

【圖4】



I862641

【發明摘要】

【中文發明名稱】

具有抗老化功效之多肽及其用途

【英文發明名稱】

POLYPEPTIDES HAVING ANTI-SENESCENT EFFECTS AND
USES THEREOF

【中文】

本發明提供多肽，該等多肽可提供抗衰老治療功效。該等多肽可經調配以供局部施用且可局部施用至個體以在該個體中或在該個體之細胞中提供抗衰老治療功效。

【英文】

Polypeptides which can provide a senotherapeutic effect are provided herein. The polypeptides can be formulated for topical application and can be applied topically to a subject to provide a senotherapeutic effect in the subject or in the cells of the subject.

【指定代表圖】

圖4A

【代表圖之符號簡單說明】

無

【發明說明書】

【中文發明名稱】

具有抗老化功效之多肽及其用途

【英文發明名稱】

POLYPEPTIDES HAVING ANTI-SENESCENT EFFECTS AND
USES THEREOF

【技術領域】

【先前技術】

【0001】 細胞老化之積聚不僅為生物體衰老之產物，其亦可能有效地促進在正反饋循環中之進一步老化誘導。在衰老之標誌當中，細胞老化可佔據中心位置，其整合衰老之初級、拮抗及整合態樣。首先，老化可能危害受影響組織之組織修復及再生能力，此係因為其減弱先驅細胞之增殖能力。其次，老化細胞可改變由其老化相關分泌表現型(SASP)表徵之旁分泌信號傳導環境，此可誘導炎症及進一步細胞老化，從而有可能加重潛在有害發炎反應且有可能促進組織損傷。第三，已在包括(但不限於)皮膚之若干組織中記載老化細胞隨年齡之積聚。第四，細胞老化可為疾病之積極參與者，該等疾病諸如黃斑變性、失智症、動脈粥樣硬化症及癌症。

【0002】 可藉由細胞核中之老化相關 β 半乳糖苷酶(SA-BGal)產生、p16表現及 α 地中海貧血/智力遲鈍X性聯染色體重塑蛋白質(ATRX)病灶積聚來鑑別老化細胞。功能改變亦區分老化細胞，該等功能改變包括減弱的增殖能力及對細胞分裂刺激之抗性。

【發明內容】

【0003】 本文中描述包含經分離、合成及/或重組多肽之組合物，該

分離、合成及/或重組多肽包含胺基酸序列LKGI (SEQ ID NO: 5)或其類似物、胺基酸序列LKGIL (SEQ ID NO: 6)或其類似物、胺基酸序列WLKGI (SEQ ID NO: 7)或其類似物。在一些實施例中，此多肽可包含至少4、5、6、7、8、9、10、11、12、13、14、15、16、17、18、19、20、21、22、23、24、25、26、27、28、29、30、35或40個胺基酸。替代地或另外，此多肽包含至多100、90、80、70、60、50、40、35、30、25或20個胺基酸。在一些情況下，該多肽與SEQ ID NO: 1至4中之任一者具有至少70%、75%、80%、85%、90%、95%、96%、97%、98%或99%序列一致性。

【0004】 本文中亦描述經分離、合成及/或重組多肽，其包含胺基酸序列SEQ ID NO: 8，該胺基酸序列由 $X_1X_2X_3X_4X_5X_6X_7X_8X_9X_{10}$ 或其類似物表示

1. 其中 X_1 為E， X_2 為T， X_4 為K， X_6 為W， X_7 為L， X_9 為G，且 X_{10} 為I；且(i) X_3 不為S；或

2. (ii)若 X_5 為任何胺基酸，則 X_8 不為G；或

3. (iii)若 X_8 為任何胺基酸，則 X_5 不為N；

4. 或(iv) (i)、(ii)或(iii)中之任一者，該胺基酸序列視情況具有1、2、3或4個保守胺基酸取代；或

5. (b)該胺基酸序列與第二序列SEQ ID NO: 2具有至少70%、80%、85%、90%或95%一致性，其中 X_1 為A， X_2 為T， X_3 為A， X_4 為K， X_5 為A， X_6 為W， X_7 為L， X_8 為K， X_9 為G，且 X_{10} 為I，該胺基酸序列視情況具有1、2、3或4個保守胺基酸取代；或(c)該胺基酸序列與第三序列SEQ ID NO: 3具有至少70%、80%、85%、90%或95%一致性，其中 X_1 為K， X_2

為L，X₅為I，X₆為L，X₈為G，且X₁₀為A；且(i)若X₉為任何胺基酸，則X₃不為N；或(ii)若X₃為任何胺基酸，則X₉不為S；或(iii)若X₄為任何胺基酸，則X₇不為L；或(iv)若X₇為任何胺基酸，則X₄不為S，及；或(v) (i)、(ii)、(iii)或(iv)中之任一者，該胺基酸序列視情況具有1、2、3或4個保守胺基酸取代；或(d)該胺基酸序列與第四序列SEQ ID NO: 4具有至少70%、80%、85%、90%或95%一致性，其中X₁為W，X₂為L，X₃為K，X₄為G，X₅為I，X₆為L，X₇為R，X₈為E，X₉為A，且X₁₀為A，該胺基酸序列視情況具有1、2、3或4個保守胺基酸取代。

【0005】 在一些實施例中，該胺基酸序列包含LKGI (SEQ ID NO: 5)。在一些實施例中，該胺基酸序列包含WLKGI (SEQ ID NO: 7)。在一些實施例中，該胺基酸序列包含LKGIL (SEQ ID NO: 6)。在一些實施例中，該胺基酸序列與序列SEQ ID NO: 1具有至少70%、80%、85%、90%或95%一致性。在一些實施例中，該胺基酸序列為SEQ ID NO: 1。在一些實施例中，該胺基酸序列為SEQ ID NO: 2。在一些實施例中，該胺基酸序列與序列SEQ ID NO: 3具有至少70%、80%、85%、90%或95%一致性。在一些實施例中，該胺基酸序列為SEQ ID NO: 3。在一些實施例中，該胺基酸序列為SEQ ID NO: 4。在一些實施例中，該重組多肽包含至少10個胺基酸、15個胺基酸或20個胺基酸。

【0006】 本文中所提供之組合物可經調配以用作治療劑、營養製劑或化妝品。

【0007】 在一些實施例中，該調配物進一步包含治療劑、營養製劑或化妝品賦形劑。在一些實施例中，該賦形劑經組態以供局部施用。在一些實施例中，該賦形劑經組態為局部補充劑。在其他實施例中，該調配物

經組態以供施用至人類皮膚。在一些實施例中，調配物為乳膏、經皮貼片、局部貼片、軟膏、油狀物、凝膠、液體、散劑、洗劑、精華液、乳液、保濕劑、化妝水(toner)、泡沫、面罩、摩斯(mousse)、氣霧、噴霧、清潔劑、水凝膠貼片、散劑或洗髮劑。在一些實施例中，該調配物可與音波治療、超音波治療、LED治療、光治療、電治療或射頻治療結合使用。在一些實施例中，該經皮貼片將該調配物遞送至該皮膚之表皮層。在一些實施例中，該經皮貼片將該調配物遞送至該皮膚之表皮層及真皮層。在一些實施例中，該調配物以最小量或較低量在個體中全身性地遞送或不意欲直接遞送至該個體之血流中。在一些實施例中，該調配物在遞送位點處及附近局部地作用。在一些實施例中，該調配物具有最小至無全身性功效。

【0008】 在一些實施例中，該調配物經組態為可食補充劑。在一些情況下，該調配物經組態為飲料。

【0009】 本文中描述治療劑、營養製劑或化妝品調配物，其包含至少一種本文中之重組或合成多肽及治療劑、營養製劑或化妝品賦形劑。

【0010】 在一些實施例中，該賦形劑經組態以供局部施用。在一些實施例中，該賦形劑經組態為局部補充劑。在其他實施例中，該調配物經調配以供施用至人類皮膚。更具體而言，該調配物可經組態以自該表皮局部地滲透至該真皮。在一些實施例中，該調配物可經組態以局部地滲透穿過該表皮及該等真皮層。在一些實施例中，該調配物可經組態以局部地滲透穿過該表皮層且進入該真皮層中之滲透性較低。通常，可使用各種滲透研究來評定調配物中組分之滲透性，該等滲透研究包括(但不限於)使用Franz擴散細胞之彼等。在一些實施例中，該調配物包含載劑、微球體、脂質體或膠束，以便攜載多肽且控制多肽穿過該皮膚之釋放時間及/或滲

透深度。在一些情況下，本文中之調配物為乳膏、軟膏、凝膠、液體、油狀物、散劑、洗劑、精華液、乳液、保濕劑、泡沫、面罩、摩斯、氣霧、噴霧、清潔劑、化妝水、局部貼片、水凝膠貼片或洗髮劑。

【0011】 在一些實施例中，該調配物經組態為可食補充劑。在一些實施例中，該調配物經組態為飲料。在一些實施例中，該調配物經組態為錠劑、膠囊、凝膠、軟糖或散劑。

【0012】 本文中描述治療有需要之個體之病況的方法，該方法包含向該個體投與包含胺基酸序列SEQ ID NO: 5至7中之至少一者的治療劑、營養製劑或化妝品調配物。

【0013】 在一些實施例中，該投與包含將該調配物局部施用至該個體。在其他實施例中，該個體為人類或其他動物。在一些實施例中，該方法包含向該個體投與有效量之該調配物。

【0014】 在一些實施例中，該病況為與該個體中老化細胞之積聚相關的病症。在一些實施例中，與老化細胞之積聚相關的該病症包含皮膚衰老。在一些實施例中，該病況為與早老症及/或早老症之影響相關的病症。在一些實施例中，早老症包含在皮膚之表皮及真皮層中具有過早衰老症狀的病況。

【0015】 本文中描述減少有需要之個體之細胞老化的方法，該方法包含向該個體投與包含多肽之治療劑、營養製劑或化妝品調配物，該多肽包含視情況具有1個保守胺基酸取代之胺基酸序列LKGI (SEQ ID NO: 5)。

【0016】 在一些實施例中，該多肽包含至少4個胺基酸、10個胺基酸、15個胺基酸或20個胺基酸。在一些實施例中，該調配物包含視情況

具有1個保守胺基酸取代之胺基酸序列WLKGI (SEQ ID NO: 7)。在一些實施例中，該調配物包含視情況具有1個保守胺基酸取代之胺基酸序列LKGIL (SEQ ID NO: 6)。在一些實施例中，該多肽包含至少5個胺基酸、10個胺基酸、15個胺基酸或20個胺基酸。在一些實施例中，該多肽包含不超過10個胺基酸、15個胺基酸、20個胺基酸、25個胺基酸、30個胺基酸、35個胺基酸或40個胺基酸。

【0017】 在一些實施例中，該調配物進一步包含治療劑、營養製劑或化妝品賦形劑。

【0018】 本文中描述減少有需要之個體之細胞老化的方法，該方法包含向該個體投與包含本文中所描述之至少一種多肽的治療劑、營養製劑或化妝品調配物。

【0019】 在一些實施例中，該調配物進一步包含治療劑、營養製劑或化妝品賦形劑。在一些實施例中，該投與包含將該調配物施用至該個體之皮膚之一部分。在一些實施例中，該調配物延長該個體之複數個細胞的壽命、誘導該個體之複數個細胞中的SIRT6表現、增加該個體之複數個細胞中的細胞再生速率、促進該個體之複數個細胞中的凋亡、促進該個體之複數個細胞中的DNA修復、增加該個體之複數個細胞中的膠原蛋白產生、增加該個體之複數個細胞中的玻尿酸合成酶產生、減少該個體之複數個細胞中的ATR^X核病灶積聚、減少該個體之複數個細胞中的p16表現、減少該個體之複數個細胞中的老化相關β-半乳糖苷酶產生、減少該個體之複數個細胞中的IL8表現、減少該個體之複數個細胞中的MMP1表現、增加該個體之複數個細胞中的BLM表現及/或防止該個體之複數個細胞中的UV誘導之DNA損害。

【0020】本文中描述治療有需要之個體之病況的方法，該方法包含向個體投與包含視情況具有1個保守胺基酸取代之胺基酸序列SEQ ID NO: 5的治療劑、營養製劑或化妝品調配物。

【0021】在一些實施例中，該治療劑、營養製劑或化妝品調配物包含視情況具有1個保守胺基酸取代之胺基酸序列SEQ ID NO: 6。在一些實施例中，該治療劑、營養製劑或化妝品調配物包含視情況具有1個保守胺基酸取代之胺基酸序列SEQ ID NO: 7。

以引用之方式併入

【0022】本說明書中提及之所有公開案、專利及專利申請案均以引用之方式併入本文中，其引用之程度如同各個別公開案、專利或專利申請案經特定及單獨地指示以引用之方式併入一般。

【圖式簡單說明】

【0023】本發明之新穎特徵在所附申請專利範圍中細緻闡述。將參考闡述利用本發明原理之說明性實施例及其隨附圖式的以下詳細描述來獲得對本發明之特徵及優點的較佳理解：

【0024】圖1說明個別多肽對早老症纖維母細胞細胞數目及老化水準之影響。

【0025】圖2說明四種多肽(肽14 (盤A)、肽13 (盤B)、肽15 (盤C)及肽16 (盤D))對老化纖維母細胞之抗衰老治療功效。 $*p<0.05$ ； $**p<0.01$ ； $***p<0.001$ 。

【0026】圖3說明多肽之抗衰老治療功效，該多肽促進較高數目的具有較少ATR_X病灶/細胞核(盤A)、較低ATR_X病灶/細胞核平均值(盤B)之細胞及較高數目的具有少於10個ATR_X病灶/細胞核(盤C)之細胞。

* $p < 0.05$; ** $p < 0.01$ 。

【0027】 圖4說明抗衰老治療多肽之功效，該多肽可在3週長暴露期間減少細胞群體中老化纖維母細胞之數目，在治療之後將抗衰老治療功效保持至少一週(盤A)，而不在此時段期間誘導細胞毒性或顯著影響細胞增殖(盤B)。 $***p < 0.001$; $****p < 0.0001$ 。

【0028】 圖5說明用多肽處理可促進細胞老化之劑量反應減少，如藉由在來源於多個供體之細胞中的每細胞之平均ATRAX病灶積聚所量測。

【0029】 圖6說明細胞老化可藉由暴露於依託泊昔而在纖維母細胞中誘導(盤A)，用多肽處理依託泊昔誘導之老化細胞可引起老化減少(盤B)，細胞老化可由UVB暴露誘導(盤C)，且用多肽處理經UVB處理之樣本可引起老化減少(盤D)。 $*p < 0.05$; $**p < 0.01$; $***p < 0.001$ 。

【0030】 圖7說明用多肽處理之人類皮膚等效物可根據整體結構分析分數展現更高品質(盤A)，相較於未處理之對照，用多肽處理之人類皮膚等效物可包含比未處理之人類皮膚等效物顯著更少的老化細胞(盤A及盤B)，及經改變的基因表現，其中p16可在經多肽處理之表皮及真皮中具有顯著更低的表現；且相較於未處理之對應物，IL-8及MMP-1顯著更少地在經多肽處理之真皮中表現(盤C)。 $*p < 0.05$; $**p < 0.01$; $***p < 0.001$; $****p < 0.0001$ 。

【0031】 圖8說明pAkt S473可在用多肽處理之表皮及真皮樣本兩者中顯著減少(盤A)，多肽處理可減少經UVB暴露之樣本之SA-B gal染色，從而指示對UVB誘導之細胞老化之保護作用(盤B)，且多肽可增加SIRT6及BLM之表現(盤C)。 $*p < 0.05$; $**p < 0.01$; $***p < 0.001$ 。

【0032】 圖9說明人類皮膚等效物中增加之表皮層厚度作為組織學

影像(盤A)及所獲得資料之統計分析(盤B)。** $p < 0.01$ 。

【0033】 圖10說明兩種多肽(肽14 (盤A)及肽13 (盤B))以及兩種多肽之重疊(盤C)的預測三維結構。

【0034】 圖11A說明未與肽14 (對照)及與12.5 μM 肽14 (12.5 μM Pep 14)一起培養5天的3D皮膚等效物(頂部列)及離體皮膚活體組織切片樣本(底部列)之蘇木精及曙紅(H&E)染色組織學影像。

【0035】 圖11B說明用12.5 μM 肽14 (處理組)處理的3D皮膚模型(頂部圖示)及離體皮膚活體組織切片樣本(底部圖示)之所預測年齡(亦稱為分子DNA年齡)低於作為未處理之對照(ctrl)的樣本之所預測年齡。
** $p < 0.01$ 。

【0036】 圖11C說明用12.5 μM 肽14 (12.5 μM Pep 14)處理的離體皮膚活體組織切片之預測年齡低於作為未處理之對照(ctrl)的樣本之預測年齡。

【0037】 圖12A說明在與IBMX一起進行14天預處理培養之後，用異丁基甲基黃嘌呤(IBMX)之陽性對照、陰性對照、肽14與IBMX及視黃酸與IBMX處理7天的MeWo細胞之細胞集結粒之相對黑色素含量。資料呈現為歸一化至陰性對照(100%)的黑色素含量之平均值及標準差。
** $p < 0.01$ ；*** $p < 0.001$ ；**** $p < 0.0001$ 。

【0038】 圖12B說明在與異丁基甲基黃嘌呤(IBMX)一起進行14天預處理培養之後，來自用陽性對照與IBMX、陰性對照、肽14及視黃酸處理7天之MeWo細胞的細胞培養基上清液之相對黑色素含量。資料呈現為歸一化至陰性對照(100%)的黑色素含量之平均值及標準差。
* $p < 0.05$ ；
** $p < 0.01$ 。

【0039】 圖13A說明在與異丁基甲基黃嘌呤(IBMx)一起進行14天預處理培養之後，用IBMx之陽性對照、陰性對照、肽14與IBMx處理14天、視黃酸與IBMx處理14天、肽14與IBMx處理7天、視黃酸與IBMx處理7天的MeWo細胞之細胞集結粒之相對黑色素含量。資料呈現為歸一化至陰性對照(100%)的黑色素含量之平均值及標準差。 $*p<0.05$ ； $**p<0.01$ ； $****p<0.0001$ 。

【0040】 圖13B說明在與異丁基甲基黃嘌呤(IBMx)一起進行14天預處理培養之後，來自用IBMx之陽性對照、陰性對照、肽14與IBMx處理14天、視黃酸與IBMx處理14天、肽14與IBMx處理7天、視黃酸與IBMx處理7天之MeWo細胞的細胞培養基上清液之相對黑色素含量。資料呈現為歸一化至陰性對照(100%)的黑色素含量之平均值及標準差。 $*p<0.05$ ； $**p<0.01$ ； $****p<0.0001$ 。

【0041】 圖14A說明用IBMx之陽性對照、陰性對照、肽14與IBMx處理14天、視黃酸與IBMx處理14天、肽14與IBMx處理7天、視黃酸與IBMx處理7天的MeWo細胞之酪胺酸酶之相對mRNA表現量。資料呈現為歸一化至GAPDH及陰性對照表現(100%)的2-ddCt之平均值及標準差。 $*p<0.05$ ； $**p<0.01$ ； $****p<0.0001$ 。

【0042】 圖14B說明用IBMx之陽性對照、陰性對照、肽14與IBMx處理14天、視黃酸與IBMx處理14天、肽14與IBMx處理7天、視黃酸與IBMx處理7天的MeWo細胞之黑色素細胞誘導之轉錄因子(MITF)之相對mRNA表現量。資料呈現為歸一化至GAPDH及陰性對照表現(100%)的2-ddCt之平均值及標準差。 $*p<0.05$ ； $**p<0.01$ ； $***p<0.001$ 。

【0043】 圖14C說明用IBMx之陽性對照、陰性對照、肽14與IBMx

處理14天、視黃酸與IBMX處理14天、肽14與IBXM處理7天、視黃酸與IBMX處理7天的MeWo細胞之多巴色素互變異構酶(DCT)之相對mRNA表現量。資料呈現為歸一化至GAPDH及陰性對照表現(100%)的2-ddCt之平均值及標準差。 $**p<0.01$ ； $***p<0.001$ ； $****p<0.0001$ 。

【0044】圖15A說明用僅媒劑(對照)、肽13或肽14處理的活體外人類皮膚模型之H&E染色組織學影像。

【0045】圖15B說明用僅媒劑(對照)、肽14或肽13處理的人類皮膚模型之組織學分數之平均值，該等組織學分數分別為21.00、23.83及23.44。 $**p<0.01$ 。

【0046】圖16說明在處理之前在基線處(左側，基線)及在處理12週之後(右側，12週)用肽14處理的面部之左側之一實例。

【0047】圖17說明用對照、肽14、肽13或視黃酸處理的3D皮膚等效物之表皮及真皮層之p16、BLIMP1、ZYG11B、IL-8、Ki-67、ZIC1、MMP1、HAS2之相對mRNA表現量。資料呈現為歸一化至GAPDH及未處理對照的2-ddCt。 $*p<0.05$ 。

【0048】圖18說明秀麗隱桿線蟲(*Caenorhabditis elegans*)之延長壽命及健康作為所獲得資料，從而指示用1 μ M或2 μ M多肽處理改善蠕蟲輾轉(盤A)、泵送(盤B)及中位壽命(盤C)。 $*p<0.05$ ； $**p<0.01$ 。

【0049】圖19說明多肽序列LKGIL (SEQ ID NO: 6) (A、B、C)及多肽序列WLKGI (SEQ ID NO: 7) (D、E、F)在不促進細胞死亡之情況下減少細胞老化的功效。在盤A及盤D中，y軸指示歸一化至未處理對照之相對老化水準。在盤B及盤D中，y軸指示歸一化至未處理對照之相對細胞數

目。在盤C及盤F中，y軸指示每細胞之平均ATR_X病灶積聚。 $*p<0.05$ ； $**p<0.01$ 。

【實施方式】

【0050】 衰老很大程度上可能由能夠維持組織體內恆定及完整性之能力的功能下降造成，可能與應激條件下對生理需求之回應減少有關。

【0051】 在皮膚衰老之嵌合體模型中，老化細胞可由內部及外部刺激誘發導，諸如時間/年齡、UV暴露及抽菸以及其他。根據此模型，老化細胞積聚在皮膚中且藉由經由由促炎性細胞介素以及其他構成之老化相關分泌表型(SASP)改變局部微環境而有效地促進組織衰老。在一些情況下，老化細胞藉由損害表皮幹細胞再生且促進其他正常細胞老化進一步促進皮膚衰老。因此，老化細胞不僅為皮膚衰老之產物，且亦為衰老過程中之積極參與者。

【0052】 皮膚功能異常可影響生物體衰老及年齡相關之疾病及病症之產生。舉例而言，與具有受損皮膚屏障之對應物相比，皮膚健康且正常屏障功能可與較低水準之發炎性及年齡相關細胞介素IL-1 β 及IL-6相關。已在患有若干年齡相關之病症的患者之血清中觀察到增加水準的IL-1 β 及IL-6，該等病症包括心血管疾病(CVD)、阿茲海默氏病(Alzheimer's disease)及II型糖尿病。在一些情況下，在老年人血清中，IL-6可與各種原因之死亡、CVD、癌症及肝相關死亡相關。在一些情況下，表皮功能之恢復可有效降低循環TNF α 、IL-1 β 及IL-6細胞介素水準。

【0053】 本文提供多肽、包含多肽及其他組分之組合物以及其使用方法。多肽及包含多肽之組合物可提供抗老化功效(例如，對於個體之細胞)。多肽可藉由促進細胞凋亡、促進DNA修復及/或抑制DNA損害誘導

之老化來促進細胞及組織之老化水準降低。抗老化功效可包括(但不限於)增加細胞再生速率、增加膠原蛋白產生、增加玻尿酸合成酶產生、減少ATR_X核病灶積聚、減少p16表現、降低SASP產生、減少老化相關β半乳糖苷酶產生、減少不均勻的色素沈著、維持或改善表皮屏障以及降低經表皮水流失(TEWL)。本文提供之多肽及包含多肽之組合物可抑制、預防或減緩衰老相關及/或老化相關之疾病或病況。此外，多肽及包含多肽之組合物可增強或改善健康及/或提高壽命。

【0054】 應理解，本文所描述之方法及組合物不限於本文所描述之特定方法、方案及試劑，且因此可變化。亦應理解，本文中所用之術語僅出於描述特定實施例之目的，且並不意欲限制本文中所描述之方法及組合物之範疇，該範疇將僅受隨附申請專利範圍限制。

【0055】 如本文及隨附申請專利範圍中所用，除非上下文另外明確規定，否則單數形式「一(a/an)」及「該」包括複數個參考物。

【0056】 除非另外定義，否則本文中所用之所有技術及科學術語具有與本文中所描述之發明所屬之領域中一般熟習此項技術者通常所理解相同之含義。儘管類似或等效於本文所描述之彼等方法、裝置及材料的任何方法、裝置及材料均可用於本文中所描述之本發明之實踐或測試中，現描述較佳的方法、裝置及材料。

【0057】 在肽或多肽中，胺基酸之適合保守取代為熟習此項技術者已知的且可通常在不改變所得分子之生物活性之情況下製得。Watson等人(1987, *Molecular Biology of the Gene*, 第4版, The Benjamin Cummings Pub. Co., 第224頁)以引用之方式併入本文中。胺基酸可呈L或D異構形式。當胺基酸殘基為多肽鏈之部分時，胺基酸之D異構形式可取

代L胺基酸殘基，只要保持所需官能特性即可。本文中之胺基酸可由其標準IUPAC 1字母碼或3字母碼表示。由「X」或「Xxx」表示之胺基酸殘基係指此項技術中已知的天然存在或非天然存在之胺基酸殘基中之任一者或附近殘基之修飾。胺基酸取代通常具有單個殘基，此類取代較佳地由表1中所闡述之彼等殘基製得，但可具有聚集或分散的多個殘基。胺基酸可經不同天然存在或非習知的胺基酸殘基置換。在含於多肽中之胺基酸殘基經具有極性、側鏈官能度或大小有關之類似特徵的另一種天然存在之胺基酸置換的情況下，此類取代可歸類為「保守的」。添加涵蓋一或多個天然存在或非習知的胺基酸殘基之添加。缺失涵蓋一或多個胺基酸殘基之缺失。

表1.保守及非保守胺基酸取代

胺基酸	保守取代	非保守取代
A	D、E、G、S及T	P及V
C	G、R、S、W及Y	F
D	A、E、G、H、N、V及Y	
E	A、D、G、K、Q及V	
F	I、L及Y	C、S及V
G	A、C、D、E及R	S、V及W
H	D、L、N、P、Q、R及Y	
I	F、L、M、N及V	K、R、S及T
K	E、M、N、Q、R及T	I
L	F、H、I、M、P、Q、R、V及W	S
M	I、K、L、R、T及V	
N	D、H、I、K、S、T及Y	
P	H、L、Q、R及S	A及T
Q	E、H、K、L、P及R	
R	C、G、H、K、L、M、P、Q、T及W	I及S
S	A、C、N、P、T、W及Y	F、G、I、L及R
T	A、K、M、N、R及S	I及P
V	D、E、I、L及M	A、F及G
W	C、L、R及S	G
Y	C、D、F、H、N及S	

【0058】 本發明涵蓋之取代亦可為「非保守的」，其中存在於多肽中之胺基酸殘基經具有不同特性之胺基酸，諸如來自不同基團之天然存在之胺基酸取代(例如，用丙胺酸取代帶電或疏水性胺基酸)，或替代地，其中天然存在之胺基酸經非習知胺基酸取代。

【0059】 如本文中所使用，術語「類似物」係指保留與多肽相同之結構或官能(例如，結合於受體)的組合物，諸如來自不同生物體之相同蛋白質。類似物之實例包括模擬物或肽模擬物、肽、較小及較大有機或無機化合物，以及本文中之多肽之衍生物及變體。此類衍生物及變體係指與天然存在之多肽不同之處在於一或多個胺基酸缺失、添加、取代或側鏈修飾的多肽。在一些實施例中，肽類似物為其中胺基酸中之一或多者已經歷側鏈修飾之肽。本發明涵蓋之側鏈修飾之實例包括胺基之修飾，諸如藉由與醛反應進行還原烷基化，隨後用 NaBH_4 進行還原；用乙醯亞胺甲酯進行脒化；用乙酸酐進行醯化；用氰酸酯進行胺基之胺甲醯化；用2,4,6-三硝基苯磺酸(TNBS)進行胺基之三硝基苄化；用丁二酸酐及四氫鄰苯二甲酸酐進行胺基之醯化；及用吡哆醛-5-磷酸酯進行離胺酸之吡哆醛化，隨後用 NaBH_4 進行還原。在一些實施例中，肽類似物為以下肽類似物：其中精胺酸殘基之胍基係藉由與諸如2,3-丁二酮、苯基乙二醛及乙二醛之試劑形成雜環縮合產物而經修飾；羧基係藉由經由O-醯基異脲形成進行之碳化二亞胺活化，隨後後續衍生為例如對應醯胺而經修飾；硫氫基可藉由諸如以下之方法而經修飾：用碘乙酸或碘乙醯胺進行羧甲基化；過甲酸氧化至氧化半胱胺酸；與其他硫醇化合物形成混合二硫化物；與順丁烯二醯亞胺、順丁烯二酸酐或其他經取代順丁烯二醯亞胺反應；使用4-氯汞基苯甲酸鹽、4-氯汞基苯基磺酸、氯化苯基汞、2-氯汞基-4-硝基苯酚及其他汞劑形成汞

劑衍生物；在鹼性pH下用氰酸酯進行胺甲醯化。在本文中之類似物中之任一者中，半胱胺酸殘基之任何修飾較佳地不影響肽形成所需二硫鍵之能力。在一些實施例中，肽類似物包含：例如藉由用N-溴代丁二醯亞胺進行氧化或用2-羥基-5-硝苄基溴或次磺醯基鹵化物使吡啶環烷基化而經修飾的色胺酸殘基；藉由用四硝基甲烷進行硝化以形成3-硝基酪胺酸衍生物而改變的酪胺酸殘基；藉由用碘乙酸衍生物進行烷基化或用焦碳酸二乙酯進行N-乙氧羰化實現的組胺酸殘基修飾之咪唑環；藉由例如在4-位置進行羥基化而修飾的脯胺酸殘基；自完全未糖基化分子至經修飾糖基化分子的糖基化變體；及作為重組分子在不同宿主細胞中之表現之結果的經改變糖基化模式。

【0060】 術語「經分離」意謂自其天然狀態改變；亦即，若其天然存在，則其已自其原始環境改變或移除或兩者。舉例而言，以其天然狀態天然存在於活的動物中的天然存在之聚核苷酸或多肽未「經分離」，但自其天然狀態之共存材料分離的相同聚核苷酸或多肽「經分離」，如該術語在本文中所用。

【0061】 如本文中所使用，術語「蛋白質」、「肽」、「寡肽」或「多肽」係指包括藉由肽鍵接合在一起的兩個或更多個胺基酸的任何組合物。應瞭解，多肽通常含有除20個胺基酸(通常稱為20個天然存在之胺基酸)以外的胺基酸，且多個胺基酸(包括封端胺基酸)可藉由天然方法(諸如糖基化及其他轉譯後修飾)或藉由此項技術中所熟知的化學修飾技術在給定多肽中經修飾。可存在於本發明之多肽中的已知修飾包括(但不限於)乙醯化、醯化、ADP核糖基化、醯胺化、共價連接類黃酮或血紅素部分、共價連接聚核苷酸或聚核苷酸衍生物、共價連接脂質或脂質衍生物、共價連接

磷脂醯環己六醇、交聯、環化、二硫鍵形成、去甲基化、形成共價交聯、形成胱胺酸、形成焦麩胺酸鹽、甲醯化、 γ 羧化、糖化、糖基化、糖基磷脂醯肌醇(GPI)膜錨形成、羥基化、碘化、甲基化、豆蔻醯化、氧化、蛋白水解處理、磷酸化、異戊烯化、外消旋化、硒化、硫酸化、轉移RNA介導之將胺基酸添加至多肽(諸如精胺醯化及泛素化)。術語「蛋白質」亦包括指代直鏈或分支鏈多肽之「人工蛋白質」，其由多肽(例如，SEQ ID NO:1-7)及間隔基之交替重複組成。編碼多肽及間隔基交替重複之DNA構築體可使用此項技術中已知之方法來合成(參見Rotzschke等人，1997, Proc. Natl. Acad. Sci. USA 94:14642-14647)。

【0062】 如本文中用於描述多肽、聚核苷酸或其他組合物之術語「經純化」係指自一或多種化合物分離之此類多肽、聚核苷酸或其他組合物，此類多肽、聚核苷酸或其他組合物在本質上與該一或多種化合物相關。此類其他組合物可為例如其他多肽或聚核苷酸、碳水化合物、脂質等。術語「經純化」亦可用於指定將本發明之單體多肽自諸如均或雜二聚體、三聚體等之寡聚形式分離。大體上純的多肽通常包含至少約50%、60%、70%、80%或90%重量/重量之多肽樣本，或更佳地至少約95%、96%、97%、98%、99%或99.5%重量/重量之多肽樣本。作為一較佳實施例，本發明之多肽相對於異源多肽至少10%、20%、30%、40%、50%、60%、70%、80%、90%、95%、96%、97%、98%、99%或100%純。

【0063】 如本文中所用，術語「個體」或「患者」涵蓋動物。在一些實施例中，該個體可為哺乳動物。哺乳動物之實例包括(但不限於)哺乳動物類別之任何成員：人類、非人類靈長類(諸如黑猩猩及其他猿類及猴類物種)；農畜，諸如牛、馬、綿羊、山羊及豬；家畜，諸如兔、狗及

貓；實驗室動物，包括嚙齒動物，諸如大鼠、小鼠及天竺鼠以及類似動物。哺乳動物可為人類。

【0064】 如本文中所使用，術語「治療(treat/treating/treatment)」包括防治性及/或治療學上延緩疾病或病況之至少一種症狀之發作，降低疾病或病況之至少一種症狀之出現率或改善疾病或病況之至少一種症狀，預防額外症狀，抑制疾病或病況，例如遏制疾病或病況之產生，減輕疾病或病況，引起疾病或病況消退，減輕由疾病或病況所引起之病況或停止疾病或病況之症狀。

【0065】 如本文中所用，術語「治療學上可接受」係指包括(但不限於)鹽、載劑或稀釋劑的材料，其不阻斷化合物之生物活性或特性，且為相對無毒的，亦即可向個體投與該材料而不造成非所需的生物功效或以有害方式與含有其之組合物之組分中之任一者相互作用。

【0066】 如本文中所用，術語「載劑」係指有助於將化合物併入細胞或組織中的相對無毒的化學化合物或藥劑。

【0067】 如本文中所用，術語「稀釋劑」係指用於在遞送之前將所關注化合物稀釋的化學化合物。稀釋劑亦可用於使化合物穩定，此係因為其可提供更穩定的環境。溶解於緩衝溶液(其亦可提供pH控制或維持)中之鹽在此項技術中用作稀釋劑，緩衝溶液包括(但不限於)磷酸鹽緩衝之生理食鹽水溶液。

【0068】 如本文所用，術語「有效量」或「治療有效量」係指足以在一定程度上減輕所治療之疾病或病況之一或多種症狀的所投與之藥劑或化合物之量。結果可為減輕及/或緩解疾病之病徵、症狀或病因，或生物系統之任何其他所需改變。舉例而言，用於治療用途之「有效量」為使疾

病症狀臨床上顯著減少所需的包含如本文所揭示之化合物的組合物之量。可使用諸如劑量遞增研究之技術測定任何個別情況下之適當「有效」量。

【0069】 可藉由細胞核中之老化相關 β 半乳糖苷酶(SA-BGal)產生、p16表現、SASP呈現及/或 α 地中海貧血/智力遲鈍X性聯染色體重塑蛋白(ATRX)病灶積聚來鑑別老化細胞。亦可區分老化細胞之功能改變包括(但不限於)降低的增殖能力及對促進細胞分裂刺激之抗性。

【0070】 衰老一般由能夠維持組織體內恆定及完整性之能力的功能下降造成，與應激條件下對生理需求之回應減弱有關。

【0071】 關於皮膚衰老，已提出一種嵌合體模型，其中衰老細胞係由內部及外部刺激誘導，諸如時間/年齡、UV暴露及抽菸以及其他刺激。根據該模型，老化細胞積聚在皮膚中且藉由經由由促炎性細胞介素以及其他構成之老化相關分泌表型(SASP)改變局部微環境而有效地促進組織衰老。已顯示老化細胞可藉由損害表皮幹細胞再生且促進其他正常細胞老化促進皮膚衰老。因此，老化細胞可不僅為皮膚衰老之產物，且亦可為衰老過程中之積極參與者。

【0072】 多肽具有諸如多功能行為之特性，其可使多肽適用於化妝或治療性應用，包括抗衰老治療。衰老期間觀察到的皮膚功能異常可影響年齡相關之疾病及病症之產生。

多肽

【0073】 如本文所提供之多肽及包含多肽之組合物可提供抗衰老治療功效，例如多肽可諸如藉由停止老化、預防老化、抑制老化、逆轉老化、毀壞老化細胞、殺死老化細胞、移除衰老細胞或藉由減少老化細胞積聚之負擔或功效的任何適合機制來減少老化。在一些情況下，此類多肽可

包含胺基酸序列LKGI (SEQ ID NO:5)。包含此類多肽之組合物可經採用或使用以提供抗衰老治療功效。

【0074】多肽(例如，抗衰老治療多肽)可包含至少4、5、6、7、8、9、10、11、12、13、14、15、16、17、18、19、20、21、22、23、24、25、26、27、28、29、30、31、32、33、34、35、36、37、38、39、40個或更多個胺基酸。在一些情況下，多肽之長度可為不超過4、5、6、7、8、9、10、11、12、13、14、15、16、17、18、19、20、21、22、23、24、25、26、27、28、29、30、31、32、33、34、35、36、37、38、39、40、45、50、55、60、65、70、75、80、85、90、95或100個胺基酸。在一些情況下，多肽之長度可為4至25、4至15或4至10個胺基酸。在一些實施例中，多肽可包含至少30、40、50、60、70、80、90、100或更多個胺基酸。在某些實施例中，多肽可包含少於100、90、80、70、60、50、40、30或更少個胺基酸。

【0075】可提供抗衰老治療功效之多肽之實例提供於下表2中。

表2：實例多肽胺基酸序列

名稱	SEQ ID NO:	胺基酸序列
肽14	1	ETAKHWLKGI
肽13	2	ATAKAWLKGI
肽15	3	KLKGILRGAA
肽16	4	WLKGILREAA

【0076】多肽可為經分離或重組多肽，其可包含胺基酸序列 $X_1X_2X_3X_4X_5X_6X_7X_8X_9X_{10}$ 。包括於多肽中之胺基酸可包含天然胺基酸，其可包括丙胺酸(Ala, A)、精胺酸(Arg, R)、天冬醯胺(Asn, N)、天冬胺酸(Asp, D)、半胱胺酸(Cys, C)、麩醯胺酸(Glu, Q)、麩胺酸(Glu, E)、甘胺酸(Gly, G)、組胺酸(His, H)、異白胺酸(Ile, I)、白胺酸

(Leu, L)、離胺酸(Lys, K)、甲硫胺酸(Met, M)、苯丙胺酸(Phe, F)、脯胺酸(Pro, P)、絲胺酸(Ser, S)、蘇胺酸(Thr, T)、色胺酸(Trp, W)、酪胺酸(Tyr, Y)或纈胺酸(Val, V)。

【0077】 在 一 些 情 況 下 ， 包 含 胺 基 酸 序 列 $X_1X_2X_3X_4X_5X_6X_7X_8X_9X_{10}$ 之 經 分 離 或 重 組 多 肽 可 包 含 與 第 一 序 列 ETAKHWLKGI (SEQ ID NO:1) 具有至少70%、75%、80%、85%、90% 或95%一致性之胺基酸序列，其中 X_1 為E， X_2 為T， X_4 為K， X_6 為W， X_7 為L， X_9 為G且 X_{10} 為I；且其中至少(i) X_3 不為S；或(ii)若 X_5 為任何胺基酸，則 X_8 不為G；或(iii)若 X_8 為任何胺基酸，則 X_5 不為N；或(iv) (i)、(ii) 或(iii)中之任一者，其中序列可視情況包含1、2、3或4個保守胺基酸取代。在一些情況下，經分離或重組多肽可包括與序列ETAKHWLKGI (SEQ ID NO:1) 具有至少70%、75%、80%、85%、90%、95%或100%一致性之胺基酸序列。本發明亦涵蓋類似物，諸如上文之肽模擬物。

【0078】 在 一 些 情 況 下 ， 包 含 胺 基 酸 序 列 $X_1X_2X_3X_4X_5X_6X_7X_8X_9X_{10}$ 之 經 分 離 或 重 組 多 肽 可 包 含 與 第 二 序 列 ATAKAWLKGI (SEQ ID NO:2) 具有至少70%、75%、80%、85%、90% 或95%一致性之胺基酸序列，其中 X_1 為A， X_2 為T， X_3 為A， X_4 為K， X_5 為A， X_6 為W， X_7 為L， X_8 為K， X_9 為G且 X_{10} 為I。此重組多肽可視情況包含1、2、3或4個保守胺基酸取代。在一些情況下，經分離或重組多肽可包括與序列ATAKAWLKGI (SEQ ID NO:2) 具有至少70%、75%、80%、85%、90%、95%或100%一致性之胺基酸序列。本發明亦涵蓋類似物，諸如上文之肽模擬物。

【0079】 在 一 些 情 況 下 ， 包 含 胺 基 酸 序 列

$X_1X_2X_3X_4X_5X_6X_7X_8X_9X_{10}$ 之經分離或重組多肽可包含與第三序列 KLKGILRGAA (SEQ ID NO:3) 具有至少 70%、75%、80%、85%、90% 或 95% 一致性之胺基酸序列，其中至少 (i) 若 X_9 為任何胺基酸，則 X_3 不為 N；或 (ii) 若 X_3 為任何胺基酸，則 X_9 不為 S；或 (iii) 若 X_4 為任何胺基酸，則 X_7 不為 L；或 (iv) 若 X_7 為任何胺基酸，則 X_4 不為 S；或 (v) (i)、(ii)、(iii) 或 (iv) 中之任一者，其中序列可視情況包含 1、2、3 或 4 個保守胺基酸取代。在一些情況下，經分離或重組多肽可包括與序列 KLKGILRGAA (SEQ ID NO:3) 具有至少 70%、75%、80%、85%、90%、95% 或 100% 一致性之胺基酸序列。本發明亦涵蓋類似物，諸如上文之肽模擬物。

【0080】 在一些情況下，包含胺基酸序列 $X_1X_2X_3X_4X_5X_6X_7X_8X_9X_{10}$ 之經分離或重組多肽可包含與第四序列 WLKGILREAA (SEQ ID NO:4) 具有至少 80%、85%、90% 或 95% 一致性之胺基酸序列，其中 X_1 為 W， X_2 為 L， X_3 為 K， X_4 為 G， X_5 為 I， X_6 為 L， X_7 為 R， X_8 為 E， X_9 為 A 且 X_{10} 為 A。此重組多肽可視情況包含 1、2、3 或 4 個保守胺基酸取代。在一些情況下，經分離或重組多肽可包括與序列 WLKGILREAA (SEQ ID NO:4) 具有至少 80%、85%、90%、95% 或 100% 一致性之胺基酸序列。本發明亦涵蓋類似物，諸如上文之肽模擬物。

【0081】 在一些情況下，多肽可包含胺基酸序列 LKGI (SEQ ID NO:5)、LKGIL (SEQ ID NO:6) 或 WLKGI (SEQ ID NO:7) (參見下表 3)。

表 3：實例多肽胺基酸序列

SEQ ID NO:	胺基酸序列
5	LKGI
6	LKGIL
7	WLKGI

【0082】 包含SEQ ID NO:5-7中之一者的多肽可包含至少4、5、6、7、8、9、10、20、30、40或50個胺基酸。在一些實施例中，包含SEQ ID NO:5-7中之一者的多肽可包含不超過4、5、6、7、8、9、10、20、30、40、50、60、70、80、90或100個胺基酸。SEQ ID NO:5-7可在多肽之N端處、在多肽之C端處或在多肽之N端與C端之間。在一些情況下，多肽可包含SEQ ID NO:5-7中之超過一者。

【0083】 多肽可經分離、大體上純或經純化。在一些情況下，分離多肽可為：(i)化學合成，或(ii)表現於宿主細胞中且經純化遠離相關及污染蛋白質。在一些情況下，多肽可作為表現載體之一部分之表現產物存在於宿主細胞中且可連接至蛋白質部分或連接至化學部分。

【0084】 所揭示多肽之類似物(包括肽模擬物)可提供抗衰老治療功效。本文所揭示之肽及多肽可包括肽模擬物等效物。

【0085】 在一些情況下，如上文所論述，多肽可與本文中所述之多肽具有序列一致性。多肽之序列一致性可指兩種多肽序列之精確胺基酸對胺基酸對應性。在一些情況下，用於測定序列一致性之技術可包括測定胺基酸序列且將胺基酸序列與第二胺基酸序列進行比較。兩個或更多個序列可藉由測定其一致性百分比或用兩個比對序列之間之精確匹配數目除以更長序列之長度且乘以100來進行比較。亦可例如藉由使用獲自國立衛生研究院(the National Institutes of Health)之高級BLAST電腦程式(包括例如版本2.2.9)比較序列資訊來測定一致性百分比。BLAST程式係基於Karlin及Altschul, Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 87:2264-2268 (1990)之比對方法且如Altschul等人, J. Mol. Biol., 215:403-410 (1990)；Karlin及Altschul, Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 90:5873-5877 (1993)；及Altschul等人，

Nucleic Acids Res. 25:3389-3402 (1997)中所論述。程式可用於測定所比較之多肽之整個長度的一致性百分比。提供預設參數以最佳化在例如blastp程式中用較短查詢序列進行之搜索。程式亦允許使用SEG濾波器來屏蔽查詢序列之片段，如藉由Wootton及Federhen, Computers and Chemistry 17:149-163 (1993)之SEG程式所測定。

組合物

【0086】 本文中揭示包含本文中所描述之多肽中之一或多者的組合物。在一些實施例中，組合物可為抗衰老治療性的。在一些情況下，組合物可用於治療年齡相關之疾病或病況或年齡相關之病症，例如以延遲年齡相關之疾病或病況或年齡相關之病症的發作，降低年齡相關之疾病或病況或年齡相關之病症的出現率或改善年齡相關之疾病或病況或年齡相關之病症。在一些情況下，組合物可用於治療組織病變，以延遲組織病變之發作、降低組織病變之出現率或改善組織病變，例如日曬之後的UV損害。

【0087】 在一些情況下，組合物可包括例如單獨或與一或多種媒劑(例如，治療學上可接受之組合物或治療學上可接受之載劑)及其他治療學上有效的化合物組合的有效量之多肽。在一些實施例中，有效量之多肽係指對用組合物治療之個體具有所需功效，該個體包括(但不限於)細胞、組織或生物體。在一些實施例中，有效量之多肽對所治療個體具有最小或較低全身性功效。在一些實施例中，有效量之多肽在所治療區域處或附近具有最大局部功效。在一些實施例中，調配物可經組態以自表皮局部地滲透至真皮。在一些實施例中，調配物經組態以局部地滲透穿過表皮層。在一些實施例中，多肽之有效量為至少1 nM、5 nM、10 nM、50 nM、100 nM、500 nM、1 μM、至少10 μM、至少25 μM、至少50 μM、至少75

μM 、至少100 μM 、至少150 μM 、至少200 μM 、至少250 μM 、至少300 μM 、至少350 μM 、至少400 μM 、至少450 μM 或至少500 μM 。在一些個例中，多肽之有效量在約1 nM至約1000 nM、約5 nM至約750 nM、約25 nM至約750 nM或約50 nM至約500 nM之間。在一些個例中，多肽之有效量在約1 μM 至約500 μM 、約25 μM 至約250 μM 、約50 μM 至約200 μM 或約75 μM 至約125 μM 之間。在一些個例中，多肽之有效量為最終組合物之至少0.00001%、0.00005%、0.0001%、0.0005%、0.001%、至少0.005%、至少0.01%、至少0.05%、至少0.1%、至少0.5%、至少1%、至少1.5%、至少2%、至少2.5%、至少3%、至少3.5%、至少4%、至少4.5%或至少5% (w/w)。在一些個例中，多肽之有效量在最終組合物之約0.00001%至約5%、0.00001%至約1%、0.00001%至約0.1%、約0.001%至約5%、約0.005%至約4%、約0.005%至約3%、約0.005%至約2%、約0.005%至約1%或約0.005%至約0.5%之間。在一些實施例中，用於活體內應用的多肽之有效量可為在活體外應用中使用之量的至少2、5、10、20、30、40、50、60、70、80、90、100、150、200、250、300、350、400、450或500倍。多肽之有效量引起多肽之一些真皮滲透，在一些情況下約1%滲透、約2%滲透、約4%滲透、約5%滲透或約10%滲透。在一些個例中，施用於皮膚上之組合物中不超過1%、2%、3%、4%、5%、6%、7%、8%、9%或10%多肽滲透至真皮中。在一些個例中，施用於皮膚上之組合物中至少1%、2%、3%、4%、5%、6%、7%、8%、9%或10%多肽滲透至真皮中。在一些個例中，在活體內應用中使用之量為活體外滲透研究中真皮滲透之量之因數。在一些個例中，在活體內應用中使用之量的因數為活體外真皮滲透之量的至少2、5、10、20、30、40、

50、60、70、80、90、100、150、200、250、300、350、400、450、500、550、600、650、700、750、800、850、900、950或1000倍。

【0088】 在一些情況下，本文所描述之組合物可與一或多種額外營養製劑、化妝品、治療劑或醫藥治療劑一起投與(例如，共投與、依序投與或共調配)。

【0089】 在一些實施例中，調配物可與一或多種治療結合使用。在一些實施例中，調配物可與音波治療、超音波治療、LED治療、光治療、電氣治療、射頻治療或其他皮膚學治療一起使用。在一些實施例中，在治療之前、之後或期間將組合物施用至皮膚。

【0090】 組合物可經調配以供局部施用。舉例而言，組合物可經調配以供施用於皮膚上。在一些實施例中，組合物經組態為局部補充物。諸如用於局部施用之彼等的調配物可為乳膏、軟膏、凝膠、液體、散劑、洗劑、精華液、乳液、保濕劑、泡沫、面罩、摩斯、氣霧、噴霧、清潔劑、化妝水、局部貼片、水凝膠貼片或洗髮劑。局部施用之多肽可施用至受影響區域，施用至未來可能受影響之區域、個體之一部分或大體上整個個體。在一些情況下，局部治療劑可與緩衝液、另一局部治療劑、乳膏或保濕劑一起施用。

【0091】 諸如用於局部施用之組合物可經調配為化妝品組合物。化妝品組合物之實例可包括化妝品、粉底、防曬劑、曬後洗劑及皮膚護理產品，包括抗衰老皮膚護理產品。在一些情況下，化妝品組合物可在臉部上留下顏色，且可包括粉底、銅色化妝品(bronzer)、睫毛膏、遮瑕膏、眼線、眉粉、眼影、腮紅、唇彩、散粉、固體緊致乳液或其他化妝品物品。在一些情況下，皮膚護理產品可為用於治療或護理皮膚，或在某種程度上

保濕皮膚、改善皮膚、加速皮膚再生、保護皮膚、預防皮膚損害或清潔皮膚之彼等產品。皮膚護理產物可以乳膏、局部貼片、水凝膠貼片、經皮貼片、軟膏、凝膠、液體、散劑、洗劑、精華液、乳液、油狀物、黏土、保濕劑、泡沫、面罩、摩斯、氣霧、噴霧、清潔劑、化妝水或洗髮劑形式施用。在一些情況下，皮膚護理產品可呈以下形式：黏著劑、繃帶、去角質劑、牙膏、保濕劑、洗劑、妝前乳、唇彩、唇膏、無水封閉型保濕劑、止汗劑、除臭劑、個人清潔產品、閉塞藥物遞送貼片、指甲油、散劑、棉紙、拭紙、護髮素或剃鬚乳膏。

【0092】 如本文中涵蓋之組合物亦可為可食的，亦即經調配為可食補充物或飲料，使得組合物經調配以由人類安全地食用。在一些情況下，可食組合物可治療學上有效地治療年齡相關之疾病或病況或年齡相關之病症。在一些情況下，可食補充物可經組態為錠劑、膠囊、咀嚼錠、軟糖、散劑、食品棒、代餐棒或食物添加劑。在一些情況下，飲料可經調配以包含水、蘇打水、茶、咖啡、奶、果汁、奶昔、飲品或其他可食液體。

【0093】 在一些情況下，組合物可包含皮膚調節劑(例如，保濕劑、去角質劑、潤膚劑或保濕液)。保濕劑可用於保濕、減少脫屑或刺激自皮膚移除積累鱗屑。去角質劑可用於自表面移除舊的皮膚細胞，且可為物理去角質劑或化學去角質劑。潤膚劑可為可軟化乾燥、粗糙或皮屑狀皮膚之製劑或成分。保濕液可用於保濕、減少脫屑或刺激自皮膚移除積累鱗屑。在一些情況下，潤膚劑為阻止水流失且對皮膚具有軟化及舒緩功效之試劑。在一些實施例中，潤膚劑可包含以下中之至少一者：植物油、礦物油、牛油樹油脂、可可脂、石臘油、脂肪酸(動物油，包括鵝鵝、貂及羊毛脂)、甘油三酯、苯甲酸酯、肉豆蔻酸酯、棕櫚酸酯、硬脂酸酯、醣

脂、磷脂、角鯊烯、甘油、玫瑰果油、安弟羅巴果油(androba oil)、葡萄籽油、酪梨油、李樹籽油、巴卡斯果油(pracaxi oil)、雲杉光皮樹(*Calycophyllum spruceanum*)油、杏仁油、摩洛哥堅果油(argan oil)、辛酸/癸酸三甘油酯、荷荷芭脂、荷荷芭油、Spectrastat G2、腦醯胺及藻類提取物。在一些情況下，組合物包含皮膚保濕劑，亦稱為皮膚保濕液。在一些情況下，皮膚保濕劑包括(但不限於)甘油、角鯊烯、山梨糖醇、玻尿酸、玻尿酸衍生物、玻尿酸鈉、玻尿酸鈉交聯聚合物、菸鹼醯胺、醣蛋白、吡咯啉酮甲酸(PCA)、離胺酸HCl、尿囊素及藻類提取物。在一些實施例中，組合物包含至少1%、2%、3%、4%、5%、6%、7%、8%、9%或10%之皮膚調節劑。在一些實施例中，組合物包含約1%至約70%、約1%至約60%、約1%至約50%、約5%至約50%、約5%至45%或約5%至40%之皮膚調節劑。

【0094】 組合物可包含光澤控制劑，其可改善或調節皮膚之光澤外觀。光澤控制劑可在本質上為多孔的。此類藥劑可提供儲集器以吸收過量水分以減少光澤外觀。光澤控制劑可為矽石、矽酸鎂鋁、滑石、絹雲母(sericite)及各種有機共聚物。特別有效的光澤控制劑可包括藉由使碳酸酯或矽酸酯與鹼(IA)金屬、鹼土(IA)金屬或過渡金屬反應形成的矽酸鹽或碳酸鹽，及矽石(二氧化矽)。較佳光澤控制劑係選自由以下組成之群：矽酸鈣、非晶形矽石、碳酸鈣、碳酸鎂、碳酸鋅、膨潤土以及其組合。

【0095】 組合物可包含成膜劑，其可輔助對皮膚之膜親和性及黏著力。成膜劑可改善組合物之持久及非轉移效能。成膜劑可為水可溶的、水不可溶的或水分散的。成膜劑可為：1)有機聚矽氧樹脂、氟化聚矽氧樹脂、有機聚矽氧樹脂之共聚物、三甲基矽烷氧基矽酸酯、聚矽氧樹脂之

GE共聚物、SF1318 (聚矽氧樹脂及異硬脂酸共聚物之有機酯)及CF1301 (聚矽氧樹脂及 α 甲基苯乙烯共聚物)、Dow Corning的聚矽氧樹脂之壓敏黏合共聚物及各種PDMS (BIO-PSA系列); 及2)丙烯酸及甲基丙烯酸聚合物及樹脂、聚矽氧-丙烯酸酯型共聚物及氟化型式, 包括聚矽氧加上來自3M之聚合物、來自Shin-Etsu之KP545、烷基-丙烯酸酯共聚物、來自Shin-Etsu之KP 561及562; 3)來自Collaborative Labs之癸烯/丁烯共聚物; 4)基於聚乙烯之材料、PVP、PVP/VA, 包括來自ISP之Antaron/Ganex (PVP/Triacontene共聚物)、來自BASF之Luviskol材料、聚氨酯、來自Alzo之Polyderm系列(包括(但不限於) Polyderm PE/PA、Polyderm PPI-SI-WS、Polyderm PPI-GH)、來自BASF之Luviset P.U.R.; 6)聚四級銨材料, 來自BASF之Luviquat系列; 7)丙烯酸酯共聚物及丙烯酸酯/丙烯醯胺共聚物, Luvimer及Ultrahold系列, 均獲自BASF; 8)基於苯乙烯之材料; 及9)聚葡萄胺糖及基於聚葡萄胺糖之材料, 包括纖維素及基於纖維素之材料。

【0096】 組合物可包含增稠劑或乳化劑。增稠劑可用於增加待用於化妝品組合物中的液體基底材料之黏度。特定增稠劑之選擇可視所需組合物之類型(例如, 基於凝膠、乳霜、洗劑或蠟)、所需流變學、所使用之液體基底材料及待用於組合物中之其他材料而定。增稠劑或乳化劑之實例可包括蠟質材料, 諸如小燭樹(candelilla)、棕櫚蠟(carnauba wax)、蜂蠟、鯨蠟、棕櫚蠟(carnauba)、楊梅蠟(baysberry)、褐煤蠟、地蠟、純地蠟、石蠟、合成蠟(諸如Fisher-Tropsch蠟)、聚矽氧蠟(來自Dow Corning之DC 2503)、微晶蠟以及類似物; 肥皂, 諸如高級脂肪酸之鈉及鉀鹽、具有12至22個碳原子之酸; 高級脂肪酸之醯胺; 炔醇胺之高級脂肪酸醯胺; 二苯

甲醛-單縮醛；乙酸鹽、丙酸鹽及乳酸鹽之鹼金屬及鹼土金屬鹽；及其混合物。亦可用聚合材料，諸如刺槐豆膠、海藻酸鈉、酪蛋白酸鈉、卵白蛋白、明膠瓊脂、角叉膠海藻酸鈉、三仙膠、柑橘籽提取物、黃蓍膠、澱粉、化學改質之澱粉以及類似物；半合成聚合材料，諸如纖維素、纖維素衍生物、纖維素醚羥乙基纖維素、甲基纖維素、羥丙基纖維素、羧甲基纖維素、羥基丙甲基纖維素、聚乙烯吡咯啉酮、聚乙烯醇、瓜爾豆膠、羥丙基瓜爾豆膠、可溶性澱粉、陽離子纖維素、陽離子瓜爾膠以及類似物；及合成聚合材料，諸如羧基乙烯基聚合物、聚乙烯吡咯啉酮、聚乙烯醇聚丙烯酸聚合物、聚(丙烯酸)、卡波姆(carbomers)、聚甲基丙烯酸聚合物、聚乙酸乙烯酯聚合物、聚氯乙烯聚合物、聚偏二氯乙烯聚合物以及類似物。亦可使用無機增稠劑，諸如矽酸鋁，諸如(例如)膨潤土，或聚乙二醇及聚乙二醇硬脂酸鹽或二硬脂酸鹽之混合物。乳化劑可用於幫助使乳液中之親水性與疏水性成分免於分離。在一些情況下，乳化劑包括(但不限於)Olivem、Oliwax LC、聚山梨醇酯、月桂醇醚-4及鯨蠟基硫酸鉀。

【0097】 化妝品組合物可提供外觀之暫時變化或可提供外觀之長期變化。在一些情況下，化妝品組合物可經調配以提供外觀之短期變化(例如，皮膚之顏色沈積或飽滿)以及外觀之長期變化(例如，減少斑點、細紋外觀、皺紋外觀或可能影響外觀之其他特徵)。

【0098】 組合物可包含在與如本文所揭示之多肽一起施用時具有累加或協同功效之添加劑。舉例而言，包含多肽及添加劑之組合物可對老化及年齡相關之疾病或病況或年齡相關之病症具有比添加劑、多肽之個別功效或添加劑及多肽之個別功效之總和更大的功效(例如，延遲一或多種症狀之發作，降低一或多種症狀之出現率或改善一或多種症狀)。添加劑可

為額外的多肽、葡糖胺聚糖、碳水化合物、多酚、蛋白質、脂質、植物水性或油性提取物、核酸、抗體、小分子、維生素、保濕劑、潤膚劑或另一種適合添加劑。在一些實施例中，組合物包含UV阻斷劑。在一些實施例中，UV阻斷劑可包括(但不限於)胺基苯甲酸、阿伏苯宗(avobenzene)、西諾沙酯(cinoxate)、二羥苯酮、胡莫柳酯(homosalate)、美拉達美特(meradimate)、奧克立林(octocrylene)、奧西諾酯(octinoxate)、奧替柳酯(octisalate)、氧苯酮(oxybenzone)、帕地馬酯O (padimate O)、英舒拉唑(ensulizole)、磺異苯酮、二氧化鈦、三乙醇胺水楊酸酯及氧化鋅。

【0099】 通常，本文所提供之方法、系統及組合物包含維生素。在一些個例中，維生素提供皮膚舒緩、皮膚恢復、皮膚補給及/或保濕功效。在一些個例中，維生素提供抗氧化功效。在一些個例中，維生素充當潤膚劑。在一些個例中，維生素改善放大毛孔、膚色不均、細紋、暗沈及/或皮膚表面脆弱之外觀。在一些個例中，維生素為維生素A、維生素D、維生素E、維生素F、維生素K、維生素B1 (硫胺)、維生素B2 (核黃素)、維生素B3 (菸鹼酸)、維生素B5 (泛酸)、維生素B7 (生物素)、維生素B6、維生素B12 (氰鈷胺素)、維生素B9、葉酸、菸鹼醯胺及其混合物。在一些個例中，組合物包含維生素之衍生物。在一些個例中，維生素之衍生物用於提高維生素在組合物中之穩定性及/或維生素衍生物與其他成分在組合物中之相容性。在一些個例中，組合物包含維生素B3或其衍生物及維生素E或其衍生物。在一些個例中，組合物包含菸鹼醯胺及維生素E或其衍生物。在一些個例中，組合物包含維生素C或其衍生物、維生素B3或其衍生物及維生素E或其衍生物。在一些實施例中，組合物包含至少0.01%、0.05%、0.5%、1%、2%、3%、4%、5%、6%、7%、8%、9%或

10%維生素。在一些實施例中，組合物包含約0.1%至約10%、約0.1%至約5%、約0.5%至約10%、約0.5%至約5%、約1%至10%或約1%至5%維生素。

【0100】 用於局部投藥之組合物可進一步包含載劑。載劑可為溶液、乳液、軟膏、油或凝膠基底。舉例而言，凝膠基底可包含以下中之一或多者：石臘油、羊毛脂、PEG、蜂蠟、礦物油、稀釋劑(諸如水及醇)、乳化劑及/或穩定劑。增稠劑可存在於治療性組合物中以供局部投藥。若意欲用於經皮投藥，則組合物可包括經皮貼片或離子電滲療法(iontophoresis)裝置。在一些情況下，可生物降解微球體(例如，聚乳酸)亦可用作組合物之載劑。在一些情況下，經皮貼片經製備以將調配物遞送至皮膚之表皮層。在一些情況下，經皮貼片經製備以將調配物遞送至皮膚之表皮及真皮層。在一些情況下，將調配物製備為最低限度地在個體中全身性遞送或不意欲直接遞送至個體之血流中。

【0101】 組合物亦可含有一或多種稀釋劑(諸如緩衝液)或一或多種抗氧化劑(諸如抗壞血酸)、低分子量多肽、多肽、胺基酸、碳水化合物(包括葡萄糖、蔗糖或糊精)、螯合劑(諸如EDTA)、麩胱甘肽及其他穩定劑。中性緩衝生理食鹽水或與非特異性血清白蛋白混合之生理食鹽水為例示性稀釋劑。可使用適合的賦形劑溶液(例如蔗糖)作為稀釋劑而將產物調配為凍乾物。

【0102】 組合物亦可包含一或多種賦形劑，諸如治療劑、營養製劑或化妝品賦形劑。賦形劑之實例可包含抗黏劑、黏合劑、包衣、顏料、崩解劑、調味劑、助滑劑、潤滑劑、防腐劑、吸附劑、甜味劑或媒劑。

【0103】 適合的賦形劑或穩定劑在所採用之劑量及濃度下對於接收

者可為無毒性的，且可包含緩衝液，諸如磷酸鹽、檸檬酸鹽及其他有機酸；鹽，諸如氯化鈉；抗氧化劑，包括抗壞血酸、維生素E及甲硫胺酸；防腐劑(諸如(例如)氯化十八烷基二甲基苯甲基銨；氯化六羥季銨；氯化苯甲烴銨；氯化苯索銨；葡萄糖酸內酯及苯甲酸鈉；苯酚、丁基或苯甲醇；低分子量(小於約10個殘基)多肽；蛋白質，諸如血清白蛋白或明膠；親水性聚合物，諸如聚乙烯吡咯啉酮；胺基酸，諸如甘胺酸、麩醯胺酸、天冬醯胺、組胺酸、精胺酸或離胺酸；單醣、雙醣及其他碳水化合物，包括葡萄糖、甘露糖或糊精；螯合劑，諸如EDTA或EDTA替代物(例如，Biopure GLDA、Spectrastat G2)；糖，諸如蔗糖、甘露糖醇、海藻糖或山梨糖醇；成鹽反離子，諸如鈉；金屬錯合物(例如，Zn-蛋白複合物)；及/或界面活性劑。在一些個例中，界面活性劑包括(但不限於)聚山梨醇酯20、聚山梨醇酯80、海藻酸鹽、泊洛沙姆(poloxamer)、TRITON (第三辛基苯氧基聚乙二醇)；非離子清潔劑；十二烷基硫酸鈉(SDS)；月桂基硫酸鈉；辛基糖苷鈉；月桂基-、肉豆蔻基-、亞油醇基-或硬脂醯基-sulfohetame；月桂基-、肉豆蔻基-、亞油醇基-或硬脂醯基-肌胺酸；亞油醇基-；肉豆蔻基-或鯨蠟基-甜菜鹼；月桂醯胺丙基-、椰油醯胺丙基-、亞油醯胺丙基-、肉豆蔻醯胺丙基-、棕櫚醯胺丙基-或異硬脂醯胺丙基-甜菜鹼(例如，月桂醯胺丙基)；肉豆蔻醯胺丙基-、棕櫚醯胺丙基-或異硬脂醯胺丙基-二甲基胺甲基椰油醯基牛磺酸鈉或甲基油烯基牛磺酸二鈉；脫水山梨糖醇單棕櫚酸鹽；及MONAQUAT系列(Mona Industries. Inc., Paterson, NJ)；聚乙二醇(PEG)、聚丙二醇(PPG)、聚氧乙二醇及聚氧丙二醇之共聚物(例如，Pluronics/Poloxamer、PLURONIC® F68等)；或另一種適合的界面活性劑。在一些情況下，組合物可包含角鯊烯、天然油、

植物提取物、玻尿酸或黏土。在一些情況下，組合物包含皮膚滲透強化子，以促進活性成分滲透至皮膚中。在一些情況下，皮膚滲透強化子可包括(但不限於)脂肪酸、精油、脲、脂質體、微球體、DMSO、氮酮、PCA 鈉及角鯊烯。

【0104】 在一些實施例中，調配物包含載劑、微球體、脂質體或膠束，以便攜帶多肽且控制多肽穿過皮膚之釋放時間及/或滲透深度。

【0105】 在一些實施例中，多肽經官能化。在一些實施例中，多肽係用化學基團官能化。在一些實施例中，多肽係用包含不超過3、4、5、6、7、8、9、10、11、12、13、14、15、16、17、18、19、20或超過20個碳之官能基官能化。在一些實施例中，多肽係用乙醯基或軟脂醯基官能化。

【0106】 待應用於個體之多肽或組合物可經滅菌。此可藉由例如經由無菌過濾膜過濾或用於滅菌之任何其他此項技術中公認的方法來實現。

【0107】 組合物可以可延遲一或多種症狀之發作、降低一或多種症狀之出現率或改善一或多種症狀的量包含治療有效量之多肽或肽模擬物，該一或多種症狀為諸如皮膚之症狀、年齡相關之疾病或病況之症狀或年齡相關之病症之症狀。在一些情況下，治療有效量可為可在個體體內激起治療性(例如，抗衰老治療性)或所需反應的治療劑(例如，多肽)之量。治療有效量可足以引起對個體之治療效益。治療有效量可視多種因素而變化，包括針對用途選擇的活性劑，及待治療的個體之年齡、體重、身高及/或一般健康。

【0108】 如在臨床情形下所理解，活性劑之有效治療量可能或不可能結合另一種藥物、化合物、治療劑或醫藥組合物來實現。因此，可在投

與一或多種活性劑之情形下考慮有效治療量，若結合一或多種其他活性劑，則可考慮以有效量給與單一活性劑，可能實現或已實現期望結果。因此，在一些個例中，可向個體投與一或多種活性劑。在其他個例中，在本文中所描述之一或多種其他治療模態之前或之後進行用本文中所描述之活性劑進行之治療。

多肽合成

【0109】 亦揭示編碼本發明所揭示之多肽中之一或多者的經分離聚核苷酸。經分離聚核苷酸可存在於包含可操作地連接至啟動子之經分離聚核苷酸的表現載體中。表現載體可存在於經分離細胞中(亦即用表現載體轉染或轉化之重組細胞)。

【0110】 適合的表現載體可包括細菌、植物、真菌、昆蟲或動物宿主細胞複製，及/或表現所揭示之肽、多肽及其變體之表現載體。表現載體可用於轉化適當的宿主細胞(例如，大腸桿菌)。經轉化宿主細胞可經培育或發酵，使得肽或多肽組成性表現或在添加誘導表現之試劑(例如，經由誘導型啟動子)之後表現。如本文中所涵蓋之表現載體可包括調節經編碼多肽之表現的控制序列。表現控制序列可包括構成性或誘導性啟動子(例如，T3、T7、Lac、trp或phoA)、核糖體結合位點或轉錄終止子。

【0111】 表現載體可用於轉化宿主細胞。適合的宿主細胞包括細菌、植物、真菌、昆蟲或動物宿主細胞。適合的細菌包括(但不限於)：革蘭氏陰性細菌(Gram-negative bacteria)，諸如埃希氏桿菌屬(*Escherichia species*) (例如，大腸桿菌)、其他革蘭氏陰性細菌(例如，假單胞菌屬(*Pseudomonas sp.*)，諸如綠膿桿菌(*Pseudomonas aeruginosa*)；或柄桿菌屬(*Caulobacter sp.*)，諸如柄桿菌屬(*Caulobacter crescentus*))，或革蘭氏

陽性細菌(例如，桿菌(*Bacillus sp.*)，諸如枯草桿菌(*Bacillus subtilis*))。適合的真菌細胞可包括酵母(例如，釀酒酵母(*Saccharomyces cerevisiae*))。

【0112】 表現載體可例如提供用於合成多肽之機制。合成可能發生於細胞中，例如動物細胞、植物細胞、細菌細胞或酵母細胞。表現載體可包含核酸，例如來源於質體、黏質體、噬菌粒(phasmid)或細菌噬菌體之DNA，或藉由化學或酶促方式合成，其中可插入或選殖可編碼本文中所描述之一或多種多肽的一或多種核酸片段。表現載體可能夠在限定宿主或生物體中自主複製，使得重新產生選殖序列。表現載體可具有直鏈、環形或超螺旋組態且可出於某些目的與其他載體或其他材料複合。表現載體之組分可包含(但不限於) DNA分子，其併入：(1)DNA；(2)編碼治療性或所需產物之序列；或(3)用於轉錄、轉譯、RNA穩定性及複製之調節元件。

【0113】 可使用表現載體產生多肽。在一些情況下，此類產生可包含培育或醱酵經轉化宿主細胞(例如，如本文中所涵蓋之細菌宿主細胞)，其包含轉而包含編碼所揭示肽、多肽或其變體(如本文中所涵蓋)之核酸分子的表現載體(如本文中所涵蓋)，其中培養在引起肽、多肽或變體表現之條件下進行；及隔離、分離或純化肽、多肽或變體。可使用此項技術中已知之方法來培育或醱酵經轉化細菌，以便表現肽、多肽或變體。例示性隔離、分離或純化方法可包括以下步驟中之一或多者：細胞干擾步驟、澄清步驟(例如，經由離心或過濾)、層析分離步驟、滲析步驟及沈澱步驟。

【0114】 在一些其他實施例中，可化學合成多肽。可使用溶液相技術、固相方法或其他適合的多肽合成方法來進行多肽之合成。

方法

【0115】 提供用於使用本文所揭示之多肽及組合物的方法。此類方法可包含向個體施用本文中所描述之多肽中之一或多者。本文所描述之方法可延遲年齡相關之疾病或病況或年齡相關之病症的發作，降低年齡相關之疾病或病況或年齡相關之病症的出現率或改善年齡相關之疾病或病況或年齡相關之病症。

【0116】 本文所描述之方法可延遲與老化細胞積聚相關之疾病、病症或病況的發作，降低該疾病、病症或病況的出現率，減少該疾病、病症或病況的出現或改善該疾病、病症或病況。與老化細胞積聚相關之疾病或病症可為年齡相關的。在一些情況下，若未經治療，則疾病或病症可隨著時間推移而惡化。

【0117】 可向個體施用或投與多肽或組合物以治療直接地或間接地受皮膚健康影響之病況。此方法可包含向該個體投與促進皮膚健康之化合物或向皮膚施用局部治療。

【0118】 年齡相關之病症可包含疾病過程期間出現的可能影響身體的事件之生物學進展，其可能模仿或大體上模仿出現於正常個體中之老化事件之全部或部分。在一些情況下，事件之此生物學進展可在加速時間段內出現。

【0119】 年齡相關之疾病或病況或年齡相關之病症可能與在身體內之正常過程有關，諸如運動及進食能力。

【0120】 在一些情況下，年齡相關之疾病或病況或年齡相關之病症可為影響皮膚之疾病、病況或病症，諸如皮膚病症或皮膚病，其可包含皺紋、細紋、乾燥、瘙癢、斑點、老年斑、褥瘡、潰瘍、癌症、色素沈著異常、感染(例如，真菌感染)，或皮膚特性減弱，諸如透明度、質地、彈

性、色澤、色調、柔軟性、堅實度、緊密度、光滑度、厚度、光亮度、發光、含水量、保水性、皮膚屏障、均勻度、鬆弛度或油性，或其他皮膚病。在一些個例中，年齡相關之疾病或病況或年齡相關之病症為皮膚之色素過多。在一些個例中，色素過多病症為黑斑、老年斑、雀斑及/或進展型色素紫斑病。在一些個例中，色素過多為日光損害、發炎、激素變化或皮膚受傷之結果。在一些個例中，色素過多出現在化妝程序之後，包括(但不限於)雷射治療、光治療或化學剝離；投與抗生素、口服避孕藥或光敏藥物；或施用局部藥劑。在一些個例中，色素過多為產生過量黑色素之結果。

【0121】 在一些個例中，藉由本文所揭示之方法、系統及組合物治療年齡相關之疾病或病況或年齡相關之病症使得皮膚外觀增亮、增加發光、增白、均勻、光滑及/或緊緻。在一些個例中，用本文所揭示之方法、系統及組合物進行之治療改善表皮屏障、皮膚含水量、皮膚保水性、皺紋外觀、光滑度、堅實度、彈性、光亮度及發光度外觀，及/或提高或維持皮膚中之腦醯胺含量。在一些個例中，藉由量測皮膚含濕量、經皮水分流失(trans-epidermal water loss；TEWL)、真皮厚度及回聲強度(echogenicity)、皮內分析、皮膚黏彈特性或皮膚表面輪廓來評定用本文所揭示之方法、系統及組合物進行之治療之功效。在一些個例中，用本文所揭示之方法、系統及組合物進行之治療之功效評定細紋/皺紋外觀、膚色外觀(均勻度)、毛孔外觀、質地/光滑度外觀、堅實度(目測)、彈性(感觸)、表皮屏障、皮膚粗糙度、皮膚色素過多或整體外觀的減少。在一些個例中，使用儀器來量測用本文所揭示之方法系統及組合物進行之治療之功效，該儀器包括(但不限於)用於量測皮膚含濕量/含水量之水分測定儀、

用於量測經皮水分流失(TEWL)之蒸汽壓力計(VapoMeter)、量測真皮厚度(密度)及回聲強度之超音波、用於量測皮膚均勻度及發色團映射之非侵入式光學皮膚成像儀器、用於量測皮膚之黏彈特性(堅實度及彈性)的使用抽取的皮膚彈性測定儀(cutometer)、皮膚輪廓量測術、多頻譜分析及用於量測皮膚表面輪廓、細紋及皺紋之比色法。

【0122】 在一些個例中，年齡相關之疾病或病況或年齡相關之病症的治療引起皺紋或皮膚色素沈著外觀減少例如10%、20%、30%、40%、50%、60%、70%、80%、90%、95%或99%。在一些個例中，儀器量測展示，與使用組合物之前相比，在使用組合物之後，細紋/皺紋外觀、膚色外觀(均勻度)、毛孔外觀、質地/光滑度外觀、堅實度(目測)、彈性(感觸)、表皮屏障、皮膚粗糙度、皮膚光亮度或整體外觀中之至少一者改善至少1%、2%、3%、4%、5%、6%、7%、8%、9%、10%、11%、12%、13%、14%、15%、16%、17%、18%、19%或20%。在一些個例中，該改善呈現為與使用組合物之前的基線相比的平均改善百分比(MPI)。在一些個例中，與使用組合物之前相比，使用組合物之後的MPI為至少1%、2%、3%、4%、5%、6%、7%、8%、9%、10%、11%、12%、13%、14%、15%、16%、17%、18%、19%或20%。在一些個例中，在使用組合物之後1週、2週、3週、4週、5週、6週、7週、8週、9週、10週、11週、12週、13週、14週、15週、16週、5個月、6個月或一年進行量測。在一些個例中，藉由分析皮膚量測中之一或多者的皮膚病況、病症或疾病的專家來評定治療之功效。在一些個例中，由使用者自身評定治療的功效。在一些個例中，至少10%、20%、30%、40%、50%、60%、70%、80%或90%使用者可在使用本文所揭示之方法、系統及組合物之後報導皮

膚屏障、皮膚粗糙度、皮膚光亮度、細紋/皺紋外觀、膚色外觀(均勻度)、毛孔外觀、質地/光滑度外觀、堅實度(目測)、彈性(感觸)或整體外觀中之至少一者的改善。在一些個例中，至少10%、20%、30%、40%、50%、60%、70%、80%或90%使用者可報導皮膚含水量的改善。在一些個例中，至少10%、20%、30%、40%、50%、60%、70%、80%或90%使用者可報導皮膚屏障功能的改善。

【0123】 在一些個例中，本文所提供之方法、系統及組合物可減少皮膚之色素過多。在一些個例中，色素過多係與黑色素過量產生相關。在一些個例中，本文所提供之方法、系統及組合物減少黑色素之過量產生。在一些個例中，本文所提供之方法、系統及組合物減少皮膚中黑色素之存在。在一些個例中，本文所提供之方法、系統及組合物藉由所治療皮膚中之細胞降低參與黑色素生成的蛋白質之表現量，包括酪胺酸酶、黑色素細胞誘導之轉錄因子(MITF)及多巴色素互變異構酶(DCT)。在一些個例中，本文所提供之方法、系統及組合物引起酪胺酸酶活性之減少、酪胺酸酶之表現或活化之減少、黑色素合成之中間產物之清除、黑素體向角質細胞之轉移之減少、現有黑色素含量之減少或黑色素細胞活性或存活率之減少。

【0124】 在一些情況下，本文所提供之方法、系統及組合物可減少皮膚發炎。在一些情況下，本文所提供之方法、系統及組合物可藉由所治療皮膚中之細胞降低參與發炎之蛋白質、干擾素- γ (IFN- γ)及介白素10 (IL-10)之表現量。

【0125】 在一些實施例中，每天一次、每天兩次、每天三次或更多次投與本文所描述之組合物。在一些實施例中，每日兩次投藥，例如上午及晚上投與本文所描述之組合物。在一些實施例中，日常、每天、每隔一

天、一週五天、一週一次、每隔一週、每月兩週、每月三週、一月一次、一月兩次、每月三次或更多次投與本文所描述之組合物。在一些實施例中，投與本文所描述之組合物持續至少1週、2週、3週、1個月、2個月、3個月、4個月、5個月、6個月、7個月、8個月、9個月、10個月、11個月、12個月、18個月、2年、3年、4年、5年或更長時間。在一些實施例中，組合物旨在作為光滑層在上午及晚上施用於臉部及/或頸部上之乾淨的乾燥皮膚上。在一些實施例中，調配物為針對皮膚之持久健康經科學調配以改善皮膚彈性且增強表皮屏障的日常必需的局部補充物。在一些實施例中，使用者將包含多肽中之至少一者的本文所描述之組合物施用至臉部及/或頸部。在一些實施例中，組合物旨在施用至身體上的皮膚。在一些實施例中，本文所描述之組合物結合其他局部組合物(諸如UV阻斷劑)一起使用。在一些實施例中，本文所描述之組合物在施用另一局部組合物之前、一起或之後施用。在一些實施例中，組合物包含UV阻斷劑。

【0126】 多肽或組合物可局部施用，亦即施用至皮膚，以延遲影響皮膚之疾病、病況或病症之發作、降低該疾病、病況或病症之出現率或改善該疾病、病況或病症。

【0127】 年齡相關之疾病或病況或年齡相關之病症可由以下引起：UV損害、DNA損害、細胞核中之ATR_X病灶積聚、增加的p16表現、增加的老化相關之 β -半乳糖活性、組織中老化細胞之積聚、增加的SASP產生、化學誘導之老化、隨時間衰老、減少的玻尿酸產生、減少的長壽蛋白6之表現、改變的類胰島素生長因子-1 (IGF-I)路徑信號傳導、增加的基質金屬蛋白酶1 (MMP1)產生、皮膚之較薄表皮層或遺傳變體。在一些個例中，年齡相關之疾病或病況或年齡相關之病症由治療方案引發或加重，例

如治療藥物之副作用。年齡相關之疾病或病況或年齡相關之病症可直接地或間接地影響皮膚之健康或外觀。在一些此類情況下，局部施用本文中之多肽或組合物可改善皮膚之健康或外觀。

【0128】 年齡相關之疾病或病況或年齡相關之病症可包含細胞增殖性病變。細胞增殖性病變可影響皮膚之健康或外觀。在一些情況下，針對細胞增殖性病變投與之治療(諸如化學療法或輻射)可影響皮膚之健康或外觀。在一些此類情況下，局部施用本文中之多肽或組合物可改善皮膚之健康或外觀。

【0129】 本文亦提供用於治療個體之皮膚的方法，其包含向個體投與組合物，該組合物可促進組織或生物體中老化細胞之數目的減少、誘導所治療細胞的促凋亡狀態、誘導SIRT6表現、預防DNA誘導之老化及/或增強DNA修復能力。在一些情況下，諸如皮膚學疾病或病況之皮膚病可包含皮膚下垂或起皺、組織中老化細胞之積聚、減少的表皮厚度、減少的膠原蛋白產生、增加的MMP-1產生、降低的DNA修復能力、減少的SIRT6表現、皮膚結構紊亂、皮膚之較薄表皮層、發炎、老化相關之分泌表型或皮膚之幹細胞耗竭。

【0130】 方法可包含向個體投與包含多肽之組合物，其可促進組織或生物體中老化細胞之數目的顯著減少。老化細胞之數目的減少可包含所治療細胞之促凋亡狀態、誘導SIRT6表現、預防DNA誘導之老化或增強DNA修復能力。在一些情況下，樣本、個體之一部分(例如，個體之面部皮膚)及/或個體中老化細胞之數目可減少至少10%、至少20%、至少30%、至少40%、至少50%、至少60%、至少70%、至少80%或至少90%。

【0131】 可將多肽或組合物施用或投與至細胞、組織或個體。在一些情況下，施用或投與多肽可在細胞、組織或個體中產生抗衰老治療功效。在一些情況下，可將多肽投與至個體、局部施用至個體或與經培養細胞一起培育以提供抗衰老治療功效。

【0132】 細胞可為經培養細胞或自個體或細胞株分離之細胞。經培養細胞之一些實例可包含角質細胞或纖維母細胞或黑色素細胞。細胞可野生型的或可經遺傳修飾。一些基因修飾可促進老化，諸如p53/p21路徑、p16/RB路徑、mRNA或miR基因以及其他RNA類之基因修飾。在一些情況下，將多肽或組合物施用至細胞可減少細胞老化。在一些情況下，細胞可包含生物體活體內或原位的細胞，包括(但不限於)動物、秀丽隱桿線蟲及人類。

【0133】 組織可為以下組織：個體之組織或已自個體分離(亦即離體)的組織。在一些情況下，組織可人工地生長。組織可包含皮膚，且組織之實例可包含健康皮膚、病變皮膚、衰老皮膚或頭皮。在一些情況下，將多肽或組合物施用至組織可減少組織之一或多個細胞或整個組織的老化。在一些情況下，組織可包含生物體活體內或原位的組織，包括(但不限於)動物、秀丽隱桿線蟲及人類。

【0134】 在個體為人類之情況下，個體可為任何年齡。在一些情況下，個體患有年齡相關之疾病或病況或年齡相關之病症，處於年齡相關之疾病或病況或年齡相關之病症的風險下或為健康的。個體可為男性或女性。

【0135】 方法可包含局部施用多肽或組合物。局部施用可包含揉擦、噴塗、蘸塗、輕拍或以其他方式將多肽或組合物施用至皮膚或黏膜。

實例

實例1

【0136】自早老症患者分離之原代纖維母細胞可構成人體內之早期衰老及細胞老化之基因模型。將來自早老症患者之原代纖維母細胞在補充有10% v.v.胎牛血清(FBS)及1% v.v.青黴素/鏈黴素溶液(1,000 U.mL⁻¹)之DMEM (達爾伯克改良伊格爾培養基(Dulbecco's Modified Eagle's Medium))中培養。使細胞保持處於5% CO₂、37°C及95%濕度氛圍中。在擴增後，將此等細胞接種於96孔盤中(1,000個細胞/孔)，且在接種6小時後，與來自50 μM之專有文庫的個別多肽一起培育48小時。陰性對照包含未處理細胞，其僅接受媒劑；陽性對照組包含與10 μM ABT-263、衰老細胞溶解化合物一起培育相同週期的細胞。在培育後，如圖1中所展示，分析相對細胞老化(藉由老化相關B-半乳糖染色相對於未處理對照之活性進行評定)，其中Y軸指示孔中細胞之總數(歸一化至未處理對照)，且X軸表示老化相關B-半乳糖染色強度/細胞核(亦即，老化水準)，亦歸一化至陰性對照。執行包括三個技術複本之三個獨立實驗。將促進細胞老化顯著減少至低於未處理對照樣本之75%的多肽視為陽性命中。

【0137】測試了總計764種多肽，其中56種促進細胞老化減少至低於未處理對照樣本之75%。因此，將其視為陽性命中及推定的抗衰老治療化合物。在實驗中視為陽性對照之ABT-263亦促進細胞老化且亦細胞毒性之顯著減少。此觀察證實，ABT-263之衰老細胞溶解特徵以及所測試多肽中的一些的抗衰老治療潛能(圖1)。

實例2

【0138】使用自3名健康的按時間順序衰老之患者分離的原代纖維

母細胞。將細胞在補充有10% v.v.胎牛血清(FBS)及1% v.v.青黴素/鏈黴素溶液(1,000 U.mL⁻¹)之DMEM (達爾伯克改良伊格爾培養基)中培養。使細胞保持處於5% CO₂、37°C及95%濕度氛圍中。在擴增後，將此等細胞接種於96孔盤中(4,000個細胞/孔)，且在接種細胞6小時後，用4種抗衰老治療多肽(肽14、肽13、肽15及肽16)中之一者進行處理並培育48小時。除在5種不同濃度(25 μM、12.5 μM、6.25 μM、3.12 μM及1.56 μM)下測試肽16外，在6種不同濃度(50 μM、25 μM、12.5 μM、6.25 μM、3.12 μM及1.56 μM)下測試各多肽。陰性對照包含未處理細胞，其僅接受媒劑。在培育後，分析相對細胞老化(藉由老化相關B-半乳糖染色相對於未處理對照之活性進行評定) (圖2，盤A至盤D)，其中Y軸指示歸一化至未處理對照之相對老化水準。各行對應於多肽之不同濃度。執行包括三個技術複本之三個獨立實驗(生物學複本)。使用變異數分析(ANOVA)及邦弗朗尼事後檢驗(Bonferroni post-hoc tests)來分析資料。將統計顯著性測定為等於或低於0.05之p值。

【0139】 所有多肽在所測試濃度中之至少一者下呈現出抗衰老治療潛能，與未處理對照相比，由細胞老化的顯著減少證明。與未處理對照(ctrl)相比，*p<0.05；**p<0.01；***p<0.001 (圖2，盤A至盤D)。

實例3

【0140】 ATRX為染色體重塑酶，其促進形成老化相關之異染色質病灶。在老化期間，其逐漸積聚於核病灶中。因此，其構成細胞老化之標記物。為研究肽14是否降低細胞老化之水準，在所處理之肽14 (1 μM、500 nM、100 nM及10 nM)及未處理之細胞中分析ATR X病灶。為這樣做，使用自3名健康的按時間順序衰老(年老)之供體分離的原代纖維母細

胞。將此等細胞在補充有10% v.v.胎牛血清(FBS)及1% v.v.青黴素/鏈黴素溶液(1,000 U.mL⁻¹)之DMEM (達爾伯克改良伊格爾培養基)中培養。使細胞保持處於5% CO₂、37°C及95%濕度氛圍中。在擴增後，將此等細胞接種於96孔盤中(4,000個細胞/孔)，且在接種6小時後，與上述濃度下之肽14多肽一起培育48小時。陰性對照包含未處理細胞，其僅接受媒劑。在培育後，評定相對細胞老化。簡要地，藉由固定、滲透且將細胞與抗ATR_X抗體，隨後二級抗體一起培育來執行免疫染色。計數細胞核及經染色ATR_X病灶之數目。**圖3**之盤A展示代表性圖式，其展示展現特定量之ATR_X病灶/細胞的細胞數目(Y軸)，表示為行(X軸)。上部圖示描繪未處理細胞，而下部圖示描繪用500 nM之肽14處理的細胞。**圖3**之盤B展示用不同條件之肽14 (行)處理的纖維母細胞之ATR_X病灶/細胞核之平均數。**圖3**之盤C展示用不同條件之肽14 (行)處理的纖維母細胞當中的呈現少於10個ATR_X病灶/細胞核的細胞之百分比。執行包括三個技術複本之三個獨立實驗(生物學複本)。使用ANOVA及邦弗朗尼事後檢驗來分析**圖3**之盤B及盤C的資料。將統計顯著性測定為等於或低於0.05之p值。

【0141】 與未處理細胞相比，當以500 nM及50 nM使用時，肽14處理顯著減少ATR_X病灶/細胞核。在相同濃度下，肽14亦增加呈現少於10個病灶/細胞核的細胞之數目。與未處理對照(ctrl)相比，*p<0.05；**p<0.01 (**圖3**)。

實例4

【0142】 使用自3名健康的按時間順序衰老(年老)之供體分離的人類原代纖維母細胞。將此等細胞在補充有10% v.v.胎牛血清(FBS)及1% v.v.青黴素/鏈黴素溶液(1,000 U.mL⁻¹)之DMEM (達爾伯克改良伊格爾培養

基)中培養。使細胞保持處於5% CO₂、37°C及95%濕度氛圍中。在擴增後，將此等細胞接種於T-75燒瓶中(250,000個細胞/燒瓶)，且在接種6小時後，與3.12 μM之肽14一起培育3週(21天)。陰性對照包含未處理細胞，其僅接受媒劑。將第0天經定義為開始用肽14處理細胞的當天。在第21天與第28天之間不執行肽14處理。每週一次，根據老化相關β-半乳糖染色水準評定細胞老化。將資料歸一化至未處理組且繪製(圖4，盤A)。亦每週一次測定細胞增殖。在第7天、第14天、第21天及第28天，細胞經胰蛋白酶處理且計數(圖4，盤B)。在計數後，將250,000個細胞接種於新的T-75燒瓶中。執行包括三個技術複本之三個獨立實驗(生物學複本)。使用T檢驗分析資料。將統計顯著性測定為等於或低於0.05之p值。

【0143】 在第二週開始，肽14促進細胞老化之顯著減少(***p<0.001；****p<0.0001)。在21天處理後，在多肽移除之後，肽14之抗衰老治療功效維持至少7天(實驗第21天與第28天之間)。未觀察到肽14處理組與未處理對照相比較的關於細胞增殖之顯著差異(圖4)。

實例5

【0144】 使用自7名健康的按時間順序衰老的患者分離的原代纖維母細胞(將患者即興鑑別為患者2、3、4、5、6、7或8)。將此等細胞在補充有10% v.v.胎牛血清(FBS)及1% v.v.青黴素/鏈黴素溶液(1,000 U.mL⁻¹)之DMEM (達爾伯克改良伊格爾培養基)中培養。使細胞保持處於5% CO₂、37°C及95%濕度氛圍中。在擴增後，將此等細胞接種於96孔盤中(4,000個細胞/孔)，且在接種6小時後，與以下5種不同濃度之肽14一起培育48小時：25 μM (濃度5)、12.5 μM (濃度4)、6.25 μM (濃度3)、3.12 μM (濃度2)及1.56 μM (濃度1)。陰性對照包含未處理細胞(濃度0)，其僅

接受媒劑。在培育後，根據在ATRAX免疫染色後定量之ATRAX病灶/細胞核之平均數目來測定相對細胞老化。執行包括三個技術複本之七個獨立實驗(生物學複本)。使用共變檢驗分析資料。將統計顯著性測定為等於或低於0.05之p值(圖5)。

【0145】 共變分析展示，在肽14處理後，ATRAX病灶/細胞核之數目顯著減少。肽14功效遵循劑量-反應模式，其中濃度及ATRAX病灶/細胞核顯著相關($p < 0.0004$) (圖5)。

實例6

【0146】 細胞老化可由若干不同刺激引起。為評定肽14是否對UVB誘導及化學誘導之老化有效，使用自3名健康供體分離之人類原代纖維母細胞。將此等細胞在補充有10% v.v.胎牛血清(FBS)及1% v.v.青黴素/鏈黴素溶液($1,000 \text{ U} \cdot \text{mL}^{-1}$)之DMEM (達爾伯克改良伊格爾培養基)中培養。使細胞保持處於5% CO_2 、 37°C 及95%濕度氛圍中。在擴增後，將此等細胞接種於96孔盤中(4,000個細胞/孔)，且在接種6小時後，使此等細胞經受依託泊昔(etoposide) ($20 \mu\text{M}$)處理持續24小時或暴露於 $0.05 \text{ J}/\text{cm}^2$ 之UVB輻射兩次。各UVB暴露對應於全世界主要城市(例如，Auckland, NZ；Los Angeles, US；及Brasilia, BR)的4月份的大致1至3小時的每日日曬。在不同的老化誘導方案後，將經依託泊昔處理之細胞與 $5 \mu\text{M}$ 、 $2.5 \mu\text{M}$ 或 $1 \mu\text{M}$ 之肽14一起培育48小時。將UVB暴露之細胞用 $5 \mu\text{M}$ 之肽14處理48小時。陰性對照包含未處理細胞，該等細胞經受應力，但僅接受媒劑。在培育後，分析相對細胞老化(藉由老化相關 β -半乳糖染色相對於未處理對照之活性進行評定)且在柱形圖中繪製。在ATRAX免疫螢光染色之後，亦評定ATRAX病灶。使用每細胞核偵測到之平均ATRAX病灶來建構圖示。執行包

括三個技術複本之三個獨立實驗(生物學複本)。使用t檢驗或ANOVA，隨後邦弗朗尼事後檢驗來分析資料。將統計顯著性測定為等於或低於0.05之p值(圖6)。

【0147】 依託泊昔處理促進細胞老化水準顯著增加($p < 0.001$)，且亦促進ATRX病灶核積聚顯著增加(表示為ATRX病灶/細胞之平均數目； $p < 0.05$) (圖6，盤A)。當用2.5 μM 或5 μM 之肽14處理受依託泊昔應力之細胞時，老化相關 β -半乳糖染色顯著減少($*p < 0.05$) (圖6，盤B，左側圖示)。當用2.5 μM 肽14處理依託泊昔暴露之細胞時，平均ATRX病灶/細胞亦顯著減少，如圖6之盤B之右側圖示中所展示。如藉由老化相關 β -半乳糖染色所評定，UVB暴露亦促進細胞老化顯著增加，5 μM 肽14處理能夠顯著防止細胞老化($*p < 0.05$)，如圖6之盤C之左側圖示中所展示。用肽14進行之處理並未顯著改變細胞數目，如圖6之盤C之右側圖示中所展示。與並未接受肽14的UVB處理之樣本($*p < 0.01$)相比，UVB暴露促進ATRX病灶/細胞核之平均數目顯著增加，且5 μM 肽14處理顯著防止細胞老化，從而產生顯著減少的ATRX病灶/細胞核(圖6，盤D)。

實例7

【0148】 使用自健康年老供體分離之人類原代纖維母細胞及角質細胞來建構人類皮膚等效物。將彼等皮膚等效物用0.01% w.v.肽14處理5天且根據使用老化相關 β -半乳糖染色之老化水準、總體結構進行表徵，如藉由表皮厚度所指示。藉由盲分析員執行基於若干參數之品質評定。所觀測參數包括細胞層之一般組織以及角質層之厚度以及其他態樣，且經展示隨衰老及老化水準而減少。該評定之最大分數為28，其中較高分數與衰老及老化的減少相關。批量使用需要最小分數19。此分數在內部驗證且經展示

隨皮膚等效物或所培養細胞之衰老/老化而減少。此外，根據特定基因之表現藉由逆轉錄-定量聚合酶鏈反應(RT-qPCR)來表徵皮膚等效物。在處理後，處理表皮及真皮以分別用於RT-qPCR。對於表皮樣本，分析甘油醛3-磷酸酯去氫酶(GAPDH；廣泛表現)；p16 (與老化相關)；IL-8 (連接至刺激)及Ki-67 (與細胞增殖相關)。對於真皮樣本，分析甘油醛3-磷酸酯去氫酶(GAPDH；廣泛表現)；p16 (與老化相關)、IL-8 (連接至刺激)、Ki-67 (與細胞增殖相關)；玻尿酸合成酶2 (HAS-2；與玻尿酸產生相關)及基質金屬蛋白酶1 (MMP1；與細胞外基質蛋白降解相關)。使用 $2^{-\Delta\Delta Ct}$ 方法分析CT值。將平均 mRNA 表現歸一化至 GAPDH (ΔCt)及陰性對照組($\Delta\Delta Ct$)。陰性對照僅接受調配物。用三個技術複本執行三個獨立實驗。使用T檢驗分析資料。將統計顯著性測定為等於或低於0.05之p值(圖7)。

【0149】 人類皮膚等效物之肽14處理促進皮膚等效物分數增加(肽14組 24 ± 1 相比於 19.0 ± 2)；如圖7之盤A中所展示，表明處理安全性、耐受性及有利功效。此與可能具有安全性及耐受性問題之其他衰老細胞溶解劑進行對比。參見例如，Tse等人, *Cancer Res.* 68: 3421 (2008)；Wilson等人, *Lancet Oncol.* 11:1149 (2010)。另外，處理促進老化相關 β -半乳糖染色之顯著減少(*** $p < 0.001$)，如圖7之盤A及圖7之盤B中所展示，證實多肽之抗衰老治療功效。此外，肽14處理使得表皮(**** $p < 0.0001$)及真皮(** $p < 0.01$)中之p16的顯著減少；減少真皮中IL-8之表現(* $p < 0.5$)；及減少真皮中MMP-1之表現(** $p < 0.01$)。資料證實，肽14之抗衰老治療潛能、安全性及耐受性，以及多肽對皮膚基因表現之有利功效，如圖7之盤C中所展示。

實例8

【0150】 為闡明肽14及類似肽13之作用機制，研究Akt S473磷酸化(圖8，盤A)、老化相關β-半乳糖染色(圖8，盤B)以及mRNA表現(圖8，盤C)。對於使用西方墨點法之Akt S473磷酸化分析，使用人類原代纖維母細胞及角質細胞。此等細胞用於建構人類皮膚等效物，使該等人類皮膚等效物保持處於5% CO₂、37°C及95%濕度氛圍空氣-液體界面中。接著，將皮膚等效物用1 μM肽14或肽13處理5天，且對皮膚等效物執行蛋白質分析。蛋白質經分離且定量。將等量蛋白質裝載於聚丙烯醯胺凝膠中且轉移至硝化纖維素膜中。將GAPDH (裝載對照)及pAkt S473抗體與膜一起培育且藉由化學發光顯示染色。在經處理與未經處理樣本之間比較相對pAkt S473/GAPDH信號。使用纖維母細胞進行老化相關B-半乳糖染色實驗。將此等細胞在補充有10% v.v.胎牛血清(FBS)及1% v.v.青黴素/鏈黴素溶液(1,000 U·mL⁻¹)之DMEM (達爾伯克改良伊格爾培養基)培養物中培養。使細胞保持處於5% CO₂、37°C及95%濕度氛圍中。在擴增後，將此等細胞接種於96孔盤中(4,000個細胞/孔)且與基本培養基一起培育6小時，以允許細胞連接。之後，使細胞暴露於0.05 J/cm²兩次。此緊接著隨後進行第二培育，其中將肽14或肽13添加至培養基且靜置48小時，當培養基改變時，且對細胞進行老化相關B-半乳糖染色。將未處理細胞與僅作為陰性對照(-)之媒劑一起培育。在將未處理對照老化相關B-半乳糖水準歸一化至100%之後，獲得相對染色。對於mRNA分析，使用纖維母細胞。將此等細胞在補充有10% v.v.胎牛血清(FBS)及1% v.v.青黴素/鏈黴素溶液(1,000 U·mL⁻¹)之DMEM (達爾伯克改良伊格爾培養基)中培養。使細胞保持處於5% CO₂、37°C及95%濕度氛圍中。在擴增之後，將此等細胞接種於6孔盤中(50,000個細胞/孔)且與基本培養基一起培育6小時，以允許細

胞連接。之後，將細胞與肽14或肽13一起培育48小時。陰性對照包含未處理細胞，其僅接受媒劑。總RNA經分離，樣本經逆轉錄，且使用qPCR測定GAPDH、長壽蛋白6 (SIRT6)、BLM及核酸外切酶1 (EXO1)基因之mRNA表現。陰性對照僅接受媒劑。使用 $2^{-\Delta\Delta Ct}$ 方法分析CT值。將平均mRNA表現歸一化至GAPDH (ΔCt)及陰性對照組($\Delta\Delta Ct$)。對於所有分析，用三個技術複本執行三個獨立實驗。使用T檢驗分析資料。將統計顯著性測定為等於或低於0.05之p值(圖8)。

【0151】 在用肽14處理之表皮以及真皮樣本兩者中，pAkt S473顯著減少(分別為 $*p < 0.05$ 及 $**p < 0.01$)。肽13僅減少真皮樣本中之pAkt S473($***p < 0.001$) (圖8，盤A)。對於UVB及老化相關B-半乳糖染色，觀察到染色在UVB暴露之後總是增加。另外，肽14及肽13均減少UVB暴露之樣本的染色($***p < 0.001$)。肽14特定地引起經處理樣本中之SIRT6及BLM表現增加($*p < 0.05$) (圖8)。

實例9

【0152】 使用自健康年老供體分離之人類原代纖維母細胞及角質細胞來建構人類皮膚等效物。將彼等皮膚等效物用0.01% w.v.肽14處理5天且根據表皮厚度表徵，該表皮厚度係根據總表皮面積定量。陰性對照僅用調配物處理。實例組織學影像展示於圖9之盤A中。用三個技術複本執行三個獨立實驗。使用t檢驗分析資料。將統計顯著性測定為等於或低於0.05之p值(圖9之盤B)。

【0153】 與未處理對照相比，人類皮膚等效物之肽14處理促進表皮厚度增加($**p < 0.01$)，表明多肽對於皮膚表皮之有利功效(圖9)。

實例10

【0154】 在水中測定具有胺基酸序列ETAKHWLKGI (SEQ ID NO:1)及ATAKAWLKGI (SEQ ID NO:2)的多肽之所預測三維結構。結構預測展示於圖10，盤A (SEQ ID NO:1)及圖10，盤B (SEQ ID NO:2)中。結構經重疊(圖10，盤C)以說明結構之相似性。

實例11

製得肽14之局部施用調配物，包括菸鹼酸、維生素E、至少一種防腐劑、至少一種乳化劑及50至150 μM 之間之肽14。將局部調配物施用至人類皮膚，從而引起皺紋外觀減少。

實例12

【0155】 製得肽14之局部施用調配物，包括菸鹼酸、維生素E、至少一種防腐劑、至少一種乳化劑及75至100 μM 之間之肽14。將局部調配物施用至人類皮膚，從而引起皺紋外觀減少。

實例13

【0156】 例示性局部施用調配物在下文展示於表4中。將局部調配物施用至人類皮膚，從而引起皺紋外觀、膚色外觀(均勻度)、毛孔外觀、質地及光滑度外觀、堅實度、彈性及整體外觀中之至少一者減少。調配物中之多肽包含本文中所揭示之多肽中之至少一者。

表4.例示性調配物	
組分	調配物之百分比
水	40%-65%
皮膚保濕液	5%-45%
潤膚劑	6%-20%
維生素	0.5%-5%
乳化劑/穩定劑	0.5%-9%
多肽	0.001%-4%

實例14

【0157】 包含肽14之例示性局部施用調配物在下文展示於表5中。

將局部調配物施用至人類皮膚，從而引起皺紋外觀、膚色外觀(均勻度)、毛孔外觀、質地及光滑度外觀、堅實度、彈性及整體外觀中之至少一者減少。調配物中之多肽包含肽14。

表5.例示性調配物	
組分	調配物之百分比
水	40%-65%
皮膚保濕劑	5%-45%
潤膚劑	6%-20%
維生素	0.5%-5%
乳化劑/穩定劑	0.5%-9%
多肽	0.001%-4%

實例15.

【0158】 在用肽14處理之後，針對皮膚衰老評定三維活體外皮膚模型及離體人類皮膚樣本。

【0159】 活體外3D皮膚模型：使用經修改方法基於Pennacchi, P. C. 等人, Glycated Reconstructed Human Skin as a Platform to Study the Pathogenesis of Skin Aging中所描述來製備3D皮膚模型。Tissue Eng. 部分A 21, 2417-2425, 2015。簡言之，使包埋纖維母細胞之I型膠原蛋白凝膠在凝膠之頂部上接種有正常人類表皮角質細胞(NHEK)且培養24小時以便使NHEK到達單層。接著，使頂部上具有NHEK之凝膠升高至空氣-液體界面且培養另外10天以允許表皮角化。藉由將肽14添加至培養基而用12.5 μ M之肽14處理凝膠。

【0160】 活體外人類皮膚模型：來自健康人類供體之皮膚樣本係獲自ZenBio (Research Triangle, NC)且與補充有10% (v/v) FBS之杜貝克改良伊格爾培養基 (Dulbecco's Modified Eagle Medium, DMEM) (Invitrogen, Carlsbad, CA)一起維持處於空氣-液體界面培養物中。在第

一天及第三天用含對照媒劑或 $12.5 \mu\text{M}$ 肽14之培養基處理皮膚樣本。在五天之後，採集樣本且將其固定於福馬林中以用於組織學分析或用於DNA分離。

【0161】 DNA甲基化分析：根據3D皮膚模型樣本及離體人類皮膚活體組織切片樣本中之DNA甲基化之水準來測定所預測生物年齡(亦稱為分子DNA年齡)。使用QIAamp DNA微型套組(Qiagen)遵循製造商說明書自樣本獲得總DNA樣本。使用人類Illumina Infinium EPIC 850K晶片執行DNA甲基化評定，作為皮膚衰老之標記物。DNA樣本包括：i)被視為未處理對照組之四個皮膚活體組織切片樣本(來自相同供體)，ii)用 $12\mu\text{M}$ 肽14處理之四個皮膚活體組織切片樣本(相同供體)，iii)被視為未處理對照組之三個3D皮膚樣本(各自自1個供體取樣一組3個皮膚，總共3個供體)，iv)用 $12\mu\text{M}$ 肽14處理之三個3D皮膚樣本(各自自1個供體取樣一組3個皮膚，總共3個供體)。使用命令 `preprocessRaw()`，隨後 `preprocessSWAN()`處理原始影像資料。接著使用 `ratioConvert()`將甲基化信號(M值)轉換為比率，接著使用 `getBeta()`轉換為 β 值，所有函數「`minfi`」R套裝軟體中實施。 β 值係使用 `betaqn()`方法歸一化，該方法分位數歸一化 β ，藉由「`watermelon`」套裝軟體實施。且使用在「`minfi`」R套裝軟體中實施之「`preprocessQuantile`」歸一化方法歸一化。歸一化 β 值用於年齡估計。

【0162】 統計分析：藉由Shapiro-Wilk測試針對常態分佈測試資料。在比較超過2個組之情況下，執行單向ANOVA，隨後執行邦弗朗尼氏多重比較檢驗(Bonferroni's multiple comparisons test)。對於比較配對樣本之情況，執行配對t檢驗。將 $p \leq 0.05$ 視為統計學上顯著。使用GraphPad

Prism (GraphPad軟體)或R軟體執行統計分析。

【0163】 結果：活體外3D皮膚模型及離體人類皮膚樣本展示，在用肽14處理5天之後，皮膚衰老減少，如**圖11A**、**圖11B**及**圖11C**中所展示。**圖11A**展示，未與肽14 (對照)及12.5 μM 肽14一起培養5天的3D皮膚等效物(頂部列)及離體皮膚活體組織切片樣本(底部列)之蘇木精及曙紅(H&E)染色組織學影像。用肽14處理的3D皮膚等效物及離體皮膚樣本大體上展示類似於未經處理對照樣本或比其更厚的表皮厚度。**圖11B**展示，用12.5 μM 肽14 (處理組)處理的3D皮膚模型樣本之所預測年齡(亦稱為分子DNA年齡)低於作為未經處理之對照(ctrl)的樣本之所預測年齡。未經處理之3D皮膚模型的所預測年齡之平均值為約80，而經肽14處理之3D皮膚模型的所預測年齡之平均值為約66 (藉由t檢驗， $p=0.25$)。**圖11C**展示，用12.5 μM 肽14處理之離體皮膚活體組織切片的所預測年齡低於作為未經處理之對照(ctrl)的樣本之所預測年齡。離體皮膚活體組織切片樣本的所預測年齡之平均值為約71，而經肽14處理之離體皮膚活體組織切片樣本的所預測年齡之平均值為約68 (** $p<0.01$)。

實例16.

【0164】 在脊椎動物中，稱為黑色素細胞之特殊細胞通常產生黑色素。MeWo細胞為人類永生化黑色素細胞系，其表示表現視黃酸受體之晚期分化之黑色素細胞，且可提供實驗模型以用於黑色素生成之活體外研究。關於將MeWo細胞用作活體外模型黑色素生成之額外描述發現於Schadendorf 等人，1994年 .Retinoic Acid Receptor-gamma-selective Retinoids Exert Antiproliferative Effects on Human-melanoma Cell-growth In-vitro.International Journal of Oncology. 數位物件識別碼：

10.3892/Ijo.5.6.1325 及 Malaspina 等人 Depigmenting potential of lichen extracts evaluated by in vitro and in vivo tests. PeerJ 8:e9150 <https://doi.org/10.7717/peerj.9150> 中。

【0165】 為測試肽14是否促進黑色素細胞之去色素，在5% CO₂、37°C及95%濕度下，在補充有10% v/v FBS及1% v/v之青黴素/鏈黴素溶液(1,000 U.mL⁻¹)的DMEM中培養MeWo細胞。對於在用實驗條件中之一者進行處理(預處理)之前兩週，將MeWo細胞與異丁基甲基黃嘌呤(IBMx)一起培養以刺激黑色素合成。在6孔盤中以每孔1,000,000個細胞接種MeWo細胞持續6小時之後，用實驗條件中之一者培育細胞持續7天，且針對胞內及上清液黑色素含量進行分析。

【0166】 實驗條件包括陽性對照組、陰性對照組、肽14 (IBMx) 7d組及視黃酸(IBMx) 7d組。陰性對照組包含MeWo細胞，該等MeWo細胞在預處理時段中用25 μM IBMx刺激2週，且接著不經處理持續7天，在接種以用於實驗之後僅接受媒劑。陽性對照組包含MeWo細胞，該等MeWo細胞在整個實驗期間與25 μM IBMx一起培育，在預處理時段中培育2週，且在處理時段中培育7天。肽14 (IBMx) 7d組包含MeWo細胞，該等MeWo細胞在預處理時段中與25 μM IBMx一起培育2週，且接著用25 μM IBMx及3.12 μM肽14處理7天。視黃酸(IBMx) 7d組包含MeWo細胞，該等MeWo細胞在預處理時段中與25 μM IBMx一起培育2週，且接著用25 μM IBMx及2 μM視黃酸處理7天。

【0167】 在處理之後，藉由樣本在492 nm下之吸光度來評定細胞集結粒及細胞培養上清液中的黑色素含量。藉由胰蛋白酶消化、計數且在200 μL之1M NaOH中培育16小時來製備細胞集結粒(Matsuda等人，

2004；Yoo等人, 2007)。在 $1.2\times g$ 離心持續10分鐘之後獲得細胞培養物上清液。將資料呈現為相對黑色素含量，樣本在指定波長(492 nm)下之吸光度歸一化至陰性對照樣本亦在相同波長下的吸光度。執行包括三個技術複本之三個獨立實驗。當偵測到統計顯著性時，使用ANOVA及邦弗朗尼事後歸因檢驗來分析資料。在組之間，統計學上顯著之p值對於 $p<0.05$ 由*表示；對於 $p<0.01$ 由**表示；對於 $p<0.001$ 由***表示；對於 $p<0.0001$ 由****表示。

【0168】在如圖12A中所展示之細胞集結粒中且在如圖12B中所展示之細胞培養物上清液中，與陽性對照、陰性對照及視黃酸處理組相比，肽14處理組促進相對黑色素含量的顯著減少。在如圖12A中所展示之細胞集結粒中，陽性對照具有陰性對照組(**** $p<0.0001$)之約170%倍之相對黑色素含量，且視黃酸處理組具有陰性對照組(** $p<0.01$)之約125%之相對黑色素含量，而肽14處理組具有陰性對照組(** $p<0.001$)之約90%或低於陰性對照組之相對黑色素含量。在如圖12B中所展示之細胞培養物上清液中，陽性對照及視黃酸處理組具有極類似於陰性對照組的相對黑色素含量，而肽14處理組具有陰性對照組(* $p<0.05$)之約70%或低於陰性對照組之相對黑色素含量。

【0169】此展示，肽14可適用於減少各種黑色素生成相關病況，包括(但不限於)黑皮病、由皮膚炎症引起之皮膚色素過多、激素變化、衰老、日曬及慢性病變。另外，肽14似乎比當前被視為抗衰老皮膚護理之最高標準分子的視黃酸表現得更佳。

實例17.

【0170】皮膚可頻繁經歷反彈性色素過多，其中在美白處理中斷之

後，皮膚中重新形成色素沈著。為測試肽14之去色素功效是否在中斷肽14處理之後仍存在，在5% CO₂、37°C及95%濕度下，在補充有10% v/v FBS及1% v/v之青黴素/鏈黴素溶液(1,000 U.mL⁻¹)的DMEM中培養MeWo細胞。對於在用實驗條件中之一者進行處理(預處理)之前兩週，將MeWo細胞與異丁基甲基黃嘌呤(IBMx)一起培養以刺激黑色素合成。在6孔盤中以每孔1,000,000個細胞接種MeWo細胞持續6小時之後，用實驗條件中之一者培育細胞持續14天，且針對胞內及上清液黑色素含量進行分析。

【0171】 實驗條件包括陽性對照組、陰性對照組、肽14 (IBMx) 14天組、視黃酸(IBMx) 14天組、第7天肽14 (IBMx)中斷組及第7天視黃酸(IBMx)中斷組。陰性對照組包含MeWo細胞，該等MeWo細胞在預處理時段中用25 μM IBMx刺激2週，且接著不經處理持續14天，在接種以用於實驗之後僅接受媒劑。陽性對照組包含MeWo細胞，該等MeWo細胞在整個實驗期間與25 μM IBMx一起培育，在預處理時段中培育2週，且在處理時段中培育14天。組中之一些用IBMx 25 μM (持續7天或14天)以及3.12 μM肽14處理，或用IBMx 25 μM (持續7天或14天)以及視黃酸2 μM處理。肽14 (IBMx) 14天組包含MeWo細胞，該等MeWo細胞在預處理時段中與25 μM IBMx一起培育2週，且接著用25 μM IBMx及3.12 μM肽14處理14天。視黃酸(IBMx) 14天組包含MeWo細胞，該等MeWo細胞在預處理時段中與25 μM IBMx一起培育2週，且接著用25 μM IBMx及2 μM視黃酸處理14天。肽14 (IBMx)7天組包含MeWo細胞，該等MeWo細胞在預處理時段中與25 μM IBMx一起培育2週，接著用25 μM IBMx及3.12 μM肽14處理僅7天，且僅與25 μM IBMx一起培養另外7天。視黃酸(IBMx) 7天組包含MeWo細胞，該等MeWo細胞在預處理時段中與25 μM

IBMX一起培育2週，接著用25 μM IBMX及2 μM 視黃酸處理僅7天，且僅與25 μM IBMX一起培養另外7天。

【0172】 在處理之後，藉由樣本在492 nm下之吸光度來評定細胞集結粒及細胞培養上清液中的黑色素含量。藉由胰蛋白酶消化、計數且在200 μL 之1M NaOH中培育16小時來製備細胞集結粒(Matsuda等人, 2004; Yoo等人, 2007)。在1.2 \times g離心持續10分鐘之後獲得細胞培養物上清液。將資料呈現為相對黑色素含量，樣本在指定波長(492 nm)下之吸光度歸一化至陰性對照樣本亦在相同波長下之樣本吸光度中的細胞之數目。因在14天時段期間細胞增殖顯著，故僅在此實驗中將黑色素含量資料歸一化至各組內之樣本中的細胞之數目。執行包括三個技術複本之三個獨立實驗。當偵測到統計顯著性時，使用ANOVA及邦弗朗尼事後歸因檢驗來分析資料。在組之間，統計學上顯著之p值對於 $p < 0.05$ 由*表示；對於 $p < 0.01$ 由**表示；對於 $p < 0.001$ 由***表示；對於 $p < 0.0001$ 由****表示。

【0173】 另外，分析參與黑色素生成的關鍵基因之mRNA含量，該等關鍵基因包括酪胺酸酶、黑色素細胞誘導之轉錄因子(MITF)及多巴色素互變異構酶(DCT)。

【0174】 在如圖13A中所展示之細胞集結粒中且在如圖13B中所展示之細胞培養物上清液中，與陽性對照及視黃酸處理組相比，肽14處理組促進相對黑色素含量的顯著減少。在如圖13A中所展示之細胞集結粒中，陽性對照具有約130%之相對黑色素含量，且視黃酸14天治療組具有約130%之相對黑色素含量，而肽14 14天治療組具有約90%或低於陰性對照組的相對黑色素含量。肽14 7天治療組具有約40%之相對黑色素含量，其為實驗組之最低相對黑色素含量。視黃酸7天治療組具有約90%之相對黑

色素含量。在如**圖13B**中所展示之細胞培養物上清液中，陽性對照具有約110%之相對黑色素含量，而視黃酸14天治療組及肽14 14天治療組具有約50%之相對黑色素含量。視黃酸7天治療組及肽14 7天治療組具有約100%之相對黑色素含量。

【0175】 黑色素生成相關基因之mRNA含量展示於**圖14A**、**14B**及**圖14C**中。肽14處理似乎引起酪胺酸酶、MITF及DCT基因之表現的顯著減少，其低於或至少類似於視黃酸處理組之mRNA含量。如**圖14A**中所展示，與其他實驗組相比，肽14 14天治療組的酪胺酸酶之相對表現量最低。如**圖14B**中所展示，肽14 14天治療組及視黃酸14天治療組的MITF之相對表現量最低。如**圖14C**中所展示，與其他實驗組相比，肽14 14天治療組及肽14 7天治療組的DCT之相對表現量最低。

【0176】 此展示，肽14可減少黑色素生成，且在中斷肽14處理之後繼續產生較低黑色素生成。另外，肽14似乎比當前被視為抗衰老皮膚護理之最高標準分子的視黃酸表現得更佳。

實例18.

【0177】 為測試肽13及肽14處理對人類皮膚模型及皮膚形態之功效，使用自健康老人供體(71、84及90歲)分離的人類原代纖維母細胞及角質細胞來建構人類皮膚等效物。用0.01% w/v (或1 μ M)之肽13或肽14處理皮膚等效物持續5天。僅用調配物處理陰性對照。在5天培養之後，分析皮膚等效物之表皮厚度，其根據總表皮面積定量。藉由盲分析員執行基於若干參數之品質評定。所觀測參數包括細胞層之一般組織以及角質層之厚度以及其他態樣，且經展示隨衰老及老化水準而減少。該評定之最大分數為28，其中較高分數與衰老及老化的減少相關。批量使用需要最小分數

19。此分數在內部驗證且經展示隨皮膚等效物或所培養細胞之衰老/老化而減少。用三個技術複本執行三個獨立實驗。使用t檢驗分析資料。將統計顯著性測定為等於或低於0.05之p值。在組之間，統計學上顯著之p值對於 $p < 0.05$ 由*表示；對於 $p < 0.01$ 由**表示；對於 $p < 0.001$ 由***表示；對於 $p < 0.0001$ 由****表示。

【0178】 圖15A展示，用僅媒劑(對照)、肽13或肽14處理的活體外人類皮膚模型之H&E染色組織學影像。用肽13或肽14處理的人類皮膚模型大體上展示與未經處理之對照樣本類似或增加的角質層(如由影像之頂部上的暗灰層或由H&E染色之亮粉紅色所指示)及表皮層(如由影像中間之中灰層或由H&E染色之紫色所展示)之厚度。圖15B展示用僅媒劑(對照)、肽14或肽13處理的人類皮膚模型之組織學分數之平均值，該平均值分別為21.00、23.83及23.44。用肽13或肽14處理的樣本之組織學分數比陰性對照更高。如藉由表皮厚度及屏障所評定，用肽13或肽14處理皮膚樣本似乎改善皮膚形態。

實例19.

【0179】 為研究肽14滲透穿過皮膚之深度的水準，使用Franz細胞且對離體皮膚培養樣本執行擴散研究。將來自女性供體(79歲)之腹部的新鮮人類皮膚切割為約2.5 cm×2.5 cm之小碎片。

【0180】 在Franz細胞研究中，用10 μ L的包含0.01%肽14之經調配乳膏處理皮膚，且將該皮膚置放於具有5 mm直徑之接觸面積(0.2 cm^2)的Franz細胞中。受體腔室具有2 mL之PBS，pH 7.4。在攪動下在32°C下使Franz細胞保持24小時。

【0181】 在離體皮膚培養研究中，用2 μ L的包含0.01%之肽14的經

調配乳膏處理皮膚(總共200 ng之肽14)。接著將皮膚樣本置放於底部具有DMEM培養基之空氣-液體界面中，且在37°C下保持24小時。

【0182】 在24小時之後，用拭紙移除皮膚上之過量調配物，且在PBS中將皮膚樣本洗滌4次。亦移除所有周圍皮膚。接著在60°C下將皮膚培育1至2分鐘，以自真皮分離表皮。收集受體腔室(2 mL)、表皮層及真皮層中之PBS，且在-80°C下冷凍直至進一步分析。對真皮層進行肽14的質譜分析以測定滲透至真皮中的肽14之量。

【0183】 在Franz細胞研究中，在真皮層中發現約1.37%至2.60%之所施用肽14。在離體皮膚培養研究中，在真皮層中發現約1.94%至1.96%之所施用肽14。在將肽14局部施用至皮膚之表面時，極少至無肽14滲透至真皮中。此表明，肽14藉由局部施用而達成極低至最少經皮滲透。

實例20.

【0184】 對人類個體執行臨床研究以評定將肽14局部施用於面部上之功效。此研究經IRB委員會批准。22名人類個體參與臨床研究且經詢問使用兩種產品，面部之各側使用一種。在面部之右側上，個體使用僅包含調配物的陰性對照。在面部之左側上，個體使用包含0.01%肽14的治療調配物。在開始使用產品(基線)之前且在將調配物每日局部施用至面部之各別側6週及12週之後，對個體進行評定。如下文所詳述來進行皮膚含濕量、經皮水分流失(TEWL)、真皮厚度及回聲強度、皮內分析、皮膚黏彈性及皮膚表面輪廓之各種量測，以評定在面部皮膚上進行局部肽14施用對細紋/皺紋外觀、膚色外觀(均勻度)、毛孔外觀、質地/光滑度外觀、堅實度(視覺)、彈性(觸覺)及整體外觀的影響。

【0185】 臨床專家定級。對功效定級：在基線、第6週及第12週

處，使用10 cm視覺類比量表(VAS)對雙側面部執行視覺及觸覺評定。使用下文詳述之儀器及方法評估以下參數：細紋/皺紋、膚色(顏色均勻度)、質地/光滑度(視覺)、堅實度(視覺)、彈性(觸覺)、皮膚毛孔、光亮度/光度及整體外觀。

【0186】 水分測定儀：水分測定儀CM 825 (Courage+Khazaka, Germany)用於藉由量測皮膚電容量來評估皮膚含濕量/含水量。在基線、第6週及第12週處，對雙側面部進行重複三次的量測且求平均值。使用測試位點地圖以確保在每次問診時量測相同位置。

【0187】 蒸汽壓力計：蒸汽壓力計(Delfin Technologies Ltd., Finland)藉由具有用以量測相對濕度及溫度之感測器的封閉圓柱形腔室來量測皮膚之經皮水分流失(TEWL)。TEWL速率之變化提供對屏障破壞或完整性之量測，藉此提供肽14對皮膚完整性之功效的指示。在基線、第6週及第12週處，所有個體對雙側面部上進行重複兩次的蒸汽壓力計量測且求平均值。在各個體之身體地圖上記錄評定位置。

【0188】 Ultrasound-DermaScan：DermaScan C USB (Cortex Technology ApS, Hadsund, Denmark)為緊密高解析度超音波掃描器。在基線及第12週處，所有個體對雙側面部進行超音波評定。在每次問診時，評定之位置相同，且將該位置記錄於面部地圖上。在獲得超音波掃描之後，針對真皮厚度(密度)及回聲強度分析該等超音波掃描。

【0189】 SIAScope：COSMETRICS™ SIAScope (Astron Clinical, Toft, 英國)為使用分光光度法皮內分析(SIA)或發色團映射之非侵入式光學皮膚成像儀器。在基線、第6週及第12週處，在雙側面部上量測真皮膠原蛋白及血紅蛋白。

【0190】 彈性測定儀：彈性測定儀MPA 580 (Courage+Khazaka, Germany)藉由向皮膚表面施加吸力，將皮膚拉至探針之孔中且使用光學量測系統測定滲透深度來量測皮膚之黏彈特性(堅實度及彈性)。在基線、第6週及第12週處，對雙側面部進行量測。在各時間點處量測相同位置且使用面部地圖進行記錄。量測值包括堅實度、彈性及淨彈性。

【0191】 VISIA-CR：使用以多種照明模式捕獲高解析度影像之VISIA-CR成像系統(Canfield Scientific, Paramus, NJ, USA)提供像片文件。在基線、第6週及第12週處，在標準1及中心、右側及左側視圖之平行偏振光中捕獲像片。

【0192】 ANTERA 3D®：Antera3D® (Miravex, Ireland)為合併皮膚輪廓量測術、多光譜分析及比色法以提供皮膚表面之三維重構及後續影像分析的儀器。在基線、第6週及第12週處，在所有個體之左側及右側的魚尾紋區域上捕獲影像。在各時間點處量測相同位置且使用面部地圖進行記錄。針對質地、廣度及深度細紋/皺紋分析影像。

【0193】 專家臨床定級

【0194】 第6週及第12週與基線之比較

【0195】 肽14調配物：對於細紋/皺紋外觀、膚色(均勻度)、毛孔外觀、質地/光滑度、堅實度(視覺)、彈性(觸感)及整體外觀，用肽14處理的面部左側之平均分數在基線與後續時間點處的比較揭露在第6週處的臨床定級之統計學上顯著的改善，該等改善持續至第12週。另外，與用肽14處理之面部左側的基線相比，光亮度/光度外觀在第12週處在統計學上顯著改善。

【0196】 對照調配物：對於細紋/皺紋外觀、膚色(均勻度)、毛孔外

觀、質地/光滑度、堅實度(視覺)、彈性(觸感)、光亮度/光度及整體外觀，用陰性對照調配物處理的面部右側之平均分數在基線與後續時間點處的比較揭露在第6週處的臨床定級之統計學上顯著的改善，該等改善持續至第12週。

【0197】 肽14處理組與陰性對照之比較(面部之左側相比於右側)

【0198】 肽14處理組與陰性對照關於處理時間之比較

【0199】 當與基線(處理前)相比時，在一些量測值中，用肽14處理的面部之左側似乎比用陰性對照處理的面部之右側更佳。相較於用陰性對照處理的面部之右側，用肽14處理的面部之左側具有藉由水分測定儀量測之更高水準的皮膚含水量、在第6週藉由SIAScope量測之更高水準的膠原蛋白含量及在第6週藉由蒸汽壓力計量測之更佳的TEWL (經皮水分流失)改善。對於真皮厚度(密度)及回聲強度之Dermascan評定及整體皮膚外觀之Visia評定，在用肽14處理的面部之左側與用陰性對照調配物處理的面部之右側之間未見顯著差異。相較於用陰性對照調配物處理的面部之右側，用肽14處理的面部之左側在第12週處具有更佳的質地(粗糙度)之Antera量測值。

【0200】 分析22名患者在使用具有0.01%肽14之局部乳膏12週之後的結果。**圖16**展示，在基線(左側，基線)處及在處理12週(右側，12週)之後，用肽14處理的面部之左側之一實例。與基線時間點相比，用0.01%肽14處理12週似乎已減少細紋及皺紋外觀且改善了光滑度、膚色(均勻度)、質地/光滑度及整體外觀。

【0201】 執行盲專家觀點之分析以測定與基線(處理前)相比展示改善的患者之百分比及所有個體之平均改善百分比(MPI)，其中MPI表示平

均改善百分比。分析發現，87%之患者評定為具有皮膚皺紋外觀的減少(MPI：3.3%)，90%評定為具有改善的皮膚彈性(MPI：4.75%)，且95.5%評定為具有皮膚均勻度(MPI：4.4%)、光亮度(MPI：5.06%)、毛孔外觀(MPI：4.58%)及堅實度(MPI：5.43%)的改善。所有個體評定為呈現較佳的皮膚質地/光滑度(MPI：7.46%)及整體外觀(MPI：6.17%)。

【0202】 藉由各種儀器評估個體之面部以測定與基線(處理前)相比展示改善的患者之百分比及所有個體之平均改善百分比(MPI)，其中MPI表示平均改善百分比。儀器評估發現，根據蒸汽壓力計評估，81%之個體具有較佳的皮膚屏障(MPI：14.19%)。根據Antera評估，73%之個體呈現較佳的皮膚粗糙度(MPI：5.05%)。根據VISIA評估，73%之個體呈現較佳的皮膚光亮度(MPI：16.63%)。

【0203】 亦評定個體之感覺。在個體之感覺的分析中，大於80%之個體認為，包含肽14之調配物促進較佳的皮膚外觀、較佳的皮膚質地、較佳的皮膚堅實度及較佳的含水量。78%之個體注意到皮膚光亮度之改善。

實例21.

【0204】 對人類皮膚使用包含本文中所揭示之多肽中之至少一者的局部調配物。調配物旨在作為光滑層在上午及夜間施用於面部及/或頸部上之乾淨的乾燥皮膚上。調配物為針對皮膚之持久健康經科學調配以改善皮膚彈性且增強表皮屏障的日常必需的局部補充物。

實例22.

【0205】 使用者將本文中所描述的包含多肽中之至少一者的局部調配物施用至面部及/或頸部。在施用局部調配物之後，使用者亦施用包含UV阻滯劑之另一種局部調配物。

實例23.

【0206】 使用者將本文中所描述的包含多肽中之至少一者的局部調配物及UV阻滯劑施用至面部或頸部。局部調配物可施用至使用者之身體上的皮膚。

實例24.

【0207】 將用來自老人供體(71、84或90歲)之細胞建構的樣本之3D皮膚等效物切片用1 μ M肽14或肽13或20 μ M視黃酸(RA)處理，且針對老化、衰老及健康之各種標記物之各種處理之功效進行評定。

【0208】 圖17展示，用對照、肽14、肽13或視黃酸處理的3D皮膚等效物之表皮(Epi)及真皮(Der)層之p16、BLIMP1、ZYG11B、IL-8、Ki-67、ZIC1、MMP1、HAS2之相對mRNA表現量。資料呈現為歸一化至GAPDH及未處理對照的2-ddCt。* $p < 0.05$ 。經肽13及肽14處理之樣本通常在表皮層中對p16、BLIMP1、ZYG11B、IL-8及Ki-67且在真皮層中對p16、MMP1、HAS2、IL-8及Ki-67具有類似的相對mRNA表現量。經肽13及肽14處理之樣本通常在表皮層中對p16、BLIMP1、ZYG11B、IL-8且在真皮層中對p16、MMP1、IL-8及Ki-67具有比經RA-處理之樣本更低的相對mRNA表現量。經肽13及肽14處理之樣本通常在表皮層中對Ki-67且對於真皮層對HAS2具有比經RA處理之樣本更高的相對mRNA表現量。經肽13及肽14處理之樣本對於真皮層對ZIC1及Ki-67具有與經RA處理之樣本類似的相對mRNA表現量。

實例25.

【0209】 抗衰老治療策略可與活體內健康及壽命延長相關。為評定肽14是否促進延長的健康及壽命，使用秀麗隱桿線蟲蠕蟲。在蠕蟲培養基

(M9緩衝液培養基)中以1 μM 或2 μM 之不同濃度添加肽14。陰性對照蠕蟲僅接受媒劑。評定兩個健康參數i)咽部泵送及ii)蠕蟲移動。亦測定壽命。對於咽部泵送分析，每日觀測15隻蠕蟲之咽部移動(泵送)且計數20秒。藉由2名不同盲觀測者將此實驗重複3次，在不同日採用不同動物群體。藉由利用單向ANOVA及鄧尼特氏事後歸因檢驗(Dunnet's post hoc test)分析各個別時間點來偵測統計學差異。將所有組與H2O組進行比較。對於蠕蟲移動分析，每日量測15隻蠕蟲的秀麗隱桿線蟲之基礎移動(亦稱為輾轉)。觀測持續時間為30秒。藉由2名不同盲觀測者將實驗重複3次，在不同日採用不同蠕蟲群體。藉由利用單向ANOVA及鄧尼特氏事後歸因分析各個別時間點來偵測統計學差異，且將所有組與H2O組進行比較。對於壽命分析，每日觀測15隻蠕蟲之壽命直至最後一隻蠕蟲死亡。藉由2名不同盲觀測者將此實驗重複3次，在不同日採用不同蠕蟲群體。量測平均壽命。藉由利用單向ANOVA及鄧尼特氏事後歸因分析各個別時間點來偵測統計學差異，且將所有組與H2O組進行比較(圖18)。

【0210】用1 μM 或2 μM 之肽14進行處理改善了蠕蟲輾轉(圖18，盤A)、泵送(圖18，盤B)及壽命(圖18，盤C)。儘管輾轉在第1天得到顯著改善(* $p < 0.05$)，但泵送在此日顯著減少(* $p < 0.5$)。綜合而言，資料表明所測試肽關於促進健康及壽命之安全性及功效。舉例而言，在第8天，與對照相比，輾轉(* $p < 0.05$)及泵送(* $p < 0.05$)兩者在用肽14處理的組中增加。主要歸因於肌肉完整性喪失，泵送隨著秀麗隱桿線蟲之衰老而減少。儘管未直接量測，但當與H2O對照組相比時，秀麗隱桿線蟲之咽部(彎曲或膨脹咽部，此線蟲衰老之兩種常見特徵)之宏觀解剖結構的缺陷亦在1 μM 肽14組中減少。未在時間點或樣本中偵測到蠕蟲移動之減少，表明肽在所測試

濃度下對秀麗隱桿線蟲不具毒性。當以1 μM 及2 μM 使用時，肽14促進蠕蟲平均壽命之統計學上顯著的增加(1 μM 肽14 $**p<0.01$ ；2 μM 肽14 $*p<0.05$)。

實例26.

【0211】 歸因於高水準之細胞老化，將來自早老症患者之皮膚細胞用作衰老之模型。將來自早老症患者之原代纖維母細胞在補充有10% v.v. 胎牛血清(FBS)及1% v.v.青黴素/鏈黴素溶液(1,000 U.mL⁻¹)之DMEM (達爾伯克改良伊格爾培養基)中培養。在5% CO₂、37°C及95%濕度氛圍下培養細胞。在擴增之後，將細胞接種於96孔盤(4,000個細胞/孔)中，且在接種後6小時，與500 nM、5 μM 或50 μM 之多肽序列LKGIL (SEQ ID NO: 6)或WLKGI (SEQ ID NO: 7)一起培育。陰性對照包含未處理細胞，其僅接受媒劑。在培育之後，分析相對細胞老化，其藉由老化相關 β -半乳糖染色相對於未處理對照之活性及藉由ATR_X病灶/細胞核之定量進行評定。執行包括三個技術複本之三個獨立實驗(生物學複本)。使用ANOVA及邦弗朗尼事後歸因檢驗分析資料。將統計顯著性測定為等於或低於0.05之p值，其中 $*p<0.05$ 且 $**p<0.01$ 。**圖19**展示多肽序列LKGIL (SEQ ID NO: 6) (A、B、C)及WLKGI (SEQ ID NO: 7) (D、E、F)對減少細胞老化而不促進細胞死亡的功效。在盤A及盤D中，y軸指示歸一化至未處理對照之相對老化水準。在盤B及盤D中，y軸指示歸一化至未處理對照之相對細胞數目。在盤C及盤F中，y軸指示每細胞之平均ATR_X病灶積聚。與未處理細胞(對於 β -半乳糖染色， $p<0.01$ ，且對於ATR_X病灶/細胞核， $p<0.05$)相比，當以5 μM 及50 μM 使用時，用LKGIL (SEQ ID NO: 6)處理細胞顯著減少老化相關 β -半乳糖染色及ATR_X病灶/細胞核之平均數目。與未處理細

胞(對於5 μM ， $p < 0.05$ ，且對於50 μM ， $p < 0.01$)相比，當以5 μM 及50 μM 使用時，用WLKGI (SEQ ID NO: 7)處理細胞減少老化相關 β -半乳糖染色水準。在所測試濃度下未觀測到細胞毒性。

實例27.

【0212】 針對作為抗老化藥劑之適用性測試額外多肽。將細胞與多肽中之一者一起培育。陰性對照包含未處理細胞，其僅接受媒劑。在培育之後，分析相對於陰性對照的相對細胞老化(藉由老化相關 β -半乳糖染色相對於陰性對照之活性來評定)及相對細胞增殖。多肽之數目展示低於1之相對細胞老化，其相較於未處理陰性對照具有減少的細胞老化，且使細胞增殖維持處於或高於未處理陰性對照之細胞增殖。此類多肽之實例展示於表6中。

【0213】 此外，研究表6之多肽對細胞老化的劑量依賴型功效。將細胞與範圍介於1.26 μM 至50 μM (1.26 μM 、3.12 μM 、6.25 μM 、12.5 μM 、25 μM 、50 μM)的各種劑量之多肽一起培育。即使在較低多肽劑量下，亦存在細胞老化之可辨減少。

表6.多肽	
SEQ ID NO.	多肽序列
9	STAKAWLKGI
10	ETAKAWEKGI
11	ETAKAWHKGI
12	ETAKAWLKSI
13	ETAKAWLKGE
14	ETAKAWLKGI
15	WLKGILRGAA
16	KTAKAWLKGI
17	NTAKAWLKGI
18	PTAKAWLKGI

19	QTAKAWLKGI
20	EQAKAWLKGI
21	WLKGCIRGAA
22	WLKGILPGAA
23	WLKGILQGAA
24	WLKGILSGAA
25	WLKGILVGAA
26	WLKGILRAAA
27	WLKGILRGHA
28	WLKGILRGIA

【0214】 儘管本文中已展示且描述本發明之較佳實施例，但熟習此項技術者將顯而易見，僅藉助於實例提供此類實施例。在不脫離本發明之情況下，熟習此項技術者現將想到眾多變化、改變及取代。應理解，本文所描述之本發明實施例之各種替代方案可用於實踐本發明。預期以下申請專利範圍限定本發明之範疇，且因而涵蓋此等申請專利範圍及其等效物之範疇內的方法及結構。

例示性實施例

【0215】 在例示性實施例當中為：

【0216】 實施例1包含用於治療皮膚之組合物，該組合物包含經分離、合成或重組多肽，該經分離、合成或重組多肽包含胺基酸序列LKGI (SEQ ID NO: 5)或其類似物，其中多肽中包含不超過100個胺基酸。實施例2.如實施例1之組合物，其中經分離、合成或重組多肽包含胺基酸序列WLKGI (SEQ ID NO: 7)或其類似物。實施例3.如實施例1或實施例2之組合物，其中經分離、合成或重組多肽包含胺基酸序列LKGIL (SEQ ID NO: 6)或其類似物。實施例4.如實施例1至3中任一項之組合物，其中經分離、合成或重組多肽包含至少4個胺基酸、10個胺基酸、15個胺基酸或20

個胺基酸。實施例5.如實施例1至4中任一項之組合物，其進一步包含治療劑、營養製劑或化妝品賦形劑。實施例6.如實施例5之組合物，其中賦形劑經組態以供局部施用。實施例7.如實施例1至6中任一項之組合物，其中組合物經組態以供施用至人類皮膚。實施例8.如實施例1至7中任一項之組合物，其中組合物為乳膏、經表皮貼片、局部貼片、軟膏、油狀物、凝膠、液體、散劑、洗劑、精華液、乳液、保濕劑、泡沫、面罩、摩斯、氣霧、噴霧、清潔劑、化妝水或洗髮劑。實施例9.如實施例1至5中任一項之組合物，其中組合物經組態為可食補充劑。實施例10.如實施例9之組合物，其中組合物經組態為飲料。實施例11.如實施例1至9中任一項之組合物，其中組合物包含至少一種選自由以下組成之群的皮膚保濕劑：丙三醇、鯊烯、山梨糖醇、玻尿酸、玻尿酸衍生物、玻尿酸鈉、玻尿酸鈉交聯聚合物、菸鹼醯胺、醣蛋白、吡咯啉酮、羧酸(PCA)、離胺酸HCl、尿囊素及藻類提取物。實施例12.如實施例1至9中任一項之組合物，其中組合物包含至少一種選自由以下組成之群的潤膚劑：植物油、礦物油、牛油樹油脂、可可脂、石臘油、脂肪酸、三酸甘油酯、苯甲酸酯、肉豆蔻酸酯、棕櫚酸酯、硬脂酸酯、醣脂、磷脂、鯊烯、丙三醇、腦醯胺及藻類提取物。實施例13.如實施例12之組合物，其中植物油選自由以下組成之群：玫瑰果油、安弟羅巴果油、葡萄籽油、酪梨油、李子籽油、巴卡斯果油、雲杉光皮樹油、杏仁油及摩洛哥堅果油。實施例14.如實施例1至13中任一項之組合物，其中組合物包含至少一種選自由以下組成之群的維生素：維生素A、維生素D、維生素E、維生素F、維生素K、維生素B1 (硫胺)、維生素B2 (核黃素)、維生素B3 (菸鹼酸)、維生素B5 (泛酸)、維生素B7 (生物素)、維生素B6、維生素B12 (氰鈷胺素)、維生素B9、葉酸、菸鹼醯胺

或其衍生物。實施例15.如實施例1至14中任一項之組合物，其中組合物包含約500 nM至約500 μ M之有效量的經分離、合成或重組多肽。實施例16.如實施例1至14中任一項之組合物，其中組合物包含約0.001%至約5% (w/w)之有效量的經分離、合成或重組多肽。實施例17.如實施例1至16中任一項之組合物，其中組合物經調配以實現不超過10%的經分離、合成或重組多肽低真皮滲透至真皮中。實施例18.如實施例1至17中任一項之組合物，其中與在使用組合物之前相比，在皮膚上使用組合物之後，組合物改善使用者之皮膚的皮膚含濕量、經皮水分流失(TEWL)、真皮厚度及回聲強度、皮內分析、皮膚黏彈特性或皮膚表面輪廓中之至少一者。實施例19.如實施例1至17中任一項之組合物，其中與在使用組合物之前相比，在皮膚上使用組合物之後，組合物減少使用者之皮膚的細紋/皺紋外觀、膚色外觀(均勻度)、毛孔外觀、質地/光滑度外觀、堅實度(視覺)、彈性(觸覺)、表皮屏障、皮膚粗糙度、皮膚色素過多或整體外觀。實施例20.如實施例1至19中任一項之組合物，其中用組合物治療皮膚減少或治療衰老對皮膚的影響。實施例21.如實施例1至20中任一項之組合物，其中用組合物治療皮膚減少細胞老化對皮膚的影響。實施例22.如實施例20至21中任一項之組合物，其中藉由以下中之至少一者來評定衰老之影響：老化相關 β -半乳糖活性水準、ATRX病灶/細胞之比率、p16表現、IL-8表現、Ki-67表現、玻尿酸合成酶2表現、基質金屬蛋白酶1 (MMP1)表現、長壽蛋白6 (SIRT6)表現、BLM表現或核酸外切酶1 (EXO1)表現。

【0217】 實施例23包含經分離、合成或重組多肽，其包含胺基酸序列 $X_1X_2X_3X_4X_5X_6X_7X_8X_9X_{10}$ 或其類似物，其中：(a)該胺基酸序列與第一序列SEQ ID NO: 1具有至少70%、80%、85%、90%或95%一致性，其中

X₁為E，X₂為T，X₄為K，X₆為W，X₇為L，X₉為G，且X₁₀為I；且(i)X₃不為S；或(ii)若X₅為任何胺基酸，則X₈不為G；或(iii)若X₈為任何胺基酸，則X₅不為N；或(iv) (i)、(ii)或(iii)中之任一者，該胺基酸序列視情況具有1、2、3或4個保守胺基酸取代；或(b)該胺基酸序列與第二序列SEQ ID NO: 2具有至少70%、80%、85%、90%或95%一致性，其中X₁為A，X₂為T，X₃為A，X₄為K，X₅為A，X₆為W，X₇為L，X₈為K，X₉為G，且X₁₀為I，該胺基酸序列視情況具有1、2、3或4個保守胺基酸取代；或(c)該胺基酸序列與第三序列SEQ ID NO: 3具有至少70%、80%、85%、90%或95%一致性，其中X₁為K，X₂為L，X₅為I，X₆為L，X₈為G，且X₁₀為A；且(i)若X₉為任何胺基酸，則X₃不為N；或(ii)若X₃為任何胺基酸，則X₉不為S；或(iii)若X₄為任何胺基酸，則X₇不為L；或(iv)若X₇為任何胺基酸，則X₄不為S，及；或(v) (i)、(ii)、(iii)或(iv)中之任一者，該胺基酸序列視情況具有1、2、3或4個保守胺基酸取代；或(d)該胺基酸序列與第四序列SEQ ID NO: 4具有至少70%、80%、85%、90%或95%一致性，其中X₁為W，X₂為L，X₃為K，X₄為G，X₅為I，X₆為L，X₇為R，X₈為E，X₉為A，且X₁₀為A，該胺基酸序列視情況具有1、2、3或4個保守胺基酸取代。實施例24.如實施例23之多肽，其中胺基酸序列包含LKGI (SEQ ID NO: 5)。實施例25.如實施例23或實施例24之多肽，其中胺基酸序列包含WLKGI (SEQ ID NO: 7)。實施例26.如實施例23至25中任一項之多肽，其中胺基酸序列包含LKGIL (SEQ ID NO: 6)。實施例27.如實施例23之多肽，其中該胺基酸序列與序列SEQ ID NO: 1具有至少70%、80%、85%、90%或95%一致性。實施例28.如實施例23之多肽，其中胺基酸序列為SEQ ID NO: 1。實施例29.如實施例23之多肽，其中胺基酸序列為SEQ

ID NO: 2。實施例30.如實施例23之多肽，其中胺基酸序列與序列SEQ ID NO: 3具有至少70%、80%、85%、90%或95%一致性。實施例31.如實施例23之多肽，其中胺基酸序列與序列SEQ ID NO: 3具有至少80%、85%、90%或95%一致性。實施例32.如實施例23之多肽，其中胺基酸序列為SEQ ID NO: 3。實施例33.如實施例23之多肽，其中胺基酸序列為SEQ ID NO: 4。實施例34.如實施例23至33中任一項之多肽，其中重組多肽包含至少10個胺基酸、15個胺基酸或20個胺基酸且不超過100個胺基酸。實施例35包含用於治療皮膚之組合物，該組合物包含至少一種如實施例23至34中任一項之經分離、合成或重組多肽及治療劑、營養製劑或化妝品賦形劑。實施例36.如實施例35之組合物，其中賦形劑經組態以供局部施用。實施例37.如實施例35或實施例36之組合物，其中組合物經調配以供施用至人類皮膚。實施例38.如實施例35至37中任一項之組合物，其中組合物為乳膏、軟膏、油狀物、凝膠、液體、油狀物、散劑、洗劑、精華液、乳液、保濕劑、泡沫、面罩、摩斯、氣霧、噴霧、清潔劑、化妝水或洗髮劑。實施例39.如實施例35之組合物，其中組合物經組態為可食補充劑。實施例40.如實施例39之組合物，其中組合物經組態為飲料。

【0218】 實施例41.如實施例35至40中任一項之組合物，其中組合物包含至少一種選自由以下組成之群的皮膚保濕劑：丙三醇、鯊烯、山梨糖醇、玻尿酸、玻尿酸衍生物、玻尿酸鈉、玻尿酸鈉交聯聚合物、菸鹼醯胺、醣蛋白、吡咯啉酮羧酸(PCA)、離胺酸HCl、尿囊素及藻類提取物。實施例42.如實施例35至40中任一項之組合物，其中組合物包含至少一種選自由以下組成之群的潤膚劑：植物油、礦物油、牛油樹油脂、可可脂、石臘油、脂肪酸、三酸甘油酯、苯甲酸酯、肉豆蔻酸酯、棕櫚酸酯、硬脂

酸酯、醣脂、磷脂、鯊烯、丙三醇、腦醯胺及藻類提取物。實施例43.如實施例42之組合物，其中植物油選自由以下組成之群：玫瑰果油、安弟羅巴果油、葡萄籽油、酪梨油、李子籽油、巴卡斯果油、雲杉光皮樹油、杏仁油及摩洛哥堅果油。實施例44.如實施例35至43中任一項之組合物，其中組合物包含至少一種選自由以下組成之群的維生素：維生素A、維生素D、維生素E、維生素F、維生素K、維生素B1 (硫胺)、維生素B2 (核黃素)、維生素B3 (菸鹼酸)、維生素B5 (泛酸)、維生素B7 (生物素)、維生素B6、維生素B12 (氰鈷胺素)、維生素B9、葉酸、菸鹼醯胺或其衍生物。實施例45.如實施例35至44中任一項之組合物，其中組合物包含約500 nM至約500 μ M之有效量的經分離、合成或重組多肽。實施例46.如實施例35至44中任一項之組合物，其中組合物包含約0.001%至約5% (w/w)之有效量的經分離、合成或重組多肽。實施例47.如實施例35至44中任一項之組合物，其中組合物包含約0.001%至約1%之有效量的經分離、合成或重組多肽。實施例48.如實施例35至47中任一項之組合物，其中與在使用組合物之前相比，在皮膚上使用組合物之後，組合物改善使用者之皮膚的皮膚含濕量、經皮水分流失(TEWL)、真皮厚度及回聲強度、皮內分析、皮膚黏彈特性或皮膚表面輪廓中之至少一者。實施例49.如實施例35至47中任一項之組合物，其中與在使用組合物之前相比，在皮膚上使用組合物之後，組合物減少使用者之皮膚的細紋/皺紋外觀、膚色外觀(均勻度)、毛孔外觀、質地/光滑度外觀、堅實度(視覺)、彈性(觸覺)、表皮屏障、皮膚粗糙度、皮膚色素過多或整體外觀。實施例50.如實施例35至49中任一項之組合物，其中用組合物治療皮膚減少或治療衰老對皮膚的影響。實施例51.如實施例35至50中任一項之組合物，其中用組合物治療皮膚減少細胞

老化對皮膚的影響。實施例52.如實施例50至51中任一項之組合物，其中藉由以下中之至少一者來評定衰老之影響：老化相關B-半乳糖活性水準、ATRX病灶/細胞之比率、p16表現、IL-8表現、Ki-67表現、玻尿酸合成酶2表現、基質金屬蛋白酶1 (MMP1)表現、長壽蛋白6 (SIRT6)表現、BLM表現或核酸外切酶1 (EXO1)表現。

【0219】 實施例53包含治療有需要之個體之病況的方法，該方法包含向個體投與包含胺基酸序列SEQ ID NO: 5之組合物。實施例54.如實施例53之方法，其中調配物包含胺基酸序列SEQ ID NO: 6。實施例55.如實施例53或實施例54之方法，其中組合物包含胺基酸序列SEQ ID NO: 7。實施例56.如實施例53至55中任一項之方法，其中投與包含將組合物局部施用至個體。實施例57.如實施例53至56中任一項之方法，其中個體為人類或其他動物。實施例58.如實施例53至57中任一項之方法，其中方法包含向個體投與有效量的組合物。實施例59.如實施例53至58中任一項之方法，其中病況為與個體中老化細胞之積聚相關的病症。實施例60.如實施例53之方法，其中與老化細胞之積聚相關的病症包含皮膚衰老。實施例61.如實施例53至60中任一項之方法，其中組合物包含至少一種選自由以下組成之群的皮膚保濕劑：丙三醇、鯊烯、山梨糖醇、玻尿酸、玻尿酸衍生物、玻尿酸鈉、玻尿酸鈉交聯聚合物、菸鹼醯胺、醣蛋白、吡咯啉酮羧酸(PCA)、離胺酸HCl、尿囊素及藻類提取物。實施例62.如實施例53至61中任一項之組合物，其中組合物包含至少一種選自由以下組成之群的潤膚劑：植物油、礦物油、牛油樹油脂、可可脂、石臘油、脂肪酸、三酸甘油酯、苯甲酸酯、肉豆蔻酸酯、棕櫚酸酯、硬脂酸酯、醣脂、磷脂、鯊烯、丙三醇、腦醯胺及藻類提取物。實施例63.如實施例62之方法，其中植物

油選自由以下組成之群：玫瑰果油、安弟羅巴果油、葡萄籽油、酪梨油、李子籽油、巴卡斯果油、雲杉光皮樹油、杏仁油及摩洛哥堅果油。實施例64.如實施例53至63中任一項之方法，其中組合物包含至少一種選自由以下組成之群的維生素：維生素A、維生素D、維生素E、維生素F、維生素K、維生素B1 (硫胺)、維生素B2 (核黃素)、維生素B3 (菸鹼酸)、維生素B5 (泛酸)、維生素B7 (生物素)、維生素B6、維生素B12 (氰鈷胺素)、維生素B9、葉酸、菸鹼醯胺或其衍生物。實施例65.如實施例53至64中任一項之方法，其中組合物包含約500 nM至約500 μM之有效量的經分離、合成或重組多肽。實施例66.如實施例53至64中任一項之方法，其中組合物包含約0.001%至約5% (w/w)之有效量的經分離、合成或重組多肽。實施例67.如實施例53至66中任一項之方法，其中組合物經調配以實現不超過10%的經分離、合成或重組多肽低真皮滲透至真皮中。實施例68.如實施例53至67中任一項之方法，其中與在使用組合物之前相比，在皮膚上使用組合物之後，組合物改善使用者之皮膚的皮膚含濕量、經皮水分流失 (TEWL)、真皮厚度及回聲強度、皮內分析、皮膚黏彈特性或皮膚表面輪廓中之至少一者。實施例69.如實施例53至68中任一項之組合物，其中與在使用組合物之前相比，在皮膚上使用組合物之後，組合物減少使用者之皮膚的細紋/皺紋外觀、膚色外觀(均勻度)、毛孔外觀、質地/光滑度外觀、堅實度(視覺)、彈性(觸覺)、表皮屏障、皮膚粗糙度、皮膚色素過多或整體外觀。實施例70.如實施例53至69中任一項之方法，其中用組合物治療皮膚減少或治療衰老對皮膚的影響。實施例71.如實施例53至70中任一項之方法，其中用組合物治療皮膚減少細胞老化對皮膚的影響。實施例72.如實施例70至71中任一項之方法，其中藉由以下中之至少一者來評定

衰老之影響：老化相關B-半乳糖活性水準、ATRAX病灶/細胞之比率、p16表現、IL-8表現、Ki-67表現、玻尿酸合成酶2表現、基質金屬蛋白酶1 (MMP1)表現、長壽蛋白6 (SIRT6)表現、BLM表現或核酸外切酶1 (EXO1)表現。

【0220】 實施例73.一種減少有需要之個體之細胞老化的方法，該方法包含向個體投與包含多肽之組合物，該多肽包含視情況具有1個保守胺基酸取代的胺基酸序列LKGI (SEQ ID NO: 5)，其中多肽中包含不超過100個胺基酸。實施例74.如實施例73之方法，其中多肽包含至少4個胺基酸、10個胺基酸、15個胺基酸或20個胺基酸。實施例75.如實施例73之方法，其中組合物包含視情況具有1個保守胺基酸取代之胺基酸序列WLKGI (SEQ ID NO: 7)。實施例76.如實施例73之方法，其中組合物包含視情況具有1個保守胺基酸取代之胺基酸序列LKGIL (SEQ ID NO: 6)。實施例77.如實施例75或實施例76之方法，其中多肽包含至少5個胺基酸、10個胺基酸、15個胺基酸或20個胺基酸，且包含不超過100個胺基酸。實施例78.如實施例73至77中任一項之方法，其中組合物進一步包含治療劑、營養製劑或化妝品賦形劑。實施例79.一種減少有需要之個體之細胞老化的方法，該方法包含向個體投與包含至少一種如實施例23至34中任一項之多肽的治療劑、營養製劑或化妝品組合物。實施例80.如實施例79之方法，其中組合物進一步包含治療劑、營養製劑或化妝品賦形劑。實施例81.如實施例79或實施例80之方法，其中投與包含將組合物施用至個體之皮膚之一部分。實施例82.如實施例79至81中任一項之方法，其中組合物延長個體之複數個細胞的壽命、誘導個體之複數個細胞中的SIRT6表現、增加個體之複數個細胞中的細胞再生速率、促進個體之複數個細胞中的凋亡、

促進個體之複數個細胞中的DNA修復、增加個體之複數個細胞中的膠原蛋白產生、增加個體之複數個細胞中的玻尿酸合成酶產生、減少個體之複數個細胞中的ATR_X核病灶積聚、減少個體之複數個細胞中的p16表現、減少個體之複數個細胞中的老化相關β-半乳糖苷酶產生、減少個體之複數個細胞中的IL8表現、減少個體之複數個細胞中的MMP1表現、增加個體之複數個細胞中的BLM表現及/或防止個體之複數個細胞中的UV誘導之DNA損害。

【0221】 實施例83包含治療有需要之個體之病況的方法，該方法包含向個體投與包含視情況具有1個保守胺基酸取代之胺基酸序列SEQ ID NO: 5的治療劑、營養製劑或化妝品組合物。實施例84.如實施例83之方法，其中治療劑、營養製劑或化妝品組合物包含視情況具有1個保守胺基酸取代之胺基酸序列SEQ ID NO: 6。實施例85.如實施例83或實施例84之方法，其中治療劑、營養製劑或化妝品組合物包含視情況具有1個保守胺基酸取代之胺基酸序列SEQ ID NO: 7。

【補充序列表】

<110> 美商第一美膚公司(ONESKIN, INC.)

<120> 具有抗老化功效之多肽及其用途

<140> TW 109124856

<141> 2020-07-22

<150> US 62/877,164

<151> 2019-07-22

<160> 34

<170> PatentIn version 3.5

<210> 1

<211> 10

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> 人工序列之描述：合成肽

<400> 1

Glu Thr Ala Lys His Trp Leu Lys Gly Ile

1 5 10

<210> 2

<211> 10

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> 人工序列之描述：合成肽

<400> 2

Ala Thr Ala Lys Ala Trp Leu Lys Gly Ile

1 5 10

<210> 3

<211> 10

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

I862641

<223> 人工序列之描述：合成肽

<400> 3

Lys Leu Lys Gly Ile Leu Arg Gly Ala Ala
1 5 10

<210> 4

<211> 10

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> 人工序列之描述：合成肽

<400> 4

Trp Leu Lys Gly Ile Leu Arg Glu Ala Ala
1 5 10

<210> 5

<211> 4

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> 人工序列之描述：合成肽

<400> 5

Leu Lys Gly Ile
1

<210> 6

<211> 5

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> 人工序列之描述：合成肽

<400> 6

Leu Lys Gly Ile Leu
1 5

<210> 7

<211> 5

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> 人工序列之描述：合成肽

<400> 7

Trp Leu Lys Gly Ile

1 5

<210> 8

<211> 10

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> 人工序列之描述：合成肽

<220>

<221> MOD_RES

<222> (3)..(3)

<223> 除Ser以外之胺基酸

<220>

<221> MOD_RES

<222> (5)..(5)

<223> 任何胺基酸

<220>

<221> MOD_RES

<222> (8)..(8)

<223> 任何胺基酸

<220>

<223> 對於取代及較佳實施例之詳細描述，參見如所申請之說明書

<400> 8

Glu Thr Xaa Lys Xaa Trp Leu Xaa Gly Ile

1 5 10

<210> 9

<211> 10

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> 人工序列之描述：合成肽

<400> 9

I862641

Ser Thr Ala Lys Ala Trp Leu Lys Gly Ile
1 5 10

<210> 10

<211> 10

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> 人工序列之描述：合成肽

<400> 10

Glu Thr Ala Lys Ala Trp Glu Lys Gly Ile
1 5 10

<210> 11

<211> 10

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> 人工序列之描述：合成肽

<400> 11

Glu Thr Ala Lys Ala Trp His Lys Gly Ile
1 5 10

<210> 12

<211> 10

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> 人工序列之描述：合成肽

<400> 12

Glu Thr Ala Lys Ala Trp Leu Lys Ser Ile
1 5 10

<210> 13

<211> 10

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> 人工序列之描述：合成肽

I862641

<400> 13

Glu Thr Ala Lys Ala Trp Leu Lys Gly Glu
1 5 10

<210> 14

<211> 10

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> 人工序列之描述：合成肽

<400> 14

Glu Thr Ala Lys Ala Trp Leu Lys Gly Ile
1 5 10

<210> 15

<211> 10

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> 人工序列之描述：合成肽

<400> 15

Trp Leu Lys Gly Ile Leu Arg Gly Ala Ala
1 5 10

<210> 16

<211> 10

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> 人工序列之描述：合成肽

<400> 16

Lys Thr Ala Lys Ala Trp Leu Lys Gly Ile
1 5 10

<210> 17

<211> 10

<212> PRT

<213> 人工序列

I862641

<220>

<223> 人工序列之描述：合成肽

<400> 17

Asn Thr Ala Lys Ala Trp Leu Lys Gly Ile
1 5 10

<210> 18

<211> 10

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> 人工序列之描述：合成肽

<400> 18

Pro Thr Ala Lys Ala Trp Leu Lys Gly Ile
1 5 10

<210> 19

<211> 10

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> 人工序列之描述：合成肽

<400> 19

Gln Thr Ala Lys Ala Trp Leu Lys Gly Ile
1 5 10

<210> 20

<211> 10

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> 人工序列之描述：合成肽

<400> 20

Glu Gln Ala Lys Ala Trp Leu Lys Gly Ile
1 5 10

<210> 21

<211> 10

<212> PRT

I862641

<213> 人工序列

<220>

<223> 人工序列之描述：合成肽

<400> 21

Trp Leu Lys Gly Ile Cys Arg Gly Ala Ala
1 5 10

<210> 22

<211> 10

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> 人工序列之描述：合成肽

<400> 22

Trp Leu Lys Gly Ile Leu Pro Gly Ala Ala
1 5 10

<210> 23

<211> 10

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> 人工序列之描述：合成肽

<400> 23

Trp Leu Lys Gly Ile Leu Gln Gly Ala Ala
1 5 10

<210> 24

<211> 10

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> 人工序列之描述：合成肽

<400> 24

Trp Leu Lys Gly Ile Leu Ser Gly Ala Ala
1 5 10

<210> 25

I862641

<211> 10
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> 人工序列之描述：合成肽

<400> 25
Trp Leu Lys Gly Ile Leu Val Gly Ala Ala
1 5 10

<210> 26
<211> 10
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> 人工序列之描述：合成肽

<400> 26
Trp Leu Lys Gly Ile Leu Arg Ala Ala Ala
1 5 10

<210> 27
<211> 10
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> 人工序列之描述：合成肽

<400> 27
Trp Leu Lys Gly Ile Leu Arg Gly His Ala
1 5 10

<210> 28
<211> 10
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> 人工序列之描述：合成肽

<400> 28
Trp Leu Lys Gly Ile Leu Arg Gly Ile Ala
1 5 10

<210> 29
<211> 10
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> 人工序列之描述：合成肽

<220>
<221> MOD_RES
<222> (3)..(3)
<223> 任何胺基酸

<220>
<221> MOD_RES
<222> (5)..(5)
<223> 任何胺基酸

<220>
<221> MOD_RES
<222> (8)..(8)
<223> 除Gly以外之胺基酸

<220>
<223> 對於取代及較佳實施例之詳細描述，參見如所申請之說明書

<400> 29
Glu Thr Xaa Lys Xaa Trp Leu Xaa Gly Ile
1 5 10

<210> 30
<211> 10
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> 人工序列之描述：合成肽

<220>
<221> MOD_RES
<222> (3)..(3)
<223> 任何胺基酸

<220>
<221> MOD_RES
<222> (5)..(5)

<223> 除Asn以外之胺基酸

<220>

<221> MOD_RES

<222> (8)..(8)

<223> 任何胺基酸

<220>

<223> 對於取代及較佳實施例之詳細描述，參見如所申請之說明書

<400> 30

Glu Thr Xaa Lys Xaa Trp Leu Xaa Gly Ile

1 5 10

<210> 31

<211> 10

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> 人工序列之描述：合成肽

<220>

<221> MOD_RES

<222> (3)..(3)

<223> 除Asn以外之胺基酸

<220>

<221> MOD_RES

<222> (4)..(4)

<223> 任何胺基酸

<220>

<221> MOD_RES

<222> (7)..(7)

<223> 任何胺基酸

<220>

<221> MOD_RES

<222> (9)..(9)

<223> 任何胺基酸

<220>

<223> 對於取代及較佳實施例之詳細描述，參見如所申請之說明書

<400> 31

Lys Leu Xaa Xaa Ile Leu Xaa Gly Xaa Ala

1 5 10

<210> 32

<211> 10

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> 人工序列之描述：合成肽

<220>

<221> MOD_RES

<222> (3)..(3)

<223> 任何胺基酸

<220>

<221> MOD_RES

<222> (4)..(4)

<223> 任何胺基酸

<220>

<221> MOD_RES

<222> (7)..(7)

<223> 任何胺基酸

<220>

<221> MOD_RES

<222> (9)..(9)

<223> 除Ser以外之胺基酸

<220>

<223> 對於取代及較佳實施例之詳細描述，參見如所申請之說明書

<400> 32

Lys Leu Xaa Xaa Ile Leu Xaa Gly Xaa Ala

1 5 10

<210> 33

<211> 10

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> 人工序列之描述：合成肽

<220>

<221> MOD_RES

<222> (3)..(3)
<223> 任何胺基酸

<220>
<221> MOD_RES
<222> (4)..(4)
<223> 任何胺基酸

<220>
<221> MOD_RES
<222> (7)..(7)
<223> 除Leu以外之胺基酸

<220>
<221> MOD_RES
<222> (9)..(9)
<223> 任何胺基酸

<220>
<223> 對於取代及較佳實施例之詳細描述，參見如所申請之說明書

<400> 33
Lys Leu Xaa Xaa Ile Leu Xaa Gly Xaa Ala
1 5 10

<210> 34
<211> 10
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> 人工序列之描述：合成肽

<220>
<221> MOD_RES
<222> (3)..(3)
<223> 任何胺基酸

<220>
<221> MOD_RES
<222> (4)..(4)
<223> 除Ser以外之胺基酸

<220>
<221> MOD_RES
<222> (7)..(7)
<223> 任何胺基酸

I862641

<220>

<221> MOD_RES

<222> (9)..(9)

<223> 任何胺基酸

<220>

<223> 對於取代及較佳實施例之詳細描述，參見如所申請之說明書

<400> 34

Lys Leu Xaa Xaa Ile Leu Xaa Gly Xaa Ala

1 5 10

【發明申請專利範圍】

【請求項1】

一種用於治療皮膚之組合物，其包含經分離、合成或重組多肽，該經分離、合成或重組多肽包含胺基酸序列WLKGI (SEQ ID NO: 7)或其類似物，其中該多肽中包含不超過100個胺基酸。

【請求項2】

如請求項1之組合物，其中該經分離、合成或重組多肽包含至少10個胺基酸、15個胺基酸或20個胺基酸。

【請求項3】

如請求項1之組合物，其進一步包含治療劑、營養製劑或化妝品賦形劑。

【請求項4】

如請求項3之組合物，其中該賦形劑經組態以供局部施用。

【請求項5】

如請求項1之組合物，其中該組合物係乳膏、經皮貼片、局部貼片、軟膏、油狀物、凝膠、液體、散劑(powder)、洗劑(lotion)、精華液、乳液(emulsion)、保濕劑、泡沫、面罩、摩斯(mousse)、氣霧、噴霧、清潔劑(cleanser)、化妝水(toner)或洗髮劑。

【請求項6】

如請求項1之組合物，其中該組合物包含至少一種選自由以下組成之群的皮膚保濕劑(hydrating agent)：丙三醇、鯊烯、山梨糖醇、玻尿酸、玻尿酸衍生物、玻尿酸鈉、玻尿酸鈉交聯聚合物、菸鹼醯胺、醣蛋白、吡咯啉酮、羧酸(PCA)、離胺酸HCl、尿囊素及藻類提取物。

【請求項7】

如請求項1之組合物，其中該組合物包含至少一種選自由以下組成之群的潤膚劑(emollient)：植物油、礦物油、牛油樹油脂、可可脂、石臘油、脂肪酸、三酸甘油酯、苯甲酸酯、肉豆蔻酸酯、棕櫚酸酯、硬脂酸酯、醯脂、磷脂、鯊烯、丙三醇、腦醯胺及藻類提取物。

【請求項8】

如請求項1之組合物，其中該組合物包含至少一種選自由以下組成之群的維生素：維生素A、維生素D、維生素E、維生素F、維生素K、維生素B1 (硫胺)、維生素B2 (核黃素)、維生素B3 (菸鹼酸)、維生素B5 (泛酸)、維生素B7 (生物素)、維生素B6、維生素B12 (氰鈷胺素)、維生素B9、葉酸、菸鹼醯胺或其衍生物。

【請求項9】

如請求項1之組合物，其中該組合物包含約500 nM至約500 μ M之有效量的該經分離、合成或重組多肽。

【請求項10】

如請求項1之組合物，其中該組合物包含約0.001%至約5% (w/w)之有效量的該經分離、合成或重組多肽。

【請求項11】

如請求項1之組合物，其中與使用該組合物之前相比，在皮膚上使用該組合物之後，該組合物改善使用者之皮膚的皮膚含濕量、經皮水分流失 (TEWL)、真皮厚度及回聲強度(echogenicity)、皮內分析、皮膚黏彈特性或皮膚表面輪廓(profile)中之至少一者。

【請求項12】

如請求項1之組合物，其中與使用該組合物之前相比，在皮膚上使用該組合物之後，該組合物減少使用者之皮膚的細紋/皺紋外觀、膚色外觀(均勻度)、毛孔外觀、質地/光滑度外觀、堅實度(視覺)、彈性(觸覺)、表皮屏障、皮膚粗糙度、皮膚色素過多或整體外觀。

【請求項13】

如請求項1之組合物，其中用該組合物治療皮膚減小或治療衰老對該皮膚之影響。

【請求項14】

如請求項1之組合物，其中用該組合物治療皮膚減少細胞老化對皮膚的影響。

【請求項15】

如請求項13之組合物，其中衰老之影響係藉由以下中之至少一者來評定：老化相關 β -半乳糖活性水準、ATR X 病灶/細胞之比率、p16表現、IL-8表現、Ki-67表現、玻尿酸合成酶2表現、基質金屬蛋白酶1 (MMP1)表現、長壽蛋白6 (SIRT6)表現、BLM表現或核酸外切酶1 (EXO1)表現。

【請求項16】

一種經分離、合成或重組多肽，其包含胺基酸序列 $X_1X_2X_3X_4X_5X_6X_7X_8X_9X_{10}$ 或其類似物，其中：

(a) 該胺基酸序列與第一序列SEQ ID NO: 1具有至少85%、90%或95%之一致性，其中 X_1 為E， X_2 為T， X_4 為K， X_6 為W， X_7 為L， X_8 為K， X_9 為G，且 X_{10} 為I；且

(i) X_3 不為S (SEQ ID NO: 8)；或

(ii) 若 X_5 為任何胺基酸，則 X_8 不為G (SEQ ID NO: 29)；或

(iii) 若 X_8 為任何胺基酸，則 X_5 不為N (SEQ ID NO: 30)；或

(iv) (i)、(ii)或(iii)中之任一者，該胺基酸序列視情況具有1、2、3或4個保守胺基酸取代；或

(b) 該胺基酸序列與第二序列SEQ ID NO: 2具有至少85%、90%或95%之一致性，其中 X_1 為A， X_2 為T， X_3 為A， X_4 為K， X_5 為A， X_6 為W， X_7 為L， X_8 為K， X_9 為G，且 X_{10} 為I，該胺基酸序列視情況具有1、2、3或4個保守胺基酸取代；或

(c) 該胺基酸序列與第四序列SEQ ID NO: 4具有至少85%、90%或95%之一致性，其中 X_1 為W， X_2 為L， X_3 為K， X_4 為G， X_5 為I， X_6 為L， X_7 為R， X_8 為E， X_9 為A，且 X_{10} 為A，該胺基酸序列視情況具有1、2、3或4個保守胺基酸取代。

【請求項17】

如請求項16之多肽，其中該胺基酸序列包含WLKGI (SEQ ID NO: 7)。

【請求項18】

如請求項16或17之多肽，其中該重組多肽包含至少10個胺基酸、15個胺基酸或20個胺基酸且不超過100個胺基酸。

【請求項19】

一種用於治療皮膚之組合物，其包含至少一種如請求項16至18中任一項之經分離、合成或重組多肽及治療劑、營養製劑或化妝品賦形劑。

【請求項20】

如請求項19之組合物，其中該賦形劑經組態以供局部施用。

【請求項21】

如請求項19之組合物，其中該組合物係乳膏、軟膏、凝膠、液體、油狀物、散劑(powder)、洗劑(lotion)、精華液、乳液(emulsion)、保濕劑、泡沫、面罩、摩斯(mousse)、氣霧、噴霧、清潔劑(cleanser)、化妝水(toner)、局部貼片或洗髮劑。

【請求項22】

如請求項19之組合物，其中該組合物包含約500 nM至約500 μ M之有效量的該經分離、合成或重組多肽。

【請求項23】

如請求項19之組合物，其中該組合物包含約0.001%至約5% (w/w)之有效量的該經分離、合成或重組多肽。

【請求項24】

如請求項19之組合物，其中用該組合物治療皮膚減小或治療衰老對該皮膚之影響。

【請求項25】

如請求項19之組合物，其中用該組合物治療皮膚減少細胞老化對皮膚的影響。

【請求項26】

如請求項24之組合物，其中衰老之影響係藉由以下中之至少一者來評定：老化相關 β -半乳糖活性水準、ATR_X病灶/細胞之比率、p16表現、IL-8表現、Ki-67表現、玻尿酸合成酶2表現、基質金屬蛋白酶1 (MMP1)表現、長壽蛋白6 (SIRT6)表現、BLM表現或核酸外切酶1 (EXO1)表現。

【請求項27】

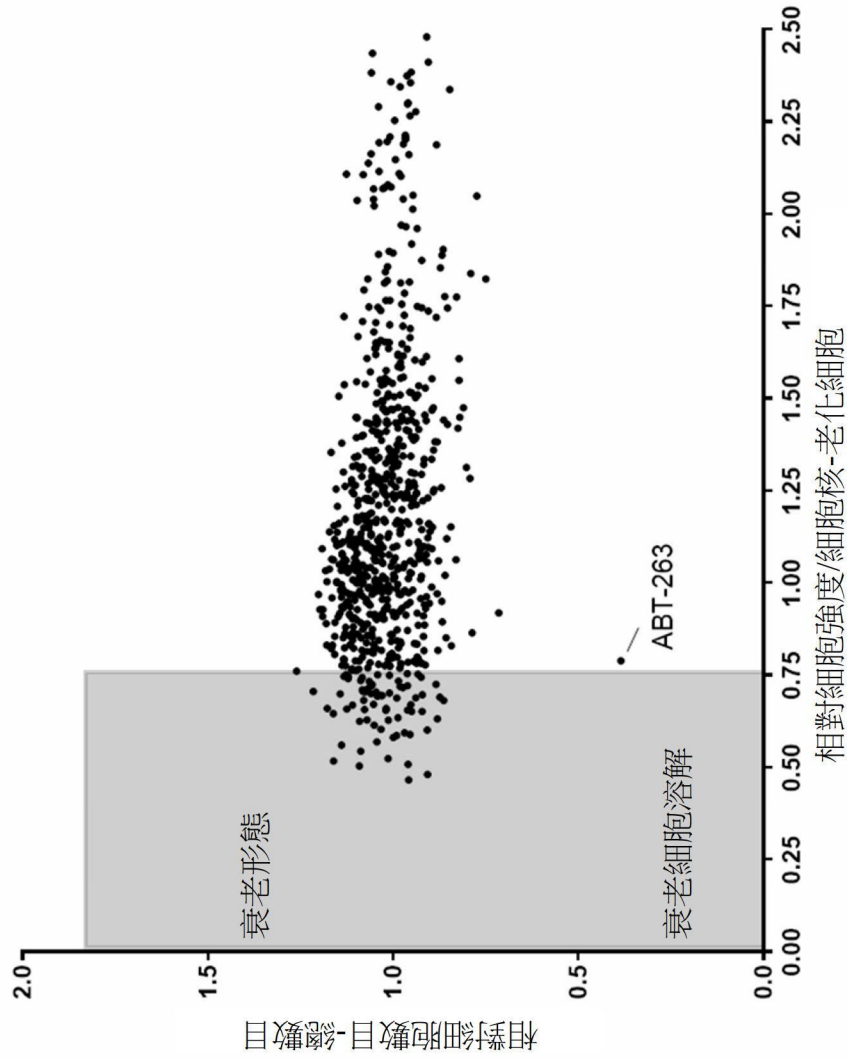
如請求項1-15及19-26中任一項之組合物，其中該組合物包含UV阻

斷劑。

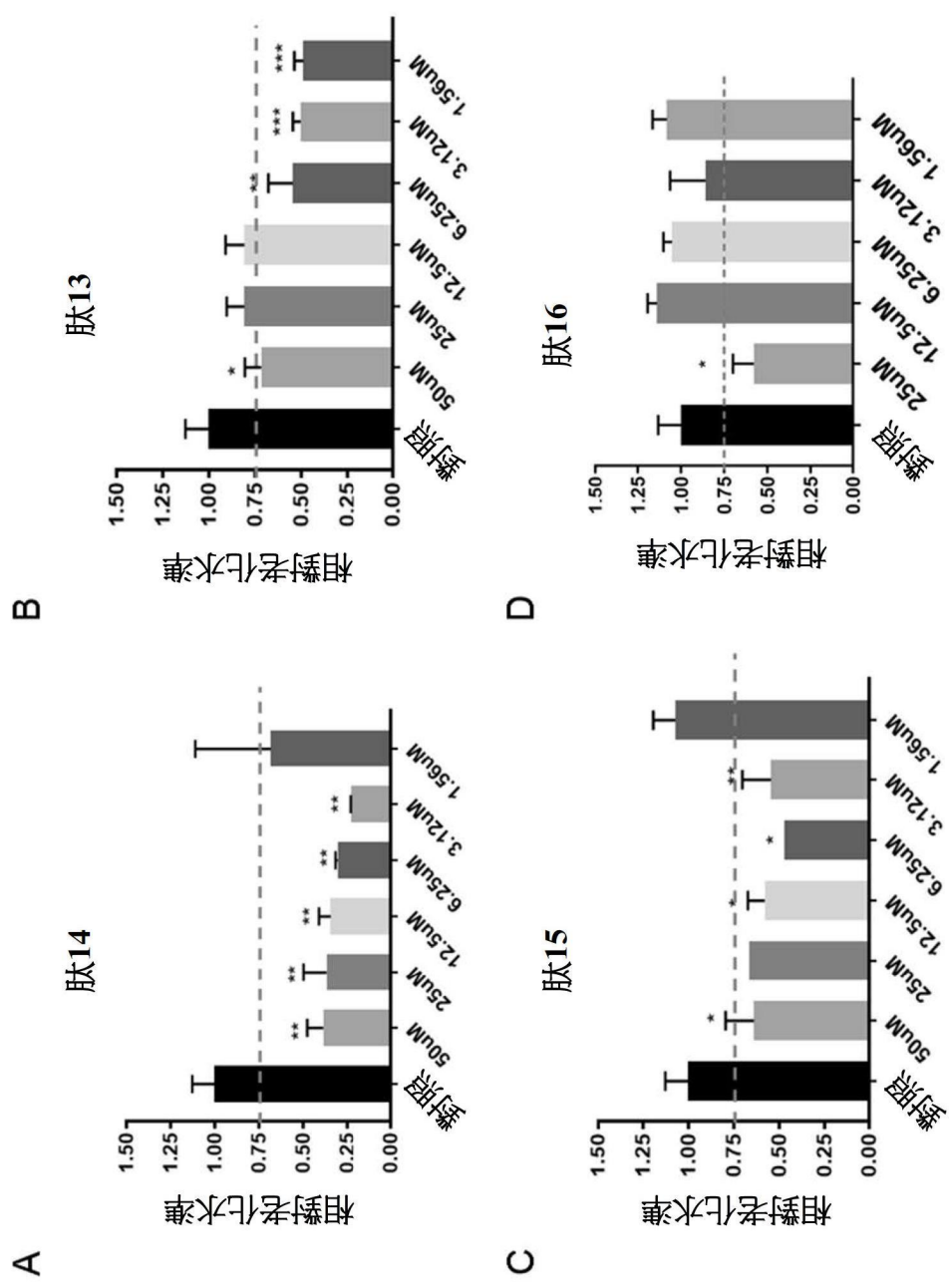
【請求項28】

如請求項27之組合物，其中該UV阻斷劑包含下列之一或多者：胺基苯甲酸、阿伏苯宗(avobenzene)、西諾沙酯(cinoxate)、二羥苯酮、胡莫柳酯(homosalate)、美拉達美特(meradimate)、奧克立林(octocrylene)、奧西諾酯(octinoxate)、奧替柳酯(octisalate)、氧苯酮(oxybenzone)、帕地馬酯O (padimate O)、英舒拉唑(ensulizole)、磺異苯酮、二氧化鈦、三乙醇胺水楊酸酯及氧化鋅。

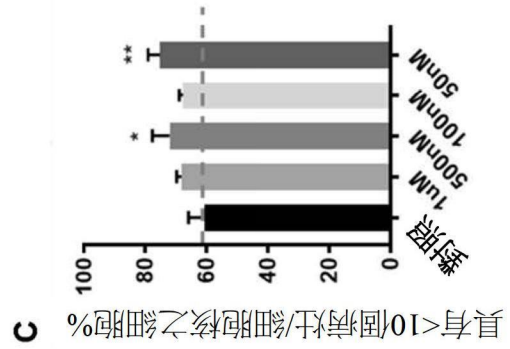
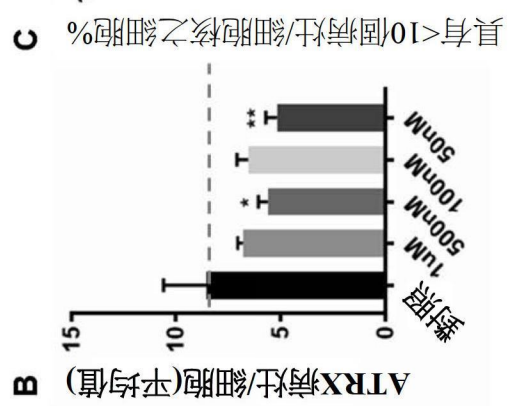
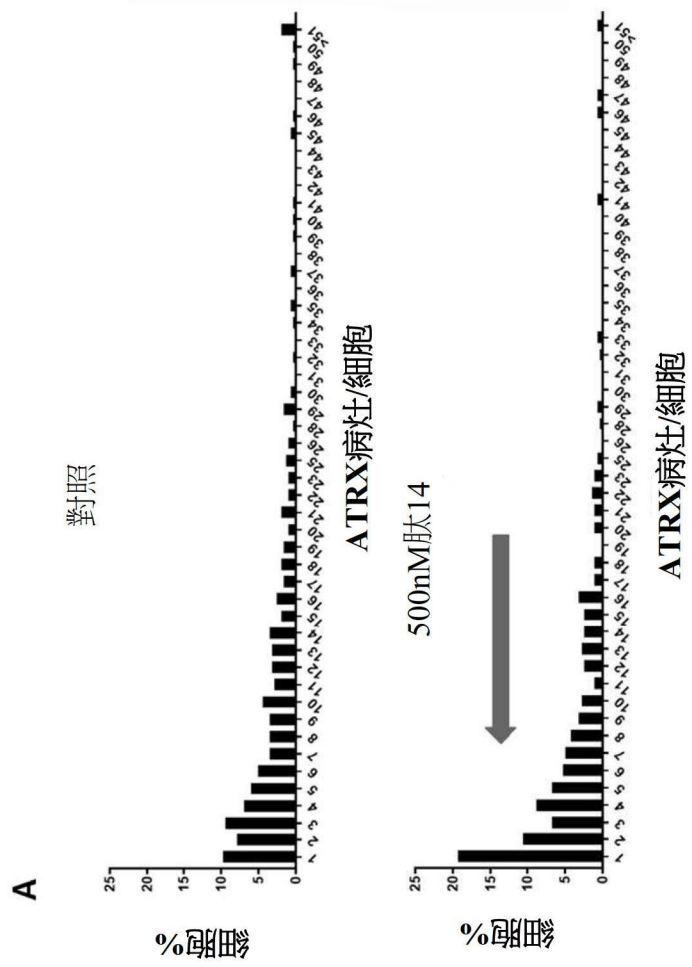
【發明圖式】



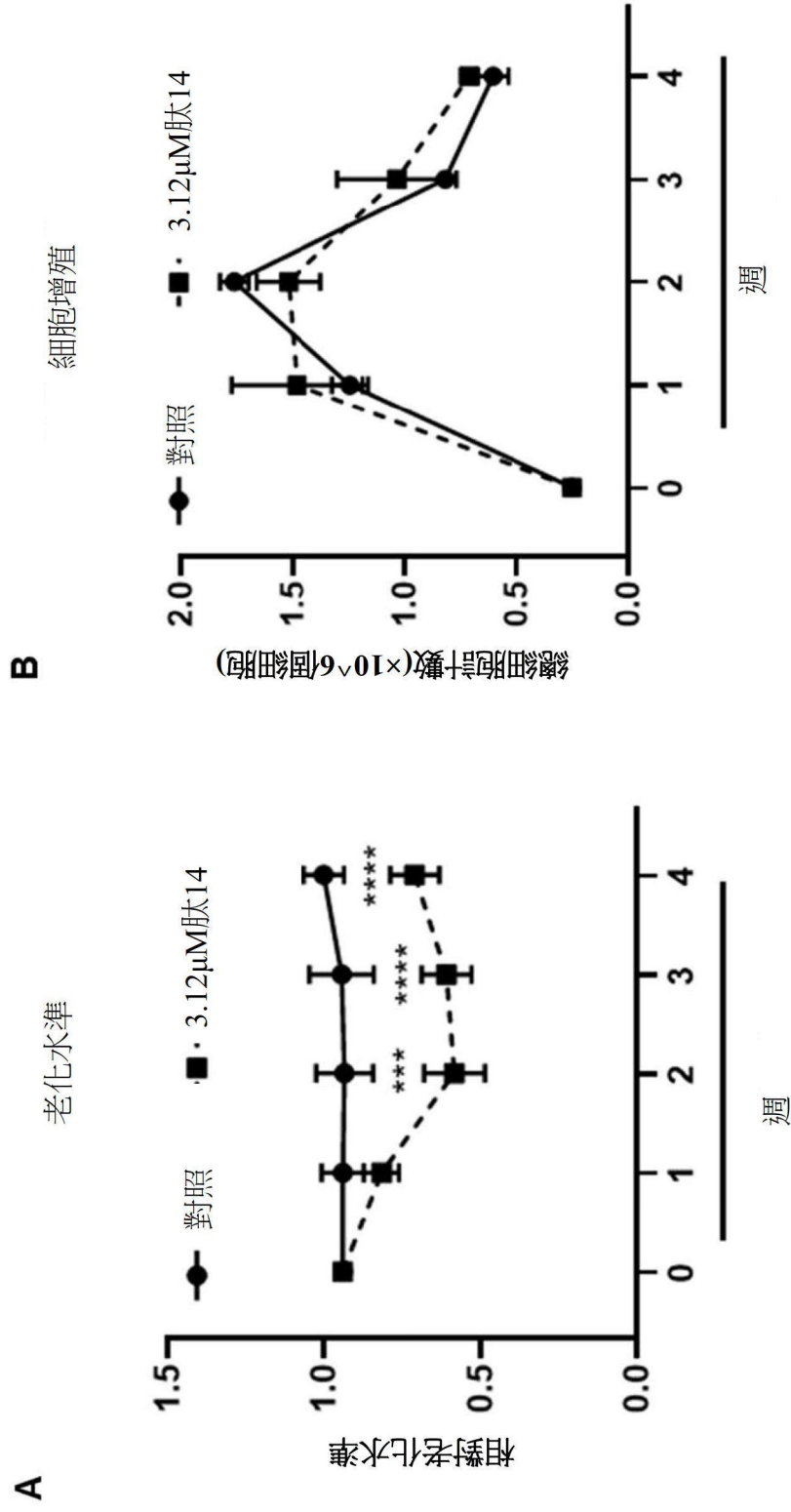
【圖1】



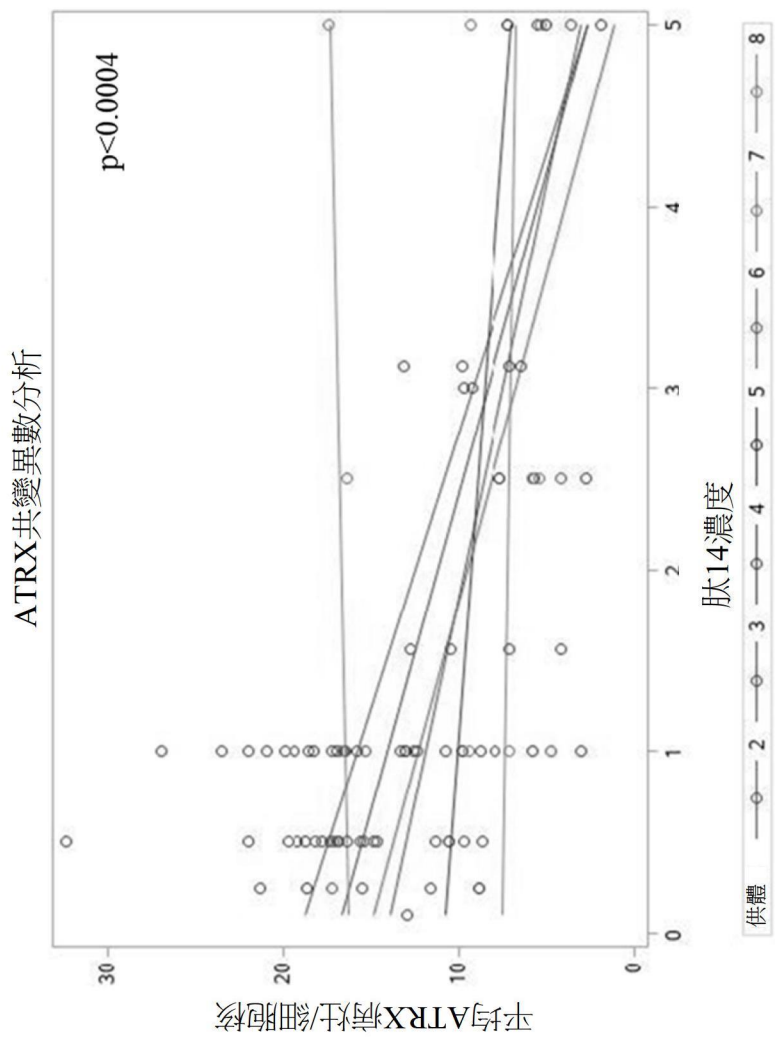
【圖2】



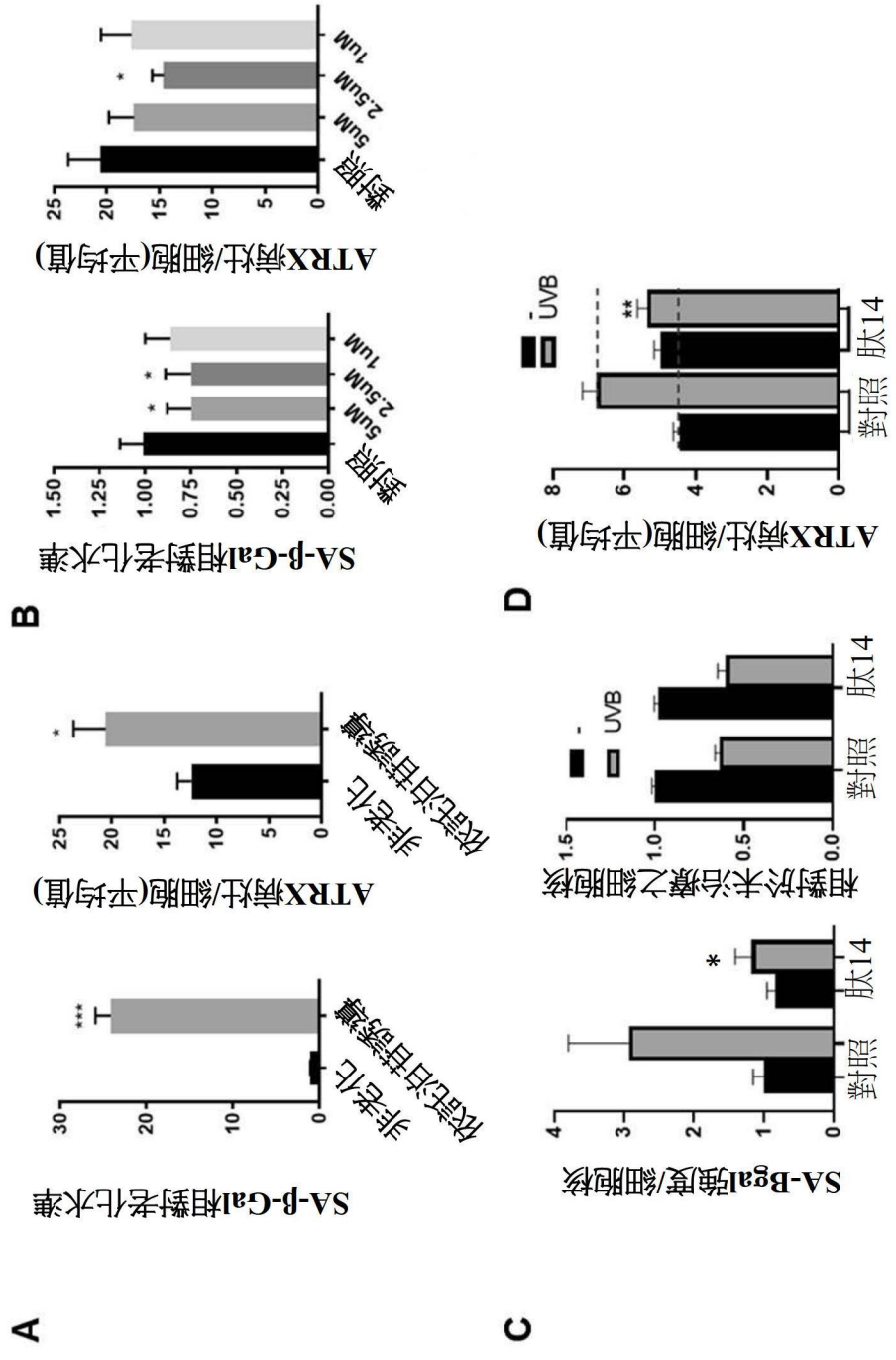
【圖3】



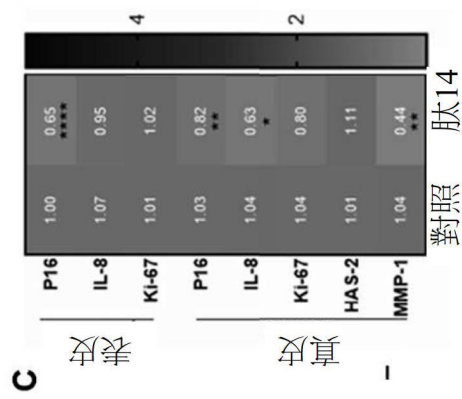
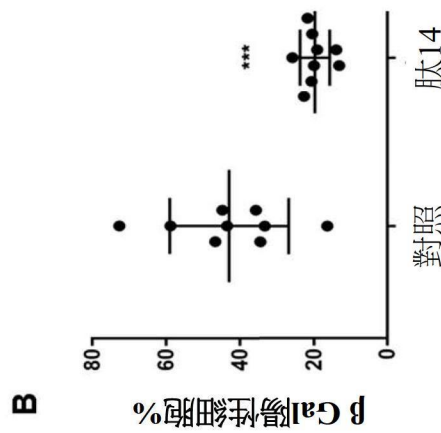
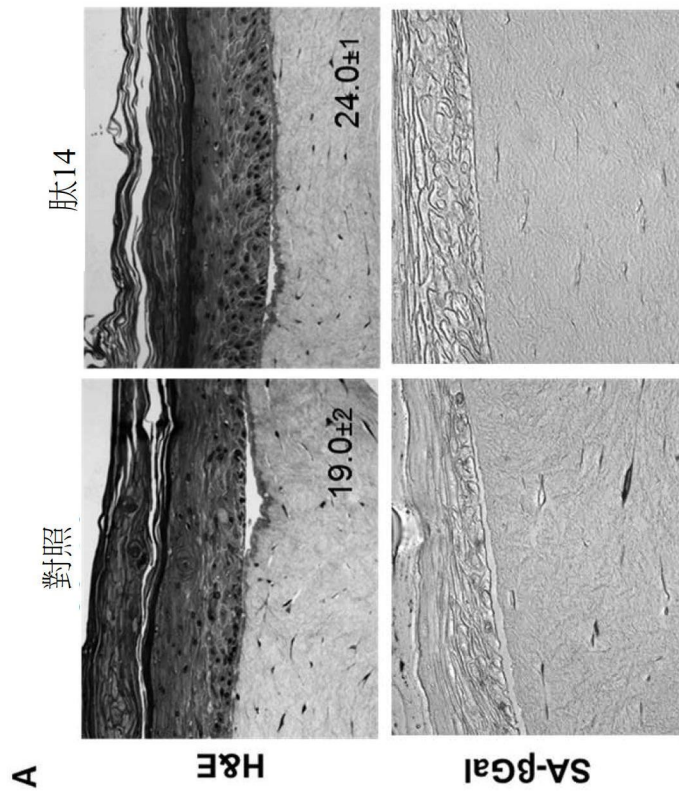
【圖4】



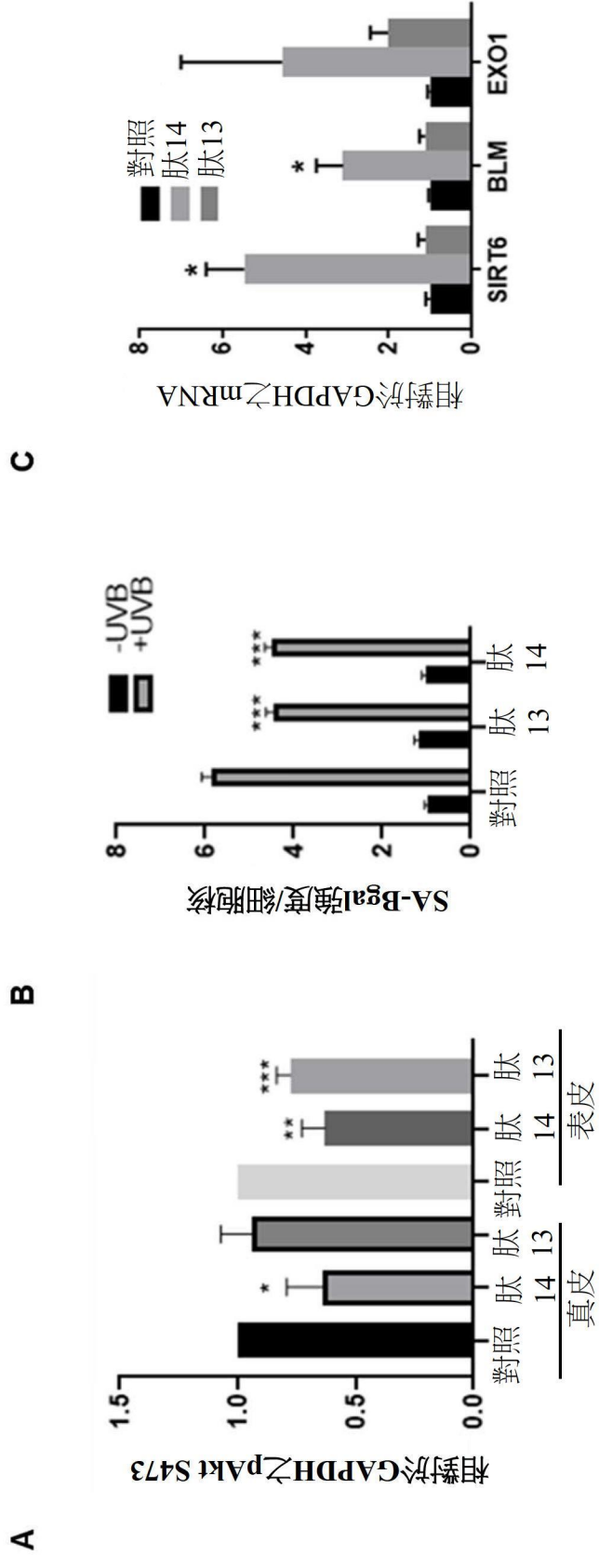
【圖5】



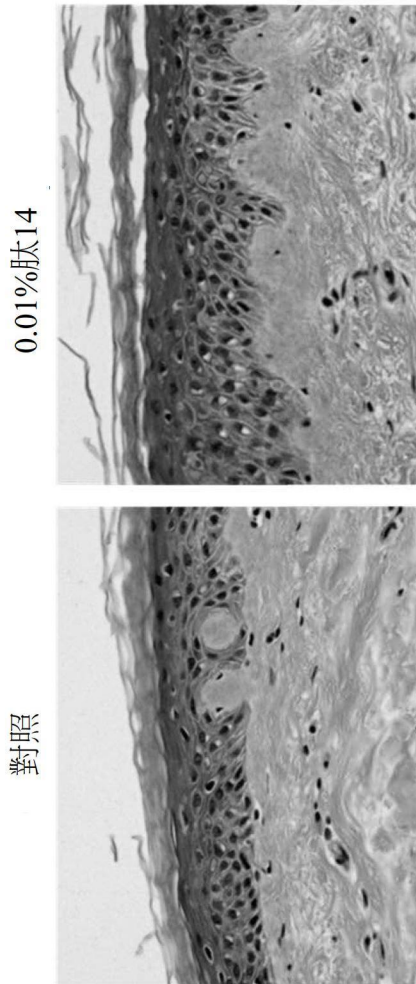
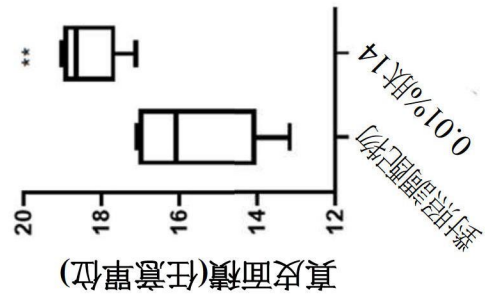
【圖6】



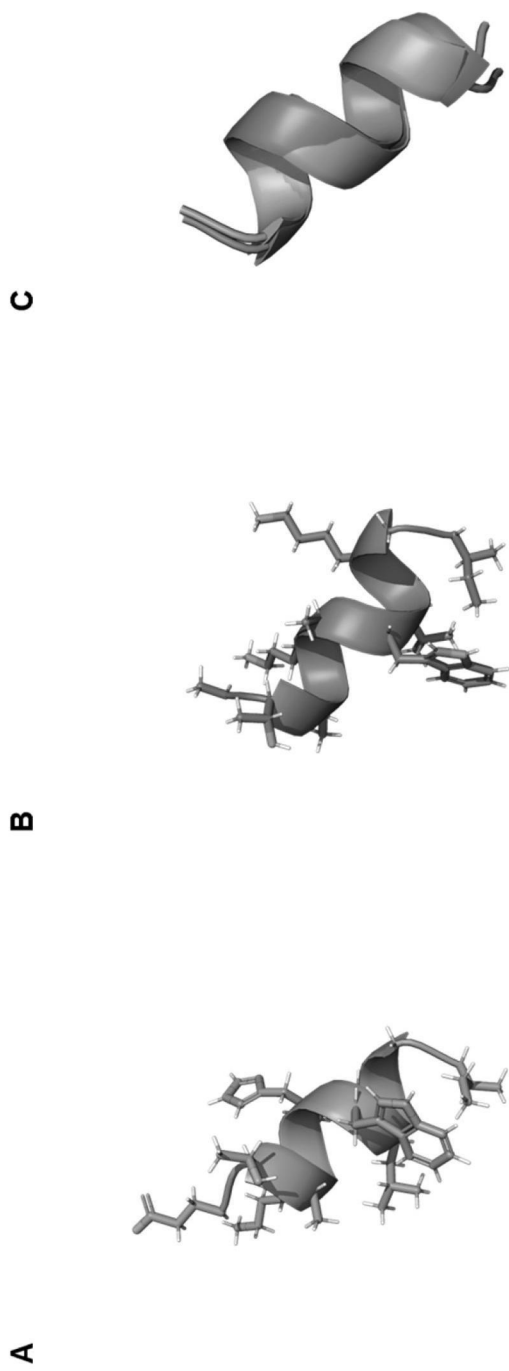
【圖7】



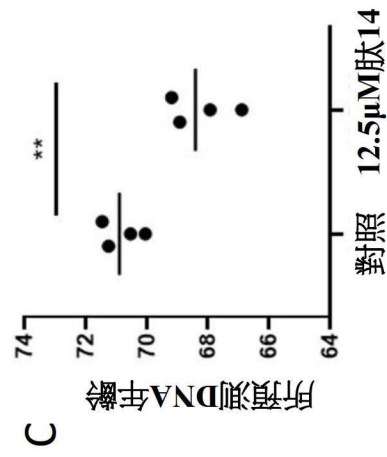
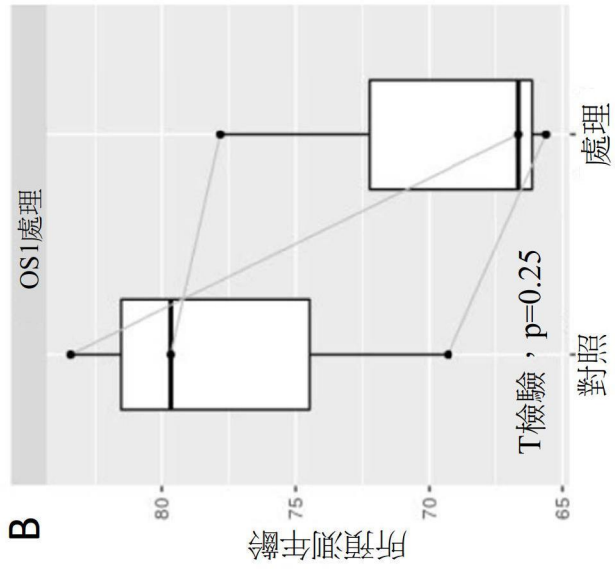
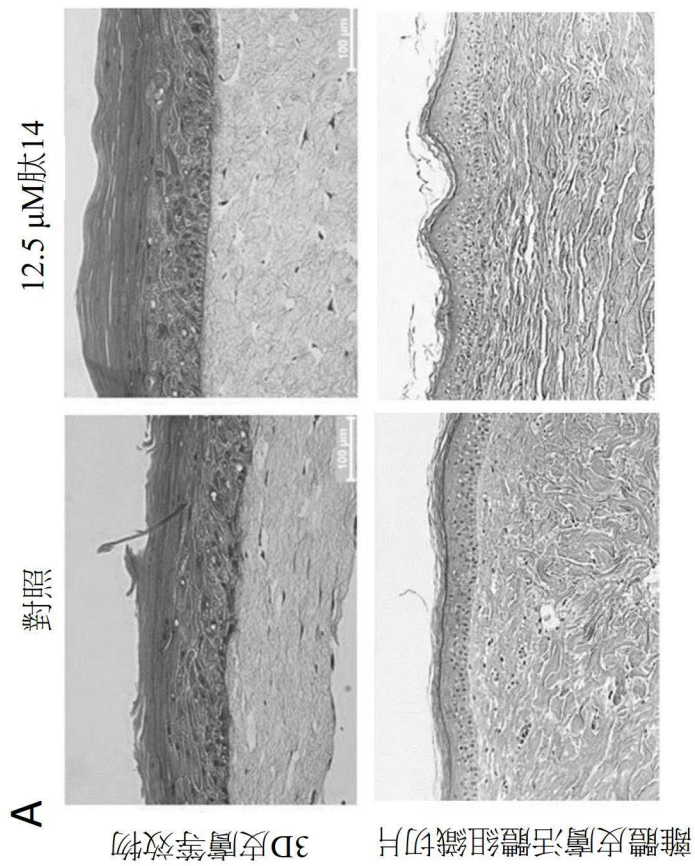
【圖8】



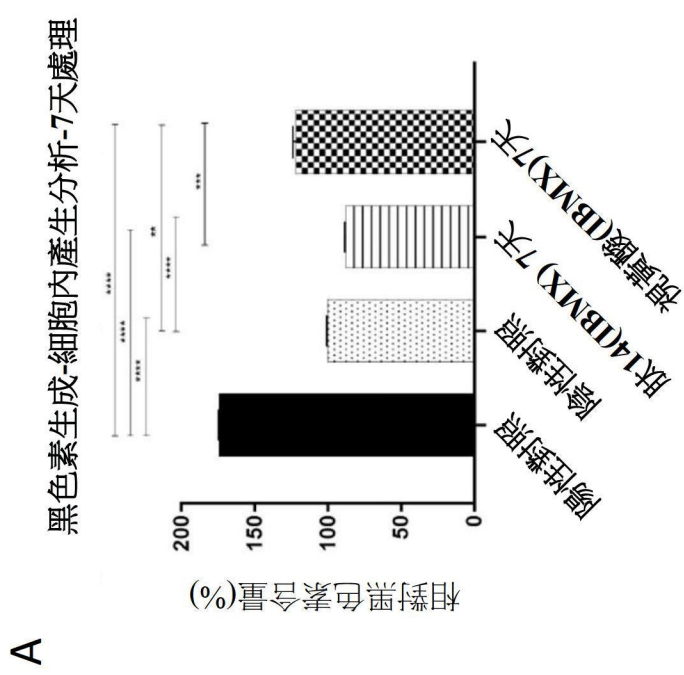
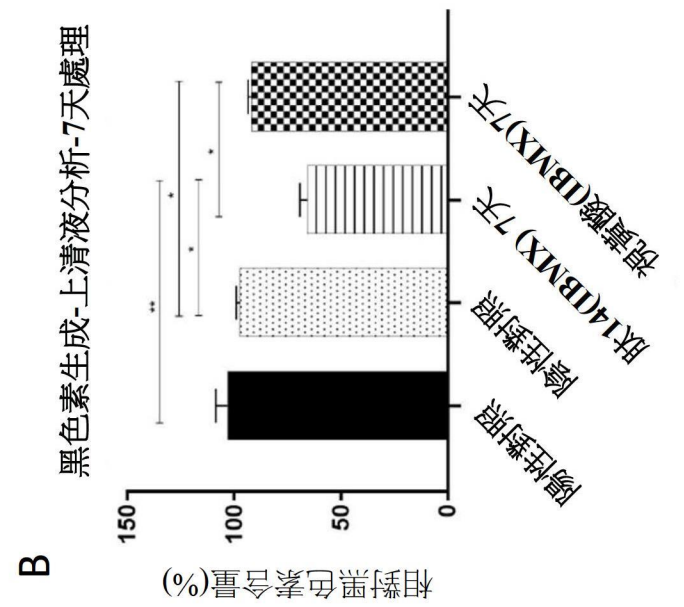
【圖9】



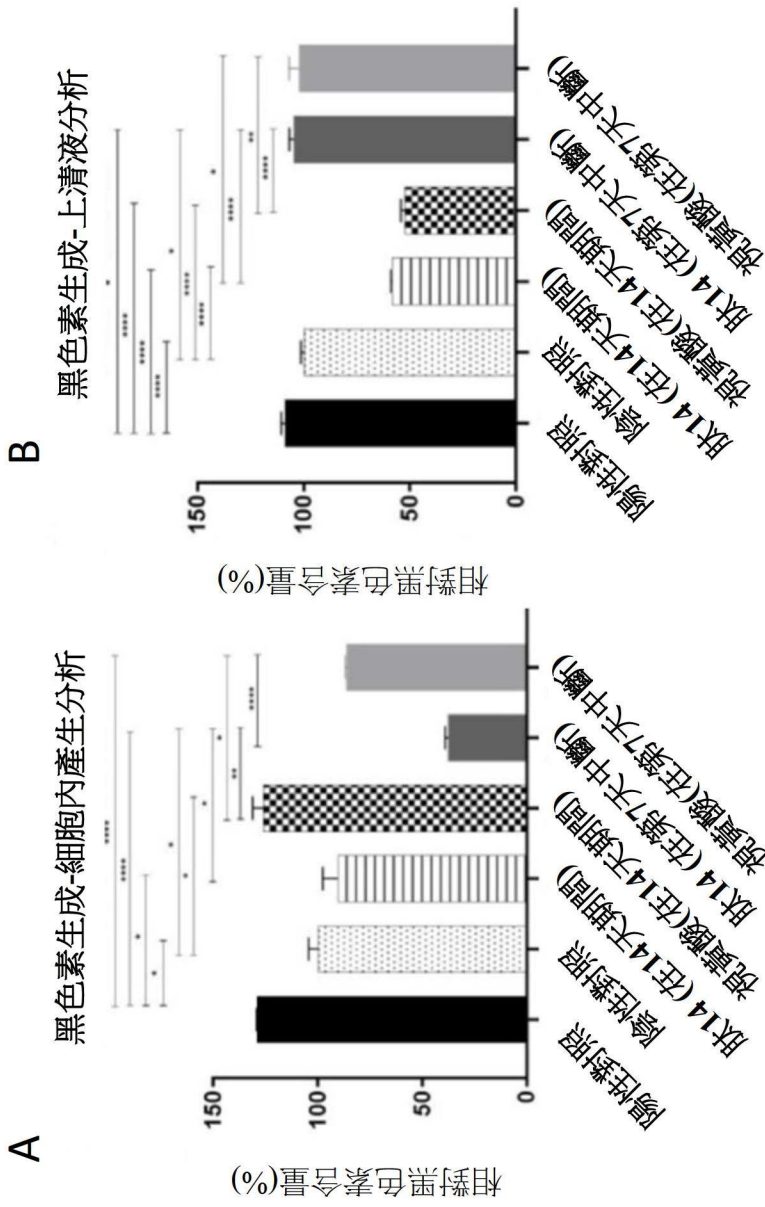
【圖10】



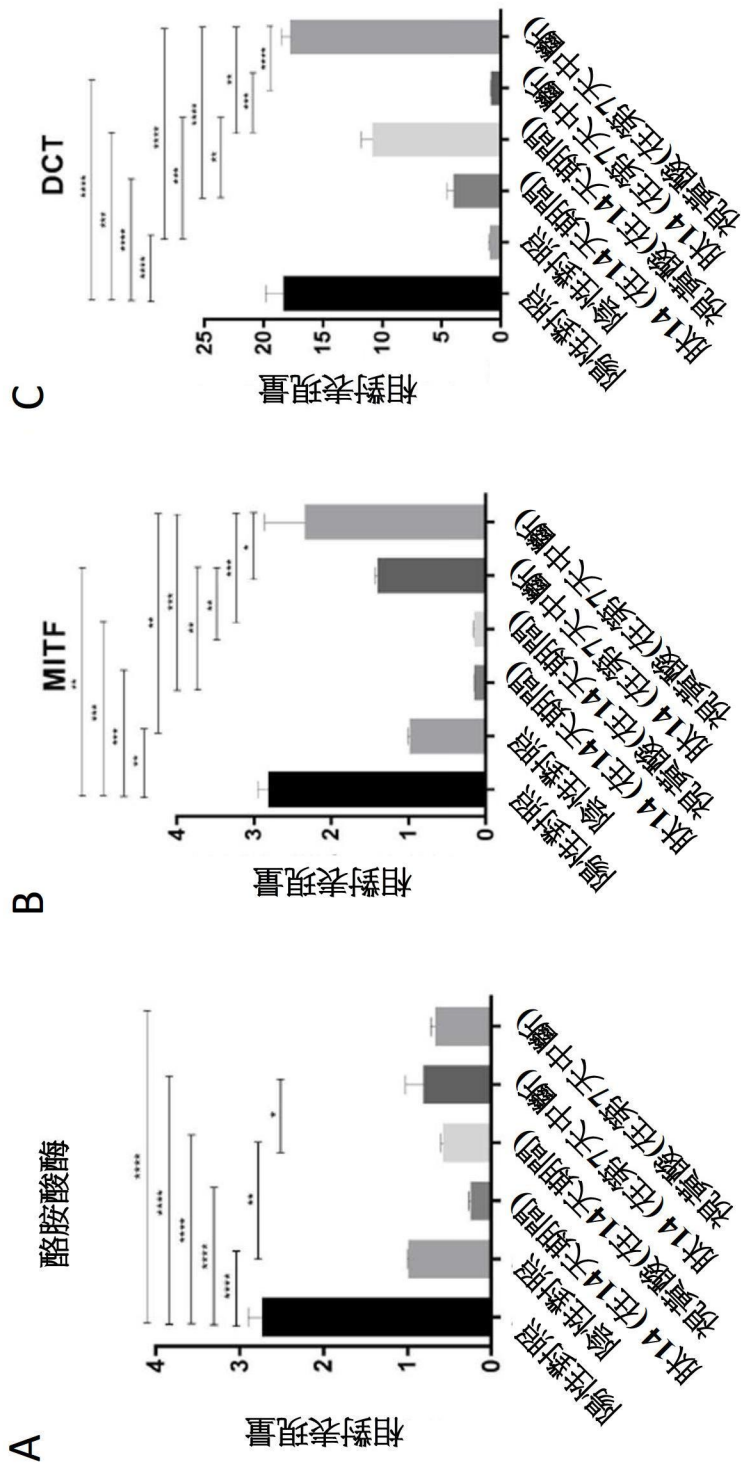
【圖11】



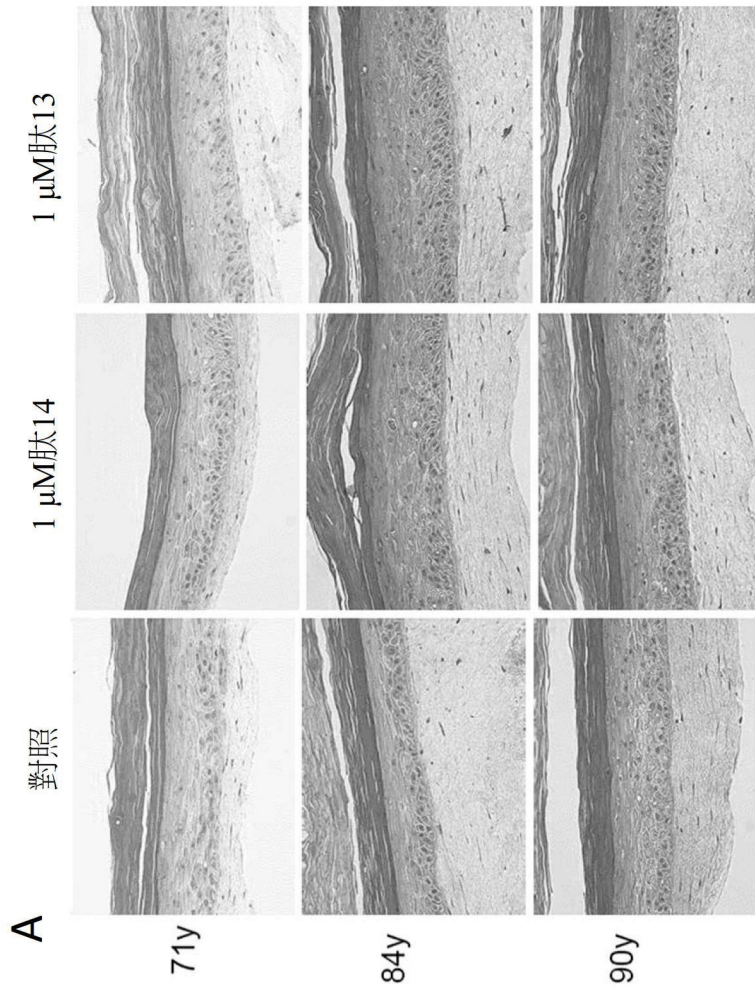
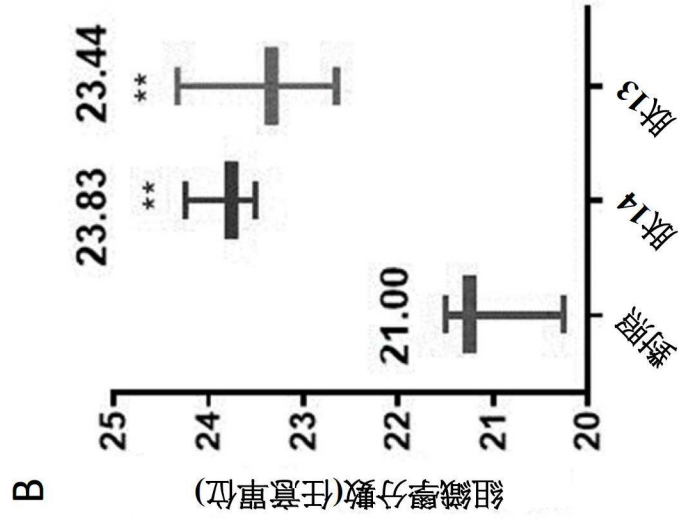
【圖12】



【圖13】



【圖14】

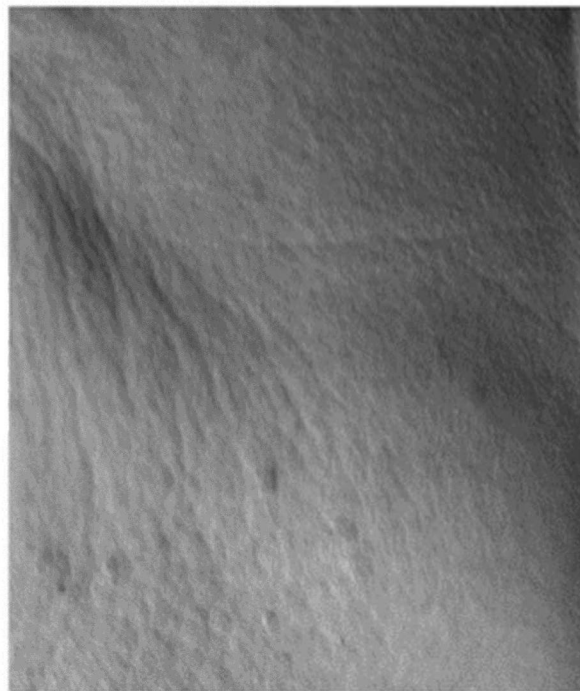


【圖15】

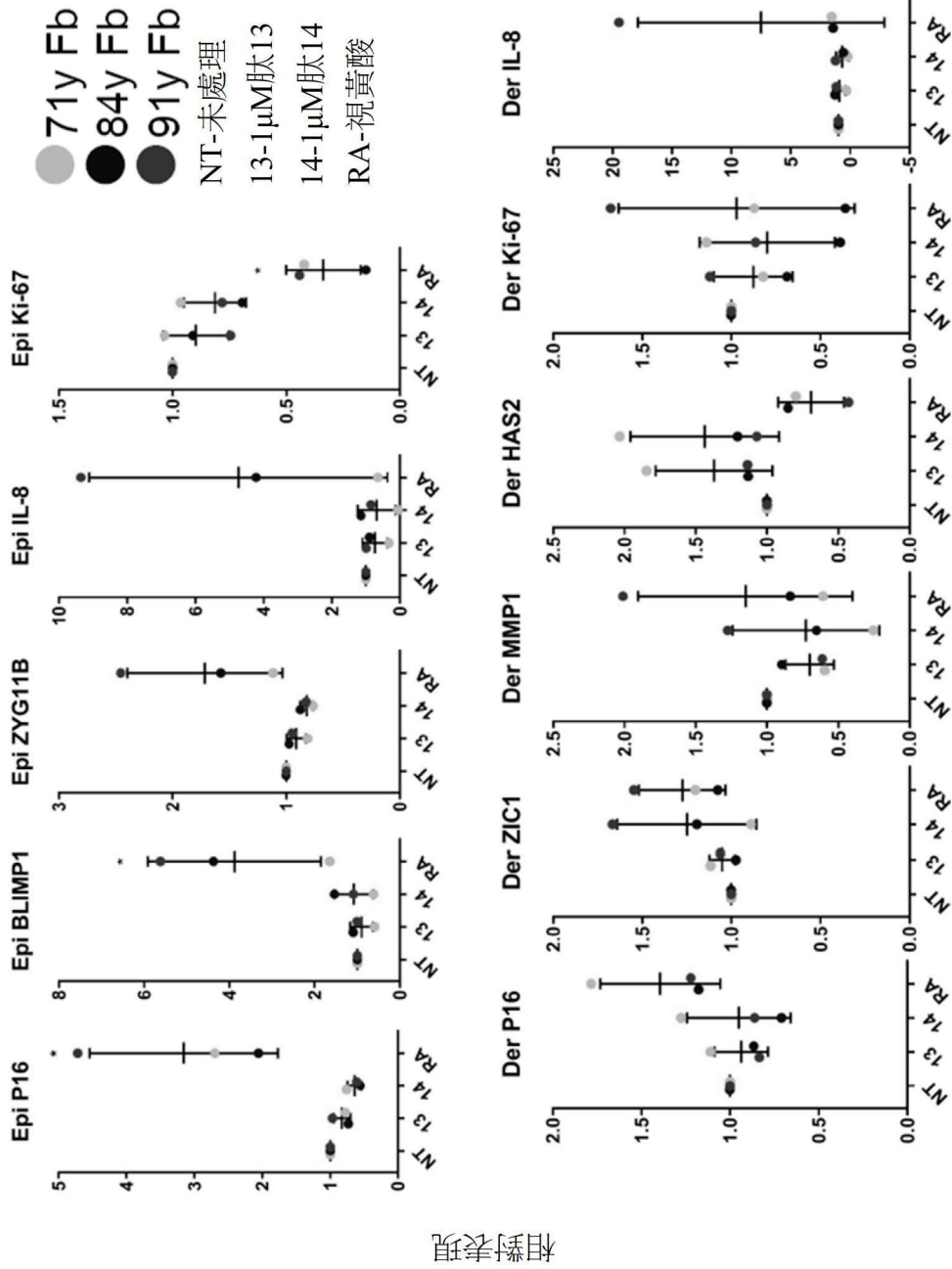
12週



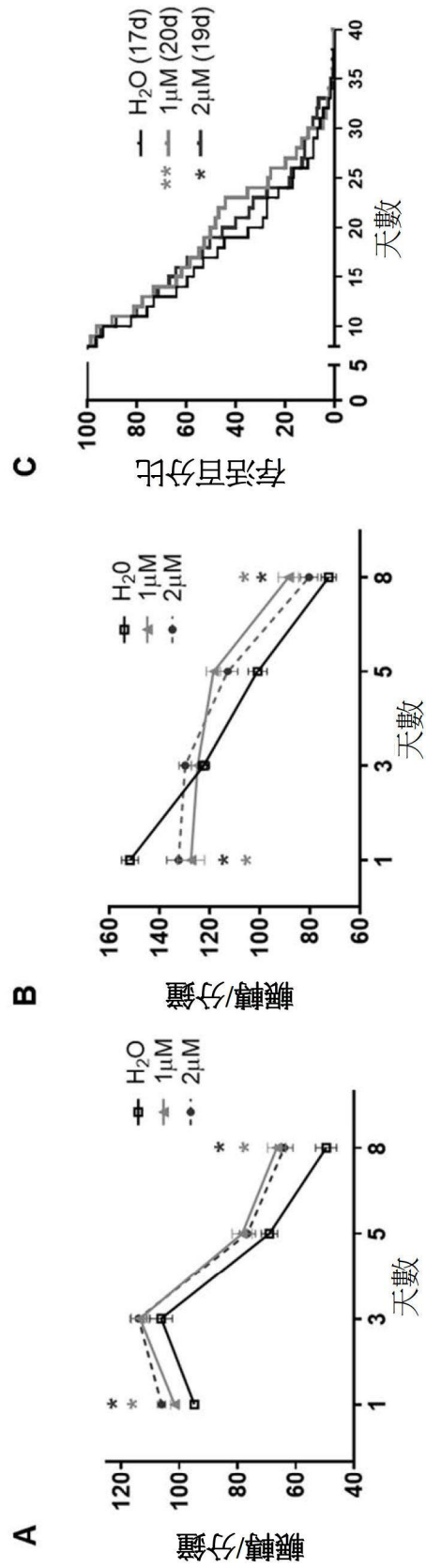
基線



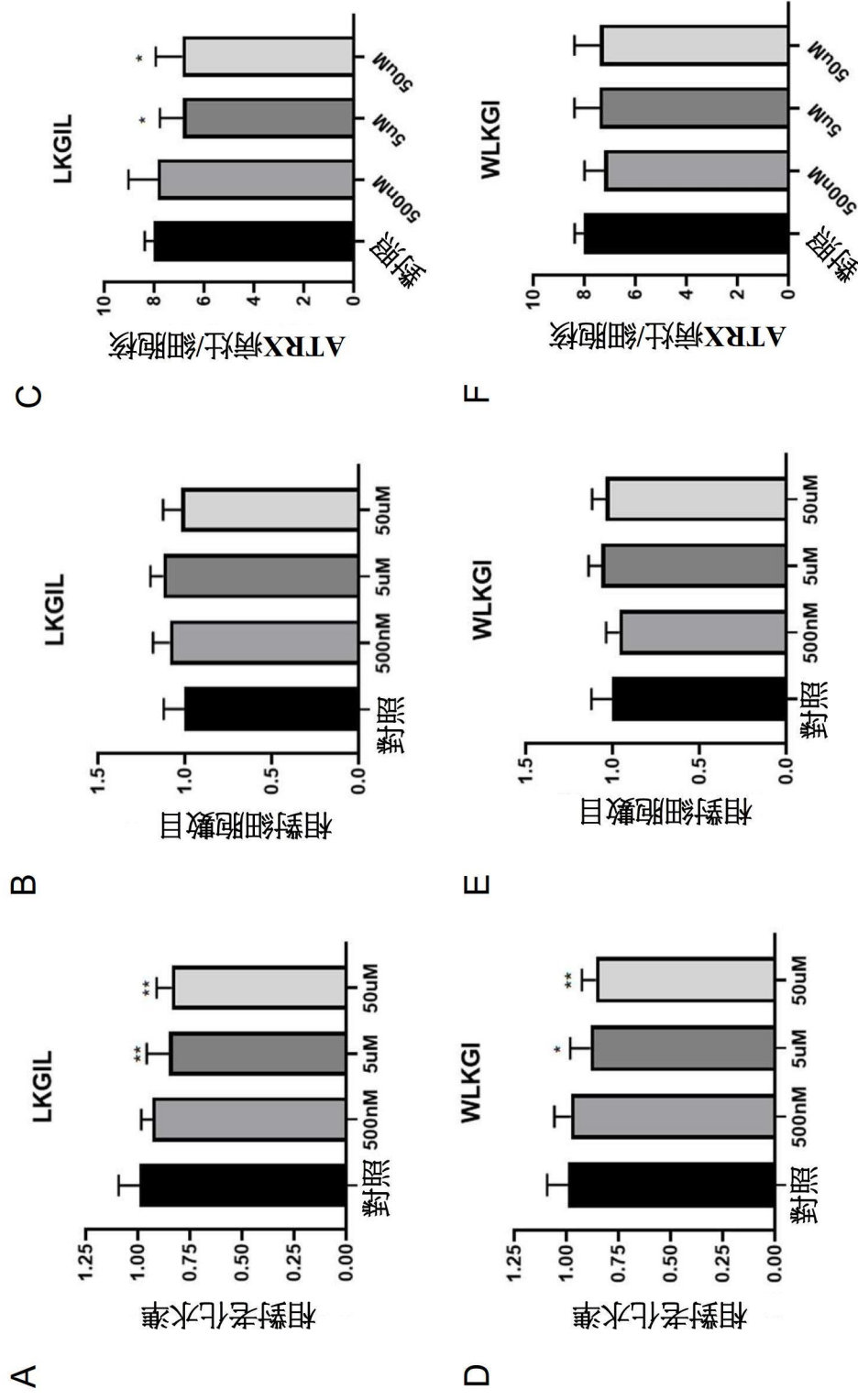
【圖16】



【圖17】



【圖18】



【圖19】