



(19)中華民國智慧財產局

(12)發明說明書公告本 (11)證書號數：TW I627185 B

(45)公告日：中華民國 107 (2018) 年 06 月 21 日

(21)申請案號：106120461

(22)申請日：中華民國 106 (2017) 年 06 月 19 日

(51)Int. Cl. : C07K7/06 (2006.01) A61K38/08 (2006.01)
 A61K8/64 (2006.01) A61Q19/08 (2006.01)

(71)申請人：劉玉春 (中華民國) LIU, YU CHUN (TW)

桃園市蘆竹區經國路 898 號 10 樓

(72)發明人：黃敏銓 HUANG, MIN-CHUAN (TW)；陳學亭 CHEN, SYUE-TIING (TW)；劉玉春 LIU, YU CHUN (TW)

(74)代理人：鄭志玲

(56)參考文獻：

CN 102988193A

CN 105213210A

EP 1205184B1

審查人員：劉建宏

申請專利範圍項數：12 項 圖式數：3 共 18 頁

(54)名稱

抗老化胜肽，其組合物及其使用方法

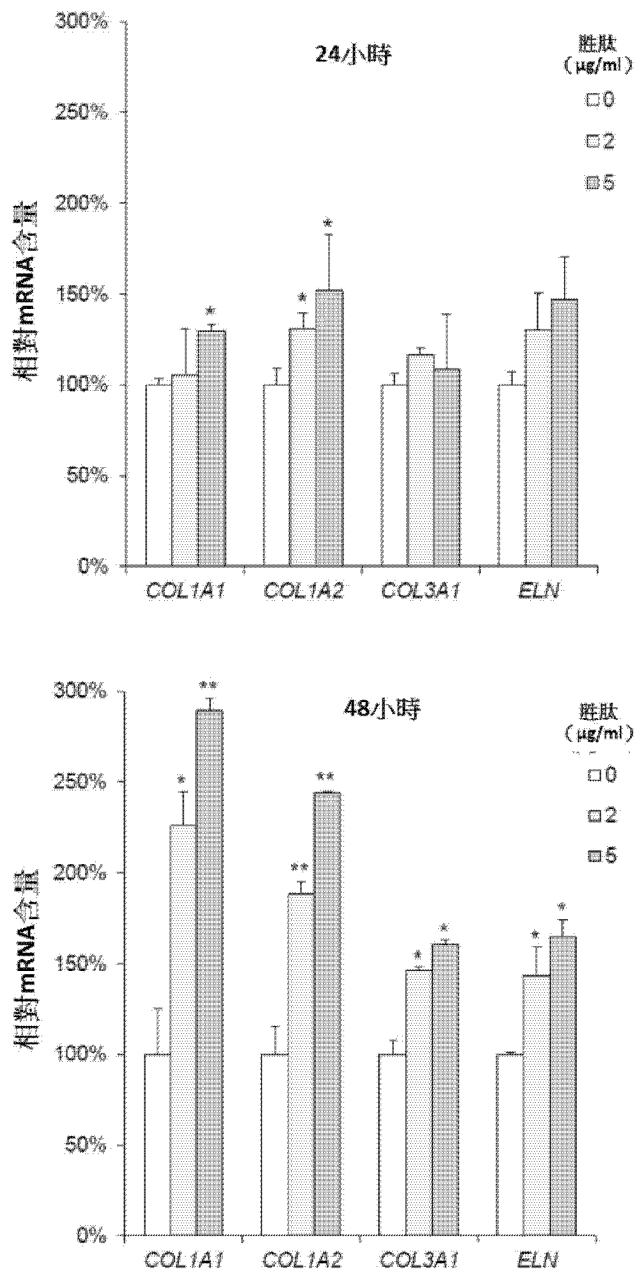
ANTI-AGING PEPTIDE, ITS COMPOSITION AND METHOD OF USING THE SAME

(57)摘要

本發明之揭露係關於一種抗老化的胜肽，其具有 ProAspSerThrGluAlaLys (SEQ ID NO: 1) 的胺基酸序列。本發明亦提供包含胜肽及使用胜肽的個人護理方法的抗老化組合物。

Disclosed is related to an anti-aging peptide, which has an amino acid sequence of ProAspSerThrGluAlaLys (SEQ ID NO: 1). Also provided are anti-aging compositions comprising the peptide and personal care methods of using the peptide.

指定代表圖：



【圖1】

【發明說明書】

【中文發明名稱】 抗老化胜肽，其組合物及其使用方法

【英文發明名稱】 ANTI-AGING PEPTIDE, ITS COMPOSITION AND

METHOD OF USING THE SAME

【技術領域】

【0001】 本發明整體而言係關於一種抗老化胜肽，其使用方法及其組合物。

【先前技術】

【0002】 一般的皮膚損害包括隨著年齡而自然發生的皮膚變薄。供應皮膚的細胞和血管減少以及真皮厚度的減少。老化或損害皮膚的損害或變化包括皺紋，細紋，色素沉著過度，膚色蠟黃，黑眼圈，眼睛浮腫，更換率降低，以及異常脫屑或脫落。一些其他損害包括可見的死皮，如剝落，鱗屑，乾燥，粗糙。隨著皮膚老化，真皮中總膠原蛋白含量減少，剩餘的膠原纖維逐漸變厚，導致交聯增加，溶解性，延展性等降低。此外，彈性蛋白變得更厚並且更多交聯。另外，真皮中纖維母細胞的增殖活性降低，而膠原蛋白合成能力下降，降解能力增強。隨著表皮的再生，真皮等變得緩慢，表皮及真皮之間的黏附性變弱，皮膚彈性迅速降低。

【0003】 雖然已經開發了一些產品以改善皮膚老化的情況，但仍然需要用於治療老化或皮膚老化之變化引起的損傷（例如皮膚損傷）的組合物及方法。

【發明內容】

【0004】 本發明係非預期地發現具有ProAspSerThrGluAlaLys (SEQ ID NO: 1) 的胺基酸序列的胜肽係有效增強膠原蛋白及/或彈性蛋白的含量以及個體中纖維母細胞之遷移。

【0005】 因此，在一方面，本發明提供一種抗老化胜肽，其係由SEQ ID NO: 1的胺基酸序列所組成的合成胜肽。該胜肽提供了增強纖維母細胞中膠原蛋白或彈性蛋白的表現以及纖維母細胞之遷移的功效。

【0006】 在另一方面，本發明提供一種個人護理組合物。該組合物包含有效量的SEQ ID NO: 1的胜肽。

【0007】 在本發明的特定具體實施例中，該組合物可進一步包含一可接受的載體，並可調製為一種局部用製劑，例如，化妝品製劑。

【0008】 根據本發明，該局部用製劑可包含軟膏、乳液、乳霜、凝膠、滴劑、噴霧、液劑或面膜。在一較佳具體實施例中，該組合物係調製為乳霜或面膜。

【0009】 在又一方面，本發明提供一種用於治療由老化引起的損傷的個人護理方法，其包含對一有需要的個體投予具有SEQ ID NO: 1的胺基酸序列的胜肽，其量可有效增強纖維母細胞中膠原蛋白或彈性蛋白的表現或增強該個體中的纖維母細胞之遷移。

【0010】 在本發明的該方法的一具體實施例中，該胜肽係局部地投予至該個體。

【0011】 在本發明的一實例中，該方法特別用於皮膚護理。

【0012】 根據本發明，該方法係用於提供抗老化、增亮皮膚之功效及一功效。

【0013】 應理解的是，前述的一般性說明及以下的詳細說明皆只是例示性及解釋性的，並不限制本發明。

【圖式簡單說明】

【0014】 配合附圖一起閱讀將可更佳地理解前述的發明內容，以及下述的詳細說明。為了說明本發明的目的，在圖式中顯示目前較佳的具體實施例。

【0015】 在圖式中：

【0016】 圖1顯示SEQ ID NO：1的胜肽在增加CCD-966SK纖維母細胞中膠原蛋白及彈性蛋白的表達的功效；其中，藉由即時RT-PCR分析以不同濃度之SEQ ID NO：1的胜肽處理CCD-966SK纖維母細胞中的膠原蛋白（COL1A1，COL1A2和COL3A1）及彈性蛋白（ELN）的mRNA含量24小時（上圖）或48小時（下圖）（* P <0.05；** P <0.01）。

【0017】 圖2A顯示48小時之遷移細胞的代表性影像；其中，藉由透孔（transwell）遷移檢測，分析以不同濃度之SEQ ID NO：1的胜肽處理CCD-966SK纖維母細胞之遷移（比例尺=100μm）。

【0018】 圖2B顯示SEQ ID NO：1的胜肽在增強CCD-966SK細胞之遷移經24小時（上圖）及48小時（下圖）的功效；其中，該等結果係自兩個獨立實驗獲得（* P <0.05；** P <0.01）。

【0019】 圖3顯示SEQ ID NO：1的胜肽並未顯著影響CCD-966SK纖維母細胞的存活力；其中，CCD-966SK細胞以不同濃度之SEQ ID NO：1的胜肽處

理24小時（上圖）、48小時（中圖）及72小時（下圖）；其中，藉由MTT檢測分析細胞活力，並自三個獨立實驗獲得結果。

【實施方式】

【0020】除非另有定義，本文使用的所有技術及科學術語具有與本發明所屬領域中的通常知識者所理解相同的含義。

【0021】用語「一」或「一個」在申請專利範圍及/或說明書中與術語「包含」一起使用時，其意思可為「一個」，但其亦與「一或多個」、「至少一個」以及「一或多於一個」的含義一致。

【0022】術語「胜肽」在本文中係以其常規含義而被使用，亦即為一種聚合物，其單體為胺基酸，並藉由醯胺鍵而互相連結在一起，另可選擇地，其係指多態（polypeptide）。當該胺基酸為 α -胺基酸時，可使用L-光學異構物或D-光學異構物。此外，亦可包含非天然的胺基酸，例如， β -丙胺酸、苯甘胺酸及高精胺酸。使用胺基酸的標準縮寫。

【0023】本文中所使用的術語「個體」係指脊椎動物，較佳地為哺乳動物，尤佳地為人。在下文中，作為個體的人特別被稱為「人類個體」。

【0024】本文中所使用的術語「載體」係指一般用於調製可增進穩定性、無菌性、遞送性的藥物或化妝品組合物的材料。當胜肽遞送系統調製為一種溶液或懸浮液時，該遞送系統係於一可接受載體中，較佳地為水性載體。可使用多種水性載體，例如，水、緩衝液、0.8%鹽水、0.3%甘胺酸、透明質酸等。該組合物可含有如所需要而可接近生理條件的生理上可接受的輔助物質，

例如pH調整及緩衝劑、溶液張力調節劑、潤濕劑及其類似物，例如，乙酸钠、乳酸钠、氯化钠、氯化钾、氯化钙、山梨醇酐单月桂酸酯、油酸三乙醇胺等。

【0025】術語「局部的」或「局部地」在本文中係以其常規含義而被使用，其係指可以在身體任何部位內或上的位置，包括但不限定於表皮、任何其他真皮、或任何其他身體組織。局部地投予或施予意指使該胜肽直接與組織接觸，例如含有黑色素生成細胞的皮膚或膜。

【0026】根據本發明，該抗老化胜肽係由SEQ ID NO: 1的胺基酸序列所組成的合成胜肽，亦即ProAspSerThrGluAlaLys序列。該胜肽可藉由標準方法或以任何一般在使用或本領域技術人員已知的方式合成。

【0027】如實例顯示，具有SEQ ID NO：1的胺基酸序列的胜肽證實具有增強膠原蛋白或彈性蛋白的表現及纖維母細胞之遷移的功效。因此，本發明亦提供了一種個人護理方法，其包含對一有需要的個體投予具有SEQ ID NO：1的胺基酸序列的胜肽，其量可有效增強纖維母細胞中膠原蛋白或彈性蛋白的表現及纖維母細胞之遷移。

【0028】另一方面，本發明提供一種抗老化組合物。該組合物包含有效量的具有SEQ ID NO：1的胺基酸序列的胜肽。該組合物藉由增強膠原蛋白及/或彈性蛋白含量及個體中纖維母細胞之遷移，提供例如，皮膚中的抗老化功效。該組合物可用於化妝品為目的，例如，護膚品。

【0029】本發明思及使用SEQ ID NO：1的胜肽作為針對各種用途的活性成分。在一較佳具體實施例中，本發明的胜肽係與可接受的載體組合而形成一種可放於皮膚上的局部用製劑。局部用製劑，例如化妝品製劑，可包含軟膏，乳液，糊劑，乳霜，凝膠，滴劑，栓劑，噴霧，液劑，粉劑及透皮貼劑。根據

FBS及青黴素/鏈黴素（100IU /50 μ g/ml）的DMEM（Dulbecco's Modified Eagle Medium）中，在5%CO₂中。

【0037】 實例3：合成cDNA及定量即時PCR

【0038】 根據製造商協定分，使用TRIzol試劑（Invitrogen）分離總RNA。cDNA合成係使用大容量cDNA逆轉錄套組（AB，USA），在20 μ l逆轉錄反應中使用2 μ g總RNA。QuantStudio 3即時PCR系統（Thermo Fisher）係用於即時PCR反應。反應係於20 μ l體積中以1 μ l cDNA及10 μ l SensiFAST SYBR Lo-ROX Mix（BIOLINE）進行。對cDNA進行即時PCR。

【0039】 使用以下引子：

- （1）COL1A1正義，5'-GAACATCCGGAGCCCAGAGG-3'（SEQ ID NO：2）及反義，5'-TCCATGTTGCAGAAGACTTT-3'（SEQ ID NO：3）；
- （2）COL1A2正義5'-GGTGAAGATGGTCACCCTGG-3'（SEQ ID NO：4）及反義，5'-GGGGCACCAGGTTTACCCTT-3'（SEQ ID NO：5）；
- （3）COL3A1正義，5'-CGCCCTCCTAATGGTCAAGG-3'（SEQ ID NO：6）及反義，5'-TTCTGAGGACCAGTAGGGCA-3'（SEQ ID NO：7）；
- （4）ELN正義，5'-CCTTCCCCGCAGTTACCTTT-3'（SEQ ID NO：8）及反義，5'-TGCAGACACTCCTAAGCCAC-3'（SEQ ID NO：9）；
- （5） β -肌動蛋白正義，5'-CGTGCGTGACATTAAGGAGA-3'（SEQ ID NO：10）及反義，5'-GAAGGAAGGCTGGAAGAGTG-3'（SEQ ID NO：11）。

【0040】 以不同濃度（0,2 5ug / ml）的SEQ ID NO：1的胜肽處理CCD-966SK纖維母細胞24小時或48小時。藉由即時RT-PCR分析細胞的膠原蛋白

(COL1A1, COL1A2及COL3A1) 及彈性蛋白 (ELN) 的mRNA含量。如圖1顯示指出, SEQ ID NO: 1的胜肽係增加CCD-966SK纖維母細胞中膠原蛋白及彈性蛋白的表現。

【0041】 實例4：透孔遷移檢測

【0042】 將0.25ml無血清DMEM中的細胞 (5×10^3) 以8 μ m孔徑的膜 (Corning, USA) 種於上室中。將含有或不含有MUC20胜肽NO.10的無血清DMEM (0.5ml) 加載至24孔培養盤的孔中的下室中。培養24小時或48小時後, 將細胞固定並以含有20% (v/v) 甲醇的0.5% (w/v) 結晶紫 (Sigma) 染色。在相差顯微鏡下計數來自5個隨機場的遷移細胞數。其結果以學生t檢驗分析, 並繪製為平均值 $\pm$ 標準差。該等結果係自兩個獨立實驗獲得。

【0043】 藉由透孔遷移檢測分析CCD-966SK纖維母細胞之遷移。如圖2A及2B所示, 其指出SEQ ID NO: 1的胜肽具有增強CCD-966SK纖維母細胞之遷移的功效。

【0044】 實例5：MTT 檢測

【0045】 將100 μ l完全DMEM中的細胞 (3×10^3) 種於含有或不含有MUC20胜肽NO.10的96孔盤中。向每個孔中加入10微升5mg/ml 3-(4,5-二甲基-2-噻唑基)-2,5-二苯基-2H-四唑溴化物溶液 (MTT; Sigma), 並在37°C下培養3小時。在那之後, 加入100 μ l之於0.01N HCl中的10%SDS以溶解MTT甲臍結晶。以分光光度計測定在550和630nm之雙波長下的所得光密度。

【0046】 藉由MTT檢測分析CCD-966SK纖維母細胞的細胞存活力。該等結果係自三個獨立實驗獲得。以SEQ ID NO: 1的胜肽處理細胞24小時 (上

圖)、48小時(中圖)及72小時(下圖)的結果顯示於圖3。發現SEQ ID NO: 1的胜肽不顯著影響CCD-966SK纖維母細胞的存活力。

【0047】鑑於上述，推斷SEQ ID NO: 1的胜肽係藉由增強纖維母細胞中膠原蛋白及/或彈性蛋白的表現及纖維母細胞之遷移以提供抗老化功效，而不是藉由細胞纖維母細胞的存活力。

【0048】本領域技術人員會理解在不脫離本發明的廣義發明概念的情況下，可修改上述具體實施例。因此，可理解的是，本發明並不局限於所揭示的特定具體實施例，而旨在於涵蓋由所附申請專利範圍所定義的本發明精神及範圍內的修飾。

【符號說明】無

【生物材料寄存】無

序列表

<110>
<120> 抗老化胜肽，其组合物及其使用方法
<130> ASB0002US
<160> 11
<170> PatentIn version 3.5
<210> 1
<211> 7
<212> PRT
<213> 人工合成
<400> 1
Pro Asp Ser Thr Glu Ala Lys
1 5
<210> 2
<211> 20
<212> DNA
<213> 人工合成
<400> 2
GAACATCCGG AGCCCAGAGG 20
<210> 3
<211> 20
<212> DNA
<213> 人工合成
<400> 3
TCCATGTTGC AGAAGACTTT 20
<210> 4
<211> 20
<212> DNA
<213> 人工合成
<400> 4
GGTGAAGATG GTCACCCTGG 20
<210> 5
<211> 20
<212> DNA
<213> 人工合成

<400>	5	
GGGGCACCAG	G TTCACCC TT	20
<210>	6	
<211>	20	
<212>	DNA	
<213>	人工合成	
<400>	6	
CGCCCTCCTA	ATGGTCAAGG	20
<210>	7	
<211>	20	
<212>	DNA	
<213>	人工合成	
<400>	7	
TTCTGAGGAC	CAGTAGGGCA	20
<210>	8	
<211>	20	
<212>	DNA	
<213>	人工合成	
<400>	8	
CCTTCCCCGC	AGTTACCTTT	20
<210>	9	
<211>	20	
<212>	DNA	
<213>	人工合成	
<400>	9	
TGCAGACACT	CCTAAGCCAC	20
<210>	10	
<211>	20	
<212>	DNA	
<213>	人工合成	
<400>	10	
CGTGCGTGAC	ATTAAGGAGA	20
<210>	11	
<211>	20	
<212>	DNA	

<213> 人工合成

<400> 11

GAAGGAAGGC TGGAAGAGTG 20



申請日: 106/06/19

【發明摘要】

IPC分類: C07K 7/06 (2006.01)
A61K 38/08 (2006.01)
A61K 8/64 (2006.01)
A61Q 19/08 (2006.01)

【中文發明名稱】 抗老化胜肽，其組合物及其使用方法

【英文發明名稱】 ANTI-AGING PEPTIDE, ITS COMPOSITION AND

METHOD OF USING THE SAME

【中文】本發明之揭露係關於一種抗老化的胜肽，其具有 ProAspSerThrGluAlaLys (SEQ ID NO: 1) 的胺基酸序列。本發明亦提供包含胜肽及使用胜肽的個人護理方法的抗老化組合物。

【英文】Disclosed is related to an anti-aging peptide, which has an amino acid sequence of ProAspSerThrGluAlaLys (SEQ ID NO: 1). Also provided are anti-aging compositions comprising the peptide and personal care methods of using the peptide.

【指定代表圖】 圖1

【代表圖之符號簡單說明】 無

【特徵化學式】 無



申請日: 106/06/19

【發明摘要】

IPC分類: C07K 7/06 (2006.01)
A61K 38/08 (2006.01)
A61K 8/64 (2006.01)
A61Q 19/08 (2006.01)

【中文發明名稱】 抗老化胜肽，其組合物及其使用方法

【英文發明名稱】 ANTI-AGING PEPTIDE, ITS COMPOSITION AND

METHOD OF USING THE SAME

【中文】本發明之揭露係關於一種抗老化的胜肽，其具有 ProAspSerThrGluAlaLys (SEQ ID NO: 1) 的胺基酸序列。本發明亦提供包含胜肽及使用胜肽的個人護理方法的抗老化組合物。

【英文】Disclosed is related to an anti-aging peptide, which has an amino acid sequence of ProAspSerThrGluAlaLys (SEQ ID NO: 1). Also provided are anti-aging compositions comprising the peptide and personal care methods of using the peptide.

【指定代表圖】 圖1

【代表圖之符號簡單說明】 無

【特徵化學式】 無

需要，可使用增稠劑，稀釋劑，乳化劑，分散助劑或黏合劑。較佳地，載體的一個功能為增強本發明的胜肽的皮膚滲透性，並且應能在體內條件下將胜肽遞送到纖維母細胞。對於本領域技術人員而言，合適的載體為習知，且其包括但不限於水、二甲基亞砒、乙醇、脂質體、液體石蠟、石蠟、二甲基甲醯胺、2-吡咯烷酮、油酸等。

【0030】此外，本發明提供一種用於治療由年齡引起的損害的個人護理方法。該方法包括對一有需要的個體投予具有SEQ ID NO：1的胺基酸序列的胜肽，其量可有效增強纖維母細胞中膠原蛋白或彈性蛋白的表現，或增強個體中纖維母細胞之遷移。根據本發明，該方法用於所述個體，特別是人類個體的抗老化，增亮皮膚，減少皮膚皺紋及細紋。

【0031】通過以下實例進一步說明本發明，所述實例係以提供例示性之目的提供而非限制。

【0032】實例

【0033】實例1：SEQ ID NO: 1之胜肽的製備

【0034】SEQ ID NO：1（序列：ProAspSerThrGluAlaLys）之胜肽係由生工有限公司（MDBio, Inc.）（台北，台灣）所合成，並藉由高效能液相層析（HPLC）及質譜法確認胜肽的純度及組成。將10mg凍乾胜肽粉末溶解於250 μ l雙去離子水（ddH₂O）中後，將胜肽原料儲存在-20°C。

【0035】實例2：細胞培養

【0036】CCD-966SK是從人的胸部分離出的皮膚纖維母細胞，其係購自生物資源保存及研究中心（Bioresource Collection and Research Center，BCRC）（新竹，台灣）。在37°C且含有5%CO₂下，培養於含有10%（v/v）

【發明申請專利範圍】

【第1項】一種抗老化胜肽，其係由SEQ ID NO: 1的胺基酸序列所組成的合成胜肽。

【第2項】如請求項1的胜肽，其具有增強纖維母細胞中膠原蛋白或彈性蛋白的表現或纖維母細胞之遷移的功效。

【第3項】一種抗老化組合物，其包含有效量的如請求項1的胜肽及一可接受的載體。

【第4項】如請求項3的組合物，其係被調製成一種局部用製劑。

【第5項】如請求項3的組合物，其中如請求項1的胜肽的量可有效增強纖維母細胞中膠原蛋白或彈性蛋白的表現或增強纖維母細胞之遷移。

【第6項】如請求項4的組合物，其中該局部用製劑包含軟膏、乳液、乳霜、凝膠、滴劑、噴霧、液劑或面膜。

【第7項】如請求項6的組合物，其中該局部用製劑為乳霜。

【第8項】如請求項6的組合物，其中該局部用製劑為面膜。

【第9項】一種如請求項1的胜肽用於製備治療由年齡引起的損傷的個人護理組合物之用途，其中如請求項1的胜肽可有效增強纖維母細胞中膠原蛋白或彈性蛋白的表現或增強該個體中的纖維母細胞之遷移。

【第10項】如請求項9的用途，其中如請求項1的胜肽係局部地投予。

【第11項】如請求項9的用途，其中該個人護理組合物係用於皮膚護理。

【第12項】如請求項11的用途，其中該個人護理組合物係用於抗老化、增亮皮膚及減少皺紋及細紋。