

명세서

발명의 명칭: 근육 이완용 조성물

기술분야

- [1] 본 발명은 생리 활성을 갖는 펩타이드 및 이를 포함하는 조성물에 관한 것으로서, 구체적으로는 생리 활성을 갖는 펩타이드를 포함하는 근육 이완, 피부주름 개선, 피지 생성 억제, 또는 여드름 개선용 조성물, 예컨대 약학적 조성물 또는 화장품 조성물에 관한 것이다.

배경기술

- [2] 동물의 신경계를 구성하는 신경세포는 다른 세포에서 찾아볼 수 없는 특이구조로 축삭을 가지고 있다. 축삭은 가늘고 긴 구조체로서 세포체에서 뻗어나와 신경세포의 표적에 연결되어 있으며, 이를 통해 신호를 전달하고 물질을 수송하게 된다.
- [3] 신경근연접은 축삭의 종말부가 골격근세포와 연결하여 임펄스가 신경세포에서 근육으로 전달될 수 있도록 특수하게 분화된 시냅스 구조이다. 골격근으로 가는 축삭은 수초에 의해 싸여있는 유수 축삭이며 근육에 가까이 가면 여러개의 종말 가지로 분지된다. 이 분지된 축삭은 수초에 의해 싸여 있으나 근육으로 들어가는 부위에서 수초가 없어지고, 다른 시냅스를 이루는 축삭 종말과 같이 종말 팽대를 형성하며, 이 종말 팽대는 오목하게 생긴 근세포 표면에 위치하게 된다. 이러한 구조를 운동종말판 또는 신경근연접이라고 한다.
- [4] 다른 시냅스에서와 같이 신경근연접의 축삭 종말에는 수많은 미토콘드리아와 시냅스 소포가 존재한다. 신경근연접의 시냅스 소포에는 신경전달물질인 아세틸콜린이 함유되어 있다. SNARE 분자는 아세틸콜린을 방출하는데 필수적이며, 아세틸콜린 방출 작용의 억제는 이완성 마비를 야기한다. 축삭 종말과 근육 사이에는 연접틈새가 있으며, 시냅스 이후 부분인 골격근세포의 세포막은 근형질쪽으로 함입되어 많은 연접 주름을 형성한다. 이 주름 부위의 세포막에도 아세틸콜린 수용체가 있어, 이 구조는 아세틸콜린과 수용체가 결합할 수 있는 면적을 넓혀주는 역할을 한다고 추측된다.
- [5] 신경 임펄스가 신경근연접으로 전달되면 종말 세포막의 전압 감응성 칼슘 채널이 열리고 칼슘이 안으로 들어와 시냅스 소포를 세포막과 융합시켜 소포 내의 아세틸콜린을 연접 틈새로 유리시킨다. 유리된 아세틸콜린은 근세포막에 있는 아세틸콜린 수용체와 결합하게 되며, 이에 의해 나트륨 채널이 열리게 되고, 그 결과 세포막의 탈분극이 일어나게 된다. 신경근연접에서 시작된 임펄스는 근섬유의 표면을 따라 퍼져나가 근세포의 심부로 전달된다. 임펄스는 삼조체(triad)로 전달되어 근형질 내 세망의 막의 칼슘 채널을 열고 칼슘을 근형질 내로 유리시킨다. 칼슘은 트로포닌 C와 결합하며 이에 따라 근육의 수축이 시작된다. 임펄스가 중단되면 칼슘은 능동수송에 의해 근형질 내 세망

수조로 다시 들어가게 되며 근육은 이완된다. 따라서, 신경근연접에서 아세틸콜린의 분비를 억제하면, 신경근연접에서 발생한 임펄스가 근육으로 전달되지 않고, 임펄스가 중단되므로 근육이 이완되게 된다.

- [6] 한편, 안면 표정 주름의 형성 원인이나 그 메카니즘은 피부를 내부로 당기는 표피 근육 긴장에 있다. 이러한 근육 긴장은 안면 근육 약화, 신경의 활동 과다의 결과이다. 신경의 과잉 활동은 근육 섬유를 자극하는 제어되지 않은 과도한 신경전달물질의 방출 특성이다. 이 때문에, 신경전달물질의 방출을 조절하는 분자는 근육의 긴장을 이완시켜, 안면 주름을 제거하는데 기여한다. 따라서, 신경전달물질의 방출을 조절하여, 근육 경련을 치료하고 안면 비대칭 및/또는 안면 주름(특히, 안면 표정 주름)을 감소하거나 제거하는데 효능이 있는 신규 활성 성분을 개발할 필요가 있다.
- [7] 근육 이완 작용과 관련해서는 보툴리눔 독신이 알려져 있다. 보툴리눔 독신은 안면 주름 제거 용도로 임상 실험과 미용에 가장 보편적으로 이용된다. 보툴리눔 독신은 SNARE 단백질의 기능적 손상을 야기하며, SNARE 복합체를 차단하여 신경전달물질인 아세틸콜린의 분비를 억제하여 근육 이완 효과를 나타낸다.
- [8] 보툴리눔 독신의 근육 이완 효과를 이용하여 근육 이완제로 사용하거나(한국 공개특허공보 제2010-0020972호), 주름을 줄이는 목적으로 이용되어 왔다. 하지만, 보툴리눔 독신의 마비 효과는 평균 6개월간 가역적이므로, 이러한 처리에는 보툴리눔 독신의 반복 주입이 필요하다. 또한, 보툴리눔 독신은 환자의 면역계에 의해 인식될 수 있는 크기를 가지므로 약제에 대한 면역 반응이 유발될 수 있다. 보툴리눔 독신에 대한 항체의 형성은 현저한 치료 효능 손실을 초래하므로 심각한 문제이다. 따라서, 면역 반응을 유발하지 않는 보다 간단하고 안정한 분자 구조를 갖고면서, 제조 비용이 효율적인, 보툴리눔 독신과 유사한 마비 효과를 나타내는 분자의 개발이 필요한 실정이다.
- [9] 한편, 피지는 피지선에서 만들어져 모공을 통하여 방출되며, 피부 및 모발 표면에 지방막을 형성하여 외부의 균으로부터 우리 몸을 보호하는 항균, 정균 작용을 한다. 피지선에서 피지의 분비가 많아지거나 모공을 통과하는 과정에서 장애가 생기게 되면 모공이 확대된다. 이와 같이 확대된 모공 안에는 피지가 축적되고, 이러한 피지는 각질, 메이크업 화장 노폐물, 또는 먼지와 서로 엉겨 축적된다. 엉겨 붙은 피지 노폐물은 공기의 라디칼과 접촉하여 산화됨으로써 갈색 혹은 검은색으로 변색되어 블랙헤드(black head)가 된다. 또한, 피지는 여드름을 유발하는 원인이기도 하므로 과도한 피지 생성을 억제할 수 있는 물질의 개발 또한 필요한 실정이다.

발명의 상세한 설명

기술적 과제

- [10] 본 발명의 목적은 근육 이완, 피부주름 개선, 피지 생성 억제, 또는 여드름 개선과 같은 다양한 생리 활성을 갖는 펩타이드 및 이를 포함하는 약학적 또는

화장료 조성물을 제공하는 것이다.

과제 해결 수단

- [11] 상기 과제를 해결하기 위해서, 본 발명은 서열번호 1로 기재되는 아미노산 서열을 포함하는 펩타이드를 제공한다.
- [12] 또한, 본 발명은 서열번호 1로 기재되는 아미노산 서열을 포함하는 펩타이드를 유효성분으로 함유하는 근육 이완용 조성물을 제공한다.
- [13] 본 발명의 한 구현예에서, 상기 조성물은 약학적 조성물 또는 화장료 조성물의 형태일 수 있으나 이에 한정되는 것은 아니다.
- [14] 본 발명의 다른 구현예에서, 상기 펩타이드는 근육 이완용 조성물 100중량%에 대하여 0.001중량% 내지 60중량%로 포함될 수 있으나 이에 한정되는 것은 아니다.
- [15] 본 발명의 다른 구현예에서, 상기 조성물은 신경 근육 질환의 예방 또는 치료에 사용할 수 있다. 본 발명의 바람직한 구현예에서, 상기 신경 근육 질환은 눈꺼풀 경련, 사경, 경부 근긴장 이상, 강직성 안검연축, 겨드랑이 다한증, 항문열창, 질경련, 이완불능증, 두통 질환, 특발성 및 신경성 배뇨근 과다증, 국소이긴장증, 측두하악관절 통증 장애, 당뇨병성 신경증, 성대(vocal cord) 기능 장애, 사시, 만성신경병증, 안면근육비대증, 배뇨근 조임근 장애, 또는 양성 전립선 비대증일 수 있고, 상기 두통 질환은 편두통일 수 있으나 이에 한정되는 것은 아니다.
- [16] 본 발명의 다른 구현예에서, 상기 펩타이드는 아세틸콜린의 분비를 억제할 수 있다.
- [17] 또한, 본 발명은 서열번호 1로 기재되는 아미노산 서열을 포함하는 펩타이드를 유효성분으로 함유하는 화장료 조성물을 제공한다.
- [18] 본 발명의 한 구현예에서, 상기 화장료 조성물은 피부상태 개선의 용도, 예컨대 피부 주름 개선, 피지 생성 억제, 또는 여드름 개선 등의 용도로 사용될 수 있으나 이에 한정되는 것은 아니다.
- [19] 본 발명의 다른 구현예에서, 상기 펩타이드는 화장료 조성물 100중량%에 대하여 0.001중량% 내지 60중량%로 포함될 수 있으나 이에 한정되는 것은 아니다.
- [20] 본 발명의 다른 구현예에서, 상기 펩타이드는 콜라겐의 발현을 증가시킬 수 있으나 이에 한정되는 것은 아니다.

발명의 효과

- [21] 본 발명의 서열번호 1로 기재되는 아미노산 서열을 포함하는 펩타이드는 근육 이완, 피부 주름 개선, 피지 생성 억제 등의 생리 활성을 나타내는 바, 상기 펩타이드를 근육 이완용 조성물, 피부 주름 개선용 조성물, 피지 생성 억제용 조성물, 블랙헤드 생성 억제용 조성물, 또는 여드름 개선용 조성물의 유효성분으로 이용할 수 있다.

도면의 간단한 설명

- [22] 도 1은 서열번호 1로 기재되는 아미노산 서열을 포함하는 펩타이드의 장기 보관시 고온 안정성 평가 결과이다.
- [23] 도 2는 서열번호 1로 기재되는 아미노산 서열을 포함하는 펩타이드의 고온 안정성 평가 결과이다.
- [24] 도 3은 서열번호 1로 기재되는 아미노산 서열을 포함하는 펩타이드의 제조합 신택신 1A 분해 정도를 나타낸다.
- [25] 도 4는 서열번호 1로 기재되는 아미노산 서열을 포함하는 펩타이드의 내인성 신택신 1A 분해 정도를 나타낸다.
- [26] 도 5는 서열번호 1로 기재되는 아미노산 서열을 포함하는 펩타이드의 SNARE 복합체 형성 억제 효과를 나타낸다.
- [27] 도 6은 서열번호 1로 기재되는 아미노산 서열을 포함하는 펩타이드의 SNARE 복합체 형성 억제 효과를 나타낸다.
- [28] 도 7은 서열번호 1로 기재되는 아미노산 서열을 포함하는 펩타이드의 아세틸콜린 분비 억제 효과를 나타내는 그래프이다.
- [29] 도 8은 서열번호 1로 기재되는 아미노산 서열을 포함하는 펩타이드의 근육 이완 효과를 나타낸다.
- [30] 도 9 및 도 10은 서열번호 1로 기재되는 아미노산 서열을 포함하는 펩타이드와 보톡스의 근육 이완 효과를 비교한 결과를 나타낸다.
- [31] 도 11은 서열번호 1로 기재되는 아미노산 서열을 포함하는 펩타이드의 세포 내 침투 여부를 확인한 결과이다.
- [32] 도 12는 서열번호 1로 기재되는 아미노산 서열을 포함하는 펩타이드의 조직 침투 양상을 확인한 결과이다.
- [33] 도 13은 서열번호 1로 기재되는 아미노산 서열을 포함하는 펩타이드의 조직 침투 양상을 모낭 주변에서 확인한 결과이다.
- [34] 도 14는 서열번호 1로 기재되는 아미노산 서열을 포함하는 펩타이드의 조직 침투 양상을 피지샘 주변에서 확인한 결과이다.
- [35] 도 15 및 도 16은 서열번호 1로 기재되는 아미노산 서열을 포함하는 펩타이드의 주름 완화 효과를 나타낸다.
- [36] 도 17은 서열번호 1로 기재되는 아미노산 서열을 포함하는 펩타이드의 도포에 의한 콜라겐 수준 증가를 나타낸다.
- [37] 도 18은 서열번호 1로 기재되는 아미노산 서열을 포함하는 펩타이드의 도포에 의한 엘라스틴 수준 증가를 나타낸다.
- [38] 도 19는 서열번호 1로 기재되는 아미노산 서열을 포함하는 펩타이드의 도포에 의한 피브로넥틴 수준 증가를 나타낸다.
- [39] 도 20은 서열번호 1로 기재되는 아미노산 서열을 포함하는 펩타이드의 도포에 의한 피지샘 수 감소 및 피지 생성 관련 마커의 발현 감소 결과를 나타낸다.

발명의 실시를 위한 형태

- [40] 이하, 본 발명을 상세히 설명한다.
- [41] **1. 본 발명의 펩타이드**
- [42] 본 발명은 유용한 생리 활성, 예컨대 근육 이완, 피부주름 개선, 피지 생성 억제, 또는 여드름 개선 등과 같은 다양한 생리 활성을 갖는 펩타이드를 제공한다.
- [43] 본 발명의 펩타이드는 서열번호 1로 기재되는 아미노산 서열을 포함한다. 한 구현예에서, 본 발명의 펩타이드는 서열번호 1로 기재되는 아미노산 서열로 이루어질 수 있으나 이에 한정되는 것은 아니다.
- [44] 본 명세서에 있어서, "펩타이드"란 용어는 펩타이드 결합에 의해 아미노산 잔기들이 서로 결합되어 형성된 선형의 분자를 의미한다. 상기 펩타이드는 본 기술분야에 공지된 통상의 생물학적 또는 화학적 합성 방법, 특히 고상 합성 기술(solid-phase synthesis techniques)에 따라 제조될 수 있다.
- [45] 상기 펩타이드는 기능에 영향을 미치지 않는 범위 내에서, 아미노산 잔기의 결실, 삽입, 치환 또는 이들의 조합에 의해서 상이한 서열을 가지는 아미노산의 변이체들, 또는 단편들일 수 있다. 상기 펩타이드의 활성을 전체적으로 변경시키지 않는 아미노산 교환은 본 기술 분야에 공지되어 있다. 경우에 따라서는 인산화(phosphorylation), 황화(sulfation), 아크릴화(acrylation), 당화(glycosylation), 메틸화(methylation), 파네실화(farnesylation) 등으로 변형될 수 있다. 따라서, 본 발명은 서열번호 1의 아미노산 서열을 포함하는 펩타이드와 실질적으로 동일한 아미노산 서열을 갖는 펩타이드 및 이의 변이체 또는 이의 활성 단편을 포함한다. 상기 실질적으로 동일한 단백질이란 상기 서열번호 1의 아미노산 서열과 60% 이상, 바람직하게는 75% 이상, 예컨대, 80% 이상, 90% 이상, 95% 이상, 98% 이상, 또는 99% 이상의 서열 상동성을 갖는 아미노산 서열을 의미하나 이에 한정되지 않으며, 60% 이상의 아미노산 서열의 상동성을 가지며 동일한 활성을 가진다면 본 발명의 범위에 포함된다. 또한, 본 발명의 펩타이드는 표적화 서열, 태그(tag), 표지된 잔기, 반감기 또는 펩타이드 안정성을 증가시키기 위한 특정 목적으로 제조된 아미노산 서열을 추가적으로 포함할 수 있다.
- [46] 또한, 본 발명의 상기 펩타이드는 본 기술분야에서 널리 공지된 다양한 방법으로 획득할 수 있다. 본 발명의 한 구현예에서, 본 발명의 펩타이드는 폴리뉴클레오타이드 제조합과 단백질 발현 시스템을 이용하여 제조하거나 펩타이드 합성과 같은 화학적 합성을 통하여 시험관 내에서 합성하는 방법, 및 무세포 단백질 합성법 등으로 제조될 수 있다.
- [47] 또한, 보다 나은 화학적 안정성, 강화된 약리 특성(반감기, 흡수성, 역가, 효능 등), 변경된 특이성(예를 들어, 광범위한 생물학적 활성 스펙트럼), 감소된 항원성을 획득하기 위하여, 본 발명의 펩타이드의 N-말단 또는 C-말단에 보호기가 결합되어 있을 수 있다. 예컨대, 상기 보호기는 아세틸기, 플루오레닐

메톡시 카르보닐기, 포르밀기, 팔미토일기, 미리스틸기, 스테아릴기 또는 폴리에틸렌글리콜(PEG)일 수 있으나, 펩타이드의 개질, 특히 펩타이드의 안정성 증진시킬 수 있는 성분이라면, 제한없이 포함할 수 있다. 상기 '안정성'은 생체 내 단백질 절단 효소의 공격으로부터 본 발명의 펩타이드를 보호하는 생체내(in vivo)에서의 안정성뿐만 아니라, 저장안정성(예컨대, 상온 저장 안정성)도 포함하는 의미로 사용된다.

- [48] **2. 본 발명의 펩타이드를 포함하는 약학적 조성물**
- [49] 본 발명의 다른 측면은 서열번호 1의 아미노산 서열을 포함하는 펩타이드를 유효성분으로 포함하는 근육 이완용 약학적 조성물을 제공한다.
- [50] 상기 서열번호 1의 아미노산 서열을 포함하는 펩타이드는 상기 '1. 본 발명의 펩타이드' 항목에서 설명한 펩타이드와 동일한바, 구체적인 설명은 위 '1. 본 발명의 펩타이드' 항목을 원용하고, 이하에서는 약학적 조성물에 특유한 구성에 대해서만 설명하도록 한다.
- [51] 본 발명의 한 구현예에 따르면, 본 발명의 상기 펩타이드는 근육 이완 활성을 가지는 바, 근육 이완을 위한 조성물의 유효성분으로 이용될 수 있다. 이에, 본 발명은 서열번호 1로 기재되는 아미노산 서열을 포함하는 펩타이드를 유효성분으로 함유하는 근육 이완용 약학적 조성물을 제공한다.
- [52] 상기 펩타이드는 근육 이완용 약학적 조성물 100중량%에 대하여 0.001 중량% 내지 60 중량%, 예컨대 0.01 중량% 내지 50 중량%의 함량으로 포함될 수 있다. 상기 근육 이완용 약학적 조성물 내의 상기 펩타이드의 함량이 하한값 미만일 경우에는 상기 펩타이드에 의한 근육 이완 효과가 충분히 발현되지 않을 수 있고, 상한값을 초과할 경우에는 투입 농도 대비 상기 펩타이드에 의한 효과가 상대적으로 낮을 수 있다.
- [53] 본 발명의 약학적 조성물은 신경 근육 질환의 예방 또는 치료에 사용될 수 있고, 근육 이완을 목적으로 하는 질환이라면 본 발명의 약학적 조성물을 제한없이 적용할 수 있다.
- [54] 본 발명에서 사용되는 용어 '예방'은 본 발명의 약학적 조성물이 신경 근육 질환의 발생을 지연시키는 모든 행위를 의미한다.
- [55] 본 발명에서 사용되는 용어 '억제'는 본 발명의 약학적 조성물이 신경 근육 질환의 발생을 감소시키는 모든 행위를 의미한다.
- [56] 본 발명에서 사용되는 용어 '치료'는 본 발명의 약학적 조성물이 신경 근육 질환의 증상이 호전되도록 하거나 이롭게 되도록 하는 모든 행위를 의미한다.
- [57] 본 발명에서 사용되는 용어 '투여'는 어떠한 적절한 방법으로 개체에게 소정의 물질을 도입하는 것을 의미하며, 본 발명의 약학적 조성물은 생체 내 표적에 도달할 수 있는 임의의 일반적인 경로를 통하여 투여될 수 있다. 본 발명의 약학적 조성물의 투여 경로는 특별히 제한되지 않으나, 경구 또는 비경구 투여할 수 있다. 구체적으로는 비경구 투여할 수 있으며, 보다 구체적으로 피부에 도포하는 방식(즉, 경피 투여)으로 적용될 수 있다. 구체적으로, 본 발명의 투여는

1일 1회 내지 4회, 2회 내지 3회 또는 2회 실시할 수 있다. 또한, 본 발명의 투여는 4주 이상, 8주 이상, 4주 내지 12주 또는 8주 내지 12주의 기간 동안 실시할 수 있다.

- [58] 본 발명에서 사용되는 용어 '신경 근육 질환'은 말초신경과 근육에 생기는 질병을 나타낸다. 말초신경은 두개골이나 척추 속에 있는 중추신경계에서 갈라져 나와서, 중추신경계와 근육이나 피부와 같은 말단 장기를 연결시켜주는 신경 그물망을 나타내며, 중추신경계에서 결정된 명령을 근육 등 말단 장기에 전달하거나, 통각 등의 감각 정보를 중추신경계로 전달한다. 말초신경계 질환에는 말초신경의 기능장애, 말초신경이 근육과 연결되는 신경근연접, 근육 자체에 생긴 질환을 포함한다.
- [59] 상기 신경 근육 질환은 눈꺼풀 경련, 사경(목의 근육들이 수축하여 목이 한쪽으로 기운 듯 부자연스러운 상태), 경부 근긴장 이상, 강직성 안검연축, 겨드랑이 다한증, 항문열창, 질경련, 이완불능증, 두통 질환, 특발성 및 신경성 배뇨근 과다증, 국소이긴장증(사지, 턱관절, 성대 등), 측두하악관절 통증 장애, 당뇨병성 신경증, 성대 기능 장애, 사시, 만성신경병증, 안면근육비대증(저작근 등), 배뇨근 조임근 장애, 양성 전립선 비대증 등의 질환을 비제한적으로 포함한다. 상기 두통 질환은 편두통일 수 있다.
- [60] 본 발명의 한 구현예에서, 본 발명의 약학적 조성물은 약학적 조성물의 제조에 통상적으로 사용하는 적절한 담체, 부형제 또는 희석제를 추가로 포함할 수 있다.
- [61] 본 발명의 약학적 조성물에서 사용가능한 담체, 부형제 또는 희석제로는, 락토즈, 텍스트로즈, 수크로스, 솔비톨, 만니톨, 자일리톨, 에리스리톨, 말티톨, 전분, 아카시아 고무, 알지네이트, 젤라틴, 칼슘 포스페이트, 칼슘 실리케이트, 셀룰로즈, 메틸 셀룰로즈, 미정질 셀룰로스, 폴리비닐 피롤리돈, 물, 메틸히드록시벤조에이트, 프로필히드록시벤조에이트, 탈크, 마그네슘 스테아레이트 또는 광물유 등을 들 수 있다.
- [62] 본 발명의 약학적 조성물은 통상의 방법에 따라 산제, 과립제, 정제, 캡슐제, 현탁액, 에멀전, 시럽, 에어로졸 등의 경구형 제형, 외용제, 좌제 및 멸균 주사용액의 형태로 제형화하여 사용될 수 있다.
- [63] 제제화할 경우에는 일반적으로 사용하는 충전제, 증량제, 결합제, 습윤제, 붕해제, 계면활성제 등의 희석제 또는 부형제를 사용하여 조제된다. 경구투여를 위한 고형제제에는 정제, 환제, 산제, 과립제, 캡슐제 등이 포함되며, 이러한 고형제제는 상기 화합물은 적어도 하나 이상의 부형제, 예를 들면, 전분, 칼슘카보네이트, 수크로스 또는 락토오스, 젤라틴 등을 섞어 조제할 수 있다.
- [64] 또한 단순한 부형제 이외에 마그네슘 스테아레이트, 탈크 같은 윤활제들도 사용된다. 경구를 위한 액상 제제로는 현탁제, 내용액제, 유제, 시럽제 등이 해당되는데 흔히 사용되는 단순희석제인 물, 리퀴드 파라핀 이외에 여러 가지 부형제, 예를 들면 습윤제, 감미제, 방향제, 보존제 등이 포함될 수 있다.

- [65] 비경구 투여를 위한 제제에는 멸균된 수용액, 비수성용제, 현탁제, 유제, 동결건조 제제, 좌제가 포함된다. 비수성용제, 현탁제로는 프로필렌글리콜, 폴리에틸렌글리콜, 올리브 오일과 같은 식물성기름, 에틸올레이트와 같은 주사 가능한 에스테르 등이 사용될 수 있다. 좌제의 기제로는 위텟솔, 마크로콜, 트윈(tween) 61, 카카오지, 라우린지, 글리세로제라틴 등이 사용될 수 있다.
- [66] 경구 투여를 위한 고형 제제에는 정제, 환제, 산제, 과립제 및 캡슐제 등이 포함되며, 이러한 고형 제제는 본 발명의 약학적 조성물에 적어도 하나 이상의 부형제, 예를 들면, 전분, 탄산칼슘, 수크로오스, 락토오스 및 젤라틴 등을 섞어 조제된다. 또한, 단순한 부형제 이외에 마그네슘, 스테arate, 탈크 같은 윤활제도 사용될 수 있다.
- [67] 경구 투여를 위한 액상 제제로는 현탁제, 내용액제, 유제 및 시럽제 등이 해당되는데 흔히 사용되는 단순 희석제인 물, 리퀴드 파라핀 이외에 여러 가지 부형제, 예를 들면 습윤제, 감미제, 방향제 및 보존제 등이 포함될 수 있다.
- [68] 피부 투여를 위한 제제로는 더스팅 파우더, 에멀전, 현탁액, 오일, 스프레이, 연고, 크림 페이스트, 젤, 폼, 또는 용액일 수 있다. 본 발명의 약학 제제는 무수 상태의 연고일 수 있고, 국소 용도에 적합하고 체온 상태에서 액체인 파라핀, 특히 저점도 파라핀을 함유하거나, 또는 상기 천연지방 또는 부분합성 지방, 예를 들면, 코코넛 지방산 트리글리세라이드, 경화유, 예를 들면 수소화된 피넛 오일 또는 캐스터 오일, 글리세롤의 지방산 부분 에스테르, 예를 들면 글리세롤 모노스테아레이트 및 디스테아레이트, 실리콘, 예를 들면 폴리메틸실록산, 예컨대 헥사메틸디실록산 또는 옥타메틸트리실록산을 함유할 수 있으며, 예를 들어 수성 크림과 관련되어 있고 수분 흡수 용량을 증가시키는 지방알코올, 그리고 스테롤, 울 왁스, 다른 유화제 및/또는 기타 첨가제를 함유할 수 있다.
- [69] 본 발명의 약학적 조성물에 함유되는 상기 아미노산 서열을 포함하는 펩타이드의 적용량은 환자의 상태 및 체중, 질병의 정도, 약물 형태, 투여 경로 및 기간에 따라 다르지만, 경우에 따라 적절하게 선택될 수 있다. 예를 들면, 상기 아미노산 서열을 포함하는 펩타이드는 1일 0.0001 내지 1000 mg/kg으로, 구체적으로는 0.1 내지 1000 mg/kg의 용량으로 투여될 수 있으며, 상기 적용은 하루에 한번 또는 수회 나누어 적용할 수도 있다. 본 발명의 상기 아미노산 서열을 포함하는 펩타이드로 구성되는 펩타이드의 투여량은 투여경로, 질병의 정도, 성별, 체중, 나이 등에 따라서 증감될 수 있다. 따라서, 상기 투여량은 어떠한 면으로든 본 발명의 범위를 한정하는 것은 아니다.
- [70] 본 발명의 약학적 조성물은 쥐, 생쥐, 가축, 인간 등의 포유동물에 다양한 경로로 투여될 수 있다. 투여의 모든 방식은 예상될 수 있는데, 예를 들면, 경구, 직장 또는 정맥, 근육, 피하, 기관지내 흡입, 자궁내 경막 또는 뇌혈관내(intracerebroventricular) 주사에 의해 투여될 수 있다.
- [71] 본 발명의 신경 근육 질환 예방, 억제 또는 치료용 약학적 조성물은 상기 아미노산 서열을 포함하는 펩타이드 외에 신경 근육 질환의 개선, 완화, 치료

또는 예방을 나타내는 유효성분을 1종 이상 추가로 함유할 수 있다.

- [72] 본 발명의 약학적 조성물은 신경 근육 질환의 개선, 완화, 치료 또는 예방을 위하여 단독으로, 또는 수술, 호르몬 치료, 약물 치료 및 생물학적 반응 조절제를 사용하는 방법들과 병용하여 사용할 수 있다.
- [73] 본 발명의 한 구현예에 따르면, 본 발명의 펩타이드는 고온에서 안정하고(도 1 및 도 2 참고), 신경전달물질의 방출에 관여하는 신타신 1A를 분해하고, SNARE 복합체의 형성을 억제하고(도 3 내지 도 6 참고), 아세틸콜린의 분비를 억제하고(도 7 참고), 근육 이완 효과가 있고(도 8 내지 도 10 참고), 세포 내로 침투 가능하고, 조직의 근육층까지 침투하여 신경 세포 마커와도 공존하여 근육 이완 효과를 나타낼 수 있다(도 11 내지 도 14 참고).
- [74] **3. 본 발명의 펩타이드를 포함하는 화장료 조성물**
- [75] 본 발명의 다른 측면은 서열번호 1의 아미노산 서열을 포함하는 펩타이드를 유효성분으로 포함하는 화장료 조성물을 제공한다.
- [76] 상기 서열번호 1의 아미노산 서열을 포함하는 펩타이드는 상기 '1. 본 발명의 펩타이드' 항목에서 설명한 펩타이드와 동일한바, 구체적인 설명은 위 '1. 본 발명의 펩타이드' 항목을 원용하고, 이하에서는 화장료 조성물의 특유한 구성에 대해서만 설명하도록 한다.
- [77] 본 발명에서 용어 '모공'이란 얼굴, 이마, 코 등에 존재하는 피지가 분비되는 작은 구멍을 나타내며, '블랙헤드'란 변성된 피지, 오래된 각질 등의 혼합물이 모공에 쌓이고, 그 주변에 존재하는 오염 물질이 침적되어 산화 과정을 거쳐, 검게 되어 까맣게 보이는 피지를 나타낸다.
- [78] 본 발명의 구현예에 있어서, 본 발명의 화장료 조성물은 피부상태 개선용 화장료 조성물일 수 있다. 상기 "피부상태 개선"은 피부의 내재적 요인 또는 외인적 요인에 의해 유발되는 피부의 손상을 치료, 경감, 완화시키는 과정 또는 그의 효과 등을 포괄적으로 의미할 수 있으며, 예를 들어, 주름개선, 피부탄력개선, 상처재생, 피지생성 억제, 또는 여드름 개선 등의 용도로 사용되는 것을 의미할 수 있으나, 이에 한정되는 것은 아니다.
- [79] 본 발명의 한 구현예에 따르면, 본 발명의 펩타이드는 고온에서 안정하며(도 1 및 도 2 참고), 근육 이완 또는 진피 구성 물질 증가로 인한 피부 주름의 개선 효과가 있다(도 15 내지 도 19 참고). 상기 진피 구성 물질은 콜라겐을 포함할 수 있으나 이에 한정되는 것은 아니다.
- [80] 본 발명의 한 구현예에 따르면, 본 발명의 펩타이드는 고온에서 안정하며(도 1 및 도 2 참고), 본 발명의 펩타이드에 의해 피지샘 수 감소 및 피지 생성 관련 마커의 발현이 감소된다(도 20 참고).
- [81] 본 발명의 화장료 조성물은 화장품 분야에서 통상적으로 사용되는 기제, 보조제 및 첨가제를 사용하여 액체 또는 고체 형태로 제조될 수 있다. 액체 또는 고체 형태의 화장품으로는, 예를 들면 이에 한정되지는 않으나 화장수, 크림제, 로션제, 입욕제 등의 형태를 포함할 수 있다. 화장품 분야에서 통상적으로

사용되는 기재, 보조제 및 첨가제는 특별히 제한되지 않으며, 예를 들면 물, 알코올, 프로필렌글리콜, 스테아르산, 글리세롤, 세틸알코올, 유동 파라핀 등이 있다.

- [82] 본 발명의 화장료 조성물은 상기 아미노산 서열을 포함하는 펩타이드뿐만 아니라, 화장료 조성물에 통상적으로 이용되는 성분들을 포함할 수 있으며, 예컨대 향산화제, 안정화제, 용해화제, 비타민, 안료 및 향료와 같은 통상적인 보조제, 그리고 담체를 포함할 수 있다.
- [83] 본 발명의 화장료 조성물은 본 기술분야에서 통상적으로 제조되는 어떠한 제형으로도 제조될 수 있으며, 예를 들어 용액, 현탁액, 유탁액, 페이스트, 젤, 크림, 로션, 파우더, 비누, 계면활성제-함유 클렌징, 오일, 분말 파운데이션, 유탁액 파운데이션, 왁스 파운데이션 및 스프레이 등으로 제형화될 수 있으나, 이에 한정되는 것은 아니다. 보다 상세하게는, 유연 화장수, 영양 화장수, 영양 크림, 마사지 크림, 에센스, 아이 크림, 클렌징 크림, 클렌징 폼, 클렌징 워터, 팩, 스프레이 또는 파우더의 제형으로 제조될 수 있다.
- [84] 본 발명의 화장료 조성물의 제형이 페이스트, 크림 또는 젤인 경우에는 담체 성분으로서 동물성유, 식물성유, 왁스, 파라핀, 전분, 트라칸트, 셀룰로오스 유도체, 폴리에틸렌글리콜, 실리콘, 벤토나이트, 실리카, 탈크 또는 산화아연 등이 이용될 수 있다.
- [85] 본 발명의 화장료 조성물의 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 디메틸에테르와 같은 추진체를 포함할 수 있다.
- [86] 본 발명의 화장료 조성물의 제형이 용액 또는 유탁액인 경우에는 담체 성분으로서 용매, 용해화제 또는 유탁화제가 이용되고, 예컨대 물, 에탄올, 이소프로판올, 에틸카보네이트, 에틸아세테이트, 벤질알코올, 벤질벤조에이트, 프로필렌글리콜, 1,3-부틸렌글리콜 오일, 글리세롤 지방족 에스테르, 폴리에틸렌글리콜 또는 소르비탄의 지방산 에스테르가 있다.
- [87] 본 발명의 화장료 조성물의 제형이 현탁액인 경우에는 담체 성분으로서 물, 에탄올 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.
- [88] 본 발명의 화장료 조성물의 제형이 계면-활성제 함유 클렌징인 경우에는 담체 성분으로서 지방족 알코올 설페이트, 지방족 알코올 에테르 설페이트, 설포숙신산 모노에스테르, 이미다졸리늄 유도체, 메틸타우레이트, 사르코시네이트, 지방산 아미드 에테르 설페이트, 알킬아미도베타인, 지방족 알코올, 지방산 글리세리드, 지방산 디에탄올아미드, 식물성유, 라놀린 유도체

또는 에톡실화 글리세롤 지방산 에스테르 등이 이용될 수 있다.

- [89] 본 발명의 화장료 조성물은 단독 또는 중복 도포하여 사용하거나, 본 발명 이외의 다른 화장료 조성물과 중복 도포하여 사용할 수 있다. 또한 본 발명에 따른 피부 보습 효과 및 피부 장벽 개선 효과가 우수한 화장료 조성물은 통상적인 사용 방법에 따라 사용될 수 있으며, 사용자의 피부 상태 또는 취향에 따라 그 사용 횟수를 달리할 수 있다.
- [90] 본 발명의 화장료 조성물이 비누, 계면활성제 함유 클렌징 또는 계면활성제 비함유 클렌징 제형일 경우, 피부에 도포한 후 닦아내거나 떼거나 물로 씻어낼 수도 있다. 구체적인 예로서, 상기 비누는 액상비누, 가루비누, 고형비누 및 오일비누이며, 상기 계면활성제 함유 클렌징 제형은 클렌징 폼, 클렌징 워터, 클렌징 수건 및 클렌징 팩이며, 상기 계면활성제 비함유 클렌징 제형은 클렌징 크림, 클렌징 로션, 클렌징 워터 및 클렌징 겔이며, 이에 한정되는 것은 아니다.
- [91] 4. 본 발명의 펩타이드를 포함하는 약학적 조성물 또는 화장료 조성물의 용도
- [92] 본 발명의 다른 측면은 서열번호 1의 아미노산 서열을 포함하는 펩타이드를 포함하는 약학적 조성물 또는 화장료 조성물의 용도를 제공한다.
- [93] 상기 서열번호 1의 아미노산 서열을 포함하는 펩타이드는 상기 '1. 본 발명의 펩타이드' 항목에서 설명한 펩타이드와 동일한바, 구체적인 설명은 위 '1. 본 발명의 펩타이드' 항목을 원용하고, 이하에서는 상기 펩타이드를 포함하는 조성물의 용도에 대해서만 설명하도록 한다.
- [94] 본 발명의 한 측면에서, 본 발명은 상기 펩타이드 또는 약학적 조성물을 피부, 또는 근육이 수축된 피부에 적용하는 단계;를 포함하는 근육 이완 방법을 제공한다. 상기 적용은 피부에 대한 도포를 포함할 수 있으나 이에 한정되는 것은 아니다.
- [95] 본 발명의 다른 측면에서, 본 발명은 상기 펩타이드 또는 약학적 조성물을 개체, 또는 신경 근육 질환이 발생한 개체에 투여하는 단계;를 포함하는 신경 근육 질환의 예방, 억제, 또는 치료 방법을 제공한다.
- [96] 상기 약학적 조성물에 대해서는 상기 '2. 본 발명의 펩타이드를 포함하는 약학적 조성물' 항목에서 설명한 바와 동일하다.
- [97] 상기 서열번호 1의 아미노산 서열을 포함하는 펩타이드 또는 상기 펩타이드를 포함하는 약학적 조성물은 유효량으로 이를 필요로 하는 개체에 도포, 투여될 수 있다.
- [98] 본 발명의 다른 측면에서, 본 발명은 상기 펩타이드 또는 화장료 조성물을 피부, 또는 주름이 발생한 피부에 적용하는 단계;를 포함하는 피부 주름 개선 방법을 제공한다.
- [99] 본 발명의 다른 측면에서, 본 발명은 상기 펩타이드 또는 화장료 조성물을 피부에 도포하는 단계;를 포함하는 피지 생성 억제 방법을 제공한다.
- [100] 본 발명의 다른 측면에서, 본 발명은 상기 펩타이드 또는 화장료 조성물을 피부, 또는 여드름이 생성된 피부에 도포하는 단계;를 포함하는 여드름 개선 방법을

제공한다.

- [101] 본 발명에 있어서, 상기 적용은 피부에 대한 도포를 포함할 수 있으나 이에 한정되는 것은 아니다.
- [102] 상기 화장료 조성물에 대해서는 상기 '3. 본 발명의 펩타이드를 포함하는 화장료 조성물' 항목에서 설명한 바와 동일하다.
- [103] 상기 서열번호 1의 아미노산 서열을 포함하는 펩타이드 또는 상기 펩타이드를 포함하는 화장료 조성물은 유효량으로 이를 필요로 하는 개체에 도포, 투여될 수 있다.
- [104] 이하, 본 발명을 제조예, 실시예 및 실험예에 의해 상세히 설명한다.
- [105] 단, 하기 제조예, 실시예 및 실험예는 본 발명을 예시하기 위한 것일 뿐, 본 발명의 내용이 하기 제조예, 실시예 및 실험예에 의해 한정되는 것은 아니다.
- [106] **제조예 1. 다양한 생리 활성을 갖는 신규 펩타이드의 제조**
- [107] 서열번호 1로 기재되는 아미노산 서열로 구성되는 신규 펩타이드 서열 'KFLIK'은 공지된 방법을 이용하여 제조하였다. 신규 펩타이드의 분자량은 647.4 Da이었다.
- [108] **실험예 1. 펩타이드의 고온 안정성 평가**
- [109] **1-1. 장기 보관시 고온 안정성 평가**
- [110] 서열번호 1의 아미노산 서열로 구성된 본 발명의 펩타이드를 1000ppm 농도로 멸균 증류수에 녹이고, 45°C에서 7일, 14일, 28일, 60일, 75일 동안 보관한 후, HPLC 분석을 수행하였다.
- [111] 그 결과, 도 1에 나타난 바와 같이, 45°C 조건에서 최대 관찰일인 75일 동안 본 발명의 펩타이드가 안정성을 유지하는 것을 확인할 수 있었다.
- [112] **1-2. 고온 안정성 평가**
- [113] 본 발명의 펩타이드를 1000ppm 농도로 멸균 증류수에 녹이고, 121°C에서 15분, 30분 동안 가온한 후 HPLC 분석을 수행하였다.
- [114] 그 결과, 도 2에 나타난 바와 같이, 121°C에서 최대 가온 시간인 30분 동안 본 발명의 펩타이드가 안정성을 유지하는 것을 확인할 수 있었다.
- [115] **실험예 2. 펩타이드의 선택신 1A 분해 정도 확인**
- [116] SNARE(soluble N-ethylmaleimide sensitive factor attachment protein receptor) 단백질은 세포 내에서 일어나는 막융합에 관여한다. 신경 전달에 관여하는 신경 SNARE는 시냅스전 막(presynaptic membrane)과 시냅스 소포(synaptic vesicle)의 결합에 관여한다. 신경전달물질의 배출시에 신경전달물질을 담고 있는 시냅스 소포는 시냅스전 막과 융합되어야 신경전달물질 배출 통로가 형성되며, 이때 막 융합은 단백질 복합체로 존재하는 SNARE에 의해 일어난다. 특히, 표적 막(target membrane)에 부착되어 있는 선택신 1A(syntaxin 1A) 단백질과 SNAP-25 단백질의 복합체인 t-SNARE 복합체와, 소포에 부착되어 있는 v-SNARE가 관여하게 된다. SNARE 접합과 꼬임 과정이 완전히 완료되지 않으면 막 융합이 실패하고 그에 따라 신경전달물질 방출이 이뤄지지 않아 근육이 이완된다. 본 발명의

펩타이드가 t-SNARE를 이루는 선택신 1A에 대해 분해능이 있는지 확인하였다.

- [117] **2-1. 재조합 선택신 1A 분해 정도 확인**
- [118] 실험군에는 재조합 선택신 1A 단백질(Novus biologicals, USA) 1 μ g과 본 발명의 펩타이드를 20 μ M, 100 μ M, 200 μ M의 농도별로 반응 완충액(50mM HEPES, 40mM 2-ME, 20 μ M ZnCl₂, pH 7.4)에 처리하고, 음성 대조군(Control)은 재조합 선택신 1A 단백질만 처리하였다. 37°C 조건에서 4시간 동안 반응시킨 후, 선택신 1A 항체(synaptic systems, Germany)를 사용하여 웨스턴 블랏을 수행하였다.
- [119] 그 결과, 본 발명의 펩타이드를 처리하면, 본 발명의 펩타이드를 처리하지 않은 음성대조군 대비 본 발명의 펩타이드가 농도 의존적으로 재조합 선택신 1A 단백질의 밴드를 감소시켰다(도 3).
- [120] **2-2. 세포 내에서 발현되는 내인성(endogenous) 선택신 1A 분해 정도 확인**
- [121] 30 μ g SH-SY5Y 세포 용해물과 본 발명의 펩타이드를 농도별로(20 μ M, 100 μ M, 200 μ M) 반응 완충액(50mM HEPES, 40mM 2-ME, 20 μ M ZnCl₂, pH 7.4)에 처리하였다. 양성 대조군(BoNT/C LC)은 본 발명의 펩타이드 대신에 0.2 μ M 보툴리눔 신경독 타입 C 경쇄(BoNT/C LC)를 사용하였고, 음성 대조군(Control)은 30 μ g SH-SY5Y 세포 용해물만 처리하였다. 각 혼합물은 37°C에서 4시간 동안 반응시켰다. 선택신 1A 항체(synaptic systems, Germany)를 사용하여 웨스턴 블랏을 수행하였다.
- [122] 그 결과, 본 발명의 펩타이드를 처리하면 BoNT/C LC를 처리한 양성대조군과 유사하게 본 발명의 펩타이드가 농도 의존적으로 내인성 선택신 1A 단백질의 밴드를 감소시켰다(도 4).
- [123] **실험예 2의 정리:** 본 발명의 펩타이드는 재조합 선택신 1A 또는 내인성 선택신 1A를 분해하며, 이에 따라, SNARE 복합체가 형성되지 않게 되므로, 신경전달물질의 방출이 이루어지지 않아 근육 이완 효과가 나타날 것으로 예상된다.
- [124] **실험예 3. SNARE 복합체 형성 분석**
- [125] **3-1. 웨스턴 블랏으로 분석**
- [126] 세포 내에서 형성되는 SNARE 복합체가 본 발명의 펩타이드의 선택신 1A 분해 작용에 의해 저해되는지 확인하였다. 구체적으로 웨스턴 블랏 수행 후에 SNARE 복합체의 예상 크기의 밴드의 밀도를 확인하였다. 3X10⁵ 세포/웰의 밀도로 6-웰 플레이트에 SH-SY5Y 세포를 접종하였다. 하룻밤 동안 배양 후에 무혈청 DMEM으로 배지를 교체하였다. 본 발명의 펩타이드를 농도별로(10 μ M, 50 μ M, 100 μ M) 24시간 동안 처리하였다. 양성대조군의 경우 0.2 μ M BoNT/C LC를 처리하였다. 음성 대조군(Control)은 시료를 처리하지 않았다. 시료를 처리하고 24시간이 경과한 후, 세포를 수집하고 용해물을 확보하여 선택신 1A 항체(synaptic systems, Germany)에 대한 웨스턴 블랏을 수행하였다. SNARE 복합체의 밴드 사이즈는 75 kDa이다.
- [127] 웨스턴 블랏 결과, 본 발명의 펩타이드를 처리하면, BoNT/C LC를 처리한

양성대조군과 유사하게 SH-SY5Y 세포 내에서 SNARE 복합체 형성 억제가 관찰되었다(도 5). 실험예 2의 결과를 감안하면, 본 발명의 펩타이드의 선택신 1A 분해 효과에 의해서 SNARE 복합체의 형성이 억제된 것으로 예상된다.

[128] **3-2. 공면역침강(coimmunoprecipitation, Co-IP)으로 분석**

[129] 공면역침강은 비-변성 조건에서 특정 단백질과 결합하는 다른 단백질을 검출할 목적으로 사용된다. 3×10^5 세포/웰의 밀도로 6-웰 플레이트에 SH-SY5Y 세포를 접종하였다. 하룻밤 배양 후 무혈청 DMEM으로 배지를 교체하였다. $50 \mu\text{M}$ 농도의 본 발명의 펩타이드를 24시간 동안 처리하였다. 양성 대조군의 경우 $0.2 \mu\text{M}$ BoNT/C LC를 처리하였다. 음성 대조군(Control)은 시료를 처리하지 않았다. 세포 용해물을 확보하여 SNAP-25 항체(synaptic systems, Germany)를 이용한 면역침강을 진행 후 SNAP-25 항체 및 선택신 1A 항체(synaptic systems, Germany)를 이용하여 웨스턴 블랏을 수행하였다.

[130] 그 결과, 본 발명의 펩타이드 처리에 의해서 SH-SY5Y 세포 내 SNARE 복합체 형성 억제에 따라 SNAP-25와 선택신 1A 간의 상호작용이 저해되는 것을 확인하였다(도 6). 도 6에서 'IP input'은 IP하기 전에 얻은 세포 용해물에서 확인된 SNAP-25, 선택신 1A 단백질의 양을 나타내며, 'Immunoprecipitation: anti-SNAP-25'은 SNAP-25 항체를 이용한 면역침강 후 얻어진 수득물에 SNAP-25 항체 또는 선택신 1A 항체를 각각 처리하여 얻은 결과를 나타낸다. 즉, 'Immunoprecipitation: anti-SNAP-25'에서 'SNAP-25' 패널은 세포 용해물에서 SNAP-25 항체에 의해 침전된 SNAP-25를 다시 검출한 것이며, '선택신 1A' 패널은 세포 용해물에서 SNAP-25 항체로 침전된 침전물을 선택신 1A 항체로 검출한 것을 나타낸다. '선택신 1A' 패널에서 시료를 처리하지 않은 음성대조군(Control)은 선택신 1A의 양이 유지되어 SNARE 복합체가 형성되어 있음을 알 수 있고, 본 발명의 펩타이드 처리군과 BoNT/C LC 처리군은 선택신 1A의 양이 감소하므로 SNARE 복합체의 형성이 저해되는 것을 알 수 있다.

[131] **실험예 3의 정리:**

[132] 본 발명의 펩타이드 처리시 SNARE 복합체 형성이 억제되며, 실험예 2의 결과를 감안하면 본 발명의 펩타이드 처리에 의해서 선택신 1A가 분해되고 이에 따라 SNARE 복합체의 형성이 저해되는 것을 알 수 있고, SNARE 복합체의 형성이 저해됨에 따라 신경전달물질의 방출이 이루어지지 않아 근육 이완 효과가 나타날 것으로 예상된다.

[133] **실험예 4. 펩타이드에 의한 아세틸콜린 분비 억제 기능 확인**

[134] 서열번호 1의 아미노산 서열로 구성된 본 발명의 펩타이드가 아세틸콜린 분비 억제 기능이 있는지 확인하였다. 인간 골수 신경아세포종(human Bone marrow Neuroblastoma)인 SH-SY5Y를 접종하고, 24시간 동안 CO_2 인큐베이터에서 배양하였다. 무혈청 배지로 배지를 교체하고 48시간 동안 배양하였다. 본 발명의 펩타이드를 $1 \mu\text{M}$, $10 \mu\text{M}$, $50 \mu\text{M}$ 의 농도로 처리하고, 양성 대조군인 테타누스(tetanus)를 50nM 로 처리하였다. 또한, 아세틸콜린 분비를 촉진하기

위한 유도 인자로 니코틴(NIC)+ 염화칼륨(KCl)을 처리한 후 30분 동안 배양하였다. 니코틴과 염화칼륨만을 처리하고, 본 발명의 펩타이드 또는 테타누스를 처리하지 않은 군을 음성 대조군으로 하였다. 배양 완료 후에 배지를 분리하고 배지에 포함되어 있는 아세틸콜린의 분비량을 콜린/아세틸콜린 분석 키트를 이용하여 측정하였다.

- [135] 도 7에 도시한 바와 같이, 정상군(Control)에서 분비된 아세틸콜린의 양을 기준으로, 본 발명의 펩타이드는 농도 의존적으로 아세틸콜린 함량을 감소시켰다. 또한 본 발명의 펩타이드를 50 μ M로 처리한 경우에는 양성 대조군인 테타누스를 처리한 군에 비해서 아세틸콜린 분비 저해 효과가 우수하였다.
- [136] **실험예 5. 마우스 발가락 근육의 이완 효과 확인**
- [137] C57BL/6 Female 7주령 마우스의 종아리 근육에 본 발명의 펩타이드 100 μ g를 투여한 후 관찰하였다. 근육 이완 효과는 발가락 외전 채점법(Digit Abduction Scoring, DAS) 분석으로 확인하였다. 외전은 팔다리를 밖으로 내뻗는 동작을 나타내며, DAS는 종아리 근육의 놀람 반응을 만드는 동물의 능력의 감소 정도를 측정한다. DAS는 0~4점으로 나누어서 점수를 주며, 점수가 높을수록 근육 이완 효과가 높은 것을 의미한다(도 8의 A). 즉, 점수가 높을수록 아세틸콜린 분비 억제 등과 같은 기작 등을 통해 놀람 반응이 저해되는 것을 의미한다. 0점은 다섯 발가락이 모두 떨어져 있는 것을 나타내고, 1점은 마우스의 발가락 두개가 외전 동안 붙어있는 것을 나타내며, 2점은 엄지와 두개의 발가락이 분리되지 않는 것을 나타내며, 3점은 엄지와 세개의 발가락이 붙어있는 것을 나타내며, 4점은 다섯개의 발가락이 모두 붙어있는 것을 나타낸다.
- [138] 도 8의 B에 나타내는 바와 같이, 본 발명의 펩타이드를 처리하기 전에는 놀람 반응이 나타나며 발가락 다섯개가 모두 떨어져 있어 0점을 나타내었다. 반면에, 본 발명의 펩타이드 주입 후에는 3시간 후부터는 본 발명의 펩타이드의 근육 이완 작용에 의해서 DAS 점수가 높아졌으며, 본 발명의 펩타이드 주입 후 17시간 이후부터는 4점을 기록하였다.
- [139] **실험예 6. 펩타이드와 보톡스 근육 이완 효과 비교**
- [140] C57BL/6 Female 7주령 마우스 2마리의 종아리 근육에 각각 본 발명의 펩타이드 100 μ g 및 BTX-A 타입(BoNT-A)을 0.6 Unit 주입 후 DAS 분석하였다.
- [141] 도 9 및 도 10에 나타낸 바와 같이, 본 발명의 펩타이드 투여군은 투여 20시간 이후에 미투여군에 비해서 근육 이완 효과가 나타났으며, BoNT-A와 유사한 정도의 효과를 나타내었다.
- [142] **실험예 4 내지 실험예 6의 정리:**
- [143] 본 발명의 본 발명의 펩타이드는 시험관 내에서 아세틸콜린 분비를 억제하고, 생체 내에서 보톡스와 유사한 정도로 근육 이완 효과를 나타내므로, 신경 근육 질환 또는 주름을 개선하는데 유용하게 사용할 수 있다.
- [144] **실험예 7. 펩타이드의 세포 내 침투 여부 또는 조직 침투 양상 확인**
- [145] 본 발명의 펩타이드의 세포 내 침투 여부 또는 조직 침투 양상을 확인시 사용한

'로다민-본 발명의 펩타이드' 접합체는 하기와 같이 제조하였다. 100mM 중탄산나트륨(pH 9.0)을 이용하여 10mg/ml의 본 발명의 펩타이드 용액을 제조하였다. 디메틸포름아미드를 이용하여 1mg/ml NHS-로다민(Thermo Scientific, 46406) 용액을 제조하였다. 본 발명의 펩타이드:NHS-로다민 = 1:10(몰비)가 되도록 용액을 혼합하였다. 차광 후 인버팅하면서 상온에서 1시간 동안 반응시켰다. 반응물을 투석한 후 LC/MS로 접합 여부를 확인하였다.

[146] **7-1. 세포 내 침투 여부 확인**

[147] 3×10^5 세포/웰의 밀도로 6-웰 플레이트에 SH-SY5Y 세포를 접종하였다. 하룻밤 배양 후 무혈청 DMEM으로 배지를 교체하였다. 형광 물질인 로다민(rhodamine)이 붙은 본 발명의 펩타이드를 농도별로 4시간 동안 처리하였다. 4시간 후에 4% 파라포름알데히드를 처리하여 세포를 고정한 후 DAPI 염색 키트(Invitrogen, USA)를 이용하여 핵 염색을 진행하였다. 형광 현미경을 통해 세포 내 펩타이드 침투 여부를 관찰하였다. 파란색은 DAPI로 염색된 세포의 핵을 나타내며, 붉은색은 '로다민-본 발명의 펩타이드' 접합체를 나타낸다.

[148] 도 11에 나타낸 바와 같이, 본 발명의 펩타이드 처리시 SH-SY5Y 세포 내로 본 발명의 펩타이드가 침투하는 것을 확인하였다.

[149] **7-2. 펩타이드의 조직 침투 양상 확인**

[150] 7주령 SD 랫의 등 부위를 제모한 후 로다민-본 발명의 펩타이드를 도포하고 1시간 후 분석을 위해 랫을 희생시켰다. 도포 부위의 피부 조직을 채취하여 포르말린 고정을 하루 동안 수행하였다. 고정된 조직을 이용하여 파라핀 블록을 만들고 섹션한 후 신경 세포 마커인 TrkB Ab(Cell signaling, USA)를 사용하여 면역조직화학 염색을 수행하였다. 이 후 DAPI 염색 키트(Invitrogen, USA)를 이용하여 핵 염색을 수행하였다. 형광 현미경을 통해 조직 내 펩타이드 침투 양상을 관찰하였다. 파란색은 DAPI로 염색된 세포의 핵을 나타내며, 붉은색은 '로다민-본 발명의 펩타이드' 접합체를 나타내고, 녹색은 TrkB(신경 섬유 마커)를 나타낸다.

[151] 확인 결과, 도 12에 나타낸 바와 같이 본 발명의 펩타이드 처리시 본 발명의 펩타이드가 피부 조직의 근육층까지 침투되는 것으로 나타났다. 또한 신경 세포 마커와도 공존(co-localization)하는 것을 확인하였다. 도 12를 확대하여 관찰하였을 때, 모낭이나 피지샘 주변의 신경 세포와 본 발명의 펩타이드가 공존하는 것이 확인되었다(도 13 및 도 14).

[152] **실험예 7의 정리:**

[153] 본 발명의 펩타이드는 세포 내로 침투 가능하고, 피부 조직의 근육층까지 침투되며, 근육층에서 신경 세포 마커와도 공존하므로 신경 세포의 신경전달물질 전달에 관여하는 SNARE 복합체의 형성에 관여하여 근육 이완 효과를 나타낼 것으로 예상된다.

[154] **실험예 8. 펩타이드의 주름 개선 효과 확인(진피 구성 물질 발현 증가)**

- [155] 7주령 무모 마우스의 등 부위에 4000ppm 본 발명의 펩타이드를 포함한 리포솜 용액을 하루 2회 총 12주간 도포하였다. 도포 부위를 육안으로 관찰한 후 피부 조직을 채취하여 포르말린으로 고정하였다. 고정된 조직을 이용하여 파라핀 블록을 만들고 블록을 섹션하여 조직 슬라이드를 준비하였다.
- [156] **8-1. 주름 완화 효과 확인**
- [157] 12주간 본 발명의 펩타이드를 포함한 리포솜 용액을 도포한 군은 리포솜 용액만 도포한 대조군에 비해서 육안 및 현미경 관찰 결과 모두에서 근육이완 효과에 의한 확연한 주름 감소가 관찰되었다(도 15 및 도 16).
- [158] **8-2. 콜라겐 발현 수준 평가**
- [159] Masson's Trichrome Staining Kit (Abcam, USA)을 이용하여 조직 슬라이드를 염색한 후 광학 현미경으로 관찰하였다.
- [160] 12주간 본 발명의 펩타이드를 포함한 리포솜 용액을 도포한 군은 리포솜 용액만 도포한 대조군에 비해서 콜라겐 수준이 증가하였다(도 17).
- [161] **8-3. 엘라스틴 및 피브로넥틴 발현 수준 평가**
- [162] 엘라스틴 항체와 피브로넥틴 항체(Cell signaling, USA)를 사용하여 면역조직화학 염색을 하고, 이 후 DAPI 염색 키트(Invitrogen, USA)이용하여 핵 염색하였다. 염색이 완료된 조직 슬라이드를 형광 현미경으로 관찰하였다.
- [163] 12주간 본 발명의 펩타이드를 포함한 리포솜 용액을 도포한 군은 리포솜 용액만 도포한 대조군에 비해서 엘라스틴, 피브로넥틴 수준이 증가하였다(도 18 및 도 19).
- [164] **실험예 9. 펩타이드의 피지 생성 억제 효과 확인**
- [165] 7주령 무모 마우스의 등 부위에 4000ppm 본 발명의 펩타이드를 포함한 리포솜 용액을 하루 2회 총 12주간 도포하였다. 도포 부위를 육안으로 관찰한 후 피부 조직을 채취하여 포르말린으로 고정하였다. 고정된 조직을 이용하여 파라핀 블록을 만들고 블록을 섹션하여 조직 슬라이드를 준비하였다. 피지 생성 관련 마커인 지방산 합성효소 항체(Cell signaling, USA)를 이용하여 면역조직화학 염색을 하고, 염색이 완료된 조직 슬라이드를 광학 현미경으로 관찰하였다.
- [166] 12주 간 본 발명의 펩타이드를 포함한 리포솜 용액을 도포한 군에서 리포솜 용액만을 도포한 대조군에 비해 확연한 피지샘 수 감소 및 피지 생성 관련 마커의 발현 감소가 확인되었다(도 20). 도 20의 좌측 패널은 펩타이드를 포함하지 않은 리포솜을 12주간 바른 개체의 결과이고, 우측 패널은 4000ppm의 펩타이드를 포함하는 리포솜을 12주간 바른 개체의 결과로서, 갈색으로 보이는 면역 염색 부위의 진하기가 펩타이드 리포솜 도포에 의해 연해지고 개수도 적어지는 것을 확인할 수 있다.
- [167] **제조예 2. 화장품 제형의 제조**
- [168] **2-1. 에센스의 제조**
- [169] 본 발명의 펩타이드를 이용하여 하기 표 1에 기재된 함량(중량부)에 따라 에센스를 제조하였다.

[170] [표1]

조성	함량(중량부)
트리에탄올아민	0.25
카르복시비닐폴리머	0.22
글리세린	4
부틸렌글리콜	2
본 발명의 펩타이드	1.5
밀납	0.5
세토스테아릴알코올	1
글리세릴모노스테아레이트	1
스쿠알렌	4
정제수	적량

[171] **2-2. 유연화장수의 제조**

[172] 본 발명의 펩타이드를 유효성분으로 함유하는 유연화장수는 하기 표 2와 같이 제조하였다.

[173] [표2]

원료	함량(중량부)
1,3-부틸렌글리콜	1.00
디소듐이디티에이	0.05
알란토인	0.10
디포타슘글리시리제이트	0.05
시트릭애씨드	0.01
소듐시트레이트	0.02
글리세레스-26	1.00
알부틴	2.00
PEG-40 수소화 캐스터오일	1.00
에탄올	30.00
본 발명의 펩타이드	1.5
착색제	미량
착향제	미량
정제수	잔량

[174] **2-3. 영양 크림의 제조**[175] 본 발명의 펩타이드를 유효성분으로 함유하는 영양크림은 하기 표 3의 조성
과 같이 제조하였다.

[176] [표3]

원료	함량(중량부)
1,3-부틸렌글리콜	7.0
글리세린	1.0
D-판테놀	0.1
마그네슘알루미늄실리케이트	0.3
PEG-40 스테아레이트	1.2
스테아릭애씨드	2.0
폴리소르베이트 60	1.5
친유형글리세릴스테아레이트	2.0
소르비탄세스퀴올리에이트	1.5
세테아릴알코올	3.0
미네랄오일	4.0
스쿠알렌	3.8
본 발명의 펩타이드	1.5
식물성 오일	1.8
디메치콘	0.4
디포타슘글리시리제이트	미량
알란토인	미량
소듐히아루로네이트	미량
토코페릴아세테이트	적량
트리에탄올아민	적량
착향제	적량
정제수	잔량

[177] **2-4. 로션의 제조**[178] 본 발명의 펩타이드를 유효성분으로 함유한 로션을 하기 표 4의 조성
과 같이 제조하였다.

[179] [표4]

원료	함량(중량부)
세토스테아릴알코올	1.6
스테아린산	1.4
친유형모노스테아린산글리세린	1.8
PEG-100 스테아레이트	2.6
세스퀴올레인산소르비탈	0.6
스쿠알렌	4.8
마카다이어아오일	2
호호바오일	2
초산토코페롤	0.4
메틸폴리실록산	0.2
초산토코페롤	0.4
1,3-부틸렌글리콜	4
산탄검	0.1
글리세린	4
d-판테놀	0.15
본 발명의 펩타이드	1.0
알란토인	0.1
카르보머(2% aq. Sol)	4
트리에탄올아민	0.15
에탄올	3
정제수	적량

[180] 제조예 3. 약학적 조성물의 제조

[181] 3-1. 산제의 제조

[182] 본 발명의 펩타이드 2 g

[183] 유당 1 g

[184] 상기의 성분을 혼합하고 기밀포에 충전하여 산제를 제조하였다.

[185] 3-2. 정제의 제조

[186] 본 발명의 펩타이드 100 mg

[187] 옥수수전분 100 mg

[188] 유당 100 mg

- [189] 스테아린산 마그네슘 2 mg
- [190] 상기의 성분을 혼합한 후, 통상의 정제의 제조 방법에 따라서 타정하여 정제를 제조하였다.
- [191] **3-3. 캡슐제의 제조**
- [192] 본 발명의 펩타이드 100 mg
- [193] 옥수수전분 100 mg
- [194] 유당 100 mg
- [195] 스테아린산 마그네슘 2 mg
- [196] 상기의 성분을 혼합한 후, 통상의 캡슐제의 제조방법에 따라서 젤라틴 캡슐에 충전하여 캡슐제를 제조하였다.
- [197] **3-4. 환의 제조**
- [198] 본 발명의 펩타이드 1 g
- [199] 유당 1.5 g
- [200] 글리세린 1 g
- [201] 자일리톨 0.5 g
- [202] 상기의 성분을 혼합한 후, 통상의 방법에 따라 1환 당 4g이 되도록 제조하였다.
- [203] **3-5. 과립의 제조**
- [204] 본 발명의 펩타이드 150 mg
- [205] 대두추출물 50 mg
- [206] 포도당 200 mg
- [207] 전분 600 mg
- [208] 상기의 성분을 혼합한 후, 30% 에탄올 100 mg을 첨가하여 섭씨 60°C에서 건조하여 과립을 형성한 후 포에 충전하였다.

청구범위

- [청구항 1] 서열번호 1로 기재되는 아미노산 서열을 포함하는 펩타이드.
- [청구항 2] 청구항 1의 펩타이드를 유효성분으로 함유하는 근육 이완용 약학적 조성물.
- [청구항 3] 청구항 2에 있어서,
상기 펩타이드는 근육 이완용 약학적 조성물 100중량%에 대하여 0.001중량% 내지 60중량%로 포함되는 약학적 조성물.
- [청구항 4] 청구항 2에 있어서,
신경 근육 질환의 예방 또는 치료에 사용하는 약학적 조성물.
- [청구항 5] 청구항 4에 있어서,
상기 신경 근육 질환은 눈꺼풀 경련, 사경, 경부 근긴장 이상, 강직성 안검연축, 겨드랑이 다한증, 항문열창, 질경련, 이완불능증, 두통 질환, 특발성 및 신경성 배뇨근 과다증, 국소이긴장증, 측두하악관절 통증 장애, 당뇨병성 신경증, 성대 기능 장애, 사시, 만성신경병증, 안면근육비대증, 배뇨근 조임근 장애 및 양성 전립선 비대증으로 이루어진 군으로부터 선택되는 어느 하나인 약학적 조성물.
- [청구항 6] 청구항 5에 있어서,
상기 두통 질환은 편두통인 약학적 조성물.
- [청구항 7] 청구항 2에 있어서,
상기 펩타이드는 아세틸콜린의 분비를 억제하는 약학적 조성물.
- [청구항 8] 청구항 1의 펩타이드를 유효성분으로 함유하는 피부상태 개선용 화장품 조성물.
- [청구항 9] 청구항 8에 있어서,
피부 주름 개선, 피지 생성 억제, 또는 여드름 개선에 사용하는 화장품 조성물.
- [청구항 10] 청구항 8에 있어서,
상기 펩타이드는 화장품 조성물 100중량%에 대하여 0.001중량% 내지 60중량%로 포함되는 화장품 조성물.
- [청구항 11] 청구항 8에 있어서,
상기 펩타이드는 콜라겐의 발현을 증가시키는 화장품 조성물.