



(19) 대한민국특허청(KR)
(12) 공개특허공보(A)

(11) 공개번호 10-2020-0057390
(43) 공개일자 2020년05월26일

(51) 국제특허분류(Int. Cl.)
C07K 7/06 (2006.01) A61K 38/00 (2006.01)
A61P 17/02 (2006.01) A61P 17/10 (2006.01)
(52) CPC특허분류
C07K 7/06 (2013.01)
A61K 38/00 (2013.01)
(21) 출원번호 10-2018-0141723
(22) 출원일자 2018년11월16일
심사청구일자 없음

(71) 출원인
고려대학교 산학협력단
서울특별시 성북구 안암로 145, 고려대학교 (안암
동5가)
(72) 발명자
조대호
서울특별시 강남구 압구정로 201, 81동 1406호
(74) 대리인
정은열

전체 청구항 수 : 총 1 항

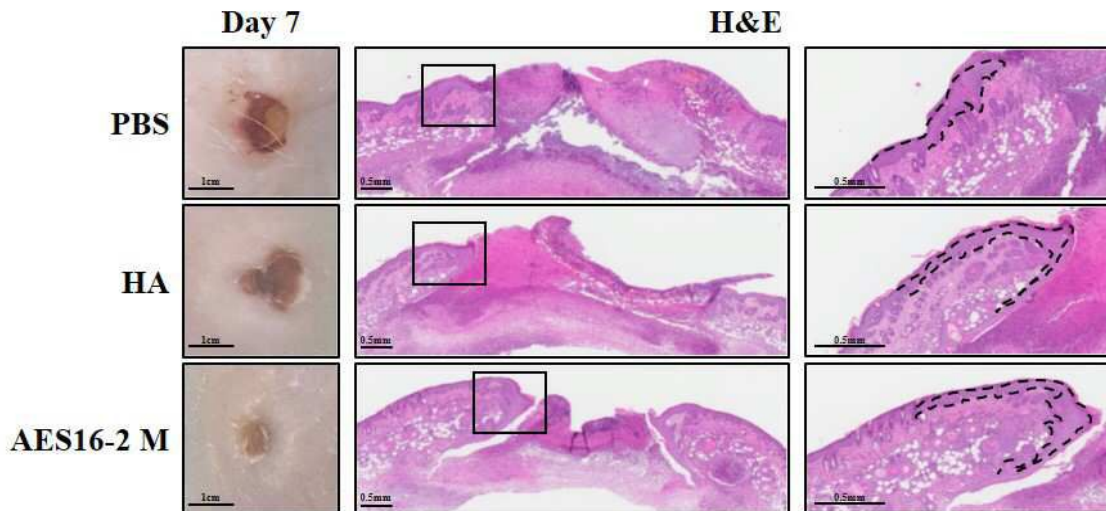
(54) 발명의 명칭 심상성 좌창에 의한 피부 손상 개선에 효과가 있는 펩타이드 AES16-2M 및 이의 용도

(57) 요약

본 발명은 심상성 좌창(여드름)에 의한 피부 손상 개선에 효과가 있는 신규 펩타이드 AES16-2M 및 이의 용도에 관한 것으로서, 보다 상세하게는 여드름에 의해 발생한 상처 개선에 도움이 되는 콜라겐의 합성을 증가시켜 여드름에 의한 상처를 빠르게 개선하는 효과가 있는 신규 펩타이드 AES16-2M 및 이의 용도에 관한 것이다.

본 발명에 따른 합성 펩타이드 AES16-2M은 5개의 아미노산으로 구성된 작은 규모의 펩타이드로 저분자이며 생분해성이기 때문에 체내 잔류기간이 길지 않고, 이에 따라 과민반응 유발 가능성이 적어 안전성이 높은 소재이다. 따라서, 부작용을 최소화할 수 있는 강점이 있다. 이에 여드름에 의한 피부 손상의 재생과 그 후유증인 흉터 발생을 방지하는 효과에 탁월하므로 부작용이 없는 여드름 치료제로 효과적으로 적용될 수 있다.

대표도 - 도1



(52) CPC특허분류

A61P 17/02 (2018.01)

A61P 17/10 (2018.01)

이 발명을 지원한 국가연구개발사업

과제고유번호 2016M3D1A1021387

부처명 과학기술정보통신부

연구관리전문기관 한국연구재단

연구사업명 미래소재디스커버리사업

연구과제명 기능면역체기술 기반 생분해성 혁신형 펩타이드 소재 개발

기 여 율 1/1

주관기관 고려대학교

연구기간 2018.02.01 ~ 2019.01.31

명세서

청구범위

청구항 1

서열번호 1로 표시되는 아미노산을 포함하는 펩타이드.

발명의 설명

기술 분야

[0001] 본 발명은 심상성 좌창(여드름)에 의한 피부 손상 개선에 효과가 있는 신규 펩타이드 AES16-2M 및 이의 용도에 관한 것으로서, 보다 상세하게는 여드름에 의해 발생한 상처 개선에 도움이 되는 콜라겐의 합성을 증가시켜 여드름에 의한 상처를 빠르게 개선하는 효과가 있는 신규 펩타이드 AES16-2M 및 이의 용도에 관한 것이다.

배경 기술

[0002] 여드름은 피지선에 존재하는 *Propionibacterium acnes* (*P. acnes*)균에 의해 발생하는 만성 염증성 피부 질환이다. 전 세계적으로 6억명 이상이 여드름 질환을 앓고 있고 세계적으로 8번째 해당되는 공통적 질환이다 (Hagstrom E.L.; Patel S.; Karimkhani C.; Boyers L.N.; Williams H.C; Hay R.J.; Weinstock M.A.; Armstrong A.W.; Dunnick C.A.; Margolis D.J.; Dellavalle R.P. Comparing cutaneous research funded by the US National Institutes of Health (NIH) with the US skin disease burden. *J. Am. Acad. Dermatol.* 2015, 73, 383). 여드름을 일으키는 *P. acnes*균은 그람 양성균, 혐기성, 피부 공생의 균이며, 피지선에서 증식될 경우, 세포외기질의 재형성과 피부 손상 또는 흉터를 유발한다. 게다가, 면포를 형성하는 여드름의 경우는 모낭 벽의 과각화의 발달로 인해 표피의 과형성과 농축을 일으킨다. 이러한 과정은 피사성 부식 및 심각한 상처와 같은 피부 상처를 일으키며 이 과정이 길어지면 2차 감염이나 후에 깊은 상처를 발생할 수도 있어서 큰 피해를 준다 (Connolly D.; Vu H.L.; Mariwalla K.; Saedi N. Acne Scarring-Pathogenesis, Evaluation, and Treatment Options. *J. Clin. Aesthet. Dermatol.* 2017, 10, 12.). 그러므로, 여드름 피사성 상처의 빠른 회복이 중요하다. 실제 환자에게는 항균제 및 항염증제로 *P. acnes*균의 수치를 줄이는 치료를 수행한다. 그러나 *P. acnes*균은 항생제의 내성을 보이고 또한 피부 상주 미생물의 항상성 불균형과 같은 부작용을 일으킨다 (Dessinioti C.; Katsambasa A. *Propionibacterium acnes* and antimicrobial resistance in acne. *Clin. Dermatol.* 2017, 35, 163.). 항생제는 상처 회복에는 긍정적인 영향이 없고 오히려 상처 회복을 지연시키기도 한다 (Ki V.; Rotstein C. Bacterial skin and soft tissue infections in adults: A review of their epidemiology, pathogenesis, diagnosis, treatment and site of care. *Can. J. Infect. Dis. Med. Microbiol.* 2008, 19, 173.). 이러한 부작용의 인식과 꾸준한 연구 개발로 최근에는, 여드름의 치료의 목적이 여드름을 효과적으로 개선하는 것뿐만 아니라 여드름의 발생 후에 남은 여드름 흉터의 발생을 막는 것까지도 주목되고 있다.

발명의 내용

해결하려는 과제

[0003] 본 발명에서는 여드름에 의한 피부 손상 치료제로 효과적으로 사용될 수 있는 신규 펩타이드를 제공하고자 한다.

과제의 해결 수단

[0004] 본 발명은 상기 과제를 해결하기 위하여, 서열번호 1로 표시되는 아미노산을 포함하는 펩타이드를 제공한다.

발명의 효과

[0005] 본 발명에 따른 합성 펩타이드 AES16-2M은 5개의 아미노산으로 구성된 작은 규모의 펩타이드로 저분자이며 생분해성이기 때문에 체내 잔류기간이 길지 않고, 이에 따라 과민반응 유발 가능성이 적어 안전성이 높은 소

재이다. 따라서, 부작용을 최소화할 수 있는 강점이 있다. 이에 여드름에 의한 피부 손상의 재생과 그 후유증인 흉터 발생을 방지하는 효과에 탁월하므로 부작용이 없는 여드름 치료제로 효과적으로 적용될 수 있다.

도면의 간단한 설명

- [0006] 도 1은 여드름 생성 7일 후 피사성 피부 상처의 회복 속도 비교와 조직학적 비교로 피부 재생 세포 이동 능력을 비교하여 보여준 도면이다.
- 도 2는 여드름성 피부 조직에서 collagen의 발현 정도를 염색하여 보여주는 도면이다.
- 도 3은 여드름성 피부 조직에서 collagen의 합성 세포인 섬유아세포의 활성화 정도를 염색하여 보여주는 도면이다.
- 도 4는 인간 섬유아세포에서 collagen의 양을 정량적으로 보여주는 도면이다.

발명을 실시하기 위한 구체적인 내용

- [0007] 이하, 본 발명을 더욱 구체적으로 설명하기로 한다.
- [0009] 본 발명은 여드름 손상 피부에 직접 작용하여 손상 피부의 재생을 향상시키는 펩타이드에 관한 것으로, 본 발명에서는 서열번호 1로 표시되는 아미노산을 포함하는 펩타이드(AES16-2M)를 제공한다.
- [0010] 본 발명자들은 여드름 질환의 쥐를 만들기 위해, Hairless-1 쥐를 이용하고, 여드름 발생을 위해 P. acnes균을 생쥐의 등 부위 피하에 주입하였다 (Jang Y.H.; Lee K.C.; Lee S.J.; Kim D.W.; Lee W.J. HR-1 Mice: A New Inflammatory Acne Mouse Model. Ann. Dermatol. 2015, 27, 257.). 균 주입 후 다음날부터 합성 펩타이드를 10 µg/kg의 농도로 2일 간격으로 3번 주입하여 총 8일간의 피하 주입하고 매일 관찰, 사진 촬영을 하였다. 펩타이드가 주사 된 생쥐의 경우, 비교군에 비해 여드름 균 주입 부위의 피사성 피부 손상부위의 크기가 빠르게 줄어들음을 관찰할 수 있었다. 육안적인 상처 크기의 면적 비교를 좀 더 조직학적으로 관찰하기 위해 펩타이드 주입 7일 후 여드름 피사성 상처 부위를 잘라 고정된 뒤 피부조직 관찰 자료를 만들어 염색, 관찰하였다. 피사성 상처의 회복이 비교군에 비해 빠름을 염색된 조직으로 확인하였다. 피부 재생의 초기 단계인 회복 부위 세포 이동의 (Li J.; Chen J.; Kirsner R. Pathophysiology of acute wound healing. Clinics in dermatology 2007, 25, 9) 양상이 증가하였음을 확인함으로써 합성 펩타이드 AEC1D의 여드름 손상 피부 재생 능력을 확인하였다.
- [0011] 한편, 피부 재생의 중요 단계인 collagen 합성 (Jensen L.T.; HΨst N.B. Collagen: scaffold for repair or execution. Cardiovasc. Res. 1997, 33, 535.) 증가 여부를 확인하였다. 비교군에 비해, AES16-2M 펩타이드 주입의 피부 상처 부위에서 월등한 collagen 합성 증가 양상을 보였다. 또한, collagen 합성의 주 관여 세포인 fibroblast 세포의 활성을 비교해 보기 위해, fibroblast 세포의 인지 단백질인 fibronectin을 염색하였을 때 (Grinnell F. Fibronectin and wound healing. J. Cell Biochem. 1984, 126, 107) 펩타이드 주입군 생쥐의 피부 조직에서 많은 양의 fibronectin이 관찰됨으로써, collagen 합성을 위한 fibroblast 세포의 활성이 높아졌음을 확인할 수 있었다.
- [0012] 또한, 합성 펩타이드 AES16-2M를 인간 fibroblast 세포에 처리하고 24시간 배양한 뒤에 세포를 모아 western blotting assay로 collagen의 발현 정도를 확인하여, collagen 합성 능력을 확인하였다.
- [0014] 이하, 실시예를 통해서 본 발명을 더욱 구체적으로 설명하기로 하되, 하기 실시예는 본 발명의 이해를 돕기 위한 것일 뿐, 본 발명의 범위를 제한하는 것은 아니다.
- [0016] 실시예는 생쥐의 등 중앙 부위에 여드름 균을 주입하고, 다음 날부터 합성 펩타이드를 피하 주사하여, 여드름에 의해 손상된 피부 조직의 재생 능력을 확인하고, 이제 작용하는 기전을 개시한다.

[0018] 물질 및 방법

[0019] <여드름 동물 모델의 확립>

- [0020] 6주령의 Hairless-1 쥐는 실험 전에 일주일 정도 안정화 기간을 가진다. 여드름의 생성을 위해, *P. acnes* 균을 생쥐의 등 중앙 부위 내피에 주입했다. 본 실험에서는 합성 펩타이드 AES16-2M는 10 µg/kg의 농도로 매 2일 마다 1주일간 피하에 주입하고 이와 함께, collagen 합성의 양성 실험군으로 Hyaluronic acid를 (HA, 24 mg/kg) 주입하고 (Quan T.; Wang F.; Shao Y.; Rittitt L.; Xia W.; Orringer J.S.; Voorhees J.J.; Fisher G.J. Enhancing structural support of the dermal microenvironment activates fibroblasts, endothelial cells, and keratinocytes in aged human skin in vivo. *J. Invest. Dermatol.* 2013, 133, 658.), 음성 대조군으로는 phospho-buffered saline (PBS)를 주입했다. 여드름에 의한 피사성 상처는 사진 촬영되었다.
- [0022] <여드름 균의 준비>
- [0023] 한국생명공학연구원 생물자원센터 (KCTC)에서 구입한 *P. acnes* 균은 무산소의 상태를 유지하는 용기에 넣어 배양했다. 5×10^9 colony forming units(CFU)/mL의 숫자로 균을 모아 이 중에 100 µl 즉, 5×10^8 CFU를 생쥐의 등 중앙 내피에 주입했다. 인간 fibroblast에 처리하기 위해서는 95 °C에서 5분을 열처리하여 사용하였다.
- [0025] <조직학적 검사>
- [0026] 여드름 균을 주입하고 7일 뒤에, 여드름 균이 주입된 등 부위 피부 조직은 잘라내어, 4% paraformaldehyde에 고정했다. paraffin에 고정된 조직은 얇게 절개한 후, 여러 염색을 수행하였다. 헤마톡신&에오신 염색을 통해 조직학적 양상을 실험하였고, Picro-Sirius Red solution을 이용하여 collagen의 양을 염색 후 확인할 수 있었다. fibronectin은 면역염색을 수행하여 확인하였다.
- [0028] <세포 배양>
- [0029] primary human dermal fibroblast세포는 국제생물자원센터 (ATCC)에서 구입하고, fibroblast basal medium (FBM)에서 배양한다. 세포는 6-웰 플레이트에서 1×10^5 /ml 씩 배양되었다. TGF-β는 양성 대조군으로 10ng/ml로 처리되었다 (Das F.; Bera A.; Ghosh-Choudhury N.; Abboud H.E.; Kasinath B.S.; Choudhury G.G. TGFβ-induced dephosphorylation suppresses mTORC1 and not mTORC2 to enhance collagen I (α2) gene expression. *PLoS One*. 2014, 9, e109608.). β-actin 단백질은 정량의 비교용으로 사용되었다.
- [0031] <웨스턴 블랏>
- [0032] 배양 후 처리된 세포들은 세포벽을 깨트린 뒤 단백질을 추출한다. 20 µg의 단백질을 sodium dodecyl sulfate (SDS) sample 버퍼로 변성시켜서, 10% SDS-polyacrylamide gel electrophoresis (PAGE) gels에서 분리 전기영동한 뒤, polyvinylidene fluoride (PVDF) membrane에 부착시킨다. membrane은 비특이적 결합을 막기 위해 5% skim milk에 1시간 넣어둔다. collagen 단백질의 양은 anti-goat collagen type I antibody를 이용하여 면역염색하였다. β-actin 단백질은 정량의 비교용으로 사용되었다.
- [0034] <통계적 분석>
- [0035] 대조군과 실험군의 차이는 paired Student's *t*-test에 의해서 평가되었으며, *P*-values<0.05 인 경우 유의한 차이로 고려되었다.
- [0037] **실시예 1. 합성 펩타이드 AES16-2M에 의한 여드름 손상 피부 재생**
- [0038] 합성 펩타이드 AES16-2M가 10 µg/kg의 농도로 주입된 여드름 피부는 음성 비교군에 비해 피사성 피부 손상이 닫히는 속도가 빠름을 확인할 수 있었다. 피부 재생의 초기 단계인 회복 부위 세포 이동의 속도 또한 활성화되어 있음을 확인하였다. 도면 1에서 보이는 바와 같이, 피사성 피부 손상부위의 크기가 확연하게 줄어들고, 헤마톡신&에오신 염색으로 조직학적으로 확인하여도 상처 사이의 크기가 줄어들었음을 확인할 수 있다. 이 결과 중, 세포

재생의 초기 단계인 세포이동 부위는 상자로 표시된 부분의 확대 부위에서 점선으로 표시하여 확인하였다.

[0040] **실시예 2. 손상된 피부 재생 부위의 collagen 합성 증가**

[0041] 합성 펩타이드 AES16-2M가 10 µg/kg의 농도로 주입 된 여드름 피부의 재생 부위 근처에서 collagen 합성이 증가함을 확인하였다. 염색된 collagen의 양을 image J 프로그램으로 수치화하여 검증하였다. error bar, mean ±SD. *** P -values<0.005, 음성 비교군에 대하여 수행하였다.

[0043] **실시예 3. 손상된 피부 재생 부위의 fibroblasts 활성화 증가**

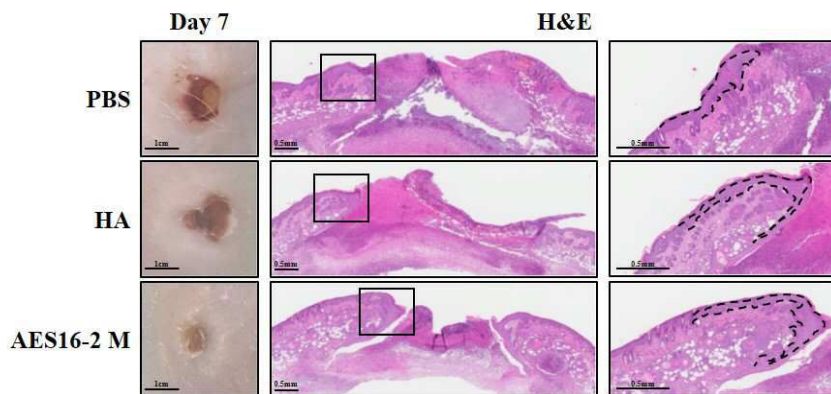
[0044] 합성 펩타이드 AES16-2M가 10 µg/kg의 농도로 주입 된 여드름 피부의 재생 부위 근처에서 collagen 합성을 주도하는 fibroblast 세포의 활성화를 확인하였다. 면역 염색된 fibronectin 갯수를 image J 프로그램으로 수치화하여 검증하였다. error bar, mean ±SD., *** P -values<0.005, 음성 비교군에 대하여 수행하였다.

[0046] **실시예 4. 합성 펩타이드 AES16-2M 에 의한 인간 fibroblast 세포에서 collagen 합성**

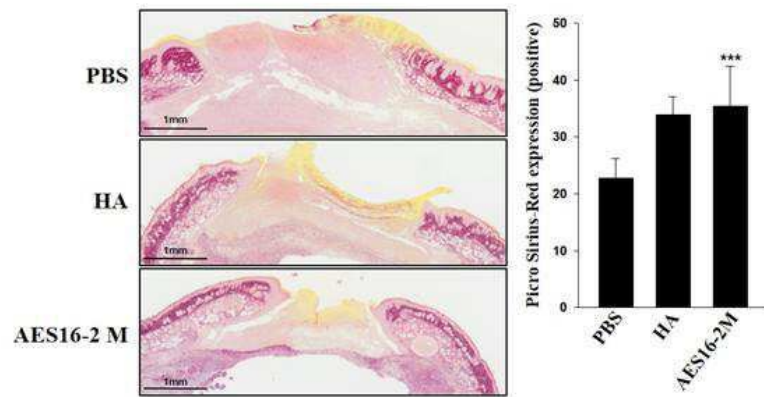
[0047] 여드름 군에 의해 감염 자극된 인간 fibroblast 세포에 처리 한 합성 펩타이드 AES16-2M (10ng/ml)가 collagen의 양을 증가시켰다. TGF-β는 양성 대조군으로 10ng/ml로 처리되었다. β-actin 단백질은 정량의 비교용으로 사용되었다.

도면

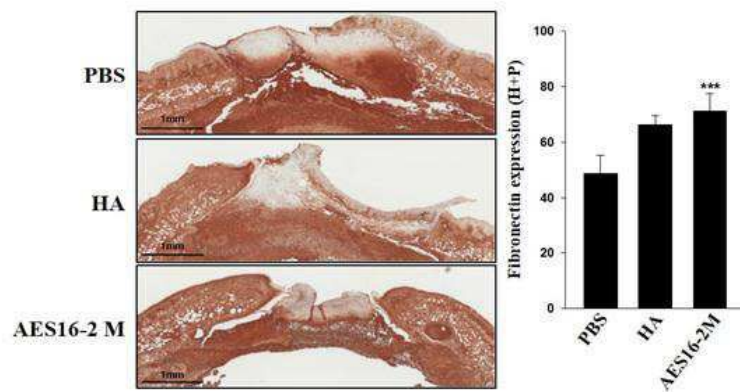
도면1



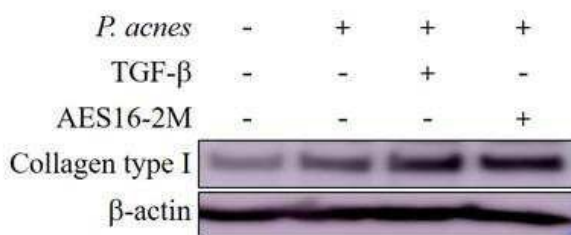
도면2



도면3



도면4



서열 목록

- <110> Korea University Research and Business Foundation
- <120> Peptide AES16-2M for improvement of acne wound and use thereof
- <130> JKP1162
- <160> 1
- <170> KoPatent In 3.0
- <210> 1
- <211> 5
- <212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> Peptide sequence for AES16-2M

<400> 1

Arg Glu Gly Arg Thr

1 5