

(19) 日本国特許庁 (JP)

(12) 特 許 公 報 (B2)

(11) 特許番号

特許第6573295号  
(P6573295)

(45) 発行日 令和1年9月11日 (2019.9.11)

(24) 登録日 令和1年8月23日 (2019.8.23)

(51) Int. Cl.

F I

<b>C 0 7 K</b>	<b>7/06</b>	<b>(2006.01)</b>	<b>C 0 7 K</b>	<b>7/06</b>	<b>Z N A</b>
<b>A 6 1 P</b>	<b>17/02</b>	<b>(2006.01)</b>	<b>A 6 1 P</b>	<b>17/02</b>	
<b>A 6 1 P</b>	<b>17/00</b>	<b>(2006.01)</b>	<b>A 6 1 P</b>	<b>17/00</b>	
<b>A 6 1 Q</b>	<b>19/08</b>	<b>(2006.01)</b>	<b>A 6 1 Q</b>	<b>19/08</b>	
<b>A 6 1 Q</b>	<b>19/02</b>	<b>(2006.01)</b>	<b>A 6 1 Q</b>	<b>19/02</b>	

請求項の数 10 (全 15 頁) 最終頁に続く

(21) 出願番号 特願2018-517117 (P2018-517117)  
 (86) (22) 出願日 平成29年3月21日 (2017.3.21)  
 (65) 公表番号 特表2018-528978 (P2018-528978A)  
 (43) 公表日 平成30年10月4日 (2018.10.4)  
 (86) 国際出願番号 PCT/KR2017/002998  
 (87) 国際公開番号 W02017/164609  
 (87) 国際公開日 平成29年9月28日 (2017.9.28)  
 審査請求日 平成29年12月8日 (2017.12.8)  
 (31) 優先権主張番号 10-2016-0034327  
 (32) 優先日 平成28年3月23日 (2016.3.23)  
 (33) 優先権主張国・地域又は機関  
 韓国 (KR)

(73) 特許権者 517432569  
 カイン サイエンス シーオー., エルテ  
 ィーディー.  
 K I N E S C I E N C E S C o . ,  
 L t d .  
 大韓民国、ソウル、ガンナムグ、ヨンド  
 ンデロ、106-ギル、42、3 (サム  
 ソンドン、ソンドベンチャータワー)  
 (SungdoVentureTower  
 , Samseong-dong) 3,  
 42, Yeongdong-daero  
 106-gil, Gangnam-g  
 u, Seoul 06172 (KR)  
 (74) 代理人 110001139  
 S K 特許業務法人

最終頁に続く

(54) 【発明の名称】 肌再生または傷治療用ペプチド及びこの用途

(57) 【特許請求の範囲】

【請求項 1】

配列番号 1 または 2 で表示されるアミノ酸からなる、ペプチド。

【請求項 2】

前記ペプチドの N-または C-末端はアセチル基、フルオレニルメトキシカルボニル基、ホルミル基、パルミトイル基、ミリスチル基、ステアシル基、及びポリエチレングリコール (PEG) からなる群から選択される保護基と結合されていることを特徴とする、請求項 1 に記載のペプチド。

【請求項 3】

肌再生または傷治療に使用するための、配列番号 1 または 2 で表示されるアミノ酸からなるペプチドを有効成分として含む、薬学的組成物。

10

【請求項 4】

前記ペプチドの N-または C-末端はアセチル基、フルオレニルメトキシカルボニル基、ホルミル基、パルミトイル基、ミリスチル基、ステアシル基、及びポリエチレングリコール (PEG) からなる群から選択される保護基と結合されていることを特徴とする、請求項 3 に記載の薬学的組成物。

【請求項 5】

前記ペプチドは 1 乃至 500 ng/ml 濃度で含有されていることを特徴とする、請求項 3 に記載の薬学的組成物。

【請求項 6】

20

前記傷は創傷によるものであることを特徴とする、請求項 3 に記載の薬学的組成物。

【請求項 7】

前記組成物は薬学的に許容可能な担体をさらに含むことを特徴とする、請求項 3 に記載の薬学的組成物。

【請求項 8】

肌老化または傷改善に使用するための、配列番号 1 または 2 で表示されるアミノ酸からなるペプチドを有効成分として含む、化粧品組成物。

【請求項 9】

前記組成物は懸濁液、乳濁液、ペースト、ゲル、クリーム、ローション、パウダー、ワックスまたはスプレー形態であることを特徴とする、請求項 8 に記載の化粧品組成物。

10

【請求項 10】

前記組成物は肌美白活性を有することを特徴とする、請求項 8 に記載の化粧品組成物。

【発明の詳細な説明】

【技術分野】

【0001】

本発明は、肌再生または傷治療用ペプチド及びこの用途に関するものである。

【0002】

本発明は、大韓民国汎部支援下で課題番号 1711030975 によってなされたものであり、前記課題の研究管理専門機関は韓国研究財団、研究事業名は創生素材ディスカバリー事業、研究課題名は機能性免疫体技術基盤の生分解性肌再生素材開発、研究期間は 2015.12.04 ~ 2016.04.30. である。

20

【0003】

本特許出願は、2016年03月23日に大韓民国特許庁に提出された大韓民国特許出願第10-2016-0034327号に対して優先権を主張し、前記特許出願の開示事項は本明細書に参照として挿入される。

【背景技術】

【0004】

肌は人体の一次防御膜として体内の器官らを温度、湿度変化、紫外線、公害物質など外部環境による刺激から保護してくれて、体温調節などの生体恒常性維持に重要な役割をする。このような肌の一番外側に存在する角質は肌の細胞が変化されて生じた組織であり、完全に死んだ細胞で構成されている。真皮層の肌結合組織中にきめが粗く形成された細胞層は表皮層に上がりながら細胞の生命力が消えて、堅固で規則的な細胞層に変わるようになる。このような構成からなる肌は一番外部で私らの身の水分を守ってくれて外から入ってくるさまざまな物質らを防御する防御線のような役割をする。すなわち、肌の表面に傷が生じる場合、表皮の早い再生能力は傷の回復を促進して傷を通じた追加感染を防止して、肌表面の傷あとを減らしてくれる役割ができる。

30

【0005】

傷が生じた肌組織が再構成される場合、さまざまな反応らが関与して具体的に、角質細胞の移動、増殖、分化、損傷細胞の脱落、外被組織の生産が関与されている。傷治癒の過程は各種細胞と因子が関与して非常に複雑な反応として、先ず傷部位に血小板が凝集して形質転換増殖因子、血小板由来増殖因子、上皮細胞増殖因子などのさまざまな細胞増殖因子が遊離されることによって血管内皮、貪食細胞、繊維芽細胞、上皮細胞などに刺激を与えて細胞増殖を促進するようになって、これと同時にこれら細胞自身も自己分泌的に繊維芽細胞増殖、形質転換増殖因子、インターロイキンなどの物質を生産、放出しながら傷治癒機転が進行される。

40

【0006】

現在、多様な活性を有していて傷治療製剤で広く使われている EGF (表皮成長因子、Epidermal growth factor) は精製して得るか、またはバクテリアで過剰発現して得る方法が使われている。直接精製して得る場合時間、お金、そして労働力がたくさん必要となっていて、またバクテリアでの過剰発現方法は、細胞内での低い発現量とバクテリアのタンパク質

50

分解酵素などによって回収率が非常に低いという問題点がある。また、E G Fは慢性の傷部位には低い治療効果を示すという報告があり、温度及びタンパク質分解酵素による短い半減期によって効率対価が高いという問題によって商用化に困難を経験しているのが実情である。

【 0 0 0 7 】

このような背景下で、従来の肌再生または傷治療用製剤の問題点を最小化させながら有効な治療効果を有する新しい治療剤の開発が要求されるのが実情であり、これに対する研究が活発に進行されているが(韓国公開特許第 1 0 - 2 0 1 5 - 0 1 3 5 7 4 3 号)、まだまだ不備なのが実情である。

【 発明の概要 】

【 発明が解決しようとする課題 】

【 0 0 0 8 】

本発明は前記のような問題点を解決するために案出されたものであり、本発明者らは肌再生または傷治療用製剤に対して例の研究をした結果、15個以下のアミノ酸からなるペプチドを製造した上で、前記ペプチドを処理した場合、繊維コラーゲン生成量増進、黒色腫細胞のメラニン生成量及びチロシナーゼ活性抑制効果を確認して、これに基づいて本発明を完成するようになった。

【 0 0 0 9 】

これに、本発明の目的は、配列番号1または2で表示されるアミノ酸からなる、肌再生または傷治療用ペプチドを提供することである。

【 0 0 1 0 】

また、本発明の他の目的は、前記ペプチドまたはこれをコーディングするポリヌクレオチドを有効成分として含む、肌再生または傷治療用薬学的組成物を提供することである。

【 0 0 1 1 】

また、本発明のまた他の目的は、前記ペプチドを有効成分として含む、肌老化または傷改善用健康機能食品/化粧品組成物を提供することである。

【 0 0 1 2 】

しかし、本発明が達成しようとする技術的課題は、以上で言及した課題で制限されないし、言及されなかったまた他の課題などは下の記載から当業者に明確に理解されることができるであろう。

【 課題を解決するための手段 】

【 0 0 1 3 】

前記のような本発明の目的を達成するために、本発明は配列番号1または2で表示されるアミノ酸からなる、ペプチドを提供する。

【 0 0 1 4 】

本発明の一具体例として、前記ペプチドのN-またはC-末端はアセチル基、フルオレニルメトキシカルボニル基、ホルミル基、パルミトイル基、ミリスチル基、ステアシル基、及びポリエチレングリコール(P E G)からなる群から選択される保護基と結合されてもよい。

【 0 0 1 5 】

また、本発明は前記ペプチドまたはこれをコーディングするポリヌクレオチドを有効成分として含む肌再生または傷治療用薬学的組成物を提供する。

【 0 0 1 6 】

本発明の一具体例として、前記ペプチドは1乃至500 ng/ml濃度で含有されてもよい。

【 0 0 1 7 】

本発明の他の具体例として、前記傷は創傷によるものであってもよい。

【 0 0 1 8 】

本発明のまた他の具体例として、前記組成物は薬学的に許容可能な担体をさらに含むことができる。

10

20

30

40

50

## 【 0 0 1 9 】

また、本発明は前記ペプチドを有効成分として含む肌老化または傷改善用化粧品組成物を提供する。

## 【 0 0 2 0 】

本発明の一具体例として、前記組成物は懸濁液、乳濁液、ペースト、ゲル、クリーム、ローション、パウダー、ワックスまたはスプレー形態であってもよい。

## 【 0 0 2 1 】

本発明の他の具体例として、肌美白活性を有してもよい。

## 【 0 0 2 2 】

また、本発明は前記ペプチドを個体に投与する段階を含む、肌再生または傷治療方法を提供する。

10

## 【 0 0 2 3 】

また、本発明は前記ペプチドの肌再生または傷治療用途を提供する。

## 【発明の効果】

## 【 0 0 2 4 】

本発明による新規ペプチドは繊維芽細胞のコラーゲン生成量を増進させて傷の治癒を促進させるだけでなく、黒色腫細胞のメラニン生成量及びチロシナーゼ活性を抑制させて優秀な美白効果を示して、非常に小さな大きさのペプチドでなされて外部物質の投与による副作用を最小化させることができるところ、既存の肌再生または傷治療用製剤を取り替えることができる有効物質で活用されることが期待される。

20

## 【図面の簡単な説明】

## 【 0 0 2 5 】

【図 1】本発明のペプチド 1 処理によるヒト繊維芽細胞から生成されたProcollagenの量を測定した結果である。

【図 2】本発明のペプチド 1 処理によるヒト繊維芽細胞から生成されたCol 1 A 1 の量を測定した結果である。

【図 3】本発明のペプチド 1 処理による黒色腫細胞から生成されたメラニンの量を測定した結果である。

【図 4】本発明のペプチド 1 処理による黒色腫細胞のチロシナーゼ(Tyrosinase)活性を評価した結果である。

30

【図 5】本発明のペプチド 1 処理によるin vitro傷モデルでの傷治療効果を確認した結果である。

【図 6】本発明のペプチド 2 処理によるin vitro傷モデルでの傷治療効果を確認した結果である。

【図 7】本発明のペプチド 1 処理によるin vitro傷モデルでの傷治療効果を定量化して評価した結果である。

【図 8】本発明のペプチド 2 処理によるin vitro傷モデルでの傷治療効果を定量化して評価した結果である。

【図 9】本発明のペプチド 1 または 2 処理による急性創傷動物モデルでの傷治療効果を確認した結果である。

40

【図 10】本発明のペプチド 1 または 2 処理による急性創傷動物モデルでの傷治療効果を定量化して評価した結果である。

【図 11】本発明のペプチド 1 または 2 処理による急性創傷動物モデルでの肌組織変化をH & E 染色を通じて確認した結果である。

## 【発明を実施するための形態】

## 【 0 0 2 6 】

以下、本発明を詳しく説明することにする。

## 【 0 0 2 7 】

本発明は、配列番号 1 または 2 で表示されるアミノ酸からなる、ペプチドを提供する。

## 【 0 0 2 8 】

50

本発明で、"ペプチド(peptide)"はアミド結合(または、ペプチド結合)で連結された2個以上のアミノ酸からなるポリマーを意味して、本発明の目的上、肌再生または傷治癒活性を有するペプチドを意味する。

#### 【0029】

ペプチド治療剤に対する多様な研究にもかかわらず、ペプチド自体大きさがとても大きくて標的組織または細胞に効果的に流入されることができないか、または半減期が短くて短期間に体内で消滅する短所を示したところ、本発明は有効な治療効果を有すると共に20個以下のアミノ酸からなる、新規ペプチドを最初に究明したという点に技術的意義がある。

#### 【0030】

本発明のペプチドは配列番号1または2で表示されるアミノ酸でなされることができるし、前記配列番号1または2で表示されるアミノ酸配列とそれぞれ75%以上、望ましくは80%以上、より望ましくは、90%以上、一番望ましくは、95%以上の配列相同性を有するアミノ酸配列を含むことができ、標的化配列、タグ(tag)、標識された残基、半減期またはペプチド安全性を増加させるための特定目的で製造されたアミノ酸配列も追加的に含むことができる。

#### 【0031】

また、本発明のペプチドに対する機能性変異体も含むことができる。前記機能性変異体は本明細書に記載したペプチド配列(配列番号1または2)の生物学的同等物などを含む。例えば、ペプチドの結合親和度及び/またはその他生物学的特性をより改善させるためにペプチドのアミノ酸またはポリヌクレオチド配列に追加的な変化を与えることができる。このような変形はペプチドのアミノ酸配列残基の欠失、挿入、及び/または置き換えを含んで、アミノ酸側鎖置換体の相対的な類似性、例えば、疎水性、親水性、電荷大きさなどに基礎してなされる。アミノ酸側鎖置換体の大きさ、模様及び種類に対する分析によって、アルギニン、リシンとヒスチジンはすべて正の電荷を帯びた残基であり、アラニン、グリシンとセリンは類似した大きさを有して、フェニルアラニン、トリプトファンとタイロシンは類似した模様を有するということが分かる。したがって、このような考慮事項に基礎して、アルギニン、リシンとヒスチジンと、アラニン、グリシンとセリンと、そしてフェニルアラニン、トリプトファンとタイロシンなどは生物学的に機能同等物と言える。

#### 【0032】

また、本発明のペプチドは当該分野で広く公知された多様な方法で獲得することができる。一例として、ポリヌクレオチドリコンビネーション(組換)とタンパク質発現システムを利用して製造するか、またはペプチド合成のような化学的合成を通じて試験管内で合成する方法、及び無細胞タンパク質合成法などで製造されることができる。

#### 【0033】

また、より良い化学的安全性、強化された薬理特性(半減期、吸水性、力価、効能など)、変更された特異性(例えば、広範囲な生物学的活性スペクトラム)、減少された抗原性を獲得するために、ペプチドのN-またはC-末端に保護基が結合されてもよい。望ましくは、前記保護基はアセチル基、フルオレニルメトキシカルボニル基、ホルミル基、パルミトイル基、ミリスチル基、ステアシル基またはポリエチレングリコール(PEG)であり得るが、ペプチドの改質、特にペプチドの安全性を増進させることができる成分なら、制限なしに含むことができる。本発明で使用される用語、"安全性"は生体内タンパク質切断酵素の攻撃から本発明のペプチドを保護するイン・ビボ安全性だけでなく、貯蔵安全性(例えば、常温貯蔵安全性)も意味する。

#### 【0034】

本発明で、"ポリヌクレオチド(polynucleotide)"はヌクレオチドが結合された重合体として、遺伝情報を伝達する役割をする。本発明の目的上、配列番号1または2のペプチドをコーディングし、前記ペプチドをコーディングするポリヌクレオチド配列とそれぞれ75%以上、望ましくは85%以上、より望ましくは90%以上、一番望ましくは95%以上配列相同性を有する配列を含むことができる。

10

20

30

40

50

## 【0035】

本発明で使用される用語、""相同性""は野生型アミノ酸配列またはポリヌクレオチド配列との類似の程度を示すためのものであり、このような相同性の比較は当業界で広く知られた比較プログラムを利用して遂行することができるし、2個以上の配列間相同性を百分率(%)で計算することができる。

## 【0036】

本発明の他の様態として、本発明は前記ペプチドまたはこれをコーディングするポリヌクレオチドを有効成分として含む、肌再生または傷治療用薬学的組成物と、肌再生または傷治療のための前記ペプチドの用途と、及び治療上有効量の前記ペプチドを個体に投与する段階を含む、肌再生または傷治療方法を提供する。

10

## 【0037】

本発明で使用される用語、""治療""は本発明による薬学的組成物の投与によって傷に対する症状が好転するか、またはよく変更されるすべての行為を意味する。

## 【0038】

本発明で、""個体""は傷の治療を要する対象を意味して、より具体的にはヒトまたは非ヒトである霊長類、マウス(mouse)、犬、猫、馬及び牛などの哺乳類を意味する。

## 【0039】

本発明で使用される用語、""肌再生""は全般的な肌老化及び肌に誘発された外部刺激に対応して肌組織が再構成される一連の反応を称えるものとして、一具体例として肌美白、肌弾力増進、しわ改善効果を示す。

20

## 【0040】

前記""肌美白""はメラニン色素の合成を阻害することで肌トーンを明るくするだけでなく、紫外線、ホルモンまたは遺伝に起因した染みやそばかすなどの肌の過剰な色素沈着を改善することを言う。

## 【0041】

本発明で使用される用語、傷(wound)は外部刺激によって組織が損傷される現象を意味するものとして、一般的な傷の治癒はたいてい細胞の変性及び死滅、周りの組織からの遊走細胞、組織流出、及び繊維素の析出と肉芽組織の形成などの過程を通るようになる。本発明の目的上、前記傷治療は前述したような過程を促進させて正常肌組織への再構成を助けることを称える、一方、前記傷は望ましくは、創傷によるものであることができるが、これに制限されるものではない。

30

## 【0042】

本発明の一実施例によれば、2種類のペプチド(ペプチド1及びペプチド2)を製造したし(実施例1参照)、前記ペプチドを処理することで、コラーゲン生成量を増進させて傷治療を促進させることができ、B16F10黒色腫細胞株のメラニン生成及びチロシナーゼ活性を抑制させて優秀な美白効果を確認することができた(実施例2乃至4参照)。また、HaCaT細胞の移動能を評価するためのscratch assay、及び急性創傷動物モデルを利用して、前記ペプチドの優秀な傷治療効果(傷減少)を確認することができる(実施例5及び6参照)、既存の肌再生または傷治療用製剤を置き換えることができる有効物質及び肌美白製剤として幅広く活用されることができよう。

40

## 【0043】

一方、本発明のペプチドまたは、これをコーディングするポリヌクレオチドはコロイド懸濁液、粉末、食塩水、脂質、リボソーム、微小球体(microspheres)、またはナノ球形粒子のような薬学的に許容されることができ担体によって運搬されることができる。これらは運搬手段と複合体を形成するか、または関連されることができるし、脂質、リボソーム、微細粒子、金、ナノ粒子、ポリマー、縮合反応剤、多糖類、ポリアミノ酸、デンドリマー、サポニン、吸着増進物質または脂肪酸のような当業界で公知の運搬システムを使って生体内に運搬されることができる。

## 【0044】

以外にも、薬学的に許容される担体は製剤時通常的に利用されるラクトース、デキストロ

50

ース、スクロース、ソルビトール、マンニトール、デンプン、アカシア、ゴム、リン酸カルシウム、アルギネート、ゼラチン、ケイ酸カルシウム、微細結晶性セルロース、ポリビニルピロリドン、セルロース、水、シロップ、メチルセルロース、メチルヒドロキシベンゾエート、プロピルヒドロキシベンゾエート、滑石、ステアリン酸マグネシウム及びミネラルオイルなどを含むことができるが、これらに限定されるものではない。また、前記成分など以外に潤滑剤、湿潤剤、甘味剤、風味剤、乳化剤、懸濁剤、保存剤などを追加で含むことができる。

【0045】

また、本発明の薬学的組成物は本発明の目的上、肌再生効果のために望ましく本発明のペプチドを1乃至500 ng/ml濃度で含むことができるが、細胞毒性なしに有効な治療効果を期待することができる濃度なら、これに制限されるものではない。

10

【0046】

本発明の薬学的組成物は目的とする方法によって経口投与するか、または非経口投与(例えば、筋肉内、静脈内、腹腔内、皮下、皮内、または局所に適用)することができ、投与量は患者の状態及び体重、疾病の程度、薬物形態、投与経路及び時間によって異なるが、当業者によって適切に選択されることができる。

【0047】

特に、本発明の薬学的組成物を肌外用剤で使用する場合、追加で脂肪物質、有機溶媒、溶解剤、濃縮剤及びゲル化剤、軟化剤、抗酸化剤、懸濁化剤、安定化剤、発泡剤(foaming agent)、芳香剤、界面活性剤、水、イオン型乳化剤、非イオン型乳化剤、充填剤、金属イオン封鎖剤、キレート化剤、保存剤、ビタミン、遮断剤、湿潤化剤、エッセンシャルオイル、染料、顔料、親水性活性剤、親油性活性剤または脂質小囊など肌外用剤に通常的に使用される任意の他の成分と同じ肌科学分野で通常的に使用される補助剤を含むことができる。また、前記成分らは肌科学分野で一般的に使用される量で導入されることができる。また、前記薬学的組成物が肌外用剤で提供される場合、これに制限されるものではないが、軟膏、パッチ、ゲル、クリームまたは噴霧剤などの剤形であることができる。

20

【0048】

本発明の薬学的組成物は薬学的に有効な量で投与する。本発明において、"薬学的に有効な量"は医学的治療に適用可能な合理的なメリット/危険の割合で疾患を治療するに十分な量を意味して、有効容量水準は患者の疾患の種類、重症度、薬物の活性、薬物に対する敏感度、投与時間、投与経路及び排出の割合、治療期間、同時使用される薬物を含んだ要素及びその他医学分野でよく知られた要素によって決まることができる。本発明の他の薬学的組成物は個別治療剤で投与するか、または他の治療剤と併用して投与されることができるし、従来の治療剤とは同時に、別途で、または順次投与されることができるし、単一または多重投与されることができる。前記要素などをすべて考慮して副作用なしに最小限の量で最大効果を得ることができる量を投与するのが重要であり、これは当業者が容易に決めることができる。

30

【0049】

具体的に本発明の薬学的組成物の有効量は、患者の年齢、性別、状態、体重、体内に活性成分の吸収度、不活性率、排泄速度、疾病種類、併用される薬物によって変わることができるし、投与経路、肥満の重症度、性別、体重、年齢などによって増減されることができる。

40

【0050】

また、本発明の他の様態として、本発明は前記ペプチドまたはこれをコーディングするポリヌクレオチドを有効成分として含む、肌老化または傷改善用健康機能食品/化粧品組成物を提供する。

【0051】

本発明で使用される用語、"改善"とは、治る状態と関連したパラメーター、例えば、症状の程度を少なくとも減少させるすべての行為を意味する。この時、前記健康機能食品/化粧品組成物は、肌老化または傷の予防または改善のために、関連疾患の発病段階以前ま

50

たは発病後、治療のための薬剤と同時にまたは別に使用されることができる。

【0052】

本発明の健康機能食品組成物は、有効成分を食品にそのまま添加するか、または他の食品または食品成分と共に使用されることができるし、通常の方法によって適切に使用されることができる。有効成分の混合量はその使用目的(予防または改善用)によって好適に決めることができる。一般に、食品または飲み物の製造時に本発明の組成物は原料に対して望ましく15重量%以下、望ましくは10重量%以下の量で添加されることができる。しかし、健康及び衛生を目的とするか、または健康調節を目的とする長期間の摂取の場合には前記量は前記範囲以下であることがある。

【0053】

本発明の健康機能食品組成物は、前記有効成分を含むこと以外に特別な制限なしに他の成分などを必修成分として含むことができる。例えば、通常の飲み物のようにさまざまな風味剤または天然炭水化物などを追加成分として含むことができる。前述した天然炭水化物の例はモノ-サッカライド、例えば、葡萄糖、果糖などと、ジ-サッカライド、例えばマルトス、スクロースなどと、及びポリサッカライド、例えばシクロデキストリンなどのような通常の糖、及びキシリトール、ソルビトール、エリトリトールなどの糖アルコールであることができる。前述以外の風味剤として天然風味剤(ソーマチン、ステビア抽出物(例えば、レバウジオシドA、グリチルリチンなど))及び合成風味剤(サッカリン、アスパルテムなど)を好適に使用することができる。前記天然炭水化物の割合は当業者の選択によって適切に決めることができる。

【0054】

前記以外に本発明の健康機能食品組成物は、さまざまな栄養剤、ビタミン、ミネラル(電解質)、合成風味剤及び天然風味剤などの風味剤、着色剤及び増進剤(チーズ、チョコレートなど)、ペクチン酸及びその塩、アルギン酸及びその塩、有機酸、保護性コロイド増粘剤、pH調節剤、安定化剤、防腐剤、グリセリン、アルコール、炭酸飲料に使用される炭酸化剤などを含むことができる。このような成分は独立してまたは組み合わせて使用することができ、このような添加剤の割合も当業者によって適切に選択されることができる。

【0055】

本発明の化粧品組成物は当業界で通常製造されるどのような剤形でも製造されることができるし、例えば、溶液、懸濁液、乳濁液、ペースト、ゲル、クリーム、ローション、パウダー、せっけん、界面活性剤-含有クレンジングオイル、粉末ファンデーション、乳濁液ファンデーション、ワックスファンデーション及びスプレーなどとして剤形化されることができるが、これらに限定されるものではない。より詳細には、柔軟化粧水、栄養化粧水、栄養クリーム、マッサージクリーム、エッセンス、アイクリーム、クレンジングクリーム、クレンジングフォーム、クレンジングウォーター、パック、スプレーまたはパウダーの剤形として製造されることができる。

【0056】

本発明の化粧品組成物に含有された有効な担体は剤形によって、当業界で通常利用される担体が利用されることができる。本発明の剤形がペースト、クリームまたはゲルの場合には担体成分として動物性油、植物性油、ワックス、パラフィン、デンプン、トラガント、セルロース誘導体、ポリエチレングリコール、シリコン、ベントナイト、シリカ、タルクまたは酸化亜鉛などが利用されることができる。

【0057】

本発明の剤形がパウダーまたはスプレーの場合には担体成分としてラクトス、タルク、シリカ、アルミニウムヒドロキシド、カルシウムシリケートまたはポリアミドパウダーが利用されることができるし、特に、スプレーの場合には追加的にクロロフルオロハイドロカーボン、プロパン/ブタンまたはジメチルエーテルのような推進体を含むことができる。

【0058】

本発明の剤形が溶液または乳濁液の場合には担体成分として溶媒、溶解化剤または乳濁化剤が利用され、例えば水、エタノール、イソプロパノール、エチルカーボネート、エチル

10

20

30

40

50



アセテート、ベンジルアルコール、ベンジル ベンゾエート、プロピレングリコール、1、3-ブチルグリコールオイル、グリセロール脂肪酸エステル、ポリエチレングリコールまたはソルビタンの脂肪酸エステルがある。

【0059】

本発明の剤形が懸濁液の場合には担体成分として水、エタノールまたはプロピレングリコールのような液状の希釈剤、エトキシ化イソステアリルアルコール、ポリオキシエチレンソルビトールエステル及びポリオキシエチレンソルビタンエステルのような懸濁剤、微小セルロース、アルミニウムメタヒドロキシド、ベントナイト、アガまたはトラガントなどが利用されることができる。

【0060】

本発明の剤形が界面-活性剤含有クレンジングの場合には担体成分として脂肪酸アルコールソルベイト、脂肪酸アルコールエーテルソルベイト、スルホコハク酸モノエステル、イセチオナート、イミダゾリウム誘導体、メチルタウレート、サルコシネート、脂肪酸アミドエーテルソルベイト、アルキルアミドベタイン、脂肪酸アルコール、脂肪酸グリセリド、脂肪酸ジエタノールアミド、植物性油、ラノリン誘導体またはエトキシ化グリセロール脂肪酸エステルなどが利用されることができる。

【0061】

本発明の化粧品組成物に含まれる成分は有効成分と担体成分以外に、化粧品組成物に通常利用される成分などを含んで、例えば抗酸化剤、安定化剤、溶解化剤、ビタミン、顔料及び香料のような通常の補助剤を含むことができる。

【0062】

以下、本発明の理解を助けるために望ましい実施例を提示する。しかし、下記の実施例は本発明をより易しく理解するために提供されるものであるだけで、下記実施例によって本発明の内容が限定されるものではない。

【実施例】

【0063】

実施例1．ペプチドの製造

【0064】

本実施例では、下記表1のペプチドを製造した。以後、高性能液体クロマトグラフィー(SHIMADZU Prominence HPLC)を利用して合成されたペプチドを純粋分離し、カラムはShiseido capcell pak C18 Column(4.6 x 50 mm)を利用した。また、質量分析機(HP 1100 series LC/MSD)を利用して、合成されたペプチドの質量を確認した。

【0065】

【表1】

Number	Amino acid sequence
1	REGRT (SEQ. 1)
2	REGRTREGRT(SEQ. 2)

【0066】

実施例2．ヒト繊維芽細胞のコラーゲン生成能評価

コラーゲンは肌結合組織の主成分であり、創傷などの傷治療または肌再生過程でコラーゲンの発現増加は必須であると言える。ここで、本実施例では、前記実施例1で製造したペプチド(ペプチド1)の処理によるヒト繊維芽細胞(Human dermal fibroblast、HDF)のコラーゲン生成能を従来文献(J. Biol. Chem. 1993 268(14):9941-9944)に開示された実験法を通じて評価した。まず、ヒト繊維芽細胞を10%Fetal Bovine Albumin(FBS)が添加されたDMEM培地で培養し、前記培養された細胞を6 well-plateに各  $2 \times 10^5$  cell/well濃度で分注して、これを24時間培養した後、2%FBSで

10

20

30

40

50

培地を入れ替えた。これから24時間経過後、本発明のペプチド(100、10、1ng/ml)を処理して再び24時間培養し、以後Procollagen Type I C-peptide(P I P)EIA Kitを使って培養培地で分泌されたprocollagenの量を測定し、Trizol reagentでRNA抽出した後、real-time PCRを通じてヒト繊維芽細胞のCol 1A1(collagen type I、alpha 1)mRNAの発現を確認した。一方、対照群で別途処理を加えない群(Control)、陽性対照群としてはTGF- $\beta$ で処理した群(TGF- $\beta$ )を利用した。

#### 【0067】

その結果、図1及び図2に示したように、本発明のペプチドで処理した群は、対照群及びTGF- $\beta$ で処理した群に比べてprocollagenの分泌量が増加し、Col 1A1の発現も10ng/ml以上の濃度で有意に増加することが分かった。

#### 【0068】

前記結果から本発明のペプチドはコラーゲン生成を誘導して肌再生または傷治癒の促進に寄与することが分かった。

#### 【0069】

#### 実施例3．黒色腫細胞のメラニン生成能評価

肌の色はメラニン細胞によって生成されたメラニン色素の量によって決まって、非正常な肌の色素沈着を改善するために多くの研究が進められて来た。特に、慢性創傷で発生する過度な色素沈着は重要な医学的問題として扱われているが、いまだに確かな治療方法が開発されていないのが実情である。ここで、本実施例では、前記実施例1で製造したペプチド(ペプチド1)の処理による黒色腫細胞株のメラニン生成能を従来文献(Life Sci. 2013 Aug 14; 93(5-6): 226-32)に開示された実験法を通じて評価した。黒色腫細胞株であるB16F10細胞を10% Fetal Bovine Albuminが添加されたDMEM培地で培養し、前記培養された細胞を12well-plateに各 $1 \times 10^5$  cell/well濃度で分注した。これを24時間培養した後、メラニン合成を促進させる-MSH(10uM)と本発明のペプチド(1、10、100ng/ml)で処理して再び24時間培養し、各wellをPBSで洗浄した後、200ulの1N NaOH溶液を添加して100 $^{\circ}$ Cで30分間溶解した。以後、ELISA readerで、405nmで吸光度を測定して黒色腫細胞株から生成されたメラニンの量を確認した。一方、対照群で別途処理を加えない群、陽性対照群としては-MSHのみで処理した群を利用した。

#### 【0070】

その結果、図3に示したように、-MSHのみで処理した群では黒色腫細胞株から多量のメラニンが生成された反面、本発明のペプチドで処理した群ではメラニン生成量が大きく減少し、特に、-MSHで処理しなかった群と比較しても大きな差を見せなかった。前記結果から本発明のペプチドはメラニン生成抑制による肌美白効果があることが分かった。

#### 【0071】

#### 実施例4．黒色腫細胞のチロシナーゼ活性評価

チロシナーゼ(Tyrosinase)はメラニン生合成過程で反応を触媒する速度調節酵素として、細胞内メラニンの量を調節することに決定的な役割をするものとして知られている。これに、本実施例では、前記実施例1で製造したペプチド(ペプチド1)での処理による黒色腫細胞株のチロシナーゼ活性を従来文献(J. Dermatol. Sci. Vol. 57(2010)170-177)に開示された実験法を通じて評価した。黒色腫細胞株であるB16F10細胞を12well-plateに各 $1 \times 10^5$  cell/well濃度で分注して24時間培養した後、-MSH(1M)と本発明のペプチド(1、10、100ng/ml)で処理し、再び24時間培養し、各wellをPBSで洗浄した後1% Triton X-100を含んだ50mM Phosphate buffer(pH 6.8)で懸濁した。Vortexing後、-80 $^{\circ}$ Cで30分凍結した後、室温で融解させて、1000gで10分間遠心分離後40ulの上層液と10mM L-DOPA 100ulを96well-plateに入れて37 $^{\circ}$ Cで反応させた。以後、ELISA readerで405nmで吸光度を測定して黒色腫細胞株のチロシナーゼ活性を確認した。一方、対照群で別途処理を加えない群、陽性対照群では-MSHのみを処理した群、及びKojic acidを処理した群を利用した。

## 【0072】

その結果、図4に示したように、-M S Hのみで処理した群では黒色腫細胞株のチロシナーゼ活性が大きく増加した一方、本発明のペプチドで処理した群では酵素活性が大きく減少し、チロシナーゼ活性抑制能を有したKojic acidで処理した群と比較しても大きな差を見せなかった。前記結果から本発明のペプチドはチロシナーゼ活性抑制による肌美白効果があることがわかった。

## 【0073】

実施例5．In vitro傷治療モデルを利用した傷治療効果確認

本実施例では、前記実施例1で製造したペプチド(ペプチド1及び2)での処理による傷治療効果をscratch assayを通じて確認した。Serum free培地にmitomycin C(10 ug/ml)を添加してヒト上皮細胞株であるHaCaT細胞を2時間の間培養してscratch傷を誘発させた。10% FBSが添加された培地でペプチド(1または10 ng/ml)、陽性対照群としてTGF-β1(1 ng/ml)で処理した後、時間の経過による細胞の移動能を観察し、傷大きさの減少を定量化した。

10

## 【0074】

その結果、図5及び6に示したように、本発明のペプチドで処理した群で、HaCaT細胞の移動がペプチド濃度依存的に増加することを確認することができた。また、傷大きさを定量化して評価した結果、図7及び8に示したように、ペプチド1またはペプチド2処理による有意な傷の大きさの減少を確認することができ、特に、ペプチド2の効果がより著しく、高濃度(10 ng/ml)だけでなく相対的に低濃度(1 ng/ml)の場合にも明らかな傷減少効果を観察することができた。

20

## 【0075】

実施例6．急性創傷動物モデルを利用した傷治療効果確認

本実施例では、前記実施例1で製造したペプチド(ペプチド1及び2)での処理による傷治療効果を、急性創傷動物モデルを利用してin vivoで確認した。

## 【0076】

6-1．傷の大きさの変化確認

8週齢Balb/c nudeマウスをAvertin(2.5%)を利用して麻酔した後、10 mm直径の円形punchを使って動物などの一部の肌を切開して急性創傷を誘発させた。摘出部位に24時間間隔で総5回ペプチドを処理して(500 ng/1回)、時間による傷の広さの減少を14日間測定し、陽性対照群としてEGFを利用した(10 ug/1回)。この時、ペプチドは20% pluronic F-127(PBS)と混合(mixture)した状態で処理し、デジタルカメラとImageJプログラムを利用して時間の経過による傷の大きさを測定して数値化して、これを比べた。

30

## 【0077】

その結果、図9及び10に示したように、ペプチド1またはペプチド2で処理した場合、陽性対照群と近似であるか、またはより優秀な傷の大きさの減少を確認することができた。特に、ペプチド2はペプチド1の二量体形態として2倍の分子量を有するので、ペプチド1に比べてさらに低い濃度で処理されたにもかかわらず、ペプチド1で処理した場合よりその効果が優秀であっただけでなく、陽性対照群に比べてもさらに優秀な傷の治療効果を

40

## 【0078】

6-2．組織変化確認

前記実施例6-1と等しい方法で急性創傷を誘発させ、急性創傷を誘発させてから5日目の肌組織を切開して組織切片を製作した。以後、H&E染色を実施し、これを、顕微鏡で観察することで、ペプチド処理による組織学的変化を観察した。一方、陽性対照群としてEGFを利用した。

## 【0079】

その結果、図11で示したように、ペプチド1及びペプチド2で処理された組織は、陽性対照群と同じく表皮(epidermis)、真皮(dermis)層の厚さがPBS陰性対照群に比べて厚

50

くなっていたし、上皮化 (epithelialization) も活発に進行されていたところ、傷の治療または回復と関連される組織学的所見を確認することができた。

【 0 0 8 0 】

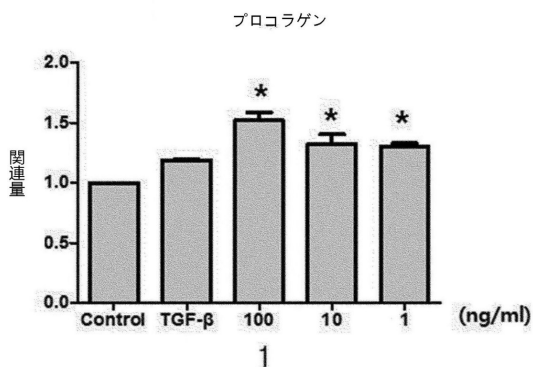
前記結果らを総合して見る時、本発明のペプチド(ペプチド 1 及びペプチド 2) は傷の回復速度を著しく促進させることができるところ、傷の治療のための有効物質に活用されることができることが分かった。

【 0 0 8 1 】

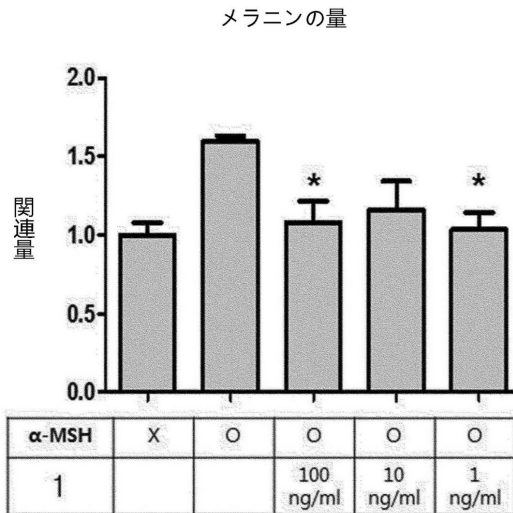
前述した本発明の説明は例示のためのものであり、本発明が属する技術分野の通常の知識を有した者は本発明の技術的思想や必須な特徴を変更しなくても他の具体的な形態で易しく変形が可能であるということを理解することができるであろう。そのため、以上で記述した実施例などはすべての面で例示的なものであり、限定的ではないものとして理解しなければならない。

10

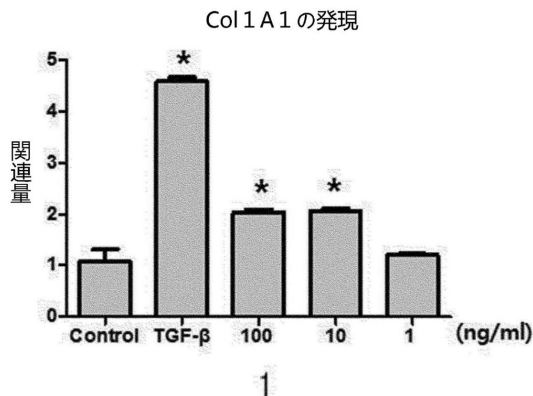
【 図 1 】



【 図 3 】

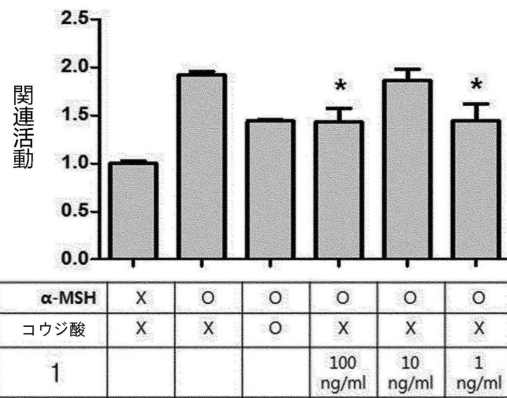


【 図 2 】

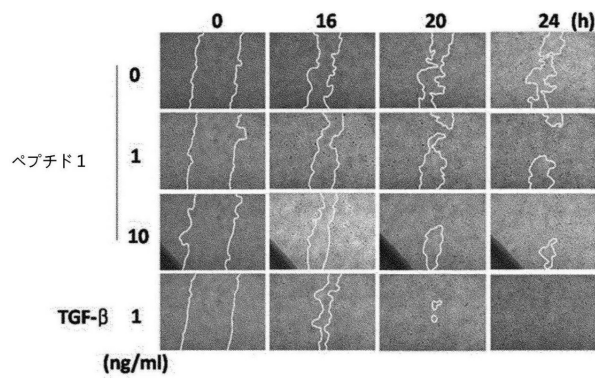


【図 4】

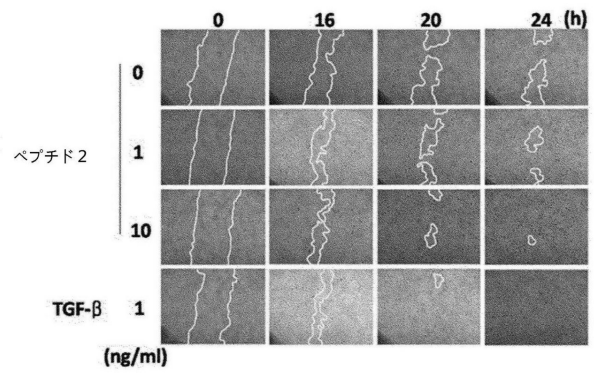
チロシナーゼ活性抑制能



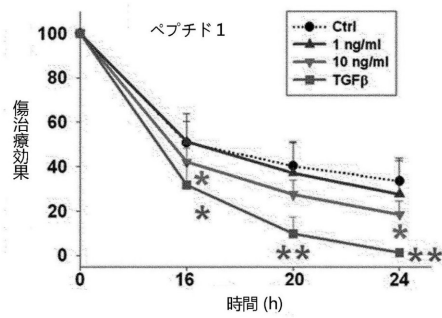
【図 5】



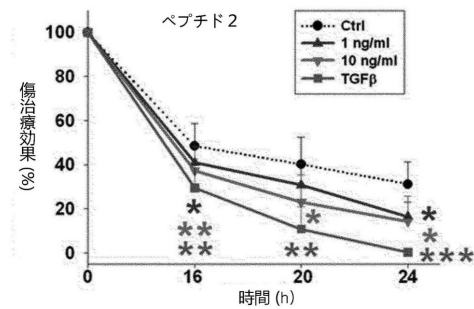
【図 6】



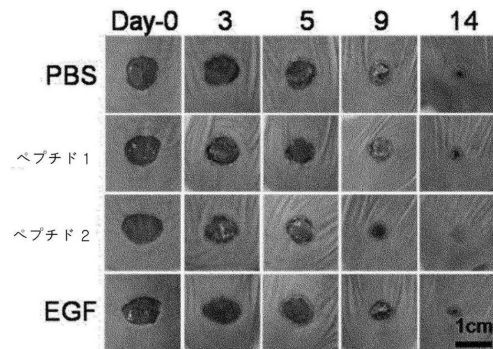
【図 7】



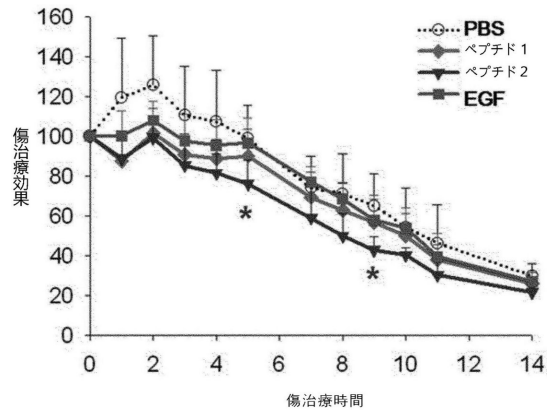
【図 8】



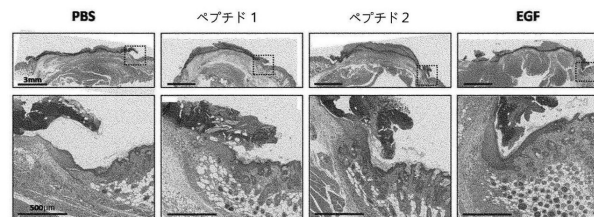
【図 9】



【図 10】



【図 11】



【配列表】

0006573295000001.app

## フロントページの続き

(51)Int.Cl.		F I	
A 6 1 K 38/08	(2019.01)	A 6 1 K 38/08	
A 6 1 K 8/64	(2006.01)	A 6 1 K 8/64	
A 6 1 K 48/00	(2006.01)	A 6 1 K 48/00	
A 6 1 P 43/00	(2006.01)	A 6 1 P 43/00	1 0 5
C 1 2 N 5/071	(2010.01)	A 6 1 P 43/00	1 1 1
		C 1 2 N 5/071	

(74)代理人 100130328

弁理士 奥野 彰彦

(74)代理人 100130672

弁理士 伊藤 寛之

(72)発明者 チョ、デホ

大韓民国、ソウル、ガンナム - グ、アプクジョン - ロ、201、81 - 1406 (アプクジョン - ドン、ヒョンダイアパート)

(72)発明者 ギル、ミンチャン

大韓民国、ソウル、グァンアク - グ、スクゴゲ - ロ、22 - ギル、20 (ボンチョン - ドン)

(72)発明者 リー、ソミ

大韓民国、ギョンギ - ド、ギムボ - シ、ギムボハンガン 11 - ロ、158、401 - 803 (ジャンギ - ドン、ジョンウォンマウルワールド4ダンジアパート)

(72)発明者 キム、ミョンス

大韓民国、ソウル、ガンドン - グ、チョンホ - デロ、1055、105 - 1003 (チョンホ - ドン、テヨンアパート)

審査官 植原 克典

(56)参考文献 特表2016 - 505626 (JP, A)

特表2009 - 523844 (JP, A)

(58)調査した分野(Int.Cl., DB名)

C 0 7 K 7 /

A 6 1 K 3 8 /

GenBank / EMBL / DDBJ / GeneSeq

JSTPlus / JMEDPlus / JST7580 (JDreamIII)

C A p l u s / R E G I S T R Y / M E D L I N E / B I O S I S ( S T N )