(12) 특허협력조약에 의하여 공개된 국제출원

(19) 세계지식재산권기구
국제사무국

(43) 국제공개일
2023 년 4 월 6 일 (06.04.2023)

WIPO | PCT

(10) 국제공개번호
WO 2023/055007 A1

(51) 국제특허분류:
C07K 7/08 (2006.01) *A61K 8/64* (2006.01)
A61K 38/00 (2006.01) *A61Q 19/00* (2006.01)
A61P 17/00 (2006.01)

(21) 국제출원번호: PCT/KR2022/014392

(22) 국제출원일: 2022 년 9 월 27 일 (27.09.2022)

(25) 출원언어: 한국어

(26) 공개언어: 한국어

(30) 우선권정보:
10-2021-0129258 2021 년 9 월 29 일 (29.09.2021) KR

(71) 출원인: (주)케어젠 (**CAREGEN CO., LTD.**) [KR/KR]; 14119 경기도 안양시 동안구 엘에스로91번길 46-38, Gyeonggi-do (KR).

(72) 발명자: **정용지 (CHUNG, Yong Ji)**; 14119 경기도 안양시 동안구 엘에스로91번길 46-38, Gyeonggi-do (KR). **김은미 (KIM, Eun Mi)**; 14119 경기도 안양시 동안구 엘에스로91번길 46-38, Gyeonggi-do (KR). **이응지 (LEE, Eung Ji)**; 14119 경기도 안양시 동안구 엘에스로91번길 46-38, Gyeonggi-do (KR). **강한아 (KANG, Hana)**; 14119 경기도 안양시 동안구 엘에스로91번길 46-38, Gyeonggi-do (KR). **황보별 (HWANG, Bobyeol)**; 14119 경기도 안양시 동안구 엘에스로91번길 46-38, Gyeonggi-do (KR).

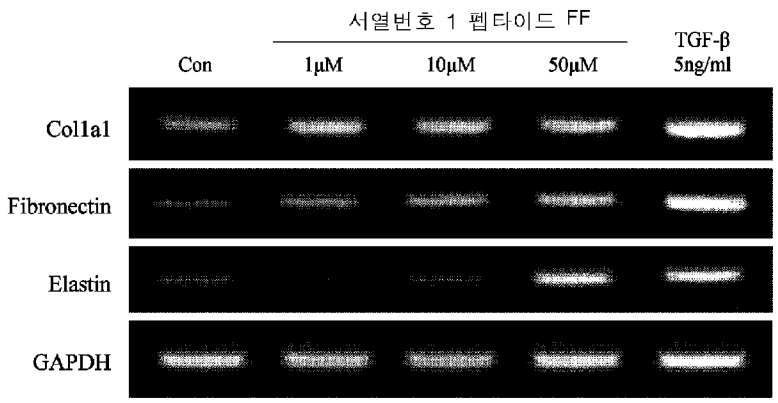
(74) 대리인: **특허법인 태평양 (BAE, KIM & LEE IP)**; 04521 서울특별시 중구 청계천로 30, 5층, Seoul (KR).

(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, 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

(54) **Title:** PEPTIDE HAVING ANTI-AGING ACTIVITY, AND USE THEREOF

(54) **발명의 명칭:** 항노화 활성을 갖는 펩타이드 및 이의 용도



FF ... Peptide of SEQ. ID No: 1

(57) **Abstract:** The present invention relates to a peptide having anti-aging activity and a composition for skin regeneration or suppressing skin aging, comprising the peptide as an active ingredient. The peptide according to the present invention, comprising an amino acid sequence of SEQ. ID No: 1, has anti-aging activity and thus can be used as a raw material for a cosmetic product for skin regeneration or suppressing skin aging or as a raw material for a pharmaceutical product for preventing, ameliorating or treating photoaging.

(57) **요약서:** 본 발명은 항노화 활성을 갖는 펩타이드 및 상기 펩타이드를 유효성분으로 포함하는 피부 노화 억제 또는 피부 재생용 조성물에 관한 것이다. 본 발명에 따른 서열번호 1 의 아미노산 서열을 포함하는 펩타이드는 항노화 활성을 가지므로 이를 피부 노화 억제 또는 피부 재생을 목적으로 하는 화장품 또는 광노화의 예방, 개선 또는 치료를 목적으로 하는 의약품의 원료로 사용할 수 있다.

WO 2023/055007 A1

[다음 쪽 계속]

(BF, BJ, CF, CG, CI, CM, GA, GN, GQ, GW, KM, ML, MR, NE, SN, TD, TG).

공개:

— 국제조사보고서와 함께 (조약 제21조(3))

— 명세서의 서열목록 부분과 함께 (규칙 5.2(a))

명세서

발명의 명칭: 항노화 활성을 갖는 펩타이드 및 이의 용도

기술분야

[1] 본 발명은 항노화 활성을 갖는 펩타이드 및 상기 펩타이드를 유효성분으로 포함하는 피부 노화 억제 또는 피부 재생용 조성물에 관한 것이다.

배경기술

[2] 피부 세포는 각종 원인에 의하여 노화 현상이 일어날 수 있고, 피부 세포의 노화에 의하여 주름이 발생할 수 있다. 생물학적 과정에 따라 시간이 경과하며 나타나는 자연적인 노화인 연대학적 노화(내인적 노화)와 햇빛에 노출되는 부위에서 발생하는 퇴행성 변화와 상기 연대학적 노화가 복합적으로 나타나는 광노화(광인성 노화)로 구분될 수 있다. 세포의 성장과 관련된 각종 인자들의 발현 또는 활성이 저해되는 경우 자연적인 세포의 노화가 발생할 수 있으며, 햇빛에 포함된 280 nm 내지 400 nm 파장의 빛에 의하여 피부 세포의 광노화가 진행될 수 있다. 그 중에서도 특히 280 nm 내지 320 nm 범위의 파장을 갖는 UVB와 같은 자외선의 조사에 의하여 피부나 섬유의 손상이 발생할 수 있으며 피부가 까맣게 타는 그을음 현상이 발생할 수 있다. UVB가 조사되면 피부 세포 내의 ROS 및 자유 라디칼의 축적이 촉진되며, 라디칼에 의해 세포 내 신호전달 체계를 자극하여 DNA, 단백질, 지질과 같은 생체 분자에 산화적 스트레스를 유발할 수 있고, 이로 인하여 피부 조직의 손상이 발생될 수 있다.

[3] 피부 세포의 산화적 스트레스가 증가하면, 표피의 각질세포나 진피의 섬유아세포에 자극이 발생하고 일련의 세포 내 신호 전달 과정을 거쳐 콜라겐 분해효소인 MMP(matrix metalloproteinase)와 같은 유전자의 발현이 증가될 수 있고, 피부의 주요 구성성분으로 진피의 90%를 차지하며 피부에 강도, 장력을 부여해 외부 자극이나 힘으로부터 피부를 보호하는 역할을 하는 콜라겐(collagen)의 감소가 유발되어, 이에 따라 피부의 노화나 주름이 형성될 수 있다. 따라서, 상기 콜라겐과 같은 섬유 단백질들의 합성이나 분해에 관련된 유전자의 발현 조절을 통해 피부 세포의 노화를 방지하고 주름의 개선 효과를 기대할 수 있다.

[4] 햇빛에 포함된 자외선의 조사에 따른 세포의 노화 작용은 단지 피부의 손상에 의하여 미용적인 측면에서 문제를 발생시키는 것뿐만 아니라, 세포의 DNA 손상으로 인하여 암을 유발하거나 중추 및 말초 신경계의 손상, 면역 시스템 파괴, 생식기관 장애, 영아 및 유아 발달 장애, 그리고 염소좌창 등의 피부 질환을 일으킬 수 있어 심각한 건강 상의 문제도 발생할 수 있는바, 그에 대한 해결책이 시급한 실정이다.

[5] 상기와 같은 문제점을 해결하기 위하여, 여러 종류의 물질들이 개발되어 왔으며 다양한 종류의 식물이나 미생물들로부터 얻은 추출물을 이용하여

상기와 같은 문제점을 극복하고자 하는 시도들이 있어 왔다. 그러나 많은 경우, 자연물로부터 얻은 추출물 내에서 구체적으로 어떤 물질이 피부 세포의 보호나 노화 현상으로부터의 회복 효과를 이끌어낼 수 있는지 확인하지 못하여, 정확한 구성을 알 수 없어 미지의 물질들도 함께 함유하고 있는 추출물 조성물을 이용하고 있는 실정이다. 인체에 직접 접촉시키거나 적용하여 사용되어야 하는 특성상, 부작용을 최소화하고 인체에 대한 안전성이 담보되어야 하는바, 상기와 같은 문제점을 해결할 수 있는 효과를 갖는 단일 물질을 정확하게 규명하여 인체의 피부 세포 등에 적용해야 할 필요성이 있다.

[6] [선행기술문헌]

[7] [비특허문헌]

[8] (비특허문헌 1)S Edgar et al., Effects of collagen-derived bioactive peptides and natural antioxidant compounds on proliferation and matrix protein synthesis by cultured normal human dermal fibroblasts, Scientific Reports, 2018; 8:10474

발명의 상세한 설명

기술적 과제

[9] 본 발명의 일 목적은 항노화 활성을 보유한 펩타이드를 제공하는 것이다.

[10] 본 발명의 다른 일 목적은 상술한 활성을 갖는 펩타이드를 유효성분으로 포함하는 피부 노화 억제 또는 피부 재생용 조성물을 제공하는 것이다.

[11] 본 발명의 또 다른 일 목적은 상술한 활성을 갖는 펩타이드를 유효성분으로 포함하는 피부 노화 억제 또는 피부 재생용 화장료 조성물을 제공하는 것이다.

[12] 본 발명의 또 다른 일 목적은 상술한 활성을 갖는 펩타이드를 유효성분으로 포함하는 광노화 예방 또는 치료용 약학적 조성물을 제공하는 것이다.

과제 해결 수단

[13] 상기 목적을 달성하기 위하여, 본 발명의 일 측면은 서열번호 1의 아미노산 서열을 포함하는 펩타이드를 제공한다.

[14] 본 발명의 다른 측면은 상기 펩타이드를 유효성분으로 포함하는 피부 노화 억제 또는 피부 재생용 조성물을 제공한다.

[15] 본 발명의 또 다른 측면은 상기 펩타이드를 유효성분으로 포함하는 피부 노화 억제 또는 피부 재생용 화장료 조성물을 제공한다.

[16] 본 발명의 또 다른 측면은 상기 펩타이드를 유효성분으로 포함하는 광노화 예방 또는 치료용 약학적 조성물을 제공한다.

발명의 효과

[17] 본 발명에 따른 서열번호 1의 아미노산 서열을 포함하는 펩타이드는 항노화 활성을 가지므로 이를 피부 노화 억제 또는 피부 재생을 목적으로 하는 화장품 또는 광노화의 예방, 개선 또는 치료를 목적으로 하는 의약품의 원료로 사용할 수 있다.

[18] 본 발명의 효과는 상기에서 언급한 효과로 제한되지 아니하며, 언급되지 않은

또 다른 효과들은 하기의 기재로부터 당업자에게 명확히 이해될 수 있을 것이다.

도면의 간단한 설명

[19] 도 1a는 본 발명의 펩타이드를 섬유아세포에 처리하였을 때 Col1a1, 피브로넥틴 및 엘라스틴의 발현을 확인한 도이다: Con은 무처리군, TGF-β1은 양성대조군.

[20] 도 1b는 본 발명의 펩타이드를 섬유아세포에 처리하였을 때 Col1a1의 발현에 미치는 영향을 보여주는 그래프이다: Con은 무처리군, TGF-β1은 양성대조군.

[21] 도 1c는 본 발명의 펩타이드를 섬유아세포에 처리하였을 때 피브로넥틴의 발현에 미치는 영향을 보여주는 그래프이다: Con은 무처리군, TGF-β1은 양성대조군.

[22] 도 1d는 본 발명의 펩타이드를 섬유아세포에 처리하였을 때 엘라스틴의 발현에 미치는 영향을 보여주는 그래프이다: Con은 무처리군, TGF-β1은 양성대조군.

[23] 도 2는 본 발명의 펩타이드를 각질형성세포에 처리하였을 때 히알루론산 단백질의 분비에 미치는 영향을 보여주는 그래프이다: Con은 무처리군, EGF는 양성대조군

[24] 도 3a는 본 발명의 펩타이드를 각질형성세포에 처리하였을 때 AQP3 및 SIRT1의 발현을 확인한 도이다: Con은 무처리군, EGF는 양성대조군.

[25] 도 3b는 본 발명의 펩타이드를 각질형성세포에 처리하였을 때 SIRT1의 발현에 미치는 영향을 보여주는 그래프이다: Con은 무처리군, EGF는 양성대조군.

[26] 도 3c는 본 발명의 펩타이드를 각질형성세포에 처리하였을 때 AQP3의 발현에 미치는 영향을 보여주는 그래프이다: Con은 무처리군, EGF는 양성대조군.

[27] 도 4a는 본 발명의 펩타이드가 섬유아세포에서 자외선(UV) 조사에 의해 증가된 세포 내 활성산소(ROS) 레벨에 미치는 영향을 보여주는 그래프이다: Con은 자외선 비조사군, NC는 자외선 조사군, 1μM, 10μM, 50μM 는 자외선 조사 및 본 발명의 펩타이드를 농도별로 처리한 군, NaC는 자외선 조사 및 N-Acetylcystein을 처리한 양성대조군.

[28] 도 4b는 본 발명의 펩타이드가 각질형성세포에서 자외선(UV) 조사에 의해 증가된 세포 내 활성산소(ROS) 레벨에 미치는 영향을 보여주는 그래프이다: Con은 자외선 비조사군, NC는 자외선 조사군, 1μM, 10μM, 50μM 는 자외선 조사 및 본 발명의 펩타이드를 농도별로 처리한 군, NaC는 자외선 조사 및 N-Acetylcystein을 처리한 양성대조군.

[29] 도 5a는 본 발명의 펩타이드가 섬유아세포에서 자외선(UV) 조사에 의해 감소된 Col1a1, 피브로넥틴 및 엘라스틴 유전자의 발현을 확인한 도이다: Con은 자외선 비조사군, NC는 자외선 조사군, 1μM, 10μM, 50μM 는 자외선 조사 및 본 발명의 펩타이드를 농도별로 처리한 군, Quercetin은 자외선 조사 및 트롤록스를 처리한 양성대조군.

[30] 도 5b는 본 발명의 펩타이드가 섬유아세포에서 자외선(UV) 조사에 의해

감소된 Col1a1 유전자의 발현에 미치는 영향을 보여주는 그래프이다: Con은 자외선 비조사군, NC는 자외선 조사군, 1μM, 10μM, 50μM 는 자외선 조사 및 본 발명의 펩타이드를 농도별로 처리한 군, Quercetin은 자외선 조사 및 트롤록스를 처리한 양성대조군.

[31] 도 5c는 본 발명의 펩타이드가 섬유아세포에서 자외선(UV) 조사에 의해 감소된 피브로넥틴 유전자의 발현에 미치는 영향을 보여주는 그래프이다: Con은 자외선 비조사군, NC는 자외선 조사군, 1μM, 10μM, 50μM 는 자외선 조사 및 본 발명의 펩타이드를 농도별로 처리한 군, Quercetin은 자외선 조사 및 트롤록스를 처리한 양성대조군.

[32] 도 5d는 본 발명의 펩타이드가 섬유아세포에서 자외선(UV) 조사에 의해 감소된 엘라스틴 유전자의 발현에 미치는 영향을 보여주는 그래프이다: Con은 자외선 비조사군, NC는 자외선 조사군, 1μM, 10μM, 50μM 는 자외선 조사 및 본 발명의 펩타이드를 농도별로 처리한 군, Quercetin은 자외선 조사 및 트롤록스를 처리한 양성대조군.

[33] 도 6a는 본 발명의 펩타이드가 섬유아세포에서 자외선(UV) 조사에 의해 증가된 MMP-1의 발현에 미치는 영향을 보여주는 그래프이다: Con은 자외선 비조사군, NC는 자외선 조사군, 1μM, 10μM, 50μM 는 자외선 조사 및 본 발명의 펩타이드를 농도별로 처리한 군, NaC는 자외선 조사 및 N-Acetylsystein을 처리한 양성대조군.

[34] 도 6b는 본 발명의 펩타이드가 각질형성세포에서 자외선(UV) 조사에 의해 증가된 MMP-1의 발현에 미치는 영향을 보여주는 그래프이다: Con은 자외선 비조사군, NC는 자외선 조사군, 1μM, 10μM, 50μM 는 자외선 조사 및 본 발명의 펩타이드를 농도별로 처리한 군, NaC는 자외선 조사 및 N-Acetylsystein을 처리한 양성대조군.

[35] 도 7a는 본 발명의 펩타이드가 각질형성세포에서 자외선(UV) 조사에 의해 감소된 AQP3 및 SIRT1의 mRNA 레벨을 확인한 도이다: Con은 자외선 비조사군, NC는 자외선 조사군, 1μM, 10μM, 50μM 는 자외선 조사 및 본 발명의 펩타이드를 농도별로 처리한 군, NaC는 자외선 조사 및 N-Acetylcystein을 처리한 양성대조군.

[36] 도 7b는 본 발명의 펩타이드가 각질형성세포에서 자외선(UV) 조사에 의해 감소된 SIRT1의 mRNA 레벨에 미치는 영향을 보여주는 그래프이다: Con은 자외선 비조사군, NC는 자외선 조사군, 1μM, 10μM, 50μM 는 자외선 조사 및 본 발명의 펩타이드를 농도별로 처리한 군, NaC는 자외선 조사 및 N-Acetylcystein을 처리한 양성대조군.

[37] 도 7c는 본 발명의 펩타이드가 각질형성세포에서 자외선(UV) 조사에 의해 감소된 AQP3의 mRNA 레벨에 미치는 영향을 보여주는 그래프이다: Con은 자외선 비조사군, NC는 자외선 조사군, 1μM, 10μM, 50μM 는 자외선 조사 및 본 발명의 펩타이드를 농도별로 처리한 군, NaC는 자외선 조사 및 N-Acetylcystein을

처리한 양성대조군.

[38]

발명의 실시를 위한 최선의 형태

[39] 이하, 본 발명을 상세히 설명한다.

[40] 본 발명의 일 측면은 서열번호 1로 표시되는 아미노산 서열을 포함하는 펩타이드를 제공한다.

[41] 본 명세서에서, 용어 '펩타이드'란 아미노산 잔기로 이루어진 선형의 분자를 의미하며, 구체적으로 본 발명의 펩타이드는 서열번호 1로 표시되는 아미노산 서열을 포함할 수 있다.

[42] 상기 '펩타이드'는 기능에 영향을 미치지 않는 범위 내에서, 아미노산 잔기의 결실, 삽입, 치환 또는 이들의 조합에 의해서 상이한 서열을 가지는 아미노산의 변이체들, 또는 단편들일 수 있다. 상기 펩타이드의 활성을 전체적으로 변경시키지 않는 아미노산 교환은 본 기술 분야에 공지되어 있다. 경우에 따라서, 펩타이드는 인산화(phosphorylation), 황화(sulfation), 아크릴화(acrylation), 당화(glycosylation), 메틸화(methylation), 파네실화(farnesylation) 등으로 변형될 수 있다. 이에, 본 발명의 펩타이드는 서열번호 1의 아미노산 서열을 포함하는 펩타이드와 실질적으로 동일한 아미노산 서열을 갖는 펩타이드 및 이의 변이체 또는 이의 활성 단편을 포함한다.

[43] 상기 실질적으로 동일한 단백질이란 상기 서열번호 1의 아미노산 서열과 75% 이상, 바람직하게는 80% 이상, 예컨대, 85% 이상, 90% 이상, 95% 이상, 98% 이상, 또는 99% 이상의 서열 상동성을 갖는 아미노산 서열을 의미하나 이에 한정되지 않으며, 75% 이상의 아미노산 서열의 상동성을 가지며 동일한 활성을 가진다면 본 발명의 범위에 포함된다.

[44] 또한, 본 발명의 펩타이드는 표적화 서열, 태그(tag), 표지된 잔기, 반감기 또는 펩타이드 안정성을 증가시키기 위한 특정 목적으로 제조된 아미노산 서열을 추가적으로 포함할 수 있다.

[45] 또한, 보다 나은 화학적 안정성, 강화된 약리 특성(반감기, 흡수성, 역가, 효능 등), 변경된 특이성(예를 들어, 광범위한 생물학적 활성 스펙트럼), 감소된 항원성을 획득하기 위하여, 본 발명의 펩타이드의 N-말단 또는 C-말단이 변형된 것일 수 있다. 상기 '안정성'은 생체 내 단백질 절단 효소의 공격으로부터 본 발명의 펩타이드를 보호하는 생체내(*in vivo*)에서의 안정성뿐만 아니라, 저장안정성(예컨대, 상온 저장 안정성)도 포함하는 의미로 사용된다.

[46] 상기 N-말단 변형은 펩타이드의 N-말단에 아세틸기(acetyl group), 플루오레닐메톡시카르보닐기(fluoreonylmethoxycarbonyl group), 포르밀기(formyl group), 팔미토일기(palmitoyl group), 미리스틸기(myristyl group), 스테아릴기(stearyl group) 및 폴리에틸렌글리콜(polyethylene glycol; PEG)로

이루어진 군으로부터 선택된 보호기가 결합한 것일 수 있으나, 이에 한정되는 것은 아니다.

[47] 상기 C-말단 변형은 펩타이드의 C-말단에 히드록시기(hydroxyl group, -OH), 아미노기(amino group, $-NH_2$), 아자이드(azide, $-NHNH_2$) 등이 결합한 것일 수 있으나, 이에 한정되는 것은 아니다.

[48] 본 발명의 펩타이드의 합성은 예를 들어 기기를 이용하거나 유전공학 기법을 이용하여 수행할 수 있다. 기기를 이용하여 합성하는 경우, 자동 펩타이드 합성기에서 원하는 펩타이드를 Fmoc 고체상(Fmoc solid-phase) 방법으로 합성할 수 있다.

[49] 본 발명의 구체적인 실시예에서, 본 발명의 서열번호 1의 아미노산 서열을 포함하는 펩타이드는 Fmoc 고체상(Fmoc solid-phase) 방법을 이용하여 합성 및 동정하였고, 동정된 펩타이드의 효능을 검증하는 것에 의해 선별되었다.

[50] 본 발명의 구체적인 실시예에서, 동정된 펩타이드의 효능을 검증하기 위해 세포외기질(ECM, extracellular matrix) 구성 성분과 피부 장벽 강화 인자의 발현 수준 증가 효과 및 자외선 조사에 의해 증가한 활성산소 레벨 감소 효능, 자외선에 의해 증가한 콜라겐 분해 관련 단백질의 발현 억제 효과에 대한 유효성 검증을 통해 본 발명의 펩타이드를 선별하였다.

[51] 이에 본 발명의 서열번호 1의 아미노산 서열을 포함하는 펩타이드는 피부 노화 억제 활성 또는 피부 재생 활성을 갖는다.

[52] 본 발명의 다른 일 측면은 서열번호 1의 아미노산 서열을 포함하는 펩타이드를 유효성분으로 포함하는 피부 노화 억제 또는 피부 재생용 조성물을 제공한다.

[53] 상기 "피부노화"는 시간의 흐름에 따라 세포에서 자연적으로 발생하는 노화일 수 있고, 햇빛에 의해 발생하는 광노화일 수 있다. 또한, 상기 노화는 다양한 원인에 의해 발생할 수 있는 세포 내 산화적 스트레스 현상에 의해 유도될 수 있으며, 이에 따라 세포 성장 억제나 세포사멸이 진행될 수 있고 피부세포에서 이를 구성하는 각종 섬유 단백질의 합성이 저해되고 분해 효소의 발현이 증가될 수 있다. 특히, 자외선 조사에 따라 피부 세포에서는 Col1a1, 피브로넥틴, 엘라스틴 또는 히알루론산과 같은 유전자의 발현이 억제되어 피부 세포의 광노화 및 주름 발생을 유발할 수 있다.

[54] 상기 "피부재생"은 피부세포의 성장을 촉진시키고 생존력을 강화하여 외부 및/또는 내부의 자극으로부터 세포손상을 방지하고 피부의 주름 개선, 탄력의 증진 및 피부 장벽을 강화시키는 것일 수 있으며, 상기 피부재생에는 외부 환경으로부터 유발되는 피부손상, 예를 들어 색소침착의 예방 또는 피부 광노화의 개선 및 또는 치료의 의미를 포함한다.

[55] 상기 피부 노화 억제 또는 피부 재생용 조성물은 노화 또는 외부 자극에 의한 세포 손상에 대한 저항성을 증진시킨다.

[56] 상기 "외부 자극"은 물리적 자극, 화장품 또는 기타 외용제 적용에 의한 화학적 자극, 자외선에 의한 자극 또는 적외선에 의한 자극일 수 있다.

[57] 상기 손상되는 세포는 피부 섬유아세포 또는 각질형성세포 일 수 있다.

[58] 본 발명의 펩타이드는 피부세포 내에서 섬유 단백질 합성 유전자의 발현 증가를 유도할 수 있다. 따라서, 상기 펩타이드는 섬유 단백질의 합성을 증가시킴에 따라 피부의 주름 및 탄력을 개선할 수 있으며, 피부 장벽을 개선시킴에 따라 외부 자극으로부터 피부세포의 저항력과 생존력을 증가시키고, 외부 자극 또는 노화로 인해 손상 받은 피부의 재생력을 증진시킬 수 있다. 피부의 노화가 진행됨에 따라 피부세포 내에서 발현량이 변화하는 세포 증식과 관련된 단백질이나 항노화 유전자 및 섬유 단백질의 발현량을 확인함으로써, 본 발명의 상기 펩타이드의 피부 노화 억제 및 피부 재생 효과를 확인할 수 있다.

[59] 상기 피부 노화 억제 또는 피부 재생용 조성물은 피부세포 내에서 콜라겐(Collagen), 피브로넥틴(fibronectin), 엘라스틴(elastin) 또는 히알루론산(hyaluronic acid)의 발현 또는 분비를 증가시킬 수 있다.

[60] 상기 피부 노화 억제 또는 피부 재생용 조성물은 피부 장벽 강화 인자인 AQP3 또는 SIRT1의 발현을 증가시킬 수 있다.

[61] 상기 피부 노화 억제 또는 피부 재생용 조성물은 자외선에 의한 활성산소(ROS)의 생성을 억제할 수 있다.

[62] 상기 피부 노화 억제 또는 피부 재생용 조성물은 자외선에 의해 감소된 콜라겐, 피브로넥틴 또는 엘라스틴의 발현을 증가시킬 수 있다.

[63] 상기 피부 노화 억제 또는 피부 재생용 조성물은 자외선에 의해 증가된 MMP-1의 발현을 억제할 수 있다.

[64] 본 발명의 구체적인 실시예에서, 본 발명의 서열번호 1의 아미노산 서열을 포함하는 펩타이드는 섬유아세포에서 Col1a1, 피브로넥틴(fibronectin) 및 엘라스틴(elastin)과 같은 세포외기질 단백질을 암호화하는 유전자의 발현을 증가시키는 것으로 나타났다.

[65] 또한, 상기 펩타이드는 각질형성세포에서 히알루론산(hyaluronic acid)의 분비를 증가시키는 것으로 나타났다.

[66] 또한, 상기 펩타이드는 각질형성세포에서 AQP3 및 SIRT1과 같은 피부 장벽 강화 유전자의 발현을 증가시키는 것으로 나타났다.

[67] 또한, 상기 펩타이드는 자외선에 의해 손상된 섬유아세포 및/또는 각질형성세포에서 세포 내 활성산소(ROS) 레벨을 감소시키는 것으로 나타났다.

[68] 또한, 상기 펩타이드는 자외선에 의해 손상된 섬유아세포에서 감소된 Col1a1, 피브로넥틴 및 엘라스틴 유전자의 발현을 증가시키는 것으로 나타났다.

[69] 또한, 상기 펩타이드는 자외선에 의해 손상된 섬유아세포 및/또는 각질형성세포에서 증가된 MMP-1의 발현을 억제하는 것으로 나타났다.

[70] 또한, 상기 펩타이드는 자외선에 의해 감소된 SIRT1 및 AOP3의 mRNA의 레벨을 증가시키는 것으로 나타났다.

[71] 따라서, 본 발명의 상기 펩타이드는 피부 세포의 노화 현상과 관련된 유전자의

발현을 조절함으로 피부 노화 억제 또는 피부 재생 활성을 가짐이 분명하고, 본 발명의 상기 펩타이드는 피부 노화 억제 또는 피부 재생을 위한 조성물의 유효성분으로 유용하게 사용될 수 있다.

[72] 본 발명의 다른 일 측면은 서열번호 1의 아미노산 서열을 포함하는 펩타이드를 유효성분으로 포함하는, 피부 노화 억제 또는 피부 재생용 화장료 조성물을 제공한다.

[73] 상기 피부 노화 억제 또는 피부 재생은 피부 주름의 예방 또는 개선, 피부 탄력 증진, 피부 장벽 강화, 색소침착의 예방 또는 피부 광노화 개선일 수 있다.

[74] 상기 서열번호 1의 아미노산 서열을 포함하는 펩타이드는 상기 '피부 노화 억제 또는 피부 재생용 조성물' 항목에서 설명한 펩타이드와 동일한바, 구체적인 설명은 위에서 기재한 내용을 원용하고, 이하에서는 피부 노화 억제 또는 피부 재생용 화장료 조성물에 특유한 구성에 대해서만 설명하도록 한다.

[75] 상기 화장료 조성물은 본 기술분야에서 통상적으로 제조되는 임의의 제형으로 제조될 수 있고, 예를 들면, 용액, 현탁액, 유탁액, 페이스트, 겔, 크림, 로션, 파우더, 비누, 계면활성제-함유 클린싱, 오일, 분말 파운데이션, 유탁액 파운데이션, 왁스 파운데이션 및 스프레이 등으로 제형화 될 수 있으나 이에 제한되는 것은 아니다.

[76] 상기 화장료 조성물은 유연 화장수, 영양 화장수, 영양 크림, 마사지 크림, 에센스, 아이 크림, 클렌징 크림, 클렌징 폼, 클렌징 워터, 팩, 스프레이, 파우더, 헤어토닉, 헤어크림, 헤어로션, 헤어샴푸, 헤어린스, 헤어컨디셔너, 헤어스프레이, 헤어 에어졸, 포마드, 젤 등과 같은 용액, 솔젤, 에멀젼, 오일, 왁스, 에어졸 등의 다양한 형태로 제조될 수 있으나, 이에 제한되는 것은 아니다.

[77] 본 발명의 화장료 조성물은 부형제, 담체 등 기타 첨가제를 포함할 수 있으며 일반 피부 화장료에 배합되는 보통의 성분을 필요한 만큼 적용 배합하는 것이 가능하다.

[78] 상기 화장료 조성물의 제형의 형태가 페이스트, 크림 또는 겔인 경우에는 담체 성분으로서 동물성유, 식물성유, 왁스, 파라핀, 전분, 트라칸트, 셀루로오스 유도체, 폴리에틸렌글리콜, 실리콘, 벤토나이트, 실리카, 탈크 또는 산화아연 등이 이용될 수 있다.

[79] 상기 화장료 조성물의 제형의 형태가 파우더 또는 스프레이인 경우에는 담체 성분으로서 락토오스, 탈크, 실리카, 알루미늄 히드록시드, 칼슘 실리케이트 또는 폴리아미드 파우더가 사용될 수 있고, 특히 스프레이인 경우에는 추가적으로 클로로플루오로히드로카본, 프로판/부탄 또는 디메틸 에테르와 같은 추진체가 포함될 수 있으나 이에 제한되는 것은 아니다.

[80] 상기 화장료 조성물의 제형의 형태가 용액 또는 유탁액인 경우에는 담체 성분으로서 용매, 용해화제 또는 유탁화제가 이용될 수 있고, 예를 들면 물, 에탄올, 이소프로판올, 에틸 카보네이트, 에틸 아세테이트, 벤질 알코올, 벤질 벤조에이트, 프로필렌글리콜, 1,3-부틸글리콜 오일, 글리세롤 지방족 에스테르,

폴리에틸렌글리콜 또는 소르비탄의 지방산 에스테르 등이 이용될 수 있다.

[81] 상기 화장료 조성물의 제형의 형태가 현탁액인 경우에는 담체 성분으로서 물, 에탄올 또는 프로필렌 글리콜과 같은 액상의 희석제, 에톡실화 이소스테아릴 알코올, 폴리옥시에틸 소르비톨 에스테르 및 폴리옥시에틸렌 소르비탄 에스테르 등과 같은 현탁제, 미소결정성 셀룰로오스, 알루미늄 메타히드록시드, 벤토나이트, 아가 또는 트라칸트 등이 이용될 수 있다.

[82] 상기 화장료 조성물의 제형이 계면-활성제 함유 클렌징인 경우에는 담체 성분으로서 지방족 알코올 설페이트, 지방족 알코올 에테르 설페이트, 설포숙신산 모노에스테르, 이세티오네이트, 이미다졸리늄 유도체, 메틸타우레이트, 사르코시네이트, 지방산 아미드 에테르 설페이트, 알킬아미도베타인, 지방족 알코올, 지방산 글리세리드, 지방산 디에탄올아미드, 식물성유, 라놀린 유도체 또는 에톡실화 글리세롤 지방산 에스테르 등이 이용될 수 있다.

[83] 상기 화장료 조성물의 제형이 헤어샴푸인 경우에는 본 발명의 펩타이드에 증점제, 계면활성제, 점도 조절제, 보습제, pH 조절제, 방부제, 에센셜 오일 등과 같이 샴푸를 조성하기 위한 베이스 성분들이 혼합될 수 있다. 상기 증점제로는 CDE가 사용될 수 있고, 상기 계면활성제로는 음이온 계면활성제인 LES와, 양쪽성 계면활성제인 코코 베타인이 사용될 수 있고, 상기 점도조절제로는 폴리쿼터가 사용될 수 있으며, 상기 보습제로는 글리세린이 사용될 수 있고, 상기 pH 조절제로는 구연산, 수산화나트륨이 사용될 수 있다. 상기 방부제로는 자몽 추출물 등이 사용될 수 있고, 이 외에도 시더우드, 페퍼민트, 로즈마리 등의 에센셜 오일과 실크 아미노산, 펜타올 또는 비타민 E가 첨가될 수 있다.

[84] 상기 화장료 조성물에 포함되는 성분은 유효 성분으로서 본 발명의 펩타이드와 담체 성분 이외에 화장료 조성물에 통상적으로 사용되는 성분들, 예를 들면 항산화제, 안정화제, 용해화제, 비타민, 안료 및 향료와 같은 통상적인 보조제 등을 더 포함할 수 있으나, 이에 제한되는 것은 아니다.

[85] 본 발명의 또 다른 일 측면은 서열번호 1의 아미노산 서열을 포함하는 펩타이드를 유효성분으로 포함하는 광노화 예방 또는 치료용 약학적 조성물을 제공한다.

[86] 상기 서열번호 1의 아미노산 서열을 포함하는 펩타이드는 상기 '피부 노화 억제 또는 피부 재생용 조성물' 항목에서 설명한 펩타이드와 동일한바, 구체적인 설명은 위에서 기재한 내용을 원용하고, 이하에서는 광노화 예방 또는 치료용 약학적 조성물에 특유한 구성에 대해서만 설명하도록 한다.

[87] 본 명세서에서, 상기 "광노화"는 태양광선에 반복적이거나 장기간 노출시 피부손상, 색소침착, 주름생성 또는 피부의 탄력이 저하되는 현상을 의미한다.

[88] 본 명세서에서, "예방"은 본 발명의 펩타이드 또는 이를 포함하는 조성물에 의해 광노화의 발생, 확산 및 재발을 억제 또는 지연시키는 모든 행위를 의미한다.

[89] 본 명세서에서, “개선 또는 치료”는 본 발명의 펩타이드 또는 이를 포함하는 조성물에 의해 광노화의 진행을 지연, 중단 또는 역전시키는 등, 광노화와 관련하여 이롭게 변경하는 모든 행위를 의미한다.

[90] 본 발명의 구체적인 실시예에서, 상기 펩타이드는 콜라겐, 피브로넥틴, 엘라스틴 및/또는 히알루론산과 같은 세포외기질(ECM) 단백질의 발현 또는 분비를 증가시키고, AQP3 및/또는 SIRT1과 같은 피부 장벽 강화 인자의 발현을 증가시킴으로써 광노화를 예방, 개선 또는 치료할 수 있다.

[91] 또한, 상기 펩타이드는 노화 또는 외부 자극에 의해 손상된 세포에서 활성산소(ROS)의 생성을 억제하고, 감소된 콜라겐, 피브로넥틴 및/또는 엘라스틴의 발현을 증가시키고, 증가된 MMP-1의 발현을 억제하고, 감소된 AQP3 및/또는 SIRT1과 같은 피부 장벽 강화 인자의 발현을 증가시킴으로써 광노화를 예방, 개선 또는 치료할 수 있다.

[92] 본 발명의 약학 조성물은 약학적으로 허용 가능한 담체를 더 포함할 수 있다.

[93] 약학적으로 허용되는 담체로는 예컨대, 경구 투여용 담체 또는 비경구 투여용 담체를 추가로 포함할 수 있다. 경구 투여용 담체는 락토스, 전분, 셀룰로스 유도체, 마그네슘 스테아레이트, 스테아르산 등을 포함할 수 있다. 또한 비경구 투여용 담체는 물, 적합한 오일, 식염수, 수성 글루코스 및 글리콜 등을 포함할 수 있다. 또한 안정화제 및 보존제를 추가로 포함할 수 있다. 적합한 안정화제로는 아황산수소나트륨, 아황산나트륨 또는 아스코르브산과 같은 항산화제가 있다. 적합한 보존제로는 벤즈알코늄 클로라이드, 메틸- 또는 프로필-파라벤 및 클로로부탄올이 있다. 적합한 약학적으로 허용되는 담체로는 Remington's Pharmaceutical Sciences(19th ed., Mack Publishing Company, Easton, PA, 1995)에 기재되어 있는 것을 참고로 할 수 있다.

[94] 본 발명의 약학적 조성물은 인간을 비롯한 포유동물에 어떠한 방법으로도 투여할 수 있다. 예를 들어, 경구 또는 비경구로 투여할 수 있으며, 비경구적인 투여방법으로는 이에 제한되는 것은 아니나, 정맥내, 근육내, 동맥내, 골수내, 경막내, 심장내, 경피, 피하, 복강내, 비강내, 장관, 국소, 설하 또는 직장내 투여일 수 있다.

[95] 본 발명의 약학적 조성물은 상술한 바와 같은 투여 경로에 따라 경구 투여용 또는 비경구 투여용 제제로 제형화 할 수 있고, 비경구 투여용 제제는 구체적으로 주사용 제제 또는 외용제의 형태로 제형화하여 사용할 수 있다.

[96] 본 발명의 약학적 조성물은 약학적으로 유효한 양으로 투여한다. 본 발명에 있어서 '약학적으로 유효한 양'은 의학적 치료에 적용 가능한 합리적인 수혜/위험 비율로 질환을 치료하기에 충분한 양을 의미하며, 유효 용량 수준은 환자의 질환의 종류, 중증도, 약물의 활성, 약물에 대한 민감도, 투여 시간, 투여 경로 및 배출 비율, 치료기간, 동시 사용되는 약물을 포함한 요소 및 기타 의학 분야에 잘 알려진 요소에 따라 결정될 수 있다. 상기 약학적 조성물은 개별 치료제로 투여하거나 다른 치료제와 병용하여 투여될 수 있고 종래의 치료제와는 동시에,

별도로, 또는 순차적으로 투여될 수 있으며, 단일 또는 다중 투여될 수 있다. 상기 요소들을 모두 고려하여 부작용 없이 최소한의 양으로 최대 효과를 얻을 수 있는 양을 투여하는 것이 중요하며, 이는 당업자에 의해 용이하게 결정될 수 있다.

[97] 상기 약학적 조성물의 유효량은 환자의 연령, 성별, 상태, 체중, 체내에 활성 성분의 흡수도, 불활성율, 배설 속도, 질병 종류, 병용되는 약물에 따라 달라질 수 있으며, 투여 경로, 중증도, 성별, 체중, 연령 등에 따라 증감될 수 있으며, 예를 들어 상기 약학적 조성물을 1일당 환자 체중 1㎏ 당 약 0.0001㎍ 내지 500mg, 바람직하게는 0.01㎍ 내지 100mg 투여할 수 있다.

[98] 상술한 바와 같이, 본 발명의 펩타이드는 피부 노화 억제 및 피부 재생 효과가 뛰어나므로, 피부 노화 억제 또는 피부 재생을 목적으로 하는 화장품 또는 광노화의 예방, 개선 또는 치료를 목적으로 하는 의약품의 원료로 사용할 수 있다.

[99] 본 발명의 또 다른 일 측면은 치료적 유효량의 서열번호 1의 아미노산 서열을 포함하는 펩타이드를 대상체에 투여하는 것을 포함하는 피부 노화 억제 또는 피부 재생 방법을 제공한다.

[100] 본 발명의 또 다른 일 측면은 치료적 유효량의 서열번호 1의 아미노산 서열을 포함하는 펩타이드를 대상체에 투여하는 것을 포함하는 광노화의 예방 또는 치료 방법을 제공한다.

[101] 상기 서열번호 1의 아미노산 서열을 포함하는 펩타이드는 상기 '피부 노화 억제 또는 피부 재생용 조성물' 항목에서 설명한 펩타이드와 동일한바, 구체적인 설명은 위에서 기재한 내용을 원용한다.

[102] 본 명세서에 있어서, 상기 용어 "치료적 유효량"은 상기 펩타이드의 처치 동안, 질환의 발병 빈도를 개선시키기 위한 목적을 달성하되, 통상 다른 치료법과 관련된 유해한 부작용은 피하는 펩타이드의 양을 의미한다.

[103] 본 발명의 또 다른 일 측면은 광노화의 예방 또는 치료를 위한 약제의 제조에 사용하기 위한 서열번호 1의 아미노산 서열의 용도를 제공한다.

[104]

[105] 이하, 본 발명을 실시예에 의해 상세히 설명한다.

[106] 단, 하기 실시예는 본 발명을 예시하기 위한 것일 뿐, 본 발명의 내용이 하기 실시예에 의해 한정되는 것은 아니다.

발명의 실시를 위한 형태

[107] **[합성예 1]**

[108] **서열번호 1의 아미노산 서열을 포함하는 펩타이드 합성**

[109] 자동 펩타이드 합성기(Liberty, CEM Corporation, 미국)를 이용하여 하기의 [표 1]에 기재된 서열번호 1의 아미노산 서열을 갖는 펩타이드를 합성하고, C18 역상 고성능액체크로마토그래피(HPLC)(U-3000, Thermo fisher scientific, 미국)를 이용하여 이들 합성된 펩타이드를 순수 분리하였다. 컬럼은 Pursuit XRs C18(250

* 4.65 mm 100Å, Agilent, 미국)을 이용하였다.

[110] [표1]

서열번호	펩타이드의 아미노산 서열
1	LCACCLHNCNECQ

[111] **[실험예 1] 펩타이드 처리에 따른 자연노화 억제 확인**

[112] **1-1. 세포외기질(ECM, extracellular matrix) 구성성분(콜라겐, 피브로넥틴, 엘라스틴) 유전자의 발현 증가 확인**

[113] 섬유아세포(fibroblast)를 대상으로 세포에서 자연적으로 진행되는 세포 노화현상을 본 발명의 펩타이드가 억제시켜 줄 수 있는지 여부를 확인하기 위하여, 자연노화와 관련된 유전자의 발현 수준을 확인하였다.

[114] 먼저, NIH3T3 세포(mouse fibroblast cell line)를 3×10^5 cell/well의 세포 밀도로 6-well plate에 seeding 후 24시간 동안 10 % Fetal bovine serum (FBS)을 포함한 DMEM 배지에서 배양하였다. 배양한 세포를 무혈청 DMEM 배지(serum free DMEM media)로 1회 세척하고, 상기 무혈청 DMEM 배지 1mL에 본 발명의 펩타이드를 각각 1, 10, 50 μM의 농도로 혼합하여 상기 세포에 분주하였다. PC(positive control)은 상기 펩타이드 대신에 TGF-β1 5ng/ml를 처리한 것으로 하였다. 세포를 24시간 동안 37℃의 CO_2 인큐베이터에서 배양하였다.

[115] 상기 배양한 세포를 PBS로 2회 세척하고 easy blue (iNtRON, Cat. No.: 17061, Korea)를 이용하여 세포로부터 RNA를 추출하였다. 추출된 RNA의 양을 정량하여, 튜브당 1000ng의 RNA를 가한 후 키트 (enzynomics, Cat. No.: PT200, Korea)를 이용하여 RT 반응을 진행하였다. PCR키트(enzynomics, Cat. No.: P581T, Korea)를 이용하여 RT-PCR을 진행하였다. RT-PCR시에 사용한 콜라겐, 피브로넥틴, 엘라스틴의 프라이머와 각 처리군의 전체 RNA 량 비교를 위해 사용된 GAPDH의 프라이머의 서열을 [표 2]에 나타내었다.

[116] [표2]

유전자	프라이머	서열(5'->3')	서열번호
Col1a1	F	CAC CCT CAA GAG CCT GAG TC	2
	R	AGA CGG CTG AGT AGG GAA CA	3
Fibronectin	F	CCA GGA ACC GAG TAC ACC AT	4
	R	ATA CCC AGG TTG GGT GAT GA	5
Elastin	F	GCAAGACCTGGCTTTGGACT	6
	R	GGGAGTTTCTGGTTAGGGCTG	7
SIRT1	F	TCA GTG GCT GGA ACA GTG AG	8
	R	TCT GGC ATG TCC CAC TAT CA	9
AQP3	F	CCT TCT TGG GTG CTG GAA TA	10
	R	ACA CGA TAA GGG AGG CTG TG	11
GAPDH	F	GGA GCC AAA AGG GTC ATC AT	12
	R	GTG ATG GCA TGG ACT GTG GT	13

[117] 그 결과, 도 1a 내지 도 1d에 나타난 바와 같이 상기 펩타이드를 처리한 경우 펩타이드의 농도가 증가함에 따라 점차 콜라겐, 피브로넥틴 및 엘라스틴 유전자의 발현이 증가하는 것을 확인하였다.이로부터, 서열번호 1의 아미노산 서열을 포함하는 펩타이드에 의하여 섬유아세포의 진피를 구성하는 세포외 기질 단백질인, 콜라겐, 피브로넥틴 및 엘라스틴 발현이 증가됨에 따라 피부 주름 등과 같은 자연 노화가 억제 또는 개선되는 효과가 있음을 알 수 있다.

[118] **1-2. 세포외기질(ECM, extracellular matrix) 구성성분(히알루론산) 유전자의 발현 증가 확인**

[119] 각질형성세포(keratinocyte)를 대상으로 세포에서 자연적으로 진행되는 세포 노화현상을 본 발명의 펩타이드가 억제시켜 줄 수 있는지 여부를 확인하기 위하여, 자연노화와 관련된 유전자의 발현 수준을 확인하였다.

[120] 먼저, HaCaT세포(human keratinocyte cell line)를 1×10^5 cell/well의 세포 밀도로 48-well plate에 seeding 후 24시간 동안 10 % Fetal bovine serum (FBS)을 포함한 DMEM 배지에서 배양하였다. 배양한 세포를 무혈청 DMEM 배지(serum free DMEM media)로 1회 세척하고, 상기 무혈청 DMEM 배지 2mL에 본 발명의 펩타이드를 각각 1, 10, 50 μM의 농도로 혼합하여 한 조건당 500 μL씩 3개의 well에 분주하였다. PC(positive control)은 상기 펩타이드 대신에 EGF 100 nM을 처리한 것으로 하였다. 세포를 24시간 동안 37℃의 CO_2 인큐베이터에서 배양하였다.

[121] 상기 배양한 HaCaT세포의 배지를 원심분리를 통해 부유물을 가라앉힌 후

상층액을 e-tube로 옮긴 후 이를 이용하여 HA ELISA(ECHELON biosciences, Cat No.:K-1200, USA)를 진행하였다.

[122] 그 결과, 도 2에 나타난 바와 같이 상기 펩타이드를 처리한 경우 펩타이드의 농도가 증가함에 따라 점차 히알루론산의 단백질 분비가 증가하는 것을 확인하였다.

[123] 이로부터, 서열번호 1의 아미노산 서열을 포함하는 펩타이드에 의하여 각질형성세포의 진피를 구성하는 세포외 기질 단백질인, 히알루론산 단백질의 양이 증가됨에 따라 피부 주름 등과 같은 자연 노화가 억제 또는 개선되는 효과가 있음을 알 수 있다.

[124] **1-3. 피부 장벽 기능 관련 유전자(SIRT1 및 AQP3)의 발현 증가 확인**

[125] 각질형성세포(keratinocyte)를 대상으로 세포에서 자연적으로 진행되는 세포 노화현상을 본 발명의 펩타이드가 억제시켜 줄 수 있는지 여부를 확인하기 위하여, 자연노화와 관련된 유전자의 발현 수준을 확인하였다.

[126] 먼저, HaCaT 세포를 3×10^5 cell/well의 세포 밀도로 6-well plate에 seeding 후 24시간 동안 10 % Fetal bovine serum (FBS)을 포함한 DMEM 배지에서 배양하였다. 배양한 세포를 무혈청 DMEM 배지(serum free DMEM media)로 1회 세척한 뒤, 상기 무혈청 DMEM 배지 1mL에 본 발명의 펩타이드를 각각 1, 10, 50 μM의 농도로 혼합하여 상기 세포에 분주하였다. PC(positive control)은 상기 펩타이드 대신에 EGF 100 nM를 처리한 것으로 하였다. 세포를 24시간 동안 37℃의 CO_2 인큐베이터에서 배양하였다.

[127] 상기 배양한 세포를 PBS로 2회 세척한 후, easy blue (iNtRON, Cat. No.: 17061, Korea)를 이용하여 세포로부터 RNA를 추출하였다. 추출된 RNA는 키트 (enzynomics, Cat. No.: RT200, Korea) 를 이용하여 RT 반응을 진행하였다. 이후, PCR키트(enzynomics, Cat. No.: R581T, Korea)를 이용하여 RT-PCR을 진행하였다. RT-PCR시에 사용한 AQP3, SIRT1 프라이머의 서열과 각 처리군의 전체 RNA 량 비교를 위해 사용된 GAPDH의 프라이머의 서열은 상기 [표 2]에 나타내었다.

[128] 그 결과, 도 3a 내지 도 3c에 나타난 바와 같이 상기 펩타이드를 처리한 경우 피부 장벽 강화 인자인 AQP3 및 SIRT1의 mRNA 레벨이 증가하는 것을 확인하였다.

[129] 이로부터, 서열번호 1의 아미노산 서열을 포함하는 펩타이드에 의하여 각질형성세포에서 피부 장벽 강화 인자인 AQP3 및 SIRT1의 발현 수준이 증가됨에 따라 자연 노화가 억제 또는 개선되는 효과가 있음을 알 수 있다.

[130] **[실험예 2]**

[131] **펩타이드 처리에 따른 외인성 노화 억제 확인**

[132] **2-1. 자외선에 의해 증가된 활성산소 억제 효과 확인**

[133] UV가 조사되면 활성산소의 레벨이 증가하므로, 본 발명의 펩타이드를 처리하는 경우 활성산소 레벨이 다시 감소하여 세포의 산화적 스트레스에 의한 노화 현상을 억제 할 수 있는지 여부를 확인하였다.

[134] 먼저, NIH3T3 세포와 HaCaT 세포를 각각 5×10^5 cell/well의 세포 밀도로 6-well plate에 seeding 후 24시간 동안 10 % Fetal bovine serum (FBS)을 포함한 DMEM 배지에서 배양하였다. 배양한 세포를 무혈청 DMEM 배지(serum free DMEM media)로 1회 세척한 뒤, 상기 무혈청 DMEM 배지 1mL에 본 발명의 펩타이드를 각각 1, 10, 50 μM의 농도로 혼합하여 상기 세포에 분주하였다. PC(Positive Control)은 상기 펩타이드 대신에 N-아세틸시스테인(N-Acetylcystein, NaC) 2.5 mM을 처리한 것으로 하였다.

[135] 1시간 동안 37℃, CO_2 인큐베이터에서 배양하였다. 상기 배양한 세포의 배지를 튜브로 옮기고, 1 ml의 PBS를 가한 후 UV 조사기(VILBER LOURMAT, Cat No.: 3102-BSU, 프랑스)를 이용하여 NIH3T3 세포는 8 J/cm^2의 UVA를 조사하고, HaCaT 세포는 15mJ/cm^2의 UVB를 조사하였다. PBS를 제거한 뒤 상기 튜브에 옮겨진 배지 900 μL 를 분주하여 24시간 동안 37℃, CO_2 인큐베이터에서 배양하였다. DCFH-DA(dichloro-dihydro-fluorescein diacetate)를 10 μM 처리한 뒤 호일로 감싸 30분 동안 37℃, CO_2 인큐베이터에서 배양하였다. PBS 로 2회 세척한 뒤, 1XTE 500 μL 분주하여 세포를 분리하였다. 원심분리 한 뒤 PBS로 세포를 세척한 뒤, FACS를 통해 형광 값을 측정하였다.

[136] 그 결과, 도 4a 및 도 4b에 나타난 바와 같이 NIH3T3 세포 및 HaCaT 세포에 본 발명의 펩타이드를 처리하면 UV 조사에 의해 증가한 세포 내 활성산소 레벨이 감소하는 것을 확인하였다.

[137] 이로부터, 서열번호 1의 아미노산 서열을 포함하는 펩타이드에 의하여 각질형성세포에서 UV 조사에 의해 증가되었던 활성산소 레벨이 다시 감소하고, 산화적 스트레스가 저해됨에 따라 세포의 광노화 현상이 방지되는 효과가 있음을 알 수 있다.

[138] **2-2. 자외선에 의해 억제된 세포외기질 구성성분(콜라겐, 피브로넥틴, 엘라스틴) 유전자의 발현 증가 확인**

[139] UV가 조사되면 세포외기질 구성성분 관련 유전자의 발현이 저해되므로, 본 발명의 펩타이드를 처리하는 경우 Col1a1, 피브로넥틴 및 엘라스틴 유전자의 발현량이 다시 회복되어 증가하는지 여부를 확인함으로써 세포의 광노화 현상을 억제할 수 있는지 여부를 확인하였다.

[140] 먼저, NIH3T3 세포를 5×10^5 cell/well의 세포 밀도로 6-well plate에 seeding 후 24시간 동안 10 % Fetal bovine serum (FBS)을 포함한 DMEM 배지에서 배양하였다. 배양한 세포를 무혈청 DMEM 배지(serum free DMEM media)로 1회 세척한 뒤, 상기 무혈청 DMEM 배지 1mL에 본 발명의 펩타이드를 각각 1, 10, 50 μM의 농도로 혼합하여 상기 세포에 분주하였다. PC(positive control)은 상기 펩타이드 대신에 50 μM의 Quercetin을 처리한 것으로 하였다. 세포를 1시간 동안 37℃의 CO_2 인큐베이터에서 배양하였다.

[141] 상기 배양한 세포의 배지를 튜브(e-tube)에 옮긴 후, 1 ml의 PBS를 가하고 UV 조사기(VILBER LOURMAT, Cat No.: 3102-BSU, 프랑스)를 이용하여 8 J/cm^2의

UVA를 조사하였다. PBS를 제거한 뒤 상기 튜브에 옮겨진 배지 900 μL를 분주하여 6시간 동안 37℃, CO_2 인큐베이터에서 배양하였다. PBS로 2회 세척 한 뒤, easy blue (iNtRON, Cat. No.: 17061, Korea)를 이용하여 세포로부터 RNA를 추출하였다. 추출된 RNA의 양을 정량하여, 튜브당 1000ng의 RNA를 가하여 키트(enzynomics, Cat. No.: RT200, Korea)를 이용하여 RT 반응을 진행하였다. 이후, PCR 키트(enzynomics, Cat. No.: R581T, Korea)를 이용하여 RT-PCR을 진행하였다. RT-PCR에 사용한 Col1a1, 피브로넥틴, 엘라스틴 프라이머의 서열과 각 처리군의 전체 RNA 량 비교를 위해 사용된 GAPDH의 프라이머의 서열은 상기 [표 2]에 나타내었다.

[142] 그 결과, 도 5a 내지 도 5d에 나타난 바와 같이 NIH3T3 세포에 본 발명의 펩타이드를 처리하면 UV 조사에 의해 감소된 Col1a1, 피브로넥틴 및 엘라스틴의 mRNA 레벨이 다시 증가하는 것을 확인하였다.

[143] 이로부터, 서열번호 1의 아미노산 서열을 포함하는 펩타이드에 의하여 섬유아세포에서 UV 조사에 의해 감소되었던 ECM 구성 성분의 발현 수준이 다시 회복됨에 따라 세포의 광노화 현상이 억제되는 효과가 있음을 알 수 있다.

[144] **2-3. 자외선에 의해 증가된 MMP-1의 발현 억제 확인**

[145] 콜라겐 분해와 관련된 단백질을 암호화하는 MMP-1은 자외선 조사에 의하여 발현이 증가되는바, 본 발명의 펩타이드를 처리하는 경우 상기 MMP-1 단백질의 발현이 다시 억제되어 세포 노화 현상을 억제할 수 있는지 여부를 확인하였다.

[146] 먼저, NIH3T3 세포와 HaCaT 세포를 각각 5×10^5 cell/well의 세포 밀도로 6-well plate에 seeding 후 24시간 동안 10 % Fetal bovine serum (FBS)을 포함한 DMEM 배지에서 배양하였다. 배양한 세포를 무혈청 DMEM 배지(serum free DMEM media)로 1회 세척하고, 무혈청 DMEM 배지 1mL에 본 발명의 펩타이드를 각각 1, 10, 50 μM의 농도로 혼합하여, 상기 세포에 분주하였다. PC(positive control)은 상기 펩타이드 대신에 2.5 mM의 N-Acetylcystein(NaC)를 처리한 것으로 하였다.

[147] 상기 세포를 1시간 동안 37℃, CO_2 인큐베이터에서 배양하였다. 배양한 세포의 배지를 튜브(e-tube)로 옮기고, 1 ml의 PBS를 가한 후 UV 조사기(VILBER LOURMAT, Cat No.: 3102-BSU, 프랑스)로 NIH3T3 세포는 6 J/cm^2의 UVA를 조사하고, HaCaT 세포는 15mJ/cm^2의 UVB를 조사하였다. PBS를 제거한 뒤 다시 상기 튜브에 옮겨 두었던 배지 900 μL를 첨가하고 24시간 동안 37℃, CO_2 인큐베이터에서 배양하였다. 배양한 세포의 배지를 튜브에 옮기고 PBS로 2회 세척한 후 세포용해 완충액을 첨가하여 세포를 용해시켰다. 5X sample buffer를 처리하여 샘플을 준비한 후 10% SDS-PAGE 겔을 이용하여 SDS-PAGE를 진행하였다. SDS-PAGE를 통해 분리한 단백질을 PVDF membrane으로 옮겼다. 5% skim milk를 사용하여 1시간 동안 실온에서 블로킹(blocking)을 진행하였다. 항 MMP-1 항체(Abcam, Cat. No.: ab137332, UK)를 1:1000으로 5% skim milk에 희석하여 membrane과 2시간 동안 반응시켰다. 이어서, 0.1% PBS-T(0.1% Tween-20 in PBS)로 10분씩 3회 세척하였다. Goat anti-rabbit IgG (Jackson Immune

Research, Cat. No.: 111-035-033, USA)를 1:3000으로 5% skim milk에 희석하여 membrane과 2시간 동안 반응시켰다. 그후, ECL 용액(GE Healthcare, Cat. No.: RPN2232, USA)을 이용하여 film으로 검출하였다. β-액틴은 실험에 사용한 단백질 총량을 비교하기 위하여 항-β-액틴 항체(Santacruz biotechnology, USA)를 이용하여 확인하였다.

[148] 그 결과, 도 6a 및 도 6b에 나타난 바와 같이 본 발명의 펩타이드는 NIH3T3 세포 및 HaCaT 세포에서 UV 조사에 의해 증가된 MMP-1의 발현을 억제할 수 있음을 확인하였다.

[149] 이를 통해 서열번호 1의 아미노산 서열을 포함하는 펩타이드에 의해 섬유아세포 및 각질형성세포에서 UV 조사에 의해 증가되었던 MMP-1의 발현을 다시 감소시킬 수 있어 세포의 노화 현상이 억제됨에 따라 피부 주름의 개선 효과가 있음을 알 수 있다.

[150] **2-4. 자외선에 의해 감소된 피부 장벽 기능 관련 유전자(SIRT1 및 AQP3)의 발현 증가 확인**

[151] UV가 조사되면 노화와 관련된 유전자의 발현이 저해되므로, 본 발명의 펩타이드를 처리하는 경우 AQP3 및 SIRT1의 발현량이 다시 회복되어 증가하는지 여부를 확인함으로써 세포의 광노화 현상을 억제할 수 있는지 여부를 확인하였다.

[152] 먼저, HaCaT 세포를 5×10^5 cell/well의 세포 밀도로 6-well plate에 seeding 후 24시간 동안 10 % Fetal bovine serum (FBS)을 포함한 DMEM 배지에서 배양하였다. 배양한 세포를 무혈청 DMEM 배지(serum free DMEM media)로 1회 세척한 뒤, 상기 무혈청 DMEM 배지 1mL에 본 발명의 펩타이드를 각각 1, 10, 50 μM의 농도로 혼합하여 상기 세포에 분주하였다. PC(positive control)은 상기 펩타이드 대신에 2.5 mM의 N-Acetylcystein(NaC)를 처리한 것으로 하였다.

[153] 세포를 1시간 동안 37℃의 CO_2 인큐베이터에서 배양하였다. 배양한 세포의 배지를 튜브(e-tube)로 옮기고, 1 ml의 PBS를 가한 후 UV 조사기(VILBER LOURMAT, Cat No.: 3102-BSU, 프랑스)로 20mJ/cm^{2}의 UVB를 조사하였다. PBS를 제거한 뒤 다시 상기 튜브에 옮겨 두었던 배지 900 μL를 첨가하고 4시간 동안 37℃, CO_2 인큐베이터에서 배양하였다. 상기 배양한 세포를 PBS로 2회 세척한 후, easy blue (iNtRON, Cat. No.: 17061, Korea)를 이용하여 세포로부터 RNA를 추출하였다. 추출된 RNA는 키트 (enzynomics, Cat. No.: RT200, Korea) 를 이용하여 RT 반응을 진행하였다. 이후, PCR키트(enzynomics, Cat. No.: R581T, Korea)를 이용하여 RT-PCR을 진행하였다. RT-PCR시에 사용한 AQP3, SIRT1 프라이머의 서열과 각 처리군의 전체 RNA 량 비교를 위해 사용된 GAPDH의 프라이머의 서열은 상기 [표 2]에 나타내었다.

[154] 그 결과, 도 7a 내지 도 7c에 나타난 바와 같이 상기 펩타이드를 처리한 경우 UV 조사에의해 감소되었던 AQP3 및 SIRT1의 mRNA 레벨이 다시 증가하는 것을 확인하였다.

[155] 이로부터, 서열번호 1의 아미노산 서열을 포함하는 펩타이드에 의하여 각질형성세포에서 UV 조사에 의해 감소되는 피부 장벽 강화 인자인 AQP3 및 SIRT1의 발현 수준이 다시 증가됨에 따라 자외선에 의한 노화가 억제 또는 개선되는 효과가 있음을 알 수 있다.

[156] 이상에서 본 발명은 기재된 실시예에 대해서만 상세히 설명되었지만 본 발명의 기술사상 범위 내에서 다양한 변형 및 수정이 가능함은 당업자에게 있어서 명백한 것이며, 이러한 변형 및 수정이 첨부된 청구범위에 속함은 당연한 것이다.

청구범위

[청구항 1] 서열번호 1의 아미노산 서열을 포함하는 펩타이드.

[청구항 2] 청구항 1에 있어서,
상기 펩타이드는 피부 노화 억제 활성 또는 피부 재생 활성을 갖는 것인 펩타이드.

[청구항 3] 청구항 1의 펩타이드를 유효성분으로 포함하는 피부 노화 억제 또는 피부재생용 조성물.

[청구항 4] 청구항 3에 있어서,
상기 조성물은 노화 또는 외부 자극에 의한 세포 손상에 대한 저항성을 증진시키는 것인, 피부 노화 억제 또는 피부재생용 조성물.

[청구항 5] 청구항 4에 있어서,
상기 외부 자극은 자외선 또는 적외선인, 피부 노화 억제 또는 피부 재생용 조성물.

[청구항 6] 청구항 4에 있어서,
상기 세포는 피부 섬유아세포 또는 각질형성세포인, 피부 노화 억제 또는 피부 재생용 조성물.

[청구항 7] 청구항 3에 있어서,
상기 조성물은 i) 콜라겐(Collagen), 피브로넥틴(fibronectin), 엘라스틴(elastin) 또는 히알루론산(hyaluronic acid)의 발현 또는 분비를 증가시키고, ii) SIRT1 또는 AQP3의 발현을 증가시키는 것인, 피부 노화 억제 또는 피부 재생용 조성물.

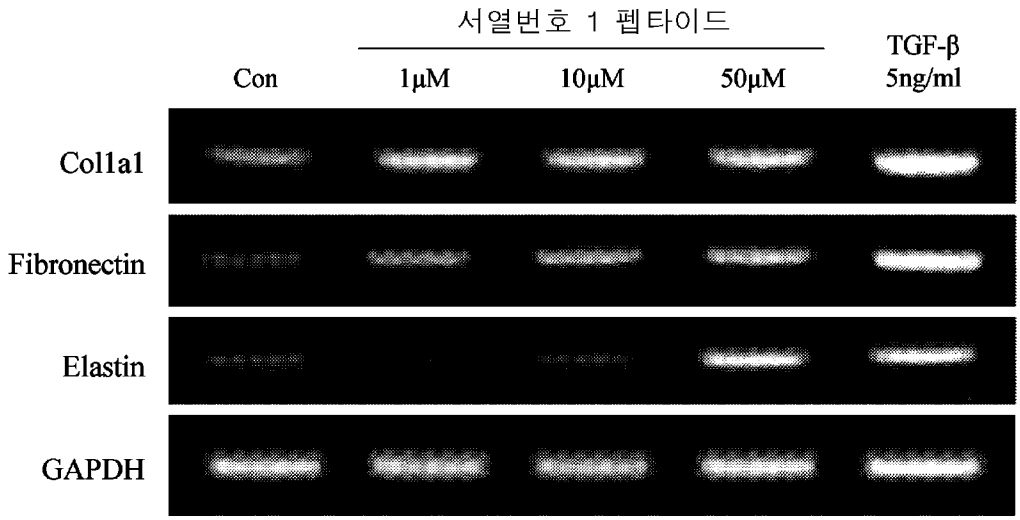
[청구항 8] 청구항 3에 있어서,
상기 조성물은 i) 자외선에 의한 활성산소(ROS)의 생성을 억제하고, ii) 자외선에 의해 감소된 콜라겐, 피브로넥틴 또는 엘라스틴의 발현을 증가시키고, iii) 자외선에 의해 증가된 MMP-1의 발현을 억제하는 것인, 피부 노화 억제 또는 피부 재생용 조성물.

[청구항 9] 청구항 1의 펩타이드를 유효성분으로 포함하는, 피부 노화 억제 또는 피부 재생용 화장료 조성물.

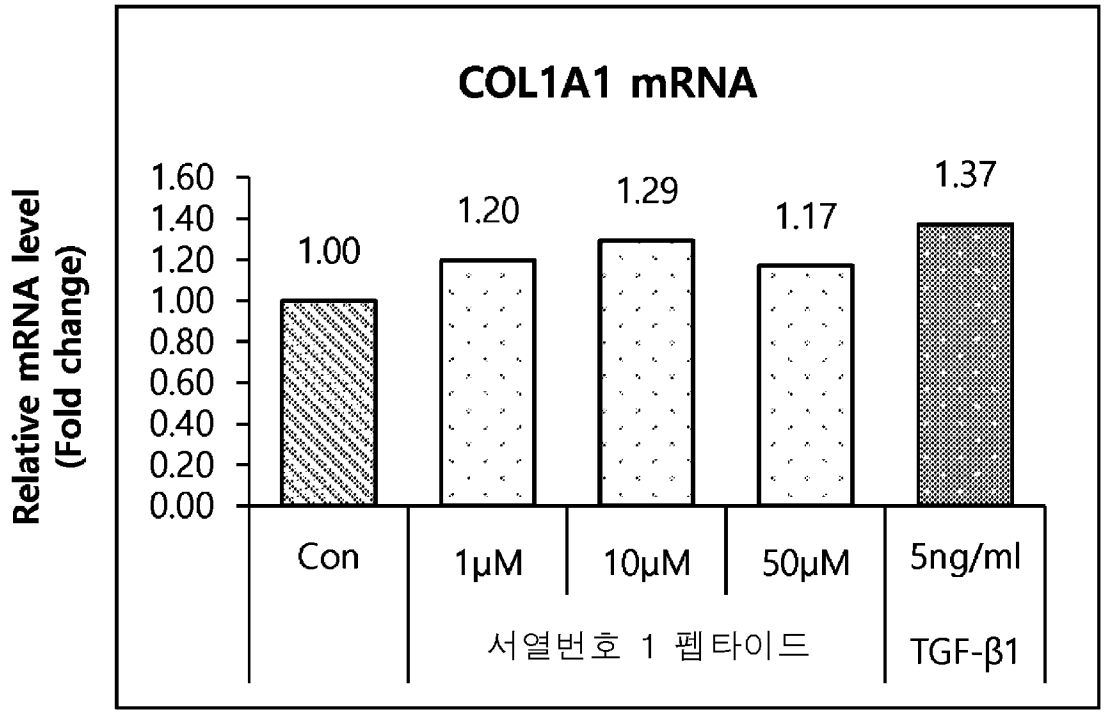
[청구항 10] 청구항 9에 있어서,
상기 피부 노화 억제 또는 피부 재생은 피부 주름의 예방 또는 개선, 피부 탄력 증진, 피부 장벽 강화, 색소침착의 예방 또는 피부 광노화 개선인 것인, 피부 노화 억제 또는 피부 재생용 화장료 조성물.

[청구항 11] 청구항 1의 펩타이드를 유효성분으로 포함하는, 광노화 예방 또는 치료용 약학적 조성물.

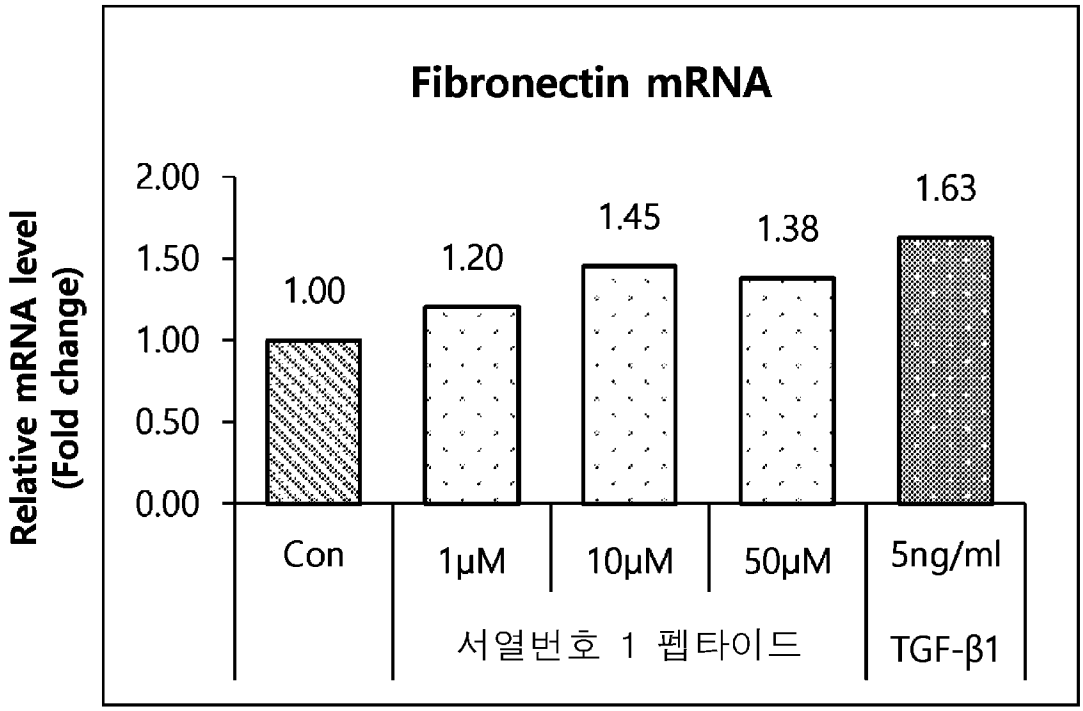
[도1a]


서열번호 1 펩타이드
Con
1μM
10μM
50μM
TGF-β
5ng/ml
Col1a1
Fibronectin
Elastin
GAPDH

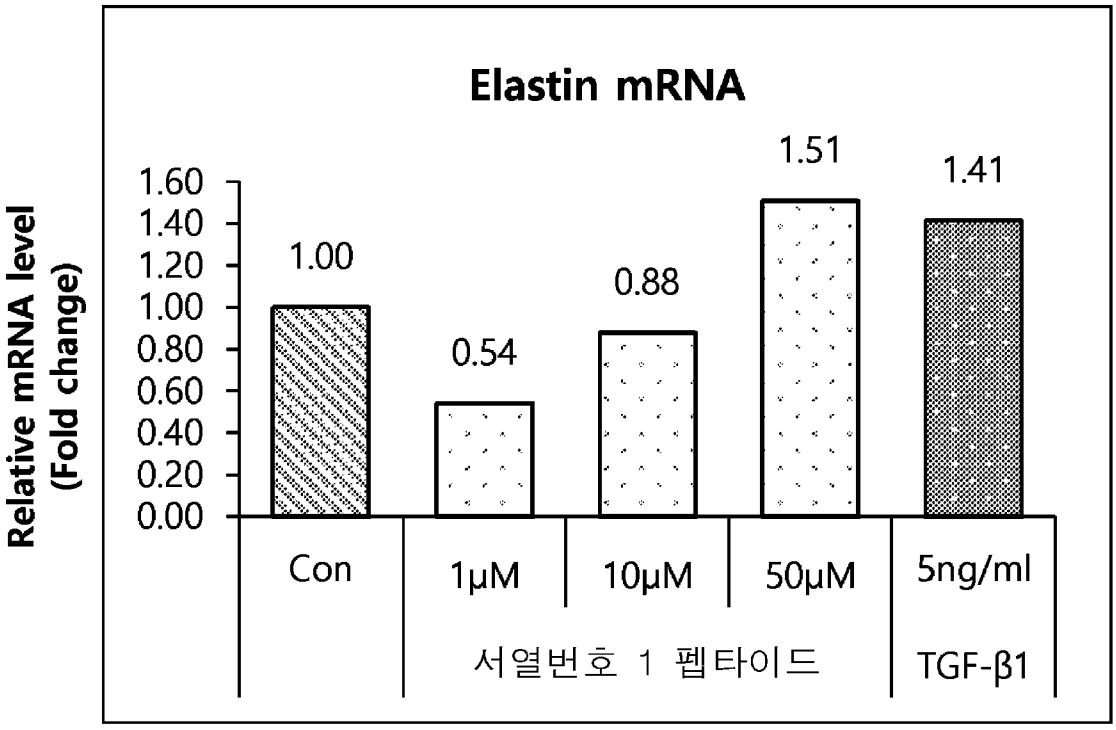
[도1b]


COL1A1 mRNA
Relative mRNA level
(Fold change)
1.60
1.40
1.20
1.00
0.80
0.60
0.40
0.20
0.00
1.00
1.20
1.29
1.17
1.37
Con
1μM
10μM
50μM
5ng/ml
서열번호 1 펩타이드
TGF-β1

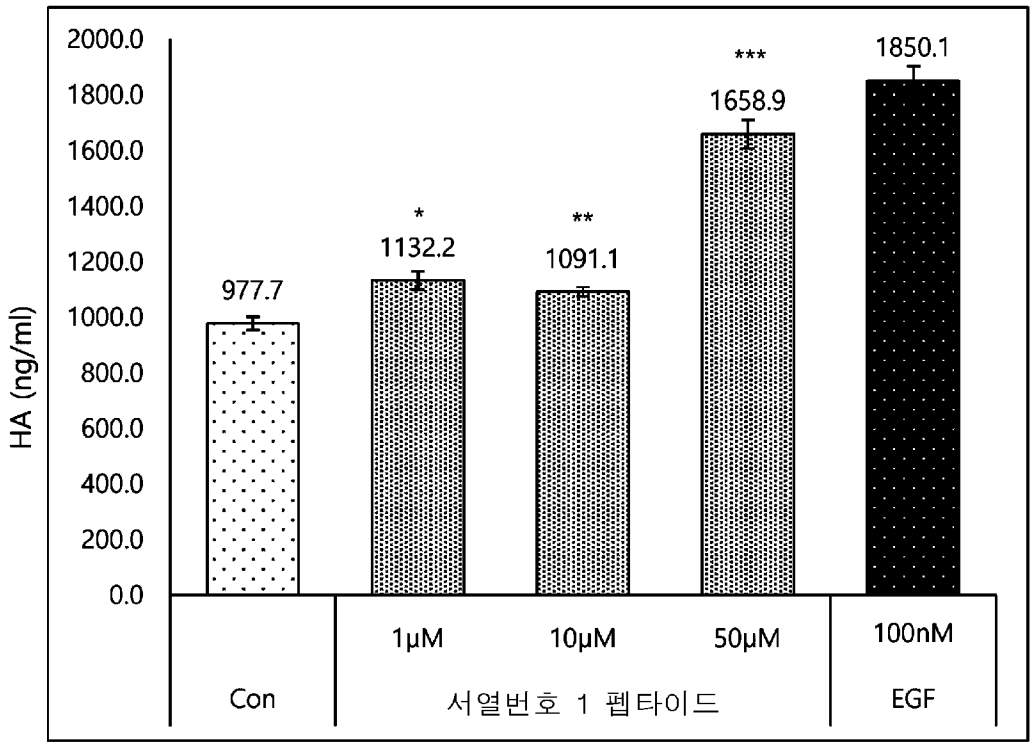
[도1c]


Fibronectin mRNA
Relative mRNA level (Fold change)
2.00
1.50
1.00
0.50
0.00
1.00
1.20
1.45
1.38
1.63
Con
1μM
10μM
50μM
5ng/ml
서열번호 1 펩타이드
TGF-β1

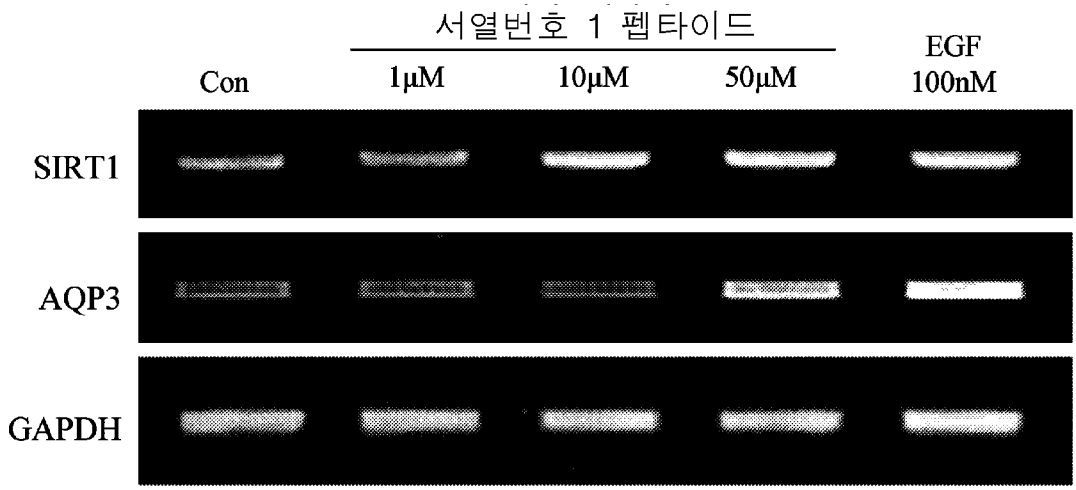
[도1d]


Elastin mRNA
Relative mRNA level (Fold change)
1.60
1.40
1.20
1.00
0.80
0.60
0.40
0.20
0.00
1.00
0.54
0.88
1.51
1.41
Con
1μM
10μM
50μM
5ng/ml
서열번호 1 펩타이드
TGF-β1

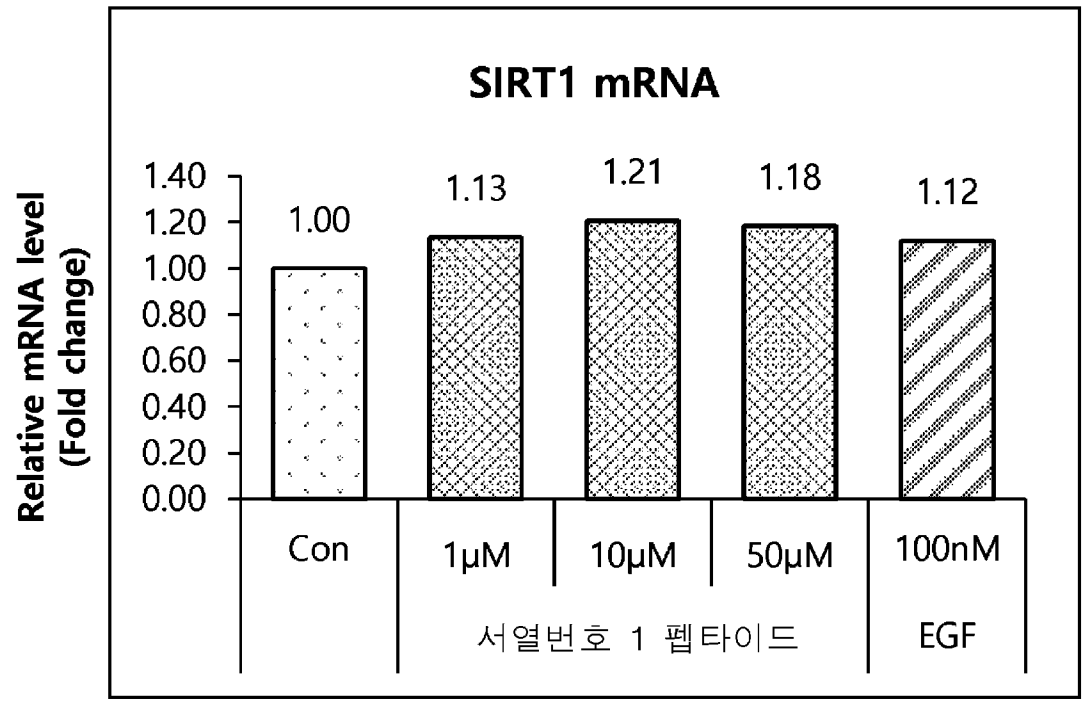
[도2]


2000.0
1800.0
1600.0
1400.0
1200.0
1000.0
800.0
600.0
400.0
200.0
0.0
HA (ng/ml)
977.7
*
1132.2
**
1091.1
***
1658.9
1850.1
Con
1μM
10μM
50μM
100nM
EGF
서열번호 1 펩타이드

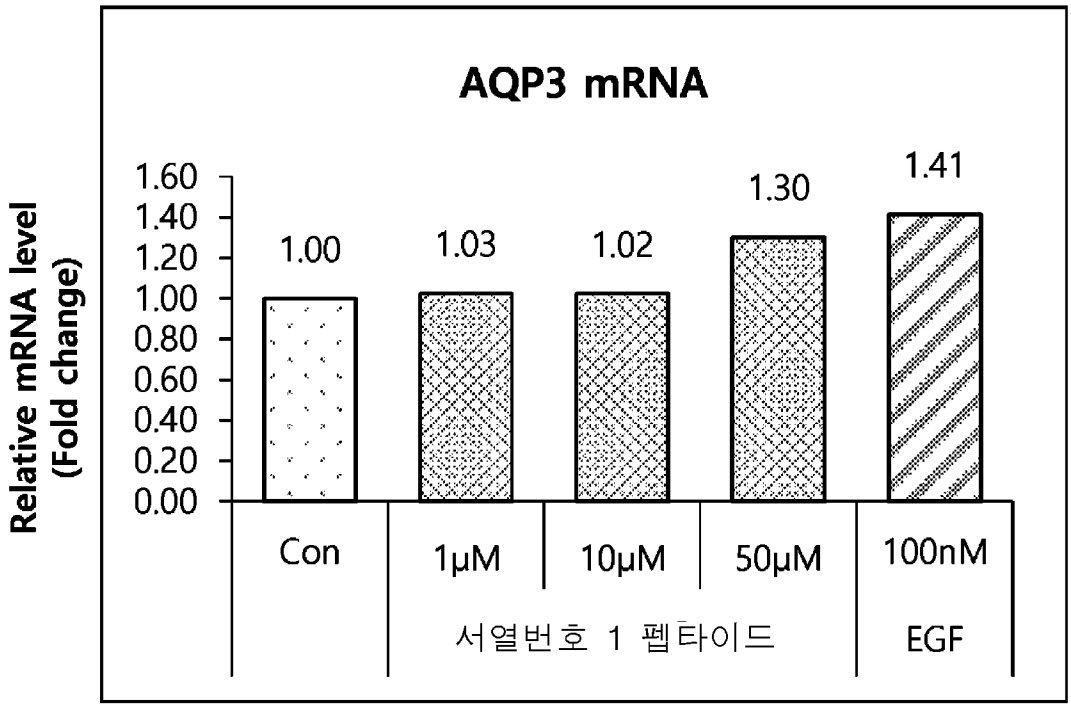
[도3a]


서열번호 1 펩타이드
Con
1μM
10μM
50μM
EGF
100nM
SIRT1
AQP3
GAPDH

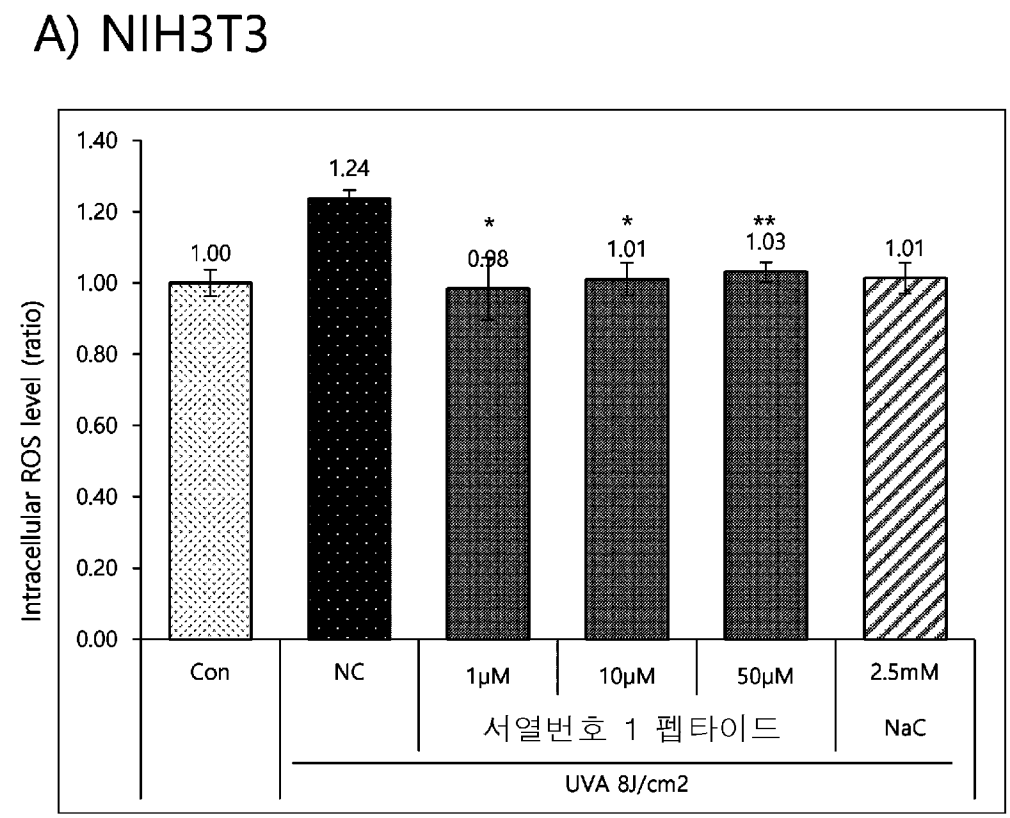
[도3b]


SIRT1 mRNA
Relative mRNA level (Fold change)
1.40
1.20
1.00
0.80
0.60
0.40
0.20
0.00
1.00
1.13
1.21
1.18
1.12
Con
1μM
10μM
50μM
100nM
서열번호 1 펩타이드
EGF

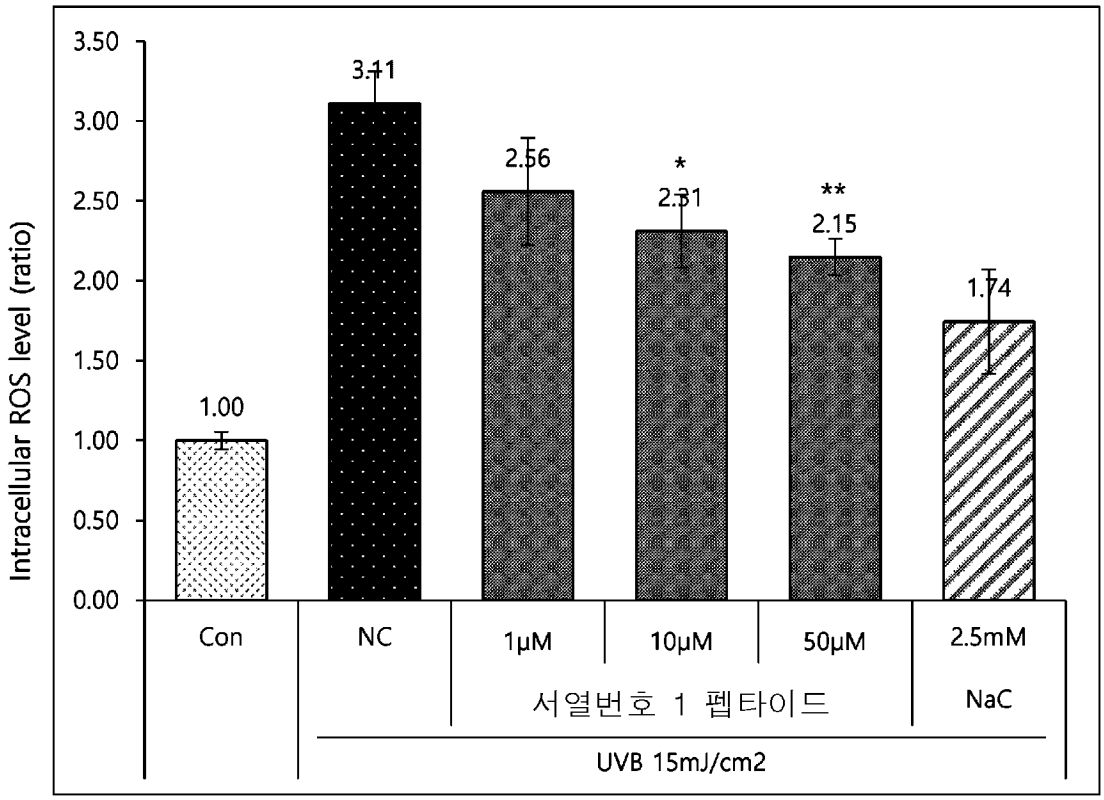
[도3c]


AQP3 mRNA
Relative mRNA level (Fold change)
1.60
1.40
1.20
1.00
0.80
0.60
0.40
0.20
0.00
1.00
1.03
1.02
1.30
1.41
Con
1μM
10μM
50μM
100nM
서열번호 1 펩타이드
EGF

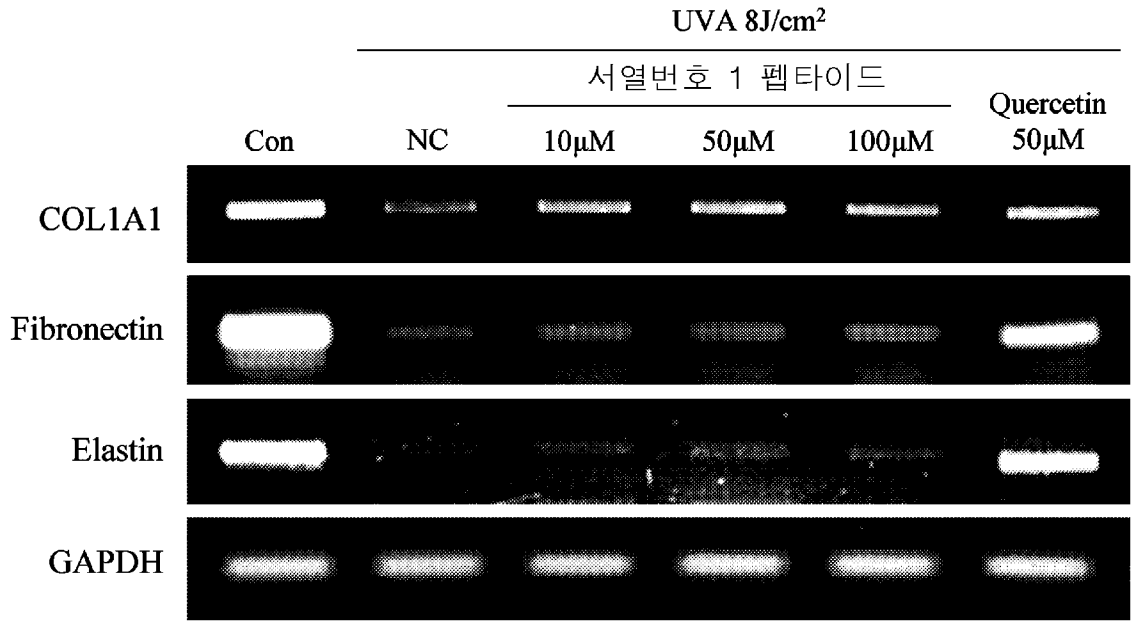
[도4a]


A) NIH3T3
Intracellular ROS level (ratio)
1.40
1.20
1.00
0.80
0.60
0.40
0.20
0.00
1.00
1.24
*
0.98
*
1.01
**
1.03
1.01
Con
NC
1μM
10μM
50μM
2.5mM
서열번호 1 펩타이드
NaC
UVA 8J/cm2

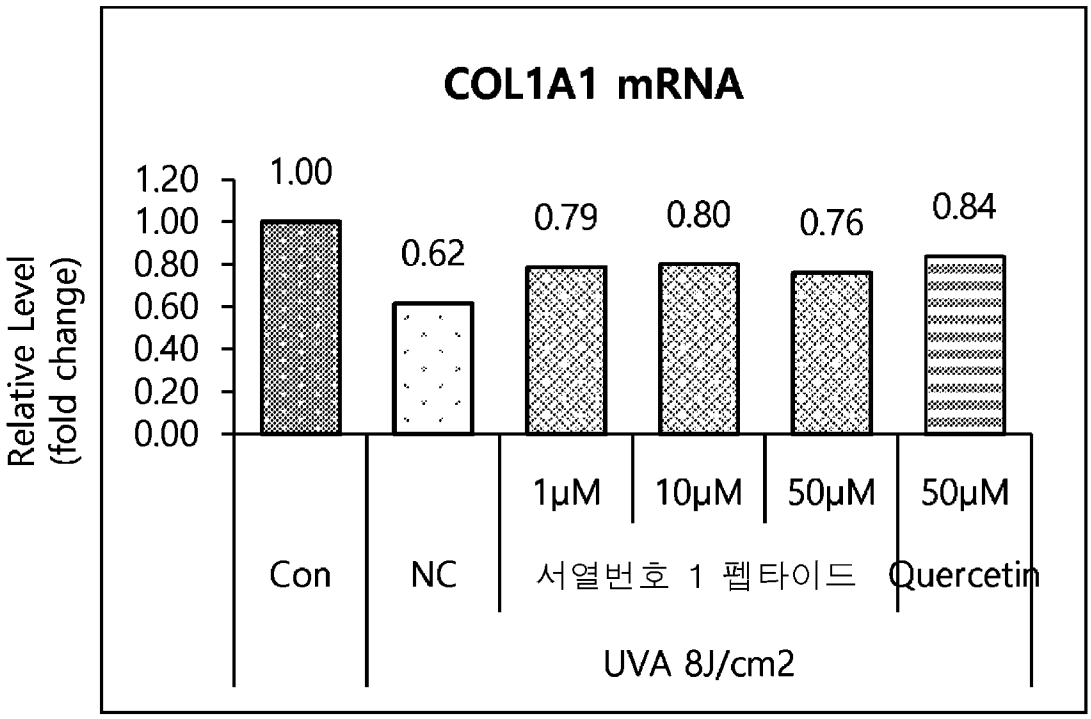
[도4b]


B) HaCaT
Intracellular ROS level (ratio)
3.50
3.00
2.50
2.00
1.50
1.00
0.50
0.00
1.00
3.11
2.56
*
2.31
**
2.15
1.74
Con
NC
1μM
10μM
50μM
2.5mM
서열번호 1 펩타이드
NaC
UVB 15mJ/cm2

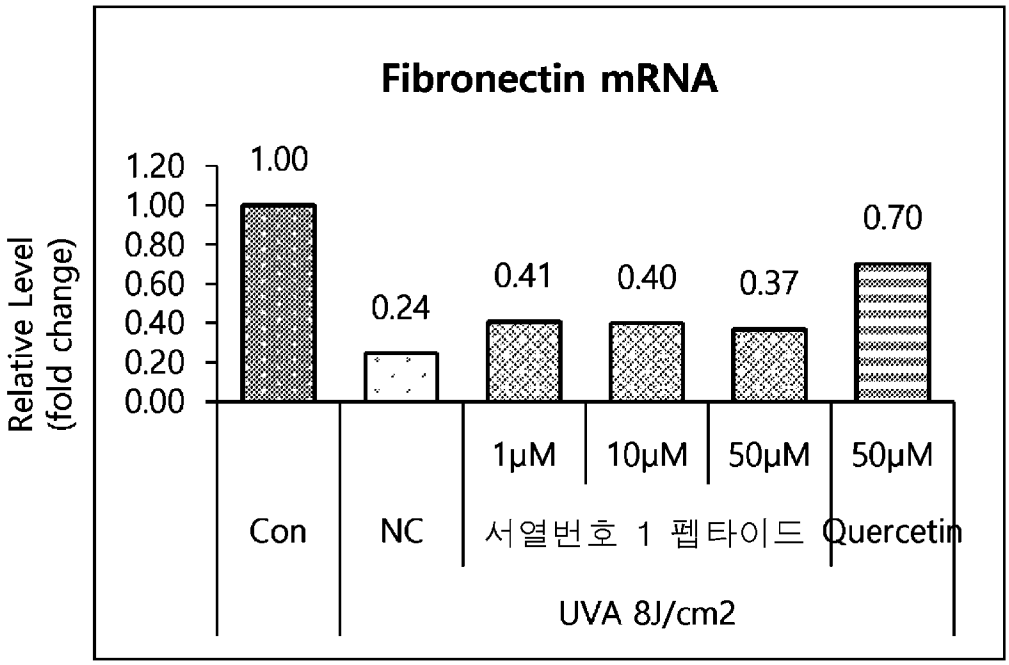
[도5a]


UVA 8J/cm²
서열번호 1 펩타이드
Con
NC
10μM
50μM
100μM
Quercetin 50μM
COL1A1
Fibronectin
Elastin
GAPDH

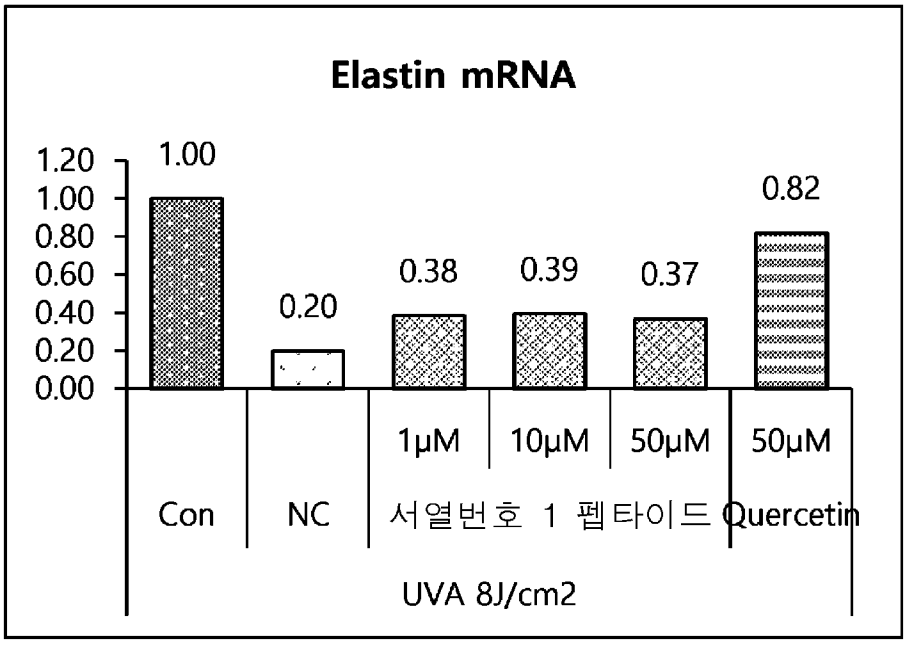
[도5b]


COL1A1 mRNA
Relative Level (fold change)
1.20
1.00
0.80
0.60
0.40
0.20
0.00
1.00
0.62
0.79
0.80
0.76
0.84
1μM
10μM
50μM
50μM
Con
NC
서열번호 1 펩타이드
Quercetin
UVA 8J/cm2

[도5c]

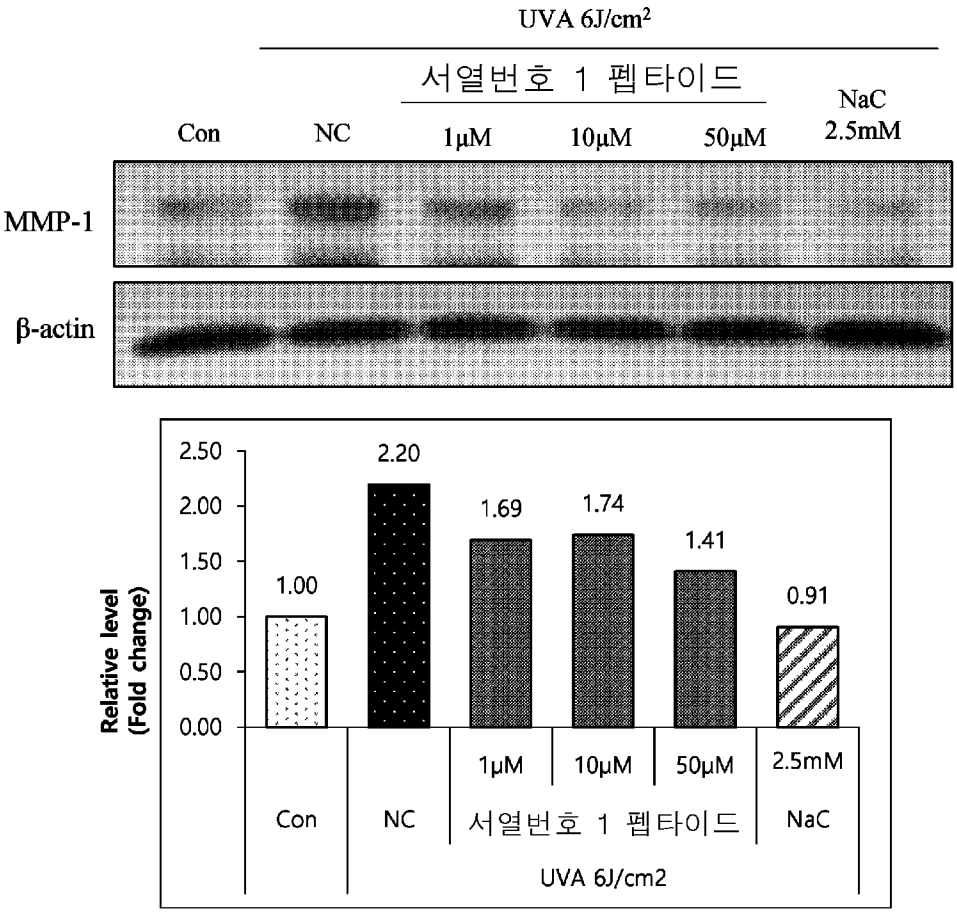

Fibronectin mRNA
Relative Level (fold change)
1.20
1.00
0.80
0.60
0.40
0.20
0.00
1.00
0.24
0.41
0.40
0.37
0.70
Con
NC
1μM
10μM
50μM
50μM
서열번호 1 펩타이드
Quercetin
UVA 8J/cm2

[도5d]


Elastin mRNA
Relative Level (fold change)
1.20
1.00
0.80
0.60
0.40
0.20
0.00
1.00
0.20
0.38
0.39
0.37
0.82
Con
NC
1μM
10μM
50μM
50μM
서열번호 1 펩타이드
Quercetin
UVA 8J/cm2

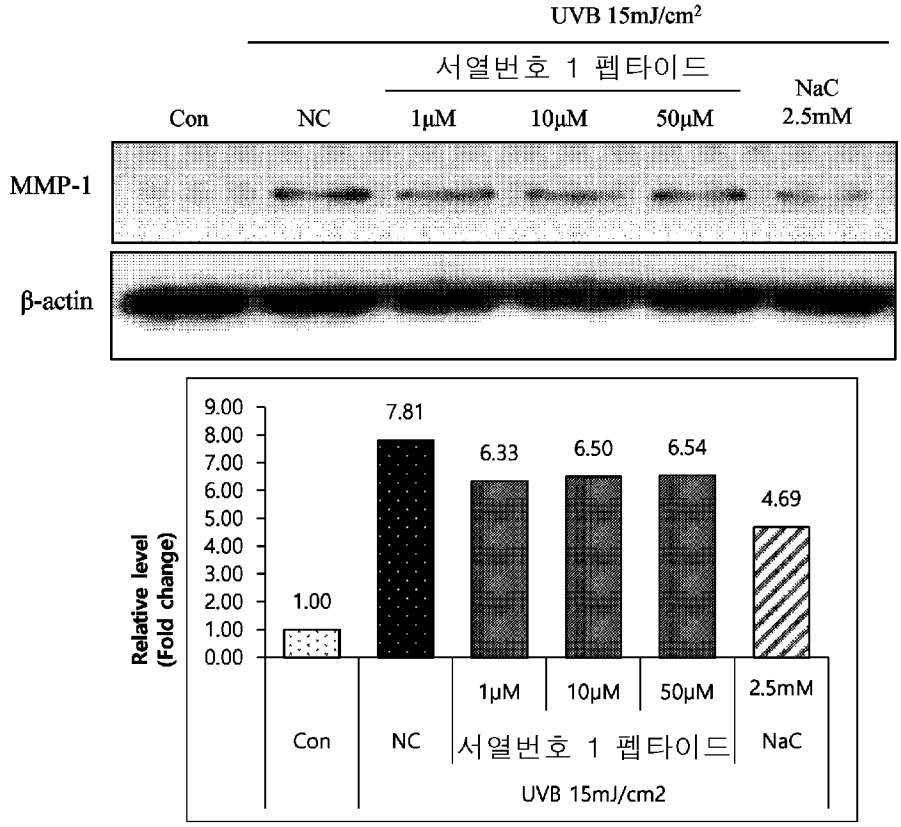
[도6a]

A) NIH3T3

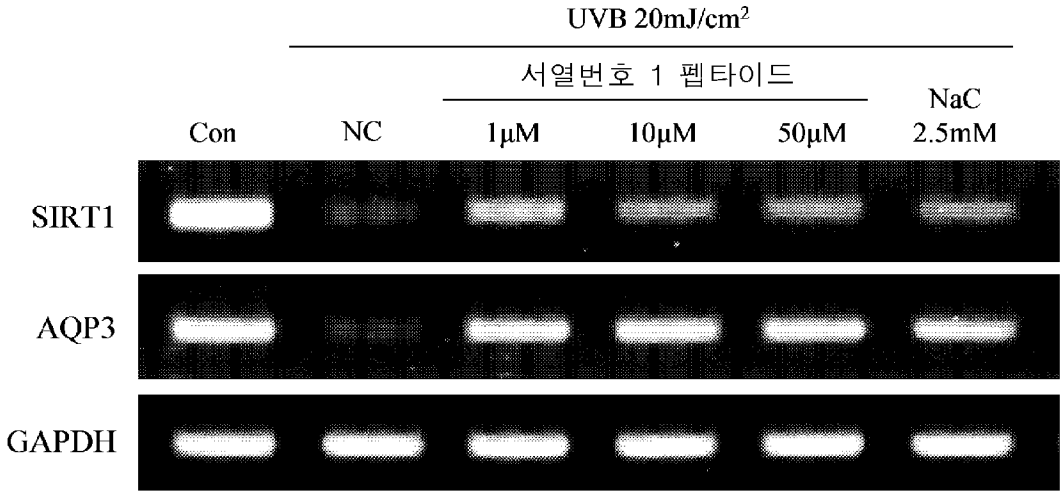

UVA 6J/cm²
서열번호 1 펩타이드
Con
NC
1μM
10μM
50μM
NaC
2.5mM
MMP-1
β-actin
Relative level
(Fold change)
2.50
2.00
1.50
1.00
0.50
0.00
1.00
2.20
1.69
1.74
1.41
0.91
1μM
10μM
50μM
2.5mM
Con
NC
서열번호 1 펩타이드
NaC
UVA 6J/cm2

[도6b]

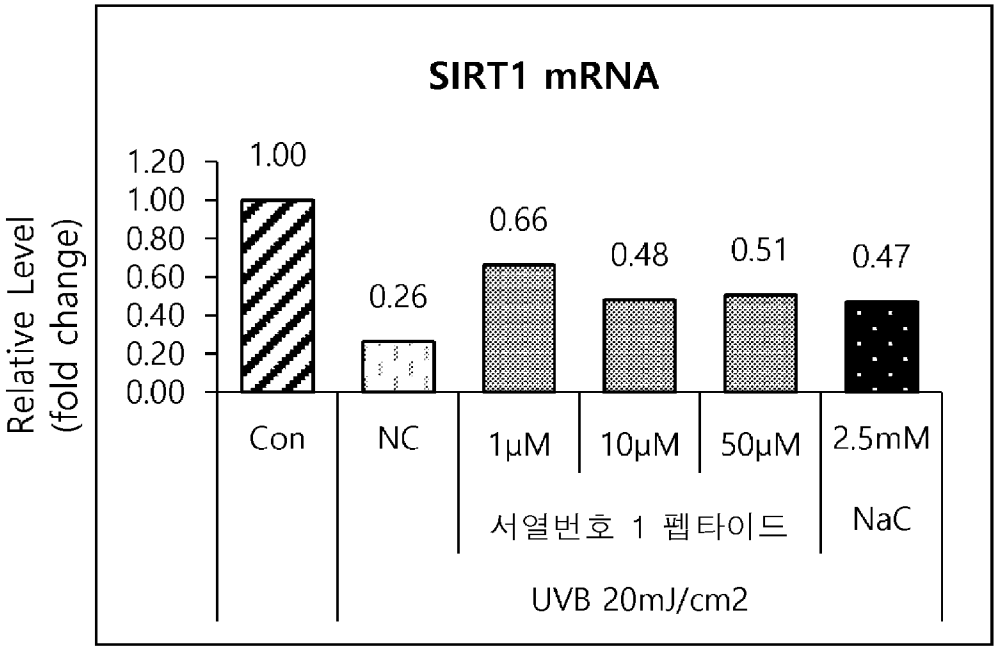
B) HaCaT



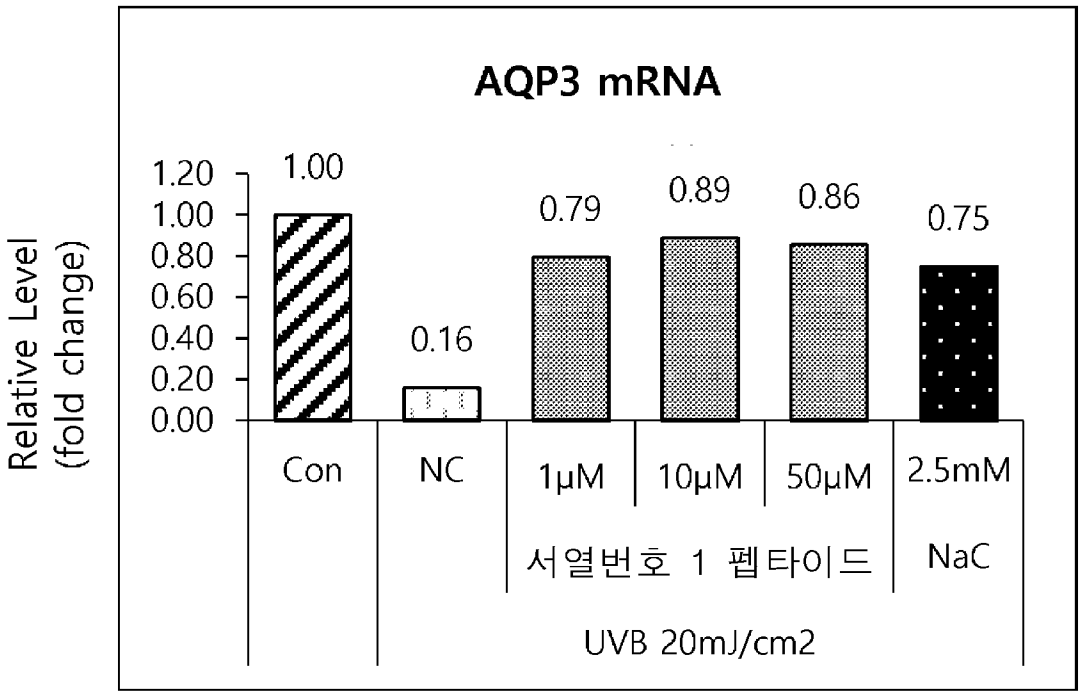
[도7a]



[도7b]


SIRT1 mRNA
Relative Level (fold change)
1.20
1.00
0.80
0.60
0.40
0.20
0.00
1.00
0.26
0.66
0.48
0.51
0.47
Con
NC
1μM
10μM
50μM
2.5mM
서열번호 1 펩타이드
NaC
UVB 20mJ/cm2

[도7c]


AQP3 mRNA
Relative Level (fold change)
1.20
1.00
0.80
0.60
0.40
0.20
0.00
1.00
0.16
0.79
0.89
0.86
0.75
Con
NC
1μM
10μM
50μM
2.5mM
서열번호 1 펩타이드
NaC
UVB 20mJ/cm2

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.
PCT/KR2022/014392

A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER

C07K 7/08(2006.01)i; **A61K 38/00**(2006.01)i; **A61P 17/00**(2006.01)i; **A61K 8/64**(2006.01)i; **A61Q 19/00**(2006.01)i

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)

C07K 7/08(2006.01); A61K 38/00(2006.01); A61K 38/08(2006.01); A61K 38/18(2006.01); A61P 17/02(2006.01); C07K 7/06(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: 피부(skin), 노화(aging), 재생(regeneration), 펩타이드(peptide), LCACCLHNCNECQ

C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
A	WO 2020-107079 A1 (INTERK PEPTIDE THERAPEUTICS LIMITED) 04 June 2020 (2020-06-04) See abstract; and claims 1, 31, 36 and 37.	1-11
A	KR 10-2021-0022405 A (CAREGEN CO., LTD.) 03 March 2021 (2021-03-03) See entire document.	1-11
A	KR 10-2021-0075098 A (COLOSSEUM COMBINATORIAL CHEMISTRY CENTRE FOR TECHNOLOGY SOCIETA A RESPONSABILITA` LIMITATA IN FORMA ABBREVIATA C4T S.R.L.) 22 June 2021 (2021-06-22) See entire document.	1-11
A	KR 10-2065171 B1 (CAREGEN CO., LTD.) 13 January 2020 (2020-01-13) See entire document.	1-11
A	NCBI. GenBank accession no. KAH0509882.1. Platelet-derived growth factor C [Microtus ochrogaster]. 15 September 2021. See entire document.	1-11

☐ 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	Date of mailing of the international search report
29 December 2022	**30 December 2022**

Name and mailing address of the ISA/KR	Authorized officer
Korean Intellectual Property Office **Government Complex-Daejeon Building 4, 189 Cheongsa-ro, Seo-gu, Daejeon 35208**	
Facsimile No. **+82-42-481-8578**	Telephone No.

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.
PCT/KR2022/014392

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 13*ter*.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
Information on patent family members

International application No.
PCT/KR2022/014392

Patent document cited in search report	Publication date (day/month/year)	Patent family member(s)	Publication date (day/month/year)
WO 2020-107079 A1	04 June 2020	AU 2019-388295 A1	03 June 2021
		CA 3120624 A1	04 June 2020
		CN 113166205 A	23 July 2021
		EP 3887389 A1	06 October 2021
		JP 2022-513171 A	07 February 2022
		KR 10-2021-0097729 A	09 August 2021
KR 10-2021-0022405 A	03 March 2021	CN 114206905 A	18 March 2022
		EP 4019530 A1	29 June 2022
		JP 2022-545243 A	26 October 2022
		KR 10-2265430 B1	15 June 2021
		US 2022-0241174 A1	04 August 2022
		WO 2021-033829 A1	25 February 2021
KR 10-2021-0075098 A	22 June 2021	AU 2019-357261 A1	13 May 2021
		CA 3115025 A1	16 April 2020
		CN 112823039 A	18 May 2021
		EA 202190888 A1	07 July 2021
		EP 3863728 A1	18 August 2021
		IL 282064 D0	31 May 2021
		IT 201800009384 A1	11 April 2020
		JP 2022-508676 A	19 January 2022
		SG 11202103026 A	29 April 2021
		US 2021-0395305 A1	23 December 2021
		WO 2020-075108 A1	16 April 2020
KR 10-2065171 B1	13 January 2020	CN 112236441 A	15 January 2021
		EP 3904369 A1	03 November 2021
		JP 2021-526145 A	30 September 2021
		JP 7048766 B2	05 April 2022
		US 11433013 B2	06 September 2022
		US 2021-0205200 A1	08 July 2021
		WO 2020-171285 A1	27 August 2020

국 제 조 사 보 고 서

국제출원번호
PCT/KR2022/014392

A. 발명이 속하는 기술분류(국제특허분류(IPC))

C07K 7/08(2006.01)i; **A61K 38/00**(2006.01)i; **A61P 17/00**(2006.01)i; **A61K 8/64**(2006.01)i; **A61Q 19/00**(2006.01)i

B. 조사된 분야

조사된 최소문헌(국제특허분류를 기재)

C07K 7/08(2006.01); A61K 38/00(2006.01); A61K 38/08(2006.01); A61K 38/18(2006.01); A61P 17/02(2006.01); C07K 7/06(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: 피부(skin), 노화(aging), 재생(regeneration), 펩타이드(peptide), 'LCACCLHNCNECQ'

C. 관련 문헌

카테고리*	인용문헌명 및 관련 구절(해당하는 경우)의 기재	관련 청구항
A	WO 2020-107079 A1 (INTERK PEPTIDE THERAPEUTICS LIMITED) 2020.06.04 요약; 청구항 1, 31, 36, 37	1-11
A	KR 10-2021-0022405 A ((주)케어젠) 2021.03.03 전체 문헌	1-11
A	KR 10-2021-0075098 A (콜로세움 콤비나토리얼 케미스트리 센터 포 테크놀로지 소시에타 아 리스폰사빌리타` 리미타타 인 포르마 아브레비아타 씨4티 에스.앋.엔.) 2021.06.22 전체 문헌	1-11
A	KR 10-2065171 B1 ((주)케어젠) 2020.01.13 전체 문헌	1-11
A	NCBI, GenBank accession no. KAH0509882.1, Platelet-derived growth factor C [Microtus ochrogaster] 2021.09.15 전체 문헌	1-11

☐ 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	국제조사보고서 발송일
2022년12월29일(29.12.2022)	**2022년12월30일(30.12.2022)**

ISA/KR의 명칭 및 우편주소	심사관
대한민국 특허청 **(35208) 대전광역시 서구 청사로 189, 4동 (둔산동, 정부대전청사)**	**허주형**
팩스 번호 **+82-42-481-8578**	전화번호 **+82-42-481-5373**

국 제 조 사 보 고 서

국제출원번호
PCT/KR2022/014392

제1기재란 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:

국 제 조 사 보 고 서
대응특허에 관한 정보

국제출원번호
PCT/KR2022/014392

국제조사보고서에서 인용된 특허문헌	공개일	대응특허문헌	공개일
WO 2020-107079 A1	2020/06/04	AU 2019-388295 A1	2021/06/03
		CA 3120624 A1	2020/06/04
		CN 113166205 A	2021/07/23
		EP 3887389 A1	2021/10/06
		JP 2022-513171 A	2022/02/07
		KR 10-2021-0097729 A	2021/08/09
KR 10-2021-0022405 A	2021/03/03	CN 114206905 A	2022/03/18
		EP 4019530 A1	2022/06/29
		JP 2022-545243 A	2022/10/26
		KR 10-2265430 B1	2021/06/15
		US 2022-0241174 A1	2022/08/04
		WO 2021-033829 A1	2021/02/25
KR 10-2021-0075098 A	2021/06/22	AU 2019-357261 A1	2021/05/13
		CA 3115025 A1	2020/04/16
		CN 112823039 A	2021/05/18
		EA 202190888 A1	2021/07/07
		EP 3863728 A1	2021/08/18
		IL 282064 D0	2021/05/31
		IT 201800009384 A1	2020/04/11
		JP 2022-508676 A	2022/01/19
		SG 11202103026 A	2021/04/29
		US 2021-0395305 A1	2021/12/23
		WO 2020-075108 A1	2020/04/16
KR 10-2065171 B1	2020/01/13	CN 112236441 A	2021/01/15
		EP 3904369 A1	2021/11/03
		JP 2021-526145 A	2021/09/30
		JP 7048766 B2	2022/04/05
		US 11433013 B2	2022/09/06
		US 2021-0205200 A1	2021/07/08
		WO 2020-171285 A1	2020/08/27