



(12) 发明专利申请

(10) 申请公布号 CN 119978070 A

(43) 申请公布日 2025. 05. 13

(21) 申请号 202510160975.9

(22) 申请日 2025.02.13

(71) 申请人 深圳市维琪科技股份有限公司

地址 518000 广东省深圳市南山区桃源街
道长源社区学苑大道1001号南山智园
D3栋2401

(72) 发明人 丁文锋 观富宜 刘子建 孙新林
曲宣诏 彭晏

(51) Int. Cl.

C07K 7/64 (2006.01)

A61K 38/12 (2006.01)

A61K 8/64 (2006.01)

A61P 17/00 (2006.01)

A61P 17/10 (2006.01)

A61Q 19/00 (2006.01)

权利要求书1页 说明书15页

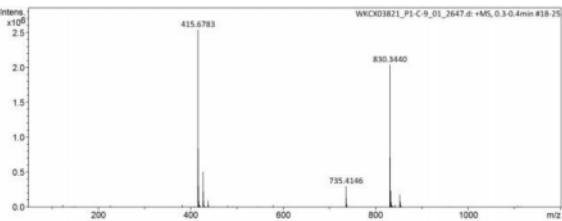
序列表(电子公布) 附图1页

(54) 发明名称

一种用于皮肤护理的环六肽及其组合物和用途

(57) 摘要

公开了一种用于皮肤护理的环六肽及其组合物和用途,涉及多肽技术领域,所述环肽具有如下结构:Cyclo-[Arg-Arg-Gln-D-Met-Glu-Glu]。具体涉及所述环肽或其盐、或它们的组合物、以及它们在制备护理或治疗皮肤或粘膜的组合物中的用途。



1. 环肽或其盐, 其特征在于, 所述环肽的结构为Cyclo-[Arg-Arg-Gln-D-Met-Glu-Glu]。

2. 根据权利要求1所述的环肽或其盐, 其特征在于, 所述盐包括所述环肽的金属盐, 所述金属包括: 锂、钠、钾、钙、镁、锰、铜、锌或铝;

或者, 所述盐包括所述环肽与有机碱形成的盐, 所述有机碱包括: 乙胺、二乙胺、乙二胺、乙醇胺、二乙醇胺、精氨酸、赖氨酸、组氨酸或哌嗪;

或者, 所述盐包括所述环肽与无机酸或有机酸形成的盐, 所述有机酸包括: 乙酸、柠檬酸、乳酸、丙二酸、马来酸、酒石酸、延胡索酸、苯甲酸、天冬氨酸、谷氨酸、琥珀酸、油酸、三氟乙酸、草酸、扑酸或葡萄糖酸; 所述无机酸包括: 盐酸、硫酸、硼酸或碳酸。

3. 一种组合物, 其特征在于, 包括有效量的权利要求1或2所述的环肽或其盐, 以及至少一种赋形剂和任选的佐剂。

4. 一种递送系统或缓释系统, 其特征在于, 包含有效量的权利要求1或2所述的环肽或其盐、或权利要求3所述的组合物。

5. 根据权利要求4所述的递送系统或缓释系统, 其特征在于, 所述递送系统或缓释系统包括: 脂质体、油质体、醇质体、毫米胶囊、微米胶囊、纳米胶囊、纳米结构的脂质载体、海绵状物、包合物、类脂囊泡、胶束、毫米球、微米球、纳米球、脂质球、微米乳液、纳米乳液、毫米粒子、微米粒子或纳米粒子。

6. 一种化妆品, 其特征在于, 包含有效量的权利要求1或2所述的环肽或其盐、或权利要求3所述的组合物、或权利要求4或5所述的递送系统或缓释系统。

7. 根据权利要求6所述的化妆品, 其特征在于, 所述化妆品的剂型包括膏、霜、乳剂、水剂、油剂、凝胶、粉剂、片剂、泥剂、贴剂、膜剂、气雾剂、喷雾剂、冻干制剂或纳米制剂。

8. 权利要求1或2所述的环肽或其盐、或权利要求3所述的组合物、或权利要求4或5所述的递送系统或缓释系统在制备用于护理或治疗皮肤或粘膜的组合物中的用途。

9. 权利要求1或2所述的环肽或其盐、或权利要求3所述的组合物、或权利要求4或5所述的递送系统或缓释系统在制备用于控油、祛痘、修护或保湿的组合物中的用途。

10. 权利要求1或2所述的环肽或其盐、或权利要求3所述的组合物、或权利要求4或5所述的递送系统或缓释系统在制备用于减少皮肤油脂合成或分泌的组合物中的用途。

11. 权利要求1或2所述的环肽或其盐、或权利要求3所述的组合物、或权利要求4或5所述的递送系统或缓释系统在制备用于促进丝聚蛋白和/或兜甲蛋白的表达的组合物中的用途, 或在制备用于促进皮肤或粘膜的再上皮化或愈合的组合物中的用途, 或在制备用于修复皮肤屏障的组合物中的用途。

12. 权利要求1或2所述的环肽或其盐、或权利要求3所述的组合物、或权利要求4或5所述的递送系统或缓释系统在制备化妆品中的用途。

一种用于皮肤护理的环六肽及其组合物和用途

技术领域

[0001] 本公开涉及多肽技术领域,特别涉及一种用于皮肤护理的环六肽及其组合物和用途。

背景技术

[0002] 皮肤油脂在人体中扮演着至关重要的角色,它不仅能够作为皮肤天然的保湿屏障,锁住水分,维持皮肤的柔软与弹性,还能有效阻挡外界有害物质及细菌的侵入,保护皮肤健康。然而,当皮肤油脂分泌过于旺盛时,就会带来一系列负面作用,如导致毛孔堵塞,引发粉刺、痤疮等皮肤问题,还会让皮肤看起来油腻、不清爽,影响整体美观。

[0003] 男性群体的雄性激素分泌比较旺盛,其皮肤油脂分泌也更加旺盛,面部、背部等皮肤区域容易大量出油,因此目前市场中的部分男性用洁面乳、沐浴露、洗发水等个人清洁用品主打控油功效。然而频繁使用清洁力过强的个人清洁用品,或者清洁方法不当均容易过度去除皮肤表面的自然油脂,导致皮肤水油失衡,进而引发皮肤屏障功能受损。一旦皮肤屏障被破坏,皮肤就会变得敏感脆弱,不仅皮肤水分加速蒸发导致皮肤出现干燥、皲裂的症状,还容易受到外界刺激而产生皮肤红肿、瘙痒等不适症状,严重时还可能引发更复杂的皮肤炎症。维护皮肤水油平衡是保护皮肤健康的重要一环。针对油脂分泌旺盛、日常过度清洁导致皮肤屏障受损的问题,不仅需要持续进行控油,还需要修复皮肤屏障、减少水分流失,从而维持皮肤水油平衡。

发明内容

[0004] 本公开涉及环六肽及其组合物和用途,所述环六肽及含有所述环六肽的组合物,具有护理或治疗皮肤或粘膜等作用。

[0005] 一方面,本公开提供了一种环肽、或其立体异构体、或其立体异构体的混合物、或其盐,所述环肽的结构为Cyclo-[Arg-Arg-Gln-D-Met-Glu-Glu]。

[0006] 本公开的环肽中含有大量不对称碳原子,本领域技术人员了解本公开的环肽具有立体异构体,并可以作为立体异构体或立体异构体混合物存在,并因此有可能得到同分异构的混合物以及外消旋混合物或非对映异构体混合物、或纯的非对映异构体或对映异构体,这取决于不对称碳的数目和存在的异构体或同分异构混合物。在一些实施方式中,本公开所述的环肽是纯的同分异构体,即,对映异构体或非对映异构体。

[0007] 本公开还包括所述环肽的所有合适的同位素变体。本公开的环肽的同位素变体此处理解为是指这样的化合物:其中在本公开的环肽内至少一个原子被替换为相同原子序数的另一个原子,但所述另一原子的原子质量不同于自然界中通常或主要存在的原子质量。可掺入本公开的环肽中的同位素的实例是:氢、碳、氮、氧或硫的那些,例如²H(氘)、³H(氚)、¹³C、¹⁴C、¹⁵N、¹⁷O、¹⁸O、³³S、³⁴S、³⁵S或³⁶S。本公开的环肽的特定的同位素变体(特别是其中已经掺入一种或多种放射性同位素的那些)可能有利于,例如检查在体内的作用机理或活性化合物的分布;由于相对简单的可制备性和可检测性,尤其是用³H或¹⁴C同位素标记的环肽适

用于该目的。另外,由于环肽的更强的代谢稳定性,同位素(例如氘)的掺入可以产生特定的治疗益处,例如体内半衰期的延长或所需活性剂量的降低。通过本领域技术人员已知的方法,例如通过在下文中进一步描述的方法和在实施例中所所述的方法,通过使用各自的试剂和/或起始物质的相应的同位素改性物,可制备本公开的环肽的同位素变体。

[0008] 术语“盐”指被认可的在动物,并且更确切地说在人类中使用的一种盐,包括所述环肽的金属盐,所述金属包括,但不局限于:锂、钠、钾、钙、镁、锰、铜、锌或铝等;包括所述环肽与有机碱形成的盐,所述有机碱包括,但不局限于:乙胺、二乙胺、乙二胺、乙醇胺、二乙醇胺、精氨酸、赖氨酸、组氨酸或哌嗪等;包括所述环肽与无机酸或有机酸形成的盐,所述有机酸包括,但不局限于:乙酸、柠檬酸、乳酸、丙二酸、马来酸、酒石酸、延胡索酸、苯甲酸、天冬氨酸、谷氨酸、琥珀酸、油酸、三氟乙酸、草酸、扑酸(pamoate)或葡萄糖酸等;所述无机酸包括,但不局限于:盐酸、硫酸、硼酸或碳酸。

[0009] 盐的性质不是决定性的,所述环肽的盐可以通过本领域公知的常规方法得到。

[0010] 本公开所述环肽、或其立体异构体、或其立体异构体的混合物、或其盐的合成可以根据现有技术中已知的常规方法来进行,例如固相合成法、液相合成法或固相与液相结合的方法,还可以通过以产生所希望的序列为目标的生物技术方法、或通过具有动物、真菌、或植物来源的蛋白质的控制水解来制备。

[0011] 例如,一种获得本公开所述环肽的方法包括以下步骤:

[0012] -将具有受保护的N-末端和自由的C-末端的氨基酸与具有自由的N-末端和受保护的或与固体载体结合的C-末端的氨基酸偶联;

[0013] -消除保护N-末端的基团;

[0014] -重复该偶联顺序和消除保护N-末端的基团,直到获得所希望的肽序列;

[0015] -消除保护C-末端的基团或从该固体载体裂解;

[0016] -将肽链N-末端的氨基与C-末端的羧基偶联环合;

[0017] -消除保护侧链的基团。

[0018] 在一些实施方式中,C-末端与一种固体载体结合并且该方法是在固相上进行,包括将具有受保护的N-末端和自由的C-末端的氨基酸与具有自由的N-末端和与一种聚合物载体结合的C-末端的氨基酸偶联;消除保护N-末端的基团;并且重复此顺序所需要的次数以便因此获得具有所希望的长度的肽,接着从最初的聚合物载体裂解所合成的肽,并将肽链N-末端的氨基与C-末端的羧基偶联环合。

[0019] 在整个合成中这些氨基酸的侧链的官能团用临时或永久的保护基团保持充分地保护。

[0020] 在一些实施方式中,固相合成可以通过将二肽或三肽偶联到聚合物支持体上或偶联到先前与聚合物支持体结合的二肽或氨基酸上的汇集策略(convergent strategy)来进行。

[0021] 由于在哺乳动物的身体外部的应用,本公开的环肽可以形成各种类型的组合物的一部分。因此本公开的另一方面,提供一种组合物,包含有效量的上述环肽、或其立体异构体、或其立体异构体的混合物、或其盐,以及至少一种赋形剂和任选的佐剂。所述组合物可以通过本领域技术人员已知的常规方法制备。

[0022] 在一些实施方式中,所述佐剂选自:激活Clock表达的剂、镇痛剂、抑制PAR-2活性

的剂、调节PGC-1 α 合成的剂、调节PPAR γ 的活性的剂、增加或减少脂肪细胞的甘油三酸酯含量的剂、刺激或延迟脂肪细胞分化的剂、脂解剂或刺激脂肪分解的剂、溶脂剂、生脂剂、乙酰胆碱受体聚集的抑制剂、抑制肌肉收缩的剂、抗胆碱能试剂、弹性蛋白酶抑制剂、基质金属蛋白酶抑制剂、黑色素合成刺激或抑制剂、增白剂或脱色剂、促色素沉着剂、日晒黑剂、抗老化剂、NO-合酶抑制剂、5 α -还原酶抑制剂、赖氨酰羟化酶和/或脯氨酰羟化酶的抑制剂、抗氧化剂、自由基清除剂和/或抗大气污染的剂、活性羰基类物质清除剂、抗糖化剂、抗组胺剂、抗病毒剂、抗寄生虫剂、乳化剂、润肤剂、有机溶剂、液体推进剂、保留水分的物质、 α 羟基酸、 β 羟基酸、增湿剂、表皮水解酶、维生素、氨基酸、蛋白质、色素、染料、生物聚合物、胶凝聚合物、增稠剂、表面活性剂、软化剂、粘合剂、防腐剂、抗皱剂、能够减少或治疗下眼袋的剂、角质层分离剂、抗微生物剂、刺激真皮或表皮大分子的合成和/或能够抑制或预防它们的降解的剂、刺激弹性蛋白合成的剂、刺激核心蛋白聚糖合成的剂、刺激层粘连蛋白合成的剂、刺激防御素合成的剂、刺激伴侣蛋白合成的剂、刺激cAMP合成的剂、刺激透明质酸合成的剂、刺激纤连蛋白合成的剂、刺激去乙酰化酶合成的剂、刺激脂质和角质层组分的合成的剂、神经酰胺、脂肪酸、抑制弹性蛋白降解的剂、抑制丝氨酸蛋白酶的剂、刺激成纤维细胞增殖的剂、刺激角质形成细胞增殖的剂、刺激脂肪细胞增殖的剂、刺激黑色素细胞增殖的剂、刺激角质形成细胞分化的剂、抑制乙酰胆碱酯酶的剂、皮肤松弛剂、刺激糖胺聚糖合成的剂、抗角化过度剂、粉刺溶解剂、抗银屑病剂、抗湿疹剂、DNA修复剂、DNA防护剂、稳定剂、止痒剂、用于治疗 and/或护理敏感性皮肤的剂、固化剂、紧致剂、重构剂、抗拉伸纹剂、调节皮脂产生的剂、止汗剂、刺激愈合的剂、协助愈合的剂、刺激再上皮化的剂、协助再上皮化的剂、细胞因子、镇静剂、抗炎剂、麻醉剂、作用于毛细血管循环和/或微循环的剂、刺激血管生成的剂、抑制血管渗透性的剂、静脉紧张剂、作用于细胞代谢的剂、用于改善真皮-表皮接合的剂、诱导毛发生长的剂、毛发生长抑制或延缓剂、香料、螯合剂、植物提取物、精油、海洋提取物、得自生物发酵过程的剂、无机盐、细胞提取物、防晒剂、以及有效抗A和/或B紫外线的有机或无机光防护剂或其混合物。

[0023] 待施用的有效量的本公开的环肽以及它们的剂量将依赖于许多因素,包括年龄、使用者的状态、状况的严重性、施用的途径和频率以及待使用的环肽的具体性质。

[0024] “有效量”意指无毒性的但足以提供希望的效果的本公开的环肽的量。在本公开的组合物中以获得希望的效果的有效浓度使用本公开的环肽。在一些实施方式中,相对于组合物的总重量,浓度在0.00000001% (按重量计) 和20% (按重量计) 之间;在一些实施方式中,相对于组合物的总重量,浓度在0.000001% (按重量计) 和15% (按重量计) 之间;在一些实施方式中,相对于组合物的总重量,浓度在0.0001% (按重量计) 和10% (按重量计) 之间;在一些实施方式中,相对于组合物的总重量,浓度在0.0001% (按重量计) 和5% (按重量计) 之间。

[0025] 本公开的另一方面,提供一种递送系统或缓释系统,以便实现有效成分的更好渗透,其包含有效量的上述环肽、或其立体异构体、或其立体异构体的混合物、或其盐、或上述的组合物。

[0026] 术语“递送系统”是指与本公开的环肽一起施用的稀释剂、佐剂、赋形剂或载体,它们选自:水、油或表面活性剂、包括石油来源、动物来源、植物来源、或合成来源的那些,例如并且不限于花生油、大豆油、矿物油、芝麻油、蓖麻油、聚山梨醇酯、脱水山梨糖醇酯、醚硫酸

酯、硫酸酯、甜菜碱、葡萄糖苷、麦芽糖苷、脂肪醇、壬苯醇醚、泊洛沙姆、聚氧乙烯、聚乙二醇、右旋糖、甘油、毛地黄皂苷和类似物。本领域的普通技术人员已知在可以给予本公开的环肽的不同递送系统中可以使用的稀释剂。

[0027] 术语“缓释”以常规含义使用,指提供化合物在一段时间内逐渐释放的化合物的递送系统。在一些实施方式中,缓释系统在整个时间段内具有相对恒定的化合物释放水平。

[0028] 递送系统或缓释系统的实例包括,但不局限于:脂质体、油质体、醇质体、毫米胶囊、微米胶囊、纳米胶囊、纳米结构的脂质载体、海绵状物、包合物、类脂囊泡、胶束、毫米球、微米球、纳米球、脂质球、微米乳液、纳米乳液、毫米粒子、微米粒子或纳米粒子。

[0029] 本公开的另一方面,提供一种化妆品,包含有效量的上述环肽、或其立体异构体、或其立体异构体的混合物、或其盐、或上述的组合物、或上述的递送系统或缓释系统。

[0030] 在一些实施方式中,所述化妆品的剂型包括膏、霜、乳剂、水剂、油剂、凝胶、粉剂、片剂、泥剂、贴剂、膜剂、气雾剂、喷雾剂、冻干制剂或纳米制剂。

[0031] 本公开的另一方面,提供一种上述环肽、或其立体异构体、或其立体异构体的混合物、或其盐、或上述的组合物、或上述的递送系统或缓释系统在制备用于护理或治疗皮肤或粘膜的组合物中的用途。

[0032] 本公开的另一方面,提供一种上述环肽、或其立体异构体、或其立体异构体的混合物、或其盐、或上述的组合物、或上述的递送系统或缓释系统在制备用于控油、祛痘、修护或保湿的组合物中的用途。

[0033] 本公开的另一方面,提供一种上述环肽、或其立体异构体、或其立体异构体的混合物、或其盐、或上述的组合物、或上述的递送系统或缓释系统在制备用于减少皮肤油脂合成或分泌的组合物中的用途。

[0034] 本公开的另一方面,提供一种上述环肽、或其立体异构体、或其立体异构体的混合物、或其盐、或上述的组合物、或上述的递送系统或缓释系统在制备用于促进丝聚蛋白(FLG)和/或兜甲蛋白(LOR)的表达的组合物中的用途,或在制备用于促进皮肤或粘膜的再上皮化或愈合的组合物中的用途,或在制备用于修复皮肤屏障的组合物中的用途。

[0035] 本公开的另一方面,提供一种上述环肽、或其立体异构体、或其立体异构体的混合物、或其盐、或上述的组合物、或上述的递送系统或缓释系统在制备化妆品中的用途。

[0036] 在本公开中,术语“皮肤”应理解为是构成它的多个层,从最上层或角质层至最下层或皮下组织,两个端点都包括在内。这些层由不同类型的细胞组成,如角质形成细胞、成纤维细胞、黑色素细胞、和/或脂肪细胞等。在本公开中,术语“皮肤”包括头皮。

[0037] 术语“护理皮肤”,指的是对皮肤进行维护和保养,改善皮肤的状态,使皮肤细腻、光洁、柔嫩、健康。

[0038] 本公开具有以下优点和效果:

[0039] 1、本公开的环肽能有效促进FLG和LOR的表达。FLG是参与皮肤屏障的重要因子,在参与组成皮肤表皮外层的角质包膜过程中,促进表皮分化,形成表皮角质层独特的屏障结构,在维持皮肤的屏障功能中具有重要作用。LOR是角质包膜的主要组成成分,对表皮屏障功能的正常发挥起着重要作用。促进FLG和LOR的表达能修护皮肤屏障,改善皮肤屏障功能,有利于锁住皮肤水分,增强皮肤的保湿能力。因此,本公开的环肽具有修护、保湿的功效。

[0040] 2、本公开的环肽能有效促进细胞迁移。促进细胞迁移能促进皮肤或粘膜的再上皮

化或伤口愈合、修复皮肤屏障。因此,本公开的环肽能够用于促进皮肤或粘膜的再上皮化或伤口愈合、修复受损皮肤屏障等,从而实现修护的功效。

[0041] 3、本公开的环肽能抑制皮脂腺细胞合成或分泌油脂,减缓油脂沉积,可以减少粉刺或痤疮的发生,也有助于粉刺或痤疮发生后皮肤的恢复,具有控油、祛痘、修护的作用。

[0042] 4、本公开的环肽由线性的RRQ(d)MEE的N-末端和C-末端偶联环合而得,但与线性的多肽相比,本公开的环肽具有更优的促进细胞迁移、促进LOR和FLG表达、抑制油脂合成或分泌的作用,从而实现优异的控油、祛痘、修护、保湿的功效。

附图说明

[0043] 为了更清楚地说明本公开的技术方案,下面将对本公开的描述中所需要使用的附图作简单地介绍,显而易见地,下面描述中的附图仅仅是本公开的一些实施例,对于本领域普通技术人员来讲,在不付出创造性劳动的前提下,还可以根据这些附图获得其他的附图。

[0044] 图1是本公开中实施例1环六肽A(分子式 $C_{32}H_{55}N_{13}O_{11}S$)的质谱图。

具体实施方式

[0045] 为使本公开的所述目的、特征和优点能够更加明显易懂,下面结合附图和实施例对本公开作进一步详细的说明。显然,所描述的实施例是本公开一部分实施例,而不是全部的实施例。基于本公开中的实施例,本领域普通技术人员在没有作出创造性劳动前提下所获得的所有其他实施例,都属于本公开所附权利要求保护的范围。

[0046] 在本公开中,用于氨基酸的缩写遵循IUPAC-IUB生化命名委员会(IUPAC-IUB Commission of Biochemical Nomenclature)在欧洲生物化学杂志(Eur.J.Biochem.1984, 138:9-37)中所指定的规则。

[0047] 如无特殊说明,本公开中所使用的实验试剂及材料均可通过市售获得。以下为部分试剂和材料的缩写:

[0048] 2-CTC Resin:一种多肽合成用的起始树脂;DCM:二氯甲烷;HOBt:1-羟基苯并三氮唑;DMF:N,N-二甲基甲酰胺;DIPEA:二异丙基乙胺;MeOH:甲醇;piperidine:哌啶;DIC:二异丙基碳二亚胺;TFA:三氟乙酸;PE:石油醚;Tis:三异丙基硅烷;EDT:1,2-乙二硫醇;Glu:谷氨酸;D-Met:D-甲硫氨酸;Gln:谷氨酰胺;Arg:精氨酸;Fmoc:9-芴基甲氧羰基;OtBu:叔丁氧基;Trt:三苯甲基;Pbf:2,2,4,6,7-五甲基二氢苯并呋喃-3-磺酰基。

[0049] 实施例1Cyclo-[Arg-Arg-Gln-D-Met-Glu-Glu]的制备

[0050] Cyclo-[Arg-Arg-Gln-D-Met-Glu-Glu],通过以下步骤制得:

[0051] S1、树脂的溶胀

[0052] 称取10g的2-CTC Resin于固相合成反应柱中,用DCM溶胀,洗涤树脂,抽走溶剂。

[0053] S2、投料反应

[0054] S2.1、称取10.3g的Fmoc-Glu(OtBu)-OH于干燥三角瓶中,用DMF溶剂溶解后置于冰水浴中冷却10min,加入11.3mL的DIPEA搅拌3min。再将上述混合液加入溶胀后的树脂中反应2.5h,抽走反应液,洗涤树脂4次,抽走溶剂。继续加入DCM、MeOH、DIPEA封端处理10min且进行2次。洗涤树脂4,抽走溶剂,得到Fmoc-Glu(OtBu)-2-CTC Resin。

[0055] S2.2、Fmoc-Glu(OtBu)-2-CTC Resin用20%piperidine/DMF脱Fmoc二次:第一次

8min,第二次5min。取样K检,显色深蓝。用DMF洗涤树脂7次,抽走溶剂。称取10.5g的Fmoc-Glu(OtBu)-OH,3.9g的HOBt加入干燥三角瓶中,加入DMF使其溶解,密封置于-18℃冰箱30min。加入5.6mL DIC活化3min。将活化后的氨基酸加入脱保护后树脂中反应2h,抽走反应液。K检树脂无色透明说明反应完全,得到Fmoc-Glu(OtBu)-Glu(OtBu)-2-CTC Resin。

[0056] S2.3、重复步骤S2.2,对N-末端Fmoc基团进行脱保护,并且在存在3.9g HOBt和5.6mL DIC的情况下,使用DMF作为溶剂,将活化后的氨基酸偶联至肽基树脂上,持续反应2h。然后洗涤这些树脂并且重复Fmoc基团的脱保护处理以便偶联下一个氨基酸。在每次偶联中,在存在3.9g HOBt和5.6mL DIC的情况下,使用DMF作为溶剂,顺序地偶联9.1g Fmoc-D-Met-OH、14.9g Fmoc-Gln(Trt)-OH、15.8g Fmoc-Arg(Pbf)-OH以及随后15.8g Fmoc-Arg(Pbf)-OH;反应完全之后,洗涤树脂,抽走溶剂,得到Fmoc-Arg(Pbf)-Arg(Pbf)-Gln(Trt)-D-Met-Glu(OtBu)-Glu(OtBu)-2-CTC Resin。

[0057] S2.4、对肽基树脂的N-末端Fmoc基团脱保护,用20% piperidine/DMF脱Fmoc二次:第一次8min,第二次5min。取样K检,显色深蓝。先用DMF洗涤树脂4次,再用DCM淋洗4次,最后用MeOH洗涤1次,抽走溶剂。收缩干燥后得到28.7g H-Arg(Pbf)-Arg(Pbf)-Gln(Trt)-D-Met-Glu(OtBu)-Glu(OtBu)-2-CTC Resin。

[0058] S3、脱树脂

[0059] S3.1、量取4.5mL TFA、445.5mL DCM混合搅拌均匀后得到裂解液,封口放置-18℃冰箱备用;异丙醚放置于-18℃冰箱冷冻备用。

[0060] S3.2、称取28.7g H-Arg(Pbf)-Arg(Pbf)-Gln(Trt)-D-Met-Glu(OtBu)-Glu(OtBu)-2-CTC Resin,加入圆底烧瓶中,加入上述冷冻好的裂解液,搅拌反应0.5h,重复1次,共裂解2次。抽滤,收集滤液浓缩得油状物,加PE搅拌固化得到26.5g的H-Arg(Pbf)-Arg(Pbf)-Gln(Trt)-D-Met-Glu(OtBu)-Glu(OtBu)-OH。

[0061] S4、环合

[0062] 将26.5g H-Arg(Pbf)-Arg(Pbf)-Gln(Trt)-D-Met-Glu(OtBu)-Glu(OtBu)-OH加入烧瓶中,加入500mL DCM搅拌,再加24.5g HATU、14g DIPEA,加300mL DMF,反应7h。反应结束后进行后处理,经处理后得到26.7g油状的Cyclo-[Arg(Pbf)-Arg(Pbf)-Gln(Trt)-D-Met-Glu(OtBu)-Glu(OtBu)]粗环肽。

[0063] S5、裂解(脱保护基团)

[0064] 取144mL TFA、4mL Tis、4mL EDT、4mL 苯甲硫醚混匀,加入26.7g粗环肽,裂解2.5h,用异丙醚沉降,后面用异丙醚洗涤,得到Cyclo-[Arg-Arg-Gln-D-Met-Glu-Glu]粗肽。

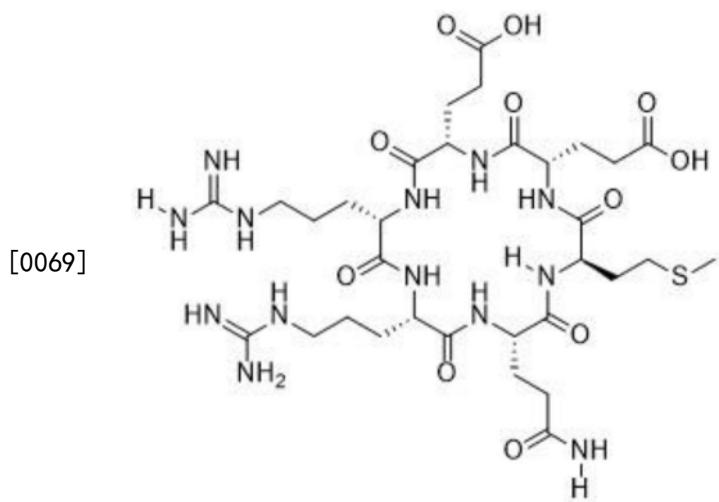
[0065] S6、纯化

[0066] 取16.0g的Cyclo-[Arg-Arg-Gln-D-Met-Glu-Glu]粗肽溶于200mL纯水中,用孔径为0.45μm微孔滤膜过滤得到澄清透明溶液,通过反相HPLC纯化处理,纯化梯度如下表:

[0067]

时间(min)	流速(mL/min)	A%(乙腈)	B%(0.1%醋酸+纯水)
0	40	2	98
10	40	6	94
30	40	10	90
45	40	12	88
60	40	20	80

[0068] 将过滤后的样品进样纯化,收集馏分,浓缩冻干,得到纯度>95.3%的环肽Cyclo-[Arg-Arg-Gln-D-Met-Glu-Glu],记为环六肽A,结构式如下所示:



[0070] 通过ESI-MS测定环六肽A的分子量,质谱图如图1所示。结果显示, $[M+H]^+$ 准分子离子峰的质荷比 (m/z) 为830.3440,质谱测得的分子量为829.34,与环六肽A的理论精确分子量相符。其核磁数据及解析结果如下:

[0071] ^1H NMR (600MHz, D_2O) δ : 4.41 (dd, $J=12, 6\text{Hz}$, 1H), 4.30 (q, $J=6\text{Hz}$, 2H), 4.23 (t, $J=6\text{Hz}$, 1H), 4.16 (t, $J=6\text{Hz}$, 1H), 4.10 (t, $J=6\text{Hz}$, 1H), 3.09 (dt, $J=24, 6\text{Hz}$, 4H), 2.50 (m, 2H), 2.22 (m, 5H), 2.08 (m, 5H), 2.00 (s, 3H), 1.94 (m, 3H), 1.82 (m, 3H), 1.70 (m, 2H), 1.48 (m, 4H)。

[0072] 表1被测试化合物的氢谱解析表

[0073]

序号	化学位移 (ppm)	质子 (氢原子) 数	峰形 (耦合常数)	结构归属
1	4.41	1	dd, $J=12, 6\text{Hz}$	跟酰胺键相连的 α -CH
2	4.30	2	q, $J=6\text{Hz}$	跟酰胺键相连的 α -CH
3	4.23	1	t, $J=6\text{Hz}$	跟酰胺键相连的 α -CH
4	4.16	1	t, $J=6\text{Hz}$	跟酰胺键相连的 α -CH
5	4.10	1	t, $J=6\text{Hz}$	跟酰胺键相连的 α -CH
6	3.09	4	dt, $J=24, 6\text{Hz}$	饱和烷烃的氢
7	2.50	2	m	饱和烷烃的氢
8	2.22	5	m	饱和烷烃的氢
9	2.08	5	m	饱和烷烃的氢
10	2.00	3	s	饱和烷烃的氢
11	1.94	3	m	饱和烷烃的氢
12	1.82	3	m	饱和烷烃的氢
13	1.70	2	m	饱和烷烃的氢
14	1.48	4	m	饱和烷烃的氢

[0074] ^{13}C NMR (150MHz, D_2O) δ : 181.23, 181.18, 177.41, 174.07, 173.51, 173.21, 172.74, 172.55, 156.71, 54.96, 54.36, 53.86, 53.37, 53.30, 40.54, 40.40, 33.90, 33.83, 30.48, 29.44, 28.95, 28.41, 28.25, 27.93, 27.63, 26.51, 24.76, 24.17, 14.15。

[0075] 表2被测试化合物的碳谱解析表

[0076]

序号	化学位移 (ppm)	碳原子数	结构归属
1	181.23	1	酰胺的羰基
2	181.18	1	酰胺的羰基

[0077]

3	177.41	2	羧基的羰基
4	174.07	1	酰胺的羰基
5	173.51	1	酰胺的羰基
6	173.21	1	酰胺的羰基
7	172.74	1	酰胺的羰基
8	172.55	1	酰胺的羰基
9	156.71	2	胍基的碳
10	54.96	1	跟酰胺键相连的 α -C
11	54.36	1	跟酰胺键相连的 α -C
12	53.86	1	跟酰胺键相连的 α -C
13	53.37	1	跟酰胺键相连的 α -C
14	53.30	2	跟酰胺键相连的 α -C
15	40.54	1	跟胍基相连的 C
16	40.40	1	跟胍基相连的 C
17	33.90	1	饱和烷烃的碳（无明显特性）
18	33.83	1	饱和烷烃的碳（无明显特性）
19	30.48	1	饱和烷烃的碳（无明显特性）
20	29.44	1	饱和烷烃的碳（无明显特性）
21	28.95	1	饱和烷烃的碳（无明显特性）
22	28.41	1	饱和烷烃的碳（无明显特性）
23	28.25	1	饱和烷烃的碳（无明显特性）
24	27.93	1	饱和烷烃的碳（无明显特性）

[0078]	25	27.63	1	饱和烷烃的碳（无明显特性）
	26	26.51	1	饱和烷烃的碳（无明显特性）
	27	24.76	1	饱和烷烃的碳（无明显特性）
	28	24.17	1	饱和烷烃的碳（无明显特性）
	29	14.15	1	饱和烷烃的碳（无明显特性）

[0079] 上述核磁共振氢谱和碳谱的结果均显示被测试化合物的结构与环六肽A的结构相一致。

[0080] 线性肽H-Arg-Arg-Gln-D-Met-Glu-Glu-OH(六肽B)以及Ac-Arg-Arg-Gln-D-Met-Glu-Glu-NH₂(乙酰基六肽C)可通过类似的制备方法获得。

[0081] 实施例2油脂含量测试

[0082] 2.1试剂与材料

[0083] 0.25%胰蛋白酶消化液(0.25g胰蛋白酶用100mL水配制而得)、PBS、FFA(亚油酸和棕榈酸按摩尔比1:1混合而得)。

[0084] 2.2仪器

[0085] 恒温CO₂培养箱、超净工作台。

[0086] 2.3细胞株

[0087] 人皮脂腺细胞SZ-95。

[0088] 2.4待测样品及分组

[0089] 2.4.1待测样品

[0090] 环六肽A、六肽B,均使用PBS进行溶解,测试浓度均为50ppm;

[0091] 辛伐他汀,使用PBS进行溶解,测试浓度为0.05μM。

[0092] 2.4.2分组

[0093] 实验组:待测样品,FFA;

[0094] 正常组:PBS;

[0095] 模型组:PBS,FFA。

[0096] 2.5实验方法

[0097] 取处于指数生长期状态良好SZ-95细胞一瓶,加入0.25%胰蛋白酶消化液,消化使贴壁细胞脱落,计数 $(1 \sim 4) \times 10^5$ 个/mL,制成细胞悬液。取适量细胞悬液接种于含完全培养基的12孔板上,置恒温CO₂培养箱中培养24h。除正常组加入PBS外,其余各孔每孔加入FFA使终浓度为225μmol/mL,诱导建模的同时,实验组分别加入对应的待测样品,置恒温CO₂培养箱中培养48h。吸弃培养基,按照油红O染色试剂盒说明书进行操作。

[0098] 2.6实验结果

[0099] 油红O(Oil Red O)为脂溶性染料,在脂肪内能高度溶解,其染色原理是油红O能特异性地与组织和细胞内的中性甘油三酯、脂质以及脂蛋白产生吸附作用从而使脂肪染色。FFA是一种诱导剂,在FFA的刺激诱导下,SZ-95细胞将大量分泌可被油红O染色的油脂。本实

验采用测试样品处理经FFA刺激诱导后的SZ-95细胞,通过检测SZ-95细胞的油脂生成量,以确定本公开的环六肽A能否抑制人皮脂腺细胞分泌油脂。

[0100] 测试样品对SZ-95细胞油脂分泌的影响结果见表3。

[0101] 表3SZ-95细胞油脂相对分泌量

组别	油脂相对分泌量 (Mean±SD)
正常组	100.00%±2.72%
模型组	222.71%±26.37%
辛伐他汀组	107.52%±3.51%***
环六肽A组	113.82%±2.79%***
六肽B组	138.17%±5.85%**

[0103] 注:与模型组相比,**P<0.01,***P<0.001。

[0104] 实验结果表明,通过将六肽B进行首尾环合后得到的环六肽A相比于线性的六肽B而言,其抑制油脂合成、分泌的能力得到了显著提升。由此可知,本公开的环六肽A不仅可抑制皮脂腺细胞合成分泌油脂,减缓油脂沉积,且其抑制效果相比于线性的六肽B而言要更为优越,可用于改善皮肤过度出油、皮肤水油失衡等问题,可以减少粉刺或痤疮的发生,也有助于粉刺或痤疮发生后皮肤的恢复,具有控油、祛痘、修护的作用。

[0105] 实施例3细胞迁移测试

[0106] 3.1试剂与材料

[0107] 0.25%胰蛋白酶消化液(0.25g胰蛋白酶用100mL水配制而得)、完全培养基、PBS。

[0108] 3.2仪器

[0109] 生物倒置显微镜、恒温CO₂培养箱、超净工作台。

[0110] 3.3细胞株

[0111] 人角质形成细胞(HaCaT)。

[0112] 3.4待测样品及分组

[0113] 3.4.1待测样品

[0114] 环六肽A、六肽B,使用PBS进行溶解,测试浓度均为200ppm。

[0115] 3.4.2分组

[0116] 样品组:待测样品;

[0117] 空白对照组:PBS。

[0118] 3.5实验方法

[0119] 取处于指数生长期状态良好的细胞一瓶,加入0.25%胰蛋白酶消化液进行消化,制成细胞悬液,接种于含完全培养基的12孔板上,置恒温CO₂培养箱中培养24h。换液,用黄色枪头在孔内中部划两条竖线,用PBS洗一次,寻找横线标记的上下位置进行拍照。拍照后,在样品组加入含2%FBS的完全培养基和待测样品;空白对照组加入含2%FBS的完全培养基和PBS。然后置恒温CO₂培养箱中培养24h。培养24h后,于生物倒置显微镜下对相同位置拍照观察,并计算划痕面积。

[0120] 划痕愈合率(%)=(施用样品前划痕面积-施用样品后划痕面积)/施用样品前划痕面积×100%。

[0121] 3.6实验结果

[0122] 细胞迁移是正常细胞的基本功能之一,是机体正常生长发育的生理过程,也是活细胞普遍存在的一种运动形式。细胞迁移作用与皮肤伤口愈合过程具有相似性,因此,促进细胞迁移对皮肤修护有积极的作用。

[0123] 测试样品对细胞迁移的影响结果见表4。

[0124] 表4测试样品对细胞迁移的影响

[0125]	组别	划痕愈合率 (Mean $\pm$ SD)
	空白对照组	10.66% $\pm$ 2.52%
	环六肽A组	47.80% $\pm$ 0.11%***
	六肽B组	35.65% $\pm$ 0.01%***

[0126] 注:与空白对照组相比,*** $P < 0.001$ 。

[0127] 结果显示,本公开的环六肽A能显著促进HaCaT细胞迁移,表现出显著的促进皮肤或粘膜的再上皮化或伤口愈合的作用。此外,由六肽B首尾环合后得到的环六肽A相比于线性的六肽B而言,其技术效果得到了显著提升。由此可知,本公开的环六肽A具有优异的促进细胞迁移的效果,能用于促进皮肤或粘膜的再上皮化或伤口愈合、修复受损皮肤屏障等,实现修护的功效。

[0128] 实施例4FLG含量测定

[0129] 4.1试剂与材料

[0130] 0.25%胰蛋白酶消化液(0.25g胰蛋白酶用100mL PBS配制而得)、完全培养基、PBS、RIPA裂解液、人丝聚合蛋白(FLG)ELISA检测试剂盒(Human FLG Filaggrin ELISAKit)、BCA蛋白定量试剂盒。

[0131] 4.2仪器

[0132] UVB灯、恒温CO₂培养箱、超净工作台。

[0133] 4.3细胞株

[0134] 人角质形成细胞(HaCaT)。

[0135] 4.4待测样品及分组

[0136] 4.4.1待测样品

[0137] 环六肽A、六肽B、乙酰基六肽C,使用PBS进行溶解,测试浓度均为50ppm。

[0138] 4.4.2分组

[0139] 样品组:UVB+待测样品;

[0140] UV组:UVB+PBS;

[0141] 空白对照组:PBS。

[0142] 4.5实验方法

[0143] 取处于指数生长期状态良好的人角质形成细胞(HaCaT)一瓶,加入0.25%胰蛋白酶消化液,消化使贴壁细胞脱落,计数 $(1 \sim 4) \times 10^5$ 个/mL,制成细胞悬液。取适量细胞悬液接种于含完全培养基的12孔板中,于CO₂培养箱中培养24h。将孔内的完全培养基吸出,加入PBS,暴露于UVB灯下照射15min;空白对照组不用照射。照射15min后,将PBS溶液吸出,样品组分别加入完全培养基和待测样品;空白对照组和UV组加入完全培养基和PBS,培养48h。收集细胞,离心取细胞沉淀,加入RIPA裂解液,用涡旋仪震匀3次(30s/次,间隔3min),离心12000rpm*10min。吸取上清液于ELISA试剂盒进行检测,并用BCA蛋白定量试剂盒检测上清

液的总蛋白浓度。

[0144] 4.6实验结果

[0145] 丝聚蛋白 (FLG) 是参与皮肤屏障的重要因子,在参与组成皮肤表皮外层的角质包膜过程中,促进表皮分化,形成表皮角质层独特的屏障结构,在维持角质层的物理强度,减少经皮水分散失等方面发挥着重要作用,有利于保持屏障完整性及保湿。因此,FLG的表达情况可以作为评价皮肤屏障修护效果的指标。通过测试某种物质对FLG表达的影响,可以评估该物质对皮肤屏障修护的效果。FLG的表达增加,有利于修护皮肤屏障,改善皮肤屏障功能,增强皮肤的保湿能力。本实验采用测试样品处理HaCaT细胞,通过检测HaCaT细胞内合成的FLG的含量,以确定本公开的环六肽A能否促进HaCaT细胞表达FLG。

[0146] 测试样品对HaCaT细胞表达FLG的影响结果见表5。

[0147] 表5测试样品对HaCaT细胞表达FLG的影响

[0148]	组别	FLG相对含量 (Mean $\pm$ SD)
	空白对照组	100.00% $\pm$ 12.39%
	UV组	28.00% $\pm$ 9.28%
	环六肽A组	57.55% $\pm$ 14.57%**
	六肽B组	48.82% $\pm$ 0.74%***
	乙酰基六肽C组	35.90% $\pm$ 14.32%

[0149] 注:与UV组相比,** $P < 0.01$,*** $P < 0.001$ 。

[0150] 结果显示,与UV组相比,本公开的环六肽A能显著促进HaCaT细胞表达FLG,但乙酰基六肽C的结果与UV组相比没有统计学差异。同时该实验结果表明,通过将六肽B进行首尾环合后得到的环六肽A相比于线性的六肽B而言,其促FLG表达的能力得到了显著提升。由此可知,本公开的环六肽A具有优异的促进FLG表达的效果,能用于修复皮肤屏障,具有修护、保湿的功效。

[0151] 实施例5LOR含量测定

[0152] 5.1试剂与材料

[0153] 0.25%胰蛋白酶消化液(0.25g胰蛋白酶用100mL水配制而得)、完全培养基、PBS、RIPA裂解液、人兜甲蛋白(LOR)ELISA检测试剂盒(Human LORLoricrin ELISAKit)、BCA蛋白定量试剂盒。

[0154] 5.2仪器

[0155] UVB灯、恒温CO₂培养箱、超净工作台。

[0156] 5.3细胞株

[0157] 人角质形成细胞(HaCaT)。

[0158] 5.4待测样品及分组

[0159] 5.4.1待测样品

[0160] 环六肽A、六肽B,使用PBS进行溶解,测试浓度均为200ppm。

[0161] 5.4.2分组

[0162] 样品组:UVB+待测样品;

[0163] UV组:UVB+PBS;

[0164] 空白对照组:PBS。

[0165] 5.5实验方法

[0166] 取处于指数生长期状态良好的人角质形成细胞(HaCaT)一瓶,加入0.25%胰蛋白酶消化液,消化使贴壁细胞脱落,计数 $(1 \sim 4) \times 10^5$ 个/mL,制成细胞悬液。取适量细胞悬液接种于含完全培养基的12孔板中,于CO₂培养箱中培养24h。将孔内的完全培养基吸出,加入PBS,暴露于UVB灯下照射15min;空白对照组不用照射。照射15min后,将PBS溶液吸出,样品组分别加入完全培养基和待测样品;空白对照组和UV组加入完全培养基和PBS,培养48h。收集细胞,离心取细胞沉淀,加入RIPA裂解液,用涡旋仪震匀3次(30s/次,间隔3min),离心12000rpm*10min。吸取上清液于ELISA试剂盒进行检测,并用BCA蛋白定量试剂盒检测上清液的总蛋白浓度。

[0167] 5.6实验结果

[0168] 兜甲蛋白(LOR)是角质包膜的主要组成成分,对表皮屏障功能的正常发挥起着重要作用。LOR的表达在皮肤屏障的修复过程中发挥着重要作用,LOR的表达增加是皮肤屏障修复的一个重要标志。本实验采用测试样品处理HaCaT细胞,通过检测HaCaT细胞内合成的LOR的含量,以确定本公开的环六肽A能否促进HaCaT细胞表达LOR。

[0169] 测试样品对HaCaT细胞表达LOR的影响结果见表6。

[0170] 表6测试样品对HaCaT细胞表达LOR的影响

[0171]

组别	LOR相对含量(Mean±SD)
空白对照组	100.00%±10.21%
UV组	51.57%±4.84%
环六肽A组	87.05%±14.91%**
六肽B组	68.81%±16.67%*

[0172] 注:与UV组相比,*P<0.05,**P<0.01。

[0173] 结果显示,本公开的环六肽A能显著促进HaCaT细胞表达LOR。同时该实验结果表明,通过将六肽B进行首尾环合后得到的环六肽A相比于线性的六肽B而言,其促LOR表达的能力得到了显著提升。由此可知,本公开的环六肽A具有优异的促进LOR表达的效果,能用于修复皮肤屏障,具有修护、保湿的功效。

[0174] 实施例6

[0175] 一种霜,通过以下步骤制得:

相	成分		重量百分比/%
	水		79.49
A	1,3-丁二醇		4.00
	1,3-丙二醇		3.00
	黄原胶		0.10
	Aristoflex AVC[INCI 名: 丙烯酸二甲基牛磺酸铵/VP 共聚物]		0.60
	异十六烷		4.50
B	WActive®EMU PB-C 植源液晶乳化剂[INCI 名: 蔗糖多硬脂酸酯、角鲨烷]		2.00
	WActive®Camellia Squalane 山茶角鲨烷[INCI 名: 角鲨烷]		1.00
	生育酚乙酸酯		0.30
	聚二甲基硅氧烷		1.00
	异壬酸异壬酯		2.00
C	1,2-己二醇		0.50
	对羟基苯乙酮		0.50
D	环六肽 A		0.01
	水		1.00

[0177] 按照处方用量,将C相物料在合适容器内加热至55-60℃,溶解完全,备用。将A相加入搅拌机,搅拌加热到80-85℃。将B相加入油相锅,搅拌加热至75-80℃,完全溶解透明。将B相抽入A相,开启真空,均质5分钟,维持搅拌,保温20分钟。开始降温,降温至60-65℃,加入C相,均质2分钟。降温至35-40℃,加入预溶D相物料,搅拌10-15分钟,即得。

[0178] 在本公开中,诸如第一和第二等之类的关系术语仅仅用来将一个实体或者操作与另一个实体或操作区分开来,而不一定要求或者暗示这些实体或操作之间存在任何这种实际的关系或者顺序。而且,术语“包括”、“包含”或者其任何其他变体意在涵盖非排他性的包含,从而使得包括一系列要素的过程、方法、物品或者终端设备不仅包括那些要素,而且还包括没有明确列出的其他要素,或者是还包括为这种过程、方法、物品或者终端设备所固有的要素。在没有更多限制的情况下,由语句“包括一个……”限定的要素,并不排除在包括所述要素的过程、方法、物品或者终端设备中还存在另外的相同要素。

[0179] 尽管为了示例性说明的目的描述了本公开的具体实施方案,但是在不偏离本公开的精神和范围的条件下,本领域的技术人员可以作出各种变形或改进。这些变形或改进都应落入本公开所附权利要求的范围。

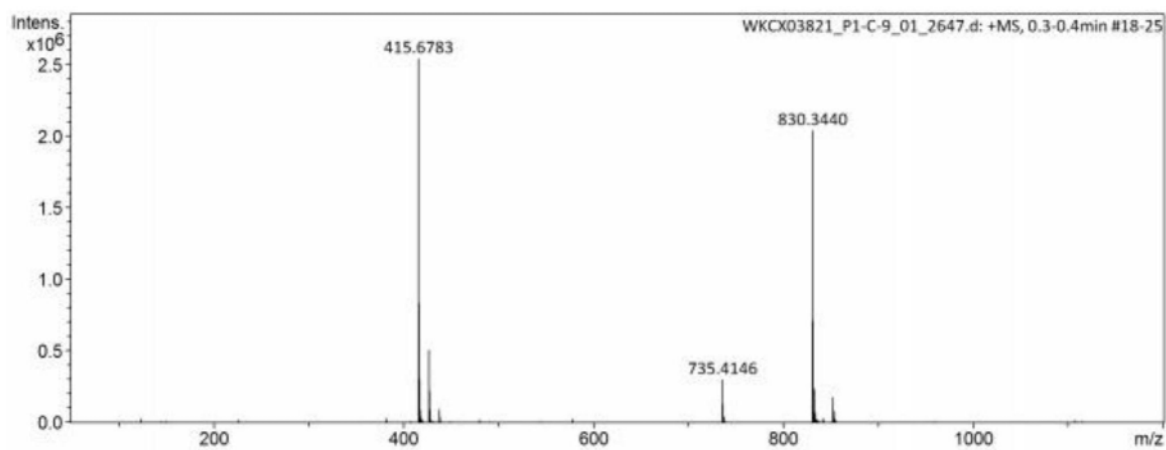


图1