



## (12)发明专利

(10)授权公告号 CN 105491982 B

(45)授权公告日 2019.09.10

(21)申请号 201480044721.0

保罗·D·怀特曼

(22)申请日 2014.08.12

(74)专利代理机构 中科专利商标代理有限责任公司 11021

(65)同一申请的已公布的文献号

申请公布号 CN 105491982 A

代理人 吴小明

(43)申请公布日 2016.04.13

(51)Int.Cl.

(30)优先权数据

61/864,964 2013.08.12 US

C07K 7/06(2006.01)

C07K 7/00(2006.01)

A61K 38/00(2006.01)

(85)PCT国际申请进入国家阶段日

2016.02.05

(56)对比文件

CN 1879888 A, 2006.12.20,

CN 103201386 A, 2013.07.10,

CN 102247603 A, 2011.11.23,

CN 102225206 A, 2011.10.26,

CN 101395180 A, 2009.03.25,

CN 103145799 A, 2013.06.12,

KR 10-2012-0104036 A, 2012.09.20,

(86)PCT国际申请的申请数据

PCT/US2014/050683 2014.08.12

(87)PCT国际申请的公布数据

W02015/023649 EN 2015.02.19

(73)专利权人 3M创新有限公司

地址 美国明尼苏达州

审查员 许珊萍

(72)发明人 戴明华

德米特里·V·斯米尔诺夫

权利要求书1页 说明书18页

(54)发明名称

用于增强透皮递送的肽

(57)摘要

本发明公开了包含肽的皮肤渗透增强剂。本发明也提供了包含该皮肤渗透增强剂的组合物。该组合物还包含活性剂,诸如药物活性剂、疫苗、美容剂和营养补充剂。本发明还提供了透皮递送药物活性剂、疫苗、美容剂或营养补充剂的方法。

1. 一种包含肽的皮肤渗透增强剂,其中所述肽的氨基酸序列如SEQ ID NO:1中所示。
2. 一种组合物,所述组合物包含权利要求1所述的皮肤渗透增强剂和活性剂,其中所述活性剂选自药物活性剂、美容剂和营养补充剂。
3. 根据权利要求2所述的组合物,其中所述活性剂为抗体、降脂化合物、治疗性蛋白质、毛发生长加速或刺激剂、毛发去除化合物或维生素。
4. 根据权利要求2所述的组合物,其中所述活性剂为包含带电小分子或蛋白质的药物活性剂。
5. 根据权利要求4所述的组合物,其中所述药物活性剂选自胰岛素、黄体化激素释放激素或脱氧胆酸钠。
6. 根据权利要求2所述的组合物,其中所述活性剂为真皮填充剂。
7. 根据权利要求6所述的组合物,其中所述真皮填充剂选自胶原、胶原模拟物、弹性蛋白、纤维蛋白、纤连蛋白、腱生蛋白、维生素A、多糖、氨基酸均质共聚物、黑色素、黑色素衍生物、天然或合成的颜料、以及它们的组合。
8. 根据权利要求7所述的组合物,其中所述多糖为脱乙酰壳多糖、软骨素、糖胺聚糖、蛋白聚糖、或它们的组合。
9. 根据权利要求7所述的组合物,其中所述真皮填充剂为透明质酸(HA)。
10. 根据权利要求6所述的组合物,其中所述真皮填充剂为聚赖氨酸、聚丙烯酰胺、聚乙二醇、聚乳酸、或它们的组合。
11. 根据权利要求2所述的组合物,其中所述活性剂为药物活性剂,并且所述组合物包含药学上可接受的赋形剂,其中所述药学上可接受的赋形剂以洗剂、霜膏或贴片的形式提供组合物。
12. 根据权利要求2所述的组合物,其中所述活性剂为疫苗。
13. 一种透皮递送美容剂或营养补充剂的方法,所述方法包括向对其有需要的受试者的皮肤施用组合物,所述组合物包含:  
载体,其选自美容上可接受的载体或营养上可接受的载体;  
活性剂,其选自美容剂或营养补充剂;和  
权利要求1所述的皮肤渗透增强剂。
14. 一种非治疗目的的令对其有需要的受试者的皮肤光滑的方法,所述方法包括使所述皮肤与有效量的权利要求2所述的组合物接触。
15. 一种非治疗目的的使有需要的受试者的皱纹光滑的方法,所述方法包括使所述皱纹与有效量的权利要求2所述的组合物接触。
16. 一种非治疗目的的用于对其有需要的受试者丰唇的方法,所述方法包括使所述唇与有效量的权利要求2所述的组合物接触。

## 用于增强透皮递送的肽

[0001] 本申请已与其序列表(文件名为Sequence\_Listing\_74320US002.TXT,2014年8月11日创建)相关联。此序列表文件包含4,556字节并且其全文以引用方式并入本文。

### 背景技术

[0002] 皮肤提供了许多药物(包括全身药物)理想的递送部位。经皮肤的药物递送可能是无痛的且提供持续的释放,从而提高了患者的顺从性。经皮肤递送的全身药物不经历首过代谢,并且皮肤递送可允许药物(诸如类似抗体和疫苗的蛋白质基药物)的全身治疗,这些药物可另外易于在胃肠道中降解或吸收。

[0003] 此外,改善皮肤健康或增强皮肤外观的美容成分也必须横穿皮肤的最外层(角质层)递送。然而,皮肤的有效环境屏障作用使药物和美容成分两者横穿角质层的递送变得复杂。角质层阻止许多分子(诸如大分子、蛋白质药物和带电小分子)穿过其屏障。

[0004] 已经探究了输送药物和美容物质穿过角质层的多种方法,包括物理和化学破坏角质层。尽管使用化学渗透增强剂已取得改观的成效,但它们通常不能输送大的亲水性化合物、蛋白质药物或带电小分子横穿角质层进入到全身循环。反而,大的亲水性化合物、蛋白质药物和带电小分子必须经常经由具有较低患者顺从性的途径(诸如注射)来递送。此外,对于可使用化学渗透增强剂输送的分子而言,化学渗透增强剂可能会造成刺激。仍需要新型渗透增强组合物,其可输送多种化合物横穿角质层到达皮肤的更深层或进入到全身循环。

### 发明内容

[0005] 本公开整体涉及包含肽的皮肤渗透增强剂,所述肽用于增强活性剂(诸如,药物活性剂、疫苗、美容剂、营养补充剂等)的透皮递送。本文所述的皮肤渗透增强剂可用于改善多种化合物(包括小的带电荷药物和大的蛋白质药物)穿过皮肤的渗透。

[0006] 本公开的一个方面提供了包含肽的皮肤渗透增强剂。所述肽可包含的氨基酸序列包含:如SEQ ID NO:1、2、3或6中所示的十个连续氨基酸残基;如SEQ ID NO:7或8中所示的十一个连续氨基酸残基;如SEQ ID NO:4或5中所示的十二个连续氨基酸残基;或它们的类似物。所述肽可包含30个或更少的总氨基酸残基或氨基酸类似物。所述肽可具有如SEQ ID NO:1、2、3、4、5、6、7、8、9、10、11、12、13、14、15、16或17中所示的氨基酸序列。

[0007] 本公开的另一个方面提供了包含如本文所公开的皮肤渗透增强剂和活性剂的组合物。所述活性剂可选自药物活性剂、疫苗、美容剂和营养补充剂;例如,抗体、降脂化合物、治疗性蛋白质、毛发生长化合物、毛发去除化合物或维生素。

[0008] 本公开的另一个方面提供了透皮递送药物活性剂、疫苗、美容剂或营养补充剂的方法,所述方法包括向对其有需要的受试者的皮肤施用组合物,所述组合物包含:载体,其选自药学上可接受的载体、美容上可接受的载体或营养上可接受的载体;活性剂,其选自药物活性剂、疫苗、美容剂或营养补充剂;和如本文所公开的皮肤渗透增强剂。

[0009] 结合具体实施方式,本公开的其他特征和方面将变得显而易见。

## 具体实施方式

[0010] 本公开整体涉及包含肽的渗透增强剂和渗透增强组合物。本文所提供的肽、渗透增强剂和组合物增强分子(诸如大分子、蛋白质药物和带电小分子)横穿角质层屏障的能力,从而避免了不合意的递送途径(诸如注射)并提高了患者的顺从性。

[0011] 本公开的皮肤渗透增强剂可逆地降低角质层的屏障抵抗并允许分子(诸如药物、疫苗、营养补充剂或美容物质)更容易地渗透到活体组织,并且在一些情况下,全身循环。在一些情况下,该皮肤渗透增强剂允许分子(诸如药物、疫苗、美容物质和营养补充剂)进入较低的皮肤层次(诸如基底层和epinosa层)。在一些情况下,该皮肤渗透增强剂允许分子进入循环系统或其他内部组织。术语“皮肤渗透增强剂”、“渗透增强剂”和“透过增强剂”可在本文互换使用。

[0012] 本文所述的皮肤渗透增强剂允许分子(诸如药物、疫苗、美容物质和营养补充剂,包括小的带电分子以及大分子诸如蛋白质)透皮递送。术语“透皮”或“透皮递送”通常用于指横穿皮肤任何部分的活性成分的任何类型的递送。也就是说,透皮通常可包括全身递送(即,活性成分横穿或基本穿过真皮输送,使得活性成分递送到血流中且全身地递送的情况)以及皮内递送(即,活性成分部分地穿过真皮(例如,穿过皮肤的外层(角质层))输送的情况,该处活性成分被递送到皮肤中,例如,用于治疗牛皮癣或用于局部麻醉药递送)。也就是说,如本文所用,透皮递送包括横穿皮肤的至少一部分(并不一定是皮肤的所有层)而不仅仅是局部施用到皮肤的外层来输送的活性剂的递送。

[0013] 不受理论的束缚,据信本文所述的渗透增强剂通过选择性地和可逆地调节皮肤对多数分子保持封闭屏障的生物过程和信号通路来协助分子穿过角质层,从而允许所需分子透皮递送。

[0014] 在术语“包含”出现在具体实施方式和权利要求书中时,该术语不具有限制意义。

[0015] 如本文所用,“一个/一种”、“该”、“所述”、“至少一个/至少一种”和“一个或多个/一种或多种”可互换使用。

[0016] 另外,在本文中,由端点表述的数值范围包括该范围内涵盖的所有数值(例如,5或更小包括0.5、1、1.25、2、2.8、3、4、5等)。

[0017] 如本文所用,“类似物”是指包含连续氨基酸序列的肽,该肽与其亲本肽(例如,SEQ ID NO:1-17)有1-3个氨基酸残基不同,但具有与其亲本肽相同或相似的增强皮肤渗透的功能。在一些情况下,差别在于保守氨基酸取代,在保守氨基酸取代中,一个氨基酸被另一个具有相似侧链的氨基酸或一个具有相似特性的氨基酸类似物替换。例如,具有相似侧链的氨基酸家族包括具有酸性或酰胺侧链的氨基酸,诸如天冬氨酸、谷氨酸、天冬酰胺或谷氨酰胺;具有碱性侧链的氨基酸,诸如赖氨酸、精氨酸和组氨酸;具有不带电极性侧链的氨基酸,诸如甘氨酸、天冬酰胺、谷氨酰胺、丝氨酸、苏氨酸、酪氨酸和半胱氨酸;具有非极性侧链的氨基酸,诸如丙氨酸、缬氨酸、亮氨酸、异亮氨酸、脯氨酸、苯丙氨酸、甲硫氨酸和色氨酸;具有 $\beta$ -支化侧链的氨基酸,诸如苏氨酸、缬氨酸和异亮氨酸;以及具有芳族侧链的氨基酸,诸如酪氨酸、苯丙氨酸、色氨酸和组氨酸。因此,示例性保守氨基酸取代包括:赖氨酸被组氨酸或精氨酸取代;组氨酸被赖氨酸或精氨酸取代;精氨酸被赖氨酸或组氨酸取代;苯丙氨酸被酪氨酸或色氨酸取代;酪氨酸被苯丙氨酸或色氨酸取代;色氨酸被苯丙氨酸或酪氨酸取代;丝氨酸被苏氨酸取代;苏氨酸被丝氨酸取代;天冬氨酸被谷氨酸取代;天冬酰胺被谷氨酰胺

取代;谷氨酰胺被天冬酰胺取代;甘氨酸被丙氨酸、缬氨酸、亮氨酸、异亮氨酸或甲硫氨酸取代;丙氨酸被甘氨酸、缬氨酸、亮氨酸、异亮氨酸或甲硫氨酸取代;缬氨酸被甘氨酸、丙氨酸、亮氨酸、异亮氨酸或甲硫氨酸取代;亮氨酸被甘氨酸、丙氨酸、缬氨酸、异亮氨酸或甲硫氨酸取代;异亮氨酸被甘氨酸、丙氨酸、缬氨酸、亮氨酸或甲硫氨酸取代;天冬氨酸被天冬酰胺或谷氨酰胺取代;天冬酰胺被天冬氨酸或谷氨酸取代;以及谷氨酰胺被天冬氨酸或谷氨酸取代。

[0018] “类似物”也指与亲本氨基酸残基相比表现出很小差别的氨基酸残基结构衍生物。“类似物”还指与其亲本肽或本领域已知的氨基酸残基相比具有很小修饰(包括但不限于改变一个或多个氨基酸残基的侧链或用任何非氨基酸替换一个或多个氨基酸残基)的肽或氨基酸残基。

[0019] 如本文所用,术语“皮肤”是指覆盖脊椎动物的外皮以及内部粘膜组织(诸如口腔粘膜、鼻粘膜、食管粘膜等)两者。

[0020] 本公开提供了包含肽的皮肤渗透增强剂。在一个实施例中,该肽所包含的氨基酸序列包含十个连续氨基酸残基,包括ACLPGLVSG (SEQ ID NO:1),ACSLPWDASC (SEQ ID NO:2),ACDTPRLTHC (SEQ ID NO:3),ACLDNTFRAC (SEQ ID NO:6)或它们的类似物。在一个实施例中,该肽所包含的氨基酸序列包含十一个连续氨基酸残基,包括ASSTTLNTLAQ (SEQ ID NO:7),ASSDIPLFTRY (SEQ ID NO:8)或它们的类似物。在一个实施例中,该肽所包含的氨基酸序列包含十二个连续氨基酸残基,包括TWTQAWPGWTW (SEQ ID NO:4),AKSSWWGRAYWY (SEQ ID NO:5)或它们的类似物。

[0021] 在一些实施例中,该肽序列通常包含7-40个氨基酸残基。在一些实施例中,该肽序列通常包含10-30个氨基酸残基。在一些实施例中,该肽序列通常包含10-20个氨基酸残基。在一些实施例中,该肽包含30个或更少的总氨基酸残基或氨基酸类似物。在一些实施例中,该肽包含20个或更少的总氨基酸残基或氨基酸类似物。在一些实施例中,该肽包含19个或更少的总氨基酸残基或氨基酸类似物。在一些实施例中,该肽包含至少7个总氨基酸残基或氨基酸类似物。在一些实施例中,该肽包含至少10个总氨基酸残基或氨基酸类似物。在一些实施例中,该肽的氨基酸序列的至少50%包含选自SEQ ID NO:1、2、3、4、5、6、7或8或它们的类似物的连续氨基酸序列。

[0022] 在一些实施例中,该皮肤渗透增强剂所包含的肽具有如SEQ ID NO:1、2、3、4、5、6、7、8或它们的类似物中所示的氨基酸序列。在一些实施例中,该皮肤渗透增强剂所包含的肽具有SHSACLPGLVSGGGG (SEQ ID NO:9),SHSACSLPWDASCGGG (SEQ ID NO:10),SHSACDTPRLTHCGGG (SEQ ID NO:11),SHSTWTQAWPGWTWGGG (SEQ ID NO:12),SHSAKSSWWGRAYWYGGG (SEQ ID NO:13),SHSACLDNTFRACGGG (SEQ ID NO:14),SHSASSTTLNTLAQWPA (SEQ ID NO:15),SHSASSDIPLFTRYGGG (SEQ ID NO:16),SHSACLDNTFRACG (SEQ ID NO:17)或它们的类似物的氨基酸序列。在一些实施例中,该肽的N-末端包含SHS的连续氨基酸序列。在一些实施例中,该肽的C-末端包含选自GGG、G和WPA的连续氨基酸序列。本公开也提供了分离的肽,其具有如SEQ ID NO:1、2、3、4、5、6、7、8、9、10、11、12、13、14、15、16、17或它们的类似物中所示的氨基酸序列。

[0023] 本公开的肽可使用已知技术(诸如固相肽合成(SPPS))来合成。在一些实施例中,本公开的肽可通过已知技术(诸如细胞、组织或器官的分级分离,色谱或电泳技术)而部分

地或完全地分离或纯化。

[0024] 本公开也提供了包含融合或嵌合肽的皮肤渗透增强剂。所述融合或嵌合肽包含第一肽和第二肽或蛋白质。在一些实施例中，第一肽为包含具有SEQ ID NO:1-8的氨基酸序列的肽或其类似物。在一些实施例中，第一肽为具有如SEQ ID NO:1-17中所示的氨基酸序列的肽或其类似物。第二肽或蛋白质不同于第一肽，例如，其所具有的氨基酸序列与第一肽基本上不相同。将第一肽和第二肽或蛋白质操作地连接（例如，融合），使得融合或嵌合肽具有第一肽和第二肽或蛋白质两者的活性。

[0025] 在一些实施例中，使所述皮肤渗透增强剂缀合到活性剂（诸如药物活性剂、疫苗、美容剂或营养补充剂）以形成缀合物。缀合明确地有别于皮肤渗透增强剂和活性剂的简单混合物。不同于简单混合物，缀合物在施用到皮肤之后保持了化学或物理关联。缀合物具有皮肤渗透增强剂肽和活性剂两者的活性。缀合物可使用已知技术（诸如共价结合、非共价亲和结合、离子结合、亲水性或疏水性亲和、物理诱捕等）来形成。

[0026] 在一些实施例中，本文所提供的皮肤渗透增强剂可在施用活性剂或包含活性剂的组合物之前直接施用到皮肤或粘膜组织。本文所提供的皮肤渗透增强剂可在应用透皮递送装置（诸如透皮贴片）之前直接施用到皮肤或粘膜组织。

[0027] 在另一个实施例中，本公开也提供了用于增强多种活性剂透皮递送的组合物。该组合物包含本文所公开的肽渗透增强剂和活性剂。在一些实施例中，所述活性剂为药物活性剂、疫苗、美容剂或营养补充剂。

[0028] 在一个实施例中，本文所提供的皮肤渗透增强剂和组合物可提供为局部或透皮制剂，诸如霜膏、凝胶、泡沫、喷雾、膏剂、洗剂、溶液、悬浮液、气溶胶制剂、非气溶胶喷雾、乳液、微乳液、分散液、糊剂、粉末、固体棒（例如，蜡基或石油基棒）、擦拭物、油剂等。

[0029] 在另一个实施例中，本文所提供的皮肤渗透增强剂和组合物可包含在透皮药物递送装置（诸如胶带、粘合透皮贴片、片材、敷料或本领域的技术人员已知的任何其他形式）中。在一些实施例中，所述装置将呈药物贮存器（诸如大小适于穿透皮肤递送选定量的活性剂的贴片）的形式。

[0030] 可使用适于连续透皮递送治疗有效量的合适活性剂的任何透皮贴片。适宜的透皮贴片包括凝胶或液体贮存器，诸如美国专利4,834,979 (Gale) 中所谓的“贮存器”贴片；通过相邻粘合剂层附着到皮肤的包含基质贮存器的贴片，诸如美国专利6,004,578 (Lee等人) 中所谓的“基质”贴片；以及包含PSA贮存器的贴片，诸如美国专利6,365,178 (Venkateshwaran等人)、6,024,976 (Miranda等人)、4,751,087 (Wick) 和6,149,935 (Chiang等人) 中所谓的“粘合剂中药物”贴片，它们的公开内容以引用方式并入本文。在一些实施例中，本文所提供的皮肤渗透增强剂和组合物包含在具有不可透过的背衬的贮存器中，所述具有不可透过的背衬显著或完全地抑制药物和/或赋形剂从贮存器迁移到敷料的皮肤接触粘合剂中。合适的不可透过的背衬的选择将取决于贮存器的组合物，并且本领域的技术人员可易于通过测试用于活性剂和/或赋形剂迁移的敷料来确定适宜的背衬。典型的不可透过的屏障包括包含一个或多个聚对苯二甲酸乙二酯层和/或铝屏障层的膜。在一个实施例中，所述不可透过的背衬可用于限制氧气和/或水蒸气透过。不可透过的背衬的示例包括具有等离子体沉积的无定形玻璃层的膜（诸如WO 2011/066493 (Kluge等人，授予3M) 中所描述的）以及具有半透明无机屏障层的膜（诸如美国专利申请公布2004/202708 (Roehrig等人，授予3M) 中所描

述的)。

[0031] 在另一个实施例中,本文所提供的皮肤渗透增强剂和组合物以包含活性剂的基质层的形式包含在药物贮存器中,所述基质层粘附到敷料的皮肤接触粘合剂。此基质可为粘合剂层,如上文所述。另选地,所述基质层可为非粘合性的或弱粘合性的且依赖于粘合剂敷料上皮肤接触粘合剂的周围边缘来将贴片固定就位并使药物贮存器与皮肤表面保持接触。

[0032] 在另一个实施例中,本文所提供的皮肤渗透增强剂和组合物以固体颗粒的形式包含在药物贮存器中,所述固体颗粒嵌在表面上或处于粘合剂敷料的皮肤接触粘合剂内。具体地,这些颗粒可为亲水性的,使得与暴露在经处理的皮肤的表面处的含水流体的接触将造成它们溶解或碎裂,因而将活性剂释放到皮肤中。

[0033] 在另一个实施例中,本文所提供的皮肤渗透增强剂和组合物包含在处于粘合剂敷料的皮肤接触粘合剂内的药物贮存器中。可在形成粘合剂敷料之前将所述活性剂与皮肤接触粘合剂混合,或可以单独的工艺步骤将其施用到粘合剂敷料的皮肤接触粘合剂。用于将活性剂施用到粘合剂层的适宜方法的示例可见于美国专利申请公布2003/054025 (Cantor等人) 和美国专利5,688,523 (Garbe等人),它们的公开内容以引用方式并入本文。

[0034] 可从多个制造商获得多种专有制剂形式的防粘衬件。本领域的技术人员通常将在模拟使用条件下基于所选择的粘合剂来测试这些衬件,以获得所需防粘特性的产品。用于提供本公开的敷料的衬件的材料与背衬相比可为显著更刚性的。可适用于本公开的粘合剂复合物的衬件可由牛皮纸、聚乙烯、聚丙烯、聚酯或这些材料中的任何一种的复合物制成。所述衬件可涂覆有防粘剂,诸如含氟化合物或有机硅。例如,美国专利4,472,480 (Olson) 描述了低表面能全氟化合物衬件,其公开内容据此以引用方式并入。所述衬件可为涂覆有有机硅防粘材料的纸材、聚烯烃膜或聚酯膜。可商购获得的有机硅涂覆的防粘纸的示例为可从伊利诺伊州威洛布鲁克的耐恒公司 (Loparex (Willowbrook, IL)) 获得的POLYSLIK<sup>®</sup> 有机硅防粘纸。

[0035] 本文所提供的组合物包含一种或多种活性剂。如本文所用,“活性剂”广义地指向使用者提供任何治疗(包括预防性治疗)的药剂,无论所述药剂是否具有生物活性。因此,活性剂包括药物活性剂、疫苗、美容剂和营养补充剂。此外,活性剂的活性可处于超过一个活性剂类别。例如,药物活性剂也可用作美容剂。因此,尽管一些药剂在本文中可能仅以一个药剂类型(例如,药物活性剂)列出,但此描述并非旨在进行限制。活性剂可包括提供任何治疗的任何药剂,包括蛋白质或带电小分子。

[0036] 在一个实施例中,活性剂可包括药物活性剂,诸如抗微生物剂,抗生素;抗霉菌剂;抗细菌剂;抗真菌剂;抗病毒剂;消炎药;止痒剂;抗牛皮癣剂;止咳剂;抗脱发剂;抗痤疮剂;抗炎剂;局部麻醉药;免疫应答调节剂,止痛剂,生长因子,激素,治疗性蛋白质等。

[0037] 要借助本文所述的皮肤渗透增强剂透皮递送的示例性药物活性剂在施用到皮肤时能够造成局部或全身影响。一些示例包括氯压定、雌二醇、尼古丁、硝化甘油、东莨菪碱和芬太尼,它们可以透皮装置的形式商购获得。其他示例包括抗炎化合物,甾体(例如,氢化可的松、泼尼松龙、曲安西龙)和非甾体(例如,萘普生、吡罗昔康、双氯灭痛)两者;抑菌剂(例如,氯己定、己基间苯二酚);抗细菌药(例如,青霉素(诸如青霉素V)、头孢菌素(诸如头孢氨苄)、红霉素、四环素、庆大霉素、磺胺噻唑、呋喃妥因和喹诺酮(诸如诺氟沙星、氟甲喹和依巴沙星));抗原生动物药(例如,甲硝唑);抗真菌药(例如,制霉菌素);冠状动脉血管扩张

剂;钙通道阻滞剂(例如,硝苯地平、地尔硫卓);支气管扩张剂(例如,茶碱、吡布特罗、沙美特罗、异丙肾上腺素);酶抑制剂诸如胶原酶抑制剂、蛋白酶抑制剂、弹性蛋白酶抑制剂、脂氧合酶抑制剂(例如,A64077)和血管紧张素转换酶抑制剂(例如,卡托普利、赖诺普利);其他抗高血压药(例如,心得安);白三烯拮抗剂(例如,ICI204,219);抗溃疡药诸如H2拮抗剂;甾体激素(例如,孕酮、睾酮、雌二醇);抗病毒药和/或免疫调节剂(例如,1-异丁基-1H-咪唑并[4,5-c]喹啉-4-胺、1-(2-羟基-2-甲基丙基)-1H-咪唑并[4,5-c]喹啉-4-胺、N-[4-(4-氨基-2-乙基-1H-咪唑并[4,5-c]喹啉-1-基)丁基]甲磺酰胺和阿昔洛韦);局部麻醉药(例如,苯佐卡因、丙泊酚、利多卡因、地卡因、丙胺卡因);强心药(例如,洋地黄、地高辛);止咳药(例如,可待因、右美沙芬);抗组胺药(例如,苯海拉明、氯苯那敏、特非那定);麻醉性镇痛药(例如,吗啡、叔丁啡、柠檬酸芬太尼、盐酸氢吗啡酮);肽激素(例如,人或动物生长激素、LHRH、甲状旁腺激素);作用于心脏的产品诸如心房肽;抗糖尿病剂(例如,胰岛素、艾塞那肽(exanatide));酶(例如,抗噬菌斑酶、溶菌酶、葡聚糖酶);止恶心药;抗惊厥药(例如,乙胺嗪);免疫抑制剂(例如,环孢菌素);精神治疗药(例如,安定);镇静剂(例如,苯巴比妥);抗凝血剂(例如,肝素、依诺肝素钠);镇痛药(例如,对乙酰氨基酚);抗偏头痛剂(例如,麦角胺、褪黑激素、舒马曲坦、佐米曲坦);抗心律失常剂(例如,氟卡尼);止吐药(例如,甲氧氯普胺、昂丹司琼、盐酸格拉司琼);抗癌剂(例如,甲氨蝶呤);神经剂诸如抗焦虑药物;止血药;抗肥胖剂;多巴胺激动剂(例如,阿朴吗啡);GnRH激动剂(例如,亮丙瑞林、戈舍瑞林、那法瑞林);生育激素(例如,hCG、hMG、尿促卵泡素);干扰素(例如,干扰素- $\alpha$ 、干扰素- $\beta$ 、聚乙二醇化干扰素- $\alpha$ )等,以及它们药学上可接受的盐和酯。构成治疗有效量的活性剂的量可由本领域的技术人员适当考虑特定药物、特定载体和期望的治疗效果而容易地确定。

[0038] 在一个实施例中,借助本文所述的渗透增强剂,可透皮递送大分子量的活性剂。提高药物分子量通常导致无协助式透皮递送减少。此类大分子的示例包括蛋白质、肽、核苷酸序列、单克隆抗体、疫苗、多糖(诸如肝素)和抗生素(诸如头孢曲松)。

[0039] 疫苗可为治疗性或预防性的,并且包括用以提高体液的和/或细胞介导的免疫应答所施用的任何材料,诸如活的或减毒的病毒和细菌的免疫原以及灭活病毒的、肿瘤来源的、原生动物的、生物体来源的、真菌的和细菌的免疫原、类毒素、毒素、多糖、蛋白质、糖蛋白、肽、细胞疫苗(例如,使用树枝状的细胞)、DNA疫苗、重组蛋白、糖蛋白和肽。适宜的疫苗的示例包括流感疫苗(包括A型流感和B型流感)、莱姆病疫苗、狂犬病疫苗、麻疹疫苗、腮腺炎疫苗、水痘疫苗、天花疫苗、肝炎疫苗(包括A型、B型和C型)、顿咳疫苗、风疹疫苗、白喉疫苗、脑炎疫苗、黄热病疫苗、副流感疫苗、重组蛋白疫苗、DNA疫苗、脊髓灰质炎疫苗、治疗性癌症疫苗、疱疹疫苗(包括HSV-1和HSV-2)、肺炎疫苗、脑膜炎疫苗、百日咳疫苗、破伤风疫苗、伤寒热疫苗、霍乱疫苗、结核疫苗、抵抗瘟疫的疫苗、b型流感嗜血杆菌、腺病毒、BCG、HIV、巨细胞病毒、登革热、猫白血病、禽疫、猪瘟、日本脑炎、呼吸道合胞体病毒、轮状病毒、乳头状瘤病毒、严重急性呼吸综合征(SARS)、炭疽、以及它们的组合。术语“疫苗”因而包括但不限于蛋白质、多糖、寡糖、或者弱化或灭活病毒形式的抗原。适宜的疫苗和疫苗佐剂的附加示例描述于美国专利申请公布2004/0049150(Dalton等人)中,其开内容据此以引用方式并入。还可参见例如公开于国际公布W0 02/24225(Thomsen等人)中的疫苗。

[0040] 在另一个实施例中,可将原本难以或不可能通过被动透皮递送来递送的小分子药物用作活性剂。此类分子的示例包括盐形式;离子型分子,诸如双膦酸盐(包括阿仑膦酸钠

或帕米膦酸钠)；以及具有不能进行被动透皮递送的物化特性的分子。

[0041] 在一些实施例中,本发明的示例性药理学活性剂包括:抗菌剂,诸如氧四环素、梭链孢酸、庆大霉素、莫匹罗星、瑞他莫林;抗霉菌剂,诸如制霉菌素、克霉唑、咪康唑、益康唑、酮康唑、联苯苄唑、以及咪唑与三唑衍生物、环匹罗司、特比萘芬、氟康唑和阿莫罗芬的组合;抗病毒剂,诸如阿昔洛韦、伐昔洛韦、喷昔洛韦、泛昔洛韦、膦甲酸(膦甲酸钠六水合物)和二十二醇;抗炎剂(糖皮质激素),诸如氢化可的松、氯倍他松、去炎松、倍他米松、莫米松和氯倍他索(及其药学上可接受的盐和衍生物);消炎药/镇痛药(属于NSAID),诸如乙酰水杨酸、双氯灭痛和布洛芬(及其药学上可接受的盐和衍生物);止痒剂,诸如糖皮质激素(例如,氢化可的松、氯倍他松和倍他米松)和局部麻醉药(例如,利多卡因和丙胺卡因)(及其药学上可接受的盐和衍生物);抗牛皮癣剂,诸如卡泊三醇和环孢霉素A(及其药学上可接受的盐和衍生物);治疗湿疹和特应性皮炎的药剂:他克莫司和吡美莫司(及其药学上可接受的盐和衍生物);抗青光眼剂,诸如噻吗洛尔、倍他洛尔、拉坦前列素、比马前列素和曲伏前列素(及其药学上可接受的盐和衍生物);局部麻醉药,诸如利多卡因、丙胺卡因、罗哌卡因、马比佛卡因、布比卡因、左布比卡因、苯佐卡因和地卡因(及其药学上可接受的盐和衍生物);用于勃起功能障碍药剂,诸如前列地尔(前列腺素E1)(及其药学上可接受的盐和衍生物);去屑剂,诸如硫化硒、吡罗克酮乙醇胺盐和酮康唑;抗脱发剂,诸如米诺地尔(及其药学上可接受的盐和衍生物);抗痤疮剂,诸如维甲酸(视黄酸)、阿达帕林、过氧化苯甲酰、克林霉素、壬二酸(及其药学上可接受的盐和衍生物);伤口愈合剂,诸如梭链孢酸(及其药学上可接受的盐和衍生物);胰岛素;促黄体生成激素释放激素;脱氧胆酸钠等。在一些实施例中,所述活性剂可包含上述活性剂的药学上可接受的盐或衍生物。药学上可接受的盐的示例包括酸性盐,诸如盐酸盐、硫酸盐、酒石酸盐、马来酸盐、柠檬酸盐、磷酸盐、乙酸盐、乳酸盐和富马酸盐;以及碱性盐,诸如钠和钾盐。还可参见例如S.M.Berge, L.D.Bighley, D.C.Monkhouse, J.Pharm.Sci.《药物科学杂志》,1977,66,1-19中公开的药用盐。

[0042] 在另一个实施例中,本公开的活性剂可包括胰岛素;干扰素- $\alpha$ ;干扰素- $\beta$ ;降血钙素;促性腺激素释放激素(GnRH);甲状旁腺激素,诸如特立帕肽;利多卡因;利多卡因/地卡因组合;芬太尼;吗啡;氢化吗啡酮;奥昔布宁;前列地尔;特比萘芬;佐米曲坦;曲安西龙丙酮;以及它们药学上可接受的盐。在一个实施例中,所述活性剂可包含脱氧胆酸钠以及其药学上可接受的盐和衍生物。

[0043] 在一些实施例中,本公开的活性剂可包括美容活性剂,诸如防晒霜、防晒剂、芳香剂、香料、精油、有机硅、润肤剂、湿润剂、调理剂、保湿剂、抗氧化剂、类固醇或其他抗炎剂、血管扩张药、剥脱剂(诸如 $\alpha$ -羟基酸或 $\beta$ -羟基酸)、生长因子、酶、漂白剂或着色剂、抗真菌剂或抗微生物剂(包括抗生素和抗菌剂,诸如聚维酮-碘、葡萄糖酸氯己定、三氯生、p-氯-m-二甲酚、甘油和丙二醇的脂肪酸单酯、过氧化苯甲酰、过氧化氢、银和银盐(包括但不限于氯化银、氧化银和磺胺嘧啶银)、苯酚、咪康唑、克霉唑、酮康唑、益康唑、十一烯酸等)、乳化剂、人工鞣制剂、鞣制促进剂、皮肤舒缓剂、皮肤紧致剂、抗皱剂、皮肤修复剂、皮脂抑制剂、皮脂兴奋剂、蛋白酶抑制剂、抗痒成分、抑制毛发生长的试剂、促进毛发生长的试剂、防汗药、止汗剂、去屑剂、助流剂、皮肤感知剂、抗痤疮治疗剂、脱毛剂、收敛剂、毛发去除化合物、或鸡眼、胼胝或疣去除剂、驱虫剂诸如N,N-二乙基-m-甲苯酰胺(DEET)、埃卡瑞丁(icaridine)和丁基乙酰氨基丙酸乙酯(及其盐和衍生物)、粉末状的或液体化妆品、降脂化合物等。

[0044] 在一些实施例中,本公开的活性剂包括真皮填充剂。真皮填充剂为向皮肤之下的孔增添体积并导致皮肤皱纹光滑或丰唇的化合物或组合物。在一些实施例中,示例性真皮填充剂可包括透明质酸(HA),具体地,大小在5,000至2,000,000道尔顿之间的范围;胶原或胶原模拟物;弹性蛋白;纤维蛋白;纤连蛋白;腱生蛋白;维生素A;多糖,诸如脱乙酰壳多糖和软骨素、糖胺聚糖或蛋白聚糖;氨基酸的同型共聚物,诸如聚赖氨酸、聚丙烯酰胺、聚乙二醇、聚乳酸和其他聚合物;黑色素和黑色素衍生物;天然和合成的颜料、或它们的组合。在一个实施例中,所述真皮填充剂共价或非共价结合至包含具有SEQ ID NO:1-8的氨基酸序列的肽或其类似物。在一个实施例中,所述真皮填充剂共价或非共价结合至具有如SEQ ID NO:1-17中所示的氨基酸序列的肽或其类似物。在一个实施例中,所述真皮填充剂以与包含具有SEQ ID NO:1-8的氨基酸序列的肽、具有如SEQ ID NO:1-17中所示的氨基酸序列的肽、或它们的类似物的混合物的形式存在。

[0045] 在一个实施例中,所述真皮填充剂包含HA和胶原或胶原模拟物的混合物。在一个实施例中,所述混合物包含约1:100至约100:1比率的HA和胶原(或其模拟物)。在另一个实施例中,HA和胶原(或其模拟物)之间的比率为至少约1:100,至少约1:50,至少约1:10,或至少约1:1.01。在另一个实施例中,HA和胶原(或其模拟物)之间的比率不大于约100:1,不大于约50:1,不大于约10:1,或不大于约1.01:1。在一个实施例中,所述真皮填充剂包含约1%至约99%的HA。在一个实施例中,所述真皮填充剂包含至少约1%、10%、15%、20%、50%或95%的HA。在一个实施例中,所述真皮填充剂包含不超过99%、95%、50%、20%、15%、10%或1%的HA。在另一个实施例中,所述真皮填充剂包含约1%至约99%的胶原或胶原模拟物。在一个实施例中,所述真皮填充剂包含至少约1%、10%、15%、20%、50%或95%的胶原或胶原模拟物。在一个实施例中,所述真皮填充剂包含不超过99%、95%、50%、20%、15%、10%或1%的胶原或胶原模拟物。可用于本发明的真皮填充剂描述于国际公布W0 2013/112488,其全文以引用方式并入本文。

[0046] 在一些实施例中,本公开的活性剂可包括营养补充剂,诸如维生素、草药提取物、草药补充剂、氨基酸、膳食矿物质、膳食纤维和抗氧化剂。

[0047] 本文所提供的组合物可用药理学上、美容上或营养上可接受的赋形剂、载体或媒介物来配制。所述组合物还可包含一种或多种添加剂,包括着色剂、芳香剂、调味剂、抗菌剂、保湿剂、增稠剂、抗氧化剂、粘合剂、悬浮剂、分散剂、增溶剂和流变改性剂。

[0048] 在一些实施例中,具体地,在活性剂具有异常低的穿过皮肤或粘膜组织的渗透速率的情况下,可在所述制剂中包含附加的渗透增强剂或透过增强剂。示例性的附加渗透增强剂包括:C<sub>1</sub>-C<sub>36</sub>脂肪酸,诸如异硬脂酸、辛酸和油酸;C<sub>8</sub>-C<sub>36</sub>脂肪醇,诸如油醇和月桂醇;C<sub>8</sub>-C<sub>36</sub>脂肪酸的低级烷基酯,诸如油酸乙酯、肉豆蔻酸异丙酯、硬脂酸丁酯和月桂酸甲酯;C<sub>6</sub>-C<sub>8</sub>二酸的二(低级)烷基酯,诸如己二酸二异丙酯;C<sub>8</sub>-C<sub>36</sub>脂肪酸的单甘油酯,诸如单月桂酸甘油酯;四甘醇(四氢糠醇聚乙二醇醚);四乙二醇(乙醇,2,2'-(氧基双(乙烯氧基))二甘醇);C<sub>6</sub>-C<sub>36</sub>烷基吡咯烷酮羧酸酯;聚乙二醇;丙二醇;2-(2-乙氧基乙氧基)乙醇;二乙二醇单甲醚;N,N-二甲基十二胺-N-氧化物;以及上述物质的组合。聚氧乙烯的烷基芳基醚、聚氧乙烯单甲醚和聚氧乙烯二甲醚也适用作增溶剂,诸如甘油和N-甲基吡咯烷酮。萜烯是另一种可用类型的软化剂,包括单独的以下物质或任意组合的以下物质:蒎烯、右旋柠檬烯、萜烯、萜品醇、萜品烯-4-醇、香芹醇、香芹酮、蒲勒酮、胡椒酮、薄荷酮、薄荷醇、新薄荷醇、百里酚、樟

脑、龙脑、柠檬醛、紫罗兰酮和桉油脑。附加的渗透增强剂应使皮肤刺激、皮肤损伤和全身毒性最小化。本公开的组合物还可包含抗刺激剂,例如,水杨酸甲酯、辣椒碱、樟脑和薄荷醇。

[0049] 本文所述的皮肤渗透增强剂或活性剂有效用于给定治疗、预防、美容或营养应用的量为足以获得预期治疗、预防、美容或营养应用的量。所使用的皮肤渗透增强剂或活性剂的精确量将根据本领域已知的因素而变化,所述因素包括但不限于:皮肤渗透增强剂或活性剂的物理和化学性质、预期给药方案、皮肤渗透增强剂或活性剂的施用方法、和所施用的制剂的种类、所施用的制剂的类型、以及治疗的条件。因此,大致地示出构成皮肤渗透增强剂或活性剂有效用于所有可能的施用的量的量是不现实的。然而,本领域的普通技术人员在充分考虑这些因素后可容易地确定合适的量。

[0050] 本公开也提供了透皮递送药物活性剂、疫苗、美容剂或营养补充剂的方法。在一个实施例中,所述方法包括向对其有需要的受试者的皮肤施用组合物,所述组合物包含:载体,其选自药学上可接受的载体、美容上可接受的载体或营养上可接受的载体;活性剂,其选自药物活性剂、疫苗、美容剂或营养补充剂;和如本文所公开的皮肤渗透增强剂。

[0051] 本公开也提供了令对其有需要的受试者的皮肤光滑的方法,所述方法包括使所述皮肤与有效量的组合物接触,所述组合物包含具有如本文所公开的肽的皮肤渗透增强剂和包括本文所公开的真皮填充剂的活性剂。本公开也提供了治疗对其有需要的受试者的皱纹的方法,所述方法包括使所述皮肤与有效量的组合物接触,所述组合物包含具有如本文所公开的肽的皮肤渗透增强剂和包括本文所公开的真皮填充剂的活性剂。本公开也提供了用于对其有需要的受试者丰唇的方法,所述方法包括使所述皮肤与有效量的组合物接触,所述组合物包含具有包含如本文所公开的肽的皮肤渗透增强剂和包括本文所公开的真皮填充剂的活性剂。

[0052] 本发明的方法可用于任何合适的受试者。合适的受试者包括动物,诸如人类、非人灵长类、啮齿类、狗、猫、马、猪、绵羊、山羊或牛。本发明的组合物可通过任何适宜的方法(诸如通过喷雾、浸渍、刷涂、滴落、擦入或以贴片形式粘附)施用到皮肤或粘膜组织。

#### [0053] 实施例

[0054] 实施例1为一种包含肽的皮肤渗透增强剂,其中所述肽所包含的氨基酸序列包含:如SEQ ID NO:1、2、3或6中所示的十个连续氨基酸残基;如SEQ ID NO:7或8中所示的十一个连续氨基酸残基;如SEQ ID NO:4或5中所示的十二个连续氨基酸残基;或它们的类似物。

[0055] 实施例2为实施例1的皮肤渗透增强剂,其中所述肽包含30个或更少的总氨基酸残基或氨基酸类似物。

[0056] 实施例3为实施例1的皮肤渗透增强剂,其中所述肽的氨基酸序列的至少50%包含选自SEQ ID NO:1、2、3、4、5、6、7或8的连续氨基酸序列。

[0057] 实施例4为实施例1的皮肤渗透增强剂,其中所述肽具有如SEQ ID NO:1、2、3、4、5、6、7、8、9、10、11、12、13、14、15、16或17中所示的氨基酸序列。

[0058] 实施例5为实施例1的皮肤渗透增强剂,其中所述肽的N-末端包含SHS的连续氨基酸序列。

[0059] 实施例6为实施例1的皮肤渗透增强剂,其中所述肽的C-末端包含选自GGGS、G和WPA的连续氨基酸序列。

[0060] 实施例7为实施例1-6中任一项的皮肤渗透增强剂,其中所述肽具有如SEQ ID NO:

10中所示的氨基酸序列。

[0061] 实施例8为实施例1-6中任一项的皮肤渗透增强剂,其中所述肽具有如SEQ ID NO:14中所示的氨基酸序列。

[0062] 实施例9为实施例1-6中任一项的皮肤渗透增强剂,其中所述肽具有如SEQ ID NO:15中所示的氨基酸序列。

[0063] 实施例10为实施例1-2或5-6中任一项的皮肤渗透增强剂,其中所述肽包含氨基酸序列的类似物,所述氨基酸序列包含:如SEQ ID NO:1、2、3或6中所示的十个连续氨基酸残基;如SEQ ID NO:7或8中所示的十一个连续氨基酸残基;或如SEQ ID NO:4或5中所示的十二个连续氨基酸残基;其中所述类似物具有不超过三个保守氨基酸取代。

[0064] 实施例11为实施例10的皮肤渗透增强剂,其中所述类似物具有不超过两个保守氨基酸取代。

[0065] 实施例12为实施例10的皮肤渗透增强剂,其中所述类似物具有不超过一个保守氨基酸取代。

[0066] 实施例13为实施例1-2或5-6中任一项的皮肤渗透增强剂,其中所述肽为具有如SEQ ID NO:1、2、3、4、5、6、7、8、9、10、11、12、13、14、15、16或17中所示的氨基酸序列的肽的类似物;其中所述类似物具有不超过三个保守氨基酸取代。

[0067] 实施例14为实施例13的皮肤渗透增强剂,其中所述类似物具有不超过两个保守氨基酸取代。

[0068] 实施例15为实施例13的皮肤渗透增强剂,其中所述类似物具有不超过一个保守氨基酸取代。

[0069] 实施例16为实施例13-15中任一项的皮肤渗透增强剂,其中所述肽为具有如SEQ ID NO:10中所示的氨基酸序列的肽的类似物。

[0070] 实施例17为实施例13-15中任一项的皮肤渗透增强剂,其中所述肽为具有如SEQ ID NO:14中所示的氨基酸序列的肽的类似物。

[0071] 实施例18为实施例13-15中任一项的皮肤渗透增强剂,其中所述肽为具有如SEQ ID NO:15中所示的氨基酸序列的肽的类似物。

[0072] 实施例19为一种包含实施例1-18中任一项的皮肤渗透增强剂和活性剂的组合物,其中所述活性剂选自药物活性剂、疫苗、美容剂和营养补充剂。

[0073] 实施例20为实施例19的组合物,其中所述活性剂为抗体、降脂化合物、治疗性蛋白质、促进或刺激毛发生长的药剂、毛发去除化合物或维生素。

[0074] 实施例21为实施例19的组合物,其中所述活性剂为包含带电小分子或蛋白质的药物活性剂。

[0075] 实施例22为实施例21的组合物,其中所述药物活性剂选自胰岛素、促黄体生成激素释放激素或脱氧胆酸钠。

[0076] 实施例23为实施例19的组合物,其中所述活性剂为真皮填充剂。

[0077] 实施例24为实施例23的组合物,其中所述真皮填充剂选自透明质酸(HA)、胶原、胶原模拟物、弹性蛋白、纤维蛋白、纤连蛋白、腱生蛋白、维生素A、多糖、氨基酸同型共聚物、黑色素、黑色素衍生物、天然或合成的颜料、以及它们的组合。

[0078] 实施例25为实施例24的组合物,其中所述多糖为脱乙酰壳多糖、软骨素、糖胺聚

糖、蛋白聚糖、或它们的组合。

[0079] 实施例26为实施例24的组合物,其中所述氨基酸同型共聚物为聚赖氨酸、聚丙烯酰胺、聚乙二醇、聚乳酸、或它们的组合。

[0080] 实施例27为实施例23的组合物,其中所述真皮填充剂选自透明质酸(HA)、胶原、胶原模拟物、或它们的组合。

[0081] 实施例28为实施例19-27中任一项的组合物,所述组合物包含药学上可接受的赋形剂,其中所述药学上可接受的赋形剂以洗剂、霜膏或贴片的形式提供组合物。

[0082] 实施例29为一种透皮递送药物活性剂、疫苗、美容剂或营养补充剂的方法,所述方法包括向对其有需要的受试者的皮肤施用组合物,所述组合物包含:

[0083] 载体,其选自药学上可接受的载体、美容上可接受的载体或营养上可接受的载体;

[0084] 活性剂,其选自药物活性剂、疫苗、美容剂或营养补充剂;和

[0085] 实施例1-18中任一项的皮肤渗透增强剂。

[0086] 实施例30为一种令对其有需要的受试者的皮肤光滑的方法,所述方法包括使所述皮肤与有效量的实施例19-28中任一项的组合物接触。

[0087] 实施例31为一种治疗对其有需要的受试者的皱纹的方法,所述方法包括使所述皱纹与有效量的实施例19-28中任一项的组合物接触。

[0088] 实施例32为一种用于对其有需要的受试者丰唇的方法,所述方法包括使所述唇与有效量的实施例19-28中任一项的组合物接触。

[0089] 以下实例进一步说明了本发明的目的和优点,但这些实例中引用的具体材料及其量以及其他条件和细节不应被理解为是对本发明的不当限制。

[0090] 实例

[0091] 材料

[0092] 从Dr.Brian Kay(芝加哥的伊利诺伊大学(University of Illinois at Chicago))获得二十九个随机M13噬菌体展示肽文库ANL1-ANL29(描述于“大集合噬菌体展示文库的有效构建”,《组合化学和高通量筛选》,2005,第8卷,第545-551页(“Efficient Construction of a Large Collection of Phage-Displayed Libraries”, Combinatorial Chemistry and High Throughput Screening,2005,vol.8,pp.545-551))。从Dr.George P.Smith(密苏里哥伦比亚大学(University of Missouri-Columbia))获得五个随机M13噬菌体展示肽文库(表1)。从马萨诸塞州伊普斯威奇的新英格兰生物实验室公司(New England BioLabs,Inc.(Ipswich,MA))获得三个随机M13噬菌体展示肽文库Ph.D.<sup>TM</sup>-12、Ph.D.<sup>TM</sup>-C7C和Ph.D.<sup>TM</sup>-7。

[0093] 表1:

[0094]	噬菌体肽文库名称	GenBank 登录号
	F3-6mer	AF246446
	F88-15mer	AF246448
[0095]	F88-Cys2	AF246451
	F88-Cys4	AF246453
	F88-Cys6	AF246455

[0096] 从马萨诸塞州伊普斯威奇的新英格兰生物实验室(New England Biolabs

(Ipswich, MA)) 获得大肠杆菌 (*E. coli*) 菌株 ER 2738 (基因型: F'proA+B+lacIq Δ (lacZ) M15zzf::Tn10 (TetR) /fhuA2glnV Δ (lac-proAB) thi-1 Δ (hsdS-mcrB) 5)。

[0097] 肽是由新泽西州皮斯卡塔韦的金斯瑞美国公司 (GenScript USA Inc. (Piscataway, NJ)) 使用逐步固相肽合成 (SPPS) 方法化学合成的。通过 HPLC 将该肽纯化至 95% 纯度并通过高分辨质谱鉴定。

[0098] 卢里亚-贝尔塔尼 (Luria Bertani, LB) 肉汤粉末; 卢里亚-贝尔塔尼 (Luria Bertani, LB) 琼脂粉末; 异丙基-β-D-硫代半乳糖苷 (IPTG); 5-溴-4-氯-3-吡啶基-β-D-半乳糖苷 (X-gal); 聚乙二醇-8000; tris-HCl; 四环素; 异硫氰酸荧光素 (FITC) 钠盐; 琼脂糖; 卵白蛋白 (产品编号 A2512) 和氯化镁均是从密苏里州圣路易斯的西格玛奥瑞奇 (Sigma-Aldrich (St. Louis, MO)) 获得的。

[0099] 根据 Dai, M 等人于“通过指导共有工程而创建新型荧光蛋白”, 《蛋白质工程、设计和选择》, 2007, 第 20 (2) 卷, 第 69-79 页 (“The Creation of a Novel Fluorescent Protein by Guided Consensus Engineering”, *Protein Engineering, Design & Selection*, 2007, vol. 20 (2), pp. 69-79) 中所描述的程序表达并纯化绿色荧光蛋白 (GFP)。

[0100] LB 肉汤培养基: 循序地将 LB 肉汤粉末重建于一升去离子水中、高压灭菌并于室温下储存。

[0101] 四环素原液 (悬浮液): 以 20mg/ml 的浓度向乙醇: 水 (1:1) 添加四环素并于 -20°C 下储存在黑暗中。在使用之前, 将所述原液悬浮液漩涡振荡。

[0102] LB/IPTG/X-gal/四环素倍替平板: 对 1L LB 培养基中包含 15g LB 琼脂的溶液进行高压灭菌并随后冷却至 <50°C。向所述 LB 培养基添加一毫升包含 IPTG (1.25g) 和 X-gal (1.0g 于 DMF (25mL) 中) 的溶液, 之后添加 1mL 四环素原液。将溶液的等分部分 (15mL) 倒入倍替平板中, 并且将所述平板于 4°C 下储存在黑暗中。

[0103] 软琼脂: 向去离子水 (1L) 添加胰蛋白胍 (10g)、酵母提取物 (5g)、NaCl (5g)、氯化镁 (1g) 和琼脂糖 (7g)。对产物进行高压灭菌, 分成 50mL 等分部分并以固体于室温下储存。在使用之前, 用微波炉融化所述软琼脂。

[0104] PEG/NaCl 噬菌体沉淀溶液: 以 20% (重量/体积) 的浓度向 2.5M NaCl 的去离子水溶液添加聚乙二醇-8000。对所述溶液进行高压灭菌, 于室温下储存。

[0105] 根据 PCT 公布 W0 2012/167081 (Wightman) 中所描述的合成程序来制备 N-(4-{[4-氨基-2-丁基-1H-咪唑并 [4,5-c] 喹啉-1-基] 氧基} 丁基)-6-(N'-异亚丙基胍基) 烟酰胺。

[0106] 使用山羊抗-豚鼠 IgG-HRP (得克萨斯州达拉斯的圣克鲁斯生物技术公司 (Santa Cruz Biotechnology, Dallas, TX)) 来进行 ELISA 测定。

[0107] 人尸体皮肤是冷冻储存的。在使用之前, 将冷冻部分放置在 PBS 中并升至室温。向皮肤样本的角质层侧施用所述噬菌体文库或所合成的肽序列。

[0108] 方法

[0109] 噬菌体扩增:

[0110] 向包含 LB 培养基 (2mL) 和四环素 (以 20μg/mL 的浓度) 的管接种大肠杆菌 ER2738 细胞, 并且随后于 37°C 下摇动 (200rpm) 孵育过夜。向包含 20μg/mL 四环素的 20mL 新鲜 LB 培养基添加等分部分 (100 微升)。于 37°C 下摇动烧瓶 (200rpm) 来孵育培养物, 并且使所述细胞生长至早期对数期 (OD<sub>600</sub>=0.5)。接着, 添加所述噬菌体样本, 并且将所述培养物于 37°C 下保持

4小时并摇动烧瓶。

[0111] 噬菌体纯化:

[0112] 通过8000rpm下离心10分钟来从噬菌体扩增培养物样本中移除大肠杆菌ER2738细胞。(以一体积上清液对五体积沉淀溶液的浓度)将所得上清液溶液添加至PEG/NaCl噬菌体沉淀溶液,并且随后于4℃下保持2小时。通过离心样本(8000rpm,30min),移除上清液并于2mL Tris-缓冲盐水(将50mM Tris-HCl溶于150mM NaCl缓冲盐水(pH 7.5)来制备Tris缓冲盐水试剂)中重悬噬菌体沉淀物来回收所得的噬菌体沉淀。将扩增的噬菌体产物于4℃储存。

[0113] 噬菌体滴度:

[0114] 向LB肉汤培养基(5-10mL)接种大肠杆菌ER2738的单菌落并于37℃下摇动(200rpm)孵育直至细胞达到早期对数生长期( $OD_{600}=0.5$ )。随后,将所述培养基分配到多个微量离心管(200微升每微量离心管,其中每个噬菌体稀释度制备一管)中。制备于LB肉汤培养基中十倍系列稀释度的扩增噬菌体产物,并且向包含培养基的单独微量离心管添加每个稀释度10微升的等分部分。将每个管漩涡振荡并于室温下孵育1-5分钟。

[0115] 将每个微量离心管的内容物转移到包含3mL保持在45℃下的软琼脂的对应培养管中。随后,将每个培养管漩涡振荡,并且将所述软琼脂倒到对应预热(37℃)的LB/IPTG/X-gal\四环素倍替平板上。将所得平板缓慢倾斜并旋转,以便将所述软琼脂均匀地铺展在平板上。使所述平板冷却五分钟,倒置并随后于37℃下孵育过夜。对具有大约100个噬菌斑的平板进行计数,从而提供稀释因子的调整。在平板上选择单个噬菌斑的噬菌体并进一步进行DNA测序。

[0116] 噬菌体的DNA测序:

[0117] 向96深孔板(每个孔具有2mL体积)的每个孔添加大肠杆菌ER2738细胞培养物(800微升如上文所述制备的早期对数期)。从如噬菌体滴度程序所述制备的倍替平板上随机选择单个噬菌斑的噬菌体。使用无菌牙签来从所述倍替平板上移除噬菌斑并将其转移到96孔板的孔中。将被感染的大肠杆菌ER2738细胞于37℃下摇动(300rpm)孵育4小时。随后,将液体培养物离心(4℃下4000rpm,60min),并且使用滚环扩增方法将从每个孔所得噬菌体上清液的等分部分(10微升)用于DNA测序。DNA测序在MCLAB(加利福尼亚州南旧金山(South San Francisco,CA))进行。

[0118] 自菌体展示文库的肽选择:

[0119] 使用实例1和2中所描述的程序来实现增强代表性活性剂化合物的皮肤渗透的肽的选择。

[0120] 实例1

[0121] (使用胶带剥离程序针对皮肤渗透增强的噬菌体展示文库选择)

[0122] 使用PIPETMAN经典移液管(威斯康星州米德尔顿的吉尔森公司(Gilson Inc., Middleton,WI))向1cm<sup>2</sup>人尸体皮肤部分施用每个噬菌体展示文库(200微升于PBS中)。使用粘合带来形成限定施用部位的方形框架。1小时之后,用PBS洗涤所述施用部位以移除残留在皮肤表面上的噬菌体。使用Scotch<sup>®</sup>盒胶带(明尼苏达州梅普尔伍德的3M公司(3M Company,Maplewood,MN))来实现皮肤样本的胶带剥离。将所述胶带放置在皮肤上,使得其覆盖整个施用部位,但未延伸超过所述框架边界(胶带条的宽度为大约1.5cm)。对于胶带的

每次施用,以300g手持辊的三个循环(3次向前行和3次向后行)将所述胶带固定到皮肤。接着,用手抓住胶带的一端并使用单向运动从所述皮肤表面迅速剥掉。在噬菌体文库施用部位处重复进行完全相同程序的胶带剥离23次以上。将胶带条21-24浸入PBS (5mL) 中以从粘合剂中回收噬菌体。另外,将第24次胶带剥离程序之后余下的皮肤样本浸入PBS (5mL) 中以从该样本中回收噬菌体。将回收的噬菌体混合并随后使其扩增。将扩增池的噬菌体加载到新的尸体皮肤样本上以进行另一个轮的选择和扩增。完成了总共四轮的选择和扩增。在最后(第4个)选择步骤之后,根据噬菌体滴度程序(上文所述)在琼脂平板上将噬菌体与大肠杆菌2738分离。从琼脂平板上随机挑出单个噬菌斑的噬菌体并使用上文所述的程序进行噬菌体DNA测序。成功地从96个分离噬菌体的噬菌斑的57个中获得DNA序列。

[0123] 实例2

[0124] (使用体内无毛豚鼠程序针对皮肤渗透增强的噬菌体展示文库选择)

[0125] 使用氧气或空气中3-5%的异氟烷来在小室中麻醉无毛豚鼠(200克雌性,来自马萨诸塞州威明顿的查尔斯河实验室(Charles River Laboratory,Wilmington,MA)),并且用同轴呼吸装置(COAX-3,从新泽西州梅德福湖的维健医疗公司(Viking Medical,Medford Lakes,NJ)获得)保持在1.5-3%的异氟烷下。将每个动物以侧卧放置在恒温控制的表面上,同时在实验持续期间,其口鼻处于麻醉面罩内侧。在程序进行期间,监测所述动物的呼吸速率并按需要调整麻醉水平。用70%异丙醇的水溶液擦拭用于加载噬菌体文库的背部部分。

[0126] 使用PIPETMAN经典移液管将在200微升PBS中包含约 $10^{11}$ 个噬菌体颗粒的噬菌体展示文库加载到 $1\text{cm}^2$ 动物背部皮肤部分上。为了控制湿度并降低施用部位处的污染,将Hill Top Chamber<sup>®</sup>(佛罗里达州圣彼德斯堡的希尔托普研究公司(Hill Top Research, St.Petersburg,FL))放置在施用部位上并用粘合剂粘附。1小时之后,从心脏流出10mL血液。将该血液立即转移到包含肝素(1000USP单位每mL)的小瓶。将该血液样本(10mL)与50mL LB肉汤培养基中的大肠杆菌ER2738细胞(早期对数期, $\text{OD}_{600}=0.5$ )混合,并且随后添加到300mL软琼脂。将包含血液和ER2738(约7mL每平板)的软琼脂的等分部分添加到五十个LB/IPTG/X-gal/四环素倍替平板。将这些平板于37℃下孵育过夜。从琼脂平板上随机挑出所得的单个噬菌斑的噬菌体并使用上文所述的程序进行噬菌体DNA测序。成功地从96个分离噬菌体的噬菌斑的48个中获得DNA序列。

[0127] 实例3

[0128] 表2中展示了由实例1和2的分离的核苷酸序列编码的肽序列(SEQ ID NO:1-8)。报导了所回收的噬菌斑中每个肽序列的频率。

[0129] 表2:

[0130]

SEQ ID NO:	序列	来自人尸体皮肤研究的 胶带剥离的噬菌斑的序 列频率 (n/57)	来自无毛豚鼠研究的 噬菌斑的序列频率 (n/48)
1	ACLPGLVLSG	1	0
2	ACSLPWDASC	1	0
3	ACDTPRLTHC	2	0
4	TWTQAWPWGWTW	1	0
5	AKSSWWGRAYWY	1	0
6	ACLDNTFRAC	2	11
7	ASSTLNTLAQ	9	5
8	ASSDIPLFTRY	1	4

[0131] 实例4

[0132] 合成肽SEQ ID NO:1-8(表2)的修饰形式,其中每个肽序列在N-末端上侧接SHS肽序列并在C-末端上侧接GGGS(SEQ ID NO:9-14和16,表3中)、WPA(SEQ ID NO:15,表3中)或G(SEQ ID NO:17)肽序列。

[0133] 实例5

[0134] 使用无毛豚鼠皮肤来进行测试皮肤渗透增强的体外测定。使用了来自动物背部区域的完整皮肤样本。制备表3中每个肽的单个测试样本,使其包含肽(以1mg/mL的浓度)、FITC钠盐(以10mg/mL的浓度)和PBS(200微升)。制备仅包含FITC钠盐(以10mg/mL的浓度)和PBS(200微升)的对照样本。使用PIPETMAN经典移液管向豚鼠皮肤的角质层侧的单独的1cm<sup>2</sup>部分施用每个肽测试样本。以相同的方式施用对照样本。将经处理的皮肤样本盖上,于室温下保持1小时并随后用去离子水洗涤5分钟以移除任何残留在皮肤表面上的FITC。使用Scotch<sup>®</sup>盒胶带来实现每个皮肤施用部位的胶带剥离。将所述胶带放置在皮肤上,使得其覆盖单个施用部位的整个表面(胶带条的宽度为大约1.5cm)。对于每个胶带剥离程序,以300g手持辊的三个循环(3次向前行和3次向后行)将所述胶带固定到皮肤。接着,用手抓住所述胶带的一端并使用单向运动从皮肤表面迅速剥掉。在每个施用部位处重复进行完全相同程序的胶带剥离总共20个胶带剥离操作。使用340nm下的紫外光针对FITC成像每个样本的第20个胶带条。存在胶带上的荧光点指示FITC渗透到第20个胶带条中。此结果呈现于表3中。

[0135] 表3:

[0136]

SEQ ID NO:	序列	在胶带条#20上可见荧光点(实例5)
9	SHSACLPGLVLSGCGGS	NT
10	SHSACSLPWDASC	是
11	SHSACDTPRLTHC	NT
12	SHSTWTQAWPWGWTW	是
13	SHSAKSSWWGRAYWY	是
14	SHSACLDNTFRAC	是
15	SHSASSTLNTLAQWPA	是

16	SHSASSDIPLFTRYGGGS	是
	对照样本(无肽)	否

[0137] NT=未测试

#### [0138] 实例6

[0139] 使用人尸体皮肤来进行测试皮肤渗透增强的体外测定。制备了两个测试样本(A和B)和对照样本。测试样本A包含GFP(以2.55mg/mL的浓度)、0.1mg肽ACLDNTFRAC(SEQ ID NO: 6, 表2)和PBS(50微升)。测试样本B包含GFP(以2.55mg/mL的浓度)、0.1mg肽SHSACLDNTFRACGGGS(SEQ ID NO: 14, 表3)和PBS(50微升)。对照样本包含GFP(以2.55mg/mL的浓度)和PBS(100微升)。使用PIPETMAN经典移液管向人尸体皮肤的单独的1cm<sup>2</sup>部分施用每个样本。使用粘合带来形成限定每个施用部位的方形框架。将经处理的皮肤样本盖上,于室温下保持2小时并随后用去离子水洗涤5分钟以移除任何残留在皮肤表面上的GFP。使用Scotch<sup>®</sup>盒胶带来实现每个皮肤施用部位的胶带剥离。将所述胶带放置在皮肤上,使得其覆盖单个施用部位的整个表面,但未延伸超过所述框架边界(胶带条的宽度为大约1.5cm)。对于每个胶带剥离程序,以300g手持辊的三个循环(3次向前行和3次向后行)将所述胶带固定到皮肤。接着,用手抓住所述胶带的一端并使用单向运动从皮肤表面迅速剥掉。在每个施用部位处重复进行完全相同程序的胶带剥离总共20个胶带剥离操作。使用340nm下的紫外光针对GFP成像所述胶带条。对于测试样本A,皮肤样本中GFP的绿色荧光信号最深渗透至胶带条14。对于测试样本B,皮肤样本中GFP的绿色荧光信号最深渗透至胶带条20。对于对照样本,皮肤样本中GFP的绿色荧光信号仅最深渗透至胶带条6。

#### [0140] 实例7

[0141] 使用无毛豚鼠皮肤来进行测试皮肤渗透增强的体外测定。使用了来自动物背部区域的完整皮肤样本。制备包含FITC钠盐(以0.05mg/mL的浓度)、肽SHSACLDNTFRACG(SEQ ID NO: 17, 以2.5mg/mL的浓度)和PBS(40微升)的测试样本。制备仅包含FITC钠盐(以0.05mg/mL的浓度)和PBS(40微升)的对照样本。使用PIPETMAN经典移液管向豚鼠皮肤的角质层侧的单独的0.25cm<sup>2</sup>部分施用每个样本。将经处理的皮肤样本盖上,于室温下保持3小时并随后于4℃下过夜。在紫外光(340nm)下视觉地检查与施用侧相对的皮肤样本侧。在与施用部位直接相对的皮肤侧上可见的荧光点用于确认FITC渗透穿过皮肤。对于测试样本,在与施用部位直接相对的皮肤侧上可见荧光点。对于对照样本,在与施用部位直接相对的皮肤侧上未见荧光点。

#### [0142] 实例8

[0143] 使用SHSACLDNTFRACGGGS(SEQ ID NO: 14)作为皮肤渗透增强剂进行体内局部接种疫苗研究。按照PCT公布WO 2012/167081(Wightman)中描述的并以引用方式并入本文的一般程序,将卵白蛋白抗原共价结合到Toll样受体(TLR)基疫苗佐剂组分。以10倍摩尔过量将溶解于二甲亚砜(DMSO)的4-甲酰苯甲酸琥珀酰亚胺酯(SFB)(伊利诺伊州罗克福德的赛默科技(Thermo Scientific, Rockford, IL))添加到卵白蛋白。随后,将所述溶液于室温下孵育2小时。通过使用预先用pH 6.0, 包含0.15NaCl的0.1M磷酸盐缓冲液平衡的ZEBRA离心柱(赛默科技(Thermo Scientific))将所述SFB修饰的卵白蛋白(表示为OVA-SFB)与游离SFB分离。针对缀合反应,该步骤也改变制备中OVA-SFB溶液的pH。接着,将TLR基疫苗佐剂组分、N-(4-[[4-氨基-2-丁基-1H-咪唑并[4,5-c]喹啉-1-基]氧基]丁基)-6-(N'-异亚丙基胍基)

烟酰胺溶解于DMSO并以5倍摩尔过量添加到缓冲的OVA-SFB中。反应介质的酸性条件导致乙酰亚胺保护基团的去保护以原位形成N-(4-{[4-氨基-2-丁基-1H-咪唑并[4,5-c]喹啉-1-基]氧基}丁基)-6-胍基烟酰胺(表示为TLR-VA)。利用预先用PBS平衡的ZEBAL离心柱将通过OVA-SFB至TLR-VA的共价缀合(表示为OVA-TLR缀合物)而形成的所得产物与未缀合组分分离。

[0144] 制备了三种疫苗制剂。疫苗制剂1包含PBS中浓度为0.625mg/mL的OVA-TLR缀合物。疫苗制剂2包含PBS中浓度为2.5mg/mL的OVA-TLR缀合物。疫苗制剂3包含在PBS中的OVA-TLR缀合物(以2.5mg/mL的浓度)和肽SHSACLDNTFRACGGGS(SEQ ID NO:14,以1mg/mL的浓度)。

[0145] 使用氧气或空气中3-5%的异氟烷来在小室中麻醉无毛豚鼠(200克雌性,来自查尔斯河实验室(Charles River Laboratory))并且用同轴呼吸装置(COAX-3,从维健医疗公司(Viking Medical)获得)保持在1.5-3%的异氟烷下。将每个动物以侧卧放置在恒温控制的表面上,同时在实验持续期间,其口鼻处于麻醉面罩内侧。在程序进行期间,监测所述动物的呼吸速率并按需要调整麻醉水平。用70%异丙醇的水溶液擦拭用作免疫部位的背部部分。

[0146] 使用了三组动物。组1(五个动物)中,对每个动物进行皮下注射800微升的疫苗制剂1。将制剂的总体积注射横穿位于动物背部的四个注射部位(即以四次单独的200微升注射给药疫苗制剂1)。在组2(四个动物)中,向每个动物局部地施用总共800微升的疫苗制剂2。具体地,将制剂的总体积施用横穿位于动物背部的四个施用部位。对于四个部位中的每一个,使用PIPETMAN经典移液管,将200微升疫苗制剂2施用到1cm<sup>2</sup>的皮肤部分。在组3(五个动物)中,使用针对疫苗制剂2所描述的相同程序向每个动物局部地施用总共800微升的疫苗制剂3。对于所有三个组,将Hi11Top Chamber<sup>®</sup>放置在每个施用部位上和并用粘合剂粘附。给药约4至12小时后移除小室。组1和2用作比较例。

[0147] 在初始免疫后3周、6周和9周,使用对应的疫苗制剂和上文所述的方法来刺激每个组中的动物。最后刺激后两周,小鼠流血。将所述血液样本于室温下保持30分钟并随后在无主动制动的2000RCF下离心15分钟。将每个样本的上清液(血清)转移到新的收集管并于-80℃下储存。使用标准血清ELISA在卵白蛋白涂覆的微量滴定板中以1/6250稀释的血清样本来确定卵白蛋白特异性抗体滴度。表4中以平均OD450值报导了特异性免疫(Ab)应答。

[0148] 表4:

[0149]

组	组中的动物	免疫方法	制剂中的皮肤渗透增强肽	特异性免疫(Ab) 应答(平均 OD450)	标准偏差
1 (比较例)	5	皮下注射	无	3.994	0.013
2 (比较例)	4	局部施用	无	0.210	0.168
3 (实例)	5	局部施用	有	2.028	0.768

[0150] 上文所述和实例中说明的实施例仅以举例的方式呈现且不旨在作为对本公开的概念和原则的限制。因此,本领域的普通技术人员应当理解,在不脱离本公开的实质和范围的情况下可对元素及其构造和布置方式作出各种改变。

[0151] 本文所引用的所有参考文献和公布全文均明确地以引用方式并入本公开。

[0152] 序列表独立文档

	SEQ ID NO: 1	ACLPGVLGSC
	SEQ ID NO: 2	ACSLPWDASC
	SEQ ID NO: 3	ACDTPRLTHC
[0153]	SEQ ID NO: 4	TWTQAWPWGWTW
	SEQ ID NO: 5	AKSSWWGRAYWY
	SEQ ID NO: 6	ACLDNTFRAC
	SEQ ID NO: 7	ASSTTLNTLAQ
	SEQ ID NO: 8	ASSDIPLFTRY
	SEQ ID NO: 9	SHSACLPGVLGSCGGGS
	SEQ ID NO: 10	SHSACSLPWDASC GGGS
	SEQ ID NO: 11	SHSACDTPRLTHC GGGS
[0154]	SEQ ID NO: 12	SHSTWTQAWPWGWTW GGGS
	SEQ ID NO: 13	SHSAKSSWWGRAYWY GGGS
	SEQ ID NO: 14	SHSACLDNTFRAC GGGS
	SEQ ID NO: 15	SHSASSTTLNTLAQWPA
	SEQ ID NO: 16	SHSASSDIPLFTRY GGGS
	SEQ ID NO: 17	SHSACLDNTFRACG