

[19] 中华人民共和国国家知识产权局



[12] 发明专利申请公布说明书

[21] 申请号 200780028534.3

[51] Int. Cl.

A61K 31/74 (2006.01)

B01F 3/00 (2006.01)

B01F 17/00 (2006.01)

[43] 公开日 2009 年 12 月 9 日

[11] 公开号 CN 101600441A

[22] 申请日 2007.5.31

[21] 申请号 200780028534.3

[30] 优先权

[32] 2006.6.1 [33] US [31] 60/809,825

[86] 国际申请 PCT/US2007/012799 2007.5.31

[87] 国际公布 WO2007/143006 英 2007.12.13

[85] 进入国家阶段日期 2009.2.1

[71] 申请人 治疗剂肽有限公司

地址 美国路易斯安纳州

[72] 发明人 D·欧文 L·范

[74] 专利代理机构 中国专利代理(香港)有限公司
代理人 梁 谋 李连涛

权利要求书 10 页 说明书 39 页 序列表 33 页

[54] 发明名称

聚合生物表面活性剂

[57] 摘要

本发明涉及可自组装或自动聚集成聚合胶束结构的生物表面活性剂及其在局部应用的皮肤病用产品中的用途。具体地说,本发明涉及符合式 Acyl-AA-Term 的聚合酰化生物表面活性剂(PAB),其中 Acyl 为饱和的或不饱和的直链或支链 8-至 22-元碳链,AA 为 4-9 个氨基酸残基的连续序列,其中至少 1 个、优选至少 2 个氨基酸残基带电荷,Term 为酸性 C 末端或酰胺 C 末端。本发明的 PAB 在最小必需培养基(MEM)的水性环境中具有低临界胶束浓度(主要低于约 100ppm),并可以在水性 MEM 环境中将表面张力降低至低于约 50 达因/cm²。它们还具有增加代谢溶解蛋白的能力。

1. 一种在水性 MEM 环境中将表面张力降低至低于约 50 达因/cm² 的方法, 包括给予符合式 Acyl-AA-Term 的聚合酰化生物表面活性剂, 其中

(a) Acyl 为饱和的或不饱和的直链或支链 8-至 22-元碳链;

(b) AA 为 4-9 个氨基酸残基的连续序列, 其中至少一个所述氨基酸残基带电荷; 和

(c) Term 为酸 C 末端或酰胺 C 末端,

其中聚合酰化生物表面活性剂在水性 MEM 环境中的临界胶束浓度低于约 200 ppm, 并选自 SEQ ID NO: 1、SEQ ID NO: 2、SEQ ID NO: 3、SEQ ID NO: 4、SEQ ID NO: 5、SEQ ID NO: 6、SEQ ID NO: 7、SEQ ID NO: 8、SEQ ID NO: 9、SEQ ID NO: 10、SEQ ID NO: 11、SEQ ID NO: 12、SEQ ID NO: 13、SEQ ID NO: 14、SEQ ID NO: 15、SEQ ID NO: 16、SEQ ID NO: 17、SEQ ID NO: 18、SEQ ID NO: 19、SEQ ID NO: 20、SEQ ID NO: 21、SEQ ID NO: 22、SEQ ID NO: 23、SEQ ID NO: 24、SEQ ID NO: 25、SEQ ID NO: 26、SEQ ID NO: 27、SEQ ID NO: 27、SEQ ID NO: 28、SEQ ID NO: 29、SEQ ID NO: 30、SEQ ID NO: 31、SEQ ID NO: 32 和 SEQ ID NO: 33。

2. 权利要求 1 的方法, 其中至少 2 个氨基酸残基带电荷, 并且聚合酰化生物表面活性剂选自 SEQ ID NO: 1、SEQ ID NO: 2、SEQ ID NO: 3、SEQ ID NO: 4、SEQ ID NO: 5、SEQ ID NO: 7、SEQ ID NO: 8、SEQ ID NO: 9、SEQ ID NO: 10、SEQ ID NO: 11、SEQ ID NO: 12、SEQ ID NO: 13、SEQ ID NO: 14、SEQ ID NO: 15、SEQ ID NO: 16、SEQ ID NO: 17、SEQ ID NO: 18、SEQ ID NO: 19、SEQ ID NO: 20、SEQ ID NO: 21、SEQ ID NO: 22、SEQ ID NO: 23、SEQ ID NO: 24、SEQ ID NO: 25、SEQ ID NO: 26、SEQ ID NO: 27、SEQ ID NO: 27、SEQ ID NO: 28、SEQ ID NO: 29、SEQ ID NO: 30、SEQ ID NO: 31、SEQ ID NO: 32 和

SEQ ID NO: 33。

3. 权利要求 1 的方法，其中至少 3 个氨基酸残基带电荷，并且聚合酰化生物表面活性剂选自 SEQ ID NO: 7、SEQ ID NO: 8、SEQ ID NO: 9、SEQ ID NO: 10、SEQ ID NO: 11、SEQ ID NO: 12、SEQ ID NO: 13、SEQ ID NO: 14、SEQ ID NO: 15、SEQ ID NO: 16、SEQ ID NO: 17、SEQ ID NO: 18、SEQ ID NO: 19、SEQ ID NO: 20、SEQ ID NO: 22、SEQ ID NO: 23、SEQ ID NO: 24、SEQ ID NO: 25、SEQ ID NO: 27、SEQ ID NO: 27、SEQ ID NO: 30 和 SEQ ID NO: 31。

4. 权利要求 1 的方法，其中至少 4 个氨基酸残基带电荷，并且聚合酰化生物表面活性剂选自 SEQ ID NO: 11、SEQ ID NO: 22 和 SEQ ID NO: 27。

5. 权利要求 2 的方法，其中聚合酰化生物表面活性剂在水性 MEM 环境中的 CMC 低于约 100 ppm，并且选自 SEQ ID NO: 1、SEQ ID NO: 2、SEQ ID NO: 3、SEQ ID NO: 4、SEQ ID NO: 5、SEQ ID NO: 7、SEQ ID NO: 8、SEQ ID NO: 9、SEQ ID NO: 10、SEQ ID NO: 11、SEQ ID NO: 12、SEQ ID NO: 13、SEQ ID NO: 14、SEQ ID NO: 15、SEQ ID NO: 16、SEQ ID NO: 18、SEQ ID NO: 19、SEQ ID NO: 20、SEQ ID NO: 21、SEQ ID NO: 22、SEQ ID NO: 23、SEQ ID NO: 24、SEQ ID NO: 25、SEQ ID NO: 26、SEQ ID NO: 27、SEQ ID NO: 27、SEQ ID NO: 28、SEQ ID NO: 29、SEQ ID NO: 30、SEQ ID NO: 31、SEQ ID NO: 32 和 SEQ ID NO: 33。

6. 权利要求 1 的方法，其中聚合酰化生物表面活性剂在水性 MEM 环境中的 CMC 低于约 50 ppm，并且选自 SEQ ID NO: 1、SEQ ID NO: 2、SEQ ID NO: 3、SEQ ID NO: 4、SEQ ID NO: 5、SEQ ID NO: 8、SEQ ID NO: 9、SEQ ID NO: 10、SEQ ID NO: 11、SEQ ID NO: 12、SEQ ID NO: 13、SEQ ID NO: 14、SEQ ID NO: 15、SEQ ID NO: 16、SEQ ID NO: 18、SEQ ID NO: 19、SEQ ID NO: 21、SEQ ID NO: 22、SEQ ID NO: 23、SEQ ID NO: 24、SEQ ID NO: 25、SEQ ID NO: 26、SEQ ID NO: 27、

SEQ ID NO: 27、SEQ ID NO: 28、SEQ ID NO: 29、SEQ ID NO: 30、SEQ ID NO: 31、SEQ ID NO: 32 和 SEQ ID NO: 33。

7. 权利要求 1 的方法, 其中聚合酰化生物表面活性剂在水性 MEM 环境中的 CMC 低于约 25 ppm, 并且选自 SEQ ID NO: 1、SEQ ID NO: 3、SEQ ID NO: 4、SEQ ID NO: 5、SEQ ID NO: 8、SEQ ID NO: 9、SEQ ID NO: 11、SEQ ID NO: 12、SEQ ID NO: 13、SEQ ID NO: 14、SEQ ID NO: 15、SEQ ID NO: 16、SEQ ID NO: 18、SEQ ID NO: 19、SEQ ID NO: 21、SEQ ID NO: 23、SEQ ID NO: 24、SEQ ID NO: 25、SEQ ID NO: 29、SEQ ID NO: 30、SEQ ID NO: 31、SEQ ID NO: 32 和 SEQ ID NO: 33。

8. 权利要求 1 的方法, 其中在聚合酰化生物表面活性剂上的带电荷氨基酸残基的百分率为氨基酸残基总数的至少约 33%, 并且聚合酰化生物表面活性剂选自 SEQ ID NO: 1、SEQ ID NO: 2、SEQ ID NO: 3、SEQ ID NO: 4、SEQ ID NO: 7、SEQ ID NO: 8、SEQ ID NO: 9、SEQ ID NO: 10、SEQ ID NO: 11、SEQ ID NO: 12、SEQ ID NO: 13、SEQ ID NO: 14、SEQ ID NO: 15、SEQ ID NO: 16、SEQ ID NO: 17、SEQ ID NO: 18、SEQ ID NO: 19、SEQ ID NO: 20、SEQ ID NO: 21、SEQ ID NO: 22、SEQ ID NO: 23、SEQ ID NO: 24、SEQ ID NO: 25、SEQ ID NO: 26、SEQ ID NO: 27、SEQ ID NO: 27、SEQ ID NO: 28、SEQ ID NO: 29、SEQ ID NO: 30、SEQ ID NO: 31、SEQ ID NO: 32 和 SEQ ID NO: 33。

9. 权利要求 1 的方法, 其中在聚合酰化生物表面活性剂上的带电荷氨基酸残基的百分率为氨基酸残基总数的至少约 50%, 并且聚合酰化生物表面活性剂选自 SEQ ID NO: 1、SEQ ID NO: 2、SEQ ID NO: 3、SEQ ID NO: 4、SEQ ID NO: 5、SEQ ID NO: 7、SEQ ID NO: 8、SEQ ID NO: 9、SEQ ID NO: 10、SEQ ID NO: 11、SEQ ID NO: 12、SEQ ID NO: 13、SEQ ID NO: 14、SEQ ID NO: 15、SEQ ID NO: 16、SEQ ID NO: 17、SEQ ID NO: 18、SEQ ID NO: 19、SEQ ID NO: 20、SEQ ID NO: 22、SEQ ID NO: 25、SEQ ID NO: 27、SEQ ID NO: 27、SEQ ID NO: 29、

SEQ ID NO: 30、SEQ ID NO: 32 和 SEQ ID NO: 33。

10. 权利要求 1 的方法，其中在聚合酰化生物表面活性剂上的带电荷氨基酸残基的百分率为氨基酸残基总数的至少约 60%，并且聚合酰化生物表面活性剂选自 SEQ ID NO: 7、SEQ ID NO: 8、SEQ ID NO: 9、SEQ ID NO: 10、SEQ ID NO: 11、SEQ ID NO: 12、SEQ ID NO: 13、SEQ ID NO: 14、SEQ ID NO: 15、SEQ ID NO: 16、SEQ ID NO: 17、SEQ ID NO: 25、SEQ ID NO: 27、SEQ ID NO: 27 和 SEQ ID NO: 30。

11. 权利要求 1 的方法，其中 Term 为酰胺 C 末端，并且聚合酰化生物表面活性剂选自 SEQ ID NO: 1、SEQ ID NO: 2、SEQ ID NO: 3、SEQ ID NO: 4、SEQ ID NO: 5、SEQ ID NO: 6、SEQ ID NO: 7、SEQ ID NO: 9、SEQ ID NO: 10、SEQ ID NO: 12、SEQ ID NO: 13、SEQ ID NO: 15、SEQ ID NO: 17、SEQ ID NO: 19、SEQ ID NO: 21；SEQ ID NO: 22、SEQ ID NO: 23、SEQ ID NO: 26、SEQ ID NO: 27、SEQ ID NO: 27、SEQ ID NO: 28、SEQ ID NO: 29、SEQ ID NO: 30、SEQ ID NO: 32 和 SEQ ID NO: 33。

12. 权利要求 1 的方法，其中 Acyl 为 C_{14} 链，并且聚合酰化生物表面活性剂选自 SEQ ID NO: 1、SEQ ID NO: 2、SEQ ID NO: 4、SEQ ID NO: 5、SEQ ID NO: 7、SEQ ID NO: 9、SEQ ID NO: 10、SEQ ID NO: 12、SEQ ID NO: 15、SEQ ID NO: 17、SEQ ID NO: 18、SEQ ID NO: 19、SEQ ID NO: 20、SEQ ID NO: 21、SEQ ID NO: 22、SEQ ID NO: 23、SEQ ID NO: 24、SEQ ID NO: 25、SEQ ID NO: 26、SEQ ID NO: 27、SEQ ID NO: 27、SEQ ID NO: 28、SEQ ID NO: 29、SEQ ID NO: 30、SEQ ID NO: 31、SEQ ID NO: 32 和 SEQ ID NO: 33。

13. 权利要求 12 的方法，其中 Term 为酰胺 C 末端，并且聚合酰化生物表面活性剂选自 SEQ ID NO: 1、SEQ ID NO: 2、SEQ ID NO: 4、SEQ ID NO: 5、SEQ ID NO: 7、SEQ ID NO: 9、SEQ ID NO: 10、SEQ ID NO: 12、SEQ ID NO: 15、SEQ ID NO: 17、SEQ ID NO: 19、SEQ ID NO: 21、SEQ ID NO: 22、SEQ ID NO: 23、SEQ ID NO: 26、SEQ ID NO:

27、SEQ ID NO: 27、SEQ ID NO: 28、SEQ ID NO: 29、SEQ ID NO: 30、SEQ ID NO: 32 和 SEQ ID NO: 33。

14. 权利要求 12 的方法，其中 Term 为酸 C 末端，并且聚合酰化生物表面活性剂选自 SEQ ID NO: 20、SEQ ID NO: 24、SEQ ID NO: 25 和 SEQ ID NO: 31。

15. 权利要求 1 的方法，其中 Acyl 为 C₁₆ 链，并且聚合酰化生物表面活性剂选自 SEQ ID NO: 3、SEQ ID NO: 6、SEQ ID NO: 8、SEQ ID NO: 11、SEQ ID NO: 13、SEQ ID NO: 14 和 SEQ ID NO: 16。

16. 权利要求 15 的方法，其中 Term 为酰胺 C 末端，并且聚合酰化生物表面活性剂选自 SEQ ID NO: 3、SEQ ID NO: 6 和 SEQ ID NO: 13。

17. 权利要求 15 的方法，其中 Term 为酸 C 末端，并且聚合酰化生物表面活性剂选自 SEQ ID NO: 8、SEQ ID NO: 11、SEQ ID NO: 14 和 SEQ ID NO: 16。

18. 权利要求 1 的方法，其中聚合酰化生物表面活性剂的 TTR 大于 10，并且聚合酰化生物表面活性剂选自 SEQ ID NO: 1、SEQ ID NO: 2、SEQ ID NO: 7、SEQ ID NO: 8、SEQ ID NO: 10、SEQ ID NO: 12、SEQ ID NO: 14、SEQ ID NO: 15、SEQ ID NO: 18、SEQ ID NO: 19、SEQ ID NO: 21、SEQ ID NO: 22、SEQ ID NO: 23、SEQ ID NO: 24、SEQ ID NO: 25、SEQ ID NO: 26、SEQ ID NO: 27、SEQ ID NO: 28、SEQ ID NO: 29 和 SEQ ID NO: 30。

19. 权利要求 17 的方法，其中聚合酰化生物表面活性剂的 TTR 为至少约 20，并且聚合酰化生物表面活性剂选自 SEQ ID NO: 1、SEQ ID NO: 2、SEQ ID NO: 7、SEQ ID NO: 8、SEQ ID NO: 12、SEQ ID NO: 15、SEQ ID NO: 18、SEQ ID NO: 19、SEQ ID NO: 22、SEQ ID NO: 24、SEQ ID NO: 25、SEQ ID NO: 28、SEQ ID NO: 29 和 SEQ ID NO: 30。

20. 权利要求 1 的方法，其中聚合酰化生物表面活性剂在 10 ppm 浓度时使 ELN、FN1 或 COL1 中的至少 2 种的表达增加至少 20%，并

且聚合酰化生物表面活性剂选自 SEQ ID NO: 7、SEQ ID NO: 9、SEQ ID NO: 10、SEQ ID NO: 12、SEQ ID NO: 18、SEQ ID NO: 21、SEQ ID NO: 22、SEQ ID NO: 24、SEQ ID NO: 26 和 SEQ ID NO: 27。

21. 权利要求 20 的方法，其中聚合酰化生物表面活性剂使 ELN、FN1 或 COL1 的表达增加至少 20%，并且聚合酰化生物表面活性剂选自 SEQ ID NO: 7、SEQ ID NO: 9、SEQ ID NO: 10、SEQ ID NO: 18、SEQ ID NO: 21、SEQ ID NO: 22、SEQ ID NO: 24 和 SEQ ID NO: 27。

22. 权利要求 1 的方法，其中聚合酰化生物表面活性剂在 10 ppm 浓度时不引起 MMP1 表达增加，并选自 SEQ ID NO: 7、SEQ ID NO: 9、SEQ ID NO: 10、SEQ ID NO: 12、SEQ ID NO: 18、SEQ ID NO: 21、SEQ ID NO: 24 和 SEQ ID NO: 27。

23. 权利要求 22 的方法，其中聚合酰化生物表面活性剂使 MMP1 表达降低至少 20%，并且选自 SEQ ID NO: 7、SEQ ID NO: 9 和 SEQ ID NO: 10。

24. 权利要求 1 的方法，其中聚合酰化生物表面活性剂在 10 ppm 浓度时不引起 IL6 或 IL8 表达增加，并且选自 SEQ ID NO: 7、SEQ ID NO: 9、SEQ ID NO: 12、SEQ ID NO: 18、SEQ ID NO: 21、SEQ ID NO: 22、SEQ ID NO: 24 和 SEQ ID NO: 26。

25. 权利要求 24 的方法，其中聚合酰化生物表面活性剂使 IL6 或 IL8 表达降低至少 20%，并且选自 SEQ ID NO: 7、SEQ ID NO: 9、SEQ ID NO: 12、SEQ ID NO: 18、SEQ ID NO: 21、SEQ ID NO: 24 和 SEQ ID NO: 26。

26. 权利要求 1 的方法，其中聚合酰化生物表面活性剂于 1 ppm 浓度 24 小时后使成纤维细胞增殖增加至少约 20%，并且选自 SEQ ID NO: 4、SEQ ID NO: 8、SEQ ID NO: 9 和 SEQ ID NO: 17。

27. 权利要求 1 的方法，其中聚合酰化生物表面活性剂于 10 ppm 浓度 24 小时后使成纤维细胞增殖增加至少约 20%，并且选自 SEQ ID NO: 3、SEQ ID NO: 7、SEQ ID NO: 11、SEQ ID NO: 13、SEQ ID NO:

14、SEQ ID NO: 15、SEQ ID NO: 16、SEQ ID NO: 20 和 SEQ ID NO: 32。

28. 权利要求 1 的方法，其中聚合酰化生物表面活性剂于 10 ppm 浓度 48 小时后使成纤维细胞增殖增加至少约 20%，并且选自 SEQ ID NO: 19、SEQ ID NO: 24 和 SEQ ID NO: 25。

29. 权利要求 1 的方法，其中聚合酰化生物表面活性剂于 25 ppm 浓度 48 小时后使成纤维细胞增殖增加至少约 20%，并且选自 SEQ ID NO: 12 和 SEQ ID NO: 23。

30. 权利要求 1 的方法，其中根据 CBQCA 测定检测，聚合酰化生物表面活性剂在低于 LD_{50} 的浓度时使代谢溶解蛋白增加至少约 20%，并且聚合酰化生物表面活性剂选自 SEQ ID NO: 1、SEQ ID NO: 2、SEQ ID NO: 4、SEQ ID NO: 7、SEQ ID NO: 12、SEQ ID NO: 13、SEQ ID NO: 14、SEQ ID NO: 15、SEQ ID NO: 17、SEQ ID NO: 18、SEQ ID NO: 20、SEQ ID NO: 21、SEQ ID NO: 23、SEQ ID NO: 24、SEQ ID NO: 25、SEQ ID NO: 26、SEQ ID NO: 28、SEQ ID NO: 29、SEQ ID NO: 30、SEQ ID NO: 31、SEQ ID NO: 32 和 SEQ ID NO: 33。

31. 权利要求 30 的方法，其中根据 CBQCA 测定检测，聚合酰化生物表面活性剂在低于 LD_{50} 的浓度时使代谢溶解蛋白增加至少约 30%，并且聚合酰化生物表面活性剂选自 SEQ ID NO: 1、SEQ ID NO: 2、SEQ ID NO: 7、SEQ ID NO: 14、SEQ ID NO: 15、SEQ ID NO: 17、SEQ ID NO: 18、SEQ ID NO: 20、SEQ ID NO: 23、SEQ ID NO: 24、SEQ ID NO: 25、SEQ ID NO: 26、SEQ ID NO: 28、SEQ ID NO: 29、SEQ ID NO: 30 和 SEQ ID NO: 31。

32. 权利要求 30 的方法，其中根据 CBQCA 测定检测，聚合酰化生物表面活性剂在低于 LD_{50} 的浓度时使代谢溶解蛋白增加至少约 50%，并且聚合酰化生物表面活性剂选自 SEQ ID NO: 15、SEQ ID NO: 18、SEQ ID NO: 23、SEQ ID NO: 24、SEQ ID NO: 26、SEQ ID NO: 28、SEQ ID NO: 29 和 SEQ ID NO: 30。

33. 权利要求 1 的方法，其中聚合酰化生物表面活性剂对 37 岁女

性成纤维细胞(ATCC CRL-2122)的 LD₅₀ 大于约 200 ppm, 并选自 SEQ ID NO: 1、SEQ ID NO: 2、SEQ ID NO: 7、SEQ ID NO: 8、SEQ ID NO: 9、SEQ ID NO: 10、SEQ ID NO: 15、SEQ ID NO: 18、SEQ ID NO: 19、SEQ ID NO: 20、SEQ ID NO: 21、SEQ ID NO: 22、SEQ ID NO: 24、SEQ ID NO: 25、SEQ ID NO: 26、SEQ ID NO: 27、SEQ ID NO: 28、SEQ ID NO: 29、SEQ ID NO: 30。

34. 权利要求 1 的方法, 其中聚合酰化生物表面活性剂在低于或等于约 100 ppm 的浓度时抑制大肠杆菌(*E. coli*)的生长, 并且选自 SEQ ID NO: 1、SEQ ID NO: 2、SEQ ID NO: 3、SEQ ID NO: 4、SEQ ID NO: 5、SEQ ID NO: 6、SEQ ID NO: 7、SEQ ID NO: 8、SEQ ID NO: 9、SEQ ID NO: 10、SEQ ID NO: 11、SEQ ID NO: 12、SEQ ID NO: 13、SEQ ID NO: 14、SEQ ID NO: 15、SEQ ID NO: 17、SEQ ID NO: 18、SEQ ID NO: 19、SEQ ID NO: 20、SEQ ID NO: 21、SEQ ID NO: 22、SEQ ID NO: 23、SEQ ID NO: 24、SEQ ID NO: 25、SEQ ID NO: 26、SEQ ID NO: 27、SEQ ID NO: 27、SEQ ID NO: 28、SEQ ID NO: 29、SEQ ID NO: 30、SEQ ID NO: 31、SEQ ID NO: 32 和 SEQ ID NO: 33。

35. 权利要求 34 的方法, 其中聚合酰化生物表面活性剂抑制绿脓杆菌(*P. aeruginosa*)或金黄色葡萄球菌(*S. aureus*)的生长, 并且选自 SEQ ID NO: 1、SEQ ID NO: 2、SEQ ID NO: 3、SEQ ID NO: 4、SEQ ID NO: 5、SEQ ID NO: 6、SEQ ID NO: 7、SEQ ID NO: 8、SEQ ID NO: 9、SEQ ID NO: 10、SEQ ID NO: 11、SEQ ID NO: 12、SEQ ID NO: 13、SEQ ID NO: 14、SEQ ID NO: 15、SEQ ID NO: 17、SEQ ID NO: 18、SEQ ID NO: 19、SEQ ID NO: 20、SEQ ID NO: 21、SEQ ID NO: 22、SEQ ID NO: 23、SEQ ID NO: 24、SEQ ID NO: 25、SEQ ID NO: 26、SEQ ID NO: 27、SEQ ID NO: 27、SEQ ID NO: 29、SEQ ID NO: 30、SEQ ID NO: 31、SEQ ID NO: 32 和 SEQ ID NO: 33。

36. 权利要求 35 的方法, 其中聚合酰化生物表面活性剂抑制白色念珠菌(*C. albicans*)的生长, 并选自 SEQ ID NO: 1、SEQ ID NO: 2、SEQ

ID NO: 5、SEQ ID NO: 7、SEQ ID NO: 12、SEQ ID NO: 15、SEQ ID NO: 18、SEQ ID NO: 21、SEQ ID NO: 22、SEQ ID NO: 23、SEQ ID NO: 24、SEQ ID NO: 25、SEQ ID NO: 26、SEQ ID NO: 27、SEQ ID NO: 31 和 SEQ ID NO: 33。

37. 权利要求 1 的方法, 其中聚合酰化生物表面活性剂在低于或等于约 100 ppm 的浓度时抑制大肠杆菌(*E. coli*)、绿脓杆菌(*P. aeruginosa*)、金黄色葡萄球菌(*S. aureus*)和白色念珠菌(*C. albicans*)的生长, 并且其选自 SEQ ID NO: 1、SEQ ID NO: 2、SEQ ID NO: 7、SEQ ID NO: 12、SEQ ID NO: 15、SEQ ID NO: 18、SEQ ID NO: 23、SEQ ID NO: 24、SEQ ID NO: 25、SEQ ID NO: 31 和 SEQ ID NO: 33。

38. 权利要求 35 的方法, 其中聚合酰化生物表面活性剂在 25 ppm 的浓度时抑制大肠杆菌(*E. coli*)、绿脓杆菌(*P. aeruginosa*)、金黄色葡萄球菌(*S. aureus*)和耐二甲氧基苯青霉素金黄色葡萄球菌(*S. aureus*)的生长, 并选自 SEQ ID NO: 12、SEQ ID NO: 15、SEQ ID NO: 30 和 SEQ ID NO: 31。

39. 权利要求 20 的方法, 其中聚合酰化生物表面活性剂不引起 MMP1 表达增加, 并选自 SEQ ID NO: 7、SEQ ID NO: 9、SEQ ID NO: 10、SEQ ID NO: 12、SEQ ID NO: 18、SEQ ID NO: 21、SEQ ID NO: 24 和 SEQ ID NO: 27。

40. 权利要求 39 的方法, 其中聚合酰化生物表面活性剂使 MMP1 表达降低至少约 20%, 并选自 SEQ ID NO: 7、SEQ ID NO: 9 和 SEQ ID NO: 10。

41. 权利要求 20 的方法, 其中聚合酰化生物表面活性剂不引起 IL6 或 IL8 表达增加, 并选自 SEQ ID NO: 7、SEQ ID NO: 9、SEQ ID NO: 12、SEQ ID NO: 18、SEQ ID NO: 21、SEQ ID NO: 22、SEQ ID NO: 24 和 SEQ ID NO: 26。

42. 权利要求 20 的方法, 其中聚合酰化生物表面活性剂不引起 MMP1、IL6 或 IL8 表达增加, 并选自 SEQ ID NO: 7、SEQ ID NO: 9、

SEQ ID NO: 12、SEQ ID NO: 18、SEQ ID NO: 21 和 SEQ ID NO: 24。

43. 权利要求 42 的方法, 其中聚合酰化生物表面活性剂抑制大肠杆菌(*E. coli*)、绿脓杆菌(*P. aeruginosa*)和金黄色葡萄球菌(*S. aureus*)中的至少 2 种的生长, 并选自 SEQ ID NO: 7、SEQ ID NO: 12、SEQ ID NO: 18 和 SEQ ID NO: 22。

44. 一种局部应用的化妆用或皮肤病用组合物, 含有(i)浓度为至少约 1 ppm 的聚合酰化生物表面活性剂, 其选自 SEQ ID NO: 1、SEQ ID NO: 2、SEQ ID NO: 3、SEQ ID NO: 4、SEQ ID NO: 5、SEQ ID NO: 6、SEQ ID NO: 7、SEQ ID NO: 8、SEQ ID NO: 9、SEQ ID NO: 10、SEQ ID NO: 11、SEQ ID NO: 12、SEQ ID NO: 13、SEQ ID NO: 14、SEQ ID NO: 15、SEQ ID NO: 16、SEQ ID NO: 17、SEQ ID NO: 18、SEQ ID NO: 19、SEQ ID NO: 20、SEQ ID NO: 21、SEQ ID NO: 22、SEQ ID NO: 23、SEQ ID NO: 24、SEQ ID NO: 25、SEQ ID NO: 26、SEQ ID NO: 27、SEQ ID NO: 27、SEQ ID NO: 28、SEQ ID NO: 29、SEQ ID NO: 30、SEQ ID NO: 31、SEQ ID NO: 32 和 SEQ ID NO: 33。

45. 权利要求 44 的局部应用的化妆用或皮肤病用组合物, 所述组合物为乳膏、洗剂、凝胶或浆液形式, 其中所述组合物为油包水乳剂、水包油乳剂、聚硅氧烷包水乳剂、水包聚硅氧烷乳剂、水包油包水乳剂或油包水包油乳剂。

46. 权利要求 44 的局部应用的化妆用或皮肤病用组合物, 所述组合物为无水凝胶或浆液或增稠的水性分散剂形式。

47. 权利要求 44 的局部应用的化妆用或皮肤病用组合物, 所述组合物还含有一种或多种选自以下的化妆用或药用成分: 研磨剂、磨砂膏、吸收剂、收敛剂、抗微生物剂、防腐剂、抗氧化剂、抗炎剂、维生素、微量矿物质、成膜剂和增加局部组合物对皮肤的亲和性的其它聚合物、湿润剂、保湿剂、pH 调节剂、皮肤调节剂、皮肤抚慰剂和/或康复剂、抗痤疮剂、皮肤漂白剂和美白剂、外部止痛剂、遮光剂。

聚合生物表面活性剂

相关申请的交叉参考

[0001] 本申请要求保护 2006 年 6 月 1 日申请的美国临时申请序号 60/809,825 的优先权。

联邦资助研究的声明

[0002] 不适用。

发明领域

[0003] 本发明涉及可自组装或自动聚集成聚合胶束结构的生物表面活性剂及其在局部应用的皮肤病用产品中的用途。具体地说，本发明涉及聚合酰化生物表面活性剂，其在最小必需培养基中具有低临界胶束浓度(由约 1.0 ppm 至约 200 ppm)，并具有增加代谢溶解性蛋白的能力。另外，它们具有相当低的毒性，优选地，在 37 岁女性成纤维细胞中的 LD₅₀ 大于 200 ppm，以及具有增加胞外皮肤基质蛋白合成和/或增加细胞更新率的能力。

发明背景

[0004] 表面活性剂作为一类分子对局部应用产品的配制人员是众所周知的。生物表面活性剂是来源于天然原材料的特定表面活性剂类别，易于被蛋白酶降解。和标准表面活性剂一样，它们在同一分子上既具有水溶性基团，又具有水不溶性基团，一般定义为“头和尾”。因此，它们对亲水性和亲脂性物质(例如油，对于本发明用途更有意义的是细胞膜)均具有亲和性；因此，这些分子还被描述为两性分子。本发明的生物表面活性剂对细胞膜具有高度亲和性，于相似浓度没有与标准表面活性剂相关的明显破坏。它们自身以降低不相适的“头和尾”

之间的表面张力的方式定向。由于生物表面活性剂的浓度增加, 界面变得饱和, 直至达到最小表面张力, 即所谓的临界胶束浓度 (“CMC”)。如果加入的生物表面活性剂大于 CMC, 则形成胶束或聚集体。CMC 一般以微摩尔(mM)表示, 取决于介质的温度和离子强度。这些聚集物的粒度和形状可变。在本发明范围内的聚合生物表面活性剂聚集体的粒度通常在约 5 nm 至 100 nm 的纳米范围内。

[0005] 在护肤品中, 十二烷基硫酸钠是一种常用的阴离子表面活性剂, 用作润湿剂、乳化剂或清洁剂。其在蒸馏水中的 CMC 为约 8.13 mM (或约 2400 ppm)。季铵化合物是广泛使用的阳离子表面活性剂。十二烷基三甲基溴化铵是该类化合物的代表, 在蒸馏水中的 CMC 为约 14.6 mM (或约 4300 ppm)。为了比较, 细胞膜的主要成分—磷脂 (例如二酰基磷脂酰胆碱) 的 CMC 在约 5×10^{-3} mM 至约 4.7×10^{-7} mM (约 3 ppm 至约 0.003 ppm) 的范围内。参见例如 D. Datta, *Membrane Biochemistry* (1987)。本发明的聚合生物表面活性剂的 CMC 在代表性的阴离子和阳离子化合物以及上述细胞膜磷脂之间。

[0006] 但是, 常规的表面活性剂已知引起刺激、发炎和其它负面后遗症。这部分归因于使皮肤脱脂、除去必需的油以及快速渗透入表皮层。令人惊奇并出乎意料的是, 本发明的聚合生物表面活性剂于相似的浓度不具有这些缺点。

[0007] 如下所述, 氨基酸序列在护肤品中的应用是本领域已知的。某些这样的序列可作为酰化部分 (例如乙酰、肉豆蔻酰、棕榈酰) 获得。一般而言, 酰化是本领域技术人员众所周知的技术, 用于增强喜水或亲水成分渗透入皮肤中。正常皮肤表面是高度疏水的, 阻止亲水物质的显著渗透。然而, 酰化氨基酸序列的特性就毒性而言可极大改变, 这又影响了其最终的可用性。令人惊讶并出乎意料的是, 本发明的许多聚合酰化生物表面活性剂对哺乳动物细胞的毒性相当低 (约 $LD_{50} > 200$), 同时对原核生命形态保持相对高度的毒性。

[0008] 而且, 与先有技术的酰化氨基酸序列不同, 本发明的聚

合生物表面活性剂能够增加皮肤基质蛋白(例如弹性蛋白、纤连蛋白、胶原蛋白)的合成和/或增加细胞更新率,同时没有使降解这些蛋白(例如基质金属蛋白酶)的酶合成协同增加。另外,令人惊奇并值得注意的是,本发明的生物表面活性剂不引起炎性蛋白增加,特别是白介素 6 和白介素 8。该特性组合使这些化合物无以伦比地适合于护肤用途。

[0009] 本发明的聚合生物表面活性剂以低 CMC 有效润湿表面的能力赋予了另一种令人惊奇并出乎意料特性—广谱抗微生物活性。本发明的聚合生物表面活性剂能够抑制多种微生物的生长或杀死多种微生物,所述微生物包括大肠杆菌(*E. coli*)、绿脓杆菌(*P. aeruginosa*)、金黄色葡萄球菌(*S. aureus*)和白色念珠菌(*C. albicans*)。

[0010] 在个人护理和皮肤病学领域,一直以来需要高度有效的多功能成分。这类成分的使用有助于减轻局部皮肤护理制剂常见的问题—例如不稳定性(由于成分的不相适性),以及活性成分的效力随时间推移降低(由于成分之间的相互作用)。多功能成分,尤其是引起刺激、发炎或其它负面后遗症的倾向性低的那些成分,不仅在配制人员当中是高度需要的,而且在越来越苛求并且成熟的消费者当中也是高度需要的。本发明的聚合生物表面活性剂的有利特性合在一起使它们成为令人惊讶并出乎意料的多功能成分,该多功能成分满足了迄今尚未满足的对要求毒性相当低的产品要求,所述产品既有助于储存、保持和改善与疾病、衰老和/或环境应激源相关的皮肤病,同时也在许多情况下同时抑制微生物生长。

[0011] 在护肤品中使用的先有技术的氨基酸序列

[0012] 以下的化妆用成分各自均由 2 个氨基酸组成,是市售可得: 二肽-1 (酪氨酸和精氨酸残基); 二肽-2 (缬氨酸和色氨酸残基); 二肽-4 (苯丙氨酸和色氨酸残基)。除非另有指示,否则化妆用成分由其在化妆品、盥洗用品和香水协会(“CTFA”)出版的国际化妆品成分(INCI)辞典和手册(第 10 版)中的指定名称描述。INCI 辞典未指定氨基酸序列或每个氨基酸残基的量。如下所述,三肽在 INCI 辞典中可被

描述为含有 2 个氨基酸残基，而没有指出 2 个所列氨基酸之一是否出现两次，或者肽序列中的第三个氨基酸是否选自 18 个其它天然氨基酸。

[0013] 美国专利申请公开号 2003/0166510 教导了使用有效量的离子金属-肽复合物以重建皮肤并减小或除去皮肤瑕疵。(本文援引的被许可的美国专利和公开的美国专利申请就以相关程度在此引入作为参考)。在该参考文献中讲述的皮肤瑕疵包括疤痕(例如由伤口、痤疮产生)、皮赘、胼胝、良性皮肤胎块、萎缩纹、面部角质、晒斑或白癜风斑。按照该参考文献，离子金属-铜(II)、锡(II)、锡(IV)和锌(II)及其盐，与化学合成的二肽、三肽和四肽复合。Phe-Phe 和 Gly-Gly 被明确地讲述为可与以上列出的离子肽复合的二肽片段。

[0014] 西班牙专利申请公开号 ES2020148 教导了由 9-17 个碳原子的饱和或不饱和的脂肪酸链组成的生物表面活性剂，N-末端连接为 L-、D-或 DL 型中的任一种的精氨酸，后接选自 20 个天然氨基酸中的任一个的第二个氨基酸。教导了具体的氨基酸序列 Arg-Gly、Arg-Ser 和 Arg-Phe。

[0015] 三肽-1，含有 3 个氨基酸残基—甘氨酸、组氨酸和赖氨酸的合成肽以商标 Kollaren C.P.P.由 Vincience 商购，以及以 Kollaren 由 I.E.B.商购。三肽-1 与水、尿素、葡萄糖和盐酸胍的混合物以 Kollaren 由 Atrium Biotechnologies 售卖。Gly-His-Lys 序列在文献中被描述为活性羰基物质(“RCS”)的清除剂，活性羰基物质是细胞代谢过程(包括脂质过氧化和糖化)的副产物。已经将 RCS 与胶原交联和伴随的皮肤弹性丧失关联起来。参见 Puig 等，“Peptides as Active Ingredients in Cosmetics,” *Cosmetics and Toiletries Manufacture Worldwide*, 121-125 页。该氨基酸序列不具有 CMC。而且，其不形成聚合体。因此，其不是本发明范围内的生物表面活性剂。

[0016] 乙酰三肽-1 是乙酸的反应产物，因此不是本发明范围内的生物表面活性剂。通常，乙酰化不能给予用作生物表面活性剂所需

的足够两性特性。

[0017] 生物素化三肽通过将维生素 H (生物素)嫁接到三肽 Gly-His-Lys 上形成。美国专利申请公开号 2006/0067905 描述了通过给予齐墩果酸、芹菜素和生物素化-Gly-His-Lys 治疗掉发的方法。该生物素化部分不赋予足以产生生物表面活性剂特性的疏水性。

[0018] 棕榈酰三肽-1 也被描述为 Pal-GKH, 是三肽-1 和棕榈酸的反应产物。其可依据商标 Lipo-GKH 由 Sederma 获得。当以酸为末端时, 该脂-寡肽序列不具有可检测的抗微生物活性; 而且, 其于相当低的浓度(例如约 50 ppm 的 LD₅₀)对哺乳动物细胞有毒性。由于这些原因, 该脂-寡肽不属于本发明的范围。

[0019] 美国专利申请公开号 2004/0120918 在段落#0008 描述了 Pal-Gly-His-Lys, 其以 Biopeptide CL 得自 Sederma。该三肽的 INCI 名称为棕榈酰寡肽, 其按照 INCI 辞典为以下的 2 个或多个氨基酸残基的合成肽的棕榈酸酯: 丙氨酸、精氨酸、天冬氨酸、甘氨酸、组氨酸、赖氨酸、脯氨酸、丝氨酸或缬氨酸。

[0020] 在 C 末端具有游离酸或酰胺的 Pal-Gly-His-Lys 在哺乳动物细胞系中表现出显著毒性(即在 37 岁女性成纤维细胞中的 LD₅₀ < 100), 因此不属于本发明的范围。

[0021] 美国专利申请公开号 2004/0132667 教导了 3 个氨基酸的序列—甘氨酸、组氨酸和赖氨酸残基。优选的三肽具有特定的氨基酸序列 Gly-His-Lys。其中教导序列的类似物包括其中 3 个氨基酸中的一个或多个在序列中重构或重排的那些(例如 Gly-Lys-His)。该公开专利还教导了取代 3 个氨基酸中的至多 2 个。其教导可取代 Gly 的氨基酸具有脂肪族侧链, 例如但不限于 β -Ala、Ala、Val、Leu、Pro 和 Ile。其中优选 Ala、Leu 和 Ile。其教导取代 Lys 或 His 的氨基酸包括具有于 pH 约 6 主要包含带电荷的氮的侧链的那些氨基酸(例如 Pro、Lys、Arg、His、锁链素和异锁链素)。最优选地, 用鸟氨酸、精氨酸或瓜氨酸置换 Lys。

[0022] '667 申请进一步教导附着至上述取代的或重排的氨基酸序列的酰基-部分,其来源于:乙酸、癸酸、月桂酸、肉豆蔻酸、辛酸、棕榈酸、硬脂酸、山萘酸、亚油酸、亚麻酸、硫辛酸、油酸、异硬脂酸、反油酸(elaidic acid)、2-乙基己酸(2-ethylhexanoic acid)、椰子油脂肪酸、牛脂酸、硬化牛脂酸、棕榈仁油脂肪酸、羊毛脂酸。这些衍生物被进一步讲述为直链或支链、长链或短链、饱和的或不饱和的、被羟基、氨基、酰基氨基、硫酸酯基或亚硫酸酯基取代的或未取代的。据教导优选的酰基包括棕榈酰和肉豆蔻酰。通过讲述用丙氨酸或精氨酸置换赖氨酸,并用棕榈酰或肉豆蔻酰基团酰化产生的3个氨基酸序列,'667 公开文献教导了以下的酰化肽: Pal-Gly-His-Arg; Pal-Arg-His-Ala; Pal-Arg-His-Gly; Pal-Ala-His-Arg; Myr-Gly-His-Arg; Myr-Arg-His-Ala; Myr-Arg-His-Gly; Myr-Ala-His-Arg。然而,该专利出版物没有讲述这些酰化三肽的C末端酰胺化或本发明的聚合生物表面活性剂的抗微生物、刺激和/或增殖特性。而且,在该公开文献中公开的三肽于中性 pH 仅具有1个带正电荷的氨基酸残基。如下所述,本发明的聚合生物表面活性剂大部分含有2个并且常常是3个带正电荷的氨基酸残基。

[0023] 三肽-2 是一种合成肽,依据商标 I.E.L. 由 Vincience 获得。根据 INCI 辞典,其含有2个氨基酸残基—酪氨酸和缬氨酸。该氨基酸序列不具有 CMC,因此不是本发明范围内的生物表面活性剂。

[0024] 三肽-3 具有氨基酸序列 Gly-His-Arg,已被 Therapeutic Peptides Inc 以上市材料公开。该氨基酸序列不具有 CMC,因此不是本发明范围内的生物表面活性剂。

[0025] 科学文献报道,铜三肽 Gly-His-Lys-Cu 对成纤维细胞的胶原合成具有刺激作用。参见 Maquart FX 等, *FEBS Lett.* 238(2):343-6 (1988)。另参见在美国皮肤医学学会第 60 届年会上发表的 Oddos T 等, "Requirement of Copper and Tripeptide Glycyl-L-Histidyl-L-Lysine-Cu (GHK) Complex Formation for Collagen Synthesis Activity in Normal

Human Dermal Fibroblasts” (New Orleans, LA1, 2002 年 2 月)。另外, 已报道该铜三肽促进伤口愈合。参见 Fish 等, *Wounds* 3:171 (1991); Mulder 等, *Wound Rep. and Regen.* 2: 259 (1994)。

[0026] Gly-His-Lys-Cu 的化妆用途描述于均转让给 ProCyte Corporation 的美国专利号 5,135,913 和 5,348,943。在商业上, 该铜三肽用作露得清紧致活力晚霜(Neutrogena Visibly Firm Night Cream)以及 ProCyte Corp.以商标名 Simple Solutions®抗衰老护肤品(由水疗师和美容师售卖)和 Neova®(由皮肤科医师售卖)提供的产品中的成分。

[0027] 于 1993 年 2 月 25 日公布的德国专利申请 DE 41 27 790 A1 教导了 Gly-His-Lys 的 Mg、Mn、Zn 和 Ge 复合物改善皮肤状况的用途。如在欧洲专利局站点 espacenet.net 所公布的, 该专利申请的文献数据也教导了三肽, 其中该肽的 3 个组成氨基酸中的每一个均是赖氨酸、羟赖氨酸、脯氨酸、羟脯氨酸、精氨酸、甘氨酸或组氨酸中的一个。更具体地说, 教导了符合式 B1-B2-B3 的三肽, 其中 B1、B2 和 B3 中的每一个均是以上列出的 7 个氨基酸之一。

[0028] 德国专利申请 DE 4244 418 A1 教导了化妆用和药用组合物, 其含有 1 pM-0.01 M 浓度的 Gly-His-Lys 和 Gly-Asp-Ser, 它们既是三肽, 又是更长肽部分的组成部分。据教导这些组合物通过用盐酸温和水解胶原、弹性蛋白、角蛋白或结缔组织制备, 或者使用溶组织梭菌(*C. histolyticum*)胶原酶部分水解制备。其中所公开的抗衰老护肤应用有刺激胶原合成和清除自由基。

[0029] 法国专利申请 FR 2 826 577 A1 教导了含有序列 Lys-Pro-Val 的肽。按照该申请, 局部应用含有该序列的组合物增加编码涉及表皮脂质(即胆固醇、脂肪酸和鞘脂)合成的酶的基因的表达, 由此改善皮肤屏障功能。该公开肽序列不具有 CMC, 因此不是本发明范围内的生物表面活性剂。

[0030] 美国专利 5,493,894 教导了用于治疗皮肤皱纹的组合物, 其含有由至少 3 个精氨酸或赖氨酸残基组成的三、四和五肽部分。其

中具体公开的三肽有：(i) H-Arg-Lys-Arg-OH；(ii) H₃C-C(O)-Arg-Lys-Arg-NH₂。这两种具体公开的序列不具有 CMC，因此不是本发明范围内的生物表面活性剂。

[0031] 美国专利申请公开号 2003/0166510 教导了离子金属-三肽复合物的用途，其中铜(II)、锡(II)、锡(IV)或锌(II)之一与以下氨基酸序列复合：Gly-His-Lys；Gly-Gly-His；His-Gly-Gly；Gly-Gly-Gly；Ala-Gly-His；Gly-Cys-Gly；His-Gly-His。上述金属-三肽复合物不具有 CMC，因此不是本发明范围内的生物表面活性剂。

[0032] 美国专利申请公开 2006/0013794 教导了化妆用、皮肤病用和/或药用组合物，其含有包含氨基酸序列 Arg-Gly-Ser 的三肽、四肽、五肽、六肽、七肽和九肽。

[0033] 四肽-1 是含有 4 个氨基酸残基—亮氨酸、脯氨酸、苏氨酸和缬氨酸的合成肽的 INCI 名称。以商标名 I.E.L. Leucocytar 弹性蛋白酶抑制剂由 Vincience 售卖。如上所述，单独的氨基酸序列不具有足以自聚集的疏水性，因此没有 CMC，不是本专利范围内的生物表面活性剂。而且，在该化合物中的 4 个氨基酸没有 1 个带电荷。由于此原因，该化合物不在本发明的范围内。

[0034] 四肽-4 是分配给合成四肽的 INCI 名称，该合成四肽以商标名 Collasyn 4 GG 由 Therapeutic Peptides Inc. 售卖。其含有 3 个氨基酸残基—甘氨酸、谷氨酸和脯氨酸。更具体地说，该肽具有序列 Gly-Glu-Pro-Gly。由于上述原因，该氨基酸序列不是本发明范围内的生物表面活性剂(即无 CMC，不自聚集)。

[0035] Therapeutic Peptides Inc. 还以商标名 Collasyn 414 GG 公开了酰化氨基酸序列 Myr-Gly-Glu-Pro-Gly。该序列于 500 ppm 以下的浓度不抑制大肠杆菌(*E. coli*)、痤疮丙酸杆菌(*P. acnes*)、绿脓杆菌(*P. aeruginosa*)、金黄色葡萄球菌(*S. aureus*)和/或白色念珠菌(*C. albicans*)的生长，因此不在本发明的范围内。

[0036] 乙酰四肽-1 是乙酸的反应产物，为含有 3 个氨基酸残基

-甘氨酸、组氨酸和赖氨酸的合成肽。其以商标名 Kollaren 6 由 I.E.B. 售卖。由于上述原因，该氨基酸序列不是本发明范围内的生物表面活性剂(即无 CMC，不自聚集)。

[0037] 乙酰四肽-2 是乙酸的反应产物，为含有 4 个氨基酸残基—天冬氨酸、赖氨酸、酪氨酸和缬氨酸的合成肽。由 I.E.B. 生产的产品以商标名 Thymulen 4 由 Atrium Biotechnologies 售卖。产品文献描述了为生物模拟肽的 Thymulen 4，其由具有皮肤再生特性的胸腺生成素衍生。由于上述原因，该氨基酸序列不是本发明范围内的生物表面活性剂(即无 CMC，不自聚集)。

[0038] Rigin 是具有序列 Gly-Gln-Pro-Arg 的四肽，在科学文献中由 Veretennikova 等, *Int. J. Peptide Protein Res.*, 17:430 (1981) 报告。棕榈酰四肽在 INCI 辞典中被描述为棕榈酸和含有甘氨酸、谷氨酰胺、脯氨酸和精氨酸的合成肽的反应产物。其由 Sederma 市售可得。

[0039] 酰化氨基酸序列 Pal-Gly-Gln-Pro-Arg-酸于 500 ppm 以下的浓度时不抑制微生物的生长，所述微生物包括大肠杆菌(*E. coli*)和绿脓杆菌(*P. aeruginosa*)，因此不在本发明的范围内。而且，该化合物及其以酰胺为末端的类似物在哺乳动物细胞系中表现出显著的毒性(即在 37 岁女性成纤维细胞中的 $LD_{50} < 100$)。

[0040] Eyeliss 是组合两种肽的原材料浓缩物的商标名，由 Sederma 销售，有助于减轻浮肿外貌和黑眼圈。如在国际专利申请 PCT FR-03/00441 中所述，其为橙皮苷甲基查耳酮和两个酰化肽片段—缬氨酰-色氨酸和 N-棕榈酰-Gly-Gln-Pro-Arg 的组合。更一般地，该 PCT 申请描述了以 C_2 - C_{22} 碳链开始并以序列 Pro-Arg-OH 终止的三肽、四肽和五肽。按照美国专利 6,974,799，Val-Trp 二肽没有显著的胶原刺激活性，其与 Gly-Gln-Pro-Arg 四肽组合未使该特性相对于使用单独的四肽实现的水平表现出任何增强。

[0041] Matrixyl 3000 是两个酰化肽 N-棕榈酰-Gly-Gln-Pro-Arg 和 N-棕榈酰-Gly-His-Lys 组合的商标。美国专利 6,974,799 教导了局部

组合物，其含有(i)约 0.00001%至约 0.5% (基于组合物总重)的至少一种“基于 rigin 的四肽”(定义为 Gly-Gln-Pro-Arg)和约 0.00001%至约 1.0%的至少一种三肽 Gly-His-Lys，其中三肽以大于四肽的量存在，和(ii)至少一种另外的护肤成分。所公开的组合物据教导可用于减少衰老和萎缩纹的明显征兆以及明显的黑眼圈。

[0042] DE 41 27 790 教导了以下的四肽：(i) Gly-His-Lys-Lys；(ii) Gly-His-Lys-Gly；(iii) Gly-His-His-Gly；(iv) Gly-His-His-Lys；(v) Gly-His-Arg-Lys；(vi) Gly-His-Arg-Gly；(vii) Gly-His-Pro-Lys；(viii) Gly-His-Pro-Lys；(ix) Hyp-Gly-Lys-Lys；(x) Hyp-Gly-His-Lys；(xi) Hyp-Gly-Arg-Lys；(xii) Hyp-Gly-Pro-Lys；(xiii) Arg-Gly-Lys-Lys；(xiv) Arg-Gly-Lys-Lys；(xv) Arg-Gly-His-Lys；(xvi) Arg-Gly-His-Lys；(xvii) Arg-Gly-Arg-Lys；(xviii) Arg-Gly-Arg-Lys；(xix) Arg-Gly-Pro-Lys；和(xx) Arg-Gly-Arg-Lys，其中 Hyp 为羟脯氨酸，所述四肽为与 Mg、Mn、Cu、Zn、Ge、Ni、Fe、Mo 和 Co 组成的寡肽金属复合物的组成部分。

[0043] 如在 ep.espacenet.com 上所公开的，德国专利申请 DE 41 27 790 的文献数据也教导了四肽，其中该肽的前 3 个氨基酸中的每一个均为赖氨酸、羟赖氨酸、脯氨酸、羟脯氨酸、精氨酸、甘氨酸或组氨酸之一，第 4 个氨基酸与前 3 个氨基酸中的一个相同。更具体地说，四肽符合式 B1-B2-B3-B1、B1-B2-B3-B2 和 B1-B2-B3-B3。在该申请中公开的寡肽金属复合物不具有 CMC，且不自聚集。由于这些原因，它们不是本发明范围内的生物表面活性剂。

[0044] 美国专利 5,493,894 具体教导了用于治疗皮肤皱纹的组合物，其含有以下四肽：(i) H-Arg-Gly-Arg-Lys-OH 和(ii) H-Lys-Arg-Ser-Arg-NH₂。这些不是生物表面活性剂，因此不在本发明范围内。

[0045] 美国专利申请公开号 2003/0166510 教导了与四肽 Gly-His-Lys-His 复合的离子金属。据教导含有该金属离子/四肽复合物的局部组合物可用于减少或除去皮肤瑕疵。

[0046] Therapeutic Peptides Inc.已在贸易文献中公开了以酰胺为末端的 VPAA 四肽序列以及肉豆蔻酰四肽-5, 其为具有 VPAA 序列的酰化合成肽。后者以商标名 Collasyn 414 VA 市售可得。该酰化氨基酸序列于 500 ppm 以下的浓度时不抑制微生物生长, 所述微生物包括大肠杆菌。而且, 该序列含不带电荷的氨基酸残基。因此, 由于这些原因, Myr-Val-Pro-Ala-Ala 不在本发明范围内。

[0047] 美国专利 4,665,053 教导了“双功能的”合成脂肽, 其被进一步定义为既用作弹性蛋白活性的抑制剂, 又用作弹性纤维的保护剂。另外, 这些脂肽部分被描述为不仅能够识别并被固定在弹性纤维上, 而且识别并中和弹性蛋白酶的活性位点。更具体地说, 该参考文献教导了符合式: $R-X-(P_1)_x-(L-Ala-L-Ala-P_2)-A$ 的具有两个连续的 L-丙氨酸残基的脂肽, 其中 P_1 为氨基酸序列, 长 2-8 个残基; x 为 0 或 1; R 为酰化疏水羧酸。 P_2 据教导为 L-Ala、L-Val、L-Pro-L-Ala 或 L-Pro-L-Val 之一。 A 为酸、醛、醇、酰胺或氯甲基酮形式的 C 末端。

[0048] 棕榈酰五肽-2 是棕榈酸和由 4 个氨基酸残基—酪氨酸、甘氨酸、苯丙氨酸和亮氨酸组成的合成肽的反应物。其可得自 Sederma。该酰化氨基酸序列含不带电荷残基, 因此不在本发明范围内。

[0049] 五肽-3 以商标名 Matrixyl 由 Sederma 售卖。其在 INCI 辞典中描述为棕榈酸和由赖氨酸、苏氨酸和丝氨酸残基组成的合成肽的反应产物。INCI 辞典未列出该物质的氨基酸序列。在没有进一步知会的情况下, 描述性的“由……组成”意指在产物中仅存在 3 个列出的氨基酸残基, 该参考文献教导了 60 个组合, 没有提示哪一个会具有特殊特性。

[0050] 如在贸易文献和制成品公司的市场资料中所公开的, Matrixyl 五肽的氨基酸序列为 Lys-Thr-Thr-Lys-Ser。该化合物进一步描述于 USPN 6,620,419, 其要求保护符合式: $R_1-X-Thr-Thr-Lys-(AA)_n-Y$ 的肽。 X 被定义为具有 D 或 L 方向的 7 个

氨基酸之一。其教导在 X 位的 7 个氨基酸当中有赖氨酸。R₁ 据教导为氢或 2-22 个碳的脂肪酸链，其包括棕榈酰。(AA)_n 据教导代表 n 个氨基酸的链，其中 n 由 0-5 变化。Y 被定义为 OR₂ 或 NR₂R₃，其中 R₂R₂ 可为氢，产生酸和酰胺 C-末端。

[0051] Pal-KTTKS-酸于低于 500 ppm 的浓度时没有表现出抗微生物活性，因此不是本发明范围内的聚合生物表面活性剂。

[0052] Collasyn 514KS 是肉豆蔻酰五肽-3 的商标名。该合成肽在序列 Myr-KTTKS-酰胺中含有苏氨酸、丝氨酸和赖氨酸残基，得自 Therapeutic Peptides Inc. 该部分未导致可溶性代谢蛋白增加，未增加细胞更新率，其也不具有所需的抗微生物特性。由于这些原因，Collasyn 514KS 不在本发明范围内。

[0053] DE 41 27 790 A1 教导了与 Mg、Mn、Cu、Zn、Ge、Ni、Fe、Mo 和 Co 复合的以下序列的五肽：(i) Hyp-Gly-Lys-Hyp-Gly；(ii) Hyp-Gly-His-Lys-Gly；(iii) Gly-Pro-Lys-Gly-Pro。这些肽未酰化，因此不是本发明范围内的生物表面活性剂。

[0054] 如在 ep.espacenet.com 上所公开的，德国专利申请 DE 41 27 790 的文献数据也教导了五肽，其中(i)前 3 个氨基酸的每一个均为赖氨酸、羟赖氨酸、脯氨酸、羟脯氨酸、精氨酸、甘氨酸或组氨酸之一，和(ii)第 4 个和第 5 个氨基酸与前 3 个氨基酸中的一个相同。更具体地说，文献数据教导了对应于以下 6 式的五肽：(i) B1-B2-B3-B1-B2；(ii) B1-B2-B3-B2-B3；(iii) B1-B2-B3-B2-B3；(iii) B1-B2-B3-B2-B1-B3；(iv) B1-B2-B3-B2-B1；(v) B1-B2-B3-B3-B2；和(vi) B1-B2-B3-B3-B1，其中 B1、B2 和 B3 中的每一个均为赖氨酸、羟赖氨酸、脯氨酸、羟脯氨酸、精氨酸、甘氨酸或组氨酸。这些肽未酰化，因此不是本发明范围内的生物表面活性剂。

[0055] 乙酰五肽-1 以商标名 Thymulen 由 Atrium Biotechnologies 售卖。其是乙酸和五肽-1 的反应产物。在产品文献中，Thymulen 被描述为诱导粒细胞-巨噬细胞集落刺激因子分泌，导致角

化细胞增殖和分化。该肽部分不具有可检测的 CMC，因此不是本发明范围内的生物表面活性剂。

[0056] Therapeutic Peptides Inc.还已出售以下的以酰胺为末端的氨基酸序列: EVEDQ; DSDPR; GRKGD; GEESN; KKALK; KRGDR; LPPSR。因为这些肽部分未酰化，所以它们不具有 CMC，不是本发明范围内的生物表面活性剂。

[0057] 美国专利号 6,492,326 要求保护在皮肤病学上可接受的载体中与“另外的护肤活性物质”组合的五肽和/或五肽衍生物及其混合物。这些另外的护肤活性物质据教导包括二-、三-和四-肽(及其衍生物)以及类维生素 A、醇酸、抗炎剂、抗真菌剂和抗微生物剂。

[0058] 题为“Peptide Conjugates, Use Thereof as a Drug and Compositions Containing Same”的 WO97/18235 公开于 1997 年 5 月。五肽和五肽衍生物公开于第 6 页的#2、5、7、9、11 和第 7 页的#14。另外的护肤活性物质，具体地说为抗真菌剂和抗微生物剂，据教导与第 8 页 19-24 行公开的肽组合。WO97/18235 还教导，所公开的肽及其衍生物可与化妆品工业众所周知的赋形剂一起用于乳膏、凝胶、奶液、洗液和喷雾剂。该申请的第 3 页进一步教导，该肽序列可用饱和或不饱和的直链或支链 C_1 - C_{20} 单羧酸酰化。更具体地说，该申请公开了在寡肽中具有特定氨基酸序列 Gly-His-Lys 的脂-寡肽。本发明的生物表面活性剂不含该特定序列。

[0059] DE 41 27 790 A1 教导了与 Mg、Mn、Cu、Zn、Ge、Ni、Fe、Mo 和 Co 之一复合的以下氨基酸序列的六肽: (i) Gly-Pro-Arg-Gly-Pro-Hyp ; (ii) Gly-His-Hyp-Gly-Lys-Pro ; (iii) Gly-Lys-Pro-Gly-Arg-Hyp ; (iv) Gly-Pro-Hyp-Gly-Pro-Pro ; (v) Gly-His-Arg-Gly-His-Lys。因为这些肽部分未酰化，所以它们不具有 CMC，不是本发明范围内的生物表面活性剂。

[0060] 六肽-1 是由 6 个氨基酸残基—丙氨酸、精氨酸、组氨酸、亮氨酸、苯丙氨酸和色氨酸组成的合成肽。因为这些肽部分未酰化，

所以它们不具有 CMC，不是本发明范围内的生物表面活性剂。

[0061] 乙酰六肽-1 是乙酸和六肽-1 的反应产物，由 Vincience 以商标名 Melitane 售卖。该肽部分不具有可检测的 CMC，因此不是本发明范围内的生物表面活性剂。

[0062] Melitane 5 PP 是葡聚糖和乙酰六肽-1 的商标名。Melitane 5 PS 是水、葡聚糖和乙酰六肽-1 的商标名。PP 和 PS 命名分别指示肽粉末和肽溶液。PS 产品在贸易文献中被描述为模拟 α 黑素细胞刺激激素的活性的肽，刺激黑素生成。这二者均可由 I.E.B. 市售可得。该肽部分不具有可检测的 CMC，因此不是本发明范围内的生物表面活性剂。

[0063] 乙酰六肽-3 是由 3 个氨基酸—精氨酸、甲硫氨酸和乙酰化谷氨酸组成的合成肽。其以商标名 Argireline 由 Lipotec 售卖。该肽部分不具有可检测的 CMC，因此不是本发明范围内的生物表面活性剂。

[0064] 六肽-4 是一种含有赖氨酸、苏氨酸和丝氨酸残基的合成肽，以商标名 Collasyn 6KS 由 Therapeutic Peptides Inc. 市售可得。该肽部分未酰化，不具有 CMC；因此，其不是本发明范围内的生物表面活性剂。

[0065] 六肽-5 是含有缬氨酸、酪氨酸、谷氨酸、脯氨酸和异亮氨酸残基的合成肽。其以商标名 Collasyn 6VY 由 Therapeutic Peptides Inc. 市售可得。该肽部分未酰化，不具有 CMC；因此，其不是本发明范围内的生物表面活性剂。

[0066] 六肽-6 是一种具有序列 VEPIPY 的合成肽。其由 Therapeutic Peptides Inc. 市售可得。该肽部分未酰化，不具有 CMC；因此，其不是本发明范围内的生物表面活性剂。

[0067] 科学文献描述了胞外基质的几种组分的趋化活性，所述组分包括胶原、纤连蛋白、弹性蛋白和原弹性蛋白，原弹性蛋白是弹性蛋白的可溶性前体。业已报道，弹性蛋白对成纤维细胞的趋化活性

与重复六肽序列 Val-Gly-Val-Ala-Pro-Gly 相关。参见 Senior RM 等, *J. Cell Biol.* 99(3): 870-874 (1984)。还已报道, Val-Gly-Val-Ala-Pro-Gly 作为序列刺激人皮肤成纤维细胞生长。参见 Kamoun A.等, *Cell Adhes. Commun.*, 3(4): 273-81 页(1995)。因为该肽序列未酰化, 所以其不具有 CMC, 不是本发明范围内的生物表面活性剂。

[0068] 棕榈酰-Val-Gly-Val-Ala-Pro-Gly 是以商标名 Biopeptide EL 得自 Sederma 的酰化六肽。Biopeptide EL 的 INCI 名称为棕榈酰寡肽。因为该肽序列不含至少 1 个带电荷的氨基酸部分, 所以其不在本发明范围内。

[0069] 美国专利申请公开号 2004/0120918 教导了神经酰胺改善具有 3-12 个氨基酸长度的氨基酸序列的多肽(或酰化多肽)的抗衰老活性的用途。'918 公开文献教导了 Val-Gly-Val-Ala-Pro-Gly 六肽的 N-酰基衍生物, 其中酰基链为 2-22 个碳的、直链或支链的、饱和或不饱和的、羟基化或非羟基化的烷酰基(alkoyl)。该公开文献更具体地教导了与 3 种神经酰胺—正-硬脂酰-二氢鞘氨醇、三羟基棕榈酰氨基羟基-丙基肉豆蔻酯或棕榈酰氨基肉豆蔻基丝氨酸酯组合的 Biopeptide EL。该特定的六肽氨基酸序列不包含在本发明的聚合生物表面活性剂之内。

[0070] 可得自 Sederma 的市售产品 Bio-Bustyl 是 Pal-VGVAPG 和 Pal-GHK 的组合。该化合物的 INCI 名称为甘油聚甲基丙烯酸酯-拉恩菌(Rahnella)/大豆蛋白发酵物-水(Aqua)-丙二醇-甘油-PEG-8-棕榈酰寡肽。Pal-VGVAPG 不含带电荷的氨基酸残基, 因此不是本发明范围内的聚合生物表面活性剂。

[0071] 肉豆蔻酰六肽-6 可以商标名 Collasyn 614VG 得自 Therapeutic Peptides Inc.。根据 INCI 辞典, 其是肉豆蔻酸和含有缬氨酸、甘氨酸、丙氨酸和脯氨酸残基的合成肽的反应产物。Collasyn 614VG 不含带电荷的氨基酸残基, 因此不是本发明范围内的聚合生物表面活性剂。

[0072] 乙酰六肽-7 在 INCI 辞典中被描述为乙酸和六肽-7 的反应产物。其以商标名 Melitane 5 由 Atrium Biotechnologies 售卖。Melitane 5 PP 和 5 PS 是葡聚糖和乙酰-六肽-7 的混合物，5 PS 还包含水。这二者均可得自 I.E.B.。该肽部分不具有可检测的 CMC，因此不是本发明范围内的生物表面活性剂。

[0073] 棕榈酰寡肽也是对 Sederma 的 Biopeptide FN 的 INCI 命名。如在美国专利申请公开号 2002/0025303 中进一步描述的，Biopeptide FN 由精氨酸、天冬氨酸、甘氨酸和丝氨酸组成。本发明的组合物没有一个由全部这 4 个氨基酸组成。

[0074] 六肽-8 已由 Therapeutic Peptides Inc. 作为以酰胺为末端的序列 Ser-Thr-Lys-Thr-Thr-Lys 售卖。因为该肽部分未酰化，所以其不具有 CMC，不是本发明范围内的生物表面活性剂。

[0075] WO 9962482 描述了烷基-七肽，其中 9-至 13-元碳链结合至七肽序列 Glu-Leu-Leu-Val-Asp-Leu-X1 的 N-末端，其中 X1 为选自 20 种天然氨基酸、羟脯氨酸和高丝氨酸的氨基酸。本发明的组合物没有一个含有 6 个氨基酸的序列 Glu-Leu-Leu-Val-Asp-Leu。

[0076] 在与水和葡聚糖一起的混合物中的九肽-1 以商标名 Melanostatine 5 由 Atrium Biotechnologies 售卖。按照其产品文献，其为用于皮肤增白的生物模拟肽。因为该肽部分未酰化，所以其不具有 CMC，不是本发明范围内的生物表面活性剂。

[0077] Therapeutic Peptides Inc. 已售卖以酰胺为末端的九肽，其具有序列 VQGEESNDK。因为该肽部分未酰化，所以其不具有 CMC，不是本发明范围内的生物表面活性剂。

[0078] 美国专利申请公开 2005/0124545 教导了含有 15 个氨基酸的序列 X_1 -Y-Phe-Thr- X_2 -Ala-Thr-Z-Ile- X_3 -Leu- X_4 -Phe-Leu- X_5 的化妆用、皮肤病用和/或药用组合物。 X_1 、 X_2 、 X_3 、 X_4 和 X_5 中的每一个都被定义为 Arg、Lys 或 His 之一。Y 被定义为 Asp 或 Glu。Z 被定义为 Asn 或 Gln。这些特定氨基酸序列不包含在本发明的聚合生物表面活

性剂之内。而且，因为符合上式的该肽部分未酰化，所以它们不具有 CMC，不是本发明范围内的生物表面活性剂。

[0079] 授予 Bascom 等的美国专利号 5,492,894 教导了具有 3-6 个氨基酸残基的肽，其中 2 个为 Arg，其中 1 个为 Lys，可用于哺乳动物皮肤皱纹的化妆治疗。公开了以下的 38 个氨基酸序列：(1) RGRK；(2) KRSR；(3) RSRK；(4) YRSRKY；(5) YRSRK；(6) RSRKY；(7) TYRSRKYS；(8) SYRSRKYT；(9) SYRSRKYS；(10) TYRSRKYT；(11) RSRKYT；(12) TYRSRK；(13) RSR KYS；(14) SYRSRK；(15) YRSRKYT；(16) TYRSRKY；(17) YRSRKYS；(18) SYRSRKY；(19) NTYRSRKYSS；(20) NSYRSRKYTS；(21) NSYRSRKYSS；(22) NTYRSRKYTS；(23) RSRKYTS；(24) NTYRSRK；(25) RSRKYSS；(26) NSYRSRK；(27) YRSRKYTS；(28) NTYRSRKY；(29) YRSRKYSS；(30) NSYRSRKY；(31) TYRSRKYSS；(32) NTYRSRKYS；(33) SYRSRKYTS；(34) NSYRSRKYT；(35) SYRSRKYSS；(36) NSYRSRKYS；(37) TYRSRKYTS；和 (38) NTYRSRKYT。烷酰基是可连接至序列中的第一个氨基酸的基团之一。

[0080] 美国专利号 6,875,744 教导了 5-22 个氨基酸长的非酰化肽序列，含有至少 80% 的苯丙氨酸、亮氨酸、丙氨酸和赖氨酸残基。在 '744 专利中公开的肽不具有 CMC，不是本发明范围内的生物表面活性剂。

发明概述

[0081] 本发明涉及在下一个段落的表中的序列的聚合酰化生物表面活性剂(“PAB”)，其在最小必需培养基(Minimal Essential Media, “MEM”)溶液(如下定义)的水性环境中具有低于约 200 ppm 的临界胶束浓度，在水性环境中将表面张力降低至低于约 50 达因/cm²。更具体地说，PAB 基本上由以下组成：(i)饱和的或不饱和的直链或支链 8-

至 22-元碳链; (ii) 4-9 个氨基酸残基, 其中至少 1 个、优选至少 2 个带电荷; 和(iii)酸 C 末端或酰胺 C 末端。在本申请中所用的带电荷氨基酸是指赖氨酸、精氨酸、天冬氨酸和谷氨酸。令人惊奇的是, 已发现本发明的 PAB 能够将代谢溶解蛋白增加至少约 20%。另外, 它们对哺乳动物细胞的毒性相当低, 优选地, 在 37 岁女性成纤维细胞中的 LD₅₀ 大于 200 ppm, 以及具有增加胞外皮肤基质蛋白合成和/或减慢皮肤基质蛋白降解的能力。

[0082] 以下的序列表构成了说明书的组成部分, 纳入该序列表是为了进一步阐述本发明的某些方面。参考这些序列中的一个或多个连同以下提供的本发明详述可更好地理解本发明。

SEQ ID NO	序列
1	Myr-KAKA 酰胺
2	Myr-AKAK 酰胺
3	Pal-GRKG 酰胺
4	Myr-GRKG 酰胺
5	Myr-LAKK 酰胺
6	Pal-GQPR 酰胺
7	Myr-KLAKK 酰胺
8	Pal-KLAKK 酸
9	Myr-KKGEM 酰胺
10	Myr-KRGKP 酰胺
11	Pal-KRGDR 酸
12	Myr-KKALK 酰胺
13	Pal-KKALK 酰胺
14	Pal-KKALK 酸
15	Myr-KKLAK 酰胺
16	Pal-GRKGD 酸
17	Myr-GRKGD 酰胺

18	Myr-KLAKKL 酸
19	Myr-AKKLAK 酰胺
20	Myr-AKKALK 酸
21	Myr-STKTTK 酰胺
22	Myr-SRVSRRSR 酰胺
23	Myr-LAKLAKKAF 酰胺
24	Myr-LAKKALKAF 酸
25	Myr-d-[KLAKKL]酸
26	Myr-TKTSKS 酰胺
27	Myr-KRGDR 酰胺
28	Myr-KSSKS 酰胺
29	Myr-KTTK 酰胺
30	Myr-KKAL-d-[K]-酰胺
31	Myr-LKKALK 酸
32	Myr-KAKL 酰胺
33	Myr-LAKK 酰胺

[0083] 上表中的序列表在本申请结尾处的序列表中提供, 并以计算机可读形式刻录在光盘序列表上, 该光盘序列表为了检索目的而提交。在书写的序列表中的信息与光盘序列表相同。除非另有说明(即 SEQ ID NO: 25 和 SEQ ID NO: 30), 否则 PAB 中的氨基酸为 L 型。

发明详述

[0084] 本发明涉及聚合酰化生物表面活性剂(“PAB”), 其在 MEM 溶液的水性环境中具有低于约 200 ppm 的临界胶束浓度, 将 MEM 溶液的表面张力降低至低于约 50 达因/cm², 其中 PAB 基本上由以下组成: (i)饱和或不饱和的直链或支链 8-至 22-元碳链; (ii) 4-9 个氨基酸残基, 其中至少 1 个带电荷; 和(iii)酸 C 末端或酰胺 C 末端。

[0085] 如在本申请中所用的, “MEM 溶液”为通过于室温将

10 g MEM Powder (如下定义)加入 950 ml 去离子的蒸馏水中并温和搅拌混合制备的 1,000 ml 溶液。向该混合物中加入 2.2 g NaHCO_3 和 10 ml 青霉素-链霉素溶液(如下定义)。然后以足以达到终体积 1,000 ml 的量加入去离子的蒸馏水。通过在搅拌下缓慢加入 1 N NaOH 或 1 N HCl 将 MEM 溶液的最终 pH 调节至 7.4-7.6。使用正压系统经由 0.2 μm 过滤器通过膜过滤处理 MEM 溶液。“MEM Powder”可以商标名 GIBCO 41500 得自 Invitrogen, Inc. (Carlsbad, Calif.), 含有以下所列浓度的成分:

<u>成分</u>	<u>浓度(mg/L)</u>
氯化钙(无水)	200.00
氯化钾	40.00
硫酸镁(无水)	97.67
氯化钠	6800.00
磷酸钠- H_2O	140.00
D-葡萄糖	1000.00
酚红	10.00
L-丙氨酸	8.90
L-精氨酸-HCl	126.00
L-天冬酰胺- H_2O	15.00
L-天冬氨酸	13.30
L-胱氨酸-2HCl	31.28
L-谷氨酸	14.70
甘氨酸	292.00
L-组氨酸-HCl- H_2O	7.50
L-组氨酸	42.00
L-异亮氨酸	52.00
L-亮氨酸	52.00
L-赖氨酸	72.50

L-甲硫氨酸	15.00
L-苯丙氨酸	32.00
L-脯氨酸	11.50
L-丝氨酸	10.50
L-苏氨酸	48.00
L-色氨酸	10.00
L-酪氨酸	51.90
L-缬氨酸	46.00
D-泛酸钙	1.00
氯化胆碱	1.00
叶酸	1.00
i-肌醇	2.00
烟酰胺	1.00
盐酸焦木素	1.00
核黄素	0.10
盐酸硫胺素	1.00

“青霉素-链霉素溶液”是由 5,000 $\mu\text{g/ml}$ 青霉素 G 钠和 5,000 $\mu\text{g/ml}$ 硫酸链霉素的 0.85% 盐水溶液组成的制备物，也可得自 Invitrogen。

[0086] 就可比较的毒性水平、抗微生物活性、细胞增殖活性和/或刺激活性(即针对基因表达)而言，本发明的 PAB 具有不同特性。如下所述，某些对哺乳动物细胞具有低毒性，对原核生命形式具有高毒性，而另一些能够增加代谢溶解蛋白。还有一些能够增加胞外皮肤基质蛋白的合成和/或减慢胞外皮肤基质蛋白的降解，以及能够增加成纤维细胞的增殖。

[0087] 如在本申请中所使用的，术语“生物表面活性剂”是指具有带电荷亲水头和长链碳疏水尾的分子，优选约 8-22 个碳原子长。这些分子被描述为生物表面活性剂，因为它们在高于它们的临界胶束

浓度时自动聚集成聚合结构。在该方面,本发明的组合物可与如在美国专利号 6,875,744 中所述的不在溶液中自动聚集的“FLAK”肽(即含有苯丙氨酸、亮氨酸、丙氨酸和赖氨酸残基的那些)区分开来。

[0088] 如在本申请中所使用的,术语“酸 C 末端”是指官能团 -COOH。

[0089] 如在本申请中所使用的,术语“酰胺 C 末端”是指选自 -CONH₂、-CONHR、-CONR₂ 的官能团,其中 R 为烷基、芳基或烷基-芳基部分。

[0090] 酰化是本领域技术人员众所周知的方法,用于保护氨基酸序列的 N-末端,以阻止与该基团进一步反应。酰基官能团具有式 R(C=O)-, 其中 R 为有机基团。它们通过由有机酸除去羧基羟基而形成。

[0091] 用于在氨基酸或氨基酸序列的 N-末端连接酰基部分的方法在本领域众所周知。其中本领域技术人员众所周知的有 Friedel-Craft 和 Schotten-Baumann 反应,这二者均使用酰基氯。参见例如美国专利号 4,126,628、日本特许号 JP 11140032、德国专利号 DE 19749556。另参见 Iyer, V.N.等, *J. Indian Chem. Soc.* 59: 856-859 (1982); Paquet A.等, *Can. J. Chem.* 60: 1806-1808 (1982)。

[0092] 用于本发明的优选酰基具有饱和或不饱和的、直链或支链的、8-22 个碳原子。更优选地,酰基部分选自豆蔻酰和棕榈酰。

[0093] 本发明的一个方面涉及以下的豆蔻酰化 PAB: SEQ ID NO: 1、SEQ ID NO: 2、SEQ ID NO: 4、SEQ ID NO: 5、SEQ ID NO: 7、SEQ ID NO: 9、SEQ ID NO: 10、SEQ ID NO: 12、SEQ ID NO: 15、SEQ ID NO: 17、SEQ ID NO: 18、SEQ ID NO: 19、SEQ ID NO: 20、SEQ ID NO: 21、SEQ ID NO: 22、SEQ ID NO: 23、SEQ ID NO: 24、SEQ ID NO: 25、SEQ ID NO: 26、SEQ ID NO: 27、SEQ ID NO: 27、SEQ ID NO: 28、SEQ ID NO: 29、SEQ ID NO: 30、SEQ ID NO: 31、SEQ ID NO: 32 和 SEQ ID NO: 33。

[0094] 本发明的另一方面涉及以下的棕榈酰化 PAB: SEQ ID NO: 3、SEQ ID NO: 6、SEQ ID NO: 8、SEQ ID NO: 11、SEQ ID NO: 13、SEQ ID NO: 14 和 SEQ ID NO: 16。

[0095] 为了保护氨基酸序列的最后一个氨基酸的羧基末端, 可以连接以下的保护基之一: -OR 或 -NHR, 其中 R 选自 H 或至多 22 个碳原子的、直链或支链的、饱和或不饱和的、线性或环状的烷基。这些酯化(-OR)和酰胺化(-NHR)的方法也是本领域技术人员周知的。

[0096] 本发明的一个方面涉及以下的具有酰胺 C 末端的 PAB: SEQ ID NO: 1、SEQ ID NO: 2、SEQ ID NO: 3、SEQ ID NO: 4、SEQ ID NO: 5、SEQ ID NO: 6、SEQ ID NO: 7、SEQ ID NO: 9、SEQ ID NO: 10、SEQ ID NO: 12、SEQ ID NO: 13、SEQ ID NO: 15、SEQ ID NO: 17、SEQ ID NO: 19、SEQ ID NO: 21、SEQ ID NO: 22、SEQ ID NO: 23、SEQ ID NO: 26、SEQ ID NO: 27、SEQ ID NO: 27、SEQ ID NO: 28、SEQ ID NO: 29、SEQ ID NO: 30、SEQ ID NO: 32 和 SEQ ID NO: 33。

[0097] 尽管不希望受理论束缚, 申请人认为, 优选在氨基酸序列末端具有羧酰胺基团的某些 PAB, 因为它们 N-末端烷基不容易被酸水解, 尤其在低于生理 pH 的 pH 值。此外, 业已发现某些以酰胺为末端的 PAB 对哺乳动物细胞具有较高的 LD₅₀ 以及较高的效力(表现为最小抑制浓度较低)和/或更宽范围的抗微生物活性。

[0098] 本发明的另一方面涉及以下的具有酸 C 末端的 PAB: SEQ ID NO: 20、SEQ ID NO: 24、SEQ ID NO: 25 和 SEQ ID NO: 31。

[0099] 本发明的 PAB 中的带电荷氨基酸残基的数量为至少 1 个, 更优选至少 2 个。存在多个带电荷氨基酸残基赋予所需特性, 包括抗微生物活性。然而, 因为空间作用和其它生物学相互作用, 基于带电荷氨基酸残基数量预测抗微生物活性(以及其它特性)已证实是难以捉摸的。

[0100] 本发明的一个方面涉及以下的 PAB: SEQ ID NO: 1、SEQ ID NO: 2、SEQ ID NO: 3、SEQ ID NO: 4、SEQ ID NO: 7、SEQ ID NO:

8、SEQ ID NO: 9、SEQ ID NO: 10、SEQ ID NO: 11、SEQ ID NO: 12、SEQ ID NO: 13、SEQ ID NO: 14、SEQ ID NO: 15、SEQ ID NO: 16、SEQ ID NO: 17、SEQ ID NO: 18、SEQ ID NO: 19、SEQ ID NO: 20、SEQ ID NO: 21、SEQ ID NO: 22、SEQ ID NO: 23、SEQ ID NO: 24、SEQ ID NO: 25、SEQ ID NO: 26、SEQ ID NO: 27、SEQ ID NO: 27、SEQ ID NO: 28、SEQ ID NO: 29、SEQ ID NO: 30、SEQ ID NO: 31、SEQ ID NO: 32 和 SEQ ID NO: 33, 其中带电荷的氨基酸残基的百分率为氨基酸残基总数的至少约 33%。

[0101] 本发明的另一方面涉及以下的PAB: SEQ ID NO: 1、SEQ ID NO: 2、SEQ ID NO: 3、SEQ ID NO: 4、SEQ ID NO: 5、SEQ ID NO: 7、SEQ ID NO: 8、SEQ ID NO: 9、SEQ ID NO: 10、SEQ ID NO: 11、SEQ ID NO: 12、SEQ ID NO: 13、SEQ ID NO: 14、SEQ ID NO: 15、SEQ ID NO: 16、SEQ ID NO: 17、SEQ ID NO: 18、SEQ ID NO: 19、SEQ ID NO: 20、SEQ ID NO: 22、SEQ ID NO: 25、SEQ ID NO: 27、SEQ ID NO: 27、SEQ ID NO: 29、SEQ ID NO: 30、SEQ ID NO: 32 和 SEQ ID NO: 33, 其中带电荷的氨基酸残基的百分率为氨基酸残基总数的至少约 50%。

[0102] 本发明的又一方面涉及以下的PAB: SEQ ID NO: 7、SEQ ID NO: 8、SEQ ID NO: 9、SEQ ID NO: 10、SEQ ID NO: 11、SEQ ID NO: 12、SEQ ID NO: 13、SEQ ID NO: 14、SEQ ID NO: 15、SEQ ID NO: 16、SEQ ID NO: 17、SEQ ID NO: 25、SEQ ID NO: 27、SEQ ID NO: 27 和 SEQ ID NO: 30, 其中带电荷的氨基酸残基的百分率为氨基酸残基总数的至少约 60%。

[0103] 本发明的另一方面涉及以下的PAB: SEQ ID NO: 1、SEQ ID NO: 2、SEQ ID NO: 3、SEQ ID NO: 4、SEQ ID NO: 5、SEQ ID NO: 7、SEQ ID NO: 8、SEQ ID NO: 9、SEQ ID NO: 10、SEQ ID NO: 11、SEQ ID NO: 12、SEQ ID NO: 13、SEQ ID NO: 14、SEQ ID NO: 15、SEQ ID NO: 16、SEQ ID NO: 17、SEQ ID NO: 18、SEQ ID NO: 19、

SEQ ID NO: 20、SEQ ID NO: 21、SEQ ID NO: 22、SEQ ID NO: 23、SEQ ID NO: 24、SEQ ID NO: 25、SEQ ID NO: 26、SEQ ID NO: 27、SEQ ID NO: 27、SEQ ID NO: 28、SEQ ID NO: 29、SEQ ID NO: 30、SEQ ID NO: 31、SEQ ID NO: 32 和 SEQ ID NO: 33，其中至少 2 个氨基酸残基带电荷。

[0104] 本发明的又一方面涉及以下的 PAB: SEQ ID NO: 7、SEQ ID NO: 8、SEQ ID NO: 9、SEQ ID NO: 10、SEQ ID NO: 11、SEQ ID NO: 12、SEQ ID NO: 13、SEQ ID NO: 14、SEQ ID NO: 15、SEQ ID NO: 16、SEQ ID NO: 17、SEQ ID NO: 18、SEQ ID NO: 19、SEQ ID NO: 20、SEQ ID NO: 22、SEQ ID NO: 23、SEQ ID NO: 24、SEQ ID NO: 25、SEQ ID NO: 27、SEQ ID NO: 27、SEQ ID NO: 30 和 SEQ ID NO: 31，其中至少 3 个氨基酸残基带电荷。

[0105] 本发明的再一方面涉及以下的 PAB: SEQ ID NO: 11、SEQ ID NO: 22 和 SEQ ID NO: 27，其中至少 4 个氨基酸残基带电荷。

[0106] 本发明的 PAB 在水性 MEM 培养基中的 CMC 令人惊奇并出乎意料地低—一些低于约 100 ppm，另一些低于约 50 ppm，还有一些低于 25 ppm。

[0107] 因此，本发明的一个方面涉及以下的 PAB: SEQ ID NO: 1、SEQ ID NO: 2、SEQ ID NO: 3、SEQ ID NO: 4、SEQ ID NO: 5、SEQ ID NO: 7、SEQ ID NO: 8、SEQ ID NO: 9、SEQ ID NO: 10、SEQ ID NO: 11、SEQ ID NO: 12、SEQ ID NO: 13、SEQ ID NO: 14、SEQ ID NO: 15、SEQ ID NO: 16、SEQ ID NO: 18、SEQ ID NO: 19、SEQ ID NO: 20、SEQ ID NO: 21、SEQ ID NO: 22、SEQ ID NO: 23、SEQ ID NO: 24、SEQ ID NO: 25、SEQ ID NO: 26、SEQ ID NO: 27、SEQ ID NO: 27、SEQ ID NO: 28、SEQ ID NO: 29、SEQ ID NO: 30、SEQ ID NO: 31、SEQ ID NO: 32 和 SEQ ID NO: 33，其在水性 MEM 环境中的 CMC 低于约 100 ppm。

[0108] 本发明的另一方面涉及以下的 PAB: SEQ ID NO: 1、SEQ

ID NO: 2、SEQ ID NO: 3、SEQ ID NO: 4、SEQ ID NO: 5、SEQ ID NO: 8、SEQ ID NO: 9、SEQ ID NO: 10、SEQ ID NO: 11、SEQ ID NO: 12、SEQ ID NO: 13、SEQ ID NO: 14、SEQ ID NO: 15、SEQ ID NO: 16、SEQ ID NO: 18、SEQ ID NO: 19、SEQ ID NO: 21、SEQ ID NO: 22、SEQ ID NO: 23、SEQ ID NO: 24、SEQ ID NO: 25、SEQ ID NO: 26、SEQ ID NO: 27、SEQ ID NO: 27、SEQ ID NO: 28、SEQ ID NO: 29、SEQ ID NO: 30、SEQ ID NO: 31、SEQ ID NO: 32 和 SEQ ID NO: 33，其在水性 MEM 环境中的 CMC 低于约 50 ppm。

[0109] 本发明的又一方面涉及以下的 PAB: SEQ ID NO: 1、SEQ ID NO: 3、SEQ ID NO: 4、SEQ ID NO: 5、SEQ ID NO: 8、SEQ ID NO: 9、SEQ ID NO: 11、SEQ ID NO: 12、SEQ ID NO: 13、SEQ ID NO: 14、SEQ ID NO: 15、SEQ ID NO: 16、SEQ ID NO: 18、SEQ ID NO: 19、SEQ ID NO: 21、SEQ ID NO: 23、SEQ ID NO: 24、SEQ ID NO: 25、SEQ ID NO: 29、SEQ ID NO: 30、SEQ ID NO: 31、SEQ ID NO: 32 和 SEQ ID NO: 33，其在水性 MEM 环境中的 CMC 低于约 25 ppm。

[0110] 本发明的一个方面涉及以下的 PAB: SEQ ID NO: 1、SEQ ID NO: 2、SEQ ID NO: 7、SEQ ID NO: 8、SEQ ID NO: 9、SEQ ID NO: 10、SEQ ID NO: 15、SEQ ID NO: 18、SEQ ID NO: 19、SEQ ID NO: 20、SEQ ID NO: 21、SEQ ID NO: 22、SEQ ID NO: 24、SEQ ID NO: 25、SEQ ID NO: 26、SEQ ID NO: 27、SEQ ID NO: 28、SEQ ID NO: 29、SEQ ID NO: 30，其在培养的 37 岁女性成纤维细胞(ATCC 索引-CRL-2122)中具有大于约 200 ppm、优选大于约 500 ppm 的 LD₅₀，其中 LD₅₀ 定义为使测试细胞群的一半或 50% 死亡的给药剂量。

[0111] 为了本发明目的，使用 CellTiter Blue 测定(Promega Corp., Madison, WI)以 37 岁女性成纤维细胞(ATCC CRL-2122)测定对哺乳动物细胞的细胞毒性。本领域技术人员会意识到，还可以使用其它类似的细胞毒性测定，例如可得自 Biosource International 和 Trek Diagnostic Systems 的阿尔玛蓝(Alamar Blue)测定。Promega 测定基于指示剂染料

阿尔玛蓝(也称为刃天青), 其是响应于细胞的细胞代谢活性而产生荧光比色信号的氧化还原指示剂。更具体地说, 染料穿透细胞的细胞膜和核膜, 并被线粒体和胞质微粒体这二者代谢。在代谢时, 染料形成于 590 nm 发射的荧光物质。通过检测荧光强度, 可以定量细胞活力。

[0112] 衰老(例如细纹和皱纹)的可见征兆与皮肤中的成纤维细胞增殖以及胶原和弹性蛋白水平相关。后者可归因于两个细胞过程中的一个或两个—降低胶原和/或弹性蛋白的合成, 和/或增加弹性蛋白酶和/或胶原酶(尤其是胶原酶 I, 也称为基质金属蛋白酶 1 (MMP1))对这些蛋白的酶促降解。令人惊讶并出乎意料的是, 本发明的 PAB 于低于 LD₅₀ 的浓度时使代谢溶解蛋白(例如胞外皮肤基质蛋白, 诸如胶原、弹性蛋白、纤连蛋白以及涉及胞内粘附的蛋白, 如核心蛋白聚糖(decorin), 和自由基清除剂)增加至少约 20%。

[0113] 为了本发明目的, 使用 Molecular Probes, Inc. (Eugene, OR)的 CBQCA 蛋白定量测定检测代谢溶解蛋白。该测定基于喹啉-2-甲醛衍生物, 其与伯胺特异性反应, 形成能够进行电泳或层析分析的缀合物。更具体地说, 在氰化物阴离子存在下, 喹啉-2-甲醛衍生物与伯胺(包括蛋白上的那些)反应, 并于 550 nm 产生高荧光发射。

[0114] 本发明该方面的一个实施方案涉及以下的 PAB: SEQ ID NO: 1、SEQ ID NO: 2、SEQ ID NO: 4、SEQ ID NO: 7、SEQ ID NO: 12、SEQ ID NO: 13、SEQ ID NO: 14、SEQ ID NO: 15、SEQ ID NO: 17、SEQ ID NO: 18、SEQ ID NO: 20、SEQ ID NO: 21、SEQ ID NO: 23、SEQ ID NO: 24、SEQ ID NO: 25、SEQ ID NO: 26、SEQ ID NO: 28、SEQ ID NO: 29、SEQ ID NO: 30、SEQ ID NO: 31、SEQ ID NO: 32 和 SEQ ID NO: 33, 根据 CBQCA 测定的检测, 其在低于 LD₅₀ 的浓度时使代谢溶解蛋白增加至少约 20%。

[0115] 本发明该方面的优选实施方案涉及以下的 PAB: SEQ ID NO: 1、SEQ ID NO: 2、SEQ ID NO: 7、SEQ ID NO: 14、SEQ ID NO: 15、SEQ ID NO: 17、SEQ ID NO: 18、SEQ ID NO: 20、SEQ ID NO: 23、

SEQ ID NO: 24、SEQ ID NO: 25、SEQ ID NO: 26、SEQ ID NO: 28、SEQ ID NO: 29、SEQ ID NO: 30 和 SEQ ID NO: 31, 根据 CBQCA 测定的检测, 其在低于 LD₅₀ 的浓度时使代谢溶解蛋白增加至少约 30%。

[0116] 本发明该方面的特别优选的实施方案涉及以下的 PAB: SEQ ID NO: 1、SEQ ID NO: 2、SEQ ID NO: 7、SEQ ID NO: 14、SEQ ID NO: 15、SEQ ID NO: 17、SEQ ID NO: 18、SEQ ID NO: 20、SEQ ID NO: 23、SEQ ID NO: 24、SEQ ID NO: 25、SEQ ID NO: 26、SEQ ID NO: 28、SEQ ID NO: 29、SEQ ID NO: 30 和 SEQ ID NO: 31, 根据 CBQCA 测定的检测, 其在低于 LD₅₀ 的浓度时使代谢溶解蛋白增加至少约 50%。

[0117] 已令人惊讶并出乎意料地发现, 本发明的 PAB 使编码 3 种胞外皮肤基质蛋白-COL1 (胶原)、纤连蛋白(FN1)和弹性蛋白(ELN)的表达基因增加。因此, 本发明的另一方面涉及增加编码胶原、弹性蛋白或纤连蛋白的一种或多种基因表达的 PAB。基因表达水平可使用 DNA 微阵列和本领域技术人员众所周知的多种其它技术检测。参见例如 Perou 等, *Nature* (London), 406: 747-752 (2000)。

[0118] 本发明该方面的一个实施方案涉及以下的 PAB: SEQ ID NO: 7、SEQ ID NO: 9、SEQ ID NO: 10、SEQ ID NO: 12、SEQ ID NO: 18、SEQ ID NO: 21、SEQ ID NO: 22、SEQ ID NO: 24、SEQ ID NO: 26 和 SEQ ID NO: 27, 其在 10 ppm 的浓度时使 ELN、FN1 或 COL1 中的至少 2 种的表达增加至少 20%。

[0119] 本发明该方面的更优选的实施方案涉及以下的 PAB: SEQ ID NO: 7、SEQ ID NO: 9、SEQ ID NO: 10、SEQ ID NO: 18、SEQ ID NO: 21、SEQ ID NO: 22、SEQ ID NO: 24 和 SEQ ID NO: 27, 其在 10 ppm 的浓度时使 ELN、FN1 或 COL1 的表达增加至少 20%。

[0120] 本发明该方面的再更优选的实施方案涉及以下的 PAB: SEQ ID NO: 7、SEQ ID NO: 9、SEQ ID NO: 10、SEQ ID NO: 12、SEQ ID NO: 18、SEQ ID NO: 21、SEQ ID NO: 24 和 SEQ ID NO: 27, 其在

10 ppm 的浓度时不仅使 COL1、ELN 或 FN1 中的至少 2 种的表达增加至少 20%，而且同时不增加 MMP1 的表达。

[0121] 本发明该方面的甚至更优选的实施方案涉及以下的 PAB: SEQ ID NO: 7、SEQ ID NO: 9 和 SEQ ID NO: 10，其使 COL1、ELN 或 FN1 中至少 2 种的表达增加至少 20%，并将 MMP1 的表达下调至少 20%。

[0122] 其它负面后遗症经常与表面活性剂相关。这些后遗症可包括不需要的炎症反应，其可表现为 IL6 和 IL8 的表达增加。已令人惊讶并出乎意料地发现，本发明的 PAB 增加并在某些情况下降低 IL6 和 IL8 的表达。

[0123] 本发明该方面的一个实施方案涉及以下的 PAB: SEQ ID NO: 7、SEQ ID NO: 9、SEQ ID NO: 12、SEQ ID NO: 18、SEQ ID NO: 21、SEQ ID NO: 22、SEQ ID NO: 24 和 SEQ ID NO: 26，其使 COL1、ELN 或 FN1 中至少 2 种的表达增加 20%，同时不增加 IL6 和 IL8 的表达。

[0124] 本发明该方面的又一个且更优选的实施方案涉及以下的 PAB: SEQ ID NO: 7、SEQ ID NO: 9、SEQ ID NO: 12、SEQ ID NO: 18、SEQ ID NO: 21、SEQ ID NO: 24 和 SEQ ID NO: 26，其使(i) COL1、ELN 或 FN1 中至少 2 种的表达增加至少 20%，和(ii) IL6 或 IL8 中至少一个的表达降低至少 20%，同时(iii)不引起 IL6 或 IL8 增加。

[0125] 本发明的再一个且更优选的方面涉及以下的 PAB: SEQ ID NO: 7、SEQ ID NO: 9、SEQ ID NO: 12、SEQ ID NO: 18 和 SEQ ID NO: 21，其使(i) COL1、ELN 或 FN1 中至少 2 种的表达增加至少 20%，和(ii)至少 IL6 和 IL8 的表达降低至少 20%。

[0126] 本发明该方面的特别优选的实施方案涉及以下的 PAB: SEQ ID NO: 7、SEQ ID NO: 9、SEQ ID NO: 12、SEQ ID NO: 18、SEQ ID NO: 21 和 SEQ ID NO: 24，其在 10 ppm 的浓度时使 ELN、FN1 或 COL1 中至少 2 种的表达增加至少 20%，且不引起 MMP1、IL6 或 IL8

的表达增加。

[0127] 已观察到炎性基因(例如 IL6 和 IL8)的慢性上调与凋亡基因如 CASP1 的上调相关。促炎基因 IL-6 和 IL-8 和/或凋亡相关基因如半胱天冬酶 1 (CASP1)的显著上调不合需要。Lyer, V.R.等, *Science* 283: 83-87 (1999); Mathy-Hartert M 等, *Inflamm Res.* 52(3):111-8 (2003); Raqib 等, *Infection and Immunity*, 2002 年 6 月, 3199-3207 页。因此, 本发明的另一方面涉及不引起 CASP1 表达增加的 PAB。

[0128] 本发明该方面的一个实施方案涉及以下的 PAB: SEQ ID NO: 7、SEQ ID NO: 9、SEQ ID NO: 10、SEQ ID NO: 18 和 SEQ ID NO: 21, 其在 10 ppm 的浓度时不引起 CASP1 表达增加。

[0129] 本发明该方面的优选实施方案涉及以下的 PAB: SEQ ID NO: 7 和 SEQ ID NO: 10, 其在 10 ppm 的浓度时引起 CASP1 表达降低。

[0130] 本发明的另一方面涉及增加成纤维细胞增殖的 PAB。对于本发明目的, 使用 Molecular Probes 的 Cyquant[®]细胞增殖测定评价增殖。该测定检测细胞核酸产生增加, 该增加又导致荧光染料的结合增加。

[0131] 本发明该方面的一个实施方案涉及以下的 PAB: SEQ ID NO: 4、SEQ ID NO: 8、SEQ ID NO: 9 和 SEQ ID NO: 17, 其于 1 ppm 的浓度 24 小时后使成纤维细胞增殖增加至少约 20%。

[0132] 本发明该方面的另一个实施方案涉及以下的 PAB: SEQ ID NO: 3, SEQ ID NO: 7、SEQ ID NO: 11、SEQ ID NO: 13、SEQ ID NO: 14、SEQ ID NO: 15、SEQ ID NO: 16、SEQ ID NO: 20 和 SEQ ID NO: 32, 其于 10 ppm 的浓度 24 小时后使成纤维细胞增殖增加至少约 20%。

[0133] 本发明该方面的又一个实施方案涉及以下的 PAB: SEQ ID NO: 19、SEQ ID NO: 24 和 SEQ ID NO: 25, 其于 10 ppm 的浓度 48 小时后使成纤维细胞增殖增加至少约 20%。

[0134] 本发明该方面的又一个实施方案涉及以下的 PAB: SEQ ID NO: 12 和 SEQ ID NO: 23, 其于 25 ppm 的浓度 48 小时后使成纤维

细胞增殖增加至少约 20%。

[0135] 本发明的 PAB 以低 CMC 有效润湿表面的能力赋予了另一种令人惊奇并出乎意料特性—广谱抗微生物活性。所述“抗微生物”活性是指据光密度检测(“OD”)证实抑制选自以下的至少一种微生物生长的能力：大肠杆菌(*E. coli*)、绿脓杆菌(*P. aeruginosa*)、金黄色葡萄球菌(*S. aureus*)和白色念珠菌(*C. albicans*)。

[0136] 所述“生长抑制”是指 OD 增加低于或没有超过 5%，OD 是浊度的无量纲检测值，与样品中存在的微生物细胞的量成比例。为了阐述目的，将本发明的 PAB 加至培养板，在培养板上大肠杆菌以约 5×10^3 cfu/ml 的终浓度存在。然后将该平板于约 37°C 温育约 24 小时，此时通过振摇重悬浮大肠杆菌，并于约 600 nm 检测 OD。因此，OD 增加低于或没有超过 5%证实了 PAB 针对大肠杆菌的抗微生物特性。

[0137] 本发明该方面的一个实施方案涉及以下的 PAB: SEQ ID NO: 1、SEQ ID NO: 2、SEQ ID NO: 3、SEQ ID NO: 4、SEQ ID NO: 5、SEQ ID NO: 6、SEQ ID NO: 7、SEQ ID NO: 8、SEQ ID NO: 9、SEQ ID NO: 10、SEQ ID NO: 11、SEQ ID NO: 12、SEQ ID NO: 13、SEQ ID NO: 14、SEQ ID NO: 15、SEQ ID NO: 17、SEQ ID NO: 18、SEQ ID NO: 19、SEQ ID NO: 20、SEQ ID NO: 21、SEQ ID NO: 22、SEQ ID NO: 23、SEQ ID NO: 24、SEQ ID NO: 25、SEQ ID NO: 26、SEQ ID NO: 27、SEQ ID NO: 27、SEQ ID NO: 28、SEQ ID NO: 29、SEQ ID NO: 30、SEQ ID NO: 31、SEQ ID NO: 32 和 SEQ ID NO: 33，通过 OD 检测证实，其在 100 ppm 以下的浓度时抑制大肠杆菌(*E. coli*)的生长。

[0138] 本发明该方面的优选实施方案涉及以下的 PAB: SEQ ID NO: 1、SEQ ID NO: 2、SEQ ID NO: 3、SEQ ID NO: 4、SEQ ID NO: 5、SEQ ID NO: 6、SEQ ID NO: 7、SEQ ID NO: 8、SEQ ID NO: 9、SEQ ID NO: 10、SEQ ID NO: 11、SEQ ID NO: 12、SEQ ID NO: 13、SEQ ID NO: 14、SEQ ID NO: 15、SEQ ID NO: 17、SEQ ID NO: 18、SEQ ID NO: 19、

SEQ ID NO: 20、SEQ ID NO: 21、SEQ ID NO: 22、SEQ ID NO: 23、SEQ ID NO: 24、SEQ ID NO: 25、SEQ ID NO: 26、SEQ ID NO: 27、SEQ ID NO: 27、SEQ ID NO: 29、SEQ ID NO: 30、SEQ ID NO: 31、SEQ ID NO: 32 和 SEQ ID NO: 33, 其在 100 ppm 以下的浓度时抑制大肠杆菌(*E. coli*)和绿脓杆菌(*P. aeruginosa*)或金黄色葡萄球菌(*S. aureus*)的生长。

[0139] 本发明该方面的更优选的实施方案涉及以下的 PAB: SEQ ID NO: 1、SEQ ID NO: 2、SEQ ID NO: 5、SEQ ID NO: 7、SEQ ID NO: 12、SEQ ID NO: 15、SEQ ID NO: 18、SEQ ID NO: 21、SEQ ID NO: 22、SEQ ID NO: 23、SEQ ID NO: 24、SEQ ID NO: 25、SEQ ID NO: 26、SEQ ID NO: 27、SEQ ID NO: 31 和 SEQ ID NO: 33, 其在 100 ppm 以下的浓度时抑制大肠杆菌(*E. coli*)、白色念珠菌(*C. albicans*)和绿脓杆菌(*P. aeruginosa*)或金黄色葡萄球菌(*S. aureus*)的生长。

[0140] 本发明该方面的再更优选的实施方案涉及以下的 PAB: SEQ ID NO: 1、SEQ ID NO: 2、SEQ ID NO: 7、SEQ ID NO: 12、SEQ ID NO: 15、SEQ ID NO: 18、SEQ ID NO: 23、SEQ ID NO: 24、SEQ ID NO: 25、SEQ ID NO: 31 和 SEQ ID NO: 33, 其在低于或等于约 100 ppm 的浓度时抑制大肠杆菌(*E. coli*)、绿脓杆菌(*P. aeruginosa*)、金黄色葡萄球菌(*S. aureus*)和白色念珠菌(*C. albicans*)的生长。

[0141] 本发明该方面的甚至更优选的实施方案涉及以下的 PAB: SEQ ID NO: 12、SEQ ID NO: 15、SEQ ID NO: 30 和 SEQ ID NO: 31, 其于 25 ppm 的浓度时抑制大肠杆菌(*E. coli*)、绿脓杆菌(*P. aeruginosa*)、金黄色葡萄球菌(*S. aureus*)和耐二甲氧基苯青霉素金黄色葡萄球菌(*Staphylococcus. aureus*)("MRSA")的生长。所述 MRSA 是指已获得抗生素二甲氧基苯青霉素抗性编码基因的细菌金黄色葡萄球菌(*S. aureus*)的分离株。

[0142] 基于上述出乎意料并令人惊讶的特性, 本发明的 PAB 可用于局部治疗应用, 包括有助于减少衰老征兆的出现。这些在下文

论述。本领域技术人员会意识到,在该范围的治疗剂中,重要的是保持潜在效力与毒性平衡。因此,本发明的另一方面涉及具有有利的毒性-治疗比(“TTR”)的 PAB。对于本申请目的, PAB 的 TTR 表示为 LD_{50} 对 PAB 针对大肠杆菌的最小抑制浓度(MIC)的比率,表示为 $LD_{50}/MIC_{(大肠杆菌)}$ 。

[0143] 如上所述,使用 MIC 评价化合物的抗微生物活性是本领域技术人员众所周知的方法。将要测试的化合物连续稀释入生长培养基中,用培养物接种,然后温育。MIC 是抑制或防止靶微生物生长的最低化合物稀释度。

[0144] PAB 的相对毒性是不可预测的,可受到 N-末端的酰基选择、带电荷氨基酸部分的序列和间隔以及保护性酰胺基团是否连接在 C 末端影响。这在下文阐述。

[0145] Pal-GHK 酰胺和 Pal-GHR 酰胺[P250]既是具有相同酰基的单阳离子三肽,又是酰胺保护基。将在最后的氨基酸位置的带正电荷氨基酸残基由赖氨酸改变为精氨酸将 LD_{50} 增加 3 倍,由 35 至 140。这两种化合物的 $MIC_{(大肠杆菌)}$ 的差异相差 25 倍: Pal-GHK 酰胺的 250 ppm 对 Pal-GHR 酰胺的 10 ppm。因此, Pal-GHR 酰胺的 TTR 比 Pal-GHK 酰胺有利 140 倍(14 对 0.1)。

[0146] 比较 Myr-KKALK 酰胺(SEQ ID NO: 12)和 Myr-KLAKK 酰胺(SEQ ID NO: 7)阐明了不可预测的显著不同特性,其可由改变甚至相同氨基酸残基的序列而产生。二者均是酰化的、以酰胺为末端的三阳离子寡肽,具有 1 个单赖氨酸酰基和 1 个双赖氨酸酰基。二者均具有 10 ppm 的 $MIC_{(大肠杆菌)}$ 。然而, SEQ ID NO: 7 的 LD_{50} 为 500,而 SEQ ID NO: 12 的 LD_{50} 为 135。

[0147] 将不带电荷的氨基酸插入相同带电荷氨基酸序列的末端,且不保护最后一个不带电荷氨基酸(即通过酰胺化),同样可以对 MIC 具有显著作用。例如,令人惊讶并出乎意料的是, Myr-KLAKK 酰胺(SEQ ID NO: 7)具有 10 ppm 的 $MIC_{(大肠杆菌)}$ 。Myr-KLAKKL 酸(SEQ

ID NO: 18)具有 5 倍高的 50 ppm 的 $MIC_{(大肠杆菌)}$ 。

[0148] 相同氨基酸序列的酸和酰胺末端之间的显著差异以 Pal-KTTKS 序列示例。而以酰胺为末端的序列具有 10 ppm 的 $MIC_{(大肠杆菌)}$ ，未保护的(即以酸为末端的)序列具有大于 500 ppm 的 $MIC_{(大肠杆菌)}$ 。

[0149] 该比较还阐明了酰化氨基酸序列的刺激作用和增殖作用的差异。例如，Pal-KTTKS 酸在 10 ppm 浓度时不显著增加代谢溶解蛋白，或者于或接近其 CMC 时不显著刺激细胞增殖。

[0150] 肽部分的酰化可以改变 MIC 多达 20 倍。例如，STKTTK 酰胺的 $MIC_{(大肠杆菌)}$ 为 >500 ppm。另外，如上所述，该非酰化序列不具有 CMC，因此不是本发明范围内的 PAB。将豆蔻酰基连接至该氨基酸序列的 N-末端，并产生本发明范围内的 PAB，降低 $MIC_{(大肠杆菌)}$ 至 25 ppm。这转化为 20 倍以上的 TTR 差异，Myr-STKTTK 酰胺(SEQ ID NO: 21)具有的 TTR 比 STKTTK 酰胺有利 20 多倍(>40 对 2)。

[0151] 本发明该方面的一个实施方案涉及 TTR 大于 10 的 PAB，并选自 SEQ ID NO: 1、SEQ ID NO: 2、SEQ ID NO: 7、SEQ ID NO: 8、SEQ ID NO: 10、SEQ ID NO: 12、SEQ ID NO: 14、SEQ ID NO: 15、SEQ ID NO: 18、SEQ ID NO: 19、SEQ ID NO: 21、SEQ ID NO: 22、SEQ ID NO: 23、SEQ ID NO: 24、SEQ ID NO: 25、SEQ ID NO: 26、SEQ ID NO: 27、SEQ ID NO: 28、SEQ ID NO: 29 和 SEQ ID NO: 30。

[0152] 本发明该方面的更优选的实施方案涉及以下的 PAB: SEQ ID NO: 7、SEQ ID NO: 10、SEQ ID NO: 12、SEQ ID NO: 18、SEQ ID NO: 21、SEQ ID NO: 22、SEQ ID NO: 24、SEQ ID NO: 26 和 SEQ ID NO: 27，其 TTR 大于 10，在 10 ppm 的浓度时使 ELN、FN1 和 COL1 中至少 2 种的表达增加。

[0153] 本发明该方面的甚至更优选的实施方案涉及以下的 PAB: SEQ ID NO: 7、SEQ ID NO: 12、SEQ ID NO: 18、SEQ ID NO: 21 和 SEQ ID NO: 24，其 TTR 大于 10，在 10 ppm 的浓度时使 ELN、FN1 和 COL1 中至少 2 种的表达增加 20%，但不引起 MMP1、IL6 或 IL8

的表达增加。

[0154] 本发明该方面的又其它优选的实施方案涉及以下的 PAB: SEQ ID NO: 7、SEQ ID NO: 12、SEQ ID NO: 18、SEQ ID NO: 22 和 SEQ ID NO: 24, 其 TTR 大于 20, 使 ELN、FN1 和 COL1 中至少 2 种的表达增加。

[0155] 本发明的一个方面涉及 PAB 治疗皮肤病的局部治疗用途, 尤其有助于减少衰老征兆的出现。另外, 用本发明范围内的 PAB 治疗可减轻或防止经常与局部皮肤病治疗相关的炎症反应。本发明的组合物还可以用于实施皮肤病学。可通过使用本发明范围内的一种或多种 PAB 改善或维持的状况的非限制性实例包括: 皮肤弹性; 皮肤紧致性; 皮肤水分; 皮肤干燥度; 瘙痒; 斑点; 细纹和皱纹; 痣; 老人斑; 痤疮; 色素沉着皮肤; 角质物; 红斑痤疮; 炎性皮肤病; 皮肤萎缩; 伤口愈合。另外, 如上所述, 本发明的组合物可用于治疗微生物感染以及在 Kerdel 等, *Dermatologic Therapeutics* (2005) 和 Hardman 等, *Goodman & Gilman's: The Pharmacological Basis of Therapeutics* (第 10 版, 2001) 中描述的病症。

[0156] CTFA 辞典描述了各种各样的非限制性化妆用和药用成分, 其任选地适用于含本发明的 PAB 的制剂。这些成分类别的实例包括: 研磨剂、磨砂膏、吸收剂、收敛剂、抗微生物剂、防腐剂、抗氧化剂、抗炎剂、维生素、微量矿物质、成膜剂和增加局部组合物对皮肤的亲和性(substantivity)的其它聚物质、湿润剂、保湿剂、pH 调节剂、皮肤调节剂、皮肤抚慰剂和/或康复剂、抗痤疮剂、皮肤漂白剂和美白剂、外部止痛剂、遮光剂(即吸收 290 nm 至 400 nm 的紫外线辐射的有机化合物, 分散或阻隔紫外线辐射的无机化合物)。适用于本发明的传递系统的化妆用和/或药用成分的其它实例公开于美国专利号 6,492,326 和 6,974,799 以及美国专利申请公布号 2005/0142095, 这些文献的公开内容通过引用结合到本文中。

[0157] 本发明的氨基酸序列可通过本领域技术人员众所周知

的技术合成制备，包括例如在美国专利号 6,620,419 中所述的固态肽合成。

[0158] 实施例

[0159] 以下实施例进一步阐述本发明。组分和特定成分以典型形式提供，并可鉴于前述公开内容得到多种在本发明范围内的修改。除非另有说明，否则百分率按总组合物的重量计。

[0160] 实施例 1-凝胶

1. DI 水	95-98%
2. 黄原胶	0.1-0.3%
3. 抗坏血酸磷酸镁	1-3%
4. 聚合酰化生物表面活性剂 SEQ ID NO 12*	10-1000 ppm
5. 羟甲基甘氨酸钠**	0.3-1%

* 得自 Therapeutic Peptides Inc. (Harahan, LA)

** 得自 Sutton Labs (Chatham, NJ)的 Suttocide A

将成分 2-5 加至 DI 水(#1)，同时以 1,000 rpm 在 Silverson 混合器中混合，直至均匀。

[0161] 实施例 2-乳膏/洗液

<u>A 相</u>	20-30%
环戊硅氧烷*	7-15%
环戊硅氧烷(和) PEG-12 二甲聚硅氧烷交联聚合物**	7-15%
环戊硅氧烷(和)二甲聚硅氧烷交联聚合物(和) 二甲聚硅氧烷/乙烯基二甲聚硅氧烷交联聚合物 ***	7-15%

B 相

DI 水	QS
聚山梨醇酯 20	0.1-1%

二丙二醇、丙二醇、甘油、丁二醇	20-30%
抗坏血酸磷酸镁	1-3%
最小必需培养基	1-5%
聚合酰化生物表面活性剂 SEQ ID NO: 21****	10-1000 ppm
对羟基苯甲酸甲酯, 对羟基苯甲酸丁酯	0.2-1%

* Dow Corning 245 Fluid

** Dow Corning 9011 复合硅弹性体

*** Dow Corning 9546 复合硅弹性体

**** 得自 Therapeutic Peptides Inc. (Harahan, LA)

将 A 相加至 B 相, 同时以 1,000 rpm 在 Silverson 混合器中混合, 直至均匀。

[0162] 实施例 3-纳颗粒浓缩物

A 相

DI 水 70-90%

B 相

中链甘油三酯(C₆-C₁₂) 2-8%

卵磷脂 2-8%

中链脂肪酸(C₆-C₁₂) 2-8%

赖氨酸或精氨酸 1-2%

聚合酰化生物表面活性剂 SEQ ID NO 21* 10-1000 ppm

* 得自 Therapeutic Peptides Inc. (Harahan, LA)

用高速匀浆器以 10,000-12,000 rpm 于 30-40°C 将 B 相混合入 A 相中达约 10 分钟。然后以超过约 10,000 psi 将产生的混合物加工为胶体磨, 产生小于约 200 nm 的粒径。将产生的浓缩物以约 1%至约 20% 的浓度加至常规巨乳乳膏。

[0163] 实施例 4-衰老征兆改善

[0164] 可如下检测含有治疗有效量的本发明的聚合酰化生物表面活性剂的局部组合物减少衰老征兆的效力：“鱼尾纹”区域中的表层纹严重性的下降；临床评价皮肤肌理和肤色以及自我评价。除了这些外观改善以外，可用螺旋测量仪(Twistometer)检测生物物理学参数的改善，包括皮肤紧致度和弹性。

[0165] 研究招募 20 名成年女性白人受试者，年龄在 35 岁左右至年近 70 的范围内。如在方案中所规定的，根据轻微至中等的光损害对她们进行选择。在每个研究随访日由课题负责人或研究助理临床评价受试者。“鱼尾纹”(眶周)区域中的表面纹(SFL)通过 Packman 和 Gans. Packman, E.W.和 Gans, E. H, “Topical moisturizers: quantification of their effect on superficial facial lines” *J. Soc. Cosmet. Chem.*, 29: 1-11 (1978)的方法评价。简言之，SFL 记分为以下 3 类严重性增加的纹/皱纹数量的加权：浅的(nx1)、明确的(nx2)和深的(nx3)。在皮肤表面肌理和肤色中分类的裂纹的严重性(表 3)以 0-10 模拟量度记分。

[0166] 彩色照片用 Nikon D70 数码照相机在标准化条件下摄取，照相机安装在对焦架上，以确保复制比(放大率)每次都相同。黑白照片用 Nikon F-100 胶片照相机类似地摄取，使用 T-max 100 印片用胶片，并在照相机镜头上使用 UVA 滤镜。

[0167] 在 8 周研究结束时，专业评级者使用彩色照片评价外观由基线的总体改善。对个体皮肤特征的改变进行评价表明，使用含有本发明的生物表面活性剂的组合物治疗，皮肤变得更光滑和较少纹路，毛孔不明显，皮肤颜色变得更均一。这些变化受试者在自我评价中也能感受到。

[0168] 用 Finlay. Finlay, J.B. “The torsional characteristics of human skin in vivo.” *Biomed. Eng.* 6: 567-573 (1971)所述类型的螺旋测量仪检测皮肤紧致度和弹性。采用以胶带附着至皮肤表面并通过在固定时间段内保持恒定的小电流旋转的盘检测扭力拉伸和回弹。附着盘可旋转的角度与皮肤紧致度成反比，当电流被断开时，扭转的皮肤的

弹性与回弹程度正相关。因此，扭力拉伸下降指示皮肤已变得更紧(结实)，回弹增加指示皮肤已变得更有弹性。

[0169] 除了螺旋测量仪检测以外，使用非参数检验(Wilcoxon符号秩检验或50%概率检验)评价皮肤状况改变的统计学显著性。这些检验不需要假定正态分布，并适于用顺序量表和名义量表分析记分，或者适于“是或否”应答。对于仪器检测，使用成对差异性“t检验”分析比较相同受试者的“前”和“后”记分。

[0170] 尽管已详细描述了本发明的示例性实施方案，但要理解的是，在不偏离本发明的精神和范围的情况下，本领域技术人员显而易见并可易于实施多种其它修改。因此，无意将随附本发明的权利要求书的范围限于上文陈述的实施例和详述，而是将权利要求解释为涵盖存在于本发明中的可申请专利的新颖性的所有特征，包括应被本发明所涉及领域的技术人员视为等效特征的所有特征。

<110> Therapeutic Peptides, Inc.

<120> 聚合生物表面活性剂

<130> 533-003

<150> US 60/809,825

<151> 2006-06-01

<160> 33

<170> PatentIn version 3.4

<210> 1

<211> 4

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> 合成肽序列

<220>

<221> 其它特征

<222> (1)..(1)

<223> 肉豆蔻酰化

<220>

<221> 其它特征

<222> (4)..(4)

<223> 以酰胺为末端的氨基酸

<400> 1

Lys Ala Lys Ala

1

<210> 2

<211> 4

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> 合成肽序列

<220>

<221> 其它特征

<222> (1)..(1)

<223> 肉豆蔻酰化

<220>

<221> 其它特征

<222> (4)..(4)

<223> 以酰胺为末端的氨基酸

<400> 2

Ala Lys Ala Lys

1

<210> 3

<211> 4

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> 合成肽序列

<220>

<221> 其它特征

<222> (1)..(1)

<223> 棕榈酰化

<220>

<221> 其它特征

<222> (4)..(4)

<223> 以酰胺为末端的氨基酸

<400> 3

Gly Arg Lys Gly

1

<210> 4

<211> 4

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> 合成肽序列

<220>

<221> 其它特征

<222> (1)..(1)

<223> 肉豆蔻酰化

<220>

<221> 其它特征

<222> (4)..(4)

<223> 以酰胺为末端的氨基酸

<400> 4

Gly Arg Lys Gly

1

<210> 5

<211> 4

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> 合成肽序列

<220>

<221> 其它特征

<222> (1)..(1)

<223> 肉豆蔻酰化

<220>

<221> 其它特征

<222> (4)..(4)

<223> 以酰胺为末端的氨基酸

<400> 5

Leu Ala Lys Lys

1

<210> 6

<211> 4

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> 合成肽序列

<220>

<221> 其它特征

<222> (1)..(1)

<223> 棕榈酰化

<220>

<221> 其它特征

<222> (4)..(4)

<223> 以酰胺为末端的氨基酸

<400> 6

Gly Gln Pro Arg

1

<210> 7

<211> 5

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> 肉豆蔻酰化，以酰胺为末端的合成氨基酸序列

<220>

<221> 其它特征

<222> (1)..(1)

<223> 肉豆蔻酰化

<220>

<221> 其它特征

<222> (5)..(5)

<223> 以酰胺为末端的氨基酸

<400> 7

Lys Leu Ala Lys Lys

1 5

<210> 8

<211> 5

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> 合成肽序列

<220>

<221> 其它特征

<222> (1)..(1)

<223> 棕榈酰化

<400> 8

Lys Leu Ala Lys Lys

1 5

<210> 9

<211> 5

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> 合成肽序列

<220>

<221> 其它特征

<222> (1)..(1)

<223> 肉豆蔻酰化

<220>

<221> 其它特征

<222> (5)..(5)

<223> 以酰胺为末端的氨基酸

<400> 9

Lys Lys Gly Glu Met

1 5

<210> 10

<211> 5

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> 合成肽序列

<220>

<221> 其它特征

<222> (1)..(1)

<223> 肉豆蔻酰化

<220>

<221> 其它特征

<222> (5)..(5)

<223> 以酰胺为末端的氨基酸

<400> 10

Lys Arg Gly Lys Pro

1 5

<210> 11

<211> 5

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> 合成肽序列

<220>

<221> 其它特征

<222> (1)..(1)

<223> 棕榈酰化

<400> 11

Lys Arg Gly Asp Arg

1 5

<210> 12

<211> 5

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> 合成肽序列

<220>

<221> 其它特征

<222> (1)..(1)

<223> 肉豆蔻酰化

<220>

<221> 其它特征

<222> (5)..(5)

<223> 以酰胺为末端的氨基酸

<400> 12

Lys Lys Ala Leu Lys

1 5

<210> 13

<211> 5

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> 合成肽序列

<220>

<221> 其它特征

<222> (1)..(1)

<223> 棕榈酰化

<220>

<221> 其它特征

<222> (5)..(5)

<223> 以酰胺为末端的氨基酸

<400> 13

Lys Lys Ala Leu Lys

1 5

<210> 14

<211> 5

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> 合成肽序列

<220>

<221> 其它特征

<222> (1)..(1)

<223> 棕榈酰化

<400> 14

Lys Lys Ala Leu Lys

1 5

<210> 15

<211> 5

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> 合成肽序列

<220>

<221> 其它特征

<222> (1)..(1)

<223> 肉豆蔻酰化

<220>

<221> 其它特征

<222> (5)..(5)

<223> 以酰胺为末端的氨基酸

<400> 15

Lys Lys Leu Ala Lys

1 5

<210> 16

<211> 5

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> 合成肽序列

<220>

<221> 其它特征

<222> (1)..(1)

<223> 棕榈酰化

<400> 16

Gly Arg Lys Gly Asp

1 5

<210> 17

<211> 5

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> 合成肽序列

<220>

<221> 其它特征

<222> (1)..(1)

<223> 肉豆蔻酰化

<220>

<221> 其它特征

<222> (5)..(5)

<223> 以酰胺为末端的氨基酸

<400> 17

Gly Arg Lys Gly Asp

1 5

<210> 18

<211> 6

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> 合成肽序列

<220>

<221> 其它特征

<222> (1)..(1)

<223> 肉豆蔻酰化

<400> 18

Lys Leu Ala Lys Lys Leu

1 5

<210> 19

<211> 6

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> 合成肽序列

<220>

<221> 其它特征

<222> (1)..(1)

<223> 肉豆蔻酰化

<220>

<221> 其它特征

<222> (6)..(6)

<223> 以酰胺为末端的氨基酸

<400> 19

Ala Lys Lys Leu Ala Lys

1 5

<210> 20

<211> 6

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> 合成肽序列

<220>

<221> 其它特征

<222> (1)..(1)

<223> 肉豆蔻酰化

<400> 20

Ala Lys Lys Ala Leu Lys

1 5

<210> 21

<211> 6

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> 合成肽序列

<220>

<221> 其它特征

<222> (1)..(1)

<223> 肉豆蔻酰化

<220>

<221> 其它特征

<222> (6)..(6)

<223> 以酰胺为末端的氨基酸

<400> 21

Ser Thr Lys Thr Thr Lys

1 5

<210> 22

<211> 8

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> 合成肽序列

<220>

<221> 其它特征

<222> (1)..(1)

<223> 肉豆蔻酰化

<220>

<221> 其它特征

<222> (8)..(8)

<223> 以酰胺为末端的氨基酸

<400> 22

Ser Arg Val Ser Arg Arg Ser Arg

1 5

<210> 23

<211> 9

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> 合成肽序列

<220>

<221> 其它特征

<222> (1)..(1)

<223> 肉豆蔻酰化

<220>

<221> 其它特征

<222> (9)..(9)

<223> 以酰胺为末端的氨基酸

<400> 23

Leu Ala Lys Leu Ala Lys Lys Ala Phe

1 5

<210> 24

<211> 9

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> 合成肽序列

<220>

<221> 其它特征

<222> (1)..(1)

<223> 肉豆蔻酰化

<400> 24

Leu Ala Lys Lys Ala Leu Lys Ala Phe

1 5

<210> 25

<211> 6

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> 合成肽序列

<220>

<221> 其它特征

<222> (1)..(6)

<223> 所有这些氨基酸都是“d”氨基酸

<220>

<221> 其它特征

<222> (1)..(1)

<223> 肉豆蔻酰化

<400> 25

Lys Leu Ala Lys Lys Leu

1 5

<210> 26

<211> 6

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> 合成肽序列

<220>

<221> 其它特征

<222> (1)..(1)

<223> 肉豆蔻酰化

<220>

<221> 其它特征

<222> (6)..(6)

<223> 以酰胺为末端的氨基酸

<400> 26

Thr Lys Thr Ser Lys Ser

1 5

<210> 27

<211> 5

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> 合成肽序列

<220>

<221> 其它特征

<222> (1)..(1)

<223> 肉豆蔻酰化

<220>

<221> 其它特征

<222> (5)..(5)

<223> 以酰胺为末端的氨基酸

<400> 27

Lys Arg Gly Asp Arg

1 5

<210> 28

<211> 5

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> 合成肽序列

<220>

<221> 其它特征

<222> (1)..(1)

<223> 肉豆蔻酰化

<220>

<221> 其它特征

<222> (5)..(5)

<223> 以酰胺为末端的氨基酸

<400> 28

Lys Ser Ser Lys Ser

1 5

<210> 29

<211> 4

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> 合成肽序列

<220>

<221> 其它特征

<222> (1)..(1)

<223> 肉豆蔻酰化

<220>

<221> 其它特征

<222> (4)..(4)

<223> 以酰胺为末端的氨基酸

<400> 29

Lys Thr Thr Lys

1

<210> 30

<211> 5

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> 合成肽序列

<220>

<221> 其它特征

<222> (1)..(1)

<223> 肉豆蔻酰化

<220>

<221> 其它特征

<222> (5)..(5)

<223> 在该位置的氨基酸为“d”氨基酸

<220>

<221> 其它特征

<222> (5)..(5)

<223> 以酰胺为末端的氨基酸

<400> 30

Lys Lys Ala Leu Lys

1 5

<210> 31

<211> 6

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> 合成肽序列

<220>

<221> 其它特征

<222> (1)..(1)

<223> 肉豆蔻酰化

<400> 31

Leu Lys Lys Ala Leu Lys

1 5

<210> 32

<211> 4

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> 合成肽序列

<220>

<221> 其它特征

<222> (1)..(1)

<223> 肉豆蔻酰化

<220>

<221> 其它特征

<222> (4)..(4)

<223> 以酰胺为末端的氨基酸

<400> 32

Lys Ala Lys Leu

1

<210> 33

<211> 4

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> 合成肽序列

<220>

<221> 其它特征

<222> (1)..(1)

<223> 肉豆蔻酰化

<220>

<221> 其它特征

<222> (4)..(4)

<223> 以酰胺为末端的氨基酸

<400> 33

Leu Ala Lys Lys

1