(19)国家知识产权局

(12)发明专利

(10)授权公告号 CN 113677404 B
(45)授权公告日 2024.03.29

(21)申请号 202080024921.5
(22)申请日 2020.02.21
(65)同一申请的已公布的文献号
申请公布号 CN 113677404 A
(43)申请公布日 2021.11.19
(30)优先权数据
62/823,730 2019.03.26 US
(85)PCT国际申请进入国家阶段日
2021.09.27
(86)PCT国际申请的申请数据
PCT/US2020/019173 2020.02.21
(87)PCT国际申请的公布数据
WO2020/197669 EN 2020.10.01
(73)专利权人 卢卡斯梅耶化妆品公司
地址 法国马西
(72)发明人 J·阿提亚-维格诺 E·卢茵
M·波莱尔
(74)专利代理机构 隆天知识产权代理有限公司 72003
专利代理师 吴小瑛 于磊
(51)Int.Cl.
A61K 8/44(2006.01)
A61Q 19/00(2006.01)
A61K 8/88(2006.01)
A61P 17/10(2006.01)
(56)对比文件
CN 105934464 A,2016.09.07
JP 2013071907 A,2013.04.22
US 2016206572 A1,2016.07.21
董红霞等.《树枝状聚赖氨酸的合成》.《合成材料老化与应用》.2010,第第39卷卷(第第3期期),第8-11页.
审查员 刘波
权利要求书2页 说明书23页 附图7页

(54)发明名称

聚赖氨酸树枝状聚合物在预防和管理易出现痤疮的皮肤和痤疮皮肤中的应用

(57)摘要

本发明涉及聚赖氨酸树枝状聚合物或其盐用于管理易出现瑕疵或易出现痤疮的皮肤或用于治疗或预防寻常痤疮的用途。聚赖氨酸树枝状聚合物作为活性物用于恢复或重新平衡皮肤微生物群。聚赖氨酸树枝状聚合物还作为活性物用于改善或恢复待治疗的皮肤的外观和感觉。

CN 113677404 B

1.第二代(G2)聚赖氨酸树枝状聚合物或其盐作为活性成分在制备用于管理、治疗或预防易出现痤疮的皮肤、易出现瑕疵的皮肤或痤疮皮肤的局部用组合物中的用途,其中

-所述第二代(G2)聚赖氨酸树枝状聚合物具有40至60的DPn,并且

-所述第二代(G2)聚赖氨酸树枝状聚合物具有长度为6至10个赖氨酸残基的线性聚-L-赖氨酸核心,其中线性聚-L-赖氨酸核心中的赖氨酸残基的ε-氨基各自被聚-L-赖氨酸的部分取代。

2.根据权利要求1所述的第二代(G2)聚赖氨酸树枝状聚合物或其盐的用途,其中所述第二代(G2)聚赖氨酸树枝状聚合物或其盐作为活性成分来制备用于恢复或重新平衡皮肤微生物群的局部用组合物。

3.根据权利要求2所述的第二代(G2)聚赖氨酸树枝状聚合物或其盐的用途,其中所述第二代(G2)聚赖氨酸树枝状聚合物或其盐作为活性成分来制备用于减少皮肤上痤疮性痤疮丙酸杆菌菌株的丰度。

4.根据权利要求3所述的第二代(G2)聚赖氨酸树枝状聚合物或其盐的用途,其中所述痤疮性痤疮丙酸杆菌菌株属于系统发育型IA1。

5.根据权利要求2所述的第二代(G2)聚赖氨酸树枝状聚合物或其盐的用途,其中所述第二代(G2)聚赖氨酸树枝状聚合物或其盐作为活性成分来制备用于增加皮肤上非痤疮性痤疮丙酸杆菌菌株的丰度。

6.根据权利要求5所述的第二代(G2)聚赖氨酸树枝状聚合物或其盐的用途,其中所述非痤疮性痤疮丙酸杆菌菌株属于系统发育型II。

7.第二代(G2)聚赖氨酸树枝状聚合物或其盐作为活性成分在制备用于在易出现痤疮的皮肤、易出现瑕疵的皮肤和痤疮皮肤中提供至少一种以下效果的局部用组合物中的用途:

-改善皮肤外观和感觉,和/或

-恢复皮肤舒适度,和/或

-预防、改善或治疗瑕疵,和/或

-舒缓肌肤,和/或

-减少或防止皮肤发红或皮肤炎症,和/或

-减少皮肤皮脂分泌,和/或

-减少可见的病变,选自粉刺、脓疱和丘疹,和/或

-改善皮肤脱屑;

其中,

-所述第二代(G2)聚赖氨酸树枝状聚合物具有40至60的DPn,并且

-所述第二代(G2)聚赖氨酸树枝状聚合物具有长度为6至10个赖氨酸残基的线性聚-L-赖氨酸核心,其中线性聚-L-赖氨酸核心中的赖氨酸残基的ε-氨基各自被聚-L-赖氨酸的部分取代。

8.根据权利要求1-7中任一项所述的第二代(G2)聚赖氨酸树枝状聚合物或其盐的用途,其中所述第二代(G2)聚赖氨酸树枝状聚合物具有46至50的DPn。

9.根据权利要求1-7中任一项所述的第二代(G2)聚赖氨酸树枝状聚合物或其盐的用途,其中在ε-氨基上接枝的聚-L-赖氨酸的部分的长度为2至6个赖氨酸残基。

10.根据权利要求1-7中任一项所述的第二代(G2)聚赖氨酸树枝状聚合物或其盐的用途,其中所述第二代(G2)聚赖氨酸树枝状聚合物为聚阳离子树枝状聚合物的形式,其中抗衡阴离子是乙酸根。

11.根据权利要求1-7中任一项所述的第二代(G2)聚赖氨酸树枝状聚合物或其盐的用途,其中所述局部用组合物是化妆品组合物。

12.根据权利要求11所述的第二代(G2)聚赖氨酸树枝状聚合物或其盐的用途,其中所述化妆品组合物选自由舒缓霜、去角质产品、日霜或凝胶产品、净化爽肤水或乳液、净化清洁剂、瑕疵修正霜或棒和遮瑕棒或霜组成的组,所述化妆品组合物用于痤疮皮肤、易出现瑕疵的皮肤或易出现痤疮的皮肤上。

13.根据权利要求1-7中任一项所述的第二代(G2)聚赖氨酸树枝状聚合物或其盐的用途,其中所述局部用组合物用于在易出现痤疮的皮肤中减少瑕疵和/或减少皮脂产生。

14.根据权利要求1-7中任一项所述的第二代(G2)聚赖氨酸树枝状聚合物或其盐的用途,其中所述局部用组合物用于治疗或预防寻常痤疮。

15.根据权利要求1-7中任一项所述的第二代(G2)聚赖氨酸树枝状聚合物或其盐的用途,其中所述第二代(G2)聚赖氨酸树枝状聚合物与其它活性成分组合使用,所述其它活性成分选自抗痤疮剂、角质层分离剂、皮脂调节剂、杀细菌剂、抗炎剂、抗发红剂、舒缓剂及它们的混合物。

16.根据权利要求15所述的第二代(G2)聚赖氨酸树枝状聚合物或其盐的用途,其中所述其它活性成分选自维生素A、维A酸类、过氧化苯甲酰、癸二醇、壬二酸、水杨酸、氨苯砜、互生叶白千层(Melaleuca alternifolia)(茶树)油及它们的组合。

聚赖氨酸树枝状聚合物在预防和管理易出现痤疮的皮肤和痤疮皮肤中的应用

[0001] 背景

[0002] 寻常痤疮(Acne vulgaris),也简称为痤疮(acne),是产生皮脂的腺体(毛囊皮脂腺)常见的慢性炎症性疾病。痤疮导致在皮肤上形成炎性隆起(丘疹、脓疱、结节和囊肿)、粉刺(黑头和白头)和疤痕。痤疮是皮肤科医生和其他医疗保健提供者治疗的最常见病症之一。世界人口中超过90%在他们生命中的某个时刻受到痤疮的影响。痤疮的发病机制是多因素的,涉及具有相互关联机制的四种关键因素:皮脂生成增加、角化过度、皮肤炎症和痤疮丙酸杆菌(Cutibacterium acnes)增殖。

[0003] 痤疮丙酸杆菌(以前称为Propionibacterium acnes)普遍存在于人类皮肤的毛囊皮脂腺中,主要存在于面部和背部。痤疮丙酸杆菌是正常皮肤微生物群中的主要成员,通过抑制一些致病菌(如金黄色葡萄球菌(Staphylococcus aureus))的发展和维持毛皮脂腺毛囊中的酸性pH酸,在维持正常皮肤微生物群中发挥重要作用,尽管痤疮丙酸杆菌是共生体,一般认为其通过促进炎症参与痤疮的发病机制中。事实上,许多研究表明,在皮肤中,痤疮丙酸杆菌通过单核细胞和角质形成细胞表达的Toll样受体激活先天免疫,并增加白细胞介素的分泌。此外,痤疮丙酸杆菌被证明与机会性感染相关,尤其是在留置医疗器械的情况下。它在皮肤微生物群平衡、痤疮炎症性状况和机会性感染中的双重作用导致以下假设:某些痤疮丙酸杆菌菌株可以通过致病和炎症潜能升高来表征。

[0004] 系统发育研究为痤疮丙酸杆菌的遗传种群结构提供了有价值的见解。已表明,痤疮丙酸杆菌具有整体克隆结构,其分离株可分为许多具有统计学意义的进化枝或系统群,命名为IA1、IA2、IB、IC、II和III型。已表明系统群在其与特定类型感染的关联方面存在差异,并且在它们产生的假定毒力决定因素、炎症潜能、抗生素抗性、聚合特性和形态特征方面有所不同。痤疮丙酸杆菌的系统发育型IA1、IA2、IB、IC已被鉴定为痤疮菌株,而系统发育型II和III被归类为非痤疮菌株。已表明系统发育型IA1是痤疮菌株中最丰富的菌株,而系统发育型II和III主要存在于健康的非痤疮皮肤中。

[0005] 事实上,许多独立的流行病学研究表明IA1型系统群的克隆复合体与中度至重度痤疮之间存在相关性(Scholz等人,PlosOne,2014,e104199,Barnard等人JournalofClinical Microbiology,2015,53,1149-1155)。

[0006] 最近,Dagnelie等人(Acta Derm Venereol,2018;98:262-267)确定并比较了严重痤疮患者与健康患者的不同的系统发育型、克隆复合体(CC)和单基因座序列分型(SLST)类型。他们表明,健康患者的系统发育型为IA1(39.1%)和II(43.4%),而痤疮组中IA1(84.4%)占主导,尤其是在背部(95.6%):IA1SLST型与严重痤疮明显相关。值得注意的是,Dagnelie等人报道,面部和背部的炎症性严重痤疮都与痤疮丙酸杆菌多样性种群的显著丧失相关。由于微生物群调节了皮肤的先天免疫,人们认为这种多样性的丧失可能引发炎症并促进炎症性痤疮病变。在最近的出版物中,Dagnelie等人提供的证据表明,痤疮丙酸杆菌亚群多样性的丧失确实触发了先天免疫系统激活,从而触发了皮肤炎症的发展(Dagnelie等人,JEADV,2019;33:2340-2348)。

[0007] 截至今天,根据痤疮的严重程度,有多条治疗线来管理痤疮。治疗基本上基于两种类型的活性成分:局部用维A酸类,其发挥抗炎作用、使皮肤脱屑正常化并发挥痤疮溶解作用,以及抗生素和杀细菌剂,例如过氧化苯甲酰,其用于减少皮肤上痤疮丙酸杆菌的总体存在。中度和重度痤疮的治疗一般是将局部用联合疗法与过氧化苄和维A酸类或抗生素组合。也可以开处抗生素和异维A酸的口服治疗。对于女性,也可以开处联合口服避孕药。不幸的是,这些治疗也有一些缺点,例如皮肤刺激、皮炎或光敏性。由于抗生素耐药性问题,抗生素的使用也存在争议,并可能导致微生物群失衡。

[0008] 然而,这些治疗无一是旨在重新平衡皮肤微生物群以与痤疮丙酸杆菌痤疮菌株相比更促进痤疮丙酸杆菌非痤疮菌株。

[0009] 因此需要替代方法来管理痤疮皮肤以及易出现痤疮的皮肤和易出现瑕疵的皮肤。

发明内容

[0010] 本发明涉及聚赖氨酸树枝状聚合物或其盐作为活性成分在管理易出现痤疮的皮肤和易出现瑕疵的皮肤中的美容、非治疗用途。本发明还涉及聚赖氨酸树枝状聚合物或其盐作为活性成分用于治疗或预防寻常痤疮的用途。

[0011] 在一些实施方案中,聚赖氨酸树枝状聚合物或其盐用作活性成分以恢复或重新平衡皮肤微生物群,优选恢复皮肤上的痤疮丙酸杆菌多样性。例如,聚赖氨酸树枝状聚合物或其盐可以作为活性成分用于降低皮肤上痤疮性痤疮丙酸杆菌菌株、优选属于系统发育型IA1、IA2、IB和IC、更优选属于系统发育型IA1的痤疮丙酸杆菌菌株的丰度。可选地或另外地,聚赖氨酸树枝状聚合物或其盐可以用于增加皮肤上非痤疮性痤疮丙酸杆菌菌株,优选属于系统发育型II或III、优选系统发育型II的痤疮丙酸杆菌菌株的丰度。

[0012] 在一些实施方案中,在痤疮皮肤、易出现痤疮的皮肤或易出现瑕疵的皮肤中,聚赖氨酸树枝状聚合物或其盐用作活性成分以:

[0013] -改善皮肤外观和感觉,和/或

[0014] -恢复皮肤舒适度,和/或

[0015] -预防、改善或治疗瑕疵,和/或

[0016] -舒缓肌肤,和/或

[0017] -减少或预防皮肤发红或皮肤炎症,和/或

[0018] -减少皮肤皮脂分泌,和/或

[0019] -减少可见的病变,如粉刺、脓疱和丘疹,和/或

[0020] -改善皮肤脱屑。

[0021] 在一些实施方案中,聚赖氨酸树枝状聚合物是DPn为40至60、优选46至50、例如48的第二代未结合的聚-L-赖氨酸树枝状接枝物(dendrigraft)。

[0022] 在一些其他实施方案中,聚赖氨酸树枝状聚合物是具有线性聚-L-赖氨酸核心的聚-L-赖氨酸树枝状接枝物,其中ε-氨基被聚-L-赖氨酸部分(moiety)取代。例如,线性聚-L-赖氨酸核心的长度为6至10个、优选8个赖氨酸残基和/或接枝在ε-氨基上的聚-L-赖氨酸部分的长度为2至6个、优选5个赖氨酸残基。

[0023] 在一些进一步的实施方案中,聚赖氨酸树枝状聚合物是聚阳离子树枝状聚合物的形式,其中抗衡阴离子是乙酸根。此类树枝状聚合物的实例在图7中给出。

[0024] 聚赖氨酸树枝状聚合物可以作为活性成分存在于非药用、化妆品或皮肤化妆品组合物中。目标化妆品组合物的实例包括舒缓霜、去角质产品、日用霜或凝胶产品、净化爽肤水或乳液、净化清洁剂、瑕疵修正霜或棒,以及遮瑕棒或霜。

[0025] 在一些实施方案中,聚赖氨酸树枝状聚合物可以与选自以下的活性成分组合使用:维生素A、维A酸类如阿达帕林(adapalene)、维A酸(tretinoin)或他扎罗汀(tazarotene);杀细菌剂如过氧化苯甲酰和癸二醇、壬二酸、水杨酸;抗炎剂如氨苯砜或互生叶白千层(Melaleuca alternifolia)(茶树)油;抗发红剂(anti-redness agent);舒缓剂;及它们的组合。

[0026] 本发明还涉及一种用于管理痤疮皮肤、易出现痤疮的皮肤或易出现瑕疵的皮肤的局部用组合物,其包含作为活性成分的聚赖氨酸树枝状聚合物和一种或多种赋形剂。局部用组合物可以包含:

[0027] -0.1至100ppm的聚赖氨酸树枝状聚合物,优选以下所列中的任一种:

[0028] 第二代未结合的聚-L-赖氨酸树枝状接枝物,DPn为40至60,优选46至50,例如48;

[0029] 具有线性聚-L-赖氨酸核心的聚-L-赖氨酸树枝状接枝物,其中ε-氨基各自被聚-L-赖氨酸的部分取代,特别是所述线性聚-L-赖氨酸核心的长度为6至10个、优选8个赖氨酸残基和/或在ε-氨基上接枝的聚-L-赖氨酸的部分的长度为2至6个、优选5个赖氨酸残基;和

[0030] 聚阳离子树枝状聚合物形式的聚赖氨酸树枝状聚合物,其中抗衡阴离子是乙酸根;

[0031] -0%至20%的一种或多种另外的活性剂,以及

[0032] -70%至99.9999%的一种或多种赋形剂,

[0033] 百分比以相对于组合物总重量的重量表示。

[0034] 本发明的另一个目的是治疗或预防受试者的痤疮的方法,该方法包括向所述受试者局部施用有效量的聚赖氨酸树枝状聚合物或其组合物的步骤。本发明还涉及一种用于恢复或重新平衡痤疮皮肤、易出现瑕疵的皮肤或易出现痤疮的皮肤中的微生物群的方法,该方法包括向所述受试者局部施用有效量的聚赖氨酸树枝状聚合物或其组合物的步骤。

[0035] 本发明还涉及一种用于在患有痤疮、具有易出现瑕疵的皮肤或具有易出现痤疮的皮肤的受试者中改善皮肤外观和感觉,和/或恢复皮肤舒适度和/或预防、改善或治疗瑕疵和/或痤疮病变和/或舒缓皮肤,和/或减少毛孔可见度(并因此使皮肤平滑),和/或减少或防止皮肤发红、和/或皮肤炎症,和/或减少皮肤皮脂分泌和/或使皮肤具有较少光泽和/或油性外观,和/或改善皮肤的方法,该方法包括向所述受试者局部施用有效量的聚赖氨酸树枝状聚合物或其组合物的步骤。

[0036] 本发明还涉及聚赖氨酸树枝状聚合物、优选聚-L-赖氨酸树枝状聚合物在制备如上所述的用于管理或治疗易出现痤疮的皮肤、易出现瑕疵的皮肤或痤疮皮肤的局部用组合物中的用途。

[0037] 附图简要说明

[0038] 图1显示了根据本发明的G2树枝状聚合物在正常人真皮成纤维细胞中的抗炎作用。在氢化可的松(0.05μg/mL)或G2树枝状聚合物(10^{-9}M、10^{-8}M、10^{-7}M或10^{-6}M)的存在下,用0.0003ng/mL IL-α处理细胞,并通过IL-8ELISA测定法测定IL-8的产生。*p<0.05,**p<0.01,***p<0.001。

[0039] 图2是显示了在实施例5中使用的寻常痤疮离体模型中产品应用的时间线的示意图。在D0、D1、D4和D6处,G2树枝状聚合物以2ppm或5ppm施加,随后(1小时)施加痤疮丙酸杆菌。

[0040] 图3显示了G2树枝状聚合物对受痤疮丙酸杆菌攻击的人皮肤外植体中TRL2表达的作用。使用未用痤疮丙酸杆菌或G2处理的外植体作为对照。

[0041] 图4显示了G2树枝状聚合物对痤疮丙酸杆菌的痤疮菌株(RT4和RT5)和痤疮丙酸杆菌的非痤疮菌株(RT6)的膜流动性的作用。G2树枝状聚合物特异性地且显著地增加了痤疮菌株的膜流动性。

[0042] 图5A-5E显示了临床研究的结果,该临床研究旨在评估在治疗28天后,采用含有G2树枝状聚合物(G2)的测试乳膏与安慰剂乳膏(安慰剂)的治疗对炎症性病变(即脓疱和丘疹)(图5A)、保留性病变(即黑头和白头)(图5B)和黑头的数量以及对皮脂分泌率(图5C)的影响。图5E和5D分别显示了治疗28天后使用辛普森和香农指数的痤疮丙酸杆菌菌株多样性。临床试验的方案和结果详细描述在实施例8中。

[0043] 图6A和6B显示了本发明的树枝状聚合物对非痤疮菌株RT6形成的生物膜和痤疮菌株RT5形成的生物膜的影响。G2树枝状聚合物降低了这两种菌株的生物膜厚度。值得注意的是,G2树枝状聚合物显著降低了RT5菌株形成的生物膜中的生物量密度,而对RT6菌株形成的生物膜的生物量密度没有显著作用。

[0044] 图7显示了本发明的聚赖氨酸树枝状聚合物的实例。

[0045] 发明详述

[0046] 申请人表明,赖氨酸残基的“树状”聚合物,在本文称为“G2树枝状聚合物”,对属于系统发育型IA1的痤疮性痤疮丙酸杆菌菌株表现出抗菌活性,MIC为20ppm。此外,G2树枝状聚合物缓和角质层分离作用并降低已知与痤疮丙酸杆菌(P.acnes)定植相关的免疫和炎症级联。申请人进一步表明,这种聚-L-赖氨酸树枝状聚合物能够特异性地靶向痤疮丙酸杆菌的痤疮菌株。值得注意的是,实施例6显示G2树枝状聚合物显著增加了属于系统发育型IA1的痤疮核糖体型(RT4和RT5)的膜流动性,而对属于系统发育型II的非痤疮核糖体型RT6没有显著作用。换言之,这一结果表明G2树枝状聚合物能够特异性地使痤疮菌株的细胞膜不稳定,并因此抑制它们的增殖而不损害非痤疮性痤疮丙酸杆菌菌株。此外,实施例7显示G2树枝状聚合物显著降低痤疮菌株RT5形成的生物膜中的生物量密度,而对非痤疮RT6菌株形成的生物膜中的生物量密度没有显著作用。聚赖氨酸树枝状聚合物因此有望通过减少生物膜的厚度同时通过使其生物膜不稳定对痤疮菌株施加选择性和特异性抑制作用,来减少由痤疮丙酸杆菌生物膜(无论什么菌株)触发的炎症反应。

[0047] 本发明的G2树枝状聚合物在痤疮皮肤中管理瑕疵和病变以及改善皮肤微生物群方面的功效被临床证实。申请人表明,用含有低浓度(2ppm)的G2树枝状聚合物的乳膏治疗28天显著改善了皮肤的外观,特别是通过与用安慰剂乳膏治疗相比减少痤疮瑕疵和病变如丘疹、脓疱、黑头和保留性病变的数量。含有G2的乳膏进一步能够降低皮肤的皮脂分泌率。值得注意的是,对面部样本进行的基因组分析表明,含G2树枝状聚合物的组合物通过增加痤疮丙酸杆菌菌株的多样性来改善皮肤微生物群:在用含G2的组合物处理的皮肤样品中,系统发育型IA1菌株(在文献中被确定为促进痤疮的菌株)的丰度减少,而非痤疮系统发育型II菌株的丰度增加。换句话说,已表明聚赖氨酸树枝状聚合物是一种能够重新平衡痤疮

皮肤中痤疮丙酸杆菌多样性的物质。

[0048] 这些结果一起证明了,聚赖氨酸树枝状聚合物是在痤疮和易出现痤疮的皮肤以及易出现瑕疵的皮肤中控制瑕疵和恢复皮肤微生物群的有效活性剂。

[0049] 因此,本发明涉及聚赖氨酸树枝状聚合物、优选聚-L-赖氨酸树枝状聚合物作为活性剂在管理痤疮皮肤、易出现痤疮的皮肤和易出现瑕疵的皮肤中的用途。

[0050] 本发明还涉及聚赖氨酸树枝状聚合物作为活性剂在预防或治疗寻常痤疮和/或管理与寻常痤疮相关的瑕疵和皮肤病变中的用途。

[0051] 本发明还涉及聚赖氨酸树枝状聚合物、优选聚-L-赖氨酸树枝状聚合物作为活性剂在具有选自痤疮皮肤、易出现痤疮的皮肤和瑕疵-痤疮皮肤的皮肤类型的受试者中用于以下的用途:

[0052] -改善皮肤外观和感觉,和/或

[0053] -恢复皮肤舒适度和/或

[0054] -预防、改善或治疗瑕疵,和/或

[0055] -预防、改善或治疗痤疮病变和/或

[0056] -舒缓肌肤,和/或

[0057] -减少毛孔的可见性,和/或

[0058] -减少或预防皮肤发红或皮肤炎症,和/或

[0059] -减少皮肤皮脂分泌和/或使皮肤具有不太光泽和/或油腻的外观

[0060] -减少可见病变:黑头、脓疱和丘疹,和/或

[0061] -改善皮肤脱屑(例如通过发挥角质层分离作用)。

[0062] 本发明还涉及聚赖氨酸树枝状聚合物、优选聚-L-赖氨酸树枝状聚合物在痤疮皮肤、易出现痤疮的皮肤或易出现瑕疵的皮肤中恢复或重新平衡微生物群的用途。更准确地说,本发明的聚赖氨酸树枝状聚合物用作减少皮肤中、优选痤疮和易出现痤疮的皮肤中痤疮性痤疮丙酸杆菌菌株丰度的物质。在另一个或另外的实施方案中,本发明的聚赖氨酸树枝状聚合物用于增加皮肤、优选痤疮或易出现痤疮的皮肤中非痤疮性痤疮丙酸杆菌的丰度。本发明还涉及聚赖氨酸树枝状聚合物在预防或减少痤疮丙酸杆菌痤疮菌株的皮肤定植中的用途。本发明进一步涉及聚赖氨酸树枝状聚合物用于增加痤疮皮肤或易出现痤疮的皮肤中的痤疮丙酸杆菌多样性的用途,例如通过减少痤疮丙酸杆菌系统发育型IA1的丰度,同时能够增加痤疮丙酸杆菌系统发育型II或III的丰度。

[0063] 在更一般的方面,本发明涉及聚赖氨酸树枝状聚合物、优选聚-L-赖氨酸树枝状聚合物作为活性剂用于恢复皮肤微生物群平衡的用途,特别是在痤疮或易出现痤疮的皮肤中。在另一方面,本发明涉及聚赖氨酸树枝状聚合物、优选聚-L-赖氨酸树枝状聚合物在预防或治疗与痤疮丙酸杆菌种群不平衡相关的皮肤生态失调中的用途。

[0064] 本发明还涉及聚赖氨酸树枝状聚合物、优选聚-L-赖氨酸树枝状聚合物作为活性剂用于维持或恢复皮肤微生物群稳态的用途,尤其是在具有痤疮皮肤、易出现痤疮的皮肤或易出现瑕疵的皮肤的受试者中。

[0065] 本发明的另一方面涉及一种用于管理受试者的选自痤疮皮肤、易出现痤疮的皮肤和易出现瑕疵的皮肤的皮肤类型的方法,该方法包括向所述受试者局部施用有效量的聚赖氨酸树枝状聚合物的步骤。这种方法能够改善受试者的皮肤外观,例如通过治疗、减少受试

者的皮肤瑕疵和皮肤病变和/或延迟其发作。

[0066] 本发明还涉及一种治疗或预防受试者的痤疮的方法,该方法包括向所述受试者局部施用有效量的聚赖氨酸树枝状聚合物的步骤。本发明的另一个目的是在具有痤疮皮肤、易出现痤疮的皮肤或易出现瑕疵的皮肤的受试者中改善皮肤外观和感觉,和/或恢复皮肤舒适度和/或预防、改善或治疗瑕疵和/或痤疮病变和/或舒缓皮肤,和/或减少毛孔的可见性(并因此使皮肤平滑),和/或减少或防止皮肤发红和/或皮肤炎症,和/或减少皮肤皮脂分泌和/或使皮肤具有不太光泽和/或油性外观,和/或改善皮肤的方法,该方法包括向所述受试者局部施用有效量的聚赖氨酸树枝状聚合物的步骤。本发明还涉及恢复或重新平衡痤疮皮肤或易出现痤疮的皮肤中的微生物群的方法,该方法包括向所述受试者局部施用有效量的聚赖氨酸树枝状聚合物的步骤。

[0067] 本发明还涉及聚赖氨酸树枝状聚合物、优选聚-L-赖氨酸树枝状聚合物在制备如上所述的用于管理或治疗易出现痤疮的皮肤、易出现瑕疵的皮肤或痤疮皮肤的局部用组合物中的用途。

[0068] 本发明还提供了使用聚赖氨酸树枝状聚合物(例如G2树枝状聚合物)和/或其盐来治疗寻常痤疮、减少皮肤炎症反应和促进皮肤脱屑的局部用组合物和方法。例如,本发明涉及一种用于减少皮肤炎症反应的方法,包括向需要治疗的受试者的皮肤施加包含聚赖氨酸树枝状聚合物(例如未结合的聚-L-赖氨酸树状接枝物)或其盐的组合物,从而减少受试者皮肤的炎症反应,其中所述炎症反应包括响应于痤疮丙酸杆菌的IL-8释放或TLR2过表达。本发明还涉及一种促进皮肤细胞脱落的方法,该方法包括向需要治疗的受试者的皮肤施加包含聚赖氨酸树枝状聚合物(例如,未结合的聚-L-赖氨酸树状接枝物)或其盐的组合物,从而促进受试者的皮肤细胞的脱落。

[0069] 根据本发明的聚赖氨酸树枝状聚合物可以作为活性成分掺入局部用组合物,通常是药物组合物、化妆品组合物或皮肤化妆品组合物。

[0070] 通常,聚赖氨酸树枝状聚合物以下列浓度存在于局部用组合物中:0.1ppm至100ppm,优选0.1ppm至20ppm,更优选0.5至10ppm,例如0.5至7ppm,例如0.5至6ppm。局部用组合物中聚赖氨酸树枝状聚合物的浓度以及所述局部用组合物的施加频率可取决于要治疗的皮肤和/或治疗的阶段。例如,小于4ppm(例如2ppm)的浓度可能足以治疗易出现痤疮的皮肤、易出现瑕疵的皮肤和具有轻度痤疮的皮肤,每天施加一次。对于治疗具有中度或重度痤疮的皮肤,可以使用更高浓度的聚赖氨酸树枝状聚合物(例如4至10ppm,例如4或6ppm),在初始治疗期间每天施加两次。一旦与痤疮相关的皮肤病变得到管理,可减少施加的剂量和频率,并且可实施数周的维持治疗。

[0071] 聚赖氨酸树枝状聚合物通常通过局部途径(topical route)使用,例如施加至待治疗的皮肤区域,例如,受痤疮困扰的皮肤区域或具有易出现痤疮特性或易出现瑕疵特性的皮肤区域。通常,待治疗的皮肤区域可能表现出一种或多种如下所述的皮肤瑕疵和/或皮肤病变和/或油性外观(例如由于皮脂的过度产生)。目标皮肤区域包括但不限于面部、颈部、胸部、肩部和背部。

[0072] 治疗频率可以变化并且取决于受试者的皮肤类型和/或痤疮(如果存在)的严重程度。通常,将聚赖氨酸树枝状聚合物施加于皮肤以每天治疗一次或两次。用聚赖氨酸树枝状聚合物的治疗可持续连续数天,例如7到28天,或几个月(至少2、3、4、6、8或10个月)。

[0073] 用本发明的聚赖氨酸树枝状聚合物尤其是以低于10ppm的浓度的长期治疗,预期在具有任何明显副作用例如皮肤刺激的患者中被很好地耐受,至少因为聚赖氨酸树枝状聚合物通过特异性靶向痤疮丙酸杆菌的痤疮菌株促进皮肤微生物群的重新平衡。

[0074] 树枝状聚合物发挥的作用可以是治疗性、预防性和/或美容性的,取决于皮肤类型和施加方式。

[0075] 例如,本发明的聚赖氨酸树枝状聚合物的用途在施加在瑕疵-痤疮皮肤上时可以是美容、非治疗用途。

[0076] 受试者可以是患有痤疮或具有易出现痤疮或易出现瑕疵的皮肤的任何受试者。

[0077] 在一些实施方案中,受试者是10至18岁、优选12至16岁的青少年。

[0078] 在一些实施方案中,受试者患有痤疮并且年龄超过23岁。

[0079] 在另一方面,受试者是超过23岁的女性或男性。

[0080] 在一些其他实施方案中,受试者具有易出现痤疮的皮肤。

[0081] 在一些进一步的实施方案中,受试者患有轻度痤疮、中度痤疮或重度痤疮,优选中度或重度痤疮。

[0082] 在进一步的实施方案中,受试者具有易出现瑕疵的皮肤。

[0083] 如本文所用,“易出现瑕疵的皮肤(blemish-prone skin)”是指其中皮肤具有发展一些粉刺和痘痘例如黑头和白头的倾向但无炎症性病变例如丘疹和脓疱的皮肤类型。

[0084] “易出现瑕疵的皮肤”的特征可以是油性和光泽外观,因为皮脂腺比其他皮肤类型产生更多的皮脂。这种皮脂产生增加通常发生在青春期,此时称为雄激素的激素物质的产生增加,进而刺激皮脂腺产生比需要更多的皮脂。某些激素治疗也可引发皮肤皮脂过度产生。这种皮脂溢本身也可以干扰正常的皮肤脱屑并导致皮肤瑕疵。在一些实施方案中,具有易出现瑕疵的皮肤的受试者没有个人痤疮史,尤其是重度或中度痤疮。

[0085] 如本文所用,“易出现痤疮的皮肤(Acne-prone skin)”是指其中皮肤具有发展出一些粉刺和痘痘以及甚至一些非常少的炎症性病变(通常为丘疹)的倾向的皮肤类型。在一些实施方案中,具有易出现痤疮的皮肤的受试者是指具有个人痤疮史的受试者,即已经经历过至少一次痤疮发作的受试者;或具有家族痤疮史的受试者,即具有至少一个已经历过中度或重度痤疮的家庭成员(母亲、父亲或姐妹/兄弟)的受试者。

[0086] “易出现痤疮的皮肤”或“易出现瑕疵的皮肤”在严格意义上并不是指患有皮肤疾病但如果管理不当可能会退化为痤疮的皮肤。

[0087] 如本文所用,“痤疮性皮肤(acneic skin)”,在本文中也称为“痤疮皮肤(acne skin)”是指患有痤疮(也称为寻常痤疮)的皮肤。痤疮是一种非接触传染的炎症性皮肤病症,涉及毛囊皮脂腺单位,其特征是由发炎和感染的皮脂腺引起的痘痘。这种疾病在青少年中最常见,但症状可持续到成年,并且有些人,尤其是女性,在25岁后首次出现症状。持久性或迟发性痤疮被称为迟发性痤疮(acne tarda)。痤疮通常出现在面部、颈部、肩部、胸部和背部。痤疮的严重程度从轻度痤疮(称为面疱性痤疮(Acne Comedonica))到中度痤疮(脓疱性痤疮(Acne Papulopustulosa))到重度痤疮(聚会性痤疮(Acne Conglobata))。轻度痤疮的特征是存在多个黑头、白头,有时还有少量丘疹。中度痤疮的特征是存在粉刺、丘疹和脓疱。皮肤可能出现红色和发炎。最后,重度痤疮是一种不常见的痤疮形式,其特征在于多个发炎的瑕疵,包括丘疹和脓疱,它们可能聚集在一起并形成结节和囊肿。痤疮的发病机制是

多因素的,涉及具有相互关联机制的四个关键因素:皮脂产生增加、角化过度、皮肤炎症和痤疮丙酸杆菌增殖。

[0088] 如本文所用,“瑕疵(blemish)”是指任何皮肤缺点,例如发红、痘痘或粉刺,例如是指在易出现瑕疵的皮肤(或易出现痤疮的皮肤)中可观察到的皮肤缺点,通常是保留性病变,例如黑头、白头和其他痘痘。

[0089] 如本文所用,“痤疮病变(acne lesion)”是指与痤疮相关的发炎、炎症性病变,例如在中度和重度痤疮中观察到的丘疹、脓疱、囊肿和结节。

[0090] 如本文所用,痤疮菌株(acneic strain)是指在痤疮皮肤中比在健康皮肤中统计学上更丰富的痤疮丙酸杆菌菌株。痤疮丙酸杆菌已细分为六种主要系统发育型,即IA1、IA2、IB、IC、II和III(Dagnelie等人,2018,同上)。在皮肤中,属于系统发育型IA1的细菌如RT4和RT5核糖体型在痤疮皮肤中占优势地位。痤疮菌株涵盖系统发育型IA1、1A2、1B和IC,优选IA1和IA2,更优选IA1,例如核糖体型I(RT1)、核糖体型4(RT4)和核糖体型5(RT5)。

[0091] 非痤疮菌株(Non-acneic strain)是指在健康皮肤中比在痤疮皮肤中统计学上更丰富的痤疮丙酸杆菌菌株。这样的菌株包括系统发育型II和III,例如核糖体型RT6。

[0092] 有关痤疮丙酸杆菌系统发育型、克隆复合体和单基因座序列的更多详细信息,可参考Dagnelie等人(同上)和Scholz等人,2016。

[0093] 在一些实施方案中,用本发明的聚赖氨酸树枝状聚合物治疗降低了受试者皮肤上存在的痤疮丙酸杆菌总群体中痤疮丙酸杆菌系统发育型I菌株的丰度。在一些其他实施方案中,用本发明的聚赖氨酸树枝状聚合物治疗增加了受试者皮肤上存在的痤疮丙酸杆菌总群体中痤疮丙酸杆菌系统发育型II或III菌株、优选系统发育型II菌株的丰度。

[0094] 如本文所用,术语“皮肤微生物群(skin microbiota)”、“皮肤微生物组(skin microbiome)”或“皮肤菌群(skinflora)”是指驻留在皮肤上、通常是人类皮肤上的微生物,并涵盖细菌、分枝杆菌、真菌和寄生细菌。大多数存在于表皮的浅层和毛囊的上部。皮肤菌群通常是非致病性的,并且是共生的(commensal)或共生的(mutualistic)。这些微生物可以提供的益处包括通过竞争营养、分泌抵抗致病性生物体的化学物质或刺激皮肤的免疫系统来防止短暂的致病性生物体在皮肤表面定殖。

[0095] “恢复或重新平衡(restoring or rebalancing)”皮肤微生物群,表示恢复微生物的多样性,以达到促进皮肤健康和/或对应健康皮肤的微生物分布的平衡。在本发明的上下文中,在易出现瑕疵的皮肤、易出现痤疮的皮肤或痤疮皮肤中“恢复或重新平衡微生物组(restoring or rebalancing microbiome)”或“恢复或重新平衡痤疮丙酸杆菌分布(restoring or rebalancing C.acnes distribution)”表示减少皮肤上痤疮性痤疮丙酸杆菌菌株的丰度。在一些实施方案中,它还包括促进皮肤上的非痤疮菌株,例如通过增加它们的丰度。在一些进一步的实施方案中,“恢复或重新平衡痤疮丙酸杆菌分布”表示本发明的聚赖氨酸树枝状聚合物能够促进痤疮丙酸杆菌的多样性,同时调节被治疗的皮肤区域上的痤疮丙酸杆菌生物量密度,从而使获得的痤疮丙酸杆菌群体接近于或类似于健康皮肤的微生物组,例如受试者的健康皮肤区域的微生物组。它还可以包括以下事实:所施加的组合物或活性成分对非致病性共生细菌菌株,尤其是痤疮丙酸杆菌的非致病性共生菌株不发挥显著的致死作用。

[0096] 表述“减少痤疮菌株的丰度(decreasing the abundance of an acneic

strain)”表示与受试者皮肤的确定区域(例如受试者的面部区域)上存在的痤疮丙酸杆菌细菌的总量相比,减少属于痤疮丙酸杆菌菌株的细菌的量/比例。

[0097] 表述“增加非痤疮菌株的丰度(increasing the abundance ofa non acneic strain)”表示与受试者皮肤的确定区域(例如受试者的面部区域)上存在的痤疮丙酸杆菌细菌的总量相比,增加属于痤疮丙酸杆菌非痤疮菌株的细菌的数量/比例。

[0098] 菌株的丰度/比例的显著增加/减少是指相对于治疗前确定的菌株丰度至少0.1%的变化,例如至少1%、2%、3%、5%、10%、15%、20%、25%、30%、35%或45%的变化。

[0099] 痤疮丙酸杆菌菌株的丰度可以如实施例8中所示通过对来自目标皮肤区域的拭子进行宏基因组学测定来确定。

[0100] 如本文所用,“增加微生物组的多样性(increase the diversity of the microbiome)”表示增加皮肤上存在的不同细菌菌株的数量。更准确地说,“增加痤疮丙酸杆菌的多样性(increasing the diversity on C.acnes)”表示增加皮肤上非痤疮菌株的数量和/或丰度。

[0101] 如本文所用,“管理易出现痤疮的皮肤或易出现瑕疵的皮肤(managing acne-prone skin or blemish-prone skin)”表示改善易出现痤疮的皮肤或易出现瑕疵的皮肤的视觉外观,例如采用本发明的治疗,皮肤具有不太油性的外观,和/或表现出较少或减少的瑕疵和痘痘,和/或瑕疵不太可见和/或皮肤具有较少的表现出瑕疵的倾向。

[0102] 表述“预防(preventing)”旨在表示延迟或防止目标病症例如瑕疵、痤疮病变或痤疮的发作。

[0103] 表述“治疗状况(treating a condition)”旨在表示减少、减轻、软化、纠正或减缓目标状况或其相关表现(例如痤疮和相关的瑕疵或病变)的发展。

[0104] 如本文所用,“树枝状聚合物(Dendrimer)”是通过从初始核心分子开始的重复反应序列形成的大分子高度支化的化合物,其中连续的层或阶段在连续的“代(generations)”中被添加以构建三维、高度有序的聚合物化合物。本领域中已描述了树枝状聚合物的制备,参见例如US 4,289,872和US 4,410,688,它们描述了基于赖氨酸单元的层的树枝状聚合物。

[0105] 本发明的树枝状聚合物是聚赖氨酸树枝状聚合物,更优选地是聚-L-赖氨酸树枝状聚合物,例如聚-L-赖氨酸树枝状接枝物。

[0106] 与常规树枝状聚合物一样,以基于代的方案制备接枝树枝状聚合物(在本文中也称为树枝状接枝接枝物(dendrigraft))涉及保护基操作与聚合步骤相结合,即通过保护、单体聚合和脱保护的循环(所谓的“从接枝(grafting from)”方法;Klok&Rodriguez Hernandez(2002)Macromolecules 35:8718-23)或通过在保护、缩合和脱保护的循环中使用预制聚合物代替分子化合物作为AB_n构建模块(所谓的“接枝到(grafting onto)”方法;Teertstra&Gauthier(2004)Prog.Polym.Sci.29:277-327)。因为G2树枝状聚合物不再是单分子化合物,树枝状接枝聚合物比常规树枝状聚合物具有更差的结构可控性(例如,如US 4,289,872中所述),但与超支化聚合物相比通常具有更规则的结构(例如,如Rodriguez-Hernandez等人(2003)Biomacromolecules 4:249-258和Klok等人(2002)Macromolecules 35:8718-8723中所述)。然而,由于它们的合成程序,接枝的树枝状聚合物的分子量随着每一代的增加而比树枝状聚合物的分子量增加得更快。

[0107] 在一些实施方案中,根据本发明的聚赖氨酸树枝状聚合物是第二代(G2)接枝的聚赖氨酸树枝状聚合物,本文也可互换地称为“G2聚-L-赖氨酸树枝状接枝物”、“G2树枝状聚合物”、“接枝的树枝状聚合物”、“接枝的聚赖氨酸树枝状聚合物”或“接枝的均聚赖氨酸树枝状聚合物”、“赖氨酸树枝状接枝物”或“DGL”。已表明,G2树枝状聚合物比线性聚赖氨酸更有效地抑制痤疮丙酸杆菌增殖和促进抗炎作用。

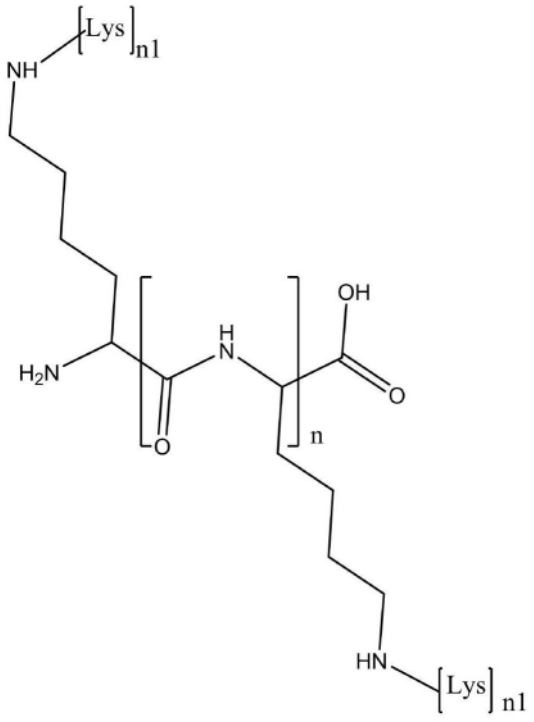
[0108] 在本发明的方法中使用的G2树枝状聚合物可如本文(实施例1)所述或如例如US2008/0206183或Collet等人(2010)Chem.Eur.J.16:2309-16所述来制备。

[0109] 在某些实施方案中,聚赖氨酸树枝状聚合物,例如G2树枝状聚合物是由30至70个赖氨酸残基、或更优选40至60个赖氨酸残基、或最优选48个赖氨酸残基组成的均聚赖氨酸树枝状接枝物。在某些实施方案中,聚赖氨酸树枝状聚合物是G2树枝状聚合物,所述G2树枝状聚合物是包含48个赖氨酸残基、由48个赖氨酸残基组成或基本上由48个赖氨酸残基组成的均聚赖氨酸树枝状接枝物。优选地,如本文所用,赖氨酸残基的数量是指所述树枝状聚合物或树枝状接枝物的平均聚合度(DPn)。

[0110] 在本发明的某些实施方案中,本发明的树枝状聚合物是未结合的。“未结合的(unconjugated)”聚赖氨酸树枝状接枝物或树枝状聚合物是指尚未与另一种材料例如药物或农业材料,通常例如治疗部分共价连接或缔合的聚赖氨酸树枝状接枝物或树枝状聚合物。换句话说,本发明的树枝状聚合物可以不含除赖氨酸之外的任何治疗、药物或美容部分。在一些实施方案中,赖氨酸残基是本发明的聚赖氨酸树枝状聚合物中存在的唯一构建模块。

[0111] 在一些实施方案中,本发明的聚赖氨酸树枝状聚合物是包含线性聚赖氨酸核心的树枝状接枝物,其中所述核心的一个或几个(优选全部)赖氨酸残基的侧链NH_2基团(ε-氨基)被聚赖氨酸部分取代。例如,本发明的聚赖氨酸树枝状接枝物可包含线性聚-L-赖氨酸核心(即α-聚-L-赖氨酸),其中每个赖氨酸残基的ε-NH_2基团被聚-L-赖氨酸部分、优选α-聚-L-赖氨酸取代。线性核心的长度可以为2至10个、例如6至10个赖氨酸残基、例如8个赖氨酸残基,聚-L-赖氨酸取代基的长度可以为2至10个、例如3至8个、例如5个赖氨酸残基。

[0112] 例如,本发明的聚赖氨酸树枝状接枝物可以包含式(I)化合物:

[0113] 

(I)

[0114] 其中n是2至10的整数,例如2、3、4、5、6、7、8或9,优选6、7、8或9,更优选7。

[0115] [Lys]表示赖氨酸残基并且n1表示连接在一起形成聚赖氨酸部分、优选α-聚赖氨酸部分的赖氨酸部分的数量,每个n1是独立地选自2至10的整数,例如2、3、4、5、6、7或8,优选3、4、5、6或7,甚至更优选4、5或6。在一些实施方案中,所有n1是相同的并且是例如5。

[0116] 本发明的树枝状接枝物的平均聚合度(DPn)为42至58,优选46至50,更优选约48。如本文所用,平均聚合度(DPn)表示根据本发明的聚赖氨酸树枝状聚合物中每个树枝状聚合物分子的赖氨酸单体的平均数。

[0117] 在一些或进一步的实施方案中,根据本发明的树枝状接枝物的重均摩尔质量(M_w)为7500至10000,优选8400至8800,例如8600g.mol^{-1}。

[0118] 聚赖氨酸树枝状聚合物,包括本发明的G2树枝状聚合物,是聚阳离子聚合物。虽然本文合成和举例说明的G2树枝状聚合物包括三氟乙酸根(TFA)作为抗衡阴离子,但该阴离子组分可与各种其他抗衡阴离子交换,例如碳酸氢根、磷酸二氢根、氟化物、氯化物、溴化物、碘化物、柠檬酸根或乙酸根。

[0119] 因此,本发明包括聚赖氨酸树枝状聚合物例如G2树枝状聚合物及其盐。适当的抗衡阴离子是乙酸根、三氟乙酸根、氯化物、柠檬酸根、磷酸根、碳酸根及它们的组合,优选乙酸根、氯化物、碳酸根及它们的组合,更优选乙酸根。

[0120] 在某些实施方案中,树枝状聚合物的抗衡阴离子是乙酸根。实际上,申请人表明,在体外,与具有氯化物或碳酸根抗衡阴离子的G2树枝状聚合物相比,具有乙酸根抗衡阴离子的G2树枝状聚合物具有改善的抗炎活性:实际上,在体外真皮成纤维细胞中,具有乙酸根作为抗衡阴离子的G2树枝状聚合物更有效地管理IL1-α刺激后I1-8的产生。

[0121] 为了在乙酸根抗衡阴离子中交换TFA抗衡阴离子,可以使用多种方法。一种方法包括在色谱模式下使用空间排阻支持(G25)和碳酸氢铵洗脱缓冲液(0.1M)。色谱法后,在碳酸

氢盐缓冲液中回收聚合物并在旋转蒸发器中干燥,从而为聚合物提供碳酸氢根抗衡阴离子。然后可通过在pH 6.5下用乙酸中和,使该抗衡阴离子与乙酸根阴离子交换。然后通过冻干干燥产物。作为替代方案,在乙酸铵缓冲液中透析聚合物溶液以交换TFA抗衡阴离子。作为进一步的替代方案,将聚合物施加到预先在乙酸盐中调节的阴离子交换树脂上。交换的性能可通过^{19}F NMR、百分数分析或通过在LC/MS中寻找TFA离子来验证。

[0122] 当用于本发明的方法和用途时,聚赖氨酸树枝状聚合物,例如G2树枝状聚合物,和/或其盐可以作为化妆品组合物、药物组合物或皮肤化妆品组合物中存在的化妆品活性成分提供。

[0123] 例如,化妆品组合物包括但不限于抗痤疮产品、城市护理产品、平滑霜、去角质产品、日常保护产品、净化爽肤水或乳液、净化清洁剂、瑕疵修正霜或棒,遮瑕棒等。在一些实施方案中,聚赖氨酸树枝状聚合物掺入非药用的化妆品或皮肤化妆品组合物中,例如适用于易出现痤疮的皮肤或易出现瑕疵的皮肤。

[0124] 因此,在某些实施方案中,聚赖氨酸树枝状聚合物,例如G2树枝状聚合物是外部或局部施加至皮肤的组合物或制剂的组分。在某些实施方案中,组合物为清洁剂、爽肤水、乳液、溶液、凝胶、乳膏/霜、软膏或泡沫的形式。在这方面,含有聚赖氨酸树枝状聚合物例如G2树枝状聚合物的制剂或组合物适用于或适应于外部或局部应用。

[0125] 包含根据本发明的聚赖氨酸树枝状聚合物例如G2树枝状聚合物的组合物可以是粘性或半粘性流体,或粘性较低的流体,例如可能用于喷雾剂或气雾剂中。它可以采取溶液、悬浮液或乳状液的形式。它可以采取固体形式,例如粉末或颗粒,其可以设计为在使用前添加到液体(例如,水)中。在一些实施方案中,制剂被或可以被施加到载体例如海绵、拭子、刷子、垫、纸巾、布、擦拭物、皮肤贴剂或敷料(其包括绷带、膏药、皮肤粘合剂或设计用于施加至组织表面的其他材料)以促进其施用。

[0126] 根据本发明的组合物可以旨在用于药物(其包括兽医但优选人)用途,和/或用于化妆品、皮肤化妆品或其他非医疗护理目的(例如,清洁皮肤,或改善皮肤的外观、感觉或气味)。

[0127] 根据本发明的组合物可以含有已知用于局部用制剂(topical formulations)的赋形剂和其他添加剂。设计用于外部或局部应用的制剂中的合适赋形剂是本领域技术人员熟知的。所包括的那些将取决于制剂的预期应用模式和部位。在用于局部施加至皮肤的制剂的上下文中,例如可以在Williams的Transdermal and Topical Drug Delivery (Pharmaceutical Press,2003)和其他类似的参考书中找到实例。还参见Date等人((2006) Skin Pharmacol.Physiol.19(1):2-16)的局部给药策略综述,还有Skin Delivery Systems((2006)John J Wille,Ed,Blackwell Publishing。

[0128] 所使用的赋形剂可以适用于在预定施用部位靶向或控制组合物或组合物的组分的释放,例如靶向所需部位和/或递送时间。此类赋形剂可以例如将组合物靶向皮肤区域,例如角质层或毛囊皮脂腺(pilosebaceous follicles),或靶向毛囊。它们可以在特定时间段内延迟或以其他方式控制组合物的释放。

[0129] 当组合物预期用于局部施加至皮肤时,合适的添加剂(也称为赋形剂)的实例包括稀释剂、填充剂、载体、润肤剂、保湿剂、香料、抗氧化剂、防腐剂、稳定剂、胶凝剂和表面活性剂;和/或其他在化妆品或制药领域的制剂中常用的物质。其他可以在Williams的

Transdermal and Topical Drug Delivery(见上文)中找到。然而,对于治疗痤疮,可以优选组合物不含润肤剂。

[0130] 聚赖氨酸树枝状聚合物,例如G2树枝状聚合物,和/或其盐可以单独或一起使用,或者可以与一种或多种另外的活性成分例如抗微生物剂(特别是抗细菌剂)或抗炎剂组合使用。另外的活性成分可与聚赖氨酸树枝状聚合物组合在一种单一组合物中,或分开施用,包括通过不同途径(例如通过口服途径)。

[0131] 在一些实施方案中,所述另外的活性成分和聚赖氨酸树枝状聚合物组合在同一组合物中。

[0132] 例如,所述制剂可以含有一种或多种药剂,所述药剂选自抗痤疮剂、角质层分离剂(keratolytics)如乳酸、粉刺消除剂(comedolytics)、能够使角质形成细胞和/或皮脂腺细胞功能正常化的药剂、抗炎剂如甘草查耳酮A(Licochalcone A)和胀果甘草(Glycyrrhiza Inflata)提取物、抗增殖剂、抗生素、抗雄激素、皮脂抑制剂(sebostatic/sebosuppressive agent)(也称为皮脂调节剂)(例如,柠檬巴毫(Backhousia citriodora)的天然提取物)、止痒剂、免疫调节剂、抗刺激剂或舒缓剂(例如,柳兰(Epilobium angustifolium)的提取物)、促进伤口愈合的药剂、防晒剂、亮肤剂、抗衰老物质,及其混合物。

[0133] 例如,抗痤疮剂包括但不限于维生素A;维A酸类如阿达帕林、维A酸或他扎罗汀;杀细菌剂如过氧化苯甲酰和癸二醇、壬二酸、水杨酸;抗炎剂如氨苯砜或互生叶白千层(茶树)油;抗发红剂;舒缓剂及它们的组合。

[0134] 作为皮脂调节剂的实例,可以举出亚麻木酚素、米粉、葡萄糖酸锌、肌氨酸、锡兰肉桂(Cinnamomum zeylanicum)树皮提取物、鳄梨提取物、澳大利亚柠檬巴毫叶提取物、红车轴草(Trifolium Pratense)(三叶草)花提取物及它们的组合。

[0135] 作为抗发红剂,可以举出皂苷、类黄酮、鲁斯可皂苷元类(ruscogenins)、七叶苷类和含有它们的提取物,例如假叶树属(Ruscus)的提取物,以及某些精油,例如薰衣草或迷迭香精油。

[0136] 作为舒缓剂的实例,可以举出尿囊素、芦荟提取物、金盏花(Calendula officinalis)提取物、桦木(例如白桦(Betula alba))提取物、柳草(柳兰)提取物、塔斯马尼亚胡椒(例如塔斯马尼亚胡椒(Tasmania Lanceolata))提取物、栗子(例如欧洲栗(Castenea sativa))提取物、矢车菊(例如矢车菊(Centaurea cyanus))提取物、积雪草(例如积雪草(Centella asiatica))提取物、野生木贼(例如问荆(Equisetum arvense))提取物、茴香(例如茴香(Foeniculum vulgare))提取物、普通金缕梅(例如北美金缕梅(Hamamelis virginiana))提取物、常春藤(例如洋常春藤(Hedera helix))提取物、玫瑰茄(Habiscus sabdariffa)提取物、百合(例如白花百合(Lilium candidum))提取物、普通锦葵(例如欧锦葵(Malva sylvestris))提取物、香蜂草(例如香蜂花(Melissa officinalis))提取物、黄芩(例如黄芩(Scutellaria baicalensis))提取物、含羞草(例如细花含羞草(Mimosa tenuiflora))提取物、委陵菜(例如洋委陵菜(Potentilla erecta))提取物、来自极端微生物(例如交替单胞菌发酵(Alteromonas ferment))的表多糖提取物、一种或多种低聚糖的提取物、例如亚麻提取物,肽如棕榈酰三肽-8,以及它们的组合。

[0137] 例如,聚赖氨酸树枝状聚合物可以存在于组合物中。所述化妆品组合物可以包含一种或多种赋形剂和任选的一种或多种另外的具有美容或药学作用的活性剂。

[0138] 在一些实施方案中,组合物中存在的另外的活性剂是美容活性成分。

[0139] 表述“美容活性剂(cosmetic active agent)”是指能够对皮肤发挥至少一种美容作用的化合物。术语“美容作用(cosmetic effect)”旨在表示目的在于改变和/或改善皮肤外观或感觉、保护皮肤免受外部攻击(阳光、风、湿气、干燥、化学产品)、或预防和/或纠正与衰老或青春期相关的现象的任何非治疗作用。

[0140] 通常,所述组合物包含:

[0141] -0.1至100ppm的本发明聚赖氨酸树枝状聚合物

[0142] -0%至20%的一种或多种另外的活性剂,和

[0143] -70%至99.9999%的一种或多种赋形剂,

[0144] 百分比以相对于组合物总重量的重量表示。

[0145] 优选地,所述组合物是化妆品或皮肤化妆品组合物。

[0146] 在一些实施方案中,聚赖氨酸树枝状聚合物(例如G2树枝状聚合物)与抗微生物剂和/或抗炎剂协同组合使用,从而允许减少一种或这两种药剂的剂量以实现相似或改善的效果。这将允许使用更小的剂量,因此将降低毒性的潜在发生率并降低昂贵的抗微生物剂的成本。

[0147] 在本文中,另外的抗微生物剂可以选自杀生物剂、消毒剂、防腐剂、抗生素、噬菌体、酶、抗粘附素、免疫球蛋白、抗微生物活性抗氧化剂,及它们的混合物;它可以作为杀细菌剂发挥作用,特别是针对丙酸杆菌。在某些实施方案中,抗微生物剂是抗生素,如青霉素、头孢菌素、碳头孢烯头霉素类、碳青霉烯、单环β-内酰胺(monobactam)、氨基糖苷、糖肽、喹诺酮、四环素、大环内酯或氟喹诺酮。具体抗生素剂的实例包括但不限于青霉素G、甲氧西林、萘夫西林、苯唑西林、氯唑西林、双氯西林、氨苄西林、阿莫西林、替卡西林、羧苄西林、美洛西林、阿洛西林、哌拉西林、亚胺培南、氨曲南、头孢噻吩、头孢唑啉、头孢克洛、头孢孟多甲酸钠、头孢西丁、头孢呋辛、头孢尼西、头孢美唑(Cefinetazole)、头孢替坦、头孢丙烯、氯碳头孢、头孢他美、头孢哌酮、头孢噻肟、头孢唑肟(Ceflizoxime)、头孢曲松、头孢他啶、头孢吡肟、头孢克肟、头孢泊肟、头孢磺啶、氟罗沙星、萘啶酸、诺氟沙星环丙沙星、氧氟沙星、依诺沙星、洛美沙星、西诺沙星、强力霉素、米诺环素、四环素、阿米卡星、庆大霉素、卡那霉素、奈替米星、妥布霉素、链霉素、阿奇霉素、克拉霉素、红霉素、依托红霉素、琥乙红霉素、葡萄庚酸红霉素、乳糖酸红霉素、硬脂酸红霉素、万古霉素、替考拉宁、氯霉素、克林霉素、甲氧苄啶、磺胺甲恶唑、呋喃妥因、利福平、莫匹罗星、甲硝唑、头孢氨苄、罗红霉素、复合阿莫西林克拉维酸(Co-amoxiclavuanate)、哌拉西林和三唑巴坦的组合、以及它们的各种盐、酸、碱和其他衍生物,以及它们的组合。

[0148] 聚赖氨酸树枝状聚合物(例如G2树枝状聚合物)和/或其盐也可以与抗真菌剂组合使用。示例性抗真菌剂包括但不限于盐酸特比萘芬、制霉菌素、两性霉素B、灰黄霉素、酮康唑、硝酸咪康唑、氟胞嘧啶、氟康唑、伊曲康唑、克霉唑、苯甲酸、水杨酸和硫化硒。

[0149] 聚赖氨酸树枝状聚合物(例如G2树枝状聚合物)和/或其盐也可以与抗病毒剂组合使用。示例性抗病毒剂包括但不限于盐酸金刚烷胺、金刚乙胺、阿昔洛韦、泛昔洛韦、膦甲酸、更昔洛韦钠、碘苷、利巴韦林、索立夫定、三氟胸苷(trifluoridine)、伐昔洛韦、阿糖腺苷、去羟肌苷、司他夫定、扎西他滨、齐多夫定、干扰素α和依度尿苷。

[0150] 聚赖氨酸树枝状聚合物(例如G2树枝状聚合物)和/或其盐也可以与抗寄生虫剂组

合使用。示例性抗寄生虫剂包括但不限于除虫菊素(pirethrins)/增效醚(piperonyl butoxide)、扑灭司林、双碘喹啉、甲硝唑、枸橼酸乙胺嗪、哌嗪、噻吩嘧啶(pyrantel pamoate)、甲苯咪唑、噻苯达唑、吡喹酮、阿苯达唑、氯胍、葡糖酸奎尼丁注射液、硫酸奎宁、磷酸氯喹、盐酸甲氟喹、磷酸伯氨喹、阿托伐醌、复方新诺明(co-trimoxazole)(磺胺甲恶唑/甲氧苄啶)和羟乙基磺酸戊双脒。

[0151] 如上所述,聚赖氨酸树枝状聚合物(例如G2树枝状聚合物)和/或其盐可以与其他已知的抗炎剂协同组合使用。抗炎剂包括但不限于皮质类固醇(例如氢化可的松、曲安西龙)、非甾体抗炎药(NSAID)(例如萘丁美酮、吲哚美辛(indomethicin)、萘普生、布洛芬)、抗炎细胞因子(例如IL-4、IL-10、IL-13)、细胞因子拮抗剂(例如IL-1受体拮抗剂、TNF-α单克隆抗体、可溶性TNF受体、血小板因子4)等。也参见,例如,US 6,190,691;US 5,776,892;US 4,816,449;和US RE37,263。

[0152] 用于本发明的方法中的制剂可以掺入以下制剂中,并因此以以下制剂的形式应用:化妆品;皮肤护理制剂(例如皮肤清洁剂、爽肤水或保湿剂);除臭剂或止汗剂;清洁制剂(例如洗面奶);药物(其包括兽医学)制剂;药妆制剂;卫生间产品(例如沐浴或淋浴添加剂或肥皂)。制剂可以是或掺入水洗型皮肤处理产品如皮肤清洁剂,或特别是免洗型皮肤处理产品。

[0153] 如本文所述,聚赖氨酸树枝状聚合物(例如G2树枝状聚合物)和/或其盐表现出抗细菌活性并降低某些痤疮丙酸杆菌菌株对皮肤细胞的粘附。因此,本发明的一个方面是通过向需要治疗的受试者的皮肤施加抗细菌有效量的含有未结合的聚-L-赖氨酸树枝状接枝物和/或其盐的组合物来治疗寻常痤疮的方法。

[0154] 如本文所用,“抗细菌活性物(antibacterial active)”是指能够预防或减少痤疮丙酸杆菌、优选痤疮性痤疮丙酸杆菌菌株的生长和增殖的活性物。

[0155] 如上所述,“痤疮(acne)”或“寻常痤疮(acne vulgaris)”是面部和上躯干的毛囊皮脂腺的多因素疾病,其特征是各种发炎和非发炎病变,如丘疹、脓疱、结节和开放性和闭合性痤疮。因此,其治疗可以包括治疗(其包括预防或减轻)任何这些症状,并且可以相应地解释提及的用作抗痤疮剂。特别地,痤疮的治疗包括治疗(包括预防)与痤疮相关的病变。它还包括抑制可能导致痤疮或其症状或与痤疮或其症状相关的丙酸杆菌活性。在本发明的上下文中,它可以特别是治疗发炎的痤疮病变。

[0156] 痤疮的治疗包括对人或动物、但特别是对人的治疗性和预防性治疗。它可能涉及完全或部分根除该状况、去除或改善相关症状、阻止该状况的后续发展和/或预防后续发生该状况或降低后续发生该状况的风险。如本文所述,它将特别涉及未结合的G2树枝状聚合物和/或其盐的用途。在某些实施方案中,该方法包括治疗与面部皮肤上存在的痤疮丙酸杆菌相关的寻常痤疮。

[0157] 本发明的另一方面涉及通过向需要治疗的受试者的皮肤施加含有未结合的聚-L-赖氨酸树枝状接枝物和/或其盐的组合物来降低皮肤炎症反应的方法。在某些实施方案中,炎症反应包括响应于痤疮丙酸杆菌的IL-8释放或TLR2过表达。可以使用任何常规技术或本文举例说明的那些技术来评估IL-8释放或TLR2过表达的可测量降低。优选地,与未与未结合的聚-L-赖氨酸树枝状接枝物和/或其盐接触的皮肤相比,聚赖氨酸树枝状聚合物(例如未结合的聚-L-赖氨酸树枝状接枝物)和/或其盐提供至少5%、10%、15%、20%、25%、

30％、35％、40％、45％、50％、55％、60％、65％、70％、75％或80％的IL-8蛋白产生和/或TLR2过表达减少。

[0158] 本发明的又一方面是通过向需要治疗的受试者的皮肤施加含有聚赖氨酸树枝状聚合物(例如,未结合的聚-L-赖氨酸树枝状接枝物)和/或其盐的组合物来促进皮肤细胞脱落的方法。脱落是一种与构成皮肤上层的表皮不断再生的事实相关的自然现象。在正常的脱落过程期间,最上面的角化细胞从表皮表面脱离。根据本方法,将聚赖氨酸树枝状聚合物例如未结合的聚-L-赖氨酸树枝状接枝物施加到皮肤表面促进脱落和/或刺激表皮更新过程。

[0159] 将含有聚赖氨酸树枝状聚合物例如未结合的G2树枝状聚合物和/或其盐的组合物“施加(Applying)”、“施加(application)”、“施用(administering)”或“施用(administration)”至受试者的皮肤包括用该组合物进行外部或局部皮肤处理。在某些实施方案中,将聚赖氨酸树枝状聚合物例如G2树枝状聚合物和/或其盐施加至受试者的面部皮肤。

[0160] 需要用含有聚赖氨酸树枝状聚合物例如G2树枝状聚合物和/或其盐的组合物治疗的受试者是指处于G2树枝状聚合物和/或其盐将提供益处例如抗痤疮活性、抗炎活性或角质层分离活性的状况的风险中、易患该状况或具有该状况的任何受试者。在一些实施方案中,本发明的方法特别可用于减少青少年的痤疮问题、减少皮肤炎症和改善成人皮肤的外观或感觉。

[0161] 含有聚赖氨酸树枝状聚合物例如未结合的G2树枝状聚合物和/或其盐的组合物的有效量可以是指提供对一种或多种痤疮性痤疮丙酸杆菌菌株的细菌生长的可测量抑制(无论是完全还是部分);炎症反应例如响应于痤疮丙酸杆菌的IL-8释放或TLR2过表达的可测量减少;和/或可测量的皮肤细胞脱落的量。它还可以是指能够改善或治疗痤疮皮肤或易出现痤疮的皮肤中的瑕疵的量。

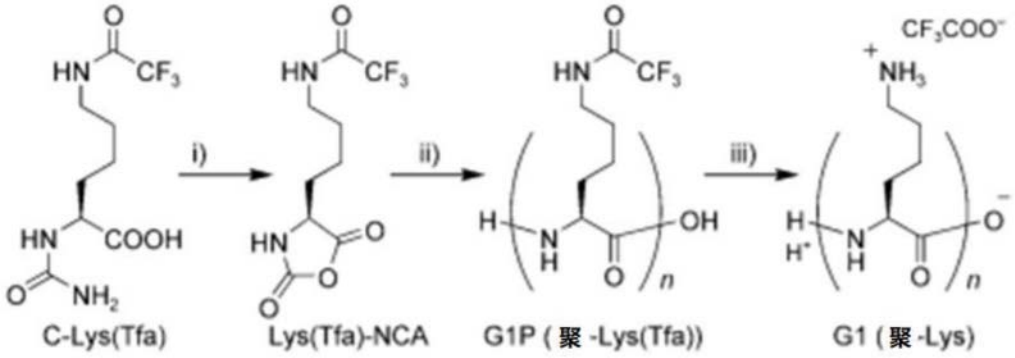
[0162] 含有聚赖氨酸树枝状聚合物例如未结合的G2树枝状聚合物和/或其盐的组合物的有效量包括约0.01ppm至约100ppm、或更优选约0.1ppm至50ppm、或最优选约1ppm至10ppm的聚赖氨酸树枝状聚合物,例如未结合的G2树枝状聚合物和/或其盐。

[0163] 在某些方面,本发明的组合物的用途是用于非治疗目的。根据该方面,组合物用作抗痤疮剂/抗炎剂或特别是护肤剂,用于非治疗目的,例如用于美容目的,例如改善皮肤、特别是面部皮肤的外观或感觉。

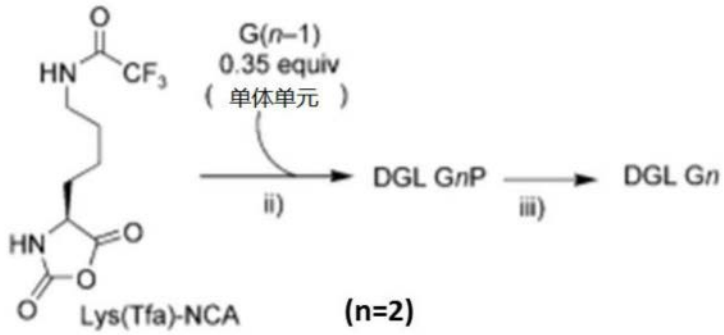
[0164] 通过以下非限制性实施例更详细地描述本发明。

[0165] 实施例1:DGL G2的合成

[0166] 第一代聚(L-赖氨酸)的合成通过三步顺序(方案1)进行。



[0167]



[0168] i)NO,O_2,MeCN,0℃,1h;ii)$NaHCO_3$(0.2N),0℃,15h;

[0169] iii)NH_3,H_2O/MeOH,40℃,15h。

[0170] 方案1

[0171] Ne-三氟乙酰基-L-赖氨酸的N-氨基甲酰化提供C-Lys(Tfa)。NO介导的C-Lys(Tfa)在乙腈中的亚硝化得到单体Lys(Tfa)-NCA,其然后在碳酸氢钠水溶液(pH 6.5)中反应得到Ne保护的低聚(L-赖氨酸)G1P。亚硝化和缩聚步骤都在一锅中进行,没有分离NCA中间体,所得聚合物G1P从反应介质中自发沉淀。通过过滤分离G1P聚合物,通过用氨的甲醇/水溶液对G1P进行碱处理使ε-氨基脱保护。脱保护得到低聚(L-赖氨酸)G1,DPn为约8,从C-Lys(Tfa)开始总产率为50-60%。

[0172] 随后通过以多代顺序实施上述反应顺序(方案1)来制备树枝状材料。在聚(L-赖氨酸)G1(30%w/w;单体单元为0.36当量)的存在下,使Lys(Tfa)-NCA粗品在$NaHCO_3$水溶液中反应后,聚合物G2P从反应介质中自发沉淀,其在分离后,进行碱性Ne脱保护,得到聚(L-赖氨酸)G2,DPn为约48,从C-Lys(Tfa)开始总产率为36%。随后,进行离子交换以将三氟乙酸盐转化为乙酸盐。

[0173] 实施例2:G2树枝状聚合物对痤疮丙酸杆菌的抑制

[0174] 评估了G2树枝状聚合物抑制培养物中痤疮丙酸杆菌生长的有效性。G2树枝状聚合物以10^{-2}M至10^{-5}M范围内的终浓度使用。使用痤疮丙酸杆菌菌株IP 53117T(参见FR2844715A1)(一种已知导致痤疮的菌株)进行实验。该菌株属于系统发育型1A1的核糖体型1(RT1),因此是痤疮菌株。

[0175] 将细菌(10^8CFU/ml)接种到含有一系列G2树枝状聚合物浓度的96孔板中。在37℃下孵育24至48小时后,MIC(最小抑制浓度)通过视觉方法定义为没有可见生长的最低浓度。基于两个独立实验的结果,该分析表明G2树枝状聚合物对痤疮丙酸杆菌菌株IP 53117T的MIC为1.6-2.3X 10^{-5}M(10-20ppm)。因此,G2树枝状聚合物显著抑制了针对测试的痤疮性痤

疮丙酸杆菌菌株的生长,并因此在高剂量(20ppm)下表现出杀细菌作用。

[0176] 实施例3:G2树枝状聚合物对角质形成细胞培养物中痤疮丙酸杆菌粘附的作用

[0177] 寻常痤疮的初始阶段是细菌在皮肤表面的建立,即定植。定植取决于细菌粘附。因此,确定了G2树枝状聚合物是否可以抑制痤疮性痤疮丙酸杆菌菌株对培养物中的角质形成细胞的粘附。

[0178] 从人上皮细胞系NCTC 2544分离角质形成细胞(Neufahrt等人(1978)Arch.Dermaol.Res.256(3):255-60)。用含有10%胎牛血清、1%抗生素(青霉素/链霉素)和1%L-谷氨酰胺的Dulbecco改良Eagle培养基(DMEM)在37℃、5%CO_2和95%湿度下维持培养。

[0179] 为了监测细菌粘附,IP 53117T细菌菌株(属于痤疮系统发育型IA1)的腺嘌呤用氚标记,并通过计算放射性来确定细菌对角质形成细胞表面的粘附。

[0180] 方法1。将标记的细菌($2x10^8$个微生物/mL)与不同量的G2树枝状聚合物(终浓度为10^{-5}M至$6.25x\ 10^{-6}$M)组合并沉积在单层角质形成细胞的表面上。孵育2小时(37℃,5%CO_2)后,用磷酸盐缓冲盐水(PBS)洗涤细胞以去除未粘附的细菌。

[0181] 方法2。角质形成细胞用G2树枝状聚合物预处理24小时。然后将标记的细菌($2x10^8$个微生物/mL)加入细胞单层2小时,而无需事先去除G2树枝状聚合物。

[0182] 该分析的结果表明,2小时后,与不存在G2树枝状聚合物情况下的痤疮丙酸杆菌的粘附相比,树枝状聚合物在10^{-5}M、$5X\ 10^{-6}$M和$2.5X\ 10^{-6}$M下对痤疮丙酸杆菌在角质形成细胞表面上的粘附分别抑制了50%、40%和29%。预处理24小时后,与不存在G2树枝状聚合物情况下的痤疮丙酸杆菌的粘附相比,G2树枝状聚合物在10^{-5}M、$5X\ 10^{-6}$M和$2.5X\ 10^{-6}$M下对痤疮丙酸杆菌在角质形成细胞表面上的粘附分别抑制了50%、51%和35%。基于这两种测定(伴随或预处理)的结果,表明G2树枝状聚合物显示出强的抗粘附活性。因此,G2树枝状聚合物可用于阻断寻常痤疮的初始阶段,即通过防止痤疮菌株的过度细菌粘附或定植。

[0183] 实施例4:G2树枝状聚合物对正常人真皮成纤维细胞的炎症的作用

[0184] 有证据表明,痤疮丙酸杆菌参与引发炎症反应。特别是,已表明痤疮丙酸杆菌对Toll样受体2(TLR2)的刺激导致白细胞介素8和12(IL-8和IL-12)浓度增加(Kim等人(2002)J.Immunol.169(3):1535-41)。因此,评估了G2树枝状聚合物对正常人真皮成纤维细胞(NHDF)的炎症的作用。将NHDF从人真皮中分离出来,并在37℃、5%CO_2和95%湿度下保持在含有10%胎牛血清、1%抗生素(青霉素/链霉素)和1%L-谷氨酰胺的DMEM中。

[0185] IL-8通过募集中性粒细胞和其他免疫细胞侵入受伤或发炎的组织来介导皮肤的炎症反应。在用促炎细胞因子IL-1α激活后,培养的人真皮成纤维细胞中可诱导IL-8分泌(Larsen等人(1989)Immunology 68(1):31-6)。因此,在存在或不存在G2树枝状聚合物(10^{-9}M、10^{-8}M、10^{-7}M或10^{-6}M)或作为阳性抗炎对照的氢化可的松(0.05μg/mL)的情况下,用IL1-α(0.1ng/mL)处理未汇合的NHDF细胞。通过酶联免疫吸附测定法(ELISA)测定IL-8从成纤维细胞的释放。

[0186] 该分析的结果(图1)表明氢化可的松使IL-8的产生减少了83%。在相同的实验条件下,G2树枝状聚合物使IL1-α-诱导的IL-8的产生减少了66至81%。因此,G2树枝状聚合物能减弱已知与痤疮丙酸杆菌定植相关的人真皮成纤维细胞中的炎症级联反应。

[0187] 实施例5:G2树枝状聚合物在人皮肤外植体中的抗痤疮和角质层分离活性

[0188] 为了证明G2树枝状聚合物的抗痤疮和角质层分离活性,使人皮肤外植体暴露于冻干的痤疮丙酸杆菌(痤疮丙酸杆菌菌株IP 53117T-RT1-系统发育型IA1)以体外模拟体内痤疮。

[0189] 皮肤处理。从经历整形外科的患者(白种人女性,26岁)获得了15个人皮肤样本。皮肤外植体保持培养8天。在第0、1、4和6天时用G2树枝状聚合物(2和5ppm)处理1小时,同时施加冻干的痤疮丙酸杆菌(30μL)(图2)。在第8天,将外植体固定并包埋在石蜡中。将5μm厚的切片用Masson三色染色或抗TLR2抗体染色。

[0190] 角质层分离作用的评价。分析了外植体的一般形态,特别是角质层。图像是用配备有由采集和存档软件Leica IM1000驱动的数码相机(tri-CCD)的Leica Orthoplan显微镜拍摄的。

[0191] TLR2的免疫染色。已知TLR2介导皮肤对痤疮的炎症反应(Kim等人(2002)J.Immunol.169(3):1535-41;McInturff&Kim(2005)Semin.Cutan.Med.Surg.24(2):73-8)。因此,用抗TLR2(克隆TL2.1;Santa Cruz)评估冷冻切片中的TLR2蛋白。将切片与1:25稀释的抗TLR2抗体在4℃下一起孵育过夜,随后用生物素/链霉亲和素-FITC偶联物检测抗体结合。细胞核用碘化丙啶染色。

[0192] IL1-α细胞因子的量化。使用ELISA测定试剂盒(Cayman,Ann Arbor,MI)确定培养基中IL1-α的浓度。使用酶标仪Tecan Infinite M200 Pro结合Magellan软件测量吸光度。

[0193] 结果。局部施加2ppm的G2树枝状聚合物导致角质层上层的适度分离,下层保持更多的分层。相比之下,施加5ppm的G2树枝状聚合物诱导更低的脱离。鉴于这种角质层分离活性,G2树枝状聚合物可用于促进皮肤脱屑。

[0194] 关于TLR2表达,以2ppm和5ppm局部施加G2树枝状聚合物导致完全抑制痤疮丙酸杆菌诱导的TLR2过表达。

[0195] 为了评估炎症反应,对IL1-α的产生进行了量化(图3)。在第1天(D1),与对照条件(即,未经处理的外植体)相比,痤疮丙酸杆菌不诱导IL1-α产生的显著增加。进一步地,与用痤疮丙酸杆菌处理相比,在第1天,2ppm和5ppm的G2树枝状聚合物分别使IL1-α产生显著降低了49%和42%。在存活4天后(D4),IL1-α的释放在对照条件下显著降低了53%。此外,与用痤疮丙酸杆菌处理相比,2ppm和5ppm的G2树枝状聚合物在第4天提供了IL1-α产生的减少(分别减少了28%和27%)。因此,G2树枝状聚合物减少痤疮丙酸杆菌的生长,减弱免疫和炎症级联反应以获得最佳皮肤保护,并提供角质层分离作用。

[0196] 实施例6:G2树枝状聚合物选择性地增加属于痤疮丙酸杆菌系统发育型IA1的痤疮丙酸杆菌菌株的膜流动性。

[0197] 测试了G2树枝状聚合物对痤疮丙酸杆菌的三种细菌菌株的膜流动性的影响。两种痤疮丙酸杆菌测试菌株是属于系统发育型IA1(RT4和RT5)的“痤疮”菌株,而最后一种是属于系统发育型II的非痤疮菌株(RT6)。

[0198] 刮下RT4、RT5和RT6(痤疮丙酸杆菌菌株)的几个菌落并放入强化的梭状芽胞杆菌培养基(RMC培养基)中。将管涡旋几秒钟并均质化,然后用RMC完全填充以产生厌氧状态。然后将管在37℃下孵育至少48小时。

[0199] 收集细菌培养物并在580nm下获取OD。接种后,将细菌送入微孔板并用G2树枝状聚合物处理或不处理。在厌氧室中2小时后,将板转移到酶标仪中72小时(OD 580nm,每30分钟

测量一次)。

[0200] 然后,分析每种痤疮丙酸杆菌菌株的细菌产生时间。在以下浓度下测试G2树枝状聚合物:6.10^{-6}M和6.10^{-7}M。

[0201] -结果

[0202] 结果在图4中示出。孵育72小时后,与对照相比,G2树枝状聚合物(6.10^{-6}M)显著降低了痤疮菌株RT4和RT5的膜刚度。值得注意的是,6.10^{-6}M的G2树枝状聚合物对RT6菌株没有表现出任何显著的作用。换句话说,与非痤疮菌株(RT6)相比,G2树枝状聚合物对痤疮菌株RT4和RT5的膜流动性表现出特异性作用。

[0203] 预期膜流动性的这种增加使痤疮系统发育型IA1的痤疮菌株的细菌膜不稳定,限制它们的生长,而维持甚至促进系统发育型II的非痤疮系统发育型菌株。

[0204] 实施例7:G2树枝状聚合物对痤疮菌株的生物膜形成的作用

[0205] -方案

[0206] 细菌菌株和细菌培养

[0207] 痤疮丙酸杆菌痤疮菌株核糖体型5(RT5)HL043PA2/HM-514和痤疮丙酸杆菌非痤疮菌株核糖体型6(RT6)HL110PA3/HM-554获自BEI Resources美国典型培养物保藏中心(美国弗吉尼亚州)。这两种菌株分别属于系统发育型IA1和II(McDowell,2017)。细菌,储存在-80℃,RT6菌株最初铺板在脑心浸液(BHI,BD)琼脂平板上,RT5菌株最初铺板在增强型梭菌培养基(RCM)琼脂平板上,并使用BD GasPackTM系统在37℃、缺氧条件下孵育。将菌落转移到含有12ml RCM的15mL无菌锥形管(Falcon)中,涡旋匀浆后,将Falcon管完全充满RCM培养基并在37℃下孵育72小时。

[0208] 载玻片上的生物膜形成

[0209] 为了评价暴露于G2树枝状聚合物期间痤疮丙酸杆菌的生物膜形成,使用了具有平玻璃底部的24孔培养板(Sensoplate,Greiner bio-one,德国)。将72小时的细菌培养物(见上段)在室温下以7,500g离心10分钟。将细菌沉淀重新悬浮在5ml无菌生理水(SPW)中。最后,将300μl细菌接种物(OD_{580nm}=0.8)放入24孔培养板的八个中心孔中。将平板在厌氧条件下孵育3小时以促进细菌的初次粘附。在这一孵育期后,小心地除去每个孔中的生理水,并加入1ml补充了或未补充G2-树枝状聚合物的细菌培养基(RCM)。将平板在厌氧Whitley A85工作站中在37℃下孵育72小时。

[0210] 72小时后(生物膜形成),小心地去除每个孔中的RCM培养基以去除浮游细胞。接下来,将300μl SYTO 9绿色荧光核酸染色剂(Thermofisher)加入每个孔中并在黑暗条件下孵育20分钟。在此之后,去除SYTO 9染色剂并在每个孔中加入300μl SPW。立即使用Zeiss LSM710(Carl Zeiss Microscopy,Oberkochen,德国)使用63x油浸物镜进行CLSM观察。在488nm下激发Syto 9,并在500至550nm范围内检测荧光发射。在整个生物膜深度每微米拍摄图像。使用Zen 2.1SP1软件(Carl Zeiss Microscopy,Oberkochen,德国)进行三维(3D)图像的可视化和处理。使用COMSTAT软件(http://www.imageanalysis.dk/)进行图像堆栈的定量分析(Heydorn等人,2000)。测定最大和平均生物膜厚度(μm)及它们的生物量体积($\mu m^3/\mu m^2$)。每项研究重复最少3次。

[0211] -结果

[0212] 表明G2树枝状聚合物减少了RT5(-48%)和RT6(-32%)菌株的生物膜厚度。值得注

意的是,与非痤疮菌株RT6相比,生物膜厚度的减少对于痤疮菌株RT5显著更重要。此外,如图6所示,G2树枝状聚合物显著降低了RT5(-50%)生物膜中的生物量密度,而对RT6生物膜中的生物量密度没有作用。

[0213] 总之,聚赖氨酸树枝状聚合物有望通过减少生物膜的厚度减少由痤疮丙酸杆菌生物膜(无论是什么菌株)引发的炎症反应,同时通过使痤疮菌株的生物膜不稳定而对痤疮菌株发挥选择性和特异性抑制作用。对于非痤疮菌株RT6,未观察到这种不稳定作用,因为生物量密度保持不变。

[0214] 值得注意的是,这样的结果与实施例6一致,实施例6表明聚赖氨酸树枝状聚合物增加了痤疮RT5菌株的膜流动性,而未增加非痤疮RT6菌株的膜流动性。

[0215] 实施例8:临床研究

[0216] 对20位面部上皮肤油腻且容易出现痤疮的白种人受试者(50%的受试者在14至25岁之间,50%的受试者在26至40岁之间)在半面部上每天两次施加含有2ppm G2树枝状聚合物的乳膏(测试乳膏)或安慰剂乳膏,持续28天。测试制剂(G2树枝状聚合物制剂)如下所示:

[0217]

商业名称	INCI 名称	%
去离子水	水	88.00
Dermofeel PA-3	植酸钠(和)水(和)醇	0.10
Ecogel	溶血卵磷脂(和)小核菌胶(和)黄原胶(和)支链淀粉	2.00
SCB 荷荷巴油	霍霍巴(Simmondsia Chinensis)籽油	3.00
Dermofeel toco 70 non gmo	生育酚(和)向日葵(Helianthus Annuus)(向日葵)籽油	0.10
Lipex shea W	牛油树脂鲸蜡醇酯类	3.00
Saboderm TTC	辛酸/癸酸甘油三酯	3.00
Dekaben C4	苯氧乙醇(和)对羟基苯甲酸甲酯(和)对羟基苯甲酸乙酯(和)对羟基苯甲酸丁酯(和)对羟基苯甲酸丙酯	0.80
G2 树枝状聚合物		0.0002

[0218] G2树枝状聚合物通过减少痤疮病变和调节皮脂分泌率显著改善痤疮皮肤的外观。

[0219] 安慰剂制剂与测试制剂相似,不同之处在于G2树枝状聚合物被水代替。使用28天后,与施加前(D0)面部上病变数量进行比较,评估产生粉刺的潜力和抗瑕疵效果:

[0220] -临床检查:在使用28天后,与施加前(D0)面部上的病变数量进行比较,评估测试乳膏与安慰剂的产生粉刺的潜力和抗瑕疵效果。在D0和D28天,皮肤科医生检查皮肤并对每个入选受试者每个半面部上的整体炎症性病变以及丘疹和脓疱进行计数。皮肤科医生还确定了每位患者每个半面部上的整体保留性病变和黑头的数量。结果示于图5A、5B和5C。

[0221] -皮脂水平测量:在第28天,使用COURAGE和KHAZAKA SM 810PC Sebumeter®定量评价分泌到皮肤表面的皮脂的量。结果示于图5D。

[0222] 结果:

[0223] 如图5A-5C所示,与安慰剂乳膏相比,包含G2树枝状聚合物的测试乳膏在治疗28天后显著减少了黑头、保留性病变和炎症性病变的数量。而且,与安慰剂乳膏相比,测试乳膏还显著降低了痤疮皮肤的皮脂分泌率(图5D)。所有这些数据一起表明G2树枝状聚合物是管理痤疮病症的有效药剂。

[0224] *G2树枝状聚合物改善痤疮皮肤的微生物群

[0225] 治疗28天后,对每个入选志愿者的每个半面部进行皮肤取样(拭子),以便通过宏基因组分析量化痤疮丙酸杆菌菌株,并确定测试乳膏相比于安慰剂乳膏对痤疮丙酸杆菌多样性的影响。

[0226] 这项宏基因组学研究的原理是扩增一个区域的痤疮皮肤杆菌并对扩增子进行测序。将扩增子序列与SLST参考数据库(http://medbac.dk/slst/pacnes)进行比较,SLST参考数据库将扩增子序列与SLST类型和进化枝以及系统发育型连接起来。该方法基于Scholtz等人的发表物(Scholz,2014,supra)的改良方法。计算每个样品的SLST类型和进化枝和系统发育型的丰度和多样性,并进行比较以评价用活性物配方治疗的志愿者和用安慰剂配方治疗的志愿者组成的组之间的治疗效果。

[0227] 方案

[0228] 将拭子冷冻并储存在-80℃直至DNA提取。使用Qiagen DNeasy PowerSoil Kit(Cat#12888)进行DNA的提取和纯化。简而言之,通过机械(珠碰撞)和化学(洗涤剂)处理的组合来裂解细胞。然后在二氧化硅膜上纯化提取的DNA。

[0229] 最初的痤疮丙酸杆菌SLST方法(Scholz,2014,同上),扩增了612个碱基对的区域,该区域太大而不能使用Illumina技术进行测序。设计了扩增一区域或497个碱基对的新引物,正向引物位于原始下游74个核苷酸处,反向位于上游26个核苷酸处。。该修饰将不允许区分SLST类型A1和A6或SLST类型E3和E7。在这两种情况下,这些变体都属于相同的进化枝和系统发育型。使用双端(paired-end)技术在Illumina Miseq上进行DNA测序。使用QIIME2套件(https://qiime2.org/)进行所有序列处理。质量过滤后,通过重叠合并读数对,聚类和嵌合序列被去除。使用99%同源性阈值将SLST类型分配给针对痤疮皮肤杆菌SLST参考数据库(http://medbac.dk/slst/pacnes)的序列。

[0230] 数据分析。

[0231] 输入数据

[0232] 使用总和缩放(TSS)程序对原始数据进行标准化,即对于给定的样品,每个SLST丰度除以所有分类群丰度的总和。

[0233] 在进行组间统计比较之前,通过去除仅在一个样品中观察到的SLST类型来进一步过滤丰度数据。

[0234] 稀疏

[0235] 使用Past 3.20软件(https://palaeo-electronica.org/2001_1/past/issue1_01.htm)绘制稀疏曲线,f(序列数)=SLST数。这些曲线允许以图形方式评价测序深度是否足够(当曲线达到平台时)。

[0236] 阿尔法(α)-多样性。

[0237] 使用Past 3.20软件计算香农和辛普森多样性指数。这两个α多样性度量用于表征

每个样品的分类多样性:香农熵样多样性和辛普森(1-D)多样性。这两个指数值都取决于丰富度(不同分类群的数量)和种群的均匀度,辛普森指数受低丰度分类群的影响较小。在这两种情况下,指数都随着多样性而增加。SLST的数量(丰富度)被提出,它也可以被认为是一个多样性度量,具有对高丰度和低丰度SLST给予相同权重的偏差。

[0238] 在所有情况下,使用SLST类型标准化的丰度数据进行计算。

[0239] 丰度比较。

[0240] 使用参数配对Student T检验和非参数Wilcoxon检验和符号检验比较每个水平的菌株类型丰度。使用SLST类型标准化和过滤的丰度数据进行计算。

[0241] 结果

[0242] 这项研究导致在测试样品中鉴定出32种SLST类型,所有类型都与文献中描述的系统发育型有关。

[0243] 系统发育型IA1是最具代表性的一种,其中SLST A1型是主要的,其次是系统发育型II、IB、IA2、IC和III。这种重新分配对于用测试乳膏或安慰剂乳膏处理的样品是相同的。系统发育型重新分配根据个体(年龄、性别)以及采样区域而不同。与面部样品相比,对于大多数背部样品,系统发育型IA1更丰富。我们的发现与Dagnelie等人的研究(Dagnelie,2018,supra)一致,Dagnelie等人进一步表明,系统发育型IA1在痤疮皮肤中比在健康皮肤中更丰富,而系统发育型II在痤疮皮肤上的丰度低于健康皮肤。

[0244] 如图5E和5F所示,在治疗28天后,与安慰剂乳膏相比,用测试乳膏治疗增加了菌株多样性。我们进一步注意到,与安慰剂乳膏相比,尤其是在男性受试者和至少23岁的受试者中,用测试组合物的治疗导致痤疮IA1系统发育型丰度的降低和非痤疮系统发育型II的增加。G2树枝状聚合物因此通过限制痤疮菌株同时促进非痤疮菌株对痤疮皮肤中的痤疮丙酸杆菌种群发挥有益作用。换句话说,G2树枝状聚合物可用于重新平衡痤疮皮肤和易出现痤疮的皮肤中的痤疮丙酸杆菌种群。

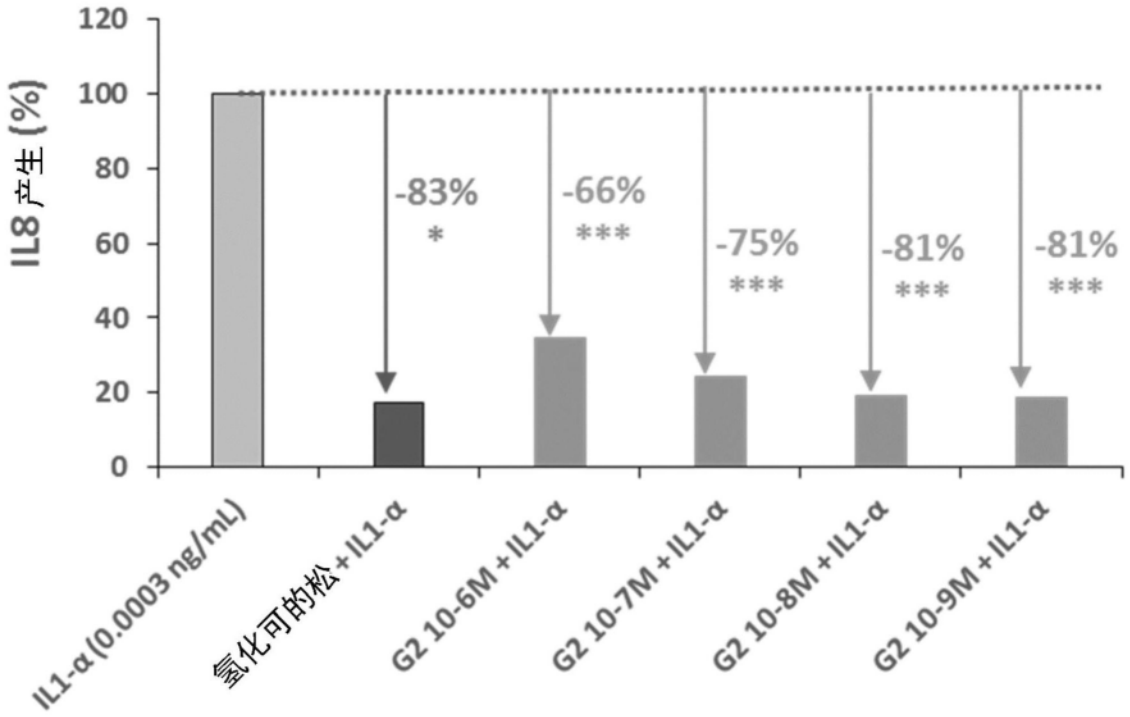

IL8 产生 (%)
120
100
80
60
40
20
0
-83%
*
-66%
***
-75%
***
-81%
***
-81%
***
IL1-α (0.0003 ng/mL)
氢化可的松 + IL1-α
G2 10-6M + IL1-α
G2 10-7M + IL1-α
G2 10-8M + IL1-α
G2 10-9M + IL1-α

图1

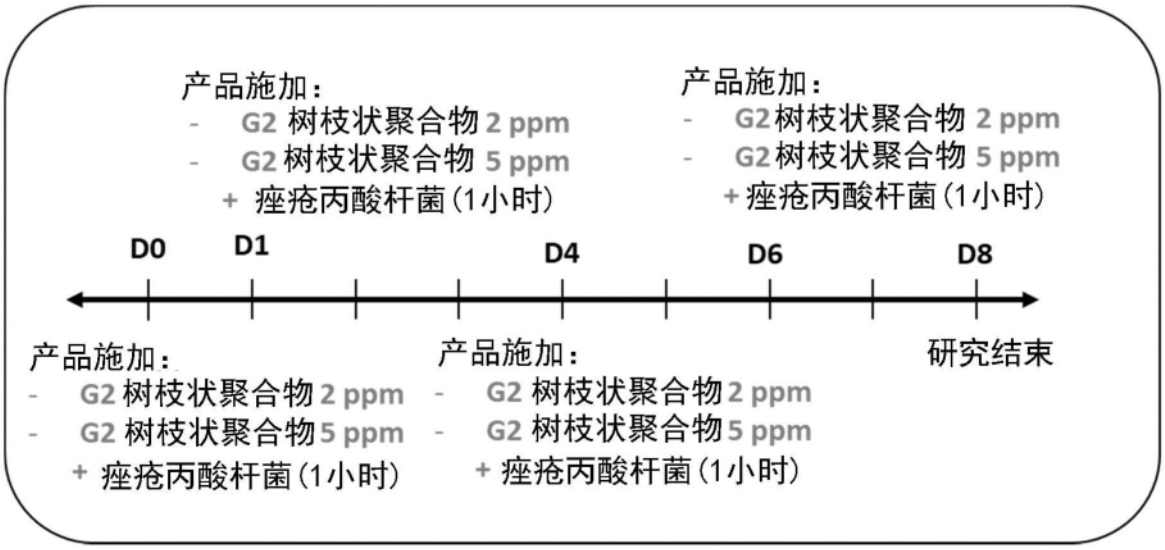

产品施加：
- G2 树枝状聚合物 2 ppm
- G2 树枝状聚合物 5 ppm
+ 痤疮丙酸杆菌 (1小时)
产品施加：
- G2 树枝状聚合物 2 ppm
- G2 树枝状聚合物 5 ppm
+ 痤疮丙酸杆菌 (1小时)
D0
D1
D4
D6
D8
产品施加：
- G2 树枝状聚合物 2 ppm
- G2 树枝状聚合物 5 ppm
+ 痤疮丙酸杆菌 (1小时)
产品施加：
- G2 树枝状聚合物 2 ppm
- G2 树枝状聚合物 5 ppm
+ 痤疮丙酸杆菌 (1小时)
研究结束

图2

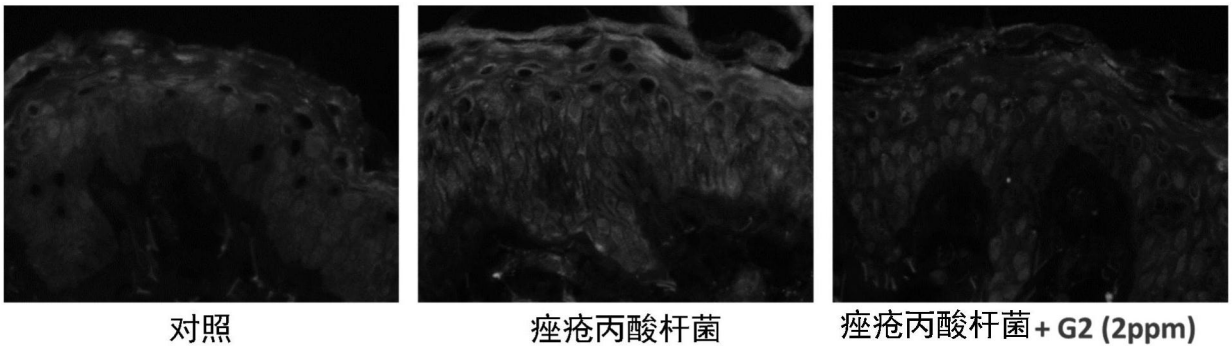

对照
痤疮丙酸杆菌
痤疮丙酸杆菌+G2 (2ppm)

图3

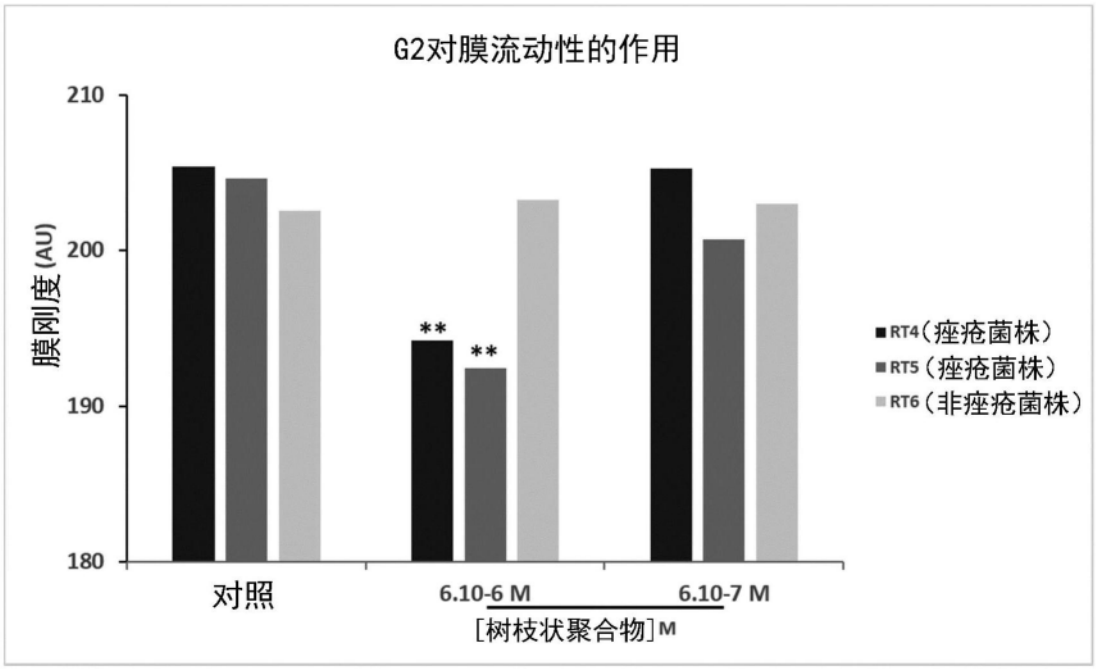

G2对膜流动性的作用
膜刚度(AU)
210
200
190
180
**
**
对照
6.10-6 M
6.10-7 M
[树枝状聚合物]M
RT4(痤疮菌株)
RT5(痤疮菌株)
RT6(非痤疮菌株)

图4

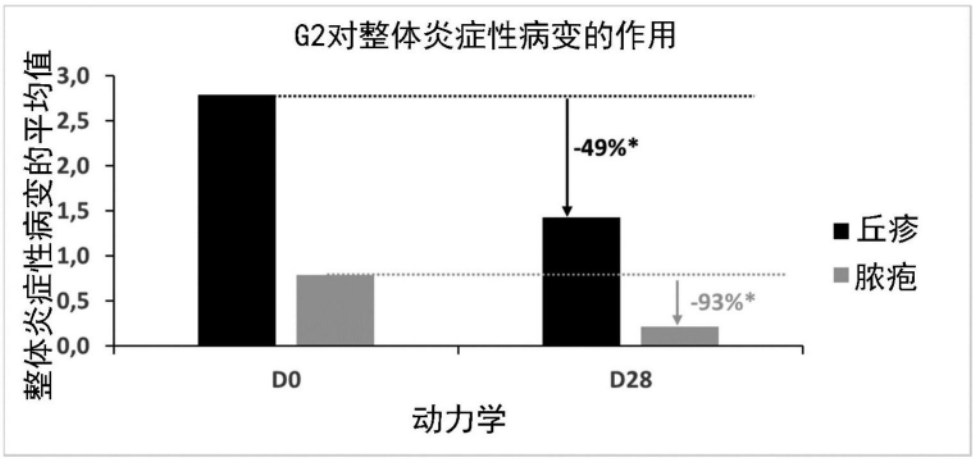

G2对整体炎症性病变的作用
整体炎症性病变的平均值
3,0
2,5
2,0
1,5
1,0
0,5
0,0
-49%*
-93%*
丘疹
脓疱
D0
D28
动力学

图5A

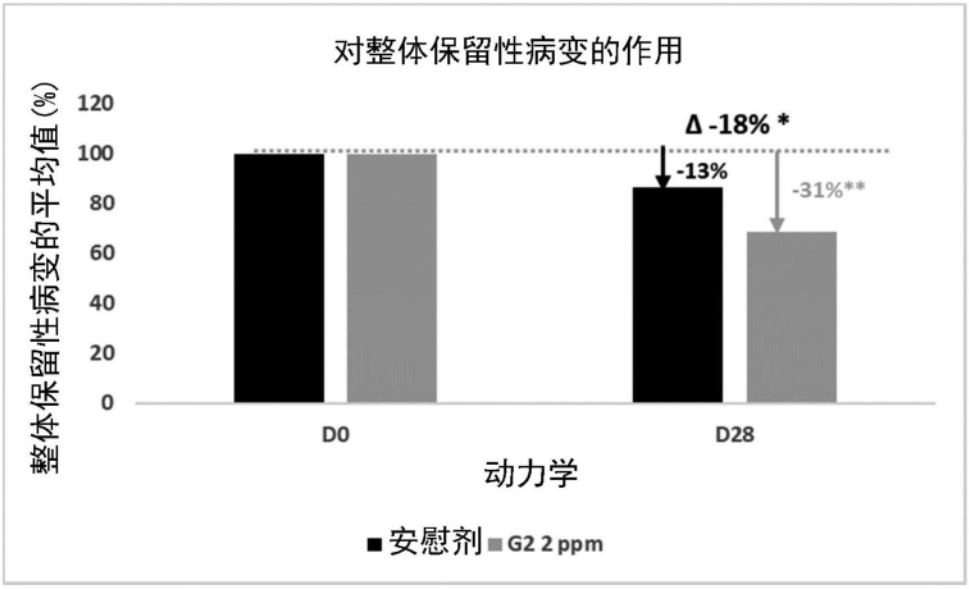

对整体保留性病变的作用
整体保留性病变的平均值(%)
120
100
80
60
40
20
0
Δ -18% *
-13%
-31%**
D0
D28
动力学
安慰剂
G2 2 ppm

图5B

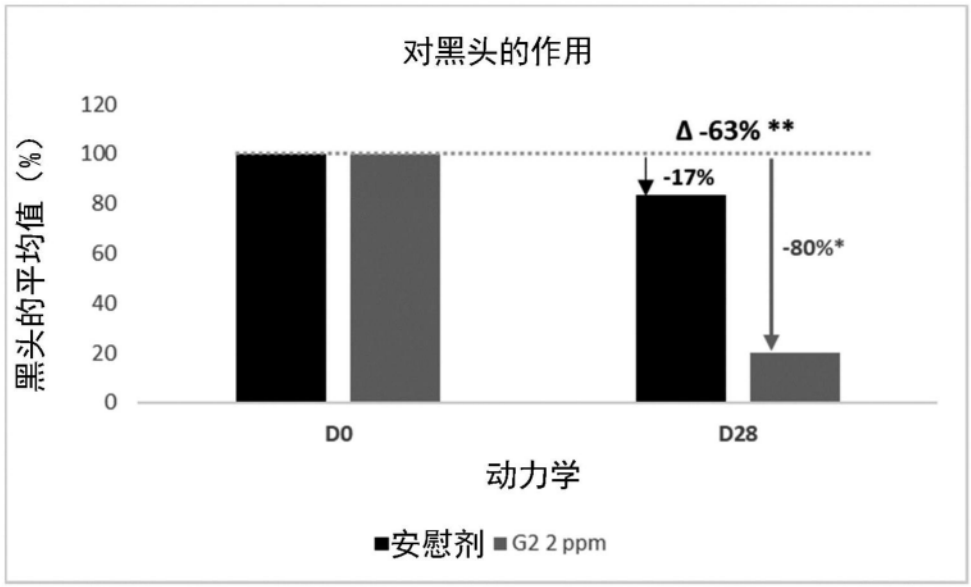

对黑头的作用
黑头的平均值（%）
120
100
80
60
40
20
0
Δ -63% **
-17%
-80%*
D0
D28
动力学
■安慰剂 ■G2 2 ppm

图5C

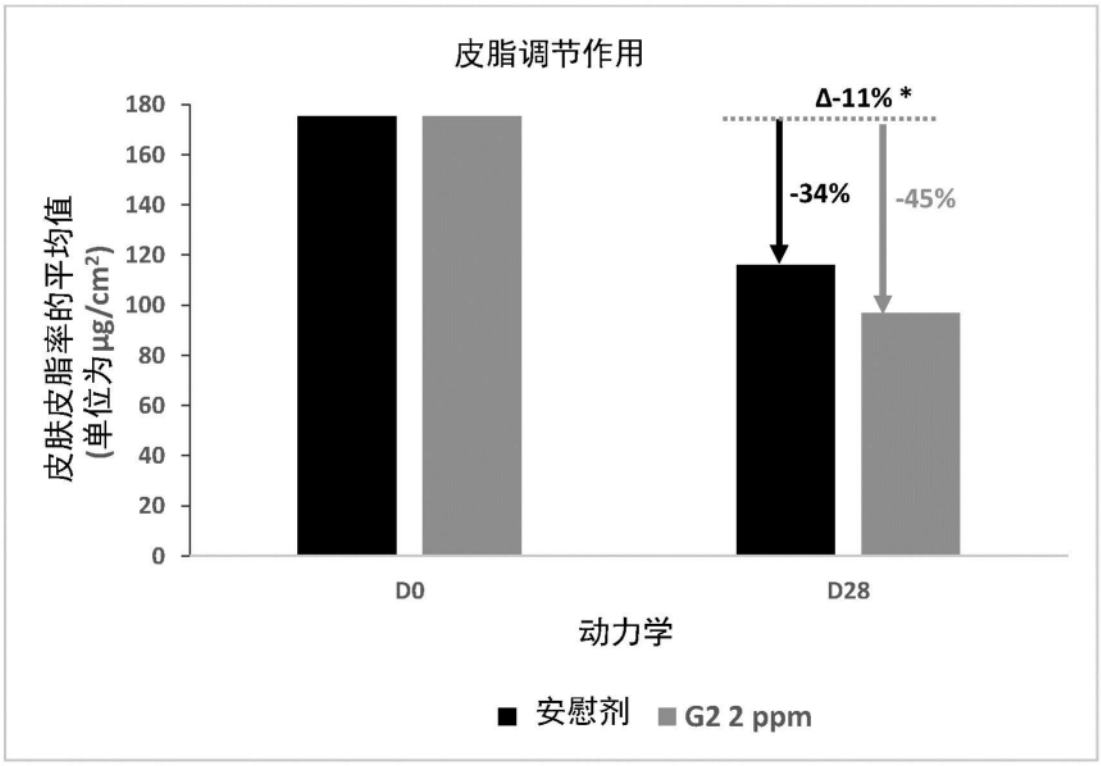

皮脂调节作用
皮肤皮脂率的平均值
(单位为μg/cm²)
180
160
140
120
100
80
60
40
20
0
Δ-11% *
-34%
-45%
D0
D28
动力学
■ 安慰剂 ■ G2 2 ppm

图5D

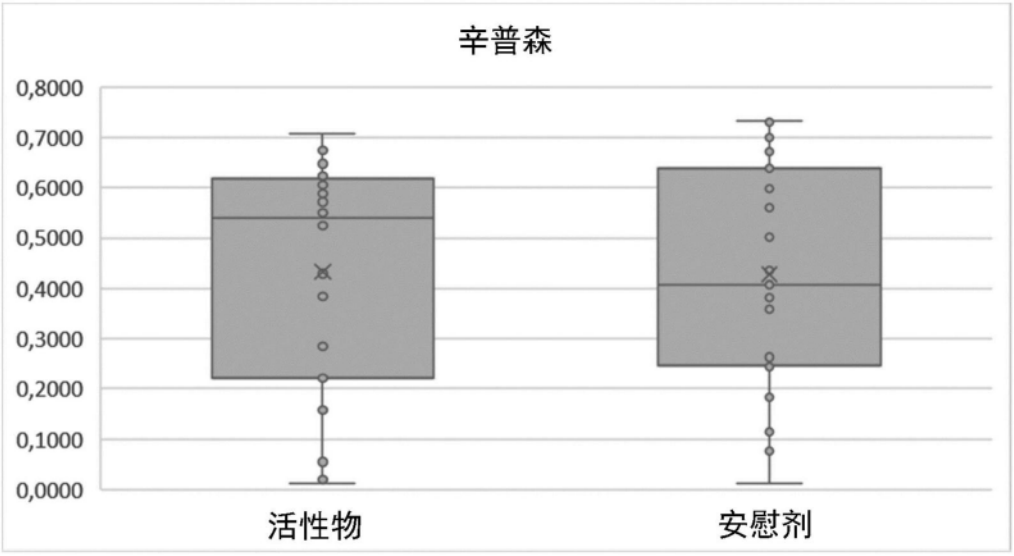

辛普森
0,8000
0,7000
0,6000
0,5000
0,4000
0,3000
0,2000
0,1000
0,0000
活性物
安慰剂

图5E

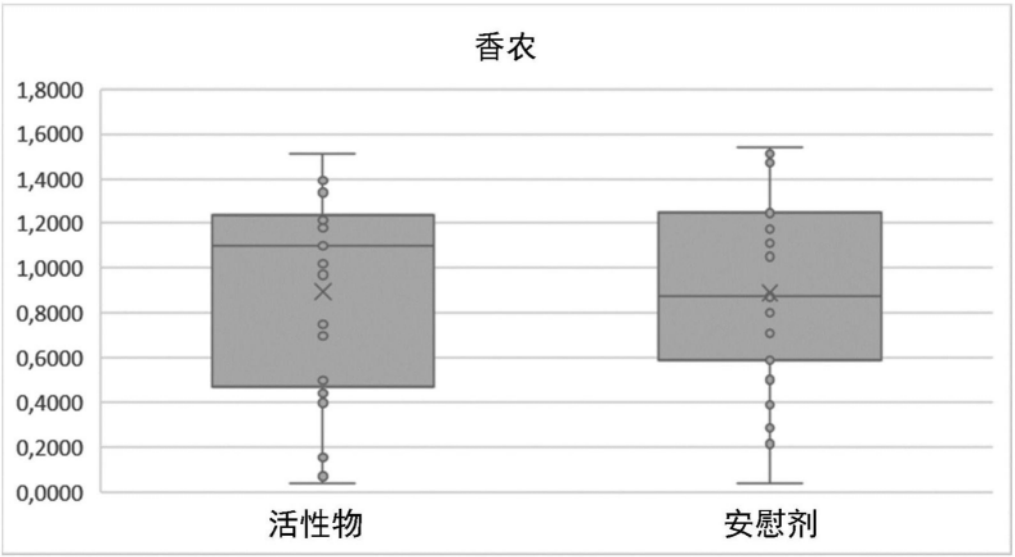

香农
1,8000
1,6000
1,4000
1,2000
1,0000
0,8000
0,6000
0,4000
0,2000
0,0000
活性物
安慰剂

图5F

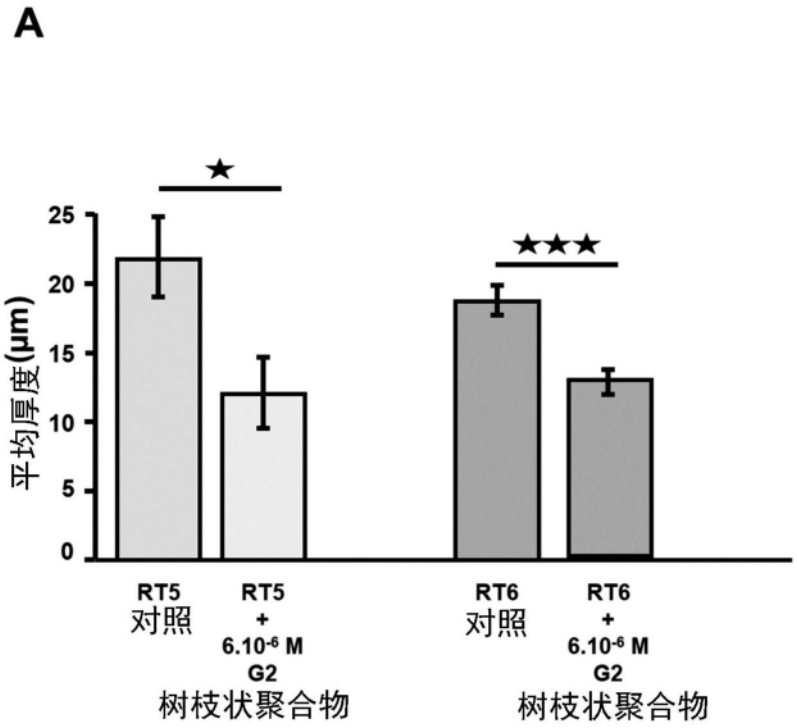

A
★
★★★
25
20
15
10
5
0
平均厚度(μm)
RT5
对照
RT5
+
6.10-6 M
G2
RT6
对照
RT6
+
6.10-6 M
G2
树枝状聚合物
树枝状聚合物

图6A

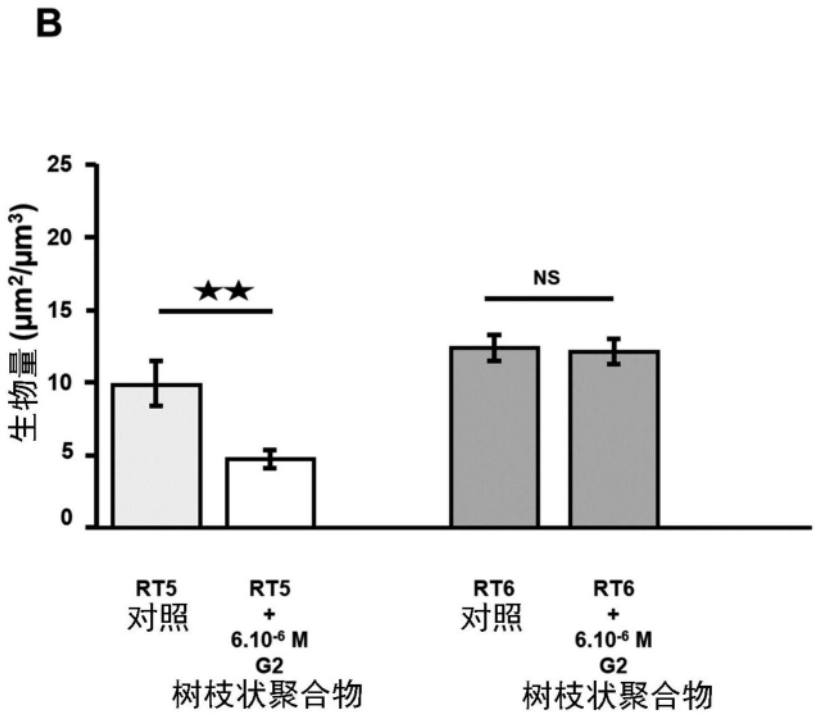

B
★★
NS
25
20
15
10
5
0
生物量 (μm2/μm3)
RT5
对照
RT5
+
6.10-6 M
G2
RT6
对照
RT6
+
6.10-6 M
G2
树枝状聚合物
树枝状聚合物

图6B

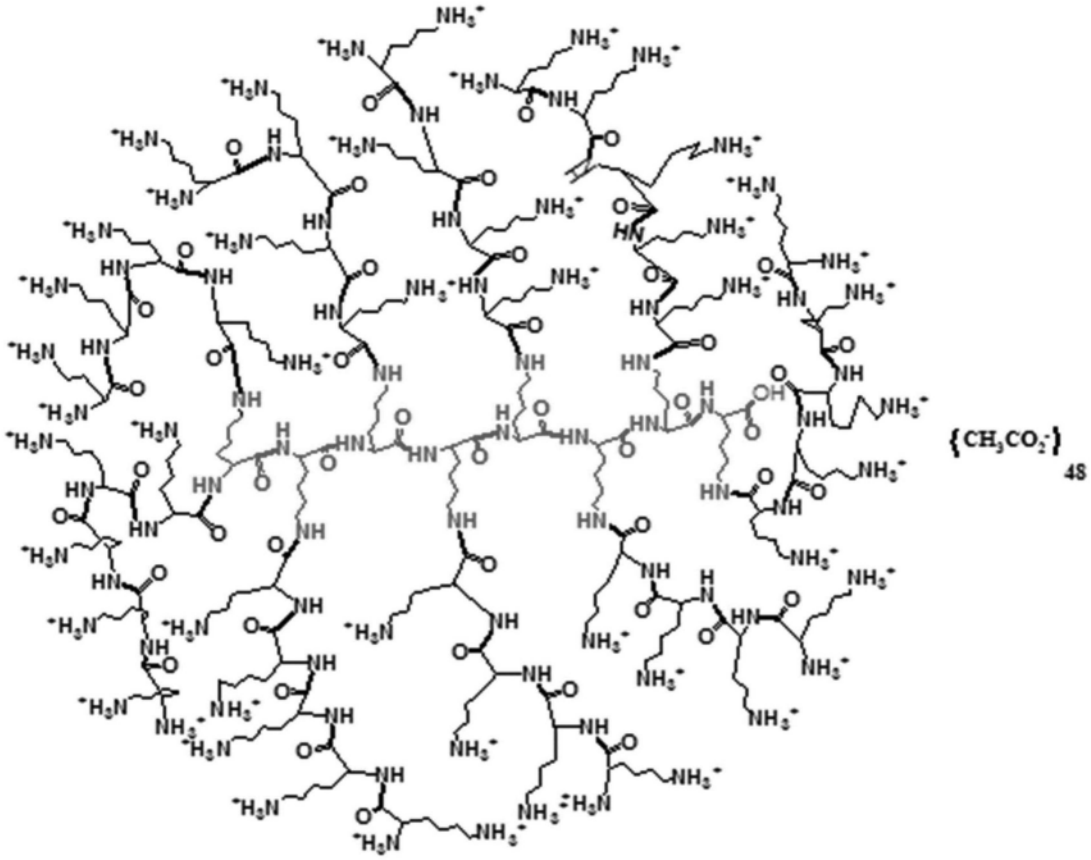


图7