파지디스플레이를 이용한 성장인자 안정화 제형 맞춤형 피부 투과 펩타이드의 개발

이설훈*

동덕여자대학교 응용화학부 화장품학 전공

Received: July 5, 2018 / Revised: August 20, 2018 / Accepted: August 23, 2018

Screening of Skin-permeable Peptide in Thermal Stabilizing Formulation Using Phage Display

Seol-Hoon Lee*

Department of Applied Chemistry, Dongduk Women's University, Seoul 02748, Republic of Korea

In this study, we identified methods to improve heat stability and skin permeability of functional protein biopolymers, such as growth factors, enzymes, and peptides. The biopolymers participate in cellular activation and catalytic functions in vivo. Therefore, when applied to cosmetics, their efficacies are expected to be helpful for skin care. However, they have disadvantages that include instability to heat and low skin permeability due to their high molecular weight. To overcome these problems, we searched for a composition that increases heat stability. Stability was improved using a polymeric humectant having a long polyethylene glycol length, compared with a mono-molecular structure humectant. Next, to enhance skin permeation, a permeation enhancing peptide was selected from a phage library. The permeation enhancing peptide can be commonly used to promote the permeation of growth factors, enzymes, and peptides. Screening was performed on the polymeric humectant formulation. One dominant peptide from the modified-screening method was identified. Furthermore, it was confirmed that the permeability of the peptide was better than that of the peptide developed through a screening system based on phosphate-buffered saline. The data indicate that the polymeric humectant formulation will be helpful for increasing the heat stability of protein ingredients and that skin permeability could be increased by a formulation-specific, penetration-enhancing peptide.

Keywords: Phage display, skin penetration, heat stability, polymeric humectant

서론

성장인자, 효소 등과 같은 단백질성 고분자 들은 생체 내에서 다양한 생리 활성을 조절하는 기능을 수행하고 있고, 이들의 기능을 피부 개선 분야에 적용하려는 다양한 시도가 진행되고 있다. 성장 인자는 생체 내에서 세포내의 신호전달 [1] 및 성장과 활성을 조절하는 역할을 담당하여, 진피, 표피 조직의 성장을 촉진한다[2]. 또한 콜라겐과 같은 간극 물질의 합성에 중요한 역할을 한다[3]. 이는 건강한 피부조직의 유지 및 주름과 같은 노화현상의 개선에 중요한 작용을 할

것으로 기대된다. 한편 생체내의 촉매 작용을 하는 효소 등도 피부 미용분야에 적용되고 있다. 단백질 분해효소의 기능을 가지는 botulinum toxin의 경우 신경세포내에 침투 후 SNARE complex 형성에 중요한 단백질 인자들을 분해한다 [4]. 이를 통하여 부분적인 신경의 마비와 주름과 관련된 근육의 활동 저하로 이어져 주름을 개선하는데 적용된다. 피부의 최외각 층인 각질의 경우, 피부결과 같은 감촉 및 산란에 의한 칙칙함을 결정하는 요소이고, 이를 위해 턴오버 기작을 조절하는 것은 피부 개선 분야에서 중요한 타겟이 되고 있다. 이런 각질 턴오버의 경우도 각질 세포 간을 연결하는 desmosome을 분해하는 단백질 분해효소의 활동에 따라서 조절된다[5].

이런 예시와 같이, 천연물과 같은 저분자 chemical의 functional 구조에 의존하는 기존의 방식을[6] 뛰어넘어 성

*Corresponding author

Tel: +82-2-940-4792, Fax: +82-50-4428-9616

E-mail: slashv@dongduk.ac.kr

© 2018, The Korean Society for Microbiology and Biotechnology

장인자와 효소 등을 피부개선 분야에 적용하려는 화장품 또한 증가 추세에 있다.

이러한 장점에도 불구하고 단백질성 고분자를 화장품과 같은 피부 외용 분야에 적용하는 데는 몇 가지 단점이 있다. 첫째 열에 대한 안정성이 부족하여 기능이 변성이 된다는 점과 둘째, 큰 분자량에 의해 피부로 전달되는데 어려움이 있다[7]. 먼저, 열에 대한 안정성의 경우, 의약품 사례인 protein drug 분야에서도 동일한 문제가 발생되고 있다. 이를 반영하여 2015년에 미국 FDA에 등록된 13종의 protein drug의 경우 12종이 2-8℃ 사이의 냉장 보관 및 운송을 해야 하는 액상의 형태를 가지고 있고 1종의 경우 dry powder의 형태를 가지고 있다[8]. 이런 경우도 sugar와 같은 첨가물을 사용하는 방식으로 이루어진다. 이때 sugar의 OH기가 물을 대신하여 단백질과 수소결합을 하게 되고 단백질의 본래 구조 유지에 도움을 주는 것으로 설명하고 있다[8]. 그러나 powder의 형태나 냉장운송 방식은 범용적인 화장품에 적용되기에는 어려움을 가지고 있는데 이는 피부의 보습 등의 화장품의 기본적인 기능을 할 수 없는 단점이 있기 때문이다.

한편, 피부전달의 측면에서는 피부의 구조를 먼저 이해할 필요가 있다. 피부의 표면의 역할은 피부 내부의 수분 손실을 막고 외부로부터의 이물질의 침입을 막는 것이다. 이를 위해 피부의 각질은 케라틴 단백질로 구성된 각질세포와 ceramide, fatty acid, wax 등으로 구성된 지질층이 그 사이를 메꾸는 구조로 이루어져 있다. 이를 brick과 mortar 구조라 명하고 있다. 각질 층은 약 10-15층의 각질세포로 구성되어 10-45 μm의 두께를 가진다[7]. 효능물질의 주요 전달 통로는 세포간 지질을 통해서 이루어지는 것으로 보고 있다. 저 분자 일수록, 적절한 친유성(logP가 3 정도)일수록 물질 자체의 피부 흡수가 뛰어난 것으로 알려져 있다. 또한 농도가 높을수록 피부 구조 내에서 diffusion 잘 되는 것으로 알 수 있다[9]. 또한 효능 물질이 담지된 제형의 조성 또한 피부 흡수에 영향을 주는 중요한 요소이다. 일례로, 제형의 극성 성분의 비율에 따라서 레티놀의 피부 전달 속도를 달리 할 수 있는 것으로 보고되고 있다. 또한 극성성분의 비율은 solid nano lipid와 같은 capsule에서의 방출 속도 조절에도 이용되고 있다[10]. 따라서 효능성분의 피부의 흡수 촉진은 효능 성분 자체의 구조나 성질뿐만 아니라 이를 담지하고 있는 제형에도 많이 의존하고 있어 이를 중요하게 고려해야 한다.

본 연구에서는 우선, 성장인자를 대상으로 열 안정성을 개선할 수 있는 보습제의 구조적 특징에 대해서 선별을 진행하였다. 단분자 보습제와 함께 Poly ethylene glycol의 길이가 다른 polymeric humectant를 이용하여 성장인자의 열 안정성에 미치는 영향을 확인하였다[11]. 그 결과 PEG 가지의 길이가 긴 경우 성장인자의 열 안정성 개선에 기여한다는 것을 확인할 수 있었다. 화장품의 제조 과정 조건에 해당하는

70℃를 기준으로 1 h 정도의 가열과정에서도 그 활성이 유지되는 경향보였다.

이로부터 단백질 성 효능 성분을 안정화 시키는 제형을 선정하였고, 이런 조건에서 피부투과를 더욱 촉진할 수 있는 방법을 확보하려 하였다. 이를 위해서 성장인자 안정화 제형을 기반으로 하여 피부 투과를 촉진할 수 있는 펩타이드를 phage display를 수행하여 선별하였다. 이는 펩타이드 서열의 디자인과 예측의 과정없이도, library에서의 선별과 증폭의 과정으로 피부 투과 펩타이드를 개발할 수 있는 효율적인 방식이다. 기존에 이를 활용하여 피부투과 펩타이드를 개발한 몇가지 사례가 보고되어 왔으나, 이들은 PBS 시스템을 활용한 사례였다[12]. 다양한 제형의 적용 측면에서는 유리한 방식일 수 있으나, 특정 제형에서의 추가적인 촉진 효과를 가져오기에는 단점이 있는 방식이다. 본 연구에서는 이를 극복하기 위해 최종적으로 사용될 성장인자 안정화 제형에서 phage display를 수행하여 펩타이드를 발굴하는 연구를 수행하였다. 제형의 특성에 대한 분석과 예측없이도 투과 촉진 펩타이드의 개발에 유리한 선택 과정의 장점을 최종 제형에서 수행함으로써 투과개선 효율을 높일 수 있을 것이라 가정하였다. 그 결과 본 연구 과정을 통해 선별된 펩타이드의 경우, 성장인자 안정화 제형에서는 기존의 PBS 기반 선별 펩타이드의 경우 보다 피부 투과성이 우수한 것을 확인할 수 있었다.

본 연구 결과를 종합하여, 향후 단백질 성 고분자 효능 물질 기반의 피부 외용제 개발에 도움이 될 것으로 기대한다.

재료 및 방법

시약 및 기기

Phage library는 Ph.D -12 phage library kit를 New England Biolab에서 구입하여 사용하였다. Franz glass cell(Standard 직 경 9 mm, Receiver 5 ml, Permeagear), 돼지 피부(1 mm 두께, Medikinetics), M-13 phage spin kit (Qiagen), P3-1, S3-2 peptide와 control peptide (FTIC fusion 형태, Pepton), PEG400, Glycerin, 1,3 Butylene glycol (Sigma), GlucmE20 (Lubrizol) glycereth26 (Lipochemical), EGF, hGH, FGFb (차메디텍) 등의 시약은 표기된 업체에서 구매 혹은 제작하였다. Two-photon confocal은 IVIM Technology (Korea)를 이용하였다.

성장인자의 열 안정성 분석

Human Dermal Fibroblast를 96 well에 serum free DMEM 배지로 60% confluent로 배양 후 다음날 Serum Free media에 각각의 성장인자를 농도 별로 처리 후 24 h를 추가 배양하였다. 이후 MTT assay를 통해서 성장인자에 의

한 HDF의 성장 촉진 효과를 수치화하였다. 성장인자의 열 안정성을 확인하기 위해 최종 1 µg/ml의 농도가 되게 90%의 보습제에 배합하였다. 이후 PCR 기기를 이용하여 70℃에서 1 h 동안 incubation한 뒤 HDF 세포에 처리하였다. 이를 종합하여 성장인자 안정화 제형은 단분자 보습제와 PEG 기반 고분자 보습제를 40%의 농도가 되는 제형을 선정하였다.

Phage display를 이용한 각질투과 phage 선별

피부 투과성 peptide를 선별하기 위해서 경피 제제의 용출 실험 방법을 응용하였다. 이를 위해 Franz glass cell (Standard 직경 9 mm, Receiver 5 ml, Permeagear)을 이용하였다[13]. Glass cell의 상단과 하단 사이에 돼지 피부(0.7 mm 두께, Medikinetics)를 장착하고 상단의 donor chamber에 phage를 처리한 뒤, 돼지 피부를 투과하여 하단의 Receiver chamber에 잔류하는 Phage를 증폭하였다. 이 과정을 1회 진행하는 것을 1 Round 선별한 것으로 정의하였다. 1 Round에서 증폭된 Phage를 가지고 다시 2 Round를 진행하는 방식으로 피부 투과력이 좋은 phage를 경쟁하는 방식으로 선별하였고 총 4 Round를 수행하였다. Receiver chamber에는 각각 500 µl와 5 ml의 TBS (50 mM Tris pH 7.5, 150 mM NaCl) 용액에 1% BSA (Sigma)와 0.01% Tween 20을 녹여서 사용하였다. Donor chamber에는 성장인자 안정화 제형을 사용하였다. Random 한 peptide 서열을 가지는 phage를 가지고 시작하기 위해서, Ph.D -12 phage library kit (New England Biolab)를 사용하였다. 500 µl의 donor chamber 액에 10¹⁰개의 phage를 처리하였다. 이후 16 h 동안 배양하였고, Receiver chamber의 TBS 5 ml를 모두 사용하여 phage를 증폭하였다. Phage를 증폭하기 위해서 Host cell로 *E. coli* ER2738 (New England Biolab)를 이용하였다. 25 ml의 LB 배지에 진탕 배양된 ER2738를 접종하고 O.D. (550 nm) 0.5에서 투과한 Phage가 있는 TBS 5 ml를 모두 처리하고 4 h 배양하였다. 이후 8000G로 원심 분리하여 *E. coli*와 phage를 분리하였다. Phage가 있는 상층액에 6 ml의 침전액(20% PEG6000, 2.5 M NaCl)을 처리하여 Phage를 침전시켰다. 8000G로 원심 분리 후 침전된 Phage에 TBS 용액을 처리하여 Phage를 분리 후 보관하였다. 최종적으로 피부 투과성 Phage가 가지는 peptide를 확인하기 위해서 phage를 single colony에서 증폭하였다. Phage를 가지는 ER2738 *E. coli*는 LB/X-gal/IPTG plate에서 파란색을 띄는 성질을 이용하였다. ER2738 배양액에 300 µl에 phage를 TBS로 적정량 희석하여 처리한 뒤, 이를 TOP agar 4 ml에 섞은 후 LB/X-gal/IPTG plate 상단에 처리하고 16 h 추가 배양한 뒤 blue colony를 선별하였다. 각각의 colony를 5 ml의 ER2738 배양액에 6 h 추가 배양한 뒤 M13 phage spin kit (Qiagen)을 이용하여 DNA를 분리 후

염기서열을 분석하였다. 이를 통해 피부투과 peptide를 선별하였다.

선별된 peptide의 투과성 확인

In vitro 각질 투과성 분석 측정하고자 하는 원료의 각질 투과성을 분석하기 위해서 Franz glass cell (Standard 직경 9 mm, Receiver 5 ml, Permeagear)을 이용하였다. Glass cell의 상단과 하단 사이에 돼지 피부(0.7 mm 두께, Medikinetics)를 장착하였다. 하단에는 각각 500 µl와 5 ml의 TBS (50 mM Tris pH 7.5, 150 mM NaCl) 용액에 1% BSA (Sigma), 0.01% Tween 20을 녹여서 사용하였다. 먼저 Phage의 경우, 선별된 phage들의 피부 투과성을 확인하기 위해서 투과된 phage의 수를 측정하여 비교하였다. 처리하는 phage의 수를 10¹⁰개로 일정하게 맞추어서 처리하였다. 16 h 반응 후에 투과하여 Receiver에 있는 Phage의 수를 측정하였다. 이를 위해 ER2738 배양액에 300 µl에 Receiver의 TBS 20 µl에 녹아있는 phage를 처리한 뒤, 이를 TOP agar 4 ml에 섞은 후 LB/X-gal/IPTG plate 상단에 처리하고 16 h 추가 배양한 뒤 blue colony의 수를 counting하였다. 선별된 peptide의 투과활성을 확인하기 위해서 FITC가 fusion 된 peptide를 사용하였다. 비교대상의 peptide를 1 µg씩 donor chamber에 처리하고 receiver chamber에 투과된 Peptide의 양을 Victor fluorescence analyzer를 이용하여 FITC의 intensity를 정량하였다.

Penetration imaging

선별된 peptide의 투과활성을 확인하기 위해서 FITC가 fusion 된 peptide를 사용하였다. 비교대상의 peptide를 1 µg씩 Porcine skin의 표면에 처리하였다. Skin을 1 cm × 1 cm 크기로 절단하여 사용하였다. 이후 6 well의 바닥에 거즈를 깔고 PBS를 포함하여 습윤한 환경을 유지하였고, Peptide가 도포된 Porcine skin을 두고 24 h incubation 하였다. 이후 면봉으로 표면을 세정하였고, D-square sampling tape으로 각질을 3회 제거하였다. 이후 two-photon confocal microscopic 장비(IVIM technology)를 이용하여 표면에서부터 5 µm 간격으로 피부 속까지 FITC를 이미징하였다[14]. 이후 5군데를 랜덤하게 선정하여 FITC의 강도를 수치화 하였다.

통계처리

본 연구의 투과성 분석 실험은 세 번 이상 수행하였으며, 이때 결과 값들은 mean ± standard deviation (S.D.)으로 나타내었다. 실험군에 따른 데이터 사이의 통계적 유의성 검정은 two-tailed Student's *t*-test를 통하여 검증하였고, *p* 값이 0.05 이하일 경우 통계학적으로 유의적인 차이가 있는 것으로 판단하였다.

결과 및 고찰

성장인자 안정화 제형 선정

교원세포의 성장을 촉진을 위하여 EGF, hGH, bFGF를 각각 100 ng/ml의 농도로 처리하였다. 그 결과 bFGF를 처리한 경우 교원세포의 성장이 촉진되며 spindle의 형태를 이루는 것을 확인할 수 있었다[15] (Fig. 1). 기존의 성장인자 보다 주름의 개선 측면에서 우수한 성장인자로 기대된다. 이런 bFGF이 경우 열에 의한 안정성이 낮다[16]. 이 정도를 확인하기 위해 우선 성장인자의 농도에 대한 교원세포의 성장 촉진 활성을 비교하였다. 100 ng/ml에서의 활성이 0.1 ng/ml에서는 나타나지 않았다. 10–1 ng/ml의 범위에서는 농도에 의존적으로 교원세포의 성장이 증가함을 확인할 수 있었다. 이를 환산하여 bFGF의 열에 대한 안정성을 파악할 수 있었다.

그 결과 증류수에 bFGF를 넣고 70℃에서 1 h 가열한 결과 활성이 1/1000 수준으로 감소한 것을 알 수 있었다(Fig. 2). 이 때 성장인자의 열 안정성을 개선하기 위해서 보습제 성분을 추가하였다. 이는 기존의 보습제의 OH 그룹등이 물과 단백질 분자 사이의 수소결합력을 줄여주는 것으로 설명하고 있다[8]. 기존의 단분자 보습제인 glycerol, 과 PEG가 결합된 PEG의 길이가 긴 polymeric humectant를 사용하였다. 각각 90%의 농도가 되게 하고 70℃에서 1 h 동안 배양하였다. 그 결과 PEG의 길이가 100 이상이 되는 Glycereth 26의 경우나 PEG400의 경우는 70℃ 1 h 배양 이후에도 90% 이상의 활성이 유지되었다(Fig. 2). 그러나 PEG의 길이가 1개인 Glucam E20의 경우는 약 30%의 활성이 유지되었다. 이를 통해서 PEG의 길이가 긴 성분을 사용할 때 성장인자의 고온 안정성을 향상시키는 것을 알 수 있었다. 또

Fig. 1. Effects of basic fibroblast growth factor (FGFb) on proliferation of fibroblasts. Cells were cultured in the presence or absence of various kinds of growth factor (EGF, hGH, FGFb in 100 ng/ml and 10% Fetal bovine serum) for 16 h. FGFb stimulated proliferation of control fibroblasts. * $p < 0.05$ compared with control.

Fig. 2. Improve of thermal stability of FGFB by various humectants. (A) Cell growth was measured by varying the concentration of FGFB. FGFB in distilled water was boiled at 70 for hour and it could not stimulate the cell proliferation. FGFB incubated with polymeric humectant having PEG structure could stimulate fibroblast proliferation. (B) In small molecular weight humectants, the efficacy were reduced after heat treatment. (C) Molecular structure of humectants * $p < 0.05$ compared with DW.

한 이들은 glycerin 류의 단분자 성분이 1–8% 수준의 활성을 유지시키는 것에 비해서도 안정화 능력이 큰 것으로 이해할 수 있다. 이를 바탕으로 PEG 기반의 polymeric humectant를 적용한 성장인자 안정화 제형을 구성하였다.

성장인자 안정화 맞춤형 피부 투과 펩타이드의 선별

Franz cell- Porcine skin 시스템과 Phage library를 활용하여 피부투과 촉진 펩타이드를 발굴하는 것은 이론적인 계산이나 화학적인 modification 없이도 투과 촉진 펩타이드를 발굴할 수 있는 방법으로 다양한 연구자에 의해서 알려져 왔다. 그러나 이때 library를 다르게 (길이 및 disulfide bond의 유무)하는 정도의 차이가 있었으나 그 방법은 유사했다[17, 18]. 대부분 donor chamber에 PBS를 사용하는 형태이다. 그러나 특정 성분이 피부로 투과가 잘되기 위해서는 피부 구조속에서의 diffusion 뿐만 아니라 제형에서 피부로 partition 되는 정도도 큰 영향을 미친다. 본 연구에서는 이점을 주목하여 screening 단계에서부터 최종 제형을 기반으로 스크리닝하여 투과 효율을 더욱 향상시키고자 하였다(Fig. 3). 이

경우 PBS에서 선별된 투과 촉진 펩타이드보다 최종 제형에서 더 우수한 투과효율을 나타낼 것으로 기대하였다.

우선 polymeric humectant 기반의 제형과 phage library를 혼합한 mixture를 Franz cell의 donor chamber에 incubation을 하는 방식으로 screening을 수행하였다. 먼저 polymeric humectant 기반의 제형에서는 Phage의 생존에 영향을 주지 않는 것을 확인하였다(data not shown). 동일한 양의 phage를 donor chamber에 incubation 하였을 때 스크리닝 round 별 receiver chamber에 투과한 phage의 수가 점증적으로 증가한 것으로 스크리닝을 통한 우수 phage의 들의 population이 증가한다는 것을 유추 할 수 있다. 3 round와 4 round의 phage의 서열을 확인한 결과 가장 population이 높은 VPRSMATHSTF 서열의 펩타이드를 확인할 수 있었다. 약 50% 정도의 분포를 가지는 것을 확인하였고 4 round 이상의 선별은 더 이상 진행하지 않았다(Fig. 4).

피부 투과 촉진 펩타이드의 활성 검증

본 연구로 선별된 펩타이드의 투과 정도를 비교하기 위해

Fig. 3. Screening of skin penetrating peptide using Phage Display. Phages were incubated with polymeric humectant mixture in donor chamber. Phages penetrated through skin were amplified and used for next round of screening. Porcine skin has epidermal and dermal skin structure with 1 mm thickness.

서 FITC를 펩타이드 C 말단에 연결하여 제작하였고, 기존의 PBS기반으로 선별된 NGSLNTHLAPIL 서열 및 콜라겐을 이루는 기본 구조가 되는 GHK 서열이 반복된 구조의 펩타이드를 대조군으로 사용하였다(Fig. 5A). 투과 실험은 Polymeric humectant 기반의 제형을 활용하였다. PBS를 기반으로 선별된 S3-2 펩타이드 보다도 Polymeric humectant 기반의 제형을 이용한 경우는 P3-1 펩타이드가 S3-2 펩타이드 보다 5배 가량 많이 피부를 투과한 것을 알 수 있었다(Fig. 5B). 그러나 이들을 PBS 조건에서 실험한 경우는 이 경향이 역전되는 것을 확인할 수 있었다(data not shown). 제형에서 피부구조로 효능성분이 partition되어 나오는 것이 피부 투과에 영향을 미치는 중요 요소라고 판단되고 제형 맞춤형 파지디스플레이를 수행 함으로써 특정 기능을 위해 선정된 제형에서의 투과효율을 높일 수 있었다. PBS 기반의 선별 방식은 다양한 제형에 일반적으로 적용시키기에 적절한 방식이라고 생각된다. 그러나 특정 목적으로 정해진 한가지 제형에 대해서 스크리닝을 수행하게 되면 제형 맞춤형 투과 촉진 펩타이드를 쉽게 선별할 수 있음을 알 수 있었다.

두가지 펩타이드의 특성을 비교하기 위해서 Porcine skin 내에서의 분포를 확인하였다. PBS 기반의 S3-2 peptide와 P3-1 peptide에 FITC를 표지하고 Polymeric humectant 기반의 제형 조건에서 porcine skin에 도포한 뒤 투과 정도를 two-photon confocal을 이용하여 관찰하였다. 가장 시그널이 강한 표피에서부터 5 μm 씩 침투하며 영상을 확인하였고, 표피 층을 지나 진피층의 영역이 되는 60 μm 깊이까지 투과를

Fig. 4. Identification of peptide from phage pool that crossed the porcine skin. After each round of selection, phage in receiver chamber was counted. (A) Small volume (20 μl) of buffer in the receiver chamber was used for the blue plaque assay. Each value is mean $\pm$ S.D ($n \geq 3$). (C) 20 phages from 3rd and 4th round pool were sequenced. The population of dominant clone (P3-1) in 3rd and 4th round of screening was calculated. (B) The amino acid sequence of surface presenting peptides was identified.

Fig. 5. In vitro skin penetrating assay of selected peptides. (A) Control, S3-2 peptide and P3-1 (FITC labeled, 1 μ g) were loaded in the donor chamber. (B) Penetrated peptides in the receiver chamber were calculated by measuring the fluorescence intensities. Each value is mean $\pm$ S.D ($n \geq 3$). $p < 0.05$ compared to the control.

검증하였다. 그 결과 P3-1 펩타이드가 피부내의 투과 및 잔류량이 많다는 것을 알 수 있다(Fig. 6). 본 연구에 의해서 발굴된 투과촉진 펩타이드들은 차후 성장 인자와의 fusion 상

태의 생산을 통하여 각각의 투과촉진 활성이 증대된 새로운 성장인자의 개발에 적용되어 피부 외용제 분야에 적용될 수 있다. 이는 화학적인 투과촉진제를 사용하여 피부 장벽기능에 교란을 가져올 수 있는 방식에[19] 비해 안전할 것으로 예상된다. 또한 세포막의 지질성분은 피부 각질 세포간 지질층과는 그 구성이 다르기 때문에[20] 피부 투과 측면에서는 세포막 투과 방식의 PTD (protein transduction domain) [21] 보다 우수한 것으로 예상된다.

요 약

본 연구에서는 성장인자, 효소, 펩타이드 등과 같은 기능성 생체 고분자를 대상으로 열에 대한 안정성 및 피부 투과성을 향상시키는 연구를 수행하였다. 이들은 생체 내에서 세포를 활성화 하거나 촉매 작용을 담당하고 있다. 따라서 화장품 등의 외용제에 적용 시, 그 효능의 우수함이 예상되나 열에 대한 불안정성과 높은 분자량으로 피부 투과성이 낮은 단점이 있다. 이를 극복하기 위해 먼저 열에 대한 안정성을 확보할 수 있는 조성을 탐색하였다. 그 결과, 단분자 구조의 humectant 대비 PEG의 길이가 긴 polymeric humectant를 사용한 경우 열에 대한 안정성이 높아지는 것을 확인 할 수 있었다.

한편 이들의 피부 투과를 촉진시키기 위하여 투과 촉진 펩

Fig. 6. In vitro imaging of peptide-distribution in Porcine skin. (A) S3-2 peptide and P3-1 (FITC labeled, 1 μ g) were spreaded on the porcine skin. Penetration of peptides were visualized by two-photon microscopy. (B) Penetrated peptides in the each skin layer were calculated by measuring the fluorescence intensities on the each images. Each value is mean $\pm$ S.D ($n = 5$). Each value is mean $\pm$ S.D ($n = 5$). * $p < 0.05$ P3-1 versus S3-2 by Student's t-test.

타이드를 phage library로부터 선별하고자 하였다. 투과 촉진 펩타이드는 성장인자, 효소, 펩타이드의 투과 촉진을 위해 공통적으로 사용할 수 있는 구조이다. 그러나 피부의 투과 정도는 물질 자체의 특성도 영향을 미칠 수 있으나 제형의 성분에 따라서 영향을 받을 수 있다. 본 연구에서는 성장인자를 안정화 할 수 있는 polymeric humectant 제형을 기반으로 투과 촉진 펩타이드 선별을 수행하였다. 그 결과 대조군 펩타이드 대비 투과촉진이 향상된 결과를 확인했을 뿐만 아니라 PBS를 기반으로 선별된 투과 촉진 펩타이드 보다 polymeric humectant 제형에서는 투과도가 우수한 것을 확인할 수 있었다.

본 연구의 결과는 기능성 생체고분자의 열 안정성 개선 및 피부 투과도 향상에 기여할 수 있을 것으로 기대된다.

Acknowledgments

This thesis was supported by the Dongduk Women's University Grant.

Conflict of Interest

The authors have no financial conflicts of interest to declare.

References

- Lee SH, Choi HS, Kim H, Lee Y. 2008. ERK is a novel regulatory kinase for poly(A) polymerase. *Nucl. Acids Res.* **36**: 803-813.
- Pastore S, Mascia F, Mariani V, Girolomoni G. 2008. The epidermal growth factor receptor system in skin repair and inflammation. *J. Invest. Dermatol.* **128**: 1365-1374.
- Geesin JC, Brown LJ, Gordon JS, Berg RA. 1993. Regulation of collagen synthesis in human dermal fibroblasts in contracted collagen gels by ascorbic acid, growth factors, and inhibitors of lipid peroxidation. *Exp. Cell Res.* **206**: 283-290.
- Blasi J, Chapman ER, Link E, Binz T, Yamasaki S, De Camilli P, et al. 1993. Botulinum neurotoxin A selectively cleaves the synaptic protein SNAP-25. *Nature* **365**: 160-163.
- Borgoño CA, Michael IP, Komatsu N, Jayakumar A, Kapadia R, Clayman GL, et al. 2007. A potential role for multiple tissue kallikrein serine proteases in epidermal desquamation. *J. Biol. Chem.* **282**: 3640-3652.
- Jun S-H, Lee S-H, Kim SY, Park SG, Lee C-K, Kang N-K. 2017. Physical properties of TEMPO-oxidized bacterial cellulose nanofibers on the skin surface. *Cellulose* **24**: 5267-5274.
- Wang Z, Wang Z, Lu WW, Zhen W, Yang D, Peng S. 2017. Novel biomaterial strategies for controlled growth factor delivery for biomedical applications. *NPG Asia Mater.* **9**: e435-17.
- Mensink MA, Frijlink HW, van der Voort Maarschalk K, Hinrichs WL. 2017. How sugars protect proteins in the solid state and during drying (review): Mechanisms of stabilization in relation to stress conditions. *Eur. J. Pharm. Biopharm.* **114**: 288-295.
- Moser K, Kriwet K, Naik A, Kalia YN, Guy RH. 2001. Passive skin penetration enhancement and its quantification in vitro. *Eur. J. Pharm. Biopharm.* **52**: 103-112.
- Jenning V, Gohla SH. 2001. Encapsulation of retinoids in solid lipid nanoparticles (SLN®). *J. Microencapsul.* **18**: 149-158.
- de Lencastre Novaes LC, Mazzola PG, Pessoa A Jr, Penna TC. 2010. Effect of polyethylene glycol on the thermal stability of green fluorescent protein. *Biotechnol. Prog.* **26**: 252-256.
- Lee S-H, Kang NG, Lee S. 2013. Selection of skin-penetrating peptide using phage display. *Yakhak Hoeiji* **57**: 125-131.
- Simon GA, Maibach HI. 2000. The pig as an experimental animal model of percutaneous permeation in man: qualitative and quantitative observations--an overview. *Skin Pharmacol. Appl. Skin Physiol.* **13**: 229-234.
- Samuelsson K, Simonsson C, Jonsson CA, Westman G, Ericson MB, Karlberg AT. 2009. Accumulation of FITC near stratum corneum -visualizing epidermal distribution of a strong sensitizer using two-photon microscopy. *Contact Dermatitis* **61**: 91-100.
- Makino T, Jinnin M, Muchemwa FC, Fukushima S, Kogushi-Nishi H, Moriya C. 2009. Basic fibroblast growth factor stimulates the proliferation of human dermal fibroblasts via the ERK1/2 and JNK pathways. *Br. J. Dermatol.* **162**: 717-723.
- Chen G, Gulbranson DR, Yu P, Hou Z, Thomson JA. 2012. Thermal stability of fibroblast growth factor protein is a determinant factor in regulating self-renewal, differentiation, and reprogramming in human pluripotent stem cells. *Stem Cells* **30**: 623-630.
- Kumar S, Sahdev P, Perumal O, Tummala H. 2012. Identification of a novel skin penetration enhancement peptide by phage display peptide library screening. *Mol. Pharmaceutics* **9**: 1320-1330.
- Hsu T, Mitragotri S. 2011. Delivery of siRNA and other macromolecules into skin and cells using a peptide enhancer. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **108**: 15816-15821.
- Boelsma E, Tanojo H, Boddé HE, Ponc M. 1996. Assessment of the potential irritancy of oleic acid on human skin: Evaluation in vitro and in vivo. *Toxicol. Vitro* **10**: 729-742.
- van Meer G, Voelker DR, Feigenson GW. 2008. Membrane lipids: where they are and how they behave. *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* **9**: 112-124.
- Eguchi A, Akuta T, Okuyama H, Senda T, Yokoi H, Inokuchi H, et al. 2001. Protein transduction domain of HIV-1 Tat protein promotes efficient delivery of DNA into mammalian cells. *J. Biol. Chem.* **276**: 26204-26210.