[0055] 소위 "각질화 외피" 단백질은 병원체성 세균 및 독성 물질의 침투에 대한 피부의 장벽 기능에 중요한 역할을 담당한다. CE-단백질 인볼루크린, 로리크린 및 필라그린의 합성을 체중 1kg당 150 μ g의 콜라겐 가수분해물을 5주 동안 매일 미리 먹인(전술한 바와 같이) 무모 마우스에서 결정하였다. 대조군(BSA 먹임) 대비 단백질의 정량은 피부에서 단백질 추출 후 SDS 폴리아크릴아미드 겔 전기영동 및 특정 항체를 이용한 웨스턴 블롯에 의해 수행하였다.

[0056] 결과를 도 3에 막대 그래프로 나타내며, 매 경우 그래프는 7회 측정의 평균값 및 표준 오차를 나타낸다. 대조군(=1) 대비 저분자량 가수분해물을 먹인 뒤 CE-단백질의 함량을 가로축에 도시한다. 왼쪽 막대는 인볼루크린을 나타내며, 가운데 막대는 로리크린을, 그리고 오른쪽 막대는 필라그린을 나타낸다.

[0057] 조사한 전체 3 CE-단백질의 합성은 본 발명에 따라 사용되는 콜라겐 가수분해물의 경구 섭취에 의해 자극되며, 인볼루크린의 경우는 3배를 초과하는 정도로 자극되는 것으로 나타났다.

[0058] 5. 콜라겐 가수분해물의 항산화 효과

[0059] 저분자량 콜라겐 가수분해물의 항산화 효과를 말론디알데히드 분석에 의해 무세포계에서 결정하였다.

[0060] 본원에서 반응성 산소종의 형성은 콜라겐 가수분해물에 의해 평균 약 7% 감소하는 것으로 나타났다. 따라서 DNA 손상 빈도도 피부 영역에서 감소될 수 있어서 노화 증상이 본 발명에 따른 사용에 의해 상쇄될 수 있다.

[0061] 6. MALDI-MS에 의한 분자량 분포의 분석

[0062] 예 1에 따라 제조된 평균 분자량이 약 2,000 Da의 본 발명에 따른 저분자량 콜라겐 가수분해물(아래의 가수분해물 A)을 평균 분자량이 약 2,100 Da(아래의 가수분해물 B) 및 약 2,900 Da(아래의 가수분해물 C)인 두 시판 콜라겐 가수분해물과 비교하였다.

[0063] 이들 세 가수분해물의 정확한 분자량 분포를 MALDI 질량 분광법(MALDI-MS)에 의해 분석하였다. 상기 목적을 위해 시료를 0.1% 트리플루오로아세트산 중에 최종 농도 10 μ g/ μ l로 조정된 뒤 μ C₁₈-재료를 이용하여 정제하였다. 시료를 MALDI 표적 상 HCCA 기질로 제조하고, Ultraflex-III-TOF/TOF 질량 분석기(제조사: Bruker Daltonics)를 이용하여 질량 분광법을 결정하였다.

[0064] 도 4a 내지 4c는 콜라겐 가수분해물 A, B 또는 C의 해당하는 질량 분광법 또는 분자량 분포를 나타내며, 분자량 또는 질량수는 세로축에 도시하고 검출 강도는 가로축에 도시하였다. 세 스펙트럼의 대조에서 본 발명에 따른 가수분해물 A가 표 2에 따른 하기 특징적 펩타이드를 포함하며, 대응하는 피크는 이들의 주변부에 비해 2 내지 4배의 검출 강도를 갖는 것으로 나타났다:

표 2

[0065]	약 656 Da
	약 825 Da
	약 1,014 Da
	약 1,211 Da
	약 1,927 Da
	약 2,410 Da
	약 3,433 Da

[0066] 특히, 600 내지 1,500 Da의 4개의 펩타이드는 두 시판 가수분해물 B 및 C에 대응물이 없으므로 특히 가수분해물 A에 특징적이다.

[0067] 7. 세포외 기질 단백질의 합성 자극

[0068] 콜라겐(I형) 및 프로테오글리칸 테코린 및 베르시칸의 합성 자극을 인간 진피 섬유아세포(피부 세포)에서 시험관 내 조사하였다. 이를 위해, 매 경우 세포를 0.5 mg/ml의 가수분해물 A, B 또는 C와 함께 24시간 동안 배양 후 콜라겐-RNA, 테코린-RNA 및 베르시칸-RNA의 발현을 실시간 PCR로 결정하고 반정량적으로 평가하였다. 테코린은 피부 콜라겐 섬유의 형성에 중요한 역할을 담당한다.

[0069] 결과를 가수분해물 B에 대해서는 도 5a에, 가수분해물 C에 대해서는 도 5b에 막대 그래프로 나타내며, 본 발명에 따른 가수분해물 A의 RNA 발현(=1) 대비 시판 가수분해물 B 또는 C의 경우 RNA 발현을 가로축에 도시한다. 왼쪽 막대는 매 경우 I형 콜라겐을 나타내며, 가운데 막대는 테코린, 그리고 오른쪽 막대는 베르시칸을 나타낸다. 매 경우 적어도 7회 측정의 평균값뿐만 아니라 표준 오차를 나타낸다.

[0070] 흥미롭게도 데이터는 두 가수분해물 B 및 C로 인해서 평균 분자량이 약간 더 높은 가수분해물 A와는 대비되게 전체 3개의 기질 단백질에서 상당히 더 적은 RNA 합성 자극이 일어나는 것으로 나타났다. 따라서 가수분해물 A의 특징적 펩타이드는 그 유리한 역할에 결정적 역할을 수행하는 것으로 나타났다.

[0071] 8. 식품(보충) 제품 및 미용제에 대한 예시적 제형

[0072] 본 발명에 따른 콜라겐 가수분해물의 사용을 위한 일부 예시적 제형을 아래에 나타내며, 이는 자명하게 다양한 방식으로 개질될 수 있다:

[0073] 캡셋(영양 보충제)

[0074]	글리세린	53.67 중량%
[0075]	콜라겐 가수분해물	21.95 중량%
[0076]	젤라틴	10.08 중량%
[0077]	구아 고무	6.00 중량%
[0078]	레시틴	5.00 중량%
[0079]	시트르산	2.00 중량%
[0080]	풍미제(카시스)	0.50 중량%
[0081]	오렌지 오일	0.50 중량%
[0082]	아세실팜 K	0.30 중량%

[0083] 초콜릿

[0084]	코코아 페이스트	51.0 중량%
[0085]	수크로오스	22.4 중량%
[0086]	코코아 버터	16.6 중량%
[0087]	콜라겐 가수분해물	10.0 중량%

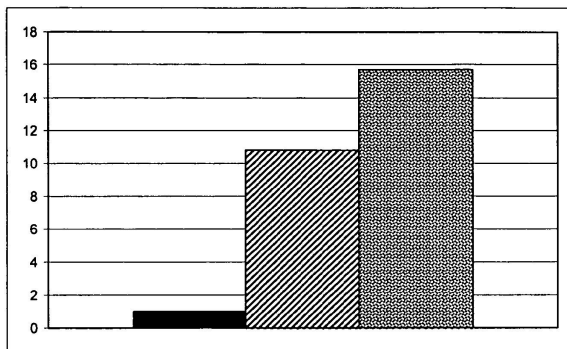
[0088] 음료

[0089]	물	63.00 중량%
--------	---	-----------

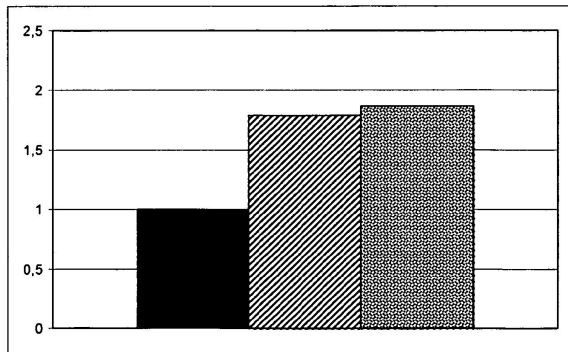
[0090]	알로에 베라 농축액	31.00 중량%
[0091]	콜라겐 가수분해물	4.00 중량%
[0092]	수크로오스	1.50 중량%
[0093]	시트르산	0.26 중량%
[0094]	풍미제 및 착색제	0.24 중량%
[0095]	수크랄로오스	0.0031 중량%
[0096]	<u>모발 샴푸</u>	
[0097]	물	58.8 중량%
[0098]	나트륨 라우레트-11 카르복실레이트	18.0 중량%
[0099]	코코 아미도 프로필 베타인	9.0 중량%
[0100]	콜라겐 가수분해물	6.0 중량%
[0101]	PEG-6 카프릴/카프르 글리세라이드	3.0 중량%
[0102]	PEG-150 디스테아레이트	2.5 중량%
[0103]	라우레트-7	2.0 중량%
[0104]	칼륨 소르베이트	0.5 중량%
[0105]	향료	0.2 중량%

도면

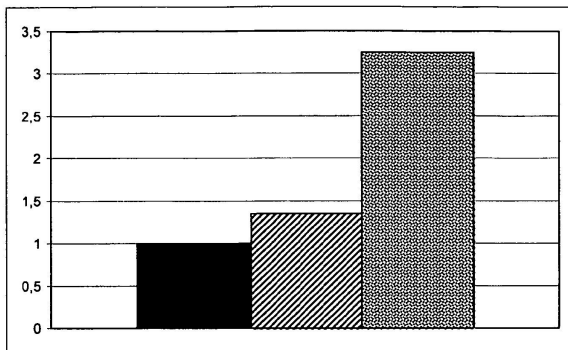
도면1a



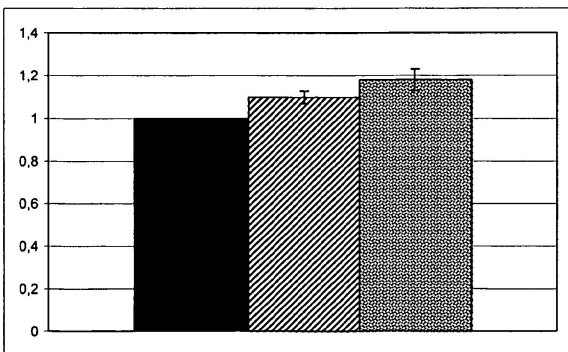
도면1b



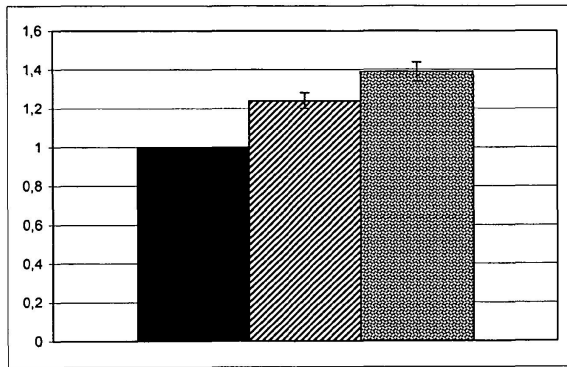
도면1c



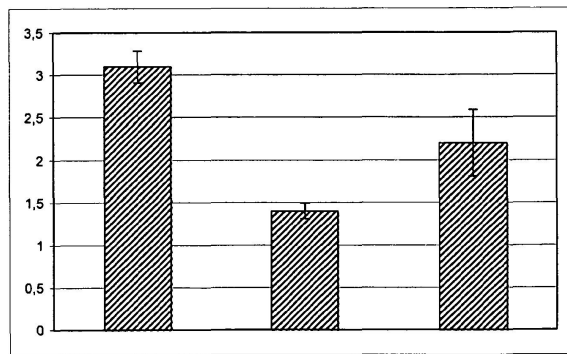
도면2a



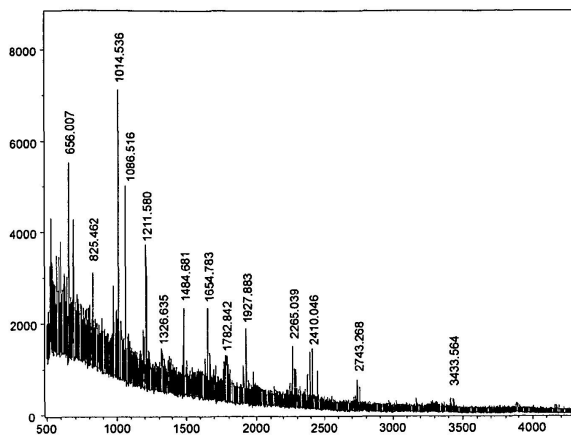
도면2b



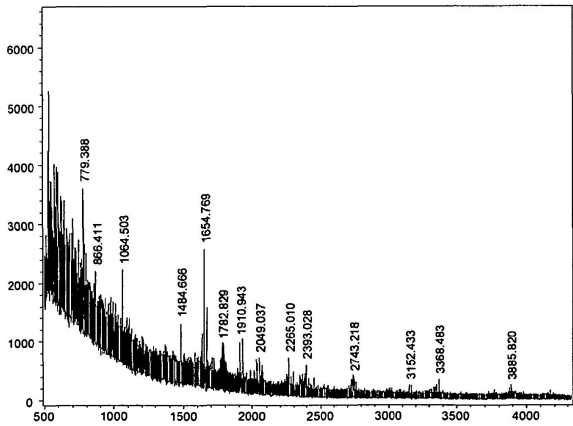
도면3



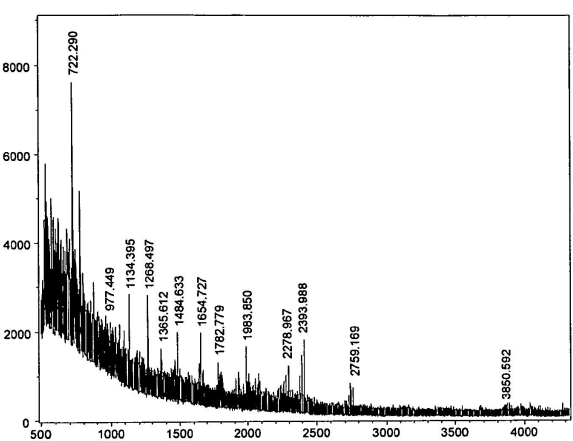
도면4a



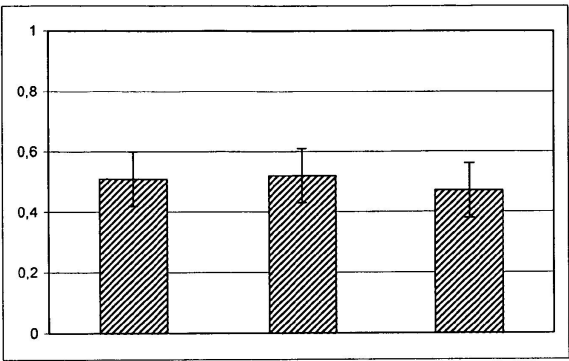
도면4b



도면4c



도면5a



도면5b

