

[19] Patents Registry [11] 1237357 B  
The Hong Kong Special Administrative Region  
香港特別行政區  
專利註冊處  
CN 106715463 B

[12] **STANDARD PATENT (R) SPECIFICATION**  
**轉錄標準專利說明書**

[21] Application no. 申請編號 [51] Int. Cl.  
17111391.3 C07K 9/00 (2006.01) A61K 8/64 (2006.01)  
[22] Date of filing 提交日期 A61Q 19/00 (2006.01) A61Q 19/08 (2006.01)  
06.11.2017

---

[54] GLYCOPEPTIDE COMPOSITIONS AND USES THEREOF  
糖化肽組合物及其用途

[30] Priority 優先權 10.12.2013 US 61/914,309	[73] Proprietor 專利所有人 SUSSEX RESEARCH LABORATORIES INC. 蘇塞克斯研究實驗室 100 Sussex Drive, Suite 1120B Ottawa, Ontario K1A 0R6 CANADA
[43] Date of publication of application 申請發表日期 13.04.2018	[72] Inventor 發明人 CLARK, Kenneth Brady K . B . 克拉克 SO, Remmick R . 索 VUKIC, Vanja V . 沃基克
[45] Date of publication of grant of patent 批予專利的發表日期 26.03.2021	[74] Agent and / or address for service 代理人及/或送達地址 BARRON & YOUNG INTELLECTUAL PROPERTY LIMITED Suite 617, Lakeside 2 No. 10 Science Park West Avenue, Hong Kong Science Park Shatin, N.T. HONG KONG
[86] International application no. 國際申請編號 PCT/CA2014/051190	
[87] International publication no. and date 國際申請發表編號及 日期 WO2015/085421 18.06.2015	
CN Application no. & date 中國專利申請編號及日期 CN 201480072253.8 09.12.2014	
CN Publication no. & date 中國專利申請發表編號及日期 CN 106715463 24.05.2017	
Date of grant in designated patent office 指定專利當局批予專利日 期 16.10.2020	



## (12)发明专利

(10)授权公告号 CN 106715463 B

(45)授权公告日 2020.10.16

(21)申请号 201480072253.8

(72)发明人 K·B·克拉克 R·索 V·沃基克

(22)申请日 2014.12.09

(74)专利代理机构 余姚德盛专利代理事务所

(65)同一申请的已公布的文献号

申请公布号 CN 106715463 A

(普通合伙) 33239

(43)申请公布日 2017.05.24

代理人 郑洪成

(30)优先权数据

61/914,309 2013.12.10 US

(51)Int.Cl.

C07K 9/00(2006.01)

(85)PCT国际申请进入国家阶段日

A61K 8/64(2006.01)

2016.07.04

A61Q 19/00(2006.01)

A61Q 19/08(2006.01)

(86)PCT国际申请的申请数据

PCT/CA2014/051190 2014.12.09

(56)对比文件

(87)PCT国际申请的公布数据

W02015/085421 EN 2015.06.18

US 6620419 B1,2003.09.16

(73)专利权人 苏塞克斯研究实验室

WO 0062743 A3,2001.01.18

地址 加拿大安大略省

CN 103505377 A,2014.01.15

审查员 黄炎

(54)发明名称

糖化肽组合物及其用途

权利要求书2页 说明书47页

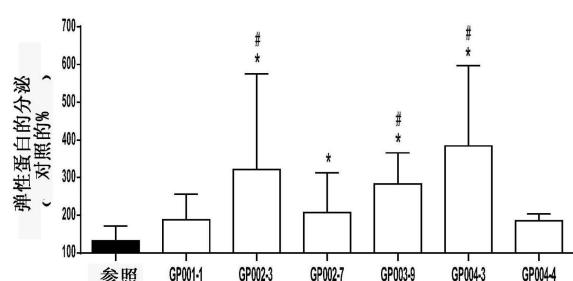
序列表15页 附图20页

(57)摘要

ELISA: 链性蛋白 (72h)

本发明公开提供了具有以下序列的糖基化寡肽:棕榈酰-X1-Lys-X2-X3-Lys-X4-OH,其中:X1为:不存在的,具有糖基化侧链的Ser,或具有糖基化侧链的Asn;X2为Thr,具有糖基化侧链的Thr,具有糖基化侧链的Asn,或具有糖基化侧链的Ser;X3为Thr,或具有糖基化侧链的Thr;X4为Ser,或具有糖基化侧链的氨基酸。X1,X2,X3和X4的至少一者为具有糖基化侧链的氨基酸。各个糖基化侧链均独立地被选自以下的碳水化合物糖基化:葡萄糖,N-乙酰基-葡萄糖,半乳糖,N-乙酰基-半乳糖,甘露糖,麦芽糖,乳糖,鼠李糖,纤维二糖,木糖和海藻糖。所述的碳水化合物上的各个羟基基团独立地为OH或乙酰化的。

B



1. 一种由以下序列组成的5个或6个氨基酸的糖基化寡肽：棕榈酰-X1-Lys-X2-X3-Lys-X4-OH，其中：

X1为：不存在的，具有糖基化侧链的Ser，或具有糖基化侧链的Asn；

X2为Thr，具有糖基化侧链的Thr，具有糖基化侧链的Asn，或具有糖基化侧链的Ser；

X3为Thr，或具有糖基化侧链的Thr；

X4为Ser，或具有糖基化侧链的Ser，

其中：X1，X2，X3和X4的至少一者为具有糖基化侧链的氨基酸；

其中：各个糖基化侧链均独立地被选自以下的碳水化合物糖基化：葡萄糖，N-乙酰基-葡萄糖胺，半乳糖，N-乙酰基-半乳糖胺，甘露糖，麦芽糖，乳糖，鼠李糖，纤维二糖，木糖和海藻糖；以及

其中：所述的碳水化合物上的各个羟基基团独立地为OH或乙酰化的。

2. 根据权利要求1所述的糖基化的寡肽，其中所述的碳水化合物上的羟基基团均是乙酰化的。

3. 根据权利要求1所述的糖基化的寡肽，其中所述的碳水化合物上的羟基基团均是非乙酰化的。

4. 根据权利要求1-3的任意一项所述的糖基化的寡肽，其中所述的X1为不存在的。

5. 根据权利要求1-3的任意一项所述的糖基化的寡肽，其中所述的X2为具有糖基化侧链的Thr。

6. 根据权利要求5所述的糖基化的寡肽，其中所述的糖基化侧链被葡萄糖、甘露糖或麦芽糖糖基化。

7. 根据权利要求5所述的糖基化的寡肽，其中所述的X1、X3和X4氨基酸是非糖基化的。

8. 根据权利要求1-3的任意一项所述的糖基化的寡肽，其中所述的X4为具有糖基化侧链的Ser。

9. 根据权利要求8所述的糖基化的寡肽，其中所述的糖基化侧链被葡萄糖、半乳糖或麦芽糖糖基化。

10. 根据权利要求8所述的糖基化的寡肽，其中所述的X1，X2和X3氨基酸是非糖基化的。

11. 根据权利要求1-3的任意一项所述的糖基化的寡肽，其中所述的X3为具有糖基化侧链的Thr。

12. 根据权利要求11所述的糖基化的寡肽，其中所述的X1，X2和X4氨基酸是非糖基化的。

13. 一种由以下序列组成的糖基化的寡肽：棕榈酰-Lys-Thr\*-Thr-Lys-Ser-OH，其中Thr\*为被全乙酰化的 $\beta$ -葡萄糖糖基化的苏氨酸。

14. 一种由以下序列组成的糖基化的寡肽：棕榈酰-Lys-Thr\*-Thr-Lys-Ser-OH，其中Thr\*为被全乙酰化的 $\alpha$ -甘露糖糖基化的苏氨酸。

15. 一种由以下序列组成的糖基化的寡肽：棕榈酰-Lys-Thr\*-Thr-Lys-Ser-OH，其中Thr\*为被全乙酰化的 $\beta$ -麦芽糖糖基化的苏氨酸。

16. 一种由以下序列组成的糖基化的寡肽：棕榈酰-Lys-Thr-Thr-Lys-Ser\*-OH，其中Ser\*为被全乙酰化的 $\beta$ -半乳糖糖基化的丝氨酸。

17. 一种由以下序列组成的糖基化的寡肽：棕榈酰-Lys-Thr-Thr-Lys-Ser\*-OH，其中

Ser\*为被全乙酰化的 $\beta$ -葡萄糖糖基化的丝氨酸。

18. 一种由以下序列组成的糖基化的寡肽:棕榈酰-Lys-Thr-Thr\*-Lys-Ser-OH,其中Thr\*为被全乙酰化的 $\beta$ -麦芽糖糖基化的苏氨酸。

19. 一种由以下序列组成的糖基化的寡肽:棕榈酰-Lys-Thr-Thr-Lys-Ser\*-OH,其中Ser\*为被全乙酰化的 $\beta$ -麦芽糖糖基化的丝氨酸。

20. 一种由根据SEQ ID NO:12-48的任意一项的序列组成的糖基化的寡肽。

21. 一种化妆或皮肤药用组合物,其包含根据权利要求1-20的任意一项所述的至少一种糖基化的寡肽。

22. 权利要求21所述的组合物在制备用于在个体中增加细胞分泌细胞外基质蛋白质的药剂的用途。

23. 根据权利要求22所述的用途,其中所述的细胞外基质蛋白质为弹性蛋白、纤连蛋白或胶原蛋白。

24. 根据权利要求1-20的任意一项所述的糖基化的寡肽在制备用于增加细胞分泌细胞外基质蛋白质的药剂中的用途。

25. 根据权利要求24所述的用途,其中所述的细胞外基质蛋白质为弹性蛋白,纤连蛋白或胶原蛋白。

26. 一种皮肤护理组合物,其包含:

a) 安全有效量的根据权利要求1-20的任意一项所述的糖基化寡肽;

b) 安全有效量的至少一种其他的皮肤护理活性物质,其选自:脱屑活性物质,祛痘活性物质,痤疮药物,维生素A化合物,维生素B<sub>3</sub>化合物,维生素C化合物,维生素E化合物,类胡萝卜素,类维生素A,二-,三-,四-,五-和六-肽及其衍生物,羟基酸,自由基清除剂,螯合剂,消炎剂,局部麻醉剂,鞣活性物质,皮肤美白剂,遮光剂,瘦身剂,类黄酮,抗微生物活性物质,皮肤愈合剂,抗真菌活性物质,法尼醇,植烷三醇,尿囊素,葡糖胺,透明质酸和它们的混合物;以及

c) 皮肤病学可接受的载体。

## 糖化肽组合物及其用途

[0001] 相关申请的交叉引用

[0002] 本申请要求2013年12月提交的美国临时专利申请No. 61/914,309的优先权权益，该申请的内容以引用方式并入本文。

### 技术领域

[0003] 本发明公开涉及在化妆和皮肤药用组合物及应用中使用的、由5至6个氨基酸组成的寡肽的糖基化。

### 背景技术

[0004] 对皮肤老化的关注在皮肤科和美容医学领域中越来越重要。皮肤老化部分是由细胞外基质(ECM)成分(包括胶原蛋白、弹性蛋白和纤连蛋白)还原而导致的复杂的过程(Callaghan, TM and Wilhelm, KP (2008) Int J. Cosmet. Sci. 30:313-322)。I型胶原蛋白是最丰富类型的胶原蛋白，并且在结构整体性、细胞粘附和迁移、组织重塑以及伤口愈合中起作用(Trojanowska, M et al., (1998) J. Mol. Med. 76:266-267; Chiquet, M. et al., (1996) Biochem. Cell Biol. 74:737-744)。在1993年，由I型原骨胶原的羧基末端衍生的五肽(Lys-Thr-Thr-Lys-Ser，也称为KTTKS SEQ ID NO:1)显示会促进ECM产生(Katayama, K et al., (1993) J. Biol. Chem. 268:9941-9944)。在使用人类肺成纤维细胞的体外模型中，发现所述的五肽会通过I型和III型胶原蛋白和纤连蛋白的增加的合成而显著地增加ECM蛋白质。

[0005] 尽管上文提及的体外数据证明所述的五肽刺激胶原蛋白和纤连蛋白合成的能力，但是其静电荷为经皮渗透设置了挑战。为了增强所述的肽的活性、稳定性，并增加亲油性，Lintner等人(Lintner (2003) US 6,620,419)将所述的五肽与16-碳脂肪酸(棕榈酸)缀合，从而创建棕榈酰KTTKS(Pal-KTTKS, SEQ ID NO:2)。这种脂肪酸的修饰相对于单独的KTTKS得以更有效地传递通过皮肤(Lintner, K (2002) Ann Dermatol Venereol 129:1S 105; Mas-Chamberlin, C et al., (2002) Ann Dermatol Venereol 129:1S 456; Tsai, TC and Hantash, BM (2008) Clin Med 2:1-20)。棕榈酰-KTTKS是作为美容试剂而研发的第一寡肽之一，并且目前是美容试剂Matrixyl<sup>TM</sup>(Sederma SAS)中的活性组分。Pal-KTTKS与皮肤护理活性的且皮肤病学可接受的载体配制，从而形成用于皮肤局部处理的皮肤护理组合物(The Proctor and Gamble Company)。发现所得的组合物特别对于皱纹形成和对于其他皮肤老化作用的皮肤处理是有利的(Robinson (2002) US 6,492,326)。发现在某些条件下Pal-KTTKS会降低成纤维细胞的活力。

[0006] 理想的是提供能够促进成纤维细胞的ECM蛋白质产生和分泌的备选寡肽。

[0007] 发明概述

[0008] 通常，本发明公开提供了具有以下序列的5或6个氨基酸糖基化的寡肽：棕榈酰-X1-Lys-X2-X3-Lys-X4-OH，其中X1为不存在的，具有糖基化侧链的Ser，或具有糖基化侧链的Asn；X2为Thr，具有糖基化侧链的Thr，具有糖基化侧链的Asn，或具有糖基化侧链的Ser；X3为Thr，或具有糖基化侧链的Thr；X4为Ser，或具有糖基化侧链的Ser，其中：X1, X2, X3和X4

的至少一者为具有糖基化侧链的氨基酸；其中：各个糖基化侧链均独立地被选自以下的碳水化合物糖基化：葡萄糖，N-乙酰基-葡糖胺，半乳糖，N-乙酰基-半乳糖胺，甘露糖，麦芽糖，乳糖，鼠李糖，纤维二糖，木糖和海藻糖；以及其中：碳水化合物上的各个羟基基团独立地为OH或乙酰化的。糖基化肽的序列定义为SEQ ID NO:3。

- [0009] 碳水化合物上的羟基基团可以都是乙酰化的。
- [0010] 碳水化合物上的羟基基团可以都不是乙酰化的。
- [0011] 在X1处的氨基酸可以是不存在的。
- [0012] 优选地，至少一个氨基酸被麦芽糖、葡萄糖、半乳糖或甘露糖糖基化。
- [0013] 在X2处的氨基酸可以为具有糖基化侧链的Thr。糖基化侧链可以被葡萄糖或麦芽糖糖基化。在X1、X3和X4处的氨基酸均可以是非糖基化的。
- [0014] 在X4处的氨基酸可以为具有糖基化侧链的Ser。糖基化侧链可以被葡萄糖或半乳糖糖基化。在X1、X2和X3氨基酸处的氨基酸可以是非糖基化的。
- [0015] 在具体的实例中，提供了具有以下序列的糖基化寡肽：棕榈酰-Lys-Thr\*-Thr-Lys-Ser-OH，其中Thr\*为被全乙酰化的 $\beta$ -葡萄糖糖基化的苏氨酸(SEQ ID NO:4)。
- [0016] 根据本发明公开的另一个示例性寡肽具有以下序列：棕榈酰-Lys-Thr\*-Thr-Lys-Ser-OH，其中Thr\*为被全乙酰化的 $\alpha$ -甘露糖糖基化的苏氨酸(SEQ ID NO:5)。
- [0017] 在另一个具体的实例中，提供了具有以下序列的糖基化寡肽：棕榈酰-Lys-Thr\*-Thr-Lys-Ser-OH，其中Thr\*为被全乙酰化的 $\beta$ -麦芽糖糖基化的苏氨酸(SEQ ID NO:6)。
- [0018] 在另一个具体的实例中，提供了具有以下序列的糖基化寡肽：棕榈酰-Lys-Thr-Thr-Lys-Ser\*-OH，其中Ser\*为被全乙酰化的 $\beta$ -半乳糖糖基化的丝氨酸(SEQ ID NO:7)。
- [0019] 在另一个具体的实例中，提供了具有以下序列的糖基化寡肽：棕榈酰-Lys-Thr-Thr-Lys-Ser\*-OH，其中Ser\*为被全乙酰化的 $\beta$ -葡萄糖糖基化的丝氨酸(SEQ ID NO:8)。
- [0020] 在另一个具体的实例中，提供了具有以下序列的糖基化寡肽：棕榈酰-Lys-Thr-Thr\*-Lys-Ser-OH，其中Thr\*为被全乙酰化的 $\beta$ -麦芽糖糖基化的苏氨酸(SEQ ID NO:9)。
- [0021] 在另一个具体的实例中，提供了具有以下序列的糖基化寡肽：棕榈酰-Lys-Thr-Thr-Lys-Ser\*-OH，其中Ser\*为被全乙酰化的 $\beta$ -麦芽糖糖基化的丝氨酸(SEQ ID NO:10)。
- [0022] 在另一个方面中，本发明公开提供了化妆或皮肤药用组合物，其包含至少一种上文所述的糖基化寡肽。
- [0023] 在另一个方面中，本方面公开提供了增加个体中由细胞分泌的细胞外基质蛋白质的方法。该方法包括将上文所述的组合物局部给予所述的个体。细胞外基质蛋白质可以为弹性蛋白、纤连蛋白或胶原蛋白。
- [0024] 在另一个方面中，本发明公开提供了上文所述的糖基化寡肽用于增加细胞分泌的细胞外基质蛋白质的用途。细胞外基质蛋白质可以为弹性蛋白、纤连蛋白或胶原蛋白。
- [0025] 在另一个方面中，本发明公开提供了皮肤护理组合物，其包含：(a)安全有效量的上文所述的糖基化寡肽；(b)安全有效量的至少一种其他的皮肤护理活性物质，其选自：脱屑活性物质，祛痘活性物质，维生素B<sub>3</sub>化合物，类维生素A，二-,三-,四-,五-和六-肽及其衍生物，羟基酸，自由基清除剂，螯合剂，消炎剂，局部麻醉剂，鞣活性物质，皮肤美白剂，瘦身剂，类黄酮，抗微生物活性物质，皮肤愈合剂，抗真菌活性物质，法尼醇，植烷三醇，尿囊素，葡糖胺及其混合物；以及(c)皮肤病学可接受的载体。

[0026] 本文所公开的、单独的或者与各种其他物质结合的肽可以采用以下形式使用:溶液,悬液,乳液;囊封于载体中,例如大胶囊、微胶囊或纳米胶囊,脂质体,或乳糜微滴中;包含在大颗粒、微颗粒或纳米颗粒中;包含在微海绵中;或者吸附在粉末状有机聚合物,滑石,斑脱土或另一种矿物质支撑体上。

[0027] 本文所公开的、单独的或者与各种其他物质结合的肽可以采用以下形式使用:盖伦配制物(galenic formulation);水包油乳液;油包水乳液;洗剂;或者胶凝、增稠、表面活性或乳化聚合物,润发油,洗剂,毛细管,洗发剂,肥皂,粉末,贴剂,铅笔,喷雾或身体油。

[0028] 本文所公开的、单独的或者与各种其他物质结合的肽可以与常规使用的任何其他的组分一起使用,例如提取的脂质,合成的脂质,胶凝、增稠、表面活性或乳化聚合物,水溶性或脂溶性活性原理的物质,植物提取物,组织提取物,海洋提取物,太阳过滤器(solar filter),或抗氧化剂。

[0029] 本文所公开的、单独的或者与各种其他物质结合的肽可以用于化妆应用中,从而特别对于皱纹形成或恶化、或者对于自然的或加速的皮肤老化(例如heliodermia或污染)结果促进愈合、水化或皮肤护理。

[0030] 本文所公开的、单独的或者与各种其他物质结合的肽可以用于制备化妆或皮肤药用药剂。所述的肽或其药剂可以用于特别对于皱纹形成或恶化、或者对于自然的或加速的皮肤老化(例如heliodermia或污染)结果促进愈合、水化或皮肤护理。

[0031] 本文所公开的、单独的或者与各种其他物质结合的肽可以与多种其他的皮肤护理活性物质一起使用。示例性的皮肤护理活性包括伤口愈合,减少妊娠纹、银屑病、皮肤癌、皮炎或湿疹的外观。

[0032] 在结合附图,回顾以下具体实施方案的描述时,本发明公开的其他方面和特征对于本领域那些普通技术人员而言是显而易见的。

[0033] 附图简述

[0034] 现在,仅通过实例,并参照附图来描述本发明公开的实施方案。

[0035] 图1为示出在人类皮肤成纤维细胞处理后的48小时(A)和72小时(B)时示例性糖化肽对弹性蛋白分泌的效力(以对照的%表示)的比较的图。

[0036] 图2为示出在人类皮肤成纤维细胞处理后的48小时(A)和72小时(B)时示例性糖化肽对纤连蛋白分泌的效力(以对照的%表示)的比较的图。

[0037] 图3A为示出示例性化合物GP001-1 (SEQ ID NO:4)的HPLC图谱的图。

[0038] 图3B为示出示例性化合物GP001-1 (SEQ ID NO:4)的质谱的图。

[0039] 图4A为示出示例性化合物GP002-3 (SEQ ID NO:8)的HPLC图谱的图。

[0040] 图4B为示出示例性化合物GP002-3 (SEQ ID NO:8)的质谱的图。

[0041] 图5A为示出示例性化合物GP002-7 (SEQ ID NO:7)的HPLC图谱的图。

[0042] 图5B为示出示例性化合物GP002-7 (SEQ ID NO:7)的质谱的图。

[0043] 图6A为示出示例性化合物GP003-9 (SEQ ID NO:6)的HPLC图谱的图。

[0044] 图6B为示出示例性化合物GP003-9 (SEQ ID NO:6)的质谱的图。

[0045] 图7A为示出示例性化合物GP004-3 (SEQ ID NO:9)的HPLC图谱的图。

[0046] 图7B为示出示例性化合物GP004-3 (SEQ ID NO:9)的质谱的图。

[0047] 图8A为示出示例性化合物GP004-4 (SEQ ID NO:10)的HPLC图谱的图。

[0048] 图8B为示出示例性化合物GP004-4 (SEQ ID NO:10) 的质谱的图。

[0049] 图9示出相衬图像,其示出6种示例性糖化肽 (GP001-1,GP002-3,GP002-7,GP003-9,GP004-3和GP004-4) 以及非糖基化的Pal-KTTKS参照肽对细胞形态学的作用。

[0050] 图10A为示出6种示例性糖化肽 (GP001-1,GP002-3,GP002-7,GP003-9,GP004-3和GP004-4) 以及非糖基化的Pal-KTTKS参照肽在48小时后对细胞活力 (通过MTT测定测量) 的作用的比较的图。

[0051] 图10B为示出6种示例性糖化肽 (GP001-1,GP002-3,GP002-7,GP003-9,GP004-3和GP004-4) 以及非糖基化的Pal-KTTKS参照肽在72小时后对细胞活力 (通过MTT测定测量) 的作用的比较的图。

[0052] 图11A为示出6种示例性糖化肽 (GP001-1,GP002-3,GP002-7,GP003-9,GP004-3和GP004-4) 以及非糖基化的Pal-KTTKS参照肽在人类皮肤成纤维细胞处理后72小时时对弹性蛋白分泌 (以对照的%表示) 的效力的比较的图。

[0053] 图11B为示出6种示例性糖化肽 (GP001-1,GP002-3,GP002-7,GP003-9,GP004-3和GP004-4) 以及非糖基化的Pal-KTTKS参照肽在人类皮肤成纤维细胞处理后72小时时对纤连蛋白分泌 (以对照的%表示) 的效力的比较的图。

[0054] 图12为示出3种示例性糖化肽 (GP003-9,GP004-3和GP004-4) 以及非糖基化的Pal-KTTKS参照肽在人类皮肤成纤维细胞处理后72小时时对总的胶原蛋白分泌 (以对照的%表示) 的效力的比较的图。

[0055] 图13为示出示例性糖化肽GP003-9以及非糖基化的Pal-KTTKS参照肽在人类皮肤体外3D模型 (由人类表皮角质形成细胞和人类皮肤成纤维细胞组成) 中在处理后72小时时对弹性蛋白分泌 (以对照的%表示) 的效力的图。

[0056] 图14示出人类皮肤 (由人类表皮角质形成细胞和人类皮肤成纤维细胞组成) 的体外3-D模型的苏木精和伊红染色切片的显微照片,其显示示例性糖化肽GP003-9以及非糖基化的Pal-KTTKS参照肽的形态学的作用。

[0057] 发明详述

[0058] 蛋白质和肽通过碳水化合物与特定侧链的共价连接 (称为糖基化) 的翻译后修饰在调控蛋白质和肽的功能中最为重要的过程出现。

[0059] 由于该过程随着细胞的类型、糖基化的位点和碳水化合物链 (多糖) 的大小而改变,所以所述的过程在细胞内受到高度的调节。在人类中,用于蛋白质糖基化的最普通的位点是使用以下糖在天冬酰氨 (N-糖基化) 上以及在丝氨酸和苏氨酸残基 (O-糖基化) 上发生:葡萄糖 (Glc) ,海藻糖 (Fuc) ,半乳糖 (Gal) ,甘露糖 (Man) ,N-乙酰基葡萄糖胺 (GlcNAc) ,N-乙酰基半乳糖胺 (GalNAc) 和唾液酸 (Sia) 。糖基化还可以包括使用以下糖的糖基化:乳糖 (Lac) ,鼠李糖 (Rha) ,纤维二糖 (Cel) 和木糖 (Xyl) 。

[0060] 蛋白质的糖基化可以增加蛋白质的结合和效力。例如胶原蛋白的糖基化允许胶原蛋白与膜受体的卵磷脂结构域结合,例如尿激酶型纤溶酶原激活物受体相关蛋白 (uPARAP/Endo180) 。肽的糖基化还可以增加所得的肽的稳定性。

[0061] 碳水化合物为皮肤的主要构成部分之一,并且在皮肤的动态平衡中起作用。碳水化合物多部分在皮肤细胞上发现,其作为受体的配体和外部信息的传导者,并且与相邻的细胞相互作用。它们可以涉及细胞增殖和分化,蛋白质合成,并且还可以形成组织结构和结

构体系。

[0062] 在老化过程中,存在的还原糖增加。糖化作用是天然的细胞过程,其是过多的内源或外源还原糖与蛋白质或脂质分子共价键合的结果。糖化作用导致细胞外蛋白质(例如胶原蛋白、纤连蛋白和弹性蛋白)交联增加,使得它们生物功能失调。糖化作用在皮肤ECM中能够形成被称为晚期糖化终产物(AGE)的交联,并且破坏这些生物分子的正常功能。在不具有酶的控制作用的条件下,糖化作用以随意的方式发生,并且显示与皱纹形成有关。在本领域中,据信还原糖会促进老化过程。糖基化不能与糖化作用的有害过程混淆。

[0063] 根据本发明公开的糖基化肽可以增加糖基化肽的稳定性,和/或可以增加它们在延迟老化过程中的效力。根据本发明公开的糖基化肽可以例如减少ECM蛋白质的降解,或则诱导ECM蛋白质的生物合成。示例性的ECM蛋白质包括:弹性蛋白、纤连蛋白和胶原蛋白。

[0064] 通常,本发明公开提供了具有序列棕榈酰-X1-Lys-X2-X3-Lys-X4-OH的糖基化寡肽,其中:X1为不存在的,具有糖基化侧链的Ser,或具有糖基化侧链的Asn;X2为Thr,具有糖基化侧链的Thr,具有糖基化侧链的Asn,或具有糖基化侧链的Ser;X3为Thr,或具有糖基化侧链的Thr;X4为Ser,或具有糖基化侧链的Ser。X1、X2、X3和X4的至少一者为具有糖基化侧链的氨基酸。各个糖基化侧链独立地被选自以下的碳水化合物糖基化:葡萄糖,N-乙酰基-葡萄糖胺,半乳糖,N-乙酰基-半乳糖胺,甘露糖,麦芽糖,乳糖,鼠李糖,纤维二糖,木糖,和海藻糖。碳水化合物上的各个羟基基团独立地为OH或乙酰化的。糖基化肽的序列定义为SEQ ID NO:3。

[0065] 在一些实例中,碳水化合物上所有的羟基基团均是乙酰化的。具有乙酰化的羟基基团的寡糖可以具有通过细胞膜的改善的渗透性。这种改善的渗透性可以改善穿过皮肤的传递。

[0066] 根据本发明公开的优选的寡肽具有N-末端棕榈酰基团。具有N-末端棕榈酰基团的寡肽可以具有改善的通过细胞膜的渗透性。这种改善的渗透性可以改善穿过皮肤的传递。优选地,根据本发明公开的寡肽具有5个氨基酸,其中X1是不存在的。

[0067] 在一些优选的寡肽中,X2为具有糖基化侧链的Thr。糖基化侧链被葡萄糖、甘露糖或麦芽糖糖基化。剩余的氨基酸优选是非糖基化的。

[0068] 在其他优选的寡肽中,X3为具有糖基化侧链的Thr。糖基化侧链被麦芽糖糖基化。剩余的氨基酸优选是非糖基化的。

[0069] 在其他优选的寡肽中,X4为具有糖基化侧链的Ser。糖基化侧链被葡萄糖、半乳糖或麦芽糖糖基化。剩余的氨基酸优选是非糖基化的。

[0070] 根据本发明公开的一个示例性寡肽具有以下序列:棕榈酰-Lys-Thr\*-Thr-Lys-Ser-OH,其中Thr\*为被全乙酰化的 $\beta$ -葡萄糖糖基化的苏氨酸(SEQ ID NO:4)。

[0071] 根据本发明公开的另一个示例性寡肽具有以下序列:棕榈酰-Lys-Thr\*-Thr-Lys-Ser-OH,其中Thr\*为被全乙酰化的 $\alpha$ -甘露糖糖基化的苏氨酸(SEQ ID NO:5)。

[0072] 根据本发明公开的另一个示例性寡肽具有以下序列:棕榈酰-Lys-Thr\*-Thr-Lys-Ser-OH,其中Thr\*为被全乙酰化的 $\beta$ -麦芽糖糖基化的苏氨酸(SEQ ID NO:6)。

[0073] 根据本发明公开的另一个示例性寡肽具有以下序列:棕榈酰-Lys-Thr-Thr-Lys-Ser\*-OH,其中Ser\*为被全乙酰化的 $\beta$ -半乳糖糖基化的丝氨酸(SEQ ID NO:7)。

[0074] 根据本发明公开的另一个示例性寡肽具有以下序列:棕榈酰-Lys-Thr-Thr-Lys-

Ser\*-OH, 其中Ser\*为被全乙酰化的 $\beta$ -葡萄糖糖基化的丝氨酸 (SEQ ID NO:8)。

[0075] 在另一个具体的实例中, 提供了具有以下序列的糖基化寡肽: 棕榈酰-Lys-Thr-Thr\*-Lys-Ser-OH, 其中Thr\*为被全乙酰化的 $\beta$ -麦芽糖糖基化的苏氨酸 (SEQ ID NO:9)。

[0076] 在另一个具体的实例中, 提供了具有以下序列的糖基化寡肽: 棕榈酰-Lys-Thr-Thr-Lys-Ser\*-OH, 其中Ser\*为被全乙酰化的 $\beta$ -麦芽糖糖基化的丝氨酸 (SEQ ID NO:10)。

[0077] 根据本发明公开的糖基化寡肽(例如上文列出的示例性糖基化寡肽)与非糖基化的Pal-KTTKS相比, 显示增强的效力和/或降低的毒性。

[0078] 在本发明公开的内容中, 增强的效力是指在体外人类皮肤成纤维细胞培养物中, 与非糖基化的Pal-KTTKS相比, 更高地诱导了弹性蛋白、纤连蛋白和总的胶原蛋白的分泌, 这是使用以下试剂盒测量的: 纤连蛋白 (Takara, MK1 15), 弹性蛋白 (Uscn Life Science Inc., E91337Hu) 和总的胶原蛋白 (Chondrex Inc., 9062)。

[0079] 为了形成可以用作有效的皮肤护理产品的配制物, 糖基化的肽优选地在配方中必须是稳定的, 可以大部分吸附在皮肤上, 并且在靶物处是生物活性的。

[0080] 如本文所用, 术语“安全有效量”是指化合物或组合物的量, 该量足以显著地诱导积极的益处, 优选为积极的胶质组织外观或感觉益处, 包括独立的或组合的本文所公开的益处, 而且足以低至可以避免不利的副作用, 即, 提供在技术人员的谨慎判断范围内的合理的益处风险比。

[0081] 如本文所用, 术语“松垂”是指由于皮肤弹性蛋白损失、损伤、改变和/或异常的结果而发生的皮肤松弛、松懈或类似的状况。

[0082] 如本文所用, 术语“光滑”或“软化”是指改变角质组织的表面, 使得其触觉得以改善。

[0083] “皮肤老化的迹象”包括但不限于由于皮肤老化而产生的所有向外明显的且触觉可觉察的显现以及任何其他的大的或微小的作用。此类迹象可以被内部因素或外部因素所诱导或导致, 例如随着时间老化和/或环境损伤。这些迹象可以由惰性过程导致, 所述的过程包括但不限于纹理不连续性的发展, 例如皱纹和粗深的皱纹, 皮纹, 缝隙, 隆起物, 大孔(与附属器结构有关, 例如汗腺管、皮脂腺或毛囊), 不平坦或粗糙, 皮肤弹性丧失(功能皮肤弹性蛋白的丧失和/或失活), 松垂(包括眼部和面颊的肿胀), 皮肤坚定性的丧失, 皮肤紧实性的丧失, 由变形的皮肤回复丧失, 变色(包括黑眼圈), 斑点, 灰黄, 色素过度沉着的皮肤区域(例如老人斑和雀斑), 角质物质, 异常分化, 角化过度, 弹性组织变性, 胶原蛋白分解以及角质层、真皮、皮肤血管系统(例如毛细管扩张或蛛状血管(spider vessel))和皮下组织(特别是接近皮肤的那些)中其他组织学改变。

[0084] 根据本发明公开的糖基化的肽可以用于治疗性地调节哺乳动物皮肤中的可见的和/或可触知的不连续性。例如, 毛孔表观直径的降低、与毛孔紧相邻的组织的表观高度接近于附件间(interadnexal)皮肤的表观高度、肤色变得更均匀、和/或细纹和/或皱纹的长度、深度和/或其它尺寸的降低。

[0085] 根据本发明公开的糖基化肽还可以用于调节皮肤的状况, 特别用于调节角质组织的状况。由于肌体内部和/或外部的多种因素可以诱导或导致多种状况, 所以必须对皮肤状况(即, 哺乳动物, 特别是人类皮肤状况)进行调节。其实例包括: 环境损伤, 辐射暴露(包括紫外线辐射), 年龄老化, 绝经状态(例如皮肤的绝经后变化), 压力, 疾病等。例如“调节皮肤

状况”包括预防性地调节和/或治疗性地调节皮肤状况，并且可以涉及以下益处的一种或多种：皮肤（即，建立皮肤的表皮和/或真皮和/或皮下（例如皮下脂肪或肌肉）层，并且在适用的情况下，建立指甲和毛干的角质层）增厚从而减少皮肤萎缩；增加真皮-表皮边界（也称为表皮突）的卷积(convolution)；防止皮肤弹性丧失（功能皮肤弹性蛋白的丧失、损坏和/或失活），例如弹性组织变性、松垂、由变形的皮肤回复的丧失；非黑色素的皮肤变色，例如黑眼圈、斑点（例如由于红斑痤疮而导致的不均匀的红色）（下文称为“红色色斑”）、灰黄（灰色）、由毛细管扩张或蛛状血管导致的变色。

[0086] 如本文所用，预防性地调节皮肤状况包括延迟、减小和/或防止皮肤中的可见的和/或可触知的不连续性（例如视觉或感觉可以检测到的皮肤中的纹理不规则性）。

[0087] 如本文所用，治疗性地调节皮肤状况包括减缓（例如减少、减小和/或抹去）皮肤中的不连续性。

[0088] 根据本发明公开的糖基化肽还可以用于改善皮肤外观和/或感觉。例如根据本发明公开的组合物可以通过在将所述的组合物应用于皮肤之后提供皮肤外观的立即可视的改善而用于调节皮肤状况的外观。一般而言，进一步包含颗粒材料的本发明公开的组合物最多地用于提供立即可视的改善。

[0089] 本发明公开的组合物可以提供其他的益处，包括稳定性、缺乏明显的（消费者不可接受的）皮肤刺激和良好的美感。

[0090] 本发明公开的组合物是稳定的。本文中使用的组分（包括根据本发明公开的糖基化肽）在所述的组合物中是稳定的，并且彼此之间以及与其他的皮肤护理活性物质（例如烟酰胺，植烷三醇，法尼醇，红没药醇和水杨酸）之间是相容的。因此，所述的组合物（包含寡肽连同其他的皮肤护理活性物质（例如烟酰胺）的组合）能够提供添加的和/或协同的皮肤益处。此外，所得的皮肤护理组合物具有良好的产品稳定性和合理的长的保质期。

[0091] 所得的组合物（包含根据本发明公开的糖基化肽，并组合至少一种其他的皮肤护理活性物质）具有良好的美感。良好的美感的实例包括所述的组合物（例如奢华的乳霜和洗剂）是（i）清爽不油腻；（ii）在皮肤上时具有光滑、丝质的感觉；（iii）容易扩散；和/或（iv）快速吸收。良好的美感的其他实例包括具有消费者可接受的外观（即，不具有不愉快的气味或变色呈现）并提供良好的皮肤感觉的组合物。

[0092] 在优选的实例中，皮肤护理产品包含占组合物的重量的大约0.01%至大约50%的糖基化肽。在更优选的实例中，皮肤护理产品包含占组合物的重量的大约0.05%至大约20%的糖基化肽。在甚至更优选的实例中，皮肤护理产品包含占组合物的重量的大约0.1%至大约10%的糖基化肽。

[0093] 本发明公开的糖基化寡肽可以与至少一种其他的成分配制。在所述的组合物将要与人类角质组织接触的情况下，其他的成分应该适用于应用在角质组织上，即，当其他的成分被引入至所述的组合物中时，它们适用于与人类角质组织接触，而不会产生在谨慎的医学判断范围内的过度的毒性、不相容性、不稳定性、过敏反应等。The CTFA Cosmetic Ingredient Handbook, Second Edition (1992) 描述了在皮肤护理工业中通常使用的多种非限定性的化妆和药用组分（其适用于本发明公开的组合物）。这些组分的种类的实例包括：磨料，吸收剂，美学成分（例如香料，颜料，着色物质/着色剂，精油，皮肤增感剂（skin sensate），收敛剂，例如丁香油，薄荷醇，樟脑，桉树油，丁香油酚，乳酸薄荷酯，金缕梅精

华),祛痘剂,抗结块剂,消泡剂,抗微生物剂(例如碘代丙基丁基氨基甲酸酯),抗氧化剂,粘结剂,生物添加剂,缓冲剂,增溶剂,螯合剂,化学添加剂,着色剂,化妆品收敛剂,化妆品杀菌剂,变性剂,药品收敛剂,外部止痛剂,成膜剂或材料(例如有助于组合物的膜形成性质和直接性的聚合物(例如二十烯与乙烯基吡咯烷酮的共聚物)),乳浊剂,pH调节剂,推进剂,还原剂,螯合剂,皮肤漂白及增亮剂(例如对苯二酚,曲酸,抗坏血酸,维生素C磷酸酯镁,抗坏血酸葡糖胺),皮肤调理试剂(例如湿润剂,包括混杂的和封闭的),皮肤舒缓和/或愈合剂(例如泛酰醇和衍生物(例如乙基泛醇),真芦荟,泛酸及其衍生物,尿囊素,红没药醇和甘草酸二钾),皮肤治疗剂,增稠剂,以及维生素及其衍生物。

[0094] 法尼醇

[0095] 本发明公开的局部组合物可以包含安全有效量的法尼醇。法尼醇是天然形成的物质,据信,其在角鲨烯和固醇(特别是胆固醇)的生物合成中作为前体和/或中间体。法尼醇还涉及蛋白质的修饰和调节(例如蛋白质的法尼基化),并且存在响应于法尼醇的细胞核受体。

[0096] 在化学上,法尼醇为[2E,6E]-3,7,11-三甲基-2,6,10-十二烷三烯-1-醇,并且如本文所用,“法尼醇”包括上述醇的异构体和互变异构体。法尼醇是市售可得的,例如名称为法尼醇(由Dragoco, 10Gordon Drive, Totowa, N.J.形成的异构体的混合物)和反式-反式-法尼醇(Sigma Chemical Company, P.O.Box 14508, St.Louis, Mo.)。

[0097] 当法尼醇存在于本发明公开的组合物中时,所述的组合物优选地包含占所述的组合物的重量的大约0.001%至大约50%、更优选地大约0.01%至大约20%、甚至更优选地大约0.1%至大约15%、甚至更优选地大约0.1%至大约10%、甚至更优选地大约0.5%至大约5%、以及甚至更优选地大约1%至大约5%的法尼醇。

[0098] 植烷三醇

[0099] 本发明公开的局部组合物可以包含安全有效量的植烷三醇。植烷三醇是被称为3,7,11,15四甲基十六烷-1,2,3-三醇的化学品的普通名称。植烷三醇可购自BASF(1609Biddle Avenue, Whyandotte, Mich.)。例如植烷三醇可用作蛛状血管/红色斑点修复剂,黑眼圈/肿眼泡修复剂,灰黄修复剂,松垂修复剂,止痒剂,皮肤增稠试剂,缩孔剂,油/光减少剂,炎症后色素沉着修复剂,伤口治疗剂,瘦身剂,以及调剂皮肤纹理(包括皱纹和细纹)。

[0100] 在本发明公开的组合物中,所包含的植烷三醇优选地占所述的组合物的重量的大约0.001%至大约50%,更优选地大约0.01%至大约20%,甚至更优选地大约0.1%至大约15%,甚至更优选地大约0.2%至大约10%,还要更优选地大约0.5%至大约10%,还要更优选地大约1%至大约5%。

[0101] 脱屑活性物质

[0102] 安全有效量的脱屑活性物质可以加入至本发明公开的组合物中,更优选地占所述的组合物的重量的大约0.1%至大约10%,甚至更优选地大约0.2%至大约5%,还优选地大约0.5%至大约4%。脱屑活性物质增强了本发明公开的皮肤外观益处。例如脱屑活性物质往往会改善皮肤的纹理(例如光滑)。适用于本文所述的用途的一种脱屑系统包含巯基化合物和两性离子表面活性剂,并且在Bissett的美国专利No.5,681,852中有所描述,该文献以引用方式并入本文。适用于本文所述的用途的另一个脱屑系统包含水杨酸和两性离子表面

活性剂,并且在Bissett的美国专利No.5,652,228中有所描述,该文献以引用方式并入本文。两性离子表面活性剂(例如在本公开中描述的那些)还用作本文所述的脱屑剂,并且十六烷基甜菜碱是特别优选的。

[0103] 祛痘活性物质

[0104] 本发明公开的组合物可以包含安全有效量的一种或多种祛痘活性物质。有用的祛痘活性物质的实例包括间苯二酚,硫,水杨酸,过氧化苯甲酰,红霉素,锌等。合适的祛痘活性物质的其他实例在1997年3月4日颁发给McAtee等人的美国专利No.5,607,980中进一步详细地描述。

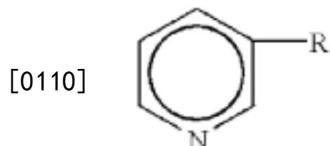
[0105] 抗皱活性物质/抗衰活性物质

[0106] 本发明公开的组合物可以进一步包含安全有效量的一种或多种抗皱活性物质或抗衰活性物质。适用于本发明公开的组合物的示例性抗皱/抗衰活性物质包括含硫的D和L氨基酸以及它们的衍生物和盐,特别是N-乙酰基衍生物,其优选的实例为N-乙酰基-L-半胱氨酸;硫醇,例如乙硫醇;羟基酸(例如 $\alpha$ -羟基酸,如乳酸和乙醇酸;或 $\beta$ -羟基酸,如水杨酸和水杨酸衍生物,如辛酰基衍生物),植酸,硫辛酸;溶血磷脂酸,皮肤剥离剂(例如苯酚等),维生素B<sub>3</sub>化合物和类维生素A,它们会增强本发明公开的角质组织的外观益处,特别是调节角质组织的状况,例如皮肤状况。

[0107] a) 维生素B<sub>3</sub>化合物

[0108] 本发明公开的组合物可以包含安全有效量的维生素B<sub>3</sub>化合物。维生素B<sub>3</sub>化合物可特别用于调节皮肤状况,如1997年4月11日提交的共同待审的美国申请系列No.08/834,010中所述(相当于1997年10月30日公开的国际公开WO 97/39733 A1)。当维生素B<sub>3</sub>化合物存在于本发明公开的组合物中时,所述的组合物优选地包含占所述的组合物的重量的大约0.1%至大约10%、甚至更优选地大约0.5%至大约10%、还更优选地大约1%至大约5%、还更优选地大约2%至大约5%的维生素B<sub>3</sub>化合物。

[0109] 如本文所用,“维生素B<sub>3</sub>化合物”是指具有下式的化合物:



[0111] 其中R为-CONH<sub>2</sub>(即,烟酰胺),-COOH(即,烟酸)或-CH<sub>2</sub>OH(即,烟醇);它们的衍生物;以及上述任何物质的盐。

[0112] 上述维生素B<sub>3</sub>化合物的示例性衍生物包括盐酸酯,包括烟酸(例如烟酸生育酚酯)的非血管舒张性的酯、烟酰氨基酸、羧酸的烟醇酯、烟酸N-氧化物和烟酰胺N-氧化物。

[0113] 合适的维生素B<sub>3</sub>化合物的实例是本领域公知的,并且可由多种来源购得,例如the Sigma Chemical Company(St.Louis,Mo.);ICN Biomedicals,Inc.(Irvin,Calif.)和Aldrich Chemical Company(Milwaukee,Wis.)。

[0114] 可以包含基本纯的材料,或者与天然(例如植物)来源通过物理和/或化学分离而获得的提取物形式的维生素化合物。

[0115] b) 类维生素A

[0116] 本发明公开的组合物还可以包含类维生素A。如本文所用,“类维生素A”包含维生

素A或视黄醇样化合物的所有天然和/或合成的类似物(它们在皮肤中具有维生素A的生物活性),以及这些化合物的几何异构体和立体异构体。类维生素A优选为视黄醇、视黄醇酯(例如视黄醇的C<sub>2</sub>-C<sub>22</sub>烷基酯,包括视黄醇棕榈酸酯,视黄醇醋酸酯,视黄醇丙酸酯)、视网膜和/或视黄酸(包括所有反式-视黄酸和/或13-顺式-视黄酸),除了视黄酸以外,更优选地为类维生素A。这些化合物是本领域公知的,并且可以由多种来源购得,例如Sigma Chemical Company (St. Louis, Mo.) , and Boerhinger Mannheim (Indianapolis, Ind.)。在本文中使用的其他类维生素A在1987年6月30日颁发给Parish等人的美国专利No. 4,677,120,1989年12月5日颁发给Parish等人的美国专利No. 4,885,311,1991年9月17日颁发给Purcell等人的美国专利No. 5,049,584,1992年6月23日颁发给Purcell等人的美国专利No. 5,124,356,以及1992年9月22日颁发给Purcell等人的美国专利No. Reissue 34,075中有所描述。其他合适的类维生素A为生育酚-视黄酸酯[视黄酸(反式-或顺式-)的生育酚酯,阿达帕林{6-[3-(1-金刚烷)-4-甲氧苯基]-2-萘甲酸},和他佐罗汀(乙基6-[2-(4,4-二甲基硫代苯并二氢吡喃-6-基)-乙炔基]烟酸酯)。优选的类维生素A为视黄醇,视黄醇棕榈酸酯,视黄醇醋酸酯,视黄醇丙酸酯,视网膜和它们的组合。

[0117] 可以包含基本纯的材料,或者与天然(例如植物)来源通过物理和/或化学分离而获得的提取物形式的维生素化合物。类维生素A优选为基本纯的,更优选为本质上是纯的。

[0118] 根据本发明公开的组合物可以包含安全有效量的类维生素A,使得所得的组合物可安全有效地用于调节角质组织状况,优选地用于调节皮肤中可视的和/或可触知的不连续性,更优选地用于调节皮肤老化的迹象,甚至更优选地用于调节与皮肤老化有关的皮肤纹理中的可视化的和/或可触知的不连续性。所述的组合物优选地包含由或大约0.005%至或大约2%、更优选地0.01%至或大约2%类维生素A。视黄醇优选地以由或大约0.01%至或大约0.15%的量使用;视黄醇酯优选地以由或大约0.01%至或大约2% (例如大约1%) 的量使用;视黄酸优选地以由或大约0.01%至或大约0.25%的量使用;生育酚-视黄酸酯、阿达帕林和他佐罗汀优选地以由或大约0.01%至或大约2%的量使用。

[0119] 在本发明公开的组合物包含类维生素A和维生素B<sub>3</sub>化合物时,类维生素A优选地以上文所述的量使用,并且维生素B<sub>3</sub>化合物优选地以由或大约0.1%至或大约10%、更优选地由或大约2%至或大约5%的量使用。

[0120] c) 羟基酸

[0121] 本发明公开的组合物可以包含安全有效量的羟基酸。用于本发明公开的组合物中的优选的羟基酸包括水杨酸和水杨酸衍生物。当在本发明公开的组合物中存在水杨酸时,水杨酸优选地以由大约0.01%至大约50%、更优选地由大约0.1%至大约20%、甚至更优选地由大约0.1%至大约10%、还更优选地由大约0.5%至大约5%、以及还更优选地由大约0.5%至大约2%的量使用。

[0122] 肽

[0123] 其他的肽(包括但不限于二-、三-和四肽及其衍生物)可以以安全有效的量包含在本发明公开的组合物中。如本文所用,“肽”是指天然形成的肽和合成的肽。包含肽的天然形成的及市售可得的组合物也可以用于本发明中。

[0124] 适用于本发明的合适的二肽包括肌肽(β-ala-his)。适用于本发明的合适的三肽包括gly-his-lys, arg-lys-arg, his-gly-gly。优选的三肽及其衍生物包括棕榈酰-gly-

his-lys, 其可以购自Biopeptide CL® (100ppm棕榈酰-gly-his-lys, 购自Sederma, France) Peptide CK (arg-lys-arg) ; Peptide CK+ (ac-arg-lys-arg-NH<sub>2</sub>) ; 以及作为核纤层蛋白购自Sigma (St. Louis, Mo.) 的his-gly-gly的铜的衍生物。适用于本发明的四肽包括肽E, arg-ser-arg-lys (SEQ ID NO:11)。

[0125] 优选地, 其他的肽选自棕榈酰-gly-his-lys、β-ala-his、它们的衍生物和组合。更优选地, 其他的肽选自棕榈酰-gly-his-lys、它们的衍生物和组合。

[0126] 当本发明的组合物中包含其他的肽时, 优选地包含占所述的组合物的重量的大约 $1 \times 10^{-6}\%$ 至大约10%、更优选地大约 $1 \times 10^{-6}\%$ 至大约0.1%、甚至更优选地 $1 \times 10^{-5}\%$ 至大约0.01%的其他的肽。在其中包含所述的肽 (Carnosine®) 的某些实施方案中, 所述的组合物优选地包含占所述的组合物的重量的大约0.1%至大约5%的所述的肽。在其中包含含肽组合物BiopeptideCL®的其他的实施方案中, 所得的组合物优选地包含占所述的组合物的重量的大约0.1%至大约10%的BiopeptideCL®。

[0127] 抗氧化剂/自由基清除剂

[0128] 本发明公开的组合物可以包含安全有效量的抗氧化剂/自由基清除剂。抗氧化剂/自由基清除剂特别用于提供针对UV辐射 (其可以导致角质层的青春痘 (scaling) 增多或纹理改变) 和针对其他环境试剂 (可以导致皮肤损害) 的保护。

[0129] 安全有效量的抗氧化剂/自由基清除剂可以加入至题述公开的组合物中, 优选地占所述的组合物的大约0.1%至大约10%、更优选地大约1%至大约5%。

[0130] 可以使用抗氧化剂/自由基清除剂, 例如抗坏血酸 (维生素C) 及其盐, 脂肪酸的抗坏血酸酯, 抗坏血酸衍生物 (例如抗坏血酸磷酸镁, 抗坏血酸磷酸钠, 抗坏血酸山梨酸酯), 生育酚 (维生素E), 生育酚山梨酸酯, 生育酚醋酸酯, 生育酚的其他酯, 丁基羟基苯甲酸及其盐, 6-羟基-2,5,7,8-四甲基色满基-2-羧酸 (以商品名Trolox®出售), 没食子酸及其烷基酯, 特别是没食子酸丙酯, 尿酸及其盐及烷基酯, 山梨酸及其盐, 硫辛酸, 胺 (例如N,N-二乙基羟胺, 氨基-胍), 疏基化合物 (例如谷胱甘肽), 二羟基富马酸及其盐, 氧脯氨酸甜菜碱 (lycine pidolate), 氧脯氨酸精氨酸, 去甲二氢愈创木酸, 生物类黄酮, 姜黄, 赖氨酸, 甲硫氨酸, 脯氨酸, 超氧化物岐化酶, 水飞蓟素, 茶提取物, 葡萄皮/籽提取物, 黑色素和迷迭香提取物。优选的抗氧化剂/自由基清除剂选自生育酚山梨酸酯和生育酚的其他酯, 更优选地为生育酚山梨酸酯。例如the use of生育酚山梨酸酯在局部组合物中及适用于本发明公开的用途在1989年7月11日颁布给Donald L.Bissett, Rodney D.Bush和Ranjit Chatterjee的美国专利No.4,847,071中有所描述。

[0131] 融合剂

[0132] 本发明公开的组合物还可以包含安全有效量的融合剂或融合试剂。如本文所用, “融合剂”或“融合试剂”是指以下活性试剂, 其能够通过形成复合物而除去系统中的金属离子, 使得金属离子不能容易地参与或催化化学反应。包含融合剂可特别用于提供针对UV辐射 (其可以有助于过多的青春痘或纹理改变) 和针对其他环境试剂 (可以导致皮肤损害) 的保护。

[0133] 可以将安全有效量的融合试剂加入至题述公开的组合物中, 优选为所述的组合物的大约0.1%至大约10%, 更优选为大约1%至大约5%。可用于本发明中的示例性融合剂在1996年1月30日颁布给Bissett等人的美国专利No.5,487,884, 1995年10月31日颁布给Bush

等人的国际公开No.91/16035,以及1995年10月31日公开的Bush等人的国际公开No.91/16034中有所描述。可用于本发明公开的组合物中的优选的螯合剂为糠偶酰二肟,糠偶酰单肟和它们的衍生物。

[0134] **类黄酮**

[0135] 本发明公开的组合物可以可任选地包含类黄酮化合物。类黄酮在美国专利No.5,686,082和5,686,367中广泛地公开,这些文献以引用方式并入本文。适用于本发明公开的类黄酮为选自非取代的黄烷酮、单取代的黄烷酮和它们的混合物的黄烷酮;选自非取代的查耳酮、单取代的查耳酮、二取代的查耳酮、三取代的查耳酮和它们的混合物的查耳酮;选自非取代的黄酮、单取代的黄酮、二取代的黄酮和它们的混合物的黄酮;一种或多种异黄酮;选自非取代的香豆素、单取代的香豆素、二取代的香豆素和它们的混合物的香豆素;选自非取代的色酮、单取代的色酮、二取代的色酮和它们的混合物的色酮;一种或多种双香豆素;一种或多种苯并二氢吡喃-4-酮;一种或多种色原烷醇;它们的异构体(例如顺式/反式异构体)和混合物。如本文所用,术语“取代的”是指其中类黄酮的一个或多个氢原子被羟基、C1-C8烷基、C1-C4烷氧基、0-糖昔等,或者这些取代基的混合物独立地取代。

[0136] 合适的类黄酮的实例包括但不限于非取代的黄烷酮,单羟基黄烷酮(例如2'-羟基黄烷酮,6-羟基黄烷酮,7-羟基黄烷酮等),单烷氧基黄烷酮s(例如5-甲氧基黄烷酮,6-甲氧基黄烷酮,7-甲氧基黄烷酮,4'-甲氧基黄烷酮等),非取代的查耳酮(特别是非取代的反式-查耳酮),单羟基查耳酮(例如2'-羟基查耳酮,4'-羟基查耳酮等),二羟基查耳酮(例如2',4-二羟基查耳酮,2',4'-二羟基查耳酮,2,2'-二羟基查耳酮,2',3-二羟基查耳酮,2',5'-二羟基查耳酮等),和三羟基查耳酮(例如2',3',4'-三羟基查耳酮,4,2',4'-三羟基查耳酮,2,2',4'-三羟基查耳酮等),非取代的黄酮,7,2'-二羟基黄酮,3',4'-二羟基萘黄酮,4'-羟基黄酮,5,6-苯并黄酮和7,8-苯并黄酮,非取代的异黄酮,大豆素(7,4'-二羟基异黄酮),5,7-二羟基-4'-甲氧基异黄酮,大豆异黄酮(由大豆提取的混合物),非取代的香豆素,4-羟基香豆素,7-羟基香豆素,6-羟基-4-甲基香豆素,非取代的色酮,3-甲酸基色酮,3-甲酸基-6-异丙基色酮,非取代的双香豆素,非取代的苯并二氢吡喃-4-酮,非取代的色原烷醇和它们的混合物。

[0137] 非取代的黄烷酮,甲氧基黄烷酮,非取代的查耳酮,2',4-二羟基查耳酮和它们的混合物优选地用于本发明。非取代的黄烷酮,非取代的查耳酮(特别是反式-异构体)和它们的混合物是更优选的。

[0138] 它们可以为合成材料,或者作为提取物由天然来源(例如植物)获得。天然来源的材料还可以进一步被衍生化(例如由天然来源在提取后制备的酯或醚的衍生物)。用于本发明的类黄酮化合物可购自多种来源,例如Indofine Chemical Company, Inc. (Somerville, N.J.), Steraloids, Inc. (Wilton, N.H.), 和 Aldrich Chemical Company, Inc. (Milwaukee, Wis.)。

[0139] 还可以使用上述类黄酮化合物的混合物。

[0140] 本文所述的类黄酮以大约0.01%至大约20%、更优选地以大约0.1%至大约10%、还更优选地大约0.5%至大约5%的浓度存在于根据本发明公开的组合物中。

[0141] **消炎剂**

[0142] 可以将安全有效量的消炎剂加入至本发明公开的组合物中,优选占所述的组合

物的大约0.1%至大约10%、更优选地为大约0.5%至大约5%。所述的消炎剂会增强本发明公开的皮肤外观益处,例如此类试剂有助于更均匀的且可接受的皮肤色泽或颜色。在所述的组合物中使用的消炎剂的提取物的量将取决于所使用的特定的抗炎试剂,因为这种试剂的效力变化很大。

[0143] 可以使用甾体消炎剂包括但不限于皮质类甾醇如氢化可的松、羟基氟羟脱氢皮质(甾)醇、 $\alpha$ -甲基地塞米松、磷酸地塞米松、二丙酸氯地米松、戊酸氯氟美松、丙酮缩羟强的松龙、氟二羟基甲基孕甾二烯二酮、醋酸去氧皮甾酮、地塞米松、二氯去氧强的松、双醋二氟松、戊酸二氟米松、Fluadrenolone、氟二氯松丙酮化合物、氟氢可的松、三甲基乙酸氟米松、Fluosinolone丙酮化合物、肤轻松醋酸酯、二氟美松(Flucortine)丁基酯、氟考龙、醋酸氟强的松、丙酮缩氟羟龙、哈西奈德、醋酸氢化可的松、丁酸氢化可的松、甲基氢化泼尼松、曲安奈德丙酮化合物、可的松、可多托松、Flucetonide、氢氟可的松、Difluorosone Diacetate、丙酮缩氟羟龙丙酮化合物、甲羟松、安西法尔、安西非特、倍它米松和其余量的酯、氯强的松、醋酸氯强的松、氯可托龙、Clescinolone、二氯去氧的松、醋丁二氟龙、氟二氯松、9-去氟肤轻松、氟米松、醋酸甲氟龙、氟氢化泼尼松、戊酸氢化可的松、氢化可的松环戊丙酸酯、氢可松氨酯、甲泼尼松、帕拉米松、氢化泼尼松、泼尼松、氯地米松二丙酸酯、曲安奈德和其混合物。优选使用的甾体消炎剂是羟基可的松。

[0144] 可以用于所述的组合物中的第二类消炎剂包括非甾体消炎剂。这一组所涵盖的化合物的种类是本领域那些技术人员所公知的。为了得到非甾体消炎剂的化学结构、合成、副作用等的详细公开,人们可以参照标准的内容,包括Anti-inflammatory and Anti-Rheumatic Drugs, K.D.Rainsford, Vol. I-III, CRC Press, Boca Raton, (1985), and Anti-inflammatory Agents, Chemistry and Pharmacology, 1, R.A.Scherrer, et al., Academic Press, New York (1974)。

[0145] 可以用于根据本发明公开的组合物中的具体的非甾类消炎剂包括但不限于:

[0146] 1)昔康,例如吡罗昔康,伊索昔康,噻吩昔康,舒多昔康和CP-14,304;

[0147] 2)水杨酸盐,例如阿司匹林,双水杨酯制剂,扑炎痛,三水杨酸胆碱镁,safaprym, solprin,二氟尼柳和芬度柳;

[0148] 3)醋酸衍生物,例如双氯芬酸,芬氯酸,消炎痛,舒林酸,甲苯酰吡啶乙酸,伊索克酸,乙基二氢苯并呋喃乙酸,二氢氧二苯并硫杂,叠氮吲酸,阿西美辛,双苯噻酸,氯苯酰二甲基吡咯乙酸,clindanac,奥昔平酸,联苯乙酸和酮咯酸;

[0149] 4)止痛剂,例如甲灭酸酸,甲氯芬那酸,氟灭酸,尼氟灭酸和托芬那酸;

[0150] 5)丙酸衍生物,例如布洛芬,萘普生,苯恶洛芬,氟比洛芬,苯酮苯丙酸,非诺洛芬,芬布芬,indopropfen,吡咯洛,卡洛芬,鲁明奥欣,普拉洛芬,咪洛芬,硫恶洛芬,舒洛芬,阿明洛芬和噻洛芬;以及

[0151] 6)吡唑,例如保泰松,羟基保泰松,非泼拉酮,阿扎丙酮和三甲保泰松。

[0152] 还可以使用这些非甾体消炎剂的混合物,以及这些试剂的皮肤病学可接受的盐或酯。例如依托芬那酯(氟灭酸的衍生物)特别用于局部应用中。在非甾体消炎剂中,布洛芬,萘普生,氟灭酸,依托芬那酯,阿司匹林,甲灭酸,甲氯芬那酸,吡罗昔康和联苯乙酸是优选的;布洛芬,萘普生,苯酮苯丙酸,依托芬那酯,阿司匹林和氟灭酸是更优选的。

[0153] 最终,所谓的“天然”消炎剂可用于本发明公开的方法中。此类试剂可以作为提取

物通过合适的物理和/或化学分离由天然来源(例如植物、真菌、微生物有机体的副产物)适当地获得,或者是合成制备的。例如可以使用小烛树蜡,红没药醇(例如 $\alpha$ 红没药醇),真芦荟,植物固醇(例如植物类固醇),Manjistha(由茜草属的植物提取得到,特别是茜草(Rubia Cordifolia)),和Guggal(由没药属的植物提取得到,特别是印度穆库尔没药(Commiphora Mukul)),可乐果提取物,甘菊,红车轴提取物和柳珊瑚提取物。

[0154] 可以用于本发明的其他消炎剂包括甘草科(植物光果甘草(Glycyrrhiza glabra)的属/种)的化合物,包括和它们的衍生物(例如盐和酯)。上述化合物的合适的盐包括金属和铵盐。合适的酯包括酸的C<sub>2</sub>-C<sub>24</sub>饱和的或不饱和的酯;优选为C<sub>10</sub>-C<sub>24</sub>,更优选为C<sub>16</sub>-C<sub>24</sub>。上述化合物的具体实例包括可溶于油的欧亚甘草提取物,甘草酸和氢琥珀酸甘草次酸本身,甘草酸单铵盐,甘草酸钾盐,甘草酸二钾,1- $\beta$ -氢琥珀酸甘草次酸,甘草酸硬脂酯和3-硬脂酰氧基-甘草次酸,以及3-琥珀酰氧基- $\beta$ -甘草亭酸二钠。甘草酸硬脂酯是优选的。

[0155] 瘦身剂

[0156] 本发明公开的组合物还可以包含安全有效量的瘦身剂。合适的试剂可以包括但不限于黄嘌呤化合物(例如咖啡碱,茶碱,可可碱和氨茶碱)。

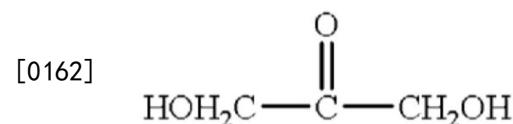
[0157] 局部麻醉剂

[0158] 本发明公开的组合物还可以包含安全有效量的局部麻醉剂。局部麻醉剂药品的实例包括苯坐卡因,利多卡因,丁哌卡因,氯普鲁卡因,辛可卡因,依替卡因,马比佛卡因,丁卡因,达克罗宁,海克卡因,普鲁卡因,古柯碱,克他命,普莫卡因,苯酚和它们药学可接受的盐。

[0159] 鞣活性物质

[0160] 本发明公开的组合物可以包含鞣活性物质。当鞣活性物质存在时,优选的是所述的组合物包含占所述的组合物的重量的大约0.1%至大约20%、更优选地大约2%至大约7%、还更优选地大约3%至大约6%的二羟基丙酮作为人工鞣活性物质。

[0161] 鞣活性物质(也称为DHA或1,3-二羟基-2-丙酮)为白色至米白色晶体粉末。这种材料可以通过化学式C<sub>3</sub>H<sub>6</sub>O<sub>3</sub>和以下化学结构表示。



[0163] 所述的化合物可以以单体和二聚体的混合物的形式存在,并且在固态晶体状态下二聚体占优势。在加热或熔融时,二聚体断裂从而产生单体。二聚形式向单体形式的转化还可以在水性溶液中发生。还已知二羟基丙酮在酸性pH值下更稳定。参见The Merck Index, Tenth Edition, entry 3167, p. 463 (1983) 和 "Dihydroxyacetone for Cosmetics", E. Merck Technical Bulletin, 03-304 1 10, 319 897, 180 588。

[0164] 皮肤美白剂

[0165] 本发明公开的组合物可以包含皮肤美白剂。当使用该皮肤美白剂时,所述的组合物优选地包含占所述的组合物的重量的大约0.1%至大约10%、更优选为大约0.2%至大约5%、还优选为大约0.5%至大约2%的皮肤美白剂。合适的皮肤美白剂包括本领域已知的那些,包括曲酸,熊果苷,抗坏血酸及其衍生物(例如抗坏血酸磷酸镁或抗坏血酸磷酸钠),以及提取物(例如桑椹提取物,胎盘提取物)。适用于本发明的皮肤美白剂还包括在名为

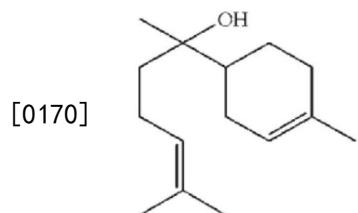
Hillebrand的PCT公开No. 95/34280(相当于1995年6月12日提交的PCT申请No.U.S.Ser.No.95/07432),和名为Kvalnes,Mitchell A.DeLong,Barton J.Bradbury,Curtis B.Motley和John D.Carter提交的共同待审的美国申请系列No.08/390,152(相当于9/8/95公开的PCT公开系列No.95/23780)中描述的那些。

[0166] 皮肤舒缓和皮肤愈合活性物质

[0167] 本发明公开的组合物可以包含皮肤舒缓或皮肤愈合活性物质。适用于本发明的皮肤舒缓或皮肤愈合活性物质包括泛酸衍生物(包括泛酰醇,泛醇,乙基泛酰醇),真芦荟,尿囊素,红没药醇和甘草酸二钾。可以将安全有效量的皮肤舒缓或皮肤愈合活性物质加入至本发明的组合物中,优选占所形成的组合物的重量的大约0.1%至大约30%、更优选为大约0.5%至大约20%、还更优选为大约0.5%至大约10%。

[0168] a) 红没药醇

[0169] 本发明公开的局部组合物还可以包含安全有效量的红没药醇。红没药醇是天然形成的不饱和的单环萜烯醇,其具有以下结构。



[0171] 红没药醇是甘菊提取物/油的主要活性成分。红没药醇可以是合成的(*d*,1- $\alpha$ -异构体或 $(+/-)$ - $\alpha$ -异构体)或天然起源的(*(-)*- $\alpha$ -异构体),并且可以以本质上纯的化合物或化合物的混合物(例如由天然来源得到的提取物,例如甘菊)形式使用。 $\alpha$ 形式的红没药醇( $\alpha$ -红没药醇)在多种化妆产品中作为皮肤调理或舒缓试剂使用。如本文所用,“红没药醇”包括甘菊提取物或油,以及此类物质的任何异构体和互变异构体。合适的红没药醇化合物作为天然材料购自Dragoco (Totowa, N.J.),产品名称为 $\alpha$ -红没药醇(天然的),并且作为合成材料购自Fluka (Milwaukee, Wis.),产品名称为 $\alpha$ -红没药醇。

[0172] 在本发明公开的组合物中,所述的组合物优选地包含占所述的组合物的重量的大约0.001%至大约50%、更优选为大约0.01%至大约20%、甚至更优选为大约0.01%至大约15%、还更优选为大约0.1%至大约10%的红没药醇。

[0173] 抗微生物和抗真菌活性物质

[0174] 本发明公开的组合物可以包含抗微生物或抗真菌活性物质。此类活性物质能够破坏微生物,防止微生物发育或防止微生物的致病作用。可以将安全有效量的抗微生物或抗真菌活性物质加入至本发明的组合物中,优选为大约0.001%至大约10%、更优选为大约0.01%至大约5%、还更优选为大约0.05%至大约2%。

[0175] 抗微生物和抗真菌活性物质的实例包括 $\beta$ -内酰胺药品,喹诺酮药品,环丙沙星,诺氟沙星,四环素,红霉素,丁胺卡那霉素,2,4,4'-三氯-2'-羟基二苯醚,3,4,4'-三氯苯胺,苯氧乙醇,苯氧基丙醇,苯氧异丙醇,强力霉素,卷曲霉素,洗必泰,金霉素,氧四环素,林大霉素,乙胺丁醇,己脒定羟乙基磺酸盐,甲硝唑,潘他米丁,庆大霉素,卡那霉素,线霉素,甲烯土霉素,乌洛托品,米诺环素,新霉素,奈替米星,巴龙霉素,链霉素,托普霉素,霉康唑,盐酸四环素,红霉素,红霉素锌,依托红霉素,硬脂酸红霉素,硫酸丁胺卡那霉素,盐酸强力霉

素盐,硫酸卷曲霉素,葡萄糖酸洗必泰,盐酸洗必泰,盐酸金霉素,氧盐酸四环素,盐酸林大霉素,盐酸乙胺丁醇,盐酸甲硝唑,盐酸潘他米丁,硫酸庆大霉素,硫酸卡那霉素, lineomycin hydrochloride,盐酸甲烯土霉素,马尿酸乌洛托品,曼德拉明,盐酸米诺环素,硫酸新霉素,硫酸奈替米星,硫酸巴龙霉素,硫酸链霉素,硫酸托普霉素,盐酸霉康唑,酮康唑,盐酸金刚烷胺,硫酸阿曼他丁,羟甲辛吡酮,parachlorometa xyleneol,制霉菌素,托萘酯,吡硫翁锌和克霉唑。

[0176] 可用于本发明的活性物质的优选的实例包括选自以下的那些:水杨酸,过氧化苯甲酰,3-羟基苯甲酸,乙醇酸,乳酸,4-羟基苯甲酸,乙酰基水杨酸,2-羟基丁酸,2-羟基戊酸,2-羟基己酸,顺式-视黄酸,反式-视黄酸,视黄醇,植酸,N-乙酰基-L-半胱氨酸,硫辛酸,杜鹃花酸,花生四烯酸,过氧化苯甲酰,四环素,布洛芬,萘普生,氢化可的松,对乙酰氨基酚,间苯二酚,苯氧乙醇,苯氧基丙醇,苯氧异丙醇,2,4,4'-三氯-2'-羟基二苯醚,3,4,4'-三氯对称二苯脲,羟甲辛吡酮,盐酸利多卡因,克霉唑,霉康唑,酮康唑,硫酸新霉素和它们的混合物。

#### [0177] 防晒活性物质

[0178] 暴露于紫外光可以导致角质层过多的青春痘和纹理改变。因此,本发明公开的组合物可以可任选地包含防晒活性物质。如本文所用,“防晒活性物质”包括防晒试剂和物理防晒霜。合适的防晒活性物质可以为有机或无机的。

[0179] 可以用于本发明的无机防晒物质包括以下金属氧化物:平均原始粒径为大约15nm至大约100nm的二氧化钛;平均原始粒径为大约15nm至大约150nm的氧化锌,平均原始粒径为大约15nm至大约150nm的氧化锆,平均原始粒径为大约15nm至大约500nm的氧化铁,以及它们的混合物。当本发明中使用无机防晒物质时,无机防晒物质以占所述的组合物的重量的大约0.1%至大约20%、优选为大约0.5%至大约10%、更优选为大约1%至大约5%。

[0180] 多种传统的有机防晒活性物质适用于本发明。Sagarin, et al., at Chapter VIII, pages 189 et seq., of Cosmetics Science and Technology (1972) 公开了多种合适的活性物质。具体的合适的防晒活性物质包括例如对氨基苯甲酸,其盐及其衍生物(乙基,异丁基,丙三酯;对二甲氨基苯甲酸);氨基苯甲酸酯(即,邻氨基苯甲酸酯;甲基,薄荷基,苯基,苄基,苯基乙基,芳樟基,松油基和环己烯基酯);水杨酸盐(戊基,苯基,辛基,苄基,薄荷基,甘油基和一缩二丙二醇酯);肉桂酸衍生物(薄荷基和苄基酯,a-苯基肉桂腈;丁酰肉桂酰丙酮酸);二羟基肉桂酸衍生物(伞形酮,甲基伞形酮,甲基乙酰-伞形酮);三羟基肉桂酸衍生物(七叶亭,甲基七叶亭,瑞香素,糖昔,七叶灵和瑞香甙);碳氢化合物(二苯基丁二烯,芪);二亚苄基丙酮和亚苄基乙酰苯;萘酚磺酸盐(2-萘酚-3,6-二磺酸和2-萘酚-6,8-二磺酸的钠盐);二羟基萘甲酸及其盐;邻-和对-二苯基二磺酸酯;香豆素衍生物(7-羟基,7-甲基,3-苯基);二唑(2-乙酰基-3-溴吲唑,苯基苯并恶唑,甲基萘恶唑,多种芳基苯并噻唑);奎宁盐(硫酸氢盐,硫酸盐,氯化物,油酸盐和丹宁酸盐);喹啉衍生物(8-羟基喹啉盐,2-苯基喹啉);羟基-或甲氧基-取代的苯甲酮;尿酸和紫尿酸;丹宁酸及其衍生物(例如hexaethyl ether);(丁基卡必醇)(6-丙基胡椒基)醚;对苯二酚;苯甲酮(羟苯,磺异苯酮,二羟苯宗,苯酰间苯二酚,2,2',4,4'-四羟基苯甲酮,2,2'-二羟基-4,4'-二甲氧基苯甲酮,奥他苯酮;4-异丙基二苯甲酰基甲烷;丁基甲氧基二苯甲酰基甲烷;依托立林;氰双苯丙烯酸辛酯;[3-(4'-甲基亚苄基)苦味酸-2-酮],对苯二亚甲基二苦味酸磺酸和4-异丙基-二苯甲酰基

甲烷。

[0181] 其中,2-乙基己基-p-甲氧基肉桂酸(可购自PARSOL MCX),4,4'-叔丁基甲氧基联苯甲酰-甲烷(可购自PARSOL 1789),2-羟基-4-甲氧基苯甲酮,辛基二甲基-对氨基苯甲酸,棓酰棓酸三油酸酯,2,2-二羟基-4-甲氧基苯甲酮,乙基-4-(双(羟基-丙基))氨基苯甲酸酯,2-乙基己基-2-氰基-3,3-二苯基丙烯酸酯,2-乙基己基-水杨酸盐,甘油基-p-氨基苯甲酸酯,3,3,5-三甲基环己基水杨酸盐,甲基氨基苯甲酸酯,p-二甲基-氨基苯甲酸或氨基苯甲酸酯,2-乙基己基-p-二甲基-氨基-安息香酸酯,2-苯基苯并咪唑-5-磺酸,2-(p-二甲基氨基苯基)-5-磺基苯并恶唑酸,氰双苯丙烯酸辛酯和这些化合物的混合物是优选的。

[0182] 在所述的组合物中使用的更优选的有机防晒活性物质包括2-乙基己基-p-甲氧基肉桂酸,丁基甲氧基联苯甲酰-甲烷,2-羟基-4-甲氧基苯甲酮,2-苯基苯并咪唑-5-磺酸,辛基二甲基-p-氨基苯甲酸,氰双苯丙烯酸辛酯和它们的混合物。

[0183] 诸如在1990年6月26日颁布给Sabatelli的美国专利No.4,937,370和在1991年3月12日颁布给Sabatelli&Spirnak的美国专利No.4,999,186中公开的那些之类的防晒活性物质也特别用于所述的组合物中。本发明中公开的防晒试剂在单一的分子中具有2个不同的发色团部分,其展现出不同的紫外线辐射吸收光谱。一个发色团部分主要吸收UVB辐射范围,另一个发色团部分在UVA辐射范围强烈吸收。

[0184] 这类防晒试剂的优选的成员为2,4-二羟基苯甲酮的4-N,N-(2-乙基己基)甲基-氨基苯甲酸酯;N,N-二-(2-乙基己基)-4-氨基苯甲酸与4-羟基二苯甲酰基甲烷形成的酯;4-N,N-(2-乙基己基)甲基-氨基苯甲酸与4-羟基二苯甲酰基甲烷形成的酯;2-羟基-4-(2-羟基乙氧基)苯甲酮的4-N,N-(2-乙基己基)甲基-氨基苯甲酸酯;4-(2-羟基乙氧基)二苯甲酰基甲烷的4-N,N-(2-乙基己基)-甲基氨基苯甲酸酯;2-羟基-4-(2-羟基乙氧基)苯甲酮的N,N-二-(2-乙基己基)-4-氨基苯甲酸酯;4-(2-羟基乙氧基)二苯甲酰基甲烷的N,N-二-(2-乙基己基)-4-氨基苯甲酸酯,以及它们的混合物。

[0185] 特别优选的防晒活性物质包括4,4'-叔丁基甲氧基二苯甲酰基甲烷,2-乙基己基-p-甲氧基肉桂酸,苯基苯并咪唑磺酸和氰双苯丙烯酸辛酯。

[0186] 使用安全有效量的有机防晒活性物质,通常为占所述的组合物的重量的大约1%至大约20%、更通常为大约2%至大约10%。提取量将根据所选的一种或多种防晒物质以及所需的紫外线防晒系数(SPF)而改变。

[0187] 颗粒材料

[0188] 本发明公开的组合物可以包含颗粒材料,优选为金属氧化物。这些颗粒可以是涂敷的或未涂敷的,带电荷的或不带电荷的。带电荷的颗粒材料在Ha等人的美国专利No.5,997,887中所有公开,所述的文献以引用方式并入本文。可以用于本发明的颗粒材料包括:氯氧化铋,氧化铁,云母,使用硫酸钡和TiO<sub>2</sub>处理的云母,二氧化硅,尼龙,聚乙烯,滑石,苯乙烯,聚丙烯,乙烯/丙烯酸共聚物,绢云母,氧化铝,硅树脂,硫酸钡,碳酸钙,醋酸纤维素,二氧化钛,聚甲基甲基丙烯酸酯和它们的混合物。

[0189] 无机颗粒材料(例如TiO<sub>2</sub>,ZnO或ZrO<sub>2</sub>)可购自多种来源。合适的颗粒材料的一个实例包括得自美国Cosmetics (TRONOX TiO<sub>2</sub>系列,SAT-T CR837,金红石TiO<sub>2</sub>)的材料。优选地,颗粒材料以占所述的组合的重量的大约0.01%至大约2%、更优选为大约0.05%至大约1.5%、还更优选地大约0.1%至大约1%的水平存在于所述的组合物中。

## [0190] 调理试剂

[0191] 本发明公开的组合物可以包含选自湿润剂,保湿霜或皮肤调理剂中的调理试剂。可以使用多种此类材料,并且每种材料均可以以占所述的组合物的重量的大约0.01%至大约20%、更优选为大约0.1%至大约10%、还更优选为大约0.5%至大约7%的水平存在。这些材料包括但不限于胍;脲;乙醇酸和乙醇酸盐(例如铵和烷基季铵盐);水杨酸;乳酸和乳酸盐(例如铵和烷基季铵盐);多种形式的任意一种的真芦荟(例如真芦荟凝胶);多元醇,例如山梨醇,甘露醇,木糖醇,赤藻糖醇,甘油,己三醇,丁三醇,丙二醇,丁二醇,乙二醇等;聚乙二醇;糖(例如蜜二糖)和淀粉;糖和淀粉衍生物(例如烷氧基化的葡萄糖,果糖,葡糖胺);透明质酸;乳酰胺单乙醇胺;乙酰胺单乙醇胺;泛酰醇;尿囊素;和它们的混合物。在本发明中还可以使用在1990年12月11日颁布给0rr等人的美国专利No.4,976,953中所述的丙氧基化甘油。

[0192] 还可以使用糖和相关材料的多种C<sub>1</sub>-C<sub>30</sub>单酯和聚酯。这些酯衍生自糖或多羟基化合物,以及一个或多个羧酸部分。此类酯材料在1977年1月25日颁布给Jandacek的美国专利No.2,831,854,美国专利No.4,005,196;在1977年1月25日颁布给Jandacek的美国专利No.4,005,195,1994年4月26日颁布给Letton等人的美国专利No.5,306,516;在1994年4月26日颁布给Letton等人的美国专利No.5,306,515;在1994年4月26日颁布给Letton等人的美国专利No.5,305,514;在1989年1月10日颁布给Jandacek等人的美国专利No.4,797,300;在1976年1月15日颁布给Rizzi等人的美国专利No.3,963,699;在1985年5月21日颁布给Volpenhein的美国专利No.4,518,772;以及在1985年5月21日颁布给Volpenhein的美国专利No.4,517,360中进一步描述。

[0193] 优选地,调理试剂选自脲,胍,蔗糖聚酯,泛酰醇,泛醇,尿囊素和它们的组合。

## [0194] 结构试剂

[0195] 在此所述的组合物、特别是在此所述的乳液可以包含结构试剂。在本发明公开的水包油乳液中,结构试剂是特别优选的。不被理论所限定,据信结构试剂帮助提供所述的组合物的流变学特征,该特征有助于所述的组合物的稳定性。例如结构试剂往往有助于液晶凝胶网格结构的形成。所述的结构试剂还可以起到乳化剂或表面活性剂的作用。优选的组合物包含大约0.1%至大约20%、更优选地大约0.1%至大约10%、还更优选地大约0.5%至大约9%的一种或多种结构试剂。

[0196] 优选的结构试剂为HLB为大约1至大约8、并且熔点为至少大约45℃的那些。合适的结构试剂选自饱和的C<sub>14</sub>至C<sub>30</sub>脂肪醇,包含大约1至大约5摩尔的聚氧化乙烯的饱和的C<sub>16</sub>至C<sub>30</sub>脂肪醇,饱和的C<sub>16</sub>至C<sub>30</sub>二醇,饱和的C<sub>16</sub>至C<sub>30</sub>单甘油醚,饱和的C<sub>16</sub>至C<sub>30</sub>羟基脂肪酸,C<sub>14</sub>至C<sub>30</sub>羟基化的和非羟基化的饱和的脂肪酸,C<sub>14</sub>至C<sub>30</sub>饱和的乙氧基化的脂肪酸,包含大约1至大约5摩尔的氧化乙烯二醇的胺和醇,甘油一酸酯含量为至少40%的C<sub>14</sub>至C<sub>30</sub>饱和的甘油基单酯,具有大约1至大约3个烷基基团以及大约2至大约3个饱和甘油单元的C<sub>1</sub>至C<sub>30</sub>饱和的聚甘油酯,C<sub>1</sub>至C<sub>30</sub>甘油基单酯,C<sub>1</sub>至C<sub>30</sub>山梨聚糖单/二酯,具有大约1至大约5摩尔氧化乙烯的C<sub>1</sub>至C<sub>30</sub>饱和的乙氧基化的山梨聚糖单/二酯,C<sub>1</sub>至C<sub>30</sub>饱和的甲基糖苷酯,C<sub>1</sub>至C<sub>30</sub>饱和的蔗糖单/二酯,具有大约1至大约5摩尔氧化乙烯的C<sub>14</sub>至C<sub>30</sub>饱和的乙氧基化的甲基糖苷酯,具有1至2个葡萄糖单元的C<sub>1</sub>至C<sub>30</sub>饱和的聚糖苷,和它们的混合物,其熔点为至少大约45℃。

[0197] 本发明公开的优选的结构试剂选自硬脂酸,棕榈酸,硬脂醇,十六醇,山醇,硬脂

酸,棕榈酸,具有平均大约1至大约5个氧化乙烯单元的硬脂醇的聚乙二醇醚,具有平均大约1至大约5个氧化乙烯单元的十六醇的聚乙二醇醚,和它们的混合物。本发明公开的更优选的结构试剂选自硬脂醇,十六醇,山醇,具有平均大约2个氧化乙烯单元的硬脂醇的聚乙二醇醚(硬脂醇聚醚-2),具有平均大约2个氧化乙烯单元的十六醇的聚乙二醇醚,和它们的混合物。甚至更优选的结构试剂选自硬脂酸,棕榈酸,硬脂醇,十六醇,山醇,硬脂醇聚醚-2,和它们的混合物。

[0198] 增稠试剂(包括增稠剂和胶凝剂)

[0199] 本发明公开的组合物可以包含一种或多种增稠试剂,其优选地占所述的组合物的重量的大约0.1%至大约5%、更优选为大约0.1%至大约4%、还更优选为大约0.25%至大约3%。

[0200] 非限定性种类的增稠试剂包括选自以下的那些:

[0201] a) 羧酸聚合物

[0202] 这些聚合物为交联的化合物,其包含一个或多个衍生自丙烯酸、取代的丙烯酸、以及这些丙烯酸和取代的丙烯酸的盐和酯的单体,其中所述的交联剂包含2个或多个碳-碳双键,并且衍生自多元醇。可用于本发明公开的聚合物在1992年2月11日颁布给Haffey等人的美国专利No. 5,087,445中;在1985年4月5日颁布给Huang等人的美国专利No. 4,509,949中;1957年7月2日颁布给Brown的美国专利No. 2,798,053中;以及CTFA Cosmetic Ingredient Dictionary, Fourth Edition, 1991, pp. 12和80中更全面的描述。

[0203] 市售可得的本发明可以使用的羧酸聚合物的实例包括卡波姆,其为与蔗糖或季戊四醇的烯丙基醚交联的丙烯酸的均聚物。卡波姆为得自B.F. Goodrich(例如Carbopol® 954)的Carbopol® 900系列。此外,其他合适的羧酸聚合试剂包括C<sub>10-30</sub>烷基丙烯酸酯与丙烯酸、甲基丙烯酸或一种它们的短链(即,C<sub>1-4</sub>醇)酯的一种或多种单体形成的共聚物,其中所述的交联试剂为蔗糖或季戊四醇的烯丙基醚。这些共聚物称为丙烯酸酯/C<sub>10-C30</sub>烷基丙烯酸酯交联聚合物,并且购自Carbopol® 1342, Carbopol® 1382, 得自B.F. Goodrich的Pemulen TR-1和Pemulen TR-2。换言之,可用于本发明的羧酸聚合物增稠剂的实例为选自卡波姆,丙烯酸酯/C<sub>10-C30</sub>烷基丙烯酸酯交联聚合物,和它们的混合物的那些。

[0204] b) 交联的聚丙烯酸酯聚合物

[0205] 本发明公开的组合物可以可任选地包含用作增稠剂或胶凝剂的交联的聚丙烯酸酯聚合物,包括阳离子和非离子聚合物,并且阳离子聚合物通常是优选的。可以使用的交联的非离子聚丙烯酸酯聚合物和交联的阳离子聚丙烯酸酯聚合物的实例在1992年3月31日颁布给Hawe等人的美国专利No. 5,100,660;1989年7月18日颁布给Heard的美国专利No. 4,849,484;1989年5月30日颁布给Farrar等人的美国专利No. 4,835,206;1986年12月9日颁布给Glover等人的美国专利No. 4,628,078;1986年7月8日颁布给Flesher等人的美国专利No. 4,599,379;以及1987年7月15日公开的Farrar等人的EP 228,868中有所描述。

[0206] c) 聚丙烯酰胺聚合物

[0207] 本发明公开的组合物可可任选地包含聚丙烯酰胺聚合物,特别是非离子聚丙烯酰胺聚合物,包括取代的支化的或非支化的聚合物。在这些聚丙烯酰胺聚合物中,给予CTFA名称为聚丙烯酰胺、异链烷烃和聚乙二醇单十二醚-7(可得自Seppic Corporation (Fairfield, N.J.)的商品名Sepigel 305)的非离子聚合物是更优选的。

[0208] 可用于本发明的其他聚丙烯酰胺聚合物包括丙烯酰胺和取代的丙烯酰胺与丙烯酸和取代的丙烯酸形成的多嵌段共聚物。这些多嵌段共聚物的市售可得的实例包括得自 Lipo Chemicals, Inc., (Patterson, N.J.) 的 Hypan SR150H, SS500V, SS500W, SSSA100H。

[0209] d) 多糖

[0210] 多种多糖可以用于本发明中。“多糖”是指包含重复的糖(即, 碳水化合物)单元的主链的胶凝剂。多糖胶凝剂的非限定性实例包括选自以下的那些: 纤维素, 羧甲基羟乙基纤维素, 醋酸丙酸羧酸纤维素, 羟基乙基纤维素, 羟基乙基乙基纤维素, 羟基丙基纤维素, 羟基丙基甲基纤维素, 甲基羟基乙基纤维素, 微晶纤维素, 硫酸纤维素钠, 和它们的混合物。烷基取代的纤维素也可以用于本发明中。在这些聚合物中, 纤维素聚合物的羟基基团是羟基烷基化的(优选为羟基乙基化的或羟基丙基化的), 从而形成羟基烷基化的纤维素, 该纤维素随后经C<sub>10</sub>–C<sub>30</sub>直链或支链烷基基团通过醚键进一步修饰。通常, 这些聚合物为C<sub>10</sub>–C<sub>30</sub>直链或支链醇与羟基烷基纤维素形成的醚。用于本发明的烷基基团的实例包括选自以下的那些: 硬脂酰基, 异硬脂酰基, 十二烷基, 十四烷基, 十六烷基, 异十六烷基, 椰油基(即, 衍生自椰子油的醇的烷基基团), 十六烷基, 油烯基, 亚油烯基, 亚麻基, 蓖麻油基基, 山嵛醇基和它们的混合物。在烷基羟基烷基纤维素醚中, 被给予CTFA名称为十六烷基羟基乙基纤维素的材料是优选的, 其中所述的材料为十六醇和羟基乙基纤维素的醚。该材料由 Aqualon Corporation (Wilmington, Del.) 以商品名 Natrosol® CS Plus 出售。

[0211] 其他有用的多糖包括硬葡聚糖, 其为(1-3)连接的葡萄糖单元的线性链, 其中每3个单元便具有一个(1-6)连接的葡萄糖, 其市售可得的实例为得自 Michel Mercier Products Inc. (Mountainside, N.J.) 的 Clearogel™ CS11。

[0212] e) 树胶

[0213] 可用于本发明的其他增稠和胶凝剂包括主要由天然来源衍生得到的材料。这些胶凝剂树胶的非限定性实例包括阿拉伯树胶, 琼脂, 褐藻胶, 褐藻酸, 褐藻酸铵, 支链淀粉, 藻酸钙, 角叉菜胶钙, 肉毒碱, 卡拉胶, 糊精, 凝胶, 结冷胶, 瓜尔豆胶, 瓜尔羟丙基氯化铵, 锂蒙脱石, 透明质酸, 水合二氧化硅, 羟基丙基壳聚糖, 羟基丙基瓜耳胶, 卡拉牙胶, 巨藻, 刺槐豆胶, 纳豆, 褐藻酸钾, 卡拉胶钾, 褐藻酸丙二醇酯, 小核菌胶, 羧甲基葡聚糖钠, 卡拉胶钠, 黄蓍胶, 黄原胶和它们的混合物。

[0214] 本发明公开的优选的组合物包括选自以下的增稠试剂: 羧酸聚合物, 交联的聚丙烯酸酯聚合物, 聚丙烯酰胺聚合物和它们的混合物, 更优选地选自羧酸聚合物, 聚丙烯酰胺聚合物和它们的混合物。

[0215] 皮肤病学可接受的载体

[0216] 本发明公开的局部组合物还包含皮肤病学可接受的载体。如本文所用, 短语“皮肤病学可接受的载体”是指所述的载体适用于具有施加于角质组织, 具有良好的美容性质, 与本发明公开的活性物质和任何其他成分相容, 并且不会导致任何难处理的安全或毒性影响。安全有效量的载体为占所述的组合物的大约50%至大约99.99%, 优选为大约80%至大约99.9%, 更优选为大约90%至大约98%, 甚至更优选为大约90%至大约95%。

[0217] 所述的载体可以为多种形式。例如乳液载体可以用于本发明中, 包括但不限于水包油、油包水、水包油包水和乳化硅油包水包油。

[0218] 优选的载体包括乳液, 例如水包油乳液、油包水乳液和乳化硅油包水。如本领域的

技术人员所理解的那样,给定的成分主要分布于水或油/硅树脂相中,这取决于组合物中成分的可溶性/分散性。水包油乳液是特别优选的。

[0219] 根据本发明公开的乳液通常包含上文所述的溶液以及脂质或油。脂质和油可以衍生自动物、植物或石油,并且可以是天然的或合成的(即,人造的)。优选的乳液还包含湿润剂,例如甘油。乳液优选地进一步包含占所述的载体的重量的大约0.01%至大约10%、更优选地大约0.1%至大约5%的乳化剂。乳化剂可以是非离子的、阴离子的或阳离子的。合适的乳化剂在例如1973年8月28日颁布给Dickert等人的美国专利No.3,755,560;1983年12月20日颁布给Dixon等人的美国专利No.4,421,769;以及McCutcheon's Detergents and Emulsifiers, North American Edition, pages 317-324 (1986) 中公开。

[0220] 所述的乳液还可以包含消泡剂,从而在应用于角质组织时减少泡沫。消泡剂包括高分子量的硅树脂和用于此类用途的本领域公知的其他材料。

[0221] 合适的乳液可以具有广泛的粘度,这取决于所需的产品形式。优选的示例性的低粘度乳液的粘度为大约50厘沱或更低,更优选为大约10厘沱或更低,还更优选为大约5厘沱或更低。

[0222] 下文更详细地描述优选的硅树脂包水和水包油乳液。

[0223] A) 硅树脂包水乳液

[0224] 硅树脂包水乳液包含连续的硅树脂相和分散的水相。

[0225] (1) 连续的硅树脂相

[0226] 本发明公开的预选的硅树脂包水乳液包含占连续的硅树脂相的重量的大约1%至大约60%、优选为大约5%至大约40%、更优选为大约10%至大约20%。连续的硅树脂相存在于外部相中,其包含或包围下文中所述的不连续的水相。

[0227] 连续的硅树脂相包含聚有机硅氧烷油。配制优选的硅树脂包油乳液系统,从而提供用于类维生素A的氧化稳定的媒介物。这些优选的乳液的连续的硅树脂相包含占有聚硅氧烷油的重量的大约50%至大约99.9%,并且为非硅树脂油的重量的低于大约50%。在特别优选的实施方案中,连续的硅树脂相包含占连续的硅树脂相的重量的至少大约50%、优选为大约60%至大约99.9%、更优选为大约70%至大约99.9%、甚至更优选为大约80%至大约99.9%聚有机硅氧烷油,以及占连续的硅树脂相的至多大约50%非硅树脂油,优选为低于大约40%、更优选为低于大约30%、甚至更优选为低于大约10%、甚至更优选为低于大约2%。这些优选的乳液系统与包含较低浓度的聚有机硅氧烷油的相当的油包水乳液相比,在延长的时间内为类维生素A提供更高的氧化稳定性。在连续的硅树脂相中的非硅树脂油的浓度最低或被避免,这样进一步增强所述的组合物中的所选类维生素A的氧化稳定性。这种类型的硅树脂包水乳液在1997年6月19日公开的PCT申请WO 97/21423中有所描述。

[0228] 用于所述的组合物中的有机聚硅氧烷油可以是挥发的,非挥发的,或者挥发的和非挥发的硅树脂的混合物。如本文中所用,术语“非挥发的”是指在环境条件下为液态并且具有等于或者高于大约100°C的闪点(在一个大气压力下)的那些硅树脂。如本文中所用,术语“挥发的”是指所有其他的硅树脂油。合适的有机聚硅氧烷可以选自跨越广泛的挥发性和粘度的多种硅树脂。合适的有机聚硅氧烷油的实例包括聚烷基硅氧烷,环状聚烷基硅氧烷和聚烷基芳基聚硅氧烷。

[0229] 可以用于本发明的组合物中的聚烷基硅氧烷包括在25°C下粘度为大约0.5至大约

1,000,000厘沱的聚烷基硅氧烷。此类聚烷基硅氧烷可以通过化学通式 $R_3SiO[R_2SiO]_xSiR_3$ 表示,其中R为具有1至大约30个碳原子的烷基基团(优选的是R为甲基或乙基,更优选为甲基;此外,在相同的分子中可以使用混合的烷基基团),并且x为0至大约10,000的整数,对该x进行选择,从而取得可以跨越大约10,000,000的所需的分子量。市售可得的聚烷基硅氧烷包括聚二甲基硅氧烷,其还称为二甲基硅油,其实例包括General Electric Company出售的Vicasil®系列,和Dow Corning Corporation出售的Dow Corning® 200系列。合适的聚二甲基硅氧烷的具体实例包括粘度为0.65厘沱、沸点为100°C的Dow Corning® 200流体,粘度为10厘沱、沸点为高于200°C的Dow Corning® 225流体,以及粘度分别为50,350和12,500厘沱、沸点高于200°C的Dow Corning® 200流体。合适的二甲基硅油包括通过化学式 $(CH_3)_3SiO[(CH_3)_2SiO]_x[CH_3RSiO]_ySi(CH_3)_3$ 表示的那些,其中R为具有2至大约30个碳原子的直链或支链烷基,并且x和y均为1或更大的整数,对x和y进行选择,从而得到可以跨越大约10,000,000的所需的分子量。这些烷基取代的二甲基硅油的实例包括十六烷基二甲基硅油和十二烷基二甲基硅油。

[0230] 适用于所述的组合物的环状聚烷基硅氧烷包括通过化学式 $[SiR_2-O]_n$ 表示的那些,其中R为烷基基团(优选地R为甲基或乙基,更优选地为甲基),n为大约3至大约8的整数,更优选地n为大约3至大约7的整数,还更优选地n为大约4至大约6的整数。当R为甲基时,这些材料通常称为环甲硅油。市售可得的环甲硅油包括粘度为2.5厘沱、沸点为172°C的Dow Corning® 244流体,其主要包含环甲硅油四聚体(即,n=4);粘度为2.5厘沱、沸点为178°C的Dow Corning® 344流体,其主要包含环甲硅油五聚体(即,n=5);粘度为4.2厘沱、沸点为205°C的Dow Corning® 245流体,其主要包含环甲硅油四聚体和五聚体(即,n=4和5)的混合物;以及粘度为4.5厘沱、沸点为217°C的Dow Corning® 345流体,其主要包含环甲硅油四聚体、五聚体和六聚体(即,n=4、5和6)的混合物。

[0231] 还可以使用诸如三甲基硅烷氧基硅酸酯之类的材料,其为相当于通式 $[(CH_2)_3SiO1/2]_x[SiO_2]_y$ 的聚合材料,其中x为大约1至大约500的整数,y为大约1至大约500的整数。市售可得的三甲基硅烷氧基硅酸酯以与二甲基硅油的混合物的Dow Corning® 593流体出售。

[0232] 聚二甲基硅氧烷醇也适用于所述的组合物。这些化合物可以通过化学式 $R_3SiO[R_2SiO]_xSiR_2OH$ 和 $HOR_2SiO[R_2SiO]_xSiR_2OH$ 表示,其中R为烷基基团(优选地R为甲基或乙基,更优选地为甲基),并且x为0至大约500的整数,对R和x进行选择,从而取得所需的分子量。市售可得的聚二甲基硅氧烷醇通常是作为与二甲基硅油或环甲硅油的混合物出售的(例如Dow Corning® 1401,1402和1403流体)。

[0233] 聚烷基芳基硅氧烷还适用于所述的组合物中。在25°C下粘度为大约15至大约65厘沱的聚甲基苯基硅氧烷是特别有用的。

[0234] 选自以下的有机聚硅氧烷优选地用于本文发明:聚烷基硅氧烷,烷基取代的二甲基硅油,环甲硅油,三甲基硅烷氧基硅酸酯,聚二甲基硅氧烷醇,聚烷基芳基硅氧烷和它们的混合物。聚烷基硅氧烷和环甲硅油更优选地用于本发明。在聚烷基硅氧烷中,二甲基硅油是优选的。

[0235] 如上文所述,连续的硅树脂相可以包含一种或多种非硅树脂油。在连续的硅树脂

相中的非硅树脂油的浓度最低或被避免,这样进一步增强所述的组合物中的所选类维生素A的氧化稳定性。在大约一个大气压力下,合适的非硅树脂油的熔点为大约25℃。适用于连续的硅树脂相中的非硅树脂油的实例是化学领域中局部个人护理产品中油包水乳液形式的公知的那些,例如矿物油、植物油、合成的油、半合成的油等。

[0236] (2) 分散的水相

[0237] 本发明公开的局部组合物包含大约30%至大约90%、更优选地大约50%至大约85%、还更优选地大约70%至大约80%的分散的水相。在乳液技术中,术语“分散相”为本领域任一技术人员公知的术语,其是指所述的相以小颗粒或小微滴存在,这些小颗粒或小微滴悬浮于连续相中并被连续相包围。分散相还称为内部相或不连续相。分散的水相为小的水性颗粒或微滴悬浮于上文所述的连续的硅树脂相中的并且被所述的硅树脂相包围的分散物。

[0238] 水相可以是水,或者水与一种或多种水溶性或可分散的组分的组合。此类组分的非限定性实例包括增稠剂、酸、碱、盐、螯合剂、树胶、水溶性或可分散的醇和多元醇、缓冲剂、防腐剂、防晒试剂、着色剂等。

[0239] 本发明公开的局部组合物通常包含占所述的组合物的重量的处于分散相中的大约25%至大约90%、优选为大约40%至大约80%、更优选为大约60%至大约80%的水。

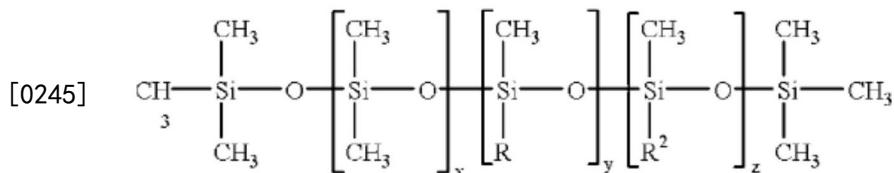
[0240] (3) 用于分散水相的乳化剂

[0241] 本发明公开的硅树脂包水的乳液优选地包含乳化剂。在优选的实施方案中,所述的组合物包含占所述的组合物的重量的大约0.1%至大约10%乳化剂、更优选地大约0.5%至大约7.5%、还更优选地大约1%至大约5%乳化剂。所述的乳化剂帮助水相分散并悬浮于连续的硅树脂相中。

[0242] 在本发明中可以使用多种乳化试剂,从而形成优选的硅树脂包水的乳液。在所述的组合物中可以使用已知的或传统的乳化试剂,前提条件是所选的乳化试剂是与本发明公开的组合物的成分是化学和物理相容的,并且提供所需的分散特征。合适的乳化剂包括本领域那些技术人员已知的用于局部个人护理产品的硅树脂乳化剂、包含非硅树脂的乳化剂和它们的混合物。优选的是,这些乳化剂的HLB值等于或低于大约14,更优选地为大约2至大约14,还更优选地为大约4至大约14。HLB值在上述范围外的乳化剂可以与其他乳化剂组合使用,从而使所述的组和取得落入所述这些范围内的有效的加权平均HLB。

[0243] 硅树脂乳化剂是优选的。多种硅树脂乳化剂可以用于本发明。这些硅树脂乳化剂通常为有机改性的有机聚硅氧烷,本领域那些技术人员还称其为硅树脂表面活性剂。有用的硅树脂乳化剂包括二甲基硅油共聚多元醇。这些材料为聚二甲基硅氧烷,其经改性从而包含聚醚侧链,例如聚氧化乙烯链、聚氧化丙烯链、这些链的混合物,以及包含由氧化乙烯和氧化丙烯衍生得到的部分的聚醚链。其他实例包括烷基改性的二甲基硅油共聚多元醇,即,包含C2-C30悬垂侧链的化合物。其他可以使用的二甲基硅油工具多元醇包括具有多种阳离子、阴离子、两性的和两性离子的悬垂部分。

[0244] 可以通过以下一般结构来描述可用于本发明的二甲基硅油共聚多元醇乳化剂:



[0246] 其中R为C<sub>1</sub>—C<sub>30</sub>直链的、支化的或环状的烷基,而R<sup>2</sup>选自:

[0247] -(CH<sub>2</sub>)<sub>n</sub>-O-(CH<sub>2</sub>CHR<sup>3</sup>O)<sub>m</sub>-H,

[0248] 和

[0249] -(CH<sub>2</sub>)<sub>n</sub>-O-(CH<sub>2</sub>CHR<sup>3</sup>O)<sub>m</sub>-(CH<sub>2</sub>CHRO)O-H,

[0250] 其中n为3至大约10的整数;R<sup>3</sup>和R<sup>4</sup>选自H和C<sub>1</sub>—C<sub>6</sub>直链的或支链的烷基,使得R<sup>3</sup>和R<sup>4</sup>不能同时是相同的;并且选择m、o、x和y,使得所述的分子具有大约200至大约10,000,000的整体分子量,而且m、o、x和y独立地选自0或更大的整数,使得m和o不能同时为0,并且z独立地选自1或更大的整数。公认的是可以得到这些共聚多元醇的位置异构体。上文中针对包含R<sup>3</sup>和R<sup>4</sup>基团的R<sup>2</sup>部分所描绘的化学表示无意于进行限定,而且为了方便这样示出。

[0251] 尽管在上述段落的结构中描绘的硅树脂表面活性剂未严谨地分类为二甲基硅油共聚多元醇,但是该硅树脂表面活性剂也可用于本发明中,其中R<sup>2</sup>为:

[0252] -(CH<sub>2</sub>)<sub>n</sub>-O-R<sup>5</sup>,

[0253] 其中R<sup>5</sup>为阳离子、阴离子、两性的或两性离子部分。

[0254] 可以用作本发明的乳化剂的二甲基硅油共聚多元醇和其他硅树脂表面活性剂的非限定性实例包括具有悬垂的聚氧化乙烯侧链的聚二甲基硅氧烷聚醚共聚物、具有悬垂的聚氧化丙烯侧链的聚二甲基硅氧烷聚醚共聚物、具有悬垂的混合的聚氧化乙烯和聚氧化丙烯侧链的聚二甲基硅氧烷聚醚共聚物、具有悬垂的有机甜菜碱侧链的聚二甲基硅氧烷聚醚共聚物、具有悬垂的羧酸酯侧链的聚二甲基硅氧烷聚醚共聚物、具有悬垂的季铵侧链的聚二甲基硅氧烷聚醚共聚物;以及进一步修饰的包含悬垂的C<sub>2</sub>—C<sub>30</sub>直链的、支化的或环状的烷基部分的上述共聚物。由Dow Corning Corporation出售的可以用于本发明的市售可得的二甲基硅油共聚多元醇的实例为Dow Corning® 190, 193, Q2-5220, 2501Wax, 2-5324流体, 和3225C(这种材料作为与环甲硅油的混合物出售)。十六烷基二甲基硅油共聚多元醇市售可得为与聚甘油基-4-异硬脂酸酯(和)己基月桂酸酯形成的混合物形式,并且以商品名ABIL® WE-09(得自Goldschmidt)出售的。十六烷基二甲基硅油共聚多元醇市售可得也是与己基月桂酸酯(和)聚甘油基-3油酸酯(和)十六烷基二甲基硅油形成的混合物形式,并且以商品名ABIL® WS-08(也得自Goldschmidt)出售的。二甲基硅油共聚多元醇的其他非限定性实例还包括二烷基二甲基硅油共聚多元醇,二甲基硅油共聚多元醇醋酸酯,二甲基硅油共聚多元醇己二酸,二甲基硅油共聚多元醇胺,二甲基硅油共聚多元醇山嵛酸酯,二甲基硅油共聚多元醇丁基醚,二甲基硅油共聚多元醇羟基硬脂酸酯,二甲基硅油共聚多元醇异硬脂酸酯,二甲基硅油共聚多元醇月桂酸酯,二甲基硅油共聚多元醇甲基醚,二甲基硅油共聚多元醇磷酸酯,和二甲基硅油共聚多元醇硬脂酸酯。参见International Cosmetic Ingredient Dictionary, Fifth Edition, 1993。

[0255] 可以用于本发明中的二甲基硅油共聚多元醇乳化剂在例如1990年10月2日颁布给Figueroa等人的美国专利No. 4,960,764中;在1989年8月30日公开的SanoGueira的欧洲专

利No.EP 330,369中;G.H.Dahms,et al., "New Formulation Possibilities Offered by Silicone Copolyols,"Cosmetics&Toiletries,vol.110,pp.91-100,March 1995; M.E.Carlotti et al., Optimization of W/O-S Emulsions And Study Of The Quantitative Relationships Between Ester Structure And Emulsion Properties," J.Dispersion Science And Technology,13 (3) ,315-336 (1992) ;P.Hameyer,"Comparative Technological Investigations of Organic and Organosilicone Emulsifiers in Cosmetic Water-in-Oil Emulsion Preparations,"HAPPI 28 (4) , pp.88-128 (1991) ;J.Smid-Korbar et al., "Efficiency and usability of silicone surfactants in emulsions,"Provisional Communication International Journal of Cosmetic Science,12,135-139 (1990) ;和D.G.Krzysik et al., "A New Silicone Emulsifier For Water-in-Oil Systems,"Drug and Cosmetic Industry,vol.146 (4) pp.28-81 (April 1990) 中有所描述。

[0256] 多种非离子的和阴离子的乳化试剂在用于本发明的不含硅树脂的乳化剂中,例如糖酯和聚酯、烷氧基化的糖酯和聚酯、C<sub>1</sub>-C<sub>30</sub>脂肪醇的C<sub>1</sub>-C<sub>30</sub>脂肪酸酯、C<sub>1</sub>-C<sub>30</sub>脂肪醇的C<sub>1</sub>-C<sub>30</sub>脂肪酸酯的烷氧基化的衍生物、C<sub>1</sub>-C<sub>30</sub>脂肪醇的的烷氧基化的酯、C<sub>1</sub>-C<sub>30</sub>脂肪酸的聚丙三酯、多元醇的C<sub>1</sub>-C<sub>30</sub>酯、多元醇的C<sub>1</sub>-C<sub>30</sub>醚、烷基磷酸酯、聚乙二醇脂肪醚磷酸酯、脂肪酸酰胺、酰基乳酸酯、肥皂和它们的混合物。其他合适的乳化剂在例如McCutcheon's, Detergents and Emulsifiers, North American Edition (1986) , Allured Publishing Corporation公开; 1991年4月30日颁布给Ciotti等人的美国专利No.5,011,681; 1983年12月20日颁布给Dixon等人的美国专利No.4,421,769; 和1973年8月28日颁布给Dickert等人的美国专利No.3,755,560中有所描述。

[0257] 这些不含硅树脂的乳化剂的非限定性实例包括:聚乙二醇20山梨聚糖单月桂酸酯(聚山梨醇酯20),聚乙二醇5大豆固醇,硬脂醇聚醚-20,鲸蜡硬脂醇聚醚-20,PPG-2甲基葡萄糖醚二硬脂酸酯,鲸蜡醇聚醚-10,聚山梨醇酯80,十六烷基磷酸酯,十六烷基磷酸钾,二乙醇氨十六烷基磷酸酯,聚山梨醇酯60,甘油基硬脂酸酯,PEG-100硬脂酸酯,聚氧乙烯20山梨聚糖三油酸酯(聚山梨醇酯85),山梨聚糖单月桂酸酯,聚氧乙烯4十二烷基醚硬脂酸钠,聚甘油基-4异硬脂酸酯,己基月桂酸酯,硬脂醇聚醚-20,鲸蜡硬脂醇聚醚-20,PPG-2甲基葡萄糖醚二硬脂酸酯,鲸蜡醇聚醚-10,二乙醇氨十六烷基磷酸酯,甘油基硬脂酸酯,PEG-100硬脂酸酯和它们的混合物。

[0258] B) 水包油乳液

[0259] 其他优选的局部载体包括水包油乳液,其具有连续的水相和分散于其中的疏水性水不溶性相(“油相”)。合适的水包油乳液载体的实例在1991年12月17日本部给Turner, D.J.等人的美国专利中;和1991年12月17日颁布给Turner, D.J.等人的美国专利No.5,073,372中有所描述。下文详细描述包含结构试剂、亲水性表面活性剂和水的特别优选的水包油乳液。

[0260] (1) 结构试剂

[0261] 优选的水包油乳液包含有助于液晶凝胶网格结构形成的结构试剂。不被理论所限定,据信结构试剂有助于为所述的组合物提供流变性特征,这有助于所述的组合物的稳定性。结构试剂还可以起到乳化剂或表面活性剂的作用。优选的组合物包含占所述的组合物

的重量的大约0.5%至大约20%、更优选地大约1%至大约10%、甚至更优选地大约1%至大约5%的结构试剂。

[0262] 本发明公开的优选的结构试剂包括硬脂酸,棕榈酸,硬脂醇,十六醇,山醇,硬脂酸,棕榈酸,硬脂醇(具有平均大约1至大约21个氧化乙烯单元)的聚乙二醇醚,十六醇(具有平均大约1至大约5氧化乙烯单元)的聚乙二醇醚,和它们的混合物。本发明公开的更优选的结构试剂选自硬脂醇,十六醇,山醇,硬脂醇(具有平均大约2个氧化乙烯单元(硬脂醇聚醚-2))的聚乙二醇醚,硬脂醇(具有平均大约21个氧化乙烯单元(硬脂醇聚醚-21))的聚乙二醇醚,十六醇(具有平均大约2个氧化乙烯单元)的聚乙二醇醚和它们的混合物。甚至更优选的结构试剂选自硬脂酸,棕榈酸,硬脂醇,十六醇,山醇,硬脂醇聚醚-2,硬脂醇聚醚-21和它们的混合物。

[0263] (2) 亲水性表面活性剂

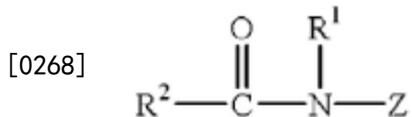
[0264] 优选的水包油乳液包含大约0.05%至大约10%、优选地为大约1%至大约6%、更优选地为大约1%至大约3%的至少一种亲水性表面活性剂,其可以将疏水性材料分散于水相(占局部载体的重量的百分率)中。所述的表面活性剂至少是必须足以分散于水中的亲水性的。

[0265] 优选的亲水性表面活性剂选自非离子表面活性剂。可以广泛地定义为长链醇(例如C<sub>8-30</sub>醇)与糖或淀粉聚合物(即,糖昔)形成的缩合产物的那些在可以用于本发明的非离子表面活性剂中。这些化合物可以通过式(S)<sub>n</sub>-O-R表示,其中S为糖部分,例如葡萄糖,果糖,甘露糖和半乳糖;n为大约1至大约1000的整数;而R为C<sub>8-30</sub>烷基基团。可以衍生出烷基基团的长链醇的实例包括癸基醇,十六醇,硬脂醇,十二烷基醇,十四烷基醇,油烯基醇等。这些表面活性剂的优选的实例包括其中S为葡萄糖部分,R为C<sub>8-20</sub>烷基基团,而n为大约1至大约9的整数的那些。这些表面活性剂的市售可得的实例包括癸基聚糖昔(可得自Henkel的APG 325 CS)和十二烷基聚糖昔(可得自Henkel的APG 600 CS)。

[0266] 其他可以使用的非离子表面活性剂包括氧化乙烯与脂肪酸(即,脂肪酸的氧化乙烯酯)的缩合产物。这些材料具有通式RCO(X)<sub>n</sub>OH,其中R为C<sub>10-30</sub>烷基基团,X为-OCH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>- (即,衍生自乙二醇或氧化物)或-OCH<sub>2</sub>CHCH<sub>3</sub>- (即,衍生自丙二醇或氧化物),并且n为大约6至大约200的整数。这些材料具有通式RCO(X)<sub>n</sub>OOCR,其中R为C<sub>10-30</sub>烷基基团,X为-OCH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>- (即,衍生自乙二醇或氧化物)或-OCH<sub>2</sub>CHCH<sub>3</sub>- (即,衍生自丙二醇或氧化物),并且n为大约6至大约100的整数。其他非离子表面活性剂为氧化乙烯与脂肪醇(即,脂肪醇的氧化乙烯醚)的缩合产物。这些材料具有通式R(X)<sub>n</sub>OR',其中R为C<sub>10-30</sub>烷基基团,X为-OCH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>- (即,衍生自乙二醇或氧化物)或-OCH<sub>2</sub>CHCH<sub>3</sub>- (即,衍生自丙二醇或氧化物),并且n为大约6至大约100的整数,而且R'为H,或C<sub>10-30</sub>烷基基团。其他非离子表面活性剂为氧化乙烯与脂肪酸和脂肪醇的缩合产物[即,其中聚氧化烯烃部分的一个末端被脂肪酸化,而另一个末端被脂肪醇醚化(即,通过醚键连接)。这些材料具有通式RCO(X)<sub>n</sub>OR',其中R和R'为C<sub>10-30</sub>烷基基团,X为-OCH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>- (即,衍生自乙二醇或氧化物)或-OCH<sub>2</sub>CHCH<sub>3</sub>- (即,衍生自丙二醇或氧化物),并且n为大约6至大约100的整数。这些氧化烯烃的非离子表面活性剂的非限定性实例包括鲸蜡醇聚醚-6,鲸蜡醇聚醚-10,鲸蜡醇聚醚-12,鲸蜡硬脂醇聚醚-6,鲸蜡硬脂醇聚醚-10,鲸蜡硬脂醇聚醚-12,硬脂醇聚醚-6,硬脂醇聚醚-10,硬脂醇聚醚-12,硬脂醇聚醚-21,PEG-6硬脂酸酯,PEG-10硬脂酸酯,PEG-100硬脂酸酯,PEG-12硬脂酸酯,PEG-20甘油基硬脂酸酯,PEG-80甘油基牛脂,

PEG-10甘油基硬脂酸酯,PEG-30甘油基椰油酸酯,PEG-80甘油基椰油酸酯,PEG-200甘油基牛脂,PEG-8二月桂酸酯,PEG-10二硬脂酸酯和它们的混合物。

[0267] 其他可以使用的非离子表面活性剂包括相当于以下结构式的多羟基脂肪酸酰胺表面活性剂:



[0269] 其中:R<sup>1</sup>为H,d-C<sub>4</sub>烷基,2-羟基乙基,2-羟基-丙基,优选为d-C<sub>4</sub>烷基,更优选为甲基或乙基,最优选为甲基;R<sup>2</sup>为C<sub>5</sub>-C<sub>31</sub>烷基或烯基,优选为C<sub>7</sub>-C<sub>19</sub>烷基或烯基,更优选为C<sub>9</sub>-C<sub>17</sub>烷基或烯基,最优选为C<sub>11</sub>-C<sub>15</sub>烷基或烯基;并且Z为多羟基烃基部分(其具有线性烃基链,并且至少3个羟基与所述的链直接连接)或其烷氧基化的衍生物(优选为乙氧基化的或丙氧基化的)。Z优选为选自葡萄糖,果糖,麦芽糖,乳糖,半乳糖,甘露糖,木糖和它们的混合物的糖部分。相当于上述结构的特别优选的表面活性剂为椰子烷基N-甲基糖苷酰胺(即,其中R<sup>2</sup>CO-部分衍生自椰子油脂肪酸)。用于制备包含多羟基脂肪酸酰胺的组合物的工艺在例如1959年2月18日公开的Thomas Hedley&Co.,Ltd.的G.B.专利说明书809,060中;1960年12月20日颁布给E.R.Wilson的美国专利No.2,965,576;1955年3月8日颁布给A.M.Schwartz的美国专利No.2,703,798;以及1934年12月25日颁布给Piggott的美国专利No.1,985,424中有所公开,其中所述的文献以引用方式全文并入本文。

[0270] 在非离子表面活性剂中,选自硬脂醇聚醚-21,鲸蜡硬脂醇聚醚-20,鲸蜡硬脂醇聚醚-12,蔗糖椰油酸酯,硬脂醇聚醚-100,PEG-100硬脂酸酯和它们的混合物中的那些是优选的。

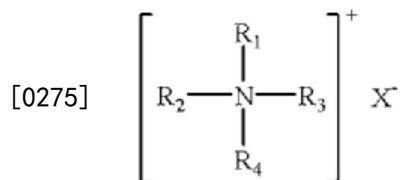
[0271] 适用于本发明的用途中的其他非离子表面活性剂包括糖酯和聚酯,烷氧基化的糖酯和聚酯,d-C<sub>30</sub>脂肪醇的d-C<sub>30</sub>脂肪酸酯,C<sub>1</sub>-C<sub>30</sub>脂肪醇的C<sub>1</sub>-C<sub>30</sub>脂肪酸酯的烷氧基化的衍生物,C<sub>1</sub>-C<sub>30</sub>脂肪醇的烷氧基化的醚,d-C<sub>30</sub>脂肪酸的聚丙三酯,多元醇的C<sub>1</sub>-C<sub>30</sub>酯,多元醇的C<sub>1</sub>-C<sub>30</sub>酯,烷基磷酸酯,聚氧化烯脂肪醚磷酸酯,脂肪酸酰胺,酰基乳酸酯和它们的混合物。这些乳化剂的非限定性实例包括:聚乙二醇20山梨聚糖单月桂酸酯(聚山梨醇酯20),聚乙二醇5大豆固醇,硬脂醇聚醚-20,鲸蜡硬脂醇聚醚-20,PPG-2甲基葡萄糖醚二硬脂酸酯,鲸蜡醇聚醚-10,聚山梨醇酯80,十六烷基磷酸酯,十六烷基磷酸钾,二乙醇胺十六烷基磷酸酯,聚山梨醇酯60,甘油基硬脂酸酯,聚氧乙烯20山梨聚糖三油酸酯(聚山梨醇酯85),山梨聚糖单月桂酸酯,聚氧乙烯4十二烷基醚硬脂酸钠,多甘油基-4异硬脂酸酯,己基月桂酸酯,PPG-2甲基葡萄糖醚5二硬脂酸酯,PEG-100硬脂酸酯和它们的混合物。

[0272] 可以用于本发明的另一组非离子表面活性剂是基于山梨聚糖或山梨醇脂肪酸酯和蔗糖脂肪酸的混合物的脂肪酸酯共混物,在各种情况下,脂肪酸优选为C<sub>8</sub>-C<sub>24</sub>,更优选为C<sub>10</sub>-C<sub>20</sub>。优选的脂肪酸酯乳化剂为山梨聚糖或山梨醇C<sub>16</sub>-C<sub>20</sub>脂肪酸酯与蔗糖C<sub>10</sub>-C<sub>16</sub>脂肪酸酯的共混物,特别是山梨聚糖硬脂酸酯和蔗糖椰油酸酯。这可以购自ICI,商品名为Arlatone 2121。

[0273] 可以用于本发明的其他合适的表面活性剂包括对照阳离子、阴离子、两性离子和两性的表面活性剂,例如本领域已知的和下文更全面地讨论的那些。例如参见McCutcheon's, Detergents and Emulsifiers, North American 15 Edition (1986), published by

Allured Publishing Corporation; 1991年4月30日颁布给Ciotti等人的美国专利No.5,011,681; 1983年12月20日颁布给Dixon等人的美国专利No.4,421,769; 以及1973年12月20日颁布给Dickert等人的美国专利No.3,755,560; 这4份参考文献以引用方式全文并入本文。可以用于本发明中的亲水性表面活性剂可以包括单一的表面活性剂,或者合适的表面活性剂的任意的组合。所选的确切的20种表面活性剂(或多种表面活性剂)取决于所述的组合和其他存在的成分的pH。

[0274] 阳离子表面活性剂也可以用于本发明中,特别是二烷基季铵化合物,其实例在美国专利No.5,151,209;美国专利No.5,151,210;美国专利No.5,120,532;美国专利No.4,387,090;美国专利No.253,155,591;美国专利No.3,929,678;美国专利No.3,959,461; McCutcheon's Deterrents&Emulsifiers, (North American edition 1979) M.C.PUBLISHING CO.; 和Schwartz, et al., Surface Active Agents, Their Chemistry and Technology, New York: Interscience Publishers, 1949中有所描述,这些描述以引用方式并入本文。可以用于本发明的阳离子表面活性剂包括阳离子铵盐,例如具有下式的那些:



[0276] 其中R<sub>1</sub>为具有大约12至大约30个碳原子的烷基基团,或者具有大约12至大约30个碳原子的芳香基、芳基或烷芳基基团;R<sub>2</sub>,R<sub>3</sub>和R<sub>4</sub>独立地选自氢,具有大约1至大约22个碳原子的烷基,或者具有大约12至大约22个碳原子的芳香基、芳基或烷芳基基团;并且X为任何相容的阴离子,优选选自氯离子,溴离子,碘离子,醋酸根,磷酸根,硝酸根,硫酸根,甲基硫酸根,乙基硫酸根,甲苯磺酸根,乳酸根,柠檬酸根,乙醇酸根和它们的混合物。此外,R<sub>1</sub>,R<sub>2</sub>,R<sub>3</sub>和R<sub>4</sub>的烷基基团还可以包含酯键和/或醚键,或者羟基或氨基基团取代基(例如烷基基团可以包含聚乙二醇和聚丙二醇部分)。

[0277] 更优选地,R<sub>1</sub>为具有大约12至大约22个碳原子的烷基基团;R<sub>2</sub>选自H,或具有大约1至大约22个碳原子的烷基基团;R<sub>3</sub>和R<sub>4</sub>独立地选自H,或具有大约1至大约3个碳原子的烷基基团;并且X如上文所述。

[0278] 还更优选地,R<sub>1</sub>为具有大约12至大约22个碳原子的烷基基团;R<sub>2</sub>,R<sub>3</sub>和R<sub>4</sub>选自H,或具有大约1至大约3个碳原子的烷基基团;并且X如上文所述。

[0279] 备选地,其他可以使用的阳离子乳化剂包括氨基-酰胺,其中在上文所述的结构中,R<sub>1</sub>为备选的R<sub>5</sub>CONH-(CH<sub>2</sub>)<sub>n</sub>,其中R<sub>5</sub>为具有大约12至大约22个碳原子的烷基基团,并且n为大约2至大约6的整数,更优选地为大约2至大约4,还更优选地为大约2至大约3。这些阳离子乳化剂的非限定性实例包括硬脂酰胺丙基PG-二甲基氯化铵磷酸酯,山嵛酰胺丙基PG二甲基氯化铵,硬脂酰胺丙基乙基二甲基硫酸乙酯铵,硬脂酰胺丙基二甲基(十四烷基醋酸酯)氯化铵,硬脂酰胺丙基二甲基鲸蜡硬脂基对甲苯磺酸铵,硬脂酰胺丙基二甲基氯化铵,硬脂酰胺丙基二甲基乳酸铵和它们的混合物。山嵛酰胺丙基PG二甲基氯化铵是特别优选的。

[0280] 季铵盐阳离子表面活性剂的非限定性实例包括选自以下的那些:十六烷基氯化铵,十六烷基溴化铵,十二烷基氯化铵,十二烷基溴化铵,硬脂酰基氯化铵,硬脂酰基溴化

铵,十六烷基二甲基氯化铵,十六烷基二甲基溴化铵,十二烷基二甲基氯化铵,十二烷基二甲基溴化铵,硬脂酰基二甲基氯化铵,硬脂酰基二甲基溴化铵,十六烷基三甲基氯化铵,十六烷基三甲基溴化铵,十二烷基三甲基氯化铵,十二烷基三甲基溴化铵,硬脂酰基三甲基氯化铵,硬脂三甲基溴化铵,十二烷基二甲基氯化铵,硬脂二甲基十六烷基二牛脂基二甲基氯化铵,双十六烷基氯化铵,双十六烷基溴化铵,双十二烷基氯化铵,双十二烷基溴化铵,二硬脂酰基氯化铵,二硬脂酰基溴化铵,双十六烷基甲基氯化铵,双十六烷基甲基溴化铵,双十二烷基甲基氯化铵,双十二烷基甲基溴化铵,二硬脂酰基甲基氯化铵,二硬脂酰基甲基溴化铵和它们的混合物。其他季铵盐包括其中C<sub>12</sub>至C<sub>30</sub>烷基碳链衍生自牛脂基脂肪酸或者椰子脂肪酸的那些。术语“牛脂基”是指衍生自牛脂基脂肪酸(通常为氢化牛脂基脂肪酸)的烷基基团,其通常具有C<sub>16</sub>至C<sub>18</sub>范围内的烷基链的混合物。术语“椰子”是指衍生自椰子脂肪酸的烷基基团,其通常具有C<sub>12</sub>至C<sub>14</sub>范围内的烷基链的混合物。衍生自这些牛脂和椰子来源的季铵盐的实例包括二牛脂基二甲基氯化铵,二牛脂基二甲基甲基硫酸铵,二(氢化牛脂)二甲基氯化铵,二(氢化牛脂)二甲基醋酸铵,二牛脂基二丙基磷酸铵,二牛脂基二甲基硝酸铵,二(椰子烷基)二甲基氯化铵,二(椰子烷基)二甲基溴化铵,牛脂氯化铵,椰子氯化铵,硬脂酰胺丙基PG-二甲基氯化铵磷酸酯,硬脂酰胺丙基乙基二甲基硫酸乙酯铵,硬脂酰胺丙基二甲基(十四烷基醋酸酯)氯化铵,硬脂酰胺丙基二甲基鲸蜡硬脂基对甲苯磺酸铵,硬脂酰胺丙基二甲基氯化铵,硬脂酰胺丙基二甲基乳酸铵和它们的混合物。具有烷基基团的季铵化合物(具有酯键)的实例为二牛脂基氧基乙基二甲基氯化铵。

[0281] 更优选的阳离子表面活性剂为选自以下的那些:山嵛酰胺丙基PG二甲基氯化铵,双十二烷基二甲基氯化铵,二硬脂酰基二甲基氯化铵,双十四烷基二甲基氯化铵,双十六烷基二甲基氯化铵,二硬脂酰基二甲基氯化铵,硬脂酰胺丙基PG-二甲基氯化铵磷酸酯,硬脂酰胺丙基乙基二甲基硫酸乙酯铵,硬脂酰胺丙基二甲基(十四烷基醋酸酯)氯化铵,硬脂酰胺丙基二甲基鲸蜡硬脂基对甲苯磺酸铵,硬脂酰胺丙基二甲基氯化铵,硬脂酰胺丙基二甲基乳酸铵和它们的混合物。

[0282] 选自以下的那些也是更优选的阳离子表面活性剂:山嵛酰胺丙基PG二甲基氯化铵,双十二烷基二甲基氯化铵,二硬脂酰基二甲基氯化铵,双十四烷基二甲基氯化铵,双十六烷基二甲基氯化铵和它们的混合物。

[0283] 阳离子表面活性剂和结构试剂的优选的组合为山嵛酰胺丙基PG二甲基氯化铵和/或山醇,其中所述的比例优选地被优化,从而保持并增强物理和化学稳定性,特别是在此类组合包含离子和/或高度极性溶剂时更是如此。该组合物特别用于诸如氧化锌和辛基甲氧基肉桂酸之类的防晒试剂的传递。

[0284] 多种阴离子表面活性剂也可以用于本发明中。例如参见1975年12月30日颁布给Laughlin等人的美国专利No.3,929,678,该文献以引用方式全文并入本文。阴离子表面活性剂的非限定性实例包括烷酰基羟乙基磺酸盐,以及烷基和烷基醚硫酸盐。烷酰基羟乙基磺酸盐通常具有下式:RCO-OCH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>SO<sub>3</sub>M,其中R为大约10至大约30个碳原子的烷基或烯基,并且M为水溶性阳离子,例如铵、钠、钾和三乙醇胺。这些羟乙基磺酸盐的非限定性实例包括选自以下的烷酰基羟乙基磺酸盐:椰油基羟乙基磺酸铵,椰油基羟乙基磺酸钠,月桂酰羟乙基磺酸钠,硬脂酰羟乙基磺酸钠和它们的混合物。

[0285] 烷基和烷基醚硫酸盐通常分别具有以下格式:ROSO<sub>3</sub>M和R<sub>0</sub>(C<sub>2</sub>H<sub>4</sub>O)<sub>x</sub>SO<sub>3</sub>M,其中R为大

约10至大约30个碳原子的烷基或烯基,x为大约1至大约10,并且M为水溶性阳离子,例如铵、钠、钾和三乙醇胺。另一个类合适的阴离子表面活性剂为以下通式的有机硫酸反应产物的水溶性盐:

[0286]  $R-SO_3-M$

[0287] 其中R<sub>1</sub>选自具有大约8至大约24个、优选为大约10至大约16个碳原子的直链或支链的饱和的脂肪族碳氢化合物自由基;并且M为阳离子。其他的阴离子合成表面活性剂包括命名为琥珀酰胺酸盐、具有大约12至大约24个碳原子的烯属磺酸盐和β-烷氧基烷基磺酸盐。这些材料的实例为十二烷基硫酸钠和十二烷基硫酸铵。

[0288] 可用于本发明的其他阴离子材料为脂肪酸的皂类(即,碱金属盐,例如钠盐或钾盐),其通常具有大约8至大约24个碳原子、优选为大约10至大约20个碳原子。用于制备所述的皂类的脂肪酸可以得自天然来源,例如植物或动物衍生的甘油酯(例如棕榈油、椰子油、大豆油、蓖麻油、牛脂、猪油等)。所述的脂肪酸还可以合成制备。皂类在美国专利No.4,557,853中更详细地描述。

[0289] 两性的和两性离子的表面活性剂也可以用于本发明中。可以用于本发明公开的组合物中的两性的和两性离子表面活性剂的实例为被广泛描述为脂肪族仲胺和叔胺,其中所述的脂肪族自由基可以是直链或支链的,并且其中一个脂肪族取代基包含大约8至大约22个碳原子(优选为C<sub>8</sub>-C<sub>18</sub>),并且一个脂肪族取代基包含阴离子水溶性基团,例如羧基、磺酸基、硫酸基、磷酸基或膦酸基。其实例为烷基亚氨基醋酸酯,以及式为RN[CH<sub>2</sub>]<sub>m</sub>CO<sub>2</sub>M]<sub>2</sub>和RNH(CH<sub>2</sub>)<sub>m</sub>CO<sub>2</sub>M的亚氨基二链烷酸酯和氨基链烷酸酯,其中m为1至4,R为C<sub>8</sub>-C<sub>22</sub>烷基或烯基,并且M为H、碱金属、碱土金属铵或烷基铵。还包括咪唑啉和铵衍生物。合适的两性的表面活性剂的具体实例包括3-十二烷基-氨基丙酸钠,3-十二烷基氨基丙烷磺酸钠,N-烷基牛磺酸,例如根据美国专利No.2,658,072的教导,通过十二烷基胺与羟乙基磺酸钠反应而制备的那些,其中所述的文献以引用方式全文并入本文;N-高级烷基天冬氨酸,例如根据美国专利No.2,438,091的教导而生产的那些,其中所述的文献以引用方式全文并入本文;以及在商品名"Miranol"下出售的并且在美国专利No.2,528,378中欧描述的产品,其中所述的文献以引用方式全文并入本文。可以使用的两性物质的其他实例包括磷酸盐,例如椰油酰胺基丙基PG-二甲基氯化铵磷酸酯(购自Mona Corp.的Monaquat PTC)。

[0290] 可以用于本发明中的其他两性的或两性离子的表面活性剂包括甜菜碱。甜菜碱的实例包括高级烷基甜菜碱,例如椰子二甲基羧基甲基甜菜碱,十二烷基二甲基羧基甲基甜菜碱,十二烷基二甲基α羧基乙基甜菜碱,十六烷基二甲基羧基甲基甜菜碱,十六烷基二甲基甜菜碱(得自Lonza Corp.的Lonzaine 16SP),十二烷基二-(2-羟基乙基)羧基甲基甜菜碱,硬脂酰基二-(2-羟基丙基)羧基甲基甜菜碱,油烯基二甲基γ-羧基丙基甜菜碱,十二烷基二-(2-羟基丙基)α-羧基乙基甜菜碱,椰子二甲基磺丙基甜菜碱,硬脂酰基二甲基磺丙基甜菜碱,十二烷基二甲基磺乙基甜菜碱,十二烷基二-(2-羟基乙基)磺丙基甜菜碱,氨基甜菜碱和氨基磺甜菜碱(其中RCONH(CH<sub>2</sub>)<sub>3</sub>自由基附着在甜菜碱的氮原子上),油烯基甜菜碱(得自Henkel的两性Velvetex OLB-50),和椰子氨基丙基甜菜碱(得自Henkel的Velvetex BK-35和BA-35)。

[0291] 其他可以使用的两性的和两性离子的表面活性剂包括磺基甜菜碱和羟基磺基甜菜碱,例如椰子氨基丙基羟基磺基甜菜碱(可得自Rhone-Poulenc的Mirataine CBS),和相

当于式 $RCON(CH_3)CH_2CH_2CO_2M$ 的烷酰基肌氨酸盐,其中R为大约10至大约20个碳原子的烷基或烯基,而M为水溶性阳离子,例如铵、钠、钾和三链烷醇胺(例如三乙醇胺),其优选的实例为月桂酰肌氨酸钠。

[0292] (3) 水

[0293] 优选的水包油乳液占所述的局部载体的重量的大约25%至大约98%、优选为大约65%至大约95%、更优选为大约70%至大约90%的水。

[0294] 疏水相分散在连续的水相中。疏水相可以包含水不溶性的或部分溶解的材料,例如本领域已知的那些,包括但不限于本发明中针对水包硅树脂乳液中所述的硅树脂,以及其他油和脂质,例如上文中针对乳液所述的那些。

[0295] 根据本发明公开的局部组合物(包括但不限于洗剂和乳膏)可以包含皮肤病学可接受的润肤剂。此类组合物优选地包含大约1%至大约50%的润肤剂。如本文所用,“润肤剂”是指用于防止或减轻干燥、以及用于保护皮肤的材料。多种合适的润肤剂是已知的,并且可以用于本发明中。Sagarin, Cosmetics Science and Technology, 2nd Edition, Vol. 1, pp. 32-43 (1972) (其以引用方式并入本文) 包含适于作为润肤剂的材料的多种实例。优选的润肤剂为甘油。优选地使用为或大约0.001%至或大约30%、更优选为或大约0.01%至或大约20%、还更优选为或大约0.1%至或大约10% (例如5%) 的甘油。

[0296] 根据本发明公开的洗剂和乳膏通常包含溶液载体系统,以及一种或多种润肤剂。洗剂和乳膏通常包含大约1%至大约50%、优选为大约1%至大约20%的润肤剂;大约50%至大约90%、优选为大约60%至大约80%的水;以及五肽和/或五肽衍生物、及上述量的其他的皮肤护理活性物质(或多种活性物质)。由于乳膏具有较高水平的润肤剂或较高水平的增稠剂,所以其通常比洗剂更稠。

[0297] 本发明公开的软膏可以包含动物或植物油或半固体碳氢化合物(油质的)的简单的载体基材;吸收水从而形成乳液的吸收软膏基材;或者水溶性基材,例如水溶性溶液载体。软膏可以进一步包含增稠试剂(例如在Sagarin, Cosmetics, Science and Technology, 2nd Edition, Vol. 1, pp. 72-73 (1972) 中所述的那些,该文献以引用方式并入本文),和/或润肤剂。例如软膏可以包含大约2%至大约10%的润肤剂;大约0.1%至大约2%的增稠试剂;以及上述量的五肽和/或五肽衍生物、及其他皮肤护理活性物质(或多种活性物质)。

[0298] 使用合适的载体配制用于清洁(“清洁剂”)的根据本发明公开的组合物,例如上文所述的那些,并且除了上述量的五肽和/或五肽衍生物、及其他皮肤护理活性物质(或多种活性物质)以外,还优选地包含大约1%至大约90%、更优选地大约5%至大约10%的皮肤病学可接受的表面活性剂。所述的表面活性剂适当地选自阴离子、非离子、两性离子、两性的和两性性质(ampholytic)表面活性剂,以及这些表面活性剂的混合物。这些表面活性剂是去污领域中那些技术人员公知的。可行的表面活性剂的非限定性实例包括异鲸蜡醇聚醚-20,甲基椰油基牛磺酸钠,甲基油酰基牛磺酸钠和十二烷基硫酸钠。对于用于本发明的示例性表面活性剂,参见1989年1月24日颁布给Kowcz等人的美国专利No. 4,800,197,该文献以引用方式全文并入本文。可以用于本发明的广泛种类的其他表面活性剂的实例在 McCutcheon's Detergents and Emulsifiers, North American Edition (1986) (由 Allured Publishing Corporation出版) 中有所描述。清洁组合物可以可任选地包含在其领域建立的水平的、传统地用于清洁组合物中的其他材料。

[0299] 清洁组合物的物理形式是不重要的。该组合物可以配制为例如toilet bars, 液体, 洗发剂, 沐浴乳, 头发调理剂, 生发灵, 糊剂或摩丝 (mouss)。冲洗清洁组合物(例如洗发剂)需要足以将充足水平的活性物质沉积在皮肤和头皮上的传递系统。优选的传递系统涉及不溶性复合物的使用。此类传递系统的更完全的公开参见1989年5月30日颁布给Barford等人的美国专利No.4,835,148。

[0300] 如本文所用, 术语“粉底”是指液体、半液体、半固体或固体皮肤化妆品, 其包含但不限于洗剂、乳膏、凝胶、糊剂、块状物等。通常在大面积的皮肤上使用所述的粉底, 例如在脸上, 从而提供特别的外观。粉底通常用于提供用于彩妆的附着基材, 例如胭脂、胭脂霜、粉等, 并且往往掩藏皮肤瑕疵, 并赋予皮肤以光滑、平坦的外观。本发明公开的粉底包括皮肤病学可接受的载体, 并且可以包含传统的组分, 例如油、着色剂、颜料、润肤剂、香料、蜡、稳定剂等。适用于本发明的示例性载体和此类其他的组分在例如1996年10月31日公开的Canter等人的PCT申请WO 96/33689, 以及1994年8月3日颁布的U.K. 专利GB 2274585中有描述。

### [0301] 组合物的制备

[0302] 用于本发明公开的方法的组合物通常通过传统的方法制备, 例如制备局部组合物领域中已知的那些。此类方法通常涉及在一个或多个步骤中在加热、冷却、施加真空等或未在上述条件下将多种组分混合成相对均匀的状态。

### [0303] 用于调节皮肤状况的方法

[0304] 本发明公开的组合物可以用于调节哺乳动物皮肤状况。角质组织状况的这种调节可以包括预防性的和治疗性的调节。例如此类调节方法定位于增厚角质组织(即, 构建皮肤的表皮和/或真皮层, 并且如果使用, 还构建指甲和毛干的角质层)并预防和/或延迟哺乳动物皮肤的衰退, 预防和/或延迟哺乳动物皮肤上的蛛状血管和/或红色的红斑的外观, 预防和/或延迟在哺乳动物眼睛下方的黑眼圈的外观, 预防和/或延迟不服用动物皮肤的灰黄, 预防和/或延迟哺乳动物皮肤的松垂, 使哺乳动物的嘴唇、头发和指甲软化和/或光滑, 预防和/或减轻哺乳动物皮肤的疥疮, 调节皮肤纹理(例如皱纹和细纹), 并改善皮肤颜色(例如发红、雀斑)。

[0305] 调节角质组织的状况涉及向角质组织局部施加安全有效量的本发明公开的组合物。可以施加的组合物的量、施加的频率和使用时期将根据五肽和/或五肽衍生物、及给定组合物中其他的皮肤护理活性物质或多种活性物质的水平, 以及所需的调节水平(例如根据已经存在的或者预计会发生的角质组织损坏的水平)而广泛地改变。

[0306] 在优选的实施方案中, 所述的组合物被长期施加于皮肤上。“长期局部施加”是指在受试对象的生命过程中的延长的时间内, 优选地在至少大约1周的时间内, 更优选地在至少大约1个月内, 甚至更优选地在至少大约3个月内, 甚至更优选地在至少大约6个月内, 以及更优选地在至少大约1年内持续地局部施加所述的组合物。尽管在各种最长时间的使用(例如5年、10年或20年)后可以获得益处, 但是优选的是长期施加持续整个受试对象的生命过程。通常, 在所述的延长的时间内, 在大约每天一次的规则进行施加, 但是施加频率可以在每周大约1次至每天大约3次或更多之间改变。

[0307] 可以使用广泛量的本发明公开的组合物, 从而提供皮肤外观和/或感觉益处。通常每次施加所施加的本发明公开的组合物的量为inmg组合物/cm<sup>2</sup>皮肤, 为大约0.1mg/cm<sup>2</sup>至大

约10mg/cm<sup>2</sup>。特别有用的施加量为大约1mg/cm<sup>2</sup>至大约2mg/cm<sup>2</sup>。

[0308] 调节角质组织状况优选的是通过施加皮肤洗剂、乳膏、凝胶、泡沫、软膏、糊剂、乳液、喷雾、调理剂、滋补品、化妆品、唇膏、粉底、指甲油、润肤液等形式的组合物(优选的是预将它们留在皮肤或其他角质结构上,以达到一些美学、预防、治疗或其他益处(即,“免洗型”组合物))而实施的。在将所述的组合物施加在皮肤上后,优选的是在皮肤上停留至少大约15分钟、更优选地至少大约30分钟、甚至更优选地至少大约1个小时、还更优选地至少几个小时(例如至多大约12个小时)的时间。可以处理脸、头发和/或指甲的外部的任何部分,例如脸、嘴唇、眼睛下方区域、眼睑、头皮、颈部、躯干、胳膊、手、腿、脚、手指甲、脚趾甲、头皮、睫毛、眉毛等。可以使用手指或者使用工具或仪器(例如垫、棉球、涂抹笔、喷雾器等)施加所述的组合物。

[0309] 确保皮肤持续地暴露于最低水平的五肽和/或五肽衍生物、及其他皮肤护理活性物质(或多种活性物质)的另一种方法是通过使用贴剂施加在例如脸上来施加所述的化合物。这种方法特别用于需要更强烈的处理的问题皮肤区域(例如面部鱼尾纹区域、皱纹、眼下部区域等)。所述的贴剂可以是封闭式的、半封闭式的或非封闭式的,并且可以是粘附或非粘附的。所述的五肽和/或五肽衍生物、及其他皮肤护理活性物质(或多种活性物质)组合物可以包含在贴剂中,或者在施加贴剂之前施加于皮肤上。所述的贴剂还包含其他的活性物质,例如用于放热反应的化学引发剂,例如在Wu等人的美国专利No.5,821,250,5,981,547和5,972,957中所述的那些。所述的贴剂优选地在皮肤上停留至少大约5分钟的时间、更优选地为至少大约15分钟、更优选地为至少大约30分钟、甚至更优选地为至少大约1小时、还更优选地以夜间治疗的形式过夜。

[0310] 在以下描述中,为了说明,列出大量的细节,从而提供对实施例的完整理解。但是,对于本领域的任一技术人员而言显而易见的是这些具体的细节不是必需的。

## 实施例

[0311] 材料和方法

[0312] 用于糖基化Pal-KTTKS衍生物的一般合成过程

[0313] 根据Pal-KTTKS序列,通过使用全乙酰化和脱乙酰化形式的多种糖(Glc, Gal, GlcNAc, GalNAc, Man, Mai, Lac, Rha, Cel, Xyl, Fuc)糖基化所有可行的位点来制备4组相似改性的五肽。通过检测体外人类皮肤成纤维细胞培养物上弹性蛋白、纤连蛋白和总的胶原蛋白的分泌以及人类皮肤(由人类表皮角质形成细胞和人类皮肤成纤维细胞组成)的体外3D模型中弹性蛋白的分泌和历史,针对毒性和生物学活性随后来检验这些合成的化合物。针对所制备的4组相似修饰的肽,通过HPLC和质谱来证明化学特性。

[0314] 组1修饰涉及使用全乙酰化或脱乙酰化形式的葡萄糖,N-乙酰基葡萄糖胺,半乳糖,N-乙酰基半乳糖胺或它们的组合对Pal-KTTKS序列中的2个中间苏氨酸的一者或二者的糖基化。

[0315] 组2修饰涉及使用全乙酰化或脱乙酰化形式的葡萄糖,N-乙酰基葡萄糖胺,半乳糖,N-乙酰基半乳糖胺对Pal-KTTKS序列中的末端丝氨酸的糖基化。

[0316] 组3修饰涉及使用全乙酰化或脱乙酰化形式的甘露糖或麦芽糖对Pal-KTTKS序列中的第一苏氨酸的糖基化。组3修饰还包括对Pal-KTTKS序列中的第一苏氨酸的丝氨酸取

代,其中丝氨酸被全乙酰化或脱乙酰化形式的葡萄糖糖基化。组3修饰还包括对Pal-KTTKS序列中的第一苏氨酸的天冬酰氨取代,其中天冬酰氨被全乙酰化或脱乙酰化形式的葡萄糖糖基化。组3修饰还包括对Pal-KTTKS序列中的N-末端的天冬酰氨氨基酸的加入,其中天冬酰氨被全乙酰化或脱乙酰化形式的葡萄糖糖基化。

[0317] 组4修饰涉及使用全乙酰化形式的半乳糖,麦芽糖,乳糖,鼠李糖,纤维二糖,木糖或海藻糖对Pal-KTTKS序列中的第一或第二苏氨酸的糖基化,或者对Pal-KTTKS序列中的末端丝氨酸的糖基化。

[0318] 所有的化学试剂均得自商业供应商的试剂级或HPLC级,并且未经进一步纯化而使用。由氢化钙(CaH<sub>2</sub>)通过蒸馏干燥得到二氯甲烷(DCM)。除非另作说明,否则所有的反应均是在室温下实施的。用于糖化肽合成的所有非糖基化的Fmoc-保护的氨基酸均得自Novabiochem(EMD Millipore)。用于糖化肽合成的所有糖基化的Fmoc-保护的氨基酸(糖化氨基酸或糖基化氨基酸)均购自Sussex Research Laboratories Inc.(Ottawa, Canada)(<http://www.sussex-research.com/products/glycoamino-acids/all-glycoamino-acids/>)。预加载的树脂(H-L-Ser(t-Bu)-2-Cl-三苯甲基游基树脂)均购自Matrix Innovation(Quebec, Canada)。标准树脂(Novabiochem 2-氯代三苯甲基游基氯化物树脂)得自EMD Millipore。棕榈酸(纯度>99%)购自Sigma Aldrich。

[0319] 在装配有805Manometric模块(最大压力60MPa),811C动态混合器,305泵和UV/VIS-155检测仪的Gilson色谱上实施逆向高压液相色谱(RP-HPLC),其中使用Phenomenex Luna C18柱:粒径为5μm,分析柱250x4.60mm。级份分别由流动相A和B(水/TFA(100/0.1)、以及乙腈/TFA(100/0.1))组成。使用UV检测在214nm下,在1mL/min流速下经过40分钟,通过2-70%流动相B的线性梯度由柱上洗脱糖化肽。在Gilson色谱(805Manometric模块,最大压力60MPa;811C动态混合器,305泵,UV/VIS-155检测仪)上实施制备型HPLC,其中使用Phenomenex Luna C18柱:粒径为10μm,半制备型柱250x21.20mm。流动相A和B分别由水/TFA(100/0.1)和乙腈/TFA(100/0.1)组成。使用UV检测在214nm下,在10mL/min流速下经过35分钟,通过2-70%流动相B的线性梯度将糖化肽与杂质分离。

[0320] 使用Micromass ZQ Single Quadrupole质谱仪,在电喷雾质谱仪(ESI-MS)上实施肽样品的分析。

[0321] 用于全乙酰化的苏氨酸糖基化寡肽的合成的一般过程

[0322] 使用标准的Fmoc固相肽合成(SPPS)方法在CS Bio CS136XT自动化合成仪上合成糖化肽。将预加载的树脂(H-L-Ser(t-Bu)-2-Cl-三苯甲基游基树脂(0.133g,0.1 mmol))放置于反应容器中。Fmoc保护的氨基酸(0.4mmol)、Fmoc保护的糖化氨基酸(0.4mmol)或棕榈酸(0.4mmol)溶解于5mL DMF中,并通过在DMF中使用HBTU(0.4mmol)和DIPEA(0.6mmol)进行活化来实施偶联反应。使用处于DMF中的20%哌啶溶液来进行Fmoc脱保护。在肽组装结束后,使用DMF(3x5mL)洗涤树脂,然后使用DCM(3x5mL)洗涤树脂,再在高度真空下干燥3小时。然后,针对各0.1mmol树脂,使用10mL试剂K(TFA:水:苯酚:苯硫基甲烷=8.5:0.5:0.5:0.5)在室温下将干燥的树脂处理3小时。由冷乙醚沉淀糖化肽粗产物,通过RP-HPLC纯化,并冷冻干燥,从而得到80-100mg糖化肽的白色粉末。通过MS证明糖化肽的分子量,并通过分析型RP-HPLC建立纯度。

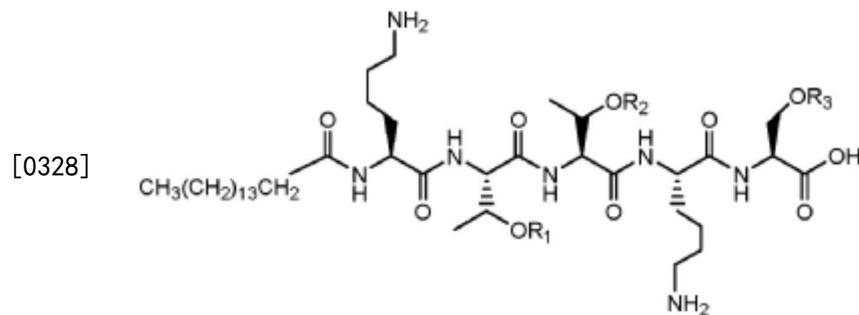
[0323] 用于脱酰化的糖基化寡肽的合成的一般过程

[0324] 向Pal-KTT\*KS-[OH]或Pal-KT\*TKS-[OH] (分别为0.05mmol) 在无水MeOH (5mL) 中形成的溶液中滴加处于无水甲醇中的甲醇钠 (1M) ,从而将pH调节至大约10。在室温下将反应混合物搅拌1小时,然后使用醋酸 (pH~4.0) 中和。在真空下除去溶剂。通过RP-HPLC纯化脱保护的糖化肽粗品,并冷冻干燥,从而得到通常为30至40mg末的靶物糖化肽的白色粉。

[0325] 用于全乙酰化的丝氨酸糖基化寡肽的合成的一般过程

[0326] 预加载的H-L-Ser (糖)-2-C1-三苯甲基游基树脂的合成:向Fmoc-Ser (糖)-OH (0.3mmol) 在无水DCM (5mL) 中形成的溶液中加入至处于离心管中的2-氯三苯甲基游基树脂 (0.4g, 0.3mmol)。在15分钟后,加入DIPEA (87μL, 0.5mmol)。将混合物在摇床上摇动30分钟,然后加入DIPEA (120μL, 0.75mmol)。使混合物在摇床上再停留3小时。向端盖 (end cap) 中加入甲醇 (0.4mL) ,并将混合物再摇动30分钟。将树脂转移至装配有多孔盘的玻璃漏斗中,并使用DMF (2x5mL) 洗涤,然后使用DCM (2x5mL) 洗涤,最后使用MeOH (3x5mL) 洗涤。将树脂在真空下过夜干燥,从而产生预加载的H-L-Ser (糖)-2-C1-三苯甲基游基树脂,以便在糖化肽的Fmoc-SPPS合成中进一步使用。

[0327] 在CS Bio CS136XT自动化合成仪上,通过标准的Fmoc固相肽合成方法来合成丝氨酸糖基化的糖化肽。将预加载的树脂 (H-L-Ser (糖)-2-C1-三苯甲基游基树脂 (0.1 mmol)) 放置在反应容器中。通过使用HBTU (0.4mmol) 和DIPEA (0.6mmol) 的活化来偶联Fmoc保护的氨基酸 (0.4mmol溶解于5mL DMF中)。相似地,偶联N-封端棕榈酸 (0.4mmol溶解于5mL DMF中)。使用处于DMF中的20%哌啶溶液除去Fmoc保护基团。在肽被组装后,使用DMF (3x5mL) 洗涤树脂,然后使用DCM (3x5mL) 洗涤,再在高度真空下干燥3小时。向干燥的树脂中加入10mL试剂K (TFA:水:苯酚:苯硫基甲烷=8.5:0.5:0.5:0.5)。然后,将混合物在室温下摇动3小时。由冷乙醚沉淀糖化肽粗品,通过RP-HPLC纯化并冷冻干燥,从而产生120-150mg靶物糖化肽的白色粉末。通过MS证明产物糖化肽的分子量,并通过分析型HPLC评估纯度。



[0329] GP001-1:R<sub>1</sub>=Ac<sub>4</sub>-β-Glc, R<sub>2</sub>=H, R<sub>3</sub>=H

[0330] GP003-9:R<sub>1</sub>=Ac<sub>7</sub>-β-Mal, R<sub>2</sub>=H, R<sub>3</sub>=H

[0331] GP002-3:R<sub>1</sub>=H, R<sub>2</sub>=H, R<sub>3</sub>=Ac<sub>4</sub>-β-Glc

[0332] GP002-7:R<sub>1</sub>=H, R<sub>2</sub>=H, R<sub>3</sub>=Ac<sub>4</sub>-β-Gal

[0333] GP004-3:R<sub>1</sub>=H, R<sub>2</sub>=Ac<sub>7</sub>-β-Mal, R<sub>3</sub>=H

[0334] GP004-4:R<sub>1</sub>=H, R<sub>2</sub>=H, R<sub>3</sub>=Ac<sub>7</sub>-β-Mal

[0335] Pal-KT (Ac<sub>4</sub>-p-Glc) TKS-[OH] (GP001-1) 的示例性合成

[0336] 在CS-Bio CS136XT自动化合成仪上,使用标准的Fmoc-SPPS方法并使用以下一般过程在H-L-Ser (t-Bu)-2-C1-三苯甲基游基树脂 (133.3mg, 0.1 mmol) 上合成糖化肽GP001-1。使用处于DMF (5mL) 中的HBTU (128.4mg, 0.4mmol) 和DIPEA (104.5μL, 0.6mmol) 将第一氨基酸

(Fmoc-Lys (Boc)-OH (187.4mg, 0.4mmol)) 偶联至预加载的树脂上。随后,按照相同的方式偶联Fmoc-氨基酸和棕榈酸。在第三偶联反应中使用Fmoc-Thr (Ac<sub>4</sub>-β-Glc)-OH (0.270mg, 0.4mmol)。在固相合成功后,使用试剂K (10mL) 由树脂上切除糖化肽。通过制备型RP-HPLC纯化所得的糖化肽粗品,从而提供Pal-KT (Ac<sub>4</sub>-β-Glc) TKS-OH, GP001-1 (70mg, 62%) 白色粉末。ESI-MS:m/z:针对C<sub>53</sub>H<sub>93</sub>N<sub>7</sub>O<sub>19</sub>计算;1132.34;测试数据:1133.1 [M+H]<sup>+</sup>。通过RP-HPLC测定纯度为95.6%。

[0337] Pal-KT (p-Glc)-TKS-[OH] (GP001-2) 的示例性合成

[0338] 将糖化肽GP001-1 (65mg, 0.05mmol) 溶解于5mL无水甲醇中,并如上文所述的一般过程,通过加入处于甲醇中的甲醇钠进行脱保护,从而产生32mg靶物脱乙酰化的糖基化GP001-2的白色粉末。ESI-MS:m/z:针对C<sub>45</sub>H<sub>85</sub>N<sub>7</sub>O<sub>15</sub>计算;964.19;测试数据:965 [M+H]<sup>+</sup>。通过分析型HPLC测定纯度为99%。

[0339] Pal-KT (Ac<sub>7</sub>-β-Mal) TKS-[OH] (GP003-9) 的示例性合成

[0340] 在CS-Bio CS136XT自动化合成仪上,使用标准的Fmoc-SPPS方法并使用以下一般过程在H-L-Ser (t-Bu)-2-C1-三苯甲基游基树脂 (133.3mg, 0.1 mmol) 上合成糖化肽GP003-9。使用处于DMF (5mL) 中的HBTU (128.4mg, 0.4mmol) 和DIPEA (104.5μL, 0.6mmol) 将第一氨基酸 (Fmoc-Lys (Boc)-OH (187.4mg, 0.4mmol)) 偶联至预加载的树脂上。随后,按照相同的方式偶联Fmoc-氨基酸。在第三偶联反应中使用Fmoc-Thr (Ac<sub>7</sub>-β-Mal)-OH (0.372mg, 0.4mmol)。在固相合成功后,使用试剂K (10mL) 由树脂上切除糖化肽。通过制备型RP-HPLC纯化所得的糖化肽粗品,从而提供Pal-KT (Ac<sub>7</sub>-β-Mal) TKS-OH, GP003-9 (90mg, 产率为63%) 白色粉末。ESI-MS:m/z:针对C<sub>65</sub>H<sub>10</sub>N<sub>7</sub>O<sub>27</sub>计算;1420.59;测试数据:1420.7 [M+H]<sup>+</sup>。通过分析型RP-HPLC测定纯度为99.1%。

[0341] Pal-KTTKS (Ac<sub>4</sub>-β-Glc)-[OH] (GP002-3) 的示例性合成

[0342] a) 通过上述的一般过程将Fmoc-Ser (Ac<sub>4</sub>-β-Glc)-OH (0.3mmol) 加载至2-氯三苯甲基游基树脂 (0.4g, 0.3mmol) 上。然后,在随后的步骤中,使用未经过进一步处理的干燥的预加载树脂。

[0343] b) 在CS Bio CS136XT自动化合成仪上,通过标准的Fmoc固相肽合成方法,在如上文所述而制备的预加载的树脂上合成糖化肽GP002-3。在固相合成功后,使用试剂K (10mL) 由树脂上切除糖化肽。通过制备型HPLC纯化所得的糖化肽粗品,从而提供Pal-KTTKS (Ac<sub>4</sub>-β-Glc)-OH, GP002-3 (136mg, 40%) 白色粉末。ESI-MS:m/z:针对C<sub>53</sub>H<sub>93</sub>N<sub>7</sub>O<sub>19</sub>计算;1132.34;测试数据:1132.5 [M+H]<sup>+</sup>。通过分析型RP-HPLC测定纯度为99.6%。

[0344] PaKTTKS (Ac<sub>4</sub>-β-Gal)-[OH] (GP002-7) 的示例性合成

[0345] a) 通过上述的一般过程将Fmoc-Ser (Ac<sub>4</sub>-β-Gal)-OH (0.3mmol) 加载至2-氯三苯甲基游基树脂 (0.4g, 0.3mmol) 上。在随后的步骤中,使用未经过进一步处理的干燥的预加载树脂。

[0346] b) 在CS Bio CS136XT自动化合成仪上,通过标准的Fmoc固相肽合成方法,在如上文所述而制备的预加载的树脂上合成糖化肽GP002-7。在固相合成功后,使用试剂K (10mL) 由树脂上切除糖化肽。通过制备型RP-HPLC纯化所得的糖化肽粗品,从而提供Pal-KTTKS (Ac<sub>4</sub>-β-Gal)-OH, GP002-7 (140mg, 41%) 白色粉末。ESI-MS:m/z:针对C<sub>53</sub>H<sub>93</sub>N<sub>7</sub>O<sub>19</sub>计算;1132.34;测试数据:1132.5 [M+H]<sup>+</sup>。通过分析型HPLC测定纯度为99.6%。

[0347] Pa1-KTT (Ac<sub>7</sub>- $\beta$ -Ma1) KS-[OH] (GP004-3) 的示例性合成

[0348] 在CS-Bio CS136XT自动化合成仪上,使用标准的Fmoc-SPPS方法并使用以下一般过程在H-L-Ser (t-Bu)-2-C1-三苯甲基游基树脂(133.3mg, 0.1 mmol)上合成糖化肽GP004-3。使用处于DMF (5mL) 中的HBTU (126.3mg, 0.4mmol) 和DIPEA (104.5 $\mu$ L, 0.6mmol) 将第一氨基酸 (Fmoc-Lys (Boc)-OH (179.6mg, 0.4mmol)) 偶联至预加载的树脂上。随后,按照相同的方式偶联Fmoc-氨基酸。在第二偶联反应中使用Fmoc-Thr (Ac<sub>7</sub>- $\beta$ -Ma1)-OH (0.383mg, 0.4mmol)。在固相合成后,使用试剂K (10mL) 由树脂上切除糖化肽。通过制备型RP-HPLC纯化所得的糖化肽粗品,从而提供Pa1-KT (Ac<sub>7</sub>- $\beta$ -Ma1) TKS-OH, GP004-3 (26mg, 产率为18%) 白色粉末。ESI-MS:m/z:针对C<sub>65</sub>H<sub>109</sub>N<sub>7</sub>O<sub>27</sub>计算;1420.59;测试数据:1420.7 [M+H]<sup>+</sup>。通过分析型RP-HPLC测定纯度为98.5%。

[0349] Pa1-KTTKS (Ac<sub>7</sub>- $\beta$ p-Ma1)-[OH] (GP004-4) 的示例性合成

[0350] a) 通过上述的一般过程将Fmoc-Ser (Ac<sub>7</sub>- $\beta$ -Ma1)-OH (0.3mmol) 加载至2-氯三苯甲基游基树脂 (0.4g, 0.3mmol) 上。然后,在随后的步骤中,使用未经过进一步处理的干燥的预加载树脂。

[0351] b) 在CS Bio CS136XT自动化合成仪上,通过标准的Fmoc固相肽合成方法,在如上文所述而制备的预加载的树脂上合成糖化肽GP004-4。在固相合成后,使用试剂K (10mL) 由树脂上切除糖化肽。通过制备型HPLC纯化所得的糖化肽粗品,从而提供Pa1-KTTKS (Ac<sub>7</sub>- $\beta$ -Ma1)-OH, GP004-4 (102mg, 24%) 白色粉末。ESI-MS:m/z:针对C<sub>65</sub>H<sub>109</sub>N<sub>7</sub>O<sub>27</sub>计算;1420.59;测试数据:1420.7 [M+H]<sup>+</sup>。通过分析型RP-HPLC测定纯度为97.8%。

[0352] 缩写

[0353]	Ac	乙酰基
[0354]	Ac4- $\beta$ -Glc	2,3,4,6-四-0-乙酰基- $\beta$ -D-吡喃葡萄糖昔
[0355]	Ac4- $\beta$ -Gal	2,3,4,6-四-0-乙酰基- $\beta$ -D-吡喃半乳糖昔
[0356]	Ac7- $\beta$ -Ma1	2,2',3,3',4',6,6'-六-0- $\beta$ -D-吡喃麦芽糖昔
[0357]	Cel	D-纤维二糖
[0358]	C1	氯
[0359]	Gal	D-半乳糖
[0360]	GalNAc	N-乙酰基-D-半乳糖胺
[0361]	Glc	D-葡萄糖
[0362]	GlcNAc	N-乙酰基-D-葡萄糖胺
[0363]	DCM	二氯甲烷
[0364]	DIPEA	N,N-二异丙基乙基胺
[0365]	DMF	二甲基甲酰胺
[0366]	Fuc	L-海藻糖
[0367]	HBTU	N,N,N',N'-四甲基-0-(1H-苯并三唑-1-基)脲鎓六氟磷酸盐
[0368]	Lac	D-乳糖
[0369]	Ma1	D-麦芽糖
[0370]	Man	D-甘露糖
[0371]	MeOH	甲醇

---

[0372]	Pal	棕榈酰
[0373]	Rha	L-鼠李糖
[0374]	t-Bu	叔丁基
[0375]	TFA	三氟醋酸
[0376]	Xyl	D-木糖
[0377]	质谱	

[0378] 通过将溶解于水中的多种肽的样品(2-5 $\mu$ L)注射至LC-MS系统(HPLC:Waters Alliance 2795)中来获得多种肽的质谱。流动相由水:甲酸(100:0.1)和乙腈:甲酸(100:0.1)组成,水:甲酸(100:0.1)和乙腈:甲酸(100:0.1)分别为流动相A和B。流动速率设定为0.2mL/min,并且组成为50:50(流动相A:流动相B)。将质谱(Mass Spec:Waters Micromass ZQ)设定为在2.0分钟运行时间内,在正模式和负模式下在1秒内均由100amu扫描至1800amu。由TIC色谱图提取质谱。

[0379] ECM ELISA测试

[0380] 将KMST-6细胞(Japan Health Sciences Foundation,JCRB0433)以7,000细胞/ml接种于12孔组织培养物处理的平板(Falcon,353043)的完全培养基中。完全培养基由以下物质组成:MEM/EBSS(Hyclone,SH30024.01),10%热灭活的FBS(Gibco,10082-147),1%L-谷氨酰胺(Hyclone,SH30031.01),1%核苷(800mg/L腺苷,850mg/L胍,730mg/L胞苷,730mg/L尿苷和240mg/L胸苷),1%青霉素/链霉素(HyClone,SV30010),1%丙酮酸钠(HyClone,SH30239.01),1%非必需氨基酸(Hyclone,SH30238.01)和0.04%庆大霉素(Gibco,15710-064)。使细胞生长2天,然后进行处理。抽吸培养基并使用1X PBS(Fisher,SH30256.01)洗涤细胞,再使用处于无血清培养基中的5 $\mu$ M(1mL/孔)糖化肽(参照(Pal-KTTKS,CPC Scientific,822197)和对照(DMSO,Fisher,BP231-100))进行处理,其中所述的无血清培养基补充有50 $\mu$ g/mL抗坏血酸钠(Sigma,A4034)和80 $\mu$ g/mL $\beta$ -氨基丙酸延胡索酸酯(Sigma,A3134)。将处理的细胞在37°C和5%CO<sub>2</sub>下温育48和72小时。在各时间点时,收集由各处理得到的培养基,并在4°C下在1500RPM下离心15分钟。收集上清液,并储存在-80°C下以用于细胞外基质蛋白质的定量。以下试剂盒用于ECM蛋白质的定量:纤连蛋白(Takara,MK115)和弹性蛋白(Uscn Life Science Inc.,E91337Hu)。收获细胞,并使用250 $\mu$ L裂解缓冲液((20mM Tris-HCl,Sigma,T1503),137mM NaCl(Sigma,S9888),2mM EDTA(Fisher,BP118),1%IGEPAL(Sigma,I8896),10%甘油(Sigma,G5516),100 $\mu$ M PMSF(Fisher,36978)和10 $\mu$ g/mL亮抑蛋白酶肽(Sigma-Aldrich,L2884))裂解。将它们在平板摇床(Lab-Line Instruments,3595)上的冰的容器中放置30分钟。将裂解物在4°C下在10000g下离心5分钟。收集上清液,并用于蛋白质的定量(BioRad,500-0112)。

[0381] 细胞形态学

[0382] 将KMST-6细胞(Japan Health Sciences Foundation,JCRB0433)以7,000细胞/ml接种于12孔组织培养物处理的平板(Falcon,353043)的完全培养基中。完全培养基由以下物质组成:MEM/EBSS(Hyclone,SH30024.01),10%热灭活的FBS(Gibco,10082-147),1%L-谷氨酰胺(Hyclone,SH30031.01),1%核苷(800mg/L腺苷,850mg/L胍,730mg/L胞苷,730mg/L尿苷和240mg/L胸苷),1%青霉素/链霉素(HyClone,SV30010),1%丙酮酸钠(HyClone,SH30239.01),1%非必需氨基酸(Hyclone,SH30238.01)和0.04%庆大霉素(Gibco,15710-

064)。使细胞生长2天,然后进行处理。抽吸培养基并使用1X PBS (Fisher, SH30256.01) 洗涤细胞,再使用处于无血清培养基中的5 $\mu$ M 糖化肽 (GP001-1, GP002-3, GP002-7, GP003-9, GP004-3和GP004-4) (参照 (Pal-KTTKS, CPC Scientific, 822197) 和对照 (DMSO, Fisher, BP231-100)) 进行处理,其中所述的无血清培养基补充有50 $\mu$ g/mL抗坏血酸钠 (Sigma, A4034) 和80 $\mu$ g/mL $\beta$ -氨基丙酸延胡索酸酯 (Sigma, A3134)。将处理的细胞在37℃和5%CO<sub>2</sub>下温育48和72小时。在各时间点时,使用Olympus Opti-Tech Scientific Microscope (Lumenera, Infinity 2照相机,放大10x) 取得图像,并记录细胞大小和形态学改变。

#### [0383] 细胞活力MTT测试

[0384] 将KMST-6细胞 (Japan Health Sciences Foundation, JCRB0433) 以7,000细胞/ml接种于完全培养基中。完全培养基由以下物质组成:MEM/EBSS (Hyclone, SH30024.01), 10%热灭活的FBS (Gibco, 10082-147), 1%L-谷氨酰胺 (Hyclone, SH30031.01), 1%核苷 (800mg/L腺苷, 850mg/L胍, 730mg/L胞苷, 730mg/L尿苷和240mg/L胸苷), 1%青霉素/链霉素 (Hyclone, SV30010), 1%丙酮酸钠 (Hyclone, SH30239.01), 1%非必需氨基酸 (Hyclone, SH30238.01) 和0.04%庆大霉素 (Gibco, 15710-064)。使细胞生长2天,然后进行处理。抽吸培养基并使用1X PBS (Fisher, SH30256.01) 洗涤细胞,再使用处于无血清培养基中的5 $\mu$ M 糖化肽 (GP001-1, GP002-3, GP002-7, GP003-9, GP004-3和GP004-4) (参照 (Pal-KTTKS, CPC Scientific, 822197) 和对照 (DMSO, Fisher, BP231-100)) 进行处理,其中所述的无血清培养基补充有50 $\mu$ g/mL抗坏血酸钠 (Sigma, A4034) 和80 $\mu$ g/mL $\beta$ -氨基丙酸延胡索酸酯 (Sigma, A3134)。将处理的细胞在37℃和5%CO<sub>2</sub>下温育48和72小时。在各时间点,通过向所有的孔中加入15 $\mu$ L染料溶液 (Promega, G4102) 来实施MTT测试。使细胞温育2-4小时。在该过程中,活细胞将染料溶液的MTT四唑成分转变成甲瓒产物。然后将溶解/停止溶液 (Promega, G4101) 加入至培养孔中,从而溶解甲瓒产物。使用微板读取器 (Molecular Devices, SpectraMax M2e) 在570nm下测量吸光率。我们将与对照相比低于50%的毒性定义为细胞活力。

#### [0385] 总的胶原蛋白测试

[0386] 将KMST-6细胞 (Japan Health Sciences Foundation, JCRB0433) 以7,000细胞/ml接种于60mm组织培养物处理的平板 (Falcon, 353002) 的完全培养基中。完全培养基由以下物质组成:MEM/EBSS (Hyclone, SH30024.01), 10%热灭活的FBS (Gibco, 10082-147), 1%L-谷氨酰胺 (Hyclone, SH30031.01), 1%核苷 (800mg/L腺苷, 850mg/L胍, 730mg/L胞苷, 730mg/L尿苷和240mg/L胸苷), 1%青霉素/链霉素 (Hyclone, SV30010), 1%丙酮酸钠 (Hyclone, SH30239.01), 1%非必需氨基酸 (Hyclone, SH30238.01) 和0.04%庆大霉素 (Gibco, 15710-064)。使细胞生长2天,然后进行处理。使用1X PBS (Fisher, SH30256.01) 洗涤细胞,并使用处于无血清培养基中的5 $\mu$ M 糖化肽 (GP003-9, GP004-3, GP004-4) (参照 (Pal-KTTKS, CPC Scientific, 822197) 和对照 (DMSO, Fisher, BP231-100)) 进行处理,其中所述的无血清培养基补充有50 $\mu$ g/mL抗坏血酸钠 (Sigma, A4034) 和80 $\mu$ g/mL $\beta$ -氨基丙酸延胡索酸酯 (Sigma, A3134)。将处理的细胞在37℃和5%CO<sub>2</sub>下温育48和72小时。在各时间点,收集由各处理得到的培养基,并在4℃下在1500RPM下离心15分钟。收集上清液,并储存在-80℃下,以应用细胞外基质蛋白质的定量。以下试剂盒用于总的胶原蛋白的定量:Sirius Red Collagen Detection Kit (Chondrex Inc., 9062)。收获细胞并使用并使用裂解缓冲液 ((20mM Tris-HCl, Sigma, T1503), 137mM NaCl (Sigma, S9888), 2mM EDTA (Fisher, BP118), 1%IGEPAL

(Sigma, I8896), 10%甘油 (Sigma, G5516), 100 $\mu$ M PMSF (Fisher, 36978) 和 10 $\mu$ g/mL亮抑蛋白酶肽 (Sigma-Aldrich, L2884) 裂解。将它们在定规摇床 (VWR, 89032-088) 上的冰的容器中放置30分钟。将裂解物在4℃下在10000g下离心5分钟。收集上清液，并用于蛋白质的定量 (BioRad, 500-0112)。

[0387] 3D人类体外皮肤模型

[0388] MatTek's EpiDermFT<sup>TM</sup>3D人类体外皮肤模型由MatTek Corporation (Ashland, MA, USA) 生产。3D皮肤模型由正常人类表皮角质细胞 (NHEK) 和正常人类皮肤成纤维细胞 (NHDF) 组成, 它们分别衍生自新生-包皮组织和成人皮肤。组织的历史表明8-12个细胞层加上角质层, 包括基底层、有棘层和颗粒层。使该组织在Costar Snapwell<sup>TM</sup>单孔组织培养板插入物中的空气-液体界面处生长, 其中所述的插入物具有0.4 $\mu$ m孔径、1.2cm直径和1.0cm<sup>2</sup>表面积。为了组织保持, 使用无血清EFT-400-ASY培养基, 其包含Dulbecco's Modified Eagle's Medium (DMEM), 表皮生长因子, 胰岛素, 氢化可的松, 5 $\mu$ g/mL庆大霉素, 0.2 $\mu$ g/ml两性霉素B和苯酚红。

[0389] 弹性蛋白的评估

[0390] 将组织用1% PBS漂洗2次, 并使用5 $\mu$ M GP003-9 (参照 (Pal-KTTKS, CPC Scientific, 822197) 和对照 (DMSO, Fisher, BP231-100)) 处理。在处理后72小时, 分离上清液, 并保持在-80℃下以用于弹性蛋白ELISA分析 (Cedarlane, SE9133Hu)。根据供应商的方法, 使用1:50样品稀释进行ELISA。

[0391] 对于总的蛋白质的定量而言, 使用1% PBS漂洗组织, 并加入冷的Tissue Protein Extraction Reagent (Pierce, 78510)。使用手持式均质机将组织均化大约1分钟。将所有的样品在4℃下在16000g下离心10分钟。离心后, 收集上清液, 并使用BCA Protein Assay Kit (Pierce, 23227) 测定蛋白质浓度。

[0392] 组织学处理

[0393] 将组织用1% PBS漂洗2次, 并使用5 $\mu$ M GP003-9 (参照 (Pal-KTTKS, CPC Scientific, 822197) 和对照 (DMSO, Fisher, BP231-100)) 处理。在处理后72小时, 在10%中性缓冲的福尔马林中过夜固定组织, 并在第二天转移至1% PBS中。然后将组织一分为二(提供横切面), 在一系列梯度乙醇中脱水, 并包埋在石蜡中。制备5微米切片, 并使用苏木精和伊红染色以用于组织学观察。

[0394] 统计学分析

[0395] 使用单因素方差统计学分析来比较3种或多种样品的平均值。Bonferroni多重比较检验允许糖化肽处理与对照或参照之间的差异的比较。统计学意义通过设定p值 (p<0.05) 导出。(使用GraphPad Prism 6得到数据分析, 其中所述的GraphPad Prism 6是科学软件, 其能够实施基础统计学检验、数据组织和科学制图)。

[0396] 以下实施例描述了制备或实施本文所述的某些组合物和方法的一些示例性模式。应该理解的是这些实施例仅是为了说明的目的, 并且无意于限定本文所述的组合物和方法的范围。

[0397] 实施例1

[0398] 如上文所述, 制备4批改性的肽, 并通过HPLC和质谱证明化学特性。总体而言, 制备44种不同的糖化肽并示于表1A和1B中。

[0399] 表1A. 合成的糖化肽

组#	GP001	GP002
[0400]	Cmpd -1 Pal-KT(Ac <sub>4</sub> - $\beta$ -Glc)TKS-OH (SEQ ID NO: 4)	Pal-KTTKS(Ac <sub>3</sub> - $\alpha$ -GalNAc)-OH (SEQ ID NO: 25)
	Cmpd -2 Pal-KT( $\beta$ -Glc)TKS-OH (SEQ ID NO: 12)	Pal-KTTKS( $\alpha$ -GalNAc)-OH (SEQ ID NO: 26)
	Cmpd -3 Pal-KT(Ac <sub>3</sub> - $\alpha$ -GalNAc)TKS-OH (SEQ ID NO: 13)	Pal-KTTKS(Ac <sub>4</sub> - $\beta$ -Glc)-OH (SEQ ID NO: 8)
	Cmpd -4 Pal-KT( $\alpha$ -GalNAc)TKS-OH (SEQ ID NO: 14)	Pal-KTTKS( $\beta$ -Glc)-OH (SEQ ID NO: 27)
	Cmpd -5 Pal-KT(Ac <sub>3</sub> - $\beta$ -GlcNAc)TKS-OH (SEQ ID NO: 15)	Pal-KTTKS(Ac <sub>3</sub> - $\beta$ -GlcNAc)-OH (SEQ ID NO: 28)
	Cmpd -6 Pal-KT( $\beta$ -GlcNAc)TKS-OH (SEQ ID NO: 16)	Pal-KTTKS( $\beta$ -GlcNAc)-OH (SEQ ID NO: 29)
	Cmpd -7 Pal-KTT(Ac <sub>4</sub> - $\beta$ -Glc)KS-OH (SEQ ID NO: 17)	Pal-KTTKS(Ac <sub>4</sub> - $\beta$ -Gal)-OH (SEQ ID NO: 7)
	Cmpd -8 Pal-KTT( $\beta$ -Glc)KS-OH (SEQ ID NO: 18)	Pal-KTTKS( $\beta$ -Gal)-OH (SEQ ID NO: 30)
	Cmpd -9 Pal-KTT(Ac <sub>3</sub> - $\alpha$ -GalNAc)KS-OH (SEQ ID NO: 19)	
	Cmpd -10 Pal-KTT( $\alpha$ -GalNAc)KS-OH (SEQ ID NO: 20)	
	Cmpd -11 Pal-KTT(Ac <sub>3</sub> - $\beta$ -GlcNAc)KS-OH (SEQ ID NO: 21)	
	Cmpd -12 Pal-KTT( $\beta$ -GlcNAc)KS-OH (SEQ ID NO: 22)	
	Cmpd -13 Pal-KT(Ac <sub>3</sub> - $\alpha$ -GalNAc)-T(Ac <sub>3</sub> - $\alpha$ -GalNAc)KS-OH (SEQ ID NO: 23)	
	Cmpd -14 Pal-KT( $\alpha$ -GalNAc)-T( $\alpha$ -GalNAc)KS-OH (SEQ ID NO: 24)	

[0401] 表1B. 合成的糖化肽

组#	GP003	GP004
[0402]	Cmpd -1	Pal-KT(Ac <sub>4</sub> - $\alpha$ -Man)TKS-OH (SEQ ID NO: 5)
	Cmpd -2	Pal-KT( $\alpha$ -Man)TKS-OH (SEQ ID NO: 31)
	Cmpd -3	Pal-KS(Ac <sub>4</sub> - $\beta$ -Glc)TKS-OH (SEQ ID NO: 32)
	Cmpd -4	Pal-KS( $\beta$ -Glc)TKS-OH (SEQ ID NO: 33)
	Cmpd -5	Pal-KN(Ac <sub>4</sub> - $\beta$ -Glc)TKS-OH (SEQ ID NO: 34)
	Cmpd -6	Pal-KN( $\beta$ -Glc)TKS-OH (SEQ ID NO: 35)
	Cmpd -7	Pal-N(Ac <sub>3</sub> - $\beta$ -Glc)KTTKS-OH (SEQ ID NO: 36)
	Cmpd -8	Pal-N( $\beta$ -Glc)KTTKS-OH (SEQ ID NO: 37)
	Cmpd -9	Pal-KT(Ac <sub>7</sub> - $\beta$ -Mal)TKS-OH (SEQ ID NO: 6)
	Cmpd -10	Pal-KT( $\beta$ -Mal)TKS-OH (SEQ ID NO: 38)
	Cmpd -11	
	Cmpd -12	

[0403] 为了测定5 $\mu$ M单独的糖化肽对细胞外基质蛋白质的分泌的作用,将所述的糖化肽与人类皮肤成纤维细胞(KMST-6)温育。使用DMSO(Fisher, BP231-100)处理对照样品细胞。如上文所述,由处理的细胞收集上清液(2个时间点,48小时和72小时的处理),并在-80℃下储存,以便使用ELISA试剂盒(纤连蛋白(Takara, MK115),弹性蛋白(Uscn Life Science Inc., E91337Hu)随后进行细胞外基质蛋白质的定量。为了进行总的细胞蛋白质的测定,收获处理的细胞并裂解。将裂解物离心,收集上清液,然后用于蛋白质的定量(BioRad, 500-0112)。在450nm吸光率下在平板读取器(Molecular Devices)上读取ELISA平板,并使用SoftMax Pro软件来计算由生成的4参数拟合标准曲线衍生得到的、所关注的蛋白质的 $\mu$ g/ml值。将各种所分泌的蛋白质的 $\mu$ g/ml对每孔的总蛋白质进行归一化。通过将至少3个独立试验的归一化值取平均值,并将它们呈现为与被设定为100%的对照处理的%,从而分析所述的数据(表2-5)。使用单因素ANOVA( $p<0.05$ )进行统计学意义的分析,其中“\*”表示当与对照相比时的统计学意义,而“#”表示与参照相比时的统计学意义。

[0404] 下表显示在人类皮肤成纤维细胞处理后,所有的44种糖化肽对弹性蛋白的分泌(表2和表3分别为在48小时和72小时下)以及对纤连蛋白的分泌(表4和表5分别为在48小时和72小时下)的效力。这些结果的图表描绘示于图1A和1B(分别在48小时和72小时的弹性蛋白的分泌),以及图2A和2B(分别在48小时和72小时的纤连蛋白的分泌)。由这些结果可以看出糖基化肽处理的成纤维细胞展现出超过对照处理的成纤维细胞的增加的ECM分泌(弹性蛋白和纤连蛋白)。

[0405] 表2.在48小时的弹性蛋白的分泌

[0406]

化合物#	GP001	GP002	GP003	GP004
对照	100%			
1	205.3	144.8	464.1 <sup>*</sup>	215.3
2	102.8	143.8	121.0	186.5
3	123.3	460.4 <sup>*</sup>	177.1	226.1
4	104.5	145.0	136.8	190.0
5	81.67	159.3	211.4	195.3
6	91.00	150.7	170.3	218.6
7		198.3	105.0	241.0
8	94.25	103.8	111.3	166.8
9	103.7		255.8 <sup>*</sup>	199.3
10	103.0		149.5	211.3
11	114.3			178.8
12	73.00			151.4
13	123.8			
14	88.00			

[0407]

表3. 在72小时的弹性蛋白的分泌

[0408]

化合物#	GP001	GP002	GP003	GP004
对照	100%			
1	188.0	145.5	413.6 <sup>*</sup>	202.0
2	94.50	127.0	160.4	138.3
3	132.5	321.6 <sup>*</sup>	146.8	384.7 <sup>*</sup>
4	100.0	142.0	120.8	185.5
5	90.00	137.3	194.2	209.5
6	81.50	111.0	128.8	170.0
7		207.1 <sup>*</sup>	148.2	193.0
8	91.25	177.8	146.5	169.3
9	104.3		283.6 <sup>*</sup>	254.6 <sup>*</sup>
10	98.67		127.6	187.0
11	94.75			121.3
12	76.75			191.8
13	131.3			
14	98.25			

[0409]

表4. 在48小时的纤连蛋白的分泌

[0410]

化合物#	GP001	GP002	GP003	GP004
对照	100%			
1	159.3 <sup>*</sup>	114.7	193.7 <sup>*</sup>	
2	133.0	95.7	165.0 <sup>*</sup>	
3	163.8 <sup>*</sup>	135.5	162.0 <sup>*</sup>	185.0 <sup>*</sup>
4	134.2	121.5	165.8 <sup>*</sup>	145.7
5	125.0	111.3	146.0	
6	123.2	109.7	140.2	
7	101.3	113.7	139.8	
8	106.4	110.0	157.2	
9	123.4		161.4 <sup>*</sup>	
10	100.2		144.5	
11	111.2			
12	106.5			
13	114.0			
14	104.8			

[0411]

表5.在72小时的纤连蛋白的分泌

[0412]

化合物#	GP001	GP002	GP003	GP004
对照	100%			
1	121.5	108.0	125.3	
2	115.4	90.60	110.3	
3	117.4	134.5 <sup>*</sup>	138.8	168.3 <sup>*</sup>
4	112.5	116.0	132.5	182.7 <sup>*</sup>
5	105.0	104.2	136.0	
6	100.0	115.8	119.7	
7	109.4	116.1	118.5	
8	106.2	121.0	126.0	
9	104.8		140.4 <sup>*</sup>	
10	104.0		94.70	
11	113.8			
12	89.25			
13	94.50			
14	94.75			

[0413] 通过这种初步筛选,鉴定6种糖化肽用于进一步的研发,其中所述的6种糖化肽为: GP001-1 (Pal-KT (Ac<sub>4</sub>-Glc) TKS-OH) , GP002-3 ((Pal-KTTKS (Ac<sub>4</sub>-Glc) -OH) , GP002-7 (Pal-KTTKS (Ac<sub>4</sub>-Gal) -OH) , GP003-9 (Pal-KT (Ac<sub>7</sub>-β-Mal) TKS-OH) , GP004-3 (Pal-KTT (Ac<sub>7</sub>-β-Mal) KS-OH) and GP004-4 (Pal-KTTKS (Ac<sub>7</sub>-β-Mal) -OH) 。

[0414] GP001-1 (Pal-KT (Ac<sub>4</sub>-β-Glc) TKS-OH) -材料:糖化肽 (β-Glc肽PerAc) ;分子量:132;外观:白色的冷冻干燥的固体;纯度(HPLC)>95% (图3A);质谱(ESI POS):符合[M+H]<sup>+</sup> = 1132.5和[M+2H]<sup>+</sup> = 567 (图3B)。

[0415] GP002-3 (Pal-KTTKS (Ac<sub>4</sub>-β-G1c) -OH) -材料:糖化肽 (β-G1c肽PerAc) ;分子量:1132;外观:白色的冷冻干燥的固体;纯度(HPLC)>99.6% (图4A);质谱(ESI POS):符合[M+H]=1132.5 (图4B)。

[0416] GP002-7 (Pal-KTTKS (Ac<sub>4</sub>-β-Gal) -OH) -材料:糖化肽 (β-G1c肽PerAc) ;分子量:1132;外观:白色的冷冻干燥的固体;纯度(HPLC)>100% (图5A);质谱(ESI POS):符合[M+H]=1132.4 (图5B)。

[0417] GP003-9 (Pal-KT (Ac<sub>7</sub>-β-Mal) TKS-OH) -材料:糖化肽 (β-麦芽糖肽PerAc) ;分子量:1420;外观:白色的冷冻干燥的固体;纯度(HPLC)>97% (图6A);质谱(ESI POS):符合[M+H]=1420.7 (图6B)。

[0418] GP004-3 (Pal-KTT (Ac<sub>7</sub>-β-Mal) KS-OH) -材料:糖化肽 (β-麦芽糖肽PerAc) ;分子量:1420;外观:白色的冷冻干燥的固体;纯度(HPLC)>95% (图7A);质谱(ESI POS):符合[M+H]=1420.8 (图7B)。

[0419] GP004-4 (Pal-KTTKS (Ac<sub>7</sub>-β-Mal) -OH) -材料:糖化肽 (β-麦芽糖肽PerAc) ;分子量:1420;外观:白色的冷冻干燥的固体;纯度(HPLC)>95% (图8A);质谱(ESI POS):符合[M+H]=1420.7 (图8B)。

[0420] 这6种糖基化的五肽经过与参照五肽Pal-KKTKS相比的体外毒性检验(细胞活力和形态学)。

[0421] 为了测定细胞的形态学和大小,按照之前所述,将5μM 6种示例性糖化肽施加给人类皮肤成纤维细胞(KMST-6)。参照五肽为Pal-KTTKS (CPC Scientific, 822197),并使用DMSO (Fisher, BP231-100) 处理对照样品细胞。形态学图像显示参照可见地干扰细胞活力,并且证明与对照和糖化肽处理的细胞相比,细胞融合度降低。尽管相比之下所检验的6种糖化肽均未显示任何形式的毒性,这可通过相差显微镜观察(图9)。重要的是,在5μM 浓度下所检验的所有糖化肽的90%均未显示任何形式的毒性,这可以通过MTT测试测量(数据未示出)。

[0422] 为了测定对细胞活力的作用(作为毒性的量度),按照之前所述,将5μM 6种示例性糖化肽施加给人类皮肤成纤维细胞(KMST-6)。参照五肽为Pal-KTTKS (CPC Scientific, 822197),并使用DMSO (Fisher, BP231-100) 处理对照样品细胞。如上文所述,将处理的细胞在37°C 和5% CO<sub>2</sub>下温育48小时(图10A) 和72小时(图10B)。在各时间点,通过向所有的孔中加入15μL染料溶液(Promega, G4102) 来实施MTT测试。使细胞温育2-4小时,在该过程中,活细胞将染料溶液的MTT四唑成分转变成甲瓒产物。然后将溶解/停止溶液(Promega, G4101) 加入至培养孔中,从而溶解甲瓒产物。使用微板读取器(Molecular Devices, SpectraMax M2e) 在570nm下测量吸光率。实施3个或多个独立的试验,并会用单因素ANOVA (p<0.05) 测定统计学意义。毒性定义为与对照相比低于50%的细胞活力。所检验的6种糖化肽中,仅一种在任一时间点下均显示出对细胞活力的作用(图10A和10B)。相比之下,非糖基化的参照五肽在48和72小时时,比对照显示出细胞活力现在降低(图10B)。重要的是,在5μM 浓度下所检验的所有糖化肽的90%均未显示任何形式的毒性,这可以通过MTT测试测量(数据未示出)。

[0423] 为了进一步标准和研究糖化肽的毒性概况,实施其他的试验来检验糖化肽GP003-9,GP004-3和GP004-4(数据未示出)。使用5μM 糖化肽、参照(Pal-KTTKS,CPC Scientific,

822197) 和对照 (DMSO, Fisher, BP231-100) 在48小时和72小时时处理人类皮肤成纤维细胞。实施以下毒性测定:1) 细胞活力 (CellTiter 96® AQueous One Solution (MTS) 比色法, Promega, G3580) 用于细胞代谢活性的测量;2) LIVE/DEAD® Viability/Cytotoxicity Kit (Molecular Probes, L-3224) 用于每个总细胞群中, 活细胞的测量;3) 通过测量以下方面来测量细胞的增殖:a) 细胞计数, 从而获得总的活细胞数量, 和b) DNA含量 (PureLink® Genomic DNA Mini Kit, Invitrogen, K182002) 用于定量具有完整的DNA的细胞;以及最后, 4) 凋亡/坏死 (Dead Cell Apoptosis Kit with Annexin V Alexa Fluor® 488&Propidium Iodide, Molecular Probes, V13241) 用于发生细胞死亡的细胞的测量。在所有所实施的其他的试验中, 3种糖化肽均为观察到毒性, 其中所述的糖化肽经过其他的体外毒性检验。

[0424] 为了证明对细胞外基质蛋白质分泌的作用。使用5 $\mu$ M 糖化肽 [GP001-1 (Pal-KT (Ac<sub>4</sub>-Glc) TKS-OH) , GP002-3 ((Pal-KTTKS (Ac<sub>4</sub>-Glc) -OH) , GP002-7 (Pal-KTTKS (Ac<sub>4</sub>-Gal) -OH) , GP003-9 (Pal-KT (Ac<sub>7</sub>- $\beta$ -Mal) TKS-OH) , GP004-3 (Pal-KTT (Ac<sub>7</sub>- $\beta$ -Mal) KS-OH) 和GP004-4 (Pal-KTTKS (Ac<sub>7</sub>- $\beta$ -Mal) -OH) ] , 参照 (Pal-KTTKS, CPC Scientific, 822197) 或空白对照 (DMSO, Fisher, BP231-100) 对人类皮肤成纤维细胞 (KMST-6) 处理72小时。实施3个或多个独立的试验。使用单因素ANOVA (p<0.05) 进行统计学意义的分析, 其中“\*”表示当与对照相比时的统计学意义, 而“#”表示与参照相比时的统计学意义。

[0425] 表6. ECM蛋白质总表

[0426]

化合物#	弹性蛋白	纤连蛋白	总的胶原蛋白
对照	100%	100%	100%
Reference	133	118	110
GP001-1	188	122	
GP002-3	322*#	135*	
GP002-7	207*	116	
GP003-9	284*#	140*	125*
GP004-3	385*#	168*#	131*#
GP004-4	186	183*#	124*

[0427] 与对照相比, 在弹性蛋白 (表6和图11A) 和纤连蛋白 (表6和图11B) 的分泌中, GP001-1, GP002-3, GP002-7, GP003-9, GP004-3和GP004-4均能诱导更高的生物学活性。但是与参照肽相比, 糖化肽GP002-3 (189%, p<0.0001) , GP003-9 (151%, p<0.0001) 和GP004-3 (252%, p<0.0001) 会显著地增加弹性蛋白的分泌, 而与对照相比, GP002-3 (222%, p<0.0001) , GP002-7 (107%, p<0.04) , GP003-9 (184%, p<0.0001) 和GP004-3 (285%, p<0.0001) 会显著地增加弹性蛋白的分泌。此外, GP004-3 (50%, p<0.02) 和GP004-4 (65%, p<0.0007) 会比参照显著地增加纤连蛋白的分泌, 而GP002-3 (35%, p<0.01) , GP003-9 (40%, p<0.0004) , GP004-3 (68%, p<0.0003) 和GP004-4 (83%, p<0.0001) 会比对照显著地增加纤连蛋白的分泌。最后, GP003-9, GP004-3和GP004-4是针对总的胶原蛋白进行检验的唯一的糖化肽, 结果显示它们均比对照显著地增加总的胶原蛋白的分泌, 分别为25% (p<0.004) , 31% (p<0.0008) 和24% (p<0.005) , 并且GP004-3 (21%, p<0.01) 比参照肽显著地增加总的胶原蛋白的分泌 (表6和图12) 。

[0428] MatTek's EpiDermFT™ (其为3D人类体皮肤模型 (其由正常的人类表皮角质细胞和

正常的人类皮肤成纤维细胞组成)用于进一步研究示例性的糖基化肽(GP003-9)对人类皮肤的作用。如上文所述,使用5 $\mu$ M GP003-9,参照(Pal-KTTKS,CPC Scientific,822197)或空白对照(DMSO,Fisher,BP231-100)处理组织。在处理后的72小时时,分离上清液,并针对弹性蛋白的分泌进行分析。图13示出与非糖基化的参照肽或对照相比,GP003-9将3D人类皮肤模型中弹性蛋白的分泌增加大约1.5倍。备选地,将使用5 $\mu$ M GP003-9,参照(Pal-KTTKS,CPC Scientific,822197)或孔板对照(DMSO,Fisher,BP231-100)处理的组织经石蜡包埋、切片、然后使用苏木精和伊红染色,用于组织学评估。图14显示GP003-9对3D人类皮肤模型的组织学不具有不利的作用。

[0429] 上述实施例的用意仅是示例性的。本领域的那些技术人员在不脱离所述的范围的条件下可以对特定的实施例进行改变、修改和变化,其中所述的范围仅由本文所附的权利要求书定义。

## 序列表.txt

<110> 苏塞克斯研究实验室

<120> 糖化肽组合物及其用途

<130> PAT 102612W-90

<150> 61/914, 309

<151> 2013-12-10

<160> 48

<170> PatentIn version 3.5

<210> 1

<211> 5

<212> PRT

<213> 智人

<400> 1

Lys Thr Thr Lys Ser

1 5

<210> 2

<211> 5

<212> PRT

<213> 智人

<220>

<221> MOD\_RES

<222> (1)..(1)

<223> 具有N-末端棕榈酰基

[0001]

<400> 2

Lys Thr Thr Lys Ser

1 5

<210> 3

<211> 6

<212> PRT

<213> 智人

<220>

<221> MISC\_FEATURE

<222> (1)..(1)

<223> 氨基酸存在或不存在；如果存在所述氨基酸为丝氨酸或天冬酰胺

<220>

<221> MOD\_RES

<222> (1)..(1)

<223> 如果所述氨基酸存在，它具有游离N-末端、N-末端棕榈酰基或N-末端乙酰基

<220>

<221> MOD\_RES

<222> (1)..(6)

<223> 所述氨基酸中的至少一者具有糖基化侧链；所述糖基化侧链独立地为：葡萄糖，N-乙酰基-氨基葡萄糖，半乳糖，N-乙酰基-半乳糖胺，甘露糖，麦芽糖，乳糖，鼠李糖，纤维二糖，木糖或海藻糖

<220>

<221> MOD\_RES

<222> (2)..(2)

<223> 如果位置1的氨基酸不存在，位置2的氨基酸具有游离N-末端、N-末端棕榈酰基或N-末端乙酰基

<220>

<221> MISC\_FEATURE

<222> (3)..(3)

<223> 所述氨基酸为苏氨酸，具有糖基化侧链的苏氨酸，具有糖基化侧链的天冬酰胺或具有糖基化侧链的丝氨酸

<220>  
 <221> MISC\_FEATURE  
 <222> (4)..(4)  
 <223> 所述氨基酸为苏氨酸或具有糖基化侧链的苏氨酸

<220>  
 <221> MISC\_FEATURE  
 <222> (6)..(6)  
 <223> 所述氨基酸为丝氨酸或具有糖基化侧链的丝氨酸

<400> 3

Xaa Lys Xaa Xaa Lys Xaa  
1 5

<210> 4  
 <211> 5  
 <212> PRT  
 <213> 智人

<220>  
 <221> MOD\_RES  
 <222> (1)..(1)  
 <223> 具有N-末端棕榈酰基

<220>  
 <221> CARBOHYD  
 <222> (2)..(2)  
 <223> 使用全乙酰化beta-葡萄糖来糖基化

<400> 4

Lys Thr Thr Lys Ser  
1 5

[0002]

<210> 5  
 <211> 5  
 <212> PRT  
 <213> 智人

<220>  
 <221> MOD\_RES  
 <222> (1)..(1)  
 <223> 具有N-末端棕榈酰基

<220>  
 <221> CARBOHYD  
 <222> (2)..(2)  
 <223> 使用全乙酰化alpha-甘露糖来糖基化

<400> 5

Lys Thr Thr Lys Ser  
1 5

<210> 6  
 <211> 5  
 <212> PRT  
 <213> 智人

<220>  
 <221> MOD\_RES  
 <222> (1)..(1)  
 <223> 具有N-末端棕榈酰基

<220>  
 <221> CARBOHYD  
 <222> (2)..(2)  
 <223> 使用全乙酰化beta-麦芽糖来糖基化

<400> 6

Lys Thr Thr Lys Ser  
1 5

<210> 7

<211> 5

<212> PRT

<213> 智人

<220>

<221> MOD\_RES

<222> (1)..(1)

<223> 具有N-末端棕榈酰基

<220>

<221> CARBOHYD

<222> (5)..(5)

<223> 使用全乙酰化beta-半乳糖来糖基化

<400> 7

Lys Thr Thr Lys Ser  
1 5

<210> 8

<211> 5

<212> PRT

<213> 智人

[0003]

<220>

<221> MOD\_RES

<222> (1)..(1)

<223> 具有N-末端棕榈酰基

<220>

<221> CARBOHYD

<222> (5)..(5)

<223> 使用全乙酰化beta-葡萄糖来糖基化

<400> 8

Lys Thr Thr Lys Ser  
1 5

<210> 9

<211> 5

<212> PRT

<213> 智人

<220>

<221> MOD\_RES

<222> (1)..(1)

<223> 具有N-末端棕榈酰基

<220>

<221> CARBOHYD

<222> (3)..(3)

<223> 使用全乙酰化beta-麦芽糖来糖基化

<400> 9

Lys Thr Thr Lys Ser  
1 5

<210> 10

<211> 5

<212> PRT  
<213> 智人

<220>  
<221> MOD\_RES  
<222> (1)..(1)  
<223> 具有N-末端棕榈酰基

<220>  
<221> CARBOHYD  
<222> (5)..(5)  
<223> 使用全乙酰化beta-麦芽糖来糖基化

<400> 10

Lys Thr Thr Lys Ser  
1 5

<210> 11  
<211> 4  
<212> PRT  
<213> 智人

<400> 11

Arg Ser Arg Lys  
1

<210> 12  
<211> 5  
<212> PRT  
<213> 智人

[0004]

<220>  
<221> MOD\_RES  
<222> (1)..(1)  
<223> 具有N-末端棕榈酰基

<220>  
<221> CARBOHYD  
<222> (2)..(2)  
<223> 使用beta-葡萄糖来糖基化

<400> 12

Lys Thr Thr Lys Ser  
1 5

<210> 13  
<211> 5  
<212> PRT  
<213> 智人

<220>  
<221> MOD\_RES  
<222> (1)..(1)  
<223> 具有N-末端棕榈酰基

<220>  
<221> CARBOHYD  
<222> (2)..(2)  
<223> 使用全乙酰化alpha-N-乙酰基半乳糖胺来糖基化

<400> 13

Lys Thr Thr Lys Ser  
1 5

<210> 14  
 <211> 5  
 <212> PRT  
 <213> 智人

<220>  
 <221> MOD\_RES  
 <222> (1)..(1)  
 <223> 具有N-末端棕榈酰基

<220>  
 <221> CARBOHYD  
 <222> (2)..(2)  
 <223> 使用alpha-N-乙酰基半乳糖胺来糖基化

<400> 14

Lys Thr Thr Lys Ser  
 1 5

<210> 15  
 <211> 5  
 <212> PRT  
 <213> 智人

<220>  
 <221> MOD\_RES  
 <222> (1)..(1)  
 <223> 具有N-末端棕榈酰基

<220>  
 <221> CARBOHYD  
 <222> (2)..(2)  
 <223> 使用全乙酰化beta-N-乙酰氨基葡萄糖来糖基化

[0005]

<400> 15

Lys Thr Thr Lys Ser  
 1 5

<210> 16  
 <211> 5  
 <212> PRT  
 <213> 智人

<220>  
 <221> MOD\_RES  
 <222> (1)..(1)  
 <223> 具有N-末端棕榈酰基

<220>  
 <221> CARBOHYD  
 <222> (2)..(2)  
 <223> 使用beta-N-乙酰氨基葡萄糖来糖基化

<400> 16

Lys Thr Thr Lys Ser  
 1 5

<210> 17  
 <211> 5  
 <212> PRT  
 <213> 智人

<220>  
 <221> MOD\_RES  
 <222> (1)..(1)

<223> 具有N-末端棕榈酰基

<220>

<221> CARBOHYD

<222> (3)..(3)

<223> 使用全乙酰化beta-葡萄糖来糖基化

<400> 17

Lys Thr Thr Lys Ser  
1 5

<210> 18

<211> 5

<212> PRT

<213> 智人

<220>

<221> MOD\_RES

<222> (1)..(1)

<223> 具有N-末端棕榈酰基

<220>

<221> CARBOHYD

<222> (3)..(3)

<223> 使用beta-葡萄糖来糖基化

<400> 18

Lys Thr Thr Lys Ser  
1 5

<210> 19

<211> 5

<212> PRT

<213> 智人

<220>

<221> MOD\_RES

<222> (1)..(1)

<223> 具有N-末端棕榈酰基

<220>

<221> CARBOHYD

<222> (3)..(3)

<223> 使用全乙酰化alpha-N-乙酰基半乳糖胺来糖基化

<400> 19

Lys Thr Thr Lys Ser  
1 5

<210> 20

<211> 5

<212> PRT

<213> 智人

<220>

<221> MOD\_RES

<222> (1)..(1)

<223> 具有N-末端棕榈酰基

<220>

<221> CARBOHYD

<222> (3)..(3)

<223> 使用全乙酰化alpha-N-乙酰基半乳糖胺来糖基化

<400> 20

Lys Thr Thr Lys Ser  
1 5

<210> 21  
<211> 5  
<212> PRT  
<213> 智人

<220>  
<221> MOD\_RES  
<222> (1)..(1)  
<223> 具有N-末端棕榈酰基  
  
<220>  
<221> CARBOHYD  
<222> (3)..(3)  
<223> 使用全乙酰化beta-N-乙酰基葡萄糖胺来糖基化  
  
<400> 21

Lys Thr Thr Lys Ser  
1 5

<210> 22  
<211> 5  
<212> PRT  
<213> 智人

<220>  
<221> MOD\_RES  
<222> (1)..(1)  
<223> 具有N-末端棕榈酰基

[0007]

<220>  
<221> CARBOHYD  
<222> (3)..(3)  
<223> 使用beta-N-乙酰氨基葡萄糖来糖基化  
  
<400> 22

Lys Thr Thr Lys Ser  
1 5

<210> 23  
<211> 5  
<212> PRT  
<213> 智人

<220>  
<221> MOD\_RES  
<222> (1)..(1)  
<223> 具有N-末端棕榈酰基

<220>  
<221> CARBOHYD  
<222> (2)..(2)  
<223> 使用全乙酰化alpha-N-乙酰基半乳糖胺来糖基化

<220>  
<221> CARBOHYD  
<222> (3)..(3)  
<223> 使用全乙酰化alpha-N-乙酰基半乳糖胺来糖基化

<400> 23

Lys Thr Thr Lys Ser  
1 5

<210> 24  
 <211> 5  
 <212> PRT  
 <213> 智人

<220>  
 <221> MOD\_RES  
 <222> (1)..(1)  
 <223> 具有N-末端棕榈酰基

<220>  
 <221> CARBOHYD  
 <222> (2)..(2)  
 <223> 使用alpha-N-乙酰基半乳糖胺来糖基化

<220>  
 <221> CARBOHYD  
 <222> (3)..(3)  
 <223> 使用alpha-N-乙酰基半乳糖胺来糖基化

<400> 24

Lys Thr Thr Lys Ser  
 1 5

<210> 25  
 <211> 5  
 <212> PRT  
 <213> 智人

<220>  
 <221> MOD\_RES  
 <222> (1)..(1)  
 <223> 具有N-末端棕榈酰基

[0008]

<220>  
 <221> CARBOHYD  
 <222> (5)..(5)  
 <223> 使用全乙酰化alpha-N-乙酰基半乳糖胺来糖基化

<400> 25

Lys Thr Thr Lys Ser  
 1 5

<210> 26  
 <211> 5  
 <212> PRT  
 <213> 智人

<220>  
 <221> MOD\_RES  
 <222> (1)..(1)  
 <223> 具有N-末端棕榈酰基

<220>  
 <221> CARBOHYD  
 <222> (5)..(5)  
 <223> 使用alpha-N-乙酰基半乳糖胺来糖基化

<400> 26

Lys Thr Thr Lys Ser  
 1 5

<210> 27  
 <211> 5  
 <212> PRT  
 <213> 智人

<220>  
 <221> MOD\_RES  
 <222> (1)..(1)  
 <223> 具有N-末端棕榈酰基

<220>  
 <221> CARBOHYD  
 <222> (5)..(5)  
 <223> 使用beta-葡萄糖来糖基化

<400> 27

Lys Thr Thr Lys Ser  
1 5

<210> 28  
 <211> 5  
 <212> PRT  
 <213> 智人

<220>  
 <221> MOD\_RES  
 <222> (1)..(1)  
 <223> 具有N-末端棕榈酰基

<220>  
 <221> CARBOHYD  
 <222> (5)..(5)  
 <223> 使用全乙酰化beta-N-乙酰基葡萄糖胺来糖基化

<400> 28

Lys Thr Thr Lys Ser  
1 5

[0009]

<210> 29  
 <211> 5  
 <212> PRT  
 <213> 智人

<220>  
 <221> MOD\_RES  
 <222> (1)..(1)  
 <223> 具有N-末端棕榈酰基

<220>  
 <221> CARBOHYD  
 <222> (5)..(5)  
 <223> 使用beta-N-乙酰基葡萄糖胺来糖基化

<400> 29

Lys Thr Thr Lys Ser  
1 5

<210> 30  
 <211> 5  
 <212> PRT  
 <213> 智人

<220>  
 <221> MOD\_RES  
 <222> (1)..(1)  
 <223> 具有N-末端棕榈酰基

<220>  
 <221> CARBOHYD

<222> (5)..(5)  
 <223> 使用beta-半乳糖来糖基化

<400> 30

Lys Thr Thr Lys Ser  
 1 5

<210> 31  
 <211> 5  
 <212> PRT  
 <213> 智人

<220>  
 <221> MOD\_RES  
 <222> (1)..(1)  
 <223> 具有N-末端棕榈酰基

<220>  
 <221> CARBOHYD  
 <222> (2)..(2)  
 <223> 使用alpha-甘露糖来糖基化

<400> 31

Lys Thr Thr Lys Ser  
 1 5

<210> 32  
 <211> 5  
 <212> PRT  
 <213> 智人

[0010]

<220>  
 <221> MOD\_RES  
 <222> (1)..(1)  
 <223> 具有N-末端棕榈酰基

<220>  
 <221> CARBOHYD  
 <222> (2)..(2)  
 <223> 使用全乙酰化beta-葡萄糖来糖基化

<400> 32

Lys Ser Thr Lys Ser  
 1 5

<210> 33  
 <211> 5  
 <212> PRT  
 <213> 智人

<220>  
 <221> MOD\_RES  
 <222> (1)..(1)  
 <223> 具有N-末端棕榈酰基

<220>  
 <221> CARBOHYD  
 <222> (2)..(2)  
 <223> 使用beta-葡萄糖来糖基化

<400> 33

Lys Ser Thr Lys Ser  
 1 5

<210> 34  
<211> 5  
<212> PRT  
<213> 智人

<220>  
<221> MOD\_RES  
<222> (1)..(1)  
<223> 具有N-末端棕榈酰基

<220>  
<221> CARBOHYD  
<222> (2)..(2)  
<223> 使用全乙酰化beta-葡萄糖来糖基化

<400> 34

Lys Asn Thr Lys Ser  
1 5

<210> 35  
<211> 5  
<212> PRT  
<213> 智人

<220>  
<221> MOD\_RES  
<222> (1)..(1)  
<223> 具有N-末端棕榈酰基

<220>  
<221> CARBOHYD  
<222> (2)..(2)  
<223> 使用beta-葡萄糖来糖基化

[0011]

<400> 35

Lys Asn Thr Lys Ser  
1 5

<210> 36  
<211> 6  
<212> PRT  
<213> 智人

<220>  
<221> MOD\_RES  
<222> (1)..(1)  
<223> 具有N-末端棕榈酰基

<220>  
<221> CARBOHYD  
<222> (1)..(1)  
<223> 使用全乙酰化beta-葡萄糖来糖基化

<400> 36

Asn Lys Thr Thr Lys Ser  
1 5

<210> 37  
<211> 6  
<212> PRT  
<213> 智人

<220>  
<221> MOD\_RES  
<222> (1)..(1)

<223> 具有N-末端棕榈酰基

<220>

<221> CARBOHYD

<222> (1)..(1)

<223> 使用beta-葡萄糖来糖基化

<400> 37

Asn Lys Thr Thr Lys Ser  
1 5

<210> 38

<211> 5

<212> PRT

<213> 智人

<220>

<221> MOD\_RES

<222> (1)..(1)

<223> 具有N-末端棕榈酰基

<220>

<221> CARBOHYD

<222> (2)..(2)

<223> 使用beta-麦芽糖来糖基化

<400> 38

Lys Thr Thr Lys Ser  
1 5

<210> 39

<211> 5

<212> PRT

<213> 智人

<220>

<221> MOD\_RES

<222> (1)..(1)

<223> 具有N-末端棕榈酰基

<220>

<221> CARBOHYD

<222> (2)..(2)

<223> 使用全乙酰化beta-半乳糖来糖基化

<400> 39

Lys Thr Thr Lys Ser  
1 5

<210> 40

<211> 5

<212> PRT

<213> 智人

<220>

<221> MOD\_RES

<222> (1)..(1)

<223> 具有N-末端棕榈酰基

<220>

<221> CARBOHYD

<222> (3)..(3)

<223> 使用全乙酰化beta-半乳糖来糖基化

<400> 40

Lys Thr Thr Lys Ser  
1 5

<210> 41  
<211> 5  
<212> PRT  
<213> 智人

<220>  
<221> MOD\_RES  
<222> (1)..(1)  
<223> 具有N-末端棕榈酰基  
  
<220>  
<221> CARBOHYD  
<222> (2)..(2)  
<223> 使用全乙酰化beta-乳糖来糖基化  
  
<400> 41

Lys Thr Thr Lys Ser  
1 5

<210> 42  
<211> 5  
<212> PRT  
<213> 智人

<220>  
<221> MOD\_RES  
<222> (1)..(1)  
<223> 具有N-末端棕榈酰基

[0013]

<220>  
<221> CARBOHYD  
<222> (5)..(5)  
<223> 使用全乙酰化beta-乳糖来糖基化  
  
<400> 42

Lys Thr Thr Lys Ser  
1 5

<210> 43  
<211> 5  
<212> PRT  
<213> 智人

<220>  
<221> MOD\_RES  
<222> (1)..(1)  
<223> 具有N-末端棕榈酰基

<220>  
<221> CARBOHYD  
<222> (2)..(2)  
<223> 使用全乙酰化alpha-鼠李糖来糖基化

<400> 43

Lys Thr Thr Lys Ser  
1 5

<210> 44  
<211> 5  
<212> PRT  
<213> 智人

<220>  
 <221> MOD\_RES  
 <222> (1)..(1)  
 <223> 具有N-末端棕榈酰基

<220>  
 <221> CARBOHYD  
 <222> (5)..(5)  
 <223> 使用全乙酰化alpha-鼠李糖来糖基化

<400> 44

Lys Thr Thr Lys Ser  
1 5

<210> 45  
 <211> 5  
 <212> PRT  
 <213> 智人

<220>  
 <221> MOD\_RES  
 <222> (1)..(1)  
 <223> 具有N-末端棕榈酰基

<220>  
 <221> CARBOHYD  
 <222> (2)..(2)  
 <223> 使用全乙酰化beta-纤维二糖来糖基化

<400> 45

Lys Thr Thr Lys Ser  
1 5

[0014]

<210> 46  
 <211> 5  
 <212> PRT  
 <213> 智人

<220>  
 <221> MOD\_RES  
 <222> (1)..(1)  
 <223> 具有N-末端棕榈酰基

<220>  
 <221> CARBOHYD  
 <222> (5)..(5)  
 <223> 使用全乙酰化beta-纤维二糖来糖基化

<400> 46

Lys Thr Thr Lys Ser  
1 5

<210> 47  
 <211> 5  
 <212> PRT  
 <213> 智人

<220>  
 <221> MOD\_RES  
 <222> (1)..(1)  
 <223> 具有N-末端棕榈酰基

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

<223> 使用全乙酰化beta-木糖来糖基化

<400> 47

Lys Thr Thr Lys Ser  
1 5

<210> 48

<211> 5

<212> PRT

<213> 智人

[0015]

<220>

<221> MOD\_RES

<222> (1)..(1)

<223> 具有N-末端棕榈酰基

<220>

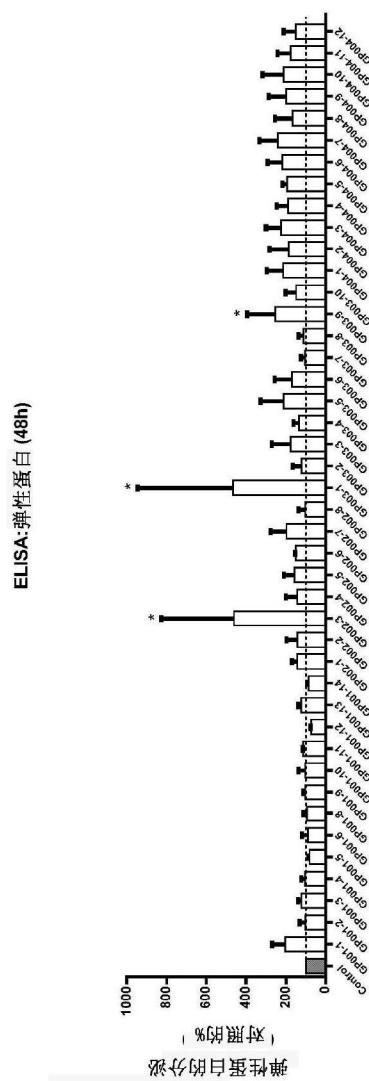
<221> CARBOHYD

<222> (5)..(5)

<223> 使用全乙酰化beta-海藻糖来糖基化

<400> 48

Lys Thr Thr Lys Ser  
1 5



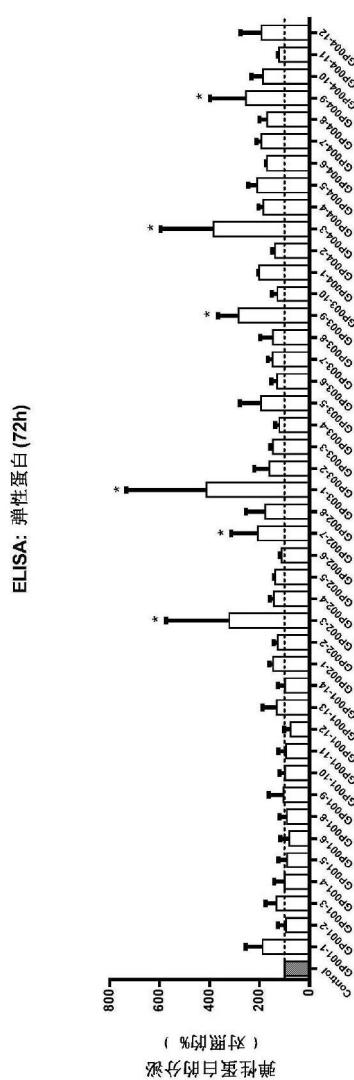


图1B

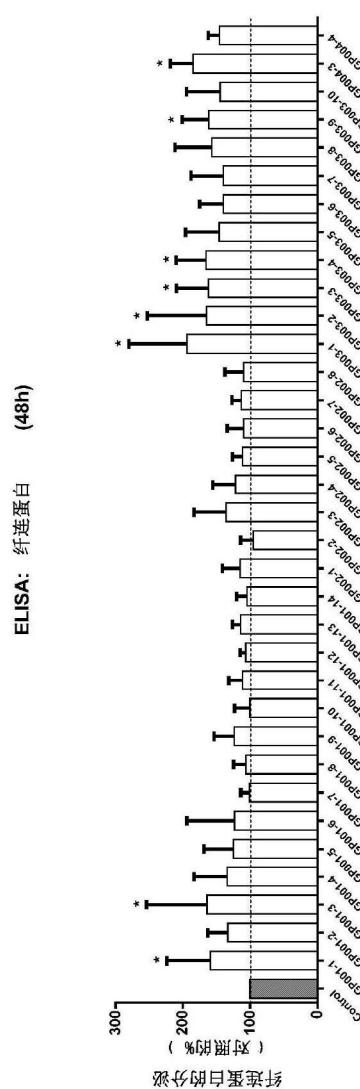


图2A

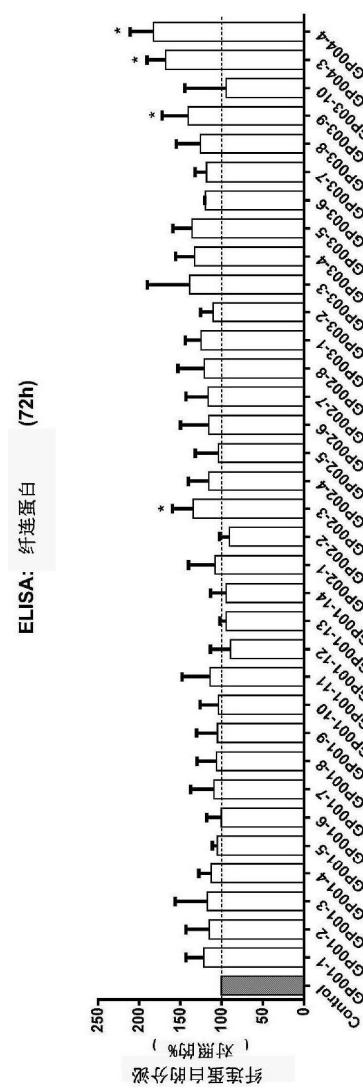


图2B

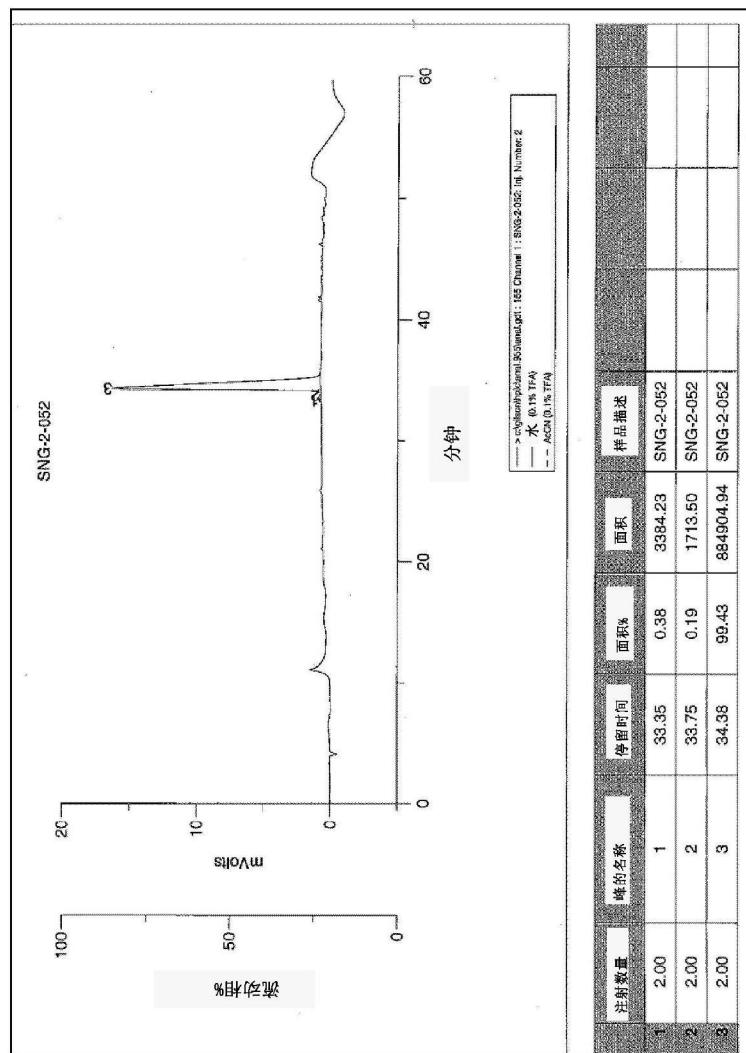


图3A

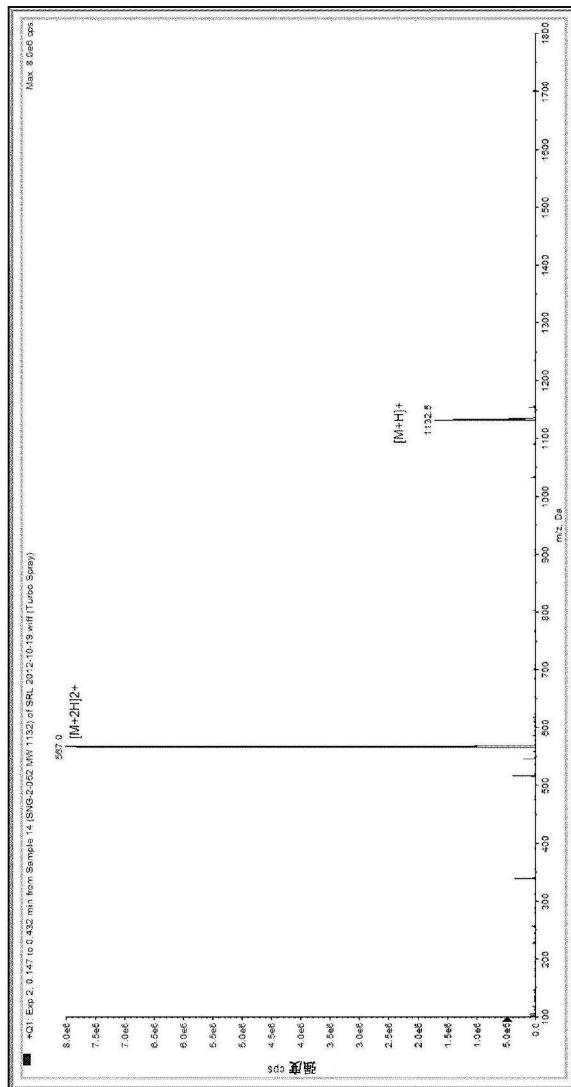
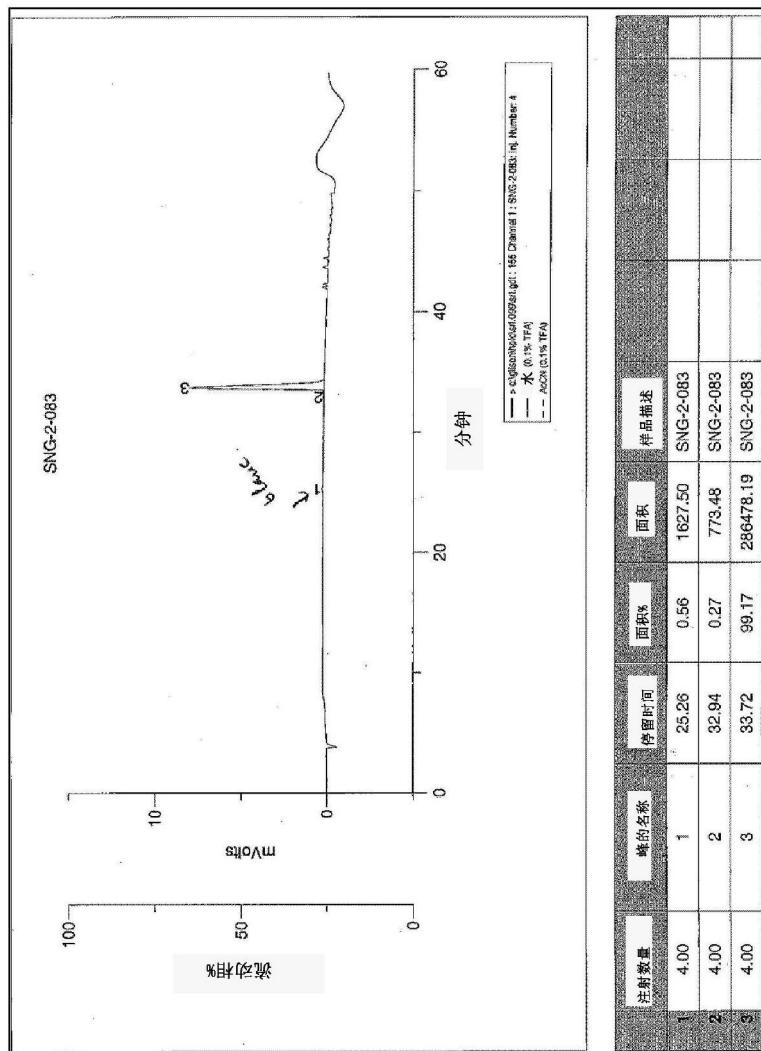


图3B



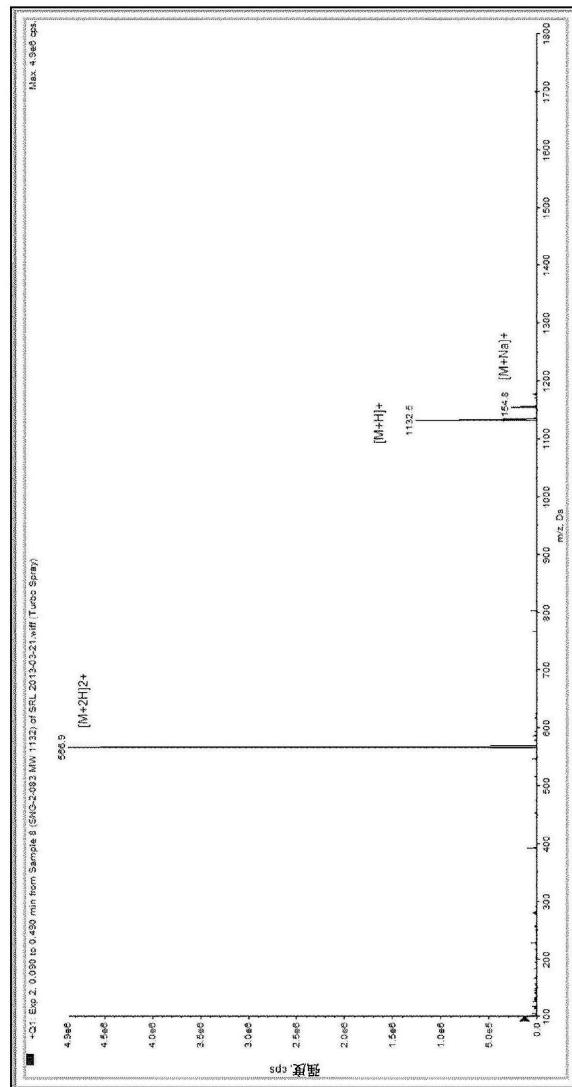


图4B

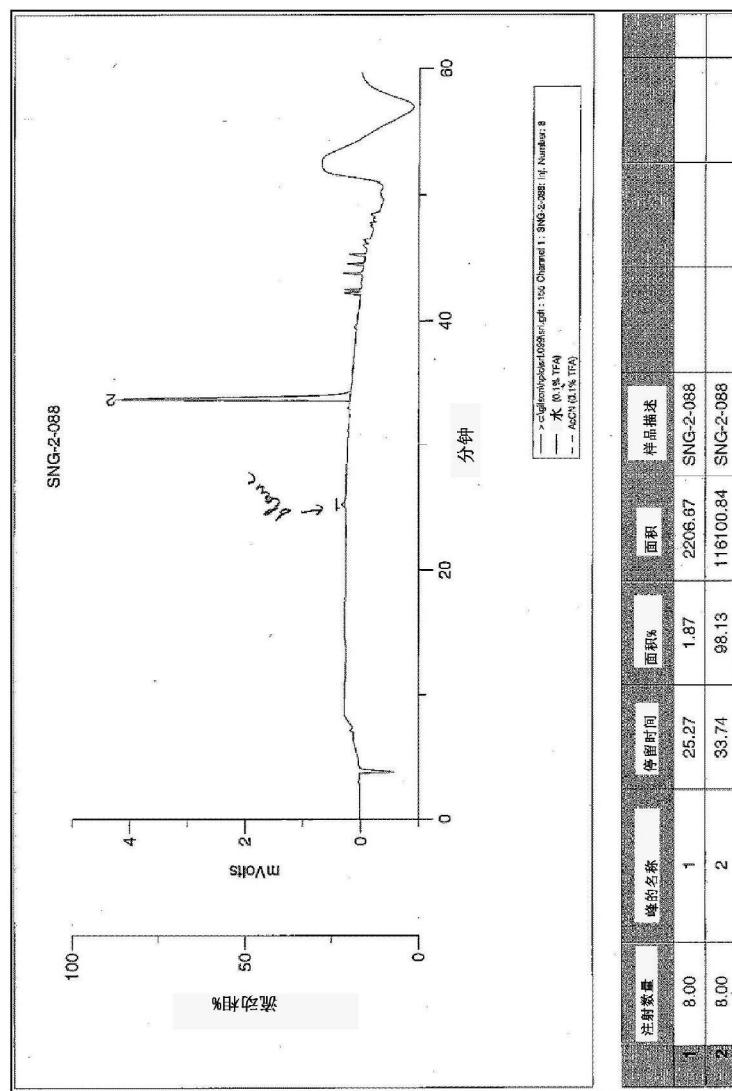


图5A

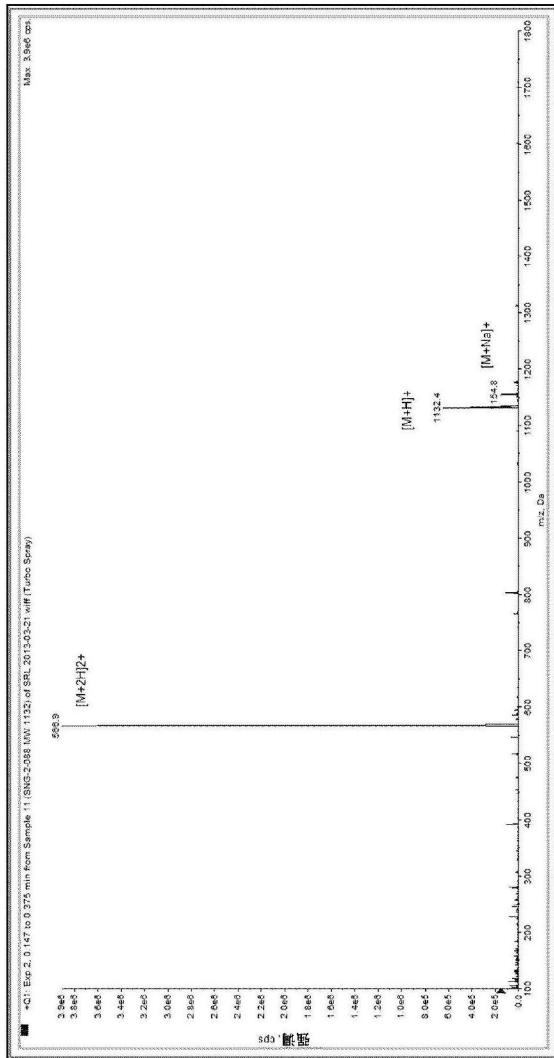


图5B

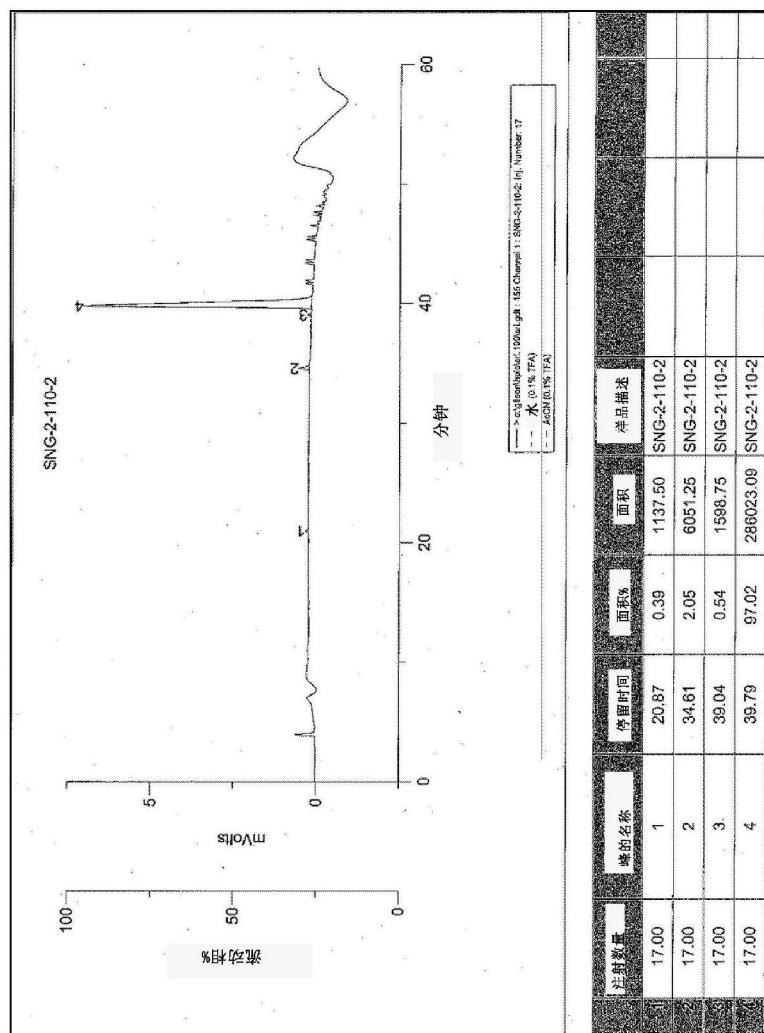


图6A

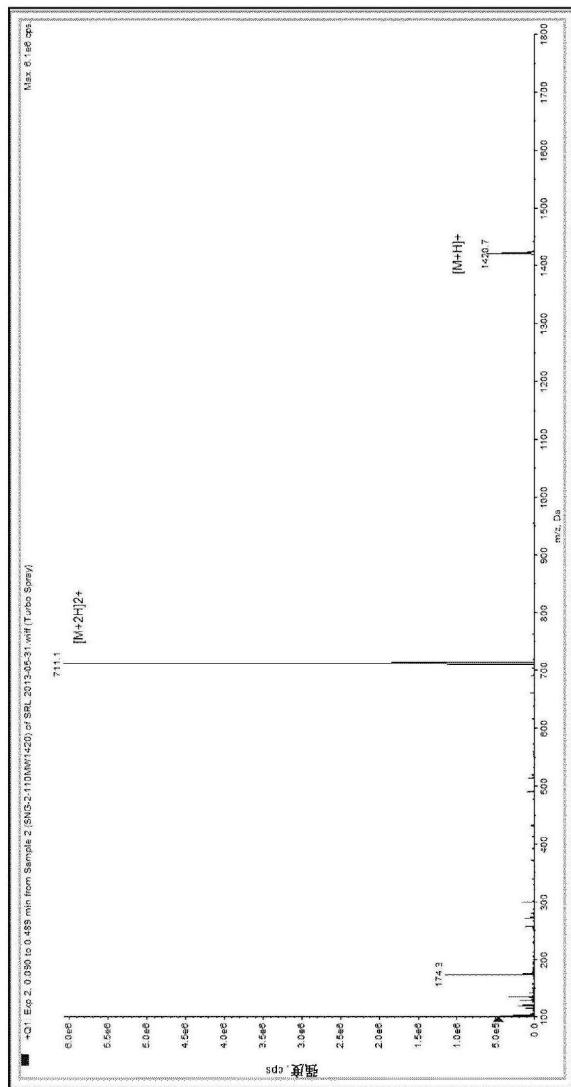


图6B

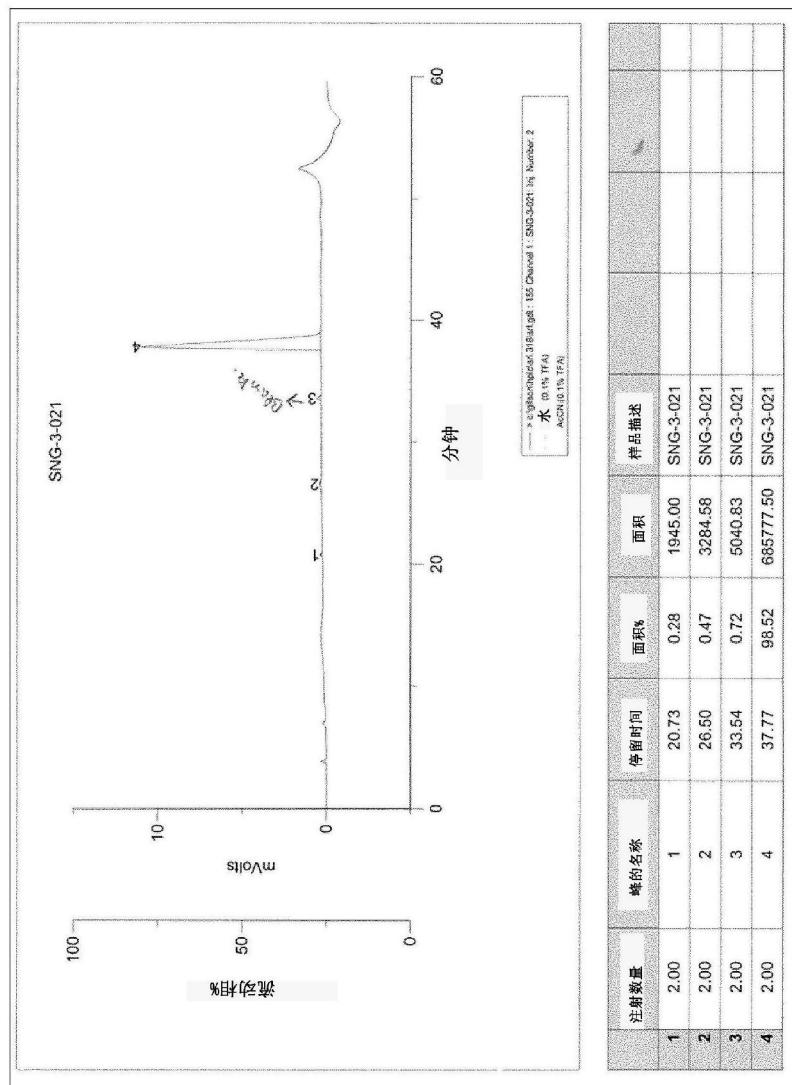


图7A

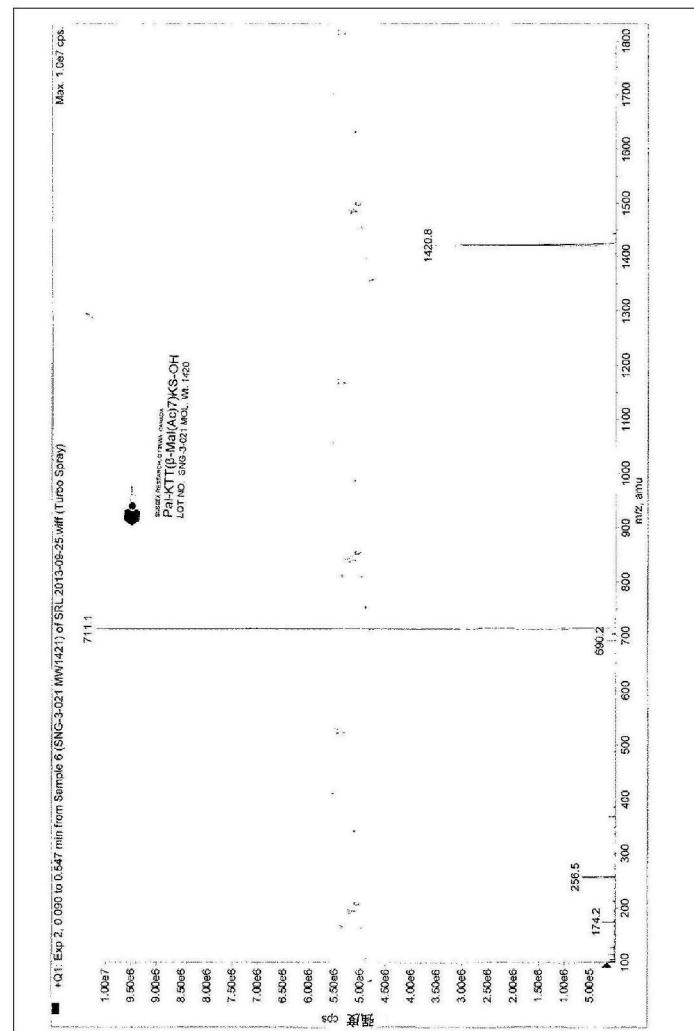


图 7B

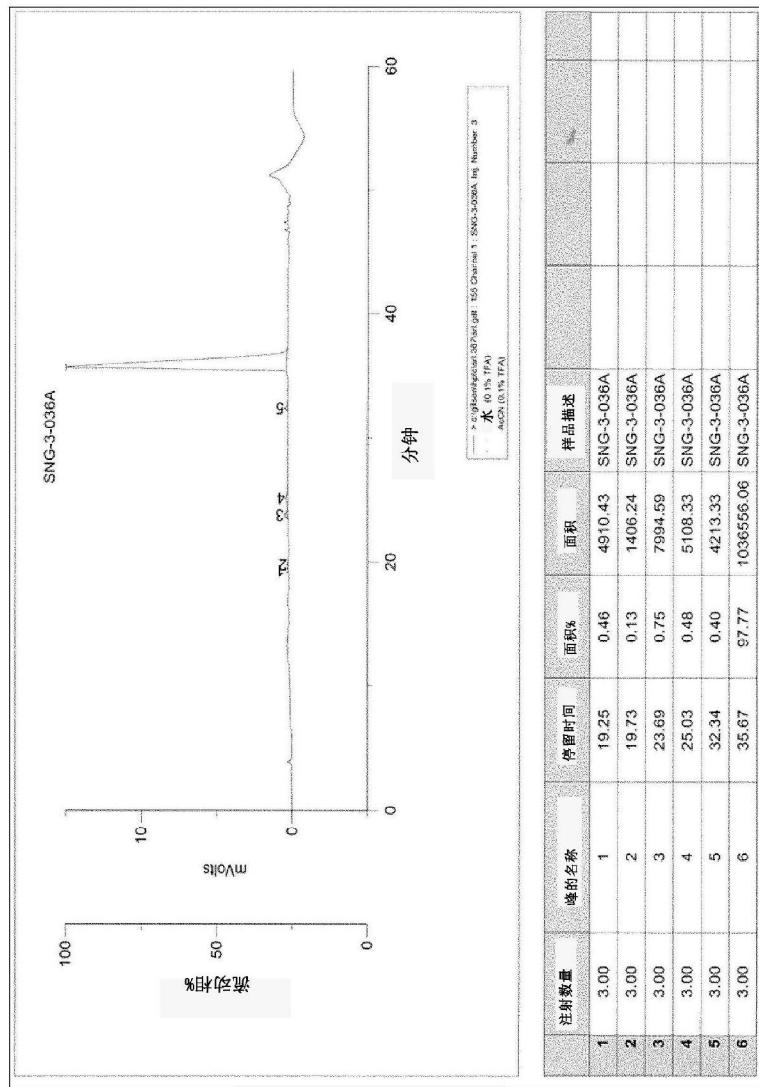


图8A

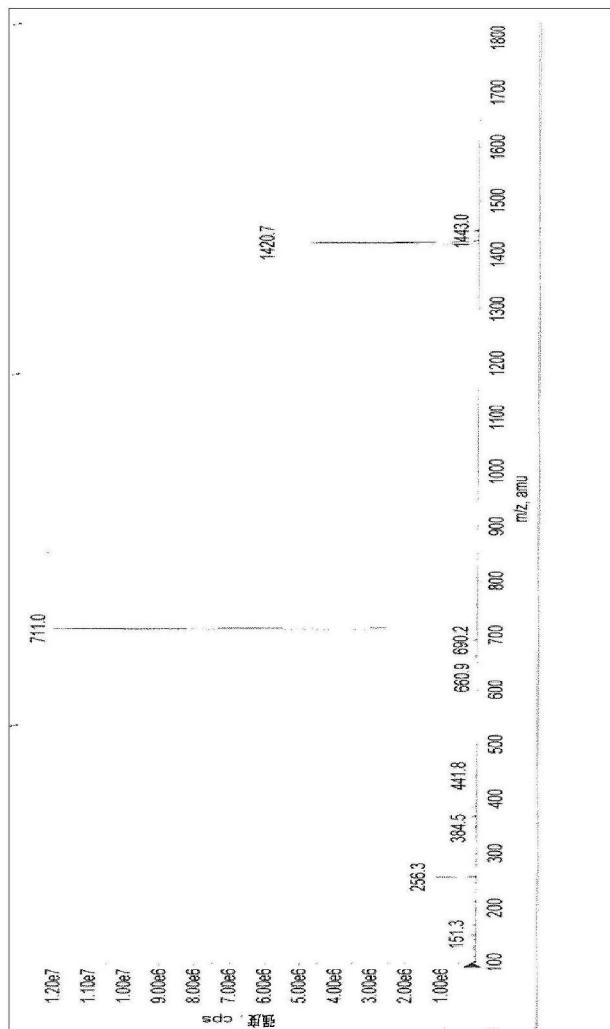


图8B

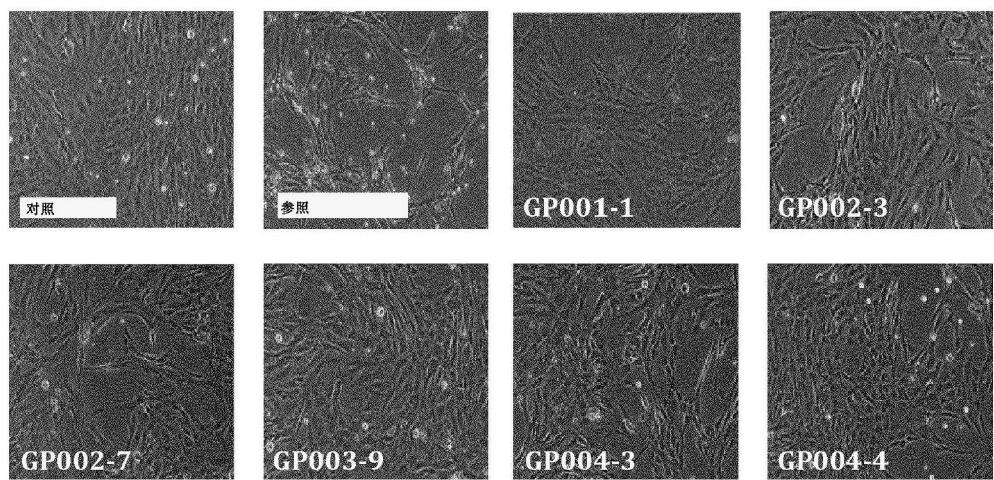


图9

细胞活力 - KMST (48h)

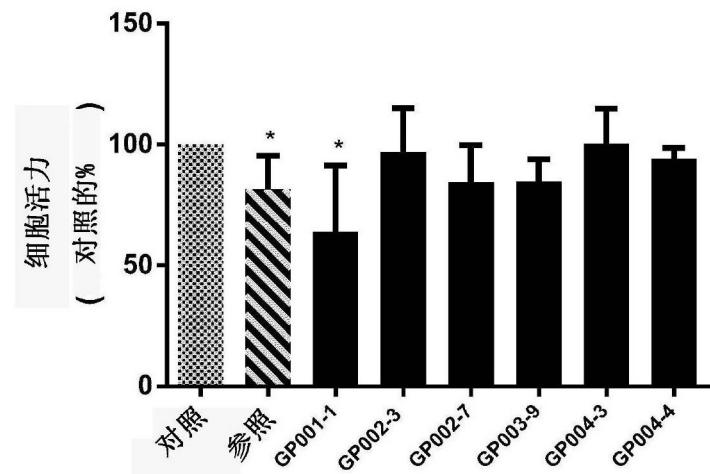


图10A

细胞活力 - KMST (72h)

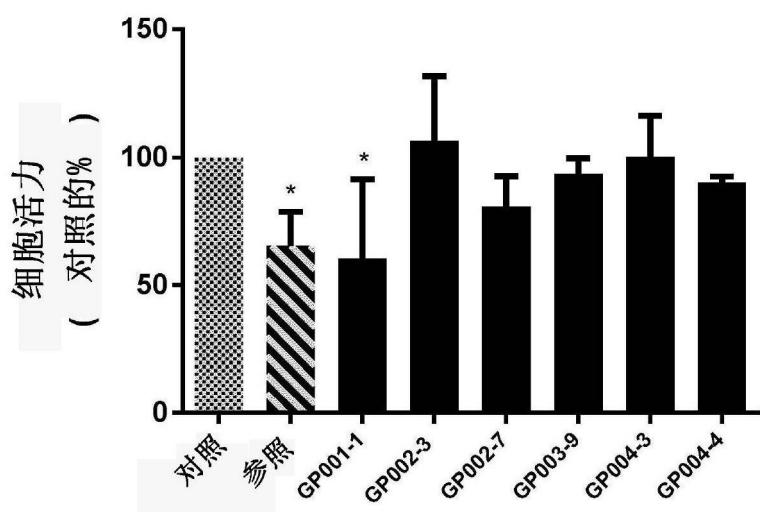


图10B

ELISA: 弹性蛋白 (72h)

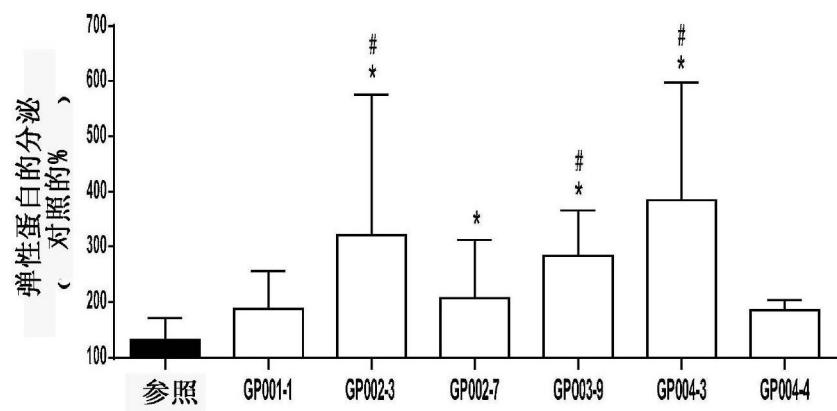


图11A

ELISA: 纤连蛋白 (72h)

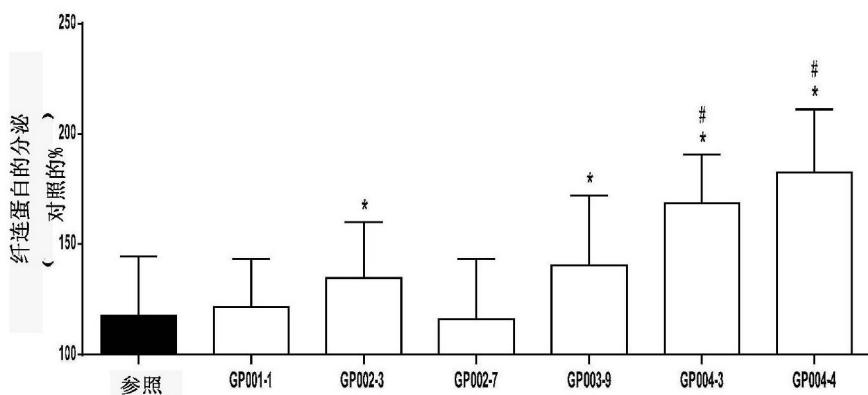


图11B

## 总的胶原蛋白(72h)

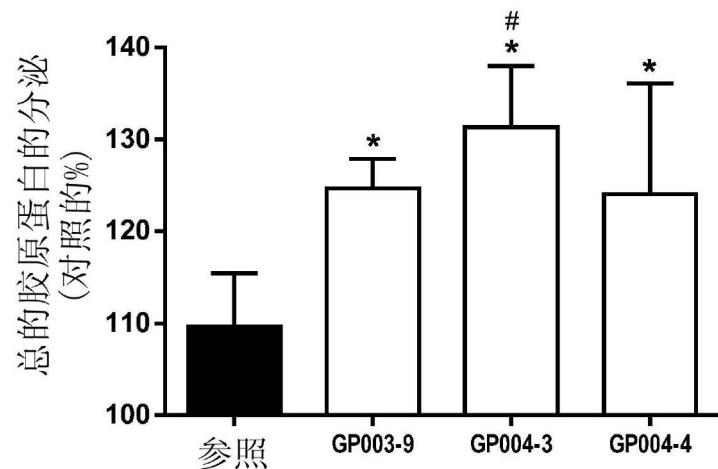


图12

**ELISA: 弹性蛋白  
3D皮肤模型**

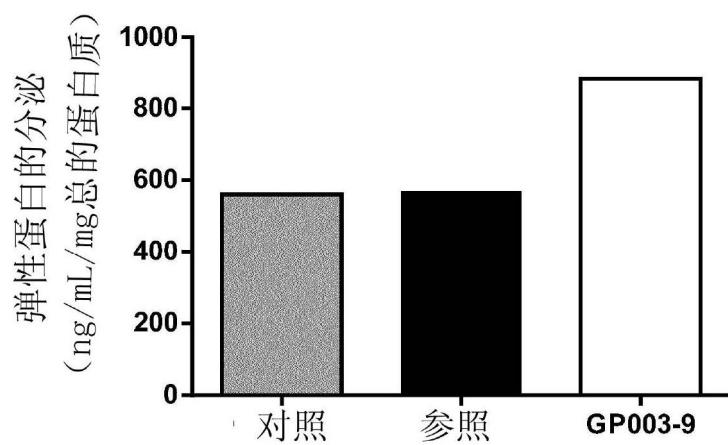


图13

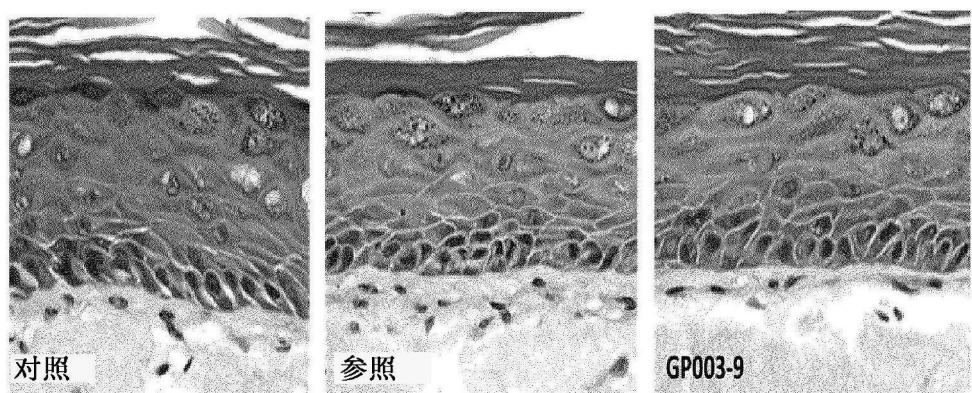


图14