



(12) 发明专利申请

(10) 申请公布号 CN 104884074 A

(43) 申请公布日 2015. 09. 02

(21) 申请号 201380056038. 4

(51) Int. Cl.

(22) 申请日 2013. 10. 25

A61K 36/55(2006. 01)

(30) 优先权数据

A61P 17/00(2006. 01)

1260235 2012. 10. 26 FR

A61P 31/00(2006. 01)

(85) PCT国际申请进入国家阶段日

2015. 04. 24

(86) PCT国际申请的申请数据

PCT/FR2013/052555 2013. 10. 25

(87) PCT国际申请的公布数据

W02014/064397 FR 2014. 05. 01

(71) 申请人 ISP 投资公司

地址 美国特拉华

(72) 发明人 J-M·博托 N·东洛热

F·波尔托兰

(74) 专利代理机构 永新专利商标代理有限公司

72002

代理人 安琪 张晓威

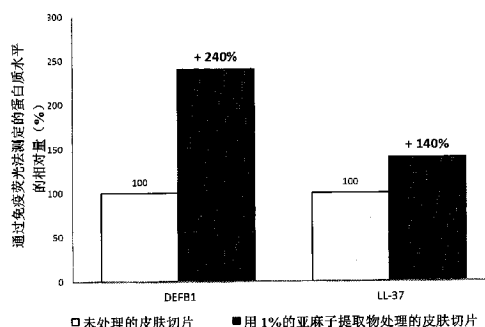
权利要求书1页 说明书13页 附图1页

(54) 发明名称

源自亚麻蛋白质水解的亚麻提取物作为活性
抗微生物剂的用途

(57) 摘要

本发明旨在用于化妆品和药学领域,更特别地用于皮肤病学领域。本发明涉及用于保护皮肤及附件免受微生物侵袭的亚麻提取物。本发明还涉及用于提高抗微生物肽的表达率的亚麻提取物。



1. 由亚麻子蛋白质水解获得的亚麻子提取物,其在药学上用于治疗由微生物侵袭所导致的皮肤和皮肤附件的刺激活性抗微生物剂。

2. 根据权利要求 1 的亚麻子提取物,其特征在于所述亚麻子提取物包含按照干提取物的重量计至少 0.1-5g/1 的肽化合物、按照干提取物的重量计 0.1-2g/1 的糖,并基本上包含分子量低于 5kDa 的肽化合物。

3. 根据权利要求 1 或 2 之一的亚麻子提取物,其用于提高抗微生物肽的表达水平。

4. 根据权利要求 1 至 3 之一的亚麻子提取物,其用于刺激皮肤的免疫防御。

5. 根据权利要求 1 至 4 之一的亚麻子提取物,其用于治疗皮肤和皮肤附件的金黄色葡萄球菌 (*Staphylococcus aureus*) 感染。

6. 由亚麻子蛋白质水解获得的亚麻子提取物用于增强健康和 / 或敏感皮肤和皮肤附件的化学屏障功能的美容用途。

7. 根据权利要求 6 的亚麻子提取物的美容用途,其用于保护皮肤和皮肤附件的共生微生物菌群和 / 或限制所述共生微生物菌群的失衡。

8. 根据权利要求 6 至 7 之一的亚麻子提取物的美容用途,其特征在于所述亚麻子提取物包含按照干提取物的重量计至少 0.1-5g/1 的肽化合物、按照干提取物的重量计 0.1-2g/1 的糖,并基本上包含分子量低于 5kDa 的肽化合物。

9. 用于保护共生微生物菌群和 / 或限制共生微生物菌群的失衡的美容治疗方法,其特征在于将包含在生理学可接受的介质中的作为活性剂的根据权利要求 6 至 8 之一的亚麻子提取物的组合物局部施用到健康皮肤和 / 或敏感皮肤上。

源自亚麻蛋白质水解的亚麻提取物作为活性抗微生物剂的用途

[0001] 本发明属于化妆品和药学领域,更特别地属于皮肤病学领域。本发明涉及用于保护皮肤及附件免受微生物侵袭 (microbial stress) 的亚麻子提取物。

[0002] 本发明还涉及用于提高抗微生物肽的表达水平的亚麻子提取物。

[0003] 本发明的术语“皮肤附件”包括在体表存在的所有角蛋白附件,特别是体毛、睫毛、眉毛、指甲和头发。

[0004] 表皮的主要功能是在生物和外部环境之间提供保护屏障。在表皮中,两种类型的屏障在起作用:由皮肤本身形成的物理屏障,其是通过强的细胞间凝聚力(桥粒,紧密连接部)和角蛋白细胞的耐磨性而确保的;以及由皮肤分泌物(皮脂,汗液)形成的化学屏障,其使得能够对抗变应原和刺激物,并且由于角质层的酸性 pH 以及水解酶和抗微生物肽的存在而起到抗菌作用。免疫系统的细胞形成能够清除那些试图穿透表皮的微生物的第三种防御屏障。

[0005] 与外部环境直接接触的皮肤被暴露于海量的微生物中,这些微生物定植在表皮和附件(毛囊,皮脂腺和汗腺)的浅层。皮肤维持着一个有利于某些微生物的稳定的生态系统,这些微生物的生长所需是与局部环境相适应的。人体皮肤可能具有超过一千种的细菌,并且它们的总数估计为 10^{12} 个细菌。健康个体的皮肤微生物菌群是共生微生物菌群,其包括常居皮肤菌群和暂时性皮肤菌群。

[0006] 常居皮肤菌群是以革兰氏阳性菌为主,特别是葡萄球菌属(例如金黄色葡萄球菌 (*S. epidermidis*))、棒状杆菌属(例如微小棒状杆菌 (*C. minutissimum*))和丙酸杆菌属(例如,痤疮丙酸杆菌 (*P. acnes*))。常居菌群的其它细菌是例如某些微球菌属或短杆菌属。

[0007] 暂时性皮肤菌群是多形态的,并且可以包括来自消化道或鼻咽或环境的潜在致病菌。其包括肠球菌、金黄色葡萄球菌 (golden staph) 和革兰氏阴性菌(特别是不动杆菌属 (*Acinetobacter*)、肠杆菌属 (*Enterobacter*)//假单胞菌属 (*Pseudomonas*))和真菌(如白色念珠菌 (*C. Albicans*))。

[0008] 暂时性皮肤菌群的细菌通常是短暂停留在皮肤上,皮肤的环境是不适于它们的。但是,它们可能作为机会致病菌,并且在具有弱化的防御系统的个体中引起感染,例如在全身性疾病(免疫抑制患者、糖尿病患者)的情况下或在皮肤屏障功能改变的情况下(银屑病或特应性皮炎)。

[0009] 任何皮肤损伤导致其天然防御线的弱化。皮肤随后易受病原微生物的攻击。另外,常居的或暂时性的皮肤微生物菌群随后可以充当机会致病菌,定植于伤口,然后,如果条件适宜的话,导致局部性和/或全身性感染过程。

[0010] 皮肤共生微生物菌群有助于通过参与皮肤的化学屏障功能而维持生态系统和皮肤健康。事实上,皮肤常居菌类在皮肤对病原微生物定植的抗性中发挥重要的作用,因为它们与致病菌竞争空间和食物,释放抗菌物质(抑制剂,产生不利的 pH 条件或者受体修饰 (receptor modification)),其降低致病菌的生长并连续刺激免疫系统,使得能够调节皮肤和皮肤附件的细菌群落。

[0011] 此外,角质形成细胞和皮脂腺细胞还特别通过表达抗微生物肽(AMP)来参与皮肤常驻菌群的平衡并保护皮肤对抗病原微生物。AMP是一个具有抗多种病原微生物的活性谱的具有少于100个氨基酸的多肽家族,所述病原微生物包括细菌、真菌、有包膜病毒和原生动物。AMP的作用机制包括直接抗微生物活性和引发宿主反应,所述引发导致细胞因子的释放、炎症、血管发生和表皮细胞再生。AMP的直接抗微生物活性的机制包括它们以多聚体蛋白的形式粘附在目标微生物的细胞膜上,导致目标微生物的溶胞。

[0012] 在人类中,两组AMP是经由皮肤而优势表达的:防卫素(DEFB)和上皮细胞抗菌肽,它们是非特异性的固有免疫系统的阳离子介质。

[0013] 人类抗菌肽hCAP18是一种非活性前肽。其C-末端片段LL37具有广谱活性的抗微生物活性并调节免疫应答。在表皮中,激肽释放酶(参与脱屑过程的原酶(primordial enzyme))负责将抗菌肽转录后成熟成为LL-37。

[0014] 防卫素是以前体前多肽原形式表达的具有少于50个氨基酸的小阳离子肽。防卫素家族可以分为两组:在上皮细胞表面上表达的 α -防卫素(其位于小肠的中性白细胞和帕内特细胞中)和 β -防卫素。被称为DEFB1至6的6个 β -防卫素已经在人体组织中被确定,包括在皮肤中表达的DEFB1、2和3。DEFB1、2和3是经由健康皮肤上层的角质形成细胞而组成性表达的,并且通过抑制病原微生物的生长和病原微生物对皮肤表面的侵袭而参与皮肤的化学屏障。

[0015] 在本文中,AMP的性质表现出特别有利于增强皮肤对抗微生物侵袭的保护功能和促进皮肤常驻菌群的平衡。

[0016] 已存在若干引入到用于局部施用的化妆品或药品的物质。文献US 2009/0005300和US 2010/0215591描述了天然的或合成的AMP及其在药物或化妆品组合物中作为抗菌剂的用途。然而,仍然需要开发新的成分,其使产生皮肤功能的健康和完整性成为可能。此外,还需要开发新的成分以改善皮肤的外观,特别是用于具有敏感性和应激性皮肤的人群。

[0017] 本发明旨在提供一种具有天然来源优势且能够保护皮肤共生微生物菌群的活性剂。发明人已经证明了本发明中所描述的亚麻子提取物的抗微生物活性。特别的是,已经证明,当施用在皮肤上时,该亚麻子提取物对皮肤共生菌群具有很强的保护活性,以免经由引起皮肤应激反应的传染原的攻击。

[0018] 因此,能够提高皮肤AMP的表达水平的新的活性成分使得考虑新的美容和治疗视角成为可能。

[0019] 根据第一个方面,本发明涉及作为活性抗微生物剂的亚麻子提取物。

[0020] 参考说明书会更好地理解本发明和因此所产生的益处。

[0021] 本发明通常涉及哺乳动物,更具体地涉及人类。

[0022] 术语“抗微生物”或“免于微生物侵袭的保护”涉及微生物的死亡、抑制它们的生长或阻止它们的生长。“抑制病原微生物的生长”是指降低病原微生物的生长,例如降低菌落数目和/或病原微生物菌落的大小,而术语“阻止微生物的生长”是指停止微生物生长。

[0023] “微生物(Microorganisms或microbes)”是指在古菌或细菌以及单细胞和丝状真菌(例如酵母菌)、单细胞或丝状藻类、单细胞和多细胞寄生虫和病毒的系统发育区域中发现的任何有机体。

[0024] 根据具体的特征,本发明涉及用于保护皮肤和皮肤附件免于微生物侵袭的亚麻子

提取物。

[0025] 对具有化学屏障功能改变或局部免疫系统弱化的皮肤使用亚麻子提取物或包含其的组合物使得皮肤和皮肤附件能够受到保护,并且使更好地抵抗由致病微生物或机会微生物的侵袭成为可能。

[0026] 根据具体的特征,本发明涉及亚麻子提取物,其用于提高抗微生物肽的表达水平。

[0027] 优选地,本发明涉及亚麻子提取物,其用于提高防卫素和 / 或抗菌肽的细胞表达水平。

[0028] 根据具体的特征,本发明涉及亚麻子提取物,其用于刺激皮肤的免疫防御。

[0029] 根据具体的特征,本发明涉及亚麻子提取物,其用于治疗皮肤和皮肤附件的金黄色葡萄球菌 (*Staphylococcus aureus*) 感染。

[0030] 本发明还涉及亚麻子提取物,其用于治疗皮肤的特应性皮炎和 / 或酒渣鼻。

[0031] 酒渣鼻是一种由细菌引起的皮肤病症,其可能与致使皮肤保护系统易受攻击的因子相关。特应性皮炎也是一种皮肤病症,其中抗菌肽的表达被异常降低。

[0032] 有利地,本发明的亚麻子提取物使刺激皮肤细胞生成抗菌肽类型的 AMP 成为可能,且不引起皮肤的毒性反应或过敏反应。

[0033] 根据第二个方面,本发明涉及亚麻子提取物用于增强皮肤和皮肤附件的化学屏障功能的用途。

[0034] “增强化学屏障功能”意味着在健康皮肤和 / 或敏感皮肤上施用亚麻子提取物或包含它的化妆品组合物使提高 AMP 的细胞表达水平成为可能。亚麻子提取物在表皮上具有局部作用,并且使缓解皮肤刺激 (如敏感皮肤的发红或不适) 成为可能。

[0035] 根据具体的特征,本发明涉及亚麻子提取物用于保护皮肤和皮肤附件的共生微生物菌群和 / 或限制所述共生微生物菌群的失衡的用途。

[0036] 有利地,本发明的亚麻子提取物的美容用途使通过在表皮中局部刺激 AMP 的表达而维持皮肤的良好化学屏障功能成为可能,这有助于维持皮肤的共生微生物区系的生态系统的平衡和有利条件。

[0037] 本发明使用的亚麻子提取物可以是任何类型的亚麻子提取物。

[0038] 根据优选的特征,亚麻子提取物来源于亚麻子蛋白质的水解。

[0039] 更优选地,所述亚麻子提取物包含按照干提取物的重量计至少 0.1-5g/l 的肽化合物,按照干提取物的重量计 0.1-2g/l 的糖,并基本上包含分子量低于 5kDa (优选分子量低于 2.5kDa) 的肽化合物。

[0040] 术语“肽”指通过肽键或通过修饰的肽键相互连接的两个或更多个氨基酸的链;术语“多肽”指具有较大尺寸的肽;术语“肽化合物”指存在于混合物中的蛋白质片段、肽和游离的氨基酸。

[0041] 术语“水解产物或来自水解”指在植物物质水解之后获得的任何物质或物质的混合物、或分离的制剂。

[0042] 为了进行提取,可以使用全植物或植物的具体部分 (叶子、种子等)。

[0043] 根据本发明更具体的是,使用亚麻科家族亚麻属 (亚麻子) 中众多植物的一种。亚麻属包括在北半球生长的超过 200 种亚麻。它们是具有纤维茎 (fibrous stem)、单叶和 5 瓣花的草本植物。根据本发明,优选地使用栽培种栽培亚麻 (*Linum usitatissimum* L.)。

本发明的亚麻子提取物（亚麻属）优选为从亚麻子种子（优选通过脱壳步骤而去除其外壳的种子）提取的蛋白质水解获得的肽提取物。

[0044] 本领域技术人员已知的任何提取或纯化方法均可以用于制备本发明的亚麻子提取物。

[0045] 优选地，所述亚麻子提取物是通过包括以下步骤的方法获得的：

[0046] – 提取植物来源蛋白质的步骤，

[0047] – 释放生物活性肽化合物的受控水解的步骤。

[0048] 在植物中发现许多蛋白质能够在它们的结构中含有生物活性肽化合物。受控水解使去除这些肽化合物成为可能。为了实施本发明，可以（但不是必须）首先提取相关的蛋白质然后将其水解，或者首先对粗提取物进行水解然后纯化肽化合物。

[0049] 用于获得本发明的亚麻子提取物的方法的具体实施方案在下文描述。

[0050] 在第一个步骤中，通过植物粉碎机粉碎植物。随后可以通过常规的有机溶剂（例如乙醇、己烷或丙酮）将由此获得的粉末“脱脂”。

[0051] 在第二个步骤中，通过常规方法进行植物蛋白的提取。植物的粉碎物悬浮在含有不溶性聚乙烯吡咯烷酮 (PVPP) (0.01% 至 20%) 型的吸附剂产物的碱性溶液中；事实上，已经观察到通过该方法，为随后的水解和纯化操作提供了便利。与蛋白质相互作用的酚类物质的浓度因此而降低。

[0052] 在离心和过滤步骤之后，收集可溶性部分，粗溶液随后构成含有蛋白质、碳水化合物和可能存在的脂质的提取物的第一形式。

[0053] 根据所述方法的一个具体实施方案，可以随后通过酸化介质来改变离子强度，从而将蛋白质沉淀，这使除去水溶性成分成为可能。然后用有机溶剂（例如乙醇或丁醇）洗涤所述沉淀，接着通过真空干燥蒸发该溶剂。然后将富含蛋白质的沉淀再溶解在水或其它溶剂中，然后构成水解产物的更为纯化的形式。

[0054] 从植物中提取蛋白质的步骤也可以在中性或酸性介质中，始终在聚乙烯吡咯烷酮的存在下进行。在过滤步骤之后，可以通过使用常规的沉淀剂如盐类（氯化钠、硫酸铵）或有机溶剂（乙醇、丙酮），以特定模式进行沉淀步骤。所获得的沉淀物可以在溶解于水或其它溶剂中后通过透析与沉淀剂分离。

[0055] 在离心和过滤步骤后收集含有蛋白质、碳水化合物和可能存在的脂质的可溶性部分。随后将粗溶液在受控条件下水解以生成肽化合物、多肽和可溶性肽。水解被定义为涉及通过水裂解分子的一种化学反应，该反应能够在中性、酸性或碱性介质中进行。根据本发明，经由蛋白水解酶而化学地和 / 或有利地进行水解。

[0056] 根据具体的特征，通过蛋白酶或蛋白酶的混合物和 / 或纤维素酶或纤维素酶的混合物来进行水解。

[0057] 根据优选特征，使用包括以下的酶的混合物：

[0058] 植物来源（例如，木瓜蛋白酶、菠萝蛋白酶、无花果蛋白酶等）和 / 或来源于微生物（曲霉菌属 (*Aspergillus*)、根霉菌属 (*Rhizopus*)、芽孢杆菌属 (*Bacillus*)、Alcalase 等）的内切蛋白酶。

[0059] – 和 / 或纤维素酶或纤维素酶混合物（例如 **Celluclast[®]** CL）。

[0060] 有利地，纤维素酶使亚麻子的细胞壁能够更好地水解，这增加了蛋白质的易接受

性并且有助于过滤。实际上,纤维素酶使具有少量寡糖的细胞壁能够水解。随后纤维素酶和蛋白酶的共同作用导致生成具有低分子量多肽(分子量低于 5kDa,更具体的是分子量低于 2.5kDa 的大部分)。一旦已经进行了这些不同的水解,则需要热灭活步骤来灭活这些酶。

[0061] 为了与上述相同的原因(即,去除多酚物质),将一定量的聚乙烯吡咯烷酮添加到该受控水解步骤的反应介质中。

[0062] 在过滤之后,所获得的溶液构成本发明的亚麻子肽提取物的第一有利形式。为了选择所产生的肽的分子量和性质,可以再度纯化该亚麻子肽提取物。可以通过超滤和/或通过色谱法有利地进行分级。

[0063] 肽提取物特别是低分子量肽提取物的使用在化妆品中具有众多优点。除了产生在起始蛋白质混合物中不存在的肽化合物外,水解和纯化使获得更稳定的肽化合物的混合物成为可能,并且可以更容易地重现组合物且不会引起化妆品过敏反应。

[0064] 根据具体的特征,本发明的亚麻子提取物基本上包含具有低分子量的肽化合物。优选地,本发明的亚麻子肽提取物基本上包含分子量低于 2.5kDa 的肽化合物。

[0065] 随后将任一种水解产物的粗略纯化形式在水中或含有水的任意混合物中溶解,然后通过超滤进行灭菌。

[0066] 定性和定量分析根据本发明获得的亚麻子提取物的物理化学特性及其肽化合物含量。术语肽化合物指存在于混合物中的蛋白质片段、肽游离氨基酸。所述肽、氨基酸和蛋白质片段通过本领域技术人员公知的常规技术进行测定。

[0067] 因此,根据本发明一个有利的实施方案,所述亚麻子提取物的 pH 为 4-5,优选 4-4.5。有利地,这种酸性 pH 促进蛋白质在水中的溶解并使蛋白质稳定。本发明的亚麻子提取物的干重为 0.1-8g/l,优选 0.1-5g/l,并且所述亚麻子提取物包含:

[0068] - 按照干提取物的重量计,0.1-5g/l 的肽化合物,

[0069] - 按照干提取物的重量计,0.1-2g/l 的糖。

[0070] 随后将提取物在水中或含有水的任何溶剂混合物中稀释,然后通过无菌过滤(sterilizing filtration)(0.2 μm)灭菌。

[0071] 根据具体的特征,将提取物在一种或多种生理学可接受的溶剂(如水、甘油、乙醇、丙二醇、丁二醇、二丙二醇、乙氧基化二甘醇或丙氧基化二甘醇、环状多元醇、或这些溶剂的任意混合物)中稀释。“生理学可接受”意味着所选择的溶剂适合与皮肤接触而不会引起毒性或不耐受反应。

[0072] 优选地,在稀释之后,所述亚麻子提取物包含:

[0073] - 按照干提取物的重量计,1.5-3.5g/l 的肽化合物,

[0074] - 和按照干提取物的重量计,约 0.3g/l 的糖。

[0075] 在本发明的亚麻子提取物中,糖的含量更优选低于 0.3g/l。

[0076] 在该稀释步骤之后,可以将提取物包封或包含在化妆品或药物载体(如在化妆品领域使用的脂质体或任意其它微囊)中,或者吸附在粉状有机聚合物、矿物支持物(如滑石和膨润土)上,更普遍地溶解在任意生理学可接受的载体中或固定在任意生理学可接受的载体上。

[0077] 本发明的亚麻子提取物可以应用于化妆品组合物或药物组合物中。所述组合物可以包含为了获得期望结果所必需的量的亚麻子提取物,所述结果为:保护皮肤和皮肤附件

以免微生物侵袭、保护皮肤和皮肤附件的菌群、刺激皮肤的免疫防御和刺激 AMP 的表达。

[0078] 根据本发明的一个有利的实施方案,相对于最终组合物的总重量,本发明的亚麻子提取物以 0.0001% 至约 20% 的浓度,优选以 0.05% 至约 5% 的浓度,甚至更优选以 1% 至约 3% 的浓度存在于组合物中。

[0079] 本发明的组合物可以通过任何适宜的途径(特别是口服、肠胃外或局部外用)施用,并且由本领域技术人员使它们的制剂适应特别是化妆品组合物或药物组合物。

[0080] 有利地,本发明的组合物意图在至少一部分面部或身体皮肤上局部皮肤给药。本发明的化妆品组合物可以用作护理产品和/或皮肤化妆产品。因此这些组合物必须包含本发明的生理学可接受的介质,即,适用于与人体皮肤或皮肤附件相接触且没有毒性、不相容性或甚至过敏反应的风险的介质。

[0081] 优选地,意图被局部施用到至少一部分面部或身体皮肤上的本发明的组合物是水溶液剂、水-醇(hydro-alcoholic)溶液剂或油溶液剂、水包油或油包水乳剂(emulsion)或复合型乳剂、溶液剂、混悬剂、微乳剂、含水或无水凝胶剂、浆液(serum)或雾滴分散体或胶态分散体的形式。这些组合物也可以是适于施用到皮肤、粘膜、嘴唇和/或皮肤附件上的乳膏剂、混悬剂或粉末的形式。这些组合物可以具有或多或少的流动性,并且为乳膏剂、洗剂、乳液(milk)、浆液、香膏剂(pomade)、乳膏剂、糊剂、软膏剂或泡沫剂的形式。它们也可以是固体形式,如棒(stick)、贴剂,或者可以以气雾剂或喷雾剂形式施用到皮肤上。它们可以用作皮肤护理产品和/或皮肤化妆产品。这些组合物也可以适用于施用到头皮和/或头发上,特别为洗发水、护发素、定型液(styling lotion)、护理液(treatment lotion)、乳膏或定型凝胶、用于头发的洗剂、发膜等。本发明的化妆品组合物尤其可用于涉及施用后漂洗或不漂洗的处理,或者以洗发水形式使用。其也可以是用刷子或梳子特别施加到睫毛、眉毛或头发上的染料或睫毛膏的形式。

[0082] 这些组合物还包括为了它们的配制所必需的在预期使用的领域中常用的任何添加剂和辅剂,如助溶剂(乙醇、甘油、苯甲醇、保湿剂……)、增稠剂、稀释剂、乳化剂、抗氧化剂、着色剂、遮光剂、色素、填料、防腐剂、香料、气味吸收剂、精油、微量元素、必需脂肪酸、表面活性剂、成膜聚合物、化学或矿物过滤器、水化剂(hydrating agent)或热水(thermal water)等。例如,可引用天然聚合物类型的水溶性聚合物,如多糖或多肽、甲基纤维素或羟丙基纤维素类的纤维素衍生物;或者合成聚合物泊洛沙姆、卡波姆、硅氧烷、PVA 或 PVP;特别地由 Ashland 公司销售的聚合物。在任何情况下,本领域技术人员会确保这些辅剂及其比例的选择使得不会不利地影响本发明的组合物的有利性质。这些辅剂可以例如相当于组合物总重量的 0.01 至 20%。当本发明的组合物是乳剂时,脂肪相可以占所述组合物总重量的 5-80 重量%,优选 5-30 重量%。用于所述组合物的乳化剂和助乳化剂(co-emulsifier)选自在所关注领域中常规使用的那些乳化剂和助乳化剂。例如,它们可以以组合物总重量的 0.3-10 重量%的比例使用。

[0083] 可以理解的是,在化妆品组合物中,本发明的活性成分可以单独使用或者与至少一个其它活性成分组合使用。

[0084] 有利地,根据本发明能够使用的组合物还可以包含旨在提高本发明的活性剂的作用的多种活性成分,特别是用于预防和/或治疗与皮肤屏障功能相关的病症或用于舒缓皮肤的活性成分。

[0085] 以非限定的方式,可以引用下列类型的组分:其它肽类活性成分、植物提取物、愈合剂、抗老化剂、抗皱剂、舒缓剂、抗自由基剂、抗紫外线剂、刺激真皮大分子合成或能量代谢的物质、水化剂、抗菌剂、抗真菌剂、抗炎剂、麻醉剂、分化调节剂(differentiation modulating agent)、皮肤色素沉着或色素脱失剂、指甲或头发生长刺激剂等。优选地,使用具有舒缓活性的物质或刺激真皮大分子合成的物质、或刺激能量代谢的物质。更具体地,所述活性成分选自生物活性肽活性成分、维生素、植物甾醇、类黄酮、DHEA 和 / 或一种它的前体或一种它的化学或生物学衍生物、金属蛋白酶抑制剂、或类视黄醇。

[0086] 根据第三个方面,本发明还包括用于意图保护共生微生物菌群和 / 或限制共生微生物菌群的失衡的美容治疗方法,其特征在于将包含亚麻子提取物的组合物局部施用到待治疗的皮肤或皮肤附件上。

[0087] 这种美容治疗方法的具体实施方案也参见上文所述。参考示例性实施例和非限制性实施例,本发明的其它优点和特征会变得更清晰。

[0088] 图 1 以直方图的形式显示用或不用 1% 亚麻子提取物治疗 24h 的离体皮肤中的抗微生物蛋白 DEFB1 和 LL-37 的表达水平的免疫组织化学检测。

[0089] 实施例 1:来自亚麻子(Linum usitatissimum L.)的活性成分的制备

[0090] 在第一个步骤中,将 1kg 亚麻子的种子在谷物研磨机上研磨。将所获得的碎粉(1kg) 放置在 10 升己烷中。随后将混合物在室温下搅拌 2 小时以进行原料的脱脂。在过滤和真空干燥之后,将所获得的粉末悬浮在 800ml 含 1% 聚乙烯吡咯烷酮(Polyclar V ISP)的 pH 10 的碱性水溶液(1 : 10 稀释)中。将混合物在室温下搅拌 2 小时以使可溶性部分溶解。在该提取阶段之后,通过离心来澄清介质,然后在平板上过滤。随后通过在中性或酸性介质中改变离子强度来对包含亚麻子的可溶性部分的滤液进行蛋白质沉淀,使去除可溶性碳水化合物组分、脂质和核酸成为可能。调节介质到 pH 3.5。去除上清液并且随后用乙醇洗涤沉淀,接着经由真空干燥蒸除溶剂。

[0091] 在该阶段中,获得约 50g 的浅黄色粉末状粗蛋白提取物,其包含:

[0092] - 蛋白质 :78%

[0093] - 碳水化合物 :20%

[0094] - 脂质 < 2%

[0095] 将该富含蛋白质的沉淀物溶解在 500g 水中。

[0096] 随后在 0.5% PVPP(Polyclar V) 和半胱氨酸内肽酶(2g/l 的菠萝蛋白酶和 2g/l 的碱性蛋白酶(alcalase))的存在下,对该粗蛋白提取物进行一系列受控的选择性酶法水解。在 50℃ 下反应 2 小时,然后在 80℃ 下持续 2 小时使酶混合物(enzymatic cocktail)失活,将水解产物在具有减小孔隙的平板上过滤,然后在灭菌管(sterilizing cartridge, 0.2 μm)中过滤。

[0097] 然后获得一种浅色水解产物,称量为 15-30g/l 的干提取物,随后将其稀释,使得通过 Lowry 法测定的肽化合物的浓度为 0.1-5g/l,优选 1.5-3.5g/l。对构成活性成分的植物水解产物的物理化学分析表明其 pH 为 4-5,优选 4-4.5。本发明的亚麻子提取物的干提取物含量为 1-8g/l,优选 0.1-5g/l,并且所述亚麻子提取物包含按照干提取物的重量计 0.1-5g/l 的肽化合物和按照干提取物的重量计 0.1-2g/l 的糖,优选地,将本发明的亚麻子提取物稀释,使得其包含按照干提取物的重量计 1.5-3.5g/l 的肽化合物和按照干提取物

的重量计 0.1-0.3g/1 的糖。

[0098] 实施例 2 :证明实施例 1 的亚麻子提取物对角质形成细胞中的 DEFB1 和 LL37 信使 RNA 的表达水平的活化作用

[0099] 此项研究的目的是确定实施例 1 的亚麻子提取物对 DEFB1 转录表达和对 LL-37 转录表达的影响。为了评估 DEFB1 信使 RNA 的表达水平和 LL-37 信使 RNA 的表达水平,进行实时聚合酶链式反应 (PCR) 定量。

[0100] 方案

[0101] 用或不用 (对照) 1% 的实施例 1 的亚麻子提取物处理 NHK 细胞 (正常原代人角质形成细胞), 每天两次, 持续 48 小时。

[0102] 为了评估 DEFB1 信使 RNA 的表达水平和 LL-37 信使 RNA 的表达水平, 需要从用实施例 1 的亚麻子提取物处理的或未处理的培养的角质形成细胞中分离总 RNA。然后将总 RNA 通过逆转录酶的作用而转变成互补 DNA。接着通过使用 StepOnePlus™ 热循环仪 (Applied Biosystems) 进行实时 PCR, 从而进行互补 DNA 的定量。这种定量使确定 DEFB1 信使 RNA 的表达水平和 LL-37 信使 RNA 的表达水平成为可能。

[0103] 结果

[0104] 与未处理的细胞相比, 在用实施例 1 的亚麻子提取物处理 48 小时之后, 观察到细胞中的 DEFB1 信使 RNA 的表达水平提高了 31% 和 LL-37 信使 RNA 的表达水平提高了 23%。

[0105] 结论

[0106] 实施例 1 的亚麻子提取物提高了在正常的人类角质形成细胞中编码 DEFB1 的信使 RNA 的表达水平和编码 LL-37 的信使 RNA 的表达水平。

[0107] 实施例 3 :证明实施例 1 的亚麻子提取物对角质形成细胞中的抗微生物蛋白 DEFB1 的表达和抗微生物蛋白 LL-37 的表达的活化作用

[0108] 此项研究的目的是确定实施例 1 的亚麻子提取物对抗微生物蛋白 DEFB1 的表达和抗微生物蛋白 LL-37 的表达的影响。为此, 通过对用或不用 (对照) 1% 的实施例 1 的亚麻子提取物处理 24 小时并且嵌入到石蜡中的角质形成细胞进行免疫细胞化学分析, 从而评估 DEFB1 蛋白的表达水平和 LL-37 蛋白的表达水平。

[0109] 方案

[0110] 培养 NHK 细胞 (正常原代人角质形成细胞)。随后用 10% 的福尔马林固定这些细胞, 然后包埋入石蜡中。然后将细胞块用切片刀切成 4 μ m 厚的切片, 接着转移到载玻片上。

[0111] 用 100% 的二甲苯从石蜡中移除这些切片, 接着在连续醇浴中再水化: 2 个 100% 乙醇浴 (EtOH) 进行 2 分钟, 1 个 95% 乙醇浴进行 2 分钟, 1 个 90% 乙醇浴进行 2 分钟, 和 1 个水浴进行 5 分钟。将载玻片浸没在 pH6 的 0.01M 柠檬酸缓冲液中并且加热至轻微沸腾, 以促进抗体进入所关注的蛋白质。将切片用 5% BSA 孵育 30 分钟, 然后用在 PBS 中稀释至 1/500 的第一抗体 (抗“DEFB1”多克隆兔抗体 ab14425 (Abcam, Cambridge, UK)) 或者用在 PBS 中稀释至 1/75 的抗“LL-37”单克隆小鼠抗体 sc-166770 (Tebu Santa Cruz, CA, USA) 孵育 1.5 小时, 同时在室温下搅拌。用 PBS 洗涤几次之后, 将这些切片用在 PBS 中稀释至 1/1000 的第二荧光抗体 (抗兔抗体 Alexa Flour 488A21206 (Invitrogen, Fisher)) 在室温下孵育 1 小时。用 0.3 μ M 4', 6' - 二脒基 -2- 苯基吲哚 (DAPI) (分子探针) 标记细胞核。用 PBS 漂洗该切片 5 分钟。通过使用荧光显微镜 (40 $\times$ 物镜) 检测抗微生物蛋白

DEFB1 和抗微生物蛋白 LL-37 的表达。

[0112] 结果

[0113] 结果表明,与未处理的角质形成细胞相比,在用 1% 的实施例 1 的亚麻子提取物处理 24 小时之后,抗微生物蛋白 DEFB1 的表达提高了 118%,并且抗微生物蛋白 LL-37 的表达提高了 136%。

[0114] 结论

[0115] 实施例 1 的亚麻子提取物刺激了角质形成细胞中抗微生物蛋白 DEFB1 的表达和抗微生物蛋白 LL-37 的表达。

[0116] 实施例 4:证明实施例 1 的亚麻子提取物对离体皮肤中抗微生物蛋白 DEFB1 的表达和抗微生物蛋白 LL-37 的表达的活化作用

[0117] 此项研究的目的是确定实施例 1 的亚麻子提取物对 DEFB1 的表达和 LL-37 的表达的影响。为了评估 DEFB1 和 LL-37 的表达水平,对离体皮肤切片进行 DEFB1 和 LL-37 的免疫标记。

[0118] 方案

[0119] 将人皮肤活组织离体培养,然后通过局部施用 20 μ l 1% 的实施例 1 的亚麻子提取物进行处理或不进行处理,每天 2 次,持续 24 小时。

[0120] 然后固定该皮肤活组织,接着通过 Shandon Hypercenter XP 自动设备 (Shandon, UK) 将其包埋在石蜡中。随后将包埋在石蜡中的皮肤活组织用切片刀切成 4 μ m 厚的切片,并且转移到载玻片上。用 100% 的二甲苯从石蜡中移除这些切片,接着在连续醇浴中再水化:2 个 100% 乙醇浴 (EtOH) 进行 2 分钟,1 个 95% 乙醇浴进行 2 分钟,1 个 90% 乙醇浴进行 2 分钟和 1 个水浴进行 5 分钟。将载玻片浸没在 pH 6 的 0.01M 柠檬酸缓冲液中并且加热至轻微沸腾,以促进抗体进入所关注的蛋白质。将切片用 5% BSA 孵育 30 分钟,然后用在 PBS 中稀释至 1/500 的第一抗体 (抗“DEFB1”多克隆兔抗体 ab14425 (Abcam, Cambridge, UK)) 或者用在 PBS 中稀释至 1/100 的抗“LL-37”单克隆小鼠抗体 sc-166770 (Tebu Santa Cruz, CA, USA) 孵育 1.5 小时,同时在室温下搅拌。用 PBS 洗涤几次之后,将这些切片用在 PBS 中稀释至 1/1000 的第二荧光抗体 (抗兔抗体 Alexa Flour 488 A21206 (Invitrogen, Fisher)) 在室温下孵育 1 小时。用 0.3 μ M 4',6'-二脒基-2-苯基吡啶 (DAPI) (分子探针) 标记细胞核。用 PBS 漂洗该切片 5 分钟。通过使用荧光显微镜 (40 $\times$ 物镜) 检测抗微生物蛋白 DEFB1 和抗微生物蛋白 LL-37 的表达。

[0121] 结果

[0122] 一组结果显示在附图 1 中。

[0123] 经由免疫组织化学对该切片获得的荧光的评估表明,与未处理的皮肤活组织相比,用实施例 1 的亚麻子提取物处理的皮肤活组织具有明显更高的 DEFB1 的表达水平 (+240%) 和 LL-37 的表达水平 (+140%)。

[0124] 结论

[0125] 作为用实施例 1 的亚麻子提取物对人皮肤活组织处理的结果,可以获得对抗微生物蛋白 DEFB1 的表达和抗微生物蛋白 LL-37 的表达的正向效果。

[0126] 实施例 5:证明实施例 1 的亚麻子提取物对离体皮肤中板层小体的数量和分泌活性的作用

[0127] 此项研究的目的是确定实施例 1 的亚麻子提取物对存在于颗粒层和角质层的界面的板层小体的数量、抗微生物蛋白存储位点的影响。为了观察板层小体,生成从离体皮肤切片获得的电子显微镜图像。

[0128] 方案

[0129] 将人皮肤活组织离体培养,然后通过局部施用 20 μ l 1%的实施例 1 的亚麻子提取物进行处理或不进行处理,每天 1 次,持续 24 小时。

[0130] 然后在室温下用 Karnovsky 固定缓冲液 (Electron Microscopy Sciences, Hatfield, UK) 固定该皮肤活组织,持续 1 小时,接着在 4°C 下过夜。随后用 0.1M 的二甲胍酸钠缓冲液 (Sigma, Steinheim, Germany) 洗涤,然后将该活组织后固定 (post-fix) 在 1% 的四氧化锇 OsO₄ 中 1 小时,然后漂洗并在连续醇浴中再水化。样品被渗透并且包含在低粘度的 Epon-Epoxy 混合物中。

[0131] 用装配有钻石刀片的切片刀生产该切片。然后用乙酸双氧铀和柠檬酸铅将切片染色。使用 60KeV 的透射型电子显微镜进行观测。

[0132] 结果

[0133] 电子显微镜图像的观测表明,与未处理的皮肤活组织相比,用实施例 1 的亚麻子提取物处理的皮肤活组织在颗粒层和角质层的界面上具有更多数量的板层小体。

[0134] 结论

[0135] 作为用实施例 1 的亚麻子提取物处理的人的皮肤活组织的结果,可以观测到对板层小体的数量、抗微生物肽存储位点的正向效果。

[0136] 实施例 6:证明实施例 1 的亚麻子提取物在角质形成细胞中所产生的对金黄色葡萄球菌 (Staphylococcus aureus) 的细菌生长的抗微生物作用

[0137] 此项研究的目的是确定由于实施例 1 的亚麻子提取物 1 刺激金黄色葡萄球菌的细菌生长所导致的增加角质形成细胞所产生的抗微生物蛋白合成的作用。为此,进行了径向扩散试验。

[0138] 方案

[0139] 用或不用 (对照) 实施例 1 的亚麻子提取物处理 NHK 细胞 (正常原代人角质形成细胞),每天两次,持续 24 小时。为了产生阴性对照,使用没有与细胞进行过任何接触的 NHK 培养基。随后回收细胞上清液,并且使用 150 μ l 细胞上清液浸透直径 6mm 的圆片。然后将该圆片放置在整体上接种有金黄色葡萄球菌的培养物上 (每种条件和培养皿 4 个圆片)。48 小时后,观测到径向扩散区。使用 QImaging Micropublisher 3.3RTV 相机拍摄抑制区域的照片并且通过 Q-capture Pro7™软件程序计算它们的直径。

[0140] 结果

[0141] 结果表明,与未处理的角质形成细胞相比,在施用了用 1%的实施例 1 的亚麻子提取物处理 24 小时的角质形成细胞的培养物所产生的上清液之后,细菌生长抑制区域的直径增加了 19%。

[0142] 结论

[0143] 实施例 1 的亚麻子提取物能够抑制细菌生长。

[0144] 实施例 7:证明实施例 1 的亚麻子提取物在角质形成细胞中所产生的对金黄色葡萄球菌的细菌生长的抗微生物作用

[0145] 此项研究的目的是确定由于实施例 1 的亚麻子提取物 1 刺激金黄色葡萄球菌的细菌生长而导致的增加角质形成细胞产生的抗微生物蛋白的合成的作用。为此,进行了细菌生长抑制试验。

[0146] 方案

[0147] 用或不用(对照)实施例 1 的亚麻子提取物处理 NHK 细胞(正常原代人角质形成细胞),每天两次,持续 48 小时。为了产生阴性对照,使用没有与细胞进行过任何接触的 NHK 培养基。随后回收细胞上清液,并且使用 200 μ l 细胞上清液并被金黄色葡萄球菌(*S. aureus*)溶液污染。将该上清液/金黄色葡萄球菌混合物在 37°C 下孵育 3 小时,随后在 TSA 琼脂平板中扩散。48 小时后,已出现金黄色葡萄球菌的菌落并且是肉眼可见的。使用 Qlmaging Micropublisher 3.3RTV 相机拍摄该平板的照片。

[0148] 结果

[0149] 结果表明,与未处理的角质形成细胞相比,在从用 1% 的实施例 1 的亚麻子提取物处理 24 小时后的角质形成细胞的培养物获得上清液的条件下,出现的金黄色葡萄球菌菌落的数量降低了 79%。

[0150] 结论

[0151] 实施例 1 的亚麻子提取物能够减少细菌菌落的数量。

[0152] 实施例:组合物的制备

[0153] 保护性舒缓日霜

[0154]

商品名	INCI 名	重量%
A 相		
Emulium Delta	鲸蜡醇(和)硬脂酸甘油酯(和)PEG-75 硬脂酸酯(和)鲸蜡醇聚醚-20(和)硬脂醇聚醚-20	4.00
Lanette O	鲸蜡硬脂醇	1.50
DC 200 Fluid/100 cs	二甲硅油	1.00
DUB 810C	椰 油 醇 辛 酸 酯 / 癸 酸 酯 (Coco Caprylate/Caprates)	1.00
DPPG	丙二醇二壬酸酯	3.00
DUB DPHCC	二聚季戊四醇六辛酸酯/六癸酸酯 (dipentaerythrityl hexacaprylate/hexacaprates)	1.50
Cegesoft PS6	植物油	1.00
维生素 E	生育酚	0.30
B 相		
去矿物质水	水(Aqua)	适量至 100
甘油	甘油	2.00
卡波普 EDT 2020	丙烯酸酯/C10-30 烷基丙烯酸酯交聚物	0.15
Keltrol BT	黄原胶	0.30
尿囊素	尿囊素	0.5
C 相		
氢氧化钠(10%的溶液)	氢氧化钠	0.30
D 相		
去矿物质水	水	5.00
Stay-C 50	抗坏血酸磷酸酯钠	0.50
E 相		
丁二醇	丁二醇	2.00
ROKONSOL MEP	苯氧乙醇(和)对羟基苯甲酸甲酯(和)对羟	1

[0155]

	基苯甲酸乙酯(和)对羟基苯甲酸丙酯	
Dekaben CP	氯苯甘醚	0.20
F 相		
GP4G	水(和)卤虫提取物	1.00
实施例 1 的亚麻子提取物		1.5

[0156] 制备 A 相并加热至 75℃。通过在搅拌下先后分散卡波普和黄原胶来制备 B 相。静止直至获得完全的均质。加热 B 相至 75℃。

[0157] 在 75℃下,在转子-定子搅拌下在 B 相中乳化 A 相。在快速搅拌下用 C 相中和。冷却至 40℃,任何加入清澈的 D 相,然后加入 E 相(预热至 40℃并且均质直至完全澄清)。在轻微搅拌下持续冷却至 25℃,并加入 F 相。

[0158] 2- 身体乳液

[0159]

商品名	INCI 名	重量%
A 相		
Montanov L	C14-22 醇(和) C12-20 烷基葡糖苷	3.00
Waglinol 2559	鲸蜡硬脂醇异壬酸酯	4.00
Tegosoft TN	C12-15 烷基苯甲酸酯	3.00
杏仁油	杏李(<i>Prunus Armeniaca</i>) (杏)仁油	2.00
鳄梨油	牛油果(<i>Persea Gratissima</i>) (鳄梨)油	1.00
Abil 350	二甲硅油	1.00
B 相		
去矿物质水	水	适 量 至 100
尿囊素	尿囊素	0.5
C 相		
Simigel EG	丙烯酸钠/丙烯酰二甲基牛磺酸酯共聚物 (Sodium Acrylate / Acryloyldimethyl Taurate Copolymer) (和)异十六烷(和)聚山梨酯 80 共聚 物(和)聚山梨酯 80	0.4
D 相		
ROKONSAL MEP	苯氧乙醇(和)对羟基苯甲酸甲酯(和)对羟基苯甲 酸乙酯(和)对羟基苯甲酸丙酯	1
Germall 115	咪唑烷基脲	0.20
E 相		
实施例 1 的亚麻子提取 物		1

[0160] 将 A 相和 B 相的组分分别在 70℃ 至 75℃ 加热。在搅拌下使 A 相在 B 相中乳化。在 45℃, 增加搅拌速度下加入 C 相。随后当温度低于 40℃ 时, 加入 D 相和 E 相。在剧烈搅拌下持续冷却至 25℃。

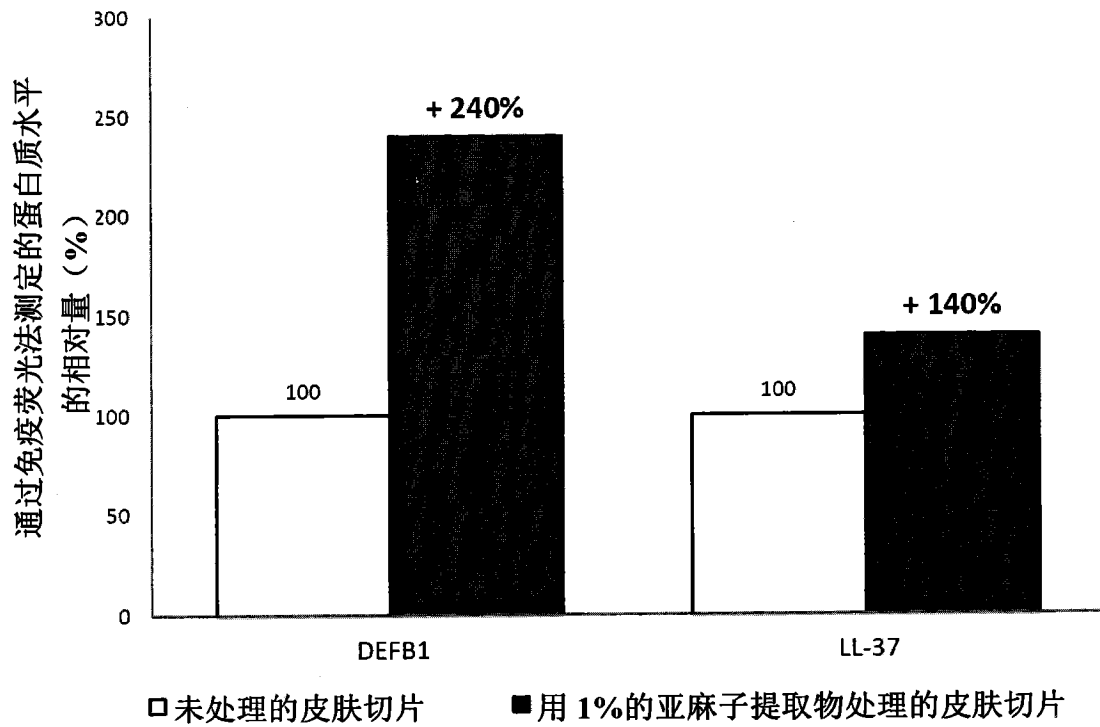


图 1:用或未用 1%亚麻子提取物处理 24h 的离体皮肤中的抗微生物蛋白 DEFB1 和 LL-37 的表达水平的免疫组织化学检测