



(12)发明专利申请

(10)申请公布号 CN 106413734 A

(43)申请公布日 2017.02.15

(21)申请号 201580019288.X

(22)申请日 2015.04.17

(30)优先权数据

1406989.2 2014.04.17 GB

(85)PCT国际申请进入国家阶段日

2016.10.11

(86)PCT国际申请的申请数据

PCT/GB2015/051165 2015.04.17

(87)PCT国际申请的公布数据

W02015/159099 EN 2015.10.22

(71)申请人 富力卡姆股份公司

地址 瑞典伦德

(72)发明人 J.阿伦法尔 P.杜纳 A.H.尼尔森

R.波斯

(74)专利代理机构 北京市柳沈律师事务所

11105

代理人 张文辉

(51)Int.Cl.

A61K 38/04(2006.01)

A61P 17/00(2006.01)

A61K 8/64(2006.01)

A61Q 7/02(2006.01)

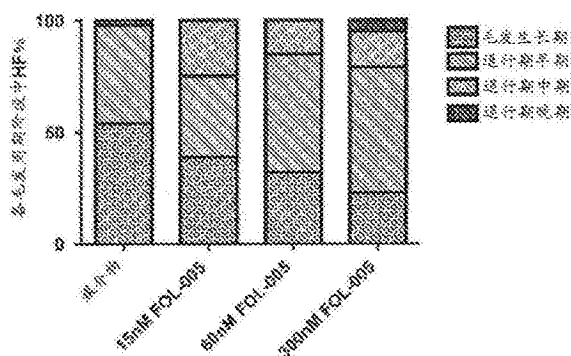
权利要求书11页 说明书25页 附图26页

(54)发明名称

用于抑制毛发生长的包含骨桥蛋白衍生物的组合物

(57)摘要

本发明提供一种用于抑制哺乳动物中的毛发生成的组合物,其包含活性多肽组分和药学上可接受和/或美容学上可接受的赋形剂、载体或稀释剂。本发明进一步提供抑制哺乳动物(例如人类)中的毛发生成的方法。



1. 一种用于抑制哺乳动物中的毛发生成的组合物,其包含:

(a) 包含SEQ ID NO:1的氨基酸序列或其片段或变体或由SEQ ID NO:1的氨基酸序列或其片段或变体组成的多肽

VDTYDGD~~IS~~VVYGLR SEQ ID NO:1

其保持对哺乳动物毛发生成的抑制活性;和

(b) 药学上可接受和/或美容学上可接受的赋形剂、载体、佐剂或稀释剂

其中所述多肽在5个与50个氨基酸长之间。

2. 根据权利要求1所述的用于抑制毛发生成的组合物,其中所述组合物能够抑制人类毛发的生长。

3. 根据权利要求1或2所述的用于抑制毛发生成的组合物,其中所述组合物能够抑制健康皮肤生成毛发。

4. 根据前述权利要求中任一项所述的用于抑制毛发生成的组合物,其中所述组合物能够抑制头皮上的毛发生成。

5. 根据前述权利要求中任一项所述的用于抑制毛发生成的组合物,其中所述组合物能够抑制现有毛囊。

6. 根据前述权利要求中任一项所述的用于抑制毛发生成的组合物,其中所述组合物诱导:

(a) 毛囊中毛发生长期的持续时间的降低(例如,通过诱导毛发生长期至退行期变化);和/或

(b) 毛囊中所述退行期的持续时间的增加;和/或

(c) 毛囊中休止期的持续时间的增加。

7. 根据权利要求6所述的用于抑制毛发生成的组合物,其中所述组合物能够诱导所述毛囊从产生终毛转换至毫毛。

8. 根据前述权利要求中任一项所述的用于抑制毛发生成的组合物,其中所述组合物能够抑制形成新的毛囊或用于产生所述毛囊的干细胞。

9. 根据前述权利要求中任一项所述的用于抑制毛发生成的组合物,其中所述多肽小于40个氨基酸长,例如小于35、30、28、26、24、22、20、19、18、17、16、15、14、13、12、11、10个或更少氨基酸长。

10. 根据权利要求9所述的用于抑制毛发生成的组合物,其中所述多肽在5个与30个氨基酸长之间,例如在5个与20个氨基酸长之间、在5个与20个氨基酸长之间、在8个与20个氨基酸长之间、在8个与16个氨基酸长之间或在10个与15个氨基酸长之间。

11. 根据权利要求10所述的用于抑制毛发生成的组合物,其中所述多肽在10个与15个氨基酸长之间。

12. 根据前述权利要求中任一项所述的用于抑制毛发生成的组合物,其中所述多肽由SEQ ID NO:1的氨基酸序列组成。

13. 根据权利要求1至11中任一项所述的用于抑制毛发生成的组合物,其中所述多肽由SEQ ID NO:2的氨基酸序列组成

VDTYDGD~~IS~~VVYGLS SEQ ID NO:2

14. 根据权利要求1至11中任一项所述的用于抑制毛发生成的组合物,其中所述多肽由

SEQ ID NO:1的氨基酸序列的片段组成。

15. 根据权利要求14所述的用于抑制毛发生成的组合物,其中所述片段为14个或更少氨基酸长,例如13、12、11、10、9、8、7、6或5个氨基酸长。

16. 根据权利要求14或15所述的用于抑制毛发生成的组合物,其中所述片段包含根据SEQ ID NO:3至65中任一个的氨基酸序列或由根据SEQ ID NO:3至65中任一个的氨基酸序列组成

(a) 14个氨基酸的肽:

VDTYDGDISVVYGL	SEQ ID NO:3
DTYDGDISVVYGLR	SEQ ID NO:4
TYDGDISVVYGLRS	SEQ ID NO:5

(b) 13个氨基酸的肽:

VDTYDGDISWYVG	SEQ ID NO: 6
DTYDGDISWYGL	SEQ ID NO: 7
TYDGDISWYGLR	SEQ ID NO: 8
YDGDISWYGLRS	SEQ ID NO: 9

(c) 12个氨基酸的肽:

VDTYDGDISVY	SEQ ID NO: 10
DTYDGDISWYVG	SEQ ID NO: 11
TYDGDISWYGL	SEQ ID NO: 12
YDGDISWYGLR	SEQ ID NO: 13
DGDISWYGLRS	SEQ ID NO: 14

(d) 11个氨基酸的肽:

VDTYDGDISV	SEQ ID NO: 15
DTYDGDISVY	SEQ ID NO: 16
TYDGDISWYVG	SEQ ID NO: 17
YDGDISWYGL	SEQ ID NO: 18
DGDISWYGLR	SEQ ID NO: 19
GDISWYGLRS	SEQ ID NO: 20

(e) 10个氨基酸的肽:

VDTYDGDISV	SEQ ID NO: 21
DTYDGDISV	SEQ ID NO: 22
TYDGDISVY	SEQ ID NO: 23
YDGDISWYVG	SEQ ID NO: 24
DGDISWYGL	SEQ ID NO: 25
GDISWYGLR	SEQ ID NO: 26
DISWYGLRS	SEQ ID NO: 27

(f) 9个氨基酸的肽:

VD TYDGD IS	SEQ ID NO: 28
DTYDGD ISV	SEQ ID NO: 29
TYDGD ISVV	SEQ ID NO: 30
YDGD ISVY	SEQ ID NO: 31
DGD ISVY G	SEQ ID NO: 32
GDISVY GL	SEQ ID NO: 33
DISVY GLR	SEQ ID NO: 34
ISVY GLRS	SEQ ID NO: 35

(g) 8个氨基酸的肽:

VD TYDGD I	SEQ ID NO: 36
DTYDGD IS	SEQ ID NO: 37
TYDGD ISV	SEQ ID NO: 38
YDGD ISVV	SEQ ID NO: 39
DGD ISVY	SEQ ID NO: 40
GDISVY G	SEQ ID NO: 41
DISVY GL	SEQ ID NO: 42
ISVY GLR	SEQ ID NO: 43

(h) 7个氨基酸的肽:

VD TYDGD	SEQ ID NO: 44
DTYDGD I	SEQ ID NO: 45
TYDGD IS	SEQ ID NO: 46
YDGD ISV	SEQ ID NO: 47
DGD ISVV	SEQ ID NO: 48
GDISVY	SEQ ID NO: 49
DISVY G	SEQ ID NO: 50
ISVY GL	SEQ ID NO: 51

(i) 6个氨基酸的肽:

DTYDGD	SEQ ID NO: 52
TYDGD I	SEQ ID NO: 53
YDGD IS	SEQ ID NO: 54
DGD ISV	SEQ ID NO: 55
GDISVV	SEQ ID NO: 56
DISVY	SEQ ID NO: 57
ISVY G	SEQ ID NO: 58

(j) 5个氨基酸的肽:

TYDGD	SEQ ID NO: 59
YDGD I	SEQ ID NO: 60
DGD IS	SEQ ID NO: 61
GDISV	SEQ ID NO: 62
DISVV	SEQ ID NO: 63
ISVVY	SEQ ID NO: 64
SVVY G	SEQ ID NO: 65。

17. 根据权利要求16所述的用于抑制毛发生成的组合物,其中所述片段包含SEQ ID NO:26的氨基酸序列或由SEQ ID NO:26的氨基酸序列组成。

18. 根据前述权利要求中任一项所述的用于抑制毛发生成的组合物,其中所述多肽包

含SEQ ID NO:1的氨基酸序列的变体或其片段或由SEQ ID NO:1的氨基酸序列的变体或其片段组成。

19.根据权利要求18所述的用于抑制毛发生成的组合物,其中所述变体包含与SEQ ID NO:1的氨基酸序列具有至少50%同一性、更优选地与所述序列具有至少60%、70%或80%或85%或90%同一性并且最优选地与所述氨基酸序列具有至少95%、96%、97%、98%或99%同一性的氨基酸序列或由所述氨基酸序列组成。

20.根据权利要求18或19所述的用于抑制毛发生成的组合物,其中所述变体包含SEQ ID NO:1的氨基酸序列或其片段或由SEQ ID NO:1的氨基酸序列或其片段组成,其中一个或多个氨基酸被保守地取代。

21.根据权利要求18至20中任一项所述的用于抑制毛发生成的组合物,其中所述多肽包含在SEQ ID NO:1的氨基酸序列内的N端和/或C端和/或内部插入的一个或多个额外氨基酸或由所述一个或多个额外氨基酸组成。

22.根据权利要求21所述的用于抑制毛发生成的组合物,其中所述多肽包含至少2、3、4、5、6、7、8、9、10、15或20个额外氨基酸或由至少2、3、4、5、6、7、8、9、10、15或20个额外氨基酸组成。

23.根据权利要求22所述的用于抑制毛发生成的组合物,其中所述额外氨基酸为来自野生型人类骨桥蛋白(SEQ ID NO:66)的相应位置的氨基酸。

24.根据权利要求18或19中任一项所述的用于抑制毛发生成的组合物,其中所述多肽包含SEQ ID NO:67的氨基酸序列或其片段或变体或由SEQ ID NO:67的氨基酸序列或其片段或变体组成

VDTYDGRGDSVVYGLR SEQ ID NO:67

25.根据权利要求24所述的用于抑制毛发生成的组合物,其中所述片段包含15个或更少氨基酸长,例如14、13、12、11、10、9、8、7、6或5个氨基酸长。

26.根据权利要求24所述的用于抑制毛发生成的组合物,其中所述多肽包含SEQ ID NO:67的氨基酸序列的变体或其片段或由SEQ ID NO:67的氨基酸序列的变体或其片段组成。

27.根据权利要求26所述的用于抑制毛发生成的组合物,其中所述变体包含与SEQ ID NO:67的氨基酸序列具有至少50%同一性、更优选地与所述序列具有至少60%、70%或80%或85%或90%同一性并且最优选地与所述氨基酸序列具有至少95%、96%、97%、98%或99%同一性的氨基酸序列或由所述氨基酸序列组成。

28.根据权利要求26或27所述的用于抑制毛发生成的组合物,其中所述变体包含SEQ ID NO:67的氨基酸序列或其片段或由SEQ ID NO:67的氨基酸序列或其片段组成,其中一个或多个氨基酸被保守地取代。

29.根据权利要求26或27所述的用于抑制毛发生成的组合物,其中所述变体包含SEQ ID NO:67的氨基酸序列或其片段或由SEQ ID NO:67的氨基酸序列或其片段组成,其中所述RGD序列被失活。

30.根据权利要求26至29中任一项所述的用于抑制毛发生成的组合物,其中所述多肽包含在SEQ ID NO:67的氨基酸序列内的N端和/或C端和/或内部插入的一个或多个额外氨基酸或由所述一个或多个额外氨基酸组成。

31. 根据权利要求30所述的用于抑制毛发生成的组合物,其中所述多肽包含至少2、3、4、5、6、7、8、9、10、15或20个额外氨基酸或由至少2、3、4、5、6、7、8、9、10、15或20个额外氨基酸组成。

32. 根据权利要求31所述的用于抑制毛发生成的组合物,其中所述额外氨基酸为来自野生型人类骨桥蛋白的相应位置的氨基酸。

33. 根据前述权利要求中任一项所述的用于抑制毛发生成的组合物,其中所述多肽包含以下氨基酸序列或由以下氨基酸序列组成:

X1-X2-X3-X4-X5-X6-D-X8-I-X10-X11-X12-Y-G-X15-X16-X17SEQ ID NO:68

其中

X1为V、E、G或K;

X2为D、E、S或P;

X3为任何氨基酸;

X4为Y、P、N或A;

X5为D、N或E;

X6为G或I;

X8为G或不存在;

X10为S或E;

X11为V或L;

X12为V、A或T

X15为L或I;

X16为R或K;以及

X17为R、K或不存在。

34. 根据权利要求18、19和33中任一项所述的用于抑制毛发生成的组合物,其中所述多肽包含SEQ ID NO:69或70的氨基酸序列或其片段或变体或由SEQ ID NO:69或70的氨基酸序列或其片段或变体组成

VDVPNGDISLAYGLR SEQ ID NO:69

DVPNGDISLAYGLRS SEQ ID NO:70

35. 根据权利要求34所述的用于抑制毛发生成的组合物,其中所述片段包含14个或更少氨基酸长,例如13、12、11、10、9、8、7、6或5个氨基酸长。

36. 根据权利要求34或35所述的用于抑制毛发生成的组合物,其中所述片段包含根据SEQ ID NO:71至133中任一个的氨基酸序列或由根据SEQ ID NO:71至133中任一个的氨基酸序列组成

(a) 14个氨基酸的肽:

VDVPNGDISLAYGL

SEQ ID NO:71

DVPNGDISLAYGLR

SEQ ID NO:72

VPNGDISLAYGLRS

SEQ ID NO:73

(b) 13个氨基酸的肽:

VDVPNGDISLAYG	SEQ ID NO: 74
DVPNGDISLAYGL	SEQ ID NO: 75
VPNGDISLAYGLR	SEQ ID NO: 76
PNGDISLAYGLRS	SEQ ID NO: 77

(c) 12个氨基酸的肽:

VDVPNGDISLAY	SEQ ID NO: 78
DVPNGDISLAYG	SEQ ID NO: 79
VPNGDISLAYGL	SEQ ID NO: 80
PNGDISLAYGLR	SEQ ID NO: 81
NGDISLAYGLRS	SEQ ID NO: 82

(d) 11个氨基酸的肽:

VDVPNGDISLA	SEQ ID NO: 83
DVPNGDISLAY	SEQ ID NO: 84
VPNGDISLAYG	SEQ ID NO: 85
PNGDISLAYGL	SEQ ID NO: 86
NGDISLAYGLR	SEQ ID NO: 87
GDISLAYGLRS	SEQ ID NO: 88

(e) 10个氨基酸的肽:

VDVPNGDISL	SEQ ID NO: 89
DVPNGDISLA	SEQ ID NO: 90
VPNGDISLAY	SEQ ID NO: 91
PNGDISLAYG	SEQ ID NO: 92
NGDISLAYGL	SEQ ID NO: 93
GDISLAYGLR	SEQ ID NO: 94
DISLAYGLRS	SEQ ID NO: 95

(f) 9个氨基酸的肽:

VDVPNGDIS	SEQ ID NO: 96
DVPNGDISL	SEQ ID NO: 97
VPNGDISLA	SEQ ID NO: 98
PNGDISLAY	SEQ ID NO: 99
NGDISLAYG	SEQ ID NO: 100
GDISLAYGL	SEQ ID NO: 101
DISLAYGLR	SEQ ID NO: 102
ISLAYGLRS	SEQ ID NO: 103

(g) 8个氨基酸的肽:

VDVPNGDI	SEQ ID NO: 104
DVPNGDIS	SEQ ID NO: 105
VPNGDISL	SEQ ID NO: 106
PNGDISLA	SEQ ID NO: 107
NGDISLAY	SEQ ID NO: 108
GDISLAYG	SEQ ID NO: 109
DISLAYGL	SEQ ID NO: 110
ISLAYGLR	SEQ ID NO: 111

(h) 7个氨基酸的肽:

VDVPNGD	SEQ ID NO: 112
DVPNGDI	SEQ ID NO: 113
VPNGDIS	SEQ ID NO: 114
PNGDISL	SEQ ID NO: 115
NGDISLA	SEQ ID NO: 116
GDISLAY	SEQ ID NO: 117
DISLAYG	SEQ ID NO: 118
ISLAYGL	SEQ ID NO: 119

(i) 6个氨基酸的肽:

DVPNGD	SEQ ID NO: 120
VPNGDI	SEQ ID NO: 121
PNGDIS	SEQ ID NO: 122
NGDISL	SEQ ID NO: 123
GDISLA	SEQ ID NO: 124
DISLAY	SEQ ID NO: 125
ISLAYG	SEQ ID NO: 126

(j) 5个氨基酸的肽:

VPNGD	SEQ ID NO: 127
PNGDI	SEQ ID NO: 128
NGDIS	SEQ ID NO: 129
GDISL	SEQ ID NO: 130
DISLA	SEQ ID NO: 131
ISLAY	SEQ ID NO: 132
SLAYG	SEQ ID NO: 133

37. 根据权利要求36所述的用于抑制毛发生成的组合物, 其中所述片段包含SEQ ID NO:94的氨基酸序列或由SEQ ID NO:94的氨基酸序列组成。

GDISLAYGLR SEQ ID NO:94

38. 根据权利要求34所述的用于抑制毛发生成的组合物, 其中所述多肽包含SEQ ID NO:69或70的氨基酸序列的变体或其片段或由SEQ ID NO:69或70的氨基酸序列的变体或其片段组成。

39. 根据权利要求38所述的用于抑制毛发生成的组合物, 其中所述变体包含与SEQ ID NO:69或70的氨基酸序列具有至少50%同一性、更优选地与所述序列具有至少60%、70%或80%或85%或90%同一性并且最优选地与所述氨基酸序列具有至少95%、96%、97%、98%或99%同一性的氨基酸序列或由所述氨基酸序列组成。

40. 根据权利要求38或39所述的用于抑制毛发生成的组合物, 其中所述变体包含SEQ ID NO:69或70的氨基酸序列或其片段或由SEQ ID NO:69或70的氨基酸序列或其片段组成, 其中一个或多个氨基酸被保守地取代。

41. 根据权利要求38至40中任一项所述的用于抑制毛发生成的组合物, 其中所述多肽包含在SEQ ID NO:69或70的氨基酸序列内的N端和/或C端和/或内部插入的一个或多个额外氨基酸或由所述一个或多个额外氨基酸组成。

42. 根据权利要求41所述的用于抑制毛发生成的组合物, 其中所述多肽包含至少2、3、4、5、6、7、8、9、10、15或20个额外氨基酸或由至少2、3、4、5、6、7、8、9、10、15或20个额外氨基

酸组成。

43. 根据权利要求42所述的用于抑制毛发生成的组合物,其中所述额外氨基酸为来自野生型鼠类骨桥蛋白的相应位置的氨基酸。

44. 根据权利要求38或39中任一项所述的用于抑制毛发生成的组合物,其中所述多肽包含SEQ ID NO:134的氨基酸序列或其片段或变体或由SEQ ID NO:134的氨基酸序列或其片段或变体组成

VDVPNGRGDSLAYGLR SEQ ID NO:135。

45. 根据权利要求44所述的用于抑制毛发生成的组合物,其中所述片段包含15个或更少氨基酸长,例如14、13、12、11、10、9、8、7、6或5个氨基酸长。

46. 根据权利要求44所述的用于抑制毛发生成的组合物,其中所述多肽包含SEQ ID NO:135的氨基酸序列的变体或其片段或由SEQ ID NO:135的氨基酸序列的变体或其片段组成。

47. 根据权利要求46所述的用于抑制毛发生成的组合物,其中所述变体包含与SEQ ID NO:135的氨基酸序列具有至少50%同一性、更优选地与所述序列具有至少60%、70%或80%或85%或90%同一性并且最优选地与所述氨基酸序列具有至少95%、96%、97%、98%或99%同一性的氨基酸序列或由所述氨基酸序列组成。

48. 根据权利要求46或47所述的用于抑制毛发生成的组合物,其中所述变体包含SEQ ID NO:135的氨基酸序列或其片段或由SEQ ID NO:135的氨基酸序列或其片段组成,其中一个或多个氨基酸被保守地取代。

根据权利要求46或47所述的用于抑制毛发生成的组合物,其中所述变体包含SEQ ID NO:135的氨基酸序列或其片段或由SEQ ID NO:135的氨基酸序列或其片段组成,其中所述RGD序列被失活。

49. 根据权利要求46至49中任一项所述的用于抑制毛发生成的组合物,其中所述多肽包含在SEQ ID NO:135的氨基酸序列内的N端和/或C端和/或内部插入的一个或多个额外氨基酸或由所述一个或多个额外氨基酸组成。

50. 根据权利要求49所述的用于抑制毛发生成的组合物,其中所述多肽包含至少2、3、4、5、6、7、8、9、10、15或20个额外氨基酸或由至少2、3、4、5、6、7、8、9、10、15或20个额外氨基酸组成。

51. 根据权利要求49或50所述的用于抑制毛发生成的组合物,其中所述额外氨基酸为来自野生型鼠类骨桥蛋白的相应位置的氨基酸。

52. 根据前述权利要求中任一项所述的用于抑制毛发生成的组合物,其中所述多肽为非天然存在的。

53. 根据前述权利要求中任一项所述的用于抑制毛发生成的组合物,其中所述多肽包含串联重复序列或由串联重复序列组成。

54. 根据权利要求53所述的用于抑制毛发生长的组合物,其中所述串联重复序列包含SEQ ID NO:1至65中任一个或多个的氨基酸序列或由SEQ ID NO:1至65中任一个或多个的氨基酸序列组成。

55. 根据权利要求54所述的用于抑制毛发生长的组合物,其中所述串联重复序列包含SEQ ID NO:1或26的氨基酸序列或由SEQ ID NO:1或26的氨基酸序列组成。

56. 根据权利要求53所述的用于抑制毛发生长的组合物,其中所述串联重复序列包含SEQ ID NO:69至133中任一个或多个的氨基酸序列或由SEQ ID NO:69至133中任一个或多个的氨基酸序列组成。

57. 根据权利要求55所述的用于抑制毛发生长的组合物,其中所述串联重复序列包含SEQ ID NO:69和/或94的氨基酸序列或由SEQ ID NO:69和/或94的氨基酸序列组成。

58. 根据前述权利要求中任一项所述的用于抑制毛发生成的组合物,其中所述多肽在一个或多个氨基酸位置处被修饰或衍生化。

59. 根据权利要求58所述的用于抑制毛发生成的组合物,其中所述多肽在一个或多个氨基酸位置处糖基化。

60. 根据权利要求58所述的用于抑制毛发生成的组合物,其中所述多肽在一个或多个氨基酸位置处PEG化。

61. 根据前述权利要求中任一项所述的用于抑制毛发生成的组合物,其用于局部施用。

62. 根据前述权利要求中任一项所述的用于抑制毛发生成的组合物,其用于经皮施用。

63. 根据前述权利要求中任一项所述的用于抑制毛发生成的组合物,其用于皮内施用。

64. 根据前述权利要求中任一项所述的用于抑制毛发生成的组合物,其中所述哺乳动物为人类。

65. 根据权利要求1至64中任一项所述的用于抑制毛发生成的组合物,其用于治疗或预防与哺乳动物中的不必要和/或过度毛发生长有关的疾病或病症。

66. 根据权利要求65所述的用于抑制毛发生成的组合物,其中所述与不必要和/或过度毛发生长有关的疾病或病症为多毛症。

67. 根据权利要求65或66所述的用于抑制毛发生成的组合物,其中所述与不必要和/或过度毛发生长有关的疾病或病症选自由多囊卵巢综合征(PCOS)(最常见原因先天性肾上腺增生)、库欣氏病、生长激素过量(肢端肥大症)、卵巢中的肿瘤、肾上腺癌、希佩尔-林道病、胰岛素抗性、间质泡膜增殖症(SH)、肥胖、迟发性皮肤卟啉病、药物(如四氢孕三烯酮、苯妥英、米诺地尔)的副作用、激素治疗以及激素病症组成的组。

68. 根据权利要求65所述的用于抑制毛发生成的组合物,其用于治疗或预防哺乳动物中的内生毛发。

69. 根据权利要求68所述的用于抑制毛发生成的组合物,其中所述内生毛发与剃须、上蜡和/或痤疮有关。

70. 根据权利要求1至64中任一项所述的组合物的用途,其用于制备用于治疗或预防与哺乳动物中的不必要和/或过度毛发生成有关的疾病或病症的药剂。

71. 根据权利要求70所述的用途,其中所述与不必要和/或过度毛发生成有关的疾病或病症为多毛症。

72. 根据权利要求70或71所述的用途,其中所述与不必要和/或过度毛发生成有关的疾病或病症选自由多囊卵巢综合征(PCOS)(最常见原因先天性肾上腺增生)、库欣氏病、生长激素过量(肢端肥大症)、卵巢中的肿瘤、肾上腺癌、希佩尔-林道病、胰岛素抗性、间质泡膜增殖症(SH)、肥胖、迟发性皮肤卟啉病、药物(如四氢孕三烯酮、苯妥英、米诺地尔)的副作用、激素治疗以及激素病症组成的组。

73. 根据权利要求70所述的用途,其中所述药剂用于治疗或预防哺乳动物中的内生毛

发。

74. 根据权利要求73所述的用途,其中所述内生毛发与剃须、上蜡和/或痤疮有关。

75. 一种用于治疗或预防哺乳动物中与不必要和/或过度毛发生长有关的疾病或病症的方法,所述方法包括向所述哺乳动物施用有效量的根据权利要求1至64中任一项所述的组合物。

76. 根据权利要求75所述的方法,其中所述与不必要和/或过度毛发生成有关的疾病或病症为多毛症。

77. 根据权利要求75或86所述的方法,其中所述与不必要和/或过度毛发生成有关的疾病或病症选自多囊卵巢综合征(PCOS)(最常见原因先天性肾上腺增生)、库欣氏病、生长激素过量(肢端肥大症)、卵巢中的肿瘤、肾上腺癌、希佩尔-林道病、胰岛素抗性、间质泡膜增殖症(SH)、肥胖、迟发性皮肤卟啉病、药物(如四氢孕三烯酮、苯妥英、米诺地尔)的副作用、激素治疗以及激素病症组成的组。

78. 根据权利要求76所述的方法,其用于治疗或预防哺乳动物中的内生毛发。

79. 根据权利要求78所述的方法,其中所述内生毛发与剃须、上蜡和/或痤疮有关。

80. 根据权利要求75至79中任一项所述的方法,其中所述哺乳动物为人类。

81. 根据权利要求75至80中任一项所述的方法,其中所述哺乳动物为雄性。

82. 根据权利要求75至80中任一项所述的方法,其中所述哺乳动物为雌性。

83. 根据权利要求1至64中任一项所述的组合物的用途,其用于人类中的美容毛发去除。

84. 根据权利要求83所述的用途,其中所述人类为男性。

85. 根据权利要求84所述的用途,其中所述毛发从身体中选自面部(例如面颊、下巴以及在上唇上方)、胸部、肩部、颈部和背部组成的组的区域去除。

86. 根据权利要求83所述的用途,其中所述人类为女性。

87. 根据权利要求86所述的用途,其中所述毛发从身体中选自面部(例如面颊、下巴以及在上唇上方)、背部、腿、臂、手指、脚、脚趾和耻骨组成的组的区域去除。

88. 一种用于人类中的美容毛发去除的方法,其包括向所述人类施用有效量的根据权利要求1至64中任一项所述的组合物。

89. 根据权利要求88所述的方法,其中所述人类为男性。

90. 根据权利要求88或89所述的方法,其中所述毛发从身体中选自面部(例如面颊、下巴以及在上唇上方)、胸部、肩部、颈部和背部组成的组的区域去除。

91. 根据权利要求88所述的方法,其中所述人类为女性。

92. 根据权利要求91所述的方法,其中所述毛发从身体中选自面部(例如面颊、下巴以及在上唇上方)、背部、腿、臂、手指、脚、脚趾和耻骨组成的组的区域去除。

93. 如权利要求1至64中任一项所述的多肽离体或体外用于抑制毛发生成的用途。

94. 根据权利要求93所述的用途,其用于在将皮肤外植体移植至哺乳动物上之前抑制所述外植体上的毛发生长。

95. 根据权利要求93所述的用途,其用于体外抑制生长毛囊(或其干细胞前体)。

96. 一种用于抑制哺乳动物中的毛发生成的组合物,其大致如本文中参考描述和附图所述。

-
97. 一种用途,其大致如本文中参考描述所述。
98. 一种方法,其大致如本文中参考描述所述。

用于抑制毛发生长的包含骨桥蛋白衍生物的组合物

发明领域

[0001] 本发明涉及用于抑制哺乳动物(包括人类)中的毛发生成的治疗。具体说来,提供用于治疗 and 预防不必要或过度毛发生长的医学和美容用途的多肽组合物。

[0002] 背景

[0003] 不必要毛发生长是一种常见问题,尤其对妇女来说,并且最通常为种族背景或遗传的结果。在一小部分妇女中,其可能由雄激素过度产生、对循环雄激素的敏感性增加或其它代谢和内分泌病症引起。大约22%的妇女由于胡须和下巴区域上存在不必要毛发生长而受到影响,并且这可为苦恼来源,导致焦虑、抑郁以及降低的生活质量。

[0004] 不必要毛发生长的潜在原因可变化。大多数为种族或遗传;然而,必须排除雄激素过量的任何迹象,例如体毛增加、不规则月经周期、痤疮、脱发以及皮脂溢。

[0005] 多囊卵巢综合征(PCOS)为雄激素过量的最常见原因,并且70%-80%的具有雄激素过量的患者证明了多毛症,不过这一迹象在亚洲血统的妇女中可能不太普遍。关于多毛症存在强烈的家族性偏好,这主要因为这一群体中的潜在内分泌病症和调节毛发生长的发育的因素具有强烈的遗传组分。

[0006] 患者应被适当地建议关于毛发去除的可用治疗方式。并无单一毛发去除方法适用于所有身体位置或患者,并且所采用的方法将取决于毛发生长的特征、区域和量,以及取决于患者的年龄、潜在疾病或病况和其个人偏好以及所选择的治疗的可能副作用。

[0007] 当然,也应认识到健康个体可能出于纯粹美容原因希望抑制其身体的所选区域上的毛发生长。

[0008] 用于去除过量毛发的治疗选项有限并且可在有效性、不适程度以及成本方面变化。当前用于去除这种不必要毛发的方法包括如拔毛、上蜡(包括糖形式)、脱毛剂、剃须以及家庭电蚀除毛的非处方方法。可在医务室进行的毛发去除方法包括激光去除和强脉冲光(IPL)。额外方式为抑制毛发生长的表面乳膏:依氟鸟氨酸13.9%乳膏(*Vaniqua*®, Shire Pharmaceuticals)。

[0009] 这些方法在介于数天至数月范围内的再生长时间内为暂时的。关于与PCOS有关的多毛症,治疗包括口服避孕药和/或抗雄激素,如螺内酯、醋酸环丙孕酮、氟他胺以及非那雄胺。

[0010] 因此,需要适用于医学和美容应用的用于抑制毛发生长的新的治疗。

[0011] 发明概述

[0012] 本发明的第一方面提供一种用于抑制哺乳动物中的毛发生成的组合物,其包含:

[0013] (a) 包含SEQ ID NO:1的氨基酸序列或其片段或变体或由SEQ ID NO:1的氨基酸序列或其片段或变体组成的多肽

[0014] VDTYDGDISVYGLR SEQ ID NO:1 [“FOL-005”]

[0015] 其保持对哺乳动物毛发生成的抑制活性;和

[0016] (b) 药学上可接受和/或美容学上可接受的赋形剂、载体、佐剂或稀释剂。

[0017] 其中所述多肽在5个与50个氨基酸长之间

[0018] 存在于本发明组合物中的多肽能够抑制哺乳动物中的毛发生成。

[0019] “抑制毛发生成”意指所述组合物能够降低、削弱、预防或消除施用所述组合物的哺乳动物中的以下毛发生成参数中的一个或多个：

[0020] (a) 来自现有毛囊的个别毛发的生长；和/或

[0021] (b) 来自现有毛囊的个别毛发的厚度；和/或

[0022] (c) 现有毛囊的数目和/或密度；和/或

[0023] (d) 新的毛囊的产生；和/或

[0024] (e) 毛囊的毛发生长期的持续时间；和/或

[0025] (f) 现有毛囊的色素沉着。

[0026] 应了解，所述抑制作用可相对于在本发明组合物不存在的情况下哺乳动物中的毛发生成为完全或部分的。例如，所述组合物可减慢但不会完全地阻止现有毛囊的毛发生长。

[0027] 有利的是，所述组合物能够体内抑制毛发的产生。

[0028] 在一个实施方案中，所述组合物能够抑制人类毛发的生长。

[0029] 在另一实施方案中，所述组合物能够抑制健康皮肤的毛发生成。

[0030] 在另一实施方案中，所述组合物能够抑制头皮上的毛发生成。

[0031] 如上文详述，本发明组合物对毛发生成的抑制可通过对现有毛囊的抑制效应和/或通过抑制新的毛囊的形成来介导。

[0032] 因此，在一个实施方案中，所述多肽能够通过诱导以下来抑制现有毛囊：

[0033] (a) 毛囊中毛发生长期的持续时间的降低（例如，通过诱导毛发生长期至退行期变化）；和/或

[0034] (b) 毛囊中所述退行期的持续时间的增加；和/或

[0035] (c) 毛囊中休止期的持续时间的增加。

[0036] 例如，多肽可能通过诱导现有毛囊中从毛发生长期至退行期和/或休止期的转变来抑制现有毛囊，因此终止所述毛囊的活性毛发生长）。

[0037] 本发明组合物中的多肽组分与天然存在的骨桥蛋白的子区共享氨基酸序列相似性。因此，至少在一些实施方案中，活性多肽组分可被视为天然存在的骨桥蛋白的活性片段或如片段的变体（即，所述多肽包含对应于天然存在的骨桥蛋白的片段的修饰（例如突变）形式的氨基酸序列的氨基酸序列）。

[0038] 骨桥蛋白还称为骨唾液酸糖蛋白 I (BSP-1 或 BNSP)、早期 T-淋巴细胞活化 (ETA-1)、分泌磷蛋白 1 (SPPI)、2ar 和立克次氏体抵抗 (Ric)，是在数种哺乳动物物种中保守的基因产物。

[0039] 该基因具有七种外显子，跨 5 千碱基长度并且在人类中，其位于染色体 4 区 13 (4q13) 的长臂上。蛋白由约 300 个氨基酸残基构成并且富含酸性残基：30–36% 为天冬氨酸或谷氨酸。骨桥蛋白具有约 30 个附接的碳水化合物残基，包括 10 个唾液酸残基，该碳水化合物残基在高尔基体中的翻译后修饰期间附接于所述蛋白。

[0040] 骨桥蛋白最初作为矿化骨基质上的骨锚定破骨细胞中的新颖唾液酸糖蛋白被发现 (Franzen 和 Heinegard, 1985, Biochem. J. 232 (3) 715–24)。名称骨桥蛋白来自骨中（骨-）蛋白的存在和其在骨细胞与矿物相之间形成桥（桥-）的能力。序列分析和后续结构研究显示骨桥蛋白是由大约十个天冬氨酸残基的高度酸性区域构成的 32 kDa 糖蛋白，该残基被认

为介导骨桥蛋白的矿物结合特性。此外,在骨桥蛋白分子的中间部分中,还存在通过R-G-D序列介导的细胞附着结构域(Oldberg等人,1986,Proc.Natl.Acad.Sci.USA 83(23):8819-23,其公开内容以引用的方式并入本文)。

[0041] 骨桥蛋白在成骨细胞中并且在数种上皮细胞类型中组成性地表达,导致骨桥蛋白被分泌至多种体液中。骨是其中沉积骨桥蛋白并且可大量回收骨桥蛋白的唯一组织类型。骨桥蛋白的表达也可在血管平滑肌细胞中,在不同癌细胞类型中并且在发炎细胞(尤其巨噬细胞和T淋巴细胞)中诱导。数种重要的细胞功能已经归因于骨桥蛋白,如粘着、增殖、迁移、抗细胞凋亡以及化学吸引。这些功能中的一些被认为经由RGD细胞粘着结构域介导,该结构域与不同整合素,主要与 $\alpha v \beta 3$ 以及 $\alpha v \beta 1$ 和 $\alpha v \beta 5$ 相互作用(关于回顾,参看Scatena等人,2007,Arterio.Thromb.Vasc.Biol.27:2302-2309)。

[0042] 近年来,骨桥蛋白已经作为能够调节发炎和免疫反应中所牵涉的数种细胞类型的有效细胞因子出现。归因于骨桥蛋白的功能的广泛范围已经使人费解并且无法全部由单细胞结合RGD序列解释。当骨桥蛋白中十一个氨基酸的肽 $R^{145}-G-D-S-L-A-Y-G-L-R-S^{155}$ (SEQ ID NO:135)(对应于UniProt码P10923的氨基酸144至154)得到鉴定并且后来进行功能映射时,该解释成立。除了介导接合至 $\alpha v \beta 3$ 整合素的已知 $R^{145}-G-D^{147}$ 位点以外,还发现骨桥蛋白分子中的两个额外基本区域,即高度特异性凝血酶裂解位点(即 $R^{154}-S^{155}$),和隐藏整合素结合位点(即 $S^{148}-L-A-Y-G-L-R^{154}$ (SEQ ID NO:136)),天气隐藏整合素结合位点结合于 $\alpha 9 \beta 1$ 整合素(参看Scatena等人,同上)。也已经鉴定关于 $\alpha 4 \beta 1$ 的额外结合位点(参看Scatena等人,同上)。

[0043] 天然存在的骨桥蛋白典型地为大约300个氨基酸长。然而,本发明组合物的多肽组分的长度显著较短,仅为5至50个氨基酸。

[0044] 因此,所述多肽小于50个氨基酸长,例如小于35、30、28、26、24、22、20、19、18、17、16、15、14、13、12、11或10个氨基酸长。

[0045] 在一个实施方案中,所述多肽在5个与30个氨基酸长之间,例如在5个与20个氨基酸长之间、在5个与20个氨基酸长之间、在8个与20个氨基酸长之间、在8个与16个氨基酸长之间或在10个与15个氨基酸长之间。

[0046] 如本文所用的术语‘氨基酸’包括标准二十种遗传编码氨基酸和其呈‘D’形式的对应立体异构体(如与天然‘L’形式相比)、 ω -氨基酸和其它天然存在的氨基酸、非常规氨基酸(例如 α, α -二取代氨基酸、N-烷基氨基酸等)以及化学衍生化氨基酸(参看下文)。

[0047] 当特定地列举氨基酸,如‘丙氨酸’或‘Ala’或‘A’时,除非另外明确陈述,否则所述术语是指L-丙氨酸和D-丙氨酸。其它非常规氨基酸也可用于本发明多肽的合适组分,只要所述多肽保持所需的功能特性。关于所示的多肽,各编码氨基酸残基适当由单字母标识表示,对应于常规氨基酸的俗名。

[0048] 根据惯例,本文所公开的氨基酸序列沿N端至C端方向提供。

[0049] 典型地,本发明组合物中所用的多肽包含L-氨基酸或由L-氨基酸组成。

[0050] 在一个优选实施方案中,本发明组合物的多肽组分由SEQ ID NO:1的氨基酸序列组成。

[0051] 在一替代实施方案中,本发明组合物的多肽组分由SEQ ID NO:2的氨基酸序列组成。

[0052] VDTYDGDISVVYGLS SEQ ID NO:2

[0053] 在另一实施方案中,所述多肽可包含SEQ ID NO:1的氨基酸序列中保持(至少部分地)对毛发生成的抑制活性的片段或由所述片段组成。

[0054] “片段”包括SEQ ID NO:1的氨基酸序列的至少5个相邻氨基酸,例如SEQ ID NO:1的至少6、7、8、9、10、11、12、13或14个相邻氨基酸。因此,所述片段可为14个或更少氨基酸长,例如13、12、11、10、9、8、7、6或5个氨基酸长

[0055] 在示例性实施方案中,所述片段包含根据SEQ ID NO:3至65中任一个的氨基酸序列或由根据SEQ ID NO:3至65中任一个的氨基酸序列组成

[0056] (a) 14个氨基酸的肽:

[0057] VDTYDGDISVVYGL SEQ ID NO:3

[0058] DTYDGDISVVYGLR SEQ ID NO:4

[0059] TYDGDISVVYGLRS SEQ ID NO:5

[0060] (b) 13个氨基酸的肽:

	VDTYDGDISVVYGL	SEQ ID NO: 6
	DTYDGDISVVYGL	SEQ ID NO: 7
[0061]	TYDGDISVVYGLR	SEQ ID NO: 8
	YDGDISVVYGLRS	SEQ ID NO: 9

[0062] (c) 12个氨基酸的肽:

	VDTYDGDISVVY	SEQ ID NO: 10
	DTYDGDISVVYGL	SEQ ID NO: 11
[0063]	TYDGDISVVYGL	SEQ ID NO: 12
	YDGDISVVYGLR	SEQ ID NO: 13
	DGDISVVYGLRS	SEQ ID NO: 14

[0064] (d) 11个氨基酸的肽:

	VDTYDGDISVV	SEQ ID NO: 15
	DTYDGDISVVY	SEQ ID NO: 16
[0065]	TYDGDISVVYGL	SEQ ID NO: 17
	YDGDISVVYGL	SEQ ID NO: 18
	DGDISVVYGLR	SEQ ID NO: 19
[0066]	GDISVVYGLRS	SEQ ID NO: 20

[0067] (e) 10个氨基酸的肽:

	VDTYDGDISV	SEQ ID NO: 21
	DTYDGDISVV	SEQ ID NO: 22
	TYDGDISVVY	SEQ ID NO: 23
[0068]	YDGDISVVYGL	SEQ ID NO: 24
	DGDISVVYGL	SEQ ID NO: 25
	GDISVVYGLR	SEQ ID NO: 26
	DISVVYGLRS	SEQ ID NO: 27

[0069] (f) 9个氨基酸的肽:

	VDTYDGDIS	SEQ ID NO: 28
	DTYDGDISV	SEQ ID NO: 29
	TYDGDISVV	SEQ ID NO: 30
[0070]	YDGDISVY	SEQ ID NO: 31
	DGDISVYV	SEQ ID NO: 32
	GDISVYGL	SEQ ID NO: 33
	DISVYGLR	SEQ ID NO: 34
	ISVYGLRS	SEQ ID NO: 35
[0071]	(g) 8个氨基酸的肽:	
	VDTYDGGDI	SEQ ID NO: 36
	DTYDGGDIS	SEQ ID NO: 37
	TYDGGDISV	SEQ ID NO: 38
[0072]	YDGGDISVV	SEQ ID NO: 39
	DGGDISVVY	SEQ ID NO: 40
	GDISVVYV	SEQ ID NO: 41
	DISVVYGL	SEQ ID NO: 42
	ISVVYGLR	SEQ ID NO: 43
[0073]	(h) 7个氨基酸的肽:	
	VDTYDGD	SEQ ID NO: 44
	DTYDGGDI	SEQ ID NO: 45
	TYDGGDIS	SEQ ID NO: 46
[0074]	YDGGDISV	SEQ ID NO: 47
	DGGDISVV	SEQ ID NO: 48
	GDISVVY	SEQ ID NO: 49
	DISVVYV	SEQ ID NO: 50
	ISVVYGL	SEQ ID NO: 51
[0075]	(i) 6个氨基酸的肽:	
	DTYDGD	SEQ ID NO: 52
	TYDGGDI	SEQ ID NO: 53
	YDGGDIS	SEQ ID NO: 54
[0076]	DGGDISV	SEQ ID NO: 55
	GDISVV	SEQ ID NO: 56
	DISVVY	SEQ ID NO: 57
	ISVVYV	SEQ ID NO: 58
[0077]	(j) 5个氨基酸的肽:	
	TYDGD	SEQ ID NO: 59
	YDGGDI	SEQ ID NO: 60
	DGGDIS	SEQ ID NO: 61
[0078]	GDISV	SEQ ID NO: 62
	DISVV	SEQ ID NO: 63
	ISVVY	SEQ ID NO: 64
	SVVYV	SEQ ID NO: 65。

[0079] 例如,所述片段可包含SEQ ID NO:26的氨基酸序列或由SEQ ID NO:26的氨基酸序列组成。

[0080] 或者,本发明组合物可包含多肽,所述多肽包含SEQ ID NO:1的氨基酸序列的变体或其片段或由SEQ ID NO:1的氨基酸序列的变体或其片段组成,其保持(至少部分地)对毛发生成的抑制活性。

[0081] “变体”意指所述多肽并未与SEQ ID NO:1共享100%氨基酸序列同一性,即SEQ ID NO:1的一个或多个氨基酸必定突变。例如,所述多肽可包含与SEQ ID NO:1的氨基酸序列具有至少50%同一性、更优选地与所述序列具有至少60%、70%或80%或85%或90%同一性并且最优选地与所述氨基酸序列具有至少95%、96%、97%、98%或99%同一性的氨基酸序列或由所述氨基酸序列组成。

[0082] 百分比同一性可通过所属领域中众所周知的方法,例如在Expasy实验室位点

[0083] (http://www.ch.embnet.org/software/LALIGN_form.html)使用LALIGN程序(Huang和Miller,Adv.Appl.Math.(1991)12:337-357)使用全局比对选项计分矩阵BLOSUM62、开放间隙罚分-14、延伸间隙罚分-4作为参数来确定。

[0084] 或者,两种多肽之间的百分比序列同一性可使用合适的计算机程序,例如威斯康星大学遗传计算小组的GAP程序来确定并且应了解百分比同一性是相对于其序列已经进行最佳比对的多肽来计算。

[0085] “突变”意指在规定位置处的氨基酸与根据SEQ ID NO:1的多肽中的氨基酸相比发生改变。例如,在规定位置处的氨基酸可缺失、被取代或可为一种或多种氨基酸的插入/添加位点。所属领域的技术人员应了解,取代可为保守或非保守的。

[0086] 或者或另外,在规定位置处的氨基酸可进行化学修饰(衍生化);参看下文。

[0087] 在一个实施方案中,变体多肽包含SEQ ID NO:1的氨基酸序列或其片段或由SEQ ID NO:1的氨基酸序列或其片段组成,其中一个或多个氨基酸被保守地取代。“保守地取代”意指一种氨基酸用具有相似特性(大小、疏水性等)的另一氨基酸取代,使得所述多肽的功能未显著改变。因此,“保守取代”为预期组合,如Gly、Ala;Val、Ile、Leu;Asp、Glu;Asn、Gln;Ser、Thr;Lys、Arg;以及Phe、Tyr。

[0088] 所属领域的技术人员应了解,变体多肽可包含在SEQ ID NO:1的氨基酸序列内的N端和/或C端和/或内部插入的一个或多个额外氨基酸。例如,所述多肽可包含在N端和/或C端和/或内部的至少2、3、4、5、6、7、8、9、10、15或20个额外氨基酸或由在N端和/或C端和/或内部的至少2、3、4、5、6、7、8、9、10、15或20个额外氨基酸组成。所述变体多肽可为天然存在或非天然存在的。

[0089] 在一个优选实施方案中,所述额外氨基酸为来自野生型人类骨桥蛋白的相应位置的氨基酸,所述野生型人类骨桥蛋白即GenBank:AAA59974.1[SEQ ID NO:66](其中与SEQ ID NO:1具有最高序列相似性的区域以斜体形式加下划线):

[0090]

MRIAVICFLLGITCAIPVKQADSGSSEEEKQLYNKYPDAVATWLNPDPSQKQNLAPQTLPSKSNESHDMDDMDDE
DDDDHVDSQDSIDSNDSDDVDVDDTDDSHQSDESHHSDESDELVTDFPTDLPATEVFTPVVPT
VDTYDGRGDSVYGLR

SKSKKFRRPDIQYPDATDEDITSHMESEELNGAYKAIPVAQDLNAPSDWDSRGKDSYETSQLDDQSAETHSHKQSRL
YKRKANDESNEHSDVIDSQELSKVSREFHSHEFHSHEDMLVVDPKSKEEDKHLKFRISHELDSASSEVN

[0091] SEQ ID NO:66

[0092] 所述野生型人类骨桥蛋白的“相应位置”意指所述额外氨基酸与存在于以上野生型人类骨桥蛋白中的相等位置中的那些相同(如果设想SEQ ID NO:1的氨基酸序列置换SEQ ID NO:66中以斜体形式加下划线的序列)。例如,所述多肽可包含在SEQ ID NO:1的氨基端的三个氨基酸VPT-和/或在SEQ ID NO:1的羧基端的五个氨基酸-SKSKK。

[0093] 在另一实施方案中,变体多肽序列可包含SEQ ID NO:67的氨基酸序列或其片段或变体或由SEQ ID NO:67的氨基酸序列或其片段或变体组成

[0094] VDTYDGRGDSVVYGLR SEQ ID NO:67

[0095] 合适的片段可由SEQ ID NO:67的15个或更少的连续氨基酸,例如SEQ ID NO:67的14、13、12、11、10、9、8、7、6或5个氨基酸连续氨基酸组成。

[0096] 同样,合适变体(如上文所定义)可包含与SEQ ID NO:67的氨基酸序列具有至少50%同一性、更优选地与所述序列具有至少60%、70%或80%或85%或90%同一性并且最优选地与所述氨基酸序列具有至少95%、96%、97%、98%或99%同一性的氨基酸序列或由所述氨基酸序列组成。

[0097] 在一个实施方案中,所述变体包含SEQ ID NO:67的氨基酸序列或其片段或由SEQ ID NO:67的氨基酸序列或其片段组成,其中所述RGD序列被失活。

[0098] 通常发现于天然存在的骨桥蛋白中的活性三肽序列“精氨酸-甘氨酸-天冬氨酸”可通过多种不同策略被失活。在一个实施方案中,RGD结构域在所述多肽中的一个或多个氨基酸处突变,使得其相对于天然存在的骨桥蛋白含有一个或多个缺失、取代和/或添加或其组合。例如,RGD结构域可至少部分地缺失,使得精氨酸和/或甘氨酸和/或天冬氨酸残基不存在。

[0099] 或者或另外,RGD结构域可在一个或多个氨基酸处被取代。例如,精氨酸和/或甘氨酸和/或天冬氨酸残基可用另一氨基酸取代。该取代可为保守或非保守的。

[0100] 同样,RGD结构域可通过取代和缺失的组合被失活,该组合包括:

[0101] (a) 精氨酸残基的取代和甘氨酸和天冬氨酸残基的缺失;

[0102] (b) 精氨酸和甘氨酸残基的取代和天冬氨酸残基的缺失(例如,-RGD-三肽可用二肽序列-DI-置换);

[0103] (c) 精氨酸和天冬氨酸残基的取代和甘氨酸残基的缺失;或

[0104] (d) 精氨酸和天冬氨酸残基的缺失和甘氨酸残基的取代。

[0105] 在一个实施方案中,三肽-RGD-序列由二肽-DI-序列置换。

[0106] 不希望受理论束缚,相信所述RGD序列的被失活可导致骨桥蛋白多肽(相对于相应的天然存在的骨桥蛋白)的构象变化,从而导致新的位点产生/暴露于周围环境。

[0107] 本发明组合物的上文定义的多肽组分源于人类骨桥蛋白的氨基酸序列和其突变变体。然而,所属领域的技术人员应了解所述多肽或者可为SEQ ID NO:1的氨基酸序列的物种同系物(例如,来自小鼠、牛、猪、兔、大鼠等的同系物)。

[0108] SEQ ID NO:1的所述物种同系物的氨基酸序列可由下式表示:

[0109] X1-X2-X3-X4-X5-X6-D-X8-I-X10-X11-X12-Y-G-X15-X16-X17

[0110] SEQ ID NO:68

[0111] 其中

[0112] X1为V、E、G或K;

[0113] X2为D、E、S或P；

[0114] X3为任何氨基酸(例如T、V、P、A或L)；

[0115] X4为Y、P、N或A；

[0116] X5为D、N或E；

[0117] X6为G或I；

[0118] X8为G或不存在；

[0119] X10为S或E；

[0120] X11为V或L；

[0121] X12为V、A或T；

[0122] X15为L或I；

[0123] X16为R或K；以及

[0124] X17为R、K或不存在。

[0125] 所属领域的技术人员应了解,变体多肽可包含在氨基酸序列SEQ ID NO:68内的N端和/或C端和/或内部添加的一个或多个额外氨基酸。例如,所述多肽可包含在N端和/或C端和/或内部的至少2、3、4、5、6、7、8、9、10、15或20个额外氨基酸或由在N端和/或C端和/或内部的至少2、3、4、5、6、7、8、9、10、15或20个额外氨基酸组成。在一个优选实施方案中,所述额外氨基酸为来自野生型骨桥蛋白(即,来自人类、小鼠、牛、猪、兔、大鼠等)的相应位置的氨基酸。

[0126] 因此,在一个实施方案中,所述多肽为鼠类同系物,其包含SEQ ID NO:69或70的氨基酸序列或其片段或变体或由SEQ ID NO:69或70的氨基酸序列或其片段或变体组成:

[0127] VDVPNGDISLAYGLR SEQ ID NO:69

[0128] DVPNGDISLAYGLRS SEQ ID NO:70

[0129] 合适的片段可由SEQ ID NO:69或70的14个或更少的连续氨基酸,例如SEQ ID NO:69或70的13、12、11、10、9、8、7、6或5个氨基酸连续氨基酸组成。

[0130] 例如,所述片段可包含根据SEQ ID NO:71至133中任一个的氨基酸序列或由根据SEQ ID NO:71至133中任一个的氨基酸序列组成:

[0131] (a) 14个氨基酸的肽:

[0132] VDVPNGDISLAYGL SEQ ID NO:71

[0133] DVPNGDISLAYGLR SEQ ID NO:72

[0134] VPNGDISLAYGLRS SEQ ID NO:73

[0135] (b) 13个氨基酸的肽:

[0136] VDVPNGDISLAYG SEQ ID NO: 74

DVPNGDISLAYGL SEQ ID NO: 75

VPNGDISLAYGLR SEQ ID NO: 76

PNGDISLAYGLRS SEQ ID NO: 77

[0137] (c) 12个氨基酸的肽:

	VDVPNGDISLAY	SEQ ID NO: 78
	DVPNGDISLAYG	SEQ ID NO: 79
[0138]	VPNGDISLAYGL	SEQ ID NO: 80
	PNGDISLAYGLR	SEQ ID NO: 81
	NGDISLAYGLRS	SEQ ID NO: 82
[0139]	(d) 11个氨基酸的肽:	
	VDVPNGDISLA	SEQ ID NO: 83
	DVPNGDISLAY	SEQ ID NO: 84
[0140]	VPNGDISLAYG	SEQ ID NO: 85
	PNGDISLAYGL	SEQ ID NO: 86
	NGDISLAYGLR	SEQ ID NO: 87
	GDISLAYGLRS	SEQ ID NO: 88
[0141]	(e) 10个氨基酸的肽:	
	VDVPNGDISL	SEQ ID NO: 89
	DVPNGDISLA	SEQ ID NO: 90
	VPNGDISLAY	SEQ ID NO: 91
[0142]	PNGDISLAYG	SEQ ID NO: 92
	NGDISLAYGL	SEQ ID NO: 93
	GDISLAYGLR	SEQ ID NO: 94
	DISLAYGLRS	SEQ ID NO: 95
[0143]	(f) 9个氨基酸的肽:	
	VDVPNGDIS	SEQ ID NO: 96
	DVPNGDISL	SEQ ID NO: 97
	VPNGDISLA	SEQ ID NO: 98
[0144]	PNGDISLAY	SEQ ID NO: 99
	NGDISLAYG	SEQ ID NO: 100
	GDISLAYGL	SEQ ID NO: 101
	DISLAYGLR	SEQ ID NO: 102
	ISLAYGLRS	SEQ ID NO: 103
[0145]	(g) 8个氨基酸的肽:	
	VDVPNGDI	SEQ ID NO: 104
	DVPNGDIS	SEQ ID NO: 105
	VPNGDISL	SEQ ID NO: 106
[0146]	PNGDISLA	SEQ ID NO: 107
	NGDISLAY	SEQ ID NO: 108
	GDISLAYG	SEQ ID NO: 109
	DISLAYGL	SEQ ID NO: 110
	ISLAYGLR	SEQ ID NO: 111
[0147]	(h) 7个氨基酸的肽:	

	VDVPNGD	SEQ ID NO: 112
	DVPNGDI	SEQ ID NO: 113
	VPNGDIS	SEQ ID NO: 114
[0148]	PNGDISL	SEQ ID NO: 115
	NGDISLA	SEQ ID NO: 116
	GDISLAY	SEQ ID NO: 117
	DISLAYG	SEQ ID NO: 118
	ISLAYGL	SEQ ID NO: 119

[0149] (i) 6个氨基酸的肽:

	DVPNGD	SEQ ID NO: 120
	VPNGDI	SEQ ID NO: 121
	PNGDIS	SEQ ID NO: 122
[0150]	NGDISL	SEQ ID NO: 123
	GDISLA	SEQ ID NO: 124
	DISLAY	SEQ ID NO: 125
	ISLAYG	SEQ ID NO: 126

[0151] (j) 5个氨基酸的肽:

	VPNGD	SEQ ID NO: 127
	PNGDI	SEQ ID NO: 128
	NGDIS	SEQ ID NO: 129
[0152]	GDISL	SEQ ID NO: 130
	DISLA	SEQ ID NO: 131
	ISLAY	SEQ ID NO: 132
	SLAYG	SEQ ID NO: 133

[0153] 在实施方案中,所述片段包含SEQ ID NO:94的氨基酸序列或由SEQ ID NO:94的氨基酸序列组成。

[0154] 同样,所述多肽可包含SEQ ID NO:69或70的氨基酸序列的变体或其片段或由SEQ ID NO:69或70的氨基酸序列的变体或其片段组成。

[0155] 合适变体(如上文所定义)可包含与SEQ ID NO:69或70的氨基酸序列具有至少50%同一性、更优选地与所述序列具有至少60%、70%或80%或85%或90%同一性并且最优选地与所述氨基酸序列具有至少95%、96%、97%、98%或99%同一性的氨基酸序列或由所述氨基酸序列组成。

[0156] 所述变体可包含SEQ ID NO:69或70的氨基酸序列或其片段或由SEQ ID NO:69或70的氨基酸序列或其片段组成,其中一个或多个氨基酸被保守地取代。

[0157] 任选地,所述多肽可包含在SEQ ID NO:69或70的氨基酸序列内的N端和/或C端和/或内部插入的一个或多个额外氨基酸或由所述一个或多个额外氨基酸组成。例如,所述多肽可包含至少2、3、4、5、6、7、8、9、10、15或20个额外氨基酸或由至少2、3、4、5、6、7、8、9、10、15或20个额外氨基酸组成,所述额外氨基酸可来自野生型鼠类骨桥蛋白的相应位置,所述野生型鼠类骨桥蛋白即NCBI参考序列:NP_001191162.1 [SEQ ID NO:134] (其中与SEQ ID NO:68具有最高序列相似性的区域以斜体形式加下划线):

[0158]

MRLAVICFCLFGIASSLPVKVTDGSGSSEKLYSLHPDPIATWLVPDPSQKQKQKLLAPQNAVSSSEKDDFKQETLPSNS
NESHDMDDDDDDDDDDGDHAESEDSVDSDESDESHHSDESDETVTASTQADTFPTPIVPT

VDVPNGRGDSLAYGLR

SKSRSFQVSDEQYPDATDEDLTSHMKSGESKESLDVIPVAQLLSMPDQDNNGKGSHESSQLDEPSLETHRLEHSKE
SQESADQSDVIDSQASSKASLEHQSHKFHSHKDKLVLDPKSKEDDRYLKFRISHELESSSSEVN SEQ ID NO:
134

[0159] 在一个实施方案中,所述多肽包含SEQ ID NO:135的氨基酸序列或其片段或变体或由SEQ ID NO:135的氨基酸序列或其片段或变体组成

[0160] VDVPNGRGDSLAYGLR SEQ ID NO:135

[0161] 合适的片段可由SEQ ID NO:135的15个或更少的连续氨基酸,例如SEQ ID NO:135的14、13、12、11、10、9、8、7、6或5个氨基酸连续氨基酸组成。

[0162] 同样,合适变体(如上文所定义)可包含与SEQ ID NO:135的氨基酸序列具有至少50%同一性、更优选地与所述序列具有至少60%、70%或80%或85%或90%同一性并且最优选地与所述氨基酸序列具有至少95%、96%、97%、98%或99%同一性的氨基酸序列或由所述氨基酸序列组成。

[0163] 在一个实施方案中,所述变体包含SEQ ID NO:135的氨基酸序列或其片段或由SEQ ID NO:135的氨基酸序列或其片段组成,其中所述RGD序列被失活。

[0164] 在本发明组合物的另一实施方案中,所述多肽包含串联重复序列或由串联重复序列组成。

[0165] 因此,所述串联重复序列可包含SEQ ID NO:1至65中任一个或多个的氨基酸序列或由SEQ ID NO:1至65中任一个或多个的氨基酸序列组成(例如,所述串联重复序列可包含SEQ ID NO:1或26的氨基酸序列或由SEQ ID NO:1或26的氨基酸序列组成)。

[0166] 或者,所述串联重复序列可包含SEQ ID NO:69至133中任一个或多个的氨基酸序列或由SEQ ID NO:69至133中任一个或多个的氨基酸序列组成(例如,所述串联重复序列可包含SEQ ID NO:69和/或94的氨基酸序列或由SEQ ID NO:69和/或94的氨基酸序列组成)。

[0167] 所属领域的技术人员应了解,本发明组合物的多肽组分可在一个或多个氨基酸位置处进行修饰或衍生化。

[0168] 一个或多个氨基酸的化学衍生物可通过与功能性侧基反应来实现。所述衍生化分子包括例如其中自由氨基已经衍生化以形成胺盐酸盐、对甲苯磺酰基、羧基苯甲酰氧基、叔丁氧基羰基、氯乙酰基或甲酰基的那些分子。自由羧基可衍生化以形成盐、甲酯和乙酯或其它类型的酯和酰胺。自由羟基可衍生化以形成O-酰基或O-烷基衍生物。还包括含有二十种标准氨基酸的天然存在的氨基酸衍生物的那些肽作为化学衍生物。例如:4-羟基脯氨酸可取代脯氨酸;5-羟基赖氨酸可取代赖氨酸;3-甲基组氨酸可取代组氨酸;高丝氨酸可取代丝氨酸并且鸟氨酸可取代赖氨酸。衍生物还包括含有一种或多种添加或缺失的肽,只要维持必要活性。其它包括的修饰为酰胺化、氨基端酰化(例如乙酰化或巯基乙酸酰胺化)、末端羧基酰胺化(例如使用氨或甲胺)和类似的末端修饰。

[0169] 所属领域的技术人员应进一步了解,肽模拟物化合物也可适用,其模拟上文详述的多肽的构象和所需特征。因此,‘多肽’包括具有SEQ ID NO:1的多肽的毛发生长抑制活性的肽模拟物化合物。

[0170] 例如,本发明的多肽不仅包括其中氨基酸残基通过肽(-CO-NH-)键接合的分子,而且包括其中所述肽键倒转的分子。此逆转-反向肽模拟物可使用所属领域中已知的方法,例

如Meziere等人(1997) J. Immunol. 159, 3230-3237 (其以引用的方式并入本文) 中所述的那些制得。这种方法涉及制得含有涉及骨架而非侧链的定向的变化的伪肽。含有NH-CO键而非CO-NH肽键的逆转-反向肽更加抵抗蛋白水解。或者, 本发明的多肽可为其中一个或多个氨基酸残基通过代替常规酰胺键的 γ (CH₂NH) -键键联的肽模拟物化合物。

[0171] 在另一替代方案中, 所述肽键可分配于整体, 限制条件是使用在所述氨基酸残基的碳原子之间保持间距的适当连接体部分; 所述连接体部分可有利地具有与肽键大致相同的电荷分布和大致相同的平面性。

[0172] 应了解, 所述多肽可便利地在其N或C端封端以便帮助降低对外蛋白水解消化的易感性。

[0173] 如D-氨基酸和N-甲基氨基酸的多种未编码或经过修饰的氨基酸也已经用于修饰哺乳动物多肽。另外, 推测的生物活性构象可通过共价修饰, 如环化或通过并入内酰胺或其它类型的桥而稳定化, 例如参看Veber等人, 1978, Proc. Natl. Acad. Sci. USA 75: 2636和Thursell等人, 1983, Biochem. Biophys. Res. Comm. 111: 166, 其以引用的方式并入本文。

[0174] 多种合成策略中的常见主题是将一些环状部分引入基于肽的构架中。所述环状部分限制肽结构的构象空间并且这频繁地导致所述肽对特定生物受体的特异性增加。这种策略的附加优势是将环状部分引入肽中也可导致所述肽对细胞肽酶的敏感性减弱。

[0175] 因此, 本发明的多肽可包含末端半胱氨酸氨基酸。所述多肽可通过所述末端半胱氨酸氨基酸中硫醇盐基团的二硫键形成以杂环形式存在或通过所述末端氨基酸之间的酰胺肽键形成以纯形式存在。如上文所指示, 通过N端和C端区半胱氨酸之间的二硫键或酰胺键环化小肽可通过降低蛋白水解并且增加结构的刚性而回避有时用线性肽观察到的特异性和半衰期问题, 由此可产生较高特异性化合物。通过二硫键环化的多肽具有自由氨基和羧基端, 所述自由氨基和羧基端仍可易感蛋白水解降解, 而通过在N端胺与C端羧基之间形成酰胺键环化的肽因此不再含有自由氨基或羧基端。因此, 本发明的肽可通过C-N键或二硫键键联。

[0176] 本发明不以任何方式受肽的环化方法限制, 但涵盖可通过任何合适的合成方法实现环状结构的肽。因此, 杂键可包括但不限于经由二硫桥、亚烷基桥或硫桥形成。环状纯肽和环状杂肽的合成方法(包括二硫桥、硫桥和亚烷基桥) 公开于以引用的方式并入本文的US 5,643,872中。环化方法的其它实例包括通过点击化学、环氧化物、醛-胺反应环化, 以及以引用的方式并入本文的US 6,008,058中公开的方法。

[0177] 众所周知, 所述末端修饰适用于降低蛋白酶消化的易感性并且因此适用于延长溶液中、尤其其中可存在蛋白酶的生物流体中所述肽的半衰期。多肽环化也由于通过环化形成的稳定结构并且鉴于关于环肽所观察到的生物活性为适用的修饰。

[0178] 因此, 在一个实施方案中, 本发明的第一方面的多肽为环状。

[0179] 然而, 在一替代实施方案中, 所述多肽为线性。

[0180] 然而, 在一个优选实施方案中, 所述多肽包含通过PEG化、酰胺化、酯化、酰化、乙酰化和/或烷基化修饰或衍生化的一个或多个氨基酸。

[0181] 所属领域的技术人员应了解, 所述多肽可在一个或多个氨基酸处糖基化。例如, 所述多肽可保持相应(‘亲本’) 骨桥蛋白的一个或多个糖基化位点, 碳水化合物基团可附接于所述位点。

[0182] 在另一实施方案中,所述多肽包含例如SEQ ID NO:1、26、69或94的氨基酸序列或其片段或变体的融合物或由例如SEQ ID NO:1、26、69或94的氨基酸序列或其片段或变体的融合物组成。

[0183] 例如,所述多肽可包含SEQ ID NO:1或26的氨基酸序列的融合物

[0184] 多肽的‘融合物’包括对应于例如融合于任何其它多肽的SEQ ID NO:1或26 (或其片段或变体)的氨基酸序列。例如,所述多肽可融合于如谷胱甘肽-S-转移酶 (GST) 或蛋白A的多肽以便促进所述多肽的纯化。所述融合物的实例是所属领域的技术人员众所周知的。同样,所述多肽可融合于如His6的寡聚组氨酸标签,或通过抗体识别的表位,如众所周知的Myc标签表位。所述多肽的任何变体或衍生物的融合物也包括于本发明的范围内。

[0185] 所述融合物可包含在本发明的所述多肽上赋予所需特征的另一部分;例如,所述部分可适用于增强或延长毛发生长抑制效应。例如,在一个实施方案中,所述融合物包含人类血清白蛋白或相似蛋白 (如US 2009/0005312中所公开,其公开内容以引用的方式并入本文)。

[0186] 或者,融合的部分可为能够促进所述多肽的细胞摄取的亲脂性分子或多肽结构域,如所属领域的技术人员已知。

[0187] 适用于本发明组合物中的多肽可通过所属领域的技术人员众所周知的体外基于细胞的表达方法制得 (例如参看Green和Sambrook,2012,Molecular Cloning,A Laboratory Manual,第四版,Cold Spring Harbor,New York,所述文献中的相关公开内容以引用的方式并入本文)。欲使用的表达载体和宿主细胞的选择可取决于多种因素。例如,如果所述多肽欲糖基化,那么将需要哺乳动物表达系统。

[0188] 合适的表达载体和宿主细胞可在市面上购自多种来源。

[0189] 或者,所述多肽可通过已知方式,如液相和固相合成 (例如t-Boc固相肽合成和BOP-SPPS) 合成。

[0190] 所属领域的技术人员应了解,本发明还包括上述多肽的药理学上和/或美容学上可接受的酸或碱加成盐的用途。用于制备适用于本发明的上述碱化合物的药理学上和/或美容学上可接受的酸加成盐的酸为形成无毒酸加成盐的那些,所述盐即含有药理学上和/或美容学上可接受的阴离子的盐,如盐酸盐、氢溴酸盐、氢碘酸盐、硝酸盐、硫酸盐、硫酸氢盐、磷酸盐、酸式磷酸盐、乙酸盐、乳酸盐、柠檬酸盐、酸式柠檬酸盐、酒石酸盐、酒石酸氢盐、丁二酸盐、顺丁烯二酸盐、反丁烯二酸盐、葡糖酸盐、糖酸盐、苯甲酸盐、甲烷磺酸盐、乙烷磺酸盐、苯磺酸盐、对甲苯磺酸盐和双羟萘酸盐 [即1,1'-亚甲基-双-(2-羟基-3-萘甲酸盐)] 等。

[0191] 药理学上和/或美容学上可接受的碱加成盐也可用于制造所述多肽的药理学上和/或美容学上可接受的盐形式。可用作制备本质上呈酸性的本发明化合物的药理学上和/或美容学上可接受的碱盐的试剂的化学碱为与所述化合物形成无毒碱盐的那些。所述无毒碱盐包括但不限于源于所述药理学上和/或美容学上可接受的阳离子 (如碱金属阳离子 (例如钾和钠) 和碱土金属阳离子 (例如钙和镁)) 的那些、铵或水溶性胺加成盐 (如N-甲基葡糖胺- (甲葡胺)) 以及低碳烷醇铵和药理学上可接受的有机胺的其它碱盐等。

[0192] 应进一步了解,所述多肽可冻干进行存储并且在使用之前在合适载体中复原。任何合适的冻干方法 (例如喷雾干燥、滤饼干燥) 和/或复原技术均可使用。所属领域的技术人员应了解,冻干和复原可导致变化程度的活性损失并且用量可必须向上调节以进行补偿。

优选地,冻干(冷冻干燥)的多肽在再水合时损失其活性(在冻干之前)的仅约20%,或仅约25%,或仅约30%,或仅约35%,或仅约40%,或仅约45%,或仅约50%。

[0193] 所述多肽以包含所述多肽和关于预期施用途和标准药学或美容学规范选择的药学上可接受和/或美容学上可接受的赋形剂、载体或稀释剂的组合物的形式提供(参看例如Remington:The Science and Practice of Pharmacy,第19版,1995,Alfonso Gennaro编,Mack Publishing Company,Pennsylvania,USA,其以引用的方式并入本文)。

[0194] “药学上可接受”包括所述制剂是无菌并且无热原质的。合适的药学载体为药学领域中众所周知的。载体必须与本发明化合物相容并且对其接受者无害的意义上为“可接受的”。典型地,所述载体将为水或生理盐水,其将为无菌并且无热原质的;然而,可使用其它可接受的载体。因此,“药学上可接受的载体”和“药学上可接受的赋形剂”包括用于形成所述制剂的一部分的任何化合物,其预期仅仅充当载体,即不预期具有其生物活性。药学上可接受的载体或赋形剂一般为安全、无毒并且在生物学或其它方面均合乎需要。如本文所用的药学上可接受的载体或赋形剂包括一种和超过一种所述载体或赋形剂。

[0195] 同样,术语“美容学上可接受”用于指示适用作美容产品的制剂。合适的美容载体为所属领域中众所周知的,如通常用于洗发剂、洗液、乳膏和其它所述产品中的那些。

[0196] 所述赋形剂可为碳水化合物、聚合物、脂质和矿物中的一个或多个。碳水化合物的实例包括乳糖、蔗糖、甘露醇和环糊精,其添加至所述组合物中,例如用于促进冻干。聚合物的实例为淀粉、纤维素醚、纤维素羧甲基纤维素、羟丙基甲基纤维素、羟乙基纤维素、乙基羟乙基纤维素、海藻酸盐、角叉菜胶、透明质酸和其衍生物、聚丙烯酸、聚磺酸盐、聚乙二醇/聚环氧乙烷、聚环氧乙烷/聚环氧丙烷共聚物、具有不同水解程度的聚乙烯醇/聚乙酸乙烯酯和聚乙烯吡咯烷酮(均具有不同分子量),其添加至所述组合物中,例如用于粘度控制,用于实现生物粘着,或用于保护脂质免于化学和蛋白水解降解。脂质的实例为脂肪酸、磷脂、单甘油酯、二酸甘油酯和三酸甘油酯、神经酰胺、鞘脂和糖脂(均具有不同酰基链长和饱和度)、卵磷脂、大豆卵磷脂、氢化卵磷脂和大豆卵磷脂,其出于类似于关于聚合物的那些的原因添加至所述组合物中。矿物的实例为滑石、氧化镁、氧化锌和氧化钛,其添加至所述组合物中,以获得益处,如液体积存的减少或有利的色素特性。

[0197] 术语“稀释剂”预期意指目的在于稀释药物制剂中的所述肽的水溶液或非水溶液。稀释剂可为生理盐水、水、聚乙二醇、丙二醇、乙醇或油(如红花油、玉米油、花生油、棉籽油或芝麻油)中的一个或多个。

[0198] 稀释剂也可充当缓冲液。术语“缓冲液”预期意指目的在于稳定化pH的含有酸-碱混合物的水溶液。缓冲液的实例为Trizma、Bicine、Tricine、MOPS、MOPSO、MOBS、Tris、Hepes、HEPBS、MES、磷酸盐、碳酸盐、乙酸盐、柠檬酸盐、乙醇酸盐、乳酸盐、硼酸盐、ACES、ADA、酒石酸盐、AMP、AMPD、AMPSO、BES、CABS、二甲胂酸盐、CHES、DIPSO、EPPS、乙醇胺、甘氨酸、HEPPSO、咪唑、咪唑乳酸、PIPES、SSC、SSPE、POPSO、TAPS、TABS、TAPSO和TES。

[0199] 任选地,所述组合物可包含佐剂。术语“佐剂”预期意指添加至所述制剂中以增加所述肽的生物效应的任何化合物。佐剂可为具有不同阴离子的锌、铜或银盐中的一个或多个,例如但不限于氟化物、氯化物、溴化物、碘化物、硫氰酸盐、亚硫酸盐、氢氧化物、磷酸盐、碳酸盐、乳酸盐、乙醇酸盐、柠檬酸盐、硼酸盐、酒石酸盐和具有不同酰基组成的乙酸盐。

[0200] 本发明的药物组合物也可呈生物可降解的微球形式。脂族聚酯已经广泛用作微球

的制造中的生物可降解聚合物,如聚(乳酸)(PLA)、聚(乙醇酸)(PGA)、PLA和PGA的共聚物(PLGA)或聚(己内酯)(PCL)和聚酐。所述微球的制剂可发现于US 5,851,451和EP0213303中。

[0201] 本发明的药物组合物也可呈聚合物凝胶的形式,其中聚合物如淀粉、纤维素醚、纤维素羧甲基纤维素、羟基丙基甲基纤维素、羟基乙基纤维素、乙基羟基乙基纤维素、海藻酸盐、角叉菜胶、透明质酸和其衍生物、聚丙烯酸、聚磺酸盐,

[0202] 所述多肽可以各种浓度配制,取决于正在使用的特定多肽的功效/毒性。优选地,所述组合物包含在1nM与1M之间,例如0.1 μ M与1mM、1 μ M与100 μ M之间、5 μ M与50 μ M之间、10 μ M与50 μ M之间、20 μ M与40 μ M之间和任选地约30 μ M的浓度下的多肽。关于离体和体外应用,组合物可包含较低浓度的多肽,例如0.0025 μ M与1 μ M之间、10nM与300nM之间或15nM与150nM之间。

[0203] 所属领域的技术人员应了解,本发明组合物可通过多种途径,例如表面、经皮、肠胃外或口服施用来施用。

[0204] 有利地,本发明组合物适用于局部施用或皮内施用。

[0205] 因此,本发明组合物可局部施用于皮肤(例如面部、腿部等)。例如,所述组合物可以含有活性多肽的软膏的形式提供,所述活性多肽悬浮或溶解于例如具有以下一个或多个的混合物中:矿物油、液体矿脂、白矿脂、丙二醇、聚氧乙烯聚氧丙烯化合物、乳化蜡和水。或者,所述多肽可配制为合适的洗液或乳膏,其悬浮或溶解于例如以下一个或多个的混合物中:矿物油、脱水山梨醇单硬脂酸酯、聚乙二醇、液体石蜡、聚山梨醇酯60、十六烷基酯蜡、鲸蜡硬脂醇、2-辛基十二烷醇、苯甲醇和水。

[0206] 任选地,用于局部施用的组合物可包含渗透增强剂(例如,如Osborne和Henke, 1997, *Pharmaceutical Technology*, November:58-82和Pathan和Setty, 2009, *Tropical Journal of Pharmaceutical Research* 8(2):173-179中所述,其公开内容以引用的方式并入本文)。

[0207] 或者,本发明组合物可肠胃外,例如皮内施用。所述组合物最好以无菌水溶液的形式使用,所述无菌水溶液可含有其它物质,例如充足的盐或葡萄糖以制得与血液等张的溶液。必要时,所述水溶液应适当地缓冲(优选地至3至9的pH)。在无菌条件下合适的肠胃外制剂的制备容易通过所属领域的技术人员众所周知的标准药物技术实现。

[0208] 适用于肠胃外施用的组合物包括水性和非水性无菌注射溶液,其可含有抗氧化剂、缓冲液、抑菌剂和使得所述制剂与预期接受者的血液等张的溶质;和水性和非水性无菌悬浮液,其可包括悬浮剂和增稠剂。所述制剂可在单位剂量或多剂量容器,例如密封的安瓿和小瓶中呈递,并且可存储于冷冻干燥(冻干)条件下,仅需要在使用之前即刻添加无菌液体载体,例如注射用水。临时注射溶液和悬浮液可由先前所述种类的无菌散剂、颗粒和片剂制备。

[0209] 使用如微球制剂的持续释放系统来递送所述多肽可为有益的。

[0210] 使用微针和其它器件来递送所述多肽也可适用。合适的微针的实例包括Hollow Microneedle Technology(来自3M)和Micro-Trans Microneedle Array Patch(来自Valeris)。用于递送所述多肽的器件的其它形式包括经皮贴片和经皮凝胶。合适的经皮贴片的实例包括可获自Dow Corning的那些粘着剂。经皮凝胶的实例包括用于激素的经皮施

用的那些。还参看Prausnitz和Langer,2008,Nature Biotechnology26:1261-1268;Jain等人,2014,Crit.Rev.Ther.Drug Carrier Syst.31(3):219-72,和Wu等人,2012,Curr Pharm Biotechnol.13(7):1292-8(其公开内容以引用的方式并入本文)。

[0211] 或者,组合物可通过手术植入的器件施用,所述手术植入的器件直接释放活性多肽至所需位点(即表皮)。

[0212] 本发明组合物也可通过经皮方法递送。

[0213] 例如,电穿孔疗法(EPT)和/或离子导入系统可用于施用蛋白和多肽。在所述方法中,使用器件来递送脉冲电场至细胞,导致细胞膜至药物的渗透性增加和细胞内药物递送的显著增强。

[0214] 替代的经皮方法电并入在体验等于或类似于用于电穿孔的那些的电脉冲的皮肤表面上利用直径高达30微米的小粒子。所述粒子被驱动通过角质层并且进入皮肤的较深层中。所述粒子可装载或涂布有药物或基因或可简单地用作在所述药物可进入的皮肤中产生孔隙的“子弹”。

[0215] 额外经皮方法也已经由PowderJect Pharmaceuticals(由Novartis AG拥有)开发。

[0216] 用于本发明的多肽和组合物的施用的合适方法为所属领域中众所周知的,例如参看Therapeutic Protein and Peptide Formulation and Delivery,Zahra Shahrokh等人(编),1997,American Chemical Society,ISBN13:9780841235281。

[0217] 本发明组合物用于抑制哺乳动物中的毛发生成。所属领域的技术人员应了解,所述用途可本质上为医学和/或美容的(如下文详细描述)。例如,欲抑制的毛发生长可与疾病或病症有关或替代地可为出于美容原因不需要的正常毛发生长(在健康个体中)。

[0218] 因此,在一个实施方案中,如上文所定义的组合物用于治疗或预防哺乳动物中与不必要和/或过度毛发生长有关的疾病或病症,如多毛症。

[0219] 例如,所述与不必要和/或过度毛发生成有关的疾病或病症可选自由多囊卵巢综合征(PCOS)(最常见原因先天性肾上腺增生)、库欣氏病、生长激素过量(肢端肥大症)、卵巢中的肿瘤、肾上腺癌、希佩尔-林道病(Von Hippel-Lindau disease)、胰岛素抗性、间质泡膜增殖症(stromal hyperthecosis,SH)、肥胖、迟发性皮肤卟啉病、药物(如四氢孕三烯酮、苯妥英、米诺地尔)的副作用、激素治疗以及激素病症组成的组。

[0220] 在另一实施方案中,所述组合物用于治疗或预防哺乳动物中的内生毛发(例如与剃须、上蜡和/或痤疮有关)。

[0221] 本发明的另一相关方面提供如上文所定义的组合物,其用于制备用于治疗或预防哺乳动物中与不必要和/或过度毛发生成有关的疾病或病症(如多毛症)的药剂。

[0222] 例如,所述与不必要和/或过度毛发生成有关的疾病或病症可选自由多囊卵巢综合征(PCOS)(最常见原因先天性肾上腺增生)、库欣氏病、生长激素过量(肢端肥大症)、卵巢中的肿瘤、肾上腺癌、希佩尔-林道病、胰岛素抗性、间质泡膜增殖症(SH)、肥胖、迟发性皮肤卟啉病、药物(如四氢孕三烯酮、苯妥英、米诺地尔)的副作用、激素治疗以及激素病症组成的组。

[0223] 在另一实施方案中,所述药剂用于治疗或预防哺乳动物中的内生毛发(例如与剃须、上蜡和/或痤疮有关)。

[0224] 有利地,所述哺乳动物为人类。

[0225] 所述哺乳动物(例如人类)可为雄性或雌性。

[0226] 本发明的另一相关方面提供用于治疗或预防哺乳动物中与不必要和/或过度毛发生成有关的疾病或病症(如多毛症)的方法,所述方法包括向所述哺乳动物施用有效量的如上文所定义的组合物。

[0227] 例如,所述与不必要和/或过度毛发生成有关的疾病或病症可选自由多囊卵巢综合征(PCOS)(最常见原因先天性肾上腺增生)、库欣氏病、生长激素过量(肢端肥大症)、卵巢中的肿瘤、肾上腺癌、希佩尔-林道病、胰岛素抗性、间质泡膜增殖症(SH)、肥胖、迟发性皮肤卟啉病、药物(如四氢孕三烯酮、苯妥英、米诺地尔)的副作用、激素治疗以及激素病症组成的组。

[0228] 在另一实施方案中,所述方法用于治疗或预防哺乳动物中的内生毛发(例如与剃须、上蜡和/或痤疮有关)。

[0229] 本发明的多肽组合物以有效量施用于患者。如本文所用的‘治疗有效量’或‘有效量’或‘治疗有效’是指对毛发生长提供抑制效应的所述量。这是经过计算来产生所需治疗效应的活性材料的预定量。所属领域的技术人员应了解,化合物的所述量可视其比活性而变化。合适的剂量可含有经过计算来产生与所需稀释剂有关的所需治疗效应的活性组合物的预定量。在本发明组合物的制造方法和用途中,提供治疗有效量的活性组分。治疗有效量可由一般技术的医学或兽医学工人基于患者特征,如年龄、重量、性别、健康状况、并发症、其它疾病等来确定,如所属领域中众所周知。

[0230] 所属领域的技术人员应了解,本发明的第一方面的组合物不限于医学用途,而且可用作美容剂(在其并未因而提供任何身体健康改进,而是仅仅向哺乳动物提供美学益处意义上)。

[0231] 因此,本发明的第四方面提供如上文所定义的组合物用于人类中的美容毛发去除的用途。

[0232] 在一个实施方案中,所述人类为男性。例如,所述毛发可从身体中选自由面部(例如面颊、下巴以及在上唇上方)、胸部、肩部、颈部和背部组成的组的区域去除。

[0233] 在一替代实施方案中,所述人类为女性。例如,所述毛发可从身体中选自由面部(例如面颊、下巴以及在上唇上方)、背部、腿、臂、手指、脚、脚趾和耻骨组成的组的区域去除。

[0234] 本发明的另一相关方面提供一种用于人类中的美容毛发去除的方法,其包括向所述人类施用有效量的如上文所定义的组合物。

[0235] 在一个实施方案中,所述人类为男性。例如,所述毛发可从身体中选自由面部(例如面颊、下巴以及在上唇上方)、胸部、肩部、颈部和背部组成的组的区域去除。

[0236] 在一替代实施方案中,所述人类为女性。例如,所述毛发可从身体中选自由面部(例如面颊、下巴以及在上唇上方)、背部、腿、臂、手指、脚、脚趾和耻骨组成的组的区域去除。

[0237] 本发明组合物可单独或其它治疗或美容治疗组合使用。例如,本发明组合物可在与一种或多种以下毛发去除/预防治疗的组合疗法中使用:

[0238] -剃须、拔毛、脱毛、热蜡、激光毛发去除、电蚀除毛(电或热分解)、表面乳膏(如依

氟鸟氨酸)和/或口服药物治疗(如用于妇女的口服避孕药、抗雄激素、非那雄胺和促性腺激素释放激素)。

[0239] 熟练人员应进一步了解,本发明组合物可体内、离体或体外使用。

[0240] 因此,除了直接应用或施用于哺乳动物以外,所述组合物还可用于离体抑制毛发生成,例如在将皮肤移植至哺乳动物上之前用于皮肤外植体中。

[0241] 或者,所述多肽可用于体外抑制生长毛囊(或其干细胞前体)。

[0242] 现将参考以下图式描述体现本发明的某些方面的优选的非限制性实施例:

[0243] 除非本文另外指示,否则关于本发明的给定方面、特征或参数的偏好和选项应被视为已经与关于本发明的所有其它方面、特征和参数的任何偏好和选项组合公开。例如,在一个实施方案中,本发明提供包含SEQ ID NO:1的多肽的表面组合物以治疗与药物的副作用有关的不必要毛发生长。

[0244] 本说明书中明显先前公开的文献的列表或讨论不应必定被视为承认该文献是技术发展水平的一部分或是公知常识。

[0245] 在权利要求书和/或本说明书中当与术语“包含(comprising)”联合使用时,措辞“一(a)”或“一(an)”的使用可意指“一个(one)”,但其也与“一个或多个”、“至少一个”和“一个或超过一个”的含义一致。

[0246] 本发明的这些和其它实施方案在联合以上描述和附图考虑时将更好地了解和理解。然而,应理解,以上描述虽然指示本发明的各种实施方案和其众多特定详情,但作为说明而非限制给出。多种取代、修饰、添加和/或重排可在本发明的范围内制得,而不偏离其精神,并且本发明包括所有所述取代、修饰、添加和/或重排。

[0247] 以下图式形成本说明书的一部分并且包括在内以进一步证明本发明的某些方面。本发明可通过与本文提供的具体实施方案的详细描述组合参考这些图式中的一个或多个来更好地理解。

[0248] 图(1)。通过本发明的示例性多肽“FOL-005”(SEQ ID NO:1;来自汇集的3名患者的数据)在培养的分人类毛囊中诱导毛发生长期至退行期转变。分析的毛囊的数目在每组32-45之间。

[0249] 图(2)。代表性冷冻切片照片,展示FOL-005诱导从毛发生长期转变至退行期

[0250] A:代表性毛干的照片

[0251] B:球区的放大

[0252] C:球区的染色,证明对真皮乳头的强烈效应

[0253] 图(3)。FOL-005对培养的分人类毛囊中的褪黑激素含量的效应。使用各组织切片的Masson Fontana组织化学和形态测量评估执行分析。结果作为平均值 $\pm$ SEM呈递,n=各组中评估的26-47个毛囊。单因子ANOVA和邦费罗尼氏事后测试(Bonferroni's post-hoc test),* $p < 0.05$

[0254] 图(4)。代表性冷冻切片照片(在放大率 $\times 200$ 下拍摄),展示FOL-005对培养的分人类毛囊中的黑色素沉着的效应。左图中的黑色正方形指示形态测量学参考区域并且形态测量学数据在图3中呈递。

[0255] 图(5)。通过FOL-005在完整人类头皮皮肤中诱导毛发生长期至退行期转变。

[0256] 图(6)。确认FOL-005在较高浓度(2名患者的平均值)下在完整人类头皮皮肤中诱

导退行期。

[0257] 图(7)。FOL-005对完整人类头皮皮肤中的Ki67阳性细胞的增殖的效应。FOL-005的浓度为60nM,平均值 $\pm$ SEM,n=评估6-17张照片/抠图。“D3”=处理后3天。

[0258] 图(8)。FOL-005对完整人类头皮皮肤中的褪黑激素含量的效应。使用各组织切片的Masson Fontana组织化学和形态测量评估执行分析。结果作为平均值 $\pm$ SEM呈递。单因子ANOVA和邦费罗尼氏事后测试,** $p<0.01$,* $p<0.05$ 。“D3”=处理后3天。

[0259] 图(9)。FOL-005对个别代表性患者中的黑色素沉着的效应。*** $p<0.001$ 。

[0260] 图(10)。代表性冷冻切片照片(在放大率x200下拍摄),展示FOL-005对完整人类头皮皮肤中的黑色素沉着的效应。评估对乳头层拍摄的照片,2-5张照片/抠图。

[0261] 图(11)。FOL-005对真皮乳头(DP)细胞的迁出的效应。仅分析毛发生长期毛囊(HF)。结果基于由6名患者汇集的数据。在用FOL-005处理的HF中迁出的DP细胞的数目无显著变化。平均值 $\pm$ SEM,n=评估的18-22个HF,曼-惠特尼测试(Mann-Whitney test),ns

[0262] 图(12)。FOL-005对真皮乳头(DP)细胞的迁出的效应。仅分析毛发生长期毛囊(HF)。结果基于由6名患者汇集的数据。在用FOL-005处理的HF中迁出的DP细胞的数目无显著变化。平均值 $\pm$ SEM,n=评估的18-22个HF,曼-惠特尼测试,ns

[0263] 图(13)。毛发周期分级。用FOL-005处理HF始终在人类头皮皮肤中诱导毛发生长期HF在所测试的所有六名患者中过早地进入退行期(在各直条中,顶部区域对应于退行期中期,中间区域对应于早期退行期并且底部区域对应于退行期)。由6名患者汇集的数据。

[0264] 图(14)。毛发周期分级。用FOL-005处理HF始终在人类头皮皮肤中诱导毛发生长期HF在所测试的所有六名患者中过早地进入退行期。由6名患者汇集的数据。

[0265] 图(15)。Masson Fontana染色。在用FOL-005处理的HF中HF色素沉着无显著变化。分析毛发生长期和退行期毛囊。由6名患者汇集的数据。平均值 $\pm$ SEM,n=评估的41-51个HF,未配对Student氏t测试,ns

[0266] 图(16)。Masson Fontana染色。在用FOL-005处理的HF中HF色素沉着无显著变化。分析毛发生长期和退行期毛囊。由6名患者汇集的数据。平均值 $\pm$ SEM,n=评估的41-51个HF,未配对Student氏t测试,ns

[0267] 图(17)。Masson Fontana染色。在用FOL-005处理的HF中HF色素沉着无显著变化。分析毛发生长期HF。由6名患者汇集的数据。平均值 $\pm$ SEM,n=评估的13-22个HF,未配对Student氏t测试,ns

[0268] 图(18)。Masson Fontana染色。在用FOL-005处理的HF中HF色素沉着无显著变化。分析毛发生长期HF。由6名患者汇集的数据。平均值 $\pm$ SEM,n=评估的13-22个HF,未配对Student氏t测试,ns

[0269] 图(19)。在用FOL-005处理的毛囊中基底膜的形态无可观察的差异(PAS染色)。

[0270] 图(20)。Ki67/TUNEL。在用15nM FOL-005处理的HF中凋亡细胞的数目显著增加(参看中间对的右手条)。在用FOL-005处理的HF中增殖细胞的数目未确定显著变化(参看各对的左手列)。分析毛发生长期和退行期HF。由6名患者汇集的数据。平均值 $\pm$ SEM,n=评估的48-59个HF,曼-惠特尼测试,* $p<0.02$ 。为了减少异常值引起的数据失真,执行Grubb氏测试并且从分析中消除异常值。

[0271] 图(21)。Ki67/TUNEL。在用15nM FOL-005处理的HF中凋亡细胞的数目显著增加。在

用FOL-005处理的HF中增殖细胞的数目未确定显著变化。分析毛发生长期和退行期HF。由6名患者汇集的数据。平均值 $\pm$ SEM, n=评估的48-59个HF, 曼-惠特尼测试, *p<0.02。为了减少异常值引起的数据失真, 执行Grubb氏测试并且从分析中消除异常值。

[0272] 图(22)。用于检测肥大细胞的甲苯胺蓝染色。组织化学可检测的毛囊周肥大细胞的数目无显著差异。

[0273] 图(23)。MHCII染色HS 14-061 (间接免疫荧光。来自DAKO的小鼠抗人类Ab HLA-DP-DQ-DR)。免疫组织学可检测的毛囊周MHCII+类细胞的数目无显著差异。这些MHCII+细胞最可能是巨噬细胞。

[0274] 图(24)。CD31染色HS14-061 (间接免疫荧光, 来自DAKO的小鼠抗人类CD31Ab)。CD31+细胞(内皮细胞)的数目无显著差异。

[0275] 图(25)。K15染色HS14-087 (间接免疫荧光, 来自Chemikon的小鼠抗人类CK15Ab)。K15+细胞的数目无显著差异。人类毛囊(HF)上皮干细胞未受不利影响。保存HF干细胞池并且因此分析FOL-005的再生潜力。

[0276] 图(26)。在人类毛囊的移植之后三次拍摄的移植物的代表性照片。(A)媒介物处理的动物, (B)FOL-005处理的动物, (C)米诺地尔处理的动物和(D)FOL-005加米诺地尔处理的动物。

[0277] 图(27)。在移植之后对人类毛囊的平均数的效应。(A)媒介物处理的组, (B)FOL-005处理的组, (C)米诺地尔处理的组和(D)FOL-005加米诺地尔处理的组。

实施例

[0278] 实施例A: 示例性肽FOL-005 [SEQ ID NO:1] 对分离人类毛囊的效应

[0279] (i) FOL-005诱导毛发生长期至退行期变化

[0280] 材料和方法

[0281] 从正常人类头皮皮肤显微解剖毛发生长期VI毛囊(参看Kloepper等人, 2010, 其公开内容以引用的方式并入本文), 所述正常人类头皮皮肤由来自经历常规面部拉皮美容手术的三个健康成年女性的知情患者同意书获得。

[0282] 分离毛囊根据Philpott等人(参看Philpott等人, 1990; Bodó等人, 2009; Gáspár等人, 2010, 其公开内容以引用的方式并入本文) 在补充胰岛素和氢化可的松的威廉姆斯E培养基(William's E medium)中进行器官培养持续6-10天。

[0283] 在培养所述毛囊后即刻起始用示例性多肽FOL-005处理, 并且持续7至10天。

[0284] 在器官培养结束时, 包埋毛囊并且针对纵向冷冻切片进行加工(Bodó等人, 2009; Gáspár等人, 2010)。

[0285] 结果

[0286] 本发明的示例性肽FOL-005 (SEQ ID NO:1; 15nM、60nM和300nM) 在分离人类毛囊中诱导毛发生长期至退行期的剂量依赖性转变(参看图1)。

[0287] 对冷冻切片的分析披露了FOL-005促进毛囊衰退, 其指示FOL-005为体外人类毛发生长的强烈抑制剂(参看图2)。

[0288] (ii) FOL-005诱导色素沉着变化

[0289] 材料和方法

[0290] Masson Fontana染色:冷冻切片风干并且在乙醇-乙酸中固定。该切片在tris缓冲生理盐水(TBS)和蒸馏水中洗涤数次。冷冻切片在56℃下在暗处用氨银溶液(Fluka, Seelze, Germany)处理40min。在蒸馏水中洗涤之后,该切片用5%硫代硫酸钠水溶液(Merck, Darmstadt, Germany)处理1min。接着,该切片在流动自来水中洗涤3min并且在0.5%中性红水溶液(Sigma)中复染。在蒸馏水中洗涤之后,切片脱水并且安装于Eukitt (O.Kindler, Freiburg, Germany)中。

[0291] 免疫组织化学:为了比较不同毛发周期阶段中HF的增殖和细胞凋亡,如先前所述(参看Kloepper等人,2010,Experimental Dermatology 19:305-12,其相关公开内容以引用的方式并入)执行Ki-67小鼠抗Ki-67抗血清(DAKO, Hamburg, Denmark)和TUNEL (ApopTag 荧光素原位细胞凋亡检测试剂盒;Millipore, Berlin, Germany)的双重免疫标记。

[0292] 结果

[0293] 黑色素沉着分析结果展示于图3中。

[0294] 在60nM FOL-005的剂量下,可检测到色素沉着的显著减少,确认在分离毛囊中诱导的毛发生长期至退行期的转变。

[0295] 展示FOL-005对一名个体中的黑色素沉着的效应的代表性冷冻切片照片展示于图4中。在媒介物处理的对照组中,接近真皮乳头观察到更致密色素沉着,而在暴露于15nM并且尤其60nM FOL-005之后,在图的右侧可见更多色素沉着(与在真皮乳头附近无更多黑色素合成时毛干的移动一致)。

[0296] 实施例B:示例性肽FOL-005 [SEQ ID NO:1] 对人类皮肤片的效应

[0297] (i) FOL-005诱导毛发生长期至退行期变化

[0298] 材料和方法

[0299] 在如(Lu等人,2007,其公开内容以引用的方式并入本文)所述的无血清条件下执行全层人类头皮皮肤器官培养持续六天。

[0300] 简单地说,女性患者的头皮皮肤在知情同意书之后获自常规面部拉皮手术。人类头皮皮肤在补充有100IU/ml青霉素G (Sigma, St Louis, MO, USA)、10μg/ml链霉素 (Sigma)、0.25μg/ml两性霉素B (Gibco, Karlsruhe, Germany) 的威廉姆斯E培养基 (Biochrom, Cambridge, UK) 中洗涤。剃除外生毛干至表皮水平;接着使用Acu-穿孔机 (STIEFEL, Offenbach am Main, Germany) 穿孔输出完整头皮皮肤的2mm活组织切片(平行于毛发生长方向,即呈斜角)。

[0301] 人类头皮组织的穿孔输出物小心地放置于威廉姆斯E培养基[补充有100IU/ml青霉素/10μg/ml链霉素、10μg/ml胰岛素 (Sigma)、10ng/ml氢化可的松 (Sigma) 和2mmol/l L-谷氨酰胺 (Invitrogen, Paisley, UK)] 中。使皮肤片段在该培养基中浮动,其中表皮在空气/液体界面处向上并且真皮/皮下组织向下。培养物在37℃下维持于具有95%空气和5%CO₂的供气孵育器中。每隔一天更换培养基。

[0302] 在培养开始之后即刻,使皮肤片段暴露于示例性肽FOL-005 (在15nM至3μM的剂量下),其持续培养的持续时间。

[0303] 在不同时间点,皮肤样本包埋于O.C.T.TM Tissue-TEK (Sakura, Zoeterwoude, the Netherlands) 中,在液氮中冷冻,并且切割6μm冷冻切片。该切片接着后固定于丙酮中,风干并且针对苏木精和曙红 (H&E; Sigma)、Giemsa或Masson-Fontana组织化学进行加工。个别毛

囊关于如(Whiting等人1999)所述的其周期阶段进行分析,而毛囊黑化通过标准硝酸银组织化学(Masson-Fontana染色)进行分析。使用Image J软件(NIH)执行近端毛基质内充分界定的参考区域的定量。

[0304] 为了评估凋亡和增殖细胞,应用双重免疫荧光。末端dUTP缺口标记(ApopTag[®]荧光素原位细胞凋亡检测试剂盒;Chemicon,Tenecula,CA,USA)用作细胞凋亡的标记物,并且Ki67免疫反应性(DakoCytomation,Glostrup,Denmark)作为细胞增殖的指示剂,如先前所述(Foitzik等人,2006)。

[0305] 结果

[0306] FOL-005在完整人类头皮皮肤中诱导毛发生长期至退行期的快速转变(参看图5和6)。

[0307] 在添加FOL-005至培养基中之后,在早期退行期中观察到几乎所有毛囊。

[0308] 退行期也通过注射FOL-005至头皮皮肤组织中来诱导。

[0309] 对冷冻切片的分析披露了FOL-005促进毛囊衰退,其指示FOL-005为体外人类毛发生长的强烈抑制剂(参看图2)。

[0310] (ii) FOL-005抑制Ki67阳性细胞的增殖并且增加细胞凋亡

[0311] 材料和方法

[0312] 如上文所述执行Masson Fontana染色和免疫组织化学。

[0313] Ki67阳性细胞的增殖和其中细胞凋亡如Whiting等人,1999,J Invest Dermatol Symp Proc 4:282-284(其相关公开内容以引用的方式并入)所述来确定。

[0314] 细胞暴露于在60nM剂量下的示例性多肽FOL-005。

[0315] 结果

[0316] 在FOL-005处理的皮肤中存在强烈的降低增殖的倾向,如通过Ki67阳性细胞的降低的比例所表示(参看图7;白条)。

[0317] 与对毛发生长的抑制一致,还存在增加的细胞凋亡水平,如通过FOL-05处理后TUNEL阳性细胞的比例所指示(参看图7;阴影条)。

[0318] (iii) FOL-005诱导色素沉着变化

[0319] 材料和方法

[0320] 在用示例性多肽FOL-005处理的分离毛囊中的色素沉着变化通过Masson-Fontana组织化学来分析(参看Whiting等人,1999,J Invest Dermatol Symp Proc 4:282-284,其相关公开内容以引用的方式并入)。

[0321] 结果

[0322] 黑色素沉着分析结果展示于图8和9中。

[0323] 通过注射或添加至培养基中使完整人类头皮皮肤暴露于FOL-005会诱导色素沉着的显著减少,从而确认毛囊中毛发生长期至退行期的转变。

[0324] 展示FOL-005对一名个体中的黑色素沉着的效应的代表性冷冻切片照片展示于图10中。媒介物处理的对照组(左图)展示强烈色素沉着,与FOL-005处理的毛囊形成对比,该FOL-005处理的毛囊呈现不太致密的色素沉着(中间和右图)。

[0325] 实施例C:头皮毛囊(HF)上FOL-005[SEQ ID NO:1]的离体分析

[0326] 重复示例性肽FOL-005对头皮毛囊(HF)的效应的以上离体分析以便证明所观察到

的对毛发生长的抑制的坚固性。

[0327] 使用人类HF在器官培养的全层人类头皮皮肤片段(4mm,6名女性患者,42-65岁)中执行以下实验。

[0328] a) DP细胞的迁出

[0329] 在HF中未观察到FOL-005处理对迁出的真皮乳头(DP)细胞的数目具有显著效应(由六名患者汇集的数据;平均值 $\pm$ SEM,n=18-22个HF,曼-惠特尼测试)。

[0330] 结果展示于图11和12中。

[0331] b) HF周期的分析

[0332] 用FOL-005处理HF始终在人类头皮皮肤中诱导毛发生长期HF在所测试的所有六名患者中过早地进入退行期(由六名患者汇集的数据)。

[0333] 结果展示于图13和14中。

[0334] c) 毛发色素沉着

[0335] 在用处于所测试的剂量下的FOL-005处理的HF中未观察到HF色素沉着的显著变化(平均值 $\pm$ SEM,未配对Student氏t测试)。

[0336] 结果展示于图15和16中(分析毛发生长期和退行期HF)。

[0337] 进一步结果展示于图17和18 9中(仅分析毛发生长期HF)。

[0338] d) 毛囊形态(PAS)

[0339] 在用FOL-005处理的HF中关于BM的形态未观察到可观察差异(指示不存在任何毒性效应)

[0340] 结果展示于图19中。

[0341] e) 增殖/细胞凋亡

[0342] 在用15nM FOL-005处理的HF中观察到凋亡细胞的数目显著增加(分析毛发生长期和退行期HF)。

[0343] 在用处于这一剂量下的FOL-005处理的HF中增殖细胞的数目未确定显著变化。

[0344] 平均值 $\pm$ SEM,n=评估的48-59个HF,曼-惠特尼测试,* $p<0.02$ 。为了减少异常值引起的数据失真,执行Grubb氏测试并且从分析中消除异常值。

[0345] 结果展示于图20和21中。

[0346] f) 关于MC(肥大细胞)、MHCII+、CD31+细胞的染色

[0347] 组织化学可检测的毛囊周肥大细胞的数目未观察到显著差异(参考图22;用于检测肥大细胞的甲苯胺蓝染色)

[0348] 免疫组织学可检测的毛囊周MHC II+类细胞的数目未观察到显著差异(参看图23)

[0349] CD31+细胞(内皮细胞)的数目无显著差异(参看图24)。

[0350] g) 关于K15+细胞的染色

[0351] K15+细胞的数目未观察到显著差异

[0352] 使用HS14-087(间接免疫荧光,来自Chemikon的小鼠抗人类CK15 Ab)执行K15染色。

[0353] 人类HF上皮干细胞未受不利影响。

[0354] 实现HF干细胞池的保存,因此证明FOL-005的再生潜力(参看图25)

[0355] 概述

[0356] 以上发现确认并且扩充了实施例B中的结果,展示示例性肽FOL-005通过诱导以下效应坚固地促进人类头皮HF中的退行期发展。

[0357] (a) 在用FOL-005处理后退行期HF的%增加;

[0358] (b) 在汇集的数据中经过处理的HF的毛基质中的凋亡细胞增加;以及

[0359] (c) 在处理增加从毛发生长期HF迁出DP的倾向

[0360] 示例性肽FOL-005看来是充分耐受的,如通过以下观察证明:

[0361] (a) 在用FOL-005处理后HF黑色素含量无显著变化;

[0362] (b) 在FOL-005处理的样品中基底膜形态或毛囊周巨噬细胞和肥大细胞和CD31+细胞的数目无显著差异;以及

[0363] (c) K15+细胞的数目无显著差异

[0364] 结论

[0365] FOL-005明显地促进HF退行期,从而确认其作为人类毛发生长抑制剂的活性:其看来是充分耐受和有效的。不存在任何毒性效应的迹象。

[0366] 实施例D:示例性肽FOL-005 [SEQ ID NO:1] 对人类皮肤片的效应

[0367] 研究FOL-005对移植至SCID小鼠上的人类男性头皮皮肤的毛发生长的效应。

[0368] 该研究的目的是调查FOL-005对具有雄激素性秃发的倾向的人类男性头皮皮肤的毛发生长的效应。为了解决这一问题,在该研究中涉及四十二只雌性六周龄SCID/浅褐色小鼠。将获自具有发展常见秃发的倾向的人类志愿者的头皮皮肤的穿孔输出移植物 3mm^2 移植至SCID/浅褐色小鼠上(每只小鼠三个移植物)。

[0369] 在移植后一周,小鼠如下随机分成四个处理组:

[0370] 1. 媒介物(10只小鼠)一周两次进行皮内注射并且用作阴性对照。

[0371] 2. 米诺地尔(5%)(11只小鼠)一天两次进行表面应用并且用作阳性对照。

[0372] 3. FOL-005(每个移植物300nM)(11只小鼠)一周两次进行皮内注射。

[0373] 4. 米诺地尔5%+FOL-005/米诺地尔(5%)(11只小鼠)一天两次进行表面应用。FOL-005(每个移植物300nM)一周两次进行皮内注射。关于最初4周,动物仅用米诺地尔处理(以便起始毛发生长)并且接着关于剩余时期(2个月),FOL-005处理作为注射液添加,而米诺地尔处理维持作为表面应用。

[0374] 一周两次由两个独立观察者对毛发/移植物的数目计数。在皮肤移植之后三个月,从该小鼠获得移植物并且在液氮中冻并且存储于 -80°C 下用于进一步分析。

[0375] 如与媒介物处理组(分别地 3.7 ± 0.6 , $p < 0.05$)相比,在FOL-005处理组(2.1 ± 0.4)中观察到毛发/移植物的数目的显著减少(参看图26和图27)。

[0376] 此外,如与用单独米诺地尔处理的组(8.1 ± 0.1 , $p < 0.001$)相比,在FOL-005+米诺地尔(3.4 ± 0.7)处理组中检测到毛发/移植物的数目的显著减少。

[0377] 在媒介物组和FOL-005+米诺地尔(3.7 ± 0.6 和 3.4 ± 0.7 , $p = \text{NS}$)中观察到毛发/移植物的相似平均数。

[0378] 这一研究的结果确认FOL-005对毛发生长具有抑制效应。FOL-005在体内人类头皮皮肤中的完全毛发生长-抑制潜力也通过以下事实理解,即其强烈地拮抗米诺地尔(临床医学中的一种最佳识别的毛发过多诱导剂)的毛发生长促进效应。

[0379] 参考文献

- [0380] Philpott MP, Sanders DA, Westgate GE, Kealey T. Human hair growth in vitro: a model for the study of hair follicle biology. *Journal of Dermatological Science*. 1994; 7: S55-S72.
- [0381] Bodo E, Kromminga A, Biro T, Borbiro I, Gaspar E, Zmijewski MA, et al. Human female hair follicles are a direct, nonclassical target for thyroid-stimulating hormone. *The Journal of investigative dermatology*. 2009; 129 (5): 1126-39.
- [0382] Gaspar E, Hardenbicker C, Bodo E, Wenzel B, Ramot Y, Funk W, et al. Thyrotropin releasing hormone (TRH): a new player in human hair-growth control. *FASEB journal: official publication of the Federation of American Societies for Experimental Biology*. 2010; 24 (2): 393-403.
- [0383] Kloepper JE, Sugawara K, Al-Nuaimi Y, Gaspar E, van Beek N, Paus R. Methods in hair research: how to objectively distinguish between anagen and catagen in human hair follicle organ culture. *Experimental Dermatology*. 2010; 19: 305-12.
- [0384] Lu Z, Hasse S, Bodo E, Rose C, Funk W, Paus R. Towards the development of a simplified long-term organ culture method for human scalp skin and its appendages under serum-free conditions. *Experimental Dermatology*. 2007; 16 (1): 37-44.
- [0385] Foitzik K, Krause K, Conrad F, Nakamura M, Funk W, Paus R. Human scalp hair follicles are both a target and a source of prolactin, which serves as an autocrine and/or paracrine promoter of apoptosis-driven hair follicle regression. *Am J Pathol*. 2006; 168 (3): 748-56.
- [0386] Whiting D A, Waldstreicher J, Sanchez M, Kaufman K D. Measuring reversal of hair miniaturization in androgenetic alopecia by follicular counts in horizontal sections of serial scalp biopsies: results of finasteride 1 mg treatment of men and postmenopausal women. *J Investig Dermatol Symp Proc* 1999; 4: 282-284.

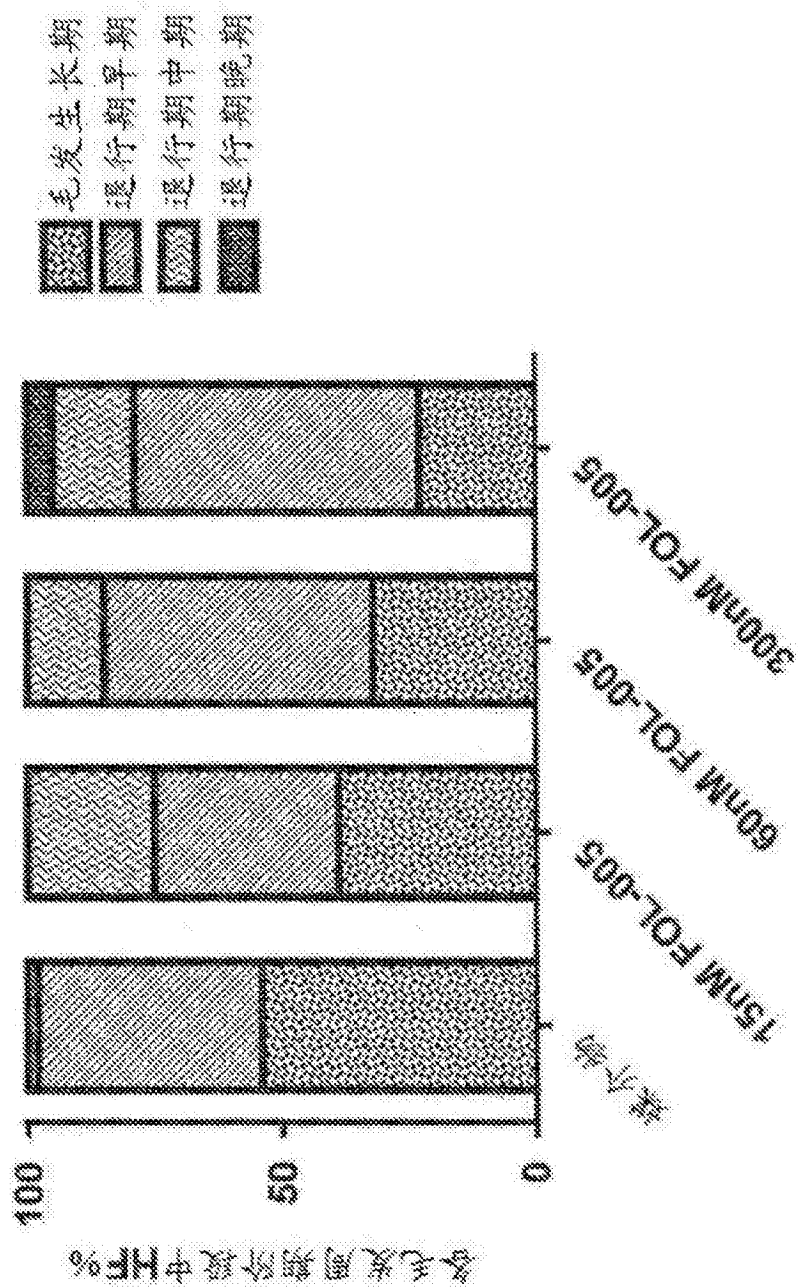


图1

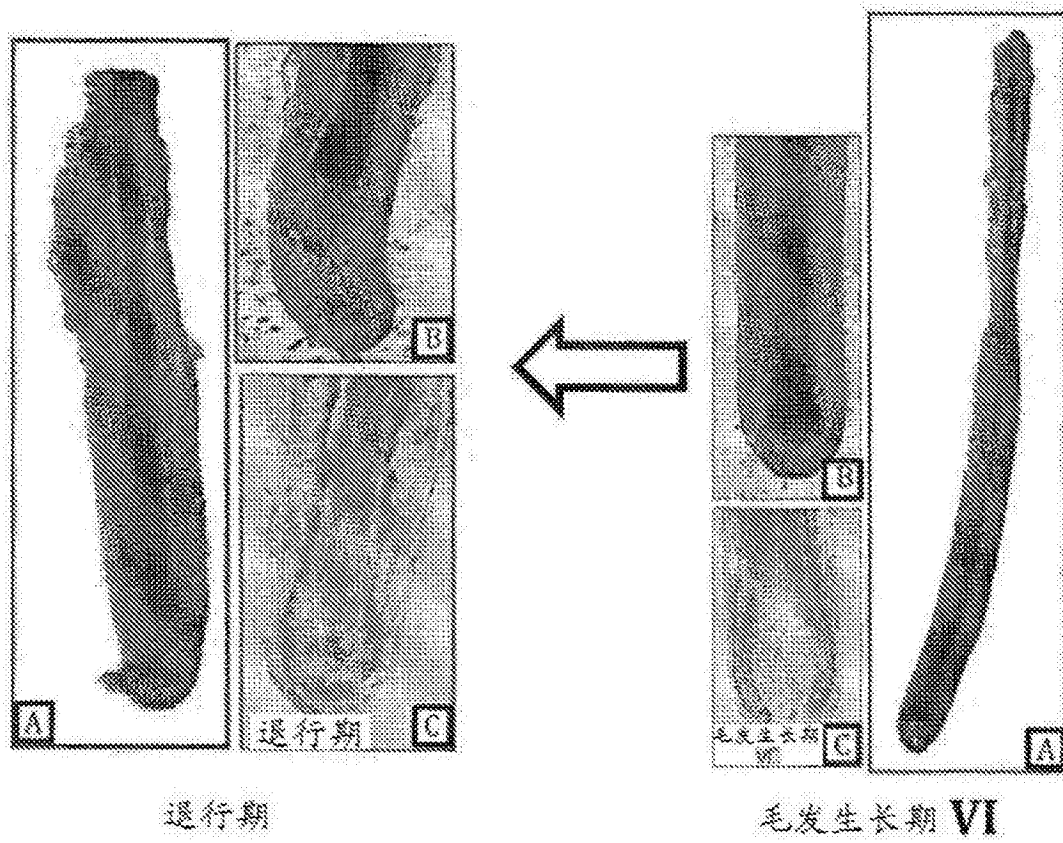


图2

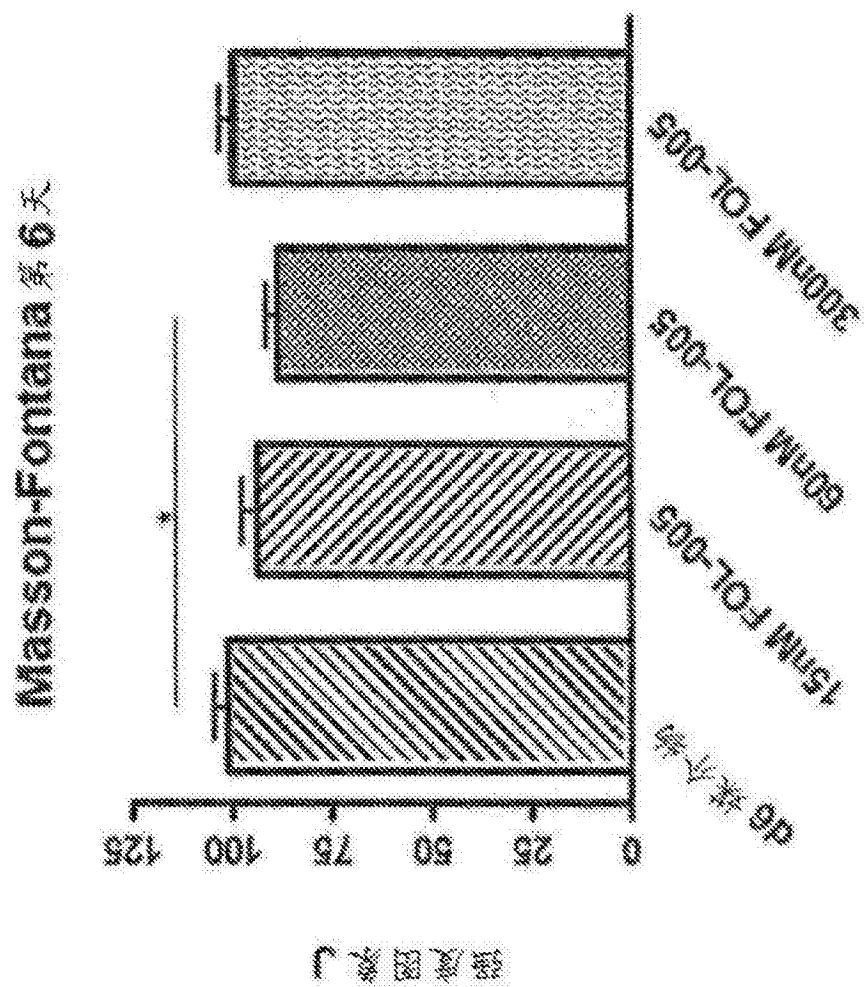


图3

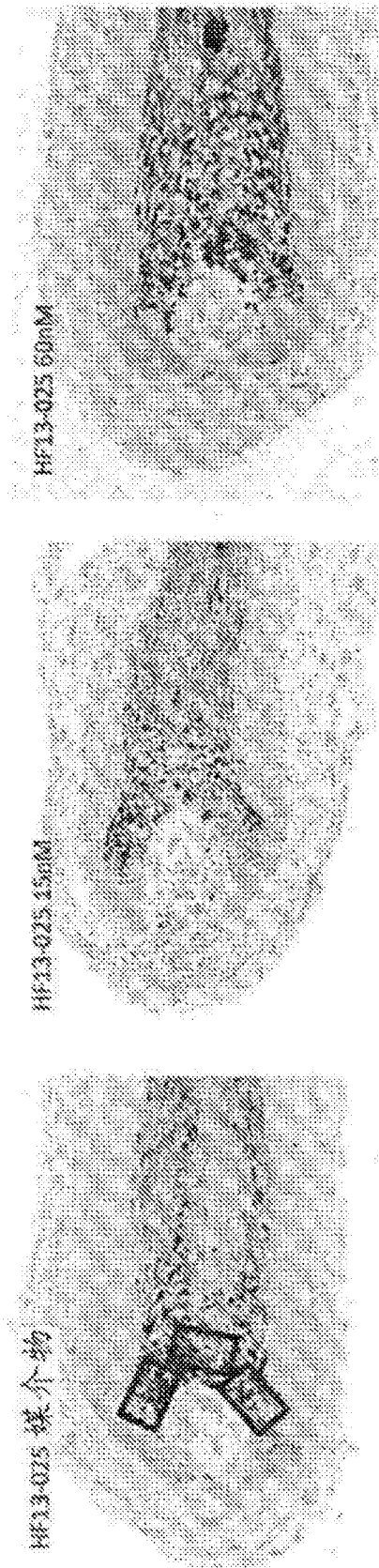
Masson-Fontana 组织化学

图4

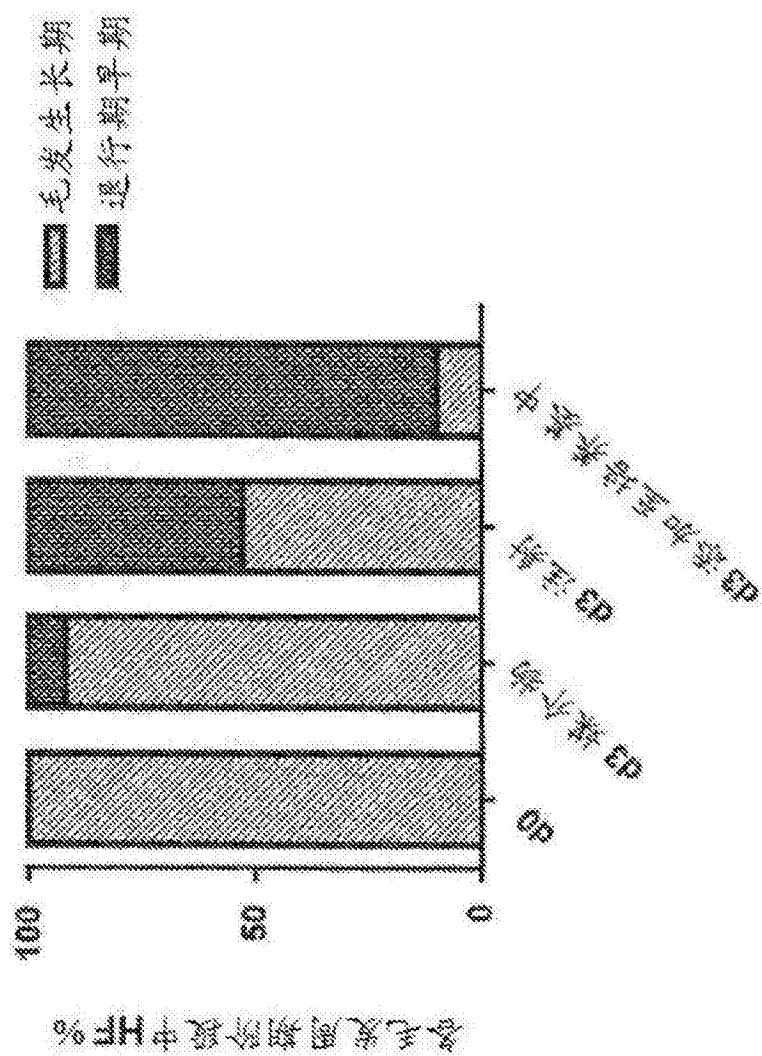


图5

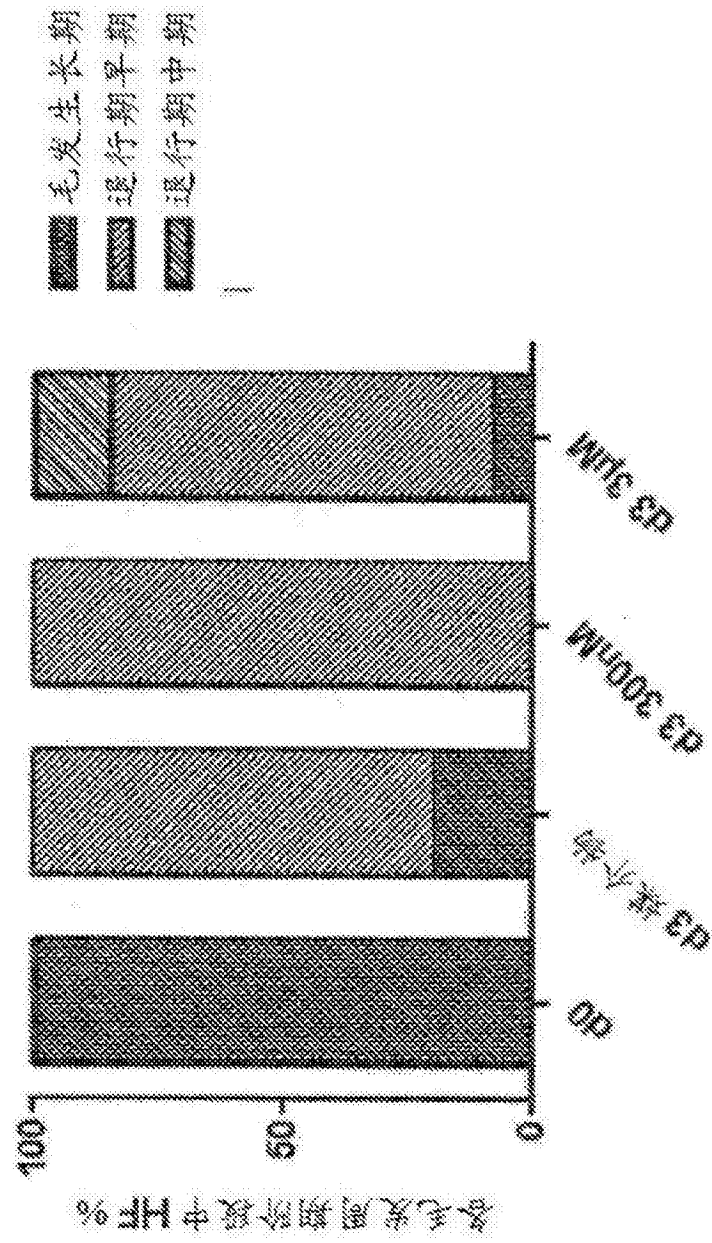


图6

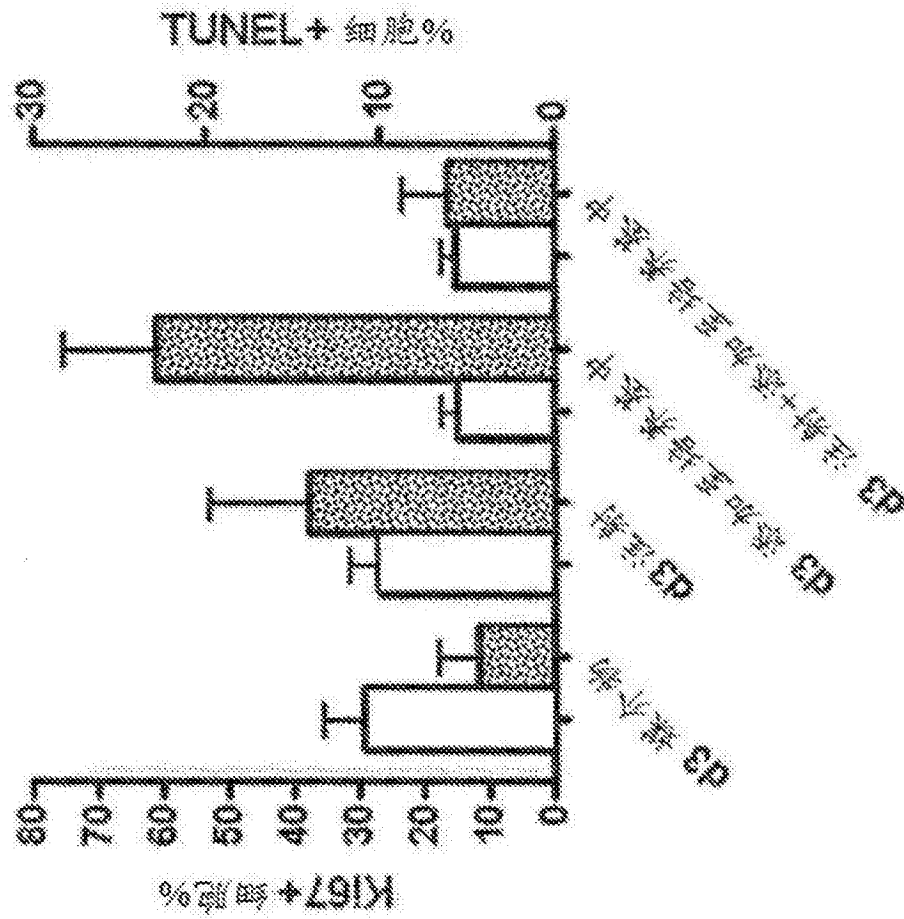


图7

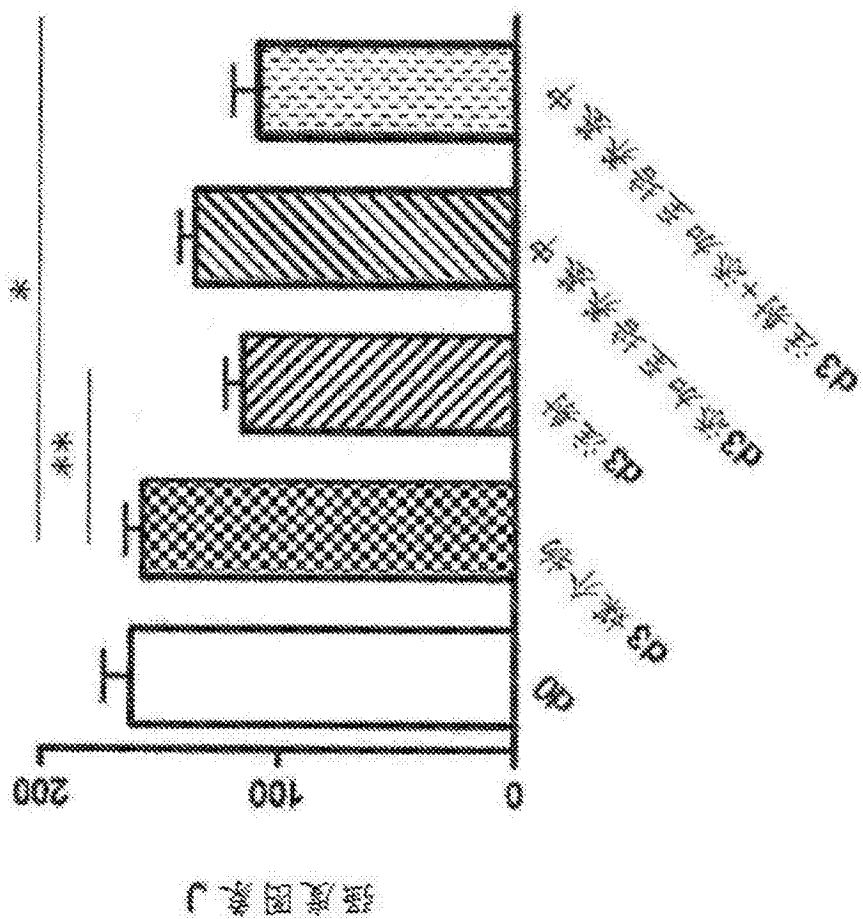


图8

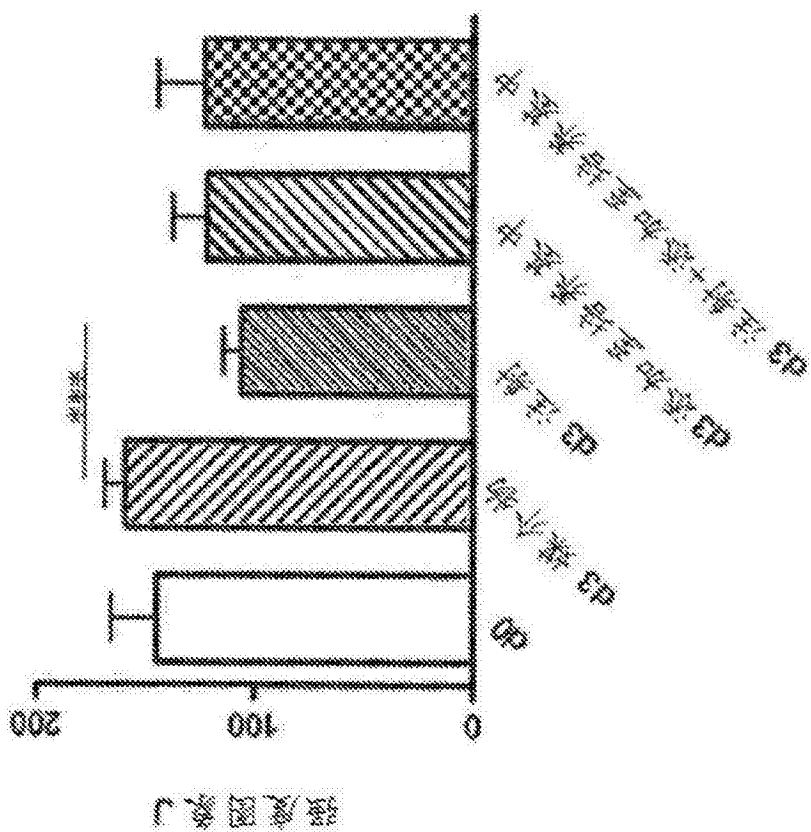


图9

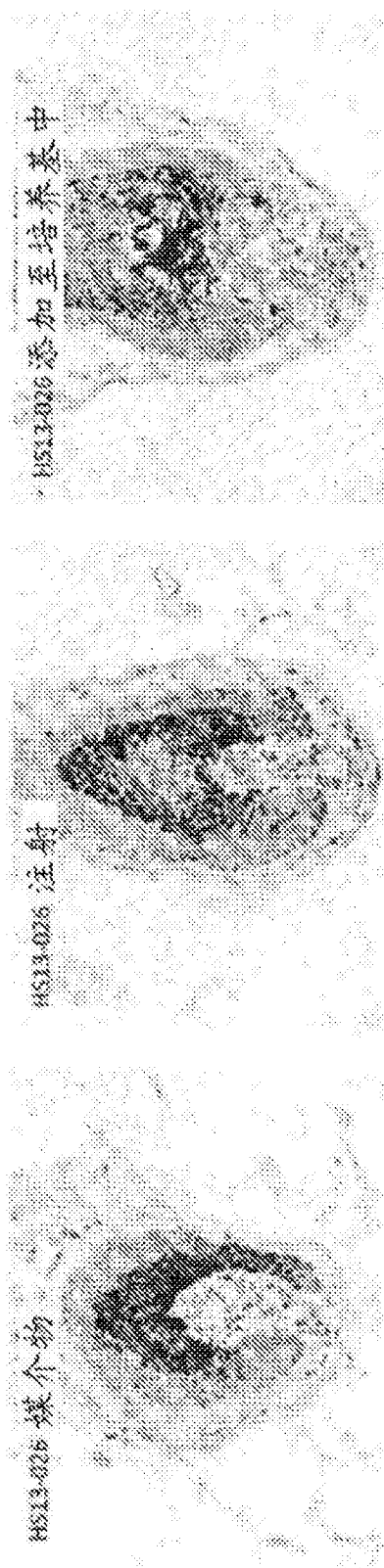


图10

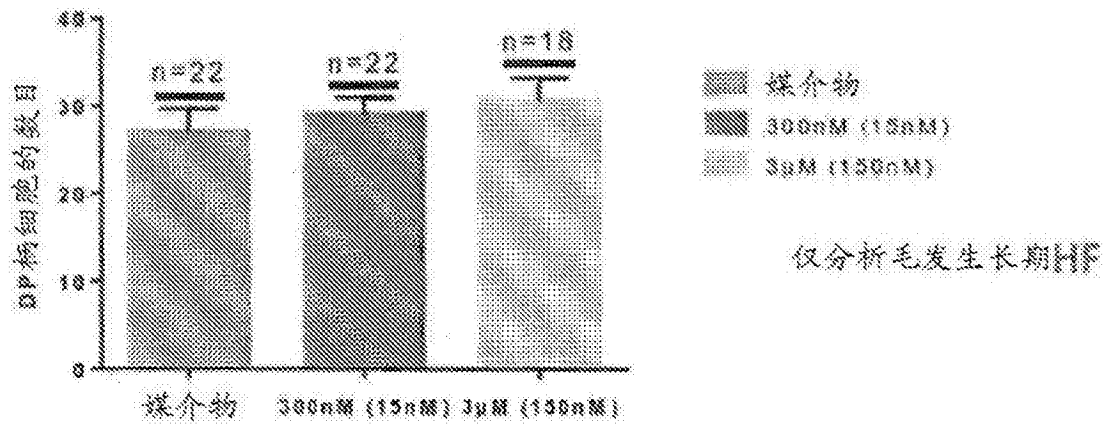


图11

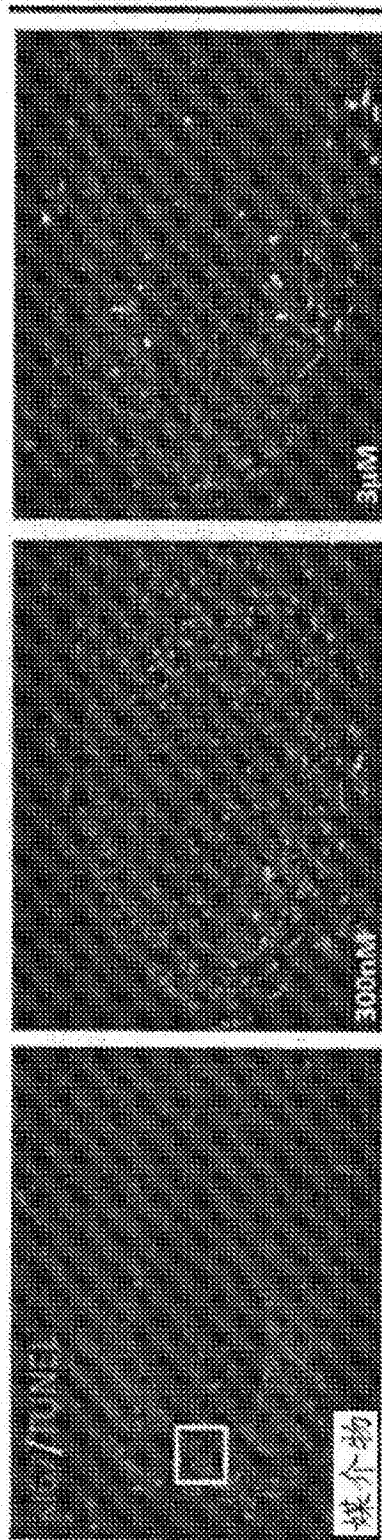


图12

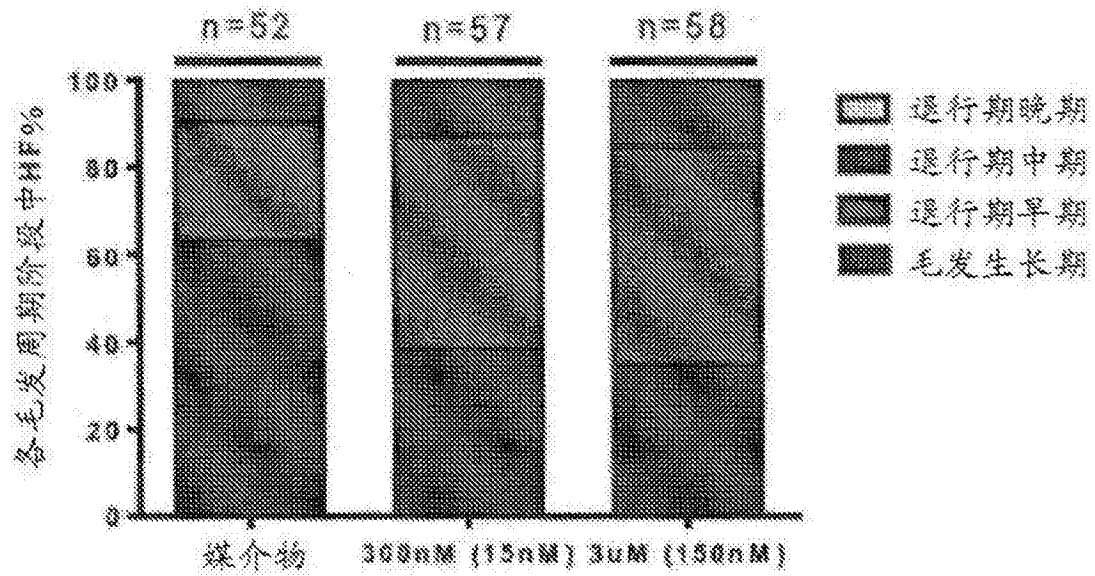


图13

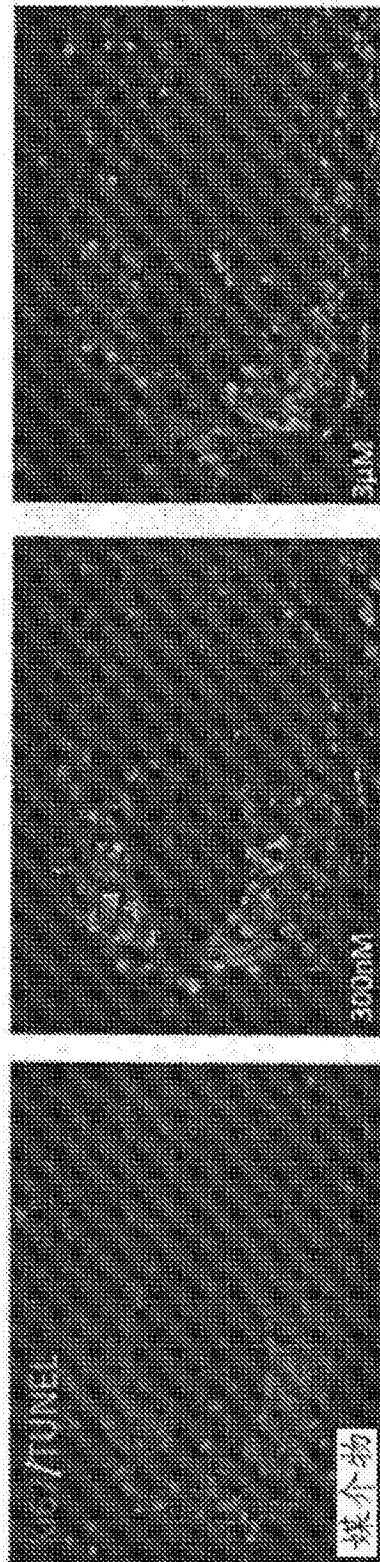


图14

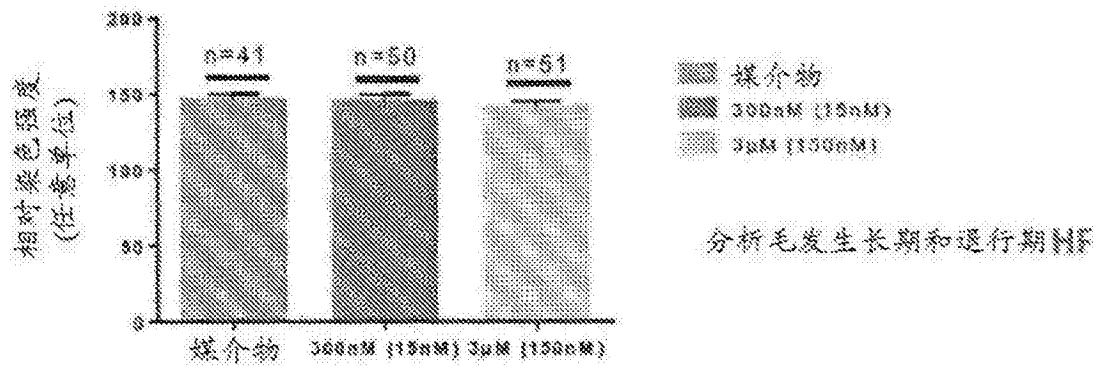


图15

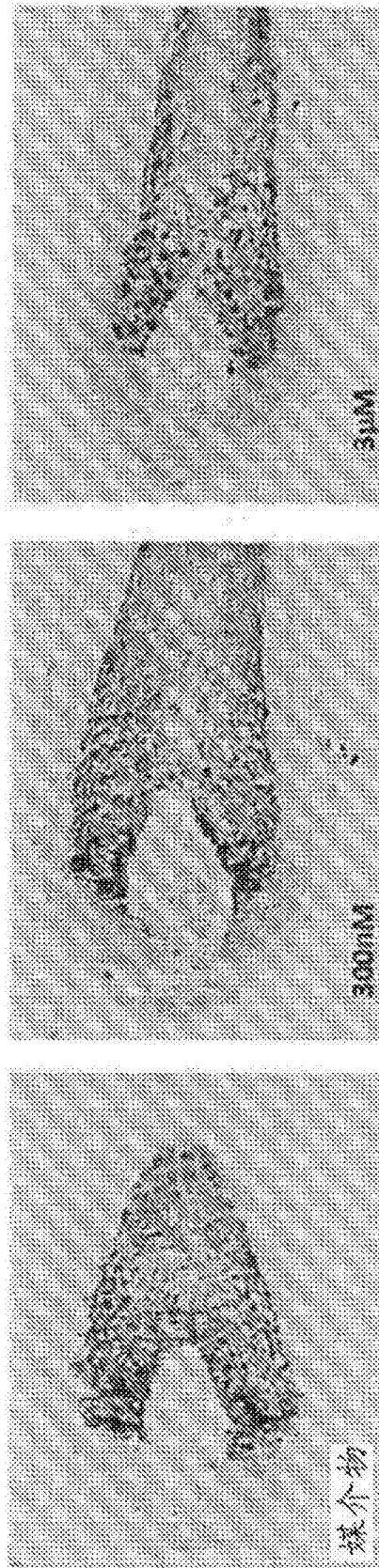


图16

Masson-Pontana 13-071, 13-077, 14-021, HS 14-028, HS 14-069, HS 14-087

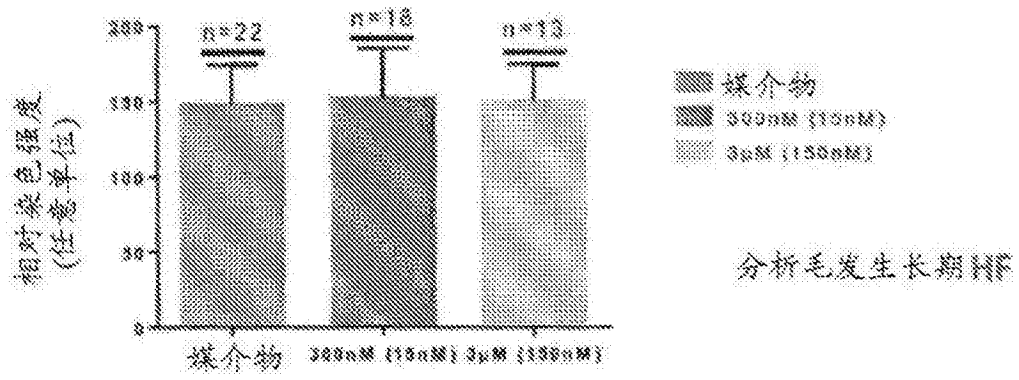


图17

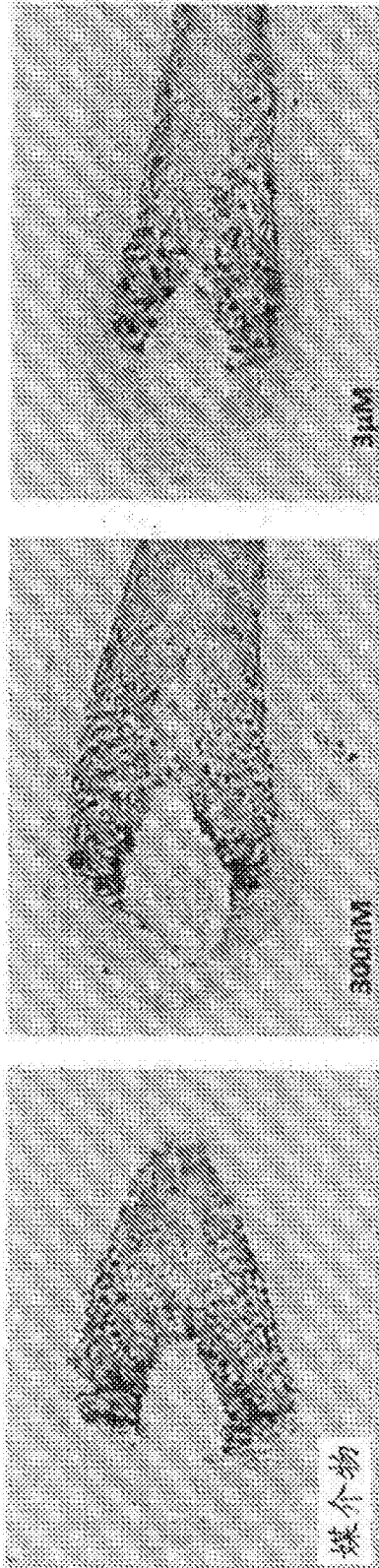


图18

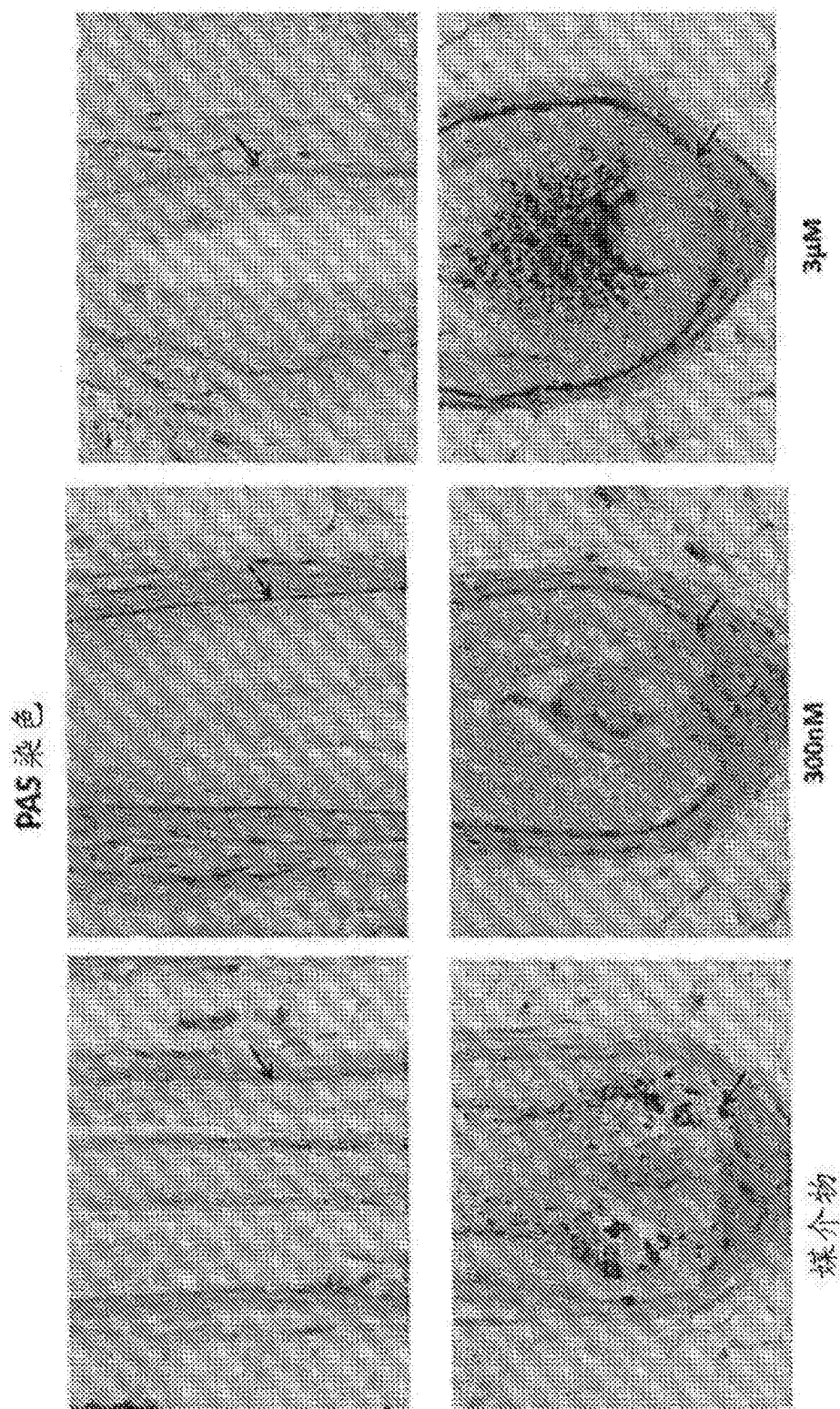


图19

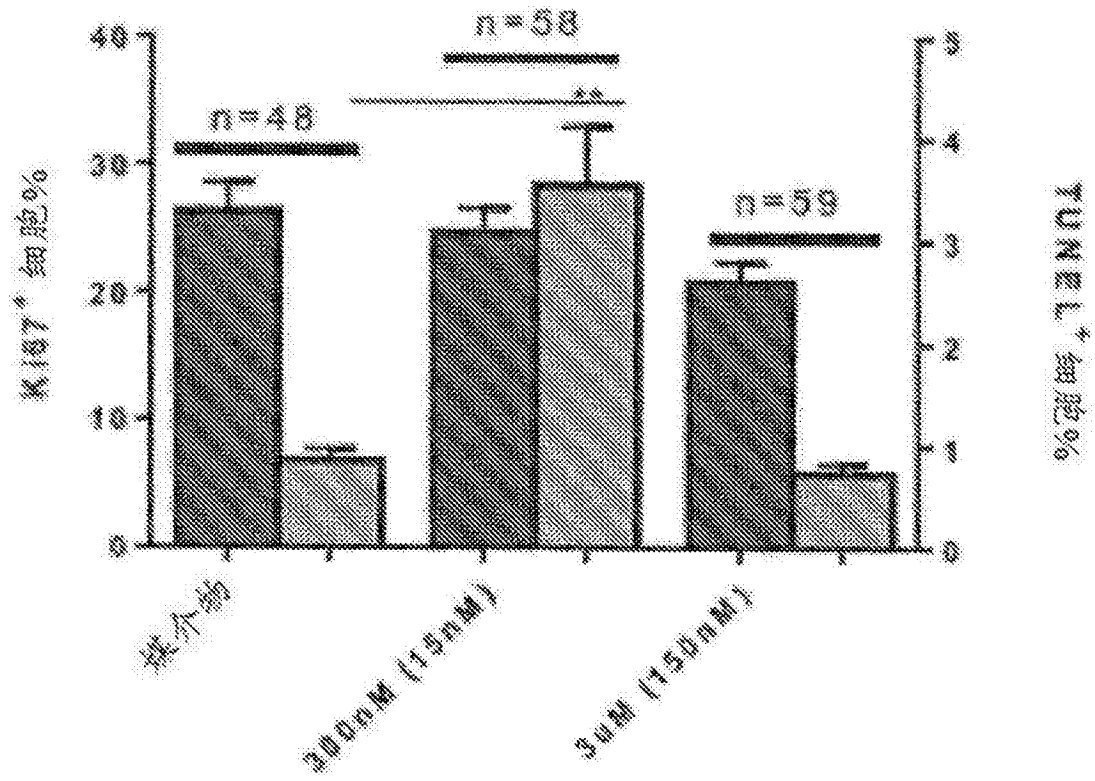


图20

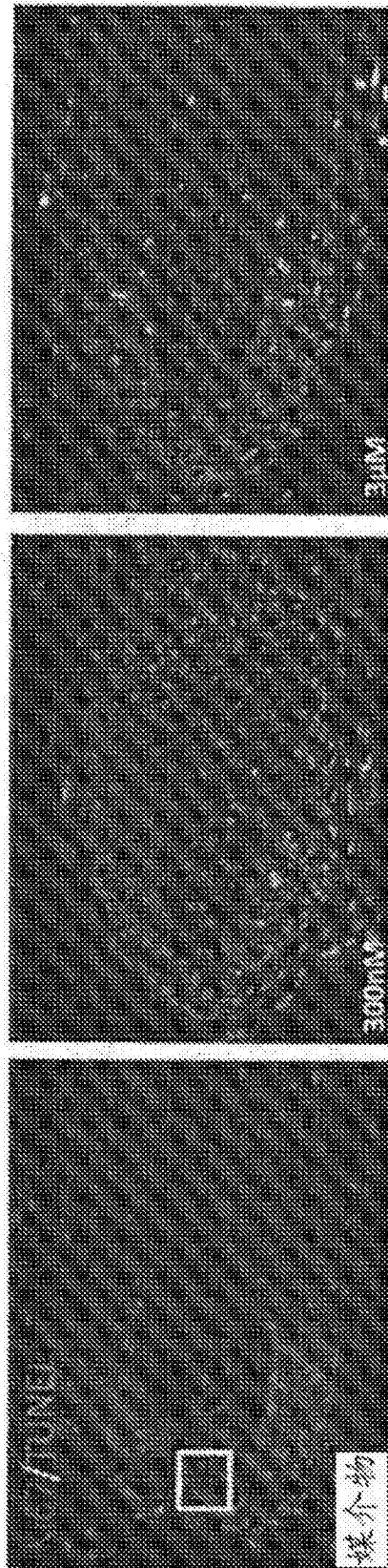


图21

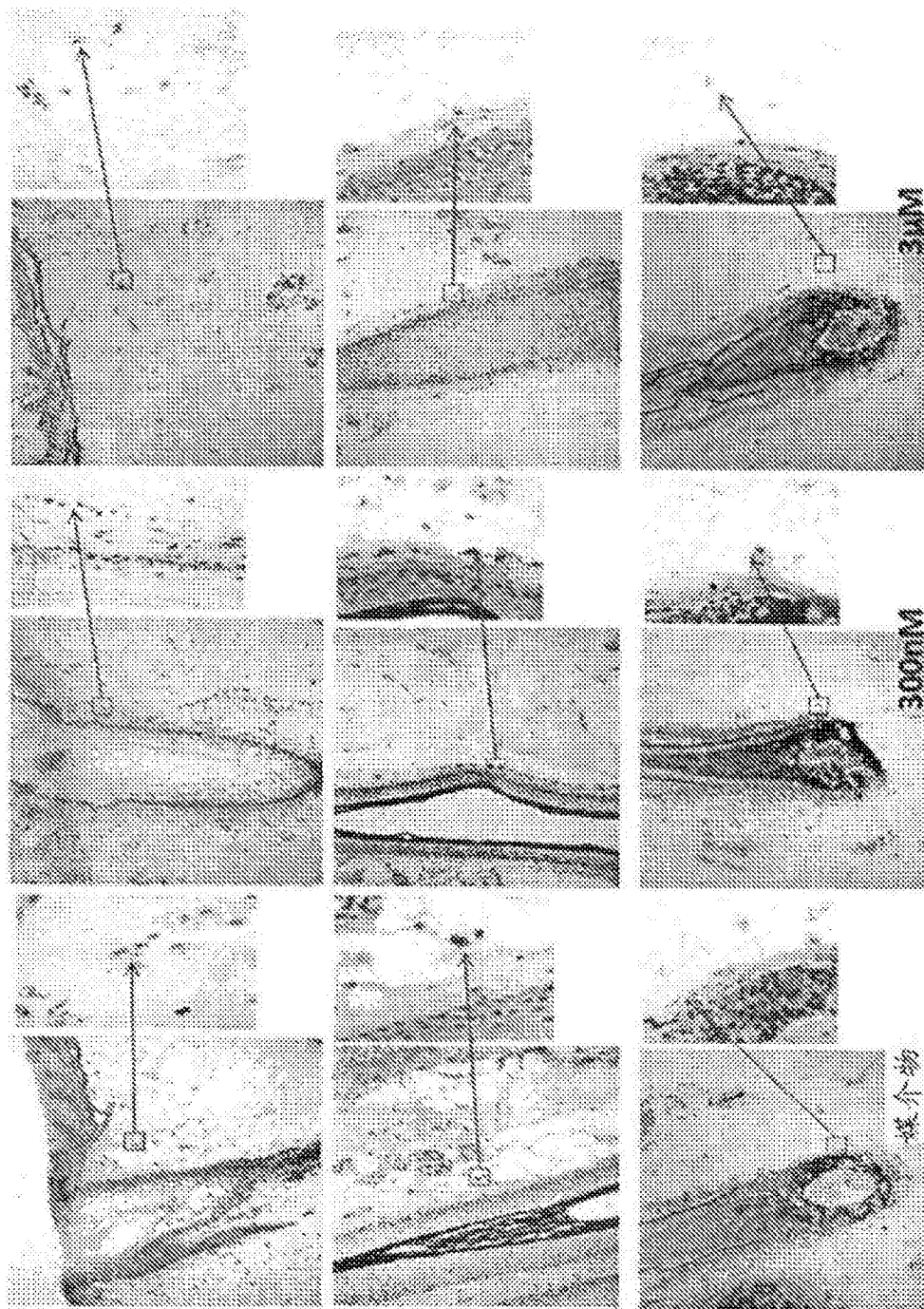


图22

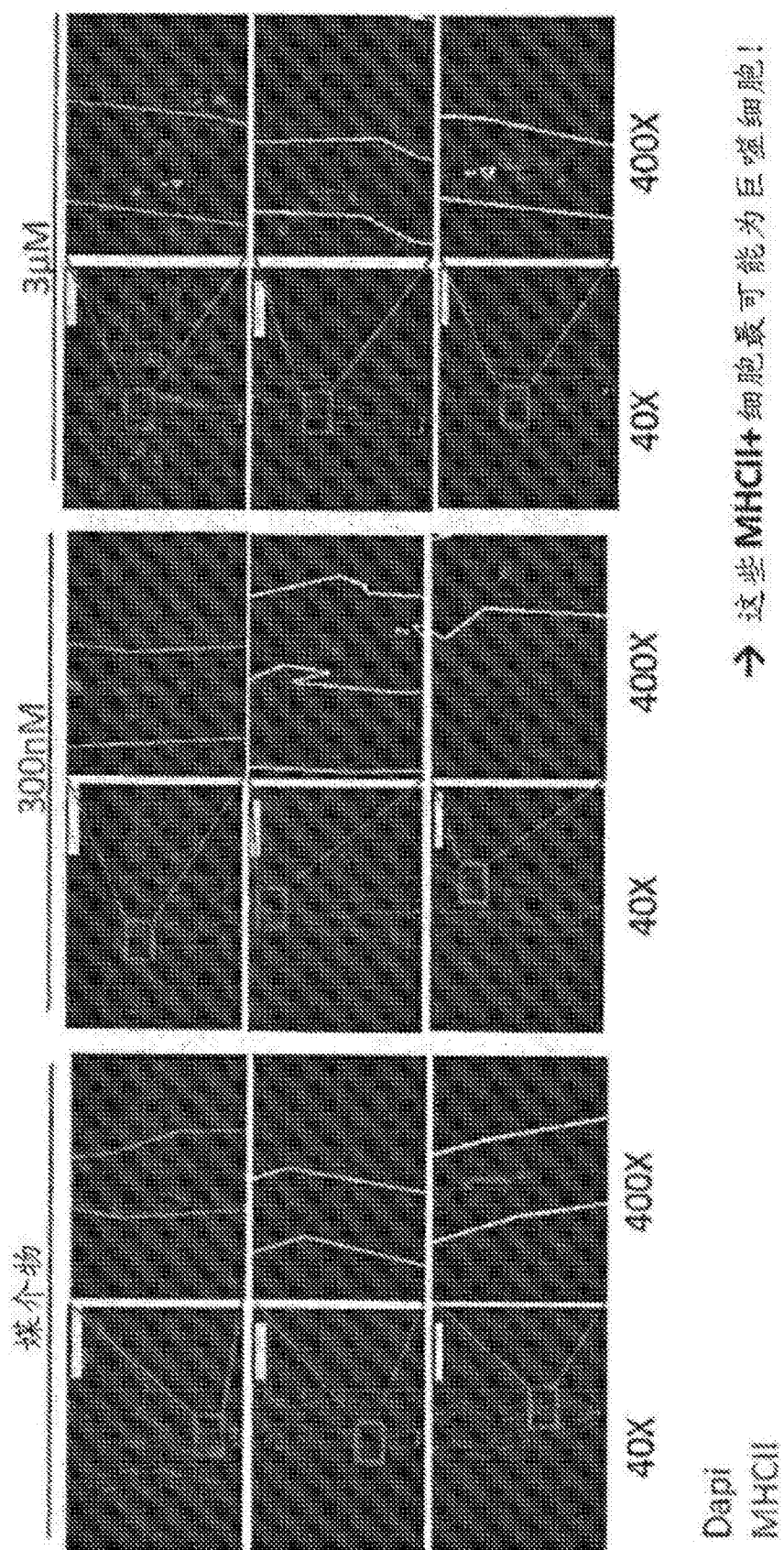


图23

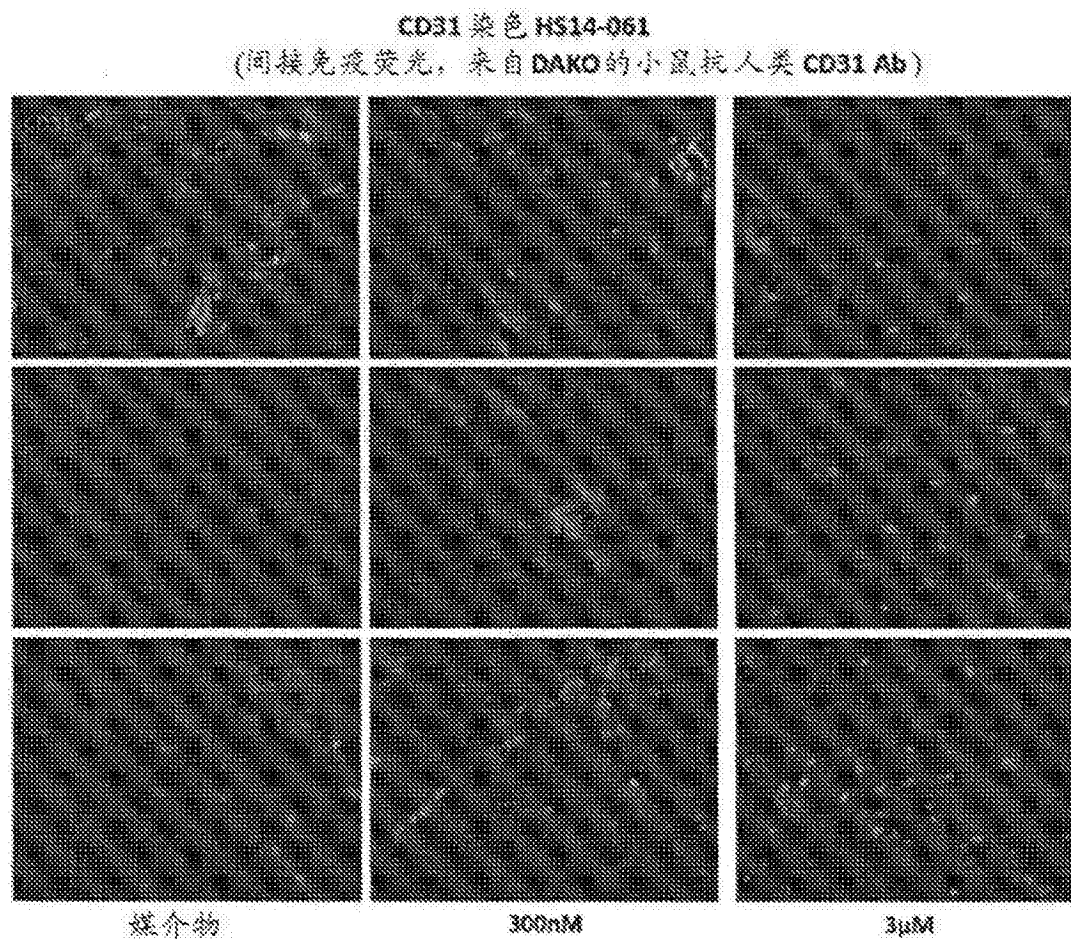


图24

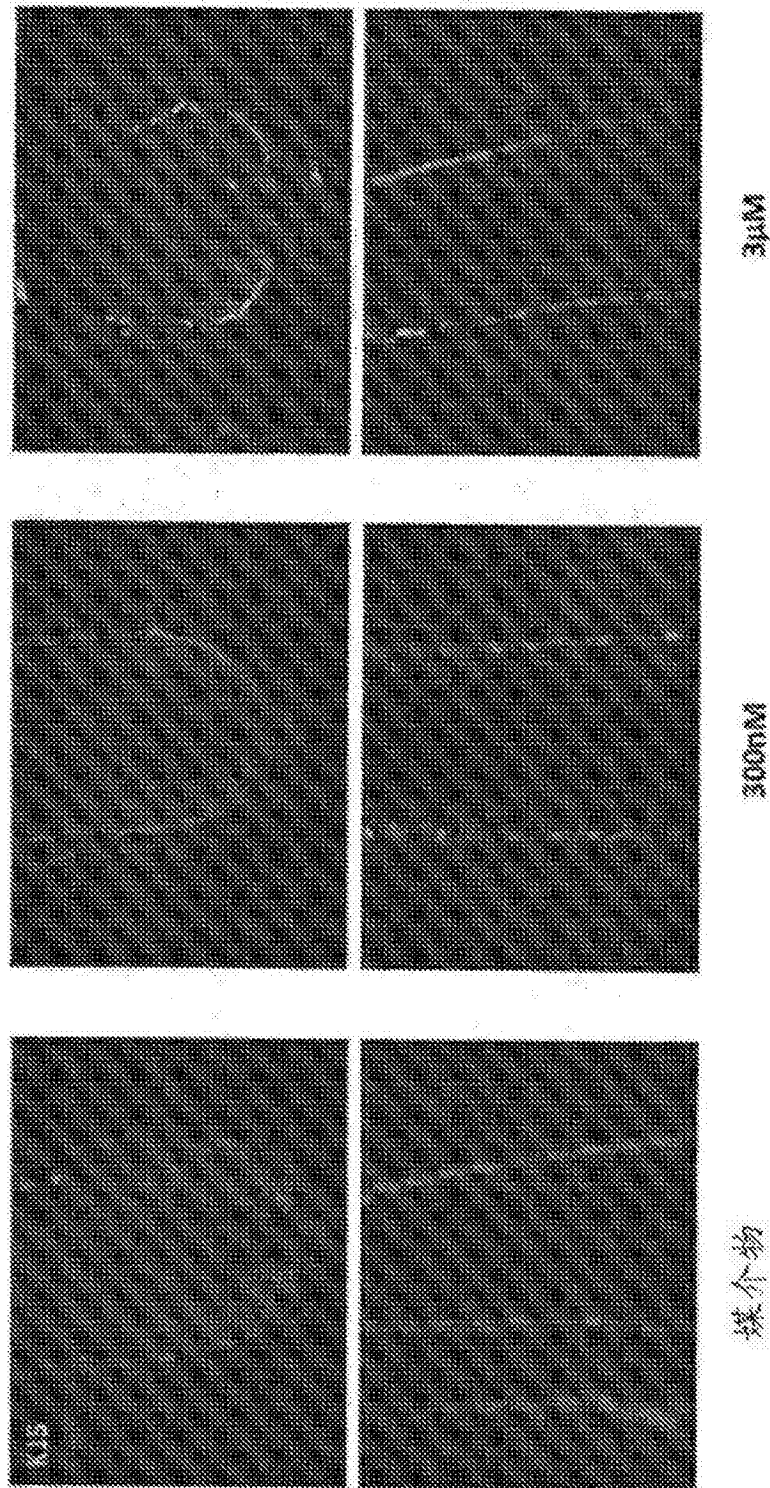
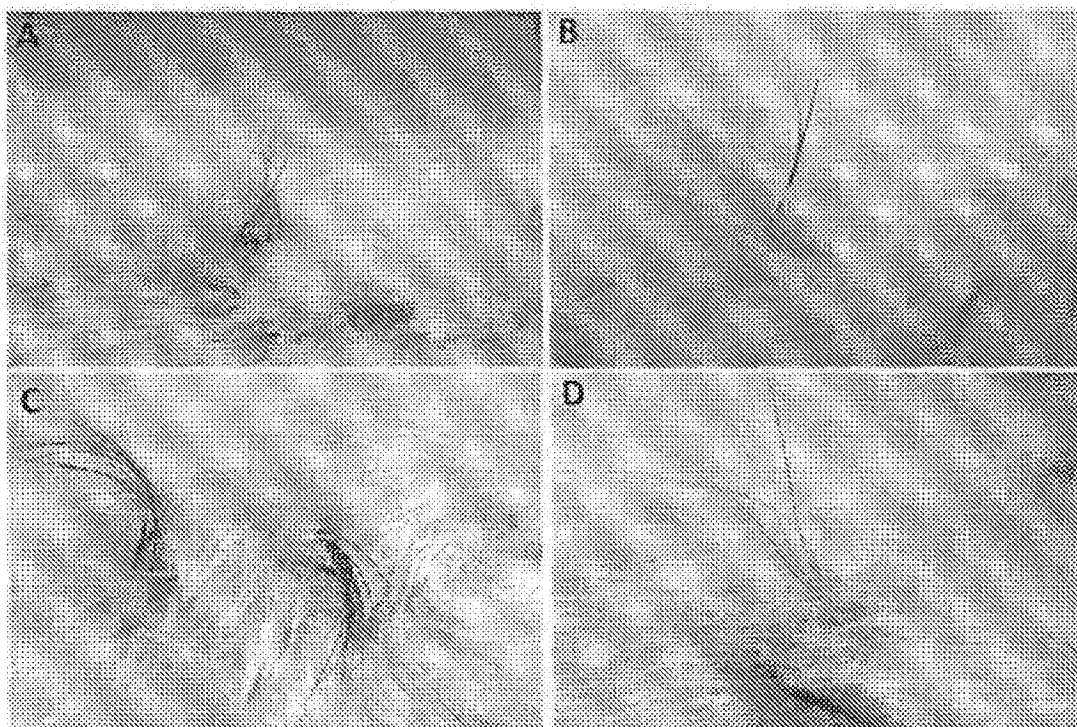


图25



在移植后3个月移植物的代表性照片：

(A)媒介物处理的组，(B)FOL-005处理的组，

(C)米诺地尔处理的组，(D)米诺地尔+FOL-005 处理的组

图26

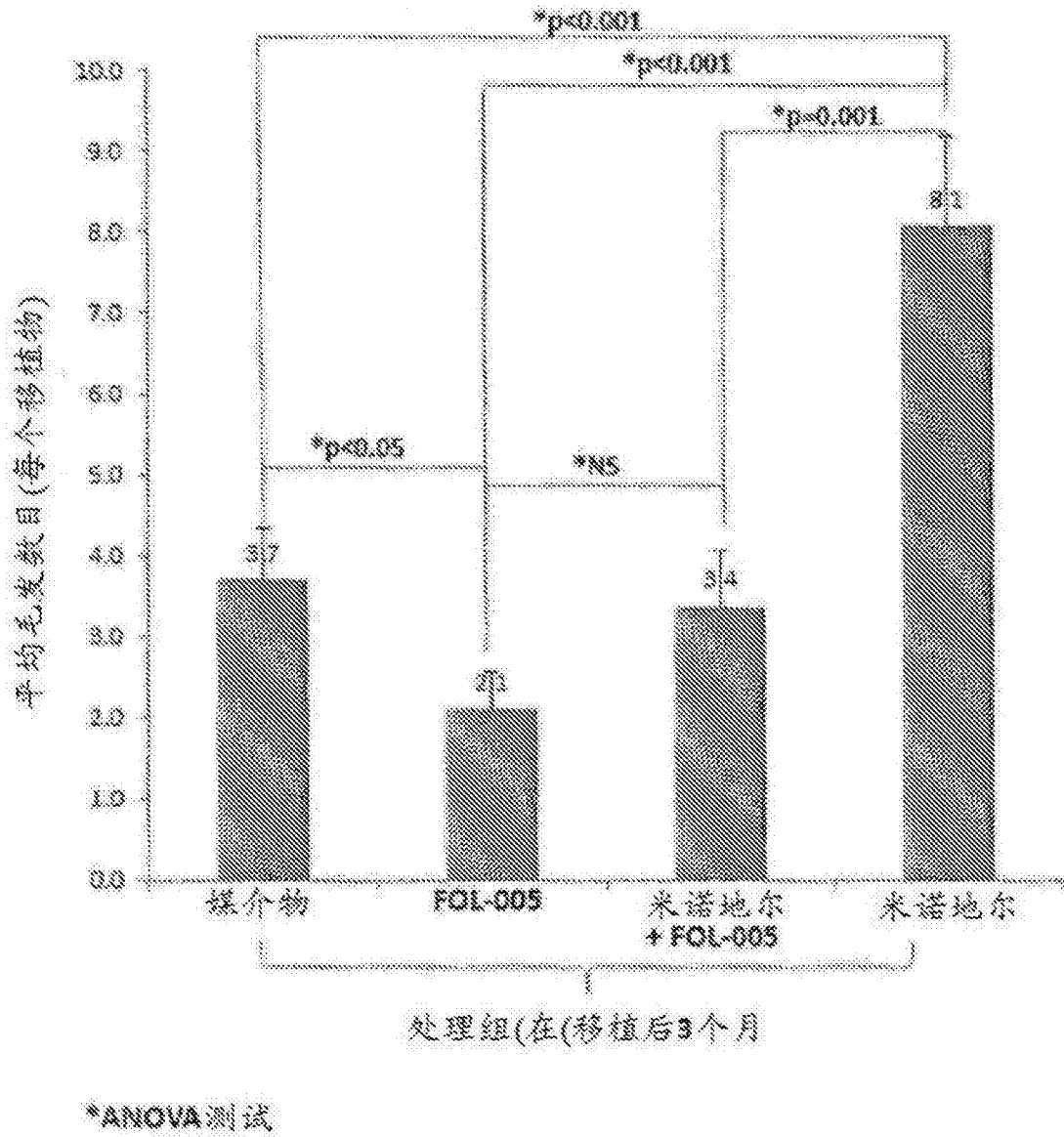


图27