



(12) 发明专利申请



(10) 申请公布号 CN 116322729 A

(43) 申请公布日 2023. 06. 23

(21) 申请号 202180064198.8

(22) 申请日 2021.07.26

(30) 优先权数据

FR2007834 2020.07.24 FR

(85) PCT国际申请进入国家阶段日

2023.03.20

(86) PCT国际申请的申请数据

PCT/FR2021/051394 2021.07.26

(87) PCT国际申请的公布数据

W02022/018392 FR 2022.01.27

(71) 申请人 科学发展实验室

地址 法国巴黎

(72) 发明人 S·勒克莱尔-比安费

S·布雷迪夫

(74) 专利代理机构 北京戈程知识产权代理有限公司 11314

专利代理师 程伟 刘彬娜

(51) Int.Cl.

A61K 36/185 (2006.01)

A61K 31/713 (2006.01)

A61P 17/00 (2006.01)

A61K 133/00 (2006.01)

权利要求书1页 说明书23页 附图4页

(54) 发明名称

富含多糖的肋果木棉花提取物

(57) 摘要

本发明涉及一种来自于肋果木棉的花,优选来自于肋果木棉的花萼的提取物,一种制备其的方法,和通过所述方法获得的提取物。本发明还涉及一种包含所述提取物的组合物,所述组合物有利地为美容、药物或皮肤病学组合物。本发明还涉及所述组合物或所述提取物,其用于预防或治疗皮肤、粘膜或毛发和指甲的疾病或病理状况,以及与皮肤、粘膜、毛发、指甲和相关皮肤附属物的微生物群失衡相关的失衡或疾病。最后,本发明涉及一种用于皮肤、毛发和指甲或粘膜以改善其状况或外观的美容护理方法,所述方法包括施用所述组合物或所述提取物。

1. 一种来自于肋果木棉 *Bombax costatum* 的花, 优选来自于肋果木棉的花萼的富含多糖的提取物, 其包含相对于干燥提取物的总重量至少15%的多糖, 所述多糖的表观分子量为1500至6000千道尔顿, 有利地3000至6000千道尔顿。

2. 根据权利要求1所述的提取物, 其包含相对于干燥提取物的总重量以重量计至少30%的多糖, 有利地相对于干燥提取物的总重量以重量计至少50%的多糖。

3. 根据权利要求1至2中任一项所述的提取物, 其中所述多糖包含选自半乳糖、鼠李糖、半乳糖醛酸、葡糖醛酸及其混合物的单糖和衍生物, 有利地多糖包含半乳糖、鼠李糖、半乳糖醛酸和葡糖醛酸的混合物。

4. 根据权利要求1至3中任一项所述的提取物, 其中所述多糖包含10至16%半乳糖, 10至17%鼠李糖, 10至17%半乳糖醛酸和3至7%葡糖醛酸。

5. 根据权利要求1至4中任一项所述的提取物, 其特征在于通过在水中固/液提取肋果木棉的花, 特别是花萼来获得所述提取物。

6. 一种用于制备根据权利要求1至4中任一项所述的来自于肋果木棉的花, 优选来自于肋果木棉的花萼的富含多糖的提取物的方法, 其包括至少一个在水中的固/液提取步骤。

7. 根据权利要求6所述的方法, 其特征在于其包括以下连续步骤:

- a) 粉碎肋果木棉的花, 特别是花萼;
- b) 在水中提取粉碎的花, 特别是花萼;
- c) 通过倾析和/或离心和/或沉淀和/或连续过滤分离固相和液相;
- d) 任选地, 使用合适的佐剂漂白血相的步骤;
- e) 任选地, 将步骤c) 或d) 中获得的提取物干燥; 和
- f) 任选地, 使在步骤c)、d) 或e) 中获得的提取物在物理和微生物学上稳定。

8. 一种组合物, 其包含根据权利要求1至5中任一项所述的来自于肋果木棉的花, 优选来自于肋果木棉的花萼的富含多糖的提取物或可以根据权利要求6和7所述的方法获得的提取物作为活性成分, 和有利地合适的赋形剂。

9. 根据权利要求1至5中任一项所述的提取物或根据权利要求8所述的组合物, 其用于预防和/或治疗:

- 与皮肤和/或粘膜和/或皮肤附属物的微生物群失衡相关的失衡和/或疾病, 有利地选自特应性皮炎、湿疹、腋臭的发生、皮肤屏障减弱、痤疮、银屑病、化脓性汗腺炎、毛囊炎、乳痂、头皮屑、瘙痒尤其是头皮瘙痒、刺激、念珠菌病和细菌性阴道病; 和/或

- 皮肤和/或粘膜和/或皮肤附属物的疾病或病理状况, 特别是炎症反应, 氧化反应, 与污染相关或无关的自由基攻击和/或暴露于UV或IR相关的疾病, 光敏性皮肤, 与微生物攻击相关的疾病或病理状况, 屏障或体内平衡障碍, 老化, 特别是时间和/或光老化, 与皮肤和/或粘膜和/或皮肤附属物的机械和/或热侵袭相关的疾病或病理状况。

10. 一种用于皮肤和/或皮肤附属物和/或粘膜以在健康的受试者中改善其状况和/或外观, 有利地预防和/或治疗皮肤屏障的改变, 皮肤脱水, 皮肤发红, 老化或光老化的皮肤, 皮肤老化, 特别是光老化, 与皮肤的机械或热侵袭相关的疾病和与化学或大气污染相关的自由基攻击相关的疾病的美容护理方法, 所述方法包括施用根据权利要求1至5中任一项所述的提取物或根据权利要求8所述的组合物。

富含多糖的肋果木棉花提取物

技术领域

[0001] 本发明涉及一种肋果木棉(*Bombax costatum*)花提取物,所述提取物富含多糖。本发明还涉及一种包含这种提取物的美容、药物或皮肤病学组合物。本发明还涉及一种用于提取富含多糖的肋果木棉花提取物的方法,以及通过所述方法可以获得的提取物。本发明还涉及该组合物或该提取物在预防或治疗皮肤、粘膜或皮肤附属物的疾病或病理状况以及预防或治疗血管疾病中的用途。最后,本发明涉及一种用于皮肤、皮肤附属物或粘膜的美容护理方法,以改善其状况或外观,所述方法包括施用该组合物或该提取物。

背景技术

[0002] 肋果木棉

[0003] 肋果木棉属于木棉科(*famille de bombacaceae*) (APG:锦葵科(*Malvaceae*))。肋果木棉也被称为*Bombax andrieuxii*或*Bombax houardii*。肋果木棉更通常被称为红花木棉树、奶酪树、红木棉树、假木棉树、森林木棉树、Voaka(莫雷语)或Boumbou(朱拉语)。

[0004] 木棉属(*Bombax*)是一个泛热带属,包含8个种:2个在非洲,5个在亚洲,1个在大洋洲,远至所罗门群岛。在过去,木棉属的划界范围要广得多。肋果木棉有时被认为与*Bombax buonopozense*同种。

[0005] 肋果木棉的用途

[0006] 通常,在非洲,肋果木棉是一种相当常见的食用树:叶子干燥并像猴面包树叶子一样被食用;花,尤其是花萼,也被食用。

[0007] 在布基纳法索,树皮被用来染红牙齿。花通常是为了肉质的花萼而收获的,花萼被煮熟后作为蔬菜食用。叶子也作为蔬菜食用。未成熟的果实,有时还有花作为酱汁中的增稠剂而添加。幼小的未成熟果实也用于制作饮料。种子油是可食用的。花作为蜜花受到高度重视。

[0008] 树的多个部分在传统医学中用于治疗不同疾病。磨成粉末的根的浸渍物在酱汁中食用,或用作治疗癫痫的浴液。树皮制剂被应用于伤口以促进愈合。

[0009] 在塞内加尔和塞拉利昂,利尿性质归因于茎和根皮。

[0010] 树皮还被用于制备治疗滴虫病、阿米巴病和其他形式的痢疾的药物。在茎皮提取物中沐浴用于治疗精神失常。磨成粉末的茎皮用于药物组合物中,用作治疗头痛的熏蒸剂。为了治疗头痛或牙痛,可以将树皮敷布放在头部。

[0011] 叶与其他药用植物一起用于治疗白带和腹泻。粉碎的叶的提取物用作饮品来解决分娩期间的问题。在粉碎的叶的提取物中反复沐浴以治疗抽搐。服用或涂抹干燥叶的茶以治疗麻疹。在严重肿胀的情况下,服用叶、茎或根皮的煎剂作为饮品。饮用叶和嫩枝的煎剂以治疗黄疸。也给儿童饮用叶煎剂以治疗佝偻病。

[0012] 植物的不同部分用于促进泌乳和作为抗疲劳的补品。用混合有乳木果油的树叶擦拭皮肤以治疗麻风病。

[0013] 在马里,服用树皮、叶子和其他植物的部分的煎剂来治疗月经失调。叶子具有润肤

作用,叶子煎剂的温水浴可以用于发烧患者,尤其是儿童。叶子也用于治疗钩虫,花用于治疗绦虫。

[0014] 所有这些数据均来自于水域和森林上校Lassina SANOU博士撰写的民族植物学报告。他在位于瓦加杜古的布基纳法索国家树种中心(CNRS)环境与可持续发展部工作(2014年12月)。

[0015] 多糖

[0016] 多苷或多糖或聚糖被任意定义为由大量糖(d'oses)或糖(sucres)缩合产生的高分子量聚合物。它们参与植物生命乃至生存的不同方面。例如,它们负责高等植物细胞壁的刚性(纤维素、半纤维素、木质素……),它们是能量储存的形式(淀粉),由于其亲水性可以保护组织对抗脱水……

[0017] 我们分为:

[0018] -均质多糖(同一种糖的缩合);和

[0019] -异质多糖(己糖、戊糖、糖醚……),

[0020] 这两个类别可以是直链的或分支的。

[0021] 微生物群(MICROBIOTE)和微生物组(MICROBIOME)

[0022] 皮肤微生物群是存在于皮肤上和皮肤中的所有微生物(细菌、病毒、真菌……)。微生物群甚至存在于真皮和脂肪组织以及外分泌腺中(Nakatsuji等人2013)。微生物群不应与微生物组混淆,所述微生物组为基因的组(细菌的基因组)。

[0023] 菌丛主要有两种类型:

[0024] -常驻菌丛,其由共生菌组成,依靠其宿主生存但不会造成损害;和

[0025] -暂居菌丛,其由腐生菌(无害)和机会性病原体组成。

[0026] 在皮肤中,存在10¹²个细菌细胞(10⁶/cm²)对应3.10¹⁰个人体细胞(比例33:1对比胃肠系统:比例25:1);500种不同的菌;1种常驻或暂居菌丛;和4个主要的类群(Phyla)。

[0027] 存在许多皮肤/微生物群相互作用:

[0028] -共生现象:皮肤代表着一个环境生态位,是某些细菌的营养库。

[0029] 细菌可以刺激免疫防御;响应的皮肤可以形成一个名副其实的抗微生物屏障,该屏障抑制病原体的生长并刺激抗微生物分子的产生,这有助于保持良好的皮肤健康状态。但根据具体情况,相同的细菌可以是共生的,也可以是致病的。共生体导致生理性炎症、屏障保护、皮肤的监视/耐受性(PAM)及其先天免疫、毒力缺失和TLR(Toll样受体)隔离。共生体生活在生物膜中。它有时因各种内在和/或环境原因而发生,这些共生体失去控制,然后变成病原体。微生物群的毒力因子增加,以及炎症现象和免疫系统的激活。共生细菌有时会被根除。

[0030] 在所谓的正常皮肤状况下,宿主免疫力维持微生物群的平衡。免疫系统缺陷导致生态失调和特定的皮肤病理状况:特应性皮炎、痤疮、银屑病。观察到痤疮期间痤疮丙酸杆菌(*P.acnes*)、特应性皮炎期间金黄色葡萄球菌(*Staphylococcus aureus*)、银屑病期间厚壁菌门(Firmicutes)(以及放线菌减少)、脂溢性皮炎期间糠秕马拉色菌(*Malassezia furfur*)对皮肤的定植的增加。

发明内容

[0031] 申请人已经发现, 肋果木棉花的提取物, 优选肋果木棉花萼的提取物, 具有以前从未描述过的美容和皮肤病学性质。

[0032] 本发明涉及一种来自于肋果木棉花, 优选来自于肋果木棉花萼的富含多糖的提取物。

[0033] 在植物学中, 花是植物的一部分, 当完整时从外到内包括:

[0034] -花萼, 由所有萼片组成;

[0035] -花冠, 由所有花瓣组成;

[0036] -雄蕊 (l' androcée), 即产生花粉的所有雄蕊 (雄性部分); 和

[0037] -雌蕊群 (gynécée) 或雌蕊 (pistil), 由所有心皮 (雌性部分) 形成。

[0038] 在本发明的上下文中, 术语“花”至少包括花冠和花萼。花也可以是完整的, 也就是说包括花萼、花冠、雄蕊和雌蕊群或雌蕊。

[0039] 根据本发明的提取物优选为肋果木棉花萼提取物。

[0040] “富含多糖的提取物”是指主要或基本上包含多糖的提取物, 也就是说大部分化合物为多糖。

[0041] 因此, 根据本发明的提取物有利地包含相对于总干燥提取物重量以重量计至少 15%, 更有利地至少 20%, 优选至少 30%, 更有利地至少 50% 的多糖。因此, 根据本发明的提取物有利地包含相对于干燥提取物的总重量以重量计 15% 至 65%, 更有利地 20% 至 65%, 优选 30% 至 65%, 更有利地 50% 至 65% 的多糖。百分比表示为相对于所述干燥提取物的总重量 (在加入任何干燥介质之前), 根据硫酸酚法 (Dubois 法) 或根据蒽酮法-总糖分光比色法进行测定。

[0042] 根据本发明, 存在于提取物中的多糖的表观分子量为 1500kDa 至 6000kDa, 有利地 3000kDa 至 6000kDa (通过气相色谱法测定)。

[0043] 有利地, 根据本发明的提取物的多糖包含选自半乳糖、鼠李糖、半乳糖醛酸、葡萄糖醛酸及其混合物的单糖和衍生物。在本发明的上下文中, 半乳糖是指 D-半乳糖和 L-半乳糖。类似地, 术语鼠李糖是指 D-鼠李糖和 L-鼠李糖。

[0044] 有利地, 根据本发明的提取物的多糖包含半乳糖、鼠李糖、半乳糖醛酸和葡萄糖醛酸的混合物。

[0045] 有利地, 根据本发明的提取物的多糖包含 (相对于存在的所有糖 (单糖) 的总重量以重量计的 %):

[0046] -10% 至 16% 半乳糖;

[0047] -10% 至 17% 鼠李糖;

[0048] -10% 至 17% 半乳糖醛酸; 和

[0049] -3% 至 7% 葡萄糖醛酸。

[0050] 根据本发明的提取物有利地基本上不含多酚。典型地, 根据本发明的提取物包含相对于干燥提取物的总重量以重量计小于 1%, 有利地小于 0.5% 的多酚。

[0051] 在本发明的上下文中, 有利地通过在水中固/液提取肋果木棉的花, 优选花萼来获得上述富含多糖的提取物。然后, 可以将多糖纯化和/或再溶解在合适的溶剂中以保证它们的物理和微生物稳定性, 或通过本领域技术人员已知的方法干燥。

[0052] 本发明还涉及一种用于制备来自于肋果木棉的花,优选来自于肋果木棉的花萼的富含多糖的提取物的方法,包括至少一个在水中和在本领域技术人员已知的最佳pH、时间和温度条件下的固/液提取步骤。

[0053] 有利地,根据本发明,用于制备来自于肋果木棉的花,优选来自于肋果木棉的花萼的富含多糖的提取物的方法包括以下连续步骤:

[0054] a) 粉碎肋果木棉的花,特别是花萼;

[0055] b) 在水中在最佳时间、pH和温度条件下提取粉碎的花,特别是花萼;

[0056] c) 通过倾析和/或离心和/或沉淀和/或连续过滤分离固相和液相;和

[0057] d) 任选地,使用合适的佐剂漂白血相的步骤;

[0058] e) 任选地,将步骤c)或d)中获得的提取物干燥;和

[0059] f) 在适合于保持提取物的物理化学性质和控制微生物生长的溶剂中使液体介质中的多糖稳定。

[0060] 有利地,根据本发明,用于制备来自于肋果木棉的花,优选来自于肋果木棉的花萼的富含多糖的提取物的方法包括以下连续步骤:

[0061] a) 粉碎肋果木棉的花,特别是花萼;

[0062] b) 在水中提取粉碎的花,特别是花萼;

[0063] c) 通过倾析和/或离心和/或沉淀和/或连续过滤分离固相和液相;

[0064] d) 任选地,使用合适的佐剂漂白血相的步骤;

[0065] e) 任选地,将步骤c)或d)中获得的提取物干燥;和

[0066] f) 任选地,使在步骤c)、d)或e)中获得的提取物在物理和微生物学上稳定。

[0067] 粉碎植物的步骤a)可以通过本领域技术人员已知的方法进行,特别是使用刀磨机或锤磨机。

[0068] 优选在水的存在下进行提取步骤b)。引入水中的粉碎植物的百分比有利地为2%至10%w/w,优选2%至5%w/w,更有利地2%w/w。优选在20℃至100℃,特别地50℃至90℃,更特别地70℃至90℃,典型地90℃的温度进行该固/液提取。

[0069] 提取时间有利地为30分钟至4小时,特别地1小时至3小时,有利地约1小时。

[0070] 分离固相和液相的步骤c)通过本领域技术人员已知的方法进行,特别是通过倾析、离心和/或连续过滤和/或通过使用合适的溶剂(优选乙醇或盐溶液)沉淀多糖来纯化。特别地,在步骤c)期间,有利地将所得的液相纯化和浓缩,例如通过超滤和/或灭菌过滤。进行步骤c)直到获得液相,所述液相具有理想的透明度和总菌小于或等于100UFC/g的微生物清洁度。

[0071] 当进行漂白血相的步骤d)时,其通过本领域技术人员已知的方法进行,特别是通过加入佐剂,如技术人员已知的合适的活性炭或漂白土进行。

[0072] 有利地,根据本发明,用水的提取获得提取物,所述提取物中多酚含量非常低或基本上不含多酚(多酚通常为痕量)。根据本发明的提取物,优选通过在水中的固/液提取获得的提取物通常具有相对于干燥提取物的总重量以重量计小于1%,优选小于0.5%的含量。

[0073] 有利地,根据本发明,根据本发明的方法包括至少一个特定的过滤和/或纯化(步骤c)和/或在活性炭上漂白(步骤d)的步骤,其能够在必要时去除剩余的多酚。特别地,所述方法包括至少一个纯化步骤,如超滤,其能够将“小”分子如多酚与“大”分子(尺寸大于一百

万道尔顿)如多糖分离。此外,有利地,在漂白步骤d)期间用活性炭处理也有助于降低提取物中多酚的水平,以有利地使多酚在根据本发明的方法结束时仅以痕量存在。

[0074] 有利地,可以通过本领域技术人员已知的方法通过干燥步骤e)使根据本发明的富含多糖的提取物稳定。

[0075] 干燥步骤e)例如可以在麦芽糖糊精或阿拉伯胶纤维类型的载体(Fibregum® 公司CNI)的存在下进行。相对于以液体形式的提取物获得的干物质的百分比,载体含量的比例通常为0%至80%载体。

[0076] 将提取物优选通过冷冻干燥或雾化干燥,以获得最终粉末。

[0077] 有利地通过部分去除水并用溶剂替代来进行使在步骤c)、d)或e)中获得的产品在物理和微生物学上稳定的步骤f),所述溶剂有利地选自植物甘油、二醇及其混合物,特别地选自植物甘油、植物来源的二醇及其混合物,更特别地选自丙二醇(propanediol)或丙二醇(propylène glycol)特别是1,3-丙二醇、和植物甘油。有利地,在液相中通过蒸发将水的量减少至相对于提取物的总质量以重量计小于50%,优选小于20%,并用抑菌或杀菌溶剂替代来进行步骤f),所述抑菌或杀菌溶剂选自植物甘油、二醇及其混合物,特别地选自植物甘油、植物来源的二醇及其混合物,更特别地选自丙二醇(propanediol)或丙二醇(propylène glycol)特别是1,3-丙二醇、和植物甘油。然后,水/溶剂比例将有利地为50/50至0/100(w/w),优选30/70(w/w)至10/90(w/w),有利地20/80(w/w)。

[0078] 优选地,例如,可以根据以下方法获得根据本发明的富含多糖的提取物:

[0079] a')将粉碎的花以2%(w/w)溶解在水中;

[0080] b')在90℃搅拌提取1小时;

[0081] c')通过连续过滤步骤纯化;

[0082] d')无菌过滤;和

[0083] e')通过蒸发水和加入甘油获得50/50至0/100,有利地30/70至10/90的水/甘油比例来使所得的提取物稳定。

[0084] 在说明书的其余部分,“根据本发明的提取物”将被认为是指如上定义的提取物本身,或能够通过如上所述的根据本发明的方法获得的提取物。可以通过上述根据本发明的方法获得的提取物具有与如上所定义的根据本发明的提取物相同的组成。

[0085] 本发明还涉及一种组合物,其包含根据本发明的来自于肋果木棉的花,优选来自于肋果木棉的花萼的富含多糖的提取物和水/溶剂混合物,所述水/溶剂混合物的水/溶剂比例(v/v)为50/50至0/100,有利地30/70至10/90,更有利地20/80,所述溶剂选自乙二醇、植物甘油及其混合物,优选选自植物来源的乙二醇和植物甘油,优选选自1,3-丙二醇和植物甘油。

[0086] 有利地,组合物包含相对于组合物的总重量以重量计0.001至30%,有利地0.001%至10%的根据本发明的提取物(以相对于组合物的总重量干燥提取物的重量表示),和相对于组合物的总重量以重量计50%至99.999%,有利地70%至99.999%的水/溶剂混合物,水/溶剂比例为50/50至0/100,有利地30/70至10/90,更有利地20/80,所述溶剂选自乙二醇、植物甘油及其混合物,优选选自植物来源的乙二醇和植物甘油,优选选自1,3-丙二醇和植物甘油。根据本发明的该方面,溶剂的量具有有效的对根据本发明的组合物,特别是根据本发明的提取物的物理和微生物稳定作用。

[0087] 本发明还涉及一种组合物,其包含根据本发明的来自于肋果木棉的花,优选来自于肋果木棉的花萼的富含多糖的提取物作为活性成分,和适当时合适的赋形剂。根据本发明的提取物如以上关于提取物本身的段落和关于能够通过根据本发明的方法获得的提取物的段落中所定义。

[0088] 所述组合物有利地为美容、药物或皮肤病学组合物。优选将所述组合物配制为通过外部局部途径施用。

[0089] 有利地,根据本发明的组合物包含相对于组合物的总重量以重量计0.001至10%,通常0.01至5%的根据本发明的提取物,提取物的重量以干燥提取物表示。

[0090] 根据本发明的组合物还可以包含一种或多种其他活性成分。

[0091] 根据本发明的组合物可以配制为适合局部施用的各种制剂的形式,特别地包括霜剂、乳剂、乳液、软膏、洗剂、油剂、水性或水醇或二醇溶液、粉末剂、贴剂、喷雾、洗发剂、漆剂或任何其他外用产品。

[0092] 根据其性质(美容、药物或皮肤病学),根据本发明的组合物还可以包含至少一种美容学、药学或皮肤病学上可接受的赋形剂。特别地,根据本发明的组合物还可以包含至少一种本领域技术人员已知的美容学、药学或皮肤病学佐剂,所述佐剂特别地选自表面活性剂、增稠剂、防腐剂、香料、染料、化学或矿物过滤剂、保湿剂和温泉水。本领域技术人员知道如何利用其常识来调整根据本发明的组合物的制剂。

[0093] 根据本发明的组合物的最佳剂量和盖仑形式可以根据在建立适合于患者或动物的药理学、皮肤病学或美容学治疗时通常考虑的标准来确定,例如患者或动物的年龄或体重、总体病症的严重程度、对治疗的耐受性、观察到的副作用、皮肤类型。

[0094] 本发明还涉及根据本发明的提取物或根据本发明的组合物,其用于预防和/或治疗未成熟、正常或成熟/老化的皮肤和/或粘膜(牙龈、牙周组织、生殖器粘膜)和/或皮肤附属物(毛发和指甲)的疾病或病理状况,特别是炎症反应,氧化反应,与污染相关或无关的自由基攻击相关的疾病,与微生物攻击相关的疾病或病理状况,屏障或体内平衡失调,老化,特别是时间和/或光老化,与皮肤和/或粘膜和/或皮肤附属物的机械和/或热侵袭相关的疾病或病理状况;更有利地未成熟、正常或成熟/老化的皮肤、皮肤附属物和/或粘膜(牙龈、牙周组织、生殖器粘膜)的炎症或刺激性反应或病理状况或屏障障碍或体内平衡障碍的用途。

[0095] 本发明还涉及根据本发明的提取物或根据本发明的组合物,其用于预防和/或治疗与未成熟、正常或成熟/老化的皮肤和/或粘膜(牙龈、牙周组织、生殖器粘膜)和/或皮肤附属物和/或其附件的微生物群失衡相关的失衡和/或疾病的用途。

[0096] 事实上,根据本发明的提取物对未成熟、正常或成熟/老化的皮肤和/或粘膜(牙龈、牙周组织、生殖器粘膜)和/或皮肤附属物和/或其附件具有针对机械、微生物、热和自由基侵袭的保护活性。根据本发明的提取物用于保护微生物群,因此能够对抗微生物群失衡。此外,根据本发明的提取物能够刺激皮肤的免疫防御和皮肤抗氧化系统。

[0097] 本发明还涉及根据本发明的提取物或根据本发明的组合物在制备用于预防和/或治疗未成熟、正常或成熟/老化的皮肤和/或粘膜(牙龈、牙周组织、生殖器粘膜)和/或皮肤附属物(毛发和指甲)的疾病或病理状况,特别是炎症反应,氧化反应,与污染相关或无关的自由基攻击相关的疾病,与微生物攻击相关的疾病或病理状况,屏障或体内平衡失调,老化,特别是时间和/或光老化,与皮肤和/或粘膜和/或皮肤附属物的机械和/或热侵袭相关

的疾病或病理状况;更有利地未成熟、正常或成熟/老化的皮肤、皮肤附属物和/或粘膜(牙龈、牙周组织、生殖器粘膜)的炎症、刺激性反应或病理状况或屏障障碍或体内平衡障碍的美容、药物或皮肤病学组合物中的用途。

[0098] 本发明还涉及根据本发明的提取物或根据本发明的组合物在制备用于预防和/或治疗与未成熟、正常或成熟/老化的皮肤和/或粘膜(牙龈、牙周组织、生殖器粘膜)和/或皮肤附属物和/或其附属物的微生物群失衡相关的失衡和/或疾病的药物、美容或皮肤病学组合物中的用途。

[0099] 本发明进一步涉及一种用于预防和/或治疗未成熟、正常或成熟/老化的皮肤和/或粘膜(牙龈、牙周组织、生殖器粘膜)和/或皮肤附属物(毛发和指甲)的疾病或病理状况,特别是炎症反应,氧化反应,与污染相关或无关的自由基攻击相关的疾病,与微生物攻击相关的疾病或病理状况,屏障或体内平衡失调,老化,特别是时间和/或光老化,与皮肤和/或粘膜和/或皮肤附属物的机械和/或热侵袭相关的疾病或病理状况;更有利地未成熟、正常或成熟/老化的皮肤、皮肤附属物(毛发和指甲)和/或粘膜(牙龈、牙周组织、生殖器粘膜)的炎症或刺激性反应或病理状况或屏障障碍或体内平衡障碍的方法,包括向有需要的受试者施用,特别是局部施用有效量的根据本发明的提取物或根据本发明的组合物。

[0100] 本发明还涉及一种用于预防和/或治疗与未成熟、正常或成熟/老化的皮肤和/或粘膜(牙龈、牙周组织、生殖器粘膜)和/或皮肤附属物和/或其附件的微生物群失衡相关的失衡和/或疾病的方法,包括向有需要的受试者施用,特别是局部施用有效量的根据本发明的提取物或根据本发明的组合物。

[0101] 特别地,根据本发明的组合物或提取物旨在预防和/或治疗未成熟、正常或成熟/老化的皮肤、皮肤附属物(毛发和指甲)和/或粘膜(牙龈、牙周组织、生殖器粘膜)的炎症或刺激性反应或病理状况或屏障障碍或体内平衡障碍。

[0102] 有利地,皮肤的炎症、刺激性反应、疾病或病理状况或屏障障碍或体内平衡障碍为:痤疮,红斑痤疮或红斑狼疮,血管疾病,特别是发红和红斑痤疮,尿布性皮炎,特应性皮炎,湿疹,接触性皮炎,刺激性皮炎,过敏性皮炎,脂溢性皮炎(乳痂),敏感性皮肤,反应性皮肤,干燥皮肤(干燥症),脱水皮肤,皮肤发红,皮肤红斑,老化或光老化皮肤,光敏性皮肤,色素性皮肤(黄褐斑、炎症后色素沉着……),妊娠纹皮肤,晒伤,化学、物理(例如孕妇的紧张压力)、细菌、真菌剂的刺激,皮肤老化,特别是与化学或大气污染和/或与暴露于UV或IR有关的自由基攻击有关的光老化和疾病。

[0103] 有利地,粘膜的炎症、刺激性反应、疾病或病理状况或屏障障碍或体内平衡障碍为牙龈炎(新生儿牙龈敏感,卫生问题,由于吸烟等)和男性或女性生殖器区域外部或内部的刺激。

[0104] 有利地,皮肤附属物的炎症、刺激性反应、疾病或病理状况或屏障障碍或体内平衡障碍为指甲易碎、指甲脆弱、毛发脆弱、毛发易碎、毛发干燥。

[0105] 有利地,与皮肤微生物群失衡相关的反应、疾病或病理状况为特应性皮炎、湿疹、难闻的腋臭的出现、皮肤屏障减弱、痤疮、银屑病和化脓性汗腺炎。

[0106] 有利地,与皮肤附属物的微生物群失衡相关的反应、疾病或病理状况为毛囊炎、乳痂、头皮屑、头皮瘙痒。

[0107] 有利地,与粘膜的微生物群失衡相关的反应、疾病或病理状况为瘙痒、刺激、念珠

菌病和细菌性阴道病。

[0108] 本发明还涉及根据本发明的提取物或根据本发明的组合物用于有利地在健康受试者中治疗和/或预防皮肤脱水,皮肤发红,老化或光老化的皮肤,光敏性皮肤,皮肤老化,特别是光老化,与化学或大气污染和/或与暴露于UV或IR有关的自由基攻击有关的疾病的美容用途。

[0109] 本发明还涉及根据本发明的提取物或根据本发明的组合物用于有利地在健康受试者中护理皮肤附属物,特别是治疗和/或预防指甲脆弱、指甲易碎、毛发脆弱、毛发易碎和毛发干燥的美容用途。

[0110] 本发明还涉及一种用于皮肤和/或皮肤附属物和/或粘膜以有利地在健康受试者中改善状况和/或其外观的美容护理方法,包括施用根据本发明的组合物或提取物。

[0111] 特别地,本发明涉及一种用于皮肤和/或皮肤附属物的美容护理以有利地在健康受试者中防止屏障的改变及其脱水的方法,包括将根据本发明的组合物或提取物应用于皮肤和/或毛发和指甲。

[0112] 特别地,本发明涉及一种用于皮肤和/或皮肤附属物以有利地在健康受试者中预防和/或治疗皮肤屏障的改变,皮肤脱水,皮肤发红,老化或光老化的皮肤,光敏性皮肤,皮肤老化,特别是光老化,与皮肤的机械或热侵袭相关的疾病和与化学或大气污染相关的自由基攻击相关的疾病,和/或与暴露于UV或IR相关的疾病的美容护理方法,包括施用根据本发明的组合物或一种提取物。

[0113] 以下实施例以非限制性方式阐明本发明。

附图说明

[0114] 图1表示痤疮丙酸杆菌和糠秕马拉色菌的生长曲线(参见实施例2-V-b.)。

[0115] 图2表示BCP活性成分对共培养中不同菌株的细菌生长的作用随时间的变化(参见实施例2-V-b.)。

[0116] 图3表示苏木精/伊红染色后RHE的形态的分析(参见实施例2-VI-b.)。

[0117] 图4a和图4b表示乳杆菌属菌株的生长曲线(参见实施例2-VII-b.)。

[0118] 图5表示在存在BCP活性成分的情况下,通过皮肤微生物群的不同菌株形成的生物膜的分析(参见实施例2-IX)。

具体实施方式

[0119] 实施例

[0120] 实施例1:来自于肋果木棉花萼的多糖溶液的制备

[0121] -将肋果木棉花萼磨碎,然后以2%w/w花萼/水的比例在搅拌下混悬于水中;

[0122] -在90℃搅拌提取1小时;

[0123] -离心所得的溶液以分离植物的固体残余物;

[0124] -通过加入活性炭漂白并过滤;

[0125] -通过超滤15kDa浓缩多糖;

[0126] -加入甘油并在真空下蒸发水,以获得80%w/w的最终甘油浓度。

[0127] 所得的多糖溶液的分析特性

- [0128] -橙色粘稠溶液
- [0129] -干物质 (m/m) :1.24%
- [0130] -pH:6.3
- [0131] -灰分:8.9%
- [0132] -总糖(蒽酮法测定):35%
- [0133] -溶液粘度(TA,mobile1,2rpm):2592Cps
- [0134] 所得的多糖的分析特性(干物质):
- [0135] -平均分子量(气相色谱法测定):3711kDa
- [0136] -成分(气相色谱法测定):15%半乳糖;17%鼠李糖;17%半乳糖醛酸;5%葡萄糖醛酸

[0137] 实施例2:生物活性

[0138] 通过真皮成纤维细胞和黑化重建表皮的基因表达调节试验研究提取物的潜在生物活性。因此,通过PCR阵列在成纤维细胞和黑化重建表皮中研究了96个对皮肤和美容生理学有重要意义的基因的表达。

[0139] a.材料和方法:

[0140] 以0.05%干物质将根据实施例1的肋果木棉多糖提取物(称为BCP提取物)加入到正常人真皮成纤维细胞(NHDF)或重建黑化人表皮的培养介质中。

[0141] 在孵育6小时或24小时后,通过定量RT-PCR(TaqMan微流体卡)评价所选标记物的表达。所研究标记物与对照相比的表达变化以相对数量表示(QR,QR>1:增加,QR<1:减少)。

[0142] b.结果:

[0143] 显示BCP提取物对重建表皮中基因表达的作用的最显著结果显示在下表1中。

[0144] 表1:黑化重建人表皮中所关注的基因表达的变化

[0145] 与对照相比的相对数量(QR)=1

[0146] 在Student检验后确定p值

[0147]	BCP 0.05%ms	QR	p 值
[0148]	RAB11A Ras 相关蛋白 Rab-11A	1.7372	0.0073
	SMPD1 鞘磷脂磷酸二酯酶(酸性鞘磷脂酶)	1.4885	0.0012
	KRT19 角蛋白, I 型细胞骨架 19 (角蛋白 19)	1.3016	0.0321
	SDC1 多配体蛋白聚糖-1	1.279	0.0401
	MITF 小眼相关转录因子	0.7409	0.0298

[0149] 这些结果表明,BCP提取物通过改变一些标记物的基因表达,具有对以下活性的特别兴趣:

[0150] 表皮屏障功能中脂质的合成与重塑

[0151] BCP提取物增加涉及角质层内脂质的合成或重塑的2种酶的基因表达：GTP酶 (Ras 相关蛋白Rab-11A) 的RAB11A基因和鞘磷脂磷酸二酯酶的SMPD1基因。

[0152] 通过增加这两个基因的表达，BCP活性成分能够增强皮肤的屏障功能及其水合作用。

[0153] 调节角质形成细胞的细胞粘附、迁移、增殖和分化的机制：

[0154] BCP活性成分增加多配体蛋白聚糖-1 (SDC1) 的表达。

[0155] 干细胞保护：

[0156] 由KRT19基因编码的角蛋白19为一种上皮标记物，被认为是表皮干细胞的标记物。

[0157] 通过刺激KRT19的表达，BCP提取物对干细胞具有保护作用。

[0158] 黑色素生成的抑制：

[0159] BCP提取物导致MITF基因表达的减少。因此，通过降低MITF基因的表达，BCP提取物具有黑色素生成抑制活性。

[0160] 下表2显示BCP提取物对成纤维细胞基因表达的最重要结果。

[0161] 表2：正常人真皮成纤维细胞 (NHDF) 中所关注的基因表达的变化

[0162] 与对照相比的相对数量 (QR) = 1

[0163] 在Student检验后确定p值

[0164]	BCP 0.05%ms	QR	p 值
	SOD2 超氧化物歧化酶 2，线粒体	9.4811	0.0045
	MT1G 金属硫蛋白-1G	5.1496	0.0037
	FBN2 原纤蛋白-2	2.9182	0.026
	FOXO1 叉头盒蛋白 O1	2.0353	0.0118

[0165]

CSGALNACT1 硫酸软骨素 N-乙酰半乳糖氨基转移酶 1	2.0195	0.0055
MKI 67 抗原 Ki-67	1.9088	0.0062
DCN 核心蛋白聚糖 (PGS2)	1.9083	0.0332
CTGF 结缔组织生长因子	1.8602	0.0377
TXNRD1 硫氧还蛋白还原酶 1	1.664	0.0148
ELN 弹性蛋白 (原弹性蛋白)	1.6088	0.0226
LMNB1 核纤层蛋白-B1	1.5846	0.0068
FGF2 肝素结合生长因子 2 (成纤维细胞生长因子 2)	1.5844	0.0355
FBN1 原纤蛋白-1 (马凡氏综合征)	1.4919	0.0119
COL3A1 胶原蛋白 3 α 1 亚基 (COL3A1)	1.4364	0.0362
CAT 过氧化氢酶	1.2865	0.0387
ACTA2 肌动蛋白, 主动脉平滑肌	1.2722	0.0293
CHST15 碳水化合物磺基转移酶 15	1.2604	0.0194
FBLN5 腓骨蛋白-5	1.2554	0.0391
COL16A1 胶原蛋白 16 α 1 亚基 (COL16A1)	1.2117	0.0422
FTH1 铁蛋白重链	1.205	0.0242
PXN 桩蛋白	1.1758	0.0184
TLN 踝蛋白-1	1.1482	0.0275
SESN2 Sestrin-2	0.5513	0.0406
MMP1 基质金属蛋白酶 1 (间质胶原酶)	0.5478	0.0045
PTGS2 前列腺素 G/H 合酶 2	0.3023	0.0314

[0166] 这些结果显示了BCP提取物在以下方面的活性:

[0167] 针对氧化应激的保护:

[0168] BCP提取物诱导多种涉及抗氧化防御的酶的表达:超氧化物歧化酶,特别是由SOD1基因编码的超氧化物歧化酶1 (Cu/ZnSOD) 和由SOD2基因编码的超氧化物歧化酶2 (MnSOD)。

[0169] BCP活性成分还诱导金属硫蛋白1 (MT1G) 的2种亚型之一的表达。

[0170] BCP活性成分还诱导编码硫氧还蛋白还原酶的亚型1的TXNRD1基因。

[0171] 这些编码具有抗氧化和/或解毒活性的蛋白质的基因的联合诱导赋予了针对UV和来自例如城市污染的重金属的保护。

[0172] 细胞外基质和皮肤弹性的抗老化作用:

[0173] 存在于真皮中的成纤维细胞的主要功能是产生、降解并因此调节与其相互作用的细胞外基质(MEC)的组分。MEC是由胶原纤维、弹性蛋白纤维和结构糖蛋白组成的网络形成的复杂结构。

[0174] 在受BCP活性成分调节的MEC蛋白中,可以发现弹性蛋白(ELN),还可以发现分别由FBN1和FBN2基因编码的原纤蛋白-1和-2。除了诱导ELN和FBN1基因以外,BCP活性成分还诱导同样构成微纤维的FBN2。

[0175] 在作用于弹性纤维的同时,BCP活性成分还作用于胶原纤维,因为它增加了胶原蛋白3的 $\alpha 1$ 亚基(COL3A1)的表达。

[0176] BCP对弹性蛋白和胶原纤维成分以及MMP1和桩蛋白表达的联合作用朝着影响皮肤弹性的方向发展,这在抗老化方面特别令人关注。

[0177] 此外,已经证明皮肤老化与成纤维细胞增殖的减少有关。与年龄相关的增殖因子Ki-67的表达下降(Ma,C.等人,2011.Expression of metallothionein-I and II in skin ageing and its association with skin proliferation.Br.J Dermatol.,164(3),第479-482页)。BCP活性成分增加MKI67的表达,表明细胞增殖增加,从而增强其抗老化作用。

[0178] 核纤层蛋白:

[0179] 已证明,核纤层蛋白B1(LMNB1)在皮肤中的表达随着年龄的增长而降低。因此,核纤层蛋白B1被认为是皮肤细胞衰老的标志物。事实上,已经证明与年龄相关或与皮肤病理状况相关的细胞衰老伴随着核纤层蛋白B1在蛋白质和mRNA水平上的表达缺失(Dreesen,0.等人,2013.The contrasting roles of lamin B1 in cellular aging and human disease.Nucleus,4(4),第283-290页)。

[0180] 因此,真皮成纤维细胞内LMNB1表达的增加表明BCP活性成分具有减少可能与年龄或皮肤病理状况有关的细胞衰老的作用,另一方面证明有利于维持核心结构和完整性。

[0181] 自噬:

[0182] BCP提取物诱导SESN2的表达的降低。SESN2特别地涉及皮肤细胞的UV反应。这朝着mTORC1复合物活性增强的方向发展,这与细胞自噬活性的降低密切相关,因此与线粒体自噬活性的调节作用相关。

[0183] 皮肤愈合:

[0184] 在粘着斑位点内,整合素经由粘附蛋白与细胞内肌动蛋白丝结合。在这些细胞质粘附蛋白中,特别可能发现由BCP活性成分过表达的TLN1基因编码的踝蛋白-1。它构成了整合素和肌动蛋白细胞骨架之间的初始键。踝蛋白与整合素的结合调节它们对MEC的亲和力,而踝蛋白与肌动蛋白的结合构成与细胞收缩机制的第一联系。这2个事件对于细胞迁移特别重要。事实上,这涉及整合素与MEC的循环附着和分离,也涉及细胞内容物易位所需的力的产生(Atherton,P.等人,2015.Vinculin controls talin engagement with the actomyosin machinery Nat.Comm.,卷6,第10页)。

[0185] 踝蛋白-1基因和桩蛋白的表达的增加证明了对细胞迁移的有益作用,特别是在皮肤愈合过程中。

[0186] 抗炎环境中的PTGS2表达不足:

[0187] 前列腺素-内过氧化物合酶包括环氧合酶-2COX2或PTGS2,催化由花生四烯酸生物

合成前列腺素(PG),以经由细胞因子的分泌和皮肤血管舒张诱导炎症过程。

[0188] COX2表达的减少表明BCP活性成分能够减少可以由不同刺激物(如病原体、UV、电离辐射等)诱导的炎症现象。

[0189] I. 抗炎活性

[0190] 根据实施例1的肋果木棉多糖提取物的抗炎活性已由PMA应激诱导的炎症所证实。

[0191] a) 材料和方法

[0192] 将正常人角质形成细胞(KHN)在37℃用0.01%和/或0.05%干物质(MS)的根据实施例1的肋果木棉多糖提取物(称为BCP提取物)或10⁻⁷M的地塞米松或吲哚美辛(抗炎参比分子)处理24小时。然后,通过加入10μg/ml PMA(佛波醇十四酸酯乙酸酯(Phorbol Myristate Acetate),炎症诱导剂)将细胞在37℃处理16小时。

[0193] 在处理结束时,通过ELISA技术测量培养物上清液中分泌的IL1α(白细胞介素1α)、PGE2(前列腺素-E2)、IL1β(白细胞介素1β)、TNFα(肿瘤坏死因子α)、IL6(白细胞介素6)和IL8(白细胞介素8)的量。

[0194] 通过单向方差分析和随后的Tuckey检验评估结果的显著性。

[0195] b) 结果

[0196] 如表3至8中的结果所示,BCP提取物显著抑制炎症条件下角质形成细胞中炎症介质IL1α、IL1β、IL6、IL8、TNFα和PGE2的产生。

[0197] 这些结果显示了BCP提取物的抗炎活性。

[0198] 表3:PMA应激作用下KHN产生的IL1-α的剂量

[0199] \$\$p<0.01相对于对照;*p<0.05**p<0.01相对于PMA;ns不显著

[0200] 单向ANOVA和随后的Tukey检验

	IL1α (pg/ml)			
	平均	标准差	变化	显著性
[0201] 对照	33.869	2.340		
PMA 10 μg/ml	372.604	91.220	+1000%	\$\$
地塞米松 0.1 μM	230.583	29.293	-38%	ns
[0202] BCP 0.05% ms	116.557	25.046	-69%	*

[0203] 表4:PMA应激作用下KHN产生的IL1β的剂量

[0204] \$\$p<0.01相对于对照;*p<0.05相对于PMA;ns不显著

[0205] 单向ANOVA和随后的Tukey检验

	IL1β (pg/ml)			
	平均	标准差	变化	显著性
[0206] 对照	18.291	2.304		
PMA 10 μg/ml	50.392	6.609	+175%	\$\$
地塞米松 0.1 μM	34.410	6.003	-32%	ns
BCP 0.05% ms	24.459	4.956	-51%	*

[0207] 表5:PMA应激作用下KHN产生的IL6的剂量

[0208] $p < 0.05$ 相对于对照; $*p < 0.05$ $***p < 0.001$ 相对于PMA

[0209] 单向ANOVA和随后的Tukey检验

	IL6 (pg/ml)			
	平均	标准差	变化	显著性
[0210]	对照	5.225	0.849	
	PMA 10 $\mu\text{g/ml}$	6.958	0.721	+33%
	地塞米松 0.1 μM	2.090	0.300	-70%
	BCP 0.01% ms	5.379	0.318	-23%

[0211] 表6: PMA应激作用下KHN产生的IL8的剂量

[0212] $***p < 0.001$ 相对于对照; $*p < 0.05$ $***p < 0.001$ 相对于PMA; ns不显著单向ANOVA和随后的Tukey检验

	IL8 (pg/ml)			
	平均	标准差	变化	显著性
[0213]	对照	161.769	10.601	
	PMA 10 $\mu\text{g/ml}$	9952.388	1393.896	6052
	地塞米松 0.1 μM	4076.675	202.317	-59
	BCP 0.01% ms	6641.050	804.243	-33

[0214] 表7: PMA应激作用下KHN产生的TNF α 的剂量

[0215] $***p < 0.001$ 相对于对照; $*p < 0.05$ $***p < 0.001$ 相对于PMA

[0216] 单向ANOVA和随后的Tukey检验

	TNF α (pg/ml)			
	平均	标准差	变化	显著性
[0218]	对照	1.546	0.655	
	PMA 10 $\mu\text{g/ml}$	33.787	0.785	+2086%
	地塞米松 0.1 μM	16.216	1.633	-52%
	BCP 0.01% ms	12.991	0.600	-62%
	BCP 0.05% ms	21.546	0.936	-36%

[0219] 表8: PMA应激作用下KHN产生的PGE2的剂量

[0220] $***p < 0.001$ 相对于对照; $**p < 0.01$ $***p < 0.001$ 相对于PMA; ns不显著

[0221] 单向ANOVA和随后的Tukey检验

	PGE2 (pg/ml)			
	平均	标准差	变化	显著性
[0222] 对照	39.000	0.000		
PMA 10 $\mu\text{g/ml}$	625.506	109.911	+1504%	\$\$\$
吲哚美辛 0.1 μM	39.000	0.000	-94%	***
BCP 0.05% ms	219.335	108.511	-65%	**

[0223] II. 表皮愈合活性

[0224] 通过研究角质形成细胞迁移(皮肤再上皮化过程中的第一步)评价根据实施例1的肋果木棉多糖提取物(称为BCP提取物)对表皮愈合的潜在活性。

[0225] a) 材料和方法

[0226] 划痕试验:在融合的正常人角质形成细胞(KHN)单层垫上进行损伤,然后用0.01%和0.05%干物质的BCP提取物或用100ng/ml的EGF(表皮生长因子)处理。

[0227] 在处理开始时和孵育5小时后拍摄照片,以测量损伤内KHN的发展速度。通过图像分析在不同条件下评价覆盖百分比。

[0228] 通过学生t检验评估结果的显著性。

[0229] b) 结果

[0230] 如表9中的结果所证明,BCP提取物显著刺激角质形成细胞迁移,从而证实其激活皮肤愈合的潜力。

[0231] 表9:KHN的迁移* $p < 0.05$ ** $p < 0.01$ *** $p < 0.001$ 相对于对照;t检验

	%恢复	相比于对照的变化
对照	33.6 $\pm$ 3.1	0
EGF 100ng/ml	62.2 $\pm$ 11.1	+85% **
BCP 0.01%ms	55.4 $\pm$ 14.1	+65% *
BCP 0.05%ms	67.0 $\pm$ 8.6	+99% ***

[0233] III. 对先天抗微生物防御的活性

[0234] 评价根据实施例1的肋果木棉多糖提取物(称为BCP提取物)对表皮角质形成细胞中抗微生物肽(PAM)和TLR2的表达的作用。

[0235] a) 材料和方法

[0236] 用BCP提取物或100ng/ml的IL1 β (阳性参比)处理正常人表皮角质形成细胞持续24或48小时。

[0237] 在处理结束时,通过实时定量RT-PCR分析hBD2、hBD3和TLR2的基因表达。

[0238] 此外,通过ELISA测量TLR2和细胞内hBD2的量。

[0239] b) 结果

[0240] 如表10和11中的结果所证明,BCP提取物显著刺激防御素和TLR2的基因和蛋白质表达;因此证明了抗微生物活性和免疫防御的激活。

[0241] 表10:角质形成细胞中PAM和TLR2的基因表达

[0242] (QR:相对量)

[0243] * $p < 0.05$; ** $p < 0.01$; *** $p < 0.001$; ns相对于对照不显著

[0244] 单向ANOVA和随后的Dunnett检验

	hBD2		hBD3		TLR2	
	QR	变化	QR	变化	QR	变化
[0245] 对照	1.12		1.09		1.08	
IL1 β 100 ng/ml	3480.89	x3000 ***	9.04	+730% ***	3.26	+201% ***
BCP 0.01% ms	12.94	+1057% ***	2.69	+147% ns	2.14	+98% *
BCP 0.05% ms	293.91	x300 ***	10.69	+882% ***	2.81	+160% **

[0246] 表11:角质形成细胞中hBD2和TLR2的产生

[0247] (细胞内蛋白表达)

[0248] *p<0.05;**p<0.01;***p<0.001;ns相对于对照不显著

[0249] 单向ANOVA和随后的Dunnett检验

	hBD2		TLR2	
	pg/ml	变化	pg/ml	变化
[0250] 对照	141.5 $\pm$ 15.2		735.9 $\pm$ 39.2	
IL1 β 100 ng/ml	2162.7 $\pm$ 51.1	+1428% ***	913.7 $\pm$ 30.5	+24% **
BCP 0.006% ms	286.33 $\pm$ 66.1	+102% *	789.2 $\pm$ 78.2	+7% ns
BCP 0.02% ms	488.8 $\pm$ 57.3	+245% ***	884.2 $\pm$ 56.0	+20% *

[0251] IV. 对细菌粘附的活性

[0252] 评价BCP提取物对4种细菌菌株与重建人表皮(RHE)或皮肤外植体的表面粘附的作用。

[0253] a) 材料和方法

[0254] -金黄色葡萄球菌、表皮葡萄球菌(*S.epidermidis*)和痤疮丙酸杆菌的粘附的研究:

[0255] 在0.6%和2%的根据实施例1的肋果木棉多糖提取物(称为BCP提取物)的存在下,将人重建表皮(RHE)孵育15分钟。然后,用PBS冲洗两次后,将表皮葡萄球菌(ATCC 14990)、金黄色葡萄球菌(ATCC 6538)或痤疮丙酸杆菌(ATCC 6919)细菌菌株沉积在RHE表面持续4小时。通过4次连续洗涤去除未粘附的细菌后,将RHE再次孵育过夜。

[0256] 通过将研磨的RHE接种到特定琼脂上后计数菌落来进行细菌的计数。结果以UFC/RHE(菌落形成单位)表示。

[0257] -干燥棒状杆菌(*C.xerosis*)的粘附的研究:

[0258] 在0.6%和2%的BCP提取物的存在下,将皮肤外植体孵育2小时。然后,将干燥棒状杆菌(*Corynebacterium xerosis*) (DSM 20743)的混悬液沉积在皮肤外植体的表面持续2小时。冲洗后,这些外植体再次孵育24小时。

[0259] 通过刮擦回收粘附在皮肤外植体表面的细菌,然后将其接种在琼脂上以进行以UFC/cm²表示的计数。

[0260] b) 结果

[0261] 在测试的两个浓度下,BCP提取物显著抑制了金黄色葡萄球菌对RHE的粘附。在2%时,BCP提取物还抑制了痤疮丙酸杆菌的粘附。(参见表12)

[0262] BCP提取物显著抑制了干燥棒状杆菌在外植体表面的粘附(见表13)。

[0263] BCP提取物通过限制病原菌的粘附同时保持共生菌的粘附,来促进皮肤微生物群的再平衡。

[0264] 表12:RHE上的细菌粘附

	痤疮丙酸杆菌		金黄色葡萄球菌		表皮葡萄球菌	
	UFC/RHE	变化	UFC/RHE	变化	UFC/RHE	变化
[0265] 对照	23125		1275000		2764801	
BCP 0.6%	NC	NC	137875	-89%	2650852	-4%
BCP 2%	8125	-65%	244750	-81%	2146464	-22%

[0266] 表13:干燥棒状杆菌在皮肤外植体上的粘附**p<0.01;***p<0.001-单向ANOVA和随后的Dunnett检验

	UFC/cm ²	变化	显著性
对照	597±190		
BCP 0.6%	272±114	-54%	**
BCP 2%	48±38	-92%	***

[0268] V. 对细菌生长的活性

[0269] 通过研究分别培养或共培养的不同菌株的细菌生长,来评价根据实施例1的肋果木棉多糖提取物(称为BCP提取物)的抗微生物活性,或相反的益生元活性。

[0270] a) 材料和方法

[0271] 使用以下代表皮肤微生物群的微生物菌株:

[0272] 金黄色葡萄球菌(ATCC 6538);

[0273] 表皮葡萄球菌(ATCC 12228);

[0274] 痤疮丙酸杆菌(ATCC 11827);

[0275] 干燥棒状杆菌(ATCC 373);

[0276] 糠秕马拉色菌(ATCC 14521);

[0277] 人葡萄球菌(*Staphylococcus hominis*) (ATCC 27844)。

[0278] -最低抑制浓度(CMI)的测定和细菌生长的“活化剂”潜力的测定:

[0279] 将BCP提取物在微孔板中在每个菌株特定的最少培养介质中以0.25%、0.5%、1%、2%、4%和8%稀释。与样品类似制备对照:

[0280] -阳性生长抑制对照:稀释的介质中的Phenonip®5%,

[0281] -由稀释的生长介质组成的对照,

[0282] -由生长介质组成的对照。

[0283] 在不同条件下加入菌株,然后孵育48小时。

[0284] 在48小时后出现显示微生物生长的疾病的情况下,对仍然显示出微生物生长的三个最高浓度收集等分试样。这些等分试样以十进位稀释度沉积在单独的平板中,以便通过有限稀释来确定种群的浓度。

[0285] 在孵育48小时后,根据所进行的十进位稀释,通过测定每种微生物的浓度(通过目测读数和测量620nm处的吸光度(浊度)同时进行)来证明细菌生长的激活。

[0286] 最后,通过与在没有产品的对照中获得的细菌生长相比较来表示结果。

[0287] -在共培养中对细菌生长的作用的测定:

[0288] 在0.25% BCP提取物,0.5%和1%或Phenonip 0.5%,阳性生长抑制对照的存在下,将共培养的金黄色葡萄球菌、表皮葡萄球菌、人葡萄球菌和痤疮丙酸杆菌菌株孵育48小时。

[0289] 取出等分试样,并将其置于所选菌株的特定琼脂上。孵育48小时后,对每个菌株进行计数。

[0290] b) 结果

[0291] -最低抑制浓度(CMI)的测定和细菌生长的“活化剂”潜力的测定:

[0292] 对于痤疮丙酸杆菌,观察到细菌生长的抑制,测定的CMI为4%。生长动力学显示BCP提取物对痤疮丙酸杆菌具有抑菌作用(参见图1)。

[0293] 类似地,糠秕马拉色菌的生长动力学显示BCP提取物对这种酵母有抑菌作用(参见图1)。

[0294] -在共培养中对细菌生长的作用的测定:

[0295] BCP提取物显示出对表皮葡萄球菌、人葡萄球菌和痤疮丙酸杆菌菌株的滋养作用,并倾向于抑制金黄色葡萄球菌的生长(杀菌作用)(参见图2)。

[0296] 这些结果显示了对皮肤微生物群平衡的保护作用。

[0297] VI.对金黄色葡萄球菌引起的损伤的防御

[0298] 在特应性皮炎患者中经常检测到金黄色葡萄球菌(*S.aureus*)。

[0299] 这些患者中存在的金黄色葡萄球菌的数量与病理状况的严重程度相关,并在病理生理学中起重要作用。

[0300] 本研究的目的在于重现这种细菌对表皮造成的压力,为此将金黄色葡萄球菌的分泌物应用于RHE表面,以研究对表皮分化蛋白的结果。

[0301] a) 材料和方法

[0302] 将1%根据实施例1的BCP提取物应用于重建人表皮(RHE)的表面作为24小时预处理。然后,通过沉积金黄色葡萄球菌(ATCC 33592)的分泌物(培养介质)对RHE进行局部处理。

[0303] 再孵育24小时后,在苏木精/伊红染色后对组织进行形态学分析,并通过免疫荧光分析屏障功能标记物的表达。使用Image J软件通过半定量评价所关注的蛋白质的表达水平。

[0304] b) 结果

[0305] 形态学分析:

[0306] 如图3所示,金黄色葡萄球菌的分泌物诱导RHE形态的中等改变:表皮(基底层)结构的解体、颗粒层透明角质颗粒的减少。

[0307] 用BCP提取物进行的预处理保留了表皮的形态,所述表皮组织得更好、更厚且透明角质颗粒的产生更明显。

[0308] 屏障功能标记物的表达:

[0309] 如表14中的结果所证明的,金黄色葡萄球菌分泌物显著降低了所研究的屏障功能标记物的表达水平:角膜锁链蛋白、桥粒芯蛋白-1和丝聚合蛋白。因此,该模型代表了金黄

色葡萄球菌对屏障功能的负面影响,特别是在特应性皮炎的病理生理学中。

[0310] BCP提取物能够抵消这种表达的减少。

[0311] 表14:RHE中屏障标记物的表达

[0312] \$p<0.05;\$\$p<0.01相对于对照;*p<0.05;**p<0.01相对于分泌物-非配对t检验

[0313]		角膜锁链蛋白	桥粒芯蛋白 1	丝聚合蛋白
	对照	100	100	100
[0314]	金黄色葡萄球菌分泌物	49.6 \$	35.4 \$\$	42.5 \$\$
	分泌物 + BCP 1%	84.2 *	120.1 **	79.4 *

因此,BCP提取物可以保护皮肤免受金黄色葡萄球菌的侵害。

[0315] VII. 针对阴道微生物群的保护作用

[0316] 在代表阴道的3种乳杆菌菌株中评价根据实施例1的BCP提取物的益生元功效;此外,在阴道上皮重建模型中研究BCP提取物,所述阴道上皮被代表常驻微生物群的乳杆菌菌株定殖。

[0317] a) 材料和方法

[0318] -对加氏乳杆菌 (*L.gasseri*)、嗜酸乳杆菌 (*L.acidophilus*)、鼠李糖乳杆菌 (*L.rhamnosus*) 的益生元作用的研究:

[0319] 在0.25%、0.5%、1%和2%根据实施例1的肋果木棉多糖提取物(称为BCP提取物)或2%葡萄糖(阳性对照)的存在下,将加氏乳杆菌(ATCC 33323)、嗜酸乳杆菌(LA-14)和鼠李糖乳杆菌(ATCC 53103)菌株接种在贫化介质中。

[0320] 孵育4小时和24小时后,通过分光光度法测量600nm处的D0(指示细菌复制速率)以及以CFU/ml表示的细菌活力(以量化存活的残留细菌的数量)来评价细菌生长。

[0321] 孵育24小时后,通过测量培养物上清液中乳酸的产生来评价对细菌代谢的影响。

[0322] -对重建阴道上皮的保护作用的研究:

[0323] 将1% BCP提取物应用于重建人阴道上皮(HVE)表面,同时,上皮被卷曲乳杆菌 (*L.crispatus*) (DSM 20356) 和加氏乳杆菌 (DSM 20243) 的混合物定殖,模拟生理常驻微生物群。

[0324] 孵育6小时后,通过实时RT-PCR评价抗微生物肽hBD2的基因表达。

[0325] b) 结果

[0326] -对加氏乳杆菌、嗜酸乳杆菌和鼠李糖乳杆菌的益生元作用的研究

[0327] 通过测量D0评价的细菌生长速率显示BCP提取物对加氏乳杆菌生长的积极作用,从4小时开始以剂量依赖的方式(初期益生元作用);以及对嗜酸乳杆菌生长的积极作用,更特别地在孵育24小时(静止期)后的益生元作用(参见图4a和图4b)。

[0328] 总之,BCP提取物对乳杆菌的活力具有与阳性对照(葡萄糖)相似甚至更大的作用,证实了其益生元作用。

[0329] 细菌活力评估(参见表15)显示,2% BCP提取物在4小时时对3种乳杆菌菌株显示出最大的益生元作用,特别是对加氏乳杆菌和其次对鼠李糖乳杆菌。对于鼠李糖乳杆菌,这种趋势持续长达24小时,而在24小时观察到加氏乳杆菌活力的显著下降,这可以用贫化介

质中与培养相关的饥饿来解释。

[0330] 浓度为0.25%的BCP提取物对嗜酸乳杆菌产生益生元作用。

[0331] 表15:乳杆菌菌株的细菌活力* $p < 0.05$; ** $p < 0.01$ -ANOVA检验

	加氏乳杆菌 (Log10 CFU/ml)		嗜酸乳杆菌 (Log10 CFU/ml)		鼠李糖乳杆菌 (Log10 CFU/ml)	
	4h	24h	4h	24h	4h	24h
对照	7.98 ± 0.01	3.10 ± 0.28	7.77 ± 0.13	5.84 ± 0.09	7.82 ± 0.21	8.23 ± 0.00
[0332] 2%葡萄糖	7.81 ± 0.27	3.42 ± 0.14	7.73 ± 0.23	7.22 ± 0.15	7.83 ± 0.06	9.09 ± 0.07
BCP 0.25%	7.89 ± 0.14	2.49 ± 0.12*	7.72 ± 0.13	8.99 ± 0.55*	7.77 ± 0.10	8.89 ± 0.27
BCP 0.5%	8.01 ± 0.19	0.00 ± 0.00**	7.74 ± 0.08	6.10 ± 0.57	7.83 ± 0.06	8.51 ± 0.56
BCP 1%	8.02 ± 0.10	3.27 ± 0.38	8.10 ± 0.58	6.29 ± 0.02	7.74 ± 0.06	7.82 ± 0.01*
BCP 2%	10.40 ± 0.24**	3.73 ± 0.07	8.83 ± 0.18	6.63 ± 0.25	8.75 ± 0.11**	10.35 ± 0.04*

[0333] 乳酸是乳杆菌初级代谢的产物,将其在嗜酸乳杆菌培养介质中定量(参见表16)。

[0334] BCP提取物诱导嗜酸乳杆菌产生的乳酸增加。

[0335] 表16:嗜酸乳杆菌产生的乳酸的定量* $p < 0.05$; ** $p < 0.01$ -ANOVA检验

	嗜酸乳杆菌	
	乳酸 (nmol/μl)	变化
对照	25421.81 ± 4389.106	
[0336] 2%葡萄糖	24200.96 ± 1062.115	-5%
BCP 0.25%	57556.58 ± 29969.59	+126%
BCP 0.5%	46584.36 ± 2749.858	+83%
BCP 1%	48314.47 ± 12267.67	+90%
BCP 2%	90768.17 ± 945.7198	+257%

[0337] 总之,这些结果显示了BCP提取物对嗜酸乳杆菌的益生元作用。这种作用在浓度为2%时更大。

[0338] 表17:对乳杆菌的益生元作用的总结

[0339] ++比阳性对照的作用更好;高益生元作用

[0340] +相当于阳性对照的作用;益生元作用

[0341] -与对照相比没有变化;没有益生元作用

	生长速率		活力		代谢 (乳酸)
	4 小时 (指数期)	24 小时 (静止期)	4 小时 (指数期)	24 小时 (静止期)	24 小时 (静止期)
[0342] 加氏乳杆菌	++	+	++	+	+
[0343] 嗜酸乳杆菌	+	++	+	++	++

[0344] -对重建阴道上皮(HVE)的保护作用的研究:

[0345] 在定植的阴道上皮(HVE)模型中,BCP提取物显著增加了hBD2基因表达(参见表18)。

[0346] 该结果显示了局部上皮防御的增强作用,以保护粘膜免受感染风险。

[0347] 表18:在乳杆菌定殖的HVE中hBD2的基因表达QR:相对量

[0348]		hBD2 (QR)
	对照	1.00
	定殖的 HVE	0.88
	定殖的 HVE + BCP 1%	3.24

[0349] VIII. 体外嗅探试验(除臭活性)

[0350] 进行体外“嗅探试验”,以评价根据实施例1的BCP提取物抑制或改变引起腋臭的主要细菌物种:纹带棒状杆菌(*C.striatum*)、表皮葡萄球菌产生气味的能力。

[0351] a) 材料和方法

[0352] 使用表皮葡萄球菌(ATCC 12228)和纹带棒状杆菌(*Corynebacterium striatum*) (ATCC 6940)菌株。

[0353] 这些菌株中的每一种都具有典型的嗅觉特征,是汗液组分代谢的结果:

[0354] 表皮葡萄球菌:戊酸和丙酸;

[0355] 纹带棒状杆菌:硫醇。

[0356] 在0.1%、0.6%或2%的BCP提取物或0.1%氯己定二葡萄糖酸盐(阳性对照)的存在下,将每种细菌菌株接种到重建汗液中。

[0357] 在孵育6小时和24小时后:

[0358] 通过以CFU/ml表示的细菌计数评价细菌活力。

[0359] 进行嗅探测试,以定性和半定量地确定嗅觉特征(气味强度):打开小瓶后,立即由训练有素的操作者对气味进行评价和评分:

[0360] 1、无(与0.1%氯己定阳性对照相当)

[0361] 2、中等

[0362] 3、强烈(细菌特异性嗅觉特征)

[0363] b) 结果

[0364] 与阴性对照相比,BCP提取物抑制了表皮葡萄球菌和纹带棒状杆菌产生的气味,但不改变这些细菌的活力(参见表19)。

[0365] 这些结果证明了除臭活性。

[0366] 表19:重建汗液中细菌的活力和气味** $p < 0.01$ -ANOVA检验相对于对照

[0367]

表皮葡萄球菌				
	6 小时		24 小时	
	活力 (Log10 CFU/ml)	气味 (嗅探)	活力 (Log10 CFU/ml)	气味 (嗅探)
对照 (重建汗液)	8.91 ± 0.21	强烈	8.69 ± 0.09	强烈
氯己定	0.00 ± 0.00 **	无	0.00 ± 0.00 **	无
BCP 0.1%	8.80 ± 0.08	中等	8.64 ± 0.30	中等-强烈
BCP 0.6%	8.87 ± 0.07	中等-无	8.87 ± 0.15	中等-无
BCP 2%	8.73 ± 0.34	中等	8.78 ± 0.18	中等-无
纹带棒状杆菌				
	6 小时		24 小时	
	活力 (Log10 CFU/ml)	气味 (嗅探)	活力 (Log10 CFU/ml)	气味 (嗅探)
对照 (重建汗液)	8.51 ± 0.08	中等	8.64 ± 0.19	中等
氯己定	0.00 ± 0.00 **	无	0.00 ± 0.00 **	强烈
BCP 0.1%	8.59 ± 0.31	中等	8.38 ± 0.11	中等
BCP 0.6%	8.66 ± 0.32	无	8.57 ± 0.11	中等-无
BCP 2%	8.28 ± 0.06	无	8.31 ± 0.28	无

[0368] IX. 细菌生物膜的研究

[0369] 生物膜被定义为与活生物体或组织相关并“包裹”在多糖基质中的微生物细胞的集合。

[0370] 生物膜为传染病中最重要的毒力因子之一,它赋予对抗生素的抗性,防止宿主防御,它通过促进病原菌的通讯系统(群体感应)来增加病原菌的毒力。

[0371] 在皮肤中,生物膜已在各种病理状况或疾病中得到描述:痤疮、酒渣鼻、特应性皮炎。生物膜也可能破坏愈合机制。

[0372] 生物膜中的细菌对抗生素、消毒剂和宿主防御系统具有先天的抵抗力;因此,生物膜促进致病菌的持续存在及其对治疗的顽固性。

[0373] 例如,在特应性皮炎的病理生理学情况下,特别描述了金黄色葡萄球菌生物膜的参与。事实上,金黄色葡萄球菌更容易以生物膜的形式存在于特应性皮肤中,可能是由于皮肤表面的改变使其能够粘附;生物膜的这种状态增强了它对治疗的抵抗力,并增加了它的毒力,从而导致慢性炎症和瘙痒症的诱发,这些现象导致特应性皮炎发病机制的恶性循环。

[0374] 评价了根据本发明的BCP提取物对皮肤微生物群的细菌的生物膜形成能力的作用。

[0375] a) 材料和方法

[0376] -测试的微生物菌株:

[0377] -表皮葡萄球菌MFP04:通过代谢分析、ARN16S和基因组测序表征的健康人皮肤菌株(LMSM菌株组)。这是一种被描述为共生的菌株。

[0378] -金黄色葡萄球菌MFP03:通过代谢分析、ARN16S和基因组测序表征的健康人皮肤菌株(LMSM菌株组)。它是一种共生菌株,一种“机会性”病原体,可以导致某些皮肤感染,并被广泛描述为与特应性皮炎的病理生理学有关。

[0379] -干燥棒状杆菌CIP 100653T/ATCC373:来自国际数据库的菌株。它是一种共生菌株,与腋臭的产生有关。

[0380] -痤疮丙酸杆菌HL045PA1/HM-516核糖核酸型4(RT4):由Fitz-Gibbon等人表征的“痤疮”菌株,从国际数据库中获得。它是一种致病菌株,参与痤疮的发病机制。

[0381] -痤疮丙酸杆菌HL110PA3/HM-554核糖核酸型6(RT6):由Fitz-Gibbon等人表征的“非痤疮”菌株,从国际数据库中获得。它是一种共生菌株。

[0382] -藤黄微球菌(*Micrococcus luteus*)0116:通过代谢分析、ARN16S和基因组测序表征的健康人皮肤菌株(LMSM菌株组)。它是一种共生菌株。

[0383] -BCP活性成分对细菌生长动力学的作用的预研究:

[0384] 进行对照研究,以验证BCP活性成分对所研究的6种菌株的生长没有作用。

[0385] 在培养开始时,将稀释至1/50的活性成分加入到介质中。根据菌株,在24小时、48小时或72小时内监测微孔板中的细菌生长。使用酶标仪/培养箱连续测量吸光度。

[0386] -通过结晶紫技术研究BCP活性成分对生物膜形成的作用:

[0387] 根据菌株,在活性成分的存在下培养24、48或72小时后,使用结晶紫染色技术在多孔板(96)中研究细菌物种生物膜的产生。

[0388] 结果表示为基于对照介质(无活性成分)中生物膜形成值的百分比。使用Mann-Whitney检验建立统计差异。

[0389] b) 结果

[0390] 根据本发明的木棉多糖的BCP提取物在测试条件下没有显著改变细菌生长的动力学。

[0391] 对不同细菌菌株生物膜产生的研究揭示了木棉树多糖提取物的以下作用(参见图5):

[0392] -显著抑制金黄色葡萄球菌生物膜形成;

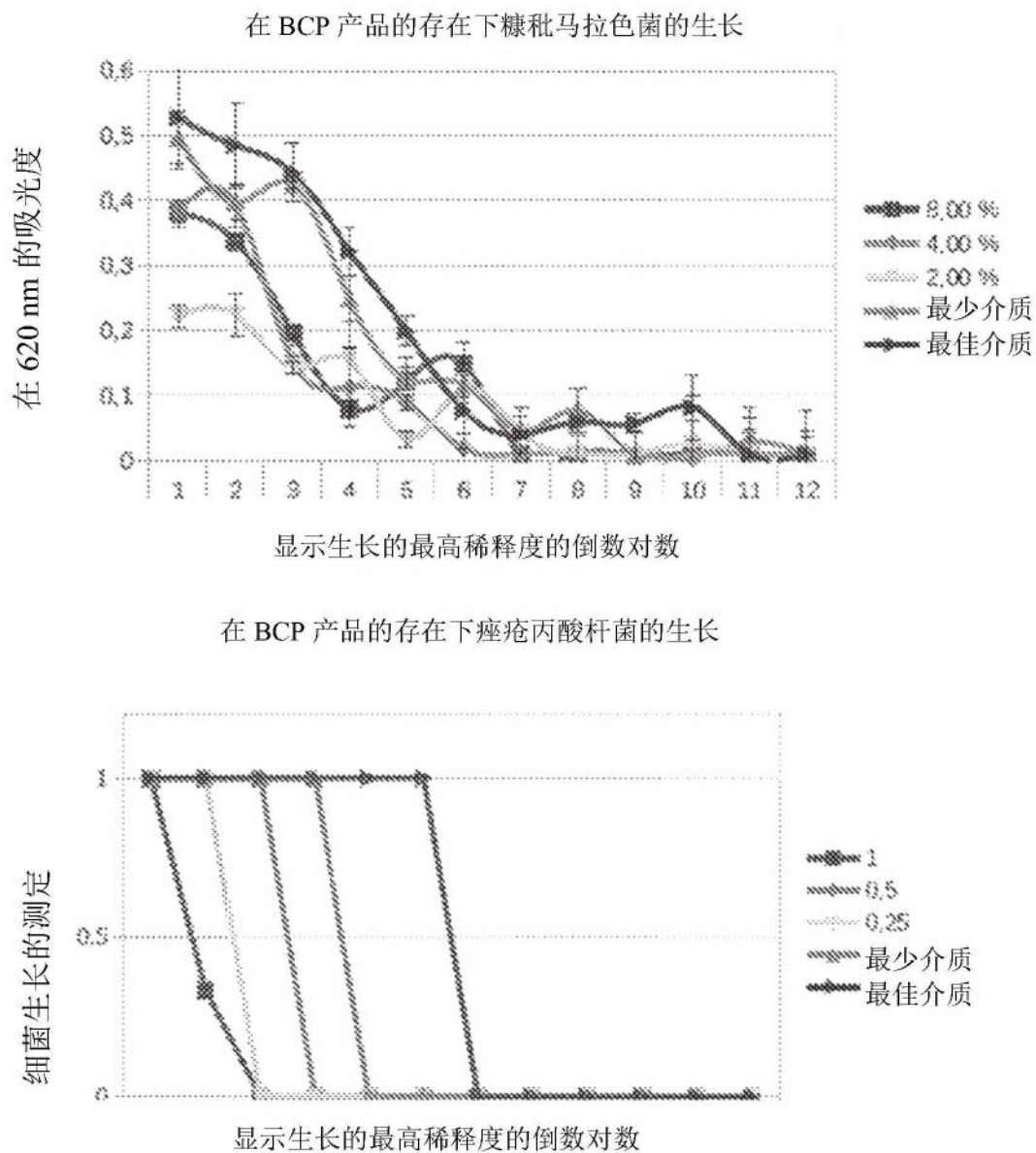
[0393] -诱导表皮葡萄球菌生物膜形成;

[0394] -没有显著调节藤黄微球菌、干燥棒状杆菌或痤疮丙酸杆菌RT6(非痤疮菌株)的生物膜形成;

[0395] -抑制痤疮菌株痤疮丙酸杆菌RT4(痤疮菌株)的生物膜形成。

[0396] 有利地,木棉多糖的BCP提取物抑制致病细菌菌株(特别是金黄色葡萄球菌和痤疮丙酸杆菌RT6)的生物膜形成能力,同时保持甚至促进共生细菌形成生物膜的能力。

[0397] 这些结果有利于活性成分对保持微生物群平衡的作用,特别是对病理状况如特应性皮炎或痤疮有益。



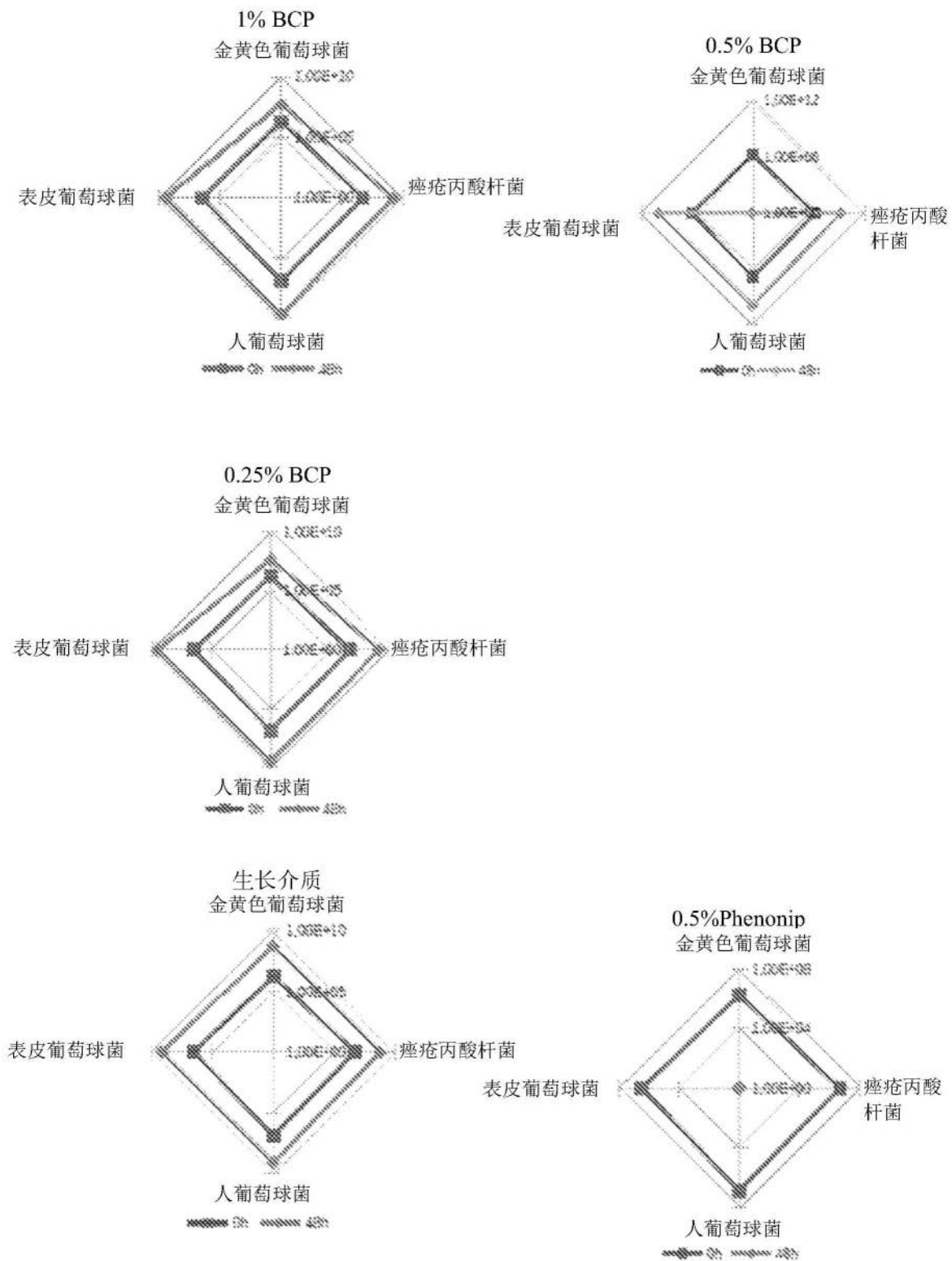


图2

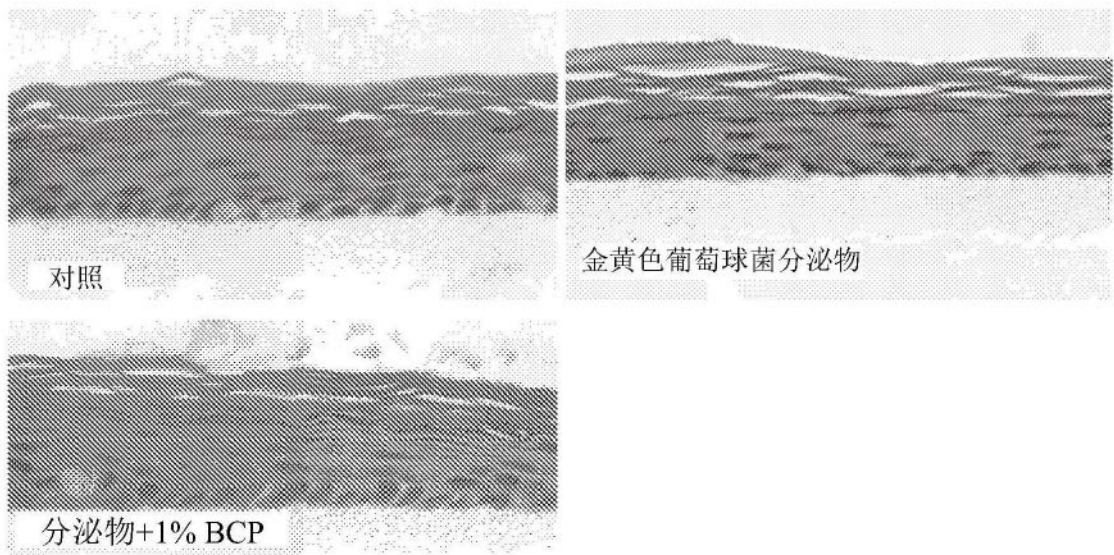


图3

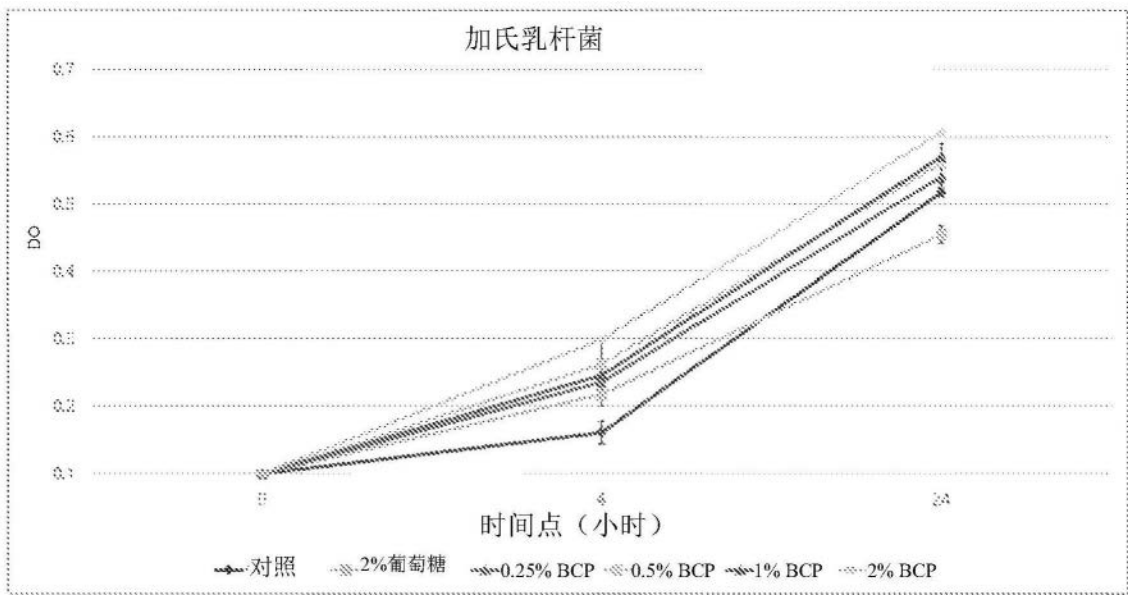


图4a

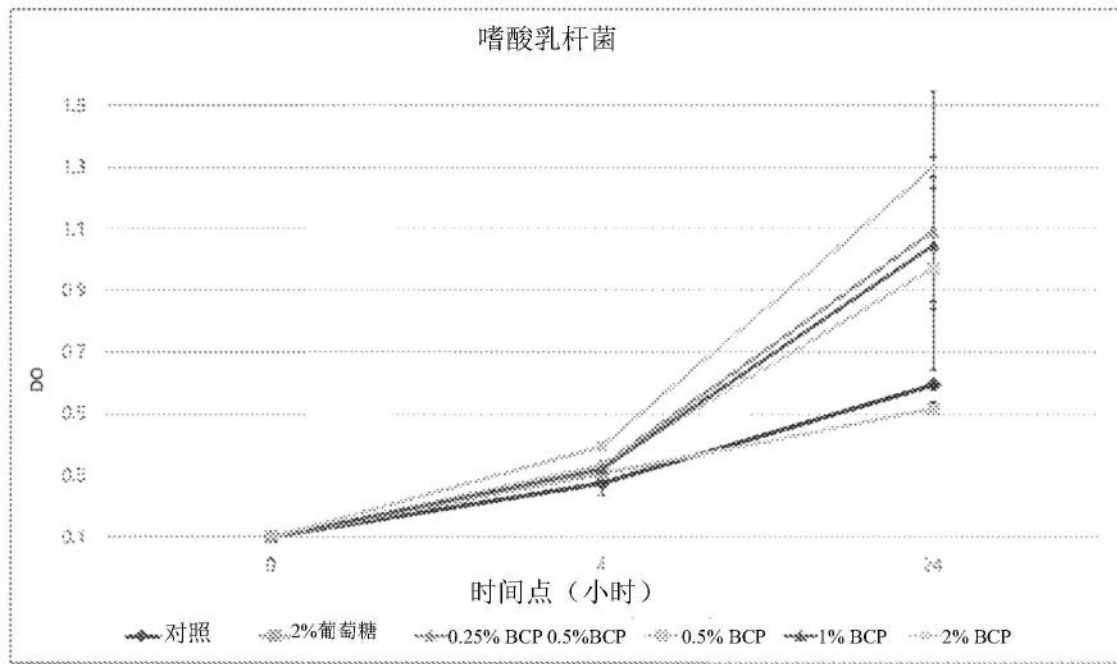


图4b

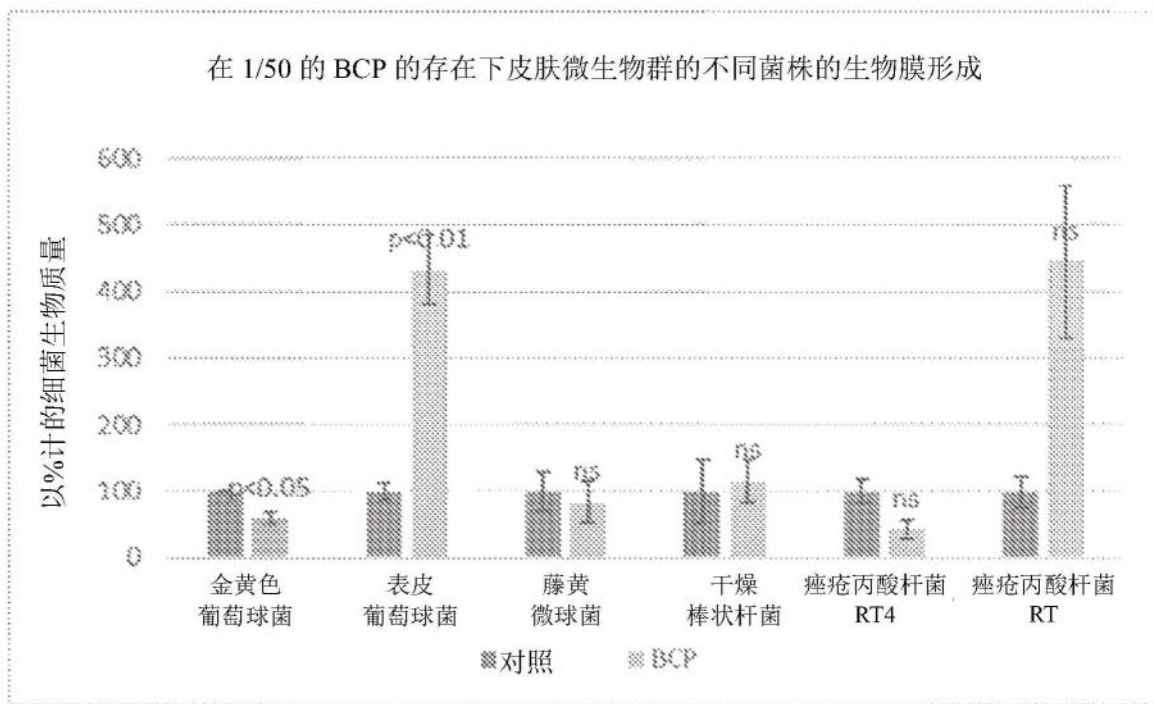


图5