

생리활성 펩타이드의 피부미용학적 특성 및 활용

모상현¹, 정대현¹, 김형식¹, 조문진¹, 서효현¹, 김성준^{2,3*}

Characteristics and Applications of Bioactive Peptides in Skin Care

Sang Hyun Moh¹, Dai Hyun Jung¹, Hyoung Shik Kim¹, Moon Jin Cho¹, Hyo Hyun Seo¹, and Sung Jun Kim^{2,3*}

접수: 2011년 11월 28일 / 게재승인: 2011년 12월 16일
© 2011 The Korean Society for Biotechnology and Bioengineering

Abstract: Bioactive peptides (BAP) showed excellent cosmetic activity than bio-materials such as caffeic acid (CA), gallic acid (GA), and nicotinic acid (NA). Caffeoyl tripeptide-1 (CT-1) is a BAP that is stabilized with Gly-His-Lys (GHK) tripeptide and CA by using Fmoc solid phase peptide synthesis. Digalloyl tetrapeptide-19 (DT-19) is stabilized by combining Lys-Glu-Cys-Gly with GA and nicotinoyl tripeptide-1 (NT-1) is synthesized by GHK and NA. According to experiments, CT-1 has an excellent anti-oxidant function even with a very small amount of 10 ppm CT-1. DT-19's tyrosinase inhibition activity has the better effect of about 28.57% in 0.01% and 33.33% in 0.005% of concentration and about 7.89% in 0.001% concentration than vitamin-C. In addition, NT-1 is safer than the NA. Almost BAPs like pal-KTTKS, acetyl hexapeptide, and copper tripeptide-1 have the anti-wrinkle effect while DT-19 and NT-1 are applicable for potential BAPs focused on the whitening effect. The three kinds of BAPs like CT-1, DT-19, and NT-1 consisting of amino acids are safe to the skin, and have more excellent stability than bio-materials which are found to be unstable and cause skin irritation. Due to the high biological activity of BAP in the

field of skin care, its utilization will increase constantly.

Keywords: Peptide, Bioactive Peptide (BAP), Anti-Oxidant, Cosmetic, Skin Care

1. 서론

주름 및 노화방지 소재 의약품과 화장품 개발에 아미노산 중합체인 펩타이드를 이용하려는 관심이 높아지면서 미용 의학과 화장품분야에서 펩타이드에 대한 생명공학적 연구는 계속 늘어나고 있다 [1-2]. 과거에는 펩타이드가 생물체에서 분리되어 의약품 용도의 펩타이드 호르몬이 사용되어 왔으나 펩타이드 호르몬이 인체나 동물 사체의 뇌하수체에서 추출 [3] 하므로 인해 정제과정에서 다른 질병의 원인균이 완전한 제거가 이루어지지 않아 치료과정 중 안전성 문제가 발생됨에 따라 사용이 매우 제한되었다. 펩타이드는 일반적으로 단백질의 기본 성분인 아미노산이 50개 이하로 결합돼 있는 oligopeptide를 일컫으며 단백질처럼 독특한 생물학적 활성을 보이는 생체 유래 물질이다. 기존 펩타이드는 제조공정의 어려움과 높은 원가 부담, 낮은 수율, 안전성 등의 문제점이 지적되어 왔으나 펩타이드가 차세대 향노화 물질로 인식되면서 빛과 열에 대해 안정성이 우수하고 인체 친화적인 펩타이드의 개발이 늘어나고 있으며 [1] 항염 (anti-inflammation), 색소질환 (pigmentation), 세포증식 (cell proliferation)과 세포 이동 (cell migration), 신생 혈관 생성 (angiogenesis), 선천성 면역 (innate immunity), 세포외 기질물질합성 (extracellular matrix synthesis)의 관련 분야에서 펩타이드에 대한 연구가 활발히 진행되고 있다 [4]. 최근에 개발되고 있는 생리활성 펩타이드 (bioactive peptide; BAP)는 위와 같은 제조공정과 원가부담 등의 여러 가지 문제점을 해결하면서 우수한 약리

¹(주)바이오프디엔씨 생명과학연구소
¹Anti-aging Research Institute of BIO-FD&C Co., Ltd., Incheon

²숙명여대 사회교육대학원 미용예술과
²Graduate School of Social Education, Sookmyung Women's University

³(주)제니트리 생명과학연구소
³Genietree Inc., 409, Hanshin IT Tower, 235, Guro3-dong, Guro-gu, Seoul 152-768, Korea
Tel: +82-2-868-1921, Fax: +82-2-868-1920
e-mail: juncokr@aol.com

적 효과로 인해 고기능성 물질로 인식되고 있다 [5]. 피부 미용 소재로서 BAP의 기능 중 cellular messenger에 관한 연구는 가장 최근이며 [6] 2009년 미국의 경우 스킨케어 성분으로 시장에서 확인된 피부 미용 소재 BAP는 25여 종으로 파악되었고 [4] 주요 기능은 진피층 콜라겐 합성에 관련된 것이었다 [5]. Caffeoyl tripeptide-1 (CT-1), digalloyl tetrapeptide-19 (DT-19), nicotinoyl tripeptide-1 (NT-1)은 Fmoc 기반의 고체상 펩타이드 합성법 (solid phase peptide synthesis; SPPS)을 이용하여 최근에 개발된 새로운 BAP이다. CT-1은 caffeic acid (CA)에 Gly-His-Lys (GHK) tripeptide를 결합시켰으며 DT-19는 gallic acid (GA)에 Lys-Glu-Cys-Gly (KECG)를 NT-1은 nicotinic acid (NA)에 GHK tripeptide를 합성하여 얻은 물질들이며 각각의 피부 미용소재로서 특징을 알아보았다.

2. 피부 미용 생리활성 펩타이드의 종류

펩타이드가 지닌 우수한 생리활성으로 인해 펩타이드 합성과 기술은 과거 수십 년간 계속 발달되어 왔다 [7-10]. 펩타이드는 단백질보다 크기가 작아 화학적인 합성법으로 제조할 수 있고 다양한 plasmodium을 만들기가 비교적 쉬우며 신기능성 물질 창출에 장점을 가지고 있다. 펩타이드 합성법으로는 고체상 합성법과 액체상 합성법, 그리고 고체상 합성법과 액체상 합성법을 혼합하는 경우 (convergent synthesis), 그리고 chemical ligation으로 화학 선택 반응에 의해 보호되지 않는 조각들을 결합시키는 방법이 이용된다. SPPS는 Fmoc/tBU를 바탕으로 한 기술이 이용되고 있으며 [11] 마이크로파 (microwave) 가열을 이용하거나 분자량이 큰 펩타이드를 합성하기 위해 고농도의 유기 용매를 이용하기도 하지만 2009년 Declereck에 의하면 유기 용매 없는 펩타이드 합성법을 발표하여 친환경적이며 경제적으로 펩타이드를 합성할 수 있는 길을 열어 놓았다 [12]. 펩타이드는 친수성으로 인해 생체막을 통과하기가 어렵고 생체내에서 분해가 빨리 일어나며 합성 및 생산 비용이 저분자 약물과 비교시 비용이 많이 드는 단점이 있음 [13]에도 불구하고 이미노산으로 구성된 펩타이드는 분해가 될 때 독성에 대한 위험이 적으며 반감기가 적어 체내 축적이 되지 않고 단백질의 기능을 나타내는 특성으로 인해 저분자 약물보다 기능이 좋은 장점이 있다. 펩타이드의 기원은 인체나 동물, 식물에서 만들어지거나 화학적 라이브러리 (chemical library) 또는 유전자와 재조합 과정을 통해 합성된 펩타이드로 분류될 수 있으며 [14-17] 현재는 재조합 과정을 통해 합성된 펩타이드의 연구가 활발하다. 피부 미용분야에서 적용되는 펩타이드는 다음과 같이 크게 3종류로 나누어지며 주로 항주름 효과를 가진다 [18].

첫째, signal peptide로써 콜라겐 합성을 증대하거나 바꾸는 역할을 하며 collagenase에 의해 콜라겐이 분해되는 것을 억제한다. 이러한 펩타이드는 섬유아세포를 직접 자극하고 MMPs를 억제하는 Lys-Thr-Thr-Lys-Ser (KTTKS)와 GHK 등과 같은 signal peptides이다. 피부의 노화 과정을 늦추기 위해서 섬유아세포를 자극하여 콜라겐 합성을 유도하거나 콜라겐이 수화 (hydration)되는 것을 억제하는 방법이 있다.

생리학적으로 노화의 대표적 현상인 주름은 근섬유의 과도한 자극으로 인해 피부 표피가 안쪽으로 당겨지면서 형성되므로 직접적인 또는 근육 신경세포의 작용을 약화시키는 방법을 이용하여 근육의 움직임을 통제하면 주름의 깊이와 강도를 감소시킬 수 있다 [19]. 펩타이드의 중요 기능은 섬유아세포를 자극하는 것으로 엘라스틴의 chemotactic 도메인에서 얻은 Val-Gly-Val-Ala-Pro-Gly (VGVAPG)라는 펩타이드는 섬유아세포의 증식을 촉진한다. 섬유아세포를 자극하는 다른 펩타이드로 Matrixyl®이라는 이름으로 불리고 있는 펩타이드는 섬유아세포에 있는 제 1형 콜라겐의 일부 잔기로서 KTTKS 펩타이드에 palmitoylated된 pal-KTTKS이며 콜라겐 합성을 촉진한다 [20-24]. 다양한 매트릭스 금속 단백질들이 콜라겐과 엘라스틴의 분해와 관련이 있기 때문에 피부 노화를 억제하는 방법 중 하나가 금속 효소의 억제제를 개발하는 것이다. 그 중 하나가 Tyr-Tyr-Arg-Ala-Asp-Asp-Arg (YYRADDR)이며 이 펩타이드는 procollagen-C proteinase를 억제함으로 콜라겐 분해속도를 지연시킨다 [25].

둘째, 신경 근육 접합부에 근육의 수축을 억제하여 표정 주름을 줄여주는 neurotransmitter-effecting peptide이며 보톡스 (botox)와 같은 효과를 나타내는 펩타이드이다. 보톡스는 신경전달을 적당히 차단하여 주름 감소를 가져오는 방법으로 보톡스 주사요법이 사용되어 왔으나 독성 [26]때문에 일부 부작용과 효과의 지속력이 6개월 이내이며 입 주변의 경우 피부 신경반응이 차단되어 정상적인 표정이 나오지 않아서 효과에 한계를 가지고 있다. Acetyl hexapeptide (ARGIRELINE®)는 보톡스 주사제의 기전과 유사하게 작용하고 바르는 보톡스로 신경 전달 물질의 분비를 억제시키는 항노화 성분이며 주름 완화에 도움을 주는 것으로 확인되고 있다 [27]. 이 물질은 보톡스 주사와는 달리 얼굴의 모든 피부에 적용이 되며 보톡스 주사 요법에서 일시적으로 나타날 수 있는 부작용이 없어 안전하게 사용할 수 있는 기능성 성분이다 [28]. 또한 Acetyl hexapeptide는 SNAP-25와 구조적으로 유사해서 근육으로의 신경전달물질 분비를 억제시키고 근육운동으로 인한 표정주름 발생을 방지하여 표정주름의 예방과 완화에 도움이 된다는 사실이 알려지고 있다 [29].

일반적으로, 근육은 신경의 말단에 연결되어 있고 신경과 신경은 synapse라는 접합부로 연결되어 신경전달 물질을 방출한다. SNAP receptor complex는 VAMP, syntaxin 및 SNAP-25라는 단백질에 의해 형성된 3중 복합체이며 이 복합체는 신경전달물질로 채워진 vesicle의 neuronal exocytosis를 조절하는 중요한 막단백질 (membrane protein)이다 [29,30]. Acetyl hexapeptide는 SNAP-25와 구조적으로 유사한 물질로 SNAP-25와 경쟁적으로 작용하여 snare complex의 구조를 변형시키면 이 snare complex는 신경전달물질을 효과적으로 방출하지 못하므로 근육운동이 약해지게 되어 근육운동에 의한 얼굴의 주름 생성을 억제해주는 역할을 한다. 또 다른 경로로 catecholamine의 과생산이 주름을 형성시키는데 acetyl hexapeptide가 catecholamine의 과생산을 억제시킴으로 근육의 수축작용도 감소해 근육의 반복적인 수축에 의해 형성되는 주름을 감소시켜 주름의 생성을 억제하는 작용을 한다 [31,32].

셋째, carrier peptide이며 구리와 같은 금속을 운반하는 펩타이드로써 진피 구성에 필수적인 cofactor를 진피로 이동시킨다. Tripeptide인 GHK는 사람의 plasma에서 처음 확인되었으며 구리 이온과 강하게 결합한다. GHK는 신호 펩타이드로 작동하면서 운반하는 구리를 엘라스틴 형성에 관여하는 여러 효소들에게 전달하는 역할을 한다. Copper Tripeptide-1은 사람의 혈액, 침 등에서 발견된 인체 유래의 천연 펩타이드이며 캐리어 펩타이드의 대표적인 물질이다. 이 펩타이드는 혈액내에서 알부민과 결합된 형태로 존재하며, 20세 연령에는 대략 200 mg/mL 정도 존재하나 노화가 진행됨에 따라 감소하여 60세에는 약 80 mg/mL으로 감소 현상을 보이게 된다. Copper tripeptide-1의 기능으로 섬유모세포에 의한 콜라겐 생성을 증가시키고 glycosaminoglycan의 합성과 분비도 촉진시키며 손상된 단백질을 재생시키는 과정과 손상조직을 정상조직으로 대체시키는 조직 재생의 중요한 역할을 한다 [33,34]. 또한 copper tripeptide-1은 superoxide dismutase와 decorin과 같은 항염 단백질을 증가시키고 ferritin으로 부터 산화철이 빠져나가는 것을 막으며 염증성 사이토 카인인 TGF-β1, tumor necrosis factor alpha, IL-1을 억제하고 활성 산소로 인한 세포 손상 및 반응성 탄소종을 막으며 단백질의 glycation을 줄여준다 [35,36].

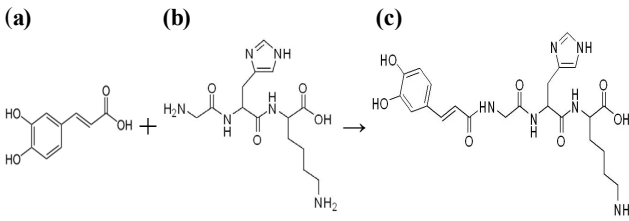


Fig. 1. Chemical structures of (a) CA (b) GHK, and (c) CT-1. CT-1 is synthesized from CA and GHK tripeptide by using Fmoc solid phase peptide synthesis.

3. Fmoc 기반의 고체상 펩타이드 합성법을 이용한 바이오 소재의 안정화

생물체내의 생화학적 대사 작용에 의하여 합성된 유기물질 중 식물에서 유래한 2차 대사산물로 크게 terpenoid, alkaloid, flavonoid 등으로 분류할 수 있으며 그 종류에 따라서 항산화작용, 항염작용, 항노화작용을 포함한 여러 가지 생리활성 기능이 있다 [37]. CA, GA, arbutin, lycopene, catechin의 대부분 phytochemical들은 용액상에서 안정도가 떨어지며 시간이 지남에 따라 빛과 열에 의한 산화로 인해 갈변된다. 온도가 높아지거나, 산소 포화도가 높아지면 갈변되는 속도는 빨라진다. 항산화 효과가 우수한 비타민 C도 안정성이 낮아 [38] 여러 가지 유도체로 안정화시키지만 안정성을 높인 유도체는 항산화 기능이 떨어진다는 문제점을 가지고 있다. 비타민 C만큼 저농도에서 항산화 효과가 우수한 CA 역시 용액 속에서 불안하여 우수한 항산화 [39] 및 항염증 [40] 기능이 있음에도 불구하고 제약, 식품, 화장품의 산업에서 많이 활용되고 있지 못한 실정이다. 그러므로 항산화 및 항염

기능이 우수하지만 수용액상에서 용해도가 낮고 불안정하며 독성이 있는 천연 바이오 소재를 우수한 생리활성을 가진 펩타이드를 사용하여 최적화된 방법으로 안정화가 요구되어 왔다. Fmoc 기반의 SPPS는 다양한 서열의 짧은 펩타이드를 빠른 시간에 합성이 가능하므로 천연 바이오 소재를 안정화시켜 단기간에 효능이 증가된 새로운 물질을 얻을 수 있는 장점이 있다.

4. 주요 피부 미용 소재 생리활성 펩타이드의 특징

4.1. CT-1

CA는 방향족 카르복시산으로 열수(熱水)와 알코올에 용해하기 쉬운 노란색상의 결정체이며 탄소가 순환하는 구조로 원두에 많이 함유되어 있고 caffeine과는 다른 화합물이다. 원두속에는 100여 종의 산성(acid) 물질들이 존재하는데, 주요 산성 물질들은 chlorogenic acid, quinic acid이고 malic acid와 citric acid는 소량 존재하며 원두를 볶는(roasting) 과정에서 chlorogenic acid는 대부분 작은 화합물로 분해된다. 200 mL의 커피속에는 70 mg에서 350 mg의 chlorogenic acid가 존재하며 이것으로부터 35 mg에서 175 mg의 CA가 공급된다. CA의 특성으로 CA는 aflatoxin의 생성을 줄여줄 뿐 아니라 산화 스트레스 유발을 방지하는 기능을 가진다. 또한 생체내외에서 우수한 항산화 작용을 하며 다른 항산화 물질보다 강력한 산화 방지 효과를 나타내지만 [41] 물에 쉽게 용해되지 않는다.

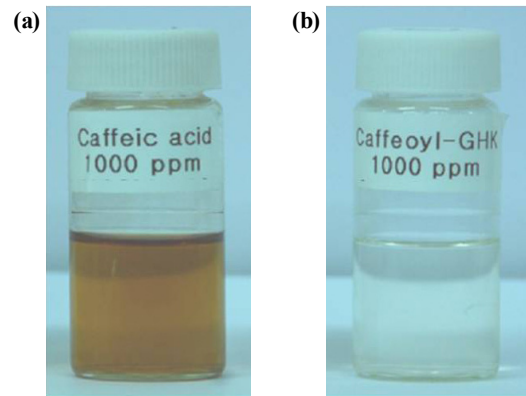


Fig. 2. Stability of (a) CA and (b) CT-1. After 30 days of experimentation using the same amount of 1,000 ppm concentration, the CA was discolored and oxidized at 25 °C while CT-1 (caffeoyl-GHK) didn't change at all.

CA는 UV-B를 조사했을 때 염증관련 COX-2 발현을 농도 의존적으로 억제하며 allergy 증상의 완화에도 효과가 있는 것으로 밝혀지고 있다 [42,43]. 그러나 CA의 이러한 기능에도 불구하고 안정성이 낮아 활용도가 적었다. CT-1은 CA에 GHK tripeptide가 결합된 BAP이며 아마이드(amide) 결합으로 안정한 구조(Fig. 1)를 형성하여 CA에 비해 상대적으로 안정성이 향상되므로 쉽게 변색되거나 물성이 바뀌지 않는 우수한 안정성(Fig. 2)을 나타낸다. CA가 우수한 항산화와

항염증 효과를 가지고 있으면서도 난용성과 수용액상에서 낮은 안정성을 가지고 있었으나 Fmoc 기반의 SPSS를 이용하여 펩타이드와 결합시키므로 인해 우수한 안정성과 용해도를 가진 CT-1이 가능하다. CT-1은 CA에 GHK tripeptide가 결합되더라도 CA와 거의 유사한 항산화 효능을 나타내었으며 (Fig. 3) 또한 프리라디칼의 활성을 억제하여 세포의 손상을 막아준다 (Fig. 4).

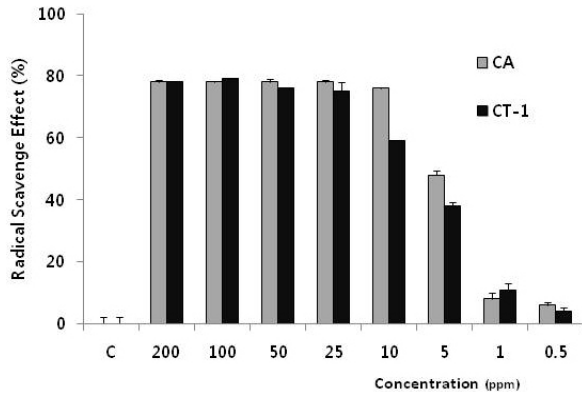


Fig. 3. Anti-oxidant activities of CA and CT-1 in the DPPH radical scavenging activity assay. 180 uL of 100 uM DPPH solution in ethanol was gently mixed with 20 uL sample and incubated for 20 min at 37°C. Absorbance was measured at 517 nm. The results were represented as mean of standard deviation of three independent experiments.

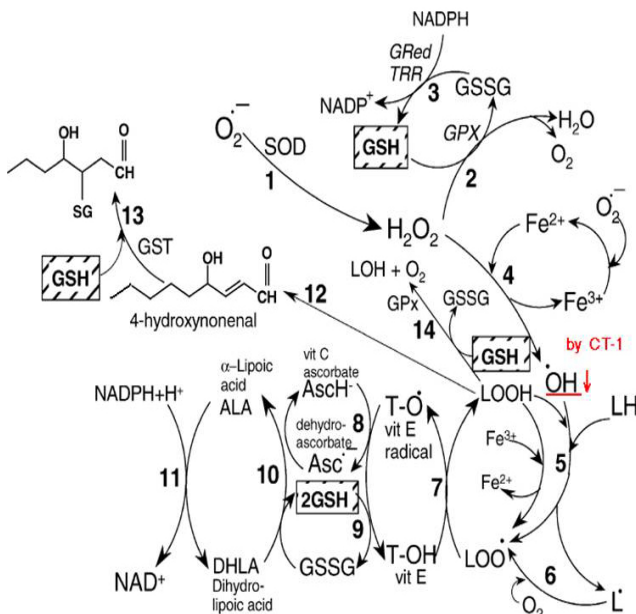


Fig. 4. Radical defense mechanism of CT-1. CT-1 has an anti-oxidation effect through scavenging process. Reactive oxygen species (ROS) can cause damage to cell membranes and DNA fragmentation in somatic cells. However, anti-oxidant like CT-1 prevents tissue damage under normal conditions.

4.2. DT-19

GA는 코코아 (cocoa), 오배자 (gallnut), 녹차 (green tea), 참나무껍데기 (oak bark) 등에 함유된 식물 유래의 polyphenol 성

분으로 건선 (psoriasis)과 같은 피부질환 환자에 효과적이고 항산화, 항염 기능이 우수하여 피부트러블 및 피부기능 개선 소재로 보고되고 있다 [44,45]. GA의 항산화 효과는 비타민 C와 그 효능이 유사하며 색소질환의 피부에 미백 효과를 나타낸다 [46]. GA는 주요 염증 사이토카인 인자인 TNF-α 및 IL-6의 저해 효과도 확인되고 있으며 또한 tyrosinase 억제 효과 (Fig. 5) 및 melanin 합성 억제 효과 (Fig. 6)도 우수한 것으로 보고되고 있다 [47-49].

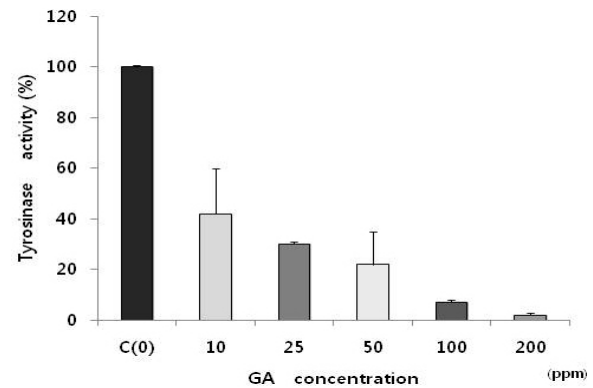


Fig. 5. Murine tyrosinase activity in B16 cells after 24 h treatment with or without GA. Tyrosinase activity in B16 cells was examined by measuring the rate of oxidation of L-DOPA. Results are expressed as percentage of control, and the data are represented as the mean ± S.E.M. of at least three determinations [48].

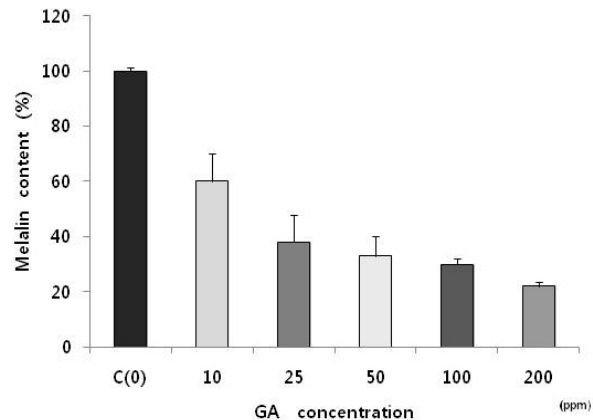


Fig. 6. Effect of GA on the melanin biosynthesis. Melanin content was used as an index of melanogenesis. Results are expressed as percentage of control, and the data are represented as the mean ± S.E.M. of at least three determinations [48].

GA는 내인성 항산화제인 환원형 글루타티온 (glutathione; GSH)의 생성을 촉진시키고 melanin의 합성을 억제하며 MTT assay에 의한 세포독성 결과 GA는 거의 독성이 발견되지 않았다 [48]. 한 분자내에 결합된 GA의 개수가 증가할수록 tyrosinase 억제력이 현격히 증가하는 것을 알 수 있으며 [50] 결합된 GA가 증가할수록 항산화 효과가 우수하다. Fig. 7에 의하면 GA는 비타민 C보다 우수한 항산화 효과를 나타내고 있으며 galloyl-KECG 보다는 결합된 GA개수가 많은 DT-19의 항산화력이 더 우수함을 확인할 수 있다.

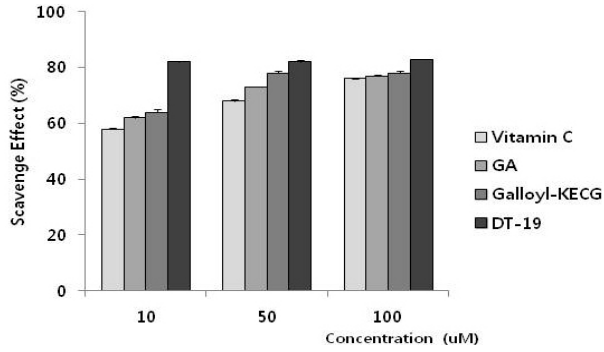


Fig. 7. Anti-oxidative activity measured by DPPH radical scavenging assay. 180 uL of 100 uM DPPH solution in ethanol was gently mixed with 20 uL sample and incubated for 20 min at 37°C. Absorbance was measured at 517 nm. Vitamin-C was used as the standard material. The results were represented as mean of standard deviation of three independent experiments.

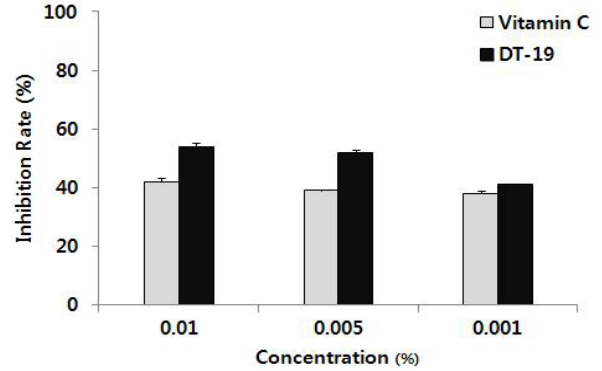


Fig. 10. Tyrosinase inhibition activity of DT-19. Purified tyrosinase was mixed with sample and incubated for 15 min at 37°C. Absorbance was measured at 490 nm. Vitamin-C was used as the standard material. The results were represented as mean of standard deviation of three independent experiments.

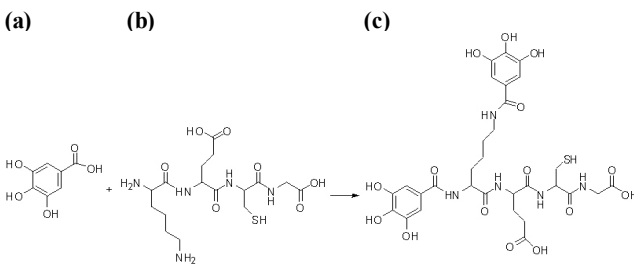


Fig. 8. Chemical structures of (a) GA, (b) KECG, and (c) DT-19. DT-19 is stabilized by combining KECG and GA by using Fmoc solid phase peptide synthesis.

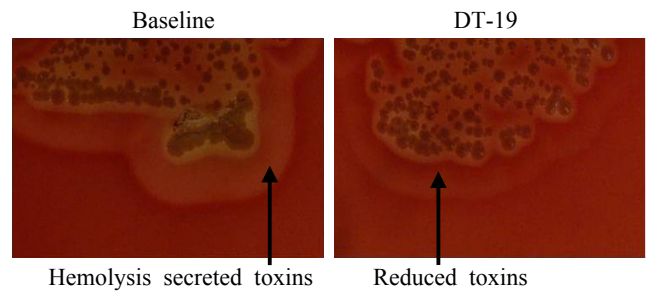


Fig. 11. DT-19 inhibits hemolysin expression and secretion of MRSA. Cell culture of MRSA on TSB medium and streaking on the sheep's blood agar in the concentration of 7×10^5 cells. DT-19 30 g/mL (30 ppm) spreading onto the sheep blood agar plate. The observation after incubation at 25°C for 24 h.

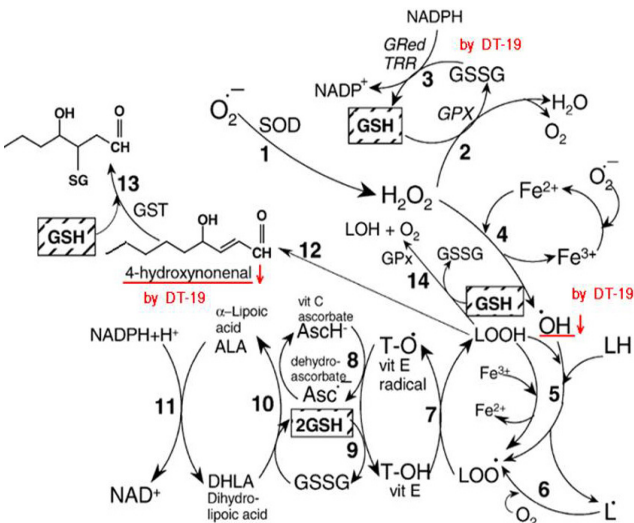


Fig. 9. Radical defense mechanism of DT-19. DT-19 can reduce 4-hydroxynonenal and hydroxy radicals. ROS are very toxic and accelerated by aging process. They are superoxide anion (O_2^-), hydrogen peroxide (H_2O_2) and hydroxyl radical ($OH\cdot$) which are the products of Fenton reaction catalyzed by free Fe and Cu. The reactive oxygen species are removed by radical scavenge mechanism in our body to keep biological homeostasis. The schematic diagram shows various pathways of GSH and other oxidants (Vit E, Vit C, lipoic acid) in the management of oxidative stress for radical scavenging.

DT-19는 GA에 KECG가 결합된 BAP이며 KECG는 항산화력이 우수한 글루타티온 (γ -ECG)의 유사 물질인 α -ECG에 lysine이 결합된 펩타이드로 글루타티온과 유사한 항산화 효과를 보이며 한 분자내에 두개의 GA (lysine의 두개 NH_2)를 결합시킬 수 있어 (Fig. 8) 보다 우수한 항산화 효과를 기대할 수 있다. 이는 DT-19가 생체내의 항산화 기능을 가지는 글루타티온의 활성을 유지시켜 주는 기능을 하여 환원형 글루타티온과 산화형 글루타티온 (GSSG)의 가역적 상호 변화에 세포 중의 산화-환원 전위를 조절하는 역할을 하고 4-hydroxynonenal과 hydroxy radicals를 제거하므로 항산화 기능을 나타내고 있다 (Fig. 9). Fig. 10에 의하면 미백 효과가 우수한 GA [40]에 KECG를 결합시킨 DT-19는 비타민 C와 비교시 0.001% 농도에서 7.89% 더 뛰어난 tyrosinase 저해 효과를 나타냈으며 0.005%와 0.01% 농도에서는 각각 33.33%, 28.57% 더 뛰어난 tyrosinase 저해 효과를 나타내고 있다. GA의 개수가 증가할수록 항산화 뿐만 아니라 tyrosinase 억제기능도 우수한 것으로 알려져 있어 [50] 이는 GA가 결합된 DT-19의 미백 기능성 소재로써 가능성을 알 수 있다. DT-19의 슈퍼박테리아 (methicillin resistant staphylococcus aureus; MRSA)에 대한 독소분비를 억제하는 실험 결과 (Fig. 11)에서 DT-19가 독소의 분비를 현저히

감소시키는 것으로 확인된다. 피부 감염을 주로 유도하는 *S. aureus*, *P. aeruginosa*와 같은 pathogen들은 정족수 감지 시스템인 quorum sensing system을 이용하여 독소의 발현 및 분비 조절을 하므로 결국 DT-19가 MRSA의 quorum sensing system을 억제할 수 있으며 이는 DT-19가 antibacterial effect를 가지고 있음을 시사한다.

4.3. NT-1

NT-1은 피부 염증완화와 피부장벽 기능강화 효과를 가진 비타민 B3 (NA) [51]와 GHK의 결합을 통해 효능과 안정성을 강화시킨 비타민 펩타이드이다. GHK는 cell growth factor로 인체내 혈장속에 존재하는 펩타이드로 활성 산소에 의한 세포와 조직의 손상을 억제하는 역할을 하며 생체내에서 copper와 복합물을 형성하고 세포의 receptor에 결합하여 세포의 유사분열을 촉진한다. GHK는 collagen, thrombospondin, fibrin-chain, prokininogen, complement C1q, interleukin 4, skin collagenase, coagulation factor XI과 SPARC와 같은 세포외 기질 단백질에 존재하거나 염증관련 단백질에 존재하는 매우 희귀한 펩타이드이며 [52] 손상된 단백질을 재생시키는 과정과 손상조직을 정상조직으로 바꾸는 과정에 관여한다. 비타민 B3는 hyperpigmentation을 줄여주고 피부를 맑고 밝게 만들어주는 미백기능성 물질로 알려져 있다 [53]. Melanin은 기저막에 위치한 melanocyte에서 합성된 후에 멜라닌을 적재한 melanosomes가 melanocyte로부터 수송당기를 통해서 keratinocyte로 전이되어 melanin이 각질층까지 이동하게 된다. 이러한 과정에서 비타민 B3는 melanocyte에서 keratinocyte로 melanin의 이동을 68%까지 감소시켜 색소 침착을 줄여준다 [53]. 또한 비타민 B3는 미백 효과 [54,55] 외에 주름 완화 효과와 TEWL을 감소시켜주고 염증성 여드름 피부 개선 효과 [53]가 보고되고 있다. 이와 같은 결과는 비타민 B3와 GHK의 결합을 통해 효능과 안정성을 강화시킨 NT-1가 미백 소재로서의 가능성을 보여주고 있다.

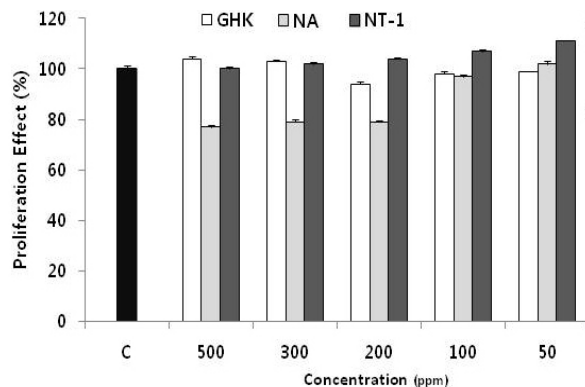


Fig. 12. Proliferation of keratinocytes from GHK, NA, and NT-1. Cell proliferation was measured by MTT assay. The cells were treated with various concentrations of sample for 24 h. MTT solutions were added and insoluble derivative formed by cellular dehydrogenase was solubilized with EtOH-DMSO (1 : 1). Absorbance was measured at 570 nm. The viability of untreated control cells was defined as 100 %. The results were represented as mean of standard deviation of three independent experiments.

Keratinocyte를 이용한 MTT assay (Fig. 12)를 통해 인체에 자극적인 NA [56]는 농도가 증가할수록 세포 독성을 나타냈지만 NT-1은 독성을 나타내지 않았다. 실험 결과 GHK는 300, 500 ppm 농도에서 100% 이상의 세포생존활성을 나타냈으며 50, 100, 200 ppm 농도에서는 94% 이상의 활성을 나타냈다. NA의 경우 50 ppm의 경우에만 100% 이상의 활성을 나타냈으며 200, 300, 500 ppm의 경우 79% 이하의 활성을 나타냈다. NT-1은 50, 100, 200, 300, 500 ppm에서 100% 이상의 세포 활성을 나타내므로써 이러한 결과는 NT-1이 피부에 안전한 물질임을 보여주고 있다.

5. 결론

펩타이드는 낮은 독성에 매우 특이적이며 소량으로도 뛰어난 생물학적 활성을 나타내기 때문에 생명공학분야에서 펩타이드에 대한 관심은 점점 고조되고 있다. 우수한 생리활성 기능을 가지고 있는 phytochemical과 같은 다양한 바이오 소재들은 안정성과 안전성 문제로 여러 합성법과 가공법이 꾸준히 제시되어 왔다. 펩타이드에 바이오 소재를 Fmoc 기반의 SPPS를 이용하여 단일물질로 합성한 BAP 소재 역시 일반적인 펩타이드처럼 안정성이 우수함을 확인할 수 있었으며 3가지 물질 BAP의 특징을 다음과 같이 정리하였다.

- ① 구성 성분이 아미노산으로 피부에 대한 친화력이 높다.
- ② 펩타이드에 의해 안정화된 BAP는 순수한 phytochemical보다 우수한 안정도를 나타낸다.
- ③ 단백질의 활성부위만을 갖는 짧은 서열만으로도 유효한 활성을 나타낸다.
- ④ BAP 합성은 단백질의 합성과 정제에 비해 적은 비용으로 가능하다.
- ⑤ 소량으로도 우수한 활성 및 기능적 효능을 갖는다.
- ⑥ 생분해성 소재로 환경오염의 가능성이 낮다.

본 결과에서 소량으로도 물질대사가 빠른 펩타이드와 생리 작용이 우수한 phytochemical 등의 바이오 소재가 합성된 BAP는 펩타이드와 바이오 소재의 특징을 각각 살릴 수 있는 새로운 물질로 활용될 수 있을 것이다. 최근 진전된 펩타이드 합성법이 개발됨에 따라 바이오 소재를 안정화시키기 위한 시도는 더욱 늘어날 것이다. 기존 펩타이드 합성의 아미드 결합은 전자가 부족한 카르복실산 (carboxylic acid)을 전자가 풍부한 아민 (amine, NH-R, R은 수소원자 또는 탄소수소 그룹)과 반응시켜서 생성시켰다. 그러나 전자가 부족한 요오드 결합 아민과 전자가 풍부한 음이온인 α -bromo nitroalkane을 반응시키는 극성반전 (umpolung) 반응을 통하여 아미드 결합을 형성시키는 연구가 발표되었다 [57]. 이 방법은 chirality를 통제할 수 있어 합성의 효율을 높일 수 있는 새로운 펩타이드 합성법으로 부각되고 있다. 이와 같은 합성법의 발달은 저비용으로 BAP를 대량 생산할 수 있고 자연계에 존재하지 않는 아미노산의 이용이 어렵다는 문제점을 해결하고 고순도의 펩타이드를 합성할 수 있는 가능성을 보여주고 있다. 또한 긴 sequence를 가진 펩타이드는 합성이 어렵고 응집이 잘 일어나는 경우가 있었으나 현재는 적절

한 수지 (resin)와 커플링 접근 방식을 이용한 다양한 합성법 [58-60]이 개발되고 있으며 펩타이드의 장점을 최대한 극대화할 수 있는 방법 [61-62]이 연구되고 있다. 이러한 진전된 펩타이드 합성법은 생물학적 활성이 우수한 BAP의 개발을 가속화할 수 있을 것이다.

본 논문을 통해 커피의 주성분 중의 하나인 chlorogenic acid으로부터 유래된 CA에 Fmoc 기반의 고체상 펩타이드 합성법으로 GHK tripeptide를 결합시킨 CT-1가 우수한 안정도와 항산화 효과가 있음을 확인할 수 있었다. GA를 KECG 펩타이드로 안정화시킨 DT-19 또한 tyrosinase의 활성을 억제하는 기능이 있으며 일반적인 펩타이드는 항노화성 물질로 주름 개선의 기능을 가지지만 DT-19는 미백 기능성 물질로도 활용이 가능할 것으로 판단된다. 비타민 펩타이드인 NT-1는 세포 독성이 확인된 NA에 GHK tripeptide를 결합시켜 활용도를 높인 잠재적인 미백 기능성 물질로 실험 결과 안전한 물질임을 확인할 수 있었다. 추후 이러한 물질들은 임상적인 연구를 통해 바이오 소재로서 높은 활용도를 이끌어 낼 수 있을 것이다. 최근 피부 미용 기능 신소재 개발 방향은 펩타이드 소재의 트렌드를 넘어서 천연물에서 유래한 phytochemical과 생체 유래 성분인 펩타이드를 접목시킨 pepflavoid (peptide + flavonoid)로 전환되고 있으며 특히 이러한 성분은 항노화의 핵심 성분으로 부상될 가능성이 높다. 고기능화가 요구되는 피부생물학 분야 (skin biological field)에서 천연물, 기능성 펩타이드를 이용한 소재는 앞으로 미용의학과 화장품 성분으로 활용 가치가 높을 것이다.

References

- Mary, P. L. and A. L. Cole (2007) Cosmeceutical peptides. *Dermatol. Ther.* 20: 343-349.
- Vlieghe, P., V. Lisowski, J. Martinez, and M. Khrestchatsky (2010) Synthetic therapeutic peptides: science and market. *Drug Discovery Today* 15: 41-56.
- Lee, S. K. (1997) Development of recombinant human growth hormone in yeast: efficacy evaluation and safety assessment. *Proceedings of the Korean Society of Toxicology Conference*. October. Korea.
- Zhang, L. and T. J. Falla (2009) Cosmeceuticals and peptides. *Clinics in Dermatology* 27: 485-494.
- Fields, K., T. J. Falla, K. Rodan, and L. Bush (2009) Bioactive peptides: signaling the future. *J. Cosmetic Dermatology* 8: 8-13.
- Samah, N. H. A. and C. M. Heard (2011) Topically applied KTTKS: a review. *J. Cosmet. Sci.* 33: 483-490.
- Dellai, A., I. Maricic, V. Kumar, S. Arutyunyan, A. Bouraoui, and A. Nefzi (2010) Parallel synthesis and anti-inflammatory activity of cyclic peptides cycloquamosin D and Met-cherimolacyclopeptide B and their analogs. *Bio. Med. Chem. Lett.* 20: 5653-5657.
- Metaferia, B. B., M. Rittler, J. S. Gheeya, A. Lee, H. Hempel, A. Plaza, W. G. S. Stevenson, C. A. Bewley, and J. Khan (2010) Synthesis of novel cyclic NGR/RGD peptide analogs via on resin click chemistry. *Bio. Med. Chem. Lett.* 20: 7337-7340.
- Richter, S., T. Ramenda, R. Bergmann, T. Knies, J. Steinbach, J. Pietzsch, and F. Wuest (2010) Synthesis of neurotensin(8-13)-phosphopeptide heterodimers via click chemistry. *Bio. Med. Chem. Lett.* 20: 3306-3309.
- Grillo, B., D. F. Rabanal, and E. Giralt (2011) Improved Fmoc based solid phase synthesis of homologous peptide fragments of human and mouse prion proteins. *J. Peptide Science* 17: 32-38.
- Coin, I., M. Beyermann, and M. Bienert (2007) Solid-phase peptide synthesis: from standard procedures to the synthesis of difficult sequences. *Nature Protocols* 2: 3247-3256.
- Valérie, D., N. Pierrick, M. Jean, and L. Frédéric (2009) Solvent-free synthesis of peptides. *Angewandte Chemie* 121: 9482-9485.
- Andrey I., L. Liran, M. Amram, A. C. Gregory, F. D. William, M. Mati, L. Binhua, and G. David (2010) Role of the conformational rigidity in the design of biomimetic antimicrobial compounds. *Angewandte Chemie* 49: 8460-8463.
- Hartmann, R. and H. Meisel (2007) Food-derived peptides with biological activity: from research to food applications. *Cur. Opin. Bio.* 18: 163-169.
- Chiara, F., L. Luisa, P. Alessandro, and B. Luisa (2005) Bioactive Peptides from Libraries. *Chemistry biology* 12: 417-426.
- Sato, A. K., M. Viswanathan, R. B. Kent, and C. R. Wood (2006) Therapeutic peptides: technological advances driving peptides into development. *Current opinion in biotech.* 17: 638-642.
- Ioannis, S., F. Demosthenes, V. Katerina, G. T. Andreas, K. Valentinos and B. Evangelos (2010) Cyanobacterial cyclopeptides as lead compounds to novel targeted cancer drugs. *Mar. Drugs* 8: 629-657.
- Ruiz, M. A., B. Clares, M. E. Morales, and V. Gallardo (2010) Evaluation of the anti-wrinkle efficacy of cosmetic formulations with an anti-aging peptide (Argireline®). *Ars. Pharm.* 50: 168-176.
- Benedetto, A. V. (1998) Environment and skin aging. *Clin. Derm.* 16: 129-139.
- Osborne, R., L. A. Mullins, and B. B. Jarrold (2009) Understanding metabolic pathways for skin anti-aging. *J. Drugs Der.* 8: 4-7.
- Amer, M. and M. Maged (2009) Cosmeceuticals versus pharmaceuticals. *Clinics in dermatology* 27: 428-430.
- Bissett, D. L. (2009) Common cosmeceuticals. *Clinics in dermatology* 27: 435-445.
- Foldvari, M., S. Attah-Poku, J. Hu, Q. Li, H. Hughes, L. A. Babiuk, and S. Kruger (1998) Palmitoyl derivatives of interferon: potential for cutaneous delivery. *J. Pharmaceutical Sciences* 87: 1203-1208.
- Robinson, L. R., N. C. Fitzgerald, D. G. Doughty, N. C. Dawes, C. A. Berge, and D. L. Bissett (2005) Topical palmitoyl pentapeptide provides improvement in photoaged human facial skin. *J. Cosmetic science* 27: 155-160.
- Lee, H. J. (2011) The use of oligopeptides as cosmetics and pharmaceuticals. Foreign high-tech research business report, pp. 9. Korean Institute of Science and Technology Information Press, Seoul.
- Becker-Wegerich, P. M., L. Rauch, and T. Ruzicka (2002) Botulinum toxin A: successful décollete rejuvenation. *Dermatologic Surgery* 28: 168-171.
- Goldsmith, J., L. Granera, and C. Wolfe (2009) Effects of argireline on EPSP amplitude at the crayfish neuromuscular junction. *Pioneering Neuroscience* 10: 11-14.
- Blanes, M., C. J. Clemente, G. Jodas, A. Gil, G. F. Ballester, B. Ponsati, L. Gutierrez, E. P. Paya, and A. F. Montiel (2002) A synthetic hexapeptide (Argireline) with antiwrinkle activity. *Int. J. Cos. Sci.* 24: 303-310.
- Gutierrez, L. M., S. Viniegra, J. Rueda, A. V. Ferrer-Montiel, J. M. Canaves, and M. Montal (1997) A peptide that mimics the C-terminal sequence of SNAP-25 inhibits secretory vesicle

- docking in chromaffin cells. *J. Bio. Chem.* 272: 2634-2639.
30. Furstenuau, A., G. Hazeltine, and M. Miller (2010) The effectiveness of argireline as a synthetic BoNT questioned, as examined in the neuromuscular junction of the *procambarus clarkii*. *Pioneering Neuroscience* 7: 7-10.
 31. Antonio, V. F., M. G. Luis, P. A. James, M. C. Jaume, G. Anabel, V. Salvador, A. B. Jennifer, A. Michael, and M. Mauricio (1998) The 26-mer peptide released from SNAP-25 cleavage by botulinum neurotoxin E inhibits vesicle docking. *FEBS Lett.* 435: 84-88.
 32. Luis, M. G., M. C. Jaume, V. F. Antonio, A. R. Juan, M. Mauricio, and V. Salvador (1995) A peptide that mimics the carboxy-terminal domain of SNAP-25 blocks Ca²⁺-dependent exocytosis in chromaffin cells. *FEBS Lett.* 372: 39-43.
 33. Maquar, F. X., L. Pickartb, M. Laurentc, P. Gillerya, J. C. Monboissea, and J. P. Borela (1988) Stimulation of collagen synthesis in fibroblast cultures by the tripeptide-copper complex glycyl-L-histidyl-L-lysine-Cu²⁺. *FEBS Lett.* 238: 343-346.
 34. Gorouhi, F. and H. I. Maibach (2009) Role of topical peptides in preventing or treating aged skin. *J. Cosmetic Science* 31: 327-345.
 35. Wegrowski, Y., F. X. Maquart, and J. P. Borel (1992) Stimulation of sulfated glycosaminoglycan synthesis by the tripeptide-copper complex Glycyl-L-histidyl-L-lysine-Cu²⁺. *Life Sciences* 51: 1049-1056.
 36. Pickart, L. (2008) The human tri-peptide GHK and tissue remodeling. *J. Bio. Sci.* 19: 969-988.
 37. Lampe, J. W. and J. L. Chang (2007) Interindividual differences in phytochemical metabolism and disposition. *Seminars in Cancer Biology* 17: 347-353.
 38. Yamamoto, I., N. Muto, K. I. Murakami, and J. I. Akiyama (1992) Collagen synthesis in human skin fibroblasts is stimulated by a stable form of ascorbate, 2-O- α -D-Glucopyranosyl-L-Ascorbic acid. *J. Nutr.* 122: 871-877.
 39. Chen, J. H. and C. T. Ho (1997) Antioxidant activities of caffeic acid and its related hydroxycinnamic acid compounds. *J. Agric. Food Chem.* 45: 2374-2378.
 40. Krizkova, L., M. Nagy, J. Polonyi, J. Dobias, A. Belicova, D. Grancai, and J. Krajcovic (2000) Phenolic acids inhibit chloroplast mutagenesis in *euglena gracilis*. *Mutat. Res.* 469: 107-114.
 41. Shahrzad, S., K. Aoyagi, A. Winter, A. Koyama, and I. Bitsch (2001) Research communication: pharmacokinetics of gallic acid and its relative bioavailability from tea in healthy humans. *J. Nutrition* 131: 1207-1210.
 42. Kang, N. J., K. W. Lee, B. J. Shin, S. K. Jung, M. K. Hwang, A. M. Bode, Y. S. Heo, H. J. Lee, and Z. Dong (2009) Caffeic acid, a phenolic phytochemical in coffee, directly inhibits fyn kinase activity and UVB-induced COX-2 expression. *Carcinogenesis* 30: 321-330.
 43. Jung, U. J., M. K. Lee, Y. B. Park, S. M. Jeon, and M. S. Choi (2006) Antihyperglycemic and antioxidant properties of caffeic acid in db/db mice. *J. Pharm. Exp. Ther.* 318: 476-483.
 44. Ow, Y. Y. and I. Stupans (2003) Gallic acid and gallic acid derivatives: effects on drug metabolizing enzymes. *Current Drug Metabolism* 4: 241-248.
 45. Kroes, B. H., A. J. J. Berg, H. C. Q. Ufford, H. Dijk, and R. P. Labadie (1992) Anti-inflammatory activity of gallic acid. *Planta Med.* 58: 499-504.
 46. Kubo, I., Q. X. Chen, and K. Nihei (2003) Molecular design of antibrowning agents: antioxidative tyrosinase inhibitors. *Food Chemistry* 81: 241-247.
 47. Kubo, I., I. Kinst-Hori, Y. Kubo, Y. Yamagiwa, T. Kamikawa, and H. Haraguchi (2000) Molecular design of antibrowning agents. *J. Agric. Food Chem.* 48: 1393-1399.
 48. Kim, Y. J. (2007) Antimelanogenic and antioxidant properties of gallic acid. *Biol. Pharm. Bull.* 30: 1052-1055.
 49. Kim, S. H., C. D. Jun, K. H. Suk, B. J. Choi, H. J. Lim, S. J. Park, S. H. Lee, H. Y. Shin, D. K. Kim, and T. Y. Shin (2006) Gallic acid inhibits histamine release and pro-inflammatory cytokine production in mast cells. *Toxicological Sciences* 91: 123-131.
 50. Chen, L. G., W. L. Chang, C. J. Lee, and L. T. Lee (2009) Melanogenesis inhibition by gallotannins from chinese galls in B16 mouse melanoma cells. *Biol. Pharm. Bull.* 32: 1447-1452.
 51. Gehring, W. (2004) Nicotinic acid/niacinamide and the skin. *J. Cos. Der.* 3: 88-93.
 52. Loren, P. (2002) Copper peptides for tissue regeneration. *Speciality Chemicals* 22: 29-31.
 53. Hakozaki, T., L. Minwalla, J. Zhuang, M. Chhoa, A. Matsubara, K. Miyamoto, A. Greatens, G. G. Hillebrand, D. L. Bissett, and R. E. Boissy (2002) The effect of niacinamide on reducing cutaneous pigmentation and suppression of melanosome transfer. *Bri. J. Der.* 147: 20-31.
 54. Nico, S., V. Jana, and P. Stan (2009) The hunt for natural skin whitening agents. *Int. J. Mol. Sci.* 10: 5326-5349.
 55. Boonme, P., V. Junyaprasert, B. Varaporn, N. Suksawad, and S. Songkro (2009) Microemulsions and nanoemulsions: novel vehicles for whitening cosmeceuticals. *J. Biomedical Nanotechnology* 5: 373-383.
 56. Ferruti, P. and R. Paoletti (1978) High polymers containing nicotinic acid, process for their preparation and their use. *US Patent* 4,067,876.
 57. Shen, B., D. M. Makley, and J. N. Johnston (2010) Umpolung' reactivity in semiaqueous amide and peptide synthesis. *Nature* 465: 1027-1032.
 58. Youhei, S. and K. Yoshiaki (2006) Click peptides-chemical biology-oriented synthesis of alzheimer's disease-related amyloid β peptide (A β) analogues based on the o-acyl isopeptide method. *Chem. Bio. Chem.* 7: 1549-1557.
 59. Han, S. Y. and Y. A. Kim (2004) Recent development of peptide coupling reagents in organic synthesis. *Tetrahedron* 60: 2447-2467.
 60. Grillo-Bosch, D., F. Rabanal, and E. Giral (2011) Improved Fmoc based solid phase synthesis of homologous peptide fragments of human and mouse prion proteins. *J. Peptide Science* 17: 1075-2617.
 61. Sarika, N. and A. E. B. Heather (2010) Cyclic peptides as potential therapeutic agents for skin disorders. *Peptide Science* 94: 673-680.
 62. Matsuzaki, K. (2009) Control of cell selectivity of antimicrobial peptides. *BBA* 1788: 1687-1692.