



(19) 대한민국특허청(KR)
(12) 공개특허공보(A)

(11) 공개번호 10-2017-0115637
(43) 공개일자 2017년10월18일

(51) 국제특허분류(Int. Cl.)
A61K 38/16 (2006.01) A61K 38/18 (2006.01)
A61K 8/64 (2006.01) A61Q 19/00 (2006.01)
(52) CPC특허분류
A61K 38/16 (2013.01)
A61K 38/1808 (2013.01)
(21) 출원번호 10-2016-0042760
(22) 출원일자 2016년04월07일
심사청구일자 2016년04월07일

(71) 출원인
고려대학교 산학협력단
서울특별시 성북구 안암로 145, 고려대학교 (안암동5가)
(주)차바이오텍
서울특별시 강남구 도산대로 442, 3층 (청담동, 피엔폴루스)
(72) 발명자
김찬화
서울특별시 용산구 이촌로87길 21 103동 402호 (이촌동, 이촌아파트)
김미정
서울특별시 강동구 강동대로 217 인텍스파크뷰 1102호
이유선
서울특별시 영등포구 63로 45 19동 63호 (여의도동, 여의도시범아파트)
(74) 대리인
특허법인다나

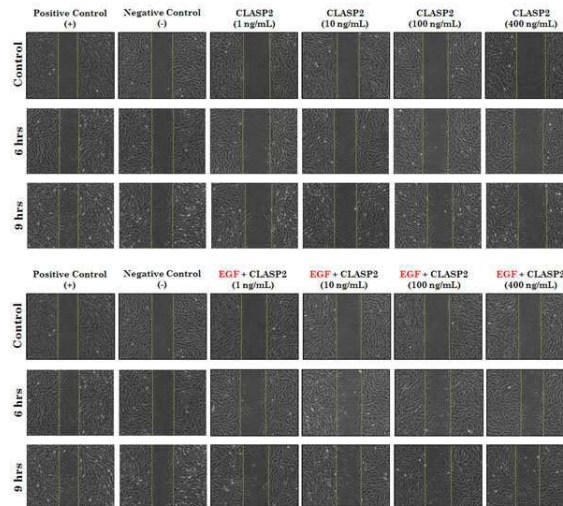
전체 청구항 수 : 총 6 항

(54) 발명의 명칭 CLASP 2를 이용한 상처 치유 또는 피부 재생용 조성물

(57) 요약

본 발명은 CLASP2(CLIP-association protein2)를 유효성분으로 포함하는 상처 치유 또는 피부 재생 촉진용 조성물에 관한 것으로, CLASP2의 섬유아세포 증식 및 이동 효과를 확인함으로써 이를 상처 치유 또는 피부 재생 촉진용 의약품 및 화장품에 적용할 수 있다.

대표도 - 도3



(52) CPC특허분류

A61K 8/64 (2013.01)

A61Q 19/00 (2013.01)

이 발명을 지원한 국가연구개발사업

과제고유번호 G01201411010183

부처명 한국산업기술평가관리원

연구관리전문기관 한국산업기술평가관리원

연구사업명 바이오의료기기산업원천기술개발사업

연구과제명 [RCMS]줄기세포유래 조직분화 배양기술을 응용한 기능성 단백질제제의 산업화 기술 개발(10047890)

기 여 율 1/1

주관기관 고려대학교 산학협력단

연구기간 2014.11.01 ~ 2015.10.31

명세서

청구범위

청구항 1

CLASP2(CLIP-association protein2)를 유효성분으로 포함하는 상처 치유 또는 피부 재생 촉진용 약학 조성물.

청구항 2

제 1 항에 있어서,
상피 세포 성장인자를 추가로 포함하는 약학 조성물.

청구항 3

제 1 항에 있어서,
상기 CLASP2(CLIP-association protein2)는 서열번호 1로 표시되는 약학 조성물.

청구항 4

CLASP2(CLIP-association protein2)를 유효성분으로 포함하는 상처 개선 또는 피부 재생용 화장품 조성물.

청구항 5

제 4 항에 있어서,
상피 세포 성장인자를 추가로 포함하는 화장품 조성물.

청구항 6

제 4 항에 있어서,
상기 CLASP2는 서열번호 1로 표시되는 화장품 조성물.

발명의 설명

기술 분야

[0001] 본 발명은 CLASP2를 이용한 상처 치유 또는 피부 재생용 조성물에 관한 것이다.

배경 기술

[0003] 창상 치유 과정은 조직이 손상을 입게 된 후, 일어나는 피부 재생의 복잡한 과정으로서, 조직의 손상 크기, 정도에 따라 그 치유 기간이 달라진다. 치유 과정은 4가지의 개별적인 과정 즉, 지혈(hemostasis), 염증(inflammation), 증식(proliferation), 리모델링(remodeling) 등의 4가지의 개별적인 과정이 순서적이고 엄격하게 조절되어 일어나는 과정이며 다양한 세포의 상호작용, 성장인자들 그리고 사이토카인들이 필요하게 된다.

[0004] 피부 섬유아세포는 조직의 기능과 구조가 다시 복구되고 재생되는 창상치유 과정에서 매우 중요한 역할을 담당

한다. 이 세포는 창상 부위 쪽으로 다른 세포들을 이동시키고 창상 부위의 가장자리에서 세포의 분열을 조절한다. 섬유아세포는 증식과 이동과정에서 모두 사이토카인들과 세포외기질(extracellular matrix, ECM)을 생산하여 섬유아세포-각질세포(keratinocyte)-내피(endothelium) 간의 상호작용을 조절한다. 세포외기질은 조직의 강도와 탄력성에 관여하는 다양한 성분으로 구성되어 있고 피부 섬유아세포의 이동을 촉진한다.

[0005] 따라서, 성공적인 창상 치유는 세포 증식, 이동 그리고 세포외기질의 많은 생물학적 과정이 관여한다. 특히, 세포 증식과 이동은 창상부위에서 분비되는 성장인자에 의해 조절되고 이들은 세포 성장과 증식, 분화, 이동을 자극시키는 단백질 같은 거대분자(macromolecules)이거나 호르몬 같은 소분자(small molecules)일 수 있다. 상피 세포 성장인자(Epidermal growth factor, EGF)는 상피 세포의 이동을 유도하고, 진피 창상 치료 과정에서 각질 세포의 증식과 이동을 자극시키는 창상 치유에 필수적인 역할을 한다. 또한, 이 성장인자는 육아조직(granulation tissue) 형성과 창상치유를 촉진시키며 섬유아세포 이동성을 자극시킨다.

[0006] 세포골격과 미세소관의 상호작용은 세포의 움직임, 성장 경로, 세포 분열에 중요한 역할을 한다. 미세소관은 모든 진핵세포의 주요한 세포골격시스템의 하나로서 매우 동력학적인 구조를 가지고 있다.

[0007] 세포골격과 미세소관의 상호작용은 세포의 움직임, 성장 경로, 세포 분열에 중요한 역할을 한다(Rodriguez et al, Nat Cell Biol, 5(7):599-609, 2003). 미세소관은 모든 진핵세포의 주요한 세포골격시스템의 하나로서 매우 동력학적인 구조를 가지고 있다. Tubulin dimer로 구성된 미세소관은 두 가지 end(slow-growing (minus)와 fast-growing (plus))로 assemble과 disassemble을 할 수 있다. 살아있는 세포에서 minus end는 미세소관의 분해를 담당한다. 하지만 plus end에서는 growth와 shrinkage 단계를 빠르게 반복하면서 세포이동을 유도한다(Desai A et al, Cell Dev Biol, 13:83-117, 1997; Tsvetkov, Cell Motil Cytoskeleton, 64(7):519-30, 2007). 그러므로 미세소관의 plus end는 아주 중요한 부분이고 세포의 이동성을 결정한다. 대부분의 진핵세포들은 plus end와 관련된 복잡한 복합단백질 메카니즘을 가지고 있다. 미세소관 end binding 단백질은 Kin I kinesins (Howard J et al, Nature, 422:753-758, 2003)와 +TIP (미세소관의 Plus end tracking protein) (Schuyler et al, Cell, 105:421-424, 2001)을 포함한다. +TIP 단백질은 end binding protein(EB1, EB2, EB3)와 cytoplasmic linker protein(CLIP170, CLIP150), APC(adenomatous polyposis coli), CLASPs(CLIP-association proteins)로 구성되어있다[비특허문헌 1~3].

[0008] CLASPs(CLIP-association proteins)는 세포의 피층과 골지체, 세포의 중심체, 염색체의 동원체, 미세소관 말단 부분에 존재하며(Inoue et al, Cell Biol, 149:153-166, 2000; Lemos et al, EMBO J, 19:3668-3682, 2000), CLASPs는 2개의 동종 미세소관 단백질(CLASP1, CLASP2)로 구성되고 미세소관 성장을 촉진시키고 성장하는 미세소관 말단부분에 관여하는 세포질 연계 단백질(CLIP-170, CLIP-115)에 binding 하는 특징을 가지고 있다. CLASP2는 미세소관이 polarized되게 만들며 움직이는 섬유아세포의 가장자리나 말단 끝 부분에 존재한다. 그리하여, 미세소관을 안정화시키고 지속적인 이동 방향성을 조장한다[비특허문헌 4~6].

[0009] 피부 재생 또는 창상 치료용 의약품이 지금까지 개발되어 오고 있으나, 기존의 치료제 보다 생체에 더 안전하고, 무엇보다도 기존에 피부 재생 또는 창상 치료에 효과가 있다고 알려진 물질보다 우수한 피부 재생을 지닌 신규 성분의 개발이 절실히 요구되고 있다.

[0010] 또한, CLASP2가 섬유아세포의 이동(migration)을 촉진하여 피부 재생이나 창상 치료에 관한 연구에 대해서는 보고된 바 없다.

선행기술문헌

특허문헌

[0011] (특허문헌 0001) 국내 특허 공개 제2014-0057806호

비특허문헌

[0012] (비특허문헌 0001) Schuyler et al, J Cell Biol, 158(1):139-152, 2002.

(비특허문헌 0002) Carvalho et al, Trends Cell Biol, 13:229-237, 2003.

(비특허문헌 0003) Mimori-Kiyosue et al, J. Biochem, 134:321-326, 2003.

(비특허문헌 0004) Akhmanova et al, Cell, 104:923-935, 2001.

(비특허문헌 0005) Tsvetkov, Cell Motil Cytoskeleton, 64(7):519-30, 2007.

(비특허문헌 0006) Mimori-Kiyosue et al, J Cell Biol, 3:168(1):141-53, 2005.

발명의 내용

해결하려는 과제

- [0013] 이에, 본 발명자들은 상기의 필요성을 인식하고, CLASP2를 유효성분으로 사용하여 당뇨병 족부궤양, 화상 등 난치성 창상과 같은 상처 치유 및/또는 피부 재생 효과를 확인함으로써 본 발명을 완성하게 되었다.
- [0014] 따라서, 본 발명은 CLASP2(CLIP-association protein2)를 유효성분으로 포함하는 상처 치유용 또는 피부 재생 촉진용 약학 조성물을 제공하는데 그 목적이 있다.
- [0015] 또한, 본 발명은 CLASP2(CLIP-association protein2)를 유효성분으로 포함하는 상처 개선용 또는 피부 재생용 화장품 조성물을 제공하는데 다른 목적이 있다.

과제의 해결 수단

- [0017] 상기 과제를 해결하기 위한 수단으로서, 본 발명은 CLASP2(CLIP-association protein2)를 유효성분으로 포함하는 상처 치유용 또는 피부 재생 촉진용 약학 조성물을 제공한다.
- [0018] 상기 과제를 해결하기 위한 다른 수단으로서, 본 발명은 CLASP2(CLIP-association protein2)를 유효성분으로 포함하는 상처 개선용 또는 피부 재생용 화장품 조성물을 제공한다.

발명의 효과

- [0020] 본 발명은 CLASP2가 섬유아세포의 이동을 촉진하는 것을 확인함으로써 상처 부위 세포의 이동을 증가시켜 피부 재생 또는 상처 치료 효과를 기대할 수 있다. 따라서, 본 발명은 CLASP2를 유효성분으로 포함하는 피부 재생 또는 상처 치유용 약학 조성물 및 화장품 조성물을 포함한다.

도면의 간단한 설명

- [0022] 도 1은 CLASP2에 대한 피부 섬유아세포의 증식률 결과를 나타낸 그래프이다.
- 도 2는 상피 세포 성장인자와 CLASP2를 같이 처리하였을 때 피부 섬유아세포의 증식률을 나타낸 결과이다.
- 도 3은 Migration Assay를 9시간 동안 시행하고 분석한 실험 결과 사진이다.
- 도 4는 도 3의 실험 결과 사진을 Imag J로 분석한 후 그래프화 한 것이다.

발명을 실시하기 위한 구체적인 내용

- [0023] 본 발명은 CLASP2(CLIP-association protein2)를 유효성분으로 포함하는 상처 치유 또는 피부 재생 촉진용 약학 조성물에 관한 것이다.
- [0024] 일 구체예로서, 본 발명의 약학 조성물은 상피 세포 성장인자를 추가로 포함할 수 있다.
- [0025] 본 발명의 유효성분으로 사용되는 CLASP2(CLIP-association protein2)는 미세소관 단백질의 한 부류이며, 세포의 피층과 골지체, 세포의 중심체, 염색체의 동원체, 미세소관 말단부분 존재한다. CLASP는 2개의 동종 미세소관 단백질(CLASP1, CLASP2)로 구성되고 미세소관 성장을 촉진시키며 성장하는 미세소관 말단부분에 관여하는 세포질 연계 단백질(CLIP-170, CLIP-115)에 결합하는 특징을 가지고 있다.

- [0026] 상기 CLASP2(CLIP-association protein2)는 원래의 아미노산 서열[<http://www.uniprot.org/uniprot/J3KR49> 참조, 서열번호 2]로부터 기능적 서열(functional sequence)을 부분적으로만 이용한 재조합 단백질을 사용하였으며, 서열번호 1[MBS cat.1192601]로 표시된다. 구체적으로는 서열번호 1의 아미노산 서열은 인간 CLASP2_아미노산 서열 중 1-6번 아미노산 서열 MAMGDD가 MRRLICKRICDY로 변경되었으며, 410-425번 아미노산 서열 DTSDKLDGTASEDGRV이 CEAFWRSRGRTAKLYSV로 변경되었고, 426-1294번 아미노산 서열은 없어진 상태의 서열을 나타낸다.
- [0027] 본 발명에 따른 상처 치료용 조성물은 CLASP2를 조성물의 총 중량을 기준으로 하여 1 내지 90 중량%의 양으로 포함할 수 있다. 또한, CLASP2는 100 내지 800 ng/mL, 200 내지 700 ng/mL, 또는 300 내지 600 ng/mL의 농도로 사용될 수 있다.
- [0028] 본 발명에 따른 조성물은 섬유아세포의 증식 및 이동 효과로 인해 피부에 발생하는 상처를 빠르게 치료하고 회복시키는 효과를 가질 수 있다. 또한, 손상된 피부에 자극을 거의 주지 않으면서 상처의 치료를 촉진시킬 수 있고, 손상된 부위가 정상적인 촉감을 가지면서 본래의 모습으로 재생되는 것을 도와 흉터 및 과립 조직의 형성을 억제할 수 있는 효과를 기대할 수 있다.
- [0029] 본원에 사용된 "상처"란 조직 구조의 연속성 또는 완전성의 물리적인 파열을 의미하며, "상처 치유"란 조직 완전성의 복원을 의미한다. 이는 조직 완전성의 부분적 또는 완전 복원을 의미할 수 있는 것이며, 따라서 상처 치료란 상처 치유 과정에 관여하는 하나 이상의 단계 또는 과정의 촉진, 개선, 진행, 가속 또는 진전을 의미한다. 또한, 상처는, 예컨대 타박상 또는 내부 궤양화와 같이 피부의 외부 구조적 완전성이 유지되는 임의의 내부 상처이거나 외부 상처, 특히 피부 상처일 수 있으며, 따라서 조직은 내부 또는 외부의 신체 조직일 수 있다. 일례로, 조직은 피부(예컨대, 인간 피부)이며, 상처는 진피 또는 표피 상처와 같은 피부 상처일 수 있다.
- [0030] 본 발명의 상처 치료용 조성물이 적용될 수 있는 상처의 종류로는, 이에 제한되지는 않으나, 베인 상처 및 열상, 외과적 절개 또는 상처, 천자, 찰과상(graze), 긁힌 상처, 압박 상처, 찰과상(abrasion), 마찰 상처(예: 기저귀 발진, 마찰 수포), 욕창 궤양(예: 욕창 또는 와창), 열 작용에 의한 상처(직접, 또는 전도, 대류 또는 복사선을 통한 냉원 및 열원 및 전기 공급원으로부터의 화상), 화학적 상처(예: 산 또는 알칼리 화상) 또는 개방 또는 무손상 종기, 피부 발진, 흠집 및 여드름을 비롯한 병원성 감염(예: 바이러스, 박테리아 또는 진균 감염), 궤양, 만성적인 상처(당뇨병-관련 상처, 예컨대 하퇴 및 족부 궤양, 정맥성 다리 궤양 및 욕창 포함)를 포함할 수 있다.
- [0031] 본 발명에 의한 약학 조성물은 상기한 유효성분과는 별도로 항염증제, 항균제, 진통제, 완화제 또는 수렴제와 같은 상처 치료 기능을 갖는 다른 통상적인 약제를 더 포함할 수 있는데, 이러한 통상적인 약제를 포함시키는 것은 본 발명이 속하는 기술적 분야에서 통상의 지식을 가진 자라면 용이하게 실시할 수 있을 것이다.
- [0032] 그 밖에도 보습제, 피부보호제 및 방부제 등을 추가로 첨가할 수도 있다.
- [0033] 본 발명에 의한 상처 치유용 약학적 조성물에 포함되는 부형제 또는 담체는 겔(gel), 페이스트(paste), 연고, 프로스트(frost), 산제, 유제 또는 에어로졸(aerosol) 등의 피부외용제에 있어서 통상적으로 사용되는 것들이 사용될 수 있으며, 상기와 같은 담체와 기타 첨가제들의 조성비는 유효약물의 용출율과 성상에 따라 결정된다.
- [0034] 또한, 본 발명에 의한 상처 치유용 약학 조성물은 화장품, 세척용 로션 또는 자외선 차단제 등에 부가하여 사용할 수도 있다.
- [0035] 본 발명에 따른 약제학적 조성물의 투여용량은 통상적인 외용제제로 1일 1회 내지 수회 환부에 따라 적량을 아침, 저녁으로 바르는 것이 바람직하다.
- [0036] 본 발명의 조성물의 바람직한 투여량은 환자의 상태 및 체중, 질병의 정도, 약물형태, 투여경로 및 기간에 따라 다르지만, 당업자에 의해 적절하게 선택될 수 있다. 그러나 바람직한 효과를 위해서, 본 발명의 조성물은 1일 0.0001 내지 100 mg/kg으로, 바람직하게는 0.001 내지 10 mg/kg으로 투여하는 것이 좋다. 투여는 하루에 한번 투여할 수도 있고, 수회 나누어 투여할 수도 있다. 상기 투여량은 어떠한 면으로든 본 발명의 범위를 한정하는 것은 아니다.
- [0037] 본 발명은 또한 CLASP2(CLIP-association protein2)를 유효성분으로 포함하는 상처 개선 또는 피부 재생용 화장품 조성물을 포함한다.
- [0038] 본 발명의 일 구현예로서, 상기 조성물에 상피 세포 성장인자를 추가로 포함할 수 있다.

- [0039] 화장료 조성물로 제제화되는 경우, 상기 CLASP2의 함량은 화장료 조성물 총 중량에 대하여 0.0001 내지 30 중량%이며, 바람직하게는 0.01 내지 20.0 중량%이다. 최소한의 상처를 개선하고 피부 재생을 촉진하는 효과를 달성할 수 있도록 CLASP2의 함량은 상기 최소치 이상인 것이 바람직하며, 과량 첨가에 따른 사용감 저하 및 각종 제형에의 적용 가능성을 고려하여 베타-라파콘의 함량은 상기 최대치 이하인 것이 바람직하다. 이때, CLASP2의 함량은 제형 또는 화장료 조성물에 함유되는 성분들의 함량에 따라 상기 범위 내에서 적절히 조절하는 것이 바람직하다.
- [0040] 본 발명의 화장품 조성물에 포함되는 성분은 유효성분으로서의 CLASP2 이외에 화장품 조성물에 통상적으로 이용되는 성분들을 포함하며, 예컨대 향산화제, 안정화제, 용해화제, 비타민, 안료 및 향료와 같은 통상적인 보조제, 그리고 담체를 포함한다.
- [0041] 본 발명의 조성물은 당업계에서 통상적으로 제조되는 어떠한 제형으로도 제조될 수 있으며, 예를 들면 유연화장수, 수렴화장수, 영양화장수, 영양크림, 마사지크림, 에센스, 아이크림, 아이에센스, 클렌징크림, 클렌징폼, 클렌징워터, 팩, 젤, 파우더, 보디로션, 보디크림, 보디오일, 보디에센스 등의 화장료로 제형화될 수 있다.
- [0042] 본 발명의 제형이 페이스트, 크림 또는 겔인 경우에는 담체 성분으로서 동물성유, 식물성유, 왁스, 파라핀, 전분, 트라칸트, 셀룰로오스 유도체, 폴리에틸렌 글리콜, 실리콘, 벤토나이트, 실리카, 탈크 또는 산화아연 등이 이용될 수 있다.
- [0043] 본 발명의 제형이 파우더 또는 스프레이인 경우에는 담체 성분으로서 락토스, 탈크, 실리카, 알루미늄 히드록시드, 칼슘 실리케이트 또는 폴리아미드 파우더가 이용될 수 있고, 특히 스프레이인 경우에는 추가적으로 클로로플루오로히드로카본, 프로판/부탄 또는 디메틸 에테르와 같은 추진체를 포함할 수 있다.
- [0044] 본 발명의 제형이 용액 또는 유탁액인 경우에는 담체 성분으로서 용매, 용해화제 또는 유탁화제가 이용되고, 예컨대 물, 에탄올, 이소프로판올, 에틸카보네이트, 에틸 아세테이트, 벤질 알코올, 벤질 벤조에이트, 프로필렌글리콜, 1,3-부틸글리콜 오일, 글리세롤 지방족 에스테르, 폴리에틸렌 글리콜 또는 소르비탄의 지방산 에스테르가 있다.
- [0045] 본 발명의 제형이 현탁액인 경우에는 담체 성분으로서 물, 에탄올 또는 프로필렌 글리콜과 같은 액상의 희석제, 에톡실화이소스테아릴 알코올, 폴리옥시에틸렌 소르비톨 에스테르 및 폴리옥시에틸렌 소르비탄 에스테르와 같은 현탁제, 미소결정성 셀룰로오스, 알루미늄 메타히드록시드, 벤토나이트, 아가 또는 트라칸트 등이 이용될 수 있다.
- [0046] 본 발명의 제형이 계면-활성제 함유 클린징인 경우에는 담체 성분으로서 지방족 알코올 설페이트, 지방족 알코올 에테르설페이트, 설포숙신산 모노에스테르, 이세티오네이트, 이미다졸리늄 유도체, 메틸타우레이트, 사르코시네이트, 지방산 아미드 에테르 설페이트, 알킬아미도베타인, 지방족 알코올, 지방산 글리세리드, 지방산 디에탄올아미드, 식물성 유, 라놀린유도체 또는 에톡실화 글리세롤 지방산 에스테르 등이 이용될 수 있다.
- [0048] 이하, 본 발명을 실시예에 의해 상세히 설명한다. 단, 하기 실시예는 본 발명을 예시하는 것일 뿐, 본 발명의 내용이 하기 실시예에 한정되는 것은 아니다.

[0050] 참고예 1: 세포 배양 및 유지

[0051] 인간 피부 섬유아세포 세포주 HS27 세포를 ATCC(American type culture collection, Maassas, VA, USA)에서 분양받아 실험에 사용하였다. DMEM(Dulbecco's Modified Eagle Medium; High Glucose, Gibco, Grand Island, NY, USA) 배지에 10%의 열불활성화된 우태아혈청(FBS, Life Technologies, Grand Island, NY, USA) 및 1% 항생제 용액(Gibco)을 첨가하여 배양하였다. 배양 조건은 37 °C, 95% 공기와 5% CO2상태로 유지하였다.

[0053] 실시예 1: 섬유아세포의 증식률 조사(Proliferation Assay)

[0054] 인간 피부 섬유아세포 세포주 HS27 세포를 PBS로 세척하여 0.05% trypsin/0.025% EDTA로 수거하였다. 대조군 및 섬유아세포에 48 시간 동안 서열번호 1로 표시되는 CLASP2(MyBioSource, Inc., California, USA, MBS cat.1192601)를 처리한 세포의 증식률을 조사하기 위하여 Cell Counting Kit(CCK-8, Dojindo, Tokyo, Japan)를

사용하였다. 피부 섬유아세포는 96-well에 well당 4,000 cells로 48시간 배양하였고, 배양기간 동안 CLASP2 단독으로 처리한 군, EGF와 CLASP2를 같이 처리한 군, 아무것도 처리하지 않은 군을 설정하고 세포의 생존율을 조사하였다. CCK-8 반응액 10 μ l를 각 well에 처리하여 37 °C에서 2시간 동안 반응시킨 후, 세포 증식률을 microplate reader(Biorad, CA, USA)로 450 nm에서 흡광도를 측정하여 분석하였다.

[0055] 도 1은 CLASP2에 대한 피부 섬유아세포의 증식률 결과를 나타낸 그래프이다. 양성 대조군은 상피 세포 성장인자 10 ng/mL을 처리하였고, 음성 대조군은 무혈청 배지(serum free media)를 처리한 것이다. CLASP2의 세포증식율은 100 ng/ml부터 2000 ng/ml까지 실시하였고, 음성 대조군과 유의적으로 차이가 나는 CLASP2의 농도는 400 ng/mL이었으며, 500 ng/ml에서 peak response를 보였고 그 이후의 고농도에서는 세포증식율이 감소하였다.

[0056] 도 2는 상피 세포 성장인자와 CLASP2를 같이 처리하였을 때 피부 섬유아세포의 증식률을 나타낸 결과이다. CLASP2 단백질 단독 처리 시의 농도는 1, 10, 100 ng/mL부터 세포 독성이 나타나지 않는 최고 농도 400 ng/mL 등 총 4개의 농도를 사용하였고 음성 대조군과 유의적으로 차이가 나는 CLASP2의 농도는 400 ng/mL부터 였으므로(도 1), EGF와의 시너지 효과(synergistic effect)를 알아보기 위한 농도도 같은 농도 스케일을 사용하여 측정하였다.

[0057] 본 발명의 CLASP2 단백질은 세포의 생존율에 거의 영향을 미치지 않았으나 EGF와 같이 처리한 군에서는 CLASP2 단백질 단독으로 처리한 군보다 양성 대조군과 비슷한 증식률을 보이거나 증가하는 것을 알 수 있었다. 특히, 양성 대조군과 유의적으로 차이가 나는 CLASP2 단백질의 농도는 400 ng/mL임을 알 수 있었다.

[0059] 실시예 2: 섬유아세포의 이동성 조사 (Migration Assay)

[0060] 섬유아세포에 미치는 CLASP2의 이동 효과는 Migration Assay Kit(ibidi, Wisconsin, USA)를 통해 확인하였다. 하나의 Well에 2.5×10^5 cells/mL, 70 μ l씩 seeding 후 9시간 동안 배양하여 세포의 이동성을 조사하였다. 또한, 세포가 이동한 면적은 Image J를 이용하여 수치화하였다

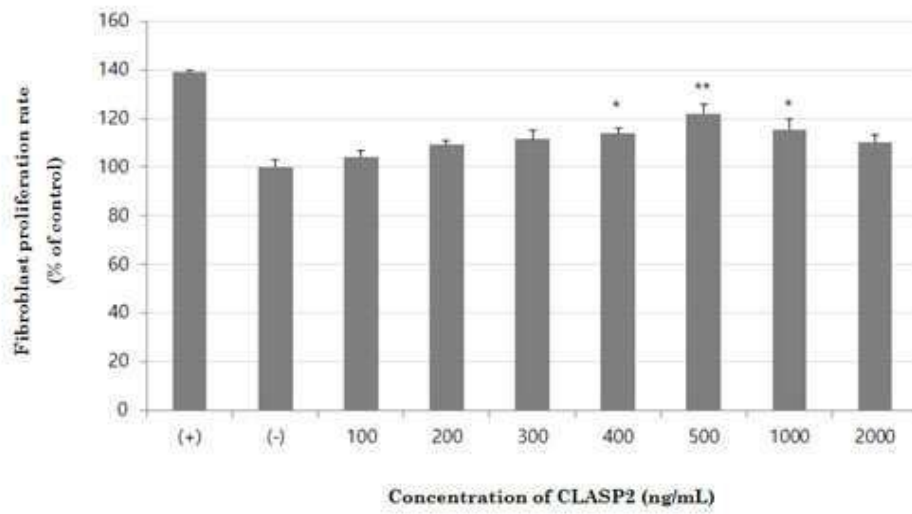
[0061] 도 3은 Migration Assay를 9 시간 동안 시행하고 분석한 실험 결과 사진이다. 9시간 후 세포이동율의 실험결과 사진을 보면, CLASP2 단독 처리군과 상피 세포 성장인자와 함께 처리한 군 모두에서 CLASP2 단백질의 농도가 높아질수록 세포의 이동이 잘 효과적으로 잘 일어나는 것을 알 수 있다.

[0062] 도 4는 도3의 실험 결과 사진을 Image J로 분석한 후 그래프화 한 것이다. CLASP2 단독 처리한 군에서 단백질의 농도가 높아질수록 세포의 이동률도 증가하지만 양성 대조군 보다 효과가 적다. 하지만, 상피 세포 성장인자와 CLASP2 단백질을 함께 처리한 군에서는 CLASP2의 농도가 높아질수록 세포의 이동이 잘 일어나는 것을 알 수 있다. 특히, CLASP2 단백질 농도 100 ng/mL부터 양성 대조군에 비해 세포 이동률이 증가하였다.

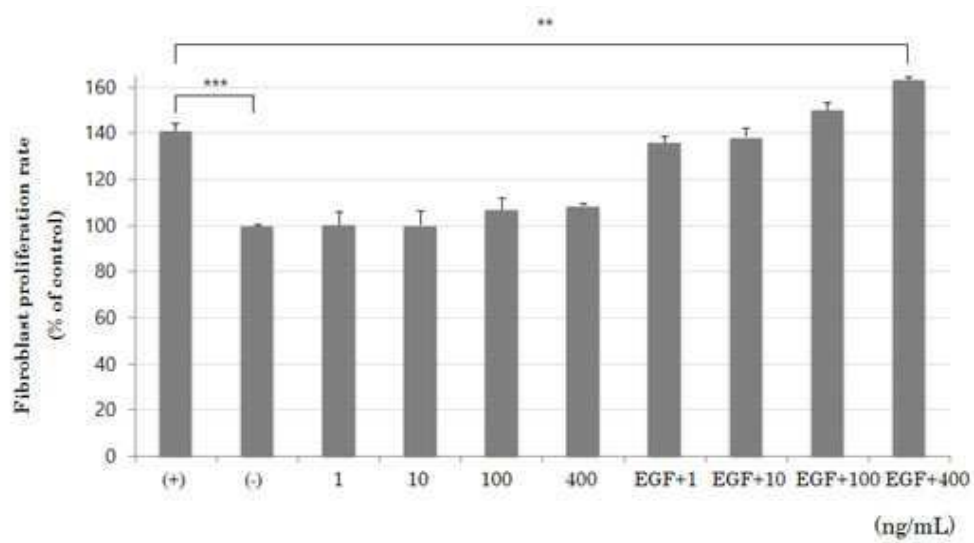
[0063] 이는 본 발명의 CLASP2가 창상부위 세포의 이동을 증가시켜 피부 재생 또는 창상 치료에 도움을 줄 수 있음을 확인할 수 있었고, 또한 그러한 용도로 사용할 수 있음을 알 수 있었다.

도면

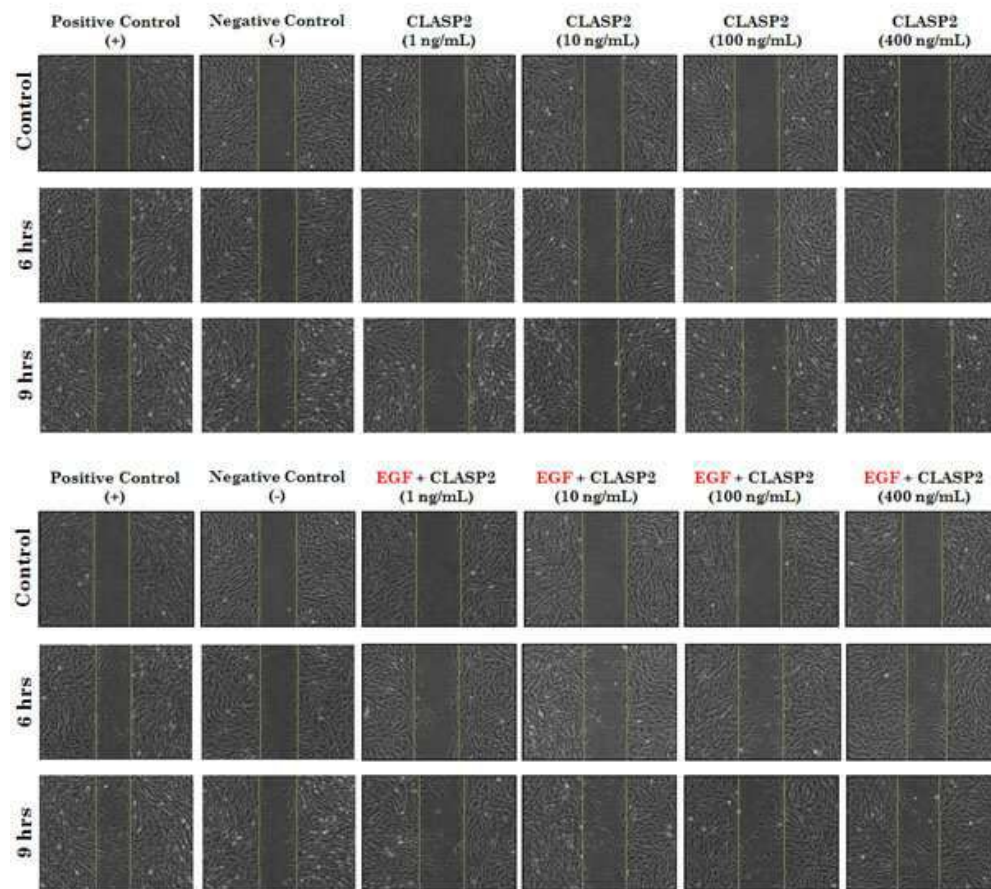
도면1



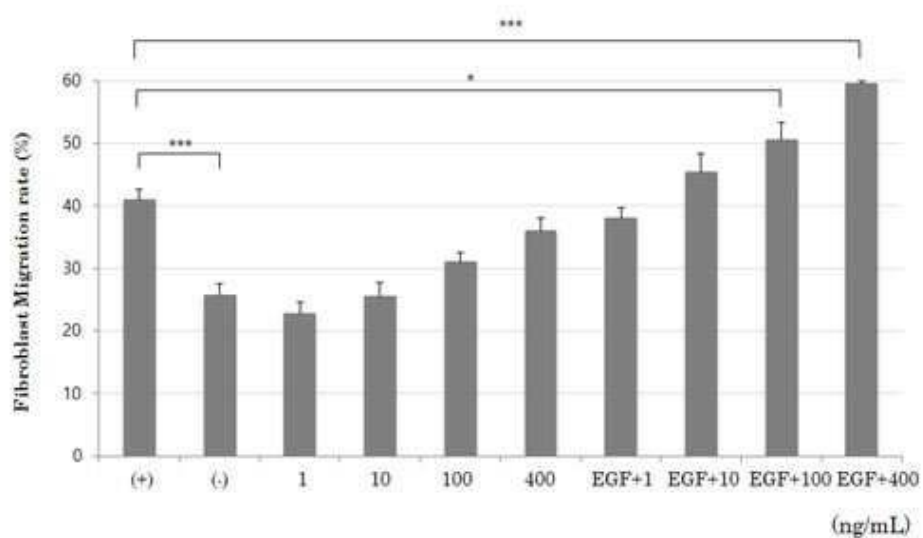
도면2



도면3



도면4



서열 목록

<110> Korea University Industrial & Academic Collaboration Foundation

<120> Therapeutic composition for skin regeneration and wound healing
using CLASP2

<130> P15U13C0794

<160> 2

<170> KopatentIn 2.0

<210> 1

<211> 431

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> CLASP2 partial sequence (MBS cat.1192601)

<400> 1

Met Arg Arg Leu Ile Cys Lys Arg Ile Cys Asp Tyr Lys Ser Phe Asp
1 5 10 15

Asp Glu Glu Ser Val Asp Gly Asn Arg Pro Ser Ser Ala Ala Ser Ala
20 25 30

Phe Lys Val Pro Ala Pro Lys Thr Ser Gly Asn Pro Ala Asn Ser Ala
35 40 45

Arg Lys Pro Gly Ser Ala Gly Gly Pro Lys Val Gly Gly Ala Ser Lys
50 55 60

Glu Gly Gly Ala Gly Ala Val Asp Glu Asp Asp Phe Ile Lys Ala Phe
65 70 75 80

Thr Asp Val Pro Ser Ile Gln Ile Tyr Ser Ser Arg Glu Leu Glu Glu
85 90 95

Thr Leu Asn Lys Ile Arg Glu Ile Leu Ser Asp Asp Lys His Asp Trp
100 105 110

Asp Gln Arg Ala Asn Ala Leu Lys Lys Ile Arg Ser Leu Leu Val Ala
115 120 125

Gly Ala Ala Gln Tyr Asp Cys Phe Phe Gln His Leu Arg Leu Leu Asp
130 135 140

Gly Ala Leu Lys Leu Ser Ala Lys Asp Leu Arg Ser Gln Val Val Arg
145 150 155 160

Glu Ala Cys Ile Thr Val Ala His Leu Ser Thr Val Leu Gly Asn Lys

165 170 175
 Phe Asp His Gly Ala Glu Ala Ile Val Pro Thr Leu Phe Asn Leu Val
 180 185 190
 Pro Asn Ser Ala Lys Val Met Ala Thr Ser Gly Cys Ala Ala Ile Arg
 195 200 205
 Phe Ile Ile Arg His Thr His Val Pro Arg Leu Ile Pro Leu Ile Thr
 210 215 220
 Ser Asn Cys Thr Ser Lys Ser Val Pro Val Arg Arg Arg Ser Phe Glu
 225 230 235 240

 Phe Leu Asp Leu Leu Leu Gln Glu Trp Gln Thr His Ser Leu Glu Arg
 245 250 255
 His Ala Ala Val Leu Val Glu Thr Ile Lys Lys Gly Ile His Asp Ala
 260 265 270
 Asp Ala Glu Ala Arg Val Glu Ala Arg Lys Thr Tyr Met Gly Leu Arg
 275 280 285
 Asn His Phe Pro Gly Glu Ala Glu Thr Leu Tyr Asn Ser Leu Glu Pro
 290 295 300
 Ser Tyr Gln Lys Ser Leu Gln Thr Tyr Leu Lys Ser Ser Gly Ser Val

 305 310 315 320
 Ala Ser Leu Pro Gln Ser Asp Arg Ser Ser Ser Ser Ser Gln Glu Ser
 325 330 335
 Leu Asn Arg Pro Phe Ser Ser Lys Trp Ser Thr Ala Asn Pro Ser Thr
 340 345 350
 Val Ala Gly Arg Val Ser Ala Gly Ser Ser Lys Ala Ser Ser Leu Pro
 355 360 365
 Gly Ser Leu Gln Arg Ser Arg Ser Asp Ile Asp Val Asn Ala Ala Ala
 370 375 380

 Gly Ala Lys Ala His His Ala Ala Gly Gln Ser Val Arg Arg Gly Arg
 385 390 395 400
 Leu Gly Ala Gly Ala Leu Asn Ala Gly Ser Tyr Ala Ser Leu Glu Cys
 405 410 415
 Glu Ala Phe Trp Arg Ser Gly Arg Thr Ala Lys Leu Tyr Ser Val

	420	425	430
<210>	2		
<211>	1294		
<212>	PRT		
<213>	Homo sapiens		
<400>	2		
Met Ala Met Gly Asp Asp Lys Ser Phe Asp Asp Glu Glu Ser Val Asp			

1	5					10					15					
Gly	Asn	Arg	Pro	Ser	Ser	Ala	Ala	Ser	Ala	Phe	Lys	Val	Pro	Ala	Pro	
20					25					30						
Lys	Thr	Ser	Gly	Asn	Pro	Ala	Asn	Ser	Ala	Arg	Lys	Pro	Gly	Ser	Ala	
35					40					45						
Gly	Gly	Pro	Lys	Val	Gly	Gly	Ala	Ser	Lys	Glu	Gly	Gly	Ala	Gly	Ala	
50					55					60						
Val	Asp	Glu	Asp	Asp	Phe	Ile	Lys	Ala	Phe	Thr	Asp	Val	Pro	Ser	Ile	
65					70					75					80	

Gln	Ile	Tyr	Ser	Ser	Arg	Glu	Leu	Glu	Glu	Thr	Leu	Asn	Lys	Ile	Arg
				85					90					95	
Glu	Ile	Leu	Ser	Asp	Asp	Lys	His	Asp	Trp	Asp	Gln	Arg	Ala	Asn	Ala
			100					105					110		
Leu	Lys	Lys	Ile	Arg	Ser	Leu	Leu	Val	Ala	Gly	Ala	Ala	Gln	Tyr	Asp
			115					120					125		
Cys	Phe	Phe	Gln	His	Leu	Arg	Leu	Leu	Asp	Gly	Ala	Leu	Lys	Leu	Ser
	130						135					140			
Ala	Lys	Asp	Leu	Arg	Ser	Gln	Val	Val	Arg	Glu	Ala	Cys	Ile	Thr	Val

145						150						155						160
Ala	His	Leu	Ser	Thr	Val	Leu	Gly	Asn	Lys	Phe	Asp	His	Gly	Ala	Glu			
					165						170						175	
Ala	Ile	Val	Pro	Thr	Leu	Phe	Asn	Leu	Val	Pro	Asn	Ser	Ala	Lys	Val			
					180						185						190	
Met	Ala	Thr	Ser	Gly	Cys	Ala	Ala	Ile	Arg	Phe	Ile	Ile	Arg	His	Thr			
					195						200						205	

His Val Pro Arg Leu Ile Pro Leu Ile Thr Ser Asn Cys Thr Ser Lys
210 215 220

Ser Val Pro Val Arg Arg Arg Ser Phe Glu Phe Leu Asp Leu Leu Leu
225 230 235 240

Gln Glu Trp Gln Thr His Ser Leu Glu Arg His Ala Ala Val Leu Val
245 250 255

Glu Thr Ile Lys Lys Gly Ile His Asp Ala Asp Ala Glu Ala Arg Val
260 265 270

Glu Ala Arg Lys Thr Tyr Met Gly Leu Arg Asn His Phe Pro Gly Glu
275 280 285

Ala Glu Thr Leu Tyr Asn Ser Leu Glu Pro Ser Tyr Gln Lys Ser Leu
290 295 300

Gln Thr Tyr Leu Lys Ser Ser Gly Ser Val Ala Ser Leu Pro Gln Ser
305 310 315 320

Asp Arg Ser Ser Ser Ser Ser Gln Glu Ser Leu Asn Arg Pro Phe Ser
325 330 335

Ser Lys Trp Ser Thr Ala Asn Pro Ser Thr Val Ala Gly Arg Val Ser
340 345 350

Ala Gly Ser Ser Lys Ala Ser Ser Leu Pro Gly Ser Leu Gln Arg Ser
355 360 365

Arg Ser Asp Ile Asp Val Asn Ala Ala Ala Gly Ala Lys Ala His His
370 375 380

Ala Ala Gly Gln Ser Val Arg Arg Gly Arg Leu Gly Ala Gly Ala Leu
385 390 395 400

Asn Ala Gly Ser Tyr Ala Ser Leu Glu Asp Thr Ser Asp Lys Leu Asp
405 410 415

Gly Thr Ala Ser Glu Asp Gly Arg Val Arg Ala Lys Leu Ser Ala Pro
420 425 430

Leu Ala Gly Met Gly Asn Ala Lys Ala Asp Ser Arg Gly Arg Ser Arg
435 440 445

Thr Lys Met Val Ser Gln Ser Gln Pro Gly Ser Arg Ser Gly Ser Pro

450 455 460
 Gly Arg Val Leu Thr Thr Thr Ala Leu Ser Thr Val Ser Ser Gly Val
 465 470 475 480
 Gln Arg Val Leu Val Asn Ser Ala Ser Ala Gln Lys Arg Ser Lys Ile
 485 490 495
 Pro Arg Ser Gln Gly Cys Ser Arg Glu Ala Ser Pro Ser Arg Leu Ser
 500 505 510

 Val Ala Arg Ser Ser Arg Ile Pro Arg Pro Ser Val Ser Gln Gly Cys
 515 520 525
 Ser Arg Glu Ala Ser Arg Glu Ser Ser Arg Asp Thr Ser Pro Val Arg
 530 535 540
 Ser Phe Gln Pro Leu Ala Ser Arg His His Ser Arg Ser Thr Gly Ala
 545 550 555 560
 Leu Tyr Ala Pro Glu Val Tyr Gly Ala Ser Gly Pro Gly Tyr Gly Ile
 565 570 575
 Ser Gln Ser Ser Arg Leu Ser Ser Ser Val Ser Ala Met Arg Val Leu

 580 585 590
 Asn Thr Gly Ser Asp Val Glu Glu Ala Val Ala Asp Ala Leu Lys Lys
 595 600 605
 Pro Ala Arg Arg Arg Tyr Glu Ser Tyr Gly Met His Ser Asp Asp Asp
 610 615 620
 Ala Asn Ser Asp Ala Ser Ser Ala Cys Ser Glu Arg Ser Tyr Ser Ser
 625 630 635 640
 Arg Asn Gly Ser Ile Pro Thr Tyr Met Arg Gln Thr Glu Asp Val Ala
 645 650 655

 Glu Val Leu Asn Arg Cys Ala Ser Ser Asn Trp Ser Glu Arg Lys Glu
 660 665 670
 Gly Leu Leu Gly Leu Gln Asn Leu Leu Lys Asn Gln Arg Thr Leu Ser
 675 680 685
 Arg Val Glu Leu Lys Arg Leu Cys Glu Ile Phe Thr Arg Met Phe Ala
 690 695 700
 Asp Pro His Gly Lys Arg Val Phe Ser Met Phe Leu Glu Thr Leu Val

705 710 715 720
 Asp Phe Ile Gln Val His Lys Asp Asp Leu Gln Asp Trp Leu Phe Val

 725 730 735
 Leu Leu Thr Gln Leu Leu Lys Lys Met Gly Ala Asp Leu Leu Gly Ser
 740 745 750
 Val Gln Ala Lys Val Gln Lys Ala Leu Asp Val Thr Arg Glu Ser Phe
 755 760 765
 Pro Asn Asp Leu Gln Phe Asn Ile Leu Met Arg Phe Thr Val Asp Gln
 770 775 780
 Thr Gln Thr Pro Ser Leu Lys Val Lys Val Ala Ile Leu Lys Tyr Ile
 785 790 795 800

 Glu Thr Leu Ala Lys Gln Met Asp Pro Gly Asp Phe Ile Asn Ser Ser
 805 810 815
 Glu Thr Arg Leu Ala Val Ser Arg Val Ile Thr Trp Thr Thr Glu Pro
 820 825 830
 Lys Ser Ser Asp Val Arg Lys Ala Ala Gln Ser Val Leu Ile Ser Leu
 835 840 845
 Phe Glu Leu Asn Thr Pro Glu Phe Thr Met Leu Leu Gly Ala Leu Pro
 850 855 860
 Lys Thr Phe Gln Asp Gly Ala Thr Lys Leu Leu His Asn His Leu Arg

 865 870 875 880
 Asn Thr Gly Asn Gly Thr Gln Ser Ser Met Gly Ser Pro Leu Thr Arg
 885 890 895
 Pro Thr Pro Arg Ser Pro Ala Asn Trp Ser Ser Pro Leu Thr Ser Pro
 900 905 910
 Thr Asn Thr Ser Gln Asn Thr Leu Ser Pro Ser Ala Phe Asp Tyr Asp
 915 920 925
 Thr Glu Asn Met Asn Ser Glu Asp Ile Tyr Ser Ser Leu Arg Gly Val
 930 935 940

 Thr Glu Ala Ile Gln Asn Phe Ser Phe Arg Ser Gln Glu Asp Met Asn
 945 950 955 960

Glu Pro Leu Lys Arg Asp Ser Lys Lys Asp Asp Gly Asp Ser Met Cys
 965 970 975
 Gly Gly Pro Gly Met Ser Asp Pro Arg Ala Gly Gly Asp Ala Thr Asp
 980 985 990
 Ser Ser Gln Thr Ala Leu Asp Asn Lys Ala Ser Leu Leu His Ser Met
 995 1000 1005
 Pro Thr His Ser Ser Pro Arg Ser Arg Asp Tyr Asn Pro Tyr Asn Tyr
 1010 1015 1020
 Ser Asp Ser Ile Ser Pro Phe Asn Lys Ser Ala Leu Lys Glu Ala Met
 1025 1030 1035 1040
 Phe Asp Asp Asp Ala Asp Gln Phe Pro Asp Asp Leu Ser Leu Asp His
 1045 1050 1055
 Ser Asp Leu Val Ala Glu Leu Leu Lys Glu Leu Ser Asn His Asn Glu
 1060 1065 1070
 Arg Val Glu Glu Arg Lys Ile Ala Leu Tyr Glu Leu Met Lys Leu Thr
 1075 1080 1085
 Gln Glu Glu Ser Phe Ser Val Trp Asp Glu His Phe Lys Thr Ile Leu
 1090 1095 1100
 Leu Leu Leu Leu Glu Thr Leu Gly Asp Lys Glu Pro Thr Ile Arg Ala
 1105 1110 1115 1120
 Leu Ala Leu Lys Val Leu Arg Glu Ile Leu Arg His Gln Pro Ala Arg
 1125 1130 1135
 Phe Lys Asn Tyr Ala Glu Leu Thr Val Met Lys Thr Leu Glu Ala His
 1140 1145 1150
 Lys Asp Pro His Lys Glu Val Val Arg Ser Ala Glu Glu Ala Ala Ser
 1155 1160 1165
 Val Leu Ala Thr Ser Ile Ser Pro Glu Gln Cys Ile Lys Val Leu Cys
 1170 1175 1180
 Pro Ile Ile Gln Thr Ala Asp Tyr Pro Ile Asn Leu Ala Ala Ile Lys
 1185 1190 1195 1200
 Met Gln Thr Lys Val Ile Glu Arg Val Ser Lys Glu Thr Leu Asn Leu
 1205 1210 1215

Leu Leu Pro Glu Ile Met Pro Gly Leu Ile Gln Gly Tyr Asp Asn Ser

1220

1225

1230

Glu Ser Ser Val Arg Lys Ala Cys Val Phe Cys Leu Val Ala Val His

1235

1240

1245

Ala Val Ile Gly Asp Glu Leu Lys Pro His Leu Ser Gln Leu Thr Gly

1250

1255

1260

Ser Lys Met Lys Leu Leu Asn Leu Tyr Ile Lys Arg Ala Gln Thr Gly

1265

1270

1275

1280

Ser Gly Gly Ala Asp Pro Thr Thr Asp Val Ser Gly Gln Ser

1285

1290