



(12) 发明专利申请

(10) 申请公布号 CN 102416226 A

(43) 申请公布日 2012. 04. 18

(21) 申请号 201110171712. 6

A61K 8/73(2006. 01)

(22) 申请日 2005. 10. 11

A61P 17/00(2006. 01)

(30) 优先权数据

A61Q 19/00(2006. 01)

0422525. 6 2004. 10. 11 GB

(62) 分案原申请数据

200580042366. 4 2005. 10. 11

(71) 申请人 索诺维亚有限公司

地址 英国赫特福德郡

(72) 发明人 P·吕布克

(74) 专利代理机构 中国专利代理(香港)有限公

司 72001

代理人 吴娟 刘健

(51) Int. Cl.

A61N 7/00(2006. 01)

A61K 9/00(2006. 01)

A61K 45/00(2006. 01)

A61K 31/728(2006. 01)

A61K 38/05(2006. 01)

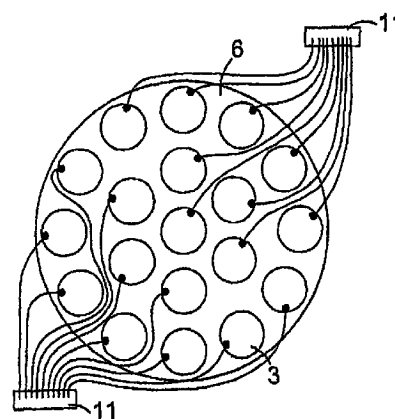
权利要求书 2 页 说明书 26 页 附图 6 页

(54) 发明名称

用于治疗皮肤病学状况的装置

(57) 摘要

本发明涉及包括转换器柔性阵列的超声输送装置和用于皮肤治疗尤其是美容皮肤状况治疗的方法和局部组合物, 以及改善日光损伤和 / 或老化皮肤的外观; 本发明还涉及这种装置和组合物在治疗皮肤方法中的用途, 该方法可结合超声的施加。组合物可包括一种或多种抗糖化剂、一种或多种抗氧化剂、皮肤病学上可接受的赋形剂和任选地一种或多种能诱导分子伴侣表达的物质。



1. 一种皮肤处理方法,其包括施加包含一种组合物的凝胶体垫、凝胶体筒、或自由流动凝胶到皮肤,所述组合物包括一种或多种抗糖化剂、一种或多种抗氧化剂、一种或多种透明质酸糖胺多糖和皮肤病学上可接受的赋形剂,所述方法还包括直接或间接施加超声到已施加所述凝胶体垫、凝胶体筒、或自由流动凝胶的皮肤区域,或作为对将要施加所述凝胶体垫、凝胶体筒、或自由流动凝胶的皮肤区域的预处理。

2. 一种皮肤处理方法,其包括施加包含一种组合物的凝胶体垫、凝胶体筒、或自由流动凝胶到皮肤,所述组合物包括一种或多种能诱导分子伴侣表达的物质、一种或多种透明质酸糖胺多糖和皮肤病学上可接受的赋形剂,所述方法还包括直接或间接施加超声到已施加所述凝胶体垫、凝胶体筒、或自由流动凝胶的皮肤区域,或作为对将要施加所述凝胶体垫、凝胶体筒、或自由流动凝胶的皮肤区域的预处理。

3. 根据权利要求1或2的方法,其中所述方法为美容治疗方法。

4. 根据权利要求1或2的方法,其中所述方法为医学治疗方法。

5. 根据权利要求1-4中任一项的方法,其,中同时施加低和高频率超声。

6. 根据权利要求1-4中任一项的方法,其中分开施加低和高频率超声。

7. 根据权利要求1-6中任一项的方法,其中使用以间隔的构型在柔性材料中排列成阵列的多个超声转换器元件施加超声,优选以补片的形式。

8. 根据上述权利要求中任一项的方法,其中所述组合物包括低和高分子量透明质酸糖胺多糖。

9. 根据上述权利要求中任一项的方法,其中所述组合物包括分子量小于 1×10^6 Da的低分子量透明质酸糖胺多糖。

10. 根据上述权利要求中任一项的方法,其中所述组合物包括分子量大于 1×10^6 Da的高分子量透明质酸糖胺多糖。

11. 根据权利要求1的方法,其中所述抗糖化剂为丙氨酰-L-组氨酸(L-肌肽)、N-乙酰基半胱氨酸、氨基胍、d-青霉胺、乙酰水杨酸(阿斯匹林)、对乙酰氨基酚、消炎痛和布洛芬和/或它们的功能衍生物或前药中的一种或多种。

12. 根据权利要求1的方法,其中所述一种或多种功能衍生物或前药为 β -丙氨酰组胺(carcinine)、N-乙酰基- β -丙氨酰组胺(N-乙酰基carcinine)、L-脯氨酰组胺和/或n-乙酰基-L-肌肽。

13. 根据权利要求1的方法,其中所述一种或多种抗氧化剂选自:精氨酸、抗坏血酸、抗坏血酸的前药或衍生物、棕榈酸抗坏血酸酯、磷酸抗坏血酸酯镁盐、磷酸抗坏血酸酯三钠盐、鹅肌肽、肌肽、opidine、高肌肽和/或乙酰基鹅肌肽。

14. 凝胶体垫、凝胶体筒、或自由流动凝胶在制备包括一种装置和所述凝胶体垫、凝胶体筒、或自由流动凝胶的试剂盒中的应用,

其中所述凝胶体垫、凝胶体筒、或自由流动凝胶包括一种组合物,所述组合物包括一种或多种抗糖化剂、一种或多种抗氧化剂、一种或多种透明质酸糖胺多糖和皮肤病学上可接受的赋形剂,

其中所述装置直接或间接施加超声到已施加所述凝胶体垫、凝胶体筒、或自由流动凝胶的皮肤区域,或作为对将要施加凝胶体垫、凝胶体筒、或自由流动凝胶的皮肤区域的预处理。

15. 凝胶体垫、凝胶体筒、或自由流动凝胶在制备包括一种装置和所述凝胶体垫、凝胶体筒、或自由流动凝胶的试剂盒中的应用，

其中所述凝胶体垫、凝胶体筒、或自由流动凝胶包括一种组合物，所述组合物包括一种或多种能诱导分子伴侣表达的物质、一种或多种透明质酸糖胺多糖和皮肤病学上可接受的赋形剂，

其中所述装置直接或间接施加超声到已施加所述凝胶体垫、凝胶体筒、或自由流动凝胶的皮肤区域，或作为对将要施加凝胶体垫、凝胶体筒、或自由流动凝胶的皮肤区域的预处理。

16. 根据权利要求 14 或 15 的应用，其中所述方法用于美容治疗方法。

17. 根据权利要求 14 或 15 的应用，其中所述方法用于医学治疗方法。

18. 根据权利要求 14-17 中任一项的应用，其中同时施加低和高频率超声。

19. 根据权利要求 14-17 中任一项的应用，其中分开施加低和高频率超声。

20. 根据权利要求 14-19 中任一项的应用，其中使用以间隔的构型在柔性材料中排列成阵列的多个超声转换器元件施加超声，优选以补片的形式。

21. 根据权利要求 14-20 中任一项的应用，其中所述组合物包括低和高分子量透明质酸糖胺多糖。

22. 根据权利要求 14-21 中任一项的应用，其中所述组合物包括分子量小于 $1 \times 10^6 \text{Da}$ 的低分子量透明质酸糖胺多糖。

23. 根据权利要求 14-21 中任一项的应用，其中所述组合物包括分子量大于 $1 \times 10^6 \text{Da}$ 的高分子量透明质酸糖胺多糖。

24. 根据权利要求 14 的应用，其中所述抗糖化剂为丙氨酰-L-组氨酸 (L-肌肽)、N-乙酰基半胱氨酸、氨基胍、D-青霉胺、乙酰水杨酸 (阿斯匹林)、对乙酰氨基酚、消炎痛和布洛芬和 / 或它们的功能衍生物或前药中的一种或多种。

25. 根据权利要求 14 的应用，其中所述一种或多种功能衍生物或前药为 β -丙氨酰组胺 (carcinine)、N-乙酰基- β -丙氨酰组胺 (N-乙酰基 carcinine)、L-脯氨酰组胺和 / 或 n-乙酰基-L-肌肽。

26. 根据权利要求 14 的应用，其中所述一种或多种抗氧化剂选自：精氨酸、抗坏血酸、抗坏血酸的前药或衍生物、棕榈酸抗坏血酸酯、磷酸抗坏血酸酯镁盐、磷酸抗坏血酸酯三钠盐、鹅肌肽、肌肽、opidine、高肌肽和 / 或乙酰基鹅肌肽。

用于治疗皮肤病学状况的装置

[0001] 本申请是申请日为 2005 年 10 月 11 日、申请号为 200580042366.4、发明名称为“用于治疗皮肤病学状况的装置”的发明专利申请的分案申请。

技术领域

[0002] 本发明涉及用于治疗皮肤的超声输送装置、方法和局部组合物,尤其用于治疗美容皮肤状况和改善日光损伤和 / 或老化皮肤的外观;本发明还涉及这种装置和组合物在治疗皮肤的方法中的用途,该方法可结合超声的施用。

[0003] 发明背景

[0004] 皮肤为输送药物或化妆品活性试剂到身体的可能途径。但是,皮肤通常不被认为是有效的输送途径,因为角质层和表皮通常渗透性低。传统上,药学治疗剂的局部施用已被靶向局部化皮肤病学部位。最近,经皮技术已用于全身导向,尤其当这种途径绕过可能发生活性剂降解的肝循环时。

[0005] 超声可用于输送分子到皮肤内。当本文中使用时,其被命名为“超声波导入法 (sonophoresis)”。施加到皮肤上的超声具有两个主要作用。第一,快速振动压力场产生空化 (cavitation),从而导致气泡形成和坍塌,这在机械上形成通过角质层的通道。第二个作用是直接加热声波所穿过的材料,因为声能通过反射、吸收和分散而减弱。在皮肤中,由于它的异质性,这比在其它组织中发生超过最多 4 倍。已知加热破坏角质层中的脂双层系统,还有助于表皮的渗透性增加。几个因素可影响超声的加热能力,包括:

[0006] (i) 以连续方式而不是脉冲方式施加超声,

[0007] (ii) 延长暴露时间,

[0008] (iii) 聚焦超声而不是使用未聚焦的施加,

[0009] (iv) 避免使用用于降低反射程度的含水凝胶,

[0010] (v) 在较高的功率密度下施加超声,

[0011] (vi) 施加超声到紧挨着骨的组织。

[0012] 利用超声,已表明低分子量分子在体外通过分离的表皮的扩散增加 2-5000 倍,且在理论研究中达到最高 1700 倍。当使用 15 分钟的 20kHz US 时,能有效地输送甚至大分子药物,如胰岛素和肝素。一项体外研究发现,利用 20kHz 的超声和 2-50W/cm² 范围内的强度,可输送最高 51kDa 的聚-L-赖氨酸分子。为了解释这种渗透的增加,一些研究已报道了孔数目的增加,而不是单个孔直径 (28 ± 12Å) 的增加。但是,对于实际上导致较大孔形成的特殊超声,已采用术语“sonomacroporation”。

[0013] 通过加热和 / 或机械应激破坏细胞间脂质和通过孔隙率增加来提高皮肤的渗透性。已报道了 6°C (1MHz, 0.25W/cm²) 到 50°C (20kHz, 10-30W/cm²) 的温度上升,但已表明小至 11°C (1MHz, 2W/cm²) 的上升就会导致皮肤损伤。强度为 1W/cm² 的连续模式超声在 10 分钟内增加深度 3cm 处的组织温度到 40°C。

[0014] 对于较小的分子,如甘露糖醇,当施加超声作为预处理或同时施加分子时,出现通过皮肤的渗透的增强;而对于大分子,如胰岛素,只在施加超声过程中记录了渗透的增强。

[0015] 超声可用于改善经皮药物输送。WO 99/34857 公开了各种活性剂的经皮药物输送,其中使用小于 $20\text{W}/\text{cm}^2$ 、优选小于 $10\text{W}/\text{cm}^2$ 的功率密度;所用频率小于 2.5MHz ,优选小于 2MHz ,优选小于 1MHz ,最优选 $20\text{--}100\text{kHz}$;使用 20kHz 的频率和 1 或 1.5 或 $7\text{W}/\text{cm}^2$ 的功率密度产生在大鼠上的体内实验数据。

[0016] US4767402 描述了使用功率密度为 $0\text{--}3\text{W}/\text{cm}^2$ 、优选 $0.5\text{--}1.5\text{MHz}$ 的超声的经皮药物输送,并建议当减小功率密度时,也应减小频率。用频率 870kHz 的 $1\text{--}2\text{W}/\text{cm}^2$ 的功率密度作为例子。

[0017] 旨在改善皮肤质量的美容处理也被表皮且尤其是外部角质层的屏障功能所阻碍。表皮由于角质化细胞/脂双层而对溶质传递提供了明显的机械和化学屏障。同样,在表皮和真皮中存在明显的酶活性,这为中和施加的异生素提供了生物化学防御,并在每单位体积活性方面类似于肝。另外,已知活性物质的分子量在测定它们扩散通过皮肤的倾向方面是重要的。已知分子量约 500Da 和以上的物质的扩散是低效的。涉及超声的方法和装置已被描述用于皮肤美容和用于医学治疗。

[0018] US6113559 公开了通过施加聚焦的超声束(超声功率密度 $100\text{--}500\text{W}/\text{cm}^2$, 频率 $1\text{--}500\text{MHz}$) 到皮肤区域来减少皱纹的方法和装置,从而输送到真皮层的能量足以加热组织以刺激真皮层或使其兴奋,从而引起能给予表皮层平滑变化的真皮层变化。

[0019] 蜂窝组织 (cellulite) 处理的超声治疗是众所周知的,且施加超声波能一般已证实在破坏皮下脂肪组织方面是有效的。例如,EP 0695559 涉及用于蜂窝组织处理的多功能设备,其可包括用于施加到例如患者身体大腿上的超声振动的发射体。但是,没有讨论合适的功率密度和频率。GB 2303552 公开了用于非侵害性减少蜂窝组织的超声装置。以约 3.3MHz 的预定频率和 $2.8\text{W}/\text{cm}^2$ 的一般功率密度使用超声设备用于蜂窝组织的超声处理,其中 50% 的能量在皮肤表面下方 $1.27\text{cm}\text{--}2.54\text{cm}$ 的深度内被吸收。

[0020] US6030374 公开了通过暴露皮肤于超声并利用注射施加活性剂到皮肤来增强活性剂通过皮肤转运的方法。活性剂可用于减少蜂窝组织的出现。对于较低频率的超声,使用功率密度为 $0.5\text{--}2.0\text{W}/\text{cm}^2$ 的 25kHz 至 3MHz 的超声频率;对于较高频率的超声,使用功率密度为 $0.2\text{--}1.0\text{W}/\text{cm}^2$ 的 3MHz 至 16MHz 的超声频率。

[0021] US5665053 涉及具有被操作人员选择性控制的超声发生器的深层负压按摩科技 (Endermology) 身体按摩器。公开的 $10\text{--}40\text{kHz}$ 的非常低频率的长波超声在通常被视为破坏性超声的范围内,其可能对细胞有损害,因此,出于安全原因,这不适合于一般应用,除了在非常低的功率水平下。

[0022] US5507790 公开了聚焦超声能的装置,从而患者皮下脂肪组织层内部部位的温度被升高到 $40.0\text{--}41.5^\circ\text{C}$,以加速局部脂肪组织脂解反应速度。装置包括供应未公开频率和未公开功率密度的超声能到聚焦元件的超声转换器。

[0023] WO99/56829 公开了超声绷带和超声转换器阵列绷带,其被认为通过靠近伤口放置超声绷带和超声转换器阵列绷带并产生超声脉冲来用于加速伤口的愈合。

[0024] WO99/48621 描述了大面积柔性压电复合转换器元件且这种转换器元件的大面积阵列具有充分的柔性以适合人体解剖学轮廓例如髌、脊柱。

[0025] 为了能有效,美容皮肤状况如皮肤老化和日光损伤的治疗必须输送活性物质到至少上部(乳突状)真皮的深度处,并因此必须使用克服这种有效的物理和生物化学屏障的

机制,即使在随着年龄的增长,所属屏障已退化时。

[0026] 人皮肤由于自然或“内在”老化的退化特征在于众多症状。这类症状包括表皮和真皮两者的变薄,两者之间汇合处的变平,伴随相关机械性能如耐磨性、弹性和屏障功能恶化的差的伤口愈合、体温调节和免疫功能。可见外观也恶化,从而产生伴有不均匀色素沉着的较粗糙、有条纹和干性外观。在大多数情况下,皮肤老化没有多少医学重要性,除了在受损的伤口愈合的情况下,其使得能发生感染和机能障碍。

[0027] 随年龄增加皮肤中的可见退化是由于或多或少同时发生的几个变化的组合。生活方式选择如抽烟和日光浴会加速这种退化。可见的明显变化包括:松垂皮肤、粗糙皮肤质地、色素沉着异常、暗淡的肤色和总体光亮度损失。起皱或皱纹(rhytide)形成可能是最常与皮肤老化有关的症状,且已知一般由于基质蛋白和蛋白聚糖的类型和分布的变化而引起。类似地,随年龄增加而下降的皮肤功能包括:细胞置换、免疫识别、感觉感受、损伤响应、血管反应性、维生素D产生、屏障功能、体温调节、皮脂产生、化学物品清除、发汗和机械保护。还可能有pH变化(4.5-5)。

[0028] 老化皮肤特征在于表皮厚度变薄,表皮增殖减弱,并伴随着网嵴(rete ridge)模式变平。明显的变薄可与基底层和棘层的细胞凋亡增加连同基底层的受损细胞增殖有关。衰老的皮肤变薄,弹性变差,并且屏障功能下降。这是因为真皮包含降低的细胞含量,具有硬的非柔性基质蛋白,和数目减少的毛细血管袢。上面的表皮因此由于真皮-表皮汇合处(DEJ)变平而受到损害,从而导致接触表面积减少,因为在DEJ附近只有较少的毛细血管袢。两个层之间的营养物和代谢物交换减少,并且损害了为响应外部环境条件变化而保持层完整性所需要的通讯。

[0029] 皮肤不仅经受内在或年代老化过程,而且经受环境或外在的一些过程。例如,已知因素如饮食、污染和抽烟会影响皮肤老化的速度。但是,作为最可能的“gerontogen”,一个因素最为突出:日光。已表明大约80%的面部老化是由于晒太阳。

[0030] 胶原、弹性蛋白和其它皮肤的细胞内和细胞外蛋白受到影响,从而导致日光性弹性组织变性、整个真皮中纤维束中局部化弹性组织的积累。

[0031] 日光的UV组分也与表皮(角质形成细胞)和真皮(成纤维细胞)的细胞群体减少有关。已表明,这是由于程度性细胞死亡或细胞凋亡的增加。表皮和真皮已知随年龄增加日益变得非细胞性,这支持这种假设。尽管表皮影响皮肤干燥且粗糙的外观,但恰是真皮控制表面的光滑程度。基质蛋白和高水结合性蛋白聚糖的减少和/或再分布很大程度上控制了皱纹的外观和总体表面光滑度。类似地,皮肤疤痕形成是由于外伤后通过肉芽组织形成造成的异常蛋白质含量、构象和分布引起,同样主要是真皮而不是表皮问题。

[0032] 光老化的一般症状包括粗糙、起皱、不规则色素沉着、毛细血管扩张、有鳞和各种良性、恶化前和恶性肿瘤。光老化在具有日晒经历的白皮肤的白种人中最突出,并在面部、颈部和上肢伸肌表面上发生最严重。弹性组织变性,被视为在颈部和上胸部上看到的多小卵石样的鸡皮疙瘩,是由于真皮中改变的弹性蛋白纤维的节状聚集引起的。在日晒的皮肤乳突状和网状真皮中已观察到逐渐增厚和缠结的弹性蛋白纤维的增殖。即使在轻微日光损伤的皮肤中,也发现弹性蛋白纤维直径的5-20倍增加,并具有原纤维结构的轻微变化和正常结构的改变,从而得到破坏的“陈旧(moth-eaten)”外观。

[0033] 总之,光损害已通过具有对支持性细胞外基质的定量和定性改变的对真皮成纤维

细胞的逐渐损伤得到证实。当太阳能通过皮肤并被吸收时,出现损伤梯度,最大损伤在外部乳突状真皮中看到,较深的网状真皮处较少。

[0034] 内在(年代)老化特征在于弹性丧失和代谢活性降低的皮肤萎缩。具体地说,角质层保持不变,但表皮总体变薄,真皮-表皮汇合处变平,从而导致皮肤脆性增加。真皮厚度和真皮血管供应减少;这伴随着真皮成纤维细胞数目和生物合成活性的降低。后一变化通过延缓的伤口愈合证实。年龄增加还具有降低角质形成细胞和成纤维细胞对生长因子的响应的作用。

[0035] 在分子和超微结构水平下,存在弹性变化和基质蛋白的其它变化。对于弹性,存在作为连接真皮-表皮汇合处到乳突状真皮的微原纤维束主要组分的细胞外蛋白质原纤蛋白的减少。这些束,通常称为耐酸纤维(oxytalan),基本上提供了表皮和真皮之间的弹性连接。以前认为只通过成纤维细胞合成,现在已表明真皮-表皮汇合处存在的纤维通过角质形成细胞合成。发现光老化皮肤中原纤蛋白浓度降低,并已证实为光老化的有用生物标记,因为知道它与皱纹形成有关。原纤蛋白浓度在受到拉伸张力并表现出牵张痕(萎缩纹)的皮肤中也降低。

[0036] 通过蛋白质(细胞内和细胞外两者)和糖之间的非酶促反应(美拉反应)对体内蛋白质进行翻译后修饰。这种反应称为糖化或糖基化作用,并被熟知在蛋白质周转、组织重构、糖尿病和老化中起重要作用。在皮肤中,这种过程被UV恶化,其中真皮糖化经常在35岁后显著增加。当还原糖如葡萄糖和果糖或它们的活性中间体如乙二醛与长半衰期蛋白质如真皮中的胶原(在人类皮肤中 $t_{1/2} = 15$ 年)和弹性蛋白的氨基反应时,蛋白质的糖化发生。由于这种过程,细胞毒性晚期糖化终末产物(AGE)聚集。

[0037] 在预先用UV辐射的皮肤中已观察到糖化的增加。已显示众所周知的蛋白质糖化生物标记-羧甲基赖氨酸(CML)主要存在于真皮中日光性弹性组织变性区域中,且在光老化皮肤中通常处于较高的浓度下,从而表明UV-诱导的氧化可能加速了光老化皮肤中AGE的形成。

[0038] AGE的积累具有几个影响。晚期糖化终末产物修饰的蛋白质为人皮肤中光-氧化细胞损伤的内源性致敏物,其通过UVA诱导产生造成光老化和光致癌作用的活性氧种类(ROS)。ROS产生还与AGE形成的早期和晚期阶段有关,这些阶段直接与ROS产生的速度有关,这又增加了基质金属蛋白酶表达,结果降低了健康可消化基质。还存在细胞外蛋白质的交联,这导致蛋白质的结构机械性能退化和减少了它们对身体天然酶如基质金属蛋白酶(MMP)的易感性,所述MMP通常确保有秩序的健康蛋白质周转。交联AGE包括种类如戊糖(pentosidine)。非交联AGE包括种类如CML。糖化还降低了蛋白质的水可及性,这使它们更加热稳定和不太可能被热变性。

[0039] 身体具有抵御有害的蛋白质修饰包括蛋白质消化酶的众多生理学机理。适时的蛋白水解在被损坏的蛋白质发生氧化性损害和交联前把它们除去。因此,快速有效的蛋白水解基本上为抗老化机理。已经提到,已通过UV诱导的糖化进行翻译后修饰的蛋白质如胶原和弹性蛋白更能抵抗内源性酶(例如金属蛋白酶)的消化。这与这类酶表达的增加结合进一步降低了健康可消化基质蛋白质对修饰的有害蛋白质的比率。

[0040] 不仅天然蛋白质通过内源性酶如胶原酶和弹性蛋白酶周转,而且其它系统在细胞内和细胞外存在以处理老化和/或变性/应激的蛋白。一种这样的机理使用分子伴侣。老

化增加与保持全部生理学系统中体内稳态的能力下降有关,且这可能至少部分起因于产生热激蛋白的能力的同时和逐步下降。减毒热激蛋白响应可能造成老年个体对环境挑战的易感性增加。

[0041] 热激蛋白 (HSP) 还称为应激蛋白,被认为通过帮助蛋白质合成、转运、折叠和降解来用作分子伴侣。它们是在所有生命形式的所有细胞中存在的一组蛋白质。当细胞经历环境应激、热、冷或缺氧时,它们被诱导。HSP 还存在于完全正常条件下的细胞中,并与血管平滑肌中的收缩和松弛反应的调节有关;它们在蛋白质折叠和功能方面起重要作用,即使没有应激存在时。

[0042] 晚期糖化终末产品的形成导致蛋白质解折叠、不可逆交联和其它化学修饰。已知 HSP 促进重折叠/构象维持以及不可逆损害的蛋白质的快速降解。已知小的热激蛋白如 α -晶体蛋白防止眼晶状体蛋白免于糖化诱导的变化。已知小的热激蛋白 (sHSP) 具有似乎造成这些伴侣蛋白催化活性的共同“晶体蛋白”核。已表明对 α -晶体蛋白/sHsp 伴侣蛋白作用的更多理解对开发治疗和预防白内障的治疗剂具有启发意义。

[0043] 热激蛋白家族包括 8-kD 遍在蛋白质 (已知与遍在蛋白质-蛋白酶体降解途径有关)、32-kD 血红素加氧酶-1 (与 UVA 诱导的氧化应激有关联) 和 HSP-47 (一种已知的胶原伴侣蛋白)。在人皮肤中发现了 HSP-27,并表明由于它与白细胞介素-1 和肿瘤坏死因子- α 的联系而在炎症疾病中起保护作用。这个连同对 HSP-27 表达与表皮角质形成细胞分化紧密相关的理解表明热激蛋白如 HSP-27 在皮肤保护以及可能在 UV-晒斑发炎循环中起作用。与其它细胞和器官系统相反,已知表皮角质形成细胞组成型表达 HSP-72,即没有暴露于先前的应激。已表明热激蛋白 HSP47 作为人成纤维细胞中前胶原合成的分子伴侣是重要的。HSP47 合成在老化和光老化皮肤中减少。

[0044] 暴露于 UV 后的 HSP 表达与对 UV 诱导的细胞死亡的抵抗力增加有关。HSP 的非毒性诱导物可保护不受 UV 暴露的直接和长期影响。研究已经表明,细胞早先暴露于红光和红外 (IR) 光保护它们不受随后暴露于 UV 光的影响。类似地,细胞的 IR 预处理还保护细胞不受随后施加的致死 (51°C) 热应激的影响。

[0045] 熟知的 HSP 对环境应激的保护作用不是随年龄增加不变的。HSP 对应激的反应随年龄增加减弱,大概在转录水平。已发现人皮肤成纤维细胞的重复轻微热激 (RMHS) 减少了年龄相关的变化速度。一项研究将年龄相关的人成纤维细胞减少糖化蛋白聚集的能力降低与和表达 HSP70 的能力的同时降低联系起来,因为暴露于 RMHS 的人成纤维细胞表现出增加的 HSP70 表达和减少的糖化蛋白聚集。RMHS 的有益作用已归因于增加的蛋白酶体活性、增加的分解 H_2O_2 的能力、减少的脂褐素聚集和增强的对 UVA 辐射的抵抗力。

[0046] 已表明肌肉中超过基线的 3-5°C 的温度上升导致 HSP 的诱导。在大鼠胚胎中已证实了通过在正常体温下施加的 30 分钟脉冲超声诱导 HSP,从而表明热激响应对热没有特异性,而是可响应于机械应激发生。类似地,暴露于超声而没有任何显著热贡献的鸡胚胎已显示出增加的 HSP72 合成,从而表明机械刺激可诱导应激响应。还得出结论,即为产生‘完全生物学作用,在暴露过程中在任何时间间隔应激都必须保持大约 10s 或以上不变’。累积作用可刺激 HSP 产生,如在 3 天期间重复轻微热激导致肌肉 HSP 水平明显升高时所发现的。

[0047] 一些物质对 HSP 表达有作用。例如,已表明水杨苷在培养的人成纤维细胞和角质形成细胞中降低从 42°C 到 39°C 的温度升高必要程度来引发 HSP 表达和降低随后 UV 诱导的

破坏程度。已知的刺激剂如十二烷基硫酸钠 (SLS) 也诱导 HSP 表达。由于施加 SLS 到离体人皮肤引起的 HSP27 上调已用作测定化学刺激引起的细胞应激的方法。但是,在类似的研究中, SLS 诱导的人表皮中 HSP27 表达受到维生素 C 局部施加的抑制。

[0048] 已表明物质锌 -L- 肌肽, 商业上还称为泊拉普利嗪, 诱导胃粘膜中的 HSP72 (应激诱导的 HSP70) 表达, 从而保护细胞不受通过化学刺激施加的应激影响。作为对照, 还试验了 ZnSO_4 和肌肽, 并发现不能引发相同的响应。作为抗溃疡药, 锌 -L- 肌肽的伤口愈合作用与它在非内皮细胞如成纤维细胞中的增殖响应有关。

[0049] 已研究了阿斯匹林对在受到热应激的完整大鼠中的 HSP70 表达的影响。在将大鼠在 37℃ 或室温下放置 30 分钟前, 对其腹膜内注射阿斯匹林 (100mg/kg) 或单独注射载体 60 分钟。相对于单独利用热处理观察到的那些, 阿斯匹林与热处理的联合产生 3-4 倍的 HSP70mRNA 水平。

[0050] 研究了 HSP-72 和 -70 在赋予对大鼠胃粘膜阿斯匹林攻击的抵抗性中的作用 ; 在长期暴露于阿斯匹林后这些 HSP 的表达。

[0051] 已知止痛药如阿斯匹林、布洛芬和对乙酰氨基酚能保护免于白内障。这种作用已归因于小 HSP 如 α - 晶体蛋白中糖诱导的交联的抑制。保护免于白内障的酶易于糖化诱导的灭活, 但显示阿斯匹林保护免于此。

[0052] 类似地, 乙酰基 -L- 肉碱被视为潜在的伴侣蛋白 - 保护剂, 这是因为它乙酰基化小 HSP 的可能糖化部位, 并因此保护它们不受糖化介导的蛋白质损害影响的能力。

[0053] 小的热激蛋白 (sHSP) 和簇集蛋白为共有多种功能类似性的分子伴侣, 尽管它们缺乏明显的序列类似性。小的热激蛋白为普遍存在的细胞内蛋白, 而簇集蛋白通常在细胞外发现。两种伴侣蛋白都能在应激条件如高温、还原和氧化下防止靶蛋白的元定形聚集和沉淀。HSP 和簇集蛋白两者的转录都通过转录因子 HSF-1 调节。但是, 已显示簇集蛋白在防止应激的靶蛋白的溶液沉淀方面比一些 sHSP 如 α - 晶体蛋白有效得多。

[0054] 簇集蛋白被表达为 75-80kDa 异源二聚体蛋白, 其被严重糖化从而它质量的 30% 由糖组成。虽然小的热激蛋白如 α - 晶体蛋白的伴侣蛋白活性在较低 pH 下明显降低, 但簇集蛋白的活性在较低 pH 下增强。这对于发生局部酸中毒 ($\text{pH} < 6$) 的组织损伤或发炎部位具有重要意义。簇集蛋白与 sHSP 共有的另一类似性是调节细胞凋亡的能力。簇集蛋白的超表达可保护细胞不受以其它方式诱导细胞凋亡的各种试剂 (例如 $\text{TNF-}\alpha$ 和 UV 辐射) 的影响。已提示簇集蛋白可与应激的细胞表面蛋白相互作用以抑制细胞凋亡前信号转导或防止应激过程中细胞内蛋白的不适当相互作用。

[0055] 许多局部皮肤制剂可用于治疗医学皮肤状况和治疗美容皮肤状况, 尤其是皮肤老化和日光损伤。在许多情况下, 这些制剂是低效的, 只有很小或短期的效力。因此需要能有效治疗皮肤状况的新制剂。此外, 本发明解决了实现这类新制剂到皮肤有效输送的问题。

发明内容

[0056] 本发明提供用于施加超声到皮肤的装置, 其包括以间隔的构型在柔性材料中排列成阵列的多个超声转换器元件, 其中超声转换器元件能在低和 / 或高频率下输送超声到皮肤区域。

[0057] 根据本发明的这个方面, 超声阵列可被结合到可应用于皮肤的面罩、一种或多种

补片内以供应超声。

[0058] 优选成形面罩或补片以与脸表面的至少部分一致。因此超声转换器元件的柔性阵列可被形成为圆形或任何其它简单或复杂形状,尤其是被最优化以与身体形状和特征特别是脸和颈部分一致的形状。阵列应充分柔性,以允许弯曲至 3-4cm 半径的曲率,优选允许弯曲至环绕复曲面 (doubly curved surface) 和单曲面 (singly calved surface) 的形状。

[0059] 使用根据本发明的装置的超声施加可用作施加本发明组合物前的预处理,或本发明的组合物可直接或通过组合物浸渍的材料例如垫如凝胶体垫被施加到皮肤上,然后通过柔性阵列输送超声。柔性超声阵列可被偶联到包含组合物并偶联超声能的薄 (2-3mm) 的一次性凝胶体垫上。合适地,柔性阵列可被直接或间接 (例如通过垫) 固定到皮肤上进行持续治疗。

[0060] 阵列的转换器元件优选被气密地密封,例如包含在即使当粘着 / 偶联到水性制剂时也能有电性能的防水柔性材料内。

[0061] 在装置中,优选柔性材料至少大致在声学上与一个或优选两个转换器元件匹配以抑制材料中可能使超声波转向或以其它方式散选超声波的反射的产生。柔性材料可包括选自热塑性塑料、热固性材料、橡胶或它们的混合物中的聚合材料。柔性的声学上匹配的材料一般由聚合材料和任选地填料形成。聚合材料应具有与转换器元件组分的良好相容性、生物相容性和柔性。合适的聚合材料包括热塑性塑料如高密度聚乙烯、聚甲基丙烯酸甲酯、聚丙烯、聚对苯二甲酸丁二醇酯、聚碳酸酯、聚氨基甲酸酯如可从 Morton Chemical 得到的 CA 118 和 CA128 和 estane 聚酯等;热固性材料如环氧树脂,如 Spurr 环氧树脂和 Stycast 80、Stycast 1365-65 等;和橡胶,如硅橡胶,如可从 Dow Corning 得到的分散体 236 和可从 Rhone-Poulenc, Inc. 得到的 RTV-141 等。如果需要,可通过掺入一种或多种填料提高聚合材料的声阻抗。合适的填料包括 PZT、钨、氧化铝、石英玻璃、碳化钨、钛、玻璃粉等,优选玻璃粉。填料颗粒的尺寸应在约 0.1- 约 50 微米的范围内,优选约 0.5- 约 5 微米。使用的填料的量将为赋予所需的声阻抗所必需的量。通常,使用约 2- 约 50 体积%的填料,且优选约 5- 约 30 体积%的填料。优选的聚合材料是硅橡胶。

[0062] 通常,转换器元件将被独立连接到超声发生器上,从而超声转换器元件能同时或顺序地输送低和高频率超声。

[0063] 根据本发明的装置可包括具有分别能输送高和低频率超声的一组高频率转换器元件和一组低频率转换器元件的柔性阵列。高和低频率转换器可被交替,或以其它方式排列成一定模式,例如两类转换器的基本规则的排列。在其它实施方案中,高和低频率元件可被安装到一起,例如,在彼此顶部,尤其是共轴地。在这方面,转换器元件可为能沿单一轴顺序或同时输送低和高频率超声的双频转换器元件。双频转换器可被排列成一定模式,例如双频转换器的基本规则的排列。转换器可为圆形或其它规则或不规则形状。转换器元件适当地包括本领域中已知的转换器材料,例如压电陶瓷 (piezoceramics)、PVDF 和 / 或诸如下述的压电材料:可在商业上从 Morgan Matroc, Inc. 得到的 PZT 粉末、陶瓷、单晶弛豫铁电体、锆钛酸铅 $\text{Pb}(\text{Zr}, \text{Ti})\text{O}_3$ 、偏铌酸铅 $\text{Pb}(\text{Nb}_2\text{O}_6)$ 、改性钛酸铅 PbTiO_3 如 $(\text{Pb}, \text{Ca})\text{TiO}_3$ 和 $(\text{Pb}, \text{Sm})\text{TiO}_3$ 、钛酸钡 BaTiO_3 、PMN-PT $(1-x)\text{Pb}(\text{Mg}^{2+} 3\text{Nb}_{2/3})\text{O}_3-x\text{PbTiO}_3$ 、PZN-PT/BTNb $2/3\text{O}_3-x(\text{yPbTiO}_3-(1-y)\text{PbZrO}_3)\text{Pb}(\text{Zn}_{1/3}\text{Nb}_{2/3})\text{O}_3-x\text{PbTiO}_3-\text{BaTiO}_3$ 、 $(1-x)\text{Pb}(\text{Zn}_{1/3}$ 等。

[0064] 在根据本发明的装置中,转换器元件能以脉冲模式输送低频率组分和以连续模式

输送高频率组分,或更优选能以连续模式输送低频率超声组分和以脉冲模式输送高频率超声组分。脉冲模式是可控制的,从而它是可变的,以提供可变的脉冲方案,例如 2ms 开,8ms 关 (20%负载循环)。

[0065] 在根据本发明的装置中,适当地,转换器元件能输送 20-500kHz、优选~ 50kHz 的低超声频率,和 / 或 0.5-3.5MHz、优选~ 1MHz 最高到 3MHz 的高超声频率。低频率超声能的空间平均功率密度合适地为 20-500mW/cm²。高频率超声能的空间平均功率密度合适地为 0.5-3W/cm²。

[0066] 在第二个方面中,本发明提供包括高频率转换器元件和低频率转换器元件的双频转换器元件,优选高和低频率转换器元件被共轴安装,并可机械和电连接。在优选的实施方案中,高频率转换器元件包括压电陶瓷材料,而低频率转换器元件包括 PVDF。高和低频率转换器元件可被结合到一起,之间任选地具有垫板元件,其可为金属垫板元件。

[0067] 根据本发明的装置可包括如本文所述的双频转换器元件的阵列。

[0068] 超声阵列可被程序控制来以设定模式输送所需顺序的脉冲或连续模式的高和 / 或低超声频率,借此避免皮肤到超声暴露过度或不足的问题,其会导致皮肤过热。本发明的装置是可控制的,从而能驱动低和高频率从而使得超声场以预定模式且在预定速度下经过阵列,例如在阵列整个宽度 (例如 5-10cm) 上从左到右 2-3 秒,然后 2-3 秒返回,即 4-6 秒循环时间;或进入阵列中心然后再出来,尤其是如果阵列具有圆形几何形状。这种模式可在相同处理时间内变化,例如左到右然后上下。理想地,施加高和低频率从而使得每个频率都尽可能均匀地覆盖正被处理的区域。优选构造柔性阵列从而使得超声不会被施加到眼上,从而定位和控制转换器从而使得过度暴露靠近骨 (例如颧骨或眼眶) 的皮肤到超声的可能性最小化。这可通过施加脉冲模式的超声和例如通过以预定相阵列序列顺序输送超声来实现。使用面罩、一种或多种补片施加超声尤其适合于家庭应用。

[0069] 装置可包括动力和控制单元,其适当地具有能使它拿在手中的适宜尺寸。单元优选提供在防水 / 擦净壳中。可由电池例如可再充电电池供应动力,以允许在远离主电源时使用。单元优选设有控制装置,以允许用户为所需的处理选择设置,这些可包括预设水平以能使用户为不同应用选择设置,例如,用于抗老化治疗、蜂窝组织治疗或用于减少疤痕,各种设置基于不同的频率和振幅 / 功率设置。合适地,控制单元可包括最大时间切断以防止过度暴露,例如 10 分钟。可提供记忆功能,例如以记录治疗日期和 / 或持续时间。

[0070] 在特别优选的实施方案中,本发明涉及一种超声处理系统,其包括排列成阵列 (2) 并用顺应性材料 (4) 保持彼此靠近的多个转换器元件 (15),所述顺应性材料 (4) 合适地为硅橡胶 (图 1a、b 和 c)。

[0071] 每个元件 (15) 可包括两个部件,高频率转换器元件,例如压电陶瓷圆盘元件 (5),和低频率转换器元件,例如 pvdf 元件 (7),定位它们从而使得每个元件的正极化电极都机械和电连接在界面 (9) 处。PZT 元件 (5) 的上表面 (30) 和 pvdf 元件 (7) 的下表面 (31) 被电连接到一起 (图 1(d))。每个元件 (1) 都通过弹簧连接器 (8) 独立地连接到图 3 中所述的电源上,所述弹簧连接器 (8) 附着在图 1a 柔性安装的板 (6) 上的并置的接触点 (3) 上。然后可将转换器阵列通过连接器 (11) 连接到超声发生器上。

[0072] 图 2a 和 2b 显示了转换器元件的一种具体形式,其中 PZT 圆盘 (12) 被导电地附着在金属元件 (13) 上,所述金属元件 (13) 又通过金属环 (23) 和绝缘垫板环 (22) 导电地附

着在 pvdf 材料 (24) 上。通过导电环 (21) 实现共用的 HT 连接 (9)。通过系统图 3B 中的独立电路或通过图 3A 中的 DDS 芯片产生 50kHz 和 1MHz 的交替驱动频率。因此在 50kHz 和 1MHz 正弦波脉冲的正弦脉冲群 (burst) 中交替激发组合的转换器。激活信号的长度和比率可为处理器控制的或来自于与测量的靶组织特性有关的传感器控制。

[0073] 在图 2a 中,通过成形下表面具有成形的聚焦轮廓例如凹面轮廓可将元件 (13) 形成成为聚焦设备,从而赋予几何学上顺应性的 pvdf 膜类似的性质。

[0074] 在第三个方面中,本发明提供一种组合物,其包括一种或多种抗糖化剂、一种或多种抗氧化剂、一种或多种皮肤病学上可接受的赋形剂和任选一种或多种能诱导分子伴侣表达的物质。

[0075] 本发明的组合物用于治疗美容皮肤状况,尤其用于改善老化皮肤的外观,尤其是通过改善日光损伤的影响。通常,存在组合物的约 0.5-5%、优选约 1-3% w/w 的抗糖化剂或每种抗糖化剂。

[0076] 合适地,在本发明的组合物的一些实施方案中,抗糖化剂还具有抗氧化剂活性。

[0077] 用于掺入到组合物内的优选抗糖化剂包括含组氨酸的二肽、丙氨酰-L-组氨酸(L-肌肽)或其肽模拟物(peptidomimetic)、N-乙酰基半胱氨酸、氨基胍、d-青霉胺、乙酰水杨酸(阿斯匹林)、对乙酰氨基酚、消炎痛和布洛芬和/或它们的功能同系物、衍生物或前药中的一种或多种。

[0078] 含组氨酸的天然二肽如 L-肌肽(β -丙氨酰-L-组氨酸或“肌肽”)已知能有效抗不同的氧衍生的自由基,以及脂过氧自由基(lipoperoxy radical)。在骨骼肌组织中高浓度存在的肌肽可延缓衰老和激发培养的人成纤维细胞中的细胞复壮。这种简单分子诱导这些作用的机理是未知的,尽管肌肽很好地证明了抗氧化剂和氧自由基清除活性。除了肌肽的预防作用外,它还可能通过与蛋白质上巯基的直接反应直接参与老化蛋白质的灭活/处置。这些肌肽化(carnosinylated)蛋白质的可能结局包括形成惰性脂褐素、通过蛋白酶体系发生蛋白水解和在与受体相互作用后的胞吐作用。

[0079] 认为肌肽可标记要除去的糖化蛋白。蛋白质周转依靠用于热变性的水合,且已知糖化蛋白具有较高的变性焓,从而明显使它们不太可降解。已表明,糖化蛋白的“肌肽化”可增加这类蛋白质的水可及表面,并因此促进热变性过程中的水合和解折叠。通过观察肌肽化糖化蛋白质的较低 ΔH 和 ΔG 变性,已证实这种理论。

[0080] 肌肽用作抗糖化剂,它抑制甲基乙二醛(MG)和 AGE 羧基甲基赖氨酸(CML)的羰基攻击。已表明肌肽本身可被各种糖容易地糖化,从而形成非诱变加合物,且它的保护作用已归因于阻止晶体蛋白、超氧化物歧化酶(SOD)和过氧化氢酶糖化的作用。与抗糖化剂氨基胍相比,发现肌肽能提供更好的效力和毒性曲线,因此肌肽为优选的抗糖化剂。

[0081] 肌肽表现出 Mn^{2+} 螯合作用和 ROS 清除性能,但单独这些不能充分解释它在使衰老成纤维细胞复壮中的作用。一项研究把它的性能归因于肌肽与糖化/氧化蛋白质和其它分子上的羰基的反应;这种反应命名为“肌肽化”,抑制了糖氧化(glycoxidised)蛋白质交联成正常大分子;并且肌肽化能影响糖氧化多肽的命运。对大鼠胚胎成纤维细胞的研究证实 L-肌肽维持了细胞形态学的保持,甚至在营养损害 5 周期间。同样, L-肌肽显著减少了连续培养 4 周后细胞中 8-羟基-脱氧鸟苷(8-OHdG)的形成。因此可推断 L-肌肽的抗衰老作用可能与它在氧化应激中对细胞内 8-OH dG 形成的抑制有关。肌肽还延长了培养的人成

纤维细胞寿命,杀死转化的细胞,保护细胞不受醛和淀粉样肽片段的影响,并在体外抑制蛋白质糖化和 DNA/蛋白质交联。成纤维细胞在肌肽存在时保持幼年外观,并在肌肽被除去时复原成衰老表型。

[0082] 除了抗糖化抗氧化剂活性外,肌肽还具有抗炎作用。在发炎部位处的变性蛋白对糖化更易感,因此抗炎作用可增强糖化的抑制。

[0083] 肌肽是水溶性的,且这表明它可代表与用于保护细胞膜的脂溶性抗氧化剂如 α -生育酚相对应的水相。发现肌肽和肌肽相关化合物(CRC)(咪唑、组氨酸、鹅肌肽)以及麦角硫因在单线态氧猝灭方面是等效的。在 Fenton 反应中由过氧化氢产生羟基的过程中,发现肌肽比试验的 CRC 更有效。但是,在测量人血清脂蛋白氧化时,证实了肌肽相关化合物的以下效率等级次序:乙酰基肌肽<乙酰基鹅肌肽<高肌肽(homocarnosine)=蛇肉肽<肌肽<鹅肌肽,而肌肽的组分氨基酸,组氨酸和丙氨酸对脂质或蛋白质氧化表现出很少或没有抑制作用。肌肽的自然水平与其它抗氧化剂体系如超氧化物歧化酶(SOD)体系的活性一起随年龄增加而降低。另外,在以其它方式灭活酶的 Cu, Zn-SOD 中,肌肽自身可保护免于蛋白质的过氧自由基片段化。肌肽以其单线态氧猝灭活性而闻名。

[0084] 已表明肌肽能二聚体地络合 Cu^{2+} ,这可解释肌肽为什么能减少自由基产生,因为金属络合将降低 Cu^{2+} 和 Fe^{2+} 的可用水平,它们否则会被蛋白质中的 AGE 配位结合(肌肽的咪唑环可类似于多种不同的含咪唑的 AGE X-连接的那种),从而导致原位产生羟基和其它反应性氧种类。肌肽还干涉铁/抗坏血酸盐诱导的磷脂氧化。

[0085] 肌肽产生剂量相关的血管松弛(血管舒张),其与内皮无关。有趣地是,在相同研究中,发现肌肽的组分氨基酸 L-组氨酸和丙氨酸分别不产生作用和产生剂量相关的血管收缩。

[0086] 肌肽在生理学上被水解成它的组分氨基酸:组氨酸和 β -丙氨酸。认为 β -丙氨酸参与促进胶原合成。组氨酸以其抗炎性质、清除单线态氧和干涉涉及铁和其它金属离子的氧化还原反应的能力而为人所知。

[0087] 已表明肌肽当作为完全肠配方的部分提供时提高伤口愈合速度,但迄今为止没有被报道在伤口愈合制剂中局部使用。

[0088] CRC 如肌肽前药 N-乙酰基-L-肌肽(NAC)经过水解原位产生肌肽。已表明 NAC 治疗眼疾病如白内障和青光眼中的氧化应激。

[0089] 其它肌肽同系物包括高肌肽和鹅肌肽,它们保护 Cu, Zn-SOD 免于灭活和阻止 Cu^{2+} 释放。许多肌肽同系物通过酶肌肽合成酶产生。

[0090] 可被掺入到根据本发明的组合物内的肌肽的功能同系物、衍生物和前药包括 β -丙氨酰组胺(carcinine)、N-乙酰基- β -丙氨酰组胺(N-乙酰基 carcinine)、L-脯氨酰组胺和/或 n-乙酰基-L-肌肽中的一种或多种。

[0091] L-肌肽的脱羧作用提供了对水解酶抗性增加的衍生物。肌肽肽模拟物(功能同系物)是已知的,它们具有类似于或甚至好于天然肌肽的自由基清除和脂质氢过氧化物灭活性能。

[0092] 两种肌肽肽模拟物(功能同系物)N-乙酰基- β -丙氨酰组胺和 L-脯氨酰组胺为脂质氢过氧化物介导的蛋白质交联的非常有效的抑制剂。在体内,已表明 N-乙酰基- β -丙氨酰组胺保护皮肤酶免于 UV 诱导的降解。

[0093] 根据本发明的组合物包括一种或多种抗氧化剂,所述抗氧化剂优选选自:精氨酸、抗坏血酸、抗坏血酸的前药或衍生物、棕榈酸抗坏血酸酯、磷酸抗坏血酸酯镁盐、磷酸抗坏血酸酯三钠盐、鹅肌肽、肌肽、opidine、高肌肽和/或乙酰基鹅肌肽。通常,抗氧化剂或每种抗氧化剂以组合物的约 0.5-5%,优选约 1-3% w/w 存在。

[0094] 精氨酸为强力抗氧化剂,且对于美拉型蛋白质交联反应为非常有效的牺牲目标。已表明精氨酸和赖氨酸都为有效的糖化抑制剂,但精氨酸尤其倾向于形成 AGE 本身。已知靠近真皮-表皮汇合处(DEJ)的毛细血管袢的数目和直径随年龄增加而减小。营养物的供应和新陈代谢以及其它细胞过程副产物的除去因此受损。由于酶催化的原位氧化氮(NO)形成,L-精氨酸用作血管扩张剂。由 L-精氨酸形成氧化氮(NO)目前被认为是心血管、中枢和外周神经系统调节以及其它体内稳态机理中所涉及的普遍存在的生物化学途径。

[0095] 抗坏血酸(维生素 C, AA)是许多生理学功能中涉及的必需营养物。它容易(但可逆地)经历两个连续单电子氧化过程以形成抗坏血酸盐基,一种相对惰性的自由基,并因此被认为是优异的还原剂。在活生物中,抗坏血酸可保护组织和细胞不受自由基和活性氧衍生种类的氧化损害。已知 AA 在包括 X-射线辐射的眼晶状体蛋白研究中施加强化的 UVA 保护能力。

[0096] 不幸地是,在一些情况下,溶液中的抗坏血酸可发生氧化并产生脱氢-L-抗坏血酸以及许多降解产物,这会导致包含抗坏血酸的组合物的褐变。几个因素可加速抗坏血酸降解,如高储存温度、光、高 pH 值和溶解氧的存在,尽管抗坏血酸与氧分子的反应机理还没有完全弄明白。此外,金属离子尤其是二价铜和三价铁离子强烈催化抗坏血酸与氧的反应。为了避免降解,可单独提供组合物的抗坏血酸组分,并在使用前不久混入到组合物的其它组分内。作为替代方案,或除抗坏血酸外,组合物中可包括抗坏血酸的稳定前药或衍生物。

[0097] 棕榈酸抗坏血酸酯为皮肤护理产品中广泛使用的维生素 C 的脂溶性衍生物。它没有刺激性,并且比抗坏血酸更稳定。另外,棕榈酸抗坏血酸酯为脂溶性抗氧化剂,并在保护皮肤免于脂质过氧化(皮肤中自由基破坏的关键类型)方面与维生素 E 至少一样有效。

[0098] 磷酸抗坏血酸酯镁盐为维生素 C 的水溶性衍生物。它没有刺激性,并且比维生素 C 更稳定。更重要地,磷酸抗坏血酸酯镁盐似乎具有与维生素 C 相同的加强皮肤胶原合成的潜能,但在明显较低的浓度下有效。大多数维生素 C 配方为强酸性,并因此产生剥落,因而磷酸抗坏血酸酯镁盐为用于组合物的优选抗坏血酸衍生物,尤其是用于皮肤敏感的个体的那些组合物和希望避免剥落作用的那些组合物。

[0099] 磷酸抗坏血酸酯三钠盐(Stay-C® 50)为抗坏血酸的一磷酸酯的钠盐。它为前维生素,比抗坏血酸在水溶液中具有更大的稳定性。皮肤中的磷酸酶对磷酸抗坏血酸酯三钠盐起作用以释放抗坏血酸。

[0100] 根据本发明的组合物可包含一种或多种能诱导分子伴侣表达的物质,尤其有用的为能诱导热激蛋白、簇集蛋白和/或 α -晶体蛋白的表达的物质。能诱导分子伴侣表达的一种或多种物质可为乙酰水杨酸、水杨酸、锌离子、锌盐、硫酸锌和/或锌-L-肌肽。通常,含锌试剂以组合物的约 0.1-1%、优选约 0.25-0.75%、最优选约 0.5% w/w 存在。当组合物中存在乙酰水杨酸或水杨酸时,合适的浓度为组合物的约 0.5-2.5%、优选约 1-1.5% w/w。

[0101] 根据本发明的组合物还可包括一种或多种抗细胞凋亡物质,优选选自烟酰胺、L-肉碱、乙酰基-L-肉碱、N-乙酰基-半胱氨酸和/或 L-肌肽。抗细胞凋亡物质存在的浓

度通常为组合物的约 0.5-5%、优选 1-3%。

[0102] 在第四个方面中,本发明提供包括一种或多种能诱导分子伴侣表达的物质和皮肤病学上可接受的赋形剂的组合物。

[0103] 根据本发明的组合物还可包括一种或多种选自以下的成分:一种或多种维生素,一种或多种小肽,和/或一种或多种氨基酸,或它们的衍生物或前药。

[0104] 可被掺入到本发明的组合物中的维生素包括维生素 B 化合物如硫胺素(维生素 B1),例如作为焦磷酸硫胺素,如磷硫胺;吡哆胺(维生素 B6),维生素 A 和/或 E,或它们的衍生物或前药。

[0105] 已表明吡哆胺(B6)有效抑制 AGE 和脂氧化产物形成,且尤其通过自身形成甲基乙二醛-吡哆胺二聚体而阻止甲基乙二醛-赖氨酸二聚体的形成。吡哆胺(B6)和焦磷酸硫胺素(B1)都已被表明为有效的 AGE 形成的后 Amadori (Post-Amadori) 抑制剂,其中 B6 实现 AGE 形成速度和最终 AGE 水平的可测量的降低,而 B1 只实现最终 AGE 水平的可测量的降低。两种化合物在 AGE 形成的后 Amadori 抑制方面都比氨基胍表现出大得多的效力。硫胺素衍生物如磷硫胺(硫胺素的脂溶性前药)已被鉴定为在血管糖尿病并发症治疗中抑制细胞内糖化的有效治疗剂,并已表明能抑制咪唑酮型 AGE 聚集。

[0106] 组合物可包括一种或多种小肽,合适地为二肽、三肽和/或四肽,和/或一种或多种氨基酸,例如,脯氨酸、赖氨酸、组氨酸、丙氨酸或它们的衍生物或前药。

[0107] 根据本发明的组合物还可包括一种或多种多糖,其可为一种或多种蛋白聚糖,如糖胺聚糖。

[0108] 使用的一种或多种糖胺聚糖可为低和/或高分子量透明质酸糖胺多糖、硫酸软骨素、硫酸皮肤素和/或一种或多种它们的衍生物。

[0109] 除了对去糖化(deglycate)基质蛋白和增加真皮血管功能的需要外,根据本发明的组合物的重要作用在于重建蛋白聚糖含量和分布。蛋白聚糖(PG)由于水合作用而对于提供皮肤的“光滑”紧张(turgidity)是重要的,而且作为生长因子和其它细胞因子的细胞间库(reservoirs)也是重要的。PG 通过真皮成纤维细胞合成,并与生长因子如碱性成纤维细胞生长因子(b-FGF)有密切关系。胶原的 N-端结合结构域受糖化影响,且因此真皮中 PG 的量和位置受 AGE 聚集影响。例如,硫酸乙酰肝素蛋白聚糖(HSPG)通过与 PGF-2 的相互作用促进细胞增殖。

[0110] 已表明一些 GAG 尤其是透明质酸在老化皮肤中不断减少。即使粘多糖只构成皮肤干重的 0.1-0.3%,其任何减少也会容易地被理解成影响皮肤紧张,因为分子在真皮中结合水最高到分子本身体积的 1000 倍。另外,已知这些物质在一些情况下影响结缔组织细胞的迁移、生长和分化。

[0111] 透明质酸或透明质酸糖胺多糖(“HA”)为长链多糖,其为大多数动物组织中环绕细胞的主要成分。HA 被吸引并粘着到细胞膜上的特异性受体上,这些特异性受体在身体损伤和疾病部位被发现数目增加,并且大量在皮肤上。这意味着药物可潜在地被寻靶并保留在需要药物的部位。HA 的安全曲线、它携带药物的能力和它潜在的寻靶特性使它成为局部药物输送的优良载体。药物可被共价地附着到 HA 上或包含在 HA 衍生物的 X-连接的网络内。

[0112] 透明质酸糖胺多糖已在美容、粘性手术和粘性补充中应用了数十年,而没有免疫

学反应或任何其它副作用。它能在结缔组织如皮肤和软骨中、在眼玻璃体中和在滑液中天然地以高浓度存在。通常它结合到细胞和蛋白质上,但一些 HA 存在于组织液中。HA 为由葡糖醛酸和 N-乙酰葡糖胺的交替单元组成的多糖。存在的羧基在皮肤的 pH(通常大约 pH 4.5-5.5)被大量离子化,因此它为高亲水性的。HA 的水结合性质和聚合分子尺寸使 HA 倾向于形成具有表面保持力潜力的粘弹性凝胶,从而用作治疗剂的库。尽管 HA 有亲水性质,但它可穿透正常的表皮,并在处理前通过已知的新陈代谢途径在真皮中细胞外聚集。

[0113] 在优选的实施方案中,根据本发明的组合物将包括低和高分子量透明质酸糖胺多糖和 / 或一种或多种其衍生物。低分子量透明质酸糖胺多糖特征上具有小于 1×10^6 Da 的分子量,而高分子量透明质酸糖胺多糖特征上具有大于 1×10^6 Da 的分子量。

[0114] 当被施加到皮肤表面时,HA 形成粘弹性光滑润滑膜,因此外部施加的 HA 不仅对皮肤具有有益作用,而且可用于增加组合物的粘度,从而当施加到皮肤时,它能保持以凝胶状层接触皮肤。当超声被施加到用根据本发明的组合物处理的皮肤时,这是尤其有益的。

[0115] 可通过乙酰氨基(还原端基)修饰但最通常是羟基和羧基来衍生 HA 分子。糖苷键也能容易地被水解以形成较短的链或寡糖。HA-药物加合物已被合成以用于有控制的输送应用,且 HA-蛋白质加合物作为生物材料和细胞基质。

[0116] HA 在生理 pH 下作为 Na-HA 存在。它完全缺乏免疫原性,这使它成为生物材料和药物输送系统的理想结构单元。通过在基膜周围形成药物的库,HA 实现药物通过皮肤的有控制的和持续的释放。NaCMC(在重量或流变学当量浓度下)和硫酸软骨素(在重量当量浓度下)在完全厚度皮肤中都没有发挥透明质酸糖胺多糖制剂观察到的有控制的释放作用,因此 HA 为用于本发明目的的尤其优选的葡糖胺聚糖。HA 对经皮吸收的增强被认为部分归因于其水合皮肤从而破坏紧密细胞 / 脂质层的能力。关于这一点,HA 因为它高的水结合能力而优于其它 GAG。

[0117] 发现 HA 的四糖发挥抗细胞凋亡作用,因为它们在应激条件下上调 HSP72 表达并抑制细胞死亡。高分子量 HA 多糖通常为具有抗血管生成、抗炎和免疫抑制活性的空间充满分子。较低分子量片段(6-20kDa)为血管生成性、炎性和免疫刺激性的。

[0118] 已表明 HA 通过经由自由基机理的美拉反应产物(葡萄糖-赖氨酸)被解聚。羟基解聚 HA,并与关节炎中的发炎和滑液分解有关联。高(而不是低)分子量 HA 和 HA 的衍生物如 BEHA 用作清除活性氧种类(ROS)如 O_2^- 和 OH 的抗氧化剂,它们否则会损害真皮成纤维细胞的迁移和增殖性能,从而延长发炎和耽搁伤口愈合。

[0119] 透明质酸糖胺多糖具有增加蛋白聚糖合成、刺激金属蛋白酶-1 的组织抑制剂的能力,具有刺激胶原重建、增强细胞迁移的能力,并通过上调转化生长因子- β 的表达刺激伤口愈合。

[0120] 低分子量 HA(~ 300 kDa)可从 Sigma, Poole, Dorset 得到(从牛玻璃体液中分离)。高分子量 HA 可从 ConvaTec, Flintshire, UK 得到(从人脐带中分离)。表 1a、1b 和 1c 中给出了商业上可得到的 HA 制剂。

[0121] 表 1a. 骨关节炎临床治疗中使用的 NaHA 的例子

[0122]

商标	NaHA 的分子量*	制造商
Artz®	600,000-1,200,000	Seikagaku (日本)
Hyalgan®	500,000-730,000	Fidia (意大利)
Synvisc®	轻微交联的 HA	Biomatrix (美国)

[0123] 表 1b. 眼科外科手术中使用的 NaHA 的例子

[0124]

商标	NaHA 的分子量*	制造商
Opegan®	600,000-1,200,000	Seikagaku (日本)
OpeganHi®	1,900,000-3,900,000	Seikagaku (日本)
Healon®	1,900,000-3,900,000	Pharmacia-Upjohn (瑞典)
Opelead®	1,530,000-2,130,000	Shiseido (日本)

[0125] *活性成分的分子量

[0126] 其它 HA 包括以 **Healon®** 名称出售的用于医疗的 NIF-NaHA 和兽医用的 **Hylartil®**; Biomatrix Inc. 开发的 Hylan A (弹粘性流体) 和 Hylan B (粘弹性凝胶)。

[0127] 表 1c.

[0128]

商标 (制造商)	总名称	分子量 ($\times 10^6$ Da)	弹性 (%) @3Hz	复数粘度(Pa s@0.02Hz)	多糖浓度 (mg/ml)
Hyalgan® (Fidia)	透明质酸糖 胺多糖	0.5-0.65	26	<0.1	10
Artz® (Seikagaku)	透明质酸糖 胺多糖	0.75	33	0.3	10
Orthovisc® (Anika)	透明质酸糖 胺多糖	1.5	66	42	15
Synvisc® Biomatrix	Hylan	6	88	213	8
SkyePharma (Solareze 双氯酚 酸钠凝胶)		0.6			

[0129] 适用于根据本发明的组合物的皮肤病学上可接受的一种或多种赋形剂包括水、水/乙醇混合物 (例如组合物 % w/w 中最高 25%, 优选最高 20% 乙醇)、粘性凝胶或乳状液、含水凝胶、水凝胶、乳膏或敷用物 (application) 形式的基于水的乳状液、乳膏或敷用物形式的水包油乳状液或胶冻。

[0130] 通常,与超声处理结合施加的组合物(其中组合物在超声处理前、超声处理过程中或超声预处理后不久被施加)将具有粘性特性,从而一层组合物可被涂布到皮肤上,并将在皮肤上保持在适当位置,直到它被除去,例如通过用薄纸或棉绒擦去组合物或通过冲洗掉制剂。

[0131] 根据本发明的组合物可包括成膜成分。一种或多种成分选自:防晒霜、湿润剂、色素、粉底或遮瑕色素,根据本发明的组合物中可包括仿晒黑(fake tan)色素或组合物。

[0132] 根据本发明的组合物优选在接近皮肤 pH 的 pH 下,例如,在 pH 4 到 pH 6 的 pH 下,或 pH 4.5 到 pH 5.5。

[0133] 在第五个方面中,本发明提供皮肤治疗方法,其包括施加根据本发明的组合物到皮肤上。

[0134] 优选该方法为美容皮肤状况的美容治疗方法。但是,本发明还包括医学皮肤状况的治疗,在这种情况下,该方法为医学治疗方法。

[0135] 皮肤治疗方法还可包括直接或间接施加超声到已施加组合物的皮肤区域,或作为对将要施加组合物的皮肤区域的预处理。

[0136] 在本发明的优选方法中,在低和/或高频率下直接或间接对已施加组合物或将要施加组合物的皮肤区域进行超声施加。

[0137] 可同时、顺序或分开施加低和高频率超声,例如,作为低和高频率的几次交替单一施加来顺序施加,或在一系列低频率施加与一系列高频率施加交替时来分开施加。低频率超声被认为用于促进分子输送到皮肤(一种称为“超声波导入法”的方法)。高频率超声具有比低频率少的超声波导入作用,但它也具有许多对皮肤有益的其它作用,因为它刺激成纤维细胞增殖、刺激胶原和其它细胞外基质(ECM)组分形成(例如原纤蛋白)、刺激血液供应、更新随年龄增加变硬的 ECM 的弹性质量、通过热和机械刺激来刺激成纤维细胞(真皮)和角质形成细胞(表皮)中热激蛋白(HSP-细胞内分子伴侣)的表达。

[0138] 在优选的方法中,同时施加低和高频率超声。

[0139] 在涉及低和高频率超声施加的本发明的方法中,优选以连续模式施加超声的低频率组分和优选以脉冲模式施加高频率组分。

[0140] 术语“超声”描述 20kHz 和以上的声音频率,低超声频率为 20-500kHz,低频率超声能的空间平均功率密度为 20-500mW/cm²;高超声频率为 500kHz (0.5MHz)-3.5MHz,高频率超声能的空间平均功率密度为 0.5-3W/cm²。

[0141] 在本发明的方法中,通常束未被聚焦并且发散。皮肤温度的靶升高为最高达到 42 或 43°C,但优选不再高。皮肤的单个区域受超声波作用最少 5 分钟,优选 10 分钟,或 5-12 分钟之间的时间。

[0142] 在本发明的方法中,可使用任选地适合施加根据本发明的组合物到皮肤的手持施用器施加超声。例如,筒/分配器可附着到超声头上,从而当头在皮肤表面周围移动时,制剂被逐渐释放,筒可包含预定量的制剂。根据正被治疗的皮肤状况,可附着具有不同制剂的不同筒,例如,不同的筒可包含用于抗老化处理、疤痕、牵张痕(stretch-marked)皮肤或蜂窝组织处理的不同组合物。通过以圆形或线形冲程移动在皮肤上轻轻按摩超声施用器来施加超声。

[0143] 超声可作为预处理在施加本发明的组合物前施加。或者或另外地,可在施加超声

过程中或施加超声前将一层组合物或浸渍有组合物的材料施加到皮肤上。当使用施用器时,在皮肤上移动施用器,从而使得单个区域都不被过度暴露于超声,所述过度暴露于超声可能导致过热。超声和按摩作用提供的机械刺激的组合有助于刺激皮肤促进更新和修复。

[0144] 可通过在超声浴中浸没将要处理的区域来施加超声,例如,直接通过浸没裸露皮肤到本发明的组合物中,或通过用组合物涂敷皮肤,包上要被处理的部分,并浸没在可传输超声能的液体中。

[0145] 如上所述,用于施加超声到皮肤的装置可包括以间隔的构型在柔性材料中排列成阵列的多个超声转换器元件,其中超声转换器元件能在低和 / 或高频率下输送超声到皮肤区域。

[0146] 可在美容医疗中心中或在医学诊所如医院诊所中或在医生外科手术中进行使用这些方法的皮肤治疗。

[0147] 直径 2-3cm 的皮肤圆形区域应进行超声最少 5 分钟,优选 10 分钟,或 5 和 12 分钟之间的时间。

[0148] 当要在美容医疗中心中或医学诊所如医院或医生外科手术中进行皮肤治疗时,用于本发明方法的合适超声设备为本文所述的结合到面罩或补片内的超声阵列;或可产生低和高频率输出并具有被设计用于提供输出频率和能量组合的手持机的设备,如 Duo Son™ 单元 (Orthosonics, Devon UK)。Duo Son™ 单元可在电流规范 (表 2 中描述) 下使用,或在由频率、瓦特数和负载循环参数最优化规定的稍微改变规范下使用,以增强活性物质输送和细胞 / 蛋白质刺激。这种调整保持在单元 CE 标记准则的范围内。

[0149] 用于输送分子到皮肤的超声 (US) 或超声波导入法的有效性应归于它对皮肤作用的两个方面。首先,快速振动压力场产生空化,从而导致气泡形成和坍塌,这在机械上形成通过角质层的通道。第二个作用是实际直接加热声波穿过的材料,因为声能通过反射、吸收和分散而减弱。在皮肤中,由于它的异质性,这比在其它组织中发生超过最多 4 倍。已知加热破坏角质层中的脂双层系统,还有助于表皮的渗透性增加。

[0150] 表 2

[0151]

电 源		
输入	90V 260V ac (50/60Hz)	
输出	24V, 1.25A dc	
电池寿命	15分钟-2小时, 依赖于模式选择	
其它		
模式	仅LF, LF+HF (脉冲)	
重量	2kg	
尺寸	200 x250 x70 mm (w x d x h)	
等级	BF	
显示器	液晶显示器	
标准	IEC 61689 (96)	
	低频 45kHz	高频 1MHz
有效束辐射面积	16.3cm ²	0.38cm ²
束不均匀性比	<6	<6
束类型	发散	发散
功率设置	0.15W, 0.4W, 0.75W	0.07W, 0.14W
最大强度	100m W/cm ²	1 W/cm ² (420mW/cm ² 平均 脉冲)
操作模式	连续	脉冲, 20% 负载 循环

[0152] 基本上,通过加热和 / 或机械应力的联合和通过孔隙率增加来破坏细胞间脂质提高皮肤渗透性。已报道了到 50℃ 的温度升高 (20kHz, 10-30W/cm²), 但已表明小至 11℃ 的温度升高 (1MHz, 2W/cm²) 就会导致皮肤伤害。强度为 1W/cm² 的连续模式超声在 10 分钟内升高 3cm 深度处的组织温度到 40℃。已表明为了治疗有益, 组织必须达到 40-45℃ 的温度保持至少 5 分钟。当暴露于 1W/cm²-1MHz 超声时, 显示组织温度以 0.86℃ / 分钟的速度增加。

[0153] 已知超声用于降解聚合物, 并用于增加从这些聚合物中释放结合的药物。当对包括聚合物如多糖优选蛋白聚糖尤其是葡糖胺聚糖如 HA 的本发明组合物施加超声时, 超声将降解 (解聚) 聚合物。这有众多作用, 当组合物中存在 HA 时, 超声产生能更容易穿透皮肤的较短链 HA 聚合物。除了使用超声促进活性物质的渗透外, 重要的是使这类活性物质在作用部位的有效停留时间最大化。微血管能使物质从渗透部位移去以在肝脏中分解。停留时间的最优化对使活性物质具有所需的作用是必需的。当本发明的组合物包括聚合物如多

糖或蛋白聚糖尤其是葡糖胺聚糖如 HA 时,超声处理能帮助在皮肤内形成聚合物(例如 HA)的仓库,其可用作缓慢释放活性物质的库,从而提供延长的作用持续时间。

[0154] 超声还刺激组合物的活性成分的释放。超声也将用于解聚已穿透皮肤的聚合物多糖或蛋白聚糖尤其是葡糖胺聚糖如 HA。当组合物中存在 HA 和抗坏血酸时,抗坏血酸将促进 HA 的解聚,其中抗坏血酸与大气氧反应并刺激解聚。

[0155] 可与超声结合施加本发明的组合物,但这不是必需的,也可不施加超声将本发明的组合物施加到皮肤上。在优选的皮肤治疗方法中,每周一次、每两周一次或每月一次与超声结合(对要施加组合物的皮肤超声预处理,或在施加组合物到皮肤的过程中或之后超声处理皮肤)施加本发明的第一组合物。在超声处理皮肤后,可施加本发明的第二组合物,例如每天一次或每 12 小时一次,而不需要超声。第一和第二组合物可为相同的,或在组成上不同,但两者都为根据本发明的组合物。

[0156] 本发明还提供包括根据本发明的组合物的敷料,其可以以药膏、补片、凝胶补片绷带或泡沫形式存在。

[0157] 还提供试剂盒,其包括根据本发明的组合物,和任选地装置,所述装置包括超声源和/或任选用于施加超声到皮肤和/或施加组合物到皮肤的施用器。根据本发明的试剂盒适合于进行本文所述的本发明方法。试剂盒还可包括试剂盒的使用说明书。

[0158] 本发明提供根据本发明的组合物在美容皮肤状况治疗中的用途。还提供根据本发明的组合物在生产用于治疗美容皮肤状况的化妆品组合物中的用途,所述美容皮肤状况例如选自:疤痕形成、日光损伤的皮肤、老化皮肤、皱纹、粗糙、不规则色素沉着、毛细血管扩张、弹性组织变性、蜂窝组织、皮肤的桔皮外观;干燥皮肤状况、有鳞、痤疮、牵张痕;疹、皴裂、红肿皮肤;瑕疵、酒渣鼻、痤疮碎冰锥样痕、肥厚性瘢痕和瘢痕疙瘩,和脱发(hairloss)。

[0159] 本文使用的术语“美容皮肤状况”包括皮肤老化的病征,其包括但不限于由于皮肤老化引起的所有外部可见和可触知的能感觉到的表现以及任何其它宏观或微观作用。这种病征可由内在或外在因素诱发或引起,例如年代老化和/或环境损害(例如日光、UV、烟、臭氧、污染物、应激等)。这些病征可源于包括但不限于以下的过程:构造上不连续性如皱纹的生成,包括细的表面皱纹和粗的深皱纹,皮肤纹,面部皱眉纹,表情纹,皱纹,皮肤日晒病(dermatoheliosis),光损害,过早皮肤老化,缝,肿块,窝,大孔(例如,与附件结构如汗腺导管、皮脂腺或毛囊有关),“桔皮”皮肤外观,干燥,有鳞,成片性和/或皮肤不均匀或粗糙的其它形式;过度皮肤油性问题如油脂的过度产生、油性、面部发亮、基础穿透;异常脱皮(或表皮脱落)或异常表皮分化(例如异常皮肤周转)如有鳞、成片性、角化病、角化过度;皮肤增湿(或水合)不充分如由皮肤屏障损伤、环境干燥引起的;皮肤弹性丧失(功能皮肤弹性蛋白的丧失和/或灭活)如弹性组织变性、松垂(包括眼区域和下颌中的浮肿)、皮肤硬度丧失、皮肤紧致性丧失、皮肤从变形中弹回性丧失;非黑色素皮肤变色如黑眼圈(under-eye circle)、拙劣的(如由于例如酒糟鼻引起的不均匀红色着色)、灰黄色(苍白色)、毛细血管扩张引起的变色;黑色素相关的着色过度(或不均匀着色的)皮肤区域;发炎后着色过度如发炎事件(例如痤疮病变、向内生长的毛发、昆虫/蜘蛛叮咬或刺伤、划伤、切伤、伤口、擦伤等)后发生的那些;萎缩如但不限于与老化或类固醇使用有关的那种;皮肤组分如基质(例如透明质酸、糖胺聚糖等)的其它组织学或显微变化、胶原分解和结构变

化或异常（例如角质层、真皮、表皮、皮肤血管系统中的变化如毛细血管扩张）；对损伤如疥疮或瘙痒的组织响应；和对下面组织（例如皮下脂肪、蜂窝组织、肌肉、小梁、隔等）尤其是靠近皮肤的那些组织的改变。

[0160] 本发明还提供根据本发明的组合物在医学治疗中或作为药物的用途。因此，本发明的组合物被提供用作药物。还提供根据本发明的组合物在生产用于治疗医学皮肤状况的药物中的用途，所述医学皮肤状况例如选自：疤痕形成、晒斑、伤口、切口、擦伤、烧伤、烧伤疤痕形成、湿疹、皮炎、干燥皮肤状况、荨麻疹、牛皮癣。

[0161] 附图列表

[0162] 图 1(a)-(c) 显示了转换器元件阵列；图 1(d) 显示了具有双频性能的单个转换器元件。

[0163] 图 2(a)-(b) 显示了转换器元件。

[0164] 图 3A 显示了用于产生交替高和低频率的单个 DDS 芯片，其中在图 3B 中，高和低频率在独立的电路中产生。

[0165] 图 4 显示了局部 1 制剂对靠近真皮-表皮汇合处的原纤蛋白表达的作用。

[0166] 图 5 显示了局部 1 制剂对表皮中 MMP-1 表达的作用。

[0167] 图 6 显示了局部 1 制剂对表皮中 RAR α 表达的作用。

[0168] 图 7 显示了局部 1 制剂对表皮中 HSP72 表达的作用。

[0169] 图 8 显示了超声处理后局部 1 制剂对靠近真皮-表皮汇合处的原纤蛋白表达的作用。

[0170] 图 9 显示了超声处理后局部 1 制剂对表皮 MMP-1 表达的作用。

[0171] 图 10 显示了超声处理后局部 1 制剂对表皮 HSP72 表达的作用。

[0172] 图 11 显示了超声处理后局部 1 制剂对真皮簇集蛋白表达的作用。

实施例

[0173] 实施例 1 局部制剂“局部 1”

[0174] 局部 1 为包含以下组分的根据本发明的组合物：

[0175] 表 3

[0176]

组分	量 % w/w
透明质酸 (0.8-3MDa mol wt 范围)	1%
透明质酸 (1.5-1.8MDa mol wt 范围)	3%
乙醇	20%
抗坏血酸	3%
磷酸抗坏血酸酯三钠盐 (STAY C-50)	1%
肌肤	3%

N-乙酰基肌肽	1%
精氨酸	3%
无菌蒸馏水	到 100%

[0177] 实施例 2 斑贴试验

[0178] 将标准 4-天斑贴试验测定延长到 7-天时间段,以检查局部 1 制剂在吸留(occlusion)或用超声输送下对诱导原纤蛋白表达的作用,所述原纤蛋白表达作为改善光老化临床病征的机理。

[0179] 对具有前臂皮肤光老化临床迹象的受试者在吸留下施加以下产品到前臂的背面:

[0180] (1) 在包括 67.2%乙醇、30%丙二醇和 0.05%丁基羟基甲苯(防腐剂)和用去离子水补足到 100%的载体中配制的 0.025% t-RA(阳性对照),

[0181] (2) 只有上述载体,

[0182] (3) 局部 1 制剂。

[0183] 使用和不使用超声设备输送局部 1。

[0184] 在标准 4-天时间范围内施加阳性对照,有吸留地局部施加 0.025%全反式 RA,以有可能最小化有害副作用。

[0185] 原纤蛋白为乳突状真皮中弹性蛋白网络的主要成分,并在固定表皮到下面真皮中起重要作用。局部施加作为阳性对照的全反式视黄酸(t-RA)改善了光老化的临床病征。以前的工作已证实,在吸留下局部施加 t-RA 四天(4-天斑贴试验)产生原纤蛋白 mRNA 和蛋白质的显著增加,预示着非吸留局部施加几周后观察到的那些,从而提供了评价新治疗干预对皮肤作用的快速和方便手段。

[0186] 还可通过检查皮肤内的其它分子监控老化。先前的工作已鉴定了酶基质金属蛋白酶 1(MMP-1:对于细胞外基质重构是必需的)³表达和核类视黄醇受体视黄酸受体 α (RAR α :对于调节维生素 A 和其衍生物的作用是必需的)⁴的变化。评价了两种分子伙伴以鉴定消除异常蛋白的途径;它们是热激蛋白 -72(HSP72)⁵和细胞外伙伴蛋白簇集蛋白⁶。

[0187] 研究为开放临床研究;活组织检查的评估为随机和盲试。在已鉴定具有中度到重度光老化前臂皮肤的年龄 40-80 岁的 10 个受试者上进行研究。

[0188] 应用的入组标准为:

[0189] 年龄 40-80 岁;自愿接受光老化前臂皮肤检查;自愿在前臂上佩戴试验斑贴最长达 4 天;自愿接受四个试验部位每一个的 3mm 穿孔活组织检查(总共 4 次活组织检查);没有损害试验部位评价的疾病状态;未全身给药;在进入研究前的过去 6 个月和 12 个月内分别没有局部或全身施用类视黄醇;没有施用局部类固醇或其它局部药物两周;签署知情同意书。

[0190] 应用的排除标准为:

[0191] 在进入研究前 30 天内有使用试验药物或试验设备的历史;瘢痕疙瘩历史;妊娠或母乳喂养。

[0192] 研究过程包括获取历史记录和进行身体检查;对伸肌前臂光老化的严重程度在临

床上分级为 0-9 等级 (0 = 没有损伤 ; 9 = 最大光损伤) ; 得到书面、证明的知情同意书。进入研究的那些受试者具有 6 或更大的光损伤等级。

[0193] 材料和方法

[0194] 斑贴试验规程

[0195] 招募六个健康但光老化的女性志愿者 (年龄范围 52-79 岁) 。在标准 6mm 直径 Finn 室中分别施加试验物质到前臂的伸肌方位 : 它们是局部 1 制剂 (20 μ l / 室)、载体基底 (20 μ l / 室) 和 0.025% 全反式 RA (Retin- **A®** 乳膏, Janssen-Cilag Ltd., 20 μ l / 室)。另外, 取基线未处理的活组织检查作为参照点。在测定的第 1 和 4 天上施加制剂到干净皮肤上。在第 4 天施加全反式 RA 到未处理的部位上。在第 8 天, 移去 Finn 室, 并在 1% 利多卡因麻醉下从每个试验部位得到 3mm 穿孔活组织检查。将活组织检查包埋在 OCT 化合物 (Tissue- **Tek®**, Miles, IN, USA) 中并骤冻在液氮中。用 1x4/o ethilon 缝合活组织检查部位, 并通知受试者在 7-10 天之间返回以去掉缝合线。

[0196] 超声规程

[0197] 招募 10 个健康但光老化的志愿者 (男性 : 2 ; 女性 : 8 ; 年龄范围 : 40-79 岁) 。单独和借助超声设备 (Duo Son™ 单元, Orthosonics, Devon, UK) 施加局部 1 制剂到伸肌前臂上。同时施加低频率 (45kHz, 100mW/cm², 连续) 和高频率 (1MHz, 1W/cm² 平均脉冲, 脉冲 20% 循环) 10 分钟时间段, 在此期间, 在皮肤上移动超声输送头。处理在测定的第 1、4 和 7 天上进行。在第 8 天, 按如前所述, 从每个处理部位取 3mm 穿孔活组织检查。

[0198] 载玻片制备

[0199] 制备厚度为 10 μ m 的冷冻切片 (OTF 恒冷切片机, Bright Instruments Ltd.) 并在组织学分析前封固到明胶涂覆的载玻片上。

[0200] 免疫组织化学

[0201] 通过免疫组织化学测定已知在光老化皮肤中减少的大量细胞外基质 (ECM) 分子, 以详细描述局部 1 制剂的潜在作用和它的输送方法。结果的主要标记为靠近真皮 - 表皮汇合处 (DEJ) 的富含原纤蛋白的微原纤维的分布。还评估了表达 MMP-1 和 RAR α 的表皮角质形成细胞的数目。检查分子伙伴, HSP72 和簇集蛋白来评估可能的修复机理。

[0202] 对于每次分析, 在三个切片 (即 3 个切片 / 处理 / 患者) 的每一个中鉴定标记。

[0203] 切片最好被固定。在 tris 缓冲盐水 (TBS ; 100mM Tris, 150mM NaCl) 中水合后, 通过加入 0.5% **Triton®**-X 100 溶解切片 (10 分钟)。洗涤后, 通过在甲醇中与过量过氧化氢温育 (30 分钟) 来消除内源性过氧化物酶活性。在施加第一抗体前封闭 (block) 切片 (在 4°C 下过夜温育) 。将阴性对照与仅仅封闭或对照小鼠血清同时温育。温育后, 在施加合适的生物素化第二抗体前用 TBS 严格洗涤切片。使用市售试剂盒按照生产商说明书 (ABC Elite System, Vector Laboratory, Peterborough UK) 将其进一步缀合到酶辣根过氧化物酶上。使用 Vector **SG®** 作为色原定位抗体 (10 分钟温育, 在 TBS 中洗涤终止该反应。使用 Nuclear Fast Red 复染切片, 最后通过连续的醇脱水, 清洗并永久封固。

[0204] 表 4

[0205]

标记	宿主	克隆	固定	稀度
富含原纤蛋白的 微原纤维	小鼠 IgG	Neomarkers; 11C1.3	4% PFA	1:100
MMP-1	小鼠 IgG	癌基因; 41-1E5	4% PFA	1:100
RAR α	兔 IgG	Santa Cruz Biotechnologies	丙酮	1:100
HSP72	小鼠 IgG	Stressgen Biotechnologies	4% PFA	1:100
簇集蛋白	兔 IgG	Santa Cruz Biotechnologies	4% PFA	1:100

[0206] 定量

[0207] 对切片随机化,盲试,并在Nikon OPTIPHOT显微镜(Tokyo,日本)上检查。为了评价ECM组分,在5点半定量等级上评价免疫染色的程度,其中0=未染色,且4=最大染色。每个受试者每个部位检查四个切片(包括对照)。记下每个切片三个高功率场的免疫染色程度得分,并计算每个部位/试验区域的平均得分。

[0208] 对于细胞有关的染色,评价每个高功率场的阳性表皮角质形成细胞的数目,并计算每个部位/试验区域的平均得分。

[0209] 使用方差分析检验(ANOVA)的反复测量评价施加试验物质不同时间段后试验部位之间的分布差异的显著性。为了评价输送方法是否影响结果测量,使用成对斯氏t-检验检验数据。使用SPSS+软件(v11.5,SPSS Inc,IL USA)检验两种模型,其中在95%置信水平下取显著性。

[0210] 结果

[0211] 红斑

[0212] 所有志愿者都很好地耐受了斑贴试验规程。此外,全反式RA在施加部位处产生标记的红斑。使用局部1制剂没有观察到红斑。

[0213] 斑贴试验规程

[0214] 原纤蛋白-1IHC

[0215] 施加全反式RA(我们的“黄金”标准)在3/6志愿者中产生靠近DEJ的原纤蛋白-1沉积。局部1制剂造成4/6被试验志愿者原纤蛋白-1沉积增加,但增加到比使用全反式RA通常观察到的低的水平(图4)。

[0216] 表5

[0217]

原纤蛋白-1染色处理	平均	标准差
基线	1.1111	0.4608
载体	1.3241	0.6050
局部1制剂	1.3704	0.9930
全反式RA	1.8241	0.7985

[0218] $p > 0.05$, 不显著

[0219] MMP-1 IHC

[0220] 在表皮和真皮两者中观察 MMP-1 染色。总体上,在吸留下局部施加全反式 RA 4 天减少了表皮角质形成细胞中的 MMP-1 表达,尽管这没有达到显著性。局部 1 制剂的施加导致类似的减少水平 (图 5)。

[0221] 表 6

[0222]

MMP-1 染色处理	平均	标准差
基线	12.1650	6.4340
载体	7.9890	3.2898
局部 1 制剂	5.0093	4.2616
全反式 RA	5.3333	4.3165

[0223] $p > 0.05$, 不显著

[0224] RAR α IHC

[0225] 主要在表皮中观察 RAR α 染色。总体上,在吸留下局部施加全反式 RA 4 天显著减少了表皮角质形成细胞中的 RAR α 表达。局部 1 制剂的施加导致类似的减少水平,尽管在该数据集中没有达到显著性 (图 6)。

[0226] 表 7

[0227]

RAR α 染色处理	平均	标准差
基线	16.8370	6.7277
载体	10.1111	4.1407
局部 1 制剂	8.3611	5.1287
全反式 RA	6.0463	5.1090

[0228] $p > 0.05$, 不显著

[0229] HSP72

[0230] 主要在表皮中发现 HSP72,在其中观察到强染色。利用全反式 RA 的处理显著增加了表皮 HSP72 的表达,局部 1 制剂也是如此 (p 分别 = 0.005 和 0.012,图 7)。

[0231] 表 8

[0232]

HSP72 染色处理	平均	标准差
------------	----	-----

基线	56.18	8.55
载体	63.61	4.83
局部 1 制剂	74.08 *	17.49
全反式 RA	77.03 **	15.44

[0233] * $p = 0.012$

[0234] ** $p = 0.005$

[0235] 超声规程

[0236] 原纤蛋白 -1

[0237] 通过没有吸留的基本局部施加或通过超声设备进一步将局部 1 制剂施加到光老化的伸肌前臂上。在所有这些的研究 ($n = 10$) 中,通过超声输送导致靠近真皮 - 表皮汇合处的原纤蛋白沉积显著增加 (图 8)。

[0238] 表 9

[0239]

原纤蛋白 -1 染色处理	平均	标准差
局部	1.8272	0.8698
超声	2.6065 *	1.0052

[0240] * $p = 0.033$

[0241] MMP-1

[0242] 在表皮和真皮两者中观察 MMP-1 染色。在超声处理后,在表皮角质形成细胞中存在轻微不显著的 MMP-1 表达减少 (图 9)。

[0243] 表 10

[0244]

MMP-1 染色处理	平均	标准差
局部	114.71	22.03
超声	107.46	31.96

[0245] $p > 0.05$, 不显著

[0246] HSP72

[0247] 超声处理后, HSP72 表现出轻微但不显著的表皮表达增加 (图 10)。

[0248] 表 11

[0249]

HSP72 染色处理	平均	标准差
------------	----	-----

局部	56.31	16.58
超声	67.57	16.41

[0250] $p > 0.05$, 不显著

[0251] 簇集蛋白

[0252] 超声处理后, 簇集蛋白也表现出轻微但不显著的真皮表达增加 (图 11)。

[0253] 表 12

[0254]

簇集蛋白染色处理	平均	标准差
局部	1.80	0.98
超声	1.95	1.00

[0255] $p > 0.05$, 不显著

[0256] 总结

[0257] 使用超声设备施加局部 1 制剂显著增加了靠近光老化皮肤的真皮-表皮汇合处的原纤蛋白沉积。

[0258] 局部 1 制剂和全反式 RA 都调节 HSP72 表达。另外, 局部 1 制剂的超声输送还导致 HSP72 表达增加。可能增加的热激蛋白表达有益于皮肤, 这通过“启动”细胞应付环境应激物 (刺激作用)。因此, 表皮角质形成细胞的 HSP72 表达增加可能参与了损伤后的细胞修复过程。

[0259] 数据表明, 施加这种制剂后, 光老化皮肤的表皮中 MMP-1 和 RAR α 表达减少, 这支持它适用于老化皮肤的处理。

[0260] 另外, 在涉及基于超声的皮肤处理的效力的试验过程中进行以下非定量观察。尽管由于试验的规程结构而不可直接比较, 但用超声施加的局部 1 制剂似乎诱导了与类视黄醇制剂类似的原纤蛋白水平。仅仅局部 1 制剂和用超声施加的局部 1 制剂没有诱导红斑或表皮增生, 与类视黄醇制剂不同。预先用超声处理的活组织检查部位处的疤痕形成程度明显低于所有其它部位处的疤痕形成。

[0261] 参考文献

[0262] 1. Watson REB, Griffiths CEM, Craven NM, Shuttleworth CA, Kielty CM. Fibrillin-rich microfibrils are reduced in photoaged skin: Distribution at the dermo-epidermal junction. J Invest Dermatol, 112:782-787, 1999

[0263] 2. Watson REB, Craven NM, Kang S, Jones CJP, Kielty CM, Griffiths CEM. A short term screening protocol, using fibrillin-1 as a receptor molecule for photoageing repair agents. J Invest Dermatol, 116:672-678, 2001

[0264] 3. Brennan M, Bhatti H, Nerusu KC, Bhagavathula N, Kang S, Fisher GJ, Varani J, Voorhees JJ. Matrix metalloproteinase-1 is the major collagenolytic enzyme responsible for collagen damage in UV-irradiated human skin. Photochem Photobiol, 78:43-48, 2003

[0265] 4. Watson REB, Ratnayaka JA, Brooke RC, Yee-Sit-Yu S, Ancian P, Griffiths CEM. Retinoic acid receptor alpha expression and cutaneous ageing. Mech Ageing Dev, 125 :465-473, 2004

[0266] 5. Jantschitsch C, Trautinger F. Heat shock and UV-B-induced DNA damage and mutagenesis in skin. Photochem Photobiol Sci. 2 :899-903, 2003

[0267] 6. Debure L, Vayssiere JL, Rincheval V, Loison F, Le Drean Y, Michel D. Intracellular clusterin causes juxtannuclear aggregate formation and mitochondrial alteration. J Cell Sci. 116 :3109-3121, 2003

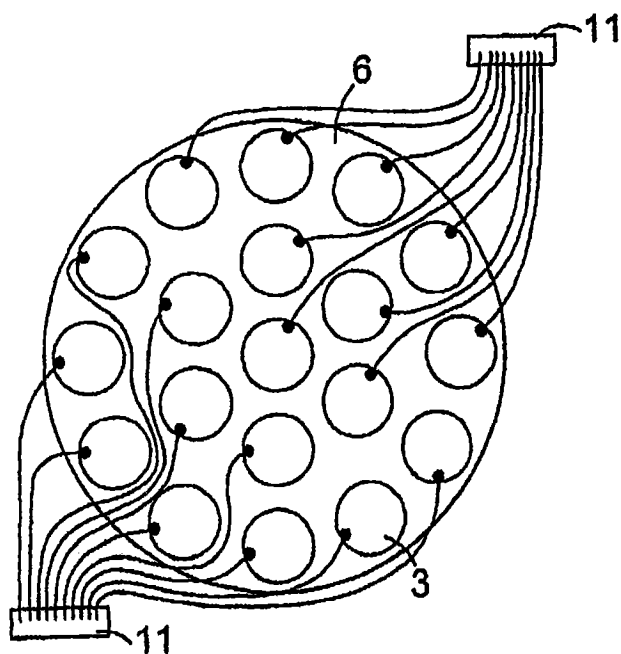


图 1(a)

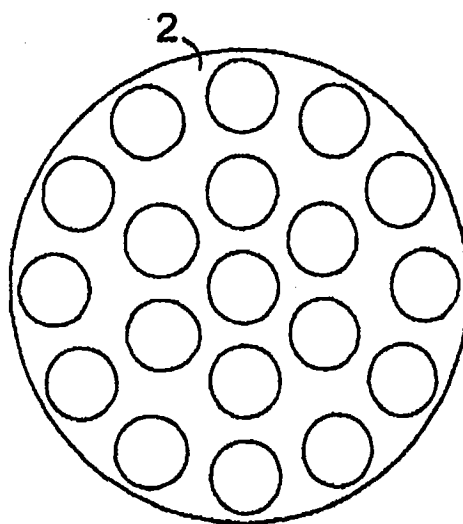


图 1(b)

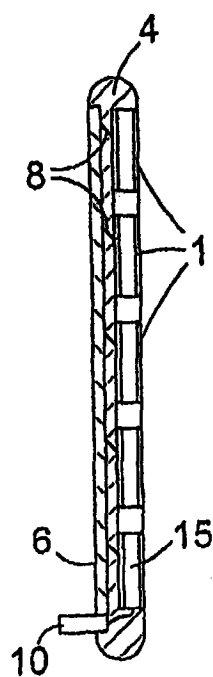


图 1(c)

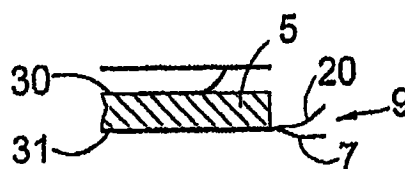


图 1(d)

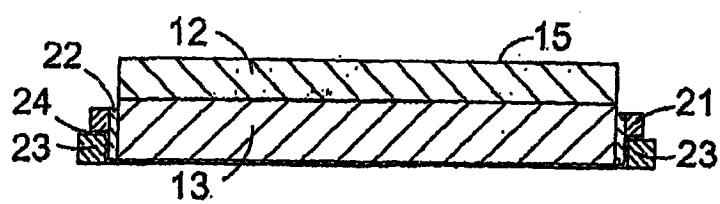


图 2a

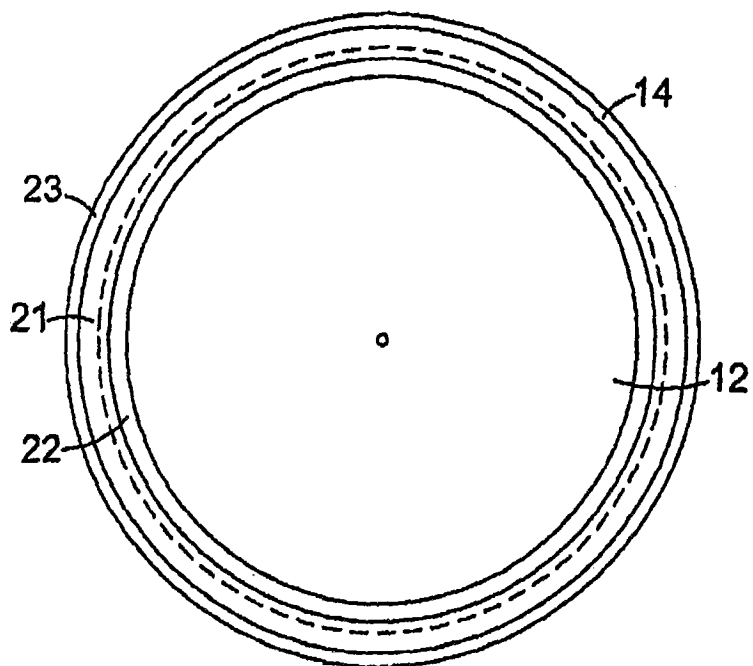


图 2b

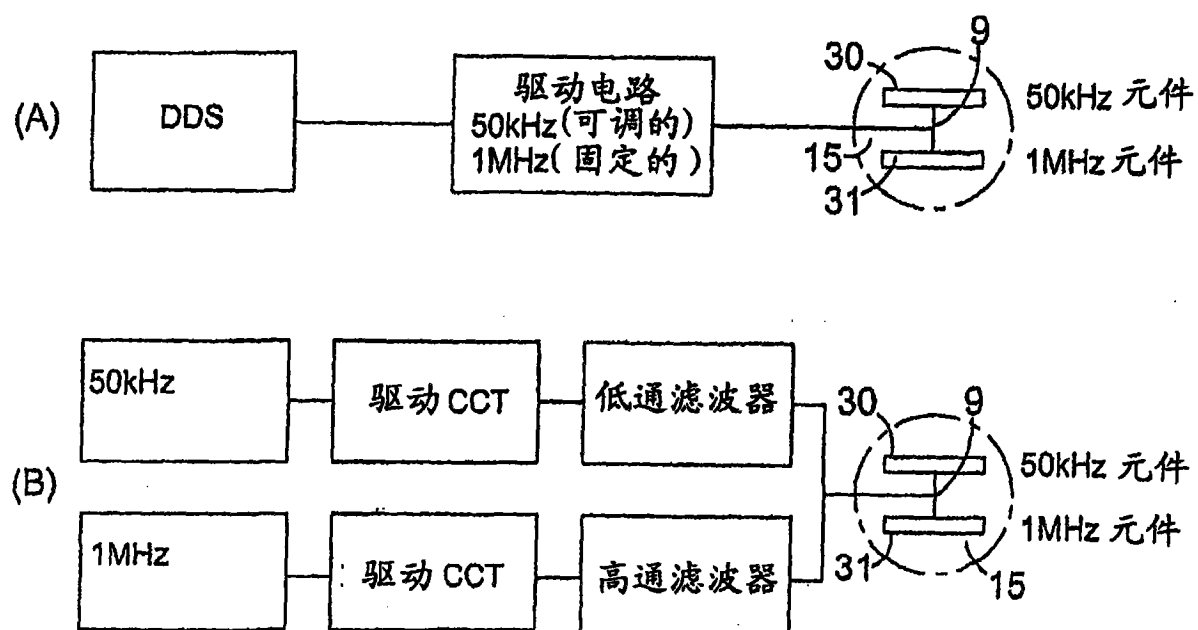


图 3

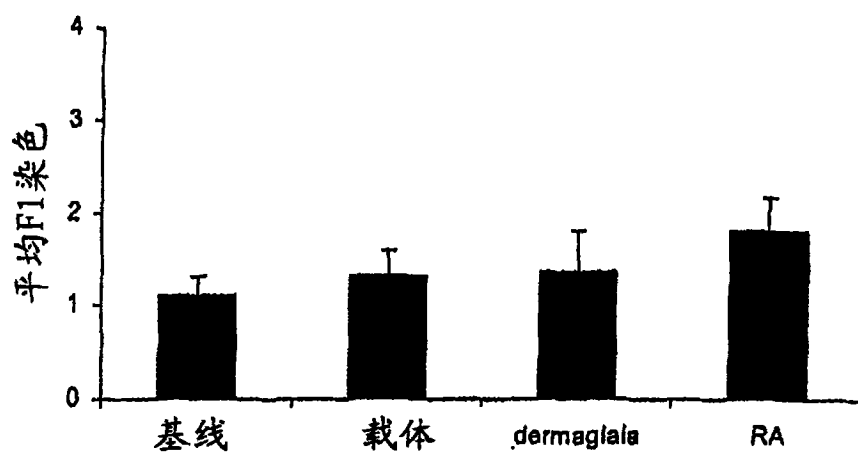


图 4

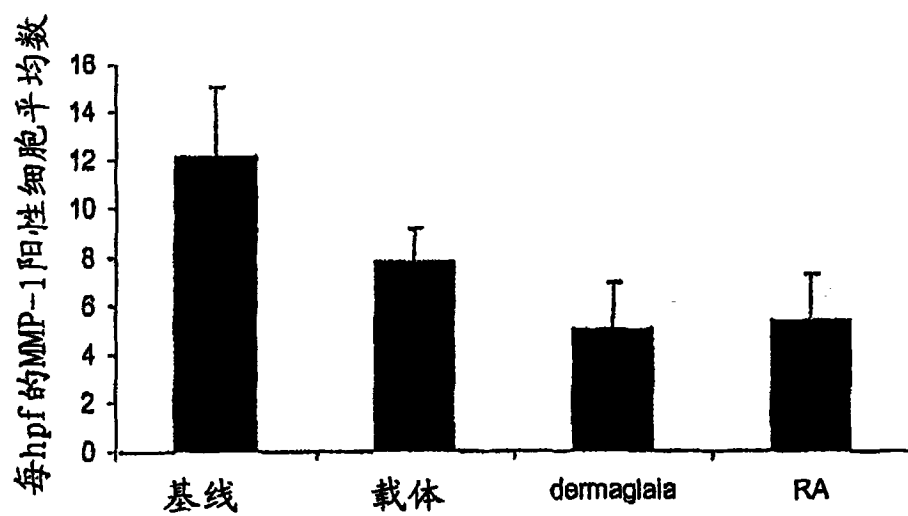


图 5

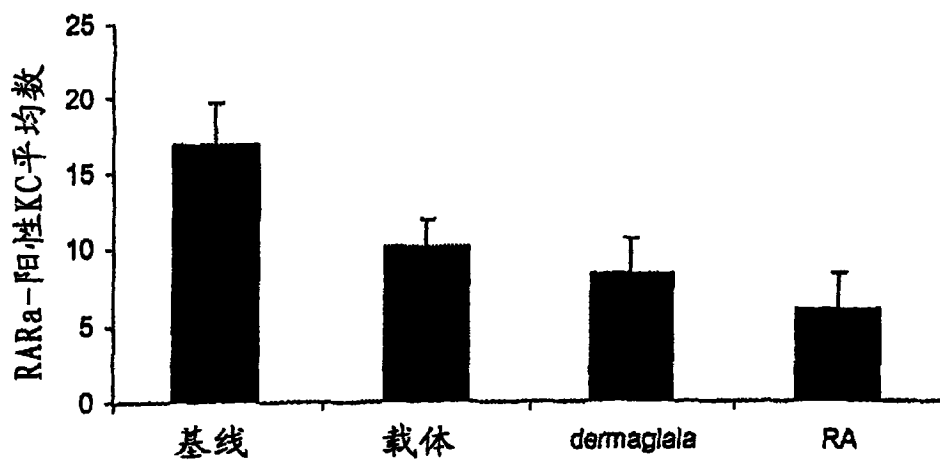


图 6

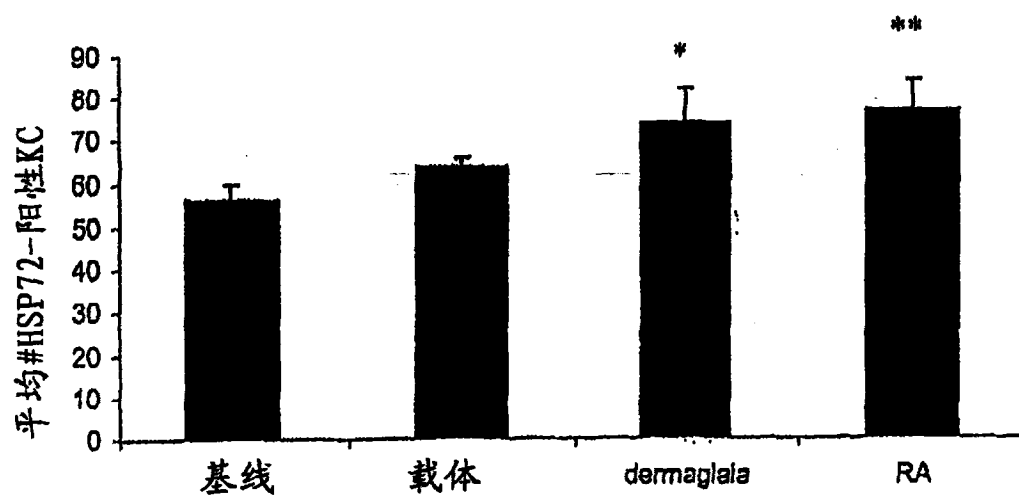


图 7

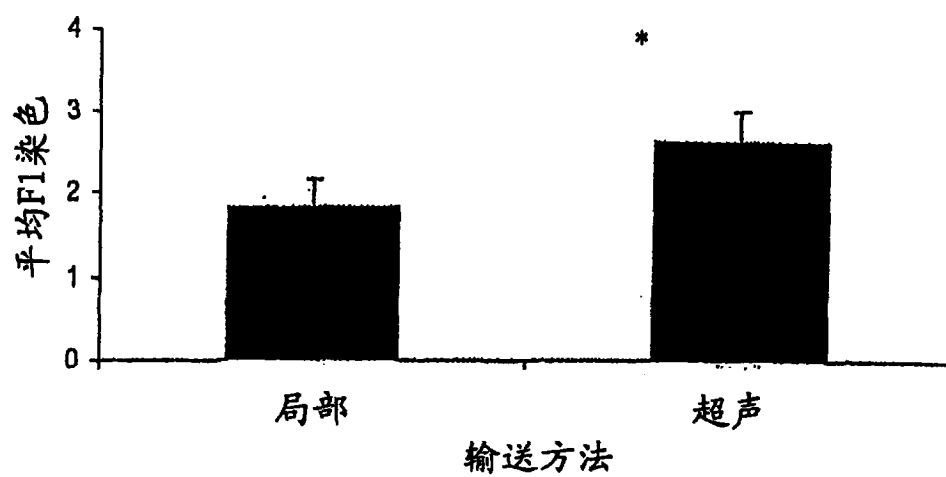


图 8

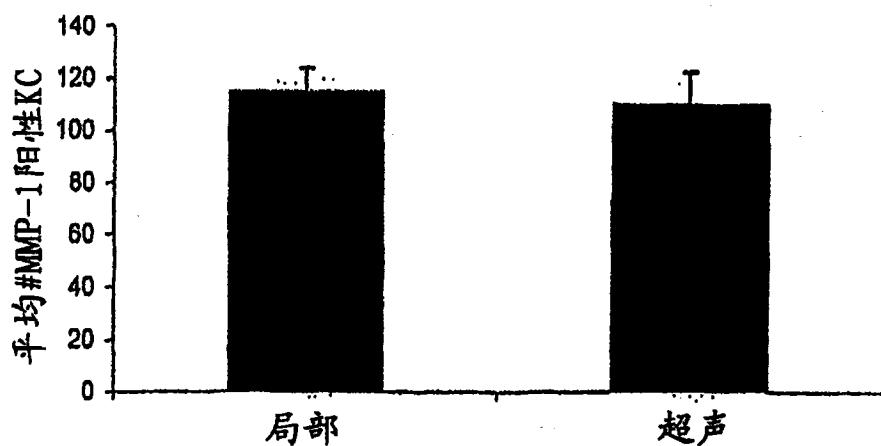


图 9

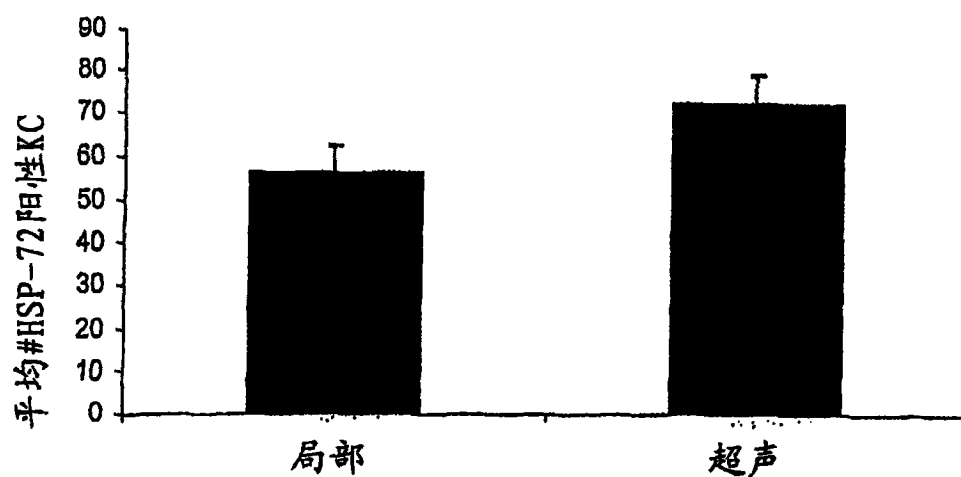


图 10

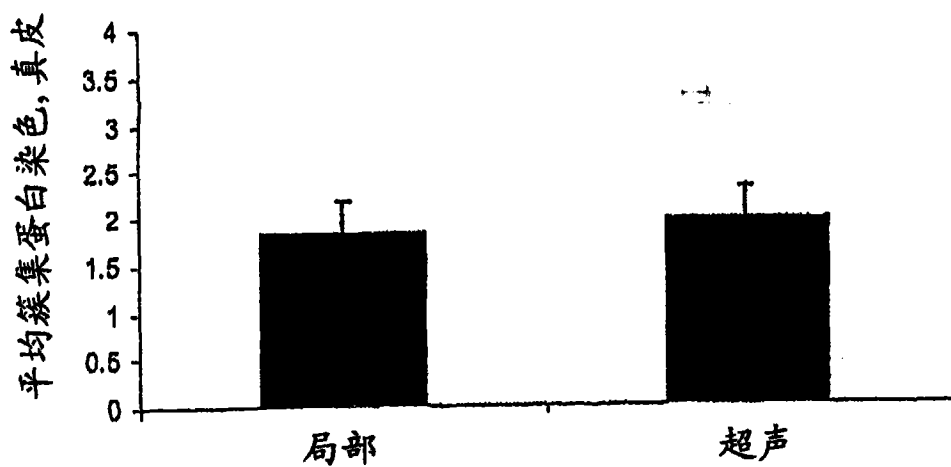


图 11