



(12) 发明专利

(10) 授权公告号 CN 101522708 B

(45) 授权公告日 2013. 07. 17

(21) 申请号 200780037799. X
 (22) 申请日 2007. 10. 08
 (30) 优先权数据
 10-2006-0098368 2006. 10. 10 KR
 (85) PCT申请进入国家阶段日
 2009. 04. 09
 (86) PCT申请的申请数据
 PCT/KR2007/004895 2007. 10. 08
 (87) PCT申请的公布数据
 W02008/044846 EN 2008. 04. 17
 (73) 专利权人 凯尔杰有限公司
 地址 韩国京畿道
 (72) 发明人 郑镛池 金荣德 金银美 崔俊英
 宋尚洙
 (74) 专利代理机构 北京金信立方知识产权代理
 有限公司 11225
 代理人 朱梅 徐琳
 (51) Int. Cl.
 C07K 14/485 (2006. 01)
 A61K 38/00 (2006. 01)

(56) 对比文件
 WO 92/08804 A1, 1992. 05. 29,
 US 5183805 A, 1993. 02. 02,
 WO 85/02198 A1, 1985. 05. 23,
 US 2005/0070465 A1, 2005. 03. 31,
 A. KOMORIYA et al. Biologically
 active synthetic fragments of epidermal
 growth factor: localization of a major
 receptor-binding region. 《PROCEEDINGS OF THE
 NATIONAL ACADEMY OF SCIENCES OF USA》. 1984,
 第 81 卷 (第 5 期), 第 1351-1355 页.
 Zonghai Li et al. Identification and
 characterization of a novel peptide ligand
 of epidermal growth factor receptor for
 targeted delivery of therapeutics. 《The
 FASEB Journal》. 2005, 第 19 卷 (第 14 期), 第
 1978-1985 页.

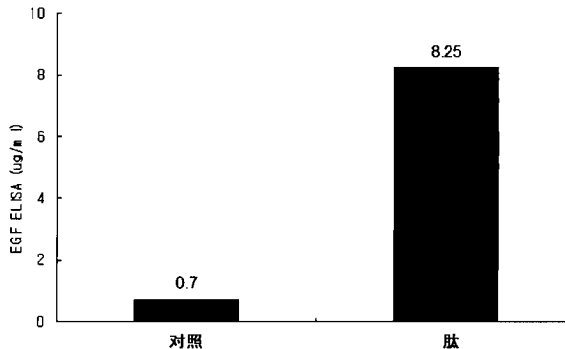
审查员 何睿

权利要求书1页 说明书12页
序列表1页 附图6页

(54) 发明名称
具有表皮生长因子活性的肽及其用途

(57) 摘要

本发明涉及包含下式 1 所示的氨基酸序列并具有表皮生长因子活性的肽及其用途: Cys-Met-Tyr-Ile-Glu-连接体-Arg-Gly-Asp(1)。本发明的 EGF 模拟肽具有与天然产生的人 EGF 相同的功能或活性并且能够促进细胞中产生自分泌 EGF。此外, 本发明的肽比天然产生的 EGF 具有更高的稳定性和皮肤渗透能力。因此, 含有该肽的组合物对需要 EGF 活性的疾病或状态显示出极好的治疗和预防功效, 并且能够有利地应用于药物组合物、准药和化妆品中。



CN 101522708 B

1. 一种具有表皮生长因子 (EGF) 活性的肽,该肽由下式 1 所示的氨基酸序列组成:
Cys-Met-Tyr-Ile-Glu-连接体-Arg-Gly-Asp (1),
其中,所述连接体由 Gly_(n) 表示,且 n 为 2-10 的整数。
2. 根据权利要求 1 所述的肽,其中,所述肽在其 N-末端或 C-末端具有选自乙酰基、苄基甲氧羰基、甲酰基、棕榈酰基、肉豆蔻基、硬脂酰基或聚乙二醇 (PEG) 组成的组中的保护基。
3. 根据权利要求 1 所述的肽,其中,位于所述肽的 C-末端的 Asp 残基另外连接到作为保护基的 Ala 或 Gly 残基上。
4. 根据权利要求 3 所述的肽,其中,所述肽由下式 2 所示的氨基酸序列组成:
Cys-Met-Tyr-Ile-Glu-Gly(n)-Arg-Gly-Asp-Gly (2)
其中,n 为 2 ~ 8 的整数。
5. 一种预防或治疗表皮生长因子有效的紊乱或状态的组合物,该组合物包含权利要求 1 ~ 4 中任一项所述的具有表皮生长因子 (EGF) 活性的肽作为活性成份。
6. 根据权利要求 5 所述的组合物,其中,所述组合物为包含 (a) 药用有效量的权利要求 1 ~ 4 中任一项所述的肽;和 (b) 可药用载体的药物组合物。
7. 根据权利要求 5 所述的组合物,其中,所述组合物为包含 (a) 美容有效量的权利要求 1 ~ 4 中任一项所述的肽;和 (b) 化妆品可用载体的化妆品组合物。
8. 根据权利要求 5 所述的组合物,其中,所述组合物通过促进天然产生的 EGF 的产生而具有促进细胞生长和分裂,上皮细胞活性的提高,血管发生,神经元再生,伤口愈合,血栓形成治疗,动脉粥样硬化治疗,胶原、弹性蛋白和层粘连蛋白的生物合成,治疗牙周疾病或改善皮肤状态的功效或活性。
9. 根据权利要求 8 所述的组合物,其中,所述组合物具有改善皮肤状态的功效。
10. 根据权利要求 8 所述的组合物,其中,所述改善皮肤状态为改善皱纹或皮肤弹性、预防皮肤老化、预防脱发、促进毛发生长、改善皮肤湿度、去除暗斑或治疗痤疮。

具有表皮生长因子活性的肽及其用途

技术领域

[0001] 本发明涉及具有表皮生长因子活性的肽及其用途。

背景技术

[0002] 斯坦利·科恩博士首次从小鼠下颌下腺中分离出由 53 个氨基酸残基组成的人表皮生长因子并且阐明其在早熟新生小鼠中加速眼睑开放 (Cohen, S. (1962) J. Biol. Chem. 237, 1555-1562)。1986 年, 斯坦利·科恩博士凭借 EGF 研究被授予诺贝尔医学奖 (Nobel medical prize)。EGF, 含有 3 个二硫键的多肽 (Savage, C. t., Jr. et al., (1973) J. Biol. Chem. 248, 7669-7672; Savage, C. R., Jr. et al., (1972) J. Biol. Chem. 247, 7612-7621), 经由 EGF 受体触发信号转导级联从而诱导哺乳动物细胞 (特别是上皮和皮肤细胞) 的生长和分裂, 从而促进上皮细胞的生长 (Sporn, M. B. et al., (1985) Nature (London) 313, 745-747; Sporn M. B. et al., (1980) N. Engl. J. Med. 303, 878-880)。此外, 已报道, EGF 在伤口愈合的分子调控中起关键作用 (Buckley, A. et al., (1985) Proc. Natl. Acad. Sci. USA. 82, 7340-7344)。

[0003] EGF 在如唾液、尿液、乳液、泪液和血液的各种体液中以高水平存在。在受伤时, 通过血流向受伤部位提供的 EGF 有助于伤口愈合而不留伤疤。此外, EGF 与 FSH (促卵泡激素) 一起参与子宫中的受精卵的成熟并且 EGF 是使由于没有血管而容易退化的角膜再生的原因。而且, EGF 通过以下各种作用在皮肤再生中起非常重要的作用: 促进上皮和内皮细胞的增殖; 促进成纤维细胞的增殖以在真皮中合成胶原; 在受伤部位促进血管发生; 诱导参与再生的因子的分泌; 以及促进纤连蛋白的生物合成以形成皮肤组织的网络化。

[0004] 人体应答创伤的发生并且向受伤组织供给 EGF 来治愈。然而, 在体内的 EGF 供给不足的情况下, 应提供外源 EGF 以回到正常和健康状态。在这点上, EGF 被认为具有大量应用。例如, EGF 可用于糖尿病脚溃疡、灼伤、创伤、角膜损伤、剖腹手术、整容剥离 (cosmetic peeling) 和皮肤老化。除上皮细胞增殖能力以外, 已提出, 人 EGF (hEGF) 通过阻止胃酸的分泌而有效用于治疗胃溃疡 (Gregory, H., (1985) J. Cell Sci. Suppl. 3, 11-17)。

[0005] Starkey 博士于 1975 年纯化了尿液中的人 EGF 并描述了它的特性; 其后, 已经进行了更多的努力以更高的产率和量来制备人 EGF (Starkey, R. H. et al., (1975) Science 189, 800; Cohen, S. et al., (1975) Proc. Natl. Acad. Sci. USA 72, 1317)。几个实验室已经报道了成功克隆了人 EGF 基因 (Smith, J. et al., (1982) Nucleic Acids Res. 10, 4467-4482; Urdea, M. S. et al., (1983) Proc. Natl. Acad. Sci. USA 80, 7461-7465; Oka, T, et al., (1985) Proc. Natl. Acad. Sci. USA 82, 7212-7216)。然而, 通过基因重组技术制备的人 EGF 还没有用于工业领域的大量和高活性的生产。

[0006] 大多数血液和组织中存在的多肽生长因子具有短至几分钟的体内半寿期。很可能, EGF 显示出差的结构稳定性。另外, 因为 EGF 是生物学不稳定的和生理化学异质的, 所以它可能显示降低的治疗功效。其皮肤渗透性极差。

[0007] 因此, 依旧需要开发出具有改善的稳定性和皮肤渗透能力并且具有 EGF 固有活性

的新物质。

[0008] 贯穿本申请,各种专利和出版物作为参考并且在括号内给出引用出处。为了更加全面地描述本发明以及本发明所属技术领域的状况,在此通过引用方式将这些专利和出版物的公开内容全部并入本申请。

发明内容

[0009] 为了开发出与天然产生的人表皮生长因子具有相同作用且与天然产生的 EGF 相比具有更加提高的稳定性和皮肤渗透性的肽,本发明人已经制备和筛选了大量的人 EGF 衍生的肽。结果,我们最终开发出了具有上述优异特性的肽。

[0010] 因此,本发明的一个目的是提供一种具有表皮生长因子 (EGF) 活性的肽。

[0011] 本发明的另一个目的是提供一种预防或治疗表皮生长因子有效的紊乱或状态的组合物。

[0012] 连同所附权利要求书和附图,从以下详述的说明中,本发明的其他目的和优点将变得明显。

[0013] 在本发明的一个方面中,提供一种具有表皮生长因子 (EGF) 活性的肽,该肽包含下式 1 所示的氨基酸序列:

[0014] Cys-Met-Tyr-Ile-Glu-连接体-Arg-Gly-Asp (1)。

[0015] 在本发明的另一个方面中,提供一种预防或治疗表皮生长因子有效的紊乱或状态的组合物,该组合物包含本发明的具有表皮生长因子 (EGF) 活性的肽作为活性成份。

[0016] 为了开发出与天然产生的人表皮生长因子具有相同作用且与天然产生的 EGF 相比具有更加提高的稳定性和皮肤渗透性的肽,本发明人已经制备和筛选了大量的人 EGF 衍生的肽。结果,我们最终发现了具有上述优异特性的肽。

[0017] 本发明人的开发策略如下:首先,将本发明的肽设计包含两个区域,EGF 衍生的序列(即 EGF 活性区域)和细胞附着区域。EGF 活性区域选自天然产生的 EGF 氨基酸序列中。为了提高本发明的肽的 EGF 活性,细胞附着区域选自细胞外基质蛋白之一的纤连蛋白。

[0018] 最终选择的 EGF 活性区域包含氨基酸序列“Cys-Met-Tyr-Ile-Glu”而最终选择的细胞附着区域包含氨基酸序列“Arg-Gly-Asp”。此外,本发明人已发现,与直接连接相比,优选经由连接体间接连接两个区域。

[0019] 根据开发策略,制备出了下式 1 所示的 EGF 模拟肽。

[0020] 使 EGF 活性区域和细胞附着区域互相连接的连接体包括本领域技术人员可利用的任何连接体。优选地,所述连接体包含多个氨基酸。在 Huston, 等人, *Methods in Enzymology*, 203 :46-88 (1991) 和 Whitlow, 等人, *Protein Eng.*, 6 :989 (1993) 中查到了肽连接体的详细资料,其教导的内容在此通过引用方式并入。本发明中适合的连接体包含具有不带电侧链的氨基酸,优选为 Gly 或者 Gly 或 Ser。优选地,所述连接体的长度为 2 ~ 18 个氨基酸残基。更优选地,所述连接体包含 2 ~ 10 个 Gly 残基。由氨基酸残基(特别是 Gly 残基)组成的连接体有助于本发明的肽的稳定性。

[0021] 即使本发明的肽本身比天然产生的 EGF 具有更高的稳定性,对其的修饰能使其具有高得多的稳定性。优选地,本发明的肽在其 N- 末端或 C- 末端具有选自由乙酰基、苄基甲氧羰基、甲酰基、棕榈酰基、肉豆蔻基、硬脂酰基或聚乙二醇 (PEG) 组成的组中的保护基。保

护基也是本发明的肽具有稳定性的原因。

[0022] 或者,式 1 所示的肽的 C- 末端被修饰具有氨基,这样提高了肽的稳定性。

[0023] 本文所用的术语“稳定性”指体内稳定性和贮藏稳定性(例如,在室温下的贮藏稳定性)。上述的保护基保护肽免受体内蛋白酶的攻击。

[0024] 根据优选的实施方式,位于肽的 C- 末端的 Asp 残基另外连接到作为保护基的 Ala 或 Gly 残基(更优选为 Gly 残基)上。

[0025] 根据最优选的实施方式,所述肽包含下式 2 所述的氨基酸序列:

[0026] Cys-Met-Tyr-Ile-Glu-Gly(n)-Arg-Gly-Asp-Gly (2)

[0027] 其中,n 为 2~8 的整数。

[0028] 典型的肽的氨基酸序列如 SEQ ID NO:1 所述。

[0029] 本发明的肽包含式 1 所示的氨基酸序列。优选地,所述肽基本由式 1 所示的氨基酸序列组成。最优选地,所述肽由式 1 所示的氨基酸序列组成。

[0030] 本文所用的术语“肽”指通过肽键连接氨基酸残基形成的线型分子。

[0031] 本发明的肽可通过本领域技术人员已知的常规化学合成方法,尤其是,固相合成技术(Merrifield, J. Amer. Chem. Soc. 85:2149-54(1963);Stewart, et al., Solid Phase Peptide Synthesis, 2nd. ed., Pierce Chem. Co.:Rockford, 111(1984))来制备。

[0032] 形成本发明的肽的结构的基本原则是连接 EGF 衍生的序列和纤连蛋白衍生的细胞附着序列。因此,对本领域技术人员来说,将是显而易见的是,描述式 1 以通过更加方便的方式来说明本发明的肽,并且落入本发明实质的式 1 的修饰或改变也包括在本发明的范围内。例如,EGF 衍生的序列和纤连蛋白衍生的细胞附着序列位置相反的肽,即“Arg-Gly-Asp-连接体-Cys-Met-Tyr-Ile-Glu”,落入本发明的范围内。此外,包含向 EGF 衍生的序列和/或纤连蛋白衍生的细胞附着序列附加的氨基酸残基(例如,1~2 个氨基酸残基)的肽落入本发明的范围内。例如,在将细胞附着序列 Arg-Gly-Asp 的 C- 末端修饰成进一步含有 Ser 残基的情况下,该肽落入本发明的范围内。

[0033] 本发明的肽具有天然产生的人 EGF 活性并且对如酸和碱的生理化学因子显示出较高的稳定性。本发明的具有显著的长期贮藏稳定性的肽可以有利地用于需要长期贮藏的产品中,例如药物、准药、化妆品和牙齿/口腔清洁或护理产品。

[0034] 在本发明的另一个方面中,提供一种预防或治疗表皮生长因子有效的紊乱或状态的组合物,该组合物包含本发明的具有表皮生长因子(EGF)活性的肽作为活性成份。

[0035] 在本发明的又一个方面中,提供一种预防或治疗表皮生长因子有效的紊乱或状态的方法,该方法包括向被试者施用包含本发明的肽的组合物。

[0036] 在本发明的还一个方面中,提供一种本发明的肽用于制备预防或治疗表皮生长因子有效的紊乱或状态的组合物的用途。

[0037] 因为本组合物包含本发明的肽作为上述活性成份,所以省略它们之间的一般说明从而避免过度冗余而导致本说明书太复杂。

[0038] 在本组合物中包含的作为活性成份的本发明的肽具有 EGF 活性并且显示出与天然产生的 EGF 相同或相似的体内功能和功效。本文所用的术语“EGF 活性”指本领域技术人员已知的天然产生的 EGF 的任一和全部活性,例如,包括促进细胞增殖和分裂。因为制备了本发明的肽以模拟天然产生的 EGF 的作用,所以其能够发挥天然产生的 EGF 的全部体内活

性。

[0039] 由于本发明的肽具有与天然产生的 EGF 相同或相似的功能和作用并且显示出比天然产生的 EGF 更高的生物活性,所以其能够有利地用于预防或治疗 EGF 有效的紊乱或状态。本文所用术语“EGF 有效的紊乱或状态”指通过天然产生的 EGF 能够预防或治疗的紊乱或状态。

[0040] 根据优选的实施方式,本发明的组合物具有促进细胞生长和分裂,上皮细胞活性,血管发生,神经元再生,伤口愈合,血栓形成治疗,动脉粥样硬化治疗,胶原、弹性蛋白、层粘连蛋白和透明质酸的生物合成,治疗牙周疾病或改善皮肤状态的功效或活性。

[0041] 在将本组合物应用于牙周疾病治疗时,可将其配制成牙膏或者牙齿和口腔清洁或护理的组合物。本文的术语“治疗牙周疾病的组合物”可与其它术语“牙齿和口腔护理的组合物”和“牙齿和口腔清洁的组合物”交替使用。本发明的肽促进齿龈组织中存在的上皮细胞的生物活性并且愈合齿龈伤口以使受损的齿龈组织再生,从而治疗或预防牙周疾病。

[0042] 更优选地,本发明的组合物具有改善皮肤状态的功效。尤其是,由于其低分子量,本组合物中用作活性成分的肽显示出极好的皮肤渗透性。因此,在将本组合物局部应用于皮肤时,很明显地,显著改善了皮肤状态。还更优选地,本组合物对皮肤状态的改善包括改善皱纹或皮肤弹性、预防皮肤老化、预防脱发、促进毛发生长、改善皮肤湿度、去除暗斑、治疗痤疮、伤口愈合和皮肤再生,最优选地,包括改善皱纹或皮肤弹性和预防皮肤老化、伤口愈合以及皮肤再生。

[0043] 例如,在本组合物中用作活性成分的肽能够促进角质细胞的增殖,诱导原胶原和纤连蛋白的生物合成以及诱导天然产生的 EGF(一种皮肤生长物质)的自分泌产生而使角质细胞层、表皮和真皮再生,从而致使:改善皱纹、皮肤弹性和皮肤湿度、预防皮肤老化、伤口愈合和皮肤再生。

[0044] 可将本组合物制备成药物或化妆品组合物。

[0045] 根据优选的实施方式,所述组合物为包含 (a) 药用有效量的本发明的肽;和 (b) 可药用载体的药物组合物。

[0046] 本文所用的术语“药用有效量”指足够显示和实现本发明的肽的功效和活性的量。

[0047] 在本发明的药物组合物中包含的通常在药物制剂中使用的可药用载体包括但不限于,乳糖、葡萄糖、蔗糖、山梨糖醇、甘露醇、淀粉、阿拉伯橡胶 (rubber arable)、磷酸钾、精氨酸盐 (arginate)、明胶、硅酸钾、微晶纤维素、聚乙烯吡咯烷酮、纤维素、水、糖浆、甲基纤维素、羟苯甲酸甲酯、羟苯甲酸丙酯、滑石、硬脂酸镁和矿物油。根据本发明的药物组合物可进一步包含润滑剂、湿润剂、甜味剂、调味剂、乳化剂、混悬剂和防腐剂。适合的可药用载体和配方的详细资料可在雷明顿氏制药科学 (Remington's Pharmaceutical Sciences (19th ed., 1995)) 中找到,将其通过引用方式并入本申请。

[0048] 根据本发明的药物组合物可经口或肠胃外给药,并且优选经肠胃外施用,例如,通过静脉内、腹膜内、肌肉内、皮下、经皮或局部施用。

[0049] 本发明的药物组合物的适合的剂量可根据药物配制方法,给药方法,患者的年龄、体重、性别、发病状态、饮食,给药时间,给药途径,排泄率及对所用药物组合物的敏感性而变化。优选地,本发明的药物组合物可以每日 0.0001 ~ 100 μ g 的剂量施用。

[0050] 根据本领域技术人员已知的常规技术,可用如上所述的可药用载体和 / 或赋形剂

配制根据本发明的药物组合物,最终提供几种形式的单剂量型和多剂量型。所述制剂的非限定性实例包括但不限于:在油或水介质中的溶液剂、混悬剂或乳剂,浸膏剂,酏剂,粉剂,颗粒剂,片剂和胶囊剂,并且可进一步包含分散剂或稳定剂。

[0051] 根据优选的实施方式,所述组合物为包含 (a) 美容有效量的本发明的肽;和 (b) 化妆品可用载体的化妆品组合物。

[0052] 本文所用的术语“美容有效量”指足够实现如上所述的改善皮肤状态的功效果的量。

[0053] 可将本发明的化妆品组合物配制成很多种形式,例如,包括溶液、混悬剂、乳剂、糊剂、软膏、凝胶、霜剂、洗剂、粉剂、皂剂、包含表面活性剂的清洁剂、油、粉状底霜、乳状底霜、蜡状底霜和喷雾剂。具体地,可将本发明的化妆品组合物配制成柔肤剂、滋养液、滋养霜、按摩霜、精华素、眼霜、清洁霜、清洁泡沫、清洁水、美容涂敷剂(pack)、喷雾剂或粉剂的形式。

[0054] 在化妆品组合物为糊剂、霜剂或凝胶的形式时,其可包含动物和植物脂肪、蜡、石蜡、淀粉、西黄蓍胶、纤维素衍生物、聚乙二醇、聚硅氧烷、皂土、硅石、滑石、氧化锌或这些物质的混合物。

[0055] 在粉剂或喷雾剂的配方中,其可包含乳糖、滑石、硅石、氢氧化铝、硅酸钙、聚酰胺粉末和这些物质的混合物。喷雾剂可另外包含常规推进剂,例如,含氯氟烃、丙烷/丁烷或二甲醚。

[0056] 溶液和乳剂的配方可包含溶剂、增溶剂和乳化剂,例如水、乙醇、异丙醇、碳酸乙酯、乙酸乙酯、苯甲醇、苯甲酸苄酯、丙二醇、1,3-丁基乙二醇、油、甘油脂肪酸酯、聚乙二醇和失水山梨糖醇的脂肪酸酯。

[0057] 混悬剂的配方可包含:液体稀释剂,例如水、乙醇或丙二醇;混悬剂,例如乙氧基异硬脂醇、聚氧乙烯山梨糖醇酯和聚氧乙烯失水山梨糖醇酯、微晶纤维素、偏氢氧化铝(aluminum metahydroxide)、皂土、琼脂及西黄蓍胶;或者这些物质的混合物。

[0058] 含有表面活性剂的清洁组合物的配方可包含脂族醇硫酸酯、脂族醇醚硫酸酯、磺基琥珀酸单酯(sulfosuccinate monoester)、异硫代硫酸酯(isothionate)、咪唑鎓盐衍生物、牛磺酸甲酯、肌氨酸酯(sarcocinate)、脂肪酸酰胺醚硫酸酯、烷基酰氨基甜菜碱、脂族醇、脂肪酸甘油酯、脂肪酸二乙醇酰胺、植物油、羊毛脂衍生物、乙氧基甘油脂肪酸酯或这些成分的混合物。

[0059] 此外,本发明的化妆品组合物可包含助剂与作为活性成分的肽及载体。助剂的非限制性实例包括防腐剂、抗氧化剂、稳定剂、增溶剂、维生素、着色剂、气味改进剂或这些物质的混合物。

[0060] 将本发明的特征和优点总结如下:

[0061] (i) 本发明的 EGF 模拟肽具有与天然产生的人 EGF 相同的功能或活性;

[0062] (ii) 本发明的肽能够促进细胞中产生自分泌 EGF;

[0063] (iii) 本发明的肽具有比天然产生的 EGF 更高的稳定性和皮肤渗透能力;

[0064] (iv) 因此,含有该肽的组合物对需要 EGF 活性的疾病或状态显示出极好的治疗和预防功效;以及

[0065] (v) 可将本发明的肽有利地应用于药物组合物、准药和化妆品中。

附图说明

- [0066] 图 1 表示实施例中制备的十三肽的 HPLC(高效液相色谱法) 分析的结果。
- [0067] 图 2 表示本发明的十三肽的稳定性的分析结果。“肽”和“rhEGF”分别表示十三肽和重组 EGF。
- [0068] 图 3 为证明十三肽促进人角质细胞生长的效果的显微镜图像。图 A 表示未处理的对照, 而图 B 表示处理组。
- [0069] 图 4 为证明十三肽以剂量依赖性方式促进人角质细胞生长的图。
- [0070] 图 5 为证明十三肽增强人角质细胞的粘附的显微镜图像。
- [0071] 图 6 为表示用十三肽处理的 NIH 3T3 细胞的运动性增强的显微镜图像。
- [0072] 图 7 表示用十三肽培养的细胞产生较高水平的自分泌 EGF。
- [0073] 图 8 表示在用十三肽培养细胞时显示透明质酸水平增加的图。
- [0074] 图 9 为显示施用含有十三肽的化妆品的 Balb C 小鼠的皮肤厚度变化的显微镜图像。

具体实施方式

[0075] 现将通过实施例进一步详细描述本发明。对本领域技术人员显而易见的是, 这些实施例是用来更具体地阐述本发明的并且如所附权利要求书提出的本发明的范围不限于实施例或受实施例的限制。

[0076] 实施例

[0077] 实施例 1 :NH₂-Cys-Met-Tyr-Ile-Glu-Gly(n)-Arg-Gly-Asp-Gly-OH 的合成

[0078] 向反应器中加入 700mg 氯三苯甲基氯树脂 (CTL 树脂, Nova Biochem, 目录号 01-64-0021), 向该反应器中加入 10ml 二氯甲烷 (MC), 接着搅拌 3 分钟。除去溶液后, 向生成物中加入 10ml 二甲基甲酰胺 (DMF), 然后搅拌 3 分钟, 之后除去溶剂。向该反应器中加入 10ml 二氯甲烷溶液, 然后向反应器中加入 200mmol Fmoc-Gly-OH Tyr(tBu)-OH(Nova Biochem, 美国) 和 400mmol DIEA(N, N'-二异丙基乙胺), 之后通过搅拌溶解该混合物, 然后搅拌的同时进行反应 1 小时。洗涤后, 使溶于 MC 中的甲醇和 DIEA(2 : 1) 与树脂反应 10 分钟, 然后用过量的 DCM/DMF(1 : 1) 洗涤该生成物。除去溶液后, 向生成物中加入 10ml DMF 并搅拌 3 分钟, 随后除去溶剂。向反应器中加入 10ml 脱保护溶液 (20% 哌啶 /DMF) 且在室温下搅拌 10 分钟, 接着除去溶液。加入相同体积的脱保护溶液后, 进行反应 10 分钟并且除去溶液, 随后依次用 DMF、MC 和 DMF 洗涤以制得 Gly-CTL 树脂。向新的反应器中加入 10ml DMF 溶液, 然后加入 200mmol Fmoc-Asp(tBu)-OH(Nova Biochem, 美国)、200mmol HoBt 和 200mmol Bop, 随后搅拌溶解。向该反应器中加入 400mmol DIEA 并且进行搅拌以溶解全部固体含有物。将溶解的氨基酸溶液引入容纳脱保护树脂的反应器中并且在室温下在搅拌的同时进行反应 1 小时。在除去反应溶液后, 用 DMF 溶液搅拌生成物 3 次以除去未反应的残余物。取反应后的树脂通过茚三酮试验评价反应程度。使用脱保护溶液, 以与上述相同的方式进行 2 次脱保护以制得 Asp(tBu)-Gly-CTL 树脂。用 DMF 和 MC 洗涤后, 进行茚三酮试验然后如上所述进行氨基酸的顺序连接。基于本发明人设计的氨基酸序列, 将 Fmoc-Gly、Fmoc-Arg(pbf)、Fmoc-Gly(n 个)、Fmoc-Glu(tBu)、Fmoc-Ile、Fmoc-Tyr(tBu)、Fmoc-Met 和 Fmoc-Cys(trt) 依次连接到树脂上。设置在肽的中间部分的 Gly 残基的数目可以通过用 Fmoc-Gly 进行 2 ~ 8 次反应而变化, 产生 7 种类型的肽基树脂。

[0079] 用 DMF、MC 和甲醇分别洗涤所制备的肽基树脂三次并且在氮气气氛下干燥,之后在 P_2O_5 下通过真空干燥。在室温下间歇搅拌下使干燥的树脂与 30ml 离去溶液 [包含 81.5% 三氟乙酸 (TFA)、5% 蒸馏水、5% 苯硫基甲烷、5% 苯酚、2.5% EDT 和 1% TIS] 反应 2 小时。过滤并用少量 TFA 溶液洗涤该树脂,之后将滤出液与母液合并。在减压下蒸馏以减小至总体积的一半后,使用 50ml 冷醚诱导沉淀并且通过离心法收集形成的沉淀,随后用冷醚洗涤 2 次。除去母液后,在氮气气氛下干燥该生成物以制得未纯化的 7 种类型的肽, NH_2 -Cys-Met-Tyr-Ile-Glu-Gly(n)-Arg-Gly-Asp-Gly-OH。在它们中,由 NH_2 -Cys-Met-Tyr-Ile-Glu-Gly-Gly-Gly-Arg-Gly-Asp-Gly-OH 组成的肽 (在下文中称为十三肽) 产量为 0.82g 并且使用分子量分析器 (PerseptivePioneer DE-STR ABI, 美国) 测定的分子量为 1272.0。

[0080] 图 1 表示所合成的肽的 HPLC 分析结果。为了 HPLC 分析,使用 Gilson 泵 (Korea Analytical Instruments Co., Ltd., 韩国) 和 C_{18} 4.6x250mm 柱。溶剂体系包含 A 溶剂 (0.1% TFA) 和 B 溶剂 (0.1% MeCN)。本发明合成的十三肽分析具有大约 20 分钟的保留时间,说明所制得的肽具有适合的纯度。使用十三肽进行以下实验。

[0081] 实施例 2 :十三肽的稳定性的评价

[0082] 为了评价实施例 1 所合成和纯化的十三肽的稳定性,在 50mM Tris-HCl (pH 8.0) 中溶解十三肽至浓度为 $10 \mu g/ml$ 。将在大肠杆菌中产生的重组 EGF 蛋白 (Sigma-Aldrich) 以相同缓冲液至浓度为 $1 \mu g/ml$ 而制成对照。将该制备的溶液引入玻璃瓶中并在 $37^\circ C$ 静置。而后,将该溶液在第 0、1、10、25、50、75 和 100 天取出并使用 NIH-3T3 细胞 (Korean Cell Line Bank) 进行 MTT 分析 (Scudiero, D. A., et al. Cancer Res. 48 :4827-4833 (1988)) 来确定肽和 EGF 的剩余活性 (图 2)。结果给出与第 0 天取出的样品的活性 (100%) 的相对值。

[0083] 如图 2 中所示,随着时间的流逝,重组 EGF 蛋白的活性急剧下降。相反,本发明的十三肽的活性显示其不随时间过去而降低。这些结果使我们推出本发明的 EGF 肽与具有全长氨基酸残基的 EGF 蛋白相比具有显著提高的稳定性。

[0084] 实施例 3 :纳米肽的制备

[0085] 在 500ml 蒸馏水中溶解 50mg 在实施例 1 中合成的十三肽。将该肽溶液与 5g 卵磷脂、0.3ml 油酸钠、50ml 乙醇和少量的油混合并用蒸馏水将其体积调节至 1L。该生成的溶液在高压下经微流化床装置以进行乳化,从而提供大小为 100nm 的纳米体 (nanosome)。该纳米体被制成最终浓度约为 50ppm 并且用作化妆品的成分。

[0086] 配方实施例 1 :柔肤剂

[0087] 按照下列成分配制包含实施例 3 中制备的含有十三肽的纳米体的柔肤剂 :

[0088] 表 1

[0089]

成分	含量 (wt%)
十三肽	0.001
1,3-丁二醇	6.0

甘油	4.0
PEG 1500	1.0
透明质酸钠	1.0
聚山梨醇酯 20	0.5
乙醇	8.0
防腐剂、颜料	适量
二苯甲酮-9	0.05
芳香剂	微量
蒸馏水	余量
合计	100

[0090] 配方实施例 2 :滋养霜

[0091] 按照下列成分配制包含实施例 3 中制备的含有十三肽的纳米体的滋养霜：

[0092] 表 2

[0093]

成分	含量 (wt%)
十三肽	0.001
绣线菊油 (Meadowfoam oil)	3.0
棕榈醇 (Cetearyl alcohol)	1.5
硬脂酸	1.5
硬脂酸甘油酯	1.5
液体石蜡	10.0
蜡	2.0
聚山梨醇酯 60	0.6
失水山梨糖醇倍半油酸酯	2.5
角烷	3.0

1,3-丁二醇	3.0
甘油	5.0
三乙醇胺	0.5
醋酸维生素 E	0.5
防腐剂、颜料	适量
芳香剂	适量
蒸馏水	余量
合计	100

[0094] 配方实施例 3 :滋养液

[0095] 按照下列成分配制包含实施例 3 中制备的含有十三肽的纳米体的滋养液 :

[0096] 表 3

[0097]

成分	含量 (wt%)
十三肽	0.002
1,3-丁二醇	4.0
甘油	4.0
棕榈醇	0.8
硬脂酸甘油酯	1.0
三乙醇胺	0.13
醋酸维生素 E	0.3
液体石蜡	5.0
角烷	3.0
夏成夷果油 (Makadamianut oil)	2.0
聚山梨醇酯 60	1.5

失水山梨糖醇倍半油酸酯	0.5
羧基乙烯基聚合物	1.0
防腐剂、颜料	适量
芳香剂	适量
蒸馏水	余量
合计	100

[0098] 配方实施例 4 :精华素

[0099] 按照下列成分配制包含实施例 3 中制备的含有十三肽的纳米体的精华素 :

[0100] 表 4

[0101]

成分	含量 (wt%)
十三肽	0.005
甘油	10.0
1,3-丁二醇	5.0
PEG 1500	2.0
尿素	0.1
DL-泛醇	0.3
EDTA-2Na	0.02
羟乙基纤维素	0.1
透明质酸钠	8.0
羧基乙烯基聚合物	0.2
三乙醇胺	0.18
辛基十二烷醇聚醚 16 (Octyldodeceth-16)	0.4
乙醇	6.0
芳香剂、防腐剂、颜料	适量

蒸馏水	余量
合计	100

[0102] 实施例 4 :肽对 HaCaT 角质细胞生长影响的分析

[0103] 为了分析本发明的肽对角质细胞增殖的影响,根据 Rizzino 等人的方法 (Rizzino, et al. Cancer Res., 48 :4266 (1988)),使用 HaCaT 角质细胞进行 SRB (磺酰罗丹明 B (Sulforhodamine B)) 比色分析。在含有添加了 100% FBS (胎牛血清) 的 EMEM (Eagle's minimal essential media, Gibco, 美国) 的 250mL 烧瓶中培养 HaCaT 角质细胞 (The Korean Cell Line Bank)。用 0.25% 胰蛋白酶溶液处理培养的 HaCaT 角质细胞以从培养瓶底部分离细胞并且离心分离收集细胞粒。在不含 FBS 的 EMEM 中重悬该细胞,将其等分试样 (4×10^3 个细胞) 加入到 96 孔板的每个孔中,并且在 37°C 、7% CO_2 下培养 24 小时。培养 24 小时后,用不含血清的新鲜培养基更换该培养基并且在如上所述的相同条件下与溶于 10% DMSO 的人 EGF 或十三肽 (10ng/ml 或 1,000ng/ml) 温育 72 小时。除去上层清液后,使用 PBS (磷酸盐缓冲盐水) 洗涤细胞 1 次并且与 SRB 溶液 (Sigma-Aldrich) 温育。用 PBS 洗涤细胞并且在显微镜下观察细胞活力 (图 3)。另外,测量 590nm 的吸光度以分析细胞增殖 (图 4)。使用未处理的培养皿和肽预先处理的培养皿测对试培养皿的细胞粘附。在培养皿上覆盖人角质细胞而后温育 24 小时,随后在显微镜下观察。如图 5 中所示,观察到,粘附到用本发明的肽处理过的培养皿的细胞数与粘附到未处理的培养皿的细胞数相比大约多 3 倍。

[0104] 我们分析了细胞运动性来进一步验证细胞增殖能力。在 60mm 培养皿上覆盖 NIH3T3 细胞并培养至适当流度 (fluency)。使用移液管刮培养皿的底面并与 $1 \mu\text{g/ml}$ 的本发明的肽温育,随后观察细胞运动性。在图 6 中,图 A 和 B 显示未用肽处理的细胞样品而图 C 和 D 显示用 $1 \mu\text{g/ml}$ 的肽处理的细胞样品。A 和 C 的图像取自 1 天处理后,而 B 和 D 的图像取自 3 天处理后。

[0105] 为了检验自分泌作用,将 HaCat 细胞系与本发明的十三肽 ($1 \mu\text{g/ml}$) 温育 6 天而后使用 ELISA 试剂盒 (R & D, 美国) 测量培养物中的 EGF 水平。我们发现,本发明的十三肽对 EGF 具有显著高的自分泌作用 (图 7)。

[0106] 此外,将 HaCat 细胞系与 5 微摩尔的本发明的十三肽温育 72 小时而后使用透明质酸 ELISA 试剂盒 (Echelon Biosciences Inc, 美国) 测量作为表示皮肤皱纹改善标记的透明质酸的水平 (图 8)。

[0107] 如图 3、4 和 5 中所示,本发明的肽对细胞生长、细胞活力和粘附具有非常高的能力。此外,本发明的肽显示促进细胞运动性。如图 7 中所示,用本发明的肽处理 HaCaT 角质细胞还诱导细胞内 EGF 水平大量提高。本发明的肽的处理极大提高了透明质酸的水平 (图 8)。

[0108] 总而言之,可以理解的是,本发明的肽对改善皮肤状态具有明显提高的效果。

[0109] 实施例 5 :肽对皮肤厚度的影响分析

[0110] 为了评价本发明的肽对化妆品的适用性和体内功效,将在配方实施例 2 中配制的滋养霜涂敷到小鼠皮肤上。

[0111] 6 周龄 Balb C 雄性小鼠 (Central Lab. Animal, Inc., 韩国) 进行 1 周的适应性饲养并用含巯基乙酸的霜剂部分去除其背部的毛发。将小鼠分成 2 组;对其中一组局部

施用包含含有十三肽的纳米体的霜剂而对另一组局部施用不含纳米体的霜剂。每天早上 (A. M. 8:30) 及晚上 (P. M. 6:30) 以 100mg 的剂量施用霜剂达 5 天。施用后, 颈部脱位处死小鼠并将其皮肤组织包蜡。用切片机将包蜡的组织切片至厚度为 $8\mu\text{m}$ 并用苏木精 / 曙红着色, 然后在光学显微镜下观察 (图 9)。

[0112] 如图 9 中所示, 包含本发明的十三肽的纳米体化妆品可促进角质细胞层和表皮层的形成和生长。因此, 发现含有本发明的肽的化妆品发挥改善皮肤皱纹和弹性的作用。

[0113] 本发明的 EGF 模拟肽具有天然产生的人 EGF 的活性且促进细胞中产生自分泌 EGF。而且, 本发明的肽与天然产生的 bFGF 相比呈现出更优异的功效和好得多的稳定性和皮肤渗透性。就此而论, 可以理解的是, 含有本发明的肽的组合物对需要 EGF 活性的疾病或状态的治疗、预防和改善能够显示极好的功效。另外, 本发明的肽能够有利地应用于药物组合物、准药、化妆品和美容品 (cosmeceutics) 中。

[0114] 已经描述了本发明的优选实施方案, 应该理解的是, 落入本发明实质内的变形和修改对于本领域技术人员是显而易见的, 并且本发明的范围由所附权利要求及其等效技术方案所确定。

EGF 序列表

<110> 凯尔杰有限公司

<120> 具有表皮生长因子活性的肽及其用途

<160>1

<170>KopatentIn 1.71

<210>1

<211>13

<212>PRT

<213> 人工序列

<220>

<223>EGF 模拟肽

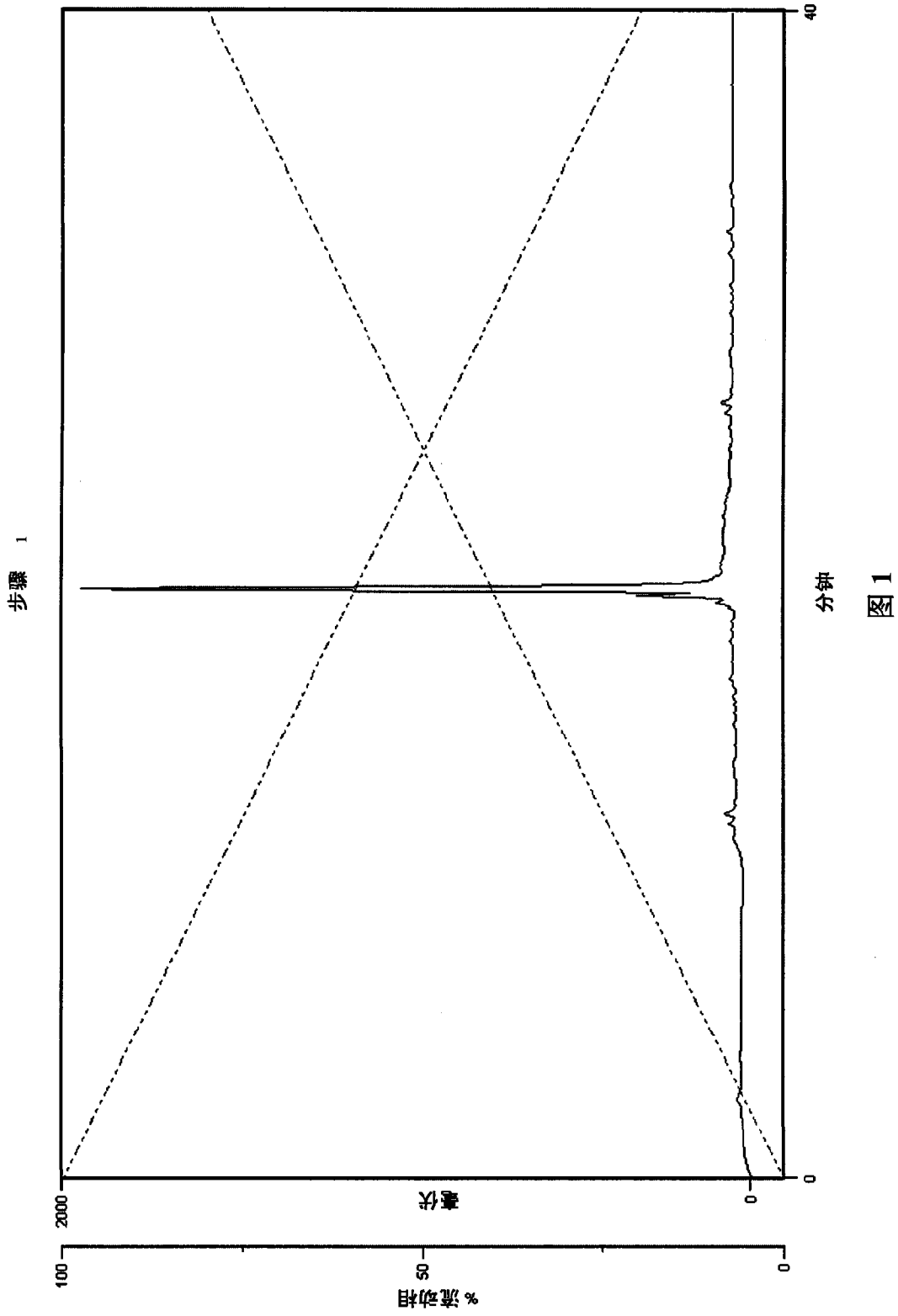
<400>1

Cys Met Tyr Ile Glu Gly Gly Gly Gly Arg Gly Asp Gly

1

5

10



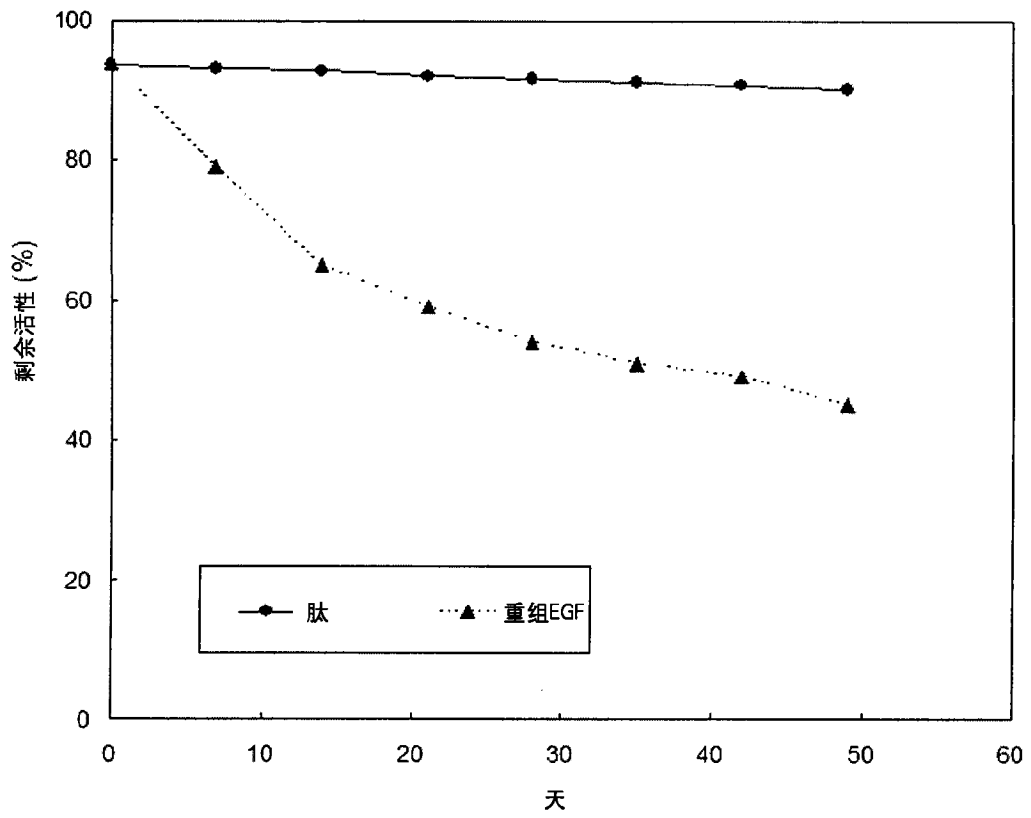


图 2

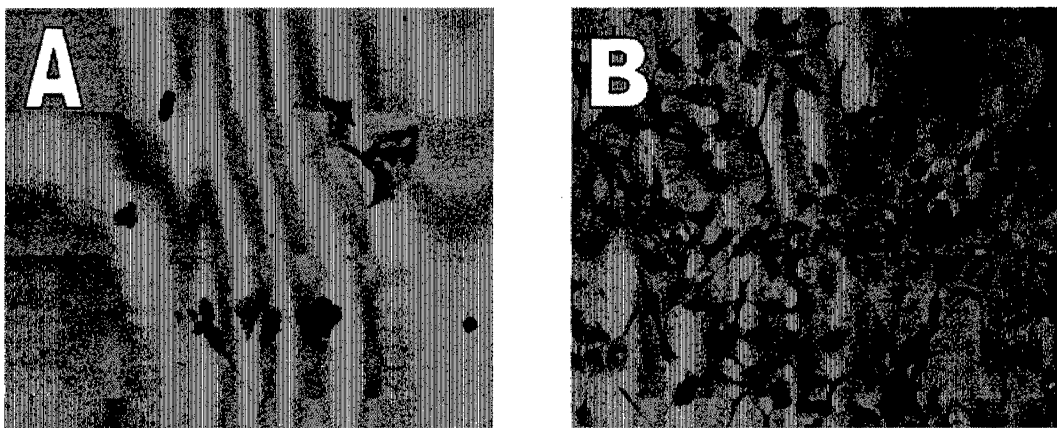


图 3

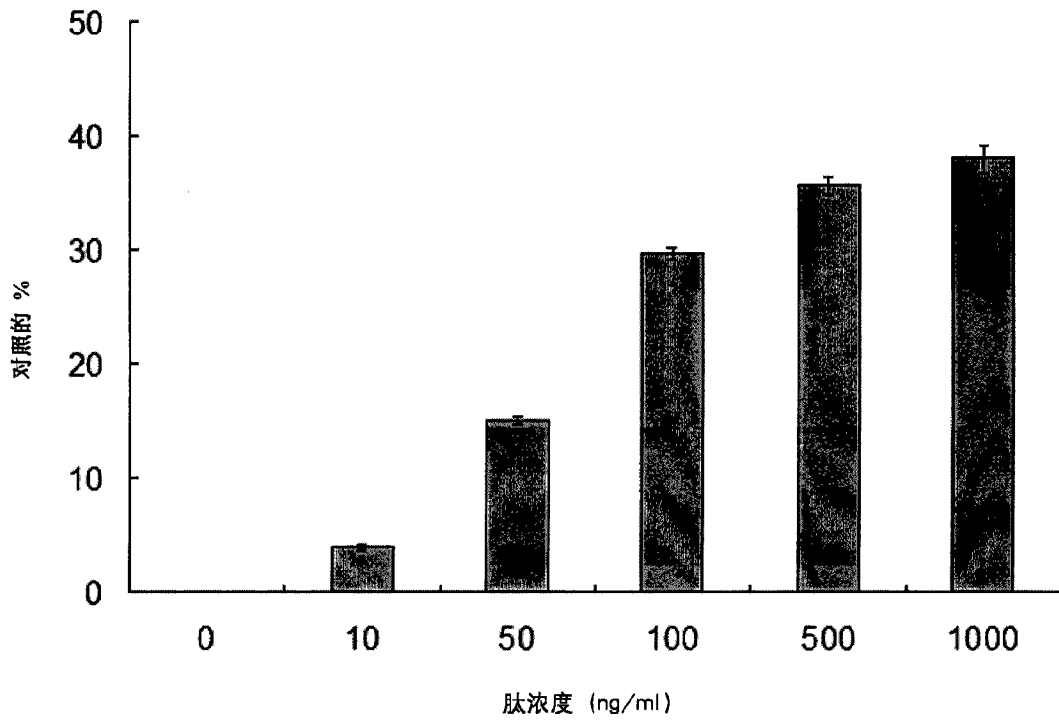


图 4

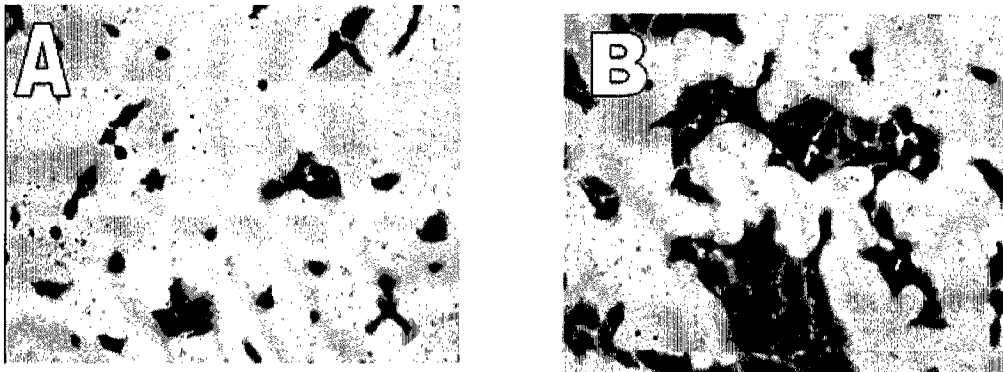


图 5

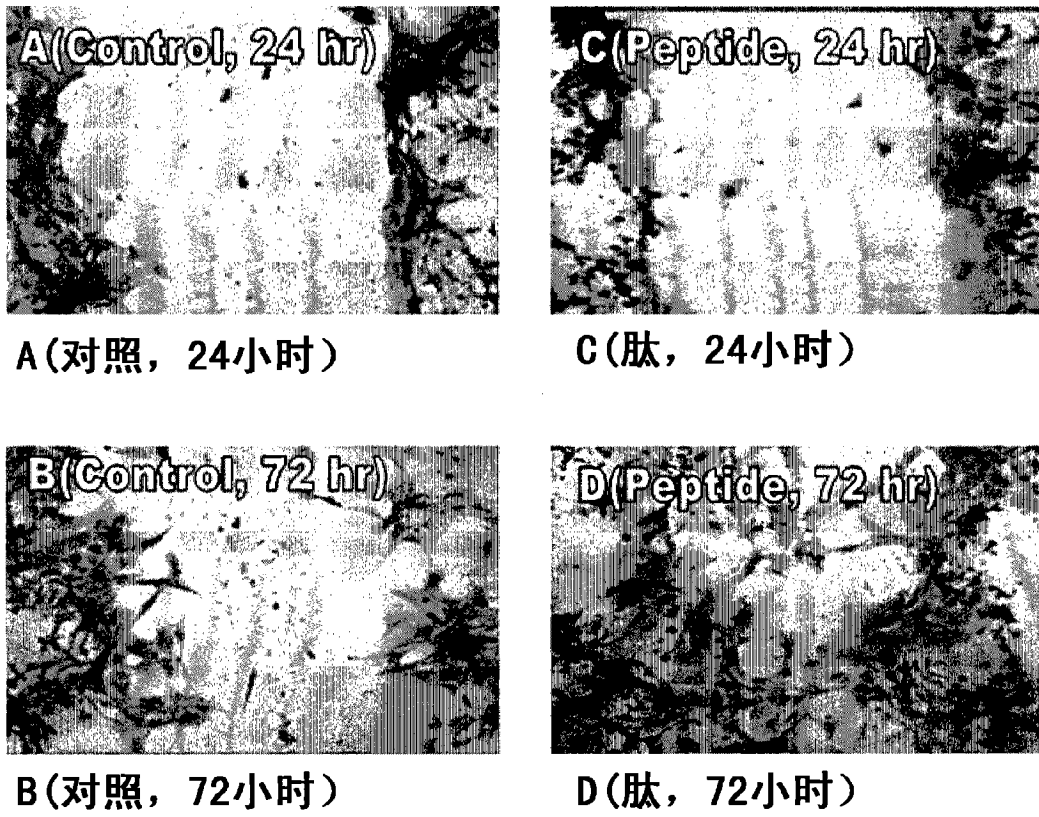


图 6

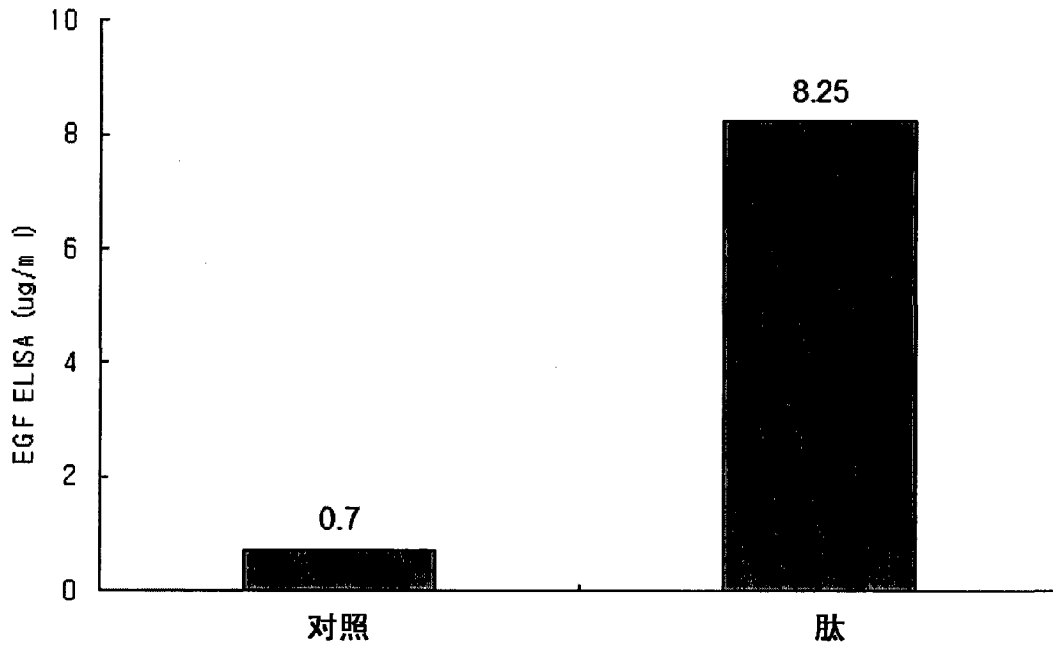


图 7

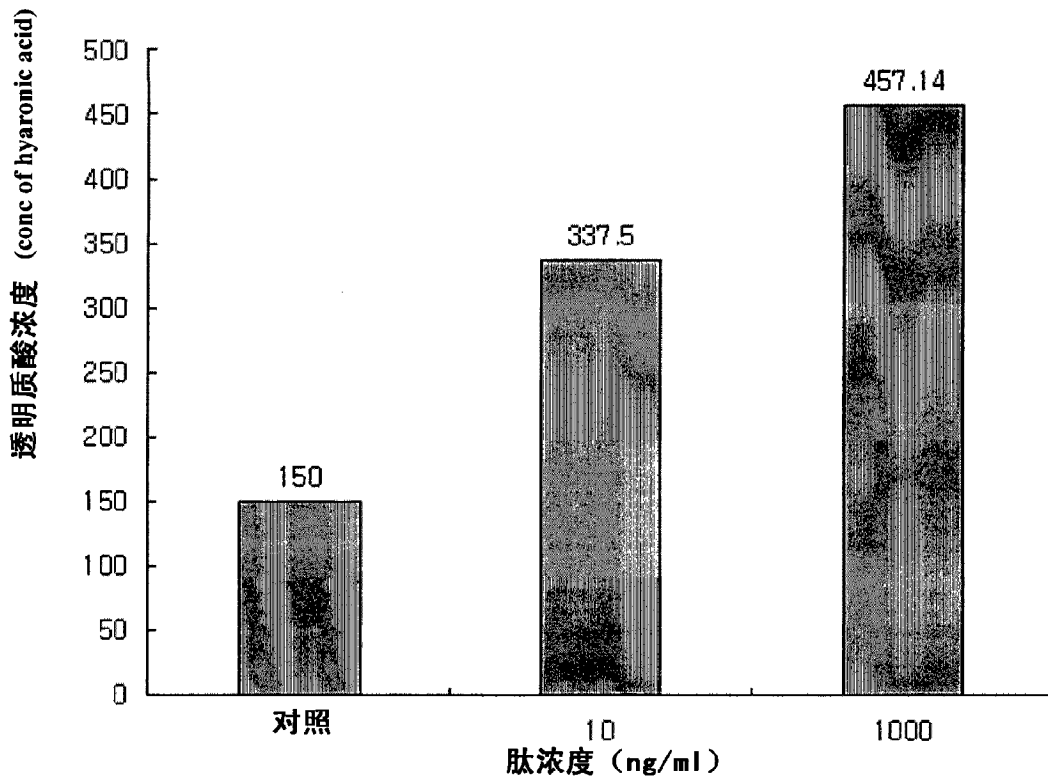


图 8

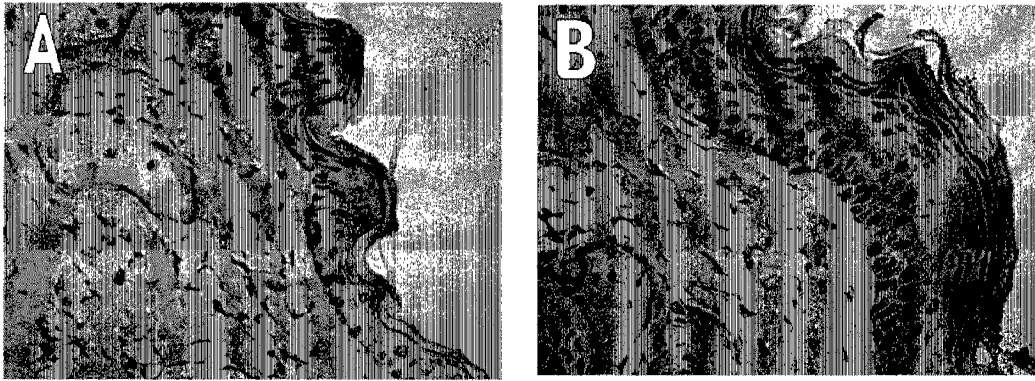


图 9