



(12) 发明专利申请

(10) 申请公布号 CN 112823039 A

(43) 申请公布日 2021.05.18

(21) 申请号 201980066612.1

(22) 申请日 2019.10.10

(30) 优先权数据

102018000009384 2018.10.11 IT

(85) PCT国际申请进入国家阶段日

2021.04.09

(86) PCT国际申请的申请数据

PCT/IB2019/058641 2019.10.10

(87) PCT国际申请的公布数据

W02020/075108 EN 2020.04.16

(71) 申请人 罗马联合化学中心有限责任公司简

写C4T有限责任公司

地址 意大利罗马

(72) 发明人 P·佩莱格里尼

(74) 专利代理机构 中国贸促会专利商标事务所

有限公司 11038

代理人 陈晓娜

(51) Int.Cl.

A61Q 19/08 (2006.01)

A61K 47/36 (2006.01)

A61K 47/32 (2006.01)

A61K 47/14 (2006.01)

A61K 9/06 (2006.01)

A61K 9/00 (2006.01)

A61K 8/81 (2006.01)

A61K 8/73 (2006.01)

A61K 8/37 (2006.01)

A61K 8/04 (2006.01)

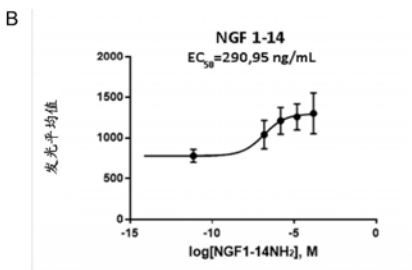
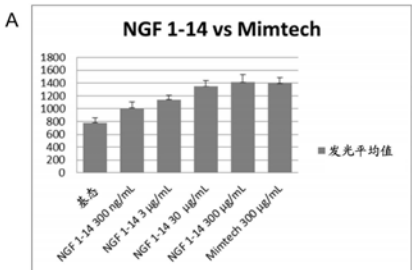
权利要求书1页 说明书12页
序列表1页 附图3页

(54) 发明名称

用于治疗 and 预防皮肤衰老和光老化的肽

(57) 摘要

本发明涉及包含Seq.ID No.1的肽及其化妆品组合物在治疗和预防皮肤衰老和光老化中的用途。



1. 一种肽,其包含Seq.ID No.1或与Seq.ID No.1具有至少85%、优选至少90%、并且更优选至少95%序列同一性的序列,及其衍生物或盐,用于治疗 and 预防皮肤衰老和光老化。

2. 根据权利要求1所述的使用的肽,其中所述肽具有多至16个氨基酸、优选多至15个氨基酸、并且更优选14个氨基酸的长度。

3. 根据权利要求2所述的使用的肽,其中所述肽由以下组成:Seq.ID No.1,或与Seq.ID No.1具有至少85%、优选至少90%、并且更优选至少95%的序列同一性的序列,及其衍生物或盐。

4. 根据前述权利要求1至3中任一项所述的使用的肽,其中所述衍生物包含用有机化合物化学修饰或保护的所述肽的N-和/或C-末端。

5. 根据权利要求4所述的使用的肽,其中所述有机化合物选自磷酰基、糖基、酰基、烷基、羧基、羟基、生物素基、泛素基和酰胺基。

6. 一种化妆品组合物,其包含如前述权利要求1至5中任一项所定义的肽和至少一种化妆品可接受的赋形剂,所述化妆品组合物用于治疗 and 预防皮肤衰老和光老化。

7. 根据权利要求6所述的使用的化妆品组合物,其中所述组合物包含所述肽或其衍生物和/或盐的量的范围为0.00000001重量%至20重量%,优选为0.000001重量%至15重量%,更优选为0.0001重量%至10重量%,并且甚至更优选为0.0001重量%至5重量%。

8. 根据权利要求6所述的使用的化妆品组合物,其中所述至少一种化妆品可接受的赋形剂选自化妆品可接受的载体、挥发性和非挥发性溶剂、水、表面活性剂、防腐剂、吸收剂、螯合剂、润滑剂、保湿剂、拒水剂、抗氧化剂、紫外线吸收剂、抗刺激剂、维生素、微量金属、抗微生物剂、香料、染料和着色成分和/或结构剂。

9. 根据权利要求8所述的使用的化妆品组合物,其中所述化妆品可接受的载体包括溶液、气雾剂、水包油乳剂、油包水乳剂、凝胶、固体和脂质体。

10. 根据权利要求8所述的使用的化妆品组合物,其中所述化妆品组合物为洗剂、霜剂、凝胶、棒、喷雾剂、软膏、糊剂、摩丝和化妆品的形式。

11. 一种用于治疗 and 预防有需要的人的皮肤老化和光老化的非治疗性方法,其包括局部施用包含前述权利要求1至5中任一项所定义的肽和至少一种化妆品可接受的赋形剂的化妆品组合物。

12. 根据权利要求11所述的非治疗性方法,其中所述方法包括通过低频超声促渗法(LFS)对皮肤进行预处理。

用于治疗 and 预防皮肤衰老和光老化的肽

发明领域

[0001] 本发明涉及用于化妆品应用的肽。特别地,本发明涉及具有Seq.ID 1的肽,该肽能够减少皮肤衰老和光老化。更具体地,本发明还涉及包含具有Seq.ID No.1的肽和至少一种化妆品可接受的赋形剂的化妆品组合物。

背景技术

[0002] 神经生长因子(NGF)是一种神经营养因子和神经肽,主要参与某些靶标神经元的生长、维持、增殖和存活的调节。

[0003] NGF是由圣路易斯华盛顿大学动物学研究所(the Zoology Institute of the Washington University of St.Louis)的Rita Levi-Montalcini教授发现的(Levi-Montalcini R.,Harvey Lect.,60:217,1966),它的发现代表了神经细胞的生长和分化机制研究的显著进展,因为NGF能够影响神经元生物学功能的发展和维持以及神经元再生。由于发现了该分子,且其在周围和中枢神经系统中的生物学功能都得到了表征,R.Levi-Montalcini教授在1986年被授予诺贝尔医学和生理学奖。大量的体外和体内研究表明了NGF在预防外科、化学、机械和局部缺血性质的神经元损伤方面的病理生理重要性,使其成为治疗周围和中枢神经系统多种病况的理想候选药物(Hefti F.,J.Neurobiol.,25:1418,1994;Fricker J.,Lancet,349:480,1997)。实际上,自多年前以来,已经通过脑内施用鼠类NGF对帕金森病和阿尔茨海默病患者进行了临床试验(参见,例如,Olsen L.等人,J.Neural Trans.:Parkinson's Disease and Dementia Section,4:79,1992)。这些研究的结果证实了在动物模型中所做的观察,并表明在施用鼠类NGF后不存在可能的副作用。随后对于人重组NGF证实了该特征(Petty B.G.等人,Annals of Neurology,36:244-246,1994)。

[0004] 这些事件是由于NGF与其两个细胞表面受体TrkA和p75结合而介导的。p75受体和Trk NGF受体这两个基因的共表达可能会导致对NGF的更大响应,并提示对神经营养因子家族的额外调控水平(Chao MV,Hempstead BL.,“p75 and Trk:a two-receptor system”,Trends Neurosci.1995;18:321-6)。鸡胚感觉神经元显示出两种不同类型的神经生长蛋白受体p75和Trk,解离常数分别为 10^{-9} M和 10^{-11} M,暗示只需要较高亲和力受体的低占有率即可介导神经生长蛋白的生物学作用(Meakin SO,Shooter EM,“The nerve growth factor family of receptors”,Trends Neurosci.1992;15:323-31)。

[0005] TrkA是具有酪氨酸激酶活性的受体,其形成NGF的高亲和力结合位点。

[0006] p75是一种跨膜蛋白,没有属于肿瘤坏死因子(TNF)受体超家族的可识别胞质催化结构域,其形成NGF的低亲和力结合位点。

[0007] 国际专利公布W02004026329A1、W02011116090、W02011049758A1和W02005019266A2涉及与人神经生长因子(NGF)相互作用或结合并中和NGF功能的肽或抗体,并涉及其在预防和/或治疗各种疾病和病症中的用途,在所述疾病和病症中,NGF活性是有害的,所述疾病或病症包括晒伤和白癜风。

[0008] 与以上引用的专利公布所提示的相反,国际专利公布W02013065078A2公开了在不

受色素异常症影响的健康皮肤的情况下,向皮肤局部施用含有NGF的制剂有效获得了皮肤颜色的增强,即增加色素沉着,以及涉及皮肤色素缺乏或着色不足的皮肤病况(如在白癜风的情形下)的改善。

[0009] 如一些参考文献(P.Di Pietro等人,“Immobilization of Neurotrophin Peptides on Gold Nanoparticles by Direct and Lipid-Mediated Interaction:A New Multipotential Therapeutic Nanoplatform for CNS Disorders”,ACS Omega (2017),2 (8),4071-4079e C.Satriano等人,“Neurotrophin-mimicking peptides at the biointerface with gold respond to copper ion stimuli”,Physical Chemistry Chemical Physics (2016),18 (44),30595-30604)中所公开的,包含人NGF的1-14序列(NGF1-14)的肽片段在本领域中被称为NGF模拟物。

[0010] 另一方面,证明NGF1-14仅与TrkA受体相互作用,特别是激活PI3/Akt级联和CREB磷酸化,而不能与p75受体相互作用和诱导ERK1/2磷酸化(A.Travaglia等人,“A small linear peptide encompassing the NGF N-terminus partly mimics the biological activities of the entire neurotrophin in PC12 cells”,ACS Chem Neurosci.2015年8月19日;6 (8):1379-92)。

[0011] 最终,W099/39728公开了当单独激活时,p75发出关于角质形成细胞和黑素细胞凋亡的信号,而当与Trk家族的受体一起激活时,则发出关于细胞存活的信号。

发明内容

[0012] 从源自现有技术(有时是相互矛盾的)开始,申请人已经研究了NGF1-14在化妆品应用中的潜在用途。

[0013] NGF1-14由以下序列表示:

[0014] Seq.ID No.1:SSSHPIFHRGEFSV

[0015] 在广泛的实验中,申请人惊奇地发现NGF1-14能够促进前胶原蛋白I和弹性蛋白的产生,以及激活黑素细胞产生黑色素。该发现表明NGF1-14在用于治疗和预防皮肤衰老和光老化的化妆品组合物中的用途。

[0016] 此外,申请人已经发现NGF1-14肽保留了皮肤病学应用所需的所有rh-NGF作用。

[0017] 申请人发现的另一个优点是,与完整蛋白质相反,NGF1-14可以通过常规的肽合成方法容易地合成并且可以在温和的条件下长时间保存。

[0018] 这些优点导致生产成本的显著降低,并使NGF1-14非常适合化妆品应用并且对化妆品应用具有吸引力。

[0019] 申请人进一步发现,可以对NGF1-14的氨基酸的数量和类型进行一些修饰而基本上不改变NGF1-14的活性。

[0020] 因此,本发明的第一个目的涉及一种肽,其包含Seq.ID No.1,或与Seq.ID No.1具有至少85%、优选至少90%、更优选至少95%序列同一性的序列,及其衍生物或盐,其用于治疗 and 预防皮肤衰老和光老化。

[0021] 此外,本发明的第二个目的涉及一种化妆品组合物,所述化妆品组合物包含肽以及至少一种化妆品可接受的赋形剂,所述肽包含Seq.ID No.1,或与Seq.ID No.1具有至少85%、优选至少90%、更优选至少95%的序列同一性的序列,及其衍生物或盐,所述化妆品

组合物用于治疗 and 预防皮肤衰老和光老化。

[0022] 本发明的第三个目的涉及用于治疗 and 预防有需要的人的皮肤老化和光老化的非治疗性方法,其包括局部施用包含肽以及至少一种化妆品可接受的赋形剂的化妆品组合物,所述肽包含Seq.ID No.1,或与Seq.ID No.1具有至少85%、优选至少90%、更优选至少95%序列同一性的序列,及其衍生物或盐。

[0023] 有利地,本发明的非治疗性方法包括通过低频超声促渗法 (Low-Frequency Sonophoresis, LFS) 对皮肤进行预处理。

附图说明

[0024] 图1显示了NGF1-14在各种浓度下以及参考Negermin™化合物的活性图 (图1A) 和 EC50 曲线 (图1B),如实施例1中所述。

[0025] 图2示出了通过实施例2中描述的实验对感兴趣的皮肤区域的处理方案。

[0026] 图3显示了在实施例2中描述的处理后测量的表皮 (图3A) 和真皮 (图3B) 上NGF1-14的水平。

[0027] 图4显示了在实施例2中所述的处理后检测到的TrkA受体的磷酸化水平。

[0028] 图5显示了在实施例3中所述的单次施用测试之后测量的大鼠真皮中的前胶原蛋白I (图5A) 和弹性蛋白 (图5B) 的水平。

[0029] 图6显示了在实施例3中所述的两周施用测试后测量的大鼠真皮中的前胶原蛋白I (图6A) 和弹性蛋白 (图6B) 的水平。

具体实施方式

[0030] 本发明的第一个目的涉及用于治疗 and 预防皮肤衰老和光老化的包含Seq.ID No.1的肽。

[0031] 根据本发明的Seq.ID No.1由序列SSSHPIFHRGEFSV表示。

[0032] 本文所用的氨基酸序列的缩写符合下表A中报道的IUPAC-IUB命名法。

[0033] 表A

[0034]

丙氨酸	Ala	A	精氨酸	Arg	R
天冬酰胺	Asn	N	天冬氨酸	Asp	D
半胱氨酸	Cys	C	谷氨酸	Glu	E
谷氨酰胺	Gln	Q	甘氨酸	Gly	G
组氨酸	His	H	异亮氨酸	Ile	I
亮氨酸	Leu	L	赖氨酸	Lys	K
甲硫氨酸	Met	M	苯丙氨酸	Phe	F
脯氨酸	Pro	P	丝氨酸	Ser	S
苏氨酸	Thr	T	色氨酸	Trp	W
酪氨酸	Tyr	Y	缬氨酸	Val	V

[0035] 当最佳比对时,根据本发明的肽可与Seq. ID No.1具有至少85%、至少90%和至少95%的序列同一性。可以通过各种已知方法和已知算法的计算机化实施(例如,BLAST、TFASTA、BESTFIT,例如见于Wisconsin Genetics Software Package,Release 7.0, Genetics Computer Group, Madison, WI)来进行序列的最佳比对。还可以使用可通过美国国家生物技术信息中心(www.ncbi.nlm.nih.gov/)获得软件的BLAST算法(Altschul等人, Mol. Biol. (1990), 215, 403-410)。

[0036] 相对于肽序列的“序列同一性百分比”是指两个序列中相同的残基的百分比。序列同一性百分比(%SI)通过下式计算:

[0037] $\%SI = (nt - nd) \times 100 / nt$

[0038] 其中nt是基本序列中的残基数目,nd是当比对以使最大数量的氨基酸相同时,面对的序列中不相同残基的总数。因此,序列SSSHPIFHRGDFSV与Seq. ID No.1具有约92.8%的序列同一性(nd=1, nt=14)。

[0039] 根据本发明的肽可以具有与Seq. ID No.1相同的长度或多至16个氨基酸的长度。

[0040] 包含本发明的Seq. ID No.1的肽中氨基酸序列的变化包括不影响肽活性的氨基酸的保守取代。根据以下条件选择能够维持肽活性的取代:(a)在取代区域中维持肽主链结构(例如片状或螺旋三维结构)的功效,(b)维持靶区域中分子的电荷或疏水性的功效,或(c)维持大部分侧链的功效。

[0041] 保守取代的实例属于由以下组成的组:碱性氨基酸(精氨酸、赖氨酸和组氨酸),酸性氨基酸(谷氨酸和天冬氨酸添加),极性氨基酸(谷氨酰胺和天冬酰胺),疏水性氨基酸(亮氨酸、异亮氨酸、缬氨酸和甲硫氨酸),芳香族氨基酸(苯丙氨酸、色氨酸和酪氨酸)和小氨基酸(甘氨酸、丙氨酸、丝氨酸和苏氨酸)。

[0042] 通常不改变特异性活性(specific activity)的氨基酸取代是本发明领域中已知的。

[0043] 最常见的变化是Ala/Ser、Val/Ile、Asp/Glu、Thr/Ser、Ala/Gly、Ala/Thr、Ser/Asn、Ala/Val、Ser/Gly、Tyr/Phe、Ala/Pro、Lys/Arg、Asp/Asn、Leu/Ile、Leu/Val、Ala/Glu、

Asp/Gly, 和相反的变化。下表C中显示了保守取代的另外的示例。

[0044] 表C

[0045]	起始氨基酸	可能的取代	优选的取代
	Ala (A)	V; L; I	V
	Arg (R)	K; Q; N	K
	Asn (N)	Q; H; D, K; R	Q
[0046]	Asp (D)	E; N	E
	Cys (C)	S; A	S
	Gln (Q)	N; E	N
	Glu (E)	D; Q	D
	Gly (G)	A	A
	His (H)	N; Q; K; R	R
	Ile (I)	L; V; M; A; F;	L
	Leu (L)	I; V; M; A; F	I
	Lys (K)	R; Q; N	R
	Met (M)	L; F; I	L
	Phe (F)	L; V; I; A; Y	Y
	Pro (P)	A	A
	Ser (S)	T	T
	Thr (T)	S	S
	Trp (W)	Y; F	Y
	Tyr (Y)	Trp; F; T; S	F
	Val (V)	I; L; M; F; A;	L

[0047] 取决于肽的长度, 本发明的肽可以通过本领域公知的方法合成, 例如通过自动肽合成仪合成, 或通过基因工程技术生产。例如, 通过基因工程制备编码包含融合伴侣和本发明的肽的融合蛋白的融合基因, 然后将其转化到宿主细胞中以表达融合蛋白。此后, 使用蛋白酶或化合物从融合蛋白上切割并分离出本发明的肽, 从而产生所需的肽。为此, 可以在编码融合伴侣和本发明的肽的多核苷酸之间插入编码可以被蛋白酶 (诸如因子Xa或肠激酶) 或化合物 (诸如CNBr或羟胺) 切割的氨基酸残基的DNA序列。

[0048] 本发明的化妆品组合物包含含有Seq. ID No.1的肽和至少一种化妆品可接受的赋形剂。

[0049] 本发明的化妆品组合物可包含一定量的肽或其衍生物和/或盐, 所述量的范围为0.00000001重量%至20重量%, 优选为0.000001重量%至15重量%, 更优选为0.0001重

量%至10重量%，甚至更优选0.0001重量%至5重量%。

[0050] 本发明的化妆品组合物可包含多种其他任选的组分，这些组分适合使这些组合物在化妆品或美学上更可接受，或为它们提供额外的使用益处。这样的常规任选成分是本领域技术人员众所周知的。这些包括任何化妆品可接受的成分，例如在Wenninger和McEwen编辑的“CTFA International Cosmetic Ingredient Dictionary and Handbook”（第7版）（The Cosmetic, Toiletry, and Fragrance Association, Inc., Washington, D.C., 1997）中找到的成分。如本文所用，“化妆品可接受的”是指适合用于与皮肤、头发或下文定义的其他合适的基底接触的材料（例如，化合物或组合物）。

[0051] 可用于本发明的化妆品可接受的成分包括化妆品可接受的载体、挥发性和非挥发性溶剂、水和其他附加成分，例如表面活性剂、防腐剂、吸收剂、螯合剂、润滑剂、保湿剂、拒水剂、抗氧化剂、紫外线吸收剂、抗刺激剂、维生素、微量金属、抗微生物剂、香料、染料和着色成分和/或结构剂。

[0052] 如本文所用，表述“化妆品可接受的载体”是指一种或多种相容的固体或液体填充剂、稀释剂、增量剂等，其如上文所定义在化妆品中是可接受的。如本文所用，术语“相容的”是指本发明的组合物的组分能够与本发明的主要活性物质组合，并且彼此之间以没有在使用情况下会实质上降低该组合物的功效的相互作用的方式组合。

[0053] 本发明中使用的载体的类型取决于所需产品的类型。可用于本发明的组合物可以是多种产品形式。这些包括但不限于洗剂、霜剂、凝胶、棒、喷雾剂、软膏、糊剂、摩丝和化妆品（例如，固体、半固体或液体化妆用品，包括粉底）。

[0054] 这些产品形式可包含几种类型的载体，包括但不限于溶液、气雾剂、乳剂（包括水包油或油包水）、凝胶、固体和脂质体。

[0055] 根据组合物的形式，本发明的组合物可以包含不同量的水。如果存在的话，相比于总组合物重量，水的量可以在小于1重量%至大于99重量%的范围内。本发明的水性组合物尤其被配制成水性洗剂或油包水或水包油乳液或复配乳液（油包水包油或水包油包水三重乳液）。这样的乳液是已知的，例如，由C.FOX记载在“Cosmetics and Toiletries”，1986年11月，第101卷，第101-112页中。

[0056] 相对于组合物的总重量，固体组合物、喷雾组合物和油包水乳膏通常包含小于10重量%、更优选小于5重量%的水。相对于组合物的总重量，滚涂组合物、水性组合物和除臭剂通常包含按重量计约15%至约99%、更优选约30%至约90%、甚至更优选约50%至约80%的水量。

[0057] 本发明的组合物可以包含一种或多种挥发性溶剂。如果存在的话，相对于组合物的总重量，挥发性溶剂或溶剂混合物的含量按重量计通常为约10%至约90%，更优选为约25%至约75%，甚至更优选为约35%至约65%。可用于本发明的溶剂优选为有机挥发性溶剂。

[0058] 如本领域技术人员所理解的，如本文所用，“挥发性”是指在环境条件下具有显著量蒸气压的物质。

[0059] 在25℃下，用于本发明的挥发性溶剂优选具有约2kPa或更高、更优选约6kPa或更高的蒸气压。本发明所用的挥发性溶剂在正常气氛（1atm）下的沸点优选小于约150℃，更优选小于约100℃，甚至更优选小于约90℃，甚至更优选仍为低于约80℃。优选地，用于本发明

的挥发性溶剂将是相对无味的并且在人类皮肤上使用是安全的。合适的挥发性溶剂包括但不限于C1-C4醇、挥发性硅酮及其混合物。优选的挥发性溶剂是C1-C4醇及其混合物。用于本发明更优选的是乙醇。

[0060] 本发明的组合物还可包含一种或多种非挥发性溶剂。如果存在的话,相对于组合物的总重量,非挥发性溶剂或溶剂混合物的含量按重量计通常为约1%至约20%,更优选约2%至约10%,甚至更优选约3%至约5%。合适的非挥发性溶剂包括但不限于苯甲酸苄酯、鲸蜡硬脂醇、鲸蜡醇、邻苯二甲酸二乙酯、肉豆蔻酸异丙酯、聚二甲基硅氧烷、辛基聚甲基硅氧烷(caprylylmethicone)及其混合物。

[0061] 在本发明的组合物中可以存在几种其他附加成分。这些包括但不限于:亲水性聚合物,所述亲水性聚合物选自聚乙二醇(PEG)、聚乙烯吡咯烷酮(PVP)、羟丙基甲基纤维素(HPMC)和泊洛沙姆;紫外线稳定剂,例如二苯酮-3;抗氧化剂,例如生育酚乙酸酯;防腐剂,例如苯氧乙醇、苯甲醇、对羟基苯甲酸甲酯、对羟基苯甲酸丙酯;pH调节剂,例如乳酸、柠檬酸、柠檬酸钠、琥珀酸、磷酸、氢氧化钠、碳酸钠;除臭剂和抗微生物剂,例如法尼醇、苯酚磺酸锌和乙基己基甘油;保湿剂,例如三山嵛精(tribehenin)、甘油;皮肤调理剂,例如尿囊素;冷却剂,例如三甲基异丙基丁酰胺和薄荷醇;头发调理成分,例如泛醇、泛硫乙胺(panthetine)、泛酰巯基乙胺(pantotheine)、泛酸醇乙基醚及其组合;推进剂,例如丙烷、异丙烷、丁烷和异丁烯;一般的盐,例如乙酸钾和氯化钠及其混合物;香料和染料。

[0062] 如果存在的话,相对于组合物的总重量,这些附加成分的存在量按重量计优选小于10%,更优选小于5%。

[0063] 本发明的肽能够促进前胶原蛋白I和弹性蛋白的产生,并且能够激活黑素细胞产生黑色素。因此,本发明的化妆品组合物特别用于治疗 and 预防皮肤老化和光老化。

[0064] 在以下实施例中将进一步描述本发明,这些实施例不限制权利要求书中描述的本发明的范围。

[0065] 实施例1

[0066] 体外活性

[0067] 对大鼠嗜铬细胞瘤细胞系(PC12)的NGF处理导致c-fos mRNA和蛋白质表达(J.Milbrandt, "Nerve growth factor rapidly induces c-fos mRNA in PC12 rat pheochromocytoma cells", Proc Natl Acad Sci U S A.1986年7月;83(13):4789-93)。

[0068] 从Milbrandt的工作开始,申请人通过使用用人c-fos启动子驱动的荧光素酶报道基因(PC12-Luci)稳定转染的克隆(B9)来监测NGF受体的激活。该克隆用于建立功能和定量测定法,以表征NGF1-14的活性。

[0069] 实验在PC12-Luci细胞中进行,该细胞内源性表达NGF受体TrkA和p75。将细胞维持在以下完全培养基中,所述培养基包含:

[0070] • DMEM-F12混合物(DMEM-F12 Glutamax;Life Technologies,GIBCO 10565-018)

[0071] • 5%胎牛血清(FBS,Sigma Aldrich,F7524)

[0072] • 10%马血清(HS,Sigma Aldrich,H1138)

[0073] • 1%青霉素-链霉素(Life Technologies,GIBCO 15140-122)

[0074] 对于传代,将细胞用PBS轻轻洗涤,然后在室温或37℃下与胰蛋白酶孵育5分钟。加入培养基,并将细胞重悬(6-8次)。

[0075] 实验一式七份 (sestuplicate) 在预先涂有50 μ g/ml I型胶原蛋白的黑色96孔板中进行。

[0076] 将PC-12-Luci细胞以25000个/孔接种在100 μ l完全生长培养基中。24小时后,小心地除去细胞培养基。然后将细胞与五种浓度 (范围为30ng/ml-300 μ g/ml, 1:10连续稀释) 的NGF1-14在含有0.1%BSA (50 μ l/孔) 的标准Tyrode缓冲液中于37 $^{\circ}$ C孵育4小时。以30 μ g/ml的量添加参考NegerminTM化合物 (由MimeTech Srl提供) 作为参考。将NGF1-14的储液重悬于无菌水中,等分并储存在-20 $^{\circ}$ C。将NegerminTM化合物的储液重新悬浮在配制缓冲液中,并保存在-20 $^{\circ}$ C。

[0077] 孵育后,通过使用EnSpire多模式读板器 (PerkinElmer) 监测基态发光水平30秒钟。然后,将Triton-Luciferin混合物以1:1的比例添加到细胞中 (50 μ l/孔),导致细胞裂解。监测所获得的发光信号另外60秒。

[0078] 上述溶液和缓冲液的组成如下:

[0079] • 配制缓冲液:50mM NaH₂PO₄,100mM NaCl,pH 7.2,

[0080] • Tyrode缓冲液:在水中130mM NaCl、5mM KCl、2mM CaCl₂、1mM MgCl₂、5mM NaHCO₃、20mM HEPES,pH 7.4;无菌过滤并储存在4 $^{\circ}$ C,

[0081] • 牛血清白蛋白 (BSA),不含脂肪酸 (Sigma,A8806);储液:在Tyrode缓冲液中为10%;等分并储存在-20 $^{\circ}$ C,

[0082] • Triton裂解储液:25mM TRIS,25mM Na₂HPO₄、2mM DTT、10%甘油、2%TRITON X-100;等分并储存在-20 $^{\circ}$ C,

[0083] • 荧光素储液:20mM Tricine、2.67mM MgSO₄、0.1mM EDTA、33.3mM DTT、270 μ M辅酶A、470 μ M荧光素、530 μ M ATP;等分并保存在-80 $^{\circ}$ C。

[0084] 将所有发光值相对于基态发光水平进行标准化。将响应值计算为所记录的动力学发光的平均值。

[0085] 进一步分析数据 (例如,计算剂量反应曲线和EC50值),并使用GraphPad Prism (GraphPad Software, Inc.) 绘制图表。结果如图1所示,显示了不同浓度的NGF1-14以及参考NegerminTM化合物的活性图 (图1A) 和EC50曲线 (图1B)。结果表明,NGF1-14以剂量依赖性方式增加基态发光水平 (Ec50=290.95ng/ml)。

[0086] 总之,这些结果表明NGF1-14具有功能活性,显示出体外效能高于参考标准NegerminTM化合物,但低于rhNGF (Ec50 rhNGF 1.4ng/ml)。降低的效力与提议的化妆品用途一致。

[0087] 实施例2

[0088] 临床前研究

[0089] 还通过使用类似超声促渗法的策略促进皮肤渗透,进行分布实验以评估NGF1-14凝胶制剂渗透角质层 (corneal stratus) 并到达真皮的能力。

[0090] 在成年雌性Sprague Dawley (SD) 大鼠 (10-12月龄) 的剃毛背部区域上进行胶带剥离和超声处理。

[0091] 由于已知持久使用超声促渗法可增加皮肤渗透性,但也会造成相当大的热损伤,因此不适合使用 (参见International Journal of Health Sciences&Research 477Vol.5;Issue:5;2015年5月:A Review on Ultrasound Parameters and Methods of

Application in Transdermal Drug Delivery), 因此, 根据常规临床实践, 施加低频超声促渗法 (LFS), 使用的是 Sonics Ultrasonic Processor Model VCX 400, 操作频率为 20KHz (尖端位移约 2cm, 连续模式), 持续 6 分钟或 10 分钟。

[0092] 将媒介物对照和 NGF1-14 凝胶制剂施于经 LFS (S) 预处理的皮肤部分或剃毛的/胶带剥离的皮肤 (NS) 上。

[0093] 下表 1 报道了媒介物对照和 NGF1-14 凝胶制剂的组成。

[0094] 表 1

	媒介物对照	NGF1-14
基于透明质酸钠的水凝胶	约 90-95%	约 90-95%
聚乙烯醇 (Sigma Aldrich Mowiol® 40-88)	5-10%	5-10%
对羟基苯甲酸酯稳定剂 (Sigma Aldrich)	低于 1%	低于 1%
NGF1-14	-	0.1%

[0096] 通过将分子量范围为 50 至 150KDa 的透明质酸钠 (由 Contipro 制造) 溶解在水中来制备基于透明质酸钠的水凝胶。

[0097] 两小时后重复处理, 在第二次凝胶/NGF 模拟施用后 2 小时, 处死大鼠以解剖皮肤样品。

[0098] 处理方案示于图 2, 其中 N 和 G 分别表示未用 LFS 用 NGF1-14 和媒介物凝胶处理的区域, 而 NS 和 GS 分别表示用 LFS 加 NGF1-14 和媒介物凝胶处理的区域。NL 和 GL 表示与 LFS 区域相邻且没有重叠的皮肤区域。

[0099] 使用柳叶刀将超声处理过的 (S) 和未超声处理过的 (NS) 皮肤区域的表皮和真皮分离, 用 PBS 洗涤并切成两部分。前者储存在 -80℃ 的无菌试管中, 以进行处理用于总蛋白提取和生化分析。

[0100] 一个皮肤部分浸入 4% 的 PFA 中以进行处理, 用于随后的组织学和免疫组织化学评估。

[0101] 表皮和真皮的蛋白质提取物用于评估 LFS 应用对 NGF1-14 凝胶制剂穿透角质层并到达真皮的能力的影响。

[0102] 在反相 C4 柱上用磷酸盐缓冲液 (pH 7.4) 和乙腈洗脱, 通过 HPLC-UV 测定 NGF 1-14 的定量。针对线性、重复性、重现性和回收率验证 HPLC-UV 方法。

[0103] 结果显示在图 3A 和 3B 中。与用媒介物处理相比, LFS 后表皮和真皮中 NGF1-14 显著增加。通过分析 NGF 存活/营养性受体 TrkA 的表达水平和激活, 证实了 NGF 模拟物/LFS 应用的功效。

[0104] 根据常规实验室实践, 通过使用针对 P-TrkA 的抗体, 通过对来自用该肽处理的 PC12 细胞培养物的蛋白质提取物进行蛋白质印迹分析, 测试了 NGF (1-14) 对 TrkA 磷酸化的影响。

[0105] 如图 4 所示, 当与相关的媒介物对照相比时, 在接受或不接受 LFS 的所有接受 NGF1-

14施用的真皮样品中,TrkA的磷酸化水平均升高。

[0106] 实施例3

[0107] 皮肤老化和光老化

[0108] 由于胞外基质胶原蛋白和弹性蛋白的蛋白质参与伤口修复、皮肤衰老和光老化,因此还分析了局部施用NGF1-14对这两种蛋白质水平的影响。

[0109] 通过使用商购Elisa试剂盒测量前胶原蛋白I和弹性蛋白,首先是在单次施用测试中,然后是两周施用测试。

[0110] 单次施用测试的结果总结在图5中。通过分析这两种蛋白质,观察到了类似的趋势:超声处理后,在用0.1%剂量NGF1-14处理的大鼠的真皮中,检测到前胶原蛋白I(A)和弹性蛋白(B)均增加。如果不使用超声波,效果就不那么明显。在实验误差范围内,检测到了弹性蛋白的轻微增加,而胶原蛋白I的值与阳性对照值相当。

[0111] 单次和两周施用测试

[0112] 首先在单次施用测试(一天)中,然后在处理前持续三周,评估0.1%剂量(P 0.1%)的NGF1-14对暴露于亚红斑水平的UV-B(每天两次,MED=60mJ/cm²)的成年皮肤的保护作用。此实验流程也称为Photo-AGing模型(PAG),因为它会诱导在老化过程中发生的结构和分子变化。

[0113] 在PAG和非PAG大鼠的剃毛背部皮肤上施加P 0.1%或媒介物凝胶进行局部处理两周。在最后一周的治疗期间,还进行了UV-B暴露(每天一次,MED=60mJ/cm²)。

[0114] 处死大鼠,并用柳叶刀解剖皮肤,用PBS洗涤并切成两部分。前一部分储存在-80℃的无菌试管中,以进行处理用于总蛋白提取和生化分析。将后一部分浸入4%PFA中,并进行处理以进行组织学和免疫组化评估。

[0115] 与单次施用研究一致,光老化诱导真皮中的前胶原蛋白I减少(图6A)和检测到的弹性蛋白表达(图6B)。

[0116] 尽管在健康皮肤中这种作用更为明显,但应用P 0.1%导致前胶原蛋白I在非PAG和PAG真皮中均增加(图6A)。弹性蛋白浓度的变化不那么明显。

[0117] 实施例4

[0118] 美黑作用

[0119] 已评估了局部应用NGF1-14对黑素细胞激活产生黑色素的影响。

[0120] 根据已经建立的方案,将正常人黑素细胞的原代细胞培养物接种在皮氏培养皿中,并在存在和不存在各种浓度的NGF 1-14的情况下培养一周。黑色素含量通过酶免疫测定法ELISA测定。在富含肽的培养物中观察到增加。

[0121] 实施例5

[0122] 皮肤刺激测试

[0123] 皮肤刺激性测试是通过应用针对皮肤化妆品应用量身定制的测定方案(即,MTT比色测定法和LDH释放测定法)进行的。

[0124] MTT比色测定法可检测线粒体酶琥珀酸脱氢酶的活性,该酶仅在活细胞中具有活性,并与MTT(黄色)反应形成蓝色盐,其光学密度(ODn)与活细胞数成比例,在570nm的波长处通过分光光度法定量光学密度。

[0125] LDH释放测定法测量培养基中乳酸脱氢酶(一种细胞质酶)的量,该酶的释放意味

着细胞膜的完整性丧失。借助于特定试剂在490nm的波长处以分光光度法定量该量。

[0126] 测试是在EPI-100-ASY测定培养基中在EpiDerm™组织(MatTek Corporation, Bratislava, Slovakia)上以0.3%的剂量(是活性剂量(0.1%)的三倍)对两份NGF1-14凝胶制剂样品(1和2)一式三份进行。使用1%Triton X-100溶液作为阳性对照。作为阴性对照,使用不含肽的凝胶基质。阳性和阴性对照均一式两份运行。将样品接触过夜18小时。

[0127] 测试结果总结在下表2(MTT)和表3(LDH)中。

[0128] 表2

	平均值(OD) ± SD	标准化的值 ± SD
阴性对照	2.0 ± 0.1	100.0 ± 3.1
阳性对照	0.7 ± 0.0	33.3 ± 2.0
样品1	1.8 ± 0.0	91.6 ± 1.8
样品2	1.9 ± 0.1	99.3 ± 3.8

[0130] 表3

	平均值(OD) ± SD	标准化的值 ± SD
阴性对照	0.13 ± 0.00	1.0 ± 0.0
阳性对照	1.04 ± 0.04	8.0 ± 0.3
样品1	0.24 ± 0.04	1.9 ± 0.3
样品2	0.14 ± 0.05	1.1 ± 0.4

[0132] 在MTT测定法中,相对于阴性对照,当存活力高于70%时,样品被视为“无刺激性”。在LDH测定法中,当LDH释放值低于阴性对照注册值的五倍时,样品被视为“无刺激性”。然后样品1和2都被视为“无刺激性”。

[0133] 实施例6

[0134] 皮肤致敏测试

[0135] 通过使用Elisa试剂盒进行IL-18释放测定法来进行皮肤致敏测试。

[0136] IL-18释放测定法测量培养基中白介素18(IL-18)的量。IL-18是一种促炎性细胞因子,在诱导过敏性接触致敏中具有关键作用。该量通过直接ELISA法定量,即,显色与培养基中细胞因子的量成正比。

[0137] 测试是在EPI-100-ASY测定培养基中在EpiDerm™组织(MatTek Corporation, Bratislava, Slovakia)上以0.3%的剂量(是活性剂量(0.1%)的三倍)对两份NGF1-14凝胶制剂样品(1和2)一式三份进行。使用0.15%DNCB(2,4-二硝基氯苯)溶液作为阳性对照。使用不含肽的凝胶基质作为阴性对照。阳性和阴性对照均一式两份运行。将样品接触过夜18小时。

[0138] 下表4总结了该测试的结果。

[0139] 表4

	平均值(pg/ml) ± SD	标准化的值 ± SD
阴性对照	27.0 ± 3.8	1.0 ± 0.1
阳性对照	252.3 ± 16.4	9.3 ± 0.6
样品1	38.3 ± 5.6	1.4 ± 0.2

样品2	45.6±8.2	1.7±0.3
-----	----------	---------

[0141] 在IL-18释放测定法中,当IL-18释放值低于阴性对照注册值的两倍时,样品被认为“不致敏”。然后样品1和2都被视为“不致敏”。

[0142] 实施例7

[0143] NGF1-14pKa和Log P和D表征

[0144] 使用配备有Ag/AgCl双接点参比pH电极、Sirius D-PAS光谱仪和浊度感应装置的自动电位滴定仪Sirius T3(Sirius Analytical Instruments Ltd.,East Sussex,UK),测定实验pKa和分配系数和分布系数(log P和log D)。在pH 1.8-12.2范围内用滴定法校准pH电极。使用顶置式搅拌器,并且温度探针监测滴定过程中的温度。滴定实验是在0.15M KCl溶液(ISA水)中在氩气气氛中温度为25±1℃的条件下进行的。所有测试均使用标准的0.5M KOH和0.5M HCl作为滴定剂进行,对于分配系数测试,将在ISA水中的饱和辛醇(5%的ISA水)中用作分配溶剂。pKa通过pH-滴定法通过电位法确定。将粉末(约0.5mg)溶解在1.5ml ISA水中,在pH 2.0-12.0范围内一式三份进行滴定。通过将粉末(约0.7mg)溶于1ml ISA水中,然后在三种不同百分比的辛醇(通常为50%、60%、70%)中进行pH度量滴定,一式三份进行LogP。使用ACD/Percepta进行针对仪器模型的预测的pKa和计算的log P。

[0145] 结果示于下表5中。由于肽从来不是中性分子,因此必须将Log P值视为相对值。

[0146] 表5

[0147]	酸性pKa	4.42±0.05 (n=50)
	碱性pKa	7.41±0.07 (n=50)
	碱性pKa	6.43±0.06 (n=50)
	Log P (w/o)	-8.50
	Log D (7.4)	-7.90

[0148] 已经特别参考本发明的一些具体实施例公开了本发明,但是应当理解,本领域技术人员可以在不脱离所附权利要求书所限定的本发明的范围的情况下进行修改和改变。

序列表

<110> 罗马联合化学中心有限责任公司简写C4T有限责任公司

<120> 用于治疗 and 预防皮肤衰老和光老化的肽

<130> COL3P1W0

<160> 1

<170> BiSSAP 1.3.6

<210> 1

<211> 14

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> 无

<400> 1

Ser Ser Ser His Pro Ile Phe His Arg Gly Glu Phe Ser Val

1

5

10

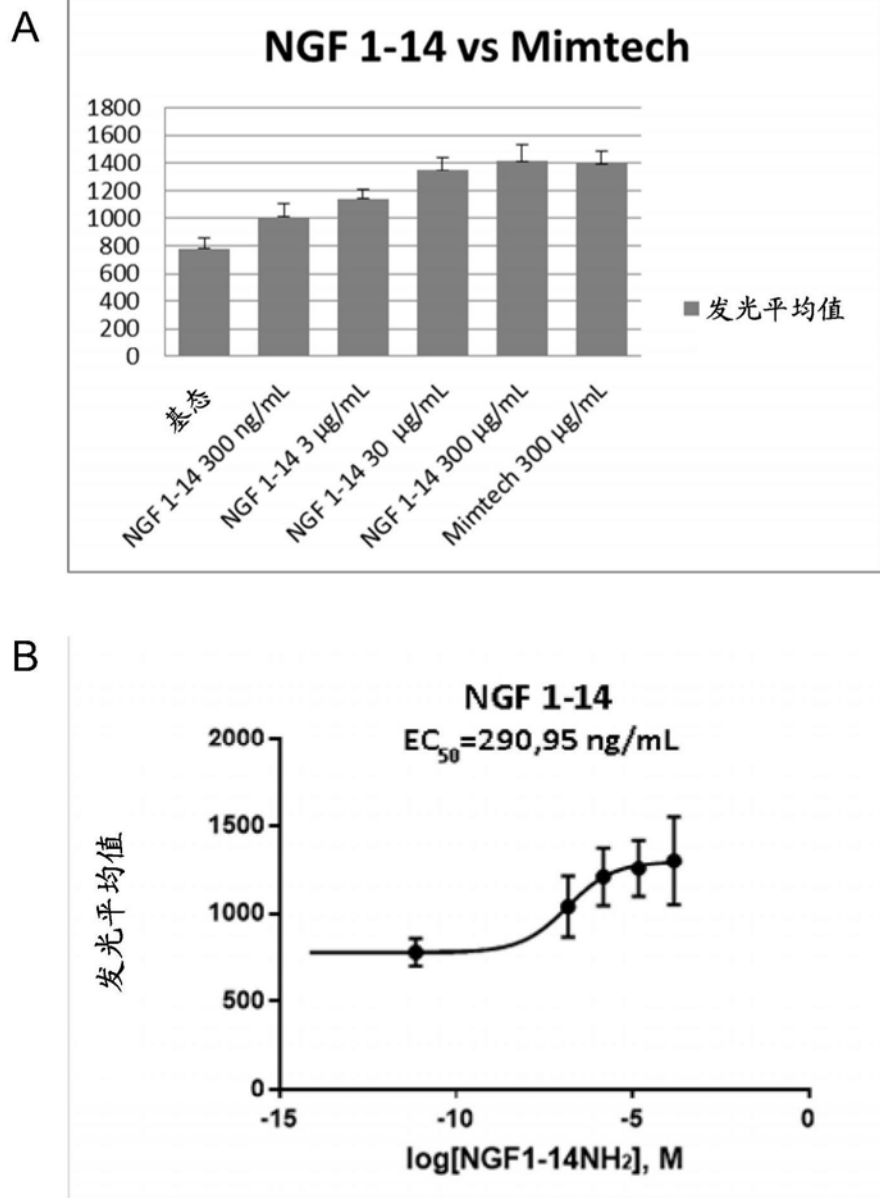


图1

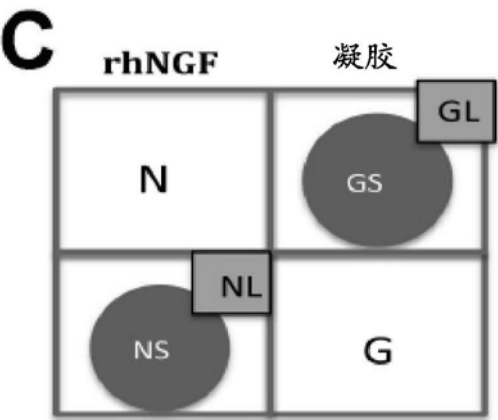


图2

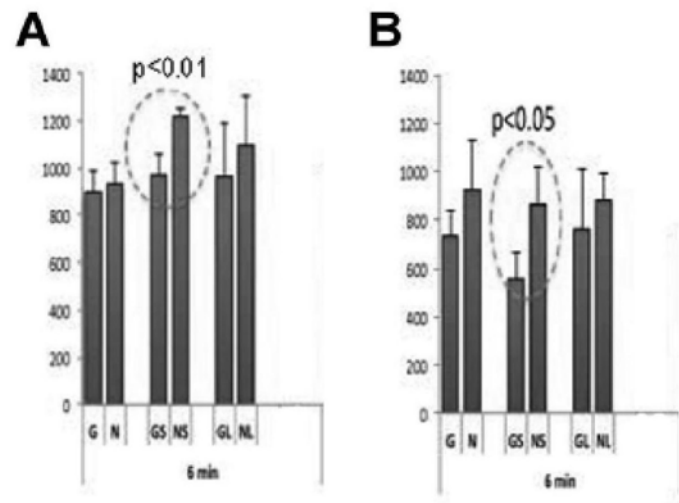


图3

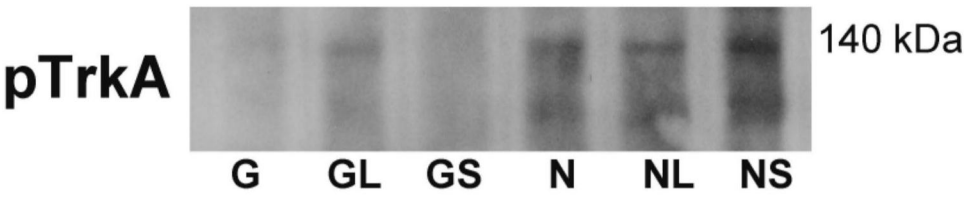


图4

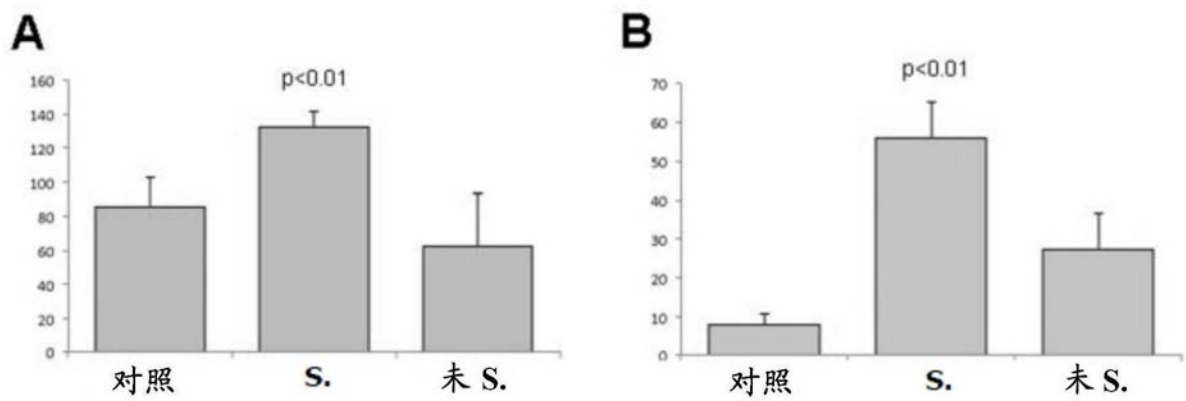


图5

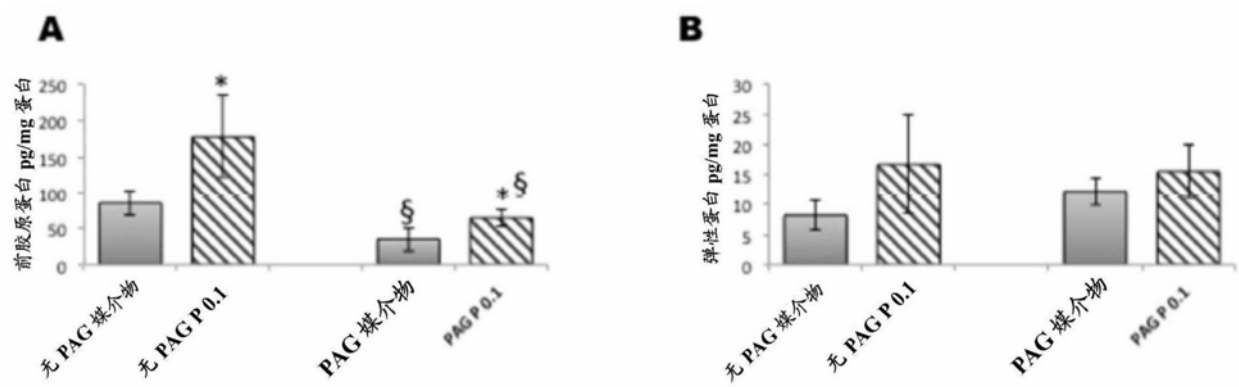


图6