

명세서

발명의 명칭: CPNE7단백질 유래 펩타이드의 신규한 용도

기술분야

- [1] 본 발명은 펩타이드의 신규한 용도에 관한 것으로, 보다 상세하게는 피부 재생, 탄력 강화 및 보습능을 촉진하는 CPNE7단백질 유래 펩타이드의 신규한 용도에 대한 것이다.

[2]

배경기술

- [3] 피부는 우리 몸의 가장 바깥층에 존재하며 동시에 전신에 분포하고 있는 가장 넓은 조직이다. 따라서 외부로부터 오는 압력, 충격, 마찰 등을 포함하는 다양한 자극들에 노출되어 있다. 피부는 이러한 외부환경으로부터 신체 내 장기를 보호하고 체온을 조절하며 감각을 느끼는 중요한 조직에 해당한다.
- [4] 피부의 구조는 표피, 진피 그리고 피하지방층으로 구분된다. 피하지방층은 진피 아래쪽에 지방세포로 구성되어 이는 지방층이며 섭취한 음식 중 남은 잉여분이 지방의 형태로 축적된 층으로 피부와 근육 사이의 위치하며 단열효과가 있어 이를 이용하여 체온을 유지하는 기능을 수행하므로 진피층과 구별된다. 외부에서 관찰되는 표피는 피부의 가장 바깥쪽에서 외부 환경과 직접 접촉하고 있는 층으로써 주로 각질층으로 이루어져 있다. 각질층은 우리 몸을 보호하는 장벽으로써 기능하므로 외부로부터 물 한 방울, 세균 또는 바이러스 등이 침투할 수 없도록 기능한다. 진피는 표피 바로 아래에 존재하는 층으로 주로 콜라겐 섬유와 탄력섬유 등의 섬유 성분과 그 사이사이에 혈관, 모낭, 신경 그리고 땀샘 등이 존재한다. 진피는 피부에 힘(장력)을 주며 피부의 모양을 이루는데 중요한 부위이다. 진피 층 내, 콜라겐 섬유나 탄력섬유 등이 약해지거나 얇아지면 주름이 생기고 피부 탄력이 감소하게 되는 원인이 된다.
- [5] 피부는 다양한 생리적 기능을 가진 보호막이면서 동시에 타인으로부터 미적 호감을 얻는데 중요한 조직이기도 하므로, 노화된 피부는 외견상 보이는 변화와 더불어 피부의 기능적 장애를 동반하기도 한다. 또한, 심한 피부 노화는 삶의 활력에 심리적 영향을 미쳐 심한 경우 우울증을 야기하기도 한다. 피부 노화의 예방이나 치료는 현대사회에서 그 중요성이 점차 증가되고 있으며, 특히 평균수명의 증가와 출산율의 저하는 노인 인구의 증가를 가져왔으며, 우리나라는 2025년이 되면 UN에서 지정한 초고령사회 기준에 도달할 것으로 예측되므로 사회적 비용 측면에서 피부 노화의 방지를 위한 노력은 간과될 수 없다.
- [6] 피부 노화의 특징으로는 우선 피부 두께 감소를 들 수 있다. 이는 표피에서 특히 두드러지며 성인기 이후 점차 표피의 두께 감소가 가속화되는 것으로 보고되었으며, 표피의 두께는 평균적으로 10년간 약 6.4%가 감소되는 것으로 알려져 있다. 표피 두께의 감소는 피부 건조증의 직접적인 병리적 원인이 될 수 있는바, 피

부 상의 수분, 표피 내 각질층의 수분 함유량은 감소하며, 전체적인 지질 함량 역시 약 65% 감소하는 것으로 알려져 있다. 또한, 나이가 들에 따라 Keratinocyte(각질 형성 세포) 증식이 감소하므로 노년층의 경우에는 각질이 제거된 이후 회복되는 속도가 젊은 사람들에 비해 현저히 느려지게 된다.

- [7] 한편, 피부 노화에 따른 내부에 가장 두드러지게 되는 구조적 변화는 피부유두(Dermal Papillae)의 상실로 인한 Dermo-Epidermal Junction (진피-표피 경계)의 편평화이다. 진피-표피 경계의 편평화는 외부 마찰에 대한 저항성을 줄여 상처 형성에 취약해지게 하는 원인이 된다. 내부적으로는 진피와 표피 간 영양분과 산소 공급이 감소하고, 다양한 세포 간 신호전달 체계를 단절시키며, 진피-표피 간 분리를 유발하게 되며, 이 과정은 주름 형성의 주요 메커니즘 중 하나로 알려져 있다.
- [8] 피부 노화의 원인은 내재적 노화(Intrinsic Aging)와, 외재적 노화(Extrinsic Aging)로 구분될 수 있다. 외재적 노화라 함은 주로 자외선에 의한 광노화(Photoaging)를 의미한다. 그러나 최근 연구들에 따르면 자외선 외에도 담배연기, 공해 등 다양한 피부 노화를 촉진하는 외재적 요인들이 내재적 요인들과 연계되어 피부 노화를 촉진하는 것으로 추정되고 있다. 피부 노화를 촉진하는 내재적 요인들에는 게놈 상 불안정(Genome Instability), 후성적 변화(Epigenetic Alteration), 호르몬의 변화, 또는 산화적 스트레스(Oxidative Stress) 등이 알려져 있다. Genetic Level이나 호르몬의 변화는 어떤 시점에서 이 기전들이 활성화되고 연계되는지 명확히 밝혀진 바가 없다. 반면, 활성산소(Reactive Oxygen Species; ROS)는 전반적인 노화 현상에 대해 주요한 원인으로 지목되어 왔다. 활성산소는 피부의 내, 외재적 요인들과 연계하여 진피 내 세포 외 기질(ECM)의 변화를 유발할 수 있음이 많은 연구들을 통해 알려져 있다. 자외선 등의 외부요인이나 세포 대사 후 자연적으로 생성된 활성산소는 Receptor Protein Tyrosine Phosphatase(RPTP) 내 효소 자리에 위치한 시스테인과 결합하여 RPTP의 Receptor Tyrosine Kinase(RTK) 억제 능력을 저해시킨다. RTK의 인산화는 세포 내부의 다양한 신호전달 체계에 영향을 주고 Mitogen-Activated Protein Kinase(MAPK)와 Nuclear Factor- κ B(NF- κ B), Activator Protein-1(AP-1) 전사 인자(Transcription Factor)의 활성을 유도한다. NF- κ B와 AP-1의 활성화는 콜라겐 생성을 저해하고 MMP 유전자 전사를 증가시켜, 피부 조직 내 콜라겐 양을 감소시키며, 비정상적 구조적 특징을 가지게 하는데 기여한다.
- [9] 피부 노화 치료 및 예방은 인류의 역사와 평행하게 꾸준히 큰 관심의 대상이었으며, 이에 대한 메커니즘과, 치료제 연구가 계속해서 진행되어 왔으나 피부 노화 치료 및 예방에 대한 기초 연구는 타 질환에 대한 치료제 연구들에 비해 그 성과가 두드러지지 못한 실정이다. 이는 피부 노화의 상위 개념인 “세포 노화”라는 주제에 대해서 근본적인 답을 찾지 못한 것 과도 연관된다. *In vitro* 상 섬유아세포(fibroblast)에 대한 연구는 수없이 존재하지만, 연구 결과를 인간의 피부 조직의 노화 방지 방안으로 연결시키지 못한 연구 역시 수없이 존재하는데, 이는 개

체 수준 (Organism-level)에서의 전체적 노화(Systemic Aging)가 피부에 주는 영향은 생각보다 복잡할 수 있음을 의미하며, 피부 노화 관련 연구에 대해서 단순히 피부뿐만 아니라 피하지방, 혈관계, 신경계 또는 면역계 등 더 확장된 관점에서 바라보아야 함을 의미할 수 있다.

발명의 상세한 설명

기술적 과제

- [10] 본 발명은 피부 진피층 내 섬유아세포 내에서의 Type I Collagen과 Type III Collagen을 합성함으로써 피부 탄력 촉진 및 노화를 예방하는 펩타이드 및 그의 용도를 제공하는 것을 목적으로 한다.
- [11] 본 발명은 피부 진피-표피 경계부의 기저막에서의 Type IV Collagen 합성을 함으로써 피부 탄력 촉진 및 노화를 예방하는 펩타이드 및 그의 용도를 제공하는 것을 다른 목적으로 한다.
- [12] 본 발명은 피부 표피층 내 각질 세포 내에서의 Ki-67의 발현을 증가시킴으로써 세포 분열과 분화를 증진시켜 표피층의 재생 촉진 및 노화를 예방하는 펩타이드 및 그의 용도를 제공하는 것을 또 다른 목적으로 한다.
- [13] 본 발명은 피부 표피층 내 각질 세포 내에서의 Filaggrin과 Involucrin을 합성함으로써 각질 세포 간 접합 기능을 증진시켜 피부 보습 촉진 및 노화를 예방하는 펩타이드 및 그의 용도를 제공하는 것을 또 다른 목적으로 한다.
- [14] 본 발명은 피부 표피층과 진피층 내 각질세포와 진피세포 내에서의 MMP-1의 발현을 감소시킴으로써 콜라겐의 분해를 저해하여 피부 노화를 예방하는 펩타이드 및 그의 용도를 제공하는 것을 또 다른 목적으로 한다.
- [15]
- [16] 본 발명의 목적은 이상에서 언급한 것으로 제한되지 않으며, 언급되지 않은 또 다른 목적들은 아래의 기재로부터 본 발명이 속하는 기술 분야의 통상의 지식을 가진 자에게 명확하게 이해될 수 있을 것이다.

[17]

과제 해결 수단

- [18] 본 발명자들은 상기 기술적 과제를 해결하기 위하여, 다양한 연구를 수행한 결과, CPNE7단백질 유래 펩타이드를 포함하는 피부 노화억제 또는 상처치료용 조성물을 개발하였다.
- [19] 상술한 목적을 달성하기 위한 일 실시 양태로서, 본 발명은 하기 일반식 1의 아미노산 서열을 포함하는, CPNE7단백질 유래 펩타이드를 포함하는 피부 노화억제 또는 상처치료용 조성물을 제공한다.
- [20] K-Y-R1-R2-R3-R4-R5-R6-R7-R8 (일반식 1)
- [21] 상기 일반식 1에서,
- [22] R1은 아르기닌(R), 리신(K) 또는 글루타민(Q)이고;
- [23] R2는 아르기닌(R) 또는 글루타민(Q)이며;

- [24] R3, R4 및 R5는 각각 아르기닌(R) 또는 리신(K)이고;
- [25] R6는 아스파라긴(N) 또는 세린(S)이며; 및
- [26] R7 및 R8은 리신(K) 또는 타이로신(Y)이다.
- [27]
- [28] 본 발명에서 제공하는 펩타이드는 세포독성을 나타내지 않으면서도, 우수한 콜라겐 합성능을 제공할 수 있다.
- [29] 본 발명에서 제공하는 펩타이드는, CPNE7단백질 유래 펩타이드를 포함하는 피부 노화억제 또는 상처치료 효과를 나타낼 수 있는 한, 이를 구성하는 아미노산 서열과 하나 이상의 아미노산 잔기가 상이한 서열을 가지는 변이체 펩타이드도 본 발명에서 제공하는 펩타이드의 범주에 포함된다.
- [30] 일반적으로, 분자의 활성을 전체적으로 변경시키지 않는 단백질 및 폴리펩타이드에서의 아미노산 교환은 당해 분야에 공지되어 있다. 가장 통상적으로 일어나는 교환은 아미노산 잔기 Ala/Ser, Val/Ile, Asp/Glu, Thr/Ser, Ala/Gly, Ala/Thr, Ser/Asn, Ala/Val, Ser/Gly, Thy/Phe, Ala/Pro, Lys/Arg, Asp/Asn, Leu/Ile, Leu/Val, Ala/Glu, Asp/Gly 간의 교환이다. 또한, 아미노산 서열상의 변이 또는 수식에 의해서 펩타이드의 열, pH 등에 대한 구조적 안정성이 증가하거나 피부 노화억제 또는 상처치료 효과가 증가한 펩타이드를 포함할 수 있다.
- [31] 예를 들어, 본 발명에서 제공하는 서열 번호 1의 펩타이드의 3번에 위치한 산성 아미노산인 글루타민은 염기성 아미노산인 리신 또는 아르기닌으로 치환되어도 본 발명에서 제공하는 펩타이드의 효과를 그대로 나타낼 수 있고; 서열 번호 1의 펩타이드의 4번 또는 5번에 위치한 염기성 아미노산인 아르기닌은 산성 아미노산인 글루타민 또는 염기성 아미노산인 리신으로 치환되어도 본 발명에서 제공하는 펩타이드의 효과를 그대로 나타낼 수 있으며; 서열 번호 1의 펩타이드의 6번, 7번 또는 9번에 위치한 염기성 아미노산인 리신은 염기성 아미노산인 아르기닌 또는 방향족 아미노산인 타이로신으로 치환되어도 본 발명에서 제공하는 펩타이드의 효과를 그대로 나타낼 수 있고; 서열 번호 1의 펩타이드의 8번에 위치한 산성 아미노산인 아스파라긴은 중성 아미노산인 세린으로 치환되어도 본 발명에서 제공하는 펩타이드의 효과를 그대로 나타낼 수 있으며; 서열 번호 1의 펩타이드의 10번에 위치한 방향족 아미노산인 타이로신은 염기성 아미노산인 리신으로 치환되어도 본 발명에서 제공하는 펩타이드의 효과를 그대로 나타낼 수 있다.
- [32] 이처럼, 본원 발명의 펩타이드를 구성하는 산성 아미노산, 염기성 아미노산 또는 방향족 아미노산은 각각 이와 다른 산성 아미노산, 염기성 아미노산, 중성 아미노산 또는 방향족 아미노산으로 치환되어도, 본 발명에서 제공하는 펩타이드의 효과를 그대로 나타낼 수 있으므로, 본 발명의 펩타이드를 구성하는 아미노산 서열과 하나 이상의 아미노산 잔기가 상이한 서열을 가지는 변이체 펩타이드도 본 발명에서 제공하는 펩타이드의 범주에 포함됨은 자명하다.

- [33] 또한, 본 발명의 펩타이드는 그의 N-말단 또는 C-말단에 임의의 아미노산이 부가된 형태를 갖더라도, 본 발명에서 제공하는 펩타이드의 효과를 그대로 나타낼 수 있으므로, 본 발명에서 제공하는 펩타이드의 범주에 포함된다. 일 예로서, 상기 펩타이드의 N-말단 또는 C-말단에 1 내지 300개의 아미노산이 부가된 형태가 될 수 있고, 다른 예로서, 상기 펩타이드의 N-말단 또는 C-말단에 1 내지 100개의 아미노산이 부가된 형태가 될 수 있으며, 또 다른 예로서, 상기 펩타이드의 N-말단 또는 C-말단에 1 내지 24개의 아미노산이 부가된 형태가 될 수 있다.
- [34] 다른 하나의 양태로서, 본 발명은 상기 펩타이드를 코딩하는 폴리뉴클레오티드를 제공한다.
- [35] 상기 폴리뉴클레오티드는 하나 이상의 염기가 치환, 결실, 삽입 또는 이들의 조합에 의해 변이될 수 있다. 뉴클레오티드 서열을 화학적으로 합성하여 제조하는 경우, 당업계에서 널리 공지된 합성법, 예를 들어 문헌(Engels and Uhlmann, *Angew Chem IntEd Engl.*, 37:73-127, 1988)에 기술된 방법을 이용할 수 있으며, 트리아스테르, 포스포이트, 포스포르아미다이트 및 H-포스페이트 방법, PCR 및 기타 오토 프라이머 방법, 고체 지지체 상의 올리고뉴클레오타이드 합성법 등을 이용하여 합성할 수 있다. 예를 들어, 본 발명의 펩타이드를 코딩하는 폴리뉴클레오티드는 서열 번호 4의 염기서열을 포함할 수 있다.
- [36] 또 다른 하나의 양태로서, 본 발명은 상기 폴리뉴클레오티드를 포함하는 발현 벡터, 상기 발현벡터를 포함하는 형질전환체 및 상기 형질전환체를 이용하여 상기 펩타이드를 제조하는 방법을 제공한다.
- [37] 본 발명의 용어 "발현벡터"란, 목적하는 숙주세포에서 목적 펩타이드를 발현할 수 있는 재조합 벡터로서, 유전자 삽입물이 발현되도록 작동 가능하게 연결된 필수적인 조절 요소를 포함하는 유전자 제작물을 의미한다. 상기 발현벡터는 개시 코돈, 종결코돈, 프로모터, 오퍼레이터 등의 발현 조절 요소들을 포함하는데, 상기 개시코돈 및 종결코돈은 일반적으로 폴리펩타이드를 암호화하는 뉴클레오티드 서열의 일부로 간주되고, 유전자 제작물이 투여되었을 때 개체에서 반드시 작용을 나타내어야 하며 코딩 서열과 인프레임(in frame)에 있어야 한다. 벡터의 프로모터는 구성적 또는 유도성일 수 있다.
- [38] 본 발명의 용어 "작동 가능하게 연결(operably linked)"이란, 일반적 기능을 수행하도록 핵산 발현 조절 서열과 목적하는 단백질 또는 RNA를 코딩하는 핵산 서열이 기능적으로 연결(functional linkage)되어 있는 상태를 의미한다. 예를 들어 프로모터와 단백질 또는 RNA를 코딩하는 핵산 서열이 작동 가능하게 연결되어 코딩 서열의 발현에 영향을 미칠 수 있다. 발현 벡터와의 작동적 연결은 당해 기술 분야에서 잘 알려진 유전자 재조합 기술을 이용하여 제조할 수 있으며, 부위-특이적 DNA 절단 및 연결은 당해 기술 분야에서 일반적으로 알려진 효소 등을 사용할 수 있다.
- [39] 또한, 상기 발현벡터는 세포 배양액으로부터 펩타이드의 분리를 촉진하기 위하여 상기 펩타이드의 배출을 위한 시그널 서열을 포함할 수 있다. 특이적인 개시

시그널은 또한 삽입된 핵산 서열의 효율적인 번역에 필요할 수도 있다. 이들 시그널은 ATG 개시코돈 및 인접한 서열들을 포함한다. 어떤 경우에는, ATG 개시코돈을 포함할 수 있는 외인성 번역 조절 시그널이 제공되어야 한다. 이들 외인성 번역 조절 시그널 및 개시코돈은 다양한 천연 및 합성 공급원일 수 있다. 발현 효율은 적당한 전사 또는 번역 강화 인자의 도입에 의하여 증가될 수 있다.

- [40] 아울러, 상기 발현백터는 상기 펩타이드의 검출이 용이하도록 하기 위하여, 임의로 엔도펩티다아제를 사용하여 제거할 수 있는 단백질 태그를 추가로 포함할 수 있다.
- [41] 본 발명의 용어 "태그(tag)"란, 정량 가능한 활성 또는 특성을 나타내는 분자를 의미하며, 플로오레세인과 같은 화학적 형광물질(fluoracer), 형광 단백질(GFP) 또는 관련 단백질과 같은 폴리펩타이드 형광물질을 포함한 형광 분자일 수도 있고; Myc 태그, 플래그(Flag) 태그, 히스티딘 태그, 루신 태그, IgG 태그, 스트렙타비딘 태그 등의 에피토프 태그일 수도 있다. 특히, 에피토프 태그를 사용할 경우, 바람직하게는 6개 이상의 아미노산 잔기로 구성되고, 보다 바람직하게는 8개 내지 50개의 아미노산 잔기로 구성된 펩타이드 태그를 사용할 수 있다.
- [42] 본 발명의 용어 "광 피부염(Photodermatitis)"은 자외선 또는 특정 물질과 햇빛이 결합하여 피부에 염증 반응을 일으키는 상태를 의미할 수 있으며 자외선 노출로 인한 피부 손상의 주요 원인 중 하나는 산화 스트레스이다. 산화 스트레스는 진피 섬유아세포에 영향을 미칠 수 있으며, 이로 인해 콜라겐 분해와 염증 반응이 촉진될 수 있다. 이러한 과정은 피부의 특성을 변화시키고, 광 피부염의 증상을 악화시킬 수 있다.
- [43] 본 발명의 용어 "아토피 피부염(Atopic dermatitis)"은 만성적인 피부염으로, 피부가 건조하고 가려움 증상이 동반되며, 염증이 반복적으로 발생하는 것이 특징으로, 유전적 요인, 환경 요인, 면역계 이상 등이 관련되어 있다고 알려져 있으며, 진피 섬유아세포의 스트레스는 아토피 피부염의 발병 및 진행과 연관될 수 있다. 산화 스트레스는 세포에 손상을 주는 자유 라디칼을 생성하며, 이는 염증 반응과 세포의 기능 저하를 일으킨다. 진피 섬유아세포는 피부의 진피층에 위치하며, 피부의 구조와 기능을 유지하는데 중요한 역할을 하므로 산화 스트레스로 인해 진피 섬유아세포의 기능이 저하되면, 피부의 보호 기능이 약화될 수 있다. 이로 인해 피부는 외부 자극에 더 취약해지며, 아토피 피부염의 증상이 악화될 수 있다. 이로 인한 산화 스트레스는 염증 반응을 촉진할 수 있다. 이러한 염증 반응은 아토피 피부염의 주요 증상 중 하나로, 진피 섬유아세포가 올바르게 기능하지 못하는 원인이 된다. 아울러, 산화 스트레스로 인한 세포 손상은 피부 장벽의 손상을 악화시킬 수 있다. 피부 장벽이 손상되면, 알레르기 반응을 일으키는 물질이 피부에 더 쉽게 침투할 수 있으며, 이는 아토피 피부염의 증상을 더욱 악화시킬 수 있다.
- [44] 본 발명에 있어서, 상기 발현백터는 CPNE7 단백질 또는 서열 번호 1로 이루어진 아미노산으로 이루어진 펩타이드를 코딩하는 뉴클레오티드 서열을 포

합할 수 있는데, 이때 사용되는 벡터는 상기 펩타이드를 생산할 수 있는 한, 특별히 이에 제한되지 않으나, 바람직하게는 플라스미드 DNA, 파아지 DNA 등이 될 수 있고, 보다 바람직하게는 상업적으로 개발된 플라스미드(pUC18, pBAD, pIDTSAMRT-AMP 등), 대장균 유래 플라스미드(pYG601BR322, pBR325, pUC118, pUC119 등), 바실러스 서브틸리스 유래 플라스미드(pUB110, pTP5 등), 효모-유래 플라스미드(YEp13, YEp24, YCp50 등), 파아지 DNA(Charon4A, Charon21A, EMBL3, EMBL4, λgt10, λgt11, λZAP 등), 동물바이러스 벡터(레트로 바이러스(retrovirus), 아데노바이러스(adenovirus), 백신시아 바이러스(vaccinia virus) 등), 곤충 바이러스 벡터(배큘로바이러스(baculovirus) 등)가 될 수 있다. 상기 발현벡터는 숙주세포에 따라서 단백질의 발현량과 수식 등이 다르게 나타나므로, 목적에 가장 적합한 숙주세포를 선택하여 사용함이 바람직하다.

- [45] 본 발명에서 제공하는 형질전환체는 상기 본 발명에서 제공하는 발현벡터를 숙주에 도입하여 형질전환시킴으로써 제작될 수 있고, 상기 발현벡터에 포함된 폴리뉴클레오티드를 발현시켜서, 상기 펩타이드를 생산하는 데 사용될 수 있다. 상기 형질전환은 다양한 방법에 의하여 수행될 수 있는데, 상기 펩타이드를 생산할 수 있는 한, 특별히 이에 제한되지 않으나, CaCl₂ 침전법, CaCl₂ 침전법에 DMSO(dimethyl sulfoxide)라는 환원 물질을 사용함으로써 효율을 높인 Hanahan 방법, 전기천공법(electroporation), 인산칼슘 침전법, 원형질 융합법, 실리콘 카바이드 섬유를 이용한 교반법, 아그로 박테리아 매개된 형질전환법, PEG를 이용한 형질전환법, 텍스트란 설페이트, 리포펙타민 및 건조/억제 매개된 형질전환 방법 등이 사용될 수 있다. 또한, 상기 형질전환체의 제작에 사용되는 숙주 역시 상기 펩타이드를 생산할 수 있는 한, 특별히 이에 제한되지 않으나, 대장균, 스트렙토마이세스, 살모넬라 티피뮤리움 등의 박테리아 세포; 사카로마이세스 세레비지에, 스킴조사카로마이세스 폼베 등의 효모 세포; 피치아 파스토리스 등의 균류세포; 드로소필라, 스포도프테라 Sf9 세포 등의 곤충 세포; CHO, COS, NSO, 293, 보우멜라노마 세포 등의 동물 세포; 또는 식물 세포가 될 수 있다.
- [46] 상기 형질전환체는 또한 본 발명의 서열 번호 1로 이루어진 아미노산으로 이루어진 펩타이드를 생산하는 방법에 사용될 수 있다. 구체적으로, 본 발명의 서열 번호 1로 이루어진 아미노산으로 이루어진 펩타이드를 생산하는 방법은 (a) 상기 형질전환체를 배양하여 배양물을 수득하는 단계; 및 (b) 상기 배양물로부터 본 발명의 펩타이드를 회수하는 단계를 포함할 수 있다.
- [47] 본 발명의 용어 "배양"이란, 미생물을 적당히 인공적으로 조절된 환경조건에서 생육시키는 방법을 의미한다. 본 발명에 있어서, 상기 형질전환체를 배양하는 방법은 당업계에 널리 알려져 있는 방법을 이용하여 수행할 수 있다. 구체적으로 상기 배양은 본 발명의 서열 번호 1로 이루어진 아미노산으로 이루어진 펩타이드를 발현시켜서 생산할 수 있는 한 특별히 이에 제한되지 않으나, 배치 공정 또는 주입 배치 또는 반복 주입 배치 공정(fed batch or repeated fed batch process)에서 연속식으로 배양할 수 있다.

- [48] 배양에 사용되는 배지는 적당한 탄소원, 질소원, 아미노산, 비타민 등을 함유한 통상의 배지 내에서 호기성 조건 하에서 온도, pH 등을 조절하면서 적절한 방식으로 특정 균주의 요건을 충족해야 한다. 사용될 수 있는 탄소원으로는 글루코즈 및 자일로스의 혼합당을 주 탄소원으로 사용하며 이외에 수크로즈, 락토즈, 프락토즈, 말토즈, 전분, 셀룰로스와 같은 당 및 탄수화물, 대두유, 해바라기유, 피마자유, 코코넛유 등과 같은 오일 및 지방, 팔미트산, 스테아린산, 리놀레산과 같은 지방산, 글리세롤, 에탄올과 같은 알코올, 아세트산과 같은 유기산이 포함된다. 이들 물질은 개별적으로 또는 혼합물로서 사용될 수 있다. 사용될 수 있는 질소원으로는 암모니아, 황산암모늄, 염화암모늄, 초산암모늄, 인산암모늄, 탄산암모늄, 및 질산 암모늄과 같은 무기질소원; 글루탐산, 메티오닌, 글루타민과 같은 아미노산 및 펩톤, NZ-아민, 육류 추출물, 효모 추출물, 맥아 추출물, 옥수수 침지액, 카세인 가수분해물, 어류 또는 그의 분해생성물, 탈지 대두 케이크 또는 그의 분해생성물 등 유기질소원이 사용될 수 있다. 이들 질소원은 단독 또는 조합되어 사용될 수 있다. 상기 배지에는 인원으로서 인산 제1칼륨, 인산 제2칼륨 및 대응되는 소듐-함유 염이 포함될 수 있다. 사용될 수 있는 인원으로는 인산이수소칼륨 또는 인산수소이칼륨 또는 상응하는 나트륨-함유 염이 포함된다. 또한, 무기 화합물로는 염화나트륨, 염화칼슘, 염화철, 황산마그네슘, 황산철, 황산망간 및 탄산칼슘 등이 사용될 수 있다. 마지막으로, 상기 물질에 더하여 아미노산 및 비타민과 같은 필수 성장 물질이 사용될 수 있다.
- [49] 또한, 배양 배지에 적절한 전구체들이 사용될 수 있다. 상기된 원료들은 배양과정에서 배양물에 적절한 방식에 의해 회분식, 유가식 또는 연속식으로 첨가될 수 있으나, 특별히 이에 제한되지는 않는다. 수산화나트륨, 수산화칼륨, 암모니아와 같은 기초 화합물 또는 인산 또는 황산과 같은 산 화합물을 적절한 방식으로 사용하여 배양물의 pH를 조절할 수 있다.
- [50] 또한, 지방산 폴리글리콜 에스테르와 같은 소포제를 사용하여 기포 생성을 억제할 수 있다. 호기 상태를 유지하기 위해 배양물 내로 산소 또는 산소-함유 기체(예, 공기)를 주입한다. 배양물의 온도는 보통 27°C 내지 37°C, 바람직하게는 30°C 내지 35°C이다. 배양은 상기 펩타이드의 생성량이 최대로 얻어질 때까지 계속한다. 이러한 목적으로 보통 10 내지 100 시간에서 달성된다.
- [51] 아울러, 배양물로부터 상기 펩타이드를 회수하는 단계는 당업계에 공지된 방법에 의해 수행될 수 있다. 구체적으로, 상기 회수 방법은 생산된 상기 펩타이드의 회수에 사용될 수 있는 한, 특별히 이에 제한되지 않으나, 바람직하게는 원심분리, 여과, 추출, 분무, 건조, 증발, 침전, 결정화, 전기영동, 분별용해(예를 들면 암모늄 설페이트 침전), 크로마토그래피(예를 들면 이온 교환, 친화성, 소수성 및 크기 배제) 등의 방법을 사용할 수 있다.
- [52] 본 발명에 따르면, CPNE7 단백질 유래 펩타이드를 함유하는 상처치료용 약학 조성물은 진피 섬유아세포의 산화 스트레스로 인한 피부 질환 치료용 약학 조성물의 형태로 사용할 수 있다. 이러한 조성물은 통상적으로 사용되는 적절한 담체

(자연적 또는 비자연적 담체), 부형제 또는 희석제를 추가로 포함하여 제조될 수 있다. 구체적으로, 상기 약학 조성물은, 각각 통상의 방법에 따라 피부질환이 유발된 부위에 투여할 수 있는 멸균 주사 용액의 형태로 제형화하여 사용될 수 있다. 본 발명에서, 상기 약학 조성물에 포함될 수 있는 담체, 부형제 및 희석제로는 락토즈, 텍스트로즈, 수크로스, 솔비톨, 만니톨, 자일리톨,

- [53] 에리스리톨, 말티톨, 전분, 아카시아 고무, 알지네이트, 젤라틴, 칼슘 포스페이트, 칼슘 실리케이트, 셀룰로즈, 메틸 셀룰로즈, 미정질 셀룰로즈, 폴리비닐 피롤리돈, 물, 메틸히드록시벤조에이트, 프로필히드록시벤조에이트, 탈크, 마그네슘 스테아레이트, 광물유, 콜라겐 등을 들 수 있다. 제제화할 경우에는 보통 사용하는 충진제, 증량제, 결합제, 습윤제, 붕해제, 계면활성제 등의 희석제 또는 부형제를 사용하여 조제될 수 있다. 특히, 멸균된 수용액, 비수성용제, 현탁제, 유제, 동결건조 제제, 좌제, 연고제(예를 들어, 치수이장제 등) 등이 포함될 수 있다. 비수성용제, 현탁제로는 프로필렌글리콜(propylene glycol), 폴리에틸렌 글리콜, 올리브오일과 같은 식물성 기름, 에틸올레이트와 같은 주사 가능한 에스테르 등이 사용될 수 있다. 좌제의 기제로는 위텟솔(witepsol), 마크로골, 트윈(tween) 61, 카카오지, 라우린지, 글리세로제라틴 등이 사용될 수 있다.
- [54] 본 발명의 약학 조성물에 포함된 상기 펩타이드의 함량은 특별히 이에 제한되지 않으나, 최종 조성물 총중량을 기준으로 0.0001 내지 50 중량%, 보다 바람직하게는 0.01 내지 20 중량%의 함량으로 포함될 수 있다.
- [55] 상기 본 발명의 약학 조성물은 약제학적으로 유효한 양으로 투여될 수 있는데, 본 발명의 용어 "약제학적으로 유효한 양"이란 의학적 치료 또는 예방에 적용 가능한 합리적인 수혜/위험 비율로 질환을 치료 또는 예방하기에 충분한 양을 의미하며, 유효 용량 수준은 질환의 중증도, 약물의 활성, 환자의 연령, 체중, 건강, 성별, 환자의 약물에 대한 민감도, 사용된 본 발명 조성물의 투여 시간, 투여 경로 및 배출 비율 치료 기간, 사용된 본 발명의 조성물과 배합 또는 동시 사용되는 약물을 포함한 요소 및 기타 의학 분야에 잘 알려진 요소에 따라 결정될 수 있다. 본 발명의 약학 조성물은 단독으로 투여하거나 공지된 진피 섬유아세포의 산화스트레스로 인한 피부질환의 치료용 약학 조성물과 병용하여 투여될 수 있다. 상기 요소를 모두 고려하여 부작용 없이 최소한의 양으로 최대 효과를 얻을 수 있는 양을 투여하는 것이 중요하다.
- [56] 본 발명의 약학 조성물의 투여량은 사용목적, 질환의 중독도, 환자의 연령, 체중, 성별, 기왕력, 또는 유효성분으로서 사용되는 물질의 종류 등을 고려하여 당업자가 결정할 수 있다. 예를 들어, 본 발명의 약학 조성물은 성인 1인당 약 0.1 ng 내지 약 100 mg/kg, 바람직하게는 1 ng 내지 약 10 mg/kg로 투여할 수 있고, 본 발명의 조성물의 투여 빈도는 특별히 이에 제한되지 않으나, 1일 1회 투여하거나 또는 용량을 분할하여 수회 투여할 수 있다. 상기 투여량은 어떠한 면으로든 본 발명의 범위를 한정하는 것은 아니다.

- [57] 본 발명은 다른 하나의 양태로서 상기 약학 조성물을 약제학적으로 유효한 양으로 진피 섬유아세포의 산화스트레스로 인한 피부질환의 이 발병된 인간을 제외한 개체에 투여하는 단계를 포함하는 진피 섬유아세포의 산화스트레스로 인한 피부질환의 치료방법을 제공한다.
- [58] 본 발명의 용어 "개체"란 진피 섬유아세포의 산화스트레스로 인한 피부질환의 치료가 요구되는 쥐, 가축 등을 포함하는 포유동물 등을 제한 없이 포함할 수 있으나, 상기 질환이 발병된 개체 중에서 인간을 제외한다.
- [59] 본 발명의 진피 섬유아세포의 산화스트레스로 인한 피부질환의 치료용 약학 조성물의 투여 경로는 목적 조직에 도달할 수 있는 한 어떠한 일반적인 경로를 통하여도 투여될 수 있다. 본 발명의 약학 조성물은 특별히 이에 제한되지 않으나, 목적하는 바에 따라 경구 투여, 피부 투여, 근육 주사, 정맥 주사, 피하 주사, 호흡기 투여, 직장 투여, 환부 투여 등의 경로를 통해 투여될 수 있다.
- [60] '경구 투여(구강 내 투여)'는 약물을 입을 통해 섭취하는 방식으로, 일반적으로 알약, 캡슐, 액체 형태의 약물이 사용될 수 있다. '피부 투여'는 약물을 피부에 바르거나 부착하는 방식으로, 크림, 젤, 패치 등의 형태로 사용될 수 있다. '근육 주사'는 약물을 직접 근육 조직에 주사하는 방식으로, 주로 주사기와 바늘을 사용할 수 있다. '정맥 주사'는 약물을 직접 혈관에 주입하는 방법으로, 주사기와 바늘, 혹은 정맥 캐놀라를 사용할 수 있다. '피하 주사'는 약물을 피부 아래 지방 조직에 주입하는 방식으로, 인슐린과 같은 약물 투여에 사용될 수 있다. '호흡기 투여'는 약물을 입 혹은 코를 통해 호흡기에 도달하게 하는 방식으로, 흡입기, 가스, 증기 등의 형태로 사용될 수 있다. '직장 투여'는 약물을 직장 내에 주입하는 방식으로, 직장 약, 직장 적립제 등의 형태로 사용될 수 있다. '환부 투여'는 약물을 직접 치료가 필요한 부위에 적용하는 방식으로, 질환 특성에 따라 크림, 젤, 패치 등의 형태로 사용될 수 있다.
- [61] 또 다른 하나의 양태로서, 본 발명은 상기 펩타이드를 포함하는 진피 섬유아세포의 산화스트레스로 인한 피부질환의 예방 또는 개선용 의약품 조성물을 제공한다.
- [62] 본 발명의 용어, "개선"이란, 치료되는 상태와 관련된 파라미터, 예를 들면 증상의 정도를 적어도 감소시키는 모든 행위를 의미한다.
- [63] 본 발명에 있어서, 상기 개선은 본 발명의 펩타이드를 유효 성분으로 포함하는 약학 조성물을 진피 섬유아세포의 산화스트레스로 인한 피부질환의 치료가 요구되는 개체에 투여하여 진피 섬유아세포 내의 활성산소의 제거를 촉진함으로써, 진피 섬유아세포의 산화스트레스로 인한 피부질환의 증상이 호전되거나 또는 이롭게 되도록 하는 모든 행위를 의미하는 것으로 해석될 수 있다.
- [64] 본 발명의 용어 "의약품"이란, 사람이나 동물의 질병을 진단, 치료, 개선, 경감, 처치 또는 예방할 목적으로 사용되는 물품들 중 의약품보다 작용이 경미한 물품들을 의미하는 것으로, 예를 들어 약사법에 따르면 의약품이란 의약품의 용도로 사용되는 물품을 제외한 것으로, 사람·동물의 질병 치료나 예방에 쓰이

는 섬유 · 고무 제품, 인체에 대한 작용이 경미하거나 직접 작용하지 않으며, 기구 또는 기계가 아닌 것과 이와 유사한 것, 감염병을 막기 위한 살균 · 살충제 등이 이에 포함된다.

- [65] 본 발명에 있어서, 상기 펩타이드를 포함하는 의약품 조성물의 종류나 제형은 특별히 제한되지 않으나, 일 예로서, 연고제, 패치제, 파우더제, 겔화제, 스프레이제, 정제 또는 스프레이제 등일 수 있다.
- [66] 또 다른 하나의 양태로서, 본 발명은 상기 펩타이드를 포함하는 진피 섬유아세포의 산화스트레스로 인한 피부질환의 예방 또는 개선용 건강 기능성 식품 조성물을 제공한다.
- [67] 본 발명의 용어, "식품"은 육류, 소시지, 빵, 초콜릿, 캔디류, 스낵류, 과자류, 피자, 라면, 기타 면류, 껌류, 아이스크림류를 포함한 낙농제품, 각종 스프, 음료수, 차, 드링크제, 알코올음료, 비타민 복합제, 건강 기능 식품 및 건강식품 등이 있으며, 통상적인 의미에서의 식품을 모두 포함한다.
- [68] 상기 건강 기능(성) 식품(functional food)이란, 특정 보건용 식품(food for special health use, FoSHU)과 동일한 용어로, 영양 공급 외에도 생체 조절 기능이 효율적으로 나타나도록 가공된 의학, 의료 효과가 높은 식품을 의미한다. 여기서 "기능(성)"이라 함은 인체의 구조 및 기능에 대하여 영양소를 조절하거나 생리학적 작용 등과 같은 보건 용도에 유용한 효과를 얻는 것을 의미한다. 본 발명의 식품은 당 업계에서 통상적으로 사용되는 방법에 의하여 제조 가능하며, 상기 제조 시에는 당 업계에서 통상적으로 첨가하는 원료 및 성분을 첨가하여 제조할 수 있다. 또한 상기 식품의 제형 또한 식품으로 인정되는 제형이면 제한 없이 제조될 수 있다. 본 발명의 식품용 조성물은 다양한 형태의 제형으로 제조될 수 있으며, 일반 약품과는 달리 식품을 원료로 하여 약품의 장기 복용 시 발생할 수 있는 부작용 등이 없는 장점이 있고, 휴대성이 뛰어나, 본 발명의 식품은 진피 섬유아세포의 산화스트레스로 인한 피부질환의 예방 또는 개선의 효과를 증진시키기 위한 보조제로 섭취가 가능하다.
- [69] 상기 건강식품(health food)은 일반식품에 비해 적극적인 건강 유지나 증진 효과를 가지는 식품을 의미하고, 건강보조식품(health supplement food)은 건강 보조 목적의 식품을 의미한다. 때에 따라, 건강 기능 식품, 건강식품, 건강보조식품의 용어는 혼용될 수 있다.
- [70] 구체적으로, 상기 건강 기능 식품은 본 발명의 펩타이드를 음료, 차류, 향신료, 껌류, 과자류 등의 식품 소재에 첨가하거나, 캡슐화, 분말화, 현탁액 등으로 제조한 식품으로, 이를 섭취할 경우 건강상 특정한 효과를 가져오는 것을 의미하나, 일반 약품과는 달리 식품을 원료로 하여 약품의 장기 복용 시 발생할 수 있는 부작용이 없는 장점이 있다.
- [71] 본 발명의 식품 조성물은, 일상적으로 섭취하는 것이 가능하기 때문에 진피 섬유아세포의 산화스트레스로 인한 피부질환의 예방 또는 개선에 대하여 높은 효과를 기대할 수 있으므로, 매우 유용하게 사용될 수 있다.

- [72] 상기 식품 조성물은 생리학적으로 허용 가능한 담체를 추가로 포함할 수 있는데, 담체의 종류는 특별히 제한되지 않으며 당해 기술 분야에서 통상적으로 사용되는 담체라면 어느 것이든 사용할 수 있다.
- [73] 또한, 상기 식품 조성물은 식품 조성물에 통상 사용되어 냄새, 맛, 시각 등을 향상할 수 있는 추가 성분을 포함할 수 있다. 예를 들어, 비타민 A, C, D, E, B1, B2, B6, B12, 니아신(niacin), 바이오틴(biotin), 폴레이트(folate), 판토텐산(panthotenic acid) 등을 포함할 수 있다. 또한, 아연(Zn), 철(Fe), 칼슘(Ca), 크롬(Cr), 마그네슘(Mg), 망간(Mn), 구리(Cu), 크롬(Cr) 등의 미네랄을 포함할 수 있다. 또한, 라이신, 트립토판, 시스테인, 발린 등의 아미노산을 포함할 수 있다.
- [74] 또한, 상기 식품 조성물은 방부제(소르빈산 칼륨, 벤조산나트륨, 살리실산, 데히드로초산나트륨 등), 살균제(표백분과 고도 표백분, 차아염소산 나트륨 등), 산화방지제(부틸히드록시아니졸(BHA), 부틸하이드록시톨루엔(BHT) 등), 착색제(타르색소 등), 발색제(아질산나트륨, 아초산 나트륨 등), 표백제(아황산나트륨), 조미료(MSG 글루탐산 나트륨 등), 감미료(둘신, 사이클라메이트, 사카린, 나트륨 등), 향료(바닐린, 락톤류 등), 팽창제(명반, D-주석산수소칼륨 등), 강화제, 유화제, 증점제(호료), 피막제, 겔 기초제, 거품억제제, 용제, 개량제 등의 식품 첨가물(food additives)을 포함할 수 있다. 상기 첨가물은 식품의 종류에 따라 선별되고 적절한 양으로 사용될 수 있다.
- [75] 본 발명의 펩타이드는 그대로 첨가하거나 다른 식품 또는 식품 성분과 함께 사용될 수 있고, 통상적인 방법에 따라 적절하게 사용될 수 있다. 유효성분의 혼합 양은 그의 사용 목적(예방, 건강 또는 치료적 처치)에 따라 적합하게 결정될 수 있다. 일반적으로, 식품 또는 음료의 제조 시에 본 발명의 식품 조성물은 식품 또는 음료에 대하여 50 중량 부 이하, 구체적으로 20 중량 부 이하의 양으로 첨가될 수 있다. 그러나 건강 및 위생을 목적으로 장기간 섭취할 경우에는 상기 범위 이하의 함량을 포함할 수 있으며, 안전성 면에서 아무런 문제가 없기 때문에 유효성분은 상기 범위 이상의 양으로도 사용될 수 있다.
- [76] 본 발명의 식품 조성물의 일 예로 건강음료 조성물로 사용될 수 있으며, 이 경우 통상의 음료와 같이 여러 가지 향미제 또는 천연 탄수화물 등을 추가 성분으로 함유할 수 있다. 상술한 천연 탄수화물은 포도당, 과당과 같은 모노사카라이드; 말토스, 슈크로스과 같은 디사카라이드; 텍스트린, 사이클로텍스트린과 같은 폴리사카라이드; 자일리톨, 소르비톨, 에리트리톨 등의 당알코올일 수 있다. 감미제는 타우마틴, 스테비아 추출물과 같은 천연 감미제; 사카린, 아스파탐과 같은 합성 감미제 등을 사용할 수 있다. 상기 천연 탄수화물의 비율은 본 발명의 건강음료 조성물 100 mL 당 일반적으로 약 0.01 내지 0.04 g, 구체적으로 약 0.02 내지 0.03 g이 될 수 있다.
- [77] 상기 외에 건강음료 조성물은 여러 가지 영양제, 비타민, 전해질, 풍미제, 착색제, 펙트산, 펙트산의 염, 알긴산, 알긴산의 염, 유기산, 보호성 콜로이드 증점제, pH 조절제, 안정화제, 방부제, 글리세린, 알코올 또는 탄산화제 등을 함유할 수

있다. 그 밖에 천연 과일주스, 과일주스 음료, 또는 야채 음료의 제조를 위한 과육을 함유할 수 있다. 이러한 성분은 독립적으로 또는 혼합하여 사용할 수 있다. 이러한 첨가제의 비율은 크게 중요하진 않지만, 본 발명의 건강음료 조성물 100 중량 부당 0.01 내지 0.1 중량부의 범위에서 선택되는 것이 일반적이다.

[78] 본 발명의 식품 조성물은 CPNE7단백질 유래 펩타이드를 포함하는 피부 노화 억제 또는 상처치료 효과를 나타낼 수 있다면 다양한 중량%로 포함할 수 있으나, 구체적으로 본 발명의 펩타이드를 식품 조성물의 총중량 대비 0.00001 내지 100 중량% 또는 0.01 내지 80 중량%로 포함할 수 있으나, 이에 제한되지 않는다.

[79]

발명의 효과

[80] 본 발명의 실시 예에 따른 CPNE7단백질 유래 펩타이드를 포함하는 피부 노화 억제 또는 상처치료용 조성물은 피부 진피층 내 섬유 아 세포 내에서의 피부 탄력 촉진 및 노화 예방에 관여하는 Type I Collagen과 Type III Collagen 합성을 촉진시킬 수 있다.

[81] 본 발명의 다른 실시 예에 따른 CPNE7단백질 유래 펩타이드를 포함하는 피부 노화억제 또는 상처치료용 조성물은 피부 진피-표피 경계부의 기저막에서의 피부 탄력 촉진 및 노화 예방에 관여하는 Type IV Collagen 합성을 촉진시킬 수 있다.

[82] 본 발명의 또 다른 실시 예에 따른 CPNE7단백질 유래 펩타이드를 포함하는 피부 노화억제 또는 상처치료용 조성물은 피부 표피층 내 각질 세포 내에서의 표피층의 재생 촉진 및 노화를 예방하는 펩타이드 및 이의 용도를 제공하는 것을 목적으로 한다.

[83] 본 발명의 또 다른 실시 예에 따른 CPNE7단백질 유래 펩타이드를 포함하는 피부 노화억제 또는 상처치료용 조성물은 피부 표피층 내 각질 세포 내에서의 피부 보습 촉진 및 노화 예방에 관여하는 Filaggrin과 Involucrin 합성을 촉진시킬 수 있다.

[84] 본 발명의 또 다른 실시 예에 따른 CPNE7단백질 유래 펩타이드를 포함하는 피부 노화억제 또는 상처치료용 조성물은 피부 표피층과 진피층 내에서의 콜라겐 분해를 저해하여 피부 노화 예방에 관여하는 MMP-1의 발현을 감소시킬 수 있다.

[85]

[86] 본 발명의 효과는 이상에서 언급한 것으로 제한되지 않으며, 언급되지 않은 또 다른 효과들은 아래의 기재로부터 본 발명이 속하는 기술 분야 통상의 지식을 가진 자에게 명확하게 이해될 수 있을 것이다.

[87]

도면의 간단한 설명

- [88] 도 1은 본 발명의 펩타이드를 농도별로 48시간 처리한 후, WST-8 용액을 배양 배지에 10 대 1로 분주하고 차광하여 37 °C 인큐베이터 조건에서 2시간 반응시킨 후, Microplate로 450nm 흡광도에서 측정한 결과이다.
- [89] 도 2의 (A)는 본 발명의 펩타이드(#96)를 7일간 다양한 농도로 처리한 후 Type I Collagen 단백질 형성 정도를 확인한 것이고, 도 4b의 (B)는 본 발명의 펩타이드(#96) 100 uM을 7일 동안 7회 처리하여 Type I Collagen 단백질 형성에 따른 EC50 값을 확인한 결과이다.
- [90] 도 3a는 표 13의 펩타이드에 대한 Type I Collagen 단백질 발현량을 비교한 그래프이다.
- [91] 도 3b는 본 발명의 펩타이드(#96)를 7일 동안 24시간 간격으로 100 uM의 농도로 처리한 후 콜라겐 침착 정도를 대조군과 비교한 것으로, (A)는 Confocal Microscope (Type I Collagen) 분석 결과이고, (B)는 Confocal Microscope Z-Stack Imaging 프로그램을 사용한 분석 결과이다.
- [92] 도 3c는 hDFs에서 본 발명의 펩타이드의 alpha-smooth muscle actin (α -SMA) 합성 효능 확인 (N=3) 한 것이다.
- [93] 도 4는 본 발명의 펩타이드 다회 처리 시 인간 유래 진피 섬유아세포 콜라겐 형성을 확인한 결과이다.
- [94] 도 5는 본 발명의 펩타이드의 인간 유래 3차원 피부조직 투과도를 확인한 결과이다.
- [95] 도 6a는 본 발명의 펩타이드의 인간 유래 3차원 피부조직 효능을 확인한 결과이다.
- [96] 도 6b는 Neoderm-ED 피부조직에서 펩타이드의 Collagen 형성능 확인 (Ex vivo) 한 것이다.
- [97] 도 7은 본 발명의 펩타이드의 Keratinocyte 증식 효능을 확인한 결과이다.
- [98] 도 8은 본 발명의 펩타이드의 피부 처리에 따른 효능을 확인한 결과이다.
- [99] 도 9는 본 발명의 펩타이드의 처리에 따른 (A) 활성산소 감소 효과 및 (B) Anti-Photodamage 효과를 확인한 결과를 나타낸 것이다.
- [100] 도 10은 본 발명의 펩타이드의 농도별 처리에 따른 Melanin Secretion 감소 효능을 확인한 결과를 나타낸 것이다.
- [101] 도 11은 Keratinocyte 및 hDF에서 본 발명의 펩타이드의 Migration 효능을 확인한 결과를 나타낸 것이다.

[102]

발명의 실시를 위한 형태

- [103] 본 발명의 목적 및 효과, 그리고 그것들을 달성하기 위한 기술적 구성들은 첨부되는 도면과 함께 상세하게 후술되어 있는 실시 예들을 참조하면 명확해질 것이다. 본 발명을 설명함에 있어서 공지 기능 또는 구성에 대한 구체적인 설명이 본 발명의 요지를 불필요하게 흐릴 수 있다고 판단되는 경우에는 그 상세한 설명을

생략할 것이다. 그리고 후술 되는 용어들은 본 발명에서의 기증을 고려하여 정의된 용어들로서 이는 사용자, 운용자의 의도 또는 관례 등에 따라 달라질 수 있다.

[104] 그러나, 본 발명은 이하에서 개시되는 실시 예들에 한정되는 것이 아니라 서로 다른 다양한 형태로 구현될 수 있다. 단지 본 실시 예들은 본 발명의 개시가 완전하도록 하고, 본 발명이 속하는 기술 분야에서 통상의 지식을 가진 자에게 발명의 범주를 완전하게 알려주기 위해 제공되는 것이며, 본 발명은 청구 항의 범주에 의해 정의될 뿐이다. 그러므로 그 정의는 본 명세서 전반에 걸친 내용을 토대로 내려져야 할 것이다.

[105] 이하에서는 본 발명의 실시 예에 대하여 구체적으로 설명하기로 한다.

[106]

[107] 실시 예 1. CPNE7단백질 유래 펩타이드의 합성

[108]

[109] 본 발명자들은 CPNE7단백질 유래 펩타이드(서열 번호 1)를 9-플루오르닐메틸 옥시카보닐(9-fluorenylmethyloxycarbonyl, Fmoc) 방법으로 합성하고, 상기 합성된 펩타이드의 아미노산을 치환하여 각 그룹의 펩타이드를 합성하였다(표 1 내지 12).

[110] N-KYQRRKKNKY-C(서열 번호 1)

[111] 먼저, 그룹 1의 펩타이드는 서열 번호 1의 펩타이드 또는 상기 서열 번호 1의 펩타이드의 5번 내지 7번 아미노산을 리신 또는 아르기닌으로 치환하여 합성하였다(표 1).

[112] [표1]

그룹 1의 펩타이드

서열번호	아미노산 서열(N-C)
1	KYQRRKKNKY
2	KYQRRKRKNKY
3	KYQRRRKKNKY
4	KYQRRRRKNKY
5	KYQRKKKKNKY
6	KYQRKRKNKY
7	KYQRKKRNKY
8	KYQRKRRKNKY

[113] 다음으로, 그룹 2의 펩타이드는 서열 번호 1의 펩타이드의 5번 내지 7번 아미노산을 리신 또는 아르기닌으로 치환하고, 8번 아미노산을 세린으로 치환하여 합성하였다(표 2).

[114] [표2]

그룹 2의 펩타이드

서열번호	아미노산 서열(N-C)
9	KYQRRKSKY
10	KYQRRKRSKY
11	KYQRRRKSXY
12	KYQRRRRSKY
13	KYQRKKKSKY
14	KYQRKRKSKY
15	KYQRKKRSKY
16	KYQRKRRSKY

[115] 다음으로, 그룹 3의 펩타이드는 서열 번호 1의 펩타이드의 5번 내지 7번 아미노산을 리신 또는 아르기닌으로 치환하고, 9번 아미노산을 타이로신으로 치환하여 합성하였다(표 3).

[116] [표3]
그룹 3의 펩타이드

서열번호	아미노산 서열(N-C)
17	KYQRRKKNYK
18	KYQRRKRNYK
19	KYQRRRKNYK
20	KYQRRRRNYK
21	KYQRKKKNYK
22	KYQRKRKNYK
23	KYQRKKRNYK
24	KYQRKRKNYK

[117] 다음으로, 그룹 4의 펩타이드는 서열 번호 1의 펩타이드의 5번 내지 7번 아미노산을 리신 또는 아르기닌으로 치환하고, 8번 아미노산을 세린으로 치환하며, 9번 아미노산을 타이로신으로 치환하고, 10번 아미노산을 리신으로 치환하여 합성하였다(표 4).

[118] [표4]
그룹 4의 펩타이드

서열번호	아미노산 서열(N-C)
25	KYQRRKKSXY
26	KYQRRKRXY
27	KYQRRRKSXY
28	KYQRRRRXY
29	KYQRKKKXY
30	KYQRKRKXY

31	KYQRKKRSYK
32	KYQRKRRSYK

[119] 다음으로, 그룹 5의 펩타이드는 서열 번호 1의 펩타이드의 3번 아미노산을 아르기닌으로 치환하고, 4번 아미노산을 글루타민으로 치환하며, 5번 내지 7번 아미노산을 리신 또는 아르기닌으로 치환하여 합성하였다(표 5).

[120] [표5]
그룹 5의 펩타이드

서열번호	아미노산 서열(N-C)
33	KYRQRKKNKY
34	KYRQRKRNKY
35	KYRQRRKNKY
36	KYRQRRRNKY
37	KYRQKKKNKY
38	KYRQKRKNKY
39	KYRQKKRNKY
40	KYRQKRRNKY

[121] 다음으로, 그룹 6의 펩타이드는 서열 번호 1의 펩타이드의 3번 아미노산을 아르기닌으로 치환하고, 4번 아미노산을 글루타민으로 치환하며, 5번 내지 7번 아미노산을 리신 또는 아르기닌으로 치환하고, 8번 아미노산을 세린으로 치환하여 합성하였다(표 6).

[122] [표6]
그룹 6의 펩타이드

서열번호	아미노산 서열(N-C)
41	KYRQRKKSKY
42	KYRQRKRSKY
43	KYRQRRKSKY
44	KYRQRRRSKY
45	KYRQKKKSKY
46	KYRQKRKSKY
47	KYRQKKRSKY
48	KYRQKRRSKY

[123] 다음으로, 그룹 7의 펩타이드는 서열 번호 1의 펩타이드의 3번 아미노산을 아르기닌으로 치환하고, 4번 아미노산을 글루타민으로 치환하며, 5번 내지 7번 아미노산을 리신 또는 아르기닌으로 치환하고, 9번 아미노산을 타이로신으로 치환하며, 10번 아미노산을 리신으로 치환하여 합성하였다(표 7).

[124]

- [125] [표7]
그룹 7의 펩타이드

서열번호	아미노산 서열(N-C)
49	KYRQRKKNYK
50	KYRQRKRNYK
51	KYRQRRKNYK
52	KYRQRRRNYK
53	KYRQKKKNYK
54	KYRQKRKNYK
55	KYRQKKRNYK
56	KYRQKRRNYK

- [126] 다음으로, 그룹 8의 펩타이드는 서열 번호 1의 펩타이드의 3번 아미노산을 아르기닌으로 치환하고, 4번 아미노산을 글루타민으로 치환하며, 5번 내지 7번 아미노산을 리신 또는 아르기닌으로 치환하고, 8번 아미노산을 세린으로 치환하며, 9번 아미노산을 타이로신으로 치환하고, 10번 아미노산을 리신으로 치환하여 합성하였다(표 8).

- [127] [표8]
그룹 8의 펩타이드

서열번호	아미노산 서열(N-C)
57	KYRQRKKSYK
58	KYRQRKRSYK
59	KYRQRRKSYK
60	KYRQRRRSYK
61	KYRQKKKSYK
62	KYRQKRKSYK
63	KYRQKKRSYK
64	KYRQKRRSYK

- [128] 다음으로, 그룹 9의 펩타이드는 서열 번호 1의 펩타이드의 3번 아미노산을 리신으로 치환하고, 4번 아미노산을 글루타민으로 치환하며, 5번 내지 7번 아미노산을 리신 또는 아르기닌으로 치환하여 합성하였다(표 9).

- [129] [표9]
그룹 9의 펩타이드

서열번호	아미노산 서열(N-C)
65	KYKQRKKNKY
66	KYKQRKRNKY
67	KYKQRRKNKY

68	KYKQRRRNKY
69	KYKQKKKNKY
70	KYKQKRKNKY
71	KYKQKKRNKY
72	KYKQKRRNKY

- [130] 다음으로, 그룹 10의 펩타이드는 서열 번호 1의 펩타이드의 3번 아미노산을 리신으로 치환하고, 4번 아미노산을 글루타민으로 치환하며, 5번 내지 7번 아미노산을 리신 또는 아르기닌으로 치환하고, 8번 아미노산을 세린으로 치환하여 합성하였다(표 10).

- [131] [표10]
그룹 10의 펩타이드

서열번호	아미노산 서열(N-C)
73	KYKQRKKSKY
74	KYKQRKRSKY
75	KYKQRRKSKY
76	KYKQRRRSKY
77	KYKQKKKSKY
78	KYKQKRKSKY
79	KYKQKKRSKY
80	KYKQKRRSKY

- [132] 다음으로, 그룹 11의 펩타이드는 서열 번호 1의 펩타이드의 3번 아미노산을 리신으로 치환하고, 4번 아미노산을 글루타민으로 치환하며, 5번 내지 7번 아미노산을 리신 또는 아르기닌으로 치환하고, 9번 아미노산을 타이로신으로 치환하며, 10번 아미노산을 리신으로 치환하여 합성하였다(표 11).

- [133] [표11]
그룹 11의 펩타이드

서열번호	아미노산 서열(N-C)
81	KYKQRKKNYK
82	KYKQRKRNYK
83	KYKQRRKNYK
84	KYKQRRRNYK
85	KYKQKKKNYK
86	KYKQKRKNYK
87	KYKQKKRNYK
88	KYKQKRRNYK

[134] 끝으로, 그룹 12의 펩타이드는 서열 번호 1의 펩타이드의 3번 아미노산을 리신으로 치환하고, 4번 아미노산을 글루타민으로 치환하며, 5번 내지 7번 아미노산을 리신 또는 아르기닌으로 치환하고, 8번 아미노산을 세린으로 치환하며, 9번 아미노산을 타이로신으로 치환하고, 10번 아미노산을 리신으로 치환하여 합성하였다(표 12).

[135] [표12]
그룹 12의 펩타이드

서열번호	아미노산 서열(N-C)
89	KYKQRKKS Y K
90	KYKQRKR S SYK
91	KYKQRRK S SYK
92	KYKQRRRS S YK
93	KYKQKKK S SYK
94	KYKQKRK S SYK
95	KYKQKKR S SYK
96	KYKQKRRS S YK

[136] 실시 예 2. WST-8 Assay (Cellrix, B1007-500)

[137]

[138] 인간 유래 진피 섬유아세포(Human dermal fibroblasts, hDFs)를 96well plate (2% FBS, 0.1% Insulin, 0.1% FGF, 0.1% Gentamycin sulfate-Amphotericin 이 함유된 Fibroblast Growth Medium (Lonza, CC-4126)을 사용)에 0.3×10^5 /well로 분주하고 하여 37 °C, 5% CO₂ 조건의 인큐베이터에서 24시간 배양하였다.

[139]

[140] 진피 섬유아세포에서 펩타이드(서열 번호 96)의 세포 독성 확인을 위하여 WST-8 분석을 진행하였다. 상기 펩타이드를 진피 섬유아세포에 각각 10, 100uM, 1, 5, 10mM 농도로 처리하였다. 각 농도별로 48시간 처리한 후, WST-8 용액을 배양 배지에 10 대 1로 분주하고 차광하여 37 °C 인큐베이터 조건에서 2시간 반응시킨 후, Microplate로 450nm 흡광도에서 측정하였다.

[141]

[142] 도 1은 본 발명의 펩타이드(#96)를 농도별로 48시간 처리한 후, WST-8 용액을 배양 배지에 10 대 1로 분주하고 차광하여 37 °C 인큐베이터 조건에서 2시간 반응시킨 후, Microplate로 450nm 흡광도에서 측정한 결과이다.

[143]

[144] 진피 섬유아세포에 본 발명의 펩타이드(#96) 10, 100uM, 1, 5, 10mM 농도를 각각 처리하였음. 48시간 후, WST-8 분석을 통해 세포 생존율을 정량하였다. 그 결과, 본 발명의 펩타이드(#96)은 5mM의 농도까지 진피 섬유아세포에 세포 독성을 나타내지 않았으며, 10mM의 농도에서 유의미한 세포 독성을 나타내었다.

[145]

[146] 실시 예 3-1. hDFs에서 펩타이드의 다회 처리에 따른 Type I 콜라겐 형성 EC50 값 확인

[147]

[148] 본 발명에 따른 본 발명의 펩타이드(#96)의 다회 처리에 따른 Type I 콜라겐 합성능을 확인하기 위하여, 진피 섬유아세포를 60mm dish에 1×10^5 /6 well plate로 분주하고 37 °C 5% CO₂ 인큐베이터에서 24시간 배양하였다. 여기에 펩타이드(서열 번호 96)를 7일 동안 24시간 간격으로 1 pM, 10 pM, 100 pM, 1 nM, 10 nM, 1000 nM, 1 uM, 10 uM, 100 uM, 1mM 처리(총 11그룹)의 농도로 처리하였다.

[149] 이후, 세포를 PBS 세척 후에 단백질을 분리해 내어 Type I Collagen의 단백질 변화량을 Western blot을 통해 확인하였고, β -Actin 단백질 양을 통해 Normalization 하여 비교하였다.

[150] 도 2의 (A)는 본 발명의 펩타이드(#96)를 7일간 다양한 농도로 처리한 후 Type I Collagen 단백질 형성 정도를 확인한 것이고, 도 4b의 (B)는 본 발명의 펩타이드(#96) 100 uM을 7일 동안 7회 처리하여 Type I Collagen 단백질 형성에 따른 EC50 값을 확인한 결과이다. 도 2를 참고하면 본 발명의 펩타이드(#96)의 다회 처리 시 EC50 값은 8.621 pM으로 확인되었으며, 대조군에 비하여 Type I Collagen의 발현이 유의미하게 증가함을 알 수 있다.

[151]

[152] 실시 예 3-2. 인간 유래 진피 섬유아세포에서 그룹 1 내지 12의 펩타이드의 Type I 콜라겐 합성능 확인

[153]

[154] 각 그룹별 펩타이드의 Type I 콜라겐 합성능을 확인하기 위하여, 진피 섬유아세포를 60mm dish에 1×10^5 /6 well plate로 분주하고 37 °C 5% CO₂ 인큐베이터에서 24시간 배양하였다. 여기에 각 펩타이드를 100uM 처리하고 24시간 배양하였다. 24시간 후, 세포를 PBS 세척 후에 단백질을 분리해 내어 Type I Collagen의 단백질 변화량을 Western blot을 통해 확인하였고, β -Actin 단백질 양을 통해 Normalization 하여 비교하였다.

[155] 표 13은 본 발명의 1 내지 12의 각 그룹별 펩타이드 100 uM의 농도를 진피 섬유아세포에 단회 처리하고 24시간 후, Type I Collagen 단백질 양의 변화를 확인한 결과이다. 도 3a는 표 13의 펩타이드에 대한 Type I Collagen 단백질 발현 양을 비교한 그래프이다. 이를 통하여 확인할 수 있는 바와 같이 본 발명의 펩타이드는 우수한 Type I 콜라겐 합성능을 보임을 알 수 있다.

[156]

[157] [표13]

서열번호	아미노산서열	Relative Protein Expression levels of Type I Collagen

Control	-	1
1	KYQRRKKNKY	1.33516
8	KYQRKRRNKY	2.31151
9	KYQRRKKSKY	1.5182
16	KYQRKRRSKY	2.83006
17	KYQRRKKNYK	1.99857
24	KYQRKRRNYK	2.8985
25	KYQRRKKSYK	1.88521
32	KYQRKRRSYK	3.29178
33	KYRQRKKNKY	2.03416
40	KYRQKRRNKY	3.50524
41	KYRQRKKSKY	1.6575
48	KYRQKRRSKY	3.15834
49	KYRQRKKNYK	1.27334
56	KYRQKRRNYK	2.80845
57	KYRQRKKSYK	1.40067
64	KYRQKRRSYK	3.62404
65	KYKQRKKNKY	1.61994
72	KYKQKRRNKY	3.08218
73	KYKQRKKSKY	1.91764
80	KYKQKRRSKY	4.68996
81	KYKQRKKNYK	3.28704
88	KYKQKRRNYK	4.40885
89	KYKQRKKSYK	2.31899
93	KYKQKKKSYK	2.63127
95	KYKQKKRSYK	3.43182
96	KYKQKRRSYK	2.14839

[158] 실시 예 3-3. hDFs에서 펩타이드의 다회 투여에 따른 **Type I** 콜라겐 침착 (deposition) 확인

[159]

- [160] 본 발명에 따른 본 발명의 펩타이드(#96)의 다회 투여에 따른 Type I 콜라겐 합성능을 확인하기 위하여, 진피 섬유아세포를 60mm dish에 1×10^5 /6 well plate로 분주하고 37 °C 5% CO₂ 인큐베이터에서 24시간 배양하였다. 여기에 펩타이드(서열 번호 96), Vitamin C(양성 대조군)를 각각 7일 동안 24시간 간격으로 100 uM의 농도로 처리하였다.
- [161] 이후, 세포를 PBS 세척 후에 단백질을 분리해 내어 Type I Collagen의 단백질 변화양을 Confocal Microscope (Type I Collagen)을 통해 확인하였다.
- [162] 도 3b는 본 발명의 펩타이드(#96)를 7일 동안 24시간 간격으로 100 uM의 농도로 처리한 후 콜라겐 침착 정도를 대조군과 비교한 것으로, (A)는 Confocal Microscope (Type I Collagen) 분석 결과이고, (B)는 Confocal Microscope Z-Stack Imaging 프로그램을 사용한 분석 결과이다.
- [163] 이를 통해 7일째, 대조군에 비해 본 발명의 펩타이드(#96) 처리 군에서 ECM(Extracellular Matrix) 내 Type I Collagen 양이 유의미하게 증가함을 확인하였다.
- [164]
- [165] 실시 예 3-4. hDFs에서 펩타이드의 α -SMA 합성 효능 확인시험
- [166] 본 발명에 따른 본 발명의 펩타이드(#96)의 투여에 따른 상처 치유 촉진 가능성을 확인하기 위하여, 진피 섬유아세포를 1.5×10^5 / Confocal Dish로 분주하고 37 °C 5% CO₂ 인큐베이터에서 24시간 배양하였다. 여기에 펩타이드(#96), Vitamin C(양성대조군) 100 uM을 48시간 동안 처리하였다.
- [167] 이후, 세포를 PBS 세척 후에 alpha-smooth muscle actin (α -SMA)의 단백질 변화량을 Confocal Microscope 을 통해 확인하였다.
- [168] α -평활근 액틴(smooth muscle actin, " α -SMA")은 피부 진피의 섬유모세포에서 발현이 되며, 피부 조직의 구조적 지지를 제공하고 피부의 탄력을 유지하는 역할을 한다. 또한 상처가 생기면 상처 부위의 섬유아세포들이 α -SMA를 발현하여 상처 피부를 수축시키는 역할을 한다. 이는 상처 치유 과정에서 상처 크기를 줄이고 상처 피부를 조직 손상으로부터 보호할 수 있다. 따라서, 피부에서 염증이 발생 시 α -SMA가 염증 부위에 증가하여 염증 반응을 조절하는 역할을 하므로 α -SMA는 피부 조직의 유지 및 안정성에 있어서 중요한 역할을 한다.
- [169]
- [170] 도 3c는 hDFs에서 펩타이드(#96)의 alpha-smooth muscle actin (α -SMA) 합성 효능 확인 (N=3) 한 것이다. 도 3c를 참고하면, 펩타이드(#96) 100 uM 단 회 처리만으로도 α -SMA 가 유의미하게 증가되며 상처 치유 촉진 효능이 있음을 알 수 있다.
- [171]
- [172] 실시 예 4. 광학현미경을 통한 세포 변화 관찰
- [173]

- [174] *In vitro* 상에서 진피 섬유아세포의 콜라겐 합성능을 증가시키는 대표적 물질로 알려져 있는 Vitamin C와 본 발명의 펩타이드(#96)와의 콜라겐 합성 효능을 인간 유래 진피 섬유아세포에 적용하여 비교하였다. 단회 도포 (총 1회)와 다회 도포 (총 7회) 그룹으로 나누어 총 7일간, 본 발명의 펩타이드(#96) 100uM 및 Vitamin C 100uM 그룹에 각각 처리하였다.
- [175]
- [176] 구체적으로, 진피 섬유아세포를 96well plate에 0.3×10^5 /well로 분주하고 37 °C 5% CO₂ 인큐베이터에서 24시간 배양하였다.
- [177]
- [178] Picro Sirius Red 염색법은 Type I Collagen과 Type III Collagen 주요 타겟으로 하는 대표적 콜라겐 염색법 중 하나로써, 총 7일간, 본 발명의 펩타이드(#96) 100uM 과 Vitamin C 100uM를 단회 도포(총 1회) 및 다회 도포(총 7회) 처리한 후, Picro Sirius Red 염색 분석을 진행하였다. Picro Sirius Red에 Positive 한 콜라겐을 정량 하였을 때, 단회 도포 그룹에서 본 발명의 펩타이드(#96) 처리 군에서 대조군에 비해 더 높게 관찰되었다(도 4). 다회 도포 그룹에서는 대조군에 비해 본 발명의 펩타이드(#96) 처리 군과 Vitamin C 처리 군에서 Picro Sirius Red에 Positive 한 콜라겐들이 확연히 더 많이 증가하였으며, 정량 결과 역시 유의성이 관찰되었다(도 4).
- [179]
- [180] 실시 예 5-1. 인간 유래 3차원 피부 조직에서 본 발명의 펩타이드의 피부 투과도 확인 결과
- [181]
- [182] 본 발명의 펩타이드의 피부 투과도 가능성 확인을 위하여 인간 유래 Keratinocyte와 진피 섬유아세포를 통해 표피와 진피로 구성된 3차원 피부 조직을 제작한 후, 형광물질을 결합한 본 발명의 펩타이드(#96) 1mM을 처리하였다. 처리 후, 1, 6, 12, 24시간 연속적으로 형광의 위치를 공초점 현미경을 통해 관찰하였다.
- [183]
- [184] 처리 1시간 후, 본 발명의 펩타이드(#96)는 각질층에서 관찰되었으며, 6시간 후 표피층에서 관찰되었다(도 5). 12시간 후부터 진피층에서 관찰되기 시작하였으며, 24시간 후 확연히 본 발명의 펩타이드(#96)가 진피층에 존재하는 것이 관찰되었다(도 5). 이를 통하여 본 발명의 펩타이드(#96)가 각질층과 표피층을 지나 진피층까지 투과가 가능함을 확인할 수 있었다.
- [185]
- [186] 실시 예 5-2. 인간 유래 3차원 피부 조직에서 펩타이드의 피부 투과도 확인
- [187]
- [188] 본 발명의 펩타이드(#96)의 Lysine 잔기에 FITC 형광을 부착하여 본 발명의 펩타이드(#96)을 이용하여 Peptide-FITC를 제작하였다. Peptide-FITC 1mM을 인간

유래 3차원 피부 조직(테고사이언스, Neoderm-ED)에 처리하고 1시간, 6시간, 12시간, 그리고 24시간마다 Peptide-FITC의 피부 투과도 상태를 공초점 현미경을 통해 확인하였다.

[189]

[190] 구체적으로, 인간 유래 3차원 피부 조직에서 본 발명의 펩타이드(#96) 처리시 조직, 세포학적 변화를 확인하기 위해 본 발명의 펩타이드(#96) 1mM 처리 24시간 후, 조직 절편에 Hematoxylin & Eosin (H&E) 염색을 하여 분석을 수행하였다.

[191]

[192] 정상적인 표피층은 외부부터 각질층 (Stratum Corneum), 투명층 (Stratum Lucidum), 과립층 (Stratum Granulosum), 유극층 (Stratum Spinosum), 기저층 (Stratum Basale)으로 구성된다. 기저층에는 매일 수백만 개의 Keratinocyte가 새로 형성되며, 이들은 한 장소에 머무르지 않고 표피의 가장 바깥쪽으로 계속해서 밀려나오게 된다. Keratinocyte가 밀려 올라오는 동안에 이 세포들은 점차 딱딱한 각질로 변화하게 된다. 인체의 피부 표면에서는 노화된 각질세포가 계속해서 떨어져 나가게 되는데, 노화된 피부에서는 새롭게 Keratinocyte의 형성이 잘되지 않아 각질층이 떨어지는데 더 많은 시간이 걸리므로 각질층이 두꺼워지게 된다. 따라서 Keratinocyte의 기능 저하는 죽은 각질 세포가 더욱 늘어나게 하며 이는 잔주름과 피부 거칠어짐의 직접적 원인이 될 수 있다.

[193]

[194] 조직학적 분석 결과, 대조군에서는 기저층에서 Keratinocyte가 관찰되지만 아직까지 유극층, 과립층, 투명층, 그리고 각질층이 제대로 형성되지 못한 것이 관찰되었다(도 6a). 반면, 본 발명의 펩타이드 처리 군에서는 정상적인 표피의 조직학적 특징이 잘 관찰되었다(도 6a). 이는 본 발명의 펩타이드가 Keratinocyte의 기능 증진을 통해 Keratinization(각화 과정)을 촉진할 수 있음을 의미한다.

[195]

[196] 실시 예 5-3. 인간 유래 3차원 피부 조직에서 펩타이드의 Collagen 형성능 확인 (*Ex vivo*)

[197]

[198] Vitamin C와 본 발명의 펩타이드와의 콜라겐 합성 효능을 인간 유래 진피 섬유아세포에 적용하여 비교하였다. 본 발명의 펩타이드의 피부 조직에서 펩타이드의 Collagen 형성능 확인을 위하여 인간 유래 Keratinocyte와 진피 섬유아세포를 통해 표피와 진피로 구성된 3차원 피부 조직을 제작(Neoderm-ED) 한 후, Vitamin C 1,000 uM, 본 발명의 펩타이드(#96)를 각각 10 uM, 100 uM, 300 uM, 1,000 uM씩 2회 처리하였다. 처리 후 Masson Trichrome Staining 방법을 이용하여 음성대조군, 양성대조군 및 처리 군에 대한 콜라겐 형성능을 48시간 간격으로 확인하였다.

[199]

도 6b는 Neoderm-ED 피부조직에서 펩타이드의 Collagen 형성능 확인 (*Ex vivo*)한 것이다. 도 6b를 확인하면 본 발명의 펩타이드 처리에 따른 우수한 콜라겐 형성능을 확인할 수 있다. 구체적으로, 음성대조군(NC 그룹) 대비하여 펩타이드

(#96) 처리 그룹에서 농도 의존적으로(Dose-dependent) 콜라겐 (Blue) 침착 양이 증가함을 확인할 수 있다.

[200]

[201] 실시 예 5-4. 인간 유래 3차원 피부 조직에서 펩타이드 피부 효능 확인 시험

[202]

[203] 본 발명의 펩타이드의 기저층 내 Keratinocyte의 증식 효능을 확인하기 위해 대 표적 세포 분열 및 증식 마커 Ki-67의 면역 형광염색 분석을 진행하였다. 이를 위하여, 인간 유래 3차원 피부 조직(테고사이언스, Neoderm-ED)에 본 발명의 펩 타이드(#96) 1mM을 처리하고 37 °C 5% CO₂ 인큐베이터에서 24시간 배양하였 다. 그 후, 각 인간 유래 3차원 피부 조직을 고정한 후 Frozen Section을 하였다. Section된 조직을 Hematoxylin & Eosin 염색을 하여 광학현미경(공초점 현미경)으 로 비교 분석하였다.

[204]

[205] 도 7을 참고하면, 인간 유래 3차원 피부 조직에 본 발명의 펩타이드(#96) 1mM 처리 24시간 후, 기저층 내 Keratinocyte에서 Ki-67에 Positive 한 세포들의 수 가 대조군에 비해 증가된 것을 확인할 수 있다. Ki-67 Positive 세포들의 비율 에 대한 정량 결과, 본 발명의 펩타이드(#96) 처리 군은 64.6(±11.1%)로 대조 군의 12.2(±3.6)%와 비교 5.3배 증가하였다(도 7). 이는 본 발명의 펩타이드가 Keratinocyte의 세포 분열 및 증식을 촉진하는 것으로 해석될 수 있다.

[206]

[207] 실시 예 5-5. 인간 유래 3차원 피부 조직에서 펩타이드 피부 효능 확인 시험

[208]

[209] 본 발명의 펩타이드의 피부 효능 확인을 위하여 인간 유래 3차원 피부 조직에 1mM의 본 발명의 펩타이드 처리 24시간 후, Type IV Collagen, MMP-1, Filaggrin, 그리고 Involucrin의 발현 양상을 면역 형광분석법을 통해 비교하였다.

[210]

[211] Type IV Collagen은 진피-표피 경계부의 기저막(Epidermal Basement Membrane) 에서 주요하게 발현된다. 기저막은 표피와 하부구조인 진피를 접합시키는 해부 학적 기능을 가지며, 표피와 진피 사이에서 액상물질의 투과를 용이하게 하지 만, 동시에 염증세포나 종양세포들의 투과를 제어하는 방어막 역할을 수행한다. 최근 연구에 따르면 노화된 피부에서 기저막의 변화가 발생하며 이때, Type IV Collagen이 감소하는 것이 밝혀졌다. 이러한 변화는 Keratinocyte의 변형 뿐 아니 라 콜라겐 분해 효소인 MMP의 증가를 야기할 수 있다.

[212]

[213] 도 8을 참고하면, 본 발명의 펩타이드(#96)는 인간 유래 3차원 피부 조직의 표 피와 진피에서 MMP-1의 발현을 감소시켰으며, 기저막에서 Type IV Collagen의 발현을 증가시킴을 확인할 수 있다. 피부의 습도 유지는 건강한 피부를 유지하 기 위한 기본 조건이며, 각질층은 자연보습인자 (Natural Moisturizing Factor)인

Filaggrin이나 Involucrin 등과 각질세포 사이에 존재하는 지질층 및 피지선으로부터 분비되는 피지에 의해 수분을 유지하게 된다.

[214]

[215] Filaggrin은 Keratinocyte의 외막과 케라틴 중간 미세섬유를 연결하는 접착제 역할을 하며, Involucrin은 피부의 물리적 장벽 역할을 하는 Keratinocyte 세포막의 형성 및 기능 유지에 중요 기능을 하며, 이들 발현의 감소는 피부 장벽 기능 저하에 따른 건선 및 아토피 피부염과 같은 피부질환을 야기할 수 있다. 이와 관련하여 도 8을 참고하면, 본 발명의 펩타이드는 인간 유래 3차원 피부 조직의 표피에서 자연보습인자 Filaggrin과 Involucrin의 발현 양을 증가시킴을 확인할 수 있다 (도 8).

[216]

[217] 실시 예 6-1. Neoderm-ME 조직에서 펩타이드의 Anti-photodamage 효능 확인

[218] 본 발명의 펩타이드의 피부 Anti-photodamage 효능 확인을 위하여 Keratinocyte와 Melanocyte로 이루어진 인간 유래 3차원 피부 조직에 UV-B 광선을 조사하였다. 이후, 100 uM의 본 발명의 펩타이드 처리 48시간 후, DCFDA 염색, Filaggrin, 그리고 Involucrin의 발현 양상을 면역 형광분석법을 통해 비교하였다.

[219]

[220] 도 9는 펩타이드(#96)의 처리에 따른 (A) 활성산소 감소 효과 및 (B) Anti-Photodamage 효과를 확인한 결과로써, 펩타이드(#96)의 처리 군이 UV-B 조사에 따른 유의미한 피부 손상 감소 효과를 제공하는 것을 확인할 수 있다.

[221]

[222] 실시 예 6-2. Neoderm-ME를 이용한 피부 미백 효능 확인

[223] 본 발명의 펩타이드의 피부 미백 효능 확인을 위하여 Keratinocyte와 Melanocyte로 이루어진 인간 유래 3차원 피부 조직에 UV-B 광선을 조사하였다. 이후, 30 uM, 100 uM, 300 uM, 1000 uM의 본 발명의 펩타이드 처리 48시간 후, Melanin Content Assay 및 Fontana Masson Staining 분석법을 통해 비교하였다.

[224]

[225] 도 10은 펩타이드(#96)의 농도별 처리에 따른 Melanin Secretion 감소 효능을 확인한 것으로, 30 uM 이상의 농도 이상에서 유의미한 Melanin Secretion 감소가 이루어짐을 확인하였다.

[226]

[227] 실시 예 7. Keratinocyte 및 hDF에서 #96의 Migration 효능 확인 시험

[228] 본 발명에 따른 본 발명의 펩타이드(#96)의 투여에 따른 세포 이동 및 상처 치유 촉진 가능성을 확인하기 위하여, 각질세포와 진피 섬유아세포를 1.5×10^5 /Transwell에 분주하고 여기에 펩타이드(#96) 100 uM을 처리하여 37 °C 5% CO₂ 인 큐베이터에서 48시간 배양하였다.

[229]

이후, 세포를 PBS 세척 후에 Crystal violet 염색을 하여 세포 이동 변화량을 Light Microscope 을 통해 확인하였다.

[230]

[231] 도 11은 Keratinocyte 및 hDF에서 본 발명의 펩타이드의 Cell Migration 효능을 확인한 것으로, 인간 진피 섬유아세포 및 각질형성 세포(keratinocyte)에서 본 발명의 펩타이드에 의해 세포의 이동이 촉진되며 상처 치유 촉진 효능이 있음을 확인한 것이다.

[232]

[233] 본 명세서와 도면에는 본 발명의 바람직한 실시 예에 대하여 개시하였으며, 비록 특정 용어들이 사용되었으나, 이는 단지 본 발명의 기술 내용을 쉽게 설명하고 발명의 이해를 돕기 위한 일반적인 의미에서 사용된 것이지, 본 발명의 범위를 한정하고자 하는 것은 아니다. 여기에 개시된 실시 예 외에도 본 발명의 기술적 사상에 바탕을 둔 다른 변형 예들이 실시 가능하다는 것은 본 발명이 속하는 기술 분야에서 통상의 지식을 가진 자에게 자명한 것이다.

청구범위

- [청구항 1] 하기 일반식 1의 아미노산 서열로 구성된 펩타이드를 포함하는 피부 노화 또는 피부 상처 치료용 조성물:
 K-Y-R1-R2-R3-R4-R5-R6-R7-R8 (일반식 1)
 상기 일반식 1에서,
 R1은 아르기닌(R), 리신(K) 또는 글루타민(Q)이고;
 R2는 아르기닌(R) 또는 글루타민(Q)이며;
 R3, R4 및 R5는 각각 아르기닌(R) 또는 리신(K)이고;
 R6는 아스파라긴(N) 또는 세린(S)이며; 및
 R7 및 R8은 리신(K) 또는 타이로신(Y)이다.
- [청구항 2] 제1항에 있어서, 상기 조성물은 Type I Collagen, Type III Collagen, Type IV Collagen, Ki-67, Filaggrin 또는 Involucrin의 활성을 촉진하거나 또는 MMP-1의 활성을 억제하는 것을 특징으로 하는, 조성물.
- [청구항 3] 제1항에 있어서, 상기 펩타이드는 서열 번호 1 내지 96 중 어느 하나의 아미노산 서열인 것을 특징으로 하는, 조성물.
- [청구항 4] 제1항의 상기 펩타이드를 코딩하는 폴리뉴클레오티드.
- [청구항 5] 제6항의 폴리뉴클레오티드를 포함하는 발현벡터.
- [청구항 6] 제1항에 있어서, 상기 조성물은 상기 펩타이드가 반복되어 연결된 폴리펩타이드를 포함하는 것을 특징으로 하는, 조성물.
- [청구항 7] 서열 번호 1 내지 96 중 어느 하나의 아미노산 서열로 이루어진 펩타이드를 포함하는 피부 재생, 탄력 및 보습 촉진을 통한 피부 노화 예방, 개선 또는 치료용 조성물.
- [청구항 8] 서열 번호 1 내지 96 중 어느 하나의 아미노산 서열로 이루어진 펩타이드를 포함하는 피부 재생, 탄력 및 보습 촉진을 통한 피부 노화 예방, 개선용 의약품 조성물.
- [청구항 9] 서열 번호 1 내지 96 중 어느 하나의 아미노산 서열로 이루어진 펩타이드를 포함하는 피부 재생, 탄력 및 보습 촉진을 통한 피부 노화 예방, 개선용 화장품 조성물.
- [청구항 10] 서열 번호 1 내지 96 중 어느 하나의 아미노산 서열로 이루어진 펩타이드를 포함하는 피부 재생, 탄력 및 보습 촉진을 통한 피부 노화 예방, 개선용 건강기능식품 조성물.
- [청구항 11] 제7항에 있어서, 상기 조성물은 약학적으로 허용되는 담체, 부형제 또는 희석제를 추가로 포함하는 것을 특징으로 하는 피부치료용 조성물.
- [청구항 12] 제7항의 조성물을 인간을 제외한 개체에 투여하여 피부 재생, 탄력 및 보습 촉진을 통한 피부 노화 예방, 개선 또는 치료하는 방법.
- [청구항 13] 제1항에 있어서,
 상기 피부 상처는 창상, 당뇨, 또는 욕창에 의한 것인 조성물.