



(19) 대한민국특허청(KR)
(12) 등록특허공보(B1)

(45) 공고일자 2013년12월09일
 (11) 등록번호 10-1337767
 (24) 등록일자 2013년11월29일

(51) 국제특허분류(Int. Cl.)
 A61K 38/18 (2006.01) A61K 38/10 (2006.01)
 A61P 17/02 (2006.01) A61P 17/00 (2006.01)
 (21) 출원번호 10-2011-0074144
 (22) 출원일자 2011년07월26일
 심사청구일자 2011년07월26일
 (65) 공개번호 10-2013-0014700
 (43) 공개일자 2013년02월08일
 (56) 선행기술조사문헌
 US20070264321 A1
 KR1020110108079 A

(73) 특허권자
 서울대학교산학협력단
 서울특별시 관악구 관악로 1 (신림동)
 (72) 발명자
 이미욱
 서울특별시 강남구 선릉로 222, 109동 304호 (대치동, 대치아이파크)
 이봉진
 서울특별시 서초구 방배로1길 9, 신동아러스빌 1005호 (방배동)
 (뒷면에 계속)
 (74) 대리인
 특허법인이룸

전체 청구항 수 : 총 5 항

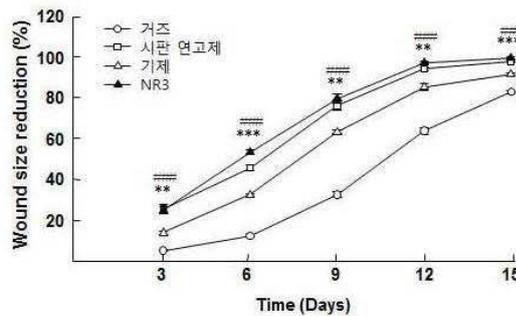
심사관 : 박제현

(54) 발명의 명칭 VEGF 발현을 증가시키는 신규한 펩타이드 및 이를 함유하는 약학적 조성물

(57) 요약

본 발명은 HIF-1 α 유전자를 활성화시켜 상처치료에 중요한 혈관내피세포성장인자(VEGF)의 전사 활성을 증가시키는 신규한 펩타이드 및 이를 포함하는 약학적 조성물 등을 제공한다. 상기 본 발명의 약학적 조성물은 상처치료, 피부 조직 재생과 발모 촉진 등의 효과를 가진다.

대표도 - 도6



p<0.01 and *p<0.001 as compared with base control (기제)
 ***p<0.001 as compared with gauze control

(72) 발명자

김은진

서울특별시 양천구 목동동로 100, 목동아파트 131
0동 1503호 (신정동)

김현휘

경기도 부천시 원미구 도당동 109번지 삼보아파트
3동 305호

이 발명을 지원한 국가연구개발사업

과제고유번호 201000017

부처명 교육과학기술부

연구사업명 기초연구사업-선도연구센터(ACE)육성사업

연구과제명 대사 질환 제어 약물 타겟 발굴 및 후보약물 활성 연구

기여율 50/100

주관기관 서울대학교

연구기간 2010.03.01 ~ 2011.02.28

이 발명을 지원한 국가연구개발사업

과제고유번호 2011-0000363

부처명 교육과학기술부

연구사업명 기초연구사업-중견연구자지원(도약-도전)

연구과제명 Reverb와 ROR의 커플링에 의한 생체시계와 지질대사의 통합적 조절기전

기여율 20/100

주관기관 서울대학교

연구기간 2010.03.01 ~ 2011.02.28

이 발명을 지원한 국가연구개발사업

과제고유번호 A092006

부처명 보건복지부

연구사업명 보건의료연구개발사업

연구과제명 신약개발구조정보통합연구센터

기여율 30/100

주관기관 서울대학교

연구기간 2010.11.01 ~ 2011.10.31

특허청구의 범위

청구항 1

서열번호 1 내지 서열번호 3으로 이루어진 군으로부터 선택된 염기서열을 가지는 펩타이드를 포함하는 상처치료 또는 피부조직재생용 약학적 조성물.

청구항 2

제 1항에 있어서,

상기 펩타이드는 저산소유도인자(HIF)-1 α , 혈관내피세포성장인자(VEGF), 파이브로넥틴(fibronectin), 또는 콜라겐(collagen)의 발현을 증가시키는 것을 특징으로 하는, 약학적 조성물.

청구항 3

제 1항에 있어서,

상기 펩타이드는 혈관내피세포를 증식시키는 것을 특징으로 하는, 약학적 조성물.

청구항 4

제 1항에 있어서,

상기 펩타이드는 세포 이동 (migration) 을 증가시키는 것을 특징으로 하는, 약학적 조성물.

청구항 5

서열번호 1 내지 서열번호 3으로 이루어진 군으로부터 선택된 염기서열을 가지는 펩타이드.

청구항 6

삭제

명세서

기술분야

[0001] 본 발명은 VEGF 발현을 증가시키는 신규한 펩타이드에 관한 것으로, 구체적으로 상기 펩타이드를 함유하는 상처치료 또는 피부조직재생용 약학적 조성물 등에 관한 것이다.

배경기술

[0002] 인체 조직의 모든 세포는 혈관에서 산소와 영양분의 공급을 필요로 한다. 이러한 현상 중에 저산소에 의한 세포 내 산소 분압을 유지하기 위한 방법이 혈관신생이다 (Chandan et al., 2009). HIF-1 α 가 결핍된 실험동물의 경우 VEGF (vascular endothelial growth factor) 발현이 감소하고, 세포사멸이 이루어져 혈관 및 심장형성 이상 등에 의해 태아 상태에서 사망한다 (Iyer et al., 1998). Wound 역시 주로 미세 순환을 저해시켜 손상 부위의 산소 공급을 저해시킴으로써 생기는 혈관 손상을 포함하게 됨으로, 저산소 상태는 wound healing 기전에서 중요한 역할을 한다. 저산소 상태시, dermal fibroblast에서 TGF- β 1 (transforming growth factor- β 1) 생성이 증가함과 결합조직에서 keratinocyte의 운동성을 증가시켜 fibroblast에서 collagen 합성에 관여한다는 것이 보고되어 있다. 또한, 혈관 생성을 촉진하고 wound healing에 중요한 혈관 생성 성장 인자인 VEGF의 전사 활성을 증가시켜 산소 의존적인 치료 조직에 산소 공급을 원활하게 해 준다 (Trentin et al., 2006; Sheid et al., 2000; Hirota et al., 2009).

[0003] 저산소 유도 인자 HIF-1 (hypoxia-inducible factor-1)는 저산소 상태에서 유도 발현되며 세포 내에서의 항상성을 유지하기 위하여 신혈관생성, erythropoiesis, glycolytic metabolism 등에 관련된 유전자를 발현시키는 기능을 한다. HIF-1의 활성은 허혈성 뇌졸중, 동맥경화증, 류마티스성 관절염 등 다양한 만성 질환의 병리학적 기전과 밀접한 관계가 있기 때문에 주요 신약 타겟으로 사용되고 있다. 최근 저산소 분압이 형성된 동맥경화 부위

에서 ROR α 발현이 증가되며 HIF-1을 조절할 수 있는 핵 수용체임이 보고되었다 (Kim et al., 2008).

[0004] ROR α (retinoic acid related orphan nuclear receptor α NR1F1) 는 NR1 family에 속하는 고아 핵 수용체이며, 간, 지방조직, 혈관, 심장, 근육, 등 여러 기관에서 많이 발현된다 (Jetten, 2009). ROR α 는 저산소 상태의 내피 세포에서 발현이 크게 증가하며 (Besnard et al., 2002), ROR α 프로모터에 HRE (hypoxia-responsive element)가 존재하여 저산소 상태에서의 전사 활성을 증가시킨다는 것이 밝혀졌다 (Miki et al., 2004). ROR α 와 그 리간드가 저산소 신호 전달을 증가시켜 VEGF의 생성을 촉진함으로써 저산소 관련 혈관 질환 치료에 활용할 수 있음이 보고되었다. 또한, 이와 관련하여 ROR α 의 DBD (DNA-binding domain) 부분이 HIF-1의 ID (inhibitory domain) 부분과 서로 결합하여 HIF-1 α 를 안정화시키고 VEGF 발현을 증가시킨다는 것이 확인되었다 (Kim et al., 2008).

발명의 내용

해결하려는 과제

[0005] 본 발명자 등은 넓은 유발 범위를 가지며, 치료 과정 동안 다양한 환경에 노출될 수 있는 질환인 상처(wound)를 저해시킬 수 있는, 사용이 간단하면서도 적용이 다양한 치료제를 개발하고자 예의 노력한 결과, HIF-1 α 발현의 증가를 통한 VEGF, fibronectin과 collagen 등의 활성을 증가시키는 ROR α DBD의 염기서열의 일부 또는 돌연변이된 염기서열을 코딩하는 펩타이드를 제작하게 되었다. 따라서, 본 발명의 목적은 VEGF 발현 증가를 경유하는 유효 펩타이드를 제작하여 신규한 상처치료(wound healing) 또는 피부조직재생용 약학적 조성물을 제공하는 것이다.

[0006] 그러나, 본 발명이 이루고자 하는 기술적 과제는 이상에서 언급한 과제에 제한되지 않으며, 언급되지 않은 또 다른 과제들은 아래의 기재로부터 당업자에게 명확하게 이해될 수 있을 것이다.

과제의 해결 수단

[0007] 본 발명은 서열번호 1 내지 서열번호 3으로 이루어진 군으로부터 선택된 염기서열을 가지는 신규한 펩타이드를 제공한다.

[0008] 본 발명의 일 구현예에서, 상기 펩타이드는 저산소유도인자(HIF)-1 α , 혈관내피세포성장인자(VEGF), 파이브로넥틴(fibronectin), 및/또는 콜라겐(collagen)의 발현을 증가시키는 것을 특징으로 한다.

[0009] 본 발명의 다른 구현예에서, 상기 펩타이드는 혈관내피세포를 증식시키는 것을 특징으로 한다.

[0010] 본 발명의 또 다른 구현예에서, 상기 펩타이드는 세포 이동 (migration) 을 증가시키는 것을 특징으로 한다.

[0011] 또한 본 발명은 서열번호 1 내지 서열번호 3으로 이루어진 군으로부터 선택된 염기서열을 가지는 펩타이드를 포함하는 상처치료 또는 피부조직재생용 약학적 조성물을 제공한다.

[0012] 또한 본 발명은 상기 약학적 조성물을 개체에 투여하여 상처치료 또는 피부조직을 재생하는 방법을 제공한다.

발명의 효과

[0013] 본 발명에 따른 신규한 펩타이드는 HIF-1 α 의 활성을 통해 VEGF 유전자를 활성화시킴으로써 세포 증식 및 이동 (migration)에 영향을 미친다. 따라서 wound healing, 피부 조직 재생, 발모 촉진 등의 효과를 나타내며, 궁극적으로, 사용이 간단하면서도 적용이 다양한 치료제 개발에 이용될 수 있을 것으로 기대된다. 또한 in vivo 상에서의 실험을 바탕으로 본 발명에 따른 신규한 펩타이드가 상피재생을 현저히 증가시키고 염증 세포 수를 크게 감소시키는 것을 고려해 볼 때, wound의 초기 발생에 나타나는 염증기에서 유효한 효과를 나타냄으로써 기존 연고제에 비해 빠른 wound healing 효과가 있을 것으로 기대된다.

도면의 간단한 설명

[0014] 도 1은 NR1, NR2 및 NR3 이 HIF-1 α 의 전사활성에 미치는 효과를 나타낸 것이다.

도 2는 NR1, NR2 및 NR3 이 HIF-1 α 와 VEGF의 단백질 발현에 미치는 효과를 나타낸 것이다.

도 3은 NR1, NR2 및 NR3 이 혈관내피세포에서 신혈관 생성에 중요한 형태학적 변화인 Tube formation에 미치는 효과를 나타낸 것이다.

도 4는 NR1, NR2 및 NR3 이 human dermal fibroblast (HDF)에서collagen 1A2, fibronectin 과 IF-1α의 단백질 발현에 미치는 효과, 및 collagen 1A2, fibronectin과 VEGF의 전사 활성화에 미치는 효과를 나타낸 것이다.

도 5는 NR2와 NR3이 HDF에서 세포 이동 (migration)에 미치는 효과를 시간대 별로 나타낸 것이다.

도 6은 NR3가 동물 실험시 wound healing에 미치는 효과를 기제 및 시판 연고제 (후시딘, 동화약품)와 비교하여 상처크기 감소율로 나타낸 것이다.

도 7은 NR3가 동물 실험시 wound healing에 미치는 효과를 현미경을 통해 낙설된 상피 부분, 육아 조직에서 신생모세혈관 및 침윤 염증세포, 또한 콜라겐 발현물을 조직병리학적으로 관찰한 결과를 나타낸 것이다.

발명을 실시하기 위한 구체적인 내용

- [0015] 본 발명은 HIF-1α의 활성을 통해 VEGF 유전자를 활성화시킴으로써 세포 증식 및 이동 (migration)에 영향을 미치는 신규한 펩타이드를 제공하고자 한다. 구체적으로, 상기 신규한 펩타이드를 통해 HIF-1α, VEGF, fibronectin과 collagen의 발현을 증가시키고, HUVECs (human umbilical vascular endothelial cells) 에서 혈관내피세포 증식을 일으키며, fibroblast에서 세포 이동 (migration) 을 증가시킴으로써 wound healing 및 피부 조직 재생과 관련한 질환 치료에 효과가 있는 치료제를 제공하고자 한다.
- [0016] 저산소 상태시, TGF-β1 (transforming growth factor-β1) 생성이 증가함과 결합조직에서 keratinocyte의 운동성을 증가시켜 fibroblast에서 콜라겐 합성에 관여한다는 사실이 알려져 있다. 또한 혈관 생성을 촉진하고 wound healing에 중요한 혈관 생성 성장 인자인 VEGF의 전사 활성을 증가시켜 산소 의존적인 치료 조직에 산소 공급을 원활하게 해 주는 역할을 한다 (Trentin et al., 2006; Sheid et al., 2000; Hirota et al., 2009).
- [0017] 본 발명자 등은 wound를 효율적으로 치료하는 물질을 개발하고자 예의 연구 노력한 결과, HIF-1α 발현의 증가를 통한 VEGF, fibronectin과 collagen 등의 활성을 증가시키는 RORα DBD (DNA-binding domain)의 염기서열의 일부 또는 돌연변이된 염기서열을 코딩하는 펩타이드를 제작하게 되었으며, 상기 펩타이드가 wound healing에 효과적으로 작용함을 발견하였다. 즉, 본 발명자 등은 상기 유효 펩타이드 처리시 HIF-1α의 전사 활성화, HIF-1α와 VEGF 단백질 발현이 증가하며 혈관내피세포의 증식이 증가하는 것을 관찰하였다. 또한 본 발명자 등은 상기 유효 펩타이드 처리시 fibroblast에서 collagen 1A2, fibronectin과 VEGF의 단백질 발현과 전사활성이 증가하며, 세포 이동 (migration) 촉진에 관여함을 관찰하였으며, in vivo 상 (생체내) 에서 대조군과 비교하여 상처 재생을 증가, 육아조직에서의 신생모세혈관 및 침윤 염증세포의 감소 등을 보이며 우수한 wound healing 촉진 효과를 나타냄을 발견하였다.
- [0018] 이에 본 발명은 서열번호 1 내지 서열번호 3으로 기재되는 염기서열들로 이루어진 군으로부터 선택된 염기서열을 가지는 상기 신규한 유효 펩타이드 및 상기 펩타이드를 포함하는 약학적 조성물을 제공한다.
- [0019] 본 발명의 약학적 조성물은 약제학적으로 허용 가능한 담체를 포함할 수 있다. 상기 약제학적으로 허용 가능한 담체는 생리식염수, 폴리에틸렌글리콜, 에탄올, 식물성 오일, 및 이소프로필미리스테이트 등을 포함할 수 있으며, 이에 한정되지는 않는다.
- [0020] 본 발명의 다른 측면은 상기 신규한 펩타이드를 유효성분으로 포함하는 약학적 조성물의 약제학적 유효량을 개체에 투여하여 상처치료 또는 피부조직을 재생하는 방법을 제공한다. 본 발명에서 “개체”란 질병의 치료를 필요로 하는 대상을 의미하고, 보다 구체적으로는 인간, 또는 비-인간인 영장류, 생쥐(mouse), 쥐(rat), 개, 고양이, 말, 및 소 등의 포유류를 의미한다. 또한, 본 발명에서 “약제학적 유효량”은 환자의 체중, 연령, 성별, 건강상태, 식이, 투여시간, 투여방법, 배설율, 및 질환의 중증도 등에 따라 그 범위가 다양하게 조절될 수 있음은 당업자에게 명백하다.
- [0021] 본 발명의 약학적 조성물의 바람직한 투여량은 환자의 상태 및 체중, 질병의 정도, 약물 형태, 투여경로, 및 기간에 따라 다르지만, 당업자에 의해 적절하게 선택될 수 있다. 그러나 바람직하게는, 1일 0.001 내지 100 mg/체중kg으로, 보다 바람직하게는 0.01 내지 30 mg/체중kg으로 투여한다. 투여는 하루에 한번 투여할 수도 있고, 여러번 나누어 투여할 수 있다.
- [0022] 본 발명의 약학적 조성물은 쥐, 생쥐, 가축, 인간 등의 포유동물에 다양한 경로로 투여될 수 있다. 투여방법에는 제한이 없으며, 예를 들면, 경구, 직장, 또는 정맥, 근육, 피하, 자궁내 경막, 또는 뇌혈관(intra cerebroventricular) 주사에 의해 투여될 수 있다.

[0023] 이하, 본 발명의 이해를 돕기 위하여 바람직한 실시예를 제시한다. 그러나 하기의 실시예는 본 발명을 보다 쉽게 이해하기 위하여 제공되는 것일 뿐, 하기 실시예에 의해 본 발명의 내용이 한정되는 것은 아니다.

[0024] **신규한 NR 펩타이드 제작**

[0025] 본 발명의 신규한 NR 펩타이드는 Fmoc-chemistry (9-Fluorenylmethyloxy-carbonyl group으로 아미노산의 아민 부분을 지지하고 난 후에 펩타이드를 합성하는 방법) 를 이용한 고상 (solid) 펩타이드 합성법에 따라 화학적으로 합성하였다.

표 1

NR 펩타이드	아미노산 서열	서열번호
NR1	KNCLIDRTSRNR	1
NR2	KNCLADRTSRAR	2
NR3	KNCLIDATSRAR	3

[0027] **[실시예]**

[0028] 상기 신규의 NR 펩타이드, 즉 NR1, NR2와 NR3를 이용하여 하기 실험을 실시하였다.

[0029] **실시예 1. NR1, NR2및 NR3이 HIF-1 α 의 전사활성에 미치는 효과**

[0030] HepG2 세포는 ATCC (American Type Culture Collection)으로부터 구입하였다. HepG2 세포 (1x10⁵ 세포/웰)를 12-웰 배양플레이트에 씨딩하고, 10 % FBS (fetal bovine serum)를 함유하는 DMEM (Dulbecco's modified Eagle's medium) 배지에서 하룻밤동안 배양하였다. HepG2 세포는 5 % CO₂ 및 95 % 공기를 갖는 습윤 항온기에서 37 °C로 유지하였다.

[0031] 배양 후, 세포를 Welfect-EXTM Plus (WeiGENE Inc., Korea)를 이용하여 HRE-Luc. (100 ng) 리포터 플라스미드로 형질전환시켰다. 형질 전환 24 시간 후, NR1 (0.2 μ M), NR2 및 NR3 (0.2 또는 2 μ M), 용매 (대조군: DMSO, Dimethyl Sulfoxide) 을 처리하였다. 처리한 지 24 시간 후, 루시페라아제 활성을 Analytical Luminescence luminometer를 이용하여 측정하였다. 형질전환 효율을 확인하기 위하여, 200 ng의 β -galactosidase (β -gal) 발현 벡터의 활성을 이용하여 루시페라아제 활성을 표준화하였다. 그 결과를 도 1에 나타내었다.

[0032] 도 1에 나타난 바와 같이, NR1, NR2와 NR3는 HIF-1 α 의 전사활성을 증가시켰다. 특히 용매만 처리한 대조군에 비해 20 배 이상으로 활성을 나타내는 것으로 관찰되었다.

[0033] **실시예 2. NR1, NR2및 NR3이 HIF-1 α 와 VEGF의 단백질 발현에 미치는 효과**

[0034] HepG2 세포 (1x10⁶ 세포/웰)를 60-cm² 디쉬에 씨딩하고, 10% FBS (fetal bovine serum)를 함유하는 DMEM (Dulbecco's modified Eagle's medium) 배지에서 하룻밤동안 배양하였다. 배양 후, HepG2 세포를 대조군과 2 μ M의 각각의 NR1, NR2와 NR3를 24 시간 처리하였다. 처리 후 웨스턴 블롯팅 분석법으로 단백질의 발현을 분석하였다.

[0035] 구체적으로, 처리 후, 50 mM NaCl, 50 mM Tris pH 7.4, 5 mM EDTA, 1% NP-40 및 프로테아제 억제제를 포함하는 용해 완충액에서 얼음 위 30분 동안 HepG2 세포를 파괴하고, 원심분리하여 전체 세포 용해액을 얻었다. 전체 세포 용해액으로부터 얻은 20-30 μ g 단백질을 9% SDS-PAGE (sodium dodecylsulfate-polyacrylamide gel electrophoresis) 하고, 폴리비닐리덴 디플루오리드 막 (Millipore, Bedford, MA, USA)에 전이시켰다. 0.1% Tween-20을 포함하는 PBS내의 5% 또는 10% (w/v) 비지방 건조 밀크로 블롯팅을 실시하고, HIF-1 α , VEGF (Santa Cruz Biotechnology), α -tubulin (Calbiochem)에 대한 특정 항체와 반응시켰다. HRP (horseradish peroxidase)-접합 2차 항체 (Zymed Lab)를 이용, 면역반응성 단백질을 Amersham ECL Western Blotting Detection Reagents로 검출하였다. 단백질 농도는 BCA (bicinchoninic acid) (Pierce) 분석으로 정량화하였고,

α -tubulin의 발현을 대조군으로 모니터링하였다. 그 결과를 도 2에 나타내었다.

[0036] 도 2에 나타난 바와 같이, NR1, NR2와 NR3에 의해 HIF-1 α 와 VEGF의 단백질 발현이 증가하는 것을 관찰하였다.

[0037] **실시예 3. NR1, NR2 및 NR3 이 혈관내피세포에서 Tube formation에 미치는 효과**

[0038] HUVEC (human umbilical vein endothelial cells, Lonza) 세포는 10 % FBS (fetal bovine serum), insulin (5 μ g/ml), rhFGF (recombinant human basic fibroblast growth factor; 1 μ g/ml), rhEGF (recombinant human epidermal growth factor; 0.1 μ g/ml), gentamycin (50 μ g/ml)과 amphotericin B (50 μ g/ml)이 첨가된 endothelial cell growth medium에 5% CO₂ 및 95% 공기를 갖는 합습 항온기에서 37 °C로 유지하였다. 96-웰 배양플레이트에 Matrigel (10 mg/ml)를 넣어주고 37°C로 배양기에서 30 분간 중합시킨 후에 HUVECs (1x10⁵ 세포/웰)을 접종한 후, 대조군 (vehicle)과 2 μ M NR1, NR2와 NR3를 24 시간 처리한 후에 현미경을 통하여 tube formation을 관찰하고 그 결과를 도 3에 나타내었다.

[0039] 도 3에 나타난 바와 같이, 혈관내피세포에서 VEGF의 발현으로 인해 증가되는 신혈관생성의 중요한 형태학적 변화인 tube formation이 NR1, NR2와 NR3에 의해 증가하는 것을 관찰하였다.

[0040] **실시예 4. NR1, NR2 및 NR3 이 HDF (human dermal fibroblast)에서 collagen 1A2, fibronectin, HIF-1 α 단백질 발현에 미치는 효과, 및 collagen 1A2, fibronectin, VEGF 전사 활성화에 미치는 효과**

[0041] HDF (human dermal fibroblast) 세포 (1x10⁶ 세포/웰)를 60-cm² 배양접시에 접종하고, 10 % FBS를 함유하는 DMEM (Dulbecco's modified Eagle's medium) 배지에서 하룻밤동안 배양하였다. HDF 세포는 5% CO₂ 및 95% 공기를 갖는 합습 항온기에서 37 °C로 유지하였다. 배양 후, HDF 세포를 2 μ M의 각각의 NR1, NR2와 NR3를 24 시간 처리하였다. 처리 후, collagen 1A2, fibronectin와 HIF-1 α (Santa Cruz Biotechnology) 단백질의 발현을 웨스턴 블롯팅 분석법으로 분석하였고, α -tubulin의 발현을 대조군으로 모니터링하였다. 그 결과를 도 4a에 나타내었다.

[0042] 도 4a에 나타난 바와 같이, NR1, NR2와 NR3에 의해 collagen 1A2, fibronectin와 HIF-1 α 의 단백질 발현이 증가하는 것을 관찰하였다.

[0043] 이에 더하여 동일한 조건으로 HDF 세포에 2 μ M 각각의 NR1, NR2와 NR3를 24 시간 처리한 후, RT-PCR (reverse transcriptase-polymerase chain reaction) 분석법으로 전사 활성화에 미치는 효과를 분석하였다. PCR 반응은 collagen 1A2, fibronectin과 VEGF에 다음과 같이 각각 특이적인 primer를 사용해서 수행하였다; collagen 1A2 (forward: 5'-TCCAAGACAAGAAACAC-3', reverse: 5'-GCAGCCATCTACAAGAAC-3'), fibronectin (forward: 5'-TGAAGAGGGGCACATGCTGA-3', reverse: 5'-GTGGGAGTTGGGCTGACTCG-3'), VEGF (forward: 5'-CTGCTGTCTTGGGTGCATTGG-3', reverse: 5'-CACGCCTCGGCTTGTCACAT-3') 과 β -actin (5'-CGTGGCCGCCCTAGGCACCA-3', reverse: 5'-TTGGCTAGGGTTCAGGGGG-3').

[0044] 도 4b에 나타나 바와 같이, NR1, NR2와 NR3에 의해 HDF 세포에서 collagen 1A2, fibronectin와 VEGF의 전사 활성이 증가한다는 것을 관찰하였다. 상기 결과는, NR1, NR2와 NR3가 wound healing에 중요한 혈관 생성 성장 인자인 VEGF와 육아조직의 빠른 성장을 일으키는 collagen, fibronectin의 생성을 촉진시킬 수 있음을 의미한다.

[0045] **실시예 5. NR2와 NR3가 HDF (human dermal fibroblast) 에서 세포이동 (migration) 에 미치는 효과**

[0047] HDF 세포 (3x10⁵ 세포/웰)를 Culture-insert 배양접시 (iBidi)에 접종하고, 10% FBS (fetal bovine serum)를 함유하는 DMEM (Dulbecco's modified Eagle's medium) 배지에서 하룻밤 동안 배양하였다. HDF 세포는 5% CO₂ 및 95% 공기를 갖는 합습 항온기에서 37°C로 유지하였다. 배양 후, Culture-insert 배양접시에 있는 culture-insert 막을 제거한 후, 각각 2 μ M의 NR2와 NR3를 처리하였다. peptide 처리 후, 6시간과 24 시간 후에 현미경을 통하여 세포 이동 (migration) 정도를 관찰하고 그 결과를 도 5에 나타내었다.

[0048] 도 5에 나타난 바와 같이, NR2와 NR3의 24 시간 처리시 용매만 처리한 대조군에 비해 세포 이동 (migration)이

활발히 일어나는 것을 관찰하였다.

[0049] **실시예 6. NR3가 in vivo 상에서 wound healing에 미치는 효과**

[0050] 250-280 g의 수컷 Sprague Dawley 쥐의 dorsal hair를 제거하고 Zoletil50[®] (Tiletamine/Zolazepam)/ Rompun[®] (Xylazine) 혼합액을 가지고 IP 주사로 마취시켰다. 쥐의 dorsum에 두 개의 피부 상처부위 (1.5 cm X 1.5 cm)를 만들고 쥐 6 마리의 12 개의 상처부위에 거즈, 기제 (polyethylene glycol 400: polyethylene glycol 3350 = 4:1), 500 µg/g NR3, 시판 연고제 (후시딘, 푸시딘산나트륨; 동화약품)를 각각 처리 후, 3, 6, 9, 12 및 15 일 후의 상처 크기 감소를 아래의 식을 이용하여 측정하고 그 결과를 도 7에 나타내었다.

[0051] $Wound\ size\ reduction\ (\%) = [(A_0 - A_t) / A_0] \times 100$

[0052] (A₀: 최초 상처 크기, A_t: 관찰일의 상처 크기)

[0053] 도6에 나타난 바와 같이, 거즈 대조군과 비교하여, 상피결손 부위의 유의성 있는 감소가 NR3 및 시판 연고제에서 인정되었다. 이에 더하여, 쥐 상처 부위의 진피와 피하조직을 채취하여 10% 탄산완충-포르말린 용액에서 고정시킨 다음 임베딩 센터 (embedding center)를 사용하여 파라핀 안에 끼워 넣고 얇게 박편을 만든 다음 이 박편을 헤마토실린-에오신 (haematoxylin-eosin)으로 염색하고 현미경으로 관찰하는 조직 검사를 시행하였다.

[0054] 더욱 자세한 조직학적 in vivo wound healing을 측정하기 위하여 Digital image analyzer (DMI-300, DMI)를 통해서 낙설된 상피 부분 (desquamated epithelium regions) 크기, 상피재생율, 육아조직에서의 신생모세혈관 수, 침윤 염증세포의 수, 콜라겐 발현 면적 및 육아조직 면적을 측정하여 그 결과를 표 2에 나타내었다.

표 2

Histomorphometry	Groups			
	거즈 대조군	기제	시판 연고제	NR3 연고제
Desquamated epithelium regions (mm)	4.16±0.91	3.53±1.16	2.91±0.28	1.95±0.31 ^{****}
Re-epithelization (%)	58.40±9.13	64.46±11.5	70.9±2.8	80.52±3.14 ^{****}
In granulation tissues				
Microvessels numbers	75.2±11.0	70.60±9.74	57.2±8.3	45.2±10.0 ^{****}
Infiltrated inflammatory cell numbers	325.8±85.4	239.4±52.9	97.6±8.5	34.0±18.4 ^{****##}
Collagen occupied regions (%)	41.78±6.49	43.07±9.61	56.1±6.9	79.50±6.00 ^{****##}
Granulation tissue areas (mm ²)	23.32±6.66	24.67±8.70	8.02±0.89	3.71±0.89 ^{****##}

Values are expressed as Mean ± S.D. of five wounds

*p<0.05, **p<0.01 and ***p<0.001 as compared with base control (기제)

##p<0.01 and ###p<0.001 as compared with gauze control

[0055]

[0056] 이에 더하여, 현미경을 통해 조직병리학적 관찰을 하여, 도 9에 나타내었다. 각각은 거즈 처리 대조군 (A-C), 기제 처리군 (D-F), 시판 연고제 (G-I)와 NR3 (J-L)를 나타낸다. A, D, G, J의 별표(*, asterisk)는 낙설된 상피 부분 (desquamated epithelium regions)을, B, E, H, K의 화살표 부분은 육아 조직에서 신생모세혈관과 침윤 염증세포를 나타낸다. C, F, I, L의 녹색 부분은 콜라겐 발현 면적을 나타낸다. 상처부위의 재생상피 정도는 다음과 같은 식을 통해 계산하였다.

[0057] $Re\text{-}epithelization (\%) = [(A-B)/C] \times 100$

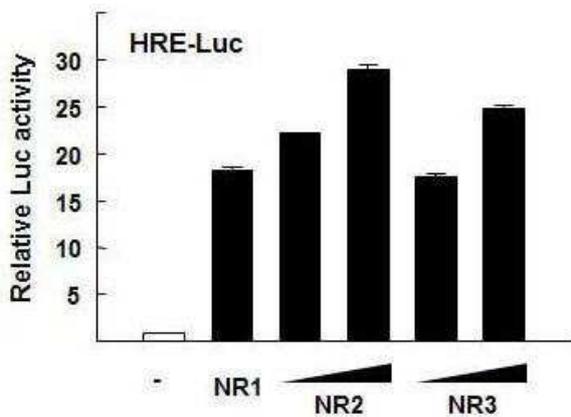
[0058] (A, B 및 C는 각각 'total length total wound (10 mm)', 'Desquamated epithelium regions (mm)' 과 'total wound (10 mm)'을 나타낸다.)

[0059] 표 2 및 도 7에 나타난 바와 같이, 거즈 처리 대조군(A~C) 과 비교하여, 상피결손 부위의 유의성 있는 ($p < 0.01$) 감소가 NR3 연고제(J~L), 및 시판 연고제 처리군(G~I) 에서 인정되었으며, 결과적으로 상피 재생율의 유의성 있는 ($p < 0.01$) 증가가 각각 인정되었다. 또한 NR3 연고제 및 시판 연고제 도포군에서는 거즈 처리 대조군에 비해 유의성 있는 ($p < 0.01$ 또는 $p < 0.05$) 신생모세혈관 및 침윤 염증세포의 감소가 육아조직에서 인정되었고, 육아조직 자체의 면적 역시 유의성 있게 ($p < 0.01$) 감소되었다. NR3연고제는 기제 처리군에 비해 육아조직에서 신생모세혈관 및 침윤 염증세포의 유의성 있는 감소가 인정되었고, 육아조직 자체의 면적 역시 유의성 있게 ($p < 0.01$) 감소되었다. 한편 NR3의 기제(D~F) 처리군에서는 거즈 대조군에 비해 의미 있는 wound healing 효과가 인정되지 않았다.

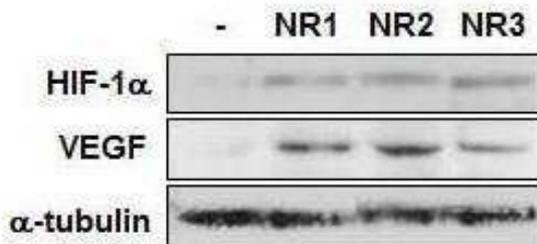
[0060] 전술한 본 발명의 설명은 예시를 위한 것이며, 본 발명이 속하는 기술분야의 통상의 지식을 가진 자는 본 발명의 기술적 사상이나 필수적인 특징을 변경하지 않고서 다른 구체적인 형태로 쉽게 변형이 가능하다는 것을 이해할 수 있을 것이다. 그러므로 이상에서 기술한 실시예들은 모든 면에서 예시적인 것이며 한정적이 아닌 것으로 이해되어야 한다.

도면

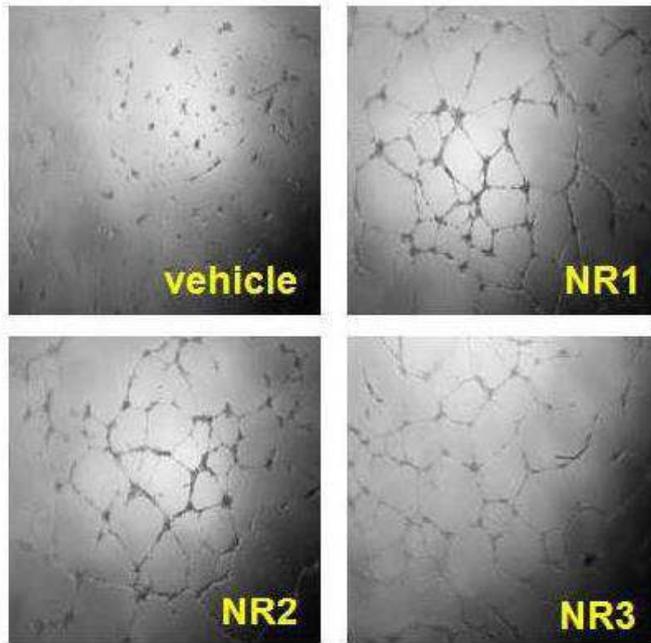
도면1



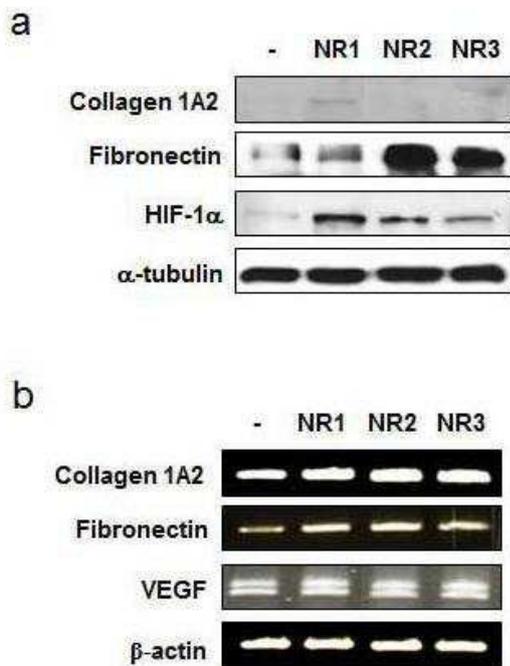
도면2



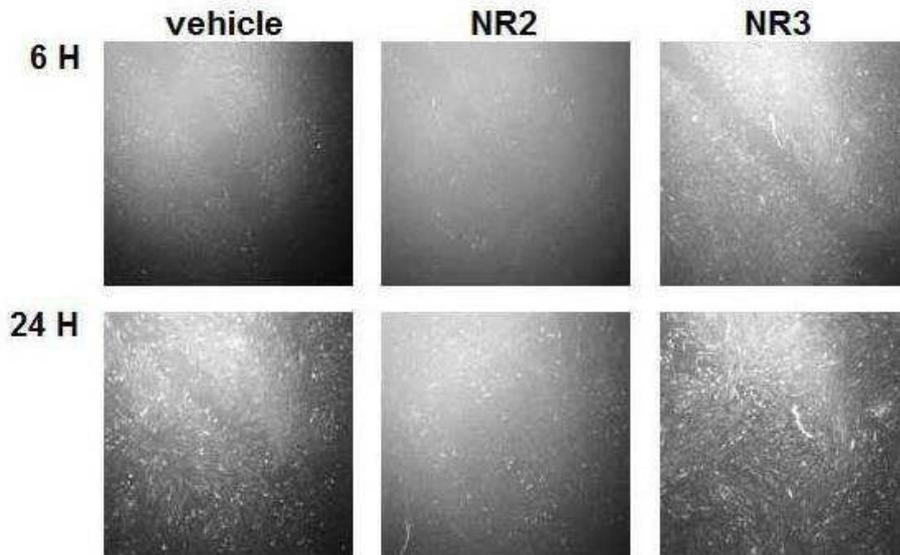
도면3



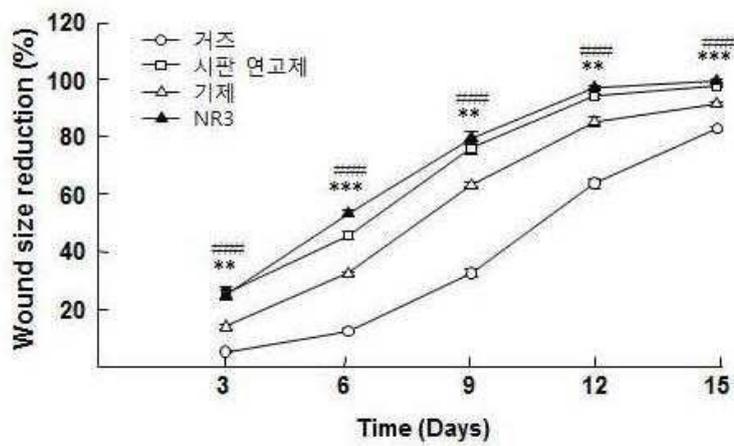
도면4



도면5



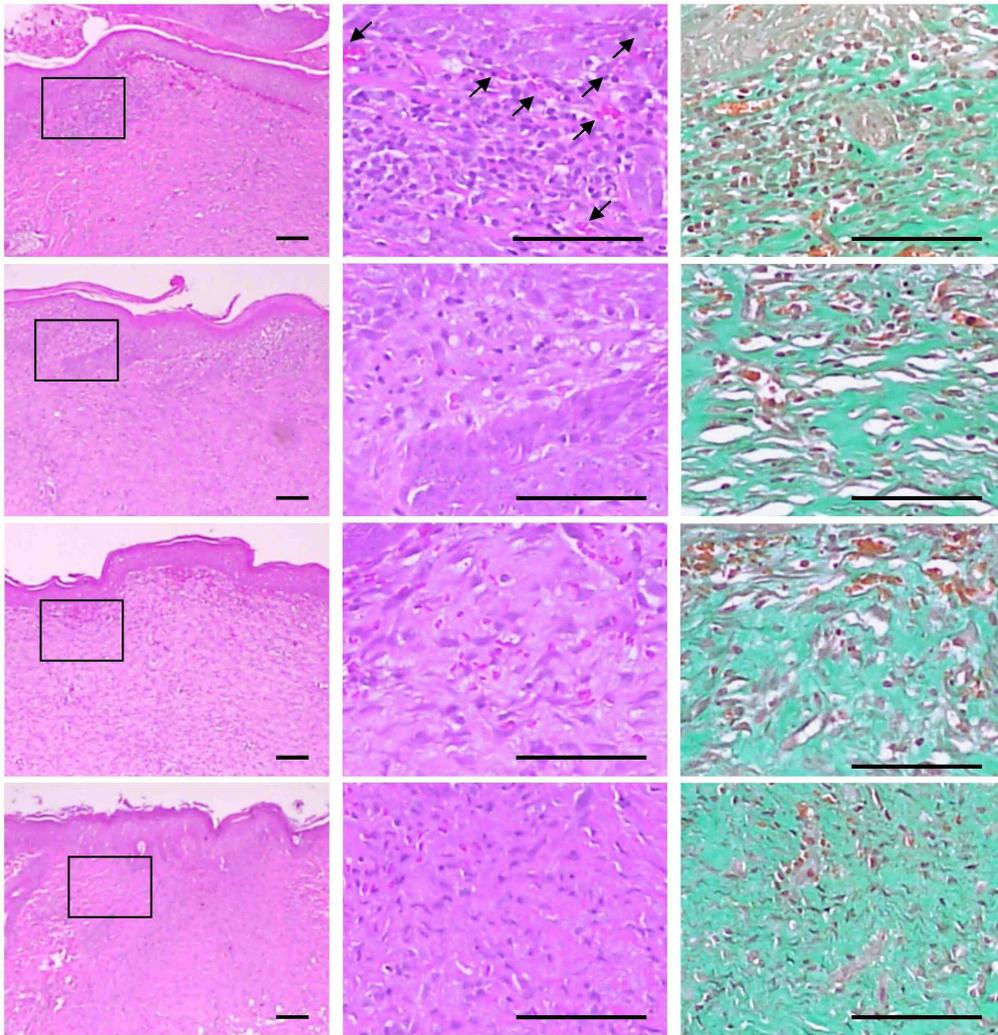
도면6



p<0.01 and *p<0.001 as compared with base control (기제)

***p<0.001 as compared with gauze control

도면7



scale bars = 160 μ m

DE, dermis; EP, regenerated epithelium; LP, lamina propria

거즈대조군(A~C), 기제 (D~F), 시판연고제 (G~I), NR3 연고제(J~L).

작은 창은 오른쪽 킬럼에서 확대된 부위임.

A, B, D, E, G, H, J 와 K: H&E stain; C, F, I 와 L: Masson's trichrome stain

서열 목록

[서열목록 전자파일 첨부](#)