



(12) 发明专利申请

(10) 申请公布号 CN 105451710 A

(43) 申请公布日 2016. 03. 30

(21) 申请号 201480017115. X 代理人 张建 黄革生
(22) 申请日 2014. 03. 21 (51) Int. Cl.
(30) 优先权数据 A61K 8/73(2006. 01)
13382107. 4 2013. 03. 22 EP A61Q 19/08(2006. 01)
(85) PCT国际申请进入国家阶段日 A61Q 7/00(2006. 01)
2015. 09. 21
(86) PCT国际申请的申请数据
PCT/EP2014/055775 2014. 03. 21
(87) PCT国际申请的公布数据
W02014/147255 EN 2014. 09. 25
(83) 生物保藏信息
CNCM I-4239 2009. 11. 04
(71) 申请人 利普泰股份公司
地址 西班牙加瓦
申请人 波利马里斯生物技术公司
(72) 发明人 R·德尔加多 冈萨雷斯
A·索莱 阿斯塔尔 A·库尔图瓦
B·托拉
(74) 专利代理机构 北京市中咨律师事务所
11247

权利要求书2页 说明书20页

(54) 发明名称

用于治疗和 / 或护理皮肤、粘膜和 / 或指甲的
外泌多糖

(57) 摘要

细菌菌株的外泌多糖, 其用于在皮肤、粘膜、
毛发和 / 或指甲的治疗和 / 或护理中, 及其化妆品
或皮肤药物组合物。具体地, 其用于皮肤老化且特
别是用于皱纹的治疗和 / 或预防。

1. 具有保藏号CNC I-4239的弧菌属(*Vibrio* sp.)菌株的外泌多糖,其用于治疗 and/或护理皮肤、粘膜、毛发和/或指甲。

2. 根据权利要求1的外泌多糖,其中这种治疗和/或护理是疼痛、炎症、瘙痒或多汗症的治疗和/或预防,或皮肤和/或粘膜的再生上皮化和/或愈合性治疗。

3. 根据权利要求1-2任一项的外泌多糖,其中所述治疗抑制神经元胞吐作用。

4. 根据权利要求1-2任一项的外泌多糖,其中所述治疗刺激成纤维细胞增殖。

5. 具有保藏号CNC I-4239的弧菌属菌株的外泌多糖在美容、非治疗性治疗和/或皮肤、粘膜、毛发和/或指甲的护理中的用途。

6. 根据权利要求5的外泌多糖的用途,其中所述美容、非治疗性治疗和/或护理是皮肤衰老的治疗和/或预防、皮肤皱纹的治疗和/或预防;皮肤坚实度缺失的治疗和/或预防;出汗的治疗和/或预防;皮肤障碍的治疗和/或护理,所述皮肤障碍选疣、胼胝形成;治疗刺激性毛发生长和/或预防脱发。

7. 根据权利要求5-6任一项的外泌多糖的用途,其中所述美容、非治疗性治疗和/或护理抑制神经元胞吐作用。

8. 根据权利要求5-6任一项的外泌多糖的用途,其中所述美容、非治疗性治疗和/或护理刺激成纤维细胞增殖。

9. 根据权利要求1-4任一项的外泌多糖,其具有选自以下的化学修饰:磷酸化、磺化、酰化、酯化、外泌多糖的金属配合物的形成和/或化学硫酸化。

10. 根据权利要求1-4任一项的外泌多糖,其包含两种不同的中性单糖类和一种酸性单糖。

11. 根据权利要求1的外泌多糖,其中所述中性单糖类是N-乙酰氨基葡萄糖和N-乙酰半乳糖胺且所述酸性单糖是葡糖醛酸。

12. 化妆品或皮肤药物组合物,其包含化妆品或皮肤药有效量的根据权利要求1-4任一项的外泌多糖和至少一种化妆品和/或皮肤药学上可接受的赋形剂、辅剂和/或成分。

13. 根据权利要求12的化妆品或皮肤药物组合物,其中将外泌多糖掺入化妆品或皮肤药学上可接受的递送系统或缓释系统中,所述化妆品或皮肤药学上可接受的递送系统或缓释系统选自:脂质体、混合脂质体、油质体、类脂质体、短链醇类的磷脂脂质体、毫米粒、微粒、纳米粒、固体脂质纳米粒、纳米结构的脂质载体、海绵状物、环糊精、囊泡、胶束、表面活性剂的混合微胶粒、表面活性剂-磷脂混合微胶粒、毫米球、微球和纳米球、毫米囊、微囊、纳米囊、微乳和纳米乳。

14. 根据权利要求12-13中任一项的化妆品或皮肤药物组合物,其中这种组合物以一种制剂存在,这种制剂选自:霜剂、复合型乳剂、溶液、液晶、无水组合物、无水组合物、水分散体、油、乳液、香脂、泡沫、洗剂、凝胶、乳膏状凝胶、含水酒精溶液、水甘醇溶液、水凝胶、搽剂、浆液、肥皂、洗发水、调理剂、浆液、多糖膜、软膏、摩丝、润发油、粉末、化妆棒、化妆笔和喷雾剂或气雾剂。

15. 根据权利要求12-14任一项的化妆品或皮肤药物组合物,其中所述的赋形剂、辅剂和/或成分选自:神经元胞吐抑制剂、抗胆碱能药物、肌收缩抑制剂、抗衰老药物、抗皱纹剂、止汗药、抗炎药和/或镇痛药、止痒药、镇静剂、麻醉药、抑制乙酰胆碱受体群集的活性剂、抑制乙酰胆碱酯酶的活性剂、皮肤松弛剂、黑色素合成刺激剂或抑制剂、增白或脱色剂、色素

沉着促进剂、日晒黑剂、NO-合酶抑制剂、5 α -还原酶抑制剂、赖氨酰和/或脯氨酰羟化酶抑制剂、抗氧化剂、自由基清除剂和/或抗大气污染剂、活性羰基类清除剂、抗糖化剂、抗组胺剂、抗病毒药、抗寄生虫药、乳化剂、润肤剂、有机溶剂、液体推进剂、皮肤调理剂、保湿剂、保持水分的物质、 α 羟基酸、 β 羟基酸、润肤霜、表皮水解酶、维生素、氨基酸、蛋白质、色素或着色剂、染料、生物聚合物、胶凝聚合物、增稠剂、表面活性剂、软化剂、乳化剂、粘合剂、防腐剂、能够减轻或治疗眼下眼袋的活性剂、去角质剂、角质剥离溶解剂、角质溶解药、抗微生物剂、抗真菌药、抑真菌剂、杀菌剂、抑菌剂、刺激真皮或表皮大分子合成和/或能够抑制或阻止它们降解的活性剂、胶原蛋白合成刺激剂、弹性蛋白合成刺激剂、核心蛋白聚糖合成刺激剂、层粘连蛋白合成刺激剂、防御素合成刺激剂、伴侣分子合成刺激剂、cAMP合成刺激剂、调节AQP-3的活性剂、调节水通道蛋白合成的活性剂、来自水通道蛋白家族的蛋白质、透明质酸合成刺激剂、糖胺聚糖合成刺激剂、纤维连接蛋白合成刺激剂、sirtuin合成刺激剂、sirtuin活化剂、热激蛋白、热激蛋白合成刺激剂、刺激角质层脂质和成分的活性剂、神经酰胺类、脂肪酸、抑制胶原蛋白降解的活性剂、抑制基质金属蛋白酶的活性剂、抑制弹性蛋白降解的活性剂、抑制丝氨酸蛋白酶的活性剂、刺激成纤维细胞增殖的活性剂、刺激角化细胞增殖的活性剂、刺激脂肪细胞增殖的活性剂、刺激黑素细胞增殖的活性剂、刺激角化细胞分化的活性剂、加速或延缓脂肪细胞分化的活性剂、抗角化过度剂、粉刺溶解剂、抗银屑病药、DNA修复剂、DNA保护剂、干细胞保护剂、稳定剂、用于治疗 and/或护理敏感性皮肤的活性剂、固化剂、抗拉长痣剂、粘合剂、调节皮脂产生的活性剂、脂肪分解剂或刺激脂解的活性剂、脂肪形成剂、调节PGC-1 α 表达的活性剂、调节PPAR γ 的活性剂、增加或减少脂肪细胞的甘油三酯含量的活性剂、抗蜂窝组织剂、PAR-2活性抑制剂、刺激愈合的活性剂、愈合剂辅佐剂、刺激表皮细胞再生的活性剂、表皮细胞再生剂辅佐剂、细胞因子、生长因子、作用于毛细血管循环和/或微循环的活性剂、刺激血管生成的活性剂、抑制血管通透性的活性剂、静脉紧张剂、作用于细胞新陈代谢的活性剂、改善真皮表皮连接的活性剂、诱导毛发生长的活性剂、毛发生长抑制或阻滞剂、延迟脱发的活性剂、香料、美容除臭剂和/或体臭吸收剂和/或体臭掩蔽剂、螯合剂、植物提取物、精油、海洋萃取物、从生物技术工艺获得的活性剂、矿物盐、细胞提取物、和抵抗紫外线A和/或B射线和/或红外A射线的防晒剂或有机或矿物光保护剂,或其混合物。

用于治疗和/或护理皮肤、粘膜和/或指甲的外泌多糖

发明领域

[0001] 本发明涉及抑制神经元胞吐作用且刺激成纤维细胞增殖的外泌多糖(EPS)。所述外泌多糖由具有保藏号CNCM I-4239的弧菌属(*Vibrio sp*)的物种分泌。本发明还涉及这种在化妆品或皮肤用药物组合物中的外泌多糖在治疗和/或护理皮肤、粘膜、毛发和/或指甲中的用途。

[0002] 背景

[0003] 用于预防和减少皱纹、特别是面部皱纹的化妆品行业中的策略之一在于施用通过抑制该区域中神经元胞吐作用阻断肌肉收缩的化合物。牵涉表情线的形状的主要肌肉是围绕眼和睫毛的那些、额、唇、嘴、颊和颈肌上的那些。这些肌肉在面部的皮下连接额部中发现，它们从其中升至皮肤并且使其插入表皮层的最深部。其收缩可以导致皮肤隆起、压缩或缓慢运动。早期皱纹的形状是皮肤衰老和正在衰老的最具有特征性的征兆。

[0004] 自从上世纪九十年的10年以来，注入肌肉毒素肉毒梭菌(*Clostridium botulinum*) (作为 **Botox**[®] 由Allergan销售) 在减少肌肉收缩和治疗例如张力失调和/或疼痛这样的相关疾病的用途已经广泛传播。神经毒素注射也用于治疗 and/或护理皮肤，目的在于减轻、延迟或预防衰老和/或光老化征兆，且特别是松弛面部表情并且减少皱纹形成或将其出现减少到最低限度。其作用机制基于阻断神经肌肉接点上的轴突的突触前末梢中的乙酰胆碱释放，由此避免神经传导和肌肉收缩。该毒素结合突触前膜中的受体、被胞质摄入并且通过胞质。其活性负责打断突触泡蛋白、SNAP-25和突出融合蛋白的三分子SNARE复合物，这避免了突触小泡结合质膜和乙酰胆碱释放至神经间隙。受控施用肉毒毒素已经用于治疗广泛的病症、障碍和疾病，例如出汗和多汗(US 6974578 B2和US 6683049 B2)、不同的皮肤障碍和疾病例如皮肤胼胝、疣、溃疡和损害(US 8048423 B2、US 2011/206731)、银屑病和皮炎(US 5670484 A)、血管高反应性和酒渣鼻(WO 2010/114828)、痤疮(WO 03/011333)、毛发生长和维持(US 6299893 B1)、面部皱纹(US 7255865B2)、眉毛和前额下垂(US 2011/280978)或下垂的口角(US 6358917 B1)以及不同类型的疼痛和炎症(US 2010/266638、US 7811586 B2、US 7704524 B2、US 7704511 B2、US 7468189 B2、US 7255866 B2、US 7091176 B2、US 6887476 B2、US 6869610 B2、US 6838434 B2、US 6641820 B2、US 6623742B2、US 6565870 B1、US 6500436 B1、US 6458365 B1、US 6423319 B1、US 6113915 A、US 5714468 A和US 6063768 B2)等。

[0005] 然而，肉毒毒素中固有的毒性导致其以宽泛剂量施用造成不期望的副作用，例如免疫源应答、头痛、恶性、麻痹或肌无力、呼吸衰竭，且在更极端的情况中甚至导致所治疗的受试者死亡[FDA News, 2008年2月8日, “FDA Notifies Public of Adverse Reactions Linked to Botox Use”; Coté, T.R. 等人 “Botulinum toxin type A injections: Adverse events reported to the US Food and Drug Administration in therapeutic and cosmetic cases” J. Amer. Acad. Derm. 2005, 53(3), 407-415]。这些严重的副作用与高治疗成本一起严重地制约了肉毒毒素以治疗或美容为目的的应用，这归因于长期应用和/或存在不适合其治疗的疾病。因此，迫切需求研发模拟肉毒毒素的麻痹效应、而配有非常简单和

更稳定的分子结构的分子,其不会诱导免疫反应且其生产成本是可承受得起的。肽性质的分子满足这些特性。

[0006] 皱纹与真皮中的多种生物学改变相关。在真皮中,存在真皮成纤维细胞数量减少,它们产生胞外基质的不同成分,其负责皮肤的坚实度和弹性和恢复皮肤的机械性能。

[0007] 在伤口愈合过程中,存在几种另外的过程,它们有助于皮肤再生并且还可以用于抗皱治疗。在愈合过程中,存在细胞增殖和迁移的增加[Grose等人,“A crucial role of β 1 integrins for keratinocyte migration in vitro and during cutaneous wound repair”,*Development.*,2002,2303-2315],这有助于表皮细胞再生,从而恢复(revertint)与年龄相关的表皮厚度减少[Varani等人,“Vitamin A Antagonizes Decreased Cell Growth and Elevated Collagen-Degrading Matrix Metalloproteinases and Stimulates Collagen Accumulation in Naturally Aged Human Skin”,*J. Invest. Dermatol.*,2000,114,480-486],且更特别地在皱纹更频繁出现的区域(眼、前额、鼻颊(nasogenian)区等区域周围)中观察到。此后,在愈合过程中,存在成纤维细胞增殖的增加,它负责进行胞外基质的合成,也有助于减少皱纹。

[0008] 自从20世纪70年代以来,外泌多糖的存在是已知的,它们由生活在因其极端条件而为人所知的生态系统中的细菌物种产生。由生活在这些生态系统中的细菌产生胞外多糖主要与存活功能有关(Raguénès等人*J Appl Microbiol.*,1997年4月,82(4):422-30)。

[0009] 在化妆品领域中,外泌多糖已经广泛应用,主要作为胶凝剂和/或调质剂(texturizing agent),添加到终产品中。现有技术中已知一些外泌多糖类广泛应用于化妆品和/或皮肤药物目的,例如描述于专利EP0534855B1中的假单胞菌属(*Pseudomonas*)细菌菌株产生的外泌多糖,其用作增稠剂、胶凝剂和/或调质剂。专利申请FR2871476A1描述了产生已经显示用作愈合剂的用途的外泌多糖的互生平胞菌属(*Alteromonas*)的热液起源的GY785菌株;专利EP0987010B1描述了改善皮肤防御系统的由热液起源的嗜常温菌产生的一种外泌多糖,并且专利申请US2010/009931描述了用作绷紧剂(tensing agent)还改善皮肤紧实度、弹性以及张力的由紫球藻属(*Porphyridium*)微藻菌株产生的外泌多糖。类似地,专利申请US2009/069213A1公开了产生一种显示抗皱纹和水合特性的多糖的紫球藻属物种微藻菌株。此外,专利US6344346B1描述了具有由根瘤菌属(*Rhizobium*)细菌分泌的天然多糖引起的水合特性的化妆品组合物。

[0010] 对皮肤具有很多优点的另一种外泌多糖是已经被证明描述于申请W02009/127057中的、由表皮葡萄球菌(*Staphylococcus epidermidis*)或金黄色葡萄球菌(*Staphylococcus aureus*)的细菌物种的菌株产生的外泌多糖。在应用这种外泌多糖的化妆品组合物之后,角质层提取物的水合作用和形态学得到改善,并且发生皮肤的脱皮。

[0011] 此外,应提及专利申请JP2003-313131,因为它描述了互生平胞菌属物种的菌株SN-1009(FERM BP-5747)产生的、具有抗皱纹特性的硫酸多糖。

[0012] 最后,申请W0 2012/072245描述具有水合特性的假交替单胞菌属(*Pseudoalteromonas*)物种的菌株产生的外泌多糖,且专利申请P2012-30432公开了弧菌属物种的菌株产生的外泌多糖,其刺激皮肤细胞中透明质酸产生。

[0013] 出人意料地,本发明申请人已经发现由弧菌属物种的非热液细菌菌株分泌的一种新的外泌多糖的活性,根据布达佩斯条约(Budapest Treaty)在编号CNCM I-4239下保藏,

其抑制神经元胞吐作用并且预防和/或减少皮肤皱纹,且还刺激成纤维细胞增殖和增加皮肤坚实度。

[0014] 发明详述

[0015] 本发明涉及由具有保藏号CNCM I-4239的弧菌属物种的细菌菌株分泌的外泌多糖的化妆品和/或皮肤药物用途。出人意料地,本发明的发明人已经发现上述外泌多糖抑制神经元胞吐作用且刺激成纤维细胞增殖。特别地,神经元胞吐作用的抑制减少和/或预防皮肤皱纹,且刺激成纤维细胞增殖、增加皮肤坚实度。

[0016] 定义

[0017] 为了促进本发明的理解,一些术语和表述的含义,正如在本发明的上下文中所使用的,被包括在内。

[0018] 在本发明的上下文中,“皮肤”被理解为包括它的多个层,从最上层或角质层至最下层或皮下组织都包含在内。这些层由不同类型的细胞如角质形成细胞、成纤维细胞、黑色素细胞和/或脂肪细胞等等组成。在本发明的上下文中,术语“皮肤”包括头皮。

[0019] 本说明书上下文中使用的术语“治疗”在未附带限制“美容、非治疗”时是指施用本发明的化合物以缓解或消除疾病或障碍或与这种疾病或障碍相关的一种或多种症状。术语“治疗”还涵盖缓解或消除疾病或障碍的生理学后果的能力。

[0020] 当术语“治疗”附带限制“美容、非治疗”时是指将所述化合物应用于皮肤、毛发和/或粘膜,特别是目的在于改善皮肤、毛发和/或粘膜的美容质量,例如、但不限于其水化水平、弹性、坚实度、光泽、品质或纹理等。本发明中的术语“护理”是指维持皮肤、毛发和/或粘膜的质量。这些质量通过在健康受试者以及那些存在皮肤和/或粘膜疾病和/或障碍的那些受试者中的化妆品处理和/或皮肤、毛发和/或粘膜护理得以改善或维持,所述疾病和/或障碍例如、但不限于皮肤上的溃疡和损害、银屑病、皮炎、痤疮或酒渣鼻等。

[0021] 本发明中使用的术语“预防”是指本发明化合物预防、延迟或阻止疾病或障碍在其出现前的出现或发生的能力。

[0022] 在本发明的上下文中,术语“衰老”指随着年龄(慢性衰老(chronoaging))或通过暴露于阳光(光老化)或环境因素如烟草烟雾、冷、热或风的极端气候条件、化学污染剂或污染物所经历的皮肤变化,并且包括所有的外部可见和/或通过触摸可察觉的变化,例如但不限于皮肤不连续性的产生,如皱纹(wrinkle)、细纹(fine line)、沟纹(furrow)、不规则性(irregularity)或粗糙(roughness)、毛孔尺寸增加、弹性丧失、紧实度丧失、平滑度丧失、从变形中恢复的能力的丧失、皮肤下垂如脸颊下垂、眼下眼袋的出现或双下巴的出现,等等,皮肤颜色的改变,如斑点、发红、眼下眼袋或色素沉着过度区域的出现(如老年斑或雀斑等等),异常分化,角化过度,弹性组织变性,角化病,脱发,桔皮样外观(orange-peel skin),真皮、表皮、血管系统或靠近皮肤的那些组织的、角质层的、胶原蛋白结构的丧失和其他组织学改变(例如蜘蛛痣或毛细血管扩张的出现),等等。术语“光老化”将由于导致皮肤的过早衰老并且出现与衰老相同的物理特征的延长的皮肤紫外辐射暴露的一系列过程归为一类,这些特征例如但不限于,肌肉松弛、下垂、颜色改变或色素沉着的不规则性、异常和/或过度角化。

[0023] 产生本发明中的胞外多糖的菌株依照布达佩斯条约于2009年9月4日保藏在国立微生物保藏中心(“Collection Nationale de Culture de Microorganismes”[National

Microorganism Culture Collection])(CNCM),巴斯德研究所(Pasteur Institute), 28rue du Docteur Roux,75724巴黎,法国,在代码CNCM I-4239下。

[0024] 因此,本发明的第一方面涉及用于皮肤、粘膜、头发和/或指甲的治疗和/或护理的具有保藏号CNCM I-4239的弧菌属(*Vibrio* sp.)物种的菌株的胞外多糖。特别地,治疗涉及治疗和/或预防疼痛、炎症、瘙痒或多汗,或使皮肤和/或粘膜的上皮再生和/或愈合治疗。

[0025] 在一个优选的实施方案中,疼痛选自与病症、疾病和/或障碍相关的疼痛,例如、但不限于接触敏感性、对冷敏感、对热敏感、皮肤刺激、毛发去除后皮肤刺激、剃毛后皮肤刺激、银屑病、敏感性皮肤、皮炎、特应性皮炎、接触性皮炎、尿布皮炎、脂溢性皮炎、湿疹、扁平苔藓、烧伤、晒伤、关节炎、类风湿性关节炎、骨关节炎、牛皮癣关节炎、超敏反应、术后、强脉冲光线疗法(IPL)后、用单色脉冲光(激光)处理后、用化学脱屑剂治疗后或过度暴露于外部攻击性试剂治疗后的皮肤疼痛或刺激等。

[0026] 在另一个优选的实施方案中,炎症选自,例如、但不限于银屑病、敏感性皮肤、皮炎、特应性皮炎、接触性皮炎、尿布皮炎、脂溢性皮炎、湿疹、酒渣鼻、痤疮、过度增生性皮肤病、烧伤、晒伤、爪间鬃、术后、强脉冲光线疗法(IPL)后、用单色脉冲光(激光)处理后、用化学脱屑剂治疗后或过度暴露于外部攻击性试剂治疗后的皮肤炎症、阴道粘膜炎症、口腔粘膜炎症、牙龈炎、牙周炎、鼻炎、过敏性鼻炎等。

[0027] 在另一个优选的实施方案中,瘙痒选自与病症、疾病和/或障碍相关的瘙痒,例如、但不限于皮炎、特应性皮炎、接触性皮炎、尿布皮炎、疱疹样皮炎、光照性皮肤病、光敏感性、妊娠相关皮炎、绝经相关皮炎、湿疹、敏感皮肤、银屑病、水痘、疱疹、带状疱疹、结节性裂毛综合征、剥脱皮肤综合征、扁平苔藓、痤疮、头皮屑、脂溢性皮炎、脱发、足癣、念珠菌病、痔疮、阴道瘙痒、肛周瘙痒、阴肛部瘙痒、晒伤、荨麻疹、瘙痒性耳炎、眼痒、老年皮肤搔痒症、水源性瘙痒症、结节性痒疹、痒疹苔藓、玫瑰糠疹、干燥病和干性皮肤、过敏反应、药物过敏、食物过敏、化学品过敏、暴露于有毒植物和暴露于虫咬等。

[0028] 在另一个方面,本发明涉及具有保藏号CNCM I-4239的弧菌属物种的细菌菌株的外泌多糖在皮肤、粘膜、毛发和/或指甲的美容、非治疗性治疗中的用途,特别是在治疗和/或预防皮肤衰老中的用途、在治疗和/或预防皮肤皱纹、优选面部皱纹中的用途、在治疗和/或预防皮肤坚实度缺失中的用途、在治疗和/或预防出汗中的用途、在治疗和/或护理选自疣、胼胝的皮肤病中的用途、在治疗性刺激毛发生长和/或预防脱发中的用途。

[0029] 优选地,皮肤、粘膜、毛发和/或指甲的美容、非治疗性治疗和/或护理抑制神经元胞吐作用。

[0030] 优选地,皮肤、粘膜、毛发和/或指甲的美容、非治疗性治疗和/或护理刺激成纤维细胞增殖。

[0031] 优选地,多汗或出汗的治疗和/或预防是治疗和/或预防腋窝、面部、生殖器、手掌或足底的多汗或出汗。

[0032] 在另一个具体的实施方案中,皮肤、粘膜、毛发和/或指甲的治疗和/或护理通过局部或透皮应用来进行。

[0033] 在另一个具体的实施方案中,可以通过以下步骤获得外泌多糖:将弧菌属保藏号CNCM I-4239物种的菌株在一种适合的培养基中发酵,常规地搅拌并且通风。可以通过在一种培养基中进行以下步骤发酵来生产本发明的外泌多糖:在15°C-37°C、优选在25°C的温度

下搅拌并充气,该培养基具有6.5与9之间(优选地大约7.5)的pH,如果必要,在发酵过程中对其进行调节。发酵持续时间在30至120小时之间,优选地在48与96小时之间。

[0034] 在一个具体的实施方案中,在本发明具有保藏号CNCM I-4239的弧菌属物种的菌株的发酵中,可以将外源性糖用作碳源,例如但不限于,半乳糖、葡萄糖、甘露糖、苦杏仁苷、纤维二糖、麦芽糖、淀粉、糖原、乳糖、其混合物和/或含有这些糖的混合物的提取物。具体地说,提供了2g/L至40g/L的葡萄糖的外源性供应,优选地从15g/L至25g/L。生产不同多糖的糖结合方法描述于现有技术中,例如但不限于以下对比文件中:W0 98/38327,“*Vibrio diabolicus* sp.nov., a new polysaccharide-secreting organism isolated from a deep-sea hydrothermal vent polychaete annelid, *Alvinella pompejana*”; Raguénès等人, *Int. J. Syst. Bact.*, (1997), 47, 989-995 and “Structure of the exopolysaccharide of *Vibrio diabolicus* isolated from a deep-sea hydrothermal vent”; Rougeaux等人, *Carbohydrate Res.*, (1999), 322:40-45。

[0035] 在另一个具体的实施方案中,提供了用于具有保藏号CNCM I-4239的弧菌属物种的菌株的发酵培养的矿物盐。它们例如但不限制于,选自提供以下离子的这些盐之中: Na^+ 、 K^+ 、 NH_4^+ 、 Ca^{2+} 、 Mg^{2+} 、 PO_4^{3-} 、 SO_4^{2-} 、 Cl^- 、 CO_3^{2-} 、或微量元素,如Cu、Mn、Fe和Zn。

[0036] 在另一个具体的实施方案中,通过本领域的技术人员已知的方法,如离心、过滤、超滤以及透析来进行外泌多糖的分离和纯化方法。优选地,用保留大于100,000Da分子量的分子的聚醚砜膜进行超滤和透析。

[0037] 在一个具体的实施方案中,本发明涉及天然的外泌多糖并且涉及本领域中的技术人员已知的任何化学修饰,例如磷酸化、磺化、用例如乙酰基、丙酮酰基、丙酰基、琥珀酰基、乳酰基或3-羟基丁基的酰化、用例如甘油基的酯化、形成外泌多糖的金属配合物和/或化学硫酸化。

[0038] 所述多糖的分子量包含100,000-1000万Da,且更优选100,000-5百万Da。在一个具体的实施方案中,进行基团解聚,其中分子量为100,000-1百万Da。解聚方法是本领域公知的,例如、但不限于“Low molecular weight heparins(5kDa) and oligoheparins(2kDa) produced by gel permeation enrichment or radical process: Comparison of structures and physicochemical and biological properties.”, Volpi等人, *Anal. Biochem.*, (1992), 200, 100-107]中所述的那些。

[0039] 在一个优选的实施方案中,通过呈现至少两种不同的中性单糖类和一种酸性单糖类表征具有保藏号CNCM I-4239的弧菌属物种的菌株产生的外泌多糖。优选地,所述中性单糖类是N-乙酰氨基葡萄糖和N-乙酰半乳糖胺。所述酸性单糖优选是葡糖醛酸。更优选地,本发明的外泌多糖提供重量占20%-60%的葡糖醛酸、25-65%的N-乙酰氨基葡萄糖和3%-25%的N-乙酰半乳糖胺的组合物,其条件是百分比总和不超过100%。甚至更优选地,外泌多糖提供重量占30%-55%的葡糖醛酸、30-60%的N-乙酰氨基葡萄糖和5%-20%的N-乙酰半乳糖胺的组合物。甚至更优选地,外泌多糖提供重量占35%-50%的葡糖醛酸、40-55%的N-乙酰氨基葡萄糖和5%-15%的N-乙酰半乳糖胺的组合物。

[0040] 本发明的其它方面涉及化妆品或皮肤药物组合物,其特征在于它包括化妆品或皮肤药物上有效量的本发明的外泌多糖以及至少一种化妆品和/或皮肤药学上可接受的赋形剂、辅剂和/或成分。可以通过本领域技术人员公知的常规方法制备所述组合物[“Harry’s

Cosmeticology”,第7版,(1982),Wilkinson J.B.,Moore R.J.,ed.Longman House,Essex,GB]。

[0041] 待施用的本发明中的化妆品或皮肤药物上有效量的胞外多糖及其剂量将取决于多种因素,包括患者的年龄、病症,待治疗和/或护理的病症、障碍或疾病的性质或严重性,施用途径和频率,并且特别是待使用的外泌多糖的性质。

[0042] “化妆品或皮肤药有效量”应当被理解为提供期望的效果的外泌多糖的无毒性、但足够的量。优选使用本发明的外泌多糖占组合物的总重0.0000001%(按重量计)-20%(按重量计);优选0.000001%(按重量计)-15%(按重量计);更优选0.0001%(按重量计)-10%(按重量计),且甚至更优选0.0001%(按重量计)-5%(按重量计)。

[0043] 在具体的实施方案中,本发明的胞外多糖还可以被结合到化妆品和/或皮肤药物递送系统和/或缓释系统中。

[0044] 术语“递送系统”涉及化妆品和/或皮肤药物上可接受的本发明的胞外多糖和与其一起被施用的载体,如稀释剂、辅剂、赋形剂、溶剂或添加剂。这些化妆品和/或皮肤药物载体可以是液体,如水、油或表面活性剂,包括石油、动物、植物或合成来源的那些,例如但不限于花生油、大豆油、矿物油、芝麻油、蓖麻油、聚山梨酯、脱水山梨醇酯、醚硫酸酯、硫酸酯、甜菜碱、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、洋地黄皂苷等等。本领域技术人员知晓可以用于其中施用胞外多糖的不同递送系统的稀释剂、辅剂、赋形剂或添加剂。

[0045] 在常规意义上使用术语“缓释”,其涉及一种化合物的递送系统,该递送系统提供这种化合物在一段时间内的逐渐释放,并且优选地,虽然不是必然地,具有在一个时间段上相对恒定的化合物释放水平。

[0046] 递送或缓释系统的实例为、但不限于脂质体、混合脂质体、油质体、类脂质体、醇质体、毫米颗粒、微粒、纳米颗粒和固体脂质纳米颗粒、纳米结构脂质载体、海绵、环糊精、囊泡、胶束、表面活性剂混合胶束、表面活性剂磷脂混合胶束、毫米球(millisphere)、微球和纳米球、脂质球(liposphere)、毫米胶囊(millicapsule)、微胶囊、纳米胶囊、以及微乳液和纳米乳液,该递送或缓释系统可以被加入以实现更好的活性成分透入。优选的递送或缓释系统是脂质体、表面活性剂-磷脂混合胶束以及微乳液,更优选地是具有内部反相胶束结构的油包水微乳液和包含微如乳液的纳米胶囊。

[0047] 可以通过现有技术中已知的方法制备该缓释系统;并且包含它们的组合物可以通过例如局部或经皮肤施用而施用;包括粘附贴剂、非粘附贴剂、封闭贴剂、微电子贴剂,并且优选地应当释放相对恒定量的本发明的胞外多糖。包含于该缓释系统中的胞外多糖的量将取决于,例如,该组合物待施用的部位在哪里,本发明胞外多糖的动力学和释放持续时间,以及待治疗和/或护理的病症、障碍和/或疾病的性质。

[0048] 包含本发明外泌多糖的组合物还可以被吸附在固体有机聚合物或固体矿物支持物上,例如、但不限于滑石粉、膨润土、二氧化硅、淀粉或麦芽糖糊精等。

[0049] 本发明的含有外泌多糖的组合物还可以被结合在与皮肤直接接触的织物、无纺布、或医疗装置中,从而使它们或通过生物降解针对织物、无纺织物或医疗装置的结合系统,或由于它们与身体之间的摩擦,由于身体水分、皮肤pH或体温而释放本发明的外泌多糖。此外,可以将本发明的外泌多糖结合入用于制备直接接触身体的衣服的衣服的织物和无纺布。

在一个优选的实施方案中,包含外泌多糖的织物、无纺布或医疗装置用于治疗那些通过抑制神经元胞吐作用、通过刺激成纤维细胞增殖或通过愈合皮肤和/或粘膜和/或使其上皮再生改善或预防的病症、障碍和/或疾病。

[0050] 织物、无纺布、衣服、医疗装置以及用于将所述化合物固定于它们上的装置,在它们之中是上述递送系统和/或缓释系统,可以在文献中找到并且是现有技术中已知的[Schaab C.K.1986"Impregnating Fabrics With Microcapsules",HAPPI May 1986; Nelson G.*Int.J.Pharm.*2002,242:55-62;Hipler U.C.y Elsner P.2006,"Biofunctional Textiles and the Skin",*Curr.Probl.Dermatol.v.33,..*,eds.S.Karger AG,Basel, Switzerland;Malcom R.K.等人*J.Cont.Release*,2004,97:313-320]。优选的织物、无纺布、衣服和医疗装置是绷带、纱布、t-恤、袜子、紧身衣、内衣、腰带、手套、尿布、卫生巾、敷料、床罩、法兰绒衣服、粘附贴剂、非粘附贴剂、封闭贴剂、微电子贴剂和/或面膜。

[0051] 本发明的含有外泌多糖的化妆品或皮肤药物组合物可以用于不同类型的局部或经皮应用的组合物中,任选地包括配制所希望的施用形式所必需的、化妆品和/或皮肤药物上可接受的赋形剂。

[0052] 局部或经皮应用的组合物可以被生产为任何固体、液体或半固体制剂,例如但不限于复合型乳液,例如但不限于霜剂、复合型乳剂,例如但不限于水包油乳液和/或水包硅油乳液、油包水乳液和/或硅油包水乳液、水/油/水或水/硅油/水型乳液、和油/水/油或硅油/水/硅油型乳液)、液晶、无水组合物、水分散体、油、奶、香膏、泡沫、洗剂、凝胶、乳霜凝胶、水醇溶液、水甘醇溶液、水凝胶、搽剂、浆液(sera)、肥皂、洗发水、调理剂、浆液(serum)、多糖膜、软膏、摩丝、润发油、粉末、化妆棒(bar)、化妆笔(pencil)和喷雾剂或气雾剂(喷雾),包括保留型(leave on)和冲洗型(rinse off)制剂。这些制剂可以局部或经皮应用并且可以使用本领域的技术人员已知的技术结合在不同类型的固体附件中,例如但不限于,绷带、纱布、t-恤、袜子、紧身衣、内衣、腰带、手套、尿布、卫生巾、敷料、床罩、小毛巾、粘附贴剂、非粘附贴剂、封闭贴剂、微电子贴剂和/或面膜中;或可以将它们结合在不同化妆产品中,如化妆粉底(如粉底液和粉饼)、洗液卸妆水、卸妆乳、眼部遮瑕膏、眼影、口红、润唇膏、唇彩和唇粉等。

[0053] 本发明的化妆品或皮肤药物组合物可以包括增加本发明化合物的经皮吸收的试剂,例如但不限于,二甲亚砜、二甲基乙酰胺、二甲基甲酰胺、表面活性剂、氮酮(1-正十二烷基氮杂环庚烷-2-酮)、醇、脲、乙氧基乙二醇、丙酮、丙二醇或聚乙二醇等。此外,本发明的化妆品或皮肤药物组合物可以通过离子导入、超声导入、电穿孔、微电子贴剂、机械压力、渗透压梯度、包扎疗法(occlusive cure)、显微注射或高压无针注射(如通过氧气压力的注射)、或其任何组合而被应用于待治疗的局部区域,以实现本发明的化合物的更好的渗透。应用区域将由待治疗和/或护理的病症、障碍和/或疾病的性质而确定。

[0054] 包含在本发明中描述的这些化妆品或皮肤药物上可接受的组合物中的这些化妆品或皮肤药物上可接受的赋形剂、辅剂和/或成分是在用于化妆品或皮肤有无组合物中通常使用的另外的成分,例如但不限于:神经元胞吐的其它抑制剂、其它抗胆碱能药物、其它肌收缩抑制剂、其它抗衰老药物、其它抗皱纹剂、其它止汗药、其它抗炎药和/或镇痛药、其它止痒药、镇静剂、麻醉药、抑制乙酰胆碱受体群集的活性剂、抑制乙酰胆碱酯酶的活性剂、皮肤松弛剂、黑色素合成刺激剂或抑制剂、增白或脱色剂、色素沉着促进剂(propigmenting

agent)、日晒黑剂(self-tanning agent)、NO-合酶抑制剂、5 α -还原酶抑制剂、赖氨酸和/或脯氨酸羟化酶抑制剂、抗氧化剂、自由基清除剂和/或抗大气污染剂、活性羰基类清除剂、抗糖化剂、抗组胺剂、抗病毒药、抗寄生虫药、乳化剂、润肤剂、有机溶剂、液体推进剂、皮肤调理剂、保湿剂、保持水分的物质、 α 羟基酸、 β 羟基酸、润肤霜、表皮水解酶、维生素、氨基酸、蛋白质、色素或着色剂、染料、生物聚合物、胶凝聚合物、增稠剂、表面活性剂、软化剂、乳化剂、粘合剂、防腐剂、能够减轻或治疗眼下眼袋的活性剂、去角质剂(exfoliating agent)、角质剥离溶解剂(desquamating agent)、角质溶解药、抗微生物剂、抗真菌药、抑真菌剂、杀菌剂、抑菌剂、刺激真皮或表皮大分子合成和/或能够抑制或阻止它们降解的活性剂、胶原蛋白合成刺激剂、弹性蛋白合成刺激剂、核心蛋白聚糖合成刺激剂、层粘连蛋白合成刺激剂、防御素合成刺激剂、伴侣分子合成刺激剂、cAMP合成刺激剂、调节AQP-3的活性剂、调节水通道蛋白合成的活性剂、来自水通道蛋白家族的蛋白质、透明质酸合成刺激剂、糖胺聚糖合成刺激剂(glycosaminoglycan synthesis-stimulating agents)、纤维连接蛋白合成刺激剂、sirtuin合成刺激剂、sirtuin活化剂、热激蛋白、热激蛋白合成刺激剂、刺激角质层脂质和成分的活性剂、神经酰胺类、脂肪酸、抑制胶原蛋白降解的活性剂、抑制基质金属蛋白酶的活性剂、抑制弹性蛋白降解的活性剂、抑制丝氨酸蛋白酶诸如激肽释放酶类、白细胞弹性蛋白酶、组织蛋白酶G的活性剂,刺激成纤维细胞增殖的活性剂、刺激角化细胞增殖的活性剂、刺激脂肪细胞增殖的活性剂、刺激黑素细胞增殖的活性剂、刺激角化细胞分化的活性剂、加速或延缓脂肪细胞分化的活性剂、抗角化过度剂、粉刺溶解剂(comedolytic agent)、抗银屑病药、DNA修复剂、DNA保护剂、干细胞保护剂、稳定剂、用于治疗 and/或护理敏感性皮肤的活性剂、固化剂、抗拉长痣剂(anti-stretch mark agents)、粘合剂、调节皮脂产生的活性剂、脂肪分解剂或刺激脂解的活性剂、脂肪形成剂、调节PGC-1 α 表达的活性剂、调节PPAR γ 的活性剂、增加或减少脂肪细胞的甘油三酯含量的活性剂、抗蜂窝组织剂、PAR-2活性抑制剂、刺激愈合的活性剂、愈合剂辅佐剂、刺激表皮细胞再生的活性剂、表皮细胞再生剂辅佐剂、细胞因子、生长因子、作用于毛细血管循环和/或微循环的活性剂、刺激血管生成的活性剂、抑制血管通透性的活性剂、静脉紧张剂(venotonic agent)、作用于细胞新陈代谢的活性剂、改善真皮表皮连接的活性剂、诱导毛发生长的活性剂、毛发生长抑制或阻滞剂、延迟脱发的活性剂、香料、美容除臭剂和/或体臭吸收剂和/或体臭掩蔽剂、螯合剂、植物提取物、精油、海洋萃取物、从生物技术工艺获得的活性剂、矿物盐、细胞提取物、和抵抗紫外线A和/或B射线和红外A射线的防晒剂或有机或矿物光保护剂,或其混合物等,条件是它们在物理上和化学上与该组合物的其余成分相容,并且特别是与本发明的外泌多糖相容。此外,这些另外的成分的性质不应当不能接受地改变本发明的外泌多糖的益处。这些所述另外的成分的性质可以是合成的或天然的,如植物提取物,或通过一种生物技术工艺或从合成工艺与生物技术工艺的组合中获得的。另外的实例可以见于CTFA International Cosmetic ingredient Dictionary&Handbook,第12版(2008)。在本发明的上下文中,生物技术工艺被理解为在生物体或它的一部分中产生活性成分或其部分的任何工艺。

[0055] 在一个具体的实施方案中,该抗皱纹和/或抗衰老剂是选自(例如但不限于):葡萄(*Vitis vinifera*)、狗牙蔷薇(*Rosa canina*)、姜黄(*Curcuma longa*)、可可(*Theobroma cacao*)、银杏(*Ginkgo biloba*)、高山火绒草(*Leontopodium Alpinum*)或盐生杜氏藻(*Dunaliella salina*)的提取物或水解的提取物;由司达玛公司(Sederma)/禾大公司

(Croda)销售的**Matrixyl®**[INCI:棕榈酰五肽-4]、**Matrixyl 3000®**[INCI:棕榈酰四肽-7、棕榈酰寡肽]、**Matrixyl® Synthe'6**[INCI:甘油、水、羟丙基环糊精、棕榈酰三肽-38]、**Essenskin™**[INCI:羟基蛋氨酸钙]、**Renovage**[INCI:替普瑞酮]或**Dermaxyl®**[INCI:棕榈酰寡肽];由彭塔法姆公司(Pentapharm)/DSM销售的**Vialox®**[INCI:五肽-3]、**Syn® -Ake®**[INCI:二肽二氨基丁酰苄基酰胺二乙酸盐]、**Syn®-Co11**[INCI:棕榈酰三肽-5]、**Phytaluronate**[INCI:槐豆(长角豆)胶]或**Preregen®**[INCI:野生大豆(大豆)蛋白、氧化还原酶];由Laboratoires Sérobiologiques/科宁公司(Cognis)/BASF销售的**Myoxinol™**[INCI:水解咖啡黄葵提取物]、**Syniorage™**[INCI:乙酰基四肽-11]、**Dermican™**[INCI:乙酰基四肽-9]或**DN-AGE™ LS**[INCI:翅荚决明叶提取物];由爱西美公司(Exsymol)销售的**Algisum C®**[INCI:甲基硅烷醇甘露糖醛酸酯]或**Hydroxyprolisilane CN®**[INCI:甲基硅烷醇羟脯氨酸酯天冬氨酸酯];由Lipotec/Lubrizol销售的**Argireline®**[INCI:乙酰基六肽-8]、**SNAP-7**[INCI:乙酰基七肽-4]、**SNAP-8**[INCI:乙酰基八肽-3]、**Leuphasyl®**[INCI:五肽-18]、**Inyline™**[INCI:乙酰基六肽-30]、**Aldenine®**[INCI:水解小麦蛋白、水解大豆蛋白、三肽-1]、**Preventhelia™**[INCI:二氨基丙酰基三肽-33]、**Decorinyl™**[INCI:三肽-10瓜氨酸]、**Trylagen®**[INCI:假交替单胞菌发酵提取物、水解小麦蛋白、水解大豆蛋白、三肽-10瓜氨酸、三肽-1]、**Eyeseryl®**[INCI:乙酰基四肽-5]、**Peptide AC29**[INCI:乙酰基三肽-30瓜氨酸]、**Relistase™**[INCI:乙酰基精氨酸酰基色氨酸酰基二苯基甘氨酸]、**Thermostressine®**[INCI:乙酰基四肽-22]、**Lipochroman™6**[INCI:二甲基甲氧基苯并二氢吡喃醇]、**Chromabright™**[INCI:二甲基甲氧基苯并二氢吡喃基棕榈酸酯]、**Antarcticine®**[INCI:假交替单胞菌发酵提取物]、**dGlyage™**[INCI:盐酸赖氨酸、卵磷脂、三肽-9瓜氨酸]、**Vilastene™**[INCI:盐酸赖氨酸、卵磷脂、三肽-10瓜氨酸]、**Hyadisine®**[INCI:假交替单胞菌发酵提取物]、**Hyanify™**[INCI: Saccharide Isomerase]、**Diffuporine™**[INCI:乙酰基六肽-37]、**Silusyne™**[INCI:大豆(大豆油)油、倍半油酸山梨坦、异十六烷、透明质酸钠、羟丙基月桂基二铵水解的大豆蛋白(Lauryldimonium Hydroxypropyl Hydrolyzed Soy Protein)、乙酰基六肽-39]或**Adifyline™**[INCI:乙酰基六肽-38]、由Institut Europeen de Biologie Cellulaire/Unipex销售的**Kollaren®**[INCI:三肽-1、葡聚糖];由温森斯/ISP/Ashland(Vincienc/ISP/Ashland)销售的**Collaxyl® IS**[INCI:六肽-9]、**Laminixyl IS™**[INCI:七肽]、**Orsirtine™ GL**[INCI:大米(rice)提取物]、**D'Orientine™ IS**[INCI:Phoenix Dactylifera(枣椰子)种子提取物]、**Phytoquintescine™**[INCI:单粒小麦(Triticum Monococcum)提取物]或**Quintescine™ IS**[INCI:二肽-4];由Infinitec Activos销售的**BONT-L-Peptide**[INCI:棕榈酰六肽-19];由赛比克公司(Seppic)销售的**Deepaline™ PVB**

[INCI: 棕榈酰水解小麦蛋白]或 **Sepilift**[®] DPHP [INCI: 二棕榈酰羟脯氨酸]; 由嘉芙诗 (Gattefossé) 销售的 **Gatuline**[®] Expression [INCI: 金纽扣 (*Acmella oleracea*) 提取物]、**Gatuline**[®] In-Tense [INCI: 千日菊 (*Spilanthus Acmella*) 花提取物] 或 **Gatuline**[®] AgeDefense2 [INCI: *Juglans Regia* (胡桃) 种子提取物]; 由 Biotechmarine 销售的 Thalassine[™] [INCI: 海藻提取物]; 由阿特雷姆创新公司/优尼派克创新公司 (Atrium Innovations/Unipex Innovations) 销售的 Chronoline[™] [INCI: 己酰基四肽-3] 或 Thymulen-4 [INCI: 乙酰基四肽-2]、由科莲/安格/巴斯夫公司 (Coletica/Engelhard/BASF) 销售的 EquiStat [INCI: 苹果 (*Pyrus Malus*) 果实提取物、大豆种子提取物] 或 Juvenesce [INCI: 乙氧基乙二醇和辛酸甘油三酯 (Caprylic Triglycerid)、视黄醇、熊果酸、植物甲萘醌、伊洛马司他]; 由麦柏乐生化公司 (Mibelle Biochemistry) 销售的 Ameliox [INCI: 肌肽、生育酚、水飞蓟果实提取物] 或 PhytoCellTec Malus Domestica [INCI: 苹果果实细胞培养物]; 由 Silab 销售的 Bioxilift [INCI: 茴芹 (*Pimpinella Anisum*) 提取物] 或 SMS Anti-Wrinkle[®] [INCI: 番荔枝 (*Annona Squamosa*) 种子提取物]; Ca²⁺通道拮抗剂, 例如但不限于阿尔维林、锰或镁盐、某些仲胺或叔胺、视黄醇及其衍生物、白藜芦醇、艾地苯醌、辅酶Q10 及其衍生物、乳香酸及其衍生物、GHK 及其衍生物和/或盐、肌肽及其衍生物、DNA 修复酶, 例如但不限于光解酶、T4 核酸内切酶 V 或氯通道激动剂等。

[0056] 在一个具体的实施方案中, 止痒药选自, 例如、但不限于咖啡黄葵 (*Abelmoschus esculentus*)、*Actaea alba*、米仔兰 (*Aglaia odorata*)、*Alkanna tinctoria*、药用蜀葵 (*Althaea officinalis*)、细青皮 (*Altingia excelsa*)、*Andropogon virginicus*、裸茎楤木 (*Aralia nudicaulis*)、*Aralia raeemosa*、蓟罂粟 (*Argemone mexicana*)、黄花假杜鹃 (*Barleria prionitis*)、茶 (*Camelia sinensis*)、*Caesalpinia digyna*、凌霄花 (*Campsis grandiflora*)、*Carissa congesta*、*Carthamus oxyacantha*、决明 (*Cassia tora*)、野菊花 (*Chrysanthemum indicum*)、*Cimicifuga racemosa*、樟树 (*Cinnamomum camphora*)、*Clematis vitalba*、云南菟丝子 (*Cuscuta reflexa*)、*Diospyros peregrina*、*Enicostema axillare*、*Hammamelis virginiana*、*Jatropha multifida*、药用薰衣草花 (*Lavandula officinalis*)、宽叶薰衣草 (*Lavandula latifolia*)、苏合香 (*Liquidambar orientalis*)、白果紫草 (*Lithospermum officinale*)、*Madhuca longifolia*、角胡麻 (*Martynia annua*)、紫苜蓿 (*Medicago sativa*)、黄兰 (*Michelia champaca*)、*Mikania glomerata*、含羞草 (*Mimosa pudica*)、水稻 (*Oryza sativa*)、肾豆 (*Phaseolus vulgaris*)、*Phyllanthus urinaria*、*Phyllanthus virgatus*、阿月浑子 (*Pistacia vera*)、蓼 (*Polygonum hydropiper*)、*Quercus ilex*、萝芙木 *Rauwolfia caffra*、蓖麻 (*Ricinus communis*)、悬钩子 (*Rubus idaeus*)、茨蓝 (*Sagittaria sagittifolia*)、*Sandoricum koetjape*、无患子 (*Sapindus mukorossi*)、*Schleichera oleosa*、木田菁 (*Sesbania grandiflora*)、*Spondias dulcis*、椴属 (*Tilia sp.*)、红椿 (*Toona ciliata*)、*Tragia involucrata*、五角栝楼 (*Trichosanthes quinqueangulata*)、*Vaccaria pyramidata*、印度翼核果 (*Ventilago madraspatana*)、*Veratrum album* 或欧洲苍耳 (*xanthium strumarium*) 等的提取物以及为止痒药的生物技术来源的一种合成化合物或产物, 例如、但不限于 Atrium/Unipex Innovations 销售的 Neutrazen[™] [INCI: 水、丁二醇、棕榈酰三肽-8]、Institut Européen de

Biologie Cellulaire/Unipex Innovations销售的**Meliprene**[®] [INCI:右旋糖酐、乙酰基六肽-1]、Lipotec/Lubrizol销售的Delisens[™] [INCI提出的:乙酰基六肽-46]、Laboratoires Sérobiologiques/Cognis/BASF销售的Skinasensyl[™] [INCI:乙酰基四肽-15]、Symrise销售的**SymSitive**[®] 1609 [INCI:4-叔丁基环己醇]、BASF销售的Symbiocyte[™] [INCI:来自Cestrum Latifolium的提取物]、Gattefossé销售的**Gatuline**[®] Derma-Sensitive [INCI:肉豆蔻酸辛基十二烷基酯、刺山柑(Capparis Spinosa)果实提取物]或Mibelle Biochemistry销售的MAXnolia [INCI:Magnolia Officinalis Bark提取物、葡萄(Vitis Vinifera)(葡萄)子提取物、生育酚]等或其混合物。

[0057] 在另一个具体的实施方案中,然后所述抗炎药和/或止痛药选自,例如、但不限于下组,该组由如下各项形成:羟基积雪草苷提取物、紫锥花属提取物、苋菜红子油、檀香油、李属叶提取物、芦荟(Aloe vera)、山金车(Arnica montana)、艾(Artemisia vulgaris)、大叶马蹄香(Asarum maximum)、金盏草成药(Calendula officinalis)、辣椒属(Capsicum)、Centipeda cunninghamii、Chamomilla recutita、文殊兰(Crinum asiaticum)、Hamamelis virginiana、Harpagophytum procumbens、贯叶金丝桃(Hypericum perforatum)、金边叶白花百合(Lilium candidum)、Malva sylvestris、Melaleuca alternifolia、Origanum majorana、牛至(Origanum vulgare)、Prunus laurocerasus、迷迭香(Rosmarinus officinalis)、白柳(Salix alba)、水飞蓟(Silybum marianum)、菊蒿(Tanacetum parthenium)、Thymus vulgaris、Uncaria guianensis或欧洲越桔(Vaccinum myrtillus)的提取物、 ω -3和 ω -6脂肪酸、Atrium/Unipex Group销售的Neutrazen[™] [INCI:水、丁二醇、右旋糖酐、棕榈酰三肽-8]、Lipotec/Lubrizol销售的Delisens[™] [INCI提出的:乙酰基Hexapeptide-46]、Institut Européen de Biologie Cellulaire/Unipex Innovations销售的**Meliprene**[®] [INCI:右旋糖酐、乙酰基六肽-1]、Laboratoires Sérobiologiques/Cognis/BASF销售的Skinasensyl[™] [INCI:乙酰基四肽-15]或Anasensyl[™] [INCI:甘露糖醇、甘草酸单铵、咖啡因、马栗树(七叶树)提取物]、Sederma/Croda销售的Calmosensine[™] [INCI:乙酰基Dipeptide-1]、辅酶Q10或烷基甘油基醚类等或其混合物。

[0058] 在另一个具体的实施方案中,抑制神经元胞吐作用的活性剂、抗胆碱药、乙酰胆碱受体成簇抑制剂和/或肌肉收缩抑制剂选自,例如、但不限于:颠茄(Atropa belladonna)、莨菪(Hyoscyamus niger)、Mandragora officinarum、南美防己(Chondodendron tomentosum)、来自茄科(Brugmansias)属或来自曼陀罗属(Daturas)的植物的提取物、肉毒梭菌毒素、衍生自蛋白质SNAP-25的肽类、衍生自突触结合蛋白的肽类、衍生自蛋白质突触融合蛋白的肽类、衍生自蛋白质突触泡蛋白的肽类、衍生自蛋白质snapin的肽类、Lipotec/Lubrizol销售的**Argireline**[®] [INCI:乙酰基六肽-8]、SNAP-7 [INCI:乙酰基七肽-4]、SNAP-8 [INCI:乙酰基八肽-3]、**Leuphasyl**[®] [INCI:五肽-18]或Inyline[™] [INCI:乙酰基六肽-30]、Infinitec Activos销售的BONT-L-Peptide [INCI:棕榈酰六肽-19]和Pentapharm/DSM销售的**Vialox**[®] [INCI:五肽-3]或**Syn[®] Ake[®]** [INCI:二肽二氨基丁酰基苄基酰胺二乙酸酯]等或其混合物。

[0059] 在一个具体的实施方案中,致密和/或再致密化剂(redensifying agent)、重构剂(restructuring agent)选自,例如,但不限于:Malpighia punicitolia、朝鲜蓟(Cynara scolymus)、草棉(Gossypium herbaceum)、翠绿芦荟(Aloe Barbadensis)、壳子(Panicum miliaceum)、黑桑(Morus nigra)、芝麻(Sesamum indicum)、大豆油、软粒小麦(Triticum vulgare)的提取物、Provital销售的**Pronalen**[®] Refirming HSC[INCI:软粒小麦、水飞蓟(Silybum Marianum)、甘氨酸大豆、问荆(Equisetum Arvense)、羽衣草(Alchemilla Vulgaris)、紫苜蓿、萝卜(Raphanus Sativus)]或**Polyplant**[®] Refirming[INCI:金花菊、Asiatic Centella、墨角藻属(Fucus)、胡芦巴]、Atrium Biotechnologies/Unipex Innovations销售的**Lanablue**[®] [INCI:山梨醇、藻类提取物]、Pentapharm/DSM销售的**Pepha**[®]-Nutrix[INCI:天然营养因子]、包含异黄酮类的植物提取物、Sederma/Croda销售的Biopeptide EL[™][INCI:棕榈酰寡肽]、Biopeptide CL[™][INCI:棕榈酰寡肽]、**Vexel**[®] [INCI:水(Aqua)、丙二醇、卵磷脂、咖啡因、软脂基肉毒碱]、**Matrixyl**[®] [INCI:棕榈酰五肽-3]、**Matrixyl**[®] 3000[INCI:棕榈酰四肽-3、棕榈酰寡肽]或Bio-Bustyl[™][INCI:聚甲基丙烯酸甘油酯、拉恩菌属(Rahnella)大豆蛋白发酵物、水(Aqua)、丙二醇、甘油、PEG-8、棕榈酰寡肽]、Laboratoires Serobiologiques/Cognis/BASF销售的**Dermosaccharides**[®] HC [INCI:甘油、水(Aqua)、葡糖氨基聚糖类、糖原]、**Aglycal**[®] [INCI:甘露糖醇、环糊精、糖原、Aratostaphylos Uva Ursi叶提取物]、**Cytokinol**[®] LS[INCI:水解酪蛋白、水解酵母蛋白、赖氨酸HCl]或**Firmiderm**[®] LS9120[INCI:榄仁树(Terminalia Catappa)叶提取物、西洋接骨木(Sambucus Negra)花提取物、PVP、鞣酸]、Silab销售的**Liftline**[®] [INCI:水解小麦蛋白]、**Raffermine**[®] [INCI:水解大豆粉]或Ridulisse**C**[®] [水解大豆蛋白]、Lipotec/Lubrizon销售的**Serilesine**[®] [INCI:六肽-10]、Decorinyl[™] [INCI:三肽-10瓜氨酸]、**Trylagen**[®] [INCI:假交替单胞菌属发酵提取物、水解小麦蛋白、水解大豆蛋白、三肽-10瓜氨酸、三肽-1]、Silusyne[™] [INCI:大豆(大豆油)油、倍半油酸山梨坦、异十六烷、透明质酸钠、羟丙基水解大豆蛋白月桂基二铵、乙酰基六肽-39]或Adifyline[™] [INCI:乙酰基六肽-38]、Coletica/Engelhard/BASF销售的**Ursolisome**[®] [INCI:卵磷脂、熊果酸、端胶原、黄原胶、硫酸软骨素钠]或**Collalift**[®] [INCI:水解麦芽提取物]、Pentapharm/DSM销售的**Syn**[®]-Co11[INCI:棕榈酰三肽-5]、Atrium Biotechnologies/Unipex Innovations销售的**Hydriame**[®] [INCI:水(Aqua)、葡糖氨基聚糖类、菌类植物胶]或Institut Europeen de Biologie Cellulaire/Unipex Innovations销售的IP2000[INCI:右旋糖酐、三氟乙酰基三肽-2]等。

[0060] 在一个具体的实施方案中,刺激真皮或表皮大分子合成的活性剂选自,例如,但不限于:胶原蛋白合成刺激剂、弹性蛋白合成刺激剂、核心蛋白聚糖合成刺激剂、层粘连蛋白

合成刺激剂、伴侣蛋白合成刺激剂、sirtuin合成刺激剂、sirtuin活化剂、水通道蛋白合成调节剂、纤连蛋白合成刺激剂、抑制胶原蛋白降解的活性剂、抑制弹性蛋白降解的活性剂、抑制丝氨酸蛋白酶例如激肽释放酶类、白细胞弹性蛋白酶或组织蛋白酶G的活性剂、刺激成纤维细胞增殖的活性剂、刺激脂肪细胞增殖的活性剂、加速或延迟脂肪细胞分化的活性剂和DNA修复剂和/或DNA保护剂,例如、但不限于积雪草(*Centella asiatica*)、酿酒酵母(*Saccharomyces cerevisiae*)、马铃薯(*Solanum tuberosum*)、迷迭香(*Rosmarinus officinalis*)、狭叶越桔(*Vaccinium angustifolium*)的提取物、藻类巨藻(*Macrocystis pyrifera*)、粉团扇藻(*Padina pavonica*)的提取物、大豆、麦芽、亚麻、鼠尾草、红色三叶草、kakkon、白色羽扇豆植物的提取物、榛子提取物、玉米提取物、酵母提取物、山毛榉根提取物、菜豆子提取物、植物激素提取物例如赤霉素类、植物生长素或细胞激肽类等或浮游动物盐沼的提取物、具有保加利亚乳杆菌(*Lactobacillus Bulgaricus*)的乳品发酵产品、亚细亚皂甙及其衍生物、维生素C及其衍生物、肉桂酸及其衍生物、Sederma/Croda销售的**Matrixyl**[®][INCI:棕榈酰五肽-3]、**Matrixyl**[®] 3000[INCI:棕榈酰四肽-3、棕榈酰寡肽]或Biopeptide CL[™][INCI:聚甲基丙烯酸甘油酯、丙二醇、棕榈酰寡肽]、Lipotec/Lubrizol销售的**Antarcticine**[®][INCI:假交替单胞菌属发酵提取物]、**Decorinyl**[®][INCI:三肽-10瓜氨酸]、**Serilesine**[®][INCI:六肽-10]、Lipeptide[INCI:水解植物蛋白]、**Aldenine**[®][INCI:水解小麦蛋白、水解大豆蛋白、三肽-1]、Relistase[™][INCI:乙酰基精氨酸基三色氨酸基二苯基甘氨酸]、Thermostressine[™][INCI:乙酰基四肽-22]、Peptide AC29[INCI:乙酰基三肽-30瓜氨酸]、Diffuporine[™][INCI:乙酰基六肽-37]、Silusyne[™][INCI:大豆(大豆油)油、倍半油酸山梨坦、异十六烷、透明质酸钠、羟丙基水解大豆蛋白的月桂基二铵(Lauryldimonium Hydroxypropyl Hydrolyzed Soy Protein)、乙酰基六肽-39]或Adifyline[™][INCI:乙酰基六肽-38]、Alban Muller销售的**Drieline**[®] PF[INCI:酵母β-葡聚糖]、Coletica/Engelhard/BASF销售的Phytovityl **C**[®][INCI:水,玉米须提取物]comercializado por Solabia、**Collalift**[®][INCI:水解麦芽提取物]、Vinciencia/ISP/Ashland销售的Phytocoehesine PSP[™][INCI:β谷甾醇硫酸钠]、矿物例如钙等、异黄酮、类胡萝卜素类特别是番茄红素、假二肽类、维生素a酸类及其衍生物例如视黄醇或棕榈酸视黄酯等或类肝素类等。

[0061] 在另一个具体的实施例中,刺激愈合的活性剂、愈合剂辅佐剂、刺激表皮细胞再生的活性剂和/或表皮细胞再生剂辅佐剂选自,例如但不限于:铁线莲叶马兜铃(*Aristolochia clematis*)、积雪草(*Centella asiatica*)、麝香玫瑰(*Rosa moschata*)、狭叶松果菊(*Echinacea angustifolia*)、聚合草(*Symphytum officinale*)、问荆(*Equisetum arvense*)、贯叶连翘(*Hypericum perforatum*)、细花含羞草(*Mimosa tenuiflora*)、鳄梨(*Persea gratissima*)、非洲李(*Prunus africanum*)、直立委陵菜(*Tormentilla erecta*)、芦荟(*Aloe vera*)的提取物、由宝唯特公司(Provital)销售的**Polyplant**[®] Epithelizing [INCI:金盏花、贯叶连翘、母菊、迷迭香]、由Laboratoires Serobiologiques/科宁/巴斯夫公司销售的**Cytokinol**[®] LS9028[INCI:水解酪蛋白、水解酵母蛋白、盐酸赖氨酸]或由科

莲/安格公司销售的 **Deliner®** [INCI: 玉蜀黍(玉米)仁提取物]、尿囊素、钙粘着蛋白、整合素、选择素、透明质酸受体、免疫球蛋白、成纤维细胞生长因子、结缔组织生长因子、血小板源生长因子、血管内皮生长因子、表皮生长因子、胰岛素样生长因子、角质形成细胞生长因子、集落刺激因子、转化生长因子-β、肿瘤坏死因子-α、干扰素、白细胞介素、基质金属蛋白酶、受体蛋白酪氨酸磷酸酶、Lipotec/Lubrizonol公司销售的 **Antarcticine®** [INCI: 假交替单胞菌发酵提取物]、**Bodyfensine®** [INCI: 乙酰基二肽-3-氨基己酸酯]或Decorinyl™ [INCI: 三肽-10-瓜氨酸]、**Trylagen®** [INCI: 假交替单胞菌发酵提取物、水解小麦蛋白、水解大豆蛋白、三肽-10-瓜氨酸、三肽-1]、Xpertmoist™ [INCI: 甘油、假交替单胞菌发酵提取物、黄原胶、脯氨酸、丙氨酸、丝氨酸、乙基己基甘油、辛甘醇]、**Serilesine®** [INCI: 六肽-10]或Thermostressine™ [INCI: 乙酰基四肽-22]和/或其混合物。

[0062] 在另一个具体的实施方案中,美容除臭剂和/或体臭吸附剂和/或体臭掩蔽剂和/或止汗药、香精和/或香味油选自,例如、但不限于:蓖麻油酸的锌盐配合物、非生物酸(abiotic acid)的衍生物、鼠尾草精、黄春菊精、康乃馨精、香蜂叶精、薄荷精、肉桂叶精、莱姆花精、杜松子精、岩石草精、乳香精、古蓬香胶精、劳丹脂精、熏衣草精、薄荷精、安息香、佛手柑、二氢羟基月桂烯醇、铃兰醛、新铃兰醛、香茅醇、柠檬精、柑橘精、橙精、肉豆蔻酒、天竺葵精、茴香籽、芫荽叶、小茴香子、杜松属、鸢尾提取物、百合、玫瑰花、茉莉、橙花油;乙酸苜酯、乙酸对叔丁基环己酯、乙酸沉香酯、乙酸苯乙酯、甘氨酸乙基甲基苯酯、苯甲酸沉香酯、甲酸苜酯(benzyl formiate)、丙酸烯丙基环己酯(allylcyclohexyl propionate)、stiralyl propionate、水杨酸苜酯、苜基乙醚、具有8-18个碳原子的支链烷醛、柠檬醛、顺蓖麻酸、香茅醛、香茅基氧基乙醛、兔耳草醛、羟基香茅醛、波吉洪醛(bourgeonal)、紫罗酮、甲基柏木基酮、茴香脑、丁香酚、异丁香油酚、香叶醇、沉香醇、萜品醇、苯乙醇、α-己基肉桂醛、香叶醇、苜丙酮、兔耳草醛、降龙涎香醚(ambroxan)、吡啶、二氢茉莉酮酸甲酯(hedione)、sandelice、cyclovertal、β-大马酮、羟乙酸烯丙基戊酯、二羟基月桂烯醇、异丁酸苯氧基乙烯酯、水杨酸环己酯、苯乙酸、醋酸牛龙牛儿酯、romilate、依罗酯(irotyl)、floramate、铝盐例如明矾、氯化铝、水合氯化铝、二氯水合铝、倍半氯水合铝、羟基尿囊素铝(aluminum hydroxy allantoinate)、氯酒石酸铝、三水合铝和三水合镉、四氯水合铝和四氯水合镉、五氯水合铝和五氯水合镉和/或其混合物;Lipotec/Lubrizonol销售的 **Leuphasyl®** [INCI: 五肽-18]、SNAP-7 [INCI: 乙酰基六肽-4]、SNAP-8 [INCI: 乙酰基八肽-3]、**Argireline®** [INCI: 乙酰基六肽-8]或Inyline™ [INCI: 乙酰基六肽-30]、Pentapharm/DSM和BONT-L-Peptide销售的 **Vialox®** [INCI: 五肽3]或**Syn® Ake®** [INCI: 二肽二氨基丁酰基苜胺二乙酸酯]、Infinitec Activos销售的 [INCI: 棕榈酰六肽-19]等或其混合物。

[0063] 应用

[0064] 在另一个方面,本发明涉及具有保藏号CNCM I-4239的弧菌属物种菌株在制备用于治疗 and/或护理皮肤、粘膜、毛发和/或指甲的化妆品或皮肤药物组合物中的用途。特别地,所述治疗涉及治疗和/或预防疼痛、炎症、瘙痒或多汗,皮肤和/或粘膜的上皮再生和/或愈合治疗,治疗和/或预防皮肤衰老、治疗和/或预防皮肤皱纹、优选面部皱纹、治疗和/或预

防皮肤坚实度缺失、治疗和/或预防多汗或出汗、治疗和/或护理选自疣、胼胝的皮肤病、治疗性刺激毛发生长和/或预防脱发。

[0065] 在另一个具体的实施方案中,本发明涉及具有保藏号CNCM I-4239的弧菌属物种菌株在制备用于抑制神经元胞吐作用的化妆品或皮肤药物组合物中的用途。

[0066] 在另一个具体的实施方案中,本发明涉及具有保藏号CNCM I-4239的弧菌属物种菌株在制备用于刺激成纤维细胞增殖的化妆品或皮肤药物组合物中的用途。

[0067] 本发明的另一个方面涉及治疗和/或护理皮肤、粘膜、毛发和/或指甲的方法,该方法包含施用化妆品和/或皮肤药学有效量的具有保藏号CNCM I-4239的弧菌属物种菌株的外泌多糖。特别地,所述治疗涉及治疗和/或预防疼痛、炎症、瘙痒或多汗,使皮肤和/和/或粘膜的上皮再生和/或愈合治疗、治疗和/或预防皮肤衰老、治疗和/或预防皮肤皱纹、优选面部皱纹、治疗和/或预防皮肤坚实度缺失、治疗和/或预防多汗或出汗、治疗和/或护理选自疣、胼胝的皮肤病、治疗性刺激毛发生长和/或预防脱发。

[0068] 在一个优选的实施方案中,疼痛选自与病症、疾病和/或障碍相关的疼痛,例如、但不限于接触敏感性、对冷敏感、对热敏感、皮肤刺激、毛发去除后皮肤刺激、剃毛后皮肤刺激、银屑病、敏感性皮肤、皮炎、特应性皮炎、接触性皮炎、尿布皮炎、脂溢性皮炎、湿疹、扁平苔藓、烧伤、晒伤、关节炎、类风湿性关节炎、骨关节炎牛皮癣关节炎、超敏反应、术后、强脉冲光线疗法(IPL)后、用单色脉冲光(激光)处理后、用化学脱屑剂治疗后或过度暴露于外部攻击性试剂治疗后的皮肤疼痛或刺激等。

[0069] 在另一个优选的实施方案中,炎症选自,例如、但不限于银屑病、敏感性皮肤、皮炎、特应性皮炎、接触性皮炎、尿布皮炎、脂溢性皮炎、湿疹、酒渣鼻、痤疮、过度增生性皮肤病、烧伤、晒伤、爪间鬃、术后、强脉冲光线疗法(IPL)后、用单色脉冲光(激光)处理后、用化学脱屑剂治疗后或过度暴露于外部攻击性试剂治疗后的皮肤炎症、阴道粘膜炎症、口腔粘膜炎症、牙龈炎、牙周炎、鼻炎、过敏性鼻炎等。

[0070] 在另一个优选的实施方案中,瘙痒选自与病症、疾病和/或障碍相关的瘙痒,例如、但不限于皮炎、特应性皮炎、接触性皮炎、尿布皮炎、疱疹样皮炎、光照性皮肤病、光敏感性、妊娠相关皮炎、绝经相关皮炎、湿疹、敏感性皮肤、银屑病、水痘、疱疹、带状疱疹、结节性裂毛综合征、剥脱皮肤综合征、扁平苔藓、痤疮、头皮屑、皮脂溢、脂溢性皮炎、脱发、足癣、念珠菌病、痔疮、阴道瘙痒、肛周瘙痒、阴肛部瘙痒、晒伤、荨麻疹、瘙痒性耳炎、眼痒、老年皮肤搔痒症、水源性瘙痒症、结节性痒疹、痒疹苔藓、玫瑰糠疹、干燥病和干性皮肤、过敏反应、药物过敏、食物过敏、化学品过敏、暴露于有毒植物和暴露于虫咬等。

[0071] 优选地,多汗或出汗的治疗和/或预防是治疗和/或预防腋窝、面部、生殖器、手掌或足底的多汗或出汗。

[0072] 在另一个方面,本发明涉及抑制神经元胞吐作用的方法,该方法包含施用化妆品和/或皮肤药学有效量的具有保藏号CNCM I-4239的弧菌属物种菌株的外泌多糖。

[0073] 在另一个方面,本发明涉及刺激成纤维细胞增殖的方法,该方法包含施用化妆品和/或皮肤药学有效量的具有保藏号CNCM I-4239的弧菌属物种菌株的外泌多糖。

[0074] 施用具有保藏号CNCM I-4239的弧菌属物种菌株的外泌多糖通过局部或透皮进行。在一个更具体的方面,局部或透皮施用通过电离子透入疗法、超声促渗、电穿孔、机械压迫、渗透压梯度、封闭愈合、微注射、通过压力的无针头注射、微型电子贴(microelectric

patches)、面膜或其任意的组合来进行。

[0075] 应用频率可以广泛改变,这取决于每位受试者的需求,从而启示从每个月1次到每天10次、优选每周1次到每天4次、更优选每周3次到每天2次、甚至更优选每天1次的应用。

[0076] 借助于下列实施例更清楚地理解本发明,这些实施例不起限定作用,包括它们的目的仅在于示例性地描述本发明外泌多糖和包含它的组合物的制备和表征。

实施例

[0077] 实施例1:具有保藏号CNCM I-4239的弧菌属物种的菌株分泌的外泌多糖的制备和分离

[0078] a)具有保藏号CNCM I-4239的弧菌属物种菌株的培养方法

[0079] 在29°C并且在pH 7.5下在发酵罐中培养具有保藏号CNCM I-4239的弧菌属物种菌株,其肉汤包含富含葡萄糖(20g/l)的2216E培养基(ZoBell C.E.J.Mar.Res.,1941,4:42.)。用10%(v/v)预培养物制备接种物,使发酵期限延长至72小时。通气和搅拌速度分别为2vvm和250rpm。

[0080] b)表多肽的纯化

[0081] 通过以12,000g离心45mins从肉汤中分离细菌。通过用聚乙烯砜膜超滤超过100KDa分子量的多糖类用蒸馏水纯化多糖。得到的多糖的平均分子量为180万Da。

[0082] 实施例2:具有保藏号CNCM I-4239的弧菌属物种菌株产生的外泌多糖的物理-化学表征

[0083] 通过根据Kamerling等人在Biochem.J.,1975151:491-495所述并且由Montreuil等人在1986,Glycoproteins.In Carbohydrate analysis:a practical approach.Eds Chaplin et Kennedy,I.R.L Press,Oxford,Washington D.C.,pp143-204中改进的方法进行水解和气相色谱测定根据实施例1得到的外泌多糖的中性和酸性单糖类的含量。得到的糖类的百分率关系为47.7%的N-乙酰氨基葡萄糖、11.4%的N-乙酰半乳糖胺和40.9%的葡萄糖醛酸。

[0084] 实施例3:使用人角化细胞的体外愈合试验

[0085] 从生长至汇合的人角化细胞培养物开始,进行用胰蛋白酶处理,在48-孔培养板中以 5×10^4 细胞/孔进行再接种。在37°C、5%CO₂加湿气氛下温育48小时后,通过用吸管端刮取生成无细胞区。然后向细胞中加入包含0.5mg/mL浓度的具有保藏号CNCM I-4239的弧菌属物种菌株产生的外泌多糖的培养基。将未处理的细胞、即未经任何产物处理的细胞用作阴性对照,而将用DMEM(Dulbecco改进的Eagle培养基)和胎牛血清处理的细胞用作阳性对照。此时使用Zeiss Axiovert 40 CFL显微镜和AxioCam MRC5照相机给无细胞区域拍照。然后将培养物温育(再次在37°C、5%CO₂与加湿气氛中)48小时,以使细胞迁移至无细胞区域。此后,拍摄新的培养物照片,与0时比较,根据相对于最初占据区域的细胞占据区域的增加计算愈合百分比。

[0086] 表1 显示相对于阴性对照观察到的愈合增加。

[0087]

测试产品	相对于阴性对照的愈合增加(%)
阴性对照	0%

阳性对照	115%
菌株CNCM I-4239分泌的外泌多糖	92%

[0088] 表1

[0089] 实施例4:对人表皮成纤维细胞的体外增殖试验

[0090] 通过基于荧光测定的细胞存活方法评价细胞增殖。根据存在的胞内酯酶活性区分活细胞,所述胞内酯酶活性通过钙黄绿素-AM的非荧光化合物进入细胞的酶转化率测定,所述化合物透入细胞,在那里其被转化成强荧光钙黄绿素,它保留在细胞内部,并且赋予高度绿色荧光强度。

[0091] 用胰蛋白酶处理人表皮成纤维细胞,以 5×10^3 细胞/孔的密度接种在96-孔培养板中。在 37°C 、 $5\% \text{CO}_2$ 加湿气氛中温育24小时后,在每个孔中加入新鲜培养基,该培养基中包含浓度为 1mg/mL 、 0.5mg/mL 和 0.25mg/mL 的具有保藏号CNCM I-4239的弧菌属物种菌株产生的外泌多糖。将未用本发明外泌多糖处理的细胞用作对照组。将细胞在 37°C 、 $5\% \text{CO}_2$ 加湿气氛中再温育24小时。接下来用在PBS(磷酸缓冲盐水, Sigma)中 $100\mu\text{L}$ 的钙黄绿素-AM(分子探针),按照Lynch等人[Lynch C.N., Wang Y.C., Lund J.K., Chen Y.-W., Leal J.A., Wiley S.R., "TWEAK induce angiogenesis and proliferation of endothelial cells", J. Cell Biol. 1999; 274(13): 8455-8459]所述的方法替换每个孔中的培养基。用多孔平板读出器(1420VICTOR2, EG&G Wallac)在 $\lambda_{\text{exc}} = 485\text{nm}$ 和 $\lambda_{\text{em}} = 530\text{nm}$ 测定荧光。将增殖计算为: $T/C \times 100$, 其中T表示测试孔的吸光度,且C表示对照孔的吸光度。

[0092] 本试验中使用钙黄绿素-AM得到的结果如表2中所示:

[0093]

测试产品	相对于对照组的生长(%)
对照组	100%
菌株CNCM I-4239分泌的外泌多糖 1mg/mL	113.6

[0094]

菌株CNCM I-4239分泌的外泌多糖 0.5mg/mL	115.4
菌株CNCM I-4239分泌的外泌多糖 0.25mg/mL	118.4

[0095] 表2

[0096] 实施例5:通过ELISA作为检测方法对SNARE复合物形成的抑制作用的研究

[0097] 由于目的在于用本发明的外泌多糖测定对SNARE复合物形成抑制作用的能力,所以研究用该化合物与SNAP-25相比在有关这种复合物形成方面的竞争抑制作用。通过ELISA技术、使用来自结合GST的复合物的蛋白质之一测定所形成的SNARE复合物比例。

[0098] 在96-孔培养板中,固定VAMP(使用 $0.037\mu\text{M}$ 溶液),随后用BSA(牛血清白蛋白)(3%)封闭游离空间。与该方法平行,测试结合GST(谷胱甘肽S-转移酶(Glutathion S-transferase))($0.0185\mu\text{M}$)的SNAP-25、突触融合蛋白($0.037\mu\text{M}$)和具有保藏号CNCM I-4239的弧菌属物种菌株产生的外泌多糖(在 1mg/mL 、 0.5mg/mL 和 0.1mg/mL),温育1小时。

[0099] 温育后,将样品转入固定了VAMP的培养板,温育1小时,以允许形成SNARE复合物。此后,洗涤培养板,用初级抗体抗-GST(抗体抗-GST表位TAG, Fisher目录号:PA1-982A)检测该复合物。用TECAN GENios分光光度测量读出器在 490nm 波长读取吸光度。

[0100] 为了有利于测试产品与形成SNARE复合物的蛋白质之一(SNAP-25)的竞争,以等摩

尔浓度混合这种比例的蛋白质与其余的蛋白质。

[0101] 表3显示用本发明外泌多糖与SNAP-25对形成SNARE复合物的竞争性抑制的结果。对复合物形成的抑制百分比与通过分光光度法检测的SNARE复合物的量成反比。

[0102]

测试产品	SNARE 复合物形成的抑制%		
	1.0 mg/mL	0.1 mg/mL	0.5 mg/mL
菌株 CNCM I-4239 分泌的外泌多糖	57	31	53-

[0103] 表3

[0104] 实施例6:通过作为检测方法的电泳对SNARE复合物形成的抑制作用的研究

[0105] 将VAMP(6 μ M)、突触融合蛋白(6 μ M)和具有保藏号CNCM I-4239的弧菌属物种菌株产生的外泌多糖(1mg/mL和0.1mg/mL)温育3小时。在使用超纯水(18.2m Ω)形成复合物的阴性对照中生成测试外泌多糖产生的相同稀释液。随后加入SNAP-25(0.6 μ M),将该混合物再温育15小时,以使SNARE复合物形成。温育后,加入加样缓冲液(Laemli样品缓冲液),用凝胶SDS-PAGE在10%丙烯酰胺凝胶中分析该混合物。通过图像采集和分析软件测定复合物的量。

[0106] 表4显示对形成SNARE复合物的抑制结果。对复合物形成的抑制百分比与检测的SNARE复合物的量成反比。

[0107]

测试产品	SNARE 复合物形成的抑制%	
	1.0 mg/mL	0.1mg/mL
菌株 CNCM I-4277 分泌的外泌多糖	60	6

[0108] 表4

[0109] 实施例7:通过ELISA方法TPA/离子霉素在成神经瘤细胞中诱导的去甲肾上腺素释放的定量

[0110] 使用TPA(12-0-十四酰基佛波醇-13-乙酸酯)/离子霉素诱导去甲肾上腺素释放能够直接测定神经元的胞吐作用。为了研究本发明外泌多糖对去甲肾上腺素释放的抑制作用,将人神经母细胞瘤细胞系的细胞与具有保藏号CNCM I-4239的弧菌属物种菌株产生的外泌多糖一起预温育(1×10^6 细胞/孔)60分钟,所述具有保藏号CNCM I-4239的弧菌属物种菌株产生的外泌多糖的测试浓度为2mg/mL、1mg/mL和0.1mg/mL。然后通过用动员胞内囊泡(包含神经递质)的12-0-十四酰基佛波醇-13-乙酸酯(TPA)100nM溶液预处理8分钟诱导去甲肾上腺素神经递质释放,随后与TPA/离子霉素(100nM/10 μ M)一起温育5分钟,这诱导这些囊泡中包含的神经递质释放。在通过针对去甲肾上腺素的特异性抗体介导并且通过基于碱性磷酸酶反应的酶反应完成的试验中,通过ELISA(去甲肾上腺素ELISA试剂盒,IBL国际参考号RE59261)对释放入培养基中的神经递质的量进行定量,产生用Thermo Scientific Multiskan Ascent仪器在405nm测定的可定量颜色吸光度信号。

[0111] 用本发明的外泌多糖阻断SNARE复合物导致对神经元胞吐的抑制作用,因此导致

释放的去甲肾上腺素水平降低(表5)。

[0112]

测试产品		去甲肾上腺素的释放%
释放阳性对照(TPA / ION)		100
菌株 CNCM I-4239 分泌 的外泌多糖	2.0 mg/mL	65.5
	1.0 mg/mL	83.4
	0.5 mg/mL	92.1

[0113] 表5

[0114] 实施例8:具有保藏号CNCM I-4239的弧菌属物种菌株分泌的外泌多糖的化妆品组合物的制备

[0115] 用水[INCI:水(AQUA)]与磷酸氢二钠[INCI:磷酸二钠]、磷酸钠2-水合物[INCI:磷酸钠]、**Zemea**[®]丙二醇[INCI:丙二醇]、**Dermosoft**[®]GMCY[INCI:辛酸甘油酯]和黄原胶[INCI:黄原胶](相C1的成分)制备具有保藏号CNCM I-4239的弧菌属物种菌株分泌的外泌多糖的1%重量的溶液。

[0116] 另一方面,在适合的容器中,将水解物5 2/016020[INCI:戊二醇]和Microcare BNA[INCI:苯醇]溶于纯水[INCI:水(AQUA)]。然后缓慢地加入**Carbopol**[®]ultrez 10 [INCI:卡波姆]。在下一步中,在搅拌下加入Arlatone MAP,160K[INCI:鲸蜡磷酸钾],直到其分散,将成分的混合物加热至70-75°C。该组成成分构成A相。

[0117] 另外将来自相B的成分Finsolv-TN[INCI:C12-15苯甲酸烷基酯]、Phytocream 2000[INCI:硬脂酸甘油酯、鲸蜡硬脂醇、棕榈酰钾水解的小麦蛋白]、Massocare EC[INCI:椰油酸乙基己酯]、苯氧乙醇[INCI:苯氧乙醇]醋酸维生素E[INCI:醋酸生育酚]在70-75°C溶解。一旦溶解,则在涡旋搅拌下缓慢地将它们加入到相A的成分的混合物中。

[0118] 将该混合物冷却至50°C,将Silicone dc 200[INCI:二甲硅油]与相C1的成分一起加入到A和B的成分的混合物中。

[0119] 在涡旋搅拌下,将Sepigel 305[INCI:水(AQUA)、聚丙烯酰胺、C13-14异链烷烃、聚乙二醇单十二醚-7](D相)加入到从不同相的混合物中得到的乳剂中。然后在涡旋搅拌下将E相、香料Ocean 12720[INCI:香精(香料)]加入到该混合物中。通过在搅拌下滴加氢氧化钠[INCI:氢氧化钠](F相)将pH调整至6.0-6.5。

[0120] 得到的化妆品组合物的比例如表6中所示:

	成分	重量%
	A 水(AQUA)	75.00
	A 戊二醇	5.00
	A 芊醇	1.00
	A 卡波姆	0.50
	A 鲸蜡磷酸钾	0.50
	B 苯甲酸 C12-15烷基酯	5.00
	B 硬脂酸甘油酯	2.05
	B 鲸蜡硬脂醇	2.05
	B 棕榈酰钾水解的小麦蛋白	0.90
[0121]	B 椰油酸乙基己酯	2.50
	B 苯氧乙醇	0.90
	B 醋酸生育酚	0.50
	C 二甲硅油	1.00
	C1 水(AQUA)	1.41
	C1 菌株CNCMI-4239的外泌多糖	0.02
	C1 磷酸氢二钠	0.03
	C1 磷酸钠	0.02
	C1 黄原胶	0.02
	C1 丙二醇	0.49
	C1 辛酸甘油酯	0.01
	D 水(AQUA)	0.34
	D 聚丙烯酰胺	0.40
	D C13-14异链烷烃	0.20
[0122]	D 聚乙二醇单十二醚-7	0.06
	E 香精(香料)	0.10
	F 氢氧化钠20%	q.s.
[0123]	表6	