



(12)发明专利申请

(10)申请公布号 CN 109328068 A

(43)申请公布日 2019.02.12

(21)申请号 201780027738.9

(74)专利代理机构 北京三友知识产权代理有限公司 11127

(22)申请日 2017.04.07

代理人 肖轶 庞东成

(30)优先权数据

10-2016-0042915 2016.04.07 KR

(51)Int.Cl.

A61K 38/10(2006.01)

(85)PCT国际申请进入国家阶段日

A23L 33/18(2006.01)

2018.11.05

A61K 8/64(2006.01)

(86)PCT国际申请的申请数据

C07K 7/08(2006.01)

PCT/KR2017/003815 2017.04.07

A61Q 19/00(2006.01)

(87)PCT国际申请的公布数据

W02017/176087 K0 2017.10.12

(71)申请人 珍白斯凯尔有限公司

地址 韩国大田广域市

申请人 金商在

(72)发明人 金商在 李圭庸 高成昊

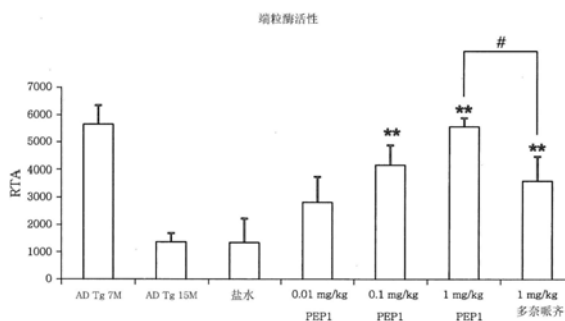
权利要求书1页 说明书11页
序列表6页 附图3页

(54)发明名称

具有增加端粒酶活性和延长端粒的效果的肽以及包含该肽的组合物

(57)摘要

本说明书涉及包含具有增加端粒酶活性和延长端粒的效果的肽的组合物,更具体而言涉及包含端粒酶衍生肽的组合物,从而有效预防、缓解和治疗由端粒酶活性降低或端粒长度减少引起的疾病以及由细胞老化或损伤引起的症状。根据本发明的一个方面,该肽增加端粒酶活性并有效延长端粒,从而提供了一种治疗由端粒酶活性异常降低和端粒的长度减少或丢失引起的疾病,以及减轻由此引起的症状的方法。



1. 一种增加端粒酶活性或延长端粒长度的组合物,所述组合物包含药学有效量的选自以下组的一种或多种,所述组由包含SEQ ID NO:1的氨基酸序列的肽、与该氨基酸序列具有至少80%序列同源性的肽或其片段组成。

2. 如权利要求1所述的组合物,其有效预防或治疗由端粒酶活性或端粒长度减少引起的疾病,或由细胞损失和衰老引起的症状。

3. 如权利要求2所述的组合物,其中,所述疾病包括选自神经退行性病症、神经系统的退行性疾病、骨骼系统的退行性疾病、肌肉系统的退行性疾病、病毒感染性疾病和导致细胞加速死亡的遗传性疾病中的一种或多种。

4. 如权利要求3所述的组合物,其中,所述神经系统的退行性疾病是选自脑疾病、脊髓损伤、周围神经损伤、周围神经疾病、肌萎缩侧索硬化症、痴呆、亨廷顿病、帕金森病、阿尔茨海默病、脊髓小脑变性和多发性神经病中的任一种。

5. 如权利要求2所述的组合物,其中,所述由细胞损失和衰老引起的症状包括选自由皮肤伤口引起的组织损失、皮肤皱纹、贫血、皮肤牛皮癣和皮肤变黑中的一种或多种。

6. 一种药物组合物,其包含权利要求1至5中任一项所述的组合物作为增加端粒酶活性或延长端粒长度的活性成分。

7. 如权利要求6所述的药物组合物,其包含以0.1 μ g/kg至100mg/kg的剂量施用的SEQ ID NO:1的肽。

8. 一种保健功能食品组合物,其包含:

权利要求1至5中任一项所述的组合物作为增加端粒酶活性或延长端粒长度的活性成分。

9. 如权利要求8所述的保健功能食品组合物,其制备为选自粉末、颗粒、丸、片剂、胶囊、糖果、糖浆和饮料中的任一种制剂。

10. 一种化妆品组合物,其包含:

权利要求1至5中任一项所述的组合物作为增加端粒酶活性或延长端粒长度的活性成分。

11. 如权利要求10所述的化妆品组合物,其制备为选自由爽肤水、乳液、乳霜、粉底、精华素、凝胶、面膜、泡沫洁面乳、肥皂和局部使用的软膏组成的组中的任一种制剂。

具有增加端粒酶活性和延长端粒的效果的肽以及包含该肽的组合物

技术领域

[0001] 本说明书涉及具有增加端粒酶活性和延长端粒的效果的肽以及包含该肽的组合物,更具体而言涉及包含衍生自端粒酶的肽的组合物,所述肽具有治疗或预防由端粒酶活性降低和端粒损失引起的细胞变性、老化或死亡。

背景技术

[0002] 已知其中在染色体末端发现的DNA六聚体(TTAGGG)序列重复的端粒具有稳定染色体的功能。反复的细胞复制缩短了染色体的末端,这表明细胞衰老,因此,端粒是各种组织中维持细胞寿命的重要因素,并且用于评估细胞衰老。端粒酶是一种酶蛋白,其催化端粒重复序列在端粒3'末端的添加,并用于恢复由于细胞衰老而丢失的端粒。端粒酶在大多数正常成体细胞中不表达,端粒长度在细胞复制中逐渐减少,并且端粒重复的减少导致细胞衰老。

[0003] 在特定疾病中,端粒末端异常快速地丢失并导致未成熟细胞的老化或变性。在人的情况下,发现表达人端粒酶(hTERT,人-端粒酶逆转录酶)的细胞绕过正常的细胞衰老途径。当在具有短端粒的老化细胞中诱导端粒酶的表达时,端粒长度增加,并且恢复与较年轻细胞相似的表型。

[0004] 与癌细胞或特定干细胞不同,体细胞具有很少或没有端粒酶活性,并且当包括端粒在内的一些染色体的末端缩短至一定长度或更短时,细胞停止分裂并进入程序性细胞衰老(细胞死亡)。由于端粒酶活性的增加减少了端粒重复序列的损失,因此预期具有在端粒末端添加端粒重复序列的作用的端粒酶活性的诱导重新启动了处于衰老或死亡阶段的体细胞的复制和分裂,并诱导其中分布有大量衰老或死亡期细胞的受损组织的恢复。

[0005] 此外,体细胞中端粒酶活性的增加可能有助于:治疗或预防神经退行性疾病(代表性地,阿尔茨海默病),治疗或改善由杀死感染细胞的免疫细胞(细胞毒性T淋巴细胞)过早衰老引发的HIV,伤口愈合如皮肤创伤,和维持移植细胞如骨髓移植。此外,已知端粒酶活性通过作为端粒酶一部分的hTERT的过表达而增加,或通过调节端粒酶组装的蛋白质如热休克蛋白(HSP)的表达而增加。

[0006] 端粒长度的估计对于理解端粒的生物学和临床意义是重要的。端粒长度是研究染色体稳定性、端粒酶活性和/或表达、增殖能力和细胞衰老过程的有用指标。端粒的临床价值的重要性可以在以下病症中得到证实:Bloom综合征(罕见的遗传性疾病,感染者的染色体断裂频率和重排高),这是一种由癌症、早衰综合征或部分早衰、遗传异常或染色体不稳定引发的疾病;以及Werner综合征(以相对年轻的人中快速出现老化为特征的罕见病症),这是一种与衰老有关的疾病。端粒长度的动态性在某一疾病过程中具有独特的表达模式。因此,它对预测疾病非常有用。

[0007] 同时,作为开发用于治疗由端粒酶活性和端粒长度减少引起的神经退行性疾病和阿尔茨海默病(这是一种众所周知的神经退行性疾病)的药物的有效性和功效实验中使用

的动物模型,采用了小鼠(3xTg-AD小鼠模型):其中三个特定基因(APP,Tau,PS1)被修饰以积累 β 淀粉样蛋白并诱导神经原纤维缠结(NFT)。其中三个基因被修饰的小鼠随时间显示出包括阿尔茨海默病症状在内的神经元损伤疾病的进展。已知候选药物的有效性和功效可通过观察神经细胞的破坏抑制和再生能力来测量,其中通过向诱导神经细胞损失的动物施用开发的药物并将其与未治疗的对照组进行比较。

[0008] 已知根据本发明的一方面的肽PEP1是由存在于端粒酶的催化部分中的16个重要氨基酸组成的肽,并且具有抗炎和抗氧化功效。如通过动物实验已经发现,根据本发明的一方面的肽可有效增加端粒酶活性和增加细胞中的端粒长度,预期PEP1可有效预防和治疗由端粒酶活性和端粒长度降低引发的各种疾病。

[0009] 本说明书提供了一种组合物,其包括衍生自端粒酶的逆转录酶的肽,以增加端粒酶活性和延长端粒。具体地,本说明书提供了包含hTERT衍生肽的组合物,以增加端粒酶活性和延长端粒。更具体而言,本说明书提供了一种组合物,其包含由16个氨基酸(PEP1)组成的hTERT衍生肽,以增加端粒酶活性和延长端粒。

[0010] [现有技术文件]

[0011] [专利文件]

[0012] (专利文件1)W0 2008-149345 A2

[0013] [非专利文件]

[0014] (非专利文件1)Simonsen,J.L.等,“Telomerase expression extends the proliferative life-span and maintains the osteogenic potential of human bone marrow stromal cells,”*Nat Biotechnol* 20(6):592-6(January,2002)

发明内容

[0015] 技术问题

[0016] 在这种背景下,本发明人试图开发一种组合物,用于预防和治疗由端粒酶活性和端粒长度降低引起的症状,从而大大增加端粒酶活性并延长端粒而没有副作用,进而完成了本发明。

[0017] 本说明书的一个目的是提供一种有效、无副作用、增加端粒酶活性和延长端粒长度的肽组合物,以及一种预防、改善和治疗端粒酶活性和端粒长度降低导致的由细胞衰老、损伤和死亡引起的症状的方法。

[0018] 技术方案

[0019] 在一方面,本发明提供了一种组合物,所述组合物包含药学有效量的选自以下组的一种或多种,所述组由包含SEQ ID NO:1的氨基酸序列的肽、与该氨基酸序列具有至少80%序列同源性的肽或其片段组成,以增加端粒酶活性或延长端粒长度。在另一方面,本发明提供增加端粒酶活性或延长端粒长度的方法,其包括对受试者施用选自以下组的一种或多种,所述组由包含SEQ ID NO:1的氨基酸序列的肽、与该氨基酸序列具有至少80%序列同源性的肽或其片段组成。

[0020] 在另一方面,本发明提供选自以下组的一种或多种,所述组由包含SEQ ID NO:1的氨基酸序列的肽、与该氨基酸序列具有至少80%序列同源性的肽或其片段组成,以增加端粒酶活性或延长端粒长度。

[0021] 在又一方面,本发明提供选自以下组的一种或多种作为增加端粒酶活性或延长端粒长度的非治疗性化妆品的活性成分的应用,所述组由包含SEQ ID NO:1的氨基酸序列的肽、与该氨基酸序列具有至少80%序列同源性的肽或其片段组成。

[0022] 在又一方面,本发明提供选自以下组的一种或多种在增加端粒酶活性或延长端粒长度的组合物中的应用,所述组由包含SEQ ID NO:1的氨基酸序列的肽、与该氨基酸序列具有至少80%序列同源性的肽或其片段组成。

[0023] 在又一方面,所述组合物用于预防或治疗由端粒酶活性和端粒长度减少引起的疾病,或由细胞损失和衰老引起的症状。

[0024] 在又一方面,本发明提供治疗或预防由端粒酶活性或端粒长度减少引起的疾病或者由细胞损失和衰老引起的症状的方法,所述方法包括对受试者施用选自以下组的一种或多种,所述组由包含SEQ ID NO:1的氨基酸序列的肽、与该氨基酸序列具有至少80%序列同源性的肽或其片段组成。

[0025] 在又一方面,本发明提供选自自由包含SEQ ID NO:1的氨基酸序列的肽、与该氨基酸序列具有至少80%序列同源性的肽或其片段组成的组的一种或多种,其用于治疗或预防由端粒酶活性或端粒长度减少引起的疾病,或由细胞损失和衰老引起的症状。

[0026] 在又一方面,本发明提供选自以下组的一种或多种作为改善或预防由端粒酶活性或端粒长度减少引起的疾病或者由细胞损失和衰老引起的症状的非治疗性化妆品的活性成分的应用,所述组由包含SEQ ID NO:1的氨基酸序列的肽、与该氨基酸序列具有至少80%序列同源性的肽或其片段组成。

[0027] 在又一方面,本发明提供选自以下组的一种或多种在改善或预防由端粒酶活性或端粒长度减少引起的疾病或者由细胞损失和衰老引起的症状的组合物中的应用,所述组由包含SEQ ID NO:1的氨基酸序列的肽、与该氨基酸序列具有至少80%序列同源性的肽或其片段组成。

[0028] 关于根据本发明一方面的组合物,所述疾病是选自神经退行性病症、神经系统的退行性疾病、骨骼系统的退行性疾病、肌肉系统的退行性疾病、病毒感染性疾病和导致细胞加速死亡的遗传性疾病中的一种或多种。

[0029] 关于根据本发明一方面的组合物,所述神经系统的退行性疾病是选自脑疾病、脊髓损伤、周围神经损伤、周围神经疾病、肌萎缩侧索硬化症、痴呆、亨廷顿病、帕金森病、阿尔茨海默病、脊髓小脑变性和多发性神经病中的任一种。

[0030] 关于根据本发明一方面的组合物,所述由细胞损失和衰老引起的症状包括选自由皮肤伤口引起的组织损失、皮肤皱纹、贫血、皮肤牛皮癣和皮肤变黑中的一种或多种。

[0031] 根据本发明的又一方面,提供了包含上述组合物作为活性成分的药物组合物来增加端粒酶活性或延长端粒长度。

[0032] 关于根据本发明又一方面的药物组合物,所述药物组合物包含以0.1 μ g/kg至100mg/kg的剂量施用的SEQ ID NO:1的肽。

[0033] 根据本发明的再一个方面,提供了包含上述组合物作为活性成分的保健功能食品组合物来增加端粒酶活性或延长端粒长度。

[0034] 关于根据本发明再一方面的保健功能食品组合物,所述组合物制备为选自粉末、颗粒、丸、片剂、胶囊、糖果、糖浆和饮料中的任一种制剂。

[0035] 根据本发明的另一个方面,提供了包含上述组合物作为活性成分的化妆品组合物来增加端粒酶活性或延长端粒长度。

[0036] 关于根据本发明另一方面的化妆品组合物,所述化妆品组合物制备为选自由爽肤水(스킨)、乳液、乳霜、粉底、精华素、凝胶、面膜、泡沫洁面乳、肥皂和局部使用的软膏组成的组中的任一种制剂。

[0037] 有益效果

[0038] 本说明书的序列为SEQ ID NO:1的肽、与该序列具有至少80%序列同源性的肽或其片段可有效预防和治疗由端粒酶活性异常降低或细胞中端粒长度减少和损失引起的疾病、细胞衰老引起的症状,以及与神经细胞和再生能力丧失相关的疾病,从而预防和治疗这些疾病。

附图说明

[0039] 图1是显示当诱导神经变性疾病时,通过在遗传操纵的神经退行性疾病实验用动物模型中施用各种浓度(0mg/kg、0.01mg/kg、0.1mg/kg和1mg/kg)的根据本说明书的肽,来比较端粒酶活性的增加的结果的图。

[0040] 图2是当诱导神经变性疾病时,通过在遗传操纵的神经退行性疾病实验用动物模型中施用各种浓度(0mg/kg、0.01mg/kg、0.1mg/kg和1mg/kg)的根据本说明书的肽,显示出端粒长度增加的染色体电泳图像。

[0041] 图3是用于测量端粒酶活性的计算相对端粒酶活性(RTA)的计算公式。

[0042] 图4是显示用于测量端粒酶活性的实验中PCR水平的实验条件的表。

[0043] 图5是用于测量端粒长度的实验中分析图像的计算公式。

具体实施方式

[0044] 由于本发明可以具有各种修改和实施方式,因此下面将更详细地描述本发明。然而,本发明不限于特定实施方式,并且应该理解的是本发明包括本发明的技术构思和范围中包括的所有修改、等同物和替代物。为了解释本发明,如果确定相关技术的详细描述可能使本发明的主旨不清,则将省略其详细描述。

[0045] 端粒是位于染色体每个末端的重复遗传物质,已知其可防止相应染色体的损伤或与不同染色体的结合。随着细胞分裂,端粒逐渐缩短,在一定数量的细胞分裂后变得非常短,细胞最终停止分裂并死亡。另一方面,端粒的延长已知可延长细胞的寿命。端粒酶衍生肽PEP1已被开发为用于包括胰腺癌在内的各种癌症的抗癌剂,并且还鉴定为参与抗炎、抗氧化和细胞渗透,以及细胞中的主要信号传导过程,以及具有抗癌效果。鉴于PEP1的细胞内功能,已经探索了除了将其用作现有抗癌剂之外还使用新适应症的可能性。

[0046] 本发明人已证实端粒酶衍生肽具有增加端粒酶活性和端粒长度的活性,从而完成了本发明。更具体而言,在本发明的一个方面,通过阿尔茨海默病动物模型实验,证实在对从端粒酶活性或长度减少的阿尔茨海默病动物模型中提取的细胞的实验中通过PEP1增加了端粒酶活性和端粒相关DNA的长度。

[0047] 在本发明的一个方面,SEQ ID NO:1的肽(PEP1)、SEQ ID NO:1的肽的片段或与所述肽序列具有至少80%序列同源性的肽包括衍生自端粒酶、特别是智人端粒酶的肽。

[0048] 本文公开的肽可包括具有至少80%、85%、90%、95%、96%、97%、98%或99%序列同源性的肽。另外，本文公开的肽可包括与SEQ ID NO:1的肽或其片段相差1个或更多氨基酸、2个或更多氨基酸、3个或更多氨基酸、4个或更多氨基酸、5个或更多氨基酸、6个或更多氨基酸或7个或更多氨基酸的肽。

[0049] 在本发明的一个方面，氨基酸变化是改变肽的物理化学性质的性质。例如，可以进行氨基酸变化以改善肽的热稳定性，改变底物特异性，并改变最佳pH。

[0050] SEQ ID NO:1中所示的肽显示在下表1中。给出下表1中的“名称”以区分一种肽与另一种肽。在本发明的一个方面，SEQ ID NO:2所示的肽表示人类端粒酶的完整肽。在本发明的另一个方面，SEQ ID NO:1的肽、其片段或与所述肽序列具有至少80%序列同源性的肽包括由端粒酶所含肽的相应位置处存在的肽合成的“合成肽”。SEQ ID NO:2表示端粒酶的全长氨基酸序列。

[0051] [表1]

SEQ ID NO:	名称	端粒酶中的位置	序列	长度
1	pep1	[611-626]	EARPALLTSRLRFIPK	16 aa
2		[1-1132]	MPRAPRCRAVRSLLRSHYREVLPLATF VRLGPGQWRLVQRGDPAAFRALVAQ CLVCVPWDARPPPAAPSFQVSCLEL VARVLQRLCERGAKNVLAFGFALLDG ARGGPPEAFTTSVRSYLPNTVTDALR GSGAWGLLLRRVGDDVLVHLLARCA LFVLVAPSCAYQVCGPPPLYQLGAATQA RPPPHASGPRRRLGCERAWNHSVREA GVPLGLPAPGARRRGGASRSRSLPKR PRRGAPEPERTPVGQGSWAHPGRTR GPSDRGFCVVSPARPAEEATSLEGALS GTRHSHPSVGRQHHAGPPSTSRPPRP WDTPCPPVYAETKHFLYSSGDKEQLR PSFLLSSLRPSLTGARRLVETIFLGSRP WMPGTPRRLPRLPQRYWQMRPLFLEL LGNHAQCPYGVLLKTHCPLRAAVTPA AGVCAREKPQGSVAAPPEEDTDPRLR VQLLRQHSSPWQVYGFVRACLRRLVP PGLWGSRHNERFLRNTKKFISLGKH AKLSLQELTWKMSVRDCAWLRRSPG VGCVPAAEHRLREEILAKFLHWLMSV YVVELLRSFFYVTETTFQKNRFFYRK SVWSKLSIGIRQHLKRVQLRELSEAE VRQHREARPALLTSRLRFIPKPDGLRPI VNMDYVVGARTFRREKRAERLTSRVK ALFSVLNYERARRPGLLGASVLGLDD IHRAWRTFVLRVRAQDPPPELYFVKV DVTGAYDTIPQDRLTEVIASIIKPQNTY CVRRYAVVQKAAHGHVRKAFKSHVS TLTDLQPYMRQFVAHLQETSPLRDAV VIEQSSSLNEASSGLFDVFLRFMCHHA VRIRGKSYVQCQGIQGSILSTLLCSLC YGDMENKLFAGIRRDGLLLRLVDDFL LVTPHLTHAKTFLRTLVRGVPEYGCVV NLRKTVVNFVVEDEALGGTAFVQMPA HGLFPWCGLLDTRTLEVQSDYSSYA RTSIRASLTFNRGFKAGRNMRRKLF VLRLKCHSLFLDLQVNSLQTVCTNIY KILLQAYRFHACVLQLPFHQVWKN PTFFLRVISDTASLCYSILKAKNAGMS LGAKGAAGPLPSEAVQWLCHQAFLK LTRHRVTYVPLLGSLRTAQTQLSRKLP GTTLTALEAAANPALPSDFKTILD	1132 aa

[0052]

[0053] 包含本发明一方面的包含SEQ ID NO:1的肽的组合物可有效预防或治疗由端粒酶活性或端粒长度减少引起的疾病或由细胞损失和衰老引起的症状。由端粒酶活性或端粒长

度减少引起的疾病包括选自神经退行性病症、神经系统的退行性疾病、骨骼系统的退行性疾病、肌肉系统的退行性疾病、病毒感染性疾病和导致细胞加速死亡的遗传性疾病中的一种或多种。受益于端粒酶活性增加的神经系统的退行性疾病可包括选自脑疾病、脊髓损伤、周围神经损伤、周围神经疾病、肌萎缩侧索硬化症、痴呆、亨廷顿病、帕金森病、阿尔茨海默病、脊髓小脑变性和多发性神经病中的任一种，但本发明不限于此。此外，受益于端粒酶活性增加的疾病状况可包括退行性关节炎、动脉粥样硬化、血栓形成、应激诱导的细胞死亡、如心力衰竭或缺血、年龄相关性黄斑变性、艾滋病 (AIDS)、伴随导致加速细胞重编程遗传性疾病发生的组织重编程受损、和其他退行性病况。

[0054] 根据本发明的一个方面的增加端粒酶活性的组合物可有效促进对由细胞损失和衰老引起的症状的治疗，并且在自由皮肤伤口引起的组织损失、皮肤皱纹、贫血、皮肤牛皮癣和皮肤变黑中的一种或多种症状的治疗中具有优选的效果。

[0055] 在一方面，本发明提供了药物组合物，其包含含有SEQ ID NO:1的氨基酸序列、与该氨基酸序列具有至少80%序列同源性的肽或其片段作为活性成分来增加端粒酶活性和延长端粒。

[0056] 本发明一方面的组合物可应用于所有动物，包括：人、狗、鸡、猪、牛、羊、豚鼠和猴。

[0057] 在一方面，本发明提供了药物组合物，其包含含有SEQ ID NO:1的氨基酸序列、与该氨基酸序列具有至少80%序列同源性的肽或其片段来预防神经细胞的损失和再生神经细胞。本发明一方面的药物组合物可以口服、直肠内、透皮、静脉内、肌肉内、腹膜内、髓内、鞘内或皮下施用。

[0058] 用于口服施用的剂型可包括但不限于：片剂、丸剂、软胶囊或硬胶囊剂、颗粒剂、粉剂、溶液剂和乳剂。用于肠胃外施用的剂型可包括但不限于注射剂、滴剂、洗剂、软膏、凝胶、霜剂、悬浮液、乳液、栓剂、贴剂或喷雾剂。

[0059] 本发明一方面的药物组合物在需要时可以包含添加剂，例如稀释剂、赋形剂、润滑剂、粘合剂、崩解剂、缓冲剂、分散剂、表面活性剂、着色剂、调味剂或甜味剂。本发明一方面的药物组合物可以通过现有技术常规方法制备。

[0060] 本发明示例性实施方式的药物组合物的有效成分可以根据施用对象的年龄、性别、体重、病理状态和严重程度、给药途径或处方者的决定而变化。基于这些因素来决定剂量是处于本领域普通技术人员的水平之内的，并且本发明示例性实施方式的药物组合物的日剂量可以是例如0.01 μ g/kg/天至10g/kg/天，具体地0.1 μ g/kg/天至1g/kg/天，更具体地0.5 μ g/kg/天至100mg/kg/天，并且当效果随剂量而存在差异时可以适当地调整。根据本发明一方面的药物组合物可以每天施用1至3次，但本发明不限于此。

[0061] 根据本发明一方面的保健功能食品组合物可以制备为选自粉末、颗粒、丸、片剂、胶囊、糖果、糖浆和饮料中的任一种制剂，但本发明不限于此。当根据本发明一方面的保健功能食品组合物用作食品添加剂时，保健功能食品组合物可以原样添加或与不同的食品或食品成分一起使用，因此可以根据常规方法适当地使用。可以添加所述保健功能食品组合物的食品的实例可以包括但不限于肉、面包、糖果、零食、面条、乳制品、维生素复合物、饮品、茶和饮料，并且包括常识中的所有类型的健康食品。

[0062] 根据本发明一方面的保健功能食品组合物可以作为食品，特别是功能性食品。根据本发明一方面的功能性食品包含在食品生产中常规添加的成分，例如，蛋白质、糖、脂类、

营养素和调味料。

[0063] 本发明的药物组合物或保健功能食品组合物可包含0.1%以上、优选最大约10%、更优选最大约5%、进一步更优选最大1% (w/v) 的SEQ ID NO:1的肽。适当浓度的选择取决于诸如优选剂量、频率和递送活性成分的方法等因素。

[0064] 本发明一方面的化妆品组合物在其制剂上没有特别限制,并且可以具有诸如柔肤水、敛肤水、滋养水、眼霜、滋养霜、按摩霜、洁肤霜、洁肤泡沫、洁肤水、粉、精华素或面膜等制剂。

[0065] 本发明一方面的化妆品组合物可以根据化妆品组合物的常规制备方法制备为各种制剂。例如,化妆品组合物可以制备为例如含有肽、爽肤水、乳膏和乳液的化妆品和芳香产品,并且可以在用常规液体洁肤水、敛肤水或保湿乳液稀释后使用。另外,化妆品组合物可包括常用的添加剂,如常用于化妆品组合物领域的稳定剂、增溶剂、维生素、颜料或香料。

[0066] 根据本发明一方面的组合物的制剂没有特别限制,并且可以是例如片剂、颗粒剂、粉剂、液体或固体制剂。每种制剂可以通过混合本领域普通技术人员根据本发明的制剂或其使用目的毫无困难地适当选择的相应领域常用组分以及活性成分来制备,并且这些组分可通过与其它组分同时应用而具有协同效应。

[0067] 本说明书中使用的术语旨在用于描述具体实施方式而不是限制本发明。前面没有数量的术语不是要限制数量,而是表示存在本文引用的至少一个项目。术语“包含”、“具有”、“包括”和“含有”应该理解为开放式(即“包括但不限于”)。

[0068] 数值范围的提及取代了范围内各数值的提及,除非另有说明,否则每个数值都如同在本说明书中单独提及那样适用于本说明书。所有范围的端值都包括在范围内,并且可以单独组合。

[0069] 除非另有说明或在上下文中明确矛盾,否则本说明书中提及的所有方法均可以按照合适的顺序执行。除非包括在权利要求中,否则使用任何一个实施方式和所有实施方式或示例性语言(例如,“诸如”或“如…”)用于更清楚地描述本发明,而不是限制本发明的范围。权利要求之外的本文任何语言不应解释为对本发明的实践必不可少。除非另外定义,否则本文使用的科技术语各自具有本发明所属领域普通技术人员通常理解的含义。

[0070] 本发明的示例性实施方式包括发明人已知的执行本发明的最佳模式。当阅读以上描述时,示例性实施方式的变化对于本领域技术人员而言将变得清楚。预期发明人适当地使用这样的变化,并通过本说明书中描述的不同方法实施本发明。因此,如专利法允许,本发明包括所附权利要求中提到的本发明要点的等同物和所有修改。此外,除非在上下文中另外明确说明或矛盾,否则具有上述组件的任何组合的所有可能变型均包括在本发明中。尽管通过示例性实施方式描述和示出了本发明,但是本领域技术人员将容易理解,可以在不背离本发明主旨和由所附权利要求限定的范围的情况下,在形式和细节上有各种变化。

[0071] 下文中,将参考实施例和实验例进一步详细描述本发明的构造和效果。然而,以下实施例和实验例仅供说明本发明以帮助理解本发明,并且本发明的范围不限于此。

[0072] [实施例1]

[0073] 肽的合成

[0074] SEQ ID NO:1的肽(下文中称为“PEP 1”)根据固相肽合成的常规已知方法制备。具体地,使用ASP48S (Pepttron, Inc., Daejeon, 韩国)通过Fmoc固相肽合成(SPPS)从C-末端将

每个氨基酸相互偶联来合成肽。其中C-末端的第一个氨基酸与树脂连接的肽如下使用：

[0075] $\text{NH}_2\text{-Lys (Boc)-2-氯-三苯甲基树脂}$

[0076] $\text{NH}_2\text{-Ala-2-氯-三苯甲基树脂}$

[0077] $\text{NH}_2\text{-Arg (Pbf)-2-氯-三苯甲基树脂}$

[0078] 在用于合成肽的所有氨基酸成分中，N-末端用Fmoc保护，残基用Trt、Boc、叔丁酯(t-Bu)和可以在酸中除去的2,2,4,6,7-五甲基二氢-苯并呋喃-5-磺酰基(Pbf)保护。氨基酸的实例如下：

[0079] $\text{Fmoc-Ala-OH, Fmoc-Arg (Pbf)-OH, Fmoc-Glu (OtBu)-OH, Fmoc-Pro-OH, Fmoc-Leu-OH, Fmoc-Ile-OH, Fmoc-Phe-OH, Fmoc-Ser (tBu)-OH, Fmoc-Thr (tBu)-OH, Fmoc-Lys (Boc)-OH, Fmoc-Gln (Trt)-OH, Fmoc-Trp (Boc)-OH, Fmoc-Met-OH, Fmoc-Asn (Trt)-OH, Fmoc-Tyr (tBu)-OH, Fmoc-Ahx-OH, Trt-巯基乙酸}$ 。

[0080] 作为偶联剂，使用2-(1H-苯并三唑-1-基)-1,1,3,3-四甲基脒六氟磷酸盐(HBTU)/N-羟基苯并三唑(HOBt)/4-甲基吗啉(NMM)。使用20%哌啶的DMF溶液进行Fmoc脱保护。为了从树脂中分离合成的肽并除去残基的保护基，使用切割混合物[三氟乙酸(TFA)/三异丙基硅烷(TIS)/乙二硫醇(EDT)/ $\text{H}_2\text{O}=92.5/2.5/2.5/2.5$]。

[0081] 通过使用其中在与固相支架结合的同时起始氨基酸被氨基酸保护基保护的状态使每个相应氨基酸反应，用溶剂洗涤所得产物，并进行脱保护的重复过程，合成每种肽。从树脂上脱离后，所合成的肽通过HPLC纯化，通过质谱(MS)确认合成，并进行冷冻干燥。

[0082] 使用高效液相色谱测定，实验中使用的所有肽的纯度为95%或更高。

[0083] 制备PEP1的具体方法如下。

[0084] 1) 偶联

[0085] 将用 $\text{NH}_2\text{-Lys (Boc)-2-氯-三苯甲基树脂}$ 保护的氨基酸(8当量)与溶解在DMF中的偶联试剂HBTU(8当量)/HOBt(8当量)/NMM(16当量)混合，在室温反应2小时，并依次用DMF、MeOH和DMF洗涤。

[0086] 2) Fmoc脱保护

[0087] 向所得产物中加入20%哌啶的DMF溶液，在室温反应2次，每次5分钟，然后依次用DMF、MeOH和DMF进行洗涤。

[0088] 3) 重复反应1)和2)，以形成肽骨架 $\text{NH}_2\text{-E (OtBu)-A-R (Pbf)-P-A-L-L-T (tBu)-S (tBu)-R (Pbf) L-R (Pbf)-F-I-P-K (Boc)-2-氯-三苯甲基树脂}$ 。

[0089] 4) 切割：通过向合成完成的肽树脂中添加切割混合物，将肽与树脂分离。

[0090] 5) 冷却后，在得到的混合物中加入二乙醚，使离心获得的肽沉淀。

[0091] 6) 通过制备型HPLC纯化后，通过LC/MS测定分子量并冻干，从而制备粉末。

[0092] [实施例2]

[0093] 实验材料和方法

[0094] 实施例2-1:实验动物的制备

[0095] 所有动物相关程序均根据汉阳大学实验动物护理和使用指南进行。在所有实验中，动物受试者的数量和疼痛最小化，并且所有动物使用一次。

[0096] 此处使用的PEP1根据实施例1中描述的方法制备，并且其他试剂和对照材料是购自Sigma Aldrich的真品。

[0097] 为了测试PEP1对阿尔茨海默病的治疗效果,阿尔茨海默病转基因小鼠(3XTg-AD)购自Jackson Laboratory。转基因小鼠的遗传特征示于表2中。

[0098] [表2]

[0099]

品系名称	B6;129-Psen1tm1Mpm Tg(APP ^{Swe} ,tauP301L)1Lfa/Mmjax
通用名	3xTg-AD
疾病	阿尔茨海默病; AD
靶向突变	淀粉样 β 前体蛋白(APP ^{Swe}), 微管相关蛋白 tau (tauP301L)
基因型	Psen1tm1Mpm/Psen1tm1Mpm Tg(APP ^{Swe} ,tauP301L)1Lfa
表型	β 淀粉样蛋白沉积, 神经原纤维缠结, 异常行为(异常学习/记忆/调节, 异常情境调节行为)

[0100] 提供8周龄的转基因小鼠并使其适应环境后,为了增加转基因小鼠的数量,将小鼠以1:2的比例分成雄性和雌性,并在每个笼中繁殖约7至8天然后分离。大约7到8周后确认怀孕的小鼠在一周后分娩并经历哺育期3周。两周后,能够获得成熟小鼠。在驯化和整个实验过程中,在12小时光暗循环中将小鼠圈养在 $23 \pm 2^\circ\text{C}$ 的温度和 $60 \pm 10\%$ 的相对湿度。

[0101] 繁殖后为了研究PEP1根据浓度的影响,将实验动物分开,然后如下施用实验材料。作为阳性对照材料,使用多奈哌齐,将实验动物分成5组,每组包括10只小鼠。每组的施用材料和剂量如下。

[0102] 组1: 盐水

[0103] 组2: 0.01mg/kg的PEP1

[0104] 组3: 0.1mg/kg的PEP1

[0105] 组4: 1mg/kg的PEP1

[0106] 组5: 1mg/kg多奈哌齐

[0107] PEP1、盐水和多奈哌齐以各浓度从第12个月起每周3次皮下注射2个月,1个月(15个月龄)小鼠(每组10只小鼠)麻醉,并用0.9%生理盐水对每只小鼠心脏进行再灌注以除去血液。然后,提取大脑,分离成海马区和整个脑区,从而获得脑组织,并用液氮快速冷冻组织。

[0108] 实施例2-2: 端粒酶活性和测量端粒长度的方法

[0109] 为了证实端粒酶活性和端粒长度随时间的减少,通过实施例2-1的方法从7个月和15个月的诱导阿尔茨海默病的动物模型获得脑组织(表示为AD Tg 7M和AD Tg 15M),以测量端粒酶活性和端粒长度。

[0110] 为了研究PEP1诱导的端粒酶活性,使用TelotAGGG端粒酶PCR ELISAPLUS(目录号12 013 789 001,Roche Boehringer-Mannheim,IN,美国),将根据实施例2-1的方法制备的整个脑组织粉碎,将200 μl 冰冷的裂解缓冲液加入到2g至3g组织中,在冰上孵育30分钟,并以16,000x g离心20分钟以分离175 μl 蛋白。对10 μg 蛋白质定量,并与反应混合物和内标混合,然后进行PCR(参见图4)。进行杂交,将样品加入到特殊包被的MP模块中进行反应,然后在450nm或690nm使用ELISA读数器测量吸光度。使用计算公式(参见图3)计算相对端粒酶活性(RTA)。

[0111] 使用TelotAGGG端粒长度测定法(目录号12 209 136 001,Roche Boehringer-

Mannheim, IN, 美国) 进行端粒长度的测量, 将整个脑组织粉碎, 然后使用High Pure PCR Template制备试剂盒(目录号11 796 828 001, Roche Boehringer-Mannheim, IN, 美国) 提取DNA, 并与1 μ g至2 μ g纯化的基因组DNA和Hinf1/Rsa 1酶混合物混合, 并在37 $^{\circ}$ C反应2小时。反应后, 将反应产物与5 μ l凝胶电泳上样缓冲液5x混合, 并在0.8%琼脂糖凝胶中以5V/cm的速率电泳3小时。当经过反应的凝胶与HCL溶液反应10分钟时, 溴酚蓝染色变为黄色。在变性溶液和中和溶液连续反应后, 使用20x SSC通过Southern印迹将所得产物转移至尼龙膜至少6至12小时。在Southern转移后, 将膜在120 $^{\circ}$ C烘烤20分钟以将DNA固定到膜上, 从而使以2x SSC缓冲液洗涤的膜杂交, 并且使用图像分析仪(GE Healthcare, ImageQuant LAS 4000) 通过将曝光时间设定为4小时来进行图像分析(分析式参见图5)。用于成像长度测量的对照DNA(分别表示为对照DNA 1或2) 是试剂盒中提供的随机序列DNA。

[0112] 实施例2-3: 统计验证方法

[0113] 对于所有统计验证, 使用SPSS 21统计程序和统计网址(<http://vassarstats.net>)。以间隔或比例尺度测量的数据表示为平均值 \pm S.E.M., 对于参数分析, 在单向或双向ANOVA检验后进行Tukey检验作为后验检验, 并且对于非参数统计使用Kruskal-Wallis检验和Mann-Whitney U检验。组间比较采用Tukey检验进行。在名义尺度的情况下, 使用卡方分析来比较各组。当p值小于0.05时, 差异被认为具有统计学显著性。

[0114] [实施例3]

[0115] 测量端粒酶活性和端粒长度的结果

[0116] 实施例3-1: 测量端粒酶活性的结果

[0117] 为了确定PEP1是否增加端粒酶活性, 通过实施例2-1和2-2的方法测量端粒酶活性。结果, 施用PEP1 (0.1mg/kg) 的组(组3) 显示与施用盐水的组(组1) 相比增加266%, 施用PEP1 (1mg/kg) 组(组14) 与施用盐水的组(组1) 相比显示增加370%, 并且与施用多奈哌齐 (1mg/kg) 组(组5) 相比显示出统计学显著的增加(参见图1)。另外, 与7个月龄的小鼠(AD Tg 7M) 相比, 证实15个月龄的小鼠(AD Tg 15M) 的端粒酶活性降低。

[0118] 实施例3-2: 测量端粒长度的结果

[0119] 为了确认PEP1诱导的端粒酶活性的增加是否对端粒长度的维持或增加具有直接影响, 通过实施例2-2的方法进行了测量端粒长度的实验。结果, 与端粒酶活性增加的结果相似, 端粒长度随PEP1施用浓度而增加(见图2)。可以看出PEP1也增加了端粒长度, 从而增加了染色体稳定性和细胞保护作用。另外, 确认与7个月龄的小鼠(AD Tg 7M) 相比, 15个月龄的小鼠(AD Tg 15M) 的端粒长度减少。

[0120] 通过上述实施例, 可以看出PEP1在使用动物模型的实验中具有增加端粒酶活性和端粒长度的作用。因此, 根据本发明一方面的肽PEP1可以开发为能够预防、改善或治疗由端粒酶活性的异常降低或细胞中端粒长度的减少和丢失引起的疾病以及由细胞衰老引起的症状的材料, 并且该材料可用于提供预防和治疗相关疾病的方法。

<110> 珍白斯凯尔有限公司
金商在

<120> 增加端粒酶活性和延长端粒长度的肽以及包含其的组合物

<130> OF17P042PCT

<150> KR 10-2016-0042915

<151> 2016-04-07

<160> 2

<170> PatentIn version 3.2

<210> 1

<211> 16

<212> PRT

<213> 智人

<400> 1

Glu Ala Arg Pro Ala Leu Leu Thr Ser Arg Leu Arg Phe Ile Pro Lys
1 5 10 15

[0001]

<210> 2

<211> 1132

<212> PRT

<213> 智人

<400> 2

Met Pro Arg Ala Pro Arg Cys Arg Ala Val Arg Ser Leu Leu Arg Ser
1 5 10 15

His Tyr Arg Glu Val Leu Pro Leu Ala Thr Phe Val Arg Arg Leu Gly
20 25 30

Pro Gln Gly Trp Arg Leu Val Gln Arg Gly Asp Pro Ala Ala Phe Arg
35 40 45

Ala Leu Val Ala Gln Cys Leu Val Cys Val Pro Trp Asp Ala Arg Pro
50 55 60

Pro Pro Ala Ala Pro Ser Phe Arg Gln Val Ser Cys Leu Lys Glu Leu
65 70 75 80

305	310	315	320	
Cys Pro Pro Val Tyr Ala Glu Thr Lys His Phe Leu Tyr Ser Ser Gly	325	330	335	
Asp Lys Glu Gln Leu Arg Pro Ser Phe Leu Leu Ser Ser Leu Arg Pro	340	345	350	
Ser Leu Thr Gly Ala Arg Arg Leu Val Glu Thr Ile Phe Leu Gly Ser	355	360	365	
Arg Pro Trp Met Pro Gly Thr Pro Arg Arg Leu Pro Arg Leu Pro Gln	370	375	380	
Arg Tyr Trp Gln Met Arg Pro Leu Phe Leu Glu Leu Leu Gly Asn His	385	390	395	400
Ala Gln Cys Pro Tyr Gly Val Leu Leu Lys Thr His Cys Pro Leu Arg	405	410	415	
[0003] Ala Ala Val Thr Pro Ala Ala Gly Val Cys Ala Arg Glu Lys Pro Gln	420	425	430	
Gly Ser Val Ala Ala Pro Glu Glu Glu Asp Thr Asp Pro Arg Arg Leu	435	440	445	
Val Gln Leu Leu Arg Gln His Ser Ser Pro Trp Gln Val Tyr Gly Phe	450	455	460	
Val Arg Ala Cys Leu Arg Arg Leu Val Pro Pro Gly Leu Trp Gly Ser	465	470	475	480
Arg His Asn Glu Arg Arg Phe Leu Arg Asn Thr Lys Lys Phe Ile Ser	485	490	495	
Leu Gly Lys His Ala Lys Leu Ser Leu Gln Glu Leu Thr Trp Lys Met	500	505	510	
Ser Val Arg Asp Cys Ala Trp Leu Arg Arg Ser Pro Gly Val Gly Cys	515	520	525	
Val Pro Ala Ala Glu His Arg Leu Arg Glu Glu Ile Leu Ala Lys Phe	530	535	540	

1010	1015	1020			
Val Trp Lys Asn Pro Thr Phe Phe Leu Arg Val Ile Ser Asp Thr Ala					
1025	1030	1035			1040
Ser Leu Cys Tyr Ser Ile Leu Lys Ala Lys Asn Ala Gly Met Ser Leu					
	1045	1050			1055
Gly Ala Lys Gly Ala Ala Gly Pro Leu Pro Ser Glu Ala Val Gln Trp					
	1060	1065			1070
[0006] Leu Cys His Gln Ala Phe Leu Leu Lys Leu Thr Arg His Arg Val Thr					
	1075	1080			1085
Tyr Val Pro Leu Leu Gly Ser Leu Arg Thr Ala Gln Thr Gln Leu Ser					
	1090	1095			1100
Arg Lys Leu Pro Gly Thr Thr Leu Thr Ala Leu Glu Ala Ala Ala Asn					
	1105	1110			1120
Pro Ala Leu Pro Ser Asp Phe Lys Thr Ile Leu Asp					
	1125	1130			

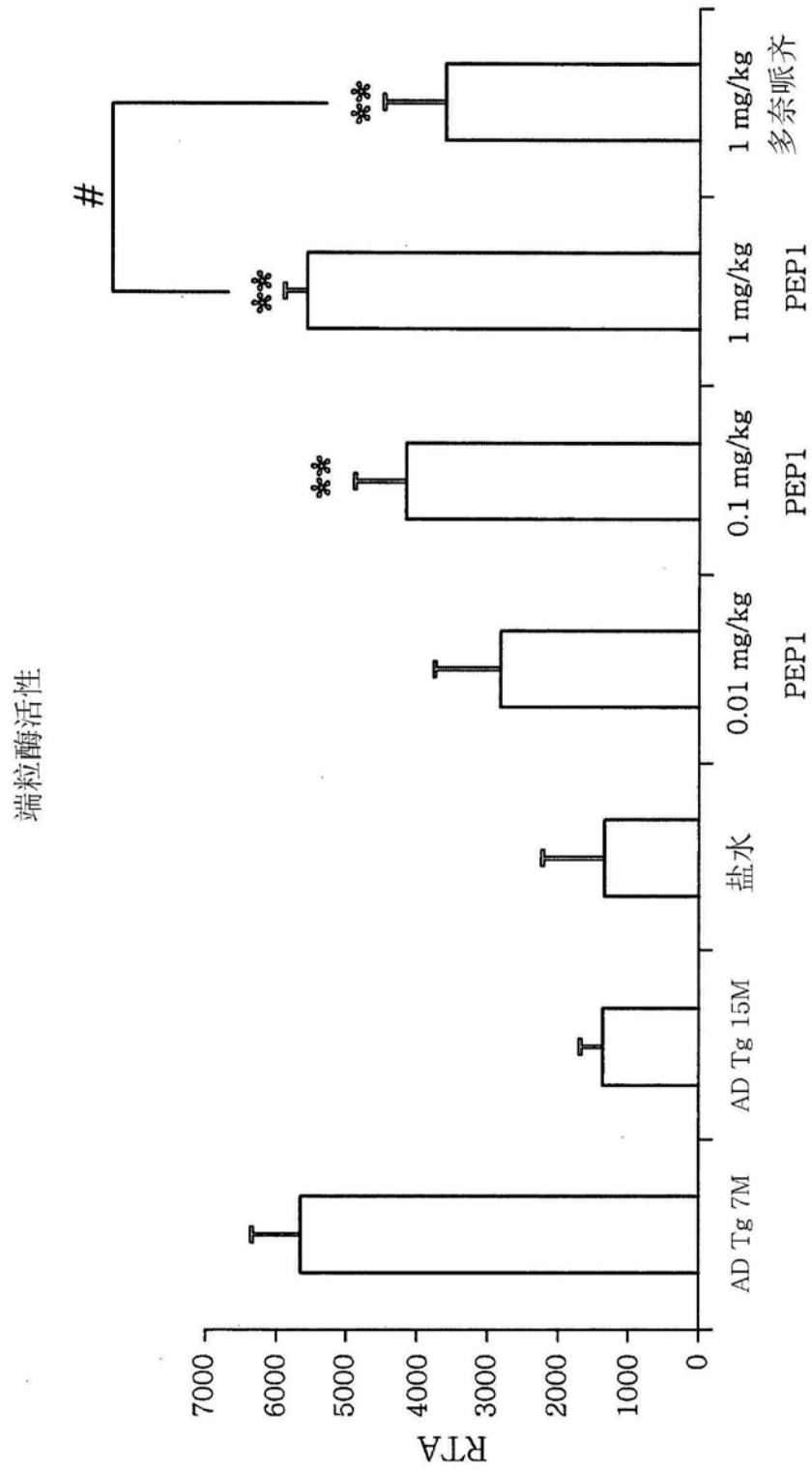


图1

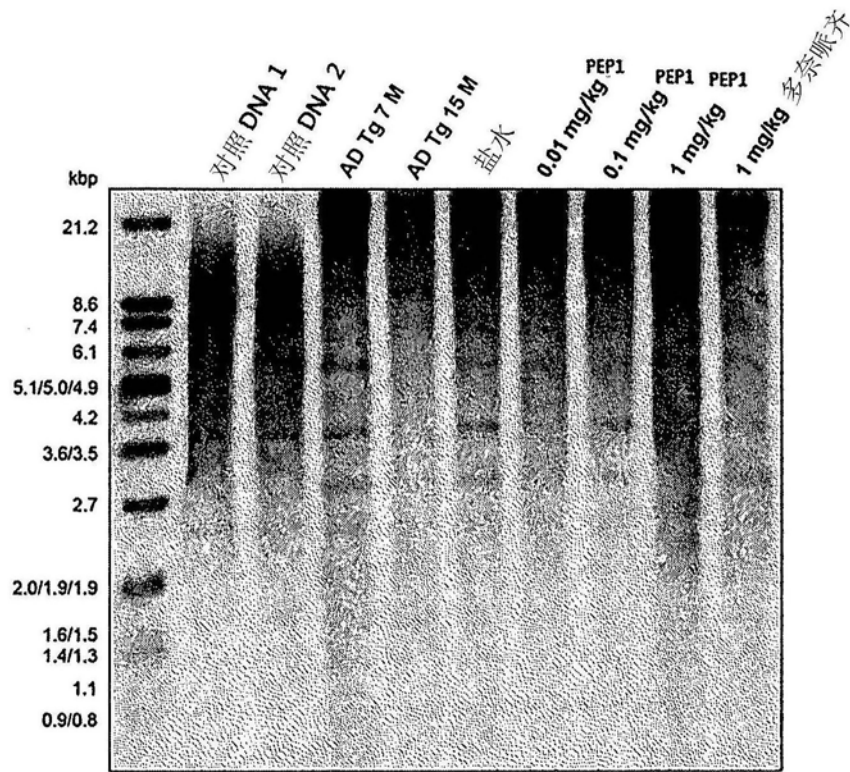


图2

$$RTA = \frac{[AS-AS,0] / AS,IS}{[ATS8-ATS8,0 / ATS8,IS]} \times 100$$

AS : 样品吸光度

AS,0 : 热处理或RNA酶处理的样品的吸光度

AS,IS : 样品内标[IS]的吸光度

ATS8 : 对照模板[TS8]的吸光度

ATS8,0 : 裂解缓冲液的吸光度

ATS8,IS : 对照模板[TS8]内标[IS]的吸光度

图3

	时间	温度	循环
引物延长	10 - 30 min	25°C	1
端粒酶失活		94°C	1
扩增:			
变性	30 s	94°C	1 - 30
退火	30 s	50°C	
聚合	90 s	72°C	
	10 min	72°C	1
保持		4°C	

图4

末端限制片段 (TRF) 的Southern印记

$$\overline{TRF} = \frac{\Sigma(OD_i)}{\Sigma(OD_i/L_i)}$$

OD_i : 化学发光信号

L_i : 位置I的TRF的长度

图5