(19) 대한민국특허청(KR)
(12) 등록특허공보(B1)

(45) 공고일자 2022년10월14일
(11) 등록번호 10-2454777
(24) 등록일자 2022년10월11일

(51) 국제특허분류(Int. Cl.)
A61K 9/00 (2006.01) *A61K 31/4172* (2006.01)
A61K 47/22 (2017.01) *A61P 17/04* (2006.01)
(52) CPC특허분류
A61K 9/0014 (2013.01)
A61K 31/4172 (2013.01)
(21) 출원번호 10-2019-7000483
(22) 출원일자(국제) 2017년06월16일
심사청구일자 2020년05월21일
(85) 번역문제출일자 2019년01월07일
(65) 공개번호 10-2019-0020022
(43) 공개일자 2019년02월27일
(86) 국제출원번호 PCT/DK2017/050201
(87) 국제공개번호 WO 2017/215723
국제공개일자 2017년12월21일
(30) 우선권주장
PA 2016 70438 2016년06월17일 덴마크(DK)
PA 2017 70225 2017년03월28일 덴마크(DK)
(56) 선행기술조사문헌
WO2009103959 A2*
*는 심사관에 의하여 인용된 문헌

(73) 특허권자
드러그 딜리버리 솔루션즈 에이피에스
덴마크, 2970 호어솔름, 아젠 알레 24-26
(72) 발명자
메네 토르킬
덴마크, 2970 호어솔름, 아젠 알레 24-26 (엠씨2 바이오텍 에이피에스 내)
셀머 요한
덴마크, 2970 호어솔름, 아젠 알레 24-26 (엠씨2 바이오텍 에이피에스 내)
(뒷면에 계속)
(74) 대리인
특허법인한얼

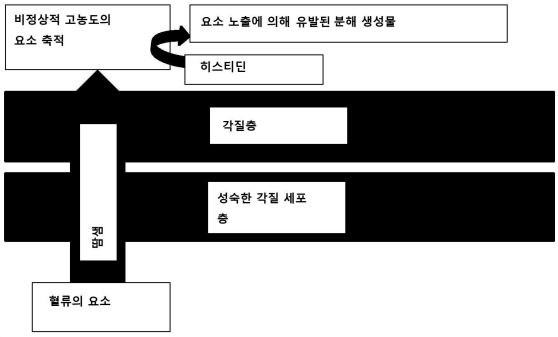
전체 청구항 수 : 총 9 항 심사관 : 이형준

(54) 발명의 명칭 **요독 가려움증의 치료에 사용하기 위한 제형**

(57) 요 약

요독 가려움증과 같은, 대상체의 요소에 의해 유발되는 가렵고 건조한 피부의 치료 또는 예방에 사용하기 위한, 아미노산 및 대부분의 폴리펩티드 및/또는 이의 유도체와 같은 친핵체를 포함하는 국소 제형이 제공된다. 아미노산은 히스티딘일 수 있고, 유도체는 히스티딘 분해 생성물, 히스티딘의 펩티드, 히스티딘과 하나 이상의 추가의 아미노산의 펩티드, 및 히스티딘의 약제학적으로 허용되는 염일 수 있다.

대 표 도 - 도1



(52) CPC특허분류
A61K 47/22 (2013.01)
A61P 17/00 (2018.01)
A61P 17/04 (2018.01)
(72) 발명자
랑게 제스퍼
덴마크, 2970 호어솔름, 아젠 알레 24-26 (엠씨2 바이오텍 에이피에스 내)
조지우 미셸
영국, 레더헤드 서레이 케이티22 7알와이, 랜돌스 로드 (드러그 딜리버리, 솔루션 리미티드 내)
휠러 데릭
영국, 레더헤드 서레이 케이티22 7알와이, 랜돌스 로드 (드러그 딜리버리, 솔루션 리미티드 내)
에반스 데이비드
영국, 레더헤드 서레이 케이티22 7알와이, 랜돌스 로드 (드러그 딜리버리, 솔루션 리미티드 내)

명 세 서

청구범위

청구항 1

대상체의 요소(urea)에 의해 유발되는 가렵고 건조한 피부의 치료 또는 예방에 사용하기 위한, 친핵체(nucleophile)를 포함하는 국소 제형으로서, 상기 친핵체가 히스티딘인, 국소 제형.

청구항 2

제1항에 있어서, 상기 요소에 의해 유발된 가렵고 건조한 피부가 요독 가려움증, 요루 피부염, 요실금 피부염, 기저귀 피부염으로 이루어진 그룹으로부터 선택되는, 국소 제형.

청구항 3

제1항 또는 제2항에 있어서, 상기 제형이 0.001 mg/cm^2 내지 5 mg/cm^2 피부 표면, 0.003 mg/cm^2 내지 1 mg/cm^2 피부 표면, 또는 0.005 mg/cm^2 내지 0.5 mg/cm^2 피부 표면 범위의 친핵체 농도로 피부에 도포되는, 국소 제형.

청구항 4

제1항 또는 제2항에 있어서, 히스티딘이 L-히스티딘인, 국소 제형.

청구항 5

제1항 또는 제2항에 있어서, 히스티딘이 약제학적 조성물의 유일한 활성 성분인, 국소 제형.

청구항 6

제1항 또는 제2항에 있어서, 상기 제형이 피롤리돈 카복실산, 피롤리돈 카복실산의 나트륨 염, 또는 아미노산 글리실글리신, 시스테인, 아르기닌 및 리신 중의 하나 이상을 추가로 포함하는, 국소 제형.

청구항 7

제1항 또는 제2항에 있어서, 상기 제형이 0.5 mg/cm^2 내지 2.5 mg/cm^2 피부 표면 범위의 히스티딘의 농도로 피부에 도포되는, 국소 제형.

청구항 8

제1항 또는 제2항에 있어서, 노인의 노화된 피부의 가려움증을 치료 또는 예방하는데 사용하기 위한, 국소 제형.

청구항 9

제1항 또는 제2항에 있어서, 필라그린 결함 환자의 가렵고 건조한 피부를 치료 또는 예방하는데 사용하기 위한, 국소 제형.

청구항 10

삭제

청구항 11

삭제

청구항 12

삭제

청구항 13

삭제

청구항 14

삭제

청구항 15

삭제

발명의 설명

기 술 분 야

[0001] 본 발명은 요독 가려움증(uremic pruritus)과 같은, 대상체의 요소(urea)에 의해 유발되는 가렵고 건조한 피부의 치료에 사용하기 위한, 친핵성 화합물(nucleophilic compound), 예를 들어, 히스티딘 또는 임의 다른 아미노산 또는 폴리펩티드 및/또는 이의 유도체를 포함하는 국소 제형에 관한 것이다. 본 발명은 또한 요독 가려움증의 예방에 사용하기 위한 국소 제형에 관한 것이기도 하다.

배 경 기 술

[0002] 요독 가려움증은 신부전증(renal failure)의 가장 고통스러운 증상 중 하나이다. 그것은 투석 환자의 최대 50%까지 영향을 미친다(1). 요독증 환자의 피부는 빈혈로 인해 창백하고, 건조하며 스크래치 흔적을 갖는다. 상태는 습진, 결정성 양진(prurigo nodularis), 화폐상 습진 및 태선화와 같은 피부 증상을 포함할 수 있다. 주관적인 증상은 국부화되거나 전신화될 수 있는 강렬한 가려움 및 화끈거림을 포함한다. 다수의 전신 및 국소 치료를 유도하는 상태의 병인에 대한 많은 가설이 있었다. 일반적으로, 이러한 치료는, 일부가 환자의 하위그룹에 도움이 될 수는 있지만, 효과가 거의 없거나 전혀 없다(1).

[0003] 요독증 투석 환자(uremic dialyzed patient)의 대사 및 내분비 변화는 많고 복잡하다(2). 체내에서 요소의 축적은 만성 신장 질환에서 주요 대사 변화 중 하나이다. 요소는 신장계 및 땀 둘 다를 통해 배설된다(3). 땀의 농도는 혈청 농도보다 2 내지 4배 더 높다. 이는, 고농도의 요소가 요독증 환자의 피부에 존재할 수 있음을 함축한다(4). 때로는 농도가 너무 커서 요소가 요독성 서리(uremic frost)처럼 보인다.

[0004] 피부의 외부 부분인 각질층(stratum corneum)은 세라미드, 콜레스테롤 및 유리 지방산으로 구성된 지질 세포간 매트릭스에 매립되고 천연 보습 인자(NMF)와 혼합된 단백질 풍부 각질 세포(corneocyte) 형태의 각질화된 상피층으로 구성된다(5)(6). 50%의 NMF는 표피 단백질, 특히 필라그린(6)의 효소 분해로 인한 아미노산 및 히스티틴, 트랜스-우로칸산 및 피롤리돈 카복실산을 포함하는 이의 중추적 아미노산 분해 생성물(7)로 구성된다. NMF의 나머지 부분은 전해질, 락트산, 요소 및 소량의 아미노산을 포함하는 땀 성분으로 구성된다. 보습 효과(물 결합)를 갖는 것 이외에, 아미노산은 천연 UV 보호의 일부를 나타내고(트랜스 우로칸산), pH 안정화 인자로서 기능한다.

[0005] 필라그린을 코딩하는 유전자에서 절단 돌연변이를 갖는 개체는 심각한 형태의 건조한 피부, 심상성 어린선 및/또는 습진에 매우 취약하다. 모든 심각한 경우의 습진의 거의 50%는 적어도 하나의 돌연변이된 필라그린 유전자를 가질 수 있는 것으로 나타났다. 필라그린 제로 담체에서 볼 수 있는 장벽 결함은 또한 천식 감수성 및 악화를 증가시키는 것으로 나타난다.

[0006] 요소는 오랫 동안 단백질을 변성시키는 능력으로 생화학적 연구 및 산업적 공정 둘 다에 사용되어 왔다(8). 구형 단백질에 대한 요소의 변성 작용은 펼쳐진 형태의 단백질 분자의 안정화에 기인한다. 요소는 또한 실온에서 아미노산에 대한 직접 농도 의존 효과를 갖는다(8). 수성 요소에 존재하는 소량의 시아네이트를 단백질 및 아미노산의 -NH2 그룹 뿐만 아니라 존재하는 -SH 그룹에 첨가하여 카바밀 유도체를 수득할 수 있다(9). 시아네이트와 아미노산 사이의 반응에 대한 속도 상수의 대수는 아미노산 또는 폴리펩티드의 아미노 그룹의 PKa 값에 선형으로 관련된다는 것이 입증되었다(15).

[0007] 따라서, 요독증 환자의 각질층의 요소의 고농도(땀으로부터의 요소)는 표피 및 각질층의 효소 생물학적 반응에 대해 지대한 영향을 미칠 것으로 예상된다. 이러한 효과는 요독 가려움증의 병인학적 인자로서 조사되지 않았

거나, 상태 치료를 위한 새로운 수단으로 간주되었다. 요독증 환자에 존재하는 농도에서 요소의 변성 효과는 NMF의 형성에 지대한 영향을 미칠 것으로 예상된다. 단백질(특히 필라그린)의 변성은 각질층에서 대부분의 NMF를 구성하는 필라그린 유래 아미노산을 감소시킬 것으로 예상되어야 한다. 또한, 필요한 효소(히스티디나제)가 또한 요독증 환자의 피부에서 고농도의 요소에 의해 변성될 수 있기 때문에 임의의 이용 가능한 히스티딘은 트랜스-우로칸산으로 형질 전환되지 않을 것이다. 히스티딘 자체는 분자에 대한 요소의 직접 작용에 의해 변화될 것이다. NMF의 양 및 품질에 상당히 영향을 미칠 것으로 예상되는 이러한 방해는 NMF의 형성 및 생물학적 효과에 대한 지식 및 역학이 새로운 것이었기 때문에 이전에 조사되지 않았다.

[0008] 종래 기술과 관련하여, US2016/0008297은 신장 질환과 관련된 가려운 피부의 치료 또는 예방에 사용하기 위한 국소 제형을 개시한다. 요소 격리에 대한 친핵성 공격의 개시는 없고, 제형에 사용된 아미노산은 친핵체(nucleophile)로서 작용하기 위해 포함되지는 않는다.

[0009] US20150252035는 다수의 다른 피부 장애 중에서 요독 가려움증과 관련된 가려움의 치료를 언급하지만, 개시된 TRPV4 억제제는 친핵체로서 작용함으로써 요소를 격리시킬 수 없다.

[0010] US2009/0186853은 가려움증을 치료할 수 있는 히스티딘 유도체 및 아미노산의 N-프로파노일 유도체를 개시한다. 그러나, 친핵체로 요소를 격리시킴으로써 유발되는 가렵고 건조한 피부를 치료하는 개시는 없다. 반대로, US2009/0186853은 요소가 제형에 포함될 수 있음을 언급한다.

발명의 내용

해결하려는 과제

[0011] 본 발명에 따라서, 요독 가려움증의 치료에 사용하기 위한 낮은 아미노 그룹 PKa를 갖는 친핵성 화합물, 바람직하게는 아미노산 또는 폴리펩티드 및/또는 이의 유도체를 포함하는 제형이 제공된다. 임의의 이론에 결부시키지 않고, 본 발명자들은 요독 가려움증 환자의 피부에 축적되는 과량의 요소의 바람직하지 않은 효과는 친핵성 화합물, 예를 들어, 친핵성 아미노산 또는 폴리펩티드 및/또는 유도체, 예를 들어, 히스티딘, 시스테인, 아르기닌, 리신, 글리실글리신, 글리실알라닌 또는 트리- 또는 테트라글리신의 존재로 상쇄될 수 있다는 것을 밝혀냈다.

[0012] 본 발명자에 의해 수행된 분석 화학에 따르면, 이러한 친핵체는 요소 유래된 시아네이트와 반응하여 카바밀화 말단 생성물 및 암모니아를 생성하는 것으로 나타난다. 임의의 잔류하는 비반응성 친핵성 아미노산, 특히 히스티딘은 이러한 아미노산으로부터 공지된 유리한 피부 효과를 발휘하고, 이에 의해 요독 가려움증 환자의 피부가 가려움증 반점이 없는 정상 상태로 복귀된다. 펩티드 및 단백질이 카밀화되는 방법에 대한 추가의 세부 사항을 위해, 본원에 참고로 인용된 지.알. 스타크(G.R. Stark)에 의해 저술된 논문(15)이 참조된다.

[0013] 본 발명에 따라서, 요독 가려움증의 치료 방법으로서, 상기 방법이 상기 대상체에게 치료적 유효량의 친핵성 화합물, 예를 들어, 친핵성 아미노산, 바람직하게는 히스티딘 및/또는 이의 유도체를 투여하는 단계를 포함하는, 치료 방법이 또한 제공된다.

과제의 해결 수단

[0014] 또 하나의 구현예에서, 본 발명은 상기 대상체에게 치료적 유효량의 친핵성 화합물, 예를 들어, 친핵성 친핵성 아미노산 또는 폴리펩티드 및/또는 이의 유도체를 투여하는 단계를 포함하는 방법에 의해 요루 피부염(urostomi dermatitis), 요실금 피부염(incontinence dermatitis) 및 기저귀 피부염(diaper dermatitis)을 포함하지만, 이에 한정되지 않는, 요소 또는 뇨의 존재에 의해 유발된 추가의 피부 상태(skin condition)의 치료를 추가로 포함한다.

[0015] 구체적으로, 대상체의 요독 가려움증을 치료 또는 예방하는데 사용하기 위한 히스티딘 및/또는 이의 유도체를 포함하는 국소 제형으로서, 상기 제형이 0.001 mg/cm^2 내지 5 mg/cm^2 피부 표면, 바람직하게는 0.003 mg/cm^2 내지 1 mg/cm^2 피부 표면, 더욱 바람직하게는 0.005 mg/cm^2 내지 0.5 mg/cm^2 피부 표면 범위의 아미노산 또는 폴리펩티드 및/또는 이의 유도체의 농도로 피부에 도포되는, 국소 제형이 제공된다.

[0016] 바람직하게는, 유도체는 낮은 PKa를 갖는 아미노산 또는 폴리펩티드 및/또는 이의 유도체, 하나 이상의 히스티딘 분해 생성물, 예를 들어, 트랜스 우로칸산, 히스티딘의 펩티드 또는 히스티딘과 하나 이상의 추가의 아미노산의 펩티드, 및 히스티딘의 약제학적으로 허용되는 염으로부터 선택된다. 히스티딘은 L-히스티딘인 것이 바람

직하다.

[0017] 하나의 구현예에서, 히스티딘 및/또는 이의 유도체는 약제학적 조성물의 유일한 활성 성분이다.

[0018] 또 다른 구현예에서, 제형은 피롤리돈 카복실산 또는 이의 염, 바람직하게는 나트륨 염을 추가로 포함한다.

도면의 간단한 설명

[0019] 도 1은 요독 가려움증과 관련된 생화학적 방해의 다이아그램을 도시한다.

도 2는 요소에 노출된 재작제된(reconstructed) 인간 표피 샘플의 조직 검사를 도시한다.

도 3은 요소에 노출된 재작제된 인간 표피 샘플의 조직 검사를 도시한다.

도 4는 요소 및 2% 아미노산을 함유하는 국소 도포된 크림에 노출된 재작제된 인간 표피 샘플의 조직 검사를 도시한다.

발명을 실시하기 위한 구체적인 내용

[0020] 언급된 바와 같이, 본 발명은 또한 요독 가려움증을 치료하기 위한 치료적 방법을 제공한다. 구체적으로, 본 발명은 이의 제2 양태에서, 대상체의 요독 가려움증의 치료 방법으로서, 히스티딘 및/또는 이의 유도체, 예를 들어, 트랜스 우로칸산(UCA)을 포함하는 국소 제형이 0.001 mg/cm^2 내지 5 mg/cm^2 피부 표면, 바람직하게는 0.003 mg/cm^2 내지 1 mg/cm^2 피부 표면, 더욱 바람직하게는 0.005 mg/cm^2 내지 0.5 mg/cm^2 피부 표면 범위의 히스티딘 및/또는 이의 유도체의 농도로 피부에 도포되는, 치료 방법을 제공한다. 아미노산 또는 폴리펩티드 및/또는 이의 유도체는 약제학적 조성물의 유일한 활성 성분일 수 있다. 대안적으로, 제형은 활성 물질, 예를 들어, 피롤리돈 카복실산을 추가로 포함한다.

[0021] 요독 가려움증은 염증성 피부 질환(특히, 만성 염증성 피부 질환), 예를 들어, 아토피성 피부염, 모든 유형의 건선(플라크 굴곡성, 반점성, 농포, 손톱, 감광성, 홍피성 건선 및 건선성 관절염 포함), 여드름, 어린선, 접촉성 피부염, 습진, 광피부증 및 건성 피부 장애와 명백하게 구별될 수 있는 충분히 정의된 징후이다.

[0022] 피부 장벽 기능은 존재하는 단백질 및 그들이 거주하는 환경(예: pH)을 포함하는 다수의 인자에 의해 제어된다. 본 발명자들은 필요한 효소(히스티디나제)가 요독증 환자의 피부에서 고농도의 요소에 의해 변성될 수 있기 때문에 히스티딘이 트랜스-우로칸산으로 형질 전환되지 않을 것임을 깨달았다.

[0023] 정상 피부에서, 장벽 형성에 관련된 다수의 단백질은 pH 의존적이고, 상부 표피/각질층의 UCA-생성된 산성 환경에서 유일한 활성 물질이다(10). 이 항상성을 유지하는 것 외에도, 각질층의 감소된 pH는 미생물 감염 및 성장을 직접 억제한다(11). 결함 필라그린이 각질층 중의 감소된 수준의 히스티딘을 포함하여 감소된 아미노산 함량을 초래할 수 있고, 이는 또한 감소된 수준의 트랜스-UCA 및 비정상적으로 높은 pH를 유도할 수 있음이 공지되어 있다. 각질층에서 최적의 pH보다 더 높으면 pH 의존적 지질 처리 효소(예: β-글루코세레브로시다제)를 감소시키고 장벽 기능 및 회복을 손상시키는 것으로 간주된다(12).

[0024] 그러나, 본 연구는 피부 장애를 앓고 있는 결함 필라그린 환자의 생리학적 원인을 해결하는 것과 관련이 없다. 본 발명자들은 대신 본 발명의 용도에서 활성 성분으로서 히스티딘 또는 폴리펩티드 및/또는 이의 유도체를 포함하는 아미노산의 사용이 요독 가려움증 환자의 피부에서 고농도의 요소에 의해 유발되는 결함 필라그린을 보상하는 것으로 나타난다는 것을 발견했다. 현재 요독 가려움증을 예방 및/또는 치료하기 위한 방법은 없다.

[0025] 또한, 히스티딘 및 대부분의 폴리펩티드 및/또는 이의 유도체를 포함하는 아미노산은 통상적인 투여량에서 포유류 독성 또는 보고된 부작용을 거의 또는 전혀 나타내지 않는다. 따라서, 활성 성분으로서 히스티딘 및 폴리펩티드 및/또는 이의 유도체를 포함하는 아미노산을 사용하면 현재 사용 중인 대안적인 약물과 비교하여 환자 접근 용이성, 광범위한 환자 집단에서 활성 성분의 사용의 증가 및 더 오래 중단되지 않는 치료 섭생을 유도하는 환자 순응도 개선을 포함하는 사용시 이점을 제공한다. 또한, 히스티딘 및 대부분의 폴리펩티드 및/또는 이의 유도체를 포함하는 아미노산은 환자의 전체 신체 표면을 치료하는데 유용하고 광범위한 범위의 피부 장애(특히, 염증성 피부 질환)에 대해 효과적인 것으로 예상된다. 바람직하게는, 이러한 피부 질환은 요소 또는 뇨의 존재에 의해 유발되고, 요루 피부염, 요실금 피부염, 및 기저귀 피부염, 보다 바람직하게는 요독 가려움증을 포함하지만, 이에 한정되지 않는다.

[0026] 도 1에 도시된 바와 같이, 요독 가려움증은 땀샘에 의해 상부 피부 표면으로 수송된 매우 과량의 요소에 의해

유발된다. 본 발명자들에 의해 수행된 새로운 관찰은 고농도의 요소가 단백질 및 아미노산의 정상적인 기능을 방해한다는 것이다. 또한, pH 조절은 고농도의 요소에 의해 부정적으로 영향을 받는다.

[0027] 히스티딘 및 대부분의 폴리펩티드 및/또는 이의 유도체를 포함하는 아미노산은 본원에 기재된 바와 같이 임의의 적합한 형태, 예를 들어, 본원에서 논의된 바와 같이 사용될 수 있다.

[0028] 히스티딘 및 대부분의 폴리펩티드 및/또는 이의 유도체를 포함하는 아미노산은 단독 요법으로서 또는 요독 가려움증의 예방 및/또는 치료를 위한 종래의 요법과 조합하여 사용될 수 있다. 적합한 종래의 요법은 스테로이드(예: 국소 투여용 스테로이드) 및/또는 적합한 지질 및/또는 광선 요법을 사용하는 치료를 포함한다.

[0029] 본 발명은 노인들의 노화된 피부에서 가려움증을 치료 또는 예방하는데 사용하기 위한 상기한 국소 제형을 추가로 제공한다. 본 발명은 또한 필라그린 결함 환자의 가렵고 건조한 피부를 치료 또는 예방하는데 있어서 제형의 용도에 관한 것이기도 한다.

[0030] 본 발명에 따르는 국소 투여용 약제학적 조성물은, 예를 들어, 용액, 크림, 연고, 젤리, 겔, 스프레이, 발포체, 분말, 리포좀, 또는 수성 또는 유성 용액 또는 현탁액의 형태일 수 있다. 수중유 에멀젼, 유중수 에멀젼 또는 폴리아프론(높은 내부 에멀젼, 겔 에멀젼 등)도 또한 본 발명에 포함된다. 적합한 부형제 및 담체는, 예를 들어, 땅콩유, 물, 에틸 코코에이트, 옥틸 코코에이트, 폴리옥시에틸렌화된 수소화 피마자유, 액체 파라핀, 이소프로판올, 글리세롤, 프로필렌 글리콜, 파라핀, 셀룰로스, 파라벤, 스테아릴 알콜, 폴리에틸렌 글리콜, 이소프로필 미리스테이트 및 페녹시에탄올을 포함한다.

[0031] 두피에 국소 도포하는 경우, 약제학적 조성물은 샴푸 또는 컨디셔너로서 제형화될 수 있다. 피부에 국소 도포하는 경우, 약제학적 조성물은 세척 및 목욕 제품(예: 바쓰 또는 샤워 겔 및 크림)에 대한 첨가제로서 제형화될 수 있다. 이러한 국소 투여용 약제학적 조성물은 화장품에 사용하기에 또한 적합한 희석제 또는 담체를 포함할 수 있다.

[0032] 피부에 도포하여 국소 투여하기 위한 약제학적 조성물은 보습제, 및 선탠 로션 및 크림을 포함할 수 있다.

[0033] 국소 투여용 약제학적 조성물은 임의의 적합한 분배기에 제공될 수 있다.

[0034] 피부에 도포하여 국소 투여하기 위한 약제학적 조성물의 경우, 희석제 또는 담체는 피부 장벽을 교차하는 활성 성분의 수송을 돕기 위해 선택되어야 하고, 피부의 각질층을 교차할 수 있는 것일 필요가 있을 수 있다. 국소 도포용 약제학적 조성물을 제조하기 위한 다수의 방법이 공지되어 있다. 예를 들어, 활성 성분은 본원에서 논의된 바와 같은 공지된 담체 물질과 혼합될 수 있다.

[0035] 대안적으로, 당업자는 국소 투여가 국부화된 주사, 예를 들어, 피내 주사로 달성될 수 있음을 이해할 것이다.

[0036] 전형적으로, 국소 투여용 조성물(예: 크림)은 활성 성분으로서 히스티딘 및 폴리펩티드 및/또는 이의 유도체를 포함하는 아미노산의 총 조성물의 중량의 약 0.05 w/w% 내지 15 w/w%, 더욱 특히 약 0.1 내지 5 w/w%, 더욱 더 특히 약 0.2 내지 2 w/w%를 함유할 것이다.

[0037] 본 발명의 약제학적 조성물은 당해 기술 분야에 익히 공지된 통상적인 약제학적 희석제 또는 담체를 사용하는 통상적인 절차에 의해 수득될 수 있다.

[0038]

[0039] **실시예 1**

[0040] 전형적인 국소 투여용 크림은 다음을 함유할 수 있다:

성분	%
버사겔(Versagel) M200(광유 (및) 에틸렌/프로필렌/스티렌 공중합체 (및) 부틸렌/에틸렌/스티렌 공중합체)	8.58
이소스테아릴 이소스테아레이트(ISIS)	12.87
사이클로메티콘	4.29
디메티콘 350cst	3.96
글리세롤	3.00
라우레쓰(Laureth) 4	0.30
2-피롤리돈-5-카복실산 (Na 염)	0.50
히스티딘	0.50
카보머(울트레즈(Ultrez) 10)	0.80
시트르산	0.10
페녹시에탄올	1.00
폴리소르베이트 20	0.075
나트륨 히알루로네이트	0.05
수산화나트륨(20% 용액)	적당량(약 0.70)
물	적당량(약 62.28)
	100

[0041]

[0042] 크림은 다음과 같이 제조될 수 있다. 적합한 용기(A)에서, 버사겔, 이소스테아릴 이소스테아레이트, 사이클로메티콘 및 0.26% 라우레쓰 4를 적합하게 혼합하면서 배합한다. 제2 용기(B)에서, 디메티콘 및 0.04% 라우레쓰 4를 적합하게 혼합하면서 배합한다. 제3 용기(C)에서, 폴리소르베이트 20을 7.425% 물과 혼합한다. 완만하게 혼합하면서, 먼저 용기 A의 내용물에 이어, 용기 B의 내용물을 용기 C에 서서히 첨가한다. 제4 용기(D)에서, 글리세롤, 2-피롤리돈-5-카복실산(나트륨 염), 시트르산, 히스티딘, 나트륨 히알루로네이트, 페녹시에탄올 및 41.55% 물을 배합한다. 제5 용기(E)에서, 카보머 및 13.50% 물을 배합한다. 완전히 분산되고 수화되면, 교반하면서 용기 E의 내용물을 용기 C에 첨가한 다음, 용기 D의 내용물을 첨가한다. pH는 (필요할 경우) 수산화나트륨을 사용하여 조정하고, 이어서 잔류하는 물로 양을 구성한다.

[0043] **실시예 2**

[0044] 히스티딘이 요소(UP를 앓고 있는 개체의 피부의 필수 불가결한 구성 성분임)의 존재하에 분해되는 방법을 입증하기 위해, 실시예 1의 크림을 5 w/w% 및 10 w/w%의 요소에 노출시켰다. 분해 공정은 경시적으로 수행되고, 40 ℃에서 6주 후에 20% 히스티딘만이 10 w/w% 요소를 갖는 크림에 남았다.

[0045] 히스티딘이 필수 아미노산이기 때문에, 피부의 정상적인 기능을 유지하기 위해서는 이의 연속적인 공급이 필요하다. 또한, 이 아미노산이 피부에서 pH 조절에 중요한 완충제인 UCA의 전구체이기 때문에 중요하다. 요독 가려움증과 관련하여, 히스티딘의 분해율은 아토피성 피부염과 같은 다른 피부 장애에서보다 훨씬 더 높다. 따라서, 본 발명자들은 히스티딘 (뿐만 아니라 이의 유도체)의 공급이 분해를 보상하여 정상적인 히스티딘 수준이 달성될 수 있도록 상응하게 더 높아야 한다는 것을 깨달았다. 그것을 염두에 두고, 본 발명자들은 히스티딘을 이러한 고농도로 제형화했다(참조: 실시예 1).

[0046] 피부 장벽 기능은 존재하는 단백질 및 그들이 존재하는 환경을 포함하는 다수의 인자에 의해 제어된다. 손상된 피부 장벽 기능은 결함 필라그린에 기인할 수 있다. 또한, 필라그린은 프로테이나제에 의해 분해되어 다량의 구성 성분 히스티딘 잔기를 방출한다. 이어서, 히스티딘 잔기는 히스티다제에 의해 탈아민화되어 특히 트랜스-우로칸산(트랜스-UCA)을 형성한다.

[0047] 본 발명은 가려운 피부 장애를 앓고 있는 환자의 결함 필라그린 문제를 해결하는 것으로 간주된다. 히스티딘 및/또는 이의 유도체는 결함 필라그린을 보상한다.

[0048] **실시예 3**

[0049] UP(요독 가려움증) 인간 피부에서 가능한 카바밀화를 추가로 조사하기 위해, 본 발명자들은 재작제된 인간 표피(RHE) 모델에서 일련의 연구를 수행했다. $4cm^2$의 큰 피부 샘플은 각각 1ml의 용적을 갖는 6개 웰 플레이트에 Episkin®으로부터 전달했다. 실험은 18 내지 25일령 피부 샘플로 수행했다. RHE는 피부에서 대사, 독성 및 염증 반응을 조사하기 위해 사용된 표준화 기술이다(13). 피부 샘플은 인간 표피 줄기 세포로부터 개발되었다. 그들은 기초 성장 배지를 사용하여 폴리카바메이트 네트 상에서 개발되었다. RHE는 각질층을 포함한 표피의 모

든 상이한 세포 층을 함유한다. 샘플을 5% CO2 대기에서 37℃에서 유지시킨다. 그들은 무균 상태로 취급한다. 새로운 성장 배지를 매일 추가한다. 4cm^2의 큰 피부 샘플은 18일 개발 후 사용 준비가 되었고, 시간 간격은 인간 피부의 정상적인 회전율과 유사하다.

[0050] 2개의 대조군을 포함하여 12개의 개별 실험을 수행했다. 성장 배지(1ml)를 표준 프로토콜에 따라 매일 교체했다. 샘플 중 6개는 3일째에, 6개는 6일째에 수거하고, 단백질 분석까지 -80℃에서 즉시 동결시켰다. 모든 샘플의 일부를 조직 검사를 위해 송부했다.

[0051] 모두 피부 샘플의 각질층 측면으로부터 다음 노출(개별 실험)을 수행했다.

[0052] 1. 대조군: 미처리 정치시킴.

[0053] 2. UP에서와 같이 mg/cm^2 피부로 계산된 동일량의 수용액 중 요소. 이러한 계산된 양은 요독증 환자의 요소의 평균 혈청 수준의 합, 땀으로부터의 요소 및 요소의 표피 세포로의 능동적 수송의 기여도의 계산에 기초하여 0.3 mg/cm^2에 상응한다. 요소의 첨가는 피부 샘플의 표면에 6 mg 요소/ml의 용액 200 μl의 첨가로 수행된다.

[0054] 3. 상기 항목 2와 같으나, 2배량(0.6 mg/cm^2).

[0055] 4. 상기 항목 3과 같고, 200μl의 1% 히스티딘 용액을 첨가한다.

[0056] 5. 5% 시판 요소 크림을 의도된 인간 용도로 투여한다.

[0057] 6. 10% 시판 요소 크림을 의도된 인간 용도로 투여한다.

[0058] 3일째에 수거된 피부 샘플은 0일 내지 2-6일 및 1일 내지 2-4일 노출시켰다(표 1).

[0059] 6일째에 수거된 피부 샘플을 상기한 바와 같이, 그리고 추가로 3일 내지 2-6일 노출시켰다. 표 1과 일치하여, 요소 수용액은 피부 샘플을 통해 즉시 흡수되었다. 2개의 크림은 피부 상단에 침적물을 남기고, 따라서 단지 2회: 0일째 및 3일째(6일 실험 동안) 도포했다. 매일 노출은 감염 위험을 최소화하기 위해 절제했다. 따라서, 2개의 상이한 도포 방법은 크림의 데포 효과로부터 예상되는 연속 요소 노출과 직접 비교가능하지 않다. 또한, 실험 2, 3 및 4로부터 6일째 수거된 요소 농도는 3일째 단지 하나의 보충 노출에 기인하여 비교적 낮을 수 있다.

[0060] 도 2 및 3은 3일 및 6일째에 수거된 실험의 조직학적 사진을 도시한다. 3일째에, 실험 2, 3, 5 및 6에서 중요한 변화가 나타난다. 심한 부종 및 분열이 각질층에서 나타나고, 유극층에서 조기 세포사가 나타난다. 실험 1(대조군) 및 4는 18일령 미처리된 RHS 샘플의 일반적인 모습과 유사하고 동일하다. 유사한 조직학적 변화가 6일간의 실험에서 나타난다. 피부 샘플이 오래되었다는 것이 분명하다. 실험 2 및 3에서, 피부는 아마도 제한된 요소 노출을 반영하여(3일만) 어느 정도 회복되었다.

[0061] 실험은 RHS 샘플에 대한 가능한 투여량 및 시간 의존적 요소 효과를 설명한다. 각질층의 현저한 부종은 요소의 물 결합능을 반영한다. 그러나, 세포사는 또한 수용액에서 요소로부터 방출된 시아나이드 이온으로부터의 직접적인 독성 효과를 가리킨다. 친핵체인 히스티딘이 3일째 및 6일째 둘 다에서 수거된 실험 4에서 예시된 바와 같이 이 효과에 대응할 수 있음이 주목할 만하다.

[0062] 단백질 분석은 이전에 개발된 방법에 따라 수행했다(14). 피부 샘플로부터 카바모일화된 단백질을 ELISA 웰에 코팅시키고, 1차 폴리클로날 항-호모시트룰린 항체 및 2차 표지된 폴리클로날 검출 항체를 사용하여 정량화했다. ELISA 판독치(흡광도 단위)는 표 2에 제공된다.

[0063] 피부 샘플의 단백질은 SDS PAGE에서 추가로 수행하였고, 면역블롯은 폴리클로날 항-호모시트룰린 항체로 수행했다. 이 실험 결과로부터 실험 6의 단백질이 이 샘플 중 카바모일화 단백질의 존재를 입증하는 양성 밴드를 유도했음을 확인했다. 이들 실험의 주요 결론은 단백질 카바밀화가 UP 환자의 요소와 필적할 만한 농도에서 3일 및 6일 동안 요소에 노출 후 RHE 모델에서 입증될 수 있다는 것이다. 실험은 시간 및 농도의 효과를 예시한다. 본 발명에 따라서, 히스티딘은 따라서 이들 효과에 대항할 수 있다.

표 1

3일

일	0	1	2	3
성장 배지	X	X	X	
요소 크림	X			
요소 용액	X	X		
수거				X

6일

일	0	1	2	3	4	5	6
성장 배지	X	X	X	X	X	X	
요소 크림	X			X			
요소 용액	X	X		X			
수거							X

[0064]

표 2

	3일	6일
대조군	0.318	0.395
UP에서와 같은 요소 농도 (중간) 6mg	0.377	0.368
UP에서와 같은 요소 농도 (고) 12mg	0.316	0.475
UP에서와 같은 요소 농도 (고) 12mg + 0.5% 히스티딘	0.312	0.321
5% 요소 크림	0,452	0.557
10% 요소 크림	0.423	0.606

ELISA 판독치는 흡광도 단위에 제시된다.

UP: 요독 가려움증

[0065]

[0066] **실시예 4**

[0067] 실시예 3에 기재된 바와 동일한 방법을 사용했다. 연구는 Episkin®으로부터 구입된 인간 재작제된 표피(RHE) 모델의 사용에 기초했다. 2개의 대조군을 포함하여 3개의 실험을 이중으로 수행했다. 첨가물을 갖거나 갖지 않은(이하 참조) 성장 배지(1ml)는 표준 프로토콜에 따라서 매일 교체했다. 실시예 3과 대조적으로, 요소 노출은 성장 배지에 요소를 첨가하여 수행했다. 실험 1은 2개의 대조군에 상응하고, 실험 2는 4 mg/ml 요소를 갖는 성장 배지를 사용하고, 실험 3은 4 mg/ml 요소를 갖는 성장 배지를 사용하고 0일째 및 3일째에 RHE 피부 표면의 상단에 도포된 2% 아미노산을 갖는 5 mg(500㎕) 크림을 첨가했다. 모두 6개 피부 샘플은 6일 후 수거되었을 때 현미경으로 건강하게 보였다. 감염 또는 괴사의 징후는 없었다. 그들은 단백질 분석까지 -80℃에서 즉시 동결시켰다. 모든 샘플의 일부를 조직 검사를 위해 송부했다.

[0068] 조직 검사

[0069] 가장 뚜렷한 변화는 특히 두 요소 및 두 백분율의 아미노산에 노출된 피부 샘플의 부종이었다. 세포는 실험 2 및 3 둘 다에서 변했지만, 2% 아미노산으로 처리된 피부 샘플에서 더 많은 생존 세포가 존재했다.

표 3

흡광도 단위로서 제시된 Elisa 판독치. 두 실험의 평균.

[0070]

대조군 GM	0,53
GM + 4mg 요소/ml	0,68
0일째 및 3일째 상부 도포된 2% 아미노산을 갖는 GM + 4mg 요소/ml	0,44

[0071] 단백질 카바밀화

[0072] 단백질화 카바밀화는 실시예 3과 동일한 방법을 사용하여 조사했다. 피부 샘플의 총 단백질의 카바밀화의 데이터는 표 3에 제시된다. 최고 수준의 카바밀화는 4 mg/ml 요소가 보충된 성장 배지로 배양된 2개의 피부 샘플에서 발견되었다. 최저 수준의 카바밀화는 요소 4 mg/ml 및 2% 아미노산 크림 둘 다로 보충된 성장 배지로 배양된 피부 샘플에서 발견되었지만, 이들 피부 샘플의 카바밀화의 수준은 아마도 대조군 샘플에서 나타난 것과 통계적으로 상이하지 않았다.

[0073] **실시예 3 및 4의 조합 결과**

[0074] 실시예 3에서, RHE 샘플은 친핵체의 예로서 히스티딘을 사용하여 계산된 실제 생활 조건에 노출시켰다. 모든 노출은 피부 샘플 상부에서 수행했다. 단백질의 카바밀화는 투석 환자에 존재하는 것으로 계산된 요소 농도에 노출 6일 이내에 입증될 수 있었다. NMF에 존재하는 것과 유사한 농도인 0.5% 히스티딘의 첨가는 이 카바밀화를 방지했다. 5% 및 10% 요소를 함유하는 시판용 크림에 노출된 샘플은 각질층의 수화(예상된 바와 같이)(도 2 및 3) 및 최고 정도의 단백질 카바밀화(표 2)를 나타냈다.

[0075] 실시예 4에서, 요독 가려움증 뿐만 아니라 기저귀 피부염 및 요루 피부염과 관련되는 최대 허용 노출 농도를 시험했다. 시험은 RHE 시스템으로 수행했다. 또한, 총 농도 2%로 3개 친핵체(아미노산)를 함유하는 크림을 시험했다. 요소를 평균 투석 환자보다 8배 더 높은 농도로 첨가했다.

[0076] 2% 아미노산 크림의 도포는 RHE 피부 샘플의 예상된 수화를 유도했다(도 4). 단백질 분석은 국소 도포된 크림이 과장된 요소 농도 노출 동안 단백질 카바밀화를 예방할 수 있었음을 나타냈다(표 3).

[0077] **실시예 5**

[0078] 하기에서, 본 발명에 포함되는 대표적인 제형(I-VII)의 제조가 개요된다.

[0079] **I) 수중유 에멀젼 크림 포뮬러**

상 A	
물	적당량
히스티딘	0.50
시트르산(무수)	0.10
나트륨 시트레이트 (이수화물)	0.17
상 B	
메틸파라벤	0.15
글리세린	8.00
상 C	
광유	26.00
바셀린	12.00
밀랍	3.00
소르비탄 스테아레이트	3.00
폴리소르베이트 60	4.00
프로필파라벤	0.15
	100.00

[0080]

[0081] 70℃로 가열하는 상 A를 예비혼합한다.

[0082] 상 B를 상 A에 첨가한다.

[0083] 상 C를 75℃로 가열한다.

[0084] 고전단 혼합을 사용하여 상 C를 상 A에 첨가한다.

[0085] 혼합하면서 25℃로 냉각시킨다.

[0086] **II) 유중수 에멀젼 크림 포뮬러**

상 A	
에틸헥실 팔미테이트	20.0
밀랍	3.00
Peg-7 수소화 피마자유	1.00
폴리글리세릴-3-폴리리시놀레에이트	1.00
상 B	
황산마그네슘	1.00
히스티딘	0.50
시트르산(무수)	0.10
나트륨 시트레이트 (이수화물)	0.17
물	73.23
	100.00

[0087]

[0088] 방법

[0089] 오일 및 수 상을 별도로 65-70℃로 가열한다

[0090] 수 상(B)을 오일 상(A)에 교반하면서 첨가한다.

[0091] 교반하여 냉각시킨다.

[0092] III) 겔 포뮬러

성분	%
글리세롤	3.00
2-피롤리돈-5-카복실산 (Na 염)	0.50
히스티딘	0.50
카보머(울트레즈 10)	0.80
시트르산	0.10
나트륨 벤조에이트	0.20
나트륨 히알루로네이트	0.05
수산화나트륨 (20% 용액)	적당량(pH 5.5까지)
물	적당량
	100.00

[0093]

[0094] 방법

[0095] 제1 용기(A)에서, 나트륨 히알루로네이트를 50%의 물에 용해시킨다. 용해되면, 글리세롤, 2-피롤리돈-5-카복실산(나트륨 염), 시트르산 및 히스티딘을 첨가한다. 제2 용기(B)에서, 적합하게 교반하면서 카보머를 30%의 물에 분산시킨다. 제3 용기(C)에서, 나트륨 벤조에이트를 5% 물에 용해시킨다. 용기 A의 내용물을 교반하면서 용기 B에 첨가한 다음, 용기 C의 내용물을 첨가한다. 필요할 경우, pH를 수산화나트륨으로 조정한 다음, 물을 적당량 첨가한다.

[0096] IV) PEG 기반 무수 연고 포뮬러

올레산	5.00
부틸화 하이드록시아니솔	0.10
PEG 4000	25.00
히스티딘	0.50
PEG 400	69.40
	100.00

[0097]

[0098] 방법

[0099] 올레산 및 부틸화 하이드록시아니솔을 용기 A에서 배합하고, 적합하게 교반하면서 65 내지 70℃로 가열한다. PEG 4000, 히스티딘 및 PEG 400을 용기 B에서 배합하고, 적합하게 교반하면서 65 내지 70℃로 가열한다. 용기 A의 내용물을 고전단 혼합으로 5분 동안 용기 B에 첨가한다. 적당하게 교반하면서 실온으로 냉각시킨다.

[0100] V) 무수 연고 포뮬러

세틸 팔미테이트	5.00
디에틸 세박케이트	8.00
스쿠알렌	5.00
프로필렌 글리콜	5.00
히스티딘	0.50
바셀린	76.50
	100.00

[0101]

[0102] 방법

[0103] 프로필렌 글리콜 및 히스티딘을 용기 A에서 배합하고 적합하게 교반하면서 65 내지 70℃로 가열한다. 용기 B에서 나머지 성분들을 배합하고, 적합하게 교반하면서 65 내지 70℃로 가열한다. 용기 A의 내용물을 고전단 혼합으로 5분 동안 용기 B에 첨가한다. 적당히 교반하면서 실온으로 냉각시킨다.

[0104] **VI) 샴푸 포뮬러**

나트륨 라우릴 에테르 설페이트	7.00
4나트륨 EDTA	0.14
시트르산 (무수)	1.11
코카미드 모노에탄올아민	1.00
나트륨 라우릴 설페이트	7.00
코코아미도프로필 베타인	2.00
염화나트륨	0.70
물	적당량
	100.00

[0105]

[0106] 방법

[0107] 모든 성분을 적당히 교반하면서 배합하여 발포를 최소화한다.

[0108] **VII) 유중수 에멀전 크림 포뮬러**

성분	%
버사겔 M200 (광유 (및) 에틸렌/프로필렌/스티렌 공중합체 (및) 부틸렌/에틸렌/스티렌 공중합체)	8.58
이소스테아릴 이소스테아레이트 (ISIS)	12.87
Arlamol HD (이소헥사데칸)	4.29
디메티콘 350cst	3.96
글리세롤	3.00
라우레쓰 4	0.30
2-피롤리돈-5-카복실산 (Na 염)	0.50
L-히스티딘	0.50
카보머 (울트레즈 10)	0.80
L-아르기닌	0.75
L-리신 하이드로클로라이드	0.70
시트르산	0.10
페녹시에탄올	1.00
폴리소르베이트 20	0.075
나트륨 히알루로네이트	0.05
수산화나트륨 (20% 용액)	적당량 (약 0.70)
물	적당량 (약 62.33)
	100.00

[0109]

[0110] 적합한 용기(A)에서, 버사겔, 이소스테아릴 이소스테아레이트, Arlamol HD 및 0.26% 라우레쓰 4를 적합하게 혼합하면서 배합한다. 제2 용기(B)에서, 디메티콘 및 0.04% 라우레쓰 4를 적합하게 혼합하면서 배합한다. 제 3 용기(C)에서, 폴리소르베이트 20을 7.425% 물과 혼합한다. 적당히 혼합하면서, 먼저 용기 A의 내용물에 이어, 용기 B의 내용물을 용기 C에 서서히 첨가한다. 제4 용기(D)에서, 글리세롤, 2-피롤리돈-5-카복실산(나트륨 염), 시트르산, L-히스티딘, L-아르기닌, L-리신 하이드로클로라이드, 나트륨 히알루로네이트, 페녹시에탄올 및 37.85% 물을 배합한다. 제5 용기(E)에서, 카보머 및 13.50% 물을 배합한다. 완전히 분산되고 수화되면, 교반하면서 용기 E의 내용물을 용기 C에 첨가한 다음, 용기 D의 내용물을 첨가한다. pH는 (필요할 경우) 수산화나트륨을 사용하여 조정한 다음, 잔류하는 물로 양을 구성한다.

[0111] **참고 문헌**

[0112] 1 Fitzpatricks . Dermatology in general medicine. Eds.Freedberg IM et al. Six eds 2003,p 400.

[0113] 2 Harrisons principels of internal medicine. Eds.Kasper et al 16th eds 2005. Chronic renal failure p 1653.

[0114] 3 Fitzpatricks. Dermatology in general medicine.Eds.Freedberg IM et al six eds.2003,p103.

[0115] 4 Al -Tamer YY,Hadi EA,al Badrani II.Ural.Res. 1997;25:337-40.

[0116] 5 Fitzpatricks.Dermatology in general medicine.Eds.Freedberg IM et al. Six eds 2003,p 109.

[0117] 6 Kezic S. Functions of filaggrin and its metabolites . In Flaggrin. Eds Thyssen JP and Maibach HI. 2014; p3-9.

[0118] 7 Kezic S,O'Regan GM, YanN et al. Levels of filaggrin degradation products are influenced by both filaggrin genotype and atopic dermatitis severity. Allergy.2011; 66:934-940.

[0119] 8 Nozaki Y and Tanford C. The solubility of amino acids and related compounds in aqueous urea solutions. J.Biol.Chem. 1963;238:4074-4081.

[0120] 9 Stark G.R and Smyth D.G.The use of cyanate for the determination of NH2 -terminal residues in proteins.J.Biol.Chem.1963,238:214-226

[0121] 10 Schmid-Wendtner MH and Korting HC, Skin Pharmacol. Physiol. 2006: 19:296-302

[0122] 11 Rippke et al, Am. J. Clin. Dermatol. 2004; 5:217-23

[0123] 12 Mauro et al, Arch. Dermatol. Res. 1998; 290: 215-22

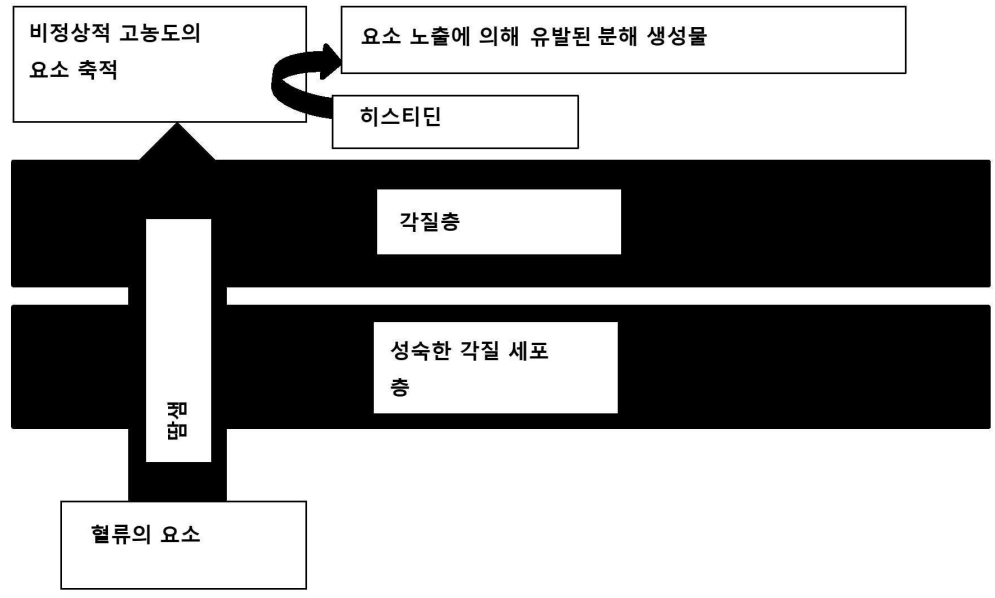
[0124] 13 Moss E et al. In situ metabolism of chinamyl alcohol in reconstructed human epidermis: New insigths into the activation of this fragrance sensitizer. Chem.Res.Toxicol. 2016; 29: 1172-8.

[0125] 14 Bandier J et al. Quantification of epidermal filaggrin in human skin and its response to skin irritation. J.Invest Dermatol. 2015;136:1519-29.

[0126] 15 G.R. Stark. Reactions of Cyanate with Functional Groups of Proteins. III. Reactions with Amino and Carboxyl Groups. Biochemistry 1965; 4: 1030-1036

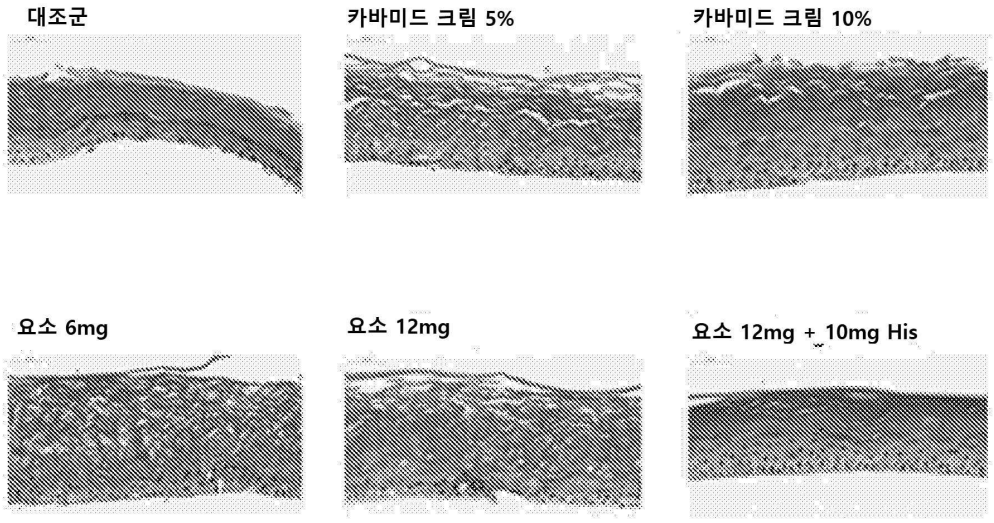
도면

도면1



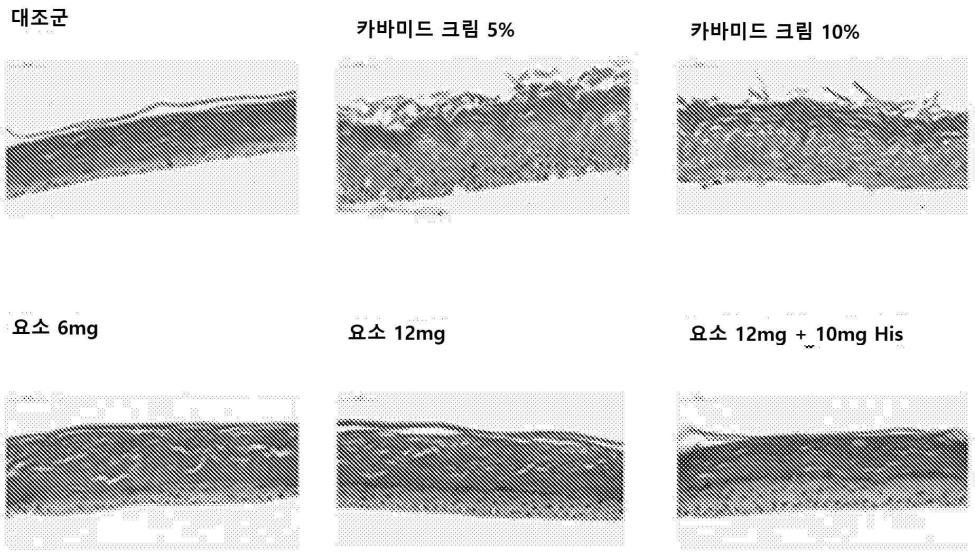
도면2

3일


대조군
카바미드 크림 5%
카바미드 크림 10%
요소 6mg
요소 12mg
요소 12mg + 10mg His

도면3

6일


대조군
카바미드 크림 5%
카바미드 크림 10%
요소 6mg
요소 12mg
요소 12mg + 10mg His

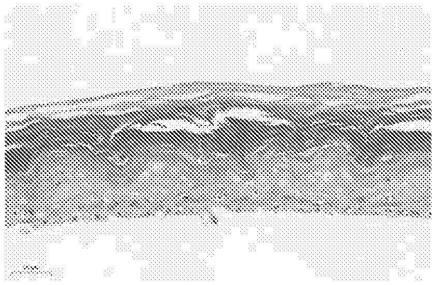
도면4

6일

GM (대조군)



GM + 4mg 요소



GM + 4mg 요소 + 크림

