



(12)发明专利申请

(10)申请公布号 CN 106084006 A

(43)申请公布日 2016.11.09

(21)申请号 201610462882.2

A61K 47/42(2006.01)

(22)申请日 2016.06.23

A61K 31/7105(2006.01)

(71)申请人 普锐尼斯生物科技有限公司

A61K 48/00(2006.01)

地址 中国香港九龙旺角道33号凯途发展大厦7楼04室

A61K 38/18(2006.01)

(72)发明人 汤涛 杜权 邓艳 东硕

(74)专利代理机构 苏州威世册知识产权代理事务所(普通合伙) 32235

代理人 杨林洁 东楠

(51)Int.Cl.

C07K 7/06(2006.01)

C12N 15/11(2006.01)

A61K 8/64(2006.01)

A61Q 19/00(2006.01)

A61Q 5/00(2006.01)

权利要求书1页 说明书4页
序列表1页 附图1页

(54)发明名称

一种透皮肤及其应用

(57)摘要

本发明提供了一种具有透皮功能或透皮增强功能的多肽及编码该多肽的核酸序列。该多肽能够促进和/或增强其他物质的透皮,这些物质包括小分子活性物质、大分子活性物质如蛋白、核酸等。本发明还提供了包含本发明透皮肤的组合,如美容制剂、美发制剂、药物组合物等。



1. 一种透皮增强多肽,其特征在于,具有 SEQ ID No 1所示的序列。
2. 一种核苷酸序列,其特征在于,该核苷酸序列含有编码 SEQ ID No 1所示的多肽序列的核苷酸序列。
3. 一种美容制剂,其特征在于包含至少一种透皮增强剂,和至少一种皮肤养护、皮肤机能改善或者皮肤色泽调节的有效成分,所述透皮增强剂含有SEQ ID No 1所示的多肽序列。
4. 一种美发制剂,其特征在于包含至少一种透皮增强剂,和至少一种美发活性成分,所述美发活性成分包括任何具有促进毛发生长、防止毛发脱落、改变毛发结构、成分或色泽功效的分子,所述透皮增强剂含有SEQ ID No 1所示的多肽序列。
5. 一种药物组合物,其特征在于包括至少一种治疗某疾病的有效剂量的药物活性成分和至少一种透皮给药增强剂,所述透皮增强剂含有SEQ ID No 1所示的多肽序列。
6. 如权利要求5所述的药物组合物,其特征在于所述药物活性成分为小分子核酸、多肽或蛋白。
7. 如权利要求6所述的药物组合物,其特征在于所述小分子核酸选自小分子干扰核酸(siRNA)、微小核酸(miRNA)或反义核酸。
8. 一种辅助活性物质透皮的方法,其特征在于将SEQ ID No 1所述的透皮增强多肽与有效剂量的活性物质混合并施于皮肤表面。
9. 如权利要求8所述的方法,其特征在于所述活性物质为小分子核酸,选自小分子干扰核酸(siRNA)、微小核酸(miRNA)或反义核酸。

一种透皮肤及其应用

技术领域

[0001] 本发明属于生物工程领域,具体的说,本发明涉及一种具有增强型透皮功能的多肽。

背景技术

[0002] 透皮给药系统或经皮吸收系统(Transdermal Drug Delivery Systems/Transdermal Therapeutic Systems,简称TDDS/TTS),指经皮肤贴敷或涂抹方式用药,药物由皮肤吸收进入全身血液循环并达到有效血药浓度、实现疾病治疗或预防的一种方法。其主要特点:(1)透皮给药系统可避免肝脏的首过效应和药物在胃肠道的灭活,药物的吸收不受胃肠道因素的影响并且减少用药的个体差异;(2)维持恒定有效血药浓度或生理效应,避免口服给药引起的血药浓度峰谷现象,降低毒副作用;(3)减少给药次数,提高治疗效能,延长作用时间,避免多剂量给药,使大多数病人易于接受;(4)使用方便,患者可以自主用药,也可以随时撤销用药。

[0003] 皮肤是最大、最易侵入的器官,皮肤遗传病多达330余种,尚无根治措施。基因治疗是将外源正常基因或基因片断导入靶细胞,以纠正或补偿基因缺陷,达到治疗遗传病的生物学高技术。经皮给药具有易操作、损伤小等优点,避免了胃肠道和肝脏的消化和降解作用。

[0004] 许多化学渗透增强剂被用来试图打开皮肤屏障,但大多数效果不理想。如果没有物理方法的帮助,化学透皮增强剂难以有效地将亲水性药物(特别是分子量大于500Da的药物)通过未破坏的皮肤进入到血液循环,并达到治疗所需的血药水平。此外,现有的化学透皮增强剂容易导致皮肤损伤、发炎、过敏、系统毒性等,在使用上收到很大限制。常用的物理方法有离子电渗、微针等,以证明对多种药物分子具有增进透皮的效果。但物理方法有很多不足,包括使用特别仪器,成本高,剂型灵活性差等,而且在不同程度上有疼痛感,不适合家庭使用等。

[0005] 因此需要开发出新型的能够克服上述诸多不足的透皮增强剂,从而有效增强和/或方便活性分子透过皮肤,使得进入体循环的活性分析剂量增加或者到达靶器官、组织和细胞的活性分子剂量增加。此外,新型透皮增强剂应不会导致皮肤损伤、发炎、过敏、系统毒性等,并能够用于大分子量药物如多肽、蛋白和核酸分子的透皮给药。

发明内容

[0006] 本发明的第一个方面是提供一种透皮增强多肽,该透皮增强肽具有 SEQ ID No 1所示的序列。SEQ ID No 1:ACSSTKKHCG。

[0007] 本发明的第二个方面是提供一种核苷酸序列,该核苷酸序列含有编码 SEQ ID No 1所示的多肽序列的核苷酸序列。

[0008] 本发明的第三个方面是提供一种包含上述透皮增强肽的组合物,这种组合物可以是美容制剂、美发制剂或药物组合物。在一种优选情况下,该美容制剂包含至少一种透皮增

强剂,和至少一种皮肤养护、皮肤机能改善或者皮肤色泽调节的有效成分,所述透皮增强剂含有SEQ ID No 1所示的多肽序列。在一种优选情况下,该美发制剂包含至少一种透皮增强剂,和至少一种美发活性成分,所述美发活性成分包括任何具有促进毛发生长、防止毛发脱落、改变毛发结构、成分或色泽功效的分子,所述透皮增强剂含有SEQ ID No 1所示的多肽序列。在一种优选情况下,该药物组合物包括至少一种治疗某疾病的有效剂量的药物活性成分和至少一种透皮给药增强剂,所述透皮增强剂含有SEQ ID No 1所示的多肽序列。进一步优选的,所述药物活性成分为小分子核酸;更优选的,所述小分子核酸选自小分子干扰核酸(siRNA)、微小核酸(miRNA)或反义核酸。

[0009] 本发明还提供一种透皮多肽辅助活性物质透皮的方法,将透皮多肽与有效剂量的活性物质混合,所述活性物质为小分子核酸,选自小分子干扰核酸(siRNA)、微小核酸(miRNA)或反义核酸。

[0010] 有益效果:使用本发明的透皮增强肽,能够在不损伤皮肤的情况下实现活性物质的透皮吸收。

附图说明

[0011] 图1、多肽透皮效果研究。对照组包括空白对照(孵育过程中不加入任何噬菌体)和表达不具有透皮能力的GLP1多肽(一种39个氨基酸的降糖多肽)的对照噬菌体。透皮肽噬菌体为表达SEQ ID No 1 序列的噬菌体。在培养平板上,噬菌斑显示为蓝色,蓝色越深表示能够透过皮肤的噬菌体越多。在空白对照和表达GLP1多肽的对照噬菌体组中,均未在小鼠血液中检测到噬菌体的存在,表明在没有辅助的情况下,噬菌体无法自主透过小鼠皮肤。对实验组而言,SEQ ID No 1 序列形成的阳性克隆(蓝色斑)数较多,表明表达SEQ ID No 1 序列多肽的噬菌体具有较好的透皮能力。

[0012] 图2、辅助荧光标记siRNA的透皮效果研究。在SEQ ID No 1 序列多肽的作用下,大量荧光标记的siRNA从皮肤表面迁移到角质层和皮下组织中。研究结果表明,在化妆品基质存在的条件下,SEQ ID No 1 序列多肽能高效辅助荧光标记siRNA的透皮。

具体实施方式

[0013] 以下结合具体实施例,对本发明作进一步说明。应理解,以下实施例仅用于说明本发明而非用于限定本发明的范围。下列实施例中未注明具体条件的实验方法,通常按照常规条件,如《分子克隆:实验室手册》(New York : CoId Spring Harbor Laboratory Press, 1989)中所述的条件或厂商提供的条件进行。

[0014] 为了证明透皮多肽辅助噬菌体透皮的效果,建立了基于冰冻切片和激光荧光共聚焦显微镜的siRNA透皮研究技术。我们将化妆品基质、化学合成的SEQ ID No 1 透皮多肽、以及荧光标记的 siRNA 进行大鼠皮肤涂抹,利用冰冻切片和激光荧光共聚焦显微镜技术,对透皮过程进行了研究。我们的研究表明,在存在化妆品基质的条件下,本研究鉴定的透皮多肽仍能高效地辅助siRNA透过大鼠皮肤。另一方面,我们研究了SEQ ID No 1在动物体内辅助表皮生长因子(EGF)透皮的效果,结果表明该多肽能有效地辅助EGF透皮。

[0015] 实施例一、采用固相合成方法合成多肽SEQ ID No 1:ACSSTKKHCG。

[0016] 采用微波辅助多肽固相合成法:以Wang树脂为固相载体,HBTU-HOBt为缩合剂,

Fmoc为 α -氨基保护基的合成策略。称取0.1mmol的Fmoc-甘氨酸-Wang树脂于固相反应器中，加入10mL的DCM溶胀树脂30min，待树脂充分溶胀，真空抽干溶剂。用20%哌啶/DMF10mL洗涤一次，向树脂中加入20%哌啶/DMF10mL并置于微波辅助固相合成仪中，于60℃，20W条件下反应3min脱除Fmoc保护基，依次用DCM、DMF洗涤，保护基脱除采用Kaiser法进行检测，检测呈阳性可继续反应。将3eq的Fmoc-氨基酸-OH、HBTU和HOBT用DMF溶解，滴加5eq的DIEA静置2min使其充分活化，加入固相反应器中，于60℃，20W条件下反应5min，缩合完成后，用DCM、DMF依次洗涤树脂。重复以上各步反应得到所需直链多肽，用TFA/TIS/H₂O为95:2.5:2.5溶液10mL，常温反应2h去掉N-端和侧链保护基并切除树脂，用DCM洗涤三次，滤液浓缩至最小体积后，加入30倍体积冰乙醚，在4℃条件下，10000r/min离心15min，弃去上清液，重复结晶两次，真空干燥得到多肽直链产物。将多肽溶于25%甲醇水溶液中，分5次每次间隔30min加入2.5eq碘进行氧化反应，室温搅拌反应2h后浓缩，得到粗产品。纯化采用凝胶层析色谱S印hadex G-15，洗脱液为50%甲醇水溶液，产物经HPLC和ESI-MS进行鉴定。得到如下序列：SEQ ID No 1 ACSSTKKHCG

实施例二、动物实验验证透皮活性

本实施例是为了研究透皮多肽在小鼠水平的透皮效果，具体步骤如下。

- [0017] 1. 实验前36小时给小鼠刮毛，得到2×2 cm无毛皮肤。
- [0018] 2. 10 μ L Er-2738 菌液(购自北京天恩泽)加入4 mL 的2×YT培养基，37℃孵育，180 rpm离心4h。
- [0019] 3. 将小鼠用3.5%水合氯醛麻醉，麻醉剂量为10 μ L/g。
- [0020] 4. 在每只小鼠准备好的2×2 cm皮肤表面，加上100 μ L噬菌体。
- [0021] 5. 半小时、一小时各取血10 μ L，混合加入1 mL步骤2制备的菌液中，37℃孵育，120 rpm条件下离心40分钟。
- [0022] 6. 将第二步混合液用蓝白斑筛选的方法过夜，得到图1所示结果。
- [0023] 7. 挑选蓝色斑点，扩增提取质粒，测序。

[0024] 实施例三、透皮多肽辅助siRNA透皮活性研究

本实施例是为了研究透皮多肽在大鼠水平的透皮效果，具体步骤如下。

- [0025] 1. 实验前36小时给大鼠刮毛，得到2×2 cm无毛皮肤。
- [0026] 2. 将少量(约0.1克)化妆品基质与化学合成的SEQ ID No1多肽1mg、以及荧光标记的siRNA(100 ng)进行充分混合。
- [0027] 3. 将混合物均匀地涂抹到已经去毛的大鼠皮肤上，用保鲜膜包裹于皮肤上。
- [0028] 4. 1个小时后处死大鼠，分离皮肤，用PBS对皮肤表面进行清洗，随后在液氮速冻条件下，进行皮肤样品的包埋和冰冻切片。利用共聚焦显微镜观察siRNA的透皮效果。得到图2所示结果。从图中我们可以看到，本发明的SEQ ID No 1所述的透皮增强肽能够辅助带有荧光标记的siRNA透过小鼠皮肤。

[0029] 实施例四、透皮多肽辅助表皮生长因子蛋白(EGF)透皮活性研究

本实施例是为了研究透皮多肽在大鼠体内水平对蛋白的透皮增强效果，具体步骤如下。

- [0030] 随机抽取10只SD大鼠，并将其平均分成共分2组，每组各5只(对照组EGF透皮给药

组;实验组SEQ ID No1混合EGF(9:1)透皮给药组)。

[0031] 1.1ml乌拉坦麻醉后,在腹部剪出约2~2cm²×2 cm²的无毛区,在此部位对照组和实验组各给药50ug。

[0032] 2. 在给药300min后采用心脏取血,4度3000转离心收集血清。

[0033] 3.取100ul血清,EGF ELISA试剂盒(上海沪鼎生物科技有限公司)检测。得到表1所示结果。

表1、辅助EGF透皮效果研究。

含量 (ng/ml)	EGF	SEQ ID No 1-EGF
1	0.12	0.39
2	0.14	0.46
3	0.09	0.46
4	0.08	0.43
5	0.11	0.51
平均值	0.108	0.450
标准差	0.024	0.044

[0034] 在SEQ ID No1 多肽的作用下,给药5小时后在大鼠体内检测到的EGF量高于对照组,表明SEQ ID No1多肽能高效辅助EGF的透皮。

SEQUENCE LISTING

- <110> 普銳尼斯生物科技有限公司
<120> 一种透皮肤及其应用
<130> 00001
<150> 20160210
<151> 20160210
<160> 1
<170> PatentIn version 3.3
<210> 1
<211> 10
<212> amino acid
<213> artificial sequence
<400> 1

ACSSTKKHCG

10

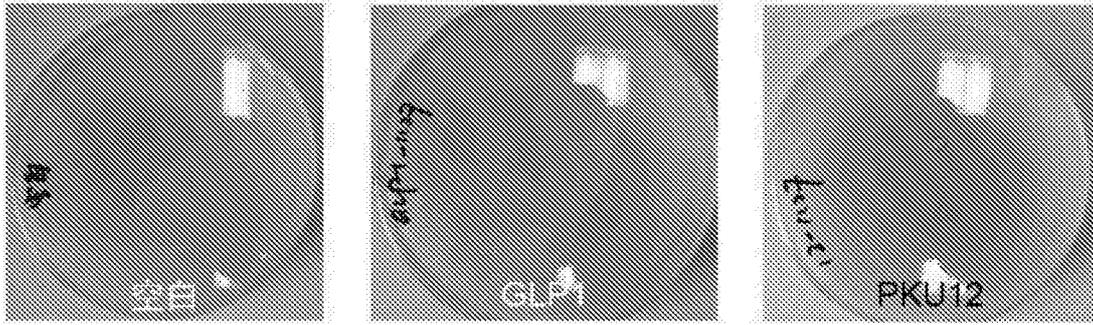


图1

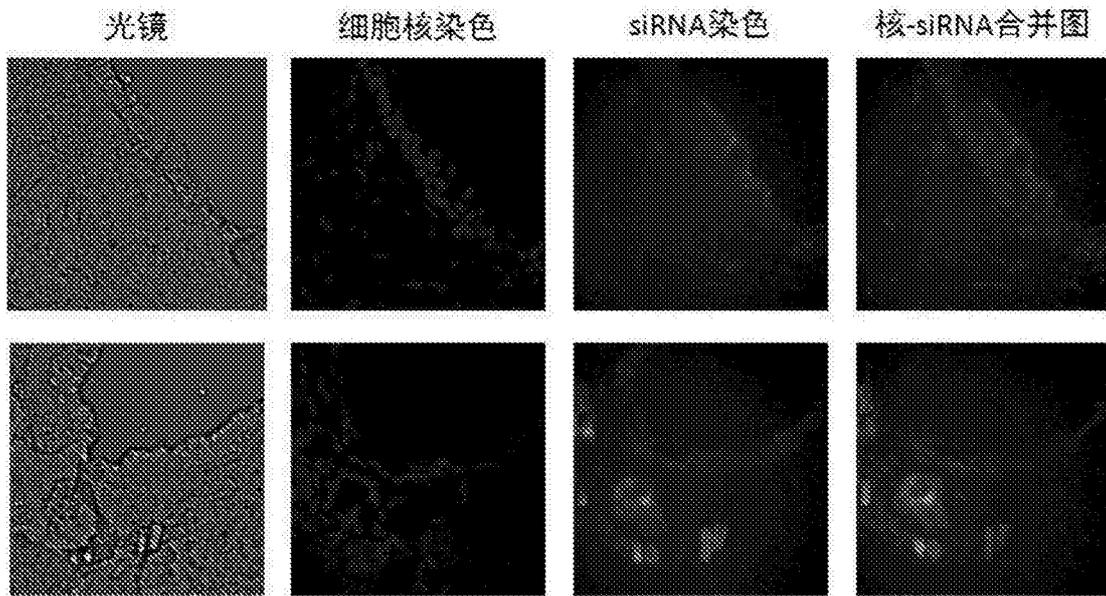


图2