



(12) 发明专利申请

(10) 申请公布号 CN 118201945 A

(43) 申请公布日 2024.06.14

(21) 申请号 202280065666.8

(22) 申请日 2022.09.27

(30) 优先权数据

10-2021-0130421 2021.09.30 KR

(85) PCT国际申请进入国家阶段日

2024.03.28

(86) PCT国际申请的申请数据

PCT/KR2022/014396 2022.09.27

(87) PCT国际申请的公布数据

W02023/055010 KO 2023.04.06

(71) 申请人 凯尔格恩有限公司

地址 韩国京畿道

(72) 发明人 郑镛池 金银美 李应智 姜憫雅

黄博培

(74) 专利代理机构 北京天昊联合知识产权代理有限公司 11112

专利代理师 孙微 尹丽鲲

(51) Int.Cl.

C07K 7/08 (2006.01)

A61K 38/00 (2006.01)

A61P 17/00 (2006.01)

A61K 8/64 (2006.01)

A61Q 19/00 (2006.01)

权利要求书1页 说明书12页

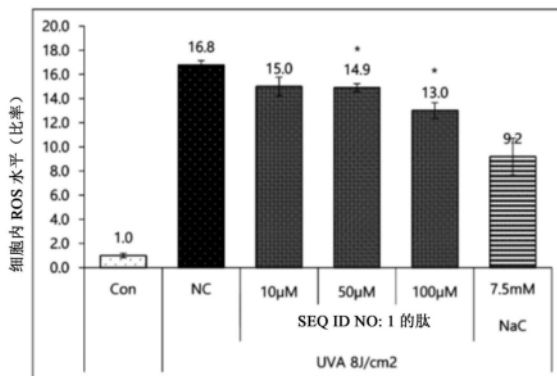
序列表(电子公布) 附图8页

(54) 发明名称

具有抗老化活性的肽及其用途

(57) 摘要

本发明涉及具有抗老化活性的肽,以及皮肤再生或抑制皮肤老化用组合物,该组合物包含该肽作为活性成分。包含SEQ ID NO:1的氨基酸序列的根据本发明的肽具有抗老化活性,因此可用作皮肤再生或抑制皮肤老化用化妆品的原料,或者可用作预防、改善或治疗光老化用药物制品的原料。



1. 一种肽,其包括SEQ ID NO:1的氨基酸序列。
2. 根据权利要求1所述的肽,其中所述肽具有皮肤老化抑制活性或皮肤再生活性。
3. 一种皮肤老化抑制或皮肤再生用组合物,所述组合物包含根据权利要求1所述的肽作为活性成分。
4. 根据权利要求3所述的组合物,其中所述组合物提高了对由外部刺激引起的细胞损伤的抵抗力。
5. 根据权利要求3所述的组合物,其中所述外部刺激为紫外线或红外线。
6. 根据权利要求4所述的组合物,其中所述细胞为皮肤成纤维细胞。
7. 根据权利要求3所述的组合物,其中所述组合物抑制了由紫外线引起的活性氧物质(ROS)的产生。
8. 根据权利要求3所述的组合物,其中所述组合物增加了损伤的细胞中胶原蛋白、纤连蛋白或弹性蛋白的表达。
9. 根据权利要求3所述的组合物,其中所述组合物抑制了MMP-1或MMP-2的表达或活性。
10. 一种皮肤老化抑制或皮肤再生用化妆品组合物,所述化妆品组合物包含根据权利要求1所述的肽作为活性成分。
11. 根据权利要求10所述的化妆品组合物,其中所述皮肤老化抑制或所述皮肤再生是预防或减少皮肤皱纹、改善皮肤弹性、强化皮肤屏障、防止色素沉积或改善皮肤光老化。
12. 一种预防或治疗光老化用药物组合物,所述药物组合物包含根据权利要求1所述的肽作为活性成分。

## 具有抗老化活性的肽及其用途

### 技术领域

[0001] 本发明涉及具有抗老化活性的肽,以及包含该肽作为活性成分的皮肤老化抑制或皮肤再生用组合物。

### 背景技术

[0002] 皮肤细胞可由于各种原因而老化,并且由于皮肤细胞的老化会产生皱纹。老化可分为随年龄增长的老化(内源性老化)以及光老化(光化性老化),其中随年龄增长的老化是随时间流逝基于生物过程发生的自然老化,光老化是在暴露于阳光的区域发生退行性改变,并且光老化与随年龄增长的老化会组合发生。当与细胞生长相关的各种因子的表达或活性受到抑制时,可发生自然细胞老化,并且由于阳光中所含的波长为280nm至400nm的光,皮肤细胞可发生光老化。特别是,如波长在280nm至320nm范围内的UVB类紫外线的照射可对皮肤或纤维造成损伤,并且可使皮肤晒成棕褐色,从而可使肤色变暗。当UVB照射皮肤细胞时,促进了皮肤细胞中ROS和自由基的积累,并刺激了由自由基引起的细胞内信号转导系统,这可诱导诸如DNA、蛋白和脂质之类的生物分子的氧化应激,因此,可对皮肤组织造成损伤。

[0003] 当皮肤细胞的氧化应激增加时,表皮的角质形成细胞或真皮的成纤维细胞受到刺激,作为胶原蛋白降解酶的诸如基质金属蛋白酶(MMP)之类的基因的表达可通过一系列细胞内信号转导过程而增加,从而引发胶原蛋白的减少,胶原蛋白作为皮肤的主要成分占真皮的90%,并且通过为皮肤提供强度和张力从而保护皮肤免受外部刺激或外力的影响。由此,会出现皮肤老化或皱纹。因此,通过调节参与诸如胶原蛋白之类的纤维蛋白合成或降解的基因的表达,预期可以达到预防皮肤细胞老化和减少皱纹的效果。

[0004] 由阳光中的紫外线的照射引起的细胞老化过程不仅导致了由于皮肤损伤引起的美容方面的问题,而且还导致了严重的健康问题,例如由于细胞的DNA损伤导致的癌症、中枢和外周神经系统的损伤、免疫系统的破坏、生殖器官异常、婴幼儿的发育异常以及皮肤病如氯痤疮,因此,迫切需要解决这些问题。

[0005] 为了解决这些问题,已经开发了各种材料,并且已经尝试通过使用从各种植物或微生物中获得的提取物来克服这些问题。然而,在许多情况下,提取物的确切组成是未知的,因为无法具体识别从天然产物中获得的提取物中的哪些物质可对保护皮肤细胞或老化现象得到恢复产生效果,因此,也一起使用了含有未知物质的提取物成分。由于该物质应当与人体直接接触或应用于人体的特点,因此应当尽量减少该物质的副作用,并且应当确保人体安全。因此,需要准确识别具有可解决上述问题的效果的单一物质并将其应用于人体皮肤细胞。

[0006] [现有技术文献]

[0007] [非专利文献]

[0008] (非专利文献1) S Edgar等人, Effects of collagen-derived bioactive peptides and natural antioxidant compounds on proliferation and matrix

protein synthesis by cultured normal human dermal fibroblasts, Scientific Reports, 2018; 8: 10474

## 发明内容

### [0009] 技术问题

[0010] 本发明的目的在于提供一种具有抗老化活性的肽。

[0011] 本发明的另一目的在于提供一种包含具有抗老化活性的肽作为活性成分的皮肤老化抑制或皮肤再生用组合物。

[0012] 本发明的还一目的在于提供一种包含具有抗老化活性的肽作为活性成分的皮肤老化抑制或皮肤再生用化妆品组合物。

[0013] 本发明的还一目的在于提供一种包含具有抗老化活性的肽作为活性成分的预防或治疗光老化用药物组合物。

### [0014] 技术方案

[0015] 为了实现上述目的,本发明的一个方面提供了一种包含SEQ ID NO:1的氨基酸序列的肽。

[0016] 本发明的另一方面提供了一种包含具有抗老化活性的肽作为活性成分的皮肤老化抑制或皮肤再生用组合物。

[0017] 本发明的还一方面提供了一种包含具有抗老化活性的肽作为活性成分的皮肤老化抑制或皮肤再生用化妆品组合物。

[0018] 本发明的还一方面提供了一种包含具有抗老化活性的肽作为活性成分的预防或治疗光老化用药物组合物。

### [0019] 有益效果

[0020] 根据本发明的包含SEQ ID NO:1的氨基酸序列的肽具有抗老化活性,因此可用作抑制皮肤老化或使皮肤再生的化妆品的原料或者可用作预防、改善或治疗光老化的药物制品的原料。

[0021] 本发明的效果不限于上述效果,并且本领域技术人员可以通过以下描述清楚地理解未提及的其他效果。

## 附图说明

[0022] 图1为示出了本发明的肽对成纤维细胞中由紫外线(UV)照射增加的细胞内活性氧物质(ROS)水平的影响的图,其中Con代表非UV照射组,NC代表UV照射组,10 $\mu$ M、50 $\mu$ M和100 $\mu$ M代表在UV照射前用不同浓度的本发明的肽处理的组,并且NaC代表在UV照射前用7.5mM的N-乙酰半胱氨酸处理的阳性对照。

[0023] 图2a为示出了本发明的肽对成纤维细胞中由紫外线(UV)照射降低的胶原蛋白、纤连蛋白和弹性蛋白的表达的影响的RT-PCR电泳照片,其中Con代表非UV照射组,NC代表UV照射组,10 $\mu$ M、50 $\mu$ M和100 $\mu$ M代表在UV照射前用不同浓度的本发明的肽处理的组,并且槲皮素(Quercetin)代表在UV照射前用50 $\mu$ M的槲皮素处理的阳性对照。

[0024] 图2b为示出了本发明的肽对成纤维细胞中由紫外线(UV)照射降低的胶原蛋白的表达的影响的图,其中Con代表非UV照射组,NC代表UV照射组,10 $\mu$ M、50 $\mu$ M和100 $\mu$ M代表在UV

照射前用不同浓度的本发明的肽处理的组,并且槲皮素代表在UV照射前用50 $\mu$ M的槲皮素处理的阳性对照。

[0025] 图2c为示出了本发明的肽对成纤维细胞中由紫外线(UV)照射降低的纤连蛋白的表达的影响的图,其中Con代表非UV照射组,NC代表UV照射组,10 $\mu$ M、50 $\mu$ M和100 $\mu$ M代表在UV照射前用不同浓度的本发明的肽处理的组,并且槲皮素代表在UV照射前用50 $\mu$ M的槲皮素处理的阳性对照。

[0026] 图2d为示出了本发明的肽对成纤维细胞中由紫外线(UV)照射降低的弹性蛋白的表达的影响的图,其中Con代表非UV照射组,NC代表UV照射组,10 $\mu$ M、50 $\mu$ M和100 $\mu$ M代表在UV照射前用不同浓度的本发明的肽处理的组,并且槲皮素代表在UV照射前用50 $\mu$ M的槲皮素处理的阳性对照。

[0027] 图3a为示出了本发明的肽对NIH3T3成纤维细胞中由紫外线(UV)照射增加的凋亡诱导因子的表达的影响的蛋白印迹电泳照片,其中Con代表非UV照射组,NC代表UV照射组,10 $\mu$ M、50 $\mu$ M和100 $\mu$ M代表在UV照射前用不同浓度的本发明的肽处理的组,并且NaC代表在UV照射前用2.5mM的N-乙酰半胱氨酸处理的阳性对照。

[0028] 图3b为示出了本发明的肽对NIH3T3成纤维细胞中由紫外线(UV)照射增加的作为凋亡诱导因子的Cleaved PARP-1的表达的影响的图,其中Con代表非UV照射组,NC代表UV照射组,10 $\mu$ M、50 $\mu$ M和100 $\mu$ M代表在UV照射前用不同浓度的本发明的肽处理的组,并且NaC代表在UV照射前用2.5mM的N-乙酰半胱氨酸处理的阳性对照。

[0029] 图3c为示出了本发明的肽对NIH3T3成纤维细胞中由紫外线(UV)照射增加的作为凋亡诱导因子的Bax的表达的影响的图,其中Con代表非UV照射组,NC代表UV照射组,10 $\mu$ M、50 $\mu$ M和100 $\mu$ M代表在UV照射前用不同浓度的本发明的肽处理的组,并且NaC代表在UV照射前用2.5mM的N-乙酰半胱氨酸处理的阳性对照。

[0030] 图3d为示出了本发明的肽对NIH3T3成纤维细胞中由紫外线(UV)照射增加的作为凋亡诱导因子的Cleaved Caspase-3的表达的影响的图,其中Con代表非UV照射组,NC代表UV照射组,10 $\mu$ M、50 $\mu$ M和100 $\mu$ M代表在UV照射前用不同浓度的本发明的肽处理的组,并且NaC代表在UV照射前用2.5mM的N-乙酰半胱氨酸处理的阳性对照。

[0031] 图4a为示出了本发明的肽对成纤维细胞中由紫外线(UV)照射增加的MMP-1和MMP-2的表达和活性的影响的蛋白印迹电泳照片,其中Con代表非UV照射组,NC代表UV照射组,10 $\mu$ M、50 $\mu$ M和100 $\mu$ M代表在UV照射前用不同浓度的本发明的肽处理的组,并且NaC代表在UV照射前用2.5mM的N-乙酰半胱氨酸处理的阳性对照。

[0032] 图4b为示出了本发明的肽对成纤维细胞中由紫外线(UV)照射增加的MMP-1表达和活性的影响的图,其中Con代表非UV照射组,NC代表UV照射组,10 $\mu$ M、50 $\mu$ M和100 $\mu$ M代表在UV照射前用不同浓度的本发明的肽处理的组,并且NaC代表在UV照射前用2.5mM的N-乙酰半胱氨酸处理的阳性对照。

[0033] 图4c为示出了本发明的肽对成纤维细胞中由紫外线(UV)照射增加的MMP-2表达和活性的影响的图,其中Con代表非UV照射组,NC代表UV照射组,10 $\mu$ M、50 $\mu$ M和100 $\mu$ M代表在UV照射前用不同浓度的本发明的肽处理的组,并且NaC代表在UV照射前用2.5mM的N-乙酰半胱氨酸处理的阳性对照。

[0034] 图5a为示出了本发明的肽对成纤维细胞中由热处理增加的MMP-1的表达的影响的

蛋白印迹电泳照片,其中Con代表非热处理组,NC代表热处理组,10 $\mu$ M、50 $\mu$ M和100 $\mu$ M代表在热处理前用不同浓度的本发明的肽处理的组,并且NaC和GSH代表分别用2.5mM的N-乙酰半胱氨酸和2mM的谷胱甘肽处理的阳性对照。

[0035] 图5b为示出了本发明的肽对成纤维细胞中由热处理增加的MMP-1的表达的影响的图,其中Con代表非热处理组,NC代表热处理组,10 $\mu$ M、50 $\mu$ M和100 $\mu$ M代表在热处理前用不同浓度的本发明的肽处理的组,并且NaC和GSH代表分别用2.5mM的N-乙酰半胱氨酸和2mM的谷胱甘肽处理的阳性对照。

### 具体实施方式

[0036] 在下文中,将更详细地描述本发明。

[0037] 本发明的一个方面提供了一种包含SEQ ID NO:1所述的氨基酸序列的肽。

[0038] 在本说明书中,术语“肽”是指由氨基酸残基组成的线性分子,并且具体而言,本发明的肽可包括SEQ ID NO:1所述的氨基酸序列。

[0039] 在不影响功能性的范围内,“肽”可以是通过氨基酸残基的缺失、插入、置换或组合而具有不同序列的氨基酸的变体或片段。不完全改变肽的活性的氨基酸交换在本领域中是已知的。在一些情况下,可以通过磷酸化、硫酸化、丙烯酰化、糖基化、甲基化、法尼基化等对肽进行修饰。因此,本发明的肽包括含有与包含SEQ ID NO:1的氨基酸序列的肽、其变体或其活性片段基本上相同的氨基酸序列的肽。

[0040] 基本上相同的蛋白是指与SEQ ID NO:1的氨基酸序列的序列同源性的75%以上、优选80%以上、例如85%以上、90%以上、95%以上、98%以上或99%以上的氨基酸序列,但不限于此,只要该蛋白具有75%以上的氨基酸序列同源性并且具有相同的活性,就包括在本发明的范围内。

[0041] 此外,本发明的肽还可以包括靶向序列、标签、标记的残基、或为特定目的制备的氨基酸序列以增加肽的半衰期或稳定性。

[0042] 此外,为了获得更好的化学稳定性、增强的药理学特性(半衰期、吸收性、效价、功效等)、改变的特异性(例如,宽的生物活性谱)和降低的抗原性,可以修饰本发明的肽的N末端或C末端。“稳定性”不仅包括用于保护本发明的肽免受体内蛋白酶攻击的体内稳定性,还包括储存稳定性(例如,室温下的储存稳定性)。

[0043] N末端的修饰可以是选自由乙酰基、苄甲氧羰基、甲酰基、棕榈酰基、肉豆蔻酰基、硬脂酰基和聚乙二醇(PEG)组成的组中的保护基与肽的N末端的结合,但不限于此。

[0044] C末端的修饰可以是羟基(-OH)、氨基(-NH<sub>2</sub>)、叠氨基(-NHNH<sub>2</sub>)等与肽的C末端的结合,但不限于此。

[0045] 可以例如使用装置或基因工程技术进行本发明的肽的合成。在使用装置合成肽的情况下,可以在自动肽合成仪中使用Fmoc固相法合成所需的肽。

[0046] 在本发明的具体实施方案中,使用Fmoc固相法合成并识别本发明的包含SEQ ID NO:1的氨基酸序列的肽,并且通过验证经鉴定的肽的功效进行选择。

[0047] 在本发明的具体实施方案中,为了验证经鉴定的肽的功效,通过以下验证来选择本发明的肽:降低由紫外线照射增加的活性氧物质水平的效果、由紫外线降低的ECM成分的恢复、以及抑制由紫外线增加的凋亡诱导因子和胶原蛋白酶的表达和活性的效果。

[0048] 因此,本发明的包含SEQ ID NO:1的氨基酸序列的肽具有皮肤老化抑制活性或皮肤再生活性。

[0049] 本发明的另一方面提供了一种具有包含SEQ ID NO:1的氨基酸序列的肽作为活性成分的皮肤老化抑制或皮肤再生用组合物。

[0050] “皮肤老化”可为细胞随着时间的推移自然发生的老化,或者可为由阳光引起的光老化,并且特别是可为由紫外线引起的光老化。此外,老化可由细胞内氧化应激诱导,细胞内氧化应激可由各种原因引起,因此,可能会发生细胞生长抑制或凋亡,构成皮肤细胞的各种纤维蛋白的合成可能会受到抑制,并且降解酶的表达可能会增加。特别是,当紫外线照射时,皮肤细胞中的诸如Colla1、纤连蛋白和弹性蛋白之类的基因的表达受到抑制,并且促进了MMP-1和MMP-2基因的表达,这可导致皮肤细胞的光老化和皱纹。

[0051] “皮肤再生”可促进皮肤细胞的生长并增强皮肤细胞的活力,以防止外部和/或内部刺激对细胞的损伤,减少皮肤皱纹,提高弹性,并强化皮肤屏障,并且皮肤再生包括预防由外部环境引起的皮肤损伤(例如色素沉积)、或者改善或治疗皮肤光老化。

[0052] 在实施方案中,皮肤老化抑制或皮肤再生用组合物提高了对由外部刺激引起的细胞损伤的抵抗力。“外部刺激”可为物理刺激、由施加化妆品或其他外部制剂引起的化学刺激、由紫外线引起的刺激或由红外线引起的刺激。

[0053] 损伤的细胞可为皮肤成纤维细胞。

[0054] 本发明的肽可诱导皮肤细胞中的纤维蛋白合成基因的表达增加,以及皮肤细胞中的纤维蛋白降解基因的表达的抑制。因此,该肽可以通过增加纤维蛋白的合成从而减少皮肤的皱纹并改善皮肤的弹性,并且可以通过改善皮肤屏障从而增加皮肤细胞的抵抗力和活力,并增强由外部刺激或老化造成损伤的皮肤的再生能力。本发明的肽的皮肤老化抑制和皮肤再生的效果可以通过测定参与细胞增殖的蛋白或抗氧化基因、纤维蛋白、以及与这些蛋白的降解酶相关的基因的表达水平进行确认,这些物质的表达水平随着皮肤老化的进展在皮肤细胞内发生变化。

[0055] 在实施方案中,皮肤老化抑制或皮肤再生用组合物抑制了由紫外线引起的活性氧物质(ROS)的产生。

[0056] 在实施方案中,皮肤老化抑制或皮肤再生用组合物增加了胶原蛋白、纤连蛋白或弹性蛋白的表达。

[0057] 在实施方案中,皮肤老化抑制或皮肤再生用组合物抑制了MMP-1或MMP-2的表达或活性。

[0058] 在本发明的具体实施方案中,示出了本发明的包含SEQ ID NO:1的氨基酸序列的肽降低了用紫外线照射的成纤维细胞中的细胞内活性氧物质(ROS)水平。

[0059] 此外,示出了该肽增加了损伤的成纤维细胞中的Colla1、纤连蛋白和弹性蛋白的表达。

[0060] 此外,示出了该肽降低了损伤的成纤维细胞中的诸如Cleaved PARP-1、Bax和Cleaved Caspase-3之类的凋亡诱导因子的表达。

[0061] 此外,示出了该肽降低了损伤的成纤维细胞中的MMP-1和MMP-2的表达和活性。

[0062] 因此,很显然,本发明的肽通过调节与皮肤细胞老化现象相关的基因的表达从而具有皮肤老化抑制或皮肤再生活性,因此本发明的肽可以有效地用作皮肤老化抑制或皮肤

再生用组合物的活性成分。

[0063] 本发明的另一方面提供了一种具有包含SEQ ID NO:1的氨基酸序列的肽作为活性成分的皮肤老化抑制或皮肤再生用化妆品组合物。

[0064] 在实施方案中,皮肤老化抑制或皮肤再生可为预防或减少皮肤皱纹、改善皮肤弹性、强化皮肤屏障、预防色素沉积或改善皮肤光老化。

[0065] 包含SEQ ID NO:1的氨基酸序列的肽与“皮肤老化抑制或皮肤再生用组合物”中描述的肽相同,因此其详细描述参见上述内容。在下文中,将仅描述皮肤老化抑制或皮肤再生用化妆品组合物的具体配置。

[0066] 化妆品组合物可以制备成本领域通常制备的任何制剂,例如溶液、悬浮液、乳液、膏、凝胶、乳霜、化妆水、粉末、肥皂、含表面活性剂的清洁剂、油、粉末粉底、乳液粉底、蜡粉底和喷雾,但不限于此。

[0067] 化妆品组合物可以制备成各种形式,例如溶液、溶胶凝胶、乳液、油、蜡和气溶胶,例如柔肤水、营养乳液、营养霜、按摩霜、精华、眼霜、清洁霜、清洁泡沫、清洁水、面膜(pack)、喷雾、粉末、生发乳、发膏、护发乳、洗发香波、护发素、护发素、发胶、头发气雾剂、发油、凝胶剂等,但不限于此。

[0068] 本发明的化妆品组合物可以包含其他添加剂,例如赋形剂和载体,并且能够根据需要施用和混合可与普通皮肤化妆品一起使用的常用成分。

[0069] 在本发明的化妆品组合物的制剂为膏、乳霜或凝胶的情况下,动物油、植物油、蜡、石蜡、淀粉、黄耆胶、纤维素衍生物、聚乙二醇、硅酮、膨润土、二氧化硅、滑石或氧化锌可用作载体成分。

[0070] 在本发明的化妆品组合物的制剂为粉末或喷雾的情况下,乳糖、滑石、二氧化硅、氢氧化铝、硅酸钙或聚酰胺粉末可以用作载体成分,并且特别是,在化妆品组合物的制剂为喷雾的情况下,可以额外含有推进剂,如氯氟烃、丙烷/丁烷或二甲醚,但不限于此。

[0071] 在化妆品组合物的制剂为溶液或乳液的情况下,可以使用溶剂、增溶剂或乳化剂作为载体成分,例如可以使用水、乙醇、异丙醇、碳酸乙酯、乙酸乙酯、苜醇、苯甲酸苜酯、丙二醇、1,3-丁二醇油、甘油酯族酯、聚乙二醇、失水山梨醇的脂肪酸酯等。

[0072] 在化妆品组合物的制剂为悬浮液的情况下,可以使用液体稀释剂如水、乙醇或丙二醇,悬浮剂如乙氧基化异硬脂醇、聚氧乙烯山梨醇酯或聚氧乙烯失水山梨糖醇酯、微晶纤维素、偏氢氧化铝、膨润土、琼脂、黄耆胶等。

[0073] 在化妆品组合物的制剂为含有表面活性剂的清洁剂的情况下,脂肪醇硫酸盐、脂肪醇醚硫酸盐、磺基琥珀酸单酯、羟乙基磺酸盐、咪唑鎓衍生物、甲基牛磺酸盐、肌氨酸盐、脂肪酰胺醚硫酸盐、烷基酰胺基甜菜碱、脂肪醇、脂肪酸甘油酯、脂肪酸二乙醇酰胺、植物油、羊毛脂衍生物、乙氧基化甘油脂肪酸酯等可以用作载体成分。

[0074] 在化妆品组合物的制剂为洗发香波的情况下,可以将用于形成香波的基本成分如增稠剂、表面活性剂、粘度调节剂、保湿剂、pH调节剂、防腐剂或精油与本发明的肽混合。CDE可用作增稠剂,作为阴离子表面活性剂的LES或作为两性表面活性剂的椰油基甜菜碱可用作表面活性剂,聚季铵盐可用作粘度调节剂,甘油可用作保湿剂,并且柠檬酸或氢氧化钠可用作pH调节剂。葡萄柚提取物等可用作防腐剂,并且还可添加诸如杉木、薄荷或迷迭香之类的精油、丝氨酸、戊醇或维生素E。

[0075] 化妆品组合物所含的成分除了本发明的肽和载体成分外,还可以包含化妆品组合物中常规使用的成分如常规佐剂,例如抗氧化剂、稳定剂、增溶剂、维生素、色素和香料作为活性成分,但不限于此。

[0076] 本发明的还一方面提供了一种具有包含SEQ ID NO:1的氨基酸序列的肽作为活性成分的预防或治疗光老化用药物组合物。

[0077] 包含SEQ ID NO:1的氨基酸序列的肽与“皮肤老化抑制或皮肤再生用组合物”中描述的肽相同,因此其详细描述参见上述内容。在下文中,将仅描述预防或治疗光老化用药物组合物的具体配置。

[0078] 在本说明书中,“光老化”是指由于反复或长期暴露于阳光从而发生的皮肤损伤、色素沉积、皱纹或皮肤弹性减退的现象。

[0079] 在本说明书中,“预防”是指通过本发明的肽或包含该肽的组合物抑制或延迟光老化的发生、扩展和复发的任何行为。

[0080] 在本说明书中,“改善或治疗”是指有益地改变光老化的任何行为,例如通过本发明的肽或包含该肽的组合物延迟、停止或逆转光老化的进展。

[0081] 在本发明的具体实施方案中,该肽抑制了由紫外线而受到损伤的成纤维细胞中的活性氧物质的产生和积累,增加了胶原蛋白、纤连蛋白和弹性蛋白的表达,抑制了诸如Cleaved PARP-1、Bax和Cleaved Caspase-3之类的凋亡诱导因子的表达,并抑制了诸如MMP-1和MMP-2之类的胶原蛋白酶的表达和活性,从而可以预防、改善或治疗光老化。

[0082] 本发明的药物组合物还可以包含药学上可接受的载体。

[0083] 药物组合物还可以包含例如用于口服施用的载体或用于肠胃外施用的载体作为药学上可接受的载体。用于口服施用的载体可以包括乳糖、淀粉、纤维素衍生物、硬脂酸镁、硬脂酸等。此外,用于肠胃外施用的载体可以包括水、合适的油、盐溶液、葡萄糖水溶液、乙二醇等。此外,药物组合物还可以包含稳定剂和防腐剂。合适的稳定剂包括抗氧化剂,如亚硫酸氢钠、亚硫酸钠和抗坏血酸。合适的防腐剂包括苯扎氯铵、对羟基苯甲酸甲酯或对羟基苯甲酸丙酯、以及氯丁醇。对于合适的药学上可接受的载体,可以参考《雷明顿药物科学》中的描述(Remington's Pharmaceutical Sciences (第19版,Mack Publishing Company,宾夕法尼亚州伊斯顿市,1995年))。

[0084] 本发明的药物组合物可以通过任何方法施用至包括人在内的哺乳动物。例如,本发明的药物组合物可以口服施用或肠胃外施用。肠胃外施用可为(但不限于)静脉内施用、肌内施用、动脉内施用、髓内施用、硬膜内施用、心内施用、透皮施用、皮下施用、腹膜内施用、鼻内施用、肠内施用、局部施用、舌下施用或直肠施用。

[0085] 本发明的药物组合物可以根据如上所述的施用途径配制成口服施用制剂或肠胃外施用制剂,并且肠胃外施用制剂可以以注射用制剂或外用制剂的形式具体配制和使用。

[0086] 本发明的药物组合物以药学有效量施用。在本发明中,“药学有效量”是指以适用于医学治疗的合理的效益/风险比治疗疾病的足够的量。可以根据包括患者的疾病类型和严重程度、药品活性、药品敏感性、施用时间、施用途径和排泄速率、治疗持续时间和同时使用的药品在内的因素以及医学领域中公知的其他因素来确定有效剂量水平。药物组合物可以作为单独的治疗剂施用或者可以与其他治疗剂组合施用,药物组合物可以与常规治疗剂同时、分开或顺序施用,或者药物组合物可以单独或多次施用。重要的是,在考虑所有上述

因素的情况下,能够以最少用量获得最大效果而没有副作用的量施用药物组合物,并且待施用的药物组合物的量可以由本领域技术人员容易地确定。

[0087] 药物组合物的有效量可以根据患者的年龄、性别、状况、体重、活性成分在体内的吸收程度、失活速率、排泄速率、疾病类型和联用药品而变化,并且药物组合物的有效量可以根据施用途径、严重程度、性别、体重、年龄等而增加或减少,例如,可以以每天每1kg患者体重约0.0001 $\mu$ g至500mg、优选0.01 $\mu$ g至100mg施用药物组合物。

[0088] 如上所述,本发明的肽具有优异的皮肤老化抑制和皮肤再生效果,并因此可用作皮肤老化抑制或皮肤再生用化妆品的原料,或者用作预防、改善或治疗光老化用药物制品的原料。

[0089] 本发明的还一方面提供了一种用于抑制皮肤老化或使皮肤再生的方法,该方法包括向受试者施用治疗有效量的包含SEQ ID NO:1的氨基酸序列的肽。

[0090] 本发明的还一方面提供了一种用于预防或治疗光老化的方法,该方法包括向受试者施用治疗有效量的包含SEQ ID NO:1的氨基酸序列的肽。

[0091] 包含SEQ ID NO:1的氨基酸序列的肽与“皮肤老化抑制或皮肤再生用组合物”中描述的肽相同,因此其详细描述参见上述内容。

[0092] 在本说明书中,术语“治疗有效量”是指达到在用肽治疗期间降低疾病发作频率的目标、但避免了其他治疗通常涉及的有害副作用情况下的肽的量。

[0093] 本发明的还一方面提供了SEQ ID NO:1的氨基酸序列用于制备预防或治疗光老化用药品的用途。

[0094] 在下文中,将参考实施例详细描述本发明。

[0095] 然而,以下实施例仅是对本发明的说明,并且本发明不受以下实施例的限制。

[0096] 本发明的例子

[0097] [合成例1]

[0098] 包含SEQ ID NO:1的氨基酸序列的肽的合成

[0099] 通过使用自动肽合成仪(Liberty,CEM Corporation,美国)合成包含[表1]的SEQ ID NO:1的氨基酸序列的肽,然后使用C18反相高效液相色谱(HPLC)(U-3000,Thermo fisher scientific,美国)分离和纯化合成的肽。将Pursuit XRs C18(250\*4.65mm100 Å,Agilent,美国)用作色谱柱。

[0100] [表1]

[0101]	SEQ ID NO:	肽的氨基酸序列
	1	LKKNCSCKRGPRTHYGQK

[0102] [实验例1]

[0103] 通过肽处理抑制活性氧物质的效果的确认

[0104] UV照射时会使活性氧物质水平增加。因此,确认了当用本发明的肽处理时,活性氧物质水平是否再次降低以及是否抑制了由细胞中的氧化应激引起的老化现象。

[0105] 首先,将NIH3T3细胞(小鼠成纤维细胞系)以 $5 \times 10^5$ 个细胞/孔的细胞密度接种在6孔板中,然后将细胞在包含10%胎牛血清(FBS)的DMEM培养基中培养24小时。用无血清DMEM培养基将培养的细胞洗涤一次,并且将本发明的肽分别以10 $\mu$ M、50 $\mu$ M和100 $\mu$ M的浓度混合在1mL的无血清DMEM培养基中,然后分配到细胞中。用7.5mM的N-乙酰半胱氨酸(NaC)代替上述

肽来处理阳性对照(PC)。

[0106] 将细胞在37°C的CO<sub>2</sub>培养箱中培养1小时。将培养细胞的培养基转移到管中,添加1ml的PBS,并且使用UV照射器(VILBER LOURMAT,Cat No.:3102-BSU,法国),用8J/cm<sup>2</sup>的UVA进行照射。在除去PBS后,再次处理900μL的转移到管中的培养基,并在37°C的CO<sub>2</sub>培养箱中培养24小时。在用10μM的二氯二氢荧光素二乙酸酯(DCFH-DA)处理后,用箔纸进行包裹,并在37°C的CO<sub>2</sub>培养箱中培养30分钟。用PBS将细胞洗涤两次,并分配500μL的1XTE以分离细胞。在离心后,用PBS洗涤细胞,并通过FACS测定荧光值。

[0107] 作为结果,如[图1]所示,确认了当用本发明的肽处理成纤维细胞时,通过紫外线照射增加的细胞内活性氧物质水平降低。

[0108] 由此可以得知,包含SEQ ID NO:1的氨基酸序列的肽使NIH3T3细胞中由UV照射增加的活性氧物质水平再次降低,并且氧化应激受到抑制,因此,预防了细胞的老化现象。

[0109] [实验例2]

[0110] 通过肽处理恢复细胞外基质(ECM)成分(胶原蛋白、纤连蛋白和弹性蛋白)的表达的确认

[0111] UV照射时会抑制构成细胞外基质(ECM)的胶原蛋白、纤连蛋白和弹性蛋白基因的表达。因此,通过确认胶原蛋白、纤连蛋白和弹性蛋白基因的表达水平是否恢复并增加,确认了当用本发明的肽处理时,细胞的光老化现象是否受到抑制。

[0112] 首先,将NIH3T3细胞以5×10<sup>5</sup>个细胞/孔的细胞密度接种在6孔板中,然后将细胞在包含10%胎牛血清(FBS)的DMEM培养基中培养24小时。用无血清DMEM培养基将培养的细胞洗涤一次,并且将本发明的肽分别以10μM、50μM和100μM的浓度混合在1mL的无血清DMEM培养基中,并分配到细胞中。用50μM的槲皮素代替上述肽来处理阳性对照(PC)。

[0113] 将细胞在37°C的CO<sub>2</sub>培养箱中培养1小时。将培养细胞的培养基转移到管中,添加1ml的PBS,并且使用UV照射器(VILBER LOURMAT,Cat No.:3102-BSU,法国),用6J/cm<sup>2</sup>的UVA进行照射。在除去PBS后,添加转移到管中的培养基,并在37°C的CO<sub>2</sub>培养箱中培养6小时。用PBS将培养的细胞洗涤两次,并且使用Easy Blue(iNtRON,Cat.No.:17061,韩国)从细胞中分离RNA。对分离的RNA的量进行定量,每管添加1,000ng的RNA,并使用试剂盒(Enzynomics,Cat.No.:RT200,韩国)反转录为cDNA,并且使用PCR试剂盒(Enzynomics,Cat.No.:P581T,韩国)进行RT-PCR。RT-PCR中使用的胶原蛋白(Coll1a1)、纤连蛋白和弹性蛋白的引物的序列以及用于比较每个处理组的总RNA量的GAPDH的引物的序列如[表2]所示。

[0114] [表2]

基因	引物	序列 (5'→3')	SEQ ID NO:
Coll1a1	F	CAC CCT CAA GAG CCT GAG TC	2
	R	AGA CGG CTG AGT AGG GAA CA	3
[0115] 纤连蛋白	F	CCA GGA ACC GAG TAC ACC AT	4
	R	ATA CCC AGG TTG GGT GAT GA	5
弹性蛋白	F	GCAAGACCTGGCTTTGGACT	6
	R	GGGAGTTTCTGGTTAGGGCTG	7
GAPDH	F	GGA GCC AAA AGG GTC ATC AT	8
	R	GTG ATG GCA TGG ACT GTG GT	9

[0116] 作为结果,如图2a至图2d所示,确认了本发明的肽增加了由UV照射降低的胶原蛋白、纤连蛋白和弹性蛋白的mRNA表达。由此可以得知,包含SEQ ID NO:1的氨基酸序列的肽具有增加成纤维细胞中由UV照射降低的胶原蛋白(Coll1a1)、纤连蛋白和弹性蛋白基因的表达水平以恢复表达水平的效果,并且通过由基因表达的蛋白抑制了细胞的光老化现象以减少皮肤皱纹。

[0117] [实验例3]

[0118] 通过肽处理抑制凋亡诱导因子的确认

[0119] UV照射时会使细胞凋亡诱导因子的表达增加。因此,通过确认诸如Cleaved PARP-1、Cleaved Caspase-3和 $\beta$ -肌动蛋白之类的凋亡诱导因子的所述增加的表达水平是否再次降低,确认了当用本发明的肽处理时,细胞的光老化现象是否受到抑制以及损伤的细胞是否再生。

[0120] 首先,将NIH3T3细胞以 $5 \times 10^5$ 个细胞/孔的细胞密度接种在6孔板中,然后将细胞在包含10%胎牛血清(FBS)的DMEM培养基中培养24小时。用无血清DMEM培养基将培养的细胞洗涤一次,并且将本发明的肽分别以 $10\mu\text{M}$ 、 $50\mu\text{M}$ 和 $100\mu\text{M}$ 的浓度混合在1mL的无血清DMEM培养基中,并分配到细胞中。用 $2.5\text{mM}$ 的N-乙酰半胱氨酸(NaC)代替上述肽来处理阳性对照(PC)。

[0121] 将细胞在 $37^\circ\text{C}$ 的 $\text{CO}_2$ 培养箱中培养1小时,并将培养细胞的培养基转移到管中,添加1mL的PBS,然后使用UV照射器(VILBER LOURMAT,Cat No.:3102-BSU,法国),用 $6\text{J}/\text{cm}^2$ 的UVA进行照射。在除去PBS后,再次添加 $900\mu\text{L}$ 的转移到管中的培养基,并在 $37^\circ\text{C}$ 的 $\text{CO}_2$ 培养箱中培养48小时。此后,将细胞用PBS洗涤两次,然后用细胞裂解缓冲液裂解细胞。通过用5X样品缓冲液处理细胞从而制备样品,使用10%SDS-PAGE凝胶进行SDS-PAGE,并将由此分离的蛋白转移到PVDF膜上。使用5%脱脂奶在室温下封闭1小时,将Anti-cleaved PARP-1抗体(CST,Cat.No.:9541S,美国)和Anti-cleaved Caspase-3抗体(CST,Cat.No.:9661S,美国)以及抗 $\beta$ -肌动蛋白抗体(Santa cruz,Cat.No.:SC-47778,美国)在5%脱脂奶中稀释至1:1000,并与膜反应2小时,然后用0.1%PBS-T(0.1%吐温-20的PBS溶液)洗涤三次,每次10分钟。将山羊抗兔IgG(Jackson Immuneresearch,Cat.No.:111-035-033,美国)和山羊抗鼠IgG(Jackson Immuneresearch,Cat.No.:111-035-003,美国)在5%脱脂奶中稀释至1:3000,并与膜反应2小时,并且使用ECL溶液(GE Healthcare,Cat.No.:RPN2232,美国)用膜进行检测。

[0122] 作为结果,如图3a至图3d所示,确认了本发明的肽使得在被UV照射损伤的细胞中表达增加的凋亡诱导因子的表达再次受到抑制。

[0123] 由此可以得知,由于包含SEQ ID NO:1的氨基酸序列的肽使得由UV照射增加的凋亡诱导因子的表达再次降低,并且抑制了细胞的光老化现象,从而获得了促进皮肤再生的效果。

[0124] [实验例4]

[0125] 通过肽处理降低MMP-1和MMP-2的表达和活性的确认

[0126] <4-1>抑制由紫外线照射增加的MMP-1和MMP-2的表达的确认

[0127] 紫外线照射时会与胶原蛋白降解相关的MMP-1和MMP-2编码蛋白的表达增加。因此,确认了当用本发明的肽处理时,MMP-1和MMP-2蛋白的合成是否再次受到抑制,以及细胞老化现象是否受到抑制。

[0128] 首先,将NIH3T3细胞以 $5 \times 10^5$ 个细胞/孔的细胞密度接种在6孔板中,然后将细胞在包含10%胎牛血清(FBS)的DMEM培养基中培养24小时。用无血清DMEM培养基将培养的细胞洗涤一次,并且将本发明的肽分别以 $10\mu\text{M}$ 、 $50\mu\text{M}$ 和 $100\mu\text{M}$ 的浓度混合在1mL的无血清DMEM培养基中,并分配到细胞中。用 $2.5\text{mM}$ 的N-乙酰半胱氨酸(NaC)代替上述肽来处理阳性对照(PC)。

[0129] 将细胞在 $37^\circ\text{C}$ 的 $\text{CO}_2$ 培养箱中培养1小时。将培养细胞的培养基转移到管中,添加1ml的PBS,并且使用UV照射器(VILBER LOURMAT, Cat No.:3102-BSU,法国),用 $6\text{J}/\text{cm}^2$ 的UVA进行照射。在除去PBS后,添加 $900\mu\text{L}$ 的转移到管中的培养基,并在 $37^\circ\text{C}$ 的 $\text{CO}_2$ 培养箱中培养48小时。将培养的细胞的培养基转移到管中,用PBS将细胞洗涤两次,然后添加细胞裂解缓冲液以裂解细胞。通过用5X样品缓冲液处理细胞以制备样品,然后使用10%SDS-PAGE凝胶进行SDS-PAGE。将通过SDS-PAGE分离的蛋白转移到PVDF膜上。使用5%脱脂奶在室温下封闭1小时。将抗-MMP-1抗体(Abcam, Cat.No.:ab137332,英国)在5%脱脂奶中稀释至1:1000,并与膜反应2小时。随后,用0.1%dm1 PBS-T(0.1%吐温-20的PBS溶液)洗涤三次,每次10分钟。将山羊抗兔IgG(Jackson Immune Research, Cat.No.:111-035-033,美国)在5%脱脂奶中稀释至1:3000,并与膜反应2小时。此后,使用ECL溶液(GE Healthcare, Cat.No.:RPN2232,美国)用膜进行检测。

[0130] 使用抗- $\beta$ -肌动蛋白抗体(Santacruz biotechnology,美国)鉴定 $\beta$ -肌动蛋白,以比较实验中使用的蛋白的总量。

[0131] 此外,为了分析MMP-2的量,准备了转移到管中的细胞培养基,然后进行明胶酶谱检测。首先使用明胶( $2\text{mg}/\text{ml}$ )作为基质进行蛋白电泳(SDS-PAGE),然后将凝胶在2.5% Triton X-100中处理30分钟,然后在 $37^\circ\text{C}$ 的缓冲液( $50\text{mM}$  Tris-HCl、 $0.2\text{M}$  NaCl、 $5\text{mM}$   $\text{CaCl}_2$ 、1% TritonX-100)中再次处理24小时。用考马斯亮蓝R250(Sigma)对经处理的凝胶进行染色,并用脱色缓冲液(5%乙醇、7.5%乙酸和蒸馏水)处理。此后,通过观察明胶水解时出现在凝胶上的空带,从而确认MMP-2的活性。

[0132] 作为结果,如图4a至图4c所示,确认了本发明的肽使得由UV照射增加的MMP-1和MMP-2的表达和活性受到抑制。

[0133] <4-2>抑制由热处理增加的MMP-1的表达的确认

[0134] 热处理时会与胶原蛋白降解相关的MMP-1编码蛋白的表达增加。因此,确认了当

用本发明的肽处理时, MMP-1蛋白的合成是否再次受到抑制, 以及细胞老化现象是否受到抑制。

[0135] 首先, 将NIH3T3细胞以 $5 \times 10^5$ 个细胞/孔的细胞密度接种在6孔板中, 然后将细胞在包含10%胎牛血清(FBS)的DMEM培养基中培养24小时。用无血清DMEM培养基将培养的细胞洗涤一次, 并且将本发明的肽分别以 $10\mu\text{M}$ 、 $50\mu\text{M}$ 和 $100\mu\text{M}$ 的浓度混合在1mL的无血清DMEM培养基中, 并分配到细胞中。用 $2.5\text{mM}$ 的N-乙酰半胱氨酸(NaC)或 $2\text{mM}$ 的谷胱甘肽(GSH)代替上述肽来处理阳性对照(PC)。

[0136] 将细胞在 $37^\circ\text{C}$ 的 $\text{CO}_2$ 培养箱中培养24小时。用石蜡膜密封6孔板的盖和下板以进行热处理, 将下板浸入 $44^\circ\text{C}$ 的水浴中, 并进行40分钟的培养。除去培养基后, 添加1mL的无血清DMEM培养基, 并在 $37^\circ\text{C}$ 的 $\text{CO}_2$ 培养箱中培养8小时。此后, 用PBS将细胞洗涤两次, 然后添加细胞裂解缓冲液以获得裂解物。

[0137] 通过用5X样品缓冲液处理细胞以制备样品, 然后使用10% SDS-PAGE凝胶进行SDS-PAGE。将通过SDS-PAGE分离的蛋白转移到PVDF膜上, 并且使用5%脱脂奶在室温下封闭1小时。将抗-MMP-1抗体(Abcam, Cat.No.: ab137332, 英国)在5%脱脂奶中稀释至1:1000, 并与膜反应2小时。用0.1% PBS-T (0.1%吐温-20的PBS溶液)洗涤三次, 每次10分钟。将山羊抗兔IgG (Jackson Immune Research, Cat.No.: 111-035-033, 美国)在5%脱脂奶中稀释至1:3000, 并与膜反应2小时。使用ECL溶液(GE Healthcare, Cat.No.: RPN2232, 美国)用膜进行检测。使用抗- $\beta$ -肌动蛋白抗体(Santacruz biotechnology, 美国)鉴定 $\beta$ -肌动蛋白, 以比较实验中使用的蛋白的总量。

[0138] 作为结果, 如图5a和图5b所示, 确认了本发明的肽降低了成纤维细胞中由热处理而增加表达的MMP-1蛋白的量。

[0139] 由此可以得知, 由于包含SEQ ID NO:1的氨基酸序列的肽使成纤维细胞中由UV照射或热处理而增加的MMP-1和MMP-2蛋白各自的量或活性再次下降并且恢复, 胶原蛋白的量可再次增加, 从而抑制了细胞的老化现象, 因此, 获得了减少皮肤皱纹的效果。

[0140] 如上所述, 尽管仅参考本文所述的实施方案详细描述了本发明, 但对于本领域技术人员而言, 在不脱离本发明的技术思想的情况下显然可以进行各种修改和改变, 并且这些修改和改变显然在权利要求的范围内。

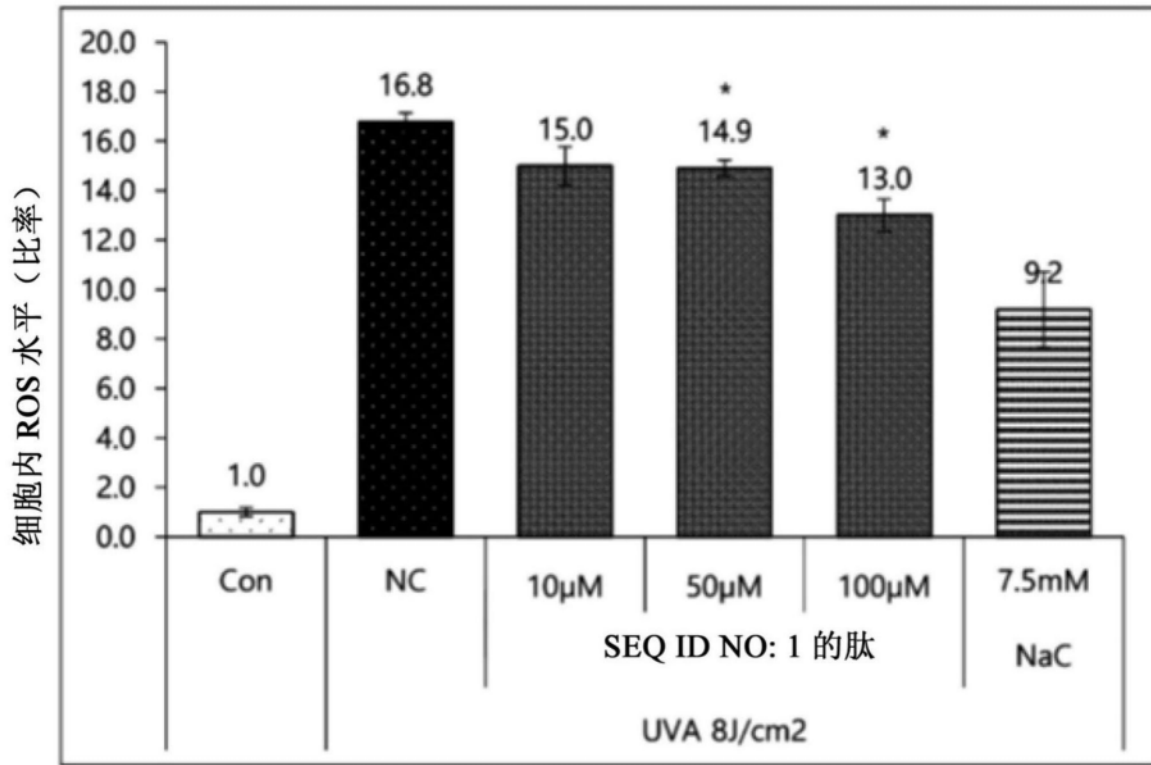


图1

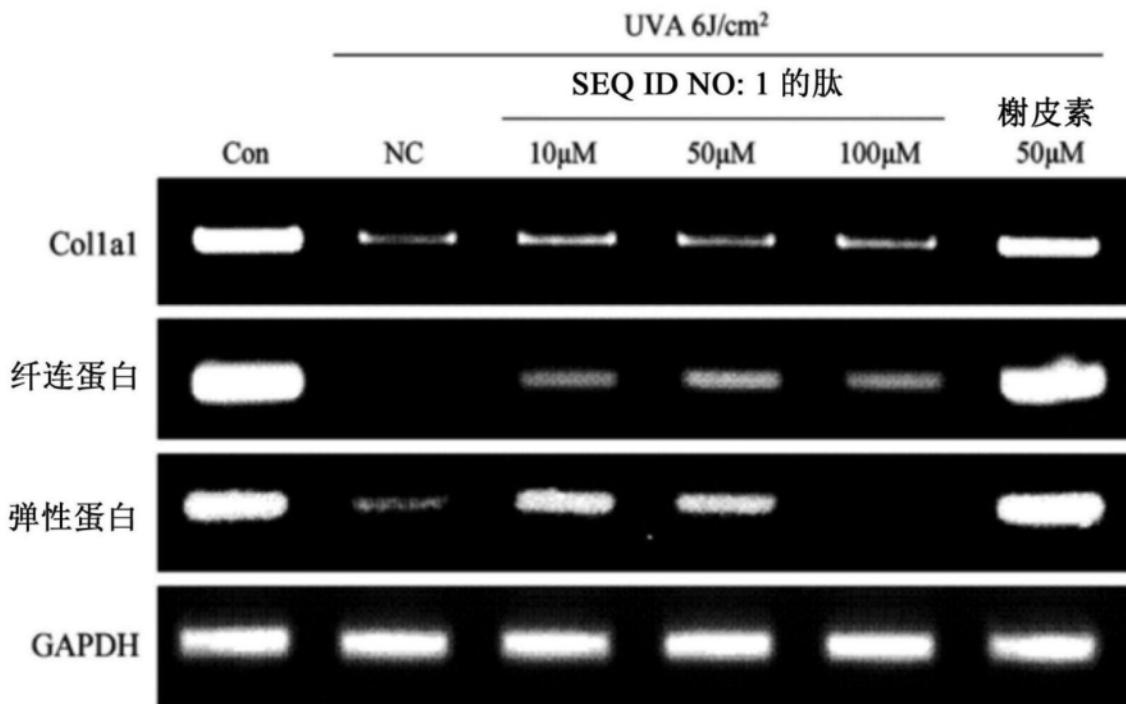


图2a

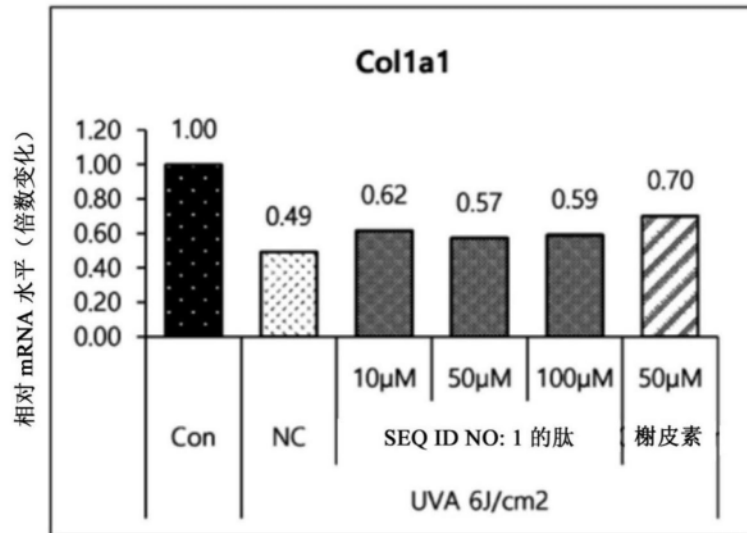


图2b

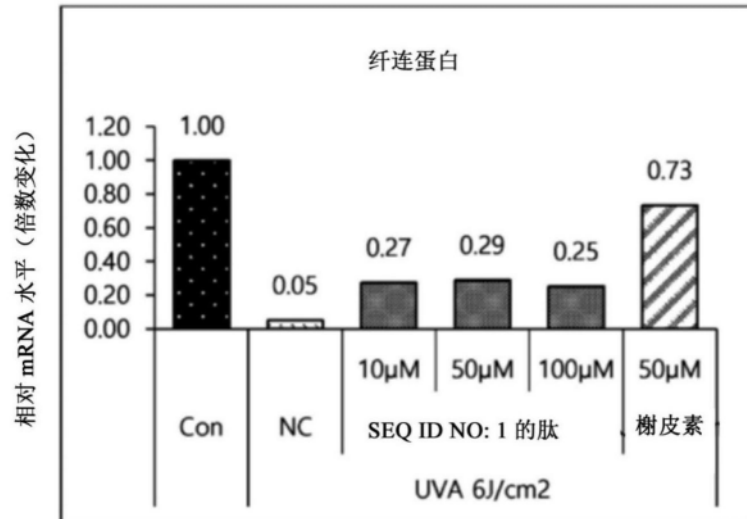


图2c

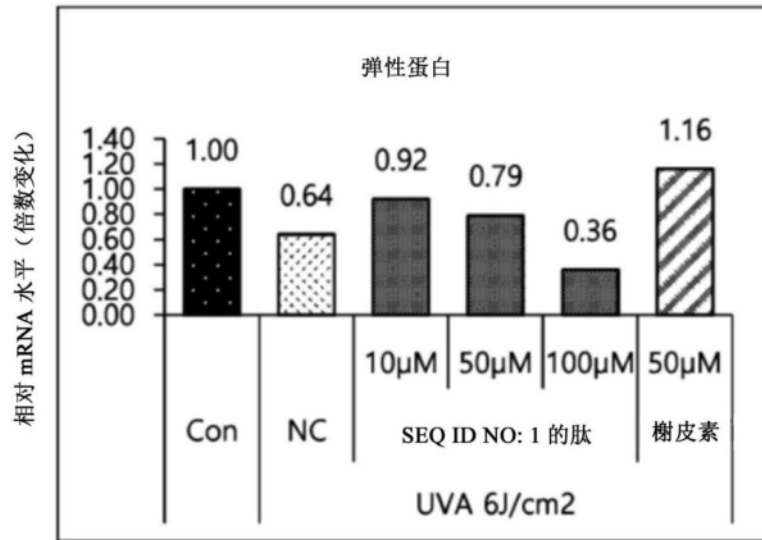


图2d

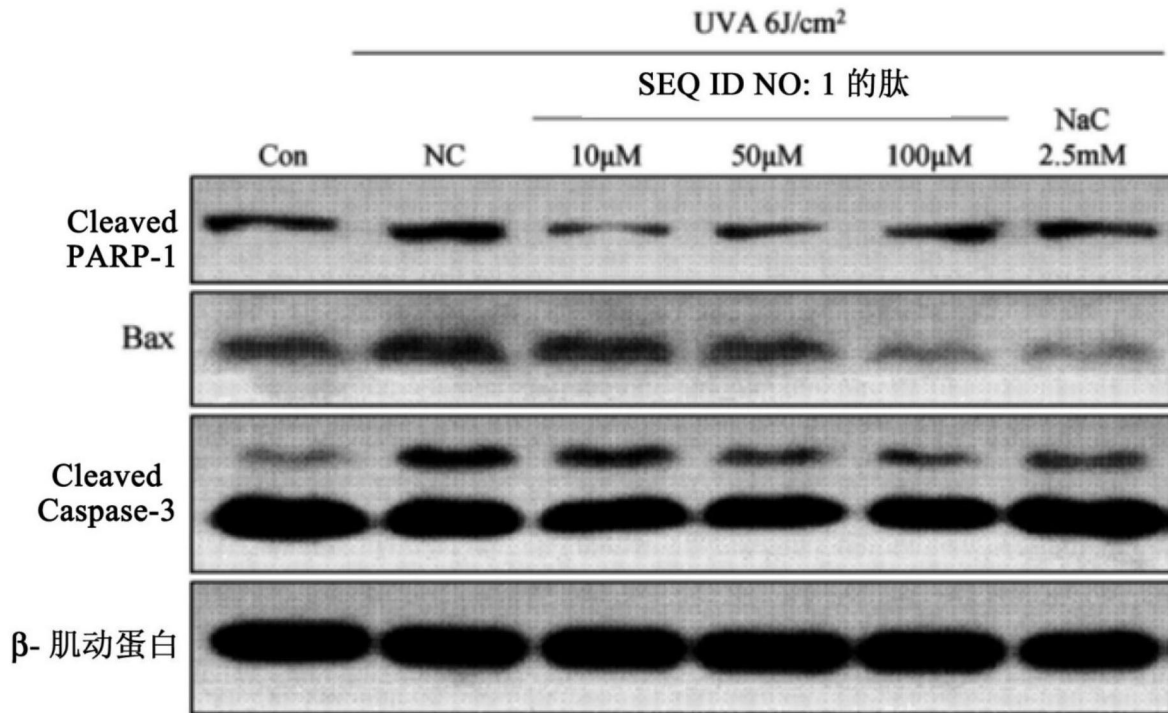


图3a

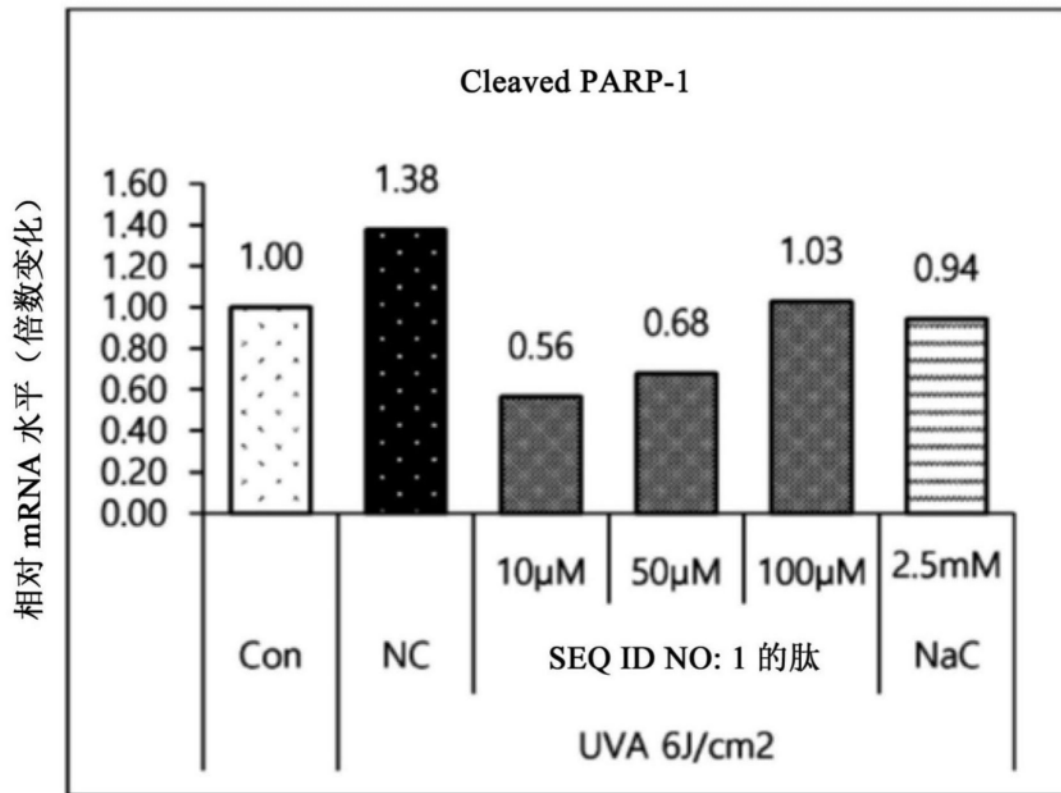


图3b

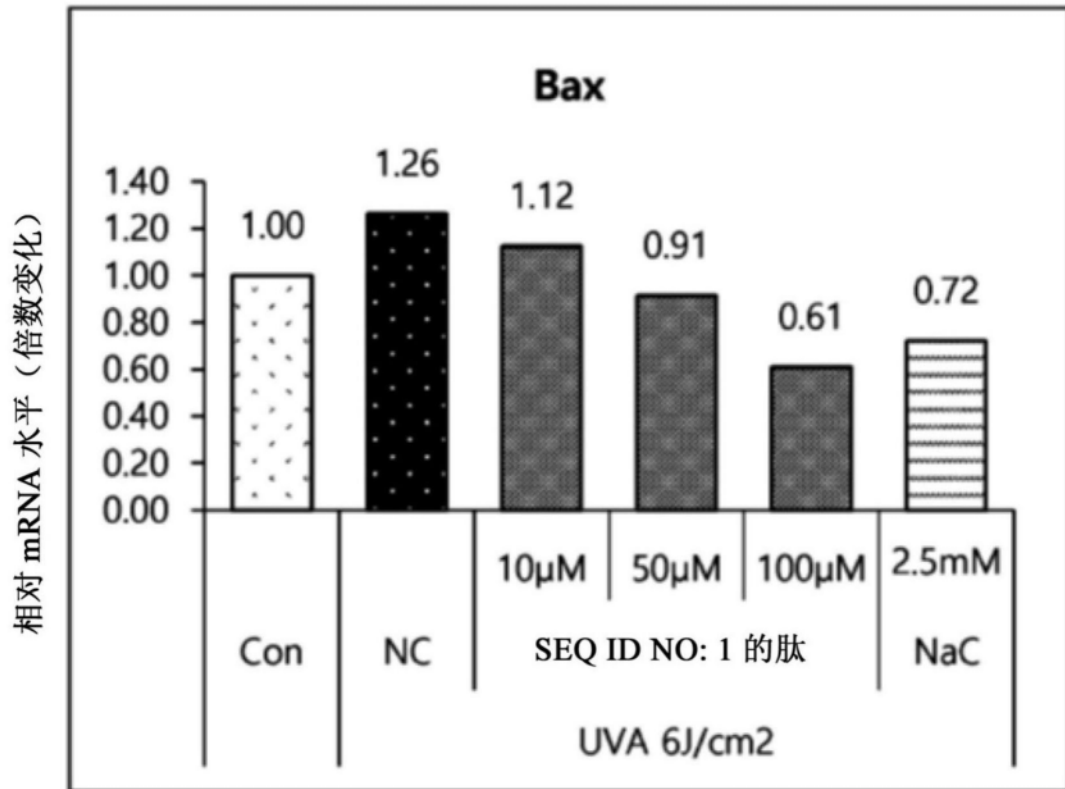


图3c

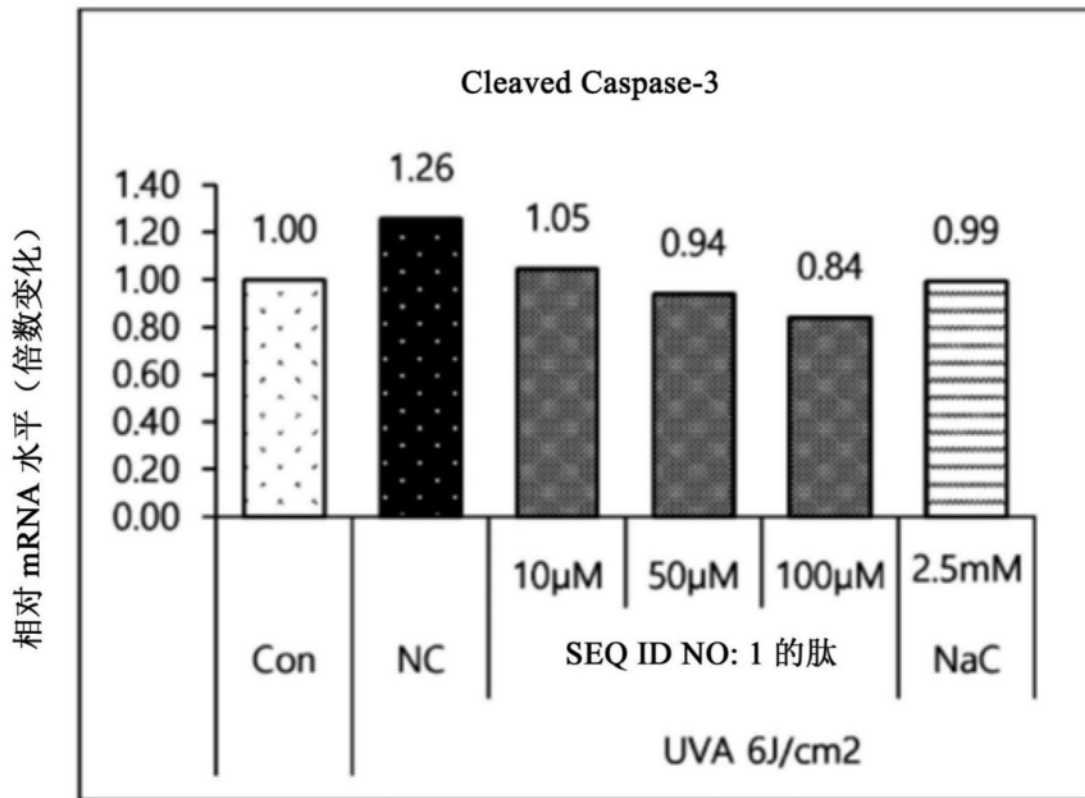


图3d

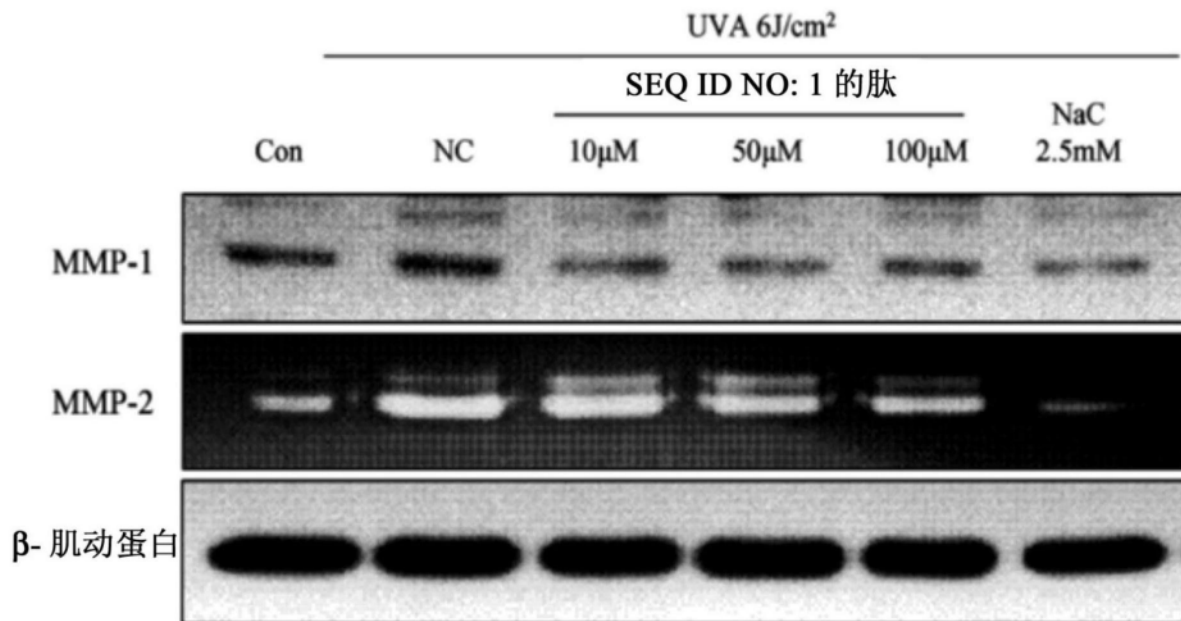


图4a

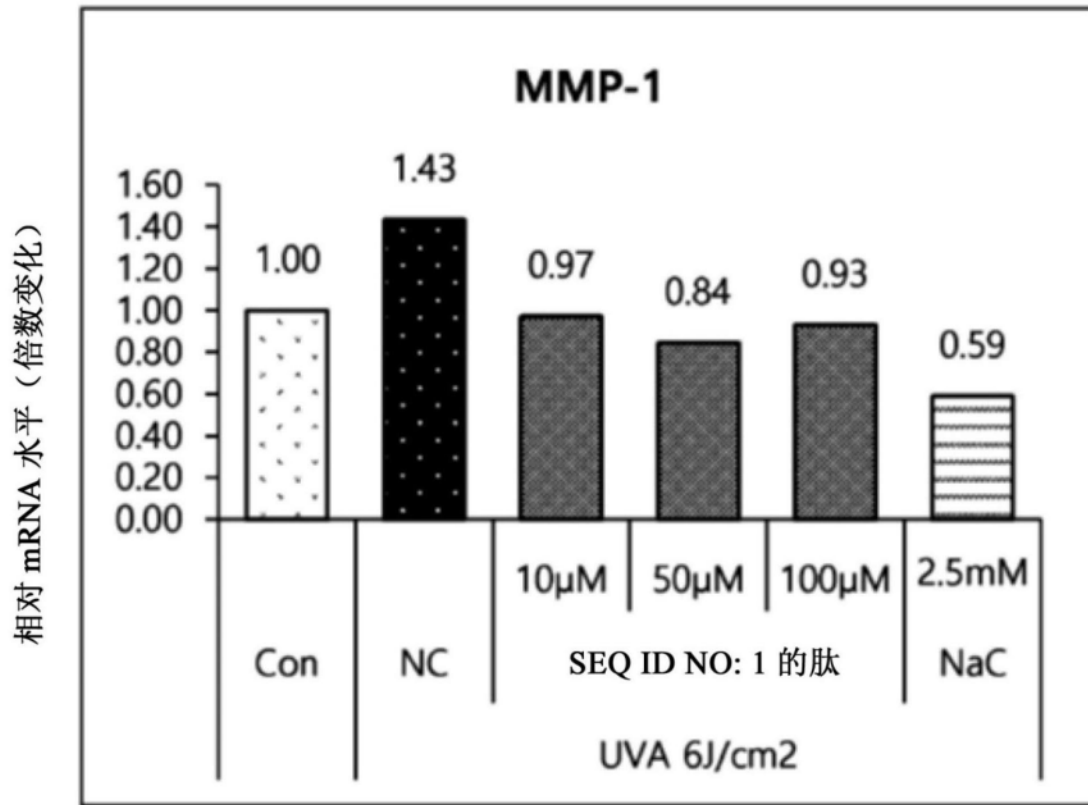


图4b

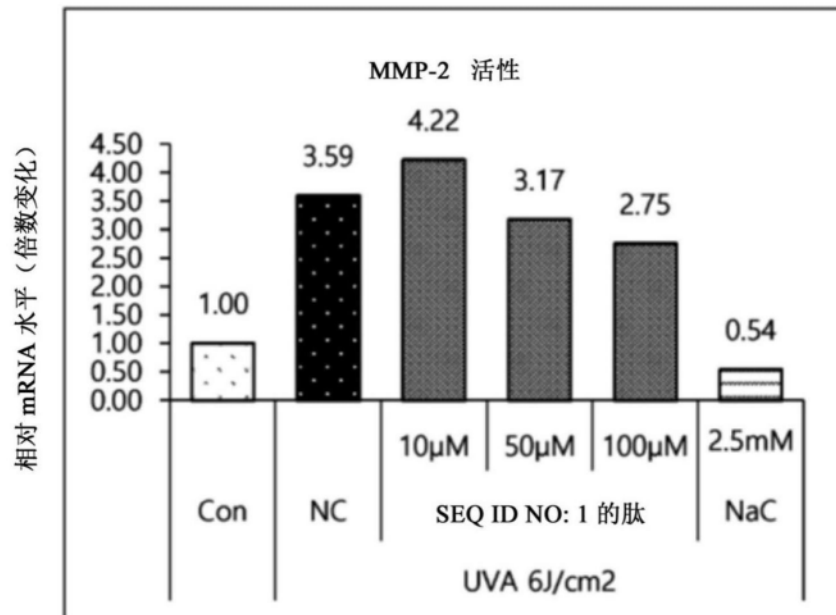


图4c

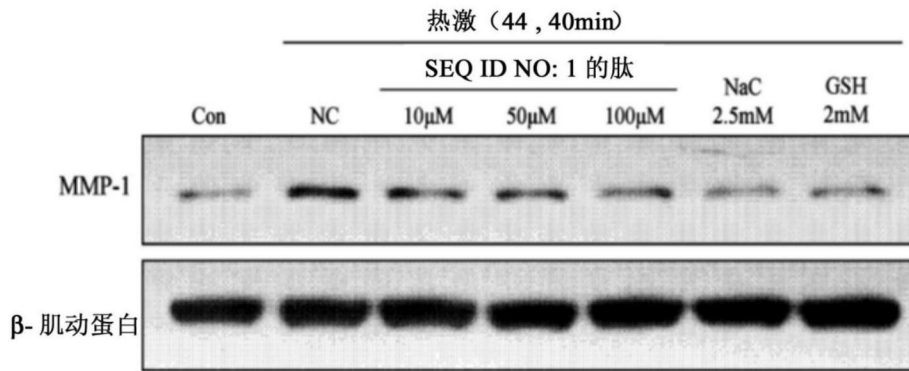


图5a

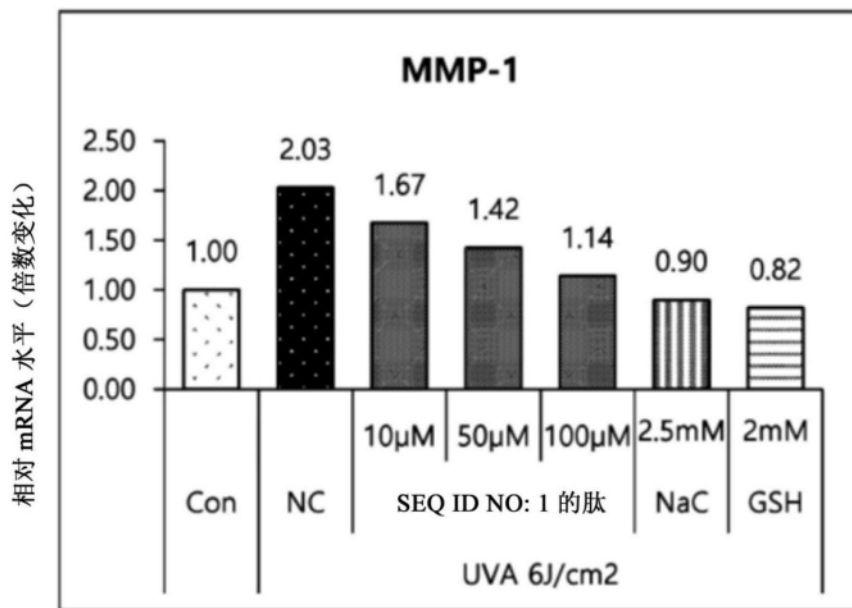


图5b