



(12)发明专利

(10)授权公告号 CN 104379177 B

(45)授权公告日 2017.07.04

(21)申请号 201380014970.0

(22)申请日 2013.03.07

(65)同一申请的已公布的文献号

申请公布号 CN 104379177 A

(43)申请公布日 2015.02.25

(30)优先权数据

61/613212 2012.03.20 US

(85)PCT国际申请进入国家阶段日

2014.09.18

(86)PCT国际申请的申请数据

PCT/US2013/029696 2013.03.07

(87)PCT国际申请的公布数据

W02013/142088 EN 2013.09.26

(73)专利权人 赫里克斯生物医疗公司

地址 美国华盛顿州

(72)发明人 L.张 R.卡迈克尔

(74)专利代理机构 中国专利代理(香港)有限公司 72001

代理人 杜艳玲 梁谋

(51)Int.Cl.

C07K 5/078(2006.01)

A61K 38/05(2006.01)

A61K 47/12(2006.01)

A61P 17/10(2006.01)

A61P 17/00(2006.01)

A61P 31/04(2006.01)

A61P 15/02(2006.01)

(56)对比文件

US 2007/0231284 A1, 2007.10.04,

US 2007/0231284 A1, 2007.10.04,

US 2010/0160213 A1, 2010.06.24,

审查员 湛侃

权利要求书1页 说明书17页

(54)发明名称

短抗微生物脂肽

(57)摘要

本发明公开了具有生物活性及治疗活性的肽。具体公开了展现抗微生物活性的KPV或KdPT的脂化二肽或三肽类似物。具体而言,本发明的肽提供比基础三肽,赖氨酸-脯氨酸-缬氨酸及赖氨酸-d-脯氨酸-酪氨酸增强的抗微生物活性。所公开的肽具有通式 C_{12-18} 脂质-KXZ-NH₂,其中K是赖氨酸;X是脯氨酸、d-脯氨酸、组氨酸或精氨酸;Z是任选地且如果存在则Z是缬氨酸、苏氨酸、丙氨酸或亮氨酸;且末端COOH是NH₂酰胺化的。该 C_{12-18} 脂质优选是月桂酸(C12)、肉豆蔻酸(C14)、十五烷酸(C15)、棕榈酸(C16)或硬脂酸(C18)的脂质部分。本发明进一步涉及使用这些肽来治疗侵袭皮肤及其它相关粘膜体表(例如口腔)的多种损伤、发炎或细菌感染的方法。

1. 包括下式中的至少一种肽和医药上可接受的载体的组合物在制备用于预防或治疗哺乳动物皮肤或粘膜组织的微生物感染的药物中的用途:

C₁₂₋₁₈脂质-赖氨酸-脯氨酸-NH₂; 或

C₁₂₋₁₈脂质-赖氨酸-d-脯氨酸-NH₂。

2. 如权利要求1的用途, 其中所述C₁₂₋₁₈脂质是月桂酸(C12)、肉豆蔻酸(C14)、十五烷酸(C15)、棕榈酸(C16)或硬脂酸(C18)的脂质部分。

3. 如权利要求1或2的用途, 其中所述肽是

棕榈酰基-赖氨酸-脯氨酸-NH₂;

棕榈酰基-赖氨酸-d-脯氨酸-NH₂;

肉豆蔻酰基-赖氨酸-d-脯氨酸-NH₂; 或

十五烷酰基-赖氨酸-d-脯氨酸-NH₂。

4. 如权利要求1或2的用途, 其中所述肽是以介于0.1 μg/mL至50 μg/mL范围内的浓度存在。

5. 如权利要求1或2的用途, 其中所述组合物是呈以下形式: 气溶胶、化妆品制剂、液体、乳霜、糊剂、软膏、粉剂或泡沫剂。

6. 如权利要求1或2的用途, 其中所述微生物感染是痤疮、异位性皮炎、酒渣鼻、细菌性阴道炎、头皮屑或足癣。

7. 如权利要求1或2的用途, 其中所述微生物感染是体味、口臭或齿龈病的原因。

8. 如权利要求1或2的用途, 其中所述组合物是呈以下形式: 喷雾剂、乳液或洗剂。

短抗微生物脂肽

[0001] 本申请要求2012年3月20日提交的美国临时申请号61/613,212的优先权益,其通过引用整体并入本文。

技术领域

[0002] 本发明涉及具有生物活性及治疗活性的肽。具体而言,本发明涉及展现抗微生物活性的KPV或KdPT的脂化二肽或三肽类似物。具体而言,本发明的肽提供比基础三肽,赖氨酸-脯氨酸-缬氨酸和赖氨酸-d-脯氨酸-酪氨酸增强的抗微生物活性。本发明进一步涉及使用这些肽来治疗侵袭皮肤及其它相关体表(例如口腔)的多种损伤、发炎或细菌感染的方法。

[0003] 发明背景

[0004] 数十年来研究者一直致力于开发抗微生物治疗和试剂。最近,存在对用于治疗数目渐增的耐药性细菌、病毒及真菌感染的新的抗微生物剂的需求。

[0005] 在科学文献和已颁布专利二者中已报道多种生物活性肽。肽在历史上已从天然来源分离,且最近已成为结构-功能关系研究的对象。此外,天然肽已充当设计合成肽类似物的起点。

[0006] 有多个专利描述了含有短肽的化妆品组合物。例如,美国专利号6,492,326提出了含有五肽和皮肤护理活性成份的皮肤护理组合物的制备和用途。

[0007] Strom等人2003 (*Journal of Medicinal Chemistry* 46: 1567-1570)描述含有化学修饰的抗细菌短肽,主要集中于极短肽(二聚体和三聚体)。也描述了某些六肽。然而,并未测试或讨论这些六肽的抗微生物活性。

[0008] α -促黑激素(α -MSH)是具有有效抗炎活性的13-氨基酸神经肽。其是通过较大前体分子前阿黑皮素(pre-opiomelanocortin)的翻译后加工来产生。已证实 α -MSH的羧基末端三肽(由残基11至13构成) KPV在体内和体外发挥抗炎活性(Brzoska, T., Luger, T.A.等人, α -melanocyte-stimulating hormone and related tripeptides: biochemistry, anti-inflammatory and protective effects in vitro and in vivo, and future perspectives for the treatment of immune-mediated inflammatory diseases. *Endocrine Reviews* 2009. 29 (5): 581-602)。已描述了结构相关衍生物KdPT (KPT)与IL-1 β 的残基193-195共线且似乎能够与IL-1 I型受体相互作用(Luger T.A.及Brzoska T. α -MSH related peptides: a new class of anti-inflammatory and immunomodulating drugs. *Ann Rheum Dis* 2007; 66 (增刊III): iii52-iii55)。有一篇报道提出,KPV对金黄色葡萄球菌(*S. aureus*)及白色念珠菌(*C. albicans*)具有抗微生物影响但并未确定MIC (Cutuli M等人,2000, antimicrobial effects of α -MSH peptides, *J. Leukocyte Biology*, 67:233-239)。与KPV不同,从未报道KdPT三肽具有抗微生物影响。

[0009] 因此,本领域需要开发具有针对众多微生物(包含革兰氏(gram)阴性及革兰氏阳性细菌)的宽范围有效抗微生物活性的肽。抗微生物肽的制造成本对医药及化妆品应用而言也是关键考虑因素。我们在本发明中公开了有成本效益的抗微生物短肽,其可在医药或

化妆品组合物中使用,用于局部治疗或管控与细菌及真菌感染相关的皮肤状况。

发明内容

[0010] 本发明涉及展现抗微生物活性的KPV或KdPT的脂化二肽或三肽类似物。具体而言,本发明的肽提供比基础三肽赖氨酸-脯氨酸-缬氨酸及赖氨酸-d脯氨酸-酪氨酸增强的抗微生物活性。分离肽的目标抗细菌活性是针对那些侵袭皮肤及相关粘膜表面的细菌。尽管不欲限于任何具体机制,但本发明肽能够通过抑制细菌生长和抑制与细菌感染相关的发炎来促进皮肤健康。

[0011] 本发明的一个实施方案是关于以下通式的脂化二肽或三肽:

[0012] C_{12-18} 脂质-KXZ-NH₂,

[0013] 其中K是赖氨酸;X是脯氨酸、D-脯氨酸(脯氨酸的D-异构体)、组氨酸或精氨酸;Z是任选的,且如果存在则Z是缬氨酸、苏氨酸、丙氨酸或亮氨酸;且末端COOH经NH₂酰胺化。该肽是经 C_{12-18} 脂质脂化且优选是经以下酸的脂质部分:月桂酸(C12)、肉豆蔻酸(C14)、十五烷酸(C15)、棕榈酸(C16)或硬脂酸(C18)。十五烷酰基及棕榈酰基是最优选的脂质基团。

[0014] 优选的脂化二氨基酸及三氨基酸包含

[0015] C_{12-18} 脂质-赖氨酸-脯氨酸-缬氨酸-NH₂;

[0016] C_{12-18} 脂质-赖氨酸-d-脯氨酸-苏氨酸-NH₂;

[0017] C_{12-18} 脂质-赖氨酸-脯氨酸-丙氨酸-NH₂;

[0018] C_{12-18} 脂质-赖氨酸-脯氨酸-亮氨酸-NH₂;

[0019] C_{12-18} 脂质-赖氨酸-脯氨酸-NH₂;

[0020] C_{12-18} 脂质-赖氨酸-d-脯氨酸-NH₂;

[0021] C_{12-18} 脂质-赖氨酸-组氨酸-NH₂;及

[0022] C_{12-18} 脂质-赖氨酸-精氨酸-NH₂。

[0023] 本发明的另一实施方案是关于含有医药上或化妆品上可接受的载体和一或多种上述肽的组合物。这些组合物中的肽浓度优选介于约0.1 μ g/mL至约20 μ g/mL或约0.1 μ g/mL至约10% (w/v) 范围内。适于局部应用的优选组合物形式是气溶胶、乳液、液体、水溶液、洗剂、乳霜、糊剂、软膏、粉剂及泡沫剂。

[0024] 本发明还涉及使用上述组合物来治疗或预防哺乳动物皮肤的微生物感染的方法。通常,治疗方法意味着向皮肤(表皮)及相关粘膜组织的受侵袭区域施用有效量的含肽组合物且保持有效时间量。当细菌感染是由选自痤疮丙酸杆菌(*P. acnes*)、金黄色葡萄球菌、大肠杆菌(*E. coli*)及白色念珠菌的细菌引起时也可使用这些方法。

[0025] 此外,本发明的肽及含有这些肽的组合物可提供纳入一般皮肤护理及化妆品制剂(例如各种皮肤化妆品、皮肤乳霜、洗剂、防晒剂及治疗性洗剂或乳霜(例如抗痤疮制剂))中的有用特征。

[0026] 发明详述

[0027] 为更充分理解本文所描述的本发明,进行以下详细描述。本发明一般性涉及包括以下通式的KPV或KdPT的抗微生物脂化二肽或三肽类似物的组合物及方法:

[0028] C_{12-18} 脂质-KXZ-NH₂,

[0029] 其中K是赖氨酸;X是脯氨酸、d-脯氨酸、组氨酸或精氨酸;Z是任选的,且如果存在

则Z是缬氨酸、苏氨酸、丙氨酸或亮氨酸；且末端COOH经NH₂酰胺化。

[0030] 可用来提供本发明化合物的C₁₂₋₁₈脂质组份的饱和或不饱和脂肪酸的实例包含：

[0031]

系统名	常用名	简写名
十二烷酸	月桂酸	12:0
十四烷酸	肉豆蔻酸	14:0
十六烷酸	棕榈酸	16:0
十七烷酸	珠光脂(曼陀罗)酸	17:0
十八烷酸	硬脂酸	18:0
9-顺-十四碳烯酸	肉豆蔻油酸	14:1 (n-5)
9-顺-十六碳烯酸	棕榈油酸	16:1 (n-7)
6-顺-十六碳烯酸	Sapienic acid	16:1 (n-10)
全顺-7,10,13-十六碳三烯酸		16:3 (n-3)
9-顺-十八碳烯酸	油酸	18:1 (n-9)
全顺-9,12-十八碳二烯酸	亚麻油酸	18:2 (n-6)

[0032] α -促黑激素(α -MSH)是具有有效抗炎活性的13-氨基酸神经肽。其是通过较大前体分子前阿黑皮素的翻译后加工来产生。已证实 α -MSH的羧基末端三肽(包括残基11至13)KPV在体内和体外发挥抗炎活性(Brzoska, T., Luger, T.A.等人, α -melanocyte-stimulating hormone and related tripeptides: biochemistry, anti-inflammatory and protective effects in vitro and in vivo, and future perspectives for the treatment of immune-mediated inflammatory diseases. Endocrine reviews 2009. 29 (5): 581-602)。已描述了结构相关衍生物KdPT (KPT)与IL-1 β 的残基193-195共线且似乎能够与IL-1 I型受体相互作用(Luger T.A.及Brzoska T. α -MSH related peptides: a new class of anti-inflammatory and immunomodulating drugs. Ann Rheum Dis 2007; 66 (增刊III): iii52-iii55)。有一篇报道提出, KPV对金黄色葡萄球菌及白色念珠菌具有抗微生物影响但未确定MIC (Cutuli M等人, 2000, antimicrobial effects of α -MSH peptides, J. Leukocyte Biology, 67:233-239)。与KPV不同, 从未报道KdPT三肽具有抗微生物影响。

[0033] 我们使用CLSI (Clinical and Laboratory standard Institute)推荐的用于抗微生物剂的标准方案(Methods for Dilution Antimicrobial Susceptibility Tests for Bacteria That Grow Aerobically; Approved Standard-第9版)来进行最低抑制浓度(MIC)确定。令人惊奇地是, KPV与KdPT在至多达2000 μ g/ml浓度下都不显示针对大肠杆菌、金黄色葡萄球菌或酵母菌的可检测的MIC。该较差抗微生物概况使得两种三肽远不符合期望用于需要抗微生物活性的治疗或化妆品应用。

[0034] 我们经由用不同长度的脂质对KPV及KdPT的 α 氨基实施N末端乙酰化来修饰两种肽。该修饰产生具有针对广谱微生物的新的、优良且出乎意料的抗微生物活性的分子。所得脂三肽显示令人惊奇地优于亲本肽的抵抗革兰氏阴性及革兰氏阳性细菌及酵母菌的抗微生物活性。脂质长度也影响该活性且我们发现, 具有碳数目介于12至18范围内的脂质最有

效。脂化后, MIC在Muller Hinton培养液中显著改良, 针对痤疮丙酸杆菌、金黄色葡萄球菌、大肠杆菌及白色念珠菌的MIC介于1 $\mu\text{g/ml}$ 至64 $\mu\text{g/ml}$ 范围内。用A或L替换Pal-KPV-NH₂中的第三残基保留抗微生物活性且此发现促使我们从KPV或KdPT移除第三氨基酸残基。所得脂二肽Pal-KP-NH₂、Pal-K-dP-NH₂都显示新的抗微生物活性。此外, KP-NH₂与KdP-NH₂二者在人类皮肤角质细胞中针对组胺诱导的IL-6表达显示中等抗炎活性(数据未显示)。我们进一步用V、A、F、G、S、H、K、I、L、D、R、S、W或Y取代第二残基P或dP。此工作提供了一组具有从未报道过的具有新的抗微生物活性的脂二肽。在医药或化妆品制剂中可将该抗微生物活性转变成治疗应用。

[0035] 总之, 本发明是基于以下发现: 衍生自KPV的特定脂二肽及脂三肽, 其是由脂质-KXZ组成, 其中脂质可合意地选自棕榈酰基-、月桂酰基-、肉豆蔻酰基-、十五烷酰基及硬脂酰基-; 且x可选自呈L-或D-对映异构形式的P、G、I、H及R, Z是任选的且如果存在则Z是羧基末端酰胺化的V、T、A或L。这些短脂肽是针对包含以下的革兰氏阳性及革兰氏阴性细菌的新的抗微生物剂: 大肠杆菌 (*E. coli*)、金黄色葡萄球菌 (*S. aureus*)、痤疮丙酸杆菌 (*P. acnes*)、皮癣菌 (dermatophyte, 例如发癣菌 (*Trichophyton spp.*)) 及酵母菌念珠菌 (*Candida spp.*, 包含白色念珠菌、光滑念珠菌 (*C. glabrata*) 及热带念珠菌 (*C. tropicalis*))。

[0036] 缩写关键词: 以上所列示的脂质是使用标准肽化学经由酰胺键与二肽或三肽偶联: myr=肉豆蔻酸, pen=十五烷酸, pal=棕榈酸, ste=硬脂酸, lau=月桂酸。氨基酸的右旋形式缩写成“d”, 例如脯氨酸的右旋形式是d-脯氨酸。此外, 氨基酸的缩写遵循常规用法:

[0037]

丙氨酸	Ala	A
精氨酸	Arg	R
天冬酰胺	ASN	N
天冬氨酸	Asp	D
半胱氨酸	Cys	C
谷氨酸	Glu	E
谷氨酰胺	Gln	Q
甘氨酸	Gly	G
组氨酸	His	H
异亮氨酸	Ile	I
亮氨酸	Leu	L
赖氨酸	Lys	K
甲硫氨酸	Met	M
苯丙氨酸	Phe	F
脯氨酸	Pro	P
丝氨酸	Ser	S
苏氨酸	Thr	T
色氨酸	Trp	W
酪氨酸	Tyr	Y

缬氨酸	Val	V
-----	-----	---

[0038] 用于医药配制及施用的技术的细节可参见最新版的 Remington's Pharmaceutical Sciences (Mack Publishing公司, Easton Pa.)。尽管希望经由局部表面递送,但仍有其它递送方式,例如:经口、胃肠外、气溶胶、肌内、皮下、经皮、髓内、鞘内、心室内、静脉内、腹膜内或鼻内施用。本发明可配制在多种载体媒介物中,例如喷雾剂;气溶胶;水包油型乳液;油包水型乳液;面霜或身体乳霜;防晒洗剂或晒后洗剂;或其它局部施用媒介物。此外,本发明的肽及含有这些肽的组合物可提供有用特征,用于纳入一般皮肤护理及化妆品制剂(例如各种皮肤化妆品、皮肤乳霜、洗剂、防晒剂及治疗性洗剂或乳霜(例如抗痤疮制剂))中。

[0039] 如本文所使用,术语“治疗剂”意指用于治疗、抵抗、改善、预防或改良患者的不期望状况或疾病的制剂。本发明所治疗状况包括多种通常侵袭诸如人类等哺乳动物的皮肤或粘膜区域的细菌感染。当由选自痤疮丙酸杆菌、金黄色葡萄球菌、大肠杆菌及白色念珠菌的细菌或真菌引起细菌感染时,这些方法也是可用的。

[0040] 根据所涵盖的具体应用,可将本发明所提供的医药组合物配制成溶液、悬浮液、胃肠外制剂、软膏、乳霜、洗剂、喷雾剂、粉剂或片剂胶囊。胃肠外制剂可包含媒介物,例如经过特别蒸馏的无热原水、磷酸盐缓冲液或生理食盐水。软膏、乳霜、洗剂及喷雾剂可包含诸如植物油或矿物油、白石蜡脂或高分子量(即大于C₁₂)醇等载体。片剂或胶囊可包含稀释剂(例如乳糖)、粘合剂、润滑剂(例如硬脂酸)及崩解剂(例如玉米淀粉)。

[0041] 含有有效量活性剂的口用喷雾剂也可使用一或多种本发明脂化肽配制。可将此材料作为抗微生物剂,每天在牙齿及牙龈表面的各四分象限上喷雾0.25 ml至0.5 ml份量1次至3次。在假牙佩戴者的情形下,可每天带上假牙之前将喷雾剂直接用于假牙表面。若需要,可提供含有有效量抗微生物剂的漱口水制剂。

[0042] 本发明组合物也可包含医药上或皮肤病学上可接受的载体。载体的实例包含乳液及凝胶。乳液通常是油相与水相的混合物。组合物也可包括磨砂膏(exfoliant abrasive)材料。组合物也可包括稳定剂。组合物也可包括控泡化合物。

[0043] 组合物也可包含一或多种其它皮肤护理活性组份。皮肤护理活性组份的实例包含脱屑活性物质、抗痤疮活性物质、维生素B3化合物、类视色素(包含视黄醇、视黄醛、视黄醇酯、视黄醇丙酸酯、视黄酸及视黄醇棕榈酸酯)、羟酸、自由基捕获剂、螯合剂、抗炎剂、局部麻醉剂、防晒活性物质(tanning active)、亮肤剂、溶脂剂、类黄酮、抗微生物活性物质、皮肤愈合剂、抗真菌活性物质、茵绿烯醇(farnesol)、植烷三醇、尿囊素、水杨酸、烟酰胺、右泛醇、生育酚乙酸酯及葡糖胺。

[0044] 组合物也可包含防晒剂化合物。防晒剂化合物的实例包含无机防晒剂化合物及有机防晒剂化合物。无机防晒剂化合物可包含金属氧化物,例如氧化锌、氧化钛及氧化铁。有机防晒剂化合物可包含甲氧基肉桂酸辛基酯、水杨酸辛基酯、对苯二亚甲基二樟脑磺酸、阿伏苯宗(avobenzone)及奥克立林(octocrylene)。

[0045] 材料及方法

[0046] 1. 肽合成. 所有所揭示的肽都是使用标准Fmoc (9-苄基甲氧基羰基)固相化学来合成。这些肽是使用标准氨基酸制备为酰胺化或游离酸序列。

[0047] 2. 细菌菌株及培养条件. 此研究中所包含的细菌菌株列示于表1中。除非另外指

明,否则使大肠杆菌UB1005、金黄色葡萄球菌SAP0017 (MRSA)及白色念珠菌105在37℃下于Mueller Hinton (MH) (Difco, BD Biosciences, MD)琼脂板及培养液(每公升含2 g牛肉膏、17.5 g酸水解酪蛋白及1.5 g淀粉)中生长。在敏感性测试之前将来自冷冻原液的细菌于刚制成的MH琼脂板上继代培养。对于痤疮丙酸杆菌,使细菌在37℃下在使用厌氧罐及AnaeroGen™ (Oxoid, Basingstoke, Hampshire, England)产生的厌氧条件中于BBL™脑心浸液(Becton, Dickinson & Company, Sparks MD)培养液或琼脂板中生长。

[0048] 3. 抗微生物活性的测定. 使用经改良CLSI微量滴定培养液稀释分析(Methods for Dilution Antimicrobial Susceptibility Tests for Bacteria That Grow Aerobically; Approved Standard-第9版)来测定每一肽的最低抑制浓度(MIC)。使用 10^5 – 10^6 个菌落形成单位(CFU)/ml或 10^4 CFU/ml (对于酵母菌)的接种物。以在37℃下孵育15 h至20 h后大于90%的微生物生长被抑制的最低肽浓度作为MIC值。对于痤疮丙酸杆菌,在测定MIC之前,将其在37℃下在厌氧条件下孵育2周。使用给定浓度(约2–5倍MIC)的混合有指示剂微生物的肽实施杀菌动力学。适当稀释后,在规定时间内间隔后将细胞平铺于琼脂板上且在37℃下孵育过夜。在痤疮丙酸杆菌的情形下,需要延长孵育时间段。计数CFU且绘制成经肽治疗后细菌随时间的存活率,此指示肽杀死微生物的有效性。

[0049] 4. 皮肤组织毒性测定. 皮肤毒性及相容性是使用EpiDerm (EPI-200)皮肤组织及MTT试剂盒(MTT-100) (MatTek, Ashland, MA)根据制造商说明书来测定。分别使用1% Triton X-100及PBS作为阳性(有毒)及阴性(无毒)对照。

[0050] 5. 基因概况分析. 使用由Sunny Biodiscovery公司(Santa Paula, CA)实施的PCR阵列分析人类真皮成纤维细胞中的84个编码细胞外基质粘附分子的基因。人类真皮成纤维细胞是来自Zen-Bio, Research Triangle Park, NC (目录编号为DF-F,批号为DFMF112410)。使细胞(低传代)在DMEM/10%FCS w/o酚红中生长直至其达到铺满期,此后将其以一式两份与3 μ g/ml、5 μ g/ml或10 μ g/ml测试材料或水一起孵育24 h。孵育结束时,在Nikon TS倒置显微镜下观察细胞。未发现实验条件有细胞毒性。定性评价显示,在5 μ g/ml测试材料下经受有丝分裂的细胞多于在10 μ g/ml测试材料下,且因此选择5 μ g/ml条件用于RNA提取。

[0051] 在孵育时间段结束时,将细胞保存在RNAlater溶液(Ambion, Austin, TX)中并保持6 h。用来自Machery-Nagel, Bethlehem, PA的NucleoSpin RNA II试剂盒提取且纯化RNA。用Agilent HP-8452A二极管阵列分光光度计在230 nm、260 nm及280 nm下评价所纯化总RNA。均衡各样品的RNA浓度且使用来自Qiagen (前SA Biosciences)的使用PCR阵列PAHS-013A (www.sabiosciences.com/rt_pcr_product/HTML/PAHS-013A.html)与第一链合成(1st strand synthesis)试剂盒、SYBR Green主混合物及PCR运行条件的BioRad iCycler iQ检测系统通过实时定量PCR来测量所关注基因的表达。在用RT2剖析仪PCR阵列数据分析3.5版软体将基因表达正规化至所携带的5个管家基因后,使用效率 $\Delta\Delta C_t$ 方法来量化结果。

[0052] 结果及讨论

[0053] KPV三肽与KdPT三肽二者在体外和体内的抗炎活性是已知的。也已报道在磷酸盐缓冲液中KPV三肽具有针对金黄色葡萄球菌及白色念珠菌的抗微生物活性(Cutulis M.等人, Antimicrobial effects of α -MSH peptides. J. Leukocyte Bio. 2000 67:233–

239)。然而,从未测定或报道过KPV的MIC值。也未知KdPT是否具有抗微生物影响。

[0054] 我们使用CLSI推荐的微量培养液稀释分析(用于在活体外测定抗生素及抗真菌剂的MIC的标准分析)在培养基中测试KPV及K-dPT的抗微生物活性(Methods for Dilution Antimicrobial Susceptibility Tests for Bacteria That Grow Aerobically; Approved Standard-第9版)。令人惊奇的是,在MH培养液中,具有或不具有C末端酰胺化的KPV (HB2067、HB2068)与KdPT (HB2089、HB2090)二者在至多达2000 $\mu\text{g}/\text{ml}$ 的浓度下都不显示可检测的MIC(表1)。这与Rauch及合作者所描述的发现一致,即使用针对白色念珠菌菌株SC5314(用于抗真菌敏感性实验的标准实验室菌株)的生长分析显示,KPV在至多达100 μM 下不能抑制酵母菌生长(Rauch I., Holzmeister S. 及 Kofler B. Anti-Candida activity of alpha-melanocyte-stimulating hormone (alpha-MSK) peptides. J. Leukoc. Biol. 2009. 85 (3):371-372)。

[0055] 用不同长度的脂质修饰KPV及KdPT,这旨在寻找抗微生物概况优于亲本三肽或相对于其经改良的类似物。三肽核心的乙酰化揭示令人惊奇的结果。脂质长度似乎至关重要且表2显示使用KPV的结果作为实例。

[0056] 碳数目介于11至18范围内的脂质似乎对KPV及KdPT两者的抗微生物活性具有正面影响(表1、表2)。对于KPV及KdPT,最佳脂质长度确定为15及16个碳(表1、表2)。这些脂质显著增强两种肽针对广谱微生物(包含革兰氏阳性、革兰氏阴性细菌及酵母菌)的抗微生物活性,如SEQ ID NO 5 (HB2178)、7或24 (HB2180或HB2200)、17 (HB2192)、23 (HB2199)所证实(表1、表2)。实际上,与在至多达2000 $\mu\text{g}/\text{ml}$ 下无活性的单独亲本三肽KPV-NH₂或KdPT-NH₂相比,脂肽针对痤疮丙酸杆菌、金黄色葡萄球菌、大肠杆菌及白色念珠菌的MIC显示接近2000倍的改良,其介于1-64 $\mu\text{g}/\text{ml}$ 范围内(表1)。将脂质长度增加至18-碳消除了革兰氏阴性选择性活性,但保留了革兰氏阳性及酵母菌选择性活性二者(表1、表2)。进一步用A或L取代Pa1-KPV-NH₂中的第三氨基酸以获得SEQ ID NO 30 (HB2208)及31 (HB2209)。令人感兴趣的是,SEQ ID NO 30与31二者都维持适宜广谱抗微生物活性,从而表明,所观察到的新的抗微生物活性可能需要或可能不需要Pa1-KPV-NH₂中的第三残基V。除了其如通过MIC指示的广谱活性外,包含SEQ ID NO 5 (HB2178)、7 (2180)、30 (HB2208)及31 (HB2209)在内的类似物在杀菌分析中都具有杀菌性且在20 min内消灭5-6 log的金黄色葡萄球菌(表3)。总之,碳数目介于12至18范围内的脂质附接至KPV-NH₂或KdPT-NH₂可产生具有先前从未报道过的新的广谱抗微生物活性的脂三肽。Pa1-KPV-NH₂或Pa1-KdPT-NH₂中的第三残基对于所观察到的新的抗微生物活性而言可能关键或可能不关键。由于诸如HB2184及HB2182等未酰胺化对应部分的活性较低或无活性,因此C末端酰胺化对于所描述的抗微生物活性极为关键。

[0057] 用A及L取代Pa1-KPV-NH₂中的第三残基未消除活性促使我们进行进一步修饰。因此,我们移除Pa1-KPV-NH₂及Pa1-KdPT-NH₂二者的第三氨基酸残基以获得脂二肽SEQ ID NO 26 (HB2202)及SEQ ID NO 27 (HB2203)。两种衍生物均显示与亲本脂三肽Pa1-KPV-NH₂及Pa1-KdPT-NH₂相似的新的抗微生物活性(表1)。该活性出人意料且从未被公开。杀菌动力学表明,两种脂二肽衍生物在PBS中具有同等杀菌性且在20 min的直接接触内消灭超过5 log的包含痤疮丙酸杆菌、金黄色葡萄球菌、大肠杆菌及酵母菌白色念珠菌在内的微生物(表3)。本发明所描述脂二肽的抗微生物活性也表现为两种脂二肽在10%胎牛血清存在下都维

持针对金黄色葡萄球菌的显著杀菌活性(表3)。此尤其显著。肽抗生素通常因干扰且结合宿主蛋白从而导致抗微生物活性降低而引起问题。虑及皮肤切口或病变(包含痤疮病变)通常伴随受伤区域的血清浸润,在血清中的抗微生物活性对于潜在治疗而言非常重要。

[0058] 为证实Pal-KP-NH₂含有最佳活性设计,交换P与K的位置,以产生HB2251 (Pal-PK-NH₂)及HB2255 (Pal-PK-OH)。与Pal-KP-NH₂相比,Pal-PK-NH₂显示活性降低超过8倍。未酰胺化衍生物Pal-PK-OH及Pal-KP-OH无活性,再次表示C末端酰胺化对于抗微生物活性至关重要。

[0059] 使用EpiDerm™皮肤模型(MatTek, Ashland, MA)与改良MTT分析法的组合来测试脂二肽产生皮肤刺激性的可能性。EpiDerm™皮肤模型展现均匀且高度可再现的类似活体内形态及生长特征。EpiDerm™是由类似那些活体内所发现的组织性基底层、棘层、颗粒层及角质化层组成。将这些组织用期望浓度的每一化合物处理20 hr。如表1中所见,由HB2202、HB2203、HB2180、HB2208及HB2209代表的所选脂肽在至多达2000 µg/ml下都未对组织活力展现负面效应。

[0060] 受新的脂二肽HB2202及HB2203的鼓励,再用V、A、F、G、L、S、H、K、I、S、R、T、Y或W替代Pal-KP-NH₂及Pal-K-dP-NH₂的第二残基来进一步修饰。如表1中所显示,该修饰法使得进一步发现一组新的脂二肽,其展现广谱抗微生物活性(Pal-KH-NH₂、Pal-KR-NH₂、Pal-KR-OH)或更强的革兰氏阳性选择性活性(Pal-KG-NH₂、Pal-KL-NH₂及Pal-KI-NH₂) (表1)。

[0061] 选择三种代表性化合物SEQ ID NO. 26 (HB2202)、SEQ ID NO. 41 (HB2242)及SEQ ID NO. 55 (HB2259)对人类真皮成纤维细胞进行基因概况研究。如表4中所显示,该三种化合物在对人类真皮成纤维细胞的影响方面显示相似倾向/模式。受影响的基因是那些参与伤口愈合及抗纤维化级联作用者。该三种化合物对整合素的影响显示在:HB2202及HB2242上调ITGA2 (整合素α₂)表达,而HB2259诱导ITGA6 (整合素α₆) (表4)。整合素与胶原蛋白结合,且在细胞与基质的相互作用中扮演重要角色。这些蛋白质在完整皮肤中是由基底角质细胞大量表达,且为人类皮肤伤口的上皮再生所必需。这些化合物也调节ADAMTS (具有1型凝血酶敏感蛋白的adam金属肽酶)及THBS3 (凝血酶敏感蛋白)的表达(表4),该两种蛋白都参与伤口愈合。在动物模型研究中,在THBS基因剔除小鼠中,下调凝血酶敏感蛋白时,与对照小鼠相比,显示会在缺血后具有增强的动脉生成、血管生成及血流恢复(Kyriakides TR及MacLauchlan S. The role of thrombospondins in wound healing, ischemia, and the foreign body reaction. J Cell Commun Signal 2009. 3:215-225)。表4中也显示,所有三种化合物都显著下调CTGF (结缔组织生长因子)以及CTNND1 (连环蛋白)的表达。CTGF与CTNND1两者都与纤维增生活性相关,且已发现在诸如瘢痕瘤及肥厚性瘢痕(HTS)等病症中的表达水平升高(Poon R等人,Catenin driven neoplastic and reactive fibroproliferative disorders. PLoS One. 2012; 7:e37940)。HTS代表伤口愈合的基本过程中的畸变,从而使成纤维细胞产生过量胶原蛋白。烧伤、创伤性损伤及手术程序通常引起HTS。在用抗微生物剂消除诸如细菌及真菌等感染物后,伤口感染也使皮肤留下HTS。脂二肽也影响KAL1 (表4)。这因为已发现由KAL1基因编码的蛋白质在异位性皮炎中参与调节表皮神经密度而尤其令人感兴趣。KAL1过表达抑制轴突过度生长,从而可能抑制异位性皮炎中的神经支配过强及异常瘙痒感(Tengara S等人,Keratinocyte-derived anosmin-1, an extracellular glycoprotein encoded by the X-linked Kallmann

syndrome gene, is involved in modulation of epidermal nerve density in atopic dermatitis. J Dermatol Sci 2010. 58:64-71)。总之,除所论述的广谱抗微生物活性外,短脂肽还可活化人类真皮细胞以促进伤口愈合及抗纤维化活性。因此,这些脂肽有益于抗微生物治疗后的伤口恢复。

[0062] 表1. KPV类似物的抗微生物活性及皮肤组织毒性

[0063]

SEQ ID	HB编号	序列	MIC (μg/ml)				毒性 EpiDerm™
			大肠杆菌	金黄色葡萄球菌	白色念珠菌	痤疮丙酸杆菌	
1	HB2067	KPV-OH	>2000	>2000	>2000	>2000	>2000
2	HB2068	KPV-NH ₂	>2000	>2000	>2000	>2000	>2000
3	HB2089	K-dPT-NH ₂	>2000	>2000	>2000	>2000	>2000
4	HB2090	K-dPT-OH	>2000	>2000	>2000	>2000	>2000
5	HB2178	Pal-K-dPT-NH ₂	64	4	16	2	>2000
6	HB2179	Dec-K-dPT-NH ₂	>2000	>2000	>2000	>2000	ND
7	HB2180	Pal-KPV-NH ₂	128	8	16	1-2	>2000
8	HB2181	Dec-KPV-NH ₂	>2000	>2000	>2000	1000	ND
9	HB2182	Pal-KdPT-OH	>2000	>2000	>2000	32	ND

[0064]

10	HB2183	Dec-KdPT-OH	>2000	>2000	>2000	>2000	ND
11	HB2184	Pal-KPV-OH	>2000	>2000	>2000	8	ND
12	HB2185	Dec-KPV-OH	>2000	>2000	>2000	>2000	ND
13	HB2188	辛烷基-KPV-NH ₂	>2000	>2000	>2000	>2000	ND
14	HB2189	十一烷基-KPV-NH ₂	2000	1000	>2000	256-500	ND
15	HB2190	月桂酰基-KPV-NH ₂	250	250	>2000	64	ND
16	HB2191	肉豆蔻酰基-KPV-NH ₂	500	250	250	16	ND
17	HB2192	十五烷酰基-KPV-NH ₂	64	16	32	1	ND
18	HB2194	硬脂酰基-KPV-NH ₂	>2000	16	16	1-2	ND
19	HB2195	辛烷基-KdPT-NH ₂	>2000	>2000	>2000	>2000	ND
20	HB2196	十一烷基-KdPT-NH ₂	2000	1000	1000	256-500	ND
21	HB2197	月桂酰基-KdPT-NH ₂	1000	500	500	128	ND
22	HB2198	肉豆蔻酰基-KdPT-NH ₂	128	64	64	8-16	ND
23	HB2199	十五烷酰基-KdPT-NH ₂	64	32	32	2-4	ND
24	HB2200	Pal-K-dPT-NH ₂	64	4	16	2	ND
25	HB2201	硬脂酰基-K-dPT-NH ₂	128	16	8	1-2	ND
26	HB2202	Pal-KP-NH ₂	64	16	16	1	>2000
27	HB2203	Pal-K-dP-NH ₂	128	8	16	1-2	>2000
28	HB2205	Pal-PV-NH ₂	>2000	>2000	>2000	>2000	ND
29	HB2207	Pal-dPS-NH ₂	>2000	>2000	>2000	32	ND
30	HB2208	Pal-KPA-NH ₂	128	16	16	1	>2000
31	HB2209	Pal-KPL-NH ₂	>2000	16	32	4-8	>2000
32	HB2230	KP-NH ₂	>2000	>2000	>2000	>2000	ND
33	HB2231	K-dP-NH ₂	>2000	>2000	>2000	>2000	ND
34	HB2236	Pal-KT-NH ₂	>2000	>2000	>2000	256-1000	ND
35	HB2237	Pal-K-dT-NH ₂	>2000	>2000	>2000	128-356	ND
36	HB2238	Pal-KK-NH ₂	2	4	16	ND	ND
37	HB2239	Pal-KV-NH ₂	>2000	>2000	>2000	>2000	ND
38	HB2240	Pal-KA-NH ₂	>2000	>2000	>2000	>2000	ND
40	HB2241	Pal-KF-NH ₂	>2000	>2000	>2000	>2000	ND
41	HB2242	Pal-KH-NH ₂	16	4	16	1-2	ND
42	HB2243	Pal-KG-NH ₂	>2000	250	>2000	32-64	ND
43	HB2244	Pal-KL-NH ₂	>2000	250	>2000	8	ND
44	HB2245	Pal-KS-NH ₂	>2000	1000	>2000	128	ND
45	HB2246	Pal-KI-NH ₂	>2000	128	>2000	>2000	ND
46	HB2247	Pal-KY-NH ₂	>2000	>2000	>2000	>2000	ND
47	HB2248	Pal-KW-NH ₂	>2000	>2000	>2000	>2000	ND
48	HB2251	Pal-PK-NH ₂	2000	128	128	4-16	ND
49	HB2252	Pal-KD-NH ₂	>2000	>2000	>2000	ND	ND
50	HB2253	Pal-KR-OH	500	16	32	2-4	ND
51	HB2255	Pal-PK-OH	>2000	>2000	>2000	>2000	ND
52	HB2256	Pal-K-dP-OH	>2000	>2000	>2000	>2000	ND
53	HB2257	Pal-KP-OH	>2000	>2000	>2000	>2000	ND
54	HB2258	Pal-KK-OH	32	16	64	1-4	ND
55	HB2259	Pal-KR-NH ₂	8	2	16	<1	ND

[0065] 表2. 脂质长度对KPV-NH₂的抗微生物活性的影响

[0066]

SEQ ID	HB编号	序列	脂质长度	MIC (μg/ml)		
				大肠杆菌	金黄色葡萄球菌	白色念珠菌
13	HB2188	辛烷基 -KPV-NH ₂	8C	>2000	>2000	>2000
8	HB2181	Dec-KPV-NH ₂	10C	>2000	>2000	>2000
14	HB2189	十一烷基 -KPV-NH ₂	11C	2000	1000	>2000
15	HB2190	月桂酰基 -KPV-NH ₂	12C	250	250	>2000
16	HB2191	肉豆蔻酰基 -KPV-NH ₂	14C	500	250	250
17	HB2192	十五烷酰基 -KPV-NH ₂	15C	64	16	32
5	HB2178	棕榈酰基 -KPV-NH ₂	16C	128	8	16
18	HB2194	硬脂酰基 -KPV-NH ₂	18C	>2000	16	16

[0067] 表3. 所选KPV类似物的杀菌动力学

杀菌动力学显示为微生物随时间的存活(CFU/ml) (检测极限为10 CFU/ml)						
PBS中的金黄色葡萄球菌SAP0017 (MRSA)						
SEQ ID	HB编号	0hr	20min	1hr	2hr	3hr
-	PBS	23050000	23050000	23050000	23050000	23050000
2	HB2068	23050000	23050000	23050000	23050000	23050000
3	HB2089	23050000	23050000	23050000	23050000	23050000
5	HB2178	23050000	<10	<10	<10	<10
7	HB2180	23050000	<10	<10	<10	<10
26	HB2202	23050000	<10	<10	<10	<10
27	HB2203	23050000	<10	<10	<10	<10
30	HB2208	23050000	<10	<10	<10	<10
31	HB2209	23050000	<10	<10	<10	<10
PBS中的痤疮丙酸杆菌ATCC11827						
SEQ ID	HB编号	0hr	20min	1hr	2hr	3hr
-	PBS	750000	750000	750000	750000	750000
2	HB2068	750000	750000	750000	750000	750000
3	HB2089	750000	750000	750000	750000	750000
5	HB2178	750000	20	<10	<10	<10
7	HB2180	750000	<10	<10	<10	<10
26	HB2202	750000	<10	<10	<10	<10
27	HB2203	750000	<10	<10	<10	<10
30	HB2208	750000	<10	<10	<10	<10
31	HB2209	750000	<10	<10	<10	<10
PBS中的白色念珠菌105						
SEQ ID	HB编号	0hr	20min	1hr	2hr	3hr
-	PBS	1300000	1300000	1300000	1300000	1300000
2	HB2068	1300000	1300000	1300000	1300000	1300000
3	HB2089	1300000	1300000	1300000	1300000	1300000
26	HB2202	1300000	3000	150	<10	<10
27	HB2203	1300000	2980	160	30	<10
10%胎牛血清中的金黄色葡萄球菌SAP0017 (MRSA)						
SEQ ID	HB编号	0hr	2hr	3hr	5hr	6hr
-	PBS中的 10%血清	30900000	30900000	30900000	30900000	30900000
2	HB2068	30900000	30900000	30900000	30900000	30900000
3	HB2089	30900000	30900000	30900000	30900000	30900000
26	HB2202	30900000	4850	1250	110	50
27	HB2203	30900000	1927000	142500	68560	34280

[0068]

[0069] 表4. 对人类真皮成纤维细胞的基因概况研究

[0070]

代号	基因名称	倍数改变(肤对PBS对照)		
		上调(+)或下调(-)		
		HB2202	HB2242	HB2259
ADAMTS	具有I型凝血酶敏感蛋白的Adam金属肽酶	3.8106	4.7899	2.4284
CDH1	I型钙粘素、E-钙粘素	1.3566	1.9725	1.0718
COL1A1	I型胶原蛋白 α 1	-1.0867	1.1975	-1.8661
COL8A1	VIII型胶原蛋白 α -1	1.4948	-1.4044	-2.5847
CTGF	结缔组织生长因子	-2.9485	-1.8921	-3.0314
CTNND1	连环蛋白(钙粘素相关蛋白) δ 1	-2.395	-2.0279	-1.1487
HAS1	透明质酸合成酶1	-2.395	-2.3295	-3.0314
ITGA2	整合素 α 2	2.2038	2.114	1.3195
ITGA6	整合素 α 6	1.2658	-1.014	2.1435
ITGA7	整合素 α 7	-1.815	-2.0279	-1.8661
ITGB2	整合素 β 2	2.2038	1.3947	2.1435
KAL1	卡曼氏综合征(Kallmann syndrome)1序列	3.5801	1.8404	1.2311
MMP1	基质金属肽酶1	2.362	1.7171	1.1487
MMP8	基质金属肽酶8	2.362	-1.6472	2.1435
MMP9	基质金属肽酶9	-1.2834	-1.6472	-2.1435
MMP10	基质金属肽酶10	2.9079	1.2142	1.6245
MMP13	基质金属肽酶13	1.0281	-2.4967	-3.249
MMP14	基质金属肽酶14	-1.0425	1.2142	-2.4623
SELE	E-选择素	2.0562	1.3947	1.0718
THBS3	凝血酶敏感蛋白	-1.9453	-3.0738	-1.6245

[0071] 本发明包含下列实例以展示本发明的某些优选实施例。

[0072] 伤口感染是因多重抗药性病原体(如MRSA)的频率增加而加重的显著问题。本发明可在治疗上或化妆品上应用于治疗、改善且预防细菌相关皮肤状况(包含痤疮、异位性皮炎、酒渣鼻)或真菌相关皮肤状况(包含头皮屑及足癣)。

[0073] 金黄色葡萄球菌是医院获得性感染的主要原因,最常与血流、皮肤及软组织、呼吸机辅助肺炎及导管相关。由耐甲氧西林(methicillin)金黄色葡萄球菌(MRSA)引起的感染频率增加尤其引人关注,尤其在美国在加护病房中患病率大于55%,且该发病率导致较长住院时间、较高成本及较高死亡风险。基因型与HA-MRSA不同的社区获得性MRSA(CA-MRSA)在无传统风险因子的患者中现已成为确立的威胁。除金黄色葡萄球菌外,革兰氏阳性细菌化脓性链球菌是复杂的皮肤及皮肤结构感染(SSTI)的主要原因。本发明提供针对MRSA相关感染的潜在预防及治疗。

[0074] 寻常痤疮是常见人类皮肤疾病,其特征在于皮肤区域具有皮脂溢出、粉刺、丘疹、

脓疱、结节及可能的瘢痕。受痤疮侵袭的区域包含面部、胸上部及背部。重度痤疮具有炎症性,但痤疮也可以非发炎形式表现。细菌痤疮丙酸杆菌可引起发炎,从而在微小粉刺或粉刺周围的真皮中导致发炎性病变,这导致发红且可导致结痂或色素过多。抗微生物短脂肽可用于呈下列形式(但不限于下列形式)的痘疤控制:笔、泡沫剂、擦拭巾(wipe)、乳霜、洗剂、喷雾剂、调色剂及/或清洁剂。另一潜在用途可是使用当前技术与(但不限于)水杨酸或类视色素的组合。

[0075] 毛囊炎是用于描述皮肤任一处的一或多个毛囊的任何发炎的词语,其包含在非裔美国男性中尤其普遍的胡须假性毛囊炎(例如剃刀突块)及头皮毛囊炎。毛囊炎是毛囊的感染。轻微情形往往导致搔痒而重度情形则可导致深度结痂。其是因细菌经由毛囊的小开口进入皮肤所致。在毛囊炎的大多数情形下,受损毛囊随后经葡萄球菌属(*Staphylococcus*)细菌感染。须痒是面部胡须区域、通常上唇处毛囊的葡萄球菌感染。须癣与须痒相似,但感染是由真菌引起。有多个建议可帮助预防此皮肤状况,例如使用抗细菌肥皂及头皮毛囊炎洗发精。也已使用氢化可体松(hydrocortisone)、抗生素或维A酸(retinoin)乳霜来治疗剃刀突块引起的刺激及丘疹。本发明所描述的广谱抗微生物脂肽应适用于由以下引起的病症:毛囊损伤、毛囊阻塞、剃须或衣服、头盔带及诸如此类在颈部、腹股沟或生殖器区域引起的摩擦。

[0076] 头皮屑是常见慢性头皮状况,其特征在于头皮搔痒及皮肤脱屑。马拉色菌属(*Malassezia*)是熟知酵母菌,其引起常见人类皮肤疾病,包含头皮屑、变色糠疹、脂溢性皮炎、牛皮癣及异位性皮炎。发癣也称为毛发钱癣或头皮钱癣,其是头皮的表面真菌感染。该疾病主要是因发癣菌属及小芽孢菌属(*Microsporum*)中的皮癣菌侵入毛干所致。发癣菌属感染的病例主要存在于中美洲至美国及西欧的一部分。该疾病具有感染性且可通过人类、动物或具有真菌的对象传播。也存在携带者状态,其中真菌存在于头皮上但未出现临床体征或症状。足癣也称为足部钱癣或足癣,其也是引起受影响区域起鳞皮、脱屑及搔痒的足部皮肤的真菌感染。其是由发癣菌引起。在一些情形下,真菌感染可伴随有继发性细菌感染。诸如特比萘芬(terbinafine)、伊曲康唑(itraconazole)及氟康唑(fluconazole)等抗真菌药已开始获得用于治疗的许可。本文所公开的具有针对细菌及真菌的广谱活性的脂二肽可具有作为局部治疗用于预防所描述状况且使其消退的潜能。

[0077] 异位性皮炎(AD)是发炎性、慢性复发性、非接触传染性和搔痒性皮肤病症,其侵袭15%-30%儿童及2%-10%成人。异位性皮炎有时称为湿疹或异位性湿疹,在婴儿及儿童中最常见。其特征在于搔痒症、湿疹性病变、干燥症(皮肤干燥)及苔藓样硬化(皮肤增厚及皮肤条纹增加)。在AD皮肤上发现的最常见细菌是金黄色葡萄球菌。实际上,大于90%的AD患者在病变及非病变皮肤上定殖有金黄色葡萄球菌,而5%的AD患者在健康皮肤上定殖有金黄色葡萄球菌。AD皮肤显示表皮障壁功能缺陷以及如通过抗微生物肽的表达降低所表明的表皮先天性免疫系统缺陷。本文所描述具有抗微生物活性及抗炎活性的脂肽应是AD护理的替代选择。

[0078] 口臭也称为呼吸臭,其是用来描述呼吸中发散非常令人讨厌的气味的术语。口臭估计是在蛀牙及牙周病后寻求牙科帮助的第三最常见原因。呼吸臭及齿龈病是由革兰氏阴性细菌(例如牙龈卟啉单胞菌(*Porphyromonas gingivalis*)、伴放线放线杆菌(*Actinobacillus actinomycetemcomitans*)、拟杆菌(*Bacteroides* spp.))引起。这些细菌

也引起口腔上皮内衬的重度发炎。具有抗炎活性的抗革兰氏阴性选择性肽将适用于维持健康口腔护理。

[0079] 三氯沙 (Triclosan) 是具有抗细菌、抗真菌及抗病毒特性的氯化芳香族化合物。其用于多种常见家居用品中, 包含肥皂、漱口水、洗碗精、牙膏、除臭剂及手部消毒液。报告已提出, 三氯沙可与自来水中的氯组合形成氯仿, 美国环境保护局 (United States Environmental Protection Agency) 将氯仿归类为可能的人类致癌物, 意指其可能引起癌症。本文所揭示的抗微生物脂二肽因具有适当抗细菌及抗真菌特性且无致癌风险而有很大潜能会替代三氯沙。

[0080] 类似地, 体味也受棒状杆菌属 (*Corynebacterium*) 的成员作用的影响。可将所描述技术的抗微生物特性纳入化妆品粉剂、凝胶、半固体、乳霜或如腋下或足部除臭剂的其它形式。

[0081] 细菌性阴道炎 (BV) 是称为阴道炎的阴道感染的最一般原因。通常, 并不将其视为“性传播感染”。细菌性阴道炎正侵袭20%至70%的女性。除了搔痒及灼热感外, 强烈的气味及异常阴道分泌物是该疾病最常见的症状。阴道念珠菌病是涉及称为念珠菌的酵母菌或真菌的过度生长的阴道感染。此酵母菌通常如众多其它生物体一样存在于口、肠及阴道中。若微生物平衡遭到破坏 (如在使用广谱抗生素时、激素波动时及其它情况下可能发生), 则可发生酵母菌过度生长。阴道念珠菌病通常称为“酵母菌感染”, 其是在接近75%的成年女性的一生中侵袭其的常见问题。也与阴道发炎相关的是非白色念珠菌, 例如光滑念珠菌及热带念珠菌; 疱疹及B族链球菌。这些状况各异且可因乳酸杆菌 (*Lactobacillus* spp.) 的损失而恶化, 乳酸杆菌是用作针对条件病原体的保护性障壁的天然共生体。因此, 使用本文所公开的抗微生物肽来控制存于 (但不限于) 润滑剂中的指示微生物 (例如) 可提供如女性保洁产品的有效护理。

[0082] 化妆品制造商将化学防腐剂添加至化妆品及洗剂以杀死细菌且延长这些产品的储藏寿命。然而, 一些防腐剂引起皮疹及其它过敏反应, 且研究已将一些这些试剂与癌症及其它健康问题相关联。在大于70%的化妆品、皮肤洗剂及除臭剂中发现诸如对羟基苯甲酸甲酯、对羟基苯甲酸丁酯及对羟基苯甲酸乙酯等合成对羟基苯甲酸酯防腐剂。对羟基苯甲酸酯防腐剂模仿雌激素的效应。即使少量这些有效化学品也可使身体的天然激素系统失衡。已将人工触发的雌激素失衡与女性乳癌及年轻男孩的睾酮缺陷相关联。化妆品工业也使用甲醛作为防腐剂。即使添加至化妆品的量较小, 其在那些对化学品敏感者中也可引起过敏反应。因此, 所描述广谱抗微生物脂二肽的一种有成本效益的潜在应用是可替代有害化学品作为化妆品工业的防腐剂。

[0083] 在以上治疗方法中用于递送肽的组合物可是气溶胶、乳液、液体、洗剂、乳霜、糊剂、软膏、粉剂或泡沫剂或其它医药上可接受的制剂。此外, 这些肽可使用较少涉及的制剂 (例如去离子水/蒸馏水、PBS或标准医用盐水溶液) 来递送。通常, 医药上可接受的制剂将包含任何适用于人类皮肤上的载体。这些医药上可接受的载体包含乙醇、二甲基亚砜、甘油、二氧化硅、氧化铝、淀粉及等效载体及稀释剂。制剂可视情况具有化妆品吸引力及/或含有诸如类视色素或其它肽等可用作本发明肽的治疗作用的佐剂的其它试剂。也可将抗生素添加至制剂以避免感染, 由此允许发生最大愈合过程。组合物中肽的浓度可是约0.1 $\mu\text{g/mL}$ 至约50 $\mu\text{g/mL}$ 或约0.1 $\mu\text{g/mL}$ 至约10% (w/v); 然而, 所采用的最终浓度可在这些范围外变化,

这取决于伤口/组织状况的性质、本发明肽的生物活性及为获得增强的组合物吸收而使用的任何佐剂或技术。

[0084] 本发明组合物可含有一或多种发挥皮肤护理活性的其它试剂。

[0085] 在本发明的优选实施例中,在组合物要与人类角质组织接触的情况下,则除本发明肽的外的任何其它组份应适于施加至角质组织;即,这些其它组份在掺入组合物中时显示在合理医学判断范围内的过度毒性、不相容性、不稳定性、过敏反应及诸如此类。CTFA Cosmetic Ingredient Handbook,第二版(1992)描述皮肤护理工业中常用的众多种非限制性化妆品及医药成份,其适用于本发明组合物中。这些成份类别的实例包含:磨料、吸收剂、美观组份(例如芳香剂)、颜料、着色剂/色素、精油、皮肤感受剂(skin sensate)、收敛剂等(例如丁香油、薄荷脑、樟脑、桉树油、丁香酚、乳酸薄荷酯、金缕梅馏出物)、抗痤疮剂、抗结块剂、消泡剂、抗微生物剂(例如碘丙基胺基甲酸丁酯)、抗氧化剂、粘合剂、生物添加剂、缓冲剂、膨胀剂、螯合剂(chelating agents)、化学添加剂、化妆品杀生物剂、变性剂、药物收敛剂、外用镇痛药、成膜剂或材料、遮光剂、pH调节剂、抛射剂、还原剂、多价螯合剂(sequestrants)、美白及亮肤剂(例如对苯二酚、曲酸、抗坏血酸、抗坏血酸基磷酸镁、抗坏血酸基葡糖胺)、皮肤调节剂(例如润湿剂)、柔肤剂及/或皮肤愈合剂(例如泛醇及其衍生物、库拉索芦荟(aloe vera)、泛酸及其衍生物、尿囊素、甜没药醇(bisabolol)及甘草酸二钾)、皮肤治疗剂、增稠剂以及维生素及其衍生物。

[0086] 可将本发明肽及相关组合物施用人类和动物(包含所有哺乳动物)。也可与典型和/或实验材料(例如组织移植物、组织培养产品、氧及敷料)组合施用。

[0087] 常用敷料的列表

[0088]

伤口敷料的分类	产品
膜	Bioclusive™ (Johnson & Johnson Medical 公司)
	Omiderm™ (omicron Scientific 有限公司),
	Opsite® (Smith & Nephew United 公司)
	Polyskin® II 透明敷料 (Kendall Healthcare)
	Tegaderm™ (3M Health Care)
水凝胶	Intrasite™ (Smith & Nephew United 公司),
	Nu-Gel™ (Johnson & Johnson Medical 公司)
	Vigilon® (Bard Medical Division)
水胶体	Comfeel® (Coloplast Sween 公司)
	DuoDerm® (ConvaTec®)
	Restore™ (Hollister Incorporated)
多糖	Bard Absorption Dressing® (Bard Medical Division)
	Debrisan (Johnson & Johnson Medical 公司)
	DuoDerm® 颗粒 (ConvaTec®)
海藻酸盐	Kaltostat® (ConvaTec®)
	Sorbsan™ (Dow Hickam Pharmaceuticals 公司)
泡沫剂敷料	Allevyn® (Smith & Nephew United 公司)
	Lyof foam® (Acme United 公司)
叠层	Biobrane® (Dow Hickam Pharmaceuticals 公司)
(*)星号是指个别公司商标	

[0089] 通常,组合物可经局部、经口、经皮、全身性或通过本领域技术人员已知可用于将本发明肽递送至损伤部位的任何其它方法施用。组合物也可以体外或离体方式施加至(例如)在培养物中生长的细胞或患者移植物。

[0090] 由于这些肽尺寸较小,因此预期其自身即能够获得一定程度的穿过皮肤的渗透率;然而,可使用某些技术来促进此移动。例如,可将亲脂性(非极性)基团添加至肽或可将肽于亲脂性赋形剂中递送至皮肤,以增强肽至角质层的可及性,从而允许移位至下表皮层。以此方式,可将这些亲脂性修饰视为前药。可在赋形剂中使用渗透促进剂诸如已知溶剂及表面活性剂以允许更好地吸收肽。预期可用于促进肽到达靶组织/损伤的专门技术包含离子电渗、电泳及超声波。离子电渗装置是由两个浸泡于电解质溶液中且置于皮肤上的电极组成。当跨过电极施加电流时,产生跨过角质层驱动肽递送的电场。电穿孔涉及施加高电压

电脉冲以增加穿过脂双层的渗透。这在施加电流的持续时间及强度方面与离子电渗不同(离子电渗使用相对恒定的低电压电场)。人们相信,电穿孔的高电压电脉冲引起脂薄层膜中的亲水孔的可逆形成,其可显著增强渗透。超声波将频率大于16 kHz的声波施加至皮肤,这导致声波所穿过的组织压缩及膨胀。所得压力变化产生众多可增强肽渗透的过程(例如空泡化、混合、温度升高)。

[0091] 以上所有肽制剂及应用都为本领域所熟知。制备及使用本发明肽的其它模式描述于(例如)美国专利第6,492,326号及第6,974,799号中,该两个专利的全文都以引用方式并入本文中。

[0092] 根据本公开内容无需过多实验即可制得且实施本文所公开且主张的所有组合物或方法。尽管已根据优选实施方案描述本发明的组合物及方法,但本领域技术人员将明了,可在不背离本发明的概念、精神及范畴下改变这些组合物及/或方法及本文所描述方法的步骤或步骤的顺序。更具体而言,应明了,可用某些在化学和生理上都相关的试剂取代本文所描述的试剂,同时可达成相同或相似结果。本领域技术人员可明了的所有这些相似取代及修改都视为在本发明范畴内。