

(19)



**Евразийское
патентное
ведомство**

(21) **202092820** (13) **A1**

(12) **ОПИСАНИЕ ИЗОБРЕТЕНИЯ К ЕВРАЗИЙСКОЙ ЗАЯВКЕ**

(43) Дата публикации заявки
2021.02.09

(22) Дата подачи заявки
2019.10.22

(51) Int. Cl. **A61K 8/64** (2006.01)
A61Q 19/08 (2006.01)
A61K 38/08 (2006.01)
A61P 21/02 (2006.01)
A61Q 17/00 (2006.01)

(54) **КОМПОЗИЦИЯ ДЛЯ РАССЛАБЛЕНИЯ МЫШЦ**

(31) **10-2018-0169495; 10-2019-0083008**

(32) **2018.12.26; 2019.07.10**

(33) **KR**

(86) **PCT/KR2019/013916**

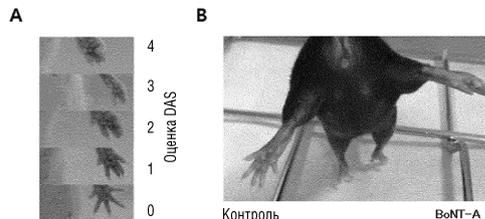
(87) **WO 2020/138674 2020.07.02**

(71) Заявитель:
КАРЕДЖЕН КО., ЛТД. (KR)

(72) Изобретатель:
**Чунг Йонг Жи, Ким Эюн Ми, Ли
Эюнг Жи (KR)**

(74) Представитель:
Медведев В.Н. (RU)

(57) Настоящее изобретение относится к пептиду, проявляющему физиологическую активность, и к композиции, содержащей тот же пептид. Пептид по настоящему изобретению проявляет различные физиологические активности, такие как расслабление мышц, уменьшение морщин на коже, ингибирование образования кожного сала и т.п. Подобный пептид как таковой можно использовать в качестве активного ингредиента в фармацевтической композиции для расслабления мышц или в косметическом средстве для уменьшения морщин кожи, ингибирования образования кожного сала или уменьшения угрей.



A1

202092820

202092820

A1

ОПИСАНИЕ ИЗОБРЕТЕНИЯ

2420-564866EA/072

КОМПОЗИЦИЯ ДЛЯ РАССЛАБЛЕНИЯ МЫШЦ

[Область техники]

Настоящее изобретение относится к пептиду, обладающему физиологической активностью и к включающей его композиции, и, более конкретно, к композиции (например, фармацевтической композиции или косметической композиции) для расслабления мышц или для уменьшения морщин кожи, подавления выработки кожного сала или уменьшения акне, в состав которой входит пептид, обладающий физиологической активностью.

[Уровень техники]

Нейроны (т.е. нервные клетки), составляющие нервную систему животного, имеют аксоны, обладающие особой структурой, которую нельзя найти в других клетках. Аксон имеет тонкую, длинную структуру, которая выступает из тела нервной клетки, так что аксон оказывается связанным с мишенью нейрона, посредством чего передаются сигналы и вещества.

Нервно-мышечный синапс имеет специфически дифференцированную синаптическую структуру, в которой терминали аксонов синаптически связаны с клетками скелетных мышц для передачи импульсов от нейронов к мышцам. Аксоны, направленные к скелетным мышцам, представляют собой миелинизированные аксоны, окруженные миелином и разветвляющиеся на различные терминальные дендриты по мере приближения аксонов к мышцам. Разветвленные аксоны окружены миелином, но миелин исчезает на участках аксонов, которые входят в мышцы. В этом случае разветвленные аксоны образуют терминальные бутоны, подобно терминалям аксонов, составляющим другие синапсы, и терминальные бутоны располагаются на поверхности вогнутых мышечных клеток. Такая структура называется «моторная бляшка» или «нервно-мышечный синапс».

Как и в других синапсах, на терминалях аксонов нервно-мышечных синапсов имеется множество митохондрий и синаптических пузырьков. Синаптические везикулы нервно-мышечных синапсов содержат ацетилхолин в качестве нейромедиатора. Молекулы SNARE необходимы для высвобождения ацетилхолина, а подавление действия высвобождения ацетилхолина вызывает вялый паралич. Между окончаниями аксонов и мышцами имеются синаптические щели, а клеточные мембраны клеток скелетных мышц, служащие постсинаптическими частями, вдавлены в сторону саркоплазмы, образуя ряд соединительных складок. Поскольку рецептор ацетилхолина присутствует на клеточных мембранах в местах соединительных складок, предполагается, что эта структура служит для расширения области, в которой рецептор может связываться с ацетилхолином.

Когда нервные импульсы передаются в нервно-мышечный синапс, чувствительные к напряжению кальциевые каналы терминальной клеточной мембраны открываются, так что ионы кальция попадают в кальциевые каналы. В результате синаптические везикулы

сливаются с клеточной мембраной, высвобождая ацетилхолин из везикул в синаптические щели. Высвобождающийся ацетилхолин имеет возможность связываться с ацетилхолиновым рецептором, присутствующим в мембране мышечной клетки, и, таким образом, открываются натриевые каналы, вызывая деполяризацию клеточной мембраны. Импульсы, исходящие из нервно-мышечного синапса, распространяются по поверхности мышечных волокон и передаются в удаленные части мышечных клеток. Импульсы передаются триадам, открывая мембранные кальциевые каналы саркоплазматической сети и высвобождая ионы кальция в саркоплазму. Ионы кальция связаны с тропонином С, и таким образом мышцы начинают сокращаться. Когда импульсы прерываются, ионы кальция возвращаются в цистерны саркоплазматической сети посредством активного транспорта, тем самым вызывая расслабление мышц. Следовательно, при подавлении секреции ацетилхолина из нервно-мышечного синапса импульсы, генерируемые нервно-мышечным синапсом, не передаются мышцам. В этом случае, из-за прерывания импульсов мышцы расслабляются.

Между тем, причина или механизм образования мимических морщин зависят от напряжения мышц эпидермиса, тянущих кожу во внутреннем направлении. Такое мышечное напряжение возникает в результате ослабления лицевых мышц и чрезмерной активности нейронов. Чрезмерная нейронная активность характеризуется неконтролируемым чрезмерным высвобождением нейротрансмиттеров, которые стимулируют мышечные волокна. В результате молекулы, контролирующие высвобождение нейротрансмиттеров, снимают напряжение мышц, способствуя разглаживанию морщин на лице. Таким образом, существует потребность в новых действующих ингредиентах, которые эффективны в отношении контроля высвобождения нейротрансмиттеров для лечения мышечного спазма и для уменьшения или устранения асимметрии лица и/или морщин (особенно, мимических морщин).

Известно, что ботулинический токсин способен расслаблять мышцы. Ботулинический токсин чаще всего используется для клинических испытаний и косметических средств с целью разглаживания морщин на лице. Ботулинический токсин вызывает функциональное повреждение белка SNARE и оказывает расслабляющее действие на мышцы, прерывая работу комплекса SNARE, тем самым подавляя секрецию нейромедиатора (например, ацетилхолина).

Ботулинический токсин использовался в качестве миорелаксанта (публикация корейского патента № 2010-0020972) или использовался для уменьшения морщин благодаря способности ботулинического токсина расслаблять мышцы. Однако, поскольку паралитический эффект ботулинического токсина обратим в среднем в течение 6 месяцев, такое лечение требует повторных инъекций ботулинического токсина. Кроме того, поскольку ботулинический токсин имеет размер, распознаваемый иммунной системой пациента, ботулинический токсин может вызывать иммунный ответ на вводимое лекарственное средство. Поскольку образование антител против ботулинического токсина приводит к значительной потере терапевтической эффективности, это является серьезной

проблемой. Поэтому, существует потребность в идентификации молекул, проявляющих паралитический эффект, подобный ботулиническому токсину, но которые имеют более простые и стабильные молекулярные структуры, которые не вызывают иммунного ответа и являются эффективными с точки зрения стоимости производства.

Между тем, кожный жир вырабатывается сальными железами и выделяется через поры кожи и обладает антибактериальным и цитостатическим действием, образуя пленки на поверхности кожи и волос для защиты нашего организма от вторгшихся микробов. Поры расширяются, когда кожный жир избыточно выделяется сальными железами или когда возникает проблема с прохождением кожного жира через поры. Кожный жир накапливается в таких расширенных порах, и этот кожный жир дополнительно накапливается, смешиваясь с омертвевшими клетками кожи, остатками косметических средств или пылью. Накопившиеся остатки кожного жира окисляются при контакте с радикалами в воздухе и, таким образом, становятся коричневыми или черными, вызывая тем самым образование черных точек. Кроме того, поскольку кожный жир вызывает акне, существует потребность в разработке материалов, способных подавить чрезмерное производство кожного сала.

[Описание]

[Техническая проблема]

Таким образом, цель настоящего изобретения состоит в том, чтобы предложить пептид, обладающий различными типами физиологической активности, такими как расслабление мышц, уменьшение морщин на коже, подавление выработки кожного сала или уменьшение акне, и фармацевтическую или косметическую композицию, включающую его.

[Решение проблемы]

Для достижения целей согласно одному аспекту настоящего изобретения предложен пептид, включающий аминокислотную последовательность, указанную в SEQ ID NO: 1.

Согласно другому аспекту настоящего изобретения предложена композиция для расслабления мышц, включающая в качестве действующего ингредиента пептид, содержащий аминокислотную последовательность, указанную в SEQ ID NO: 1.

Согласно одному варианту осуществления настоящего изобретения композиция может находиться в форме фармацевтической композиции или косметической композиции, но настоящее изобретение этим не ограничено.

Согласно другому варианту осуществления настоящего изобретения пептид может быть включен в количестве от 0,001% по весу до 60% по весу, исходя из 100% по весу композиции для расслабления мышц, но настоящее изобретение этим не ограничено.

Согласно еще одному варианту осуществления настоящего изобретения композиция может быть использована для профилактики или лечения нервно-мышечного заболевания. В одном предпочтительном варианте осуществления настоящего изобретения нервно-мышечное заболевание может включать подергивание век,

кривошее, цервикальную дистонию, тонический блефароспазм, подмышечный гипергидроз, трещину заднего прохода, колькоспазм, ахалазию, головную боль, идиопатическую и нейрогенную детрузорную гиперактивность, фокальную дистонию, боль/нарушение височно-нижнечелюстного сустава, диабетическую нейропатию, дисфункцию голосовых связок, косоглазие, хроническую нейропатию, гипертрофию лицевых мышц, детрузорносфинктерную диссинергию или доброкачественную гиперплазию предстательной железы, и головная боль может представлять собой мигрень, но настоящее изобретение не ограничено этим.

Согласно еще одному варианту осуществления настоящего изобретения пептид может ингибировать секрецию ацетилхолина.

Согласно еще одному аспекту настоящего изобретения предложена косметическая композиция, включающая в качестве действующего ингредиента пептид, содержащий аминокислотную последовательность, указанную в SEQ ID NO: 1.

Согласно одному варианту осуществления настоящего изобретения косметическая композиция может использоваться с целью улучшения состояния кожи, например, уменьшения морщин на коже, подавления выработки кожного сала или уменьшения угрей, но настоящее изобретение не ограничено этим.

Согласно другому варианту осуществления настоящего изобретения пептид может быть включен в количестве от 0,001% по весу до 60% по весу, исходя из 100% по весу косметической композиции, но настоящее изобретение не ограничено этим.

Согласно еще одному варианту осуществления настоящего изобретения пептид может увеличивать экспрессию коллагена, но настоящее изобретение не ограничено этим.

[Полезные эффекты]

Поскольку пептид, включающий аминокислотную последовательность, указанную в SEQ ID NO: 1, согласно настоящему изобретению обладает физиологической активностью, такой как расслабление мышц, уменьшение морщин на коже, подавление выработки кожного сала и т.п., пептид можно использовать в качестве действующего ингредиента в композиции для расслабления мышц, композиции для уменьшения кожных морщин, композиции для подавления выработки кожного сала, композиции для подавления образования черных точек или композиции для уменьшения акне.

[Описание чертежей]

На фиг. 1 показаны результаты оценки высокотемпературной стабильности пептида, включающего аминокислотную последовательность, указанную в SEQ ID NO: 1, при хранении в течение длительного периода времени.

На фиг. 2 показаны результаты оценки высокотемпературной стабильности пептида, включающего аминокислотную последовательность, указанную в SEQ ID NO: 1.

На фиг. 3 показана степень разложения рекомбинантного синтаксина 1А пептидом, включающим аминокислотную последовательность, указанную в SEQ ID NO: 1.

На фиг. 4 показана степень разложения эндогенного синтаксина 1А пептидом, включающим аминокислотную последовательность, указанную в SEQ ID NO: 1.

На фиг. 5 показано ингибирующее действие пептида, включающего аминокислотную последовательность, указанную в SEQ ID NO: 1, на образование комплекса SNARE.

На фиг. 6 показано ингибирующее действие пептида, включающего аминокислотную последовательность, указанную в SEQ ID NO: 1, на образование комплекса SNARE.

Фиг. 7 представляет собой график, показывающий ингибирующее действие пептида, включающего аминокислотную последовательность, указанную в SEQ ID NO: 1, на секрецию ацетилхолина.

На фиг. 8 показан миорелаксанта́ный эффект пептида, который включает аминокислотную последовательность, указанную в SEQ ID NO: 1.

На фиг. 9 и 10 показаны результаты сравнения эффектов ботокса и пептида, включающего аминокислотную последовательность, указанную в SEQ ID NO: 1, на расслабление мышц.

На фиг. 11 показаны результаты определения, проникает ли в клетки пептид, включающий аминокислотную последовательность, указанную в SEQ ID NO: 1.

На фиг. 12 показаны результаты проверки механизма проникновения в ткань для пептида, включающего аминокислотную последовательность, указанную в SEQ ID NO: 1.

На фиг. 13 показаны результаты проверки того, что механизм проникновения пептида в ткань, который включает аминокислотную последовательность, указанную в SEQ ID NO: 1, осуществляется вокруг волосяного фолликула.

На фиг. 14 показаны результаты проверки того, что механизм проникновения пептида в ткань, который включает аминокислотную последовательность, указанную в SEQ ID NO: 1, осуществляется вокруг сальных желез.

На фиг. 15 и 16 показан уменьшающий морщины эффект пептида, включающего аминокислотную последовательность, указанную в SEQ ID NO: 1.

На фиг. 17 показан повышенный уровень коллагена при нанесении пептида, включающего аминокислотную последовательность, указанную в SEQ ID NO: 1.

На фиг. 18 показан повышенный уровень эластина при нанесении пептида, включающего аминокислотную последовательность, указанную в SEQ ID NO: 1.

На фиг. 19 показан повышенный уровень фибронектина при нанесении пептида, включающего аминокислотную последовательность, указанную в SEQ ID NO: 1.

На фиг. 20 показаны результаты уменьшения количества сальных желез и снижения экспрессии маркера, связанного с продукцией кожного сала, при нанесении пептида, включающего аминокислотную последовательность, указанную в SEQ ID NO: 1.

[Лучший вариант осуществления изобретения]

Далее настоящее изобретение будет описано подробно.

1: Пептид по настоящему изобретению

Настоящее изобретение относится к пептиду, обладающему полезной физиологической активностью, например, различным физиологическим действием, таким

как расслабление мышц, уменьшение морщин на коже, подавление выработки кожного сала или уменьшение акне.

Пептид по настоящему изобретению включает аминокислотную последовательность, указанную в SEQ ID NO: 1. Согласно одному варианту осуществления пептид по настоящему изобретению может состоять из аминокислотной последовательности, указанной в SEQ ID NO: 1, но настоящее изобретение этим не ограничено.

В данном описании термин «пептид» относится к линейной молекуле, образованной путем связывания аминокислотных остатков друг с другом посредством пептидных связей. Пептид может быть получен с использованием обычных способов биологического или химического синтеза, известных в соответствующей области, в частности, способов твердофазного синтеза.

Пептид может включать аминокислотные варианты или фрагменты, которые имеют отличающиеся последовательности в пределах, не влияющих на его функциональные возможности, вследствие делеции, вставки или замены аминокислотного остатка (остатков) или их комбинации. Замена аминокислот без изменения активности пептида в общем известна в соответствующей области. В некоторых случаях пептид может быть модифицирован путем фосфорилирования, сульфатирования, акрилирования, гликозилирования, метилирования, фарнезилирования и т.п. Поэтому, настоящее изобретение включает пептид, который имеет по существу такую же аминокислотную последовательность, что и пептид, включающий аминокислотную последовательность, указанную в SEQ ID NO: 1, и его варианты или активные фрагменты. Выражение «практически идентичный белок» относится к белку, аминокислотная последовательность которого имеет гомологию по последовательности 60% или более, предпочтительно, 75% или более, например, 80% или более, 90% или более, 95% или более, 98% или более, или 99% или более относительно аминокислотной последовательности SEQ ID NO: 1, но настоящее изобретение этим не ограничено. Белки, имеющие гомологию по аминокислотной последовательности 60% или более и проявляющие такую же активность, входят в объем настоящего изобретения. Кроме того, пептид по настоящему изобретению может дополнительно включать направляющую последовательность, метку, меченый остаток или аминокислотную последовательность, специально подобранную для увеличения периода полужизни или стабильности пептида.

Также пептид по настоящему изобретению может быть получен с использованием различных способов, хорошо известных в соответствующей области. В соответствии с одним вариантом осуществления настоящего изобретения пептид по настоящему изобретению может быть получен с использованием рекомбинации полинуклеотидов и системы экспрессии белка, или может быть получен с использованием способа синтеза пептида *in vitro* посредством химического синтеза, такого как пептидный синтез, и способа бесклеточного синтеза белка и аналогичных способов

Кроме того, с N- или C-концом пептида по настоящему изобретению может быть

связана защитная группа для реализации более высокой химической стабильности, улучшенных фармакологических свойств (периода полужизни, абсорбируемости, титрования, эффективности и т.п.), модифицированной специфичности (например, широкого диапазона спектров биологической активности) и пониженной антигенности. Например, защитной группой может являться ацетильная группа, флуоренилметоксикарбонильная группа, формильная группа, пальмитоильная группа, миристильная группа, стеарильная группа или полиэтиленгликоль (ПЭГ). Однако защитные группы можно использовать без ограничения, пока защитные группы могут модифицировать пептид, в частности, могут повышать стабильность пептида. Термин «стабильность» используется в значении, включающем стабильность *in vivo*, где пептид по настоящему изобретению защищен от атаки ферментов, расщепляющих белок *in vivo*, а также стабильность при хранении (например, стабильность при хранении при комнатной температуре).

2: Фармацевтическая композиция, включающая пептид по настоящему изобретению

Другой аспект настоящего изобретения относится к фармацевтической композиции для расслабления мышц, включающей пептид, содержащий аминокислотную последовательность, указанную в SEQ ID NO: 1.

Поскольку пептид, включающий аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 1, идентичен пептиду, описанному в разделе «1: Пептид по настоящему изобретению», то для его конкретного описания см. раздел «1: Пептид по настоящему изобретению». Далее будет описана только конкретная конфигурация фармацевтической композиции.

Согласно одному варианту осуществления настоящего изобретения пептид по настоящему изобретению обладает миорелаксантной активностью и, таким образом, может использоваться в качестве действующего ингредиента композиции для расслабления мышц. Соответственно, настоящее изобретение относится к фармацевтической композиции для расслабления мышц, которая включает в качестве действующего ингредиента пептид, включающий аминокислотную последовательность, указанную в SEQ ID NO: 1.

Пептид может быть включен в количестве от 0,001% по весу до 60% по весу, например, в количестве от 0,01% по весу до 50% по весу, исходя из 100% по весу фармацевтической композиции для расслабления мышц. Когда содержание пептида в фармацевтической композиции для расслабления мышц меньше нижнего предела, эффект пептида на расслабление мышц может быть недостаточно выражен. С другой стороны, когда содержание пептида превышает верхний предел, может быть получен относительно низкий эффект пептида относительно концентрации добавленного пептида.

Фармацевтическая композиция по настоящему изобретению может использоваться для профилактики или лечения нервно-мышечного заболевания. В этом случае фармацевтическая композиция по настоящему изобретению может неограниченно применяться при нервно-мышечном заболевании до тех пор, пока нервно-мышечное

заболевание является заболеванием, которое необходимо лечить расслаблением мышц.

Термин «защита», используемый в настоящем изобретении, относится ко всем типам действий, при которых фармацевтическая композиция по настоящему изобретению задерживает начало нервно-мышечного заболевания.

Термин «ингибирование», используемый в настоящем изобретении, относится ко всем типам действий, при которых фармацевтическая композиция по настоящему изобретению подавляет начало нервно-мышечного заболевания.

Термин «лечение», используемый в настоящем изобретении, относится ко всем типам действий, при которых фармацевтическая композиция по настоящему изобретению улучшает или облегчает симптомы нервно-мышечного заболевания.

Термин «введение», используемый в настоящем изобретении, относится к введению определенного вещества субъекту с использованием любых подходящих способов. В этом случае фармацевтическая композиция по настоящему изобретению может вводиться любыми обычными путями введения, с помощью которых композиция может достигать цели *in vivo*. Путь введения фармацевтической композиции по настоящему изобретению особо не ограничивается, но фармацевтическая композиция по настоящему изобретению может вводиться перорально или парентерально. В частности, фармацевтическая композиция по настоящему изобретению может вводиться парентерально и, более конкретно, может вводиться путем нанесения композиции на кожу (т.е. дермальным введением). В частности, введение фармацевтической композиции по настоящему изобретению можно проводить от одного до четырех раз в день, от двух до трех раз в день или два раза в день. Также введение фармацевтической композиции по настоящему изобретению можно проводить в течение периода от 4 недель или более длительного периода, 8 недель или более длительного периода, от 4 недель до 12 недель или от 8 недель до 12 недель.

Термин «нервно-мышечное заболевание», используемый в настоящем изобретении, относится к расстройству, которое возникает в периферических нервах и мышцах. Периферический нерв относится к нейронной сети, которая расходится от центральной нервной системы в черепе или позвоночнике, соединяя конечные органы, такие как мышцы или кожа, с центральной нервной системой, и служит для передачи команд, отдаваемых в центральной нервной системе, до конечных органов, таких как мышцы, или передают сенсорную информацию, такую как чувство боли, в центральную нервную систему. Заболевание периферической нервной системы включает дисфункцию периферических нервов, заболевания в нервно-мышечных синапсах, в которых периферические нервы соединены с мышцами, или в самих мышцах и т.п.

Неограничивающие примеры нервно-мышечного заболевания включают такие заболевания, как подергивание век, кривошею (неестественное положение шеи, при котором шея наклонена в одну сторону из-за сокращения мышц), шейную дистонию, тонический блефароспазм, подмышечный гипергидроз, анальную трещину, колькоспазм, ахалазию, головную боль, идиопатическую и нейрогенную детрузорную гиперактивность,

фокальную дистонию (конечностей, височно-нижнечелюстных суставов, голосовых связок и т.п.), боль/нарушение височно-нижнечелюстного сустава, диабетическую нейропатию, дисфункцию голосовых связок, косоглазие, хроническую нейропатию, гипертрофию лицевых мышц (в жевательных мышцах и т.п.), детрузорносфинктерную диссинергию или доброкачественную гиперплазию предстательной железы и т.п. Головная боль может представлять собой мигрень.

Согласно одному варианту осуществления настоящего изобретения фармацевтическая композиция по настоящему изобретению может дополнительно включать подходящий носитель, эксципиент или разбавитель, которые обычно используются для изготовления фармацевтической композиции.

Носитель, эксципиент или разбавитель, который можно использовать в фармацевтической композиции по настоящему изобретению, включает лактозу, декстрозу, сахарозу, сорбит, маннит, ксилит, эритрит, мальтит, крахмал, гуммиарабик, альгинат, желатин, фосфат кальция, силикат кальция, целлюлозу, метилцеллюлозу, аморфную целлюлозу, поливинилпирролидон, воду, метилгидроксibenзоат, пропилгидроксibenзоат, тальк, стеарат магния, минеральное масло и т.п.

Фармацевтическая композиция по настоящему изобретению может использоваться для изготовления таких форм, как порошки, гранулы, таблетки, капсулы, суспензии, эмульсии, сироп, пероральные составы (такие как аэрозоль), препараты для наружного применения, суппозитории и стерильные растворы для инъекций, в зависимости от используемых стандартных способов.

При составлении фармацевтическая композиция может быть изготовлена с использованием разбавителя или эксципиента, обычно используемого в данной области, такого как наполнитель, увеличивающий объем агент, связующий агент, смачивающий агент, дезинтегрирующий агент, поверхностно-активное вещество и т.п. Твердый препарат для перорального введения включает таблетку, пилюлю, порошок, гранулу, капсулу и т.п. Такой твердый препарат может быть изготовлен путем смешивания соединения по меньшей мере с одним эксципиентом, например крахмалом, карбонатом кальция, сахарозой или лактозой, желатином и т.п.

Кроме того, в дополнение к простым эксципиентам в настоящем изобретении могут использоваться смазывающие вещества, такие как стеарат магния, тальк и т.п. Жидкофазный препарат для перорального введения включает суспензию, раствор для внутреннего применения, эмульсию, сироп и т.п. Такой жидкофазный препарат может включать в себя различные эксципиенты, например, смачивающий агент, подсластитель, ароматизатор, консервант и т.п. в дополнение к инертным разбавителям (например, воде, жидкому парафину), обычно используемым в данной области.

Препарат для парентерального введения включает стерильный водный раствор, неводный растворитель, суспензию, эмульсию, лиофилизированный препарат, суппозиторий и т.п. В качестве неводного растворителя и суспензии можно использовать растительное масло, такое как пропиленгликоль, полиэтиленгликоль или оливковое масло,

или сложный эфир для инъекций, такой как этилолеат, и т.п. В качестве основы суппозитория можно использовать Витепсол, макрогол, твин 61, масло какао, лауриновое масло, глицериновый желатин и т.п.

Твердый препарат для перорального введения включает таблетку, пилюлю, порошок, гранулу, капсулу и т.п. Такой твердый препарат может быть изготовлен путем смешивания фармацевтической композиции по настоящему изобретению по меньшей мере с одним эксципиентом, например крахмалом, карбонатом кальция, сахарозой, лактозой, желатином и т.п. Помимо простых эксципиентов, в настоящем изобретении также могут быть использованы смазывающие вещества, такие как стеарат магния, тальк и т.п.

Жидкофазный препарат для перорального введения включает суспензию, раствор для внутреннего применения, эмульсию, сироп и т.п. Такой жидкофазный препарат может включать в себя различные эксципиенты, например, смачивающий агент, подсластитель, ароматизатор, консервант и т.п. в дополнение к инертным разбавителям (например, воде, жидкому парафину), обычно используемым в данной области.

Препарат для нанесения на кожу включает присыпку, эмульсию, суспензию, масло, спрей, мазь, крем-пасту, гель, пену или раствор. Фармацевтический препарат по настоящему изобретению может представлять собой безводную мазь и может содержать парафин, который подходит для местного применения и находится в жидком состоянии при температуре тела, в частности, парафин с низкой вязкостью, или может содержать натуральные жиры или частично синтезированные жиры, например, триглицерид кокосовых жирных кислот, гидрогенизированное масло (например, гидрогенизированное арахисовое масло или касторовое масло), неполный эфир глицерина и жирных кислот (например, моностеарат и дистеарат глицерина), силикон (например, полиметилсилоксан, такой как гексаметилдисилоксан или октаметилтрисилоксан) и т.п. Например, фармацевтический препарат может содержать жирный спирт, который связан с водным кремом и служит для увеличения способности абсорбировать влагу, а также стерин, ланолин, другие эмульгирующие агенты и/или другие добавки.

Доза включающего аминокислотную последовательность пептида, которая содержится в фармацевтической композиции по настоящему изобретению, может варьировать в зависимости от состояния и веса пациента, тяжести заболевания, формы лекарственного средства, пути введения и времени введения, но при необходимости может быть выбрана должным образом. Например, пептид, включающий аминокислотную последовательность, можно вводить ежедневно в дозировке от 0,0001 до 1000 мг/кг, в частности, в дозировке от 0,1 до 1000 мг/кг. Пептид можно применять один раз в день или несколькими дробными дозами. Однако доза фармацевтической композиции не ограничивает объем настоящего изобретения. Доза пептида, включающего аминокислотную последовательность по настоящему изобретению, может колебаться в зависимости от пути введения, тяжести заболевания, пола, веса и возраста пациента и т.п. Следовательно, доза пептида не предназначена для ограничения каким-либо образом

объема настоящего изобретения.

Фармацевтическая композиция по настоящему изобретению может вводиться млекопитающим (например, мышам, крысам, домашнему скоту, людям и т.п.) различными путями. Можно выбирать способ введения. В этом случае пептид можно, например, вводить всеми способами введения, такими как пероральная, ректальная или внутривенная, внутримышечная, подкожная, внутриматочная, дуральная или интрацеребровентрикулярная инъекция.

В дополнение к пептиду, включающему аминокислотную последовательность, фармацевтическая композиция для профилактики, ингибирования или лечения нервно-мышечного заболевания согласно настоящему изобретению может дополнительно включать один или несколько действующих ингредиентов, обладающих эффектом улучшения, облегчения или профилактики нервно-мышечного заболевания.

Для улучшения, облегчения или профилактики нервно-мышечного заболевания фармацевтическую композицию по настоящему изобретению можно использовать отдельно или в сочетании с хирургическим вмешательством, гормональной терапией, лекарственным лечением и другими видами лечения с использованием модификатора биологической реакции.

Согласно одному варианту осуществления настоящего изобретения пептид по настоящему изобретению стабилен при высокой температуре (см. фиг.1 и 2), разлагает синтаксин 1A, который участвует в высвобождении нейротрансмиттеров, подавляет образование комплекса SNARE (см. фиг. 3-6), ингибирует секрецию ацетилхолина (см. фиг. 7), обладает миорелаксantным эффектом (см. фиг. 8-10), проникает в клетки и проникает в мышечную оболочку ткани, колокализуясь с нейрональным маркером, тем самым проявляя миорелаксantный эффект (см. фиг. 11-14).

3. Косметическая композиция, включающая пептид по настоящему изобретению

Еще один аспект настоящего изобретения относится к косметической композиции, включающей в качестве действующего ингредиента пептид, содержащий аминокислотную последовательность, указанную в SEQ ID NO: 1.

Поскольку пептид, включающий аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 1, идентичен пептиду, описанному в разделе «1: Пептид по настоящему изобретению», то для его конкретного описания см. раздел «1: Пептид по настоящему изобретению». Далее будет описана только конкретная конфигурация косметической композиции.

В настоящем изобретении термин «поры» относится к небольшим отверстиям, через которые выделяется кожный жир, присутствующий на лице, лбу, носу и т.п., а термин «черная точка» относится к кожному салу, которое выглядит черным в виде накапливаемой в порах смеси разложившегося кожного сала, старых мертвых клеток кожи и т.п., а загрязнения откладываются вокруг пор.

Согласно одному варианту осуществления настоящего изобретения косметическая композиция по настоящему изобретению может представлять собой косметическую

композицию для улучшения состояния кожи. Термин «улучшение состояния кожи» обычно может означать процесс лечения, улучшения или облегчения повреждения кожи, вызванного внутренними или внешними факторами кожи или их действием. Например, улучшение может означать, что косметическая композиция используется для уменьшения морщин, повышения эластичности кожи, регенерации ран, подавления выработки кожного сала или уменьшения акне и т.п., но настоящее изобретение этим не ограничено.

Согласно одному варианту осуществления настоящего изобретения пептид по настоящему изобретению стабилен при высокой температуре (см. фиг.1 и 2) и имеет эффект уменьшения морщин кожи за счет расслабления мышц или увеличения количества компонентов дермы (см. фиг. 15-19). Компоненты дермы могут включать коллаген, но настоящее изобретение этим не ограничено.

Согласно одному варианту осуществления настоящего изобретения пептид по настоящему изобретению стабилен при высокой температуре (см. фиг.1 и 2), и количество сальных желез снижено, и уровень экспрессии маркера, связанного с выработкой кожного сала, снижен (см. фиг. 20).

Косметическая композиция по настоящему изобретению может быть изготовлена в жидкой или твердой форме с использованием основного вещества, адьюванта и добавки, обычно используемой в области косметики. Косметические средства в жидкой или твердой форме могут, например, включать лосьон для лица, крем, средство для ванны и т.п., но настоящее изобретение этим не ограничено. Например, основное вещество, адьювант и добавка, обычно используемые в области косметики, включают воду, спирт, пропиленгликоль, стеариновую кислоту, глицерин, цетиловый спирт, жидкий парафин и т.п., но настоящее изобретение не ограничено конкретно ими.

В дополнение к пептиду, включающему аминокислотную последовательность, косметическая композиция по настоящему изобретению может включать компоненты, обычно используемые в косметической композиции. Например, косметическая композиция может включать обычные адьюванты и носители, такие как антиоксидант, стабилизирующий агент, солюбилизующий агент, витамины, пигмент и ароматизатор.

Косметическая композиция по настоящему изобретению может быть изготовлена в виде любых составов, обычно получаемых в предшествующем уровне техники. Например, косметическая композиция может быть составлена для приготовления раствора, суспензии, эмульсии, пасты, геля, крема, лосьона, порошка, суспензии, очищающего средства, содержащего поверхностно-активное вещество, масла, порошковой основы, эмульсионной основы, восковой основы, спрея и т.п., но настоящее изобретение этим не ограничено. Более конкретно, косметическая композиция может быть составлена для приготовления тоника, лосьона, питательного крема, массажного крема, эссенции, крема для глаз, очищающего крема, очищающей пены, очищающей воды, упаковки, спрея, или порошка.

Когда состав косметической композиции по настоящему изобретению представляет собой пасту, крем или гель, в качестве компонента-носителя можно

использовать животное масло, растительное масло, воск, парафин, крахмал, трагакант, производное целлюлозы, полиэтиленгликоль, силикон, бентонит, диоксид кремния, тальк, оксид цинка и т.п.

Когда состав косметической композиции по настоящему изобретению представляет собой порошок или спрей, в качестве компонента-носителя можно использовать лактозу, тальк, диоксид кремния, гидроксид алюминия, силикат кальция или порошок полиамида. В частности, когда состав представляет собой спрей, состав может дополнительно включать пропеллент, такой как хлорфторуглеводород, пропан/бутан или диметиловый эфир.

Когда состав косметической композиции по настоящему изобретению представляет собой эмульсию, в качестве компонента-носителя можно использовать растворитель, солюбилизующий агент или эмульгирующий агент. Например, компонент-носитель включает воду, этанол, изопропанол, этилкарбонат, этилацетат, бензиловый спирт, бензилбензоат, пропиленгликоль, 1,3-бутиленгликолевое масло, глицериновый алифатический эфир, полиэтиленгликоль или сложный эфир жирной кислоты и сорбитана.

Когда состав косметической композиции по настоящему изобретению представляет собой суспензию, в качестве компонента-носителя можно использовать жидкий разбавитель, такой как вода, этанол или пропиленгликоль, суспендирующий агент, такой как этоксилированный изостеариловый спирт, сложный эфир полиоксиэтиленсорбита и сложный эфир полиоксиэтиленсорбитана, микрокристаллическая целлюлоза, метагидроксид алюминия, бентонит, агар, трагакант и т.п.

Когда состав косметической композиции по настоящему изобретению представляет собой очищающее средство, содержащее поверхностно-активное вещество, в качестве компонента-носителя могут быть использованы сульфат алифатического спирта, сульфат эфира алифатического спирта, моноэфир сульфосукцината, производное имидазолиния, метилтаурат, саркозинат, сульфозфир амида жирной кислоты, алкиламидобетаин, алифатический спирт, глицерид жирной кислоты, диэтаноламид жирной кислоты, растительное масло, производное ланолина, сложный эфир этоксилированного глицерина и жирной кислоты или т.п..

Косметическая композиция по настоящему изобретению может использоваться сама по себе, или может использоваться в препарате двойного применения, или может использоваться в препарате двойного применения с другой косметической композицией, отличной от косметической композиции по настоящему изобретению. Кроме того, косметическая композиция по настоящему изобретению, которая обладает превосходным увлажняющим эффектом и отличным эффектом улучшения кожного барьера, может использоваться в соответствии с обычными способами применения, и число вариантов ее применения может варьировать в зависимости от состояния кожи пользователя или предпочтений пользователя.

Когда косметическая композиция по настоящему изобретению представляет собой мыло, очищающий состав, содержащий поверхностно-активные вещества, или очищающий состав, не содержащий поверхностно-активных веществ, косметическую композицию можно стереть, удалить или смыть водой после нанесения на кожу. В качестве конкретного примера мыло представляет собой жидкое мыло, мыльный порошок, твердое мыло и масляное мыло; очищающий состав, содержащий поверхностно-активные вещества, представляет собой очищающую пену, очищающую воду, очищающее полотенце и очищающую упаковку; а не содержащий поверхностно-активные вещества очищающий состав представляет собой очищающий крем, очищающий лосьон, очищающую воду и очищающий гель, но настоящее изобретение этим не ограничено.

4. Применение фармацевтической композиции или косметической композиции, включающей пептид по настоящему изобретению

Еще один аспект настоящего изобретения относится к применению фармацевтической композиции или косметической композиции, которая включает пептид, включающий аминокислотную последовательность, указанную в SEQ ID NO: 1.

Поскольку пептид, включающий аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 1, идентичен пептиду, как описано в разделе «1: Пептид по настоящему изобретению», см. раздел «1: Пептид по настоящему изобретению» для его конкретного описания. идентичен пептиду, описанному в разделе «1: Пептид по настоящему изобретению», то для его конкретного описания см. раздел «1: Пептид по настоящему изобретению». Далее будет описано только применение композиции, включающей пептид.

Согласно одному аспекту настоящего изобретения настоящее изобретение относится к способу расслабления мышц, который включает применение пептида или фармацевтической композиции просто на коже или на коже, в которой сокращаются мышцы. Применение может включать применение на коже, но настоящее изобретение этим не ограничено.

Согласно другому аспекту настоящего изобретения настоящее изобретение относится к способу профилактики, ингибирования или лечения нервно-мышечного заболевания, который включает введение пептида или фармацевтической композиции просто субъекту или субъекту, у которого развилось нервно-мышечное заболевание.

Фармацевтическая композиция описана в разделе «2: Фармацевтическая композиция, включающая пептид по настоящему изобретению».

Эффективное количество пептида, включающего аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 1, или фармацевтическую композицию, включающую пептид, можно применять у субъекта/вводить субъекту, нуждающемуся в этом.

Согласно еще одному аспекту настоящего изобретения настоящее изобретение относится к способу уменьшения морщин на коже, который включает применение пептида или косметической композиции просто на коже или на коже, на которой появляются морщины.

Согласно еще одному аспекту настоящего изобретения настоящее изобретение

относится к способу подавления выработки кожного сала, который включает применение пептида или косметической композиции на коже.

Согласно еще одному аспекту настоящего изобретения настоящее изобретение относится к способу уменьшения акне, который включает применение пептида или косметической композиции просто на коже или на коже, на которой появляются акне.

Согласно настоящему изобретению, применение может включать применение на коже, но настоящее изобретение этим не ограничено.

Косметическая композиция описана в разделе «3: Косметическая композиция, включающая пептид по настоящему изобретению».

Эффективное количество пептида, включающего аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 1, или косметической композиции, включающей пептид, можно применять у субъекта/вводить субъекту, нуждающемуся в этом.

Далее настоящее изобретение будет описано подробно со ссылкой на его примеры получения, примеры и экспериментальные примеры.

Однако следует понимать, что нижеследующие примеры получения, примеры и экспериментальные примеры приведены только с целью иллюстрации настоящего изобретения и не предназначены для ограничения объема настоящего изобретения.

Пример получения 1: получение нового пептида, обладающего различной физиологической активностью

Новую пептидную последовательность «KFLIK», имеющую аминокислотную последовательность, указанную в SEQ ID NO: 1, получали с использованием известного способа. Молекулярная масса нового пептида составила 647,4 Да.

Экспериментальный пример 1: оценка высокотемпературной стабильности пептида

1-1: оценка высокотемпературной устойчивости при длительном хранении

Пептид по настоящему изобретению, имеющий аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 1, растворяли в стерильной дистиллированной воде в концентрации 1000 ppm, хранили при 45°C в течение 7 дней, 14 дней, 28 дней, 60 дней и 75 дней, а затем анализировали с помощью ВЭЖХ.

В результате, как показано на фиг. 1 видно, что стабильность пептида по настоящему изобретению сохранялась в течение максимального времени наблюдения 75 дней в условиях 45°C.

1-2: оценка высокотемпературной устойчивости

Пептид по настоящему изобретению растворяли в стерильной дистиллированной воде до концентрации 1000 ppm, нагревали при 121°C в течение 15 минут и 30 минут, а затем анализировали с помощью ВЭЖХ.

В результате, как показано на фиг. 2 видно, что стабильность пептида по настоящему изобретению поддерживалась при 121°C в течение максимального времени нагревания 30 минут.

Экспериментальный пример 2: подтверждение степени разложения

синтаксина 1A пептидом

Белок рецептора прикрепления растворимого фактора, чувствительного к N-этилmaleимиду (SNARE), участвует в слиянии мембран, происходящем в клетках. Нейрональный SNARE, участвующий в нейротрансмиссии, связан со связыванием синаптических везикул с пресинаптической мембраной. Синаптические везикулы, несущие нейротрансмиттеры при высвобождении нейротрансмиттеров должны сливаться с пресинаптической мембраной, чтобы сформировать канал высвобождения нейротрансмиттеров. В этом случае слияние происходит через SNARE, представленного в виде белкового комплекса. В частности, в слиянии участвует комплекс t-SNARE, который представляет собой комплекс белка SNAP-25 и белка синтаксина 1A, прикрепленного к мембране-мишени, и v-SNARE, прикрепленного к везикулам. Когда процессы конъюгации и скручивания SNARE не завершены полностью, слияние мембран не удается. Поэтому, вследствие того что нейромедиаторы не высвобождаются, мышцы остаются расслабленными. Было подтверждено, обладает ли пептид по настоящему изобретению способностью разлагать синтаксин 1A, составляющий t-SNARE.

2-1: подтверждение степени разложения рекомбинантного синтаксина 1A

В экспериментальной группе в реакционном буферном растворе (50 mM HEPES, 40 mM 2-ME, 20 мкМ ZnCl₂, pH 7,4) обрабатывали 1 мкг рекомбинантного белка синтаксина 1A (Novus bios, США) увеличивающейся концентрацией (20 мкМ, 100 мкМ и 200 мкМ) пептида по настоящему изобретению. В отрицательном контроле (Контроль) в реакционном буферном растворе присутствовал только рекомбинантный белок синтаксин 1A. Полученную смесь оставляли реагировать в течение 4 часов при температуре 37°C, а затем анализировали с помощью вестерн-блоттинга с использованием антитела к синтаксину 1A (Synaptic Systems, Германия).

В результате было подтверждено, что, когда в раствор добавляли пептид по настоящему изобретению, полоса рекомбинантного белка синтаксина 1A уменьшалась за счет действия пептида по настоящему изобретению в зависимости от концентрации по сравнению с отрицательным контролем, где в раствор не добавляли пептид по настоящему изобретению (фиг. 3).

2-2: подтверждение степени разложения эндогенного синтаксина 1A, экспрессированного в клетках

В реакционном буферном растворе (50 mM HEPES, 40 mM 2-ME, 20 мкМ ZnCl₂, pH 7,4) обрабатывали 30 мкг лизата клеток SH-SY5Y увеличивающейся концентрацией (20 мкМ, 100 мкМ и 200 мкМ) пептида по настоящему изобретению. В положительном контроле (BoNT/C LC), 0,2 мкМ легкой цепи ботулинического нейротоксина типа C (BoNT/C LC) использовали вместо пептида по настоящему изобретению, а в случае отрицательного контроля (Контроль) в образце присутствовало только 30 мкг 0 мкг лизата клеток SH-SY5Y. Каждую из смесей оставляли реагировать в течение 4 часов при температуре 37°C. Реакционную смесь анализировали с помощью вестерн-блоттинга с использованием антитела к синтаксину 1A (Synaptic Systems, Германия).

В результате было подтверждено, что, когда в раствор добавляли пептид по настоящему изобретению, полоса рекомбинантного белка синтаксина 1А уменьшалась за счет действия пептида по настоящему изобретению в зависимости от концентрации, как и в положительном контроле, где в раствор добавляли ВоNT/C LC (фиг. 4).

Краткое изложение экспериментального примера 2: Пептид по настоящему изобретению разлагает рекомбинантный синтаксин 1А или эндогенный синтаксин 1А, и, таким образом, комплекс SNARE не образуется. Следовательно, ожидается, что пептид по настоящему изобретению будет иметь эффект миорелаксации, поскольку не будет происходить высвобождения нейромедиаторов.

Экспериментальный пример 3: анализ образования комплекса SNARE

3-1: анализ с использованием вестерн-блоттинга

Было подтверждено, ингибируется ли комплекс SNARE, образующийся в клетках, разложением синтаксина 1А под действием пептида по настоящему изобретению. В частности, после проведения вестерн-блоттинга определяли плотность полосы комплекса SNARE, имеющей ожидаемый размер. Клетки SH-SY5Y высевали с плотностью 3×10^5 клеток/лунку в 6-луночный планшет. После культивирования клеток в течение ночи среду заменяли бессывороточной средой DMEM. Полученный культуральный раствор обрабатывали возрастающей концентрацией (10 мкМ, 50 мкМ и 100 мкМ) пептида по настоящему изобретению. Для положительного контроля раствор обрабатывали 0,2 мкМ ВоNT/C LC. В отрицательном контроле (Контроль) образец не обрабатывали. Через 24 часа после обработки образца клетки собирали и получали лизат, который затем анализировали с помощью вестерн-блоттинга с использованием антитела к синтаксину 1А (Synaptic Systems, Германия). Размер полосы комплекса SNARE составлял 75 кДа.

Исходя из результатов вестерн-блоттинга было замечено, что, когда в раствор добавляли пептид по настоящему изобретению, образование комплекса SNARE в клетках SH-SY5Y ингибировалось, как и в случае положительного контроля, где в раствор добавляли ВоNT/C LC (фиг. 5). Принимая во внимание результаты экспериментального примера 2, ожидалось, что образование комплекса SNARE должно было ингибироваться вследствие разложения синтаксина 1А пептидом по настоящему изобретению.

3-2: анализ с использованием коиммунопреципитации (Co-IP)

Коиммунопреципитацию использовали с целью обнаружения белка, который связывается с другим определенным белком в неденатурирующих условиях. Клетки SH-SY5Y высевали с плотностью 3×10^5 клеток/лунку в 6-луночный планшет. После культивирования клеток в течение ночи среду заменяли бессывороточной средой DMEM. Полученный культуральный раствор обрабатывали пептидом по настоящему изобретению в концентрации 50 мкМ в течение 24 часов. Для положительного контроля раствор обрабатывали 0,2 мкМ ВоNT/C LC. В отрицательном контроле (Контроль) образец не обрабатывали. Был получен клеточный лизат, который иммунопреципитировали с использованием антитела к SNAP-25 (Synaptic Systems, Германия) с последующим вестерн-блоттингом с использованием антитела к SNAP-25 и антитела к синтаксину 1А

(Synaptic Systems, Германия).

В результате было подтверждено, что взаимодействие между SNAP-25 и синтаксином 1A ингибировалось, поскольку образование комплекса SNARE в клетках SH-SY5Y подавлялось добавлением пептида по настоящему изобретению (фиг. 6). На фиг. 6 часть «Исходн. кол-во на IP» представляет количество белка синтаксина 1A и SNAP-25, обнаруженного в клеточном лизате, полученном до IP, а часть «Иммунопреципитация: анти-SNAP-25» представляет результаты, полученные при анализе конечного продукта (полученного после иммунопреципитации с использованием антитела к SNAP-25) с использованием антитела к SNAP-25 или антитела к синтаксину 1A. То есть в «Иммунопреципитации: анти-SNAP-25» панель «SNAP-25» показывает результаты, полученные путем повторного обнаружения SNAP-25, который был преципитирован антителом к SNAP-25 из клеточного лизата, а панель «синтаксин 1A» показывает результаты, полученные при анализе преципитата, который был осажден антителом к SNAP-25 из клеточного лизата, с использованием антитела к синтаксину 1A. Можно видеть, что комплекс SNARE не формировался, потому что количество синтаксина 1A сохранялось в отрицательном контроле (Контроль), где образец не обрабатывали, в панели «синтаксин 1A». И также можно видеть, что образование комплекса SNARE ингибировалось, потому что количество синтаксина 1A было снижено в группе, обработанной пептидом по изобретению, и в группе, обработанной BoNT/C LC.

Краткое содержание экспериментального примера 3:

Можно видеть, что образование комплекса SNARE ингибировалось при обработке пептидом по настоящему изобретению. Рассматривая результаты экспериментального примера 2, можно также заметить, что синтаксин 1A разлагался при воздействии пептида по настоящему изобретению, тем самым ингибируя образование комплекса SNARE. Следовательно, ожидалось, что пептид по настоящему изобретению оказывает эффект миорелаксации, поскольку не высвобождаются нейротрансмиттеры вследствие ингибирования образования комплекса SNARE.

Экспериментальный пример 4: подтверждение ингибирующего действия пептида на секрецию ацетилхолина

Было проверено, оказывает ли пептид по настоящему изобретению, включающий аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 1, ингибирующее действие на секрецию ацетилхолина. Клетки нейробластомы костного мозга человека SH-SY5Y высевали и культивировали в течение 24 часов в CO₂-инкубаторе. Среду заменяли бессывороточной средой, и клетки культивировали в течение 48 часов. Полученный культуральный раствор обрабатывали возрастающей концентрацией (1 мкМ, 10 мкМ и 50 мкМ) пептида по настоящему изобретению, а затем обрабатывали 50 нМ столбнячным токсином в качестве положительного контроля. Кроме того, культуральный раствор обрабатывали никотином (NIC) с хлоридом калия (KCl) в качестве фактора, стимулирующего секрецию ацетилхолина, а затем культивировали в течение 30 минут. Группу, в которой культуральный раствор обрабатывали никотином и хлоридом калия, но не обрабатывали

пептидом по настоящему изобретению или столбнячным токсином, использовали в качестве отрицательного контроля. Когда культивирование было завершено, среду отделяли, и измеряли уровень секреции ацетилхолина в среде с использованием набора для анализа холина/ацетилхолина.

Как показано на фиг. 7, было подтверждено, что пептид по настоящему изобретению концентрационно-зависимо снижает содержание ацетилхолина относительно уровня секретлируемого ацетилхолина в нормальной группе (Контроль). Также было подтверждено, что пептид по настоящему изобретению обладает превосходным ингибирующим действием на секрецию ацетилхолина, когда образец обрабатывали пептидом по настоящему изобретению в концентрации 50 мкМ, по сравнению с положительным контролем, в котором образец обрабатывали столбнячным токсином.

Экспериментальный пример 5: подтверждение влияния на расслабление мышц пальцев ног у мышей

100 мкг пептида по настоящему изобретению вводили в икроножную мышцу 7-недельным самкам мышей C57BL/6, а затем проводили наблюдения. Эффект расслабления мышц определяли с использованием цифровой оценки отведения пальцев (DAS). Отведение относится к движению вытягивания конечностей, и показатель DAS получают путем измерения степени снижения способности у животного реагировать вздрагиванием в икроножной мышце. Оценка DAS имеет диапазон от 0 до 4. В этом случае более высокая оценка означает более высокий эффект расслабления мышц (фиг. 8A). То есть более высокий балл означает, что реакция вздрагивания в большей степени подавляется посредством таких механизмов, как подавление секреции ацетилхолина и т.п. Оценка 0 означает, что все пять пальцев ноги разделены, оценка 1 означает, что два пальца ноги зафиксированы во время отведения, оценка 2 означает, что большой палец и два пальца ноги не разделены, оценка 3 означает, что большой палец и три пальца стопы зафиксированы, а оценка 4 означает, что все пять пальцев стопы зафиксированы.

Как показано на фиг. 8b, реакция вздрагивания наблюдалась перед обработкой пептидом по настоящему изобретению, все пять пальцев ног были разделены, что было оценено в 0 баллов. С другой стороны, действие пептида по настоящему изобретению на расслабление мышц увеличивает баллы DAS через 3 часа после инъекции пептида по настоящему изобретению, и оценка 4 была зарегистрирована через 17 часов после инъекции пептида по настоящему изобретению.

Экспериментальный пример 6: сравнение миорелаксантных эффектов пептида и ботокса

100 мкг пептида по настоящему изобретению и 0,6 единицы ВТХ-А типа (BoNT-A) инъецировали в каждую из икроножных мышц двух 7-недельных самок мышей C57BL/6, а затем проводили DAS-анализ.

Как показано на фиг. 9 и 10, группа, получавшая пептид по изобретению, показала лучший эффект расслабления мышц после 20 часов введения по сравнению с группой,

которой ничего не вводили, и имела эффект, аналогичный эффекту BoNT-A.

Краткое содержание экспериментальных примеров 4-6:

Пептид по настоящему изобретению можно эффективно использовать для облегчения нервно-мышечного заболевания или улучшения морщин, поскольку пептид по настоящему изобретению подавляет секрецию ацетилхолина *in vitro* и демонстрирует эффект расслабления мышц *in vivo*, подобно ботоксу.

Экспериментальный пример 7: подтверждение проникновения пептида в клетки или механизма проникновения в ткань

Конъюгат «родамин-пептид по изобретению», используемый для подтверждения проникновения пептида по настоящему изобретению в клетки или механизма проникновения в ткань, получали следующим образом. 10 мг/мл раствора пептида по настоящему изобретению получали с использованием 100 мМ бикарбоната натрия (pH 9,0). 1 мг/мл раствора NHS-родамина (Thermo Scientific, 46406) получали с использованием диметилформаида. Растворы смешивали таким образом, чтобы молярное соотношение пептида по настоящему изобретению и конъюгата NHS-родамин составляло 1:10. Полученную смесь оставляли реагировать при комнатной температуре в течение часа при переворачивании в защищенном от света месте. Реакционный раствор подвергали диализу и затем анализировали с помощью ЖХ/МС для подтверждения конъюгации между родамином и пептидом по настоящему изобретению.

7-1: подтверждение проникновения пептида в клетки

Клетки SH-SY5Y высевали с плотностью 3×10^5 клеток/лунку в 6-луночный планшет. После культивирования клеток в течение ночи среду заменяли бессывороточной средой DMEM. В культуральный раствор добавляли возрастающие концентрации пептида по настоящему изобретению, меченного флуоресцентным веществом (т.е. родамином), в течение 4 часов. Через 4 часа культуральный раствор обрабатывали 4%-м параформальдегидом для фиксации клеток. После этого ядра клеток окрашивали DAPI с использованием набора для окрашивания DAPI (Invitrogen, США). Проникновение пептида в клетки наблюдали с помощью флуоресцентного микроскопа. Синий цвет представляет собой ядра клеток, окрашенных DAPI, а красный цвет представляет собой конъюгат «пептид по изобретению-родамин».

Как показано на фиг. 11, было подтверждено, что пептид по настоящему изобретению проникал в клетки SH-SY5Y, когда в культуральный раствор добавляли пептид по настоящему изобретению.

7-2: подтверждение механизма проникновения пептида в ткань

Со спинки 7-недельной крысы SD удаляли шерсть, и на спинку крысы наносили родамин и пептид по настоящему изобретению. Через час крысу забивали для анализа. Область кожной ткани, на которую наносили препараты, собирали и фиксировали в формалине в течение суток. Из фиксированной ткани получали парафиновый блок, и приготавливали срезы на микротоме, которые затем иммуногистохимически окрашивали с использованием антитела к нейрональному маркеру TrkB (Cell Signaling, США). После

этого окрашивали ядра клеток с использованием набора для окрашивания DAPI (Invitrogen, США). Проникновение пептида в клетки наблюдали с помощью флуоресцентного микроскопа. Синий представляет ядра клеток, окрашенных DAPI, красный представляет конъюгат «пептид по изобретению-родамин», а зеленый представляет TrkB (маркер нервных волокон).

На основе полученных результатов было подтверждено, что пептид по настоящему изобретению проникал в мышечную оболочку кожной ткани, когда кожу обрабатывали пептидом по настоящему изобретению, как показано на фиг. 12. Также было подтверждено, что пептид по настоящему изобретению локализовался совместно с нейрональным маркером. При увеличении изображения на фиг. 12 было подтверждено, что пептид по настоящему изобретению и нейроны вокруг волосяных фолликулов или сальных желез имели совместную локализацию (фиг. 13 и 14).

Краткое содержание экспериментального примера 7:

Пептид по настоящему изобретению может проникать в клетки, проникает в мышечную оболочку кожной ткани и локализуется вместе с нейрональным маркером в мышечной оболочке. Следовательно, ожидается, что пептид по настоящему изобретению участвует в образовании комплекса SNARE, участвующего в доставке нейротрансмиттеров нейронов, тем самым проявляя эффект расслабления мышц.

Экспериментальный пример 8: подтверждение эффекта пептида на уменьшение морщин (повышенная экспрессия дермальных компонентов)

Раствор липосом, включающий 4000 ppm пептида по настоящему изобретению, наносили на спинку 7-недельной лысой мыши в возрасте дважды в день в течение всего 12 недель. После того как область нанесения наблюдалась невооруженным глазом, кожную ткань собирали и фиксировали в формалине. Из фиксированной ткани готовили парафиновый блок и нарезали на микротоме для подготовки предметных стекол.

8-1: подтверждение эффекта уменьшения морщин

В группе мышей, которым в течение 12 недель наносили раствор липосом, включающий пептид по настоящему изобретению, за животными наблюдали невооруженным глазом и проводили наблюдения под микроскопом. В результате было замечено, что морщины значительно уменьшались в результате эффекта миорелаксации у всех мышей по сравнению с контрольной группой, которой наносили только раствор липосом (фиг. 15 и 16).

8-2: оценка уровня экспрессии коллагена

Срезы тканей окрашивали с использованием набора для трехцветного окрашивания по Массону (Abscam, США), а затем наблюдали с помощью оптического микроскопа.

Было подтверждено, что уровень экспрессии коллагена увеличился в группе мышей, которым наносили раствор липосом, включающий пептид по настоящему изобретению, в течение 12 недель, по сравнению с контрольной группой, которой наносили только раствор липосом (фиг. 17).

8-3: оценка уровня экспрессии эластина и фибронектина

Срезы тканей иммуногистохимически окрашивали с использованием антител к эластину и антител к фибронектину (Cell signaling, США) с последующим окрашиванием ядер с использованием набора для окрашивания DAPI (Invitrogen, США). Окрашенные слайды ткани наблюдали с помощью флуоресцентного микроскопа.

Было подтверждено, что уровни экспрессии эластина и фибронектина увеличивались в группе мышей, которым наносили раствор липосом, включающий пептид по настоящему изобретению, в течение 12 недель, по сравнению с контрольной группой, которой наносили только раствор липосом (фиг. 18 и 19).

Экспериментальный пример 9: подтверждение ингибирующего действия пептида на продукцию кожного сала

Раствор липосом, включающий 4000 ppm пептида по настоящему изобретению, наносили на спинку голыи мыши в возрасте 7 недель дважды в день в течение всего 12 недель. После того как нанесенная область наблюдалась невооруженным глазом, кожную ткань собирали и фиксировали в формалине. Из фиксированной ткани готовили парафиновый блок и нарезали на микротоме для подготовки предметных стекол. Срезы ткани иммуногистохимически окрашивали с использованием антитела к синтазе жирных кислот (Cell Signaling, США) в качестве маркера, связанного с выработкой кожного сала, и окрашенные слайды ткани наблюдали с помощью оптического микроскопа.

Было подтверждено, что количество сальных желез и уровень экспрессии маркера, связанного с выработкой кожного сала, был снижен в группе мышей, которым наносили липосомный раствор, включающий пептид по настоящему изобретению, в течение 12 недель, по сравнению с контрольной группой, которой наносили только раствор липосом (фиг. 20). На левой панели фиг. 20 показаны результаты, полученные при нанесении липосом, не включающих пептид, в течение 12 недель, а на правой панели показаны результаты, полученные при нанесении липосом, содержащей 4000 ppm пептида, в течение 12 недель. На этой фиг. можно видеть, что коричневые иммуноокрашенные участки были блеклыми и количество иммуноокрашенных участков уменьшалось при нанесении липосом с пептидом.

Пример получения 2: изготовление косметического состава

2-1: изготовление эссенции

Эссенцию изготавливали с использованием пептида по настоящему изобретению исходя из содержания (частей по весу), приведенного в нижеследующей таблице 1.

[Таблица 1]

Композици	Содержание (части по весу)
Триэтаноламин	0,25
Карбоксивиниловый полимер	0,22
Глицерин	4
Бутиленгликоль	2
Пептид по изобретению	1,5

Пчелиный воск	0,5
Цетостеариловый спирт	1
Глицерил моностеарат	1
Сквален	4
Очищенная вода	Нужное количество

2-2: изготовление тоника

Тоник, включающий пептид по настоящему изобретению в качестве действующего ингредиента, изготавливали, как указано в нижеследующей таблице 2.

[Таблица 2]

Базовые вещества	Содержание (части по весу)
1,3-бутиленгликоль	1,00
Динатриевая соль ЭДТА	0,05
Аллантоин	0,10
Глицирризинат калия	0,05
Лимонная кислота	0,01
Цитрат натрия	0,02
Глицерет-26	1,00
Арбутин	2,00
Масло касторовое гидрогенизированное ПЭГ-40	1,00
Этанол	30,00
Пептид по изобретению	1,5
Краситель	Следовое количество
Ароматизатор	Следовое количество
Очищенная вода	До нужного объема

2-3: изготовление питательного крема

Питательный крем, включающий пептид по настоящему изобретению в качестве действующего ингредиента, изготавливали на основе композиций, перечисленных в нижеследующей таблице 3.

[Таблица 3]

Базовые вещества	Содержание (части по весу)
1,3-Бутиленгликоль	7,0
Глицерин	1,0
D-пантенол	0,1
Силикат магния и алюминия	0,3

ПЭГ-40 стеарат	1,2
Стеариновая кислота	2,0
Полисорбат 60	1,5
Глицерилстеарат, липофильный	2,0
Сорбитана сесквиолеат	1,5
Цетеариловый спирт	3,0
Минеральное масло	4,0
Сквален	3,8
Пептид по изобретению	1,5
Растительное масло	1,8
Диметикон	0,4
Глицирризата калия	Следовое количество
Аллантоиновый	Следовое количество
гиалуроната натрия	Следовое количество
Токоферилацетат	Нужное количество
Триэтаноламин	Нужное количество
Ароматизатор	Нужное количество
Очищенная вода	До нужного объема

2-4: изготовление лосьона

Лосьон, содержащий пептид по настоящему изобретению в качестве действующего ингредиента, изготавливали на основе композиций, перечисленных в следующей таблице 4.

[Таблица 4]

Базовые вещества	Содержание (части по весу)
Цетостеариловый спирт	1,6
Стеариновая кислота	1,4
Глицерат моностеариновой кислоты, липофильный	1,8
Стеарат ПЭГ-100	2,6
Сорбитана сесквиолеат	0,6
Сквален	4,8
Масло макадамии	2
Масло жожоба	2
Токоферола ацетат	0,4
Метилполисилоксан	0,2

Токоферола ацетат	0,4
1,3-Бутиленгликоль	4
Ксантановая камедь	0,1
Глицерин	4
D-пантенол	0,15
Пептид по изобретению	1,0
Аллантоин	0,1
Карбомер (2%-й водн. раствор)	4
Триэтаноламин	0,15
Этанол	3
Очищенная вода	Нужное количество

Пример получения 3: изготовление фармацевтической композиции

3-1: изготовление порошка

Пептид по изобретению	2 г
Лактоза	1 г

Для изготовления порошка компоненты смешивали, а затем помещали в герметичную упаковку.

3-2: изготовление таблетки

Пептид по изобретению	100 мг
Кукурузный крахмал	100 мг
Лактоза	100 мг
Стеарат магния	2 мг

Чтобы изготовить таблетку в соответствии с обычным способом приготовления таблетки, компоненты смешивали, а затем прессовали таблетку.

3-3: изготовление капсулы

Пептид по изобретению	100 мг
Кукурузный крахмал	100 мг
Лактоза	100 мг
Стеарат магния	2 мг

Для получения капсулы в соответствии с обычным способом изготовления капсулы, компоненты смешивали, а затем заполняли желатиновую капсулу.

3-4: изготовление пилюли

Пептид по изобретению	1 г
Лактоза	1,5 г
Глицерин	1 г
Ксилит	0,5 г

Компоненты смешивали, а затем обрабатывали в соответствии с обычным способом изготовления пилюли, чтобы компоненты были включены в количестве 4 г на пилюлю.

3-5: изготовление гранул

Пептид по изобретению	150 мг
Экстракт сои	50 мг
Глюкоза	200 мг
Крахмал	600 мг

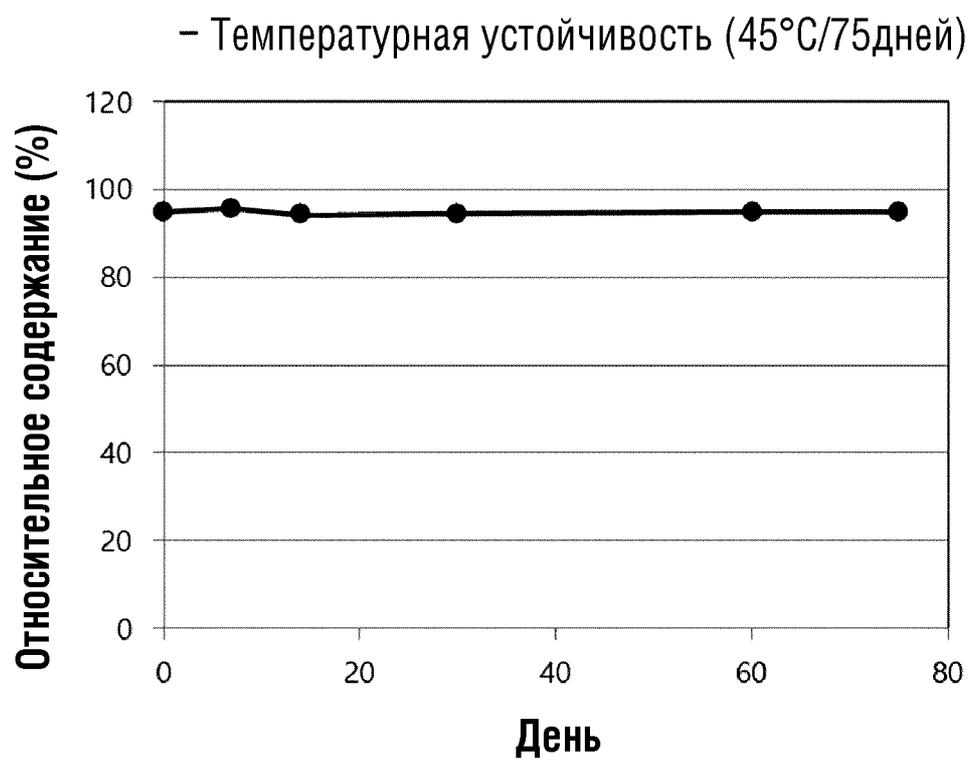
Компоненты смешивали, а затем к ним добавляли 100 мг 30%-го этанола. Полученную смесь сушили при температуре 60°C по Цельсию, получая гранулы, которые затем помещали в упаковку.

ФОРМУЛА ИЗОБРЕТЕНИЯ

1. Пептид, содержащий аминокислотную последовательность, указанную в SEQ ID NO: 1.
2. Фармацевтическая композиция для расслабления мышц, содержащая пептид по п. 1 в качестве действующего ингредиента.
3. Фармацевтическая композиция по п. 2, где пептид включен в количестве от 0,001% по весу до 60% по весу, исходя из 100% по весу фармацевтической композиции для расслабления мышц.
4. Фармацевтическая композиция по п. 2, которая используется для профилактики или лечения нервно-мышечного заболевания.
5. Фармацевтическая композиция по п. 4, где нервно-мышечное заболевание включает любое заболевание, выбранное из группы, состоящей из подергивания век, кривошеи, цервикальной дистонии, тонического блефароспазма, подмышечного гипергидроза, анальной трещины, кольпоспазма, ахалазии, головной боли, идиопатической и нейрогенной детрузорной гиперактивности, фокальной дистонии, боли/нарушений в височно-нижнечелюстном суставе, диабетической нейропатии, дисфункции голосовых связок, косоглазия, хронической нейропатии, гипертрофии лицевых мышц, детрузорносфинктерной диссинергии и доброкачественной гиперплазии простаты.
6. Фармацевтическая композиция по п. 5, где головная боль представляет собой мигрень.
7. Фармацевтическая композиция по п. 2, где пептид подавляет секрецию ацетилхолина.
8. Косметическая композиция для улучшения состояния кожи, содержащая пептид по п. 1 в качестве действующего ингредиента.
9. Косметическая композиция по п. 8, которая используется для улучшения морщин кожи, подавления выработки кожного сала или уменьшения акне.
10. Косметическая композиция по п. 8, где пептид включен в количестве от 0,001% по весу до 60% по весу, исходя из 100% по весу косметической композиции.
11. Косметическая композиция по п. 8, где пептид увеличивает экспрессию коллагена.

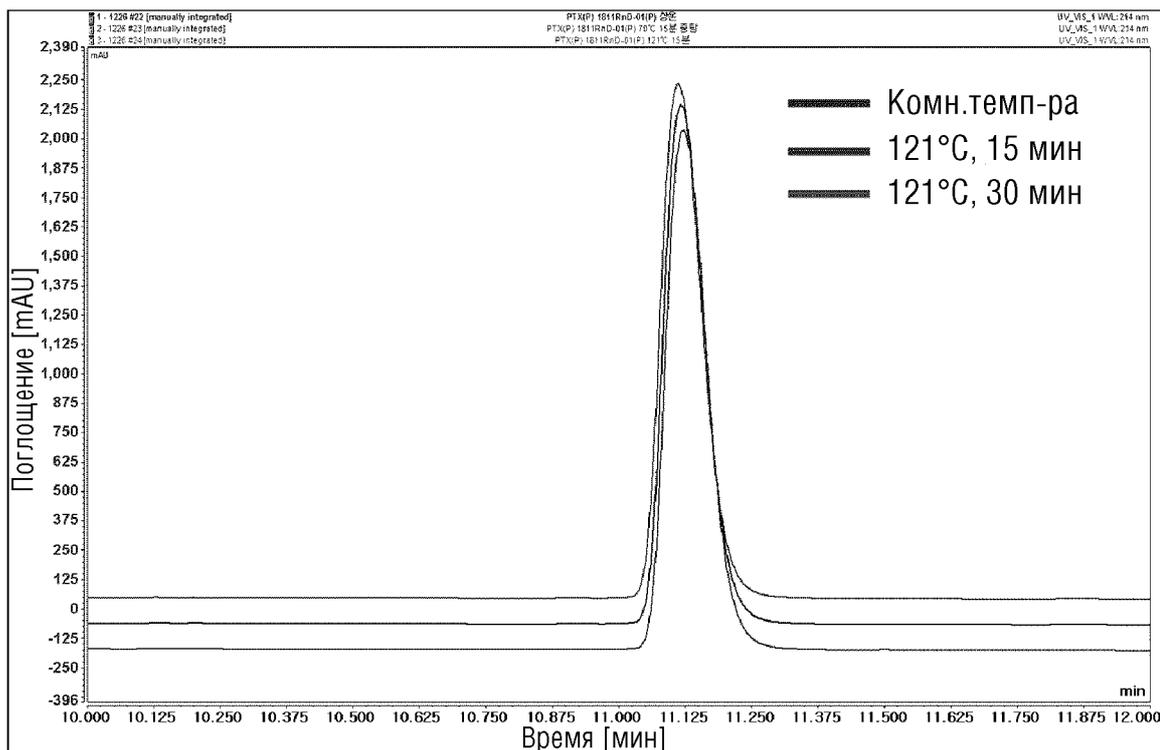
По доверенности

ФИГ.1



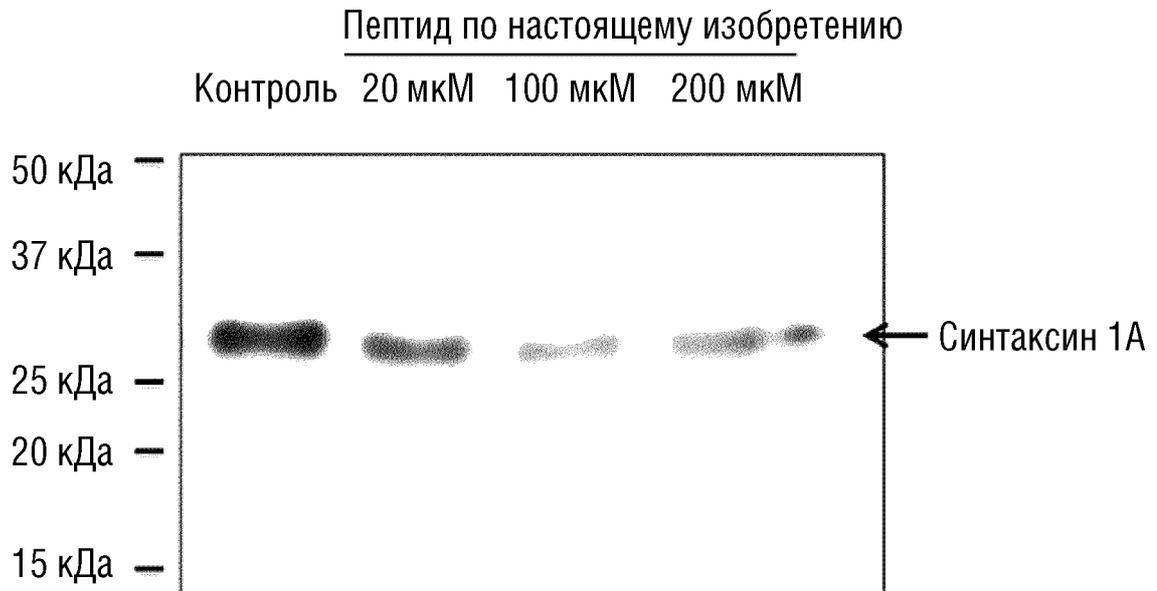
ФИГ.2

– Температурная устойчивость (121°C/15 мин)



Обработка	Линия пика	Относительные %
Стандарт	Красный	100%
121°C/15 мин	Синий	101,2%
121°C/30 мин	Зеленый	101,2%

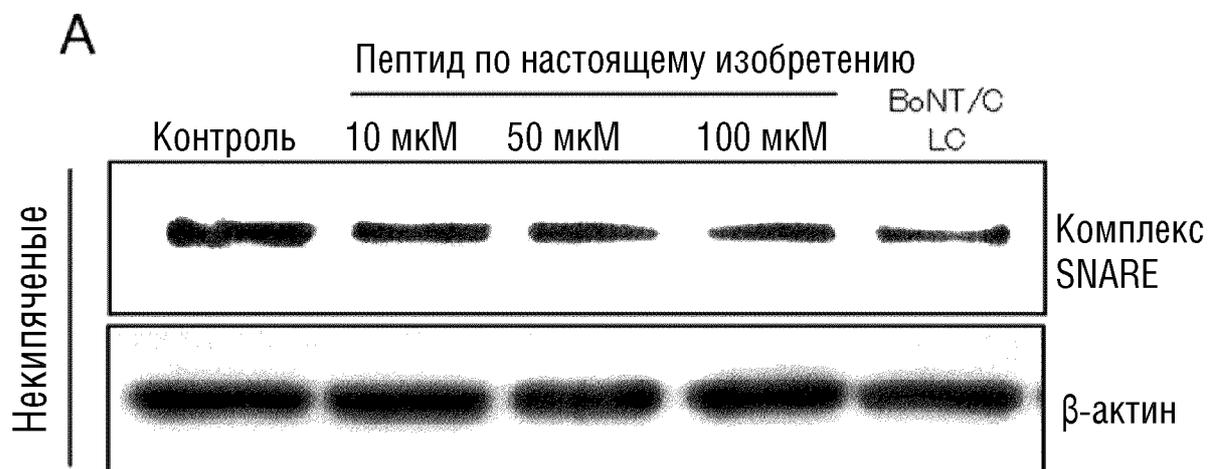
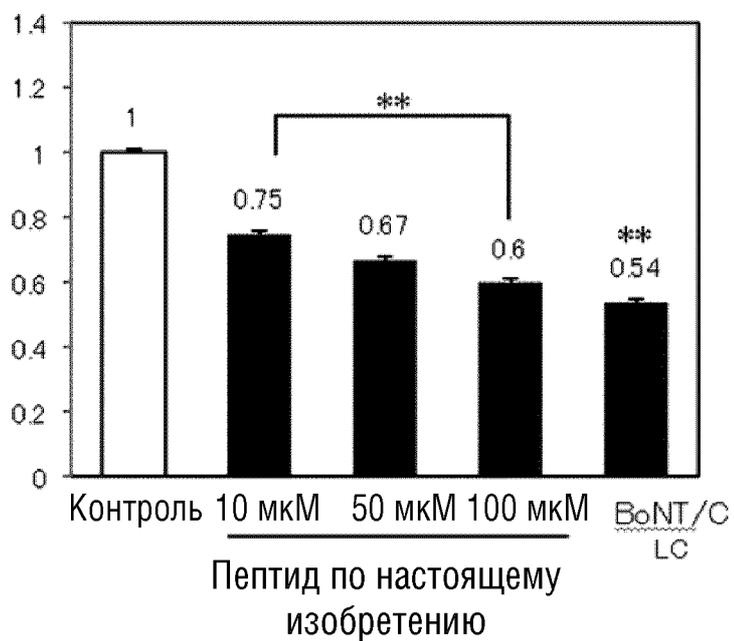
ФИГ.3



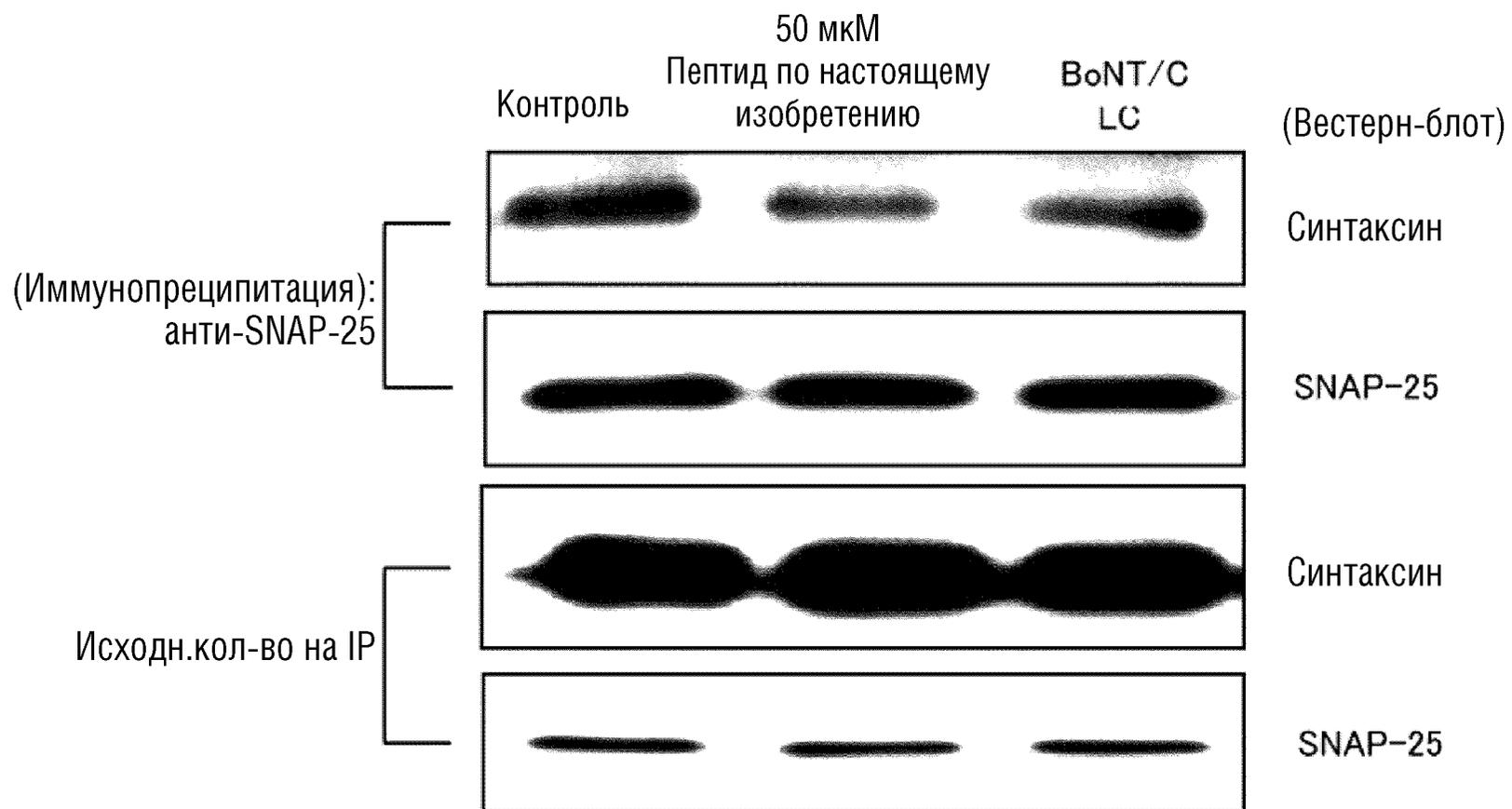
ФИГ.4



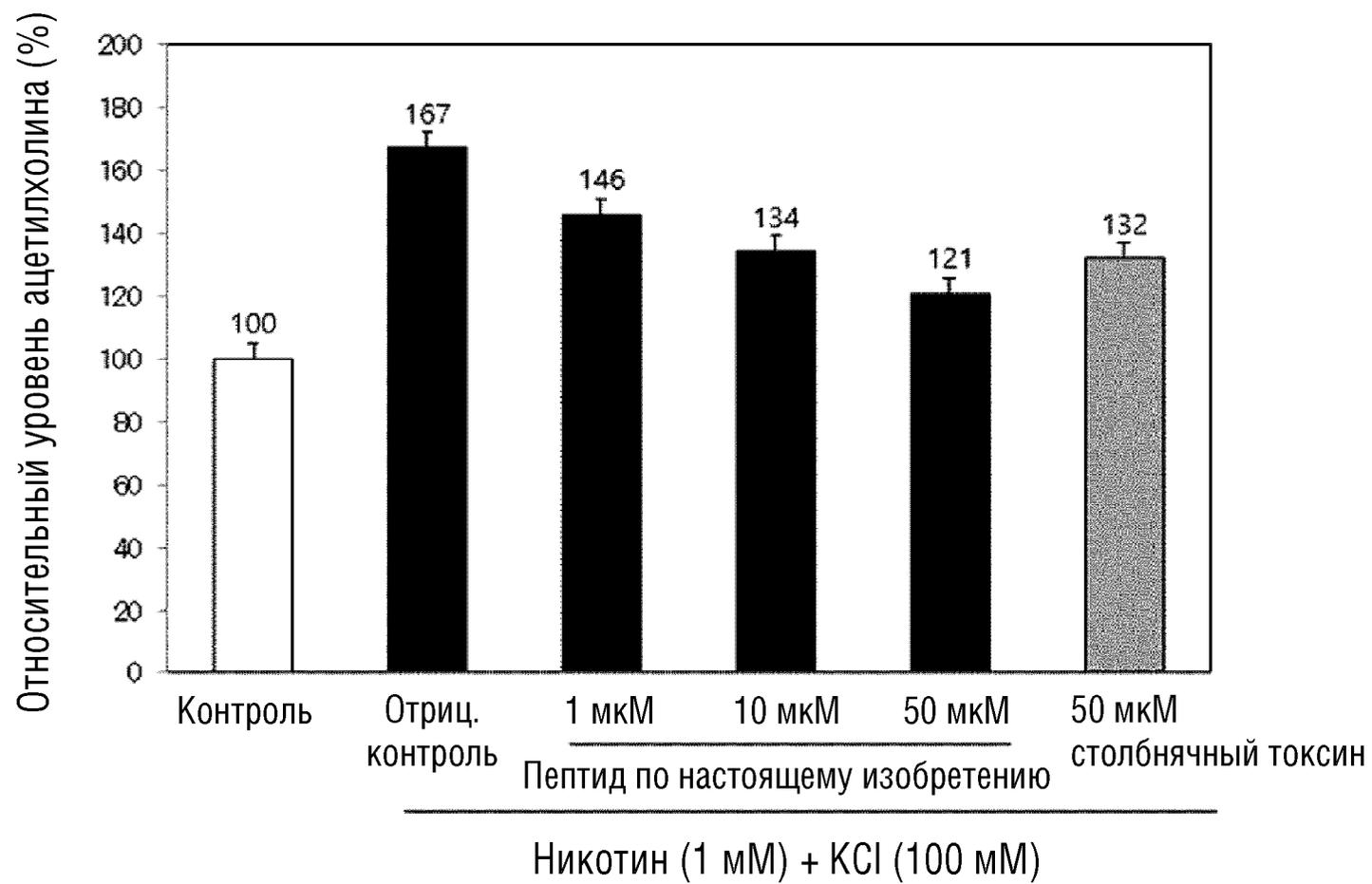
ФИГ.5

**B**

ФИГ.6



ФИГ.7



ФИГ.8

А



4

3

2

1

0

Оценка DAS

В

Перед

3 ч

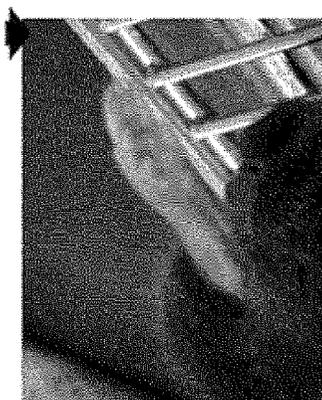
7 ч



17 ч

25 ч

30 ч



ФИГ.9

A



4
3
2
1
0

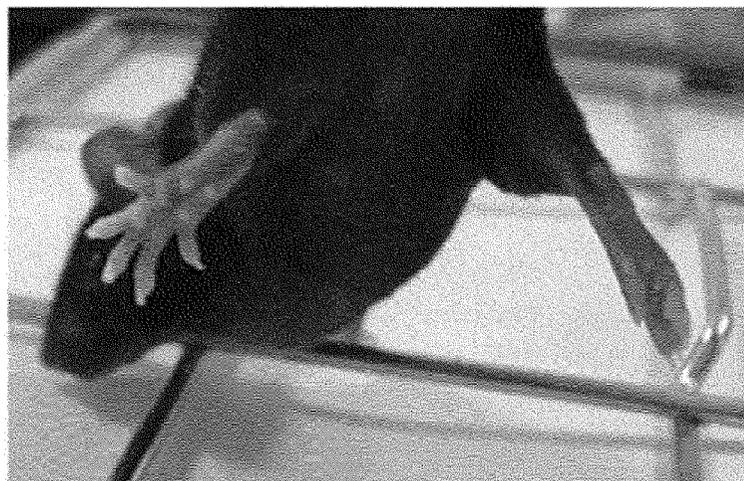
Оценка DAS

B



Контроль

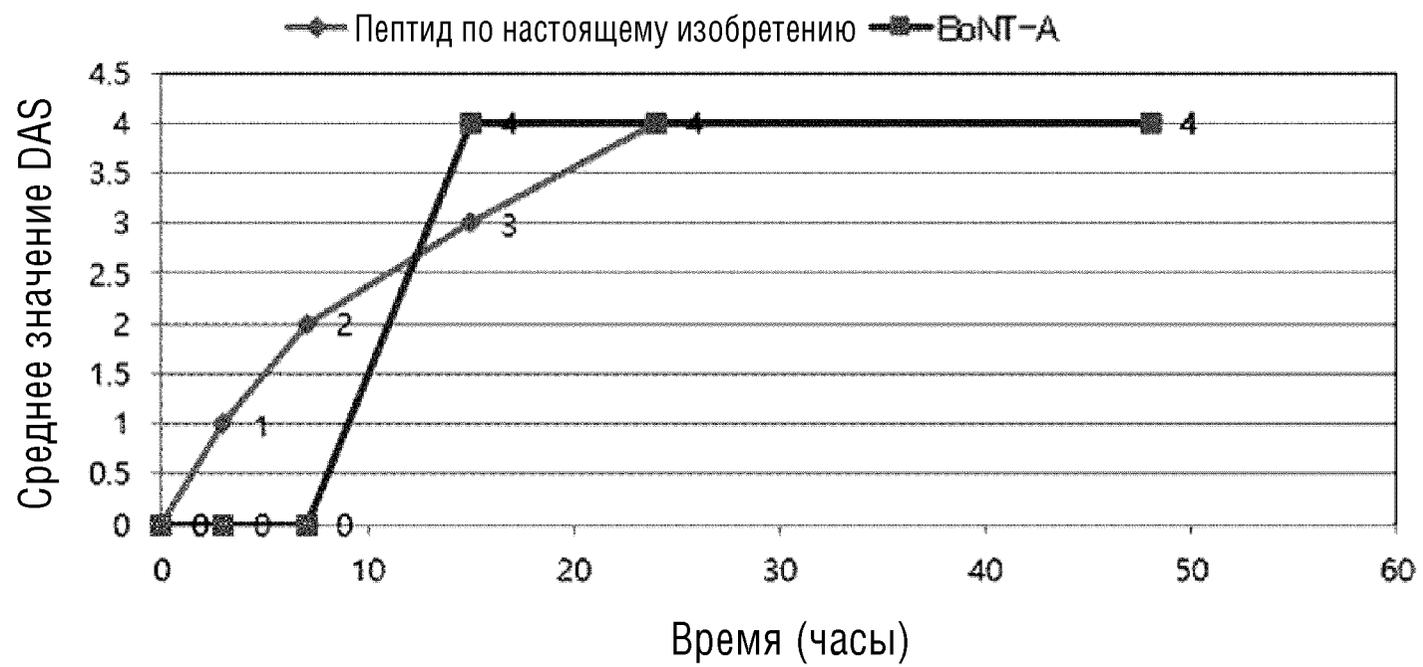
BoNT-A



Контроль

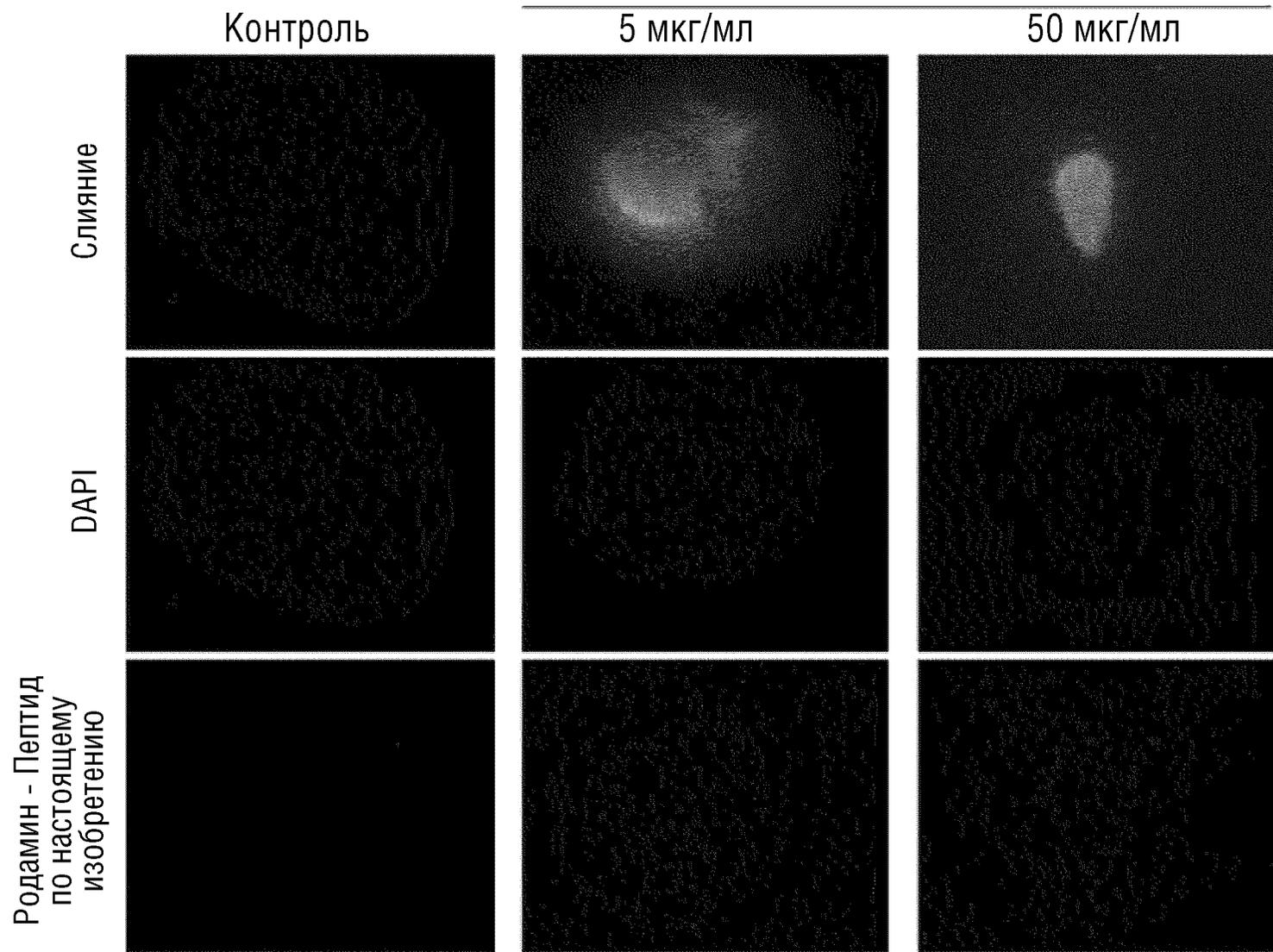
Пептид по настоящему изобретению

ФИГ.10

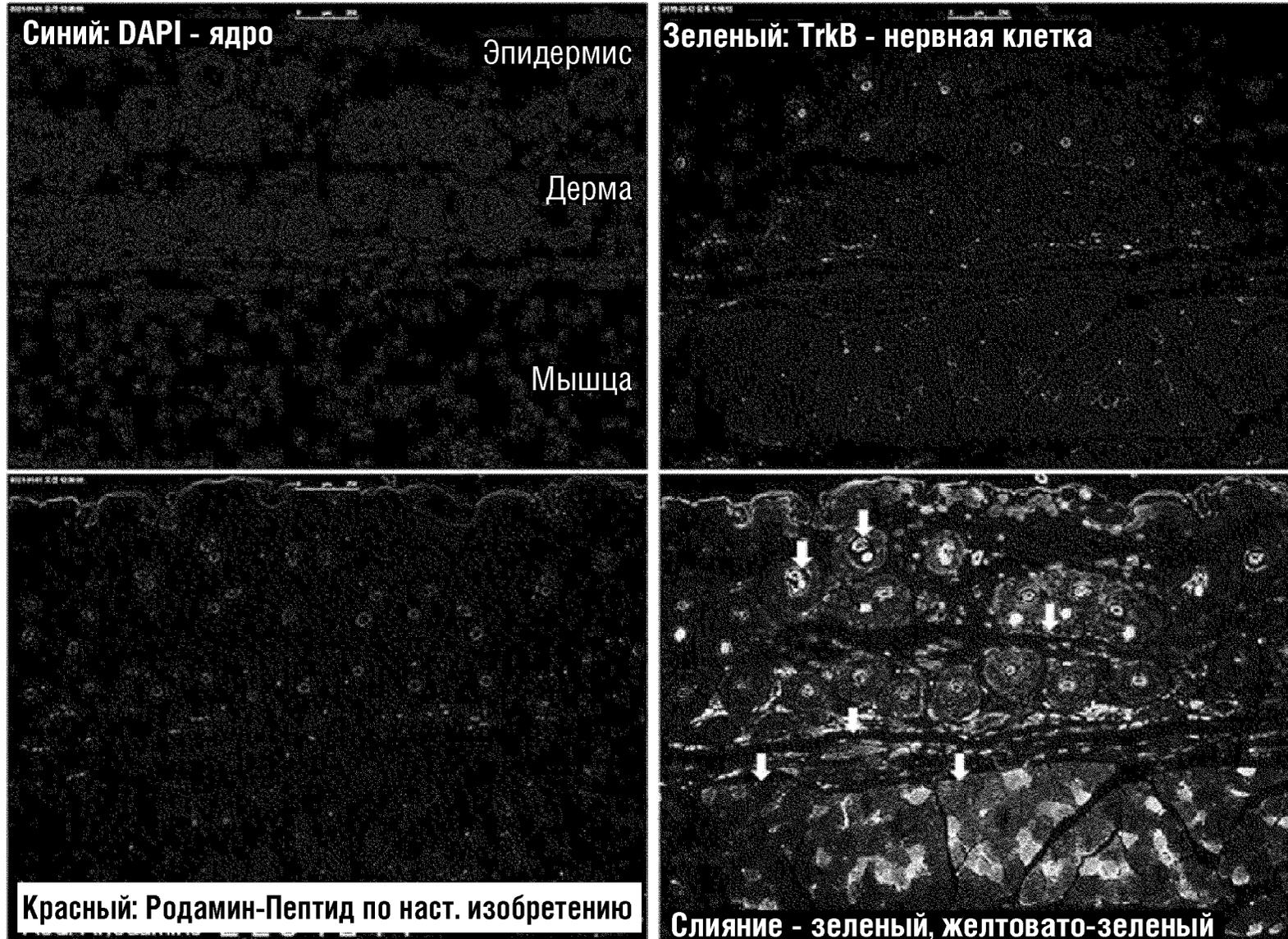


ФИГ.11

Родамин - Пептид по настоящему изобретению



ФИГ.12

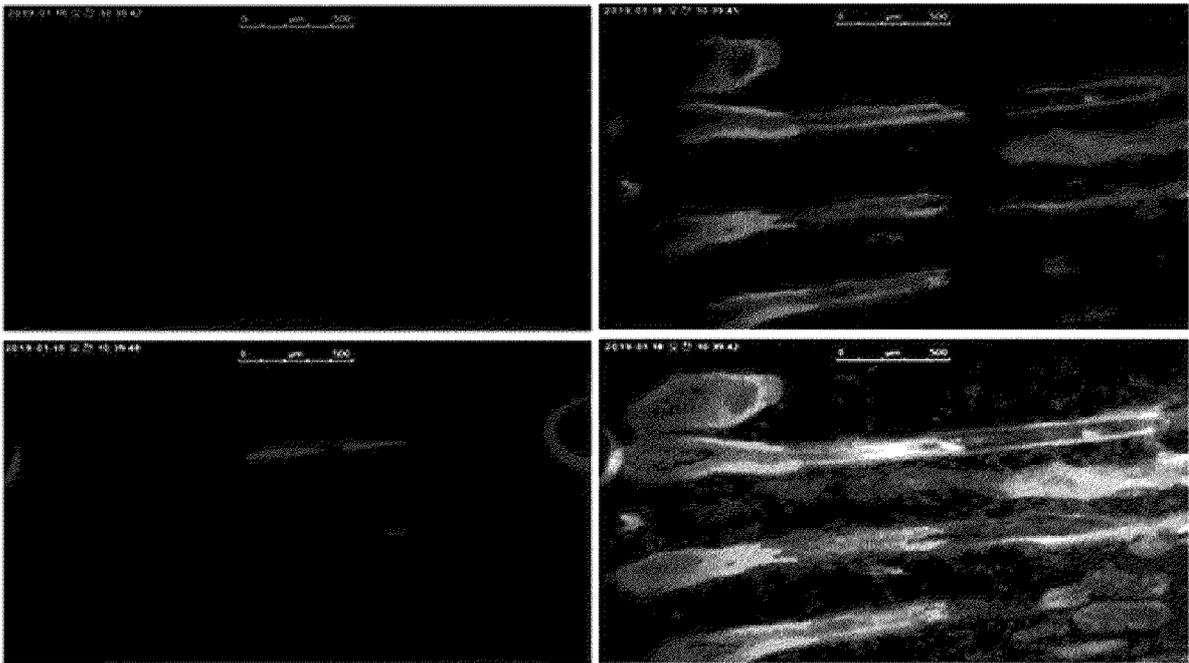


ФИГ.13

Волосной фолликул

Синий: DAPI

Зеленый: FITC_нервная клетка



Красный: Родамин-Пептид по настоящему изобретению

Слияние

ФИГ.14

Сальная железа

Синий: DAPI



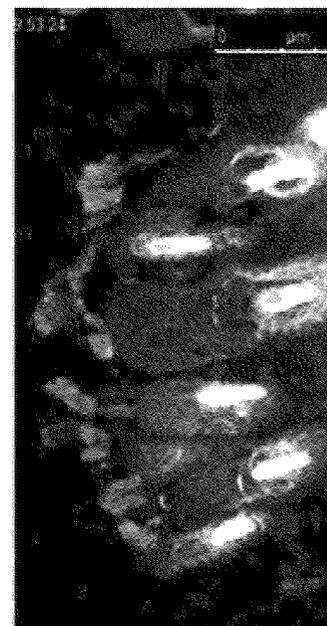
Зеленый: FITC_
нервная клетка



Красный: Пептид
по настоящему
изобретению



Слияние



ФИГ.15

Липосомный контроль

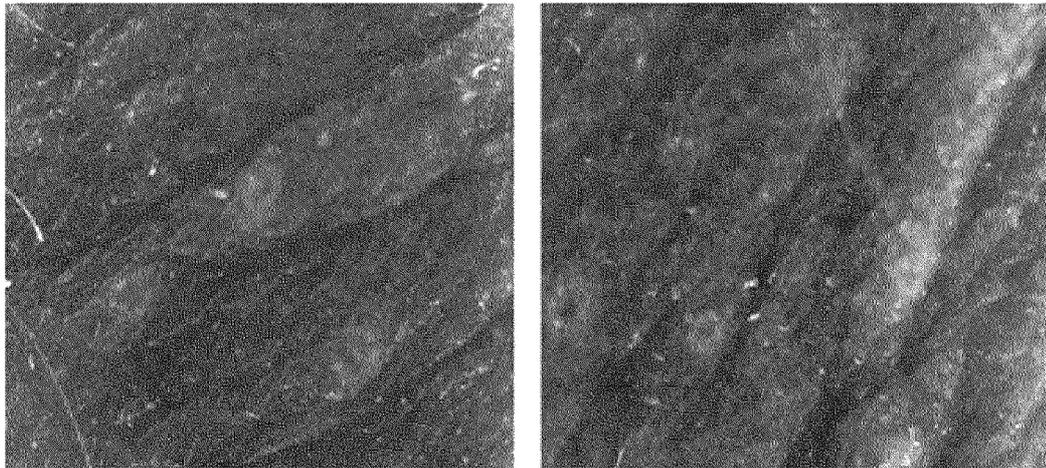


Липосомный раствор пептида по настоящему изобретению

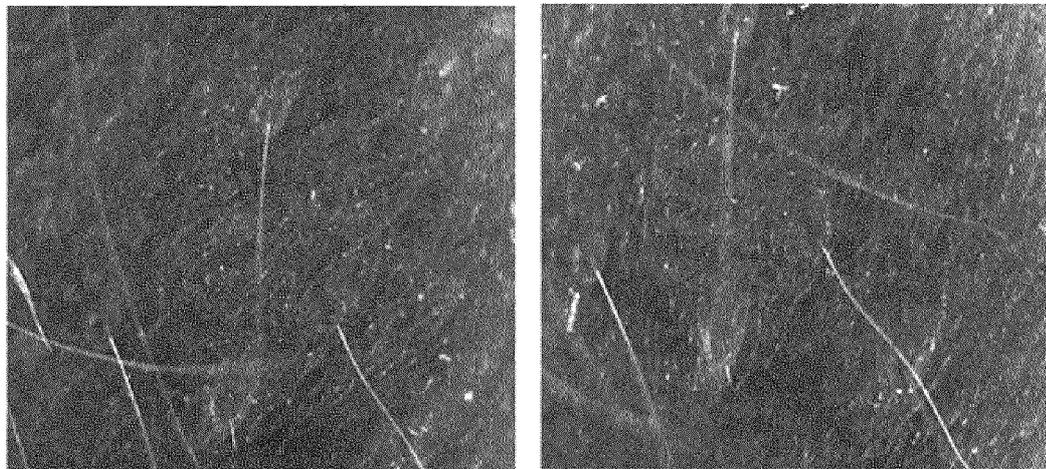


ФИГ.16

Липосомный контроль

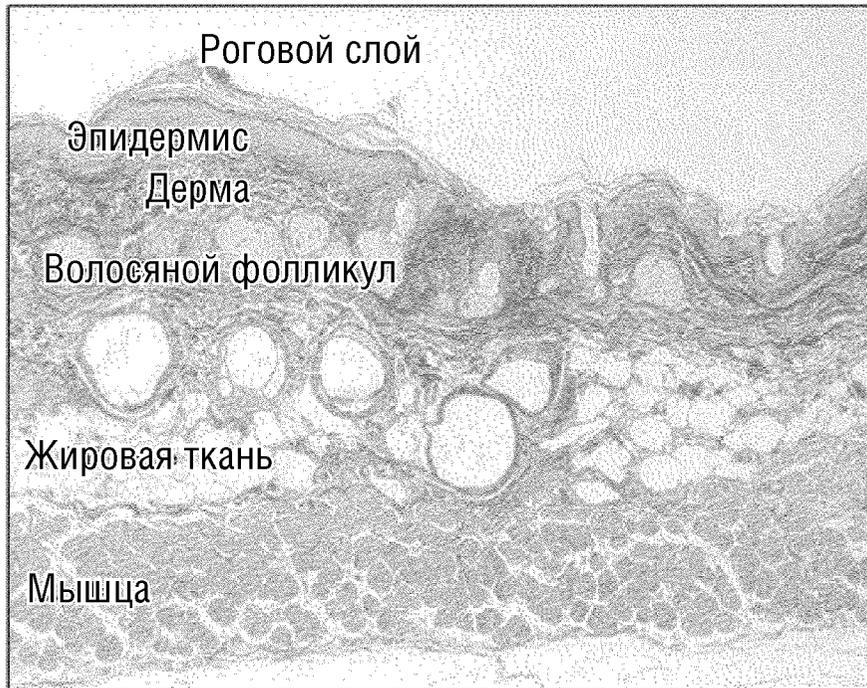


Липосомный раствор пептида по настоящему изобретению

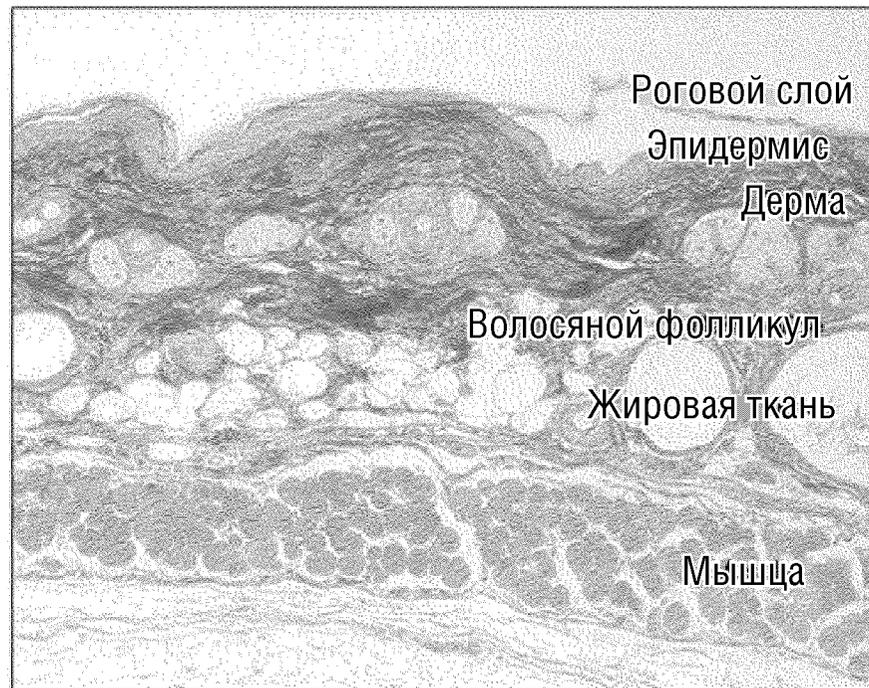


ФИГ.17

Липосомный контроль



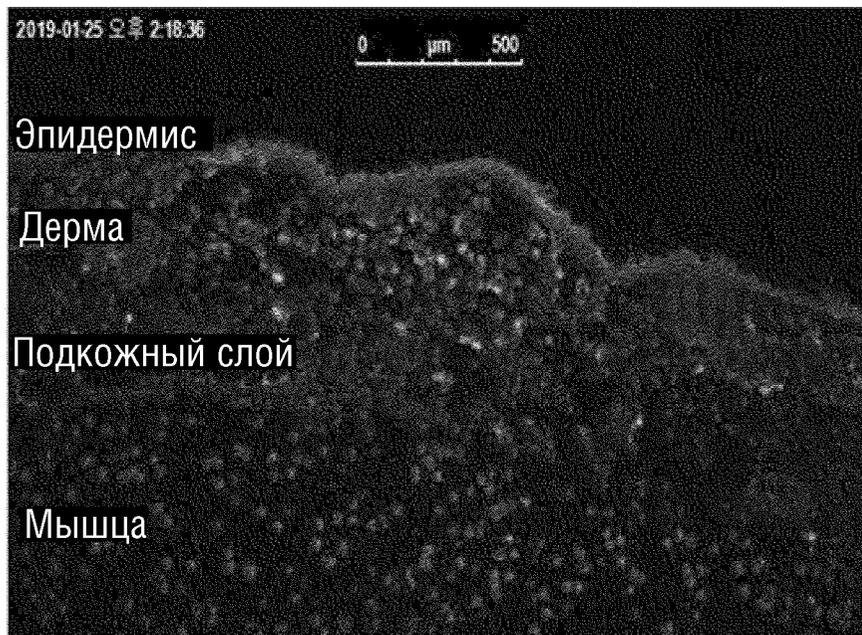
Липосомный раствор пептида по настоящему изобретению



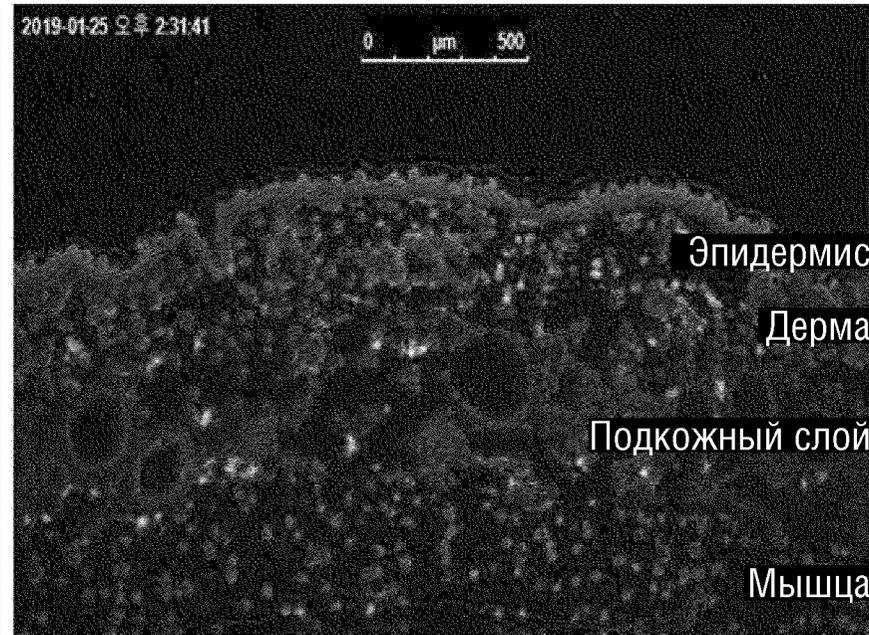
Синий: collagen

ФИГ.18

Липосомный контроль



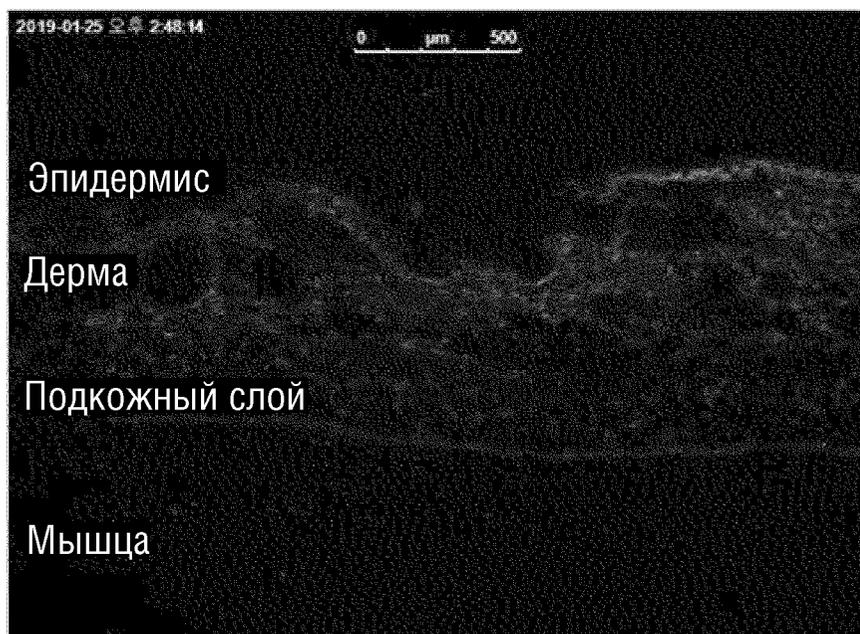
Липосомный раствор пептида по настоящему изобретению



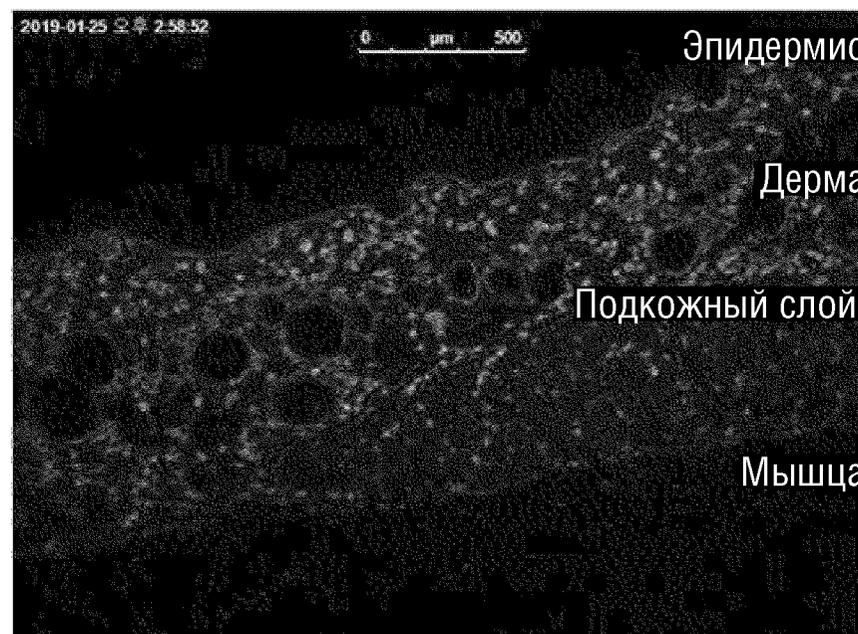
Синий: ядра Красный: эластин

ФИГ.19

Липосомный контроль



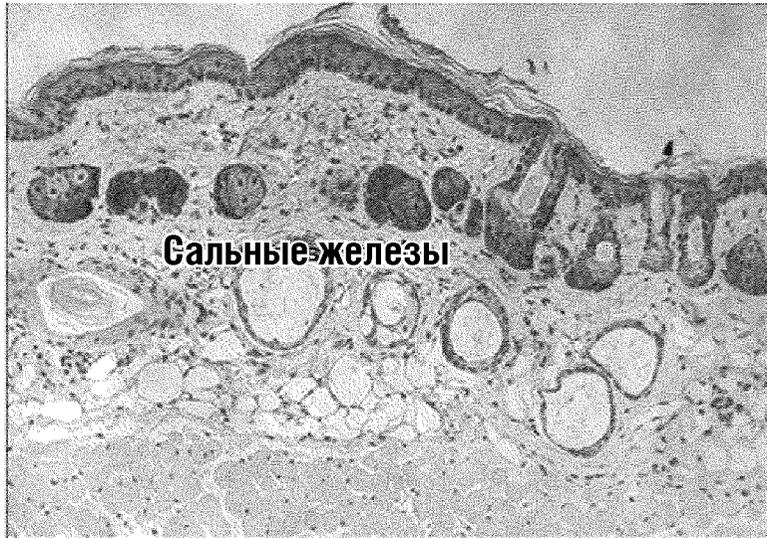
Липосомный раствор пептида по настоящему изобретению



Синий: ядра Красный: фибронектин

ФИГ.20

Липосомный контроль



Эпидермис

Дерма

Жировая ткань

Мышца

Сальные железы

Липосомный раствор пептида по настоящему изобретению



Сальные железы

X100