

(12) 특허협력조약에 의하여 공개된 국제출원

(19) 세계지식재산권기구
국제사무국

(43) 국제공개일

2024년 10월 10일 (10.10.2024)



(10) 국제공개번호

WO 2024/210294 A1

(51) 국제특허분류:

C12N 15/81 (2006.01)

A61Q 19/08 (2006.01)

C07K 7/06 (2006.01)

A61K 38/00 (2006.01)

A61P 17/00 (2006.01)

C12R 1/84 (2006.01)

A61K 8/64 (2006.01)

(21) 국제출원번호:

PCT/KR2023/019297

(22) 국제출원일:

2023년 11월 28일 (28.11.2023)

(25) 출원언어:

한국어

(26) 공개언어:

한국어

(30) 우선권정보:

10-2023-0044543 2023년 4월 5일 (05.04.2023) KR

(71) 출원인: 주식회사 비제이와이 (BJY INC.) [KR/KR]; 31035 충청남도 천안시 서북구 직산읍 직산로 136, 2201호, Chungcheongnam-do (KR). 한국생산기술연구원 (KOREA INSTITUTE OF INDUSTRIAL TECHNOLOGY) [KR/KR]; 31056

충청남도 천안시 서북구 입장면 양대기로길 89, Chungcheongnam-do (KR).

(72) 발명자: 유병조 (YU, Byung Jo); 16582 경기도 수원시 권선구 권광로 55, 111동 803호, Gyeonggi-do (KR).

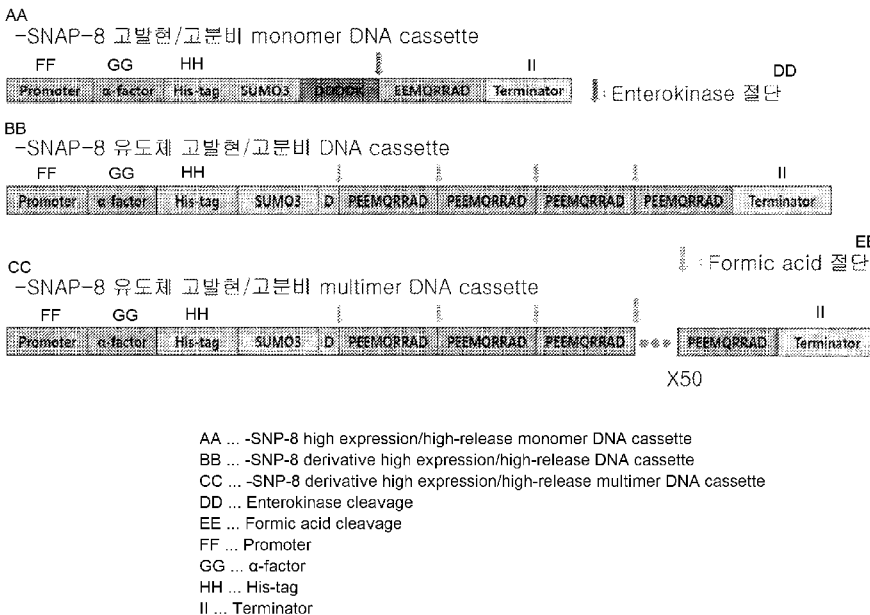
(74) 대리인: 김현재 (KIM, Hyun Jae); 10564 경기도 고양시 덕양구 권율대로 656, 8층 830호, Gyeonggi-do (KR).

(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, CV, CZ, DE, DJ, DK, DM, DO, DZ, EC, EE, EG, ES, FI, GB, GD, GE, GH, GM, GT, HN, HR, HU, ID, IL, IN, IQ, IR, IS, IT, JM, JO, JP, KE, KG, KH, KN, KP, KW, KZ, LA, LC, LK, LR, LS, LU, LY, MA, MD, MG, MK, MN, MU, 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, TN, TR, TT, TZ, UA, UG, US, VC, VN, WS, ZA, ZM, ZW.

(54) Title: YEAST FERMENTATION PRODUCTION OF PEPTIDE SNAP-8 DERIVATIVES FOR SKIN WRINKLE REDUCTION AND USE THEREOF

(54) 발명의 명칭: 피부 주름개선용 펩타이드 스냅-8(SNAP-8) 유도체의 효모 발효 생산 및 이의 이용

FIG 1



(57) Abstract: The present invention relates to the yeast fermentation production of peptide SNAP-8 derivatives for skin wrinkle reduction and a use thereof. By using the expression cassette for producing SNAP-8 derivatives, expression vector and transformants containing same according to the present invention, high-purity SNAP-8 derivatives can be produced in large quantities at low cost. Furthermore, the SNAP-8 derivatives produced according to the present invention have excellent anti-wrinkle effects and thus can be widely applied as cosmetic materials, quasi-drugs, and pharmaceuticals for relevant uses across the industry.

[다음 쪽 계속]

WO 2024/210294 A1

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

규칙 4.17에 의한 선언서:

- 발명자의 신원에 관한 선언 (규칙 4.17(i))
- 발명자 선언 (규칙 4.17(iv))

공개:

- 국제조사보고서와 함께 (조약 제21조(3))
- 명세서의 서열목록 부분과 함께 (규칙 5.2(a))

(57) 요약서: 본 발명은 피부 주름개선용 펩타이드 스냅-8(Snap-8) 유도체의 효모 발효 생산 및 이의 이용에 관한 것으로, 본 발명의 SNAP-8 유도체 제조용 발현 카세트, 발현 벡터 및 이를 포함하는 형질전환체를 이용하면, 적은 비용으로 고순도의 SNAP-8 유도체를 대량으로 제조할 수 있다. 또한, 본 발명에 따라 제조된 SNAP-8 유도체는 항-주름 효과가 뛰어나므로, 관련 용도의 화장품 소재, 의약품 및 의약품 등 산업 전반에 널리 이용될 수 있다.

명세서

발명의 명칭: 피부 주름개선용 펩타이드 스

냅-8(SNAP-8) 유도체의 효모 발효 생산 및 이의 이용

기술분야

- [1] 본 발명은 피부 주름개선용 펩타이드 스냅-8(Snap-8) 유도체의 효모 발효 생산 및 이의 이용에 관한 것이다.

배경기술

- [2] 피부는 전신을 둘러싸며 크게 표피, 진피, 피하지방의 3층 구조로 이루어져 있다. 이 중 최외곽에 위치한 표피에는 각질층(stratum corneum)이 존재함으로써 외부의 여러 자극원으로부터 인체를 보호하는 피부장벽의 역할을 한다. 각질층 및 피부의 층 구조는 외부의 스트레스나 해로운 자극으로부터 인체를 효과적으로 보호할 수 있게 하지만 화장품의 유효성분 또한 쉽게 흡수되지 못할 수 있다.
- [3] 본 기술분야에서 미백, 주름, 항산화, 항노화 등의 기능성 화장품의 신소재 개발과 더불어 실제로 피부에 적용 시 경피 흡수율을 높이는 것이 중요한 과제이다. 피부라는 매우 뛰어난 장벽에 의해 유효성분이 원활히 흡수되지 못하기 때문에 아무리 뛰어난 효능을 가진 성분이라고 할지라도 피부에 적용 시 그 효과를 발휘하지 못할 수 있다.
- [4] 한편, SNARE(Soluble Nethylmaleimide-sensitive factor Attachment Protein Receptor; SNAP Receptor) 펩타이드는 모든 종에 존재하는 특정 단백질 군을 말하며, 주된 역할은 소포 융합(vesicle fusion) 매개이다. 즉 SNARE는 신경세포에서 시냅스 소포(synaptic vesicle)와 시냅스 전 막(presynaptic membrane)의 결합에 관여한다.
- [5] 신경전달물질을 함유하는 신경말단에 위치하는 시냅스 소포와 시냅스 전 막의 막융합에 의해 신경전달물질 배출 통로가 열리게 되는데, 표적 막(target membrane)에 부착되어 있는 신타신(Syntaxin) 1a protein과 SNAP-25 protein의 complex인 t-SNARE complex와 소포에 부착되어 있는 v-SNARE가 관여하게 되고, 이들 SNARE 펩타이드는 파매기처럼 꼬여 있게 된다.
- [6] 생체막들은 서로 강하게 밀어내므로 이들 막은 자발적으로 융합되지 않고 외부에서 강한 힘이 주어져 막들 간의 반발력을 극복하여야 하는데, 이러한 힘을 제공하는 것이 SNARE 펩타이드인 것으로 알려져 있다. 이와 같이 SNARE complex의 형성은 신경전달물질의 배출을 포함하는 세포 외 배출작용(exocytosis)의 주요 현상이다.
- [7] SNARE complex의 배출작용은 피부의 주름에도 밀접한 연관성을 갖고 있다. 예로 피부 주름 개선용으로 사용중인 보톡스는 신경전달 물질 배출에 관여하는 SNARE 펩타이드를 절단하는 프로테아제로서, SNARE 펩타이드를 절단함으로써

써 신경전달을 차단하고 결과적으로 보톡스가 침투된 근육세포를 마비시킴으로써 피부 주름개선에 영향을 준다.

발명의 상세한 설명

기술적 과제

- [8] 본 발명자들은 경제적 생산이 가능한 항-주름 효과를 가진 펩타이드를 개발하고자 예의 연구 노력하였다. 그 결과 본 발명의 효모 발효 생산 펩타이드(SNAP-8 유도체)가 경제적 생산이 가능할 뿐만 아니라 항-주름 효과도 우수함을 규명함으로써 본 발명을 완성하게 되었다.
- [9] 본 발명이 해결하고자 하는 과제는 SNAP-8 유도체 제조용 발현 카세트를 제공하는 것이다.
- [10] 본 발명이 해결하고자 하는 다른 과제는 SNAP-8 유도체 제조용 발현 벡터를 제공하는 것이다.
- [11] 본 발명이 해결하고자 하는 또 다른 과제는 SNAP-8 유도체 제조용 발현 벡터를 포함하는 형질전환체를 제공하는 것이다.
- [12] 본 발명이 해결하고자 하는 또 다른 과제는 SNAP-8 유도체의 제조방법을 제공하는 것이다.
- [13] 본 발명이 해결하고자 하는 또 다른 과제는 SNAP-8 유도체를 포함하는 피부주름 예방 또는 치료용 약학적 조성물을 제공하는 것이다.
- [14] 본 발명이 해결하고자 하는 또 다른 과제는 SNAP-8 유도체를 포함하는 피부주름 방지 또는 개선용 화장품 조성물을 제공하는 것이다.
- [15] 본 발명이 해결하고자 하는 또 다른 과제는 SNAP-8 유도체를 포함하는 피부주름 방지 또는 개선용 의약품 조성물을 제공하는 것이다.
- [16] 본 발명의 과제들은 이상에서 언급한 기술적 과제로 제한되지 않으며, 언급되지 않은 또 다른 기술적 과제들은 아래의 기재로부터 당업자에게 명확하게 이해될 수 있을 것이다.

과제 해결 수단

- [17] 본 발명자들은 경제적 생산이 가능한 항-주름 효과를 가진 펩타이드를 개발하고자 예의 연구 노력하였다. 그 결과, 본 발명의 효모 발효 생산 펩타이드(SNAP-8 유도체)가 경제적 생산이 가능할 뿐만 아니라 항-주름 효과도 우수함을 규명하였다.
- [18] 본 발명은 SNAP-8 유도체 제조용 발현 카세트, SNAP-8 유도체 제조용 발현 벡터, SNAP-8 유도체 제조용 발현 벡터를 포함하는 형질전환체, 이를 이용한 SNAP-8 유도체의 제조방법, SNAP-8 유도체를 포함하는 피부주름 예방 또는 치료용 약학적 조성물, SNAP-8 유도체를 포함하는 피부주름 방지 또는 개선용 화장품 조성물 및 SNAP-8 유도체를 포함하는 피부주름 방지 또는 개선용 의약품 조성물에 관한 것이다.
- [19] 이하, 본 발명을 더욱 자세히 설명하고자 한다.

[20]

[21] 본 발명의 일 양태는 SNAP-8(Acetyl octapeptide-3) 유도체를 코딩하는, 서열번호 1로 표시되는 폴리뉴클레오티드 서열을 포함하고, 상기 폴리뉴클레오티드 서열이 효모에서 발현될 수 있는 프로모터 서열 및 Fusion partner SUMO3 서열과 작동가능하게 연결되어 있는, SNAP-8 유도체 제조용 발현 카세트에 관한 것이다.

[22] 본 발명에서 용어 "Acetyl octapeptide-3(SNAP-8)"는 항 주름 효능을 가진 펩타이드 화장품 원료로, 화학적 합성으로 생산되어 단가가 높고 여러 화학물질이 함유될 수 있는 단점이 있다. 이에, 본 발명자는 이를 보완하기 위하여 Gene work을 통해 SNAP-8(짧은 핵산 서열, EEMQRRAD)를 생산하는 균주를 제조하였으며, 효모 발효를 통해 SNAP-8를 생산한 바 있다.

[23] 본 발명에서 용어 "SNAP-8 유도체"는 기존 SNAP-8 서열 앞에 P가 추가로 붙어 있는 펩타이드로, 분리, 정제 과정에서 포름산(formic acid)를 활용한 절단(cleavage) 방법을 사용하여 멀티머(multimer)로 발효 생산한 펩타이드를 모노머(monomer)로 전환할 수 있는 바, 경제적인 생산이 가능하다.

[24] 본 발명의 용어, "SNAP-8 유도체 제조용 발현 카세트"는 SNAP-8 유도체를 발현할 수 있는 발현구조체를 의미한다.

[25] 본 발명에서 상기 발현 카세트는 상기 SNAP-8 유도체를 코딩하는 폴리뉴클레오티드 서열을 포함할 수 있으며, 구체적으로 상기 발현 카세트가 포함하는 SNAP-8 유도체를 코딩하는 폴리뉴클레오티드 서열은 서열번호 1로 표시되는 염기서열(PEEMQRRAD)로 이루어진 것일 수 있으나, 이에 제한되는 것은 아니다.

[26] 본 발명에서 이용되는 염기서열은, 생물학적으로 균등 활성을 갖는 변이를 고려한다면, 서열목록에 기재된 서열과 실질적인 동일성(substantial identity)을 나타내는 서열도 포함하는 것으로 해석된다. 상기 용어, '실질적인 동일성'은 본 발명의 서열과 임의의 다른 서열을 최대한 대응되도록 얼라인(align)하고, 당업계에서 통상적으로 이용되는 알고리즘을 이용하여 얼라인된 서열을 분석한 경우에, 최소 60%의 상동성, 더욱 구체적으로 70%의 상동성, 더더욱 구체적으로 80%의 상동성, 가장 구체적으로 90%의 상동성을 나타내는 서열을 의미한다.

[27] 따라서 상기 서열번호 1로 표시되는 염기서열과 높은 상동성을 갖는 염기서열, 예를 들면 그 상동성이 70% 이상, 구체적으로 80% 이상, 더욱 구체적으로 90% 이상의 높은 상동성을 갖는 염기서열도 본 발명의 범위에 포함되는 것으로 해석되어야 한다.

[28] 본 발명의 일 구현예에 따르면, 상기 SNAP-8 유도체 제조용 발현 카세트는 상기 서열번호 1로 표시되는 폴리뉴클레오티드 서열이 복수 회 반복하여 포함되는 것일 수 있다.

[29] 또한, 상기 SNAP-8 유도체 제조용 발현 카세트는 상기 서열번호 1로 표시되는 폴리뉴클레오티드 서열이, 효모에서 발현될 수 있는 프로모터 서열 및 고발현/고분비 신호 서열과 작동가능하게 연결된 것일 수 있다.

- [30] 구체적인 예로, 상기 프로모터는 AOX1, TEF, GAP 또는 이들의 조합일 수 있으나, 효모에서 발현하기에 적절한 프로모터라면 특별히 이에 제한되지 않는다. 상기 예시된 프로모터의 서열은 당업계에 알려진 서열을 사용할 수 있다.
- [31] 다른 구체적인 예로, 상기 고발현/고분비 신호 서열은 Fusion partner SUMO3일 수 있으나, 효율을 증대시킬 수 있으면 특별히 이에 제한되지 않는다. 상기 예시된 고발현/고분비 신호 서열은 당업계에 알려진 서열을 사용할 수 있다.
- [32] 본 발명에서 용어, "작동가능하게 연결된(operably linked)"은 일반적 기능을 수행하도록 핵산 발현조절 서열과 목적하는 단백질 또는 펩타이드를 코딩하는 핵산 서열이 기능적으로 연결(functional linkage)되어 있는 상태를 의미한다. 예로, 프로모터와 단백질 또는 펩타이드를 코딩하는 핵산 서열이 작동가능하게 연결되어 코딩 서열의 발현에 영향을 미칠 수 있다. 발현 벡터와의 작동적 연결은 당해 기술분야에서 잘 알려진 유전자 재조합 기술을 이용하여 제조할 수 있으며, 부위 특이적 DNA 절단 및 연결은 당해 기술분야에서 일반적으로 알려진 효소 등을 사용할 수 있다.
- [33] 또한, 상기 SNAP-8 유도체 제조용 발현 카세트는 발현된 멀티머(multimer) SNAP-8 유도체의 정제를 용이하게 하기 위하여, 상기 발현 카세트 내의 상기 폴리뉴클레오티드 서열의 업스트림 또는 다운스트림에 His을 코딩하는 폴리뉴클레오티드를 추가로 포함할 수 있다.
- [34] 또한, 상기 SNAP-8 유도체 제조용 발현 카세트는 프로모터, 고발현/고분비 신호 서열, SNAP-8 유도체를 코딩하는 서열 및 His 등의 서열 외에도 전사증강인자, 종결인자, 개시인자 및 다른 유전적 조절 인자들과 같은 SNAP-8 유도체의 발현을 조절하는 구성요소들을 더 포함할 수 있다.
- [35] 본 발명의 일 실시예에서는, TEF 프로모터 서열(서열번호 2), α -factor 서열(서열번호 3), His-tag 서열, SUMO3 서열(서열번호 4), D 서열, SNAP-8 유도체를 코딩하는 폴리뉴클레오티드 서열(서열번호 1), 및 CYC1 터미네이터 서열(서열번호 5)이 순차적으로 삽입된 SNAP-8 유도체 제조용 발현 카세트를 제작하였다(도 1 참조).
- [36]
- [37] 본 발명의 다른 일 양태는 상술한 SNAP-8 유도체 제조용 발현 카세트를 포함하는, SNAP-8 유도체 제조용 발현 벡터에 관한 것이다.
- [38] 본 발명의 용어, "발현 벡터"는 숙주세포에 DNA를 도입하여 목적 유전자의 발현을 효율적으로 유도하기 위한 수단으로서, 구체적으로 목적 펩타이드인 SNAP-8 유도체가 발현되도록 작동가능하게 연결된 필수적인 조절 요소를 포함하는 유전자 작제물을 의미할 수 있다.
- [39] 상기 발현 벡터의 구체적인 예로, 플라스미드 벡터, 코스미드 벡터, 박테리오파지 벡터 또는 바이러스 벡터 등을 들 수 있다. 더욱 구체적인 예로, 대장균 유래 플라스미드(pBR322, pBR325, pUC118, pUC119, pET30a, pET30c 또는 pGEX-GST), 바실러스 서브틸러스 유래 플라스미드(pUB110 또는 pTP5), 효모 유래 플

라스미드(YEp13, YEp24, YCp50, pPINK α -HC, pPink-HC 또는 pPink-LC) 또는 Ti 플라스미드 등을 사용할 수 있고, 레트로바이러스, 아테노바이러스 또는 백시니아 바이러스와 같은 동물 바이러스, 배쿨로바이러스와 같은 곤충 바이러스 또는 식물 바이러스가 사용될 수 있으며, pPZP, pGA 및 pCAMBIA 계열과 같은 바이러리 벡터를 사용할 수 있으나, 본 발명의 발현 카세트를 숙주세포 내로 도입할 수 있는 한 이에 제한되지 않는다.

[40] 또한, 상기 발현 벡터는 발현조절 서열과 기능적으로 연결될 수 있다. 구체적인 예로, 상기 벡터는 프로모터, 오퍼레이터, 개시코돈, 종결코돈, 폴리아데닐화 시그널, 인핸서 같은 발현 조절 요소 외에도 막 표적화 또는 분비를 위한 신호 서열 또는 리더 서열을 포함할 수 있으나, 이에 제한되는 것은 아니며, 발명의 목적에 따라 다양하게 제조될 수 있다. 또한, 선택성 마커를 포함할 수 있으며, 자가 복제하거나 숙주 DNA에 통합될 수 있다. 본 발명의 벡터는 당해 기술 분야에서 잘 알려진 유전자 재조합 기술을 이용하여 제조할 수 있으며, 부위-특이적 DNA 절단 및 연결은 당해 기술 분야에서 일반적으로 알려진 효소 등을 사용할 수 있다.

[41] 본 발명의 일 실시예에서는, 상기 SNAP-8 유도체 제조용 발현 카세트를 통상의 방법을 통해 발현 벡터 pPink α -HC vector에 삽입하여 SNAP-8 유도체 제조용 발현 벡터를 제작하였다(도 2a 및 2b 참조).

[42]

[43] 본 발명의 또 다른 일 양태는 상술한 SNAP-8 유도체 제조용 발현 벡터를 포함하는 형질전환체에 관한 것이다.

[44] 본 발명의 용어, "형질전환체"는 외래의 유전물질이 도입되어 유전형질이 변화된 생물체를 의미한다.

[45] 구체적인 예로, 상기 형질전환체는 피치아(*Pichia*), 에쉬리키아(*Escherichia*), 사카로마이세스(*Saccharomyces*), 자이고사카로마이세스(*Zygosaccharomyces*), 클루베로마이세스(*Kluyveromyces*), 칸디다(*Candida*), 스킨조사카로마이세스(*Schizosaccharomyces*), 이자켄키아(*Issachenkia*), 야로이아(*Yarrowia*) 또는 한세놀라(*Hansenula*) 속 균주일 수 있으나, 상기 SNAP-8 유도체를 발현할 수 있으면 특별히 이에 제한되지 않는다.

[46] 보다 구체적으로, 상기 형질전환체는 피치아 파스토리스(*Pichia pastoris*)일 수 있으나, 상기 SNAP-8 유도체를 발현할 수 있으면 특별히 이에 제한되지 않는다.

[47] 본 발명에서, 상기 피치아 파스토리스는 재조합 단백질 생산에 가장 널리 활용되는 효모 균주를 의미한다. 상기 효모 균주는 유전자 조작이 용이하며 다양한 발현시스템이 개발되어 있고 대량배양이 용이하다는 장점을 갖는다. 뿐만 아니라, 인체 단백질과 같은 고등세포 유래의 재조합 단백질을 생산할 때 단백질을 세포 밖으로 분비할 수 있는 분비기능, 및 당쇄 부가 등과 같은 단백질의 번역 후 수식(post-translational modification) 기능을 수행할 수 있는 장점을 제공한다. 재조합 단백질의 분비 생산은 단백질 분비 신호와 목표단백질을 인위적으로 융합(fusion)하여 세포 외 분비를 가능하게 한 것으로, 단백질의 분비과정을 통해서 단

백질의 폴딩(folding)이나 이황화 결합의 형성 및 당쇄 부가 과정이 진행됨에 따라, 생물학적으로 완전한 활성을 갖는 재조합 단백질을 생산할 수 있는 장점이 있다. 또한, 생물학적 활성을 갖는 단백질을 배지로부터 직접 얻을 수 있기 때문에 경제적으로 효율이 낮은 세포의 분쇄나 재접힘 단계를 필요로 하지 않아 매우 경제적이다.

- [48] 본 발명의 일 실시예에서는, 상기 SNAP-8 유도체 제조용 발현 벡터를 통상의 방법으로 *P. pastoris* 균주에 도입(형질주입)하여 형질전환체를 제작하였다(제조에 참조).
- [49]
- [50] 본 발명의 또 다른 일 양태는 상술한 SNAP-8 유도체 제조용 발현 벡터를 포함하는 형질전환체를 배양하는 단계; 및 배양된 형질전환체로부터 발현된 펩타이드를 분리 및 정제하는 단계를 포함하는, SNAP-8 유도체의 제조방법에 관한 것이다.
- [51] 상기 형질전환체를 배양하는 단계는 상기 형질전환체의 영양 요구성을 고려하여 수행될 수 있다.
- [52] 구체적인 예로, *P. pastoris*는 메틸 영양 요구성 효모 세포로서, 이의 배양을 위해서 완충된 복합 메탄올 배지(BMMY), 완충된 최소 메탄올 배지(BMM) 등을 이용할 수 있으나, 이에 제한되지 않으며, 발명의 목적에 맞게 당업자에 의해 적절히 선택될 수 있다.
- [53] 또한, 상기 형질전환체의 배양물로부터 SNAP-8 유도체의 회수는 당업계에 공지된 방법에 의해 수행될 수 있다. 구체적으로, 원심분리, 여과, 추출, 분무, 건조, 증발, 침전, 결정화, 전기영동, 분별용해(예를 들면 암모늄 설페이트 침전), 크로마토그래피(예를 들면 이온 교환, 친화성, 소수성 및 크기배제) 등의 방법을 사용할 수 있으나, 본 발명의 SNAP-8 유도체를 회수할 수 있는 한, 특별히 이에 제한되지 않는다.
- [54] 본 발명에서, 배양된 형질전환체로부터 발현된 SNAP-8 유도체를 분리 및 정제하는 단계는 상기 발현된 멀티머(multimer) SNAP-8 유도체를 모노머(monomer) SNAP-8 유도체로 절단(cleavage)하는 단계를 추가로 포함할 수 있다. 이때, 상기 배양된 형질전환체로부터 발현된 SNAP-8 유도체를 분리 및 정제하는 단계에는 포름산(Formic acid)을 이용할 수 있으나, 이에 제한되는 것은 아니며, 발명의 목적에 맞게 당업자에 의해 적절히 선택될 수 있다.
- [55] 본 발명의 일 실시예에서는, 상기 SNAP-8 유도체 제조용 발현 벡터를 포함하는 *P. pastoris* 형질전환체를 다양한 발효 조건에서 배양한 후, 이를 수집 및 용해하여 SNAP-8 유도체를 분리하였다. 또한, Formic acid를 이용하여 멀티머 SNAP-8 유도체를 모노머 SNAP-8 유도체로 절단 후 발효액에서 분리 및 정제하였으며, HPLC 분석을 통해 SNAP-8 유도체 발효 생산물을 확인하였다(제조에 참조).
- [56]

- [57] 본 발명의 또 다른 일 양태는 상술한 방법으로 제조된 SNAP-8 유도체를 포함하는 피부주름 예방 또는 치료용 약학적 조성물에 관한 것이다.
- [58] 본 발명의 약학적 조성물은 특정의 제형으로 반드시 한정되는 것이 아닌 모든 제형을 포함하며, 구체적인 제형의 예로는 경고제(plasters), 과립제(granules), 로션제(lotions), 리니먼트제(liniments), 리모나데제(lemonades), 방향수제(aromatic waters), 산제(powders), 시럽제(syrups), 액제(liquids and solutions), 에어로솔제(aerosols), 엑스제(extracts), 엘릭실제(elixirs), 연고제(ointments), 유동엑스제(fluidextracts), 유제(emulsions), 현탁제(suspensions), 전제(decoctions), 침제(infusions), 정제(tablets), 좌제(suppositories), 주사제(injections), 주정제(spirits), 카타플라스마제(cataplsma), 캡셀제(capsules), 크림제(creams), 트로키제(troches), 톤크제(tinctures), 파스타제(pastes), 환제(pills), 연질 또는 경질 젤라틴 캡셀 중 선택되는 어느 하나일 수 있다.
- [59] 또한, 본 발명의 약학적 조성물은 약제학적으로 허용 가능한 담체, 희석제 또는 부형제를 더 포함할 수 있다. 사용가능한 담체, 부형제 또는 희석제로는, 락토즈, 텍스트로즈, 수크로즈, 솔비톨, 만니톨, 자이리톨, 에리스리톨, 말티톨, 전분, 아카시아 고무, 알지네이트, 젤라틴, 칼슘 포스페이트, 칼슘 실리케이트, 셀룰로즈, 메틸 셀룰로즈, 미정질 셀룰로즈, 폴리비닐피롤리돈, 물, 메틸하이드록시벤조에이트, 프로필하이드록시벤조에이트, 탈크, 마그네슘 스테아레이트 및 광물유가 있으며, 이중 선택되는 하나 이상을 사용할 수 있다.
- [60] 한편, 본 발명의 약학적 조성물에 포함되는 본 발명 유효성분 펩타이드의 함량은, 사용방법, 복용자의 상태에 따라 바람직하게 조절하는 것이 좋다. 바람직하게는 약학 조성물에 건조 중량 기준으로 0.000001~50중량% 첨가될 수 있으나, 반드시 이적에 한정되는 것은 아니다. 그러나 그 함량이 0.000001중량% 미만일 경우 약리 효과가 미미할 수 있으며, 50중량%를 초과하는 경우에는 사용량 대비 약리 효과 상승률이 낮아 비경제적일 수 있다. 다만, 본 발명 약학적 조성물의 투여량은 투여방법, 복용자의 연령, 성별 및 체중 등을 고려하여 결정하는 것이 좋다. 일 예로, 본 발명의 조성물은 1일 0.000001 내지 1g/kg(체중)으로 1회 이상 투여가 가능하다. 그러나, 상기의 투여량은 예시하기 위한 일 예에 불과하며, 복용자의 상태에 의해 변화될 수 있다.
- [61]
- [62] 본 발명의 또 다른 일 양태는 상술한 방법으로 제조된 SNAP-8 유도체를 포함하는 피부주름 방지 또는 개선용 화장품 조성물에 관한 것이다.
- [63] 본 발명의 화장품 조성물은 특정의 형태(제형)에 국한되지 않고, 용액, 외용 연고, 크림, 폼, 영양 화장수, 유연 화장수, 팩, 유연수, 유액, 메이크업 베이스, 에센스, 비누, 액체 세정료, 입욕제, 선 스크린 크림, 선 오일, 현탁액, 유탁액, 페이스트, 젤, 로션, 파우더, 비누, 계면 활성제-함유 클렌징, 오일, 분말 파운데이션, 유탁액 파운데이션, 왁스 파운데이션, 패치 및 스프레이로 이루어진 군으로부터 선택되는 제형으로 제조할 수 있으나, 이에 제한되는 것은 아니다.

- [64] 상기 본 발명의 화장료 조성물은 일반 피부 화장료에 배합되는 화장품학적으로 허용 가능한 담체를 1종 이상 추가로 포함할 수 있으며, 통상의 성분으로 예를 들면 유분, 물, 계면 활성제, 보습제, 저급 알코올, 증점제, 킬레이트제, 색소, 방부제, 향료 등을 적절히 배합할 수 있으나, 이에 제한되는 것은 아니다.
- [65] 상기 본 발명의 화장료 조성물에 포함되는 화장품학적으로 허용 가능한 담체는 화장료 조성물의 제형에 따라 다양하다.
- [66] 본 발명의 제형이 연고, 페이스트, 크림 또는 젤인 경우에는, 담체 성분으로서 동물성 유, 식물성 유, 왁스, 파라핀, 전분, 트라칸트, 셀룰로오스 유도체, 폴리에틸렌 글리콜, 실리콘, 벤토나이트, 실리카, 탈크, 산화 아연 등이 이용될 수 있으나, 이에 제한되는 것은 아니다. 이들은 단독으로 사용되거나 2종 이상 혼합되어 사용될 수 있다.
- [67] 본 발명의 제형이 파우더 또는 스프레이인 경우에는, 담체 성분으로서 락토스, 탈크, 실리카, 알루미늄 히드록사이드, 칼슘 실케이트, 폴리아미드 파우더 등이 이용될 수 있고, 특히 스프레이인 경우에는 추가적으로 클로로플루오로하드로 카본, 프로판/부탄 또는 디메틸 에테르와 같은 추진제를 포함할 수 있으나, 이에 제한되는 것은 아니다. 이들은 단독으로 사용되거나 2종 이상 혼합되어 사용될 수 있다.
- [68] 본 발명의 제형이 용액 또는 유탁액인 경우에는, 담체 성분으로서 용매, 용해화제 또는 유탁화제 등이 이용될 수 있으며, 예컨대 물, 에탄올, 이소프로판올, 에틸 카보네이트, 에틸 아세테이트, 벤질 알코올, 벤질 벤조에이트, 프로필렌 글리콜, 1,3-부틸글리콜 오일 등이 이용될 수 있고, 특히, 목화씨 오일, 땅콩 오일, 옥수수 배종 오일, 올리브 오일, 피마자 오일 및 참깨 오일, 글리세롤 지방족 에스테르, 폴리에틸렌 글리콜 또는 소르비탄의 지방산 에스테르가 이용될 수 있으나, 이에 제한되는 것은 아니다. 이들은 단독으로 사용되거나 2종 이상 혼합되어 사용될 수 있다.
- [69] 본 발명의 제형이 현탁액인 경우에는, 담체 성분으로서 물, 에탄올 또는 프로필렌 글리콜과 같은 액상의 희석제, 에톡실화 이소스테아릴 알코올, 폴리옥시에틸렌 소르비톨 에스테르 및 폴리옥시에틸렌 소르비탄 에스테르와 같은 현탁제, 미소결정성 셀룰로오스, 알루미늄 메타하이드록시드, 벤토나이트, 아가 또는 트라칸트 등이 이용될 수 있으나, 이에 제한되는 것은 아니다. 이들은 단독으로 사용되거나 2종 이상 혼합되어 사용될 수 있다.
- [70] 본 발명의 제형이 비누인 경우에는, 담체 성분으로서 지방산의 알칼리 금속 염, 지방산 헤미에스테르 염, 지방산 단백질 히드롤리제이트, 이세티오네이트, 라놀린 유도체, 지방족 알코올, 식물성 유, 글리세롤, 당 등이 이용될 수 있으나, 이에 제한되는 것은 아니다. 이들은 단독으로 사용되거나 2종 이상 혼합되어 사용될 수 있다.
- [71] 본 발명의 제형이 계면-활성제 함유 클렌징인 경우에는, 담체 성분으로서 지방족 알코올 설페이트, 지방족 알코올 에테르 설페이트, 설포숙신산 모노에스테르,

이세티오네이트, 이미다졸리늄 유도체, 메틸타우레이트, 사르코시테이트, 지방산 아마이드 에테르 설페이트, 알킬아미도베타인, 지방족 알코올, 지방산 글리세리드, 지방산 디에탄올아미드, 식물성 오일, 라놀린 유도체 또는 에톡실화 글리세롤 지방산 에스테르 등이 이용될 수 있으나, 이에 제한되는 것은 아니다. 이들은 단독으로 사용되거나 2종 이상 혼합되어 사용될 수 있다.

[72] 또한, 본 발명의 화장료 조성물은 화장 분야에서 통상적인 보조제 예컨대 친수성 또는 친유성 겔화제, 친수성 또는 친유성 활성제, 보존제, 향산화제, 용매, 방향제, 충전제, 차단제, 안료, 흡취제 및 염료를 함유할 수 있다.

[73]

[74] 본 발명의 또 다른 일 양태는 상술한 방법으로 제조된 SNAP-8 유도체를 포함하는 피부주름 방지 또는 개선용 의약외품 조성물에 관한 것이다.

[75] 본 발명의 의약외품 조성물은 바디 클렌저, 비누, 및 핸드워시로 이루어진 군에서 선택되는 제형으로 제조할 수 있으나, 이에 제한되는 것은 아니다.

[76]

[77] 한편, 본 명세서에서 사용하는 용어 '펩타이드' 및 '단백질'은 서로 동일한 의미로 정의하며, 필요에 의해 혼용해서 사용하기로 한다.

발명의 효과

[78] 본 발명은 피부 주름개선용 펩타이드 스냅-8(Snap-8) 유도체의 효모 발효 생산 및 이의 이용에 관한 것으로, 본 발명의 SNAP-8 유도체 제조용 발현 카세트, 발현 벡터 및 이를 포함하는 형질전환체를 이용하면, 적은 비용으로 고순도의 SNAP-8 유도체를 대량으로 제조할 수 있다. 또한, 본 발명에 따라 제조된 SNAP-8 유도체는 항-주름 효과가 뛰어나므로, 관련 용도의 화장품 소재, 의약외품 및 의약품 등 산업 전반에 널리 이용될 수 있다.

[79] 본 발명의 실시예들에 따른 효과는 이상에서 예시된 내용에 의해 제한되지 않으며, 더욱 다양한 효과들이 본 명세서 내에 포함되어 있다.

도면의 간단한 설명

[80] 도 1는 본 발명의 일 실시예에 따라 제조된 DNA cassette 모식도이다.

[81] 도 2a 및 도 2b는 본 발명의 일 실시예에 따라 제조된 벡터맵으로, 도 2a는 10 mer, 도 2b는 50 mer 벡터맵이다.

[82] 도 3은 본 발명의 일 실시예에 따라 SNAP-8 유도체의 D-P cleavage 결과를 확인한 도이다.

[83] 도 4는 본 발명의 일 실시예에 따라 SNAP-8 유도체의 D-P cleavage 후 동결건조 전/후의 포름산 제거 결과를 확인한 도이다.

[84] 도 5는 본 발명의 일 실시예에 따라 SNAP-8 유도체의 주름 개선 효과(membrane fusion assay)를 확인한 도이다.

[85]

발명의 실시를 위한 형태

[86] 이하, 실시예를 통하여 본 발명을 더욱 상세히 설명하고자 한다. 이들 실시예는 오로지 본 발명을 보다 구체적으로 설명하기 위한 것으로, 본 발명의 요지에 따라 본 발명의 범위가 이들 실시예에 의해 제한되지 않는다는 것은 당업계에서 통상의 지식을 가진 자에 있어서 자명할 것이다.

[87]

[88] 제조예. SNAP-8 유도체(PEEMQRRAD, 서열번호 1) 펩타이드의 제조

[89] 1) 균주, DNA 카세트, 벡터

[90] 생산용 균주로 안전성을 인정받은 효모 균주(*Pichia pastoris*)를 사용하였다.

Gene work을 통하여 포름산 절단이 가능한 멀티머인 SNAP-8 유도체를 생산하는 DNA 카세트를 제조하고(도 1 및 하기 표 1 참조), 이를 포함하는 벡터(10 mer, 50 mer)(도 2a 및 2b 참조)를 *P. pastoris* 균주에 도입(형질주입)하여 형질전환체를 제작하였다. 이때, Fusion partner SUMO3를 삽입하여 안정적인 발현을 유도하였다.

[91] [표1]

Cassette 서열

	서열
TEF Promoter	ATAACTGTCGCCTCTTTTATCTGCCGCACTGCATGA GGTGTCCCCTTAGTGGGAAAGAGTACTGAGCCAAC CCTGGAGGACAGCAAGGGAAAAATACCTACAACCT GCTTCATAATGGTCGTAAAAACAATCCTTGTCGGAT ATAAGTGTTGTAGACTGTCCCTTATCCTCTGCGATG TTCTTCCTCTCAAAGTTTGCGATTTCTCTCTATCAGA ATTGCCATCAAGAGACTCAGGACTAATTTTCGCAGT CCCACACGCACTCGTACATGATTGGCTGAAATTTCC CTAAAGAATTTTTTTTTTTCACGAAAATTTTTTTTTTAC ACAAGATTTTCAGCAGATATAAAATGGAGAGCAGG ACCTCCGCTGTGACTCTTCTTTTTTTTCTTTTATTCTC ACTACATACATTTTAGTTATTCGCCAAC(서열번호 2)
α -Factor	MRFPSIFTAVLFAASSALAAPVNTTTEDETA QIPAEAVIGYS DLEGDFDVAVLPFSNSTNNG LLFINTTASIAAKEEGVSLEKR(서열번호 3)
His-tag	HHHHHH
Fusion part ner SUMO3	EEKPKEGVKTENDHINLKVAGQDGSVVQFKIKR HTPLSKLMKAYCERQGLSMRQIRFRFDGQPINE TDTPAQLEMEDEDTIDVFQQQTGG(서열번호 4)
D	GAT

CYC1 Terminator	TCATGTAATTAGTTATGTCACGCTTACATTCACGCCC TCCTCCCACATCCGCTCTAACCGAAAAGGAAGGAGT TAGACAACCTGAAGTCTAGGTCCCTATTTATTTTTT TAATAGTTATGTTAGTATTAAGAACGTTATTTATATT TCAAATTTTCTTTTTTTTCTGTACAAACGCGTGTACG CATGTAACATTATACTGAAAACCTTGCTTGAGAAGG TTTTGGGACGCTCGAAGGCTTTAATTTGC(서열번호 5)
-----------------	--

[92] 2) SNAP-8 유도체 발현 벡터가 도입된 효모의 배양

[93] 하기 표 2 및 3의 조건대로, SNAP-8 유도체 생산용 효모 균주에 적합한 배지를 선정하고, 상기 배지에서 각 플라스크/10L 규모로 균주를 배양하였다.

[94] [표2]

Flask test

Promoter	AOX1	TEF	GAP
Volume	Baffled flask 30 ml / 250 ml		Baffled flask 50 ml / 250 ml
Fed-batch	0.5% Methanol, 1 ml / day	2% Glucose, 1 ml / day	2% Glucose, 1 ml / day
Initial OD ₆₀₀	25~30		
Temperature	30°C After methanol induction 24°C	30°C	
Agitation	247 rpm		
Time	96 hr		
Media condition	BMGY or BMMY 1% Yeast extract 2% Peptone 2% Glucose or 0.5% Methanol 100 mM Potassium phosphate pH 6.0 Biotin 12 ppm	BMGY 1% Yeast extract 2% Peptone 2% Glucose 100 mM Potassium phosphate pH 6.0 Biotin 12 ppm	YPDZ 1% Yeast extract 2% Peptone 2% Glucose 25 μg/L Zeocin

[95] [표3]

10 L test

Volume	2 L
--------	-----

Media condition	1% Yeast extract 2% Peptone 2% Glycerol 100 mM Potassium phosphate pH 6.0 Biotin 40 ppm		
Fed-batch	Glycerol batch phase	Glycerol fed-batch phase	Glucose fed-batch phase
	Until wet cell 190~150 g/L	2% Glycerol+PTM ₁ , 25 ml/hr until wet cell 150~220 g/L	4 % Glucose+PTM ₁ 3.6 ml/hr/L 4hr 7.3 ml/hr/L 2hr 10.9 ml/hr/L 66hr
Temperature	30°C	28°C	24°C
Time	24 hr	24 hr	72 hr
pH	6.0		
Agitation	600~800 rpm		
Aeration	1~2 vvm		

[96] PTM₁, *pichia* Trace Metrols

[97] 3) SNAP-8 유도체 펩타이드의 분리·정제

[98] 상기 배양된 효모 배양액을 원심분리(3,000 rpm, 10 분)하여 상등액만 회수(균체 제거)하고, 배양액과 아세톤을 6:4의 비율로 넣고 2시간 냉동시켰다. 원심분리(3,000 rpm, 10 분)하여 펠릿(pellet)을 회수하여 완전히 건조시켰다. His-tag로 분리 후, 포름산(Formic acid)을 활용한 절단(cleavage) 공정-His-tag 정제된 발효물에 포름산 처리(하기 표 4 참조) 후 1M NH₄OH로 중성화-을 진행하였다. 동결건조 후 HPLC 분석을 수행하였다.

[99] [표4]

온도, 포름산 농도(%), 처리 시간(h)에 따른 회수율 및 모노머 전환율

조건	회수율	모노머 전환율
37°C, 60%, 48h	75%	31.3%
37°C, 60%, 72h	65.7%	40%
37°C, 60%, 96h	62%	45%
37°C, 90%, 48h	72.3%	48.2%

[100] 표 4의 포름산 처리 농도, 온도 및 시간은 예시적인 것으로 이에 제한되는 것은 아니며, 다양할 수 있다. 비제한적인 예를 들어, 온도는 약 30°C 내지 40°C, 또는

약 33°C 내지 39°C, 또는 약 35°C 내지 38°C일 수 있다. 포름산 처리 농도(%)는 약 50% 내지 99%, 또는 약 60% 내지 95%, 또는 약 60% 내지 90%일 수 있다. 또, 처리 시간은 약 40시간 내지 120시간, 또는 약 45시간 내지 100시간일 수 있다.

[101] 도 3에서 확인할 수 있듯이, 포름산 처리 전 멀티머 SNAP-8 유도체가 생산되었으며, 포름산을 처리한 후에 멀티머가 모노머로 절단된 것을 알 수 있었다. 나아가, 도 4에서 확인할 수 있듯이, 동결건조 후에는 포름산이 제거되는 것을 알 수 있었다.

[102]

[103] 실험예. SNAP-8 유도체 펩타이드의 주름 개선 효과 확인(Membrane Fusion Assay)

[104] 상기 제조예에서 제조된 SNAP-8 유도체 펩타이드 외 3 종(Argirelin, Argirelin 유도체, SNAP-8)의 펩타이드 시료에 대한 막 융합(membrane fusion) 저해 효과를 확인하였다.

[105] 먼저, 형광물질이 표시된 미세한 피막입자인 리포솜을 제조하기 위해 1-팔미토일-1,2-디올레오일-sn-글리세로-3-포스파티딜콜린(POPC, 62mol%), 1,2-디올레오일-sn-글리세로-3-포스파티딜세린(DOPS, 35mol%), 1,2-디올레오일-sn-글리세로-3-포스포세린-N-(7-니트로-2-1,3-벤즈옥사디아졸-4-일)(NBD-PE, 1.5mol%)인 형광물질인 로다민(Rhodamine-PE, 1.5mol%)을 혼합하여 10mM 리포솜(v-vesicle)을 제조하였다. 한편, 형광물질이 표시되지 않는 리포솜을 제조하기 위해 DOPS와 POPC를 35:65가 되도록 혼합하여 리포솜(t-vesicle)을 제조하였다.

[106] 정제된 SNAP25와 Syntaxin 1a의 complex를 만들기 위해 몰농도가 1:1이 되도록 혼합하여 실온에서 1시간 반응시킨 후 형광물질이 표시되지 않은 리포솜과 몰비율이 100:1이 되도록 섞고, VAMP-2는 형광물질이 들어있는 리포솜과 몰비율이 50:1로 결합시켰다.

[107] 그 다음, 22종의 리포솜을 투석한 후 1:9(v-vesicle:t-vesicle)의 비율로 섞은 후, SNAP-25, Syntaxin 1a 및 VAMP-2를 포함하는 상기 혼합물에 Control(Argirelin, Argirelin 유도체, SNAP-8) 및 SNAP-8 유도체 펩타이드를 첨가하여 분석하였다. 형광강도 측정기(모델명: SpectraMax M2, 제조사: Molecular Device)를 이용하여 형광강도를 측정하였다.

[108] NBD-PE의 형광파장은 465nm/530nm(excitation/emission)이며, Rhodamine의 형광파장은 465nm/625nm(excitation/emission)으로 NBD-PE의 방출파장을 Rhodamine이 흡수할 수 있게 설정되었다. 상기 방법은 형광 공명 에너지 전이 시스템(FRET(Flourescence Energy Transfer) system)이라고 하며, T-vesicle과 T-vesicle의 막 융합(membrane fusion)이 진행될수록 상기 BDPE와 Rhodamine의 거리는 멀어져 흡광도를 시간순으로 측정할 수 있고, NBD-PE의 흡광도 값은 증가하고 Rhodamine의 값은 감소하게 된다.

[109] [표5]

Membrane Fusion 저해 효과 결과

	Control	Argirelin	Argirelin 유도체	SNAP-8	SNAP-8 유도체
Membrane Fusion(%)	15.68	14.90	12.78	11.18	10.61
Membrane Fusion(% of control)	100	95.05	81.54	71.33	67.68
Inhibition rate of Membrane Fusion(% of control)	-	4.95	18.146	28.67	32.32

- [110] 상기 표 5 및 도 5에서 확인할 수 있듯이, 대조군과 비교하여 Argirelin은 1.83%, Argirelin 유도체는 17.36%, SNAP-8은 26.03%, SNAP-8 유도체는 27.40%의 SNARE complex 형성에 의한 막 융합 저해 효과를 확인하였다. 특히, SNAP-8 유도체가 가장 우수한 막 융합 저해 효과를 나타내었다.

서열목록 Free Text

- [111] 서열번호 1:
- [112] PEEMQRRAD
- [113] 서열번호 2:
- [114] ATAACGTGTCGCCTCTTTTATCTGCCGCACTGCATGAGGTG
TCCCCTTAGTGGGAAAGAGTACTGAGCCAACCCTGGAGGA
CAGCAAGGGAAAAATACCTACAACCTTGCTTCATAATGGTC
GTAAAAACAATCCTTGTCGGATATAAGTGTTGTAGACTGT
CCCTTATCCTCTGCGATGTTCTTCTCTCAAAGTTTGCGA
TTTCTCTCTATCAGAATTGCCATCAAGAGACTCAGGACTA
ATTCGCAGTCCCACACGCACTCGTACATGATTGGCTGAA
ATTTCCCTAAAGAATTTTTTTTTCACGAAAATTTTTTTTT
TACACAAGATTTTCAGCAGATATAAAATGGAGAGCAGGAC
CTCCGCTGTGACTCTTCTTTTTTTTCTTTTATTCTCACTA
CATACATTTTAGTTATTCGCCAAC
- [115] 서열번호 3:
- [116] MRFPSIFTAVLFAASSALAAPVNTTTEDETAQIPAEAVIG
YSDLEGDFDVAVLFPSTNNGLLFINTTASIAAKEEGVSLEKR
- [117] 서열번호 4:
- [118] EEKPKEGVKTENDHINLKVAGQDGSVVQFKIKRHTPLSKL
MKAYCERQGLSMRQIRFRFDGQPINETDTPAQLEMEDEDTIDVFQQQTGG
- [119] 서열번호 5:

[120] TCATGTAATTAGTTATGTCACGCTTACATTCACGCCCTCC
TCCCACATCCGCTCTAACCGAAAAGGAAGGAGTTAGACAA
CCTGAAGTCTAGGTCCCTATTTATTTTTTTTAATAGTTAT
GTTAGTATTAAGAACGTTATTTATATTTCAAATTTTCTT
TTTTTCTGTACAAACGCGTGTACGCATGTAACATTATAC
TGAAAACCTTGCTTGAGAAGGTTTTGGGACGCTCGAAGGCTTTAATTTGC

청구범위

- [청구항 1] SNAP-8(Acetyl octapeptide-3) 유도체를 코딩하는, 서열번호 1로 표시되는 폴리뉴클레오티드 서열을 포함하고,
상기 폴리뉴클레오티드 서열이 효모에서 발현될 수 있는 프로모터 서열 및 Fusion partner SUMO3 서열과 작동가능하게 연결되어 있는,
SNAP-8 유도체 제조용 발현 카세트.
- [청구항 2] 제1항에 있어서, 상기 SNAP-8 유도체 제조용 발현 카세트는 상기 서열번호 1로 표시되는 폴리뉴클레오티드 서열이 복수 회 반복하여 포함되는 것인, 발현 카세트.
- [청구항 3] 제1항 또는 제2항의 발현 카세트를 포함하는, SNAP-8 유도체 제조용 발현 벡터.
- [청구항 4] 제3항의 발현 벡터를 포함하는 형질전환체.
- [청구항 5] 제4항에 있어서,
상기 형질전환체는 피치아(*Pichia*), 에쉬리키아(*Escherichia*), 사카로마이세스(*Saccharomyces*), 자이코사카로마이세스(*Zygosaccharomyces*), 클루베로마이세스(*Kluyveromyces*), 칸디다(*Candida*), 스킨조사카로마이세스(*Schizosaccharomyces*), 이자켄키아(*Issachenkia*), 야로이아(*Yarrowia*) 및 한세룰라(*Hansenula*) 속 균주로 이루어진 균으로부터 선택되는 것인, 형질전환체.
- [청구항 6] 제4항 또는 제5항의 형질전환체를 배양하는 단계; 및
배양된 형질전환체로부터 발현된 펩타이드를 분리 및 정제하는 단계를 포함하는, SNAP-8 유도체의 제조방법.
- [청구항 7] 제6항에 있어서, 상기 분리 및 정제하는 단계는 멀티머(multimer) SNAP-8 유도체를 모노머(monomer) SNAP-8 유도체로 절단(cleavage)하여 수행되는 것인, SNAP-8 유도체의 제조방법.
- [청구항 8] 서열번호 1로 표시되는 SNAP-8 유도체를 포함하는 피부주름 예방 또는 치료용 약학적 조성물.
- [청구항 9] 서열번호 1로 표시되는 SNAP-8 유도체를 포함하는 피부주름 방지 또는 개선용 화장품 조성물.
- [청구항 10] 서열번호 1로 표시되는 SNAP-8 유도체를 포함하는 피부주름 방지 또는 개선용 의약외품 조성물.

[도 1]

- SNAP-8 고발현/고분비 monomer DNA cassette

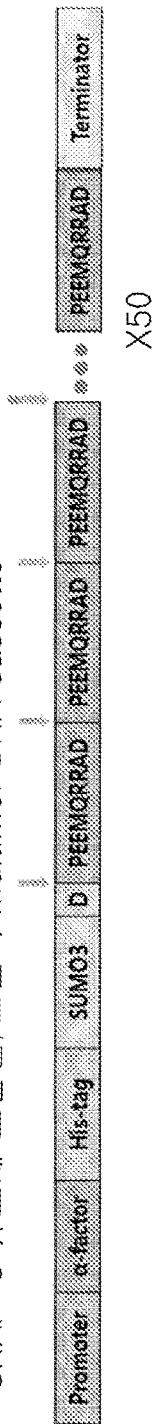


- SNAP-8 유도체 고발현/고분비 DNA cassette

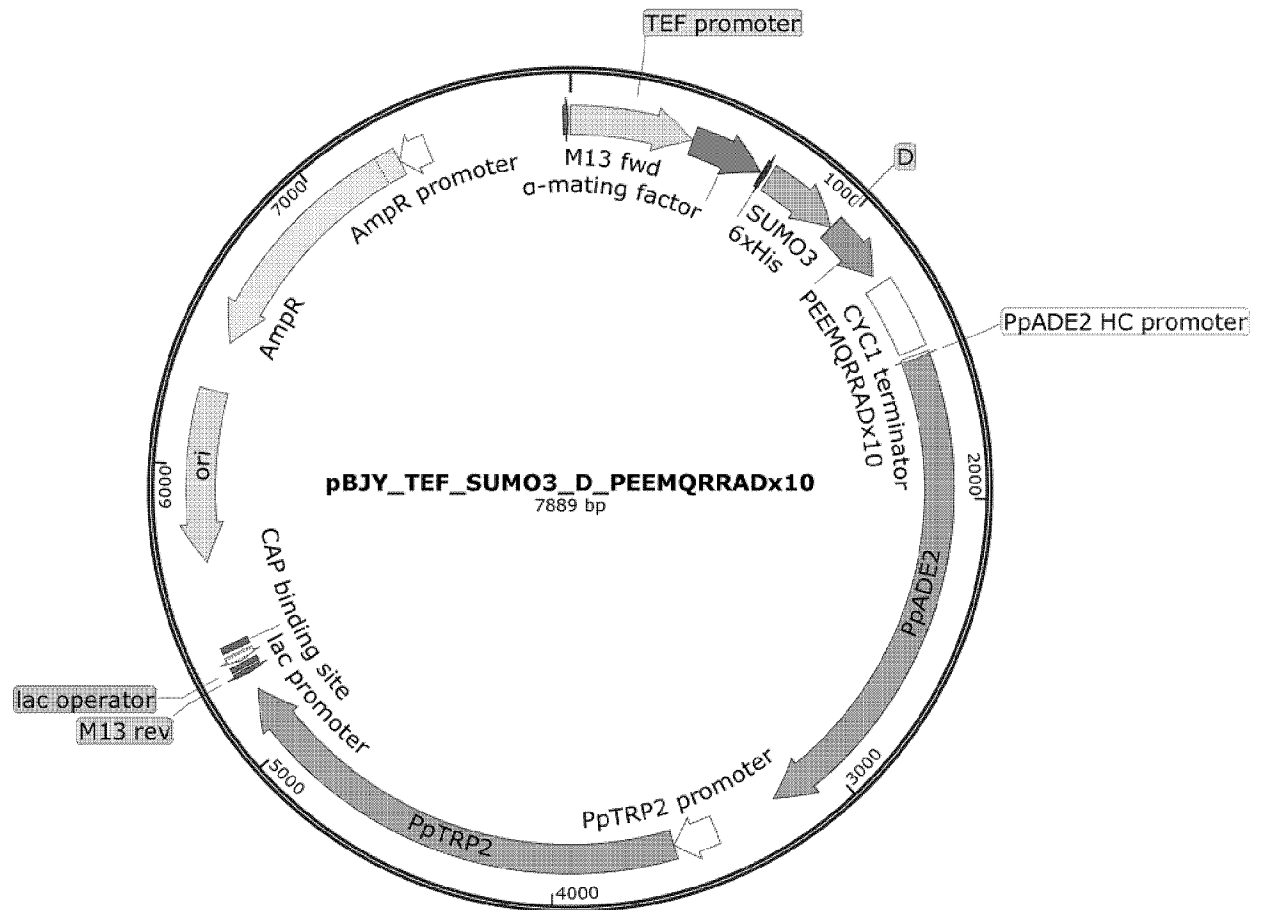


Formic acid 절단

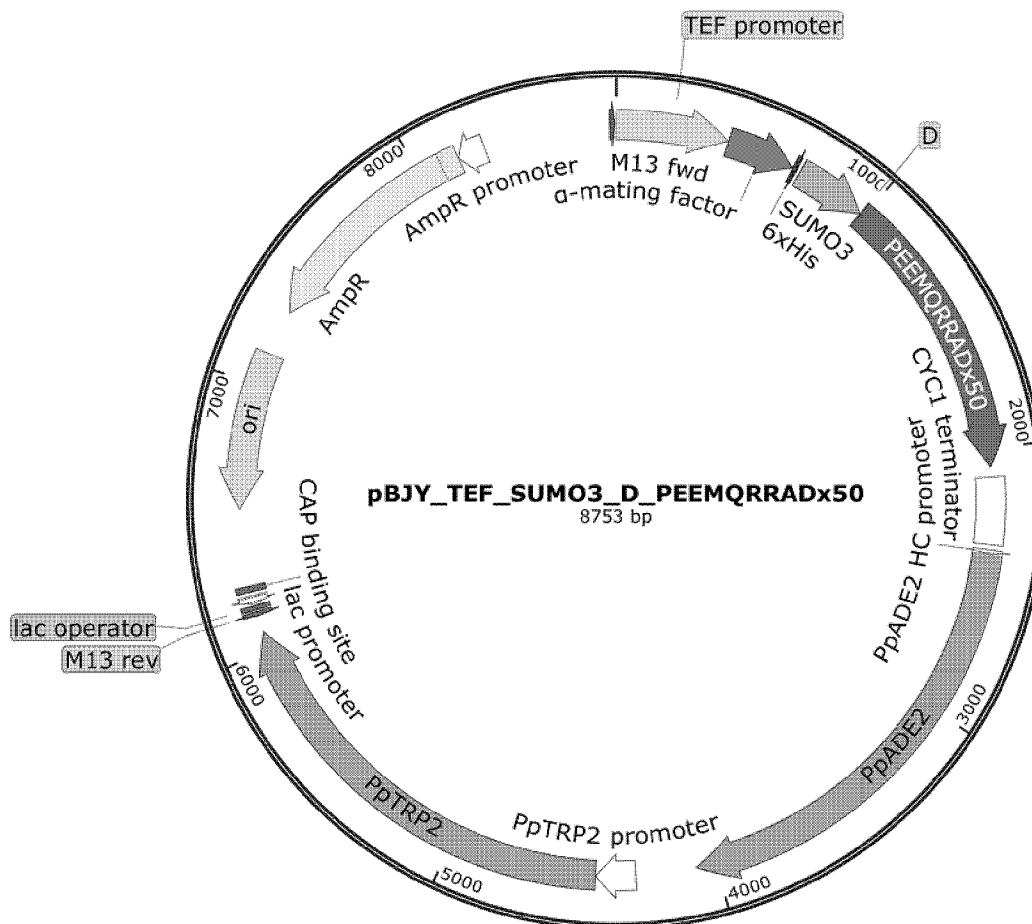
-SNAP-8 유도체 고발현/고분비 multimer DNA cassette



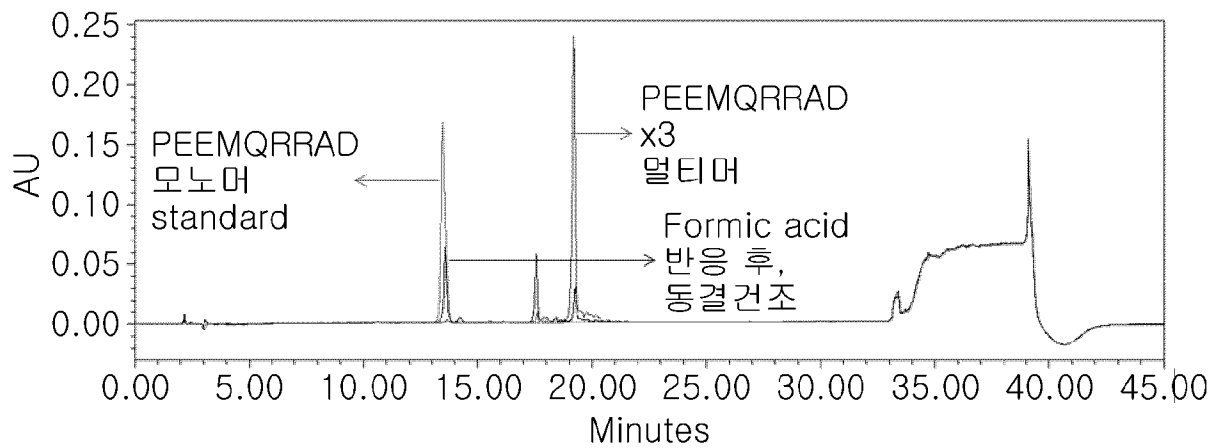
[도2a]



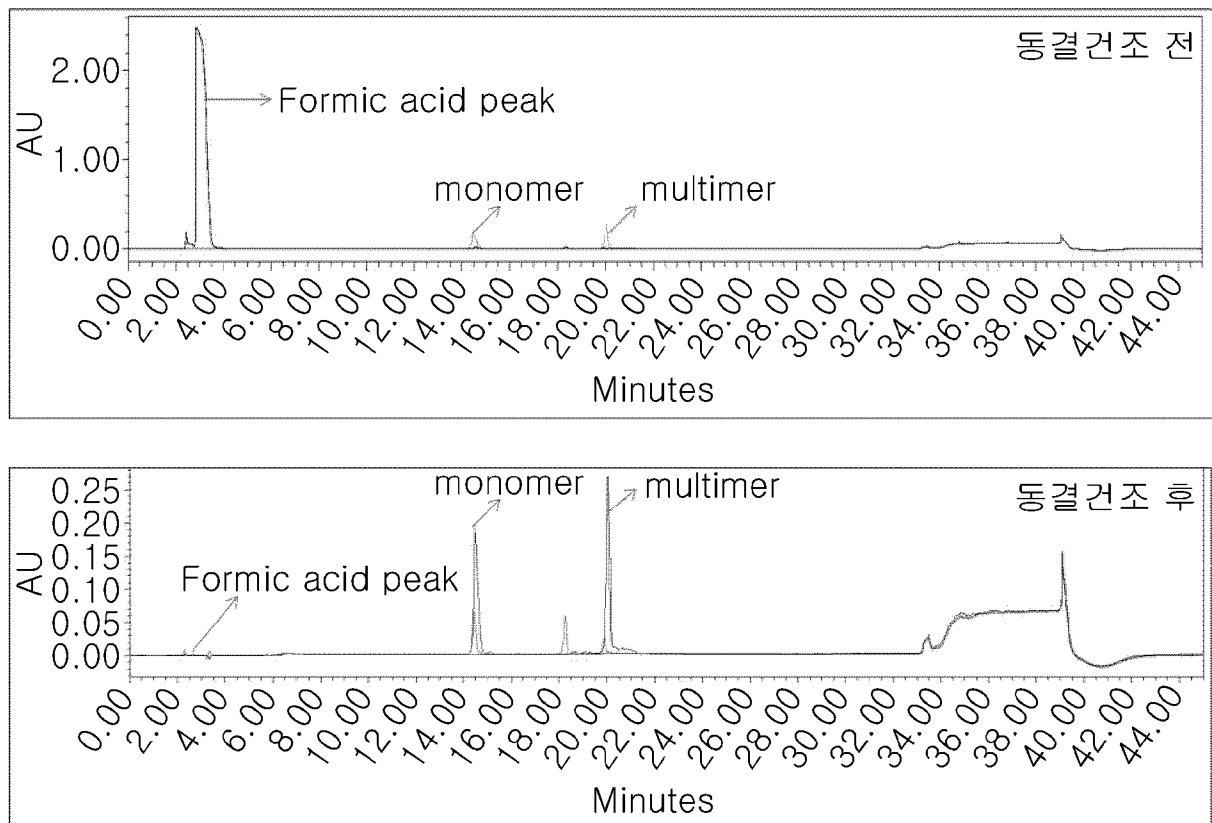
[도2b]



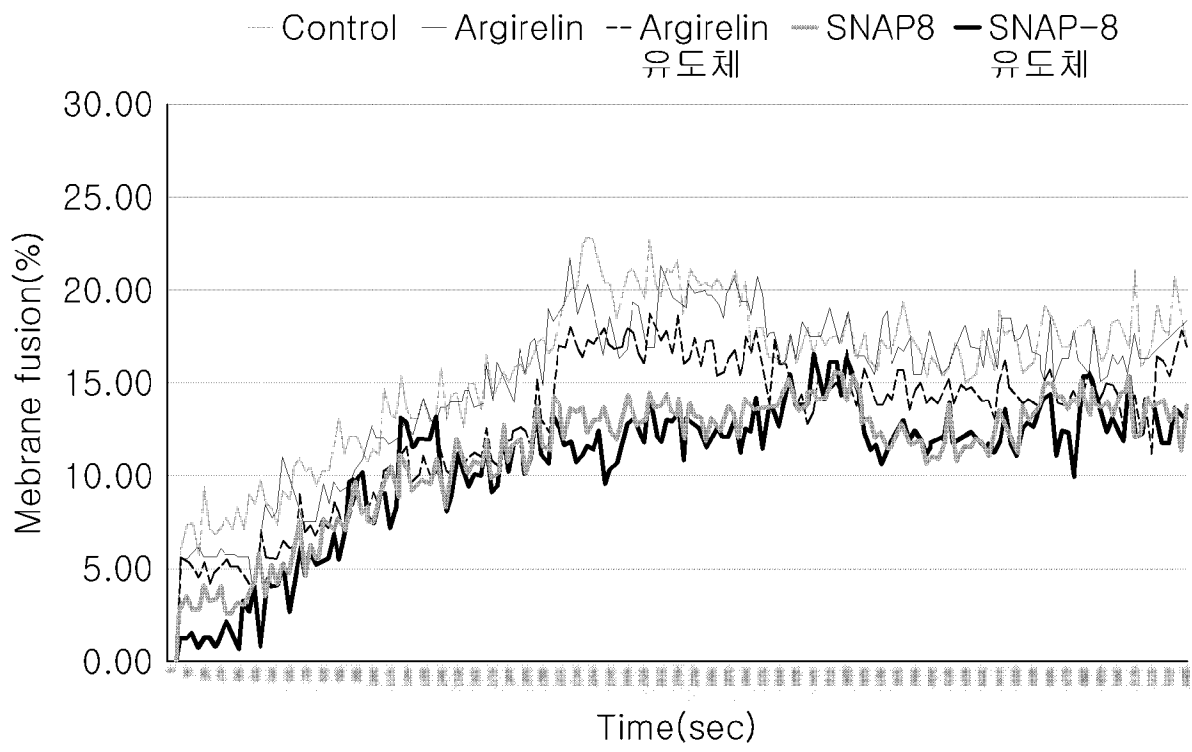
[도3]



[도4]



[도5]



INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/KR2023/019297

A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER

C12N 15/81(2006.01)i; **C07K 7/06**(2006.01)i; **A61P 17/00**(2006.01)i; **A61K 8/64**(2006.01)i; **A61Q 19/08**(2006.01)i;
A61K 38/00(2006.01)i; C12R 1/84(2006.01)n

According to International Patent Classification (IPC) or to both national classification and IPC

B. FIELDS SEARCHED

Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols)

C12N 15/81(2006.01); A61K 38/00(2006.01); A61K 8/19(2006.01); A61K 8/64(2006.01); C07K 5/083(2006.01)

Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched

Korean utility models and applications for utility models: IPC as above
 Japanese utility models and applications for utility models: IPC as above

Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practicable, search terms used)

eKOMPASS (KIPO internal) & keywords: 스냅-8(soluble N-ethylmaleimide-sensitive factor attachment protein-8, SNAP-8), 아세틸옥타펩타이드-3(acetyl octapeptide-3), 유도체(derivative), 프로모터(promoter), 코딩(coding), 주름(wrinkle)

C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
A	US 8865651 B2 (OTTE, Stephanus Cornelis Maria et al.) 21 October 2014. See abstract; claims 1 and 11; and paragraph [0080].	1-5,8-10
A	KR 10-1766876 B1 (KOREA INSTITUTE OF INDUSTRIAL TECHNOLOGY) 14 August 2017. See abstract; and claims 1 and 3.	1-5,8-10
A	WO 2011-008904 A1 (TABOR, A. T. et al.) 20 January 2011 (2011-01-20) See abstract; claims 1-5; and paragraph [0150].	1-5,8-10
A	KR 10-2370679 B1 (AQUALEX INC. et al.) 11 March 2022 (2022-03-11) See entire document.	1-5,8-10
A	Ji, M. et al. Method development for acetyl octapeptide-3 analysis by liquid chromatography-tandem mass spectrometry. 2020. Journal of Analytical Science and Technology. vol. 11, document no. 34, pp. 1-7. See entire document.	1-5,8-10



Further documents are listed in the continuation of Box C.



See patent family annex.

* Special categories of cited documents:

“A” document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance
 “D” document cited by the applicant in the international application
 “E” earlier application or patent but published on or after the international filing date
 “L” document which may throw doubts on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified)
 “O” document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means
 “P” document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed

“T” later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention

“X” document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step when the document is taken alone

“Y” document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other such documents, such combination being obvious to a person skilled in the art

“&” document member of the same patent family

Date of the actual completion of the international search

05 March 2024

Date of mailing of the international search report

05 March 2024

Name and mailing address of the ISA/KR

**Korean Intellectual Property Office
 Government Complex-Daejeon Building 4, 189 Cheongsaro, Seo-gu, Daejeon 35208**

Facsimile No. +82-42-481-8578

Authorized officer

Telephone No.

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/KR2023/019297

Box No. I Nucleotide and/or amino acid sequence(s) (Continuation of item 1.c of the first sheet)

1. With regard to any nucleotide and/or amino acid sequence disclosed in the international application, the international search was carried out on the basis of a sequence listing:
 - a. ☒ forming part of the international application as filed.
 - b. ☐ furnished subsequent to the international filing date for the purposes of international search (Rule 13ter.1(a)),
☐ accompanied by a statement to the effect that the sequence listing does not go beyond the disclosure in the international application as filed.
2. ☐ With regard to any nucleotide and/or amino acid sequence disclosed in the international application, this report has been established to the extent that a meaningful search could be carried out without a WIPO Standard ST.26 compliant sequence listing.
3. Additional comments:

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/KR2023/019297

Box No. II Observations where certain claims were found unsearchable (Continuation of item 2 of first sheet)

This international search report has not been established in respect of certain claims under Article 17(2)(a) for the following reasons:

1. ☐ Claims Nos.:
because they relate to subject matter not required to be searched by this Authority, namely:
2. ☒ Claims Nos.: **7**
because they relate to parts of the international application that do not comply with the prescribed requirements to such an extent that no meaningful international search can be carried out, specifically:

Claim 7 refers to a claim violating the manner of referring to a dependent claim (PCT Rule 6.4(a)), and thus is unclear.
3. ☒ Claims Nos.: **6**
because they are dependent claims and are not drafted in accordance with the second and third sentences of Rule 6.4(a).

INTERNATIONAL SEARCH REPORT
Information on patent family members

International application No.

PCT/KR2023/019297

Patent document cited in search report			Publication date (day/month/year)	Patent family member(s)			Publication date (day/month/year)
US	8865651	B2	21 October 2014	EP	1992332	A1	19 November 2008
				EP	2155155	A2	24 February 2010
				US	2010-0136103	A1	03 June 2010
				WO	2008-136676	A2	13 November 2008
				WO	2008-136676	A3	14 May 2009
KR	10-1766876	B1	14 August 2017	WO	2018-070829	A1	19 April 2018
WO	2011-008904	A1	20 January 2011	CN	102471769	A	23 May 2012
				EP	2454368	A1	23 May 2012
				EP	4219708	A2	02 August 2023
				US	2012-0115938	A1	10 May 2012
				US	9132202	B2	15 September 2015
KR	10-2370679	B1	11 March 2022	None			

A. 발명이 속하는 기술분류(국제특허분류(IPC))

C12N 15/81(2006.01)i; C07K 7/06(2006.01)i; A61P 17/00(2006.01)i; A61K 8/64(2006.01)i; A61Q 19/08(2006.01)i;
A61K 38/00(2006.01)i; C12R 1/84(2006.01)n

B. 조사된 분야

조사된 최소문헌(국제특허분류를 기재)

C12N 15/81(2006.01); A61K 38/00(2006.01); A61K 8/19(2006.01); A61K 8/64(2006.01); C07K 5/083(2006.01)

조사된 기술분야에 속하는 최소문헌 이외의 문헌

한국등록실용신안공보 및 한국공개실용신안공보: 조사된 최소문헌란에 기재된 IPC
일본등록실용신안공보 및 일본공개실용신안공보: 조사된 최소문헌란에 기재된 IPC

국제조사에 이용된 전산 데이터베이스(데이터베이스의 명칭 및 검색어(해당하는 경우))

eKOMPASS(특허청 내부 검색시스템) & 키워드: 스냅-8(soluble N-ethylmaleimide-sensitive factor attachment protein-8, SNAP-8), 아세틸옥타펩타이드-3(acetyl octapeptide-3), 유도체(derivative), 프로모터(promoter), 코딩(coding), 주름(wrinkle)

C. 관련 문헌

카테고리*	인용문헌명 및 관련 구절(해당하는 경우)의 기재	관련 청구항
A	US 8865651 B2 (STEPHANUS CORNELIS MARIA OTTE 등) 2014.10.21 요약; 청구항 1, 11; 단락 [0080]	1-5,8-10
A	KR 10-1766876 B1 (한국생산기술연구원) 2017.08.14 요약; 청구항 1, 3	1-5,8-10
A	WO 2011-008904 A1 (TABOR, A. T. 등) 2011.01.20 요약; 청구항 1-5; 단락 [0150]	1-5,8-10
A	KR 10-2370679 B1 ((주)아쿠아텍스 등) 2022.03.11 전체 문헌	1-5,8-10
A	Ji, M. 등., "Method development for acetyl octapeptide-3 analysis by liquid chromatography-tandem mass spectrometry", 2020, Journal of Analytical Science and Technology, 11권, 문헌번호 34, 페이지 1-7 전체 문헌	1-5,8-10

☐ 추가 문헌이 C(계속)에 기재되어 있습니다.

☒ 대응특허에 관한 별지를 참조하십시오.

* 인용된 문헌의 특별 카테고리:

“A” 특별히 관련이 없는 것으로 보이는 일반적인 기술수준을 정의한 문헌

“D” 본 국제출원에서 출원인이 인용한 문헌

“E” 국제출원일보다 빠른 출원일 또는 우선일을 가지나 국제출원일 이후에 공개된 선출원 또는 특허 문헌

“L” 우선권 주장에 의문을 제기하는 문헌 또는 다른 인용문헌의 공개일 또는 다른 특별한 이유(이유를 명시)를 밝히기 위하여 인용된 문헌

“O” 구두 개시, 사용, 전시 또는 기타 수단을 언급하고 있는 문헌

“P” 우선일 이후에 공개되었으나 국제출원일 이전에 공개된 문헌

“T” 국제출원일 또는 우선일 후에 공개된 문헌으로, 출원과 상충하지 않으며 발명의 기초가 되는 원리나 이론을 이해하기 위해 인용된 문헌

“X” 특별한 관련이 있는 문헌. 해당 문헌 하나만으로 청구된 발명의 신규성 또는 진보성이 없는 것으로 본다.

“Y” 특별한 관련이 있는 문헌. 해당 문헌이 하나 이상의 다른 문헌과 조합하는 경우로 그 조합이 당업자에게 자명한 경우 청구된 발명은 진보성이 없는 것으로 본다.

“&” 동일한 대응특허문헌에 속하는 문헌

국제조사의 실제 완료일

2024년03월05일(05.03.2024)

국제조사보고서 발송일

2024년03월05일(05.03.2024)

ISA/KR의 명칭 및 우편주소

대한민국 특허청
(35208) 대전광역시 서구 청사로 189, 4동 (둔산동,
정부대전청사)

팩스 번호 +82-42-481-8578

심사관

허주형

전화번호 +82-42-481-5373

제1기제란 핵산염기 및/또는 아미노산 서열(첫 번째 용지의 1.c의 계속)

1. 국제출원에 개시된 핵산염기 및/또는 아미노산 서열과 관련하여, 국제조사는 다음에 기초하여 수행되었습니다.
 - a. ☒ 출원시 국제출원의 일부를 구성하는 서열목록
 - b. ☐ 국제조사를 목적으로 국제출원일 이후에 제출된 서열목록(규칙 13의3.1(a))

☐ 서열목록이 출원시 국제출원의 개시 범위를 넘지 않는다는 취지의 진술서를 첨부
2. ☐ 국제출원에 개시된 핵산염기 및/또는 아미노산 서열에 대해, 본 보고서는 WIPO 표준 ST.26을 준수하는 서열목록이 없이 유효한 조사를 할 수 있는 범위에서 작성되었습니다
3. 추가 의견:

제2기재란 일부 청구항을 조사할 수 없는 경우의 의견(첫 번째 용지의 2의 계속)

PCT 제17조(2)(a)의 규정에 따라 다음과 같은 이유로 일부 청구항에 대하여 본 국제조사보고서가 작성되지 아니하였습니다.

1. ☐ 청구항:
이 청구항은 본 기관이 조사할 필요가 없는 대상에 관련됩니다. 즉,
2. ☒ 청구항: 7
이 청구항은 유효한 국제조사를 수행할 수 없을 정도로 소정의 요건을 충족하지 아니하는 국제출원의 부분과 관련됩니다. 구체적으로는,
청구항 7은 종속항 기재방법(PCT 규칙 6.4(a))을 위반한 청구항을 인용하고 있어 불명료합니다.
3. ☒ 청구항: 6
이 청구항은 종속청구항이나 PCT규칙 6.4(a)의 두 번째 및 세 번째 문장의 규정에 따라 작성되어 있지 않습니다.

국제조사보고서에서 인용된 특허문헌	공개일	대응특허문헌	공개일
US 8865651 B2	2014/10/21	EP 1992332 A1	2008/11/19
		EP 2155155 A2	2010/02/24
		US 2010-0136103 A1	2010/06/03
		WO 2008-136676 A2	2008/11/13
		WO 2008-136676 A3	2009/05/14
KR 10-1766876 B1	2017/08/14	WO 2018-070829 A1	2018/04/19
WO 2011-008904 A1	2011/01/20	CN 102471769 A	2012/05/23
		EP 2454368 A1	2012/05/23
		EP 4219708 A2	2023/08/02
		US 2012-0115938 A1	2012/05/10
		US 9132202 B2	2015/09/15
KR 10-2370679 B1	2022/03/11	없음	