(12) 특허협력조약에 의하여 공개된 국제출원

(19) 세계지식재산권기구
국제사무국

(43) 국제공개일
2021 년 4 월 22 일 (22.04.2021)

WIPO | PCT

(10) 국제공개번호
WO 2021/075791 A2

(51) 국제특허분류:
C07K 7/06 (2006.01)

(21) 국제출원번호: PCT/KR2020/013726

(22) 국제출원일: 2020 년 10 월 8 일 (08.10.2020)

(25) 출원언어: 한국어

(26) 공개언어: 한국어

(30) 우선권정보:
10-2019-0129817 2019 년 10 월 18 일 (18.10.2019) KR

(71) 출원인: 주식회사 인코스팜 (**INCOSPHARM CORPORATION**) [KR/KR]; 34036 대전시 유성구 테크노2로 328, Daejeon (KR).

(72) 발명자: 정화지 (**CHUNG, Hwa-Jee**); 34074 대전시 유성구 지족로190번길 16, 204-1204, Daejeon (KR). 신가영 (**SHIN, Kayoung**); 35210 대전시 서구 청사로 5, 108-904, Daejeon (KR). 김홍재 (**KIM, Heungjae**); 34010 대전시 유성구 구즉로 16, 113-501, Daejeon (KR). 박기돈 (**PARK, Keedon**); 34889 대전시 중구 유등천동로 428, 301-1002, Daejeon (KR).

(74) 대리인: 특허법인 플러스 (**PLUS INTERNATIONAL IP LAW FIRM**); 35209 대전시 서구 한밭대로 809, 10층, Daejeon (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, DJ, DK, DM, DO, DZ, EC, EE, EG, ES, FI, GB, GD, GE, GH, GM, GT, HN, HR, HU, ID, IL, IN, IR, IS, IT, JO, JP, KE, KG, KH, KN, KP, KW, KZ, LA, LC, LK, LR, LS, 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, ST, SV, SY, TH, TJ, TM, TN, TR, TT, TZ, UA, UG, US, UZ, VC, VN, WS, ZA, ZM, ZW.

(84) 지정국 (별도의 표시가 없는 한, 가능한 모든 종류의 역내 권리의 보호를 위하여): ARIPO (BW, GH, GM, KE, LR, LS, MW, MZ, NA, RW, SD, SL, ST, 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).

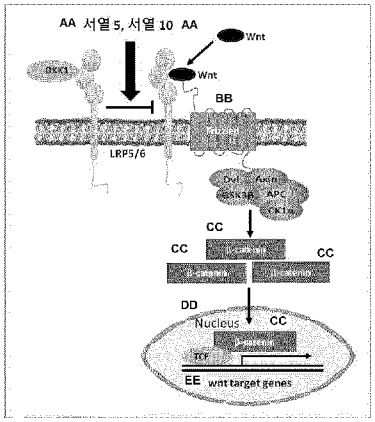
공개:

— 국제조사보고서 없이 공개하며 보고서 접수 후 이를 별도 공개함 (규칙 48.2(g))

— 명세서의 서열목록 부분과 함께 (규칙 5.2(a))

(54) **Title:** PEPTIDE FOR REDUCING HAIR LOSS AND PROMOTING HAIR GROWTH, AND COSMETIC COMPOSITION AND PHARMACEUTICAL COMPOSITION COMPRISING SAME

(54) **발명의 명칭:** 탈모 완화 및 모발 성장을 촉진시키는 펩타이드, 이를 포함하는 화장료 조성물 및 약학적 조성물



AA ... Sequence
BB ... Frizzled
CC ... β-catenin
DD ... Nucleus
EE ... wnt target genes

(57) **Abstract:** The present invention relates to a peptide for reducing hair loss or promoting hair growth, and a cosmetic composition and a pharmaceutical composition comprising same, and specifically, a cosmetic composition, and a pharmaceutical composition for treatment may be provided, which are capable of reducing hair loss and promoting hair growth by activating a Wnt/β-catenin signaling pathway, and at the same time, promoting the activity of the collagenase MMP-2 and ALP proteins and growth hormones needed for hair growth.

(57) **요약서:** 본 발명은 탈모 완화 또는 모발 성장을 촉진하는 펩타이드, 이를 포함하는 화장료 조성물 및 약학적 조성물에 관한 것으로, 구체적으로는 Wnt/β-카테닌 신호전달 경로를 활성화하고, 동시에 모발 성장에 필요한 성장 호르몬들과 콜라게나아제 MMP-2 및 ALP 단백질 활성을 촉진하여, 탈모를 완화하고 모발 성장을 촉진할 수 있는 화장료 조성물 및 치료용 약학적 조성물을 제공할 수 있다.

WO 2021/075791 A2

명세서

발명의 명칭: 탈모 완화 및 모발 성장을 촉진시키는 펩타이드, 이를 포함하는 화장료 조성물 및 약학적 조성물

기술분야

[1] 본 발명은 탈모증 예방 또는 개선 펩타이드 및 이를 포함하는 조성물에 관한 것으로, 보다 상세하게는 Wnt/β-카테닌 신호전달 경로를 활성화하여 탈모 완화 또는 모발 성장을 촉진하는 펩타이드, 이를 포함하는 화장료 조성물에 관한 것이다.

배경기술

[2] 일반적으로 사람들은 하루 평균 약 100개 정도의 모발이 빠지며 동시에 새로운 모발이 자라기 때문에 두피 모발의 수는 쉽게 줄어들지 않는다. 탈모란 모발이 있어야 할 부위에 없거나 빈약한 상태를 말하는 것으로서, 모발 생성에 필요한 영양공급과 신진대사가 원활하게 이루어지지 않아 생기는 진행성 질환으로 분류하기도 한다.

[3] 탈모를 일으키는 요인들은 아직까지 명확하지 않지만, 노화, 유전적 요인, 스트레스, 남성 호르몬의 작용, 혈액순환 장애, 피지분비의 이상, 모낭충, 영양불량, 면역계의 혼란, 피부질환 등 여러 가지 요인들에 의해 복합적으로 발생할 수 있으며, 남성들뿐만 아니라 여성의 탈모도 증가하고 있는 추세로, 탈모로 인한 외형적 변화는 많은 스트레스와 심리적 불안, 외형적 컴플렉스를 유발하여 현대인에게 있어서 탈모는 심리적으로도 심각한 문제를 야기한다.

[4] 탈모를 치료하기 위한 방법으로 약물치료, 모낭이식수술, 민간요법, 한방치료, 탈모 기능성 샴푸 등 다양한 방법 등이 있다. 최초의 탈모 치료제인 로게인(Rogain)은 미 식약청 (FDA) 허가를 받은 안전한 제품이고 두피 혈액순환을 촉진시키지만 근본적인 치료효과는 없고, 판토가(pantogar)는 맥주 효모에 포함된 다양한 아미노산과 미네랄이 모발에 영양을 공급하나 큰 치료 효과는 없으며, 동의보감의 감초 약재 성분을 포함하며 아리메진산 비타민이 주성분인 드로젠(Drogen)은 발모에 대한 근거가 부족한 한방성분 발모 치료제로서, 상기의 탈모 치료제들은 부작용을 수반하거나 근본적인 탈모 치료 방법이 아니다.

[5] 현재 탈모 치료에 가장 많이 사용되고 있는 약물로는 미국 FDA에서 승인을 받은 2,4-디아미노-6-피페리디노피리미딘-3-옥사이드(일명 '미녹시딜 (Minoxidil, MINX)' 제제)와 II형 5α환원효소의 특정 억제제인 피나스테라이드 (finasteride)가 주성분인 프로페시아(Propecia, Merck & Co., Inc.의 상표명)를 들 수 있다. 미녹시딜 제제는 혈관 확장 효과를 통하여 혈류량을 증가시키고 모근에 영양분을 공급함으로써 모발 성장을 유도하는 약물로서, 특히 가마 부위의 탈모 증상 완화에 대해서 효과가 좋은 것으로 알려져 있으나, 규칙적으로 장기간에

걸쳐 사용하여야 하고, 가마 부위 이외 부위의 탈모에 대해서는 그다지 좋은 효과를 발휘하지 못한다는 단점이 있다. 경구투여용인 프로페시아 역시 지속적이고 규칙적인 복용을 필요로 하며, 여성이 장기복용하는 경우 기형아 출산 확률이 높고, 일부 환자들에 대해서는 성욕 감퇴, 발기 부전 등의 부작용을 나타낸다는 문제점이 보도된 바 있다. 따라서 미녹시딜 제제 또는 피나스테라이드 제제가 가지는 부작용을 극복할 수 있으면서 탈모 방지 및 발모 촉진 효과가 우수한 화합물의 개발이 요구되어 왔다.

[6] 한편, 모낭세포의 순환 생리는 머리카락이 성장하는 성장단계(Anagen), 퇴화단계(Catagen), 휴지기 또는 정체기 단계(Telogen)의 3가지 단계가 순차적으로 거듭되어 이루어지고, 이에 따라 머리카락이 자라고 탈락하는 과정이 반복된다. 휴지기 또는 정체기 단계에 머무르는 모낭세포가 많아지게 되면 머리카락이 탈락하는 alopecia(대머리) 상태가 되는데, 근본적인 탈모를 치료하기 위해서는 성장단계의 모낭세포를 증가시키고 퇴화단계 및 휴지기 단계의 세포를 감소시키는 방향으로의 접근이 필요하다.

[7] 본 발명은 상기와 같은 문제점을 해결하기 위한 것으로서, Wnt/β-catenin 신호전달계와 모발의 성장 및 모낭 줄기세포와의 연관성에 착안하여, 펩타이드 단편을 합성하였고, 탈모 완화 및 모발 성장을 촉진하는 효과가 있음을 확인하고, 본 발명을 완성하였다.

[8] 선행기술문헌

[9] Kwack et al. Journal of Investigative Dermatology, 2012, 132, 6, 1554-1560

[10] Jeong et al. Annals of Dermatology, 2017, 29, 1, 102-105

발명의 상세한 설명

기술적 과제

[11] 본 발명은 Wnt/β-카테닌 신호전달계에 관여하는 펩타이드 단편을 탈모증 예방, 개선 또는 치료용으로 제공하는 것을 목적으로 한다.

[12] 또한, 본 발명은 특정 부위에 국한되지 않고, 두피 전반에 걸친 탈모 증상에 효과가 있는, 탈모증 개선을 위한 화장료 조성물 및 탈모증 예방 또는 치료용 약학적 조성물을 제공하는 것을 목적으로 한다.

[13] 또한, 본 발명은 모낭 세포에 필요한 단백질의 발현을 조절하여, 모발 성장을 촉진시키는 펩타이드를 제공하는 것을 목적으로 한다.

[14] 본 발명의 다른 목적은 모발 성장을 촉진시키는 펩타이드를 유효성분으로 포함하는 화장료 조성물 및 약학적 조성물을 제공하는 것이다.

과제 해결 수단

[15] 상기 목적을 달성하기 위하여 본 발명은 서열번호 5 또는 서열번호 10의 아미노산 서열을 포함하는 탈모증 예방, 개선 또는 치료용 펩타이드를 제공한다.

[16] 서열번호 5: SCRIQ, 서열번호 10: RIP

[17] 본 발명의 일 예에 있어서, 상기 펩타이드는 Wnt/β-카테닌 신호전달 경로를

활성화하는 것일 수 있다.

[18] 본 발명의 일 예에 있어서, 상기 탈모증은 원형 탈모증, 유전성 안드로젠 탈모증, 휴지기 탈모증, 외상성 탈모증, 생장기 탈모증, 비강성 탈모증, 지루 탈모증 및 선천성 탈모증으로 이루어진 그룹에서 선택된 어느 하나 이상일 수 있다.

[19] 본 발명은 서열번호 5 또는 서열번호 10의 아미노산 서열을 포함하는 펩타이드를 유효성분으로 포함하는 탈모증 개선용 화장료 조성물을 제공한다.

[20] 본 발명의 일 예에 있어서, 상기 유효성분은 화장료 조성물 전체 중량을 기준으로 0.0001 내지 10 중량%로 포함되는 것일 수 있다.

[21] 본 발명은 서열번호 5 또는 서열번호 10의 아미노산 서열을 포함하는 펩타이드 또는 약학적으로 허용가능한 그의 염을 유효성분으로 포함하는 탈모증 예방 또는 치료용 약학적 조성물을 제공한다.

[22] 본 발명의 일 예에 있어서, 상기 유효성분은 약학적 조성물 전체 중량을 기준으로 0.0001 내지 10 중량%로 포함되는 것일 수 있다.

[23] 본 발명의 일 예에 있어서, 상기 서열번호 5를 포함하는 펩타이드의 아미노산 서열의 수는 5 내지 15이며, 상기 서열번호 10를 포함하는 펩타이드의 아미노산 서열의 수는 3 내지 13일 수 있다.

[24] 본 발명은 상기 서열번호 5 및 서열번호 10를 포함하는, 아미노산 서열의 수가 8 내지 50인 탈모증 예방, 개선 또는 치료용 폴리펩타이드를 제공한다.

[25] 또한, 본 발명은 서열번호 5 또는 서열번호 10의 아미노산 서열을 포함하는, 3 내지 12개의 아미노산 서열로 이루어진 모발 성장 촉진용 펩타이드, 이를 유효성분으로 포함하는 모발 성장 촉진용 화장료 조성물을 제공한다.

[26] 또한, 본 발명은 상기 펩타이드 또는 약학적으로 허용가능한 그의 염을 유효성분으로 포함하는 모발 성장 촉진용 약학적 조성물을 제공한다.

발명의 효과

[27] 본 발명에 따른 펩타이드는 Wnt/β-카테닌 신호전달 경로의 저해물질인 DKK-1가 LRP5/6 수용체에 결합하는 것을 선택적으로 방해하고, 이에 따라 Wnt/β-카테닌 신호전달계를 활성화시킴으로써, 조직 형성에 관여하는 성장 호르몬에 긍정적으로 작용하여 새로운 혈관 형성에 도움을 줄 뿐만 아니라 세포 재생력 향상, 케라틴 세포 증식 촉진 및 모낭 성장을 바람직한 양태로 조절함으로써, 모발의 성장기를 유지시켜 탈모를 예방하고 모발 생성을 촉진하는 효과를 제공할 수 있다.

[28] 또한 상기 펩타이드를 유효성분으로 포함하는 화장료 조성물 및 약학적 조성물을 이용하여 부작용이 적은 탈모증 예방, 개선 또는 치료를 위한 제품 생산에 유용하게 사용될 수 있다.

도면의 간단한 설명

[29] 도 1a는 본 발명의 실시예 1에 따라, 서열번호 5의 펩타이드 처리에 의한 모유두

세포에서의 β-카테닌 및 비활성/활성 인산화 GSK3β 단백질 발현 변화를 비교 분석한 웨스턴 블롯 결과이며, 도 1b는 이의 결과 그래프를 나타낸 것이다.

[30] 도 2a는 본 발명의 실시예 1에 따라, 서열번호 10의 펩타이드 처리에 의한 모유두 세포에서의 β-카테닌 및 비활성/활성 인산화 GSK3β단백질 발현 변화를 비교 분석한 웨스턴 블롯 결과이며, 도 2b는 이의 결과 그래프를 나타낸 것이다.

[31] 도 3a는 본 발명의 실시예 2에 따라, 서열번호 5의 펩타이드를 다양한 농도로 처리하여 β-카테닌 및 비활성 인산화 GSK3β 단백질 발현 활성이 가장 높은 농도를 스크리닝한 결과이다.

[32] 도 3b는 본 발명의 실시예 2에 따라, 서열번호 10의 펩타이드를 다양한 농도로 처리하여 β-카테닌 및 비활성 인산화 GSK3β단백질 발현 활성이 가장 높은 농도를 스크리닝한 결과이다.

[33] 도 4a는 본 발명의 실시예 3에 따른 서열번호 5 및 서열번호 10의 DKK-1의 활성의 억제 여부를 확인한 결과이다.

[34] 도 4b는 본 발명의 실시예 3에 따라 서열번호 5 및 서열번호 10의 DKK-1의 활성의 억제 정도를 β-카테닌의 발현 변화율 그래프 결과를 나타낸 것이다.

[35] 도 5 및 도 6은 본 발명의 실시예 4 내지 6에 따른 펩타이드 서열번호 5 및 서열번호 10 처리에 의하여 모발 주기의 성장기 유지 및 퇴행기 진행 억제에 영향을 주는 성장호르몬 단백질 및 유전자 발현 변화를 분석한 결과이다.

[36] 도 7a는 본 발명의 실시예 7에 따른 펩타이드 서열번호 5를 인체 모낭조직에 처리하여 모간 (hair shaft)의 길이 성장을 분석한 결과이다.

[37] 도 7b는 본 발명의 실시예 7에 따른 펩타이드 서열번호 10을 인체 모낭조직에 처리하여 모간 (hair shaft)의 길이 성장을 분석한 결과이다.

[38] 도 8은 본 발명에 따른 서열번호 5 및 서열번호 10의 펩타이드 처리에 의한 Wnt/β-카테닌 신호 전달 작용기작 모식도를 나타낸 것이다.

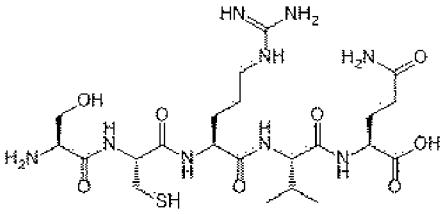
발명의 실시를 위한 최선의 형태

[39] 이하에서 본 발명에 대하여 구체적으로 설명한다. 본 명세서에서 사용되는 용어는 따로 정의하지 않는 경우 해당 분야에서 통상의 지식을 가진 자가 일반적으로 이해하는 내용으로 해석되어야 할 것이다. 본 명세서의 도면 및 실시예는 통상의 지식을 가진 자가 본 발명을 쉽게 이해하고 실시하기 위한 것으로 도면 및 실시예에서 발명의 요지를 흐릴 수 있는 내용은 생략될 수 있으며, 본 발명이 도면 및 실시예로 한정되는 것은 아니다.

[40] 본 발명은 서열번호 5 또는 서열번호 10의 아미노산 서열을 포함하는 탈모증 예방, 개선 또는 치료용 펩타이드를 제공한다.

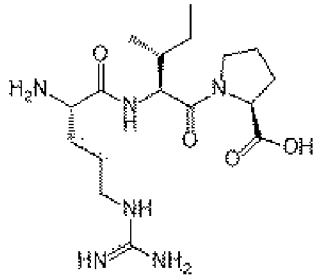
[41] [서열번호 5]: SCRIQ

[42]



[43] [서열번호 10]: RIP

[44]



[45] 상기 펩타이드는 Wnt/β-카테닌(β-catenin) 신호전달 경로를 활성화하는 것일 수 있다.

[46] Wnt는 세포로부터 분비되는 시스테인(cystein)이 많은 당 단백질로서, 주변세포의 수용체에 결합하여 활성화된 수용체를 통해 여러 가지 단계를 거쳐 많은 유전자의 발현을 조절함으로써, 다양한 생명 현상을 조절하는 것으로 알려져 있다.

[47] 그 중에서도 Wnt/β-카테닌 신호전달 경로는 모발 성장과 모낭 줄기세포 활성화에 중요한 역할을 한다. Wnt 리간드(ligand)가 존재하지 않을 경우 β-카테닌은 GSK3β(glycogen synthase kinase-3β)에 의해 인산화되고, 세포 내의 β-카테닌 분해 복합체가 형성되어, 프로테아좀에 의해 β-카테닌이 분해된다. 하지만 Wnt 리간드가 수용체인 LRP5 혹은 LRP6에 결합하면 GSK3β의 활성이 억제됨으로써 β-카테닌의 인산화 및 분해가 억제된다. 따라서 세포질에 축적된 β-카테닌은 핵으로 이동하여 하위 표적 유전자의 발현을 촉진시키며, 이렇게 발현된 단백질들은 모발의 성장과 분화에 영향을 미치게 된다.

[48] 본 발명에 따른 서열번호 5 또는 서열번호 10로 표시되는 아미노산 서열을 포함하는 펩타이드는 상기 Wnt 리간드가 수용체인 LRP5 혹은 LRP6에 결합할 수 있도록 함으로써 Wnt/β-카테닌 신호전달 경로를 활성화하고, 결과적으로 모낭세포의 생리 활성을 높여, 재생을 촉진하는 효과로 연결될 수 있다.

[49] 보다 구체적으로, 본 발명에 따른 펩타이드는 LRP5/6에 대하여 DKK-1(Dickkopf-1)과 경쟁적 결합을 할 수 있다. DKK-1은 Wnt/β-카테닌 신호전달 경로의 강력한 길항제로서 디하이드로테스토스테론 (dihydrotestosterone, DHT)에 의해 유도된다. DHT는 직접적 탈모를 일으키는 호르몬으로 알려져 있는데, 모낭 세포의 특정 부분과 결합하여, 모발주기의 퇴행기로의 변화와 세포 사멸을 촉진한다.

[50] DKK-1은 Wnt 리간드의 수용체인 LRP5/6에 매우 고친화적인 리간드이며, DKK-1이 LRP5/6에 선택적으로 결합하게 되면 Wnt 리간드에 의해 유도되는 Frizzled-LRP5/6 complex 형성이 억제되어, 하위 시그널인 β-카테닌이 인산화되어 불활성화되고 궁극적으로 모발 성장이 저해되는 결과를 가져올 수 있다.

[51] 본 발명에 따른 펩타이드는 상기 DKK-1과 경쟁적으로 LRP5/6에 결합함으로써, DKK-1의 결합에 의한 Wnt/β-카테닌 신호 전달 경로의 방해를 저해할 수 있고, 오히려 Wnt/β-카테닌 신호 전달 경로의 활성화를 통하여 모발 성장과 연관된 단백질의 발현을 유도할 수 있다.

[52] 본 발명은 상기 펩타이드를 유효성분으로 포함하는 탈모증 개선용 화장료 조성물을 제공한다.

[53] 상기 유효성분은 조성물 전체 중량을 기준으로 0.0001 내지 10 중량%로 포함될 수 있다. 바람직하게는 0.001 내지 8 중량%, 보다 바람직하게는 0.01 내지 3 중량%로 포함되는 것일 수 있다. 상기 함량 범위 내에서 펩타이드가 성장인자를 활성화시키고, 두피 내 혈행 개선을 통한 모발 성장 및 모낭을 활성화시켜 모발을 강화시킬 뿐만 아니라, 두피 환경 개선에 효과적이며 탈모증 개선의 뚜렷한 효과를 볼 수 있다.

[54] 상기 유효성분은 본 발명에 따른 서열번호 5 또는 서열번호 10로 표시되는 아미노산 서열을 포함하는 펩타이드가 0.1 내지 100 μM로 포함되는 것이 좋으며, 바람직하게는 서열번호 5의 경우 1 내지 80 μM, 보다 바람직하게는 5 내지 60 μM로 포함되고, 서열번호 10의 경우 0.5 내지 50 μM, 보다 바람직하게는 10 내지 50 μM로 포함되는 것이 세포에 독성을 나타내지 않으면서, 탈모증 개선 및 모발 성장 촉진에 있어 보다 우수한 효과를 나타낼 수 있다.

[55] 상기 탈모증은 원형 탈모증, 유전성 안드로젠 탈모증, 휴지기 탈모증, 외상성 탈모증, 생장기 탈모증, 비강성 탈모증, 지루 탈모증 및 선천성 탈모증으로 이루어진 그룹에서 선택된 어느 하나 이상일 수 있다.

[56] 구체적으로 상기 펩타이드는 염 형태로 존재하는 것을 사용할 수 있는데, 이는 아미노기를 적절한 산과 반응시키는 것에 의하여 만들어지는 것으로서, 예를 들면 유기산 부가염으로서 아세테이트, 아디페이트, 알기네이트, 시트레이트, 아스파테이트, 벤조에이트, 벤젠설포네이트, 바이설페이트, 부티레이트, 캄포레이트, 캄포설포네이트, 디글루코네이트, 글리세로포스페이트, 헤미설페이트, 헵타노에이트, 헥사노에이트, 포르메이트, 푸마레이트, 하이드로클로라이드, 하이드로브로마이드, 하이드로요오다이드, 2-하이드록시에탄설포네이트, 락테이트, 말레에이트, 메시틸렌설포네이트, 메탄설포네이트, 나프틸렌설포네이트, 니코티네이트, 2-나프탈렌설포네이트, 옥살레이트, 말리에이트, 파모에이트, 펙티네이트, 퍼설페이트, 3-페닐프로피오네이트, 피크레이트, 피발레이트, 프로피오네이트, 숙시네이트, 타르트레이트, 트리클로로아세테이트, 트리플루오로아세테이트, 포스페이트,

글루타메이트, 바이카보네이트, 파라-톨루엔설포네이트 및 운데카노 에이트일 수 있으나, 이에 한정되는 것은 아니다.

[57] 또한, 무기산 부가염을 형성하기 위해 사용될 수 있는 산의 예로는 염산, 브롬화수소산, 황산 또는 인산일 수 있으나 이에 한정되는 것은 아니다.

[58] 상기 화장료 조성물은 두피 세포의 항상성을 유지하기 위하여 완충액을 더 포함하는 것일 수 있다. 완충액은 단당류, 다가알코올 및 전해질 화합물을 포함하는 복합 완충액일 수 있다.

[59] 상기 단당류는 두피 세포 내 영양공급원으로 이용될 수 있는 것이면 제한없이 사용 가능하다. 구체적으로 6개의 탄소원자를 가진 단당류로서, D-글루코스(D-glucose), D-글로오스(D-gulose) D-만노오스(D-mannose), D-갈락토오스(D-galalctose), D-이도오스(D-idose), D-탈로오스(D-talose), D-알로오스 (D-allose), D-알트로오스(D-altrose), D-프룩토오스(D-fructose), D-타가토오스(D-tagatose) 및 L-소르보오스 (L-sorbose)로 이루어진 군에서 어느 하나 또는 둘 이상 선택하여 사용할 수 있다.

[60] 상기 단당류는 완충액 기준으로 5 내지 30 중량%로 포함될 수 있고, 바람직하게는 7 내지 28 중량%, 더욱 바람직하게는 10 내지 25 중량%로 포함될 수 있다. 상술한 함량 범위로 포함되는 경우 적절한 점도 형성으로 사용감이 우수하다.

[61] 상기 전해질 화합물은 일반적으로 화장료 조성물에 사용되어 두피 내 깊숙이 무기질을 공급할 수 있고, 피부에 닿았을 때 알레르기 반응 및 자극감이 없는 것이면 특별히 한정되지 않고 사용 가능하다. 바람직하게는 염화나트륨, 염화칼륨, 염화칼슘 및 황산나트륨으로 이루어진 군에서 선택된 어느 하나 이상을 포함할 수 있다.

[62] 또한 전해질 화합물은 전체 화장료 조성물 기준으로 0.001 내지 2 중량%, 바람직하게는 0.005 내지 1 중량%, 더욱 바람직하게는 0.01 내지 0.1 중량%로 포함될 수 있다. 상기 함량 범위에서 전해질 화합물이 포함되는 경우 세포 내외의 산염기의 균형을 유지하고, 모낭세포와의 삼투압을 적절하게 유지함으로써 건강한 두피 환경을 조성할 수 있다.

[63] 본 발명의 화장료 조성물은 당업계에서 통상적으로 제조되는 어떠한 제형으로도 제조될 수 있으며, 예를 들어, 용액, 현탁액, 유탁액, 페이스트, 겔, 크림, 로션, 파우더, 비누, 클렌징 폼, 오일, 분말 파운데이션, 유탁액 파운데이션, 왁스 파운데이션, 팩, 마사지크림, 샴푸, 린스, 트리트먼트 및 스프레이로 이루어진 군에서 어느 하나 이상 선택된 제형을 가질 수 있으나, 이에 제한되는 것은 아니다.

[64] 본 발명의 두피의 건강 개선을 위한 화장료 조성물의 제형이 페이스트, 크림 또는 겔인 경우에는 동물성유, 식물성유, 왁스, 파라핀, 전분, 트라칸트, 셀룰로오스 유도체, 폴리에틸렌 글리콜, 실리콘, 벤토나이트, 실리카, 탈크 또는 산화아연을 더 포함할 수 있고, 제형이 파우더 또는 스프레이인 경우에는

락토스, 탈크, 실리카, 알루미늄 히드록시드, 칼슘 실리케이트 또는 폴리아미드 파우더가 더 포함될 수 있고, 특히 스프레이인 경우에는 추가적으로 클로로플루오로히드로카본, 프로판/부탄 또는 디메틸 에테르와 같은 추진체를 더 포함할 수 있다.

[65] 본 발명의 화장료 조성물의 제형이 용액 또는 유탁액인 경우에는 용매, 용해화제 또는 유탁화제가 더 포함되고, 이는 물, 에탄올, 이소프로판올, 에틸 카보네이트, 에틸 아세테이트, 벤질 알코올, 벤질 벤조에이트, 프로필렌 글리콜, 1,3-부틸글리콜 오일, 글리세롤 지방족 에스테르, 폴리에틸렌 글리콜 및 소르비탄의 지방산 에스테르로 이루어진 군에서 선택된 어느 하나 이상일 수 있다.

[66] 본 발명의 화장료 조성물의 제형이 현탁액인 경우에는 물, 에탄올 또는 프로필렌 글리콜과 같은 액상의 희석제, 에톡실화 이소스테아릴 알코올, 폴리옥시에틸렌 소르비톨 에스테르 및 폴리옥시에틸렌 소르비탄 에스테르와 같은 현탁제, 미소결정성 셀룰로오스, 알루미늄 메타히드록시드, 벤토나이트, 아가 또는 트라칸트 등이 더 포함될 수 있다.

[67] 또한, 상기 화장료 조성물에는 탈모를 예방할 수 있는 표피성장인자(Eepidermal growth factor, EGF), 형질전환생장인자-a(Transforming growth factor-a, TGFa), 형질전환생장인자-b(Transforming growth factor-b, TGF-b), 섬유아세포성장인자-2(Basic fibroblast growth factor, bFGF), 세포성장인자(Keratinocyte Growth Factor, KGF), 줄기세포성장인자(Stem Cell Factor, SCF), 혈소판유래성장인자(Platelet derived growth factor, PDGF), 혈관내피성장인자(Vascular endothelial Growth Factor, VEGF) 및 염기성 섬유모세포성장인자(basic Fibroblast Growth Factor, bFGF)로 이루어진 군에서 어느 하나 이상 필요에 따라 적절하게 선택하여 더 포함할 수 있고, 본 발명에 따른 펩타이드는 이러한 성장인자들을 활성화시킴으로써 모발 성장 및 발모 촉진을 위한 두피 환경 조성 및 유지 효과를 제공할 수 있다.

[68] 본 발명에 따른 화장료 조성물은 일반적으로 화장료 조성물이 적용될 수 있는 부위로서, 두피뿐만이 아니라 발모를 필요로 하는 신체 부위라면 어디나 적용될 수 있다. 예를 들면 외상으로 인한 흉터로 모발 또는 털이 손상된 부위 또는 단순 미용효과를 목적으로 하는 넓은 이마, M형 이마, 속눈썹, 눈썹 또는 무모증의 상태 호전에도 사용할 수 있다.

[69] 본 발명은 상기 펩타이드 또는 약학적으로 허용가능한 그의 염을 유효성분으로 포함하는 탈모증 예방 또는 치료용 약학적 조성물일 수 있다.

[70] 상기 유효성분은 전술한 바와 같이 조성물 전체 중량을 기준으로 0.0001 내지 10 중량%로 포함되는 것일 수 있다. 상기 함량 범위는 펩타이드가 성장인자를 활성화시켜 두피 내 혈행 개선을 통한 모발 성장 및 모낭을 활성화시켜 모발을 강화시킬 뿐만 아니라, 두피 건강 개선에 효과적이고 탈모증 예방 또는 치료의 뚜렷한 효과를 볼 수 있다.

[71] 또한, 본 발명의 서열번호 5를 포함하는 펩타이드의 아미노산 서열의 수는 5 내지 15이며, 상기 서열번호 10를 포함하는 펩타이드의 아미노산 서열의 수는 3 내지 13일 수 있다. 구체적으로 예를 들면, 서열번호 5를 포함하는 펩타이드 경우 SCRIQ, EGLSCRIQ, EGLSCRIQK, EGLSCRIQKD, EGLSCRIQKDH, GLSCRIQKD, GEGLSCRIQKDHH 일 수 있으나, 특별히 이에 한정되는 것은 아니다. 서열번호 10을 포함하는 펩타이드의 경우 예를 들면, 전술한 펩타이드의 Q(glutamine: 글루타민)를 P(proline: 프롤린)으로 변경한 것으로서, RIP, SCRIP, EGLSCRIP, EGLSCRIPK, EGLSCRIPKD, EGLSCRIPKDH, GLSCRIPKD, GEGLSCRIPKDHH 일 수 있으나, 특별히 이에 한정되는 것은 아니다.

[72] 본 발명은 상기 서열번호 5 및 서열번호 10를 모두 포함하는 탈모증 예방, 개선 또는 치료용 펩타이드 조성물을 제공한다. 상기 서열번호 5 및 서열번호 10을 모두 포함하는 펩타이드 조성물의 경우 LRP5/6에 대하여 DKK-1과의 경쟁적 결합에서 결합 친화도가 더 크고, 더 유리하게 작용할 수 있으며, Wnt 리간드가 수용체에 결합하는 것을 저해하지 않고도 DKK-1의 결합을 저해하는 효과를 발휘할 수 있다.

[73] 아울러, 본 발명은 서열번호 5 및/또는 서열번호 10의 아미노산 서열을 포함하는 펩타이드 조성물을 투여하는 단계;를 포함하는 탈모증을 예방 또는 치료하는 방법을 제공한다.

[74] 또한, 본 발명은 서열번호 5 또는 서열번호 10의 아미노산 서열을 포함하는, 모발 성장 촉진용 펩타이드, 상기 펩타이드를 유효성분으로 포함하는 모발 성장 촉진용 화장료 조성물 및 상기 펩타이드 또는 약학적으로 허용가능한 그의 염을 포함하는 약학적 조성물을 제공한다.

[75] 상기 약학적 조성물은 경구, 비경구, 동맥내, 피내, 경피, 근육내, 복강내, 정맥내, 피하 또는 비내 투여되는 것일 수 있으나, 바람직하게 비경구, 경피 또는 피하 투여되는 것일 수 있다.

[76] 본 발명의 조성물은 약학적 조성물의 제조에 통상적으로 사용하는 적절한 담체, 부형제 및 희석제를 더 포함할 수 있다.

[77] 본 발명의 펩타이드 유효성분을 포함하는 조성물에 포함될 수 있는 담체, 부형제 및 희석제로는 락토즈, 덱스트로즈, 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 및 광물유를 들 수 있다. 제제화할 경우에는 보통 사용하는 충진제, 증량제, 결합제, 습윤제, 붕해제, 계면활성제 등의 희석제 또는 부형제를 사용하여 조제된다. 경구투여를 위한 고형제제에는 정제, 환제, 산제, 과립제, 캡슐제 등이 포함되며, 이러한 고형제제는 상기 추출물에 적어도 하나 이상의 부형제 예를 들면, 전분, 칼슘카보네이트(calcium carbonate), 수크로스(sucrose) 또는 락토오스(lactose), 젤라틴 등을 섞어 조제된다. 또한

단순한 부형제 이외에 마그네슘 스테아레이트, 탈크 같은 윤활제들이 사용될 수 있다. 경구를 위한 액상 제제로는 현탁제, 내용액제, 유제, 시럽제 등이 해당되는데 흔히 사용되는 단순 희석제인 물, 리퀴드 파라핀 이외에 여러 가지 부형제, 예를 들면 습윤제, 감미제, 방향제, 보존제 등이 포함될 수 있다.

[78] 본 발명의 약학적 조성물이 비경구 투여용인 경우 임상 투여 시에 크림, 젤, 패치, 분무제, 연고제, 경고제, 로션제, 리니멘트제, 파스타제 및 카타플라스마제로 이루어진 군에서 선택된 어느 하나 이상의 제형일 수 있으나, 이에 한정되는 것은 아니다.

[79] 비경구 투여용 제형으로 제제화하기 위하여 안정제 또는 완충제와 함께 물에 혼합하여 용액 또는 현탁액으로 제조되고, 이는 앰플 또는 바이알 단위 투여형으로 제조될 수 있다. 상기 약학적 조성물은 멸균되거나 방부제, 안정화제, 수화제 또는 유화 촉진제, 삼투압 조절을 위한 염 및/또는 완충제 등의 보조제 및 기타 치료적으로 유용한 물질을 함유할 수 있으며, 통상적인 방법인 혼합, 과립화 또는 코팅 방법에 따라 제제화할 수 있다.

[80] 이하 하기의 실시 예를 통하여 본 발명에 대해 설명하고자 한다. 다만, 하기의 실시 예는 본 발명을 구체적으로 설명하기 위한 것으로, 본 발명의 범위를 하기의 실시 예로 한정하는 것은 아니며, 통상의 기술자라면 본 발명의 권리범위 내에서 본 명세서에 기재된 내용의 여러 가지 변형된 형태를 실시할 수 있다.

발명의 실시를 위한 형태

[81] **[제조예] 서열번호 5 및 서열번호 10의 펩타이드의 합성**

[82] 본 발명에 사용되는 펩타이드들의 합성은 Fmoc(9-fluorenylmethoxycarbonyl)을 Nα아미노산의 보호기로 사용하는 고상법에 의해 합성하였으며(Fmoc Solid Phase Peptide Synthesis), HOBt-DIC (N-hydroxybenzotriazole-diisopropylcarbodiimide) 방법에 따라 펩타이드를 연장하였다 (Wang C. Chan, Perter D. white, "Fmoc solid phase peptide synthesis" Oxford). 상기 방법으로 서열번호 5(세린-시스테인-아르기닌-아이소류신-글루타민, SCRIQ), 서열번호 10(아르기닌-아이소류신-프롤린, RIP)의 펩타이드를 합성하였으며, 정제고성능액체크로마토그래피(Prep-HPLC, column C18, 10 ㎛, 250 mm×22mm)를 이용하여 정제 후, 동결건조하여 서열번호 5(LC mass로 측정된 분자량: 605.71)을 69% 수율로 83 mg, 서열번호 6(LC mass로 측정된 분자량: 600.69)을 72% 수율로 86 mg, 서열번호 10(LC mass로 측정된 분자량: 384.47)를 91% 수율로 70 mg 수득하였다.

[83] **[실시예 1]. 펩타이드의 Wnt/β-카테닌 신호전달 경로의 활성화 효과 확인**

[84] 하기 표 1에 나타난 서열번호 5 및 서열번호 10의 펩타이드 처리에 의한 세포 내 Wnt/β-카테닌 신호전달 경로 활성화를 분석하기 위해 β-카테닌, GSK3β 및 p-GSK3β 단백질 발현에 대한 웨스턴 블롯을 수행하였다.

[85] 인간 모유두 세포(human follicular dermal papilla cell: HFDPC)는 배양용 6웰 플레이트(well plate)에 1×10^5 또는 5×10^4 개의 세포 수로 일정하게 분주하여 DMEM(Dulbecco's Modified Eagle Media, Gibco BRL)에서 24시간 동안 37℃ 5% CO_2 조건으로 인큐베이터에서 배양하였다. 이후, 서열번호 5 및 서열번호 10의 펩타이드들을 10mM의 농도로 물로 녹여 농축액으로 하고, 이를 배지로 희석하여 200uM, 100uM, 20 uM의 농도로 각각 희석한 후 각 웰에 1 ㎖의 배지가 우선 들어있는 상태에 각 희석액을 1 ㎖씩 넣어 처리한 후 일정 시간 동안 배양하고, 배양 종료 후 배지를 제거한 후 SDS sample buffer로 세포를 파쇄 후 SDS-PAGE gel 전기영동으로 각 단백질을 분리하고, PVDF membrane(polyvinylidene Fluoride)에 이동시킨 후 블로킹 버퍼를 이용해 비특이적 결합을 없애고, Active β-카테닌, GSK3β 및 p-GSK3β(Inactive)단백질에 대한 항체 및 이에 대한 HRP 결합된 이차항체(anti-rabbit IgG HRP(sigma))를 반응시킨 후 ECL prime kit(Amersham pharmacia)를 이용한 Enhanced chemiluminescence(ECL) 반응을 시켜, ChemiDoc 분석을 수행하여, 그 결과를 도 1a, 도 1b, 도 2a 및 도 2b에 나타내었다.

[86] 도 1a 내지 도 2b를 통해 서열번호 5 및 서열번호 10으로 표시되는 각 펩타이드를 처리한 경우, β-카테닌과 p-GSK3β 단백질 발현이 유의미하게 증가된 것을 확인할 수 있다. 그 발현 증가 수준은 펩타이드를 처리하지 않은 대조구에 비해 월등히 증가함을 알 수 있다.

[87] [표1]

서열번호 5 및 10

Name	서열	Name	서열
서열번호 5	SCRIQ	서열번호 10	RIP

[88] **[실시예 2]. Wnt/β-카테닌 신호전달 경로 활성화 최적 농도 탐색**

[89] 본 발명에 따른 서열번호 5 및 서열번호 10 펩타이드를 농도별로 처리하여 Wnt/β-카테닌 신호전달 경로를 활성화 시키는 최적의 농도를 탐색하였다. 구체적인 실험 방법은 서열번호 5의 경우, 농도를 0.1, 0.5, 1, 5, 10, 20, 40, 60, 80, 100 μM로 희석한 것을 제외하면, 실시예 1과 같고, 그 결과는 도 3a에 나타내었다. 서열번호 10의 경우, 농도를 0.1, 0.5, 1, 5, 10, 20, 40, 50 μM로 희석한 것을 제외하면, 실시예 1과 같고, 그 결과는 도 3b에 나타내었다.

[90] 도 3a 및 도 3b에서 알 수 있는 바와 같이, 본 발명에 따른 서열번호 5 및 서열번호 10 펩타이드 모두 저농도 0.1 μM 내지 고농도 100 μM 또는 50 μM까지의 전 농도에서 Active β-카테닌 단백질 발현을 증가시킨 것을 확인할 수 있다. 또한, 서열번호 5 및 서열번호 10의 펩타이드의 Active β-카테닌 단백질 발현 증대를 가장 효과적으로 나타내는 최적의 농도가 존재하며, 이를 통해 상기 효과는 농도 의존적으로 증가하는 것은 아니라는 사실을 확인할 수 있다.

[91] **[실시예 3]. DKK-1 활성 억제 확인**

[92] 본 발명에 따른 서열번호 5 및 서열번호 10 펩타이드를 처리하여, DKK-1에 의해 저해된 Wnt/β-카테닌 신호전달 경로가 재활성화 되는지 분석하였다.

[93] 구체적으로, 인간 모유두 세포(human follicular dermal papilla cell: HFDPC)는 배양용 12웰 플레이트에 5×10^4개의 세포 수로 일정하게 분주하여 DMEM(Dulbecco's Modified Eagle Media, Gibco BRL)에서 24시간 동안 37℃ 5% CO_2 조건으로 인큐베이터에서 배양하였다. 배양 후 각 웰에 재조합 단백질 DKK-1을 각각 처리하여 Wnt/β-카테닌 신호전달 경로를 저해하면서, 본 발명의 서열번호 5 및 서열번호 10 펩타이드를 적정 농도로 추가 처리한 후, 일정 시간 동안 배양하였다.

[94] 배양 종료 후 배지를 제거한 후 SDS sample buffer로 세포를 파쇄 후 SDS-PAGE gel 전기영동으로 각 단백질을 분리하고, PVDF membrane(polyvinylidene Fluoride)에 이동시킨 후 블로킹 버퍼를 이용해 비특이적 결합을 없애고, β-카테닌과 p-GSK3β 단백질에 대한 항체 및 이에 대한 HRP 결합된 이차 항체(anti-rabbit IgG HRP(sigma))를 반응시킨 후 ECL prime kit(Amersham pharmacia)를 이용한 Enhanced chemiluminescence(ECL) 반응을 시켜, ChemiDoc분석을 수행하였고, 그 결과를 도 4a 및 도 4b에 나타내었다.

[95] 도 4a 및 도 4b에서 알 수 있는 바와 같이, 대조구 경우에는 재조합 단백질 DKK-1 처리시 Non-phospho(Active)β-카테닌 발현수준이 약 24% 감소하는 것을 통하여 재조합 DKK-1에 의해 Wnt/β-카테닌 신호 전달 경로가 억제하는 것을 확인할 수 있었다. 반면, 본 발명의 서열번호 5과 서열번호 10 펩타이드를 재조합 DKK-1과 동시에 처리한 경우는 Non-phospho(Active)β-카테닌 발현수준이 약 10% 내지 31% 각각 증가되어 회복된 것을 확인할 수 있다. 이는 본 발명의 서열번호 5와 10의 펩타이드가 DKK-1과 경쟁적으로 LRP5/6에 결합함으로써, DKK-1의 결합에 의한 Wnt/β-카테닌 신호 전달 경로의 방해를 저해할 수 있고, 오히려 Wnt/β-카테닌 신호 전달 경로의 활성화를 통하여 모발 성장과 연관된 단백질의 발현을 유도할 수 있다는 사실을 뒷받침하는 결과이다.

[96] **[실시예 4]. 모발 관련 성장호르몬 발현 증가 확인**

[97] 본 발명에 따른 서열번호 5 및 서열번호 10 펩타이드를 처리하여 모발 주기 성장기에 영향을 주는 성장호르몬인 VEGF, IGF-I, FGF10, FGF1 및 FGF7 단백질 또는 유전자 변화를 확인하기 위해 웨스턴 블롯과 RT-PCR을 수행하였다.

[98] 구체적인 웨스턴 블롯 실험 방법으로 인간 모유두 세포(human follicular dermal papilla cell: HFDPC)를 배양용 6웰 플레이트에 1×10^5개의 세포 수로 일정하게 분주하여 DMEM(Dulbecco's Modified Eagle Media, Gibco BRL)에서 24시간 동안 37 ℃ 5% CO_2 조건으로 인큐베이터에서 배양하였다. 본 발명의 서열번호 5 및 서열번호 10 펩타이드를 10 mM의 농도로 물로 녹여 농축액으로 하고, 이를 배지로 희석하여 각각의 최적농도인 10 또는 40 μM의 농도로 희석하였다. 이후 각 웰에 1 ㎖의 배지가 우선 들어있는 상태에 각 희석액을 1 ㎖씩 넣어 처리한 후 48시간 동안 배양하고, 배양 종료 후 배지를 제거한 후 SDS sample buffer로

세포를 파쇄 후 SDS-PAGE gel 전기영동으로 각 단백질을 분리하고, PVDF membrane(polyvinylidene Fluoride)에 이동시킨 후 블로킹 버퍼를 이용해 비특이적 결합을 없애고, VEGF, IGF1, FGF2 및 FGF10 단백질에 대한 항체 및 이에 대한 HRP 결합된 이차항체(anti-rabbit IgG HRP(sigma))를 반응시킨 후 ECL prime kit(Amersham pharmacia)를 이용한 Enhanced chemiluminescence(ECL) 반응을 시켜, ChemiDoc 분석을 수행하였고, 그 결과를 도 5에 나타내었다.

[99] 또한 구체적인 RT-PCR 실험 방법으로 본 발명의 서열번호 5 및 서열번호 10 펩타이드를 최적농도인 10 또는 40 μM의 농도로 상기와 동일한 방법으로 배양한 인간 모유두 세포에 처리하여 일정 시간 배양하였다. 배양 종료 후 Trizol (Ambion)로 세포를 파쇄하였고, chloroform/isopropanol로 전체 mRNA를 모은 뒤 reverse trascriptase로 cDNA를 합성하였다. FGF1과 FGF7에 대한 특이적인 primer를 이용해 RT-PCR (Thermal Cycler, Bio-rad)을 수행하고 증폭된 산물을 agarose gel 전기영동으로 분석하여 그 결과를 도 5에 나타내었다.

[100] 도 5에서 알 수 있는 바와 같이, 서열번호 5 및 서열번호 10 펩타이드에 의해 VEGF, IGF-I 및 FGF10 단백질, FGF1 및 FGF7 단백질 유전자 발현이 증가되는 것을 확인할 수 있다. 이들은 모발 성장인자와 연관된 단백질로서 이들의 발현 증가를 통하여 본 발명에 따른 펩타이드의 모발 성장 촉진 효과를 예상할 수 있다.

[101] **[실시예 5]. MMP-2 (matrix metalloproteinase-2)와 ALP (Alkaline phosphatase) 발현 증가 확인**

[102] 본 발명에 따른 서열번호 5 및 서열번호 10 펩타이드를 처리하여 모발 주기 성장기에 영향을 주는 Type IV Collagenase인 MMP-2 단백질 유전자와 모발성장기의 대표적인 인자인 ALP 단백질 유전자 변화를 확인하기 위해 RT-PCR을 수행하였다.

[103] 구체적인 RT-PCR 실험 방법은 실시예 4와 동일하게 수행하였다. MMP-2 및 ALP에 대한 특이적인 primer를 이용해 RT-PCR (Thermal Cycler, Bio-rad)을 수행하고 증폭된 산물은 agarose gel 전기영동으로 분석하여 그 결과를 도 6(a)에 나타내었다.

[104] 도 6(a)에서 알 수 있는 바와 같이, 서열번호 5 및 서열번호 10 펩타이드에 의해 MMP-2 및 ALP 단백질 유전자 발현이 대조구 대비하여 증가되는 것을 확인할 수 있으며, 이들의 발현 증가를 통하여 본 발명에 따른 펩타이드의 모발 성장 촉진 효과를 예상할 수 있다.

[105] **[실시예 6]. 세포주기 관련 단백질 p21 억제 확인**

[106] Wnt/β-카테닌 신호 전달 경로의 타겟 단백질 중 하나인 p21 (cyclin-dependent kinase inhibitor 1a, Cdkn1a)은 휴지기에 높게 발현이 되는 단백질로 cyclin-dependent kinases (Cdks) 발현을 억제함으로써 모발주기의 성장기로의 진입을 억제하는 역할을 한다. 서열번호 5와 서열번호 10 펩타이드 처리에 의해 p21이 억제될 수 있는지를 분석하기 위해 p21 단백질 발현에 대한 웨스턴 블롯을

수행하였다.

[107] 구체적인 실험방법은 실시예 4와 동일하게 수행하였으며, PVDF membrane(polyvinylidene Fluoride)에 이동시킨 후 블로킹 버퍼를 이용해 비특이적 결합을 없애고, p21 단백질에 대한 항체 및 이에 대한 HRP 결합된 이차항체(anti-mouse IgG HRP(sigma))를 반응시킨 후 ECL prime kit(Amersham pharmacia)를 이용한 Enhanced chemiluminescence(ECL) 반응을 시키고, ChemiDoc분석을 수행하여, 그 결과를 도 6(b)에 나타내었다.

[108] 도 6(b)에서 알 수 있는 바와 같이, 서열번호 5 및 서열번호 10 펩타이드에 의해 p21 단백질이 대조구에 대비하여 현저히 감소한 것을 확인할 수 있다. 따라서, 본 발명에 따른 서열번호 5 및 서열번호 10 펩타이드에 의해 모발 성장 촉진 효과를 예상할 수 있다.

[109] **[실시예 7]. 인체 모낭에서의 모간 생장촉진 효과 확인**

[110] 인체에서 분리된 모낭조직을 주변 구성물을 모두 분리하여 Earle's balanced salts solution (EBSS; SigmaAldrich)에 보관하였다. 성장단계의 모낭을 현미경하에서 조심스럽게 분리한 후 실험에 사용하였다. 분리된 모낭은 Williams medium E (Gibco, Grand Island, NY, USA)에 2 mM L-glutamine (Gibco, NY, USA), 10 μg/㎖ insulin (SigmaAldrich), 10 ng/㎖ hydrocortisone (SigmaAldrich), 100 unit/㎖ penicillin, 100 μg/㎖ streptomycin를 첨가하여 37°C, 5% CO_2 95% air의 조건에서 배양하였다. 본 발명의 화합물 서열번호 5 (100 μM)와 서열번호 10 (16.6 μM)을 처리하여 7일간 혹은 10일간 배양 후 성장한 모간의 길이를 Image J (version 1.52a NIH, Bethesda, MD, USA)를 이용하여 측정하여 분석하여, 그 결과를 도 7a 및 도 7b에 나타내었다. 이때 양성대조군으로 Minoxidil (10 μM) 혹은 IGF-1 (10 ng/㎖)을 처리하였다.

[111] 도 7a 및 도 7b에서 알 수 있는 바와 같이, 본 발명의 서열번호 5와 서열번호 10를 각각 처리한 군이 IGF-1 또는 미녹시딜 양성대조군에 대비하여 월등한 모간 길이 성장이 관찰되었다.

서열목록 Free Text

[112] 서열번호 5 및 10의 서열 정보는 별도의 파일 형태로 제출함.

청구범위

[청구항 1] 서열번호 5 또는 서열번호 10의 아미노산 서열을 포함하는 탈모증 예방, 개선 또는 치료용 펩타이드.
서열번호 5: SCRIQ
서열번호 10: RIP

[청구항 2] 제 1항에 있어서,
상기 펩타이드는 Wnt/β-카테닌 신호전달 경로를 활성화하는 것인 펩타이드.

[청구항 3] 제 1항에 있어서,
상기 탈모증은 원형 탈모증, 유전성 안드로젠 탈모증, 휴지기 탈모증, 외상성 탈모증, 생장기 탈모증, 비강성 탈모증, 지루 탈모증 및 선천성 탈모증으로 이루어진 그룹에서 선택된 어느 하나 이상인, 탈모증 예방, 개선 또는 치료용 펩타이드.

[청구항 4] 제 1항에 따른 펩타이드를 유효성분으로 포함하는 탈모증 개선용 화장료 조성물.

[청구항 5] 제 4항에 있어서,
상기 유효성분은 조성물 전체 중량을 기준으로 0.0001 내지 10 중량%로 포함되는 것인, 탈모증 개선용 화장료 조성물.

[청구항 6] 제 1항에 따른 펩타이드 또는 약학적으로 허용가능한 그의 염을 유효성분으로 포함하는 탈모증 예방 또는 치료용 약학적 조성물.

[청구항 7] 제 1항에 있어서,
상기 서열번호 5를 포함하는 펩타이드의 아미노산 서열의 수는 5 내지 15이며, 상기 서열번호 10으로 이루어진 펩타이드의 아미노산 서열의 수는 3 내지 13인 탈모증 예방, 개선 또는 치료용 펩타이드.

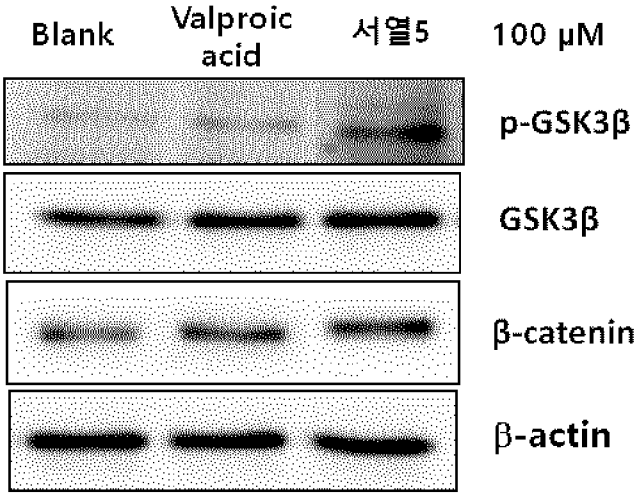
[청구항 8] 제 1항에 있어서,
상기 서열번호 5를 포함하는 펩타이드 및 서열번호 10을 포함하는 펩타이드를 포함하는 탈모증 예방, 개선 또는 치료용 펩타이드 조성물.

[청구항 9] 서열번호 5 또는 서열번호 10의 아미노산 서열을 포함하는, 모발 성장 촉진용 펩타이드.
서열번호 5: SCRIQ
서열번호 10: RIP

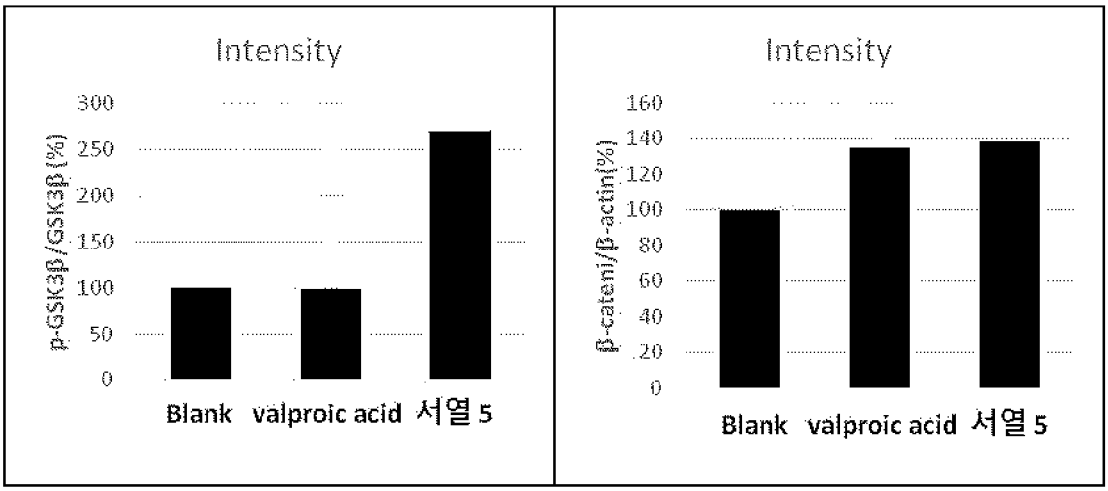
[청구항 10] 제 9항에 따른 펩타이드를 유효성분으로 포함하는 모발 성장 촉진용 화장료 조성물.

[청구항 11] 제 9항에 따른 펩타이드 또는 약학적으로 허용가능한 그의 염을 유효성분으로 포함하는 모발 성장 촉진용 약학적 조성물.

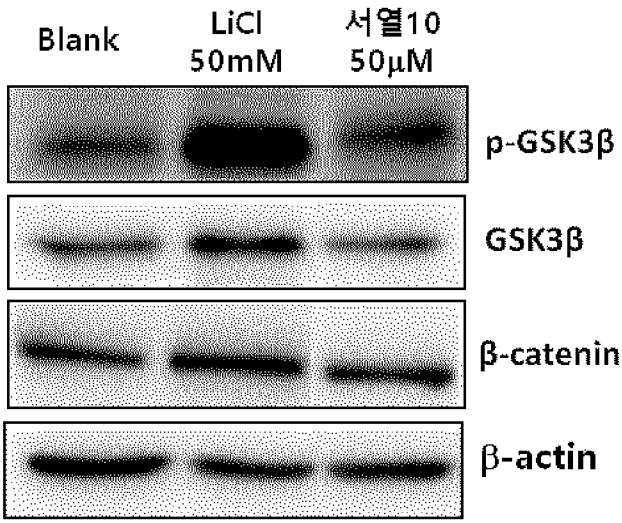
[도1a]


Blank
Valproic acid
서열5
100 μM
p-GSK3β
GSK3β
β-catenin
β-actin

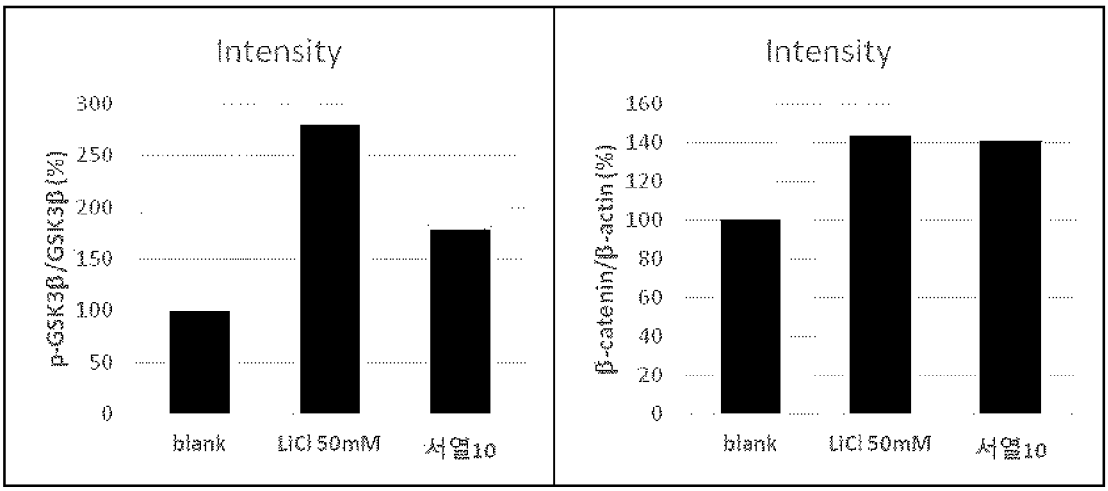
[도1b]


Intensity
p-GSK3β/GSK3β (%)
300
250
200
150
100
50
0
Blank
valproic acid
서열 5
Intensity
β-catenin/β-actin(%)
160
140
120
100
80
60
40
20
0
Blank
valproic acid
서열 5

[도2a]

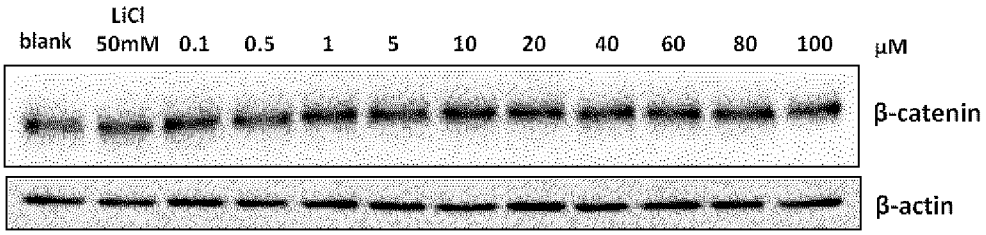

Blank
LiCl 50mM
서열10 50μM
p-GSK3β
GSK3β
β-catenin
β-actin

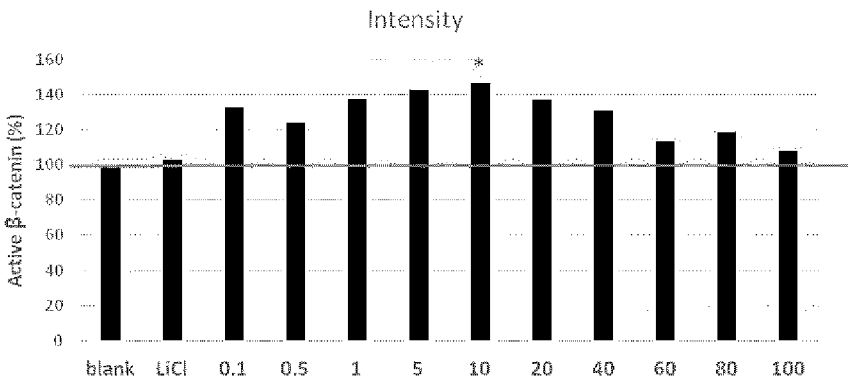
[도2b]


Intensity
p-GSK3β/GSK3β (%)
300
250
200
150
100
50
0
blank
LiCl 50mM
서열10
Intensity
β-catenin/β-actin (%)
160
140
120
100
80
60
40
20
0
blank
LiCl 50mM
서열10

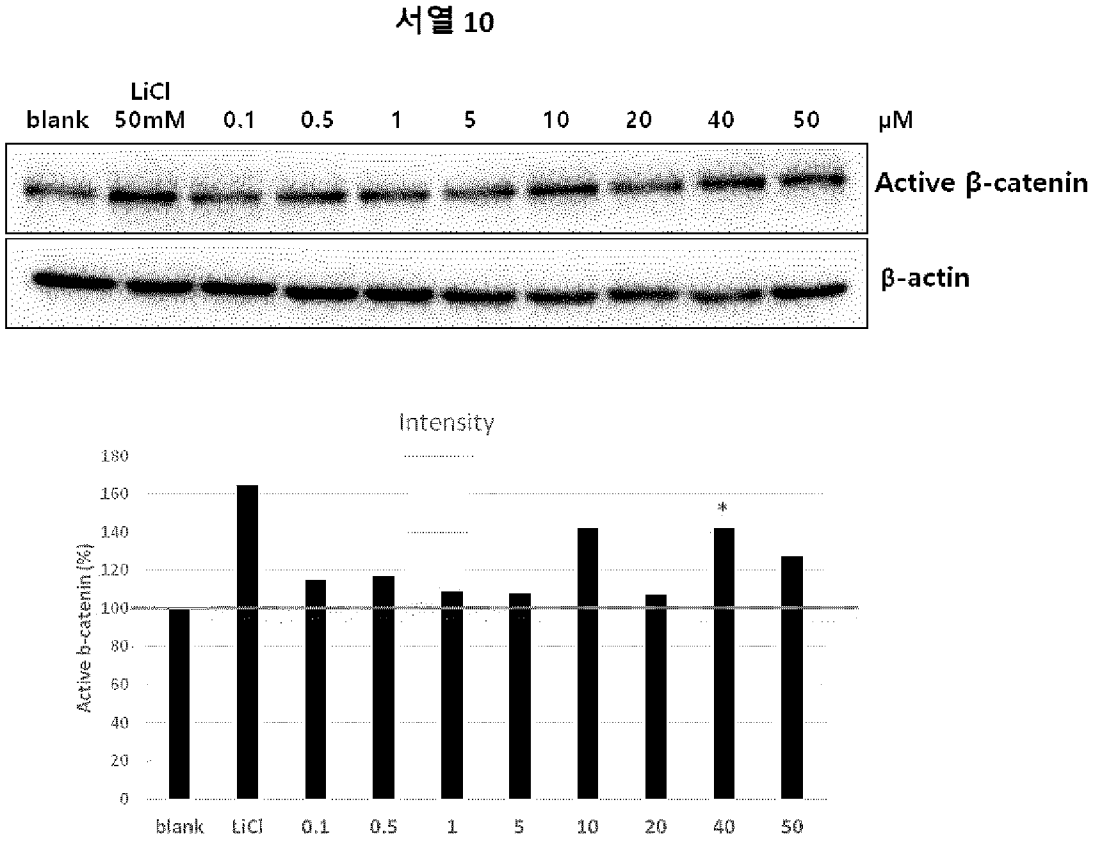
[도3a]

서열 5

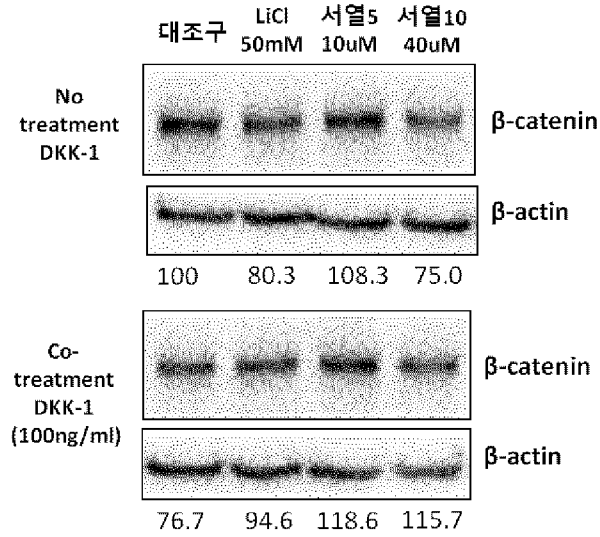

blank
LiCl 50mM
0.1
0.5
1
5
10
20
40
60
80
100
μM
β-catenin
β-actin


Intensity
Active β-catenin (%)
160
140
120
100
80
60
40
20
0
*
blank
LiCl
0.1
0.5
1
5
10
20
40
60
80
100

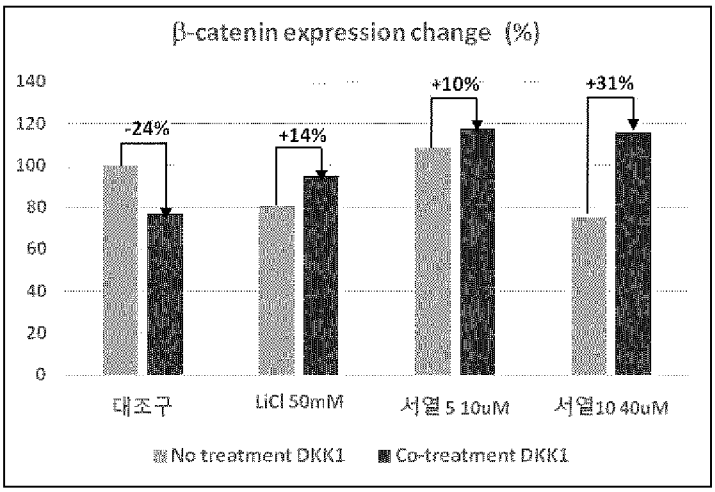
[도3b]


서열 10
LiCl
blank 50mM 0.1 0.5 1 5 10 20 40 50 μM
Active β-catenin
β-actin
Intensity
Active b-catenin (%)
180
160
140
120
100
80
60
40
20
0
*
blank LiCl 0.1 0.5 1 5 10 20 40 50

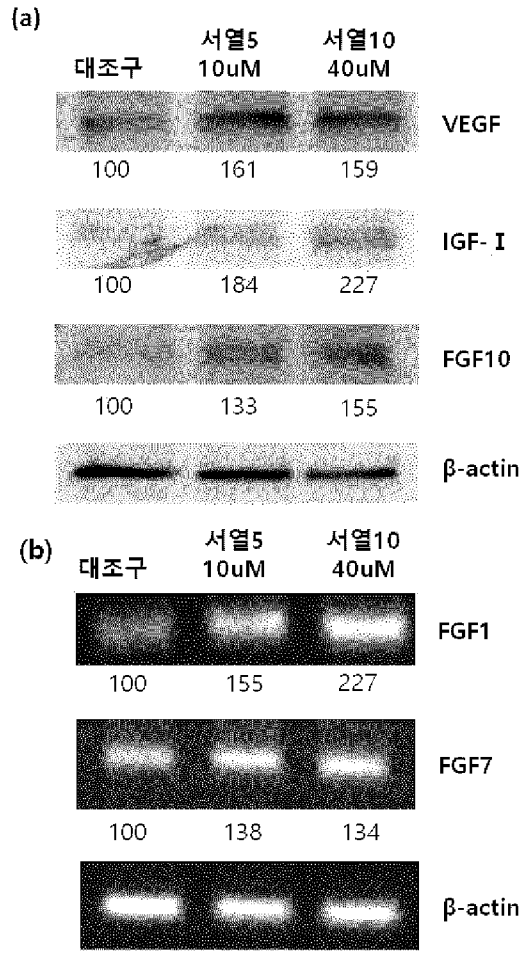
[도4a]


대조구 LiCl 50mM 서열5 10uM 서열10 40uM
No treatment DKK-1
β-catenin
β-actin
100 80.3 108.3 75.0
Co-treatment DKK-1 (100ng/ml)
β-catenin
β-actin
76.7 94.6 118.6 115.7

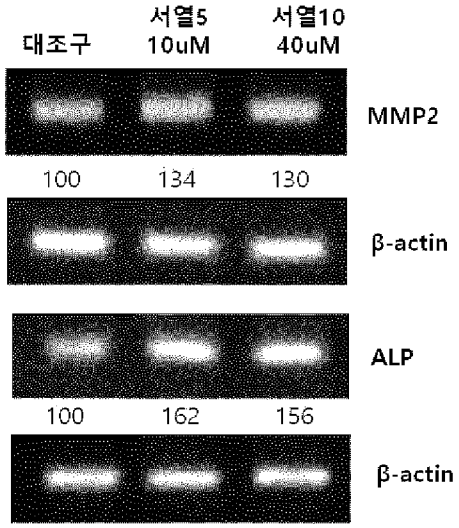
[도4b]


β-catenin expression change (%)
140
120
100
80
60
40
20
0
-24%
+14%
+10%
+31%
대조구
LiCl 50mM
서열 5 10uM
서열10 40uM
No treatment DKK1
Co-treatment DKK1

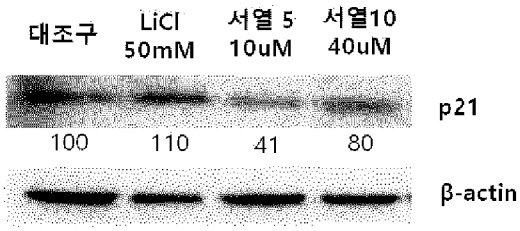
[도5]


(a)
대조구
서열5 10uM
서열10 40uM
VEGF
100 161 159
IGF- I
100 184 227
FGF10
100 133 155
β-actin
(b)
대조구
서열5 10uM
서열10 40uM
FGF1
100 155 227
FGF7
100 138 134
β-actin

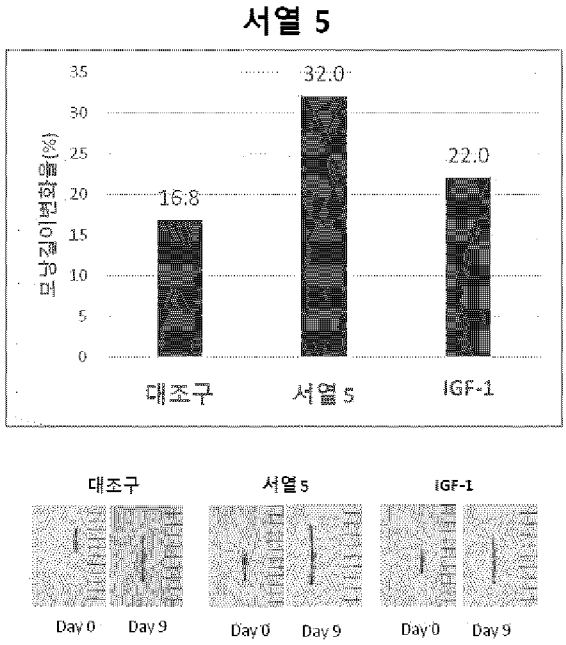
[도6]


대조구
서열5 10uM
서열10 40uM
MMP2
100 134 130
β-actin
ALP
100 162 156
β-actin

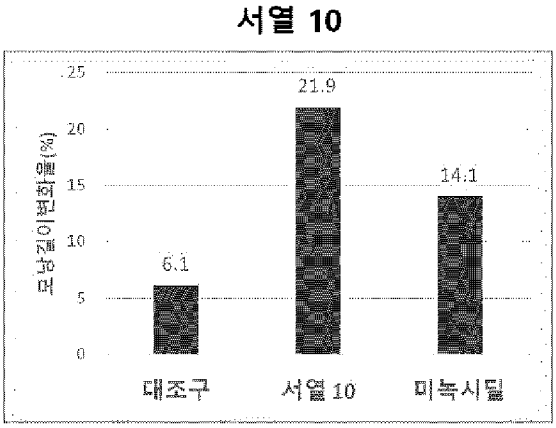
(b)

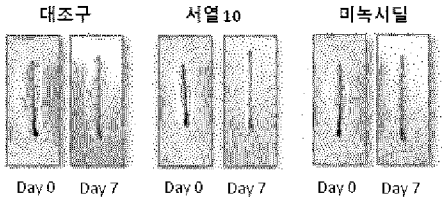

대조구
LiCl 50mM
서열 5 10uM
서열10 40uM
p21
100 110 41 80
β-actin

[도7a]

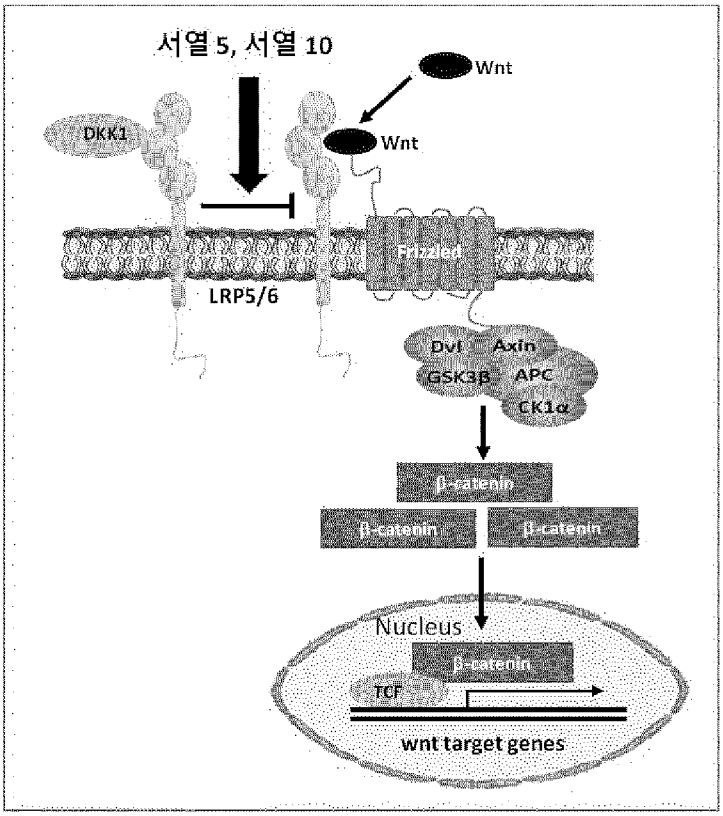

서열 5
모낭길이변화율(%)
35
30
25
20
15
10
5
0
16.8
32.0
22.0
대조구
서열 5
IGF-1
대조구
서열 5
IGF-1
Day 0
Day 9
Day 0
Day 9
Day 0
Day 9

[도7b]


서열 10
모낭길이변화율(%)
25
20
15
10
5
0
6.1
21.9
14.1
대조구
서열 10
미녹시딜


대조구
서열10
미녹시딜
Day 0
Day 7
Day 0
Day 7
Day 0
Day 7

[도8]


서열 5, 서열 10
Wnt
Wnt
DKK1
Frizzled
LRP5/6
Dvl
Axin
GSK3β
APC
CK1α
β-catenin
β-catenin
β-catenin
Nucleus
β-catenin
TCF
wnt target genes