

8 重复肽 功效评价报告

由环特生物——AAALAC 国际实验动物认证的 CRO 机构权威出具



环特生物创新实验中心 | 杭州

本中心实验动物生产许可证编号 SCXK(浙)2022-0003

实验动物使用许可证编号 SYXK(浙)2022-0004

项目编号: TW10679-1R1

委托单位: 华熙生物科技股份有限公司

报告日期: 2024 年 11 月 27 日

声 明

尊敬的客户：

感谢您对环特生物的信任。我单位基于“严谨、真实、保密”的科研服务原则，特对持续信赖我们的广大客户做出以下声明：

- 实验流程的质控声明

本单位对实验流程始终履行严格的质控体系要求。实验人员拥有专业的背景，且经过系统的培训考核，取得上岗资格。在实验室制度和标准操作规程的约束下，开展相关实验。实验过程采用多种内外部的监督手段，确保实验动物、人员、仪器、试剂及环境符合要求，将实验操作的随机误差和操作误差降到最低。

- 实验数据的真实声明

本单位保证实验的公正性、独立性和诚实性，实验结论对接收的委托样品负责，其样品所代表性、真实性和准确性由委托方负责。本单位保证实验数据的真实性、客观性，并可提供原始的分析数据及图文素材供您查阅。同时，我们明令禁止对任何实验数据，进行无科学依据的凭空捏造或人为修改。

- 实验结果的保密声明

尊重客户知识产权、全力以赴创造价值，是所有环特人开展对外服务的纯粹信仰。我们保证严格遵守契约精神，不在客户未知的情况下，随意对实验的具体细节和结论进行曝光和传播。对委托方所提供的样品及在提供试验服务的活动中所获的国家秘密、商业秘密、技术秘密保密。

本报告未盖本单位公章无效，涂改、缺页、复印无效，复制报告未重新加盖本单位公章无效。委托方如对本报告有异议，须在收到本报告之日起 15 日内向本单位提出。

环特生物

检测报告

客户信息:

华熙生物科技股份有限公司

山东省济南市高新技术开发区天辰大街 678 号

项目信息:

样 品 名 称: 8 重复合肽

规 格 及 数 量: 15 mL/瓶 × 3 瓶

颜 色 及 物 态: 透明液体

生产日期或批号: 20240125

限期使用日期: 1 年

生 产 企 业: 润辉生物技术(威海)有限公司

生 产 地 址: 山东省威海市南海新区滨海路北、东海路东

储 存 条 件: 冷藏(0-4℃)

收 样 日 期: 2024.10.29

完 成 日 期: 2024.11.18

检 测 项 目: 细胞毒性和抗皱功效

检测结论:

1. 样品 8 重复合肽, 在人永生化角质形成细胞 (HaCaT) 中, 在 0.312% 浓度范围内无细胞毒性; 在人真皮成纤维细胞中, 在 0.625% 浓度范围内无细胞毒性。
2. 样品 8 重复合肽具有抗皱功效。

检测方法: 请详见附页

检测结果: 请详见附页

备 注: 本检测报告仅对接收样品的测试结果负责

杭州环特生物科技股份有限公司

授权签名:



周示玉 环特生物授权签字人

检测项目 1：细胞毒性

一、实验室试验简述

方法名称		细胞毒性检测试验方法（MTT 法）																				
方法来源		《化妆品细胞毒性测定标准操作规程》																				
试验起止日期		2024 年 11 月 09 日-2024 年 11 月 11 日，共计 3 日。																				
结果简述	体系及样本量	试验体系：人永生化角质形成细胞（HaCaT）、人真皮成纤维细胞。 细胞代数：至少传 2 代。 每组实验细胞量：5 × 10 ³ 个/孔。																				
	原理方法	活细胞的线粒体中含有琥珀酸脱氢酶，而琥珀酸脱氢酶可以将外源性的 MTT 还原为水不溶性的蓝紫色结晶甲瓚，并沉积在细胞中，而死细胞无此功能。二甲基亚砷溶液（DMSO）能溶解细胞中的甲瓚，用多功能酶标仪测定 490 nm 波长处的吸光度值，由于结晶形成的量与活细胞的数量成正比，所以吸光度值可以间接地反映出活细胞的数量。																				
	实验步骤	1. 分别接种人永生化角质形成细胞和人真皮成纤维细胞于 96 孔板内（5 × 10³ 个/孔），于 37 °C，5% CO₂ 中培养 24 h。 实验分组如下： <table><tr><th>实验分组</th><th>细胞模型</th><th>给药浓度</th><th>检测指标</th></tr><tr><td>空白对照组</td><td>/</td><td>/</td><td rowspan="7">细胞活力（MTT 法）</td></tr><tr><td>正常对照组</td><td rowspan="5">人永生化角质形成细胞</td><td>/</td></tr><tr><td rowspan="4">样品组</td><td>0.156%</td></tr><tr><td>0.312%</td></tr><tr><td>0.625%</td></tr><tr><td>1.25%</td></tr><tr><td>2.5%</td></tr></table> <table><tr><th>实验分组</th><th>细胞模型</th><th>给药浓度</th><th>检测指标</th></tr></table>	实验分组	细胞模型	给药浓度	检测指标	空白对照组	/	/	细胞活力（MTT 法）	正常对照组	人永生化角质形成细胞	/	样品组	0.156%	0.312%	0.625%	1.25%	2.5%	实验分组	细胞模型	给药浓度
实验分组	细胞模型	给药浓度	检测指标																			
空白对照组	/	/	细胞活力（MTT 法）																			
正常对照组	人永生化角质形成细胞	/																				
样品组		0.156%																				
		0.312%																				
		0.625%																				
		1.25%																				
2.5%																						
实验分组	细胞模型	给药浓度	检测指标																			

		空白对照组	/	/	细胞活力（MTT 法）
		正常对照组	人真皮成纤维细胞	/	
	样品组			0.312%	
				0.625%	
				1.25%	
				2.5%	
				5%	
	2. 给药：样品组加入含相应浓度样品的新鲜培养基，正常对照组和空白对照组均更换为新鲜培养基，继续于 37℃，5% CO ₂ 孵育 24 h。				
	3. 孵育结束后向每孔中加入 MTT 溶液，继续培养 4 h。				
	4. 去培养基，加入 DMSO 溶液，振荡混匀，测定 490 nm 处吸光度值。				
$\text{细胞活力（\%）} = \frac{\text{OD}_{490}\text{样品组} - \text{OD}_{490}\text{空白对照组}}{\text{OD}_{490}\text{正常对照组} - \text{OD}_{490}\text{空白对照组}} \times 100\%$					
OD ₄₉₀ ：490 nm 处的吸光度值					
适用性及局限性	适用于化妆品及其原料的细胞毒性测试，要求样品能溶解于水或制备成能在水中均匀分散的悬浮液。				
判定依据	统计学处理结果采用 mean ± SD 表示，用 SPSS26.0 软件进行统计学分析。 本实验采用多组间的单因素方差分析（ANOVA）进行统计分析。统计结果以α = 0.05 为检验界限，p < 0.05 (与正常对照组比较) 表明具有显著性差异，且细胞活力小于 100%，判定为有毒性。				

二、检测结果

检测项目	检测浓度 (%)	细胞活力 (%，mean ± SD)	p 值	检测结果
细胞毒性 (人永生化角质形成细胞)	0.156	98.8 ± 1.50	> 0.05	无细胞毒性
	0.312	97.5 ± 0.287	> 0.05	无细胞毒性
	0.625	92.1 ± 1.04	< 0.001	有细胞毒性
	1.25	89.2 ± 1.48	< 0.001	有细胞毒性
	2.5	76.2 ± 1.01	< 0.001	有细胞毒性

检测项目	检测浓度 (%)	细胞活力 (%，mean ± SD)	p 值	检测结果
细胞毒性 (人真皮成纤维细胞)	0.312	96.5 ± 0.405	> 0.05	无细胞毒性
	0.625	93.7 ± 3.09	> 0.05	无细胞毒性
	1.25	91.1 ± 1.90	< 0.05	有细胞毒性
	2.5	87.1 ± 1.73	< 0.001	有细胞毒性
	5	68.3 ± 2.78	< 0.001	有细胞毒性

该样品细胞毒性实验折线图，如下图 1、图 2 所示：

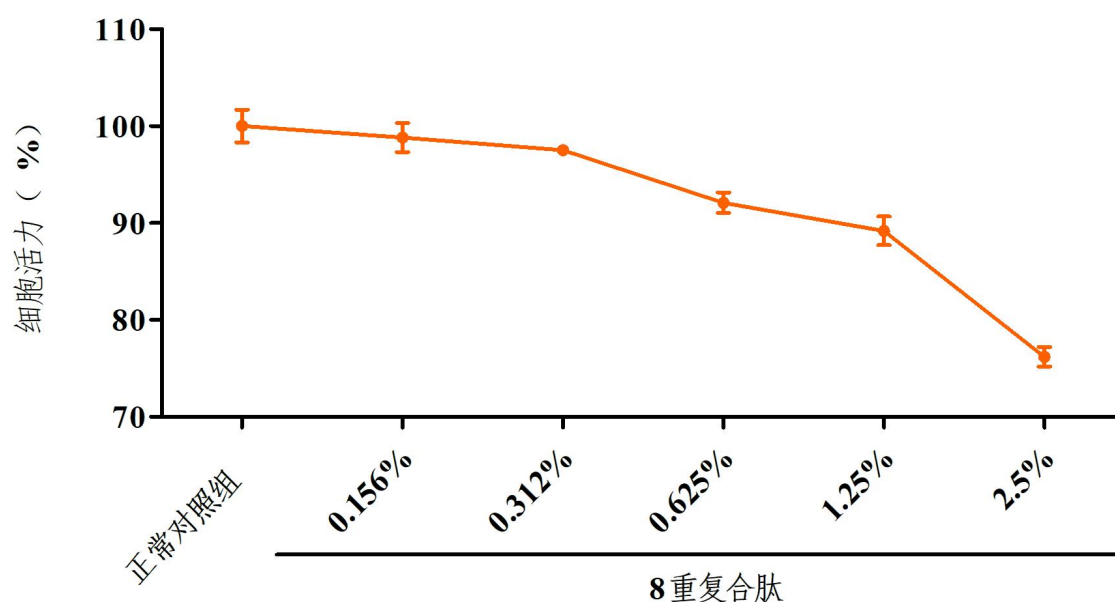


图 1. 细胞活力折线图 (人永生化角质形成细胞)

根据测试结果，在人永生化角质形成细胞 (HaCaT) 中，样品 8 重复肽组的细胞活力与正常对照组 (100%) 相比，在 0.312% 浓度范围内无明显差异，揭示了样品在 0.312% 浓度范围内无细胞毒性。

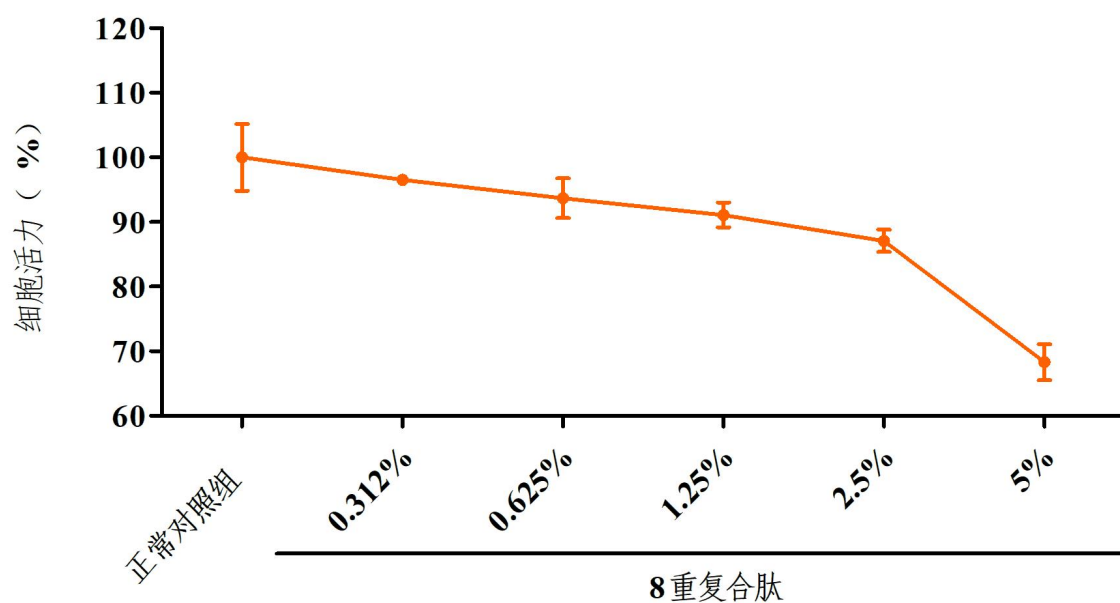


图 2. 细胞活力折线图（人真皮成纤维细胞）

根据测试结果，在人真皮成纤维细胞中，样品 8 重复肽组的细胞活力与正常对照组（100%）相比，在 0.625% 浓度范围内无明显差异，揭示了样品在 0.625% 浓度范围内无细胞毒性。

三、结论

在本次实验条件下，样品 8 重复肽，在人永生化角质形成细胞（HaCaT）中，在 0.312% 浓度范围内无细胞毒性；在人真皮成纤维细胞中，在 0.625% 浓度范围内无细胞毒性。

四、参考文献

- [1] 任周新.MTT 法在中草药成分干预细胞增殖及活性中的应用[J].中医学报,2023,38(10):2043-2049.
- [2] 刘炬,郭强,张军等.利用细胞毒性实验检测血液中炭疽毒素致死因子的方法学研究[J].军事医学,2013,37(05):390-395.
- [3] 刘凯,朱丽敏,许宝青等.MTT 法检测几种多糖和寡糖的体外细胞毒性[J].浙江农业科学,2014(03):421-424.

检测项目 2：抗皱功效

一、实验室试验简述

方法名称		抗皱功效试验方法
方法来源		化妆品紧致抗皱功效测试-体外细胞胶原蛋白基因表达量测定标准操作规程（SOP）
试验起止日期		2024 年 11 月 11 日-2024 年 11 月 18 日，共 8 日
结果简述	体系及样本量	细胞品系：人真皮成纤维细胞和人永生化角质形成细胞（HaCaT）。 细胞代数：至少传 2 代。 <i>COL1A1</i>、<i>COL3A1</i>、<i>COL5A1</i>、<i>COL6A1</i> 和 <i>COL18A1</i> 每组实验细胞量：3 × 10⁵ 个/孔。 <i>COL4A1</i>、<i>COL7A1</i> 和 <i>COL17A1</i> 每组实验细胞量：6 × 10⁵ 个/孔。
	原理方法	成纤维细胞既合成和分泌胶原蛋白、弹性蛋白，生成胶原纤维、网状纤维和弹性纤维，也合成和分泌糖胺聚糖和糖蛋白等基质成分。I和 III 型胶原蛋白是真皮细胞外基质的主要成分之一，在婴儿和青少年皮肤中，I型胶原蛋白的含量约占 70%，而III型胶原蛋白占 30%；皮肤皱纹的出现与胶原蛋白的正常合成和表达密切相关，紫外线的照射会导致皮肤粗糙、变厚、失去弹性，形成皱纹。在人体皮肤中，有约 75%的蛋白质是胶原蛋白，维持着皮肤的紧实度。然而随着年龄增长，人类皮肤会逐渐出现萎缩（变薄）、脆弱、色素沉着不良和伤口愈合延迟。皮肤脆弱部分归因于半桥粒的变化和真表皮连接处的各类胶原蛋白（Collagen I，III，IV，VII）表达下调，其中，半桥粒（主要成分为胶原蛋白 XVII）是直接连接基底角质细胞和基底膜的结构。V型胶原蛋白属于纤维型胶原，主要分布在真皮和角膜等组织中，<i>COL5A1</i> 基因表达水平随年龄增长而降低，这可能与皮肤老化和胶原纤维减少有关；VI型胶原蛋白作为细胞外基质的重要组成部分，它与细胞及周围基底膜紧密相连；<i>COL18A1</i> 基因编码 XVIII 型胶原的α链，XVIII 型胶原属于非原纤维胶原蛋白，与几乎所有组织的各种基底膜（BM）相关。本实验利用人真皮成纤维

		细胞和人永生角质形成细胞，将样品作用于细胞后，通过检测 COL1A1、COL3A1、COL4A1、COL5A1、COL6A1、COL7A1、COL17A1 和 COL18A1 基因相对表达量，以此来评价该样品是否具有抗皱功效。																	
实验步骤	一、COL1A1、COL3A1、COL5A1、COL6A1 和 COL18A1 基因相对表达量检测																		
	1. 接种人真皮成纤维细胞于 6 孔板中（3 × 10 ⁵ 个/孔），于 37 °C，5% CO ₂ 孵育 24 h。																		
	实验分组如下：																		
	<table><tr><td>实验分组</td><td>给药浓度</td><td>诱导条件</td><td>细胞模型</td><td>检测指标</td></tr><tr><td>正常对照组</td><td>/</td><td>/</td><td rowspan="3">人真皮成纤维细胞</td><td>COL1A1、COL3A1、</td></tr><tr><td>模型对照组</td><td>/</td><td rowspan="2">UVA</td><td>COL5A1、COL6A1</td></tr><tr><td>样品组</td><td>0.625%</td><td>和 COL18A1 基因相对表达量</td></tr></table>	实验分组	给药浓度	诱导条件	细胞模型	检测指标	正常对照组	/	/	人真皮成纤维细胞	COL1A1、COL3A1、	模型对照组	/	UVA	COL5A1、COL6A1	样品组	0.625%	和 COL18A1 基因相对表达量	
	实验分组	给药浓度	诱导条件	细胞模型	检测指标														
	正常对照组	/	/	人真皮成纤维细胞	COL1A1、COL3A1、														
	模型对照组	/	UVA		COL5A1、COL6A1														
	样品组	0.625%			和 COL18A1 基因相对表达量														
	2. 孵育结束后，去培养基，D-Hanks 清洗 1 - 2 次，然后将样品组与模型对照组进行 UVA 辐射（5 J/cm ² ）。																		
	3. 造模结束后，将正常对照组和模型对照组更换为新鲜培养基，样品组中加入含有样品的新鲜培养基，继续于 37 °C，5% CO ₂ 孵育 24 h。																		
4. 提取各实验组总 RNA，合成 cDNA，利用 q-PCR 检测β-actin 和目的基因的基因表达。																			
5.用β-actin 作为基因表达的内参，计算目的基因的 RNA 相对表达量。																			
$RNA相对表达量 = 2^{\Delta\Delta C(t)}$ $\Delta\Delta C(t) = \overline{\Delta C(t)}_{模型对照组} - \Delta C(t)_{样品组}$ $\Delta C(t) = C(t)_{目的基因} - C(t)_{\beta-actin}$																			
二、COL4A1、COL7A1、COL17A1 基因相对表达量检测																			
1. 接种人永生角质形成细胞（HaCaT）于 6 孔板中（6 × 10 ⁵ 个/孔），于 37 °C，5% CO ₂ 孵育 24 h。																			
实验分组如下：																			

	实验分组	给药浓度	细胞模型	检测指标
	正常对照组	/	人永生化角质形成细胞	COL4A1、COL7A1、COL17A1 基因相对表达量
	样品组	0.312%		
	2. 孵育结束后，去培养基，D-Hanks 清洗 1 - 2 次，正常对照组更换为新鲜培养基，样品组中加入含有样品的新鲜培养基，继续于 37℃，5% CO ₂ 孵育 24 h。			
3. 提取各实验组总 RNA，合成 cDNA，利用 q-PCR 检测β-actin 和目的基因的基因表达。				
4. 用β-actin 作为基因表达的内参，计算目的基因的 RNA 相对表达量。				
$\text{RNA 相对表达量} = 2^{\Delta\Delta C(t)}$ $\Delta\Delta C(t) = \overline{\Delta C(t)}_{\text{正常对照组}} - \Delta C(t)_{\text{样品组}}$ $\Delta C(t) = C(t)_{\text{目的基因}} - C(t)_{\beta\text{-actin}}$				
适用性及局限性	适用于化妆品及其原料的抗皱功效测试，要求样品能溶解于水或制备成能在水中均匀分散的悬浮液。			
判定依据	统计学处理结果采用 mean ± SD 表示，用 SPSS26.0 软件进行统计学分析。 本实验采用两组间的的独立样本 T 检验进行统计分析。统计结果以α = 0.05 为检验界限，p < 0.05 判定为具有显著性差异，与正常对照组相比，样品组 COL4A1、COL7A1、COL17A1 基因相对表达量显著上调；与模型对照组相比，样品组 COL1A1、COL3A1、COL5A1、COL6A1 和 COL18A1 基因相对表达量显著上调，表明样品具有抗皱功效。			

二、检测结果

检测项目	检测样品	检测浓度	COL1A1 基因相对表达量	上调率 (%)	p 值(vs.NC)	检测结果
			(mean ± SD)			
抗皱功效	正常对照组	-	1.32 ± 0.119	-	< 0.05	显著
	模型对照组	-	1.00 ± 0.079	-	-	-
	8 重复合肽	0.625%	1.29 ± 0.064	29	< 0.01	显著

注：NC 为模型对照组

检测项目	检测样品	检测浓度	COL3A1 基因相对表达量	上调率 (%)	p 值(vs.NC)	检测结果
			(mean ± SD)			
抗皱功效	正常对照组	-	1.47 ± 0.091	-	< 0.01	显著
	模型对照组	-	1.00 ± 0.069	-	-	-
	8 重复合肽	0.625%	1.30 ± 0.054	30	< 0.01	显著

注：NC 为模型对照组

检测项目	检测样品	检测浓度	COL5A1 基因相对表达量	上调率 (%)	p 值(vs.NC)	检测结果
			(mean ± SD)			
抗皱功效	正常对照组	-	1.62 ± 0.117	-	< 0.01	显著
	模型对照组	-	1.00 ± 0.115	-	-	-
	8 重复合肽	0.625%	1.50 ± 0.119	50	< 0.01	显著

注：NC 为模型对照组

检测项目	检测样品	检测浓度	COL6A1 基因相对表达量	上调率 (%)	p 值(vs.NC)	检测结果
			(mean ± SD)			
抗皱功效	正常对照组	-	1.39 ± 0.056	-	< 0.01	显著
	模型对照组	-	1.00 ± 0.097	-	-	-
	8 重复合肽	0.625%	1.47 ± 0.133	47	< 0.01	显著

注：NC 为模型对照组

检测项目	检测样品	检测浓度	COL18A1 基因相对表达		上调率 (%)	p 值(vs.NC)	检测结果
			量 (mean ± SD)				
抗皱功效	正常对照组	-	1.50 ± 0.074		-	< 0.001	显著
	模型对照组	-	1.00 ± 0.026		-	-	-
	8 重复合肽	0.625%	1.60± 0.100		60	< 0.001	显著

注：NC 为模型对照组

检测项目	检测样品	检测浓度	COL4A1 基因相对表达量		上调率（%）	p 值(vs.BC)	检测结果
			（mean ± SD）				
抗皱功效	正常对照组	-	1.00 ± 0.028	-	-	-	
	8 重复合肽	0.312%	1.46 ± 0.123	46	< 0.01	显著	

注：BC 为正常对照组

检测项目	检测样品	检测浓度	COL7A1 基因相对表达量		上调率（%）	p 值(vs.BC)	检测结果
			（mean ± SD）				
抗皱功效	正常对照组	-	1.00 ± 0.026	-	-	-	
	8 重复合肽	0.312%	1.60 ± 0.100	60	< 0.001	显著	

注：BC 为正常对照组

检测项目	检测样品	检测浓度	COL17A1 基因相对表达		上调率 (%)	p 值(vs.BC)	检测结果
			量 (mean ± SD)				
抗皱功效	正常对照组	-	1.00 ± 0.028		-	-	-
	8 重复合肽	0.312%	1.26 ± 0.016		26	< 0.001	显著

注：BC 为正常对照组

该样品功效实验柱形图，如下图 3~图 10 所示：

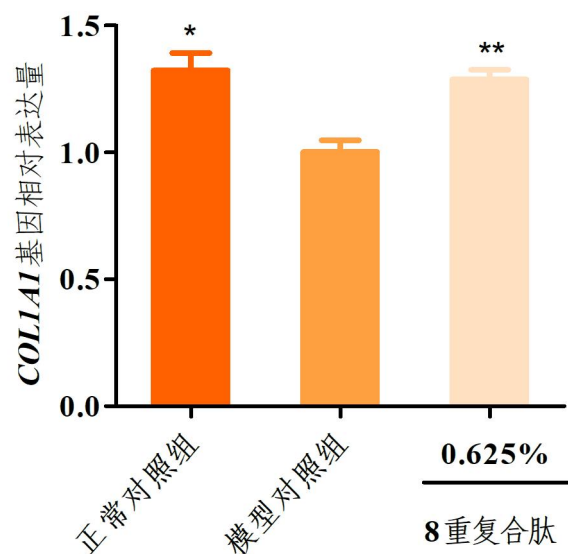


图 3. *COL1A1* 基因相对表达量柱形图
与模型对照组比较, * $p < 0.05$, ** $p < 0.01$

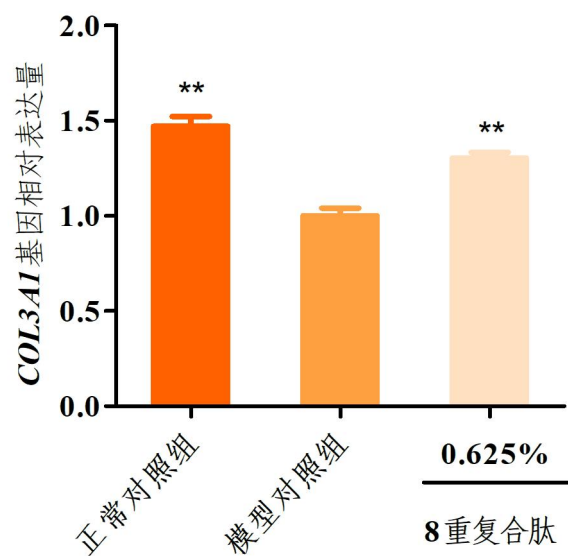


图 4. *COL3A1* 基因相对表达量柱形图
与模型对照组比较, ** $p < 0.01$

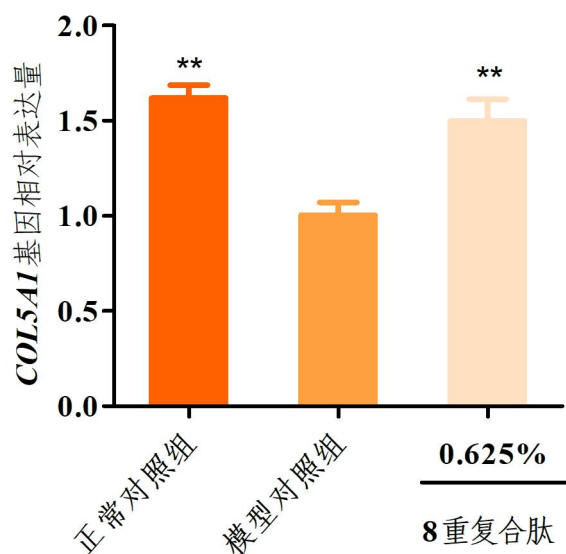


图 5. *COL5A1* 基因相对表达量柱形图
 与模型对照组比较, * $p < 0.05$, ** $p < 0.01$

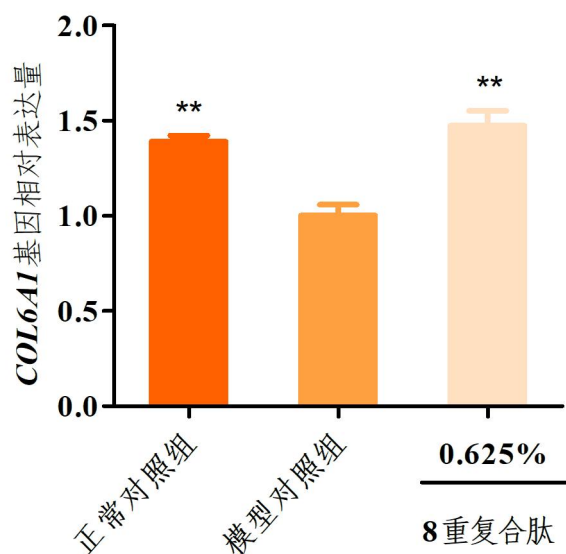


图 6. *COL6A1* 基因相对表达量柱形图
 与模型对照组比较, ** $p < 0.01$

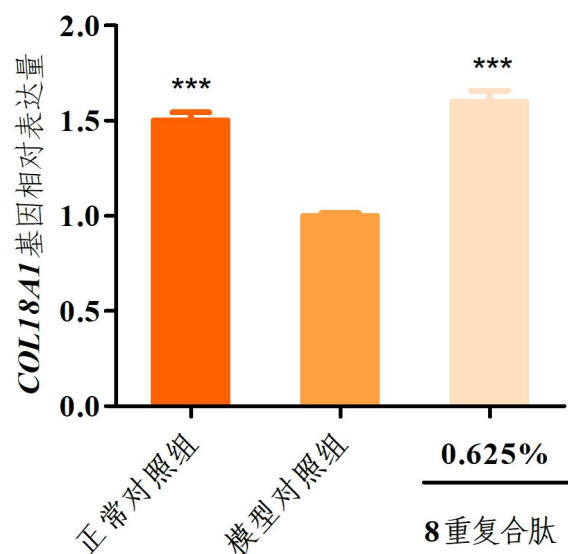


图 7. *COL18A1* 基因相对表达量柱形图
与模型对照组比较, *** $p < 0.001$

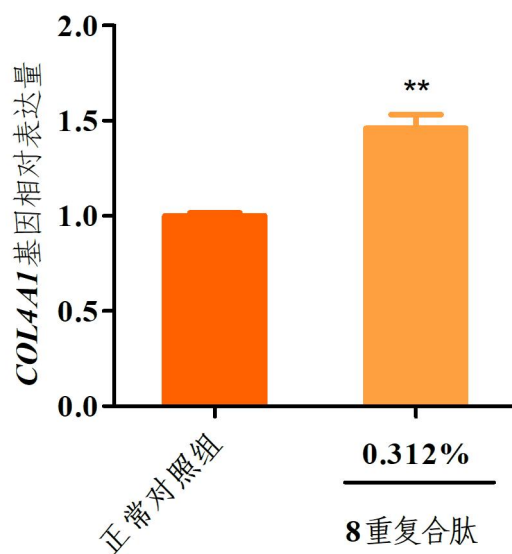


图 8. *COL4A1* 基因相对表达量柱形图
与正常对照组比较, ** $p < 0.01$

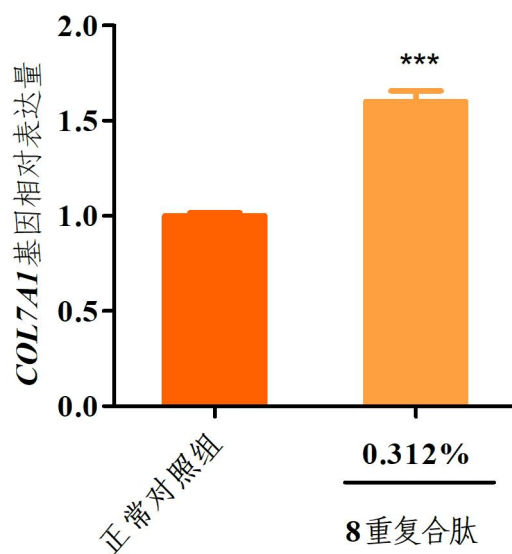


图 9. *COL7A1* 基因相对表达量柱形图
与正常对照组比较, *** $p < 0.001$

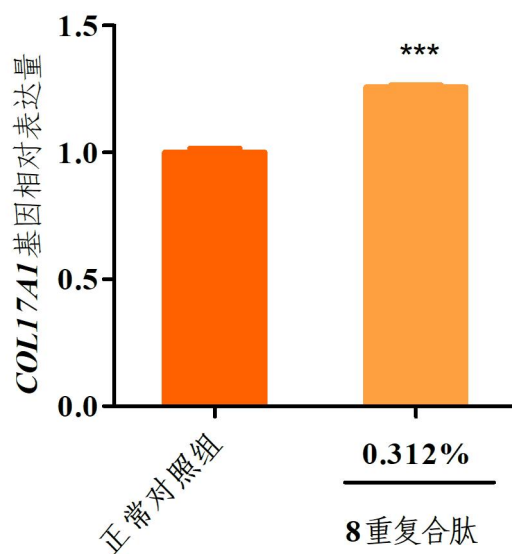


图 10. *COL17A1* 基因相对表达量柱形图
与正常对照组比较, *** $p < 0.001$

根据测试结果,与正常对照组相比,模型对照组的 *COL1A1*、*COL3A1*、*COL5A1*、*COL6A1* 和 *COL18A1* 基因相对表达量显著下调,说明本次测试刺激条件有效。

样品 8 重复合肽组的 *COL1A1*、*COL3A1*、*COL5A1*、*COL6A1* 和 *COL18A1* 基因相对表达量与模型对照组相比,均明显上调,上调率分别为 29%, 30%, 50%, 47%, 60%; 样品 8 重复合肽组的 *COL4A1*、*COL7A1* 和 *COL17A1* 基因相对表达量与正常对照组相比,均明显上调,上调率分别为 46%, 60%, 26%, 揭示了样品 8 重复合肽具有抗皱功效。

三、结论

在本次实验条件下，样品 8 重复肽具有抗皱功效。

四、参考文献

- [1] 胡孝辉, 朱承睿, 高丰厚, 等. UVB 诱导人皮肤成纤维细胞 I, III 型胶原下调机制的研究[J]. 中国美容整形外科杂志, 2010(7):4.
- [2] Chiang H M, Chen H C, Chiu H H, et al. Neonauclea reticulata (Havil.) Merr Stimulates Skin Regeneration after UVB Exposure via ROS Scavenging and Modulation of the MAPK/MMPs/Collagen Pathway[J]. Evidence-Based Complementray and Alternative Medicine, 2013(7):324864.
- [3] Je Y J, Choi D K, Sohn K C, et al. Inhibitory role of Id1 on TGF- β -induced collagen expression in human dermal fibroblasts - ScienceDirect[J]. Biochemical & Biophysical Research Communications, 2014, 444(1):81-85.
- [4] Guo Q, Tian Q, Tian X, et al. Effect of Regulating the Expression of HSP47 on Collagen Metabolism in Scleral Fibroblasts[J]. Current Eye Research, 2020:1-9.
- [5] 范婷, 赵健烽, 常烨璐, 等. 重组人源化 III 型胶原蛋白对皮肤功能性相关基因表达的影响[J]. 日用化学工业(中英文), 2022, 52(12):7.
- [6] 杨诗羽, 林定, 高飞, 等. 香草乙酮对胶原蛋白 COL17A1 基因表达的影响及在护肤品中的应用[J]. 日用化学品科学, 2021(044-010).
- [7] LIU N, MATSUMURA H, KATO T, et al. Stem cell competition orchestrates skin homeostasis and ageing[J]. Nature, 2019, 568(7752): 1-7.
- [8] KMD Bushby, Collins J, Hicks D. Collagen type VI myopathies [J]. Advances in Experimental Medicine and Biology, 2013, 802: 185.
- [9] 叶滔, 项琪, 杨艳, 黄亚东. 胶原蛋白的开发与应用研究进展[J]. 生物工程学报, 2023, 39(3): 942-960.
- [10] Ritva Heljasvaara, Mari Aikio, Heli Ruotsalainen, et al, Collagen XVIII in tissue homeostasis and dysregulation — Lessons learned from model organisms and human patients[J], Matrix Biology, 2017, 57-58: 55-75.

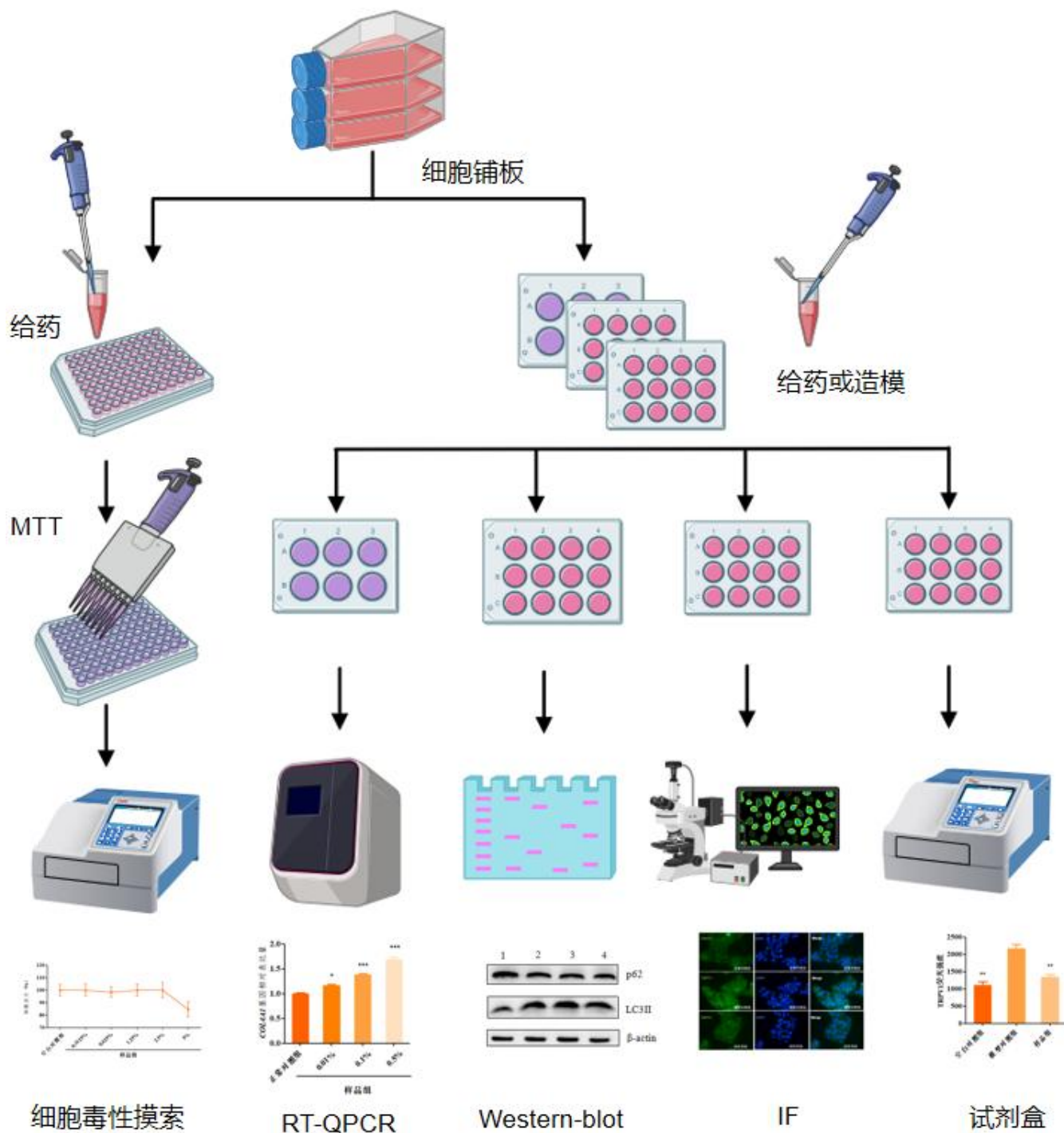
检测：彭飞、汪敏、张圆圆

审核：陈欣苗

日期：2024 年 11 月 22 日

日期：2024 年 11 月 27 日

附录、实验流程图



健康美丽产业 CRO 服务开拓者与引领者



Web: www.zhunter.com

Email: info@zhunter.com

六大创新实验中心

杭 州：浙江省杭州市滨江区江陵路 88 号 5 幢 2 楼

南 京：江苏省南京市江宁区生命科技小镇

广 州：广州市白云区嘉禾街广云路 408 号 410 室

北 京：北京市北京经济技术开发区科创六街 2 号院 9 号楼 1 层 101 室

上 海：上海市奉贤区临港南桥科技绿洲 35 号楼一楼

Boston: 16192 Coastal Highway, Lewes, Delaware 19958, County of Sussex.