

(12) 특허협력조약에 의하여 공개된 국제출원

(19) 세계지식재산권기구  
국제사무국



(10) 국제공개번호

(43) 국제공개일  
2018년 1월 4일 (04.01.2018)

WIPO | PCT

WO 2018/004281 A2

(51) 국제특허분류:

C07K 5/06 (2006.01) A61K 8/64 (2006.01)  
C07C 223/04 (2006.01) A61Q 19/02 (2006.01)  
C07K 19/00 (2006.01)

(21) 국제출원번호: PCT/KR2017/006919

(22) 국제출원일: 2017년 6월 29일 (29.06.2017)

(25) 출원언어: 한국어

(26) 공개언어: 한국어

(30) 우선권정보:  
10-2016-0081998 2016년 6월 29일 (29.06.2016) KR

(71) 출원인: 에이엔웍주식회사 (ANPEP INC.) [KR/KR];  
28118 충청북도 청주시 청원구 오창읍 양청송대길 128,  
Chungcheongbuk-do (KR).

(72) 발명자: 강상문 (KANG, Sang Moon); 34010 대전시  
유성구 구죽로 16, 108동 401호, Daejeon (KR). 황석연  
(HWANG, Seock Yeon); 34403 대전시 대덕구 계족산  
로 136, 509동 1402호, Daejeon (KR). 임미혜 (LIM, Mi  
Hye); 16832 경기도 용인시 수지구 수지로 342번길 27,  
101동 1608호, Gyeonggi-do (KR). 박청 (PARK, Chun);  
34120 대전시 유성구 가정로 65, 101동 405호, Daejeon  
(KR). 신은진 (SHIN, Eun Jin); 28319 충청북도 청주시

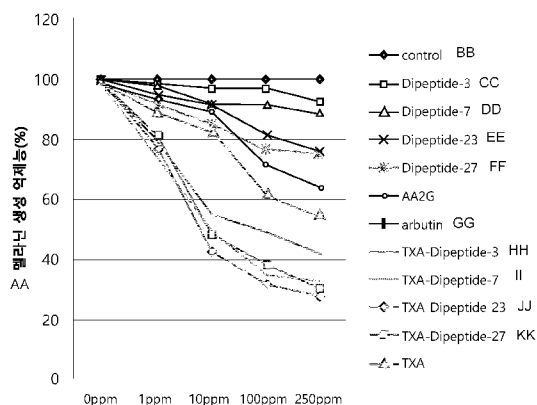
청원구 율량로 174-201, Chungcheongbuk-do (KR). 이기  
영 (LEE, Kee Young); 28117 충청북도 청주시 청원구  
오창읍 2산단로 160 대성베르힐 107-302, Chungcheong-  
buk-do (KR). 박운규 (PARK, Un Kyu); 34525 대전시  
동구 용운로147번길 33, 102호, Daejeon (KR). 임현지  
(LIM, Hyun Ji); 35207 대전시 서구 청사로 254, 110  
동 405호, Daejeon (KR). 양동현 (YANG, Dong Hyun);  
41198 대구시 동구 아양로11길, 19, Daegu (KR). 차상주  
(CHA, Sang Joo); 10235 경기도 고양시 일산서구 하이  
파크3로 61, 409-503, Gyeonggi-do (KR).

(74) 대리인: 정부연 (JUNG, Bu Yon); 06646 서울시 서초구  
반포대로26길, 29, 원플러스 빌딩 2층, Seoul (KR).

(81) 지정국 (별도의 표시가 없는 한, 가능한 모든 종류의 국  
내 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, CZ, DE, DJ, DK, DM, DO, DZ, EC,  
EE, EG, ES, FI, GB, GD, GE, GH, GM, GT, HN, HR, HU,  
ID, IL, IN, IR, IS, 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, SM, ST, SV, SY, TH, TJ, TM, TN, TR,  
TT, TZ, UA, UG, US, UZ, VC, VN, ZA, ZM, ZW.

(54) Title: TRANEXAMIC ACID-PEPTIDE HAVING SKIN WHITENING ACTIVITY AND USES THEREOF

(54) 발명의 명칭: 피부 미백 활성을 가지는 트라넥삼산-펩타이드 및 그 용도



AA ... Inhibition ability of melanin production (%)  
BB ... Control  
CC ... Diipeptide-3  
DD ... Diipeptide-7  
EE ... Diipeptide-23  
FF ... Diipeptide-27  
GG ... Arbutin  
HH ... TXA-Diipeptide-3  
II ... TXA-Diipeptide-7  
JJ ... TXA-Diipeptide-23  
KK ... TXA-Diipeptide-27

(57) Abstract: Disclosed are a tranexamic acid-peptide having a skin  
whitening effect and skin whitening activity with excellent thermal sta-  
bility and time stability, which is capable of inducing return to healthy  
skin and whitening effect through skin turnover improvement, and a use  
thereof. The present invention provides a tranexamic acid-peptide hav-  
ing skin whitening activity selected from the group consisting of Tranex-  
amil-AS, Tranexamil-AT, Tranexamil-AP, Tranexamil-G P, Tranex-  
amil-ES, Tranexamil-KK, Tranexamil-HK, Tranexamil-MY, Tranex-  
amil-GH, Tranexamil-MA, Tranexamil-A H, Tranexamil-CC, Tranex-  
amil-SA, Tranexamil-WA, Tranexamil-WE, Tranexamil-KD, Tranex-  
amil-NA, Tranexamil-T S, Tranexamil-SS, Tranexamil-EC, Tranexamil-  
TA, Tranexamil-PF, Tranexamil-VS, Tranexamil-VV, Tranexamil-V P,  
Tranexamil-AA, Tranexamil-PS, Tranexamil-HA, Tranexamil-GK, Tranexamil-KV,  
Tranexamil-AR, Tranexamil-R P, Tranexamil-PQ, Tranexamil-QG, Tranexamil-PP,  
Tranexamil-VR, Tranexamil-SV, Tranexamil-ET, Tranexamil-CG and Tranexamil-NT.

[다음 쪽 계속]



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

공개:

- 국제조사보고서 없이 공개하며 보고서 접수 후 이를 별도 공개함 (규칙 48.2(g))
- 명세서의 서열목록 부분과 함께 (규칙 5.2(a))

(57) 요약서: 피부의 턴오버 개선을 통한 미백 효과 및 건강한 피부로의 회귀를 유도하는 것이 가능하며, 피부 미백효과 및 열적안정성과 시간안정성이 뛰어난 피부 미백 활성을 가지는 트라넥삼산-펩타이드 및 그 용도가 개시된다. 본 발명은 트라넥사미드-AS, 트라넥사미드-AT, 트라넥사미드-AP, 트라넥사미드-GP, 트라넥사미드-ES, 트라넥사미드-KK, 트라넥사미드-HK, 트라넥사미드-MY, 트라넥사미드-GH, 트라넥사미드-MA, 트라넥사미드-AH, 트라넥사미드-CC, 트라넥사미드-SA, 트라넥사미드-WA, 트라넥사미드-WE, 트라넥사미드-KD, 트라넥사미드-NA, 트라넥사미드-TS, 트라넥사미드-SS, 트라넥사미드-EC, 트라넥사미드-TA, 트라넥사미드-PF, 트라넥사미드-VS, 트라넥사미드-VV, 트라넥사미드-VP, 트라넥사미드-AA, 트라넥사미드-PS, 트라넥사미드-HA, 트라넥사미드-GK, 트라넥사미드-KV, 트라넥사미드-AR, 트라넥사미드-RP, 트라넥사미드-PQ, 트라넥사미드-QG, 트라넥사미드-PP, 트라넥사미드-VR, 트라넥사미드-SV, 트라넥사미드-ET, 트라넥사미드-CG 및 트라넥사미드-NT 로 구성된 군 에서 선택되는 피부 미백 활성을 나타내는 트라넥삼산-펩타이드를 제공한다.

## 명세서

# 발명의 명칭: 피부 미백 활성을 가지는 트라넥삼산-펩타이드 및 그 용도

### 기술분야

- [1] 본 발명은 피부 미백 활성을 가지는 트라넥삼산-펩타이드 및 그 용도에 관한 것으로 보다 상세하게는 피부 미백효과 및 열적안정성과 저장안정성이 뛰어난 특정서열을 가지는 트라넥삼산-펩타이드 및 그 용도에 관한 것이다.

### 배경기술

- [2] 피부는 인체에서 가장 큰 조직으로 햇빛이나 물리, 화학적 자극으로부터 신체 내부를 보호해 주는 기능을 하며 이는 인간의 생명유지를 위해 절대적으로 필요하며 끊임없이 재생되어 항상성을 유지시킨다. 피부는 바깥쪽으로부터 표피, 진피, 피하지방 순서대로 구성되어 있으며 가장 얇은 조직인 표피는 피부의 보습과 보호를 담당하는 중요한 기능을 담당하고 있으며 수분 손실, 손상과 세균침입 등을 방지하는 역할을 맡고 있다. 피부는 신체를 전부 감싸고 있는 조직으로 다양한 기능을 가지고 있다. 신체 내부와 외부 사이에서 장벽 기능을 가지고 있으므로 랑게르한스섬에 의한 면역 체계를 갖추고 있고 표피에 의한 수분 조절기능을 가지고 있음. 또한, 적절한 햇빛으로 비타민 D를 합성하고 지질의 저장고와 땀샘으로의 배설 기능도 수행한다. 건강한 피부에서의 정상적인 분화과정에 의해 생성된 각질층은 피부의 보습을 유지하고 외부환경의 자극으로부터 보호하는 기능을 가지고 있다. 이러한 기능을 피부 장벽 기능이라 하며 표피의 가장 중요한 역할이라고 할 수 있다.
- [3] 화장품의 주요한 효능 중 하나인 미백은 멜라닌 합성과 피부 명암에 관련된 많은 효소들의 활성이 명백해졌지만 아시안 피부색이 특히 더 과색소가 침착되고 노화되기 쉬운 이유에 대해선 아직 완전히 밝혀지지 않은 상태이다. 피부 명암을 밝힌다고 여겨지는 물질들은 전형적으로 멜라닌 합성과 그에 관련된 효소들 각각을 저해하는 것으로 알려져 있다.
- [4] 사람의 피부색은 여러 가지 요인들 특히, 계절, 인종, 및 성별에 따라 다르며, 주로 멜라닌, 카로틴, 및 헤모글로빈의 양에 의해서 결정되는데, 이중 멜라닌이 가장 결정적인 요소로 작용한다. 멜라닌(melanin)은 피부 기저층에 존재하는 멜라닌 세포(melanocyte)에서 합성되며 주변 각질 세포로 전이되어 사람의 피부색을 나타낸다. 멜라닌이 비정상적으로 적게 되면 백반증과 같은 피부 병변이 유발되며, 반대로 과잉으로 생산될 경우에는 기미, 잡티를 형성하는 것으로 알려져 있다. 멜라닌은 아미노산 일종인 티로신(tyrosine)에 티로시나아제(tyrosinase)가 작용함으로써, 티로시나아제는 자외선에 의해 더욱 활성화되기 때문에 햇빛을 많이 받게 되면 피부가 검게 변하게 된다. 국내 및 일본 등지에서 피부 미백효과 개념의 화장품들이 큰 시장을 형성하고 있는데,

이들은 대개 티로시나아제의 활성 억제 효과가 있는 물질들을 배합한 제품들이다.

- [5] 최근 멜라닌 합성과 피부 명암에 관련된 많은 효소들의 활성이 명백해졌지만 아시아인 피부색이 특히 더 과색소가 침착되고 노화되기 쉬운 이유에 대해선 아직 완전히 밝혀지지 않았다. 피부 명암을 밝힌다고 여겨지는 물질들은 전형적으로 멜라닌 합성과 그에 관련된 효소들 각각을 저해하는 것으로 알려져 있다.
- [6] 종래에 티로시나아제의 활성억제제로서 미백화장품에 배합되는 원료들에는 아스코르빈산(비타민 C) 및 그 유도체, 상백피추출물, 녹차추출물, 알로에 추출물, 황금추출물 등 식물추출물 뿐만 아니라, 코직산, 알부틴, 유용성 감초추출물 및 트라넥삼산아마이드 등이 있다. 그러나 각종 식물추출물들은 불안정하고 제품에 배합할 경우 효과가 지속적이지 못하며, 티로시나아제 활성억제력도 미미하다는 문제점이 있다. 또한 코직산(kojic acid)은 티로시나아제 억제제로서 통상적으로 사용되고 있으나, 알레르기 반응을 일으킬 수 있으며(Nakagawa M. et.al., Contact Dermatitis, 43:PP9-3(1995)) 제품 내에서 불안정하여 2%에 가까운 과량을 사용해야 하는 등 조성물로서 제조하는데 어렵다는 문제점이 있다.
- [7] 트라넥삼산 (Tranexamic acid)은 아미노산의 일종인 리신의 유사체로 제약에서는 지혈제로 널리 사용되어 왔으며 세계보건기구가 정한 필수 약품 중에 하나로 지정될 정도로 사용 빈도 및 안전성을 검증받은 원료이다. 트라넥삼산은 혈액 내 항 응고제인 플라스민의 활성부위의 활성화를 막아 지혈 작용을 돕는 역할을 하지만 플라스민은 혈액응고 뿐만이 아니라 멜라닌을 생성하는 세포인 멜라노사이트의 성장을 촉진하고 동시에 멜라닌의 생성을 촉진하는 물질 프로스타글라딘과 류코트라이엔의 전구물질인 아라키돈산의 생성을 활성화하여 세포내 멜라닌 생성에도 큰 영향을 미치는데 트라넥삼산은 플라스민의 활성을 억제하여 미백에 도움을 주게 된다.
- [8] 한편, 펩타이드를 이용한 다양한 미백제를 개발하기 위한 다양한 시도가 있었지만, 그 효과는 그리 크지 않았으며, 효과를 보다 극대화하기 위한 비타민 C-펩타이드 복합체, 하이드로 퀴논펩타이드 복합체 등도 제조에 있어 어려움이 있으며, 고가이기 때문에 이용이 제한적이어서 시장에서의 적용은 그리 많지 않았다.
- [9] 현재 시중 판매중인 대다수의 미백 기능성 소재은 이러한 멜라닌 색소 축적 부위를 제거함으로써 증상적인 부분은 완화하는데 그 초점이 맞춰져 있으며, 기존 피부과적 시술 역시도 이러한 축적 부위를 레이저를 통해 인위적으로 제거하는데 그 목적을 두고 있다.
- [10] 하지만 이러한 증상적인 부분만을 제거하는 것은 단기간의 효과를 나타낼 수는 있으나, 근본적 원인인 턴오버 개선을 동반하지 않기 때문에 빠른 기간 내에 다시 멜라닌이 축적되는 부작용을 보이게 됨 따라서 피부의 턴오버 주기를 정상적으로 돌려주며 보습 작용을 통해 피부의 과각질화를 예방 및 제거할 수

있다면 단순히 멜라닌 색소 축적 부위를 제거하는 증상 완화 위주의 해결책이 아닌 멜라닌 색소 축적의 근본 원인을 해결함은 물론 건강한 피부로의 변화를 꾀할 수 있을 것으로 예상할 수 있다.

## 발명의 상세한 설명

### 기술적 과제

- [11] 따라서 본 발명은 상기 문제점을 해결하기 위하여 안출된 것으로, 트라넥삼산-펩타이드의 임상적인 효능과 화장품 제형 개발을 진행하여 기존 미백 소재의 단점을 보완한 신규한 고 기능성 미백 소재를 개발함과 더불어, 트라넥삼산-펩타이드의 피부 진피층으로 흡수성을 시험하고, 피부의 턴오버 개선을 통한 미백 효과 및 건강한 피부로의 회귀를 유도하는 것이 가능한 피부 미백 활성을 가지는 트라넥삼산-펩타이드 및 그 용도를 제공하고자 한다.

### 과제 해결 수단

- [12] 상기 과제를 해결하기 위하여 본 발명의 제1양태는 트라넥사미-AS, 트라넥사미-AT, 트라넥사미-AP, 트라넥사미-GP, 트라넥사미-ES, 트라넥사미-KK, 트라넥사미-HK, 트라넥사미-MY, 트라넥사미-GH, 트라넥사미-MA, 트라넥사미-AH, 트라넥사미-CC, 트라넥사미-SA, 트라넥사미-WA, 트라넥사미-WE, 트라넥사미-KD, 트라넥사미-NA, 트라넥사미-TS, 트라넥사미-SS, 트라넥사미-EC, 트라넥사미-TA, 트라넥사미-PF, 트라넥사미-VS, 트라넥사미-VV, 트라넥사미-VP, 트라넥사미-AA, 트라넥사미-PS, 트라넥사미-HA, 트라넥사미-GK, 트라넥사미-KV, 트라넥사미-AR, 트라넥사미-RP, 트라넥사미-PQ, 트라넥사미-QG, 트라넥사미-PP, 트라넥사미-VR, 트라넥사미-SV, 트라넥사미-ET, 트라넥사미-CG 및 트라넥사미-NT로 구성된 군에서 선택되는 피부 미백 활성을 나타내는 트라넥삼산-펩타이드를 제공한다.
- [13] 또한 상기 트라넥삼산-펩타이드는 멜라닌 생성을 억제시키는 것을 특징으로 하는 트라넥삼산-펩타이드를 제공한다.
- [14] 또한 상기 트라넥삼산-펩타이드는 티로시나아제의 활성을 억제시키는 것을 특징으로 하는 트라넥삼산-펩타이드를 제공한다.
- [15] 또한 상기 트라넥삼산-펩타이드는 MITF(microphthalmia-associated transcription factor)의 발현을 억제시키는 것을 특징으로 하는 트라넥삼산-펩타이드를 제공한다.
- [16] 또한 상기 트라넥삼산-펩타이드는 0.01% ~ 5.0% 농도에서 미백 효과를 가지는 것을 특징으로 하는 트라넥삼산-펩타이드를 제공한다.
- [17] 또한 상기 트라넥삼산-펩타이드는 N-말단의 트라넥삼산에 의해 증가된 안정성을 갖는 것을 특징으로 하는 트라넥삼산-펩타이드를 제공한다.
- [18] 또한 본 발명의 제2양태는 트라넥사미-AS, 트라넥사미-AT, 트라넥사미-AP, 트라넥사미-GP, 트라넥사미-ES, 트라넥사미-KK, 트라넥사미-HK,

트라넥사밀-MY, 트라넥사밀-GH, 트라넥사밀-MA, 트라넥사밀-AH, 트라넥사밀-CC, 트라넥사밀-SA, 트라넥사밀-WA, 트라넥사밀-WE, 트라넥사밀-KD, 트라넥사밀-NA, 트라넥사밀-TS, 트라넥사밀-SS, 트라넥사밀-EC, 트라넥사밀-TA, 트라넥사밀-PF, 트라넥사밀-VS, 트라넥사밀-VV, 트라넥사밀-VP, 트라넥사밀-AA, 트라넥사밀-PS, 트라넥사밀-HA, 트라넥사밀-GK, 트라넥사밀-KV, 트라넥사밀-AR, 트라넥사밀-RP, 트라넥사밀-PQ, 트라넥사밀-QG, 트라넥사밀-PP, 트라넥사밀-VR, 트라넥사밀-SV, 트라넥사밀-ET, 트라넥사밀-CG 및 트라넥사밀-NT로 구성된 군에서 선택되는 트라넥삼산-펩타이드를 포함하는 피부 미백용 조성물을 제공한다.

- [19] 또한 상기 조성물은 화장료 조성물인 것을 특징으로 하는 피부 미백용 조성물을 제공한다.

### 발명의 효과

- [20] 이러한 본 발명에 따르면, 트라넥삼산-펩타이드는 멜라닌 생성을 억제시켜 피부 미백에 우수한 효과를 가지고 있으며, 안정성 및 피부투과도가 매우 우수하므로, 기존의 화장료 조성물에 비하여 효과적인 피부미백용 화장료 조성물의 생산에 유용하다.

### 도면의 간단한 설명

- [21] 도 1은 트라넥삼산-펩타이드 라이브러리에 대한 미백 스크리닝 그래프,  
 [22] 도 2는 트라넥삼산-펩타이드에 대한 고성능 액상 크로마토그래피 분석 결과를 나타내는 그래프,  
 [23] 도 3은 트라넥삼산-펩타이드의 열 안정성, 광안정성을 측정한 결과를 나타내는 그래프,  
 [24] 도 4는 -MSH를 처리한 B16F10 세포에 트라넥삼산-펩타이드를 처리한 후, 멜라닌 세포의 멜라닌 생성 감소효과를 촬영하여 비교한 그래프,  
 [25] 도 5는 트라넥삼산-펩타이드의 티로시나제 억제능을 농도별로 정한 결과를 나타내는 그래프,  
 [26] 도 6는 트라넥삼산-펩타이드의 세포독성을 NIH3T3 세포, HACAT 세포의 독성을 통해 확인한 그래프,  
 [27] 도 7은 -MSH를 처리한 B16F10 세포에 트라넥삼산-펩타이드를 처리한 후, mRNA를 추출하고 멜라닌 생성 표지인자 (MITF) 프라이머를 이용하여 역전사 중합효소 연쇄반응을 수행한 결과를 나타낸 그래프,  
 [28] 도 8은 임상시험을 통해 트라넥삼산-펩타이드와 트라넥삼산의 미백 임상 효능을 비교한 그래프,  
 [29] 도 9는 1% 트라넥삼산-펩타이드를 함유하는 그룹의 미백효과 임상시험 결과그래프,  
 [30] 도 10은 0.5% 트라넥삼산-펩타이드를 함유하는 그룹의 미백효과 임상시험

결과 그래프.

### 발명의 실시를 위한 최선의 형태

- [31] 이하, 실시예를 통하여 본 발명을 더욱 상세히 설명하고자 한다. 이들 실시예는 오로지 본 발명을 보다 구체적으로 설명하기 위한 것으로, 본 발명의 요지에 따라 본 발명의 범위가 이들 실시예에 의해 제한되지 않는다는 것은 당업계에서 통상의 지식을 가진 자에 있어서 자명할 것이다.
- [32] 본 발명자들은 트라넥삼산이 결합된 펩타이드에 있어서, 트라넥삼산-펩타이드 융합체의 피부미백효과를 주시하고 예의 실험을 진행한 결과, 트라넥삼산-펩타이드 라이브러리에서 일부 펩타이드가 멜라닌 생성을 억제하여 피부 미백에 효과를 나타낸다는 사실을 발견하고 본 발명에 이르게 되었다.
- [33] 따라서 본 발명의 제1양태는 트라넥사미-AS, 트라넥사미-AT, 트라넥사미-AP, 트라넥사미-GP, 트라넥사미-ES, 트라넥사미-KK, 트라넥사미-HK, 트라넥사미-MY, 트라넥사미-GH, 트라넥사미-MA, 트라넥사미-AH, 트라넥사미-CC, 트라넥사미-SA, 트라넥사미-WA, 트라넥사미-WE, 트라넥사미-KD, 트라넥사미-NA, 트라넥사미-TS, 트라넥사미-SS, 트라넥사미-EC, 트라넥사미-TA, 트라넥사미-PF, 트라넥사미-VS, 트라넥사미-VV, 트라넥사미-VP, 트라넥사미-AA, 트라넥사미-PS, 트라넥사미-HA, 트라넥사미-GK, 트라넥사미-KV, 트라넥사미-AR, 트라넥사미-RP, 트라넥사미-PQ, 트라넥사미-QG, 트라넥사미-PP, 트라넥사미-VR, 트라넥사미-SV, 트라넥사미-ET, 트라넥사미-CG 및 트라넥사미-NT로 구성된 군에서 선택되는 피부 미백 활성을 나타내는 트라넥삼산-펩타이드를 개시한다.
- [34] 본 발명자들은 N-말단에 트라넥삼산을 포함하는 다양한 트라넥삼산-펩타이드 라이브러리를 제조하고 후보 펩타이드들을 준비한 후, 후보 펩타이드들 중에서 멜라닌 생성 억제 활성이 우수한 펩타이드를 스크리닝 함으로써, 본 발명의 트라넥삼산-펩타이드가 제공된다.
- [35] 본 명세서에서 용어 “펩타이드”는 펩타이드 결합에 의해 아미노산 잔기들이 서로 결합되어 형성된 선형의 분자를 의미하며, 트라넥삼산-펩타이드는 펩타이드의 N-말단에 트라넥삼산을 결합시킨 형태를 말한다.
- [36] 본 발명의 바람직한 구현예에 따르면, 본 발명의 펩타이드는 N-말단에 트라넥삼산을 결합하여 변형을 유도할 수 있다. 이러한 변형을 통해 본 발명의 펩타이드는 생체 내 투여시 안정성이 증가되어 높은 반감기를 가질 수 있다.
- [37] 본 발명의 바람직한 구현예에 따르면, 펩타이드의 C-말단에 아미노기(-NH<sub>2</sub>) 결합하여 변형을 유도할 수 있다.
- [38] 상술한 아미노산의 변형은 본 발명의 펩타이드의 안정성을 크게 개선하는 작용을 한다. 본 명세서에서 용어 “안정성”은 인 비보(in vivo) 안정성뿐만 아니라, 저장 안정성(예컨대, 상온 저장 안정성)도 의미한다. 상술한 보호기는

생체 내의 단백질 절단효소의 공격으로부터 본 발명의 펩타이드를 보호하는 작용을 한다.

- [39] 본 발명의 바람직한 구현예에 따르면, 본 발명의 펩타이드는 사람 유래의 세포에 독성을 나타내지 않아 피부 미백용 펩타이드로서 활용도가 매우 높다. 본 발명에 따르면, 100 ng/ml-1000  $\mu$ g/ml의 농도로 HaCat 세포 및 NIH3T3 세포에 트라넥삼산-펩타이드를 처리한 결과, 현저한 세포 독성은 측정되지 않았으며 육안으로 세포의 형태를 확인하였을 때도 큰 변화는 관찰되지 않았다(도 6).
- [40] 본 발명에 따르면, 트라넥삼산-펩타이드는 50°C 온도에서도 우수한 열안정성을 나타내며, 일광조건에서도 안정함을 확인하였다(도 3). 본 발명의 펩타이드는 의약품, 의약외품 및 화장품과 같은 장기간 저장이 요구되는 제품에 유리하게 적용될 수 있다.
- [41] 본 발명의 바람직한 실시예에 따르면, 본 발명의 펩타이드는 멜라닌 생성 억제능을 갖는다. 본 발명에 따르면, 멜라닌 세포에 -MSH를 처리하여 멜라닌 생성을 유발시킨 후 본 발명의 트라넥삼산-펩타이드를 처리하고 배양시킨 후 멜라닌 생성량을 비교한 결과, 대조군에 비해 멜라닌 생성이 최대 약50% 수준으로 억제되었다(표 1).
- [42] 본 발명의 바람직한 구현예에 따르면, 본 발명의 펩타이드는 멜라닌의 생성을 농도-의존적으로 증가시킨다. 본 발명에 따르면, 트라넥삼산-펩타이드(NA-PS) 및 트라넥삼산이 결합되어 있지 않은 펩타이드를 농도별(1  $\mu$ 10  $\mu$ 100  $\mu$ 250  $\mu$ 로 세포에 처리하고 3일 동안 배양한 후 멜라닌 생성량을 육안으로 확인한 결과, 트라넥삼산-펩타이드를 처리한 경우 농도-의존적으로 멜라닌 생성량이 감소되는 것을 확인하였다(도 4). 또한, 트라넥삼산-펩타이드 4종, 트라넥삼산이 결합되어 있지 않은 펩타이드, 알부틴 및 AA2G를 농도별(1  $\mu$ 10  $\mu$ 100  $\mu$ 250  $\mu$ 로 처리하고 3일 동안 배양한 후 배양액의 흡광도를 490 nm에서 측정하여 분석한 결과, 트라넥삼산이 결합되어 있지 않은 펩타이드로 처리한 세포에 비해 트라넥삼산-펩타이드로 처리한 세포에서 멜라닌 생성량이 현저히 감소되었음을 확인하였다(도 1).
- [43] 본 발명의 바람직한 구현예에 따르면, 본 발명의 펩타이드는 티로시나아제의 활성을 억제시킨다. 본 발명에 따르면, L-티로신, 펩타이드 혹은 트라넥삼산-펩타이드와 티로시나아제를 반응시킨 후 475 nm에서 흡광도를 측정하여 티로시나아제에 대한 저해율을 확인한 결과, 트라넥삼산-펩타이드로 처리하였을 경우 트라넥삼산이 결합되어 있지 않은 펩타이드 및 알부틴으로 처리한 것과 비교하여 티로시나아제 활성에 있어 현저한 억제효과를 나타내었다(도 5).
- [44] 본 발명의 바람직한 구현예에 따르면, 본 발명의 펩타이드는 MITF(Microphthalmia-associated transcription factor)의 발현을 억제시킨다. 멜라닌은 티로시나아제, TRP-1, TRP-2 등의 일련의 효소반응에 의하여 생성되며(Olivares et al., *Pigment Cell Melanoma Res* 22(6): 750-760(2009)), 멜라닌

생성의 주요 기전은 멜라닌 세포의 증식과 티로시나아제 효소 활성도의 증가이다. 멜라닌 생성에 있어 가장 중요한 역할을 하는 효소는 티로시나아제이며, 멜라닌 생합성에서 초기단계를 촉매하는 속도조절 인자로서, 이 효소에 의해 티로신이 3,4-dihydroxy-phenylalanine(DOPA), DOPA 퀴논으로 변환되어 붉은 계열의 페오멜라닌(pheomelanin)과 갈색 계열의 유멜라닌(eumelanin)이 합성된다(Lopez et al., *J Biol Chem* 267: 381-390(1992)). 유멜라닌 형성의 중요한 다른 두 가지 효소는 TRP-1과 TRP-2이다. 또한, MITF(Microphthalmia-associated transcription factor)는 티로시나아제 및 관련 효소(TRPs)의 전사를 담당하는 주요한 요소로 MITF의 발현이 억제되면 멜라닌 생성이 억제된다고 할 수 있다.

- [45] 본 발명에 따르면, 멜라닌 세포에 -MSH 및 펩타이드(PS, VS) 또는 -MSH 및 트라넥삼산-펩타이드(Tranexamyl-AP, Tranexamyl-HK, Tranexamyl-VS, Tranexamyl-PS)를 농도별(1  $\mu$ 10  $\mu$ 50  $\mu$ 로 처리하고 4일간 배양한 후 세포로부터 mRNA를 추출하여 역전사 중합효소 연쇄반응을 수행한 결과, 트라넥삼산-펩타이드를 처리한 경우 멜라닌 생성과 관련이 있는 유전자(MITF)의 발현이 억제되는 것을 확인하였다(도 7). 이러한 결과는 본 발명의 펩타이드가 멜라닌 생성과 관련된 유전자의 발현을 억제하여 피부 미백에 매우 우수한 효능을 가진다는 것을 의미한다.
- [46] 또한, 본 발명의 펩타이드를 포함하는 조성물의 경우, 다양한 제형을 이용하여 피부 미백에 매우 효과적으로 이용될 수 있다.
- [47] 트라넥삼산-펩타이드의 미백 효능을 확인하기 위해 상기 트라넥삼산-펩타이드를 함유하는 크림을 제조하여 임상시험을 수행하였다. 그 결과 트라넥삼산-펩타이드는 순수한 트라넥삼산 혹은 대조군에 비해 임상조건에서 미백 개선 효능이 우수함을 확인하였다(도 9). 또한 트라넥삼산-펩타이드의 함량을 절반으로 낮춰 수행한 시험에서도 동일한 결과가 관찰되었으며, 이는 트라넥삼산-펩타이드의 함량이 낮아지더라도 미백 효과를 가질 수 있다는 것을 의미한다(도 10).
- [48]
- [49] 또한 본 발명의 제2양태는, 트라넥사밀-AS, 트라넥사밀-AT, 트라넥사밀-AP, 트라넥사밀-GP, 트라넥사밀-ES, 트라넥사밀-KK, 트라넥사밀-HK, 트라넥사밀-MY, 트라넥사밀-GH, 트라넥사밀-MA, 트라넥사밀-AH, 트라넥사밀-CC, 트라넥사밀-SA, 트라넥사밀-WA, 트라넥사밀-WE, 트라넥사밀-KD, 트라넥사밀-NA, 트라넥사밀-TS, 트라넥사밀-SS, 트라넥사밀-EC, 트라넥사밀-TA, 트라넥사밀-PF, 트라넥사밀-VS, 트라넥사밀-VV, 트라넥사밀-VP, 트라넥사밀-AA, 트라넥사밀-PS, 트라넥사밀-HA, 트라넥사밀-GK, 트라넥사밀-KV, 트라넥사밀-AR, 트라넥사밀-RP, 트라넥사밀-PQ, 트라넥사밀-QG, 트라넥사밀-PP, 트라넥사밀-VR, 트라넥사밀-SV, 트라넥사밀-ET, 트라넥사밀-CG 및

트라넥사밀-NT로 구성된 군에서 선택되는 트라넥삼산-펩타이드를 포함하는 피부 미백용 조성물을 제공한다.

[50] 본 발명의 조성물은 화장료 조성물로 제조될 수 있다.

[51] 본 발명의 조성물에서 유효성분으로 이용되는 트라넥삼산-펩타이드는 2 내지 6개의 아미노산 잔기로 구성되어 매우 분자량이 작아 피부 침투율이 매우 우수하다. 따라서 본 발명의 조성물을 국소적으로 피부에 도포하는 경우 높은 피부 침투율로 인해 피부 미백 효과를 달성할 수 있다. 본 발명의 조성물은 멜라닌 생성을 억제하므로 피부 색상을 밝게 하고 피부 톤을 일정하게 하며, 피부색소의 제거 및 검버섯 제거 등에 효과적이다. 본 발명의 트라넥삼산-펩타이드는 각질세포에서 멜라닌 색소의 생성을 여러 과정으로 억제하고 각질세포에서 기 생성된 멜라닌의 배출을 방지 또는 약화시켜 피부 각질세포층의 색상을 밝게 하는 효능을 발휘한다.

[52] 본 발명에 따른 상기 트라넥삼산-펩타이드를 유효성분으로 함유하는 조성물은 젤 타입, 스킨 타입, 크림 타입, 연고 타입 등의 의약 조성물 및 화장료 조성물에 적용될 수 있지만, 이들만으로 한정되는 것은 아니다. 상기의 조성물은 그것의 타입에 따라 적절한 통상의 연화제, 유화제, 증점제 또는 당업계에 공지되어 있는 기타 물질들을 첨가하여, 공지의 방법에 의해 적절하게 제조될 수 있다.

[53] 상기 젤 타입 조성물은 트리메틸올프로판, 폴리에틸렌 글리콜 또는 글리세린 등의 연화제, 프로필렌 글리콜, 에탄올, 이소세틱알콜 등의 용매, 정제수 등을 첨가하여 제조할 수 있다.

[54] 상기 스킨 타입 조성물은 스테아릴 알콜, 미리스틸 알콜, 베헤닐 알콜, 아라키딜 알콜, 이소스테아릴 알콜, 이소세틸 알콜 등의 지방 알콜, 부틸렌 글라이콜, 글리세린, 알란토인, 메틸 파라벤, 이디티에이-2-소듐, 잔탄검, 디메티콘, 폴리에틸렌 글라이콜-60 하이드로제네이트 카스틀 오일, 폴리 소르베이트 60 및 정제수 등을 첨가하여 제조할 수 있다.

[55] 상기 크림 타입 조성물은 스테아릴 알콜, 미리스틸 알콜, 베헤닐 알콜, 아라키딜 알콜, 이소스테아릴 알콜, 이소세틸 알콜 등의 지방 알콜, 레시틴, 포스파티딜콜린, 포스파티딜에탄올아민, 소프파티질세린, 소프파티딜이노시톨 등의 리피드, 이들의 유도체, 글리세릴 스테아레이트, 소르비탄 팔미테이트, 소리비탄 스테아레이트 등의 유화제, 아보카도 오일, 살구 오일, 바바수 오일, 유리지치 오일, 동백 오일 등의 천연 지방 또는 오일, 프로필렌글리콜 등의 용매 및 정제수 등을 첨가하여 제조할 수 있다.

[56] 상기 연고 타입 조성물은 연화제, 유화제 및 마이크로크리스탈린납, 파라핀, 세레신, 밀납, 경납, 바세린 등의 왁스를 첨가하여 제조할 수 있다.

[57] 또한 본 발명은 활성 성분으로서 상기 조성물들과 하나 이상의 약제학적으로 허용되는 담체 또는 부형제를 포함하는 제제로 제공될 수 있다.

[58] 따라서, 상기 제제에는 약제학적으로 허용되는 담체, 희석제, 부형제, 또는 이들의 조합이 필요에 따라 포함될 수 있다. 이들 제제는 생물체 내로 활성

성분의 투여를 용이하게 한다.

[59] 이하, 실시예를 통해 본 발명을 더욱 상술하지만, 하기 실시예는 본 발명을 예시하기 위한 것이며, 본 발명의 범주가 이들만으로 한정되는 것은 아니다.

[60] 실시예

[61] 실시예 1: 펩타이드 라이브러리의 합성

[62] 펩타이드 라이브러리를 합성하기 위해 19개의 nsc-아미노산(nsc-Ala, nsc-Arg(pbf), nsc-Asp(OtBu), nsc-Asn(trt), nsc-Gly, nsc-Glu(OtBu), nsc-Gln(trt), nsc-His(trt), nsc-Ser(tBu), nsc-Thr(tBu), nsc-Tyr(tBu), nsc-Trp(Boc), nsc-Leu, nsc-Ile, nsc-Val, nsc-Phe, nsc-Met, nsc-Lys(Boc), nsc-Pro)이 부착된 클로로 트리틸 클로라이드 레진(Chloro trityl chloride resin: CTL resin, Novabiochem Cat No. 01-64-0021)을 96웰 테프론 반응기에 시리즈 별로 각 19 라인에 50 mg을 넣고 메틸렌 클로라이드(MC) 1 ml를 가하여 3분간 교반하였다. 용액을 제거하고 디메틸포름아마이드(DMF) 1 ml를 넣어 3분간 교반한 후 다시 용매를 제거하였다. 제조된 트라넥삼산-펩티딜 레진은 DMF, MC 및 메탄올로 각각 3번을 세척하고, 질소 공기를 천천히 흘려 건조한 후, P2O5하에서 진공으로 감압하여 완전히 건조하였다. 제조된 레진에 탈루용액[트리플로로화 초산(Trifluoroacetic acid: TFA) 81.5%, 증류수 5%, 티오아니졸(Thioanisole) 5%, 페놀 5%, EDT(1,2-Ethanedithiol) 2.5% 및 TIS(Triisopropylsilane) 1% 포함] 30 mL을 넣은 후 상온에서 가끔 흔들어주며 얼음 수조 안에서 1 시간 반응을 유지하였다. 레진을 여과하고, 소량의 TFA 용액으로 세척한 후 모액과 합하였다. 이 후 트라넥삼산-펩타이드를 수득하였다.

[63] 합성 및 정제 결과 서로 다른 서열의 펩타이드가 결합된 트라넥삼산-펩타이드 40종을 얻었다(표 1). 합성된 트라넥삼산-펩타이드의 수율은 펩타이드의 서열에 차이에 따른 물성 차에 의해 상이하나 대략 10%대의 평균 수율을 보이고 있다. 컬럼 분리 시 elution 시간도 역시 상이하나 8분대에서 피크를 확인할 수 있었다.

[64] 실시예 2 : 트라넥삼산-펩타이드의 스크리닝

[65] 마우스 멜라닌 세포 B16F1세포는 DMEM(Dulbecco's modified Eagle's media, Sigma)에 10% 우태아혈청(fetal bovine serum, Sigma)을 첨가한 배지로 37°C, 5% CO2 조건에서 배양하였다. 24-웰 플레이트에 1 X 10<sup>5</sup> cells/well의 농도로 세포를 배양하고 세포의 부착을 확인한 뒤, 대조군에는 아무것도 처리하지 않고 용매만 넣었으며, 양성대조군은 α-MSH를 20 ug/ml, 그리고 나머지 디쉬에는 α-MSH 20 ug/ml과 트라넥삼산-펩타이드 40종과 대조군으로 Arbutin과 AA2G를 1 ug/ml, 10 ug/ml, 100 ug/ml, 250 ug/ml의 농도가 되도록 처리를 하였다. 각각의 디쉬에 시험물질을 가한 뒤 3일 동안 배양하였다. 3일 뒤, 원심분리를 통해 배양액을 제거한 뒤 세포 내 멜라닌 생성량을 측정하기 위하여 세포를 용해하여 세포 내 멜라닌을 수집하여 490 nm에서 관찰하였다.

[66] 40종의 트라넥삼산-펩타이드를 농도별로 처리한 뒤 멜라닌 생성 억제효과를 측정하였다. 멜라닌의 양이 트라넥삼산을 결합시킨 펩타이드를 처리한 군에서

비교군인 트라넥삼산 및 트라넥삼산이 결합되어 있지 않은 펩타이드에 비해 급격히 줄어드는 것을 확인할 수 있었다. 또한  $\alpha$ -MSH 저해능(%)이 우수한 합성 트라넥삼산-펩타이드 4종 (Tranexamil-AP, -HK, -VS, -PS)의 경우는 기존의 미백 기능성 소재인 Arbutin과 AA2G에 비해서도 우수한 것으로 파악되었다 (도2). 이러한 결과로부터 피부에 멜라닌의 생성을 유발시키는 요인이 적용되었을 때 합성된 트라넥삼산-디펩타이드가 그 활성을 억제해 피부의 톤을 밝게 할 수 있을 것으로 사료된다.

[67] 스크리닝에 의해 좋은 역가를 보인 후보 펩타이드는 별도 그룹으로 구분하여 대량 합성 이후 실험을 수행 하였다. 표 1은 트라넥삼산-펩타이드의 스크리닝 결과를 나타내었다.

[68] [표1]

| 번호 | 품명              | $\alpha$ -MSH<br>저해능(%) | 번호 | 품명              | $\alpha$ -MSH<br>저해능(%) |
|----|-----------------|-------------------------|----|-----------------|-------------------------|
| 1  | 대조군(무처리)        | 100                     | 22 | Dipeptide-21 TA | 76                      |
| 2  | Dipeptide-1 AS  | 98                      | 23 | Dipeptide-22 PF | 89                      |
| 3  | Dipeptide-2 AT  | 88                      | 24 | Dipeptide-23 VS | 24                      |
| 4  | Dipeptide-3 AP  | 41                      | 25 | Dipeptide-24 VV | 72                      |
| 5  | Dipeptide-4 GP  | 80                      | 26 | Dipeptide-25 VP | 69                      |
| 6  | Dipeptide-5 ES  | 80                      | 27 | Dipeptide-26 AA | 92                      |
| 7  | Dipeptide-6 KK  | 83                      | 28 | Dipeptide-27 PS | 28                      |
| 8  | Dipeptide-7 HK  | 32                      | 29 | Dipeptide-28 HA | 87                      |
| 9  | Dipeptide-8 MY  | 78                      | 30 | Dipeptide-29 GK | 96                      |
| 10 | Dipeptide-9 GH  | 70                      | 31 | Dipeptide-30 KV | 83                      |
| 11 | Dipeptide-10 MA | 56                      | 32 | Dipeptide-31 AR | 93                      |
| 12 | Dipeptide-11 AH | 82                      | 33 | Dipeptide-32 RP | 87                      |
| 13 | Dipeptide-12 CC | 83                      | 34 | Dipeptide-33 PQ | 71                      |
| 14 | Dipeptide-13 SA | 81                      | 35 | Dipeptide-34 QG | 85                      |
| 15 | Dipeptide-14 WA | 65                      | 36 | Dipeptide-35 PP | 85                      |
| 16 | Dipeptide-15 WE | 78                      | 37 | Dipeptide-36 VR | 70                      |
| 17 | Dipeptide-16 KD | 81                      | 38 | Dipeptide-37 SV | 64                      |
| 18 | Dipeptide-17 NA | 79                      | 39 | Dipeptide-38 ET | 52                      |
| 19 | Dipeptide-18 TS | 75                      | 40 | Dipeptide-39 CG | 92                      |
| 20 | Dipeptide-19 SS | 80                      | 41 | Dipeptide-40 NT | 84                      |
| 21 | Dipeptide-20 EC | 61                      | 42 | TXA             | 45                      |

[69] 실시예 3 : 트라넥삼산-펩타이드의 안정성 확인 실험

[70] 제조된 펩타이드의 열과 광안정성을 확인하기 위하여, HPLC를 이용하여

순수하게 정제한 98% 이상의 고순도 Tranexamyl-AP, Tranexamyl-HK, Tranexamyl-VS 및 Tranexamyl-PS를 100 µg/mL의 농도를 가지도록 50 mM Tris-HCl(pH 8.0) 완충용액에 용해하여 유리 바이알에 분주하여 넣은 후 50 °C에서 7, 14, 21, 28, 35, 42 및 60일 보관하며 열에 의한 펩타이드의 손실을 측정하고 동일한 방법으로 일광 조건에서 안정성 여부를 측정하였다.(도 3).열에 의한 펩타이드의 손실을 측정하고 일광 조건에서 안정성 여부를 측정한 결과, 60일까지 단지 10% 미만의 펩타이드의 손실을 나타내어 열 및 보관기간에 있어 높은 안정성을 갖는다는 것을 확인하였다. 또한 비교 안정성 실험 결과 트라넥삼산-디펩타이드는 트라넥삼산이 결합되어 있지 않은 펩타이드에 비해 평균적으로 약 20% 이상 잔존량이 많았다. 결론적으로 트라넥삼산-펩타이드가 트라넥삼산이 결합되어 있지 않은 펩타이드 보다 열과 태양광에서 안정한 것을 확인하였다

[71]

[72] 실시예 4: 트라넥삼산-펩타이드의 미백효능 확인

[73] 트라넥삼산-펩타이드를 농도별로 처리한 뒤 멜라닌 생성 억제효과를 측정하였다. 마우스의 멜라닌 세포는 DMEM(Dulbecco's modified Eagle's media, Sigma)에 10% 우태아혈청(fetal bovine serum, Sigma)을 첨가한 배지로 37°C, 5% CO<sub>2</sub> 조건에서 배양하였다. 24-웰 플레이트에 1 X 10<sup>5</sup> 세포/웰(cells/well)의 농도로 세포를 배양하고 세포의 부착을 확인한 뒤, 대조군에는 아무것도 처리하지 않고 용매만 넣었으며, 양성대조군은 -MSH을 20 µg/ml 그리고 나머지 디쉬에는 α-MSH 20 µg/ml과 트라넥삼산-펩타이드 4종과 순수 펩타이드, 대조군으로 Arbutin과 AA2G를 1 µg/ml, 10 µg/ml, 100 µg/ml, 250 µg/ml의 농도가 되도록 처리를 하였다. 각각의 디쉬에 시험물질을 가한 뒤 3일 동안 배양하였다. 3일 뒤, 원심분리를 통해 배양액을 제거한 뒤 세포의 멜라닌 생성량을 육안으로 확인하였다.

[74] 도 4는 생성된 멜라닌 세포를 관찰한 사진으로 트라넥삼산-펩타이드와 VS의 펩타이드에 대한 각 처리 농도에 따른 멜라닌의 생성 감소 비율을 확인한 것으로 세포수는 α-MSH를 처리한 것에 비해 비교적 줄어들지 않으나, 알부틴 등으로 유사한 농도로 처리한 곳에서는 세포수가 급격히 줄어드는 것을 관찰 할 수 있었다. 세포수에 비해 멜라닌의 생성량이 감소되는 것으로 보아 멜라닌 생성 저해 효과가 있음을 알 수 있었다.

[75]

[76] 실시예 5 : 트라넥삼산-펩타이드의 타이로시나아제의 활성감소

[77] 멜라닌 생합성 과정에 관여하는 효소로 알려져있는 타이로시네아제는 L-타이로신으로부터 시작되는 멜라닌 생합성 과정 중에서도, L-타이로신에서 3,4-dihydroxy-L-phenylalanine (DOPA)로, 그리고 DOPA에서 dopaquinone으로 산화되는 과정에 촉매로 작용한다. 이 두 번의 산화 반응 후의 후속 반응은 자발적으로 일어나기 때문에, 타이로시네아제가 관여하는 반응이 전체 반응 속도를 결정하게 된다. 이러한 이유로 타이로시네아제 저해 활성은 미백 활성을

평가하는데 매우 중요한 요소이다. 본 실험에서는 합성 tranexamic acid dipeptide의 in vitro 티로시네이즈 저해 활성을 비교하였다 (도5).

- [78] 기질인 L-티로신을 1.5 mM의 농도가 되도록 인산완충액(0.05 M, pH 6.8)에 용해시킨 다음, 이 용액 0.01 ml를 0.3 ml 용량의 분광광도계 큐벳(cuvette)에 가하고 보조인자(cofactor)인 L-DOPA를 0.06 mM 농도로 만들어 0.01 ml 첨가하였다. 여기에 본 발명의 펩타이드를 첨가하고 0.1 ml가 되도록 상기 인산완충액을 첨가하였다. 여기에 티로시나아제를 인산완충액에 60 U/mL로 용해시킨 효소 용액을 0.1 ml 첨가함으로써 반응을 진행시켰다. 그리고 알부틴, 트라넥삼산-펩타이드 및 트라넥삼산이 결합되지 않은 펩타이드를 각각 100 ppm 씩 사용하여 비교실험을 하였다. 이때 대조군(blank)으로는 티로시나아제 대신 완충액만을 0.1 ml 첨가한 것으로 하였다. 반응은 37°C에서 10분간 진행시켰으며, 분광광도계(spectrophotometer, Beckman DU-7500)를 이용하여 475 nm에서의 흡광도를 측정하여 티로시나아제에 대한 저해율을 구하였다 (도 5). 실험 결과, 4종의 트라넥삼산-펩타이드는 AA2G나 알부틴에 비해 상대적으로 양호한 티로시나아제 억제효과를 나타내었고 트라넥삼산이 결합되지 않는 펩타이드는 저해 효과가 좋지 않은 것을 확인하였다.

[79]

[80] 실시예 6 : 세포독성실험

- [81] 본 발명의 펩타이드에 대한 각질세포내독성이 있는지의 여부를 확인하기 위하여, 세포 독성 평가는 MTT assay를 이용하여 측정하였다. HACAT세포와 3T3세포를 24 well plate에 각 well당 4X10<sup>4</sup> cells/24well의 세포수가 되도록 seeding 한 후 24 h 동안 37 °C, 5% CO<sub>2</sub>조건으로 항온 배양하였다. PBS로 2회 세척 후 배양 후 합성 tranexamic acid dipeptide를 농도별(1mg ~ 1ug/mL)로 처리하여 24 h 동안 항온 배양하였다. 배양 후 MTT 0.5% in DPBS를 배양배지와 1:9(v/v)로 혼합하여 첨가한 후 2 h 동안 CO<sub>2</sub> incubator에서 배양한 후 생성된 formazan을 DMSO에 녹여 ELISA를 이용하여 570 nm에서 측정하였다. 도 6에서 보는 바와 같이, 각질세포주의 일종인 HaCat 세포, 섬유아세포의 일종인 NIH3T3 세포에 대하여, 저농도에서 고농도까지 투여한 펩타이드에 의한 세포수의 감소는 관찰되지 않았으며, 세포들의 현미경적인 관찰에서도 별다른 변화가 관찰되지 않았다.

- [82] 이를 통해 본 발명의 트라넥삼산-펩타이드는 피부 관련 세포에 독성이 전혀 없음을 알 수 있으며, 이로써 본 펩타이드를 피부에 처리하여도 큰 영향을 끼치지 않으리라는 것을 예측할 수 있다.

[83]

[84] 실시예 7: 멜라닌 생성 표지인자들의 억제

- [85] -MSH를 처리하여 멜라닌 생성이 유발된 마우스 흑색종 세포에서 트라넥삼산-펩타이드의 미백 활성을 보다 확실하게 검증하기 위하여, MITF(microphthalmia-associated transcription factor)의 RNA 생성을 실시간 역전사

중합효소 연쇄반응(qRT-PCR)으로 확인하였다.

- [86] 먼저 실시예 2에서 배양된 B16F10세포에 트라넥삼산-펩타이드 2종 (TXA-VS, TXA-PS)를 각각 0.1, 0.05% 농도가 되게 처리하였다. 그리고 realtime PCR 측정을 위해 RNA 샘플의 추출을 아래와 같이 진행하였다.
- [87] 추출은 intron사 RNA extraction kit 사용하여 진행하였다. 구체적인 실험방법은 아래와 같다.
- [88] ①  $1 \times 10^6$  cell in 1.5mL tube
- [89] ② 13000rpm으로 10초간 돌려 Media 제거
- [90] ③ 1mL lysis buffer를 넣어준다.
- [91] ④ 세게 Vortex.
- [92] ⑤ Chloroform 200 $\mu$ l을 넣어주고 vortex.
- [93] ⑥ 4도, 13000rpm에서 10분 동안 centrifuge. 빈 tube에 400 $\mu$ l 옮겨줌
- [94] ⑦ binding buffer 400 $\mu$ l을 Mix와 함께 넣어준 후 부드럽게 2~3번 pipetting
- [95] ⑧ column위에 용액을 올려준다.
- [96] ⑨ 13000rpm에서 30초 동안 centrifuge.
- [97] ⑩ 700 $\mu$ l buffer A로 세척
- [98] ⑪ tube을 닫은 후 13000rpm으로 30초 centrifuge.
- [99] ⑫ buffer B로 10~11번 반복.
- [100] ⑬ 1~2분 동안 13000rpm으로 건조.
- [101] ⑭ Elution buffer 50 $\mu$ l을 column에 넣어 준 후 실온에서 1분간 incubator
- [102] ⑮ 13000rpm으로 1분간 centrifuge
- [103] 추출된 RNA를 이용하여 MITF의 발현량을 확인하기 위해 realtime PCR을 진행하였고 실험에 사용된 시약과 조건은 아래와 같다.
- [104] realtime PCR reagent: INTRON사 RealMOD™green qRT-PCR Mix
- [105] Primer: MITF, GAPDH ( 주)Bioneer제작)
- [106] PCR primer sequence는 표2, PCR mix 조성표는 표3, PCR 반응 조건은 표4에 각각 나타나 있다.
- [107] [표2]

| primer name | SEQUENCE (5'--->3')  |
|-------------|----------------------|
| fMITF       | GGCCAAGGCAGAGCAACTT  |
| rMITF       | GCCCATGGTGGCAAGCT    |
| fGAPDH      | ATCCCATCACCATCTTCCAG |
| rHAPDH      | CCATCACGCCACAGTTTCC  |

[108] [표3]

|                     |            |     |
|---------------------|------------|-----|
|                     |            | 1x  |
| qRT-PCR             | <u>10</u>  | 10  |
| E <sub>n2</sub> Mix | <u>0.4</u> | 0.4 |
| primer 1            |            | 1   |
| primer 2            |            | 1   |
| RNA                 | <u>1</u>   | 1   |
| Water               | <u>8.6</u> | 6.6 |

총 20 $\mu$ l

[109] [표4]

|                     | temp.(°C) | times  | cycles    |
|---------------------|-----------|--------|-----------|
| cDNA synthesis      | 42        | 15mins | 1         |
| Enzyme activation   | 95        | 10mins | 1         |
| Denaturation        | 95        | 15sec  | <u>45</u> |
| annealing/extension | 45        | 60sec  | 45        |

[110] 실험 결과, 도 7, 8에서와 같이 본 발명의 트라넥삼산-펩타이드가 멜라닌 생성과 관계가 있는 유전자인 MITF의 발현을 농도 의존적으로 억제한다는 것을 확인하였다.

[111]

[112] 실시예 8 : 트라넥삼산-펩타이드가 함유된 젤 타입 조성물

[113] 상기 실시예 2에서 제조한 트라넥삼산-펩타이드를 하나 또는 복수로 포함하며, 하기 표 2의 조성으로 이루어진 젤 타입 조성물을 일반적인 젤 타입 조성물의 합성방법에 따라 제조하였다.

[114] [표5]

| 성분         | 중량(%) |
|------------|-------|
| 트라넥삼산-펩타이드 | 1     |
| 카르복시비닐폴리머  | 1.0   |
| 트리에탄올아민    | 1.0   |
| 부틸렌글라이콜    | 5.0   |
| 글리세린       | 10.0  |
| 하이드로게니티드   | 1.0   |
| 방부제, 향     | 적량    |
| 정제수        | 잔량    |
| 합계         | 100   |

[115] 실시예 9: 트라넥삼산-펩타이드가 함유된 스킨 타입 조성물

[116] 상기 실시예 2에서 제조한 트라넥삼산-펩타이드를 하나 또는 복수로 포함하며, 하기 표3의 조성으로 이루어진 스킨 타입 조성물을 일반적인 스킨 타입 조성물의 합성방법에 따라 제조하였다.

[117] [표6]

| 성분                  | 중량(%) |
|---------------------|-------|
| 트라넥삼산-펩타이드          | 1     |
| 농글리세린               | 10    |
| 프로필렌글리콜             | 10    |
| 폴리옥티에틸렌경화피마자유(E040) | 1.0   |
| 히알루론산나트륨수용액(1%)     | 5.0   |
| 에탄올                 | 5.0   |
| 방부제, 향              | 적량    |
| 정제수                 | 잔량    |
| 합계                  | 100   |

[118] 실시예 10 : 트라넥삼산-펩타이드가 함유된 크림 타입 조성물

[119] 상기 실시예 2에서 제조한 트라넥삼산-펩타이드를 하나 또는 복수로 포함하며, 하기 표4의 조성으로 이루어진 젤 타입 조성물을 일반적인 젤 타입 조성물의 합성방법에 따라 제조하였다.

[120] [표7]

| 성분            | 중량(%) |
|---------------|-------|
| 트라넥삼산-펩타이드    | 1     |
| 스테아릴알콜        | 6.0   |
| 스테아린산         | 2.0   |
| 농글리세린         | 1.0   |
| 스쿠알란          | 9.0   |
| 1,3-부틸렌글리콜    | 6.0   |
| 폴리솔베이트 60     | 1.5   |
| 폴리에틸렌글리콜 1000 | 4.0   |
| 경화 라놀린        | 4.0   |
| 옥틸 도데카놀       | 10.0  |
| 솔비탄 스테아레이트    | 0.8   |
| 트리에탄올아민       | 0.5   |
| 방부제, 향        | 적량    |
| 정제수           | 잔량    |
| 합계            | 100   |

[121] 실험예 : 임상 시험

[122] 상기 실시예 2에서 멜라닌합성 억제효능이 높았던 4 가지의 트라넥삼산-디펩타이드 중 두 가지(VS, PS)를 선정하여 하기 실시예 10의 크림과 동일한 조성으로 트라넥삼산-디펩타이드를 1% 첨가한 크림을 2가지 제조하였으며 피부미백효과를 확인하기 위하여 피부색소침착을 가지고 있으며 기질적인 질환이 없는 여성 54명을 모집하였다. 이때 양성대조군은 트라넥삼산이 들어있는 크림이었으며 음성대조군은 기본 베이스 크림이었다.

[123] 피험자들은 얼굴은 세로로 두 부분으로 나누고 상기 제조된 크림 두 종류를 각각 얼굴에 도포하였으며 아침, 저녁, 1일 2회씩 8주간 세안 후 꾸준히 사용하도록 하였다.

[124] 크림 사용 이전과 8주간 크림을 사용한 이후 피부의 색소침착정도 변화를

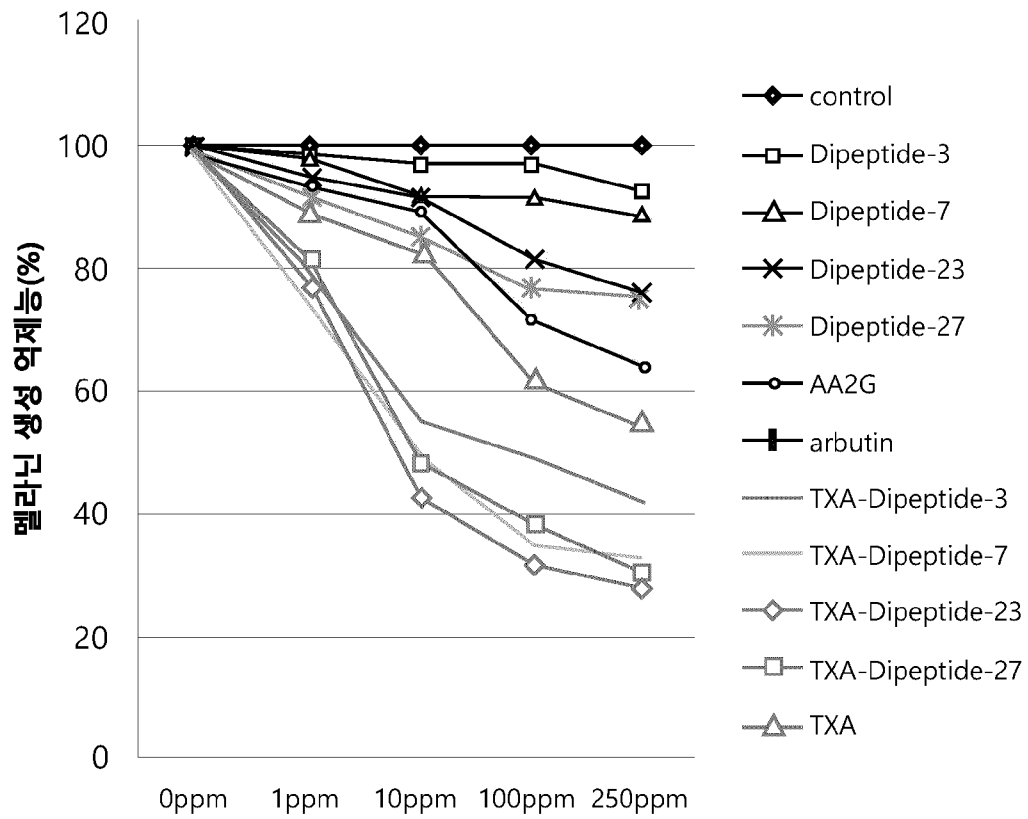
객관적으로 평가하기 위하여 Mexameter(CK, Germany)를 이용하여 크림 사용전과 2주후, 4주후, 6주후 및 8주후에 각각 측정하였으며 측정 결과는 도9에 나타내었다.

- [125] 도 9에 나타난 바와 같이, 두 종류의 트라넥삼산-디펩타이드를 함유한 크림은 모두 음성대조군 및 양성대조군인 트라넥삼산만을 함유한 크림보다 미백효과가 뛰어난 것이 확인되었다. 또한 Melanin index의 주간별 변화율을 살펴본 결과 8주 후 트라넥삼산-디펩타이드 1군(VS)은 22.9%, 트라넥삼산-디펩타이드 2군(PS)은 183.2%, 트라넥삼산군은 11.4% 그리고 베이스크림은 6.6% 감소한 것을 확인할 수 있었다 (도 9).
- [126] 상기 시험의 결과 두 가지의 트라넥삼산-디펩타이드 중 효능이 높았던 트라넥삼산-디펩타이드를 선택하여 크림 중 함량을 낮추기 위한 시도로서 0.5%의 트라넥삼산-디펩타이드 크림을 제조하여 10명의 여성을 모집하고 상기와 같은 방법으로 8주간 임상시험을 시행하였다.
- [127] 도 10에 나타난 바와 같이 0.5% 트라넥삼산-디펩타이드를 함유한 크림은 트라넥삼산만을 함유하는 크림 및 베이스크림보다 미백효과가 높은 것을 확인할 수 있었다. 또한 Melanin index의 주간별 변화율을 살펴본 결과 8주 후 0.5% 트라넥삼산-디펩타이드 1군(VS)은 23.9%, 트라넥삼산군은 10.2% 그리고 베이스크림군은 4.7% 감소한 것을 확인할 수 있었다.
- [128]
- [129] 이상으로 본 발명의 특정한 부분을 상세히 기술하였는바, 당업계의 통상의 지식을 가진 자에게 있어서 이러한 구체적인 기술은 단지 바람직한 구현예일 뿐이며, 이에 본 발명의 범위가 제한되는 것이 아닌 점은 명백하다. 따라서, 본 발명의 실질적인 범위는 첨부된 청구항과 그의 등가물에 의하여 정의된다고 할 것이다.

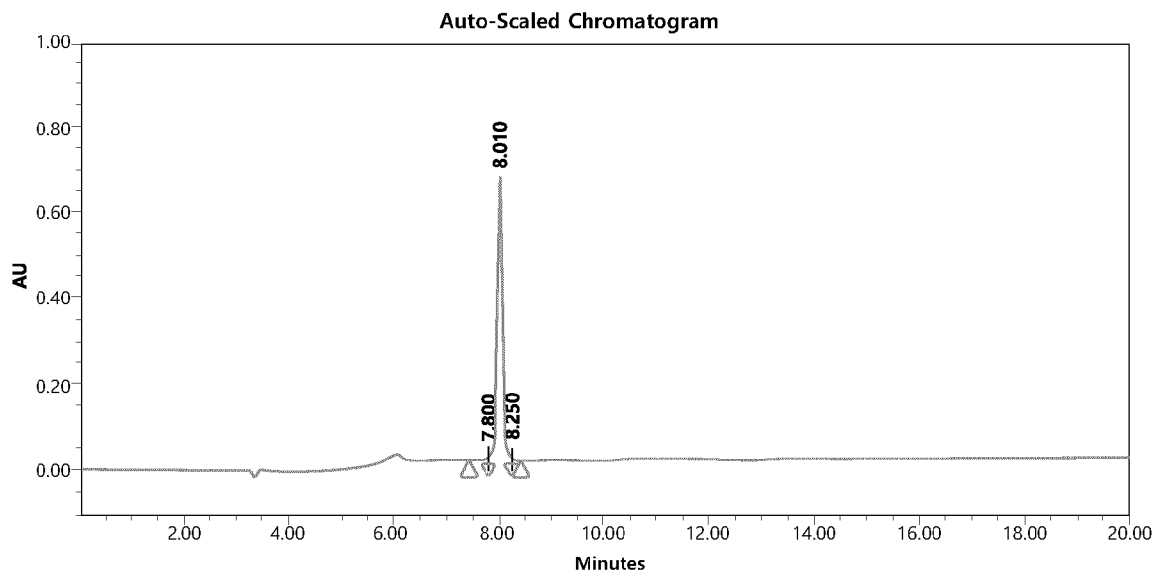
## 청구범위

- [청구항 1] 제1항에 있어서,  
상기 트라넥삼산-펩타이드는 펠라닌 생성을 억제시키는 것을 특징으로 하는 트라넥삼산-펩타이드.
- [청구항 2] 제1항에 있어서,  
상기 트라넥삼산-펩타이드는 펠라닌 생성을 억제시키는 것을 특징으로 하는 트라넥삼산-펩타이드.
- [청구항 3] 제1항에 있어서,  
상기 트라넥삼산-펩타이드는 티로시나아제의 활성을 억제시키는 것을 특징으로 하는 트라넥삼산-펩타이드.
- [청구항 4] 제1항에 있어서,  
상기 트라넥삼산-펩타이드는 MITF(microphthalmia-associated transcription factor)의 발현을 억제시키는 것을 특징으로 하는 트라넥삼산-펩타이드.
- [청구항 5] 제1항에 있어서,  
상기 트라넥삼산-펩타이드는 0.01% ~ 5.0% 농도에서 미백 효과를 가지는 것을 특징으로 하는 트라넥삼산-펩타이드.
- [청구항 6] 제1항에 있어서,  
상기 트라넥삼산-펩타이드는 N-말단의 트라넥삼산에 의해 증가된 안정성을 갖는 것을 특징으로 하는 트라넥삼산-펩타이드.
- [청구항 7] 트라넥사미-AS, 트라넥사미-AT, 트라넥사미-AP, 트라넥사미-GP, 트라넥사미-ES, 트라넥사미-KK, 트라넥사미-HK, 트라넥사미-MY, 트라넥사미-GH, 트라넥사미-MA, 트라넥사미-AH, 트라넥사미-CC, 트라넥사미-SA, 트라넥사미-WA, 트라넥사미-WE, 트라넥사미-KD, 트라넥사미-NA, 트라넥사미-TS, 트라넥사미-SS, 트라넥사미-EC, 트라넥사미-TA, 트라넥사미-PF, 트라넥사미-VS, 트라넥사미-VV, 트라넥사미-VP, 트라넥사미-AA, 트라넥사미-PS, 트라넥사미-HA, 트라넥사미-GK, 트라넥사미-KV, 트라넥사미-AR, 트라넥사미-RP, 트라넥사미-PQ, 트라넥사미-QG, 트라넥사미-PP, 트라넥사미-VR, 트라넥사미-SV, 트라넥사미-ET, 트라넥사미-CG 및 트라넥사미-NT로 구성된 군에서 선택되는 트라넥삼산-펩타이드를 포함하는 피부 미백용 조성물.
- [청구항 8] 제7항에 있어서,  
상기 조성물은 화장품 조성물인 것을 특징으로 하는 피부 미백용 조성물.

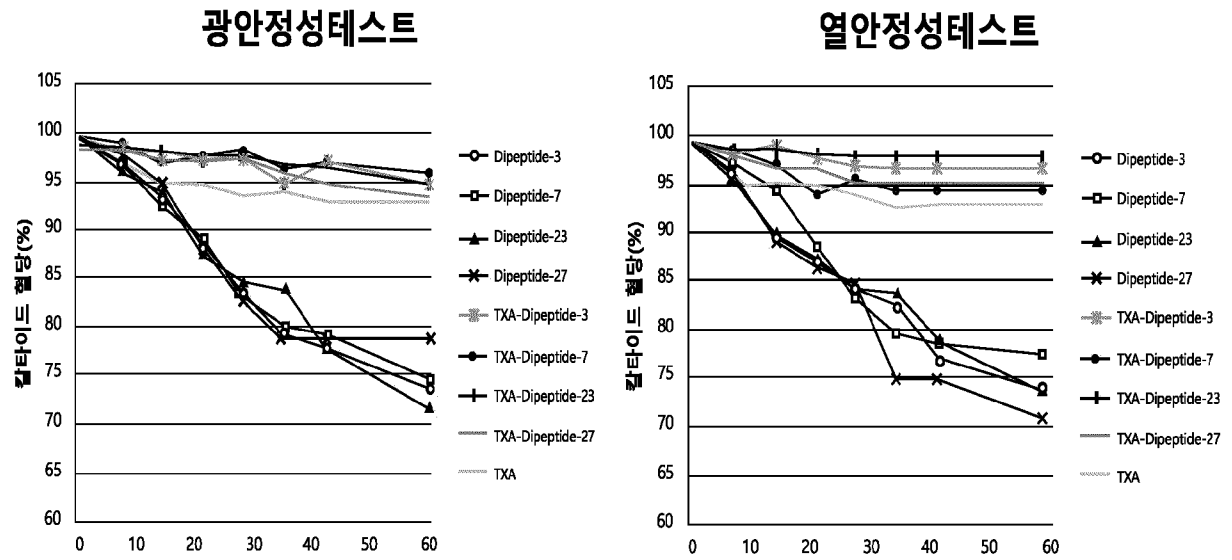
[도1]



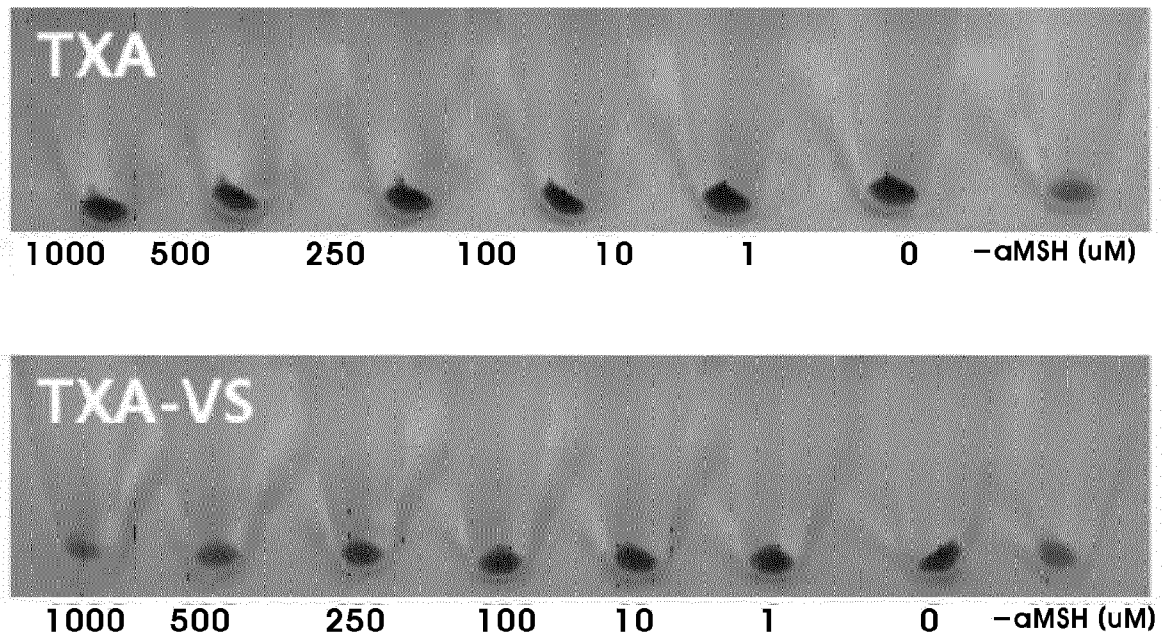
[도2]



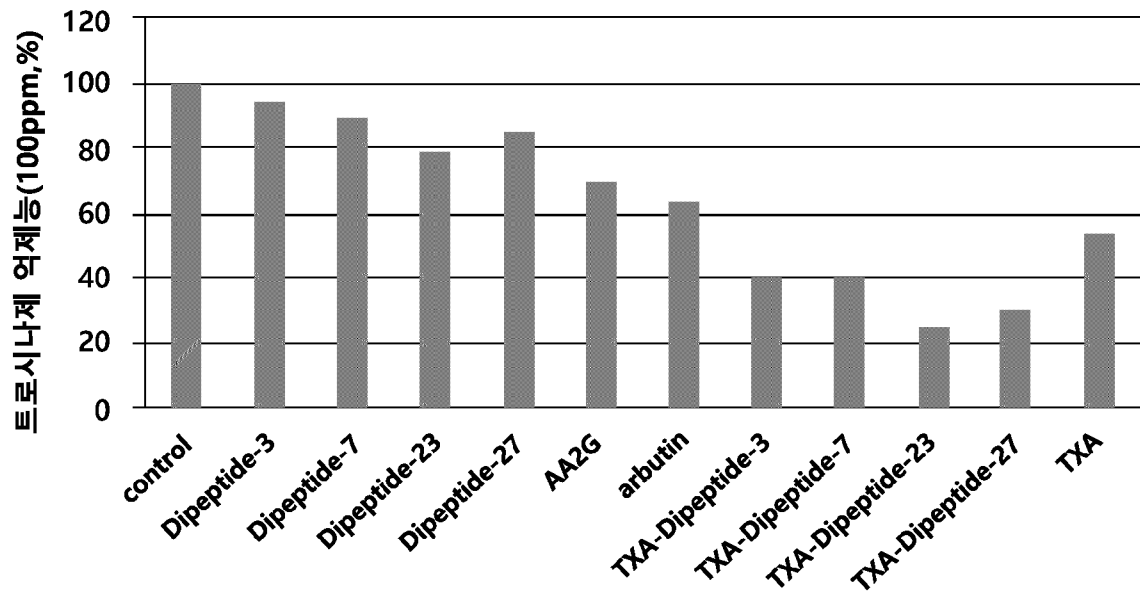
[도3]



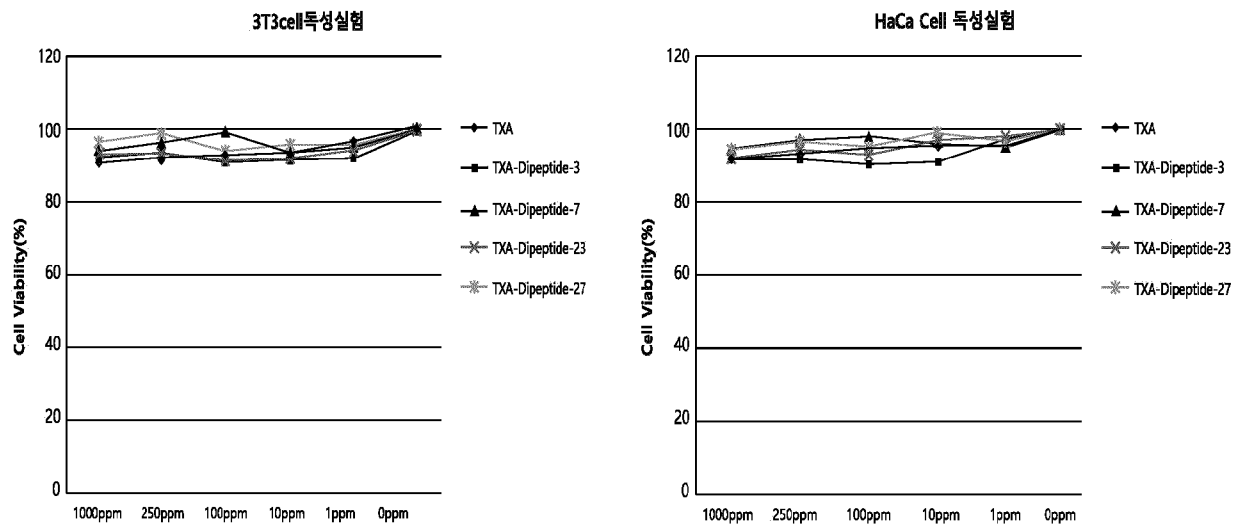
[도4]



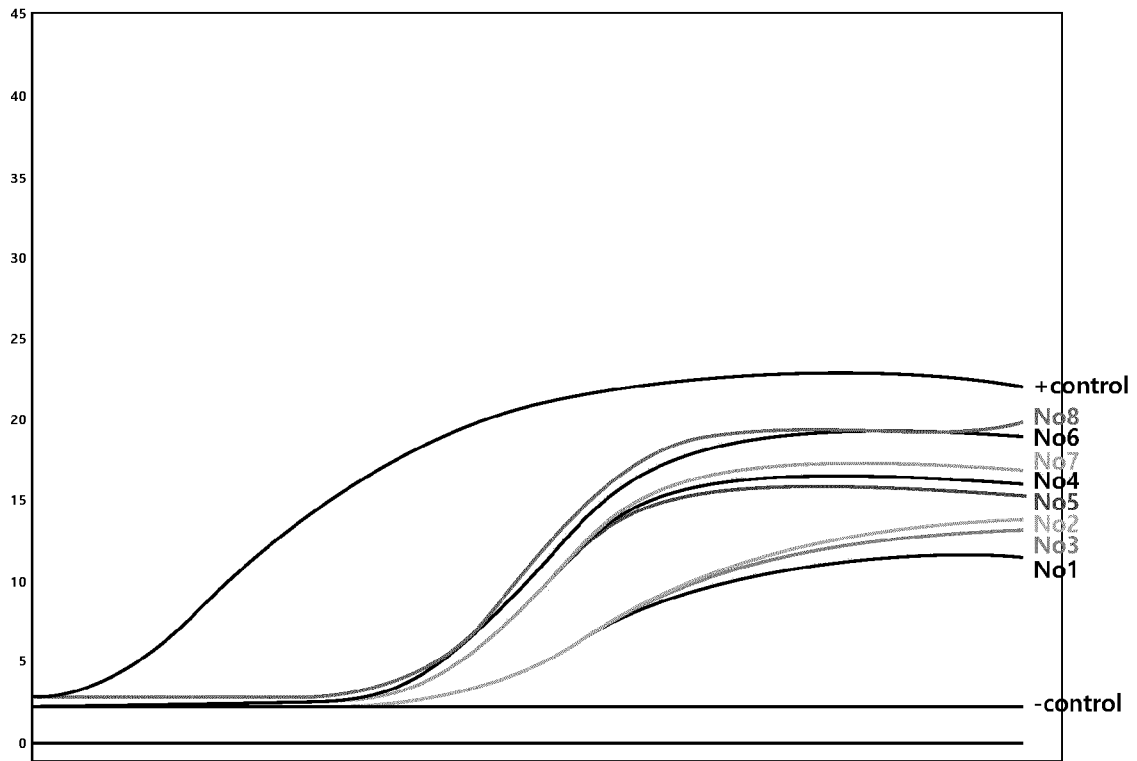
[도5]



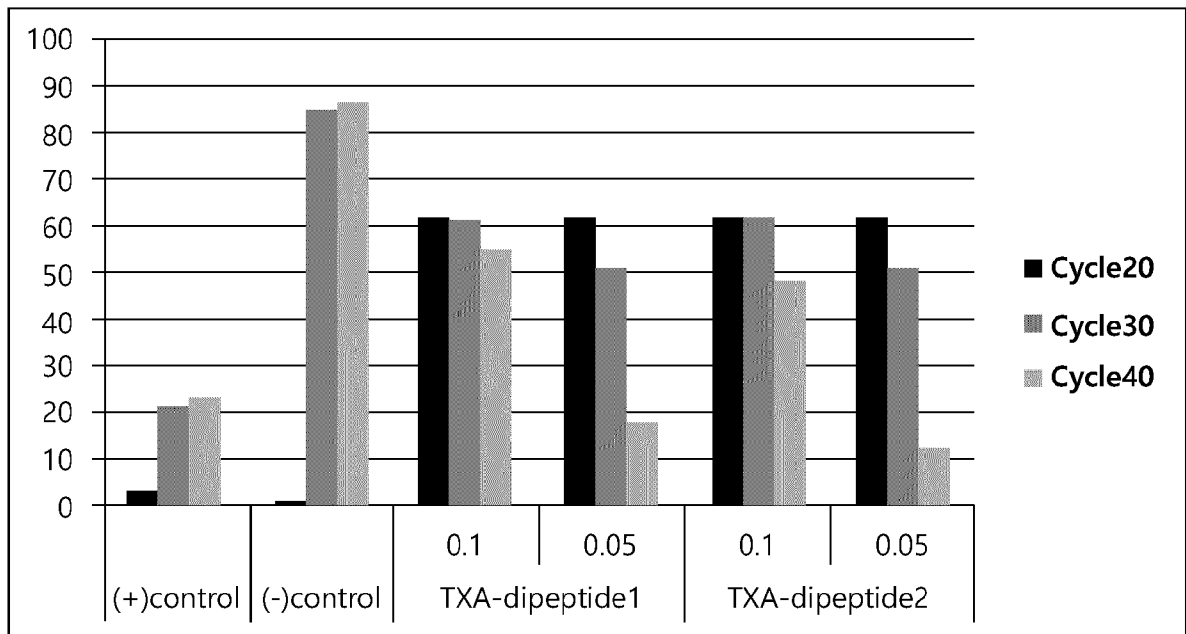
[도6]



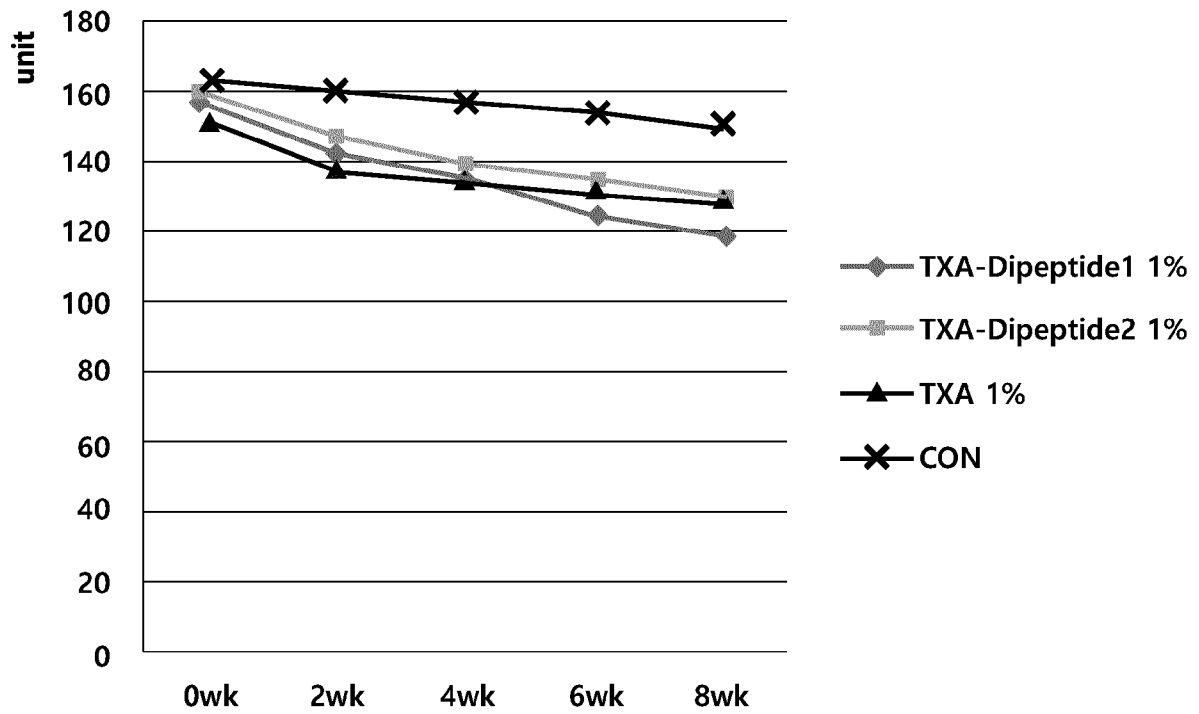
[도7]



[도8]



[도9]



[도10]

