



(12) 发明专利申请

(10) 申请公布号 CN 116284241 A

(43) 申请公布日 2023. 06. 23

(21) 申请号 202310428893.9

(22) 申请日 2023.04.20

(71) 申请人 深圳市维琪科技股份有限公司

地址 518000 广东省深圳市南山区桃源街
道长源社区学苑大道1001号南山智园
D3栋2401

(72) 发明人 丁文锋 肖玉 赵文豪 孙新林
观富宜 陈雪 彭晏

(51) Int. Cl.

C07K 7/06 (2006.01)

A61K 38/08 (2019.01)

A61P 17/00 (2006.01)

A61P 17/18 (2006.01)

A61P 17/16 (2006.01)

权利要求书4页 说明书22页 附图6页

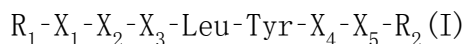
(54) 发明名称

新的肽及其组合物和用途

(57) 摘要

本发明提供一种具有式 (I) $R_1-X_1-X_2-X_3-$
 $Leu-Tyr-X_4-X_5-R_2$ 的肽、或其立体异构体、或其立
体异构体的混合物、或其盐、或它们的组合物、以
及它们在制备用于抗老化或光老化、抗衰修护、
舒缓、保湿的组合物中的用途。

1. 式(I)所示的肽、或其立体异构体、或其立体异构体的混合物、或其盐,



式(I)中,

X_1 选自: -Gly-、-Lys-或键;

X_2 选自: -Nle-、-Val-、-Leu-或-Ile-;

X_3 选自: -Lys-、-Arg-或-His-;

X_4 选自: -Gly-或键;

X_5 选自: -Ser-或键;

R_1 选自: H或 R_3-CO- , 其中 R_3 选自: 取代的或未取代的烷基、取代的或未取代的烯基;

R_2 选自: $-NR_4R_5$ 或 $-OR_4$, 其中各个 R_4 和 R_5 彼此独立地选自: H、取代的或未取代的烷基、取代的或未取代的烯基;

所述烷基是指具有1-24个碳原子(可选具有1-16个碳原子;可选具有1-14个碳原子;可选具有1-12个碳原子;可选具有1、2、3、4、5、或6个的碳原子)的饱和脂肪族直链或支链的烷基;可选选自: 甲基、乙基、异丙基、异丁基、叔丁基、戊基、己基、庚基、辛基、癸基、十二烷基、十四烷基、十六烷基、十八烷基、2-乙基己基、2-甲基丁基、或5-甲基己基;

所述烯基是指具有2-24个碳原子(可选具有2-16个碳原子;可选具有2-14个碳原子;可选具有2-12个碳原子;可选具有2、3、4、5、或6个碳原子)的直链或支链烯基;所述烯基具有一个或多个碳-碳双键,可选具有1、2或3个共轭或非共轭的碳-碳双键;所述烯基是通过一个单键而结合至分子的其余部分;可选选自: 乙烯基、油烯基、或亚油烯基;

可选地,所述“取代的烷基”、“取代的烯基”中的取代基选自 C_1-C_4 烷基;羟基; C_1-C_4 烷氧基;氨基; C_1-C_4 氨基烷基; C_1-C_4 羰氧基; C_1-C_4 氧基羰基;卤素(如氟、氯、溴、以及碘);氰基;硝基;叠氮化物; C_1-C_4 烷基磺酰基;硫醇; C_1-C_4 烷硫基; C_6-C_{30} 芳氧基如苯氧基; $-NR_b(C=NR_b)NR_bR_c$, 其中 R_b 和 R_c 是独立地选自: H、 C_1-C_4 烷基、 C_2-C_4 烯基、 C_2-C_4 炔基、 C_3-C_{10} 环烷基、 C_6-C_{18} 芳基、 C_7-C_{17} 芳烷基、具有三至十元的杂环基、或氨基的保护基。

2. 根据权利要求1所述的式(I)所示的肽、或其立体异构体、或其立体异构体的混合物、或其盐,其特征在于, R_1 选自: H、乙酰基、叔-丁酰基、己酰基、2-甲基己酰基、辛酰基、癸酰基、月桂酰基、肉豆蔻酰基、棕榈酰基、硬脂酰基、油酰基或亚油酰基; R_4 、 R_5 彼此独立地选自: H、甲基、乙基、己基、十二烷基或十六烷基;

可选地, R_1 选自H、乙酰基、月桂酰基、肉豆蔻酰基或棕榈酰基; R_4 是H并且 R_5 选自: H、甲基、乙基、己基、十二烷基或十六烷基;

可选地, R_1 是H、乙酰基或棕榈酰基; R_2 是-OH或-NH₂。

3. 根据权利要求1所述的式(I)所示的肽、或其立体异构体、或其立体异构体的混合物、或其盐,其特征在于,选自下列肽(1)-(40):

(1) H-Gly-Nle-Lys-Leu-Tyr-OH;

(2) Ac-Gly-Nle-Lys-Leu-Tyr-NH₂;

(3) Palm-Gly-Nle-Lys-Leu-Tyr-OH;

(4) Palm-Gly-Nle-Lys-Leu-Tyr-NH₂; (5) H-Val-Lys-Leu-Tyr-Gly-Ser-OH;

(6) H-Val-Lys-Leu-Tyr-Gly-Ser-NH₂; (7) Ac-Val-Lys-Leu-Tyr-Gly-Ser-NH₂; (8) Palm-Val-Lys-Leu-Tyr-Gly-Ser-OH; (9) Palm-Val-Lys-Leu-Tyr-Gly-Ser-NH₂; (10) H-

Lys-Val-Lys-Leu-Tyr-OH;

(11) H-Lys-Val-Lys-Leu-Tyr-NH₂;

(12) Ac-Lys-Val-Lys-Leu-Tyr-NH₂;

(13) Palm-Lys-Val-Lys-Leu-Tyr-NH₂; (14) Palm-Lys-Val-Lys-Leu-Tyr-OH; (15) H-Gly-Nle-Arg-Leu-Tyr-OH;

(16) H-Gly-Nle-Arg-Leu-Tyr-NH₂;

(17) Ac-Gly-Nle-Arg-Leu-Tyr-OH;

(18) Ac-Gly-Nle-Arg-Leu-Tyr-NH₂;

(19) Palm-Gly-Nle-Arg-Leu-Tyr-OH; (20) Palm-Gly-Nle-Arg-Leu-Tyr-NH₂; (21) H-Lys-Leu-Lys-Leu-Tyr-OH;

(22) Ac-Lys-Leu-Lys-Leu-Tyr-NH₂;

(23) Ac-Gly-Ile-Lys-Leu-Tyr-NH₂;

(24) H-Gly-Leu-Arg-Leu-Tyr-Ser-OH; (25) H-Gly-Val-Lys-Leu-Tyr-NH₂;

(26) Palm-Gly-Val-His-Leu-Tyr-NH₂; (27) Ac-Gly-Nle-Arg-Leu-Tyr-Gly-OH; (28) H-Nle-Lys-Leu-Tyr-Gly-OH;

(29) Ac-Ile-Lys-Leu-Tyr-Gly-Ser-NH₂; (30) H-Lys-Nle-Arg-Leu-Tyr-OH;

(31) H-Ile-Lys-Leu-Tyr-Ser-NH₂;

(32) Ac-Gly-Nle-Lys-Leu-Tyr-OH;

(33) Palm-Gly-Leu-Lys-Leu-Tyr-NH₂;

(34) H-Gly-Leu-Lys-Leu-Tyr-Gly-OH;

(35) Ac-Ile-Lys-Leu-Tyr-Gly-NH₂;

(36) H-Ile-Arg-Leu-Tyr-Gly-Ser-OH;

(37) H-Val-His-Leu-Tyr-Gly-NH₂;

(38) Ac-Val-His-Leu-Tyr-Gly-Ser-OH;

(39) Palm-Gly-Leu-Arg-Leu-Tyr-Gly-NH₂;

(40) H-Gly-Leu-Arg-Leu-Tyr-Ser-OH。

4. 根据权利要求3所述的式(I)所示的肽、或其立体异构体、或其立体异构体的混合物、或其盐,其特征在于,选自下列肽(3)、肽(4)、肽(8)、肽(9)、肽(13)、肽(14)、肽(19)和肽(20),具体地,

(3) Palm-Gly-Nle-Lys-Leu-Tyr-OH;

(4) Palm-Gly-Nle-Lys-Leu-Tyr-NH₂;

(8) Palm-Val-Lys-Leu-Tyr-Gly-Ser-OH;

(9) Palm-Val-Lys-Leu-Tyr-Gly-Ser-NH₂;

(13) Palm-Lys-Val-Lys-Leu-Tyr-NH₂;

(14) Palm-Lys-Val-Lys-Leu-Tyr-OH;

(19) Palm-Gly-Nle-Arg-Leu-Tyr-OH;

(20) Palm-Gly-Nle-Arg-Leu-Tyr-NH₂。

5. 根据权利要求1-4任一项所述的式(I)所示的肽、或其立体异构体、或其立体异构体的混合物、或其盐,其特征在于,

所述盐包括式(I)所示的肽的金属盐,其中,所述金属包括:锂、钠、钾、钙、镁、锰、铜、锌或铝;

可选地,所述盐包括式(I)所示的肽与有机碱形成的盐,所述有机碱包括:乙胺、二乙胺、乙二胺、乙醇胺、二乙醇胺、精氨酸、赖氨酸、组氨酸或哌嗪;

可选地,所述盐包括式(I)所示的肽与无机酸或有机酸形成的盐,其中,所述有机酸包括:乙酸、柠檬酸、乳酸、丙二酸、马来酸、酒石酸、延胡索酸、苯甲酸、天冬氨酸、谷氨酸、琥珀酸、油酸、三氟乙酸、草酸、扑酸或葡萄糖酸;所述无机酸包括:盐酸、硫酸、硼酸或碳酸。

6. 一种组合物,其特征在于,包括有效量的如权利要求1-5任一项所述的式(I)所示的肽、或其立体异构体、或其立体异构体的混合物、或其盐,以及至少一种赋形剂和任选的佐剂;

可选地,所述佐剂选自:激活S1PR2活性的其他试剂、镇痛剂、抑制PAR-2活性的剂、胶原合成刺激剂、调节PGC-1 α 合成的剂、调节PPAR γ 的活性的剂、增加或减少脂肪细胞的甘油三酸酯含量的剂、刺激或延迟脂肪细胞分化的剂、脂解剂或刺激脂肪分解的剂、溶脂剂、生脂剂、乙酰胆碱受体聚集的抑制剂、抑制肌肉收缩的剂、抗胆碱能试剂、弹性蛋白酶抑制剂、基质金属蛋白酶抑制剂、黑色素合成刺激或抑制剂、增白剂或脱色剂、促色素沉着剂、日晒黑剂、抗老化剂、NO-合酶抑制剂、5 α -还原酶抑制剂、赖氨酰羟化酶和/或脯氨酰羟化酶的抑制剂、抗氧化剂、自由基清除剂和/或抗大气污染的剂、活性羰基类物质清除剂、抗糖化剂、抗组胺剂、抗病毒剂、抗寄生虫剂、乳化剂、润肤剂、有机溶剂、液体推进剂、皮肤调理剂、保留水分的物质、 α 羟基酸、 β 羟基酸、增湿剂、表皮水解酶、维生素、氨基酸、蛋白质、色素、染料、生物聚合物、胶凝聚合物、增稠剂、表面活性剂、软化剂、粘合剂、防腐剂、抗皱剂、能够减少或治疗下眼袋的剂、角质层分离剂、抗微生物剂、抗真菌剂、抑真菌剂、灭菌剂、抑菌剂、刺激真皮或表皮大分子的合成和/或能够抑制或预防它们的降解的剂、刺激弹性蛋白合成的剂、刺激核心蛋白聚糖合成的剂、刺激层粘连蛋白合成的剂、刺激防御素合成的剂、刺激伴侣蛋白合成的剂、刺激cAMP合成的剂、刺激HSP70合成的剂、刺激热休克蛋白合成的剂、刺激透明质酸合成的剂、刺激纤连蛋白合成的剂、刺激去乙酰化酶合成的剂、刺激脂质和角质层组分的合成的剂、神经酰胺、脂肪酸、抑制胶原降解的剂、抑制弹性蛋白降解的剂、抑制丝氨酸蛋白酶的剂、刺激成纤维细胞增殖的剂、刺激角质形成细胞增殖的剂、刺激脂肪细胞增殖的剂、刺激黑色素细胞增殖的剂、刺激角质形成细胞分化的剂、抑制乙酰胆碱酯酶的剂、皮肤松弛剂、刺激糖胺聚糖合成的剂、抗角化过度剂、粉刺溶解剂、抗银屑病剂、抗湿疹剂、DNA修复剂、DNA防护剂、稳定剂、止痒剂、用于治疗或/或护理敏感性皮肤的剂、固化剂、紧致剂、重构剂、抗拉伸纹剂、调节皮脂产生的剂、止汗剂、刺激愈合的剂、协助愈合的剂、刺激再上皮化的剂、协助再上皮化的剂、细胞因子、镇静剂、抗炎剂、麻醉剂、作用于毛细血管循环和/或微循环的剂、刺激血管生成的剂、抑制血管渗透性的剂、静脉紧张剂、作用于细胞代谢的剂、用于改善真皮-表皮接合的剂、诱导毛发生长的剂、毛发生长抑制或延缓剂、香料、螯合剂、植物提取物、精油、海洋提取物、得自生物发酵过程的剂、无机盐、细胞提取物、防晒剂、以及有效抗A和/或B紫外线的有机或无机光防护剂或其混合物。

7. 根据权利要求6所述的组合物,其特征在于,所述组合物的制剂选自:霜剂、油、香膏、泡沫、洗剂、凝胶、擦剂、浆液、软膏、摩丝、粉末、杆剂、笔剂、喷雾剂、气溶胶、胶囊剂、片剂、颗粒剂、口香糖、溶液、混悬液、乳剂、酞剂、多糖薄膜、胶冻或明胶。

8. 一种递送系统或缓释系统,其特征在于,包含有效量的如权利要求1-5任一项所述的式(I)所示的肽、或其立体异构体、或其立体异构体的混合物、或其盐、或权利要求6或7所述的组合物;

所述递送系统或缓释系统选自:脂质体、油质体、非离子型表面活性剂脂质体囊泡、醇质体、毫米胶囊、微米胶囊、纳米胶囊、纳米结构的脂质载体、海绵状物、环糊精、类脂囊泡、胶束、毫米球、微米球、纳米球、脂质球、微米乳液、纳米乳液、毫米粒子、微米粒子或纳米粒子。

9. 权利要求1-5任一项所述的式(I)所示的肽、或其立体异构体、或其立体异构体的混合物、或其盐、或权利要求6或7所述组合物、或权利要求8所述的递送系统或缓释系统在制备用于抗老化或光老化的组合物中的用途。

10. 权利要求1-5任一项所述的式(I)所示的肽、或其立体异构体、或其立体异构体的混合物、或其盐、或权利要求6或7所述组合物、或权利要求8所述的递送系统或缓释系统在制备用于抗衰修护的组合物中的用途,所述抗衰修护包括提高细胞活性、促进细胞增殖和迁移、增强或修护皮肤屏障中的一种或多种。

11. 权利要求1-5任一项所述的式(I)所示的肽、或其立体异构体、或其立体异构体的混合物、或其盐、或权利要求6或7所述组合物、或权利要求8所述的递送系统或缓释系统在制备用于舒缓的组合物中的用途。

12. 权利要求1-5任一项所述的式(I)所示的肽、或其立体异构体、或其立体异构体的混合物、或其盐、或权利要求6或7所述组合物、或权利要求8所述的递送系统或缓释系统在制备用于保湿的组合物中的用途。

新的肽及其组合物和用途

技术领域

[0001] 本发明涉及多肽技术领域,特别是一种能够增强或修护皮肤屏障的肽以及含有这些肽的组合物,以及它们的用途。

背景技术

[0002] 皮肤是人体的第一道防线,具有保护、感觉、调节体温、代谢等作用。在皮肤的保护作用中,皮肤屏障是关键,作为皮肤重要的防护线,可以保护皮肤免受伤害、抵御机械损伤、避免组织器官受损、防止外界有害物质入侵、抗氧化、抗紫外线损伤等,还可以防止机体内各种营养物质、水分的流失,对保持人体内环境的稳定起着重要作用。

[0003] 皮肤屏障由皮脂膜、角质层细胞及细胞间脂质构成,角质层细胞“堆砌”于连续的细胞间脂质中形成一种特殊的“砖-墙”架构体系。角质层细胞内含有排列紧密的角蛋白,形成了许多不溶性的角蛋白纤维束。其中,角蛋白是角质层细胞的主要蛋白,只有在其正常表达的情况下,才能保证皮肤屏障的完整性,从而发挥保护皮肤的作用。丝聚蛋白(FLG)是人体皮肤角质层中连接角蛋白纤维的重要分子,在FLG单体协助连接下,角蛋白纤维规则地聚集,在表皮的最外层形成坚实的物理屏障,从而防止表皮水分的丢失和外界物质的入侵。FLG分布在角质层的不同部分,随角质形成细胞迁移过程逐渐被酶降解为天然保湿因子等角质层需要的小分子物质。由此可知,丝聚蛋白在保湿、维持屏障完整性方面发挥着重要的作用。

[0004] 此外,透明质酸也是皮肤屏障的重要组成成分,存在于皮肤中的透明质酸含量随着人类皮肤成熟和老化过程而变化。透明质酸能够改善皮肤营养代谢,锁住皮肤表面的水分,使皮肤柔嫩光滑;同时还能够保护细胞不受病原菌的侵害,加快恢复皮肤组织,改善皮肤的生理特性,具有天然保湿、皮肤修护的作用。随着人们年龄的增长及营养、日照、环境等因素的影响,人体合成透明质酸的能力逐渐下降,皮肤中透明质酸的含量会逐渐降低,当皮肤中的透明质酸含量低于某一水平时,皮肤表层的含水量会逐渐降低,造成角质层细胞老化和皮肤内部水分流失,使人表皮衰老。透明质酸还会被透明质酸酶分解,变成低分子量的酸性刺激源,从而引起组胺释放,诱导机体产生敏感症状。

[0005] 由于环境、饮食和错误的皮肤护理等原因,越来越多的人群出现皮肤屏障受损的情况,使得皮肤自身防御能力不足,导致皮肤敏感、老化、干燥等问题,故研究解决上述皮肤问题至关重要。目前,改善皮肤屏障功能的主要方法是采用保湿剂,包括油脂封闭保湿剂、亲水基质吸湿保湿剂、水合保湿剂等,但是单纯的保湿无法从根本上解决问题。因此,有必要针对改善皮肤屏障功能的作用机制,开发一种能够从根本上抗衰修护的活性物,以满足人们日益增长的护理皮肤的需求。

发明内容

[0006] 本发明的目的在于提供一种能够增强或修护皮肤屏障的肽以及含有这些肽的组合物,以及它们在抗老化或光老化、抗衰修护、舒缓、保湿等方面的用途。

[0007] 鉴于此,本发明提供一种式(I)所示的肽、或其立体异构体、或其立体异构体的混合物、或其盐,

[0008] $R_1-X_1-X_2-X_3-Leu-Tyr-X_4-X_5-R_2$ (I)

[0009] 式(I)中,

[0010] X_1 选自:-Gly-、-Lys-或键;

[0011] X_2 选自:-Nle-、-Val-、-Leu-或-Ile-;

[0012] X_3 选自:-Lys-、-Arg-或-His-;

[0013] X_4 选自:-Gly-或键;

[0014] X_5 选自:-Ser-或键;

[0015] R_1 选自:H或 R_3-CO- ,其中 R_3 选自:取代的或未取代的烷基、取代的或未取代的烯基;

[0016] R_2 选自:- NR_4R_5 或- OR_4 ,其中各个 R_4 和 R_5 彼此独立地选自:H、取代的或未取代的烷基、取代的或未取代的烯基;

[0017] 所述烷基是指具有1-24个碳原子(可选具有1-16个碳原子;可选具有1-14个碳原子;可选具有1-12个碳原子;可选具有1、2、3、4、5、或6个的碳原子)的饱和脂肪族直链或支链的烷基;可选选自:甲基、乙基、异丙基、异丁基、叔丁基、戊基、己基、庚基、辛基、癸基、十二烷基、十四烷基、十六烷基、十八烷基、2-乙基己基、2-甲基丁基、或5-甲基己基;

[0018] 所述烯基是指具有2-24个碳原子(可选具有2-16个碳原子;可选具有2-14个碳原子;可选具有2-12个碳原子;可选具有2、3、4、5、或6个碳原子)的直链或支链烯基;所述烯基具有一个或多个碳-碳双键,可选具有1、2或3个共轭或非共轭的碳-碳双键;所述烯基是通过一个单键而结合至分子的其余部分;可选选自:乙烯基、油烯基、或亚油烯基;

[0019] 可选地,所述“取代的烷基”、“取代的烯基”中的取代基选自 C_1-C_4 烷基;羟基; C_1-C_4 烷氧基;氨基; C_1-C_4 氨基烷基; C_1-C_4 羰氧基; C_1-C_4 氧基羰基;卤素(如氟、氯、溴、以及碘);氰基;硝基;叠氮化物; C_1-C_4 烷基磺酰基;硫醇; C_1-C_4 烷硫基; C_6-C_{30} 芳氧基如苯氧基;- $NR_b(C=NR_b)NR_bR_c$,其中 R_b 和 R_c 是独立地选自:H、 C_1-C_4 烷基、 C_2-C_4 烯基、 C_2-C_4 炔基、 C_3-C_{10} 环烷基、 C_6-C_{18} 芳基、 C_7-C_{17} 芳烷基、具有三至十元的杂环基、或氨基的保护基。

[0020] 可选地, R_1 选自:H、乙酰基、叔-丁酰基、己酰基、2-甲基己酰基、辛酰基、癸酰基、月桂酰基、肉豆蔻酰基、棕榈酰基、硬脂酰基、油酰基或亚油酰基; R_4 、 R_5 彼此独立地选自:H、甲基、乙基、己基、十二烷基或十六烷基;

[0021] 可选地, R_1 选自H、乙酰基、月桂酰基、肉豆蔻酰基或棕榈酰基; R_4 是H并且 R_5 选自:H、甲基、乙基、己基、十二烷基或十六烷基;

[0022] 可选地, R_1 是H、乙酰基或棕榈酰基; R_2 是-OH或-NH₂。

[0023] 可选地,式(I)所示的肽、或其立体异构体、或其立体异构体的混合物、或其盐,选自下列肽(1)-(40):

[0024] (1)H-Gly-Nle-Lys-Leu-Tyr-OH;

[0025] (2)Ac-Gly-Nle-Lys-Leu-Tyr-NH₂;

[0026] (3)Palm-Gly-Nle-Lys-Leu-Tyr-OH;

[0027] (4)Palm-Gly-Nle-Lys-Leu-Tyr-NH₂;

[0028] (5)H-Val-Lys-Leu-Tyr-Gly-Ser-OH;

[0029] (6)H-Val-Lys-Leu-Tyr-Gly-Ser-NH₂;

- [0030] (7) Ac-Val-Lys-Leu-Tyr-Gly-Ser-NH₂;
- [0031] (8) Palm-Val-Lys-Leu-Tyr-Gly-Ser-OH;
- [0032] (9) Palm-Val-Lys-Leu-Tyr-Gly-Ser-NH₂;
- [0033] (10) H-Lys-Val-Lys-Leu-Tyr-OH;
- [0034] (11) H-Lys-Val-Lys-Leu-Tyr-NH₂;
- [0035] (12) Ac-Lys-Val-Lys-Leu-Tyr-NH₂;
- [0036] (13) Palm-Lys-Val-Lys-Leu-Tyr-NH₂;
- [0037] (14) Palm-Lys-Val-Lys-Leu-Tyr-OH;
- [0038] (15) H-Gly-Nle-Arg-Leu-Tyr-OH;
- [0039] (16) H-Gly-Nle-Arg-Leu-Tyr-NH₂;
- [0040] (17) Ac-Gly-Nle-Arg-Leu-Tyr-OH;
- [0041] (18) Ac-Gly-Nle-Arg-Leu-Tyr-NH₂;
- [0042] (19) Palm-Gly-Nle-Arg-Leu-Tyr-OH;
- [0043] (20) Palm-Gly-Nle-Arg-Leu-Tyr-NH₂;
- [0044] (21) H-Lys-Leu-Lys-Leu-Tyr-OH;
- [0045] (22) Ac-Lys-Leu-Lys-Leu-Tyr-NH₂;
- [0046] (23) Ac-Gly-Ile-Lys-Leu-Tyr-NH₂;
- [0047] (24) H-Gly-Leu-Arg-Leu-Tyr-Ser-OH;
- [0048] (25) H-Gly-Val-Lys-Leu-Tyr-NH₂;
- [0049] (26) Palm-Gly-Val-His-Leu-Tyr-NH₂;
- [0050] (27) Ac-Gly-Nle-Arg-Leu-Tyr-GlyOH;
- [0051] (28) H-Nle-Lys-Leu-Tyr-GlyOH;
- [0052] (29) Ac-Ile-Lys-Leu-Tyr-Gly-Ser-NH₂;
- [0053] (30) H-Lys-Nle-Arg-Leu-Tyr-OH;
- [0054] (31) H-Ile-Lys-Leu-Tyr-Ser-NH₂;
- [0055] (32) Ac-Gly-Nle-Lys-Leu-Tyr-OH;
- [0056] (33) Palm-Gly-Leu-Lys-Leu-Tyr-NH₂;
- [0057] (34) H-Gly-Leu-Lys-Leu-Tyr-Gly-OH;
- [0058] (35) Ac-Ile-Lys-Leu-Tyr-Gly-NH₂;
- [0059] (36) H-Ile-Arg-Leu-Tyr-Gly-Ser-OH;
- [0060] (37) H-Val-His-Leu-Tyr-Gly-NH₂;
- [0061] (38) Ac-Val-His-Leu-Tyr-Gly-Ser-OH;
- [0062] (39) Palm-Gly-Leu-Arg-Leu-Tyr-Gly-NH₂;
- [0063] (40) H-Gly-Leu-Arg--Leu-Tyr-Ser-OH。
- [0064] 可选地, 式(I)所示的肽、或其立体异构体、或其立体异构体的混合物、或其盐, 选自下列肽(3)、肽(4)、肽(8)、肽(9)、肽(13)、肽(14)、肽(19)和肽(20), 具体地,
- [0065] (3) Palm-Gly-Nle-Lys-Leu-Tyr-OH;
- [0066] (4) Palm-Gly-Nle-Lys-Leu-Tyr-NH₂;
- [0067] (8) Palm-Val-Lys-Leu-Tyr-Gly-Ser-OH;

[0068] (9) Palm-Val-Lys-Leu-Tyr-Gly-Ser-NH₂;

[0069] (13) Palm-Lys-Val-Lys-Leu-Tyr-NH₂;

[0070] (14) Palm-Lys-Val-Lys-Leu-Tyr-OH;

[0071] (19) Palm-Gly-Nle-Arg-Leu-Tyr-OH;

[0072] (20) Palm-Gly-Nle-Arg-Leu-Tyr-NH₂。

[0073] 本发明的式(I)所示的肽可以作为立体异构体或立体异构体的混合物存在;例如,其所包含的这些氨基酸可以具有L-、D-的构型、或彼此独立地是外消旋的。因此,有可能获得同分异构混合物以及外消旋混合物或非对映混合物、或纯的非对映异构体或对映异构体,这取决于不对称碳的数量和存在什么同分异构体或同分异构混合物。本发明的式(I)所示的肽的优选的结构是纯的同分异构体,即,对映异构体或非对映异构体。

[0074] 例如,当本发明所述-Lys-时,应理解-Lys-选自-L-Lys-、-D-Lys-、或两者的混合物,是外消旋的或非外消旋的。在本文件中描述的制备方法使本领域的普通技术人员能够通过选择具有正确构型的氨基酸来获得本发明的肽的每种立体异构体。

[0075] 本发明还包括式(I)所示的肽的所有合适的同位素变体。本发明的这些肽的同位素变体此处理解为是指这样的化合物:其中在本发明的肽内至少一个原子被替换为相同原子序数的另一个原子,但所述另一原子的原子质量不同于自然界中通常或主要存在的原子质量。可掺入本发明的肽中的同位素的实例是:氢、碳、氮或氧的那些,例如²H(氘)、³H(氚)、¹³C、¹⁴C、¹⁵N、¹⁷O或¹⁸O。本发明的肽的特定的同位素变体(特别是其中已经掺入一种或多种放射性同位素的那些)可能有利于,例如检查在体内的作用机理或活性化合物的分布;由于相对简单的可制备性和可检测性,尤其是用³H或¹⁴C同位素标记的化合物适用于该目的。另外,由于化合物的更强的代谢稳定性,同位素(例如氘)的掺入可以产生特定的治疗益处,例如体内半衰期的延长或所需活性剂量的降低;因此,在某些情况下,本发明的肽的这种改性还可构成本发明的优选实施方案。通过本领域技术人员已知的方法,例如通过在下文中进一步描述的方法和在实施例中所所述的方法,通过使用各自的试剂和/或起始物质的相应的同位素改性物,可制备本发明的肽的同位素变体。

[0076] 术语“盐”指被认可的在动物,并且更确切地说在人类中使用的一种盐,包括式(I)所示的肽的金属盐,所述金属包括,但不局限于:锂、钠、钾、钙、镁、锰、铜、锌或铝等;包括式(I)所示的肽与有机碱形成的盐,所述有机碱包括,但不局限于:乙胺、二乙胺、乙二胺、乙醇胺、二乙醇胺、精氨酸、赖氨酸、组氨酸或哌嗪等;包括式(I)所示的肽与无机酸或有机酸形成的盐,所述有机酸包括,但不局限于:乙酸、柠檬酸、乳酸、丙二酸、马来酸、酒石酸、延胡索酸、苯甲酸、天冬氨酸、谷氨酸、琥珀酸、油酸、三氟乙酸、草酸、扑酸(pamoate)或葡萄糖酸等;所述无机酸包括,但不局限于:盐酸、硫酸、硼酸或碳酸。

[0077] 本发明式(I)所示的肽、或其立体异构体或其盐的合成可以根据现有技术中已知的常规方法来进行,例如固相合成法、液相合成法或固相与液相结合的方法,还可以通过以产生所希望的序列为目标的生物技术方法、或通过具有动物、真菌、或植物来源的蛋白质的控制水解来制备。

[0078] 例如,一种获得式(I)所示的肽的方法包括以下步骤:

[0079] -将具有受保护的N-末端和自由的C-末端的氨基酸与具有自由的N-末端和受保护的或与固体载体结合的C-末端的氨基酸偶联;

[0080] -消除保护N-末端的基团；

[0081] -重复该偶联顺序和消除保护N-末端的基团，直到获得所希望的肽序列；

[0082] -消除保护C-末端的基团或从该固体载体裂解。

[0083] 优选地，C-末端与一种固体载体结合并且该方法是在固相上进行，包括将具有受保护的N-末端和自由的C-末端的氨基酸与具有自由的N-末端和与一种聚合物载体结合的C-末端的氨基酸偶联；消除保护N-末端的基团；并且重复此顺序所需要的次数以便因此获得具有所希望的长度的肽，接着从最初的聚合物载体裂解所合成的肽。

[0084] 在整个合成中这些氨基酸的侧链的官能团用临时或永久的保护基团保持充分地保护，并且可以与从该聚合物载体裂解肽的过程同时地或正交地脱保护。

[0085] 可选地，固相合成可以通过将二肽或三肽偶联到聚合物支持体上或偶联到先前与聚合物支持体结合的二肽或氨基酸上的汇集策略 (convergent strategy) 来进行。

[0086] 使用本领域已知的标准条件和方法对N-末端和C-末端脱保护和/或以非确定的次序从聚合物支持体裂解肽，随后可以修饰所述末端的官能团。可以对与聚合物支持体结合的式(I)的肽进行N-末端和C-末端的任选的修饰，或在肽已从聚合物支持体裂解后进行N-末端和C-末端的任选的修饰。

[0087] 本发明的另一方面，提供一种组合物，包括有效量的上述式(I)所示的肽、或其立体异构体、或其立体异构体的混合物、或其盐，以及至少一种赋形剂和任选的佐剂。

[0088] 可选地，所述佐剂选自：激活S1PR2活性的其他试剂、镇痛剂、抑制PAR-2活性的剂、胶原合成刺激剂、调节PGC-1 α 合成的剂、调节PPAR γ 的活性的剂、增加或减少脂肪细胞的甘油三酸酯含量的剂、刺激或延迟脂肪细胞分化的剂、脂解剂或刺激脂肪分解的剂、溶脂剂、生脂剂、乙酰胆碱受体聚集的抑制剂、抑制肌肉收缩的剂、抗胆碱能试剂、弹性蛋白酶抑制剂、基质金属蛋白酶抑制剂、黑色素合成刺激或抑制剂、增白剂或脱色剂、促色素沉着剂、日晒黑剂、抗老化剂、NO-合酶抑制剂、5 α -还原酶抑制剂、赖氨酰羟化酶和/或脯氨酰羟化酶的抑制剂、抗氧化剂、自由基清除剂和/或抗大气污染的剂、活性羰基类物质清除剂、抗糖化剂、抗组胺剂、抗病毒剂、抗寄生虫剂、乳化剂、润肤剂、有机溶剂、液体推进剂、皮肤调理剂、保留水分的物质、 α 羟基酸、 β 羟基酸、增湿剂、表皮水解酶、维生素、氨基酸、蛋白质、色素、染料、生物聚合物、胶凝聚合物、增稠剂、表面活性剂、软化剂、粘合剂、防腐剂、抗皱剂、能够减少或治疗下眼袋的剂、角质层分离剂、抗微生物剂、抗真菌剂、抑真菌剂、灭菌剂、抑菌剂、刺激真皮或表皮大分子的合成和/或能够抑制或预防它们的降解的剂、刺激弹性蛋白合成的剂、刺激核心蛋白聚糖合成的剂、刺激层粘连蛋白合成的剂、刺激防御素合成的剂、刺激伴侣蛋白合成的剂、刺激cAMP合成的剂、刺激HSP70合成的剂、刺激热休克蛋白合成的剂、刺激透明质酸合成的剂、刺激纤连蛋白合成的剂、刺激去乙酰化酶合成的剂、刺激脂质和角质层组分的合成的剂、神经酰胺、脂肪酸、抑制胶原降解的剂、抑制弹性蛋白降解的剂、抑制丝氨酸蛋白酶的剂、刺激成纤维细胞增殖的剂、刺激角质形成细胞增殖的剂、刺激脂肪细胞增殖的剂、刺激黑色素细胞增殖的剂、刺激角质形成细胞分化的剂、抑制乙酰胆碱酯酶的剂、皮肤松弛剂、刺激糖胺聚糖合成的剂、抗角化过度剂、粉刺溶解剂、抗银屑病剂、抗湿疹剂、DNA修复剂、DNA防护剂、稳定剂、止痒剂、用于治疗 and/或护理敏感性皮肤的剂、固化剂、紧致剂、重构剂、抗拉伸纹剂、调节皮脂产生的剂、止汗剂、刺激愈合的剂、协助愈合的剂、刺激再上皮化的剂、协助再上皮化的剂、细胞因子、镇静剂、抗炎剂、麻醉剂、作用于毛细血管循环和/

或微循环的剂、刺激血管生成的剂、抑制血管渗透性的剂、静脉紧张剂、作用于细胞代谢的剂、用于改善真皮-表皮接合的剂、诱导毛发生长的剂、毛发生长抑制或延缓剂、香料、螯合剂、植物提取物、精油、海洋提取物、得自生物发酵过程的剂、无机盐、细胞提取物、防晒剂、以及有效抗A和/或B紫外线的有机或无机光防护剂或其混合物。

[0089] 可选地,所述组合物的制剂选自:霜剂、油、香膏、泡沫、洗剂、凝胶、擦剂、浆液、软膏、摩丝、粉末、杆剂、笔剂、喷雾剂、气溶胶、胶囊剂、片剂、颗粒剂、口香糖、溶液、混悬液、乳剂、酞剂、多糖薄膜、胶冻或明胶。

[0090] 本发明的肽根据它们的序列的性质或N-末端和/或C-末端中的任何可能的修饰,在水中具有可变的溶解度。因此本发明的肽可以通过水溶液掺入组合物中,且不溶于水的那些可溶解于常规溶剂中,所述溶剂例如并且不限于乙醇、丙醇、异丙醇、丙二醇、甘油、丁二醇或聚乙二醇或其任何组合。

[0091] 待施用的有效量的本发明的肽以及它们的剂量将依赖于许多因素,包括年龄、使用者的状态、状况的严重性、施用的途径和频率以及待使用的肽的具体性质。

[0092] “有效量”意指无毒性的但足以提供希望的效果的本发明的一种或多种肽的量。在本发明的组合物中以获得希望的效果的有效浓度使用本发明的肽;在一个优选形式中,相对于组合物的总重量,在0.00000001% (按重量计) 和20% (按重量计) 之间,优选在0.000001% (按重量计) 和15% (按重量计) 之间、更优选在0.0001% (按重量计) 和10% (按重量计) 之间,并且甚至更优选在0.0001% (按重量计) 和5% (按重量计) 之间。

[0093] 本发明的另一方面,提供一种递送系统或缓释系统,以便实现有效成分的更好渗透,其包含有效量的上述式(I)所示的肽、或其立体异构体、或立体异构体的混合物、或其盐、或上述的组合物。

[0094] 术语“递送系统”是指与本发明的肽一起施用的稀释剂、佐剂、赋形剂或载体,它们选自:水、油或表面活性剂、包括石油来源、动物来源、植物来源、或合成来源的那些,例如并且不限于花生油、大豆油、矿物油、芝麻油、蓖麻油、聚山梨醇酯、脱水山梨糖醇酯、醚硫酸酯、硫酸酯、甜菜碱、葡萄糖苷、麦芽糖苷、脂肪醇、壬苯醇醚、泊洛沙姆、聚氧乙烯、聚乙二醇、右旋糖、甘油、毛地黄皂苷和类似物。本领域的普通技术人员已知在可以给予本发明的肽的不同递送系统中可以使用的稀释剂。

[0095] 术语“缓释”以常规含义使用,指提供化合物在一段时间内逐渐释放的化合物的递送系统,且优选地但不是必须地,在整个时间段内具有相对恒定的化合物释放水平。

[0096] 递送系统或缓释系统的实例是脂质体、油质体、非离子型表面活性剂脂质体囊泡、醇质体、毫米胶囊、微米胶囊、纳米胶囊、纳米结构的脂质载体、海绵状物、环糊精、类脂囊泡、胶束、毫米球、微米球、纳米球、脂质球、微米乳液、纳米乳液、毫米粒子、微米粒子或纳米粒子。

[0097] 本发明的另一方面,提供一种上述式(I)所示的肽、或其立体异构体、或其立体异构体的混合物、或其盐、或上述组合物、或上述的递送系统或缓释系统在制备用于抗老化或光老化的组合物中的用途。

[0098] 本发明的另一方面,提供一种上述式(I)所示的肽、或其立体异构体、或其立体异构体的混合物、或其盐、或上述组合物、或上述的递送系统或缓释系统在制备用于抗衰修护的组合物中的用途,所述抗衰修护包括提高细胞活性、促进细胞增殖和迁移、增强或修护皮

肤屏障中的一种或多种。

[0099] 本发明的另一方面,提供一种上述式(I)所示的肽、或其立体异构体、或其立体异构体的混合物、或其盐、或上述组合物、或上述的递送系统或缓释系统在制备用于舒缓的组合物中的用途。

[0100] 本发明的另一方面,提供一种上述式(I)所示的肽、或其立体异构体、或其立体异构体的混合物、或其盐、或上述组合物、或上述的递送系统或缓释系统在制备用于保湿的组合物中的用途。

[0101] 在本说明书中,用于氨基酸的缩写遵循IUPAC-IUB生化命名委员会(IUPAC-IUB Commission of Biochemical Nomenclature)在欧洲生物化学杂志(Eur.J.Biochem.1984, 138:9-37)中所指定的规则。

[0102] 因此,例如,Lys表示 $\text{NH}_2\text{-CH}(\text{CH}_2\text{CH}_2\text{CH}_2\text{CH}_2\text{NH}_2)\text{-COOH}$,Lys-表示 $\text{NH}_2\text{-CH}(\text{CH}_2\text{CH}_2\text{CH}_2\text{CH}_2\text{NH}_2)\text{-CO-}$, -Lys表示 $\text{-NH-CH}(\text{CH}_2\text{CH}_2\text{CH}_2\text{CH}_2\text{NH}_2)\text{-COOH}$,并且-Lys-表示 $\text{-NH-CH}(\text{CH}_2\text{CH}_2\text{CH}_2\text{CH}_2\text{NH}_2)\text{-CO-}$ 。因此,表示肽键的连字符消除了当位于该符号的右侧时的氨基酸(在此用常规非离子化形式来表示)1-羧基中的OH,并且消除了当位于该符号的左侧时的氨基酸2-氨基中的H;两种修饰可以应用于同一个符号(见表1)。

[0103] 表1氨基酸残基的结构以及它们的单字母和三字母缩写符号

名称/缩写符号	残基	名称/缩写符号	残基
甘氨酸基 -Gly- G		正亮氨酸基 -Nle-	
赖氨酸基 -Lys- K		亮氨酸基 -Leu- L	
酪氨酸基 -Tyr- Y		缬氨酸基 -Val- V	
丝氨酸基 -Ser- S		精氨酸基 -Arg- R	

[0105] 缩写“Palm-”在本发明中用来表示棕榈酰基;Gly:甘氨酸;Nle:正亮氨酸;Lys:赖

氨酸;Leu:亮氨酸;Tyr:酪氨酸;Val:缬氨酸;Ser:丝氨酸;Arg:精氨酸。

[0106] 本发明具有以下优点和效果:

[0107] 1、本发明的肽通过人工设计得到,合成方便,且对人体安全无刺激。

[0108] 2、本发明的肽能够提高细胞活性、促进细胞增殖和迁移、增强或修护皮肤屏障,保护皮肤免受外界伤害,具有抗衰修护作用;亦具有抗老化或光老化的作用。

[0109] 3、本发明的肽能够提高透明质酸的含量,促进丝聚蛋白表达,亦能够抑制透明质酸酶活性,从而增强或修护皮肤屏障,具有保湿、舒缓的作用。

附图说明

[0110] 为了更清楚地说明本发明的技术方案,下面将对本发明的描述中所需要使用的附图作简单地介绍,显而易见地,下面描述中的附图仅仅是本发明的一些实施例,对于本领域普通技术人员来讲,在不付出创造性劳动的前提下,还可以根据这些附图获得其他的附图。

[0111] 图1是肽(4)Palm-Gly-Nle-Lys-Leu-Tyr-NH₂(分子式C₄₅H₇₉N₇O₇)质谱图,[M+H]⁺准分子离子峰的质荷比(m/z)为830.6035,质谱测得的分子量为829.60。

[0112] 图2是肽(9)Palm-Val-Lys-Leu-Tyr-Gly-Ser-NH₂(分子式C₄₇H₈₂N₈O₉)质谱图,[M+H]⁺准分子离子峰的质荷比(m/z)为903.6204,质谱测得的分子量为902.62。

[0113] 图3是肽(13)Palm-Lys-Val-Lys-Leu-Tyr-NH₂(分子式C₄₈H₈₆N₈O₇)质谱图,[M+H]⁺准分子离子峰的质荷比(m/z)为887.6615,质谱测得的分子量为886.66。

[0114] 图4是肽(14)Palm-Lys-Val-Lys-Leu-Tyr-OH(分子式C₄₈H₈₅N₇O₈)质谱图,[M+H]⁺准分子离子峰的质荷比(m/z)为888.98,质谱测得的分子量为887.98。

[0115] 图5是肽(20)Palm-Gly-Nle-Arg-Leu-Tyr-NH₂(分子式C₄₅H₇₉N₉O₇)质谱图,[M+H]⁺准分子离子峰的质荷比(m/z)为858.6092,质谱测得的分子量为857.61。

[0116] 图6是测试样品对HaCaT细胞活性的影响结果图。

[0117] 图7是测试样品对光老化细胞活性的影响结果图。

[0118] 图8是细胞划痕实验结果图。

[0119] 图9是测试样品对透明质酸含量的影响结果图。

[0120] 图10是测试样品对FLG表达的影响结果图。

[0121] 图11是测试样品对透明质酸酶抑制率的影响结果图。

具体实施方式

[0122] 为使本发明的所述目的、特征和优点能够更加明显易懂,下面结合附图和实施例对本发明作进一步详细的说明。显然,所描述的实施例是本发明一部分实施例,而不是全部的实施例。基于本发明中的实施例,本领域普通技术人员在没有作出创造性劳动前提下所获得的所有其他实施例,都属于本发明保护的范围。

[0123] 需要说明的是,在本发明中,用于氨基酸的缩写遵循IUPAC-IUB的生物化学命名委员会在Eur.J.Biochem.(1984)138:9-37和J.Chem.(1989)264:633-673中指定的规则。

[0124] Amide Resin:一种多肽合成用的起始树脂(交联度1%,替代度1.72mmol/g,粒度100-200目);Fmoc-Linker:4-[(2,4-二甲氧基苯基)(Fmoc-氨基)甲基]苯氧乙酸;Wang Resin:王树脂;Ac₂O:醋酸酐;DMF:N,N-二甲基甲酰胺;DIPEA:二异丙基乙胺;DIC:二异丙基

碳二亚胺;piperidine:哌啶;HOBt:1-羟基苯并三氮唑;TFA:三氟乙酸;TIS:三异丙基硅烷;DMAP:4-二甲氨基吡啶;Palm-OH:棕榈酸;Palm-:棕榈酰基;Gly:甘氨酸;Nle:正亮氨酸;Lys:赖氨酸;Leu:亮氨酸;Tyr:酪氨酸;Val:缬氨酸;Ser:丝氨酸;Arg:精氨酸;Fmoc:9-芴基甲氧羰基;Boc:叔丁氧基羰基;tBu:叔丁基;Pbf:2,2,4,6,7-五甲基二氢苯并呋喃-5-磺酰基。

[0125] 实施例1 Palm-Gly-Nle-Lys-Leu-Tyr-NH₂的制备

[0126] 1.1 Fmoc-Linker-Amide Resin的制备

[0127] 称取9g的Amide Resin树脂于固相合成反应柱中,用DMF溶胀,洗涤树脂,抽走溶剂。

[0128] 称取8.7g的Fmoc-Linker、2.7g的HOBt于干燥三角瓶中。用DMF溶剂溶解后置于冰水浴中冷却10min,加3.7mL的DIC活化10min,避免水汽。

[0129] 将活化后的Fmoc-Linker加入溶胀后的树脂中反应2.5h,抽走反应液,洗涤树脂,抽走溶剂。

[0130] 继续加入Ac₂O与DIPEA封端处理1.5h。洗涤树脂,抽走溶剂。

[0131] 1.2 脱Fmoc

[0132] Fmoc-Linker-Amide Resin用20%piperidine/DMF脱Fmoc二次,每次10min,取样K检,显色深蓝。用DMF洗涤树脂7次,抽走溶剂。

[0133] 1.3 投料反应

[0134] 称取7.7g的Fmoc-Tyr(tBu)-OH,2.7g的HOBt加入干燥三角瓶中,加入DMF使其溶解,密封置于-18℃冰箱30min。加3.9mL DIC活化3min,避免水汽。将活化后的氨基酸加入脱保护后树脂中反应2h,抽走反应液。K检树脂无色透明说明反应完全。

[0135] 对N-末端Fmoc基团进行脱保护,并且在存在2.7g HOBt和3.9mL DIC的情况下,使用DMF作为溶剂,将活化后的5.9g的Fmoc-Leu-OH偶联至肽基树脂上,持续反应2h。然后洗涤这些树脂并且重复Fmoc基团的脱保护处理以便偶联下一个氨基酸。在每次偶联中,在存在2.7g HOBt和3.9mL DIC的情况下,使用DMF作为溶剂,顺序地偶联7.9g的Fmoc-Lys(Boc)-OH、7.1g的Fmoc-Nle-OH以及随后5.9g的Fmoc-Gly-OH;反应完全之后,洗涤树脂,抽走溶剂。

[0136] 对肽基树脂的N-末端Fmoc基团脱保护,用20%piperidine/DMF脱Fmoc二次,每次10min,取样K检,显色深蓝。用DMF洗涤树脂6次,抽走溶剂。

[0137] 在存在5.4g HOBt和7.7mL DIC的情况下,使用DMF作为溶剂,将8.6g的Palm-OH偶联至肽基树脂上,持续反应2.5h,洗涤树脂,抽走溶剂,收缩干燥后得到19.4g的Palm-Gly-Nle-Lys(Boc)-Leu-Tyr(tBu)-Linker-Amide Resin。

[0138] 1.4 裂解

[0139] 量取114mL的TFA、3mL的TIS和3mL的水混合搅拌均匀后得到裂解液,封口放置-18℃冰箱备用;异丙醚放置于-18℃冰箱冷冻备用。

[0140] 称取19.4g的Palm-Gly-Nle-Lys(Boc)-Leu-Tyr(tBu)-Linker-Amide Resin,加入圆底烧瓶中,加入上述冷冻好的裂解液,搅拌反应2h。抽滤,收集滤液浓缩到15mL后加入异丙醚搅拌离心洗涤6次,真空干燥,得到14.0g的Palm-Gly-Nle-Lys-Leu-Tyr-NH₂粗肽。

[0141] 1.5 纯化

[0142] 称取14.0g粗肽溶于360mL的醋酸、甲醇和水的混合溶液中,用孔径为0.22μm微孔

滤膜过滤得到澄清透明溶液,通过反相HPLC纯化处理,纯化梯度如下表:

	时间 (min)	流速 (mL/min)	A% (乙腈)	B% (0.1%醋酸+纯水)
[0143]	0	40	25	75
	10	40	25	75
[0144]	20	40	50	50
	30	40	65	35
	60	40	65	35

[0145] 将过滤后的样品进样纯化,收集馏分,浓缩冻干,得到纯度97.16%的肽(4) Palm-Gly-Nle-Lys-Leu-Tyr-NH₂。

[0146] 实施例2Palm-Val-Lys-Leu-Tyr-Gly-Ser-NH₂的制备

[0147] 2.1Fmoc-Linker-Amide Resin的制备

[0148] 称取9g的Amide Resin树脂于固相合成反应柱中,用DMF溶胀,洗涤树脂,抽走溶剂。

[0149] 称取8.7g的Fmoc-Linker、2.6g的HOBt于干燥三角瓶中。用DMF溶剂溶解后置于冰水浴中冷却10min,加3.7mL的DIC活化10min,避免水汽。

[0150] 将活化后的Fmoc-Linker加入溶胀后的树脂中反应2.5h,抽走反应液,洗涤树脂,抽走溶剂。

[0151] 继续加入Ac₂O与DIPEA封端处理1.5h。洗涤树脂,抽走溶剂。

[0152] 2.2脱Fmoc

[0153] Fmoc-Linker-Amide Resin用20%piperidine/DMF脱Fmoc二次,每次10min,取样K检,显色深蓝。用DMF洗涤树脂7次,抽走溶剂。

[0154] 2.3投料反应

[0155] 称取6.5g的Fmoc-Ser(tBu)-OH,2.7g的HOBt加入干燥三角瓶中,加入DMF使其溶解,密封置于-18℃冰箱30min。加3.9mL DIC活化3min,避免水汽。将活化后的氨基酸加入脱保护后树脂中反应2h,抽走反应液。K检树脂无色透明说明反应完全。

[0156] 对N-末端Fmoc基团进行脱保护,并且在存在2.7g HOBt和3.7mL DIC的情况下,使用DMF作为溶剂,将活化后的5.0g的Fmoc-Gly-OH偶联至肽基树脂上,持续反应2h。然后洗涤这些树脂并且重复Fmoc基团的脱保护处理以便偶联下一个氨基酸。在每次偶联中,在存在2.7g HOBt和3.7mL DIC的情况下,使用DMF作为溶剂,顺序地偶联7.7g的Fmoc-Tyr(tBu)-OH、7.1g的Fmoc-Leu-OH、9.4g的Fmoc-Lys(Boc)-OH以及随后6.8g的Fmoc-Val-OH;反应完全之后,洗涤树脂,抽走溶剂。

[0157] 对肽基树脂的N-末端Fmoc基团脱保护,用20%piperidine/DMF脱Fmoc二次,每次10min,取样K检,显色深蓝。用DMF洗涤树脂6次,抽走溶剂。

[0158] 在存在5.4g HOBt和7.7mL DIC的情况下,使用DMF作为溶剂,将8.6g的Palm-OH偶联至肽基树脂上,持续反应2.5h,洗涤树脂,抽走溶剂,收缩干燥后得到21.5g的Palm-Val-Lys(Boc)-Leu-Tyr(tBu)-Gly-Ser(tBu)-Linker-Amide Resin。

[0159] 2.4裂解

[0160] 量取114mL的TFA、3mL的TIS和3mL的水混合搅拌均匀后得到裂解液,封口放置-18℃冰箱备用;异丙醚放置于-18℃冰箱冷冻备用。

[0161] 称取21.5g的Palm-Val-Lys(Boc)-Leu-Tyr(tBu)-Gly-Ser(tBu)-Linker-Amide Resin,加入圆底烧瓶中,加入上述冷冻好的裂解液,搅拌反应2h。抽滤,收集滤液浓缩到15mL后加入异丙醚搅拌离心洗涤6次,真空干燥,得到10.3g的Palm-Val-Lys-Leu-Tyr-Gly-Ser-NH₂粗肽。

[0162] 2.5纯化

[0163] 称取10.3g粗肽溶于800mL的醋酸和水的混合溶液中,用孔径为0.22μm微孔滤膜过滤得到澄清透明溶液,通过反相HPLC纯化处理,纯化梯度如下表:

[0164]

时间(min)	流速(mL/min)	A%(乙腈)	B%(0.1%醋酸+纯水)
0	40	10	90
10	40	25	75
20	40	50	50
30	40	65	35
60	40	65	35

[0165] 将过滤后的样品进样纯化,收集馏分,浓缩冻干,得到纯度97.08%的肽(9) Palm-Val-Lys-Leu-Tyr-Gly-Ser-NH₂。

[0166] 实施例3Palm-Lys-Val-Lys-Leu-Tyr-NH₂的制备

[0167] 3.1Fmoc-Linker-Amide Resin的制备

[0168] 称取9g的Amide Resin树脂于固相合成反应柱中,用DMF溶胀,洗涤树脂,抽走溶剂。

[0169] 称取8.7g的Fmoc-Linker、2.6g的HOBt于干燥三角瓶中。用DMF溶剂溶解后置于冰水浴中冷却10min,加3.7mL的DIC活化10min,避免水汽。

[0170] 将活化后的Fmoc-Linker加入溶胀后的树脂中反应2.5h,抽走反应液,洗涤树脂,抽走溶剂。

[0171] 继续加入Ac₂O与DIPEA封端处理1.5h。洗涤树脂,抽走溶剂。

[0172] 3.2脱Fmoc

[0173] Fmoc-Linker-Amide Resin用20%piperidine/DMF脱Fmoc二次,每次10min,取样K检,显色深蓝。用DMF洗涤树脂7次,抽走溶剂。

[0174] 3.3投料反应

[0175] 称取7.7g的Fmoc-Tyr(tBu)-OH,2.7g的HOBt加入干燥三角瓶中,加入DMF使其溶解,密封置于-18℃冰箱30min。加3.9mL DIC活化3min,避免水汽。将活化后的氨基酸加入脱保护后树脂中反应2h,抽走反应液。K检树脂无色透明说明反应完全。

[0176] 对N-末端Fmoc基团进行脱保护,并且在存在2.7g HOBt和3.9mL DIC的情况下,使用DMF作为溶剂,将活化后的5.9g的Fmoc-Leu-OH偶联至肽基树脂上,持续反应2h。然后洗涤这些树脂并且重复Fmoc基团的脱保护处理以便偶联下一个氨基酸。在每次偶联中,在存在2.7g HOBt和3.9mL DIC的情况下,使用DMF作为溶剂,顺序地偶联7.9g的Fmoc-Lys(Boc)-OH、6.8g的Fmoc-Val-OH以及随后9.4g的Fmoc-Lys(Boc)-OH;反应完全之后,洗涤树脂,抽走溶剂。

[0177] 对肽基树脂的N-末端Fmoc基团脱保护,用20%piperidine/DMF脱Fmoc二次,每次10min,取样K检,显色深蓝。用DMF洗涤树脂6次,抽走溶剂。

[0178] 在存在5.4g HOBt和7.7mL DIC的情况下,使用DMF作为溶剂,将8.6g的Palm-OH偶联至肽基树脂上,持续反应2.5h,洗涤树脂,抽走溶剂,收缩干燥后得到19.8g的Palm-Lys(Boc)-Val-Lys(Boc)-Leu-Tyr(tBu)-Linker-Amide Resin。

[0179] 3.4裂解

[0180] 量取152mL的TFA、4mL的TIS和4mL的水混合搅拌均匀后得到裂解液,封口放置-18℃冰箱备用;异丙醚放置于-18℃冰箱冷冻备用。

[0181] 称取19.8g的Palm-Lys(Boc)-Val-Lys(Boc)-Leu-Tyr(tBu)-Linker-Amide Resin,加入圆底烧瓶中,加入上述冷冻好的裂解液,搅拌反应2h。抽滤,收集滤液浓缩到15mL后加入异丙醚搅拌离心洗涤6次,真空干燥,得到6.3g的Palm-Lys-Val-Lys-Leu-Tyr-NH₂粗肽。

[0182] 3.5纯化

[0183] 称取6.3g粗肽溶于450mL的醋酸、甲醇和水的混合溶液中,用孔径为0.22μm微孔滤膜过滤得到澄清透明溶液,通过反相HPLC纯化处理,纯化梯度如下表:

[0184]

时间(min)	流速(mL/min)	A%(乙腈)	B%(0.1%醋酸+纯水)
0	40	10	90
10	40	25	75
20	40	35	65
30	40	40	60
50	40	50	50
80	40	60	40

[0185] 将过滤后的样品进样纯化,收集馏分,浓缩冻干,得到纯度96.55%的肽(13)Palm-Lys-Val-Lys-Leu-Tyr-NH₂。

[0186] 实施例4Palm-Lys-Val-Lys-Leu-Tyr-OH的制备

[0187] 4.1树脂的溶胀及反应

[0188] 称取10g的Wang Resin树脂于固相合成反应柱中,用DMF溶胀,洗涤树脂,抽走溶剂。

[0189] 称取11.0g的Fmoc-Tyr(tBu)-OH、4.0g的HOBt于干燥三角瓶中。用DMF溶剂溶解后置于冰水浴中冷却10min,加6mL的DIC活化10min,避免水汽。

[0190] 将活化后的Fmoc-Tyr(tBu)-OH和1.5g的DMAP加入溶胀后的树脂中反应2.5h,抽走反应液,洗涤树脂,抽走溶剂。

[0191] 继续加入Ac₂O、DIPEA和DMAP封端处理1.5h。洗涤树脂,抽走溶剂。

[0192] 4.2脱Fmoc

[0193] Fmoc-Tyr(tBu)-Wang Resin用20%piperidine/DMF脱Fmoc二次,每次10min,取样K检,显色深蓝。用DMF洗涤树脂7次,抽走溶剂。

[0194] 4.3投料反应

[0195] 称取7g的Fmoc-Leu-OH,3g的HOBt加入干燥三角瓶中,加入DMF使其溶解,密封置于-18℃冰箱30min。加5mL的DIC活化3min,避免水汽。将活化后的氨基酸加入脱保护后树脂

中反应2h,抽走反应液。K检树脂无色透明说明反应完全。

[0196] 对N-末端Fmoc基团进行脱保护,并且在存在3g HOBt和5mL DIC的情况下,使用DMF作为溶剂,将活化后的9g的Fmoc-Lys(Boc)-OH偶联至肽基树脂上,持续反应2h。然后洗涤这些树脂并且重复Fmoc基团的脱保护处理以便偶联下一个氨基酸。在每次偶联中,在存在3g HOBt和5mL DIC的情况下,使用DMF作为溶剂,顺序地偶联8g的Fmoc-Val-OH以及随后11g的Fmoc-Lys(Boc)-OH;反应完全之后,洗涤树脂,抽走溶剂。

[0197] 对肽基树脂的N-末端Fmoc基团脱保护,用20%piperidine/DMF脱Fmoc二次,每次10min,取样K检,显色深蓝。用DMF洗涤树脂6次,抽走溶剂。

[0198] 在存在7g HOBt和9mL DIC的情况下,使用DMF作为溶剂,将10g的Palm-OH偶联至肽基树脂上,持续反应2.5h,洗涤树脂,抽走溶剂,收缩干燥后得到23g的Palm-Lys(Boc)-Val-Lys(Boc)-Leu-Tyr(tBu)-WangResin。

[0199] 4.4裂解

[0200] 量取131mL的TFA、3.5mL的TIS、3.5mL的水混合搅拌均匀后得到裂解液,封口放置-18℃冰箱备用;异丙醚放置于-18℃冰箱冷冻备用。

[0201] 称取23g的Palm-Lys(Boc)-Val-Lys(Boc)-Leu-Tyr(tBu)-Wang Resin,加入圆底烧瓶中,加入上述冷冻好的裂解液,搅拌反应2h。抽滤,收集滤液浓缩到15mL后加入异丙醚搅拌离心洗涤6次,真空干燥,得到13g的Palm-Lys-Val-Lys-Leu-Tyr-OH粗肽。

[0202] 4.5纯化

[0203] 称取13g粗肽溶于220mL醋酸、甲醇和水的混合溶液中,用孔径为0.22μm微孔滤膜过滤得到澄清透明溶液,通过反相HPLC纯化处理,纯化梯度如下表:

[0204]	时间(min)	流速(mL/min)	A%(乙腈)	B%(0.1%醋酸+纯水)
	0	40	25	75
	15	40	35	65
	30	40	45	55
	45	40	60	40
	80	40	65	35
	100	40	65	35

[0205] 将过滤后的样品进样纯化,收集馏分,浓缩冻干,得到纯度97.615%的肽(14) Palm-Lys-Val-Lys-Leu-Tyr-OH。

[0206] 实施例5Palm-Gly-Nle-Arg-Leu-Tyr-NH₂的制备

[0207] 5.1Fmoc-Linker-Amide Resin的制备

[0208] 称取9g的Amide Resin树脂于固相合成反应柱中,用DMF溶胀,洗涤树脂,抽走溶剂。

[0209] 称取8.7g的Fmoc-Linker、2.6g的HOBt于干燥三角瓶中。用DMF溶剂溶解后置于冰水浴中冷却10min,加3.7mL的DIC活化10min,避免水汽。

[0210] 将活化后的Fmoc-Linker加入溶胀后的树脂中反应2.5h,抽走反应液,洗涤树脂,抽走溶剂。

[0211] 继续加入Ac₂O与DIPEA封端处理1.5h。洗涤树脂,抽走溶剂。

[0212] 5.2脱Fmoc

[0213] Fmoc-Linker-Amide Resin用20% piperidine/DMF脱Fmoc二次,每次10min,取样K检,显色深蓝。用DMF洗涤树脂7次,抽走溶剂。

[0214] 5.3投料反应

[0215] 称取7.7g的Fmoc-Tyr(tBu)-OH, 2.7g的HOBt加入干燥三角瓶中,加入DMF使其溶解,密封置于-18℃冰箱30min。加3.9mL DIC活化3min,避免水汽。将活化后的氨基酸加入脱保护后树脂中反应2h,抽走反应液。K检树脂无色透明说明反应完全。

[0216] 对N-末端Fmoc基团进行脱保护,并且在存在2.7g HOBt和3.9mL DIC的情况下,使用DMF作为溶剂,将活化后的5.9g的Fmoc-Leu-OH偶联至肽基树脂上,持续反应2h。然后洗涤这些树脂并且重复Fmoc基团的脱保护处理以便偶联下一个氨基酸。在每次偶联中,在存在2.7g HOBt和3.9mL DIC的情况下,使用DMF作为溶剂,顺序地偶联15.2g的Fmoc-Arg(Pbf)-OH、7.1g的Fmoc-Nle-OH以及随后5.9g的Fmoc-Gly-OH;反应完全之后,洗涤树脂,抽走溶剂。

[0217] 对肽基树脂的N-末端Fmoc基团脱保护,用20% piperidine/DMF脱Fmoc二次,每次10min,取样K检,显色深蓝。用DMF洗涤树脂6次,抽走溶剂。

[0218] 在存在5.4g HOBt和7.7mL DIC的情况下,使用DMF作为溶剂,将8.6g的Palm-OH偶联至肽基树脂上,持续反应1.5h,洗涤树脂,抽走溶剂,收缩干燥后得到18.2g的Palm-Gly-Nle-Arg(Pbf)-Leu-Tyr(tBu)-Linker-Amide Resin。

[0219] 5.4裂解

[0220] 量取152mL的TFA、4mL的TIS和4mL的水混合搅拌均匀后得到裂解液,封口放置-18℃冰箱备用;异丙醚放置于-18℃冰箱冷冻备用。

[0221] 称取18.2g的Palm-Gly-Nle-Arg(Pbf)-Leu-Tyr(tBu)-Linker-Amide Resin,加入圆底烧瓶中,加入上述冷冻好的裂解液,搅拌反应2h。抽滤,收集滤液浓缩到15mL后加入异丙醚搅拌离心洗涤6次,真空干燥,得到13g的Palm-Gly-Nle-Arg-Leu-Tyr-NH₂粗肽。

[0222] 5.5纯化

[0223] 称取13g粗肽溶于220mL的醋酸和水的混合溶液中,用孔径为0.22μm微孔滤膜过滤得到澄清透明溶液,通过反相HPLC纯化处理,纯化梯度如下表:

	时间 (min)	流速 (mL/min)	A% (乙腈)	B% (0.1%醋酸+纯水)
[0224]	0	40	25	75
	10	40	25	75
[0225]	20	40	55	45
	30	40	65	35
	50	40	70	30
	80	40	70	30

[0226] 将过滤后的样品进样纯化,收集馏分,浓缩冻干,得到纯度98.23%的肽(20) Palm-Gly-Nle-Arg-Leu-Tyr-NH₂。

[0227] 实施例6

[0228] 本发明式(I)中的其他肽可以通过类似的方法制备。

[0229] 所获得的这些肽通过ESI-MS测定其分子量,部分肽的测试结果见下表2及图1-5:

[0230] 表2质谱法测定分子量结果

编号	序列	分子量质谱分析结果
(4)	Palm-Gly-Nle-Lys-Leu-Tyr-NH ₂	829.60
(9)	Palm-Val-Lys-Leu-Tyr-Gly-Ser-NH ₂	902.62
(13)	Palm-Lys-Val-Lys-Leu-Tyr-NH ₂	886.66
(14)	Palm-Lys-Val-Lys-Leu-Tyr-OH	887.98
(20)	Palm-Gly-Nle-Arg-Leu-Tyr-NH ₂	857.61

[0232] 实施例7细胞增殖实验

[0233] 7.1试剂与材料

[0234] 噻唑蓝(MTT)、二甲基亚砜(DMSO)、DMEM培养基、胎牛血清、PBS。

[0235] 7.2仪器

[0236] 酶标仪、CO₂培养箱、超净工作台。

[0237] 7.3细胞株

[0238] 人角质形成细胞(HaCaT)购买自中国科学院典型培养物保藏委员会昆明细胞库。

[0239] 7.4待测样品

[0240] 多肽组:肽(4)、肽(9)、肽(13)和肽(20),上述样品测试浓度均为6.25ppm、12.5ppm、25ppm。

[0241] 空白对照组:PBS。

[0242] 阳性对照组:2%DMSO。

[0243] 7.5实验方法

[0244] 取处于指数生长期状态良好的细胞,加入0.25%胰蛋白酶消化液,消化使贴壁细胞脱落,计数 $1\sim4\times10^5$ 个/mL,制成细胞悬液。

[0245] 取细胞悬液接种于96孔板上,200 μ L/孔,置恒温CO₂培养箱中培养24h。

[0246] 换液,分别加入多肽组、空白对照组和阳性对照组样品,20 μ L/孔,置于37℃、5%CO₂培养箱中孵育72h。

[0247] 每孔加入20 μ L 5mg/mLMTT,继续于37℃、5%CO₂培养箱中孵育4h。弃去原溶液,加入150 μ L/孔的DMSO,置于平板摇床上振摇5min后,使用酶标仪在波长570nm处测定每孔的OD值,并计算细胞活性。

[0248] 细胞活性=(测试样品孔OD-调零孔OD)/(空白对照孔OD-调零孔OD)×100%

[0249] 7.6实验结果

[0250] MTT法是一种检测细胞存活和生长的方法,测得的OD值与细胞活性成正比。细胞活性越高,值越大,反之,当细胞活性显著小于80%时,被认定为具有明显细胞毒性。

[0251] 测试样品对HaCaT细胞活性的影响结果见图6,结果显示,与空白对照组相比,阳性对照组的HaCaT细胞活性显著下降,表明2%的DMSO对HaCaT细胞具有毒性作用,而多肽组均没有明显的细胞毒性,其中肽(9)和肽(20)在低浓度下即能够明显地提高细胞活性,促进HaCaT角质形成细胞增殖。

[0252] 由此可知,本发明的肽能提高HaCaT角质形成细胞的活性,促进HaCaT角质形成细胞增殖,从而修护皮肤屏障,保护皮肤免受外界伤害。

[0253] 实施例8光老化实验

[0254] 8.1试剂与材料

[0255] 胎牛血清、DMEM培养基、PBS、青霉素、链霉素、噻唑蓝(MTT)。

[0256] 8.2仪器

[0257] 酶标仪、CO₂培养箱、超净工作台。

[0258] 8.3细胞株

[0259] 人角质形成细胞(HaCaT)购买自中国科学院典型培养物保藏委员会昆明细胞库。

[0260] 8.4待测样品

[0261] 多肽组:肽(13)和肽(20),上述样品测试浓度均为6.25ppm、12.5ppm。

[0262] 空白对照组:PBS。

[0263] UV组:UV辐射,加PBS。

[0264] 8.5实验方法

[0265] 取处于指数生长期状态良好的细胞,加入0.25%胰蛋白酶消化液,消化使贴壁细胞脱落,计数 $1\sim4\times10^5$ 个/mL,制成细胞悬液。

[0266] 适当稀释取10000个/孔细胞悬液接种于96孔板上,待细胞长满至80%左右时,建立UV光老化模型。空白对照组加50μL PBS,补充培养基至200μL,不进行UV照射;UV组和多肽组,加入适量PBS反复洗至无色后,加入50μLPBS,以80mJ/cm² UV灯下照射,灯源和培养瓶间距15cm,经照射后,弃去PBS,UV组加入PBS溶液和培养基至200μL,多肽组加入培养液和倍比稀释样品至200μL。空白对照组、UV组、多肽组继续于37℃、5%CO₂培养箱中孵育24h。

[0267] 之后每孔加入22μL 5mg/mL MTT,继续于37℃、5%CO₂培养箱中孵育4h。弃去原溶液,加入150μL/孔的DMSO,置于平板摇床上振摇5min后,使用酶标仪读取490nm和630nm波长下的参比OD值。

[0268] 8.6实验结果

[0269] 皮肤衰老受到内源性因素和外源性因素的影响,如遗传、环境暴露、紫外线照射、激素变化等。这些因素的累积,特别是紫外线的照射,导致皮肤结构、功能和外观的改变。本实验选取80mJ/cm² UV能量进行辐射建立皮肤光老化模型。

[0270] 测试样品对光老化细胞活性的影响结果见图7,与空白对照组相比,经UV辐照后,UV组HaCaT细胞活性显著下降,表明成功建立了光老化模型。与UV组相比,多肽组在低浓度下即能够明显地提高细胞活性,从而改善细胞老化,产生明显的抗光老化作用。

[0271] 由此可知,本发明的肽具有优异的抗光老化作用,可用于延缓衰老。

[0272] 实施例9细胞划痕实验

[0273] 9.1试剂与材料

[0274] 胎牛血清、DMEM培养基、PBS、青霉素、链霉素。

[0275] 9.2仪器

[0276] 光学显微镜、CO₂培养箱。

[0277] 9.3细胞株

[0278] 人角质形成细胞(HaCaT)购买自中国科学院典型培养物保藏委员会昆明细胞库。

[0279] 9.4待测样品

[0280] 多肽组:肽(13)和肽(20),上述样品测试浓度均为12.5ppm。

[0281] 空白对照组:PBS。

[0282] 阳性对照组:50U/mL的EGF。

[0283] 9.5实验方法

[0284] 取处于指数生长期状态良好的HaCaT细胞一瓶,加入0.25%胰蛋白酶消化液,消化使贴壁细胞脱落,计数 $1\sim4\times10^5$ 个/mL,制成细胞悬液。

[0285] 将细胞以15万个/孔的密度接种于24孔板,每孔2mL细胞悬浮液,待细胞贴壁长满后,换含0.5%~1%胎牛血清的培养基维持细胞24h使其同步化。用灭菌移液枪头进行划痕,PBS洗去掉落细胞,加入待测样品,继续于37℃、5%CO₂培养箱中孵育,24h后置于光学显微镜下观察细胞迁移情况。

[0286] 9.6实验结果

[0287] 细胞的划痕迁移实验能反应细胞的增殖修复能力。在HaCaT细胞长满培养皿的基础上进行划痕实验,于施用样品后24h在光学显微镜下观察细胞的迁移情况,评价测试样品对细胞增殖和迁移的影响。

[0288] 细胞划痕实验结果见图8,结果显示,空白对照组的细胞划痕仍旧明显,划痕间距正常;与空白对照组相比,EGF阳性对照组的细胞增殖迁移明显,表明建模成功。多肽组的划痕间距较空白对照组细胞划痕间距均有缩短,并出现细胞迁移轨迹。

[0289] 由此可知,本发明的肽能够促进细胞增殖和迁移,从而具有皮肤修护作用。

[0290] 实施例10透明质酸含量测定

[0291] 10.1试剂与材料

[0292] 胎牛血清、DMEM培养基、PBS、胰蛋白酶、透明质酸检测试剂盒、RIPA裂解液、BCA蛋白试剂盒。

[0293] 10.2仪器

[0294] 酶标仪、CO₂培养箱、超净工作台、恒温箱。

[0295] 10.3细胞株

[0296] 人角质形成细胞(HaCaT)购买自中国科学院典型培养物保藏委员会昆明细胞库。

[0297] 10.4待测样品

[0298] 多肽组:肽(4)、肽(13)和肽(20),上述样品测试浓度均为12.5ppm。

[0299] 空白对照组:PBS。

[0300] 10.5实验方法

[0301] 取处于指数生长期状态良好的HaCaT细胞一瓶,加入0.25%胰蛋白酶消化液,消化使贴壁细胞脱落,计数 $1\sim4\times10^6$ 个/mL,制成细胞悬液。

[0302] 将细胞以 10^5 个/孔接种于6孔板上,直至细胞长满至80%左右时开始分组。空白对照组加200μLPBS,补充培养基至800μL;多肽组加入200μL样品,补充培养基至800μL。空白对照组和多肽组置于37℃、5%CO₂培养箱中孵育48h。

[0303] 培养结束后,使用细胞刮掉细胞,加入200μL的RIPA裂解液提取蛋白,冰冻15min,离心力10000g离心10min,提取上清,使用BCA法测定总蛋白定量为1mg/mL,按照透明质酸检测试剂盒操作说明书进行操作。15min内用酶标仪在570nm处依序测量各孔的OD值。

[0304] 10.6实验结果

[0305] 透明质酸是人皮肤表皮的主要基质成分之一,也是皮肤屏障的重要组成成分,它能够锁住皮肤表面的水分,保护细胞不受病原菌的侵害,加快恢复皮肤组织,改善皮肤的生

理特性,具有天然保湿、皮肤修护的作用。皮肤中透明质酸含量的减少或破坏,可造成皮肤水分流失,使表皮衰老,因而透明质酸又被称为抗衰老因子。本实验通过测定本发明的肽对透明质酸含量的影响,以此确定本发明的肽能否提升透明质酸的含量,进而发挥保湿、抗衰修护的作用。

[0306] 测试样品对透明质酸含量的影响结果见图9,结果显示,与空白对照组相比,多肽组均能够不同程度地提高透明质酸的含量,其中,本发明肽(4)和肽(20)的技术效果更优。

[0307] 由此可知,本发明的肽能够提高透明质酸的含量,从而增强皮肤屏障,补充皮肤表面的水分,使皮肤表面水润光滑,从而具有保湿、抗衰修护的功效。

[0308] 实施例11丝聚蛋白表达实验

[0309] 11.1试剂与材料

[0310] 胎牛血清、DMEM培养基、PBS、丝聚蛋白(FLG)检测试剂盒。

[0311] 11.2仪器

[0312] 荧光显微镜、CO₂培养箱、超净工作台、恒温箱。

[0313] 11.3细胞株

[0314] 人角质形成细胞(HaCaT)购买自中国科学院典型培养物保藏委员会昆明细胞库。

[0315] 11.4待测样品

[0316] 多肽组:肽(4)、肽(9)、肽(13)和肽(20),上述样品测试浓度均为10ppm、50ppm。

[0317] 空白对照组:PBS。

[0318] UV组:UV辐射,加PBS。

[0319] 11.5实验方法

[0320] 取冻存的HaCaT细胞培养,按照1:2传代至5代左右,选择长势较好的细胞作为实验对象。取细胞悬液,按照10⁴个/孔接种于96孔板上,加入完全培养基,置37℃、5%CO₂培养箱中培养24h,待细胞长满至80%左右时,建立UV光老化模型。

[0321] 用真空泵将原培养基溶液吸出,开始分组。空白对照组加200μLPBS,补充培养基至1200μL,不进行UV照射;UV组和多肽组,加入适量PBS反复洗至无色后,加入200μLPBS,以80mJ/cm² UV灯下照射,灯源和培养瓶间距15cm,经照射后,弃去PBS,UV组加入PBS溶液和培养基至1200μL,多肽组加入培养液和倍数稀释样品至1200μL。空白对照组、UV组、多肽组继续于37℃、5%CO₂培养箱中孵育24h。

[0322] 孵育后消化细胞,爬片12h后,固定细胞,使用丝聚蛋白(FLG)检测试剂盒对细胞进行染色,染色完毕后,置于荧光显微镜下观察。

[0323] 11.6实验结果

[0324] 丝聚蛋白(FLG)是人体皮肤角质层中连接角蛋白纤维的重要分子,可防止表皮水分丢失和外界物质入侵,因此,提高FLG的表达可以增强或修护皮肤屏障。本实验选取80mJ/cm² UV能量进行辐射建立皮肤角质层细胞模型,检测样品对FLG表达的影响,以此分析本发明的肽能否促进FLG表达。

[0325] 测试样品对FLG表达的影响结果见图10,结果显示,与空白对照组相比,经UV辐照后,UV组FLG含量显著下降(如图10中浅色部分所示),表明成功建立了实验细胞模型。与UV组相比,多肽组在10-50ppm范围内均能够不同程度地提高FLG含量,促进FLG表达,具有优异的促FLG表达的作用。其中,肽(13)的技术效果最优。

[0326] 由此可知,本发明的肽能够促进FLG表达,增强或修护皮肤屏障。

[0327] 实施例12透明质酸酶抑制实验

[0328] 12.1实验仪器与试剂

[0329] 分光光度计、磷酸盐缓冲溶液(PBS)、透明质酸、透明质酸酶。

[0330] 12.2待测样品

[0331] 肽(13)和肽(14),上述样品测试浓度均为50ppm、100ppm。

[0332] 12.3实验方法

[0333] 实验分为四组:空白对照组A1(PBS+透明质酸酶)、不含酶空白对照组A2(PBS+不含透明质酸酶的溶剂)、样品组B1(待测样品+透明质酸酶)、不含酶样品组B2(待测样品+不含透明质酸酶的溶剂),每组总反应体积相同。

[0334] 按照分组,将100 μ L的CaCl₂(2.5mmol/L)与500 μ L透明质酸酶(500U/mL)或不含透明质酸酶的溶剂混合,取20 μ L置于37℃恒温气浴震荡20min;空白对照组加入20 μ LPBS置于37℃恒温气浴震荡20min;样品组加入20 μ L不同浓度的样品置于37℃恒温气浴震荡20min;加入40 μ L的透明质酸置于37℃恒温气浴震荡40min;加入10 μ L乙酰丙酮溶液置于50℃恒温气浴震荡10min,75℃烘箱40min,50℃烘箱10min,待反应结束冷却后快速撕掉保鲜膜,避免产生水汽,再加入100 μ L的96%无水乙醇,10 μ L的Ehrlich试剂,于492nm处测量吸光值。

[0335] 透明质酸酶抑制率(%) = $\frac{(A1-A2)-(B1-B2)}{A1-A2} \times 100\%$ 。

[0336] 12.4实验结果

[0337] 透明质酸酶能够分解体内的透明质酸,使其变成低分子量的酸性刺激源,从而引起组胺释放,诱导机体产生敏感症状。此外,透明质酸的减少会破坏皮肤的屏障功能,导致皮肤内部水分流失。因此,抑制透明质酸酶的活性,可以达到舒缓、保湿、修护皮肤屏障的效果。

[0338] 测试样品对透明质酸酶抑制率的影响结果见图11。结果显示,在测试浓度下肽(13)和肽(14)均能够抑制透明质酸酶的活性。肽(13)在100ppm的抑制率为49.40%,肽(14)在100ppm的抑制率为40.96%。

[0339] 肽(13)和肽(14)的不同之处在于,前者的肽链C末端为酰胺化(-NH₂)的形式,后者肽链C末端为-OH的形式。实验表明,本发明的肽,不管其肽链C末端是-NH₂还是-OH,均具有相同的功效,均能够抑制透明质酸酶的活性,发挥舒缓、保湿、修护皮肤屏障的作用。

[0340] 综上所述,本发明的肽能够提高细胞活性,促进细胞增殖和迁移,增强或修护皮肤屏障,具有抗衰修护作用;亦具有抗老化或光老化的作用;还具有舒缓、保湿的功效。

[0341] 实施例13含肽(4)的脂质体的制备

	成分	以重量计%
[0342]	二棕榈酰基磷脂酰胆碱	4.0
	肽(4)	0.2
	防腐剂	0.5
[0343]	水	适量至 100

[0344] 制备方法:将二棕榈酰基磷脂酰胆碱称重且溶于氯仿。于真空下蒸发溶剂,直至得

到磷脂薄层,将此层于55℃以所需浓度的肽水溶液处理而水化,得到多室脂质体。将多室脂质体通过高压均质处理,得到尺寸更加小而均一的单室脂质体。

[0345] 实施例14含肽(9)的精华液的制备

	成分	以重量计%
	透明质酸钠	0.05
	丁二醇	3.00
	黄原胶	0.10
[0346]	1,2-戊二醇	2.00
	1,2-己二醇	0.50
	海藻糖	2.00
	肽(9)	0.03
	纯化水	适量至 100

[0347] 制备方法:纯化水搅拌加热至85℃,保温30min;将透明质酸钠、黄原胶预溶于丁二醇,加入水中,搅拌溶解完全;搅拌降温至35℃,加入剩余成分,搅拌均匀即得。

[0348] 实施例15含肽(13)的乳液的制备

	成分	以重量计%
	A 鲸蜡硬脂醇(和)鲸蜡硬脂基葡萄糖苷	5.0
	霍霍巴油	5.0
	矿物油	5.0
	棕榈酸异丙酯	7.0
	B 甘油	5.0
[0349]	尿囊素	0.1
	聚丙烯酰胺(和)C13-14 异链烷烃(和)月桂醇聚醚-7	0.3
	水	适量至 100
	C 防腐剂	0.5
	D 香精	0.5
	肽(13)	0.01

[0350] 制备方法:将肽(13)用水溶解得到多肽溶液;将鲸蜡硬脂醇(和)鲸蜡硬脂基葡萄糖苷、霍霍巴油、矿物油、棕榈酸异丙酯加热至85℃,搅拌均匀;得A相;将甘油、尿囊素、聚丙烯酰胺(和)C13-14异链烷烃(和)月桂醇聚醚-7用水溶解,加热至85℃,得B相;将A相快速加入B相,恒温均质3-5min,冷却;冷却至60℃以下加入防腐剂,搅拌均匀,冷却至45℃以下加入多肽溶液、香精,即得。

[0351] 实施例16含肽(14)的微米乳液组合物

	成分	以重量计%
[0352]	A 二乙基己基磺基琥珀酸钠	1.35
	异硬脂酸	7.65
	B 水	0.2
	变性乙醇	0.8
	C 椰油酸乙基己酯	适量至 100
	D 肽 (14)	0.005

[0353] 制备方法:按照处方用量,称取B相的成分加于容器中。接着,将D相添加至B相且于连续搅拌下均质化。随后将A相添加至混合物。最后,添加C相,搅拌均匀即得。

[0354] 实施例17含肽(20)的爽肤水的制备

	成分	以重量计%
[0355]	丙二醇	1.0
	尿囊素	0.3
	甘油	1.0
	PEG-7 甘油椰油酸酯	1.0
	肽 (20)	0.005
	防腐剂	0.5
	香精	0.5
	水	适量至 100

[0356] 制备方法:将尿囊素、甘油用水溶解,加热至85℃,保温30分钟;将PEG-7甘油椰油酸酯、肽(20)用水溶解;上述溶液冷却后混合,搅拌均匀,得混合溶液;将丙二醇、防腐剂、香精依次加入上述混合溶液,加水搅拌均匀,即得。

[0357] 尽管已描述了本发明实施例的优选实施例,但本领域内的技术人员一旦得知了基本创造性概念,则可对这些实施例做出另外的变更和修改。所以,所附权利要求意欲解释为包括优选实施例以及落入本发明实施例范围的所有变更和修改。

[0358] 最后,还需要说明的是,在本文中,诸如第一和第二等之类的关系术语仅仅用来将一个实体或者操作与另一个实体或操作区分开来,而不一定要求或者暗示这些实体或操作之间存在任何这种实际的关系或者顺序。而且,术语“包括”、“包含”或者其任何其他变体意在涵盖非排他性的包含,从而使得包括一系列要素的过程、方法、物品或者终端设备不仅包括那些要素,而且还包括没有明确列出的其他要素,或者是还包括为这种过程、方法、物品或者终端设备所固有的要素。在没有更多限制的情况下,由语句“包括一个……”限定的要素,并不排除在包括所述要素的过程、方法、物品或者终端设备中还存在另外的相同要素。

[0359] 以上对本发明所提供的新的肽及其组合物和用途,进行了详细介绍,本文中应用了具体个例对本发明的原理及实施方式进行了阐述,以上实施例的说明只是用于帮助理解本发明的方法及其核心思想;同时,对于本领域的一般技术人员,依据本发明的思想,在具

体实施方式及应用范围上均会有改变之处,综上所述,本说明书内容不应理解为对本发明的限制。

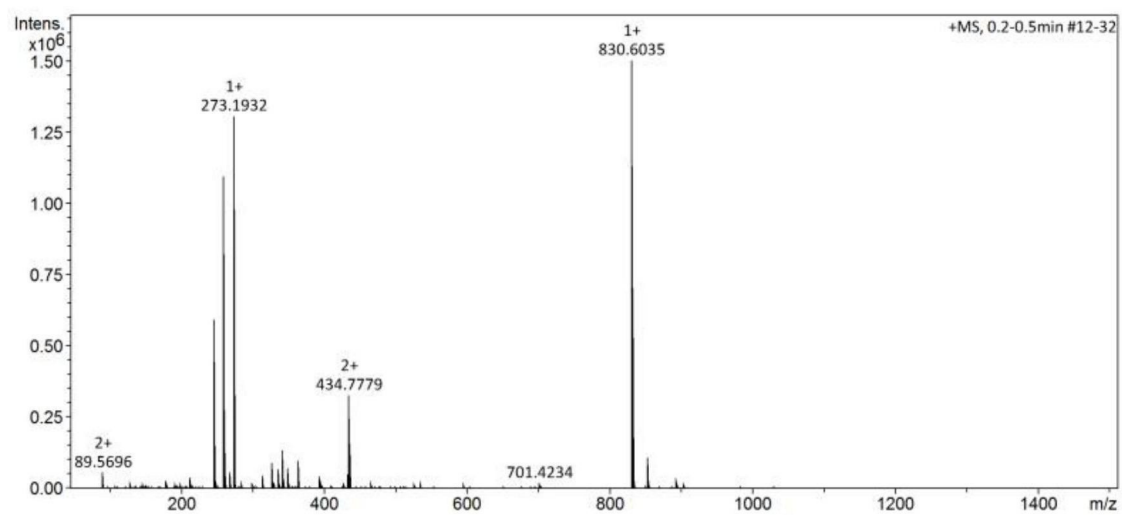


图1

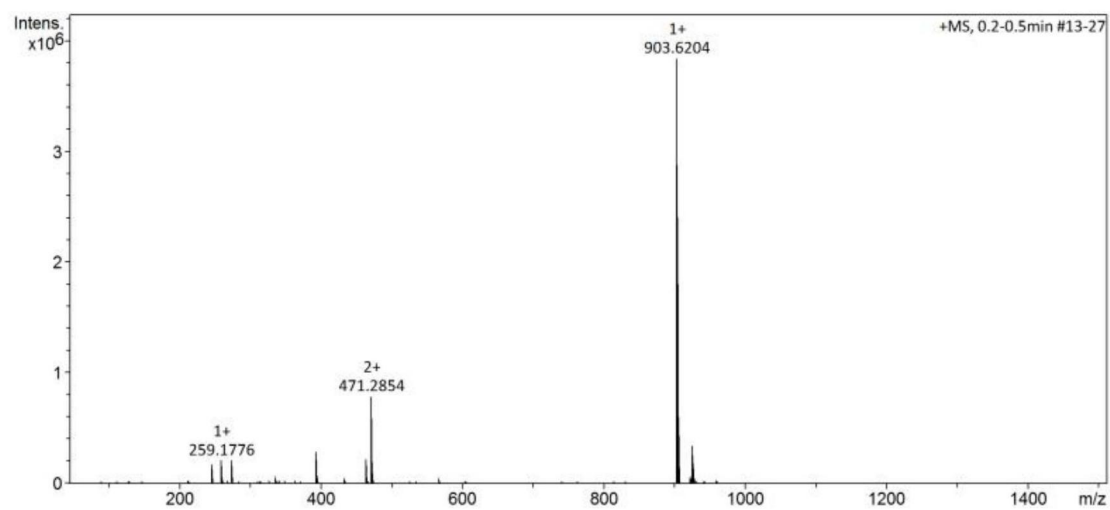


图2

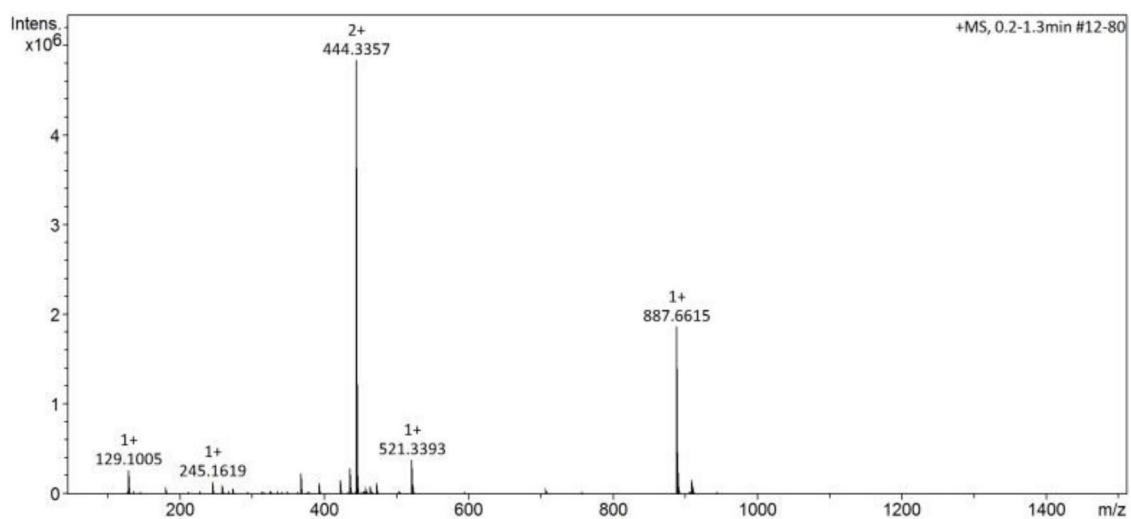


图3

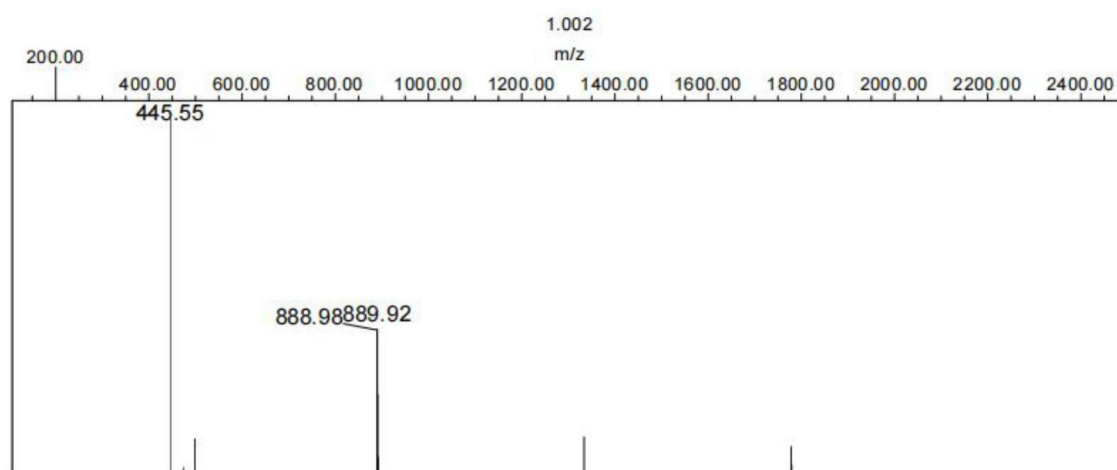


图4

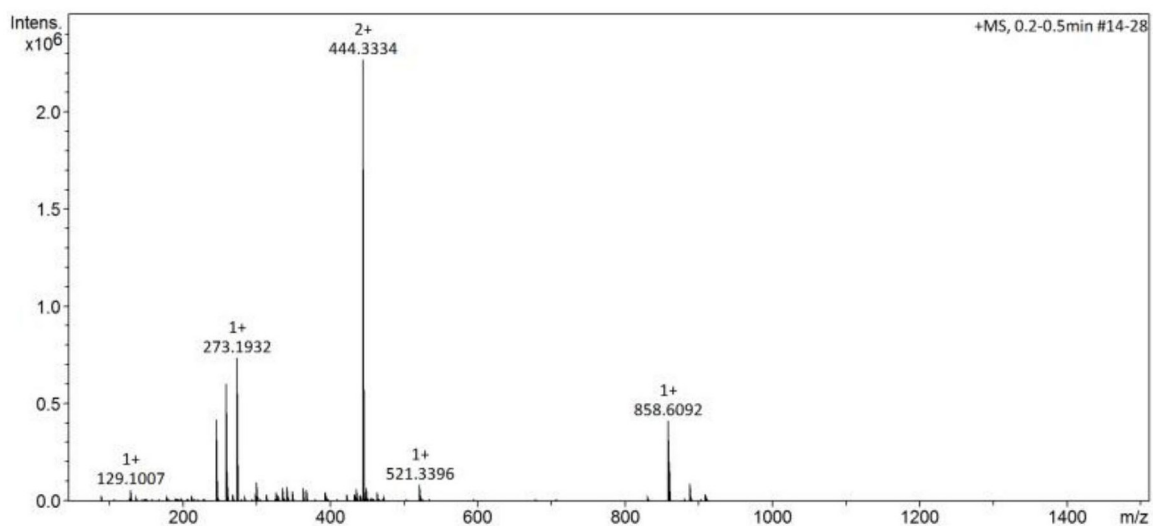


图5

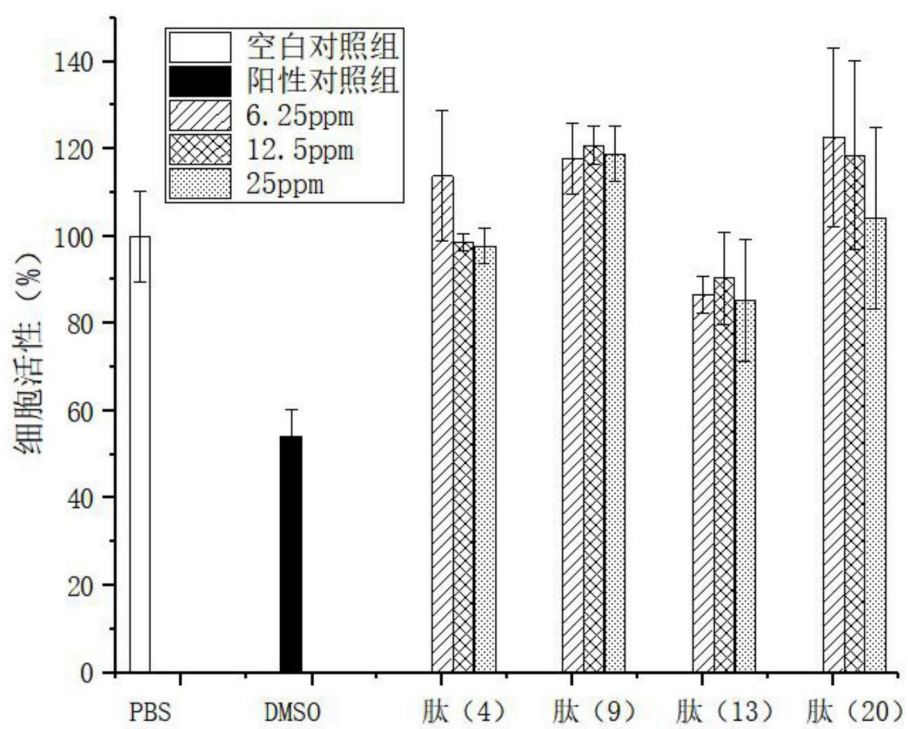


图6

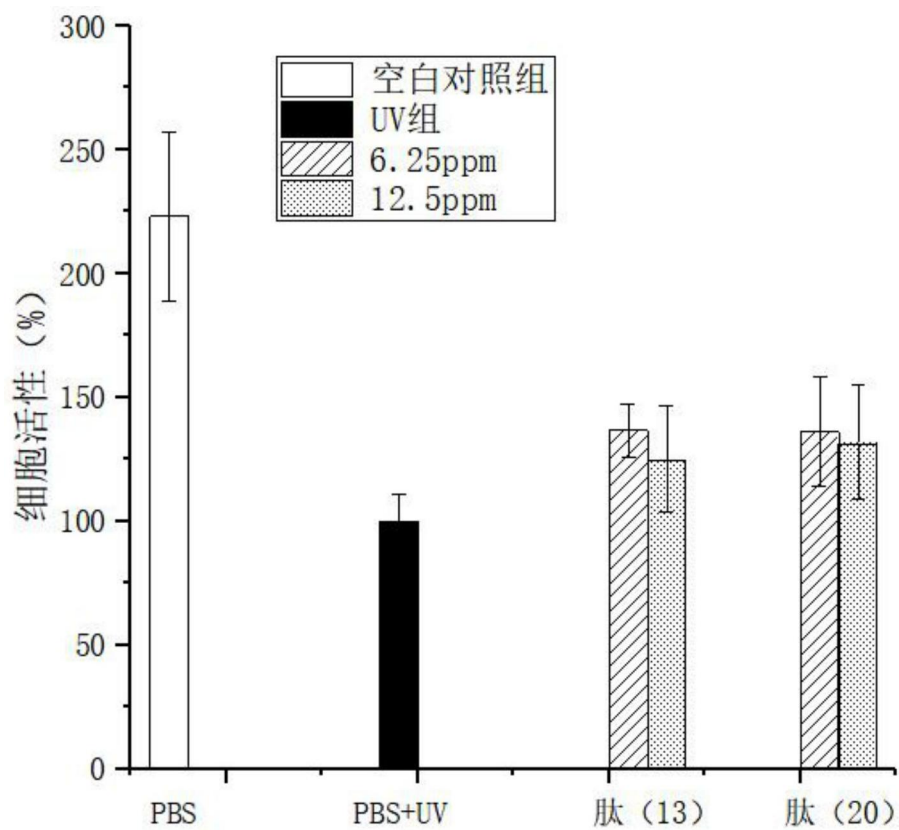


图7

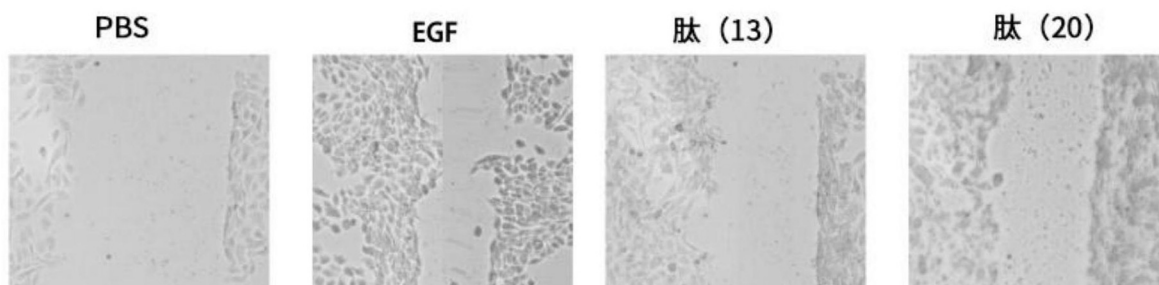


图8

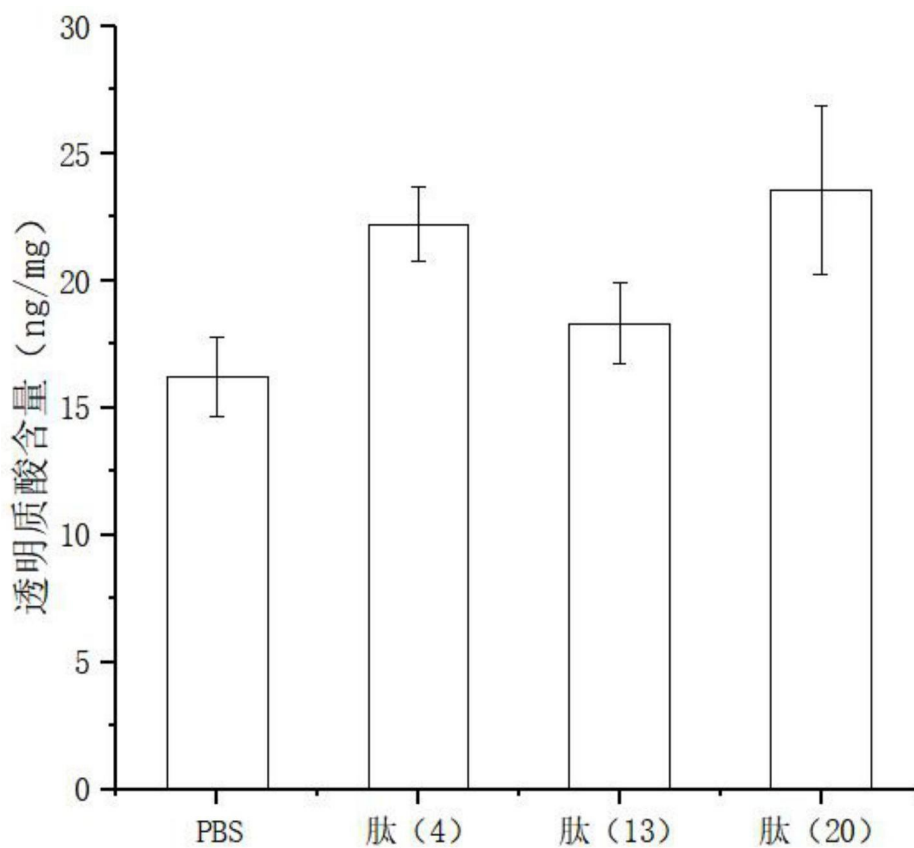


图9

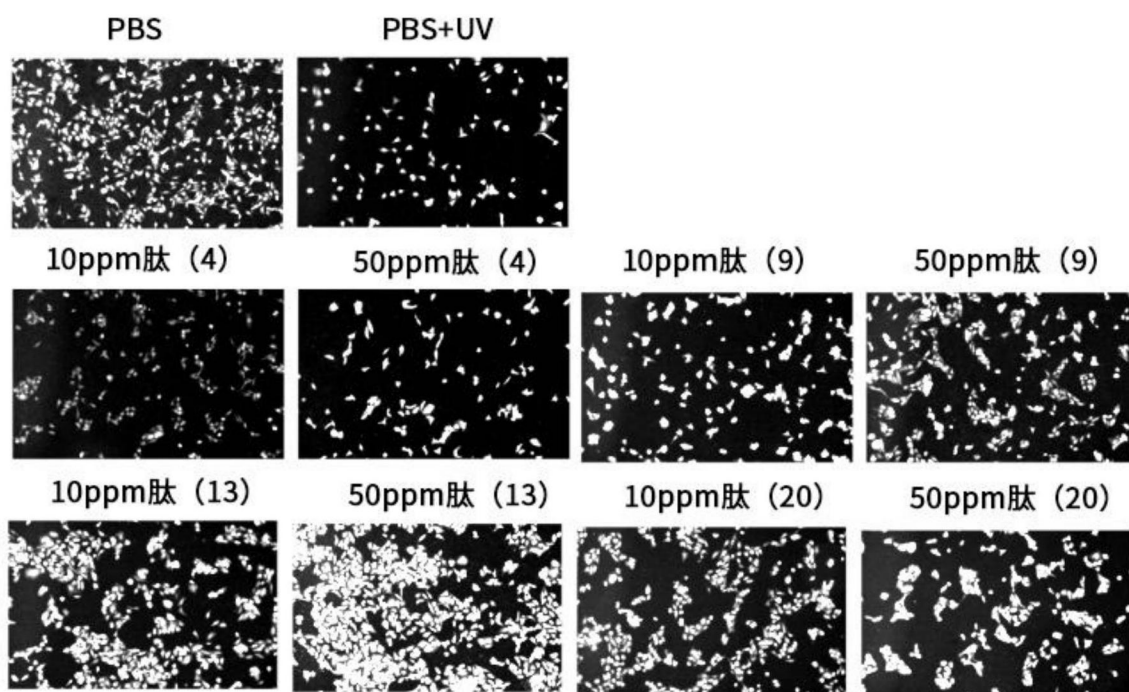


图10

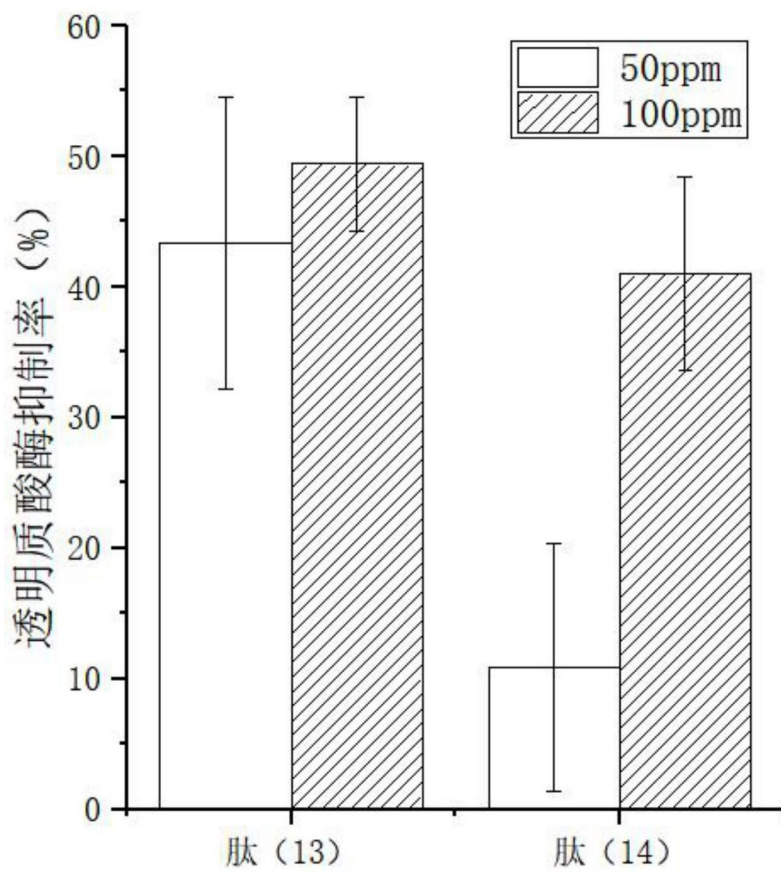


图11