



(12) 发明专利申请

(10) 申请公布号 CN 104968324 A

(43) 申请公布日 2015. 10. 07

(21) 申请号 201380070121. 7

(51) Int. Cl.

(22) 申请日 2013. 11. 12

A61K 8/44(2006. 01)

(30) 优先权数据

1220354. 3 2012. 11. 12 GB

A61Q 19/00(2006. 01)

(85) PCT国际申请进入国家阶段日

A61K 9/00(2006. 01)

2015. 07. 10

A61K 31/198(2006. 01)

A61P 17/00(2006. 01)

(86) PCT国际申请的申请数据

PCT/GB2013/052973 2013. 11. 12

(87) PCT国际申请的公布数据

W02014/072747 EN 2014. 05. 15

(71) 申请人 美地医药有限公司

地址 英国吉尔福德

申请人 雷丁大学

(72) 发明人 娜塔莎·阿斯基 安德烈·科布

艾德里安·克里斯多弗·威廉斯

马克·巴里·布朗

(74) 专利代理机构 中科专利商标代理有限责任

公司 11021

代理人 柳春琦

权利要求书2页 说明书42页 附图8页

(54) 发明名称

包含非天然吸湿性氨基酸的皮肤组合物

(57) 摘要

非天然的吸湿性氨基酸可用于增强皮肤的水分保持和摄取性质。具体地，此类氨基酸是 N- 羟基丝氨酸，N- 羟基甘氨酸，L- 高丝氨酸， α - 羟基甘氨酸，2-(氨基氧基)-2- 羟基乙酸，2- 羟基-2-(羟基氨基)乙酸，2-(氨基氧基)乙酸，和它们的组合。

1. 用于增强动物的外部角质结构的水化和 / 或水分保持和 / 或摄取性质的非天然的吸湿性氨基酸。
2. 用于根据权利要求 1 的用途的非天然的吸湿性氨基酸, 其中所述结构是皮肤。
3. 用于根据权利要求 1 或 2 的用途的非天然的吸湿性氨基酸, 其中所述氨基酸能够在 32°C 从相对湿度 (RH) ≤ 50% 的大气吸收并保留水分。
4. 用于根据权利要求 3 的用途的非天然的吸湿性氨基酸, 其中所述氨基酸能够在 32°C 从相对湿度 (RH) ≤ 40% 的大气吸收并保留水分。
5. 用于根据任一前述权利要求的用途的非天然的吸湿性氨基酸, 其中所述宿主是哺乳动物。
6. 用于根据权利要求 5 的用途的非天然的吸湿性氨基酸, 其中所述宿主是人。
7. 包括眼用制剂在内的局部制剂, 所述制剂包含至少一种权利要求 1-4 中任一项所限定的氨基酸。
8. 根据权利要求 7 的制剂, 其还包含一种或多种另外的增湿成分。
9. 根据权利要求 7 或 8 的制剂, 其还包含一种或多种另外的其他氨基酸。
10. 根据权利要求 7-9 中任一项的制剂, 其中所述制剂通过使用 NMF 的一种或多种氨基酸成分而模仿 NMF。
11. 根据权利要求 10 的制剂, 其中所述 NMF 的一种或多种氨基酸成分以近似于在 NMF 中发现的量和 / 或比率存在。
12. 根据权利要求 7-11 中任一项的制剂, 其中所述制剂通过使用 NMF 的一种或多种非氨基酸成分而模仿 NMF。
13. 根据权利要求 12 的制剂, 其中所述 NMF 的一种或多种非氨基酸成分以近似于在 NMF 中发现的量和 / 或比率存在。
14. 根据权利要求 12 或 13 的制剂, 其中所述 NMF 的一种或多种非氨基酸成分包括一种或多种盐。
15. 根据权利要求 14 的制剂, 其中所述一种或多种盐选自钠盐、钾盐、HCl 盐和二乙胺盐。
16. 用于根据任一前述权利要求的用途的氨基酸或根据任一前述权利要求的组合物, 其中所述氨基酸选自 N- 羟基丝氨酸, N- 羟基甘氨酸, L- 高丝氨酸, α - 羟基甘氨酸, 2-(氨基氧基)-2- 羟基乙酸, 2- 羟基-2-(羟基氨基) 乙酸, 2-(氨基氧基) 乙酸和它们的组合。
17. 根据权利要求 16 的氨基酸, 其选自 α - 羟基甘氨酸或 L- 高丝氨酸, 或二者。
18. 任一前述权利要求所限定的氨基酸或包含所述氨基酸的组合物, 其用于动物的外部角质结构的化妆处理。
19. 根据权利要求 18 的氨基酸, 其中所述结构是皮肤。
20. 根据权利要求 18 或 19 的氨基酸, 其用于选自由下述组成的组的用途 :
 - a) 用于润肤剂制剂 ;
 - b) 用于治疗干眼的眼用制剂 ;
 - c) 用于湿润增厚的皮肤 ;
 - d) 用于指甲和 / 或蹄软化 ;
 - e) 与脱毛技术组合使用 ;

- f) 用在面膜中；
- g) 用于在皮肤病症的治疗中水化皮肤；和
- h) 和用于在施用隔离剂之前水化皮肤；
- i) 用于伤口愈合。

21. 权利要求 1-17 中任一项所限定的氨基酸，其用于促进药物的经皮吸收。

22. 权利要求 1-17 中任一项所限定的氨基酸或包含所述氨基酸的组合物，其用作抗炎剂，任选地与其他抗炎剂组合。

23. 根据权利要求 22 的氨基酸或组合物，其中所述炎症中起作用的因子是 GM-CSF。

24. 根据权利要求 22 或 23 的氨基酸或组合物，其中所述氨基酸选自 N- 羟基丝氨酸、L- 高丝氨酸、N- 羟基甘氨酸和包含它们中的一种或多种的组合。

25. 权利要求 1-17 中任一项所限定的氨基酸或包含所述氨基酸的组合物，其用作抗刺激剂。

26. 根据权利要求 25 的氨基酸或组合物，其中所述氨基酸选自 N- 羟基丝氨酸、L- 高丝氨酸、N- 羟基甘氨酸和包含它们中的一种或多种的组合。

27. 用于经皮施用药物的组合物，其包含权利要求 1-17 中任一项所限定的氨基酸，以有助于所述药物的皮肤穿透。

28. 用于经皮施用药物的组合物，其包含权利要求 1-17 中任一项所限定的氨基酸，以减少所述药物的刺激。

29. 任一前述权利要求所限定的氨基酸或包含所述氨基酸的组合物，其中所述氨基酸在 32°C 具有不大于 80% 的潮解相对湿度 (DRH)。

30. 任一前述权利要求所限定的氨基酸或包含所述氨基酸的组合物，其中所述氨基酸具有至少 0.7 的 O/C 比。

包含非天然吸湿性氨基酸的皮肤组合物

[0001] 本申请涉及适于增强皮肤的水化和增湿的物质和组合物。

[0002] 干燥病 (Xerosis), 或干性皮肤, 是大部分人在其一生中的某个点经历的常见病症。季节性的干燥病在寒冷干燥的冬季月份中常见, 并且证据表明干燥病随年龄变得更流行 (Whit-Chu, 2011)。多种炎性皮肤病症, 如特应性皮炎 (atopic dermatitis)、刺激性接触性皮炎 (irritant contact dermatitis) 和银屑病 (psoriasis), 引起局部面积的干燥性皮肤。另外, 一些患者具有遗传性病症, 如鱼鳞病 (ichthyosis), 导致慢性干性皮肤。

[0003] 天然保湿因子 (NMF) 的重要作用是维持充分的皮肤水化。角质层的充分水化起到三个主要作用 : (1) 其保持皮肤的可塑性, 防止其受损伤 ; (2) 其允许水解酶在脱皮过程中起作用 (Rawlings, 1994), 以及 (3) 其有助于最适宜的角质层屏障功能。

[0004] NMF 主要由游离氨基酸和这些氨基酸的多种衍生物组成, 所述衍生物如羧酸吡咯烷酮钠 (焦谷氨酸盐, 2- 氧代 - 吡咯烷酮羧酸, 或 PCA), 尿刊酸 (天然的紫外 [UV] 光吸收剂), 无机盐, 糖, 和乳酸以及脲 (表 2) (Clar, 1981)。目前与 NMF 相关的无机盐包括氯化物、磷酸盐以及钠、钾、钙和镁的柠檬酸盐。NMF 包装在角质细胞 (corneocytes) 中, 占角质细胞质的约 10% 和角质层干重的 20% 至 30%。

[0005] NMF 成分是高度有效的湿润剂, 其吸收并结合来自大气或来自较深皮肤层的水分, 将水分汲取到角质细胞中。这一过程甚至可以在相对湿度低至 50% 时发生, 允许角质细胞在低湿度环境中保持充足的水分水平。水分的吸收是如此有效的, 以致 NMF 基本上溶解在其所吸收的水中 (Rawlings, 1994)。水化的 NMF, 特别是中性和碱性的氨基酸, 形成与角蛋白纤维的离子相互作用, 减少纤维之间的分子间力, 并且由此增加角质层的弹性。这种弹性起作用使得皮肤看起来健康柔软, 并且有助于防止由机械应力引起的开裂或剥落。另外, NMF 允许角质细胞平衡由围绕其的细胞内 “水泥 (cement)” 施加的渗透压。

[0006] 保持溶质浓度平衡对于防止大量水分注入 (如在长时间洗浴后在发皱的皮肤中观察到的) 和水分流出 (其将引起角质细胞收缩) 二者。

[0007] 传统上, 认为角质层不是活的组织。尽管这在技术上是真实的, 但角质层是一种动态结构, 其中多种酶仍然起作用, 并且这些酶需要特定量的游离的或液态的水来发挥作用。结合 NMF 的水提供大量的这种必需水, 并且这些酶中的多种参与脱皮过程, 破坏在皮肤的大部分表层中将角质细胞保持在一起的多种键和力。研究表明这些脱皮酶的活性受组织内水分水平的影响 (Harding, 2000)。

[0008] NMF 减少或缺少 NMF 已经与多种角质层异常相关, 所述角质层异常在临幊上表现为具有起皮、剥落或者甚至皲裂和开裂的干性皮肤区域。这些病症包括特应性皮炎、银屑病、寻常性鱼鳞病 (ichthyosis vulgaris) 和干燥病。在特应性皮炎中, 已经证明皮肤中 NMF 的量通常减少 (Palmer, 2006), 而在银屑病皮肤和鱼鳞病 (ichthyosis) 中, NMF 基本上不存在 (Harding, 2000)。在更常见的皮肤病症, 如干燥病中, 也观察到减少的 NMF 水平。已经表明常规的肥皂清洗皮肤从角质层的表层去除 NMF。事实上, 最外层典型地表现出减少的 NMF 水平, 这主要是由于洗浴或暴露于 UV 光。另外, 衰老似乎急剧减少角质层中的氨基酸含量。研究已表明皮肤水化与其氨基酸含量之间的显著相关性 (Horri, 1989)。所有这些

病症表现出异常的脱皮特征,角质细胞积聚,导致干性皮肤明显的干燥、粗糙、起皮和剥落性质 (Harding, 2000)。

[0009] NMF 的来源是大量时间的深入研究的主题。关于尿刊酸和 PCA 的大量研究确定这些化合物来源于如上文所述被假定不包含活性酶的角质层中的氨基酸。作为该研究的结果,现在认识到,尽管角质层在生物学上是死亡的,但是其在生物化学上非常有活性。分析角质层的氨基酸组成最终导致这样的发现 :NMF 成分是由聚丝蛋白蛋白水解产生的分解产物 (Scott, 1982)。

[0010] 聚丝蛋白是一种位于新形成的角质细胞中的存在于颗粒层上方的角质细胞层中的大的富含组氨酸的蛋白。聚丝蛋白的功能是聚集纤丝,并且具体地是将表皮的和毛根内鞘角蛋白纤丝排列成高度有序的线性阵列或粗原纤维。

[0011] 聚丝蛋白具有一种高分子量前体,即聚丝蛋白原,其源于颗粒层的透明角质颗粒。当粒细胞分化成角质化细胞时,聚丝蛋白原去磷酸化并且降解成高碱性、低分子量的聚丝蛋白。正是在这一阶段聚丝蛋白起作用聚集纤丝,催化角蛋白纤维之间的二硫键形成。这些聚集的纤维形成包绕进入角质层的细胞的包膜的一部分,允许其保持角质细胞特有的极扁平的形状 (Scott, 1982)。

[0012] 一旦角蛋白纤维已经形成,聚丝蛋白经受几乎是立即的蛋白水解和降解攻击。该降解过程中最初的步骤之一是聚丝蛋白精氨酸残基转化为瓜氨酸残基。该过程增加聚丝蛋白分子的酸性,导致聚丝蛋白 / 角蛋白复合物的松懈,并且增加蛋白水解酶的接入。在这一点上,聚丝蛋白分子完全降解成其各自的氨基酸和衍生物,这将占角质层中存在的游离氨基酸及其衍生物的 70–100% (Scott, 1982)。

[0013] 随着角质细胞向角质层的更表层移动,发生聚丝蛋白向 NMF 的转化。聚丝蛋白加工的时间和在角质层中的准确深度取决于角质细胞内的水活性和外部的相对湿度。在潮湿的环境中,当没有干燥作用时,聚丝蛋白的水解几乎在最外面的表面发生。在低湿度中,水解在较深的层中发生,在此处, NMF 的作用是防止皮肤脱水 (Harding, 2000)。已经证明,敷到皮肤上的闭合贴片可以完全防止聚丝蛋白降解。

[0014] 聚丝蛋白转化为 NMF 还受角质细胞内水活性的控制,并且仅在狭窄范围内发生 – 如果水活性太高,聚丝蛋白是稳定的,而如果其太低,水解酶将不能作用并且降解聚丝蛋白 (Harding, 2000)。由此,皮肤的水化状态影响聚丝蛋白的降解过程。

[0015] 重要地,NMF 的产生在角质细胞内产生很大的渗透压。因此,直到角质细胞已经成熟且加强,并且向角质层的更表面层迁移时,才发生降解过程,在角质层的更表层中周围的脂质和其他细胞外成分平衡所产生的渗透压 (Harding, 2000)。

[0016] 通常认为 NMF 包括通过对丙酮 / 醚处理的角质层进行 30 分钟水处理释放的可水提取的物质 (Jokura, 1995)。所述可水提取的物质被认为是在角质层内发现的全部的天然保湿因子。典型地,NMF 的组成大致为 :氨基酸 48.3%;PCA10.2%;尿酸 2.1%;乳酸 10.1%;柠檬酸 7.9%;其他有机酸 2%;尿素 14%, 和无机离子 5.2%。占 NMF 的 5% 的无机离子包括钾、钠和钙。钙离子和钾离子在表皮的终末分化中是重要的,并且在屏障受扰时消失,而镁离子加速角质层中皮肤屏障的恢复 (Nakagawa, 2004)。羧酸吡咯烷酮钠 (PCA) 和乳酸都是高度吸湿性的,并且充当有效的保湿剂,二者大约占 NMF 的 10%。最大百分数的 NMF 是占 48% 的氨基酸,其中中性氨基酸占 34.5%,酸性氨基酸占 5%,碱性氨基酸占其余的 8%。

[0017] 丝氨酸是在 NMF 内发现的最大的游离氨基酸，并且占 NMF 中发现的所有游离氨基酸的 36%。甘氨酸是第二大游离的氨基酸，占 22%，接下来是丙氨酸，占 NMF 中游离氨基酸的 13%。组氨酸 (8%)、鸟氨酸 (7%)、瓜氨酸 (6%)、精氨酸 (6%) 和脯氨酸 (2%) 也都存在于 NMF 中。

[0018] 尽管自二十世纪六十年代以来一些皮肤研究者就已经了解 NMF 在皮肤水化中的重要性，在二十世纪八十年代确定了 NMF 与聚丝蛋白加工的关系，但是，仅随着最近聚丝蛋白功能丧失突变的鉴定才理解相关性的充分显著性。

[0019] 已经表明遗传的聚丝蛋白基因 (FLG) 的功能丧失突变引起中度 - 至 - 重度寻常性鱼鳞病，并且使患者容易患特应性皮炎，包括复发的或持续到成年期的早发型特应性湿疹 (early-onset atopic eczema)。在特应性皮炎中，已经表明 PCA、尿刊酸和组氨酸的水平与 FLG 基因型相关，其在携带多种 FLG 突变的患者中减少。已经鉴定了 FLG 基因中的多个突变；这些变体中仅有两种由约百分之九的源于欧洲的人携带，表明聚丝蛋白突变在特定人口中的流行性。携带功能丧失的聚丝蛋白突变的患者在角质层中在所有深度都具有显著减少的 NMF 水平。另外，与非携带者相比，聚丝蛋白突变的携带者表现出增加的经表皮水分流失。

[0020] 聚丝蛋白蛋白水解异常可能响应环境因素发生。如上文所示，低湿度减弱水解酶使聚丝蛋白分解为 NMF 的能力，因此产生皮肤表面干燥。另外，已经证明 UV 辐射减弱聚丝蛋白向其 NMF 成分的天然降解。此外，皮肤中 NMF 水平随年龄下降，并且这种下降已经归因于在老年人中减少的聚丝蛋白原合成和减少的屏障功能。

[0021] 如上所示，角质层中所包含的大约三分之一的水是结合水，其余的是游离水。增加游离水的水平对角质层的弹性没有影响，并且是结合 NMF 的水为皮肤提供其弹性性质。已经证明，通过外部施用含有 NMF 的保湿剂替代或补充皮肤中的 NMF 供应是成功的治疗干燥病皮肤的方法 (Weber, 2012)。

[0022] 一些 NMF 成分已经用于增湿赋形剂 (moisturising vehicles) 有几十年了，却并不知晓它们为什么具有一些作用。例如，尿素早在 1943 年就已经包含在保湿膏中 (Harding, 2000)。然而，直到 1966 年才测量正常和特应性患者的皮肤尿素水平，现在已知该水平在患有特应性皮炎的患者和老年人皮肤中是减少的。已经表明局部施用尿素或其前体精氨酸校正尿素的不足。乳酸盐是在 1946 年首先报道用在保湿剂中作为鱼鳞病的治疗。已经表明，与不含乳酸盐的保湿剂相比，其改善并且防止干性皮肤症状的重现。L- 乳酸和 D, L- 乳酸似乎是通过刺激角质层中的神经酰胺合成而起作用。PCA 是最常见的单一 NMF 成分，并且已经表明，由于肥皂清洗和 / 或年龄的原因而在皮肤的最外层中减少。已经广泛地报道局部应用 PCA 减轻干性皮肤的症状 (Harding, 2000)。

[0023] 在皮肤内，水可以通过被动扩散从角质层迁移到大气。水的这种正常的迁移称为经表皮水分流失 (TEWL)。这是由于对水渗透没有绝对的屏障而导致的。在健康的表皮中，在颗粒层 / 角质层接界处的含水量应该约为 40%，在皮肤表面含水量应该为 15% -25%。当含水量约为 10% 以下时，发生明显的皮肤起皮。

[0024] 实践皮肤病学 (Practical Dermatology) (2012 年 7 月, 24 - 26) 提到一种酪氨酸衍生物，但没有公开该衍生物的性质，发现该衍生物当局部施用时在相对短的时间内显著增加 (build) 皮肤基质的体积。没有提供进一步的限制。

[0025] 现在令人惊讶地发现非天然的吸湿性氨基酸可用于水化，并且另外地增强皮肤和角质结构 (keratinaceous structures) 的水分保持和摄取性质。这些性质还使得这些氨基酸能够充当可以与其他渗透增强剂协同作用的渗透增强剂。

[0026] 因此，在第一方面，本发明提供用于增强动物外部角质结构的水化和 / 或水分保持和 / 或摄取性质的非天然的吸湿性氨基酸。优选的所述结构是皮肤，但是本发明的氨基酸可以用在指甲、角、毛发和眼睛上。

[0027] 本发明还提供非天然的吸湿性氨基酸用于增强动物的外部角质结构的水化和 / 或水分保持和 / 或摄取性质的用途。

[0028] 本发明还提供用于增强动物的外部角质结构的水化和 / 或水分保持和 / 或水分摄取性质的方法，所述方法包括向所述皮肤施用有效量的非天然的吸湿性氨基酸。

[0029] 一个令人惊讶的发现是本发明的单个氨基酸能够增强基本上亲脂性的药物的渗透或经皮吸收，观察到对于增加亲脂性的增加的作用。本领域常规的渗透增强剂对不能充分渗透皮肤的那些药物表现出最大的作用。然而，本发明的氨基酸的增强作用表现为随 $\log P$ 增加，以致该作用不如对那些具有更加亲水的性质的药物那样大，但是随着增加的亲脂性而增加。

[0030] 用于本文时，术语“药物”是指可以需要局部或经皮施用的任意药理学活性剂。

[0031] 因此，进一步提供非天然氨基酸作为旨在用于局部施用的药物的渗透增强剂的用途。示例性的此类药物包括甾体和保留在角质层中并且与其粘合或结合到角蛋白的其他分子，以及 $\log P > 3$ 的那些，但是渗透增强作用适用于所有用于局部施用的药物，优选那些较亲水性具有更多的亲脂性的药物。

[0032] 三种优选的药物和氨基酸组合为：甲硝唑 (metronidazole) 和 N- 羟基丝氨酸；双氯芬酸二乙胺 (diclofenac diethylamine, DDEA) 和 N- 羟基甘氨酸；以及阿昔洛韦 (acyclovir) 和 L- 高丝氨酸。然而，通常，本发明优选的氨基酸也优选作为渗透增强剂，对于本发明的大部分氨基酸，特别是具有至少 0.7 的 O/C 比的那些氨基酸，观察到有益的作用。1 以上的 O/C 比是有益的。

[0033] 用作渗透增强剂的优选的氨基酸包括 N- 羟基丝氨酸、N- 羟基甘氨酸、L- 高丝氨酸和 α - 羟基甘氨酸。其他适当的药物如下：

[0034]

药物类型	
局部止痒药(antipruritics)	克罗米通(Crotamiton) 盐酸多塞平(Doxepin hydrochloride) 二甲基硫蒽(Mesulphen) 聚乙二醇单十二醚(Polidocanol)
1局部麻醉剂(anaesthetics)	阿美索卡因(Amethocaine) (溶液或霜剂中的盐酸盐, 凝胶或软膏中的碱) 阿米卡因(Amylocaine) (盐酸盐) 苯佐卡因(Benzocaine) 丁哌卡因(Bucricaine) (盐酸盐) 硫酸布他卡因(Butacaine Sulphate) 苦味酸氨基苯甲酸丁酯(Butyl Aminobenzoate Picrate)

[0035]

	Cincocaine (碱、盐酸盐或苯甲酸盐) 盐酸二甲异喹(Dimethisoquin Hydrochloride) 盐酸达克罗宁(Dyclocaine Hydrochloride) 乙基氯(Ethyl Chloride) 利多卡因(Lidocaine) 利诺卡因(Lignocaine) 麦替卡因(Myrtocaine) 奥昔卡因(Oxethazaine) (Oxetacaine) 丙胺卡因(Prilocaine) 盐酸丙泮卡因(Propanocaine Hydrochloride) <u>丁卡因(Tetracaine)</u>
抗阻胺药(Antihistamines)	安他唑啉(Antazoline) 盐 酸 氯 环 利 嗪 (Chlorcyclizine Hydrochloride) 二 甲 菲 定 马 来 酸 盐 (Dimethindene Maleate) 苯海拉明(Diphenhydramine) 希司咯定(Histapyrrodine) 盐 酸 异 西 喷 地 (Isothipendyl Hydrochloride) 美吡拉敏(Mepyramine) 马来酸美吡拉敏(Mepyramine Maleate) 盐 酸 托 普 帕 敏 (Tolpropamine Hydrochloride) 盐 酸 曲 比 那 敏 (Tripeleannamine Hydrochloride) 盐酸曲普利啶(Triprolidine Hydrochloride)
皮质类甾醇(Corticosteroids)	双 丙 酸 阿 氯 米 松 (Alclometasone dipropionate) 双 丙 酸 倍 氯 米 松 (Beclomethasone

[0036]

	dipropionate) 倍他米松戊酸酯(Betamethasone valerate) 丙酸氯倍他索(Clobetasol propionate) 丁酸氯倍他松(Clobetasone butyrate) 去羟米松(Desoximetasone) 戊酸二氟可龙(Diflucortolone valerate) 氟轻松(Fludroxycortide/ Flurandrenolone) 氟西奈德(Fluocinolone acetonide) 氢化可的松(Hydrocortisone) 醋酸氢化可的松(Hydrocortisone acetate) 丁酸氢化可的松(Hydrocortisone butyrate)
用于银屑病的局部制剂	卡泊三醇(Calcipotriol) 煤焦油(Coal tar) 二羟基蒽酚(Dithranol) 5-尿嘧啶(5-Fluouracil) 环孢素(Ciclosporin) 富马酸(Fumaric acid) 氯萘帕林(Lonapalene) 甲氨蝶呤(Methotrexate) 甲氧沙林(Methoxsalen) 水杨酸(Salicylic acid) 他卡西醇(Tacalcitol) 他扎罗汀(Tazarotene)
用于痤疮(acne)的局部制剂	壬二酸(Azelaic acid) 过氧苯甲酰(Benzoyl peroxide) 二硫代水杨酸(Dithiosalicylic acid) 莫维A胺(Motretinide) 间苯二酚(Resorcinol)
用于痤疮的局部抗菌剂	克林霉素(Clindamycin)

[0037]

	红霉素(Erythromycin)
“皮肤病学药物”	<p>贝卡普勒明(Becaplermin) (糖尿病皮肤溃疡(Diabetic skin ulcers))</p> <p>Bentoquatum (预防由毒葛(poison ivy)引起的过敏性接触性皮炎)</p> <p>全顺十八碳-6,9,12-三烯酸(加莫尼克酸(Gamolenic acid))</p> <p>乙醇酸(光损伤的皮肤)</p> <p>氢醌(Hydroquinone)/对甲氧酚(Mequinol)(脱色素剂)</p> <p>鱼石脂(Ichthammol)</p> <p>Keluamid (脂溢性皮炎(seborrhoeic dermatitis))</p> <p>琥珀酸锂(Lithium succinate)</p> <p>莫诺苯宗(Monobenzone) (白癜风(vitiligo))</p> <p>聚磷酸均苯三酚(Polyphloroglucinol Phosphate) (治疗伤口和瘙痒性皮肤病症(wounds and pruritic skin disorders))</p> <p>吡酮酸钠(Sodium pidolate) (湿润剂(humectant), 作为霜剂/洗剂用于干性皮肤病症)</p> <p>硫磺(Sulphur) (温和的抗真菌剂/杀菌剂)</p> <p>硫化石灰(Sulphurated Lime) (用于痤疮、疥疮(scabies)、脂溢性皮炎)</p> <p>硫化钾(Sulphurated Potash) (痤疮)</p> <p>米诺地尔(Minoxidil) (毛发生长)</p>
用于痤疮的局部类维生素A和相关制剂	<p>阿达帕林(Adapalene)</p> <p>异维A酸(Isotretinoin)</p> <p>Polyprenoic acid</p>

[0038]

	维甲酸(Tretinoin)
其他用于痤疮的局部制剂	烟酰胺(Nicotinamide)

[0039]

局部抗菌剂	安福霉索(Amphomycin) 杆菌肽(Bacitracin)/杆菌肽锌盐(Bacitracin Zinc) 硫酸卡那霉素B(Bekanamycin Sulphate) 氯霉素(Chloramphenicol) 氯喹那多(Chlorquinaldol) 金霉素(Chlortetracycline) 硫酸新霉素B(Framycetin sulphate) 夫西地酸(Fusidic Acid) 哈喹诺(Halquinol) 莫匹罗星(Mupirocin) 莫匹罗星(Mupirocin) 硫酸新霉素(Neomycin sulphate) 多粘菌素(Polymyxins) (硫酸多粘菌素B (Polymyxin B Sulphate)) 碘胺嘧啶银(Silver sulphadiazine) (碘胺嘧啶(sulfadiazine)) 氨苯碘胺(Sulphanilamide) 碘胺二甲异嘧啶(Sulphasomidine) 碘胺噻唑钠(Sulphathiazole (sulfathiazole) Sodium)
局部抗真菌剂	(过氧苯甲酰(Benzoyl peroxide)) 阿莫罗芬(Amorolfine) 苯甲酸(Benzoic acid) 联苯苄唑(Bifonazole) 溴氯柳苯胺(Bromochlorosalicylanilide)

[0040]

	丁氯柳胺(Buclosamide)
	盐酸丁萘芬(Butenafine Hydrochloride)
	盐 酸 氯 苄 甲 咪 喹 (Chlormidazole Hydrochloride)
	氯苯甘醚(Chlorphenesin)
	环吡酮胺(Ciclopirox Olamine)
	克霉唑(Clotrimazole)
	盐酸氯康唑(Croconazole Hydrochloride)
	依柏康唑(Eberconazole)
	硝酸益康唑(Econazole nitrate)
	芬替克洛(Fenticlor)
	硝酸芬替康唑(Fenticonazole Nitrate)
	氟曲马唑(Flutrimazole)
	卤普罗近(Haloproglin)
	酮康唑(Ketoconazole)
	美帕曲星(Mepartycin)
	硝酸咪康唑(Miconazole nitrate)
	盐酸萘替芬(Naftifine Hydrochloride)
	那他霉素(Natamycin)
	盐酸奈康唑(Neticonazole Hydrochloride)
	制霉菌素(Nystatin)
	硝酸奥莫康唑(Omoconazole Nitrate)
	硝酸奥昔康唑(Oxiconazole Nitrate)
	吡咯尼群(Pyrrolnitrin)
	硝酸舍他康唑(Sertaconazole Nitrate)
	丙酸钠(Sodium Propionate)
	舒苯汀(Sulbentine)
	硝酸硫康唑(Sulconazole nitrate)
	硝酸硫康唑(Sulconazole Nitrate)

[0041]

	特比萘芬(Terbinafine) 噻康唑(Tioconazole) 托西拉酯(Tolciclate) 托萘酯(Tolnaftate) 三醋汀(Triacetin) 十一碳烯酸酯(Undecenoates)/十一碳烯酸(Undecanoic Acid)
抗病毒制剂	1-二十二烷醇(1-Docosanol) 阿昔洛韦(Aciclovir) 溴夫定(Brivudine) 依度尿苷(Edoxudine) 伊巴他滨(Ibacitabine) 碘苷(Idoxuridine) 在二甲亚砜中的碘苷(Idoxuridine in dimethyl sulfoxide) 咪喹莫特(Imiquimod) 喷昔洛韦(Penciclovir) 阿糖腺苷(Vidarabine)
杀寄生虫制剂	苯甲酸苄酯(Benzyl benzoate) 胺甲萘(Carbaryl) 马拉硫磷(Malathion) 扑灭司林(Permethrin) 苯氧司林(Phenothrin)
用于轻微切口和擦伤的制剂	溴化十六烷基三甲铵(Cetrimide) 火棉胶(Collodion) 硫酸镁(Magnesium sulphate) 原黄素(Proflavine)
局部循环制剂	类肝素(Heparinoid)
止汗药(Antiperspirants)	氯化铝(Aluminium chloride) 格隆溴铵(Glycopyrronium bromide)

[0042]

经皮药物	东莨菪碱(Scopolamine) 丁丙诺啡(Buprenorphine) 格兰塞隆(Granisetron) 尼古丁(Nicotine) 利斯的明(Rivastigmine) 硝酸甘油(Nitroglycerin) 哌醋甲酯(Methylphenidate) 可乐定(Clonidine) 睾酮(Testosterone) 醋酸炔诺酮(Norethindrone acetate) 芬太尼(Fentanyl) 司来吉兰(Selegiline) 炔雌醇(Ethinyl estradiol) 甲基孕酮(Norelgestromin) 罗替高汀(Rotigotine) 雌二醇(Estradiol) 奥昔布宁(Oxybutynin)
------	---

[0043] 尽管在下文中常提到皮肤,但是,应该理解,该术语包括对任意其他角质结构(诸如指甲)以及其他外部膜(诸如角膜)的指代,除非上下文另外清楚指明。

[0044] 用于本文时,非天然氨基酸是这样的:其不是由待治疗的皮肤的宿主合成的,或者不与专门的宿主 tRNA 相关联。此类氨基酸、特别是不是由宿主合成的那些的优点在于,它们较少经受代谢,诸如通过天然存在的酶进行的代谢,以致它们比天然存在的氨基酸更久地保留在皮肤中,由此可以延长任何湿润或渗透增强作用。

[0045] 术语“增湿”、“水分保留”和“水分摄取”以及相关的术语在举例说明本发明时在本文中可互换使用,并且提及一个就包括对其他的指代,除非上下文另外清楚指明。个别来说,所述术语具有具体的意思。术语“增湿”是一个综合性术语,并且表示导致干燥皮肤的湿度水平的平衡或趋向平衡的过程的物质或条件。增强的“水分保持”表示减小的皮肤允许水分逸散的倾向性,并且“水分保持”表示皮肤保留水分的倾向性。“水分摄取”是皮肤从环境(如湿空气)吸收水分的性质。术语“水化(hydration)”包括皮肤中的水的水平以及水摄取到皮肤中的过程,诸如水分摄取,同前所述。

[0046] 用于本文时,术语“吸湿性”表示能够在 32°C 从相对湿度 (RH) ≤ 50%、并且优选 40% 以下的大气吸收并保持水分的氨基酸。

[0047] 对于吸湿性的化合物,其必须能够与水形成非键合的缔合 (non-binding association)。硫酸镁是非常吸湿性的,并且在水的氧原子和镁原子之前形成非键合相互

作用。对什么使得化合物具有吸湿性的进一步的研究导致在土壤样品和气溶胶上进行的工作。在气溶胶内发现的最丰富的游离氨基酸是甘氨酸、丝氨酸和丙氨酸。这些也是在 NMF 内发现的三种最丰富的游离氨基酸。在大气气溶胶实验中腐殖物质的吸湿性导致对所观察到的吸湿性与腐殖质的化学结构之间的研究 (Sasaki, 2007)。通过该工作, 确定了具有较高的氧 / 碳比 (O/C) 的化合物通常表现出更大的吸湿性性质 (Sasaki, 2007)。例如, L- 丝氨酸具有 3 个氧原子和 3 个碳原子, 以致其具有 O/C = 1.0。

[0048] 本发明的氨基酸在 32°C 能够潮解。优选地, 本发明的氨基酸在 32°C 具有不大于 80% 的潮解相对湿度 (DRH)。本发明优选的氨基酸具有在 32°C 的不大于 80% 的 DRH 和至少 0.7 的 O/C 比。

[0049] 天然存在的氨基酸是动物中的 L- 氨基酸, 并且要用本发明治疗的优选的动物是哺乳动物。优选的哺乳动物是具有暴露的或无毛的皮肤 (不管是完全的还是部分的) 的那些, 特别优选是人。

[0050] 非天然氨基酸通常是 D- 氨基酸, 但是在待治疗的动物中不合成的 L- 氨基酸可以包括少有的 L- 氨基酸, 如 α - 羟基甘氨酸和 L- 高丝氨酸。

[0051] 在本发明的氨基酸是新的情形下, 则提供这些氨基酸作为本发明的方面和实施方案。

[0052] 本发明的氨基酸是包含通过一个或两个并且优选一个碳原子与酰亚胺或更优选地与胺基团连接的 COOH 基团的任意分子。尽管优选本发明的氨基酸处于其游离的、两性离子形式, 但是, 它们还可以以溶液中的盐形式或者作为离子对提供。

[0053] 本发明的氨基酸可以以任何适当的形式施用到皮肤, 所述形式诸如霜剂、洗剂、凝胶、油膏、软膏、摩丝 (mousse)、泡沫剂、溶液、注射剂、混悬剂、胶质系统或喷雾剂 (推进剂或泵), 在包含水性成分 (如可以充当氨基酸的溶剂的水性成分) 的载体中, 或在包含能够溶解或混入氨基酸的有机赋形剂的载体中。备选地或另外地, 所述形式可以包括一种或多种用于局部施用的药物, 并且可以进一步包含任何另外的物质, 如膜形成剂、抗菌剂、抗氧化剂、稳定剂、乳化剂、sterililants、增稠剂和着色剂。

[0054] 所述施用形式可以包括一种本发明的氨基酸, 或者可以包含两种以上本发明的氨基酸。无论如何, 施用形式可以进一步包含本领域中教导的一种或多种另外的保湿剂成分, 并且可以包含其他氨基酸, 如天然的吸湿性氨基酸, 或不如本发明的氨基酸那样吸湿的天然的和非天然的氨基酸。优选的天然存在的氨基酸是 L- 高丝氨酸。

[0055] 在一个方面中, 优选的是, 通过优选地以近似于在 NMF 中发现的量和 / 或比率使用 NMF 的一种或多种氨基酸成分来模仿 NMF。NMF 中的氨基酸的量和比例是如上文详细描述的。

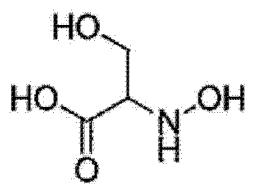
[0056] 进一步优选的是, 通过优选地以近似于在 NMF 中发现的量和 / 或比率包括 NMF 的一种或多种非氨基酸成分来模仿 NMF。这些优选地包括一种或多种盐, 特别是钠盐和钾盐。

[0057] 优选地, 任意施用形式的所有成分都是药用的。

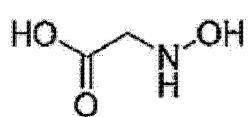
[0058] 本发明优选的氨基酸具有至少为 1 的 O/C 比。更优选的比率是至少 1.5:1, 并且 2:1 以及高于 2:1 的比率是优选的。

[0059] 下述化合物是本发明优选的化合物：

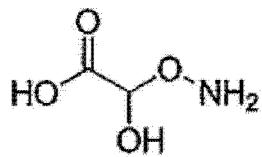
[0060]



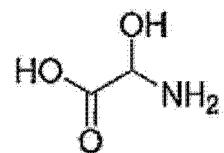
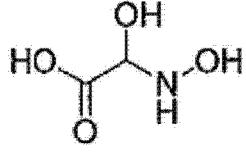
N-羟基丝氨酸



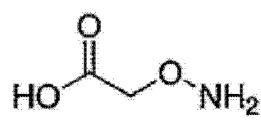
N-羟基甘氨酸



2-(氨基氧基)-2-羟基乙酸

 α -羟基甘氨酸

2-羟基-2-(羟基氨基)乙酸



2-(氨基氧基)乙酸

[0061] 应该理解,包含本发明的氨基酸的组合物可以防护性或预防性能力施用,特别是在寒冷的天气,诸如冬季。

[0062] 本发明的组合物还可以用于治疗或预防诸如炎性皮肤病、特应性皮炎、湿疹、鱼鳞癣(干性皮肤病)、冬季干燥病(winter xerosis)、局部苔藓化(localised lichenifications)和湿疹发作(eczematous episodes)。

[0063] 本发明的组合物可用于治疗伤口,特别是局部膜,优选是皮肤。

[0064] 应该理解,本发明的组合物尤其可用作化妆品制剂。所述制剂可以用于增强皮肤外观(如通过使皮肤膨胀的皱纹治疗)和皮肤弹性,其中氨基酸可以与例如胶原治疗联合使用。用在指甲上,化妆品治疗可以用于软化要剪掉的指甲,或者水化指甲以有助于防止破裂。在毛发治疗中,水化可以用于增加毛发的柔度,以帮助防止分裂。

[0065] 应该理解,本发明的氨基酸还可以用于其他得益于其皮肤增湿性质的应用。因此,本发明预期本发明的氨基酸作为局部制剂中的赋形剂的用途。这可以抵消其他赋形剂(如乙醇)的脱水作用,或者仅作为润肤剂,或抗脱水剂,或者能够增强药物吸收。

[0066] 提供本发明的氨基酸作为抗炎剂的用途,特别是在所述炎症中起作用的因子是GM-CSF的情形下。对所述用途特别优选的氨基酸是N-羟基丝氨酸、L-高丝氨酸、N-羟基甘氨酸以及包含它们中一种或多种的组合。

[0067] 提供本发明的氨基酸作为抗刺激剂的用途。对所述用途特别优选的氨基酸是N-羟基丝氨酸、L-高丝氨酸、N-羟基甘氨酸以及包含它们中一种或多种的组合。

[0068] 本发明的氨基酸可以用作或用于润肤剂。

[0069] 本发明的氨基酸可以用在用于治疗干眼的滴眼液或其他眼用制剂中。

[0070] 本发明的氨基酸还可以用于湿润增厚的皮肤,以例如促使老茧去除。

[0071] 本发明的氨基酸可以用于辅助指甲和/或蹄软化。

[0072] 本发明的氨基酸还可以与脱毛技术联合使用。

[0073] 给定本发明的组合物的水化性质,其还用在面膜中。

[0074] 本发明的氨基酸还可以在皮肤病症(包括银屑病、疣(warts)和瘊(verrucae))的治疗中用于水化皮肤,由此允许更有效地向靶部位递送药物。

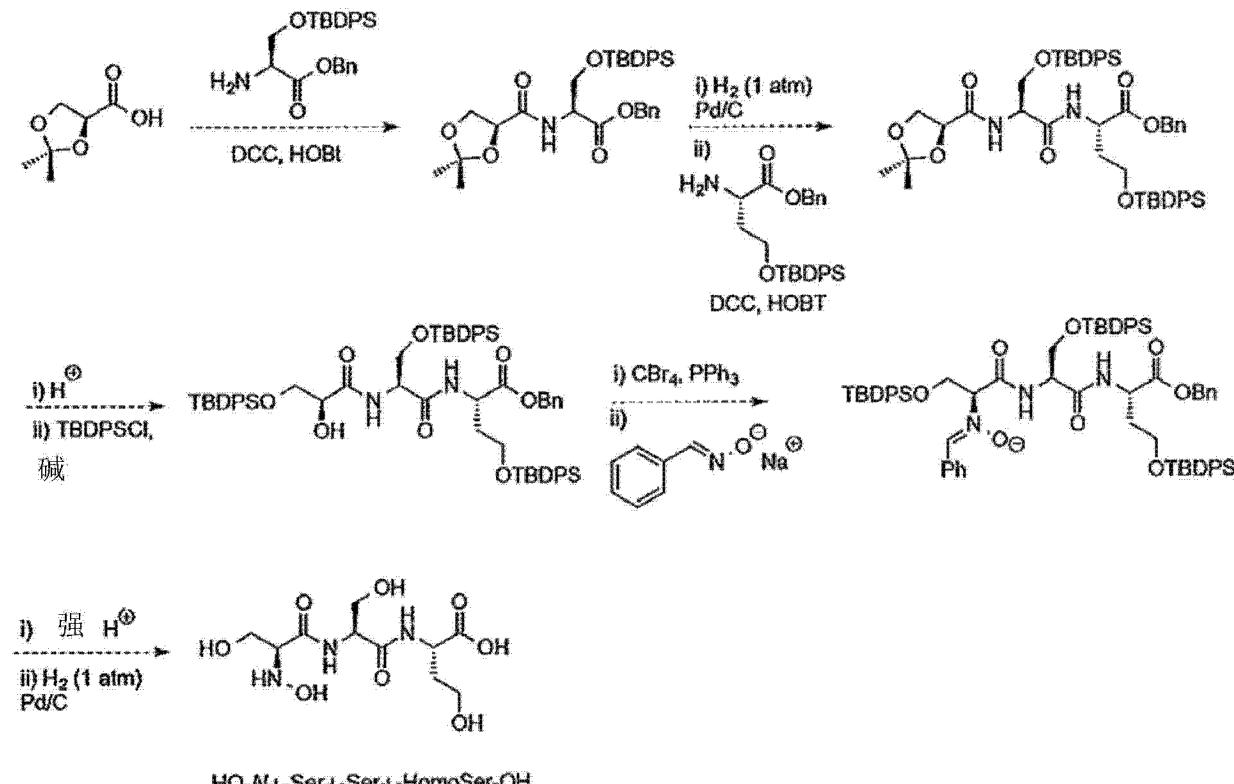
[0075] 应该理解,本发明的氨基酸可以在施用隔离剂前施用于皮肤,特别是在目的是防止皮肤脱水(如干燥)的情况下。

[0076] 通常,本发明的氨基酸用在化妆品制剂中,特别是可以引起皮肤变干的那些化妆品

制剂中,以及用于增强皮肤健康和外观的那些化妆品制剂中,如皮肤保湿剂和抗皱霜剂。护发产品,诸如护发素(hair conditioner),也是有益的。

[0077] 下述合成途径示例可以怎样缀合本发明的氨基酸。除了熟练的医师另有决定的情况或其中缀合物较不优选(如例如出于到角质层中的摄取速度的原因),在本文所示的任何应用中,此类缀合物可以任选地作为本发明的氨基酸的附加或替代本发明的氨基酸使用。

[0078]



[0079] 现在将参考附图进一步举例说明本发明,其中:

[0080] 图1显示用于测量饱和溶液的RH的实验设置;

[0081] 图2显示在40% RH 24小时后同一化合物的相对于DRH(潮解相对湿度)的与水相比的平均百分比重量增加;

[0082] 图3显示对于每种检测的氨基酸,在用1.33M氨基酸溶液处理24小时后40% RH 24小时后的平均百分比重量增加;

[0083] 图4显示双氯芬酸在48小时的实验期间通过表皮膜的累积渗透;每个条棒(bar)表示平均渗透+SEM, n = 5-6;

[0084] 图5显示48小时后双氯芬酸通过表皮膜的累积渗透;每个条棒表示平均渗透+SEM, n = 5-6;

[0085] 图6显示在48小时的实验期间甲硝唑通过表皮膜的累积渗透;每个条棒表示平均渗透+SEM, n = 5-6;

[0086] 图7显示48小时后甲硝唑通过表皮膜的累积渗透;每个条棒表示平均渗透+SEM, n = 5-6;

[0087] 图8显示在48小时的实验期间阿昔洛韦通过表皮膜的累积渗透;每个条棒表示平

均渗透 +SEM, n = 5-6 ;

[0088] 图 9 显示 48 小时后阿昔洛韦通过表皮膜的累积渗透 ; 每个条棒表示平均渗透 +SEM, n = 5-6 ;

[0089] 图 10 显示对于每种检测的氨基酸, 在用 1.33M 氨基酸溶液处理 24 小时后 75% RH 24 小时后的平均百分比重量增加 ;

[0090] 图 11 显示 3 种药物的药物吸收增强因子 (enhancement factor) 的图 ;

[0091] 图 12 显示 RHE 组织在 42 分钟暴露和 42 暴露后温育后的生存力 ; 每个点表示平均组织生存力, 误差条表示范围 ; n = 4 ;

[0092] 图 13 显示 RHE 组织在 24 小时暴露后的生存力 ; 每个点表示平均组织生存力, 误差条表示范围 ; n = 3 ;

[0093] 图 14 显示在暴露于 10% w/v N-H-G, 1% w/v N-H-G, 10% w/v L- 丝氨酸和 10% w/v 甘氨酸的溶液后在 t = 2、6 和 24h 的组织生存力和阳性对照 (1% w/v TritonTM X-100, t = 3 和 7h) ; 每个时间点表示平均组织生存力, 并且误差条表示范围, n = 3 ;

[0094] 图 15 显示 GM-CSF 从银屑病组织的释放 ; 每个点表示 6 天内 GM-CSF 的平均累积释放, 测量在 2、4 和 6 天进行, 误差条表示范围 n = 2-3 ; 并且

[0095] 图 16 显示总的 GM-CSF 释放。每个条棒表示 6 天内从银屑病模型和对照 RHE 组织的总的 GM-CSF 释放 ; 误差条表示范围, n = 2-3。

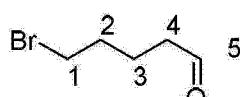
[0096] 现在将通过下述非限制性的实施例来举例说明本发明。

[0097] 实施例 1

[0098] 实验

[0099] 5-Bromopental:

[0100]



[0101] 在 -78 °C 在氮气氛下搅拌在无水 DCM(100mL) 中的 5- 溴戊酸乙酯 (3.9295g, 18mmol) 的溶液, 向其中加入 DIBAL-H(31mL, 31mmol, 1.7 当量, 1M, 在己烷中)。将得到的橙色溶液在 -78°C 在氮气氛下继续搅拌, 同时通过 TLC 追踪反应。搅拌 8 小时后, 加入 HCl(1M, 50mL) 和水 (100mL) 猥灭反应。从氮气氛中取出无色混合物, 并搅拌过夜以逐渐恢复到室温。混合物用 DCM(2x50mL) 萃取, 用 MgSO₄ 干燥, 过滤并且真空浓缩, 以提供作为淡黄色油的粗标题产物 (2.766g, 80%, 21mmol), 其在不进行进一步纯化的情况下使用。R_f = 0.30 二乙醚 / 己烷 (2/5)。

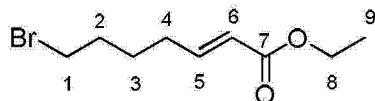
[0102] ¹H NMR (400MHz, CDCl₃) 1.76-1.83 (2H, m, J = 12.0Hz, H-3), 1.87-1.94 (2H, m, J = 12.0Hz, H-2), 2.48-2.52 (2H, t, J = 8.0Hz, H-4), 3.41-3.44 (2H, t, J = 8.0Hz, H-1), 9.79 (1H, t, J = 4.0Hz, H-5) ppm。

[0103] ¹³C NMR (400MHz, CDCl₃) 20.6 (C-3), 31.9 (C-2), 33.0 (C-4), 42.9 (C-1), 201.8 (C-5) ppm。

[0104] v_{max} (FT IR, CCCL₃, KBr plates) /cm⁻¹ 2938 (C-H), 2725 (C-H 醛), 1721 (C = O), 1437 (C-H), 1390 (N-O), 1253, 1042, 913, 743。

[0105] (E)-7- 溴庚 -2- 烯酸乙酯 :

[0106]



[0107] 向在 DCM(100mL) 中的粗 5-bromopental (2.766g, 16mmol) 的搅拌的悬浮液中一次性加入 (乙氧甲酰基亚甲基) 三苯基膦 ((carbethoxymethylene) triphenylphosphorane) (8.098g, 23mmol, 1.4 当量)。在用饱和氯化铵 (50mL) 猥灭之前, 将混合物在室温搅拌 22h。用 DCM(2x 50mL) 萃取所述混合物, 并且用水 (50mL) 洗涤合并的有机提取物。有机层用 MgSO₄ 干燥, 过滤, 并且真空浓缩, 以提供粗的黄色液体 (10.320g)。然后, 纯化粗产物, 通过在硅胶上的柱色谱, 用二乙醚 / 己烷 (1/3) 洗脱, 从而提供标题产物 (2.723g, 72%, 11.5mmol); R_f = 0.39 二乙醚 / 己烷 (1/3);

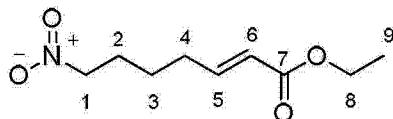
[0108] δ_H (400MHz, CDCl₃) 1.27–1.32 (3H, t, J = 8.0Hz, H-7), 1.55–1.60 (2H, m, J = 8.0Hz, H-3), 2.02–1.06 (2H, m, J = 16.0Hz, H-2), 2.27–2.29 (2H, t, J = 16.0Hz, H-4), 4.16–4.22 (2H, q, J = 32.0Hz, H-1), 4.38–4.42 (2H, t, J = 16.0Hz, H-6) ppm。

[0109] δ_C (400MHz, CDCl₃) 14.28 (C-9), 26.52 (C-3), 31.20 (C-2), 32.02 (C-4), 33.26 (C-8), 60.25 (C-1), 121.90 (C-6), 148.14 (C-5), 166.55 (C-7) ppm。

[0110] ν_{max} (FT IR, CCCl₃, KBr plates) /cm⁻¹ 2938 (C-H), 1714 (C = O), 1654 (C = C), 1445, 1367 (N-O), 1266, 1185, 1134 (C-O), 1095, 1039, 979 (C-H), 913 (C-H), 848, 742。

[0111] (E)-7-硝基庚-2-烯酸乙酯:

[0112]



[0113] 在 0℃ 搅拌在 DMF(13mL) 中的 7-溴庚-2-烯酸乙酯 (2.6486g, 11.3mmol) 的溶液, 向其中一次性加入亚硝酸钠 (1.1657g, 16.9mmol, 1.5 当量)。得到的溶液在 0℃ 搅拌, 同时通过 TLC 追踪反应。8h 后, TLC 显示大部分的起始材料的消耗。将反应加入到冰冷的水 (20mL) 中, 并且用二乙醚 (25mL) 萃取。然后用盐水 (饱和的, 25mL) 洗涤有机层。将有机萃取物用 MgSO₄ 干燥, 过滤并且真空浓缩, 以给出黄色液体 (1.9390g)。然后, 纯化粗产物, 通过在硅胶上的柱色谱, 用二乙醚 / 己烷 (1/4) 洗脱, 从而提供标题产物 (0.5283g, 23%, 2.6mmol);

[0114] R_f = 0.29 二乙醚 / 己烷 (1/4);

[0115] δ_H (400MHz, CDCl₃) 1.27–1.31 (3H, t, J = 8.0Hz, H-9), 1.54–1.62 (2H, quin, J = 16.0Hz, H-3), 2.00–2.08 (2H, quin, J = 16.0Hz, H-2), 2.25–2.30 (2H, q, J = 16.0Hz, H-4), 4.16–4.22 (2H, q, J = 16.0Hz, H-8), 4.38–4.42 (2H, t, J = 8.0Hz, H-1), 5.83–5.85 (1H, d, J = 12.0Hz, H-6), 6.88–6.95 (1H, dt, J = 8.0Hz, J' = 16.0Hz) ppm。

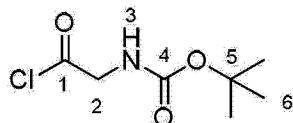
[0116] δ_C (400MHz, CDCl₃) 14.28 (C-9), 26.52 (C-3), 31.20 (C-2), 32.02 (C-4), 33.26 (C-8), 60.25 (C-1), 121.90 (C-6), 148.14 (C-5), 166.55 (C-7) ppm。

[0117] ν_{max} (FT IR, CCCl₃, KBr plates) /cm⁻¹ 2936 (C-H), 2865, 1716 (C = O), 1644 (NO₂), 1445 (C-H), 1415, 1388, 1288 (C = C), 1229, 1170 (C-O), 1134, 1096, 1033, 912 (=

C-H), 823, 734, 649。

[0118] (2-氯-2-氧乙基)氨基甲酸叔丁酯

[0119]



[0120] 在室温在氮气氛下将 Boc-Gly (2.833g, 16.2mmol) 溶解在无水 DCM (30mL) 中。将该 Boc-Gly 溶液转移至在无水 DMF 中的草酰氯 (3.10mL, 2.2 当量, 35.6mmol) 溶液中 (3 滴)。将得到的溶液在室温在氮气氛下搅拌，同时通过 TLC 追踪反应。3.5h 后，TLC 显示起始材料耗尽。将混合物真空浓缩以产生酰基氯 (3.4634g, 111%, 18mmol)。

[0121] $R_f = 0.15$ 二乙醚 / 己烷 (4/1)；

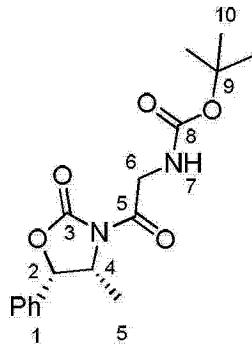
[0122] ^1H NMR (400MHz, CDCl_3) 1.49 (9H, s, H-6), 3.69 (2H, s, H-2), 5.95 (1H, br s, H-3) ppm。

[0123] ^{13}C NMR (400MHz, CDCl_3) 39.77 (C-6), 66.77 (C-2), 106.35 (C-5), 138.34 (C-4), 183.29 (C-1) ppm。

[0124] ν_{max} (FT IR, CCl_3 , KBr plates) / 2989 (C-H), 1766 (C = O), 1742 (C = O), 1375, 1314, 1264, 1189, 1158, 1009 (C-N), 919, 852, 747 cm^{-1} 。

[0125] (2-((4R, 5S)-4-甲基-2-氧代-5-苯基𫫇唑烷-3-基)-2-氧代乙基)氨基甲酸叔丁酯：

[0126]



[0127] 在 -78 °C 将 LiHMDS (2.5474g, 15mmol, 1.2 当量) 加入到在无水 THF (10mL) 中的 (4R, 5S)-(+)-4-甲基-5-苯基-2-𫫇唑烷酮 (2.2104g, 12mmol) 的冷却的溶液中。将混合物搅拌 30 分钟，然后加入在无水 THF (10mL) 中的 Boc-Gly-Cl (2.4634g, 1.5 当量, 18mmol)，然后加温至室温。在室温搅拌 14 小时后，当 TLC 显示酰基氯耗尽时，加入 NH_4Cl (饱和的, 30mL) 猥灭反应。用乙酸乙酯 (50mL) 萃取混合物。有机层用碳酸氢钠 (饱和的, 50mL) 进一步萃取。将有机层用 MgSO_4 干燥，过滤，并且真空浓缩以提供深血红色液体 (2.2964g)。将粗产物在室温放置过夜，产生棕色 / 红色固体。向所述固体加入二乙醚 / 己烷 (4/1) 的溶液，并且过滤，产生纯的棕色固体的标题产物 (1.2702g, 32%, 3.8mmol)。

[0128] $R_f = 0.43$ 二乙醚 / 己烷 (4/1)；

[0129] Mpt = 106-111 °C.

[0130] ^1H NMR (400MHz, CDCl_3) 0.00 (9H, s, H-10), 0.82 (3H, d, $J = 6\text{Hz}$, H-5), 1.5

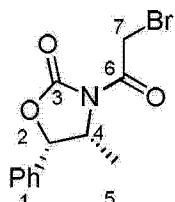
5 (2H, s, H-6), 4.20 (1H, quin, $J = 8\text{Hz}$, H-4), 4.92 (1H, br s, H-7), 5.72 (1H, d, $J = 8\text{Hz}$, H-2), 7.52–7.26 (5H, m, H-1) ppm。

[0131] ^{13}C NMR (400MHz, CDCl_3) 0.06 (C-10), 3.66 (C-5), 7.66 (C-6), 47.92 (C-4), 51.53 (C-2), 54.57 (C-9), 126–128 (C-1), 169.22 (C-3), 179.35 (C-8), 183.05 (C-5) ppm。

[0132] ν_{max} (FT IR, CCl_3 , KBr plates) / 3200 (N-H), 1754 (C = O), 1500 (C = O 酰胺), 913 (C = C bending), 744cm^{-1} 。

[0133] (4R, 5S)-3-(2-溴乙酰基)-4-甲基-5-苯基恶唑烷-2-酮：

[0134]



[0135] 在 -78°C 在氮气下将 n-BuLi (1mL, 10mmol, 1.1 当量) 加入到在无水 THF (8mL) 中的恶唑烷-2-酮 (1.5930g, 9mmol, 1.0 当量) 的搅拌的溶液中。15 分钟后, 逐滴加入作为在 THF (9.6mL) 中的溶液的溴乙酰溴 (0.57mL, 12mmol, 1.3 当量), 并且在 -78°C 搅拌 15 分钟, 然后加温到环境温度。2 小时后, 用 NH_4Cl (饱和的, 15mL) 和乙酸 (5mL) 猝灭反应, 用 EtOAc (20mL) 萃取, 用 NaHCO_3 (饱和的, 20mL) 和盐水 (饱和的, 20mL) 洗涤, 用 MgSO_4 干燥, 并真空浓缩。纯化粗产物, 通过在硅胶上的急骤柱色谱, 用 EtOAc/己烷 (3/17) 洗脱, 以提供标题产物 (0.2593g, 10%, 0.9mmol)。

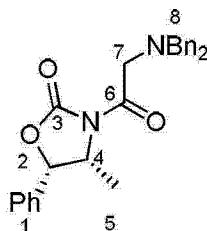
[0136] $R_f = 0.41$ EtOAc/己烷 (3/17); ^1H NMR (400MHz, CDCl_3) 0.93–0.94 (3H, d, $J = 4.0\text{Hz}$, H-5), 4.51–4.59 (2H, q, $J = 20.0\text{Hz}$, H-7), 4.77–4.83 (1H, q, $J = 12.0\text{Hz}$, H-4), 5.74–5.76 (1H, d, $J = 8\text{Hz}$, H-2), 7.26–7.46 (5H, m, H-1) ppm。

[0137] ^{13}C NMR (400MHz, CDCl_3) 14.29 (C-5), 28.23 (C-7), 55.24 (C-4), 79.53 (C-2), 125.64 (C-1), 129.03 (C-1), 134.59 (C-3), 150.20 (C-6) ppm。

[0138] ν_{max} (FT IR, CCl_3 , KBr plates) / 2964 (C-H), 2917, 2849, 1776 (C = O), 1700 (C = O), 1496 (Ph), 1455, 1415, 1340 (C-N), 1317, 1260, 1217, 1196 (C-O), 1169, 1146, 1120, 1089, 1066, 1037, 1001, 990, 970911, 883, 803, 765, 730, 700, 661, 639, 618cm^{-1} 。

[0139] (4R, 5S)-3-(二苄基甘氨酰)-4-甲基-5-苯基恶唑烷-2-酮：

[0140]



[0141] 在室温将二苄胺 (0.485mL, 3.0mmol, 2.2 当量) 加入到在无水 DCM (1mL) 中的 N-酰基-恶唑烷-2-酮 (0.4081g, 1.37mmol, 1.0 当量) 的搅拌的溶液中。将反应混合物在氮下搅拌 18 小时。得到的混合物分配在 DCM (10mL) 与水 (10mL) 之间。水层用 DCM (10mL) 洗涤。将合并的有机层用水 (10mL) 洗涤, 用 MgSO_4 干燥并真空浓缩。纯化粗产物, 通过在硅胶上

的急骤柱色谱,用 EtOAc/己烷(3/17)洗脱,以提供标题产物(0.38844g,73%,1.0mmol)。

[0142] $R_f = 0.30$ EtOAc/己烷(3/17);

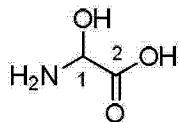
[0143] ^1H NMR(400MHz, CDCl_3) 0.87–0.89(3H, d, $J = 8.0\text{Hz}$, H-5), 3.83–3.91(2H, q, $J = 20.0\text{Hz}$, H-7), 3.95(2H, s, H-8), 4.64–4.70(1H, q, $J = 12.0\text{Hz}$, H-4), 5.61–5.63(1H, d, $J = 8\text{Hz}$, H-2), 7.23–7.42(15H, m, H-1) ppm。

[0144] ^{13}C NMR(400MHz, CDCl_3) 14.67(C-5), 54.56(C-7), 55.24(C-8), 58.18(C-4), 79.50(C-2), 125.64–129.03(C-1), 167.23(C-3), 184.49(C-6) ppm。

[0145] ν_{\max} (FT IR, CCl_3 , KBr plates)/ cm^{-1} 3027(=C-H), 2360, 2341, 1790(Ph), 1705(C=0), 1494(Ph), 1454(C-H), 1367, 1344(C-N), 1245, 1218, 1197(C-O), 1150, 1120, 1089, 1067, 1028, 984, 954, 917, 791, 766, 747, 698, 668, 643 cm^{-1} 。

[0146] 2-氨基-2-羟基乙酸:

[0147]



[0148] 将在冰冷的水(10mL)中的醋酸铵(9.4725g,0.1mol,2当量)加入到在冰冷的水(10mL)中的乙醛酸一水合物(4.6015g,0.05mol,1当量)的搅拌的溶液中。在搅拌的数分钟内出现白色沉淀。在0℃搅拌45分钟并放置2小时后,将反应混合物过滤。用水(20mL)和甲醇(2x 10mL)洗涤白色沉淀,以产生粗标题产物(4.6951g,0.051mol,103%)。将粗产物(4.1697g)通过高真空泵干燥5小时,以提供标题产物(4.0571g,97%)。

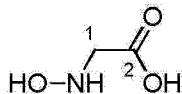
[0149] δ_{H} (400MHz, D_2O) 4.93(1H, s, H-1) ppm。

[0150] δ_{C} (400MHz, D_2O) 26.81(C-1), 175.83(C-2) ppm。

[0151] ν_{\max} (FT IR, CCl_3 , KBr plates)/ cm^{-1} 3056(O-H, C-H), 1637(C=0), 1561(N-H), 1449, 1394, 1352, 1305(C-O), 1194, 1129, 1071(C-N), 881, 827, 616, 564, 536。

[0152] N-羟基甘氨酸

[0153]



[0154] 将乙醛酸(1.630g,22mmol)和 $\text{NH}_3\text{OH}\cdot\text{HCl}$ (1.1540g,22mmol)在室温在水(100mL)中搅拌。用1M NaOH升高pH至5,然后加入氰基硼氢化钠(sodium cyanohydridoborate)(3.306g,52mmol,2.5当量)。反应搅拌48小时,然后逐滴加入1M HCl降低pH至1。将混合物过滤,并将滤液真空浓缩。向白色残留物中加入水,并将混合物再次真空浓缩,以产生白色固体(7.7289g)。用水吸收该白色残留物,并且通过amberlite 200C钠。加入2%氨溶液以从amberlite去除产物。将滤液真空浓缩,并且自热乙醇重结晶,以产生黄色标题产物(0.6562g,33%,7.2mmol)。

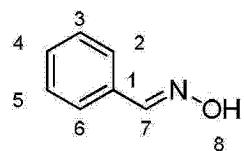
[0155] 熔点=137–139℃。

[0156] δ_{H} (400MHz, D_2O) 1.18(1H, br s, N-H), 3.62(2H, br s, H-1) ppm。

[0157] δ_{C} (400MHz, D_2O) 17.72(C-1), 185.00(C-2) ppm。

[0158] 苯甲醛肟

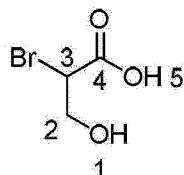
[0159]



[0160] 在室温将苯甲醛 (2.00mL, 20mmol) 在冰：水：乙醇 (2:1:1, 20mL) 的混合物中搅拌。将盐酸羟胺 (1.3860g, 20mmol) 加入到搅拌的悬浮液中，然后加入 50% 氢氧化钠水溶液 (4mL, 40mmol)，同时保持温度低于 30 °C。在室温搅拌 1 小时后，用二乙醚 (2x 25mL) 萃取混合物。将水性萃取物用浓 HCl 酸化至 pH 6，同时保持温度低于 30 °C，然后再次用二乙醚 (2x 25mL) 萃取。将合并的有机萃取物用 MgSO₄ 干燥，过滤并真空浓缩，以产生无色液体 (2.4246g, 100 %, 20mmol)。 δ_{H} (400MHz, CDCl₃) 7.38 (2H, m, H-5, H-3), 7.58 (2H, m, H-2, H-6), 7.88 (1H, t, J = 1.4Hz, H-4), 8.15 (1H, s, H-7) ppm。 δ_{C} (400MHz, CDCl₃) 127.0 (C-5 和 C-3), 128.8 (C-6 and C-2), 130.0 (C-4), 131.8 (C-1), 150.4 (C-7) ppm。 ν_{max} (FT IR, CCCL₃, KBr plates) / cm⁻¹ 3280, 3061 (C-H), 3028 (C-H), 2985 (C-H), 2898, 2358, 2341, 1896, 1810, 1697 (C = N), 1631 (N-H), 1598 (C = C), 1577 (C = C), 1492 (N -O), 1443, 1303, 1288, 1209, 1176, 1158, 1102, 1074, 946, 868, 752, 702, 644。m/z (FTMS+ESI) found 122.0597 ([M+H]⁺, 100%) C₇H₈NO requires 122.0600。

[0161] 2-溴-3-羟基丙酸

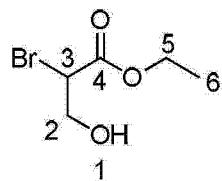
[0162]



[0163] 将溴化钾 (350.634g, 2.94mol) 和 L-丝氨酸 (100.0g, 0.95mol) 在 0 °C 在 2.5M 硫酸水溶液 (1.8L) 中搅拌。缓慢加入亚硝酸钠 (92.0g, 1.33mol)，以确保温度保持低于 5°C。在前 8 小时内加入一半亚硝酸钠，将混合物搅拌过夜，然后在接下来的 30 分钟内加入剩余的亚硝酸钠。在 0°C 搅拌 2.5 小时后，用二乙醚 (3x 250mL) 萃取混合物。合并有机萃取物，用 MgSO₄ 干燥，过滤并真空浓缩。然后，将残留物在高真空下进一步浓缩 8 小时，以产生标题产物 (154.6969g, 96%, 0.915mol)。 δ_{H} (400MHz, CDCl₃) 3.97–4.09 (2H, ddd, J = 5.2Hz, J' = 12.1Hz, J'' = 25.8Hz, H-2), 4.40 (1H, t, J = 5.3Hz, H-3) ppm。 δ_{C} (400MHz, CDCl₃) 43.8 (C-2), 63.7 (C-3), 172.8 (C-4) ppm。 ν_{max} (FT IR, CCCL₃, KBr plates) / cm⁻¹ 3407 (O-H), 2931 (C-H), 2355, 1722, 1615 (C = O), 1452, 1398, 1290, 1269, 1245, 1191 (C-O), 1160 (C-O), 1068, 1026, 909。

[0164] 2-溴-3-羟基丙酸乙酯

[0165]

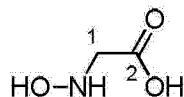


[0166] 将浓硫酸 (2.8mL, 0.003mL/mmol) 缓慢加入到 2-溴-3-羟基丙酸

(154.6969g, 0.92mol) 在无水乙醇 (1.83L, 2mL/mmol) 中的搅拌的混合物中, 然后在回流下加热 1.5 小时。将混合物冷却并加入冰冷的水 (1.83L), 并且用二乙醚 (2x 1.8mL) 萃取。合并有机萃取物, 并用冰冷的水 (1.8L)、5% M 碳酸钠水溶液 (2x 1.8L) 和饱和盐水 (1.8L) 洗涤。有机萃取物用硫酸镁干燥, 过滤并真空浓缩, 以产生标题产物 (179.27g, 99.5%, 0.91mol)。 δ_{H} (400MHz, CDCl₃) 1.30 (3H, t, J = 6.8Hz, H-6), 2.41 (1H, br s, H-1), 3.92–4.07 (2H, ddd, J = 7.6Hz, J' = 12.0Hz, J'' = 40.0Hz, H-2), 4.25 (2H, J = 7.2Hz, H-5), 4.30 (1H, t, J = 1.6Hz, H-3) ppm。 δ_{C} (400MHz, CDCl₃) 13.92 (C-6), 44.61 (C-3), 62.43 (C-5), 63.85 (C-2), 166.7 (C-4) ppm。 ν_{max} (FT IR, CCCl₃, KBr plates) /cm⁻¹ 3434 (O-H), 2987 (C-H), 2939 (C-H), 1736 (C = O), 1464, 1373, 1298, 1269, 1244, 1184, 1152, 1098 (C-O), 1080 (C-O), 1041 (C-O), 951, 857, 797, 678, 615。

[0167] N-羟基甘氨酸 (备选合成)

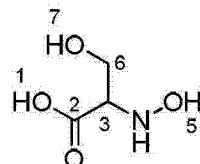
[0168]



[0169] 将钠 (0.4626g, 0.02mol) 加入到苯甲醛肟 (2.3999g, 0.02mol) 在无水乙醇 (40mL) 中的搅拌的混合物中。加入溴乙酸乙酯 (2.44mL, 0.022mol, 1.1 当量), 并搅拌混合物直至 pH 达到 7, 该过程需要 3 小时。将混合物过滤, 并且用氯仿 (2x 40mL) 洗涤固体。将合并的滤液真空浓缩。将残留物吸收在二乙醚 (50mL) 中并在冰箱中放置过夜。将混合物过滤, 用冷二乙醚洗涤, 并将固体在抽气下干燥 (3.1580g)。将硝酮 (1.5g) 固体在浓 HCl (20mL) 中搅拌并在回流下加热 0.5 小时。将混合物真空浓缩。将残留物吸收在水中, 并用氢氧化铵溶液升高 pH 至 6。将混合物在冰箱中冷却 48 小时, 过滤, 并将固体由热乙醇水溶液 (75%) 重结晶, 以产生 (0.8095g, 8.90mmol, 76%)。熔点 = 137–139 °C。 ν_{max} (FT IR, CCCl₃, KBr plates) /cm⁻¹ 3375, 3234, 3094, 2908, 1645, 1592, 1549, 1508, 1406, 1305, 1214, 1178。

[0170] N-羟基丝氨酸

[0171]

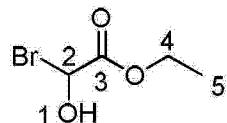


[0172] 将钠 (0.4600g, 0.02mol) 加入到苯甲醛肟 (2.4201g, 0.02mol) 在无水乙醇 (40mL) 中的搅拌的混合物中。加入 2-溴-3-羟基丙酸乙酯 (4.334g, 0.022mol, 1.1 当量), 并搅拌混合物直到 pH 达到 7, 该过程需要 3 小时。将混合物过滤, 并用氯仿 (2x 40mL) 洗涤固体。将合并的滤液真空浓缩。将残留物吸收在二乙醚 (50mL) 中, 并且在冰箱中放置过夜。将混合物过滤, 用冷二乙醚洗涤, 并将固体在抽气下干燥 (2.4131g)。将硝酮 (1.5g) 固体在浓 HCl (20mL) 中搅拌, 并在回流下加热 0.5 小时。将混合物真空浓缩。残留物吸收在水 (10mL) 中, 并且用氢氧化铵溶液将 pH 升高至 6。将混合物在冰箱中冷却 48 小时, 过滤, 并且将固体由热乙醇水溶液 (75%) 重结晶。加入丙酮, 以促使标题产物从溶液中析出, 以产生所述标题产物 (0.6724g, 5.56mmol, 88%)。熔点 = 159–163 °C。 δ_{H} (400MHz, CDCl₃) 3.12 (1H, m, H-8), 3.56 (1H, m, H-8), 4.59 (1H, m, H-3) ppm。 ν_{max} (FT IR, CCCl₃, KBr plates) /cm⁻¹ 3308 (O-H),

3032 (COOH), 2908 (CH), 1648 (N-H), 1591 (C = O), 1540 (N-O), 1511, 1402, 1306, 1229, 1174。

[0173] 2-溴-2-羟基乙酸乙酯

[0174]



[0175] 将 N-溴琥珀酰亚胺 (11.5343g, 65mmol) 在 80 °C 在四氯化碳 (80mL) 中搅拌。向混合物中逐滴加入在乙醇酸乙酯 (6.15mL, 65mmol) 中的过氧二苯甲酰 (Dibenzoyl peroxide) (0.0521g, 0.2mmol)，然后在回流下加热 30 分钟，经过该时间放热反应减退。将混合物冷却至室温，过滤并真空浓缩。静置残留物直到有沉淀形成，该过程需要约 3 天。将混合物过滤，并用二氯甲烷洗涤，从而产生无色固体 (0.8544g, 4.7mmol, 7%)。熔 点 = 107-110 °C。 δ_{H} (400MHz, CDCl₃) 1.07 (3H, t, J = 3.9Hz, H-5), 2.66 (1H, br s, H-1), 3.44 (2H, q, J = 7.1Hz, H-4), 4.01 (1H, s, H-2) ppm。 δ_{C} (400MHz, CDCl₃) 16.7 (C-5), 57.3 (C-4), 86.0 (C-2), 172.9 (C-3) ppm。 ν_{max} (FT IR, CCCL₃, KBr plates) / cm⁻¹ 3479 (O-H), 3406 (C-H), 1697 (C = O), 1614, 1439 (C-H), 1393, 1228 (C-O), 1191 (C-O), 1083 (C-O), 904, 808, 776, 719。

[0176] 实施例 2

[0177] 实验概述：

[0178] 本实验是测量在 32°C 在密封容器中由饱和氨基酸溶液产生的潮解相对湿度 (DRH)；DRH 越低，所测量的溶液的保水性越高。潮解相对湿度是化合物潮解的相对湿度，即这样的相对湿度，在所述相对湿度，化合物吸收如此多的水以致其溶解在所吸收的水中。

[0179] 设备：

[0180] 设备设置的示意图显示在图 1 中，图 1 显示用于测量饱和溶液的 RH 的实验设置。

[0181] 将装置维持在 32°C。选择 32°C 作为外角质层的温度。由于氨基酸最终被递送至皮肤的外层，那么，这些化合物在 32°C 的保水性是重要的。

[0182] 方法

[0183] 如上述地，通过在转动的同时将氨基酸加入到水 (1mL, 32°C) 中来制备饱和溶液。在添加到水中之前将总氨基酸称重，并称重剩余的氨基酸，由此可以确定所用的化合物的质量。然后，将饱和溶液 (1mL, 32°C) 转移到小瓶中，同样由于通过向水中加入氨基酸，部分摩尔体积引起体积变化。

[0184] 每 30 分钟记录在温湿计上显示的温度和 % RH (% 相对湿度)，直到 % RH 保持恒定。温度证实样品所经历的温度是 32°C。

[0185] 24 小时的结果总结在表 1 中，其中 S. D. 是标准偏差。

[0186] 表 1

[0187]

保湿剂	DRH	S. D.	O/C 比
尿素 1.7g	75.03	6.04	1

L- 丝氨酸 0.95g	82.53	3.65	1
D- 丝氨酸 1.2g	82.13	8.82	1
α - 羟基甘氨酸 0.35g	79.73	2.29	1.5
L- 高丝氨酸 1.9g	71.37	4.72	0.75
甘氨酸 1.1g	79.13	0.17	1
水 (1mL)	98.73	1.79	-
D- 丝氨酸 0.95g	85.40	4.72	1
水 (3mL)	100.00	0.00	-
L- 脯氨酸	44.6	2.6	0.4
硝酸锌	45.8	2.6	0
N- 羟基甘氨酸	68.1	3.0	1.5
N- 羟基丝氨酸	68.3	2.1	1.3
丙氨酸	83.1	11.0	0.67
苏氨酸	86.0	8.9	0.75

[0188]

半胱氨酸	89.6	13.1	0.67
天冬酰胺	91.2	10.7	0.75
天冬氨酸	100.0	0.0	1

[0189] 可以看出,在这些检测中, α - 羟基甘氨酸和 L- 高丝氨酸表现出特别有利的相对湿度水平。更具体地,本发明的氨基酸在 32°C 有利地具有不超过 80% 的 DRH。另外,还可以看出,本发明的氨基酸具有至少 0.7 的 O/C 比。

[0190] 从上表中,从 3 次实验的平均值,24 小时后水的相对湿度为 100%,如预测地,其作为对照。如预测地, L 和 D- 丝氨酸具有相似的 % RH, 原因在于它们是对映异构体。羟基甘氨酸具有 79.7% 的 RH, 优于丝氨酸。L- 高丝氨酸在 24 小时具有 71.4% 的 RH, 由此表现出极好的潮解相对湿度 (DRH) 测量。

[0191] 实施例 3

[0192] 蛇研究

[0193] 流程

[0194] •所有实验一式三份进行(即,三份单独的溶液,三片皮肤,每份溶液一片)。所用的皮肤来自玉米蛇(*Elaphe guttata*)(美国玉米蛇)的背部。

[0195] •通过在水(1mL)中搅拌氨基酸(甘氨酸0.1008g,L-丝氨酸0.1395g,D-丝氨酸0.1400g,L-高丝氨酸0.1582g, α -羟基-甘氨酸0.1213g)而制备浓度为1.33M的各种氨基酸的溶液。

[0196] •将来自同一供体的顶部(背侧)的蛇皮切成 $\sim 1\text{cm}^2$ 的片。将每片称重,并直接放置在所述氨基酸溶液之一中,每个溶液一片蛇皮。

[0197] •1小时后,从所述溶液中取出蛇皮,并在滤纸上吸干。记录蛇皮的重量,之后将同一蛇皮放回到氨基酸溶液中。

[0198] •再过23小时后(总共24小时),再次将蛇皮在滤纸上吸干并称重。

[0199] •然后,将现在已经吸收了测试氨基酸的蛇皮在真空干燥器中在二氧化硅(0%RH)上放置48小时,之后称重。现在所述皮肤是干燥的,并且包含测试氨基酸。

[0200] •然后将蛇皮放置在40%RH(用饱和硝酸锌溶液控制)的干燥器中,以确定该皮肤能够从这一湿度水平的大气吸收多少水分。

[0201] •然后再次称重各皮肤样品。

[0202] 附图2显示同一化合物在40%RH24小时后,相对于DRH(潮解相对湿度)的与水相比的平均百分比重量增加。图2显示将皮肤用测试氨基酸饱和、干燥、然后暴露于40%湿度后24小时的DRH。

[0203] 附图3显示对于每种测试氨基酸,在用1.33M氨基酸溶液处理24小时后在40%RH24小时后的平均百分比重量增加。

[0204] 同样地,可以看出,在这些检测中, α -羟基甘氨酸和L-高丝氨酸表现出特别有利的性质。

[0205] 流程B

[0206] •通过在水(1mL)中搅拌化合物(100mg)而制备每种化合物的10%w/w浓度溶液。分开制备每种化合物的三份独立的溶液,以使实验可以同时一式三份地进行。在使用商购霜剂的情形中,将霜剂样品(100mg)放置在小瓶中。

[0207] •将来自同一供体的顶部的蛇皮切成 1cm^2 的片。将每片称重并且直接放置在所述化合物溶液之一中。每份溶液一片蛇皮。将蛇皮直接放置在溶液的上部,以使仅有一面与所述溶液接触。当将蛇皮放置在溶液中时,需要小心,以使所述皮肤平整地放置在溶液表面上。

[0208] •1小时后,将蛇从所述溶液取出并在滤纸上吸干。记录蛇皮的重量,之后将同一蛇皮放回到同一化合物溶液中。

[0209] •再过23小时后(总共24小时),再次将蛇皮在滤纸上吸干并称重。

[0210] •然后将蛇皮在真空干燥器中在二氧化硅(0%相对湿度(RH))上放置48小时,之后称重。在被放置在真空干燥器中之前,二氧化硅应该干燥24小时。

[0211] •然后将蛇皮放置在特定RH(40%RH是用饱和硝酸锌溶液控制的;70%RH是用1:1 NaCl:Na₂CO₃饱和溶液控制的;100%RH是用水控制的)的干燥器中。每个室应该在将蛇皮样品放置在所述室中前48小时制备,并且用湿度计检测RH。

[0212] 附图10显示对于每种测试氨基酸,在用10%w/w氨基酸溶液处理24小时后在

70% RH 24 小时后的平均百分比重量增加。

[0213] 实施例 4

[0214] 研究了用本发明的氨基酸制剂预处理皮肤以增强具有不同生理化学性质的三种化合物的渗透性的效果。所述三种化合物为：

[0215] 阿昔洛韦

[0216] 甲硝唑, 和

[0217] 双氯芬酸二乙胺 (Diclofenac diethylamine)

[0218] 方法

[0219] 使用 Waters Alliance Separations Module 和 Waters 检测器, 用 HPLC 分析阿昔洛韦、甲硝唑和双氯芬酸二乙胺 (DDEA)。柱和样品的温度分别保持在 45±2°C 和 5.0±2°C。使用具有保护柱 (Phenomenex USA, C-184.0x 3.0mm) 的 Kinetix™ C-18 (Phenomenex, USA) 柱 (150mm x 4.6mm 5 μm 粒度) 作为固定相。移动相是三个部分：移动相 A, 水；移动相 B, 甲醇；和移动相 C, 10mM 磷酸铵缓冲液 pH 2.5。移动相使用流速为 0.8mL/min 的梯度流 (表 2) 运行。样品运行 12 分钟, 注入体积为 10 μL。阿昔洛韦、甲硝唑和 DDEA 在 276nm 波长下处理, 大概的保留时间分别为 4.7、6.5 和 8.7min。由通过连续稀释制备的一系列标准物连同分别制备的质量对照 (quality controls) 构建校准曲线。标准物和 QC's 用收集流体 (磷酸缓冲盐水) 稀释。记录数据并用 Empower Pro³软件分析。

[0220] 表 2. 用于分析方法的流动梯度。

[0221]

时间	%移动相 A	%移动相 B	%移动相 C
0.00	99.0	1.0	0.0
1.00	99.0	1.0	0.0
2.00	90.0	10.0	0.0
3.00	90.0	10.0	0.0
4.00	60.0	40.0	0.0
5.50	5.0	90.0	5.0
6.00	5.0	95.0	0.0
8.00	99.0	1.0	0.0
12.00	99.0	1.0	0.0

[0222] 在去离子水中以 10% w/v 制备 N-羟基丝氨酸、L-高丝氨酸、N-羟基甘氨酸和 N-羟基丝氨酸、L-高丝氨酸、N-羟基甘氨酸的 1:1:1 比例的组合的预处理用溶液。

[0223] 通过用 API 饱和溶剂系统 (50:50, PEG-400: 水) 约 16 小时而制备 ACV、甲硝唑和 DDEA 的供体溶液。在体外渗透性实验中用药前, 将所述供体溶液离心。

[0224] 人表皮膜制备自整形还原手术 (cosmetic reduction surgery) (腹壁成形术 (abdominoplasty)) 后的皮肤。将完整厚度的皮肤在环境温度下解冻直至可延展。通过钝剥离机械去除皮下脂肪。在去除脂肪后, 将皮肤在热的去离子水 ($60 \pm 3^\circ\text{C}$) 中浸没 45s。用带手套的手指将表皮膜 (包含角质层和表皮) 从下面的真皮上取下, 并且弃掉真皮。然后将表皮膜漂浮 (角质层侧向上) 在滤纸上的去离子水中。从表面去除过量的水分, 并且将组织安装在 Franz 型扩散池中。每个池具有大约 0.60cm^2 的平均表面积和大约 2.0mL 的容积。设置水浴温度以保持皮肤表面温度为 32°C , 以代表体内皮肤。

[0225] 进行三次实验, 各 API (阿昔洛韦、甲硝唑和 DDEA) 一次。在每个实验过程中, 每个 API 准备总计 32 个池。用电阻评估表皮膜的完整性, 以确保表皮膜是完好无损的。将所述池各自用 $100\mu\text{L}$ 的 N- 羟基丝氨酸 ($n = 6$)、L- 高丝氨酸 ($n = 6$)、N- 羟基甘氨酸 ($n = 6$) 的 10% w/v 溶液和组合预处理溶液 ($n = 6$) 预处理过夜 (约 16h), $n = 6$ 个池未进行预处理。另外, 还制备空白池 (没有预处理) 和安慰剂池 (用组合预处理溶液预处理), 以评估分析测定的任何潜在的干扰。在预处理期后, 从表皮膜的表面去除预处理溶液, 并且将表面干燥。将下部的接收室用接收流体 (磷酸缓冲盐水) 填充, 并且使用预先校准的正移液器 (positive displacement pipette) 给所述池施用 6mg 剂量 (即 $10\text{mg}/\text{cm}^2$) 的每种 API 饱和的供体溶液, 例外的是空白池和安慰剂池。在 0, 1, 2, 4, 6, 24, 30 和 48h 时间点, 从取样臂取出接收流体的样品 ($200\mu\text{L}$)。在取出各样品后, 替换以等体积的预先温育的接收流体。使用 HPLC 分析样品, 并且定量已经渗透的各 API 的水平。

[0226] 结果

[0227] 观察到, 自所有已经用本发明的氨基酸预处理的池的双氯芬酸渗透显著更高 (图 4 和 5)。在用 N- 羟基甘氨酸预处理表皮膜 ($t = 24$ 小时) 后观察到渗透的双氯芬酸的最高量, 观察到双氯芬酸渗透的最大增强是没有进行预处理的表皮膜的 18.79 倍。

[0228] 图 4 显示在 48 小时的实验期间双氯芬酸通过表皮膜的累积渗透。每个条棒表示平均渗透 +SEM, $n = 5-6$ 。

[0229] 图 5 显示 48 小时后双氯芬酸通过表皮膜的累积渗透。每个条棒表示平均渗透 +SEM, $n = 5-6$ 。

[0230]

表 3. 在不进行预处理和用新的氨基酸溶液预处理后双氯芬酸的平均累积渗透。增强比(ER)是指与在未进行预处理的情况下双氯芬酸渗透相比的增强。

时间(h)	未进行预处理		预处理 N-羟基丝氨酸		预处理 L-高丝氨酸		预处理 N-羟基甘氨酸		预处理 1:1:1 组合	
	平均渗透的 DDEA ($\mu\text{g}/\text{cm}^2$)	平均渗透	平均渗透的 DDEA ($\mu\text{g}/\text{cm}^2$)	平均 ER	平均渗透的 DDEA ($\mu\text{g}/\text{cm}^2$)	平均 ER	平均渗透的 DDEA ($\mu\text{g}/\text{cm}^2$)	平均 ER	平均渗透的 DDEA ($\mu\text{g}/\text{cm}^2$)	平均 ER
1.0	0.00	0.00	n/a	0.00	n/a	0.00	n/a	0.00	n/a	n/a
2.0	0.00	0.19	n/a	0.00	n/a	0.00	n/a	0.00	n/a	n/a
4.0	0.05	0.83	16.05	0.00	0.00	0.39	7.63	0.00	0.00	0.00
6.0	0.15	1.53	9.97	0.14	0.93	1.03	6.72	0.04	0.27	
24.0	1.31	11.83	9.01	2.93	2.23	24.67	18.79	8.23	6.27	
30.0	1.64	13.99	8.51	4.27	2.60	25.84	15.72	12.07	7.34	
48.0	3.17	20.14	6.35	8.21	2.59	36.87	11.63	23.19	7.31	

[0231] 在表 4 中, 观察到, 在 $t = 2\text{h}$ 时间点后, 自所有已经用本发明的氨基酸预处理的池的甲硝唑渗透显著更高 (图 6 和 7)。在用 N-羟基丝氨酸预处理表皮膜 ($t = 30\text{ 小时}$) 后

观察到渗透的甲硝唑的最高量, 观察到甲硝唑渗透性的最大增强是没有进行预处理的表皮膜的 14.72 倍。

[0232] 图 6 显示在 48 小时的实验期间甲硝唑通过表皮膜的累积渗透。每个条棒表示平均渗透 +SEM, n = 5-6。

[0233] 图 7 显示 48 小时后甲硝唑通过表皮膜的累积渗透。每个条棒表示平均渗透 +SEM, n = 5-6。

[0234]

表 4. 在未进行预处理和用新的氨基酸溶液预处理后甲硝唑的平均累积渗透。增强比(ER)是指与在未进行预处理的情况下的甲硝唑渗透相比的增强。

时 间 (h)	未进行预处 理		预处理 N-羟基丝氨酸		预处理 L-高丝氨酸		预处理 N-羟基甘氨酸		预处理 1:1:1 组合	
	平均 甲 硝 唑 ($\mu\text{g}/\text{cm}^2$)	平均 甲 硝 唑 ($\mu\text{g}/\text{cm}^2$)	平均 甲 硝 唑 ER	平均 甲 硝 唑 ($\mu\text{g}/\text{cm}^2$)						
1.0	0.09	0.04	0.50	0.00	0	0.00	0	0.03	0	0.33
2.0	0.12	0.23	1.84	0.09	0.75	0.09	0.74	0.08	0.64	
4.0	0.21	0.54	2.56	0.38	1.81	0.42	2.00	0.50	2.35	
6.0	0.26	1.10	4.22	0.70	2.67	0.85	3.26	0.91	3.47	
24.0	0.52	4.65	8.92	3.37	6.47	2.15	4.13	2.41	4.63	
30.0	0.58	8.51	14.72	4.72	8.17	3.51	6.08	3.34	5.77	
48.0	1.12	12.50	11.20	6.68	5.98	6.70	6.00	4.94	4.42	

[0235] 在表 5 中, 在已经用本发明的氨基酸预处理的池中较早地观察到在接收流体中的阿昔洛韦渗透 (图 8 和 9)。在用 L- 高丝氨酸预处理表皮膜 ($t = 48$ 小时) 后观察到渗透的

阿昔洛韦的最高量,观察到阿昔洛韦渗透的最大增强是没有进行预处理的表皮膜的 11.72 倍。未能计算 $t = 48$ 小时之前的增强比,原因是缺少在该点之前的自未处理的皮肤的阿昔洛韦渗透。

[0236] 图 8 显示在 48 小时的实验期间阿昔洛韦通过表皮膜的累积渗透。每个条棒表示平均渗透 +SEM, $n = 5-6$ 。

[0237] 图 9 显示 48 小时后阿昔洛韦通过表皮膜的累积渗透。每个条棒表示平均渗透 +SEM, $n = 5-6$ 。

[0238]

表 5. 在未进行预处理和用新的氨基酸溶液预处理后阿昔洛韦的平均累积渗透。增强比(ER)是指与在未进行预处理的情况下阿昔洛韦渗透相比的增强。

时间(h)	未进行预处理		预处理 N-羟基丝氨酸		预处理 L-高丝氨酸		预处理 N-羟基甘氨酸		预处理 1:1:1 组合	
	平均渗透的阿昔洛韦 ($\mu\text{g}/\text{cm}^2$)	平均 ER								
1.0	0.00	0.00	NC	0.00	NC	0.00	NC	0.00	NC	0.00
2.0	0.00	0.00	NC	0.00	NC	0.00	NC	0.00	NC	0.00
4.0	0.00	0.00	NC	0.00	NC	0.00	NC	0.00	NC	0.00
6.0	0.00	0.00	NC	0.06	NC	0.01	NC	0.03	NC	0.03
24.0	0.00	0.03	NC	0.22	NC	0.12	NC	0.15	NC	0.15
30.0	0.00	0.11	NC	0.32	NC	0.14	NC	0.20	NC	0.20
48.0	0.04	0.26	5.99	0.51	11.72	0.21	4.82	0.30	7.00	

*NC – 未计算

[0239] 总结

[0240] 用本发明的氨基酸预处理表皮膜增强药物在其上的渗透。

- [0241] 取决于药物的物理化学性质,本发明的不同氨基酸具有不同的增强效果。
- [0242] 药物吸收增强因子的图表显示在图 11 中。由该图可以清楚看出,增强随着增加的 Log P 而增加。在这一点上,增强因子和 Log P 如下:
- [0243]

	ER	Log P
双氯芬酸二乙胺	19	0.85
甲硝唑	15	-0.02
ACV	12	-1.56

[0244] 实施例 5

[0245] 使用混合物和组合将水吸收到蛇皮中:

[0246] 常规制剂与基质 (base) 的组合

[0247] 使用实施例 3 所述的流程,唯一的区别在于蛇皮最终在~ 75% RH 的溶液 (使用 1:1 NaCl:Na₂CO₃饱和溶液制备) 中再水化。所有样品为 10% (透明质酸除外,其中一个样品以 1% 使用,并且单独测试赋形剂)。结果显示在图 10 中。

[0248] 从该结果可以看出,本发明的氨基酸与 Oilatum 的组合在其增湿能力方面是特别有益的。

[0249] 实施例 6

[0250] RHE 刺激评估法 1

[0251] 1.1 介绍

[0252] 本实验的目的是研究 α - 羟基甘氨酸 (α -H-G) 和 L- 高丝氨酸 (L-h-S) 引起皮肤刺激的潜力。本方法是基于根据 OECD 指南测试号 439 :体外皮肤刺激 (OECD guideline Test No. 439: In Vitro Skin Irritation) 的验证的用于“SkinEthic 皮肤刺激测试 -42 双测定 (The SkinEthic Skin Irritation Test-42bis assay)”的 SOP。所述流程提供在第 1.2 节中。关于该方法的进一步的详情可见于 SkinEthic™ RHE SOP, Version 2.1(2009 年 7 月), SkinEthic skin irritation test-42bis test method for the prediction of acute skin irritation of chemicals:42minutes application+42hours post-incubation(用于预测化学品的急性皮肤刺激的 SkinEthic 皮肤刺激测试 -42 双测试法 :42 分钟施用 +42 小时后温育)。可从 [<http://ecvam.jrc.ec.europa.eu>] 找到。在该流程中,少于 50% 的阴性对照的组织生存力评分表明测试溶液是刺激性的。

[0253] 另外,进行另一个实验,其中测试溶液与组织的接触时间增加至 24 小时。在该点后,使用 MTT 测定来确定组织生产力和测试溶液引起刺激的潜力。

[0254] 1.2 SkinEthic 皮肤刺激测试 -42 双测定流程

[0255] 1.2.1 RHE 刺激测试流程

[0256] 1.2.1.1 预温育步骤

[0257] 在收到组织时,完成下述步骤:

[0258] (i) 将 6 孔平板的孔填充以 1mL 生长培养基。

[0259] (ii) 将组织从其包装中取出,清洁,以去除转运琼脂糖,并且检查损坏迹象;弃掉损坏的组织;

- [0260] (iii) 将组织转移到生长培养基中, 然后在 37°C, 5% CO₂温育, 直到施用测试溶液。
- [0261] 1.2.1.1.2 制备磷酸缓冲盐水 (PBS)
- [0262] (i) 将 PBS 片 (x 5) 加入到 500mL 容量瓶中。
- [0263] (ii) 将来自步骤 (i) 的容量瓶用去离子水 (18.2MΩ) 定容, 并用 PTFE 磁力搅拌器搅拌, 直到观察到 PBS 片溶解。
- [0264] (iii) 需要时使用 PBS。
- [0265] 1.2.1.1.3 制备 MTT 溶液
- [0266] (i) 称重 3-(4,5-二甲基噻唑-2-基)-2,5-二苯基四唑溴化物 (MTT) (100.0±5.0mg) 到 20mL 容量瓶中。产生的溶液具有 5mg/mL 的标称 MTT 浓度。
- [0267] (ii) 将来自步骤 (i) 的容量瓶用 PBS 定容。
- [0268] (iii) 向来自步骤 (ii) 的容量瓶添加 PTFE 磁力搅拌器, 并且搅拌溶液直到完全溶解。
- [0269] (iv) 用 0.2 μm 滤器将来自步骤 (iii) 的溶液直接过滤到无菌管中。
- [0270] (v) 在需要之前, 该储液避光, 并保存在 -20°C。
- [0271] (vi) 需要时, 将 MTT 溶液解冻, 并用预先温育的保持培养基稀释, 以得到多至 1mg/mL 的浓度。
- [0272] 1.2.1.1.4 制备阳性对照 (5% SDS) 溶液
- [0273] (i) 称重十二烷基硫酸钠 (SDS, 100±5.0mg) 到 20mL 容量瓶中, 并且用去离子水 (18.2MΩ) 定容。
- [0274] (ii) 将来自步骤 (i) 的容量瓶用去离子水 (18.2MΩ) 定容, 并用 PTFE 磁力搅拌器搅拌, 直到 SDS 完全溶解。
- [0275] (iii) 将溶液用无菌的 0.2 μm 滤器 PES 滤器过滤除菌。
- [0276] 1.2.1.1.5 施用 5 和 1% w/v α-H-G 和 10 和 1% w/v L-h-S 并清洗
- [0277] 1.2.1.1.6 施用 5 和 1% w/v α-H-G 和 10 与 1% w/v L-h-S 和对照
- [0278] (i) 使用正移液器将 16 μL±0.5 μL 的测试溶液 (在水中的 5% w/v α-羟基甘氨酸 (α-H-G), 在水中的 1% w/v α-羟基甘氨酸 (α-H-G), 在水中的 10% w/v L-高丝氨酸 (L-h-S), 在水中的 1% w/v L-高丝氨酸 (L-h-S)) 和阴性 (PBS) 与阳性 (5% SDS) 对照分散到表皮组织之上。利用移液管的尖端将测试溶液或对照分布到表面表皮上。
- [0279] (ii) 用镊子将尼龙网放置在组织表面上, 并且代替平板盖。
- [0280] (iii) 将来自步骤 (ii) 的平板在通风橱中在室温保持 42 分钟或在 37°C, 5% CO₂ 温育 24 小时。
- [0281] 1.2.1.1.7 清洗和干燥步骤
- [0282] (i) 处理后, 将尼龙网从组织表面上取下。
- [0283] (ii) 所述组织用 PBS (1mL) 以距插入物 5-8cm 的距离清洗 25 次, 以从表皮表面上去除所有残留的测试物质。
- [0284] (iii) 将来自步骤 (ii) 的插入物倒空, 并且在无菌吸水纸上干燥。
- [0285] (iv) 将角质层的表面用棉签干燥。
- [0286] (v) 将来自步骤 (iv) 的洗涤的组织转移到预先填装 2mL 温育的生长培养基的新鲜

的 6 孔培养板中。

[0287] 1.2.1.1.8 处理后温育 :42 小时

[0288] (i) 处理后, 将组织在 37°C, 5% CO₂, 95% 湿润的大气温育 42 小时。

[0289] (ii) 在培养期结束时, 保留在处理的 RHE 组织下的下层清液。

[0290] (iii) 通过以 300RPM 搅拌 2 分钟将维持培养基均化。

[0291] (iv) 将培育培养基放置在离心管中并且保存在 -20°C, 直至需要进行分析。

[0292] 1.2.1.1.9MTT 测定

[0293] (i) 将 24 孔板中需要的孔填装 300 μL 的 MTT 溶液并且避光。

[0294] (ii) 将组织从处理后温育平板上取出, 并且用吸水纸除去过量的培养基。

[0295] (iii) 将处理的组织转移到 24 孔板的预先填充有 MTT 溶液的孔中。

[0296] (iv) 将平板在 37°C, 5% CO₂, 95% 湿润的大气温育 3h (+/-5min)。

[0297] (v) 将新平板填装 800 μL 异丙醇, 并且将处理的组织转移到该平板中。向每个组织的上部加入另外 700 μL 异丙醇。

[0298] (vi) 将平板用 parafilm 膜密封, 以防止蒸发, 并用箔材避光, 然后冷藏 (2-8°C) 过夜, 以进行提取。

[0299] (vii) 提取后, 将组织用移液管尖端刺穿, 以向孔中加入全部的提取液。该溶液通过用移液管混合而均化。

[0300] (viii) 将 3x 200 μL 提取液 / 孔移液到 96 孔板中, 并用 μQuant 分光光度计在 570nm 测量光密度。

[0301] 1.3 结果和讨论

[0302] 42min 与 24h 暴露的组织生存力评估的结果分别显示在图 122 和图中。观察到在暴露于所有测试溶液后的组织生存力都已经保持高于 50% 的阴性对照, 这表明所述溶液 (5% w/v α-H-G, 1% w/v α-H-G, 10% w/v L-h-S, 1% w/v L-h-S) 是非刺激的。

[0303] 图 12 显示 RHE 组织在 42 分钟暴露和 42 暴露后温育后的生存力。每个点表示平均组织生存力, 误差条表示范围 ;n = 4。

[0304] 图 13 显示 RHE 组织在 24 小时暴露后的生存力。每个点表示平均组织生存力, 误差条表示范围 ;n = 3。

[0305] 2. RHE 刺激评估法 2

[0306] 2.1 介绍

[0307] 方法 1 用于研究 α-羟基甘氨酸 (α-H-G) 和 L- 高丝氨酸 (L-h-S) 引起皮肤刺激的潜力。该流程主要是设计并验证单个化合物而不是溶液。因此, 为了提供对 N- 羟基丝氨酸和 N- 羟基甘氨酸引起皮肤刺激的潜在性的深入了解, 使用 Mattek's MTT 有效时间 (ET-50) 测定来研究第二流程, 所述测定设计用来检测化合物的混合物。另外, 选择并检测作为 N- 羟基丝氨酸和 N- 羟基甘氨酸的比较剂的两种商购的氨基酸相关的化合物 (L- 丝氨酸和甘氨酸)。

[0308] Mattek's MTT 有效时间 (ET-50) 测定使用最少 3 个暴露时间 (在每个暴露时间, 通过 MTT 测定确定组织生存力), 以构建剂量响应曲线来确定化学品将生存力减少为对照的 50% 所需要的暴露时间 (即 ET-50 值)。作为通用指南, 下述分组可以用于基于得到的 ET-50 结果来分配预期的体内刺激反应 :

[0309]

<u>ET-50 (小时)预期的体内刺激</u>	<u>实例</u>
< 0.5 强/严重的, 可能是腐蚀性的	浓硝酸
0.5-4 中度的	1%十二烷基硫酸钠
4-12 中度到轻度的	1% Triton X-100
12-24 非常轻度的	婴儿香波
24 非刺激的	10 %吐温 20

[0310] 2. 2MTT ET-50 测定流程

[0311] 溶液的刺激评估使用下文所述的流程进行。将每种测试溶液 ;N- 羟基丝氨酸 (10% w/v, N-H-S, 在水中), N- 羟基甘氨酸 (1% w/v, N-H-G, 在水中), L- 丝氨酸 (10% w/v, 在水中) 和甘氨酸 (10% w/v, 在水中), 阳性 (1% v/v Triton X-100, 在 PBS 中) 和阴性 (未处理的) 对照以不同的给药时期 (对于溶液为 2、6 和 24h ;对于阴性对照为 5h, 并且对于阳性对照为 3 和 7h, n = 3) 施用于组织。

[0312] 2. 2. 1RHE 组织的预温育步骤

[0313] 组织一到达就保存在 2-8°C, 然后进行下述步骤 :

[0314] (i) 使用自动移液管将 6 孔板的孔填装预温的 (37°C) 测定培养基 (0. 9mL, 随所述组织提供)。

[0315] (ii) 将组织从其包装中取出, 清洁并且用棉签除去转运琼脂糖, 并且检查损坏的迹象。弃去损坏的组织。

[0316] (iii) 将组织转移到测定培养基中并在 37°C, 5% CO₂ 培育, 直到在次日施用测试溶液 ;N- 羟基丝氨酸 (10% w/v, N-H-S, 在水中), N- 羟基甘氨酸 (1% w/v, N-H-G, 在水中), L- 丝氨酸 (10% w/v, 在水中) 和甘氨酸 (10% w/v, 在水中)。

[0317] 2. 2. 2 制备工作 MTT 溶液

[0318] 使用下述步骤制备工作 MTT 溶液 :

[0319] (i) 从冷库中取出 MTT 浓缩物, 并且使其解冻。用 MTT 稀释液稀释所述浓缩物 (1mL 浓缩物对 4mL MTT 稀释液)。

[0320] (ii) 将来自步骤 (i) 的 MTT 溶液以 300g 的力离心 5 分钟, 以除去任何颗粒。

[0321] (iii) 将来自步骤 (ii) 的 MTT 溶液的上清在 4°C 在暗处保存最多 24 小时的时期, 并且在需要时使用。

[0322] 2. 2. 3 溶液和对照的施用

[0323] (i) 在施用溶液和对照之前, 用自动移液管从 6 孔板去除 RHE 组织的预培育培养基, 替换为新鲜的预温的 (37°C) 测定培养基 (0. 9mL, 随所述组织提供)。

[0324] (ii) 使用正移液器, 将溶液 N- 羟基丝氨酸 (10% w/v, N-H-S, 在水中), N- 羟基甘氨酸 (1% w/v, N-H-G, 在水中), L- 丝氨酸 (10% w/v, 在水中) 和甘氨酸 (10% w/v, 在水

中) 或对照(阴性和阳性对照)分散(100±0.5 μL)到RHE组织的上面。然后,使用无菌玻璃棒将所述溶液或对照分布到RHE组织的表面上。

[0325] (iii) 将盖子放置在包含RHE组织的孔板上,并且将组织放回到培养箱(37°C, 5% CO₂)中持续需要的用药时间(对于溶液为2、6和24h;对于阳性对照为3和7h;对于阴性对照为5h)。

[0326] 2.2.4 MTT 测定

[0327] 为了确定施用所述溶液和对照后RHE组织的生存力,使用下述步骤:

[0328] (i) 将24孔板中需要的孔中填装300 μL MTT溶液并且避光。

[0329] (ii) 将组织从处理后温育平板取出,并且用无菌棉签去除过量的溶液和对照。

[0330] (iii) 然后将RHE组织用1000 μL PBS清洗五次,以从表皮表面上去除残留的溶液。

[0331] (iv) 将来自步骤(iii)的组织用棉签吸干。

[0332] (v) 将来自步骤(iv)的处理的组织转移到24孔板中预先填装了MTT溶液(300 μL)的孔中。将这些平板在37°C, 5% CO₂和95%湿润的大气温育3h(+/-5min)。

[0333] (vi) 然后将处理的组织转移到填装了1mL提取溶液的新平板中。

[0334] (vii) 在2-8°C提取前,将平板用Parafilm®密封以防止蒸发并且使用箔材以避光,以使蒸发减至最少。

[0335] (viii) 在提取后,将RHE组织从孔中取出,并且加入另外1mL提取溶液。使用移液器混合提取溶液并且使之在视觉上是均匀的。

[0336] (ix) 用自动移液器将来自步骤(viii)的溶液转移到96孔板的n=3个孔(200 μL/孔)中,并且在570nm的波长测量光密度。

[0337] 2.3 结果和讨论

[0338] 在2、6和24h的组织生存力评估显示在图14中。剂量响应曲线表明,在三个用药时期(2、6和24h),1% w/v N-H-G, 10% w/v L-丝氨酸和10% w/v 甘氨酸对RHE组织的生存力没有显著影响。由此,并且根据ET-50指导记录值,1% w/v N-H-G, 10% w/v L-H-S和10% w/v 甘氨酸将被认为是非刺激的。

[0339] 计算10% w/v N-H-S在22.8h的ET-50,这将10% w/v N-H-S分类为非常轻度的刺激剂。表明两种商购的氨基酸相关化合物(L-丝氨酸和甘氨酸)是非刺激剂。

[0340] 图14显示在暴露于10% w/v N-H-G, 1% w/v N-H-G, 10% w/v L-丝氨酸和10% w/v 甘氨酸的溶液(在t=2、6和24h)和阳性对照(1% w/v Triton™ X-100, t=3和7h)后的组织生存力。每个时间点表示平均组织生存力,并且误差条表示范围,n=3。

[0341] 3 银屑病组织的体外评估.方法3

[0342] 3.1 介绍

[0343] 在本研究中使用基于人细胞的体外银屑病组织模型,该模型由银屑病成纤维细胞和正常的角质形成细胞组成。当与正常RHE组织相比较时,银屑病组织模型表现出基底上皮细胞的过渡增殖,和较正常RHE组织的增加的银屑病标记的表达(例如GM-CSF)。GM-CSF是包括银屑病在内的慢性炎症和自身免疫疾病所涉及的先天性免疫系统的主要激活剂(Löntz等1995),其中巨噬细胞、粒细胞、嗜中性粒细胞、嗜曙红细胞和树突细胞可能促成组织损伤和疾病进展(Krinner 2007)。GM-CSF刺激干细胞产生粒细胞和其他巨噬细胞,然

后激活这些分化的免疫细胞。GM-CSF 还已经被鉴定为自身免疫疾病中的炎性调节剂，在包括过敏性和银屑病患者、关节炎和哮喘患者的多种炎症部位检测到升高的 GM-CSF mRNA 或蛋白水平 (Plater-Zyberk 等, 2008)。在过去数年的多个体内研究已经表明，通过中和抗体阻断 GM-CSF 可以预防或者甚至治愈包括关节炎实验自身免疫脑炎、银屑病在内的多种炎症模型中的促炎症疾病 (Schon 等, 2000) 和肺病 (Plater-Zyberk 等, 2008)。另外，发现利用重组 GM-CSF 的治疗加重慢性炎症疾病，例如，已经证明接受 GM-CSF 治疗的患有慢性银屑病的患者具有加重的银屑病损伤 (Kelly 等, 2007)。由于 GM-CSF 在银屑病中的重要性，在本研究中选择其进行分析。

[0344] 3.2 方法

[0345] 在该研究中，使用两种类型的 RHE 组织，它们是源自 MatTek Corporation (Ashland, MA) 的健康的和银屑病组织。由于两种组织以相同的方式进行处理，因此，为了简化，下述流程将两种组织类型都称为 RHE 组织并且将所有培养基都称作测定培养基。唯一的不同之处在于，不同类型的组织（健康的和银屑病组织）需要两种不同类型的培养基。健康组织对照用在本实验中，证明银屑病组织中的 GM-CSF 水平按供应商之前所证明的那样进行评估。

[0346] 3.2.1 RHE 组织的预温育步骤

[0347] 组织一到达就保存在 2–8°C，之后进行下述步骤：

[0348] (i) 用自动移液器将 6 孔板的孔填装预温的 (37°C) 测定培养基 (0.9mL, 随所述组织提供)。

[0349] (ii) 将组织从它们的包装中取出，用棉签清洁以去除转运琼脂糖，并且检查损坏迹象。弃掉损坏的组织。

[0350] (iii) 将组织转移到生长培养基中，然后在 37°C, 5% CO₂ 温育，直到在次日施用所述溶液。

[0351] 3.2.2 制备 MTT 溶液

[0352] (i) 称重 3-(4,5-二甲基噻唑-2-基)-2,5-二苯基四唑溴化物 (MTT) (100.0±5.0mg) 到 A 级 20mL 容量瓶中。产生的溶液具有 5mg/mL 的标称 MTT 浓度。

[0353] (ii) 将来自步骤 (i) 的容量瓶用 PBS 定容。

[0354] (iii) 向来自步骤 (ii) 的容量瓶加入 PTFE 磁力搅拌器，并且搅拌溶液直到完全溶解。

[0355] (iv) 用 0.2 μm 滤器将来自步骤 (iii) 的溶液直接过滤到无菌管中。

[0356] (v) 使该储液避光并保存在 -20°C 直至需要。

[0357] (vi) 需要时，将 MTT 溶液解冻，并用预温的保持培养基稀释，以得到多至 1mg/mL 的浓度。

[0358] 3.2.3 组织准备和测试溶液施用

[0359] (i) 在平衡期末，去除每个孔的培养基，然后将组织抬起并放置在培养台 (culture stand) 上，并向孔中加入新鲜的预温的 (37°C) 测定培养基 (5mL)。

[0360] (ii) 使用正移液器，将测试溶液在水中的 10% w/v N-H-S (N-羟基丝氨酸)、在水中的 10% w/v N-H-G (N-羟基甘氨酸)、在水中的 10% w/v L-h-S (L-高丝氨酸) 和在水中的 10% w/v 组合 1:1:1 (N-H-S:N-H-G:L-h-S) 分散 (50±0.5 μL) 到 RHE 组织的上部。然后

用无菌玻璃棒将所述溶液或对照分布到 RHE 组织的表面上。

[0361] (iii) 将盖子放置在包含 RHE 组织的孔板上，并且在施用之间将所述组织放回到培养箱 (37°C , 5% CO₂) 中 48h。

[0362] 3.2.4 培养基变换和溶液的再施用

[0363] (i) 每 48h, 从 6 孔板中取出用于 RHE 组织的培养基，并且转移到管中保存 (-20°C)，用于细胞因子分析。

[0364] (ii) 使用自动移液器向每个组织加入新鲜的预温的 (37°C) 测定培养基 (5mL)。

[0365] (iii) 自每个处理取出 1 个组织用于生存力评估。

[0366] (iv) 然后用 100 μL PBS 清洗 RHE 组织以从表皮表面去除残留的溶液。

[0367] (v) 使用正移液器，将溶液在水中的 10% w/v N-H-S、在水中的 1% w/v N-H-G、在水中的 10% w/v L-h-S 和 10% w/v 组合 1:1:1(N-H-S:N-H-G:L-h-S) 分散 (50±0.5 μL) 到 RHE 组织的上部。用无菌玻璃棒将所述溶液或对照分布到 RHE 组织的表面上。

[0368] (vi) 将盖子放置到包含 RHE 组织的孔板上，并且在 t = 0、48 和 96h 的施用之间将组织放回到培养箱 (37°C , 5% CO₂) 48h。

[0369] 3.2.5 MTT 测定

[0370] 为了确定 RHE 组织在施用所述溶液和对照后的生存力，使用下述步骤：

[0371] (i) 将 24 孔板中需要的孔填装 300 μL MTT 溶液并且避光。

[0372] (ii) 将组织从处理后温育平板取出，并且用无菌棉签去除过量的溶液和对照。

[0373] (iii) 然后用 1000 μL PBS 清洗 RHE 组织五次，以从表皮表面去除残留的溶液。

[0374] (iv) 用棉签吸干来自步骤 (iii) 的组织。

[0375] (v) 将来自步骤 (iv) 的处理的组织转移到预先填装有 MTT 溶液 (300 μL) 的 24 孔板中的孔中，将该平板在 37°C , 5% CO₂ 和 95% 湿润的大气下温育 3h (+/-5min)。

[0376] (vi) 然后将处理的组织转移到装有 1mL 提取溶液的新平板中。

[0377] (vii) 在 2-8°C 提取之前，将平板用 Parafilm® 密封以防止蒸发并用箔材避光，以使蒸发最小化。

[0378] (viii) 提取后，将 RHE 组织从孔中取出，并加入另外 1mL 提取溶液。使用移液器混合提取溶液并使之视觉上是均匀的。

[0379] (ix) 用自动移液器将来自步骤 (viii) 的溶液转移到 96 孔板的 n = 3 个孔 (200 μL/ 孔) 中，并且在 570nm 的波长测量光密度。

[0380] 3.2.6 分析细胞因子释放

[0381] 分析条件培养基，以确定所释放的 GM-CSF 的浓度。使用 Invitrogen Human GM-CSF 试剂盒（固相夹心酶联免疫吸附测定 (ELISA)）来定量 GM-CSF 的浓度。将对人 GM-CSF 具有特异性的抗体包被在微量滴定板的孔上。每份样品，包括人 GM-CSF 标准品，直接移液到包被的孔中，然后加入生物素化的二抗。将平板在环境条件下温育 0.5h，在该期间，人 GM-CSF 抗原同时与在一个位点的固定（捕获）抗体和在第二位点的溶液相生物素化的抗体结合。去除过量的二抗，并且加入链霉抗生物素 - 过氧化物酶（酶）。该酶与生物素化的抗体结合以与四元夹心物竞争。将该夹心物在环境条件下第二次温育 0.5h，并且通过洗涤去除任何未结合的酶，之后加入底物溶液，导致有色产物的形成，所述有色产物通过使用 μ Quant 分光光度计测量所述溶液在 450nm 的吸光度而进行定量。这种有色产物的强度与原始样品中

存在的人 GM-CSF 的浓度直接成正比，并且由提供的 GM-CSF 标准品进行定量。

[0382] 3.3 结果和讨论

[0383] 图 15 和 16 显示在银屑病和对照重建的人皮肤模型中用在水中的 10% w/v N-H-S、在水中的 1% w/v N-H-G、在水中的 10% w/v L-h-S 和 10% w/v 组合 1:1:1 (N-H-S:N-H-G:L-h-S) 溶液处理 6 天的效果。这证明，与未处理的银屑病组织相比，用 N-H-S、L-h-S、N-H-G 和组合溶液处理减少了 GM-CSF 自银屑病组织的释放。GM-CSF 释放的这一减少表明 N- 羟基丝氨酸 (N-H-S)、L- 高丝氨酸 (L-h-S)、N- 羟基甘氨酸 (N-H-G) 和 1:1:1 组合对银屑病的治疗可以是有益的。

[0384] 测试溶液在水中的 10% w/v N-H-S、在水中的 1% w/v N-H-G、在水中的 10% w/v L-h-S 和 10% w/v 组合 1:1:1 (N-H-S:N-H-G:L-h-S) 溶液中没有一种在 6 天实验期后对组织生存力有强的负面影响。这一数据支持来自刺激评估的结论，即，所述溶液是非刺激的，即，在实验持续期间，组织生存力保持在 50% 之上（表 6）。

[0385] 表 6. 暴露于测试项目后的组织生存力 (n = 1)

[0386]

处理中的天数	作为未处理的对照的百分比的正常 RHE 组织生存力(%)			作为未处理的对照的百分比的银屑病组织 (%)		
	2	4	6	2	4	6
10% w/v N-H-S	83.4	91.5	86.9	94.0	75.3	96.0
10% w/v L-h-S	88.3	82.1	78.6	85.9	88.8	81.2
10% w/v N-H-G	97.9	91.5	93.3	87.1	77.6	89.6
10% w/v 组合	82.2	85.5	75.5	101.0	84.5	101.3
CTRL	100.0	100.0	100.0	100.0	100.0	100.0

[0387] 图 15 显示 GM-CSF 从银屑病组织的释放。每个点表示 6 天内 GM-CSF 的平均累积释放，测量在 2、4 和 6 天进行，误差条表示范围 n = 2-3。

[0388] 图 16 显示总的 GM-CSF 释放。每个条棒表示 6 天内 GM-CSF 自银屑病模型和对照 RHE 组织的总释放。误差条表示范围 n = 2-3。

[0389] 4 总结

[0390] 4.1 RHE 刺激评估（方法 1）

[0391] 使用 42 双测定流程研究 L- 高丝氨酸 (L-h-S) 和 α - 羟基甘氨酸 (α -H-G) 的皮肤刺激潜力，其中添加一个 24h 的增加的用药期。两个温育期 (42min 和 24h) 后的组织生存力分析表明组织生存力保持在 50% 之上，这表明 L- 高丝氨酸 (L-h-S) 和 α - 羟基甘氨酸 (α -H-G) 都是非刺激的。

[0392] 4.2 RHE 刺激评估（方法 2）

[0393] 为了进一步研究响应于 N- 羟基甘氨酸 (N-H-G) 和 N- 羟基丝氨酸 (N-H-S) 的皮肤刺激潜力, 使用 ET-50 皮肤刺激流程 (MatTek)。由于其适用于制剂和混合物, 因此选择该流程。在这一测定中, 除了测试项目 N- 羟基甘氨酸 (N-H-G) 和 N- 羟基丝氨酸 (N-H-S) 外, 选择两种商购氨基酸相关化合物 (L- 丝氨酸和甘氨酸) 用于比较。在本研究中, 发现 α - 羟基甘氨酸 (α -H-G) 是非刺激的 (即, 具有 ET-50<24h) 并且 10% w/v N- 羟基丝氨酸 (N-H-S) 被归类为非常轻度的刺激剂 (即, 具有 12-24h 的 ET-50)。两种商购氨基酸相关化合物 (L- 丝氨酸和甘氨酸) 都表现出是非刺激的。

[0394] 4.3 银屑病组织的体外评估

[0395] 在银屑病的 RHE 模型中研究 N- 羟基丝氨酸 (N-H-S)、L- 高丝氨酸 (L-h-S)、N- 羟基甘氨酸 (N-H-G) 对 GM-CSF 释放的影响。观察到 N- 羟基丝氨酸 (N-H-S)、L- 高丝氨酸 (L-h-S)、N- 羟基甘氨酸 (N-H-G) 和所述组合处理减少 GM-CSF 的产生, 这表明 N- 羟基丝氨酸 (N-H-S)、L- 高丝氨酸 (L-h-S)、N- 羟基甘氨酸 (N-H-G) 在银屑病的治疗中可以是有益的。因此, 提供本发明的氨基酸作为抗炎剂的用途, 特别是在所述炎症中起作用的因子是 GM-CSF 的情况下。对于所述用途尤其优选的氨基酸是 N- 羟基丝氨酸、L- 高丝氨酸、N- 羟基甘氨酸和包含它们中的一种或多种的组合。

[0396] 由于在 6 天用药期内 RHE 生存力保持高于未处理的对照的 50%, 因此, 在用 N- 羟基丝氨酸 (N-H-S)、L- 高丝氨酸 (L-h-S)、N- 羟基甘氨酸 (N-H-G) 用药期间银屑病的 RHE 模型的组织生存力与之前关于 L- 高丝氨酸 (L-h-S)、N- 羟基甘氨酸 (N-H-G) 二者的研究相一致, 这进一步证实它们是非刺激剂。该研究还表明 N- 羟基丝氨酸 (N-H-S) 是非刺激剂。

[0397] 因此, 提供本发明的氨基酸作为抗刺激剂的用途。对于所述用途特别优选的氨基酸是 N- 羟基丝氨酸、L- 高丝氨酸、N- 羟基甘氨酸和包含它们中的一种或多种的组合。

[0398] 参考文献

[0399] Clar EJ, Fourtanier A(1981). Pyrrolidone carboxylic acid and the skin(吡咯烷酮羧酸和皮肤) [法文]. Int J Cosmet Sci. (国际化妆品科学杂志) 3:101-13.

[0400] Harding CR, Watkinson A, Rawlings AV等(2000). Dry skin, moisturisation and corneodesmolysis(干性皮肤, 保湿和角膜水解). Int J Cosmet Sci. (国际化妆品科学杂志) 22:21-52.

[0401] Horii I, Nakayama Y, Obata M等(1989). Stratum corneum hydration and amino acid content in xerotic skin(干燥病皮肤中的角质层水化与氨基酸含量). Brit J Dermatol. (英国皮肤学杂志) 121:587-592.

[0402] Jokura Y, Ishikawa S, Tokuda H, Imokawa G(1995). Molecular analysis of elastic properties of the stratum corneum by solid state ¹³C-nuclear magnetic resonance spectroscopy(通过固态 ¹³C- 核磁共振光谱学对角质层的弹性性质进行分子分析). J Invest Dermatol(皮肤学研究杂志) 104:806-812.

[0403] Kezic S, Kemperman P M, Koster E S, De Jongh C M, Thio H B(2008). Loss-of-function mutations in the filaggrin gene lead to reduced level of natural moisturizing factor in the stratum corneum(聚丝蛋白基因中的丧失功能的突变导致角质层中减少水平的天然保湿因子). J Invest Dermatol(皮肤学研究杂志) 128:2117-2119.

- [0404] Kezic S, O'Regan GM, Yau N 等 (2011). Levels of filaggrin degradation products are influenced by both filaggrin genotype and atopic dermatitis severity(聚丝蛋白降解产物的水平受聚丝蛋白基因型和特应性皮炎严重性的影响). Allergy(过敏症)66:934-40.
- [0405] Nakagawa N, Sakai S, Matsumoto M, Yamada K(2004). Relationship between NMF(lactate and potassium)content and the physical properties of the stratum corneum in healthy subjects(健康受试者中NMF(乳酸盐和钾)含量与角质层物理性质之间的关系). J Invest Dermatol(皮肤学研究杂志)122:755-763.
- [0406] Palmer CN, Irvine atopic dermatitis, Terron-Kwiatkowski A 等 (2006). Common loss of-function variants of the epidermal barrier protein filaggrin are a major predisposing factor for atopic dermatitis(表皮屏障蛋白聚丝蛋白常见的功能丧失变体是特应性皮炎的主要易感因子). Nat Genet. (自然遗传学)38:441-446.
- [0407] Rawlings AV, Scott IR, Harding CR等(1994). Stratum corneum moisturisation at the molecular level(分子水平上的角质层保湿). J Invest Dermatol. (皮肤学研究杂志)103:731-741.
- [0408] Sasaki O, Kanai I, Yazawa Y(2007). Relationship between the chemical structure of humic substances and their hygroscopic properties(腐殖质的化学结构与其吸湿性性质之间的关系). Science(科学)1:17-22.
- [0409] Scott IR, Harding CR, Barrett JG(1982). Histidine-rich protein of the keratohyalin granules. Source of the free amino acids, urocanic acid, and pyrrolidone carboxylic acid in the stratum corneum(角质透明蛋白粒的富含组氨酸的蛋白。角质层中游离氨基酸尿刊酸和吡咯烷酮羧酸的来源). Biochim Biophys Acta. 719:110-117.
- [0410] Weber, M. T. 等 (2012)., J Clin Aesthet Dermatol. (临床美容皮肤学杂志)5:29 - 39.
- [0411] White-Chu EF, Reddy M. Dry skin in the elderly:complexities of a common problem(老年人的干性皮肤:常见问题的复杂性). Clin Dermatol. (临床皮肤学)2011 ; 29(1):37-42.

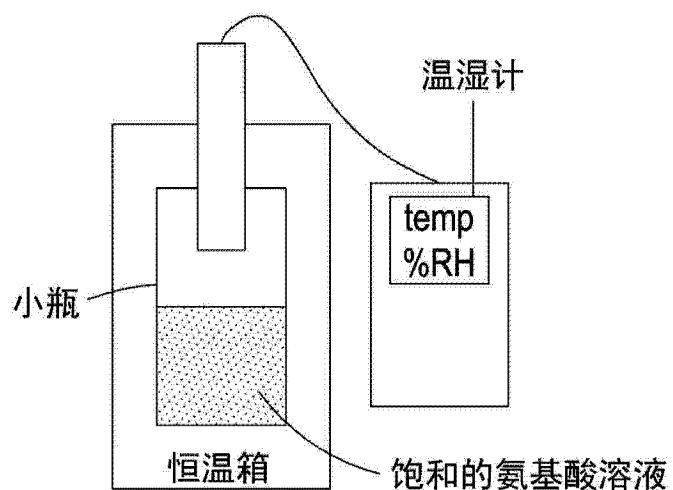


图 1

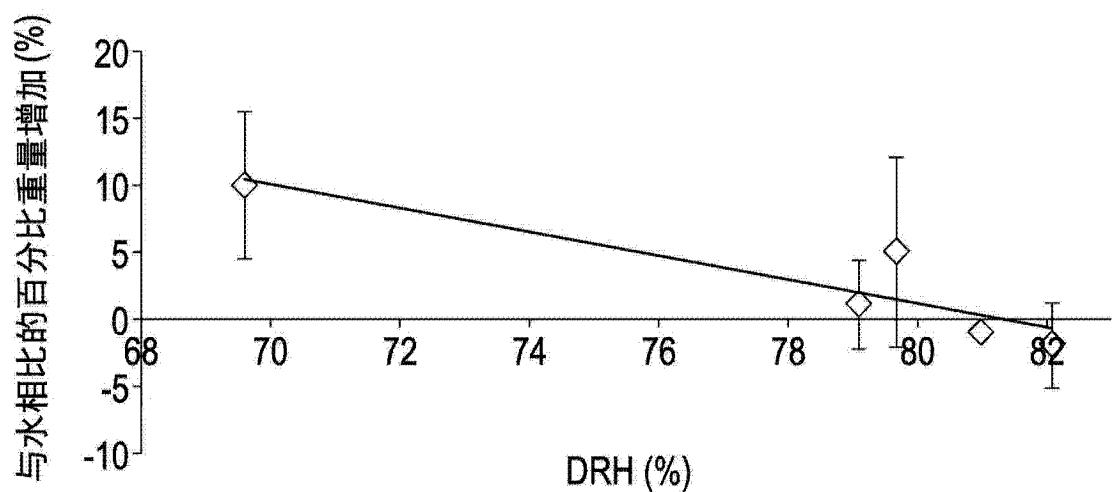


图 2

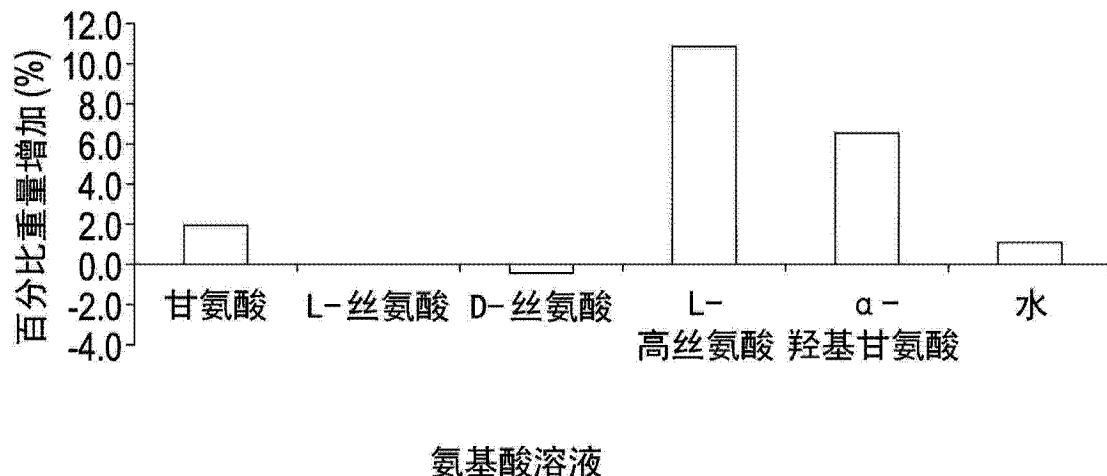


图 3

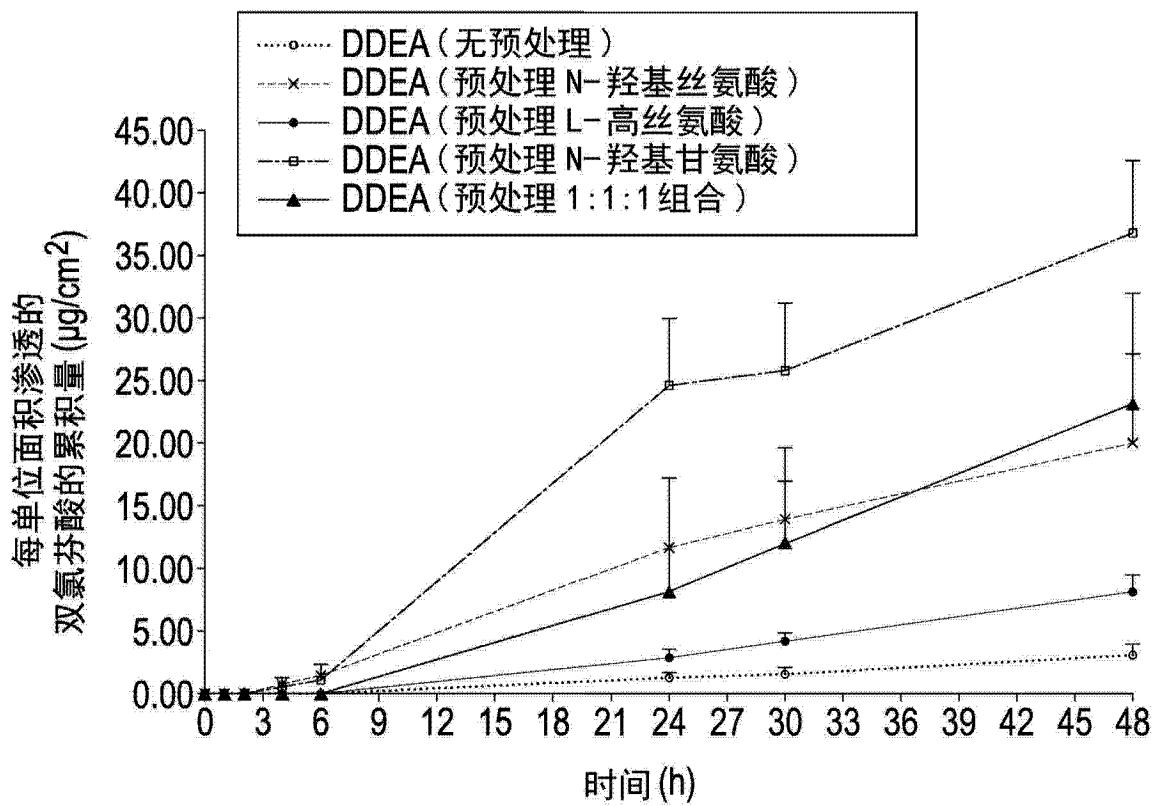


图 4

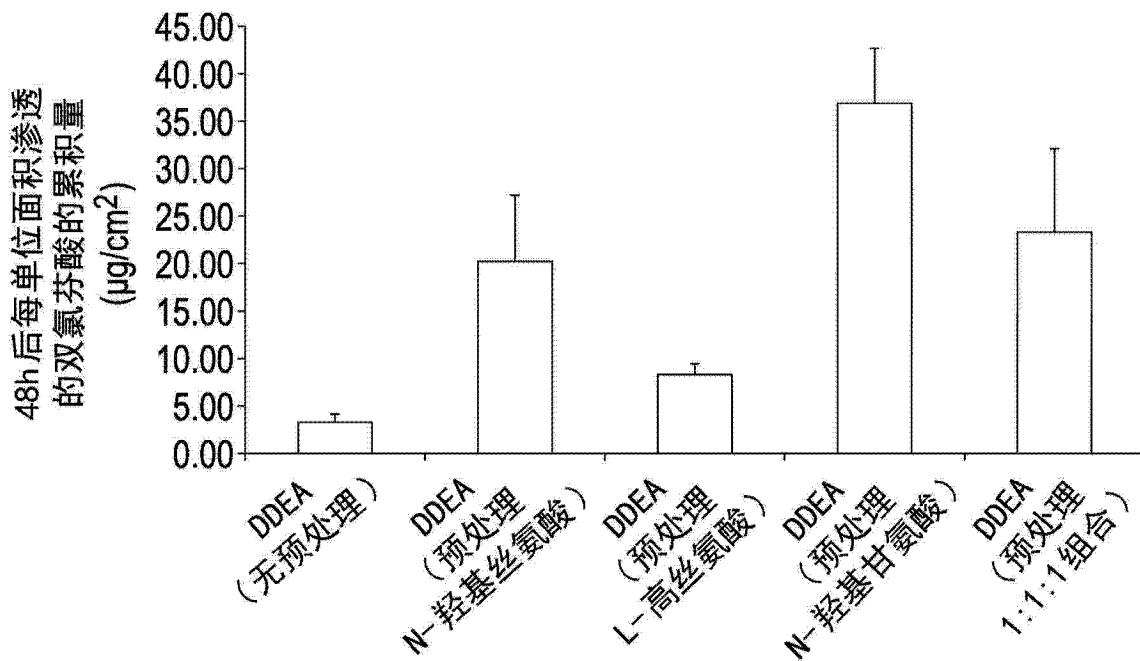


图 5

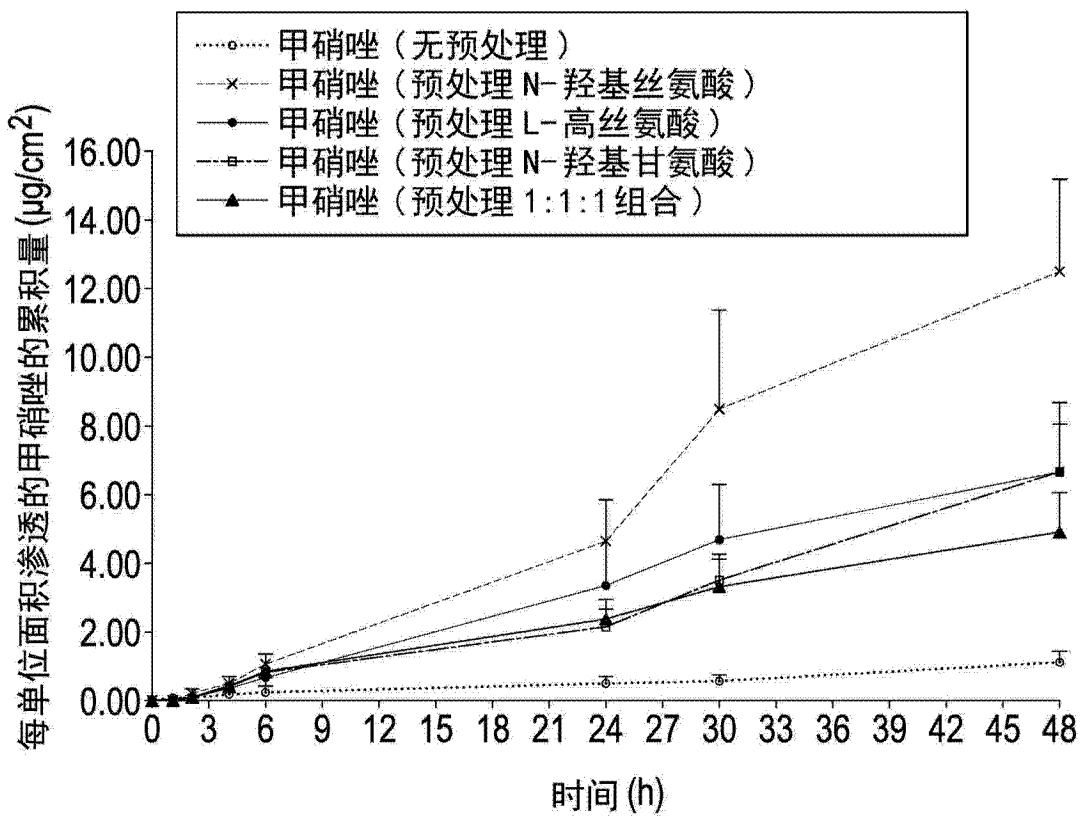


图 6

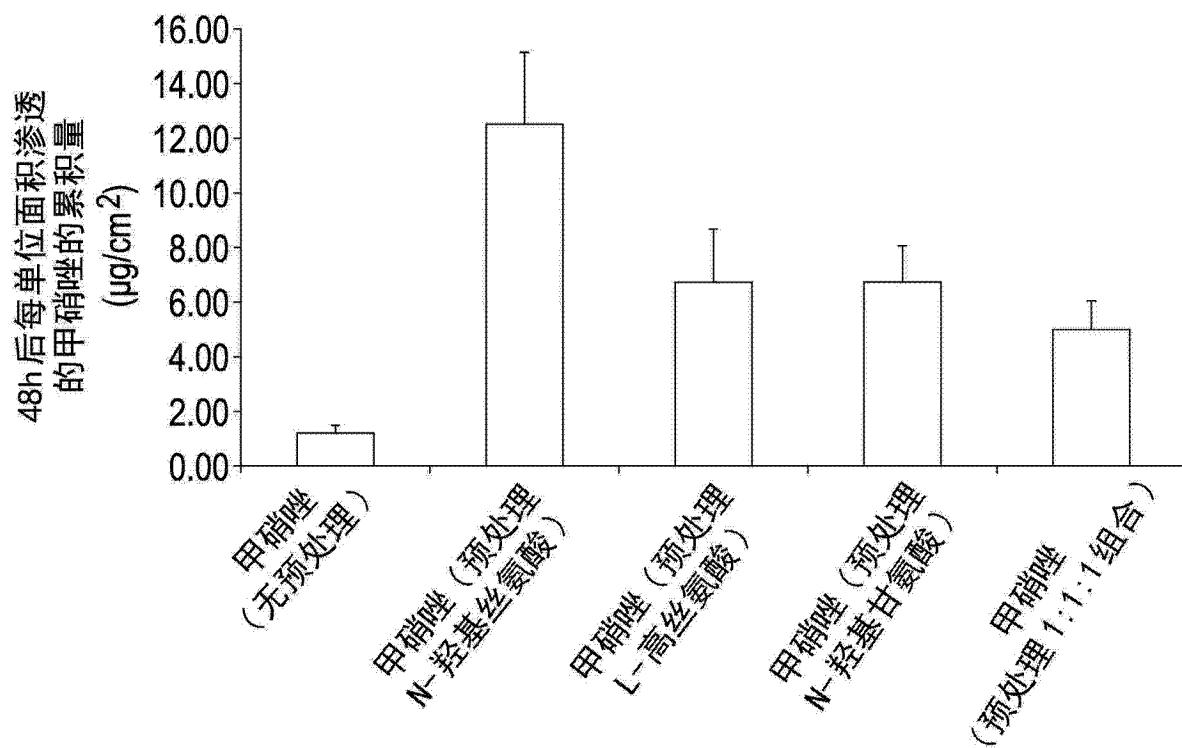


图 7

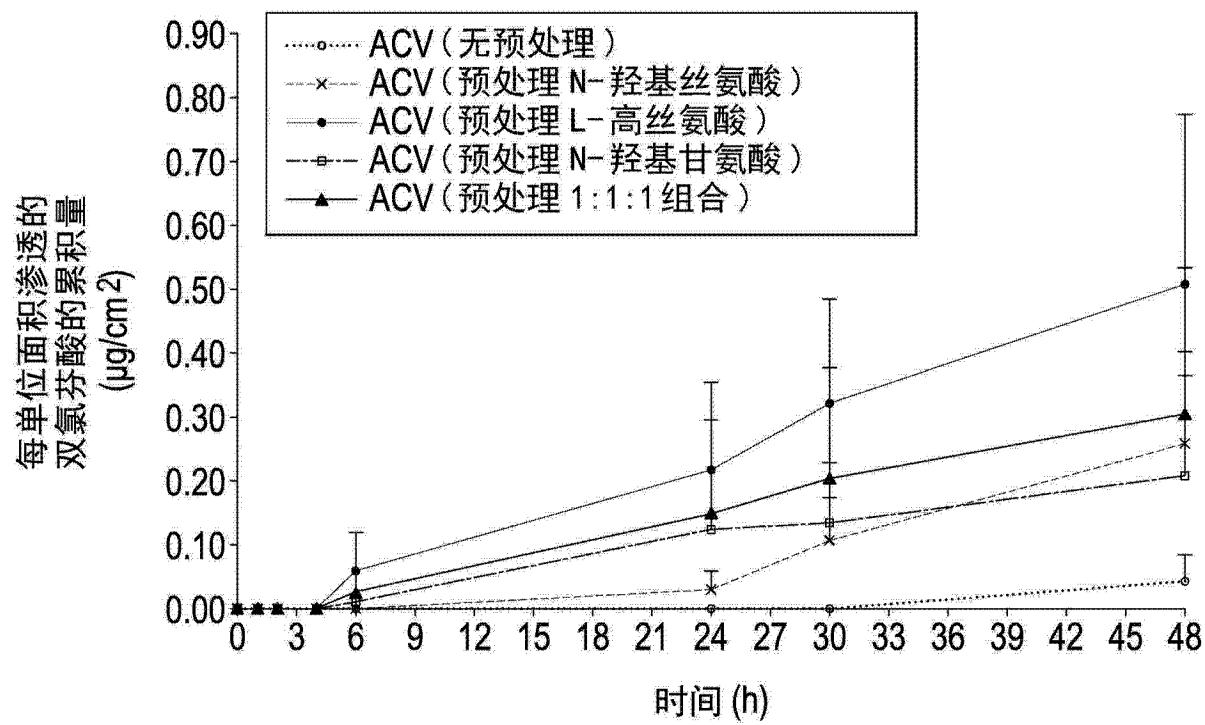


图 8

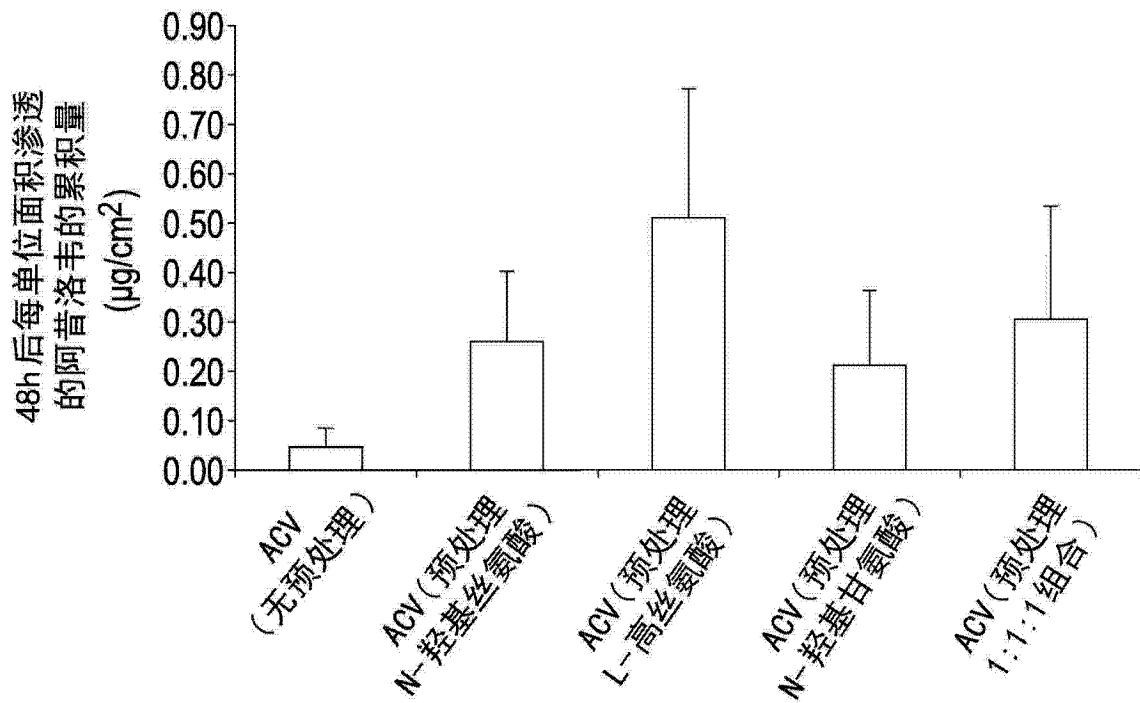


图 9

在 32°C 75% RH 24 小时后
(在处理 24h 后) 的百分比重量增加

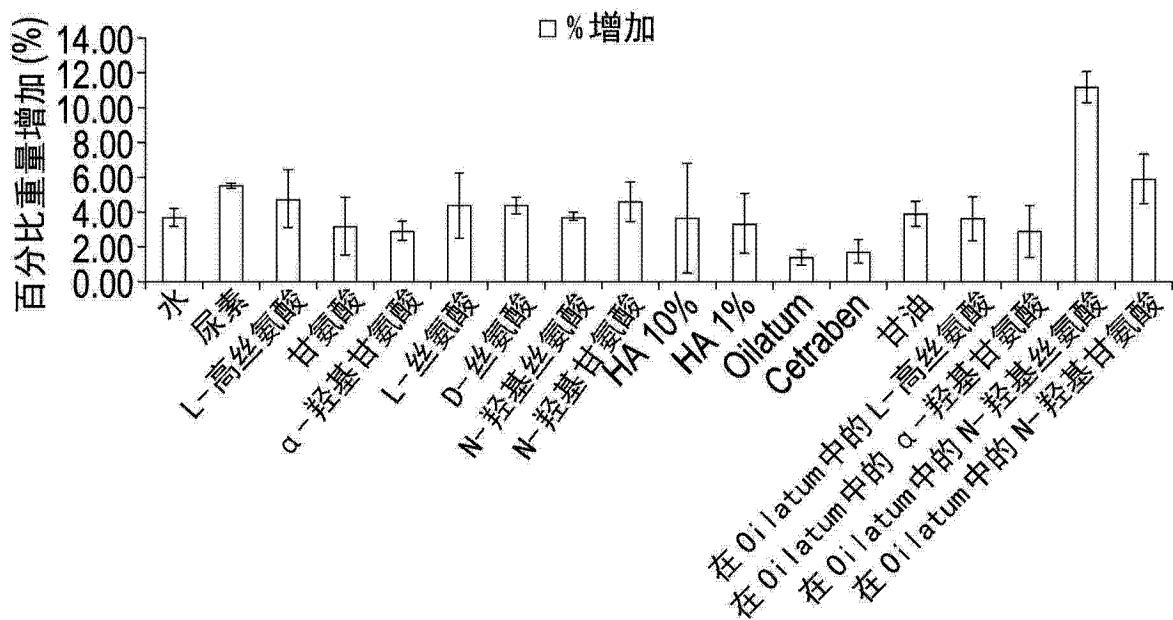


图 10

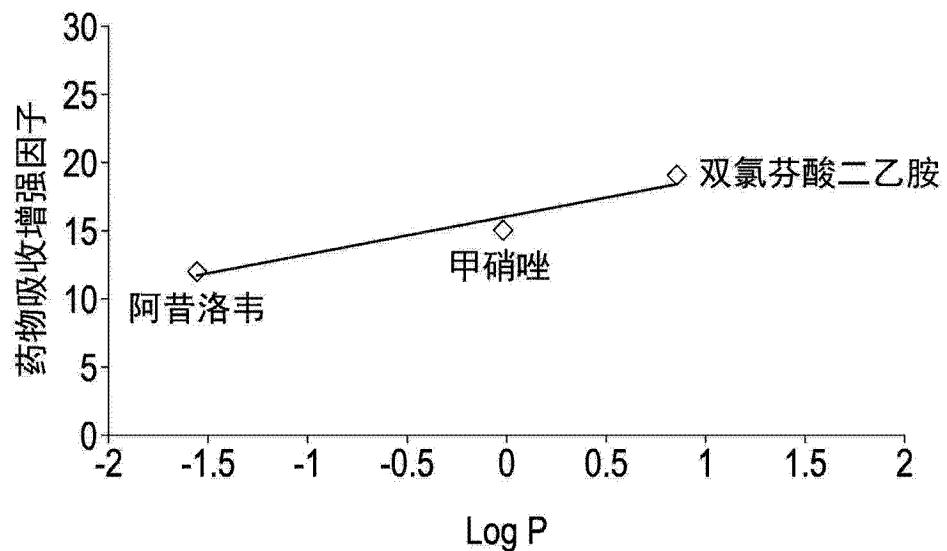


图 11

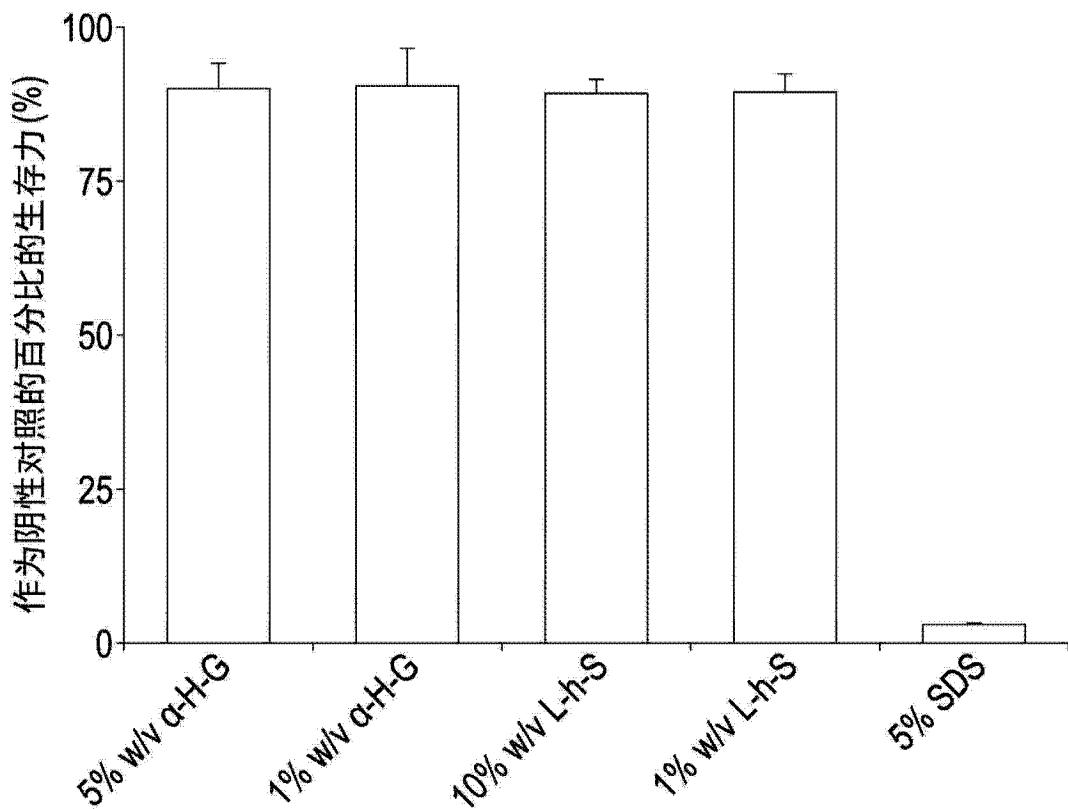


图 12

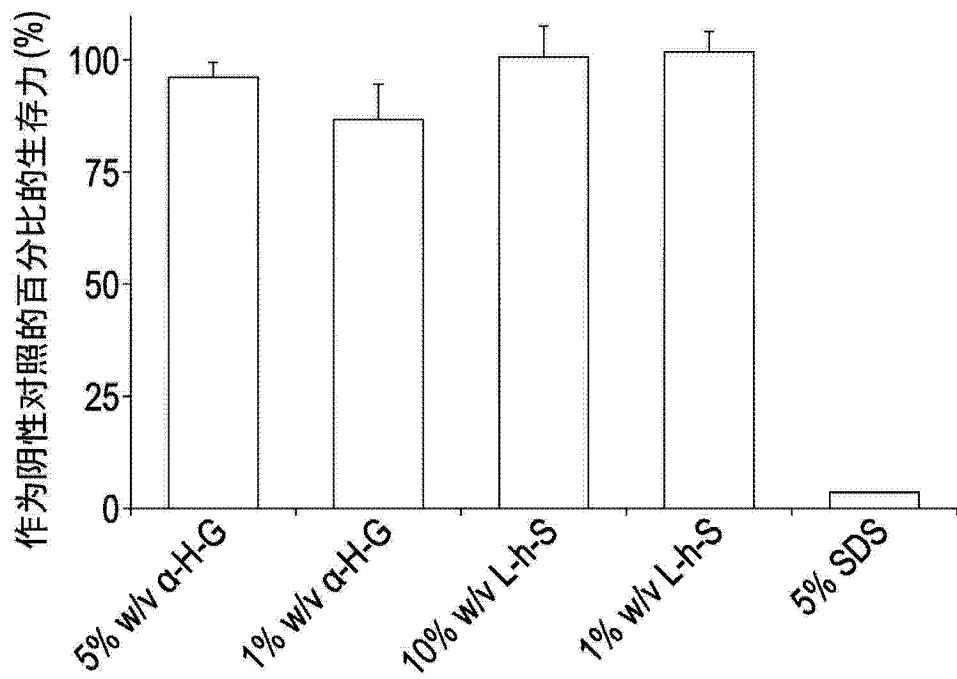


图 13

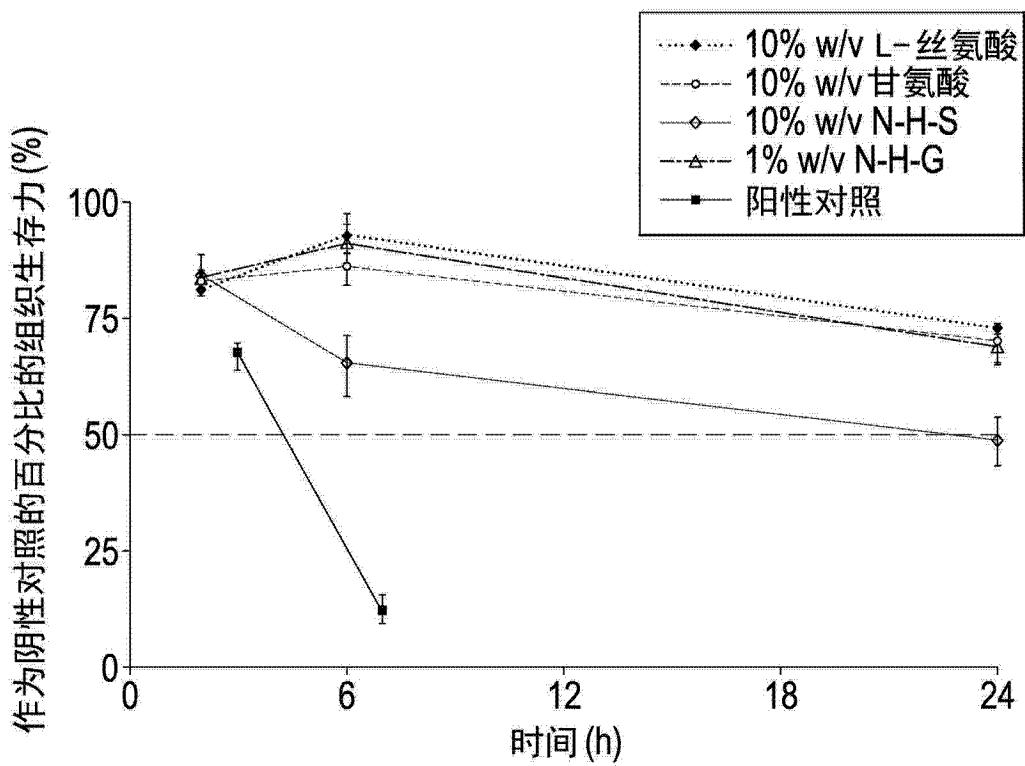


图 14

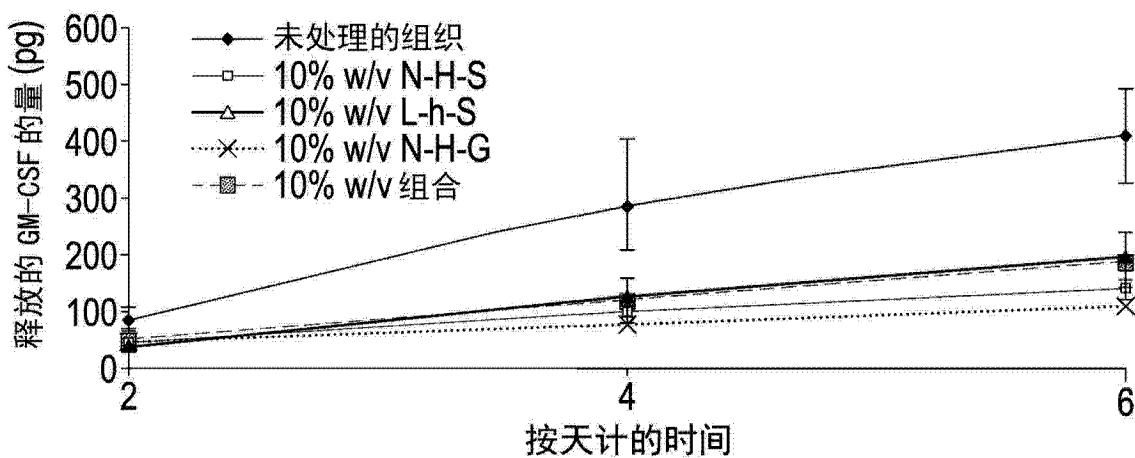


图 15

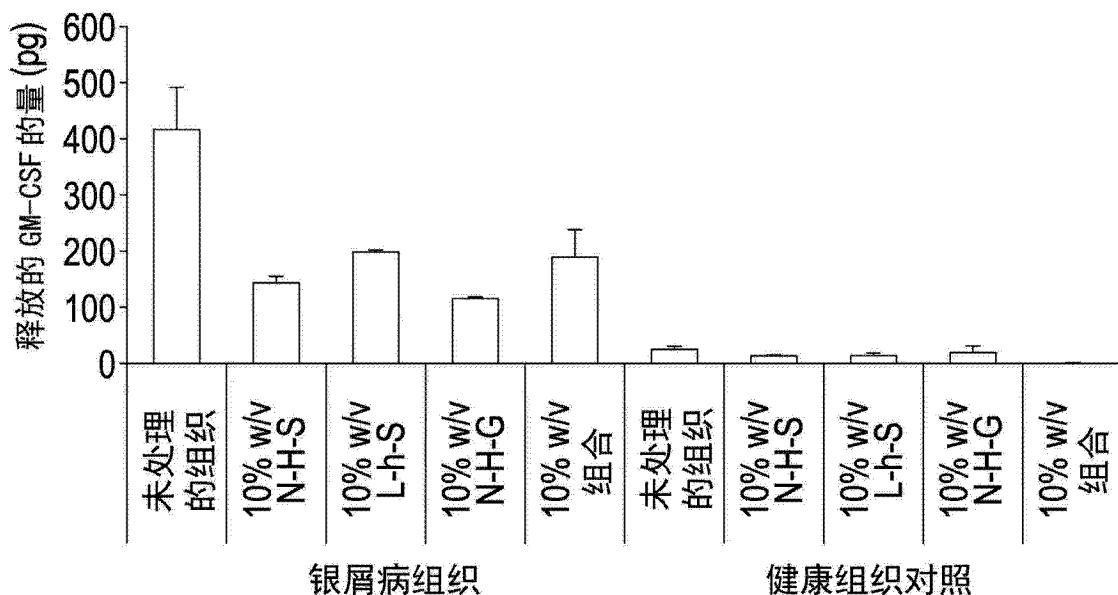


图 16