



(12) 发明专利申请

(10) 申请公布号 CN 102470119 A

(43) 申请公布日 2012.05.23

(21) 申请号 201080029101.1 *A61K 45/06* (2006.01)
(22) 申请日 2010.07.01 *A61P 17/00* (2006.01)
(30) 优先权数据 *A61K 8/44* (2006.01)
0954497 2009.07.01 FR
(85) PCT申请进入国家阶段日
2011.12.28
(86) PCT申请的申请数据
PCT/EP2010/059401 2010.07.01
(87) PCT申请的公布数据
W02011/000930 FR 2011.01.06
(71) 申请人 皮埃尔·法布尔皮肤化妆品公司
地址 法国布洛涅-比扬古
(72) 发明人 C·德舍莱特 N·卡斯泰里齐
L·邦宗
(74) 专利代理机构 北京戈程知识产权代理有限
公司 11314
代理人 程伟
(51) Int. Cl.
A61K 31/198 (2006.01)

权利要求书 1 页 说明书 10 页

(54) 发明名称
L-丝氨酸作为药物用于预防和/或治疗皮肤
炎症应答的用途

(57) 摘要
本发明涉及 L-丝氨酸作为药物用于预防和/
或治疗由 PAR2 受体的过度表达和/或过度活化引
起的皮肤炎症应答的用途。

1. L- 丝氨酸用作药物用于预防和 / 或治疗由 PAR2 受体的过度表达和 / 或过度活化引起的皮肤炎症应答的用途。

2. 包含 L- 丝氨酸的药物组合物用作药物用于预防和 / 或治疗由 PAR2 受体的过度表达和 / 或过度活化引起的皮肤炎症应答的用途。

3. 根据权利要求 2 所述的组合物, 其进一步包含 Avène 温泉水。

4. 根据权利要求 2 或权利要求 3 所述的组合物, 其进一步包含甘油。

5. 根据权利要求 2 所述的组合物, 其中 L- 丝氨酸是所述组合物的唯一活性剂。

6. 根据权利要求 2 至 5 任一项所述的组合物, 其中所述由 PAR2 受体的过度表达和 / 或过度活化引起的皮肤炎症应答是选自过敏性皮炎、扁平苔藓、牛皮癣、瘙痒症、脂溢性皮炎、酒糟鼻、红铜斑疹和皮肤超敏的皮肤炎症病理学的原因。

7. 根据权利要求 2 至 6 任一项所述的组合物, 其中所述 L- 丝氨酸的浓度相对于所述组合物总重量为按重量计算介于 0.01% 至 10% 之间, 优选相对于所述组合物总重量为按重量计算介于 0.5% 和 3% 之间。

8. 一种包含 L- 丝氨酸、Avène 温泉水、甘油和化妆品上可接受的载体的皮肤化妆用组合物。

L-丝氨酸作为药物用于预防和 / 或治疗皮肤炎症应答的用途

技术领域

[0001] 本发明涉及 L-丝氨酸作为药物用于预防和 / 或治疗由 PAR2 受体的过度表达 / 过度活化引起的皮肤炎症应答的用途,特别地,还涉及包含 L-丝氨酸、Avène 温泉水、甘油和化妆品上可接受的载体的皮肤化妆用组合物。

背景技术

[0002] 蛋白酶活化受体-2(PAR2)与涉及炎症应答的多种疾病的病理生理学相关(Rattenholl A 等人;Drug News Perspect;2008 Sep;21(7):369-81)。

[0003] PAR2 属于与 G 蛋白偶联的 7 次跨膜受体的超家族,但是具有独特的活化途径。实际上,PAR2 通过丝氨酸蛋白酶(如胰蛋白酶、类胰蛋白酶)以及因子 Xa 和 VIIa 激活。通过这些蛋白酶的受体的细胞外部分的裂解暴露出新的氨基末端结构域(SLIGKV),所述结构域作为“附着”于受体的配体:其于细胞外环 2 处自身结合并经历自身活化。

[0004] PAR2 由皮肤的各种细胞类型表达:角质细胞、汗腺的肌上皮细胞、毛囊、真皮层树突状细胞以及固有层和真皮层的内皮细胞(Steinhoff 等人,Exp Dermatol;1999Aug;8(4):282-94)。

[0005] 生黑色素细胞不表达该受体,尽管 PAR2 在通过促进黑色素由生黑色素细胞向角质细胞转移的色素沉着中起重要作用(Seiberg 等人,Exp Cell Res.;2000Jan 10;254(1):25-32)。由表皮层产生的丝氨酸蛋白酶具有趋化性作用,这可引起皮肤中的白细胞募集。它们还参与体内平衡、有丝分裂发生和表皮分化的控制并调节皮肤的屏障功能。此外,丝氨酸蛋白酶促成与炎症、宿主防御、致癌作用、纤维化和神经刺激相关的皮肤病的病理生理学。

[0006] 丝氨酸蛋白酶的生理学和病理生理学皮肤性质在某种程度上与 PARs 有关。实际上,PAR2 在皮肤炎症疾病(如过敏性皮炎、扁平苔藓和牛皮癣)中的表皮、真皮和血管中被过度表达(Steinhoff 等人,Exp Dermatol;1999Aug;8(4):282-94)。

[0007] PAR2 在患有过敏性皮炎的患者的瘙痒症发病过程中也起作用(Steinhoff 等人,J Neurosci. 2003Jul 16;23(15):6176-80)。

[0008] 通过胰蛋白酶型蛋白酶的 PAR2 的活化诱导角质细胞(HaCaT)的 IL-8 的产生(Hou 等人,Immunology,1998,94:356-362)。在具有敏感性皮肤的受试者当中,显示出 PAR2 被过度活化。敏感性神经纤维中 PAR2 过度活化的结果是皮肤的不适感。此外,角质细胞中 PAR2 过度活化的结果是炎症和迟缓性屏障功能(la fonction barrière ralentie)(迟缓性片状体的分泌,sécrétion des corps lamellaires ralenties)的恢复(Hachem JP 等人,J Invest Dermatol.;2006Sep;126(9):2074-86)。

[0009] 因此,确实需要开发降低 PAR2 表达和 / 或活性的活性剂。

发明内容

[0010] 令人惊讶的是,本申请人已证明 L- 丝氨酸、L- 天冬酰胺和 / 或 L- 缬氨酸每个都能够抑制 PAR2 的表达 / 活化。

[0011] 因此,本发明涉及 L- 丝氨酸和 / 或 L- 天冬酰胺和 / 或 L- 缬氨酸作为药物用于预防和 / 或治疗由 PAR2 受体的过度表达和 / 或过度活化引起的皮肤炎症应答的用途。

[0012] 有利地,本发明涉及 L- 丝氨酸作为药物用于预防和 / 或治疗由 PAR2 受体的过度表达和 / 或过度活化引起的皮肤炎症应答的用途。

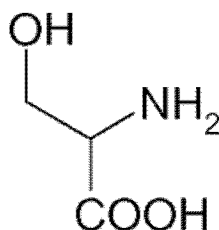
[0013] 有利地,由 PAR2 的过度表达和 / 或过度活化引起的皮肤炎症应答是选自过敏性皮炎、扁平苔藓、牛皮癣、瘙痒症、脂溢性皮炎、酒糟鼻、红铜斑疹 (la couperose) 和皮肤超敏的皮肤炎症病理学的原因。

[0014] 因此,有利地,本发明涉及 L- 丝氨酸和 / 或 L- 天冬酰胺和 / 或 L- 缬氨酸作为药物用于预防和 / 或治疗选自过敏性皮炎、扁平苔藓、牛皮癣、瘙痒症、脂溢性皮炎、酒糟鼻、红铜斑疹 (la couperose) 和皮肤超敏的皮肤炎症病理学。

[0015] L- 丝氨酸是 C3 α - 氨基酸,丙氨酸的羟基化同系物。

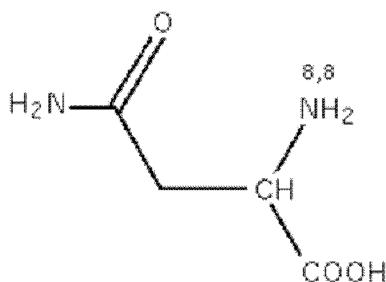
[0016] L- 丝氨酸是羟基化脂肪族氨基酸,其系统命名为 2- 氨基 -3- 羟基丙酸并具有以下的结构式:

[0017]



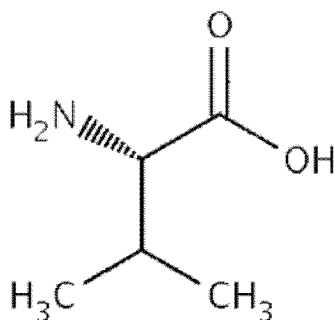
[0018] L- 天冬酰胺 (或天门冬 - 氨基 - 琥珀酸) 是不带电荷的并且亲水的极性 α - 氨基酸,其衍生自天冬氨酸并具有以下的结构式:

[0019]



[0020] L- 缬氨酸是非极性的并且疏水的 α - 氨基酸,其具有以下的结构式:

[0021]



[0022] “PAR2 受体的过度表达”是指所述受体以多于正常生理条件下的数量表达。

[0023] “PAR2 受体的过度活化”是指所述受体与正常生理条件下相比显示出更高的活性。

[0024] 因此，L- 丝氨酸和 / 或 L- 天冬酰胺和 / 或 L- 缬氨酸被用于抑制 PAR2 受体。

[0025] “抑制 PAR2 受体”是指抑制和 / 或降低 PAR2 受体的表达，也是抑制和 / 或降低 PAR2 受体的活性。

[0026] 在本发明的上下文中，术语“预防 (prévenir)”和“预防 (prévention)”是指避免疾病、失调或是一种或多种体征和 / 或症状的出现。

[0027] 有利地，L- 丝氨酸和 / 或 L- 天冬酰胺和 / 或 L- 缬氨酸与 Avène 温泉水联合使用。

[0028] 在一个优选方式中，L- 丝氨酸与 Avène 温泉水联合使用。

[0029] 所述 Avène 温泉水的组合物如下所示：

组合物 mg/l	Avène
氯化物	5.4
碳酸氢盐 (Bicarbonates)	226.7
碳酸氢盐 (Hydrogénocarbonates)	
硫酸盐	13.1
硅酸盐	
二氧化硅	14
硝酸盐	
钙	42.7
镁	21.2
钠	4.8
钾	0.8
铁	0.005
硒	0.005
硅	
锌	0.02
铜	0.005
干燥残留物	207
矿物成分	低
pH	7.5
等渗性	低渗

[0031] 有利地，L- 丝氨酸和 / 或 L- 天冬酰胺和 / 或 L- 缬氨酸与甘油联合使用。

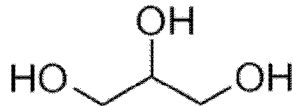
[0032] 在一个优选方式中，L- 丝氨酸与甘油联合使用。

[0033] 更有利地，L- 丝氨酸和 / 或 L- 天冬酰胺和 / 或 L- 缬氨酸与 Avène 温泉水以及甘油联合使用。

[0034] 在一个优选方式中，L- 丝氨酸与 Avène 温泉水和甘油联合使用。

[0035] 甘油或丙三醇是指具有如下结构式的 1,2,3- 丙三醇：

[0036]



[0037] 优选地, L-丝氨酸和 / 或 L-天冬酰胺和 / 或 L-缬氨酸以 30 μ M 以上的浓度使用, 优选以 50 μ M 以上的浓度使用, 更优选以 80 μ M 以上的浓度使用, 在一个特别优选的方式中为 100 μ M 以上。

[0038] 根据另一方面, 本发明涉及包含 L-丝氨酸和 / 或 L-天冬酰胺和 / 或 L-缬氨酸的药物组合物用作药物用于预防和 / 或治疗由 PAR2 受体的过度表达和 / 或过度活化引起的皮肤炎症应答。

[0039] 在一个优选方式中, 本发明涉及包含 L-丝氨酸的药物组合物用作药物用于预防和 / 或治疗由 PAR2 受体的过度表达和 / 或过度活化引起的皮肤炎症应答。

[0040] 优选地, 所述组合物是皮肤病学组合物。

[0041] 在一个特别优选的方式中, 所述组合物用于局部施用。

[0042] “局部施用”是指直接施用于皮肤。

[0043] 有利地, 所述药物组合物进一步包含 Avène 温泉水和 / 或甘油, 优选排除显示出炎症作用的任何其它活性剂, 并在一个特别优选的方式中排出任何其它活性剂。

[0044] 在本发明的另一个具体实施方式中, L-丝氨酸和 / 或 L-天冬酰胺和 / 或 L-缬氨酸是显示出抗炎作用的所述组合物的唯一活性剂, 并在一个特别优选的方式中为唯一的活性剂。

[0045] 在一个优选方式中, L-丝氨酸是显示出抗炎作用的所述组合物的唯一活性剂, 并在一个特别优选的方式中为唯一的活性剂。

[0046] 在根据本发明的一个特别的具体实施方式中, 根据本发明的组合物可进一步包含特别用于皮肤感染的预防和 / 或治疗的活性剂。

[0047] 优选地, 根据本发明的组合物被用作药物用于预防和 / 或治疗敏感性皮肤。

[0048] 通常, 敏感性皮肤被定义为皮肤的特别反应性。

[0049] 该皮肤反应性典型地由作为使受试者与可能具有不同起源的引发因素接触的应答的不适性体征的显现来表示。在所述敏感性皮肤的表面应用化妆品, 食用某些食物、暴露于骤变的温度、空气污染和 / 或紫外线或红外线辐射将会成为一个问题。还存在相关因素, 如年龄和皮肤类型。例如, 与那些具有正常皮肤者相比, 敏感性皮肤更常见于那些具有干性或油性皮肤者。在本发明的上下文中, 敏感性皮肤包括过敏性皮肤 (les peaux irritables) 和排他性皮肤 (les peaux intolérantes)。

[0050] 排他性皮肤是通过灼热、紧绷或刺痛感和 / 或发红对各种因素 (如化妆品或皮肤病用产品或肥皂的使用) 起反应的皮肤。总之, 这些体征与红斑以及高度脂溢性或痤疮性, 或甚至是酒糟鼻样皮肤有关, 无论是否有干斑。

[0051] 过敏性皮肤是通过瘙痒, 换言之, 是通过发痒或通过刺痛对各种因素 (如环境、情绪、食物、风、摩擦、剃须、具有高钙浓度的硬水、温度变化、湿度……) 起反应的皮肤。

[0052] 有利地, 由 PAR2 受体的过度表达和 / 或过度活化引起的皮肤炎症应答是皮肤炎症病理学的原因, 其中所述病理学优选自过敏性皮炎、扁平苔藓、牛皮癣、瘙痒症、脂溢性皮炎、酒糟鼻、红铜斑疹和皮肤超敏。

[0053] 因此,有利地,本发明涉及包含 L- 丝氨酸和 / 或 L- 天冬酰胺和 / 或 L- 缬氨酸的组合物用作药物用于预防和 / 或治疗选自过敏性皮炎、扁平苔藓、牛皮癣、瘙痒症、脂溢性皮炎、酒糟鼻、红铜斑疹和皮肤超敏的病理学。

[0054] 过敏性皮炎被描述为与角质层的脂类,特别是神经酰胺的代谢缺陷相关。该病理学的表现形式为蔓延至身体大部分的或多或少的慢性干燥症,其与某些部位炎症和痒疹的发作有关。

[0055] 牛皮癣同样是一种慢性发展的皮肤炎症性疾病,其感染了 2% 的人口。其特征在于与炎症应答相关的表皮细胞的异常增长。

[0056] 扁平苔藓(随机出现)是可能与压力有关的自身免疫性疾病。它突然发作,类似于过敏反应:皮肤覆盖有湿疹状-鳞状丘疹,引起发痒。扁平苔藓可能产生自或局限于小面积皮肤。肌肉性或风湿性疼痛可能会伴随着扁平苔藓的发作。该疾病可持续 12 至 15 个月。

[0057] 脂溢性皮炎是面部和头皮的皮肤病,其特征是具有模糊轮廓的红色斑块以及稀薄的不粘连的鳞片。

[0058] 酒糟鼻是一种最初良性的、不可治愈的皮肤病,其表现为鼻子和面颊部位的慢性红肿并且有时会出现于下巴和额头部位。这些症状还伴有刺痛感,特别是在眼睛周围。

[0059] 红铜斑疹是面部凸出区域(鼻子、面颊、额头、下巴...)的永久性红肿的状态,有时伴有肉眼可见的细小血管。

[0060] 优选地,根据本发明的组合物将包含相对于所述组合物总重量的以重量计介于 0.01% 至 10% 之间的 L- 丝氨酸和 / 或 L- 天冬酰胺和 / 或 L- 缬氨酸,优选相对于所述组合物总重量的以重量计介于 0.5% 至 3% 之间的 L- 丝氨酸和 / 或 L- 天冬酰胺和 / 或 L- 缬氨酸。

[0061] 在一个优选方式中,根据本发明的组合物将包含相对于所述组合物总重量的以重量计介于 0.01% 至 10% 之间的 L- 丝氨酸,优选相对于所述组合物总重量的以重量计介于 0.5% 至 3% 之间的 L- 丝氨酸。

[0062] 根据本发明的组合物可制备成通过局部、口服、皮下、可注射的、直肠的或生殖器途经施用的制剂。

[0063] 优选地,根据本发明的组合物可制备成通过局部途经施用的制剂。

[0064] 根据本发明的组合物可以根据所需施用模式通常使用的所有医用形式提供。

[0065] 载体可具有根据所需要的组合物类型的各种性质。

[0066] 更特别地,关于旨在通过局部途经施用的组合物,所述载体可以是含水的、醇水的或油性的溶液、溶液状分散剂或是洗液状或血清状分散剂、液体乳剂或乳状半流体乳剂、霜状悬浮剂或乳剂、含水的或无水的凝胶剂、微乳剂、微囊、微粒或者离子型 and / 或非离子型泡状分散剂。这些组合物根据标准方法制备。

[0067] 这些组合物尤其能够组成用于面部、手部、足部、大解剖学褶皱或躯干的清洁、保护、治疗或护理的霜剂(例如日霜、晚霜、卸妆霜、粉底霜、防晒霜);化妆产品如粉底液、卸妆乳、保护或护理身体乳、晒后修复乳;皮肤护理用洗剂、凝胶剂或泡沫剂如清洁或杀菌洗剂、防晒洗剂、人工美黑洗剂;沐浴用组合物;包含杀菌剂的除臭组合物;须后凝胶剂或洗剂;脱毛霜或防虫叮组合物。

[0068] 根据本发明的组合物还可包括组成肥皂或清洁条的固体制剂。

[0069] 其还可以溶液剂、霜剂、凝胶剂、乳剂、泡沫剂的形式或以包含加压推进剂的喷雾剂组合物的形式用于毛发。

[0070] 当本发明的组合物是乳剂时,脂肪相相对于所述组合物总重量的比例按重量计为从 5% 至 80%, 优选地, 按重量计为从 5% 至 50%。在乳剂形式的组合物中使用的油类、乳化剂和共乳化剂选自那些在化妆品和 / 或皮肤病学领域中常用者。

[0071] 所述乳化剂和共乳化剂可以相对于所述组合物总重量, 以重量计 0.3% 至 30% 的比例, 优选以重量计 0.5% 至 15% 的比例存在于所述组合物中。

[0072] 当本发明的组合物是油性凝胶时, 脂肪相可占所述组合物总重量的 90% 以上。

[0073] 本发明的化妆品和 / 或皮肤病学组合物还可包括化妆品、药理学和 / 或皮肤病学领域中的常用佐剂, 如亲水性或亲脂性凝胶化剂、亲水性或亲脂性活性剂、防腐剂、抗氧化剂、溶剂、芳香剂、担体、过滤剂、杀菌剂、矫味剂和着色剂。这些不同佐剂的量为所考虑的领域中的常用量, 例如在所述组合物总重量的 0.01% 至 35%。

[0074] 根据其性质, 这些佐剂可引入到脂肪相和 / 或水相中。

[0075] 作为本发明可使用的脂肪, 可提及的是, 矿物油例如氢化聚异丁烯和凡士林油, 植物油例如牛油果液体组分、向日葵和杏仁的油, 动物油例如全氢角鲨烯, 合成油尤其是普赛林油 (l'huile de Purcellin)、豆蔻酸异丙酯和棕榈酸乙基己酯, 以及氟化油例如全氟聚醚。还可使用脂肪醇、脂肪酸例如硬脂酸、以及例如蜡尤其是石蜡、棕榈蜡和蜂蜡。还可使用硅化合物如硅油, 例如环甲硅油和二甲硅油, 蜡, 树脂和硅酮橡胶。

[0076] 作为本发明可使用的乳化剂, 可提及的是, 例如, 硬脂酸甘油酯、聚山梨醇酯 60、由 HENKEL 公司以 Sinnowax AO[®] 为名出售的含有 33 摩尔环氧乙烷的十六烷基硬脂醇 / 氧乙烷化十六烷基硬脂醇的混合物、由 GATTEFOSSE 公司以 Tefose[®] 为名出售的 PEG-6/PEG-32/硬脂酸甘醇酯的混合物、PPG-3 豆蔻基乙基醚、硅酮乳化剂如十六烷基二甲硅酮共聚醇以及山梨聚糖单 - 或三 - 硬脂酸酯、PEG-40 硬脂酸酯、单硬脂酸氧乙烷化山梨糖醇酯 (200E)。

[0077] 作为本发明可使用的溶剂, 可提及的是, 低级醇, 尤其是乙醇和异丙醇, 以及丙二醇。

[0078] 作为亲水性凝胶化剂, 可提及的是, 羧基聚合物如卡波姆, 丙烯酸共聚物如丙烯酸酯 / 烷基丙烯酸酯共聚物, 聚丙烯酰胺, 特别是由 SEPPIC 公司以 Sepigel 305[®] 为名出售的聚丙烯酰胺、C13-14- 异石蜡烃和月桂醇聚醚 -7 的混合物, 多糖例如纤维素衍生物如羟烷基纤维素, 特别是羟丙基纤维素和羟乙基纤维素, 天然胶如瓜尔胶、角豆胶和黄原胶和黏土。

[0079] 作为亲脂性凝胶化剂, 可提及的是, 改性黏土如膨润土, 脂肪酸金属盐如硬脂酸铝和疏水硅胶, 或者乙基纤维素和聚乙烯。

[0080] 可使用的亲水性活化剂包括蛋白质或蛋白质水解物, 氨基酸, 多元醇尤其是 C2-C10 的多元醇如甘油、山梨醇、丁二醇和聚乙二醇, 脲, 尿囊素, 糖和糖的衍生物, 水溶性维生素, 淀粉, 以及细菌或植物的提取物如芦荟提取物。

[0081] 可使用的亲脂性活性剂包括视黄醇 (维生素 A) 及其衍生物, 生育酚 (维生素 E) 及其衍生物, 神经酰胺, 精油和不皂化物 (生育三烯酚、芝麻酯素、 γ -谷维素、植物甾醇、角鲨烯、蜡类、萜类)。

[0082] 根据另一个方面, 本发明涉及 L- 丝氨酸和 / 或 L- 天冬酰胺和 / 或 L- 缬氨酸抑制

PAR2 受体的化妆品用途。

[0083] 在一个优选方式中,本发明涉及 L- 丝氨酸抑制 PAR2 受体的化妆品用途。

[0084] 根据另一个方面,本发明涉及用于预防和 / 或治疗由 PAR2 受体的过度表达和 / 或过度活化引起的皮肤炎症应答的化妆品和 / 或药物治疗方法,其包含至少一个施用本发明的药物或化妆品组合物的步骤。

[0085] 所述施用步骤可以为,例如,在皮肤或干燥的毛发上施用霜剂、凝胶剂、血清制品、洗剂、卸妆乳或晒后修复组合物,在湿的毛发上使用毛发洗剂、香波,或在牙龈上施用牙膏。

[0086] 优选地,所述方法是一种皮肤病学方法,其包含至少一个如上所述的在皮肤上施用皮肤病学组合物的步骤。

[0087] 根据本发明的化妆品和 / 或药物方法可通过局部施用根据本发明的组合物(例如每天施用)来实施。

[0088] 根据本发明的方法可包含单一的施用步骤。

[0089] 根据另一个具体实施方式,所述化妆品治疗方法包含每天重复 2 至 3 次所述施用步骤共计一天或多天,并且通常需要至少 4 周甚至是 4 至 15 周的延续期,并视情况而定伴有一个或多个中断期。

[0090] 根据另一个方面,本发明涉及包含 L- 丝氨酸和 / 或 L- 天冬酰胺和 / 或 L- 缬氨酸、Avène 温泉水和甘油,以及药学上或化妆品上可接受的载体的组合物。

[0091] 在一个优选方式中,本发明涉及包含 L- 丝氨酸、Avène 温泉水和甘油,以及药学上或化妆品上可接受的载体的组合物。

[0092] 有利地,所述组合物是皮肤用化妆品组合物。

[0093] 优选地,所述组合物不包括显示出抗炎作用的其它活性剂,并且在一个特别优选的方式中不包括其它活性剂。

具体实施方式

[0094] 实施例 1:

[0095] 使用 HaCaT 细胞株角质细胞模型。L- 丝氨酸和 L- 天冬酰胺购自 EVONIK, L- 精氨酸购自 AMINO, L- 缬氨酸购自 AJINOMOTO。

[0096] 将荧光探针(浓度为 $2 \mu\text{M}$ 的 Fluo-4/AM) 并入接种在 96 孔板中的细胞中 30 分钟并将待测活性剂孵育 30 分钟。只有与钙离子结合的探针的去酯化形式可于 485nm 荧光下激发并于 535nm 发射。所用培养缓冲液是补充有 HEPES (20mM) 和水溶性丙磺舒 (2.5mM) 的 HBSZS 缓冲液。

[0097] 用 10nM 胰蛋白酶刺激细胞。

[0098] 所用参考分子是浓度为 $1 \mu\text{M}$ 的 STI 分子(大豆胰蛋白酶抑制剂)。

[0099] 在蒸馏水中增溶至 50mg/ml 的 L- 丝氨酸和 L- 天冬酰胺(L- 丝氨酸为 475.8mM 并且 L- 天冬酰胺为 378.4mM) 于 $3 \mu\text{M}$ 、 $10 \mu\text{M}$ 、 $30 \mu\text{M}$ 和 $100 \mu\text{M}$ 浓度评价。

[0100] L- 精氨酸在蒸馏水中增溶至 100mM。

[0101] L- 缬氨酸在蒸馏水中增溶至 200mM。

[0102] L- 天冬氨酸在蒸馏水中增溶至 200mM。

[0103] 钙流(其代表 PAR2 受体的活化)通过荧光根据胰蛋白酶注射前后的动力学实时

逐孔地测定。PAR2 受体活化的抑制百分比相当于钙流的抑制百分比。

[0104] 图 1 中所示的结果显示 L- 丝氨酸的施用允许以剂量依赖方式抑制 PAR2 受体活化。

[0105] 表 1 中所示的结果显示 L- 天冬氨酸的施用允许抑制 PAR2 受体活化,但不是以剂量依赖的方式。

[0106] 表 1 中所示的结果显示 L- 缬氨酸的施用允许抑制 PAR2 受体活化。

[0107] 此外,结果显示 L- 精氨酸非显著地抑制 PAR2 受体活化。

[0108] 表 1

抑制百分比	抗-PAR-2 活性 (抑制百分比)			
	浓度	3 μ M	10 μ M	30 μ M
[0109] L-丝氨酸	3%	13%	20%	33%***
L-天冬氨酸	23%*	23%*	22%*	31%***
L-精氨酸	-17%	12%	-11%	1%
L-缬氨酸	6%	26%*	20%	34%***
1 μ M STI	106-109%***			

[0110] $p < 0.5$ 和 $p < 0.001$ (***) 值与胰蛋白酶值有显著性差异 (Dunnett 检验)

[0111] 实施例 2:

[0112] 皮肤屏障功能提供抵御外界环境的保护。表皮角质细胞可直接对很多刺激物或过敏原做出反应并主动参与皮肤的炎症和免疫过程,特别是通过促炎细胞因子(蛋白质源介质)的合成与分泌。

[0113] 趋化因子——白介素-8(IL-8)——其通过角质细胞表达并深入参与炎症应答的扩增,已有更加具体的研究。趋化因子的主要功能是募集和活化嗜中性粒细胞,尤其是通过刺激它们的促炎分子的分泌。

[0114] 所进行的实验允许依据源自细胞株(HaCaT)的人类角质细胞上的由胰蛋白酶刺激的 IL-8 的分泌评价 L- 丝氨酸的抗炎活性。

[0115] -IL-8 的含量测定原理:三明治型 ELISA 允许在培养上清液中分泌的 IL-8 的定量。

[0116] IL-8 被固定于微孔板孔的单克隆抗体捕获。加入第二抗 IL-8 抗体。该抗体是生物素化的,其能够使得伴有过氧化物酶活性的链霉亲和素的固定。过氧化物酶底物的加入使得能够通过测量 450nm 处的吸收度来定量每孔中 IL-8 的浓度。

[0117] - 材料和方法

[0118] a) 细胞工具:

[0119] 使用 HaCaT 人类角质细胞的细胞株。

[0120] b) 材料:

[0121] 使用用于细胞培养的 96 孔微孔板和配有进样器的平板读取仪:MiThras LB940TM(Berthold Technologies[®])。

[0122] c) 试剂:

[0123] 使用 10nM 胰蛋白酶作为刺激剂。

[0124] 使用来自人类 CXCL8/IL8 DuoSet R&D 系统试剂盒 (参考 DY208(E)) 的试剂。

[0125] d) 测试产物:

[0126] 在蒸馏水中增溶至 475.8mM 的 L-丝氨酸于 3 μM、10 μM、30 μM、100 μM、300 μM 和 1mM 的浓度进行评价。

[0127] e) 方案:

[0128] L-丝氨酸于 37°C 培养 1 小时 (HBSS 缓冲液)。然后加入刺激剂 (胰蛋白酶 T03) 并于 37°C 培养 24 小时。

[0129] 收集培养上清液, 于 4°C 离心, 然后于 -20°C 储存。

[0130] 样品的 IL-8 的浓度通过以下方程式的标准曲线计算:

$$[0131] \quad OD = (B_{\max} * [IL-8]) / (K_d + [IL-8])$$

[0132] 其次, IL-8 分泌的抑制百分比根据以下公式计算:

[0133]

$$\text{抑制}\% = 100 - \left(\frac{[\text{IL-8}] \text{平均值 (活性剂)} - [\text{IL-8}] \text{平均值 (对照)}}{[\text{IL-8}] \text{平均值 (刺激剂)} - [\text{IL-8}] \text{平均值 (对照)}} * 100 \right)$$

[0134] 结果

[0135] 下表中显示的值代表 HaCaT 角质细胞的胰蛋白酶刺激后的 IL-8 分泌水平的 L-丝氨酸抑制作用。

[0136] IL-8 分泌的抑制百分比:

[0137] 独立实验: (n = 2)

[0138] 表 2

[0139]

通过 10nM 胰蛋白酶的 IL-8 分泌的诱导因素	抑制%			
	L-丝氨酸			
	10μM	30μM	100μM	1mM
相对于对照组细胞的 2.6X (未刺激的基础产物)	47***	50***	66***	74***

[0140] $p < 0.001$ (***) 值与胰蛋白酶值有显著性差异 (Dunnett 检验)

[0141] 结论

[0142] 在体外, 在细胞水平上, 促炎刺激 (如通过胰蛋白酶的 PAR2 受体活化) 诱导通过角质细胞的 IL-8 分泌。

[0143] L-丝氨酸显示在通过胰蛋白酶的 PAR2 受体刺激后通过角质细胞的 IL-8 分泌的显著抑制作用, 其于 1mM 浓度具有 74% 的平均抑制率。

[0144] 实施例 3: 根据本发明的组合物

[0145]

INCI 名称	百分比	功能
水	QSP100%	

EDTA 二钠	0.2	配位剂
苯氧乙醇 - 尼泊金类	0.8	防腐剂
甘油	4	润湿剂
卡波姆	0.5	凝胶化剂
硬脂酸甘油酯	4	乳化剂、稠度因子
鲸蜡硬脂醇异壬酸酯	3	润肤剂
二甲硅油	5	润肤剂
角鲨烷	5	润肤剂
石蜡油	10	润肤剂
L- 丝氨酸	1	活性剂
三乙醇胺	0.30	pH 调节剂