



(19) 대한민국특허청(KR)

(12) 등록특허공보(B1)

(45) 공고일자 2015년03월30일

(11) 등록번호 10-1507188

(24) 등록일자 2015년03월24일

(51) 국제특허분류(Int. Cl.)

C07K 7/06 (2006.01) A61K 38/08 (2006.01)

(21) 출원번호 10-2010-7001773

(22) 출원일자(국제) 2008년06월25일

심사청구일자 2013년06월25일

(85) 번역출제출일자 2010년01월26일

(65) 공개번호 10-2010-0039861

(43) 공개일자 2010년04월16일

(86) 국제출원번호 PCT/US2008/068186

(87) 국제공개번호 WO 2009/003037

국제공개일자 2008년12월31일

(30) 우선권주장

60/937,331 2007년06월27일 미국(US)

(56) 선행기술조사문헌

US06323219 B1

US06602856 B1

US20020142392 A1

전체 청구항 수 : 총 29 항

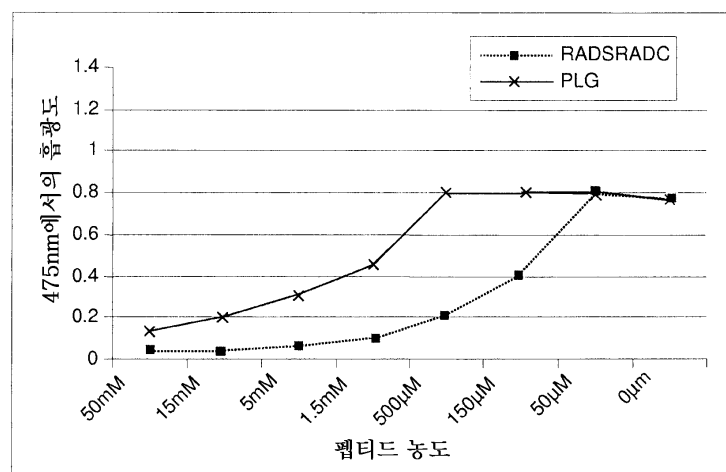
심사관 : 노은주

(54) 발명의 명칭 펩티드 티로시나제 억제제 및 그의 용도

(57) 요약

본원에서는 티로시나제의 효소 활성을 억제시키는 펩티드 뿐만 아니라, 피부 색소침착을 감소시키는데 그를 사용하기 위한 제제 및 방법, 및 국소용 제제로 억제 펩티드를 투여하는 방법을 개시한다. 상기 펩티드는 RADRADC 및 PLG-OH 서열을 특징으로 한다. 피부 치료 방법 또한 제공되며, 이 방법은 아미노산 서열 SFLLRN을 특징으로 하는 펩티드의 사용을 더 포함한다.

대표도 - 도1



특허청구의 범위

청구항 1

10 mM 미만의 티로시나제의 IC50을 갖고, RADSRADC 펩티드 (서열 2) 및 그의 보존적 아미노산 치환 변이체로 이루어진 군으로부터 선택된 정제된 펩티드.

청구항 2

제1항에 있어서, 5 mM 미만의 IC50을 갖는 펩티드.

청구항 3

제1항에 있어서, RADSRADC 펩티드 (서열 2) 서열의 1번째 또는 5번째 위치의 R이 치환되지 않은 것인 펩티드.

청구항 4

제1항에 있어서, D-아미노산을 포함하는 펩티드.

청구항 5

제1항에 있어서, 조절기에 연결되어 있는 펩티드.

청구항 6

제5항에 있어서, 조절기가 지방산인 펩티드.

청구항 7

제6항에 있어서, 펩티드 서열이 RADSRADC인 펩티드.

청구항 8

10 mM 미만의 티로시나제의 IC50을 갖고 RADSRADC 펩티드 (서열 2) 및 그의 보존적 아미노산 치환 변이체로 이루어진 군으로부터 선택된 티로시나제 억제제를 피부 색소침착을 감소시키는 유효량으로 포함하는, 피부 색소침착을 감소시키기 위한 국소용, 경구용 또는 주사용 제제.

청구항 9

제8항에 있어서, 펩티드가 RADSRADC인 제제.

청구항 10

제8항에 있어서, 펩티드가 IC50 농도의 2배 미만의 농도로 존재하는 것인 제제.

청구항 11

제8항에 있어서, 펩티드가 IC50 농도의 2배 초과 농도로 존재하는 것인 제제.

청구항 12

제8항에 있어서, 하이드로퀴논을 포함하지 않는 제제.

청구항 13

제8항에 있어서, 제2 치료제를 더 포함하는 제제.

청구항 14

제13항에 있어서, 제2 치료제가 제1항 내의 두 상이한 구조를 갖는 2개의 펩티드가 존재하도록 하는 펩티드인 제제.

청구항 15

제8항에 있어서, 액체 형태인 제제.

청구항 16

제8항에 있어서, 수화 제제, 항산화제 제제 및 자유 라디칼 제거제로부터 선택되는 물질을 더 포함하는 제제.

청구항 17

제8항에 있어서, 티로시나제 억제제가 RADSRADC 펩티드 (서열 2)인 제제.

청구항 18

제8항에 있어서, 펩티드가 리포솜내 함유되어 있는 것인 제제.

청구항 19

10 mM 미만의 티로시나제의 IC50을 갖고 RADSRADC 펩티드 (서열 2) 및 그의 보존적 아미노산 치환 변이체로 이루어진 군으로부터 선택된 티로시나제 억제제 및 피부 화이트닝제의 유효량을 포함하는, 피부 색소침착을 감소시키기 위한 피부학적으로 허용되는 국소용 제제.

청구항 20

10 mM 미만의 티로시나제의 IC50을 갖고 RADSRADC 펩티드 (서열 2) 및 그의 보존적 아미노산 치환 변이체로 이루어진 군으로부터 선택된 펩티드를 포함하는, 피부 색소침착을 미백시키기 위한 제제.

청구항 21

제20항에 있어서, 펩티드가 RADSRADC 펩티드 (서열 2)의 보존적 아미노산 치환 변이체이고 RGDSRGDC의 서열을 갖는 것인 제제.

청구항 22

제20항에 있어서, 국소용 제제인 제제.

청구항 23

제20항에 있어서, 제2 치료제를 더 포함하며, 펩티드가 상기 제2 치료제와 별도로 투여되는 것인 제제.

청구항 24

제20항에 있어서, 미세박피술 과정과 함께 투여되는 제제.

청구항 25

제20항에 있어서, 미세박피술 과정과 동시에 투여되는 제제.

청구항 26

제20항에 있어서, 방사선 과정과 함께 투여되는 제제.

청구항 27

제20항에 있어서, 연마 장치, 미세바늘, 전기 천공 장치 또는 이온 영동 장치에 의해 수행되는 물리적 치료법과 함께 투여되는 제제.

청구항 28

10 mM 미만의 티로시나제의 IC50을 갖고 RADSRADC 펩티드 (서열 2) 및 그의 보존적 아미노산 치환 변이체로 이루어진 군으로부터 선택된 정제된 펩티드; 피부학적으로 허용되는 담체; 제2 치료용 제품; 및 사용 설명서를 포함하는, 피부 화이트닝 기술을 수행하기 위한 키트.

청구항 29

제28항에 있어서, 펄티드 및 담체가 사전배합되어 있는 것인 키트.

청구항 30

삭제

청구항 31

삭제

청구항 32

삭제

청구항 33

삭제

청구항 34

삭제

청구항 35

삭제

청구항 36

삭제

청구항 37

삭제

청구항 38

삭제

청구항 39

삭제

명세서

기술분야

[0001]

관련 출원에 대한 상호 참조

[0002]

본 출원은 2007년 6월 27일에 출원된 미국 가특허 출원 번호 제60/937,331호 (본원에서 그의 전문이 참고로 인용된다)로부터 우선권을 주장한다.

[0003]

정부 지원에 관한 언급

[0004]

없음.

[0005]

서열 목록, 컴퓨터 프로그램, 또는 컴팩트 디스크에 대한 참조

[0006]

본 출원인은 서열 목록의 종이 사본이 첨부된 컴퓨터 디스크 상에서 찾아볼 수 있는 컴퓨터 판독 가능한 형태의 서열 목록과 일치한다고 주장하고 있다. 본 출원인은 서열 목록 내용의 전문을 참고로 인용한다.

[0007]

본 발명의 배경

[0008]

본 발명의 분야

[0009]

본 발명은 티로시나제 억제제 분야, 및 상기 효소를 억제시키는 것을 포함하는 치료 방법 및 치료용 조성물에 관한 것이다.

배경 기술

[0010]

관련 분야

[0011]

본 발명은 티로시나제의 효소 활성을 감소시키는 신규한 생물학적 제제, 특히 펩티드에 관한 것이다. 이러한 제제는 기초 과학 연구에서, 진단학적 적용에 있어 연구용 및 개발용 도구로서의 용도, 과다색소침착을 특징으로 하는 피부 병태 치료용 의약품으로서의 용도, 및 그의 종양형성 가능성을 촉진시키는데 티로시나제 효소 활성에 의존하는 병적 상태를 치료하기 위한 치료제로서의 용도를 갖는다.

[0012]

멜라닌은 자외선의 유해한 효과로부터 인체를 보호하는데 있어 중요한 역할을 한다. 멜라닌은 또한 의료 과학 및 화장품학에 있어서도 중요한 인자이다. 멜라닌은 피부 조직에서 형성되거나 합성되는 것으로 알려져 있다. 과량의 멜라닌은 피부를 검게 만들고, 멜라닌의 비균일한 분포가 기미와 주근깨를 유발하는데, 이들 둘은 모두 피부병이다. 멜라닌의 생합성 경로에는 티로신의 L-3,4-디하이드록시페닐알라닌 (L-DOPA)으로의 축매적 하이드록실화, 및 L-DOPA의 도파크롬으로의 전환이 포함되어 있다. 멜라닌 합성을 억제하는데 효과적인 방법은 티로신의 하이드록실화를 차단하는 것이다.

[0013]

하이드로퀴논 (HQ)은 1950년대 이래 의사의 처방전 없이 구매할 수 있는 시판용 피부 미백제 제품으로서, 그리고 1960년대 이래로 시판용 의료 제품으로서 사용되어 왔다. 이는 또한 예를 들면, 염모제 및 손톱 코팅용 제품과 같은 미용 제품에서도 사용된다. 유럽 국가에서 HQ 유사체인 알부틴, 및 HQ 및 알부틴을 천연적으로 함유하고 있는 식물 물질을 비롯한 식물 성분이 여전히 계속하여 이용가능하기는 하지만, 유럽 연합국에서는 2001년도부터 HQ를 화장품 피부 미백 제제에 사용하는 것을 허용하지 않고 있다. 또한, 문헌 [Matsubayashi et al., "Pharmaceutical and clinical assessment of hydroquinone ointment prepared by extemporaneous nonsterile compounding," Biol Pharm Bull. 2002 Jan;25(1):92-6]을 참조한다. 상기 문헌에 개시되어 있는 바와 같이, 일본에서는 미국과 유럽 연합에서 이용가능한 피부 미백 크림을 모방하여 임시로 비-멸균 합성에 의해 피부 탈색제 하이드로퀴논 (HQ) 연고를 제조하였다. 그러나, HQ 연고의 색수차, 상대적으로 큰 효능의 변동성, 및 경미하기는 하지만 바람직하지 못한 부작용을 비롯한 다양한 문제들이 관찰되었다. HQ의 IC50은 약 700 μ M인 것으로 공개되어 있다.

[0014]

하이드로퀴논을 함유하는 요법이 아시아 국가에서는 불법화되어 있는데, 이는 상기 병태를 앓고 있는 많은 사람들이 표준 HQ 치료법을 사용할 수 없게 하고 있다. 사실상, 미국 FDA는 미국 국내에서의 하이드로퀴논의 사용을 강력히 금지시킬 수 있음을 공시하였다. 추가로, 하이드로퀴논은 내장 악성종양과 관련되어 있고, 장기간 국소 전달하는 것이 잠재적으로는 유해한 치료학적 옵션일 수 있다. 최상의 환경하에 있는 하이드로퀴논이 단지 부분적으로만 과다색소침착을 완화시킬 수 있다. 몇몇 의약품 제제는 기타 다른 활성 성분들, 예로서 코직산, 알부틴, 및 비타민 C를 포함하기는 하였지만, 따라서, 그 효능은 활성 성분을 적절한 피부층으로 전달하지 못하는 화학물질의 불능 또는 불안정성과 관련된 문제로 인해 실망스러웠다. 보다 고농도의 물질을 사용하였지만, 환자들은 대개 피부 자극 때문에 치료를 중단한다. 이에, 활성 성분들, 예로서 레틴 A 및 하이드로퀴논으로부터 유발되는 자극을 감소시키기 위해 국소 스테로이드제를 첨가하게 되었다. 기미와 기타 다른 과다색소침착을 치료하는데는 대개 수개월에서부터 수년이 걸리기 때문에 활성 성분들의 자극적인 효과를 방지하는데 필요한 농도로 얼굴에 국소 스테로이드제를 사용하는 것은 국소 스테로이드제 유도성 부작용을 유발하지 않고서는 불가능한 것이다. 중간 정도 이상의 효능을 갖는 국소 스테로이드제를 수주 이상 연속하여 얼굴에 사용하면 보편적으로 피부 위축증, 취약증 및 모세혈관확장증이 일어나게 된다. 이러한 부작용 프로파일은 특히, 예로서 얼굴과 같은 부위에서는 허용될 수 없는 것이다.

[0015]

적외선 레이저가 사용되어 왔으며, 이는 몇몇 성공을 이루었다. 이는 일반적으로 예로서, 진피와 같이 더 깊은 피부 부위로 색소를 위치시키는 병태에 더욱 효과적이다. 표피를 효과적으로 치료하기 위해서는 보통 박피성 치료법이 사용된다. 이러한 요법은 환자가 감염되기 쉽도록 하는 2도 화상 또는 짓무름의 발생을 포함한, 환자의 장기간의 휴양 기간과도 관련이 있다. 추가로, 레이저 요법은 환자 다수가 비용 부담을 할 수 없는 값비싼 치료 옵션이다. 극단적인 경우, 표백제가 성공적이지 못하였을 때에는 선택적으로 피부 탈색이 일어났다. 많은 병적 상태가 색소를 피부에 비정상적으로 침착시킬 수 있다. 예를 들면, 호르몬 불균형으로 인해 얼굴과 팔다리에 과다색소침착이 일어날 수 있으며, 이는 임신중 또는 출산 여성에서 가장 빈번하게 관찰되는 것으로 잘

알려져 있다. 종종, 이러한 과다색소침착은 미적으로 외관을 흉하게 만들어 자부심과 관련된 문제 및 사회적인 상황하에서는 쑥스러움을 느끼게 할 수 있다. 기미는 종종 피츠패트릭(Fitzpatrick) IV-VI형 피부를 갖는 개체에 영향을 준다. 이것이 전세계 인구의 상당 부분을 구성한다.

[0016] 피츠패트릭 IV형 내지 VI형 피부를 갖는 다수의 개체는 아시안계이다.

[0017] 외형 및 햇빛 노출에 대한 피부 반응에 대한 시험에 기초한 피츠패트릭 피부 유형 등급에 따라 개체는 일반적으로 하기와 같이 분류된다:

[0018] I형: 매우 흰 피부톤, 금발 또는 빨간머리.

[0019] II형: 밝은색 피부톤, 햇볕에 잘 그을리지만, 보통 정도의 화상.

[0020] III형: 흰 피부톤 내지 올리브 피부톤, 때때로 화상을 입음.

[0021] IV형: 중간 정도의 갈색 피부톤, 드물게 화상을 입음.

[0022] V형: 진한 갈색 피부톤, 거의 좀처럼 화상을 입지 않음.

[0023] VI형: 검은 피부톤, 매우 검은 눈, 화상 내성을 띈.

[0024] 기미 이외에도, 예로서 얼굴과 같이 미적으로 민감한 위치의 과다색소침착은 질병, 특히, 예로서 여드름 또는 주사로 인한 염증 이후에 발생할 수 있다. 이러한 병태는 또한 현저한 심리적인 불안감을 일으킬 수 있다. 미국에서는 연간 130억 달러가 의약화장품에 소비된다. 현재 시판되고 있는 기타 다른 비-약리학적 제제들의 계속되는 안정성에 관한 문제 (비타민 C) 또는 전달과 관련된 문제 (알부민, 코직산 등)와 함께, 미국 시장에서 하이드로퀴논이 금지될 것으로 예상됨에 따라, 올리고펩티드 억제제가 이러한 많은 비충족 요구 사항에 관한 해결책을 제공할 수 있다.

[0025] 구체적인 특허 문헌 및 공개 문헌

[0026] 문헌 [Scot et al., "Production of cyclic peptides and proteins in vivo," *Proc. Nat. Acad. Sci.* Vol. 96, Issue 24, 13638-13643, November 23, 1999]에는 세균에서의 사이클릭, 8개-아미노산 티로시나제 억제제 슈도스텔라린 F 생산에 관해 개시되어 있다.

[0027] 문헌 [Verma et al., "Modulation of agonist binding to human dopamine receptor subtypes by L-prolyl-L-leucyl-glycinamide and a peptidomimetic analog," *J Pharmacol Exp Ther.* 2005 Dec;315(3):1228-36. Epub 2005 Aug 26]에는 인간 도파민 (DA) 수용체 하위유형에 결합하는 효능제 조절에 있어 시상하부 트리펩티드 L-프롤릴-L-류실-글리신아미드 (PLG) 및 그의 구조적으로 한정된 유사체인, 3(R)-[(2(S)-피롤리딘닐카르보닐)아미노]-2-옥소-1-피롤리딘아세트아미드 (PAOPA)의 역할이 개시되어 있다.

[0028] 2000년 12월 26일에 발행된 야마다(Yamada) 등의 US 6,165,982 (발명의 영문명칭 "Use of sericin as antioxidants and tyrosinase inhibitors")에는 항산화능을 발휘하는데 충분한 양으로 세리신을 활성 성분으로서 포함하는, 티로신 활성의 억제제로서, 또는 항산화제로서 유용한 조성물이 개시되어 있다. 세리신은 실크를 구성하는, 고분자량의 천연 가용성 당단백질이다. 세리신은 피부와 모발의 각질에 결합하여 보호 필름을 형성한다.

[0029] 1992년 6월 30일에 발행된 타케우치(Takeuchi) 등의 US 5,126,327 (발명의 영문명칭 "Melanocyte-stimulating hormone inhibitor and external preparation containing the same")에는 특정 아미노산 서열, 1 내지 12개의 탄소 원자를 갖는 아실기, 아미노산 잔기, 또는 1 내지 12개의 탄소 원자를 갖는 그의 아실화된 유도체, 2 내지 40개의 아미노산 잔기를 갖는 펩티드 잔기 또는 그의 아실화된 유도체를 갖는 멜라닌 세포-자극 호르몬 억제제가 개시되어 있다.

[0030] 2006년 4월 11일에 발행된 아케트(Arquette)의 US 7,025,957 (발명의 영문명칭 "Composition and method to whiten skin")에는 피부 화이트닝 제제로서 효과적인 조성물이 개시되어 있다. 상기 조성물은 호호바 밀 (시몬드시아 치넨시스(*Simmondsia chinensis*))로부터 추출된 글리코시드인 시몬드신(Simmondsin)을 포함한다. 특정 실시양태에서, 상기 조성물은 호호바 (시몬드시아 치넨시스)의 추출물을 포함한다. 조성물은 피부를 화이트닝시키는데 효과적인 양으로 제제를 개체에게 국소적으로 적용시켜 투여되며, 여기서 상기 조성물은 호호바 추출물을 포함한다.

[0031] 2006년 8월 1일에 발행된 포티노스(Fotinos)의 US 7,083,781 (발명의 영문명칭 "Film forming polymers,

methods of use, and devices and applications thereof")에는 중합체, 활성 성분 및 용매를 포함하며, 압연, 확장, 에어로졸에 의해 또는 소적으로 전달될 수 있고, 피부와의 접촉으로 필름을 형성할 수 있는 것으로서 활성제를 대상체의 피부에 전달하기 위한 조성물, 및 그러한 방법이 개시되어 있다. 당업계에 공지되어 있는 화장품 활성제는 피부 외관 개선용 조성물을 형성하는 필름에 혼입되어 있을 수 있다. 전형적으로 이러한 병태를 상쇄시키는데 사용되는 항-과다색소침착 제제는 티로시나제 억제제, 예로서 펩티드 혼합물 및 식물 추출물, 발효 산물, 및 항산화제, 예로서 하이드로퀴논, 코직산, 아스코르브산 유도체, 하이드로퀴논 및 하이드로퀴논 전구체의 합성 또는 천연 유도체를 포함할 수 있다. 본 발명의 바람직한 실시양태에서, 항-과다색소침착 제제는 펜탐 엘티디.(Pentharm Ltd.)(스위스 바젤 소재)의 멜라화이트(Melawhite); 콜레티카(Coletica) (프랑스 소재)의 바이오화이트(Biowhite)TM; 세더마(Sederma) (프랑스 소재)의 에티올린(Etioline); 켈레시마(Kelesima) (이탈리아 소재)의 아르보사(Arbossa); 가테포세(Gattefosse) (프랑스 소재)의 가톨렌(Gatuline) 화이트닝; 엑시몰(Exsymol) (모나코 소재)의 아스코르보실란 C(Ascorbocilan C); 및 알프스 팜.(Alps Pharm.)(일본 소재)의 코직산(Kojic acid)이다.

[0032] 2006년 10월 24일에 발행된 리(Lee)의 US 7,125,572 (발명의 영문명칭 "Tyrosinase inhibitor extract")에는 레몬 껍질로부터 추출된 티로시나제 억제제 추출물이 개시되어 있다. 티로시나제 억제제가 이로운 피부 화이트닝 효과를 제공한다. 본 발명에 따라, 본 발명의 티로시나제 억제제 추출물은 280 nm에서 주 흡광도를 갖는다. 이는 티로시나제 억제제 추출물이 단백질 또는 펩티드를 함유한다는 것을 시사한다. 티로시나제를 억제하는데 있어 단백질 또는 펩티드가 주된 활성 성분인 것으로 여겨진다. 추출물 중 다른 성분들이 예로서, 항노화 및 항산화와 같은 추가의 효과를 제공할 수 있다. 티로시나제 억제제 추출물은 로션, 에멀전, 크림, 연고, 스틱, 액제, 팩, 및 겔과 같은 다양한 형태로 제조될 수 있다. 티로시나제 억제제 추출물은 화장품에 보통 사용되는 임의의 성분들, 예로서 오일성 물질, 보습제, 점증제, 보존제, 유화제, 의료 성분, 향미제, 유화 안정화제 등과 혼합될 수 있다.

[0033] 다양한 다른 특허 및 공개 문헌에 관련되지 않은 용도의 펩티드가 개시되어 있다. 예를 들면, TRAP: 트롬빈 수용체 활성화 펩티드 (서열 1과 관련됨)를 개시하고 있는 US 6,982,249를 참조한다.

발명의 내용

[0034] **본 발명의 간단한 요약**

[0035] 하기의 간단한 요약이 본 발명의 모든 특징과 측면을 포함하는 것도 아니며, 본 발명이 본 요약에서 논의된 모든 특징과 측면을 포함해야 한다는 것을 암시하는 것도 아니다.

[0036] 본 발명은 하기 예시되는 특정 펩티드 서열에 관한 것이다:

[0037] >1 서열 1

[0038] SFLLRN ("SF 펩티드")

[0039] >2 서열 2

[0040] RADSRADC ("RA 펩티드")

[0041] > 서열 3 (비교예) ("VL 펩티드")

[0042] VLLK

[0043] 또한, 트리펩티드 PLG-OH ("PLG")가 사용되며, 대조군으로 폴리-L 락트산이 사용된다.

[0044] 또한, 정확한 서열 RADSRADC에 대한 변형이 이루어질 수 있으며, 예로서 다음이 있다.

[0045] > 서열 4

[0046] RGDSRGDC.

[0047] 본 발명은 추가로 본 발명의 펩티드를 함유하는 키트 및 조성물, 및 티로시나제 발현이 관여하는 병태의 치료 방법에 관한 것으로서, 여기서 상기 본 발명의 펩티드는 피부에서 멜라닌 세포 활성이 관여하는 병태의 치료를 위해 국소적으로 투여되고, 내부적으로 투여될 수 있다. PLG 펩티드가 천연 아미노 말단 및 카르복시 말단을 함유함에 유의한다. 이는 천연 카르복시 말단을 나타내는 PLG-OH로 표시한다. 이는 글리신 아미드 말단을 갖는 공지의 펩티드 PLG-NH₂와 구별된다.

[0048] 또한, 본 발명의 펩티드는 인간 피부에 보다 덜 자극적일 수 있고, 국소 적용에서 하이드로퀴논 (HQ)를 대체할 수 있으며, 이로써 실질적으로 HQ를 포함하지 않는 제제가 생성된다.

[0049] 본 발명은 추가로 본 발명의 펩티드를 함유하는 키트 및 조성물, 및 티로시나제 발현이 관여하는 병태의 치료 방법에 관한 것으로서, 여기서 상기 본 발명의 펩티드는 피부에서 멜라닌 세포 활성이 관여하는 병태의 치료를 위해 국소적으로 투여된다. 다른 제제는 신체 다른 부위의 티로시나제 활성을 치료하는데 유용하며, 이는 내부로 투여될 수 있다.

[0050] 따라서, 특정 측면에서 본 발명은 아미노산 서열 RADSRAIC와 63% 이상의 동일성을 갖고, 약 10 mM 미만의 티로시나제의 IC50을 갖는 정제된 펩티드에 관한 것이다. 사실상 펩티드는 3개까지의 위치에서 치환될 수 있으며, 이는 결실도 포함한다. 이러한 변경 뿐만 아니라 억제 효능에 대한 상기 변경 시험에 관해 안내지침을 제공한다. 몇몇 경우에 있어서, 펩티드는 약 5 mM 미만, 또는 그보다 더 작은 값의 IC50을 가질 것이다. 몇몇 경우에, R 또는 F와 같은 이들 잔기는 펩티드가 티로시나제에 결합하는 것을 증가시키는 역할을 한다는 점에서 잔기를 R 또는 F로 치환시키는 것이 본 발명에 포함된다. V, A, L, M 또는 I와 같은 이들 잔기는 억제 기능을 증가시키는 역할을 한다는 점에서 1 내지 3개의 잔기를 V, A, L, M 또는 I로 치환시킬 수 있다.

[0051] 추가로, K는 L 또는 R로; F는 W 또는 Y로; E는 D로 치환시킬 수 있는데, 이는 이들 잔기가 유사한 것으로 알려져 있기 때문이다. 또한 몇몇 실시양태에서는 2개의 인접한 하전된 아미노산을 갖는 것이 이롭다. 특정 측면에서, 본 발명은 아미노산 중 일부 또는 그 모두에 대한 D-아미노산의 용도를 포함한다. 본 발명의 펩티드는 하기에서 정의되는 바와 같이, 예로서 팔미트산 또는 에스테르와 같은 조절기(modulating group)에 연결될 수 있다.

[0052] 한 측면에서, 본 치환을 아래 차트로 제시할 수 있다:

1열-인용된 잔기	2열-치환기
R	K 또는 L
S	T, A, A, L, M, I
D	N, V, A, L, M, I
C	V, A, L, M, I
A	G, V, A, L, M, I
L	I, V, A, M, I
N	D
F	R, W, Y

[0053]

[0054] 특정 측면에서, 본 발명은 피부 화이트닝에 유용한 국소용 제제를 포함한다. 본 제제는 피부학적으로 허용되는 성분으로 제조된다. 본 제제는 표준 담체 물질을 포함할 뿐만 아니라, 특정 경우에는, 제2 치료제, 및 PLG-OH, RA 펩티드 및 YR 펩티드로 이루어진 군으로부터 선택되는 서열과 실질적으로 동일한 펩티드를 포함할 수 있다. 이들 펩티드는 상기 기술된 바와 같이 변경될 수 있다. 특정 실시양태에서, 제제는 잠재적으로 처방전 없이 구매할 수 있는 사용을 위해, 또는 처방전하의 사용을 위해 적합화될 수 있다. 처방전 없이 구매할 수 있는 사용을 위해서는 펩티드가 IC50 농도의 약 2배 미만의 농도로 존재하는 제제를 사용할 수 있다. 처방전하의 사용을 위해서는 펩티드가 IC50 농도의 2 내지 100배의 농도로 존재하는 제제를 사용할 수 있다.

[0055] 본 발명의 펩티드는 특정 측면에서는 HQ보다 우수하고, 실질적으로 HQ를 포함하지 않도록 제제화될 수 있다. 특정 제제에서는 상이한 펩티드가 상이한 서열, 상이한 부작기 등과 조합될 수 있다. 담체는 수화 제제, 향산화제 제제 및 자유 라디칼 제거제로부터 선택되는 물질을 포함할 수 있다.

[0056] 특정 제제에서는 펩티드가 리포솜으로 제제화됨으로써 개선된 피부 흡수율을 갖게 될 것이다.

[0057] 특정 측면에서, 본 발명은 피부 미백 (화이트닝)을 포함하는 피부 치료 방법을 포함한다. 이러한 측면은 RADSRAIC, SFLLRN 또는 펩티드 PLG-OH 중 하나와 실질적으로 동일한 펩티드를 피부에 투여하는 단계를 포함하며, 여기서 상기의 펩티드 투여 단계가 티로시나제를 충분히 억제함으로써 피부 색소침착을 미백화시키는 것인 피부 치료 방법을 포함한다. 투여는 상기 언급한 바와 같이 국소용 제제를 투여하는 것을 포함할 수 있으며, 이는 추가로 제2 치료용 제품을 포함할 수 있다.

[0058] 본 발명의 치료 방법은 또한 추가적인 미세박피술 과정의 도움으로 함께 피부 화이트닝을 수행하는 것을 포함한다. 투여는 미세박피술 과정과 동시에 이루어질 수 있다. 투여는 방사선 과정과 함께 이루어진다. 그러한 과정을 사용하여 피부 투과성을 증가시킬 수 있다. 추가로, 투여는 연마 장치, 미세바늘, 전기 천공 장치, 또는

이온 영동 장치에 의해 수행되는 물리적 치료법과 함께 이루어질 수 있다.

- [0059] 특정 측면에서, 본 발명은 약 10 mM 미만의 티로시나제의 IC50을 갖고, RA 펩티드 또는 SF 펩티드의 서열과 63 % 이상 동일한 서열을 갖는 펩티드로 이루어진 군으로부터 선택되는 정제된 펩티드; 피부학적으로 허용되는 담체; 제2 치료용 제품; 및 사용 설명서를 포함하는, 피부 화이트닝 기술을 수행하기 위한 키트를 포함한다. 본 키트는 소비자용 또는 의사용일 수 있으며, 제제가 즉석으로 적용될 수 있도록 펩티드와 담체의 사전배합물을 포함할 수 있거나, 또는 펩티드와 담체를 혼합해야 할 필요가 있을 수 있다.

도면의 간단한 설명

- [0060] 도 1은 티로시나제 활성에 대한 RA 펩티드 (서열 2) 및 PLG-OH의 펩티드의 시험관내 효과를 보여주는 그래프이다.
- 도 2는 티로시나제 활성에 대한 SF 펩티드 (서열 1), VL 펩티드 및 폴리-L 락트산 대조군의 펩티드의 시험관내 효과를 보여주는 그래프이다.
- 도 3은 비히클 대 PLG-OH의 얼굴 색소침착의 개선(%)을 보여주는 막대 그래프이다.
- 도 4는 대조군, 티로시나제 억제제 HQ 및 RA 펩티드 (그래프에서 "P3"으로 표기됨)에 노출된 세포의 증식 속도를 보여주는 막대 그래프이다.
- 도 5는 상이한 농도의 억제제 HQ 및 RA 펩티드 ("P3") 하에 세포에서 멜라닌 생성의 억제를 보여주는 막대 그래프이다.
- 도 6은 상이한 농도의 억제제 HQ 및 RA 펩티드 ("P3")의 티로시나제 활성을 보여주는 막대 그래프이다.

발명을 실시하기 위한 구체적인 내용

- [0061] 바람직한 실시양태의 상세한 설명

- [0062] 개요

- [0063] 약 4 내지 10개의 아미노산으로 이루어진 짧은 펩티드를 개시하며, 이는 티로시나제에 대해 억제 활성을 갖는 것으로 나타났다. 짧은 서열 펩티드는 천연 발생 아미노산을 사용하여 합성적으로 디자인된 것이며, 따라서 생물학적으로 안전하다. 상기 펩티드는 적절한 피부층으로의 접근을 허용하는 것으로서, 리포솜을 포함하나, 이에 한정되지 않는, 다수의 메커니즘을 통해 멜라닌 세포로 전달될 수 있다. 이러한 펩티드는 가장 보편적으로 사용되는 성분인 비타민 C가 받는 것과 같은 산화와 관련된 문제를 받지 않는다. 이들 펩티드는 하이드로퀴논이 간암을 유발하는 것처럼 간암을 유발하지는 않으며, 상기 펩티드는 천연 발생 아미노산으로부터 유래된 것이기 때문에 티로시나제가 실활될 때 세포내에서 쉽게 분해된다. 이는 멜라닌 합성을 억제함으로써 피부 미백 또는 화이트닝을 일으킨다.

- [0064] 정의

- [0065] 달리 정의하지 않는 한, 본원에서 사용되는 모든 기술 용어 및 과학 용어는 본 발명이 속하는 분야의 숙련인이 보편적으로 이해하고 있는 것과 동일한 의미를 갖는다. 본원에 기술된 것과 유사하거나 등가인 임의의 방법 및 물질이 본 발명의 실시 또는 시험에 사용될 수 있지만, 바람직한 방법 및 물질을 기술한다. 일반적으로, 세포 및 분자 생물학 및 화학과 관련하여 사용되는 명명법, 및 상기의 기법들은 당업계에 잘 알려져 있고, 보편적으로 사용되는 것이다. 구체적으로 정의되지 않은 특정 실험 기법은 일반적으로 당업계에 잘 알려져 있는 통상의 방법에 따라, 그리고, 본 명세서 전체에서 인용되고 논의된 다양한 일반 참고 문헌 및 보다 구체적인 참고 문헌에 기술되어 있는 바와 같이 실시된다. 명확성을 목적으로 하기에서 하기 용어를 정의한다.

- [0066] 본원에서 사용되는 용어 "티로시나제"는 페놀 (예로서, 티로신)의 산화를 촉매화시키는 효소인 모노페놀 모노옥시게나제 (EC 1.14.18.1; CAS 번호: 9002-10-2)를 지칭한다. 이는 산화에 의한 티로신으로부터의 멜라닌 및 다른 색소 생산을 촉매화시키는 것으로서, 식물 및 동물 조직에 존재하는 구리-함유 효소이다. 모든 티로시나제는 공통적으로 그의 활성 부위내 이핵형-3개의 구리 중심을 갖는다. 여기서, 2개의 구리 원자는 각각 3개의 히스티딘 잔기와 배위결합되어 있다. 문헌 [Matoba et al., "Crystallographic evidence that the dinuclear copper center of tyrosinase is flexible during catalysis," *J Biol Chem.*, 2006 Mar 31;281(13):8981-90. Epub 2006 Jan 25]에는 티로시나제 촉매 중심에 대한 3차원 모델이 개시되어 있다.

- [0067] 본원에서 사용되는 용어 "펩티드"는 그의 통상적인 의미로, 즉, 단량체는 아미노산이고, 아미드 결합을 통해 함께 결합되어 있는 중합체라는 의미로 사용되며, 별법으로는, 폴리펩티드로서도 지칭된다. 아미노산이 α -아미노산인 경우, L-광학 이성체 또는 D-광학 이성체가 사용될 수 있다. 또한, 비천연 아미노산, 예를 들면, β -알라닌, 페닐글리신 및 호모아르기닌 또한 포함하는 것으로 한다. 본 발명의 펩티드는 2개 이상의 아미노산 단량체 길이이며, 20개 이하의 아미노산 단량체 길이일 수 있다. 아미노산에 대하여 표준 약어를 사용한다 (하기 기술됨).
- [0068] 용어 "담체"는 치료학적 티로시나제 억제제의 안정성, 무균성, 및 전달가능성을 증진시키는데 사용되는, 제약 화합물을 제제화할 때 보편적으로 사용되는 화합물을 의미한다. 펩티드 전달 시스템이 액체 또는 현탁액제로서 제제화될 경우, 전달 시스템은 허용되는 담체, 바람직하게는 수성 담체 중에 포함된다. 각종 수성 담체, 예로서 물, 완충수, 0.8% 염수, 0.3% 글리신, 하이알루론산 등이 사용될 수 있다. 이들 조성물은 통상의 잘 알려져 있는 멸균 기법에 의해 멸균될 수 있거나, 멸균 여과될 수 있다. 생성된 수용액은 그 자체로서 사용하기 위해 패키징될 수 있거나, 동결건조될 수 있고, 동결건조된 제제는 투여 이전에 멸균 용액과 배합된다. 조성물은 예로서, pH 조절제 및 완충제, 등장성 조절제, 습윤제 등, 예를 들면 아세트산나트륨, 락트산나트륨, 염화나트륨, 염화칼륨, 염화칼슘, 소르비탄 모노라우레이트, 트리에탄올아민 올레에이트 등과 같이 생리학적 조건에 가깝게 만드는데 필요한 제약상 허용되는 보조 물질을 함유할 수 있다.
- [0069] 본원에서 사용되는 용어 "국소" 또는 "국소적으로"라는 용어는 그의 통상적인 의미로 점적이라는 것을 지칭하는데, 이는 표피, 임의의 다른 진피, 또는 임의의 다른 신체 조직을 포함하나, 이에 한정되지 않는 신체의 일부에 또는 그 위에서 이루어지는 것일 수 있다. 국소 투여 또는 적용이란 멜라닌 생산 세포를 함유하는 조직, 예로서 피부 또는 막과 펩티드를 직접 접촉시키는 것을 의미한다. 본 발명의 국소용 제제를 피부 또는 점막에 적용시키는 방법은 "비정형" 또는 액상 또는 반액상 담체, 예로서 겔, 로션, 에멀전, 크림, 플라스터 또는 연고, 또는 그의 형태를 유지하는 비-확장 물질인 "정형" 담체, 예로서 패취, 드레싱 및 밴드를 포함한다. 활성 펩티드의 정형 및 비정형 제형을 위한 용매는 비-독성의 제약상 허용되는 물질, 바람직하게는, 실질적으로 시스템의 부착 특성 또는 가용성에 부정적인 영향을 미치지 않는 액체이다. 용매는 바람직하게 다가 알코올 또는 다가 알코올들의 조합물이다. 다가 알코올이란 용어는 임의의 유기 폴리알코올을 의미하고, 이는 디프로필렌 글리콜, 프로필렌 글리콜, 폴리에틸렌 글리콜, 글리세린, 부틸렌 글리콜, 헥실렌 글리콜, 폴리옥시에틸렌, 폴리프로필렌 글리콜, 소르비톨, 에틸렌 글리콜 등을 포함한다. 다른 적합한 용매로는 지방산, 예로서 올레산, 리놀레산, 카프릭산 등과 이뿐만 아니라, 지방 에스테르 또는 알코올을 포함한다. 추가의 적합한 용매로는 펩티드 기재 조성물을 용해시키기 위해 진피 또는 경피용 조성물에서 보편적으로 사용되는 다른 비-독성의 비휘발성 용매를 포함한다.
- [0070] 2개의 폴리펩티드 서열과 관련하여 용어 "서열 동일성"이란 최대치로 일치하도록 두 서열을 정렬하였을 때 동일한, 두 서열 중의 잔기를 지칭하는 것이다. 비교를 위한 서열을 최적으로 정렬하는 것은 예로서, 스미스(Smith) 및 워터맨(Waterman) (문헌 [*Adv. Appl. Math.* 2: 482 (1981)])의 국부 상동성 알고리즘에 의해, 니들만(Needleman) 및 운쉬(Wunsch) (문헌 [*J. Mol. Biol.* 48:443 (1970)])의 상동성 정렬 알고리즘에 의해, 피어슨(Pearson) 및 리프만(Lipman) (문헌 [*Proc. Natl. Acad. Sci. (U.S.A.)* 85: 2444 (1988)])의 유사성 검색 방법에 의해, 이러한 알고리즘의 컴퓨터화된 실행에 의해 (GAP, BESTFIT, FASTA, 및 TFASTA (위스콘신주 매디슨 사이언스 드라이브 575 소재의 제네틱스 컴퓨터 그룹(Genetics Computer Group)의 위스콘신 제네틱스 소프트웨어 패키지(Wisconsin Genetics Software Package)) 또는 검사에 의해 수행될 수 있다. 서열 동일성은 참고 서열과 동일한 잔기에 기초하여 계산될 수 있다. 예를 들면, 8개의 잔기를 갖는 RADSRAAC의 경우, 5개의 동일한 잔기를 갖는다면, 서열 동일성은 5/8 또는 63%가 될 수 있다. 펩티드 길이가 제한되어 있기 때문에, 본 교시에 따라 교체가 이루어질 때에는 63% 이상의 동일성이 "본질적으로 동일"한 것으로 간주된다. 또한, 6/8 (75%) 또는 7/8 (88%) 서열 동일성을 가질 수 있다. 추가의 일례로서, 시스테인과 같은 잔기가 제거될 수 있거나 또는 R이 V, L, M 또는 I로 교체될 수 있으며, 이는 7/8 또는 88% 동일성을 가질 것이다.
- [0071] 본원에서 사용된 용어 "실질적 동일성"은 폴리펩티드가 전장의 펩티드 길이를 갖는 비교창에 걸쳐 참고 서열과 비교하였을 때 60% 이상의 서열 동일성, 바람직하게는 85% 이상의 동일성 및 종종 90 내지 95%의 서열 동일성, 보다 일반적으로는 99% 이상의 서열 동일성을 갖는 서열을 포함하는 것인, 폴리펩티드 서열의 특징을 의미한다. 실질적 동일성은 추가로 아미노산의 보존적 치환을 포함한다. 본 발명의 6 또는 8개의 잔기로 이루어진 펩티드와 관련하여 "본질적으로 동일하다"라는 용어는 구체적으로 치환에 관한 안내지침을 제공하는 본 교시와, 상기 정의에 따라 6개 중 2개의 아미노산 치환 또는 8개 중 3개의 아미노산 치환이 허용된다는 것을 의미한다.

- [0072] 아미노산 치환을 만드는데 있어 추가의 안내지침으로서, 결합 특성을 증가시키기 위해서는 주어진 잔기를 R 또는 F로 교체함으로써, 또는 억제 특성을 증가시키기 위해서는 V, A, L, M 또는 I로 교체함으로써 치환시킬 수 있다. 일부의 펩티드는 티로시나제 효소에의 결합을, 그리고 또다른 일부의 펩티드는 억제에 관한 것을 지시할 수 있다. F 또는 R을 교체하지 않는 것, 및 K 또는 E 뿐만 아니라, Y 또는 W를 교체하지 않는 것이 일반적으로는 바람직하다. 전체 서열과 관련하여 Y로 교체하는 것은, t가 티로시나제에 대한 천연 기질인 잔기이기 때문에 고려되어야 한다. 실제로 몇몇 교체를 통해서 티로시나제 활성이 증가될 수 있다는 것에 주의하여야 한다. 추가의 안내지침에 대해서는, 문헌 [Schurink et al., "Novel peptides with tyrosinase inhibitory activity," Peptides 28:485:495 (Jan. 2007)]을 참조한다.
- [0073] 보존적 아미노산 치환은 아미노산의 측쇄에서 관련이 있는 아미노산 패밀리 내에서 일어나는 치환이다. 유전적으로 코딩된 아미노산은 일반적으로 하기 패밀리로 분류된다: (1) 산성=아스파테이트, 글루타메이트; (2) 염기성=리신, 아르기닌, 히스티딘; (3) 비-극성=알라닌, 발린, 류신, 이소류신, 프롤린, 페닐알라닌, 메티오닌, 트립토판; 및 (4) 비하전된 극성=글리신, 아스파라긴, 글루타민, 시스테인, 세린, 트레오닌, 티로신. 더욱 바람직한 패밀리는 하기와 같다: 세린 및 트레오닌 (지방족-하이드록시 패밀리); 아스파라긴 및 글루타민 (아미드-함유 패밀리); 알라닌, 발린, 류신 및 이소류신 (지방족 패밀리; 페닐알라닌, 트립토판), 및 티로신 (방향족 패밀리), 및 시스테인 및 메티오닌 (황-함유 측쇄 패밀리). 예를 들면, 류신을 이소류신 또는 발린으로, 아스파테이트를 글루타메이트로, 트레오닌을 세린으로의 단리된 치환, 또는 아미노산을 구조적으로 관련된 아미노산으로 치환하는 대체 치환이 특히 프레임워크 부위 내에 있는 아미노산을 포함하지 않는다면, 이는 생성된 분자의 결합 또는 특성에 주요한 영향을 미치지 않을 것이라고 예상하는 것도 타당한 것으로 보인다. 바람직한 보존적 아미노산 치환기는 하기와 같다: 발린-류신-이소류신, 페닐알라닌-티로신, 리신-아르기닌, 알라닌-발린, 글루탐산-아스파르트산, 시스테인-메티오닌, 및 아스파라긴-글루타민.
- [0074] 본원에서 사용되는 용어 "각화성 조직"은 포유동물 (예로서, 인간, 개, 고양이 등)의 가장 바깥쪽의 보호막으로서 배치된 각질-함유층을 의미하는 것으로, 피부, 점막, 입술, 모발, 발톱, 손톱, 큐티클, 발굽 등을 포함하나, 이에 한정되지 않는다.
- [0075] 본원에서 사용되는 용어 "국소 적용"이란 각화성 조직의 표면 상에 본 발명의 조성물을 적용하거나 얇게 바르는 것을 의미한다.
- [0076] 본원에서 사용되는 용어 "피부학적으로-허용되는"이란 용어는 상기 기술된 조성물 또는 그의 성분들이 부적당한 독성, 부적합성, 불안정성, 알레르기 반응 등 없이 포유동물의 각화성 조직과 접촉시키는데 사용하기 적합하다는 것을 의미한다.
- [0077] 본원에서 사용되는 용어 "주사용 제제"는 인간 및/또는 동물에게로 주사하기에 적합한 제제를 의미하며, 주사는 진피내, 피하, 근육내 또는 정맥내 주사이다. 이러한 제제는 무균성이고, 발열물질이 없고, 생리학적으로 허용되는 pH를 가질 것이다.
- [0078] 본원에서 사용되는 용어 "방사선 과정"은 대상체의 피부 또는 내부 조직에 적용되는 치료 과정을 의미하며, 이는 화장용 또는 치료 목적으로 사용된다. 본 용어는 전자기 방사선 장치, 예로서 레이저, LED, 무선 주파수 등을 사용하는 것을 포함한다. 본 용어는 또한 초음파 장치를 사용하는 것을 포함한다. 이러한 장치들 모두 본 제제를 사용하여 수행될 수 있는 피부 화이트닝 과정에 사용된다. 이들 과정 중 일부는 각질층 투과성을 변경시키게 되며, 이는 본 발명의 펩티드 투여 과정에 이롭게 유용할 것이다.
- [0079] 당업계에서 이해되고 있는 바와 같이, 용어 "IC50"은 시험관내 분석으로 수행된 바, 티로시나제 활성을 50% 억제시키는데 필요한 티로시나제 억제제 펩티드의 농도를 의미하고, 특정 농도 "미만"의 값은 더 낮은 농도의 IC50 값을 포함한다. 약이라는 용어는 $\pm 10\%$ 편차 및 상이한 시약, 실험 조건 등으로 인한 편차들을 포함할 수 있다. 정제된 티로시나제 제제 (예로서, 버섯 티로시나제)를 사용하여 IC50을 시험관내에서 측정하는 것은 임상 용량을 결정하는데 유용하다.
- [0080] **일반 방법 및 물질**
- [0081] 일반적 의미로 본 발명의 물질 및 방법은 티로시나제 활성을 억제하고, 인간에 적용될 수 있도록 제제화될 수 있는 펩티드이다. 따라서, 멜라닌 생산이 관여하는 병태의 치료 또는 호전에 유용하다.
- [0082] **펩티드**
- [0083] 본 발명의 펩티드는 세포 내에서 티로시나제 활성을 억제하는 능력을 보유하는 펩티드 유사체 또는 펩티드 유도

체 또는 펩티드모방체를 포함한다. 예를 들면, 본 발명의 억제 펩티드 티로시나제 조절인자는 그의 안정성, 생체이용성, 가용성 등을 증가시키도록 변형될 수 있다. 본원에서 사용되는 용어 "펩티드 유사체", "펩티드 유도체" 및 "펩티드모방체"는 펩티드의 화학적 구조를 모사하고, 펩티드의 기능적 특성을 보유하는 분자를 포함한다. 펩티드 유사체를 디자인하는 접근법은 당업계에 알려져 있다. 예를 들면, 문헌 [Farmer, P. S. in Drug Design (E. J. Ariens, ed.) Academic Press, New York, 1980, vol. 10, pp.119-143]; [Ball, J. B. and Alewood, P. F. (1990) J. Mol. Recognition 3:55]; [Morgan, B. A. and Gainor, J. A. (1989) *Ann. Rep. Med. Chem.* 24:243]; 및 [Freidinger, R. M. (1989) *Trends Pharmacol. Sci.* 10:270]을 참조한다. 펩티드 유사체, 유도체 및 펩티드모방체의 예로는 하나 이상의 벤조디아제핀 분자로 치환된 펩티드 (예로서, [James, G. L. et al. (1993) *Science* 260:1937-1942] 참조), 메틸화된 아마이드 결합을 갖는 펩티드 및 "레트로-인verso (retro-inverso)" 펩티드 (시스토(Sisto)의 미국 특허 번호 제4,522,752호 참조)를 포함한다. 펩티드 유사체, 펩티드 유도체 및 펩티드모방체는 추가로 하기에 상세히 설명한다.

[0084] 본 발명의 펩티드는 천연 발생 아미노산, 또는 비-천연 발생 아미노산 중 임의의 것으로부터 유래된 잔기를 포함할 수 있다. 이들 천연 발생 아미노산 및 비-천연 발생 아미노산은 D 또는 L 입체배위일 수 있다. 본원에서 용어 D 및 L은 당업계에 공지되어 있는 사용 의미로 사용된다. 본 발명의 펩티드는 단일 아미노산 및 짧은 길이 (예로서, 1-10개)의 아미노산을 포함한다. 추가로, 본 발명의 변형된 펩티드는 또한 단량체 또는 이량체를 포함할 수 있다.

[0085] 본원에서는 아미노산에 대한 표준 1문자 및 3문자 코드가 사용되며, 이는 하기와 같다:

[0086] A (Ala) 알라닌	C (Cys) 시스테인	D (Asp) 아스파르트산
[0087] E (Glu) 글루탐산	F (Phe) 페닐알라닌	G (Gly) 글리신
[0088] H (His) 히스티딘	I (Ile) 이소류신	K (Lys) 리신
[0089] L (Leu) 류신	M (Met) 메티오닌	N (Asn) 아스파라긴
[0090] P (Pro) 프롤린	Q (Gln) 글루타민	R (Arg) 아르기닌
[0091] S (Ser) 세린	T (Thr) 트레오닌	V (Val) 발린
[0092] W (Trp) 트립토판	Y (Tyr) 티로신	

[0093] 하기 기술된 바와 같이, 명시된 잔기는 천연 발생 L 아미노산, 또는 그의 변형, 즉, 화학적 변형, 광학 이성체, 또는 변형기에의 결합일 수 있다. 색소 합성 경로의 처음 두 단계인: 아미노산 티로신의 디하이드록시페닐알라닌 (DOPA)으로의 하이드록실화 및/또는 그 이후의 도파킨으로의 산화를 촉매할 수 있는 티로시나제의 활성을 특이적으로 억제시키는 본 발명의 펩티드의 능력을 유지하는 펩티드 범위 내에서 특정 변형이 이루어질 수 있을 것으로 생각된다.

[0094] 또한, 몇몇 추가의 바람직한 특성을 펩티드에 부여하기 위해 특정 서열 내에서 특이적인 변형이 이루어질 수 있을 것으로도 생각된다. 펩티드 활성의 뚜렷한 손실없이 단백질 구조에서 특정 아미노산이 다른 아미노산에 대해 치환될 수 있다. 펩티드의 상호작용능 및 성질이 그 펩티드의 생물학적인 기능적 활성을 정의하기 때문에 짧은 펩티드 서열에서도 조차 특정의 아미노산 서열 치환이 이루어질 수 있으며, 그럼에도 불구하고 유사한 특성을 갖는 펩티드를 수득할 수 있는 것이다. 따라서, 생물학적 유용성 또는 활성의 뚜렷한 손실없이 본 발명의 티로시나제 억제제의 서열을 다양하게 변형시킬 수 있으며, 가능하게는 원하는 활성도 증진시킬 수 있다고 본 발명자들은 생각하였다.

[0095] 예를 들면, 티로시나제 억제 특성을 갖는 펩티드 작제물을 디자인할 때, 분자의 하나 이상의 특성을 조절하는 치환이 사용될 수 있다. 그러한 변이체는 전형적으로 펩티드 내의 하나 이상의 위치에서 하나의 아미노산이 또 다른 아미노산에 대해 교체되는 것을 포함한다. 예를 들면, 펩티드 구조의 상호작용 결합능을 증진시키기 위해 상기 구조에서 다른 아미노산에 대해 특정 아미노산을 치환할 수 있다. 또한 L-아미노산을 D-아미노산으로 치환할 수 있거나, 특정의 측쇄 공유결합적 변형을 포함한다.

[0096] 상기와 같이 변형시킬 때 아미노산의 수치로 지수를 고려할 수 있다.

[0097] 당업계에서 일반적으로는 단백질에 상호작용성인 생물학적 기능을 부여하는데 있어 아미노산의 수치로 지수가 중요한 것으로 이해되고 있다 (문헌 [Kyte and Doolittle, 1982]). 아미노산의 상대적인 수치로 특징이 생성되는 단백질의 2차 구조에 기여하며, 이것이 다시 다른 분자, 예를 들면, 효소, 기질, 수용체, DNA, 항체, 항원

등과 상기 단백질의 상호작용을 한정하는 것으로 인정되고 있다.

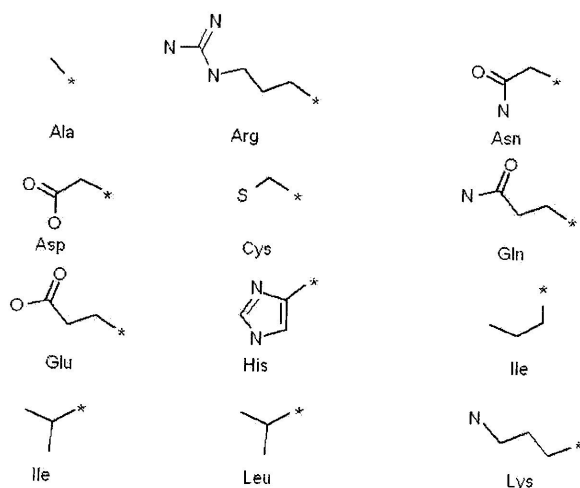
[0098] 각각의 아미노산은 그의 소수성 및 전하 특징에 기초하여 수치로 지수를 할당받았다 (문헌 [Kyte and Doolittle, 1982]). 이들은 하기와 같다: 이소류신 (+4.5); 발린 (+4.2); 류신 (+3.8); 페닐알라닌 (+2.8); 시스테인/시스틴 (+2.5); 메티오닌 (+1.9); 알라닌 (+1.8); 글리신 (-0.4); 트레오닌 (-0.7); 세린 (-0.8); 트립토판 (-0.9); 티로신 (-1.3); 프롤린 (-1.6); 히스티딘 (-3.2); 글루타메이트 (-3.5); 글루타민 (-3.5); 아스파테이트 (-3.5); 아스파라긴 (-3.5); 리신 (-3.9); 및 아르기닌 (-4.5).

[0099] 본 예시되는 서열을 변형시킬 때, 특정 아미노산은 유사한 수치로 지수 또는 점수를 갖는 다른 아미노산에 의해 치환됨으로써 여전히 유사한 생물학적 활성을 갖는 단백질을 수득할 수 있고, 즉 여전히 생물학적으로 기능상 등가인 단백질을 수득할 수 있다. 상기와 같이 교체할 때, 수치로 지수가 ± 2 이내인 아미노산 치환이 바람직하고, ± 1 이내인 것이 특히 바람직하며, ± 0.5 이내인 것이 더욱더 특히 바람직하다.

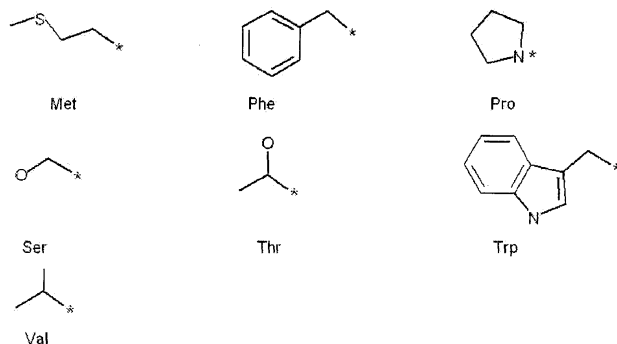
[0100] 또한, 유사 아미노산들의 치환이 친수성에 기초하여 효과적으로 이루어질 수 있다. 미국 특허 번호 제 4,554,101호 (본원에서 참고로 인용됨)는 인접 아미노산의 친수성에 의해 지배되는 단백질의 가장 큰 국소 평균 친수성이 상기 단백질의 생물학적 특성과 상관되어 있다고 제시하였다. 미국 특허 번호 제 4,554,101호에서 상세히 설명되어 있는 바와 같이 이들 아미노산 잔기들에 하기 친수성 값들이 할당되었다: 아르기닌 (+3.0); 리신 (+3.0); 아스파테이트 (+3.0 ± 1); 글루타메이트 (+3.0 ± 1); 세린 (+0.3); 아스파라긴 (+0.2); 글루타민 (+0.2); 글리신 (0); 트레오닌 (-0.4); 프롤린 (-0.5 ± 1); 알라닌 (-0.5); 히스티딘 (-0.5); 시스테인 (-1.0); 메티오닌 (-1.3); 발린 (-1.5); 류신 (-1.8); 이소류신 (-1.8); 티로신 (-2.3); 페닐알라닌 (-2.5); 트립토판 (-3.4).

[0101] 예시되는 서열을 변형시킬 때, 아미노산 치환은 또한 일반적으로는 아미노산 측쇄 치환기의 상대적인 유사성, 예를 들면, 그의 소수성, 친수성, 전하, 크기 등에 기초하여 이루어질 수 있는데, 그럼에도 펩티드의 특별한 특성이 강조될 수 있다. 다양한 상기 특징들을 고려하는 예시적인 치환이 당업자에게 잘 알려져 있으며, 히스티딘과 아르기닌 및 리신 (이는 생리학적 pH가 염기성이다); 글루타메이트 및 아스파테이트 (이는 산성이다); 세린 및 트레오닌; 글루타민 및 아스파라긴; 및 발린, 류신 및 이소류신을 포함한다.

[0102] 천연 발생 아미노산 측쇄를 하기에 도시하며, 여기서 *는 화합물 골격의 부착점을 나타낸다.



[0103]



[0104]

[0105]

본 발명의 펩티드의 아미노산이 변형됨으로써 아미노기는 아실화, 알킬화 또는 아릴화될 수 있다. 벤질기는 할로겐화, 니트로실화, 알킬화, 설포네이트화 또는 아실화될 수 있다.

[0106]

각종의 화학적으로 변형된 아미노산이 본 발명의 펩티드 내로 혼입될 수 있다. 이러한 예로는 하기를 포함한다:

[0107]

아세틸화

[0108]

N-아세틸-L-알라닌, N-아세틸-L-아르기닌; N-아세틸-L-아스파라긴; N-아세틸-L-아스파르트산; N-아세틸-L-시스테인; N-아세틸-L-글루타민; N-아세틸-L-글루탐산; N-아세틸글리신; N-아세틸-L-히스티딘; N-아세틸-L-이소류신; N-아세틸-L-류신; N2-아세틸-L-리신; N6-아세틸-L-리신; N-아세틸-L-메티오닌; N-아세틸-L-페닐알라닌; N-아세틸-L-프롤린; N-아세틸-L-세린; N-아세틸-L-트레오닌; N-아세틸-L-트립토판; N-아세틸-L-티로신; N-아세틸-L-발린.

[0109]

아미드화

[0110]

L-알라닌 아미드, L-아르기닌 아미드

[0111]

포르밀화

[0112]

N-포르밀-L-메티오닌

[0113]

하이드록실화

[0114]

4-하이드록시-L-프롤린

[0115]

지질 변형

[0116]

S-파네실-L-시스테인, S-게라닐게라닐-L-시스테인, N-팔미토일-L-시스테인, S-팔미토일-L-시스테인, N-미리스토일-글리신, N6-미리스토일-L-리신

[0117]

메틸화

[0118]

N-메틸-L-알라닌, N,N,N-트리메틸-L-알라닌, 오메가-N,오메가-N-디메틸-L-아르기닌, L-베타-메틸티오아스파르트산, N5-메틸-L-글루타민, L-글루탐산 5-메틸 에스테르, 3'-메틸-L-히스티딘, N6-메틸-L-리신, N6,N6-디메틸-L-리신, N6,N6,N6-트리메틸-L-리신, N-메틸-L-메티오닌, N-메틸-L-페닐알라닌

[0119]

포스포릴화

[0120]

오메가-N-포스포-L-아르기닌, L-아스파르트산 4-포스포릭 안하이드라이드, S-포스포-L-시스테인, 1'-포스포-L-히스티딘, 3'-포스포-L-히스티딘, O-포스포-L-세린, O-포스포-L-트레오닌, O4'-포스포-L-티로신

[0121]

기타

[0122]

L-셀레노시스테인, L-셀레노메티오닌, L-3-옥소알라닌, 2-피롤리돈-5-카르복실산, L-글루타밀 5-글리세틸포스포릴에탄올아민, 2'-[3-카르복사미도-3-(트리메틸암모니오)프로필]-L-히스티딘 (디프타미드), N6-비오틴-L-리신, N6-(4-아미노-2-하이드록시부틸)-L-리신 (하이퓨신), N6-레티날-L-리신.

[0123]

본 발명의 펩티드에 함유된 아미노산에 대해 이루어지는 기타 다른 변형도 당업계에 알려져 있으며, 이는 예를 들면, 커너(Kuhner) 등의 US 6,858,581에 기재되어 있는데, 상기 문헌에는 화학적으로 변형된 향미생물성 펩티

드가 기재되어 있다.

[0124] 조절기

[0125] 상기에 제시된 화학식을 갖는 본 발명의 티로시나제 조절인자 중 제제의 세포 흡수율 또는 효능을 개선시키기 위한 조절기가 티로시나제 억제제 펩티드에 직접 또는 간접적으로 부착될 수 있다. 예를 들면, 조절기는 공유 커플링에 의해 펩티드에 직접적으로 부착될 수 있거나, 조절기는 안정적인 비공유 회합에 의해 간접적으로 부착될 수 있다. 본 발명의 하나의 실시양태에서, 조절기는 조절인자의 펩티드의 아미노-말단에 부착된다. 별법으로, 본 발명의 또다른 실시양태에서, 조절기는 조절인자의 펩티드의 카복시-말단에 부착된다.

[0126] 추가의 또다른 실시양태에서, 조절기는 (예로서, 리실 잔기(들)의 엡실론 아미노기를 통해, 아스파르트산 잔기(들) 또는 글루탐산 잔기(들)의 카복실기를 통해, 티로실 잔기(들), 세린 잔기(들) 또는 트레오닌 잔기(들)의 하이드록시기를 통해, 또는 아미노산 측쇄 상의 다른 적합한 반응기를 통해) 화합물의 펩티드의 하나 이상의 아미노산 잔기의 측쇄에 부착된다. 상기 조절기 제조에 관한 추가의 안내지침은 미국 특허 5,854,204에서 찾아볼 수 있다.

[0127] 본 발명의 펩티드는 또한 기타 다른 티로시나제 억제제, 예로서 코직산 (C₆H₆O₄; 5-하이드록시-2-(하이드록시메틸)-4-피론) 또는 그네톨(gnetol)에 접합될 수 있다 (문헌 [Biosci Biotechnol Biochem. 2003 Mar;67(3):663-5] 참조).

[0128] 세포 투과성을 증진시키기 위한 또다른 조절기는 멜라닌 세포에 의해 인식되고 흡수되는 아미노산 서열이다. 문헌 [D'Ursi et al., "A Membrane-Permeable Peptide Containing the Last 21 Residues of the GS Carboxyl Terminus Inhibits GS-Coupled Receptor Signaling in Intact Cells: Correlations between Peptide Structure and Biological Activity," *Mol Pharmacol* 69:727-736, 2006]에는 세포 막을 가로질러 공유 결합된 카고, 예로서 내인성 단백질의 펩티드 또는 폴리펩티드 단편을 수송할 수 있는 세포-투과성 펩티드가 개시되어 있다. 상기 저자는 그의 펩티드를 16-잔기 단편 페너트라틴에 커플링시켰고, 상기 단편은 여기에 개시된 펩티드에 커플링될 수 있다.

[0129] 따라서, 조절기라는 용어는 펩티드의 안정성 흡수 등을 개선시키거나, 추가로 티로시나제를 억제시킴으로써 펩티드의 활성에 영향을 주는, 펩티드에 연결되는 유기 소분자를 의미한다.

[0130] 바람직한 실시양태에서, 조절기(들)는 사이클릭, 헤테로사이클릭 또는 폴리사이클릭기를 포함한다. 본원에서 사용되는 용어 "사이클릭기"는 약 3 내지 10개, 바람직하게는 약 4 내지 8개, 및 더욱 바람직하게는 약 5 내지 7개의 탄소 원자를 갖는, 사이클릭 포화 또는 불포화 (즉, 방향족) 기를 포함하는 것으로 한다. 예시적인 사이클릭기로는 사이클로프로필, 사이클로부틸, 사이클로펜틸, 사이클로헥실, 및 사이클로옥틸을 포함한다. 사이클릭기는 치환되지 않거나, 하나 이상의 고리 위치에서 치환될 수 있다. 따라서, 사이클릭기는 예로서, 할로젠, 알킬, 사이클로알킬, 알케닐, 알키닐, 아릴, 헤테로사이클, 하이드록실, 아미노, 니트로, 티올 아민, 이민, 아미드, 포스포네이트, 포스핀, 카르보닐, 카복실, 실릴, 에테르, 티오에테르, 설포닐, 설포네이트, 셀레노에테르, 케톤, 알데히드, 에스테르, --CF₃, --CN 등으로 치환될 수 있다.

[0131] 또다른 바람직한 실시양태에서, 변형기는 피부를 통한 흡수를 증가시키기 위해 펩티드에 결합된 지방산을 포함한다. 적합한 지방산 (이는 상응하는 에스테르를 포함하는 것으로 한다)은 메틸 팔미테이트, 메틸 스테아레이트, 이소프로필 라우레이트, 이소프로필 미리스테이트, 이소프로필 팔미테이트, 에틸헥실 팔미테이트, 라우릴 락테이트 및 세틸 락테이트로 이루어진 군으로부터 선택되는 지방산 에스테르 연화제를 포함한다.

[0132] 용어 "헤테로사이클릭기"는 약 3 내지 10개, 바람직하게는 약 4 내지 8개, 및 더욱 바람직하게는 약 5 내지 7개의 탄소 원자를 갖는 사이클릭 포화 또는 불포화 (즉, 방향족) 기를 포함하되, 여기서 고리 구조는 약 1 내지 4개의 헤테로원자를 포함하는 것으로 한다. 헤테로사이클릭기는 피롤리딘, 옥솔란, 티올란, 이미다졸, 옥사졸, 피페리딘, 피페라진, 모르폴린을 포함한다. 헤테로사이클릭 고리는 예를 들면, 할로젠, 알킬, 사이클로알킬, 알케닐, 알키닐, 아릴, 다른 헤테로사이클, 하이드록실, 아미노, 니트로, 티올, 아민, 이민, 아미드, 포스포네이트, 포스핀, 카르보닐, 카복실, 실릴, 에테르, 티오에테르, 설포닐, 셀레노에테르, 케톤, 알데히드, 에스테르, --CF₃, --CN 등과 같은 치환기로 하나 이상의 위치에서 치환될 수 있다. 헤테로사이클은 또한 다른 사이클릭기에 가교되거나 융합될 수 있다.

[0133] 제제

[0134] 본 발명의 펩티드는 바람직하게 피부학적으로 허용되는 담체를 함유하는 국소용 조성물로 제제화된다. 본원에

서 사용되는 "피부학적으로-허용되는 담체"라는 어구는, 담체가 각화성 조직에 국소 적용되기에 적합하고, 미적 특성이 우수하고, 본 발명의 활성 성분 및 임의의 다른 성분들과 상용성이고, 임의의 부적당한 안전성 또는 독성과 관련된 우려를 일으키지 않을 것이라는 것을 의미한다. 안전하고 유효한 담체의 양은 조성물의 약 50% 내지 약 99.99%, 바람직하게는 약 80% 내지 약 99.9%, 더욱 바람직하게는 약 90% 내지 약 98%, 더욱더 바람직하게는 약 90% 내지 약 95%이다.

[0135] 담체는 매우 다양한 형태일 수 있다. 예를 들면, 수중유, 유중수, 수중유중수 및 실리콘중수중유 에멀전을 포함하나, 이에 한정되지 않는 에멀전 담체가 본원에서 유용하다.

[0136] 바람직한 담체는 에멀전, 예로서 수중유 에멀전, 유중수 에멀전, 및 실리콘중수 에멀전을 함유한다.

[0137] 본 발명에 따른 에멀전은 일반적으로 상기 기술된 것과 같은 용액 및 지질 또는 오일을 함유한다. 지질 및 오일은 동물, 식물, 또는 석유로부터 유래될 수 있고, 천연 또는 합성 (즉, 인공)일 수 있다. 바람직한 에멀전은 또한 보습제, 예로서 글리세린을 함유한다. 에멀전은 바람직하게는 추가로 담체 중량에 기초하여 약 0.01% 내지 약 10%, 더욱 바람직하게는 약 0.1% 내지 약 5%의 유화제를 함유할 것이다. 유화제는 비이온성, 음이온성, 또는 양이온성일 수 있다. 적합한 유화제는 예를 들면, 1973년 8월 28일에 발행된 디커트(Dickert) 등의 미국 특허 번호 제3,755,560호; 1983년 12월 20일에 발행된 딕슨(Dixon) 등의 미국 특허 번호 제4,421,769호; 및 문헌 [McCutcheon's Detergents and Emulsifiers, North American Edition, pages 317-324 (1986)]에 개시되어 있다.

[0138] 에멀전은 각화성 조직에 적용시킬 때 형성되는 기포를 최소화하기 위해 소포제를 함유할 수 있다. 소포제는 고분자량 실리콘 및 그러한 용도로 당업계에 잘 알려져 있는 다른 물질을 포함한다.

[0139] 적합한 에멀전은 원하는 제품 형태에 따라 매우 다양한 범위의 점도를 가질 수 있다. 낮은 점도를 갖는 에멀전이 바람직한데, 그의 일례는 약 50 센티스토크 이하, 더욱 바람직하게는 약 10 센티스토크 이하, 더욱더 바람직하게는 약 5 센티스토크 이하의 점도를 갖는 것이다.

[0140] 바람직한 실리콘중수 및 수중유 에멀전은 2006년 8월 24일 공개된, 비세트(Bissett) 등의 US PGPUB 20060188462 (발명의 영문명칭 "Skin care compositions containing a sugar amine")에 상세히 기재되어 있다.

[0141] 본 발명의 펩티드는 리포솜으로 제제화될 수 있다. 본 발명의 펩티드는 예를 들면, 유스터(Uster) 등의 US 4,944,948 (발명의 영문명칭 "EGF/Liposome gel composition and method") (상기 문헌에서 사용된 EGF는 역제 펩티드로 치환된다)에 기재되어 있는 바와 같은 방법에 따라 리포솜 중에 함유될 수 있다. 상기 문헌에 기재되어 있는 바와 같이, 음전하를 띤 리포솜의 고점도 수성 분산액이 리포솜-포획된 펩티드를 사용하여 제조될 수 있다. 전형적으로 등물량의 중성 및 음전하를 띤 인지질 및 콜레스테롤을 함유하는 지질 혼합물을, 펩티드 및 등전점이 pH 5.5 내지 8.5인 양쪽이온성 화합물을 함유하는 저전도성 수성 매질에서 현탁시켜 겔-유사 조성물을 형성함으로써 펩티드/리포솜 조성물이 형성된다. 추가의 예시적인 안내지침은 메자이(Mezei) 등의 US 4,485,054 (발명의 영문명칭 "Method of encapsulating biologically active materials in multilamellar lipid vesicles (MLV)")에서 찾아볼 수 있다.

[0142] 본 발명의 펩티드 티로시나제 억제제는 또한 경구용 또는 주사용 제제로서 제조될 수 있다. 주사용 제제의 pH는 특히 주사시의 안전과 편안함과 관련하여, 그리고 특히 제제가 액상 제제로 공급되는 경우에 있어 중요하다. 적합한 제제는 보존제, 예로서 벤조산나트륨, 메틸파라벤 및 프로필파라벤 등을 함유할 수 있고, 그의 pH는 25℃에서 pH 6.8-8.0일 수 있다. pH는 바람직하게 완충액에 의해 유지된다. 적합한 완충제로는 아세트이트 완충액, 2-아미노-2-메틸-1-프로판올, 글리신 완충액, 포스페이트 완충액, (트리스>하이드록시메틸-아미노메탄) (TRIS) 완충액, (2→N-모르폴리노-에탄설폰산) 등을 포함한다. 제제는 전형적으로는 또한 상기 정의된 것과 같은 담체를 포함할 것이다. 주사용 제제는 흑색종, 및 예로서, 아교모세포종과 같이 티로시나제를 발현하는 세포로부터 유래된 기타 다른 암 치료에 사용하기 적합하다. 추가 설명은 1998년 6월 30일에 발행된 부샤르(Bouchard) 등의 US 5,773,291 (발명의 영문명칭 "Non-melanolytic mammalian cell constitutively expressing biologically active human tyrosinase and use thereof")에서 찾아볼 수 있다. 이러한 제제는 국소 적용으로는 접근이 불가능한 멜라닌 세포, 예로서 비-각화성 조직에서 발견되는 멜라닌 세포에 유용하다. 멜라닌 세포는 표피 기저층 뿐만 아니라, 모낭, 망막, 포도막 및 연수막에서도 발견된다. 이러한 세포는 흑색종의 기점 부위이다. 경구용 제제와 관련된 일례의 제제는 US 2007/0134279에서 찾아볼 수 있다.

[0143] 본 발명의 펩티드 티로시나제 억제제는 단독으로, 또는 서로 함께 조합되어 사용될 수 있다. 이는 또한 기타 다른 생물학적으로 활성인 약물 또는 의약화장품과 함께 조합되어 사용될 수 있다. 이는 리포솜 또는 기타 다

른 경피 전달 메커니즘, 예로서 파괴 장치 등에 의해 전달될 수 있다. 지방산 쇠를 펩티드의 C-말단 또는 N-말단에 접합시킴으로써 지질 분배를 통해 각질층으로의 비-리포솜 기반 전달을 촉진시킬 수 있다. 기타 다른 치사제 또는 자멸제(suicide agent)를 펩티드에 접합시킴으로써 높은 수준으로 티로시나제를 발현하는 세포, 예로서 흑색종 세포로 치사제 또는 자멸제를 전달할 수 있다.

[0144] 본 발명의 펩티드의 지질 펩티드 제제는 2001년 9월 11일에 발행된 대속스(Dasseux)의 US 6,287,590 (발명의 영문명칭 "Peptide/lipid complex formation by co-lyophilization"); 1996년 8월 6일에 발행된 야트빈(Yatvin) 등의 US 5,543,389 (발명의 영문명칭 "Covalent polar lipid-peptide conjugates for use in salves"), 및 기타 다른 문헌에 추가로 기재되어 있다.

[0145] 티로시나제에 대해 생물학적인 억제 활성을 갖는, 본원에 기술된 올리고펩티드의 길이, 즉 20개, 또는 바람직하게는 12개 이하의 아미노산은 종래에 기술된 바 없다. 현재까지 생체내에서 티로시나제 효소 활성을 억제시키는데 사용된 모든 제제는 비-펩티드 기반인 것으로 생각된다.

[0146] 본 발명의 펩티드를 제조하는 것에 관한 추가의 안내지침은 2004년 5월 6일 공개된 초드리(Chaudhuri) 등의 US 20040086560 (발명의 영문명칭 "Skin-lightening")에서 찾아볼 수 있다.

[0147] 본 발명의 펩티드는 추가로 피부 병태를 치료하거나 호전시키는데 유용한 기타 다른 성분, 또는 박피 시술과 함께 본 발명의 펩티드를 투여할 경우, 자극을 감소시켜 주는 성분과 함께 제제화될 수 있다. 이러한 추가 성분을 본원에서는 "제2 치료제"라 명명하며, 그의 예로는 1% 비타민 K, 및 수성 베이스 중의 1% 하이드로코르티손; 여드름 치료 제제 (예로서, 살리실산, 위치 하젤로 완충처리된 알코올 베이스 등); 잔주름/주름살 치료 제제 (예로서, 수성 베이스 중의 하이알루론산); 수화 제제 (예로서, 미네랄 오일 베이스 중의 칼렌둘라, 비타민 A, D 또는 E, 또는 그의 조합물); 항산화제 제제/자유라디칼 제거제 (예로서, 미네랄 오일 베이스 중의 비타민 A, E 및 K)가 있다. 단독으로 또는 기타 다른 화합물과 함께 조합하여 사용될 수 있는 제품 카테고리의 다른 예로는 방부제, 수렴제, 클렌저, 모공 충혈 완화제, 밤, 식물 성분, 콜라겐 자극제, 허브, 미세유화제, 산소 전달 비히클, 단백질, 세럼, 피부 퍼밍제, 토너, 및 국소 마취제가 있다. 사용될 수 있는 제품을 개별적으로 지명하면 (괄호 안에는 그와 관련이 이점을 명시함) 알로에 베라 (진정); 알과 하이드록시산 (필(peel)); 알과리포산 (항산화제); 벤조일 및 기타 다른 퍼옥시드 (여드름); 세라마이드 (하이드레이터); 구리 (토닝); 구리 펩티드 (토닝); CoQ-10 (조효소 Q-10) 및 다른 효소 (토닝); 코르티손 (진정); 글리콜산 (필); 하이알루론산 (콜라겐 자극); 하이드로지질 (하이드레이터); 락트산 (필); 아스코르브인산마그네슘 (자유 라디칼 제거제, 콜라겐 자극제, 표백); 니아신 (혈관 확장); 인지질 (보습효과); 칼륨 (토닝, 건선), 및 살리실산 (여드름)이 있다. 상기 성분들의 사용에 대해서는 2007년 4월 19일 공개된 가라시우크(Karasiuk)의 US PGPU 20070088371 (발명의 영문명칭 "Microdermabrasion System and Method of Use")에서도 함께 교시되어 있다.

[0148] 추가의 제2 치료제로서 본 발명의 티로시나제 억제제 펩티드 및 제제는 또한 임의로 서로 혼합될 수 있고, 치료용, 즉 피부 미백 또는 화이트닝용의 기타 다른 피부 화이트닝제와 함께 혼합될 수 있다. 예를 들면, 조합될 수 있는 피부 화이트닝 제품으로는 시스테인, 4-티오레스로신, 3-아미노티로신, 5-하이드록시-2-하이드록시메틸- γ -피리돈, 포메스 야포니쿠스(*fomes japonicus*) 및 가노데르마(*ganoderma*) 추출물, 코직산, 글라브리딘, 리코라이스(*licorice*) 추출물, 글리시리진산, 카타란투스 로세우스(*catharanthus roseus*) 추출물, 프로테오글리칸, 프로테이나제 억제제, 올리고펩티드, 베타인, 및 메틸 4-벤질옥시-2-하이드록시벤조에이트, 4-벤질옥시-2-하이드록시벤조산 등이 있으나, 이에 한정되지 않는다. 본 발명의 펩티드들은 또한 조합될 수 있거나, 기타 티로시나제 억제제, 예로서 이소리퀴리티게닌 칼콘 (ILC) 또는 4,4'-디하이드록시바이페닐 (44'-BP)과 함께 조합될 수 있다 (문헌 [Kim et al., "4,4'-Dihydroxybiphenyl as a new potent tyrosinase inhibitor," *Biol Pharm Bull.* 2005 Feb;28(2):323-7] 참조).

[0149] 투여량

[0150] 용어 "치료상 유효량"은 멜라닌 세포에 적용되어 멜라닌 생산을 감소시키거나 제거하는, 티로시나제 억제 효과를 일으키는데 충분한 약물의 양을 의미하는 것으로 한다. 이러한 양은 당업계에 공지되어 있거나, 당업계에 공지된 방법에 의해 결정될 수 있으며, 이는 전형적으로 성인 1인당 약 0.1 내지 20,000 mg 및 바람직하게는 약 10 내지 10,000 mg 범위이고, 가장 바람직하게는 1회 적용당 억제제 약 20 내지 5,000 mg 범위이며, 이는 선택한 제제, 및 조직, 예로서 피부 또는 점막이 작용 부위인지 여부에 따라 달라진다. 본 조성물 중 마취제 양의 유일한 상한은 제제가 실질적으로 억제 제제의 결정을 포함하지 않는 것이고, 용매 사용량은 정형 조성물을 원하는 적용 부위에 부착시킬 수 있는 상기 조성물의 특성에 바람직하지 못한 영향을 미치기에는 충분하지 않은 것이다. 따라서, 단일 성분인 억제 펩티드는 상기 범위 내의 치료학적 유효량으로 마취제를 함유한다. 펩티드

농도는 IC50으로부터 외삽법으로 추정하였을 때에 실험상 적합한 것으로 밝혀졌다. 일반적으로, IC50의 2배를 초과하는 농도가 처방전하의 사용에 위해 적절할 것이고; IC50의 약 2배 미만의 농도는 처방전 없이 구매할 수 있는 사용에 적합할 것이라고 제안되어 진다. 그러나, 피부 흡수 부족 또는 다른 손실을 고려하면 제제는 IC50의 약 100배 이하로 함유할 수 있다. IC50의 2배되는 농도에서는 95%의 티로시나제 억제제가 이루어져야 한다. 하기 표는 예시적인 것이다:

펩티드	농도 (mM)	크림 1 oz 당 g 수
PLG-OH	5.46	0.043
SF 펩티드	16 mM	0.379
RA 펩티드	246 uM	0.0062

상기 제제는 본질적으로 하기와 같이 제조하였다:

성분 명칭	허용 범위	바람직한 범위
1. 물	1.00 – 90.00%	30.00 – 70.00%
2. 알로에 바르바덴시스 (<i>Aloe barbadensis</i>) 잎즙	1.00 – 90.00%	5.00 – 60.00%
3. 카프릴릭/카프릭 트리글리세리드	1.00 – 15.00%	5.00 – 10.00%
4. 펜틸렌 글리콜	0.50 – 10.00%	1.00 – 5.00%
5. 디글리세린	0.50 – 20.00%	1.00 – 10.00%
6. 비스-에폭시디글리콜 사이클로헥산 1,4-디카복실레이트	0.50 – 3.00%	1.00 – 2.00%
7. 디메티콘	0.50 – 10.00%	1.00 – 5.00%
8. 에틸 아스코르베이트	0.10 – 10.00%	1.00 – 5.00%
9. 하이알루론산나트륨	0.50 – 90.00%	5.00 – 20.00%
10. 나트륨 PCA	0.50 – 20.00%	1.00 – 5.00%
11. 세테아릴 알코올	0.50 – 5.00%	1.00 – 3.00%
12. 디세틸 포스페이트	0.50 – 5.00%	0.50 – 3.00%
13. 세테트-10 포스페이트	0.50 – 5.00%	0.50 – 3.00%
14. 글리시리자 글라브라(<i>Glycyrrhiza glabra</i>)(리코라이스) 뿌리 추출물	0.01 – 5.00%	0.10 – 2.00%
15. 스쿠알렌	0.50 – 10.00%	1.00 – 5.00%
16. 스크레로티움 겔	0.20 – 4.00%	0.50 – 2.00%
17. 데카펩티드-12		
18. 부틸렌 글리콜	1.00 – 30.00%	3.00 – 10.00%
19. 판테놀	0.10 – 5.00%	0.50 – 2.00%
20. 알란토인	0.01 – 1.00%	0.10 – 0.50%
21. 테트라나트륨 EDTA	0.05 – 2.00%	0.10 – 0.50%
22. 클로르페네신	0.10 – 1.00%	0.10 – 0.50%
23. 카프릴릭 글리콜	0.10 – 2.00%	0.50 – 1.00%
24. 페녹시에탄올	0.30 – 2.00%	0.50 – 1.00%

단위 면적당, 다시 말해, 1cm² 또는 1cm²당 억제 펩티드의 농도 및 정량은 원하는 효과를 얻기 위해서는 독립적으로 달라질 수 있다. 두께가 감소되어 있는 투여 형태 중에 함유되어 있는 억제 펩티드 베이스의 농도가 보다 고농도이면 짧은 지속 기간 동안 적용이 이루어질 것이다. 두께가 증가된 투여 형태 중에 함유되어 있는 억제 펩티드 베이스의 농도가 고농도이면 (1cm² 또는 1cm²당 억제 펩티드가 더 많은 mg 수로 존재하면) 개시는 빠르고 지속 기간은 긴 강력한 억제가 이루어질 것이다. 두께가 감소되어 있는 투여 형태 중 억제 펩티드 베이스가 저농도로 존재한다면 개시는 더 길고, 지속 기간은 짧은 경미한 억제가 이루어질 것이다. 두께가 증가된 투여 형태 중에 함유되어 있는 억제 펩티드 베이스가 저농도로 존재한다면 개시는 더 길고, 지속 기간은 더욱 긴 경미한 억제가 이루어질 것이다. 상기 설명으로 제시한 바와 같이, 얇거나 (약 0.001 인치) 두껍게 (약 0.500 인치 이상) 코팅할 수 있는 능력과 조합하였을 때, 전체 조성물 중의 매우 낮은 농도 (약 0.1%)에서부터 높은 농도 (40% 이상)까지로 억제 펩티드의 농도를 달리할 수 있는 능력을 통해 본 발명을 실시하는 의사는 관심의 대상이 되는 특정 해부 부위에서의 필요에 따라 시스템의 투여량을 달리 할 수 있다.

대체로, 주어진 조직, 예로서 상피하층의 경우에 선택된 펩티드 약물, 농도 및 두께, 및 적용 기간은 조직, 예를 들면 표피 또는 점막의 기저층을 투과할 수 있는 펩티드의 능력, 및 약 2 내지 30분 이내에 효과가 최고조에 도달할 수 있는 펩티드의 능력에 기초하여 결정된다. 억제 펩티드가 조직, 예를 들면 표피에 미치는 효과 지속 기간은 선택된 제제, 억제 펩티드의 농도, 및 적용 두께에 따라 약 2 내지 240분 범위여야 한다. 당업자에게는 자명한 바, 필요에 따라 더 길거나 짧은 지속 기간 또한 선택될 수 있다.

[0156]

치료 방법

[0157]

상기 기술된 바와 같이 제제화되고/거나 변형된 본 발명의 펩티드는 각종 치료 양식으로 사용될 수 있다. 예를 들면, 이는 레이저 치료법 또는 박피술/미세박피술과 함께 섭취되거나, 주사되거나 또는 적용될 수 있다. 박피술은 박피 (샌딩(sanding))에 의해 피부 표면을 제거하는 화장용 의료 기술이다. 이는 햇빛에 손상된 피부를 제거하는데, 및 피부 상처 및 검은색 점을 제거하거나 줄이는데 사용된다. 알루미늄 결정 또한 사용되기는 하지만, 박피술 장치는 전형적으로 다이아몬드 팁이 달린 것이다. "실크필(SilkPeel)"로 지칭되는 한 가지 접근법은 다이아몬드 팁 미세피부절편기를, 용액을 깊숙히 전달하는 것과 함께 조합시킨 것이며, 여기서 상기 용액은 피부를 개선시켜 주고 피부에 활력을 주는 화이트너를 포함할 수 있다. 바람직한 방법에서는 펩티드를 미세 박피술 중에 전달되는 용액의 일부로서 투여한다. 유체를 유동시켜 미세박피되는 피부 부위를 감싸도록 함으로써 박피술을 수행하는 경우, 피부를 비타민, 로션 등과 이뿐만 아니라, 바람직한 방법에서는 본 발명의 티로시나제 억제제 펩티드(들)로 전처리 및 후처리, 둘 모두를 실시한다. 전처리는 미세박피되는 피부 치료 부위를 연화시켜 좀더 완벽하고 용이하게 박피될 수 있도록 함으로써 이후에 남는 피부 조직의 외상이 덜 남게 하는 반면, 후처리는 이후에 남는 피부 조직의 스트리킹 및 발적을 감소시키는데 도움을 준다. 이러한 치료 방법에 관한 추가 설명은 2004년 2월 24일에 발행된 가라시우크의 US 6,695,853 (발명의 영문명칭 "Microdermabrasion system and method of use")에서 찾아볼 수 있다.

[0158]

본 발명은 또한 레이저 치료법과 함께 사용될 수 있다. 레이저 치료법, 예로서 에르븀 레이저는 다양한 깊이의 손상된 피부 조직을 증발시킨다. 에르븀 레이저는 미국 특허 3,978,427에 추가로 기재되어 있다. 에르븀 레이저 기술은 국소 마취액을 사용하여 실시되고, 치유되는데는 보통 2 내지 5일이 걸리는데, 이는 레이저 에너지 투과 깊이에 따라 다르다. 멜라닌의 흡수 스펙트럼을 바탕으로 Q-스위치 방식의 루비 레이저 (694 nm) 및 Q-스위치 방식의 Nd:Yag 레이저 (1064 nm)는 본 발명의 펩티드와의 조합시에 예로서, 혹자 증후군 및 염증 후 과다 색소침착과 같은 과다색소침착된 병변 치료에 대한 최상의 레이저가 된다.

[0159]

본 발명의 펩티드는 레이저 치료법 이외의 각종 방사선 치료법, 예로서 RF 장치, LED, 또는 초음파를 통한 방사 에너지 투여와 함께 사용될 수 있다. 본 발명의 펩티드는 또한 미세바늘 치료법, 전기 천공 또는 이온 영동에 사용될 수 있다. 적절한 미세바늘은 2001년 7월 3일에 발행된 가슈타인(Garstein) 등의 US 6256533 (발명의 영문명칭 "Apparatus and method for using an intracutaneous microneedle array")에 기재되어 있다. 전기 천공은 피부에 고전압 펄스를 가하는 것을 포함하는데, 이는 일시적인 공극 형성을 유도하는 것으로 제안된 것이다. 고전압 및 짧은 치료 시간 (몇 밀리초)이 가장 빈번하게 사용된다. 전달시키는 것에 영향을 미치는 다른 전기적 파라미터로는 펄스 특성, 예로서 펄스 파형, 펄스율, 및 펄스의 수를 포함하고, 이는 추가로 다수의 공개 문헌 상에 추가로 기재되어 있다. 친유성 및 크기가 다른 분자 (즉, 소분자, 단백질, 펩티드 및 올리고뉴클레오타이드)의 피부 투과성을 증진시키는데 상기와 같은 기술이 성공적으로 사용되어 왔다. 이온 영동은 국소적으로 적용된 치료제의 투과를 증진시키기 위해 낮은 수준의 전류를 피부에 직접적으로 또는 투여 형태를 통해 간접적으로 적용하는 것을 포함한다. 이러한 방법의 결과로서 약물 투과가 증가하게 되는 것은 하기 메커니즘들 중 하나 또는 그의 조합이 이유가 될 수 있다: 전기반발 (하전된 용질의 경우), 전기삼투 (비하전된 용질의 경우), 및 전기교란(하전된 용질 및 비하전된 용질, 2가지 모두의 경우). 수개의 이온 영동 시스템이 현재 상업적으로 개발 중에 있다.

[0160]

본 발명이 사용될 수 있는 상기 언급한 질병들 이외에 또는 그를 포함하여 하기와 같은 것이 있으며, 이는 제한되지 않는다: 주근깨 감소, 아시아인 피부의 황색 매스-톤의 감소 및 피부 억제, 노화 과정과 관련된 피부이상 변색증 뿐만 아니라 정맥류 질병과 연관된 발적 감소 및 UV 유도성 색소침착의 감소.

[0161]

상기 기술한 바와 같이, 바람직한 치료 방법은 피부 미백을 포함한다. 본 억제제는 또한 다른 치료법을 위해 사용될 수 있다. 티로시나제는 수개의 다른 멜라닌 세포 분화 항원, 예로서 MART-1, gp100, 또는 gp75보다도 더욱 균일하게 발현되기 때문에 흑색종을 앓는 환자의 면역요법 치료를 위해서는 관심이 대상이 되는 표적 항원이 된다. 2가지 별도의 조사에서는 면역조직화학 또는 역전사-중합효소 연쇄 반응에 의해 평가한 바, 티로시나제가 100%의 새로운 흑색종 표본에서 발현된 것으로 나타났다. 이러한 데이터는 본질적으로 흑색종을 앓는 모든 환자에 대해 우수한 표적이 될 수 있음을 시사한다 (문헌 [Riley et al., J. Immunother., 2001, 24, 212-220]).

[0162]

티로시나제는 또한 보크트-고야나기-하라다(Vogt-Koyanagi-Harada) (VKH) 질환에도 연루되어 있다. VKH는 중추 신경계, 청각 및 외피 징후와 관련된 양측성 육아종 범포도막염이다. 보통은 무균성 뇌막염과 유사한 전구 증상을 보인 후, 이어서, 삼출 망막 박리 및 디스크 충혈을 동반한 후부 포도막염을 보인다. VKH 질환을 앓고,

티로시나제 패밀리 펩티드로 자극을 받은 환자로부터 확립된 T 세포 클론을 통해 현저한 염증전 Th1형 T 세포 반응을 입증하였다. 리드(Read) 등은 티로시나제 및 기타 다른 티로시나제 패밀리 단백질로부터 유래된 펩티드로 래트를 면역화시켜 래트에서 VKH 유사 증후군이 유도될 수 있음을 입증하였다 (문헌 [Read et al., *Curr. Opin. Ophthalmol*, 2000, 11, 437-442]).

[0163] 실시예

[0164] 디자인 및 시험관내 시험

효소 반응을 위해 버섯 티로시나제, L-티로신 및 기타 다른 화합물질을 시그마 알드리치(Sigma-Aldrich)로부터 입수하였다. 공지된 티로시나제 기질과의 잠재적인 상동성에 기초하여 짧은 서열 펩티드 1-7을 디자인하였다. 합성 펩티드 모두 3 내지 10개의 아미노산 길이고, tBoc 및/또는 Fmoc 고체상 화학법을 사용하여 합성하였다. 모든 경우에서 펩티드는 연구 등급 (>80% 순도)인 것으로 확인되었다. 편의상 연구 등급 시약을 사용하였음을 이해할 것이며, 펩티드는 제약 등급의 순도로 90% 초과, 바람직하게는 99% 초과 순도로 제조되는 것이 바람직하다.

실험 펩티드에 의한 티로시나제의 억제제는 기질 L-티로신의 반응 산물인 도파크롬의 비색 검출에 의해 측정하였다. 버섯 티로시나제, L-티로신, 및 인산칼륨 완충액 (pH 6.8)을, 5% DMSO에 용해된 짧은 서열 펩티드를 함유하는 96웰 플레이트에 첨가하고, 37°C에서 인큐베이션시켰다. 반응 개시 후 30분째에 BIO-TEK 플레이트 판독기를 사용하여 475 nm에서의 흡광도를 측정하였다. 3가지의 개별 사례마다 3중으로 각 실험을 실시하였다. 프로토콜은 문헌 [Piao et al., "Mushroom Tyrosinase Inhibition Activity of Some Chromones," *Chem. Pharm. Bull.* 56(3): 309-311 (2002)], 및 [Pomerants, *J. Biol. Chem* 238:2351-2357 (1963)]에 추가로 상세히 기재되어 있다.

효소 동역학은 0.5, 1, 2, 및 4 mM L-티로신의 기질 농도에 수반되는 반응 속도 변화를 관찰함으로써 미카엘리스-멘톤 반응식(Michaelis-Menton equation)을 사용하여 계산하였다. 일단 개시 반응 속도를 수득한 후, 라인 웨버-버크(Lineweaver-Burke) 플롯을 작성하여 Km, Vmax를 계산하고, 효소 억제 모드를 측정하였다.

[0168] IC50 결과

분자량이 321 내지 1,556 범위인 7개의 합성 펩티드를 하기에 제시한다. 스크리닝된 7개의 펩티드 중 5개가 다양한 억제 효과를 갖지만, 2개는 티로시나제에 대한 어떤 활성도 유지하지 않는 것으로 나타났다. 이들 펩티드에 대한 IC50 값은 약 40 μM 내지 8 mM 범위였다. 결과를 하기 표에 제시한다:

분자량 (달톤)	제제	IC50
284.4	PLG-OH	2.73 mM
470.6	VLLK	효과 없음
838	SFLLRN	8 mM
1200-1400	폴리-L-락트산	효과 없음
892.9	RADSRADC	123 μM
1200-2400	폴리-L-락트산	효과 없음

결론적으로, 본 발명자들은 관찰된 티로시나제 기질 특성에 대한 유사성에 기초하여 짧은 서열의 합성 펩티드를 디자인하였다. 놀랍게도, 본 발명자들은 티로시나제에 대하여 다양한 억제 정도를 갖는 펩티드를 발견하게 되었다.

S	F	L	L	R	N		
R	A	D	S	R	A	D	C
			P	L	G		

본 관찰 결과의 하나의 측면은 상기 제공한 안내지침을 비롯한, 가능한 펩티드 변형에 대한 정보에 관한 것이다. 상기 나타낸 3가지 펩티드를 비교할 때, 각 실시양태에서 서열의 내부에 하나 이상의 하전된 잔기가 발견됨을 알 수 있다. 이는 밑줄로 표시된 D 및 R 잔기에 의해 나타낸 바와 같이, 서로 나란히 양전하를 띤 잔기를 갖는 것이 상기 모티프에서 바람직한 것임을 보여준다. 아래 표에서와 같이, 공지된 원리에 따른 전하에 기초하여 서열을 변경시킬 수 있다:

기 pKA

- [0175] 산
- [0176] 카르복시-말단 3.1
- [0177] 아스파르테이트 4.4
- [0178] 글루타메이트 4.4
- [0179] 시스테인 8.5
- [0180] 티로신 10.0
- [0181] 염기
- [0182] 아미노-말단 8.0
- [0183] 리신 10.0
- [0184] 아르기닌 12.0
- [0185] 히스티딘 6.5
- [0186] 다시, 어떠한 이론에도 얽매이지 않으면서, 변형 목적에 있어서 PLG가 L-티로신이 아닌 L-dopa와 경쟁하는 작용을 하고 있는 것으로 나타난 것으로 여겨지고 있다. SFLLRN은 L-티로신 유사체로서의 활성을 위해 페닐알라닌(F)을 필요로 한다. RADSRADC는 티로시나제 효소에 영향을 주는 말단 시스테인을 이용하는 것으로 보인다.
- [0187] 추가로, Tyr 또는 유사 잔기 (예로서, Phe 또는 Trp)로 이루어진 하나 이상의 아미노산이 존재하는 것이 바람직할 수 있다. 이러한 관찰 결과는 예시한 것과 유사한 서열을 디자인하는데 있어 추가의 안내지침을 제공한다. 또한, 자가-조립 2차 구조를 형성함으로써 다수의 티로시나제 분자가 단일 복합체에 의해 결합할 수 있도록 하는 펩티드를 디자인할 수 있다. 이는 다수의 티로신 잔기를 갖는 서열을 선호한다.
- [0188] IC50 값이 40 μ M 정도로 낮게 측정되었는데, 이 값은 현재 시판용으로 이용가능한 유효 티로시나제 억제제 중 일부의 값과 일치한다. 모든 경우에서 억제 모드는 경쟁적인 것으로 결정되었다. 특정 효소에 대하여 활성을 갖는 짧은 서열 펩티드의 발견이 미래의 제약 요법의 개발에 관한 중요한 전략을 제시한다. 짧은 서열 펩티드는 피부 투과 증가, 리포솜 캡슐화 또는 지질 접합화에 대한 관리 용이성(amenability), 및 독성 감소를 비롯한, 종래 약리학적 약물 및 성장 인자보다 우수한 수개의 이점을 제공한다. 본 발명자들이 인식하고 있는 바, 이는 티로시나제에 대한 짧은 서열 펩티드의 현저한 억제 효과를 입증한 최초의 보고이다.
- [0189] 안정성 시험
- [0190] 펩티드: 본 발명의 >1 서열 1 SFLLRN, >2 서열 2 RADSRADC 및 PLG-OH를 비롯한 5개의 펩티드를 상업적 공급업체인 NeoMPS로부터 주문하였다. 6번째 펩티드인 VLLK는 기타 다른 펩티드의 안정성을 정량적으로 평가하기 위한 내부 표준으로서 사용하였다.
- [0191] HPLC/MS: 각 펩티드에 대해 1%의 용액을 제조하고, 이를 관에 밀봉시켜 주변 환경하에서 유지시켰다. 대략 30일의 시간 범위로 주기적으로 고성능 액체 크로마토그래피 (HPLC) 및 질량 분광분석 (MS)을 시험하였다. 내부 표준으로서 사용된 새로운 1% VLLK 용액은 각 시험일과 동일한 날에 제조하였다. 각 펩티드의 양은 VLLK의 피크 면적과 비교되는 각 펩티드의 피크 면적에 의해 측정하였다.
- [0192] HPLC 또는 MS로부터 측정하였을 때, SFLLRN을 비롯한 4개의 펩티드는 4개월 동안 분해되지 않는 것으로 나타났다. 그러나, RADSRADC는 MS에서 좀더 작은 종의 피크 면적이 증가한 것으로 나타난 바와 같이 처음 1개월 동안에 분해되기 시작하여 2개월 후까지 진행되는 것으로 보였으며, RADSRADC 종은 HPLC에서 관찰할 수 없었는데, 이는 완전히 분해되었음을 나타낸다. 아직 RADSRADC가 어떻게 분해되는지는 확실하지 않지만, 가장 가능한 원인은 시스테인과 관련이 있을 수 있다. 분해 메커니즘은 시스테인을 다른 아미노산으로 교체하는 것이 이로움은 나타낼 수 있음을 시사하고 있으나 추가의 조사가 요구된다.
- [0193] 세포 분석
- [0194] 색소 세포에서의 멜라닌형성 저해 활성은 문헌 [Cancer Research, Vol. 42, pp. 1994-2002 (1982)]에 기재되어 있는 방법을 약간 변형시켜 분석하였다. 마우스 흑색종 세포주인 B-16 세포 4 x 10⁴ 개를, 10 v/v% 소 태아 혈청을 함유하는 10 ml 이글스 MEM(Eagle's MEM)에 현탁시키고, 25 cm² 룩스(Roux) 플라스크로 옮기고, 5 v/v%

CO₂ 존재하에 37℃에서 배양하였다. 5일간 계속하여 배양하였는데, 출발일과 셋째날에는 배양 배지를 추가로 시험 표본도 함유하는 새로운 배양 배지로 새로 공급하였다. 0.8 w/v% 염수를 함유하는 포스페이트 완충액 (pH 7.2)으로 세정한 후, 티로신 및 EDTA를 함유하는 용액을 사용하여 세포를 분리하고, 여과시켜 회수하였다. 이어서, 여과지 상에 있는 세포를 건조시키고, 농도 계측기를 사용하여 500 nm의 반사광 강도에 대해 측정하였다.

[0195]

다른 분석법들도 본 발명의 펩티드의 시험에 사용될 수 있다. 2004년 9월 9일 공개된 오로우(Orlow) 등의 US PG PUB 2004/0175767 (발명의 영문명칭 "Methods and compositions that affect melanogenesis")에 기재된 티로시나제 활성 분석법을 사용하여 멜라닌형성 억제제에 대해 추가로 스크리닝할 수 있다. 상기 문헌에 기재되어 있는 바와 같이, 티로시나제를 시험용 세포 배지로 분비되도록 할 수 있다. 시험관내 배양물에서 성장시킨 야생형 멜라닌형성 세포는 그가 생체내에서 합성하는 것과 같이 멜라닌소체 내부에서 멜라닌을 합성할 것이다. 이들 배양된 세포에서는 일부 티로시나제가 또한 분비되기는 하였지만, 티로시나제는 멜라닌소체 막에서 두드러지게 관찰되었다. 멜라닌소체 막에서 관찰되는 티로시나제는 C-말단 막투과 도메인에 의해 그 자리에 유지되며, 멜라닌소체 루멘을 향해 배치된 그의 활성 부위를 갖는다. 대조적으로, P 단백질의 돌연변이, 또는 P 단백질 기능을 억제하는 화합물을 통해 멜라닌형성이 억제된 멜라닌형성 세포에서는 티로시나제가 잘못 배치될 것이다. 세포의 티로시나제 분획 상당수가 세포로부터 성장 또는 인큐베이션 배지로 분비된다. 또한, 분비된 티로시나제 폴리펩티드에는 그의 C-말단 막 앵커가 존재하지 않기 때문에 상기 폴리펩티드는 야생형 세포에서 발견되는 것보다 짧을 것이다. 그러나, 분비된 티로시나제는 그가 세포의 티로신으로부터 멜라닌을 합성할 수 있는 성장 또는 인큐베이션 배지에서 효소적으로 활성을 띤다. 그 결과, 멜라닌형성이 억제된 멜라닌형성 세포로부터의, 티로신-함유 성장 또는 인큐베이션 배지는 검은색으로 변하게 될 것이다. 배지 중 티로신의 농도가 높으면 높을수록 배지는 더욱더 검게 되고, 배지 중 티로시나제의 농도가 높으면 높을수록 배지가 검게 변하는 속도는 더 빨라지게 된다. 멜라닌형성이 억제되지 않은 멜라닌형성 세포는 유의적으로 더 적은 양의 티로시나제를 분비하기 때문에, 그가 배양된 티로신-함유 성장 또는 인큐베이션 배지는 검게 변하지 않을 것이다.

[0196]

생체내 분석

[0197]

시험관내에서 현저한 티로시나제 억제를 보인 펩티드를 그의 생체내 피부-화이트닝 활성에 대하여 추가로 시험할 수 있다.

[0198]

본 분석에서는 건강한 남성 및 여성 지원자 (20-50세)의 위팔 영역 중 각각 2.25 cm²의 면적을 갖는 2개의 상이한 지점에 3일 동안 매일 1회씩 약 0.6 J의 자외선을 조사하고, 24일에 걸쳐 매일 3회씩 조사된 지점에 억제 펩티드를 적용시켰다. 이후, 피부-화이트닝제를 적용시킨 조사된 지점을 대조군과 비교하여 멜라닌형성 억제 정도, 즉, 피부-화이트닝 효과를 예측하였다.

[0199]

이러한 분석을 위한 피부-화이트닝제는 10 중량부의 에탄올 및 0.18 중량부의 메틸 p-하이드록시벤조에이트를 0 (대조군의 경우), 4, 10, 16 또는 40 중량부의 50 w/w%의 활성 펩티드 또는 유도체와 함께 혼합하고, 10 w/w 시트르산 수용액을 사용하여 상기 혼합물의 pH를 pH 5.5로 조정하고, 혼합물에 정제수를 부어 총량이 100 중량부가 되게 하여 제조하였다.

[0200]

따라서, 피부-화이트닝제 중 펩티드의 농도는 0 w/w% (대조군의 경우), 2 w/w%, 5 w/w%, 8 w/w% 또는 20 w/w%였다.

[0201]

피부-화이트닝제를 먼저 거즈에 적신 후, 밀봉 드레싱 기법에 따라 조사된 지점에 거즈를 부착시켜 피부-화이트닝제를 적용시켰다.

[0202]

멜라닌형성 억제, 즉, 피부-화이트닝 효과에 대해 처리된 지점과 대조군을 비교하고; 피부-화이트닝 효과를 "우수," "변화없음," 또는 "열등"으로 등급화하고; (각 군당 20명의 지원자 중) "우수"라고 답변한 지원자의 인원수를 세어 피부-화이트닝 효과를 측정하였다.

[0203]

임상 연구

[0204]

난치성 기미가 있는 환자 (6개월 동안 처방전 없이 구매할 수 있는 제품, 또는 HQ 4%로, 또는 6개월간 트리-루마(Tri-luma)® 크림으로는 치료되지 못한 환자)를 무작위 임의 추출하여 2개의 처리군 (비히클 및 펩티드)으로 맹검법으로 처리하였다. 환자에게 하루에 2회 각 제품을 적용시킨 후에 30 Qam의 자외선 차단 지수로 자외선 차단시켰다. 이어서, 환자에게서 0-100 명목 척도 (0은 변화 없음에 해당하고, 100은 완전한 해결에 해당함)를 사용하여 이들의 얼굴 색소침착의 개선율을 평가하였다. 이 결과를 도 3에 제시하였으며, 여기서 PLG-OH 펩티드는 40-50%의 개선율을 나타내는 것으로 평가되었으며, 비히클에서는 개선이 나타나지 않았다. 펩티드를 1%

의 리포솜으로 제제화하고, 리포솜만을 대조군으로 사용하였다. 이 4개월 노출 기간 동안, 비히클 또는 펩티드 제제를 적용한 환자에게서 어떠한 부작용 (예를 들면, 홍반, 상흔, 접촉성 피부염 반응, 면포 형성)도 보고되지 않았다.

[0205] 멜라닌 합성의 억제제로서의 펩티드 평가

[0206] 펩티드 SF, VL 및 PLG-OH를 대조군으로서의 코직산, 공지된 티로시나제 억제제 및 리코라이스 추출물 (공지된 티로시나제 억제제)과 함께 시험하였다 (문헌 [J. Agric. Food Chem., 51(5), 1201-1207, 2003] 참조).

[0207] 포스페이트 완충액 (1.0M, pH 6.8) 및 5%, 및 순수로 이루어진 분석 완충액 중 버섯 티로시나제 (시그마 알드리치 cat # T3824) 및 L-티로신 (시그마 알드리치 cat # T8566)을 사용하여 티로신 억제를 측정하였다. 시험 샘플 농축물 및 티로시나제를 포함하는 분석 완충액을 암실에서 1 시간 동안 실온에서 인큐베이션하고, 흡광도를 판독하였다.

[0208] B-16 색소침착 분석은 페놀 레드, FBS, 항생제, L-글루타민 및 기타 다른 표준 성분이 없는 DMEM에서 성장시킨 B16-F10 마우스 흑색종 세포 (ATCC CRL-6475)를 사용하였다. 세포를 540 nm 및 570 nm에서 여과되는 팩커드 스펙트라카운트(Packard Spectracount) (마이크로플레이트 분광광도계)에서 계수하였다. 세포를 성장 배지로 배양하고, 24 시간 동안 37 °C 및 10% CO₂에서 인큐베이션하였다. 세포를 시험 활성 성분을 함유하는 성장 배지 200 µl로 처리하고, 37 °C 및 10% CO₂에서 인큐베이션하였다. 7일 후에, 팩커드 마이크로플레이트 판독기를 사용하여 540 nm에서 세포를 판독하였다. 세포 생존도는 샘플에서 살아있는 세포의 수를 결정하는데 사용되는 MTT 분석 (문헌 [Mosmann T. Rapid colorimetric assay for cellular growth and survival: application to proliferation and cytotoxicity assays. J Immunol Methods. 1983 Dec 16;65(1-2):55-63])을 이용하여 평가하였다.

[0209] 그 결과를 아래 표로 정리하였다:

활성제	시험 농도	티로시나제 억제 %	탈색 % (B-16 분석)
코직산	0.25%	94%	ND
리코라이스 추출물	0.01%	97%	ND

[0210]

리코라이스 추출물	0.001%	ND	76%
SF 펩티드	8 mM	ND (완충액에 불용성임)	0%
RA 펩티드	150 µM	99%	14%
RA 펩티드	300 µM	ND	19%
RA 펩티드	450 µM	ND	23%
PLG 펩티드	3 mM	6%	세포 독성

[0211]

[0212] 시험관내 버섯 티로시나제 활성에 의해 평가한 바와 같이 이들 데이터는 RA 펩티드가 150 µM 농도에서 시험하였을 때 버섯 티로시나제의 효과적인 억제제임을 시사한다. 이 농도는 B16세포 배양물에서 멜라닌 합성을 이전에 관찰된 티로시나제 활성 억제로부터 예측되는 정도로 억제하기에는 충분하지 않았다. 그러나, RA 펩티드를 보다 높은 농도로 투여하였을 때 탈색이 비록 중간 정도였으나 증가하였다. 이들 농도에서 생존도는 유의한 영향을 받지 않았다. SF 펩티드나 PLG 모두 이들 분석에서는 효과적인 것으로 여겨지지 않았다. 그러나, PLG는 멜라닌 세포 사멸로부터 그의 탈색 효과를 부분적으로 유도할 수 있었으며, 이는 HQ의 작용과 동일한 메커니즘이다. HQ는 그의 티로시나제 억제에 대한 IC₅₀보다 7배 더 낮은 농도인 100 µM에서 100% 세포 사멸을 초래한다.

[0213] RA 펩티드의 상세한 연구

[0214] 재료

[0215] 버섯 티로시나제, L-티로신, 하이드로퀴논 및 L-DOPA를 시그마 알드리치로부터 구입하였다. RA 펩티드 (아미노산 서열 RADSRAADC, 순도 > 82%)는 NeoMPS, 인크.(NeoMPS, Inc.)(미국 캘리포니아주 샌디에고 소재)가 합성하

었다. 멜라닌 세포 (계대수 3의 1차)는 스탠포드 대학 피부학과의 토드 리키(Todd Ridky) 박사로부터 기증받았다.

[0216] 버섯 티로시나제의 효소 분석

[0217] 문헌 [Piao et al. (Piao LZ, Park HR, Park YK, Lee SK, Park JH, Park MK. 2002. Mushroom Tyrosinase Inhibition Activity of Some Chromones. *Chem Pharm Bull* 50(3): 309-311]에 따른 방법을 변형시킨 방법을 사용하고 기질로 L-티로신을 사용하여 시험관내에서 티로시나제 억제 활성을 측정하였다. 효소, 기질 및 억제제의 농도를 각각 [E], [S] 및 [I]로 표시하였다. 80 μ l의 0.067 M 인산칼륨 완충액 (pH 6.8), 0.067 M 인산칼륨 완충액 (pH 6.8) 중 40 μ l의 L-티로신, 5% DMSO 용액 중 40 μ l의 억제제, 및 40 μ l의 버섯 티로시나제 용액을 96웰 마이크로플레이트에 첨가하여 각 시약의 최종 농도가 0.2 mg/ml [S], 및 96 유닛/ml [E]가 되게 하고, [I]는 다양한 농도로 제조하였다. 억제제 용액 대신 5% DMSO 용액을 블랭크 용액에 첨가하고, 총 부피를 200 μ l로 조정하고, 이를 대조군으로서 사용하였다. 분석 혼합물을 37°C에서 인큐베이션시켰다. 상이한 시기에 마이크로플레이트 판독기를 사용하여 475 nm에서 반응 혼합물 중의 도파크롬 생산량을 측정하였다. 티로시나제 활성의 억제율(%)은 하기와 같이 계산하였다:

[0218]
$$\text{억제율}(\%) = [(A-B)-(C-D)]/(A-B) \times 100$$

[0219] A: 인큐베이션 이후의 블랭크 용액의 흡광도

[0220] B: 인큐베이션 이전의 블랭크 용액의 흡광도

[0221] C: 인큐베이션 이후의 샘플 용액의 흡광도

[0222] D: 인큐베이션 이전의 샘플 용액의 흡광도

[0223] 멜라닌 세포 배양 및 처리

[0224] 1차 인간 멜라닌 세포는 친절하게 스탠포드 대학 피부학과의 토드 리키 박사로부터 기증받았다. 세포를 인간 멜라닌 세포 성장 보충제 (HMGS, (캐스캐이드 바이올로지스(Cascade Biologics))로 보충된 배지 254 (캐스캐이드 바이올로지스)에서 배양하였다. 37°C, 5% CO₂의 습윤 대기하에 세포를 성장시켰다. 세포 플레이팅 밀도는 상기 세포가 시험 샘플과 함께 인큐베이션되는 기간 동안 대수 성장기에 있도록 정하였다. 세포의 계대배양물을 4 x 10⁴ 개의 세포/cm²의 밀도로 플레이팅하였다. 대략 24시간 후에 새로운 배지 및 시험 샘플을 첨가하였다. 시험 샘플 첨가 후 7일이 경과하였을 때, 세포를 수거하고, 이틀에 한번씩 새로운 배지 및 시험 샘플로 교체하였다.

[0225] 세포 생존도에 대한 멜라닌 세포 분석

[0226] WST-1 세포 증식 키트 (로슈(Roche))를 사용하여 세포 생존도를 측정하였다. 세포를 1x10⁵/웰 (24웰 플레이트)로 플레이팅하였다. 플레이팅 후 24시간이 경과하였을 때, 시험 샘플을 첨가하고, 배양물을 추가로 7일 동안 인큐베이션시켰다. 처리 기간이 종료되었을 때, 50 μ l WST-1을 각 웰에 첨가하였다. 플레이트를 4시간 동안 37°C의 암실에 놓고, 마이크로플레이트를 사용하여 450 nm에서의 흡광도를 판독하였다. 보통, 시험하고자 하는 각 군당 3개의 복제 웰을 측정하였다. 배지는 함유하나, 세포는 함유하지 않는 웰을 대조군으로서 사용하였다. 세포 생존도를 하기 식에 따라 계산하였다:

[0227]
$$\text{세포 생존도} = \text{흡광도 (시험 샘플)} / \text{흡광도 (오직 배지만)} \times 100\%.$$

[0228] 세포 티로시나제 활성의 분석

[0229] 기질로서 L-DOPA를 사용하였을 때의 세포 티로시나제 활성은 문헌 [Cheng et al. (Cheng KT, Hsu FL, Chen SH, Hsieh PK, Huang HS, Lee CK, Lee MH. 2007. New Constituent from Podocarpus macrophyllus var. macrophyllus Shows Anti-tyrosinase Effect and Regulates Tyrosinase-Related Proteins and mRNA in Human Epidermal Melanocytes. *Chem Pharm Bull* 55(5): 757-761]의 방법에 의해 분석하였다. 인간 멜라닌 세포를 6 웰 플레이트에서 배양하였다. 7일 동안 각각의 시험 샘플로 처리한 후, 세포를 포스페이트로 완충처리된 염수 (PBS)로 세척하고, 1% 트리톤 X-100을 함유하는 포스페이트 완충액 (pH 6.8)을 사용하여 용해시켰다. 초음파 처리한 후, 10분 동안 10000 g으로 원심분리하여 용해물을 정화시켰다. 바이오-래드(Bio-Rad) 단백질 분석용 키트로 단백질 함량을 측정 후, 동량의 단백질 (40 μ g)을 함유하는 96웰 배양 플레이트에 용해물을 첨가하고, 각 웰에서 150 μ l가 되도록 용해 완충액으로 조정하였다. 용해 완충액 중에 용해된 75 μ l의 10 mM L-DOPA를 각

웰에 첨가하였다. 배양 플레이트를 30분 동안 37℃에서 인큐베이션시킨 후, 분광광도계를 사용하여 475 nm에서 관독하였다.

[0230] 하기 식을 사용하여 티로시나제 억제 활성을 계산하였다:

[0231] $\text{티로시나제 억제율(\%)} = [1 - (\text{샘플의 } 475 \text{ nm에서의 O.D.} / \text{대조군의 } 475 \text{ nm에서의 O.D.})] \times 100\%$.

[0232] 멜라닌 함량 측정

[0233] 인간 멜라닌 세포를 6웰 플레이트에서 배양하고, 7일 동안 각각의 시험 샘플로 처리하였다. PBS로 세척한 후, 트립신/EDTA (PBS 중 0.25%/0.1%) 중에서 단시간 동안 인큐베이션시켜 세포를 분리시켰다. 분취액을 사용하여 세포를 계수하였다. 남아있는 세포에 조음과처리를 하고, 500 μl 1 M NaOH 중 37℃에서 빛을 피해 밤새도록 인큐베이션시켰다. 미지 샘플의 475 nm에서의 OD와, 합성 멜라닌을 사용하여 수득한 표준 곡선을 비교하여 멜라닌 농도를 계산하였다.

[0234] 세포 생존도에 대한 RA 펩티드의 효과

[0235] 멜라닌 세포 상에서 시험된 HQ의 농도는 1, 10, 100 및 1000 μM 인 반면, 상기 두 펩티드의 농도는 1, 10 및 100 μM 이었다. 100 또는 1000 μM 의 HQ를 첨가한 후 24시간째에 멜라닌 세포가 사멸한 것이 관찰되었으며, 이를 통해 HQ의 세포독성을 확인하였다. 10 μM 이하의 HQ로 처리하였을 때에는 세포가 생존해 있는 것으로 관찰되었다. 7일 동안 처리한 후 100 μM 이하의 농도를 갖는 RA 펩티드에 대해서는 어떤 독성도 관찰되지 않았다.

[0236] 멜라닌형성에 대한 RA의 억제 효과가 세포 성장을 억제시킬 수 있다는 가능성을 배제시키기 위해, 본 발명자들은 시험 샘플의 존재 및 부재하에서 성장한 세포의 갯수를 비교하였다. 본 발명자들은 RA 펩티드의 멜라닌 세포 증식 속도에 대한 어떤 억제 효과도 관찰하지 못했다. 상이한 화합물로 처리한 후의 증식 속도를 도 4에 제시하였다. 하이드로퀴논의 경우, 10 μM 보다 높은 농도는 세포 독성이 100%이기 때문에 시험될 수 없기는 하지만, 이 또한 10 μM 이하에서는 어떤 억제 효과도 나타내지 않았다.

[0237] 멜라닌 함성에 대한 RA 펩티드의 효과

[0238] RA 펩티드가 멜라닌형성을 억제시켰다는 것을 입증하는 보다 직접적인 증거를 제시하기 위해, 멜라닌 세포에서의 멜라닌 생산에 대해 상기 펩티드가 미치는 효과를 연구하였다. 7일 동안, 어떤 것도 첨가하지 않거나, RA 펩티드 또는 HQ로 처리한 멜라닌 세포 중의 멜라닌 함량은 분광광도계를 사용하여 측정하고, 멜라닌 표준 곡선과 비교하였다. 세포의 멜라닌 함량을 그래프로 도시한 도 5에 멜라닌 함량이 감소된 것이 나타나 있다. 10 μM HQ (비-독성 용량)로 처리하였을 때 멜라닌 함량이 약간 감소하였다. 이와 달리, 유사한 농도의 펩티드는 멜라닌 함량을 현저히 감소시켰다.

[0239] 세포 티로시나제 활성에 대한 RA 펩티드의 효과

[0240] 본원 발명자들은 또한 기질로 L-DOPA를 사용하여 세포 티로시나제 활성에 대한 RA 펩티드의 억제 작용을 조사하였다. 원심분리하고 단백질을 계산한 후, 각 웰 중의 특정 단백질 함량을 보완하여 일정 부피의 각 샘플 상등액을 96웰 배양 플레이트로 옮기고, 0.067 M의 포스페이트 완충액 (pH 6.8)을 사용하여 각 웰의 부피가 150 μl 가 되도록 조정하였다. 포스페이트 완충액 (pH 6.8) 중에 용해된 75 μl 의 10 mM L-DOPA를 각 웰에 첨가하였다. 배양 플레이트를 30분 동안 37℃에서 인큐베이션시킨 후, 분광광도계를 사용하여 475 nm에서 관독하였다. 결과를 도 6에 제시한다. 10 μM 하이드로퀴논으로 멜라닌 세포를 처리하였을 때, 세포 티로시나제 활성은 28.8% 만큼 감소하였고; RA 펩티드로 처리하였을 때에는 세포 티로시나제 활성이 용량에 의존하여 감소하였다. 1 μM 의 RA 펩티드는 효소 활성을 1.2% 만큼 감소시켰고; 10 μM 의 RA 펩티드는 15.6% 만큼 감소시켰다. 마지막으로, 100 μM 의 RA 펩티드는 효소 활성을 21.1% 만큼 감소시켰다.

[0241] 요컨대, 도 4 내지 6에 제시된 결과는 RA 펩티드가 세포의 증식에 불리한 영향을 미치지 않고, HQ에 비해 멜라닌 함량의 현저하게 개선된 감소를 나타내며, 티로시나제 활성을 억제한다는 것을 보여준다.

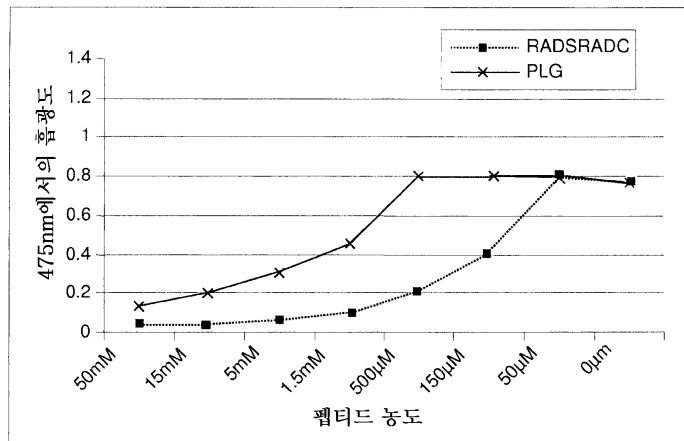
[0242] 결론

[0243] 상기의 구체적인 설명은 본 발명을 예시하고 설명하기 위한 것이며, 본 발명의 범주를 제한하는 것으로 이해되어서는 안된다. 본 명세서에서 언급된 임의의 특허 또는 공개문헌은 그의 출원일 또는 공개일 당시 상기 특허 또는 공개문헌이 속하는 분야의 당업자의 수준을 나타내며, 명확하게 상세히 설명된 것은 아니지만, 당업계의 숙련인이 이해할 수 있는 발명의 상세한 설명을 전달하기 위한 것이다. 언급된 방법 또는 물질을 설명하고 허용하기 위한 목적의 필요에 따라, 상기 특허 및 공개문헌들은 이들 각각이 구체적으로 및 개별적으로 참고로 인

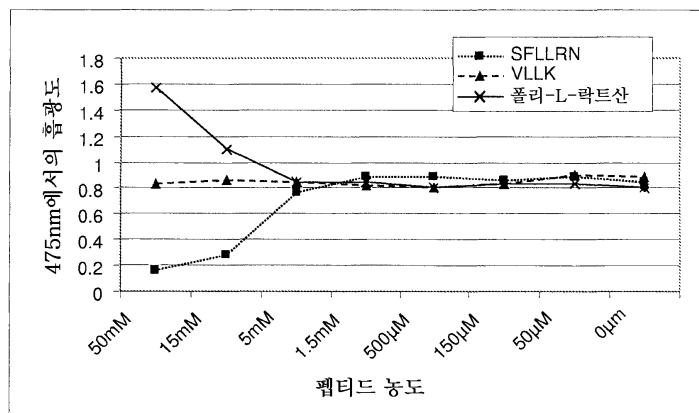
용된 것처럼 동일한 정도로 참고로 본원에서 인용된다.

도면

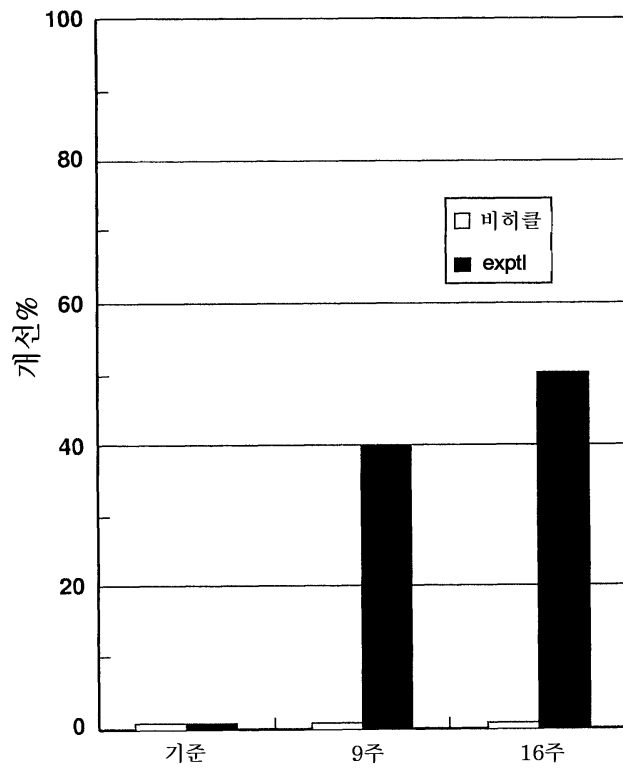
도면1



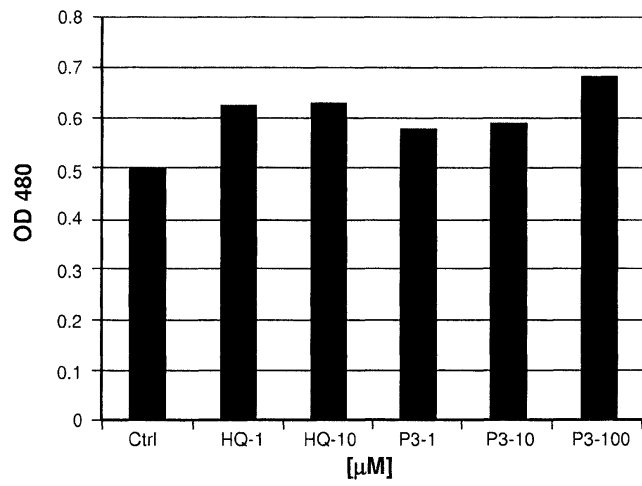
도면2



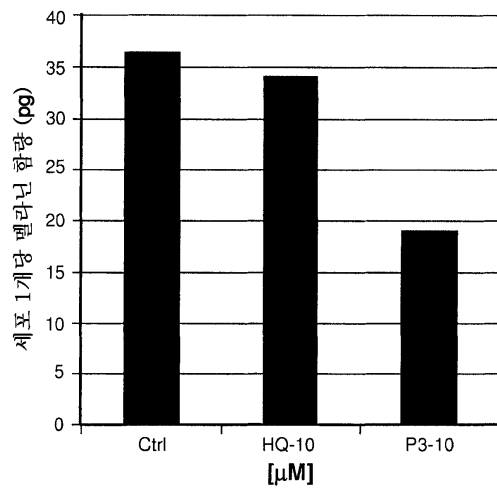
도면3



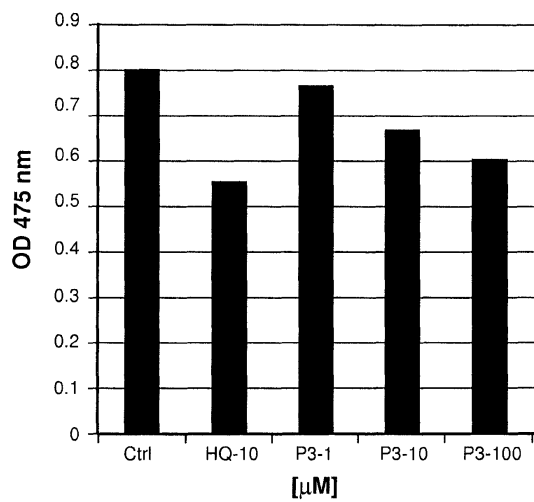
도면4



도면5



도면6



서열목록

SEQUENCE LISTING

- <110> Hantash, Basil
- <120> PEPTIDE TYROSINASE INHIBITORS AND USES THEREOF
- <130> 3815.41B-1
- <140> not assigned yet
- <141> 2008-06-25
- <150> 60/937331
- <151> 2007-06-27
- <160> 4
- <170> PatentIn version 3.3

<210> 1
 <211> 6
 <212> PRT
 <213> Artificial
 <220><223> Synthetic peptide
 <400> 1
 Ser Phe Leu Leu Arg Asn
 1 5
 <210> 2
 <211> 8
 <212> PRT
 <213> Artificial
 <220><223> Synthetic peptide

 <400> 2
 Arg Ala Asp Ser Arg Ala Asp Cys
 1 5
 <210> 3
 <211> 4
 <212> PRT
 <213> Artificial
 <220><223> Synthetic peptide
 <400> 3
 Val Leu Leu Lys
 1
 <210> 4
 <211> 8
 <212> PRT
 <213> Artificial
 <220><223> Synthetic peptide
 <400> 4
 Arg Gly Asp Ser Arg Gly Asp Cys
 1 5