



(19) 대한민국특허청(KR)
(12) 공개특허공보(A)

(11) 공개번호 10-2007-0112827
(43) 공개일자 2007년11월27일

(51) Int. Cl.

C12Q 1/68 (2006.01)

(21) 출원번호 10-2007-7022263

(22) 출원일자 2007년09월28일

심사청구일자 없음

번역문제출일자 2007년09월28일

(86) 국제출원번호 PCT/US2006/007362

국제출원일자 2006년02월28일

(87) 국제공개번호 WO 2006/094093

국제공개일자 2006년09월08일

(30) 우선권주장

60/657,494 2005년03월01일 미국(US)

(71) 출원인

이 아이 듀폰 디 네모아 앤드 캄파니

미합중국 데라웨어주 (우편번호 19898) 월밍톤시
마아캣트 스트리트 1007

(72) 발명자

왕, 홍

미국 19348 펜실베이니아주 케넷 스퀘어 카지오 코
트 605

우, 잉

미국 19806 펜실베이니아주 윌링포드 스콧 레인 717

오브리언, 존, 피.

미국 19363 펜실베이니아주 옥스포드 새기노 로드
971

(74) 대리인

김영, 양영준

전체 청구항 수 : 총 45 항

(54) 피부 관리 조성물-저항성 피부-결합 펩티드의 확인 방법

(57) 요약

본 발명은 피부 관리 조성물-저항성 피부-결합 펩티드를 확인하기 위한 방법에 관한 것이다. 피부 관리 조성물-저항성 피부-결합 펩티드는 피부 관리 조성물 매트릭스로부터 피부에 강하게 결합하며, 그 내에서 안정하다. 피부 관리 조성물-저항성 피부 결합 펩티드를 기초로 하는 펩티드계 피부 유익제, 예컨대 피부 컨디셔너 및 피부 착색제를 기재한다. 펩티드계 피부 컨디셔너 및 피부 착색제는 직접 또는 임의로 스페이서를 통해 피부 컨디셔너 또는 착색제에 커플링된 피부 관리 조성물-저항성 피부-결합 펩티드로 구성된다. 이러한 펩티드계 피부 관리 조성물 및 착색제를 포함하는 피부 관리 및 피부 착색 제품 조성물 또한 기재한다.

특허청구의 범위

청구항 1

- a) DNA 회합된 펩티드의 조합 라이브러리를 제공하는 단계;
- b) (a)의 라이브러리를 피부 샘플과 접촉시켜 피부가 DNA 회합된 펩티드와 복합체를 형성함으로써 DNA 회합된 펩티드-피부 복합체를 포함하는 반응 용액을 형성하는 단계;
- c) 반응 용액으로부터 (b)의 DNA 회합된 펩티드-피부 복합체를 분리하는 단계;
- d) (c)의 분리된 DNA 회합된 펩티드-피부 복합체를 피부 관리 조성물 매트릭스와 접촉시켜, 펩티드-피부 복합체-조성물 혼합물을 형성하며, 여기서 피부 관리 조성물 매트릭스의 농도는 완전 강도 농도의 약 10% 이상인 단계;
- e) 펩티드-피부 복합체-조성물 혼합물로부터 (d)의 DNA 회합된 펩티드-피부 복합체를 분리하는 단계;
- f) (e)의 DNA 회합된 펩티드-피부 복합체의 펩티드 부분을 코딩하는 DNA를 증폭시키는 단계; 및
- g) 피부 관리 조성물 저항성 피부-결합 펩티드를 코딩하는 (f)의 증폭된 DNA를 서열결정하며, 여기서 피부 관리 조성물-저항성 피부-결합 펩티드가 확인되는 것인 단계를 포함하는, 피부 관리 조성물-저항성 피부-결합 펩티드의 확인 방법.

청구항 2

제1항에 있어서, 단계 (e) 이후

- i) DNA 회합된 펩티드-피부 복합체의 펩티드를 용리제와 접촉시켜, 이에 의해 DNA 회합된 펩티드의 일부는 피부로부터 용리되고, DNA 회합된 펩티드의 일부는 복합체로 남아 있으며;
- ii) (i)의 용리되거나 또는 복합체화된 DNA 회합된 펩티드를 단계 (f) 및 (g)에 적용시키는 방법.

청구항 3

제1항 또는 제2항에 있어서, 펩티드를 코딩하는 DNA를

- a) 중합효소 연쇄 반응; 및
- b) 펩티드를 코딩하는 DNA를 포함하는 파지로 숙주 세포를 감염시키고, 상기 숙주 세포를 적절한 성장 배지에서 성장시키는 방법

으로 이루어진 군으로부터 선택된 방법에 의해 증폭시키는 방법.

청구항 4

제1항 또는 제2항에 있어서, 단계 (f)의 증폭된 DNA를 신선한 피부 샘플과 접촉시키고, 단계 (b) 내지 (f)를 1회 이상 반복하여 펩티드를 코딩하는 방법.

청구항 5

제1항에 있어서, 단계 (d)를 1회 이상 반복하는 방법.

청구항 6

제1항에 있어서, DNA 회합된 펩티드의 조합 라이브러리를 피부 관리 조성물 매트릭스에 제공하고, 피부 샘플과 접촉시켜, DNA 회합된 펩티드-피부 복합체를 포함하는 반응 용액을 형성하며, 여기서 피부 관리 조성물 매트릭스의 농도는 완전 강도 농도의 약 10% 이상인 방법.

청구항 7

제1항에 있어서, DNA 회합된 펩티드의 조합 라이브러리를 피부 관리 조성물 매트릭스에 제공하고, 피부 샘플과 접촉시켜, DNA 회합된 펩티드-피부 복합체를 포함하는 반응 용액을 형성하며, 여기서 피부 관리 조성물 매트릭

스의 농도는 완전 강도 농도의 약 10% 이상이며, 단계 (d) 및 (e)가 임의로 삭제된 방법.

청구항 8

제1항에 있어서, DNA 회합된 펩티드의 조합 라이브러리가 파지 디스플레이, 박테리아 디스플레이 및 효모 디스플레이로 이루어진 군으로부터 선택된 방법에 의해 생성되는 방법.

청구항 9

제1항에 있어서, DNA 회합된 펩티드의 조합 라이브러리를 피부 샘플과의 접촉 이전에 또는 접촉과 동시에 비-표적과 임의로 접촉시켜, 비-표적에 결합하는 펩티드를 제거하는 방법.

청구항 10

제1항에 있어서, 피부 관리 조성물 매트릭스의 농도가 완전 강도 농도의 약 20% 이상인 방법.

청구항 11

제1항에 있어서, 피부 관리 조성물 매트릭스의 농도가 완전 강도 농도의 약 50% 이상인 방법.

청구항 12

제1항에 있어서, 피부 관리 조성물 매트릭스의 농도가 완전 강도 농도의 약 75% 이상인 방법.

청구항 13

제1항에 있어서, 피부 관리 조성물 매트릭스가 비회석된 것인 방법.

청구항 14

제2항에 있어서, 용리제가 산, 염기, 염 용액, 물, 에틸렌 글리콜, 디옥산, 티오시아네이트, 구아니딘 및 우레아로 이루어진 군으로부터 선택된 것인 방법.

청구항 15

제1항에 있어서, 피부 관리 조성물 매트릭스가 피부 컨디셔닝 제품인 방법.

청구항 16

제1항에 있어서, 피부 관리 조성물 매트릭스가 피부 클렌징 제품인 방법.

청구항 17

- a) DNA 회합된 펩티드의 조합 라이브러리를 제공하는 단계;
- b) (a)의 라이브러리를 피부 샘플과 접촉시켜 피부가 DNA 회합된 펩티드와 복합체를 형성함으로써 DNA 회합된 펩티드-피부 복합체를 포함하는 반응 용액을 형성하는 단계;
- c) 반응 용액으로부터 (b)의 DNA 회합된 펩티드-피부 복합체를 분리하는 단계;
- d) (c)의 분리된 DNA 회합된 펩티드-피부 복합체를 피부 관리 조성물 매트릭스와 접촉시켜 펩티드-피부 복합체-조성물 혼합물을 형성하며, 여기서 피부 관리 조성물 매트릭스의 농도는 완전 강도 농도의 약 10% 이상인 단계;
- e) 펩티드-피부 복합체-조성물 혼합물로부터 (d)의 DNA 회합된 펩티드-피부 복합체를 분리하는 단계;
- f) (e)의 DNA 회합된 펩티드-피부 복합체의 펩티드 부분을 코딩하는 DNA를 증폭시키는 단계; 및
- g) 피부 관리 조성물-저항성 피부-결합 펩티드를 코딩하는 (f)의 증폭된 DNA를 서열결정하며, 여기서 컨디셔너-저항성 피부-결합 펩티드가 확인되는 것인 단계

를 포함하는 방법에 의해 확인되는 피부 관리 조성물-저항성 피부-결합 펩티드.

청구항 18

서열 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, 20, 21, 22, 23, 24, 25 및 27로 이루어진 군으로부터 선택된 피부 관리 조성물-저항성 피부-결합 펩티드.

청구항 19

화학식 $(SCP_m)_n-BA$

(식 중,

- a) SCP는 피부 관리 조성물-저항성 피부-결합 펩티드이고;
- b) BA는 유익제이고;
- c) m은 1 내지 약 100의 범위이고;
- d) n은 1 내지 약 50,000의 범위임)

를 갖는 2중 블록 펩티드계 피부 유익제.

청구항 20

화학식 $[(SCP_x-S)_m]_n-BA$

(식 중,

- a) SCP는 피부 관리 조성물-저항성 피부-결합 펩티드이고;
- b) BA는 유익제이고;
- c) S는 스페이서이고;
- d) x는 1 내지 약 10의 범위이고;
- e) m은 1 내지 약 100의 범위이고;
- f) n은 1 내지 약 50,000의 범위임)

를 갖는 3중 블록 펩티드계 피부 유익제.

청구항 21

제19항에 있어서, 유익제가 피부 컨디셔닝제인 2중 블록 펩티드계 유익제.

청구항 22

제20항에 있어서, 유익제가 피부 컨디셔닝제인 3중 블록 펩티드계 유익제.

청구항 23

제19항에 있어서, 유익제가 착색제인 2중 블록 펩티드계 유익제.

청구항 24

제20항에 있어서, 유익제가 착색제인 3중 블록 펩티드계 유익제.

청구항 25

제19항 내지 제24항 중 어느 한 항에 있어서, 피부 관리 조성물-저항성 피부-결합 펩티드가

- a) DNA 회합된 펩티드의 조합 라이브러리를 제공하는 단계;
- b) (a)의 라이브러리를 피부 샘플과 접촉시켜 피부가 DNA 회합된 펩티드와 복합체를 형성함으로써 DNA 회합된 펩티드-피부 복합체를 포함하는 반응 용액을 형성하는 단계;
- c) 반응 용액으로부터 (b)의 DNA 회합된 펩티드-피부 복합체를 분리하는 단계;
- d) (c)의 분리된 DNA 회합된 펩티드-피부 복합체를 피부 관리 조성물 매트릭스와 접촉시켜 펩티드-피부 복합체-

조성물 혼합물을 형성하며, 여기서 피부 관리 조성물 매트릭스의 농도는 완전 강도 농도의 약 10% 이상인 단계;

e) 펩티드-피부 복합체-조성물 혼합물로부터 (d)의 DNA 회합된 펩티드-피부 복합체를 분리하는 단계;

f) (e)의 DNA 회합된 펩티드-피부 복합체의 펩티드 부분을 코딩하는 DNA를 증폭시키는 단계; 및

g) 피부 관리 조성물-저항성 피부-결합 펩티드를 코딩하는 (f)의 증폭된 DNA를 서열결정하며, 여기서 피부 관리 조성물-저항성 피부-결합 펩티드가 확인되는 것인 단계

를 포함하는 방법에 의해 분리되는 것인 펩티드계 유익제.

청구항 26

제19항 내지 제24항 중 어느 한 항에 있어서, 피부 관리 조성물-저항성 피부-결합 펩티드가 약 7개 아미노산 내지 약 25개 아미노산 길이인 펩티드계 유익제.

청구항 27

제19항 내지 제24항 중 어느 한 항에 있어서, 피부 관리 조성물-저항성 피부-결합 펩티드가 약 12개 아미노산 내지 약 20개 아미노산 길이인 펩티드계 유익제.

청구항 28

제19항 내지 제24항 중 어느 한 항에 있어서, 피부 관리 조성물-저항성 피부-결합 펩티드가 펩티드의

a) N-말단; 및

b) C-말단

으로 이루어진 군으로부터 선택된 적어도 한쪽 말단에서 하나 이상의 시스테인 잔기를 더 포함하는 것인 펩티드계 유익제.

청구항 29

제19항 내지 제24항 중 어느 한 항에 있어서, 피부 관리 조성물-저항성 피부-결합 펩티드가 펩티드의

a) N-말단; 및

b) C-말단

으로 이루어진 군으로부터 선택된 적어도 한쪽 말단에서 하나 이상의 리신 잔기를 더 포함하는 것인 펩티드계 유익제.

청구항 30

제19항 내지 제24항 중 어느 한 항에 있어서, 피부 관리 조성물-저항성 피부-결합 펩티드가 서열 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, 20, 21, 22, 23, 24, 25 및 27로 이루어진 군으로부터 선택된 아미노산 서열을 갖는 것인 펩티드계 유익제.

청구항 31

제21항 또는 제22항에 있어서, 피부 컨디셔닝제가 폴리살리실레이트, 프로필렌 글리콜, 글리세린, 글리콜산, 락트산, 말산, 시트르산, 타르타르산, 글루카르산, 갈락타르산, 3-히드록시발레르산, 살리실산 및 1,3 프로판디올로 이루어진 군으로부터 선택된 것인 펩티드계 유익제.

청구항 32

제23항 또는 제24항에 있어서, 착색제가 D&C 레드 21번, D&C 레드 27번, D&C 레드 오렌지 5번, D&C 레드 21번, D&C 오렌지 10번, 이산화티탄, 산화아연, D&C 레드 36번, D&C 오렌지 17번, D&C 레드 7, 11, 31 및 34번의 칼슘 레이크, D&C 레드 12번의 바륨 레이크, D&C 레드 13번의 스트론튬 레이크, FD&C 옐로우 5번의 알루미늄 레이크, FD&C 옐로우 6번의 알루미늄 레이크, D&C 레드 27번의 알루미늄 레이크, D&C 레드 21번의 알루미늄 레이크, FD&C 블루 1번의 알루미늄 레이크, 산화철, 망간 바이올렛, 산화크롬, 울트라마린 블루, 카본 블랙, 디히드록시

아세톤 및 착색된 미소구체로 이루어진 군으로부터 선택된 것인 펩티드계 유익제.

청구항 33

제32항에 있어서, 착색된 미소구체가 폴리스티렌, 폴리메틸메타크릴레이트, 폴리비닐톨루엔, 스티렌/부타디엔 공중합체 및 라텍스로 이루어진 군으로부터 선택된 물질로 구성되며, 여기서 미소구체는 약 10 나노미터 내지 약 2 마이크로미터의 직경을 갖는 것인 펩티드계 유익제.

청구항 34

제20항, 제22항 및 제24항 중 어느 한 항에 있어서, 스페이서가 에탄올 아민, 에틸렌 글리콜, 6개 탄소 원자의쇄 길이를 갖는 폴리에틸렌, 3 내지 6개 반복 단위를 갖는 폴리에틸렌 글리콜, 페녹시에탄올, 프로판올아미드, 부틸렌 글리콜, 부틸렌글리콜아미드, 프로필 페닐, 에틸 알킬 설퍼, 프로필 알킬 설퍼, 헥실 알킬 설퍼, 스테릴 알킬 설퍼, 세틸 알킬 설퍼 및 팔미토일 알킬 설퍼로 이루어진 군으로부터 선택된 것인 펩티드계 유익제.

청구항 35

제20항, 제22항 및 제24항 중 어느 한 항에 있어서, 스페이서가 프롤린, 리신, 글리신, 알라닌, 세린 및 이들의 혼합물로 이루어진 군으로부터 선택된 아미노산을 포함하는 펩티드인 펩티드계 유익제.

청구항 36

제20항, 제22항 및 제24항 중 어느 한 항에 있어서, 스페이서가 서열 1, 서열 5, 서열 6 및 서열 7로 이루어진 군으로부터 선택된 아미노산 서열을 포함하는 펩티드인 펩티드계 유익제.

청구항 37

유효량의 제19항 또는 제20항의 펩티드계 유익제를 포함하는 피부 관리 제품 조성물.

청구항 38

유효량의 제21항 또는 제22항의 펩티드계 유익제를 포함하는 피부 컨디셔닝 제품 조성물.

청구항 39

유효량의 제23항 또는 제24항의 펩티드계 유익제를 포함하는 피부 착색 제품 조성물.

청구항 40

유효량의 제21항 또는 제22항의 펩티드계 유익제를 포함하는 피부 착색 제품 조성물.

청구항 41

유효량의 제21항 또는 제22항의 펩티드계 유익제를 포함하는 피부 클렌징 제품 조성물.

청구항 42

제38항의 조성물을 피부에 도포하고, 보호 층을 형성하도록 하는 것을 포함하는, 피부에 펩티드계 컨디셔너의 보호 층을 형성하는 방법.

청구항 43

피부의 착색을 유발하기에 충분한 시간 동안 제39항의 조성물을 피부에 도포하는 것을 포함하는, 피부의 착색 방법.

청구항 44

a) i) $(SCP_m)_n-C$; 및

ii) $[(SCP_X-S)_m]_n-C$

(여기서,

- 1) SCP는 피부 관리 조성물-저항성 피부-결합 펩티드이고;
- 2) C는 착색제이고;
- 3) n은 1 내지 약 50,000의 범위이고;
- 4) S는 스페이서이고;
- 5) m은 1 내지 약 100의 범위이고;
- 6) x는 1 내지 약 10의 범위임)

로 이루어진 군으로부터 선택된 피부 착색제를 포함하는 피부 착색 조성물을 제공하며,

여기서, 피부 관리 조성물-저항성 피부-결합 펩티드는

- A) DNA 회합된 펩티드의 조합 라이브러리를 제공하는 단계;
 - B) (A)의 라이브러리를 피부 샘플과 접촉시켜 피부가 DNA 회합된 펩티드와 복합체를 형성함으로써 DNA 회합된 펩티드-피부 복합체를 포함하는 반응 용액을 형성하는 단계;
 - C) 반응 용액으로부터 (B)의 DNA 회합된 펩티드-피부 복합체를 분리하는 단계;
 - D) (C)의 분리된 DNA 회합된 펩티드-피부 복합체를 피부 관리 조성물 매트릭스와 접촉시켜, 펩티드-피부 복합체-조성물 혼합물을 형성하며, 여기서 피부 관리 조성물 매트릭스의 농도는 완전 강도 농도의 약 10% 이상인 단계;
 - E) 펩티드-피부 복합체-조성물 혼합물로부터 (D)의 DNA 회합된 펩티드-피부 복합체를 분리하는 단계;
 - F) (E)의 DNA 회합된 펩티드-피부 복합체의 펩티드 부분을 코딩하는 DNA를 증폭시키는 단계; 및
 - G) 피부 관리 조성물 저항성 피부-결합 펩티드를 코딩하는 (F)의 증폭된 DNA를 서열결정하며, 여기서 피부 관리 조성물-저항성 피부-결합 펩티드가 확인되는 것인 단계
- 를 포함하는 방법에 의해 선택되는 것인 단계; 및
- b) 피부 착색제가 피부에 결합하기에 충분한 시간 동안 (a)의 피부 착색 조성물을 피부에 도포하는 단계
- 를 포함하는, 피부의 착색 방법.

청구항 45

a) i) $(SCP_m)_n$ -SCA; 및

ii) $[(SCP_x-S)_m]_n$ -SCA

(여기서,

- 1) SCP는 피부 관리 조성물-저항성 피부-결합 펩티드이고;
- 2) SCA는 피부 컨디셔닝제이고;
- 3) n은 1 내지 약 50,000의 범위이고;
- 4) S는 스페이서이고;
- 5) m은 1 내지 약 100의 범위이고;
- 6) x는 1 내지 약 10의 범위임)

로 이루어진 군으로부터 선택된 피부 컨디셔너를 포함하는 피부 관리 조성물을 제공하며,

여기서, 피부 관리 조성물-저항성 피부-결합 펩티드는

- A) DNA 회합된 펩티드의 조합 라이브러리를 제공하는 단계;
- B) (A)의 라이브러리를 피부 샘플과 접촉시켜 피부가 DNA 회합된 펩티드와 복합체를 형성함으로써 DNA 회합된

펩티드-피부 복합체를 포함하는 반응 용액을 형성하는 단계;

C) 반응 용액으로부터 (B)의 DNA 회합된 펩티드-피부 복합체를 분리하는 단계;

D) (C)의 분리된 DNA 회합된 펩티드-피부 복합체를 피부 관리 조성물 매트릭스와 접촉시켜, 펩티드-피부 복합체-조성물 혼합물을 형성하며, 여기서 피부 관리 조성물 매트릭스의 농도는 완전 강도 농도의 약 10% 이상인 단계;

E) 펩티드-피부 복합체-조성물 혼합물로부터 DNA 회합된 펩티드-피부 복합체를 분리하는 단계;

F) (E)의 DNA 회합된 펩티드-피부 복합체의 펩티드 부분을 코딩하는 DNA를 증폭시키는 단계; 및

G) 피부 관리 조성물-저항성 피부-결합 펩티드를 코딩하는 (F)의 증폭된 DNA를 서열결정하며, 여기서 피부 관리 조성물-저항성 피부-결합 펩티드가 확인되는 것인 단계

를 포함하는 방법에 의해 선택되는 것인 단계; 및

b) (a)의 피부 관리 조성물을 피부에 도포하여, 상기 보호 층을 형성하도록 하는 단계

를 포함하는, 피부에 펩티드계 컨디셔너의 보호 층을 형성하는 방법.

명세서

<1> 본 특허 출원은 2005년 3월 1일자로 출원된 미국 특허 가출원 제60/657494호를 우선권으로 주장한다.

기술분야

<2> 본 발명은 개인 관리 제품 분야에 관한 것이다. 보다 구체적으로, 본 발명은 피부 관리 조성물-저항성 피부-결합 펩티드의 확인 방법, 및 펩티드계 피부 유익제, 예컨대 피부 컨디셔너 및 피부 착색제에서의 그의 용도에 관한 것이다.

배경기술

<3> 피부 컨디셔너 및 피부 착색제는 잘 알려져 있으며, 피부 관리 제품으로 자주 사용된다. 현존 피부 컨디셔너 및 피부 착색제의 주요 문제는 장시간 효과에 필요한 내구성이 부족하다는 것이다. 이들 조성물의 내구성을 개선시키기 위하여, 펩티드계 피부 컨디셔너, 피부 착색제 및 기타 유익제가 개발되어 왔다 (황 (Huang) 등의 본원과 동시계류 중이며 공동 명의인 미국 특허 출원 공보 제2005/0050656호 및 미국 특허 출원 공보 제2005/0226839호 참조). 펩티드계 피부 컨디셔너 또는 착색제는 피부에 높은 결합 친화성을 갖는 특정 펩티드 서열을 각각 컨디셔닝 또는 착색제와 커플링하여 제조된다. 펩티드 부분은 피부에 결합하며, 이에 의해 컨디셔닝 또는 착색제를 강하게 부착한다. 피부에 대해 높은 결합 친화성을 갖는 펩티드는 파지 디스플레이 스크리닝 기법을 사용하여 확인하여 왔다 (황 등의 상기 공보; 에스텔 (Estell) 등의 WO 0179479; 머레이 (Murray) 등의 미국 특허 출원 공보 제2002/0098524호; 얀센 (Janssen) 등의 미국 특허 출원 공보 제2003/0152976호; 및 얀센 등의 WO 04048399 참조). 0179479, 2002/0098524, 2003/0152976 및 04048399 출원은 목욕 젤의 희석 용액 (즉, 2% 수용액)의 존재 하에 펩티드 라이브러리를 피부 샘플과 접촉시키고, 얻어진 파지-펩티드-피부 복합체를 파지 디스플레이 스크리닝 동안 목욕 젤 용액으로 세척하는 것을 기재하고 있으나, 사용된 목욕 젤의 농도는 목욕 젤-저항성 피부-결합 펩티드를 확인하기에는 너무 낮다.

<4> 피부-결합 펩티드는 피부 관리 조성물 매트릭스의 존재 하에 결합 친화성이 감소하며, 이에 따라 조성물 매트릭스로부터 피부에 강하게 결합하지 않거나, 또는 피부 관리 제품의 사용에 의해 피부로부터 씻겨 없어진다. 게다가, 피부-결합 펩티드는 피부 관리 조성물 매트릭스에서 장시간 동안 안정하지 않으며, 이는 피부 관리 제품 조성물에서 시간에 따라 그의 결합 친화성이 감소되도록 한다.

<5> 샴푸-저항성 모발-결합 펩티드 (황 등의 본원과 동시계류 중이며 공동 명의인 미국 특허 출원 제2005/0050656호, 및 오브리언 (O'Brien) 등의 본원과 동시계류 중이며 공동 명의인 미국 특허 출원 제11/251715호 참조), 전풍균 (*Malassezia furfur*)의 세포 표면 단백질에 결합하는 샴푸-저항성 항체 단편 (문헌 [Dolk et al., Appl. Environ. Microbiol. 71:442-450 (2005)] 참조) 및 모발 컨디셔너-저항성 모발-결합 펩티드 (왕 (Wang) 등의 본원과 동시계류 중이며 공동 명의인 미국 특허 출원 공보 제60/657494호 참조)의 확인 방법이 보고되어 있다. 그러나, 피부 관리 조성물-저항성 피부-결합 펩티드의 확인 방법은 기재되어 있지 않다.

<6> 이에 따라, 해결해야 할 문제는 피부 관리 조성물 매트릭스로부터 피부에 결합할 수 있으며, 그 내에서 안정한

피부-결합 펩티드를 제공하는 것이다.

- <7> 출원인은 피부 관리 조성물-저항성 피부-결합 펩티드의 확인 방법을 발견함으로써 인해 언급된 문제에 대처하였다. 본 발명의 방법에 의해 확인된 피부 관리 조성물-저항성 피부-결합 펩티드 서열은 피부 관리 조성물 매트릭스의 존재 하에 피부에 높은 결합 친화성을 가지며, 피부 관리 조성물에서의 안정성이 개선된 펩티드계 피부 유익제, 예컨대 피부 컨디셔너 및 피부 착색제를 제조하는데 사용될 수 있다.
- <8> <발명의 개요>
- <9> 본 발명은 피부 관리 조성물의 존재에 의해 영향을 받지 않는 피부-결합 펩티드의 확인 및 단리 방법에 관한 것이다. 본 발명의 피부 관리 조성물-저항성 피부-결합 펩티드는 조합 펩티드 라이브러리로부터 스크리닝되며, 임의로 스페이서 및 유익제, 예컨대 착색제 및 컨디셔너를 포함하는 2중 블록 또는 3중 블록 구조로 피부 관리 조성물을 제공한다.
- <10> 따라서, 본 발명은
- <11> a) DNA 회합된 펩티드의 조합 라이브러리를 제공하는 단계;
- <12> b) (a)의 라이브러리를 피부 샘플과 접촉시켜 피부가 DNA 회합된 펩티드와 복합체를 형성함으로써 DNA 회합된 펩티드-피부 복합체를 포함하는 반응 용액을 형성하는 단계;
- <13> c) 반응 용액으로부터 (b)의 DNA 회합된 펩티드-피부 복합체를 단리하는 단계;
- <14> d) (c)의 단리된 DNA 회합된 펩티드-피부 복합체를 피부 관리 조성물 매트릭스와 접촉시켜, 펩티드-피부 복합체-조성물 혼합물을 형성하며, 여기서 피부 관리 조성물 매트릭스의 농도는 완전 강도 농도의 약 10% 이상인 단계;
- <15> e) 펩티드-피부 복합체-조성물 혼합물로부터 (d)의 DNA 회합된 펩티드-피부 복합체를 단리하는 단계;
- <16> f) (e)의 DNA 회합된 펩티드-피부 복합체의 펩티드 부분을 코딩하는 DNA를 증폭시키는 단계; 및
- <17> g) 피부 관리 조성물 저항성 피부-결합 펩티드를 코딩하는 (f)의 증폭된 DNA를 서열결정하며, 여기서 피부 관리 조성물-저항성 피부-결합 펩티드가 확인되는 것인 단계;
- <18> 를 포함하는, 피부 관리 조성물-저항성 피부-결합 펩티드의 확인 방법을 제공한다.
- <19> 임의로, 피부-결합 펩티드를 단계 (e) 이후 용리제로 피부로부터 용리시킬 수 있으며, 본 발명의 방법에 의해 확인되는 펩티드를 상기 방법에 연속적으로 적용시켜 더 정련시킬 수 있다.
- <20> 또 다른 실시양태에서, 본 발명은
- <21> a) DNA 회합된 펩티드의 조합 라이브러리를 제공하는 단계;
- <22> b) (a)의 라이브러리를 피부 샘플과 접촉시켜 피부가 DNA 회합된 펩티드와 복합체를 형성함으로써 DNA 회합된 펩티드-피부 복합체를 포함하는 반응 용액을 형성하는 단계;
- <23> c) 반응 용액으로부터 (b)의 DNA 회합된 펩티드-피부 복합체를 단리하는 단계;
- <24> d) (c)의 단리된 DNA 회합된 펩티드-피부 복합체를 피부 관리 조성물 매트릭스와 접촉시켜, 펩티드-피부 복합체-조성물 혼합물을 형성하며, 여기서 피부 관리 조성물 매트릭스의 농도는 완전 강도 농도의 약 10% 이상인 단계;
- <25> e) 펩티드-피부 복합체-조성물 혼합물로부터 (d)의 DNA 회합된 펩티드-피부 복합체를 단리하는 단계;
- <26> f) (e)의 DNA 회합된 펩티드-피부 복합체의 펩티드 부분을 코딩하는 DNA를 증폭시키는 단계; 및
- <27> g) 피부 관리 조성물 저항성 피부-결합 펩티드를 코딩하는 (f)의 증폭된 DNA를 서열결정하며, 여기서 피부 관리 조성물-저항성 피부-결합 펩티드가 확인되는 것인 단계
- <28> 를 포함하는 방법에 의해 확인되는 피부 관리 조성물-저항성 피부-결합 펩티드를 제공한다.
- <29> 추가적으로, 본 발명은 화학식 $(SCP)_n$ -BA를 갖는, 2중 블록 펩티드계 피부 유익제를 제공하며, 여기서
- <30> a) SCP는 피부 관리 조성물-저항성 피부-결합 펩티드이고;

- <31> b) BA는 유익제이고;
- <32> c) m은 1 내지 약 100의 범위이고;
- <33> d) n은 1 내지 약 50,000의 범위이다.
- <34> 유사하게는, 본 발명은 화학식 $[(SCR-S)_m]_n$ -BA를 갖는, 3중 블록 펩티드계 유익제를 제공하며, 여기서
- <35> a) SCP는 피부 관리 조성물-저항성 피부-결합 펩티드이고;
- <36> b) BA는 유익제이고;
- <37> c) S는 스페이서이고;
- <38> d) x는 1 내지 약 10의 범위이고;
- <39> e) m은 1 내지 약 100의 범위이고;
- <40> f) n은 1 내지 약 50,000의 범위이다.
- <41> 또 다른 실시양태에서, 본 발명은 유효량의 본 발명의 펩티드계 피부 컨디셔너를 포함하는 피부 관리 제품 조성물을 제공한다. 유사하게는, 본 발명은 유효량의 본 발명의 펩티드계 피부 착색제를 포함하는 피부 착색 제품 조성물을 제공한다. 추가적으로, 본 발명은 유효량의 본 발명의 펩티드계 피부 컨디셔너를 포함하는 피부 클렌징 제품 조성물을 제공한다.
- <42> 별도의 실시양태에서, 본 발명은 본 발명의 조성물을 피부에 도포하고, 보호 층을 형성하도록 하는 것을 포함하는, 피부에 펩티드계 컨디셔너의 보호 층을 형성하는 방법을 제공한다. 유사하게는, 본 발명은 피부의 착색을 유발하기에 충분한 시간 동안 본 발명의 조성물을 피부에 도포하는 것을 포함하는, 피부의 착색 방법을 제공한다.
- <43> 또 다른 실시양태에서, 본 발명은
- <44> a) i) $(SCP_m)_n$ -C; 및
- <45> ii) $[(SCP_x-S)_m]_n$ -C
- <46> (여기서,
- <47> 1) SCP는 피부 관리 조성물-저항성 피부-결합 펩티드이고;
- <48> 2) C는 착색제이고;
- <49> 3) n은 1 내지 약 50,000의 범위이고;
- <50> 4) S는 스페이서이고;
- <51> 5) m은 1 내지 약 100의 범위이고;
- <52> 6) x는 1 내지 약 10의 범위임)
- <53> 으로 이루어진 군으로부터 선택된 피부 착색제를 포함하는 피부 착색 조성물을 제공하며,
- <54> 여기서, 상기 피부 관리 조성물 저항성 피부-결합 펩티드는
- <55> A) DNA 회합된 펩티드의 조합 라이브러리를 제공하는 단계;
- <56> B) (A)의 라이브러리를 피부 샘플과 접촉시켜 피부가 DNA 회합된 펩티드와 복합체를 형성함으로써 DNA 회합된 펩티드-피부 복합체를 포함하는 반응 용액을 형성하는 단계;
- <57> C) 반응 용액으로부터 (B)의 DNA 회합된 펩티드-피부 복합체를 분리하는 단계;
- <58> D) (C)의 분리된 DNA 회합된 펩티드-피부 복합체를 피부 관리 조성물 매트릭스와 접촉시켜, 펩티드-피부 복합체-조성물 혼합물을 형성하며, 여기서 피부 관리 조성물 매트릭스의 농도는 완전 강도 농도의 약 10% 이상인 단계;
- <59> E) 펩티드-피부 복합체-조성물 혼합물로부터 (D)의 DNA 회합된 펩티드-피부 복합체를 분리하는 단계;

- <60> F) (E)의 DNA 회합된 펩티드-피부 복합체의 펩티드 부분을 코딩하는 DNA를 증폭시키는 단계; 및
- <61> G) 피부 관리 조성물 저항성 피부-결합 펩티드를 코딩하는 (F)의 증폭된 DNA를 서열결정하며, 여기서 피부 관리 조성물-저항성 피부-결합 펩티드가 확인되는 것인 단계
- <62> 를 포함하는 방법에 의해 선택되는 것인 단계; 및
- <63> b) 피부 착색제가 피부에 결합하기에 충분한 시간 동안 (a)의 피부 착색 조성물을 피부에 도포하는 단계
- <64> 를 포함하는, 피부의 착색 방법을 제공한다.
- <65> 추가의 실시양태에서, 본 발명은
- <66> a) i) $(SCP_m)_n$ -SCA; 및
- <67> ii) $[(SCP_x-S)_m]_n$ -SCA
- <68> (여기서,
- <69> 1) SCP는 피부 관리 조성물-저항성 피부-결합 펩티드이고;
- <70> 2) SCA는 피부 컨디셔닝제이고;
- <71> 3) n은 1 내지 약 50,000의 범위이고;
- <72> 4) S는 스페이서이고;
- <73> 5) m은 1 내지 약 100의 범위이고;
- <74> 6) x는 1 내지 약 10의 범위임)
- <75> 로 이루어진 군으로부터 선택된 피부 컨디셔너를 포함하는 피부 관리 조성물을 제공하며,
- <76> 여기서, 피부 관리 조성물-저항성 피부-결합 펩티드는
- <77> A) DNA 회합된 펩티드의 조합 라이브러리를 제공하는 단계;
- <78> B) (A)의 라이브러리를 피부 샘플과 접촉시켜 피부가 DNA 회합된 펩티드와 복합체를 형성함으로써 DNA 회합된 펩티드-피부 복합체를 포함하는 반응 용액을 형성하는 단계;
- <79> C) 반응 용액으로부터 (B)의 DNA 회합된 펩티드-피부 복합체를 분리하는 단계;
- <80> D) (C)의 분리된 DNA 회합된 펩티드-피부 복합체를 피부 관리 조성물 매트릭스와 접촉시켜, 펩티드-피부 복합체-조성물 혼합물을 형성하며, 여기서 피부 관리 조성물 매트릭스의 농도는 완전 강도 농도의 약 10% 이상인 단계;
- <81> E) 펩티드-피부 복합체-조성물 혼합물로부터 (D)의 DNA 회합된 펩티드-피부 복합체를 분리하는 단계;
- <82> F) (E)의 DNA 회합된 펩티드-피부 복합체의 펩티드 부분을 코딩하는 DNA를 증폭시키는 단계; 및
- <83> G) 피부 관리 조성물-저항성 피부-결합 펩티드를 코딩하는 (F)의 증폭된 DNA를 서열결정하며, 여기서 피부 관리 조성물-저항성 피부-결합 펩티드가 확인되는 것인 단계
- <84> 를 포함하는 방법에 의해 선택되는 것인 단계; 및
- <85> b) (a)의 피부 관리 조성물을 피부에 도포하고, 보호 층을 형성하는 단계
- <86> 를 포함하는, 펩티드계 컨디셔너의 보호 층을 피부에 형성하는 방법을 제공한다.
- <87> <서열 목록의 간단한 설명>
- <88> 본 발명은 하기 발명의 상세한 설명 및 첨부된 서열 목록으로부터 보다 완전하게 이해될 수 있으며, 이는 본 출원의 일부를 형성한다.
- <89> 하기 서열은 37 C.F.R. 1.821 내지 1.825 ("뉴클레오타이드 서열 및/또는 아미노산 서열 기재를 포함하는 특허 출원에 대한 요건 - 서열 규칙")에 따르며, 세계 지적 재산권 기구 (WIPO) 기준 ST.25 (1998) 및 EPO 및 PCT의 서열 목록 요건 (규칙 5.2 및 49.5 (a-비스), 및 시행세칙의 제208항 및 부록 C)에 부합한다. 뉴클레오타이드 및

아미노산 서열 데이터에 사용된 기호 및 형식은 37 C.F.R. § 1.822에서 설명하는 규칙에 따른다.

- <90> 서열 1은 카스파아제 3 절단 부위의 아미노산 서열이다.
- <91> 서열 2는 파지 DNA를 서열결정하기 위한 올리고뉴클레오타이드 프라이머의 뉴클레오타이드 서열이다.
- <92> 서열 3은 실시예 4 및 15에서 기재된 것과 같은 모발-결합 펩티드 대조군의 아미노산 서열이다.
- <93> 서열 4는 실시예 4에서 기재된 것과 같은 형광 표지된 모발 결합 펩티드의 아미노산 서열이다.
- <94> 서열 5 내지 7은 펩티드 스페이서의 아미노산 서열이다.
- <95> 서열 8 내지 25는 바디 워시 (body wash)-저항성 피부-결합 펩티드의 아미노산 서열이다.
- <96> 서열 26은 실시예 15에서 대조군으로서 사용된 모발-결합 펩티드의 아미노산 서열이다.
- <97> 서열 27은 C-말단에 첨가된 시스테인 잔기를 갖는 바디 워시-저항성 피부-결합 펩티드 (서열 20)의 아미노산 서열이다.

발명의 상세한 설명

- <98> 본 발명은 피부 관리 조성물 매트릭스의 존재 하에 높은 친화성으로 인간 피부에 특이적으로 결합하는 피부-결합 펩티드의 확인 방법을 제공한다. 이러한 피부-결합 펩티드는 피부 관리 조성물 매트릭스의 존재 하에 피부에 대한 높은 결합 친화성을 가지며, 피부 관리 조성물에서의 안정성이 개선된 펩티드계 피부 유익제, 예컨대 피부 컨디셔너 및 피부 착색제를 제조하는데 사용될 수 있다.
- <99> 하기 정의가 본원에서 사용되며, 청구의 범위 및 명세서의 해석을 위해 참조하여야 한다.
- <100> "SCP"는 피부 관리 조성물-저항성 피부-결합 펩티드를 의미한다.
- <101> "BA"는 피부 유익제를 의미한다.
- <102> "SCA" 피부 컨디셔닝제를 의미한다.
- <103> "C"는 착색제를 의미한다.
- <104> "S"는 스페이서를 의미한다.
- <105> 용어 "펩티드"는 펩티드 결합 또는 변형된 펩티드 결합에 의해 서로 연결된 2개 이상의 아미노산을 나타낸다.
- <106> 본원에서 사용된 것과 같은 용어 "피부"는 인간 피부, 또는 인간 피부에 대한 대응품, 예컨대 피그 피부, 비트로-스킨® (Vitro-Skin®) 및 에피덤 (Epiderm™)을 나타낸다.
- <107> 어구 "피부 관리 조성물-저항성 피부-결합 펩티드"는 피부 관리 조성물 매트릭스로부터 피부에 강하게 결합하며, 그 내에서 안정한 펩티드를 나타낸다.
- <108> 어구 "피부 관리 조성물 매트릭스"는 비희석되거나 희석된 형태의 피부 관리 제품, 예컨대 피부 컨디셔너, 피부 클렌저, 메이크-업 (make-up), 안티-링클 제품 및 피부 착색제, 또는 하나 이상의 피부 관리 제품의 성분과, 추가적으로 2종 이상의 피부 관리 제품의 성분을 포함하는 혼합물을 포함하는 매질을 나타낸다. 피부 관리 제품의 성분에는 오일, 왁스, 검, 소위 페이스트상 지방 물질, 피부 컨디셔닝제, 피부 착색제, 향산화제, 보존제, 충전제, 계면활성제, UVA 및/또는 UVB 선스크린, 향료, 증점제, 습윤제, 및 음이온, 비이온 또는 양쪽성 중합체, 및 염료 또는 안료가 포함되나, 이에 제한되지는 않는다.
- <109> 어구 "완전 강도 농도"는 피부 관리 제품에 존재하는 것과 같은 성분의 농도를 나타낸다.
- <110> 용어 "유익제"는 피부에 사용하기 위해 피부 관리 조성물-저항성 피부-결합 펩티드와 커플링하여, 미용 또는 피부 과학적 효과를 제공할 수 있는 화합물 또는 물질을 나타내는 일반적인 용어이다. 전형적으로, 유익제에는 개인 관리 산업에서 통상적으로 사용되는 다른 물질과 함께 컨디셔너, 착색제, 향료 및 선스크린 등이 포함된다.
- <111> 본원에서 사용된 것과 같은 용어 "커플링" 및 "커플링된"은 임의의 화학 회합을 나타내며, 공유 및 비-공유 상호작용 둘 모두가 포함된다.
- <112> 용어 "펩티드-피부 복합체"는 펩티드에서의 결합 부위를 통해 피부에 결합된 펩티드를 포함하는 구조를 의미한다.

다.

- <113> 용어 "DNA 회합된 펩티드-피부 복합체"는 피부 및 펩티드 사이의 복합체를 나타내며, 여기서 펩티드는 핵산 성분을 확인하는 DNA와 회합되어 있다. 전형적으로, DNA 회합된 펩티드는 디스플레이 시스템, 예컨대 파지 디스플레이의 결과로서 제조된다. 상기 시스템에서, 펩티드는 파지의 표면에서 디스플레이되나, 펩티드를 코딩하는 DNA는 파지의 부착된 당단백질 코팅 내에 포함된다. 파지 내에서의 코딩 DNA의 회합은 펩티드의 확인을 위한 코딩 영역의 증폭을 촉진시키는데 사용될 수 있다.
- <114> 용어 "비-표적"은 그에 대한 결합 친화성을 갖는 펩티드가 바람직하지 않은 기질을 나타낸다. 피부 관리 조성물-저항성 피부-결합 펩티드의 선택에 대하여, 비-표적에는 모발 및 플라스틱이 포함되나, 이에 제한되지는 않는다.
- <115> 용어 "아미노산"은 단백질 또는 폴리펩티드의 기본 화학 구조 단위를 나타낸다. 하기 약어를 본원에서 사용하여, 특정 아미노산을 확인한다.
- | | <u>아미노산</u> | <u>3 문자 약어</u> | <u>1 문자 약어</u> |
|-------|-------------|----------------|----------------|
| <117> | 알라닌 | Ala | A |
| <118> | 아르기닌 | Arg | R |
| <119> | 아스파라긴 | Asn | N |
| <120> | 아스파르트산 | Asp | D |
| <121> | 시스테인 | Cys | C |
| <122> | 글루타민 | Gln | Q |
| <123> | 글루탐산 | Glu | E |
| <124> | 글리신 | Gly | G |
| <125> | 히스티딘 | His | H |
| <126> | 이소류신 | Ile | I |
| <127> | 류신 | Leu | L |
| <128> | 리신 | Lys | K |
| <129> | 메티오닌 | Met | M |
| <130> | 페닐알라닌 | Phe | F |
| <131> | 프롤린 | Pro | P |
| <132> | 세린 | Ser | S |
| <133> | 트레오닌 | Thr | T |
| <134> | 트립토판 | Trp | W |
| <135> | 티로신 | Tyr | Y |
| <136> | 발린 | Val | V |
- <137> "유전자"는 코딩 서열 이전 (5' 비-코딩 서열) 및 이후 (3' 비-코딩 서열)의 조절 서열을 비롯한 특정 단백질을 발현하는 핵산 단편을 나타낸다. "천연 유전자"는 그의 고유한 조절 서열을 갖는 자연에서 발견되는 유전자를 나타낸다. "키메라 유전자"는 자연에서 함께 발견되지 않는 조절 및 코딩 서열을 포함하는, 천연 유전자가 아닌 임의의 유전자를 나타낸다. 따라서, 키메라 유전자는 상이한 공급원으로부터 유래된 조절 서열 및 코딩 서열, 또는 동일한 공급원으로부터 유래되나 자연에서 발견되는 것과는 상이한 방법으로 배열된 조절 서열 및 코딩 서열을 포함할 수 있다. "외래" 유전자는 숙주 유기체에서는 보통 발견되지 않지만, 유전자 전달에 의해 숙주 유기체로 도입되는 유전자를 나타낸다. 외래 유전자는 비-천연 유기체로 삽입된 천연 유전자, 또는 키메라 유전자를 포함할 수 있다.

- <138> "합성 유전자"는 당업자들에게 알려진 절차를 사용하여 화학적으로 합성된 올리고뉴클레오타이드 구성 블록으로부터 어셈블링될 수 있다. 이러한 구성 블록을 리게이션 및 어닐링하여, 유전자 절편을 형성하고, 이후 이를 효소적으로 어셈블링하여 전체 유전자를 구성한다. DNA의 서열과 관련된 것으로서, "화학적으로 합성된"은 성분 뉴클레오타이드가 시험관 내 어셈블링되었음을 의미한다. 잘 알려진 절차를 사용하여 DNA의 수동 화학 합성을 달성할 수 있거나, 또는 여러 시판 기계 중 하나를 사용하여 자동화된 화학 합성을 수행할 수 있다. 따라서, 유전자는 숙주 세포의 코돈 바이어스를 반영하기 위한 뉴클레오타이드 서열의 최적화를 기준으로 최적 유전자 발현을 위해 맞추어질 수 있다. 당업자들은 코돈 사용이 숙주에 의해 부여받은 이들 코돈으로 편중되는 경우의 성공적인 유전자 발현의 가능성을 안다. 바람직한 코돈의 결정은 서열 정보가 이용가능한 숙주 세포로부터 유래된 유전자의 조사를 기준으로 할 수 있다.
- <139> "코딩 서열"은 특정 아미노산 서열에 대해 코딩하는 DNA 서열을 나타낸다. "적합한 조절 서열"은 코딩 서열의 이전 (5' 비-코딩 서열) 또는 이후 (3' 비-코딩 서열)에 위치한 뉴클레오타이드 서열을 나타내며, 이는 전사, RNA 가공 또는 안정성, 또는 관련된 코딩 서열의 번역에 영향을 미친다. 조절 서열은 프로모터, 번역 선도 서열, 인트론, 폴리아데닐화 인식 서열, RNA 처리 부위, 이펙터 결합 부위 및 스템-루프 (stem-loop) 구조를 포함할 수 있다.
- <140> "프로모터"는 코딩 서열 또는 기능 RNA의 발현을 조절할 수 있는 DNA 서열을 나타낸다. 일반적으로, 코딩 서열은 프로모터 서열에 대해 3'에 위치된다. 프로모터는 그의 전체가 천연 유전자로부터 유래될 수 있거나, 또는 자연에서 발견되는 상이한 프로모터로부터 유래된 상이한 요소로 구성될 수 있거나, 또는 심지어 합성 DNA 절편을 포함한다. 상이한 프로모터가 상이한 조직 또는 세포 형태에서, 또는 상이한 발전 단계에서, 또는 상이한 환경 또는 생리학적 조건에 반응하여 유전자의 발현을 지시할 수 있다고 당업자들에 의해 이해된다. 대부분의 시간에서의 대부분의 세포 형태에서 발현되는 유전자를 유발하는 프로모터는 보통 "구성 프로모터"로도 지칭된다. 추가적으로, 대부분의 경우에서 조절 서열의 정확한 경계가 완벽하게 정의되지 않았기 때문에, 상이한 길이의 DNA 단편은 동일한 프로모터 활성을 가질 수 있다고 인식된다.
- <141> 본원에서 사용된 것과 같은 용어 "발현"은 본 발명의 핵산 단편으로부터 유래된 센스 (mRNA) 또는 안티센스 RNA의 전사 및 안정한 축적을 나타낸다. 또한, 발현은 mRNA에서 폴리펩티드로의 번역을 나타낸다.
- <142> 용어 "형질전환"은 숙주 유기체의 계놈으로 핵산 단편을 옮겨 유전적으로 안정한 유전 양식을 얻는 것을 나타낸다. 형질전환된 핵산 단편을 함유하는 숙주 유기체는 "유전자 도입된", "재조합" 또는 "형질전환된" 유기체로도 지칭된다.
- <143> 용어 "숙주 세포"는 형질전환 또는 형질감염된 세포, 또는 외인성 폴리뉴클레오타이드 서열에 의해 형질전환 또는 형질감염 가능한 세포를 나타낸다.
- <144> 용어 "플라스미드", "벡터" 및 "카세트"는 종종 세포의 중추 대사의 일부가 아닌 유전자를 담지하며, 보통 원형 이중 가닥 DNA 분자 형태인 여분의 염색체 요소를 나타낸다. 이러한 요소는 자율 복제 서열, 계놈 중합 서열, 파지 또는 뉴클레오타이드 서열, 임의의 공급원으로부터 유래된 선형 또는 원형의 단일 또는 이중 가닥 DNA 또는 RNA일 수 있으며, 여기서 여러 뉴클레오타이드 서열은 적절한 3' 비번역 서열과 함께 선택된 유전자 생성물을 위한 프로모터 단편 및 DNA 서열을 세포로 도입할 수 있는 독특한 구조로 연결되거나 또는 재조합된다. "형질전환 카세트"는 외래 유전자를 함유하며 특정 숙주 세포의 형질전환을 촉진하는 외래 유전자 이외의 요소를 갖는 특정 벡터를 나타낸다. "발현 카세트"는 외래 유전자를 함유하며, 외래 숙주에서의 유전자의 발현을 증강시키도록 하는 외래 유전자 이외의 요소를 갖는 특정 벡터를 나타낸다.
- <145> 용어 "파지" 또는 박테리오파지는 박테리아에 감염하는 바이러스를 나타낸다. 본 발명의 목적을 위해 변경된 형태를 사용할 수 있다. 바람직한 박테리오파지는 M13으로 불리는 "야생" 파지로부터 유래된다. M13 시스템은 박테리아 내부에서 성장하여, 감염된 세포를 파괴하지는 않지만 새로운 파지를 계속 만들도록 할 수 있다. 이는 단일 가닥 DNA 파지이다.
- <146> 용어 "파지 디스플레이"는 박테리오파지 또는 파지미드 입자의 표면에서의 작용성 외래 펩티드 또는 소형 단백질의 디스플레이를 나타낸다. 유전적 처리된 파지를 사용하여 그의 천연 표면 단백질의 절편과 같은 펩티드를 나타낼 수 있다. 펩티드 라이브러리는 상이한 유전자 서열을 갖는 파지의 집단에 의해 생성될 수 있다.
- <147> "PCR" 또는 "중합효소 연쇄 반응"은 특정 DNA 절편의 증폭에 사용되는 기법이다 (미국 특허 제4,683,195호 및 제4,800,159호 참조).

- <148> 본원에서 사용된 표준 재조합 DNA 및 분자 클로닝 기법은 당업자들에게 잘 알려져 있으며, 문헌 [Sambrook, J., Fritsch, E. F. and Maniatis, T., Molecular Cloning: A Laboratory Manual, Second Edition, Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, NY (1989)] (이후, "Maniatis"), [Silhavy, T. J., Bennis, M. L. and Enquist, L. W., Experiments with Gene Fusions, Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, NY (1984)] 및 [Ausubel, F. M. et al., Current Protocols in Molecular Biology, published by Greene Publishing Assoc. and Wiley-Interscience (1987)]에 기재되어 있다.
- <149> 본 발명은 피부 관리 조성물 매트릭스의 존재 하에 높은 친화성으로 피부에 특이적으로 결합하는 피부 관리 조성물-저항성 펩티드 서열의 확인 방법을 제공한다. 상기 방법은 표준 바이오패닝 기법의 변형이며, 여기서 피부를 조합 생성된 펩티드의 라이브러리와 접촉시킨다. 이후, 얻어진 DNA 회합된 펩티드-피부 복합체를 일정 시간 동안 피부 관리 조성물 매트릭스와 접촉시킨다. DNA 회합된 펩티드-피부 복합체를 분리시키고, 용리제와 접촉시켜, 용리된 DNA 회합된 펩티드 및 피부에 결합되어 남아 있는 DNA 회합된 펩티드를 얻는다. 용리된 DNA 회합된 펩티드 및/또는 나머지 결합된 DNA 회합된 펩티드를 증폭시키고, 확인한다. 확인된 피부 관리 조성물-저항성 피부-결합 펩티드 서열을 사용하여 펩티드계 피부 유익제, 예컨대 피부 컨디셔너 및 피부 착색제를 구성할 수 있다.
- <150> 피부 관리 조성물-저항성 피부-결합 펩티드의 확인
- <151> 본원에서 정의된 것과 같은 피부 관리 조성물-저항성 피부-결합 펩티드 (SCP)는 피부 관리 조성물 매트릭스로부터 피부에 특이적으로 결합하며, 그 내에서 안정한 펩티드 서열이다. 본 발명의 피부 관리 조성물-저항성 피부-결합 펩티드는 약 7개 아미노산 내지 약 45개 아미노산 길이, 보다 바람직하게는 약 7개 아미노산 내지 약 25개 아미노산 길이, 가장 바람직하게는 약 12개 내지 약 20개 아미노산 길이이다. 본 발명의 펩티드는 무작위로 생성되며, 이후 하기 기재된 것과 같이 피부 관리 조성물 매트릭스의 존재 하에 피부에 대한 그의 결합 친화성을 기준으로 피부 샘플에 대해 선택된다.
- <152> 펩티드의 무작위 라이브러리의 생성은 잘 알려져 있으며, 박테리아 디스플레이 (문헌 [Kemp, D.J.; Proc. Natl. Acad. Sci. USA 78(7):4520-4524 (1981)] 및 [Helfman et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA 80(1):31-35, (1983)]), 효모 디스플레이 (문헌 [Chien et al., Proc Natl Acad Sci USA 88(21):9578-82 (1991)]), 조합 고체 상 펩티드 합성 (미국 특허 제5,449,754호, 동 제5,480,971호, 동 제5,585,275호, 동 제5,639,603호 참조) 및 파지 디스플레이 기법 (미국 특허 제5,223,409호, 동 제5,403,484호, 동 제5,571,698호, 동 제5,837,500호 참조)을 비롯한 여러 기법에 의해 달성될 수 있다. 이러한 생물학적 펩티드 라이브러리를 생성하기 위한 기법은 당업계에 잘 알려져 있다. 방법의 예는 문헌 [Dani, M., J. of Receptor & Signal Transduction Res., 21(4):447-468 (2001)], [Sidhu et al., Methods in Enzymology 328:333-363 (2000)] 및 [Phage Display of Peptides and Proteins, A Laboratory Manual, Brian K. Kay, Jill Winter, and John McCafferty, eds.; Academic Press, NY, 1996]에 기재되어 있다. 추가적으로, 파지 디스플레이 라이브러리는 뉴 잉글랜드 바이오랩스 (New England Biolabs; 매사추세츠주 베벌리 (Beverly, MA) 소재)와 같은 제조업자로부터 구입할 수 있다.
- <153> 한 실시양태에서, 몇몇 방식으로 펩티드와 회합된 펩티드를 코딩하는 DNA를 갖는 것이 특히 유용하다. 이러한 회합은 스크리닝 또는 바이오패닝 방법에서 결합 펩티드의 빠른 확인을 용이하게 한다. 코딩 DNA는 PCR 증폭되거나 또는 복제 숙주를 감염시키는데 사용되어, 용이한 확인을 위해 펩티드의 발현을 증가시킬 수 있다. 전형적인 DNA 회합된 펩티드는 상기 언급된 것과 같은 파지 디스플레이, 박테리아 디스플레이, 및 효모 디스플레이의 방법에 의해 제조된다.
- <154> 펩티드를 무작위로 생성하기 위한 바람직한 방법은 파지 디스플레이에 의한 것이다. 파지 디스플레이는 시험관 내 선택 기법이며, 여기서 펩티드 또는 단백질을 박테리오파지의 코딩 단백질에 유전적으로 융합시켜, 파지 비리온의 외부에서 융합된 펩티드의 디스플레이를 얻는 반면, 융합을 코딩하는 DNA는 비리온 내에 있다. 디스플레이된 펩티드 및 이를 코딩하는 DNA 사이의 이러한 물리적 연결은 "바이오패닝"이라고 불리는 간단한 시험관 내 선택 절차에 의해 각각 상응하는 DNA 서열에 연결된 막대한 수의 펩티드의 변이체의 스크리닝을 가능하게 한다. 가장 간단한 형태에서, 파지-디스플레이된 변이체의 풀 (pool)을 관심 표적과 함께 인큐베이션하고, 비결합된 파지를 세척 제거하고, 파지와 표적 간의 결합 상호작용의 절단에 의해 특이적으로 결합된 파지를 용리시켜 바이오패닝을 수행한다. 이후, 용리된 파지를 생체 내 증폭시키고, 과정을 반복하여, 가장 단단한 결합 서열을 위해 파지 풀의 단계적 농축을 얻는다. 3회 이상의 선택/증폭 과정 이후, 각각의 클론을 DNA 서열결정에 의해 특성화한다.
- <155> 본 발명의 피부 관리 조성물-저항성 피부-결합 펩티드는 피부 조성물 매트릭스의 존재 하에 피부에 대한 그의

결합 친화성을 기준으로, 피부 샘플에 대한 파지 펩티드의 선택에 의한 파지 디스플레이를 사용하여 확인할 수 있다. 피부 및 파지 펩티드를 다양한 방법으로 피부 조성물 매트릭스와 접촉시켜, 하기 상세하게 기재되는 것과 같이 펩티드-피부 복합체-조성물 혼합물을 형성할 수 있다. 예를 들어, 파지 펩티드 라이브러리를 피부 조성물 매트릭스에 용해시키고, 이후 이를 피부 샘플과 접촉시킬 수 있다. 별법으로, 피부 샘플을 파지 디스플레이 라이브러리와 접촉시켜 형성된 파지-펩티드-피부 복합체를 후속적으로 피부 조성물 매트릭스와 접촉시킬 수 있다. 추가적으로, 이러한 피부 조성물 매트릭스-접촉 방법의 임의의 조합을 사용할 수 있다.

<156> DNA 회합된 펩티드의 적합한 라이브러리를 생성하거나 또는 상업 공급자로부터 구매한 이후, 상기 라이브러리를 적절한 양의 피부 샘플과 접촉시켜, DNA 회합된 펩티드-피부 복합체를 포함하는 반응 용액을 형성한다. 인간 피부 샘플은 시체 또는 시험관 내 인간 피부 배양액으로부터 얻을 수 있다. 추가적으로, 피그 피부, 비트로-스킨® (IMS 인크., (코네티컷주 밀포드 (Milford, CT) 소재)에서 시판됨) 및 에피덤™ (EpiDerm™; 맷테크 코포레이션 (MatTek Corp.; 매사추세츠주 애쉬랜드 (Ashland, MA) 소재)에서 시판됨)을 인간 피부에 대한 대용물로서 사용할 수 있다. DNA 회합된 펩티드의 라이브러리를 피부 샘플에 접촉시키기에 적합한 용액에 용해시킨다. 한 실시양태에서, 펩티드의 라이브러리를 계면활성제를 함유하는 완충 염수 수용액에 용해시킨다. 적합한 용액은 0.5% 트윈® (Tween®) 20을 갖는 트리스-완충 염수 (TBS)이다. 또 다른 실시양태에서, 펩티드의 라이브러리를 피부 관리 조성물 매트릭스에 용해시키고 (하기 참조), 이후 피부 샘플과 접촉시킨다. 피부 표면에 대한 펩티드의 물질 전달 속도를 증가시키기 위해 용액을 임의의 방법으로 진탕하여, 이에 의해 최대 결합을 달성하기 위해 요구되는 시간을 단축시킬 수 있다. 최대 결합을 달성하기 위해 요구되는 시간은 여러 인자, 예컨대 피부 샘플의 크기, 펩티드 라이브러리의 농도 및 진탕 속도에 따라 변한다. 요구되는 시간은 일반적인 실험을 사용하여 당업자들에 의해 용이하게 측정될 수 있다. 전형적으로, 접촉 시간은 1분 내지 1시간이다. 임의로, 펩티드의 라이브러리를 피부 샘플에 접촉시키기 이전 또는 동시에 비-표적, 예컨대 모발 또는 플라스틱과 접촉시켜, 비-표적에 결합하는 바람직하지 않은 DNA 회합된 펩티드를 제거할 수 있다.

<157> 피부 샘플과의 접촉시, 여러 무작위로 생성된 펩티드가 피부에 결합하여, DNA 회합된 펩티드-피부 복합체를 형성한다. 여러 펩티드는 복합체를 형성하지 않고 남아 있으며, 피부 샘플의 일부 또한 결합되지 않는다. 복합체를 형성하지 않는 펩티드는 임의의 적합한 완충 용액, 예컨대 트리스-HCl, 트리스-완충 염수, 트리스-보레이트, 트리스-아세트산, 트리에틸아민, 포스페이트 완충액 및 글리신-HCl을 사용하여 세척하여 임의로 제거될 수 있으며, 여기서 트리스-완충 염수 용액이 바람직하다. 또한, 세척 용액은 계면활성제, 예컨대 SDS (나트륨 도데실 술페이트), DOC (나트륨 데옥시클로레이트), 노니데트 (Nonidet) P-40, 트리톤 (Triton) X-100 및 트윈® 20을 함유할 수 있으며, 여기서 약 0.5% 농도의 트윈® 20이 바람직하다. 세척 단계는 1회 이상 반복할 수 있다.

<158> 복합체를 형성하지 않는 물질을 제거한 이후, DNA 회합된 펩티드-피부 복합체를 일정 시간, 전형적으로는 약 1분 내지 약 30분 동안 피부 관리 조성물 매트릭스와 접촉시켜, 펩티드-피부 복합체-조성물 혼합물을 형성한다. 본원에서 사용된 것과 같은 피부 관리 조성물 매트릭스는 비회석되거나 회석된 형태 중 하나로서 피부 관리 제품, 예컨대 피부 컨디셔너, 피부 클렌저, 메이크-업, 안티-링클 제품 및 피부 착색제, 또는 하나 이상의 피부 관리 제품의 성분과, 추가적으로 2종 이상의 피부 관리 제품의 성분을 포함하는 혼합물을 포함하는 매질을 나타낸다. 적합한 피부 관리 제품 조성물은 당업계에 잘 알려져 있다. 피부 관리 조성물은 필리프 (Philippe) 등의 미국 특허 제6,280,747호에 기재되어 있다. 예를 들어, 피부 관리 조성물은 조성물의 총 중량에 대하여 일반적으로 약 10 내지 약 90 중량%의 분율로 지방 물질을 함유하는 무수 조성물일 수 있으며, 여기서 지방 상은 하나 이상의 액상, 고체상 또는 반-고체상 지방 물질을 포함한다. 지방 물질에는 오일, 왁스, 검 및 소위 페이스트상 지방 물질이 포함되나, 이에 제한되지는 않는다. 별법으로, 조성물은 적합한 분산액, 예컨대 유중수 또는 수중유 에멀션일 수 있다. 추가적으로, 조성물은 피부 컨디셔닝제 (예를 들어, 하기 참조), 피부 착색제 (예를 들어, 하기 참조), 향산화제, 보존제, 충전제, 계면활성제, UVA 및/또는 UVB 선스크린, 향료, 증점제, 습윤제, 및 음이온성, 비이온성 또는 양쪽성 중합체, 및 염료 또는 안료를 비제한적으로 비롯한 하나 이상의 통상적인 미용 또는 피부 과학적 첨가제 또는 보조제를 함유할 수 있다. 로레알 (L'oreal), 뉴트로지나 (Neutrogena), 프록터 앤드 갬블 (Procter and Gamble), 유니레버 (Unilever) 및 존슨 앤드 존슨 (Johnson and Johnson)과 같은 회사로부터의 시판 피부 관리 제품을 사용할 수 있다. 이러한 피부 관리 제품은 시중 슈퍼마켓 및 약국에서 구입할 수 있다. 바람직하게는, 이들 내에서 피부 관리 조성물-저항성 피부-결합 펩티드가 궁극적으로 사용될 피부 관리 조성물 매트릭스를 상기 방법에서 사용한다. 피부 관리 조성물 매트릭스는 비회석 사용되거나, 또는 특히 매우 점성인 조성물의 경우 그의 사용을 용이하게 하기 위해 희석시킬 수 있다. 피부

관리 조성물은 물로 희석시키거나, 또는 적합한 완충 용액, 예컨대 상기 기재된 것들을 사용할 수 있다. 피부 관리 조성물 매트릭스의 농도는 완전 강도 농도의 약 10% 이상, 바람직하게는 약 20% 이상, 보다 바람직하게는 약 50% 이상, 보다 더 바람직하게는 약 75% 이상이다. 가장 바람직하게는, 피부 관리 조성물 매트릭스는 비희석된 형태로 사용된다. 임의로, DNA 회합된 펩티드-피부 복합체를 피부 관리 조성물 매트릭스와 1회 이상 접촉시킬 수 있다.

<159> 한 실시양태에서, 피부 관리 조성물 매트릭스는 피부 컨디셔닝 제품을 포함한다. 또 다른 실시양태에서, 피부 관리 조성물 매트릭스는 피부 클렌징 제품을 포함한다.

<160> DNA 회합된 펩티드-피부 복합체를 펩티드-피부 복합체-조성물 혼합물로부터 분리시키고, 상기 기재된 것과 같이 완충 용액을 사용하여 1회 이상 임의로 세척한다. 또한, 피부 관리 조성물 매트릭스는 세척 용액으로서 사용될 수 있다. 이후, DNA 회합된 펩티드-피부 복합체를 일정 시간 동안, 바람직하게는 1 내지 30분 동안 용리제와 접촉시켜, 피부로부터 DNA 회합된 펩티드를 분리시킬 수 있으나, 몇몇 DNA 회합된 펩티드는 이러한 처리 이후 여전히 피부에 결합되어 남아있을 것이다. 임의로, DNA 회합된 펩티드-스킨 복합체를 새로운 용기로 옮기고, 이후 용리제와 접촉시킬 수 있다. 용리제는 산 (pH 1.5 내지 3.0); 염기 (pH 10 내지 12.5); 다량의 염 농축물, 예컨대 $MgCl_2$ (3 내지 5 M) 및 $LiCl$ (5 내지 10 M); 물; 에틸렌 글리콜 (25 내지 50%); 디옥산 (5 내지 20%); 티오시아네이트 (1 내지 5 M); 구아니딘 (2 내지 5 M); 및 우레아 (2 내지 8 M)를 비제한적으로 비롯한 임의의 알려진 용리제일 수 있으며, 여기서 산으로 처리하는 것이 바람직하다. 사용된 용리 완충액이 산 또는 염기인 경우, 용리 단계 이후 중화 완충액을 첨가하여 pH를 중성 범위로 조절한다. 임의의 적합한 완충액을 사용할 수 있으며, 여기서 pH 9.2의 1 M 트리스-HCl이 산 용리 완충액으로 사용하기에 바람직하다.

<161> 이후, 용리된 펩티드 또는 나머지 결합된 펩티드를 코딩하는 DNA, 또는 용리된 펩티드 및 나머지 결합된 펩티드 둘 모두를 코딩하는 DNA를 당업계에 알려진 방법을 사용하여 증폭시킨다. 예를 들어, 용리된 펩티드 및 나머지 결합된 펩티드를 코딩하는 DNA는 박테리아 숙주 세포, 예컨대 대장균 (*E. coli*) ER2738을 본원에 참고로 포함되는 황 등의 본원과 동시계류 중이며 공동 명의인 미국 특허 출원 공보 제2005/0050656호에 기재된 것과 같이 원하는 펩티드를 코딩하는 DNA로 감염시켜 증폭시킬 수 있다. 감염된 숙주 세포를 적절한 성장 배지, 예컨대 LB (루리아-베르타니 (Luria-Bertani)) 배지에서 성장시키고, 이 배양액을 적합한 성장 배지, 예컨대 IPTG (이소프로필 β -D-티오갈락토피라노시드) 및 S-GalTM (3,4-시클로헥세노에스쿨레틴- β -D-갈락토피라노시드)을 갖는 LB 배지를 함유하는 아가에 스프레딩한다. 성장 이후, 플라크를 DNA 분리 및 서열결정을 위해 수집하여, 피부 관리 조성물-저항성 피부-결합 펩티드 서열을 확인한다. 별법으로, 용리된 펩티드 및 나머지 결합된 펩티드를 코딩하는 DNA를 핵산 증폭 방법, 예컨대 중합효소 연쇄 반응 (PCR)을 사용하여 증폭시킬 수 있다. 이러한 방법에서, 본원에 참고로 포함되는 안센 등의 미국 특허 출원 공보 제2003/0152976호에 기재된 것과 같이, PCR은 용리된 펩티드 및/또는 나머지 결합된 펩티드를 코딩하는 DNA에서 적절한 프라이머를 사용하여 수행된다.

<162> 한 실시양태에서, 박테리아 숙주 세포를 감염시켜 용리된 펩티드 및 나머지 결합된 펩티드를 코딩하는 DNA를 증폭시키고, 증폭된 DNA 회합된 펩티드를 신선한 피부 샘플과 접촉시키고, 상기 기재된 전체 과정을 1회 이상 반복하여, 피부 관리 조성물-저항성 피부-결합 DNA 회합된 펩티드가 풍부한 집단을 얻는다. 원하는 횟수의 바이오패닝 사이클 이후, 당업계에 잘 알려져 있는 표준 DNA 서열결정 기법을 사용하여 증폭된 DNA 서열을 측정하여, 피부 관리 조성물-저항성 피부-결합 펩티드 서열을 확인한다.

<163> 피부 관리 조성물-저항성 피부-결합 펩티드의 제조

<164> 본 발명의 피부 관리 조성물-저항성 피부-결합 펩티드는 표준 펩티드 합성 방법을 사용하여 제조할 수 있으며, 이는 당업계에 잘 알려져 있다 (예를 들어, 문헌 [Stewart et al., Solid Phase Peptide Synthesis, Pierce Chemical Co., Rockford, IL, 1984], [Bodanszky, Principles of Peptide Synthesis, Springer-Verlag, New York, 1984] 및 [Pennington et al., Peptide Synthesis Protocols, Humana Press, Totowa, NJ, 1994] 참조). 추가적으로, 여러 회사가 맞춤 펩티드 합성 서비스를 제공한다.

<165> 별법으로, 본 발명의 펩티드는 재조합 DNA 및 분자 클로닝 기법을 사용하여 제조할 수 있다. 피부-결합 펩티드를 코딩하는 유전자는 이종 숙주 세포, 특히 미생물 숙주의 세포에서 제조할 수 있다.

<166> 본 발명의 결합 펩티드의 발현을 위한 바람직한 이종 숙주 세포는 진균 또는 박테리아 족 내에서 광범위하게 발견될 수 있으며, 광범위한 온도, pH 값 및 용매 내성에 걸쳐 성장하는 미생물 숙주이다. 전사, 번역 및 단백질 생합성 기기가 세포 공급 원료에 관계없이 동일하기 때문에, 기능성 유전자는 세포 바이오매스를 생성하기 위해 사용되는 탄소 공급 원료에 관계없이 발현된다. 숙주 균주의 예에는 진균 또는 효모 종, 예컨대 아스페루길루

스 (*Aspergillus*), 트리코테르마 (*Trichoderma*), 사카로미세스 (*Saccharomyces*), 피치아 (*Pichia*), 칸디다 (*Candida*), 한센울라 (*Hansenula*), 또는 박테리아 중, 예컨대 살모넬라 (*Salmonella*), 바실루스 (*Bacillus*), 아시네토박터 (*Acinetobacter*), 로도코커스 (*Rhodococcus*), 스트렙토미세스 (*Streptomyces*), 에스케리키아 (*Escherichia*), 슈도모나스 (*Pseudomonas*), 메틸로모나스 (*Methylobacter*), 알칼리게네스 (*Alcaligenes*), 시네토코스티스 (*Synechocystis*), 아나배나 (*Anabaena*), 티오바실루스 (*Thiobacillus*), 메타노박테리움 (*Methanobacterium*) 및 클렙시엘라 (*Klebsiella*)가 포함되나, 이에 제한되지는 않는다.

<167> 여러 발현 시스템을 사용하여 본 발명의 펩티드를 제조할 수 있다. 이러한 벡터에는 염색체, 에피솜 및 바이러스 유래된 벡터, 예를 들어 박테리아 플라스미드, 박테리오파지, 트랜스포손, 삽입 인자, 효모 에피솜, 바이러스, 예컨대 배칼로바이러스, 레트로바이러스로부터 유래된 벡터, 및 이들의 조합으로부터 유래된 벡터, 예컨대 플라스미드 및 박테리오파지 유전 인자로부터 유래된 벡터, 예컨대 코스미드 및 파지미드가 포함되나, 이에 제한되지는 않는다. 발현 시스템 구성은 발현을 조절하며 또한 일으키는 조절 영역을 포함할 수 있다. 일반적으로, 숙주 세포에서 폴리뉴클레오티드 또는 폴리펩티드를 유지하거나, 증식시키거나 또는 발현시키기에 적합한 임의의 시스템 또는 벡터를 이와 관련하여 발현에 사용할 수 있다. 미생물 발현 시스템 및 발현 벡터는 숙주 세포의 성장에 대해 외래 단백질의 높은 수준의 발현을 지시하는 조절 서열을 함유한다. 조절 서열은 당업자들에게 잘 알려져 있으며, 예에는 벡터 내의 조절 인자, 예를 들어 증강 서열의 존재를 비롯한, 화학적 또는 물리적 자극에 대해 반응하여 유전자의 발현이 켜지거나 또는 꺼지도록 유발하는 것들이 포함되나, 이에 제한되지는 않는다. 임의의 이러한 것들은 본 발명의 임의의 결합 펩티드의 생성을 위한 키메라 유전자를 구성하는데 사용될 수 있다. 이후, 이러한 키메라 유전자를 형질전환을 통해 적절한 미생물로 도입하여, 높은 수준의 펩티드의 발현을 제공할 수 있다.

<168> 적합한 숙주 세포의 형질전환에 유용한 벡터 또는 카세트는 당업계에 잘 알려져 있다. 전형적으로, 벡터 또는 카세트는 관련된 유전자의 전사 및 번역을 지시하는 서열, 하나 이상의 선택가능한 마커, 및 자율적으로 복제하거나 염색체를 통합하도록 하는 서열을 함유한다. 적합한 벡터는 전사 개시를 조절하는 유전자의 영역 5' 및 전사 종결을 조절하는 DNA 단편의 영역 3'를 포함한다. 비록 이러한 조절 영역은 생성 숙주로서 선택된 특정 종에 타고난 유전자로부터 유래될 필요는 없다고 이해되지만, 조절 영역 둘 모두 형질전환된 숙주 세포에 대한 유전자 상동성으로부터 유래된 경우가 가장 바람직하다. 선택가능한 마커 유전자는 형질전환된 숙주 세포의 선택을 위한 표현형, 예컨대 대장균에서의 테트라사이클린 또는 암피실린 내성을 제공한다.

<169> 목적 숙주 세포에서의 키메라 유전자를 발현하도록 하는데 유용한 개시 조절 영역 또는 프로모터는 많으며 당업자들에게 친숙하다. 실질적으로, 유전자를 구동할 수 있는 임의의 프로모터가 본 발명의 결합 펩티드의 생성에 적합하며, 이에 CYC1, HIS3, GAL1, GAL10, ADH1, PGK, PHO5, GAPDH, ADC1, TRP1, URA3, LEU2, ENO, TPI (사카로미세스에서의 발현에 유용함); AOX1 (피치아에서의 발현에 유용함); 및 lac, ara, tet, trp, IP_L, IP_R, T7, tac 및 trc (대장균에서의 발현에 유용함), 및 또한 amy, apr, npr 프로모터 및 바실루스에서의 발현에 유용한 여러 파지 프로모터가 포함되나, 이에 제한되지는 않는다.

<170> 또한, 종결 조절 영역은 바람직한 숙주 고유의 여러 유전자로부터 유래될 수 있다. 임의로, 종결 부위는 불필요할 수 있으나, 포함되는 경우가 가장 바람직하다.

<171> 상기 기재된 것과 같은 적절한 DNA 서열을 함유하는 벡터, 및 또한 적절한 프로모터 또는 대조 서열을 적절한 숙주를 형질전환시키는데 사용하여, 숙주가 본 발명의 펩티드를 발현하도록 할 수 있다. 무세포 번역 시스템 또한 본 발명의 DNA 구조로부터 유래된 RNA를 사용하여 이러한 펩티드를 제조하는데 사용할 수 있다. 임의로, 형질전환된 숙주의 분비 생성물로서 즉석 유전자 생성물을 제조하는 것이 바람직할 수 있다. 성장 배지로의 원하는 단백질의 분비는 정제 절차가 단순화되며 보다 저렴해진다는 이점을 갖는다. 분비 신호 서열은 세포막을 통해 발현가능한 단백질의 능동 수송을 촉진하는데 종종 유용하다는 것이 당업계에 잘 알려져 있다. 분비 가능한 형질전환된 숙주의 생성은 숙주 제조에 기능성인 분비 신호에 대해 코딩하는 DNA 서열의 도입에 의해 달성될 수 있다. 적절한 신호 서열을 선택하는 방법은 당업계에 잘 알려져 있다 (예를 들어, EP 546049 및 WO 9324631 참조). 분비 신호 DNA 또는 촉진제는 발현-조절 DNA, 및 즉석 유전자 또는 유전자 단편 사이에, 및 유전자 단편을 갖는 동일한 리딩 프레임에 위치할 수 있다.

<172> 펩티드계 피부 유익제

<173> 본 발명의 펩티드계 피부 유익제는 피부 관리 조성물-저항성 피부-결합 펩티드 (SCP)를 유익제 (BA), 예컨대 컨디셔너, 착색제, 향료 및 선스크린 등과 커플링하여 형성된다. 펩티드계 유익제의 피부 관리 조성물-저항성 피

부-결합 펩티드 부분은 피부 관리 조성물 매트릭스로부터 피부에 강하게 결합하며, 이에 따라 긴 지속 효과를 위해 피부에 부착된 유익제를 유지시킨다. 피부 관리 조성물-저항성 피부-결합 펩티드 및 유익제 사이의 커플링 상호작용은 공유 결합 또는 비-공유 상호작용일 수 있으며, 하기 기재된 것과 같이 임의의 스페이서를 통할 수 있다.

<174> 또한, 항 등의 본원과 동시계류 중이며 공동 명의인 미국 특허 출원 공보 제2005/0050656호에 기재된 것과 같이, 펩티드계 유익제와 피부 사이의 상호작용을 증강시키기 위해 유익제에 커플링된 다중 피부 관리 조성물-저항성 피부-결합 펩티드를 갖는 것이 바람직할 수 있다. 단일 피부 관리 조성물-저항성 피부-결합 펩티드 서열의 다중 복제체를 유익제에 커플링하거나, 또는 2개 이상의 피부 관리 조성물-저항성 피부-결합 펩티드 서열을 직접 또는 스페이서를 통해 서로 연결하고, 얻어진 다-복제체 피부-결합 서열을 유익제에 커플링하여 수행될 수 있다. 추가적으로, 다-복제체 피부 관리 조성물-저항성 피부-결합 펩티드 서열의 다중 복제체를 유익제에 커플링할 수 있다. 이러한 모든 펩티드계 피부 유익제에서, 동일한 피부 관리 조성물-저항성 피부-결합 펩티드의 다중 복제체를 또는 상이한 피부 관리 조성물-저항성 피부-결합 펩티드의 조합을 사용할 수 있다.

<175> 본 발명의 한 실시양태에서, 펩티드계 유익제는 화학식 $(SCP)_m$ -BA를 갖는, 피부 관리 조성물-저항성 피부-결합 펩티드 (SCP) 및 유익제 (BA)로 이루어진 2중 블록 조성물이며, 여기서 m은 1 내지 약 100, 바람직하게는 1 내지 약 10의 범위이다. 유익제가 분자 종인 경우, n은 1 내지 약 100, 바람직하게는 1 내지 약 10의 범위이다. 유익제가 입자, 예컨대 안료인 경우, n은 1 내지 약 50,000, 바람직하게는 1 내지 약 10,000의 범위이다.

<176> 또 다른 실시양태에서, 펩티드계 유익제는 피부 관리 조성물-저항성 피부-결합 펩티드를 유익제로부터 분리하는 스페이서 (S)를 함유한다. 피부 관리 조성물-저항성 피부-결합 펩티드의 다중 복제체를 단일 스페이서 분자와 커플링할 수 있다. 별법으로, 피부 관리 조성물-저항성 피부-결합 펩티드의 다중 복제체는 여러 스페이서에 의해 분리될 수 있다. 이러한 실시양태에서, 펩티드계 유익제는 화학식 $[(SCP)_x-S]_n$ -BA를 갖는, 피부 관리 조성물-저항성 피부-결합 펩티드, 스페이서 및 유익제로 이루어진 3중 블록 조성물이며, 여기서 x는 1 내지 약 10의 범위이며, 바람직하게는 x는 1이고, m은 1 내지 약 100, 바람직하게는 1 내지 약 10의 범위이다. 유익제가 분자 종, 예컨대 염료 또는 비-입자 컨디셔닝제인 경우, n은 1 내지 약 100, 바람직하게는 1 내지 약 10의 범위이다. 유익제가 입자, 예컨대 안료인 경우, n은 1 내지 약 50,000, 바람직하게는 1 내지 약 10,000의 범위이다.

<177> 본원에서 기재된 것과 같은 SCP는 일반적 명칭이며, 단일 피부 관리 조성물-저항성 피부-결합 펩티드 서열을 나타내는 것을 의미하는 것이 아니라는 것을 이해하여야 한다. 상기 기재된 것과 같이 m, n 또는 x가 1 초과인 경우, 이는 일련의 상이한 서열의 피부-결합 펩티드가 조성물의 일부를 형성할 수 있는 경우의 상황에 대해 제공하기 위한 본 발명의 범주 내에 있다. 추가적으로, S는 일반적인 용어이며 단일 스페이서를 나타내는 것을 의미하는 것은 아니다. 3중 블록 조성물에 대해 상기 사용된 것과 같이 m 또는 n이 1 초과인 경우, 이는 일련의 상이한 스페이서가 조성물의 일부를 형성할 수 있는 경우의 상황에 대해 제공하기 위한 본 발명의 범주 내에 있다. 또한, 이러한 구조는 반드시 펩티드, 유익제 및 임의로 스페이서 사이의 공유 결합을 나타내는 것이 아니라는 것을 이해하여야 한다. 하기 기재된 것과 같이, 펩티드, 유익제 및 임의로 스페이서 사이의 커플링 상호작용은 공유 또는 비-공유 중 하나일 수 있다.

<178> 본 발명의 피부 관리 조성물-저항성 피부-결합 펩티드계 유익제의 제조는 피부 컨디셔너 및 피부 착색제에 대해 하기 기재되어 있다. 이러한 방법은 다른 유익제에 적용될 수 있으며, 이러한 다른 피부 관리 조성물-저항성 피부-결합 펩티드계 유익제가 본 발명의 범주 내에 있다는 것을 이해하여야 한다.

<179> 펩티드계 피부 컨디셔너

<180> 본 발명의 펩티드계 피부 컨디셔너는 피부 관리 조성물-저항성 피부-결합 펩티드 (SCP)를 피부 컨디셔닝제 (SCA)와 커플링하여 형성된다. 컨디셔너의 피부 관리 조성물-저항성 피부-결합 펩티드 부분은 피부 관리 조성물 매트릭스로부터 피부에 강하게 결합하여, 이에 따라 컨디셔닝 효과를 오래 지속시키기 위해 피부에 부착된 컨디셔닝제를 유지시킨다. 피부 관리 조성물-저항성 피부-결합 펩티드는 상기 기재된 방법을 사용하여 확인된다.

<181> 본원에서 정의된 것과 같은 피부 컨디셔닝제에는 피부를 팽팽하게 하는 아스트린젠트; 죽은 피부 세포를 제거하는 박리제; 매끄럽고 부드럽고 유연한 외관을 유지시키는 것을 돕는 피부 연화제; 피부의 상층의 수분 함량을 증가시키는 보습제; 피부 표면으로부터 수분의 증발을 방해하는 폐쇄제 (occlusive); 건강 증진제 및 건조 또는 손상된 피부의 외관을 강화시키거나, 박리를 줄이며 유연함을 유지시키는 기타 화합물이 포함되나, 이에 제한되지는 않는다. 본 발명의 펩티드계 피부 컨디셔너에서, 임의의 적합한 공지된 피부 컨디셔닝제를 사용할 수 있

다. 피부 컨디셔닝제는 당업계에서 잘 알려져 있으며 (예를 들어, 본원에 참고로 포함되는 그린 (Green) 등의 WO 0107009 참조), 여러 공급원으로부터 시판된다. 피부 컨디셔닝제의 적합한 예에는 알파-히드록시산, 베타-히드록시산, 폴리에틸렌, 히알루론산, D,L-판테놀, 폴리살리실레이트, 비타민 A 팔미테이트, 비타민 E 아세테이트, 글리세린, 소르비톨, 실리콘, 실리콘 유도체, 라놀린, 천연 오일, 트리글리세리드 에스테르, 감마 아미노부티르산, 호르몬, 에컨대 인간 성장 호르몬, 및 인슐린-유사 성장 인자-I가 포함되나, 이에 제한되지는 않는다. 본 발명의 바람직한 피부 컨디셔닝제는 폴리살리실레이트, 프로필렌 글리콜 (CAS 제57-55-6호, 다우 케미칼 (Dow Chemical; 미시간주 미들랜드 (Midland, MI) 소재), 글리세린 (CAS 제56-81-5호, 프록터 & 갬블 캄파니 (Proctor & Gamble Co.; 오하이오주 신시내티 (Cincinnati, OH) 소재)), 글리콜산 (CAS 제79-14-1호, 듀폰 캄파니 (DuPont Co.; 델라웨어주 월밍톤 (Wilmington, DE) 소재)), 락트산 (CAS 제50-21-5호, 알파 에이지 (Alfa Aesar; 매사추세츠주 워드 힐 (Ward Hill, MA) 소재)), 말산 (CAS 제617-48-1호, 알파 에이지), 시트르산 (CAS 제77-92-9호, 알파 에이지), 타르타르산 (CAS 제133-37-9호, 알파 에이지), 글루카르산 (CAS 제87-73-0호), 갈락타르산 (CAS 제526-99-8호), 3-히드록시발레르산 (CAS 제10237-77-1호), 살리실산 (CAS 제69-72-7호, 알파 에이지) 및 1,3 프로판디올 (CAS 제504-63-2호, 듀폰 캄파니 (델라웨어주 월밍톤 소재))이다. 폴리살리실레이트는 본원에 참고로 포함되는 화이트 (White) 등의 미국 특허 제4,855,483호에 기재된 방법에 의해 제조할 수 있다. 글루카르산은 문헌 [Merbouh et al, Carbohydr. Res. 336:75-78 (2001)]에 기재된 방법을 사용하여 합성할 수 있다. 3-히드록시발레르산은 브라무치 (Bramucci)의 WO 02/012530에 기재된 것과 같이 제조할 수 있다.

<182>

본 발명의 펩티드계 피부 컨디셔너는 특정 피부 관리 조성물-저항성 피부-결합 펩티드를 피부 컨디셔닝제에 직접 또는 임의로 스페이서를 통해 커플링하여 제조된다. 커플링 상호작용은 공유 결합 또는 비-공유 상호작용, 에컨대 수소 결합, 정전기 상호작용, 소수성 상호작용 또는 반 데르 발스 상호작용일 수 있다. 비-공유 상호작용의 경우, 펩티드계 피부 컨디셔너는 펩티드를 컨디셔닝제 및 임의로 스페이서 (사용되는 경우)와 혼합하고, 충분한 시간 동안 상호작용이 발생하도록 하여 제조할 수 있다. 당업계에 알려진 방법, 예를 들어 겔 투과 크로마토그래피를 사용하여 비결합된 물질을 얻어진 펩티드계 피부 컨디셔너 부가물로부터 분리할 수 있다.

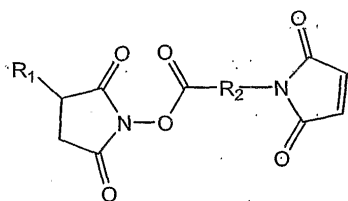
<183>

황 등의 본원과 동시계류 중이며 공동 명의인 미국 특허 출원 공보 제2005/0050656호에 기재된 것과 같이, 본 발명의 펩티드계 피부 컨디셔너는 특정 피부 관리 조성물-저항성 피부-결합 펩티드를 피부 컨디셔닝제에 직접 또는 스페이서를 통해 공유적으로 부착시켜 제조할 수도 있다. 임의의 적합한 공지된 펩티드 또는 단백질 컨주게이션 화학을 사용하여 본 발명의 펩티드계 피부 컨디셔너를 형성할 수 있다. 컨주게이션 화학은 당업계에 잘 알려져 있다 (예를 들어, 문헌 [Hermanson, Bioconjugate Techniques, Academic Press, New York (1996)] 참조). 적합한 커플링제에는 카르보디이미드 커플링제, 산 염화물, 이소시아네이트, 에폭시드, 말레이미드, 및 펩티드에서의 말단 아민 및/또는 카르복실산 기, 및 술폰히드릴 기에 대해 반응성이며, 피부 컨디셔닝제에서의 아민, 카르복실산 또는 알콜기에 반응성인 기타 관능성 커플링 시약이 포함되나, 이에 제한되지는 않는다. 추가적으로, 펩티드에서의 반응성 아민 또는 카르복실산기를 보호하여 펩티드계 피부 컨디셔너에 대한 원하는 구조를 생성하는 것이 필요할 수 있다. 아미노산에 대한 보호기, 에컨대 t-부틸옥시카르보닐 (t-Boc)의 사용은 당업계에 잘 알려져 있다 (예를 들어, 스튜어트 등의 상기 문헌; 보단스즈키의 상기 문헌; 및 페닝톤 등의 상기 문헌 참조). 몇몇 경우에서, 피부-결합 펩티드에의 커플링을 위해 반응성 기, 에컨대 카르복실산, 알콜, 아민, 이소시아네이트 또는 알데히드기를 피부 컨디셔닝제에 도입하는 것이 필요할 수 있다. 이러한 변형은 통상의 화학, 에컨대 산화, 환원 및 포스겐화 등을 사용하여 될 수 있으며, 이는 당업계에 잘 알려져 있다.

<184>

피부 관리 조성물-저항성 피부-결합 펩티드를 스페이서를 통해 피부 컨디셔닝제와 커플링하는 것도 바람직할 수 있다. 스페이서는 펩티드로부터 컨디셔닝제를 분리하도록 하여, 작용제가 펩티드와 피부와의 결합을 방해하지 않는 것을 보장한다. 스페이서는 임의의 여러 분자, 에컨대 알킬쇄, 페닐 화합물, 에틸렌 글리콜, 아미드 및 에스테르 등일 수 있다. 바람직한 스페이서는 친수성이며, 1 내지 약 100개 원자, 보다 바람직하게는 2 내지 약 30개 원자의쇄 길이를 갖는다. 바람직한 스페이서의 예에는 에탄올 아민, 에틸렌 글리콜, 6개 탄소 원자의쇄 길이를 갖는 폴리에틸렌, 3 내지 6개 반복 단위를 갖는 폴리에틸렌 글리콜, 페녹시에탄올, 프로판올아미드, 부틸렌 글리콜, 부틸렌글리콜아미드, 프로필 페닐, 및 에틸, 프로필, 헥실, 스테릴, 세틸, 및 팔미토일 알킬쇄가 포함되나, 이에 제한되지는 않는다. 스페이서는 상기 기재된 임의의 커플링 화학 반응을 사용하여 펩티드 및 피부 컨디셔닝제에 공유적으로 부착될 수 있다. 스페이서의 도입을 촉진시키기 위해, 펩티드 및 컨디셔닝제에의 커플링을 위해 양쪽 말단 모두에서 스페이서 및 반응성기를 함유하는 이관능성 가교제를 사용할 수 있다. 적합한 이관능성 가교제는 당업계에 잘 알려져 있으며, 디아민, 에컨대 1,6-디아미노헥산; 디알데히드, 에컨대 글루타라알데히드; 비스 N-히드록시숙신이미드 에스테르, 에컨대 에틸렌 글리콜-비스(숙신산 N-히드록시숙신이미드 에스테르), 디숙신이미딜 글루타레이트, 디숙신이미딜 수베레이트, 및 에틸렌 글리콜-비스(숙신이미딜숙신네이트); 디이소시아네이트, 에컨대 헥사메틸렌디이소시아네이트; 비스 옥시란, 에컨대 1,4 부탄디일 디글리시

딜 에테르; 및 디카르복실산, 예컨대 숙신디살리실레이트 등이 포함되나, 이에 제한되지는 않는다. 각각의 말단에 상이한 반응성 기를 함유하는 헤테로이관능성 가교제 또한 사용될 수 있다. 헤테로이관능성 가교제의 예



에는 화학식 (식 중, R₁은 H 또는 치환체 기, 예컨대 -SO₃Na, -NO₂ 또는 -Br이고, R₂는 스페이서, 예컨대 -CH₂CH₂ (에틸), -(CH₂)₃ (프로필) 또는 -(CH₂)₃C₆H₅ (프로필 페닐)임)를 갖는 화합물이 포함되나, 이에 제한되지는 않는다. 이러한 헤테로이관능성 가교제의 예는 3-말레이미도프로피온산 N-히드록시숙신이미드 에스테르이다. 이들 시약의 N-히드록시숙신이미드 에스테르기는 컨디셔너에서의 아민 또는 알콜기와 반응하는 반면, 말레이미드기는 펩티드에 존재하는 티올기와 반응한다. 티올기는 하나 이상의 시스테인기를 결합 펩티드 서열의 적어도 한쪽 말단, 즉 C-말단 또는 N-말단에 첨가하여 펩티드에 도입할 수 있다. 여러 스페이서 아미노산 잔기, 예컨대 글리신을 결합 펩티드 서열 및 말단 시스테인 사이에 도입하여, 결합 서열로부터 반응 티올기를 분리시킬 수 있다. 게다가, 하나 이상의 리신 잔류물을 결합 펩티드 서열의 적어도 한쪽 말단, 즉 C-말단 또는 N-말단에 첨가하여, 커플링을 위한 아민기를 제공할 수 있다.

<185>

추가적으로, 스페이서는 임의의 아미노산 및 그의 혼합물을 포함하는 펩티드일 수 있다. 바람직한 펩티드 스페이서는 아미노산, 예컨대 프롤린, 리신, 글리신, 알라닌 및 세린, 및 그의 혼합물을 포함한다. 추가적으로, 펩티드 스페이서는 특정 효소 절단 부위, 예컨대 서열 1로 주어지는 프로테아제 카스파아제 3 부위를 포함할 수 있으며, 이는 피부로부터 컨디셔닝제의 효소적 제거를 가능하게 한다. 펩티드 스페이서는 1 내지 약 50개 아미노산, 바람직하게는 1 내지 약 20개 아미노산 길이일 수 있다. 펩티드 스페이서의 예에는 서열 5 내지 7이 포함되나, 이에 제한되지는 않는다. 이들 펩티드 스페이서는 당업계에 알려진 임의의 방법에 의해 결합 펩티드 서열에 연결될 수 있다. 예를 들어, 상기 기재된 표준 펩티드 합성 방법을 사용하여 전체 결합 펩티드-펩티드 스페이서-2중 블록을 제조할 수 있다. 추가적으로, 카르보디이미드 커플링제 (예를 들어, 문헌 [Hermanson, Bioconjugate Techniques, Academic Press, New York (1996)]), 이산 염화물, 디이소시아네이트 및 펩티드에서의 말단 아민 및/또는 카르복실산기에 반응성인 기타 이관능성 커플링 시약을 사용하여 결합 펩티드 및 펩티드 스페이서 블록을 합칠 수 있다. 별법으로, 상기 기재된 재조합 DNA 및 분자 클로닝 기법을 사용하여 전체 결합 펩티드-펩티드 스페이서-2중 블록을 제조할 수 있다. 또한, 스페이서는 펩티드 스페이서 및 유기 스페이서 분자의 조합일 수 있으며, 이는 상기 기재된 방법을 사용하여 제조될 수 있다.

<186>

또한, 펩티드계 피부 컨디셔너 및 피부 사이의 상호작용을 증강시키기 위해 피부 컨디셔닝제에 커플링된 다중 피부 관리 조성물-저항성 피부-결합 펩티드를 갖는 것이 바람직할 수 있다. 동일한 피부-결합 펩티드의 다중 복제체 또는 상이한 피부-결합 펩티드의 조합물 중 하나를 사용할 수 있다. 거대 컨디셔닝 입자 (예를 들어, 입자 에멀션)의 경우, 다수, 즉 약 50,000개 이하의 피부-결합 펩티드를 컨디셔닝제에 커플링할 수 있다. 소수의 피부-결합 펩티드를 보다 적은, 즉 약 100개 이하의 컨디셔너 분자에 커플링할 수 있다. 추가적으로, 펩티드의 다중 복제체를 서로 연결시키고, 피부 컨디셔닝제에 커플링할 수 있다. 이에 따라, 본 발명의 한 실시양태에서, 펩티드계 피부 컨디셔너는 화학식 (SCP)_m-SCA를 갖는, 피부 관리 조성물-저항성 피부-결합 펩티드 (SCP) 및 피부 컨디셔닝제 (SCA)로 이루어진 2중 블록 조성물이며, 여기서 m은 1 내지 약 100, 바람직하게는 1 내지 약 10의 범위이다. 컨디셔닝제가 분자 종인 경우, n은 1 내지 약 100, 바람직하게는 1 내지 약 10의 범위이다. 컨디셔닝제가 입자인 경우, n은 1 내지 약 50,000, 바람직하게는 1 내지 약 10,000의 범위이다.

<187>

또 다른 실시양태에서, 펩티드계 피부 컨디셔너는 상기 기재된 것과 같이 피부 컨디셔닝제로부터 피부 관리 조성물-저항성 피부-결합 펩티드를 분리하는 스페이서 (S)를 함유한다. 피부-결합 펩티드의 다중 복제체를 단일 스페이서 분자에 커플링할 수 있다. 추가적으로, 펩티드의 다중 복제체를 스페이서를 통해 서로 연결시키고, 스페이서를 통해 피부 컨디셔닝제에 커플링할 수 있다. 이러한 실시양태에서, 펩티드계 피부 컨디셔너는 화학식 [(SCP)_x-S]_m-SCA를 갖는, 피부 관리 조성물-저항성 피부-결합 펩티드, 스페이서 및 피부 컨디셔닝제로 이루어진 3중 블록 조성물이며, 여기서 x는 1 내지 약 10의 범위이며, 바람직하게는 x는 1이고, m은 1 내지 약 100의 범위이며, 바람직하게는 m은 1 내지 약 10이다. 피부 컨디셔닝제가 분자 종, 즉 비-입자 컨디셔닝제인 경우, n은 1 내지 약 100, 바람직하게는 1 내지 약 10의 범위이다. 피부 컨디셔닝제가 입자인 경우, n은 1 내지 약 50,000, 바람직하게는 1 내지 약 10,000의 범위이다.

- <188> 본원에서 기재된 것과 같은 SCP는 일반적인 명칭이며, 단일 피부-결합 펩티드 서열을 나타내는 것을 의미하는 것이 아니라는 것을 이해하여야 한다. 상기 기재된 것과 같은 m, n 또는 x가 1 초과인 경우, 일련의 상이한 서열의 피부-결합 펩티드가 조성물의 일부를 형성할 수 있는 경우의 상황에 대해 제공하기 위한 본 발명의 범주 내에 있다. 추가적으로, S는 일반적인 용어이며, 단일 스페이서를 나타내는 것을 의미하는 것은 아니다. 3중 블록 조성물에 대해 상기 사용된 것과 같은 m 또는 n이 1 초과인 경우, 일련의 상이한 스페이서가 조성물의 일부를 형성할 수 있는 경우의 상황에 대해 제공하기 위한 본 발명의 범주 내에 있다. 이러한 구조가 펩티드, 피부 컨디셔닝제 및 임의로 스페이서 사이의 공유 결합을 반드시 나타낼 필요는 없다는 것 또한 이해하여야 한다. 상기 기재된 것과 같이, 펩티드, 피부 컨디셔닝제 및 임의로 스페이서 사이의 커플링 상호작용은 공유 또는 비-공유 중 하나일 수 있다.
- <189> 본 발명의 펩티드계 피부 컨디셔너는 피부 관리용 제품에서 사용될 수 있다. 또한, 피부-결합 펩티드 자체가 피부를 위한 컨디셔닝제로서 기능할 수 있다는 것을 인지하여야 한다. 피부 관리 제품 조성물에는 피부 컨디셔너, 피부 클렌저, 메이크-업, 안티-링클 제품 및 피부 착색제가 포함되나, 이에 제한되지는 않는다. 한 실시양태에서, 피부 관리 제품 조성물은 피부 컨디셔닝 제품이다. 또 다른 실시양태에서, 피부 관리 조성물은 피부 착색 제품이다. 또 다른 실시양태에서, 피부 관리 제품 조성물은 피부 클렌징 제품이다.
- <190> 본 발명의 피부 관리 제품 조성물은 미용상 허용되는 매질 중 유효량의 펩티드계 피부 컨디셔너 또는 상이한 펩티드계 피부 컨디셔너의 혼합물을 포함한다. 피부 관리 조성물에 대한 유효량의 펩티드계 피부 컨디셔너 또는 피부-결합 펩티드는 본원에서 조성물의 총 중량에 대하여 약 0.001 내지 약 10 중량%, 바람직하게는 약 0.01 내지 약 5 중량%의 분율로서 정의된다. 이러한 분율은 피부 관리 제품의 유형의 기능에 따라 다양할 수 있다. 피부 관리 제품에 대한 미용상 허용되는 매질의 성분은 당업계에 잘 알려져 있으며, 예는 상기 기재된 것과 같다.
- <191> 펩티드계 피부 착색제
- <192> 본 발명의 펩티드계 피부 착색제는 피부 관리 조성물-저항성 피부-결합 펩티드 (SCP)를 착색제 (C)와 커플링하여 형성된다. 펩티드계 피부 착색제의 피부 관리 조성물-저항성 피부-결합 펩티드 부분은 피부 관리 조성물 매트릭스로부터 피부에 강하게 결합하며, 이에 따라 피부 착색 효과를 오래 지속시키기 위해 피부에 부착된 착색제를 유지시킨다. 피부 관리 조성물-저항성 피부-결합 펩티드는 상기 기재된 방법을 사용하여 확인된다.
- <193> 본 발명의 펩티드계 피부 착색제는 상기 기재된 임의의 커플링 방법을 사용하여 특정 피부 관리 조성물-저항성 피부-결합 펩티드를 착색제와 직접 또는 스페이서를 통해 커플링하여 제조된다. 본원에서 정의된 것과 같은 착색제는 피부의 색을 변화시키는데 사용될 수 있는 임의의 염료 및 안료 등이다. 본 발명의 펩티드계 피부 착색제에서, 임의의 적합한 공지된 착색제를 사용할 수 있다. 착색제는 당업계에 잘 알려져 있으며 (예를 들어, 그린 등의 상기 문헌, 문헌 [CFTA International Color Handbook, 2nd ed., Micelle Press, England (1992)] 및 [Cosmetic Handbook, US Food and Drug Administration, FDA/IAS Booklet (1992)] 참조), 여러 공급원 (예를 들어, 바이엘 (Bayer; 펜실베이니아주 피츠버그 (Pittsburgh, PA) 소재); 시바-가이거 (Ciba-Geigy; 뉴욕주 태리타운 (Tarrytown, NY) 소재); ICI (뉴 저지주 브리지워터 (Bridgewater, NJ) 소재); 샌도즈 (Sandoz; 오스트리아 비엔나 (Vienna, Austria) 소재); BASF (뉴 저지주 마운트 올리브 (Mount Olive, NJ) 소재); 및 Hoechst (독일 프랑크푸르트 (Frankfurt, Germany) 소재)로부터 시판된다. 본 발명의 펩티드계 피부 착색제에서 사용하기 위한 바람직한 착색제에는 염료 (에오신 유도체, 예컨대 D&C 레드 21번 및 할로겐화된 플루오레세인 유도체, 예컨대 D&C 레드 27번, D&C 레드 21번과 조합한 D&C 레드 오렌지 5번 및 D&C 오렌지 10번), 및 안료 (이산화티탄, 산화아연, D&C 레드 36번 및 D&C 오렌지 17번, D&C 레드 7, 11, 31 및 34번의 칼슘 레이크, D&C 레드 12번의 바륨 레이크, D&C 레드 13번의 스트론튬 레이크, FD&C 옐로우 5번, FD&C 옐로우 6번, D&C 레드 27번, D&C 레드 21번 및 FD&C 블루 1번의 알루미늄 레이크, 산화철, 망간 바이올렛, 산화크롬, 울트라마린 블루 및 카본 블랙)이 포함된다. 또한, 착색제는 태양에의 노출 없이 피부에 태닝된 외관을 생성하는 선리스 태닝제 (sunless tanning agent), 예컨대 디히드록시아세톤일 수 있다.
- <194> 추가적으로, 부착, 흡수 또는 흡착된 염료를 갖는 유기 및 무기 나노입자를 착색제로서 사용할 수 있다. 예를 들어, 착색제는 착색된 중합체 나노입자일 수 있다. 중합체 미소구체의 예에는 폴리스티렌, 폴리메틸메타크릴레이트, 폴리비닐톨루엔, 스티렌/부타디엔 공중합체 및 라텍스의 미소구체가 포함되나, 이에 제한되지는 않는다. 본 발명에서의 사용을 위하여, 미소구체는 약 10 나노미터 내지 약 2 마이크로미터의 직경을 갖는다. 미소구체는 임의의 적합한 염료, 예컨대 상기 기재된 것들을 미소구체와 커플링시켜 착색될 수 있다. 염료는 미소구체의 표면에 커플링되거나 또는 다공성 미소구체의 다공성 구조 내에 흡착될 수 있다. 공유 부착이 가능

하도록 관능화된 비염색된 미소구체 및 염색된 미소구체를 비롯한 적합한 미소구체는 방 레보라토리스 (Bang Laboratories; 인디애나주 피셔 (Fishers, IN) 소재)와 같은 회사에서 시판된다.

<195> 또한, 펩티드계 피부 착색제 및 피부 사이의 상호작용을 증강시키기 위해 착색제에 커플링된 다중 피부 관리 조성물-저항성 피부-결합 펩티드를 갖는 것이 바람직할 수 있다. 동일한 피부-결합 펩티드의 다중 복제체 또는 상이한 피부-결합 펩티드의 조합 중 하나를 사용할 수 있다. 추가적으로, 다중 피부-결합 펩티드 서열을 상기 기재된 것과 같이 서로 연결시키고, 착색제에 커플링할 수 있다. 거대 안료 입자의 경우, 다수, 즉 약 50,000 개 이하의 피부-결합 펩티드를 안료에 커플링할 수 있다. 보다 소수의 피부-결합 펩티드를 보다 소수, 즉 약 100개 이하의 염료 분자에 커플링시킬 수 있다. 이에 따라, 본 발명의 한 실시양태에서, 펩티드계 피부 착색제는 화학식 $(SCP_m)_n-C$ 를 갖는, 피부 관리 조성물-저항성 피부-결합 펩티드 (SCP) 및 착색제 (C)로 이루어진 2중 블록 조성물이며, 여기서 m은 1 내지 약 100의 범위이며, 바람직하게는 m은 1 내지 약 10이다. 착색제가 분자 중, 예컨대 염료인 경우, n은 1 내지 약 100, 바람직하게는 1 내지 약 10의 범위이다. 착색제가 입자, 예컨대 안료 또는 나노입자인 경우, n은 1 내지 약 50,000, 바람직하게는 1 내지 약 10,000의 범위이다.

<196> 또 다른 실시양태에서, 펩티드계 피부 착색제는 상기 기재된 것과 같이 착색제로부터 결합 펩티드를 분리하는 스페이서 (S)를 함유한다. 피부-결합 펩티드의 다중 복제체를 단일 스페이서 분자에 커플링할 수 있다. 추가적으로, 펩티드의 다중 복제체를 스페이서를 통해 서로 연결하고, 스페이서를 통해 착색제에 커플링할 수 있다. 이러한 실시양태에서, 펩티드계 피부 착색제는 화학식 $[(SCP_x-S)_m]_n-C$ 를 갖는, 피부 관리 조성물-저항성 피부-결합 펩티드, 스페이서 및 착색제로 이루어진 3중 블록 조성물이며, 여기서 x는 1 내지 약 10의 범위이며, 바람직하게는 x는 1이고, m은 1 내지 약 100의 범위이며, 바람직하게는 m은 1 내지 약 10이다. 착색제가 분자 중, 예컨대 염료인 경우, n은 1 내지 약 100, 바람직하게는 1 내지 약 10의 범위이다. 착색제가 입자, 예컨대 안료 또는 나노입자인 경우, n은 1 내지 약 50,000, 바람직하게는 1 내지 약 10,000의 범위이다.

<197> 본원에서 사용된 것과 같은 SCP는 일반적인 용어이며, 단일 피부-결합 펩티드 서열을 나타내는 것을 의미하는 것이 아니라는 것을 이해하여야 한다. 상기 기재된 것과 같이 m, n 또는 x가 1 초과인 경우, 일련의 상이한 서열의 피부-결합 펩티드가 조성물의 일부를 형성할 수 있는 경우의 상황에 대해 제공하기 위한 본 발명의 범주 내에 있다. 추가적으로, S는 일반적인 용어이며, 단일 스페이서를 나타내는 것을 의미하는 것은 아니다. 3중 블록 조성물에 대해 상기 사용된 것과 같이 m 또는 n이 1 초과인 경우, 일련의 상이한 스페이서가 조성물의 일부를 형성할 수 있는 경우의 상황에 대해 제공하기 위한 본 발명의 범주 내에 있다. 또한, 이러한 구조는 펩티드, 착색제 및 임의로 스페이서 사이의 공유 결합을 나타낼 필요가 없다는 것을 이해하여야 한다. 상기 기재된 것과 같이, 펩티드, 착색제 및 임의로 스페이서 사이의 커플링 상호작용은 공유 또는 비-공유 중 하나일 수 있다.

<198> 본 발명의 펩티드계 피부 착색제는 화운테이션, 브러쉬, 립스틱, 립 라이너, 립 글로스, 아이섀도 및 아이라이너를 비제한적으로 비롯한 미용 및 메이크-업 제품에서의 착색제로서 사용될 수 있다. 이들은 지방 물질을 함유하는 미용상 허용되는 매질을 포함하는 무수 메이크-업 제품일 수 있거나, 또는 상기 기재된 것과 같이 적합한 분산액, 예컨대 유중수 또는 수중유 에멀션의 형태일 수 있다. 이러한 조성물에서, 펩티드계 피부 착색제의 분율은 본원에서 조성물의 총 중량에 대하여 일반적으로 약 0.001 내지 약 40 중량%의 분율로서 정의된다.

<199> 피부 처리 방법

<200> 또 다른 실시양태에서, 본 발명의 펩티드계 컨디셔너 및 착색제로 피부를 처리하기 위한 방법을 제공한다. 구체적으로, 본 발명은 유효량의 펩티드계 피부 컨디셔너를 포함하는 상기 기재된 조성물 중 하나를 피부에 도포하고, 보호 필름을 형성하도록 하여, 피부에 펩티드계 컨디셔너의 보호 필름을 형성하는 방법 또한 포함한다. 본 발명의 조성물은 분무, 브러싱 및 손에 의한 도포를 비제한적으로 비롯한 다양한 방법에 의해 피부에 도포될 수 있다. 펩티드계 컨디셔너 조성물은 보호 필름을 형성하기에 충분한 시간, 바람직하게는 적어도 약 0.1 내지 60분 동안 피부와의 접촉을 유지한다.

<201> 또한, 본 발명은 유효량의 펩티드계 피부 착색제를 포함하는 피부 착색 조성물을 상기 기재된 방법에 의해 피부에 도포하여 피부를 착색하는 방법을 제공한다.

실시예

<202> 본 발명은 하기 실시예에서 추가로 정의된다. 이들 실시예는 비록 본 발명의 바람직한 실시양태를 나타내지만, 단지 예시 목적으로서 주어진다라는 것을 이해하여야 한다. 상기 논의 및 이들 실시예로부터, 당업자들은 본 발

명의 필수적인 특성을 확인할 수 있으며, 여러 용도 및 조건에 이를 적용하기 위해 그의 정신 및 범주로부터 벗어나지 않고 본 발명의 여러 변경 및 변형을 만들 수 있다.

<203> 사용된 약어의 의미는 하기와 같다. "min"은 "분"을 의미한다. "sec"는 "초"를 의미한다. "h"는 "시간"을 의미한다. "μL"은 "마이크로리터"를 의미한다. "mL"은 "밀리리터"를 의미한다, "L"은 "리터"를 의미한다. "nm"은 "나노미터"를 의미한다. "mm"은 "밀리미터"를 의미한다. "cm"은 "센티미터"를 의미한다. "μm"은 "마이크로미터"를 의미한다. "mM"은 "밀리몰 농도"를 의미한다. "M"은 "몰 농도"를 의미한다. "mmol"은 "밀리몰"을 의미한다 "μmol"은 "마이크로몰"을 의미한다. "g"은 "그램"을 의미한다. "μg"은 "마이크로그램"을 의미한다. "mg"은 "밀리그램"을 의미한다. "pfu"는 "플레이그 형성 단위 (plaque forming unit)"를 의미한다. "BSA"는 "소 혈청 알부민"을 의미한다. "ELISA"는 "효소 결합 면역흡수 분석법"을 의미한다. "A"는 "흡광도"를 의미한다. "A₄₅₀"은 "450 nm의 파장에서 측정된 흡광도"를 의미한다. "TBS"는 "트리스-완충 염수"를 의미한다. "TBST-X"는 "트윈[®] 20을 함유하는 트리스-완충 염수"를 의미하며, 여기서 "X"는 트윈[®] 20의 중량 분율이다. "SEM"은 "평균의 표준 오차"를 의미한다. "THF"는 "테트라히드로푸란"을 의미한다. "DMF"는 "디메틸포름아미드"를 의미한다. "Mw"는 "중량 평균 분자량"을 의미한다. "kDa"는 "킬로달톤"을 의미한다. "NMR"은 "핵자기 공명 분광법"을 의미한다. "v/v"는 "부피 대 부피 비"를 의미한다.

<204> 일반 방법

<205> 표준 재조합 DNA 및 분자 클로닝 기법은 당업계에 잘 알려져 있으며, 문헌 [Sambrook, J., Fritsch, E. F. and Maniatis, T., Molecular Cloning: A Laboratory Manual, Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, N.Y., 1989], [T. J. Silhavy, M. L. Bannan, and L. W. Enquist, Experiments with Gene Fusions, Cold Spring Harbor Laboratory, Cold Spring Harbor, N.Y., 1984], 및 [Ausubel, F. M. et al., Current Protocols in Molecular Biology, Greene Publishing Assoc. and Wiley-Interscience, N.Y., 1987]에 기재되어 있다.

<206> 박테리아 배양의 유지 및 성장에 적합한 재료 및 방법 또한 당업계에 잘 알려져 있다. 하기 실시예에서 사용하기에 적합한 기법은 문헌 [Manual of Methods for General Bacteriology, Philipp Gerhardt, R. G. E. Murray, Ralph N. Costilow, Eugene W. Nester, Willis A. Wood, Noel R. Krieg and G. Briggs Phillips, eds., American Society for Microbiology, Washington, DC, 1994] 또는 [Thomas D. Brock in Biotechnology: A. Textbook of Industrial Microbiology, Second Edition, Sinauer Associates, Inc., Sunderland, MA, 1989]에서 발견할 수 있다. 박테리아 세포의 성장 및 유지를 위한 실시예에서 기재된 모든 시약 및 물질은 달리 명시되지 않는다면 알드리치 케미칼스 (Aldrich Chemicals; 위스콘신주 밀워키 (Milwaukee, WI) 소재), BD 다이아그노스틱 시스템스 (BD Diagnostic Systems; 메릴랜드주 스파크스 (Sparks, MD) 소재), 라이프 테크놀로지스 (Life Technologies; 메릴랜드주 록빌 (Rockville, MD) 소재) 또는 시그마 케미칼 캄파니 (Sigma Chemical Company; 미주리주 세인트루이스 (St. Louis, MO) 소재)로부터 얻을 수 있다.

<207> 파지 디스플레이 펩티드 라이브러리

<208> 4개의 파지 디스플레이 펩티드 라이브러리를 하기 실시예에서 사용하였다. Ph.D.-12TM 파지 디스플레이 펩티드 라이브러리를 뉴 잉글랜드 바이오랩스 (매사추세츠주 베벌리)로부터 구매하였다. 상기 키트는 M13 파지의 부코팅 단백질 (pIII)에 융합된 무작위 펩티드 12-머의 조합 라이브러리를 기준으로 한다. 디스플레이된 펩티드를 pIII의 N-말단에서 발현시켜, 신호 펩티드를 절단한 이후 코팅 단백질의 제1 잔기가 디스플레이된 펩티드의 제1 잔기가 된다. Ph.D.-12TM 라이브러리는 대략 2.7×10^9 개 서열로 구성된다.

<209> 하나는 15-머 무작위 펩티드 서열을 함유하며, 다른 하나는 20-머 무작위 펩티드 서열을 함유하며, 또 다른 하나는 제3 및 제11 위치에 시스테인 잔기를 갖는 14-머 디설피드 구속된 무작위 펩티드 서열을 함유하는 3개의 파지 디스플레이 펩티드 라이브러리를 카이 (Kay) 등의 문헌 [Combinatorial Chemistry & High Throughput Screening, Vol. 8, 545-551 (2005)]에 의해 기재된 방법을 사용하여 제조하였다. 이 방법은 시두 (Sidhu) 등의 문헌 [Methods in Enzymology 328:333-363 (2000)]에 보고된 방법의 변형이며, 여기서 대장균 균주 CJ236 (dut⁻ ung⁻)을 사용하여 우리딘-함유 단일 가닥 파지미드 DNA (U-ssDNA)를 생성한다. 제2 가닥의 프라이머로서 뿐만 아니라 코딩 무작위 아미노산을 삽입하기 위해 올리고뉴클레오타이드를 사용하여 제2 가닥 합성을 위한 주형으로서 상기 DNA를 사용한다. 제2 가닥 합성의 완료시에, 이중 가닥 DNA (dsDNA)를 야생 균주로 형질전환시킨다. 임의의 U-ssDNA를 숙주 세포에 의해 분해시키고, 이에 따라 재조합 균주만이 남아, 파지 입자를 생성한다. 이 방법은 M13 코팅 단백질에 대한 펩티드 융합 또는 돌연변이를 생성하는데 이용될 수 있다. 카이 등의 방법

은 유전자 III의 시작에서 앰버 (amber) 정지 코돈을 사용한다. 무작위하게 신장된 DNA 서열을 함유하는 올리고뉴클레오타이드를 단일 가닥 파지 게놈으로 어닐링하여, 무작위화된 영역을 정지 코돈으로 정렬한다. 단일 가닥 DNA (ssDNA)를 공유-폐쇄 원형 dsDNA로 효소적으로 전환시키고, 후속적으로 대장균의 비-역제제 균주로 전기천공하였다. 새롭게 합성된 DNA 가닥 (음성 가닥)은 숙주 세포에서 양성 가닥의 생성을 위한 주형으로서 기능하며, 이는 바이러스 유전자의 전사/번역에 이용되며, 바이러스 입자로 패키징된다.

<210> 실시예 1-3 (예상)

<211> 피부 컨디셔너-저항성 피부-결합 펩티드의 확인

<212> 본 예상 실시예의 목적은 3개의 무작위 파지 디스플레이 펩티드 라이브러리, 구체적으로는 Ph.D.-12™ 파지 디스플레이 펩티드 라이브러리, 15-머 및 20-머 무작위 펩티드 라이브러리로부터 피부 컨디셔너-저항성 피부-결합 펩티드를 확인하는 방법을 설명하기 위한 것이다.

<213> 이러한 목적을 위하여, 미니폴드 (Minifold) I 점-블롯 시스템 (슬라이더 & 쉘, 인크. (Schleicher & Schuell, Inc.; 뉴햄프셔주 킨 (Keene, NH) 소재)의 상부 96-웰 블록 하에 한 층의 파라필름® (Parafilm®)을 도포하고, 무모 피그 피부의 층을 파라필름® 덮개의 상부에 첨가하고, 이후 기기를 꼭 죄어, 독특한 피그 피부-하부 96-웰 기기를 제조한다. 피그 피부는 시중 슈퍼마켓으로부터 구입할 수 있으며, -80℃에서 저장한다. 사용 전에, 피부를 탈이온수에 두어 해동시키고, 이후 종이 수건을 사용하여 블러팅 건조시킨다. 피부의 표면을 90% 이소프로판올로 닦고, 이후 탈이온수로 세정한다.

<214> 관심있는 라이브러리로부터 대략 4×10^{10} pfu의 파지를 함유하는 샘플을 각 실험에서 사용한다. 파지 라이브러리의 샘플을 먼저 전처리하여 모발 및 플라스틱 결합 클론을 제거한다. 모발-결합 클론을 제거하기 위해, 파지 라이브러리의 샘플을 인터내셔널 헤어 임포터스 앤드 프로덕츠 (International Hair Importers and Products; 뉴욕주 벨러로스 (Bellerose, NY) 소재)로부터 입수한 인간 모발의 샘플과 함께 실온에서 1시간 동안 인큐베이션한다. 하기 절차를 사용하여 수행한다. 모발을 먼저 실온에서 30분 동안 90% 이소프로판올에 두고, 이후 10분 동안 5회 각각 탈이온수로 세척한다. 모발을 실온에서 밤새 공기-건조시킨다. 모발을 1 cm 길이로 절단하고, 파지 라이브러리와 인큐베이션하기 위해 10 내지 20개 모발을 마이크로원심분리기 튜브에 둔다. 모발 샘플에 노출시킨 이후, 파지 샘플을 폴리스티렌, 6-웰 세포 배양 클러스터 (코닝 인크 (Corning Inc.; 매사추세츠주 액톤 (Acton, MA) 소재; Cat. 제3526호)에 옮기고, 실온에서 1시간 동안 인큐베이션하여, 플라스틱-결합 클론을 제거한다.

<215> 전처리된 파지 샘플을 피그 피부 샘플을 함유하는 기기에 첨가하고, 혼합물을 실온에서 1시간 동안 인큐베이션한다. 파지 용액을 제거하고, 피그 피부 샘플을 실온에서 5분 동안 비희석된 올레이 에이지 데파잉 프로텍티브 리뉴얼 로션 (Olay Age Defying Protective Renewal Lotion; 프록터 & 갬블 (오하이오주 신시내티 소재))에서 인큐베이션한다. 이후, 피그 피부 샘플을 TBST-0.5% 완충액으로 6회 세척한다. 세척 이후, 피그 피부를 pH 2.2의 0.2 M 글리신-HCl 중 1 mg/mL BSA로 이루어진 용리 완충액으로 처리하고, 10분 동안 인큐베이션한다. 이후, pH 9.2의 1 M 트리스-HCl로 이루어진 중화 완충액을 첨가한다. 용리된 파지 또는 여전히 피그 피부에 결합된 파지를 신선 숙주 세포 (대장균 ER2338)를 첨가하여 증폭시킨다. 증폭된 파지 및 단리된 파지를 신선 피부 샘플과 접촉시키고, 바이오패닝 절차를 각 라이브러리에 대해 2회 이상 반복한다.

<216> 제3 바이오패닝 과정 이후, 무작위 단일 파지 클론을 선택하고, 단일 플라크 용해물을 사용 설명서 (뉴 잉글랜드 바이오랩스)에 따라 제조하고, QIAprep 스핀 M13 키트 (키아젠 (Qiagen; 캘리포니아주 발렌시아 (Valencia, CA) 소재)를 사용하여 단일 가닥 파지 게놈 DNA를 정제하고, 서열 2로 주어지는 -96 gIII 서열결정 프라이머 (5'-CCCTCATAGTTAGCGTAACG-3')를 사용하여 듀폰 서열결정 설비에서 서열결정한다. 디스플레이된 펩티드는 유전자 III의 신호 펩티드 바로 이후에 위치한다. 확인된 피부-결합 펩티드 서열은 피부 컨디셔너 매트릭스로부터 피부에 결합할 수 있으며, 이들 결합 내에서 안정하다고 예상된다.

<217> 실시예 4 (예상)

<218> 피부 컨디셔너-저항성 피부-결합 펩티드의 특이성

<219> 본 예상 실시예의 목적은 ELISA 절차를 사용하여 실시예 1 내지 3에 기재된 방법을 사용하여 확인된 피부 컨디셔너-저항성 피부-결합 펩티드의 특이성을 측정하는 방법을 설명하기 위한 것이다.

<220> 실시예 1 내지 3에 기재된 방법을 사용하여 확인된 피부 컨디셔너 저항성 피부-결합 펩티드를 대조 펩티드인 서

열 3으로 주어지는 비관련된 모발-결합 펩티드인 I-B5 (황 등의 상기 문헌 참조)과 함께 사용한다. 상기 펩티드 모두는 C-말단에서 형광 태그 5-카르복시플루오레세인-아미노핵심 아미디트 (5-FAM)로 유도체화된 첨가된 리신 잔기와 함께 SynPep (캘리포니아주 더블린 (Dublin, CA) 소재)에서 합성한다. 표지된 I-B5 모발-결합 펩티드의 서열은 서열 4로서 주어진다.

<221> 분석을 위하여, 미니폴드 I 점-블롯 시스템 (슬라이허 & 쉴, 인크. (뉴햄프셔주 킨 소재)의 상부 96-웰 블록 하에 한 층의 파라필름®을 도포하고, 모발 또는 무모 피그 피부 층을 파라필름® 덮개의 상부에 첨가하고, 이후 기기를 꼭 죄어, 독특한 모발 또는 피그 피부-하부 96-웰 기기를 생성한다. 96-웰 기기 내의 모발 또는 피부 샘플을 먼저 실온에서 1시간 동안 샘플을 인큐베이션하여 슈퍼블록® (SuperBlock®) 블로킹 완충액 (트리스-완충; 피어스 바이오테크놀로지 (Pierce Biotechnology; 일리노이주 록포드 (Rockford, IL) 소재)으로 블로킹한다. 이후, 모발 또는 피부 샘플을 세척 완충액 (TBST-0.5%)으로 6회 세척한다. 결합 완충액 1.0 mL (1 mg/mL BSA를 함유하는 TBST-0.5%) 중 20 μ M의 농도에서의 형광 태그가 부착된 펩티드를 각 웰에 첨가하고, 37°C에서 30분 동안 인큐베이션한다. 모발 또는 피부 샘플을 TBST-0.5%로 6회 세척하고, 이후 웰 당 항-플루오레세인/마우스 IgG (몰레큘러 프로브즈, 인크 (Molecular Probes, Inc.; 오레곤주 유진 (Eugene, OR) 소재) 용액 1.0 mL (블로킹 완충액 중 1:1000 희석액)을 첨가한다. 샘플을 실온에서 1시간 동안 인큐베이션하고, 이후 세척 완충액으로 6회 세척한다. 이후, 항-마우스 IgG-HRP 컨쥬게이트 (피어스 바이오테크놀로지) 용액 1.0 mL (블로킹 완충액 중 1:1000 희석액)를 각 웰에 첨가하고, 샘플을 실온에서 1시간 동안 인큐베이션한다. 샘플을 세척 완충액으로 6회 세척하고, TMB 기질 (피어스 바이오테크놀로지) 300 μ L를 각 웰에 첨가한다. 샘플을 실온에서 10분 동안 인큐베이션하고, 이후 각 웰로부터 샘플 100 μ L를 취하고, 신규 마이크로타이터 플레이트에서의 웰에 첨가한다. 이후, 정지 용액 (2 M 황산 용액) 100 μ L를 각 웰에 첨가하고, 각 샘플의 흡광도를 450 nm의 파장에서 측정한다. 상기 분석을 각각 3회 이상으로 이루어진 2중 실험하여 수행한다.

<222> 피부 컨디셔너-저항성 피부-결합 펩티드는 높은 A_{450} 값에 의해 나타난 것과 같이 피부에 강한 결합 친화성을 가지며, 낮은 A_{450} 값에 의해 나타난 것과 같이 모발에 낮은 결합 친화성을 가질 것이라고 예상된다. 대조 모발-결합 펩티드 I-B5는 피부에 낮은 결합 친화성을 가지며, 모발에 높은 결합 친화성을 가질 것이다.

<223> 실시예 5 (예상)

<224> 피부 컨디셔너 매트릭스로부터 피부에의 피부 컨디셔너-저항성 피부-결합 펩티드의 결합

<225> 본 예상 실시예의 목적은 피부-컨디셔너 저항성 피부-결합 펩티드가 피부 컨디셔너 매트릭스로부터 피부에 결합하는 것을 입증하는 방법을 설명하기 위한 것이다.

<226> 실시예 4에 기재된 동일한 ELISA 방법을 사용하였다. 실시예 1 내지 3에서 확인된 피부-결합 펩티드를 고-전단 혼합기 (실버선 (Silverson), 모델 L4R7A; 실버선 머신즈 (Silverson Machines; 매사추세츠주 이스트 롱메도우 (East Longmeadow, MA) 소재)를 사용하여 비희석된 올레이 에이지 데파잉 프로텍티브 리뉴얼 로션 (프록터 앤 갬블 (오하이오주 신시내티 소재))과 함께 6분 동안 각각 별도로 혼합하여, 20 μ M의 최종 펩티드 농도를 얻는다. 피그 피부 샘플을 실시예 4에 기재된 것과 같이 블로킹하고, 이후 37°C에서 30분 동안 펩티드-컨디셔너 혼합물 중에서 인큐베이션한다. 이후, 피그 피부 샘플을 세척하고, 실시예 4에 기재된 것과 같이 처리하고, 각 샘플의 흡광도를 450 nm의 파장에서 측정한다.

<227> 완충액으로부터 피부에의 피부-결합 펩티드의 결합을 동일한 절차를 사용하여 측정한다. 추가적으로, 대조군을 피부 컨디셔너 및 완충액 모두에서 임의의 피부-결합 펩티드의 존재 없이 동일한 절차를 사용하여 수행한다.

<228> A_{450} 값에 의해 나타난 것과 같이 피부 결합 펩티드에 대한 결합 친화성은 피부 컨디셔너 매트릭스 및 완충액에서 유사할 것이며, 이는 피부-컨디셔너-저항성 피부-결합 펩티드가 피부 컨디셔너 매트릭스로부터 피부에 강하게 결합한다는 것을 나타낸다.

<229> 실시예 6 (예상)

<230> 피부 컨디셔너 매트릭스에서의 피부 컨디셔너-저항성 피부-결합 펩티드의 안정성

<231> 본 예상 실시예의 목적은 피부 컨디셔너 매트릭스에서의 피부 컨디셔너-저항성 피부-결합 펩티드의 안정성을 입증하는 방법을 설명하기 위한 것이다.

<232> 피부 컨디셔너 중 실시예 1 내지 3에서 확인된 피부-결합 펩티드의 각각의 혼합물을 실시예 5에 기재된 것과 같

이 제조한다. 비교 목적을 위하여, 완충액 중 피부-결합 펩티드의 용액을 사용한다. 모든 용액을 실온에서 저장하고, 펩티드의 결합 활성을 상이한 시간 간격에서 취해진 샘플을 사용하여 실시예 5에 기재된 ELISA 절차를 사용하여 측정한다. 또한, 대조군을 완충액 및 피부-결합 펩티드를 함유하지 않은 피부 컨디셔너로 수행한다.

<233> A₄₅₀에 의해 나타낸 것과 같이, 21일 이하의 시간 동안 피부 컨디셔너 중에 저장한 이후의 피부-결합 펩티드에 대한 결합 친화성에서 유의한 감소가 없을 것이라고 예상된다.

<234> 실시예 7-10 (예상)

<235> 피부 클렌저-저항성 피부-결합 펩티드의 확인

<236> 본 예상 실시예의 목적은 3개의 무작위 파지 디스플레이 펩티드 라이브러리, 구체적으로는 Ph.D.-12™ 파지 디스플레이 펩티드 라이브러리, 15-머 및 20-머 무작위 펩티드 라이브러리로부터 피부 클렌저-저항성 피부-결합 펩티드를 확인하는 방법을 설명하기 위한 것이다.

<237> 존슨 (Johnson)의 헤드-투-투우 베이비 워시 (Head-to-Toe Baby Wash; 존슨 & 존슨 (Johnson & Johnson; 뉴 저지주 스킬맨 (Skillman, NJ) 소재)) 피부 클렌저를 피부 컨디셔너 대신 사용한 것을 제외하고는 실시예 1 내지 3에서 기재된 절차를 사용한다.

<238> 확인된 피부-결합 펩티드 서열은 피부 클렌저 매트릭스로부터 피부에 결합할 수 있으며, 그 내에서 안정할 것이라고 예상된다. 피부-결합 펩티드의 특이성은 실시예 4에 기재된 것과 같이 측정된다. 피부-클렌저 매트릭스로부터 피부에 결합하기 위한 피부-결합 펩티드의 능력은 실시예 5에 기재된 절차를 사용하여 측정되며, 피부 클렌저 매트릭스에서의 피부-결합 펩티드의 안정성은 실시예 6에 기재된 것과 같이 측정된다.

<239> 실시예 11-13

<240> 바디 워시-저항성 피부-결합 펩티드의 확인

<241> 본 실시예의 목적은 3개의 무작위 파지 디스플레이 펩티드 라이브러리, 구체적으로는 Ph.D.-12™ 파지 디스플레이 펩티드 라이브러리, 15-머 무작위 펩티드 라이브러리 및 14-머 디술피드 제한된 무작위 펩티드 라이브러리로부터 바디 워시-저항성 피부-결합 펩티드를 확인하기 위한 것이었다.

<242> 이러한 목적을 위하여, 미니폴드 I 점-블롯 시스템 (슬라이더 & 설, 인크. (뉴햄프셔주 킨 소재))의 상부 96-웰 블록 하에 한 층의 파라필름®을 도포하고, 무모 피그 피부의 층을 파라필름® 덮개의 상부에 첨가하고, 이후 기기를 짝 죄어, 독특한 피그 피부-하부 96-웰 기기를 제조하였다. 피그 피부는 시중 슈퍼마켓으로부터 구입하였으며, -80℃에서 저장하였다. 사용 전에, 피부를 탈이온수에 두어 해동시켰으며, 이후 종이 수건을 사용하여 블러팅 건조시켰다. 피부의 표면을 90% 이소프로판올로 닦고, 이후 탈이온수로 세정하였다.

<243> 96-웰 기기 내의 피부 샘플을 먼저 실온에서 1시간 동안 인큐베이션하여 슈퍼블록® 블로킹 완충액 (트리스-완충; 피어스 바이오테크놀로지 (일리노이주 록포드 소재))으로 블로킹하였다. 이후, 피부 샘플을 세척 완충액 (TBST-0.5%)으로 6회 세척하였다.

<244> 관심 있는 라이브러리로부터 대략 1×10^{11} pfu의 파지를 함유하는 샘플을 각 실험에서 사용하였다. 파지 라이브러리의 샘플을 먼저 존슨 (Johnson)의 헤드-투-투우 베이비 워시 (존슨 & 존슨 (뉴 저지주 스킬맨 소재))로 예비-혼합하고, 피부-웰에 첨가하고, 서서히 진탕하면서 37℃에서 30분 동안 인큐베이션하였다. 이 시간 이후, 비결합된 파지 입자를 제거하고 버렸다. 이후, 피부 샘플을 TBST 완충액 (0.5% 트윈 20)으로 10회 세척하였다. 피부로부터 결합된 파지를 용리시키기 이전에, 기기의 상부 플레이트 (웰을 형성하는 피부 위의 부분)를 제거하고, 새로운 플레이트로 대체하였다. 상기 단계는 임의의 플라스틱-결합 파지를 제거하였다. 피그 피부를 pH 2.2의 0.2 M 글리신-HCl 중 1 mg/mL BSA로 이루어진 용리 완충액으로 처리하고, 20분 정도 동안 인큐베이션하였다. 이후, pH 9.2의 1 M 트리스-HCl로 이루어진 중화 완충액을 첨가하였다. 용리된 파지 및 여전히 피그 피부에 결합된 파지를 신선 숙주 세포 (대장균 ER2338)의 첨가에 의해 증폭시켰다. 증폭된 파지 및 단리된 파지를 신선 피그 피부 샘플과 접촉시키고, 바이오패닝 절차를 각 라이브러리에 대해 3회 이상 반복하였다.

<245> 제4 바이오패닝 과정 이후, 무작위 단일 파지 클론을 선택하고, 단일 플라크 용해물을 사용 설명서 (뉴 잉글랜드 바이오랩스)에 따라 제조하고, QIAprep 스핀 M13 키트 (쿼아젠 (캘리포니아주 발렌시아 소재))를 사용하여 단일 가닥 파지 게놈 DNA를 정제하고, 서열 2로 주어지는 -96 gIII 서열결정 프라이머 (5'-

CCCTCATAGTTAGCGTAACG-3')를 사용하여 듀폰 서열결정 설비에서 서열결정하였다. 디스플레이된 펩티드를 유전자 III의 신호 펩티드 바로 이후에 위치시켰다. 확인된 바다 위시-저항성 피부-결합 파지-펩티드의 아미노산 서열은 하기 표 1에서 주어진다.

표 1

바다 위시-저항성 피부-결합 펩티드의 아미노산 서열					
실시예	펩티드 라이브러리	클론 ID	아미노산 서열	서열 번호	빈도 (%)
11	12-머	피부-12머-1	TMGFTAPRFPHY	8	59
11	12-머	피부-12머-2	SVSVGMKPSRP	9	12
11	12-머	피부-12머-3	NLQHSVGTSPVW	10	6
11	12-머	피부-12머-4	NHSNWKTAADFL	11	4
11	12-머	피부-12머-5	NQAASITKRPVY	12	4
11	12-머	피부-12머-6	GSSTVGRPSLYE	13	4
11	12-머	피부-12머-7	SDTISRLHVSMT	14	4
11	12-머	피부-12머-8	SPLTPVYERKLL	15	4
11	12-머	피부-12머-9	SPYPSWSTPAGR	16	4
11	12-머	피부-12머-10	VQPIITNTRYEGG	17	4
11	12-머	피부-12머-11	WPMHPEKGSRWS	18	4
12	15-머	피부-15머-1	QLSYHAYPQANHAP	19	20
13	14-머	피부-cys-1	SGCHLVYDNGFCDH	20	9
13	14-머	피부-cys-2	ASCPSSASHADPCAH	21	6
13	14-머	피부-cys-3	NLCDSARDSRCKV	22	6
13	14-머	피부-cys-4	DACSGNGHPNDCDR	23	4
13	14-머	피부-cys-5	DHCLGRQLQPCYP	24	4
13	14-머	피부-cys-6	DWCDTIIPGRITCHG	25	4

실시예 14

바다 위시-저항성 피부-결합 펩티드의 특성화

본 실시예의 목적은 ELISA 절차를 사용하여 바다 위시-저항성 피부 결합 펩티드의 피부 결합 친화성을 평가하기 위한 것이었다.

실시예 11 내지 13에서 확인된 파지-펩티드 클론을 신선 숙주 세포 (대장균 ER2338)에 감염시켜 증폭시켰다. 실시예 11 내지 13에 기재된 피그 피부 하부 96-웰 기기 시스템을 ELISA 절차를 위해 사용하였다. 시험된 각각의 클론에 대하여, 피그 피부 웰을 TBS 중 2% 분말 탈지유로 이루어진 블로킹 완충액 (솔라이저 & 쉘, 인크.) 400 μ L와 함께 실온에서 1시간 동안 인큐베이션하였다. 시스템을 역으로하고, 이를 종이 수건으로 블러팅 건조시켜 블로킹 완충액을 제거하였다. 시스템을 TBST-0.05%로 이루어진 세척 완충액으로 6회 세정하였다. 웰을 BSA 1 mg/mL 및 파지 1×10^{11} pfu를 함유하는 TBST-0.5% 100 μ L로 충전하였다. 샘플을 서서히 진탕하면서 37°C에서 15분 동안 인큐베이션하였다. 웰을 TBST-0.5%로 10 내지 20회 세척하여 비-결합 파지를 제거하였다. 이후, 블로킹 완충액 중 1:500으로 희석된 호스래디쉬 퍼옥시다제/항-M13 항체 컨쥬게이트 (아머삼 USA (Amersham USA; 뉴 저지주 피스카타웨이 (Piscataway, NJ) 소재) 100 μ L를 각 웰에 첨가하고, 실온에서 1시간 동안 인큐베이션하였다. 컨쥬게이트 용액을 제거하고, 웰을 TBST-0.05%로 6회 세척하였다. 피어스 바이오테크놀로지 (일리노이주 록포드 소재)로부터 얻어진 TMB 기질 (200 μ L)을 각 웰에 첨가하고, 실온에서 5 내지 30분, 전형적으로는 10분 동안 색이 나타나도록 하였다. 이후, 정지 용액 (2 M H₂SO₄ 200 μ L)을 각 웰에 첨가하고, 용액을 96-웰 플레이트로 옮기고, 마이크로플레이트 분광 광도계 (몰레큘러 디바이스 (Molecular Devices; 캘리포니아주 서니베일 (Sunnyvale, CA) 소재))를 사용하여 450 nm에서의 흡광도 (A₄₅₀)를 측정하였다. 적어도 3회 반복의 평균으로서 보고되는 얻어진 흡광도 값 및 평균의 표준 오차 (SEM)가 표 2에서 주어진다.

표 2

ELISA 분석 결과

클론 ID	서열 번호	A ₄₅₀ ± SEM
대조군, 파지 없음	---	0.076 ± 0.012
피부-12머-1	8	0.506 ± 0.097
피부-12머-2	9	0.818 ± 0.108
피부-12머-4	11	0.874 ± 0.039
피부-12머-5	12	0.391 ± 0.036
피부-12머-6	13	0.677 ± 0.104
피부-12머-7	14	1.134 ± 0.093
피부-12머-8	15	0.433 ± 0.05
피부-12머-9	16	1.146 ± 0.131
피부-12머-10	17	0.418 ± 0.036
피부-12머-11	18	0.81 ± 0.038
피부-15머-1	19	1.264 ± 0.166
피부-cys-1	20	1.385 ± 0.046
피부-cys-2	21	1.184 ± 0.044
피부-cys-3	22	0.927 ± 0.044
피부-cys-4	23	0.852 ± 0.033
피부-cys-6	25	1.657 ± 0.047

<251>

<252> 도 2에서의 데이터로부터 나타낼 수 있는 것과 같이, 클론은 A₄₅₀ 값에 의해 측정되는 것과 같이 피부에 대하여 여러 친화성을 가졌다. 그러나, 대조군으로 얻어진 A₄₅₀ 값에 비해 유의하게 높은 A₄₅₀ 값으로 나타나는 것과 같이, 모든 클론은 유의한 친화성을 가졌다.

<253> 실시예 15

<254> 바다 위시 처리 이후 바다 위시-저항성 피부-결합 펩티드의 특성화

<255> 본 실시예의 목적은 ELISA 절차를 사용하여 바다 위시로 처리한 이후 선택된 바다 위시-저항성 피부 결합 펩티드의 피부 결합 친화성을 평가하기 위한 것이었다.

<256> 하기와 같은 변형과 함께 실시예 14에서 기재된 ELISA 절차를 사용하였다. 웰로부터 비-결합 파지 펩티드를 제거한 이후, 존슨의 헤드-투-토우 베이비 위시 200 μL를 웰에 첨가하고, 30분 동안 인큐베이션하였다. 실시예 14에 기재된 세척 및 발색 단계가 뒤따랐다. 완충 세척액 샘플에 대하여, 실시예 14에 기재된 동일한 절차를 사용하였다. 피부에 대해 결합 친화성이 낮다고 알려진, 각각 서열 3 및 26으로서 주어진 2개의 모발-결합 파지 펩티드인 IB5 및 D21을 대조군으로서 동일한 절차를 사용하여 시험하였다. 3회 이상 반복의 평균으로서 보고된 얻어진 흡광도 값 및 평균의 표준 오차가 하기 표 3에서 주어진다.

표 3

클론 ID	서열 번호	바디 위시 $A_{450} \pm \text{SEM}$	완충액 위시 $A_{450} \pm \text{SEM}$
대조군, 파지 없음	----	0.050 ± 0.004	0.093 ± 0.020
IB5, 모발 대조군	3	0.453 ± 0.035	0.202 ± 0.010
D21, 모발 대조군	26	0.549 ± 0.053	0.297 ± 0.004
피부-12머-9	16	2.265 ± 0.132	1.298 ± 0.11
피부-15머-1	19	1.447 ± 0.178	1.031 ± 0.045
피부-cys-1	20	1.444 ± 0.293	1.182 ± 0.070

<257>

<258>

결과는 바디 위시-저항성 피부-결합 펩티드 파지가 피부에 대한 높은 결합 친화성을 가지며, 바디 위시로 처리한 이후 피부에 대한 유의한 결합 친화성을 유지한다는 것을 입증한다. 모발-결합 대조군은 완충액 세척 및 바디 위시 처리 이후 예상된 것과 같이 피부-결합 파지 펩티드에 비해 유의하게 낮은 결합 친화성을 가졌다.

<259>

실시예 16 (예상)

<260>

바디 위시-저항성 피부-결합 펩티드의 특이성

<261>

본 예상 실시예의 목적은 ELISA 절차를 사용하여 실시예 11 내지 13에서 확인된 바디 위시-저항성 피부-결합 펩티드의 특이성을 측정하는 방법을 설명하기 위한 것이다.

<262>

실시예 11 내지 13에서 확인된 바디 위시-저항성 피부-결합 펩티드를 대조 펩티드인 서열 3으로 주어지는 비관련된 모발-결합 펩티드인 I-B5 (황 등의 상기 문헌 참조)과 함께 사용한다. 상기 펩티드 모두를 C-말단에서 형광 태그 5-카르복시플루오레세인-아미노핵심 아미디트 (5-FAM)로 유도체화된 첨가된 리신 잔기와 함께 SynPep (캘리포니아주 두블린 소재)에서 합성한다.

<263>

분석을 위하여, 미니폴드 I 점-블롯 시스템 (솔라이더 & 쉘, 인크. (뉴햄프셔주 켄 소재))의 상부 96-웰 블록 하에 한 층의 파라필름[®]을 도포하고, 모발 또는 무모 피그 피부 층을 파라필름[®] 덮개의 상부에 첨가하고, 이후 기기를 짝 짝 죄어, 독특한 모발 또는 피그 피부-하부 96-웰 기기를 생성한다. 96-웰 기기에서의 모발 또는 피부 샘플을 먼저 실온에서 1시간 동안 샘플을 인큐베이션하여 슈퍼블록[®] 블로킹 완충액 (트리스-완충; 피어스 바이오테크놀로지 (일리노이주 록포드 소재))으로 블로킹한다. 이후, 모발 또는 피부 샘플을 세척 완충액 (TBST-0.5%)으로 6회 세척한다. 결합 완충액 1.0 mL (1 mg/mL BSA를 함유하는 TBST-0.5%) 중 20 μ M의 농도에서의 형광 태그가 부착된 펩티드를 각 웰에 첨가하고, 37°C에서 30분 동안 인큐베이션한다. 모발 또는 피부 샘플을 TBST-0.5%로 6회 세척하고, 이후 웰 당 항-플루오레세인/마우스 IgG (몰레큘러 프로브즈, 인크 (오래곤주 유진 소재)) 용액 1.0 mL (블로킹 완충액 중 1:1000 희석액)를 첨가한다. 샘플을 실온에서 1시간 동안 인큐베이션하고, 이후 세척 완충액으로 6회 세척한다. 이후, 항-마우스 IgG-HRP 컨쥬게이트 (피어스 바이오테크놀로지) 용액 1.0 mL (블로킹 완충액 중 1:1000 희석액)를 각 웰에 첨가하고, 샘플을 실온에서 1시간 동안 인큐베이션한다. 샘플을 세척 완충액으로 6회 세척하고, TMB 기질 (피어스 바이오테크놀로지) 300 μ L를 각 웰에 첨가한다. 샘플을 실온에서 10분 동안 인큐베이션하고, 이후 각 웰로부터 샘플 100 μ L를 취하고, 신규 마이크로타이타 플레이트에서의 웰에 첨가한다. 이후, 정지 용액 (2 M 황산 용액) 100 μ L를 각 웰에 첨가하고, 각 샘플의 흡광도를 450 nm의 파장에서 측정한다. 상기 분석을 각각 3회 이상으로 이루어진 2중 실행하여 수행한다.

<264>

바디 위시-저항성 피부-결합 펩티드는 높은 A_{450} 값에 의해 나타난 것과 같이 피부에 강한 결합 친화성을 가지며, 낮은 A_{450} 값에 의해 나타난 것과 같이 모발에 낮은 결합 친화성을 가질 것이라고 예상된다. 대조 모발-결합 펩티드 I-B5는 피부에 낮은 결합 친화성을 가지며, 모발에 높은 결합 친화성을 가질 것이다.

- <265> 실시예 17 (예상)
- <266> 피부-결합 펩티드계 피부 컨디셔너
- <267> 본 예상 실시예의 목적은 링커로서 3-말레이미도프로피온산을 사용하여 바디 위시-저항성 피부-결합 펩티드를 8-arm 폴리에틸렌 글리콜 (8-arm PEG)과 커플링하여 펩티드계 피부 컨디셔너를 제조하는 방법을 설명하기 위한 것이다,
- <268> 8-Arm PEG의 관능화
- <269> 테트라히드로푸란 (THF) 20 mL에 0.97 g (0.78 mmol)을 용해시켜 8-arm PEG (Mw 10 kDa; 넥타 트랜스포밍 테라퓨틱스 (Nektar Transforming Therapeutics; 앨라배마주 헌즈빌 (Huntsville, AL) 소재)에서 시판됨)의 용액을 제조한다. 용액을 질소 하에 잘 교반하고, 3-말레이미도프로피온산 용액 2 mL (7.5 mmol; 알드리치)를 첨가한다. 이후, N,N'-디시클로헥실-카르보디이미드 (DCC) 용액 2 mL (DMF 2 mL 중 1.55 g)를 첨가하고, 이어서 디메틸아미노피리딘 (DMAP) 250 μ L를 적가한다. 혼합물을 50°C에서 밤새 교반한다. 다음날, 혼합물을 실온으로 냉각시키고, 중 소결 필터 깔때기 (캠글래스 인크 (Chemglass Inc; 뉴 저지주 바인랜드 (Vineland, NJ) 소재))를 사용하여 여과하였다. 여액을 다량의 에테르/DMF (30:1의 v/v)로 침전시킨다. 침전물을 수집하고, 물 70 mL에 용해시켜, 균질한 수용액을 형성한다. 수용액을 에테르로 4회 추출하였다. 최종적으로, 수성 부분을 동결 건조시켜, 건조 분말을 수득한다.
- <270> 관능화된 8-Arm PEG-링커와 피부-결합 펩티드의 커플링
- <271> 상기 기재된 것과 같이 제조된 관능화된 8 arm-PEG-링커를 TBF 완충액에 현탁하고, 펩티드 서열의 C-말단에 첨가된 시스테인 잔기 (서열 27로 주어짐: SynPep로부터 입수)를 갖는, 동일한 몰 비의 바디 위시-저항성 피부-결합 펩티드 피부-cys-1 (서열 20)을 용액에 첨가한다. 혼합물을 실온에서 6시간 동안 교반한다. 최종 생성물을 물/에테르로 추출하여 정제하고, NMR에 의해 분석한다.
- <272> 실시예 18 (예상)
- <273> 펩티드계 피부 착색제의 제조
- <274> 본 예상 실시예의 목적은 디스퍼스 오렌지 (Disperse Orange) 3 염료에 바디 위시-저항성 피부-결합 펩티드인 피부-cys-1 (서열 20)을 공유 부착하여 펩티드계 피부 착색제를 제조하는 방법을 기재하기 위한 것이다. 염료를 먼저 이소시아네이트로 관능화시키고, 이후 피부-cys-1 펩티드와 반응시킨다.
- <275> 디스퍼스 오렌지 3의 관능화
- <276> 건조 상자에서, 디스퍼스 오렌지 3 (알드리치) 14.25 g을 적하 깔때기로 무수 THF 400 mL에 현탁시켰다. 자석 교반 막대를 포함하는 2 리터 4구 반응 플라스크 (코닝 인크., 뉴욕주 코닝 (Corning, NY) 소재; 부품 제1533-12호)를 무수 톨루엔 200 mL로 충전시킨다. 플라스크에 손가락 냉각기 (코닝 인크., 부품 제1209-04호), 및 적하 깔때기를 갖는 제2 손가락 냉각기를 설치하고, 후드에서 오일조에 둔다.
- <277> 포스젠 (25.4 mL)을 실온에서 반응 플라스크로 응축시킨다. 포스젠 첨가가 완료된 이후, 오일조의 온도를 80°C로 증가시키고, 디스퍼스 오렌지 3 현탁액을 2시간 동안 100 mL 증가량으로 반응 플라스크에 적가하면서, 반응 온도 및 기체 세정기로부터의 기체 배출을 모니터링한다. 온도를 첨가 동안 64°C 이하로 유지하였다. 첨가가 완료된 이후, 반응물을 64°C에서 1시간 동안 가열하고, 이후 밤새 교반하면서 실온으로 냉각시킨다.
- <278> 내용물을 40°C 이하에서 유지시키면서 반응 용매를 진공-증류시켜 건조시키고, 진공을 추가 시간 동안 유지시킨다. 반응 플라스크를 건조 상자로 옮기고, 생성물을 수집하고 밤새 건조시킨다. 목적 생성물을 양성자 NMR에 의해 확인한다.
- <279> 이소시아네이트 관능화된 염료와 피부-cys-1 피부-결합 펩티드의 커플링
- <280> 상기 기재된 것과 같이 제조된 이소시아네이트 관능화된 디스퍼스 오렌지 3 [(2-(4-이소시아네이트페닐)-1-(4-니트로페닐)디아젠] (16 mg)을 DMF 5 mL에 용해시키고, DMF 10 mL에 용해된 SynPep의 비-보호된 피부-cys-1 펩티드 (서열 20) 75 mg을 함유하는 용액에 첨가한다. 트리에틸아민 (30 mg)을 첨가하여 반응을 촉매화한다. 용액을 실온에서 24시간 동안 교반한다. 용매를 증발시켜, 암적갈색 분말 생성물을 수득한다. 생성물을 MALDI 질량 분석에 의해 분석하여 부가물 형성을 확인한다.

서열목록

SEQUENCE LISTING

<110> E.I. du Pont de Nemours and Co.

<120> A METHOD FOR IDENTIFYING SKIN CARE COMPOSITION-RESISTANT
SKIN-BINDING PEPTIDES

<130> CL2929 PCT

<160> 27

<170> PatentIn version 3.3

<210> 1

<211> 8

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Caspase 3 cleavage site

<400> 1

Leu Glu Ser Gly Asp Glu Val Asp
1 5

<210> 2

<211> 20

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Primer

<400> 2

ccctcatagt tagcgtaacg

20

<210> 3

<211> 12

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Hair-binding peptide

<400> 3

Thr Pro Pro Glu Leu Leu His Gly Asp Pro Arg Ser
1 5 10

<210> 4

<211> 13

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Fluorescently-labeled hair-binding peptide

<220>

<221> MISC_FEATURE

<222> (13)..(13)

<223> Derivatized with the fluorescent tag
5-carboxyfluorescein-aminohexyl amidite

<400> 4

Thr Pro Pro Glu Leu Leu His Gly Asp Pro Arg Ser Lys
1 5 10

<210> 5

<211> 37

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Peptide spacer

<400> 5

Thr	Ser	Thr	Ser	Lys	Ala	Ser	Thr	Thr	Thr	Thr	Ser	Ser	Lys	Thr	Thr
1				5					10					15	

Thr	Thr	Ser	Ser	Lys	Thr	Thr	Thr	Thr	Thr	Ser	Lys	Thr	Ser	Thr	Thr
			20					25					30		

Ser	Ser	Ser	Ser	Thr
			35	

<210> 6

<211> 22

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Peptide spacer

<400> 6

Gly	Gln	Gly	Gly	Tyr	Gly	Gly	Leu	Gly	Ser	Gln	Gly	Ala	Gly	Arg	Gly
1				5					10					15	

Gly	Leu	Gly	Gly	Gln	Gly
			20		

<210> 7

<211> 10

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Peptide spacer

<400> 7

Gly	Pro	Gly	Gly	Tyr	Gly	Pro	Gly	Gln	Gln
1				5					10

<210> 8

<211> 12

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Body wash-resistant skin-binding peptide

<400> 8

Thr	Met	Gly	Phe	Thr	Ala	Pro	Arg	Phe	Pro	His	Tyr
1				5							10

<210> 9

<211> 12

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Body wash-resistant skin-binding peptide

<400> 9

Ser	Val	Ser	Val	Gly	Met	Lys	Pro	Ser	Pro	Arg	Pro
1				5							10

<210> 10

<211> 12

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Body wash-resistant skin-binding peptide

<400> 10

Asn	Leu	Gln	His	Ser	Val	Gly	Thr	Ser	Pro	Val	Trp
1				5					10		

<210> 11

<211> 12

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Body wash-resistant skin-binding peptide

<400> 11

Asn	His	Ser	Asn	Trp	Lys	Thr	Ala	Ala	Asp	Phe	Leu
1			5						10		

<210> 12

<211> 12

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Body wash-resistant skin-binding peptide

<400> 12

Asn	Gln	Ala	Ala	Ser	Ile	Thr	Lys	Arg	Val	Pro	Tyr
1				5					10		

<210> 13

<211> 12

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Body wash-resistant skin-binding peptide

<400> 13

Gly	Ser	Ser	Thr	Val	Gly	Arg	Pro	Ser	Leu	Tyr	Glu
1				5					10		

<210> 14

<211> 12

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Body wash-resistant skin-binding peptide

<400> 14

Ser	Asp	Thr	Ile	Ser	Arg	Leu	His	Val	Ser	Met	Thr
1				5						10	

<210> 15

<211> 12

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Body wash-resistant skin-binding peptide

<400> 15

Ser	Pro	Leu	Thr	Val	Pro	Tyr	Glu	Arg	Lys	Leu	Leu
1				5					10		

<210> 16

<211> 12

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Body wash-resistant skin-binding peptide

<400> 16

Ser	Pro	Tyr	Pro	Ser	Trp	Ser	Thr	Pro	Ala	Gly	Arg
1				5					10		

<210> 17

<211> 12

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Body wash-resistant skin-binding peptide

<400> 17

Val	Gln	Pro	Ile	Thr	Asn	Thr	Arg	Tyr	Glu	Gly	Gly
1				5					10		

<210> 18

<211> 12

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Body wash-resistant skin-binding peptide

<400> 18

Trp	Pro	Met	His	Pro	Glu	Lys	Gly	Ser	Arg	Trp	Ser
1				5					10		

<210> 19

<211> 15

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Body wash-resistant skin-binding peptide

<400> 19

Gln	Leu	Ser	Tyr	His	Ala	Tyr	Pro	Gln	Ala	Asn	His	His	Ala	Pro
1				5				10					15	

<210> 20

<211> 14

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Body wash-resistant skin-binding peptide

<400> 20

Ser	Gly	Cys	His	Leu	Val	Tyr	Asp	Asn	Gly	Phe	Cys	Asp	His
1				5				10					

<210> 21

<211> 14

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Body wash-resistant skin-binding peptide

<400> 21

Ala	Ser	Cys	Pro	Ser	Ala	Ser	His	Ala	Asp	Pro	Cys	Ala	His
1				5					10				

<210> 22

<211> 14

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Body wash-resistant skin-binding peptide

<400> 22

Asn	Leu	Cys	Asp	Ser	Ala	Arg	Asp	Ser	Pro	Arg	Cys	Lys	Val
1				5					10				

<210> 23

<211> 14

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Body wash-resistant skin-binding peptide

<400> 23

Asp	Ala	Cys	Ser	Gly	Asn	Gly	His	Pro	Asn	Asn	Cys	Asp	Arg
1				5					10				

<210> 24

<211> 14

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Body wash-resistant skin-binding peptide

<400> 24

Asp His Cys Leu Gly Arg Gln Leu Gln Pro Val Cys Tyr Pro
1 5 10

<210> 25

<211> 14

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Body wash-resistant skin-binding peptide

<400> 25

Asp Trp Cys Asp Thr Ile Ile Pro Gly Arg Thr Cys His Gly
1 5 10

<210> 26

<211> 12

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Hair-binding sequence

<400> 26

Arg Thr Asn Ala Ala Asp His Pro Ala Ala Val Thr

1 5 10

<210> 27

<211> 15

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Body wash-resistant skin-binding peptide with a cysteine residue
at C-terminus

<400> 27

Ser	Gly	Cys	His	Leu	Val	Tyr	Asp	Asn	Gly	Phe	Cys	Asp	His	Cys
1				5					10					15