



(19) 대한민국특허청(KR)
(12) 공개특허공보(A)

(11) 공개번호 10-2021-0022405
(43) 공개일자 2021년03월03일

(51) 국제특허분류(Int. Cl.)
C07K 7/06 (2006.01) A61K 38/00 (2006.01)
A61K 8/64 (2006.01) A61P 17/00 (2006.01)
A61P 29/00 (2006.01) A61Q 19/00 (2006.01)
(52) CPC특허분류
C07K 7/06 (2013.01)
A61K 38/00 (2013.01)
(21) 출원번호 10-2019-0101877
(22) 출원일자 2019년08월20일
심사청구일자 2019년08월20일

(71) 출원인
(주)케어젠
경기도 안양시 동안구 엘에스로91번길 46-38
(72) 발명자
정용지
경기도 군포시 엘에스로91번길 77 (금정동)
김은미
경기도 용인시 수지구 성북1로 157 ,105동1103호(성북동,버들치마을경남아너스빌1차)
(뒷면에 계속)
(74) 대리인
리엔목특허법인

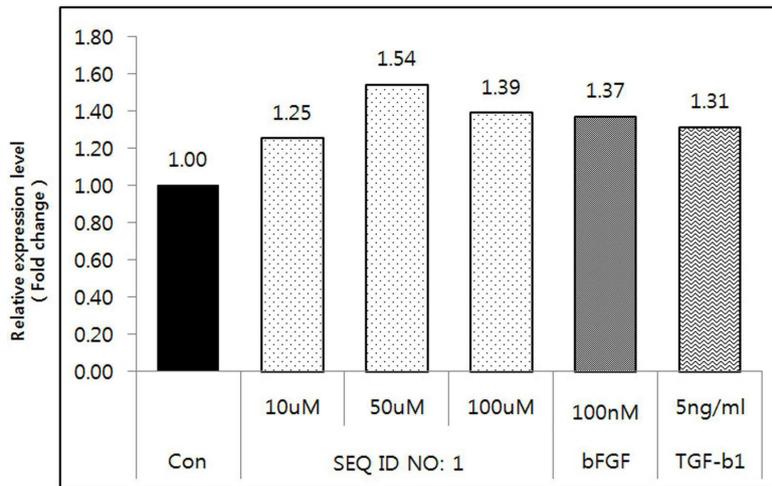
전체 청구항 수 : 총 9 항

(54) 발명의 명칭 피부 상태 개선 활성을 갖는 펩타이드 및 이의 용도

(57) 요약

본 출원은 피부 상태 개선 활성을 갖는 펩타이드 및 이의 용도에 관한 것으로서, 서열번호 1의 아미노산 서열로 이루어진 펩타이드, 상기 펩타이드를 포함하는 피부 상태 개선용 화장품 조성물 및 상기 펩타이드를 포함하는 염증성 피부 질환 예방 또는 치료용 약제학적 조성물을 제공한다.

대표도 - 도1



(52) CPC특허분류

A61K 8/64 (2013.01)
A61P 17/00 (2018.01)
A61P 29/00 (2018.01)
A61Q 19/00 (2013.01)

(72) 발명자

이용지

경기도 안양시 만안구 안양천서로 177 ,210동80
5호(안양동, 래미안안양메가트리아)

강한아

경기도 안양시 동안구 관평로212번길 21, 313동
1502호 (관양동, 공작아파트)

명세서

청구범위

청구항 1

서열번호 1의 아미노산 서열로 이루어진, 펩타이드.

청구항 2

청구항 1에 있어서, 상기 펩타이드의 N-말단은 아세틸기(acetyl group), 플루오레닐메톡시카르보닐기(fluorenylmethoxycarbonyl group), 포르밀기(formyl group), 팔미토일기(palmitoyl group), 미리스틸기(myristyl group), 스테아릴기(stearyl group), 부톡시카르보닐기(butoxycarbonyl group), 알릴옥시카르보닐기(allyloxycarbonyl group) 및 폴리에틸렌글리콜(polyethylene glycol; PEG)로 이루어진 군으로부터 선택되는 어느 하나의 보호기와 결합된 것인, 펩타이드.

청구항 3

청구항 1에 있어서, 상기 펩타이드의 C-말단은 아미노기(amino group, $-NH_2$), 삼차 알킬기(tertiary alkyl group) 및 아자이드(azide, $-NHNH_2$)로 이루어진 군으로부터 선택되는 어느 하나의 보호기와 결합된 것인, 펩타이드.

청구항 4

청구항 1에 있어서, 상기 펩타이드는 하기와 같은 특성으로부터 선택되는 어느 하나 이상을 나타내는 것인, 펩타이드:

- (a) 섬유아세포 및 각질형성세포의 사멸 억제;
- (b) 콜라겐의 합성 촉진;
- (c) 매트릭스 메탈로프로테아제의 발현 억제;
- (d) 섬유아세포 및 각질형성세포의 활성 회복; 및
- (e) 염증성 사이토카인의 발현 억제.

청구항 5

청구항 1 내지 4 중 어느 한 항의 펩타이드를 유효성분으로 포함하는 피부 상태 개선용 화장품 조성물.

청구항 6

청구항 5에 있어서, 상기 피부 상태 개선은 주름 개선, 피부 탄력 개선, 상처 재생, 피부 노화 억제, 또는 염증성 피부 질환의 완화인 것인, 화장품 조성물.

청구항 7

청구항 6에 있어서, 상기 피부 노화는 자외선에 의한 피부 노화인 것인, 화장품 조성물.

청구항 8

청구항 1 내지 4 중 어느 한 항의 펩타이드를 유효성분으로 포함하는, 염증성 피부 질환 예방 또는 치료용 약제학적 조성물.

청구항 9

청구항 8에 있어서, 상기 염증성 피부 질환은 여드름, 아토피성 피부염, 건선, 지루성 피부염, 접촉성 피부염, 홍반성 루프스 또는 구진상 두드러기인 것인, 약제학적 조성물.

발명의 설명

기술 분야

[0001] 본 출원은 피부 상태 개선 활성을 갖는 펩타이드 및 이의 용도에 관한 것이다.

배경 기술

[0002] 인간의 피부는 끊임없이 변화를 겪게 되며, 그 중 가장 대표적인 것이 노화에 의한 피부의 기능 저하 및 시각적인 아름다움의 감소이다. 노화는 피부의 주름을 형성시키며, 대표적인 주름 형성의 인자로서 자외선 노출 및 콜라겐의 생합성 감소 등을 들 수 있다. 피부의 노화는 크게 유전적 요소에 따른 내인성 노화와 태양 광선 등의 외부 환경적 요소에 따른 외인성 노화로 구분된다. 이 중에서도 외인성 노화의 경우 활성산소 제거, 섬유아세포의 증식 및 콜라겐의 생합성 촉진 등을 통하여 노화를 예방, 치료 또는 지연시킬 수 있는 것으로 알려져 있다.

[0003] 한편, 세포의 기질(extracellular matrix)의 주요 구성 성분인 콜라겐은 피부의 섬유아세포에서 생성되는 주요 기질 단백질이다. 콜라겐은 피부, 건(tendon), 뼈 및 치아의 유기물질의 대부분을 형성하는데, 특히, 뼈와 피부(진피)에 그 포함량이 높다. 이러한 콜라겐은 연령 및 자외선 조사에 의한 광노화에 의해 감소되며, 이는 피부의 주름 형성과 밀접한 연관이 있다고 알려져 있다. 또한, 콜라겐은 상처치유에 있어서 중요한 역할을 담당하며, 손상된 상피에서 콜라겐의 합성을 촉진시켜서 상처를 신속하고 흉터 없이 회복시킬 수 있다. 아울러, 콜라겐의 생합성이 촉진됨에 따라 기저층 등의 치밀도가 높아지게 되면 단위 피부 밀도당 멜라닌 색소 농도가 낮아지게 되어, 피부톤이 밝아지는 효과를 기대할 수 있음이 보고된 바 있다.

[0004] 이러한 기술적 배경 하에서, 콜라겐의 생합성 촉진, 섬유아세포 등의 증식 및 활성 증진과 같은 기작을 통하여 피부 상태를 개선하기 위한 다각적인 연구가 진행되고 있으나(한국 등록특허 제10-1043081호), 아직은 미비한 실정이다.

발명의 내용

해결하려는 과제

[0005] 일 양상은 서열번호 1의 아미노산 서열로 이루어진 펩타이드를 제공하는 것이다.

[0006] 다른 양상은 서열번호 1의 아미노산 서열로 이루어진 펩타이드를 유효성분으로 포함하는 피부 상태 개선용 화장료 조성물을 제공하는 것이다.

[0007] 또 다른 양상은 서열번호 1의 아미노산 서열로 이루어진 펩타이드를 유효성분으로 포함하는 염증성 피부 질환 예방 또는 치료용 약제학적 조성물을 제공하는 것이다.

[0008] 본 출원의 다른 목적 및 이점은 첨부한 청구범위 및 도면과 함께 하기의 상세한 설명에 의해 보다 명확해질 것이다. 본 명세서에 기재되지 않은 내용은 본 출원의 기술 분야 또는 유사한 기술 분야 내 숙련된 자이면 충분히 인식하고 유추할 수 있는 것이므로 그 설명을 생략한다.

과제의 해결 수단

[0009] 본 출원에서 개시된 각각의 설명 및 실시형태는 각각의 다른 설명 및 실시 형태에도 적용될 수 있다. 즉, 본 출원에서 개시된 다양한 요소들의 모든 조합이 본 출원의 범주에 속한다. 또한, 하기 기술된 구체적인 서술에 의하여 본 출원의 범주가 제한된다고 볼 수 없다.

[0010] 일 양상은 서열번호 1의 아미노산 서열로 이루어진 펩타이드를 제공한다.

[0011] 본 명세서에서 사용되는 용어, "펩타이드"는 펩타이드 결합에 의해 아미노산 잔기들이 서로 결합되어 형성된 선형의 분자를 의미할 수 있다. 상기 펩타이드는 당업계에 공지된 화학적 합성 방법, 특히 고상 합성 기술(solid-phase synthesis techniques; Merrifield, J. Amer. Chem. Soc. 85:2149-54(1963); Stewart, et al., Solid Phase Peptide Synthesis, 2nd. ed., Pierce Chem. Co.: Rockford, 111(1984)) 또는 액상 합성 기술(US 등록특허 제5,516,891호)에 따라 제조될 수 있다. 본 발명자들은 생물학적으로 유효한 활성을 갖는 펩타이드를 개발하고자 예의 노력한 결과, 서열번호 1의 아미노산 서열로 이루어진 펩타이드를 규명하였다. 여기서, 상기 생물학적으로 유효한 활성은 (a) 섬유아세포 및 각질형성세포의 사멸 억제; (b) 콜라겐의 합성 촉진; (c) 매트릭스 메탈로프로테아제의 발현 억제; (d) 섬유아세포 및 각질형성세포의 활성 회복; 및 (e) 염증성 사이토카인의 발

현 억제와 같은 특성으로부터 선택되는 어느 하나 이상을 나타내는 것일 수 있다. 따라서, 상기 펩타이드는 피부 상태 개선을 위한 용도, 염증성 피부 질환의 예방 또는 치료를 위한 용도로 활용될 수 있다.

- [0012] 상기 펩타이드는 화학적 안정성, 강화된 약리 특성(반감기, 흡수성, 역가, 효능 등), 변경된 특이성(예를 들어, 광범위한 생물학적 활성 스펙트럼), 감소된 항원성을 획득하기 위하여, 펩타이드의 N- 또는 C-말단에 보호기가 결합되어 있을 수 있다. 일 구체예에 있어서, 상기 펩타이드의 N-말단은 아세틸기(acetyl group), 플루오레닐메톡시카르보닐기(fluorenylmethoxycarbonyl group), 포르밀기(formyl group), 팔미토일기(palmitoyl group), 미리스틸기(myristyl group), 스테아릴기(stearyl group), 부톡시카르보닐기(butoxycarbonyl group), 아릴옥시카르보닐기(allyloxycarbonyl group) 및 폴리에틸렌글리콜(polyethylene glycol; PEG)로 이루어진 군으로부터 선택되는 어느 하나의 보호기와 결합될 수 있고; 및/또는 상기 펩타이드의 C-말단은 아미노기(amino group, $-NH_2$), 삼차 알킬기(tertiary alkyl group) 및 아자이드(azide, $-NHNH_2$)로 이루어진 군으로부터 선택되는 어느 하나의 보호기와 결합될 수 있다. 또한, 상기 펩타이드는 선택적으로, 표적화 서열, 태그(tag), 표지된 잔기, 반감기 또는 펩타이드 안정성을 증가시키기 위한 특정 목적으로 제조된 아미노산 서열도 추가적으로 포함할 수 있다.
- [0013] 본 명세서에서 사용되는 용어, "안정성"은 생체 내 단백질 절단효소의 공격으로부터 상기 펩타이드를 보호하는 인 비보 안정성뿐만 아니라, 저장 안정성(예컨대, 상온 저장 안정성)도 의미할 수 있다.
- [0014] 다른 양상은 서열번호 1의 아미노산 서열로 이루어진 펩타이드를 유효성분으로 포함하는 피부 상태 개선용 화장품 조성물을 제공한다.
- [0015] 상기 펩타이드에 대한 설명에서 언급된 용어 또는 요소 중 이미 언급된 것과 동일한 것은 상술한 바와 같다.
- [0016] 본 명세서에서 사용되는 용어, "개선"은 상태의 완화 또는 치료와 관련된 파라미터, 예를 들면 증상의 정도를 적어도 감소시키는 모든 행위를 의미할 수 있다.
- [0017] 본 명세서에서 사용되는 용어, "피부 상태 개선"은 피부의 내재적 요인 또는 외인적인 요인에 의하여 유발되는 피부의 손상을 치료, 경감, 완화시키는 과정 또는 그의 효과 등을 포괄적으로 의미할 수 있으며, 예를 들어, 주름 개선, 피부 탄력 개선, 상처 재생, 피부 노화 억제, 또는 염증성 피부 질환의 완화를 나타내는 것으로 해석될 수 있으나, 이에 제한되는 것은 아니다.
- [0018] 여기에서, "주름 개선", "피부 탄력 개선", 및 "상처 재생"은 콜라겐의 합성 촉진 등을 포함하는 피부 내 콜라겐의 총량을 증가시키는 모든 작용을 의미할 수 있다. 또한, "피부 노화 억제"는 주름, 피부의 처짐, 탄력성 감소 등과 같은 피부의 기능 저하를 억제하는 것을 의미할 수 있다. 이때, 상기 피부 노화는 광노화, 예를 들어, 자외선에 의한 피부 노화일 수 있다. 또한, "염증성 피부 질환의 완화"는 염증성 사이토카인의 발현 억제 등을 포함하는, 생리학적 또는 병리학적으로 발생한 피부의 염증 반응을 완화 또는 개선시키는 모든 작용을 의미할 수 있다.
- [0019] 종래의 기능성 펩타이드는 유효한 생물학적 활성에도 불구하고 펩타이드 자체의 크기로 인해, 표적 조직 또는 세포에 효과적으로 유입되지 못하거나 반감기가 짧아 단기간에 체내에서 소멸되는 단점을 보여 주었다. 반면, 일 실시예에 따른 화장품 조성물은 10개 이하의 아미노산으로 이루어진 펩타이드를 유효성분으로 포함하며, 이에 따라, 유효 성분의 피부 침투율 등이 매우 우수하고, 예를 들어, 국소적으로 피부에 도포하는 경우, 피부 상태를 효과적으로 개선할 수 있다.
- [0020] 일 실시예에 따르면, 상기 펩타이드는 섬유아세포의 세포 활성을 증가시키고 콜라겐의 합성을 촉진할 수 있었다. 또한, 상기 펩타이드는 섬유아세포 및 각질형성세포의 사멸 억제 효과, 자외선에 의해 증가된 매트릭스 메탈로프로테아제의 발현 또는 활성 증가 효과, 및 자외선에 의해 저하된 섬유아세포 및 각질형성세포의 활성 회복 효과를 보여주었다. 따라서, 상기 펩타이드는 피부 상태 개선용 화장품 조성물의 유효성분으로 활용될 수 있다.
- [0021] 상기 화장품 조성물은 상기 펩타이드의 화장품학적 유효량(cosmetically effective amount); 및/또는 화장품학적으로 허용되는 담체를 포함하는 것일 수 있으나, 이에 제한되는 것은 아니다.
- [0022] 본 명세서에서 사용되는 용어 "화장품학적 유효량"은 상기 화장품 조성물의 피부 상태 개선 효능을 달성하는 데 충분한 양을 의미한다.
- [0023] 상기 화장품 조성물은 당업계에서 통상적으로 제조되는 어떠한 제형으로도 제조될 수 있으며, 예를 들어, 용액,

현탁액, 유탁액, 페이스트, 겔, 크림, 로션, 파우더, 비누, 계면활성제-함유 클린싱, 오일, 분말 파운데이션, 유탁액 파운데이션, 왁스 파운데이션 및 스프레이 등으로 제형화될 수 있으나, 이에 제한되는 것은 아니다. 예를 들어, 유연 화장수, 영양 화장수, 영양 크림, 마사지 크림, 에센스, 아이 크림, 클렌징 크림, 클렌징 폼, 클렌징 워터, 팩, 스프레이 또는 파우더의 제형으로 제조될 수 있다.

- [0024] 상기 화장료 조성물의 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.
- [0025] 상기 화장료 조성물의 제형이 파우더 또는 스프레이인 경우에는 담체 성분으로서 락토스, 탈크, 실리카, 알루미늄 히드록시드, 칼슘 실리케이트 또는 폴리아미드 파우더가 이용될 수 있고, 예를 들어, 스프레이인 경우에는 추가적으로 클로로플루오로히드로카본, 프로판/부탄 또는 디메틸 에테르와 같은 추진체를 포함할 수 있다.
- [0026] 상기 화장료 조성물의 제형이 용액 또는 유탁액인 경우에는 담체 성분으로서 용매, 용해화제 또는 유탁화제가 이용되고, 예컨대 물, 에탄올, 이소프로판올, 에틸 카보네이트, 에틸 아세테이트, 벤질 알코올, 벤질 벤조에이트, 프로필렌 글리콜, 1,3-부틸글리콜 오일, 글리세롤 지방족 에스테르, 폴리에틸렌 글리콜 또는 소르비탄의 지방산 에스테르를 포함할 수 있다.
- [0027] 상기 화장료 조성물의 제형이 현탁액인 경우에는 담체 성분으로서 물, 에탄올 또는 프로필렌 글리콜과 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.
- [0028] 상기 화장료 조성물의 제형이 계면-활성제 함유 클린징인 경우에는 담체 성분으로서 지방족 알코올 설페이트, 지방족 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.
- [0029] 상기 화장료 조성물에 포함되는 성분은 유효 성분으로서의 펩타이드와 담체 성분 이외에, 화장료 조성물에 통상적으로 이용되는 성분들을 포함하며, 예를 들어, 항산화제, 안정화제, 용해화제, 비타민, 안료 및 향료와 같은 통상적인 보조제를 포함할 수 있다.
- [0030] 또 다른 양상은 서열번호 1의 아미노산 서열로 이루어진 펩타이드를 유효성분으로 포함하는 화장료 조성물을 개체의 피부에 도포하는 단계를 포함하는, 피부 상태를 개선하는 방법을 제공한다.
- [0031] 상기 화장료 조성물에 대한 설명에서 언급된 용어 또는 요소 중 이미 언급된 것과 동일한 것은 상술한 바와 같다.
- [0032] 본 명세서에서 사용되는 용어, "적용하는", "투여하는", 및 "도포하는"은 상호교환적으로 사용되고 일 실시예에 따른 조성물을 원하는 부위로 적어도 부분적 국소화를 초래하는 것, 또는 투여 경로에 의해 개체 내로 일 실시예에 따른 조성물의 배치하는 것을 의미할 수 있다.
- [0033] 또 다른 양상은 서열번호 1의 아미노산 서열로 이루어진 펩타이드를 유효성분으로 포함하는 염증성 피부 질환 예방 또는 치료용 약제학적 조성물을 제공한다.
- [0034] 상기 펩타이드에 대한 설명에서 언급된 용어 또는 요소 중 이미 언급된 것과 동일한 것은 상술한 바와 같다.
- [0035] 본 명세서에서 용어, "예방"은 상기 조성물의 투여로 질병의 발병을 억제 또는 지연시키는 모든 행위를 의미한다.
- [0036] 본 명세서에서 용어, "치료"는 질병을 앓거나 또는 질병이 발병할 위험이 있는 개체에게, 상기 개체의 상태(예를 들면, 하나 이상의 증상)의 개선, 질병 진행의 지연, 증상 발생의 지연 또는 증상 진행의 둔화 등을 포함한 효과를 제공하는 임의의 형태의 치료를 의미한다. 따라서, 상기 "치료" 및 "예방"은 증상의 치유 또는 완전한 제거를 의미하도록 의도되지 않는다.
- [0037] 상기 "개체"는 질병의 치료를 필요로 하는 대상을 의미하고, 보다 구체적으로는, 인간 또는 비-인간인 영장류, 생쥐(mouse), 개, 고양이, 말, 및 소 등의 포유류를 의미한다.

- [0038] 상기 약제학적 조성물에 의한 예방 또는 치료 대상 질병인, "염증성 피부 질환"은 염증을 주 병변으로 하는 피부 질환을 총칭하는 것일 수 있으며, 예를 들어, 여드름, 아토피성 피부염, 건선, 지루성 피부염, 접촉성 피부염, 홍반성 루프스 또는 구진상 두드러기일 수 있으나, 이에 제한되는 것은 아니다.
- [0039] 일 실시예에 따르면, 상기 펩타이드는 자외선에 의해 증가된 매트릭스 메탈로프로테아제의 발현 또는 활성 증가 효과, 자외선에 의해 저하된 섬유아세포 및 각질형성세포의 활성 회복 효과, 및 자외선에 의해 증가된 염증성 인자 발현 저해 효과를 보여주었다. 따라서, 상기 펩타이드는 염증성 피부 질환 예방 또는 치료용 약제학적 조성물의 유효성분으로 활용될 수 있다.
- [0040] 상기 약제학적 조성물은 상기 펩타이드의 약제학적 유효량(pharmaceutically effective amount); 및/또는 약제학적으로 허용되는 담체를 포함하는 것일 수 있으나, 이에 제한되는 것은 아니다.
- [0041] 본 명세서에서 사용되는 용어 "약제학적 유효량"은 상기 약제학적 조성물의 염증성 피부 질환 예방 또는 치료 효능을 달성하는 데 충분한 양을 의미할 수 있다.
- [0042] 상기 약제학적으로 허용되는 담체는 제제 시에 통상적으로 이용되는 것으로서, 락토스, 텍스트로스, 수크로스, 솔비톨, 만니톨, 전분, 아카시아 고무, 인산 칼슘, 알기네이트, 젤라틴, 규산 칼슘, 미세결정성 셀룰로스, 폴리비닐피롤리돈, 셀룰로스, 물, 시럽, 메틸 셀룰로스, 메틸히드록시벤조에이트, 프로필히드록시벤조에이트, 활석, 스테아르산 마그네슘 및 미네랄 오일 등을 포함하나, 이에 한정되는 것은 아니다. 적합한 약제학적으로 허용되는 담체 및 제제는 Remington's Pharmaceutical Sciences (19th ed., 1995)에 상세히 기재되어 있다.
- [0043] 상기 약제학적 조성물은 상기 성분들 이외에 윤활제, 습윤제, 감미제, 향미제, 유화제, 현탁제, 보존제 등을 추가로 포함할 수 있으나, 이에 제한되는 것은 아니다.
- [0044] 상기 약제학적 조성물은 경구 또는 비경구, 바람직하게는 비경구로 투여할 수 있고, 비경구 투여인 경우에는 근육 주입, 정맥 내 주입, 피하 주입, 복강 주입, 국소 투여, 경피 투여 등으로 투여할 수 있으나, 이에 한정되는 것은 아니다.
- [0045] 상기 약제학적 조성물의 투여량은 1일당 0.0001 내지 1000 ug(마이크로그램, 0.001 내지 1000 ug, 0.01 내지 1000 ug, 0.1 내지 1000 ug, 또는 1.0 내지 1000 ug)일 수 있으나, 이에 제한되는 것은 아니며, 제제화 방법, 투여 방식, 환자의 연령, 체중, 성, 병적 상태, 음식, 투여 시간, 투여 경로, 배설 속도 및 반응 감응성과 같은 요인들에 의해 다양하게 처방될 수 있다.
- [0046] 상기 약제학적 조성물은 당해 발명이 속하는 기술분야에서 통상의 지식을 가진 자가 용이하게 실시할 수 있는 방법에 따라, 약제학적으로 허용되는 담체 및/또는 부형제를 이용하여 제제화함으로써 단위 용량 형태로 제조되거나 또는 다용량 용기 내에 내입시켜 제조될 수 있다.
- [0047] 상기 제형은 오일 또는 수성 매질중의 용액, 현탁액 또는 유화액 형태이거나, 엑스제, 분말제, 과립제, 정제 또는 캡슐제 형태일 수도 있으며, 분산제 및/또는 안정화제를 추가적으로 포함할 수 있다.
- [0048] 또 다른 양상은 치료학적 유효량의 서열번호 1의 아미노산 서열로 이루어진 펩타이드를 유효성분으로 포함하는 약제학적 조성물을 개체에 투여하는 단계를 포함하는, 염증성 피부 질환을 예방 또는 치료하는 방법을 제공한다.
- [0049] 상기 약제학적 조성물에 대한 설명에서 언급된 용어 또는 요소 중 이미 언급된 것과 동일한 것은 상술한 바와 같다.
- [0050] 또 다른 양상은 서열번호 1의 아미노산 서열로 이루어진 펩타이드를 유효성분으로 포함하는 피부 상태 개선용 식품 조성물을 제공한다.
- [0051] 상기 펩타이드에 대한 설명에서 언급된 용어 또는 요소 중 이미 언급된 것과 동일한 것은 상술한 바와 같다.
- [0052] 상기 식품 조성물에 함유된 유효성분으로서의 펩타이드의 함량은 식품의 형태, 소망하는 용도 등에 따라 적절하게 비제한적으로 선택될 수 있으며, 예를 들어, 전체 식품 중량의 0.01 내지 15 중량%로 첨가할 수 있다. 또한 예를 들어, 건강 음료 조성물은 100 ml를 기준으로 0.02 내지 10 g, 바람직하게는 0.3 내지 1 g의 비율로 첨가할 수 있다.

발명의 효과

- [0053] 일 양상에 따른 펩타이드에 의하면, 섬유아세포의 세포 활성을 증가시키고 콜라겐의 합성을 촉진함으로써, 주름

개선, 피부 탄력 개선, 상처 재생, 피부 노화 억제 등을 포함하는 피부 상태 개선에 적용할 수 있다.

[0054] 일 양상에 따른 펩타이드에 의하면, 섬유아세포 및 각질형성 세포의 저해된 활성을 회복시키고 염증성 사이토카인의 발현을 억제함으로써, 피부의 염증 반응을 완화 또는 개선하는데 적용할 수 있다.

[0055] 따라서, 일 양상에 따른 펩타이드는 피부 상태 개선용 화장품 조성물 또는 염증성 피부 질환 예방 또는 치료용 약제학적 조성물의 유효성분으로 활용될 수 있다.

도면의 간단한 설명

[0056] 도 1은 서열번호 1의 아미노산 서열로 이루어진 펩타이드를 섬유아세포에 첨가한 후, 프로콜라겐 1a의 발현 증가를 확인한 결과이다.

도 2는 상기 펩타이드를 섬유아세포에 첨가한 후, PPAR-γ, PPAR-δ, 및 PGC-1α의 발현 증가를 확인한 결과이다.

도 3은 상기 펩타이드를 섬유아세포에 첨가한 후, 자외선 조사에 의해 증가된 cleaved caspase-3의 발현 감소를 확인한 결과이다.

도 4는 상기 펩타이드를 각질형성세포에 첨가한 후, 자외선 조사에 의해 증가된 cleaved PARP-1 및 cleaved caspase-3의 발현 감소를 확인한 결과이다.

도 5는 상기 펩타이드를 섬유아세포에 첨가한 후, 자외선 조사에 의해 증가된 MMP-1의 발현 감소 및 MMP-2의 활성 감소를 확인한 결과이다.

도 6은 상기 펩타이드를 섬유아세포에 첨가한 후, 자외선 조사에 의해 감소된 Colla1, Fibronectin, 및 Elastin의 발현 증가를 확인한 결과이다.

도 7은 상기 펩타이드를 각질형성세포에 첨가한 후, 자외선 조사에 의해 감소된 SIRT1 및 AQP3의 발현 증가를 확인한 결과이다.

도 8은 상기 펩타이드를 각질형성세포에 첨가한 후, 자외선 조사에 의해 증가된 TNF-α, COX-2, IL-1β, 및 IL-6의 발현 감소를 확인한 결과이다.

발명을 실시하기 위한 구체적인 내용

[0057] 이하 본 발명을 실시예를 통하여 보다 상세하게 설명한다. 그러나, 이들 실시예는 본 발명을 예시적으로 설명하기 위한 것으로 본 발명의 범위가 이들 실시예에 한정되는 것은 아니다.

[0058] 실시예 1. 펩타이드의 합성

[0059] 자동 펩타이드 합성기(Milligen 9050, Millipore, 미국)를 이용하여 하기의 [표 1]에 기재된 서열번호 1의 아미노산 서열을 갖는 펩타이드를 합성하고, C18 역상 고성능액체크로마토그래피(HPLC)(Waters Associates, 미국)를 이용하여 이들 합성된 펩타이드를 순수 분리하였다. 컬럼은 ACQUITY UPLC BEH300 C18 (2.1 mm X 100 mm, 1.7 μm, Waters Co, 미국)을 이용하였다.

표 1

[0060]	서열번호	서열 (5'→3')
	1	ECEELEEK

[0061] 실시예 2. 프로콜라겐 1a의 발현 증가 효과 확인

[0062] 마우스 섬유아세포인 NIH3T3 세포를 6-웰 플레이트에 5×10³ cells/well의 밀도로 시딩한 후, 이를 16 시간 동안 배양하였다. 이후, 배양 배지를 무혈청 배지 (serum-free media)로 교체한 뒤, 여기에 서열번호 1의 아미노산 서열로 이루어진 펩타이드를 10 μM, 50 μM, 또는 100 μM로 첨가하고, 이를 24 시간 동안 배양하였다. 이후, Procollagen 1a ELISA kit (Us biological lifescience, USA)를 사용하여, 배지 내 Procollagen 1a의 함량을 측정하였다. 한편, 대조군으로 미처리군(Con)을 사용하였고, 양성 대조군으로는 100nM의 bFGF를 첨가한 군 및 5ng/ml의 TGF-β1을 첨가한 군을 사용하였다.

[0063] 그 결과, 도 1에 나타난 바와 같이, 서열번호 1의 아미노산 서열로 이루어진 펩타이드의 첨가에 의해, 섬유아세포의 콜라겐 합성과 관련된 인자인, 프로콜라겐 1 α 발현이 증가됨을 확인하였다.

[0064] **실시예 3. 섬유아세포의 활성 증진 효과 확인**

[0065] 본 실시예에서는 미토콘드리아의 생물 발생(Mitochondrial biogenesis) 관련 유전자인 PPAR- γ , PPAR- δ , 및 PGC-1 α 의 발현 수준을 측정함으로써, 섬유아세포의 세포 활성화에 일 실시예에 따른 펩타이드가 미치는 영향을 확인하고자 하였다. 구체적으로, 마우스 섬유아세포인 NIH3T3 세포를 6-웰 플레이트에 3×10^5 cells/well의 밀도로 시딩한 후, 이를 16 시간 동안 배양하였다. 이후, 배양 배지를 무혈청 배지로 교체한 뒤, 여기에 서열번호 1의 아미노산 서열로 이루어진 펩타이드를 10 μ M, 50 μ M, 또는 100 μ M로 첨가하고, 이를 24 시간 동안 배양하였다. 상기 배양된 세포로부터 mRNA를 추출한 뒤, cDNA synthesis kit & PCR pre-mix (Intron, Korea)를 사용하여, 상기 추출된 mRNA를 역전사시킴으로써 각각의 cDNA를 합성하였다. 이후, 상기 cDNA와 PPAR- γ , PPAR- δ , 및 PGC-1 α 프라이머를 사용하여 중합효소연쇄 반응(polymerase chain reaction: PCR)을 수행하였다. 한편, 대조군 및 양성 대조군은 실시예 2과 동일한 군을 사용하였으며, 본 실시예에서 사용한 프라이머의 뉴클레오타이드 서열은 하기 표 2와 같다.

표 2

프라이머명		서열 (5'→3')	서열번호
PPAR- γ	정방향	ACGATCTGCCTGAGGTCTGT	2
	역방향	CATCGAGGACATCCAAGACA	3
PPAR- δ	정방향	CTGAAGGGAAGGGGTAGAG	4
	역방향	CAGTCTGGATGCTGCTACA	5
PGC-1 α	정방향	ACTGAGCTACCCCTGGGATG	6
	역방향	TAAGGATTTCGGTGGTGACA	7
GAPDH	정방향	GGTGTGAACGGATTGGCCGTATTG	8
	역방향	CCGTTGAATTTGCCGTGAGTGGAGT	9

[0067] 그 결과, 도 2에 나타난 바와 같이, 서열번호 1의 아미노산 서열로 이루어진 펩타이드의 첨가에 의해, 섬유아세포의 세포 활성화와 관련된 인자인, PPAR- γ , PPAR- δ , 및 PGC-1 α 의 발현이 증가됨을 확인하였다. 상기 결과를 통해, 일 실시예에 따른 펩타이드는 섬유아세포의 세포 활성을 증가시키고 콜라겐의 합성을 촉진함으로써, 주름 개선, 피부 탄력 개선, 상처 재생 등을 포함하는 피부 상태 개선에 기여함을 알 수 있었다.

[0068]

[0069] **실시예 4. 섬유아세포 및 각질형성세포의 사멸 억제 효과 확인**

[0070] 마우스 섬유아세포인 NIH3T3 세포 또는 인간 각질형성세포인 HaCaT 세포를 6-웰 플레이트에 각각 3×10^5 cells/well의 밀도로 시딩한 후, 이를 16 시간 동안 배양하였다. 이후, 배양 배지를 무혈청 배지로 교체한 뒤, 여기에 서열번호 1의 아미노산 서열로 이루어진 펩타이드를 10 μ M, 50 μ M, 또는 100 μ M로 첨가하고, 이를 1 시간 동안 배양하였다. 상기 배양된 세포를 포함하는 웰을 인산완충생리식염수(PBS)로 세척한 뒤, NIH3T3 세포 또는 HaCaT 세포에 각각 6J/cm², 또는 15J/cm²의 자외선을 조사함으로써, 세포사멸 단백질의 발현 증가를 유도하였다. 이후, 배양 배지를 무혈청 배지로 교체한 뒤, 여기에 서열번호 1의 아미노산 서열로 이루어진 펩타이드를 각각 10 μ M, 50 μ M, 또는 100 μ M로 첨가하고, 이를 24 시간 동안 배양하였다. 상기 배양된 세포에 용해 버퍼를 첨가하여 세포 용해물을 수득한 뒤, cleaved PARP-1 및 cleaved caspase-3 항체(santacruz biotechnology, USA)를 사용하여 웨스턴 블롯을 수행하였다. 한편, 대조군으로 미처리군(Con)을 사용하였고, 음성 대조군 및 양성 대조군으로는 각각 자외선 조사 후 미처리군(NC), 및 자외선 조사 후 2.5mM의 NaCl를 첨가한 군을 사용하였다.

[0071] 그 결과, 도 3 및 도 4에 나타난 바와 같이, 자외선 조사에 의해 증가된, 섬유아세포의 cleaved caspase-3 발현은 서열번호 1의 아미노산 서열로 이루어진 펩타이드의 첨가에 의해 감소되었으며, 이와 마찬가지로, 각질형성세포의 cleaved PARP-1 및 cleaved caspase-3의 발현 역시 유의적으로 감소됨을 확인하였다. 상기 결과를 통해, 일 실시예에 따른 펩타이드는 피부 세포의 세포 사멸을 억제시킬 수 있음을 알 수 있었다.

[0072] **실시예 5. 자외선에 의해 증가된 매트릭스 메탈로프로테아제 억제 효과 확인**

[0073] 마우스 섬유아세포인 NIH3T3 세포를 6-웰 플레이트에 3×10^5 cells/well의 밀도로 시딩한 후, 이를 16 시간 동안 배양하였다. 이후, 배양 배지를 무혈청 배지로 교체한 뒤, 여기에 서열번호 1의 아미노산 서열로 이루어진 펩타이드를 10 μ M, 50 μ M, 또는 100 μ M로 첨가하고, 이를 1 시간 동안 배양하였다. 상기 배양된 세포를 포함하는 웰을 인산완충생리식염수로 세척한 뒤, NIH3T3 세포에 각각 6J/cm²의 자외선을 조사함으로써, MMP-1 및 MMP-2의 발현 증가를 유도하였다. 이후, 배양 배지를 무혈청 배지로 교체한 뒤, 여기에 서열번호 1의 아미노산 서열로 이루어진 펩타이드를 10 μ M, 50 μ M, 또는 100 μ M로 첨가하고, 이를 24 시간 동안 배양하였다. 이후, 상기 배양된 세포에 용해 버퍼를 첨가하여 세포 용해물을 수득한 뒤, MMP-1의 발현을 측정하기 위하여 MMP-1 항체(cell signaling, USA)를 사용하여 웨스턴 블롯을 수행하였다.

[0074] 한편, MMP-2의 활성을 측정하기 위하여, 상기 세포 용해물을 대상으로 젤라틴 자이모그래피를 수행하였다. 구체적으로, 2 mg/ml의 젤라틴이 포함된 기질을 사용하여 단백질 전기영동(SDS-PAGE)을 실시한 후, 2.5%의 트라이톤 X-100(Triton X-100)을 30분간 처리한 뒤, 여기에 50 mM Tris-HCl, 0.2 M NaCl, 5 mM CaCl₂, 및 1% Triton X-100을 포함하는 완충제를 37°C에서 24 시간 동안 처리하였다. 이후, 쿠마시 브릴리언트 블루(Coomassie brilliant blue) R250(Sigma)으로 젤을 염색하였고, 여기에 5% 메탄올, 7.5% 아세트산, 증류수를 포함하는 탈색 버퍼를 첨가한 뒤, 젤라틴의 가수분해에 의하여 나타나는 밴드를 육안으로 관찰하였다. 한편, 대조군, 음성 대조군, 및 양성 대조군은 실시예 4와 동일한 균을 사용하였다.

[0075] 그 결과, 도 5에 나타낸 바와 같이, 자외선 조사에 의해 증가된, 섬유아세포의 MMP-1 발현 및 MMP-2 활성은 서열번호 1의 아미노산 서열로 이루어진 펩타이드의 첨가에 의해 감소됨을 확인하였다.

[0076] **실시예 6. 자외선에 의해 저해된 섬유아세포 및 각질형성세포의 활성 회복 효과 확인**

[0077] 본 실시예에서는 진피의 구성 성분으로 알려진 Colla1, Fibronectin, 및 Elastin의 발현을 통해 섬유아세포의 활성 변화를 평가하고, 항노화 유전자인 SIRT1 및 피부 장벽 구성 유전자인 AQP3의 발현을 통해 각질형성세포의 활성 변화를 평가함으로써, 상기 세포들의 활성 회복에 일 실시예에 따른 펩타이드가 미치는 영향을 확인하고자 하였다. 구체적으로, 마우스 섬유아세포인 NIH3T3 세포 또는 인간 각질형성세포인 HaCaT 세포를 6-웰 플레이트에 각각 3×10^5 cells/well의 밀도로 시딩한 후, 이를 16 시간 동안 배양하였다. 이후, 배양 배지를 무혈청 배지로 교체한 뒤, 여기에 서열번호 1의 아미노산 서열로 이루어진 펩타이드를 10 μ M, 50 μ M, 또는 100 μ M로 첨가하고, 이를 1 시간 동안 배양하였다. 상기 배양된 세포를 포함하는 웰을 인산완충생리식염수로 세척한 뒤, NIH3T3 세포 또는 HaCaT 세포에 각각 6J/cm² 또는 20J/cm²의 자외선을 조사함으로써, 세포 활성의 저해를 유도하였다. 이후, 배양 배지를 무혈청 배지로 교체한 뒤, 여기에 서열번호 1의 아미노산 서열로 이루어진 펩타이드를 10 μ M, 50 μ M, 또는 100 μ M로 첨가하고, 이를 6 시간 동안 배양하였다. 상기 배양된 세포로부터 mRNA를 추출한 뒤, cDNA synthesis kit & PCR pre-mix (Intron, Korea)를 사용하여, 상기 추출된 mRNA를 역전사시킴으로써 각각의 cDNA를 합성하였다. 이후, 섬유아세포 유래 cDNA와 Colla1, Fibronectin, 및 Elastin 프라이머; 및 각질형성세포 유래 cDNA와 SIRT1, 및 AQP3 프라이머를 사용하여 중합효소연쇄 반응을 수행하였다. 한편, 대조군, 음성 대조군, 및 양성 대조군은 실시예 4와 동일한 균을 사용하였고, 본 실시예에서 사용한 프라이머의 뉴클레오타이드 서열은 하기 표 3 및 표 4와 같다.

표 3

프라이머명		서열 (5'→3')	서열번호
Colla1	정방향	CACCTCAAGAGCCTGAGTC	10
	역방향	AGACGGCTGAGTAGGGAACA	11
Fibronectin	정방향	CCAGGAACCGAGTACACCAT	12
	역방향	ATACCCAGGTTGGGTGATGA	13
Elastin	정방향	GGACCCCTGACTCGCGACCT	14
	역방향	GGGGAGGTGGGACTGCCCAA	15
GAPDH	정방향	GGTGTGAACGGATTGGCCGTATTG	8
	역방향	CCGTTGAATTTGCCGTGAGTGGAGT	9

표 4

프라이머명		서열 (5'→3')	서열번호
SIRT1	정방향	TCAGTGGCTGGAACAGTGAG	16
	역방향	TCTGGCATGTCCCACTATCA	17
AQP3	정방향	CCTTCTGGGTGCTGGAATA	18
	역방향	ACACGATAAGGGAGGCTCTG	19
GAPDH	정방향	GGTGTGAACGGATTGGCCGTATTG	8
	역방향	CCGTTGAATTTGCCGTGAGTGGAGT	9

[0079]

[0080]

그 결과, 도 6 및 도 7에 나타낸 바와 같이, 자외선 조사에 의해 저해된 섬유아세포의 Colla1, Fibronectin, 및 Elastin의 발현은 서열번호 1의 아미노산 서열로 이루어진 펩타이드의 첨가에 의해 다시 정상 수준으로 회복되었으며, 이와 마찬가지로, 각질형성세포의 감소된 SIRT1 및 AQP3의 발현 역시 회복됨을 확인하였다. 상기 결과를 통해, 일 실시예에 따른 펩타이드는 손상된 피부 세포의 활성을 회복시킴으로써, 진피층 치밀도 감소 및 피부 장벽 감소 등을 포함하는 피부의 병리학적 환경을 개선하는데 기여할 수 있음을 알 수 있었다.

[0081]

실시예 7. 자외선에 의해 증가된 염증성 인자 발현 저해 효과 확인

[0082]

인간 각질형성세포인 HaCaT 세포를 6-웰 플레이트에 3×10^5 cells/well의 밀도로 시딩한 후, 이를 16 시간 동안 배양하였다. 이후, 배양 배지를 무혈청 배지로 교체한 뒤, 여기에 서열번호 1의 아미노산 서열로 이루어진 펩타이드를 10 μ M, 50 μ M, 또는 100 μ M로 첨가하고, 이를 1 시간 동안 배양하였다. 상기 배양된 세포를 포함하는 웰을 인산완충생리식염수로 세척한 뒤, HaCaT 세포에 15mJ/cm²의 자외선을 조사함으로써, 염증성 인자, 즉 염증성 사이토카인의 발현 증가를 유도하였다. 상기 배양된 세포로부터 mRNA를 추출한 뒤, cDNA synthesis kit & PCR pre-mix (Intron, Korea)를 사용하여, 상기 추출된 mRNA를 역전사시킴으로써 각각의 cDNA를 합성하였다. 이후, 상기 cDNA와 TNF- α , COX-2, IL-1 β , 및 IL-6 프라이머를 사용하여 중합효소연쇄 반응을 수행하였다. 한편, 대조군 및 양성 대조군은 실시예 4와 동일한 군을 사용하였고, 본 실시예에서 사용한 프라이머의 뉴클레오타이드 서열은 하기 표 5와 같다.

표 5

프라이머명		서열 (5'→3')	서열번호
TNF- α	Forward	CGTCAGCCGATRTGCTATCT	20
	Reverse	CGGACTCCGCAAAGTCTAAG	21
COX-2	Forward	ATCATTCACCAGGCAAATTGC	22
	Reverse	GGCTTCAGCATAAAGCGTTTG	23
IL-1 β	Forward	TTCGACACATGGGATAACGA	24
	Reverse	TCTTCAACACGCAGGACAG	25
IL-6	Forward	AAAGAGGCACTGCCAGAAAA	26
	Reverse	ATCTGAGGTGCCATGCTAC	27
GAPDH	Forward	GGTGTGAACGGATTGGCCGTATTG	8
	Reverse	CCGTTGAATTTGCCGTGAGTGGAGT	9

[0083]

[0084]

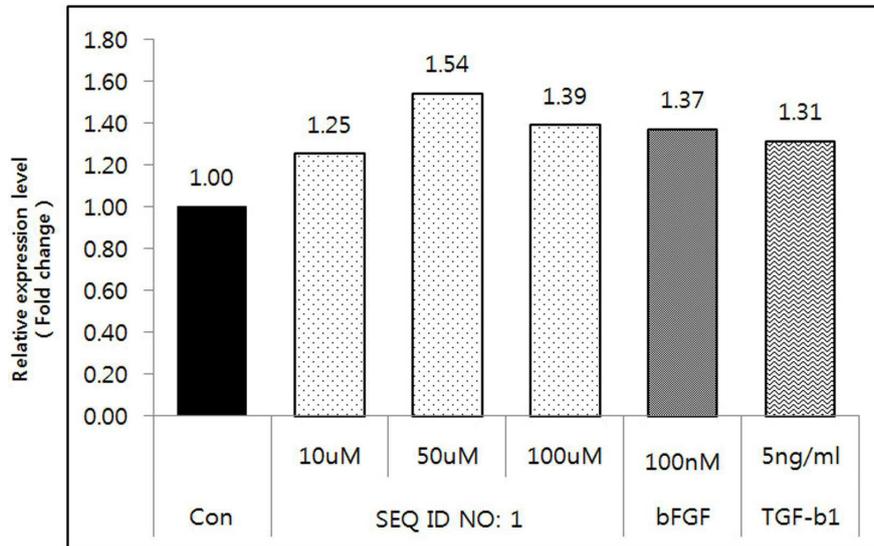
그 결과, 도 8에 나타낸 바와 같이, 자외선 조사에 의해 증가된, 각질형성세포의 TNF- α , COX-2, IL-1 β , 및 IL-6 발현은 서열번호 1의 아미노산 서열로 이루어진 펩타이드의 첨가에 의해 감소되었다. 상기 결과를 통해, 일 실시예에 따른 펩타이드는 피부의 염증 반응을 완화 또는 개선시킬 수 있음을 알 수 있었다.

[0085]

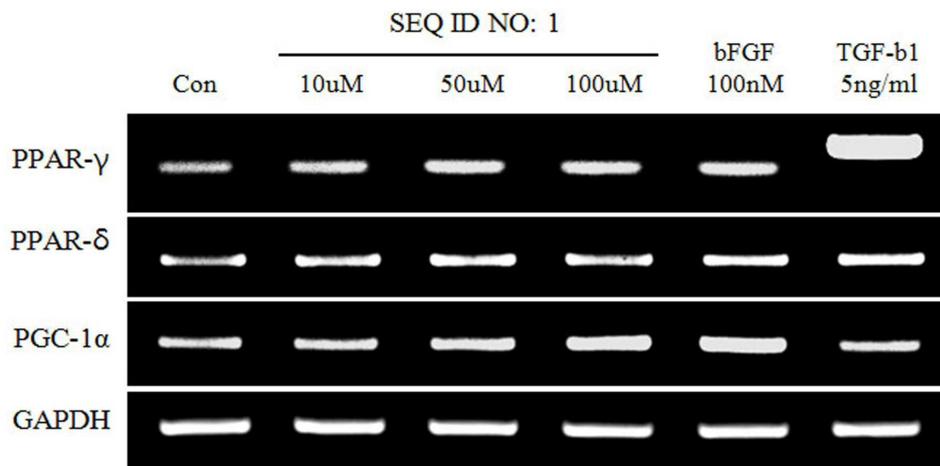
전술한 본 발명의 설명은 예시를 위한 것이며, 본 발명이 속하는 기술분야의 통상의 지식을 가진 자는 본 발명의 기술적 사상이나 필수적인 특징을 변경하지 않고서 다른 구체적인 형태로 쉽게 변형이 가능하다는 것을 이해할 수 있을 것이다. 그러므로 이상에서 기술한 실시예들은 모든 면에서 예시적인 것이며 한정적이 아닌 것으로 이해해야만 한다.

도면

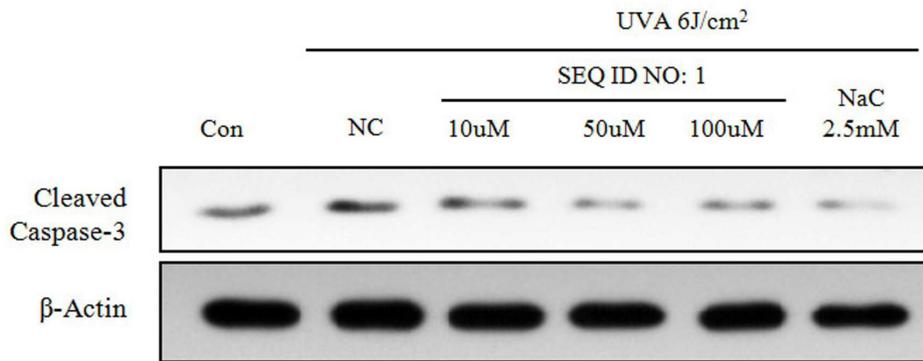
도면1



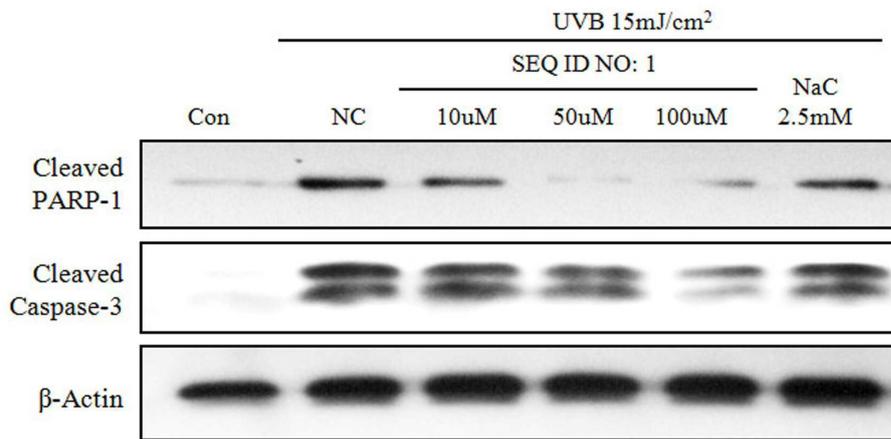
도면2



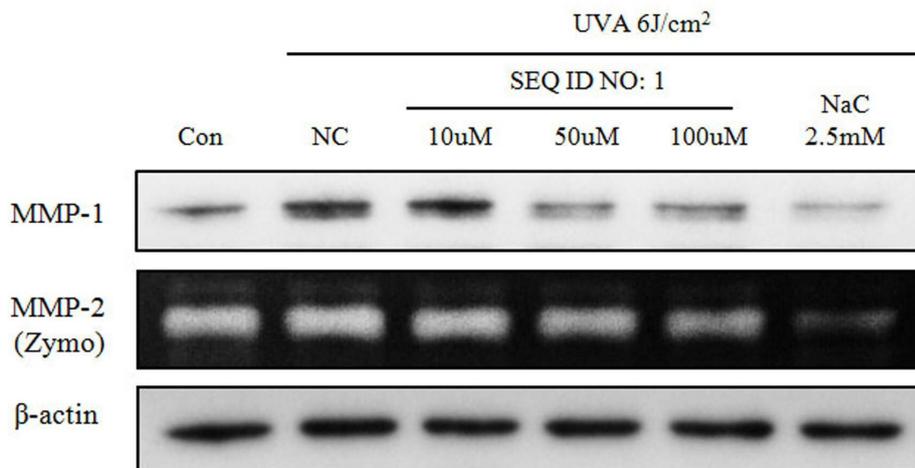
도면3



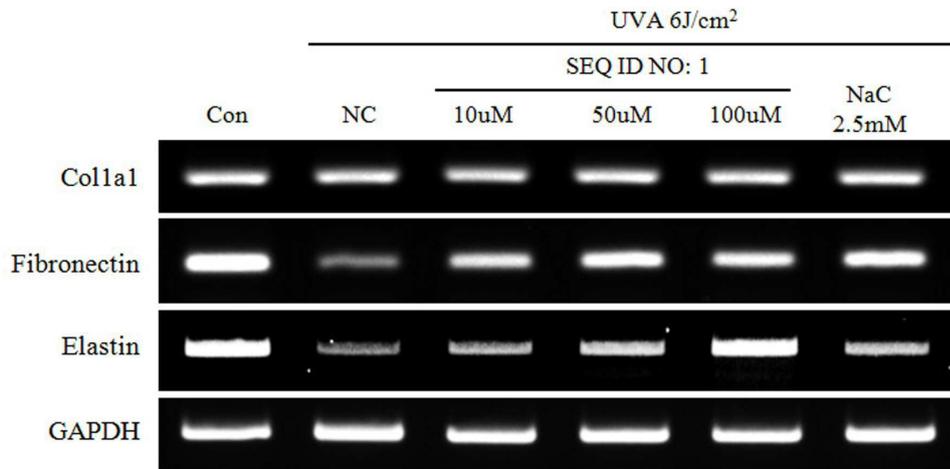
도면4



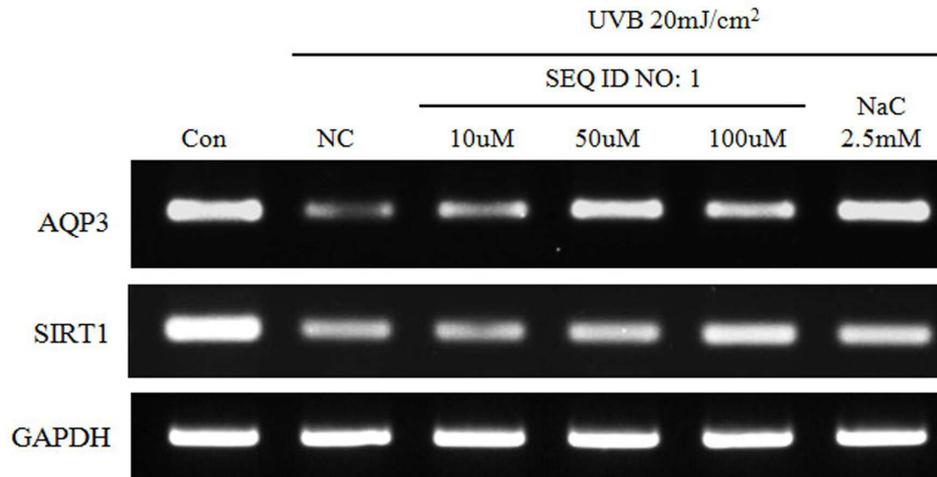
도면5



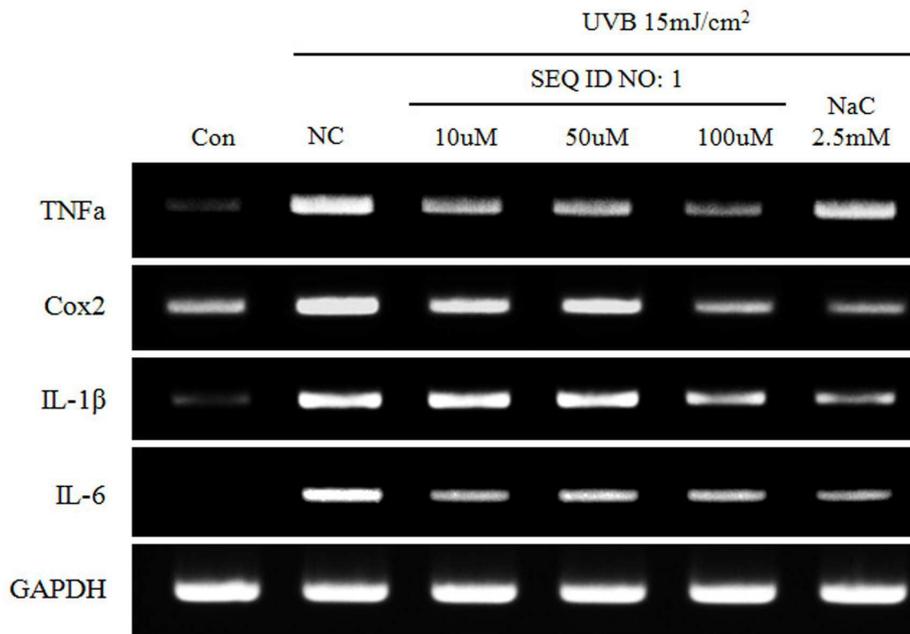
도면6



도면7



도면8



서열목록

- <110> CAREGEN CO., LTD.
- <120> Peptide having activities of skin condition improvement and uses thereof
- <130> P1903KR_PN126782KR
- <160> 27
- <170> KoPatentIn 3.0
- <210> 1
- <211> 8
- <212> PRT
- <213> Artificial Sequence
- <220><223> Peptide 1
- <400> 1
- Glu Cys Glu Glu Leu Glu Glu Lys
- 1 5
- <210> 2
- <211> 20
- <212> DNA
- <213> Artificial Sequence
- <220><223> PPAR-gamma_F
- <400> 2

acgatctgcc tgaggtctgt	20
<210> 3	
<211> 20	
<212> DNA	
<213> Artificial Sequence	
<220><223> PPAR-gamma_R	
<400> 3	
catcgaggac atccaagaca	20
<210> 4	
<211> 20	
<212> DNA	
<213> Artificial Sequence	
<220><223> PPAR-delta_F	
<400> 4	
ctgaagggaa ggggtagag	20
<210> 5	
<211> 19	
<212> DNA	
<213> Artificial Sequence	
<220><223> PPAR-delta_R	
<400> 5	
cagtctggat gctgtaca	19
<210> 6	
<211> 20	
<212> DNA	
<213> Artificial Sequence	
<220><223> PGC-1alpha_F	
<400> 6	
actgagctac ccttgggatg	20
<210> 7	
<211> 20	
<212> DNA	
<213> Artificial Sequence	

<220><223> PGC-1alpha_R
 <400> 7
 taaggatttc ggtggtgaca 20
 <210> 8
 <211> 25
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence
 <220><223> GAPDH_F
 <400> 8
 ggtgtgaacg gatttgccg tattg 25

 <210> 9
 <211> 25
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence
 <220><223> GAPDH_R
 <400> 9
 ccgttgaatt tgccgtgagt ggagt 25
 <210> 10
 <211> 20
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence
 <220><223> Colla1_F
 <400> 10
 caccctcaag agcctgagtc 20
 <210> 11
 <211> 20
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence
 <220><223> Colla1_R
 <400> 11
 agacggctga gtagggaaca 20

 <210> 12
 <211> 20

<212> DNA
 <213> Artificial Sequence
 <220><223> Fibronectin_F
 <400> 12
 ccaggaaccg agtacaccat 20
 <210> 13
 <211> 20
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence
 <220><223> Fibronectin_R
 <400> 13
 ataccaggt tgggtgatga 20
 <210> 14
 <211> 20
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence
 <220><223> Elastin_F
 <400> 14
 ggaccctga ctgcgacct 20

 <210> 15
 <211> 20
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence
 <220><223> Elastin_R
 <400> 15
 ggggaggtgg gactgcccaa 20
 <210> 16
 <211> 20
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence
 <220><223> SIRT1_F
 <400> 16
 tcagtggctg gaacagtgag 20
 <210> 17

<211> 20
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence
 <220><223> SIRT1_R
 <400> 17
 tctggcatgt cccactatca 20

<210> 18
 <211> 20
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence
 <220><223> AQP3_F
 <400> 18
 ccttcttggg tgctggaata 20

<210> 19
 <211> 20
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence
 <220><223> AQP3_R
 <400> 19
 acacgataag ggaggctctg 20

<210> 20
 <211> 21
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence
 <220><223> TNF-alpha_F
 <400> 20
 cgtcagccga ttrtgctatc t 21

<210> 21
 <211> 20
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence
 <220><223> TNF-alpha_R
 <400> 21

cggactccgc aaagtctaag 20

<210> 22

<211> 21

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> COX-2_F

<400> 22

atcattcacc aggcaaattg c 21

<210> 23

<211> 21

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> COX-2_R

<400> 23

ggcttcagca taaagcgttt g 21

<210> 24

<211> 20

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> IL-1beta_F

<400> 24

ttcgacacat gggataacga 20

<210> 25

<211> 20

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> IL-1beta_R

<400> 25

tctttcaaca cgcaggacag 20

<210> 26

<211> 20

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> IL-6_F

<400> 26

aaagaggcac tgccagaaaa

20

<210> 27

<211> 20

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> IL-6_R

<400> 27

atctgaggtg cccatgctac

20