



- (51) 국제특허분류:  
A61K 47/48 (2006.01) A61K 31/12 (2006.01)  
A61K 47/42 (2006.01)
- (21) 국제출원번호: PCT/KR2014/002446
- (22) 국제출원일: 2014년 3월 24일 (24.03.2014)
- (25) 출원언어: 한국어
- (26) 공개언어: 한국어
- (30) 우선권정보:  
10-2013-0044201 2013년 4월 22일 (22.04.2013) KR
- (71) 출원인: 애니젠 주식회사 (ANYGEN CO., LTD.)  
[KR/KR]; 500-706 광주광역시 북구 첨단과기로 333, 광주 테크노파크 시험생산동 306호, Gwangju (KR).
- (72) 발명자: 강성진 (KANG, Sung Jin); 502-799 광주광역시 서구 염화로 57번길 19 금호타운 2차아파트 203동 308호, Gwangju (KR). 김산호 (KIM, San Ho); 502-854 광주광역시 서구 금호운천길 83 상무푸르지오아파트 109동 802호, Gwangju (KR). 박진순 (PARK, Jin Soon); 706-092 대구시 수성구 용학로 33길 9 동산파크 9동 104

호, Daegu (KR). 반수호 (BAN, Soo Ho); 506-719 광주광역시 광산구 왕버들로 132번길 22수원 2차 우미린아파트 209동 2403호, Gwangju (KR). 박진석 (PARK, Jin Suk); 506-302 광주광역시 광산구 첨단중앙로 181번길 42-14 일신아파트 101동 1006호, Gwangju (KR).

(74) 대리인: 양부현 (YANG, Boo-Hyun); 151-832 서울시 관악구 남부순환로 1922 청동빌딩 301호, 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, 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, KN, KP, KZ, LA, LC, LK, LR, LS, LT, 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 역내 권리의 보호를 위하여): ARIPO (BW, GH, GM,

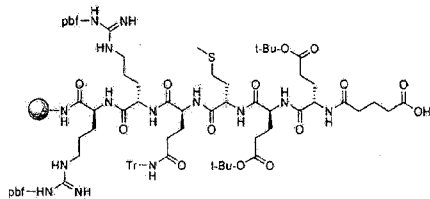
[다음 쪽 계속]

(54) Title: DESIGN OF CURCUMIN-PEPTIDE COMPLEX HAVING IMPROVED SOLUBILITY AND FUNCTION COMPARED WITH CURCUMIN AND METHOD FOR PREPARING CURCUMIN-PEPTIDE COMPLEX

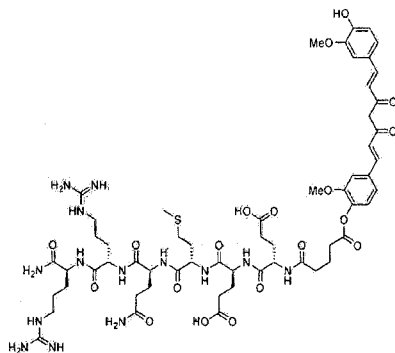
(54) 발명의 명칭 : 커큐민 대비 용해도와 기능을 향상시킨 커큐민-펩타이드의 설계 및 이의 제조방법

도. 2

1. Amide resin:  
HOBt, DIC  
Fmoc-Glu(tBu)-OH, Fmoc-Glu(tBu)-OH, Fmoc-Met-OH, Fmoc-Gln(Trt)-OH,  
Fmoc-Arg(pbf)-OH, Fmoc-Arg(pbf)-OH  
2. Piperidine/DMF (20:80)  
3. DIEA, Glutaric anhydride



4. Curcumin, DMAP, DCM, DIC  
5. TFA/DCM/9W (70:20:1)



(57) Abstract: The present invention relates to a curcumin-peptide complex having improved solubility in water compared with curcumin; to a method for improving solubility of curcumin in water; to a method for preparing the complex; and to a cosmetic composition and a functional health food which contain the complex. The present invention provides a curcumin-peptide complex in which a peptide material validated to have biocompatibility and safety is linked to curcumin as a natural resource having a very excellent functional effect via a linker compound, and the curcumin-peptide complex is completely dissolved in water. The present invention provides a method for improving solubility of curcumin in water, thereby contributing to an increase in availability of curcumin as medicines, cosmetics, and food.

(57) 요약서: 본 발명은 커큐민에 비하여 물에 대한 용해도가 향상된 커큐민-펩타이드 복합체, 커큐민의 물에 대한 용해도를 향상시키는 방법, 상기 복합체의 제조방법, 및 상기 복합체를 포함하는 화장품 조성물 및 건강기능식품에 관한 것이다. 본 발명은 생체친화성과 안전성이 입증된 펩타이드 소재와 기능성 효과가 매우 우수한 천연자원 소재인 커큐민이 링커 화합물을 통하여 결합된 커큐민-펩타이드 복합체를 제공하며, 상기 커큐민-펩타이드 복합체는 물에 완전히 용해된다. 본 발명은 커큐민의 물에 대한 용해도를 향상시키는 방법을 제공함으로써 커큐민의 의약품, 화장품 및 식품으로서의 활용도를 높이는 데 기여할 수 있다.



KE, LR, LS, MW, MZ, NA, RW, SD, SL, 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 (BF, BJ, CF, CG, CI, CM, GA, GN, GQ, GW, KM, ML, MR, NE, SN, TD, TG).

**공개:**

- 국제조사보고서와 함께 (조약 제 21 조(3))
- 청구범위 보정 기한 만료 전의 공개이며, 보정서를 접수하는 경우 그에 관하여 별도 공개함 (규칙 48.2(h))
- 명세서의 서열목록 부분과 함께 (규칙 5.2(a))

## 【명세서】

## 【발명의 명칭】

커큐민 대비 용해도와 기능을 향상시킨 커큐민-펩타이드의 설계 및  
이의 제조방법

5

## 【기술 분야】

본 발명은 커큐민에 비하여 물에 대한 용해도가 향상된 커큐민-  
펩타이드 복합체, 커큐민의 물에 대한 용해도를 향상시키는 방법, 상기  
복합체의 제조방법, 및 상기 복합체를 포함하는 화장품 조성물 및  
10 건강기능식품에 관한 것이다.

## 【배경 기술】

커큐민(curcumin)은 울금(전라남도 진도군의 대표작물)의 주요 약효  
성분으로서 카레, 겨자 등에 포함된 천연 색소이며, 고대로부터 향신료나  
15 염증, 피부질환 등의 민간 치료제로 사용되어 왔다. 커큐민은 강력한  
항산화 기능이 있으며, 구조적으로 페놀계의 항산화제에 속하는데 최근  
항암 효과가 밝혀지면서 과학계의 관심이 집중되고 있다. 그러나,  
커큐민은 우수한 생물학적 활성에도 불구하고, 물에 용해되지 않아 생체  
흡수율과 생물학적 이용도(bioavailability)가 극히 저조하여 의약품,  
20 화장품 및 식품으로의 개발이 용이하지 않으며, 이를 극복하기 위하여  
다양한 유도체의 개발을 통한 바이오 활성소재 개발이 활발히 진행 중이다.

펩타이드(Peptide)는 아미노산으로 구성된 단백질의 기능적 최소  
단위로서 생명 신호전달 및 생체 기능 조절에 관여하는 차세대 인체 친화성  
생물소재이다.

25 주로 화학합성법으로 생산되어 생명과학 연구 및 의약품, 기능성  
화장품/식품 & 의료용 소재로 제품화 되어 광범위하게 사용되고 있는  
생물소재이다.

펩타이드는 주로 의약품에서 활용되어 왔으나, 지난 2002년 '세계  
피부 과학회 학술대회'에서 그동안 사용되어 오던 비타민 C보다 생리활성  
30 효과가 뛰어나다는 논문들이 발표되면서 세계적으로 주목받기 시작하였다.  
그러나, 펩타이드는 우수한 기능성 화장품 소재임에도 불구하고 원료

자체가 다른 화장품 원료와 달리 고가이므로 적정 유효농도 이하로 처방됨으로 인해 즉각적인 효능을 볼 수 없어 시장 확대가 제한받고 있는 실정이다.

본 명세서 전체에 걸쳐 다수의 논문 및 특허문헌이 참조되고 그 인용이 표시되어 있다. 인용된 논문 및 특허문헌의 개시 내용은 그 전체로서 본 명세서에 참조로 삽입되어 본 발명이 속하는 기술 분야의 수준 및 본 발명의 내용이 보다 명확하게 설명된다.

### 【발명의 내용】

#### 10 【해결하려는 과제】

이러한 배경 하에서, 본 발명자들은 우수한 생물학적 활성을 갖는 커큐민의 의약품, 화장품 및 식품으로서의 활용도를 높이기 위하여 커큐민의 용해도를 개선하기 위한 연구를 수행하였다. 나아가, 본 발명자들은 펩타이드는 생체친화성과 안전성이 입증된 소재이며, 커큐민은 기능성 효과가 매우 우수한 천연자원 소재이므로 펩타이드-커큐민 복합체를 이용한 제품화는, 두 기능성 소재가 가진 장점을 극대화하고 단점을 상호 극복할 수 있는 융합소재로서 가치가 있는 것으로 판단하였다. 또한, 펩타이드-커큐민 복합체의 대량생산에 의한 원가절감을 통해 제품단가를 낮추면, 시장 확대 및 신규 시장 창출이 가능할 것으로 판단하였다.

20 이에, 본 발명자들은 울금(*Curcuma longa*)에 주로 존재하는 천연 항산화 성분인 커큐민과 피부 상태 개선에 효과가 있는 기능성 펩타이드를 융합한 커큐민-펩타이드 융합 신소재를 개발하였으며, 제조한 커큐민-펩타이드 복합체가 물에 완전히 용해됨을 확인하였고, 상기 커큐민-펩타이드 복합체의 대량생산을 위한 제조 프로토콜을 최적화함으로써, 본 발명을 완성하게 되었다.

따라서, 본 발명의 목적은 커큐민에 비하여 물에 대한 용해도가 향상된 커큐민-펩타이드 복합체를 제공하는 데 있다.

본 발명의 다른 목적은 커큐민의 물에 대한 용해도를 향상시키는 방법을 제공하는 데 있다.

30 본 발명의 또 다른 목적은 커큐민-펩타이드 복합체의 제조방법을 제공하는 데 있다.

본 발명의 또 다른 목적은 상기 커큐민-펩타이드 복합체를 포함하는 항산화 또는 피부상태 개선용 화장품 조성물을 제공하는 데 있다.

본 발명의 또 다른 목적은 상기 커큐민-펩타이드 복합체를 포함하는 건강기능식품을 제공하는 데 있다.

5

본 발명의 다른 목적 및 이점은 하기의 발명의 상세한 설명, 청구범위 및 도면에 의해 보다 명확하게 된다.

### 【과제의 해결 수단】

10        본 발명의 일 양태에 따르면, 본 발명은 (i) 커큐민; 및 (ii) 상기 커큐민과 링커 화합물을 통하여 결합된 2 내지 30개의 아미노산으로 이루어진 펩타이드를 포함하고, 물에 용해되는 것을 특징으로 하는, 커큐민에 비하여 물에 대한 용해도가 향상된 커큐민-펩타이드 복합체를 제공한다.

15

본 발명자들은 우수한 생물학적 활성을 갖는 커큐민의 의약품, 화장품 및 식품으로서의 활용도를 높이기 위하여 커큐민의 용해도를 개선하기 위한 연구를 수행하였다. 나아가, 본 발명자들은 펩타이드는 생체친화성과 안전성이 입증된 소재이며, 커큐민은 기능성 효과가 매우  
20        우수한 천연자원 소재이므로 펩타이드-커큐민 복합체를 이용한 제품화는, 두 기능성 소재가 가진 장점을 극대화하고 단점을 상호 극복할 수 있는 융합소재로서 가치가 있는 것으로 판단하였다. 또한, 펩타이드-커큐민 복합체의 대량생산에 의한 원가절감을 통해 제품단가를 낮추면, 시장 확대 및 신규 시장 창출이 가능할 것으로 판단하였다. 이에, 본 발명자들은  
25        울금(*Curcuma longa*)에 주로 존재하는 천연 항산화 성분인 커큐민과 피부 상태 개선에 효과가 있는 기능성 펩타이드를 융합한 커큐민-펩타이드 융합 신소재를 개발하였으며, 제조한 커큐민-펩타이드 복합체가 물에 완전히 용해됨을 확인하였고, 상기 커큐민-펩타이드 복합체의 대량생산을 위한 제조 프로토콜을 최적화하였다.

30

본 명세서에서 용어, "커큐민[(1,7-bis-(4-hydroxy-3-methoxyphenyl)-1, 6-heptadiene-3,5-dione)]"은 울금의 구근에 포함되어

있는 심황(turmeric)의 주색소 성분을 의미한다.      커큐민은 다양한  
원천으로부터 얻을 수 있으며, 예를 들면 화학적으로 합성될 수 있고,  
식물로부터 분리될 수도 있다.      본 발명의 목적상 상기 커큐민에는  
커큐민과 실질적으로 동일한 활성(예컨대, 항산화능)을 나타내는 한 이의  
5      유도체도 포함된다.

본 발명의 일구현예에 따르면, 상기 펩타이드는 2 내지 20개의  
아미노산을 갖는다.      일특정예에 따르면, 상기 펩타이드는 2 내지 18개의  
아미노산을 가지며, 다른 특정예에서는 2 내지 15개의 아미노산을 갖는다.

본 발명의 다른 구현예에 따르면, 상기 펩타이드들은 피부상태(skin  
10      conditions) 개선 활성을 갖는 펩타이드들이다.

본 발명의 또 다른 구현예에 따르면, 상기 펩타이드는 C-말단에  
카복실기 또는 아세트아마이드를 갖는다.      일특정예에 따르면, 상기  
펩타이드는 서열목록 제1서열 내지 제28서열로 구성된 군으로부터 선택된다.

본 발명의 커큐민-펩타이드 복합체는 상기의 커큐민, 펩타이드 및  
15      이들을 연결하는 링커 화합물을 포함한다.

본 발명의 일구현예에 따르면, 상기 링커 화합물은 생분해성 링커  
화합물이다.      일특정예에 따르면, 상기 링커 화합물은 커큐민과  
에스터(ester) 결합을 형성하며, 체내의 에스터라제(esterase)에 의해  
가수분해 될 수 있다.

본 발명의 일구현예에 따르면, 상기 링커 화합물은  
20      글루타레이트(glutarate)이다.      상기 글루타레이트 링커는 커큐민의  
작용기(예컨대, OH 그룹) 및 펩타이드의 N-말단과 각각 공유결합 하여  
커큐민-펩타이드 복합체를 형성할 수 있다.

본 발명의 일구현예에 따르면, 상기 링커 화합물은 커큐민과 에스터  
25      결합으로 결합되고, 펩타이드의 N-말단과는 펩타이드 결합으로 결합된다.  
예를 들면, 상기 링커 화합물로서 글루타레이트를 이용하는 경우, 링커  
화합물은 커큐민의 OH 그룹과 축합반응(에스터 결합)으로 결합하고,  
펩타이드의 N-말단과도 축합반응으로 결합(펩타이드 결합)함으로써 커큐민-  
펩타이드 복합체가 형성된다.      상기 커큐민-펩타이드 복합체의 예가 하기  
30      도 2 및 3에 도시되어 있다.

본 발명의 일구현예에 따르면, 본 발명의 커큐민-펩타이드 복합체는

항산화 및 피부상태(skin conditions) 개선 활성을 동시에 나타낸다. 특히, 본 발명의 커큐민-펩타이드 복합체는 (i) 용해도 증가 특성뿐만 아니라, (ii) 커큐민과 펩타이드 사이의 상승적(synergistic) 효과로 인하여 커큐민과 펩타이드 단독이 나타내는 효과보다 더 우수한 항산화 및

5 피부상태 개선 활성을 동시에 나타낼 수 있다.

상기 피부상태 개선은 피부 주름 개선, 피부 탄력 개선 및 피부 노화 방지를 포함한다. 하기 실시예에서 확인한 바와 같이, 커큐민-펩타이드 복합체는 세포 독성을 나타내지 않으며(도 8 참조), 비타민 C와 동등한 정도의 강력한 항산화 활성을 나타내고(도 9 및 10 참조), 세포 내

10 지질과산화물을 저해하여 노화를 방지할 수 있으며(도 11 참조), 콜라겐 생합성을 매우 촉진시킬 수 있다(도 12 참조). 특히, 본 발명의 커큐민-펩타이드 복합체를 포함하는 화장품 조성물(피부 외용제)은 주름 개선에 있어 월등한 효능을 나타낼 수 있다(표 10 내지 13 참조).

15 본 발명의 다른 양태에 따르면, 본 발명은 링커 화합물을 통하여 커큐민에 2 내지 30개의 아미노산으로 이루어진 펩타이드를 공유결합시키는 단계를 포함하는 커큐민의 물에 대한 용해도를 향상시키는 방법을 제공한다.

본 발명의 일구현예에 따르면, 상기 링커 화합물은

20 글루타레이트(glutarate)이다.

본 발명의 일구현예에 따르면, 상기 공유결합시키는 단계는 커큐민의 OH기에 링커 화합물을 에스터 결합시키고, 펩타이드의 N-말단에 링커 화합물을 펩타이드 결합시키는 단계이거나; 또는 펩타이드의 N-말단에 링커 화합물을 펩타이드 결합시키고, 커큐민의 OH기에 링커 화합물을

25 에스터 결합시키는 단계이다.

본 발명의 일구현예에 따르면, 상기 공유결합시키는 단계는 하기의 소단계를 포함한다:

(a) 고체상 합성법으로 고체수지 상에서 2 내지 30개의 아미노산으로 이루어진 펩타이드를 합성하는 단계;

30 (b) 단계 (a)에서 합성된 펩타이드에 링커 화합물을 반응시켜 펩타이드의 N-말단에 링커 화합물을 공유결합시키는 단계;

(c) 단계 (b)의 결과물에 커큐민을 반응시켜 커큐민과 링커 화합물이 공유결합 된 커큐민-펩타이드 복합체를 형성시키는 단계; 및

(d) 단계 (c)에서 형성된 커큐민-펩타이드 복합체를 상기 고체수지로부터 분리(cleavage)하는 단계.

- 5 하기 실시예에 나타난 바와 같이, 커큐민은 물에 용해되지 않으나, 커큐민에 링커 화합물을 통하여 펩타이드를 공유결합 시키는 경우에는 물에 완전히 용해된다(도 4 내지 7 참조). 따라서, 커큐민에 링커 화합물을 통하여 펩타이드를 공유결합 시키는 것으로 커큐민의 물에 대한 용해도를 향상시킬 수 있으며, 이로 인하여 커큐민의 의약품, 화장품 및
- 10 식품으로서의 활용도를 높일 수 있다.

본 발명의 또 다른 양태에 따르면, 본 발명은 다음의 단계를 포함하는 커큐민-펩타이드 복합체의 제조방법을 제공한다:

(a) 고체상 합성법으로 고체수지 상에서 2 내지 30개의 아미노산으로 이루어진 펩타이드를 합성하는 단계;

- 15 (b) 단계 (a)에서 합성된 펩타이드에 링커 화합물을 반응시켜 펩타이드의 N-말단에 링커 화합물을 공유결합 시키는 단계;

(c) 단계 (b)의 결과물에 커큐민을 반응시켜 커큐민과 링커 화합물이 공유결합 된 커큐민-펩타이드 복합체를 형성시키는 단계; 및

- (d) 단계 (c)에서 형성된 커큐민-펩타이드 복합체를 상기
- 20 고체수지로부터 분리(cleavage)하는 단계.

본 발명의 제조방법의 특징은, 고체상 수지에 펩타이드를 먼저 합성하고, 여기에 링커 화합물을 결합시킨 다음 커큐민을 링커 화합물에 결합시키는 것이다.

- 본 발명의 단계 (a)에서는 고체수지상(예컨대, 아마이드기가 도입된
- 25 수지)에서 보호기(예컨대, Fmoc)로 보호된 아미노산들을 순차적으로 커플링 하여 펩타이드를 합성한다. 이러한 펩타이드 합성 반응들은 일반적으로 알려진 펩타이드 합성법을 이용할 수 있다(Synthetic Peptides: A User's Guide, G.R. Grant, ed., Freeman & Co., 1992, pp.77-183). 아미노산의 커플링은 DIC(diisopropyl carbodiimide), HOBt(Hydroxybenzotriazole),
- 30 DMF(dimethylformamide), HBTU(o-benzotriazole-N,N, N',N'-tetramethyluronium hexafluorophosphate) 및 DIEA(N,N-

Diisopropylethylamine) 등의 커플링 시약 중에서 선택적으로 사용하여 실시할 수 있다.

본 발명의 일구현예에 따르면, 상기 수지의 치환율은 0.8-1.0 mmole/g이다.

- 5        본 발명의 일구현예에 따르면, 단계 (a)는 2-4 당량의 Fmoc-아미노산을 커플링 시약의 존재 하에서 반응시키며, 각 Fmoc-아미노산과 Fmoc-아미노산 사이의 커플링 시간은 2-5 시간이다. 커플링의 온도는 28-32℃일 수 있다.

- 10        본 발명의 단계 (b)에서는 단계 (a)의 합성물에 링커 화합물을 반응시켜 펩타이드의 N-말단에 링커 화합물을 공유결합시킨다.

본 발명의 일구현예에 따르면, 링커 화합물로는 글루타릭 무수물을 사용할 수 있으며, 이에 따라 단계 (b)에서는 상기 펩타이드의 N-말단에 글루타레이트가 공유결합된 화합물이 형성된다. 일특정예에서는 링커 화합물을 2-4 당량 사용할 수 있다.

- 15        본 발명의 일구현예에 따르면, 단계 (b)의 반응은 DIEA (N,N-Diisopropylethylamine)의 존재 하에서 실시한다. 반응 시간은 1-3시간이 적당하며, 반응온도는 32-37℃가 적당하다.

- 20        본 발명의 단계 (c)에서는 헥사펩타이드와 링커 화합물의 결합물에 커큐민을 반응시켜 커큐민과 링커 화합물이 공유결합된 커큐민-헥사펩타이드 복합체를 형성시킨다.

단계 (c)의 반응은 단계 (b)와 동일하게 실시할 수 있으며, 이때 DMAP(4-Dimethylaminopyridine)를 사용하여 반응을 실시할 수 있다.

- 25        본 발명의 단계 (d)에서는 형성된 커큐민-펩타이드 복합체를 수지로부터 분리(cleavage)한다. 분리는 TFA/DCM, TFA/TIS/물, TFA/TIS/DCM 또는 TFA/물을 사용하여 실시할 수 있다.

본 발명의 일구현예에 따르면, 본 발명의 방법은 상기 단계 (d)의 결과물(조 커큐민-펩타이드 복합체)을 가지고 크로마토그래피(예컨대, 고성능액체크로마토그래피)를 실시하여 커큐민-펩타이드 복합체를 분리 정제하는 단계를 더 포함한다.

- 30        일특정예에 따르면, 상기 크로마토그래피를 이용한 정제는 하기 표 2에 기재된 각 수치에  $\pm 2$ (또는  $\pm 1$ )를 한 수치범위의 조건으로 실시할

수 있다.

본 발명의 일구현예에 따르면, 본 발명의 제조방법은 초음파 처리 하에서 실시된다.

5           본 발명의 또 다른 양태에 따르면, 본 발명은 상기 커큐민-펩타이드 복합체를 유효성분으로 포함하는 향산화 또는 피부상태(skin conditions) 개선용 화장품 조성물을 제공한다.

본 발명의 일구현예에 따르면, 상기 피부상태 개선은 피부 주름 개선, 피부 탄력 개선 또는 피부 노화 방지이다.

10           본 발명의 화장품 조성물에 포함되는 성분은 유효성분으로서의 커큐민-펩타이드 복합체 이외에 화장품 조성물에 통상적으로 이용되는 성분들을 포함하며, 예컨대 향산화제, 안정화제, 용해화제, 비타민, 안료 및 향료와 같은 통상적인 보조제, 그리고 담체를 포함한다.

본 발명의 화장품 조성물은 당업계에서 통상적으로 제조되는 어떠한 제형으로도 제조될 수 있으며, 예를 들어, 용액, 현탁액, 유탁액, 페이스트, 15 젤, 크림, 로션, 파우더, 비누, 계면활성제-함유 클린싱, 오일, 분말 파운데이션, 유탁액 파운데이션, 왁스 파운데이션 및 스프레이 등으로 제형화 될 수 있으나, 이에 한정되는 것은 아니다. 보다 상세하게는, 화장수(수렴 화장수, 유연 화장수 등), 크림, 로션, 세럼, 에센스, 영양젤 20 또는 마사지 크림의 제형으로 제조될 수 있다.

본 발명의 제형이 페이스트, 크림 또는 젤인 경우에는 담체 성분으로서 동물성유, 식물성유, 왁스, 파라핀, 전분, 트라칸트, 셀룰로오스 유도체, 폴리에틸렌 글리콜, 실리콘, 벤토나이트, 실리카, 탈크 또는 산화아연 등이 이용될 수 있다.

25           본 발명의 제형이 파우더 또는 스프레이인 경우에는 담체 성분으로서 락토스, 탈크, 실리카, 알루미늄 히드록시드, 칼슘 실리케이트 또는 폴리아미드 파우더가 이용될 수 있고, 특히 스프레이인 경우에는 추가적으로 클로로플루오로히드로카본, 프로판/부탄 또는 디메틸 에테르와 같은 추진체를 포함할 수 있다.

30           본 발명의 제형이 용액 또는 유탁액인 경우에는 담체 성분으로서 용매, 용해화제 또는 유탁화제가 이용되고, 예컨대 물, 에탄올,

이소프로판올, 에틸 카보네이트, 에틸 아세테이트, 벤질 알코올, 벤질 벤조에이트, 프로필렌글리콜, 1,3-부틸글리콜 오일, 글리세롤 지방족 에스테르, 폴리에틸렌 글리콜 또는 소르비탄의 지방산 에스테르가 있다.

본 발명의 제형이 현탁액인 경우에는 담체 성분으로서 물, 에탄올  
5 또는 프로필렌글리콜과 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.

본 발명의 제형이 계면-활성제 함유 클린징인 경우에는 담체  
10 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  
15 에스테르 등이 이용될 수 있다.

본 발명의 또 다른 양태에 따르면, 본 발명은 상기 커큐민-펩타이드 복합체를 포함하는 건강기능식품을 제공한다.

상기 건강기능식품은 특별히 이에 제한되지 않으나, 건강 기능성  
20 식품, 영양 보조제, 영양제, 파머푸드(pharmafood), 건강보조식품, 뉴트라슈티칼(nutraceutical), 디자인어 푸드, 식품 첨가제 등의 모든 형태의 식품이 될 수 있는데, 바람직하게는 육류, 소세지, 빵, 초코렛, 캔디류, 스낵류, 과자류, 피자, 라면, 기타 면류, 껌류, 아이스크림류를 포함한 낙농제품, 각종 스프, 음료수, 차, 드링크제, 알콜 음료 및 비타민  
25 복합제 등이 될 수 있다.

본 발명의 건강기능식품은 식품제조 시에 통상적으로 첨가되는 성분을 포함하며, 예를 들어, 단백질, 탄수화물, 지방, 영양소, 조미제 및 향미제를 포함한다. 상술한 탄수화물의 예는 모노사카라이드, 예를 들어, 포도당, 과당 등; 디사카라이드, 예를 들어 말토 스, 슈크로스, 올리고당  
30 등; 및 폴리사카라이드, 예를 들어 덱스트린, 사이클로덱스트린 등과 같은 통상적인 당 및 자일리톨, 소르비톨, 에리트리톨 등의 당알콜이다.

향미제로서 천연 향미제 [타우마틴, 스테비아 추출물(예를 들어 레바우디오시드 A, 글리시르히진 등)] 및 합성 향미제(사카린, 아스파르탐 등)를 사용할 수 있다. 상기 외에 본 발명의 식품은 여러 가지 영양제, 5 비타민류, 광물(전해질), 식이성분, 합성 풍미제 및 천연 풍미제 등의 풍미제, 착색제 및 증진제(치즈, 초콜릿 등), 펙트산 및 그의 염, 알긴산 및 그의 염, 유기산, 보호성 콜로이드 증점제, pH 조절제, 안정화제, 방부제, 글리세린, 알콜, 탄산음료에 사용되는 탄산화제 등을 함유할 수 있다.

## 10 【발명의 효과】

본 발명의 특징 및 이점을 요약하면 다음과 같다:

- (i) 본 발명은 생체친화성과 안전성이 입증된 펩타이드 소재와 기능성 효과가 매우 우수한 천연자원 소재인 커큐민이 링커 화합물을 통하여 결합된 커큐민-펩타이드 복합체를 제공하며, 상기 커큐민-펩타이드 15 복합체는 물에 완전히 용해된다.
- (ii) 본 발명은 커큐민의 물에 대한 용해도를 향상시키는 방법을 제공함으로써 커큐민의 의약품, 화장품 및 식품으로서의 활용도를 높이는데 기여할 수 있다.
- (iii) 본 발명은 항산화 및 피부상태 개선 효능을 지닌 피부 멀티 20 기능 개선 소재로서, 두 기능성 소재가 가진 장점을 극대화하고, 단점을 상호 극복할 수 있는 융합소재에 관한 것이다.
- (iv) 본 발명은 커큐민-펩타이드의 분리 정제방법을 통해 상업적 대량 생산이 가능하다.

## 25 【도면의 간단한 설명】

도 1은 본 발명의 정제공정을 통하여 생산된 커큐민-헥사펩타이드 복합체의 크로마토그래피 결과를 보여준다.

도 2는 커큐민-아지렐린 복합체의 개략적인 합성과정을 보여준다.

도 3은 커큐민-구리 펩타이드 복합체의 개략적인 합성과정을 30 보여준다.

도 4는 커큐민이 물에 용해되지 않음을 보여준다.

도 5는 커큐민-아지렐린 복합체가 물에 완전히 용해되었음을 보여준다.

도 6은 커큐민-구리 펩타이드 복합체가 물에 완전히 용해되었음을 보여준다.

5 도 7은 다양한 커큐민-펩타이드 복합체가 물에 완전히 용해되었음을 보여준다.

도 8은 커큐민-펩타이드 복합체의 피부세포 안전성 시험결과를 보여준다. 피부세포에서의 안전성을 MTT 시험법으로 시험하였으며, 농도는 최고 100  $\mu$ M에서 2배씩 희석하여 최저 6.25  $\mu$ M까지 처리하였다.

10 A: 각질형성세포, B: 섬유아세포.

도 9는 비타민과 커큐민의 항산화 효과를 보여준다. A: 비타민, B: 커큐민.

도 10은 커큐민-펩타이드 복합체의 항산화 효과를 보여준다.

도 11은 커큐민-펩타이드 복합체의 지질과산화 저해 활성을 보여준다.

15 도 12는 커큐민-펩타이드 복합체의 콜라겐 생합성 촉진 효과를 보여준다.

#### 【발명을 실시하기 위한 구체적인 내용】

이하, 실시예를 통하여 본 발명을 더욱 상세히 설명하고자 한다.

20 이들 실시예는 오로지 본 발명을 보다 구체적으로 설명하기 위한 것으로서, 본 발명의 요지에 따라 본 발명의 범위가 이들 실시예에 의해 제한되지 않는다는 것은 당업계에서 통상의 지식을 가진 자에 있어서 자명할 것이다.

본 명세서 전체에 걸쳐, 특정 물질의 농도를 나타내기 위하여 사용되는 "%"는 별도의 언급이 없는 경우, 고체/고체는 (중량/중량) %, 고체/액체는 (중량/부피) %, 액체/액체는 (부피/부피) %이다.

#### 실시예

제조예. 초음파 합성기를 이용한 커큐민-펩타이드 복합체 제조

30 사용원료

Fmoc-Glu(tbu)-OH, Fmoc-Met-OH, Fmoc-Gln(Trt)-OH, Fmoc-Arg(Pbf)-

OH 등의 원료는 GLS로부터 구매하였고, 커큐민은 TCI에서 구매하였으며, 글루타레이트는 Sigma에서 구입하였으며, 일반 원료(DMF, DIEA, NMP, DCM)는 대정화금으로부터 구매하여 사용하였다.

## 5 Fmoc 탈보호

Fmoc의 탈보호는 20% 피페리딘/DMF을 사용하였으며, 세척은 DCM(Dichloromethane), DMF(dimethylformamide) 등을 사용하여 5분씩 수행하였다.

## 10 아미노산 결합

커플링 시약(coupling reagent)으로 HOBt/DIC(Hydroxybenzotriazole/diisopropylcarbodiimide)를 사용하여 서열목록 제1서열의 아미노산 서열로 아미노산들을 순서대로 고체상 합성법에 의하여 순서대로 결합하였다. 반응시간은 4시간 이상, 합성 온도는 30℃로 하였다.

15

## 분리(Cleavage)

반응완료 후 전체 분리는 70% TFA/DCM 용액을 사용하여 2 시간 동안 분리하고, 에테르 중에서 추출하고 건조하여 비-정제된 펩타이드를 얻었다.

## 20 커큐민-펩타이드 복합체 합성

N-말단의 특성에 따른 레진(아마이드 레진 등)을 선별한 후 합성 스케일에 따라 초음파 합성기(Sonicator, 애니젠 제작)를 선택하여 반응기에 넣고, 0.5-1시간 동안 DMF 용매에서 레진을 스웰링하였다. 펩타이드는 SPPS(Solid Phase Peptide Synthesis)를 이용하였다.

25 구체적으로, 스웰링 한 후 Fmoc을 20% 피페리딘을 이용하여 10분간 2회 실시하고, DMF를 이용하여 2분간 6회에 걸쳐 깨끗하게 세척하였다. 상기 레진에 펩타이드 합성용 Fmoc-X1-OH를 DMF에 완벽히 녹인 다음 레진에 넣어주었다. 커플링 시약을 아미노산의 당량에 따라 넣어주었다. 이후, 초음파 합성기 이용하여 4시간 이상 합성을 실시하였다.

30 반응이 종료되면 용매를 벤트(Vent)시킨 후 깨끗한 DMF로 2분씩 6회에 걸쳐 세척하였다. 이후, 상기의 방법과 같은 방법으로 Fmoc-X2-OH,

Fmoc-X3-OH, Fmoc-X4-OH ... 등의 아미노산으로 커플링을 실시하였다.

세척 후, 합성한 레진 상태에서 글루타릭 무수물(Glutaric anhydride)을

3당량, DIEA를 사용하여 자체 제작한 대용량 초음파 합성기로 2시간

실시하였으며, 온도는 35℃를 유지하며 반응시켰다. 이후, 커큐민을 위와

5 같은 방법으로 3당량, DMAP를 사용하여 위의 물질에 합성을 실시하였다.

합성 완료 후 TFA/DCM 용액을 이용하여 2시간 동안 분리를 실시한 후 얻은

조(Crude) 제품을 HPLC를 이용하여 정제한 후 커큐민-펩타이드 복합체

물질을 확보하였다. 구체적인 합성공정은 다음과 같았다.

# 10 【표 1】

|                                      |
|--------------------------------------|
| • 레진 치환율: 0.9 mmole/g                |
| • 아미노산: 3 eq                         |
| • 커플링 시약: DIC, HOBt, DMF, HBTU, DIEA |
| • 커플링 시간: 4시간                        |
| • 커플링 온도: 30℃                        |
| • 분리: 70% TFA/DCM, 1시간               |
| 합성시간 절약 및 수율 상승                      |

## 정제

수득된 펩타이드는 하기 조건의 그라디언트(gradient) 조건하에서 HPLC로 정제 후 동결 건조하여 목적 펩타이드를 수득하였다.

- 15 A. 기기: Shimadzu 8A (5 cm \* 25 cm)/8A (prep(dia 5 cm))
- B. 용매의 조성: 버퍼 A=0.1% TFA/아세트나이트릴, 버퍼 B=0.1% TFA/H<sub>2</sub>O
- C. 흐름속도(Flow rate): 50-140 ml/분
- D. 컬럼: Silicagel C18 reverse phase
- 20 E. 그라디언트 테이블

## 【표 2】

| Time(min) | H <sub>2</sub> O(%) | Acetonitrile(%) |
|-----------|---------------------|-----------------|
| 0-5       | 95→68               | 5→32            |
| 5-12      | 68→56               | 32→44           |
| 12-17     | 5→5                 | 95→95           |
| 18-26     | 55→35               | 95→5            |

중간 규모(10 mmole) 펩타이드 합성에서 얻어진 결과를 바탕으로 펩타이드 의약품 원료에 대한 대규모(100 mmole) 합성을 수행하여 스케일 상승(scale-up)을 실시하였다. 합성된 조펩타이드는 HPLC 정제조건을 확립하여 정제를 하여 최종목적물을 생산하였다(도 1). 커큐민-펩타이드 복합체 중에서, 커큐민-아지렐린 복합체 및 커큐민-구리 펩타이드 복합체의 개략적인 합성과정 및 이들의 화학식을 각각 도 2 및 3에 나타내었다.

실시에 1. 커큐민-펩타이드 복합체의 용해도 측정

#### 10 <1-1> 커큐민의 용해도 측정

하기 표 3에 표시된 바와 같이 다양한 농도의 DMSO 용액을 준비하였다. 1 mg이 담긴 E. 튜브에 준비한 용액 90  $\mu$ l를 넣고 용해 여부를 확인하였다(E. 튜브에 100  $\mu$ l를 만들어 두었으나, 전체를 옮길 시 오차가 발생함을 고려하여 90  $\mu$ l만을 취하여 녹였다).

#### 15 【표 3】

| DMSO 농도 | 70%         | 80%        | 90%        |
|---------|-------------|------------|------------|
| DMSO 부피 | 70 $\mu$ l  | 80 $\mu$ l | 90 $\mu$ l |
| 3DW 부피  | 30 $\mu$ l  | 20 $\mu$ l | 10 $\mu$ l |
| 전체 부피   | 100 $\mu$ l |            |            |

그 결과, 도 4에 나타난 바와 같이, 커큐민 단독은 70% 이상의 DMSO에서만 용해되었으며, 물에는 용해되지 않았다.

#### 20 <1-2> 커큐민-아지렐린 복합체의 용해도 확인

시험물질 1 mg이 담긴 E. 튜브에 표 3에 계산되어있는 양의 물(3차

증류수)을 넣고 용해 여부를 확인하였다.

그 결과, 도 5에 나타난 바와 같이, 커큐민 단독은 물에 용해되지 않았으나, 커큐민-아지렐린 복합체는 물에 잘 용해되었음을 확인할 수 있었다.

#### 5 <1-3> 커큐민-구리 펩타이드 복합체의 용해도 확인

커큐민-구리 펩타이드 복합체(curcumin-Glutarate-GHK-Cu)의 용해도가 용매에 따라 어떻게 달라지는지를 확인하였다. 이를 위하여, 표 4에 기재된 바와 같이 다양한 종류의 용매를 준비하고, 1 mg의 시험물질에 준비한 용매를 넣고 용해 정도를 관찰하였다.

10

【표 4】

|   | 용매                     | 부피   | 샘플 양 |
|---|------------------------|------|------|
| 1 | 아세트나이트릴(with 0.1% TFA) | 1 mL | 1 mg |
| 2 | DMSO                   | 1 mL | 1 mg |
| 3 | 아세트나이트릴                | 1 mL | 1 mg |
| 4 | 3차 증류수(with 0.1% TFA)  | 1 mL | 1 mg |

그 결과, 도 6에 나타난 바와 같이, 커큐민-구리 펩타이드 복합체는 DMSO 및 아세트나이트릴에는 용해되지 않았으나, 3차 증류수에는 완전히 용해되었음을 확인할 수 있었다.

15

#### <1-4> 다양한 커큐민-펩타이드 복합체의 용해도 확인

물에 대한 용해도가 낮은 커큐민에 펩타이드를 결합시켜 그 용해도가 달라짐을 확인하기 위하여, E. 튜브에 커큐민 또는 커큐민-펩타이드 복합체(표 5)를 1 mg씩 넣은 후 3차 증류수 700  $\mu$ l를 첨가하였다. 1분간 볼텍싱 한 다음 용해도를 확인하였다.

20

그 결과, 표 5 및 도 7에 나타난 바와 같이, 커큐민의 경우 3차 증류수와 혼합하고 볼텍싱을 하여도 녹지 않고 바닥에 가라앉았으나, 27종의 커큐민-펩타이드 복합체는 모두 물에 잘 녹음을 확인할 수 있었다.

25

【표 5】

|    | 커큐민-펩타이드 복합체                | 분자량    | 펩타이드명                | 물에 대한 용해도 |
|----|-----------------------------|--------|----------------------|-----------|
| 0  | 커큐민(대조군)                    | 368.38 | -                    | 용해되지 않음   |
| 1  | 커큐민-GHR                     | 368.4  | 커큐민-Tripeptide-3     | 용해됨       |
| 2  | 커큐민-LPTV                    | 428.5  | 커큐민-Tetrapeptide-1   | 용해됨       |
| 3  | 커큐민-GEFG                    | 358.4  | 커큐민-Tetrapeptide-4   | 용해됨       |
| 4  | 커큐민-DKYV                    | 523.6  | 커큐민-Tetrapeptide-2   | 용해됨       |
| 5  | 커큐민-VPAA                    | 356.2  | 커큐민-Tetrapeptide-5   | 용해됨       |
| 6  | 커큐민-KTKS                    | 563.3  | 커큐민-Pentapeptide-3   | 용해됨       |
| 7  | 커큐민-ARHLFW                  | 829.0  | 커큐민-Hexapeptide-1    | 용해됨       |
| 8  | 커큐민-VEPIPY                  | 716.8  | 커큐민-Hexapeptide-6    | 용해됨       |
| 9  | 커큐민-VGVAPG                  | 736.9  | 커큐민-Oligopeptide-3   | 용해됨       |
| 10 | 커큐민-STKTK                   | 706.8  | 커큐민-Hexapeptide-8    | 용해됨       |
| 11 | 커큐민-VQGEBSNDK               | 1047.0 | 커큐민-Nonapeptide-1    | 용해됨       |
| 12 | 커큐민-EMQRR-amide             | 846.4  | 커큐민-Hexapeptide-7    | 용해됨       |
| 13 | 커큐민-EMQRR-amide             | 717.3  | 커큐민-Pentapeptide-11  | 용해됨       |
| 14 | 커큐민-MQRR-amide              | 588.3  | 커큐민-Tetrapeptide-11  | 용해됨       |
| 15 | 커큐민-QRR-amide               | 457.2  | 커큐민-Tripeptide-11    | 용해됨       |
| 16 | 커큐민-KHG                     | 340.1  | 커큐민-Tripeptide-12    | 용해됨       |
| 17 | 커큐민-GKH                     | 340.1  | 커큐민-Tripeptide-13    | 용해됨       |
| 18 | 커큐민-GQPR-amide              | 456.2  | 커큐민-Tetrapeptide-11  | 용해됨       |
| 19 | 커큐민-KAKA-amide              | 415.2  | 커큐민-Tetrapeptide-12  | 용해됨       |
| 20 | 커큐민-AKAK-amide              | 415.2  | 커큐민-Tetrapeptide-13  | 용해됨       |
| 21 | 커큐민-GRKG-amide              | 415.2  | 커큐민-Tetrapeptide-14  | 용해됨       |
| 22 | 커큐민-KLAKK-amide             | 585.4  | 커큐민-Pentapeptide-12  | 용해됨       |
| 23 | 커큐민-KKKKKKKKKGKH (K9GKH)    | 1493.0 | 커큐민-Dodecapeptide-1  | 용해됨       |
| 24 | 커큐민-KKKKKKKKKKKGKH (K10GKH) | 1621.1 | 커큐민-Tridecapeptide-1 | 용해됨       |
| 25 | 커큐민-POG (O-하이드록시프롤린)        | 285.1  | 커큐민-Tripeptide-14    | 용해됨       |
| 26 | 커큐민-GPO (O-하이드록시프롤린)        | 285.1  | 커큐민-Tripeptide-15    | 용해됨       |
| 27 | 커큐민-GOP (O-하이드록시프롤린)        | 285.1  | 커큐민-Tripeptide-16    | 용해됨       |

DMSO를 물과 혼합한 상태에서 녹이는 방법과, 커큐민을 DMSO에 먼저 녹인 뒤 물을 첨가하는 방법에 따른 용해도에서의 큰 차이를 관찰하기는  
 5 힘들다. 두 방법 모두에서 커큐민은 70%의 DMSO에서는 용해되나, 100% 물에는 용해되지 않는다. 그러나, 상기 실시예 1에서 확인된 바와 같이 커큐민-펩타이드 복합체는 모두 물에 잘 용해되었다.

이러한 결과는 커큐민에 펩타이드를 결합시켜 복합체를 형성시키는 경우 커큐민의 용해도가 현저히 증가될 수 있음을 보여준다.

## 실시예 2. 커큐민-펩타이드 복합체의 인간 피부세포 안전성 시험

커큐민-아지텔린 복합체에 대하여 인간 피부구성 세포들 즉,

각질형성세포(keratinocyte)와 섬유아세포(fibroblast)에 세포주인 HaCaT 세포주와 CCD-986sk에 대하여 안전성 혹은 세포 독성 존재 여부를 검사하기 위해 MTT 시험을 실시하였다. 이를 위하여 인간 각질형성 세포주 HaCaT 세포와 섬유아세포인 CCD-986sk를 24웰 플레이트에  $5 \times 10^3$  세포/웰과  $5 \times 10^4$  세포/웰씩 동일하게 혈구계수기(hemacytometer)를 이용하여 계수한 후 분주해 배양하였다. 10% FBS를 함유하는 DMEM에서 48시간 동안 배양하여 배양용기 표면적의 50% 만큼 배양되면, 커큐민-아지렐린 복합체가 적절한 농도로 함유되어 있는 배지에서 24시간 동안 더 배양하였다. 배양 후 MTT(3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyl tetrazolium bromide, Sigma M5655) 용액(2.5 mg/ml)을  $50 \mu\text{l}$  첨가하고 3시간 동안 추가로 배양하였다. 이후, 세포 배양액을 전부 버리고,  $200 \mu\text{l}$ 의 디메틸설폭사이드(DMSO, Sigma D2650)를 각 웰 당  $200 \mu\text{l}$  처리하여 교반한 후,  $100 \mu\text{l}$  씩을 96 웰로 취하여 ELISA(Enzyme-Linked Immunosorbent Assay)로 570 nm에서 흡광도를 측정하였다. 세포에 대한 독성 혹은 증식을 촉진하는 정도는 순수한 물을 사용한 대조군의 흡광 강도를 기준으로 백분율로 표시하였다.

도 8에 나타난 바와 같이, 커큐민-아지렐린 복합체는 처리 농도  $100 \mu\text{M}$  까지 세포독성이 없었다. 특히, 섬유아세포에서 커큐민-아지렐린 복합체  $50 \mu\text{M}$ 에서 대조군 대비 약 20% 이상 세포 증식능을 보였으며, 이는 화장품 원료로서 세포독성이 없으면서, 피부교원질을 생산하는 섬유아세포의 증식을 촉진시킴으로써 주름개선에도 효과가 있음을 의미한다(도 8의 B).

### 실시예 3. 커큐민-펩타이드 복합체의 항산화 시험

유해산소(toxic oxygen species)라고도 하는 활성산소종(reactive oxygen species, ROS)은 호흡 등과 같은 생리작용에 의해 세포에서 생성되는 독성물질로 끈임없이 생산되고 소멸하며, 정상적인 상태에서는 3-5% 정도로 존재한다. 이런 활성산소종은 슈퍼옥시드 라디칼(Superoxide radical,  $\text{O}_2^-$ ), 하이드록시라디칼(hydroxyl radical,  $\text{HO}^\bullet$ )과 같은 자유라디칼(free radical : 화학적으로 최외각 전자궤도에 쌍을 이루고 있지 않은 원자나 분자로 매우 불안정하여 높은 반응성을 가짐)의 형태로 존재하거나

혹은 과산화수소(hydrogen peroxide,  $H_2O_2$ )나 일중항산소(Singlet radical,  $^1O_2$ )와 같이 쌍을 이룬 전자를 가진 화합물의 형태로 존재한다. 활성산소는 생리계 내에서 세균을 살균하는 생체 방어 작용을 하는 장점도 있지만, 일반적으로 생체 내에서 산화를 일으켜 질병의 원인이 되는 유해한 작용을 한다. 이 활성산소는 생물분자를 공격하여 세포나 조직에 피해를 주며, 노화나 각종 성인병질환에 관여하는 여러 종류의 질병을 야기한다는 보고도 있다. 이러한 활성산소에 의한 산화작용을 억제 할 수 있는 항산화제에 관한 연구가 미용업계에서도 활발하게 진행 되고 있으며, 항산화력이 강력한 천연물이나 물질들의 연구개발은 항노화 물질로서 각광받고 있다.

본 시험방법은 에탄올상에서 DPPH(1,1-Diphenyl-2-picrylhydrazyl, Sigma D9132-1G)가 발생시키는 자유라디칼에 대한 소거능을 시험함으로써 항산화 효과의 직접적인 작용 정도를 파악할 수 있는 시험법이다. 화합물 DPPH는 에탄올 내에서 자유라디칼을 발생하는데, 이에 일정 농도의 시료와 혼합하여 자유라디칼의 양이 어느 정도 감소하는지 확인하였다. 구체적으로, 에탄올 0.4 ml에 0.1 mM의 DPPH용액 0.5 ml, 그리고 일정농도로 희석된 추출물 0.1 ml를 첨가하고, 10초간 강하게 볼텍싱한 후 냉암소에서 30분간 반응시켰다. ELISA를 이용하여 517 nm에서 흡광도를 측정하며, 항산화능의 정도는 에탄올을 사용한 대조군(음성대조군)의 흡광강도를 기준으로 백분율로 표시하였다.

#### [수학식 1]

자유라디칼 활성 저해율(%) =  $100 - \{(\text{각 시료액의 반응흡광도} / \text{공시료액의 반응흡광도}) \times 100\}$

커큐민-아지렐린 복합체의 항산화 시험을 DPPH 시험법을 통하여 확인한 결과, 커큐민을 비타민과 비교하였을 때 커큐민은 비타민과 유사한 항산화 효과가 있음을 확인하였다(도 9). 커큐민-아지렐린 복합체 역시 항산화 효과가 대조군 대비 매우 우수한 항산화력을 가지며(도 10). 커큐민-아지렐린 복합체의 경우 50  $\mu M$ 에서 이미 고점에 도달하였으며, 시너지 효과가 있음을 확인하였다(도 10). 이러한 결과는 비타민 C와 유사한 항산화력을 가지면서도 피부세포에 안정하여 항노화 화장품 원료로서 매우 가치가

높음을 의미한다.

#### 실시예 4. 지질과산화(Lipid peroxidation) 시험방법

지질과산화는 동물이나 식물에서 세포 손상을 일으키는 메커니즘으로 잘 알려져 있다. 따라서, 이러한 지질과산화를 시험하기 위하여 TBARS(Thiobarbituric Acid Reactive Substance) 키트를 이용하여 시험하였다. 지질과산화는 세포에서 산화적 스트레스의 지시자로서 지질과산화의 자연적인 두 가지 산물인 MDA나 4-HNE(4-hydroxynonenal)와 같은 더욱 복잡하고 반응성이 높은 물질을 형성하며 분해된다. TBARS 키트는 직접적으로 MDA(Malondialdehyde)를 측정하는 기법으로, 구체적인 실험방법으로는 적정 농도의 커큐민-아지렐린 복합체를 인간 각질형성 세포주에 처리한 후 그 배양액을 수득하여 사용하였다. 시험방법은 다음과 같았다. 100  $\mu$ l의 시료와 MDA 스탠다드를 E-튜브에 분주하고, SDS 용해 용액을 100  $\mu$ l 추가하였다. 가볍게 믹스한 후 상온에서 5분 동안 반응시키고, 250  $\mu$ l의 TBA 시약을 각 웰에 추가한 다음, E-튜브의 뚜껑을 닫은 후 95°C서 45-60분간 반응시켰다. 반응이 끝나면 얼음에서 5분간 추가 반응시킨 후, 3,000 rpm으로 15분 동안 원심분리 후 상등액을 취하여 분석하였다. 200  $\mu$ l씩 96 웰에 옮긴 후 532 nm로 읽었다.

세포 내 지질과산화는 세포 손상의 직접적인 원인이 된다. 그렇기 때문에 세포 내 지질과산화를 저해한다는 것은 세포 손상을 줄이고, 노화나 질병으로부터 보호할 수 있다는 의미가 된다. 커큐민-아지렐린 복합체의 지질과산화에 대한 실험 결과, 대조군에 비하여 커큐민-아지렐린을 100  $\mu$ M 처리 시 지질과산화를 약 20% 이상 줄여주는 것을 확인하였다(도 11).

#### 실시예 5. 커큐민-펩타이드 복합체의 콜라겐 생합성 개선 확인

사람 피부를 구성하는 섬유아세포에서 분비되는 다양한 콜라겐은 노화 과정 및 주름형성과 밀접한 관련이 있다. 섬유아세포를 이용한 콜라겐 합성 정도를 통해 시험물질의 항주름 활성을 검증할 수 있다. 콜라겐의 합성 정도를 확인하기 위하여 인간섬유아세포(CCD986-SK) 배양 시 커큐민-펩타이드 복합체를 25  $\mu$ M로 처리하여 세포 내 콜라겐의 생성 증가 정도를 비교 시험하는 방법으로 Procollagen type I C-peptide EIA 키트(Precoated,

Takara Biomedical Co)를 사용하여 측정하였다. 주름개선 생리활성에 대한 양성 대조군으로 한국식품의약품안전청(KFDA)으로부터 주름개선 기능성으로 인증받은 레티놀을 사용하여 레티놀 보다 30% 이상의 콜라겐 생합성 촉진 효과가 있는지 여부를 평가하였다.

- 5            커큐민-아지렐린 복합체의 콜라겐 생합성을 ELISA 키트로 측정한 결과, 커큐민-아지렐린 복합체의 경우 대조군 대비 약 30% 이상 콜라겐 생합성을 촉진함을 확인하였다(도 12).

실시에 6. 커큐민-펩타이드 복합체를 함유하는 화장료 조성물의 효능 평가

- 10            상기의 실험들로 피부생리 활성이 확인된 커큐민-아지렐린 복합체를 함유하는 조성물의 효능을 확인하기 위하여 일반적으로 많이 사용되는 화장품 제형인 화장수(표 6), 로션(표 7), 크림(표 8) 및 에센스(표 9)의 제형에 커큐민-아지렐린 복합체를 0.5% (5g/kg) 적용하여 화장품들을 제조하였다. 각 제형의 제조 방법은 다음과 같았다.

- 15            화장수를 제조하기 위하여, 표 6의 성분 11번에 2, 3, 4 및 8번을 순서대로 투입하고 교반하여 용해시켰다(용해물 1). 5번을 60℃ 정도로 가열하여 용해시킨 후, 여기에 10번을 투입하여 용해시켰다(용해물 2). 상기 용해물 2를 용해물 1에 투입하였다. 마지막으로 1, 6, 7 및 9번을 투입하여 충분히 교반한 뒤 숙성시켰다.

- 20            로션을 제조하기 위하여, 표 7의 성분 10, 11, 13 및 16번을 혼합 교반하면서 80-85℃에서 가열하여 제조부에 투입한 후 유화시키고, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9 및 12번을 80-85℃에서 가열 용해한 후 투입시켜 유화시켰다. 유화가 끝나면 교반기를 이용하여 교반하면서 50℃까지 냉각한 뒤 15번을 투입하고, 45℃까지 냉각한 뒤 14번을 투입하고, 35℃에서 1번을 투입하여  
25            25℃까지 냉각한 뒤 숙성시켰다.

- 크림을 제조하기 위하여, 표 8의 성분 12, 13, 14 및 16번을 혼합 교반하면서 80-85℃에서 가열하여 제조부에 투입한 후 유화시키고, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10 및 11번을 80-85℃에서 가열하여 용해한 후 15번을 투입하고 교반한 다음, 그 결과물을 제조부에 투입하고 유화시켰다. 유화가  
30            끝나면 교반기를 이용하여 교반하면서 35℃까지 냉각하고, 1번을 투입하여 25℃까지 냉각한 뒤 숙성시켰다.

에센스를 제조하기 위하여, 표 9의 성분 2, 3, 4, 5 및 6번을 일정한 온도에서 균질화하여, 비이온계 양친매성 지질을 얻었다. 상기 비이온계 양친매성 지질과 1, 7, 8 및 14번을 혼합하고, 일정한 온도에서 균질화하여 마이크로플루이다이저를 통과시키고, 이어 9번을 일정한 온도에서 서서히

5 첨가하여 균질화한 후 다시 마이크로플루이다이저에 재차 통과시켰다. 그리고, 10, 11, 12 및 13번을 투입하여 분산시켜 안정화시키고 숙성시켰다.

제조된 조성물들을 가지고 인체 피부 적용 시 주름개선 효과를 시험하기 위하여 50세 이상의 건강한 성인 남녀 16명을 대상으로 14일간 커큐민-아지렐린 복합체 2종을 함유하는 조성물들과 대조군으로 함유하지 않은 조

10 성물들을 1일 2회 1g (혹은 ml) 씩 눈가 주름에 바르는 방법으로 시험하였다. 14일간 도포 후 개선 효과는 눈가 주름의 개선 정도에 대한 만족도 조사를 통해 매우 효과, 약간 효과, 무 효과 및 주름 악화의 4단계로 수치화 하였다.

15 【표 6】

| 번호 | 원료             | 함량(중량 %)   |
|----|----------------|------------|
| 1  | 커큐민-아지렐린 복합체   | 0.5%       |
| 2  | 글리세린           | 3.0%       |
| 3  | 부틸렌 글리콜        | 2.0%       |
| 4  | 프로필렌 글리콜       | 2.0%       |
| 5  | 폴리옥시에칠렌 경화피마자유 | 1.0%       |
| 6  | 에탄올            | 10.0%      |
| 7  | 트리에탄올아민        | 0.1%       |
| 8  | 방부제            | 미량         |
| 9  | 색소             | 미량         |
| 10 | 향료             | 미량         |
| 11 | 정제수            | up to 100% |

【표 7】

| 번호 | 원료 | 함량(중량 %) |
|----|----|----------|
|----|----|----------|

|    |                           |            |
|----|---------------------------|------------|
| 1  | 커큐민-아지렐린 복합체              | 0.5%       |
| 2  | 밀납                        | 1.0%       |
| 3  | 폴리솔베이트 60                 | 1.5%       |
| 4  | 솔비탄 세스퀴올레이트               | 0.5%       |
| 5  | 유동 파라핀                    | 10.0%      |
| 6  | 소르비탄 스테아레이트               | 1.0%       |
| 7  | 친유형 모노스테아린산 글리세린          | 0.5%       |
| 8  | 스테아린산                     | 1.5%       |
| 9  | 글리세릴스테아레이트/피이지-400 스테아레이트 | 1.0%       |
| 10 | 프로필렌글리콜                   | 3.0%       |
| 11 | 카르복시폴리머                   | 0.1%       |
| 12 | 트리에탄올아민                   | 0.2%       |
| 13 | 방부제                       | 미량         |
| 14 | 색소                        | 미량         |
| 15 | 향료                        | 미량         |
| 16 | 정제수                       | up to 100% |

【표 8】

| 번호 | 원료                                    | 함량(중량 %) |
|----|---------------------------------------|----------|
| 1  | 커큐민-아지렐린 복합체                          | 0.5%     |
| 2  | 스테아린산                                 | 2.0%     |
| 3  | 세틸알콜                                  | 2.0%     |
| 4  | 글리세릴모노스테아레이트                          | 2.0%     |
| 5  | 폴리옥시에틸렌소르비탄모노스테아레이트                   | 0.5%     |
| 6  | 솔비탄세스퀴올레이트                            | 0.5%     |
| 7  | 글리세릴모노스테아레이트/글리세릴스테아레이트/폴리옥시에틸렌스테아레이트 | 1.0%     |
| 8  | 왁스                                    | 1.0%     |
| 9  | 유동파라핀                                 | 4.0%     |

|    |                  |            |
|----|------------------|------------|
| 10 | 스쿠알란             | 4.0%       |
| 11 | 카프릴릭/카프릭트리글리세라이드 | 4.0%       |
| 12 | 카르복시비닐폴리머        | 0.3%       |
| 13 | 부틸렌글리콜           | 5.0%       |
| 14 | 글리세린             | 3.0%       |
| 15 | 트리에탈올아민          | 0.5%       |
| 16 | 정제수              | up to 100% |

【표 9】

| 번호 | 원료            | 함량(중량 %)   |
|----|---------------|------------|
| 1  | 커큐민-아지렐린 복합체  | 0.5%       |
| 2  | 시토 스테롤        | 1.7%       |
| 3  | 폴리글리세릴 2-올레이트 | 1.5%       |
| 4  | 세라마이드         | 0.7%       |
| 5  | 스테아레스-4       | 1.2%       |
| 6  | 콜레스테롤         | 1.5%       |
| 7  | 디세틸포스페이트      | 0.4%       |
| 8  | 농글리세린         | 5.0%       |
| 9  | 마카다미아 오일      | 15.0%      |
| 10 | 카르복시비닐폴리머     | 0.2%       |
| 11 | 산탄검           | 0.2%       |
| 12 | 방부제           | 미량         |
| 13 | 향료            | 미량         |
| 14 | 정제수           | up to 100% |

- 실험결과, 하기 표 10 내지 13에 나타난 바와 같이, 커큐민-아지렐린 복합체가 들어 있는 조성물 사용군들에서 높은 주름 개선효과를 확인할 수 있었다. 구체적으로, 대조군으로 사용된 조성물에서는 주목할 만한 주름 개선효과가 나타나지 않은 반면, 커큐민-아지렐린 복합체를 0.5% 함유하는 조성물들에서는 일관되게 주름개선에 대한 효과가 나타났다. 특히, 크림

과 에센스 제형에서는 매우 효과라고 응답한 비율이 전체 사용의 50%를 넘었다.

【표 10】

커큐민-펩타이드 복합체 함유 화장수의 피부 주름 개선효과

|                        |       |      |       |
|------------------------|-------|------|-------|
| 대조군 조성물                | 매우 효과 | 0 명  | 0%    |
|                        | 약간 효과 | 1 명  | 6.25% |
|                        | 효과 없음 | 14 명 | 87.5% |
|                        | 악화    | 1 명  | 6.25% |
| 커큐민-펩타이드<br>복합체 함유 조성물 | 매우 효과 | 4 명  | 25%   |
|                        | 약간 효과 | 10 명 | 62.5% |
|                        | 효과 없음 | 2 명  | 12.5% |
|                        | 악화    | 0 명  | 0%    |

5

【표 11】

커큐민-펩타이드 복합체 함유 로션의 피부 주름 개선효과

|                        |       |      |        |
|------------------------|-------|------|--------|
| 대조군 조성물                | 매우 효과 | 0 명  | 0%     |
|                        | 약간 효과 | 3 명  | 18.75% |
|                        | 효과 없음 | 11 명 | 68.75% |
|                        | 악화    | 2 명  | 12.5%  |
| 커큐민-펩타이드<br>복합체 함유 조성물 | 매우 효과 | 5 명  | 31.25% |
|                        | 약간 효과 | 10 명 | 62.5%  |
|                        | 효과 없음 | 1 명  | 6.25%  |
|                        | 악화    | 0 명  | 0%     |

【표 12】

## 커큐민-펩타이드 복합체 함유 크림의 피부 주름 개선효과

|                        |       |      |        |
|------------------------|-------|------|--------|
| 대조군 조성물                | 매우 효과 | 0 명  | 0%     |
|                        | 약간 효과 | 1 명  | 6.25%  |
|                        | 효과 없음 | 14 명 | 87.5%  |
|                        | 악화    | 1 명  | 6.25%  |
| 커큐민-펩타이드<br>복합체 함유 조성물 | 매우 효과 | 9 명  | 56.25% |
|                        | 약간 효과 | 4 명  | 25%    |
|                        | 효과 없음 | 3 명  | 18.75% |
|                        | 악화    | 0 명  | 0%     |

【표 13】

## 커큐민-펩타이드 복합체 함유 에센스의 피부 주름 개선효과

|                        |       |      |        |
|------------------------|-------|------|--------|
| 대조군 조성물                | 매우 효과 | 1 명  | 6.25%  |
|                        | 약간 효과 | 1 명  | 6.25%  |
|                        | 효과 없음 | 14 명 | 87.5%  |
|                        | 악화    | 0 명  | 0%     |
| 커큐민-펩타이드<br>복합체 함유 조성물 | 매우 효과 | 8 명  | 50%    |
|                        | 약간 효과 | 5 명  | 31.25% |
|                        | 효과 없음 | 3 명  | 18.75% |
|                        | 악화    | 0 명  | 0%     |

- 5           이상으로 본 발명의 특정한 부분을 상세히 기술하였는 바, 당업계의 통상의 지식을 가진 자에게 있어서 이러한 구체적인 기술은 단지 바람직한 구현 예일 뿐이며, 이에 본 발명의 범위가 제한되는 것이 아닌 점은 명백하다. 따라서, 본 발명의 실질적인 범위는 첨부된 청구항과 그의 등가물에 의하여 정의된다고 할 것이다.

**【특허청구범위】****【청구항 1】**

(i) 커큐민; 및 (ii) 상기 커큐민과 링커 화합물을 통하여 결합된 2 내지 30 개의 아미노산으로 이루어진 펩타이드를 포함하고, 물에 용해되는 것을 특징으로 하는, 커큐민에 비하여 물에 대한 용해도가 향상된 커큐민-펩타이드 복합체.

**【청구항 2】**

제 1 항에 있어서, 상기 링커 화합물은 글루타레이트(glutarate)인 것을 특징으로 하는 커큐민-펩타이드 복합체.

**【청구항 3】**

제 1 항에 있어서, 상기 링커 화합물은 커큐민과 에스터 결합하고, 펩타이드의 N-말단과는 펩타이드 결합하는 것을 특징으로 하는 커큐민-펩타이드 복합체.

**【청구항 4】**

제 1 항에 있어서, 상기 펩타이드는 2 내지 15 개의 아미노산으로 이루어진 것을 특징으로 하는 커큐민-펩타이드 복합체.

**【청구항 5】**

제 1 항에 있어서, 상기 펩타이드는 서열목록 제 1 서열 내지 제 28 서열로 구성된 군으로부터 선택되는 것을 특징으로 하는 커큐민-펩타이드 복합체.

**【청구항 6】**

제 1 항에 있어서, 상기 커큐민-펩타이드 복합체는 항산화 및 피부상태(skin conditions) 개선 활성을 동시에 나타내는 것을 특징으로 하는 커큐민-펩타이드 복합체.

**【청구항 7】**

링커 화합물을 통하여 커큐민에 2 내지 30 개의 아미노산으로 이루어진 펩타이드를 공유결합 시키는 단계를 포함하는 커큐민의 물에 대한 용해도를 향상시키는 방법.

5     **【청구항 8】**

제 7 항에 있어서, 상기 링커 화합물은 글루타레이트(glutarate)인 것을 특징으로 하는 방법.

10     **【청구항 9】**

제 7 항에 있어서, 상기 공유결합 시키는 단계는 커큐민의 OH 기에 링커 화합물을 에스터 결합시키고, 펩타이드의 N-말단에 링커 화합물을 펩타이드 결합시키는 단계; 또는 펩타이드의 N-말단에 링커 화합물을 펩타이드 결합시키고, 커큐민의 OH 기에 링커 화합물을 에스터 결합시키는 단계인 것을 특징으로 하는 방법.

15

**【청구항 10】**

제 7 항에 있어서, 상기 펩타이드는 서열목록 제 1 서열 내지 제 28 서열로 구성된 군으로부터 선택되는 것을 특징으로 하는 방법.

20     **【청구항 11】**

다음의 단계를 포함하는 커큐민-펩타이드 복합체의 제조방법:

(a) 고체상 합성법으로 고체수지 상에서 2 내지 30개의 아미노산으로 이루어진 펩타이드를 합성하는 단계;

(b) 단계 (a)에서 합성된 펩타이드에 링커 화합물을 반응시켜

25     펩타이드의 N-말단에 링커 화합물을 공유결합 시키는 단계;

(c) 단계 (b)의 결과물에 커큐민을 반응시켜 커큐민과 링커 화합물이 공유결합 된 커큐민-펩타이드 복합체를 형성시키는 단계; 및

(d) 단계 (c)에서 형성된 커큐민-펩타이드 복합체를 상기 고체수지로부터 분리(cleavage)하는 단계.

30

**【청구항 12】**

제 11 항에 있어서, 상기 제조방법은 초음파 처리 하에서 실시되는 것을 특징으로 하는 제조방법.

【청구항 13】

5 제 11 항에 있어서, 상기 단계 (a)는 2-4 당량의 Fmoc-아미노산을 커플링 시약의 존재 하에서 반응시키며, 각 Fmoc-아미노산과 Fmoc-아미노산 사이의 커플링 시간은 2-5 시간인 것을 특징으로 하는 제조방법.

【청구항 14】

10 제 11 항에 있어서, 상기 단계 (b)의 링커 화합물은 글루타릭 무수물(glutaric anhydride)인 것을 특징으로 하는 제조방법.

【청구항 15】

15 제 11 항에 있어서, 상기 방법은 단계 (d) 이후에, 크로마토그래피를 통하여 단계 (d)의 결과물로부터 커큐민-펩타이드 복합체를 분리 정제하는 단계를 더 포함하는 것을 특징으로 하는 제조방법.

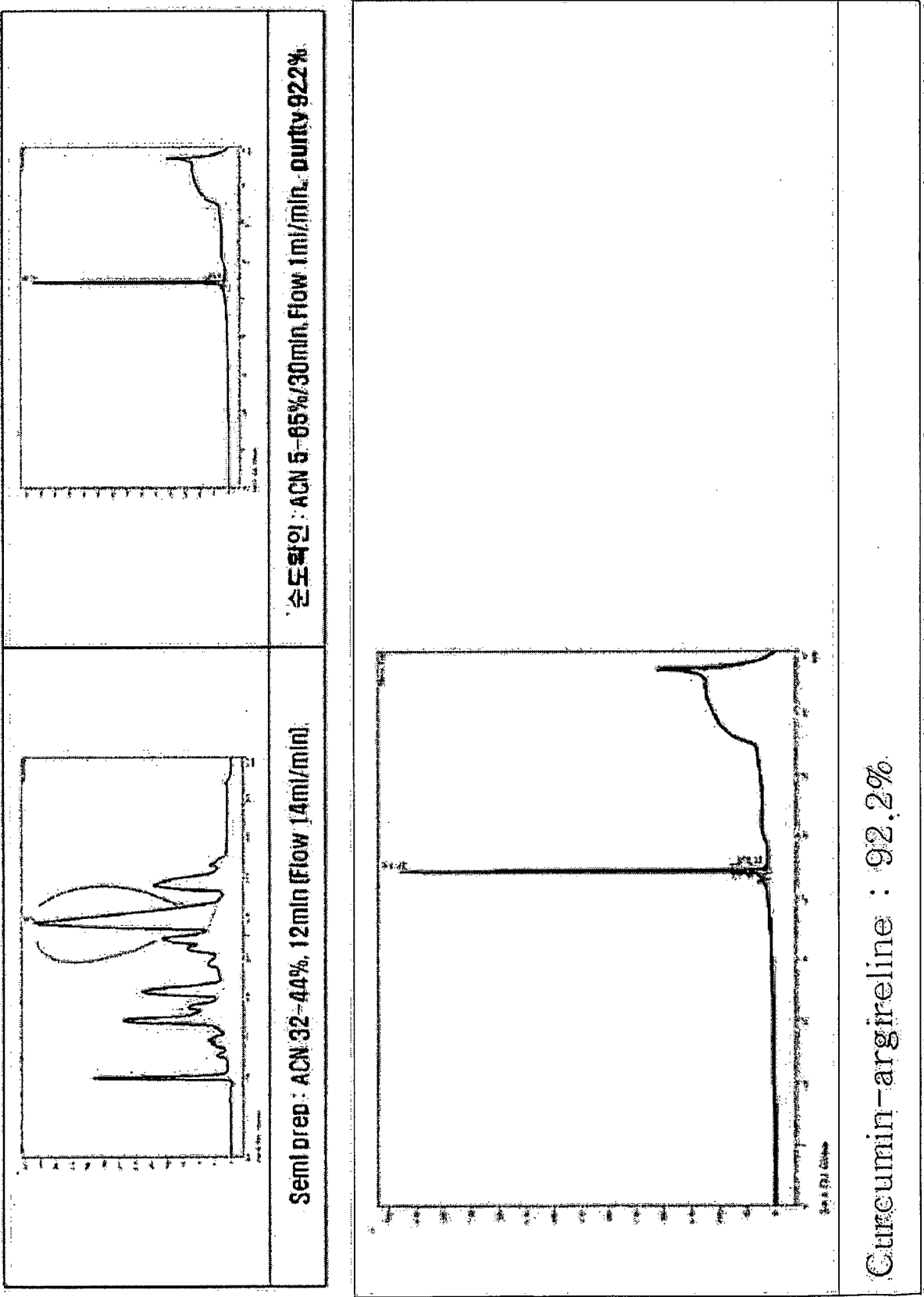
【청구항 16】

20 제 1 항 내지 제 6 항 중 어느 한 항의 커큐민-펩타이드 복합체를 유효성분으로 포함하는 향산화 또는 피부상태(skin conditions) 개선용 화장품 조성물.

【청구항 17】

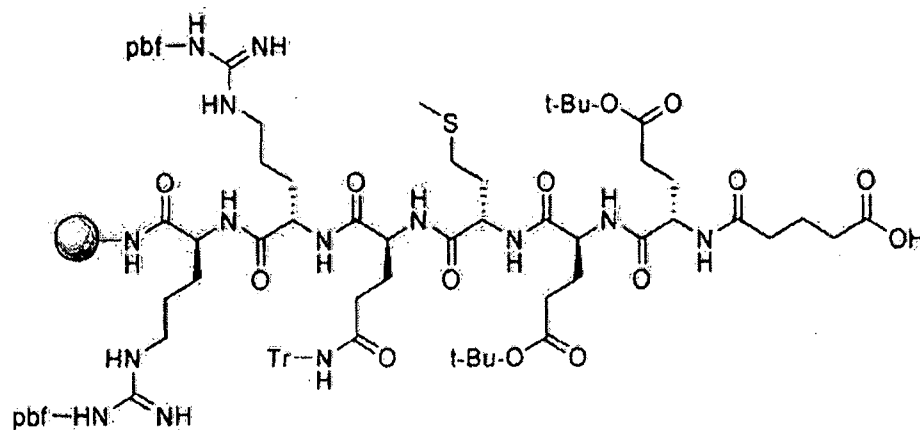
25 제 1 항 내지 제 6 항 중 어느 한 항의 커큐민-펩타이드 복합체를 포함하는 건강기능식품.

도. 1

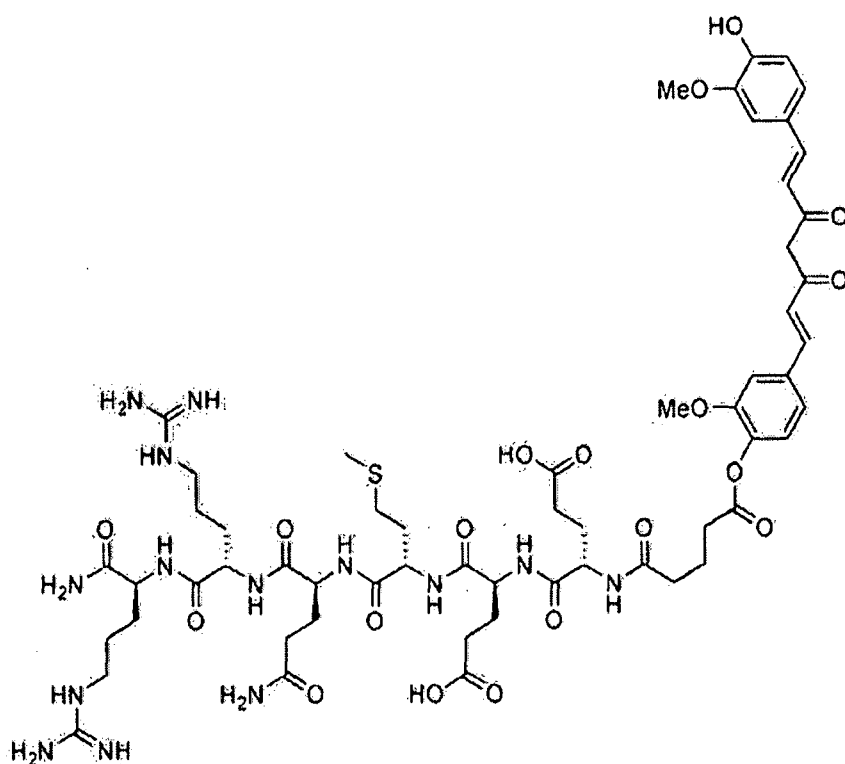


**도. 2**

1. Amide resin:  
HOBt, DIC  
Fmoc-Glu(tBu)-OH, Fmoc-Glu(tBu)-OH, Fmoc-Met-OH, Fmoc-Gln(Trt)-OH,  
Fmoc-Arg(pbf)-OH, Fmoc-Arg(pbf)-OH
2. Piperidine/DMF (20:80)
3. DIEA, Glutamic anhydride



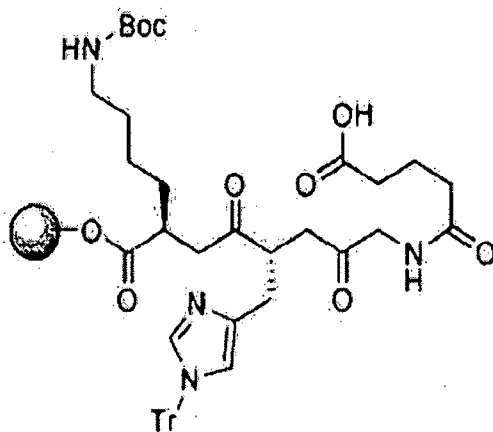
4. Curcumin, DMAP, DCM, DIC  
5. TFA/DCM/DW (70:29:1)



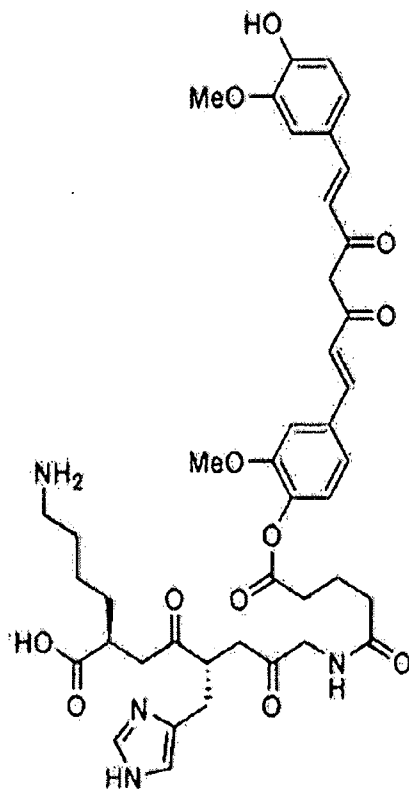
3/12

## 도 3

1. Trt resin;  
HOBT, DIC  
Fmoc-Gly-OH, Fmoc-His(Trt)-OH, Fmoc-Lys(Boc)-OH
2. Piperidine/DMF (20:80)
3. DIEA, Glutaric anhydride

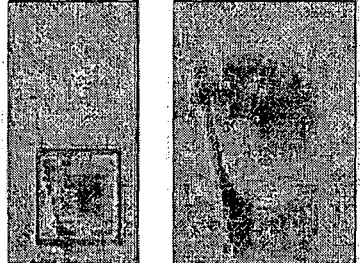
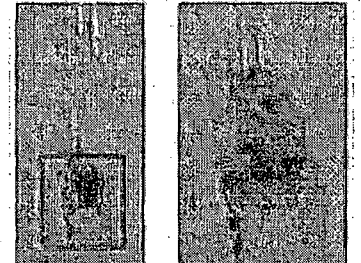
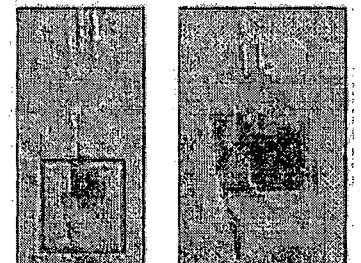


4. Curcumin, DMAP, DCM, DIC
5. TFA/DCM/DW (50:49:1)

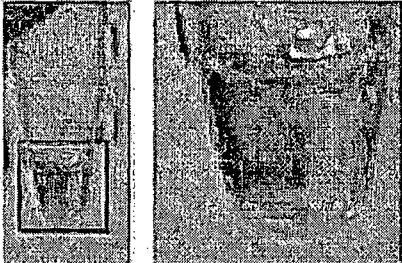


4/12

## 도 4

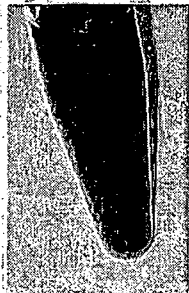
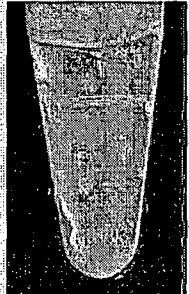
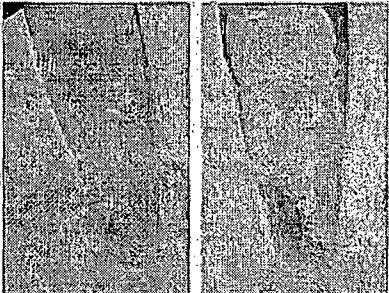
| 용매                 | 사진 (축소/부분확대)                                                                        | 결과                                   |
|--------------------|-------------------------------------------------------------------------------------|--------------------------------------|
| DMSO 90%           |    | 처리 직후 매우 잘 녹음                        |
| DMSO 80%           |    | 처리 직후 매우 잘 녹음                        |
| DMSO 70%           |  | 처리 직후에는 침전물이 조금<br>보이나, 시간이 지나면 녹아있음 |
| 100% 물<br>(3차 증류수) |  | 일정시간 경과 이후에도 침전물<br>존재(잘 녹지 않음)      |

## 도 5

| 사진 (축소/부분확대)                                                                        | 결과            |
|-------------------------------------------------------------------------------------|---------------|
|  | 물에 녹인 직후 잘 녹음 |

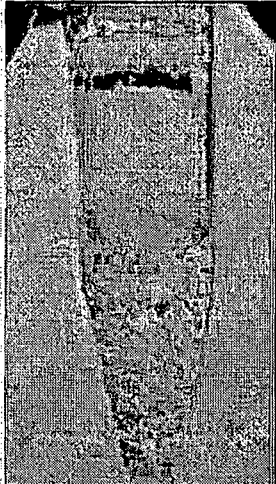
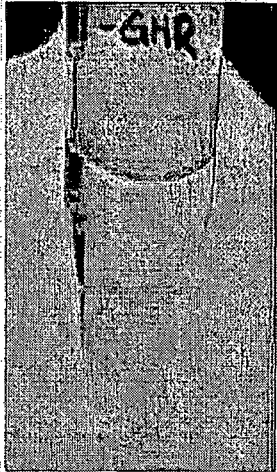
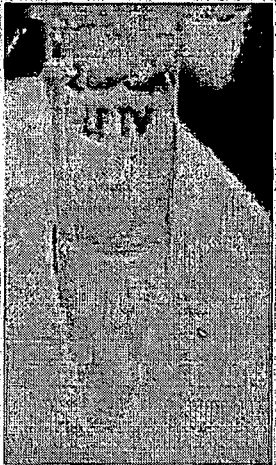
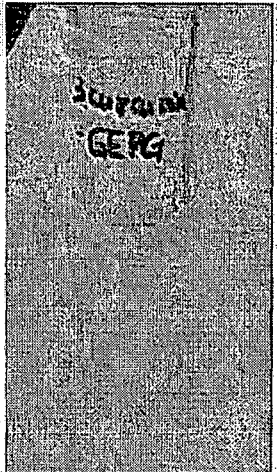
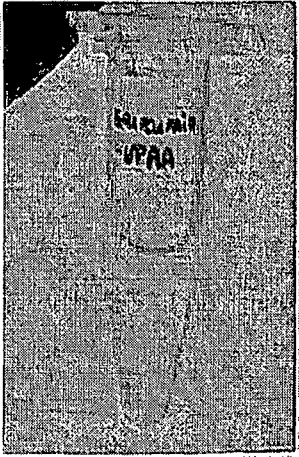
5/12

## 도 6

| 용매                           | 사진                                                                                  | 결과                                                       |
|------------------------------|-------------------------------------------------------------------------------------|----------------------------------------------------------|
| DMSO                         |    | DMSO에는 진한 청록색(색이 너무 짙어 검게 보임)을 띠며 원심분리 시 석출됨을 확인 (녹지 않음) |
| 3차 증류수 (with 0.1% TFA)       |   | 완전히 용해되어 석출되지 않음                                         |
| Acetonitrile                 |  | 전부 용해되지 않아 원심분리 시 sample이 석출됨을 확인                        |
| Acetonitrile (with 0.1% TFA) |  | 전부 용해되지 않아 원심분리 시 sample이 석출됨을 확인                        |

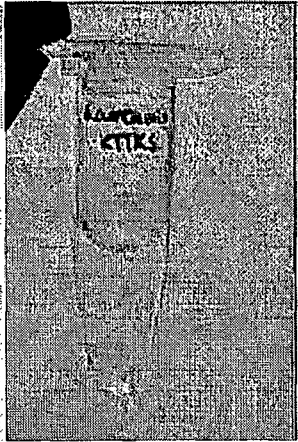
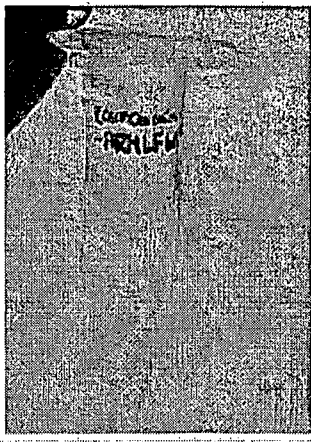
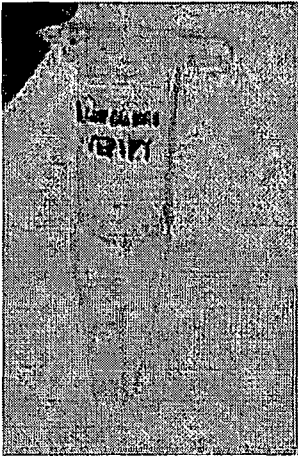
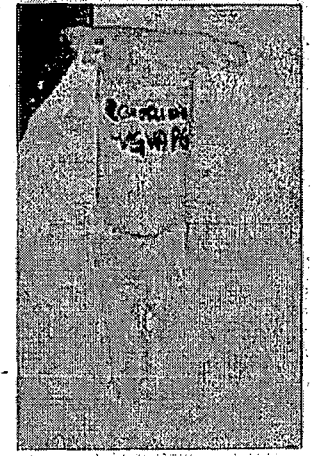
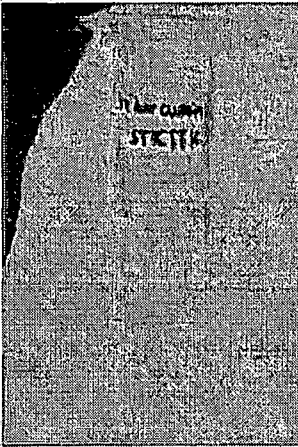
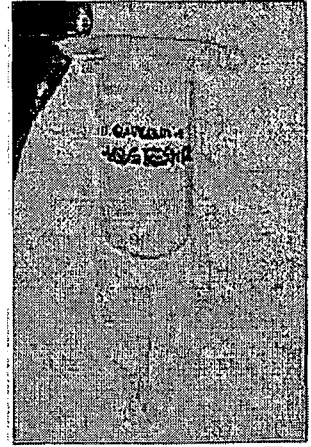
6/12

## 도 7a

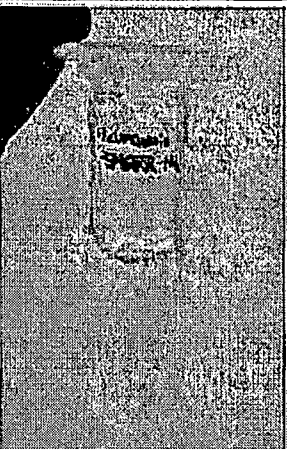
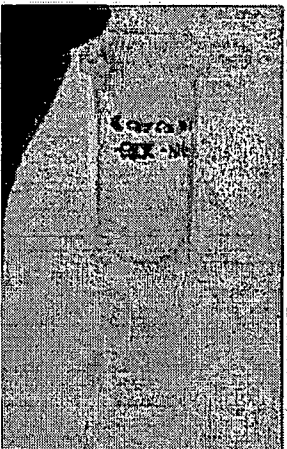
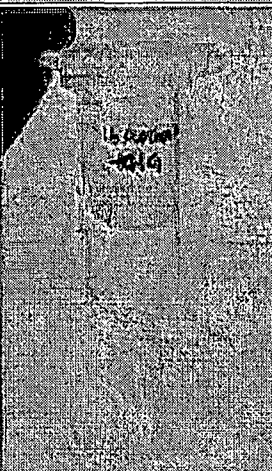
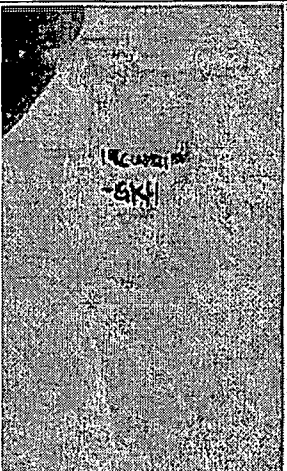
| Sample name          | Picture                                                                             | Sample name          | Picture                                                                               |
|----------------------|-------------------------------------------------------------------------------------|----------------------|---------------------------------------------------------------------------------------|
| 0. Curcumin          |    | 1. Curcumin<br>-GHR  |    |
| 2. Curcumin<br>-LPTV |  | 3. Curcumin<br>-GEPG |  |
| 4. Curcumin<br>-DKV  |  | 5. Curcumin<br>-VPAA |  |

7/12

## 도 7b

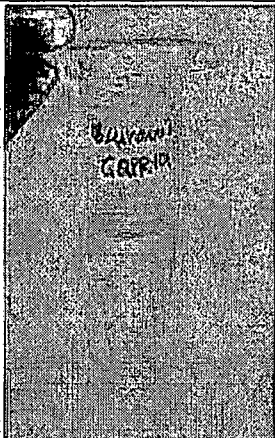
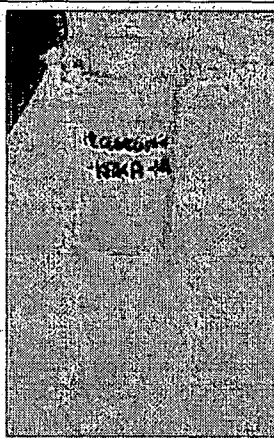
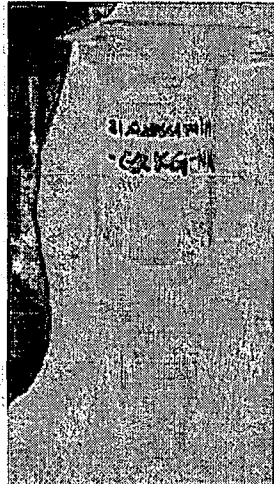
| Sample name            | Picture                                                                             | Sample name                | Picture                                                                               |
|------------------------|-------------------------------------------------------------------------------------|----------------------------|---------------------------------------------------------------------------------------|
| 6. Curcumin<br>-KTKS   |    | 7. Curcumin<br>-ARHLFW     |    |
| 8. Curcumin<br>-VEPIRY |   | 9. Curcumin<br>-VGVAPG     |   |
| 10. Curcumin<br>-STKTK |  | 11. Curcumin<br>-VQGEESNDK |  |

도 7c

| Sample name                             | Picture                                                                             | Sample name                            | Picture                                                                               |
|-----------------------------------------|-------------------------------------------------------------------------------------|----------------------------------------|---------------------------------------------------------------------------------------|
| 12. Curcumin<br>-EEMQRR-NH <sub>2</sub> |    | 13. Curcumin<br>-EMQRR-NH <sub>2</sub> |    |
| 14. Curcumin<br>-MQRR-NH <sub>2</sub>   |  | 15. Curcumin<br>-QRR-NH <sub>2</sub>   |  |
| 16. Curcumin<br>-KHG                    |  | 17. Curcumin<br>-GKH                   |  |

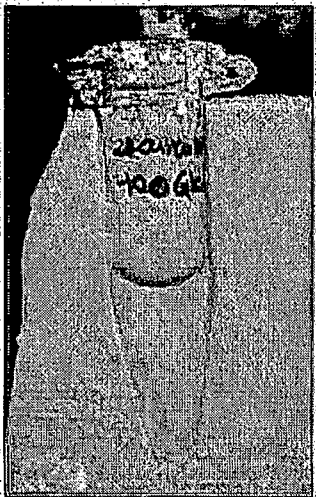
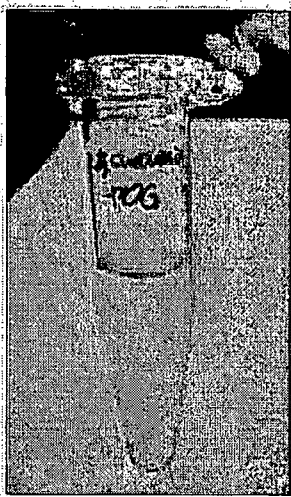
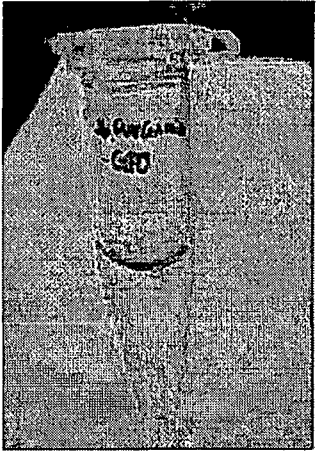
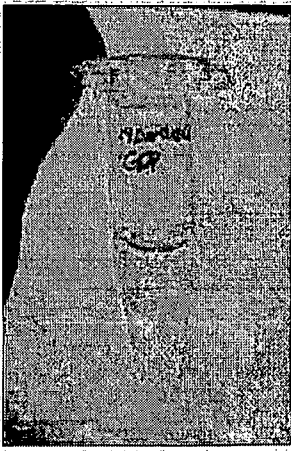
9/12

## 도 7d

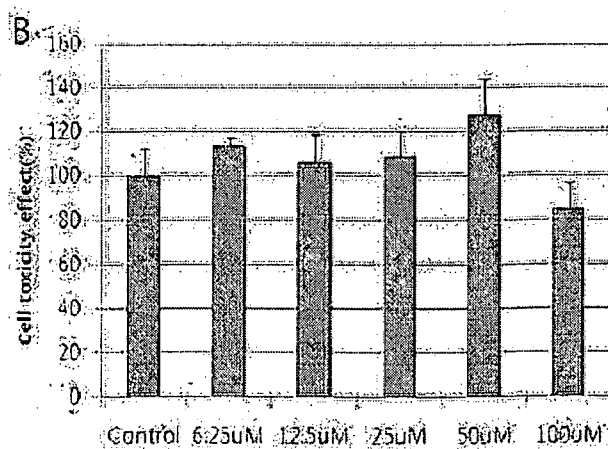
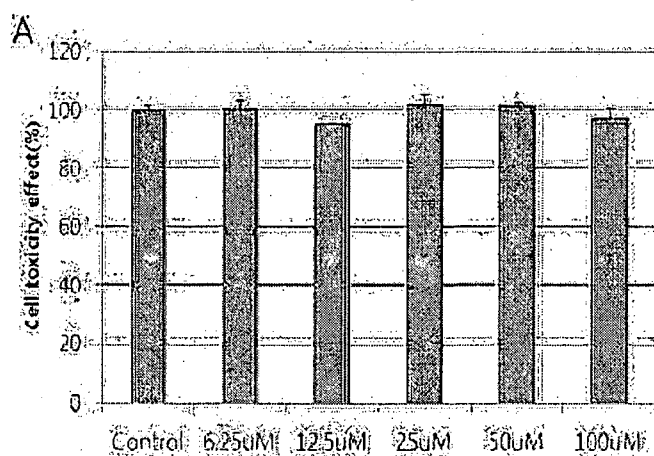
| Sample name                            | Picture                                                                             | Sample name                                | Picture                                                                               |
|----------------------------------------|-------------------------------------------------------------------------------------|--------------------------------------------|---------------------------------------------------------------------------------------|
| 18. Curcumin<br>-GQPR-NH <sub>2</sub>  |    | 19. Curcumin<br>-KAKA-NH <sub>2</sub>      |    |
| 20. Curcumin<br>-AKAK-NH <sub>2</sub>  |   | 21. Curcumin<br>-GRKG-NH <sub>2</sub>      |   |
| 22. Curcumin<br>-KLAKK-NH <sub>2</sub> |  | 23. Curcumin<br>-KKKKKKKKKKGK<br>H (K9GKH) |  |

10/12

## 도 7e

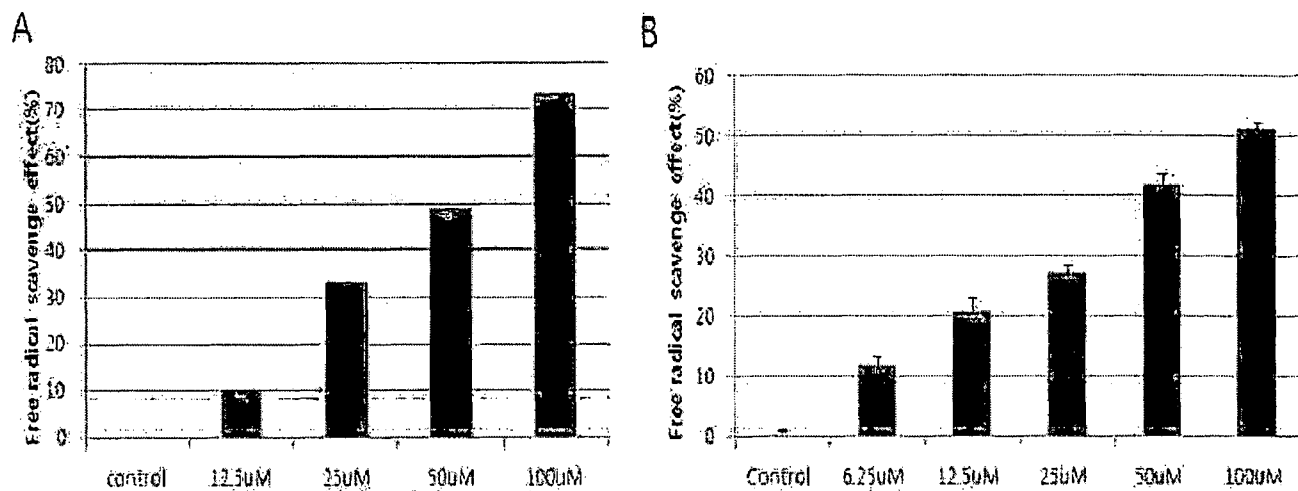
| Sample name                                  | Picture                                                                            | Sample name                                | Picture                                                                              |
|----------------------------------------------|------------------------------------------------------------------------------------|--------------------------------------------|--------------------------------------------------------------------------------------|
| 24. Curcumin<br>-KKKKKKKKKKKG<br>KH (K10GKH) |   | 25. Curcumin<br>-POG<br>(O=hydroxyproline) |   |
| 26. Curcumin<br>-GPO<br>(O=hydroxyproline)   |  | 27. Curcumin<br>-GOP<br>(O=hydroxyproline) |  |

## 도 8

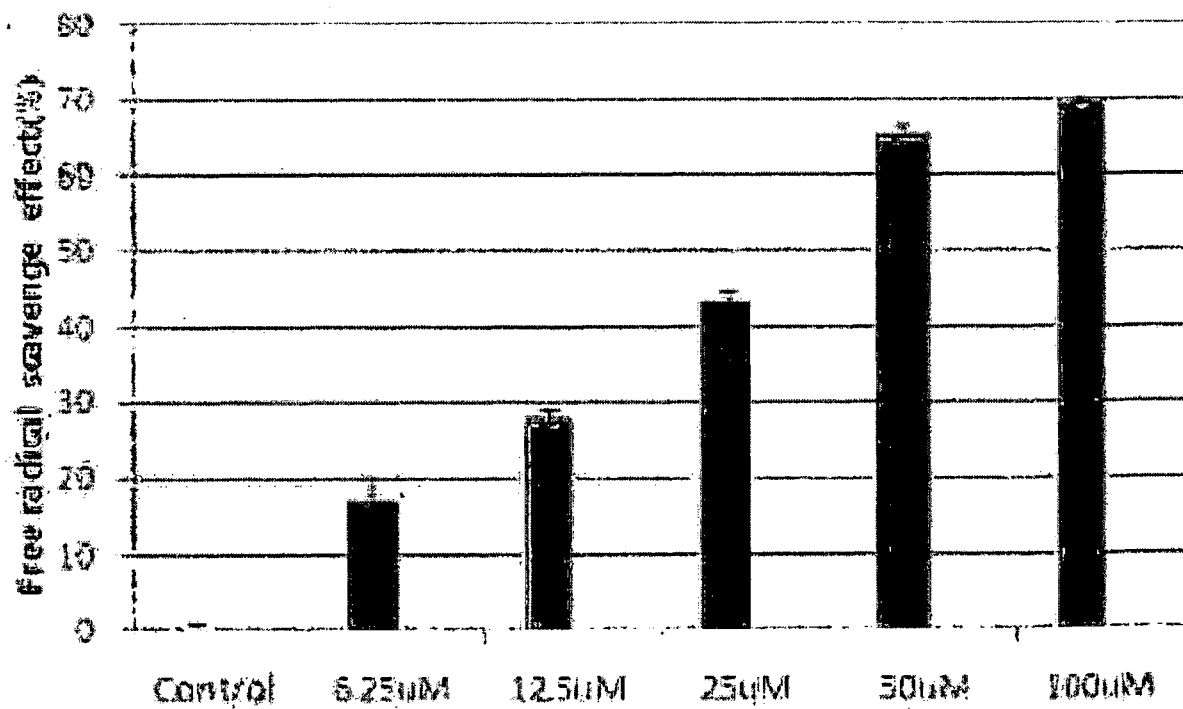


11/12

## 도 9

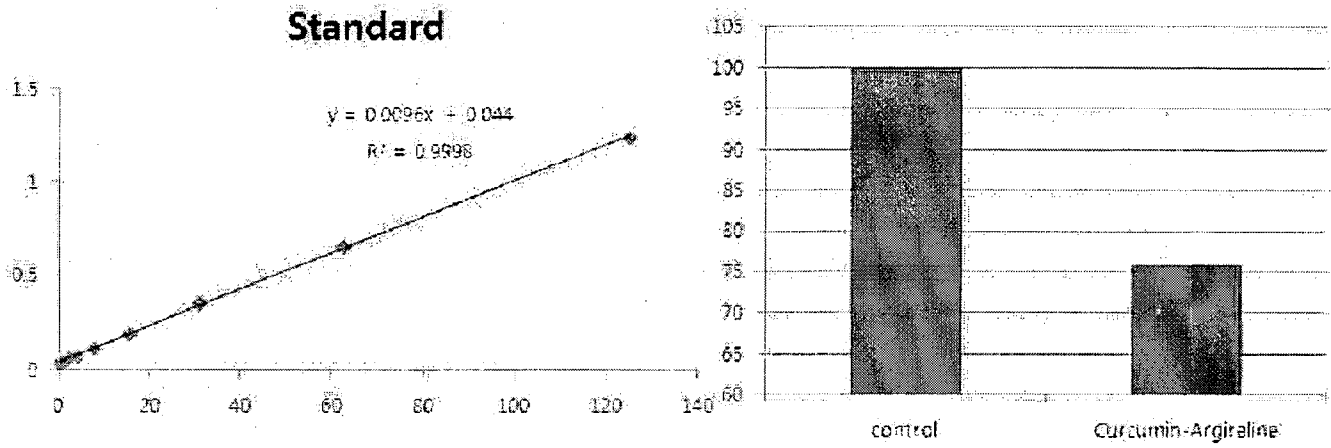


## 도 10

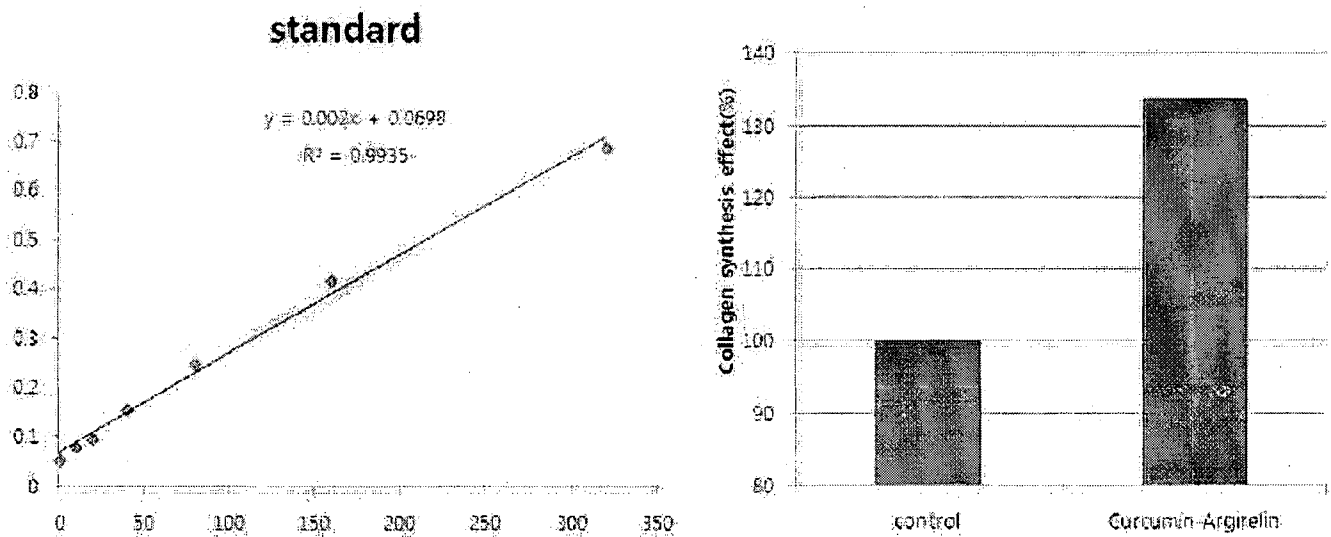


12/12

## 도 11



## 도 12



## INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/KR2014/002446

## A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER

*A61K 47/48(2006.01)i, A61K 47/42(2006.01)i, A61K 31/12(2006.01)i*

According to International Patent Classification (IPC) or to both national classification and IPC

## B. FIELDS SEARCHED

Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols)

A61K 47/48; A61K 39/395; A61K 38/24; A61P 35/00; C07C 57/42; A61K 9/48; C07K 5/09; A61K 31/536; C07K 5/11; A61K 47/42; A61K 31/12

Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched

Korean Utility models and applications for Utility models: IPC as above  
Japanese Utility models and applications for Utility models: IPC as above

Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practicable, search terms used)

eKOMPASS (KIPO internal) &amp; Keywords: curcumin, peptide, solid-phase synthesis, antioxidant, cosmetic composition, health functional food, linker, solubility, glutarate, complex

## C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

| Category* | Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages                                                                                                                                                                                                                                                                            | Relevant to claim No. |
|-----------|---------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|-----------------------|
| X         | US 2011-0263500 A1 (HANSEL, William et al.) 27 October 2011<br>See abstract, paragraphs [0023], [0034]-[0038], claims 1, 5, 6, 11 and figure 1.                                                                                                                                                                                                               | 1-4,7-9,11-15,17      |
| A         |                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                               | 5-6,10,16             |
| A         | US 2010-0316631 A1 (SAFAVY, Ahmad) 16 December 2010<br>See abstract and claims 2, 10, 52.                                                                                                                                                                                                                                                                     | 1-17                  |
| A         | US 2012-0288533 A1 (LIVNEY, Yoav D.) 15 November 2012<br>See abstract and claims 1, 15-16.                                                                                                                                                                                                                                                                    | 1-17                  |
| A         | CN 102250204 A (CAPITAL MEDICAL UNIVERSITY) 23 November 2011<br>See abstract, paragraph [0003] and claims 1, 6.                                                                                                                                                                                                                                               | 1-17                  |
| A         | DUBEY, SHIV K. et al., "Design, synthesis and characterization of some bioactive conjugates of curcumin with glycine, glutamic acid, valine and demethylated piperic acid and study of their antimicrobial and antiproliferative properties", European Journal of Medicinal Chemistry, 2008, no. 43, pp. 1837-1846<br>See abstract and pages 1842-1843, 1845. | 1-17                  |



Further documents are listed in the continuation of Box C.



See patent family annex.

\* Special categories of cited documents:

"A" document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance

"E" earlier application or patent but published on or after the international filing date

"L" document which may throw doubts on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified)

"O" document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means

"P" document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed

"T" later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention

"X" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step when the document is taken alone

"Y" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other such documents, such combination being obvious to a person skilled in the art

"&amp;" document member of the same patent family

Date of the actual completion of the international search

27 AUGUST 2014 (27.08.2014)

Date of mailing of the international search report

27 AUGUST 2014 (27.08.2014)

Name and mailing address of the ISA/KR

Korean Intellectual Property Office  
Government Complex-Daejeon, 189 Sconsa-ro, Daejeon 302-701,  
Republic of Korea

Facsimile No. 82-42-472-7140

Authorized officer

Telephone No.

**INTERNATIONAL SEARCH REPORT**  
Information on patent family members

International application No.

**PCT/KR2014/002446**

| Patent document<br>cited in search report | Publication<br>date | Patent family<br>member                | Publication<br>date      |
|-------------------------------------------|---------------------|----------------------------------------|--------------------------|
| US 2011-0263500 A1                        | 27/10/2011          | WO 2010-033580 A2<br>WO 2010-033580 A3 | 25/03/2010<br>01/07/2010 |
| US 2010-0316631 A1                        | 16/12/2010          | WO 2008-051474 A1                      | 02/05/2008               |
| US 2012-0288533 A1                        | 15/11/2012          | NONE                                   |                          |
| CN 102250204 A                            | 23/11/2011          | CN 102250204 B                         | 05/06/2013               |

**A. 발명이 속하는 기술분류(국제특허분류(IPC))**

A61K 47/48(2006.01)i, A61K 47/42(2006.01)i, A61K 31/12(2006.01)i

**B. 조사된 분야**

조사된 최소문헌(국제특허분류를 기재)

A61K 47/48; A61K 39/395; A61K 38/24; A61P 35/00; C07C 57/42; A61K 9/48; C07K 5/09; A61K 31/536; C07K 5/11; A61K 47/42; A61K 31/12

조사된 기술분야에 속하는 최소문헌 이외의 문헌

한국등록실용신안공보 및 한국공개실용신안공보: 조사된 최소문헌란에 기재된 IPC  
일본등록실용신안공보 및 일본공개실용신안공보: 조사된 최소문헌란에 기재된 IPC

국제조사에 이용된 전산 데이터베이스(데이터베이스의 명칭 및 검색어(해당하는 경우))

eKOMPASS(특허청 내부 검색시스템) & 키워드: 커큐민, 펩타이드, 고체상 합성, 향산화, 화장품, 건강기능식품, 링커, 용해도, glutarate, 복합체

**C. 관련 문헌**

| 카테고리* | 인용문헌명 및 관련 구절(해당하는 경우)의 기재                                                                                                                                                                                                                                                                                                                   | 관련 청구항              |
|-------|----------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|---------------------|
| X     | US 2011-0263500 A1 (HANSEL, WILLIAM 외) 2011.10.27<br>요약, 단락 [0023], [0034]-[0038], 청구항 1, 5, 6, 11 및 도면 1 참조.                                                                                                                                                                                                                                | 1-4, 7-9, 11-15, 17 |
| A     |                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                              | 5-6, 10, 16         |
| A     | US 2010-0316631 A1 (SAFAVY, AHMAD) 2010.12.16<br>요약 및 청구항 2, 10, 52 참조.                                                                                                                                                                                                                                                                      | 1-17                |
| A     | US 2012-0288533 A1 (LIVNEY, YOAV D.) 2012.11.15<br>요약 및 청구항 1, 15-16 참조.                                                                                                                                                                                                                                                                     | 1-17                |
| A     | CN 102250204 A (CAPITAL MEDICAL UNIVERSITY) 2011.11.23<br>요약, 단락 [0003] 및 청구항 1, 6 참조.                                                                                                                                                                                                                                                       | 1-17                |
| A     | DUBEY, SHIV K. 외, `Design, synthesis and characterization of some bioactive conjugates of curcumin with glycine, glutamic acid, valine and demethylenated piperic acid and study of their antimicrobial and antiproliferative properties`, European Journal of Medicinal Chemistry, 2008, 43권, 페이지 1837-1846<br>요약 및 페이지 1842-1843, 1845 참조. | 1-17                |



추가 문헌이 C(계속)에 기재되어 있습니다.



대응특허에 관한 별지를 참조하십시오.

\* 인용된 문헌의 특별 카테고리:

“A” 특별히 관련이 없는 것으로 보이는 일반적인 기술수준을 정의한 문헌

“T” 국제출원일 또는 우선일 후에 공개된 문헌으로, 출원과 상충하지 않으며 발명의 기초가 되는 원리나 이론을 이해하기 위해 인용된 문헌

“E” 국제출원일보다 빠른 출원일 또는 우선일을 가지나 국제출원일 이후에 공개된 선출원 또는 특허 문헌

“X” 특별한 관련이 있는 문헌. 해당 문헌 하나만으로 청구된 발명의 신규성 또는 진보성이 없는 것으로 본다.

“L” 우선권 주장에 의문을 제기하는 문헌 또는 다른 인용문헌의 공개일 또는 다른 특별한 이유(이유를 명시)를 밝히기 위하여 인용된 문헌

“Y” 특별한 관련이 있는 문헌. 해당 문헌이 하나 이상의 다른 문헌과 조합하는 경우로 그 조합이 당업자에게 자명한 경우 청구된 발명은 진보성이 없는 것으로 본다.

“O” 구두 개시, 사용, 전시 또는 기타 수단을 언급하고 있는 문헌

“&” 동일한 대응특허문헌에 속하는 문헌

“P” 우선일 이후에 공개되었으나 국제출원일 이전에 공개된 문헌

국제조사의 실제 완료일

2014년 08월 27일 (27.08.2014)

국제조사보고서 발송일

2014년 08월 27일 (27.08.2014)

ISA/KR의 명칭 및 우편주소

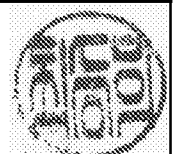
 대한민국 특허청  
(302-701) 대전광역시 서구 청사로 189,  
4동 (둔산동, 정부대전청사)

팩스 번호 +82-42-472-7140

심사관

최승희

전화번호 +82-42-481-8740



| 국제조사보고서에서<br>인용된 특허문헌 | 공개일        | 대응특허문헌                                 | 공개일                      |
|-----------------------|------------|----------------------------------------|--------------------------|
| US 2011-0263500 A1    | 2011/10/27 | WO 2010-033580 A2<br>WO 2010-033580 A3 | 2010/03/25<br>2010/07/01 |
| US 2010-0316631 A1    | 2010/12/16 | WO 2008-051474 A1                      | 2008/05/02               |
| US 2012-0288533 A1    | 2012/11/15 | 없음                                     |                          |
| CN 102250204 A        | 2011/11/23 | CN 102250204 B                         | 2013/06/05               |