(19) 대한민국특허청(KR)
(12) 등록특허공보(B1)

(45) 공고일자 2020년03월24일
(11) 등록번호 10-2092435
(24) 등록일자 2020년03월17일

(51) 국제특허분류(Int. Cl.)
A61K 48/00 (2006.01) *A61K 31/7068* (2006.01)
A61K 31/713 (2006.01) *A61K 8/60* (2006.01)
A61K 8/64 (2006.01) *C12N 15/113* (2010.01)
(52) CPC특허분류
A61K 48/00 (2013.01)
A61K 31/7068 (2013.01)
(21) 출원번호 10-2015-7028181
(22) 출원일자(국제) 2014년03월07일
심사청구일자 2018년02월26일
(85) 번역문제출일자 2015년10월08일
(65) 공개번호 10-2015-0132267
(43) 공개일자 2015년11월25일
(86) 국제출원번호 PCT/US2014/021738
(87) 국제공개번호 WO 2014/138578
국제공개일자 2014년09월12일
(30) 우선권주장
61/775,188 2013년03월08일 미국(US)
(56) 선행기술조사문헌
KR1020040107495 A*
KR1020120041042 A*
*는 심사관에 의하여 인용된 문헌

(73) 특허권자
예일 유니버시티
미국, 코네티컷 06511, 뉴 헤븐, 투 휘트니 애비뉴
(72) 발명자
파웰렉, 존, 메이슨
미국, 코네티컷주 06517, 햄든, 우드론 스트리트 154
(74) 대리인
이명진

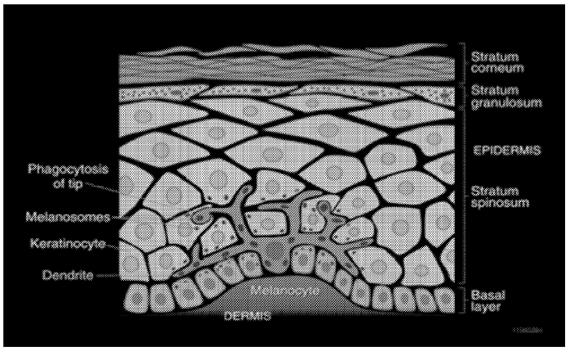
전체 청구항 수 : 총 4 항 심사관 : 정의준

(54) 발명의 명칭 **피부색소침착 감소용 조성물 및 방법**

(57) 요 약

본 발명은 피부색소침착 감소용 조성물 및 방법을 제공한다. 본 발명은 시알산 전이효소 활성 저해제, 올리고당 형성 저해제, 또는 올리고당 활성 저해제, 및 이러한 저해제를 이용하는 방법을 포함한다. 특정 실시예에서, 본 발명은 Neu5Ac(α2,6)Gal/GalNAc-함유 올리고당의 형성 및/또는 활성을 저해하는 방법을 포함한다.

대 표 도



(52) CPC특허분류
A61K 31/713 (2013.01)
A61K 8/606 (2013.01)
A61K 8/64 (2013.01)
C12N 15/1137 (2013.01)
C12Y 204/99001 (2013.01)
C12Y 204/99006 (2013.01)
C12N 2310/14 (2013.01)

명 세 서

청구범위

청구항 1

삭제

청구항 2

삭제

청구항 3

삭제

청구항 4

삭제

청구항 5

삭제

청구항 6

삭제

청구항 7

삭제

청구항 8

삭제

청구항 9

삭제

청구항 10

삭제

청구항 11

삭제

청구항 12

삭제

청구항 13

삭제

청구항 14

삭제

청구항 15

삭제

청구항 16

삭제

청구항 17

삭제

청구항 18

삭제

청구항 19

삭제

청구항 20

2%의 시티딘을 포함하는 과다색소침착 치료용 약학적 조성물.

청구항 21

삭제

청구항 22

삭제

청구항 23

삭제

청구항 24

삭제

청구항 25

삭제

청구항 26

삭제

청구항 27

삭제

청구항 28

삭제

청구항 29

삭제

청구항 30

삭제

청구항 31

삭제

청구항 32

삭제

청구항 33

삭제

청구항 34

삭제

청구항 35

삭제

청구항 36

삭제

청구항 37

삭제

청구항 38

삭제

청구항 39

삭제

청구항 40

삭제

청구항 41

삭제

청구항 42

삭제

청구항 43

삭제

청구항 44

삭제

청구항 45

삭제

청구항 46

삭제

청구항 47

삭제

청구항 48

삭제

청구항 49

삭제

청구항 50

삭제

청구항 51

삭제

청구항 52

삭제

청구항 53

설명 자료(instructional material), 및 2%의 시티딘을 포함하는 피부색소침착 감소용 약학적 조성물을 포함하는, 피부색소침착 감소용 키트.

청구항 54

삭제

청구항 55

삭제

청구항 56

삭제

청구항 57

삭제

청구항 58

삭제

청구항 59

삭제

청구항 60

삭제

청구항 61

삭제

청구항 62

삭제

청구항 63

삭제

청구항 64

삭제

청구항 65

삭제

청구항 66

삭제

청구항 67

삭제

청구항 68

삭제

청구항 69

삭제

청구항 70

삭제

청구항 71

삭제

청구항 72

삭제

청구항 73

삭제

청구항 74

삭제

청구항 75

삭제

청구항 76

삭제

청구항 77

삭제

청구항 78

삭제

청구항 79

삭제

청구항 80

삭제

청구항 81

삭제

청구항 82

삭제

청구항 83

2%의 시티딘을 포함하는 피부색소침착 감소용 비의료용 조성물.

청구항 84

2%의 시티딘을 포함하는 피부색소침착 감소용 비의료용 조성물을 포함하는, 피부색소침착 감소용 키트.

발명의 설명

기 술 분 야

[0001] **관련 출원의 상호 참조**

[0002] 이 출원은 2013년 3월 8일에 출원된 미국 가출원번호 제 61/775,188호의 우선권을 주장하며, 그 내용은 전체 참조로 본 명세서에 포함된다.

배 경 기 술

[0003] 인간으로서 우리는, 얼굴 및 신체의 다른 부분에서 고르지 않거나 또는 비대칭 색소침착이 자존감을 낮추고, 우울증, 사회적 지위에 관한 문제 및 직장에서 생산성의 감소를 야기할 수 있는 사회적 존재이다 (Balkrishnan et al., 2006, Int J Dermatol 45:111-5). 피부의 과다색소침착은 많은 개인들이 교정 치료를 요하는 공통 질병이다. 이것은 반점(spot) 또는 피부의 특정 부분에서 때때로 비대칭적으로; 다른 경우에는 좌우대칭(bilateral symmetry)으로, 피부 멜라닌이 증가된 결과이다. 이것은 멜라닌 합성의 증가 및 각질형성세포(keratinocytes)로의 이동; 많은 수의 멜라닌형성세포(melanocytes); 및 어떤 경우에는 식균 작용(phagocytosis)을 통해 멜라닌을 축적하는 멜라닌-함유 대식세포(melanophages)에 의해 야기될 수 있다. 과다색소침착된 부분은 갈색 내지 푸른빛의 회색으로 된다. 과다색소침착에는 많은 원인들이 있으며, 가장 일반적인 원인은 기미(melasma), 염증 후 과다색소침착(post-inflammatory hyperpigmentation, PIH) 및 일광흑색점(solar lentigenes) (간반(liver spots))이다.

[0004] 멜라닌형성세포는 피부 색소를 생성하는 세포이다. 주된 색소인 멜라닌은, 멜라닌형성세포의 세포질에서 멜라닌소체(melanosomes)로 알려진 소세포체에 위치한 효소군에 의해 합성된다. 멜라닌형성세포는 이들이 멜라닌을 제공하는 각질형성세포와 가까이 표피의 기저층에 있다. 일반적으로, 인간은 인종적 배경에 상관없이 피부의 mm^2 당 약 동일한 수의 멜라닌형성세포를 가진다. 각 멜라닌형성세포는 "표피-멜라닌 단위(epidermal-melanin unit)"로 약 36개의 각질형성세포와 접하고 있다. 일반적으로, 이것은 멜라닌 합성 및 우리의 실제 피부색 및 강도를 결정하는 각질형성세포로의 이의 전달을 포함하여, 멜라닌형성세포의 *수*가 아니라 멜라닌형성세포의 *활성*을 의미한다. 멜라닌을 탑재한 멜라닌소체는 멜라닌형성세포로부터 가장 풍부한 피부 세포인 주위의 각질형성

세포로 이동되어, 피부에 착색과 자외선 차단을 부여한다 (도 1).

[0005] 멜라닌소체의 각질형성세포로 이동은 하나의 세포에서 다른 세포로의 세포기관(organelle) 공여와 관련된 독특한 생물학적 과정이고, 피부색소침착에서 중요한 단계이다. 이러한 과정에서 문제가 있는 개인은 피부 멜라닌 함량을 현저하게 감소시킬 수 있다. 상기 과정은 각질형성세포에 멜라닌형성세포의 부착; 각질형성세포로 멜라닌소체의 이동; 및 피부에서 각질형성세포의 핵상 영역(supranuclear area)으로 이동(trafficking)을 포함한다. 멜라닌형성세포-각질형성세포 이동과 관련하여, 세포 생물학, 사이토카인 및 호르몬 신호 경로 및 펩티드 및 단백질의 역할에 대한 정보가 증가하고 있다 (Scott et al., 2007, Exp Cell Res 313:3840-50; Scott et al., 2008, J Invest Dermatol 128:151-61; Scott, 2012, J Invest Dermatol 132(4):1073-4; Singh et al., 2012, J Cell Sci 125(Pt 18):4306-19). 그러나, 당해 기술분야에서 과다색소침착의 예방 및 치료용 조성물 및 방법에 대한 니즈가 남아있다. 본 발명은 이러한 미해결 과제를 충족시킨다.

발명의 내용

해결하려는 과제

[0006] 본 발명은 피부색소침착 감소용 조성물을 제공한다. 상기 조성물은 시알산 전이효소(sialyltransferase) 활성 저해제, 올리고당 형성 저해제, 또는 올리고당 활성 저해제를 포함한다. 일 실시예에서, 시알산 전이효소 활성 저해제는 β-갈락토시드 α2,6'-시알산 전이효소 I (ST6Gal.I) 활성 저해제를 포함한다. 일 실시예에서, 상기 저해제는 세포에서 ST6Gal.I의 발현을 감소시킨다. 일 실시예에서, 상기 저해제는 Neu5Ac(α2,6)Gal/GalNAc-함유 올리고당의 형성을 감소시킨다. 일 실시예에서, 상기 저해제는 Neu5Ac(α2,6)Gal/GalNAc-함유 올리고당 활성 저해제이다.

[0007] 일 실시예에서, 상기 저해제는 핵산, siRNA, 안티센스 핵산, 리보자임, 펩티드, 소분자, 길항제, 앱타머, 및 펩티드 모방체(peptidomimetic) 중 적어도 하나이다. 일 실시예에서, 상기 저해제는 표 1에 열거된 저해제들로부터 선택된다. 일 실시예에서, 상기 저해제는 표 2에 열거된 저해제들로부터 선택된다.

[0008] 일 실시예에서, 상기 저해제는 시티딘, 시티딘 일인산 N-아세틸뉴라민산 (cytidine monophosphate N-acetylneuraminic acid), 6'-시알릴갈락토오스, 6'-시알릴 N-아세틸갈락토사민, 6'-시알릴락토오스, 3'-시알릴락토오스, 또는 N-아실-뉴라미닐 중 적어도 하나이다. 일 실시예에서, 상기 저해제는 시티딘 또는 이의 유사체이다.

[0009] 일 실시예에서, 상기 저해제는 6'-시알릴락토오스이다. 일 실시예에서, 상기 저해제는 3'-시알릴락토오스이다.

[0010] 일 실시예에서, 상기 조성물은 적어도 두 개의 저해제를 포함한다. 일 실시예에서, 상기 조성물은 6'-시알릴락토오스 및 시티딘, 또는 이의 유사체를 포함한다. 일 실시예에서, 상기 조성물은 3'-시알릴락토오스 및 시티딘, 또는 이의 유사체를 포함한다. 일 실시예에서, 상기 조성물은 6'-시알릴락토오스 및 3'-시알릴락토오스를 포함한다. 일 실시예에서, 상기 조성물은 6'-시알릴락토오스, 3'-시알릴락토오스 및 시티딘, 또는 이의 유사체를 포함한다. 일 실시예에서, 2 이상의 저해제의 효과는 상승적이다.

[0011] 본 발명은 시티딘, 또는 이의 유사체를 포함하는 피부색소침착 감소용 조성물을 제공한다. 일 실시예에서, 상기 조성물은 6'-시알릴락토오스를 더 포함한다. 일 실시예에서, 상기 조성물은 3'-시알릴락토오스를 더 포함한다.

[0012] 본 발명은 시알산 전이효소 활성 저해제, 올리고당 형성 저해제 및 올리고당 활성 저해제로 이루어진 군으로부터 선택된 저해제의 유효량을 피험자에게 투여하는 단계를 포함하는 피부색소침착의 감소 방법을 제공한다.

[0013] 일 실시예에서, 시알산 전이효소 활성 저해제는 β-갈락토시드 α2,6'-시알산 전이효소 I (ST6Gal.I) 활성 저해제를 포함한다. 일 실시예에서, 상기 저해제는 세포에서 ST6Gal.I의 발현을 감소시킨다. 일 실시예에서, 상기 저해제는 Neu5Ac(α2,6)Gal/GalNAc-함유 올리고당의 형성을 감소시킨다. 일 실시예에서, 상기 저해제는 Neu5Ac(α2,6)Gal/GalNAc-함유 올리고당 활성 저해제이다.

[0014] 일 실시예에서, 상기 저해제는 핵산, siRNA, 안티센스 핵산, 리보자임, 펩티드, 소분자, 길항제, 앱타머, 및 펩티드 모방체 중 적어도 하나이다. 일 실시예에서, 상기 저해제는 표 1에 열거된 저해제들로부터 선택된다. 일 실시예에서, 상기 저해제는 표 2에 열거된 저해제들로부터 선택된다.

[0015] 일 실시예에서, 상기 저해제는 시티딘, 시티딘 일인산 N-아세틸뉴라민산, 6'-시알릴갈락토오스, 6'-시알릴 N-아세틸갈락토사민, 6'-시알릴락토오스, 3'-시알릴락토오스, 또는 N-아실-뉴라미닐 중 적어도 하나이다. 일 실시예

에서, 상기 저해제는 시티딘 또는 이의 유사체이다.

[0016] 일 실시예에서, 상기 저해제는 6'-시알릴락토오스이다. 일 실시예에서, 상기 저해제는 3'-시알릴락토오스이다.

[0017] 일 실시예에서, 상기 방법은 적어도 두 개의 저해제를 포함하는 조성물을 투여하는 단계를 포함한다. 일 실시예에서, 상기 조성물은 6'-시알릴락토오스 및 시티딘, 또는 이의 유사체를 포함한다. 일 실시예에서, 상기 조성물은 3'-시알릴락토오스 및 시티딘, 또는 이의 유사체를 포함한다. 일 실시예에서, 상기 조성물은 6'-시알릴락토오스 및 3'-시알릴락토오스를 포함한다. 일 실시예에서, 상기 조성물은 6'-시알릴락토오스, 3'-시알릴락토오스 및 시티딘, 또는 이의 유사체를 포함한다. 일 실시예에서, 2 이상의 저해제의 효과는 상승적이다.

[0018] 일 실시예에서, 상기 방법은 시알산 전이효소 활성 저해제, 올리고당 형성 저해제 및 올리고당 활성 저해제로 이루어진 군으로부터 선택된 제 1 저해제를 포함하는 제 1 조성물을 투여하는 단계; 및 시알산 전이효소 활성 저해제, 올리고당 형성 저해제 및 올리고당 활성 저해제로 이루어진 군으로부터 선택된 제 2 저해제를 포함하는 제 2 조성물을 투여하는 단계를 포함한다. 일 실시예에서, 제 1 조성물은 시티딘, 시티딘 일인산 N-아세틸뉴라민산, 6'-시알릴갈락토오스, 6'-시알릴 N-아세틸갈락토사민, 6'-시알릴락토오스, 3'-시알릴락토오스, 및 N-아실-뉴라미닐로 이루어진 군으로부터 선택된 제 1 저해제를 포함한다. 일 실시예에서, 제 2 조성물은 시티딘, 시티딘 일인산 N-아세틸뉴라민산, 6'-시알릴갈락토오스, 6'-시알릴 N-아세틸갈락토사민, 6'-시알릴락토오스, 3'-시알릴락토오스, 및 N-아실-뉴라미닐로 이루어진 군으로부터 선택된 제 2 저해제를 포함한다.

[0019] 일 실시예에서, 상기 방법은 상기 조성물을 피험자의 피부에 투여하는 단계를 포함한다. 일 실시예에서, 상기 피험자는 적어도 피부 부위에 과다색소침착을 가진다. 일 실시예에서, 상기 방법은 멜라닌 생성을 저해한다. 일 실시예에서, 상기 방법은 피험자의 멜라닌형성세포로부터 피험자의 각질형성세포로 멜라닌소체의 이동을 저해한다. 일 실시예에서, 상기 피험자는 인간이다.

[0020] 본 발명은 유효량의 시티딘, 또는 이의 유사체를 피험자에게 투여하는 단계를 포함하는 피부색소침착의 감소 방법을 제공한다. 일 실시예에서, 상기 방법은 유효량의 6'-시알릴락토오스를 피험자에게 투여하는 단계를 더 포함한다. 일 실시예에서, 상기 방법은 유효량의 3'-시알릴락토오스를 피험자에게 투여하는 단계를 더 포함한다.

과제의 해결 수단

[0021] 본 발명은 피부색소침착 감소용 키트를 제공한다. 상기 키트는 설명 자료 (instructional material), 및 시알산 전이효소 활성 저해제, 올리고당 형성 저해제 및 올리고당 활성 저해제로 이루어진 군으로부터 선택된 저해제를 포함하는 피부색소침착 감소용 조성물을 포함한다.

[0022] 일 실시예에서, 상기 시알산 전이효소 활성 저해제는 β-갈락토시드 α2,6'-시알산 전이효소 I (ST6Gal.I) 활성 저해제를 포함한다. 일 실시예에서, 상기 저해제는 세포에서 ST6Gal.I의 발현을 감소시킨다. 일 실시예에서, 상기 저해제는 Neu5Ac(α2,6)Gal/GalNAc-함유 올리고당의 형성을 감소시킨다. 일 실시예에서, 상기 저해제는 Neu5Ac(α2,6)Gal/GalNAc-함유 올리고당 활성 저해제이다.

[0023] 일 실시예에서, 상기 저해제는 핵산, siRNA, 안티센스 핵산, 리보자임, 펩티드, 소분자, 길항제, 앱타머, 및 펩티드 모방체 중 적어도 하나이다. 일 실시예에서, 상기 저해제는 표 1에 열거된 저해제들로부터 선택된다. 일 실시예에서, 상기 저해제는 표 2에 열거된 저해제들로부터 선택된다.

[0024] 일 실시예에서, 상기 저해제는 시티딘, 시티딘 일인산 N-아세틸뉴라민산, 6'-시알릴갈락토오스, 6'-시알릴 N-아세틸갈락토사민, 6'-시알릴락토오스, 3'-시알릴락토오스, 또는 N-아실-뉴라미닐 중 적어도 하나이다. 일 실시예에서, 상기 저해제는 시티딘 또는 이의 유사체이다.

[0025] 일 실시예에서, 상기 저해제는 6'-시알릴락토오스이다. 일 실시예에서, 상기 저해제는 3'-시알릴락토오스이다.

[0026] 일 실시예에서, 상기 조성물은 적어도 두 개의 저해제를 포함한다. 일 실시예에서, 상기 조성물은 6'-시알릴락토오스 및 시티딘, 또는 이의 유사체를 포함한다. 일 실시예에서, 상기 조성물은 3'-시알릴락토오스 및 시티딘, 또는 이의 유사체를 포함한다. 일 실시예에서, 상기 조성물은 6'-시알릴락토오스 및 3'-시알릴락토오스를 포함한다. 일 실시예에서, 상기 조성물은 6'-시알릴락토오스, 3'-시알릴락토오스 및 시티딘, 또는 이의 유사체를 포함한다. 일 실시예에서, 2 이상의 저해제의 효과는 상승적이다.

[0027] 일 실시예에서, 상기 키트는 시알산 전이효소 활성 저해제, 올리고당 형성 저해제 및 올리고당 활성 저해제로 이루어진 군으로부터 선택된 제 1 저해제를 포함하는 제 1 조성물; 및 시알산 전이효소 활성 저해제, 올리고당 형성 저해제 및 올리고당 활성 저해제로 이루어진 군으로부터 선택된 제 2 저해제를 포함하는 제 2 조성물을 포

함한다. 일 실시예에서, 제 1 조성물은 시티딘, 시티딘 일인산 N-아세틸뉴라민산, 6'-시알릴갈락토오스, 6'-시알릴 N-아세틸갈락토사민, 6'-시알릴락토오스, 3'-시알릴락토오스, 및 N-아실-뉴라미닐로 이루어진 군으로부터 선택된 제 1 저해제를 포함한다. 일 실시예에서, 제 2 조성물은 시티딘, 시티딘 일인산 N-아세틸뉴라민산, 6'-시알릴갈락토오스, 6'-시알릴 N-아세틸갈락토사민, 6'-시알릴락토오스, 3'-시알릴락토오스, 및 N-아실-뉴라미닐로 이루어진 군으로부터 선택된 제 2 저해제를 포함한다.

도면의 간단한 설명

[0028] 하기의 본 발명의 바람직한 실시예의 상세한 설명은 첨부된 도면과 함께일 때 더 잘 이해될 것이다. 본 발명을 설명하기 위하여, 현재 바람직한 실시예를 도면에 나타낸다. 그러나, 본 발명은 도면에 나타난 실시예의 정확한 배열 및 방법에 한정되지 않는다는 것을 이해하여야 한다.

도 1은 인간 피부에서 색소 시스템의 개략도이다. 단일 멜라닌형성세포 및 이의 멜라닌소체를 이동시키는 주위의 각질형성세포의 도메인을 나타낸다. 멜라닌소체는 멜라닌형성세포 수지상돌기(melanocyte dendrite)를 통하여 이동된다. 이것은 표피-멜라닌 단위라고 한다.

도 2는 마커로서 EBL(elderberry bark lectin)/SNA를 이용하여 4명의 다른 개체로부터 멜라닌형성세포의 조직화학염색(histochemical staining)을 설명하는 실험 결과를 나타내는 영상의 세트이다. 절편은 갈색 발색제를 이용하여 표준 면역과산화효소법(immunoperoxidase methods)으로 염색하였다. 대조염색 (Counter-staining)은 헤마톡실린으로 하였다. 패널은 많은 각질형성세포로 둘러싸인 단일의 멜라닌형성세포를 나타낸다. 화살표는 멜라닌형성세포의 핵을 가리킨다.

도 3a 및 도 3b를 포함하는 도 3은, 동일한 피부 생검(skin biopsy)의 순차적인 절편으로부터 멜라닌형성세포의 조직화학염색을 설명하는 실험 결과를 나타내는 영상의 세트이다. 절편은 갈색 발색제를 이용하여 표준 면역과산화효소법으로 염색하였다. 대조염색은 헤마톡실린으로 하였다. 도 3a는 멜라닌형성세포의 염색을 나타내는 EBL/SNA 렉틴으로 염색한 절편을 나타낸다. 도 3b는 MAAII 렉틴으로 염색된 순차적인 절편을 나타낸다. 멜라닌형성세포 핵은 하얀 별표로 표시된다.

도 4a 및 도 4b를 포함하는 도 4는, 공-배양에서 각질형성세포와 접촉하는 멜라닌형성세포를 설명하는 실험 결과를 나타내는 영상의 세트이다. 배양물은 적색 발색제를 이용하여 표준 조직화학 기술에 의해 EBL/SNA로 염색하고 자이스 광학현미경(Zeiss light microscope)으로 사진을 찍었다. 도 4a는 멜라닌형성세포 원형질막의 EBL/SNA 염색을 나타내는 저전력 사진(low power photo)이다. 도 4b는 사상위족 접촉점(filapodial contact points)(별표)의 고전력 사진이다.

도 5a 및 도 5b를 포함하는 도 5는, L-시티딘 (25 μM)이 인간 멜라닌형성세포-각질형성세포 공-배양의 EBL 염색 및 멜라닌 함량에 미치는 영향을 설명하는 실험 결과를 나타내는 영상의 세트이다. 배양물은 표준 IHC 과정을 이용하여, L-시티딘 (25 μM)과 함께 72시간 배양하고, BSS로 헹군 다음, 파라포름알데히드로 고정시키고, BSS로 다시 헹구고, EBL (적색 발색제)로 염색하였다. 대조염색은 헤마톡실린으로 하였다. 랜덤 필드(Random fields)는 Spot Flex 디지털 카메라가 장착된 Zeiss Axioskop 40 광학현미경으로 사진을 찍었다. 포토샵 도구를 이용하여, 수지상돌기를 본 명세서의 처리군에 잘라 붙였다. 그 다음, 복합 영상은 자동 명암 및 밝기 도구(automatic contrast and brightening tools)와 함께 향상되었다. 도 5a는 비처리 대조군을 나타낸다; 도 5b는 L-시티딘으로 처리되고, EBL로 염색된 군을 나타낸다.

도 6은 L-시티딘 (Cyt, 50 μM), 6'-시알릴락토오스 (6'-SL, 50 μM) 및 3'-시알릴락토오스 (3'-SL, 50 μM)이 인간 멜라닌형성세포-각질형성세포 공-배양의 멜라닌 함량에 미치는 영향을 비처리 대조군 (UT)과 비교하여 설명하는 실험 결과를 나타내는 영상의 세트이다. 배양물은 각 물질과 함께 72시간 배양하고, 원심분리로 펠렛화하였으며, 멜라닌은 분광광도계로 정량화를 위해 용해하였다. 원래 영상은 Spot Flex 디지털 카메라가 장착된 Zeiss Axioskop 40 광학현미경으로 제시되었다. 모든 영상은 자동 명암 및 밝기 도구와 함께 향상되었다.

도 7a 내지 도 7d를 포함하는 도 7은, 시티딘, 6'-SL 및 3'-SL이 멜라닌형성세포-각질형성세포 공-배양의 멜라닌 함량에 미치는 영향을 설명하는 실험 결과를 나타낸다. 세포를 저해제와 함께 72시간 동안 배양하고, 파라포름알데히드로 고정시킨 다음, 멜라닌을 폰타나-마손(Fontana-Masson) 은(silver) 염색으로 염색하여 멜라닌을 시각화하였다 (Kwon-Chung et al., 1981, J Clin Microbiol, 13:383-387). 랜덤 필드를 사진 찍고, 포토샵 도구로 처리군으로 배열하였다. 모든 영상은 자동 명암 및 밝기 도구와 함께 향상되었다. 도 7a는 비처리 대조군을 나타내고 (50 μM); 도 7b는 시티딘 처리 세포를 나타내며 (50 μM); 도 7c는 6'-SL 처리 세포를 나타내고

(50 μM); 도 7d는 3'-SL 처리 세포를 나타낸다 (50 μM).

도 8a 및 도 8b를 포함하는 도 8은, 멜라닌형성세포-각질형성세포 공-배양에서 멜라닌 함량 (도 8a) 및 티로시나제 활성 (도 8b)을 측정하는 실험 결과를 나타내는 그래프의 세트이다. 파선(dashed line)은 실험 시작시의 t_0 수준을 나타낸다. 멜라닌 함량이 블리스 가산성(Bliss Additivity)으로 예상된 것보다 상당히 큰 경우는, (*) ($p = \leq 0.06$); (**) ($p = \leq 0.01$)로 표시된다.

도 9a 및 도 9b를 포함하는 도 9는, 시티딘 및 3'-SL이 조합하여 멜라닌형성세포-각질형성세포 상호작용 및 멜라닌소체 이동에 미치는 영향을 설명하는 실험 결과를 나타내는 영상의 세트이다. 세포를 시티딘 + 3'-SL과 함께 72시간 동안 배양하고, 파라포름알데히드로 고정시킨 다음, 멜라닌을 폰타나-마손 은 염색으로 염색하였다 (Kwon-Chung et al., 1981, J Clin Microbiol, 13:383-387). 영상을 사진 찍고, 포토샵 도구로 처리군으로 배열하였다. 영상은 동일한 층에서 포토샵 자동 명암 및 밝기 도구와 함께 향상되었다. 도 9a는 비처리 대조군을 나타낸다. 도 9b는 시티딘 (15 μM) + 3'-SL (15 μM)로 처리된 세포를 나타낸다.

도 10은 ST6 siRNA 및, 보다 적은 ST3 siRNA가 마우스-멜란-A 세포에서 EBL 결합을 감소시킨다는 것을 설명하는 실험 결과를 나타내는 영상의 세트이다 (UT = 비처리 대조군).

도 11a 및 도 11b를 포함하는 도 11은, 배양된 인간 멜라닌형성세포에서 ST6 및 ST3의 siRNAs가 멜라닌 생성 (도 11a) 및 티로시나제 활성 (도 11b)에 미치는 영향을 설명하는 실험 결과를 나타내는 그래프의 세트이며, 이는 ST6 siRNA 및, 보다 적은 ST3 siRNA가 멜라닌 생성을 감소시킨다는 것을 설명한다 (UT = 비처리 대조군).

발명을 실시하기 위한 구체적인 내용

[0029] 본 발명은 일반적으로 피부색소침착 감소용 조성물 및 방법에 관한 것이다. 본 발명은 과도한 색소침착 또는 고르지 않은 색소침착의 예방 및/또는 치료에 사용된다. 특정 실시예에서, 본 발명은 과다색소침착을 예방 및/또는 치료한다.

[0030] 일 실시예에서, 본 발명은 피험자에서 피부색소침착을 감소시키기 위한 조성물을 제공한다. 일 실시예에서, 상기 조성물은 시알산 전이효소 활성 저해제, Neu5Ac(α2,6)Gal/GalNAc-함유 올리고당의 활성 저해제, 또는 이의 조합을 포함한다.

[0031] 일 실시예에서, 본 발명은 피부색소침착의 감소 방법을 제공한다. 일 실시예에서, 상기 방법은 시알산 전이효소 활성 저해제, Neu5Ac(α2,6)Gal/GalNAc-함유 올리고당의 활성 저해제, 또는 이의 조합을 포함하는 조성물의 유효량을 피험자에게 투여하는 단계를 포함한다. 특정 실시예에서, 상기 방법은 피험자의 멜라닌형성세포에 상기 조성물을 투여하는 단계를 포함한다.

[0032] 정의

[0033] 별도로 정의되지 않으면, 본 명세서에 사용된 모든 기술적 및 과학적 용어는 이 발명이 속하는 기술분야에서 당업자에 의해 일반적으로 이해되는 것과 같은 의미를 가진다. 비록 본 명세서에 기재된 것과 유사 또는 동등한 임의의 방법 및 물질이 본 발명의 실시 또는 실험에서 사용될 수 있을지라도, 바람직한 방법 및 물질이 기재된다.

[0034] 일반적으로, 본 명세서에 사용된 명명법 및 세포배양, 분자 유전학, 유기화학, 및 핵산 화학 및 혼성화에서 실험 방법은 당해 기술분야에서 잘 알려지고 흔히 사용되는 것이다.

[0035] 표준 기술은 핵산 및 펩티드 합성에 사용된다. 상기 기술 및 방법은 일반적으로 기술분야 및 다양한 일반적인 참고문헌에 있는 종래의 방법에 따라 수행되며 (예를 들어, Sambrook and Russell, 2012, Molecular Cloning, A Laboratory Approach, Cold Spring Harbor Press, Cold Spring Harbor, NY, and Ausubel et al., 2002, Current Protocols in Molecular Biology, John Wiley & Sons, NY), 이 문서 전체에 제공된다.

[0036] 본 명세서에 사용된 명명법 및 하기에 기재된 분석화학 및 유기합성에서 사용된 실험 방법은 당해 기술분야에서 잘 알려지고 흔히 사용되는 것이다. 표준 기술 또는 이의 변형은 화합물 합성 및 화합물 분석에 사용된다.

[0037] 본 명세서에 사용된 바와 같이, 각각의 하기 용어는 이 부문에서 그것과 관련된 의미를 가진다.

[0038] 본 명세서에 사용된 관사 "a" 및 "an"은 관사의 문법적인 목적어의 하나 또는 하나 이상 (즉, 적어도 하나)을 나타낸다. 한 예로서, "an element"는 하나의 요소 또는 하나 이상의 요소를 의미한다.

[0039] 본 명세서에 사용된 "약(about)"은, 양, 일시적인 기간(temporal duration) 등과 같은 측정할 수 있는 값을 나타내는 경우, 지정된 값(specified value)으로부터 ±20% 또는 ±10%, 더 바람직하게는 ±5%, 더욱 바람직하게는 ±1%, 및 더욱 더 바람직하게는 ±0.1%의 편차를 포함하기 위한 것이고, 이러한 편차는 개시된 방법을 수행하기에 적절하다.

[0040] "안티센스"는 특히 단백질을 인코딩하는 이중가닥 DNA 분자의 비-코딩 가닥의 핵산 서열, 또는 비-코딩 가닥에 실질적으로 상동인 서열을 나타낸다. 본 명세서에 정의된 바와 같이, 안티센스 서열은 단백질을 인코딩하는 이중가닥 DNA 분자의 서열에 상보적이다. 안티센스 서열은 DNA 분자의 코딩 서열의 코딩 부분에만 상보적일 필요는 없다. 안티센스 서열은 조절 서열이 코딩 서열의 발현을 조절하는 단백질을 인코딩하는 DNA 분자의 코딩 서열에 지정된 조절 서열에 상보적일 수 있다.

[0041] 본 명세서에 사용된 바와 같이, "앱타머"는 다른 분자에 특이적으로 결합할 수 있는 소분자를 나타낸다. 앱타머는 일반적으로 폴리뉴클레오티드- 또는 펩티드-기반 분자이다. 폴리뉴클레오티드 앱타머는 일반적으로 특정 표적 분자, 예를 들어 펩티드, 단백질, 약물, 비타민, 특히 유기 및 무기 분자에 대하여 적당한 결합 친화도 및 특이도를 갖는 것으로 설계된 매우 특이적인 3차원 형태를 갖는 수 가닥의 핵산을 포함하는, DNA 또는 RNA 분자이다. 이러한 폴리뉴클레오티드 앱타머는 기하급수적 농축(exponential enrichment)에 의해 리간드의 체계적 진화 (systematic evolution)의 사용을 통해 광대한 집단의 랜덤 서열로부터 선택될 수 있다. 펩티드 앱타머는 일반적으로 특정 리간드에 결합하는 단백질 스캐폴드에 부착된 약 10 내지 약 20 아미노산의 루프(loop)이다. 펩티드 앱타머는 효모 이중 혼성화 반응(yeast two-hybrid system)과 같은 방법을 이용하여, 조합 라이브러리(combinatorial libraries)로부터 동정 및 분리될 수 있다.

[0042] 본 명세서에 사용된 바와 같이, "상보적인(Complementary)"은 2개의 핵산, 예를 들어 2개의 DNA 분자 사이의 아단위(subunit) 서열 상보성의 광범위한 개념을 나타낸다. 두 분자에서 뉴클레오티드 위치가 일반적으로 서로 염기쌍을 형성할 수 있는 뉴클레오티드에 의해 차지되는 경우, 핵산은 이 위치에서 서로에게 상보적일 것으로 간주된다. 따라서, 2개의 핵산은 각각의 분자에서 적어도 약 50%, 바람직하게는 적어도 약 60%, 더 바람직하게는 적어도 약 80%의 상응하는 위치가 일반적으로 서로 염기쌍을 형성하는 뉴클레오티드에 의해 차지되는 경우, 서로에게 실질적으로 상보적이다 (예를 들어, A:T 및 G:C 뉴클레오티드 쌍).

[0043] "질환(disease)"은 동물이 항상성(homeostasis)을 유지할 수 없고, 만일 질환이 개선되지 않으면 동물의 건강이 계속 악화되는 동물의 건강 상태이다. 이와 반대로, 동물에서 "장애(disorder)"는 동물이 항상성을 유지할 수 있으나, 동물의 건강 상태가 장애가 없는 동물에서보다 덜 유리한 건강 상태이다. 치료되지 않은 채 방치되면, 장애는 동물의 건강 상태의 감소를 필연적으로 더 야기하지 않는다.

[0044] 질환 또는 장애는, 만일 질환 또는 장애의 증상의 중증도, 이러한 증상이 환자에 의해 경험되는 빈도수, 또는 둘 다가 감소되면 "완화된다(alleviated)"이다.

[0045] 용어 "유효량" 및 "약학적으로 유효량"은 비독성이나 원하는 생물학적 결과를 제공하기 위한 물질의 충분한 양을 나타낸다. 그 결과는 질환 또는 장애의 징후, 증상, 또는 원인의 감소 및/또는 완화, 또는 생물학적 시스템의 임의의 다른 원하는 변화일 수 있다. 임의의 개개의 경우에서, 적당한 유효량은 일상적인 실험을 이용하여 당업자에 의해 결정될 수 있다.

[0046] 본 명세서에 사용된 바와 같이, "내인성(endogenous)"은 유기체, 세포, 조직 또는 시스템으로부터 또는 내부에서 생성되는 임의의 물질을 나타낸다.

[0047] 본 명세서에 사용된 바와 같이, 용어 "외인성(exogenous)"은 유기체, 세포, 조직 또는 시스템으로부터 도입되는 또는 외부에서 생성되는 임의의 물질을 나타낸다.

[0048] 본 명세서에 사용된 바와 같이, 용어 "발현"은 이의 프로모터에 의해 구동되는 특정 뉴클레오티드 서열의 전사 및/또는 번역으로 정의된다.

[0049] 본 명세서에 사용된 바와 같이, 용어 "발현 벡터"는 전사될 수 있는 유전자 산물의 적어도 일부에 대해 코딩하는 핵산 서열을 함유하는 벡터를 나타낸다. 어떤 경우에, RNA 분자는 단백질, 폴리펩티드, 또는 펩티드로 번역된다. 다른 경우에, 이들 서열은 안티센스 분자, siRNA, 리보자임 등의 생성에 의해 변역되지 않는다. 발현 벡터는 특정 숙주 유기체에서 작동가능하게 결합된 코딩 서열의 전사 및 번역에 필요한 핵산 서열을 의미하는, 다양한 조절 서열을 함유할 수 있다. 전사 및 번역을 조절하는 조절 서열외에, 벡터 및 발현 벡터는 다른 기능도 제공하는 핵산 서열을 함유할 수 있다.

[0050] 용어 "융합 폴리펩티드"는 이종 서열(heterologous sequence) (예를 들어, 비-루시퍼라제 아미노산 또는 단백질)에 결합된 관심 단백질 (예를 들어, 루시퍼라제)을 함유하는 키메릭 단백질을 나타낸다.

[0051] 용어 "상동(homology)"은 상보성 정도를 나타낸다. 부분적 상동 또는 완전한 상동 (즉, 동일성)이 있을 수 있다. 상동은 종종 서열 분석 소프트웨어 (예를 들어, Sequence Analysis Software Package of the Genetics Computer Group. University of Wisconsin Biotechnology Center. 1710 University Avenue. Madison, Wis. 53705)를 이용하여 측정된다. 이러한 소프트웨어는 상동 정도를 다양한 치환, 결실, 삽입, 및 다른 변형에 할당함으로써 유사한 서열을 일치시킨다. 보존성 치환(Conservative substitutions)은 일반적으로 하기의 군 내에서 치환을 포함한다: 글리신, 알라닌; 발린, 이소류신, 류신; 아스파르트산, 글루타민산, 아스파라긴, 글루타민; 세린, 트레오닌; 리신, 아르기닌; 및 페닐알라닌, 티로신.

[0052] "분리된 올리고뉴클레오티드" 또는 "분리된 폴리뉴클레오티드"에서와 같이, 핵산에 관하여 사용될 때 용어 "분리된(isolated)"은, 보통 이의 기원과 관련된 것과 함께 적어도 하나의 오염 물질로부터 동정 및 분리된 핵산 서열을 나타낸다. 따라서, 분리된 핵산은 이것이 자연에서 발견되는 것과 다른 형태 또는 환경에서 존재한다. 이와 반대로, 비-분리된 핵산 (예를 들어, DNA 및 RNA)은 이들이 자연에서 존재하는 상태로 발견된다. 예를 들어, 정해진 DNA 서열 (예를 들어, 유전자)은 인접 유전자(neighboring genes)에 가까이 있는 숙주 세포 염색체에서 발견된다; RNA 서열 (예를 들어, 특정 단백질을 인코딩하는 특정 mRNA 서열)은 다수의 단백질을 인코딩하는 많은 기타 mRNAs와 함께 혼합물로서 세포에서 발견된다. 그러나, 분리된 핵산은, 한 예로서, 핵산이 자연 세포(natural cells)의 핵산과 다른 염색체 위치에 있거나, 또는 그 반대로 자연에서 발견되는 것과 다른 핵산 서열에 의해 측면에 있는 핵산을 일반적으로 발현하는 세포에서 이러한 핵산을 포함한다. 분리된 핵산 또는 올리고뉴클레오티드는 단일-가닥 또는 이중-가닥 형태로 존재할 수 있다. 분리된 핵산 또는 올리고뉴클레오티드가 단백질을 발현하기 위해 이용되는 경우, 올리고뉴클레오티드는 최소한도로 센스 또는 코딩 가닥 (즉, 올리고뉴클레오티드는 단일-가닥일 수 있음)을 함유하나, 센스 및 안티-센스 가닥 (즉, 올리고뉴클레오티드는 이중-가닥일 수 있음) 둘 다를 함유할 수 있다.

[0053] "분리된 단백질" 또는 "분리된 폴리펩티드"에서와 같이, 폴리펩티드에 관하여 사용될 때 용어 "분리된"은, 보통 이의 기원과 관련된 것과 함께 적어도 하나의 오염 물질로부터 동정 및 분리된 폴리펩티드를 나타낸다. 따라서, 분리된 폴리펩티드는 이것이 자연에서 발견되는 것과 다른 형태 또는 환경에서 존재한다. 이와 반대로, 비-분리된 폴리펩티드 (예를 들어, 단백질 및 효소)는 이들이 자연에서 존재하는 상태로 발견된다.

[0054] 대상에 적용되는 바와 같이, "자연발생적인"은 대상이 자연에서 발견될 수 있다는 사실을 나타낸다. 예를 들어, 자연에서 소스로부터 분리될 수 있고 인간에 의해 의도적으로 변형되지 않는 (바이러스를 포함한) 유기체에서 존재하는 폴리펩티드 또는 폴리뉴클레오티드 서열은 자연발생적인 서열이다.

[0055] "핵산"의 경우 데옥시리보뉴클레오시드 또는 리보뉴클레오시드로 구성되며, 포스포디에스터 결합 또는 변형된 결합, 예를 들어 포스포트리에스터, 포스포라미데이트, 실옥산, 카보네이트, 카복시메틸에스터, 아세트아미데이트, 카바메이트, 티오에테르, 다리 포스포라미데이트, 다리 메틸렌 포스포네이트, 포스포로티오에이트, 메틸포스포네이트, 포스포로디티오에이트, 다리 포스포로티오에이트 또는 설폰 결합, 및 이러한 결합의 조합으로 구성되는, 임의의 핵산을 의미한다. 또한, 용어 "핵산"은 특히 5개의 생물학적으로 발생하는 염기 (아데닌, 구아닌, 티민, 시토신 및 우라실) 외의 염기로 구성된 핵산을 포함한다. 용어 "핵산"은 일반적으로 커다란 폴리뉴클레오티드를 나타낸다.

[0056] 폴리뉴클레오티드 서열을 기재하기 위해 종래의 표기법이 본 명세서에서 사용된다: 단일-가닥 폴리뉴클레오티드 서열의 왼쪽 말단은 5'-말단이고; 이중-가닥 폴리뉴클레오티드 서열의 왼쪽 방향은 5'-방향이라고 한다.

[0057] 초기 RNA 전사에 뉴클레오티드의 5'에서 3' 첨가의 방향은 전사 방향이라고 한다. mRNA와 동일한 서열을 갖는 DNA 가닥은 "코딩 가닥"이라고 하고; DNA의 기준점의 5'에 위치한 DNA 가닥의 서열은 "상류 서열(upstream sequences)"이라고 하며; DNA의 기준점의 3'에 위치한 DNA 가닥의 서열은 "하류 서열(downstream sequences)"이라고 한다.

[0058] "발현 카세트"의 경우, 전사 또는 번역에 대해 필요한 프로모터/조절 서열에 작동가능하게 결합된 코딩 서열을 포함하는 핵산 분자를 의미한다.

[0059] 본 명세서에 사용된 바와 같이, 용어 "작동가능하게 결합된"은 특정 유전자의 전사 및/또는 원하는 단백질 분자의 합성을 유도할 수 있는 핵산 분자가 생성되도록 핵산 서열이 결합된 것을 나타낸다. 또한, 용어는 기능적 (예를 들어, 효소적으로 활성적인, 결합 파트너에 결합할 수 있는, 저해할 수 있는 등) 단백질 또는 폴리펩티드

를 생성하는 방식으로 아미노산을 인코딩하는 서열의 결합을 나타낸다.

[0060] 본 명세서에 사용된 바와 같이, 용어 "프로모터/조절 서열"은 프로모터/조절 서열에 작동가능하게 결합된 유전자 산물의 발현에 필요한 핵산 서열을 의미한다. 어떤 경우에, 이러한 서열은 코어 프로모터 서열일 수 있고, 다른 경우에는, 이러한 서열이 인핸서 서열 및 유전자 산물의 발현에 필요한 다른 조절 요소를 포함할 수도 있다. 상기 프로모터/조절 서열은 유도성 방식으로 유전자 산물을 발현하는 것일 수 있다.

[0061] "유도성" 프로모터는, 유전자 산물을 인코딩하거나 또는 특정하는 폴리뉴클레오티드와 함께 작동가능하게 결합되는 경우, 프로모터에 반응하는 유도제 (inducer)가 존재할 때만 실질적으로 유전자 산물을 생성하는 뉴클레오티드 서열이다.

[0062] "항시성(constitutive)" 프로모터는, 유전자 산물을 인코딩하거나 또는 특정하는 폴리뉴클레오티드와 함께 작동가능하게 결합되는 경우, 세포의 대부분 또는 모든 생리적 조건 하에 세포에서 유전자 산물을 생성하는 뉴클레오티드 서열이다.

[0063] "폴리펩티드"는 아미노산 잔기가 펩티드 결합으로 연결된 고분자를 나타내며, 자연발생적인 구조적 변형체(structural variants), 및 이의 합성된 유사체와 관련된다. 합성 폴리펩티드는 자동 폴리펩티드 합성기를 이용하여 합성될 수 있다.

[0064] 용어 "단백질"은 일반적으로 커다란 폴리펩티드를 나타낸다.

[0065] 용어 "펩티드"는 일반적으로 짧은 폴리펩티드를 나타낸다.

[0066] 폴리펩티드 서열을 나타내기 위해 종래의 표기법이 본 명세서에서 사용된다: 폴리펩티드 서열의 왼쪽 말단은 아미노-말단이고; 폴리펩티드 서열의 오른쪽 말단은 카복실-말단이다.

[0067] 본 명세서에 사용된 바와 같이, "펩티드 모방체(peptidomimetic)"는 부모 펩티드의 생물학적 작용을 모방할 수 있는 비-펩티드성 구조적 요소(non-peptidic structural elements)를 함유하는 화합물이다. 펩티드 모방체는 펩티드 결합을 포함할 수 있거나 또는 포함할 수 없다.

[0068] "폴리뉴클레오티드"는 핵산의 단일 가닥 또는 병렬 및 역-병렬(anti-parallel) 가닥을 의미한다. 따라서, 폴리뉴클레오티드는 단일-가닥 또는 이중-가닥 핵산일 수 있다. 본 발명의 문맥 내에서, 일반적으로 발생하는 핵산 염기에 대해 하기 약어가 사용된다. "A"는 아데노신을 나타내고, "C"는 시티딘을 나타내며, "G"는 구아노신을 나타내고, "T"는 티미딘을 나타내며, "U"는 우리딘을 나타낸다.

[0069] 용어 "올리고뉴클레오티드"는 일반적으로 약 60 뉴클레오티드보다 크지 않은, 짧은 폴리뉴클레오티드를 나타낸다. 뉴클레오티드 서열이 DNA 서열 (즉, A, T, G, C)로 표시되는 경우, 이것은 "U"가 "T"를 대체하는 RNA 서열 (즉, A, U, G, C)도 포함한다는 것을 이해할 것이다.

[0070] "재조합 폴리뉴클레오티드"는 자연적으로 결합되지 않는 서열을 함께 갖는 폴리뉴클레오티드를 나타낸다. 증폭된 또는 집합된(assembled) 재조합 폴리뉴클레오티드는 적당한 벡터에 포함될 수 있으며, 상기 벡터는 적당한 숙주 세포를 변형시키기 위해 사용될 수 있다.

[0071] 재조합 폴리뉴클레오티드는 비-코딩 기능도 제공할 수 있다 (예를 들어, 프로모터, 복제 개시점(origin of replication), 리보좀-결합 부위 등).

[0072] 본 명세서에 사용된 바와 같이, 용어 "재조합 폴리펩티드"는 재조합 DNA 방법을 이용하여 생성된 폴리펩티드로서 정의된다. 재조합 폴리뉴클레오티드를 포함하는 숙주 세포는 "재조합 숙주 세포"라고 한다. 유전자가 재조합 폴리뉴클레오티드를 포함하는 재조합 숙주 세포에서 발현된 유전자는, "재조합 폴리펩티드"를 생성한다.

[0073] 본 명세서에 사용된 바와 같이, "재조합 세포"는 재조합 폴리뉴클레오티드를 포함하는 숙주 세포이다.

[0074] 본 명세서에 사용된 바와 같이, "리보자임"은 DNA 제한 엔도뉴클레아제와 유사한 방식으로 단일-가닥 RNA를 특이적으로 절단하는 능력을 가진 RNA 분자이다. RNAs를 인코딩하는 뉴클레오티드 서열의 변형을 통해, RNA 분자에서 특정 뉴클레오티드 서열을 인식하고 이것을 절단하는 것으로 설계될 수 있다 (Cech, 1988, J. Amer. Med. Assn. 260:3030). 2개의 기본 유형의 리보자임, 즉 테트라하이메나-유형(tetrahymena-type) (Hasselhoff, 1988, Nature 334:585) 및 해머헤드-유형 (hammerhead-type)이 있다. 테트라하이메나-유형 리보자임은 길이가 4개의 염기 서열을 인식하는 반면, 해머헤드-유형 리보자임은 길이가 11-18개의 염기 서열을 인식한다. 서열이 길어질수록, 표적 mRNA에 특이적으로 발생할 가능성이 더 커진다. 결과적으로, 해머헤드-유형 리보자임은 특정

mRNA 종을 비활성화하기 위해 테트라하이메나-유형 리보자임보다 바람직하고, 18-염기 인식 서열은 다양한 관련 없는 mRNA 분자 내에서 무작위로 발생할 수 있는 더 짧은 인식 서열보다 바람직하다. 리보자임 및 유전자 발현을 저해하기 위한 이의 용도도 당해 기술분야에서 잘 알려져 있다 (참조, Cech et al., 1992, J. Biol. Chem. 267:17479-17482; Hampel et al., 1989, Biochemistry 28:4929-4933; Eckstein et al., International Publication No. WO 92/07065; Altman et al., U.S. Patent No. 5,168,053).

[0075] 본 명세서에 사용된 바와 같이, 용어 "특이적으로 결합한다"는 다른 분자 또는 특징을 인식하고 결합하나, 실질적으로는 시료에서 다른 분자들 또는 특징들을 인식하거나 또는 결합하지 않는 항체와 같은 분자를 의미한다.

[0076] 본 명세서에 사용된 바와 같이, 용어 "교차우성 음성 돌연변이체 유전자 (transdominant negative mutant gene)"는 돌연변이되지 않는 (즉, 야생형 서열을 가지는) 동일한 유전자 또는 유전자 산물의 다른 복제물이 (예를 들어, 야생형 단백질 기능을 저해함으로써) 적당히 기능하는 것을 방지하는 폴리펩티드 또는 단백질 산물을 인코딩하는 유전자를 나타낸다. 교차우성 음성 돌연변이체 유전자의 산물은 본 명세서에서 "우성 음성(dominant negative)" 또는 "DN" (예를 들어, 우성 음성 단백질, 또는 DN 단백질)이라고 한다.

[0077] 본 명세서에 사용된 바와 같이, 문구 "저해하다(inhibit)"는 분자, 반응, 상호작용, 유전자, mRNA, 및/또는 측정가능한 양에 의한 단백질의 발현, 안정성, 기능 또는 활성을 감소시키거나 또는 완전히 방지하는 것을 의미한다. 저해제는 부분적으로 또는 완전히 자극을 차단하기 위해 결합하고, 단백질, 유전자, 및 mRNA 안정성, 발현, 기능 및 활성을 감소시키고, 방지하며, 활성화를 지연시키고, 비활성화시키며, 감광도를 낮추거나 또는 하향 조절하는 화합물, 예를 들어 길항제이다.

[0078] 본 명세서에 사용된 바와 같이, 문구 "시알산 전이효소 저해제 (sialyltransferase inhibitor)"는 당업자에게 알려진 임의의 방법을 이용하여 직접적으로 또는 간접적으로 시알산 전이효소 활성을 저해하는 조성물 또는 화합물을 나타낸다. 시알산 전이효소 저해제는 핵산, 펩티드, 소분자, 길항제, 앱타머, 또는 펩티드 모방체를 포함하는 임의의 유형의 화합물일 수 있으나, 이에 한정되지 않는다. 시알산 전이효소 저해제는 β-갈락토시드 α2,3-시알산 전이효소 (ST3Gal) 군 (family), β-갈락토시드 α2,6-시알산 전이효소 (ST6Gal) 군, GalNAc α2,6-시알산 전이효소 (ST6GalNAc) 군, 및 α2,8-시알산 전이효소 (ST8Sia) 군을 포함하는 시알산 전이효소 군 중 하나 이상의 일원을 저해할 수 있으나, 이에 한정되지 않는다.

[0079] 본 명세서에 사용된 바와 같이, 문구 "Neu5Ac(α2,6)Gal/GalNAc 저해제"는, 당업자에게 알려진 임의의 방법을 이용하여 직접적으로 또는 간접적으로 Neu5Ac(α2,6)Gal/GalNAc 활성을 저해하는 조성물 또는 화합물을 나타낸다. Neu5Ac(α2,6)Gal/GalNAc 저해제는 핵산, 펩티드, 소분자, 길항제, 앱타머, 또는 펩티드 모방체를 포함하는 임의의 유형의 화합물일 수 있으나, 이에 한정되지 않는다. 본 명세서에 사용된 바와 같이, "Neu5Ac(α2,6)Gal/GalNAc 저해제" 또는 "Neu5Ac(α2,6)Gal/GalNAc의 저해"도 Neu5Ac(α2,6)Gal/GalNAc-함유 올리고당, Neu5Ac(α2,6)Gal/GalNAc-함유 당접합체(glycoconjugates), Neu5Ac(α2,6)Gal/GalNAc-함유 당지질(glycolipids), Neu5Ac(α2,6)Gal/GalNAc-함유 당단백질(glycoprotein) 등을 포함하여, Neu5Ac(α2,6)Gal/GalNAc를 포함하는 접합체의 저해제를 포함한다.

[0080] 본 명세서에 사용된 바와 같이, "마커 유전자" 또는 "리포터 유전자"는 유전자를 발현하는 세포에 뚜렷한 표현형을 부여함으로써 유전자를 가지지 않는 세포로부터 구별될 유전자를 갖도록 하는 유전자이다. 이러한 유전자는 마커가 선택 물질 (예를 들어, 제초제, 항생제 등)의 사용을 통해 화학적 방법에 의해 '선택'할 수 있는 특성을 부여하거나, 또는 간단하게 관찰 또는 시험을 통해, 즉 '스크리닝'에 의해 확인할 수 있는 "리포터" 특성인지 여부에 따라, 선택할 수 있는 또는 스크리닝할 수 있는 마커를 인코딩할 수 있다. 본 명세서의 요소는 특정 마커 유전자의 사용을 통해 상세히 예시된다. 물론, 적당한 마커 유전자 또는 리포터 유전자의 많은 예는 기술분야에 알려져 있고, 발명의 실시에서 사용될 수 있다. 따라서, 하기의 논의는 포괄적이라기 보다는 다소 예시적이라고 이해할 것이다. 본 명세서에 개시된 기술 및 당해 기술분야에서 알려진 일반적인 재조합 기술을 고려하여, 본 발명은 임의의 유전자의 변화를 가능하게 한다.

[0081] "벡터"는 분리된 핵산을 포함하고 세포의 내부에 분리된 핵산을 전달하기 위해 사용될 수 있는 물질의 조성이다. 선형 폴리뉴클레오티드, 이온성 또는 양친매성(amphiphilic) 화합물과 관련된 폴리뉴클레오티드, 플라스미드, 및 바이러스를 포함하는 많은 벡터가 당해 기술분야에서 알려져 있으나, 이에 한정되지 않는다. 따라서, 용어 "벡터"는 자율적으로(autonomously) 복제하는 플라스미드 또는 바이러스를 포함한다. 또한, 용어는 폴리리신 화합물, 리포좀 등과 같은 세포로 핵산의 전달을 용이하게 하는 비-플라스미드 및 비-바이러스 화합물을 포함하는 것으로 해석되어야 한다. 바이러스 벡터의 예는 아데노바이러스 벡터, 아데노-관련 바이러스 벡터, 레트로바이러스 벡터 등을 포함하나, 이에 한정되지 않는다.

[0082] 본 명세서에 사용된 바와 같이, 용어 "설명 자료(Instructional material)"는 간행물, 녹음, 그림, 또는 키트 내에 본 발명의 조성물 및/또는 화합물의 유용성을 전하는데 사용될 수 있는 임의의 다른 표현 매체를 포함한다. 키트의 설명 자료는 본 발명의 화합물 및/또는 조성물을 함유하는 용기에 부착할 수 있거나 또는 상기 화합물 및/또는 조성물을 함유하는 용기와 함께 발송될 수 있다. 대안적으로, 설명 자료는 수령인이 협력하여 설명 자료 및 화합물을 사용하려는 의도와 함께 용기로부터 별도로 발송될 수 있다. 설명 자료의 전달은 간행물 또는 키트의 유용성을 전하는 다른 표현 매체의 물리적 전달에 의할 수 있거나, 또는 대안적으로 전자 메일에 의하거나, 또는 웹사이트로부터 내려받는 것과 같은 컴퓨터에 의하여 전자 전송 (electronic transmission)으로 이루어질 수 있다.

[0083] 범위: 이 명세서 전체에 걸쳐, 본 발명의 다양한 측면은 범위 형식으로 제시될 수 있다. 범위 형식의 설명은 단지 편의 및 간결함을 위한 것으로 이해되어야 하며, 발명의 범위에 대해 융통성 없는 제한으로 해석되어서는 안된다. 따라서, 범위의 설명은 구체적으로 개시된 모든 가능한 부분범위(subranges) 및 그 범위 내의 개개의 수치값을 가지는 것으로 간주되어야 한다. 예를 들어, 1 내지 6과 같은 범위의 설명은, 구체적으로 개시된 부분범위, 예를 들어 1 내지 3, 1 내지 4, 1 내지 5, 2 내지 4, 2 내지 6, 3 내지 6 등, 및 그 범위 내의 개개의 수, 예를 들어 1, 2, 2.7, 3, 4, 5, 5.3, 및 6을 가지는 것으로 간주되어야 한다. 이것은 범위의 폭과 상관없이 적용한다.

[0084] 설명

[0085] 본 발명은 일반적으로 피부색소침착 감소용 조성물 및 방법에 관한 것이다. 본 발명은 과도한 색소침착 또는 고르지 않은 색소침착의 예방 및/또는 치료에 사용된다. 특정 실시예에서, 본 발명은 과다색소침착을 예방 및/또는 치료한다. 과다색소침착은 기미, 염증 후 과다색소침착(PIH), 및 일광흑색점 (간반)을 포함하는 많은 원인들에서 발생할 수 있으나, 이에 한정되지 않는다.

[0086] 본 발명은 부분적으로 멜라닌 형성 및 멜라닌소체 이동에서 Neu5Ac(α2,6)Gal/GalNAc, 특히 Neu5Ac(α2,6)Gal/GalNAc-함유 올리고당의 역할의 발견에 기초한다. Neu5Ac(α2,6)Gal/GalNAc는 일부 막-결합 당접합체의 말단 서열인 시알산화(sialylated) 올리고당 서열이다. 본 명세서에 제시된 바와 같이, Neu5Ac(α2,6)Gal/GalNAc는 멜라닌형성세포의 수지상돌기 및 멜라닌형성세포로부터 각질형성세포로 멜라닌소체를 이동시키는 기능에서 발견된다. 따라서, 본 발명은 피부색소침착을 감소시키기 위해, Neu5Ac(α2,6)Gal/GalNAc 및 Neu5Ac(α2,6)Gal/GalNAc-함유 올리고당의 활성, 및/또는 Neu5Ac(α2,6)Gal/GalNAc 및 Neu5Ac(α2,6)Gal/GalNAc-함유 올리고당의 형성을 저해하는 것을 포함한다. Neu5Ac(α2,6)Gal/GalNAc 및 Neu5Ac(α2,6)Gal/GalNAc-함유 올리고당의 형성은 β-갈락토시드 α2,6'-시알산 전이효소 I (ST6Gal.I)의 활성에 의해 매개되고, 이로써 본 발명은 피부색소침착을 감소시키기 위해 ST6Gal.I의 활성을 저해하는 것을 포함한다.

[0087] 또한, ST3Gal 및 ST6Gal를 포함하여 시알산 전이효소의 발현의 저해가 피부색소침착을 감소시킨다는 것이 본 명세서에 기재된다. 따라서, 본 발명은 피부색소침착을 감소시키기 위해, 시알산 전이효소의 발현, 활성, 또는 둘 다를 저해하는 것을 포함한다.

[0088] 일 실시예에서, 본 발명은 피험자에서 피부색소침착을 감소시키기 위한 조성물을 제공하며, 상기 조성물은 올리고당 형성의 저해제를 포함한다. 일 실시예에서, 본 발명은 피험자에서 피부색소침착을 감소시키기 위한 조성물을 제공하며, 상기 조성물은 올리고당 활성의 저해제를 포함한다. 일 실시예에서, 상기 조성물은 글리코실화(glycosylated) 올리고당의 형성 및/또는 기능을 저해한다. 본 명세서에 기재된 바와 같이, 멜라닌형성세포 수지상돌기에서 관찰된 특정 올리고당은 멜라닌 생성 및 멜라닌소체 이동과 관련될 것으로 확인된다.

[0089] 일 실시예에서, 본 발명은 피험자에서 피부색소침착을 감소시키기 위한 조성물을 제공한다. 일 실시예에서, 상기 조성물은 시알산 전이효소 활성 저해제, Neu5Ac(α2,6)Gal/GalNAc-함유 올리고당의 활성 저해제, 또는 이의 조합을 포함한다.

[0090] 본 명세서에 기재된 바와 같이, Neu5Ac(α2,6)Gal/GalNAc는 특정 경우에 당접합체에서 발견되는 말단의 시알산화 올리고당 서열이다. 본 명세서에 기재된 바와 같이, Neu5Ac(α2,6)Gal/GalNAc 활성 저해제는 Neu5Ac(α2,6)Gal/GalNAc를 함유하는 올리고당, 당접합체, 당단백질, 막-결합 당단백질 등의 활성 저해제를 포함한다. 일 실시예에서, Neu5Ac(α2,6)Gal/GalNAc 활성 저해제는 직접적으로 Neu5Ac(α2,6)Gal/GalNAc 서열을 저해한다. 다른 실시예에서, Neu5Ac(α2,6)Gal/GalNAc 활성 저해제는 Neu5Ac(α2,6)Gal/GalNAc가 부착된 개체(entity)(예를 들어, 당접합체, 당단백질 등)를 저해한다.

[0091] 일 실시예에서, 상기 조성물은 시알산 전이효소 발현 저해제를 포함한다. 예를 들어, 일 실시예에서, 상기 조성

물은 세포에서 시알산 전이효소 발현의 발현 수준을 감소시키는 분리된 핵산 (예를 들어, siRNA, 리보자임, 안티센스 RNA 등)을 포함한다.

[0092] 일 실시예에서, 상기 조성물은 Neu5Ac(α2,6)Gal/GalNAc 발현 저해제를 포함한다. 예를 들어, 일 실시예에서, 상기 조성물은 세포에서 Neu5Ac(α2,6)Gal/GalNAc 발현의 발현 수준을 감소시키는 분리된 핵산 (예를 들어, siRNA, 리보자임, 안티센스 RNA 등)을 포함한다.

[0093] 일 실시예에서, 상기 조성물은 시알산 전이효소 활성 저해제를 포함한다. 예를 들어, 일 실시예에서, 상기 조성물은 시알산 전이효소의 활성을 감소시키는 핵산, 펩티드, 소분자, 길항제, 앱타머, 또는 펩티드 모방체를 포함한다. 일 실시예에서, 상기 조성물은 시알산 전이효소 저해제, 시티딘, 또는 이의 유사체를 포함한다.

[0094] 일 실시예에서, 상기 조성물은 Neu5Ac(α2,6)Gal/GalNAc의 활성 저해제를 포함한다. 예를 들어, 일 실시예에서, 상기 조성물은 Neu5Ac(α2,6)Gal/GalNAc의 활성을 감소시키는 핵산, 펩티드, 소분자, 길항제, 앱타머, 또는 펩티드 모방체를 포함한다. 일 실시예에서, 상기 조성물은 6'-시알릴락토오스 (6'-SL), 또는 이의 유사체를 포함한다. 일 실시예에서, 상기 조성물은 3'-시알릴락토오스 (3'-SL), 또는 이의 유사체를 포함한다.

[0095] 특정 실시예에서, 상기 조성물은 본 명세서에 기재된 저해제의 조합을 포함한다. 예를 들어, 일 실시예에서, 상기 조성물은 시티딘, 6'-SL, 및 3'-SL 중 적어도 2개의 조합을 포함한다. 일 실시예에서, 상기 조성물은 시알산 전이효소 및/또는 Neu5Ac(α2,6)Gal/GalNAc의 저해제를 포함하는 식물 추출물을 포함한다.

[0096] 일 실시예에서, 상기 조성물은 약학적으로 허용가능한 담체를 포함한다. 예를 들어, 특정 실시예에서, 상기 조성물은 본 명세서에 기재된 저해제의 전달을 위한 비히클을 포함한다. 일 실시예에서, 상기 약학적으로 허용가능한 담체는 피부학적으로 허용가능한 비히클을 포함한다.

[0097] 일 실시예에서, 본 발명은 과다색소침착의 예방 또는 치료 방법을 제공한다. 특정 실시예에서, 상기 방법은 기미, 염증 후 과다색소침착, 또는 일광흑색점 (간반)에 의해 야기된 과다색소침착을 예방 또는 치료한다. 일 실시예에서, 상기 방법은 시알산 전이효소 활성 저해제, Neu5Ac(α2,6)Gal/GalNAc 활성 저해제, 또는 이의 조합을 포함하는 조성물의 유효량을 피험자에게 투여하는 단계를 포함한다. 일 실시예에서, 상기 방법은 피험자의 멜라닌형성세포에 상기 조성물을 투여하는 단계를 포함한다.

[0098] 일 실시예에서, 본 발명은 피부색소침착의 감소 방법을 제공한다. 일 실시예에서, 상기 방법은 시알산 전이효소 활성 저해제, Neu5Ac(α2,6)Gal/GalNAc 활성 저해제, 또는 이의 조합을 포함하는 조성물의 유효량을 피험자에게 투여하는 단계를 포함한다. 특정 실시예에서, 상기 방법은 피험자의 멜라닌형성세포에 상기 조성물을 투여하는 단계를 포함한다.

[0099] 일 실시예에서, 본 발명은 멜라닌 생성을 저해하는 방법을 제공한다. 일 실시예에서, 상기 방법은 시알산 전이효소 활성 저해제, Neu5Ac(α2,6)Gal/GalNAc의 활성 저해제, 또는 이의 조합을 포함하는 조성물의 유효량을 피험자에게 투여하는 단계를 포함한다. 특정 실시예에서, 상기 방법은 피험자의 멜라닌형성세포에 상기 조성물을 투여하는 단계를 포함한다.

[0100] 일 실시예에서, 본 발명은 멜라닌형성세포로부터 각질형성세포로 멜라닌소체의 이동을 저해하는 방법을 제공한다. 일 실시예에서, 상기 방법은 시알산 전이효소 활성 저해제, Neu5Ac(α2,6)Gal/GalNAc의 활성 저해제, 또는 이의 조합을 포함하는 조성물의 유효량을 피험자에게 투여하는 단계를 포함한다. 특정 실시예에서, 상기 방법은 피험자의 멜라닌형성세포에 상기 조성물을 투여하는 단계를 포함한다.

[0101] 저해제

[0102] 일 실시예에서, 본 발명은 피험자에서 피부색소침착을 감소시키기 위한 조성물을 제공하며, 상기 조성물은 올리고당 형성의 저해제를 포함한다. 일 실시예에서, 본 발명은 피험자에서 피부색소침착을 감소시키기 위한 조성물을 제공하며, 상기 조성물은 올리고당 활성의 저해제를 포함한다. 일 실시예에서, 상기 조성물은 글리코실화 올리고당의 형성 및/또는 기능을 저해한다.

[0103] 일 실시예에서, 본 발명의 조성물은 시알산 전이효소 활성 저해제를 포함한다. 일 실시예에서, 시알산 전이효소 저해제는 β-갈락토시드 α2,3-시알산 전이효소 (ST3Gal) 군, β-갈락토시드 α2,6-시알산 전이효소 (ST6Gal) 군, GalNAc α2,6-시알산 전이효소 (ST6GalNAc) 군, 및 α2,8-시알산 전이효소 (ST8Sia) 군을 포함하는 시알산 전이효소 군 중 하나 이상에 대한 저해제이나, 이에 한정되지 않는다. 일 실시예에서, 상기 시알산 전이효소 저해제는 ST3Gal의 저해제이다. 일 실시예에서, 상기 시알산 전이효소 저해제는 ST6Gal의 저해제이다. 일 실시예에서, 상기 시알산 전이효소 저해제는 ST6Gal.I의 저해제이다. 일 실시예에서, 시알산 전이효소 활성 저해제는

Neu5Ac(α2,6)Gal/GalNAc 또는 Neu5Ac(α2,6)Gal/GalNAc-함유 접합체 (예를 들어, 올리고당, 당단백질 등)의 형성을 감소, 저해, 또는 예방하는 임의의 화합물, 분자, 또는 물질이다. 일 실시예에서, 시알산 전이효소 활성 저해제는 핵산, 펩티드, 소분자, siRNA, 리보자임, 안티센스, 길항제, 앱타머, 펩티드 모방체, 또는 임의의 이의 조합을 포함한다.

[0104] 일 실시예에서, 본 발명의 조성물은 Neu5Ac(α2,6)Gal/GalNAc의 저해제를 포함한다. Neu5Ac(α2,6)Gal/GalNAc 활성 저해제는 Neu5Ac(α2,6)Gal/GalNAc 또는 Neu5Ac(α2,6)Gal/GalNAc-함유 접합체 (예를 들어, 올리고당, 당단백질 등)의 기능을 감소, 저해, 또는 예방하는 임의의 화합물, 분자, 또는 물질이다. 일 실시예에서, Neu5Ac(α2,6)Gal/GalNAc의 저해제는 멜라닌 형성을 감소, 저해, 또는 예방하는 임의의 화합물, 분자, 또는 물질이다. 일 실시예에서, Neu5Ac(α2,6)Gal/GalNAc의 저해제는 멜라닌형성세포로부터 각질형성세포로 멜라닌소체의 이동을 감소, 저해, 또는 예방하는 임의의 화합물, 분자, 또는 물질이다. 일 실시예에서, Neu5Ac(α2,6)Gal/GalNAc 활성 저해제는 핵산, 펩티드, 소분자, siRNA, 리보자임, 안티센스, 길항제, 앱타머, 펩티드 모방체, 또는 임의의 이의 조합이다.

[0105] 소분자

[0106] 저해제가 소분자인 경우, 소분자는 당업자에게 알려진 표준 방법을 이용하여 얻어질 수 있다. 이러한 방법은 화학적 유기합성 또는 생물학적 방법을 포함한다. 생물학적 방법은 당해 기술분야에서 잘 알려진 방법을 이용하여, 생물학적 소스로부터의 정제, 재조합 합성 및 시험관 내(*in vitro*) 번역 시스템을 포함한다. 일 실시예에서, 본 발명의 소분자 저해제는 유기 분자, 무기 분자, 생체분자, 합성 분자 등을 포함한다.

[0107] 다양한 질환 및 질병의 치료에서 잠재적으로 유용한 분자적으로 다양한 화합물의 조합 라이브러리는 당해 기술분야에서 라이브러리를 만드는 방법으로 잘 알려져 있다. 상기 방법은 고체상 합성, 용해 방법, 단일 화합물의 병렬 합성, 화학 혼합물의 합성, 단단한 코어 구조, 유연한 선형 서열, 얽힘풀기 전략(deconvolution strategies), 태깅 기술, 및 선도물질 발굴(lead discovery)의 비편재된 분자 배경 (unbiased molecular landscapes) 대 선도물질 개발(lead development)의 편재된 구조의 발생을 포함하는 당업자에게 잘 알려진 다양한 기술을 사용할 수 있다.

[0108] 소분자 라이브러리 합성의 일반적인 방법에서, 활성화된 코어 분자는 많은 빌딩 블럭과 함께 응축되고, 이는 공유결합된 코어-빌딩 블럭 집합의 조합 라이브러리가 된다. 코어의 모양 및 강성은 모양 공간에서 빌딩 블럭의 방향을 결정한다. 상기 라이브러리는 특징지어진 생물학적 구조 ("집중 라이브러리(focused libraries)")를 표적하기 위해 코어, 결합, 또는 빌딩 블럭을 변경시켜 편재화시킬 수 있거나 또는 유연한 코어를 이용하여 덜 구조적인 편재(less structural bias)로 합성될 수 있다.

[0109] 인간에는 20종 이상의 시알산 전이효소가 있으며 (Harduin-Lepers et al., 2001, Biochimie 83:727-37), 많은 시알산 전이효소 저해제가 보고되어 왔다 (Lin et al., 2005, Biochem Biophys Res Commun, 331: 953-957; Izumi et al., 2005, J Org Chem, 70: 8817-8824; Chang et al., 2006, Chem Commun, 14: 629-931; Chang et al., 2006, Biochem Biophys Res Commun, 341: 614-619; Hsu et al., 2005, 96: 415-422; Kleineidam et al., 1997, Glycoconj J, 14: 57-66; Xia et al., 2006, J Org Chem, 71: 3696-3706; Lee et al., 2002, J Biol Chem, 277: 49341-49351; Gouyer et al., 2001, Front Biosci, 6: D1235-1244; Azuma et al., 2000, Glycoconj J, 17: 301-306; Delannoy et al., Glycoconj J. 1996, 13: 717-726; Kajihara et al., 1993, Carbohydr Res, 247: 179-193; Cambron and Leskawa, 1993, Biochem Biophys Res Commun, 193: 585-590; Kilton and Maca, 1977, J Natl Cancer Inst., 58: 1479-1481; Kijima-Suda et al., 1988, Cancer Res, 48: 3728-3732; Hindenburg et al., 1985, Cancer Res, 45: 3048-3052; Guette et al., 1983, Biochimie, 563-567; Shibuya et al., 1987, 262: 1596-1601; Wang et al., 2003, Bioorg Med Chem, 11: 4217-4224). 일 실시예에서, 상기 시알산 전이효소 저해제는 ST6Gal.I의 저해제이다. ST6Gal.I는 몇몇 N- 및 O-결합된 올리고당 및 당지질 (강글리오시드(gangliosides))의 Neu5Ac(α2,6)Gal/GalNAc 말단의 형성을 촉진한다. 전형적인 시알산 전이효소 저해제는 표 1에 열거된 저해제를 포함하나, 이에 한정되지 않는다. 일 실시예에서, 상기 조성물은 적어도 하나의 이러한 시알산 전이효소 저해제, 또는 본 명세서에 열거되지 않은 추가의 이러한 저해제를 포함한다 (표 1).

[0110] **[표 1]**

[0111] 시알산 전이효소 활성 저해제

Stachybotrydial	(Lin et al., 2005)
Cytidinyl-5-sialylethylphosphonate	(Izumi et al., 2005)
Lithocholic acid analogs	(Chang et al., 2006a)
Soyasaponin I	(Hsu et al, 2005; Chang et al., 2006b)
Cytidine	(Kleineidam et al., 1997)
2-thiocytidine	(Kleineidam et al., 1997)
5'-CDP	(Kleineidam et al., 1997)
5'-CMP	(Kleineidam et al., 1997)
5'-CTP	(Kleineidam et al., 1997)
fluorinated mucin core 2 branched oligosaccharides	(Xia et al., 2006)
Hexapeptide (NH(2)-GNWWWW)	(Lee et al., 2002)
GalNAcalpha-O-bn	(Guyer et al, 2001)
Etoposide	(Azuma et al., 2000)
acetyl-alpha-D-galactosaminide	(Delannoy et al., 1996)
6'-modified methyl N-acetyl-beta-lactosaminide (6'-Deoxy, 6'-thio, and 6'-O-tetrahydropyranosyl analogues of methyl N-acetyl-beta-lactosaminide) and disulfide dimmers thereof	(Kajihara et al, 1993)
UDP-dialdehyde	(Cambron and Leskawa, 1993)
CMP-dialdehyde	(Cambron and Leskawa, 1993)
UDP	(Cambron and Leskawa, 1993)
CMP	(Kilton et al, 1977; Cambron and Leskawa, 1993)
UDP-Gal	(Cambron and Leskawa, 1993)
UDP-GalNAc	(Cambron and Leskawa, 1993)
UMP	(Kilton et al, 1977)
AMP	(Kilton et al, 1977)
GMP	(Kilton et al, 1977)
5-fluoro-2',3'-isopropylidene-5'-O-(4-N-acetyl-2,4-dideoxy-3,6,7,8-tetra-O-acetyl-1-methoxycarbonyl-D-glycero-alpha-D-galactooctapyranosyl)uridine	(Kijima-Suda et al, 1988)
3-Deazauridine	(Hindenburg et al., 1985)
Acivicin	(Hindenburg et al., 1985)
1-beta-D-Arabinofuranosylcytosine	(Hindenburg et al., 1985)
Hydroxyurea	(Hindenburg et al., 1985)
bis-(p-nitrophenyl)phosphate	(Guette et al., 1983)
other	(Shibuya et al., 1987; Wang et al, 2003)

[0112]

[0113] 일 실시예에서, 상기 조성물은 시티딘을 포함한다. 본 명세서에서 별도로 기재된 바와 같이, 시티딘은 멜라닌형성을 감소시키고, 멜라닌형성세포로부터 각질형성세포로 멜라닌소체의 이동을 방지하는 것으로 확인된다. 따라서, 일 실시예에서, 본 발명의 조성물은 피부색소침착의 감소를 위해, 시티딘, 또는 이의 유사체를 포함한다. 시티딘 유사체의 예는 젬시타빈, 데옥시시티딘, 5-아자-2'-데옥시시티딘 (데시타빈 또는 5-아자-CdR), 1-β-D-아라비노퓨라노실시토신 (arabinofuranosylcytosine) (시타라빈 또는 ara-C), 슈도이소시티딘 (psi ICR); 5-플루오로-2'-데옥시시티딘 (FCdR), 5-아자-2'-데옥시-2',2'-디플루오로시티딘; 5-아자-2'-데옥시-2'-플루오로시티딘, 1-β-D-리보퓨라노실-2(1H)-피리미디논 (제불라린(Zebularine)), 2',3'-디데옥시-5-플루오로-3'-티아시티딘 (엠트리바 (Emtriva)), 2'-시클로시티딘 (안시타빈), 1-β-D-아라비노퓨라노실-5-아자시토신 (파자라빈 (Fazarabine) 또는 ara-AC), 6-아자시티딘 (6-아자-CR), 5,6-디히드로-5-아자시티딘 (dH-아자-CR), N^4-펜틸옥시카보닐-5'-데옥시-5-플루오로시티딘 (카페시타빈(Capecitabine)), N^4-옥타데실-시타라빈, 및 엘라이딘산 시타라빈(elaidic acid cytarabine)을 포함하나, 이에 한정되지 않는다.

[0114] 일 실시예에서, Neu5Ac(α2,6)Gal/GalNAc의 저해제는 올리고당 저해제를 포함한다. 이전 연구는 고도의 시알산화 당단백질인 글리코포린(glycophorin)의 EBL-매개 침전의 저해를 나타내는 많은 작은 올리고당을 보고하였고, EBL 렉틴이 Neu5Ac(α2,6)Gal/GalNAc 서열을 함유하는 올리고당의 강한 친화도를 나타낸다는 것을 추론하였다 (Shibuya et al, 1987, J Biol Chem, 262(4): 1596-1601). 이러한 저해제의 비-제한적인 예는 표 2에 나타내었다. 일 실시예에서, 본 발명의 조성물은 적어도 하나의 표 2에 열거된 저해제, 또는 이의 유사체, 또는 본 명세

서에 열거되지 않은 유사한 구조체를 포함한다.

[0115] **[표 2]**

[0116] Neu5Ac(α2,6)Gal/GalNAc의 올리고당 저해제

p-Nitrophenyl N-acetyl-β-D-galactosaminide	(Shibuya et al., 1987)
Neu5Ac(α2-6)Gal(β1-4)Glc	(Shibuya et al., 1987)
Neu5Ac(α2-6)Gal(β1-4)Glc-ol	(Shibuya et al., 1987)
Neu5Ac(α2-6)Gal(β1-4)GlcNAc(β1-3)Gal(β1-4)Glc	(Shibuya et al., 1987)
Neu5Ac(α2-3)Gal(β1-3)GlcNAc(β1-3)Gal(β1-4)Glc	(Shibuya et al., 1987)
Bovine fetuin triantennary carbohydrate chains	(Shibuya et al., 1987)
Porcine thyroglobulin biantennary carbohydrate chains	(Shibuya et al., 1987)

[0117]

[0118] 일 실시예에서, 상기 조성물은 6'-시알릴락토오스 (6'-SL) (Neu5Ac(α2,6)Gal(β1-4)Glc)를 포함한다. 일 실시예에서, 상기 조성물은 3'-시알릴락토오스 (3'-SL) (Neu5Ac(α2,3)Gal(β1-4)Glc)를 포함한다. 본 명세서에서 별도로 기재된 바와 같이, 6'-SL 및 3'-SL은 둘 다 멜라닌 형성을 감소시키고, 멜라닌형성세포로부터 각질형성세포로 멜라닌소체의 이동을 방지하는 것으로 확인되었다. 본 명세서에서 별도로 기재된 바와 같이, 3'-SL이 EBL/SMA에 의해 Neu5Ac(α2,6)Gal/GalNAc의 염색을 저해하지 않는 것으로 이미 확인되었던 것처럼, Neu5Ac(α2,6)Gal/GalNAc의 저해제로서 3'-SL의 발견은 특히 놀라웠다. 따라서, 일 실시예에서, 본 발명의 조성물은 피부 색소침착의 감소를 위해, 적어도 하나의 6'-SL, 또는 이의 유사체, 및 3'-SL, 또는 이의 유사체를 포함한다.

[0119] 일 실시예에서, 본 발명의 소분자 저해제는 적어도 하나의 표 1에 열거된 저해제, 또는 적어도 하나의 표 2에 열거된 저해제, 또는 시티딘, 시티딘 일인산 N-아세틸뉴라민산, 6'-시알릴갈락토오스, 6'-시알릴 N-아세틸갈락토사민, 6'-시알릴락토오스, 3'-시알릴락토오스, 또는 N-아실-뉴라미닐 중 적어도 하나를 포함한다. 일 실시예에서, 본 발명의 소분자 저해제는 본 명세서에 기재된 저해제의 유사체 또는 유도체를 포함한다.

[0120] 본 명세서에 기재된 소분자 및 소분자 화합물은 만일 염이 묘사되지 않을지라도 염으로서 존재할 수 있고, 본 발명이 본 명세서에 나타낸 저해제의 염 및 용매화물, 및 저해제의 비-염 및 비-용매화물 형태를 모두 포함하는 것으로 이해되고, 마찬가지로 당업자에 의해 잘 이해된다. 일 실시예에서, 본 발명의 저해제의 염은 약학적으로 허용가능한 염이다.

[0121] 본 명세서에 기재된 임의의 저해제의 토토머 형태(tautomeric form)가 존재할 수 있는 경우, 비록 단 하나 또는 일부의 토토머 형태가 명백하게 묘사될 수 있을 지라도, 각 및 모든 토토머 형태는 본 발명에서 포함되는 것이다. 예를 들어, 2-히드록시피리딜 부분이 묘사되는 경우, 상응하는 2-피리딘 토토머도 의미한다.

[0122] 또한, 본 발명은 기재된 저해제의 임의의 거울상이성질체(enantiomeric) 또는 부분입체이성질체(diasteriomeric) 형태를 포함하는, 임의의 또는 모든 입체화학 형태(stereochemical forms)를 포함한다. 본 명세서에서 구조 및 이름의 설명은 모든 가능한 묘사된 저해제의 입체이성질체를 포함하는 것이다. 또한, 모든 형태의 저해제, 예를 들어 결정성 또는 비-결정성 형태의 저해제는 본 발명에 의해 포함된다. 또한, 본 발명의 저해제를 포함하는 조성물은, 예를 들어 이의 특정한 입체화학 형태를 포함하는 실질적으로 순수한 저해제의 조성물, 또는 2 이상의 입체화학 형태를 포함하는 임의의 비율의 본 발명의 저해제의 혼합물, 예를 들어 라세믹 또는 비-라세믹 혼합물을 포함하는 조성물을 의미한다.

[0123] 일 실시예에서, 본 명세서에 기재된 소분자는 유도체화의 후보물질이다. 따라서, 특정한 경우에, 효능, 선택도, 및 용해도를 조절하는 본 명세서에 기재된 소분자의 유사체는 본 명세서에 포함되고, 신약 개발(drug discovery) 및 약물 개발 (drug development)에 유용한 선도 물질을 제공한다. 따라서, 특정한 경우에, 최적화 동안 약물 전달, 신진대사, 신규성, 및 안전성의 쟁점을 고려하여 새로운 유사체를 설계한다.

[0124] 어떤 경우에, 본 명세서에 기재된 소분자 저해제는 조합 화학 및 의약 화학 분야에서 잘 알려진 바와 같이 유도체화/유사체화 된다. 상기 유사체 또는 유도체는 다양한 위치에서 작용기를 첨가 및/또는 치환하여 제조될 수 있다. 따라서, 본 명세서에 기재된 소분자는 잘 알려진 화학 합성 방법을 이용하여 유도체/유사체로 변환될 수 있다. 예를 들어, 모든 수소 원자 또는 치환기는 선택적으로 새로운 유사체로 변형될 수 있다. 또한, 결합 원자 또는 기는 탄소 백본 또는 헤테로원자와 함께 긴 링커 또는 짧은 링커로 변형될 수 있다. 또한, 고리기는 고리 내 다른 수의 원자를 가지기 위해 및/또는 헤테로원자를 포함하기 위해 변형될 수 있다. 또한, 방향족은 시클릭 고리로 변환될 수 있고, 그 반대도 그럴 수 있다. 예를 들어, 상기 고리는 5-7 원자로부터일 수 있고, 동종고리 또는 이종고리일 수 있다.

[0125] 본 명세서에 사용된 바와 같이, 용어 "유사(analog)", "유사체(analogue)", 또는 "유도체(derivative)"는 하나 이상의 화학 반응에 의해 부모 화합물 또는 분자로부터 제조된 화합물 또는 분자를 나타내는 것을 의미한다. 따라서, 유사체는 본 명세서에 기재된 소분자 저해제의 구조와 유사한 구조를 갖는 구조체일 수 있거나, 또는 본 명세서에 기재된 소분자 저해제의 스캐폴드를 기준으로 할 수 있으나, 특정 성분 또는 구조적 구성에 대하여 이와 다르게, 신진대사적으로 유사한 작용 또는 반대 작용을 가질 수 있다. 본 발명에 따른 임의의 소분자 저해제의 유사체 또는 유도체는 피부색소침착을 감소시키는데 사용될 수 있다.

[0126] 일 실시예에서, 본 명세서에 기재된 소분자 저해제는 서로 독립적으로 수소 기를 다른 치환기로 변형시켜 독립적으로 유도체화/유사체화시킬 수 있다. 즉, 각 분자 위의 각 원자는 동일한 분자 위의 다른 원자에 대하여 독립적으로 변형시킬 수 있다. 유도체/유사체의 제조를 위해 임의의 종래의 변형이 사용될 수 있다. 예를 들어, 원자 및 치환기는 수소, 알킬, 지방족, 직쇄 지방족, 사슬 헤테로원자를 갖는 지방족, 분기형 지방족, 치환형 지방족, 고리형 지방족, 하나 이상의 헤테로원자를 갖는 헤테로고리형 지방족, 방향족, 헤테로방향족, 다중방향족, 폴리아미노산, 펩티드, 폴리펩티드, 이의 조합, 할로겐, 할로-치환된 지방족 등으로 독립적으로 구성될 수 있다. 또한, 화합물 위의 임의의 고리기는 고리 크기를 증가 및/또는 감소, 및 백본 원자를 탄소 원자 또는 헤테로원자로 변화시키기 위해 유도체화될 수 있다.

[0127] 핵산

[0128] 기타 관련된 측면에서, 본 발명은 저해제를 인코딩하는 분리된 핵산을 포함한다. 어떤 경우에, 상기 저해제는 시알산 전이효소 및/또는 Neu5Ac(α2,6)Gal/GalNAc를 저해하는 siRNA 또는 안티센스 분자이다. 일 실시예에서, 상기 핵산은 핵산이 바람직하게 핵산의 발현을 유도할 수 있도록 프로모터/조절 서열을 포함한다. 따라서, 본 발명은 세포에서 외인성 DNA의 동반하는 발현과 함께 세포로 외인성 DNA를 도입하기 위한 발현 벡터 및 방법을 포함하고, Sambrook 등 (2001, Molecular Cloning: A Laboratory Manual, Cold Spring Harbor Laboratory, New York), 및 Ausubel 등 (1997, Current Protocols in Molecular Biology, John Wiley & Sons, New York)에 기재된 것과 같으며, 본 명세서에서 별도로 기재된 바와 같다. 본 발명의 다른 측면에서, 시알산 전이효소 및/또는 Neu5Ac(α2,6)Gal/GalNAc는, 시알산 전이효소 및/또는 Neu5Ac(α2,6)Gal/GalNAc를 비활성화 및/또는 격리시킴으로써 저해될 수 있다. 따라서, 시알산 전이효소 및/또는 Neu5Ac(α2,6)Gal/GalNAc의 활성을 저해시키는 것은 교차우성 음성 돌연변이체를 이용하여 이루어질 수 있다.

[0129] 일 실시예에서, siRNA는 시알산 전이효소 단백질의 수준을 감소시키거나 또는 Neu5Ac(α2,6)Gal/GalNAc 서열을 함유하는 단백질의 수준을 감소시키는데 사용된다. RNA 간섭 (RNAi)은 다양한 유기체 및 세포 유형에 이중-가닥 RNA (dsRNA)의 도입이 상보적 mRNA의 분해를 야기하는 현상이다. 세포에서, 긴 dsRNAs는 다이서 (Dicer)로서 알려진 리보뉴클레아제에 의해 짧은 21-25 뉴클레오티드 작은 간섭 RNAs, 또는 siRNAs로 절단된다. 이어서 siRNAs는 과정에서 풀림인 RISC (RNA-induced silencing complex)로 단백질 성분을 모은다. 그 다음, 활성화된 RISC는 siRNA 안티센스 가닥 및 mRNA 사이의 염기쌍 상호작용에 의해 상보적 전사에 결합한다. 결합된 mRNA는 절단되고, mRNA의 서열 특이적 분해는 유전자 침묵을 야기한다. 참조, U.S. Patent No. 6,506,559; Fire et al., 1998, Nature 391(19):306-311; Timmons et al., 1998, Nature 395:854; Montgomery et al., 1998, TIG 14 (7):255-258; David R. Engelke, Ed., RNA Interference (RNAi) Nuts & Bolts of RNAi Technology, DNA Press, Eagleville, PA (2003); and Gregory J. Hannon, Ed., RNAi A Guide to Gene Silencing, Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, NY (2003). Soutschek 등 (2004, Nature 432:173-178)은 정맥내 전신 전달을 돕는 siRNAs의 화학적 변형을 기재한다. siRNAs의 최적화는 전체 G/C 함량, 말단 (Tm)에서 C/T 함량 및 3' 돌출부(overhang)의 뉴클레오티드 함량의 고려사항을 포함한다. 참조, Schwartz et al., 2003, Cell, 115:199-208 and Khvorova et al., 2003, Cell 115:209-216. 따라서, 본 발명은 RNAi 기술을 이용하여 시알산 전이효소 단백질 및/또는 Neu5Ac(α2,6)Gal/GalNAc-함유 단백질의 수준을 감소시키는 방법도 포함한다.

[0130] 다른 측면에서, 본 발명은 siRNA 또는 안티센스 폴리뉴클레오티드를 포함하는 벡터를 포함한다. 바람직하게는, 상기 siRNA 또는 안티센스 폴리뉴클레오티드는 표적 폴리펩티드의 발현을 감소시킬 수 있으며, 상기 표적 폴리펩티드는 시알산 전이효소 및 Neu5Ac(α2,6)Gal/GalNAc-함유 펩티드로 이루어진 군으로부터 선택된다. 벡터 및 벡터들 중 선택한 것에 원하는 폴리뉴클레오티드의 결합은 당해 기술분야에서 잘 알려져 있으며, 상기 Sambrook 등, 상기 Ausubel 등, 및 본 명세서에서 별도로 기재된 바와 같다.

[0131] 상기 siRNA 또는 안티센스 폴리뉴클레오티드는 본 명세서에서 별도로 기재된 바와 같이 많은 유형의 벡터에 복제될 수 있다. 상기 siRNA 또는 안티센스 폴리뉴클레오티드의 발현의 경우, 각 프로모터에서 적어도 하나의 모듈은 RNA 합성의 시작 부위의 위치로 작용한다.

[0132] 상기 siRNA 또는 안티센스 폴리뉴클레오티드의 발현을 평가하기 위하여, 세포에 도입될 발현 벡터는 바이러스 벡터를 이용하여 형질감염 또는 감염되려고 하는 세포 집단으로부터 발현 세포의 동정 및 선별을 용이하게 하기 위하여 선별가능한 마커 유전자 또는 리포터 유전자 또는 둘 다를 함유할 수도 있다. 다른 실시예에서, 상기 선별가능한 마커는 DNA의 별개의 조각에 대해 수행될 수 있고, 공-형질감염 방법에서 사용될 수 있다. 선별가능한 마커 및 리포터 유전자는 둘 다 숙주 세포에서 발현을 가능하게 하는 적당한 조절 서열과 함께 측면에 있을 수 있다. 유용한 선별가능한 마커는 당해 기술분야에서 알려져 있으며, 항생제-내성 유전자, 예를 들어 네오마이신 내성 등을 포함한다.

[0133] 따라서, 다른 측면에서, 본 발명은 본 발명의 뉴클레오티드 서열 또는 본 발명의 구조체를 포함하는 벡터에 관한 것이다. 벡터의 선택은 차후에 도입될 숙주 세포에 의존할 것이다. 특정 실시예에서, 본 발명의 벡터는 발현 벡터이다. 적당한 숙주 세포는 다양한 원핵 숙주 세포 및 진핵 숙주 세포를 포함한다. 특정 실시예에서, 상기 발현 벡터는 바이러스 벡터, 박테리아 벡터 및 포유류 세포 벡터로 이루어진 군으로부터 선택된다. 원핵생물-벡터 및/또는 진핵생물-벡터 기반 시스템은 본 발명의 폴리뉴클레오티드, 또는 이의 동족 폴리펩티드를 생성하기 위한 용도로 사용될 수 있다. 많은 이러한 시스템은 상업적으로 널리 이용가능하다.

[0134] 또한, 상기 발현 벡터는 바이러스 벡터의 형태로 세포에 제공될 수 있다. 바이러스 벡터 기술은 당해 기술분야에서 잘 알려져 있으며, Sambrook 등 (2001), 및 Ausubel 등 (1997), 및 다른 바이러스학 및 분자 생물학 매뉴얼에 기재된다. 벡터로서 유용한 바이러스는, 레트로바이러스, 아데노바이러스, 아데노-관련 바이러스, 헤르페스 바이러스, 및 렌티바이러스를 포함하나, 이에 한정되지 않는다. 일반적으로, 적당한 벡터는 적어도 하나의 유기체, 프로모터 서열, 편리한 제한 엔도뉴클레아제 부위, 및 하나 이상의 선별가능한 마커에서 기능적 복제 개시점을 함유한다 (참조, WO 01/96584; WO 01/29058; 및 U.S. Pat. No. 6,326,193).

[0135] 폴리뉴클레오티드의 삽입에 적당한 벡터는 원핵생물에서의 발현 벡터, 예를 들어 pUC18, pUC19, Bluescript 및 이의 유도체, mp18, mp19, pBR322, pMB9, ColE1, pCR1, RP4, 파지 및 pSA3 및 pAT28와 같은 "셔틀(shuttle)" 벡터; 효모에서의 발현 벡터, 예를 들어 2 마이크론 플라스미드, 통합 플라스미드, YEP 벡터, 동원체 플라스미드(centromere plasmids) 등의 유형의 벡터; 곤충 세포에서의 발현 벡터, 예를 들어 pAC 시리즈 및 pVL의 벡터; 식물에서의 발현 벡터, 예를 들어 pIBI, pEarleyGate, pAVA, pCAMBIA, pGSA, pGWB, pMDC, pMY, pORE 시리즈 등; 및 바이러스 벡터 (아데노바이러스, 아데노바이러스에 관련된 바이러스, 예를 들어 레트로바이러스 및, 특히 렌티바이러스), 및 비-바이러스 벡터, 예를 들어 pSilencer 4.1-CMV (Ambion), pcDNA3, pcDNA3.1/hyg, pHMCV/Zeo, pCR3.1, pEFI/His, pIND/GS, pRc/HCMV2, pSV40/Zeo2, pTRACER-HCMV, pUB6/V5-His, pVAX1, pZeoSV2, pCI, pSVL 및 PKSV-10, pBPV-1, pML2d 및 pTDT1을 기반으로 한 진핵 세포에서의 발현 벡터로부터 유도된 벡터이다.

[0136] 한 예로서, 핵산 서열이 도입되는 벡터는 이것이 세포에 도입될 때 숙주 세포의 게놈에서 통합되거나 또는 통합되지 않는 플라스미드일 수 있다. 한 예로서, 본 발명의 뉴클레오티드 서열 또는 본 발명의 유전자 구조체가 삽입될 수 있는 벡터의 비-제한적인 예는 진핵생물 세포에서 테트-온(tet-on) 유도성 발현 벡터를 포함한다.

[0137] 상기 벡터는 당업자에 의해 알려진 종래의 방법으로 얻어질 수 있다 (Sambrook et al., "Molecular cloning, a Laboratory Manual" 2nd ed., Cold Spring Harbor Laboratory Press, N.Y., 1989 Vol 1-3). 특정 실시예에서, 상기 벡터는 동물 세포를 변형하는데 유용한 벡터이다.

[0138] 일 실시예에서, 상기 재조합 발현 벡터는 본 명세서에서 별도로 기재된 바와 같이 본 발명의 펩티드 또는 펩티드 모방체 저해제를 인코딩하는 핵산 분자를 함유할 수도 있다.

[0139] 추가의 프로모터 요소, 즉, 인핸서는 전사 개시의 빈도를 조절한다. 일반적으로, 비록 많은 프로모터가 시작 부위의 하류에 기능적 요소를 함유하는 것으로 나타날지라도, 이들은 시작 부위의 상류 부분 30-110 bp에 위치한다. 종종 프로모터 요소 사이의 공간은, 요소가 서로에 대하여 뒤집거나 또는 이동할 때 프로모터 기능이 보존되도록 유연적이다. 티미딘 키나제 (tk) 프로모터에서, 프로모터 요소 사이의 공간은 활성이 감소하기 시작하기 전에 따로 50 bp로 증가될 수 있다. 프로모터에 따라, 개개의 요소는 전사를 활성화시키기 위해 협력하여 또는 독립적으로 작용할 수 있는 것으로 나타난다.

[0140] 프로모터는 코딩 부분 및/또는 엑손의 상류에 위치한 5' 비-코딩 서열을 분리하여 얻어질 수 있는 것처럼, 유전자 또는 폴리뉴클레오티드 서열과 자연적으로 관련된 것일 수 있다. 이러한 프로모터는 "내인성"이라고 할 수 있다. 유사하게, 인핸서는 그 서열의 하류 또는 상류에 위치한 폴리뉴클레오티드 서열과 자연적으로 관련된 것일 수 있다. 대안적으로, 특정 장점들은 이의 자연 환경에서의 폴리뉴클레오티드 서열과 일반적으로 관련되지

않는 프로모터를 나타내는 재조합 또는 이종 프로모터의 조절 하에, 코딩 폴리뉴클레오티드 부분을 위치결정하여 얻어질 것이다. 재조합 또는 이종 인핸서도 이의 자연 환경에서의 폴리뉴클레오티드 서열과 일반적으로 관련되지 않는 인핸서를 나타낸다. 이러한 프로모터 또는 인핸서는 다른 유전자의 프로모터 또는 인핸서; 임의의 다른 원핵 세포, 바이러스 세포 또는 진핵 세포로부터 분리된 프로모터 또는 인핸서; 및 "자연발생적인"이 아닌, 즉 다른 전사 조절 부분의 다른 요소들, 및/또는 발현을 변경하는 돌연변이들을 함유하는 프로모터 또는 인핸서를 포함할 수 있다. 프로모터 및 인핸서의 핵산 서열을 합성적으로 생성하는 것 이외에, 서열은 본 명세서에 기재된 조성물과 함께 PCR™을 포함하여 재조합 복제 및/또는 핵산 증폭 기술을 이용하여 생성될 수 있다 (U.S. Patent 4,683,202, U.S. Patent 5,928,906). 또한, 미토콘드리아, 엽록체 등과 같은 비-핵 세포소기관(non-nuclear organelles) 내에 서열의 직접 전사 및/또는 발현도 사용될 수 있는 조절 서열이 고려된다.

[0141] 자연스럽게, 발현을 위해 선택된 세포 유형, 세포소기관, 및 유기체에서 DNA 부분의 발현을 효과적으로 유도하는 프로모터 및/또는 인핸서를 사용하는 것이 중요할 것이다. 분자생물학 분야의 당업자는 단백질 발현을 위해 프로모터, 인핸서, 및 세포 유형의 조합의 사용 방법을 일반적으로 알고 있다, 참조 Sambrook 등 (2001). 사용된 프로모터는 도입된 DNA 부분의 높은 수준의 발현을 유도하기 위해 적당한 조건 하에서 항시성, 조직-특이적, 유도성, 및/또는 유용할 수 있으며, 예를 들어, 재조합 단백질 및/또는 펩티드의 대량 생산에서 유리하다. 상기 프로모터는 이종 또는 내인성일 수 있다.

[0142] 본 명세서에 제시된 실험예에서 예시된 프로모터 서열은 immediate early 시토메갈로바이러스(cytomegalovirus, CMV) 프로모터 서열이다. 이러한 프로모터 서열은 거기에 작동가능하게 결합된 임의의 폴리뉴클레오티드 서열의 발현의 높은 수준을 구동할 수 있는 강한 항시성 프로모터 서열이다. 그러나, 시미안 바이러스 40 (SV40) 초기 프로모터, 마우스 포유류 종양 바이러스(mouse mammary tumor virus, MMTV), 인간 면역결핍 바이러스(HIV) 긴 말단 반복(long terminal repeat, LTR) 프로모터, 원숭이 바이러스 프로모터, 조류 백혈병 바이러스 프로모터(avian leukemia virus promoter), 엡스타인-바 바이러스(Epstein-Barr virus) 즉시 초기 프로모터, 로우스 육종 바이러스 프로모터(Rous sarcoma virus promoter), 및 인간 유전자 프로모터, 예를 들어 액틴 프로모터, 미오신 프로모터, 헤모글로빈 프로모터, 및 근육 크레아틴 프로모터를 포함하나 이에 한정되지 않는 다른 항시성 프로모터 서열도 사용될 수 있으나, 이에 한정되지 않는다. 또한, 본 발명은 항시성 프로모터의 사용에 한정되지 않아야 한다. 유도성 프로모터도 본 발명의 일부로서 고려된다. 본 발명에서 유도성 프로모터의 사용은, 폴리뉴클레오티드 서열의 발현을 원하는 경우 작동가능하게 결합된 폴리뉴클레오티드 서열의 발현을 켤 수 있거나, 또는 이러한 발현을 원하지 않을 경우 발현을 끌 수 있는 분자 스위치를 제공한다. 유도성 프로모터의 예는 메탈로티오닌 프로모터, 글루코코르티코이드 프로모터, 프로게스테론 프로모터, 및 테트라사이클린 프로모터를 포함하나, 이에 한정되지 않는다. 또한, 본 발명은 프로모터가 원하는 조직 (예를 들어, 피부)에서만 활성적인, 조직-특이적 프로모터의 사용을 포함한다. 조직-특이적 프로모터는 당해 기술분야에서 잘 알려져 있으며, 케라틴 14 프로모터 및 파신(fascin) 프로모터 서열을 포함하나, 이에 한정되지 않는다.

[0143] 특정 실시예에서, 핵산의 발현은 외부적으로 조절된다. 더 특정한 실시예에서, 상기 발현은 독시사이클린 테트-온 시스템을 이용하여 외부적으로 조절된다.

[0144] 재조합 발현 벡터는 변형되거나 또는 형질감염된 숙주 세포의 선별을 용이하게 하는 선별가능한 마커 유전자도 함유할 수 있다. 적당한 선별가능한 마커 유전자는 특정 약물, β-갈락토시다제, 클로람페니콜 아세틸 전이효소(acetyltransferase), 반딧불이 루시퍼라제(firefly luciferase), 또는 면역글로불린 또는 이의 부분, 예를 들어 면역글로불린의 Fc 부분, 바람직하게는 IgG에 내성을 부여하는 G418 및 하이그로마이신(hygromycin)과 같은 단백질을 인코딩하는 유전자이다. 상기 선별가능한 마커는 관심 핵산으로부터 별도의 벡터에 도입될 수 있다.

[0145] 리포터 유전자는 잠재적으로 형질감염된 세포를 동정하고 조절 서열의 기능성을 평가하는데 사용된다. 쉽게 평가할 수 있는 단백질을 인코딩하는 리포터 유전자는 당해 기술분야에서 잘 알려져 있다. 일반적으로, 리포터 유전자는 수여자 유기체 또는 조직에서 존재하지 않거나 또는 발현되지 않고, 단백질의 발현이 일부 쉽게 검출가능한 특성, 예를 들어 효소 활성에 의해 나타나는 단백질을 인코딩하는 유전자이다. 리포터 유전자의 발현은 DNA가 수여자 세포에 도입된 후 적당한 시간에 분석된다.

[0146] 적당한 리포터 유전자는 루시퍼라제, β-갈락토시다제, 클로람페니콜 아세틸 전이효소, 분비된 알칼리성 포스파타제, 또는 녹색형광 단백질 유전자를 인코딩하는 유전자를 포함할 수 있다 (참조, Ui-Tei et al., 2000 FEBS Lett. 479:79-82). 적당한 발현 시스템은 잘 알려져 있으며, 잘 알려진 기술을 이용하여 제조될 수 있거나 또는 상업적으로 얻어질 수 있다. 내부 결실 구조체는 유일한(unique) 내부 제한 부위를 이용하여 또는 유일하지 않은(non-unique) 제한 부위의 부분 소화 (partial digestion)에 의해 생성될 수 있다. 그 다음, 구조체를 siRNA

폴리뉴클레오티드 및/또는 폴리펩티드 발현의 높은 수준을 표시하는 세포로 형질감염시킬 수 있다. 일반적으로, 리포터 유전자의 발현의 가장 높은 발현 수준을 나타내는 최소의 5' 측면 부분이 있는 구조체는 프로모터로서 동정된다. 이러한 프로모터 부분은 리포터 유전자에 결합될 수 있고, 프로모터-구동된 전사를 조절하는 능력의 물질을 평가하는데 사용될 수 있다.

[0147] 재조합 발현 벡터는 숙주 세포에 도입되어 재조합 세포를 생성할 수 있다. 상기 세포는 원핵 세포 또는 진핵 세포일 수 있다. 본 발명의 벡터는 진핵 세포, 예를 들어 효모 세포, 사카로마이세스 세레비지애(Saccharomyces cerevisiae), 또는 포유류 세포, 예를 들어 상피 신장 293 세포 또는 U2OS 세포; 또는 원핵 세포, 예를 들어 박테리아, 대장균(Escherichia coli) 또는 고초균 (Bacillus subtilis)을 변형시키는데 사용될 수 있다. 핵산은 종래의 기술, 예를 들어 인산칼슘 또는 염화칼슘 공-침전, DEAE-덱스트란-매개 형질감염, 리포펙틴, 전기천공법 또는 미세주입법(microinjection)을 이용하여 세포에 도입될 수 있다. 적당한 숙주 세포의 변형 및 형질감염 방법은 Sambrook 등 (Molecular Cloning: A Laboratory Manual, 2nd Edition, Cold Spring Harbor Laboratory press (1989)), 및 다른 실험 교재에서 확인될 수 있다.

[0148] siRNA 폴리뉴클레오티드의 생성 후에, 당업자는 siRNA 폴리뉴클레오티드가 치료제 화합물로서 siRNA를 개량하기 위해 변형될 수 있는 특정 특성을 가질 것이라고 이해할 것이다. 따라서, siRNA 폴리뉴클레오티드는 이것을 변형시켜 분해를 저항하는 것으로 더 설계되어, 포스포로티오에이트, 또는 기타 결합, 메틸포스포노에이트, 설폰, 설페이트, 케틸(ketyl), 포스포로디티오에이트, 포스포라미데이트, 포스페이트 에스터 등을 포함할 수 있다 (참조, Agrwal et al., 1987 Tetrahedron Lett. 28:3539-3542; Stec et al., 1985 Tetrahedron Lett. 26:2191-2194; Moody et al., 1989 Nucleic Acids Res. 12:4769-4782; Eckstein, 1989 Trends Biol. Sci. 14:97-100; Stein, In: Oligodeoxynucleotides. Antisense Inhibitors of Gene Expression, Cohen, ed., Macmillan Press, London, pp. 97-117 (1989)).

[0149] 임의의 폴리뉴클레오티드는 생체내(*in vivo*)에서 이의 안정성을 증가시키기 위해 더 변형될 수 있다. 가능한 변형은 5' 및/또는 3' 말단에서 측면 서열의 첨가; 백본에서 포스포디에스터 결합보다는 포스포로티오에이트 또는 2' O-메틸의 사용; 및/또는 이노신, 큐에오신(queosine), 및 와이부토신(wybutosine) 등과 같은 비전통적인 염기, 및 아데닌, 시티딘, 구아닌, 티민, 및 우리딘의 아세틸-, 메틸-, 티오- 및 다른 변형 형태의 함유를 포함하나, 이에 한정되지 않는다.

[0150] 본 발명의 일 실시예에서, 플라스미드 벡터에 의해 발현되는 안티센스 핵산 서열은 시알산 전이효소 및/또는 Neu5Ac(α2,6)Gal/GalNAc-함유 단백질 발현을 저해하는데 사용된다. 상기 안티센스 발현 벡터는 포유류 세포 또는 포유류 자체를 형질감염시키는데 사용되고, 이렇게 함으로써 시알산 전이효소 및/또는 Neu5Ac(α2,6)Gal/GalNAc-함유 단백질의 내인성 발현을 감소시킨다.

[0151] 유전자 발현을 저해시키기 위한 안티센스 분자 및 이의 용도는 당해 기술분야에서 잘 알려져 있다 (참조, Cohen, 1989, In: Oligodeoxyribonucleotides, Antisense Inhibitors of Gene Expression, CRC Press). 안티센스 핵산은, 용어가 본 명세서에서 별도로 정의된 바와 같이, 특정 mRNA 분자의 적어도 일부에 상보적인 DNA 또는 RNA 분자이다 (Weintraub, 1990, Scientific American 262:40). 세포에서, 안티센스 핵산은 이중-가닥 분자를 형성함으로써 유전자의 번역을 저해하는 것에, 상응하는 mRNA에 혼성화한다.

[0152] 유전자의 번역을 저해하기 위한 안티센스 방법의 사용은 당해 기술분야에서 알려져 있으며, Marcus-Sakura (1988, Anal. Biochem. 172:289)에 기재된다. 이러한 안티센스 분자는 Inoue (1993, U.S. Patent No. 5,190,931)에 의해 알려진 안티센스 분자를 인코딩하는 DNA를 이용하여 유전자 발현을 통해 세포에 제공될 수 있다.

[0153] 대안적으로, 본 발명의 안티센스 분자는 합성적으로 제조된 다음, 세포에 제공될 수 있다. 약 10 내지 약 30 사이의 안티센스 올리고머, 더 바람직하게는 약 15 뉴클레오티드는, 이들이 쉽게 합성되고 표적 세포에 도입되기 때문에, 바람직하다. 본 발명에 의해 고려된 합성 안티센스 분자는 변형되지 않은 올리고뉴클레오티드에 비해 개선된 생물학적 활성을 가지는 기술분야에서 알려진 올리고뉴클레오티드 유도체를 포함한다 (참조, U.S. Patent No. 5,023,243).

[0154] 안티센스 핵산의 합성 및 발현을 위한 조성물 및 방법은 본 명세서에서 별도로 기재된 바와 같다.

[0155] 유전자 발현을 저해시키기 위한 리보자임 및 이의 용도도 당해 기술분야에서 잘 알려져 있다 (참조, Cech et al., 1992, J. Biol. Chem. 267:17479-17482; Hampel et al., 1989, Biochemistry 28:4929-4933; Eckstein et al., International Publication No. WO 92/07065; Altman et al., U.S. Patent No. 5,168,053). 리보자임은

DNA 제한 엔도뉴클레아제와 유사한 방식으로 다른 단일-가닥 RNA를 특이적으로 절단하는 능력을 가진 RNA 분자이다. 이러한 RNAs를 인코딩하는 뉴클레오티드 서열의 변형을 통해, 분자는 RNA 분자에서 특정 뉴클레오티드 서열을 인식하고 이것을 절단하는 것으로 설계될 수 있다 (Cech, 1988, J. Amer. Med. Assn. 260:3030). 이러한 방법의 주요 장점은 리보자임이 서열-특이적이라는 사실이다.

[0156] 2개의 기본 유형의 리보자임, 즉, 테트라하이메나-유형 (Hasselhoff, 1988, Nature 334:585) 및 해머헤드-유형이 있다. 테트라하이메나-유형 리보자임은 길이가 4개의 염기인 서열을 인식하는 반면, 해머헤드-유형 리보자임은 길이가 11-18개의 염기인 염기 서열을 인식한다. 서열이 길어질수록, 서열이 표적 mRNA 종에서 독점적으로 발생할 가능성이 더 커진다. 결과적으로, 해머헤드-유형 리보자임은 특정 mRNA 종을 비활성화하기 위해 테트라하이메나-유형 리보자임보다 바람직하고, 18-염기 인식 서열은 다양한 관련 없는 mRNA 분자 내에서 무작위로 발생할 수 있는 더 짧은 인식 서열보다 바람직하다.

[0157] 본 발명의 일 실시예에서, 리보자임은 시알산 전이효소 및/또는 Neu5Ac(α2,6)Gal/GalNAc-함유 단백질 발현을 저해하는데 사용된다. 표적 분자의 발현을 저해하는데 유용한 리보자임은, 본 발명의 시알산 전이효소 및/또는 Neu5Ac(α2,6)Gal/GalNAc-함유 단백질의 mRNA 서열에 상보적인 기본적인 리보자임 구조에 표적 서열을 결합함으로써 설계될 수 있다. 시알산 전이효소 및/또는 이의 Neu5Ac(α2,6)Gal/GalNAc-함유 단백질을 표적하는 리보자임은, 시판되는 시약을 이용하여 합성될 수 있고 (Applied Biosystems, Inc., Foster City, CA) 또는 이들은 이들을 인코딩하는 DNA로부터 유전적으로 발현될 수 있다.

[0158] 폴리펩티드

[0159] 기타 관련된 측면에서, 본 발명은 시알산 전이효소 및/또는 Neu5Ac(α2,6)Gal/GalNAc의 활성을 저해하는 분리된 펩티드 저해제를 포함한다. 예를 들어, 일 실시예에서, 본 발명의 펩티드 저해제는 시알산 전이효소 및/또는 Neu5Ac(α2,6)Gal/GalNAc에 결합하여 시알산 전이효소 및/또는 Neu5Ac(α2,6)Gal/GalNAc의 정상적인 기능성 활성을 방지함으로써 직접 시알산 전이효소 및/또는 Neu5Ac(α2,6)Gal/GalNAc의 활성을 저해한다. 다른 실시예에서, 본 발명의 펩티드 저해제는 내인성 시알산 전이효소 및/또는 Neu5Ac(α2,6)Gal/GalNAc와 경쟁하여 시알산 전이효소 및/또는 Neu5Ac(α2,6)Gal/GalNAc의 활성을 저해한다. 또 다른 실시예에서, 본 발명의 펩티드 저해제는 교차우성 음성 돌연변이체로서 작용하여 시알산 전이효소 및/또는 Neu5Ac(α2,6)Gal/GalNAc의 활성을 저해한다.

[0160] 본 발명에 따른 폴리펩티드의 변이체는, (i) 하나 이상의 아미노산 잔기가 보존 또는 비-보존 아미노산 잔기 (바람직하게는 보존 아미노산 잔기)로 치환되고, 이러한 치환된 아미노산 잔기는 유전 암호에 의해 인코딩되는 것이거나 또는 인코딩되는 것이 아닐 수 있는 것, (ii) 하나 이상의 변형된 아미노산 잔기, 예를 들어 치환기의 결합에 의해 변형된 잔기가 있는 것, (iii) 상기 폴리펩티드가 본 발명의 폴리펩티드의 대안적인 스플라이스 변이체(alternative splice variant)인 것, (iv) 상기 폴리펩티드의 단편 및/또는 (v) 상기 폴리펩티드가 다른 폴리펩티드, 예를 들어 리더 서열(leader sequence) 또는 분비 서열(secretory sequence) 또는 정제 (예를 들어, His-태그) 또는 검출 (예를 들어, Sv5 에피토프 태그)에 사용되는 서열과 함께 융합되는 것일 수 있다. 상기 단편은 원래 서열의 단백질 가수분해 절단(proteolytic cleavage) (다중-부위 단백질 가수분해 포함)을 통해 생성된 폴리펩티드를 포함한다. 변이체는 번역 후(post-translationally) 변형되거나, 또는 화학적으로 변형될 수 있다. 이러한 변이체는 본 명세서에서 알려준 것으로부터 당업자의 범위 내에 있을 것으로 판단된다.

[0161] 당해 기술분야에서 알려진 바와 같이, 2개의 폴리펩티드 사이의 "유사성"은 두 번째 폴리펩티드의 서열에 하나의 폴리펩티드의 아미노산 서열 및 이의 보존 아미노산 대체제를 비교하여 결정된다. 변이체는 원래 서열과 다른, 바람직하게는 관심 부분(segment of interest) 당 40% 미만의 잔기에서 원래 서열과 다른, 더 바람직하게는 관심 부분 당 25% 미만의 잔기에서 원래 서열과 다른, 더욱 더 바람직하게는 관심 부분 당 10% 미만의 잔기에서 원래 서열과 다른, 가장 바람직하게는 관심 부분 당 아주 조금의 잔기에서 원래 단백질 서열과 다른, 및 원래 서열의 기능성 및/또는 유비퀴틴(ubiquitin) 또는 유비퀴틴화 단백질(ubiquitylated protein)의 결합력을 보존하기 위해 원래 서열에 대해 동시에 충분히 상동하는 폴리펩티드 서열을 포함하는 것으로 정의된다. 본 발명은 원래의 아미노산 서열과 적어도 60%, 65%, 70%, 72%, 74%, 76%, 78%, 80%, 90%, 또는 95% 유사 또는 동일한 아미노산 서열을 포함한다. 2개의 폴리펩티드 사이의 동일성 정도는 컴퓨터 알고리즘 및 당업자에게 널리 알려진 방법을 이용하여 결정된다. 2개의 아미노산 서열 사이의 동일성은 바람직하게는 BLASTP 알고리즘을 이용하여 결정된다 (BLAST Manual, Altschul, S., et al., NCBI NLM NIH Bethesda, Md. 20894, Altschul, S., et al., J. Mol. Biol. 215: 403-410 (1990)).

[0162] 본 발명의 폴리펩티드는 번역 후 변형될 수 있다. 예를 들어, 본 발명의 범위 내에 있는 번역 후 변형은 신호

펩티드 절단, 글리코실화(glycosylation), 아세틸화, 이소프레닐화(isoprenylation), 단백질 가수분해, 미리스토일화 (myristoylation), 단백질 접힘(protein folding) 및 단백질 가수분해 처리 (proteolytic processing) 등을 포함한다. 일부 변형 또는 처리 결과는 추가의 생물학적 기계의 도입을 필요로 한다. 예를 들어, 신호 펩티드 절단 및 코어 글리코실화와 같은 처리 결과는, 표준 번역 반응에 개의 미세소체 막(canine microsomal membranes) 또는 제노푸스 에그 추출물(Xenopus egg extracts) (U.S. Pat. No. 6,103,489)을 가하여 시험한다.

[0163] 본 발명의 폴리펩티드는 번역 후 변형에 의해 또는 번역 동안 비천연 아미노산(unnatural amino acids)을 도입하여 형성된 비천연 아미노산을 포함할 수 있다. 단백질 번역 동안 비천연 아미노산을 도입하기 위해, 다양한 방법을 이용할 수 있다. 한 예로서, 특정 tRNAs, 예를 들어 억제 특성을 갖는 tRNAs인 억제 tRNAs는, 위치-지정 비-천연형 아미노산 치환(site-directed non-native amino acid replacement, SNAAR) 과정에서 사용되었다. SNAAR에서, 유일한 코돈은 (WO90/05785에 기재된) 단백질 합성 동안 유일한 부위에 비-천연형 아미노산을 표적하는 것으로 작용하는, mRNA 및 억제 tRNA에서 필요하다. 그러나, 억제 tRNA는 단백질 번역 시스템에 존재하는 아미노아실 tRNA 합성효소에 의해 인식될 수 없어야 한다. 특정 경우에, 비-천연형 아미노산은 tRNA 분자가 천연형 아미노산을 특이적으로 변형시키는 화학 반응을 이용하여 아미노아실화되고 아미노아실화된 tRNA의 기능성 활성을 유의하게 변경시키지 않은 후에 형성될 수 있다. 이러한 반응을 아미노아실화 후 변형이라고 한다. 예를 들어, 이의 동족 tRNA에 결합된 리신 ($tRNA_{LYS}$)의 엡실론-아미노 기는, 아민 특이적 광친화 반응(photoaffinity label)으로 변형될 수 있었다.

[0164] 본 발명의 펩티드 저해제는 융합 단백질을 제조하기 위해, 단백질과 같은 다른 분자와 함께 결합될 수 있다. 이것은 결과의 융합 단백질이 펩티드 저해제의 기능성을 유지하도록 제공된 N-말단 또는 C-말단 융합 단백질의 합성에 의해 이루어질 수 있다.

[0165] 본 발명의 펩티드 또는 키메릭 단백질의 고리형 유도체도 본 발명의 일부이다. 고리화는 펩티드 또는 키메릭 단백질이 다른 분자와 관련하여 더 유리한 형태를 가지도록 허용할 수 있다. 고리화는 당해 기술분야에서 알려진 기술을 이용하여 이루어질 수 있다. 예를 들어, 이황화 결합(disulfide bonds)은 유리 설프히드릴 기(free sulfhydryl groups)를 갖는 2개의 적당히 공간이 있는 성분 사이에서 형성될 수 있으며, 또는 아미드 결합은 하나의 성분의 아미노 기와 다른 성분의 카복실 기 사이에서 형성될 수 있다. 또한, 고리화는 아조벤젠-함유 아미노산을 이용하여 이루어질 수 있으며, Ulysse, L., 등에 의해 기재된 바와 같다 (J. Am. Chem. Soc. 1995, 117, 8466-8467). 결합을 형성하는 성분들은 아미노산 성분, 비-아미노산 성분 또는 둘의 조합의 측쇄일 수 있다. 본 발명의 실시예에서, 고리형 펩티드는 오른쪽 위치로 베타-회전을 포함할 수 있다. 베타-회전은 오른쪽 위치에서 아미노산 Pro-Gly을 첨가하여 본 발명의 펩티드에 도입시킬 수 있다.

[0166] 상기 기재된 바와 같은 펩티드 결합을 함유하는 고리형 펩티드보다 더 유연한 고리형 펩티드를 생성하는 것이 바람직할 수 있다. 더 유연한 펩티드는 펩티드의 오른쪽 및 왼쪽 위치에서 시스테인을 도입하고 2개의 시스테인 사이에 이황화 다리를 형성함으로써 제조될 수 있다. 2개의 시스테인은 베타-시트 및 회전이 변형되지 않도록 배열된다. 상기 펩티드는 이황화 결합의 길이 및 베타-시트 부분에서 더 작은 수의 수소 결합의 결과로서 더 유연하다. 고리형 펩티드의 상대적인 유연성은 분자 동역학 시뮬레이션(molecular dynamics simulations)에 의해 결정될 수 있다.

[0167] (a) 태그(Tags)

[0168] 본 발명의 특정 실시예에서, 본 발명의 폴리펩티드는 태그의 아미노산 서열을 더 포함한다. 상기 태그는 폴리히스티딘 태그 (His-tags) (예를 들어, H6 및 H10 등) 또는 IMAC 시스템에서 사용하기 위한 다른 태그, 예를 들어, Ni^{2+} 친화도 컬럼 등, GST 융합체, MBP 융합체, 스트렙타비딘-태그, 박테리아 효소 BIRA의 BSP 비오티닐화(biotinylation) 표적 서열 및 항체에 의해 유도된 태그 에피토프 (예를 들어, 특히 c-myc 태그, FLAG-태그)를 포함하나, 이에 한정되지 않는다. 당업자에 의해 관찰될 것처럼, 상기 태그 펩티드는 본 발명의 융합 단백질의 정제, 검사 (inspection), 선별 및/또는 시각화에 사용될 수 있다. 본 발명의 특정 실시예에서, 상기 태그는 검출 태그 및/또는 정제 태그이다. 상기 태그 서열은 본 발명의 단백질의 융합에서 간섭되지 않을 것이라고 이해될 것이다.

[0169] (b) 리더 서열 및 분비 서열

[0170] 따라서, 본 발명의 폴리펩티드는 다른 폴리펩티드 또는 태그, 예를 들어 리더 서열 또는 분비 서열 또는 정제 또는 검출에 사용되는 서열에 융합될 수 있다. 특정 실시예에서, 본 발명의 폴리펩티드는 본 발명의 폴리펩티드의 빠른 높은-친화도 정제를 위하여 글루타치온-S-전이효소 단백질 태그를 포함한다. 실제로, 이러한 GST-융합

단백질은 이의 글루타치온에 대한 높은 친화도를 통해 세포로부터 정제될 수 있다. 아가로오스 비드는 글루타치온에 결합될 수 있고, 이러한 글루타치온-아가로오스 비드는 GST-단백질에 결합한다. 따라서, 본 발명의 특정 실시예에서, 본 발명의 폴리펩티드는 고체 지지체에 결합된다. 바람직한 실시예에서, 만일 본 발명의 폴리펩티드가 GST 부분을 포함하면, 상기 폴리펩티드는 글루타치온-변형된 지지체에 결합된다. 특정한 경우에, 글루타치온-변형된 지지체는 글루타치온-아가로오스 비드이다. 또한, 프로테아제 절단 부위를 인코딩하는 서열은 친화도 태그 및 폴리펩티드 서열 사이에서 포함될 수 있으며, 따라서 이러한 특정 효소와 함께 배양한 후 결합 태그를 제거함으로써 상응하는 관심 단백질의 정제를 용이하게 한다.

[0171] (c) 표적 서열

[0172] 또한, 본 발명은 바람직한 세포 성분 또는 세포 유형 또는 조직에 키메릭 펩티드를 유도할 수 있는 표적 도메인에 융합된, 본 명세서에 기재된 펩티드 저해제를 포함하는 키메릭 펩티드에 관한 것이다. 상기 키메릭 펩티드는 추가 아미노산 서열 또는 도메인도 함유할 수 있다. 상기 키메릭 펩티드는 다양한 성분이 다른 출처에서 온다는 점에서 재조합이고, 따라서 자연에서 함께 발견되지 않는다 (즉, 이종이다).

[0173] 상기 표적 도메인은 막 스패닝 도메인(membrane spanning domain), 막 결합 도메인, 또는 소포체(vesicles) 또는 핵과 관련된 펩티드를 유도하는 서열일 수 있다. 상기 표적 도메인은 특정 세포 유형 또는 조직에 펩티드 저해제를 표적할 수 있다. 예를 들어, 상기 표적 도메인은 세포 표면 리간드 또는 표적 조직 (예를 들어, 피부 또는 멜라닌형성세포)의 세포 표면 항원에 대한 항체일 수 있다. 표적 도메인은 세포 성분에 펩티드 저해제를 표적할 수 있다.

[0174] (d) 세포내 표적

[0175] 특정 제형으로 조합된 세포내 물질인, 이러한 펩티드는 효과적인 세포내 물질일 수 있다. 그러나, 이러한 펩티드의 효능을 증가시키기 위하여, 상기 펩티드 저해제는 "세포통과(transcytosis)", 예를 들어 상피세포에 의해 펩티드의 흡수를 촉진하는 두 번째 펩티드를 함유하는 융합 펩티드 또는 키메릭 펩티드로서 제공될 수 있다. 설명하기 위하여, 본 발명의 펩티드 저해제는 HIV 단백질 Tat의 N-말단 도메인의 모두 또는 단편, 예를 들어 세포 통과를 촉진할 수 있는 Tat의 잔기 1-72 또는 이의 더 작은 단편과 함께 융합 폴리펩티드의 일부로서 제공될 수 있다. 다른 실시예에서, 상기 펩티드 저해제는 안테노페디아(antenopedia) III 단백질의 모두 또는 일부와 함께 융합 폴리펩티드로 제공될 수 있다.

[0176] 또한, 상기 펩티드 저해제는 펩티드 저해제의 세포내 국소화 (intracellular localization)를 용이하게 하기 위하여, 세포막을 횡단하는 펩티드 저해제의 세포외 형태의 전좌(translocation)를 구동하는 이종 펩티드 서열("내재화 펩티드(internalizing peptide)")를 포함하는 키메릭 펩티드로서 제공될 수 있다. 이와 관련하여, 치료제 펩티드 저해제는 세포내로 활성적인 것이다. 상기 내재화 펩티드는, 저절로, 상대적으로 높은 속도로 세포 통과에 의해 세포막을 횡단할 수 있다. 상기 내재화 펩티드는 융합 단백질로서 상기 펩티드 저해제에 결합될 수 있다. 결과의 키메릭 펩티드는 단독의 활성제 폴리펩티드에 비해 더 높은 속도로 세포에 수송됨으로써, 이것이 적용되는 세포에 이의 도입을 향상시키는 방법을 제공한다.

[0177] 일 실시예에서, 상기 내재화 펩티드는 드로소필라 안테나페디아 단백질 (Drosophila antennapedia protein), 또는 이의 상동으로부터 유도된다. 유사-단백질(homeo-protein) 안테나페디아의 60 아미노산 길이의 유사도메인(homeodomain)은 생물학적 막을 통해 전좌하는 것으로 설명되었으며, 이것이 결합하는 것에 이종 폴리펩티드의 전좌를 용이하게 할 수 있다. 참조, Derossi et al. (1994) J Biol Chem 269:10444-10450; 및 Perez et al. (1992) J Cell Sci 102:717-722. 최근에, 이 단백질의 16 아미노산 길이 만큼 작은 단편이 내재화를 구동하기에 충분하다는 것을 설명하였다. 참조, Derossi et al. (1996) J Biol Chem 271:18188-18193.

[0178] 본 발명은 본 명세서에 기재된 펩티드 저해제, 및 통계적으로 유의한 양에 의해 상기 펩티드 저해제에 비해 키메릭 단백질의 막횡단 수송을 증가시키는데 충분한 안테나페디아 단백질 (또는 이의 상동)의 적어도 일부를 고려한다.

[0179] 내재화 펩티드의 다른 예는 HIV 교차활성제(transactivator, TAT) 단백질이다. 이 단백질은 4개의 도메인으로 나뉘는 것으로 나타난다 (Kuppuswamy et al. (1989) Nucl. Acids Res. 17:3551-3561). 정제된 TAT 단백질은 조직 배양에서 세포에 의해 흡수되고 (Frankel and Pabo, (1989) Cell, 55:1189-1193), 펩티드, 예를 들어 TAT의 잔기 37-62에 상응하는 단편은 시험관 내(*in vitro*)에서 세포에 의해 빠르게 흡수된다 (Green and Loewenstein, (1989) Cell 55:1179-1188). 고도의 염기성 부분은 핵의 내재화 부분의 내재화 및 표적을 매개한다 (Ruben et al., (1989) J. Virol. 63:1-8).

[0180] 다른 전형적인 세포횡단(transcellular) 폴리펩티드는 키메릭 단백질의 막횡단 수송을 증가시키기 위해 마스토파란(mastoparan)의 충분한 부분을 포함하는 것으로 생성될 수 있다 (T. Higashijima et al., (1990) J. Biol. Chem. 265:14176).

[0181] 임의의 특정 이론에 얽매이지 않고, 친수성 폴리펩티드가 수용체-매개 세포통과에 의해 막을 횡단할 수 있는 수송가능한 펩티드에 폴리펩티드를 연결 또는 결합하여 막 장애물을 횡단하여 생리적으로 수송될 수도 있다는 것을 알 수 있다. 이러한 유형의 적당한 내재화 펩티드는 히스톤, 인슐린, 트랜스페린, 염기성 알부민, 프로락틴 및 인슐린-유사 성장인자 I (IGF-I), 인슐린-유사 성장인자 II (IGF-II) 또는 기타 성장인자의 모두 또는 일부를 이용하여 생성될 수 있다. 예를 들어, 모세관 세포에 대해 인슐린 수용체의 친화도를 나타내고 혈당 감소에서 인슐린보다 덜 효과적인 인슐린 단편은, 수용체-매개 세포통과에 의해 막횡단 수송을 할 수 있으며, 따라서 대상 펩티드 저해제에 대해 내재화 펩티드로서 작용할 수 있다.

[0182] 다른 종류의 전좌/내재화 펩티드는 pH-의존성 막 결합을 나타낸다. 산성 pH에서 나선 형태(helical conformation)를 가지는 내재화 펩티드의 경우, 상기 내재화 펩티드는 양친매성의 특성을 얻는다, 즉 이것은 소수성 계면 및 친수성 계면 둘 다를 가진다. 더 상세하게는, 약 5.0-5.5의 pH 범위 내에, 내재화 펩티드는 표적 막에 상기 부분의 삽입을 용이하게 하는 알파-나선, 양친매성 구조를 형성한다. 알파-나선-유도하는 산성 pH 환경은 세포 엔도솜 내에 존재하는 낮은 pH 환경에서 발견될 수 있다. 이러한 내재화 펩티드는 엔도솜 구획으로부터 세포질까지, 식균작용 메커니즘(endocytic mechanism)에 의해 흡수된, 대상 펩티드 저해제의 수송을 용이하게 하는데 사용될 수 있다.

[0183] 바람직한 pH-의존성 막-결합 내재화 펩티드는 높은 퍼센트의 나선-형성 잔기, 예를 들어 글루타메이트, 메티오닌, 알라닌 및 류신을 포함한다. 또한, 바람직한 내재화 펩티드는 충분한 비충전(uncharged) 막-결합 도메인이 pH 5에서 펩티드 내에 존재하여 표적 세포막으로 삽입되도록, pH 5-7의 범위 내의 pKa's를 갖는 이온화 가능한 잔기를 포함한다.

[0184] 또 다른 바람직한 내재화 펩티드는 아포-지질단백질 A-1 및 B의 펩티드; 펩티드 독소, 예를 들어 멜리틴(melittin), 봄보리틴(bombolittin), 델타 헤모리신 (delta hemolysin) 및 파르닥신(pardaxins); 항생제 펩티드, 예를 들어 알라메티신 (alamethicin); 펩티드 호르몬, 예를 들어 칼시토닌(calcitonin), 코르티코트로핀 방출 인자(corticotrophin releasing factor), 베타 엔돌핀(beta endorphin), 글루카곤, 부갑상선 호르몬(parathyroid hormone), 췌장 폴리펩티드; 및 많이 분비된 단백질의 신호 서열에 상응하는 펩티드를 포함한다. 또한, 전형적인 내재화 펩티드는 산성 pH에서 내재화 펩티드의 알파-나선 특징을 향상시키는 치환기의 결합을 통해 변형될 수 있다.

[0185] 본 발명에서 사용하기에 적당한 또 다른 종류의 내재화 펩티드는, 생리적 pH에서 "숨겨진(hidden)" 소수성 도메인을 포함하나, 표적 세포 엔도솜의 낮은 pH 환경에서 노출된다. 소수성 도메인의 pH-유도 접힘 및 노출 시, 상기 부분은 지질 이중층에 결합하고 세포의 세포질로 공유결합된 폴리펩티드의 전좌를 가져온다. 이러한 내재화 펩티드는 서열이 슈도모나스 외독소 A(Pseudomonas exotoxin A), 클라트린(clathrin), 또는 디프테리아 독소(Diphtheria toxin)에서 확인된 후 형성될 수 있다.

[0186] 또한, 공극-형성 단백질 또는 펩티드는 본 명세서에서 내재화 펩티드로서 작용할 수 있다. 공극-형성 단백질 또는 펩티드는 C9 보체 단백질, 세포용해 (cytolytic) T-세포 분자 또는 NK-세포 분자로부터 얻어지거나 유도될 수 있다. 이러한 부분은 막에서 고리-유사 구조를 형성할 수 있으며, 이에 의해 막을 통해 결합된 폴리펩티드를 세포 내부로 수송할 수 있다.

[0187] 내재화 펩티드의 단순한 막 삽입(intercalation)은 세포막을 횡단하여 펩티드 저해제의 전좌를 충분히 할 수 있다. 그러나, 전좌는 세포내 효소의 기질 (즉, "액세서리 펩티드(accessory peptide)")인 내재화 펩티드에 결합하여 개선될 수 있다. 액세서리 펩티드는 세포막을 통해 세포질면(cytoplasmic face)으로 밀어내는 내재화 펩티드의 일부에 결합되는 것이 바람직하다. 상기 액세서리 펩티드는 전좌/내재화 부분 또는 고정(anchoring) 펩티드의 하나의 말단에 유리하게 결합될 수 있다. 본 발명의 액세서리 부분은 하나 이상의 아미노산 잔기를 함유할 수 있다. 일 실시예에서, 액세서리 부분은 세포의 인산화의 기질을 제공할 수 있다 (예를 들어, 상기 액세서리 펩티드는 티로신 잔기를 함유할 수 있다).

[0188] 상기 기재된 바와 같이, 내재화 및 액세서리 펩티드는 각각 독립적으로 화학적 가교에 의해 또는 융합 단백질의 형태로 펩티드 저해제에 첨가될 수 있다. 융합 단백질의 경우에, 비구조적(unstructured) 폴리펩티드 링커는 각각의 펩티드 부분 사이에 포함될 수 있다.

[0189] 일반적으로, 내재화 펩티드는 폴리펩티드를 직접 내보내는 것에 대해서도 충분할 것이다. 그러나, RGD 서열과 같은 액세서리 펩티드가 제공되는 경우, 이의 숙주 세포로부터 융합 단백질을 직접 내보내기 위해 분비 신호 서열을 포함하는 것이 필요할 수 있다. 바람직한 실시예에서, 상기 분비 신호 서열은 N-말단 끝에 위치하고, (임의로) 분비 신호와 융합 단백질의 나머지 사이의 단백질 가수분해 부위에 의해 측면에 위치한다.

[0190] 특정한 경우에, 상기 펩티드 저해제의 일부로서 핵 국소화 신호를 포함하는 것도 바람직할 수 있다.

[0191] 대상 펩티드 저해제를 포함하여 융합 폴리펩티드의 생성에서, 다양한 펩티드 도메인의 적당한 접힘을 확실하게 하기 위하여 비구조적 링커를 포함하는 것이 필요할 수 있다. $(Gly_3Ser)_4$ 링커를 포함하여, 많은 합성 링커 및 천연 링커가 당해 기술분야에서 알려져 있으며, 본 발명에서는 사용을 위해 변경될 수 있다.

[0192] (e) 펩티드 저해제 모방체

[0193] 다른 실시예에서, 대상 펩티드 저해제 치료제는 상기 펩티드 저해제의 펩티드 모방체이다. 펩티드 모방체는 펩티드 및 단백질을 기준으로 하거나, 또는 펩티드 및 단백질로부터 유도된 화합물이다. 본 발명의 펩티드 모방체는 일반적으로 비천연 아미노산, 형태적 구속(conformational restraints), 등전자 대체(isosteric replacement) 등을 이용하여 알려진 펩티드 저해제 서열의 구조적 변형에 의해 얻어질 수 있다. 대상 펩티드 모방체는 펩티드 및 베-펩티드 합성 구조체 사이의 구조적 공간의 연속체(continuum)를 구성한다; 따라서, 펩티드 모방체는 부모 펩티드 저해제의 활성을 갖는 비-펩티드성 화합물로 펩티드를 번역하는데 도움을 주고 약물작용 발생단(pharmacophore)을 설명하는데 유용할 수 있다.

[0194] 또한, 본 명세서에서 명백한 바와 같이, 대상 펩티드 저해제의 미메토프 (mimetopes)가 제공될 수 있다. 이러한 펩티드 모방체는 상기 펩티드 모방체의 세포내 국소화에 대해 비-가수분해성(non-hydrolyzable) (예를 들어, 프로테아제에 대한 안정성 또는 상응하는 펩티드를 분해하는 기타 생리적 조건의 증가), 특이성 및/또는 효능의 증가, 및 세포 투과도의 증가와 같은 특성을 가질 수 있다. 설명을 목적으로, 본 발명의 펩티드 유사체는, 벤조디아제핀 (참조, Freidinger et al. in Peptides: Chemistry and Biology, G. R. Marshall ed., ESCOM Publisher: Leiden, Netherlands, 1988), 치환된 감마 락탐 고리 (Garvey et al. in Peptides: Chemistry and Biology, G. R. Marshall ed., ESCOM Publisher: Leiden, Netherlands, 1988, p123), C-7 모방체 (Huffman et al. in Peptides: Chemistry and Biologyy, G. R. Marshall ed., ESCOM Publisher: Leiden, Netherlands, 1988, p. 105), 케토-메틸렌 슈도펩티드 (Ewenson et al. (1986) J Med Chem 29:295; and Ewenson et al. in Peptides: Structure and Function (Proceedings of the 9th American Peptide Symposium) Pierce Chemical Co. Rockland, Ill., 1985), β-회전 디펩티드 코어 (Nagai et al. (1985) Tetrahedron Lett 26:647; and Sato et al. (1986) J Chem Soc Perkin Trans 1:1231), β-아미노알콜 (Gordon et al. (1985) Biochem Biophys Res Commun 126:419; and Dann et al. (1986) Biochem Biophys Res Commun 134:71), 디아미노케톤 (Natarajan et al. (1984) Biochem Biophys Res Commun 124:141), 및 메틸렌아미노-변형 (Roark et al. in Peptides: Chemistry and Biology, G. R. Marshall ed., ESCOM Publisher: Leiden, Netherlands, 1988, p134)을 이용하여 생성될 수 있다. 또한, 일반적으로 하기 문헌을 참조한다 (Session III: Analytic and synthetic methods, in in Peptides: Chemistry and Biology, G. R. Marshall ed., ESCOM Publisher: Leiden, Netherlands, 1988).

[0195] 상기 펩티드 모방체를 생성하기 위해 수행될 수 있는 다양한 측쇄 치환 외에, 본 발명은 특히 펩티드 이차 구조의 구조적으로 구속된 모방체의 사용을 고려한다. 많은 대체제는 펩티드의 아미드 결합을 개발하였다. 종종 아미드 결합의 대체제로 개발된 것은 하기의 기를 포함한다: (i) 트랜스-올레핀, (ii) 플루오로알켄, (iii) 메틸렌아미노, (iv) 포스폰아미드(phosphonamides), 및 (v) 설폰아미드.

[0196] 또한, 미메토프의 다른 예는 단백질-기반 화합물, 탄수화물-기반 화합물, 지질-기반 화합물, 핵산-기반 화합물, 천연 유기 화합물, 합성으로 유도된 유기 화합물, 항-유전자형 항체(anti-idiotypic antibodies) 및/또는 촉매 항체, 또는 이의 단편들을 포함하나, 이에 한정되지 않는다. 미메토프는 상기 펩티드 저해제에 결합할 수 있는 화합물에 대해 천연 화합물 및 합성 화합물의 스크리닝 라이브러리에 의해 얻어질 수 있다. 또한, 미메토프는 천연 화합물 및 합성 화합물의 라이브러리, 특히, 화학 라이브러리 또는 조합 라이브러리 (즉, 서열 또는 크기는 다르나 동일한 빌딩 블럭을 가지는 화합물의 라이브러리)로부터 얻어질 수 있다. 또한, 미메토프는 합리적인 (rational) 약물 설계에 의해 얻어질 수 있다. 합리적인 약물 설계 방법에서, 본 발명의 화합물의 3차원 구조는 NMR(nuclear magnetic resonance) 또는 x-선 결정학으로 분석될 수 있다. 그 다음, 3차원 구조는 컴퓨터 모델링에 의해 잠재적인 미메토프의 구조를 예측하는데 사용될 수 있으며, 예측된 미메토프 구조는 화학 합성, 재조

합 DNA 기술, 또는 천연 공급원 (예를 들어, 식물, 동물, 박테리아 및 곰팡이)으로부터 미메토프를 분리하여 제조될 수 있다.

[0197] 본 발명의 펩티드 저해제, 또는 키메릭 단백질은 종래의 기술로 합성될 수 있다. 예를 들어, 상기 펩티드 저해제 또는 키메릭 단백질은 고체상 펩티드 합성을 이용하여 화학 합성으로 합성될 수 있다. 이러한 방법은 고체상 합성 방법 또는 용액상 합성 방법을 사용한다 (참조, J. M. Stewart, and J. D. Young, Solid Phase Peptide Synthesis, 2nd Ed., Pierce Chemical Co., Rockford Ill. (1984) and G. Barany and R. B. Merrifield, The Peptides: Analysis Synthesis, Biology editors E. Gross and J. Meienhofer Vol. 2 Academic Press, New York, 1980, pp. 3-254 for solid phase synthesis techniques; and M Bodansky, Principles of Peptide Synthesis, Springer-Verlag, Berlin 1984, and E. Gross and J. Meienhofer, Eds., The Peptides: Analysis, Synthesis, Biology, suprs, Vol 1, for classical solution synthesis.).

[0198] 다른 분자와 함께 결합된 본 발명의 펩티드 저해제, 또는 키메릭 단백질을 포함하는 N-말단 또는 C-말단 융합 단백질은, 재조합 기술, 상기 펩티드 저해제 또는 키메릭 단백질의 N-말단 또는 C-말단, 및 원하는 생물학적 기능을 갖는 선별된 단백질 또는 선별할 수 있는 마커의 서열을 통해, 융합함으로써 제조될 수 있다. 결과의 융합 단백질은 본 명세서에 기재된 선별된 단백질 또는 마커 단백질에 융합된 펩티드 저해제 또는 키메릭 단백질을 함유한다. 융합 단백질을 제조하는데 사용될 수 있는 단백질의 예는, 면역글로불린, 글루타치온-S-전이효소 (GST), 헤마글루티닌(hemagglutinin, HA), 및 끝이 잘린(truncated) myc를 포함한다.

[0199] 본 발명의 펩티드는 생물학적 발현 시스템을 이용하여 개발될 수 있다. 이러한 시스템의 사용은 랜덤 펩티드 서열의 큰 라이브러리의 생성 및 특정 단백질에 결합하는 펩티드 서열에 대해 이러한 라이브러리의 스크리닝을 허용한다. 라이브러리는 적당한 발현 벡터에 랜덤 펩티드 서열을 인코딩하는 합성 DNA를 복제하여 생성될 수 있다 (참조, Christian et al 1992, J. Mol. Biol. 227:711; Devlin et al, 1990 Science 249:404; Cwirla et al 1990, Proc. Natl. Acad, Sci. USA, 87:6378). 또한, 라이브러리는 중첩 펩티드의 동시 합성에 의해 구성될 수 있다 (참조, U.S. Pat. No. 4,708,871).

[0200] 본 발명의 펩티드 및 키메릭 단백질은, 염산, 황산, 브롬산, 인산 등과 같은 무기산; 또는 포름산, 아세트산, 프로피온산, 글리콜산, 젖산, 피루브산, 옥살산, 석신산, 말산, 주석산, 시트르산, 벤조산, 살리실산, 벤젠설폰산, 및 톨루엔설폰산과 같은 유기산과 반응시켜 약학적 염으로 변환시킬 수 있다.

[0201] 항체

[0202] 또한, 본 발명은 시알산 전이효소 및/또는 Neu5Ac(α2,6)Gal/GalNAc에 대해 특이적인 항체, 또는 항체 단편을 함유하는 시알산 전이효소 및/또는 Neu5Ac(α2,6)Gal/GalNAc의 저해제도 고려된다. 상기 항체는 온전한 단일클론 또는 다클론 항체, 및 면역학적으로 활성인 단편 (예를 들어, Fab 또는 $(Fab)_2$ 단편), 항체 중쇄, 항체 경쇄, 인간화 항체, 유전자 조작된 단일쇄 Fv 분자 (Ladner et al, U.S. Pat. No. 4,946,778), 또는 키메릭 항체, 예를 들어, 쥐 항체의 결합 특이성을 함유하나 남아있는 부분이 인간 기원인 항체일 수 있다. 단일클론 및 다클론 항체를 포함하는 항체, 단편 및 키메라는, 당업자에게 알려진 방법을 이용하여 제조될 수 있다.

[0203] 항체는 관심 면역 항원을 함유하는 온전한 폴리펩티드 또는 단편을 이용하여 제조될 수 있다. 동물을 면역시키는데 사용된 폴리펩티드 또는 올리고펩티드는 RNA의 번역으로부터 얻어지거나 또는 화학적으로 합성될 수 있으며, 만일 원한다면, 운반 단백질에 결합될 수 있다. 펩티드에 화학적으로 결합될 수 있는 적당한 운반체는, 소혈청알부민 및 티로글로불린(thyroglobulin), 키홀-림펫 헤모시아닌 (keyhole limpet hemocyanin)을 포함한다. 그 다음, 상기 결합된 폴리펩티드는 동물을 면역시키는데 사용될 수 있다 (예를 들어, 마우스, 랫트, 또는 토끼).

[0204] 저해제로서 사용하기 전에, 펩티드는 정제하여 오염 물질을 제거한다. 이와 관련하여, 상기 펩티드는 적당한 조절기관에 의해 규정된 기준을 충족시키기 위해 정제될 것으로 이해될 것이다. 많은 종래의 정제 방법들 중 어느 하나는, 알킬화 실리카 컬럼, 예를 들어 C_4-, C_8- 또는 C_{18}- 실리카를 이용한 역상 고압 액체 크로마토그래피 (HPLC)를 포함하여 필요한 수준의 순도에 도달하게 하는데 사용될 수 있다. 증가하는 유기 함량의 구배 (gradient) 이동상은 일반적으로 정제, 예를 들어 소량의 트리플루오로아세트산을 함유하는 수용성 완충액에서 아세토니트릴의 정제를 이루는데 사용된다. 또한, 이온-교환 크로마토그래피는 이의 전하를 기준으로 폴리펩티드를 분리하는데 사용될 수 있다. 또한, 친화도 크로마토그래피는 정제 방법에서 유용할 수 있다.

[0205] 항체 및 펩티드는 단백질 가수분해 저하에 대한 이의 내성의 개선 또는 용해도 특성의 최적화 또는 이들을 치료

제로서 더 적합하게 만들기 위해 통상의 분자생물학적 기술을 이용하여 변형될 수 있다. 이러한 폴리펩티드의 유사체는 자연발생적인 L-아미노산, 예를 들어, D-아미노산 또는 비-자연발생적인 합성 아미노산 외의 잔기를 함유하는 것을 포함한다. 본 발명에서 유용한 폴리펩티드는 이들의 적용에서 유용한 비-아미노산 부분에 더 결합될 수 있다. 특히, 펩티드의 안정성, 생물학적 반감기, 수용해도, 및 면역학적 특성을 개선하는 부분이 유용하다. 이러한 부분의 비-제한적인 예는 폴리에틸렌 글리콜(PEG)이다.

[0206] 조합

[0207] 일 실시예에서, 본 발명의 조성물은 본 명세서에 기재된 시알산 전이효소 및/또는 Neu5Ac(α2,6)Gal/GalNAc 저해제의 조합을 포함한다. 예를 들어, 일 실시예에서, 상기 조성물은 시알산 전이효소 저해제 및 Neu5Ac(α2,6)Gal/GalNAc 저해제를 포함한다. 특정 실시예에서, 본 명세서에 기재된 저해제의 조합을 포함하는 조성물은 부가효과(additive effect)를 가지며, 상기 조합의 전체 효과는 각 개개의 저해제의 효과의 합과 대략 동일하다. 다른 실시예에서, 본 명세서에 기재된 저해제의 조합을 포함하는 조성물은 상승효과(synergistic effect)를 가지며, 상기 조합의 전체 효과는 각 개개의 저해제의 효과의 합보다 크다.

[0208] 저해제의 조합을 포함하는 조성물은, 임의의 적당한 비율로 개개의 저해제를 포함한다. 예를 들어, 일 실시예에서, 상기 조성물은 1:1 비율의 2개의 저해제를 포함한다. 다른 실시예에서, 상기 조성물은 1:1:1 비율의 3개의 저해제를 포함한다. 그러나, 상기 조합은 임의의 특정 비율에 한정되지 않는다. 효과적인 것으로 보이는 어느 정도의 임의의 비율을 포함한다.

[0209] 일 실시예에서, 본 발명의 조성물은 시티딘 및 6'-SL을 포함한다. 다른 실시예에서, 본 발명의 조성물은 시티딘 및 3'-SL을 포함한다. 또 다른 실시예에서, 본 발명의 조성물은 6'-SL 및 3'-SL을 포함한다. 또 다른 실시예에서, 본 발명의 조성물은 시티딘, 6'-SL 및 3'-SL을 포함한다. 특정 실시예에서, 시티딘, 6'-SL 및 3'-SL 중 적어도 2개를 포함하는 조성물은 상승작용을 나타낸다.

[0210] 약학적 조성물

[0211] 본 명세서에 기재된 약학적 조성물의 제형은 약리학 분야에서 알려진 또는 향후 개발되는 임의의 방법에 의해 제조될 수 있다. 일반적으로, 이러한 제조 방법은 담체와 관련된 활성 성분 또는 하나 이상의 다른 부성분(accessory ingredients)을 제공하는 단계, 그 다음, 필요하거나 또는 원한다면, 생성물을 원하는 단회-용량 단위 또는 다회-용량 단위로 형성하거나 또는 포장하는 단계를 포함한다. 일 실시예에서, 상기 담체는 피부학적으로 허용가능한 비히클을 포함한다.

[0212] 전형적인 피부학적으로 허용가능한 비히클은 당해 기술분야에서 잘 알려져 있으며, 예를 들어, 물, 부틸렌 글리콜, 트리에탄올아민, 메틸파라벤, 글리세린, 이산화티탄, 폴리아크릴아미드, 가수분해된 호호바 에스터(hydrolyzed jojoba esters), 프로필렌 글리콜, 라우레스-7, 세테아릴 에틸헥사노에이트, 실리카, 글리세릴 스테아레이트, 베타인(betaine), 시클로펜타실옥산, 디메치콘, 시클로헥사실옥산, 암모늄 아크릴로일디메틸타우레이트(ammonium acryloyldimethyltaurate), 디메틸 이소소르비드(dimethyl isosorbide), PEG-8 디메치콘, 말토덱스트린, 잔탄검, 소듐 코코일 이세티오네이트(sodium cocoyl isethionate), 스테아르산, 세틸 알콜, 소듐메틸 코코일 타우레이트(sodiummethyl cocoyl taurate), 폴리소르베이트 60, 바이오사카라이드 검(biosaccharide gum), PPG-5-세테스(Ceteth)-20, C_{12}-C_{15} 알킬 벤조에이트, 산화 아연, 옥티녹세이트(octinoxate), 트리베헤닌(tribehenin), 오조케라이트(ozokerite), 시클로메치콘, 메치콘, 폴리글리세릴-4 이소스테아레이트, 또는 이의 조합을 포함할 수 있다 (미국특허출원 공개 번호 제 US2010/0260695호). 그러나, 본 발명의 피부학적으로 허용가능한 비히클은 임의의 특정 성분 또는 제형에 한정되지 않는다. 어느 정도, 상기 조성물은 당해 기술분야에서 알려진 또는 앞으로 발견되는 임의의 적당한 피부학적으로 허용가능한 비히클을 포함한다.

[0213] 비록 본 명세서에 제공된 약학적 조성물의 설명이 주로 인간에 대한 윤리적 투여에 적합한 약학적 조성물에 관한 것일지라도, 이러한 조성물이 일반적으로 모든 종류의 동물에 대한 투여에 적합한 것으로 당업자에 의해 이해될 것이다. 다양한 동물에 대한 투여에 적합한 조성물을 만들기 위하여, 인간에 대한 투여에 적합한 약학적 조성물의 변형은 잘 이해되고, 일반적인 수의 약리학자는, 만일 있다면, 단지 보통의 실험으로 이러한 변형을 설계하고 수행할 수 있다. 본 발명의 약학적 조성물의 투여 대상은 인간 및 다른 영장류, 즉 상업적으로 관련된 포유류, 예를 들어 비-인간 영장류인 소, 돼지, 말, 양, 고양이, 및 개를 포함하는 포유류를 포함하나 이에 한정되지 않는 것으로 고려된다.

[0214] 본 발명의 방법에서 유용한 약학적 조성물은 눈, 경구, 직장, 질, 비경구, 국소, 폐, 비강내, 구강, 또는 다른 투여 경로에 적합한 제형으로 제조, 포장, 또는 판매될 수 있다. 기타 고려된 제형은 예상된 나노입자, 리포좀

제제, 활성 성분을 함유하는 재밀봉된 적혈구(resealed erythrocytes), 및 면역학적-기반 제형을 포함한다.

[0215] 본 발명의 약학적 조성물은 단회 단위 용량으로, 또는 다수의 단회 단위 용량으로, 대량으로 제조, 포장, 또는 판매될 수 있다. 본 명세서에 사용된 바와 같이, "단위 용량"은 미리결정된 양의 활성 성분을 포함하는 약학적 조성물의 개별적인 양이다. 활성 성분의 양은 일반적으로 피험자에게 투여되는 활성 성분의 용량 또는 이러한 용량의 간편한 분수, 예를 들어, 이러한 용량의 반 또는 삼분의 일과 동일하다.

[0216] 본 발명의 약학적 조성물에서 활성 성분, 약학적으로 허용가능한 담체, 및 임의의 추가 성분의 상대적인 양은 치료받는 피험자의 신원, 크기 및 상태에 따라 달라질 것이며, 상기 조성물이 투여되는 경로에 따라 더 달라질 것이다. 한 예로서, 상기 조성물은 0.1% 및 100% (w/w) 사이의 활성 성분을 포함할 수 있다.

[0217] 활성 성분 이외에, 본 발명의 약학적 조성물은 하나 이상의 추가의 약학적 활성제를 더 포함할 수 있다. 섬유증(fibrosis)의 치료에 유용한 기타 활성제는 코르티코스테로이드 및 면역억제제를 포함하여, 항-염증제를 포함한다.

[0218] 본 발명의 약학적 조성물의 제어-방출 제형 또는 지속-방출 제형은 종래의 기술을 이용하여 제조될 수 있다.

[0219] 본 명세서에 사용된 바와 같이, 약학적 조성물의 "비경구 투여"는 피험자의 조직의 신체 상해(physical breaching)에 의해 특징지워진 임의의 투여 경로 및 조직의 구멍을 통한 상기 약학적 조성물의 투여 경로를 포함한다. 따라서, 비경구 투여는 상기 조성물의 주입, 절개 수술(surgical incision)을 통해 상기 조성물의 적용, 조직-침투 비-외과적 환부(tissue-penetrating non-surgical wound) 등을 통해 상기 조성물의 적용에 의한 약학적 조성물의 투여를 포함하나, 이에 한정되지 않는다. 특히, 비경구 투여는 안내(intraocular), 유리체강 내(intravitreal), 피하 (subcutaneous), 복강내, 근육내, 흉골내 주사(intrasternal injection), 종양내, 및 신장 투석 주입 기술(kidney dialytic infusion techniques)을 포함하나, 이에 한정되지 않는 것으로 고려된다.

[0220] 비경구 투여에 적합한 약학적 조성물의 제형은 약학적으로 허용가능한 담체, 예를 들어 멸균수 또는 멸균 등장성 식염수(sterile isotonic saline)와 혼합된 활성 성분을 포함한다. 이러한 제형은 일시 투여(bolus administration) 또는 연속 투여에 적합한 형태로 제조, 포장, 또는 판매될 수 있다. 주사가능한 제형은 방부제를 함유하는 앰풀(ampules) 또는 다회-용량 용기와 같은 단위 투여 형태로 제조, 포장, 또는 판매될 수 있다. 비경구 투여용 제형은 현탁액, 용액, 유성 또는 수성 비히클 내 에멀젼, 페이스트, 및 이식형 지속-방출(implantable sustained-release) 또는 생분해성 제형을 포함하나, 이에 한정되지 않는다. 이러한 제형은 현탁화제, 안정화제, 또는 분산제를 포함하는 하나 이상의 추가 성분을 더 포함할 수 있으나, 이에 한정되지 않는다. 비경구 투여용 제형의 일 실시예에서, 활성 성분은 재구성된 조성물의 비경구 투여 전에 적당한 비히클(예를 들어, 멸균 발열성물질 제거수(sterile pyrogen-free water))과 함께 재구성의 건조 형태 (즉, 분말 또는 과립)로 제공된다.

[0221] 상기 약학적 조성물은 멸균 주사가능한 수성 또는 유성 현탁액 또는 용액의 형태로 제조, 포장, 또는 판매될 수 있다. 이러한 현탁액 또는 용액은 알려진 기술에 따라 제형화될 수 있으며, 활성 성분 외에, 추가 성분, 예를 들어 본 명세서에 기재된 분산제, 습윤제, 또는 현탁화제를 포함할 수 있다. 이러한 멸균 주사가능한 제형은 비-독성 비경구적으로-허용가능한 희석제 또는 용매, 예를 들어 물 또는 1,3-부탄디올을 이용하여 제조될 수 있다. 기타 허용가능한 희석제 및 용매는 링거액, 등장성 식염수(isotonic sodium chloride solution), 및 합성 모노-글리세리드 또는 디-글리세리드와 같은 불휘발유(fixed oils)를 포함하나, 이에 한정되지 않는다. 유용한 기타 비경구-투여가능한 제형은 미세결정 형태의 활성 성분, 리포좀 제제의 활성 성분, 또는 생분해성 고분자 시스템의 성분으로서 포함하는 것을 포함한다. 지속 방출 또는 이식용 조성물은 약학적으로 허용가능한 고분자 물질 또는 소수성 물질, 예를 들어 에멀젼, 이온 교환 수지, 난용성 고분자, 또는 난용성 염을 포함할 수 있다.

[0222] 본 발명의 약학적 조성물은 구강을 통해 폐 투여에 적합한 제형으로 제조, 포장, 또는 판매될 수 있다. 이러한 제형은 활성 성분을 포함하고, 약 0.5 내지 약 7 나노미터, 바람직하게는 약 1 내지 약 6 나노미터 범위의 직경을 가지는 건조 입자를 포함할 수 있다. 이러한 조성물은 편리하게 추진제의 흐름(stream of propellant)이 분말을 분산시키는 것으로 유도될 수 있는 건조 분말 저장소를 포함하는 장치를 이용하거나, 또는 자동-추진 용매(self-propelling solvent)/분말-분산 용기, 예를 들어 밀봉된 용기에 있는 저-비등(low-boiling) 추진제에 용해되거나 또는 현탁된 활성 성분을 포함하는 장치를 이용하여, 투여하기 위한 건조 분말 형태이다. 바람직하게는, 이러한 분말은 적어도 98% 중량의 입자가 0.5 나노미터보다 큰 직경을 가지고, 적어도 95% 중량의 입자가 7

나노미터보다 작은 직경을 가지는 입자를 포함한다. 더 바람직하게는, 적어도 95% 중량의 입자가 1 나노미터보다 큰 직경을 가지고, 적어도 90% 중량의 입자가 6 나노미터보다 작은 직경을 가진다. 바람직하게는, 건조 분말 조성물은 당류와 같은 고체 미세 분말 희석제를 포함하고, 편리하게 단위 투여 형태로 제공된다.

[0223] 저-비등 추진제는 일반적으로 대기압에서 65° F 이하의 끓는점을 갖는 액체 추진제를 포함한다. 일반적으로, 상기 추진제는 조성물의 50 내지 99.9% (w/w)를 구성할 수 있고, 활성 성분은 조성물의 0.1 내지 20% (w/w)를 구성할 수 있다. 상기 추진제는 추가 성분, 예를 들어 (바람직하게는, 활성 성분을 포함하는 입자와 같은 입자 크기를 갖는) 액체 비-이온성 또는 고체 음이온성 계면활성제 또는 고체 희석제를 더 포함할 수 있다.

[0224] 비경구 투여에 적합한 약학적 조성물의 제형은 약학적으로 허용가능한 담체, 예를 들어 멸균수 또는 멸균 등장성 식염수와 혼합된 활성 성분을 포함한다. 이러한 제형은 일시 투여 또는 연속 투여에 적합한 형태로 제조, 포장, 또는 판매될 수 있다. 주사가능한 제형은 방부제를 함유하는 앰플 또는 다회-용량 용기와 같은 단위 투여 형태로 제조, 포장, 또는 판매될 수 있다. 비경구 투여용 제형은 현탁액, 용액, 유성 또는 수성 비히클 내 에멀젼, 페이스트, 및 이식형 지속-방출 또는 생분해성 제형을 포함하나, 이에 한정되지 않는다. 이러한 제형은 현탁화제, 안정화제, 또는 분산제를 포함하는 하나 이상의 추가 성분을 더 포함할 수 있으나, 이에 한정되지 않는다. 비경구 투여용 제형의 일 실시예에서, 활성 성분은 재구성된 조성물의 비경구 투여 전에 적당한 비히클 (예를 들어, 멸균 발열성물질 제거수)과 함께 재구성의 건조 형태 (즉, 분말 또는 과립)로 제공된다.

[0225] 상기 약학적 조성물은 멸균 주사가능한 수성 또는 유성 현탁액 또는 용액의 형태로 제조, 포장, 또는 판매될 수 있다. 이러한 현탁액 또는 용액은 알려진 기술에 따라 제형화될 수 있으며, 활성 성분 외에, 추가 성분, 예를 들어 본 명세서에 기재된 분산제, 습윤제, 또는 현탁화제를 포함할 수 있다. 이러한 멸균 주사가능한 제형은 비-독성 비경구적으로-허용가능한 희석제 또는 용매, 예를 들어 물 또는 1,3-부탄디올을 이용하여 제조될 수 있다. 기타 허용가능한 희석제 및 용매는 링거액, 등장성 식염수, 및 합성 모노-글리세리드 또는 디-글리세리드와 같은 불휘발유를 포함하나, 이에 한정되지 않는다. 유용한 기타 비경구-투여가능한 제형은 미세결정 형태의 활성 성분, 리포좀 제제의 활성 성분, 또는 생분해성 고분자 시스템의 성분으로서 포함하는 것을 포함한다. 지속 방출 또는 이식용 조성물은 약학적으로 허용가능한 고분자 물질 또는 소수성 물질, 예를 들어 에멀젼, 이온 교환 수지, 난용성 고분자, 또는 난용성 염을 포함할 수 있다.

[0226] 의약품의 국소 투여에 대한 장애물은 표피의 각질층이다. 상기 각질층은 단백질, 콜레스테롤, 스핑고지질, 유리 지방산 및 다양한 기타 지질로 구성된 고도 내성 층이고, 각화 세포(cornified cell) 및 살아있는 세포를 포함한다. 각질층을 통해 화합물의 침투 속도(flux)를 제한하는 인자들 중 하나는, 피부 표면에 적재 또는 적용될 수 있는 활성 물질의 양이다. 피부의 단위 면적 당 적용되는 활성 물질의 양이 많아질수록, 피부 표면과 피부의 아래층 사이의 농도 구배는 커지고, 결국 피부를 통한 활성 물질의 확산력(diffusion force)도 커진다. 따라서, 활성 물질의 큰 농도를 함유하는 제형은 더 적은 농도를 가진 제형보다, 오히려, 더 일정한 속도로, 피부를 통해 활성 물질의 침투를 야기할 가능성이 높으며, 모든 다른 것들은 동일하다.

[0227] 국소 투여에 적합한 제형은, 액체 또는 반-액체 제제, 예를 들어 도포제 (liniments), 로션; 수중유(oil-in-water) 에멀젼 또는 유중수(water-in-oil) 에멀젼, 예를 들어 크림, 연고 또는 페이스트; 및 용액 또는 현탁액을 포함하나, 이에 한정되지 않는다. 국소적으로 투여가능한 제형은, 비록 활성 성분의 농도가 용매 내 활성 성분의 용해 한도(solubility limit) 만큼 높을 수 있을지라도, 약 1% 내지 약 10% (w/w)의 활성 성분을 포함할 수 있다. 국소 투여용 제형은 본 명세서에 기재된 하나 이상의 추가 성분을 더 포함할 수 있다.

[0228] 투과 인핸서가 사용될 수 있다. 이러한 물질은 피부를 횡단하는 약물의 침투 속도를 증가시킨다. 당해 기술분야에서 일반적인 인핸서는 에탄올, 글리세롤 모노라우레이트, PGML (폴리에틸렌 글리콜 모노라우레이트 (polyethylene glycol monolaurate)), 디메틸설폭시드 등을 포함한다. 기타 인핸서는 올레산, 올레일 알콜, 에톡시디글리콜, 라우로카프람(laurocapram), 알칸카복실산, 디메틸설폭시드, 극성 지질(polar lipids), 또는 N-메틸-2-피롤리돈을 포함한다.

[0229] 본 발명의 조성물의 일부를 국소 전달하기 위한 하나의 허용가능한 비히클은 리포좀을 함유할 수 있다. 상기 리포좀의 조성물 및 이의 용도는 당해 기술분야에서 알려져 있다 (예를 들어, 참조 U.S. Patent No. 6,323,219).

[0230] 대안적인 실시예에서, 국소적으로 활성인 약학적 조성물은 임의로 기타 성분, 예를 들어 보조제, 항-산화제, 킬레이트제, 계면활성제, 기포제, 습윤제, 유화제, 점증제(viscosifiers), 완충제, 방부제 등과 혼합될 수 있다. 다른 실시예에서, 투과 인핸서 또는 침투 인핸서는 조성물 내에 포함되고, 투과 인핸서가 없는 조성물에 대하여 각질층으로 및 각질층을 통해 활성 성분의 경피 침투 (percutaneous penetration)를 개선시키는데 효과적이다.

올레산, 올레일 알콜, 에톡시디글리콜, 라우로카프람, 알칸카복실산, 디메틸설폭시드, 극성 지질, 또는 N-메틸-2-피롤리돈을 포함하는 다양한 투과 인핸서는 당업자에게 알려져 있다. 다른 측면에서, 상기 조성물은 각질층의 구조에서 장애를 증가시키도록 작용하는 굴수성 물질(hydrotropic agent)을 더 포함할 수 있고, 이로써 각질층을 횡단하여 수송을 증가시킨다. 다양한 굴수성 물질, 예를 들어 이소프로필 알콜, 프로필렌 글리콜, 또는 소듐 자일렌 설포네이트는 당업자에게 알려져 있다.

[0231] 국소적으로 활성인 약학적 조성물은 바람직한 변화에 영향을 미치기 위해 유효량으로 적용되어야 한다. 본 명세서에 사용된 바와 같이, "유효량"은 변화가 바람직한 경우, 피부 표면의 부분을 덮는데 충분한 양을 의미할 것이다. 활성 화합물은 조성물의 약 0.0001% 내지 약 15% 중량 부피의 양으로 존재하여야 한다. 더 바람직하게는, 조성물의 약 0.0005% 내지 약 5%의 양으로 존재하여야 한다; 가장 바람직하게는, 조성물의 약 0.001% 내지 약 1%의 양으로 존재하여야 한다. 이러한 화합물은 합성적으로 유도되거나 또는 자연적으로 유도될 수 있다.

[0232] 본 명세서에 사용된 바와 같이, "추가 성분"은 하나 이상의 하기의 것을 포함하나, 이에 한정되지 않는다: 부형제; 표면활성제; 분산제; 불활성 희석제; 과립화제 및 붕해제; 결합제; 윤활제; 감미제; 향미제; 착색제; 방부제; 젤라틴과 같은 생리적으로 분해가능한 조성물; 수성 비히클 및 용매; 유성 비히클 및 용매; 현탁화제; 분산제 또는 습윤제; 유화제; 완화제(demulcents); 완충제; 염; 증점제 (thickening agents); 충전제; 항산화제; 항생제; 항진균제; 안정화제; 및 약학적으로 허용가능한 고분자 물질 또는 소수성 물질. 본 발명의 약학적 조성물에 포함될 수 있는 기타 "추가 성분"은 당해 기술분야에서 알려져 있으며, Remington's Pharmaceutical Sciences (1985, Genaro, ed., Mack Publishing Co., Easton, PA)에 기재되어 있고, 참조로 본 명세서에 포함된다.

[0233] 저해 방법

[0234] 시알산 전이효소 및/또는 Neu5Ac(α2,6)Gal/GalNAc 활성은 당업자에게 알려진 임의의 방법을 이용하여 저해될 수 있다. 시알산 전이효소 및/또는 Neu5Ac(α2,6)Gal/GalNAc 활성을 저해하는 방법의 예는, 시알산 전이효소 및/또는 Neu5Ac(α2,6)Gal/GalNAc-함유 단백질을 인코딩하는 내인성 유전자의 발현을 저해하는 방법, 시알산 전이효소 및/또는 Neu5Ac(α2,6)Gal/GalNAc-함유 단백질을 인코딩하는 mRNA의 발현을 감소시키는 방법, 및 시알산 전이효소 및/또는 Neu5Ac(α2,6)Gal/GalNAc의 기능, 활성, 또는 안정성을 저해하는 방법을 포함하나, 이에 한정되지 않는다. 따라서, 시알산 전이효소 및/또는 Neu5Ac(α2,6)Gal/GalNAc 저해제는 시알산 전이효소 및/또는 Neu5Ac(α2,6)Gal/GalNAc-함유 단백질을 인코딩하는 유전자의 발현을 감소시키고, 시알산 전이효소 및/또는 Neu5Ac(α2,6)Gal/GalNAc-함유 단백질을 인코딩하는 mRNA의 반감기, 안정성, 또는 발현을 감소시키며, 또는 시알산 전이효소 및/또는 Neu5Ac(α2,6)Gal/GalNAc의 기능, 활성 또는 안정성을 저해하는 화합물일 수 있다. 시알산 전이효소 및/또는 Neu5Ac(α2,6)Gal/GalNAc는 펩티드, 핵산, 앱타머, 펩티드 모방체, 및 소분자, 또는 이의 조합을 포함하는 임의의 유형의 화합물일 수 있으나, 이에 한정되지 않는다.

[0235] 시알산 전이효소 및/또는 Neu5Ac(α2,6)Gal/GalNAc 저해는 직접적으로 또는 간접적으로 이루어질 수 있다. 예를 들어, 시알산 전이효소 및/또는 Neu5Ac(α2,6)Gal/GalNAc는 시알산 전이효소 및/또는 Neu5Ac(α2,6)Gal/GalNAc, 예를 들어 항체와 직접 상호작용하는 화합물 또는 조성물에 의해 직접적으로 저해될 수 있다. 대안적으로, 시알산 전이효소 및/또는 Neu5Ac(α2,6)Gal/GalNAc는 시알산 전이효소 및/또는 Neu5Ac(α2,6)Gal/GalNAc 하류 작동체(downstream effectors), 또는 시알산 전이효소 및/또는 Neu5Ac(α2,6)Gal/GalNAc 발현을 상향-조절하는 상류 조절자 (upstream regulators)를 저해하는 화합물 또는 조성물에 의해 간접적으로 저해될 수 있다.

[0236] 내인성 유전자의 발현을 감소시키는 방법은 유전자 발현의 특정 저해제를 제공하는 단계를 포함한다. mRNA 또는 단백질의 발현을 감소시키는 방법은 mRNA의 반감기 또는 안정성을 감소시키는 단계 또는 mRNA의 발현을 감소시키는 단계를 포함한다. 시알산 전이효소 및/또는 Neu5Ac(α2,6)Gal/GalNAc-함유 단백질의 발현을 감소시키는 방법은, siRNA, microRNA, 안티센스 핵산, 리보자임, 교차우성 음성 돌연변이체를 인코딩하는 발현 벡터, 펩티드, 소분자, 및 이의 조합을 사용하는 방법을 포함하나, 이에 한정되지 않는다.

[0237] 후보 저해제의 동정 및 시험을 위한 어세이

[0238] 시알산 전이효소 및/또는 Neu5Ac(α2,6)Gal/GalNAc 저해제는 세포에서 유전자 발현, mRNA 발현, 또는 단백질 활성, 기능 또는 안정성을 감소 또는 방해하려는 이의 능력에 대해 시험 화합물을 스크리닝하여 동정될 수 있다.

[0239] 시알산 전이효소 및/또는 Neu5Ac(α2,6)Gal/GalNAc의 발현은 단백질 수준 또는 핵산 수준에서 검출될 수 있다. 본 발명은 본 명세서에 열거된 단백질 또는 핵산 검출 방법 중 어느 하나의 방법으로 한정되지 않아야 하며, 당

해 기술분야에서 알려진 바와 같이 알려지거나 또는 지금까지 알려지지 않은 검출 방법을 모두 포함하여야 한다.

[0240] 일 실시예에서, 시료가 세포, 배양액, 또는 신체 시료일 수 있는 경우, 시알산 전이효소 및/또는 Neu5Ac(α2,6)Gal/GalNAc-함유 단백질에 특이적인 항체는 시료 내 단백질 발현을 검출하는데 사용된다. 상기 방법은 시료 내 시알산 전이효소 및/또는 Neu5Ac(α2,6)Gal/GalNAc-함유 단백질의 발현을 측정하기 위해, 시알산 전이효소 및/또는 Neu5Ac(α2,6)Gal/GalNAc-함유 단백질에 유도된 적어도 하나의 항체와 시료를 접촉시키는 단계를 포함한다. 단백질의 발현 수준은 농도 측정법 (densitometry)을 포함하여 당해 기술분야에서 잘 알려진 기술을 이용하여 정량화될 수 있으나, 이에 한정되지 않는다. 당업자는 하기의 본 명세서에 기재된 면역세포화학 방법이 수동으로 또는 자동화 방식으로 수행된다는 것을 인지할 것이다.

[0241] 항체 결합을 검출하는 기술은 당해 기술분야에서 잘 알려져 있다. 단백질에 결합하는 항체는 항체 결합 수준, 및 단백질 발현 수준에 상응하는 검출가능한 신호를 생성하는 화학 시약의 사용을 통해 검출될 수 있다. 본 발명의 바람직한 면역세포화학 방법 중 하나에서, 항체 결합은 표지 고분자에 결합된 이차 항체의 사용을 통해 검출된다. 표지 고분자의 예는 고분자-효소 접합체를 포함하나, 이에 한정되지 않는다. 이러한 복합체에서 효소는 일반적으로 항원-항체 결합 부위에서 발색제 (chromogen)의 침적(deposition)을 촉진시키는데 사용되며, 이렇게 함으로써 단백질 발현 수준에 상응하는 세포 염색을 야기한다. 특히 관심있는 효소는 호스래디시 퍼옥시다제 (horseradish peroxidase, HRP) 및 알칼리성 포스파타제(alkaline phosphatase, AP)를 포함한다. 상업용 항체 검출 시스템, 예를 들어 Dako Envision+ system (Dako North America, Inc., Carpinteria, CA) 및 Mach 3 system (Biocare Medical, Walnut Creek, CA)은, 본 발명을 실시하는데 사용될 수 있다.

[0242] 항체 결합의 검출은 검출가능한 물질에 항체를 결합함으로써 용이하게 될 수 있다. 검출가능한 물질의 예는 다양한 효소, 보결분자단(prosthetic groups), 형광 물질, 발광 물질, 생체발광 물질, 및 방사성 물질을 포함한다. 적당한 효소의 예는 호스래디시 퍼옥시다제, 알칼리성 포스파타제, β-갈락토시다제, 또는 아세틸콜린에스터라제를 포함한다; 적당한 보결분자단 복합체의 예는 스트렙타비딘/비오틴 및 아비딘/비오틴을 포함한다; 적당한 형광 물질의 예는 움벨리페론(umbelliferone), 플루오레세인(fluorescein), 플루오레세인 이소티오시아네이트, 로다민 (rhodamine), 디클로로트리아지닐아민 플루오레세인(dichlorotriazinylamine fluorescein), 염화단실(dansyl chloride) 또는 피코에리트린(phycoerythrin)을 포함한다; 발광 물질의 예는 루미놀(luminol)을 포함한다; 생체발광 물질의 예는 루시퍼라제, 루시페린(luciferin), 및 에쿼린(aequorin)을 포함한다; 적당한 방사성 물질의 예는 ^{125}I, ^{131}I, ^{35}S, 또는 ^{3}H을 포함한다.

[0243] 가장 간단하고 가장 직접적인 의미에서, 면역어세이는 결합 어세이 이다. 특히 바람직한 면역어세이는 당해 기술분야에서 알려진 다양한 유형의 효소결합면역흡착 분석법(enzyme linked immunosorbent assays, ELISA) 및 방사면역측정법 (radioimmunoassays, RIA)이다. 조직 절편을 이용한 면역조직화학 검출 (Immunohistochemical detection)도 특히 유용하다. 그러나, 검출은 이러한 기술에 한정되지 않고 웨스턴 블롯팅, 도트 블롯팅, FACS 분석 등도 사용될 수 있다는 것을 쉽게 이해할 것이다.

[0244] 하나의 전형적인 ELISA에서, 단백질에 결합하는 항체는 단백질 친화도를 나타내는 선별된 표면, 예를 들어 폴리스티렌 마이크로타이터 플레이트(microtiter plate) 내 웰에 고정된다. 그 다음, 시험 시료를 웰에 첨가한다. 비-특이적으로 결합된 면역복합체를 제거하기 위하여 결합 및 세척한 후, 결합된 항체를 검출할 수 있다. 검출은 일반적으로 검출가능한 표지에 결합된 단백질에 대해 특이적인 이차 항체의 첨가에 의해 이루어진다. 이러한 유형의 ELISA는 간단한 "샌드위치 ELISA"이다. 또한, 검출은 이차 항체를 첨가한 다음, 이차 항체의 결합 친화도를 갖는 삼차 항체를 첨가함으로써 이루어질 수 있으며, 상기 삼차 항체는 검출가능한 표지에 결합되어 있다.

[0245] 다른 전형적인 ELISA에서, 단백질 항원을 함유하는 것으로 추측되는 시료를 웰 표면에 고정시킨 다음, 본 발명의 항체와 접촉시킨다. 비-특이적으로 결합된 면역복합체를 제거하기 위하여 결합 및 세척한 후, 결합된 항체를 검출한다. 초기 항체가 검출가능한 표지에 결합되는 경우, 면역복합체는 직접 검출될 수 있다. 한번 더, 면역복합체는 일차 항체의 결합 친화도를 갖는 이차 항체를 이용하여 검출될 수 있으며, 상기 이차 항체는 검출가능한 표지에 결합되어 있다.

[0246] 단백질이 고정되어 있는 다른 ELISA는, 검출에서 경쟁 항체의 사용을 수반한다. 이러한 ELISA에서, 표지 항체는 단백질에 결합하도록 웰에 첨가되고, 이의 표지에 의하여 검출된다. 그 다음, 알려지지 않은 시료에서 마커 항원의 양은 코팅된 웰과 함께 배양 전에 또는 배양 동안 표지 항체와 시료를 혼합함으로써 결정된다. 시료에서 단백질 항원의 존재는 웰에 결합하는데 이용할 수 있는 항체의 양을 감소시키는 것으로 작용하고, 이로써 최종

신호를 감소시킨다.

[0247] 사용된 방식에 상관없이, ELISAs는 공통으로 비-특이적으로 결합된 종을 제거하기 위하여 코팅, 배양 또는 결합, 세척, 및 결합한 면역복합체의 검출과 같은 특정 특성을 가진다. 이들은 하기와 같이 기재된다.

[0248] 항원 또는 항체와 함께 플레이트의 코팅에서, 상기 플레이트의 웰은 밤새도록 또는 지정된 기간 동안, 항원 또는 항체의 용액과 함께 배양된다. 그 다음, 상기 플레이트의 웰은 불충분하게 흡착된 물질을 제거하기 위하여 세척된다. 그 다음, 임의의 남아있는 웰의 이용가능한 표면은 시험 항혈청에 대해서 항원과 관련하여 중성인 비특이적 단백질과 함께 "코팅된다". 이들은 소혈청알부민 (BSA), 카제인 및 분유 용액을 포함한다. 고정 표면에 비특이적 흡착 부위의 코팅은, 표면에 항혈청의 비특이적 결합에 의해 야기된 배경을 감소시킨다.

[0249] ELISAs에서, 직접 방법보다는 이차 또는 삼차 검출 방법을 사용하는 것이 더 관행일 것 같다. 따라서, 웰에 단백질 또는 항체의 결합, 배경을 감소시키기 위해 비-반응성 물질과 함께 코팅, 및 결합되지 않은 물질을 제거하기 위해 세척한 후, 고정 표면을 면역복합체 (항원/항체) 형성에 효과적인 조건 하에 시험되는 생물학적 시료 및/또는 대조 시료와 접촉시킨다. 그 다음, 면역복합체의 검출은 표지 이차 결합 리간드 또는 항체, 또는 표지 삼차 항체 또는 삼차 결합 리간드와 함께 이차 결합 리간드 또는 항체를 필요로 한다.

[0250] "면역복합체 (항원/항체) 형성에 효과적인 조건 하에"는 상기 조건이 항원 및 항체를 용액, 예를 들어 BSA, 소 감마 글로불린(bovine gamma globulin, BGG) 및 인산염 완충 식염수(phosphate buffered saline, PBS)/Tween으로 희석시키는 단계를 포함하는 것이 바람직하나 이에 한정되지 않는다는 것을 의미한다. 또한, 이러한 첨가된 물질들은 비특이적 배경의 감소에 도움이 되는 경향이 있다.

[0251] 또한, "적당한" 조건은 배양이 효과적인 결합을 허용하는데 충분한 온도 및 기간을 의미한다. 배양 단계는 일반적으로 약 1 내지 2에서 4시간, 바람직하게는 25℃ 내지 27℃의 온도에 따라 수행할 수 있고, 또는 약 4℃에서 밤새도록 수행할 수 있다.

[0252] ELISA에서 모든 배양 단계 후에, 비-복합체 물질을 제거하기 위하여 접촉된 표면을 세척한다. 바람직한 세척 방법은 PBS/Tween, 또는 붕산염 완충액과 같은 용액으로 세척하는 단계를 포함한다. 시험 시료와 원래 결합된 물질 사이에 특정 면역복합체를 형성한 후에, 세척하고, 면역복합체의 훨씬 적은 양의 발생이 결정될 수 있다.

[0253] 검출 방법을 제공하기 위하여, 이차 항체 또는 삼차 항체는 검출하기 위해 관련된 표지를 가질 것이다. 바람직하게는, 이 표지는 적당한 발색기질 (chromogenic substrate) 또는 다른 기질과 함께 배양하자마자 색 또는 다른 검출가능한 신호를 생성하는 효소이다. 따라서, 일차 또는 이차 면역복합체는 추가 면역복합체 형성의 개발을 유리하게 하는 기간 및 조건 하에 (예를 들어, PBS-Tween과 같은 PBS-함유 용액에서 실온에서 2시간 동안 배양), 우레아제, 글루코오스 옥시다제, 알칼리성 포스파타제 또는 하이드로겐 퍼옥시다제(hydrogen peroxidase)-결합된 항체와 함께 검출될 수 있다.

[0254] 표지 항체와 함께 배양한 후, 결합되지 않은 물질을 제거하기 위해 세척하고, 효소 표지로서 퍼옥시다제의 경우, 표지의 양은 발색기질, 예를 들어 우레아 및 브로모크레졸 퍼플(bromocresol purple) 또는 2,2'-아지도-디-(3-에틸-벤즈티아졸린-6-설폰산 [ABTS] 및 H_2O_2와 함께 배양하여 정량화된다. 그 다음, 정량화는 가시광선 스펙트럼 분광광도계를 이용하여 색상 정도를 측정하여 이루어진다.

[0255] 다른 실시예에서, 시알산 전이효소 및/또는 Neu5Ac(α2,6)Gal/GalNAc-함유 단백질의 발현은 핵산 수준에서 검출된다. 발현을 평가하기 위한 핵산-기반 기술은 당해 기술분야에서 잘 알려져 있으며, 신체 시료에서 mRNA의 수준을 결정하는 단계를 포함한다. 많은 발현 검출 방법은 분리된 RNA를 사용한다. mRNA의 분리에 대해 선별하지 않은 임의의 RNA 분리 기술은 신체 시료의 RNA의 정제를 이용할 수 있다 (참조, Ausubel, ed., 1999, Current Protocols in Molecular Biology (John Wiley & Sons, New York)). 또한, 많은 수의 조직 시료는 당업자에게 잘 알려진 기술, 예를 들어 Chomczynski의 한-단계 RNA 분리 방법을 이용하여 즉시 처리될 수 있다 (Chomczynski, 1989, U.S. Pat. No. 4,843,155).

[0256] 용어 "프로브"는 특이적으로 의도된 표적 생체분자, 예를 들어, 뉴클레오티드 전사체 또는 단백질에 선별적으로 결합할 수 있는 임의의 분자를 나타낸다. 프로브는 당업자에 의해 합성될 수 있거나, 또는 적당한 생물학적 제제로부터 유도될 수 있다. 프로브는 검출가능한 표지로 표지되도록 특이적으로 설계될 수 있다. 프로브로서 사용될 수 있는 분자의 예는, RNA, DNA, 단백질, 항체, 및 유기분자를 포함하나, 이에 한정되지 않는다.

[0257] 분리된 mRNA는 서던 또는 노던 분석, 중합효소연쇄반응 분석 및 프로브 어레이를 포함하는 혼성화 또는 증폭 어세이에서 검출될 수 있으나, 이에 한정되지 않는다. mRNA 수준을 검출하기 위한 하나의 방법은, 검출되는 유전

자에 의해 인코딩되는 mRNA에 혼성화할 수 있는 핵산 분자 (프로브)와 분리된 mRNA를 접촉시키는 단계를 포함한다. 상기 핵산 프로브는 전장(full-length) cDNA, 또는 이의 일부, 예를 들어 길이가 적어도 7, 15, 30, 50, 100, 250 또는 500 뉴클레오티드의 올리고뉴클레오티드일 수 있으며, 가혹한 조건 하에 시알산 전이효소 및/또는 Neu5Ac(α2,6)Gal/GalNAc-함유 단백질을 인코딩하는 mRNA 또는 게놈 DNA에 특이적으로 혼성화하기에 충분할 수 있다. mRNA와 프로브의 혼성화는 당해 표적이 발현되는 것을 나타낸다.

[0258] 일 실시예에서, 아가로오스 겔에 분리된 mRNA를 실행시킨 다음 겔에서 니트로셀룰로오스 막으로 mRNA를 이동시킴으로써, mRNA를 고체 표면에 고정시키고 프로브와 접촉시킨다. 대안적인 실시예에서, 프로브는 고체 표면에 고정되고, mRNA는 Affymetrix 유전자 칩 어레이 (Santa Clara, CA)에서 프로브와 접촉된다. 당업자는 시알산 전이효소 및/또는 Neu5Ac(α2,6)Gal/GalNAc-함유 단백질을 인코딩하는 mRNA 수준을 검출하는데 사용하기 위해 알려진 mRNA 검출 방법을 즉시 적응시킬 수 있다.

[0259] 시료에서 표적 mRNA의 수준을 결정하는 대안적인 방법은, RT-PCR (Mullis, 1987, U.S. Pat. No. 4,683,202에 설명된 실험예), 리가제 연쇄반응(ligase chain reaction) (Barany, 1991, Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 88:189 193), 자기부양염기서열복제(self-sustained sequence replication) (Guatelli, 1990, Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 87:1874 1878), 전사 증폭 시스템(transcriptional amplification system) (Kwoh, 1989, Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 86:1173 1177), Q-베타 레플리카제 (Lizardi, 1988, Bio/Technology, 6:1197), 회전원 복제(rolling circle replication) (Lizardi, U.S. Pat. No. 5,854,033) 또는 임의의 다른 핵산 증폭 방법에 의한 다음, 당업자에게 잘 알려진 기술을 이용하여 증폭된 분자의 검출에 의한, 핵산 증폭 과정을 포함한다. 이러한 검출 방식은, 핵산 분자가 매우 낮은 수로 존재하는 경우, 핵산 분자의 검출에 특히 유용하다. 본 발명의 특정 측면에서, 발현은 정량적 형광원 RT-PCR (즉, TaqMan® System)로 평가된다. 이러한 방법은 일반적으로 시알산 전이효소 및/또는 Neu5Ac(α2,6)Gal/GalNAc-함유 단백질에 특이적인 올리고뉴클레오티드 프라이머 쌍을 사용한다. 알려진 서열에 특이적인 올리고뉴클레오티드 프라이머의 설계 방법은 당해 기술분야에서 잘 알려져 있다.

[0260] RNA의 발현 수준은 막 블롯(membrane blot) (예를 들어, 노던, 서던, 도트 등과 같은 혼성화 분석에서 사용됨), 또는 마이크로웰, 시료 튜브, 겔, 비드 또는 섬유 (또는 결합된 핵산을 포함하는 임의의 고체 지지체)을 이용하여 모니터될 수 있다. 참조, U.S. Pat. Nos. 5,770,722, 5,874,219, 5,744,305, 5,677,195 및 5,445,934, 이들은 참조로 본 명세서에 포함된다. 또한, 발현의 검출은 용액에서 핵산 프로브를 이용하는 것을 포함할 수 있다.

[0261] 본 발명의 다른 실시예에서, 시험관 내(*in vitro*) 결합 어세이는 시알산 전이효소 및/또는 Neu5Ac(α2,6)Gal/GalNAc의 잠재적인 저해제의 결합 친화도 및 해리 동역학(dissociation kinetics)을 측정하는데 사용된다. 시험관 내(*in vitro*) 결합 어세이의 예는 당해 기술분야에서 잘 알려져 있다. 기준은 새로운 물질 또는 화합물을 시험하는 경우 또는 본 명세서에 기재된 다양한 매개변수를 측정하는 경우에 사용될 수 있다. 또한, 매개변수를 측정하는 경우, 기준의 측정은 피험자가 시험 화합물로 처리되기 전에 피험자로부터 얻은 조직 또는 체액에서 시알산 전이효소 및/또는 Neu5Ac(α2,6)Gal/GalNAc와 같은 매개변수의 농도를 측정하는 단계를 포함할 수 있으며, 동일한 매개변수는 시험 화합물로 처리한 후에 측정될 수 있다. 본 발명의 다른 측면에서, 기준은 시료에 첨가되고 내부 대조로서 유용한 물질 또는 화합물을 외인성으로 첨가시킬 수 있으며, 특히 시료가 몇 단계 또는 과정을 통해 처리되는 경우, 각 단계의 관심 마커의 회수량은 측정되어야 한다. 이러한 외인성으로 첨가된 내부 기준은 종종 표지 형태, 즉 방사성 동위원소로 첨가된다.

[0262] 이러한 스크리닝 방법에서 사용하기 위한 시험 화합물은 소분자, 앱타머를 함유하는 핵산, 펩티드, 펩티드 모방체 및 기타 약물들일 수 있다. 시알산 전이효소 및/또는 Neu5Ac(α2,6)Gal/GalNAc의 단편은, 시알산 전이효소 및/또는 Neu5Ac(α2,6)Gal/GalNAc 결합 파트너에 시알산 전이효소 및/또는 Neu5Ac(α2,6)Gal/GalNAc의 결합을 경쟁적으로 저해할 수 있는 것으로 고려되고, 이렇게 함으로써 시알산 전이효소 및/또는 Neu5Ac(α2,6)Gal/GalNAc 활성을 저해한다.

[0263] 본 발명의 시험 화합물은, 생물학적 라이브러리, 공간-주소지정 병렬 고상 또는 액상 라이브러리(spatially-addressable parallel solid phase or solution phase libraries), 얽힘풀기를 필요로 하는 합성 라이브러리 방법(synthetic library methods requiring deconvolution), "하나의-비드 하나의-화합물(one-bead one-compound)" 라이브러리 방법, 및 친화도 크로마토그래피 선별을 이용한 합성 라이브러리 방법을 포함하여, 당해 기술분야에서 알려진 조합 라이브러리 방법의 수많은 방법들 중 어느 것을 이용하여 얻어질 수 있다. 상기 생물학적 라이브러리 방법은 펩티드 라이브러리에 한정되는 반면, 다른 4개의 방법들은 펩티드, 비펩티드 올리고머(nonpeptide oligomer), 또는 화합물의 소분자 라이브러이에 적용할 수 있다 (Lam, 1997, Anticancer Drug

Des. 12:145). 시알산 전이효소 및/또는 Neu5Ac(α2,6)Gal/GalNAc의 저해제는 치료제 적용에서 유용할 수 있으며, 또는 치료제의 개발에서 선도 약물로 작용할 수 있다. 합성 기술은 하기와 같은 화합물을 제조하는데 사용될 수 있다: 소분자, 펩티드, 핵산, 항체, 및 본 발명의 방법의 실시에서 유용한 기타 치료제 조성물의 화학적 및 효소적 제조. 본 명세서에 기재되지 않으나 당업자에게 알려진 기타 기술이 사용될 수 있다.

[0264] 본 발명의 하나의 측면에서, 앱타머, 펩티드 모방체, 또는 단편을 포함하나 이에 한정되지 않는 소분자의 라이브러리는, 시알산 전이효소 및/또는 Neu5Ac(α2,6)Gal/GalNAc 결합 파트너에 경쟁적 결합을 분석할 수 있다.

[0265] 본 발명에서 유용한 저해제는, 당업자에게 알려진 표준 방법을 이용하여 얻어질 수 있다. 이러한 방법은 화학적 유기합성 또는 생물학적 방법을 포함한다. 생물학적 방법은 당해 기술분야에서 잘 알려진 방법을 이용하여, 생물학적 소스, 재조합 합성 및 시험관 내 번역 시스템으로부터의 정제를 포함한다.

[0266] 또한, 본 발명은 본 발명의 이러한 방법을 이용하여 동정된 물질 (예를 들어, 모티프, 모티프를 포함하는 펩티드, 및 이의 펩티드 모방체)을 고려한다. 상기 물질 (예를 들어, 모티프, 모티프를 포함하는 펩티드, 및 이의 펩티드 모방체)은 시알산 전이효소 및/또는 Neu5Ac(α2,6)Gal/GalNAc 분해를 조절하는데 사용될 수 있으며, 이들은 상기 물질이 도입되는 세포의 세포 과정을 조절하는데 사용될 수 있다. 따라서, 상기 물질 (예를 들어, 모티프, 모티프를 포함하는 펩티드, 및 이의 펩티드 모방체)은 시알산 전이효소 및/또는 Neu5Ac(α2,6)Gal/GalNAc 활성과 관련된 질환, 장애, 또는 질병에 걸린 개체에게 투여하기 위한 조성물로 제형화될 수 있다.

[0267] 치료 방법

[0268] 본 발명은 올리고당 형성 저해제를 포함하는 조성물의 유효량을 투여하는 단계를 포함하는, 피부색소침착의 감소 방법을 제공한다. 일 실시예에서, 본 발명은 시알산 전이효소 활성 저해제를 포함하는 조성물의 유효량을 투여하는 단계를 포함하는, 피부색소침착의 감소 방법을 제공한다. 일 실시예에서, 본 발명은 올리고당 활성 저해제를 포함하는 조성물의 유효량을 투여하는 단계를 포함하는, 피부색소침착의 감소 방법을 제공한다. 일 실시예에서, 상기 조성물은 글리코실화 올리고당의 형성 및/또는 기능을 저해한다.

[0269] 본 발명은 시알산 전이효소 및/또는 Neu5Ac(α2,6)Gal/GalNAc 관련 장애의 치료 방법을 포함한다. 본 명세서에 사용된 바와 같이, 용어 "시알산 전이효소 및/또는 Neu5Ac(α2,6)Gal/GalNAc 관련 장애"는 시알산 전이효소 및/또는 Neu5Ac(α2,6)Gal/GalNAc의 활성에 의해 야기되거나 또는 특징지워진 임의의 질환, 장애, 또는 질병을 나타낸다. 일 실시예에서, 본 발명은 과다색소침착의 치료 방법을 포함한다. 다른 실시예에서, 본 발명은 과도한 색소침착의 치료 방법을 포함한다. 또 다른 실시예에서, 본 발명은 고르지 않은 색소침착의 치료 방법을 포함한다. 또 다른 실시예에서, 본 발명은 색소침착을 감소시키는 방법을 포함한다.

[0270] 치료 방법에서 시알산 전이효소 및/또는 Neu5Ac(α2,6)Gal/GalNAc 저해제의 투여는, 당해 기술분야에서 알려진 방법을 이용하여 많은 다른 방법으로 이루어질 수 있다. 예를 들어, 특정 실시예에서, 상기 방법은 피험자의 피부에 시알산 전이효소 및/또는 Neu5Ac(α2,6)Gal/GalNAc 저해제를 국소 투여하는 단계를 포함한다. 특정 실시예에서, 상기 방법은 시알산 전이효소 및/또는 Neu5Ac(α2,6)Gal/GalNAc 저해제를 비경구 투여하는 단계를 포함한다.

[0271] 본 발명의 치료 및 예방 방법은 필요할 때 임의의 피험자에서 피부색소침착을 감소시키는데 사용될 수 있다. 예를 들어, 특정 실시예에서, 상기 피험자는 인간 및 다른 영장류 및 상업적으로 관련된 포유류, 예를 들어 비-인간 영장류인 소, 돼지, 말, 양, 고양이, 및 개를 포함하는 포유류를 포함하나 이에 한정되지 않는다.

[0272] 본 발명의 시알산 전이효소 및/또는 Neu5Ac(α2,6)Gal/GalNAc 저해제는 피험자에게 단독으로, 또는 다른 치료제와 함께 투여될 수 있는 것으로 이해될 것이다.

[0273] 일 실시예에서, 시알산 전이효소 및/또는 Neu5Ac(α2,6)Gal/GalNAc 저해제는 피험자에게 투여된다. 또한, 상기 저해제는 표적 세포에 전달 또는 효능을 용이하게 하기 위해 혼성 또는 융합 조성물일 수 있다. 일 실시예에서, 혼성 조성물은 조직-특이적 표적 서열을 포함할 수 있다. 예를 들어, 일 실시예에서, 상기 저해제는 멜라닌형성세포 또는 멜라닌형성세포의 수지상돌기에 표적된다.

[0274] 따라서, 본 발명의 치료 및 예방 방법은 본 발명의 방법을 실시하기 위해 시알산 전이효소 및/또는 Neu5Ac(α2,6)Gal/GalNAc 저해제를 포함하는 약학적 조성물의 사용을 포함한다. 본 발명의 실시에 유용한 약학적 조성물은 ng/kg/day 및 100 mg/kg/day의 투여량을 전달하기 위해 투여될 수 있다. 일 실시예에서, 상기 방법은 포유류에서 1 μM 및 10 μM의 본 발명의 화합물의 농도를 야기하는 용량의 투여를 구상한다.

[0275] 일반적으로, 포유류, 바람직하게는 인간에게 본 발명의 방법으로 투여될 수 있는 투여량은, 포유류의 체중의 킬

로그램 당 0.5 ㎍ 내지 약 50 mg의 양인 반면, 정확한 투여량은 치료받는 포유류의 유형 및 질환 상태의 유형, 포유류의 연령 및 투여 경로를 포함하는 많은 인자에 따라 달라질 것이나, 이에 한정되지 않는다. 바람직하게는, 상기 화합물의 투여량은 포유류의 체중의 킬로그램 당 1 ㎍ 내지 약 10 mg으로 달라질 것이다. 더 바람직하게는, 투여량은 포유류의 체중의 킬로그램 당 3 ㎍ 내지 약 1 mg으로 달라질 것이다.

[0276] 상기 화합물은 수시로 하루에 여러 번으로 포유류에게 투여될 수 있거나, 또는 덜 자주, 예를 들어 하루에 한번, 일주일에 한번, 2주일마다 한번, 한달에 한번, 또는 훨씬 덜 자주, 예를 들어 몇 달마다 한번 또는 심지어 1년 이하에 한번 투여될 수 있다. 투여 빈도는 당업자에게 쉽게 명백할 것이며, 많은 인자, 예를 들어 치료받는 질환의 유형 및 중증도, 포유류 유형 및 연령 등에 의존할 것이나, 이에 한정되지 않는다.

[0277] 바람직한 실시예에서, 본 발명은 시알산 전이효소 및/또는 Neu5Ac(α2,6)Gal/GalNAc의 활성을 저해함으로써 과다색소침착을 치료하는 방법을 포함한다. 하나의 측면에서, 시알산 전이효소 및/또는 Neu5Ac(α2,6)Gal/GalNAc의 활성은 멜라닌 생성 또는 멜라닌소체 이동을 저해하기 위하여, 피험자에게 시알산 전이효소 및/또는 Neu5Ac(α2,6)Gal/GalNAc 저해제를 투여함으로써 저해된다.

[0278] 일 실시예에서, 본 발명은 본 명세서에 기재된 저해제의 조합을 투여하는 단계를 포함하는 방법을 포함한다. 특정 실시예에서, 상기 방법은 부가효과를 가지며, 저해제의 조합의 투여의 전체 효과는 각 개개의 저해제의 투여의 효과의 합과 대략 동일하다. 다른 실시예에서, 상기 방법은 상승효과를 가지며, 저해제의 조합의 투여의 전체 효과는 각 개개의 저해제의 투여의 효과의 합보다 크다.

[0279] 상기 방법은 임의의 적당한 비율로 저해제의 조합을 투여하는 단계를 포함한다. 예를 들어, 일 실시예에서, 상기 방법은 1:1 비율의 2개의 개개의 저해제를 투여하는 단계를 포함한다. 다른 실시예에서, 상기 방법은 1:1:1 비율의 3개의 개개의 저해제를 투여하는 단계를 포함한다. 그러나, 상기 방법은 임의의 특정 비율에 한정되지 않는다. 효과적인 것으로 보이는 어느 정도의 임의의 비율을 포함한다.

[0280] 일 실시예에서, 상기 방법은 시티딘 및 6'-SL을 투여하는 단계를 포함한다. 다른 실시예에서, 상기 방법은 시티딘 및 3'-SL을 투여하는 단계를 포함한다. 또 다른 실시예에서, 상기 방법은 6'-SL 및 3'-SL을 투여하는 단계를 포함한다. 또 다른 실시예에서, 상기 방법은 시티딘, 6'-SL 및 3'-SL을 투여하는 단계를 포함한다. 특정 실시예에서, 시티딘, 6'-SL 및 3'-SL 중 적어도 2개를 투여하는 단계를 포함하는 방법은 상승작용을 나타낸다.

[0281] 특정 실시예에서, 상기 방법은 저해제의 조합을 포함하는 조성물을 투여하는 단계를 포함한다. 예를 들어, 일 실시예에서, 상기 방법은 시티딘 및 6'-SL을 포함하는 조성물을 투여하는 단계를 포함한다. 일 실시예에서, 상기 방법은 시티딘 및 3'-SL을 포함하는 조성물을 투여하는 단계를 포함한다. 다른 실시예에서, 상기 방법은 6'-SL 및 3'-SL을 포함하는 조성물을 투여하는 단계를 포함한다. 또 다른 실시예에서, 상기 방법은 시티딘, 6'-SL 및 3'-SL을 포함하는 조성물을 투여하는 단계를 포함한다.

[0282] 특정 실시예에서, 상기 방법은 하나 이상의 조성물을 투여하는 단계를 포함하며, 각 조성물은 하나 이상의 저해제를 포함한다. 예를 들어, 일 실시예에서, 상기 방법은 시티딘을 포함하는 제 1 조성물 및 6'-SL을 포함하는 제 2 조성물을 투여하는 단계를 포함한다. 일 실시예에서, 상기 방법은 시티딘을 포함하는 제 1 조성물 및 3'-SL을 포함하는 제 2 조성물을 투여하는 단계를 포함한다. 일 실시예에서, 상기 방법은 6'-SL을 포함하는 제 1 조성물 및 3'-SL을 포함하는 제 2 조성물을 투여하는 단계를 포함한다. 일 실시예에서, 상기 방법은 시티딘을 포함하는 제 1 조성물, 6'-SL을 포함하는 제 2 조성물, 및 3'-SL을 포함하는 제 3 조성물을 투여하는 단계를 포함한다. 다른 조성물은 임의의 순서대로 및 임의의 적당한 간격으로 피험자에게 투여될 수 있다. 예를 들어, 특정 실시예에서, 하나 이상의 조성물은 동시에 또는 거의 동시에 투여된다. 특정 실시예에서, 상기 방법은 하나 이상의 조성물의 시차 투여(staggered administration)를 포함하며, 여기서 제 1 조성물이 투여되고 제 2 조성물은 약간의 나중 시점에서 투여된다. 바람직한 치료 효과를 생성하는 임의의 적당한 투여 간격이 사용될 수 있다.

[0283] 피험자에게 본 발명의 핵산 또는 펩티드 저해제의 투여는, 유전자 요법을 이용하여 이루어질 수 있다. 유전자 요법은 생체외(*ex vivo*) 또는 생체내(*in vivo*) 기술에 의하여 세포에 치료 유전자를 삽입하는 것을 기준으로 한다. 적당한 벡터 및 방법은 시험관 내(*in vitro*) 또는 생체내(*in vivo*)에서 유전자 치료에 대해 기재되었으며, 그 내용에 관한 전문가로서 알려져 있다; 참조, Giordano, Nature Medicine 2 (1996), 534-539; Schaper, Circ. Res 79 (1996), 911-919; Anderson, Science 256 (1992), 808-813; Isner, Lancet 348 (1996), 370-374; Muhlhauser, Circ. Res 77 (1995), 1077-1086; Wang, Nature Medicine 2 (1996), 714-716; WO94/29469; WO97/00957 or Schaper, Current Opinion in Biotechnology 7 (1996), 635-640 및 상기 참고문헌들은 이 안에

인용된다. 본 발명의 폴리펩티드를 암호화하는 폴리뉴클레오티드는 직접 삽입 또는 세포에서 리포좀 또는 바이러스 벡터 (예를 들어, 아데노바이러스 벡터 또는 레트로바이러스 벡터)를 통해 삽입하여 설계될 수 있다. 바람직하게는, 상기 세포는 배아 세포 또는 난세포 또는 동일한 것으로부터 유래된 배종 라인(germinal line)의 세포이고, 더 바람직하게는 상기 세포는 코어 세포이다. 본 발명에 따라 사용될 수 있는 적당한 유전자 분포 시스템은 특히 리포좀, 수용체에 의해 매개된 분포 시스템, 있는 그대로(naked)의 DNA 및 바이러스 벡터, 예를 들어 헤르페스 바이러스, 레트로바이러스, 아데노바이러스 및 아데노-관련 바이러스를 포함할 수 있다. 또한, 유전자 치료를 위한 신체에서 특정 부위에 대한 핵산의 분포는, 유전자총(biolistic) 분포 시스템을 사용하여 이루어질 수 있으며, 이는 Williams (Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 88 (1991), 2726-2729)에 의해 기재된다. 재조합 DNA와 함께 세포의 형질감염 표준 방법은 분자생물학에 관한 전문가에 의해 잘 알려져 있다, 참조, WO94/29469; 또한, 상기한 것을 참조하라. 유전자 치료는 본 발명의 재조합 DNA 분자 또는 벡터를 환자에게 직접 투여함으로써 또는 생체외에서 본 발명의 폴리뉴클레오티드 또는 벡터와 함께 세포를 형질감염시키고 환자에게 형질감염된 세포를 투여함으로써 수행될 수 있다.

[0284] 본 발명의 키트

[0285] 일 실시예에서, 본 발명은 조성물 및 이의 사용을 위한 설명 자료를 포함하는 키트이다. 일 실시예에서, 상기 조성물은 본 명세서에서 별도로 기재된 바와 같이, 하나 이상의 저해제를 포함한다. 일 실시예에서, 상기 키트는 다수의 조성물을 포함하고, 하나 이상의 다수의 조성물은 하나 이상의 저해제를 포함한다. 일 실시예에서, 상기 키트는 도포용 도구(applicator)를 포함한다. 상기 키트 내에 포함된 설명 자료는 상기 저해제 조성물의 사용을 위한 사용 설명서를 포함한다. 다양한 실시예에서, 상기 설명 자료는, 전체 또는 일부로, 조성물 내 저해제의 유형, 사용될 저해제 조성물의 양, 이의 투여 횟수, 저해제 조성물의 투여에 의해 얻어지는 결과, 및 저해제 조성물의 사용을 위한 기타 매개변수를 열거한다.

[0286] **실험예**

[0287] 본 발명은 하기의 실험예를 참조하여 더 상세히 기재된다. 이러한 실험예는 단지 설명하기 위해 제공되는 것일 뿐, 별도로 명시되지 않는 한 이에 한정되는 것으로 의도되지 않는다. 따라서, 본 발명은 하기의 실험예에 한정되는 것으로 해석되어서는 안되며, 오히려, 본 명세서에 제공되는 가르침의 결과로서 명백해지는 모든 변화를 포함하는 것으로 해석되어야 한다.

[0288] 더 이상의 설명 없이, 당업자는 상술한 설명 및 하기의 예문을 이용하여, 본 발명의 화합물을 제조 및 이용하고, 청구된 방법을 실시할 수 있다고 생각한다. 따라서, 본 발명의 바람직한 실시예를 명확하게 나타내는 하기의 작업예는, 어떤 방식으로도 명세서의 나머지를 한정하는 것으로 해석되지 않는다.

[0289] 실험예 1: 멜라닌 함량 및 멜라닌소체 이동에 대한 Neu5Ac(α2,6)Gal/GalNAc의 역할

[0290] 인간으로서 우리는, 얼굴 및 신체의 다른 부분에서 고르지 않거나 또는 비대칭 색소침착이 자존감을 낮추고, 우울증, 사회적 지위에 관한 문제 및 직장에서 생산성의 감소를 야기할 수 있는 사회적 존재이다 (Balkrishnan et al., 2006, Int J Dermatol 45:111-5). 피부의 과다색소침착은 많은 개인들이 교정 치료를 요하는 공통 질병이다. 이것은 반점 또는 피부의 특정 부분에서 때때로 비대칭적으로; 다른 경우에는 좌우대칭으로, 피부 멜라닌이 증가된 결과이다. 이것은 멜라닌 합성의 증가 및 각질형성세포로의 이동; 많은 수의 멜라닌형성세포; 및 어떤 경우에는 식균 작용을 통해 멜라닌을 축적하는 멜라닌-함유 대식세포(melanophages)에 의해 야기될 수 있다. 과다색소침착된 부분은 갈색 내지 푸른빛의 회색으로 된다. 과다색소침착에는 많은 원인들이 있으며, 가장 일반적인 원인은 기미, 염증 후 과다색소침착(PIH) 및 일광흑색점 (간반)이다. 따라서, 본 발명은 과도하고 고르지 않은 피부색소침착을 감소시키기 위한 새로운 화합물 및 이의 조합에 중점을 둔다. 상기 화합물은 멜라닌형성(melanogenesis)에 특이적인 글리코실화 경로 및 멜라닌형성세포로부터 각질형성세포로 멜라니소체의 이동을 표적한다.

[0291] 본 명세서에서 글리코실화는 멜라닌/멜라닌소체 합성 및 세포-세포 이동에서 역할을 가지는 것으로 설명되었다. 과도하거나 또는 고르지 않은 피부색소침착은 침범된 개체에서 심각한 불안 및 우울증을 야기할 수 있다. 과다색소침착을 감소시키기 위한 몇몇 국소 치료가 상업적으로 이용될 수 있으나, 아직 충분히 만족스러운 것으로 입증된 것은 아무 것도 없다. 본 발명은 색소 시스템을 조절하는 올리고당의 합성 및 기능의 저해를 통해 피부색소침착을 감소시키는 화합물 및 방법에 관한 것이다. 멜라닌형성세포 수지상돌기에 의해 발현되는 올리고당은 본 발명에서 동정되었다. 따라서, 이들은 피부색소침착에서 속도-제한 단계인 각질형성세포로 멜라닌소체의 이동과 밀접하게 관련되어 있다. 따라서, 본 명세서에 기재된 멜라닌 이동의 저해제는 과다색소침착, 예를 들어

기미, 염증 후 과다색소침착 및 일광흑색점 ("간반")의 영역에서 피부 색소 감소, 및 일반적으로 더 고른 피부색(skin tone)을 이루는데 유용할 것이다.

[0292] 이들 실험에서 사용된 물질 및 방법은 하기에 설명된다.

[0293] 세포 배양

[0294] 일차 신생아 정상 인간 각질형성세포(Primary neonatal normal human keratinocytes, NHKs) (Invitrogen, Life Technologies, Grand Island, NY)를 4-웰 콜라겐 코팅된 챔버 슬라이드 (Fisher Scientific, Waltham, MA)에 $5x10^5$ cells/well의 밀도로 씨딩하였다. 세포를 1 ml의 혈청-없는 각질형성세포 성장 배지 (KGM) (Keratinocyte-SFM, Invitrogen)에서 유지시키고, 5% CO_2 배양기에서 48시간 동안 배양하였다. KGM Singlequots (Lonza)를 첨가하여 완전한 KGM을 제조하였다. 어둡게 착색된 인간 신생아 표피 멜라닌형성세포 (Darkly pigmented human neonatal epidermal melanocytes, HEM-DP) (Invitrogen)는 각질형성세포와 달리 $2.5x10^5$ cells/well으로 씨딩하고, 37℃에서 24시간 동안 배양하였다. KGM을 1 ml의 멜라닌형성세포 성장 배지 (melanocyte growth medium, MGM) (Invitrogen)로 대체하고, 공-배양물을 48시간 더 배양하였다. 공-배양물은 72시간 동안 20 ㎕/well의 최종 부피의 표시된 농도에서 저해제를 3회 처리하였다. 세포를 1x 인산염 완충 식염수 (PBS)로 부드럽게 세척하고, 실온에서 20분 동안 4% 파라-포름알데히드 (PFA)에서 고정시켰다.

[0295] 렉틴 조직화학

[0296] 4% PFA에서 고정된 세포를 1x PBS로 세척하고, 이중 효소 차단 용액(dual enzyme block solution) (Dako, Glostrop, Denmark)에서 실온에서 10분 동안 배양한 다음, 1x PBS로 세척하고, 실온에서 10분 동안 단백질 차단 용액과 함께 배양하였다. 그 다음, 세포를 비오티닐화 엘더베리 나무껍질 렉틴 (1:800) (Vector Labs, Burlingame, CA)과 함께 실온에서 30분 동안 배양하였다. 1x PBS로 세척한 후, 세포를 벡타스타틴(vectastain) ABC-AP (Vector Labs) 복합체와 함께 실온에서 30분 동안 배양하였다. 벡타스타틴 ABC-AP 키트와 함께 제공된 사용 설명서에 따라 새로운 ABC-AP 복합체를 제조하였다. 세포를 1x PBS로 세척하여 ABC-AP 복합체를 제거하고, 적색 발색제 염색 용액 (Dako)과 함께 실온에서 10분 동안 빠르게 배양하였다. 세포를 물로 헹구고, 5분 동안 질 없는 헤마톡실린(gill free hematoxylin)으로 5분 동안 배양하였다. 슬라이드를 H_2O에서 헹군 다음, 0.5% 수산화암모늄으로 부드럽게 세척하였다. 슬라이드를 자연건조시키고 커버 슬립 위에 장착한 다음, 형광현미경 (Nikon)을 이용하여 tiff 형태로 영상을 캡쳐하고 분석하였다.

[0297] 멜라닌의 폰타나-마손 은 염색

[0298] 멜라닌의 은 염색은 폰타나-마손 염색 키트 (American MasterTech, Lodi, CA)와 함께 제공된 사용 설명서에 따라 수행되었다. 콜라겐-코팅된 챔버 슬라이드에서 성장된 세포를 4% PFA에서 고정시키고, 5분 동안 물로 헹궈 미량의 PBS를 제거하였다. 그 다음, 슬라이드를 암모니아를 처리한 은 용액(ammonical silver solution)에 놓은 후, 0.1% 염화금(gold chloride) 용액, 5% 소듐 티오설페이트 (sodium thiosulfate) 용액에서 배양하고, 흐르는 수돗물에 헹궈 염색 용액을 제거한 다음, 새로운 무수 알콜로 3회 탈수하였다. 깨끗해진 슬라이드를 새로운 자일렌으로 3회 헹구고, 커버 슬립을 봉입제(mounting medium)와 함께 적용시켰다.

[0299] 저해제로 처리

[0300] 세포를 $2x10^5$ cells/well로 24-웰 플레이트에 플레이팅 하고, 다양한 저해제로 3회 처리하였다. 배지를 24시간마다 새로운 저해제-함유 배지로 대체하였다. 72시간 후, 세포를 프로테아제 저해제 칵테일 및 PMSF (페닐메틸설포닐 플루오라이드)를 함유하는 세포 용해 완충액 (Invitrogen)으로 용해하고, 얼음 위에서 20분 동안 배양하였다. 용해 완충액으로 배양한 후, 용해된 세포를 10분 동안 10,000 rpm에서 원심분리하였다. 동일한 시료로부터, 상청액을 도파 산화효소(dopa oxidase) 활성의 측정을 위해 저장하였고, 펠렛은 멜라닌 함량을 평가하였다.

[0301] 도파 산화효소 어세이

[0302] 반응 혼합물은 20 ㎕의 용해물 상청액(lysate supernatant), 160 ㎕의 50 mM 인산나트륨 완충액(0.1 M, pH 6.8) 내 20 ㎕의 10 mM L-도파를 함유하였다. 3회 시료의 시료들을 96-웰 플레이트로 옮기고, M5 마이크로플레이트 리더 (ThermoScientific, Waltham, MA)로 1분 간격으로 30분 동안 475nm에서 흡광도를 판독하여 도파크롬의 형성을 즉시 평가하였다. 동역학으로부터 얻은 기울기를 사용하여, 비처리 대조 웰에 비해 처리 웰에서 % 도파 산화효소/티로시나제 활성을 계산하였다.

[0303] 멜라닌 어세이

[0304] 멜라닌을 공지의 방법 (Ni-Komatsu, et al., 2005, Pigment Cell Res 18(6),447-453)에 따라 추출하였다. 간단하게는, 성장 배지를 제거하고, 세포를 상기와 같이 용해하였다. 용해된 세포를 원심분리하고, 펠렛을 에탄올:에테르 (1:1) 용액으로 세척한 다음, 2N NaOH 내 100 ㎕의 20% DMSO에 용해시켰다. 멜라닌 추출액 (100 ㎕)을 96-웰 플레이트로 옮기고, 총 멜라닌 함량을 M5 Spectramax 플레이트 리더 (490nm)로 정량화하였다.

[0305] 사진촬영 및 영상 처리

[0306] 배양된 세포의 대표적인 필드는 Spot Flex 디지털 카메라가 장착된 Zeiss Axioskop 40 광학현미경으로 사진을 찍었다. 포토샵 도구를 이용하여, 관심 영역을 본 명세서의 처리군에 잘라 붙였다. 제공된 도면의 경우, 임의의 복합 영상은 자동 명암 및 밝기 도구(automatic contrast and brightening tools)와 함께 향상되었다.

[0307] 통계

[0308] 용량 반응 곡선은 하기 문헌에 기재된 바와 같이 블리스 가산성 및 상승작용으로 평가되었다 (Fitzgerald et al., 2006, Nat Chem Biol 2:458-466; Ritz, C. & Streibig, J. C. (2005) Bioassay Analysis using R. J. Statist. Software, Vol 12, Issue 5). 처리 배양물 대 비처리 배양물에서 멜라닌 함량 및 티로시나제/도파 산화효소 활성의 비교의 경우, P-값은 Welch Two Sample t-test에 의해 결정되었다.

[0309] ST6 및 ST3의 녹다운

[0310] 마우스 멜란-A 세포를 24-웰 플레이트에 8 x 10^4 cells/well로 씨딩하고, 37℃에서 24시간 동안 배양하였다. 그 다음, RNAiFect Transfection Handbook (Qiagen)에 따라, 이들을 ST6 및 ST3 siRNAs로 형질감염시켰다. 간단하게는, 각각 1 ㎍의 siRNA ST6 및 siRNA ST3를 1:3 및 1:6의 희석으로 RNAi Fect 형질감염 시약에 첨가하고; 100 ㎕의 배양 배지에서 3 ㎕ 및 6 ㎕의 RNAi Fect와 함께 혼합한 다음; 실온에서 멜란-A 세포와 함께 10-15분 동안 배양하고 37℃에서 24시간 더 배양하였다. 배양물을 헹구고, 새로운 배양 배지를 첨가한 다음, 세포를 고정하고 EBL과 함께 염색한 후, 세포를 37℃에서 24시간 더 배양하였다 (Ni-Komatsu et al., 2005, Pigment Cell Res, 18: 447-53).

[0311] 실험의 결과는 이하 설명한다.

[0312] 피부 생검(cutaneous biopsies)에서 렉틴 결합 연구

[0313] 20 비오티닐화 렉틴의 패널은 특이적인 글리코실화 구조체의 마커로서 모으고, 렉틴 조직화학을 사용하여 정상적인 표피 멜라닌형성세포 및 각질형성세포와 함께 피부 생검에서 이들의 염색 패턴을 분석하였다. 대부분의 연구된 20 렉틴은 멜라닌형성세포의 특정 염색을 나타내지 않은 반면, EBL(elderberry bark lectin)/SNA는 수지상 돌기의 눈에 띄는 표지와 함께, 표피에서 다른 세포에 비해 정상적인 멜라닌형성세포를 염색하기 때문에 눈에 띄었다. EBL/SNA는 특정 글리칸에 대하여 말단 Neu5Ac(α2,6)Gal/GalNAc 서열을 인식하고, 도 2에 나타낸 것은 EBL 및 갈색 발색제로 염색된 생검의 광학현미경 사진이다. 각각의 4 패널은 다른 개체로부터 온다. 염색은 세포체(cell body)에서 나오는 눈에 띄는 멜라닌형성세포 수지상돌기와 함께 표피의 기저층에서 멜라닌형성세포를 나타낸다 (도 2). 멜라닌형성세포 핵 (화살표로 표시됨)은 주위의 각질형성세포와 같이 헤마톡실린 대조염색으로부터 푸른색으로 염색된다. 다양한 인종적 배경 및 피부색을 갖는 개체의 생검에서 동일한 염색 패턴이 나타났다.

[0314] 두 번째 연구에서, 하나의 개체로부터 피부 생검의 조직 절편은 EBL로 염색되었고, 대조로서, MAAII 렉틴 (*Maackia amurensis* L.)은 상기 언급된 20 렉틴 조사(survey)에서 멜라닌형성세포의 염색이 거의 나타나지 않았다 (도 3a 및 도 3b). MAAII는 Neu5Ac(α2,3)Gal/GalNAc 서열을 인식한다. 도 2에서 처럼, EBL 염색에 의하여 세포체에서 돌출된 눈에 띄는 멜라닌형성세포 수지상돌기가 확인되었다 (도 3a). 이와 반대로, MAAII 렉틴 (*Maackia amurensis* L.)은 멜라닌형성세포를 염색하지 않았다 (도 3b). MAAII는 Neu5Ac(α2,3)Gal/GalNAc 서열을 인식한다. 이러한 결과들에 의하여, 멜라닌형성세포의 EBL 렉틴 및 Neu5Ac(α2,6)Gal/GalNAc 서열의 특이성이 설명될 수 있다.

[0315] 멜라닌형성세포-각질형성세포 공-배양에서 EBL/SNA 결합

[0316] 그 다음, EBL/SNA 염색을 인간 멜라닌형성세포 및 각질형성세포의 공-배양에서 조사하였다. EBL/SNA 염색은 적색 발색제와 함께 시각화하였다. 도 4a는 각질형성세포와 접촉하는 멜라닌형성세포를 나타낸다. 수지상돌기를 포함하는 멜라닌형성세포 원형질막은 EBL/SNA와 함께 강하게 염색된다. 각질형성세포와의 접촉점에서, 멜라닌형

성세포 수지상돌기는 EBL/SNA (별표)으로도 염색되는 많은 사상위족을 확장한다. 고전력 사진을 도 4b에 나타내었다.

[0317] EBL/SNA에 의해 인식되는 특정 올리고당 서열

[0318] EBL/SNA에 의해 인식되는 Neu5Ac(α2,6)Gal/GalNAc인 시알산화 올리고당 서열은, 다양한 생물학적 시스템에서 일부 막-관련 당접합체의 말단 서열이다 (Schauer, 2009, Curr Opin Struct Biol 19:507-514). EBL이 입체 방해 때문에 Neu5Ac(α2,6)Gal/GalNAc 서열 및 관련된 Neu5Ac(α2,3)Gal/GalNAc 서열 (MAAII에 의해 인식됨) 간을 구별하는 것처럼, 결합은 고도로 특이적이다 (Shibuya et al, 1987, J Biol Chem, 262(4): 1596-1601; Kaku et al, 2007, J Biochem, 142:3). 본 명세서에 제시된 결과는, EBL/SNA 렉틴에 의해 인식된 Neu5Ac(α2,6)Gal/GalNAc 서열이 각질형성세포로 멜라닌소체 이동에 관련되며, EBL/SNA 렉틴에 의해 인식된 Neu5Ac(α2,6)Gal/GalNAc 서열이 멜라닌형성세포 수지상돌기에 있는 글리칸의 말단에 있다는 것을 최초로 규명한 것이다. 이것은 색소침착 경로에서 이전에 알려지지 않은 단계를 제시하는 것이다. 이와 마찬가지로, 세포-세포 인식 및 세포-세포 결합을 포함하는, 생물학적 인식 시스템에서 말단 뉴라민산/시알산에 N- 및 O-결합된 올리고당은 어떠한 기능을 발휘한다 (Schauer, 2009, Curr Opin Struct Biol 19:507-514). 각질형성세포로 멜라닌소체 이동이 피부색소침착에서 속도-제한 단계이기 때문에, 이것은 Neu5Ac(α2,6)Gal/GalNAc-올리고당 합성 및/또는 기능의 붕괴가 멜라닌소체 이동을 저해할 수도 있고 이로써 피부색소침착을 감소시키는 방법을 제공한다는 것을 의미한다. 따라서, 이러한 방법의 잠재적인 저해제는 멜라닌형성세포 및 각질형성세포의 공-배양에 어떠한 영향을 미치는지 확인하기 위해 시험되었다.

[0319] 멜라닌형성세포-각질형성세포 공-배양에서 L-시티딘이 EBL 결합에 미치는 영향

[0320] 멜라닌형성세포-각질형성세포 공-배양에서, ST6Gal.I 저해제인 L-시티딘 (Kleineidam et al., 1997, Glycoconj J, 14: 57-66)이, EBL/SNA 염색에 미치는 영향을 시험하기 위해, 실험을 수행하였다 (도 5). 비처리 배양물은 각질형성세포와 접촉하는 사상위족을 포함하여, 멜라닌형성세포 수지상돌기에서 눈에 띄는 EBL 염색을 나타내었다. 이러한 밀접한 관련은 Neu5Ac(α2,6)Gal/GalNAc의 말단에 결합된 올리고당이 멜라닌소체 이동에 어떠한 기능을 발휘한다는 것을 의미한다 (도 5a). 시티딘으로 처리하면 EBL 염색이 현저히 감소되었다 (도 5b). 이러한 결과는 ST6Gal.I이 Neu5Ac(α2,6)Gal/GalNAc-올리고당 형성에 필요하고, 시티딘이 이 방법의 효과적인 저해제인 것을 나타낸다.

[0321] 멜라닌형성세포-각질형성세포 공-배양에서 L-시티딘, 6'-시알릴락토오스 및 3'-시알릴락토오스가 멜라닌 함량에 미치는 영향

[0322] 따라서, 인간 멜라닌형성세포-각질형성세포 공-배양에서, 시티딘이 멜라닌 함량에 미치는 영향을 시험하였다. 또한, 6'-시알릴락토오스 (Neu5Ac(α2,6)Gal(β1-4)Glc; 6'-SL), EBL/SNA 인식 서열의 올리고당 상동체 및 고도의 시알산화 당단백질인 글리코포린의 EBL-매개 침전에 대하여 강력한 저해제를 시험하였다 (Shibuya et al, 1987, J Biol Chem, 262(4): 1596-1601; Kaku et al, 2007, J Biochem, 142: 3). 대조군으로서, 배양물은 입체 방해 때문에 EBL/SNA 결합 부위와 상호작용하지 않고, 그 결과 글리코포린의 EBL-매개 침전의 약한 저해제인 3'-시알릴락토오스 (Neu5Ac(α2,6)Gal(β1-4)Glc; 3'-SL)와 함께 배양하였다 (Shibuya et al, 1987, J Biol Chem, 262(4): 1596-1601 Kaku et al, 2007, J Biochem, 142: 3). 배양물은 각 물질과 함께 72시간 동안 배양하였고, 세포는 원심분리로 펠렛화하였으며, 멜라닌은 용해하고 분광광도계로 정량화하였다. 모든 3개의 물질은 비처리 배양물에 비해 멜라닌 함량을 각각 감소시켰다 (도 6). 예상외로, 3개 중 3'-SL이 가장 강한 감소를 보였다. 이것은 3'-SL이 EBL 결합에 대해 약한 경쟁자로 알려져 있기 때문에 놀라운 결과였다 (Shibuya et al, 1987, J Biol Chem, 262(4): 1596-1601; Kaku et al, 2007, J Biochem, 142: 3).

[0323] 유사하게, 멜라닌형성세포-각질형성세포 공-배양물에 대하여 폰타나-마손 (Fontana-Masson) 은 염색 방법으로 멜라닌을 염색하는 경우 (Kwon-Chung et al., 1981, J Clin Microbiol, 13:383-387), 시티딘, 6'-SL 및 3'-SL 각각은 멜라닌형성세포-각질형성세포 공-배양에서 멜라닌 함량을 감소시켰다 (도 7). 이것은 멜라닌형성세포 내에서 멜라닌형성 및 각질형성세포로 멜라닌소체의 이동이 이러한 물질에 의해 각각 저해되었다는 것을 나타내었다.

[0324] 시티딘과 조합한 6'-SL 및 3'-SL이 멜라닌형성에 미치는 영향

[0325] 멜라닌 함량 및 티로시나제 활성에 대한 6'-SL, 3'-SL, 및 시티딘의 저해 활성을 비교하기 위해, 단일 물질로서 및 조합으로, 멜라닌형성세포-각질형성세포 공-배양에서 용량-반응 연구를 수행하였다. 모든 처리 범주는 시험된 모든 농도 (5-40 μM)에서 멜라닌 함량의 매우 유의한 감소를 야기하였다 (도 8a; 표 3). 어떤 농도에서의

처리는 72시간 실험 동안 새로운 멜라닌 합성, 즉, 실험 시작시의 t_0 수준 (파선) 이상의 멜라닌 합성을 저해하였다. 다른 경우에는, 새로운 멜라닌 함량을 방지할 뿐만 아니라, 예상외로, 72시간 실험 동안 t_0 수준에서 보여준 것 이하로 감소하였으며 (도 8a, 파선), 이는 이들 물질의 처리가 멜라닌 분해 또는 배양 배지로의 방출을 야기하였다는 것을 암시한다. 각 농도에서 저해 퍼센트는 블리스 가산성(Bliss Additivity)을 비교하고 분석하였다, 즉, 단독의 2개의 물질의 합과 유의하게 동일함 (Fitzgerald et al., 2006, Nat Chem Biol 2:458-466; Ritz, C. & Streibig, J. C., 2005, Bioassay Analysis using R. J. Statist. Software, Vol 12, Issue 5.). 실제로 많은 처리 농도가 블리스 가산성을 나타내는 반면, 다른 것들은 상승적으로 저해하였는데, 이는 예상되는 블리스 가산성 이상이다. 상승작용은 $p = \leq 0.01$ 내지 $p = \leq 0.06$ 범위의 P-값 (도 8a, 별표)으로, 3'-SL + 6'-SL (5 + 5 μM, 10 + 10 μM, 15 + 15 μM); 3'-SL + 시티딘 (15 + 15 μM); 및 6'-SL + 시티딘 (15 + 15 μM)의 조합에서 나타났다. 동일한 시료에서 물질들 중 아무것도 티로시나제 활성을 유의하게 감소시키지 않았다 (도 8b). 종합하면, 상기 결과는 저해제가 글리코실화 과정을 저해하여 티로시나제 후 경로(post-tyrosinase pathways)를 표적함으로써 멜라닌 함량을 감소시켰다는 것을 나타낸다.

표 3

[0326] P-값 시험: 처리군 대 비처리 대조군*

처리	농도 (μM)	P-값 대 비처리 대조군
시티딘	15	0.0003
	20	0.0001
	30	0.0004
	35	0.0005
	40	0.0004
3'-SL	10	0.0051
	15	0.0077
	20	0.0067
	30	0.0004
	35	0.0003
	40	0.0006
6'-SL	10	0.0002
	15	0.0013
	20	0.0027
	30	0.0006
	35	0.0003
	40	0.0006
Cyt + 3'-SL	5+5	0.0002
	10+10	0.0024
	15+15	0.0002
	20+20	0.0004
Cyt + 6'-SL	5+5	0.0007
	10+10	0.0020
	15+15	0.0005
	20+20	0.0003
3'-SL + 6'-SL	5+5	0.0003
	10+10	0.0005
	15+15	0.0002
	20+20	0.0005

[0327] * P-값은 Welch Two Sample t-test에 의해 결정되었다.

[0328] 멜라닌 함량의 > 80% 저해를 위한 최소 용량은 각 처리 범주에 대해 측정하였다. 6'-SL + 3'-SL의 조합이 가장 효과적이었고, 이는 5 μM + 5 μM의 조합 농도에서 멜라닌 함량의 ~85% 저해를 야기하며, 임의의 다른 범주에서 보다 3배 더 활성적이다 (도 8a, 표 4).

표 4

[0329] 멜라닌 함량의 > 80% 저해를 위한 최소 처리 용량*

처리	> 80% 저해를 위한 최소 농도
비처리 대조군	해당 없음
단일 물질	
시티딘	30 μM
6'-SL	30 μM
3'-SL	30 μM
조합 물질	
시티딘 + 6'-SL	15 μM + 15 μM
시티딘 + 3'-SL	15 μM + 15 μM
6'-SL + 3'-SL	5 μM + 5 μM

[0330] * 데이터는 도 8a에 있다.

[0331] 시티딘, 6'-SL, 3'-SL이 멜라닌 이동에 미치는 영향

[0332] 시티딘, 3'-SL, 및 6'-SL의 단독 및 조합으로 처리한 후, 멜라닌형성세포-각질형성세포 멜라닌소체 이동에 미치는 영향을 평가하였다. 도 9a는 여러 각질형성세포에 의해 둘러싸인 고도의 멜라닌화(melanized) 멜라닌형성세포에 대한 비처리 공-배양물의 대표적인 필드를 나타낸다. 멜라닌형성세포는 멜라닌소체로 가득하며, 원형질막의 상당부분에 걸쳐 인접한 각질형성세포와 밀접하게 접촉한다. 멜라닌형성세포와 직접 접촉하는 각질형성세포(밝은 별표가 있는 핵)는 멜라닌형성세포로부터 이동된 많은 세포질 멜라닌 과립을 함유한다. 멜라닌형성세포와 접촉하지 않은 각질형성세포 (어두운 별표가 있는 핵)는 현저하게 적은 멜라닌소체를 함유하였다. 이와 반대로, 3'-SL + 시티딘의 조합으로 처리된 공-배양물의 대표적인 필드는 멜라닌형성세포-각질형성세포 접촉의 현저한 감소 및 양쪽 세포 유형에서 멜라닌소체의 감소를 나타낸다 (도 9b). 모든 처리 범주는 이러한 효과를 나타내었으나, 이동이 동역학 과정이기 때문에, 본 명세서에서 연구된 정적 고정된 배양물(static fixed cultures)에서 정량화될 수 없었다. 종합하면, 상기 결과는 단독 또는 조합의 시티딘, 3'-SL, 및 6'-SL (및/또는 이러한 화합물을 함유하는 식물 추출물)이 피부색소침착의 감소에서 효과적임을 나타낸다.

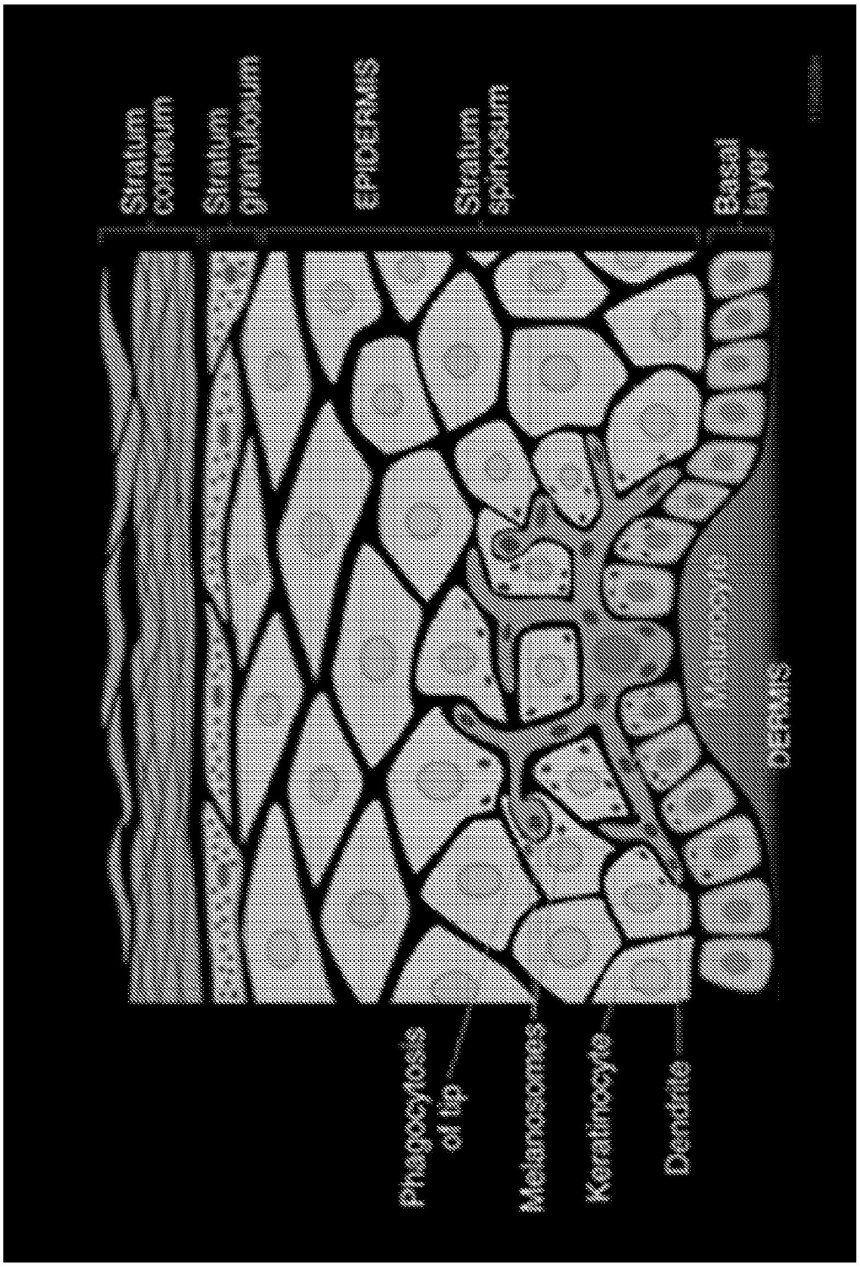
[0333] ST6 및 ST3에 대한 siRNAs의 형질감염

[0334] ST6 및 ST3 siRNAs가 마우스 멜라닌-A 세포에 형질감염되었을 때, EBL 결합 (도 10) 및 멜라닌 생성 (도 11)은 ST6 siRNA에 의해 강하게 저해되었고, ST3 siRNA에 의해서는 어느 정도까지 저해되었다. 종합하면, 이러한 결과들은 시알릴(α2,6)gal-말단 글리칸이 멜라닌 합성 및 각질형성세포로 멜라닌소체 이동에서 중요한 역할을 한다는 것을 설명한다.

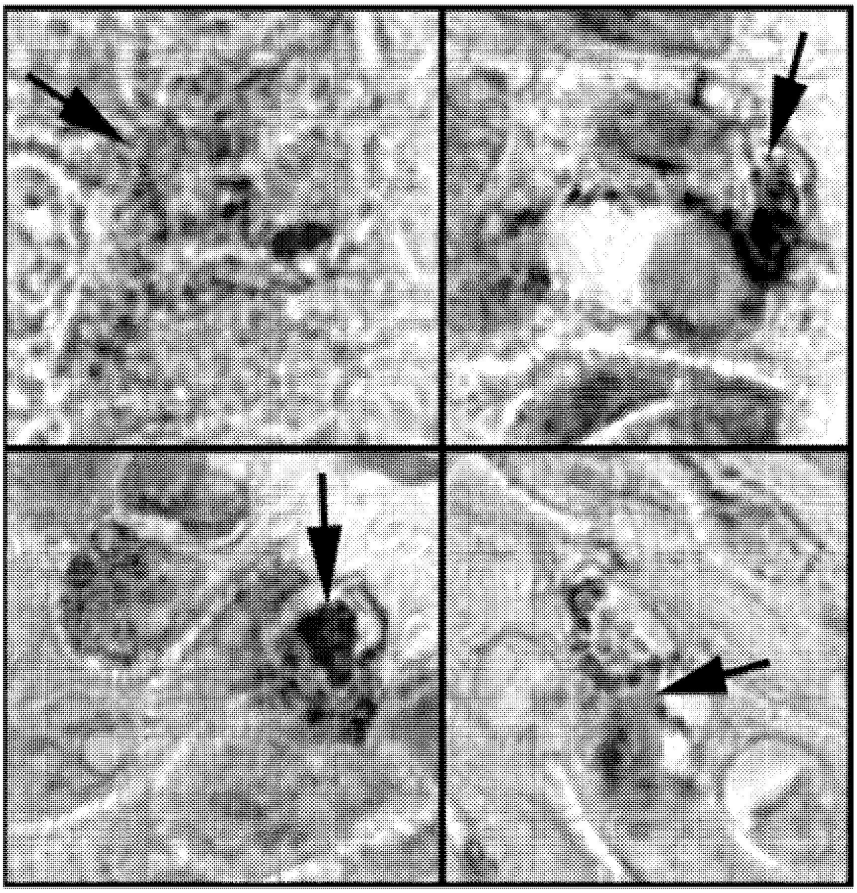
[0335] 각각 및 모든 특허의 명세서, 특허 출원, 및 본 명세서에 인용된 간행물은, 이에 의하여 전체 참조로 본 명세서에 포함된다. 이 발명은 특정 실시예에 관하여 개시된 반면, 기타 실시예 및 이 발명의 변화는 발명의 참된 정신 및 범위로부터 벗어나지 않고 당업자에 의해 발명될 수 있다는 것이 명백하다. 첨부된 청구항은 모든 이러한 실시예 및 등가의 변화를 포함하는 것으로 해석되도록 의도된다.

도면

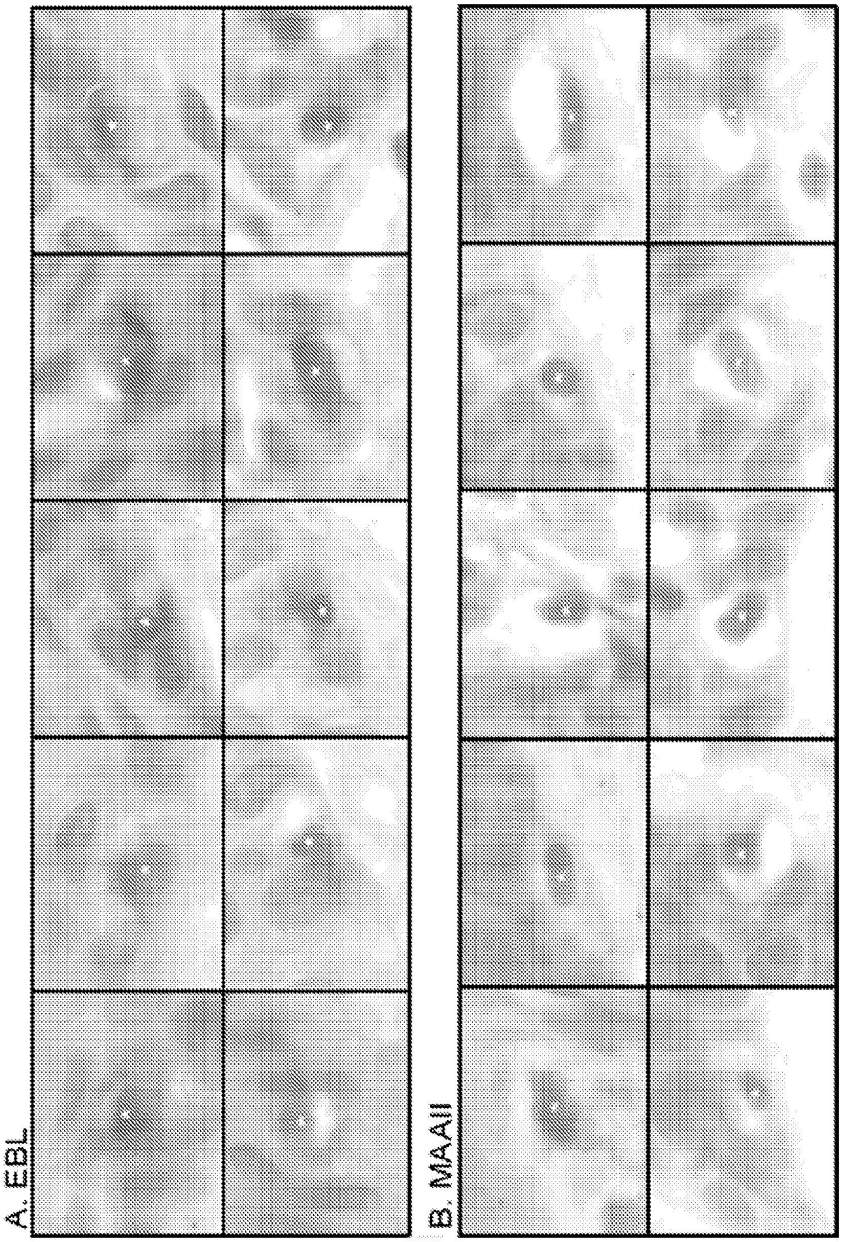
도면1


Stratum corneum
Stratum granulosum
Epidermis
Stratum spinosum
Basal layer
Dermis
Phagocytosed lip
Melanosomes
Keratinocyte
Dendrite

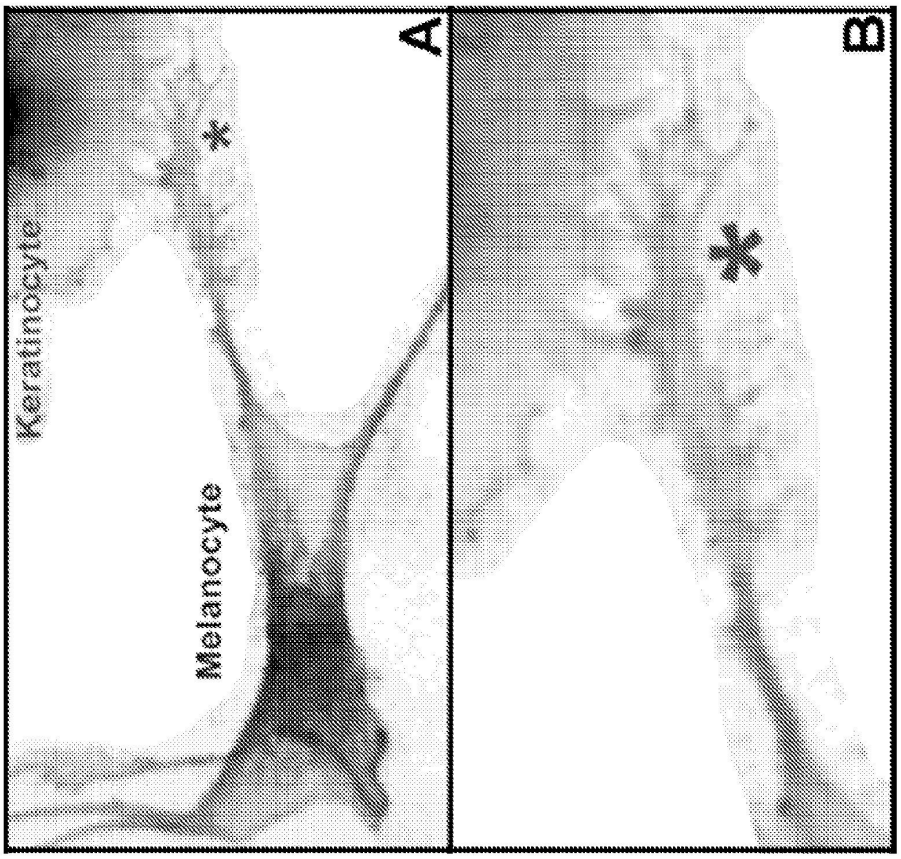
도면2



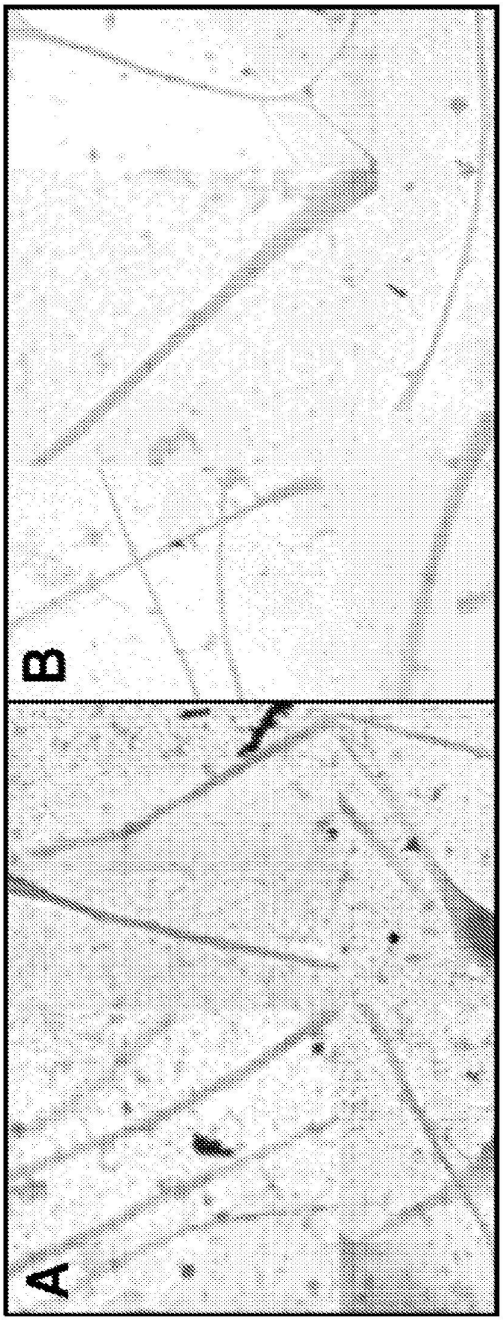
도면3



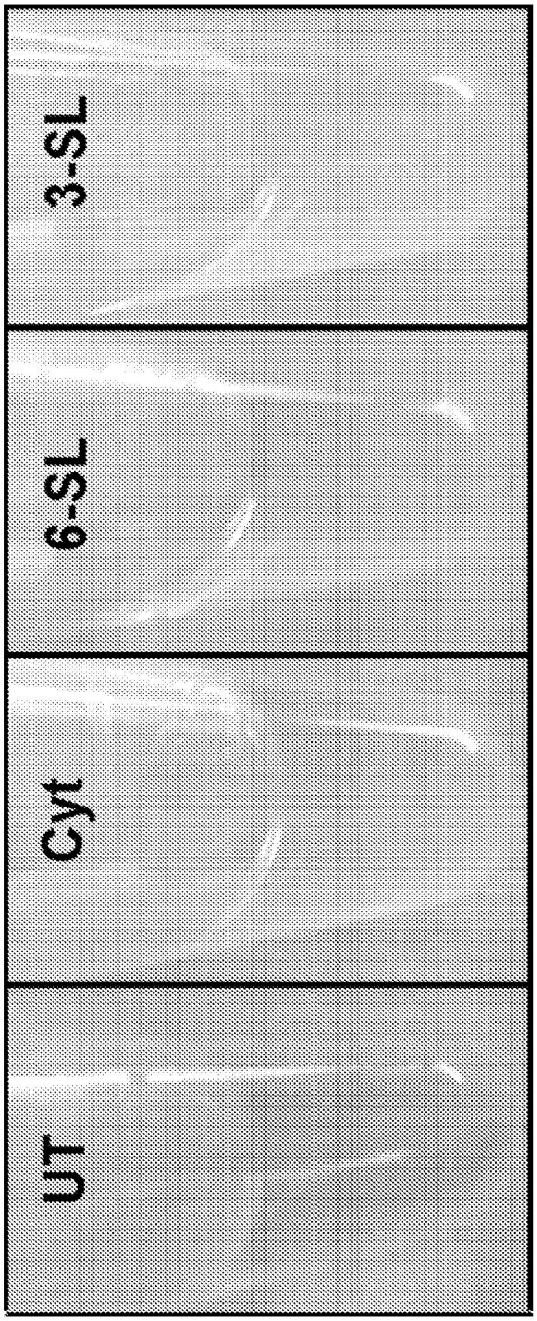
도면4



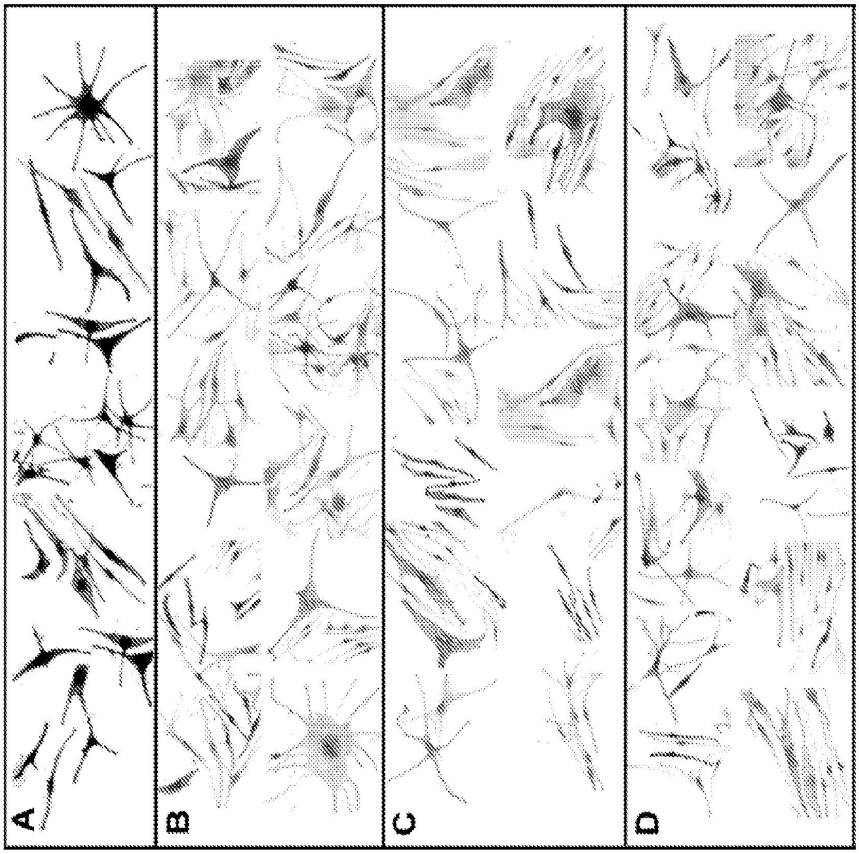
도면5



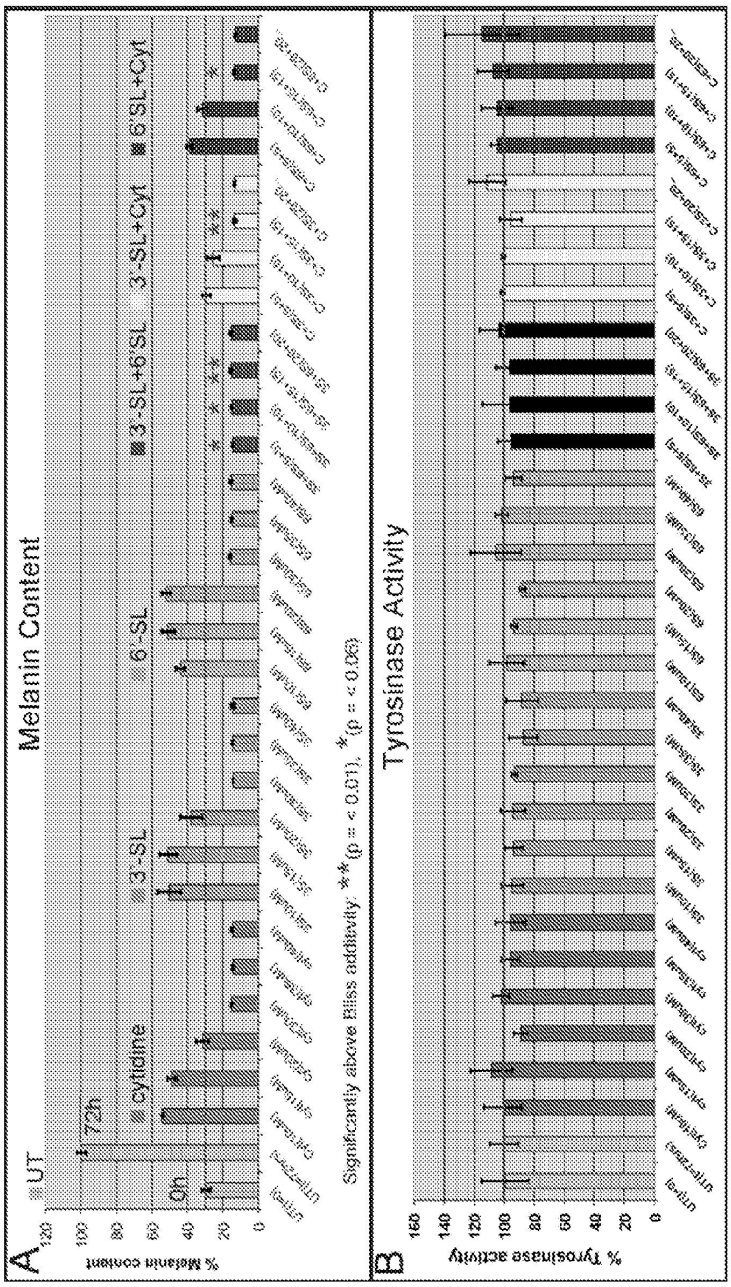
도면6



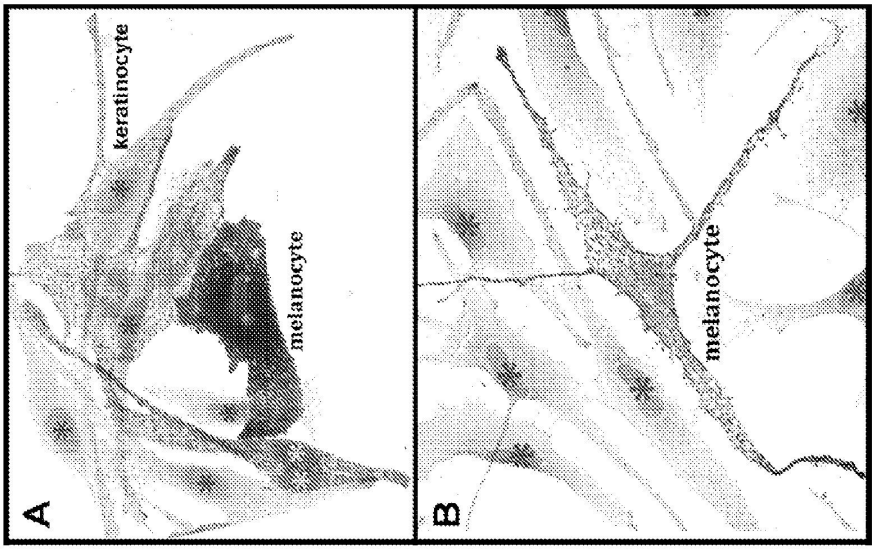
도면7



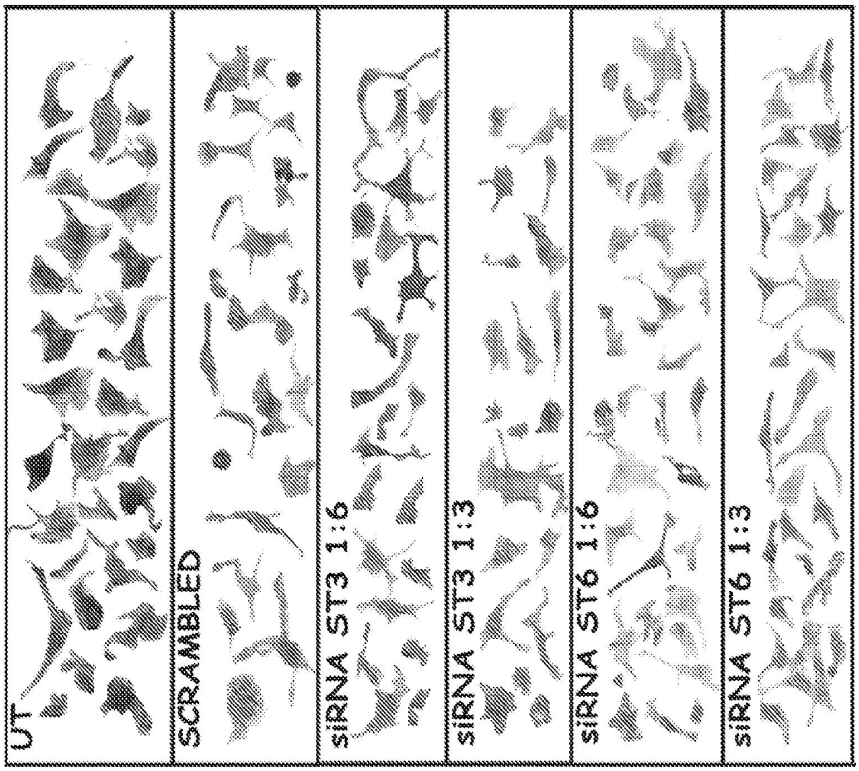
도면8


A
Melanin Content
UT
72h
cytidine
0h
3-SL
6'-SL
3-SL+6'SL
3'-SL+Cyt
6'SL+Cyt
% Melanin content
Significantly above Bliss additivity: **(p = < 0.01), *(p = < 0.05)
B
Tyrosinase Activity
% Tyrosinase activity

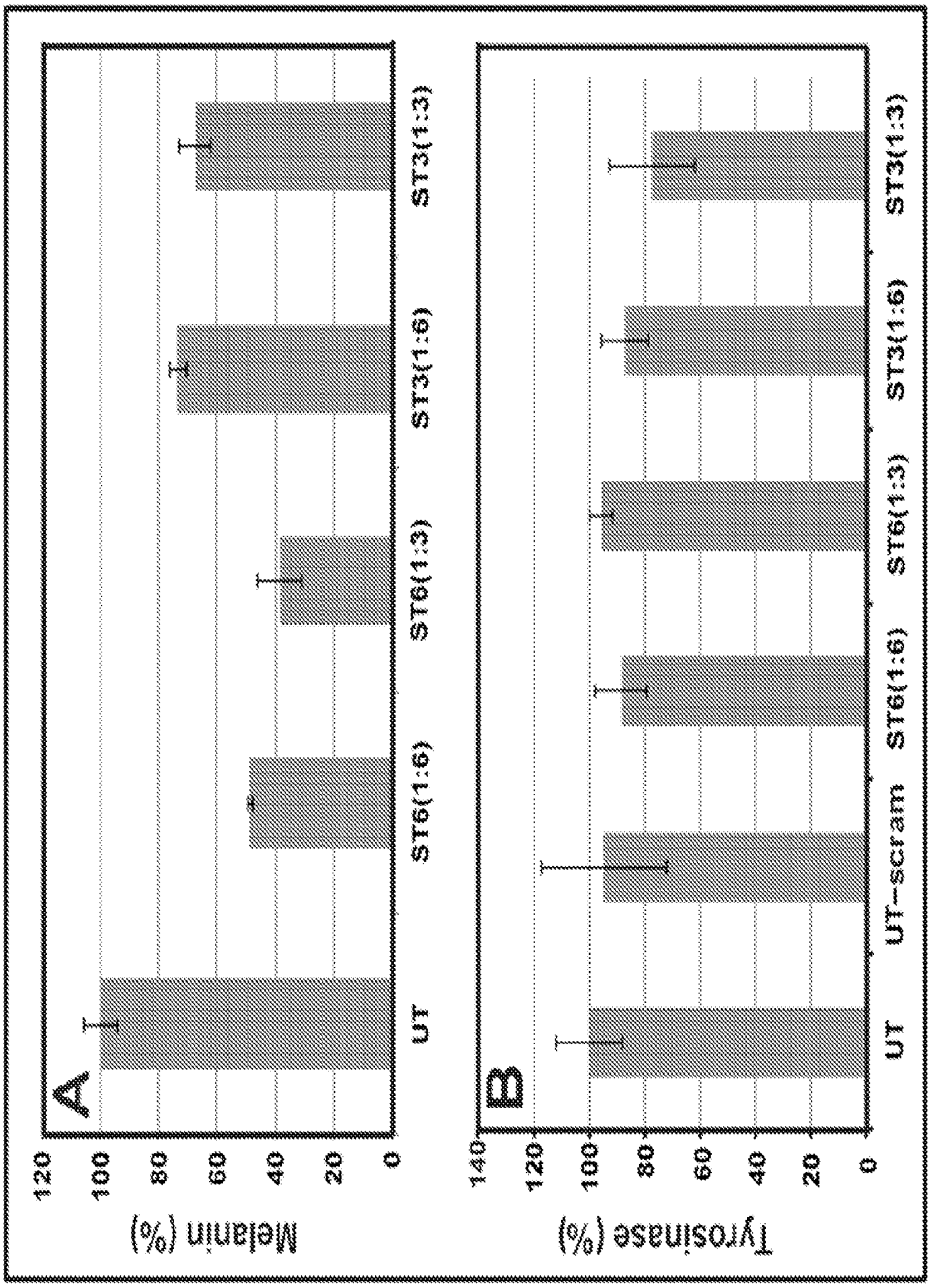
도면9


A
keratinocyte
melanocyte
B
melanocyte

도면10


UT
SCRAMBLED
siRNA ST3 1:6
siRNA ST3 1:3
siRNA ST6 1:6
siRNA ST6 1:3

도면11


A
Melanin (%)
120
100
80
60
40
20
0
UT
ST6(1:6)
ST6(1:3)
ST3(1:6)
ST3(1:3)
B
Tyrosinase (%)
140
120
100
80
60
40
20
0
UT
UT-scram
ST6(1:6)
ST6(1:3)
ST3(1:6)
ST3(1:3)