



(19) 대한민국특허청(KR)
(12) 공개특허공보(A)

(11) 공개번호 10-2023-0096914
(43) 공개일자 2023년06월30일

(51) 국제특허분류(Int. Cl.)

A61K 8/64 (2006.01) A61K 38/07 (2006.01)
A61K 38/08 (2019.01) A61K 38/10 (2006.01)
A61K 38/16 (2006.01) A61K 38/17 (2006.01)
A61K 8/67 (2006.01) A61P 17/00 (2006.01)
A61Q 19/00 (2006.01) A61Q 19/02 (2006.01)
A61Q 19/08 (2006.01)

(52) CPC특허분류

A61K 8/64 (2013.01)
A61K 38/07 (2013.01)

(21) 출원번호 10-2022-7005995

(22) 출원일자(국제) 2020년07월22일

심사청구일자 없음

(85) 번역문제출일자 2022년02월22일

(86) 국제출원번호 PCT/US2020/043033

(87) 국제공개번호 WO 2021/016330

국제공개일자 2021년01월28일

(30) 우선권주장

62/877,164 2019년07월22일 미국(US)

(71) 출원인

원스킨 인크.

미국 94017 캘리포니아주 샌프란시스코 인디애나 스트리트 953

우니앙 브라질레이라 데 에두카상 카톨리쿠 (우베 에세)

브라질 브라질리아 데에프 누클리우 반제이란치 롯08 세엠페도블레베 쿠아드라 05 콘준투 13

우니베르시다지 카톨리쿠 데 브라질리아 (우세베)

브라질 아구아스 클라라스 데에프 01 - 에페세테 로치 케에스 07

(72) 발명자

프랑코 옥타비오

브라질 79112-170 엠에스 캄포 그란데 토키오 스트리트 652

포르토 윌리엄 파리아스

브라질 72236-011 디에프 세일란디아 콘즈 케이 씨29 큐엔피 30

(뒷면에 계속)

(74) 대리인

김진희, 김태홍

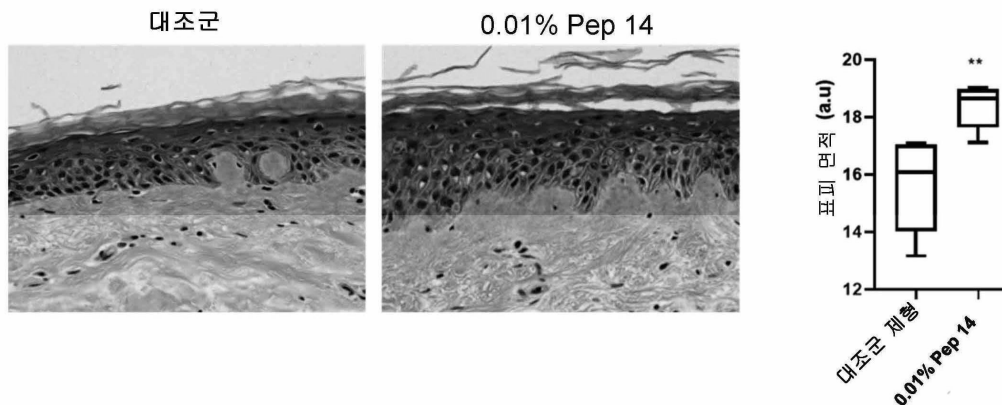
전체 청구항 수 : 총 85 항

(54) 발명의 명칭 항노화 효과를 갖는 폴리펩타이드 및 그의 용도

(57) 요약

노화치료 효과를 제공할 수 있는 폴리펩타이드가 본원에 제공된다. 상기 폴리펩타이드는 국소 적용을 위해 제형화될 수 있고, 개체에서 또는 개체의 세포에서 노화치료 효과를 제공하기 위해 개체에 국소적으로 적용될 수 있다.

대표도



(52) CPC특허분류

A61K 38/08 (2021.08)
A61K 38/10 (2013.01)
A61K 38/16 (2013.01)
A61K 38/17 (2013.01)
A61K 8/675 (2013.01)
A61P 17/00 (2018.01)
A61Q 19/00 (2013.01)
A61Q 19/02 (2013.01)
A61Q 19/08 (2013.01)

(72) 발명자

조나리 알레산드라

미국 94017 캘리포니아주 샌프란시스코 인디애나
스트리트 953

올리베이라 카를리나 레이스 데

미국 94017 캘리포니아주 샌프란시스코 인디애나
스트리트 953

오초아 에드가 안드레스

미국 94017 캘리포니아주 샌프란시스코 인디애나
스트리트 953

카르발호 줄리아나 로트 데

미국 94017 캘리포니아주 샌프란시스코 인디애나
스트리트 953

브레이스 리어

미국 94017 캘리포니아주 샌프란시스코 인디애나
스트리트 953

보로니 마리아나

미국 94017 캘리포니아주 샌프란시스코 인디애나
스트리트 953

구이앙 밀리에네스

미국 94017 캘리포니아주 샌프란시스코 인디애나
스트리트 953

실바 투아니 데 알렌카르 에

미국 94017 캘리포니아주 샌프란시스코 인디애나
스트리트 953

명세서

청구범위

청구항 1

LKGI(서열번호 5)의 아미노산 서열 또는 이의 유사체를 포함하는 단리, 합성 또는 재조합 폴리펩타이드를 포함하는 피부 치료용 조성물로서, 폴리펩타이드는 100개 이하의 아미노산을 포함하는 것인 조성물.

청구항 2

제1항에 있어서, 단리, 합성 또는 재조합 폴리펩타이드는 WLKGI(서열번호 7)의 아미노산 서열 또는 이의 유사체를 포함하는 것인 조성물.

청구항 3

제1항 또는 제2항에 있어서, 단리, 합성 또는 재조합 폴리펩타이드는 LKGIL(서열번호 6)의 아미노산 서열 또는 이의 유사체를 포함하는 것인 조성물.

청구항 4

제1항 내지 제3항 중 어느 한 항에 있어서, 단리, 합성 또는 재조합 폴리펩타이드는 적어도 4개의 아미노산, 10개의 아미노산, 15개의 아미노산, 또는 20개의 아미노산을 포함하는 것인 조성물.

청구항 5

제1항 내지 제4항 중 어느 한 항에 있어서, 치료학적, 영양약학적 또는 미용학적 부형제를 추가로 포함하는 조성물.

청구항 6

제5항에 있어서, 부형제는 국소 적용을 위해 구성된 것인 조성물.

청구항 7

제1항 내지 제6항 중 어느 한 항에 있어서, 인간 피부에 적용하기 위해 구성된 조성물.

청구항 8

제1항 내지 제7항 중 어느 한 항에 있어서, 크림, 경피 패치, 국소 패치, 연고, 오일, 젤, 액체, 파우더, 로션, 세럼, 에멀션, 모이스처라이저, 폼, 페이스 마스크, 무스, 에어로졸, 스프레이, 클린저, 토너 또는 샴푸인 조성물.

청구항 9

제1항 내지 제5항 중 어느 한 항에 있어서, 식용 보충제로서 구성된 조성물.

청구항 10

제9항에 있어서, 음료로서 구성된 조성물.

청구항 11

제1항 내지 제9항 중 어느 한 항에 있어서, 글리세린, 스쿠알렌, 소르비톨, 히알루론산, 히알루론산 유도체, 히알루론산나트륨, 히알루론산나트륨 가교중합체, 나이아신아마이드, 당단백질, 피롤리돈 카르복실산(PCA), 라이신 HCl, 알란토인 및 조류 추출물로 이루어지는 군으로부터 선택된 적어도 하나의 피부 수화제를 포함하는 조성물.

청구항 12

제1항 내지 제9항 중 어느 한 항에 있어서, 식물성 오일, 미네랄 오일, 시어 버터, 코코아 버터, 펠트콜라툼, 지방산, 트리글리세라이드, 벤조에이트, 미리스테이트, 팔미테이트, 스테아레이트, 당지질, 인지질, 스쿠알렌, 글리세린, 세라마이드 및 조류 추출물로 이루어지는 군으로부터 선택된 적어도 하나의 연화제를 포함하는 조성물.

청구항 13

제12항에 있어서, 식물성 오일은 로즈 힙 오일, 안디로바 오일, 포도씨유, 아보카도유, 자두씨유, 프라카씨 오일, 칼리코필럼 스프루세아눔(*Calycophyllum spruceanum*) 오일, 아몬드유 및 아르간 오일로 이루어지는 군으로부터 선택되는 것인 조성물.

청구항 14

제1항 내지 제13항 중 어느 한 항에 있어서, 비타민 A, 비타민 D, 비타민 E, 비타민 F, 비타민 K, 비타민 B1(티아민), 비타민 B2(리보플라빈), 비타민 B3(나이아신), 비타민 B5(판토텐산), 비타민 B7(비오틴), 비타민 B6, 비타민 B12(시아노코발라민), 비타민 B9, 엽산, 나이아신아마이드, 또는 이들의 유도체로 이루어지는 군으로부터 선택된 적어도 하나의 비타민을 포함하는 조성물.

청구항 15

제1항 내지 제14항 중 어느 한 항에 있어서, 약 500 nM 내지 약 500 μ M의 단리, 합성 또는 재조합 폴리펩타이드의 유효량을 포함하는 조성물.

청구항 16

제1항 내지 제14항 중 어느 한 항에 있어서, 약 0.001% 내지 약 5% (w/w)의 단리, 합성 또는 재조합 폴리펩타이드의 유효량을 포함하는 조성물.

청구항 17

제1항 내지 제14항 중 어느 한 항에 있어서, 약 0.01% 내지 약 1%의 단리, 합성 또는 재조합 폴리펩타이드의 유효량을 포함하는 조성물.

청구항 18

제1항 내지 제17항 중 어느 한 항에 있어서, 조성물을 사용하기 이전과 비교하여 피부 상에 조성물을 사용한 이후의 사용자의 피부의 피부 수분 함량, 경표피 수분 손실(trans-epidermal water loss: TEWL), 진피 두께 및 에코발생도, 피부내 분석, 피부 점탄성 특성, 또는 피부 표면 프로파일 중 적어도 하나를 개선시키는 조성물.

청구항 19

제1항 내지 제17항 중 어느 한 항에 있어서, 조성물을 사용하기 이전과 비교하여 피부 상에 조성물을 사용한 이후의 사용자의 피부의 라인/주름의 외관, 피부 톤(균일성)의 외관, 모공의 외관, 텍스처/평활도의 외관, 건조성(시각), 탄성(촉각), 표피 배리어, 피부 거칠기, 피부 과색소침착, 또는 전체적인 외관을 감소시키는 조성물.

청구항 20

제1항 내지 제19항 중 어느 한 항에 있어서, 조성물을 이용하는 피부의 치료는 피부에 대한 에이징(aging)의 영향을 감소시키거나 치료하는 것인 조성물.

청구항 21

제1항 내지 제20항 중 어느 한 항에 있어서, 조성물을 이용하는 피부의 치료는 피부에 대한 세포 노화(cellular senescence)의 영향을 감소시키는 것인 조성물.

청구항 22

제20항 또는 제21항에 있어서, 에이징의 영향은 노화 관련 β -갈락토시다아제 활성 레벨, ATRX 병소/세포의 비율, p16 발현, IL-8 발현, Ki-67 발현, 히알루로닉 신타아제 2 발현, 매트릭스 메탈로프로테아제 1(MMP1) 발현,

시루투인 6(SIRT6) 발현, BLM 발현, 또는 엑소뉴클레아제 1(EXO1) 발현 중 적어도 하나에 의해 평가되는 것인 조성물.

청구항 23

$X_1X_2X_3X_4X_5X_6X_7X_8X_9X_{10}$ 의 아미노산 서열 또는 이의 유사체를 포함하는 단리, 합성 또는 재조합 폴리펩타이드로서,

(a) 아미노산 서열은 제1 서열 서열번호 1에 대해 적어도 70%, 80%, 85%, 90% 또는 95% 동일성을 갖고, 이때 X_1 은 E이고, X_2 는 T이고, X_4 는 K이고, X_6 는 W이고, X_7 은 L이고, X_9 은 G이고, X_{10} 은 I이고;

(i) X_3 는 S가 아니거나; 또는

(ii) X_5 가 임의의 아미노산인 경우 X_8 은 G가 아니거나; 또는

(iii) X_8 이 임의의 아미노산인 경우 X_5 는 N이 아니거나; 또는

(iv) (i), (ii), 또는 (iii) 중 임의의 하나이면서 선택적으로 1, 2, 3, 또는 4개의 보존적 아미노산 치환을 갖거나; 또는

(b) 아미노산 서열은 제2 서열 서열번호 2에 대해 적어도 70%, 80%, 85%, 90% 또는 95% 동일성을 갖고, 이때 X_1 은 A이고, X_2 는 T이고, X_3 는 A이고, X_4 는 K이고, X_5 는 A이고, X_6 는 W이고, X_7 은 L이고, X_8 은 K이고, X_9 은 G이고, X_{10} 은 I면서, 선택적으로 1, 2, 3, 또는 4개의 보존적 아미노산 치환을 갖거나; 또는

(c) 아미노산 서열은 제3 서열 서열번호 3에 대해 적어도 70%, 80%, 85%, 90% 또는 95% 동일성을 갖고, 이때 X_1 은 K이고, X_2 는 L이고, X_5 는 I이고, X_6 는 L이고, X_8 은 G이고, X_{10} 은 A이고;

(i) X_9 이 임의의 아미노산인 경우 X_3 는 N이 아니거나; 또는

(ii) X_3 가 임의의 아미노산인 경우 X_9 은 S가 아니거나; 또는

(iii) X_4 가 임의의 아미노산인 경우 X_7 은 L이 아니거나; 또는

(iv) X_7 이 임의의 아미노산인 경우 X_4 는 S가 아니고; 또는

(v) (i), (ii), (iii), 또는 (iv) 중 임의의 하나이면서 선택적으로 1, 2, 3, 또는 4개의 보존적 아미노산 치환을 갖거나; 또는

(d) 아미노산 서열은 제4 서열 서열번호 4에 대해 적어도 70%, 80%, 85%, 90% 또는 95% 동일성을 갖고, 이때 X_1 은 W이고, X_2 는 L이고, X_3 는 K이고, X_4 는 G이고, X_5 는 I이고, X_6 는 L이고, X_7 은 R이고, X_8 은 E이고, X_9 은 A이고, X_{10} 은 A이면서, 선택적으로 1, 2, 3, 또는 4개의 보존적 아미노산 치환을 갖는 것인 폴리펩타이드.

청구항 24

제23항에 있어서, 아미노산 서열은 LKGI(서열번호 5)를 포함하는 것인 폴리펩타이드.

청구항 25

제23항 또는 제24항에 있어서, 아미노산 서열은 WLKGI(서열번호 7)를 포함하는 것인 폴리펩타이드.

청구항 26

제23항 내지 제25항 중 어느 한 항에 있어서, 아미노산 서열은 LKGIL(서열번호 6)을 포함하는 것인 폴리펩타이드.

청구항 27

제23항에 있어서, 아미노산 서열은 서열번호 1의 서열에 대해 적어도 70%, 80%, 85%, 90% 또는 95% 동일성을 갖는 것인 폴리펩타이드.

청구항 28

제23항에 있어서, 아미노산 서열은 서열번호 1인 폴리펩타이드.

청구항 29

제23항에 있어서, 아미노산 서열은 서열번호 2인 폴리펩타이드.

청구항 30

제23항에 있어서, 아미노산 서열은 서열번호 3의 서열에 대해 적어도 70%, 80%, 85%, 90% 또는 95% 동일성을 갖는 것인 폴리펩타이드.

청구항 31

제23항에 있어서, 아미노산 서열은 서열번호 3의 서열에 대해 적어도 80%, 85%, 90% 또는 95% 동일성을 갖는 것인 폴리펩타이드.

청구항 32

제23항에 있어서, 아미노산 서열은 서열번호 3인 폴리펩타이드.

청구항 33

제23항에 있어서, 아미노산 서열은 서열번호 4인 폴리펩타이드.

청구항 34

제23항 내지 제33항 중 어느 한 항에 있어서, 제조합 폴리펩타이드는 적어도 10개의 아미노산, 15개의 아미노산, 또는 20개의 아미노산 및 100개 이하의 아미노산을 포함하는 것인 폴리펩타이드.

청구항 35

제23항 내지 제34항 중 어느 한 항의 적어도 하나의 단리, 합성 또는 제조합 폴리펩타이드와 치료학적, 영양학적 또는 미용학적 부형제를 포함하는 피부 치료용 조성물.

청구항 36

제35항에 있어서, 부형제는 국소 적용을 위해 구성되는 것인 조성물,

청구항 37

제35항 또는 제36항에 있어서, 인간 피부에 적용하기 위해 제형화된 조성물.

청구항 38

제35항 내지 제37항 중 어느 한 항에 있어서, 크림, 연고, 젤, 액체, 오일, 파우더, 로션, 세럼, 에멀션, 모이스처라이저, 폼, 페이스 마스크, 무스, 에어로졸, 스프레이, 클린저, 토너, 국소 패치, 또는 샴푸인 조성물.

청구항 39

제35항에 있어서, 식용 보충제로서 구성된 조성물.

청구항 40

제39항에 있어서, 음료로서 구성된 조성물.

청구항 41

제35항 내지 제40항 중 어느 한 항에 있어서, 글리세린, 스쿠알렌, 소르비톨, 히알루론산, 히알루론산 유도체, 히알루론산나트륨, 히알루론산나트륨 가교중합체, 나이아신아마이드, 당단백질, 피롤리돈 카르복실산(PCA), 라이신 HCl, 알란토인 및 조류 추출물로 이루어지는 군으로부터 선택된 적어도 하나의 피부 수화제를 포함하는 조

성물.

청구항 42

제35항 내지 제40항 중 어느 한 항에 있어서, 식물성 오일, 미네랄 오일, 시어 버터, 코코아 버터, 펩트콜라툼, 지방산, 트리글리세라이드, 벤조에이트, 미리스테이트, 팔미테이트, 스테아레이트, 당지질, 인지질, 스쿠알렌, 글리세린, 세라마이드 및 조류 추출물로 이루어지는 군으로부터 선택된 적어도 하나의 연화제를 포함하는 조성물.

청구항 43

제42항에 있어서, 식물성 오일은 로즈 힙 오일, 안디로바 오일, 포도씨유, 아보카도유, 자두씨유, 프라카씨 오일, 칼리코펠럼 스프루세아눔 오일, 아몬드유 및 아르간 오일로 이루어지는 군으로부터 선택되는 것인 조성물.

청구항 44

제35항 내지 제43항 중 어느 한 항에 있어서, 비타민 A, 비타민 D, 비타민 E, 비타민 F, 비타민 K, 비타민 B1(티아민), 비타민 B2(리보플라빈), 비타민 B3(나이아신), 비타민 B5(판토텐산), 비타민 B7(비오틴), 비타민 B6, 비타민 B12(시아노코발라민), 비타민 B9, 엽산, 나이아신아마이드, 또는 이들의 유도체로 이루어지는 군으로부터 선택된 적어도 하나의 비타민을 포함하는 조성물.

청구항 45

제35항 내지 제44항 중 어느 한 항에 있어서, 약 500 nM 내지 약 500 μ M의 단리, 합성 또는 재조합 폴리펩타이드의 유효량을 포함하는 조성물.

청구항 46

제35항 내지 제44항 중 어느 한 항에 있어서, 약 0.001% 내지 약 5% (w/w)의 단리, 합성 또는 재조합 폴리펩타이드의 유효량을 포함하는 조성물.

청구항 47

제35항 내지 제44항 중 어느 한 항에 있어서, 약 0.01% 내지 약 1%의 단리, 합성 또는 재조합 폴리펩타이드의 유효량을 포함하는 조성물.

청구항 48

제35항 내지 제47항 중 어느 한 항에 있어서, 조성물을 사용하기 이전과 비교하여 피부 상에 조성물을 사용한 이후의 사용자의 피부의 피부 수분 함량, 경표피 수분 손실(TEWL), 진피 두께 및 에코발생도, 피부내 분석, 피부 점탄성 특성, 또는 피부 표면 프로파일 중 적어도 하나를 개선시키는 조성물.

청구항 49

제35항 내지 제47항 중 어느 한 항에 있어서, 조성물을 사용하기 이전과 비교하여 피부 상에 조성물을 사용한 이후의 사용자의 피부의 라인/주름의 외관, 피부 톤(균일성)의 외관, 모공의 외관, 텍스처/평활도의 외관, 견고성(시각), 탄성(촉각), 표피 배리어, 피부 거칠기, 피부 과색소침착, 또는 전체적인 외관을 감소시키는 조성물.

청구항 50

제35항 내지 제49항 중 어느 한 항에 있어서, 조성물을 이용하는 피부의 치료는 피부에 대한 에이징의 영향을 감소시키거나 치료하는 조성물.

청구항 51

제35항 내지 제50항 중 어느 한 항에 있어서, 조성물을 이용하는 피부의 치료는 피부에 대한 세포 노화의 영향을 감소시키는 조성물.

청구항 52

제50항 내지 제51항 중 어느 한 항에 있어서, 에이징의 영향은 노화 관련 B-갈락토시다아제 활성 레벨, ATRX 병소/세포의 비율, p16 발현, IL-8 발현, Ki-67 발현, 히알루로닉 신타아제 2 발현, 매트릭스 메탈로프로테아제 1(MMP1) 발현, 시루투인 6(SIRT6) 발현, BLM 발현, 또는 엑소뉴클레아제 1(EXO1) 발현 중 적어도 하나에 의해 평가되는 것인 조성물.

청구항 53

병태의 치료가 필요한 개체에서 병태를 치료하는 방법으로서, 개체에게 서열번호 5의 아미노산 서열을 포함하는 조성물을 투여하는 단계를 포함하는 방법.

청구항 54

제53항에 있어서, 조성물은 서열번호 6의 아미노산 서열을 포함하는 것인 방법.

청구항 55

제53항 또는 제54항에 있어서, 조성물은 서열번호 7의 아미노산 서열을 포함하는 것인 방법.

청구항 56

제53항 내지 제55항 중 어느 한 항에 있어서, 투여는 조성물을 개체에게 국소적으로 적용하는 것을 포함하는 방법.

청구항 57

제53항 내지 제56항 중 어느 한 항에 있어서, 개체는 인간 또는 다른 동물인 방법.

청구항 58

제53항 내지 제57항 중 어느 한 항에 있어서, 조성물의 유효량을 개체에게 투여하는 것을 포함하는 방법.

청구항 59

제53항 내지 제58항 중 어느 한 항에 있어서, 병태는 개체 내에 노화 세포의 축적과 관련된 질환인 방법.

청구항 60

제53항에 있어서, 노화 세포의 축적과 관련된 질환은 에이징 피부를 포함하는 것인 방법.

청구항 61

제53항 내지 제60항 중 어느 한 항에 있어서, 조성물은 글리세린, 스쿠알렌, 소르비톨, 히알루론산, 히알루론산 유도체, 히알루론산나트륨, 히알루론산나트륨 가교중합체, 나이아신아마이드, 당단백질, 피룰리돈 카르복실산(PCA), 라이신 HCl, 알란토인 및 조류 추출물로 이루어지는 군으로부터 선택된 적어도 하나의 피부 수화제를 포함하는 것인 방법.

청구항 62

제53항 내지 제61항 중 어느 한 항에 있어서, 조성물은 식물성 오일, 미네랄 오일, 시어 버터, 코코아 버터, 페트롤라툼, 지방산, 트리글리세라이드, 벤조에이트, 미리스테이트, 팔미테이트, 스테아레이트, 당지질, 인지질, 스쿠알렌, 글리세린, 세라마이드 및 조류 추출물로 이루어지는 군으로부터 선택된 적어도 하나의 연화제를 포함하는 것인 방법.

청구항 63

제62항에 있어서, 식물성 오일은 로즈 힙 오일, 안디로바 오일, 포도씨유, 아보카도유, 자두씨유, 프라카씨 오일, 칼리코필럼 스프루세아눔 오일, 아몬드유 및 아르간 오일로 이루어지는 군으로부터 선택되는 것인 방법.

청구항 64

제53항 내지 제63항 중 어느 한 항에 있어서, 조성물은 비타민 A, 비타민 D, 비타민 E, 비타민 F, 비타민 K, 비

타민 B1(티아민), 비타민 B2(리보플라빈), 비타민 B3(나이아신), 비타민 B5(판토텐산), 비타민 B7(비오틴), 비타민 B6, 비타민 B12(시아노코발라민), 비타민 B9, 엽산, 나이아신아마이드, 또는 이들의 유도체로 이루어지는 군으로부터 선택된 적어도 하나의 비타민을 포함하는 것인 방법.

청구항 65

제53항 내지 제64항 중 어느 한 항에 있어서, 조성물은 약 500 nM 내지 약 500 μ M의 단리, 합성 또는 재조합 폴리펩타이드의 유효량을 포함하는 것인 방법.

청구항 66

제53항 내지 제64항 중 어느 한 항에 있어서, 조성물은 약 0.001% 내지 약 5% (w/w)의 단리, 합성 또는 재조합 폴리펩타이드의 유효량을 포함하는 것인 방법.

청구항 67

제53항 내지 제66항 중 어느 한 항에 있어서, 조성물은 진피 내로 단리, 합성 또는 재조합 폴리펩타이드의 10% 이하의 낮은 진피 투과를 달성하기 위해 제형화되는 것인 방법.

청구항 68

제53항 내지 제67항 중 어느 한 항에 있어서, 조성물은 조성물을 사용하기 이전과 비교하여 피부 상에 조성물을 사용한 이후의 사용자의 피부의 피부 수분 함량, 경표피 수분 손실(TEWL), 진피 두께 및 에코발생도, 피부내 분석, 피부 점탄성 특성, 또는 피부 표면 프로파일 중 적어도 하나를 개선시키는 것인 방법.

청구항 69

제53항 내지 제68항 중 어느 한 항에 있어서, 조성물은 조성물을 사용하기 이전과 비교하여 피부 상에 조성물을 사용한 이후의 사용자의 피부의 라인/주름의 외관, 피부 톤(균일성)의 외관, 모공의 외관, 텍스처/평활도의 외관, 건고성(시각), 탄성(촉각), 표피 배리어, 피부 거칠기, 피부 과색소침착, 또는 전체적인 외관을 감소시키는 것인 방법.

청구항 70

제53항 내지 제69항 중 어느 한 항에 있어서, 조성물을 이용하는 피부의 치료는 피부에 대한 에이징의 영향을 감소시키거나 치료하는 것인 방법.

청구항 71

제53항 내지 제70항 중 어느 한 항에 있어서, 조성물을 이용하는 피부의 치료는 피부에 대한 세포 노화의 영향을 감소시키는 것인 방법.

청구항 72

제70항 또는 제71항에 있어서, 에이징의 영향은 노화 관련 B-갈락토시다아제 활성 레벨, ATRX 병소/세포의 비율, p16 발현, IL-8 발현, Ki-67 발현, 히알루로닉 신타아제 2 발현, 매트릭스 메탈로프로테아제 1(MMP1) 발현, 시루투인 6(SIRT6) 발현, BLM 발현, 또는 엑소뉴클레아제 1(EXO1) 발현 중 적어도 하나에 의해 평가되는 것인 방법.

청구항 73

세포 노화의 감소가 필요한 개체에서 세포 노화를 감소시키는 방법으로서, 상기 방법은 개체에게, 선택적으로 하나의 보존적 아미노산 치환을 갖는 LKGI(서열번호 5)의 아미노산 서열을 포함하는 폴리펩타이드를 포함하는 조성물을 투여하는 단계를 포함하고, 폴리펩타이드는 100개 이하의 아미노산을 포함하는 것인 방법.

청구항 74

제73항에 있어서, 폴리펩타이드는 적어도 4개의 아미노산, 10개의 아미노산, 15개의 아미노산, 또는 20개의 아미노산을 포함하는 것인 방법.

청구항 75

제73항에 있어서, 조성물은 선택적으로 하나의 보존적 아미노산 치환을 갖는 WLKGI(서열번호 7)의 아미노산 서열을 포함하는 것인 방법.

청구항 76

제73항에 있어서, 조성물은 선택적으로 하나의 보존적 아미노산 치환을 갖는 LKGIL(서열번호 6)의 아미노산 서열을 포함하는 것인 방법.

청구항 77

제75항 또는 제76항에 있어서, 폴리펩타이드는 적어도 5개의 아미노산, 10개의 아미노산, 15개의 아미노산, 또는 20개의 아미노산을 포함하고, 100개 이하의 아미노산을 포함하는 것인 방법.

청구항 78

제73항 내지 제77항 중 어느 한 항에 있어서, 조성물은 치료학적, 영양약학적 또는 미용학적 부형제를 추가로 포함하는 것인 방법.

청구항 79

세포 노화의 감소가 필요한 개체에서 세포 노화를 감소시키는 방법으로서, 개체에게, 제23항 내지 제34항 중 어느 한 항의 적어도 하나의 폴리펩타이드를 포함하는 치료학적, 영양약학적 또는 미용학적 조성물을 투여하는 단계를 포함하는 방법.

청구항 80

제79항에 있어서, 조성물은 치료학적, 영양약학적 또는 미용학적 부형제를 추가로 포함하는 것인 방법.

청구항 81

제79항 또는 제80항에 있어서, 투여는 개체의 피부의 일부분에 조성물을 적용하는 것을 포함하는 것인 방법.

청구항 82

제79항 내지 제81항 중 어느 한 항에 있어서, 조성물은 개체의 복수의 세포의 수명을 연장하고/하거나, 개체의 복수의 세포에서 SIRT6 발현을 유도하고/하거나, 개체의 복수의 세포에서 세포 재생 속도를 증가시키고/시키거나, 개체의 복수의 세포에서 아포토시스를 촉진하고/하거나, 개체의 복수의 세포에서 DNA 수복을 촉진하고/하거나, 개체의 복수의 세포에서 콜라겐 생성을 증가시키고/시키거나, 개체의 복수의 세포에서 히알루론산 신타아제 생성을 증가시키고/시키거나, 개체의 복수의 세포에서 ATRX 핵 병소(nuclear foci) 축적을 감소시키고/시키거나, 개체의 복수의 세포에서 p16 발현을 감소시키고/시키거나, 개체의 복수의 세포에서 노화 관련 베타-갈락토시다아제 생성을 감소시키고/시키거나, 개체의 복수의 세포에서 IL8 발현을 감소시키고/시키거나, 개체의 복수의 세포에서 MMP1 발현을 감소시키고/시키거나, 개체의 복수의 세포에서 BLM 발현을 증가시키고/시키거나, 개체의 복수의 세포에서 UV 유도된 DNA 손상을 방지하는 것인 방법.

청구항 83

병태의 치료가 필요한 개체에서 병태를 치료하는 방법으로서, 상기 방법은 개체에게, 선택적으로 하나의 보존적 아미노산 치환을 갖는 서열번호 5의 아미노산 서열을 포함하는 치료학적, 영양약학적 또는 미용학적 조성물을 투여하는 단계를 포함하는 방법.

청구항 84

제83항에 있어서, 치료학적, 영양약학적 또는 미용학적 조성물은 선택적으로 하나의 보존적 아미노산 치환을 갖는 서열번호 6의 아미노산 서열을 포함하는 것인 방법.

청구항 85

제83항 또는 제84항에 있어서, 치료학적, 영양약학적 또는 미용학적 조성물은 선택적으로 하나의 보존적 아미노

산 치환을 갖는 서열번호 7의 아미노산 서열을 포함하는 것인 방법.

발명의 설명

기술 분야

[0001] 상호 참조

[0002] 본 출원은, 2019년 7월 22일자로 출원된 미국 가특허 출원 제62/877,164호를 우선권으로 주장하며, 상기 가특허 출원의 전체 내용은 본원에 참고로 인용되어 있다.

배경 기술

[0003] 세포 노화(cellular senescence)의 축적은 유기체 에이징(aging)의 산물일뿐만 아니라, 이는 또한 양성 피드백 사이클에서 추가적인 노화 유도에 적극적으로 기여할 수 있다. 에이징의 특징 중에서, 세포 노화는 에이징의 중심 위치의 통합적이고 주된, 길항적이고 통합적인 관점을 차지할 수 있다. 먼저, 노화는 영향받은 조직의 조직 수복 및 재생 능력을 타협할 수 있는데, 그 이유는 노화가 전구체 세포의 증식 능력을 감소시키기 때문이다. 둘째, 노화 세포(senescent cell)는 그들의 노화 관련 분비 표현형(senescence-associated secretory phenotype, SASP)을 특징으로 하는 파라크라인 신호전달 환경(paracrine signaling milieu)을 변경시킬 수 있는데, 이는 염증 및 추가로 세포 노화를 유도함으로써 가능하게는 잠재적으로 유해한 염증 반응을 악화시키고, 가능하게는 조직 손상을 촉진할 수 있다. 셋째, 가령에 따른 노화 세포의 축적은 몇몇 조직 내에서 보고되었는데, 피부를 포함하나 이로 제한되는 것은 아니다. 넷째, 세포 노화는 질병, 예를 들어 황반 변성, 치매, 아테롬성경화증 및 암에서 활동적인 플레이어일 수 있다.

[0004] 노화 세포는 노화 관련 베타-갈락토시다아제(Senescence-Associated beta-galactosidase, SA-BGal), p16 발현, 및 알파 지중해 빈혈/핵 내의 정신 지체 X 연관 염색질 리모델링 단백질(X-linked chromatin remodeling protein, ATRX) 병소 축적에 의해 확인될 수 있다. 또한, 감소된 증식능 및 유사분열 자극에 대한 내성을 포함하는 기능적인 변경은 노화 세포를 구별한다.

발명의 내용

[0005] 본 출원에서 LKGI(서열번호 5)의 아미노산 서열 또는 이의 유사체, LKGIL(서열번호 6)의 아미노산 서열 또는 이의 유사체, 또는 WLKGI(서열번호 7)의 아미노산 서열 또는 이의 유사체를 포함하는 단리, 합성 또는 재조합 폴리펩타이드를 포함하는 조성물이 기재된다. 몇몇 실시양태에서, 그러한 폴리펩타이드는 적어도 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, 20, 21, 22, 23, 24, 25, 26, 27, 28, 29, 30, 35, 또는 40개의 아미노산을 포함할 수 있다. 대안적으로 또는 추가적으로, 그러한 폴리펩타이드는 최대 100, 90, 80, 70, 60, 50, 40, 35, 30, 25, 또는 20개의 아미노산을 포함한다. 몇몇 예에서, 폴리펩타이드는 서열번호 1-4 중 임의의 서열에 대해 적어도 70%, 75%, 80%, 85%, 90%, 95%, 96%, 97%, 98% 또는 99% 서열 동일성을 보유한다.

[0006] 또한, 본 출원에서 $X_1X_2X_3X_4X_5X_6X_7X_8X_9X_{10}$ 에 의해 나타내어지는 서열번호 8의 아미노산 서열 또는 이의 유사체를 포함하는 단리, 합성 또는 재조합 폴리펩타이드가 기재되는데, 이때 X_1 은 E이고, X_2 는 T이고, X_4 는 K이고, X_6 는 W이고, X_7 은 L이고, X_9 은 G이고, X_{10} 은 I이고;

[0007] (i) X_3 는 S가 아니거나; 또는

[0008] (ii) X_5 가 임의의 아미노산인 경우 X_8 은 G가 아니거나; 또는

[0009] (iii) X_8 이 임의의 아미노산인 경우 X_5 는 N이 아니거나; 또는

[0010] (iv) (i), (ii), 또는 (iii) 중 임의의 하나이면서 선택적으로 1, 2, 3, 또는 4개의 보존적 아미노산 치환을 갖거나; 또는

[0011] (b) 아미노산 서열은 제2 서열 서열번호 2에 대해 적어도 70%, 80%, 85%, 90% 또는 95% 동일성을 갖고, 이때 X_1 은 A이고, X_2 는 T이고, X_3 는 A이고, X_4 는 K이고, X_5 는 A이고, X_6 는 W이고, X_7 은 L이고, X_8 은 K이고, X_9 은 G이고, X_{10} 은 I면서, 선택적으로 1, 2, 3, 또는 4개의 보존적 아미노산 치환을 갖거나; 또는 (c) 아미노산 서열은 제3

서열 서열번호 3에 대해 적어도 70%, 80%, 85%, 90% 또는 95% 동일성을 갖고, 이때 X_1 은 K이고, X_2 는 L이고, X_5 는 I이고, X_6 는 L이고, X_8 은 G이고, X_{10} 은 A이고; (i) X_9 이 임의의 아미노산인 경우 X_3 는 N이 아니거나; 또는 (ii) X_3 가 임의의 아미노산인 경우 X_9 은 S가 아니거나; 또는 (iii) X_4 가 임의의 아미노산인 경우 X_7 은 L이 아니거나; 또는 (iv) X_7 이 임의의 아미노산인 경우 X_4 는 S가 아니고; 또는 (v) (i), (ii), (iii), 또는 (iv) 중 임의의 하나이면서 선택적으로 1, 2, 3, 또는 4개의 보존적 아미노산 치환을 갖거나; 또는 (d) 아미노산 서열은 제4 서열 서열번호 4에 대해 적어도 70%, 80%, 85%, 90% 또는 95% 동일성을 갖고, 이때 X_1 은 W이고, X_2 는 L이고, X_3 는 K이고, X_4 는 G이고, X_5 는 I이고, X_6 는 L이고, X_7 은 R이고, X_8 은 E이고, X_9 은 A이고, X_{10} 은 A이면서, 선택적으로 1, 2, 3, 또는 4개의 보존적 아미노산 치환을 보유한다.

[0012] 몇몇 실시양태에서, 아미노산 서열은 LKGI(서열번호 5)를 포함한다. 몇몇 실시양태에서, 아미노산 서열은 WLKGI(서열번호 7)를 포함한다. 몇몇 실시양태에서, 아미노산 서열은 LKGIL(서열번호 6)을 포함한다. 몇몇 실시양태에서, 아미노산 서열은 서열번호 1의 서열에 대해 적어도 70%, 80%, 85%, 90% 또는 95%의 동일성을 보유한다. 몇몇 실시양태에서, 아미노산 서열은 서열번호 1이다. 몇몇 실시양태에서, 아미노산 서열은 서열번호 2이다. 몇몇 실시양태에서, 아미노산 서열은 서열번호 3의 서열에 대해 적어도 70%, 80%, 85%, 90% 또는 95%의 동일성을 보유한다. 몇몇 실시양태에서, 아미노산 서열은 서열번호 3이다. 몇몇 실시양태에서, 아미노산 서열은 서열번호 4이다. 몇몇 실시양태에서, 제조합 폴리펩타이드는 적어도 10개의 아미노산, 15 아미노산, 또는 20개의 아미노산을 포함한다.

[0013] 본 출원에서 제공된 조성물은 치료학적, 영양약학적 또는 미용학적(therapeutic, nutraceutical, 또는 cosmetic)으로 사용하기 위해 제형화될 수 있다.

[0014] 몇몇 실시양태에서, 제형은 치료학적, 영양약학적 또는 미용학적 부형제(therapeutic, nutraceutical, 또는 cosmetic excipient)를 추가로 포함한다. 몇몇 실시양태에서, 부형제는 국소 적용을 위해 구성된다. 부형제는 국소 보충제로서 구성된다. 추가의 실시양태에서, 제형은 인간 피부에 적용하기 위해 구성된다. 몇몇 실시양태에서, 제형은 크림, 경피 패치, 국소 패치, 연고, 오일, 젤, 액체, 파우더, 로션, 세럼, 에멀션, 모이스처라이저, 폼, 페이스 마스크, 무스, 에어로졸, 스프레이, 클린저, 토너 또는 샴푸이다. 몇몇 실시양태에서, 제형은 음과 처리, 초음파 처리, LED 처리, 광 처리, 전기 처리, 또는 고주파 처리와 함께 사용될 수 있다. 몇몇 실시양태에서, 경피 패치는 제형을 피부의 표피층에 전달한다. 몇몇 실시양태에서, 경피 패치는 제형을 피부의 표피층 및 진피층에 전달한다. 몇몇 실시양태에서, 제형은 개체 내에서 최소량 또는 소량으로 전신적으로 전달되거나, 또는 개체의 혈류 내로 직접 전달되도록 의도되지 않는다. 몇몇 실시양태에서, 제형은 전달 부위에서 및 전달 부위 주위에서 국소적으로 작용한다. 몇몇 실시양태에서, 제형은 전신적으로 효과를 보유하지 않거나 최소 효과를 보유한다.

[0015] 몇몇 실시양태에서, 제형은 식용 보충제로서 구성된다. 몇몇 경우에서, 제형은 음료로서 구성된다.

[0016] 본 출원에서 본 출원의 적어도 하나의 제조합 또는 합성 폴리펩타이드와 치료학적, 영양약학적 또는 미용학적 부형제를 포함하는 치료학적, 영양약학적 또는 미용학적 제형(therapeutic, nutraceutical, 또는 cosmetic formulations)이 기재된다.

[0017] 몇몇 실시양태에서, 부형제는 국소 적용을 위해 구성된다. 몇몇 실시양태에서, 부형제는 국소 보충제로서 구성된다. 추가의 실시양태에서, 제형은 인간 피부에 적용하기 위해 제형화된다. 더 구체적으로, 제형은 표피로부터 진피로 국소적으로 투과되도록 구성된다. 몇몇 실시양태에서, 제형은 표피층 및 진피층을 통해 국소적으로 투과되도록 구성될 수 있다. 몇몇 실시양태에서, 제형은 표피층을 통해 국소적으로 투과되어 진피층 내로 저농도를 보유하도록 구성될 수 있다. 종종, 제형 내의 성분의 투과는 프란츠 확산 셀(Franz diffusion cell)을 이용하는 것들을 포함하나 이로 제한되는 것은 아닌 다양한 투과 연구를 이용하여 평가될 수 있다. 몇몇 실시양태에서, 제형은 폴리펩타이드를 운반하여 피부를 통해 폴리펩타이드의 방출 시간 및/또는 투여 깊이를 제어하기 위해 담체, 미소구, 리포솜, 또는 마이셀을 포함한다. 몇몇 경우에서, 본 출원의 제형은 크림, 연고, 젤, 액체, 오일, 파우더, 로션, 세럼, 에멀션, 모이스처라이저, 폼, 페이스 마스크, 무스, 에어로졸, 스프레이, 클린저, 토너, 국소 패치, 또는 샴푸이다.

[0018] 몇몇 실시양태에서, 제형은 식용 보충제로서 구성된다. 몇몇 실시양태에서, 제형은 음료로서 구성된다. 몇몇 실시양태에서, 제형은 정제, 캡슐, 젤, 거미(gummy), 또는 파우더로서 구성된다.

[0019] 본 출원에서 병태의 치료가 필요한 개체에서 병태를 치료하는 방법이 기재되는데, 상기 방법은 개체에게 서열번호

호 5-7 중 적어도 하나의 아미노산 서열을 포함하는 치료학적, 영양약학적 또는 미용학적 제형을 투여하는 단계를 포함한다.

[0020] 몇몇 실시양태에서, 투여는 제형을 개체에게 국소적으로 적용하는 단계를 포함한다. 추가의 실시양태에서, 개체는 인간 또는 다른 동물이다. 몇몇 실시양태에서, 상기 방법은 유효량의 제형을 개체에게 투여하는 단계를 포함한다.

[0021] 몇몇 실시양태에서, 병태는 개체에서 노화 세포의 축적과 관련된 질환이다. 몇몇 실시양태에서, 노화 세포의 축적과 관련된 질환은 에이징 피부를 포함한다. 몇몇 실시양태에서, 병태는 조로증 및/또는 조로증의 효과와 관련된 질환이다. 몇몇 실시양태에서, 조로증은 피부의 표피층 및 진피층에서 조기 에이징 징후를 갖는 병태를 포함한다.

[0022] 본 출원에서 세포 노화의 감소가 필요한 개체에서 세포 노화를 감소시키는 방법이 기재되는데, 상기 방법은 개체에게, 선택적으로 하나의 보존적 아미노산 치환을 갖는 LKGI(서열번호 5)의 아미노산 서열을 포함하는 폴리펩타이드를 포함하는 치료학적, 영양약학적 또는 미용학적 제형을 투여하는 단계를 포함한다.

[0023] 몇몇 실시양태에서, 폴리펩타이드는 적어도 4개의 아미노산, 10개의 아미노산, 15개의 아미노산, 또는 20개의 아미노산을 포함한다. 몇몇 실시양태에서, 제형은 선택적으로 하나의 보존적 아미노산 치환을 갖는 WLKGI(서열번호 7)의 아미노산 서열을 포함한다. 몇몇 실시양태에서, 제형은 선택적으로 하나의 보존적 아미노산 치환을 갖는 LKGIL(서열번호 6)의 아미노산 서열을 포함한다. 몇몇 실시양태에서, 폴리펩타이드는 적어도 5개의 아미노산, 10개의 아미노산, 15개의 아미노산, 또는 20개의 아미노산을 포함한다. 몇몇 실시양태에서, 폴리펩타이드는 10개 이하의 아미노산, 15개 이하의 아미노산, 20개 이하의 아미노산, 25개 이하의 아미노산, 30개 이하의 아미노산, 35개 이하의 아미노산, 또는 40개 이하의 아미노산을 포함한다.

[0024] 몇몇 실시양태에서, 제형은 치료학적, 영양약학적 또는 미용학적 부형제를 추가로 포함한다.

[0025] 본 출원에서 세포 노화의 감소가 필요한 환자에서 세포 노화의 감소 방법이 기재되는데, 상기 방법은 개체에게 본 출원에 기재된 적어도 하나의 폴리펩타이드를 포함하는 치료학적, 영양약학적 또는 미용학적 제형을 투여하는 단계를 포함한다.

[0026] 몇몇 실시양태에서, 제형은 치료학적, 영양약학적 또는 미용학적 부형제를 추가로 포함한다. 몇몇 실시양태에서, 투여는 개체의 피부의 일부분에 제형을 적용하는 단계를 포함한다. 몇몇 실시양태에서, 제형은 개체의 복수의 세포의 수명을 연장하고, 개체의 복수의 세포에서 SIRT6 발현을 유도하고, 개체의 복수의 세포에서 세포 재생 속도를 증가시키고, 개체의 복수의 세포에서 아포토시스를 촉진하고, 개체의 복수의 세포에서 DNA 수복을 촉진하고, 개체의 복수의 세포에서 콜라겐 생성을 증가시키고, 개체의 복수의 세포에서 히알루로닉 신타아제 생성을 증가시키고, 개체의 복수의 세포에서 ATRX 핵 병소(nuclear foci) 축적을 감소시키고, 개체의 복수의 세포에서 p16 발현을 감소시키고, 개체의 복수의 세포에서 노화 관련 베타-갈락토시다아제 생성을 감소시키고, 개체의 복수의 세포에서 IL8 발현을 감소시키고, 개체의 복수의 세포에서 MMP1 발현을 감소시키고, 개체의 복수의 세포에서 BLM 발현을 증가시키고, 및/또는 개체의 복수의 세포에서 UV 유도된 DNA 손상을 방지한다.

[0027] 본 출원에서 병태의 치료가 필요한 개체에서 병태를 치료하는 방법이 기재되는데, 상기 방법은 개체에게, 선택적으로 하나의 보존적 아미노산 치환을 갖는 서열번호 5의 아미노산 서열을 포함하는 치료학적, 영양약학적 또는 미용학적 조성물을 투여하는 단계를 포함한다.

[0028] 몇몇 실시양태에서, 치료학적, 영양약학적 또는 미용학적 제형은 선택적으로 하나의 보존적 아미노산 치환을 갖는 서열번호 6의 아미노산 서열을 포함한다. 몇몇 실시양태에서, 치료학적, 영양약학적 또는 미용학적 제형은 선택적으로 하나의 보존적 아미노산 치환을 갖는 서열번호 7의 아미노산 서열을 포함한다.

[0029] **참고 인용**

[0030] 본 명세서에 언급된 모든 간행물, 특허, 및 특허 출원은 각각의 개별적인 간행물, 특허, 또는 특허 출원이 구체적으로 및 개별적으로 참고로 인용된 것으로 나타난 것과 같은 동일한 정도로 본 출원에 참고로 인용된다.

도면의 간단한 설명

[0031] 본 발명의 신규한 특징은 첨부된 청구범위에 상세하게 기재된다. 본 발명의 특징 및 이점의 더 좋은 이해는 본 발명의 원리가 이용되는 예시적인 실시양태를 기재하는 후술하는 상세한 설명 및 첨부 도면을 참고로 얻어질 것이다:

도 1은 조로증 섬유아세포 세포 수 및 노화 레벨에 대한 개별적인 폴리펩타이드의 효과를 나타낸다.

도 2는 에이징 섬유아세포에 대한 4가지 펩타이드, 즉 펩타이드 14(패널 A), 펩타이드 13(패널 B), 펩타이드 15(패널 C), 및 펩타이드 16(패널 D)의 노화치료 효과(senotherapeutic effect)를 나타낸다. * $p < 0.05$; ** $p < 0.01$; *** $p < 0.001$.

도 3은 더 적은 ATRX 병소/핵을 갖는 더 많은 수의 세포(패널 A), 더 낮은 평균의 ATRX 병소/핵(패널 B), 및 10 미만의 ATRX 병소/핵을 갖는 더 많은 수의 세포(패널 C)를 촉진하는 폴리펩타이드의 노화치료 효과를 나타낸다. * $p < 0.05$; ** $p < 0.01$.

도 4는 세포 독성을 유도하지 않거나 또는 이 기간 중 세포 증식에 현저하게 영향을 미치지 않으면서 처리 후 적어도 1주 동안 노화치료 효과를 유지하면서(패널 A) 3주간의 장기 노출 동안 세포 군집 내에서 노화 섬유아세포의 수를 감소시킬 수 있는(패널 B) 노화치료 폴리펩타이드의 효과를 나타낸다. *** $p < 0.001$; **** $p < 0.0001$.

도 5는 폴리펩타이드를 이용하는 처리는 다수의 공여자로부터 유래한 세포에서 세포당 평균 ATRX 병소 축적에 의해 측정되는 바와 같이, 세포 노화에서 투여량 응답 감소를 촉진할 수 있다는 것을 나타낸다.

도 6은 세포 노화는 에토포사이드에 대한 노출로 섬유아세포에서 유도될 수 있고(패널 A), 폴리펩타이드를 이용하는 에토포사이드 유도된 노화 세포의 처리는 감소된 노화를 야기할 수 있고(패널 B), 세포 노화는 UVB 노출에 의해 유도될 수 있고(패널 C), 및 폴리펩타이드를 이용하는 UVB 처리된 샘플의 처리는 감소된 노화를 야기할 수 있다(패널 D)는 것을 나타낸다. * $p < 0.05$; ** $p < 0.01$; *** $p < 0.001$.

도 7은 폴리펩타이드를 이용하여 처리된 인간 피부 등가물이 전체적인 구조 분석 스코어에 따라 더 높은 품질을 나타낼 수 있고(패널 A), 폴리펩타이드를 이용하여 처리된 인간 피부 등가물이 미처리된 인간 피부 등가물보다 현저하게 더 적은 노화 세포를 포함할 수 있고(패널 A 및 B), 및 p16이 미처리된 대조군과 비교하여 폴리펩타이드 처리된 표피 및 진피에서 현저하게 더 낮은 발현을 보유했을 수 있는 변경된 유전자 발현을 포함할 수 있고; IL-8 및 MMP-1은 처리되지 않은 대응물과 비교하여 폴리펩타이드 처리된 진피에서 현저하게 덜 발현되었다는 것(패널 C)을 나타낸다. * $p < 0.05$; ** $p < 0.01$; *** $p < 0.001$; **** $p < 0.0001$.

도 8은 pAkt S473이 폴리펩타이드를 이용하여 처리된 표피 및 진피 샘플 둘 다에서 현저하게 감소될 수 있고(패널 A), 폴리펩타이드 처리가 UVB 노출된 샘플에서 SA-B gal 염색을 감소시킬 수 있고, 이는 UVB 유도된 세포 노화로부터의 보호를 나타내고(패널 B), 및 폴리펩타이드가 SIRT6 및 BLM의 발현을 증가시킬 수 있다는 것(패널 C)을 나타낸다. * $p < 0.05$; ** $p < 0.01$; *** $p < 0.001$.

도 9는 조직학적 이미지(패널 A) 및 획득된 데이터의 통계학적 분석(패널 B)으로서 인간 피부 등가물에서 증가된 표피층 두께를 나타낸다. ** $p < 0.01$.

도 10은 2개의 폴리펩타이드, 즉 펩타이드 14(패널 A) 및 펩타이드 13(패널 B)의 예측된 3차원 구조, 뿐만 아니라 2개의 폴리펩타이드의 중첩(패널 C)을 나타낸다.

도 11a는 5일 동안 펩타이드 14 없이(대조군) 및 12.5 μM 펩타이드 14(12.5 μM Pep 14)와 함께 배양된 3D 피부 등가물(윗줄) 및 생체 외 피부 생검 샘플(아래줄)의 헤마톡실린 및 에오신(H&E) 염색된 조직학적 이미지를 나타낸다.

도 11b는 12.5 μM 펩타이드 14(처리)를 이용하여 처리된 3D 피부 모델(윗쪽 그래프) 및 생체 외 피부 생검(아래쪽 그래프) 샘플의 분자 DNA 연령으로도 언급되는 예측된 연령이 미처리된 대조군(ctrl)인 샘플에 대한 예측된 연령보다 더 낮았음을 나타낸다.

도 11c는 12.5 μM 펩타이드 14(12.5 μM Pep 14)를 이용하여 처리된 생체 외 피부 생검의 예측된 연령이 미처리된 대조군(ctrl)인 샘플의 예측된 연령보다 더 낮았음을 나타낸다.

도 12a는 이소부틸 메틸크산틴(IBMx)과 함께 14일 전처리 배양 후 양성 대조군인 IBMx, 음성 대조군, IBMx와 함께 펩타이드 14, 및 IBMx와 함께 레티노산을 이용하여 7일 동안 처리된 MeWo 세포의 세포 펠렛의 상대 멜라닌 함량을 나타낸다. 데이터는 음성 대조군(100%)에 대해 정규화된 멜라닌 함량의 평균 및 표준 편차로 나타낸다. ** $p < 0.01$; *** $p < 0.001$; **** $p < 0.0001$.

도 12b는 이소부틸 메틸크산틴(IBMx)과 함께 14일 전처리 배양 후 IBMx와 함께 양성 대조군, 음성 대조군, 펩타이드 14, 및 IBMx와 함께 레티노산을 이용하여 7일 동안 처리된 MeWo 세포 유래의 세포 배양 배지 상등액의 상대 멜라닌 함량을 나타낸다. 데이터는 음성 대조군(100%)에 대해 정규화된 멜라닌 함량의 평균 및 표준 편차로

나타낸다. * $p < 0.05$; ** $p < 0.01$.

도 13a는 이소부틸 메틸크산틴(IBMx)과 함께 14일 전처리 배양 후 양성 대조군인 IBMx, 음성 대조군, 14일 동안 IBMx와 함께 펩타이드 14, 14일 동안 IBMx와 함께 레티노산, 7일 동안 IBMx와 함께 펩타이드 14, 7일 동안 IBMx와 함께 레티노산을 이용하여 처리된 MeWo 세포의 세포 펠렛의 상대 멜라닌 함량을 나타낸다. 데이터는 음성 대조군(100%)에 대해 정규화된 멜라닌 함량의 평균 및 표준 편차로 나타낸다. * $p < 0.05$; ** $p < 0.01$; **** $p < 0.0001$.

도 13b는 이소부틸 메틸크산틴(IBMx)과 함께 14일 전처리 배양 후 양성 대조군인 IBMx, 음성 대조군, 14일 동안 IBMx와 함께 펩타이드 14, 14일 동안 IBMx와 함께 레티노산, 7일 동안 IBMx와 함께 펩타이드 14, 7일 동안 IBMx와 함께 레티노산을 이용하여 처리된 MeWo 세포 유래의 세포 배양 배지 상등액의 상대 멜라닌 함량을 나타낸다. 데이터는 음성 대조군(100%)에 대해 정규화된 멜라닌 함량의 평균 및 표준 편차로 나타낸다. * $p < 0.05$; ** $p < 0.01$; **** $p < 0.0001$.

도 14a는 양성 대조군인 IBMx, 음성 대조군, 14일 동안 IBMx와 함께 펩타이드 14, 14일 동안 IBMx와 함께 레티노산, 7일 동안 IBMx와 함께 펩타이드 14, 7일 동안 IBMx와 함께 레티노산을 이용하여 처리된 MeWo 세포의 타이로시나아제의 상대 mRNA 발현 레벨을 나타낸다. 데이터는 GAPDH 및 음성 대조군(100%)에 대해 정규화된 2-ddCt의 평균 및 표준 편차로 나타낸다. * $p < 0.05$; ** $p < 0.01$; **** $p < 0.0001$.

도 14b는 양성 대조군인 IBMx, 음성 대조군, 14일 동안 IBMx와 함께 펩타이드 14, 14일 동안 IBMx와 함께 레티노산, 7일 동안 IBMx와 함께 펩타이드 14, 7일 동안 IBMx와 함께 레티노산을 이용하여 처리된 MeWo 세포의 멜라닌형성세포 유도 전사 인자(melanocyte inducing transcription factor, MITF)의 상대 mRNA 발현 레벨을 나타낸다. 데이터는 GAPDH 및 음성 대조군(100%)에 대해 정규화된 2-ddCt의 평균 및 표준 편차로 나타낸다. * $p < 0.05$; ** $p < 0.01$; *** $p < 0.001$.

도 14c는 양성 대조군인 IBMx, 음성 대조군, 14일 동안 IBMx와 함께 펩타이드 14, 14일 동안 IBMx와 함께 레티노산, 7일 동안 IBMx와 함께 펩타이드 14, 7일 동안 IBMx와 함께 레티노산을 이용하여 처리된 MeWo 세포의 도파크롬 토트머라아제(dopachrome tautomerase, DCT)의 상대 mRNA 발현 레벨을 나타낸다. 데이터는 GAPDH 및 음성 대조군(100%)에 대해 정규화된 2-ddCt의 평균 및 표준 편차로 나타낸다. ** $p < 0.01$; *** $p < 0.001$; **** $p < 0.0001$.

도 15a는 비히클 단독(대조군), 펩타이드 13, 또는 펩타이드 14를 이용하여 처리된 시험관 내 인간 피부 모델의 H&E 염색된 조직학적 이미지를 나타낸다.

도 15b는 비히클 단독(대조군), 펩타이드 13, 또는 펩타이드 14를 이용하여 처리된 인간 피부 모델의 조직학 스코어의 평균을 나타낸다. ** $p < 0.01$.

도 16은 처리 이전의 베이스라인(좌측, 베이스라인) 및 처리 12주 후(우측, 12주)에서 펩타이드 14를 이용하여 처리된 얼굴의 좌측면의 예를 나타낸다.

도 17은 대조군, 펩타이드 14, 펩타이드 13, 또는 레티노산을 이용하여 처리된 3D 피부 등가물의 표피층 및 진피층의 p16, BLIMP1, ZYG11B, IL-8, Ki-67, ZIC1, MMP1, HAS2의 상대 mRNA 발현 레벨을 나타낸다. 데이터는 GAPDH 및 미처리된 대조군에 대해 정규화된 2-ddCt로 나타낸다. * $p < 0.05$.

도 18은 1 μ M 또는 2 μ M 폴리펩타이드를 이용하는 처리가 웜 스래싱(worm thrashing)(패널 A), 펌핑(패널 B), 및 중간 수명(패널 C)을 개선시켰음을 나타내는 데이터를 획득한 바와 같이 카에노르하브디티스 엘레간스(*Caenorhabditis elegans* (*C. elegans*))의 연장된 수명 및 건강수명을 나타낸다. * $p < 0.05$; ** $p < 0.01$.

도 19는 세포 사멸을 촉진하지 않으면서 세포 노화를 감소시키는 폴리펩타이드 서열 LKGIL(서열번호 6) (A, B, C), 및 폴리펩타이드 서열 WLKGI(서열번호 7) (D, E, F)의 효과를 나타낸다. 패널 A 및 D에서, y축은 미처리된 대조군에 대해 정규화된 상대 노화 레벨을 나타낸다. 패널 B 및 E에서, y축은 미처리된 대조군에 대해 정규화된 상대 세포 수를 나타낸다. 패널 C 및 F에서, y축은 세포당 평균 ATRX 병소 축적을 나타낸다. * $p < 0.05$; ** $p < 0.01$.

발명을 실시하기 위한 구체적인 내용

[0032] 에이징은 대부분 조직 항상성 및 완전성을 유지할 수 있는 능력의 기능적 감소로부터 유발되고, 가능하게는 스트레스 상태 하에서 생리적 요구에 대한 감소된 반응을 동반할 수 있다. **

[0033] 피부 에이징의 모자이크 모델에서, 노화 세포는 내인성 및 외인성 자극, 그중에서도 예를 들어 시간/연령, UV 노출 및 흡연에 의해 유도될 수 있다. 이 모델에 따라, 노화 세포는 피부내에 축적되고, 그 중에서 특히 전염증

성 사이토카인으로 구성되는 노화 관련 분비 표현형(SASP)을 통해 국소 미세환경을 변경시킴으로써 조직 에이징을 활발하게 촉진한다. 몇몇 경우에서, 노화 세포는 또한 표피 줄기 세포 재생을 타협하고 달리 정상 세포의 노화를 촉진함으로써 피부 에이징을 촉진한다. 따라서, 노화 세포는 피부 에이징의 생성물일뿐만 아니라 에이징 과정에서의 활동적인 플레이어이다.

[0034] 피부 기능이상은 유기체 에이징 및 연령 관련 질병 및 질환의 발생에 영향을 미칠 수 있다. 예를 들어, 피부 건강 및 정류 배리어 기능은 타협된 피부 배리어를 갖는 대응물에 비해 염증성 및 연령 관련 사이토카인 IL-1 β 및 IL-6의 더 낮은 레벨과 관련될 수 있다. IL-1 β 및 IL-6의 증가된 레벨은 심혈관 질환(CVD), 알츠하이머병, 및 2형 당뇨병을 포함하는 몇몇 연령 관련 질환을 갖는 환자의 혈청에서 관찰되었다. 몇몇 경우에서, 노인의 혈청 IL-6는 전 원인 사망률, CVD, 암, 및 간 관련 사망률과 관련될 수 있다. 몇몇 경우에서, 표피 기능의 회복은 순환성 TNF α , IL-1 β 및 IL-6 사이토카인 레벨을 효과적으로 감소시킬 수 있다.

[0035] 본 출원에서 폴리펩타이드, 폴리펩타이드 및 다른 성분을 포함하는 조성물 및 이의 사용 방법이 제공된다. 폴리펩타이드 및 폴리펩타이드를 포함하는 조성물은 (예를 들어, 개체의 피부에 대한) 항노화 효과를 제공할 수 있다. 폴리펩타이드는 아포토시스를 촉진함으로써, DNA 수복을 촉진함으로써, 및/또는 DNA 손상 유도된 노화를 억제함으로써 세포 및 조직 내의 노화 레벨의 감소를 촉진할 수 있다. 항노화 효과는 증가된 세포 재생 속도, 증가된 콜라겐 생성, 증가된 히알루론산 신타아제 생성, 감소된 ATRX 핵 병소 축적, 감소된 p16 발현, 더 낮은 SASP 생성, 감소된 노화 관련 베타-갈락토시다아제 생성, 감소된 불균일 색소침착, 표피 배리어의 유지 또는 개선, 및 감소된 경표피 수분 손실(reduced transepidermal water loss, TEWL)을 포함할 수 있으나, 이들로 제한되는 것은 아니다. 본 출원에서 제공된 폴리펩타이드 및 폴리펩타이드를 포함하는 조성물은 에이징 관련 및/또는 노화 관련 질병 또는 병태를 억제, 예방, 또는 둔화할 수 있다. 또한, 폴리펩타이드 및 폴리펩타이드를 포함하는 조성물은 건강수명을 증강 또는 개선시키고/시키거나 수명을 연장시킬 수 있다.

[0036] 본 출원에 기재된 방법 및 조성물은 본 출원에 기재된 특정 방법론, 프로토콜, 및 시약으로 제한되지 않고, 변형될 수 있음이 이해되어야 한다. 또한, 본 출원에서 사용된 용어는 단지 특정 실시양태를 기재하는 목적을 위한 것이고, 본 출원에 기재된 방법 및 조성물의 범위를 제한하려는 의도는 아니며, 이는 첨부된 청구범위에 의해서만 제한될 것이다.

[0037] 첨부된 청구범위를 포함하여 본 출원에서 사용된 바와 같이, 단수 형태 "a," "an," 및 "the"는 문맥상 명백하게 달리 나타내지 않으면 복수 형태를 포함한다.

[0038] 달리 정의하지 않으면, 본 출원에서 사용된 모든 기술 용어 및 과학 용어는 본 출원에 기재된 발명이 속하는 기술분야에서 통상의 기술자에게 통상적으로 이해되는 바와 동일한 의미를 보유한다. 본 출원에 기재된 것들과 유사 또는 균등한 임의의 방법, 디바이스, 및 재료는 본 출원에 기재된 발명의 실시 또는 테스트에 사용될 수 있음에도 불구하고, 이제 바람직한 방법, 디바이스, 및 재료가 기재된다.

[0039] 펩타이드 또는 폴리펩타이드에서, 아미노산의 적합한 보존적 치환은 당해 기술분야의 통상의 기술자에게 공지되어 있고, 일반적으로 생성되는 분자의 생물학적 활성을 변경시키지 않고 이루어질 수 있다. 문헌(Watson et al. (1987, Molecular Biology of the Gene, 4th Edition, The Benjamin Cummings Pub. Co., p. 224))은 본 출원에 참고로 인용된다. 아미노산은 L- 또는 D-이성질체 형태일 수 있다. 아미노산 잔기가 폴리펩타이드 사슬의 일부분인 경우, 아미노산의 D-이성질체 형태는 요망되는 기능적 특성이 유지되는 한 L-아미노산 잔기로 치환될 수 있다. 본 출원에서 아미노산은 그들의 표준 IUPAC 1-문자 코드 또는 3-문자 코드로 나타낼 수 있다. "X" 또는 "Xxx"로 나타낸 아미노산 잔기는 당해 기술분야에 공지된 자연 발생하는 또는 자연 발생하지 않는 아미노산 잔기 중 임의의 하나 또는 가까운 잔기의 변형을 의미한다. 아미노산 치환은 전형적으로 단일 잔기의 치환이고, 그러한 치환은 바람직하게는 표 1에 기재된 것들을 이용하여 이루어지지만, 군집되거나 분산된 다수의 잔기의 치환일 수 있다. 아미노산은 상이한 자연 발생하는 또는 비전형적인 아미노산 잔기로 대체될 수 있다. 그러한 치환은 "보존적"으로 분류될 수 있는데, 이 경우 폴리펩타이드 내에 함유된 아미노산 잔기는 극성, 측쇄 기능성, 또는 크기와 관련하여 유사한 특성의 다른 자연 발생하는 아미노산으로 대체된다. 첨가는 하나 이상의 자연 발생하는 또는 비전형적인 아미노산 잔기의 첨가를 포괄한다. 결실은 하나 이상의 아미노산 잔기의 결실을 포괄한다.

표 1

보존적 및 비보존적 아미노산 치환

아미노산	보존적 치환	비보존적 치환
A	D, E, G, S, 및 T	P 및 V
C	G, R, S, W, 및 Y	F
D	A, E, G, H, N, V, 및 Y	
E	A, D, G, K, Q, 및 V	
F	I, L, 및 Y	C, S, 및 V
G	A, C, D, E, 및 R	S, V, 및 W
H	D, L, N, P, Q, R, 및 Y	
I	F, L, M, N, 및 V	K, R, S, 및 T
K	E, M, N, Q, R, 및 T	I
L	F, H, I, M, P, Q, R, V, 및 W	S
M	I, K, L, R, T, 및 V	
N	D, H, I, K, S, T, 및 Y	
P	H, L, Q, R, 및 S	A 및 T
Q	E, H, K, L, P, 및 R	
R	C, G, H, K, L, M, P, Q, T, 및 W	I 및 S
S	A, C, N, P, T, W, 및 Y	F, G, I, L, 및 R
T	A, K, M, N, R, 및 S	I 및 P
V	D, E, I, L, 및 M	A, F, 및 G
W	C, L, R, 및 S	G
Y	C, D, F, H, N, 및 S	

[0040]

[0041]

또한, 본 개시내용에 의해 포괄되는 치환은 "비보존적"일 수 있는데, 이때 폴리펩타이드 내에 존재하는 아미노산 잔기는 상이한 특성을 갖는 아미노산, 예를 들어 상이한 기 유래의 자연 발생하는 아미노산으로 대체되거나 (예를 들어, 하전된 또는 소수성 아미노산을 알라닌으로 치환), 또는 대안적으로, 이때 자연 발생하는 아미노산은 비전형적인 아미노산으로 치환된다.

[0042]

본 출원에서 사용된 바와 같이 용어 "유사체(들)"는 폴리펩타이드, 예를 들어 상이한 유기체 유래의 동일한 단백질과 동일한 구조 또는 기능(예를 들어, 수용체에 대한 결합)을 유지하는 조성물을 의미한다. 유사체의 예는 모방체 또는 펩티도모방체, 펩타이드, 소형 및 대형 유기 또는 무기 화합물, 뿐만 아니라 본 출원의 폴리펩타이드의 유도체 및 변이체를 포함한다. 그러한 유도체 및 변이체는 하나 이상의 아미노산 결실, 치환, 또는 측쇄 변형에 의해 자연 발생하는 폴리펩타이드와 상이한 폴리펩타이드를 의미한다. 몇몇 실시양태에서, 펩타이드 유사체는 하나 이상의 아미노산이 측쇄 변형을 겪은 펩타이드이다. 본 개시내용에 의해 고려된 측쇄 변형의 예는 알데히드와의 반응에 의한 환원적 알킬화에 이은 NaBH_4 를 이용하는 환원에 의한 아미노기의 변형; 메틸아세트아미데이트를 이용하는 아민화; 아세트산 무수물을 이용하는 아실화; 시아네이트를 이용하는 아미노기의 카르바모일화; 2,4,6-트리니트로벤젠 설폰산(TNBS)을 이용하는 아미노기의 트리니트로벤질화; 석신산 무수물 및 테트라하이드로프탈산 무수물을 이용하는 아미노기의 아실화; 및 피리독살-5-포스페이트를 이용하는 라이신의 피리독살화에 이은 NaBH_4 를 이용하는 환원을 포함한다. 몇몇 실시양태에서, 펩타이드 유사체는 아르기닌 잔기(들)의 구아니딘기가 시약, 예를 들어 2,3-부탄디온, 페닐글리옥살 및 글리옥살을 이용하는 헤테로사이클릭 축합 생성물의 형성에 의해 변형되고; 카르복실기(들)는 0-아실이소유레아 형성에 이은 후속적인 유도체화, 예를 들어 상응하는 아미드로의 유도체화에 의한 카르보디이미드 활성화에 의해 변형되고; 설프하이드릴기(들)는 방법, 예를 들어 요오도아세트산 또는 요오도아세트아미드를 이용하는 카르복시메틸화에 의해 변형될 수 있고; 시스테인산으로의 퍼포름산 산화; 다른 티올 화합물과의 혼합된 다이설파이드의 형성; 말레이미드, 말레산 무수물 또는 다

른 치환된 말레이미드와의 반응; 4-클로로머큐리벤조에이트, 4-클로로머큐리페닐설폰산, 페닐머큐리 클로라이드, 2-클로로머큐리-4-니트로페놀 및 다른 수은 함유 물질을 이용하는 수은 함유 유도체의 형성; 알칼리성 pH에서 시아네이트를 이용하는 카르바모일화이다. 본 출원의 임의의 유사체에서, 시스테인 잔기의 임의의 변형은 바람직하게는 필요한 다이설파이드 결합을 형성하기 위한 펩타이드의 능력에 영향을 미치지 않는다. 몇몇 실시양태에서, 펩타이드 유사체는 예를 들어 N-브로모석신이미드를 이용하는 산화 또는 2-하이드록시-5-니트로벤질 브로마이드 또는 설페닐 할라이드를 이용하는 인돌 고리의 알킬화에 의해 변형된 트립토판 잔기(들); 3-니트로타이로신 유도체를 형성하기 위해 테트라니트로메탄을 이용하는 질화에 의해 변형된 타이로신 잔기; 요오도아세트산 유도체를 이용하는 알킬화 또는 디에틸피로카르보네이트를 이용하는 N-카르보에톡실화에 의해 수행된 히스티딘 잔기 변형의 이미다졸 고리(들); 예를 들어 4-위치에서 하이드록실화에 의해 변형된 프롤린 잔기(들); 완전히 비글리코실화된 분자로부터 변형된 글리코실화된 분자로의 글리코실화 변이체; 및 상이한 숙주 세포에서 재조합 분자의 발현으로부터 유발되는 바와 같은 변형된 글리코실화 패턴을 포함한다.

[0043] 용어 "단리된"은 그의 자연 상태에서부터 변경되었음을 의미한다; 즉, 자연적으로 발생하는 경우, 이는 그의 원래 환경으로부터 변화 또는 제거되거나, 또는 둘 다이다. 예를 들어, 자연 발생하는 폴리뉴클레오타이드 또는 폴리펩타이드가 살아있는 동물 내에서 자연적으로 존재하는 경우 "단리된" 것이 아니지만, 동일한 폴리뉴클레오타이드 또는 폴리펩타이드가 그의 자연 상태의 공존하는 물질로부터 분리되는 경우 그 용어가 본 출원에서 사용된 바와 같이 "단리된" 것이다.

[0044] 본 출원에서 사용된 바와 같이, 용어 "단백질", "펩타이드", "올리고펩타이드", 또는 "폴리펩타이드"는 펩타이드 결합에 의해 함께 연결된 2개 이상의 아미노산을 포함하는 임의의 조성물을 의미한다. 폴리펩타이드는 종종 20개의 자연 발생하는 아미노산으로 통상적으로 언급되는 20개의 아미노산 이외의 아미노산을 함유하고, 말단 아미노산을 포함하는 많은 아미노산이 해당 폴리펩타이드 내에서 자연적인 과정, 예를 들어 글리코실화 및 다른 번역 후 변형, 또는 당해 기술분야에 널리 공지된 화학적 변형 기법에 의해 변형될 수 있는 것으로 인식될 것이다. 본 개시내용의 폴리펩타이드 내에 존재할 수 있는 공지된 변형은 아세틸화, 아실화, ADP-리보실화, 아미드화, 플라보노이드 또는 헴(heme) 모이어티의 공유 결합, 폴리뉴클레오타이드 또는 폴리뉴클레오타이드 유도체의 공유 결합, 지질 또는 지질 유도체의 공유 결합, 포스파티딜이노시톨의 공유 결합, 가교결합, 고리화, 다이설파이드 결합 형성, 탈메틸화, 공유 가교 결합의 형성, 시스틴의 형성, 파이로글루타메이트의 형성, 포르밀화, 감마-카르복실화, 당화, 글리코실화, 글리코실포스파티딜 이노시톨(GPI) 멤브레인 앵커 형성, 하이드록실화, 요오드화, 메틸화, 미리스토일화, 산화, 단백질분해 과정, 인산화, 프레닐화, 라세미화, 셀레노일화, 황화, 폴리펩타이드에 대한 트랜스퍼-RNA 매개된 아미노산의 첨가, 예를 들어 아르기닐화 및 유비퀴틴화를 포함하나, 이들로 제한되는 것은 아니다. 또한, 용어 "단백질"은 폴리펩타이드 (예를 들어, 서열번호 1-7) 및 스페이서의 교호 반복부로 구성되는 선형 또는 비선형 폴리펩타이드를 의미하는 "인공 단백질"도 포함한다. 폴리펩타이드 및 스페이서 교호 반복부를 코딩하는 DNA 컨스트럭트는 당해 기술분야의 공지된 방법을 이용하여 합성될 수 있다(문헌 (Rotzschke et al., 1997, Proc. Natl. Acad. Sci. USA 94:14642-14647) 참조).

[0045] 폴리펩타이드, 폴리뉴클레오타이드, 또는 다른 조성물을 기재하기 위해 본 출원에서 사용된 바와 같이, 용어 "정제된"은 자연적으로 그와 일반적으로 관련된 하나 이상의 화합물로부터 분리된 그러한 폴리펩타이드, 폴리뉴클레오타이드, 또는 다른 조성물을 의미한다. 그러한 다른 조성물은 예를 들어 다른 폴리펩타이드 또는 폴리뉴클레오타이드, 탄수화물, 지질 등을 포함한다. 또한, 용어 "정제된"은 올리고머 형태, 예를 들어 호모- 또는 헤테로-이량체, 삼량체 등으로부터 본 개시내용의 단량체성 폴리펩타이드의 분리를 구체적으로 기재하기 위해 사용될 수 있다. 실질적으로 순수한 폴리펩타이드는 전형적으로 폴리펩타이드 샘플의 적어도 약 50%, 60%, 70%, 80% 또는 90% 중량/중량, 또는 더 바람직하게는 폴리펩타이드 샘플의 적어도 약 95%, 96%, 97%, 98%, 99% 또는 99.5% 중량/중량을 포함한다. 바람직한 실시양태로서, 본 개시내용의 폴리펩타이드는 이중성 폴리펩타이드에 비해 적어도 10%, 20%, 30%, 40%, 50%, 60%, 70%, 80%, 90%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99% 또는 100% 순수하다.

[0046] 본 출원에서 사용된 바와 같이, 용어 "개체" 또는 "환자"는 동물을 포괄한다. 몇몇 실시양태에서, 개체는 포유동물일 수 있다. 포유동물의 예는 포유동물 강의 임의의 구성원을 포함하나, 이들로 제한되는 것은 아니다: 인간, 비인간 영장류, 예를 들어 침팬지, 및 다른 유인원 및 원숭이 종; 농장 동물, 예를 들어 소, 말, 양, 염소, 및 돼지; 가축, 예를 들어 토끼, 개, 및 고양이; 설치류를 포함하는 실험실 동물, 예를 들어 래트, 마우스, 및 기니 피그 등. 포유동물은 인간일 수 있다.

[0047] 본 출원에서 사용된 바와 같이, 용어 "치료하다", "치료하는", 또는 "치료"는 예방적으로 및/또는 치료적으로 질병 또는 병태의 적어도 하나의 증상의 개시의 지연, 발생의 감소, 또는 완화, 추가적인 증상의 예방, 질병 또는 병태의 억제, 예를 들어 질병 또는 병태의 진행의 중단, 질병 또는 병태의 완화, 질병 또는 병태의 퇴행 유

발, 질병 또는 병태에 의해 유발된 상태의 완화, 또는 질병 또는 병태에 의해 유발된 증상의 중단을 포함한다.

- [0048] 본 출원에서 사용된 바와 같이, 용어 "치료적으로 허용 가능한"은 화합물의 생물학적 활성 또는 특성을 폐지하지 않고 상대적으로 비독성인 염, 담체, 또는 희석제를 포함하나 이들로 제한되는 것은 아닌 물질을 의미하는데, 즉 상기 물질은 조성물에 함유되는 경우 조성물의 임의의 성분과 유해한 방식으로 상호작용하지 않거나 또는 바람직하지 않은 생물학적 효과를 유발하지 않으면서 개체에게 투여될 수 있다.
- [0049] 본 출원에서 사용된 바와 같이, 용어 "담체"는 화합물의 세포 또는 조직 내로의 통합을 촉진하는 상대적으로 비독성인 화학적 화합물 또는 제제를 의미한다.
- [0050] 본 출원에서 사용된 바와 같이, 용어 "희석제"는 전달 이전에 관심 화합물을 희석하기 위해 사용되는 화학적 화합물을 의미한다. 또한, 희석제는 화합물을 안정화시키기 위해 사용될 수 있는데, 그 이유는 그들이 더 안정한 환경을 제공할 수 있기 때문이다. (또한, pH 제어 또는 유지도 제공할 수 있는) 완충처리된 용액 중에 용해된 염은 당해 기술분야에서 희석제로서 이용되는데, 그 예로는 포스페이트 완충처리된 염수 용액을 포함하나, 이로 제한되는 것은 아니다.
- [0051] 본 출원에서 사용된 바와 같이, 용어 "유효량" 또는 "치료 유효량"은 치료하려는 질병 또는 병태의 증상 중 하나 이상을 어느 정도까지 완화시킬 투여되는 제제 또는 화합물의 충분한 양을 의미한다. 결과는 질병의 징후, 증상, 또는 원인의 감소 및/또는 경감, 또는 생물학적 시스템의 다른 요망되는 변경일 수 있다. 예를 들어, 치료적 용도를 위한 "유효량"은 질병 징후에서 임상적으로 현저한 감소를 제공하기에 필요한 본 출원에 개시된 바와 같은 화합물을 포함하는 조성물의 양이다. 임의의 개별적인 경우에서 적합한 "효과적인" 양은 투여량 상승 연구와 같은 기법을 이용하여 결정될 수 있다.
- [0052] 노화 세포는 노화 관련 베타-갈락토시다아제(SA-BGal) 생성, p16 발현, SASP의 제시, 및/또는 알파 지중해 빈혈/핵 내에서 정신 지체 X 연관 염색질 리모델링 단백질(ATRX) 병소 축적에 의해 확인될 수 있다. 또한, 노화 세포를 구별할 수 있는 기능적 변경은 감소된 증식능 및 유사분열 자극에 대한 내성을 포함하나, 이들로 제한되는 것은 아니다.
- [0053] 에이징은 일반적으로 조직 항상성 및 완전성을 유지할 수 있는 능력의 기능적 감소로부터 유발되고, 스트레스 상태 하에서 생리적 요구에 대한 감소된 반응을 동반한다.
- [0054] 피부 에이징과 관련하여, 모자이크 모델이 제안되었는데, 이때 노화 세포는 내인성 및 외인성 자극, 예를 들어 다른 자극 중에서도 특히 시간/연령, UV 노출, 및 흡연에 의해 유도된다. 모자이크 모델에 따라, 노화 세포는 피부내에 축적되고 그들 중에서도 특히 전염증성 사이토카인으로 구성되는 노화 관련 분비 표현형(SASP)을 통해 국소 미세환경을 변경시킴으로써 조직 에이징을 활발하게 촉진시킨다. 노화 세포는 표피 줄기 세포 재생을 타협하고 달리 정상 세포의 노화를 촉진함으로써 피부 에이징을 촉진시킬 수 있다. 따라서, 노화 세포는 피부 에이징의 생성물일뿐만 아니라 에이징 과정에서 활발한 플레이어일 수 있다.
- [0055] 폴리펩타이드는 이들을 노화치료법을 포함하는 미용학적 또는 치료적 적용을 위해 유용하게 만들 수 있는 다기능성 거동과 같은 특성을 보유한다. 에이징 중에 관찰된 피부 기능 이상은 연령 관련 질병 및 질환의 발생에 영향을 미칠 수 있다.
- [0056] **폴리펩타이드**
- [0057] 본 출원에 기재된 폴리펩타이드 및 폴리펩타이드를 포함하는 조성물은 노화치료 효과를 제공할 수 있는데, 예를 들어 폴리펩타이드는 예를 들어 노화를 중단시킴으로써, 노화를 방지함으로써, 노화를 억제함으로써, 노화를 역전시킴으로써, 노화 세포를 파괴함으로써, 노화 세포를 사멸시킴으로써, 노화 세포를 제거함으로써, 또는 노화 세포 축적의 부담 또는 효과를 감소시키는 임의의 적합한 메커니즘에 의해 노화를 감소시킬 수 있다. 그러한 폴리펩타이드는 몇몇 경우에서 아미노산 서열 LKGI(서열번호 5)를 포함할 수 있다. 그러한 폴리펩타이드를 포함하는 조성물은 노화치료 효과를 제공하기 위해 이용되거나 또는 사용될 수 있다.
- [0058] 폴리펩타이드(예를 들어, 노화치료 폴리펩타이드)는 적어도 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, 20, 21, 22, 23, 24, 25, 26, 27, 28, 29, 30, 31, 32, 33, 34, 35, 36, 37, 38, 39, 40개 또는 그 초과 아미노산을 포함할 수 있다. 몇몇 경우에서, 폴리펩타이드는 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, 20, 21, 22, 23, 24, 25, 26, 27, 28, 29, 30, 31, 32, 33, 34, 35, 36, 37, 38, 39, 40, 45, 50, 55, 60, 65, 70, 75, 80, 85, 90, 95, 또는 100개 이하 길이의 아미노산일 수 있다. 몇몇 경우에서, 폴리펩타이드는 길이가 4 내지 25개, 4 내지 15개, 또는 4 내지 10개의 아미노산일 수 있다. 몇몇 실시

양태에서, 폴리펩타이드는 적어도 30, 40, 50, 60, 70, 80, 90, 100개, 또는 그 초과인 아미노산을 포함할 수 있다. 특정 실시양태에서, 폴리펩타이드는 100, 90, 80, 70, 60, 50, 40, 30개 미만, 또는 더 적은 아미노산을 포함할 수 있다.

[0059] 노화치료 효과를 제공할 수 있는 폴리펩타이드의 예는 하기 표 2에 제공된다.

표 2

예시적인 폴리펩타이드 아미노산 서열

명칭	서열 번호:	아미노산 서열
펩타이드 14	1	ETAKHWLKGI
펩타이드 13	2	ATAKAWLKGI
펩타이드 15	3	KLKGILRGAA
펩타이드 16	4	WLKGILREAA

[0060]

폴리펩타이드는 단리 또는 재조합 폴리펩타이드일 수 있는데, 이는 $X_1X_2X_3X_4X_5X_6X_7X_8X_9X_{10}$ 의 아미노산 서열을 포함할 수 있다. 폴리펩타이드 내에 포함된 아미노산은 천연 아미노산을 포함할 수 있고, 이는 알라닌(Ala, A), 아르기닌(Arg, R), 아스파라진(Asn, N), 아스파르트산(Asp, D), 시스테인(Cys, C), 글루타민(Glu, Q), 글루탐산(Glu, E), 글라이신(Gly, G), 히스티딘(His, H), 이소류신(Ile, I), 류신(Leu, L), 라이신(Lys, K), 메티오닌(Met, M), 페닐알라닌(Phe, F), 프롤린(Pro, P), 세린(Ser, S), 트레오닌(Thr, T), 트립토판(Trp, W), 타이로신(Tyr, Y), 또는 발린(Val, V)을 포함할 수 있다.

[0062]

몇몇 경우에서, $X_1X_2X_3X_4X_5X_6X_7X_8X_9X_{10}$ 의 아미노산 서열을 포함하는 단리 또는 재조합 폴리펩타이드는 제1 서열, ETAKHWLKGI(서열번호 1)에 대해 적어도 70%, 75%, 80%, 85%, 90% 또는 95%의 동일성을 갖는 아미노산 서열을 포함할 수 있는데, 이때 X_1 은 E이고, X_2 는 T이고, X_4 는 K이고, X_6 는 W이고, X_7 은 L이고, X_9 은 G이고, X_{10} 은 I이고; 이때 적어도 (i) X_3 는 S가 아니거나; 또는 (ii) X_5 가 임의의 아미노산인 경우, X_8 은 G가 아니거나; 또는 (iii) X_8 이 임의의 아미노산인 경우, X_5 는 N이 아니거나; 또는 (iv) (i), (ii), 또는 (iii) 중 임의의 하나에서 서열은 선택적으로 1, 2, 3, 또는 4개의 보존적 아미노산 치환을 포함할 수 있다. 몇몇 경우에서, 단리 또는 재조합 폴리펩타이드는 ETAKHWLKGI(서열번호 1)의 서열에 대해 적어도 70%, 75%, 80%, 85%, 90%, 95% 또는 100%의 동일성을 갖는 아미노산 서열을 포함할 수 있다. 또한, 본 개시내용은 유사체, 예를 들어 상기의 펩티도모방체도 고려한다.

[0063]

몇몇 경우에서, $X_1X_2X_3X_4X_5X_6X_7X_8X_9X_{10}$ 의 아미노산 서열을 포함하는 단리 또는 재조합 폴리펩타이드는 제2 서열, ATAKAWLKGI(서열번호 2)에 대해 적어도 70%, 75%, 80%, 85%, 90% 또는 95%의 동일성을 갖는 아미노산 서열을 포함할 수 있는데, 이때 X_1 은 A이고, X_2 는 T이고, X_3 는 A이고, X_4 는 K이고, X_5 는 A이고, X_6 는 W이고, X_7 은 L이고, X_8 은 K이고, X_9 은 G이고, X_{10} 은 I이다. 그러한 재조합 폴리펩타이드는 선택적으로 1, 2, 3, 또는 4개의 보존적 아미노산 치환을 포함할 수 있다. 몇몇 경우에서, 단리 또는 재조합 폴리펩타이드는 ATAKAWLKGI(서열번호 2)의 서열에 대해 적어도 70%, 75%, 80%, 85%, 90%, 95% 또는 100%의 동일성을 갖는 아미노산 서열을 포함할 수 있다. 또한, 본 개시내용은 유사체, 예를 들어 상기의 펩티도모방체도 고려한다.

[0064]

몇몇 경우에서, $X_1X_2X_3X_4X_5X_6X_7X_8X_9X_{10}$ 의 아미노산 서열을 포함하는 단리 또는 재조합 폴리펩타이드는 제3 서열, KLKGILRGAA(서열번호 3)에 대해 적어도 70%, 75%, 80%, 85%, 90% 또는 95%의 동일성을 갖는 아미노산 서열을 포함할 수 있는데, 이때 적어도 (i) X_9 이 임의의 아미노산인 경우 X_3 는 N이 아니거나; 또는 (ii) X_3 가 임의의 아미노산인 경우 X_9 은 S가 아니거나; 또는 (iii) X_4 가 임의의 아미노산인 경우 X_7 은 L이 아니거나; 또는 (iv) X_7 이 임의의 아미노산인 경우 X_4 는 S가 아니거나; 또는 (v) (i), (ii), (iii), 또는 (iv) 중 임의의 하나로서, 이때 서열은 선택적으로 1, 2, 3, 또는 4개의 보존적 아미노산 치환을 포함할 수 있다. 몇몇 경우에서, 단리 또는 재조합 폴리펩타이드는 KLKGILRGAA(서열번호 3)에 대해 적어도 70%, 75%, 80%, 85%, 90%, 95% 또는 100%의 동일성을 갖는 아미노산 서열을 포함할 수 있다. 또한, 본 개시내용은 유사체, 예를 들어 상기의 펩티도모방체도 고

려한다.

[0065] 몇몇 경우에서, $X_1X_2X_3X_4X_5X_6X_7X_8X_9X_{10}$ 의 아미노산 서열을 포함하는 단리 또는 재조합 폴리펩타이드는 제4 서열, WLKGILREAA(서열번호 4)에 대해 적어도 80%, 85%, 90% 또는 95%의 동일성을 갖는 아미노산 서열을 포함할 수 있는데, 이때 X_1 은 W이고, X_2 는 L이고, X_3 는 K이고, X_4 는 G이고, X_5 는 I이고, X_6 는 L이고, X_7 은 R이고, X_8 은 E이고, X_9 은 A이고, X_{10} 은 A이다. 그러한 재조합 폴리펩타이드는 선택적으로 1, 2, 3, 또는 4개의 보존적 아미노산 치환을 포함할 수 있다. 몇몇 경우에서, 단리 또는 재조합 폴리펩타이드는 WLKGILREAA(서열번호 4)에 대해 적어도 80%, 85%, 90%, 95% 또는 100%의 동일성을 갖는 아미노산 서열을 포함할 수 있다. 또한, 본 개시내용은 유사체, 예를 들어 상기의 펩티도모방체도 고려한다.

[0066] 몇몇 경우에서, 폴리펩타이드는 아미노산 서열 LKGI(서열번호 5), LKGIL(서열번호 6), 또는 WLKGI(서열번호 7)을 포함할 수 있다(하기 표 3 참조).

표 3

예시적인 폴리펩타이드 아미노산 서열

서열 번호:	아미노산 서열
5	LKGI
6	LKGIL
7	WLKGI

[0067]

[0068] 서열번호 5-7 중 하나를 포함하는 폴리펩타이드는 적어도 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 20, 30, 40, 또는 50개의 아미노산을 포함할 수 있다. 몇몇 실시양태에서, 서열번호 5-7 중 하나를 포함하는 폴리펩타이드는 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 20, 30, 40, 50, 60, 70, 80, 90, 또는 100개 이하의 아미노산을 포함할 수 있다. 서열번호 5-7은 폴리펩타이드의 N-말단에, 폴리펩타이드의 C-말단에, 또는 폴리펩타이드의 N-말단과 C-말단의 사이에 존재할 수 있다. 몇몇 경우에서, 폴리펩타이드는 서열번호5-7 중 하나 초과를 포함할 수 있다.

[0069] 폴리펩타이드는 단리되거나, 실질적으로 순수하거나, 또는 정제될 수 있다. 몇몇 경우에서, 단리된 폴리펩타이드는 (i) 화학적으로 합성되거나 또는 (ii) 숙주 세포 내에서 발현되고 관련 및 오염 단백질로부터 분리될 수 있다. 몇몇 경우에서, 폴리펩타이드는 발현 벡터의 일부분의 발현 생성물로서 숙주 세포 내에 존재할 수 있고, 단백질 모이어티에 연결될 수 있거나 또는 화학적 모이어티에 연결될 수 있다.

[0070] 개시된 폴리펩타이드의 펩티도모방체를 포함하는 유사체는 노화치료 효과를 제공할 수 있다. 본 출원에 개시된 펩타이드 및 폴리펩타이드는 펩티도모방체 증가물을 포함할 수 있다.

[0071] 몇몇 경우에서, 상기 논의된 바와 같이, 폴리펩타이드는 본 출원에 기재된 폴리펩타이드에 대해 서열 동일성을 보유할 수 있다. 폴리펩타이드의 서열 동일성은 2개의 폴리펩타이드 서열의 정확한 아미노산-대-아미노산 대응을 의미할 수 있다. 몇몇 경우에서, 서열 상동성을 결정하기 위한 기법은 아미노산 서열을 결정하는 단계 및 제 2 아미노산 서열과 아미노산 서열을 비교하는 단계를 포함할 수 있다. 2개 이상의 서열은 그들의 퍼센트 동일성, 또는 2개의 정렬된 서열 사이의 정확한 매치의 수를 더 긴 서열의 길이로 나누고 100을 곱한 값을 결정함으로써 비교될 수 있다. 또한, 퍼센트 동일성은 예를 들어 국립보건원으로부터 이용 가능한 버전 2.2.9와 같은 진보된 BLAST 컴퓨터 프로그램을 이용하여 서열 정보를 비교함으로써 결정될 수 있다. BLAST 프로그램은 문헌(Karlin and Altschul, Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 87:2264-2268 (1990))의 정렬 방법에 기초하고, 문헌(Altschul, et al., J. Mol. Biol., 215:403-410 (1990); Karlin and Altschul, Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 90:5873-5877 (1993); 및 Altschul et al., Nucleic Acids Res. 25:3389-3402 (1997))에 논의된 바와 같다. 프로그램은 비교되는 폴리펩타이드의 전체 길이에 걸쳐 퍼센트 동일성을 결정하기 위해 사용될 수 있다. 기본 파라미터는 예를 들어 blastp 프로그램에서 짧은 문의 서열을 이용하는 조사를 최적화하기 위해 제공된다. 또한, 프로그램은 문헌(Wootton and Federhen, Computers and Chemistry 17:149-163 (1993))의 SEG 프로그램에 의해 결정되는 바와 같이 문의 서열의 세그먼트를 제거(mask-off)하기 위해 SEG 필터의 사용을 허용한다.

[0072] **조성물**

[0073] 본 출원에서 본 출원에 기재된 하나 이상의 폴리펩타이드를 포함하는 조성물이 기재된다. 몇몇 실시양태에서,

조성물은 노화치료제일 수 있다. 몇몇 경우에서, 조성물은 연령 관련 질병 또는 병태 또는 연령 관련 질환을 치료하기 위해, 예를 들어 연령 관련 질병 또는 병태 또는 연령 관련 질환의 발병을 지연시키기 위해, 발생을 감소시키기 위해, 또는 개선하기 위해 사용될 수 있다. 몇몇 경우에서, 조성물은 조직 병변을 치료하기 위해, 조직 병변, 예를 들어 일광 노출 시 UV 손상의 개시를 지연시키기 위해, 발생을 감소시키기 위해 또는 개선시키기 위해 사용될 수 있다.

[0074] 몇몇 경우에서, 조성물은 예를 들어 유효량의 폴리펩타이드만을 또는 하나 이상의 비히클(예를 들어, 치료적으로 허용 가능한 조성물 또는 치료적으로 허용 가능한 담체) 및 다른 치료적으로 허용 가능한 화합물과 함께 포함할 수 있다. 몇몇 실시양태에서, 폴리펩타이드의 유효량은 개체에 대한 요망되는 효과를 갖는 것을 의미하는데, 개체의 예는 조성물로 처리된 세포, 조직, 또는 유기체를 포함하나 이들로 제한되는 것은 아니다. 몇몇 실시양태에서, 폴리펩타이드의 유효량은 처리된 개체에 대해 전신적으로 낮은 효과 또는 최소 효과를 보유한다. 몇몇 실시양태에서, 폴리펩타이드의 유효량은 처리된 부위 또는 근처에서 국소적으로 최대 효과를 보유한다. 몇몇 실시양태에서, 제형은 표피로부터 진피로 국소적으로 투과되도록 구성될 수 있다. 몇몇 실시양태에서, 제형은 표피층을 통해 국소적으로 투과되도록 구성될 수 있다. 몇몇 실시양태에서, 폴리펩타이드의 유효량은 적어도 1 nM, 5 nM, 10 nM, 50 nM, 100 nM, 500 nM, 1 μ M, 적어도 10 μ M, 적어도 25 μ M, 적어도 50 μ M, 적어도 75 μ M, 적어도 100 μ M, 적어도 150 μ M, 적어도 200 μ M, 적어도 250 μ M, 적어도 300 μ M, 적어도 350 μ M, 적어도 400 μ M, 적어도 450 μ M 또는 적어도 500 μ M이다. 몇몇 경우에서, 폴리펩타이드의 유효량은 약 1 nM 내지 약 1000 nM, 약 5 nM 내지 약 750 nM, 약 25 nM 내지 약 750 nM, 또는 약 50 nM 내지 약 500 nM 사이이다. 몇몇 경우에서, 폴리펩타이드의 유효량은 약 1 μ M 내지 약 500 μ M, 약 25 μ M 내지 약 250 μ M, 약 50 μ M 내지 약 200 μ M, 또는 약 75 μ M 내지 약 125 μ M 사이이다. 몇몇 경우에서, 폴리펩타이드의 유효량은 최종 조성물의 적어도 0.00001%, 0.00005%, 0.0001%, 0.0005%, 0.001%, 적어도 0.005%, 적어도 0.01%, 적어도 0.05%, 적어도 0.1%, 적어도 0.5%, 적어도 1%, 적어도 1.5%, 적어도 2%, 적어도 2.5%, 적어도 3%, 적어도 3.5%, 적어도 4%, 적어도 4.5% 또는 적어도 5% (w/w)이다. 몇몇 경우에서, 폴리펩타이드의 유효량은 최종 조성물의 약 0.00001% 내지 약 5%, 0.00001% 내지 약 1%, 0.00001% 내지 약 0.1%, 약 0.001% 내지 약 5%, 약 0.005% 내지 약 4%, 약 0.005% 내지 약 3%, 약 0.005% 내지 약 2%, 약 0.005% 내지 약 1% 또는 약 0.005% 내지 약 0.5% 사이이다. 몇몇 실시양태에서, 생체 내 적용을 위한 폴리펩타이드의 유효량은 시험관 내 적용에서 사용된 양보다 적어도 2, 5, 10, 20, 30, 40, 50, 60, 70, 80, 90, 100, 150, 200, 250, 300, 350, 400, 450, 또는 500배일 수 있다. 폴리펩타이드의 유효량은 폴리펩타이드의 일부 진피 투과, 몇몇 경우에서 약 1% 투과, 약 2% 투과, 약 4% 투과, 약 5% 투과, 또는 약 10% 투과를 야기한다. 몇몇 경우에서, 피부 상에 적용된 조성물 내의 폴리펩타이드의 1%, 2%, 3%, 4%, 5%, 6%, 7%, 8%, 9% 또는 10% 이하가 진피 내로 투과된다. 몇몇 경우에서, 피부 상에 적용된 조성물 내의 폴리펩타이드의 적어도 1%, 2%, 3%, 4%, 5%, 6%, 7%, 8%, 9% 또는 10%가 진피 내로 투과된다. 몇몇 경우에서, 생체 내 적용에서 사용된 양은 시험관 내 투과 연구에서 진피 투과의 양의 인수(factor)이다. 몇몇 경우에서, 생체 내 적용에서 사용된 양의 인수는 시험관 내 진피 투과의 양의 적어도 2, 5, 10, 20, 30, 40, 50, 60, 70, 80, 90, 100, 150, 200, 250, 300, 350, 400, 450, 500, 550, 600, 650, 700, 750, 800, 850, 900, 950, 또는 1000배이다.

[0075] 몇몇 경우에서, 본 출원에 기재된 조성물은 하나 이상의 추가의 영양약학적, 미용학적, 치료학적, 또는 약학적 처리와 함께(예를 들어, 동시-투여, 순차 투여, 또는 동시-제형화) 투여될 수 있다.

[0076] 몇몇 실시양태에서, 제형은 하나 이상의 처리와 함께 사용될 수 있다. 몇몇 실시양태에서, 제형은 음파 처리, 초음파 처리, LED 처리, 광 처리, 전기 처리, 고주파 처리, 또는 다른 피부학적 처리와 함께 사용될 수 있다. 몇몇 실시양태에서, 조성물은 처리 이전, 이후, 또는 도중에 피부에 적용될 수 있다.

[0077] 조성물은 국소 적용을 위해 제형화될 수 있다. 예를 들어, 조성물은 피부 상에 적용하기 위해 제형화될 수 있다. 몇몇 실시양태에서, 조성물은 국소 보충제로서 구성된다. 국소 적용을 위한 것들과 같은 제형은 크림, 연고, 젤, 액체, 파우더, 로션, 세럼, 에멀션, 모이스처라이저, 폼, 페이스 마스크, 무스, 에어로졸, 스프레이, 클린저, 토너, 국소 패치, 또는 샴푸일 수 있다. 국소적으로 적용된 폴리펩타이드는 환부에, 향후 개체의 일부 분, 또는 실질적으로 전체적인 개체에 영향을 미칠 수 있는 부위에 적용될 수 있다. 몇몇 경우에서, 국소 처리는 버퍼, 다른 국소 처리, 크림, 또는 모이스처라이저를 이용하여 적용될 수 있다.

[0078] 예를 들어 국소 적용을 위한 조성물은 미용학적 조성물로 제형화될 수 있다. 미용학적 조성물의 예는 메이크업, 파운데이션, 선크림, 애프터 선 로션, 및 향에이징 스킨 케어 제품을 포함하는 스킨 케어 제품을 포함할 수 있다. 몇몇 경우에서, 메이크업 조성물은 얼굴 위에 색조를 남길 수 있고, 파운데이션, 브론저, 마스크라, 컨실러, 아이 라이너, 브로우 컬러, 아이 세도우, 블러셔, 립 컬러, 파우더, 고체 에멀션 컴팩트, 또는 다른 메이크

업 제품을 포함할 수 있다. 몇몇 경우에서, 스킨 케어 제품은 어떻게든 보습, 개선, 재생 촉진, 보호, 손상 예방, 또는 피부 세정을 위한 처리 또는 케어를 위해 사용되는 것들일 수 있다. 스킨 케어 제품은 크림, 국소 패치, 하이드로겔 패치, 경피 패치, 연고, 젤, 액체, 파우더, 로션, 세럼, 에멀션, 오일, 클레이, 모이스처라이저, 폼, 페이스 마스크, 무스, 에어로졸, 스프레이, 클린저, 토너 또는 샴푸로서 적용될 수 있다. 몇몇 경우에서, 스킨 케어 제품은 접착제, 붕대, 각질제거제, 치약, 모이스처라이저, 로션, 프라이머, 립스틱, 립 밤, 무수 페색 모이스처라이저, 발한억제제, 데오도란트, 개인 세정 용품, 페색 약물 전달 패치, 네일 폴리쉬, 파우더, 조직, 와이프, 헤어 컨디셔너, 또는 면도 크림의 형태일 수 있다.

[0079] 본 출원에서 고려된 바와 같은 조성물은 식용일 수 있는데, 즉 식용 보충제 또는 음료로서 제형화될 수 있어 조성이 인간에 의해 안전하게 소비되도록 제형화될 수 있다. 몇몇 경우에서, 식용 조성물은 연령 관련 질병 또는 병태 또는 연령 관련 질환을 치료하기 위해 치료적으로 효과적일 수 있다. 몇몇 경우에서, 식용 보충제는 정제, 캡슐, 츠(chwe), 거미, 파우더, 식품 바, 식사 대용 바, 또는 식품 첨가제로서 구성될 수 있다. 몇몇 경우에서, 음료는 물, 소다, 티, 커피, 우유, 주스, 셰이크, 드링크, 또는 다른 식용 액체를 포함하도록 제형화될 수 있다.

[0080] 몇몇 경우에서, 조성물은 피부 컨디셔닝제(예를 들어, 습윤제, 각질제거제, 연화제, 또는 수화제)를 포함할 수 있다. 습윤제는 모이스처라이징, 스케일링 감소, 또는 피부로부터 축적된 스케일의 제거 촉진을 위한 것일 수 있다. 각질제거제는 표면으로부터 오래된 피부 세포의 제거를 위한 것일 수 있고, 물리적인 각질제거제 또는 화학적인 각질제거제일 수 있다. 연화제는 건조하거나, 거칠거나, 또는 푸석푸석한 피부를 부드럽게 할 수 있는 제조물 또는 성분일 수 있다. 수화제는 모이스처라이징, 각질 감소, 또는 피부로부터 축적된 스케일의 제거 촉진을 위한 것일 수 있다. 몇몇 경우에서, 연화제는 피부에 대한 연화 효과 및 진정 효과를 갖고 수분 손실을 예방하는 제제이다. 몇몇 실시양태에서, 연화제는 식물성 오일, 미네랄 오일, 시어 버터, 코코아 버터, 펩트콜라툼, 지방산(에뮤(emu), 밍크(mink), 및 라놀린(lanolin)을 포함하는 동물류), 트리글리세라이드, 벤조에이트, 미리스테이트, 팔미테이트, 스테아레이트, 당지질, 인지질, 스쿠알렌, 글리세린, 로즈 힙 오일, 안디로바 오일, 포도씨유, 아보카도유, 자두씨유, 프라카씨 오일, 칼리코필럼 스프루세아눔 오일, 아몬드유 및 아르간 오일, 카프릴릭/카프릭 트리글리세라이드, 호호바 버터, 호호바 오일, 스펙트라스타트 G2, 세라마이드 및 조류 추출물 중 적어도 하나를 포함할 수 있다. 몇몇 경우에서, 조성물은 피부 수화제(skin hydrator)로도 언급되는 피부 수화제(skin hydrating agent)를 포함할 수 있다. 몇몇 경우에서, 피부 수화제는 글리세린, 스쿠알렌, 소르비톨, 히알루론산, 히알루론산 유도체, 히알루론산나트륨, 히알루론산나트륨 가교중합체, 나이아신아마이드, 당단백질, 피롤리돈 카르복실산(PCA), 라이신 HCl, 알란토인 및 조류 추출물을 포함하나 이들로 제한되는 것은 아니다. 몇몇 실시양태에서, 조성물은 적어도 1%, 2%, 3%, 4%, 5%, 6%, 7%, 8%, 9% 또는 10%의 피부 컨디셔닝제를 포함한다. 몇몇 실시양태에서, 조성물은 약 1% 내지 약 70%, 약 1% 내지 약 60%, 약 1% 내지 약 50%, 약 5% 내지 약 50%, 약 5% 내지 45% 또는 약 5% 내지 40%의 피부 컨디셔닝제를 포함한다.

[0081] 조성물은 피부의 광택 외관을 개선 또는 조절할 수 있는 광택 조절제를 포함할 수 있다. 광택 조절제는 자연적으로 다공성일 수 있다. 그러한 제제는 광택 외관을 감소시키기 위해 과량의 수분을 흡수하는 레저버를 제공할 수 있다. 광택 조절제는 실리카, 마그네슘 알루미늄 실리케이트, 탈크, 세리사이트 및 다양한 유기 공중합체일 수 있다. 특히 효과적인 광택 조절제는 실리케이트 또는 카르보네이트 또는 실리케이트와 알칼리(IA) 금속, 알칼리 토(IA) 금속, 또는 전이 금속의 반응에 의해 형성된 카르보네이트, 및 실리카(실리콘 다이옥사이드)를 포함할 수 있다. 바람직한 광택 조절제는 칼슘 실리케이트, 비정질 실리카, 칼슘 카르보네이트, 마그네슘 카르보네이트, 아연 카르보네이트, 벤토나이트 클레이, 및 이들의 조합으로 이루어지는 군으로부터 선택된다.

[0082] 조성물은 필름 형성제를 포함할 수 있는데, 이는 피부에 대한 필름 직접성 및 접착에 조력할 수 있다. 필름 형성제는 조성물의 내구성(long wear) 및 비전달 성능을 개선할 수 있다. 필름 형성제는 수용성, 수불용성, 또는 수분산성일 수 있다. 필름 형성제는 1) 유기 실리콘 수지, 플루오르화 실리콘 수지, 유기 실리콘 수지의 공중합체, 트리메틸실록시실리케이트, 실리콘 수지의 GE의 공중합체, SF1318(실리콘 수지 및 이소스테아르산 공중합체의 유기 에스테르) 및 CF1301(실리콘 수지 및 알파 메틸 스티렌 공중합체), Dow Corning의 실리콘 수지의 감압성 접착제 공중합체 및 다양한 PDMS(BIO-PSA 시리즈); 및 2) 아크릴 및 메타크릴 중합체 및 수지, 실리콘-아크릴레이트 타입 공중합체 및 3M의 실리콘 플러스 폴리머를 포함하는 플루오르화 버전, Shin-Etsu의 KP545, 알킬-아크릴레이트 공중합체, Shin-Etsu의 KP 561 및 562; 3) Collaborative Labs의 데센/부텐 공중합체; 4) ISP의 Antaron/Ganex를 포함하는 폴리비닐계 재료인 PVP, PVP/VA(PVP/트리아코텐 공중합체), BASF의 Luviskol 재료; 5) 폴리우레탄, Polyderm PE/PA, Polyderm PPI-SI-WS, Polyderm PPI-GH를 포함하나 이들로 제한되는 것은 아닌 Alzo의 Polyderm 시리즈, BASF의 Luviset P.U.R.; 6) 폴리퀴터늄 재료, BASF의 Luviquat 시리즈; 7) 아크릴레

이트 공중합체 및 아크릴레이트/아크릴아마이드 공중합체, 둘 다 BASF에서 구입 가능한 Luvimer 및 Ultrahold; 8) 스티렌계 재료; 및 9) 셀룰로오스 및 셀룰로오스계 재료를 포함하는 키토산 및 키토산계 재료일 수 있다.

[0083] 조성물은 점증제 또는 유화제를 포함할 수 있다. 점증제는 미용학적 조성물 내에서 사용되는 액체계 재료의 점도를 증가시키기 위해 사용될 수 있다. 특정 점증제의 선택은 요망되는 조성물의 타입(예를 들어, 젤, 크림, 로션, 또는 왁스계), 요망되는 유동학, 사용된 액체계 재료, 및 조성물 내에 사용되는 다른 재료에 따라 달라질 수 있다. 점증제 또는 유화제의 예는 왁스 재료, 예를 들어 칸텔릴라, 카르나우바 왁스, 비왁스, 경랍, 카르나우바, 베이베리, 몬탄, 지랍, 세레신, 파라핀, 합성 왁스, 예를 들어 피셔-트롭쉬 왁스, 실리콘 왁스(Dow Corning의 DC 2503), 미세결정성 왁스 등; 고급 지방산, 12개 내지 22개의 탄소 원자를 갖는 산의 비누, 예를 들어 나트륨 및 칼륨 염; 고급 지방산의 아마이드; 알킬올아민의 고급 지방산 아마이드; 디벤즈알데히드-모노소르비톨 아세탈; 아세테이트, 프로피오네이트 및 락테이트의 알칼리 금속 및 알칼리 토 금속 염; 및 이들의 혼합물을 포함할 수 있다. 또한, 중합체 재료, 예를 들어 로커스트 콩 검, 나트륨 알기네이트, 나트륨 카제이네이트, 난 알부민, 젤라틴 한천, 카라기난 검 나트륨 알기네이트, 크산탄 검, 킨스 시드 추출물, 트라가칸스 검, 전분, 화학적으로 변형된 전분 등, 반합성 중합체 재료, 예를 들어 셀룰로오스, 셀룰로오스 유도체, 셀룰로오스 에테르 하이드록시에틸 셀룰로오스, 메틸 셀룰로오스, 하이드록시프로필 셀룰로오스, 카르복시메틸 셀룰로오스, 하이드록시프로필메틸 셀룰로오스, 폴리비닐피롤리돈, 폴리비닐알코올, 구아 검, 하이드록시프로필 구아 검, 가용성 전분, 양이온성 셀룰로오스, 양이온성 구아 등 및 합성 중합체 재료, 예를 들어 카르복시비닐 중합체, 폴리비닐피롤리돈, 폴리비닐 알코올 폴리아크릴산 중합체, 폴리(아크릴산), 카르보머, 폴리메타크릴산 중합체, 폴리비닐 아세테이트 중합체, 폴리비닐 클로라이드 중합체, 폴리비닐리덴 클로라이드 중합체 등도 유용하다. 또한, 예를 들어 벤토나이트와 같은 알루미늄 실리케이트, 또는 폴리에틸렌 글리콜 및 폴리에틸렌 글리콜 스테아레이트 또는 디스테아레이트의 혼합물과 같은 무기 증점제도 사용될 수 있다. 유화제는 에멀션 내에서 친수성 및 소수성 성분이 분리되지 않도록 도움을 주기 위해 사용될 수 있다. 몇몇 경우에서, 유화제는 Olivem, Oliwax LC, 폴리소르베이트, laureth-4, 및 칼륨 세틸 설페이트를 포함하나 이들로 제한되는 것은 아니다.

[0084] 미용학적 조성물은 외관의 일시적인 변화를 제공할 수 있거나, 또는 외관의 장기간의 변화를 제공할 수 있다. 몇몇 경우에서, 미용학적 조성물은 외관의 단기 변화(예를 들어, 피부의 착색 또는 플럼핑(plumping))뿐만 아니라 외관의 장기 변화(예를 들어, 반점의 감소, 미세 라인의 외관, 주름의 외관, 또는 외관에 영향을 미칠 수 있는 다른 특징)를 제공하기 위해 제형화될 수 있다.

[0085] 조성물은 본 출원에 개시된 바와 같은 폴리펩타이드가 적용되는 경우 상가 효과 또는 상승 효과를 갖는 첨가제를 포함할 수 있다. 예를 들어, 폴리펩타이드 및 첨가제를 포함하는 조성물은 첨가제, 폴리펩타이드의 개별적인 효과 또는 첨가제 및 폴리펩타이드의 개별적인 효과의 합보다 노화 및 연령 관련 질병 또는 병태, 또는 연령 관련 질환에 대한 더 큰 효과(예를 들어, 하나 이상의 증상의 발병의 지연, 발생의 감소, 또는 개선)를 보유할 수 있다. 첨가제는 추가적인 폴리펩타이드, 글리코사미노글리칸, 탄수화물, 폴리페놀, 단백질, 지질, 식물 수성 또는 오일 추출물, 핵산, 향제, 소분자, 비타민, 습윤제, 연화제, 또는 다른 적합한 첨가제일 수 있다. 몇몇 실시양태에서, 조성물은 UV 차단제를 포함한다. 몇몇 실시양태에서, UV 차단제는 아미노벤조산, 아보벤존, 시녹세이트, 디옥시벤존, 호모살레이트, 메라디메이트, 옥토크릴렌, 옥티녹세이트, 옥티살레이트, 옥시벤존, 파디메이트, 엔셀리졸, 설리소벤존, 티타늄 다이옥사이드, 트롤아민 살리실레이트, 및 아연 옥사이드를 포함할 수 있으나 이들로 제한되는 것은 아니다.

[0086] 종종 본 출원에서 제공된 방법, 시스템, 및 조성물은 비타민을 포함한다. 몇몇 경우에서, 비타민은 피부 진정, 피부 회복, 피부 보충, 및/또는 보습 효과를 제공한다. 몇몇 경우에서, 비타민은 항산화 효과를 제공한다. 몇몇 경우에서, 비타민은 연화제로서 작용한다. 몇몇 경우에서, 비타민은 확대된 모공, 불균일 피부 톤, 미세 라인, 탁함, 및/또는 약해진 피부 표면의 외관을 개선시킨다. 몇몇 경우에서, 비타민은 비타민 A, 비타민 D, 비타민 E, 비타민 F, 비타민 K, 비타민 B1(티아민), 비타민 B2(리보플라빈), 비타민 B3(나이아신), 비타민 B5(판토텐산), 비타민 B7(비오틴), 비타민 B6, 비타민 B12(시아노코발라민), 비타민 B9, 엽산, 나이아신아마이드, 및 이들의 혼합물이다. 몇몇 경우에서, 조성물은 비타민의 유도체를 포함한다. 몇몇 경우에서, 비타민의 유도체는 조성물 내에서 비타민의 안정성 및/또는 조성물 내에서 다른 성분과 비타민 유도체의 상용성을 개선시키기 위해 사용된다. 몇몇 경우에서, 조성물은 비타민 B3 또는 그의 유도체 및 비타민 E 또는 그의 유도체를 포함한다. 몇몇 경우에서, 조성물은 나이아신아마이드 및 비타민 E 또는 그의 유도체를 포함한다. 몇몇 경우에서, 조성물은 비타민 C 또는 그의 유도체, 비타민 B3 또는 그의 유도체, 및 비타민 E 또는 그의 유도체를 포함한다. 몇몇 실시양태에서, 조성물은 적어도 0.01%, 0.05%, 0.5%, 1%, 2%, 3%, 4%, 5%, 6%, 7%, 8%, 9% 또는 10%의 비타민을 포함한다. 몇몇 실시양태에서, 조성물은 약 0.1% 내지 약 10%, 약 0.1% 내지 약 5%, 약 0.5% 내지 약

10%, 약 0.5% 내지 약 5%, 약 1% 내지 10% 또는 약 1% 내지 5%의 비타민을 포함한다.

[0087] 국소 투여용 조성물은 담체를 추가로 포함할 수 있다. 담체는 용액, 에멀션, 연고, 오일, 또는 젤 베이스일 수 있다. 젤 베이스는, 예를 들어 하기 성분 중 하나 이상을 포함할 수 있다: 페트롤라툼, 라놀린, PEG(들), 비왁스, 미네랄 오일, 희석제, 예를 들어 물 및 알코올, 유화제, 및/또는 안정화제. 증점제는 국소 투여용 치료 조성물 내에 존재할 수 있다. 경피 투여를 위해 의도되는 경우, 조성물은 경피 패치 또는 전리요법 디바이스를 포함할 수 있다. 몇몇 경우에서, 생분해성 미소구(예를 들어, 폴리락트산)도 또한 조성물을 위한 담체로서 이용될 수 있다. 몇몇 경우에서, 경피 패치는 제형을 피부의 표피층에 전달하기 위해 제조된다. 몇몇 경우에서, 경피 패치는 제형을 피부의 표피층 및 진피층에 전달하기 위해 제조된다. 몇몇 경우에서, 제형은 개체 내에서 전신적으로 최소로 전달되거나 또는 개체의 혈류 내로 직접 전달되지 않도록 제조된다.

[0088] 또한, 조성물은 하나 이상의 희석제, 예를 들어 버퍼, 또는 하나 이상의 산화방지제, 예를 들어 아스코르브산, 저분자량 폴리펩타이드, 폴리펩타이드, 아미노산, 글루코오스, 수크로오스 또는 텍스트린을 포함하는 탄수화물, 킬레이팅제, 예를 들어 EDTA, 글루타치온 및 다른 안정화제를 함유할 수 있다. 중성의 완충처리된 염수 또는 비특이적인 혈청 알부민과 혼합된 염수는 예시적인 희석제이다. 생성물은 희석제로서 적합한 부형제 용액(예를 들어, 수크로오스)을 이용하여 동결건조물로서 제형화될 수 있다.

[0089] 또한, 조성물은 하나 이상의 부형제, 예를 들어 치료학적, 영양약학적 또는 미용학적 부형제를 포함할 수 있다. 부형제의 예는 흡착방지제, 결합제, 코팅, 색소, 붕해제, 향료, 활택제, 윤활제, 보존제, 흡착제, 감미제, 또는 비히클을 포함할 수 있다.

[0090] 적합한 부형제 또는 안정화제는 이용되는 투여량 및 농도에서 수용자에게 비독성일 수 있고, 버퍼, 예를 들어 포스페이트, 시트레이트, 및 다른 유기 산; 염, 예를 들어 나트륨 클로라이드; 아스코르브산, 비타민 E, 및 메티오닌을 포함하는 산화방지제; 보존제(예를 들어, 옥타데실디메틸벤질 암모늄 클로라이드; 헥사메토늄 클로라이드; 벤잘코늄 클로라이드; 글루코노락톤 및 나트륨 벤조에이트; 페놀, 부틸 또는 벤질 알코올과 같은 것); 저분자량(약 10 미만의 잔기) 폴리펩타이드; 단백질, 예를 들어 혈청 알부민 또는 젤라틴; 친수성 중합체, 예를 들어 폴리비닐피롤리돈; 아미노산, 예를 들어 글라이신, 글루타민, 아스파라진, 히스티딘, 아르기닌, 또는 라이신; 단당류, 이당류, 및 글루코오스, 만노오스, 또는 텍스트린을 포함하는 다른 탄수화물; 킬레이팅제, 예를 들어 EDTA 또는 EDTA 대체제(예를 들어, Biopure GLDA, Spectrastat G2); 당, 예를 들어 수크로오스, 만니톨, 트레할로오스, 또는 소르비톨; 염 형성 짝이온, 예를 들어 나트륨; 금속 착물(예를 들어, Zn-단백질 착물); 및/또는 계면활성제를 포함할 수 있다. 몇몇 경우에서, 계면활성제는 폴리소르베이트 20, 폴리소르베이트 80, 알기네이트, 폴록사머, TRITON(t-옥틸페녹시폴리에톡시에탄올); 비이온성 세정제; 나트륨 도데실 설페이트(SDS); 나트륨 라우릴 설페이트; 나트륨 옥틸 글리코사이드; 라우릴-, 미리스틸-, 리놀레일-, 또는 스테아릴-설포해당; 라우릴-, 미리스틸-, 리놀레일-, 또는 스테아릴-사르코신; 리놀레일-, 미리스틸-, 또는 세틸-베타인; 라우로아미도프로필-, 코카미도프로필-, 리놀레아미도프로필-, 미리스타미도프로필-, 팔미도프로필-, 또는 이소스테아르아미도프로필-베타인(예를 들어, 라우로아미도프로필); 미리스타미도프로필-, 팔미도프로필-, 또는 이소스테아르아미도프로필-디메틸아민 나트륨 메틸 코코일-, 또는 2나트륨 메틸 올레일-타우레이트; 소르비탄 모노팔미테이트; 및 MONAQUAT 시리즈(Mona Industries, Inc., Paterson, NJ); 폴리에틸렌 글리콜(PEG), 폴리프로필렌 글리콜(PPG), 폴리옥시에틸렌과 폴리옥시프로필렌 글리콜의 공중합체(예를 들어, Pluronic/Poloxamer, PLURONIC® F68 등); 또는 다른 적합한 계면활성제를 포함하나 이들로 제한되는 것은 아니다. 몇몇 경우에서, 조성물은 스쿠알렌, 천연 오일, 식물 추출물, 히알루론산, 또는 클레이를 포함할 수 있다. 몇몇 경우에서, 조성물은 피부내로 활성 성분의 투과를 증강시키기 위한 피부 투과 증강제를 포함한다. 몇몇 경우에서, 피부 투과 증강제는 지방산, 정유, 유레아, 리포솜, 미소구, DMSO, 아존, 나트륨 PCA, 및 스쿠알렌을 포함할 수 있으나 이들로 제한되는 것은 아니다.

[0091] 몇몇 실시양태에서, 제형은 폴리펩타이드를 운반하기 위해 및 피부내에서 폴리펩타이드의 방출 시간 및/또는 피부를 통한 폴리펩타이드의 투과 깊이를 제어하기 위해 담체, 미소구, 리포솜, 또는 마이셀을 포함한다.

[0092] 몇몇 실시양태에서, 폴리펩타이드는 기능화된다. 몇몇 실시양태에서, 폴리펩타이드는 화학기를 이용하여 기능화된다. 몇몇 실시양태에서, 폴리펩타이드는 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, 20 개 이하, 또는 20개 초과인 탄소를 포함하는 작용기를 이용하여 기능화된다. 몇몇 실시양태에서, 폴리펩타이드는 아세틸 또는 팔미토일을 이용하여 기능화된다.

[0093] 개체에게 적용되는 폴리펩타이드 또는 조성물은 멸균될 수 있다. 이는 예를 들어 멸균 여과 멤브레인을 통한 여과, 또는 멸균을 위한 임의의 다른 당해 기술분야에 인식된 방법에 의해 수행될 수 있다.

- [0094] 조성물은 하나 이상의 증상, 예를 들어 피부, 연령 관련 질병 또는 병태, 또는 연령 관련 질환의 증상의 발병을 지연시키거나, 발생을 감소시키거나, 개선할 수 있는 양으로 치료 유효량의 폴리펩타이드 또는 펩티도모방체를 포함할 수 있다. 몇몇 경우에서, 치료 유효량은 개체에서 치료적 응답(예를 들어, 노화치료적 응답) 또는 요망되는 응답을 촉발시킬 수 있는 치료제(예를 들어, 폴리펩타이드)의 양일 수 있다. 치료 유효량은 개체에게 치료적 이점을 유발하기에 충분할 수 있다. 치료 유효량은 사용을 위해 선택된 활성제, 및 치료하려는 개체의 연령, 체중, 신장, 및/또는 일반적인 건강을 포함하는 다양한 인자에 따라 달라질 수 있다.
- [0095] 임상적인 맥락에서 이해되는 바와 같이, 활성제의 치료 유효량은 다른 약물, 화합물, 치료학적, 또는 약학 조성물과 함께 달성되거나 또는 달성되지 않을 수 있다. 따라서, 치료 유효량은 하나 이상의 활성제를 투여하는 맥락에서 고려될 수 있고, 단일 활성제는 하나 이상의 다른 활성제와 함께 바람직한 결과가 달성될 수 있거나 또는 달성되는 경우 유효량으로 제공되는 것으로 간주될 수 있다. 따라서, 몇몇 경우에서, 하나 이상의 활성제는 개체에게 투여될 수 있다. 다른 경우에서, 본 출원에 기재된 활성제를 이용하는 치료는 본 출원에 기재된 하나 이상의 다른 치료 양태 이전, 또는 이후에 수행된다.
- [0096] **폴리펩타이드 합성**
- [0097] 또한, 본 출원에 개시된 폴리펩타이드 중 하나 이상을 코딩하는 단리된 폴리뉴클레오타이드가 개시된다. 단리된 폴리뉴클레오타이드는 프로모터에 작동 가능하게 연결된 단리된 폴리뉴클레오타이드를 포함하는 발현 벡터 내에 존재할 수 있다. 발현 벡터는 단리된 세포(즉, 발현 벡터로 형질감염 또는 형질전환된 재조합 세포) 내에 존재할 수 있다.
- [0098] 적합한 발현 벡터는 개시된 펩타이드, 폴리펩타이드, 및 이의 변이체를 발현하는 박테리아, 식물, 균류, 곤충, 또는 동물 숙주 세포 복제, 및/또는 발현 벡터를 포함할 수 있다. 발현 벡터는 적합한 숙주 세포(예를 들어, 이. 콜라이(*E. coli*))를 형질전환하기 위해 사용될 수 있다. 형질전환된 숙주 세포는 배양 또는 발효되어 펩타이드 또는 폴리펩타이드가 구성적으로 또는 발현을 유도하는 제제를 첨가한 후(예를 들어, 유도성 프로모터에 의해) 발현되도록 할 수 있다. 본 출원에서 고려된 바와 같은 발현 벡터는 코딩된 폴리펩타이드의 발현을 조절하는 조절 서열을 포함할 수 있다. 발현 조절 서열은 구성적 또는 유도성 프로모터(예를 들어, T3, T7, Lac, trp, 또는 phoA), 리보솜 결합 부위, 또는 전사 종결자를 포함할 수 있다.
- [0099] 발현 벡터는 숙주 세포를 형질전환하기 위해 이용될 수 있다. 적합한 숙주 세포는 박테리아, 식물, 균류, 곤충, 또는 동물 숙주 세포를 포함한다. 적합한 박테리아는 그람 음성 박테리아, 예를 들어 에스케리치아(*Escherichia*) 종(예를 들어, 이. 콜라이), 다른 그람 음성 박테리아(예를 들어, 슈도모나스(*Pseudomonas*) sp., 예를 들어 슈도모나스 아에루기노사(*Pseudomonas aeruginosa*), 또는 카울로박터(*Caulobacter*) sp., 예를 들어 카울로박터 크레센투스(*Caulobacter crescentus*)), 또는 그람 양성 박테리아(예를 들어, 바실러스(*Bacillus*) sp., 예를 들어 바실러스 썩틸리스(*Bacillus subtilis*))를 포함하나, 이들로 제한되는 것은 아니다. 적합한 진균 세포는 효모(예를 들어, 사카로마이세스 세레비시아(*Saccharomyces cerevisiae*))를 포함할 수 있다.
- [0100] 발현 벡터는 예를 들어 폴리펩타이드의 합성을 위한 메커니즘을 제공할 수 있다. 합성은 세포, 예를 들어 동물 세포, 식물 세포, 박테리아 세포, 또는 효모 세포 내에서 일어날 수 있다. 발현 벡터는 핵산, 예를 들어 플라스미드, 코스미드, 파지미드, 또는 박테리오파지로부터 유래되거나 또는 화학적 또는 효소적 수단에 의해 합성된 DNA를 포함할 수 있는데, 이때 본 출원에 기재된 하나 이상의 폴리펩타이드를 코딩할 수 있는 핵산의 하나 이상의 단편이 삽입되거나 또는 클로닝될 수 있다. 발현 벡터는 규정된 숙주 또는 유기체 내에서 자율 복제가 가능하여 클로닝된 서열이 재생되도록 한다. 발현 벡터는 선형, 환형, 또는 초나선 형태를 보유할 수 있고, 특정의 목적을 위해 다른 벡터 또는 다른 재료와 복합체화될 수 있다. 발현 벡터의 구성요소는 (1) DNA; (2) 치료 또는 요망되는 생성물을 코딩하는 서열; 또는 (3) 전사, 번역, RNA 안정성, 및 복제를 위한 조절 요소를 통합하는 DNA 분자를 포함할 수 있으나, 이들로 제한되는 것은 아니다.
- [0101] 폴리펩타이드는 발현 벡터를 이용하여 생성될 수 있다. 몇몇 경우에서, 그러한 생성은 개시된 펩타이드, 폴리펩타이드, 또는 이의 변이체(본 출원에서 고려된 바와 같음)를 코딩하는 핵산 분자를 포함하는 발현 벡터(본 출원에서 고려된 바와 같음)를 포함하는 형질전환된 숙주 세포(예를 들어, 본 출원에서 고려된 바와 같은 박테리아 숙주 세포)를 배양 또는 발효하는 단계로서, 이때 배양은 펩타이드, 폴리펩타이드, 또는 변이체의 발현을 유발하는 조건 하에서 일어나는 단계; 및 펩타이드, 폴리펩타이드, 또는 변이체를 단리, 분리 또는 정제하는 단계를 포함할 수 있다. 형질전환된 박테리아는 펩타이드, 폴리펩타이드, 또는 변이체를 발현시키기 위해 당해 기술분야에 공지된 방법을 이용하여 배양 또는 발효될 수 있다. 예시적인 단리, 분리, 또는 정제 방법은 하기 단계 중

하나 이상을 포함할 수 있다: 세포 파쇄 단계, 세정 단계(예를 들어, 원심분리 또는 여과에 의해), 크로마토그래피 분리 단계, 투석 단계, 및 침전 단계.

[0102] 몇몇 다른 실시양태에서, 폴리펩타이드는 화학적으로 합성될 수 있다. 폴리펩타이드의 합성은 용액 상 기법, 고체 상 기법, 또는 폴리펩타이드 합성의 다른 적합한 방법을 이용하여 수행될 수 있다.

[0103] 방법

[0104] 본 출원에 개시된 폴리펩타이드 및 조성물의 사용을 위한 방법이 제공된다. 그러한 방법은 개체에게 본 출원에 기재된 하나 이상의 폴리펩타이드의 적용을 포함한다. 본 출원에 기재된 방법은 연령 관련 질병 또는 병태 또는 연령 관련 질환의 발병을 지연시키거나, 발생을 감소시키거나, 또는 개선시킬 수 있다.

[0105] 본 출원에 기재된 방법은 노화 세포의 축적과 관련된 질병, 질환, 또는 병태의 발병을 지연시키거나, 발생을 감소시키거나, 또는 개선시킬 수 있다. 노화 세포의 축적과 관련된 질병 또는 질환은 연령과 관련될 수 있다. 몇몇 경우에서, 상기 질병 또는 질환은 치료하지 않으면 시간 경과에 따라 악화될 수 있다.

[0106] 폴리펩타이드 또는 조성물은 건강한 피부에 의해 직접적으로 또는 간접적으로 영향받은 병태를 치료하기 위해 개체에 적용 또는 투여될 수 있다. 그러한 방법은 개체에게 피부 건강을 촉진하는 화합물을 투여하는 단계 또는 피부에 국소 치료를 적용하는 단계를 포함할 수 있다.

[0107] 연령 관련 질환은 정상적인 개체에서 발생하는 에이징 이벤트의 모두 또는 일부를 모방하거나 또는 실질적으로 모방할 수 있는, 신체에 영향을 미칠 수 있는 질병 과정 도중에 발생하는 이벤트의 생물학적 진행을 포함할 수 있다. 몇몇 경우에서, 이벤트의 이러한 생물학적 진행은 가속 시간 프레임에 걸쳐 발생할 수 있다.

[0108] 연령 관련 질병 또는 병태 또는 연령 관련 질환은 운동 능력 및 섭식 능력과 같은 신체에서의 정기적인 과정과 관련될 수 있다.

[0109] 몇몇 경우에서, 연령 관련 질병 또는 병태 또는 연령 관련 질환은 피부에 영향을 미칠 수 있는 질병, 병태, 또는 질환, 예를 들어 주름, 라인, 건조증, 가려움증, 반점, 검버섯, 욕창, 궤양, 암, 색소침착이상, 감염(예를 들어, 진균 감염), 또는 피부 자선, 예를 들어 투명도, 텍스처, 탄성, 색조, 톤, 유연성, 견고성, 긴장, 평활도, 두께, 광택, 발광, 수화, 수분 보유, 피부 배리어, 균일성, 이완, 또는 유질, 또는 다른 데르마토스의 감소를 포함할 수 있는 피부 질환 또는 피부병일 수 있다. 몇몇 경우에서, 연령 관련 질병 또는 병태 또는 연령 관련 질환은 피부의 과색소침착이다. 몇몇 경우에서, 과색소침착 질환은 기미, 검버섯, 검은사마귀, 및/또는 진행성 색소성 자반병이다. 몇몇 경우에서, 과색소침착은 일광 노출, 염증, 호르몬 변화, 또는 피부 손상의 결과이다. 몇몇 경우에서, 과색소침착은 레이저 처리, 광 처리, 또는 화학적 박리; 항생제, 경구 피임, 또는 광감작 약물의 투여; 또는 국소 제제의 적용을 포함하나 이들로 제한되는 것은 아닌 미용 시술 이후에 발생한다. 몇몇 경우에서, 과색소침착은 멜라닌의 과생성의 결과이다.

[0110] 몇몇 경우에서, 본 출원에 개시된 방법, 시스템 및 조성물을 이용하는 연령 관련 질병 또는 병태 또는 연령 관련 질환의 치료는 피부 외관의 광채, 발광 증가, 광택, 균일성, 평활도 및/또는 견고성을 야기한다. 몇몇 경우에서, 본 출원에 개시된 방법, 시스템, 및 조성물을 이용하는 치료는 표피 배리어, 피부 수화 레벨, 피부 수분 보유, 주름의 외관, 평활도, 견고성, 탄성, 광택 및 광도의 외관을 개선시키고/시키거나 피부의 세라마이드 레벨을 개선 또는 유지한다. 몇몇 경우에서, 본 출원에 개시된 방법, 시스템, 및 조성물을 이용하는 처리의 효과는 피부 수분 함량, 경표피 수분 손실(TEWL), 진피 두께 및 에코발생도, 피부내 분석, 피부 점탄성 특성, 또는 피부 표면 프로파일에 의해 평가된다. 몇몇 경우에서, 본 출원에 개시된 방법, 시스템, 및 조성물을 이용하는 처리의 효과는 라인/주름의 외관, 피부 톤(균일성)의 외관, 모공의 외관, 텍스처/평활도의 외관, 견고성(시각), 탄성(촉각), 표피 배리어, 피부 거칠기, 피부 과색소침착, 또는 전체적인 외관에서의 감소에 대해 평가한다. 몇몇 경우에서, 본 출원에 개시된 방법, 시스템, 및 조성물을 이용하는 처리의 효과는 피부 수분 함량/수화를 측정하기 위한 수분측정기, 경표피 수분 손실(TEWL)을 측정하기 위한 수분증발량 측정기(VapoMeter), 진피 두께(밀도) 및 에코발생도를 측정하는 초음파, 피부 균일성 및 발색단 맵핑을 측정하기 위한 광학 피부 이미징 기구, 피부의 점탄성 특성(견고성 및 탄성)을 측정하기 위한 석션을 이용하는 큐토미터, 피부 유연성측정법, 다중 스펙트럼 분석, 및 피부 표면 프로파일, 라인, 및 주름을 측정하기 위한 비색법을 포함하나 이들로 제한되는 것은 아닌 기구를 이용하여 측정된다.

[0111] 몇몇 경우에서, 연령 관련 질병 또는 병태 또는 연령 관련 질환의 치료는 예를 들어, 10%, 20%, 30%, 40%, 50%, 60%, 70%, 80%, 90%, 95% 또는 99% 만큼 주름 또는 피부 색소침착의 외관의 감소를 야기한다. 몇몇 경우에서, 기기 측정은 라인/주름의 외관, 피부 톤(균일성)의 외관, 모공의 외관, 텍스처/평활도의 외관, 견고성(시각),

탄력(촉각), 표피 배리어, 피부 거칠기, 피부 광택 중 적어도 하나에서 개선을 나타내거나, 또는 조성물의 사용 이전과 비교하여 조성물의 사용 이후에 적어도 1%, 2%, 3%, 4%, 5%, 6%, 7%, 8%, 9%, 10%, 11%, 12%, 13%, 14%, 15%, 16%, 17%, 18%, 19% 만큼의 전체적인 외관의 개선을 나타낸다. 몇몇 경우에서, 개선은 조성물의 사용 이전의 베이스라인과 비교하여 평균 백분율 개선(mean percentage improvement, MPI)으로서 나타낸다. 몇몇 경우에서, MPI는 조성물의 사용 이전과 비교하여 조성물의 사용 이후에 적어도 1%, 2%, 3%, 4%, 5%, 6%, 7%, 8%, 9%, 10%, 11%, 12%, 13%, 14%, 15%, 16%, 17%, 18%, 19% 또는 20%이다. 몇몇 경우에서, 측정은 조성물의 사용 이후 1주, 2주, 3주, 4주, 5주, 6주, 7주, 8주, 9주, 10주, 11주, 12주, 13주, 14주, 15주, 16주, 5개월, 6개월, 또는 1년에서 이루어진다. 몇몇 경우에서, 치료의 효과는 피부 측정치 중 하나 이상을 분석하는 피부 병태, 질병, 또는 질환의 전문가에 의해 평가된다. 몇몇 경우에서, 치료의 효과는 사용자 본인들에 의해 평가된다. 몇몇 경우에서, 사용자의 적어도 10%, 20%, 30%, 40%, 50%, 60%, 70%, 80% 또는 90%는 본 출원에 개시된 방법, 시스템, 및 조성물을 사용한 후에 피부 배리어, 피부 거칠기, 피부 광택, 라인/주름의 외관, 피부 톤(균일성)의 외관, 모공의 외관, 텍스처/평활도의 외관, 건조성(시각), 탄성(촉각), 또는 전체적인 외관 중 하나에서 개선을 보고할 수 있다. 몇몇 경우에서, 사용자의 적어도 10%, 20%, 30%, 40%, 50%, 60%, 70%, 80% 또는 90%는 피부의 수화에서 개선을 보고할 수 있다. 몇몇 경우에서, 사용자의 적어도 10%, 20%, 30%, 40%, 50%, 60%, 70%, 80% 또는 90%는 피부 배리어 기능에서 개선을 보고할 수 있다.

[0112] 몇몇 경우에서, 본 출원에서 제공된 방법, 시스템, 및 조성물은 피부의 과색소침착을 감소시킬 수 있다. 몇몇 경우에서, 과색소침착은 멜라닌의 과잉 생성과 관련되어 있다. 몇몇 경우에서, 본 출원에서 제공된 방법, 시스템, 및 조성물은 멜라닌의 과잉 생성을 감소시킨다. 몇몇 경우에서, 본 출원에서 제공된 방법, 시스템, 및 조성물은 피부내에서 멜라닌 색소의 존재를 감소시킨다. 몇몇 경우에서, 본 출원에서 제공된 방법, 시스템, 및 조성물은 처리된 피부내에서 세포에 의한 타이로시나아제, 멜라닌형성세포 유도 전사 인자(melanocyte inducing transcription factor, MITF) 및 도파크롬 토트머라아제(dopachrome tautomerase, DCT)를 포함하는 멜라닌 형성과 관련된 단백질의 발현 레벨을 감소시킨다. 몇몇 경우에서, 본 출원에서 제공된 방법, 시스템, 및 조성물은 타이로시나아제 활성의 감소, 타이로시나아제의 발현 또는 활성화의 감소, 멜라닌 합성의 중간 생성물의 제거, 멜라노솜의 각질형성세포로의 전이의 감소, 기존의 멜라닌 함량의 감소, 또는 멜라닌형성세포 활성 또는 생존율의 감소를 야기한다.

[0113] 몇몇 경우에서, 본 출원에서 제공된 방법, 시스템, 및 조성물은 피부 염증을 감소시킬 수 있다. 몇몇 경우에서, 본 출원에서 제공된 방법, 시스템, 및 조성물은 처리된 피부내의 세포에 의해 염증과 관련된 단백질, 즉 인터페론-감마(IFN- γ) 및 인터류킨 10(IL-10)의 발현 레벨을 감소시킬 수 있다.

[0114] 몇몇 실시양태에서, 본 출원에 기재된 조성물은 1일 1회, 1일 2회, 1일 3회 또는 그 초과로 투여된다. 몇몇 실시양태에서, 본 출원에 기재된 조성물은 1일 2회 투여, 예를 들어 아침과 저녁에 투여된다. 몇몇 실시양태에서, 본 출원에 기재된 조성물은 매일(daily), 매일(every day), 격일로, 주 5일, 주 1회, 격주로, 월 2주, 월 3주, 월 1회, 월 2회, 월 3회 또는 그 초과로 투여된다. 몇몇 실시양태에서, 본 출원에 기재된 조성물은 적어도 1주, 2주, 3주, 1개월, 2개월, 3개월, 4개월, 5개월, 6개월, 7개월, 8개월, 9개월, 10개월, 11개월, 12개월, 18개월, 2년, 3년, 4년, 5년, 또는 더 긴 기간 동안 투여된다. 몇몇 실시양태에서, 조성물은 아침 및 저녁에 얼굴 및/또는 목의 깨끗하고 마른 피부 상에 평활층으로서 적용되도록 한다. 몇몇 실시양태에서, 제형은 피부의 장기 지속되는 건강을 위한 표피 배리어를 강화시키고 피부 탄력을 개선하기 위해 과학적으로 제형화된 매일의 필수적인 국소 보충제이다. 몇몇 실시양태에서, 사용자는 얼굴 및/또는 목에 적어도 하나의 폴리펩타이드를 포함하는 본 출원에 기재된 조성물을 적용한다. 몇몇 실시양태에서, 조성물은 신체 상의 피부에 적용되도록 한다. 몇몇 실시양태에서, 본 출원에 기재된 조성물은 다른 국소 조성물, 예를 들어 UV 차단제와 함께 사용된다. 몇몇 실시양태에서, 본 출원에 기재된 조성물은 다른 국소 조성물의 적용 이전, 함께, 또는 이후에 적용된다. 몇몇 실시양태에서, 조성물은 UV 차단제이다.

[0115] 폴리펩타이드 또는 조성물은 국소적으로, 즉 피부에 영향을 미치는 질병, 병태, 또는 질환의 발병을 지연시키거나, 발생을 감소시키거나, 또는 개선시키기 위해 피부에 적용될 수 있다.

[0116] 연령 관련 질병 또는 병태 또는 연령 관련 질환은 UV 손상, DNA 손상, 세포 핵 내의 ATRX 병소 축적, 증가된 p16 발현, 증가된 노화 관련 β -갈락토시다아제 활성, 조직 내 노화 세포의 축적, 증가된 SASP 생성, 화학적으로 유도된 노화, 연대기적 에이징, 감소된 히알루론산 생성, 시루투인 6의 감소된 발현, 변경된 인슐린 유사 성장인자-1(IGF-I) 경로 신호전달, 매트릭스 메탈로펩티다아제 1(MMP1)의 증가된 생성, 피부의 얇은 표피층, 또는 유전적 변이체에 의해 유발될 수 있다. 몇몇 경우에서, 연령 관련 질병 또는 병태 또는 연령 관련 질환은 치료 레지먼, 예를 들어 치료약의 부작용에 의해 개시되거나 또는 악화된다. 연령 관련 질병 또는 병태 또는 연령 관

런 질환은 피부의 건강 또는 외관에 직접적으로 또는 간접적으로 영향을 미칠 수 있다. 본 출원의 폴리펩타이드 또는 조성물의 국소 적용은 몇몇 그러한 경우에서 피부의 건강 또는 외관을 개선시킬 수 있다.

[0117] 연령 관련 질병 또는 병태 또는 연령 관련 질환은 세포 증식성 질환을 포함할 수 있다. 세포 증식성 질환은 피부의 건강 또는 외관에 영향을 미칠 수 있다. 몇몇 경우에서, 세포 증식성 질환을 위해 투여된 치료, 예를 들어 화학요법 또는 방사선요법은 피부의 건강 또는 외관에 영향을 미칠 수 있다. 본 출원의 폴리펩타이드 또는 조성물의 국소 적용은 몇몇 그러한 경우에서 피부의 건강 또는 외관을 개선시킬 수 있다.

[0118] 또한, 본 출원에서 개체의 피부를 치료하기 위한 방법이 제공되는데, 상기 방법은 개체에게 조직 또는 유기체 내에서 노화 세포의 수의 감소, 치료된 세포에서 전아포토시스(pro-apoptotic) 상태의 유도, SIRT6 발현의 유도, DNA 유도된 노화의 예방, 및/또는 DNA 수복 능력의 증강을 촉진할 수 있는 조성물을 투여하는 단계를 포함한다. 몇몇 경우에서, 피부병, 예를 들어 피부과 질환 또는 병태는 피부 늘어짐 또는 주름, 조직 내 노화 세포의 축적, 감소된 표피 두께, 감소된 콜라겐 생성, 증가된 MMP-1 생성, 감소된 DNA 수복 능력, 감소된 SIRT6 발현, 피부 해체, 피부의 얇은 표피층, 염증, 노화 관련 분비 표현형, 또는 피부의 줄기 세포 소진을 포함할 수 있다.

[0119] 상기 방법들은 개체에게 조직 또는 유기체 내에서 노화 세포의 수의 현저한 감소를 촉진시킬 수 있는 폴리펩타이드를 포함하는 조성물을 투여하는 단계를 포함할 수 있다. 노화 세포의 수의 감소는 처리된 세포에서 SIRT6 발현 유도, DNA 유도된 노화 예방, 또는 DNA 수복 능력 증강을 포함하는 전아포토시스 상태를 포함할 수 있다. 몇몇 경우에서, 샘플, 개체의 일부분(예를 들어, 개체의 안면 피부), 및/또는 개체에서 노화 세포의 수는 적어도 10%, 적어도 20%, 적어도 30%, 적어도 40%, 적어도 50%, 적어도 60%, 적어도 70%, 적어도 80% 또는 적어도 90% 만큼 감소될 수 있다.

[0120] 폴리펩타이드 또는 조성물은 세포, 조직, 또는 개체에 적용 또는 투여될 수 있다. 몇몇 경우에서, 폴리펩타이드의 적용 또는 투여는 세포, 조직, 또는 개체에서 노화치료 효과를 야기할 수 있다. 몇몇 경우에서, 폴리펩타이드는 노화치료 효과를 제공하기 위해 개체에 투여될 수 있거나, 개체에 국소적으로 적용될 수 있거나, 또는 배양된 세포와 함께 인큐베이션될 수 있다.

[0121] 세포는 배양된 세포 또는 개체 또는 세포주로부터 단리된 세포일 수 있다. 배양된 세포의 몇몇 예는 각질형성세포 또는 섬유아세포 또는 멜라닌형성세포를 포함할 수 있다. 세포는 야생형일 수 있거나 또는 유전적으로 변형될 수 있다. 몇몇 유전적 변형은 노화를 촉진할 수 있는데, 그 예로는 p53/p21 경로, p16/RB 경로, 다른 RNA 클래스 중에서 mRNA 또는 miR 유전자에서의 변형을 들 수 있다. 몇몇 경우에서, 세포에 대한 폴리펩타이드 또는 조성물의 적용은 세포 내에서 노화를 감소시킬 수 있다. 몇몇 경우에서, 세포는 동물, 씨, 엘레간스, 및 인간을 포함하나 이들로 제한되는 것은 아닌 유기체 내의 생체 내 또는 인 시츄 세포를 포함할 수 있다.

[0122] 조직은 개체의 조직 또는 개체로부터 단리된 즉 생체 외 조직인 조직일 수 있다. 몇몇 경우에서, 조직은 인공적으로 성장될 수 있다. 조직은 피부를 포함할 수 있고, 조직의 예는 건강한 피부, 병든 피부, 에이징된 피부, 또는 두피를 포함할 수 있다. 몇몇 경우에서, 조직에 대한 폴리펩타이드 또는 조성물의 적용은 조직의 하나 이상의 세포 또는 전체 조직에서 노화를 감소시킬 수 있다. 몇몇 경우에서, 조직은 동물, 씨, 엘레간스, 및 인간을 포함하나 이들로 제한되는 것은 아닌 유기체 내의 생체 내 또는 인 시츄 조직을 포함할 수 있다.

[0123] 개체가 인간인 경우, 개체는 임의 연령의 개체일 수 있다. 몇몇 경우에서, 개체는 연령 관련 질병 또는 병태 또는 연령 관련 질환을 갖거나, 연령 관련 질병 또는 병태 또는 연령 관련 질환에 대해 위험한 상태이거나, 또는 건강하다. 개체는 남성 또는 여성일 수 있다.

[0124] 방법은 폴리펩타이드 또는 조성물의 국소 적용을 포함할 수 있다. 국소 적용은 문지름, 분무, 침지, 가볍게 문지름, 또는 달리 폴리펩타이드 또는 조성물을 피부 또는 점막에 적용하는 것을 포함할 수 있다.

[0125] **실시예**

[0126] **실시예 1**

[0127] 조로증 환자로부터 단리된 1차 섬유아세포는 인간에서 조기 에이징 및 세포 노화의 유전적 모델을 구성할 수 있다. 조로증 환자 유래의 1차 섬유아세포는 10% v.v. 태아 소 혈청(FBS), 및 1% v.v.의 페니실린/스트렙토마이신 용액(1,000 U.mL⁻¹)으로 보충된 DMEM(Dulbecco's Modified Eagle's Medium, 돌베코의 변형된 이글 배지) 중에서 배양되었다. 세포는 5% CO₂, 37°C 및 95% 습도 분위기 중에서 유지되었다. 확장 이후, 이들 세포는 96웰 플레이트 내에 시딩되었고(웰당 1,000개의 세포), 플레이팅하고 6시간 이후에 독점 라이브러리 유래의 개별적인 폴리

펩타이드와 함께 50 μM 에서 48시간 동안 인큐베이션되었다. 음성 대조군은 비히클만이 수용된 미처리 세포를 포함하였고; 양성 대조군은 동일한 기간 동안 세노라이트(senolytic) 화합물 10 μM ABT-263과 함께 인큐베이션되었다. 인큐베이션 이후, 상대 세포 노화(미처리된 대조군에 대한 노화 관련 B-갈락토시다아제 염색의 활성에 의해 평가됨)는 **도 1**에 나타난 바와 같이 분석되었는데, 이때 Y 축은 웰 내의 세포의 총 수(미처리된 대조군에 대해 정규화된)를 나타내고, X 축은 또한 음성 대조군에 대해 정규화된, 노화 관련 B-갈락토시다아제 염색 강도/핵(즉, 노화 레벨)을 나타낸다. 3회의 기술적 중복실험을 포함하는 3회의 독립적인 실험이 수행되었다. 미처리된 대조군 샘플의 세포 노화 75% 미만으로 세포 노화의 현저한 감소를 촉진한 폴리펩타이드는 양성 히트로 간주되었다.

[0128] 총 764개의 폴리펩타이드가 테스트되었는데, 그 중에서 56개는 미처리된 대조군 샘플의 세포 노화 75% 미만으로 세포 노화의 감소를 촉진하였다. 따라서, 그들은 양성 히트 및 추정적인 노화치료 화합물로 간주되었다. 또한, 본 실험에서 양성 대조군으로 간주된 ABT-263도 세포 노화의 현저한 감소를 촉진하였으나, 세포 독성이 있었다. 이러한 관찰은 ABT-263의 세노라이트 특성뿐만 아니라 테스트된 폴리펩타이드 중 몇몇의 노화치료 포텐셜을 확인시켜 주었다(**도 1**).

[0129] 실시예 2

[0130] 3명의 건강한 연대기적으로 에이징된 환자로부터 단리된 1차 섬유아세포가 사용되었다. 세포는 10% v.v. 태아 소 혈청(FBS), 및 1% v.v.의 페니실린/스트렙토마이신 용액($1,000 \text{ U.mL}^{-1}$)으로 보충된 DMEM(둘베코의 변형된 이글 배지) 중에서 배양되었다. 세포는 5% CO_2 , 37°C 및 95% 습도 분위기 중에서 유지되었다. 확장 이후, 이들 세포는 96웰 플레이트 내에 시딩되었고(웰당 4,000개의 세포), 플레이트하고 6시간 후 세포는 4개의 노화치료 폴리펩타이드(펩타이드 14, 펩타이드 13, 펩타이드 15, 및 펩타이드 16) 중 하나로 처리되었고, 48시간 동안 인큐베이션되었다. 각각의 폴리펩타이드는 6개의 상이한 농도에서 테스트되었다: 50 μM , 25 μM , 12.5 μM , 6.25 μM , 3.12 μM , 및 1.56 μM . 다만, 펩타이드 16은 예외적으로 5개의 상이한 농도에서 처리되었다: 25 μM , 12.5 μM , 6.25 μM , 3.12 μM , 및 1.56 μM . 음성 대조군은 비히클만을 수용한 미처리된 세포를 포함하였다. 인큐베이션 이후, 상대 세포 노화(미처리된 대조군에 대한 노화 관련 B-갈락토시다아제 염색의 활성에 의해 평가됨)가 분석되었는데(**도 2**, 패널 A-D), 이때 Y 축은 미처리된 대조군에 대해 정규화된 상대 노화 레벨을 나타낸다. 각각의 컬럼은 폴리펩타이드의 상이한 농도에 상응한다. 3회의 기술적인 중복실험을 포함하는 3회의 독립적인 실험(생물학적 중복실험)이 수행되었다. 데이터는 분산 분석(Analysis of Variance, ANOVA) 및 본페로니 사후 검정(Bonferroni post-hoc test)을 이용하여 분석되었다. 통계학적 유의성은 0.05와 동등하거나 또는 더 낮은 p 값으로 결정되었다.

[0131] 모든 폴리펩타이드는 테스트된 농도 중 적어도 하나에서 노화치료 포텐셜을 나타냈고, 미처리된 대조군과 비교하여 세포 노화의 현저한 감소에 의해 입증되었다. 미처리된 대조군(ctrl)과 비교하여 * $p < 0.05$; ** $p < 0.01$; *** $p < 0.001$ (**도 2**, 패널 A-D).

[0132] 실시예 3

[0133] ATRX는 노화 관련 헤테로염색질 병소의 형성에 기여하는 염색질 리모델링 효소이다. 이는 노화 중 핵 병소 내에 더욱 더 축적된다. 따라서, 이는 세포 노화의 마커를 구성한다. 펩타이드 14가 세포 노화의 레벨을 감소시켰는지 조사하기 위해, ATRX 병소는 펩타이드 14 처리된 세포(1 μM , 500 nM, 100 nM, 및 10 nM) 및 미처리된 세포에서 분석되었다. 그렇게 하기 위해, 3명의 건강한 연대기적으로 에이징된 (노인) 공여자로부터 단리된 1차 섬유아세포가 사용되었다. 이들 세포는 10% v.v. 태아 소 혈청(FBS), 및 1% v.v.의 페니실린/스트렙토마이신 용액($1,000 \text{ U.mL}^{-1}$)으로 보충된 DMEM(둘베코의 변형된 이글 배지) 중에서 배양되었다. 세포는 5% CO_2 , 37°C 및 95% 습도 분위기 중에서 유지되었다. 확장 이후, 이들 세포는 96웰 플레이트 내에 시딩되었고(웰당 4,000개의 세포), 플레이트하고 6시간 후 세포는 상기 언급된 농도의 펩타이드 14 폴리펩타이드와 함께 48시간 동안 인큐베이션되었다. 음성 대조군은 비히클만이 수용된 미처리된 세포를 포함하였다. 인큐베이션 이후, 상대 세포 노화가 평가되었다. 개략적으로, 면역염색은 고정, 투과, 및 항ATRX 항체 이어서 2차 항체와 함께 세포를 인큐베이션함으로써 수행되었다. 핵 및 염색된 ATRX 병소의 수는 계수되었다. **도 3**의 패널 A는 컬럼(X 축)으로 나타낸 ATRX 병소/세포의 특정 양을 제시하는 세포의 수(Y 축)를 나타내는 대표적인 그래프를 나타낸다. 상단 그래프는 미처리된 세포를 나타내는 한편, 하단 그래프는 500 nM에서 펩타이드 14로 처리된 세포를 나타낸다. **도 3**의 패널 B는 상이한 조건의 펩타이드 14(컬럼)로 처리된 섬유아세포의 ATRX 병소/핵의 평균 수를 나타낸다. **도 3**의 패널 C는 상이한 조건의 펩타이드 14(컬럼)로 처리된 섬유아세포 중에서 10 미만의 ATRX 병소/핵을 나타내는 세

포의 백분율을 나타낸다. 3회의 기술적인 중복실험을 포함하는 독립적인 실험(생물학적 중복실험)이 수행되었다. 도 3의 패널 B 및 C의 데이터는 ANOVA 및 본페로니 사후 검정을 이용하여 분석되었다. 통계학적 유의성은 0.05와 동등하거나 또는 더 낮은 p 값으로 결정되었다.

[0134] 펩타이드 14 처리는 500 nM 및 50 nM로 사용되는 경우 미처리된 세포와 비교하여 ATRX 병소/핵을 현저하게 감소시켰다. 동일한 농도에서, 펩타이드 14는 또한 10 미만의 병소/핵을 나타낸 세포의 수를 증가시켰다. 미처리된 대조군(ctrl)과 비교하여 * $p < 0.05$; ** $p < 0.01$ (도 3).

[0135] 실시예 4

[0136] 3명의 건강한 연대기적으로 에이징된 (노인) 환자로부터 단리된 1차 섬유아세포가 사용되었다. 이들 세포는 10% v.v. 태아 소 혈청(FBS), 및 1% v.v.의 페니실린/스트렙토마이신 용액($1,000 \text{ U.mL}^{-1}$)으로 보충된 DMEM(둘베코의 변형된 이글 배지) 중에서 배양되었다. 세포는 5% CO_2 , 37°C 및 95% 습도 분위기 중에서 유지되었다. 확장 이후, 이들 세포는 T-75 플라스크 내에 시딩되었고(플라스크당 250,000개의 세포), 플레이팅하고 6시간 후 3.12 μM 의 펩타이드 14와 함께 3주(21일) 동안 인큐베이션되었다. 음성 대조군은 비히클만을 수용한 미처리된 세포를 포함하였다. 0일째는 세포를 펩타이드 14로 처리하기 시작한 날로 규정되었다. 21일째와 28일째 사이에는 펩타이드 14 처리를 수행하지 않았다. 세포 노화는 노화 관련 β -갈락토시다아제 염색 레벨에 따라 매주 평가되었다. 데이터는 미처리된 그룹에 대해 정규화되었고, 플롯되었다(도 4, 패널 A). 또한, 세포 증식도 매주 결정되었다. 7일째, 14일째, 21일째, 및 28일째에, 세포는 트립신처리되었고 계수되었다(도 4, 패널 B). 계수 후, 250,000개의 세포는 새로운 T-75 플라스크 내에 플레이팅되었다. 3회의 기술적인 중복실험을 포함하는 3회의 독립적인 실험(생물학적 실험)이 수행되었다. 데이터는 T-테스트를 이용하여 분석되었다. 통계학적 유의성은 0.05와 동등하거나 또는 더 낮은 p 값으로 결정되었다.

[0137] 펩타이드 14는 두 번째 주의 초기에 세포 노화의 현저한 감소(** $p < 0.001$; **** $p < 0.0001$)를 촉진하였다. 처리 21일 후, 펩타이드 14의 노화치료 효과는 폴리펩타이드 제거 후(21일째의 실험일과 28일째의 실험일 사이) 적어도 7일 동안 유지되었다. 펩타이드 14 처리군과 미처리된 대조군을 비교하면 세포 증식과 관련하여 유의미한 차이는 관찰되지 않았다(도 4).

[0138] 실시예 5

[0139] 7명의 건강한 연대기적으로 에이징된 환자로부터 단리된 1차 섬유아세포가 사용되었다(환자는 환자 2, 3, 4, 5, 6, 7, 또는 8로 무작위 확인되었다). 이들 세포는 10% v.v. 태아 소 혈청(FBS), 및 1% v.v.의 페니실린/스트렙토마이신 용액($1,000 \text{ U.mL}^{-1}$)으로 보충된 DMEM(둘베코의 변형된 이글 배지) 중에서 배양되었다. 세포는 5% CO_2 , 37°C 및 95% 습도 분위기 중에서 유지되었다. 확장 이후, 이들 세포는 96웰 플레이트 내에 시딩되었고(웰당 4,000개의 세포), 플레이팅하고 6시간 후 5개의 상이한 농도의 폴리펩타이드 14와 함께 48시간 동안 인큐베이션되었다: 25 μM (농도 5), 12.5 μM (농도 4), 6.25 μM (농도 3), 3.12 μM (농도 2), 및 1.56 μM (농도 1). 음성 대조군은 미처리된 세포(농도 0)를 포함하였는데, 이는 비히클만을 수용하였다. 인큐베이션 이후, 상대 세포 노화는 ATRX 면역 염색 후 정량화된 ATRX 병소/핵의 평균 수에 따라 결정되었다. 3회의 기술적인 중복실험을 포함하는 7회의 독립적인 실험(생물학적 중복실험)이 수행되었다. 데이터는 공분산 테스트를 이용하여 분석되었다. 통계학적 유의성은 0.05와 동등하거나 또는 더 낮은 p 값으로 결정되었다.

[0140] 공분산 분석은 ATRX 병소/핵의 수가 펩타이드 14 처리 후 현저하게 감소되는 것을 나타낸다. 펩타이드 14 효능은 농도와 ATRX 병소/핵이 유의미하게 관련되어 있는 용량 응답 패턴을 따랐다($p < 0.0004$) (도 5).

[0141] 실시예 6

[0142] 세포 노화는 몇 가지 상이한 자극에 의해 유발될 수 있다. 펩타이드 14가 UVB 유도된 및 화학적으로 유도된 노화에 대해 효과적이었는지 여부를 평가하기 위해, 3명의 건강한 공여자로부터 단리된 인간 1차 섬유아세포가 사용되었다. 이들 세포는 10% v.v. 태아 소 혈청(FBS), 및 1% v.v.의 페니실린/스트렙토마이신 용액($1,000 \text{ U.mL}^{-1}$)으로 보충된 DMEM(둘베코의 변형된 이글 배지) 중에서 배양되었다. 세포는 5% CO_2 , 37°C 및 95% 습도 분위기 중에서 유지되었다. 확장 이후, 이들 세포는 96웰 플레이트 내에 시딩되었고(웰당 4,000개의 세포), 플레이팅하고 6시간 후 24시간 동안 에토포사이드($20 \mu\text{M}$)로 처리되거나, 또는 0.05 J/cm^2 의 UVB 방사에 2회 노출되도록 하였다. 각각의 UVB 노출은 대략 세계 각처의 주요 도시(예를 들어, 오클랜드, 뉴질랜드; 로스앤젤레스, 미국;

및 브라질리아, 브라질)의 4월에서의 1일 1 내지 3시간 일광 노출에 상응한다. 상이한 노화 유도 프로토콜 이후, 에토포사이드 처리된 세포는 5 μ M, 2.5 μ M, 또는 1 μ M의 펩타이드 14와 함께 48시간 동안 처리되었다. UVB 노출된 세포는 5 μ M의 펩타이드 14와 함께 48시간 동안 처리되었다. 음성 대조군은 미처리된 세포를 포함 하였는데, 이는 스트레스를 받도록 하였지만 비히클만을 수용하였다. 인큐베이션 이후, 상대 세포 노화(미처리 된 대조군에 대한 노화 관련 β -갈락토시다아제 염색에 의해 평가됨)가 분석되었고, 컬럼 그래프로 플롯되었다. 또한, ATRX 병소는 ATRX 면역형광 염색 이후 평가되었다. 그래프는 해당 검출된 평균 ATRX 병소를 이용하여 작성되었다. 3회의 기술적인 중복실험을 포함하는 3회의 독립적인 실험(생물학적 중복실험)이 수행되었다. 데이터는 t-테스트 또는 ANOVA, 이어서 본페로니 사후 검정을 이용하여 분석되었다. 통계학적 유의성은 0.05와 동등하거나 또는 더 낮은 p 값으로 결정되었다.

[0143] 에토포사이드 처리는 세포 노화 레벨에서의 현저한 증가($p < 0.001$), 및 또한 ATRX 병소 핵 축적의 현저한 증가(ATRX 병소/세포의 평균 수에 의해 나타냄; $p < 0.05$)를 촉진하였다(도 6, 패널 A). 에토포사이드 스트레스처리된 세포가 2.5 μ M 또는 5 μ M의 펩타이드 14로 처리되는 경우, 노화 관련 β -갈락토시다아제 염색은 현저하게 감소되었다($*p < 0.05$) (도 6, 패널 B, 좌측 그래프). 또한, 도 6의 패널 B의 우측 그래프에 나타난 바와 같이, 평균 ATRX 병소/세포는 에토포사이드 노출된 세포가 2.5 μ M 펩타이드 14로 처리되는 경우 현저하게 감소되었다. 또한, UVB 노출은 노화 관련 β -갈락토시다아제 염색에 의해 평가되는 바와 같이 세포 노화에서 현저한 증가를 촉진하였고, 도 6의 패널 C의 좌측 그래프에 나타난 바와 같이, 5 μ M 펩타이드 14 처리는 세포 노화를 현저하게 예방할 수 있다($*p < 0.05$). 펩타이드 14를 이용하는 처리는 도 6의 패널 C의 우측 그래프에 나타난 바와 같이, 세포 수를 현저하게 변경시키지 않았다. UVB 노출은 ATRX 병소/핵의 평균 수의 현저한 증가를 촉진시켰고, 5 μ M 펩타이드 14 처리는 세포 노화를 현저하게 예방하여 펩타이드 14를 수용하지 않은 UVB 처리된 샘플과 비교하여 현저하게 감소된 ATRX 병소/핵을 유도하였다.

[0144] 실시예 7

[0145] 건강한 노인 공여자로부터 단리된 인간 1차 섬유아세포 및 각질형성세포는 인간 피부 등가물을 구축하기 위해 사용되었다. 이들 피부 등가물은 0.01% w.v. 펩타이드 14를 이용하여 15일 동안 처리되었고, 표피 두께에 의해 나타난 바와 같이 전체적인 구조인 노화 관련 B-갈락토시다아제 염색을 이용하여 에이징의 레벨에 따라 특성화되었다. 몇몇 파라미터에 기반한 품질 평가는 블라인드 분석에 의해 수행되었다. 관찰된 파라미터는 다른 관점 중에서도 세포 층의 일반적인 조직화뿐만 아니라 각질층의 두께를 포함하고, 에이징 및 노화 레벨에 따라 감소되는 것으로 확인되었다. 평가는 최대 스코어 28을 보유하였는데, 이때 더 높은 스코어는 연령 및 노화의 감소와 상관관계가 있었다. 최소 스코어 19는 배치 사용을 위해 요구되었다. 이 스코어는 내부적으로 검증되었고, 피부 등가물의 연령/노화에 따라 감소되는 것으로 확인되었다. 또한, 피부 등가물은 역전사 정량 폴리머라아제 연쇄 반응(RT-qPCR)에 의해 특정 유전자의 발현에 따라 특성화되었다. 처리 후, 표피 및 진피는 별도로 RT-qPCR을 위해 처리되었다. 표피 샘플의 경우, 글리세르알데히드-3-포스페이트 데하이드로게나아제(GAPDH; 편재적 발현); p16(노화와 관련됨), IL-8(자극과 연관됨), 및 Ki-67(세포 증식과 관련됨)이 분석되었다. 진피 샘플의 경우, 글리세르알데히드-3-포스페이트 데하이드로게나아제(GAPDH; 편재적 발현); p16(노화와 관련됨), IL-8(자극과 연관됨), Ki-67(세포 증식과 관련됨), 히알루로닉 신타아제 2(HAS-2; 히알루론산 생성과 관련됨), 및 매트릭스 메탈로프로테아제 1(MMP1; 세포외 매트릭스 단백질 분해와 관련됨)이 분석되었다. CT 값은 $2^{-\Delta\Delta Ct}$ 방법을 이용하여 분석되었다. 평균 mRNA 발현은 GAPDH(ΔCt) 및 음성 대조군($\Delta\Delta Ct$)에 대해 정규화되었다. 음성 대조군은 제형만이 수용되었다. 3회의 독립적인 실험은 3회의 기술적인 중복실험과 함께 수행되었다. 데이터는 T-테스트를 이용하여 분석되었다. 통계학적 유의성은 0.05와 동일하거나 또는 더 낮은 p 값으로 결정되었다(도 7).

[0146] 인간 피부 등가물의 펩타이드 14 처리는 도 7의 패널 A에 나타난 바와 같이 증가된 피부 등가물 스코어를 촉진하였는데(펩타이드 14 그룹 24 ± 1 대 19.0 ± 2), 이는 처리 안전성, 용인성 및 유리한 효과를 시사한다. 이는 안전성 및 용인성 이슈를 보유할 수 있는 다른 세노라이트 제제와는 대조적이다. 문헌(예를 들어, Tse et al., Cancer Res. 68: 3421 (2008); Wilson et al., Lancet Oncol. 11:1149 (2010) 참조). 또한, 처리는 도 7의 패널 A 및 도 7의 패널 B에 나타난 바와 같이, 폴리펩타이드의 노화치료 효과와 함께 노화 관련 β -갈락토시다아제 염색에서 현저한 감소를 촉진하였다($***p < 0.001$). 또한, 펩타이드 14 처리는 표피($****p < 0.0001$) 및 진피($**p < 0.01$)에서 p16의 현저한 감소; 진피($*p < 0.5$)에서 IL-8의 감소된 발현; 및 진피($**p < 0.01$)에서 MMP-1의 감소된 발현을 유발하였다. 데이터는 도 7의 패널 C에 나타난 바와 같이 펩타이드 14의 노화치료 포텐셜, 상기 폴리펩타이드의 피부 유전자 발현에 대한 안전성 및 용인성뿐만 아니라 이로인한 효과를 입증한다.

[0147] 실시예 8

[0148] 펩타이드 14 및 유사한 펩타이드 13의 작용 메커니즘을 규명하기 위해, Akt S473 인산화(도 8, 패널 A), 노화 관련 β -갈락토시다아제 염색(도 8, 패널 B), 뿐만 아니라 mRNA 발현(도 8, 패널 C)이 조사되었다. 웨스턴 블로팅을 이용하는 Akt S473 인산화 분석을 위해, 인간 1차 섬유아세포 및 각질형성세포가 사용되었다. 이들 세포는 인간 피부 등가물을 구축하기 위해 사용되었고, 5% CO₂, 37°C 및 95% 습도 분위기 기액 계면 내에 유지되었다. 이어서, 피부 등가물은 1 μ M의 펩타이드 14 또는 펩타이드 13을 이용하여 5일 동안 처리되었고, 단백질 분석은 피부 등가물에 대해 수행되었다. 단백질은 단리 및 정량화되었다. 동량의 단백질은 폴리아크릴아마이드 겔에 로딩되었고, 니트로셀룰로오스 멤브레인으로 이전되었다. GAPDH(로딩 대조군) 및 pAkt S473 항체는 멤브레인과 함께 인큐베이션되었고, 염색은 화학발광에 의해 확인되었다. 상대적인 pAkt S473/GAPDH 신호는 처리된 샘플과 비처리된 샘플 사이에서 비교되었다. 노화 관련 B-갈락토시다아제 염색 실험의 경우, 섬유아세포가 사용되었다. 이들 세포는 10% v.v. 태아 소 혈청 (FBS), 및 1% v.v.의 페니실린/스트렙토마이신 용액(1,000 U·mL⁻¹)으로 보충된 DMEM(둘베코의 변형된 이글 배지) 중에서 배양되었다. 세포는 5% CO₂, 37°C 및 95% 습도 분위기 내에 유지되었다. 확장 이후, 이들 세포는 96웰 플레이트 내에 시딩되었고(웰당 4,000개의 세포), 기본 배지와 함께 6시간 동안 인큐베이션하여 세포가 부착되도록 하였다. 그 후, 세포는 0.05 J/cm²에 2회 노출되었다. 이후 바로 제 2 인큐베이션이 수행되었는데, 이때 펩타이드 14 또는 펩타이드 13이 배지에 첨가되었고, 48시간 동안 방치하였는데, 이때 배지는 변화였고, 세포는 노화 관련 B-갈락토시다아제에 대해 염색되었다. 미처리된 세포는 음성 대조군(-)으로서 단지 비히클과 함께 인큐베이션되었다. 상대적인 염색은 100%로 미처리된 대조군 노화 관련 B-갈락토시다아제 레벨을 정규화한 후 획득되었다. mRNA 분석을 위해, 섬유아세포가 사용되었다. 이들 세포는 10% v.v. 태아 소 혈청 (FBS), 및 1% v.v.의 페니실린/스트렙토마이신 용액(1,000 U·mL⁻¹)으로 보충된 DMEM(둘베코의 변형된 이글 배지) 중에서 배양되었다. 세포는 5% CO₂, 37°C 및 95% 습도 분위기 내에 유지되었다. 확장 이후, 이들 세포는 6웰 플레이트 내에 시딩되었고(웰당 50,000개의 세포), 기본 배지와 함께 6시간 동안 인큐베이션하여 세포가 부착되도록 하였다. 그 후, 세포는 펩타이드 14 또는 펩타이드 13과 함께 48시간 동안 인큐베이션되었다. 음성 대조군은 비히클만을 수용한 미처리된 세포를 포함하였다. 총 RNA는 단리되었고, 샘플은 역전사되었으며, GAPDH, 시루투인 6(SIRT6), BLM, 및 엑소뉴클레아제 1(EXO1) 유전자의 mRNA 발현은 qPCR을 이용하여 결정되었다. 음성 대조군은 비히클만 수용되었다. CT 값은 2 ^{$\Delta\Delta Ct$} 방법을 이용하여 분석되었다. 평균 mRNA 발현은 GAPDH(ΔCt) 및 음성 대조군($\Delta\Delta Ct$)에 대해 정규화되었다. 모든 분석의 경우, 3회의 독립적인 실험이 3회의 기술적인 중복실험과 함께 수행되었다. 데이터는 T-테스트를 이용하여 분석되었다. 통계학적 유의성은 0.05와 동등하거나 또는 더 낮은 p 값으로 결정되었다(도 8).

[0149] pAkt S473은 펩타이드 14로 처리된 표피뿐만 아니라 진피 샘플 둘 다에서(각각 *p<0.05, 및 **p<0.01) 현저하게 감소되었다. 펩타이드 13은 진피 샘플에서만 pAkt S473을 감소시켰다(***p<0.001) (도 8, 패널 A). UVB 및 노화 관련 B-갈락토시다아제 염색의 경우, 염색은 항상 UVB 노출 이후에 증가되는 것으로 관찰되었다. 추가적으로, 펩타이드 14 및 펩타이드 13 둘 다 UVB-노출된 샘플에서 염색을 감소시켰다(***p<0.001). 펩타이드 14는 처리된 샘플에서 증가된 SIRT6 및 BLM 발현을 특이적으로 유발하였다(*p<0.05) (도 8).

[0150] 실시예 9

[0151] 건강한 노인 공여자로부터 단리된 인간 1차 섬유아세포 및 각질형성세포는 인간 피부 등가물을 구축하기 위해 사용되었다. 이들 피부 등가물은 0.01% w.v.의 펩타이드 14를 이용하여 5일 동안 처리되었고, 총 표피 면적에 따라 정량화된 표피 두께에 따라 특성화되었다. 음성 대조군은 제형만으로 처리되었다. 예시적인 조직화학적 이미지는 도 9의 패널 A에 나타난다. 3회의 기술적인 반복실험과 함께 3회의 독립적인 실험이 수행되었다. 데이터는 t-테스트를 이용하여 분석되었다. 통계학적 유의성은 0.05와 동등하거나 또는 더 낮은 p 값으로 결정되었다(도 9의 패널 B).

[0152] 인간 피부 등가물의 펩타이드 14 처리는 미처리된 대조군과 비교하여 증가된 표피 두께를 촉진시켰는데(**p<0.01), 이는 피부 표피에 대한 폴리펩타이드의 이로운 효과를 시사한다(도 9).

[0153] 실시예 10

[0154] 아미노산 서열 ETAKHWLKG(서열번호 1) 및 ATAKAWLKG(서열번호 2)를 갖는 폴리펩타이드의 예측된 3차원 구조는 물 중에서 결정되었다. 구조 예측은 도 10, 패널 A(서열번호 1) 및 도 10, 패널 B(서열번호 2)에 나타난다. 구조는 구조의 유사성을 나타내기 위해 중첩되었다(도 10, 패널 C).

[0155] 실시예 11

[0156] 나이아신, 비타민 E, 적어도 하나의 보존제, 적어도 하나의 유화제 및 50-150 μ M 사이의 펩타이드 14를 포함하는 펩타이드 14의 국소적으로 적용되는 제형이 제조되었다. 국소 제형은 인간 피부에 적용되었고, 주름의 외관의 감소를 야기하였다.

[0157] 실시예 12

[0158] 나이아신, 비타민 E, 적어도 하나의 보존제, 적어도 하나의 유화제 및 75-100 μ M 사이의 펩타이드 14를 포함하는 펩타이드 14의 국소적으로 적용되는 제형이 제조되었다. 국소 제형은 인간 피부에 적용되었고, 주름의 외관의 감소를 유발하였다.

[0159] 실시예 13

[0160] 예시적인 국소적으로 적용되는 제형은 하기 표 4에 나타난다. 국소 제형은 인간 피부에 적용되었고, 주름의 외관, 피부 톤(균일성)의 외관, 모공의 외관, 텍스처 및 평활도의 외관, 견고성, 탄성, 및 전체적인 외관 중 적어도 하나의 감소를 야기하였다. 제형 내의 폴리펩타이드는 본 출원에 개시된 폴리펩타이드 중 적어도 하나를 포함한다.

표 4

예시적인 제형	
성분	제형 내 백분율
물	40% - 65%
피부 수화제	5% - 45%
진정제	6% - 20%
비타민	0.5% - 5%
유화제 / 안정화제	0.5% - 9%
폴리펩타이드	0.001% - 4%

[0161]

[0162] 실시예 14

[0163] 예시적인 국소적으로 적용되는 제형은 하기 표 5에 나타난다. 국소 제형은 인간 피부에 적용되고, 주름의 외관, 피부 톤(균일성)의 외관, 모공의 외관, 텍스처 및 평활도의 외관, 견고성, 탄성, 및 전체적인 외관 중 적어도 하나의 감소를 야기하였다. 제형 내의 폴리펩타이드는 펩타이드 14를 포함한다.

표 5

예시적인 제형	
성분	제형 내 백분율
물	40% - 65%
피부 수화제	5% - 45%
진정제	6% - 20%
비타민	0.5% - 5%
유화제 / 안정화제	0.5% - 9%
폴리펩타이드	0.001% - 4%

[0164]

[0165] 실시예 15

[0166] 3차원 시험관 내 피부 모델 및 생체 외 인간 피부 샘플은 펩타이드 14를 이용하는 처리 이후 피부 에이징에 대해 평가되었다.

- [0167] 시험관 내 3D 피부 모델: 3D 피부 모델은 문헌(Pennacchi, P. C. et al. Glycated Reconstructed Human Skin as a Platform to Study the Pathogenesis of Skin Aging. Tissue Eng. Part A 21, 2417-2425, 2015)에 기재된 제법에 기반한 변형된 방법을 이용하여 제조되었다. 개략적으로, 섬유아세포로 포매된 타입 I 콜라겐 젤은 젤의 상부에 정상 인간 표피 각질형성세포(normal human epidermal keratinocytes, NHEK)로 시딩되었고, MHEK가 단층에 도달하도록 하기 위해 24시간 동안 배양되었다. 이어서, 상부의 NHEK를 갖는 젤은 기액 계면으로 상승되었고, 표피 각질화가 가능하도록 추가로 10일 동안 배양되었다. 젤은 펩타이드 14를 배양 배지에 첨가함으로써 12.5 μ M의 펩타이드 14로 처리되었다.
- [0168] 생체 외 인간 피부 모델: 건강한 인간 공여자 유래의 피부 샘플은 ZenBio (Research Triangle, NC)로부터 수득되었고, 10% (v/v) FBS로 보충된 돌베코의 변형된 이글 배지(DMEM) (Invitrogen, Carlsbad, CA)를 이용하는 기액 계면 배양에 유지되었다. 피부 샘플은 1일째 및 3일째에 대조군 비히클 또는 배지 중의 12.5 μ M 펩타이드 14로 처리되었다. 5일 이후, 샘플은 수확되었고, 조직학을 위해 포르말린 내에 고정되거나 또는 DNA 단리를 위해 사용되었다.
- [0169] DNA 메틸화 분석: 분자 DNA 연령으로도 언급되는 예측된 생물학적 연령은 3D 피부 모델 샘플 내의 DNA 메틸화의 레벨 및 생체 외 인간 피부 생검 샘플로부터 결정되었다. 총 DNA 샘플은 제조사의 지침에 따라 QIAamp DNA Mini Kit(Qiagen)을 이용하여 샘플로부터 수득되었다. 피부 에이징의 마커로서 DNA 메틸화 평가는 인간 Illumina Infinium EPIC 850K 칩을 이용하여 수행되었다. DNA 샘플은 i) 미처리된 대조군으로서 고려된 4개의 피부 생검 샘플(동일한 공여자 유래), ii) 12 μ M 펩타이드 14로 처리된 4개의 피부 생검 샘플(동일한 공여자), iii) 미처리된 대조군으로서 고려된 3개의 3D 피부 샘플(각각의 샘플은 1명의 공여자 유래의 3개의 피부의 풀, 총 3명의 공여자), iv) 12 μ M 펩타이드 14로 처리된 3개의 3D 피부 샘플(각각의 샘플은 1명의 공여자 유래의 3개의 피부의 풀, 총 3명의 공여자)을 포함하였다. 미가공 이미지 데이터는 명령어 preprocessRaw() 이어서 preprocessSWAN()을 이용하여 처리되었다. 이어서 메틸화 신호(M 값)는 ratioConvert()를 이용하여 비율로, 이어서 getBeta()를 이용하여 베타 값으로 전환되었고, 모든 함수는 "minfi" R 패키지에서 실행되었다. 베타 값은 betaqn()을 이용하여 정규화되었는데, 이는 베타를 변위치 정규화하고, "watermelon" 패키지에 의해 실행되고, "minfi" R 패키지에서 실행된 "preprocessQuantile" 정규화법을 이용하여 정규화된다. 정규화된 베타 값은 연령 추정을 위해 사용되었다.
- [0170] 통계학적 분석: 데이터는 샤피로-윌크(Shapiro-Wilk) 테스트에 의한 정규 분포에 대해 테스트되었다. 2개 초과 그룹을 비교하는 경우, 일원 ANOVA가 수행되었고, 이어서 본페로니의 다중 비교 테스트가 수행되었다. 대응 샘플이 비교되는 경우, 대응 t-테스트가 수행되었다. $p \leq 0.05$ 는 통계학적으로 유의미한 것으로 간주된다. 통계학적 분석은 GraphPad Prism(GraphPad 소프트웨어) 또는 R 소프트웨어를 이용하여 수행되었다.
- [0171] 결과: 시험관 내 3D 피부 모델 및 생체 외 인간 피부 샘플은 도 11a, 11b 및 11c에 나타난 바와 같이 펩타이드 14를 이용하는 5일 동안의 처리한 후 피부 에이징의 감소를 나타냈다. 도 11a는 3D 피부 등가물의 헤마톡실린 및 에오신(H&E) 염색된 조직학적 이미지(윗줄) 및 5일 동안 펩타이드 14 없이(대조군) 및 12.5 μ M 펩타이드 14와 함께 5일 동안 배양된 생체 외 피부 생검 샘플(아래줄)을 나타낸다. 펩타이드 14로 처리된 3D 피부 등가물 및 생체 외 피부 샘플은 일반적으로 미처리된 대조군과 유사하거나 또는 그보다 더 두꺼운 표피 두께를 나타냈다. 도 11b는 12.5 μ M 펩타이드 14(처리)로 처리된 3D 피부 모델 샘플의 분자 DNA 연령으로도 공지된 예측된 연령이 미처리된 대조군(ctrl)인 샘플의 예측된 연령보다 더 낮았음을 나타낸다. 미처리된 3D 피부 모델에 대한 예측된 연령의 평균은 약 80세였던 반면, 펩타이드 14-처리된 3D 피부 모델에 대한 예측된 연령은 약 66세였다(t-테스트에 의해 $p=0.25$). 도 11c는 12.5 μ M 펩타이드 14로 처리된 생체 외 피부 생검의 예측된 연령이 미처리된 대조군(ctrl)인 샘플의 예측된 연령보다 더 낮았음을 나타낸다. 생체 외 피부 생검 샘플에 대한 예측된 연령의 평균은 약 71세였던 반면, 펩타이드 14-처리된 생체 외 피부 생검 샘플에 대한 예측된 연령의 평균은 약 68세였다(** $p < 0.01$).
- [0172] **실시예 16**
- [0173] 척추동물에서, 멜라닌형성세포라 칭하는 분화된 세포는 통상적으로 멜라닌을 생성한다. MeWo 세포는 레티노산 수용체를 발현하는 후기 분화된 멜라닌형성세포를 나타내는 인간 불멸화된 멜라닌형성세포이고, 멜라닌형성의 시험관 내 조사를 위한 실험 모델을 제공할 수 있다. 시험관 내 모델 멜라닌 생성으로서 MeWo 세포의 사용에 관한 추가적인 설명은 문헌(Schadendorf et al., 1994. Retinoic Acid Receptor-gamma-selective Retinoids Exert Antiproliferative Effects on Human-melanoma Cell-growth In-vitro. International Journal of Oncology. Doi:10.3892/Ijo.5.6.1325 및 Malaspina et al., Depigmenting potential of lichen extracts

evaluated by in vitro and in vivo tests. PeerJ 8:e9150 <https://doi.org/10.7717/peerj.9150>.)에서 확인된다.

[0174] 펩타이드 14가 멜라닌형성세포의 탈색소침착을 촉진하는지 여부를 테스트하기 위해, MeWo 세포는 5% CO₂, 37℃ 및 95% 습도에서 10% v/v FBS 및 1% v/v의 페니실린/스트렙토마이신 용액(1,000 U·mL⁻¹)으로 보충된 DMEM 중에서 배양되었다. 실험 조건의 하나로 처리하기 이전 2주 동안(전처리), MeWo 세포는 멜라닌 합성을 자극하기 위해 이소부틸 메틸크산틴(IBMx)과 함께 배양되었다. MeWo 세포가 6웰 플레이트 내에 웰당 1,000,000개의 세포로 6시간 동안 시딩된 후, 세포는 실험 조건 중 하나를 이용하여 7일 동안 인큐베이션되었고, 세포 내 및 상등액 멜라닌 함량에 대해 분석되었다.

[0175] 실험 조건은 양성 대조군, 음성 대조군, 펩타이드 14 (IBMx) 7d 그룹, 레티노산 (IBMx) 7d 그룹을 포함하였다. 음성 대조군은 전처리 기간 내의 2주 동안 25 μM IBMx를 이용하여 자극되었고, 이어서 7일 동안 처리되지 않고, 실험을 위한 플레이팅 이후 비히클만을 수용하는 MeWo 세포를 포함하였다. 양성 대조군은 전처리 기간 내의 2주 동안 및 처리 기간 내의 7일 동안 전체적인 실험 도중에 25 μM IBMx와 함께 인큐베이션된 MeWo 세포를 포함하였다. 펩타이드 14 (IBMx) 7d 그룹은 전처리 기간 내의 2주 동안 25 μM IBMx와 함께 인큐베이션되고, 이어서 7일 동안 25 μM IBMx 및 3.12 μM 펩타이드 14를 이용하여 처리된 MeWo 세포를 포함하였다. 레티노산 (IBMx) 7d 그룹은 전처리 기간 내의 2주 동안 25 μM IBMx와 함께 인큐베이션되었고, 이어서 7일 동안 25 μM IBMx 및 2 μM 레티노산을 이용하여 처리된 MeWo 세포를 포함하였다.

[0176] 처리 이후, 세포 펠렛 및 세포 배양 상등액 내의 멜라닌 함량은 492 nm에서 샘플의 흡광도에 의해 평가되었다. 세포 펠렛은 트립신화에 의해 제조되었고, 계수되었고, 200 μL의 1 M NaOH 내에서 16시간 동안 인큐베이션되었다(Matsuda et al., 2004; Yoo et al., 2007). 세포 배양 상등액은 10분 동안 1.2 X g 원심분리 후 수득되었다. 데이터는 명시된 파장(492 nm)에서 음성 대조군 샘플의 흡광도에 대해 정규화된 동일한 파장에서 샘플의 흡광도인 상대 멜라닌 함량으로서 나타낸다. 3회의 기술적인 중복실험을 포함하는 3회의 독립적인 실험이 수행되었다. 데이터는 통계학적 유의성이 검출된 경우 ANOVA 및 본페로니 사후 검정을 이용하여 분석되었다. 통계학적으로 유의미한 p 값은 그룹 사이에서 p<0.05의 경우 *; p<0.01의 경우 **; p<0.001의 경우 ***; p<0.0001의 경우 ****로 나타낸다.

[0177] 펩타이드 14 처리는 도 12a에 나타난 바와 같이, 세포 펠렛에서 및 도 12b에 나타난 바와 같이, 세포 배양 상등액에서 양성 대조군, 음성 대조군 및 레티노산 처리군과 비교하여 상대 멜라닌 함량에서 현저한 감소를 촉진하였다. 도 12a에 나타난 바와 같이 세포 펠렛에서, 양성 대조군은 음성 대조군의 약 170%의 상대 멜라닌 함량을 보유하고(**** p<0.0001), 레티노산 처리군은 음성 대조군의 약 125%의 상대 멜라닌 함량을 보유하였지만(**p<0.01), 펩타이드 14 처리군은 음성 대조군의 약 90%의 상대 멜라닌 함량(***p<0.001) 또는 음성 대조군보다 더 낮은 상대 멜라닌 함량을 보유하였다. 도 12b에 나타난 바와 같이 세포 배양 상등액에서, 양성 대조군 및 레티노산 처리군은 음성 대조군과 매우 유사한 상대 멜라닌 함량을 보유하였지만, 펩타이드 14 처리군은 음성 대조군의 약 70%의 상대 멜라닌 함량(*p<0.05) 또는 음성 대조군보다 더 낮은 상대 멜라닌 함량을 보유하였다.

[0178] 이는 펩타이드 14가 흑피증, 피부 염증, 호르몬 변화, 에이징, 일광 노출, 및 만성 병변에 의해 유발된 피부 과색소침착을 포함하나 이들로 제한되는 것은 아닌 여러 가지 멜라닌형성 관련 병태를 감소시키기 위한 적용점을 보유할 수 있음을 나타낸다. 또한, 펩타이드 14는 현재 항에이징 스킨케어를 위한 금 표준 분자로서 고려되고 있는 레티노산보다 더 양호한 성능을 나타냈다.

[0179] 실시예 17

[0180] 피부는 종종 반발성 과색소침착을 경험할 수 있는데, 이때 색소침착은 광 처리(들)의 중단 이후 피부에서 재확립된다. 펩타이드 14의 탈색소침착 효과가 펩타이드 14 처리가 중단된 이후에 유지되는지 여부를 테스트하기 위해, MeWo 세포는 5% CO₂, 37℃ 및 95% 습도에서 10% v.v. 태아 소 혈청 (FBS), 및 1% v.v.의 페니실린/스트렙토마이신 용액(1,000 U·mL⁻¹)으로 보충된 DMEM(둘베코의 변형된 이글 배지) 내에서 배양되었다. 실험 조건 중 하나로 처리하기 2주 전(전처리)의 경우, MeWo 세포는 멜라닌 합성을 자극하기 위해 이소부틸 메틸크산틴(IBMx)과 함께 배양되었다. MeWo 세포는 6시간 동안 웰당 1,000,000개의 세포로 6웰 플레이트 내에 시딩되었고, 세포는 14일 동안 실험 조건 중 하나를 이용하여 인큐베이션되었고, 세포 내 및 상등액 멜라닌 함량에 대해 분석되었다.

[0181] 실험 조건은 양성 대조군, 음성 대조군, 펩타이드 14 (IBMx) 14일 그룹, 레티노산 (IBMx) 14일 그룹, 7일째에

중단된 펩타이드 14 (IBMX) 그룹, 및 7일째에 중단된 레티노산 (IBMX) 그룹을 포함하였다. 음성 대조군은 전처리 기간 내에 2주 동안 25 μ M IBMX로 자극되고, 이어서 14일 동안 처리되지 않고, 실험을 위해 플레이팅된 후 비히클만이 수용된 MeWo 세포를 포함하였다. 양성 대조군은 전처리 기간 내의 2주 동안 및 처리 기간 내의 14일 동안의 전체 실험 중 25 μ M IBMX와 함께 인큐베이션된 MeWo 세포를 포함하였다. 그룹들 중 일부는 7일 또는 14일 동안 IBMX 25 μ M, 뿐만 아니라 3.12 μ M 펩타이드 14 둘 다, 또는 IBMX 25 μ M (7일 또는 14일 동안), 뿐만 아니라 레티노산 2 μ M 둘 다로 처리되었다. 펩타이드 14 (IBMX) 14일 그룹은 전처리 기간 내의 2주 동안 25 μ M IBMX와 함께 인큐베이션되었고, 이어서 25 μ M IBMX 및 3.12 μ M 펩타이드 14를 이용하여 14일 동안 처리된 MeWo 세포를 포함하였다. 레티노산 (IBMX) 14일 그룹은 전처리 기간 내의 2주 동안 25 μ M IBMX와 함께 인큐베이션되었고, 이어서 25 μ M IBMX 및 2 μ M 레티노산을 이용하여 14일 동안 처리된 MeWo 세포를 포함하였다. 펩타이드 14 (IBMX) 7일 그룹은 전처리 기간 내의 2주 동안 25 μ M IBMX와 함께 인큐베이션되었고, 이어서 25 μ M IBMX 및 3.12 μ M 펩타이드 14로 단지 7일 동안 처리되었고, 25 μ M IBMX만을 이용하여 추가로 7일 동안 배양된 MeWo 세포를 포함하였다. 레티노산 (IBMX) 7일 그룹은 전처리 기간 내의 2주 동안 25 μ M IBMX와 함께 인큐베이션되었고, 이어서 25 μ M IBMX 및 2 μ M 레티노산을 이용하여 단지 7일 동안 처리되었고, 25 μ M IBMX만을 이용하여 추가로 7일 동안 배양된 MeWo 세포를 포함하였다.

[0182] 처리 이후, 세포 펠렛 및 세포 배양 상등액 내의 멜라닌 함량은 492 nm에서 샘플의 흡광도에 의해 평가되었다. 세포 펠렛은 트립신화에 의해 제조되었고, 계수되었고, 200 μ L의 1 M NaOH 내에서 16시간 동안 인큐베이션되었다(Matsuda et al., 2004; Yoo et al., 2007). 세포 배양 상등액은 10분 동안 1.2 X g 원심분리 후 수득되었다. 데이터는 명시된 파장(492 nm)에서 음성 대조군 샘플의 흡광도에 대해 정규화된 동일한 파장에서 샘플의 흡광도인 상대 멜라닌 함량으로서 나타낸다. 세포 증식은 단지 본 실험에서 14일 기간 중에 현저하기 때문에, 멜라닌 함량 데이터는 각각의 그룹 내의 샘플에서 세포의 수에 대해 정규화되었다. 3회의 기술적인 중복실험을 포함하는 3회의 독립적인 실험이 수행되었다. 데이터는 통계학적 유의성이 검출된 경우 ANOVA 및 본페로니 사후 검정을 이용하여 분석되었다. 통계학적으로 유의미한 p 값은 그룹 사이에서 $p < 0.05$ 의 경우 *; $p < 0.01$ 의 경우 **; $p < 0.001$ 의 경우 ***; $p < 0.0001$ 의 경우 ****로 나타낸다.

[0183] 추가로, 타이로시나아제, 멜라닌형성세포 유도 전사 인자(MIFF) 및 도파크롬 토모라아제(DCT)를 포함하는 멜라닌형성에 관련된 중요한 유전자의 mRNA 레벨이 분석되었다.

[0184] 펩타이드 14 처리는 도 13a에 나타난 바와 같이 세포 펠렛에서, 및 도 13b에 나타난 바와 같이 세포 배양 상등액에서 양성 대조군 및 레티노산 처리군과 비교하여 상대 멜라닌 함량에서 현저한 감소를 촉진하였다. 도 13a에 나타난 바와 같이 세포 펠렛에서, 양성 대조군은 약 130%의 상대 멜라닌 함량을 보유하고, 레티노산 14일 처리군은 약 130%의 상대 멜라닌 함량을 보유하고있지만, 펩타이드 14 14일 처리군은 약 90% 또는 음성 대조군보다 더 낮은 상대 멜라닌 함량을 보유하고있다. 펩타이드 14 7일 처리군은 약 40%의 상대 멜라닌 함량, 즉 실험 그룹 중 최저의 상대 멜라닌 함량을 보유하고있다. 레티노산 7일 처리군은 약 90%의 상대 멜라닌 함량을 보유하고있다. 도 13b에 나타난 바와 같이 세포 배양 상등액에서, 양성 대조군은 약 110%의 상대 멜라닌 함량을 보유하고있지만, 레티노산 14일 처리군 및 펩타이드 14 14일 처리군은 약 50%의 상대 멜라닌 함량을 보유하고있다. 레티노산 7일 처리군 및 펩타이드 14 7일 처리군은 약 100%의 상대 멜라닌 함량을 보유하고있다.

[0185] 멜라닌 생성 유전자의 mRNA 레벨은 도 14a, 도 14b, 및 도 14c에 나타낸다. 펩타이드 14 처리는 타이로시나아제, MITF, 및 DCT 유전자의 발현에서 현저한 감소를 유발하는 것으로 나타나는데, 이들은 레티노산 처리된 그룹에 대한 mRNA 레벨보다 적거나 또는 적어도 유사하다. 도 14a에 나타난 바와 같이, 타이로시나아제의 상대 발현 레벨은 다른 실험 그룹과 비교하여 펩타이드 14 14일 처리군의 경우 가장 낮았다. 도 14b에 나타난 바와 같이, MITF의 상대 발현 레벨은 펩타이드 14 14일 처리군 및 레티노산 14일 처리군의 경우 가장 낮았다. 도 14c에 나타난 바와 같이, DCT의 상대 발현 레벨은 다른 실험 그룹과 비교하여 펩타이드 14 14일 처리군 및 펩타이드 14 7일 처리군의 경우 가장 낮았다.

[0186] 이는 펩타이드 14가 멜라닌형성을 감소시킬 수 있고, 펩타이드 14 처리 중단 이후에 더 낮은 멜라닌형성의 유발을 계속할 수 있음을 나타낸다. 또한, 펩타이드 14는 현재 항에이징 스킨케어에 위한 금 스탠다드 분자로 고려되는 레티노산보다 더 양호한 성능을 나타냈다.

[0187] 실시예 18

[0188] 인간 피부 모델 및 피부 형태학에 대한 펩타이드 13 및 펩타이드 14의 효과를 테스트하기 위해, 건강한 노인 공여자(71, 84, 및 90세)로부터 단리된 인간 1차 섬유아세포 및 각질형성세포가 인간 피부 등가물을 구축하기 위해 사용되었다. 피부 등가물은 0.01% w/v (또는 1 μ M)의 펩타이드 13 또는 펩타이드 14를 이용하여 5일 동안

처리되었다. 음성 대조군은 제형만으로 처리되었다. 5일 배양 이후, 피부 등가물은 표피 두께에 대해 분석되었는데, 이는 총 표피 면적에 따라 정량화되었다. 품질 평가 기반의 몇몇 파라미터는 블라인드 분석자에 의해 수행되었다. 관찰된 파라미터는 세포층의 일반적인 조직화, 뿐만 아니라 다른 관점 중에서도 각질층의 두께를 포함하였고, 에이징 및 노화 레벨에 따라 감소되는 것으로 확인되었다. 평가는 28의 최대 스코어를 보유하였는데, 이는 연령 및 노화의 감소와 관련된 더 높은 스코어이다. 19의 최소 스코어는 배치 사용을 위해 필요하였다. 이 스코어는 내부적으로 검증되었고, 피부 등가물 또는 배양된 세포의 연령/노화에 따라 감소되는 것으로 확인되었다. 3회의 독립적인 실험은 3회의 기술적인 중복실험과 함께 수행되었다. 데이터는 t-테스트를 이용하여 분석되었다. 통계학적 유의성은 0.05와 동등하거나 또는 더 낮은 p 값으로 결정되었다. 통계학적으로 유의미한 p 값은 그룹 사이에서 $p < 0.05$ 의 경우 *, $p < 0.01$ 의 경우 **, $p < 0.001$ 의 경우 ***, $p < 0.0001$ 의 경우 ****로 나타났다.

[0189] 도 15a는 비히클 단독(대조군), 펩타이드 13, 또는 펩타이드 14로 처리된 시험관 내 인간 피부 모델의 H&E 염색된 조직학적 이미지를 나타낸다. 펩타이드 13 또는 펩타이드 14로 처리된 인간 피부 모델은 일반적으로 미처리된 대조군 샘플에 비해 유사하거나 또는 증가된 두께의 피부 각질층(이미지의 상단의 암회색 층 또는 H&E에 의해 염색된 밝은 분홍에 의해 나타낸 바와 같음) 및 표피층(이미지의 중단의 중간 정도의 회색 층 또는 H&E에 의해 염색된 갈색에 의해 나타낸 바와 같음)을 나타냈다. 도 15b는 비히클 단독(대조군), 펩타이드 13, 또는 펩타이드 14로 처리된 인간 피부 모델의 조직학 스코어의 평균을 나타내는데, 이들은 각각 21.00, 23.83, 및 23.44였다. 조직학 스코어는 음성 대조군의 경우보다 펩타이드 13 또는 펩타이드 14로 처리된 샘플의 경우 더 높았다. 펩타이드 13 또는 펩타이드 14를 이용하는 피부 샘플의 처리는 표피 두께 및 배리어에 의해 평가된 바와 같이 피부 형태학을 개선시키는 것으로 나타났다.

[0190] 실시예 19

[0191] 피부 깊이를 통한 펩타이드 14의 투과의 레벨을 연구하기 위해, 생체 외 피부 배양 샘플에 대해 프란츠(Franz) 세포를 이용하는 확산 연구가 수행되었다. 여성 공여자(79세)의 복수 유래의 새로운 인간 피부는 $\sim 2.5\text{cm} \times 2.5\text{cm}$ 의 작은 단편으로 절단되었다.

[0192] 프란츠 셀 연구에서, 피부는 0.01% 펩타이드 14를 포함하는 10 μL 의 제형화된 크림으로 처리되었고, 5 mm 직경의 접촉 면적(0.2cm^2)으로 프란츠 셀 내에 위치되었다. 수용 챔버는 2 mL의 PBS, pH 7.4를 보유하였다. 프란츠 셀은 교반 하에 32°C에서 24시간 동안 유지되었다.

[0193] 생체 외 피부 배양 연구에서, 피부는 0.01%의 펩타이드 14를 포함하는 2 μL 의 제형화된 크림을 이용하여 처리되었다(총 200 ng의 펩타이드 14). 이어서, 피부 샘플은 저부에서 DMEM 배지와 기액 계면에 위치되었고, 37°C에서 24시간 동안 유지되었다.

[0194] 24시간 후, 피부 상의 과량의 제형은 티슈 페이퍼로 제거되었고, 피부 샘플은 PBS 중에서 4회 세척되었다. 또한, 주위 피부 모두는 제거되었다. 이어서, 피부는 진피로부터 표피를 분리하기 위해 60°C에서 1-2분 동안 인큐베이션되었다. 수용 챔버(2 mL) 내의 PBS, 표피층, 및 진피층은 수집되었고, 추가 분석 때까지 -80°C에서 동결되었다. 진피층은 진피 내로 투과된 펩타이드 14의 양을 결정하기 위해 펩타이드 14에 대한 질량 분광분석법에 의해 분석되었다.

[0195] 프란츠 셀 연구에서, 적용된 펩타이드 14의 약 1.37% 내지 2.60%가 진피층 내에서 확인되었다. 생체 외 피부 배양 연구에서, 적용된 펩타이드 14의 약 1.94% 내지 1.96%가 진피층 내에서 확인되었다. 펩타이드 14가 피부의 표면에 국소적으로 적용되는 경우 진피층 내로 투과된 펩타이드 14는 거의 없거나 없었다. 이는 펩타이드 14가 국소 적용으로 매우 낮거나 최소의 진피 투과를 달성함을 입증한다.

[0196] 실시예 20

[0197] 임상 연구는 얼굴에 대한 펩타이드 14의 국소 적용의 효과를 평가하기 위해 인간 개체에 대해 수행되었다. 본 연구는 기관 감사 위원회(Institutional review board, IRB)에 의해 승인되었다. 22명의 인간 개체가 본 임상 연구에 참여하였고, 얼굴의 각각의 측면에 2개의 제품을 사용하도록 요청되었다. 얼굴의 우측면 상에, 개체는 제형만을 포함하는 음성 대조군을 사용하였다. 얼굴의 좌측면 상에, 개체는 0.01% 펩타이드 14를 포함하는 처리 제형을 사용하였다. 개체는 얼굴의 각각의 측면에 제품 사용을 시작하기 이전(베이스라인) 및 매일 국소 적용하고 6주 및 12주 후에 평가되었다. 피부 수분 함량, 경피 수분 손실(TEWL), 진피 두께 및 에코발생도, 피부내 분석, 피부 점탄성 특성, 및 피부 표면 프로파일의 다양한 측정이 라인/주름, 피부 톤(균일성)의 외관, 모공의 외관, 텍스처/평활도의 외관, 견고성(시각), 탄성(촉각), 및 전체적인 외관에 대한 얼굴 피부 상의 펩타이드 14의

국소 적용의 효과를 평가하기 위해 상세히 후술되는 바와 같이 수행되었다.

- [0198] 임상 전문가 등급화: 효능에 대한 등급화: 시각 및 촉각 평가는 베이스라인, 6주째 및 12주째에 양 측면 얼굴 상에서 10 cm 시각 아날로그 척도(Visual Analog Scales, VAS)를 이용하여 수행되었다. 하기 파라미터가 평가되었다: 상세히 후술되는 기기 및 방법을 이용하는 미세 라인/주름, 피부 톤(색조의 균일성), 텍스처/평활도(시각), 견고성(시각), 탄성(촉각), 피부 모공, 광택/발광, 및 전체적인 외관.
- [0199] 수분 측정기(Corneometer): Corneometer CM 825 (Courage + Khazaka, Germany)는 피부 커패시턴스(skin capacitance)를 측정함으로써 피부 수분 함량/수화를 평가하기 위해 사용되었다. 측정은 베이스라인, 6주째 및 12주째에 양 측면 얼굴 상에서 3회 수행되었고, 평균을 냈다. 테스트 부위 맵은 동일한 위치가 각각의 방문에서 측정되는 것을 보장하기 위해 사용되었다.
- [0200] 수분증발량 측정기(VapoMeter): VapoMeter(Delfin Technologies Ltd., Finland)는 상대 습도 및 온도를 측정하기 위한 센서를 갖는 폐쇄된 원통형 챔버를 이용하여 피부의 경표피 수분 손실(TEWL)을 측정한다. TEWL 비율의 변화는 배리어 붕괴 또는 완전성의 측정치를 제공함으로써 피부 완전성에 대한 펩타이드 14의 효과의 척도를 제공한다. 모든 개체는 베이스라인, 6주째 및 12주째에 양 측면의 얼굴에 대한 중복 측정되고 평균을 낸 수분증발량측정기 측정값을 보유하였다. 평가 위치는 각각의 개체에 대해 바디 맵 상에 기록되었다.
- [0201] 초음파 - 더마스캔: DermaScan C USB(Cortex Technology ApS, Hadsund, Denmark)는 컴팩트한 고해상도 초음파 스캐너이다. 모든 개체는 베이스라인 및 12주째에 양 측면의 얼굴에서 측정된 초음파 평가값을 보유하였다. 평가의 위치는 각각의 방문에서 동일하였고, 페이스 맵 상에 기록되었다. 초음파 스캔의 획득 시, 그들은 진피 두께(밀도) 및 에코발생도에 대해 분석되었다.
- [0202] SIAScope: COSMETICS™ SIAScope(Astron Clinical, Toft, UK)는 분광광도법적 피부내 분석(Spectrophotometric Intracutaneous Analysis, SIA) 및 발색단 맵핑을 이용하는 비침습적 광학 피부 이미징 기기이다. 진피 콜라겐 및 헤모글로빈은 베이스라인, 6주째 및 12주째에 양 측면 얼굴 상에서 측정되었다.
- [0203] 큐토미터(Cutometer): Cutometer MPA 580(Courage + Khazaka, Germany)은 피부 표면을 흡입하고, 프로브의 천공 내로 피부를 흡출하고, 광학 측정 시스템을 이용하여 투과 깊이를 결정함으로써 피부의 점탄성 특성(견고성 및 탄성)을 측정한다. 측정은 베이스라인, 6주째 및 12주째에 양 측면 얼굴 상에서 수행되었다. 페이스 맵을 이용하여 동일한 위치가 각각의 시점에서 측정되었고, 기록되었다. 측정치는 견고성, 탄성 및 네트 탄성을 포함하였다.
- [0204] VISIA-CR: 사진 문서(Photo documentation)는 다중 발광 모드에서 고해상도 이미지를 캡처하는 VISIA-CR 이미징 시스템(Canfield Scientific, Paramus, NJ, USA)을 이용하여 제공된다. 사진은 베이스라인, 6주째 및 12주째에 중앙, 우측 및 좌측면의 스탠다드 1 및 병행 편광으로 캡처된다.
- [0205] ANTERA 3D®: Antera 3D®(Miravex, Ireland)는 피부 표면의 3차원 재구성 및 후속 이미지 분석을 제공하기 위해 피부 프로필로메트리, 다중-스펙트럼 분석 및 비색법을 조합하는 기기이다. 이미지는 베이스라인, 6주째 및 12주째에 모든 개체에서 좌측 및 우측 상의 눈꼬리 잔주름 부위(crow's feet area)에 대해 캡처된다. 각각의 시점에서 페이스 맵을 이용하여 동일한 위치가 측정되고 기록되었다. 이미지는 라인/및 주름의 텍스처, 폭 및 깊이 라인/주름에 대해 분석되었다.
- [0206] 전문가 임상 등급화
- [0207] 베이스라인에 대한 6주째 및 12주째의 비교
- [0208] 펩타이드 14 제형: 후속 시점과 베이스라인에서 펩타이드 14로 처리된 얼굴의 좌측면의 평균 스코어의 비교는 라인/주름, 피부 톤(균일성), 모공의 외관, 텍스처/평활도, 견고성(시각), 탄성(촉각), 및 전체적인 외관에 대한 6주째에서 12주째로 계속되는 임상적인 등급화에서 통계학적으로 유의미한 개선을 나타냈다. 추가적으로, 광택/발광의 외관은 펩타이드 14로 처리된 얼굴의 좌측면에 대한 베이스라인과 비교하여 12주째에 통계학적으로 현저하게 개선되었다.
- [0209] 대조군 제형: 후속 시점과 베이스라인에서 음성 대조군 제형으로 처리된 얼굴의 우측면의 평균 스코어의 비교는 라인/주름, 피부 톤(균일성), 모공의 외관, 텍스처/평활도, 견고성(시각), 탄성(촉각), 및 전체적인 외관에 대한 6주째에서 12주째로 계속되는 임상적인 등급화에서 통계학적으로 유의미한 개선을 나타냈다.
- [0210] 음성 대조군에 대한 펩타이드 14 처리의 비교(얼굴의 좌측 대 우측)

- [0211] 처리 시간에 따른 음성 대조군에 대한 펩타이드 14 처리의 비교
- [0212] 베이스라인(처리 이전)과 비교하는 경우, 펩타이드 14로 처리된 얼굴의 좌측면은 몇몇 측정값에서 음성 대조군으로 처리된 얼굴의 우측면보다 더 양호한 것으로 나타났다. 펩타이드 14로 처리된 얼굴의 좌측면은 음성 대조군 제형으로 처리된 얼굴의 우측면보다 수분측정기 측정값에 의한 더 높은 레벨의 피부 수화, 6주째에 SIAScope에 의한 더 높은 레벨의 콜라겐 레벨, 및 6주째에 VapoMeter 측정값에 의한 더 양호한 TEWL(경표피 수분 손실) 개선을 보여주었다. 진피 두께(밀도) 및 에코발생도에 대한 더마스캔 평가 및 전체적인 피부 외관에 대한 Visia 평가의 경우 펩타이드 14로 처리된 얼굴의 좌측면과 음성 대조군 제형으로 처리된 얼굴의 우측면 사이의 유의미한 차이는 확인되지 않았다. 펩타이드 14로 처리된 얼굴의 좌측면은 음성 대조군 제형으로 처리된 얼굴의 우측면보다 12주째에 텍스처(거칠기)의 더 양호한 Antera 측정값을 보여주었다.
- [0213] 0.01% 펩타이드 14를 갖는 국소 크림을 이용하고 12주 후 22명의 환자의 결과가 분석되었다. 도 16은 베이스라인(좌측, 베이스라인) 및 처리 12주 후(우측, 12주)에서 펩타이드 14로 처리된 얼굴의 좌측면의 예를 나타낸다. 0.01% 펩타이드 14를 이용하는 12주의 처리는 베이스라인 시점과 비교하여 라인 및 주름의 외관을 감소시켰고, 평활도, 피부 톤(균일성), 텍스처/평활도, 및 전체적인 외관을 개선시켰다.
- [0214] 블라인드 전문가 의견의 분석은 모든 개체의 개선 및 평균 백분율 개선(MPI)을 나타내는 환자의 백분율을 결정하기 위해 수행되었는데, 이때 MPI는 베이스라인(처리 이전)과 비교한 평균 퍼센트 개선을 나타낸다. 본 분석은 피부 주름의 외관(MPI: 3.3%)에서 감소를 갖는 것으로 평가된 환자의 87%, 개선된 피부 탄성(MPI: 4.75%)을 갖는 것으로 평가된 90%, 및 피부 균일성(MPI: 4.4%), 광택(MPI: 5.06%), 모공의 외관(MPI: 4.58%), 및 건고성(MPI: 5.43%)에서 개선을 갖는 것으로 평가된 95.5%를 확인하였다. 모든 개체는 더 좋은 피부 텍스처/평활도(MPI: 7.46%) 및 전체적인 외관(MPI: 6.17%)을 나타내는 것으로 평가되었다.
- [0215] 개체의 얼굴은 개선을 나타내는 환자의 백분율 및 모든 개체의 평균 백분율 개선(MPI)을 결정하기 위해 다양한 기기에 의해 평가되었는데, 이때 MPI는 베이스라인(처리 이전)과 비교한 평균 퍼센트 개선을 나타낸다. 기기 평가는 개체의 81%가 수분증발량 측정기 평가에 따라 더 양호한 피부 배리어를 보여주었음을 나타냈다(MPI: 14.19%). 개체의 73%는 Antera 평가에 따라 더 양호한 피부 거칠기를 나타냈다(MPI: 5.05%). 개체의 73%는 VISIA 평가에 따라 더 양호한 피부 광택을 나타냈다(MPI: 16.63%).
- [0216] 또한, 개체의 인식이 평가되었다. 개체 인식의 분석에서, 80%를 초과하는 개체는 펩타이드 14를 포함하는 제형이 더 양호한 피부 외관, 더 양호한 피부 텍스처, 더 양호한 피부 건고성, 및 더 양호한 수화를 촉진시키는 것으로 인식하였다. 개체의 78%는 피부 광택에서 개선을 인식하였다.
- [0217] **실시예 21**
- [0218] 본 출원에 개시된 폴리펩타이드 중 적어도 하나를 포함하는 국소 제형은 인간 피부 상에 사용된다. 상기 제형은 아침 및 저녁에 얼굴 및/또는 목의 세정되고 건조된 피부 상에 평활층으로서 적용되도록 의도된다. 상기 제형은 피부의 장기 지속성 건강을 위해 피부 탄력을 개선하고 표피 배리어를 증강시키기 위해 과학적으로 제형화된 매일의 필수적인 국소 보충제이다.
- [0219] **실시예 22**
- [0220] 사용자는 폴리펩타이드 중 적어도 하나를 포함하는 본 출원에 기재된 국소 제형을 얼굴 및/또는 목에 적용한다. 또한, 사용자는 상기 국소 제형을 적용한 이후 UV 차단제를 포함하는 다른 국소 제형을 적용한다.
- [0221] **실시예 23**
- [0222] 사용자는 폴리펩타이드 중 적어도 하나 및 UV 차단제를 포함하는 본 출원에 기재된 국소 제형을 얼굴 또는 목에 적용한다. 상기 국소 제형은 사용자의 신체 상의 피부에 적용될 수 있다.
- [0223] **실시예 24**
- [0224] 노인 공여자(71, 84 또는 90세) 유래의 세포를 이용하여 구축된 샘플의 3D 피부 등가물 절편은 1 μ M 펩타이드 14 또는 펩타이드 13, 또는 20 μ M 레티노산(RA)으로 처리되었고, 노화, 에이징, 및 건강의 다양한 마커의 다양한 처리의 효과에 대해 평가되었다.
- [0225] 도 17은 대조군, 펩타이드 14, 펩타이드 13, 또는 레티노산으로 처리된 3D 피부 등가물의 표피층(Epi) 및 진피층(Der)의 p16, BLIMP1, ZYG11B, IL-8, Ki-67, ZIC1, MMP1, HAS2의 상대 mRNA 발현 레벨을 나타낸다. 데이터는 GAPDH 및 미처리된 대조군에 대해 정규화된 2-ddCt로서 나타낸다. *p<0.05. 펩타이드 13 및 펩타이드 14-처리된

샘플은 일반적으로 표피층에서 p16, BLIMP1, ZYG11B, IL-8, 및 Ki-67에 대해 및 진피층에서 p16, MMP1, HAS2, IL-8, 및 Ki-67에 대해 유사한 상대 mRNA 발현 레벨을 보유했었다. 펩타이드 13 및 펩타이드 14-처리된 샘플은 일반적으로 표피층에서 p16, BLIMP1, ZYG11B, IL-8에 대해 및 진피층에서 p16, MMP1, IL-8, 및 Ki-67에 대해 RA-처리된 샘플보다 더 낮은 상대 mRNA 발현 레벨을 보유했었다. 펩타이드 13 및 펩타이드 14-처리된 샘플은 일반적으로 표피층에서 Ki-67에 대해 및 진피층에서 HAS2에 대해 RA-처리된 샘플보다 더 높은 상대 mRNA 발현 레벨을 보유했었다. 펩타이드 13 및 펩타이드 14-처리된 샘플은 진피층에서 ZIC1 및 Ki-67에 대해 RA-처리된 샘플과 유사한 상대 mRNA 발현 레벨을 보유했었다.

[0226] 실시예 25

[0227] 노화치료 전략은 생체 내에서 건강수명 및 수명 연장과 연결될 수 있다. 펩타이드 14가 연장된 건강수명 및 수명을 촉진시키는지 여부를 평가하기 위해, 카에노르합디티스 엘레간스 웜이 사용되었다. 펩타이드 14는 1 μ M 또는 2 μ M의 상이한 농도로 웜 배지(M9 버퍼 배지) 내에 첨가되었다. 음성 대조군 웜은 비히클만 수용되었다. 2가지 건강수명 파라미터가 평가되었다: i) 인두 펌핑(pharyngeal pumping) 및 ii) 웜 운동(worm movement). 또한, 수명도 결정되었다. 인두 펌핑 분석의 경우, 15마리의 웜은 매일 그들의 인두 운동(펌핑)이 관찰되었고, 20초 동안 계수되었다. 본 실험은 다른 날에 상이한 동물 집단을 이용하여 2명의 상이한 블라인드 관찰자에 의해 3회 반복되었다. 통계학적 차이는 일원 ANOVA 및 던넛 사후 검정에 의해 각각의 개별적인 시점을 분석함으로써 검출되었다. 모든 그룹은 H2O 그룹과 비교되었다. 웜 운동 분석의 경우, 스레싱으로도 언급되는 씨. 엘레간스의 기본 운동은 15마리의 웜에 대해 매일 측정되었다. 관찰 지속기간은 30초였다. 본 실험은 다른 날에 상이한 동물 집단을 이용하여 2명의 상이한 블라인드 관찰자에 의해 3회 반복되었다. 통계학적 차이는 일원 ANOVA 및 던넛 사후 검정에 의해 각각의 개별적인 시점을 분석함으로써 검출되었고, 모든 그룹은 H2O 그룹과 비교되었다. 수명 분석의 경우, 15마리의 웜은 마지막 웜이 죽을 때까지 매일 그들의 수명이 관찰되었다. 본 실험은 다른 날에 상이한 동물 집단을 이용하여 2명의 상이한 블라인드 관찰자에 의해 3회 반복되었다. 평균 수명이 측정되었다. 통계학적 차이는 일원 ANOVA 및 던넛 사후 검정에 의해 각각의 개별적인 시점을 분석함으로써 검출되었고, 모든 그룹은 H2O 그룹과 비교되었다(도 18).

[0228] 1 μ M 또는 2 μ M의 펩타이드 14를 이용하는 처리는 웜 스레싱(도 18, 패널 A), 펌핑(도 18, 패널 B), 및 수명(도 18, 패널 C)을 개선시켰다. 스레싱은 1일째에 현저하게 개선되었지만(*p<0.05), 펌핑은 이 날에 현저하게 감소되었다(*p<0.5). 함께 고려하면, 데이터는 건강수명 및 수명의 촉진과 관련하여 테스트된 펩타이드의 안전성 및 효능을 시사한다. 예를 들어, 8일째에 스레싱(*p<0.05) 및 펌핑(*p<0.05) 둘 다는 대조군과 비교하여 펩타이드 14로 처리된 군에서 증가되었다. 펌핑은 씨. 엘레간스에서 에이징에 따라 감소되었는데, 이는 주로 근육 완전성의 상실에 기인한다. 또한, 직접적으로 측정되지는 않았지만, 씨. 엘레간스의 인두의 거시 해부학에서의 결함(구부러지거나 또는 부은 인두, 둘 다 선충 에이징의 공통적인 특징)은 H2O 대조군과 비교하는 경우 1 μ M 펩타이드 14 그룹에서 감소되었다. 웜 운동의 감소는 시점 또는 샘플에서 검출되지 않았는데, 이는 펩타이드가 테스트된 농도에서 씨. 엘레간스에게 독성이 없음을 시사한다. 1 μ M 및 2 μ M로 사용되는 경우, 펩타이드 14는 웜 평균 수명에서 통학적으로 유의미한 증가를 촉진하였다(1 μ M 펩타이드 14 **p<0.01; 2 μ M 펩타이드 14 *p<0.05).

[0229] 실시예 26

[0230] 조로증 환자 유래의 피부 세포는 높은 레벨의 세포 노화 때문에 에이징의 모델로서 사용되었다. 조로증 환자의 1차 섬유아세포는 10% v.v. 태아 소 혈청(FBS), 및 1% v.v.의 페니실린/스트렙토마이신 용액(1,000 U.mL⁻¹)으로 보충된 DMEM(둘베코의 변형된 이글 배지) 중에서 배양되었다. 세포는 5% CO₂, 37°C 및 95% 습도 분위기 중에서 유지되었다. 확장 이후, 이들 세포는 96웰 플레이트 내에 시딩되었고(웰당 4,000개의 세포), 플레이팅하고 6시간 후 세포는 500 nM, 5 μ M 또는 50 μ M의 폴리펩타이드 서열 LKGIL(서열번호 6) 또는 WLKGI(서열번호 7)와 함께 인큐베이션되었다. 음성 대조군은 비히클만이 수용된 미처리된 세포를 포함하였다. 인큐베이션 이후, 미처리된 대조군에 대한 노화 관련 β -갈락토시다아제 염색의 활성 및 ATRX 병소/핵의 정량화에 의해 평가된 상대 세포 노화가 분석되었다. 3회의 기술적인 중복실험을 포함하는 3회의 독립적인 실험(생물학적 중복실험)이 수행되었다. 데이터는 ANOVA 및 본페로니 사후 검정을 이용하여 분석되었다. 통계학적 유의성은 0.05와 동등하거나 또는 더 낮은 p 값으로 결정되었고, *p<0.05 및 ** p<0.01였다.

[0231] 도 19는 세포 사멸을 촉진시키지 않으면서 세포 노화를 감소시키는 폴리펩타이드 서열 LKGIL(서열번호 6) (A, B, C), 및 WLKGI(서열번호 7)의 효과를 나타낸다. 패널 A 및 D에서, y-축은 미처리된 대조군에 대해 정규화된 상대 노화 레벨을 나타낸다. 패널 B 및 E에서, y-축은 미처리된 대조군에 대해 정규화된 상대 세포 수를 나타낸

다. 패널 C 및 F에서, y-축은 세포당 평균 ATRX 병소 축적을 나타낸다. LKGIL(서열번호 6)을 이용하는 세포의 처리는 미처리된 세포와 비교하여 5 μ M 및 50 μ M로 사용되는 경우 노화 관련 β -갈락토시다아제 염색 및 ATRX 병소/핵의 평균 수를 현저하게 감소시켰다(β -갈락토시다아제 염색의 경우 $p<0.01$ 및 ATRX 병소/핵의 경우 $p<0.05$). WLKGI(서열번호 7)를 이용하는 처리는 미처리된 세포와 비교하여 5 μ M 및 50 μ M로 사용되는 경우 노화 관련 α -갈락토시다아제 염색 레벨을 감소시켰다(5 μ M의 경우 $p<0.05$ 및 50 μ M의 경우 $p<0.01$). 테스트된 농도에서 세포 독성은 관찰되지 않았다.

[0232] 실시예 27

[0233] 추가적인 폴리펩타이드는 항에이징제로서의 적합성에 대해 테스트되었다. 세포는 폴리펩타이드 중 하나와 함께 인큐베이션되었다. 음성 대조군은 비히클만을 수용한 미처리 세포를 포함하였다. 인큐베이션 이후, 상대 세포 노화(음성 대조군에 대한 노화 관련 β -갈락토시다아제 염색의 활성화에 의해 평가됨) 및 음성 대조군에 대한 상대 세포 증식이 분석되었다. 다수의 폴리펩타이드는 미처리된 음성 대조군보다 감소된 세포 노화를 갖는 1보다 적은 상대 세포 노화를 나타냈고, 미처리된 음성 대조군의 경우와 유사하거나 또는 그 이상의 세포 증식을 유지하였다. 그러한 폴리펩타이드의 예는 표 6에 나타낸다.

[0234] 또한, 세포 노화에 대한 표 6의 폴리펩타이드의 용량 의존성 효과가 연구되었다. 세포는 1.26 μ M 내지 50 μ M 범위 내의 다양한 용량(1.26 μ M, 3.12 μ M, 6.25 μ M, 12.5 μ M, 25 μ M, 50 μ M)의 폴리펩타이드와 함께 인큐베이션되었다. 더 낮은 용량의 폴리펩타이드에서도 세포 노화의 현저한 감소가 존재하였다.

표 6

폴리펩타이드	
서열 번호:	폴리펩타이드 서열
9	STAKAWLKGI
10	ETAKAWEKGI
11	ETAKAWHKGI
12	ETAKAWLKSI
13	ETAKAWLKGE
14	ETAKAWLKGI
15	WLKGILRGAA
16	KTAKAWLKGI
17	NTAKAWLKGI
18	PTAKAWLKGI
19	QTAKAWLKGI
20	EQAKAWLKGI
21	WLKGICRGAA
22	WLKGILPGAA
23	WLKGILQGAA
24	WLKGILSGAA
25	WLKGILVGAA
26	WLKGILRAAA
27	WLKGILRGHA
28	WLKGILRGIA

[0235]

[0236] 본 발명의 바람직한 실시양태가 본 출원에 제시되고 기재되었지만, 그러한 실시양태는 단지 예로서 제공된 것임을 당해 기술분야의 통상의 기술자에게 명백할 것이다. 이제 다수의 변경, 변형, 및 치환이 본 발명을 벗어나지 않으면서 당해 기술분야의 통상의 기술자에게 발생할 것이다. 본 출원에 기재된 발명의 실시양태에 대한 다양한

대안이 본 발명의 실시예에 이용될 수 있는 것으로 이해되어야 한다. 후술하는 청구범위는 본 발명의 범위를 규정하고 그로 인해 이들 청구범위 내의 방법 및 구조 및 그들의 등가물이 커버되는 것으로 의도된다.

[0237] **예시적인 실시양태**

[0238] 예시적인 실시양태 중에서:

[0239] 실시양태 1은 LKGI(서열번호 5)의 아미노산 서열 또는 이의 유사체를 포함하는 단리, 합성 또는 재조합 폴리펩타이드를 포함하는 피부 치료용 조성물을 포함하는데, 이때 폴리펩타이드는 100개 이하의 아미노산을 포함한다. 실시양태 2. 실시양태 1의 조성물로서, 이때 단리, 합성 또는 재조합 폴리펩타이드는 WLKGI(서열번호 7)의 아미노산 서열 또는 이의 유사체를 포함한다. 실시양태 3. 실시양태 1 또는 실시양태 2의 조성물로서, 이때 단리, 합성 또는 재조합 폴리펩타이드는 LKGIL(서열번호 6)의 아미노산 서열 또는 이의 유사체를 포함한다. 실시양태 4. 실시양태 1-4 중 어느 하나의 조성물로서, 이때 단리, 합성 또는 재조합 폴리펩타이드는 적어도 4개의 아미노산, 10개의 아미노산, 15개의 아미노산, 또는 20개의 아미노산을 포함한다. 실시양태 5. 실시양태 1-4 중 어느 한 실시양태의 조성물로서, 치료학적, 영양학적 또는 미용학적 부형제를 추가로 포함한다. 실시양태 6. 실시양태 5의 조성물로서, 이때 부형제는 국소 적용을 위해 구성된다. 실시양태 7. 실시양태 1-6 중 어느 한 실시양태의 조성물로서, 이때 조성물은 인간 피부에 적용하기 위해 구성된다. 실시양태 8. 실시양태 1-7 중 어느 한 실시양태의 조성물로서, 이때 조성물은 크림, 경피 패치, 국소 패치, 연고, 오일, 젤, 액체, 파우더, 로션, 세럼, 에멀션, 모이스처라이저, 폼, 페이스 마스크, 무스, 에어로졸, 스프레이, 클린저, 토너 또는 샴푸이다. 실시양태 9. 실시양태 1-5 중 어느 한 실시양태의 조성물로서, 이때 조성물은 식용 보충제로서 구성된다. 실시양태 10. 실시양태 9의 조성물로서, 이때 조성물은 음료로서 구성된다. 실시양태 11. 실시양태 1-9 중 어느 한 실시양태의 조성물로서, 이때 조성물은 글리세린, 스쿠알렌, 소르비톨, 히알루론산, 히알루론산 유도체, 히알루론산나트륨, 히알루론산나트륨 가교중합체, 나이아신아마이드, 당단백질, 피롤리돈 카복실산(PCA), 라이신 HCl, 알란토인 및 조류 추출물로 이루어지는 군으로부터 선택된 적어도 하나의 피부 수화제를 포함한다. 실시양태 12. 실시양태 1-9 중 어느 한 실시양태의 조성물로서, 이때 조성물은 식물성 오일, 미네랄 오일, 시어 버터, 코코아 버터, 페트콜라툼, 지방산, 트리글리세라이드, 벤조에이트, 미리스테이트, 팔미테이트, 스테아레이트, 당지질, 인지질, 스쿠알렌, 글리세린, 세라마이드 및 조류 추출물로 이루어지는 군으로부터 선택된 적어도 하나의 연화제를 포함한다. 실시양태 13. 실시양태 12의 조성물로서, 이때 식물성 오일은 로즈 힙 오일, 안디로바 오일, 포도씨유, 아보카도유, 자두씨유, 프라락씨 오일, 칼리코필럼 스프루세아눔 오일, 아몬드유 및 아르간 오일로 이루어지는 군으로부터 선택된다. 실시양태 14. 실시양태 1-13 중 어느 한 실시양태의 조성물로서, 이때 조성물은 비타민 A, 비타민 D, 비타민 E, 비타민 F, 비타민 K, 비타민 B1(티아민), 비타민 B2(리보플라빈), 비타민 B3(나이아신), 비타민 B5(판토텐산), 비타민 B7(비오틴), 비타민 B6, 비타민 B12(시아노코발라민), 비타민 B9, 엽산, 나이아신아마이드, 또는 이들의 유도체로 이루어지는 군으로부터 선택된 적어도 하나의 비타민을 포함한다. 실시양태 15. 실시양태 1-14 중 어느 한 실시양태의 조성물로서, 이때 조성물은 약 500 nM 내지 약 500 μ M의 단리, 합성 또는 재조합 폴리펩타이드의 유효량을 포함한다. 실시양태 16. 실시양태 1-14 중 어느 한 실시양태의 조성물로서, 이때 조성물은 약 0.001% 내지 약 5% (w/w)의 단리, 합성 또는 재조합 폴리펩타이드의 유효량을 포함한다. 실시양태 17. 실시양태 1-16 중 어느 한 실시양태의 조성물로서, 이때 조성물은 단리, 합성 또는 재조합 폴리펩타이드의 10% 이하의 낮은 진피 투과를 달성하기 위해 제형화된다. 실시양태 18. 실시양태 1-17 중 어느 한 실시양태의 조성물로서, 이때 조성물은 조성물을 사용하기 이전과 비교하여 피부 상에 조성물을 사용한 이후의 사용자의 피부의 피부 수분 함량, 경피피 수분 손실(TEWL), 진피 두께 및 예코발생도, 피부내 분석, 피부 점탄성 특성, 또는 피부 표면 프로파일 중 적어도 하나를 개선시킨다. 실시양태 19. 실시양태 1-17 중 어느 한 실시양태의 조성물로서, 이때 조성물은 조성물을 사용하기 이전과 비교하여 피부 상에 조성물을 사용한 이후의 사용자의 피부의 라인/주름의 외관, 피부 톤(균일성)의 외관, 모공의 외관, 텍스처/평활도의 외관, 견고성(시각), 탄성(촉각), 표피 배리어, 피부 거칠기, 피부 과색소침착, 또는 전체적인 외관을 감소시킨다. 실시양태 20. 실시양태 1-19 중 어느 한 실시양태의 조성물로서, 이때 조성물을 이용하는 피부의 치료는 피부에 대한 에이징의 영향을 감소시키거나 치료한다. 실시양태 21. 실시양태 1-20 중 어느 한 실시양태의 조성물로서, 이때 조성물을 이용하는 피부의 치료는 피부에 대한 세포 노화의 영향을 감소시킨다. 실시양태 22. 실시양태 20-21 중 어느 한 실시양태의 조성물로서, 이때 에이징의 영향은 노화 관련 β -갈락토시다아제 활성 레벨, ATRX 병소/세포의 비율, p16 발현, IL-8 발현, Ki-67 발현, 히알루로닉 신타아제 2 발현, 매트릭스 메탈로프로테아제 1(MMP1) 발현, 시루투인 6(SIRT6) 발현, BLM 발현, 또는 엑소뉴클레아제 1(EXO1) 발현 중 적어도 하나에 의해 평가된다.

[0240] 실시양태 23은 $X_1X_2X_3X_4X_5X_6X_7X_8X_9X_{10}$ 의 아미노산 서열 또는 이의 유사체를 포함하는 단리, 합성 또는 재조합 폴리

펩타이드를 포함하는데, 이때 (a) 아미노산 서열은 제1 서열 서열번호 1에 대해 적어도 70%, 80%, 85%, 90% 또는 95% 동일성을 갖고, 이때 X_1 은 E이고, X_2 는 T이고, X_4 는 K이고, X_6 는 W이고, X_7 은 L이고, X_9 은 G이고, X_{10} 은 I이고; (i) X_3 는 S가 아니거나; 또는 (ii) X_5 가 임의의 아미노산인 경우 X_8 은 G가 아니거나; 또는 (iii) X_8 이 임의의 아미노산인 경우 X_5 는 N이 아니거나; 또는 (iv) (i), (ii), 또는 (iii) 중 임의의 하나이면서 선택적으로 1, 2, 3, 또는 4개의 보존적 아미노산 치환을 갖거나; 또는 (b) 아미노산 서열은 제2 서열 서열번호 2에 대해 적어도 70%, 80%, 85%, 90% 또는 95% 동일성을 갖고, 이때 X_1 은 A이고, X_2 는 T이고, X_3 는 A이고, X_4 는 K이고, X_5 는 A이고, X_6 는 W이고, X_7 은 L이고, X_8 은 K이고, X_9 은 G이고, X_{10} 은 I면서, 선택적으로 1, 2, 3, 또는 4개의 보존적 아미노산 치환을 갖거나; 또는 (c) 아미노산 서열은 제3 서열 서열번호 3에 대해 적어도 70%, 80%, 85%, 90% 또는 95% 동일성을 갖고, 이때 X_1 은 K이고, X_2 는 L이고, X_5 는 I이고, X_6 는 L이고, X_8 은 G이고, X_{10} 은 A이고; (i) X_9 이 임의의 아미노산인 경우 X_3 는 N이 아니거나; 또는 (ii) X_3 가 임의의 아미노산인 경우 X_9 은 S가 아니거나; 또는 (iii) X_4 가 임의의 아미노산인 경우 X_7 은 L이 아니거나; 또는 (iv) X_7 이 임의의 아미노산인 경우 X_4 는 S가 아니고; 또는 (v) (i), (ii), (iii), 또는 (iv) 중 임의의 하나이면서 선택적으로 1, 2, 3, 또는 4개의 보존적 아미노산 치환을 갖거나; 또는 (d) 아미노산 서열은 제4 서열 서열번호 4에 대해 적어도 70%, 80%, 85%, 90% 또는 95% 동일성을 갖고, 이때 X_1 은 W이고, X_2 는 L이고, X_3 는 K이고, X_4 는 G이고, X_5 는 I이고, X_6 는 L이고, X_7 은 R이고, X_8 은 E이고, X_9 은 A이고, X_{10} 은 A이면서, 선택적으로 1, 2, 3, 또는 4개의 보존적 아미노산 치환을 보유한다.

실시양태 24. 실시양태 23의 폴리펩타이드로서, 이때 아미노산 서열은 LKGI(서열번호 5)를 포함한다. 실시양태 25. 실시양태 23 또는 실시양태 24의 폴리펩타이드로서, 이때 아미노산 서열은 WLKGI(서열번호 7)를 포함한다. 실시양태 26. 실시양태 23-25 중 어느 한 실시양태의 폴리펩타이드로서, 이때 아미노산 서열은 LKGIL(서열번호 6)을 포함한다. 실시양태 27. 실시양태 23의 폴리펩타이드로서, 이때 아미노산 서열은 서열번호 1의 서열에 대해 적어도 70%, 80%, 85%, 90% 또는 95% 동일성을 보유한다. 실시양태 28. 실시양태 23의 폴리펩타이드로서, 이때 아미노산 서열은 서열번호 1이다. 실시양태 29. 실시양태 23의 폴리펩타이드로서, 이때 아미노산 서열은 서열번호 2이다. 실시양태 30. 실시양태 23의 폴리펩타이드로서, 이때 아미노산 서열은 서열번호 3의 서열에 대해 적어도 70%, 80%, 85%, 90% 또는 95% 동일성을 보유한다. 실시양태 31. 실시양태 23의 폴리펩타이드로서, 이때 아미노산 서열은 서열번호 3의 서열에 대해 적어도 80%, 85%, 90% 또는 95% 동일성을 보유한다. 실시양태 32. 실시양태 23의 폴리펩타이드로서, 이때 아미노산 서열은 서열번호 3이다. 실시양태 33. 실시양태 23의 폴리펩타이드로서, 이때 아미노산 서열은 서열번호 4이다. 실시양태 34. 실시양태 23-33 중 어느 한 실시양태의 폴리펩타이드로서, 이때 재조합 폴리펩타이드는 적어도 10개의 아미노산, 15개의 아미노산, 또는 20개의 아미노산 및 100개 이하의 아미노산을 포함한다. 실시양태 35는 실시양태 23-34 중 어느 한 실시양태의 적어도 하나의 단리, 합성 또는 재조합 폴리펩타이드와 치료학적, 영양학적 또는 미용학적 부형제를 포함하는 피부 치료용 조성물을 포함한다. 실시양태 36. 실시양태 35의 조성물로서, 이때 부형제는 국소 적용을 위해 구성된다. 실시양태 37. 실시양태 35 또는 실시양태 36의 조성물로서, 이때 조성물은 인간 피부에 적용하기 위해 제형화된다. 실시양태 38. 실시양태 35-37 중 어느 한 실시양태의 조성물로서, 이때 조성물은 크림, 연고, 젤, 액체, 오일, 파우더, 로션, 세럼, 에멀션, 모이스처라이저, 폼, 페이스 마스크, 무스, 에어로졸, 스프레이, 클린저, 토너, 국소 패치, 또는 샴푸이다. 실시양태 39. 실시양태 35의 조성물로서, 이때 조성물은 식용 보충제로서 구성된다. 실시양태 40. 실시양태 39의 조성물로서, 이때 조성물은 음료로서 구성된다.

[0241]

실시양태 41. 실시양태 35-40 중 어느 한 실시양태의 조성물로서, 이때 조성물은 글리세린, 스쿠알렌, 소르비톨, 히알루론산, 히알루론산 유도체, 히알루론산나트륨, 히알루론산나트륨 가교중합체, 나이아신아마이드, 당단백질, 피롤리돈 카르복실산(PCA), 라이신 HCl, 알란토인 및 조류 추출물로 이루어지는 군으로부터 선택된 적어도 하나의 피부 수화제를 포함한다. 실시양태 42. 실시양태 35-40 중 어느 한 실시양태의 조성물로서, 이때 조성물은 식물성 오일, 미네랄 오일, 시어 버터, 코코아 버터, 페트롤라툼, 지방산, 트리글리세라이드, 벤조에이트, 미리스테이트, 팔미테이트, 스테아레이트, 당지질, 인지질, 스쿠알렌, 글리세린, 세라마이드 및 조류 추출물로 이루어지는 군으로부터 선택된 적어도 하나의 연화제를 포함한다. 실시양태 43. 실시양태 42의 조성물로서, 이때 식물성 오일은 로즈 힙 오일, 안디로바 오일, 포도씨유, 아보카도유, 자두씨유, 프라카씨 오일, 칼리코필럼 스프루세아눔 오일, 아몬드유 및 아르간 오일로 이루어지는 군으로부터 선택된다. 실시양태 44. 실시양태 35-43 중 어느 한 실시양태의 조성물로서, 이때 조성물은 비타민 A, 비타민 D, 비타민 E, 비타민 F, 비타민 K, 비타민 B1(티아민), 비타민 B2(리보플라빈), 비타민 B3(나이아신), 비타민 B5(판토텐산), 비타민 B7(비오틴), 비타민 B6, 비타민 B12(시아노코발라민), 비타민 B9, 엽산, 나이아신아마이드, 또는 이들의 유도체로 이루어지는 군으로부터 선택된 적어도 하나의 비타민을 포함한다. 실시양태 45. 실시

양태 35-44 중 어느 한 실시양태의 조성물로서, 이때 조성물은 약 500 nM 내지 약 500 μ M의 단리, 합성 또는 재조합 폴리펩타이드의 유효량을 포함한다. 실시양태 46. 실시양태 35-44 중 어느 한 실시양태의 조성물로서, 이때 조성물은 약 0.001% 내지 약 5% (w/w)의 단리, 합성 또는 재조합 폴리펩타이드의 유효량을 포함한다. 실시양태 47. 실시양태 35-44 중 어느 한 실시양태의 조성물로서, 이때 조성물은 약 0.001% 내지 약 1%의 단리, 합성 또는 재조합 폴리펩타이드의 유효량을 포함한다. 실시양태 48. 실시양태 35-47 중 어느 한 실시양태의 조성물로서, 이때 조성물은 조성물을 사용하기 이전과 비교하여 피부 상에 조성물을 사용한 이후의 사용자의 피부의 피부 수분 함량, 경표피 수분 손실(TEWL), 진피 두께 및 에코발생도, 피부내 분석, 피부 점탄성 특성, 또는 피부 표면 프로파일 중 적어도 하나를 개선시킨다. 실시양태 49. 실시양태 35-47 중 어느 한 실시양태의 조성물로서, 이때 조성물은 조성물을 사용하기 이전과 비교하여 피부 상에 조성물을 사용한 이후의 사용자의 피부의 라인/주름의 외관, 피부 톤(균일성)의 외관, 모공의 외관, 텍스처/평활도의 외관, 견고성(시각), 탄성(촉각), 표피 배리어, 피부 거칠기, 피부 과색소침착, 또는 전체적인 외관을 감소시킨다. 실시양태 50. 실시양태 35-49 중 어느 한 실시양태의 조성물로서, 이때 조성물을 이용하는 피부의 치료는 피부에 대한 에이징의 영향을 감소시키거나 치료한다. 실시양태 51. 실시양태 35-50 중 어느 한 실시양태의 조성물로서, 이때 조성물을 이용하는 피부의 치료는 피부에 대한 세포 노화의 영향을 감소시킨다. 실시양태 52. 실시양태 50-51 중 어느 한 실시양태의 조성물로서, 이때 에이징의 영향은 노화 관련 B-갈락토시다아제 활성 레벨, ATRX 병소/세포의 비율, p16 발현, IL-8 발현, Ki-67 발현, 히알루로닉 신타아제 2 발현, 매트릭스 메탈로프로테아제 1(MMP1) 발현, 시루투인 6(SIRT6) 발현, BLM 발현, 또는 엑소뉴클레아제 1(EXO1) 발현 중 적어도 하나에 의해 평가된다.

[0242]

실시양태 53은 병태의 치료가 필요한 개체에서 병태를 치료하는 방법을 포함하는데, 상기 방법은 개체에게 서열번호 5의 아미노산 서열을 포함하는 조성물을 투여하는 단계를 포함한다. 실시양태 54. 실시양태 53의 방법으로서, 이때 조성물은 서열번호 6의 아미노산 서열을 포함한다. 실시양태 55. 실시양태 53 또는 실시양태 54의 방법으로서, 이때 조성물은 서열번호 7의 아미노산 서열을 포함한다. 실시양태 56. 실시양태 53-55 중 어느 한 실시양태의 방법으로서, 이때 투여는 조성물을 개체에게 국소적으로 적용하는 단계를 포함한다. 실시양태 57. 실시양태 53-56 중 어느 한 실시양태의 방법으로서, 이때 개체는 인간 또는 다른 동물이다. 실시양태 58. 실시양태 53-57 중 어느 한 실시양태의 방법으로서, 이때 방법은 조성물의 유효량을 개체에게 투여하는 단계를 포함한다. 실시양태 59. 실시양태 53-58 중 어느 한 실시양태의 방법으로서, 이때 병태는 개체 내에 노화 세포의 축적과 관련된 질환이다. 실시양태 60. 실시양태 53의 방법으로서, 이때 노화 세포의 축적과 관련된 질환은 에이징 피부를 포함한다. 실시양태 61. 실시양태 53-60 중 어느 한 실시양태의 방법으로서, 이때 조성물은 글리세린, 스쿠알렌, 소르비톨, 히알루론산, 히알루론산 유도체, 히알루론산나트륨, 히알루론산나트륨 가교중합체, 나이아신아마이드, 당단백질, 피롤리돈 카르복실산(PCA), 라이신 HCl, 알란토인 및 조류 추출물로 이루어지는 군으로부터 선택된 적어도 하나의 피부 수화제를 포함한다. 실시양태 62. 실시양태 53-61 중 어느 한 실시양태의 방법으로서, 이때 조성물은 식물성 오일, 미네랄 오일, 시어 버터, 코코아 버터, 펩트올라툼, 지방산, 트리글리세라이드, 벤조에이트, 미리스테이트, 팔미테이트, 스테아레이트, 당지질, 인지질, 스쿠알렌, 글리세린, 세라마이드 및 조류 추출물로 이루어지는 군으로부터 선택된 적어도 하나의 연화제를 포함한다. 실시양태 63. 실시양태 62의 방법으로서, 이때 식물성 오일은 로즈 힙 오일, 안디로바 오일, 포도씨유, 아보카도유, 자두씨유, 프라카씨 오일, 칼리코펠럼 스프루세아눔 오일, 아몬드유 및 아르간 오일로 이루어지는 군으로부터 선택된다. 실시양태 64. 실시양태 53-63 중 어느 한 실시양태의 방법으로서, 이때 조성물은 비타민 A, 비타민 D, 비타민 E, 비타민 F, 비타민 K, 비타민 B1(티아민), 비타민 B2(리보플라빈), 비타민 B3(나이아신), 비타민 B5(판토텐산), 비타민 B7(비오틴), 비타민 B6, 비타민 B12(시아노코발라민), 비타민 B9, 엽산, 나이아신아마이드, 또는 이들의 유도체로 이루어지는 군으로부터 선택된 적어도 하나의 비타민을 포함한다. 실시양태 65. 실시양태 53-64 중 어느 한 실시양태의 방법으로서, 이때 조성물은 약 500 nM 내지 약 500 μ M의 단리, 합성 또는 재조합 폴리펩타이드의 유효량을 포함한다. 실시양태 66. 실시양태 53-64 중 어느 한 실시양태의 방법으로서, 이때 조성물은 약 0.001% 내지 약 5% (w/w)의 단리, 합성 또는 재조합 폴리펩타이드의 유효량을 포함한다. 실시양태 67. 실시양태 53-66 중 어느 한 실시양태의 방법으로서, 이때 조성물은 진피 내로 단리, 합성 또는 재조합 폴리펩타이드의 10% 이하의 낮은 진피 투과를 달성하기 위해 제형화된다. 실시양태 68. 실시양태 53-67 중 어느 한 실시양태의 방법으로서, 이때 조성물은 조성물을 사용하기 이전과 비교하여 피부 상에 조성물을 사용한 이후의 사용자의 피부의 피부 수분 함량, 경표피 수분 손실(TEWL), 진피 두께 및 에코발생도, 피부내 분석, 피부 점탄성 특성, 또는 피부 표면 프로파일 중 적어도 하나를 개선시킨다. 실시양태 69. 실시양태 53-68 중 어느 한 실시양태의 방법으로서, 이때 조성물은 조성물을 사용하기 이전과 비교하여 피부 상에 조성물을 사용한 이후의 사용자의 피부의 라인/주름의 외관, 피부 톤(균일성)의 외관, 모공의 외관, 텍스처/평활도의 외관, 견고성(시각), 탄성(촉각), 표피 배리어, 피부 거칠기, 피부 과색소침착, 또는 전체적인 외관을 감소시킨다. 실시양태 70. 실시양태 53-69 중 어느

한 실시양태의 방법으로서, 이때 조성물을 이용하는 피부의 치료는 피부에 대한 에이징의 영향을 감소시키거나 치료한다. 실시양태 71. 실시양태 53-70 중 어느 한 실시양태의 방법으로서, 이때 조성물을 이용하는 피부의 치료는 피부에 대한 세포 노화의 영향을 감소시킨다. 실시양태 72. 실시양태 70-71 중 어느 한 실시양태의 방법으로서, 이때 에이징의 영향은 노화 관련 β -갈락토시다아제 활성 레벨, ATRX 병소/세포의 비율, p16 발현, IL-8 발현, Ki-67 발현, 히알루로닉 신타아제 2 발현, 매트릭스 메탈로프로테아제 1(MMP1) 발현, 시루투인 6(SIRT6) 발현, BLM 발현, 또는 엑소뉴클레아제 1(EXO1) 발현 중 적어도 하나에 의해 평가된다.

[0243]

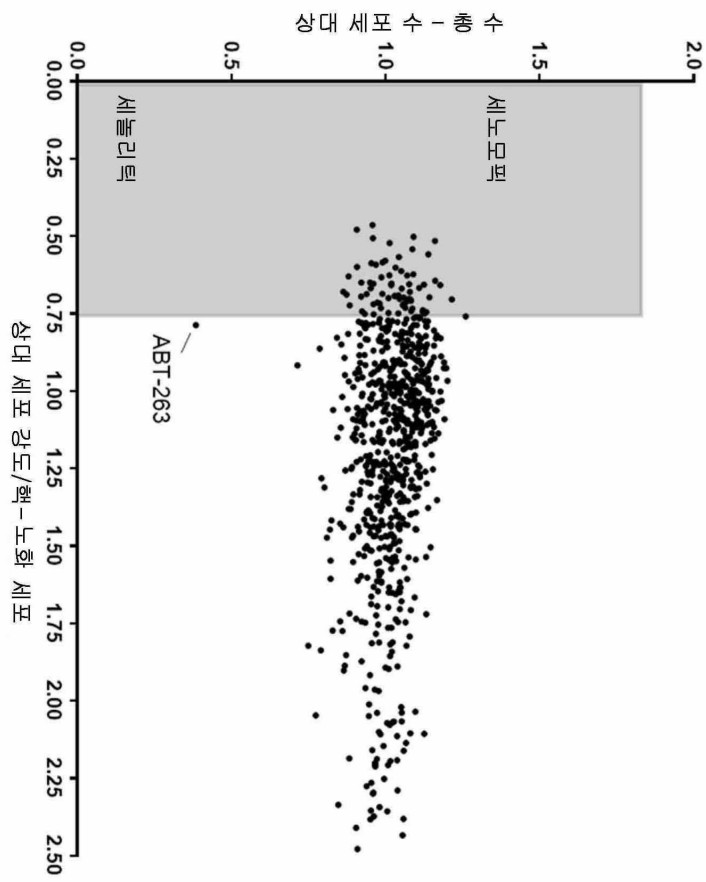
실시양태 73. 세포 노화의 감소가 필요한 개체에서 세포 노화를 감소시키는 방법으로서, 상기 방법은 개체에게, 선택적으로 하나의 보존적 아미노산 치환을 갖는 LKGI(서열번호 5)의 아미노산 서열을 포함하는 폴리펩타이드를 포함하는 조성물을 투여하는 단계를 포함하고, 폴리펩타이드는 100개 이하의 아미노산을 포함한다. 실시양태 74. 실시양태 73의 방법으로서, 이때 폴리펩타이드는 적어도 4개의 아미노산, 10개의 아미노산, 15개의 아미노산, 또는 20개의 아미노산을 포함한다. 실시양태 75. 실시양태 73의 방법으로서, 이때 조성물은 선택적으로 하나의 보존적 아미노산 치환을 갖는 WLKGI(서열번호 7)의 아미노산 서열을 포함한다. 실시양태 76. 실시양태 73의 방법으로서, 이때 조성물은 선택적으로 하나의 보존적 아미노산 치환을 갖는 LKGIL(서열번호 6)의 아미노산 서열을 포함한다. 실시양태 77. 실시양태 75 또는 실시양태 76의 방법으로서, 이때 폴리펩타이드는 적어도 5개의 아미노산, 10개의 아미노산, 15개의 아미노산, 또는 20개의 아미노산을 포함하고, 100개 이하의 아미노산을 포함한다. 실시양태 78. 실시양태 73-77 중 어느 한 실시양태의 방법으로서, 이때 조성물은 치료학적, 영양약학적 또는 미용학적 부형제를 추가로 포함한다. 실시양태 79. 세포 노화의 감소가 필요한 개체에서 세포 노화를 감소시키는 방법으로서, 상기 방법은 개체에게 실시양태 23-34 중 어느 한 실시양태의 적어도 하나의 폴리펩타이드를 포함하는 치료학적, 영양약학적 또는 미용학적 조성물을 투여하는 단계를 포함한다. 실시양태 80. 실시양태 79의 방법으로서, 이때 조성물은 치료학적, 영양약학적 또는 미용학적 부형제를 추가로 포함한다. 실시양태 81. 실시양태 79 또는 실시양태 80의 방법으로서, 이때 투여는 개체의 피부의 일부분에 조성물을 적용하는 단계를 포함한다. 실시양태 82. 실시양태 79-81 중 어느 한 실시양태의 방법으로서, 이때 조성물은 개체의 복수의 세포의 수명을 연장하고, 개체의 복수의 세포에서 SIRT6 발현을 유도하고, 개체의 복수의 세포에서 세포 재생 속도를 증가시키고, 개체의 복수의 세포에서 아포토시스를 촉진하고, 개체의 복수의 세포에서 DNA 수복을 촉진하고, 개체의 복수의 세포에서 콜라겐 생성을 증가시키고, 개체의 복수의 세포에서 히알루로닉 신타아제 생성을 증가시키고, 개체의 복수의 세포에서 ATRX 핵 병소(nuclear foci) 축적을 감소시키고, 개체의 복수의 세포에서 p16 발현을 감소시키고, 개체의 복수의 세포에서 노화 관련 베타-갈락토시다아제 생성을 감소시키고, 개체의 복수의 세포에서 IL8 발현을 감소시키고, 개체의 복수의 세포에서 MMP1 발현을 감소시키고, 개체의 복수의 세포에서 BLM 발현을 증가시키고, 및/또는 개체의 복수의 세포에서 UV 유도된 DNA 손상을 방지한다.

[0244]

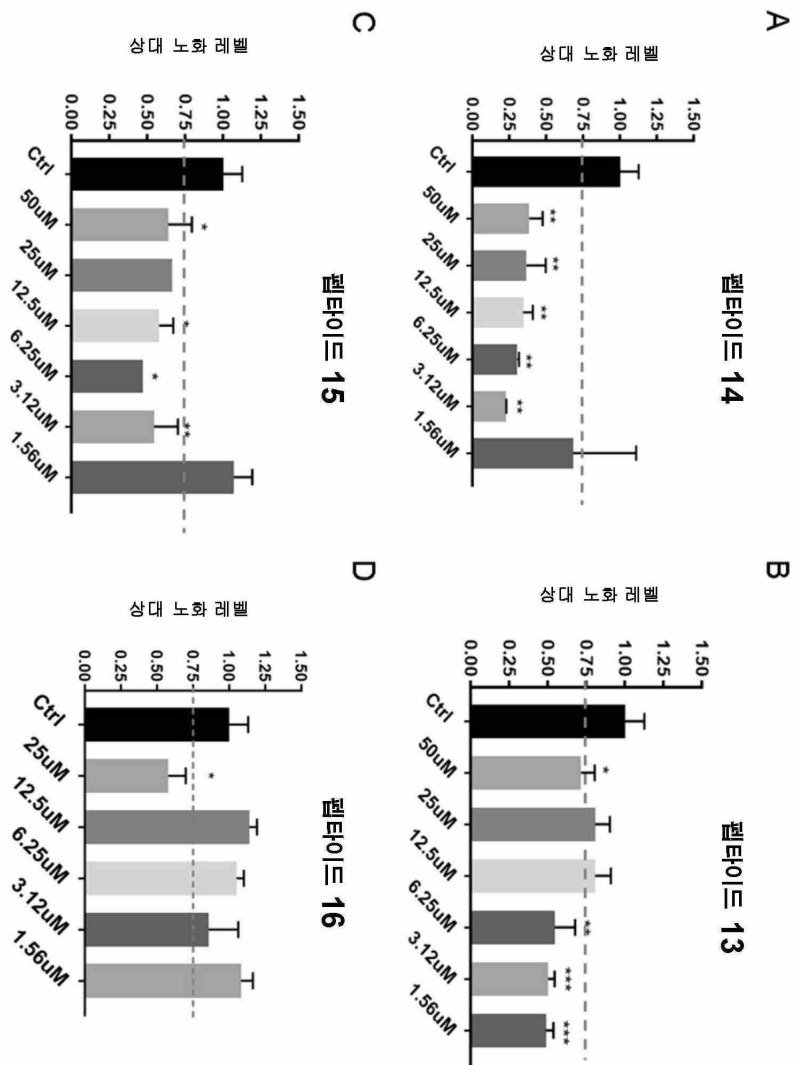
실시양태 83은 병태의 치료가 필요한 개체에서 병태를 치료하는 방법으로서, 상기 방법은 개체에게, 선택적으로 하나의 보존적 아미노산 치환을 갖는 서열번호 5의 아미노산 서열을 포함하는 치료학적, 영양약학적 또는 미용학적 조성물을 투여하는 단계를 포함한다. 실시양태 84. 실시양태 83의 방법으로서, 이때 치료학적, 영양약학적 또는 미용학적 조성물은 선택적으로 하나의 보존적 아미노산 치환을 갖는 서열번호 6의 아미노산 서열을 포함한다. 실시양태 85. 실시양태 83 또는 실시양태 84의 방법으로서, 이때 치료학적, 영양약학적 또는 미용학적 조성물은 선택적으로 하나의 보존적 아미노산 치환을 갖는 서열번호 7의 아미노산 서열을 포함한다.

도면

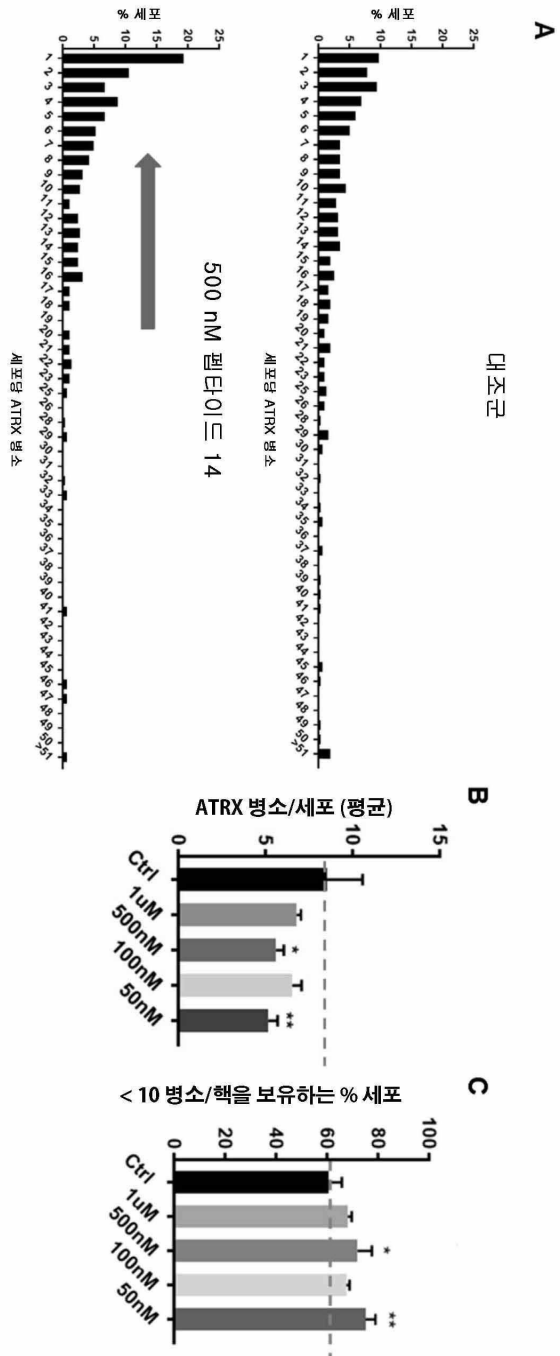
도면1



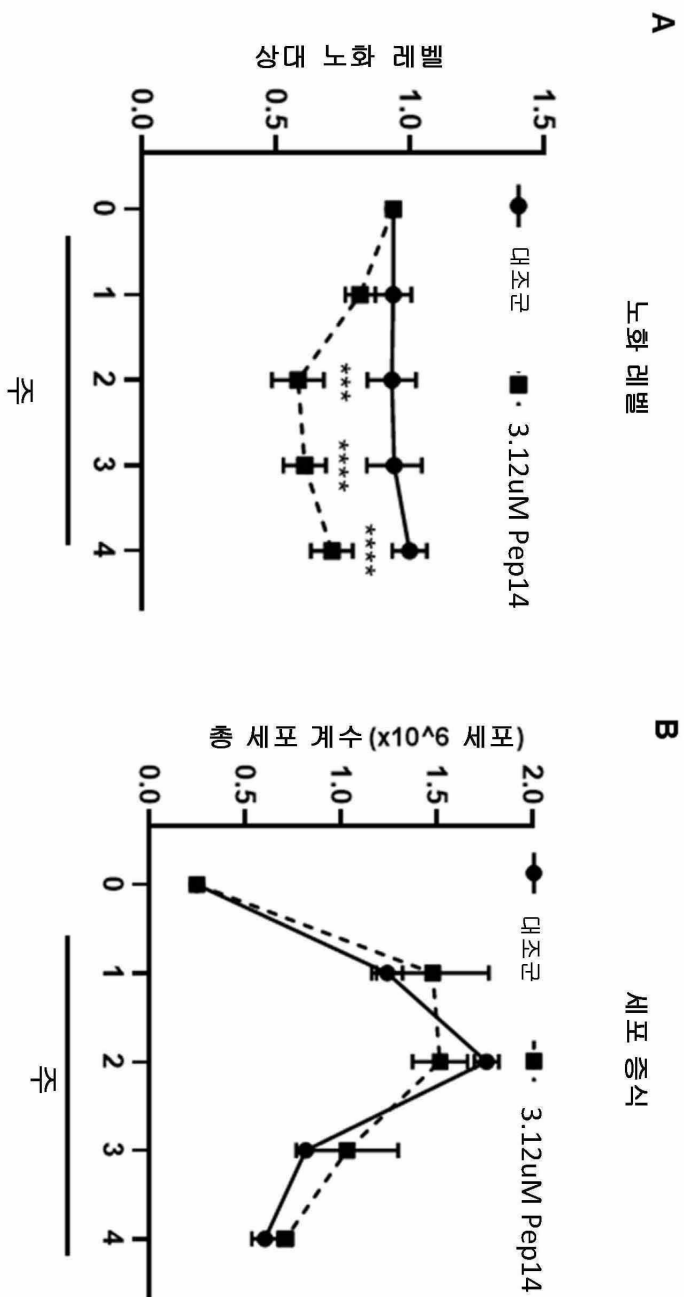
도면2



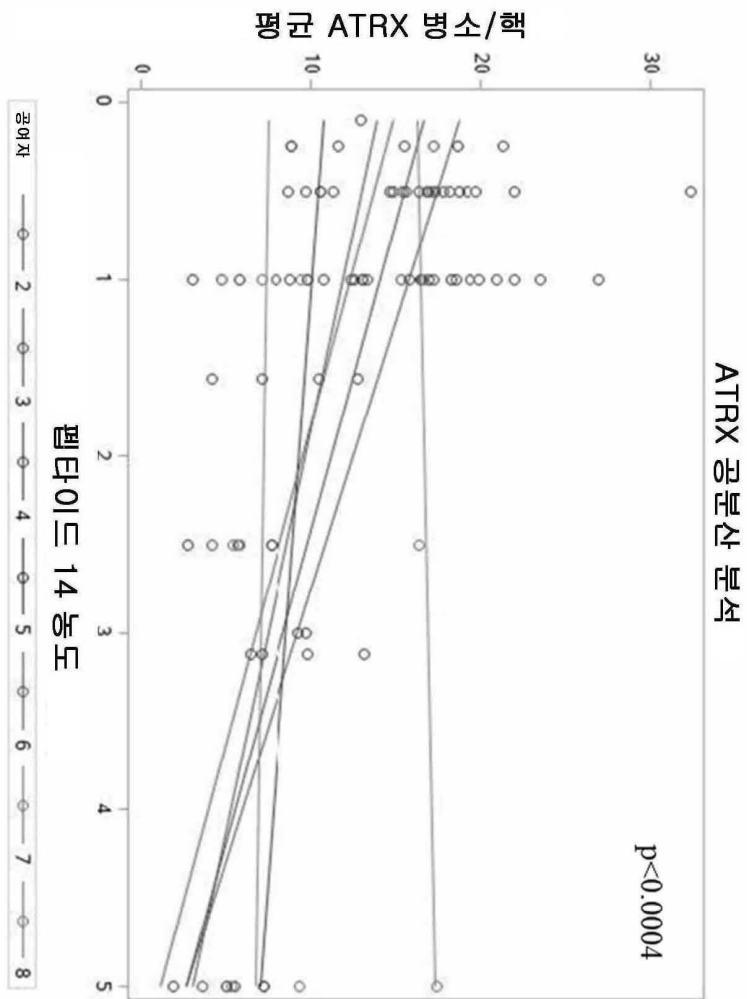
도면3



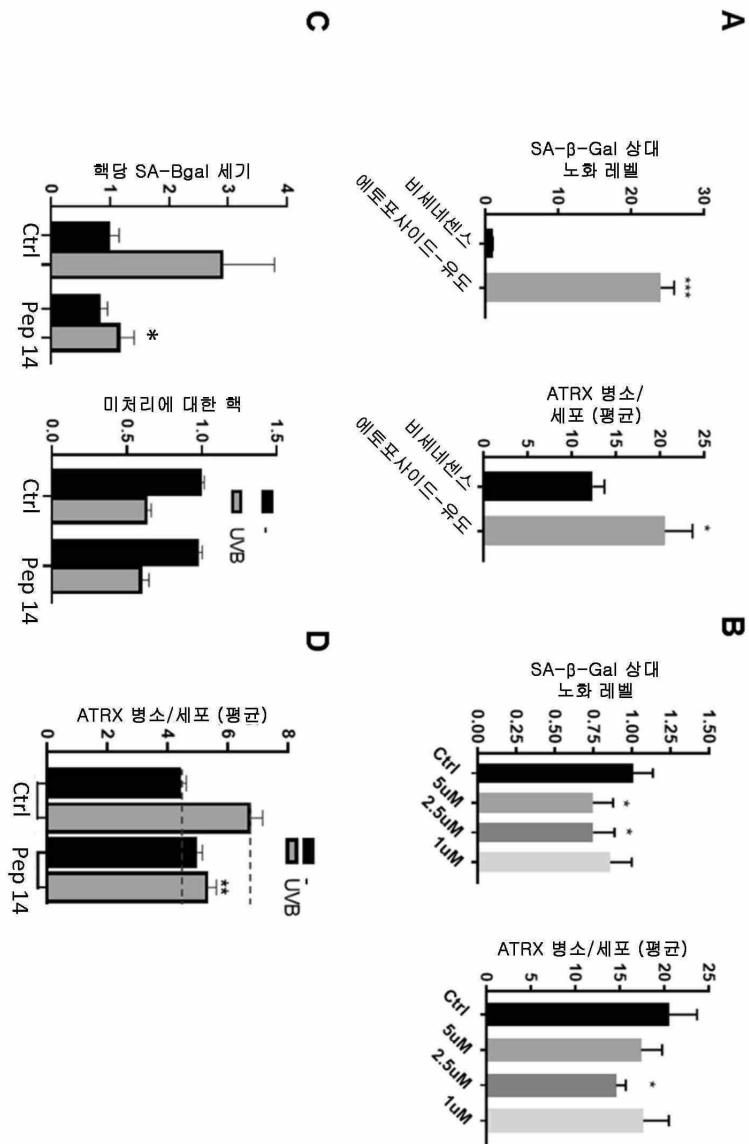
도면4



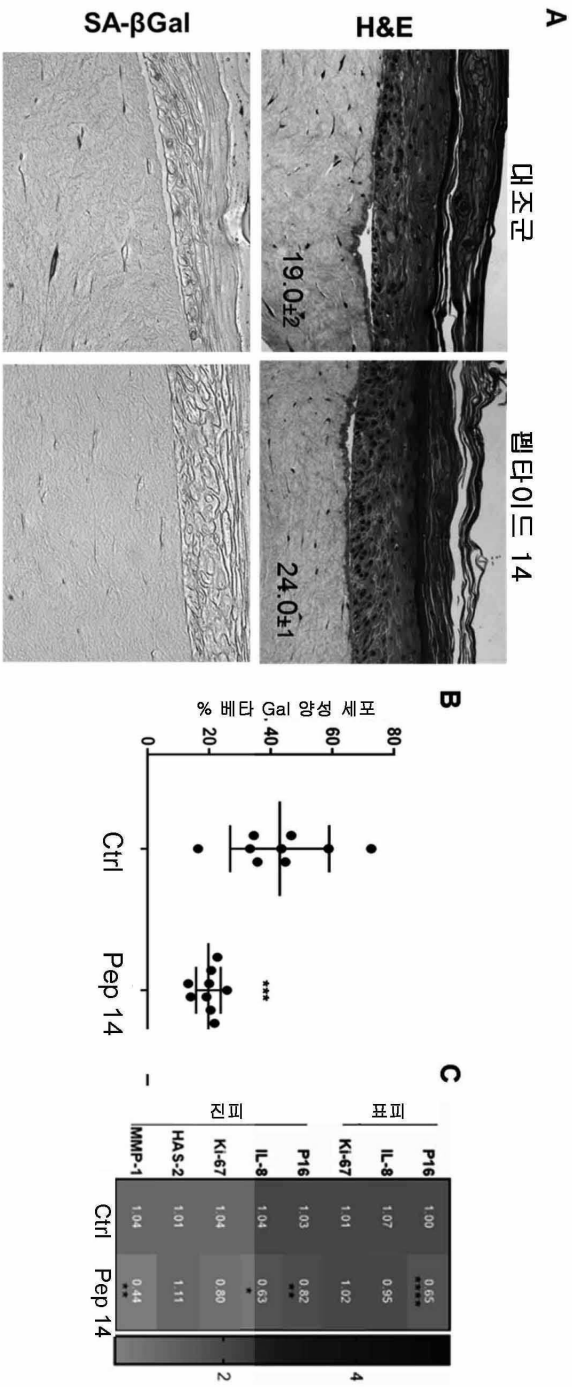
도면5



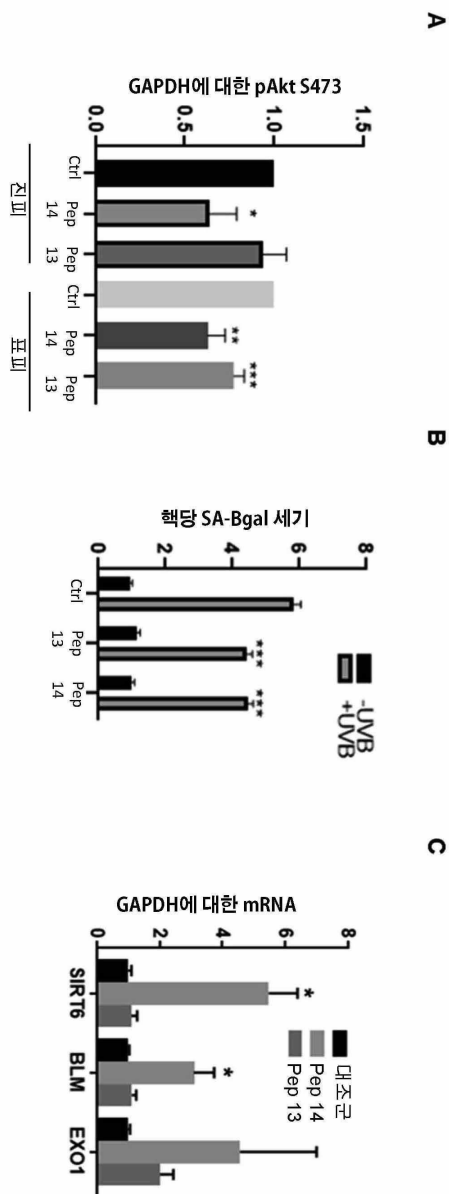
도면6



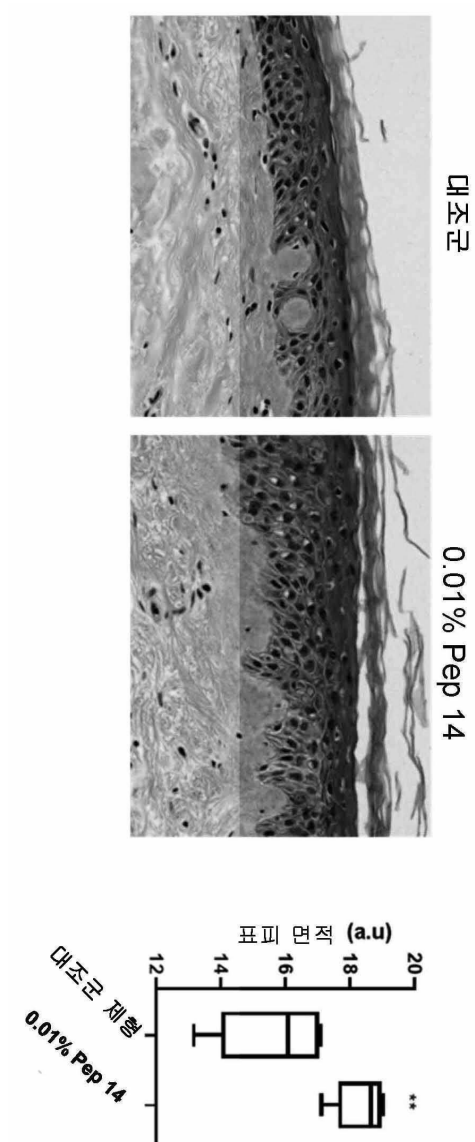
도면7



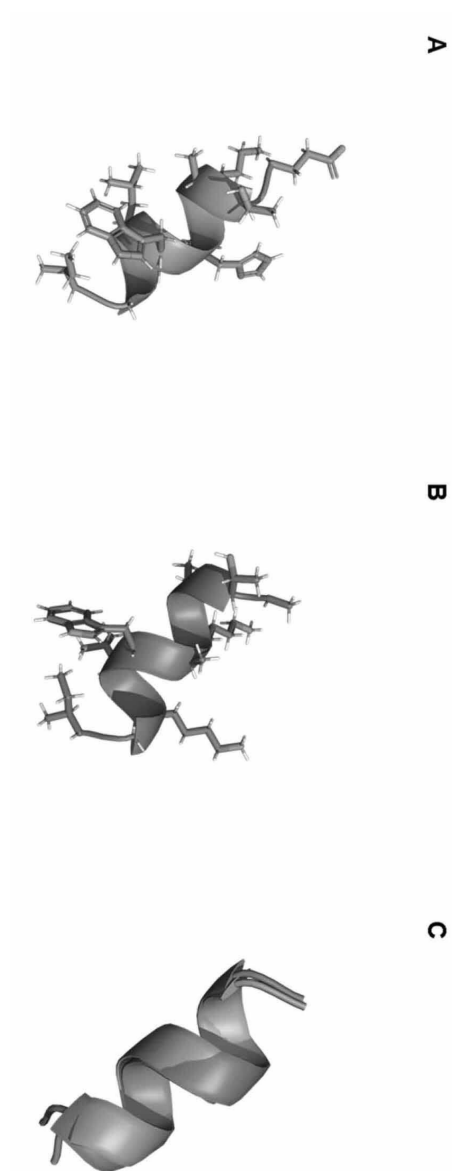
도면8



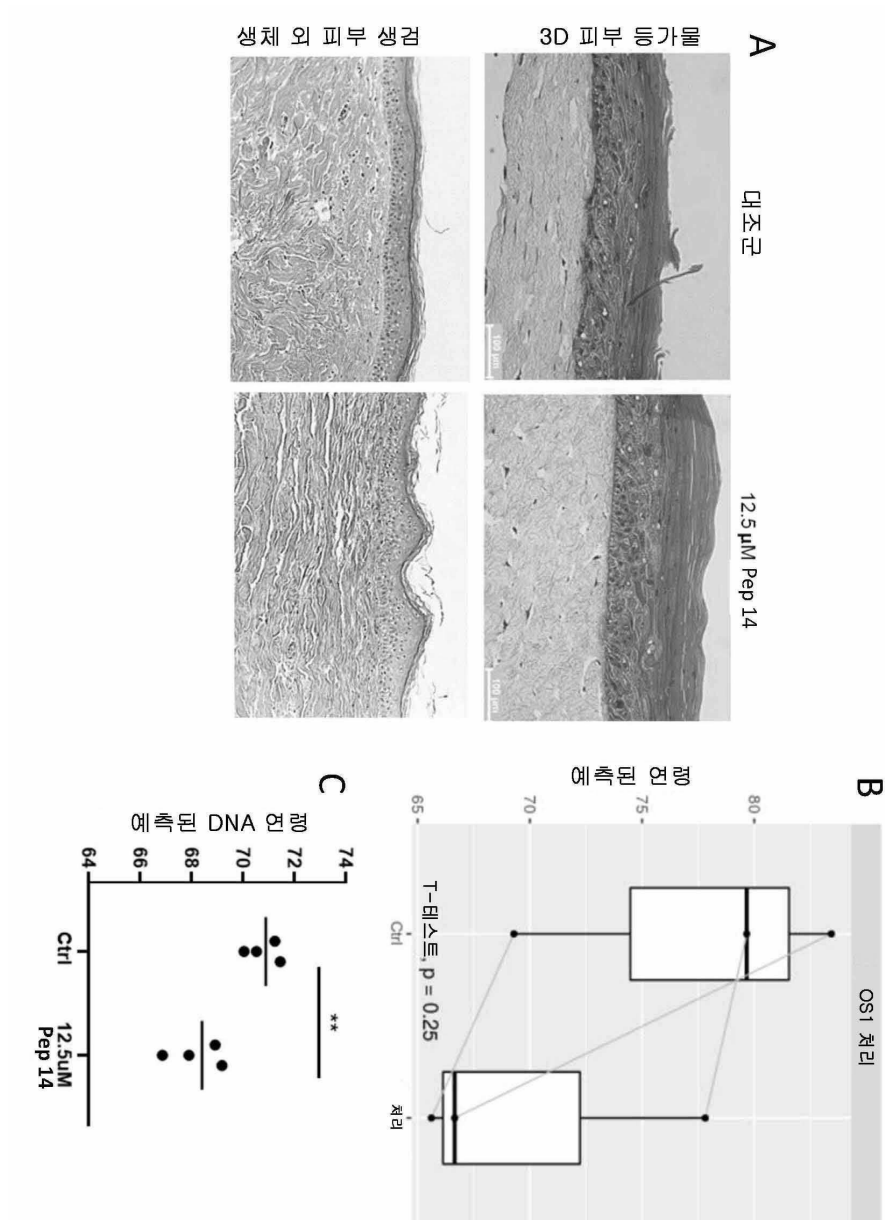
도면9



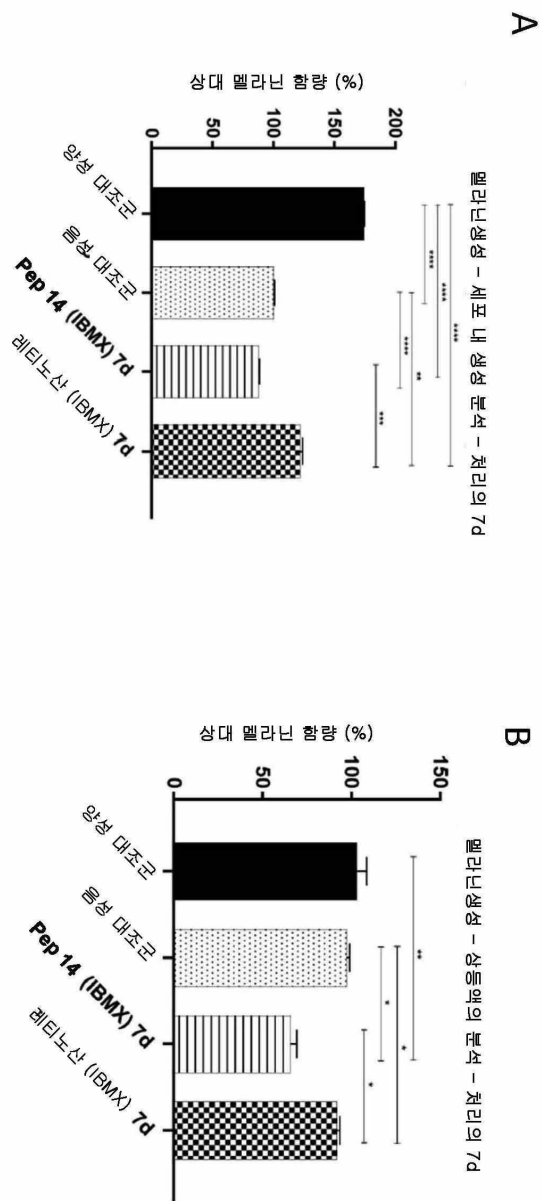
도면10



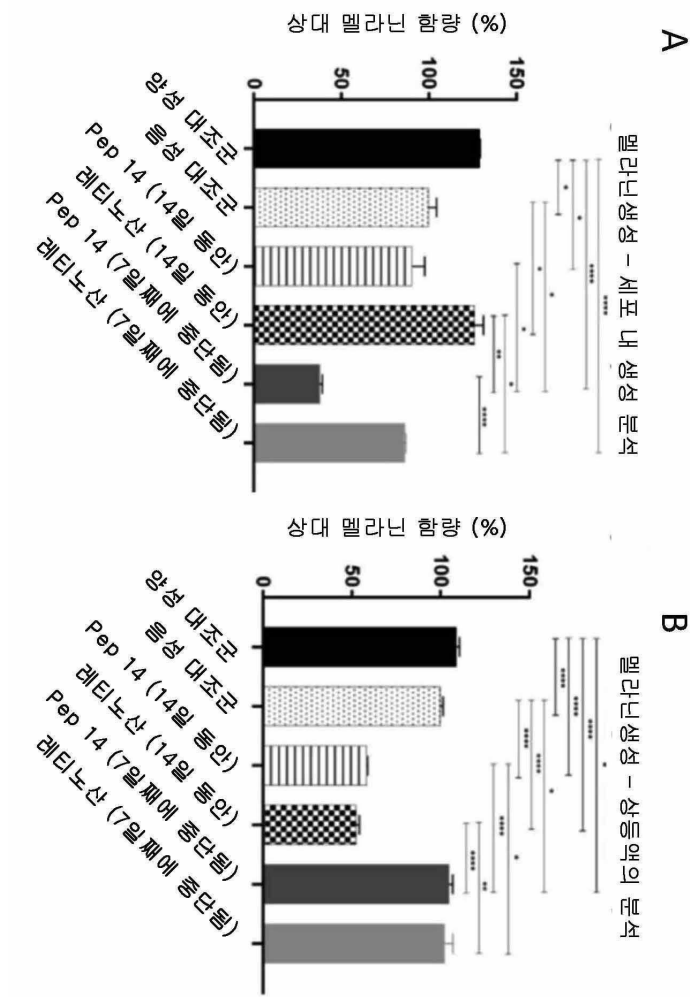
도면11



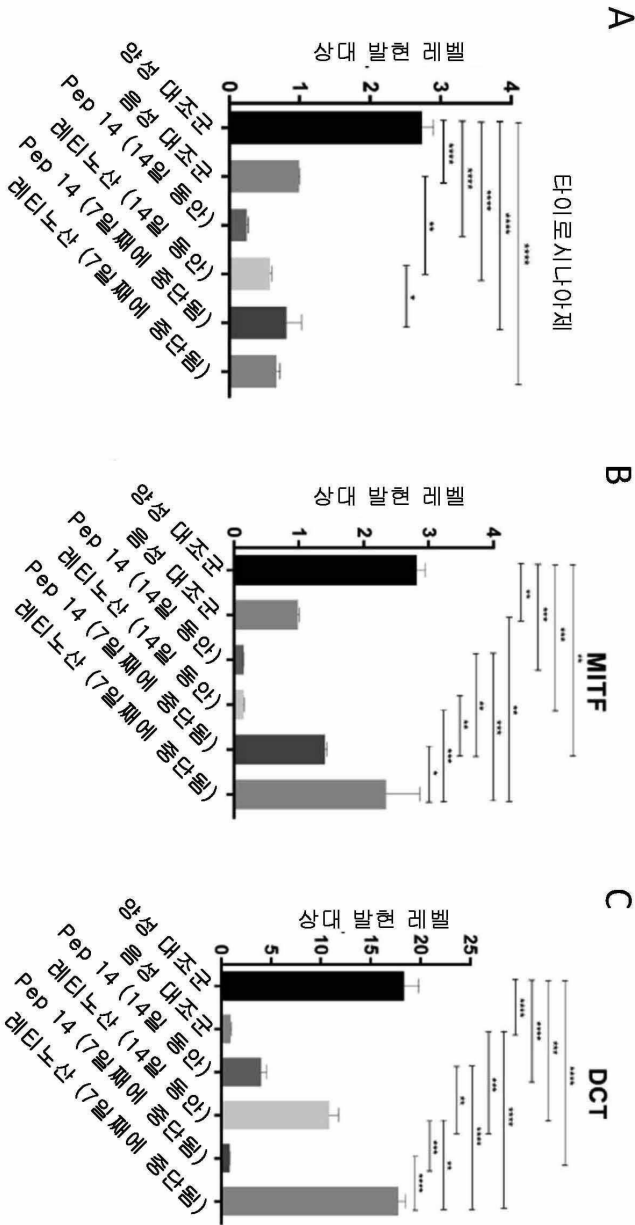
도면12



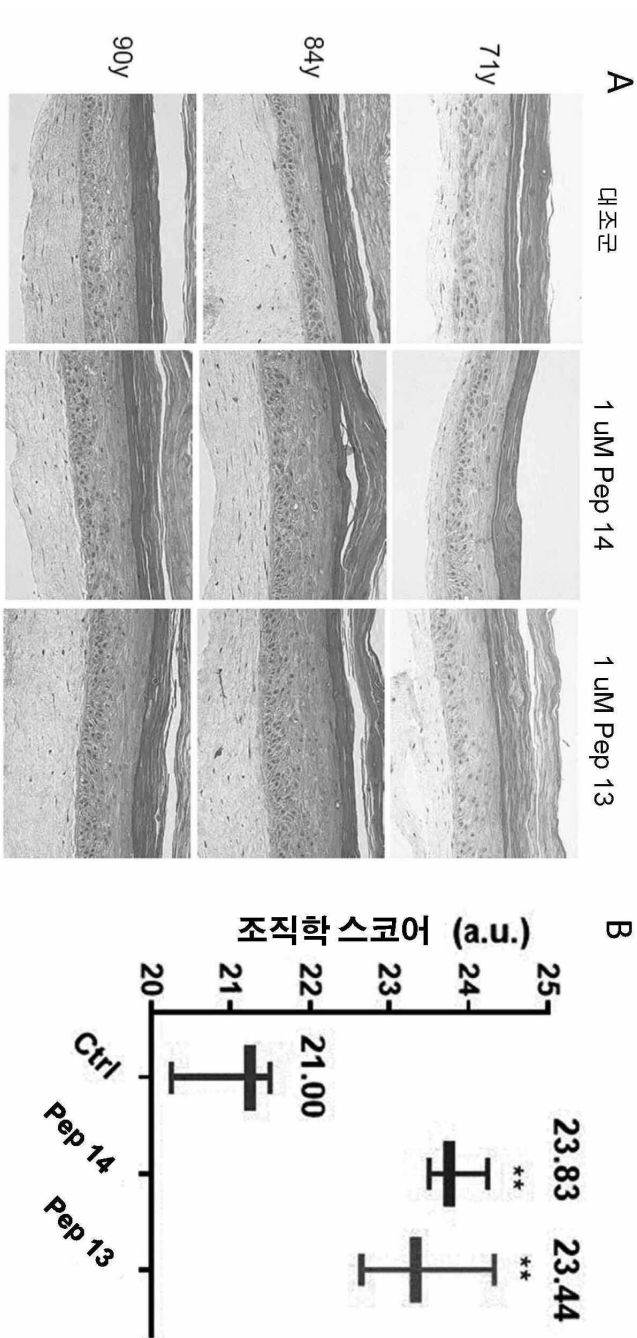
도면13



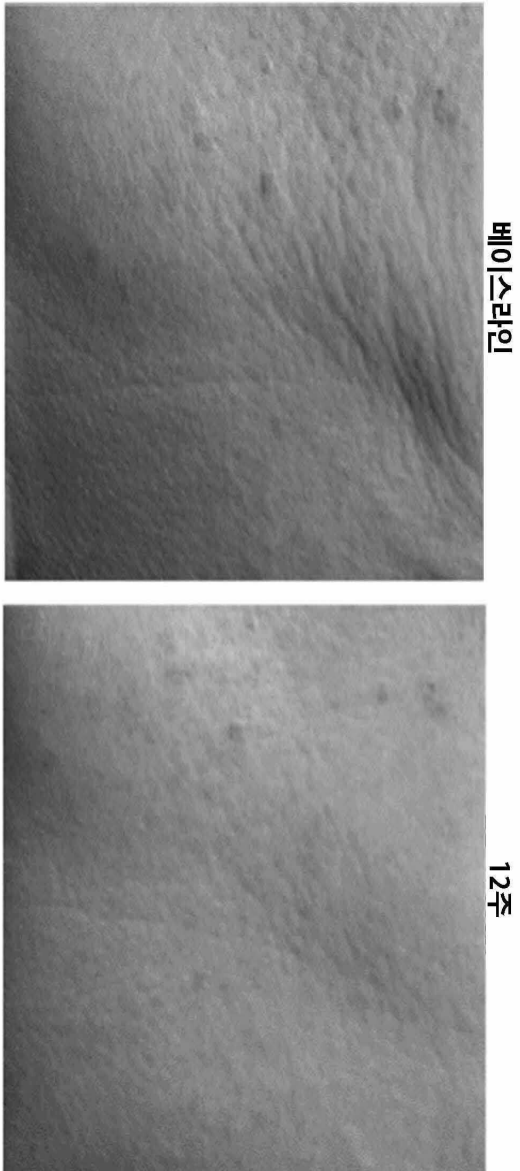
도면14



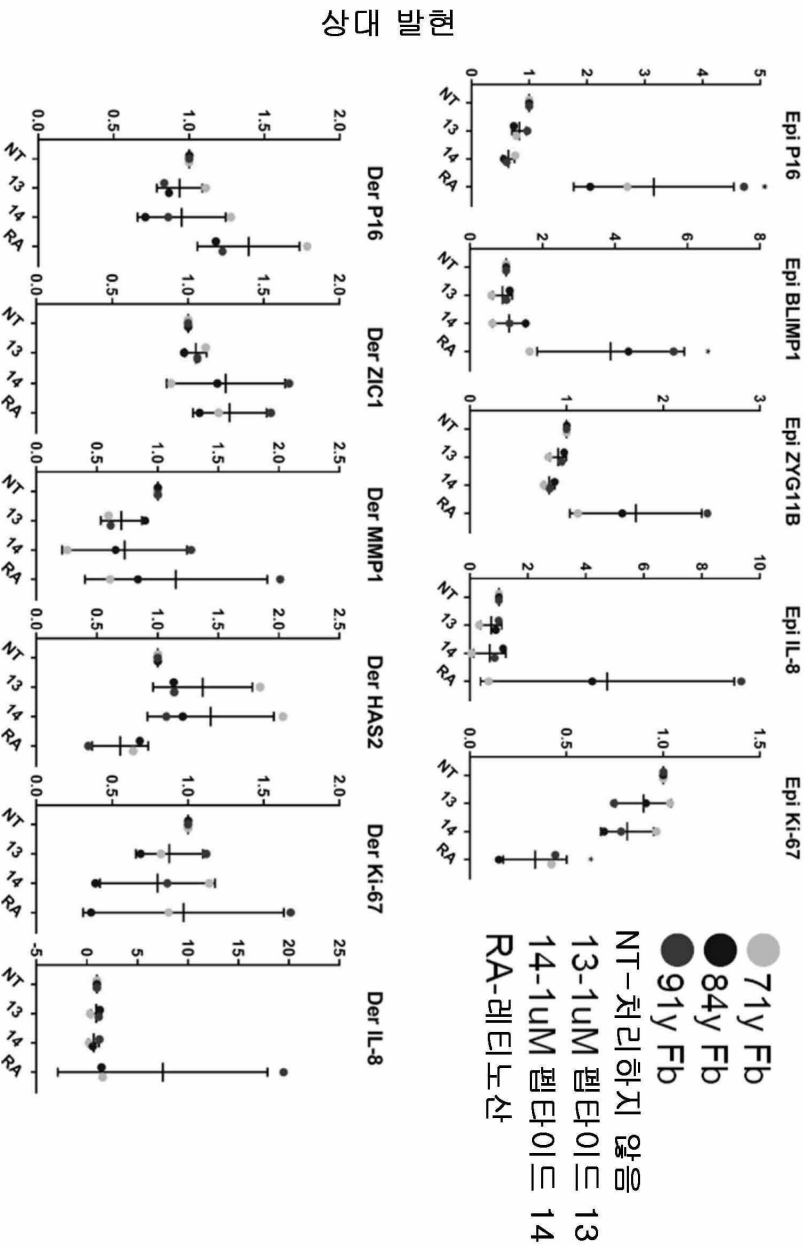
도면15



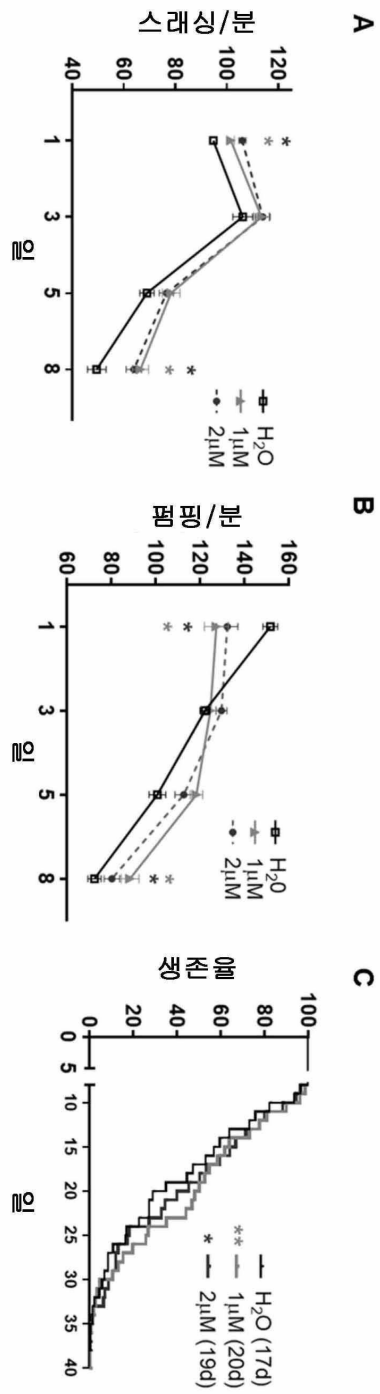
도면16



도면17



도면18



도면19

