[19] 中华人民共和国国家知识产权局

[51] Int. Cl[7]
C07K 5/06
C07K 1/14 A61K 38/05
A61K 7/48 A61P 17/16

[12] 发明专利申请公开说明书

[21] 申请号 03109346.9

[43] 公开日 2003 年 10 月 22 日

[11] 公开号 CN 1450083A

[22] 申请日 2003.4.4 [21] 申请号 03109346.9

[30] 优先权

[32] 2002. 4. 5 [33] MC [31] 2484

[71] 申请人 爱克希莫尔公司

地址 摩纳哥

[72] 发明人 玛丽 - 克里斯廷西吉恩

[74] 专利代理机构 中国国际贸易促进委员会专利商标事务所

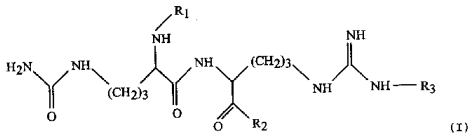
代理人 李华英

权利要求书 2 页 说明书 10 页

[54] 发明名称 瓜氨酸基精氨酸二肽类似物及其作为护理和治疗剂的皮肤病学用途

[57] 摘要

本发明涉及天然二肽瓜氨酸基精氨酸的一种藻类加合物，其皮肤病学用途和不表现出任何毒性潜能的该二肽的化学类似物作为皮肤和表皮性组织护理和治疗剂的用途，所述类似物具有以下通式(I)：其中：R1 代表酰基或酰氧基，R2 代表羟基、胺、烷基胺或烷氧基，R3 代表氢原子或羟基。



(I)

ISSN1008-4274

1. 海藻提取物，特别是来自红色大型藻类，其特征在于它可以是通过包括以下步骤的方法获得的:

-在药学可接受的溶剂或溶剂混合物辅助下对所述藻类进行提取，

-富集内在多肽或蛋白的重量直至总含量至少等于20%，

-最后引入滴定含量的通过化学途径得到的瓜氨酸基精氨酸二肽，

-对所得的提取物进行热处理。

2. 根据权利要求1的提取物，其特征在于所述藻类优选是最理想地积存了相对于干藻总重量10%干重的瓜氨酸基精氨酸的藻类。

3. 根据权利要求1或2的提取物，其特征在于所述提取在所述溶剂或溶剂混合物回流下进行2-4小时。

4. 根据权利要求1-3之一的提取物，其特征在于所述溶剂或溶剂混合物是水与含氨乙醇溶液的混合物。

5. 根据权利要求1-4之一的提取物，其特征在于所述富集步骤是所述内在多肽或蛋白的浓缩所致。

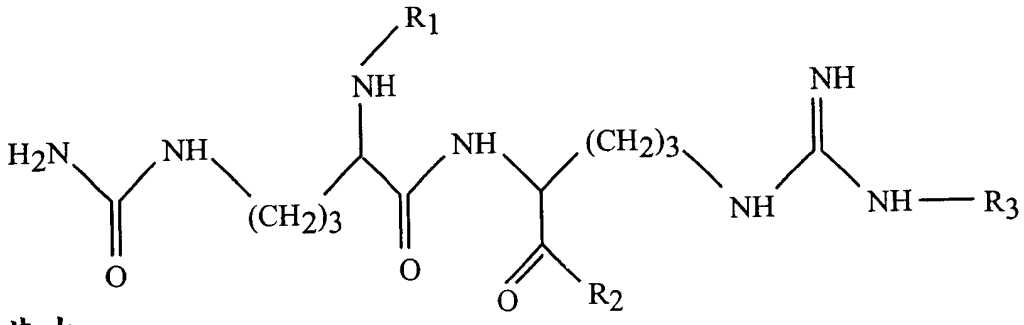
6. 根据权利要求1-4之一的提取物，其特征在于所述富集步骤是引入一定量的药学中可利用的标准蛋白所致。

7. 根据权利要求6的提取物，其特征在于所述药学中可利用的标准蛋白选自植物蛋白、动物蛋白和藻类蛋白，或其各自的水解产物，优选小麦或大豆蛋白、胶原蛋白、弹性蛋白、海洋生物胶原、螺旋藻蛋白和微藻类蛋白。

8. 根据权利要求1-7之一的提取物，其特征在于所述处理步骤在40℃进行3小时。

9. 根据权利要求1-8之一的提取物作为皮肤和表皮性组织护理和治疗剂的用途。

10. 瓜氨酸基精氨酸天然二肽的类似物或其任何一种盐作为皮肤和表皮性组织护理和治疗剂的用途，所述类似物具有以下通式(I):



(I)

其中:

-R1 代表酰基或酰氧基,

-R2 代表羟基、胺、烷基胺或烷氧基,

-R3 代表氢原子或羟基。

11. 根据权利要求 10 的用途, 其特征在于所述类似物中 R1 是酰基, R2 是烷氧基而 R3 是氢原子。

12. 根据权利要求 10 的用途, 其特征在于所述类似物中 R1 是乙酰基, R2 是羟基而 R3 是氢原子。

13. 根据权利要求 10 或 11 的用途, 其特征在于所述类似物中 R1 是乙酰基, R2 是乙氧基而 R3 是氢原子。

14. 根据权利要求 9 的提取物或根据权利要求 10-13 之一的类似物作为被设计成潜在的氮源的护理和治疗剂的用途。

15. 根据权利要求 9 的提取物或根据权利要求 10-13 之一的类似物作为能激活细胞能量代谢的护理和治疗剂的用途。

16. 根据权利要求 9 的提取物或根据权利要求 10-13 之一的类似物作为表现出细胞刺激特性的护理和治疗剂的用途。

17. 根据权利要求 9 的提取物或根据权利要求 10-13 之一的类似物作为能改善暴露于寒冷温度的皮肤或表皮性组织的行为的护理和治疗剂的用途。

18. 根据权利要求 9 的提取物或根据权利要求 10-13 之一的类似物作为使皮肤经受降低光强度而不增加松弛及失去皮肤光泽的护理和治疗剂的用途。

19. 根据权利要求 9 的提取物或根据权利要求 10-13 之一的类似物用于制备皮肤病学组合物或在其中的用途。

瓜氨酸基精氨酸二肽类似物及其作为护理和治疗剂的皮肤病学用途

本发明涉及天然二肽瓜氨酸基精氨酸的一种藻类加合物，以及其在皮肤病学中的用途，还涉及该二肽的化学类似物作为皮肤和表皮性组织护理和治疗剂的用途。

文献报道了大型藻类所共有的性能：从位于海洋中的硝酸盐、亚硝酸盐或铵离子形式的外部来源消费氮，将其还原并最终将其贮存为有机形式特别是氨基酸、蛋白质和色素（Hanisak M.D (1983), 在 Capenter, E.J.和 Capone, D.G（编著）“Nitrogen in the marine environment”. Academic press Inc.）。

因此，已经从 Grateloupia turuturu 红海藻提取物中第一次分离了以瓜氨酸基精氨酸二肽形式的含氮有机模型并对其进行了结构表征（Miyazawa K.等，Bulletin of the Japanese Society of Scientific Fisheries (1974), vol. 40, pp. 815-818）。

之后对其它红藻科如 Grateloupia filicina、Polyides rotundus、Polysiphonia lanosa 的鉴定发现在它们的醇提取物的组成中也存在相同的二肽，更特别是在 Chondrus crispus 红藻中。当该海藻是例如在冬季末从加拿大沿岸收集来的时，瓜氨酸基精氨酸二肽构成主要的含氮有机模型并代表超过 50%植物中存在的总氮（Laycok M.V.等, Can. J. Biochem. (1977), vol. 55, pp. 27-30）。

然而此后由相同的加拿大科学研究组对 Chondrus crispus 藻进行的新近研究证明了除加拿大沿岸海水中氮的生物可利用度以外的其它生理因素对藻类中天然产生瓜氨酸基精氨酸二肽的条件的影响（Laycok M.V.等, Can. J. Biochem. （1981）, vol. 59, pp. 522-527）。他们由此注意到在一年当中瓜氨酸基精氨酸含量是波动的，分子贮存过程主要发生在冬季和当水温低于 15℃时。此外在冬季末达到最高的

二肽浓度。相同的作者还强调指出了植物在该贮存过程期间的营养阶段，由于水很冷而使生长受到限制。最后，最低量的照射或光强度被证明也是在该过程中不可缺少的要素。

但是上述文章的作者仅提出了贮存的二肽作为氮潜在储备的作用，该氮储备为植物供应能量。一旦位于海洋中的含氮源浓度降低，该储备是真正可以利用的并迅速被消耗掉，特别是当春季来临时。因此所述二肽支持着植物并使其充分利用有利条件进行生长。

本申请人鉴于几个原因考虑将瓜氨酸基精氨酸二肽作为皮肤和表皮性组织护理和治疗剂的皮肤病学用途。

首先，文献并未报道在高级哺乳动物的皮肤组织和表皮性组织之中以该形式的这种有利供给的生物合成。

其次，由于瓜氨酸基精氨酸二肽的结构和氮原子数，继其在藻类中观察到的行为之后，这种供给可能构成相当重要的氮源，而这是令人感兴趣的，例如对于皮肤愈合和皮肤组织的修复过程。事实上，在外伤后期间常会注意到氨的丢失（Chyun J.H.等，J. Nutr.(1984), vol.114., pp.1697-1704）。紊乱皮肤的酸中毒问题和用这种氮源维持胞内中性 pH 也是目标。

所述二肽作为皮肤和表皮性组织护理和治疗剂的益处还得自于本申请人发现并在以下发明详述中描述的其生物学性质。瓜氨酸基精氨酸二肽对培养的成纤维细胞的能量代谢的有利作用和细胞刺激行为分别通过腺苷三磷酸计量和细胞增殖试验得到证实。

与所述二肽在藻类中所起的生理学作用相关并基于已知的对负热休克应答的侣伴蛋白质（热休克蛋白或 HSP）过量表达（Holland D. B. 等, J. Invest. Dermatology (1993), vol. 101, pp. 196-199），本申请人证明了在皮肤水平使用所述二肽来治疗暴露于寒冷温度的皮肤的裨益。在这些不利条件下，由瓜氨酸基精氨酸分子构成的能量储备在表皮细胞水平促进蛋白质合成并增强侣伴蛋白质的表达。

本申请人还证明了所述二肽治疗暴露于光照强度降低的皮肤而不增加皮肤松弛及失去皮肤光泽的裨益。

此外，在较次要水平上，例如可以预见当所述二肽穿透皮肤时瓜氨酸基精氨酸二肽在皮肤蛋白酶的作用下可用作瓜氨酸和精氨酸来源。

这两种氨基酸特别是精氨酸的外源供给在皮肤病学中也是有益的。因此由于其抗氧化特性精氨酸明显参与愈合过程中。它还被描述为胶原合成中的底物（Chithra P.等, J. Clin. Biochem. Nutr. (1995), vol. 18, pp. 111-117 和引用文献）.

瓜氨酸被发现存在于某些表皮蛋白（Kubilus J.等，Biochem. Biophys. Acta (1979), vol. 581, pp. 114-121）和某些毛发蛋白（Rogers G.E.等, Biochim. Biophys. Acta (1977), vol. 495, pp. 159-175）中，在侧链精氨酸残基的酶促转化之后。已知精氨酸和瓜氨酸是尿素循环中的代谢中间体。在干燥皮肤问题中特别需要过量产生内源性尿素（Wolhrab J., Skin Pharmcol. Appl. Skin Physiol. (2002), vol. 15, pp. 44-45）。

然而，意料之外并且非常令人惊奇的是，本申请人注意到所述二肽的基因毒性潜能，对于从 Chondrus crispus 藻提取的纯化物质和通过化学合成得到的复制品均是如此。

这两种结果来自于本申请人根据 OECD 471 指南进行的调查研究，遵循当前对在人类中任何可施用形式的诱变潜能的研究中已完善确立的方法：Ames 测试（Kirkland D.J., Mutation research (1994), vol. 312, pp. 195-199, (ICH 指导委员会, 19 July 1995, Guidance on specific aspect of regulatory genotoxicity tests of pharmaceuticals)。

因此很明显这种行为是瓜氨酸基精氨酸二肽在皮肤病学中的任何用途所绝对不相容的。

本发明的研究人员此后继续进行其研究，工作针对保留瓜氨酸基精氨酸形式但缺乏基因毒性潜能而同时保持最初对于二肽所证实的全部活性。

本申请人由此鉴定了不同的合成二肽。它们在其潜在取代位点中的 3 个位点部分或全部被官能化。它们具有与对纯化的天然物质所注意到的相同的生物学性质。另一方面，这种结构并不表现出上述不可

接受的副作用。

同时，本申请人注意到，对于富集多肽或蛋白质并根据以下由本发明的发明人所开发的方案而获得的藻类提取物，基因毒性被消除了。

由此本发明的第一个目的是获得一种所述天然二肽的类似物，它也来源于藻类但其中不存在与纯化的天然分子相关的基因毒性潜能。而对于该后者所注意到的生物学性质完全得以保留。

所述方案的第一步是在药学所接受的溶剂或溶剂混合物的帮助下进行海藻提取，特别是从红色大型藻类，优选从 Chondrus crispus。

所述藻类优选是最理想地积存了相对于干海藻总重量10%干重的瓜氨酸基精氨酸的海藻。

用于获得本发明的提取物的提取过程有利地在如下条件下进行，如所述提取在所述溶剂或溶剂混合物回流下进行 2-4 小时。

优选用于进行所述提取的溶剂是水与含氨乙醇的混合物。

第二步旨在富集内在多肽或蛋白质的重量直至总含量至少等于20%。

根据本发明一个有利的实施方案，所述富集来自于内在天然蛋白的浓缩。或者，所述富集可以是外来的，来自于引入药学中可利用的标准蛋白。

引入的蛋白优选是植物蛋白或其水解产物，如特别是小麦或大豆蛋白。

考虑到活性调节，引入的蛋白优选是动物蛋白或其水解产物，如胶原蛋白或弹性蛋白。

引入的蛋白优选是海洋生物胶原或其水解产物。

引入的蛋白优选是其它藻类蛋白或其水解产物，如特别是螺旋藻蛋白(spiruline)和微藻类蛋白。

最后，可将滴定含量的通过化学途径得到的瓜氨酸基精氨酸二肽引入所获得的提取物中以补充所述提取物直至 10wt%。

第三步是将富集了多肽或蛋白的所述提取物进行热处理。

所述处理有利地在 40℃进行 3 小时。

不可否认，由于其对 Ames 测试所呈现的阴性结果，从以上所述方案获得的所述类似物代表了一种具有新结构的产物。它与纯化的天然分子不同，这很可能是由于其加合物状态及存在许多与所述多肽或蛋白的相互作用。

本发明的第二个目的涉及该藻类加合物（更常称为提取物）的用途，以及缺乏基因毒性潜能的瓜氨酸基精氨酸化学类似物作为皮肤和表皮性组织护理和治疗剂的用途。

护理和治疗剂在本发明中是指一般表现出修复和复苏活性从而使得它们能更好地对抗损害如寒冷或黑暗的药剂。

据我们目前所知，没有要求保护过瓜氨酸基精氨酸二肽或其部分或全部化学官能化的类似物用于这种目的的用途。

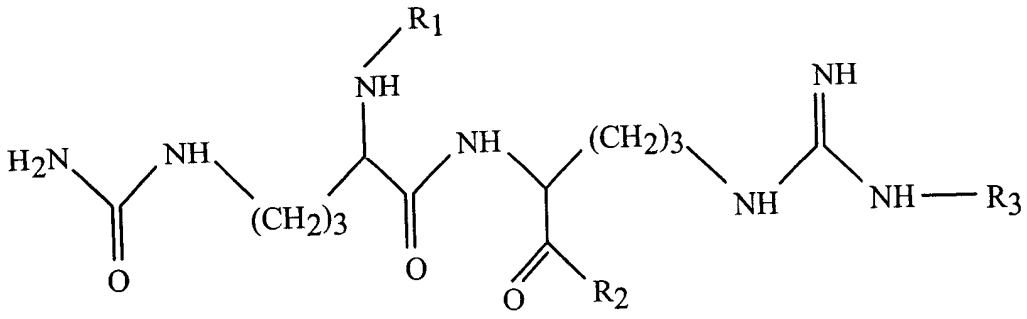
以 WO94/09750 公开的国际专利申请描述了一种基于精氨酸和瓜氨酸肽衍生物的化妆品组合物。某些二肽衍生物公开于该申请中。不过所列的结构与本发明的不同，原因是肽结合的位置不同，以及产生的性能也不同。

然而，瓜氨酸基精氨酸化学类似物的化妆品用途已经在先前由本申请人提出并以 EP 1 060 739 A1 公开的专利申请中进行了描述。其公开了一种用于减肥的局部涂敷用化妆品组合物，含有 L-精氨酸，L-精氨酸类似物，或一种其衍生物。但是同样在该先前的文件中既未提及甚至也未提示本发明的相同类似物现在所产生的在皮肤和表皮性组织水平的特性。

由本申请人对所述化学类似物所进行的结构/活性关系研究揭示，消除基因毒性潜能的主要条件是取代瓜氨酸单元中的α-氨基官能团。

取代精氨酸单元中的α-羧基和胍基官能团也被考虑过。尽管保持了无毒性的特征，所述取代似乎较为次要，仅使得所述类似物对于要求保护的应用更为有效而已。

这就是本发明的另一个目的还在于瓜氨酸基精氨酸天然二肽的类似物或其任何一种盐作为皮肤和表皮性组织护理和治疗剂的皮肤病学用途的原因，所述类似物具有以下通式（I）:



(I)

其中，

-R1 代表酰基或酰氧基，

-R2 代表羟基、胺、烷基胺或烷氧基，

-R3 代表氢原子或羟基。

如同先前描述的来源于藻类的提取物，所有这些衍生物均不具有潜在的基因毒性。因此，其皮肤病学用途是完全可以接受的。

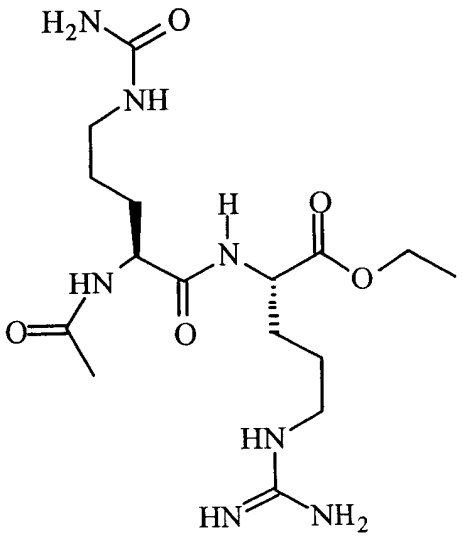
这些衍生物是根据本领域技术人员已知的方法简单合成的，即例如通过对α-氨基官能团的酰化作用和/或对α-羧基官能团的酯化作用。

根据本发明的一个实施方案，通式（I）的化合物中 R1 是酰基或酰氧基，有利地是乙酰基，R2 是烷氧基，有利地是乙氧基，而 R3 是氢原子。

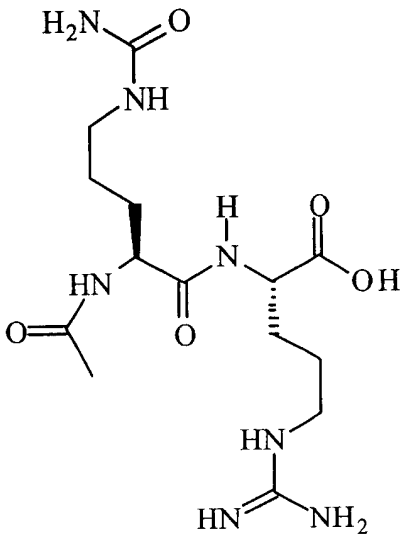
本发明的另一个实施方案是使用通式（I）的化合物，其中 R1 是酰基或酰氧基，有利地是乙酰基，R2 是羟基，而 R3 是氢原子。

以下实施例非限定性列出本发明的所述类似物。

N-乙酰基-L-瓜氨酸基-L-精氨酸乙酯 （NAc-L-CIT-L-ARG-OEt）



N-乙酰基-L-瓜氨酸基-L-精氨酸 （NAc-L-CIT-L-ARG）



如已提到的，瓜氨酸基精氨酸分子特别表现出对细胞能量代谢的活性。它还具有某些细胞刺激特性以及对侣伴蛋白质表达的增强作用，旨在改善暴露于寒冷温度的皮肤或表皮性组织的行为。

为了比较之前描述的纯化天然二肽的活性与作为本发明第一目的的藻类加合物的活性，以及作为本发明其它目的的某些化学类似物的活性，进行了几项体外测试。

以下测试说明了那些对比数据。

测试 1：瓜氨酸基精氨酸天然二肽的类似物对培养的成纤维细胞

的能量代谢的影响（通过腺苷三磷酸（ATP）计量）。与纯化的天然二肽的比较。

培养成纤维细胞，在剥夺生长因子（2%胎牛血清）的培养基的存在下，以 10^5 细胞/毫升的比率接种.

对每一细胞悬液用测光法通过确定在340nm的吸光度的降低根据以下等式测量 ATP 量:

ATP + 3-磷酸甘油酸→ADP + 1,3-二磷酸甘油酸

1,3-二磷酸甘油酸+NADH→甘油醛-3-磷酸+NAD+P

结果:

	ATP 量（nM/mg 蛋白）
A（无活性成分的对照）	26.7 +/- 5.2
A + 1% 纯化的 Cit-Arg	88.62 +/- 8
A + 1% 藻类加合物	96.2 +/- 6.2
A + 1% NAc-Cit-Arg	90.7 +/- 6.5

测试 2: 瓜氨酸基精氨酸天然二肽类似物的细胞刺激特性的证据。

对在补充 2%胎牛血清的培养基中维持的人成纤维细胞系进行测试（对照）。

通过中性红比色法测试（Borenfreund E. 等, (1984), Toxicol. Lett., vol. 24, pp. 119）评价细胞增殖。然后通过在 540 nm 测量光密度（OD），根据以下等式，获得细胞生长变化:

$$\%\text{刺激}=\frac{OD_{\text{活性成分}}-OD_{\text{对照}}}{OD_{\text{对照}}}\times 100$$

结果:

纯化的 Cit-Arg(%)	0,016	0,031	0,063	0,125	0,5
%刺激	2	25	30	32.5	36
藻类加合物(%)	0,016	0,031	0,063	0,125	0,5
%刺激	8	32	38	44	52
NAc-Cit-Arg(%)	0,016	0,031	0,063	0,125	0,5
%刺激	5	26	34	40	45

测试 3: 在寒冷温度下瓜氨酸基精氨酸天然二肽的类似物对侣伴蛋白质(HSP 72)表达的作用。与纯化的天然二肽的比较。

将一些再造的人表皮暴露于4℃,首先无活性成分存在(对照),然后在活性成分存在下,进行测试。使用 HSP 72 特异性单克隆抗体通过免疫荧光进行半定量检测而评价 HSP 72 表达。它是基于对所观察到的荧光的总体评价。

荧光越显著,HSP 72 蛋白表达得越多。

结果:

	对照	纯化的 Cit-Arg	藻类加合物	NAc-Cit-Arg
HSP 72	++	+++	++++	+++

++: 少数细胞发出荧光

+++: 许多细胞发出荧光

++++: 整个活细胞层发出荧光

所述二肽或其化学类似物对治疗暴露于降低光强度的皮肤的益处通过对一组男性和女性进行的体内测试得到证实。用包含在以下详述的乳霜组成中的藻类加合物,联合一些光治疗疗程,进行测试。

测试 4: 用 7%藻类加合物配制的乳霜联合一些光治疗疗程对皮肤的作用

对这种在皮肤水平效应的评价技术是通过类似等级的自我评价技术。

进行了两个系列的光治疗疗程:

-第一系列：10 个人对本申请人定义的每一个参数进行评分，分别在特定数目的以下暴露条件的疗程之前和之后：

光强度：2500 Lux

暴露时间：每天 20 分钟

治疗时间：在 1 个月内 1 周 2 次

-第二系列：以上 10 个人对相同的参数进行评份，光暴露条件与上述相同，并在局部涂敷用 7%藻类提取物配制的乳霜之后。

含有所述提取物的组合物的配方：

甘油硬脂酸酯和硬脂基聚氧乙烯醚	10
十八烷基乙基己酸酯	10
Macadamia ternilolia 籽油	10
甘油	3
聚二甲硅氧烷	0,3
对羟苯甲酸甲酯钠	0,1
对羟苯甲酸丙酯	0,05
咪唑烷基脲	0,3
聚丙烯酰胺和 C13-14 异链烷烃和月桂基聚氧乙烯（7）醚	1
角叉菜提取物（滴定至 10%瓜氨酸基精氨酸）	7
纯净水 qsp	58,05

结果：

对于 80%的测试对象，注意到滋润程度显著改善，产生舒适的和均匀的触感。对于其中的 70%，回复皮肤光泽，特别是脸部，同时真皮深层皮肤松弛减轻。

本发明的另一个目的还在于如以上所定义的藻类加合物和瓜氨酸基精氨酸化学类似物的用途，用在或用于制备皮肤病学组合物。