



(12) 发明专利申请



(10) 申请公布号 CN 118871089 A

(43) 申请公布日 2024. 10. 29

(21) 申请号 202380028047.6

(22) 申请日 2023.03.15

(30) 优先权数据

22382248.7 2022.03.16 EP

(85) PCT国际申请进入国家阶段日

2024.09.14

(86) PCT国际申请的申请数据

PCT/IB2023/052524 2023.03.15

(87) PCT国际申请的公布数据

W02023/175531 EN 2023.09.21

(71) 申请人 路博润先进材料公司

地址 美国

(72) 发明人 R·索比罗斯 A·索莱阿斯塔尔

N·阿尔米尼亚纳多马内奇

C·波内尔 C·加西亚埃尔南德斯

C·尤瑟夫 S·门德斯

N·伊巴兹布兰奇

B·穆盖萨马尔奎内斯

F·I·布拉沃巴斯克斯

(74) 专利代理机构 北京市中咨律师事务所

11247

专利代理师 张莉 黄革生

(51) Int.Cl.

A61K 8/64 (2006.01)

A61K 8/9789 (2006.01)

A61Q 5/00 (2006.01)

A61Q 17/00 (2006.01)

A61Q 17/04 (2006.01)

A61Q 19/08 (2006.01)

权利要求书5页 说明书42页

序列表 (电子公布)

(54) 发明名称

红小豆的蛋白质水解产物及其美容用途

(57) 摘要

从红小豆获得的蛋白质水解产物及其用途，特别是在皮肤和/或毛发的美容处理和/或护理中的用途。该蛋白质水解产物包含至少一种选自以下的化合物：(i) Val-Ala-Glu-Gln-Glu-Gln-Glu-Gln-Ala-Lys-Arg-Gln (SEQ ID No.1)；(ii) Leu-Pro-Gln-Gln-Glu-Gln-Gly-His-Asp-Arg (SEQ ID No.2)；(iii) Val-Asp-Ala-Gln-Pro-Glu-Glu-Gln-Gln-Arg (SEQ ID No.3)；以及 (iv) Gly-Ile-Asn-Ala-Glu-Asn-Asn-Gln-Arg-Asn (SEQ ID No.4)。还公开了制备所述蛋白质水解产物的方法。

1. 一种红小豆蛋白质水解产物,所述红小豆蛋白质水解产物包含至少一种选自以下的化合物(即,1、2、3或4种化合物):

- (i) Val-Ala-Glu-Gln-Glu-Gln-Glu-Gln-Ala-Lys-Arg-Gln (SEQ ID No.1);
- (ii) Leu-Pro-Gln-Gln-Glu-Gln-Gly-His-Asp-Arg (SEQ ID No.2);
- (iii) Val-Asp-Ala-Gln-Pro-Glu-Glu-Gln-Gln-Arg (SEQ ID No.3); 以及
- (iv) Gly-Ile-Asn-Ala-Glu-Asn-Asn-Gln-Arg-Asn (SEQ ID No.4)。

2. 根据权利要求1所述的蛋白质水解产物,所述蛋白质水解产物包含:

- (i) Val-Ala-Glu-Gln-Glu-Gln-Glu-Gln-Ala-Lys-Arg-Gln (SEQ ID No.1); 以及
- (ii) Leu-Pro-Gln-Gln-Glu-Gln-Gly-His-Asp-Arg (SEQ ID No.2)。

3. 根据权利要求1所述的蛋白质水解产物,所述蛋白质水解产物包含:

- (iii) Val-Asp-Ala-Gln-Pro-Glu-Glu-Gln-Gln-Arg (SEQ ID No.3); 以及
- (iv) Gly-Ile-Asn-Ala-Glu-Asn-Asn-Gln-Arg-Asn (SEQ ID No.4)。

4. 根据权利要求3所述的蛋白质水解产物,所述蛋白质水解产物包含:

- (i) Val-Ala-Glu-Gln-Glu-Gln-Glu-Gln-Ala-Lys-Arg-Gln (SEQ ID No.1); (iii) Val-Asp-Ala-Gln-Pro-Glu-Glu-Gln-Gln-Arg (SEQ ID No.3); 以及
- (iv) Gly-Ile-Asn-Ala-Glu-Asn-Asn-Gln-Arg-Asn (SEQ ID No.4)。

5. 根据权利要求3所述的蛋白质水解产物,所述蛋白质水解产物包含:

- (ii) Leu-Pro-Gln-Gln-Glu-Gln-Gly-His-Asp-Arg (SEQ ID No.2);
- (iii) Val-Asp-Ala-Gln-Pro-Glu-Glu-Gln-Gln-Arg (SEQ ID No.3); 以及
- (iv) Gly-Ile-Asn-Ala-Glu-Asn-Asn-Gln-Arg-Asn (SEQ ID No.4)。

6. 根据前述权利要求中任一项所述的红小豆蛋白质水解产物,所述红小豆蛋白质水解产物包含:

- (i) Val-Ala-Glu-Gln-Glu-Gln-Glu-Gln-Ala-Lys-Arg-Gln (SEQ ID No.1);
- (ii) Leu-Pro-Gln-Gln-Glu-Gln-Gly-His-Asp-Arg (SEQ ID No.2);
- (iii) Val-Asp-Ala-Gln-Pro-Glu-Glu-Gln-Gln-Arg (SEQ ID No.3); 以及
- (iv) Gly-Ile-Asn-Ala-Glu-Asn-Asn-Gln-Arg-Asn (SEQ ID No.4)。

7. 根据前述权利要求中任一项所述的红小豆蛋白质水解产物,所述红小豆蛋白质水解产物还包含:

- (v) Glu-Tyr-Thr-Gly-Asp-Ala-Ala-Gly-Arg (SEQ ID No.5)。

8. 根据前述权利要求中任一项所述的蛋白质水解产物,其中所述水解产物不含分子量大于3kDa的任何组分。

9. 根据前述权利要求中任一项所述的蛋白质水解产物,其中当存在时,以下化合物中的每一种化合物以0.001ppm至0.15ppm或0.005ppm至0.08ppm的量存在:

- (i) Val-Ala-Glu-Gln-Glu-Gln-Glu-Gln-Ala-Lys-Arg-Gln (SEQ ID No.1);
- (ii) Leu-Pro-Gln-Gln-Glu-Gln-Gly-His-Asp-Arg (SEQ ID No.2);
- (iii) Val-Asp-Ala-Gln-Pro-Glu-Glu-Gln-Gln-Arg (SEQ ID No.3);
- (iv) Gly-Ile-Asn-Ala-Glu-Asn-Asn-Gln-Arg-Asn (SEQ ID No.4); 以及
- (v) Glu-Tyr-Thr-Gly-Asp-Ala-Ala-Gly-Arg (SEQ ID No.5)。

10. 根据前述权利要求中任一项所述的蛋白质水解产物,所述蛋白质水解产物还包含

至少0.05mg、优选0.15mg多酚/毫升蛋白质水解产物,如通过福林-西奥卡特方法所确定的。

11.根据前述权利要求中任一项所述的蛋白质水解产物,其中所述水解产物通过在丝氨酸内切蛋白酶的存在下酶促水解红小豆的蛋白质来获得。

12.根据权利要求11所述的蛋白质水解产物,其中所述内切蛋白酶是枯草杆菌蛋白酶A。

13.根据前述权利要求中任一项所述的蛋白质水解产物,其中所述水解产物通过以下步骤来获得:

- a) 提供磨碎的红小豆在水中的悬浮液;
- b) 用碱处理悬浮液,以便将磨碎的红小豆中的蛋白质溶解;
- c) 用丝氨酸内切蛋白酶酶促处理在b)中获得的所述悬浮液;
- d) 使c)中获得的所述悬浮液中的所述丝氨酸内切蛋白酶失活以形成粗水解产物;以及
- e) 从所述粗水解产物中除去分子量大于3KDa的组分。

14.根据权利要求13所述的蛋白质水解产物,其中e)包括

f) 通过固/液分离来从所述粗水解产物回收上清液;以及

g) 从所述上清液中除去分子量大于3KDa的组分。

15.根据权利要求13或权利要求14所述的蛋白质水解产物,其中b)包括将所述悬浮液的pH调节至约6.5至约7.5,优选为7的pH。

16.根据权利要求13至15中任一项所述的蛋白质水解产物,其中c)在20℃至30℃、优选23℃至27℃的温度下进行。

17.根据权利要求13至16中任一项所述的蛋白质水解产物,其中d)包括将c)中获得的所述悬浮液加热至至少70℃、或70℃至90℃、或75℃至85℃的温度。

18.一种化合物,所述化合物选自:

(i) Val-Ala-Glu-Gln-Glu-Gln-Glu-Gln-Ala-Lys-Arg-Gln (SEQ ID No.1);

(ii) Leu-Pro-Gln-Gln-Glu-Gln-Gly-His-Asp-Arg (SEQ ID No.2);

(iii) Val-Asp-Ala-Gln-Pro-Glu-Glu-Gln-Gln-Arg (SEQ ID No.3);

(iv) Gly-Ile-Asn-Ala-Glu-Asn-Asn-Gln-Arg-Asn (SEQ ID No.4);

(v) Glu-Tyr-Thr-Gly-Asp-Ala-Ala-Gly-Arg (SEQ ID No.5),以及它们的立体异构体和美容上可接受的盐。

19.根据权利要求1至16中任一项所述的蛋白质水解产物或根据权利要求17所述的至少一种化合物与通过微生物明串珠菌发酵萝卜根获得的滤液的组合。

20.一种制备红小豆蛋白质水解产物的方法,其中所述水解产物通过以下步骤来获得:

- a) 提供磨碎的红小豆在水中的悬浮液;
- b) 用碱处理悬浮液,以便将磨碎的红小豆中的蛋白质溶解;
- c) 用丝氨酸内切蛋白酶酶促处理在b)中获得的所述悬浮液;
- d) 使c)中获得的所述悬浮液中的所述丝氨酸内切蛋白酶失活以形成粗水解产物;以及
- e) 从所述粗水解产物中除去分子量大于3KDa的组分。

21.根据权利要求20所述的方法,其中e)包括

f) 通过固/液分离来从所述粗水解产物回收上清液;以及

g) 从所述上清液中除去分子量大于3KDa的组分。

22. 根据权利要求20或21所述的方法,其中所述丝氨酸内切蛋白酶是枯草杆菌蛋白酶A。

23. 根据权利要求20至22中任一项所述的方法,其中b) 包括将所述悬浮液的pH调节至约6.5至约7.5,优选为7的pH。

24. 根据权利要求20至23中任一项所述的方法,其中c) 在20℃至30℃、优选23℃至27℃的温度下进行优选约30分钟至约120分钟、约45分钟至约90分钟、或约60分钟的时段。

25. 根据权利要求20至24中任一项所述的方法,其中d) 包括将c) 中获得的所述悬浮液加热至至少70℃、或70℃至90℃、或75℃至85℃的温度,优选持续至少约20分钟。

26. 根据权利要求21所述的方法,其中e) 包括离心。

27. 根据权利要求21所述的方法,其中f) 包括超滤。

28. 根据权利要求20至27中任一项所述的方法,其中在所述磨碎的红小豆中的每g蛋白质的酶活性为0.1AU/g至0.5AU/g。

29. 根据权利要求20至28中任一项所述的方法,其中在所述磨碎的红小豆中的蛋白质的百分比为15%w/w至25%w/w。

30. 根据权利要求20至29中任一项所述的方法,其中所述磨碎的红小豆在磨碎的红小豆在水中的所述悬浮液中以20g/Kg水至100g/Kg水的量存在。

31. 一种蛋白质水解产物,所述蛋白质水解产物能够通过根据权利要求20至30中任一项所述的方法获得。

32. 根据权利要求20至30中任一项所述的方法,其中所述蛋白质水解产物是根据权利要求1至17中任一项所述的蛋白质水解产物。

33. 一种个人护理组合物或化妆品组合物,所述个人护理组合物或化妆品组合物包含: 根据权利要求1至17或31中任一项所述的红小豆蛋白质水解产物;或根据权利要求18所述的化合物、或其立体异构体或美容上可接受的盐;或根据权利要求19所述的组合;以及至少一种美容上可接受的赋形剂或成分。

34. 根据权利要求33所述的个人护理组合物或化妆品组合物,基于所述个人护理组合物或化妆品组合物的总重量计,所述个人护理组合物或化妆品组合物包含约0.001重量%至10重量%、优选约0.004重量%至5重量%的量的根据权利要求1至17或31中任一项所述的红小豆蛋白质水解产物。

35. 根据权利要求33或权利要求34所述的个人护理组合物或化妆品组合物,其中所述至少一种美容上可接受的赋形剂或成分选自表面活性剂、毛发调理剂、润肤剂、乳化剂、湿润剂、流变改性剂、维生素、毛发生长促进剂、去头皮屑剂、保湿剂、毛发固定剂、毛发着色剂、氧化剂、毛发染料、毛发漂白剂、色素;以及它们的组合。

36. 根据权利要求33至35中任一项所述的个人护理组合物或化妆品组合物,其中所述化妆品组合物为选自以下的组的形式:乳膏、多重乳剂、溶液、液晶、无水组合物、水分散体、油、乳、香膏、泡沫、乳液、凝胶、乳膏凝胶、水醇溶液、水甘醇溶液、水凝胶、搽剂、肥皂、洗发剂、护发素、精华素、多糖膜、软膏、摩丝、润发油、粉末、棒、笔、喷雾剂或气雾剂。

37. 根据权利要求1至17或31中任一项所述的红小豆蛋白质水解产物;或根据权利要求18所述的化合物、或其立体异构体或美容上可接受的盐;或根据权利要求19所述的组合,用于皮肤和/或毛发的美容、非治疗性处理和/或护理的用途。

38. 根据权利要求37所述的用途, 其中所述美容、非治疗性处理和/或护理是减轻或预防环境暴露组对所述皮肤和/或毛发的不利影响。

39. 根据权利要求37或权利要求38所述的用途, 其中所述美容、非治疗性处理和/或护理是减轻或预防含有颗粒物质的空气污染对所述皮肤和/或毛发的不利影响。

40. 根据权利要求39所述的用途, 其中所述颗粒物质来源于道路灰尘、来源于柴油或者是花粉(例如杉树花粉)。

41. 根据权利要求37或权利要求38所述的用途, 其中所述美容、非治疗性处理和/或护理是减轻或预防阳光对所述皮肤和/或毛发的不利影响。

42. 根据权利要求41所述的用途, 其中所述阳光包括UV-A照射。

43. 根据权利要求41或权利要求42所述的用途, 其中所述不利影响包括由于阳光而使所述毛发的颜色变浅。

44. 根据权利要求37或38所述的用途, 其中所述美容、非治疗性处理和/或护理是减轻或预防漂白或染色对毛发的不利影响。

45. 根据权利要求37或38所述的用途, 其中所述美容、非治疗性处理和/或护理是减轻或预防热应力对毛发的不利影响。

46. 根据权利要求37至45中任一项所述的用途, 其中所述不利影响包括由毛发中脂质的过氧化和/或由毛发中蛋白质的羰基化引起的对所述毛发的损伤。

47. 根据权利要求37至42中任一项所述的用途, 其中所述不利影响包括由所述皮肤的氧化引起的对所述皮肤的损伤。

48. 根据权利要求37至42中任一项所述的用途, 其中所述美容、非治疗性处理和/或护理是维持和/或改善所述皮肤的物理屏障功能。

49. 根据权利要求37至42、权利要求47或权利要求48中任一项所述的用途, 其中所述用途包括增加所述皮肤中的角质形成细胞增殖。

50. 根据权利要求37至42、权利要求47或权利要求49中任一项所述的用途, 其中所述用途包括增加皮肤增亮、和/或增加所述皮肤的光泽、和/或增加皮肤亮度和/或减少暗斑。

51. 根据权利要求37至42、权利要求47或权利要求49中任一项所述的用途, 其中所述用途包括减少皮肤发红。

52. 根据权利要求37至42、权利要求47或权利要求49中任一项所述的用途, 其中所述用途包括增加肤色和/或增加皮肤肌理均匀性和/或降低皮肤粗糙度。

53. 根据权利要求37至46中任一项所述的用途, 其中所述用途包括增加毛发可处理性。

54. 根据权利要求53所述的用途, 其中所述增加毛发可处理性包括减少分叉和/或增加纤维排列和/或减少卷曲和/或减少蓬松度。

55. 一种处理和/或护理所述皮肤和/或毛发的(美容、非治疗性)方法, 所述方法包括向受试者施用根据权利要求1至12中任一项所述的红小豆蛋白质水解产物、或根据权利要求13所述的化合物、或其立体异构体或美容上可接受的盐、或根据权利要求14所述的组合, 其中所述处理和/或护理是减轻或预防所述环境暴露组对所述皮肤和/或毛发的不利影响; 减轻或预防含有颗粒物质的空气污染对所述皮肤和/或毛发的不利影响; 减轻或预防阳光对所述皮肤和/或毛发的不利影响; 减轻或预防染色对毛发的不利影响; 和/或维持和/或改善所述皮肤的物理屏障功能。

56. 根据权利要求55所述的处理和/或护理的方法,其中所述施用是局部的。

红小豆的蛋白质水解产物及其美容用途

技术领域

[0001] 本发明涉及从红小豆获得的蛋白质水解产物以及它们的用途,特别是在皮肤和/或毛发的美容处理和/或护理中的用途。蛋白质水解产物可用于保护皮肤和/或毛发免受环境暴露组的不利影响,包括由空气污染和/或阳光引起的不利影响。此外,蛋白质水解产物可用于保护毛发免受化学应力和热应力,例如由个人护理方案引起的化学应力和热应力。还公开了制备蛋白质水解产物的方法。

背景技术

[0002] 个体在一生中所暴露的外在因素的总和被称为环境暴露组。皮肤的外观、毛发的外观和衰老受到内在因素和外在因素的联合作用的影响。负面影响皮肤和毛发的内在因素包括例如实足年龄、人的遗传组成和皮肤内发生的其他生物学变化。几十年来,已经忽略了对皮肤和毛发的外在损伤因素。然而,越来越多的证据表明环境暴露组可能对皮肤和毛发外观具有不利影响[Vierkötter A1等人,Airborne particle exposure and extrinsic skin aging.J Invest Dermatol.2010;以及Paarado C等人,“Environmental Stressors on Skin Aging.Mechanistic insights”,Front Pharmacol.2019;10:759,2019年7月9日出版,doi:10.3389/fphar.2019.00759]。

[0003] 与环境暴露组相关的外在因素的示例包括暴露于太阳发出的紫外(UV)线、由诸如TV/计算机/智能电话屏幕的设备发出的高能可见光(紫-蓝)、以及在诸如烟雾和香烟烟雾的大气污染中存在的有害化学试剂。

[0004] 紫外线(UV)照射是对皮肤和头发的外观具有不利影响的主要外在因素之一。外在衰老已被认为主要是太阳照射暴露(也称为光衰老)的结果。

[0005] 在深入研究污染对健康的影响之后,对污染对皮肤和毛发外观的有害作用的认识已经增加[Vierkötter A等人,Airborne particle exposure and extrinsic skin aging.J Invest Dermatol.2010]。另外,已知各种污染物对皮肤和毛发的不利影响可由于它们与UV照射的相互作用而被放大[Drakaki E等人,Air pollution and the skin.Front.Environ.Sci.,2014]。例如,众所周知,皮肤的主要作用是在宿主和环境之间形成屏障。皮肤必须保护有机体免受化学品、紫外线、机械伤害和病原微生物的损伤。皮肤也必须提供有效的防止水和电解质流失的渗透屏障。[Feingold K,Elias P.The important role of lipids in the epidermis and their role in the formation and maintenance of the cutaneous barrier.Biochim Biophys Acta.2014]空气污染物可能对皮肤的功能具有主要影响。在角质层脂质代谢或角化细胞的蛋白质组分中,干扰皮肤屏障功能的改变不利地影响皮肤外观。空气污染物可通过氧化损伤诱导对人皮肤的脂质、DNA和/或蛋白质的正常功能的严重干扰[Eleni Drakaki,Clio Dessinioti和Christina V.Antoniou.Air pollution and the skin.Front.Environ.Sci.,2014]。

[0006] 此外,自1880年以来,温室气体(主要是二氧化碳)的持续人为排放已导致地球温度增加了1℃还多,大部分升温发生在最近45年[美国国家航空航天局(National

Aeronautics and Space Administration.) NASA ozone watch.2020b[2020年4月4日引用]。可从https://ozonewatch.gsfc.nasa.gov/facts/history_SH.html获得]。因此,尽管太阳照射和污染物是环境暴露组的两个重要组成部分,其他环境因素例如温室气体和温度(它们影响所有生化反应)也是高度相关的。

[0007] 上述外在因素可导致反应性氧化物质(ROS)的高产生。在皮肤中,ROS的产生可通过快速耗尽酶(谷胱甘肽过氧化物酶、谷胱甘肽还原酶、超氧化物歧化酶、过氧化氢酶)和非酶(维生素E、维生素C和谷胱甘肽)的抗氧化能力来影响皮肤的防御[Valacchi G等人, Cutaneous responses to environmental stressors. Ann N Y Acad Sci.2012]。在毛发中,氧化应激反应也可具有显著的负面效应。蛋白质是毛干(65%至95%)和蛋白质羰基化的主要组分,其为可显著损伤毛发的不可逆氧化蛋白质修饰。期望通过保护毛发蛋白质免受污染物的羰基化,使毛发和头皮免受城市应激。[Baraibar, Martin. Urban pollution induces irreversible carbonylation of hair proteins. Conference: IFSCC, 2018]。

[0008] 此外,皮肤,特别是毛发,也经受来自日常个人护理程序的其他应激物。对毛干的外在损伤的各种原因可以粗略地分为物理原因和化学原因。人毛干由具有中心轴向髓质和外部表皮层的皮质组成。毛发损伤的化学原因包括漂白和染发,而物理原因包括热处理(例如用直发器处理)、来自发饰的摩擦及洗涤[Lee Y等人, Comparison of hair shaft damage after chemical treatment in Asian, White European, and African hair. Int J Dermatol. 2014]。

[0009] 外在因素对皮肤和毛发的作用可以与那些与内在因素相关的作用区分开。受到环境暴露组不利影响的皮肤可能表现出更多的衰老症状,例如皱纹。受到环境暴露组不利影响的毛发可能看起来受损并且不易处理。

[0010] 从预防的观点来看,抵消环境暴露组因素(即外在因素)是特别令人感兴趣的,因为外在因素比内在因素更容易被改变。

[0011] 期望皮肤和/或毛发看上去美观上令人愉悦。非常需要发现可以保护皮肤、头皮和毛发免受环境暴露组侵袭的活性成分,例如它们每天可能暴露于其的环境的侵袭,包括由于日常个人护理程序引起的应激物。具体地讲,非常需要发现可以对皮肤和/或毛发的美容有益效果提供此类保护的此类活性成分。

[0012] US20210177733公开了用于增强皮肤自身防御由环境暴露组诱导的氧化性应激引起的自由基侵袭的组合物和方法。该组合物包含马基莓(*Aristotelia chilensis*)的叶提取物;球花醉鱼草(*Buddleja globosa*)的叶提取物;莓香果(*Ugni molinae*)的叶提取物。

[0013] 来自Greentech的**Zoryalys**[®]是一种天然活性成分“来源于几种分子:姜烯酮和姜辣素(Shogaol&Gingerol)(在阳光充足的区域生长)、木兰醇和厚朴酚(Magnolol&Honokiol)(生长在受污染的区域)和大裂叶五桠木(Pracaxi)(仿生脂类)(<https://www.greentech.fr/en/zoryalys-2/>)。ZORYALYS[®]被描述为保护毛发免受蛋白氧化,并且从毛发纤维的表层到中心具有活性,从而允许完全保护毛发免受环境暴露组侵袭。该活性物质被描述为通过维持角蛋白完整性来维持头发的机械性能并改善健康且漂亮头发的头发光泽。

[0014] 通过模拟胃肠消化从挤压红小豆蛋白释放的表现出抗炎活性的肽公开于Zhensheng Shi等人,“Peptides released from extruded adzuki bean protein through

simulated gastrointestinal digestion exhibit anti-inflammatory activity”, J.Agric.Food Chem.2021,69,7028-7036中。

[0015] 仍然需要可保护皮肤和/或毛发免受环境暴露组诱导的氧化应激的替代性植物基活性组合物。仍需要当暴露于环境暴露组时可保护/维持/改善皮肤和/或毛发的美容性质的替代性植物基活性组合物。

[0016] 本发明着手满足上文确定的一些或全部需求,并且着手解决上文确定的一些或全部问题。

发明内容

[0017] 在第一方面,本发明涉及一种红小豆蛋白质水解产物,其包含至少一种选自以下的化合物(即,1、2、3或4种化合物):

[0018] (i)Val-Ala-Glu-Gln-Glu-Gln-Glu-Gln-Ala-Lys-Arg-Gln(SEQ ID No.1);

[0019] (ii)Leu-Pro-Gln-Gln-Glu-Gln-Gly-His-Asp-Arg(SEQ ID No.2);

[0020] (iii)Val-Asp-Ala-Gln-Pro-Glu-Glu-Gln-Gln-Arg(SEQ ID No.3);以及

[0021] (iv)Gly-Ile-Asn-Ala-Glu-Asn-Asn-Gln-Arg-Asn(SEQ ID No.4)。

[0022] 蛋白质水解产物可另外包含以下化合物:

[0023] (v)Glu-Tyr-Thr-Gly-Asp-Ala-Ala-Gly-Arg(SEQ ID No.5)。

[0024] 已经发现本发明的蛋白质水解产物可用于减轻或预防环境暴露组对皮肤和/或毛发的不利影响。对皮肤和/或毛发的不利影响包括由空气污染和/或阳光引起的那些不利影响。对毛发的不利影响还包括由于化学处理(例如染色)和物理处理(例如由辅助定型器具(例如吹风机或直发器)而导致的那些不利影响。对毛发的不利影响可表现为以下形式的毛发:受损;不易处理;具有更多的分叉;具有减少的纤维排列;具有增加的卷曲;和/或含水更少。对皮肤的不利影响可表现为以下形式:屏障功能降低;皮肤的暗淡外观;皮肤的增亮、亮度和/或光泽的损失;皮肤肌理均匀性的损失;皮肤粗糙度的增加;出现暗斑;和/或红斑(皮肤发红)。

[0025] 在另一方面,本发明涉及选自以下的化合物:

[0026] (i)Val-Ala-Glu-Gln-Glu-Gln-Glu-Gln-Ala-Lys-Arg-Gln(SEQ ID No.1);

[0027] (ii)Leu-Pro-Gln-Gln-Glu-Gln-Gly-His-Asp-Arg(SEQ ID No.2);

[0028] (iii)Val-Asp-Ala-Gln-Pro-Glu-Glu-Gln-Gln-Arg(SEQ ID No.3);

[0029] (iv)Gly-Ile-Asn-Ala-Glu-Asn-Asn-Gln-Arg-Asn (SEQ ID No.4);

[0030] (v)Glu-Tyr-Thr-Gly-Asp-Ala-Ala-Gly-Arg(SEQ ID No.5),以及

[0031] 它们的立体异构体和美容上可接受的盐。令人惊奇的是,已经发现这些化合物表现出优异的抗氧化活性。不受理论的束缚,据信这些化合物的这种优异的抗氧化活性有助于蛋白质水解产物如本文所述发挥作用的能力。

[0032] 在一个方面,本发明涉及根据本发明第一方面的蛋白质水解产物与通过微生物明串珠菌(*Leuconostoc*)发酵萝卜(*Raphanus sativus*)根获得的滤液的组合。已经发现这种组合导致针对抗氧化活性的协同效应。本发明还延伸至选自以下的化合物的组合:

[0033] (i)Val-Ala-Glu-Gln-Glu-Gln-Glu-Gln-Ala-Lys-Arg-Gln(SEQ ID No.1);

[0034] (ii)Leu-Pro-Gln-Gln-Glu-Gln-Gly-His-Asp-Arg(SEQ ID No.2);

[0035] (iii)Val-Asp-Ala-Gln-Pro-Glu-Glu-Gln-Gln-Arg(SEQ ID No.3);
[0036] (iv)Gly-Ile-Asn-Ala-Glu-Asn-Asn-Gln-Arg-Asn(SEQ ID No.4);
[0037] (v)Glu-Tyr-Thr-Gly-Asp-Ala-Ala-Gly-Arg(SEQ ID No.5);以及
[0038] 它们的立体异构体和美容上可接受的盐、以及通过微生物明串珠菌发酵萝卜根获得的滤液。

[0039] 在一个方面,本发明涉及一种制备红小豆蛋白质水解产物的方法,其中水解产物通过以下步骤来获得:

[0040] a) 提供磨碎的红小豆在水中的悬浮液;
[0041] b) 用碱处理悬浮液,以便将磨碎的红小豆中的蛋白质溶解;
[0042] c) 用丝氨酸内切蛋白酶酶促处理在b)中获得的悬浮液;
[0043] d) 使c)中获得的悬浮液中的丝氨酸内切蛋白酶失活以形成粗水解产物;
[0044] e) 通过固/液分离来从粗水解产物回收上清液;以及
[0045] f) 从上清液中除去分子量大于3KDa的组分。

[0046] 该方法可用于制备根据本发明第一方面的蛋白质水解产物。本发明延伸至通过本文所述的红小豆蛋白质水解产物的制备方法获得的蛋白质水解产物。

[0047] 在一个方面,本发明涉及个人护理组合物或化妆品组合物,其包含至少一种美容上可接受的赋形剂或成分和根据本发明第一方面的红小豆蛋白质水解产物、或选自以下的化合物:

[0048] (i)Val-Ala-Glu-Gln-Glu-Gln-Glu-Gln-Ala-Lys-Arg-Gln(SEQ ID No.1);
[0049] (ii)Leu-Pro-Gln-Gln-Glu-Gln-Gly-His-Asp-Arg(SEQ ID No.2);
[0050] (iii)Val-Asp-Ala-Gln-Pro-Glu-Glu-Gln-Gln-Arg(SEQ ID No.3);
[0051] (iv)Gly-Ile-Asn-Ala-Glu-Asn-Asn-Gln-Arg-Asn (SEQ ID No.4);
[0052] (v)Glu-Tyr-Thr-Gly-Asp-Ala-Ala-Gly-Arg(SEQ ID No.5),以及

[0053] 它们的立体异构体和美容上可接受的盐、或所述化合物与通过微生物明串珠菌发酵萝卜根获得的滤液的组合。

[0054] 在一个方面,本发明涉及使用根据本发明第一方面的红小豆蛋白质水解产物、或选自以下的化合物:

[0055] (i)Val-Ala-Glu-Gln-Glu-Gln-Glu-Gln-Ala-Lys-Arg-Gln(SEQ ID No.1);
[0056] (ii)Leu-Pro-Gln-Gln-Glu-Gln-Gly-His-Asp-Arg(SEQ ID No.2);
[0057] (iii)Val-Asp-Ala-Gln-Pro-Glu-Glu-Gln-Gln-Arg(SEQ ID No.3);
[0058] (iv)Gly-Ile-Asn-Ala-Glu-Asn-Asn-Gln-Arg-Asn- (SEQ ID No.4);
[0059] (v)Glu-Tyr-Thr-Gly-Asp-Ala-Ala-Gly-Arg(SEQ ID No.5),以及

[0060] 它们的立体异构体和美容上可接受的盐、或所述化合物与通过微生物明串珠菌发酵萝卜根获得的滤液的组合,用于处理和/或护理皮肤和/或毛发。具体地讲,皮肤和/或毛发的处理和/或护理是美容的和非治疗性的。

[0061] 在一个方面,本发明涉及处理和/或护理皮肤和/或毛发的方法,该方法包括将根据本发明第一方面的红小豆蛋白质水解产物或选自以下的化合物:

[0062] (i)Val-Ala-Glu-Gln-Glu-Gln-Glu-Gln-Ala-Lys-Arg-Gln(SEQ ID No.1);
[0063] (ii)Leu-Pro-Gln-Gln-Glu-Gln-Gly-His-Asp-Arg(SEQ ID No.2);

[0064] (iii)Val-Asp-Ala-Gln-Pro-Glu-Glu-Gln-Gln-Arg (SEQ ID No.3);

[0065] (iv)Gly-Ile-Asn-Ala-Glu-Asn-Asn-Gln-Arg-Asn (SEQ ID No.4);

[0066] (v)Glu-Tyr-Thr-Gly-Asp-Ala-Ala-Gly-Arg (SEQ ID No.5), 以及

[0067] 它们的立体异构体和美容上可接受的盐、或所述化合物与通过微生物明串珠菌发酵萝卜根获得的滤液的组合,施用于受试者。处理和/或护理包括:减轻或预防环境暴露组对皮肤和/或毛发的不利影响;减轻或预防空气污染对皮肤和/或毛发的不利影响;减轻或预防阳光对皮肤和/或毛发的不利影响;减轻或预防化学处理对毛发的不利影响;减轻或预防热应力对毛发的不利影响;和/或维持和/或改善皮肤的物理屏障功能。

具体实施方式

[0068] 本发明基于发现红小豆蛋白质水解产物的令人惊讶的特性,该特性使蛋白质水解产物适用于皮肤和/或毛发的美容、非治疗性应用。

[0069] 定义

[0070] 在本发明的上下文中,“皮肤”应理解为包括皮肤、从最上层或角质层到最下层或下皮层(包括两者)的层。这些层由不同类型的细胞构成,诸如角质形成细胞、成纤维细胞、黑素细胞、和/或脂肪细胞等。在本发明的上下文中,术语“皮肤”包括头皮。术语“皮肤”包括哺乳动物的皮肤,例如人的皮肤,并且包括附有毛发的皮肤。

[0071] 在本发明的上下文中,“毛发”包括受试者的头皮、皮肤、睫毛、眉毛、小胡子区域和/或胡须区域的毛发。

[0072] 如在本说明书的上下文中使用的术语“处理”,当伴随着限定条件“美容”时,其意指处理是非治疗性的并且具有改善皮肤和/或毛发的美容外观的目的,并且包括改善皮肤和/或毛发的特性,例如但不限于水合水平、弹性、紧实度、光泽、肤色或肌理,这些特性影响皮肤和/或毛发的美容外观。术语“护理”在本说明书的上下文中是指维持皮肤和/或毛发的特性。皮肤和/或毛发的特性通过在健康受试者以及存在皮肤和/或毛发的疾病和/或病症(例如但不限于皮肤溃疡和损伤、牛皮癣、皮炎、痤疮或酒渣鼻、脱发等)的那些受试者中的美容处理和/或护理来改善和维持。

[0073] 用于本发明的术语“预防”是指本发明的活性预防、延缓或阻止对皮肤和/或毛发的不利影响的症状或表现的出现或发展的能力。用于本发明的术语“减轻”是指本发明的活性减少或减轻对皮肤和/或毛发的不利影响的症状或表现的能力。

[0074] 如本文所用,术语“约”,例如当指可测量的值(诸如特定组分的量或重量或温度)时,是指指定量的 $\pm 20\%$ 、 $\pm 10\%$ 、 $\pm 5\%$ 、 $\pm 1\%$ 、 $\pm 0.5\%$ 或特别是 $\pm 0.1\%$ 的变化。

[0075] 如本文所用,术语“包含”或“包括”(其是包含性的或开放式的并且不排除附加的未列举的元素或方法步骤)旨在以另选实施方案的形式涵盖短语“基本上由……组成”和“由……组成”,其中“由……组成”排除未指定的任何元素或步骤并且“基本上由……组成”允许包括不实质上影响所考虑的组合物或方法的本质或基本和新颖特征的附加的未列举的元素或步骤。

[0076] 在本说明书中,用于氨基酸的缩写遵循《欧盟生物化学期刊(Eur.J.Biochem.)》,(1984),138,9-37中规定的IUPAC-IUB生化命名委员会的规则。因此,例如,Gly表示 $\text{NH}_2\text{-CH}_2\text{-COOH}$,Gly-表示 $\text{NH}_2\text{-CH}_2\text{-CO-}$, -Gly表示 $\text{-NH-CH}_2\text{-COOH}$,并且 -Gly-表示 $\text{-NH-CH}_2\text{-CO-}$ 。因此,代

表肽键的连字符在位于符号右侧时,消除了氨基酸的1-羧基基团中的OH(在此以常规非电离形式表示),并且在位于符号左侧时,消除了氨基酸的2-氨基基团中的H;两种修改均可以应用于同一符号(参见下表)。

氨基酸残基的结构和它们的单字母和三字母代码命名			
名称	残基	符号	残基
天冬氨酰 -Asn- N		谷氨酰胺酰 -Gln- Q	
组氨酰 -His- H		甘氨酰 -Gly- G	
赖氨酰 -Lys- K		酪氨酰 -Tyr- Y	
亮氨酰 -Leu- L		天冬氨酰 -Asp- D	
谷氨酰 -Glu- E		异亮氨酰 -Ile- I	
缬氨酰 -Val- V		精氨酰 -Arg- R	
苏氨酰 -Thr- T		脯氨酰 -Pro- P	
丙氨酰 -Ala- A			

[0078] 红小豆蛋白质水解产物及其制备方法

[0079] 在第一方面,本发明涉及红小豆蛋白质水解产物。

[0080] 红小豆也被称为赤豆,并且是最初生长在中国和接近西藏的高纬度地带的豆类,并且因为它富含蛋白质(百分比>20%)而在世界范围内被消费。赤豆还被称为红豆(日语:小豆(アズキ),azuki,アヅキ,adzuki)、红小豆或红色绿豆。

[0081] 蛋白质水解产物是由蛋白质的水解降解获得的片段混合物,并且包含例如游离氨基酸和不同分子量及组成的肽。本发明的蛋白质水解产物可从红小豆蛋白的酶促水解获得。

- [0082] 蛋白质水解产物包含至少一种选自以下的化合物(即,1、2、3或4种化合物):
- [0083] (i)Val-Ala-Glu-Gln-Glu-Gln-Glu-Gln-Ala-Lys-Arg-Gln(SEQ ID No.1);
- [0084] (ii)Leu-Pro-Gln-Gln-Glu-Gln-Gly-His-Asp-Arg(SEQ ID No.2);
- [0085] (iii)Val-Asp-Ala-Gln-Pro-Glu-Glu-Gln-Gln-Arg(SEQ ID No.3);以及
- [0086] (iv)Gly-Ile-Asn-Ala-Glu-Asn-Asn-Gln-Arg-Asn(SEQ ID No.4)。
- [0087] 因此,蛋白质水解产物可包含:
- [0088] (i)Val-Ala-Glu-Gln-Glu-Gln-Glu-Gln-Ala-Lys-Arg-Gln(SEQ ID No.1);以及
- [0089] (ii)Leu-Pro-Gln-Gln-Glu-Gln-Gly-His-Asp-Arg(SEQ ID No.2)。
- [0090] 蛋白质水解产物可包含:
- [0091] (iii)Val-Asp-Ala-Gln-Pro-Glu-Glu-Gln-Gln-Arg(SEQ ID No.3);以及
- [0092] (iv)Gly-Ile-Asn-Ala-Glu-Asn-Asn-Gln-Arg-Asn(SEQ ID No.4);
- [0093] 蛋白质水解产物可包含:
- [0094] (i)Val-Ala-Glu-Gln-Glu-Gln-Glu-Gln-Ala-Lys-Arg-Gln(SEQ ID No.1);
- [0095] (iii)Val-Asp-Ala-Gln-Pro-Glu-Glu-Gln-Gln-Arg(SEQ ID No.3);以及
- [0096] (iv)Gly-Ile-Asn-Ala-Glu-Asn-Asn-Gln-Arg-Asn(SEQ ID No.4)。
- [0097] 蛋白质水解产物可包含:
- [0098] (ii)Leu-Pro-Gln-Gln-Glu-Gln-Gly-His-Asp-Arg(SEQ ID No.2);
- [0099] (iii)Val-Asp-Ala-Gln-Pro-Glu-Glu-Gln-Gln-Arg(SEQ ID No.3);以及
- [0100] (iv)Gly-Ile-Asn-Ala-Glu-Asn-Asn-Gln-Arg-Asn(SEQ ID No.4)。
- [0101] 蛋白质水解产物可包含:
- [0102] (i)Val-Ala-Glu-Gln-Glu-Gln-Glu-Gln-Ala-Lys-Arg-Gln(SEQ ID No.1);
- [0103] (ii)Leu-Pro-Gln-Gln-Glu-Gln-Gly-His-Asp-Arg(SEQ ID No.2);
- [0104] (iii)Val-Asp-Ala-Gln-Pro-Glu-Glu-Gln-Gln-Arg(SEQ ID No.3);以及
- [0105] (iv)Gly-Ile-Asn-Ala-Glu-Asn-Asn-Gln-Arg-Asn(SEQ ID No.4)。
- [0106] 蛋白质水解产物,特别是具有上文给定标记为(i)、(ii)、(iii)或(iv)的化合物的任何组合的蛋白质水解产物,可以另外包含以下化合物:
- [0107] (v)Glu-Tyr-Thr-Gly-Asp-Ala-Ala-Gly-Arg(SEQ ID No.5)。
- [0108] 已经发现上文标记为(i)至(v)的每种化合物具有优异的抗氧化活性。不受理论的束缚,据信这种活性有助于本发明的蛋白质水解产物所表现出的有利的皮肤/毛发处理和/或护理特性。
- [0109] 当存在于蛋白质水解产物中时,上文标记为(i)至(v)的这些化合物各自以0.001ppm至0.15ppm或0.005ppm至0.08ppm的量存在于蛋白质水解产物中。当存在于蛋白质水解产物中时,上文标记为(i)的化合物可以0.001ppm至0.1ppm、0.005ppm至0.05ppm、或0.01ppm至0.03ppm的量存在于蛋白质水解产物中。当存在于蛋白质水解产物中时,上文标记为(ii)的化合物可以0.001ppm至0.1ppm、0.005ppm至0.05ppm、或0.015ppm至0.04ppm的量存在于蛋白质水解产物中。当存在于蛋白质水解产物中时,上文标记为(iii)的化合物可以0.001ppm至0.1ppm、0.005ppm至0.05ppm、或0.01ppm至0.03ppm的量存在于蛋白质水解产物中。当存在于蛋白质水解产物中时,上文标记为(iv)的化合物可以0.005ppm至0.15ppm、0.01ppm至0.1ppm、或0.03ppm至0.08ppm的量存在于蛋白质水解产物中。当存在于蛋白质水

解产物中时,上文标记为(v)的化合物可以0.001ppm至0.15ppm、0.001ppm至0.01ppm、或0.003ppm至0.008ppm的量存在于蛋白质水解产物中。

[0110] 蛋白质水解产物可具有小于或等于3kDa的分子量。因此,蛋白质水解产物可不含分子量大于3kDa的任何组分,即,其可不含分子量大于3kDa的组分。这可以通过过滤水解产物来实现。

[0111] 蛋白质水解产物可通过如下方式来获得:用碱处理磨碎的红小豆在水中的悬浮液以溶解磨碎的红小豆中的蛋白质,用丝氨酸内切蛋白酶处理所得悬浮液,使悬浮液中的丝氨酸内切蛋白酶失活以形成粗水解产物,并纯化粗水解产物。在这种情况下,在悬浮液(红小豆中的蛋白质已经溶解于其中的磨碎的红小豆在水中的悬浮液)中,而不是在任何形式的分离蛋白质上进行磨碎的红小豆中的蛋白质的酶促水解。纯化可包括从粗水解产物中除去分子量大于3kDa的任何组分。本发明的蛋白质水解产物是该方法的纯化产物。该方法可以不包括从磨碎的红小豆中分离蛋白质和对分离的蛋白质进行酶促水解的步骤。该方法可以不包括将分离自红小豆的蛋白质进行酶促水解,因此蛋白质水解产物将包含除蛋白质片段以外的组分,例如多酚和其他有机化合物。

[0112] 具体地讲,蛋白质水解产物可以每毫升蛋白质水解产物至少0.05mg多酚、特别是每毫升蛋白质水解产物至少0.15mg多酚的量包含多酚。具体地讲,多酚的量可以为0.05mg/mL至0.30mg/mL,更特别地为0.15mg/mL至0.25mg/mL。多酚的量可以通过福林-西奥卡特(Folin-Ciocalteu)方法来测量,并且可以特别地表示为mg没食子酸当量/mL蛋白质水解产物。福林-西奥卡特(Folin-Ciocalteu)方法是用于分析源自植物的组合物的技术人员熟知的方法,并且在文献中得到广泛描述(例如Lamuela-Raventós,“Folin-Ciocalteu method for the measurement of total phenolic content and antioxidant capacity”2018, Measurement of Antioxidant Activity&Capacity:Recent Trends and Applications)。另选地,蛋白质水解产物可包含多酚,其量为至少2mg多酚/g蛋白质水解产物(以干重计),特别是至少6mg/g。具体地讲,多酚的量可以为2mg/g至12mg/g,更特别地为6mg/g至9mg/g。多酚是指天然存在的有机化合物,其特征在于存在多个酚单元。多酚包括例如类黄酮、鞣酸和鞣花单宁。

[0113] 蛋白质水解产物可具有2mg至5mg的干重;19w/w%至35w/w%的蛋白质含量;74%至80%的DPPH活性;以及0.05mg/mL至0.30mg/mL或2mg/g至12mg/g的多酚含量。

[0114] 蛋白质水解产物可根据以下步骤制备:a)至d)以获得粗水解产物,随后纯化该粗水解产物。

[0115] 步骤a)包括提供磨碎的红小豆在水中的悬浮液。红小豆是生红小豆。磨碎的红小豆可以通过将红小豆磨碎成粉而得到。可将红小豆粉过筛以除去较大的碎片。典型地,磨碎的红小豆具有小于250微米的粒度。

[0116] 步骤b)包括用碱处理磨碎的红小豆在水中的悬浮液,以便将磨碎的红小豆的蛋白质溶解在水中。该步骤的目的是增加溶解在悬浮液中的蛋白质含量。通常,该步骤包括将悬浮液的pH调节至约6.5至约pH7.5的pH,例如调节至为7的pH。悬浮液的pH影响悬浮液中蛋白质的量和类型。这可以通过将碱如NaOH加入到磨碎的红小豆在水中的悬浮液中来实现。典型地,步骤b)在室温下进行,即,在 $22\pm 2^{\circ}\text{C}$ 下进行。在将碱加入到磨碎的红小豆的悬浮液之后,在步骤c)之前,将悬浮液在室温下维持一段时间,通常为1小时。

[0117] 步骤c) 包括用丝氨酸内切蛋白酶(也称为丝氨酸内肽酶)酶促处理步骤b) 中获得的悬浮液。丝氨酸内切蛋白酶可以是枯草杆菌蛋白酶A。枯草杆菌蛋白酶A(分类为EC 3.4.21.62, 肽酶家族S8) 也被称为枯草溶菌素(Subtilisin Carlsberg)、枯草杆菌蛋白酶A、**Alcalase**[®]、ALK-酶、地衣芽孢杆菌蛋白酶A(bacillopeptidase A)、枯草芽孢杆菌碱性蛋白酶、枯草杆菌产蛋白酶、枯草杆菌产蛋白酶AL、粘菌素(colistinase)、基因酶I(genenaseI)、**Esperase**[®]、maxatase、蛋白酶XXVII、热酶(thermoase)、superase、枯草杆菌蛋白酶DY、枯草杆菌蛋白酶(subtilopeptidase)、SP 266、**Savinase**[®]、kzusase、蛋白酶VIII、蛋白质A 3L、orientase 10B或蛋白酶S。枯草杆菌蛋白酶A通常得自地衣芽孢杆菌(*Bacillus licheniformis*)。步骤c) 在20℃至30℃的温度下进行, 并且可以在23℃至27℃的温度下或在约25℃的温度下进行。步骤c) 可进行例如约30分钟至约120分钟、约45分钟至约90分钟、或约60分钟的时间。通常, 磨碎的红小豆中每g蛋白质的酶活性为0.1AU/g至0.5AU/g。AU表示安森单位(Anson Unit)。安森单位是酶浓度的单位, 其定义为在标准条件(25℃和pH 7.50) 下能够以与一毫当量的酪氨酸相同的初始速率消化尿素变性的血红蛋白的酶量。典型地, 磨碎的红小豆中的蛋白质的百分比为15%w/w至25%w/w。典型地, 磨碎的红小豆在水中的浓度为20g-100g(磨碎的红小豆)/Kg(水)。

[0118] 步骤d) 包括使酶失活以得到粗分离物。在步骤c) 期间, 监测悬浮液(经历酶促水解)的pH。pH的下降与肽片段的释放和随后酸性羧酸的积累有关。典型地, 在步骤c) 期间, 经历酶促水解的悬浮液发生轻微的酸化, 导致例如0.2至0.3pH单位的下降。在酶促水解步骤c) 之后, 通过将c) 中获得的悬浮液的温度升高至至少70℃、或70℃至90℃、或75℃至85℃来使酶失活。步骤c) 中获得的悬浮液可以在该温度下保持一段时间来获得, 优选持续至少约20分钟。步骤d) 的产物是粗水解产物。

[0119] 然后对步骤d) 的粗水解产物进行纯化以除去分子量大于3kDa的任何组分。这可以通过固/液分离(步骤e)) 和超滤(步骤f)) 来实现。步骤e) 是纯化步骤并且包括通过固/液分离来从粗水解产物中除去固体物质。合适的分离技术是本领域已知的, 并且包括例如过滤、沉降、倾析和/或离心。可使用孔径小于1000μm、或小于20μm、或小于10μm、或小于1μm、或小于0.1μm的过滤器进行过滤。过滤可以在连续过滤操作中进行, 例如使用孔径逐渐减小的过滤器。步骤f) 也是纯化步骤并且包括超滤以从步骤e) 中获得的上清液中除去具有大于3kDa的分子量的片段。超滤是本领域熟知的技术, 并且包括使用膜来分离具有不同分子量的分子, 在这种情况下具有3kDa的截断阈值。

[0120] 本发明延伸至通过上述方法获得的蛋白质水解产物。

[0121] 本发明延伸至选自以下的化合物:

[0122] (i) Val-Ala-Glu-Gln-Glu-Gln-Glu-Gln-Ala-Lys-Arg-Gln(SEQ ID No.1);

[0123] (ii) Leu-Pro-Gln-Gln-Glu-Gln-Gly-His-Asp-Arg(SEQ ID No.2);

[0124] (iii) Val-Asp-Ala-Gln-Pro-Glu-Glu-Gln-Gln-Arg(SEQ ID No.3);

[0125] (iv) Gly-Ile-Asn-Ala-Glu-Asn-Asn-Gln-Arg-Asn(SEQ ID No.4); 以及

[0126] (v) Glu-Tyr-Thr-Gly-Asp-Ala-Ala-Gly-Arg(SEQ ID No.5)。

[0127] 已经发现上文标记为(i) 至(v) 的每种化合物具有优异的抗氧化活性。不受理论的束缚, 据信这种活性有助于本发明的蛋白质水解产物所表现出的有利的皮肤/毛发处理和/或护理特性。

[0128] 本发明还延伸至根据本发明第一方面的蛋白质水解产物与通过微生物明串珠菌发酵萝卜根获得的滤液的组合。

[0129] 本发明延伸至选自以下的化合物的组合：

[0130] (i) Val-Ala-Glu-Gln-Glu-Gln-Glu-Gln-Ala-Lys-Arg-Gln (SEQ ID No.1)；

[0131] (ii) Leu-Pro-Gln-Gln-Glu-Gln-Gly-His-Asp-Arg (SEQ ID No.2)；

[0132] (iii) Val-Asp-Ala-Gln-Pro-Glu-Glu-Gln-Gln-Arg (SEQ ID No.3)；

[0133] (iv) Gly-Ile-Asn-Ala-Glu-Asn-Asn-Gln-Arg-Asn (SEQ ID No.4)；

[0134] (v) Glu-Tyr-Thr-Gly-Asp-Ala-Ala-Gly-Arg (SEQ ID No.5)；以及

[0135] 它们的立体异构体和美容上可接受的盐、以及通过微生物明串珠菌发酵萝卜根获得的滤液。

[0136] 该利用微生物明串珠菌发酵萝卜根而得到的滤液含有抗菌肽并且作为防腐剂发挥作用。通过微生物明串珠菌发酵萝卜根获得的商业滤液的一个示例是来自Active Micro Technologies LCC的 **Leucidal**[®] (INCI名称:明串珠菌/萝卜根发酵滤液)。最优选的明串珠菌菌种是泡菜明串珠菌 (*Leuconostoc kimchi*)。 **Leucidal**[®] 典型地用作防腐剂。已经发现,在该滤液的存在下,本发明的蛋白质水解产物的抗氧化活性得到出乎意料地增强。

[0137] 组合物

[0138] 本发明包括组合物,其可以是个人护理组合物或化妆品组合物,并且其包含如本文所述的蛋白质水解产物以及至少一种美容上可接受的赋形剂或助剂。本发明延伸至一种组合物,其可以是个人护理组合物或化妆品组合物,并且其包含:如本文所述的蛋白质水解产物与通过微生物明串珠菌发酵萝卜根获得的滤液的组合;以及至少一种美容上可接受的赋形剂或助剂。本发明延伸至可以是个人护理组合物或化妆品组合物的组合物,其包含选自以下的化合物:

[0139] (i) Val-Ala-Glu-Gln-Glu-Gln-Glu-Gln-Ala-Lys-Arg-Gln (SEQ ID No.1)；

[0140] (ii) Leu-Pro-Gln-Gln-Glu-Gln-Gly-His-Asp-Arg (SEQ ID No.2)；

[0141] (iii) Val-Asp-Ala-Gln-Pro-Glu-Glu-Gln-Gln-Arg (SEQ ID No.3)；

[0142] (iv) Gly-Ile-Asn-Ala-Glu-Asn-Asn-Gln-Arg-Asn (SEQ ID No.4)；

[0143] (v) Glu-Tyr-Thr-Gly-Asp-Ala-Ala-Gly-Arg (SEQ ID No.5), 以及

[0144] 它们的立体异构体和美容上可接受的盐、以及至少一种美容上可接受的赋形剂或助剂。本发明延伸至可以是个人护理组合物或化妆品组合物的组合物,并且其包含:选自以下的化合物的组合:

[0145] (i) Val-Ala-Glu-Gln-Glu-Gln-Glu-Gln-Ala-Lys-Arg-Gln (SEQ ID No.1)；

[0146] (ii) Leu-Pro-Gln-Gln-Glu-Gln-Gly-His-Asp-Arg (SEQ ID No.2)；

[0147] (iii) Val-Asp-Ala-Gln-Pro-Glu-Glu-Gln-Gln-Arg (SEQ ID No.3)；

[0148] (iv) Gly-Ile-Asn-Ala-Glu-Asn-Asn-Gln-Arg-Asn (SEQ ID No.4)；

[0149] (v) Glu-Tyr-Thr-Gly-Asp-Ala-Ala-Gly-Arg (SEQ ID No.5), 以及

[0150] 它们的立体异构体和美容上可接受的盐、以及通过微生物明串珠菌发酵萝卜根获得的滤液;以及至少一种美容上可接受的赋形剂或助剂。

[0151] 这些组合物可以通过本领域的技术人员已知的常规方式制备[“Harry’s Cosmetics”, 第七版, (1982), Wilkinson J.B., Moore R.J. 编辑, Longman House,

Essex,GB]。

[0152] 该组合物含有美容有效量的蛋白质水解产物或选自以下的化合物:

[0153] (i)Val-Ala-Glu-Gln-Glu-Gln-Glu-Gln-Ala-Lys-Arg-Gln(SEQ ID No.1);

[0154] (ii)Leu-Pro-Gln-Gln-Glu-Gln-Gly-His-Asp-Arg(SEQ ID No.2);

[0155] (iii)Val-Asp-Ala-Gln-Pro-Glu-Glu-Gln-Gln-Arg(SEQ ID No.3);

[0156] (iv)Gly-Ile-Asn-Ala-Glu-Asn-Asn-Gln-Arg-Asn₂(SEQ ID No.4);

[0157] (v)Glu-Tyr-Thr-Gly-Asp-Ala-Ala-Gly-Arg(SEQ ID No.5),以及

[0158] 它们的立体异构体和美容上可接受的盐,应当施用何种化合物以及它们的剂量将取决于多种因素,包括年龄、患者状态、待处理和/或护理的病况、病症或疾病的性质或严重性、施用的途径和频率、以及待使用化合物的具体性质。

[0159] 术语“化妆品上有效量”应理解为意指无毒但足以提供所需效果的本发明的提取物的量。基于个人护理组合物或化妆品组合物的总重量计,蛋白质水解产物可以至少0.001重量%,特别是约0.001重量%至10重量%,优选约0.004重量%至5重量%的量存在。

[0160] 该组合物可以是用于局部施加的组合物,其任选地包括调配所需施用形式所必需的美容上或药学上可接受的赋形剂。局部用组合物是适用于局部施加到哺乳动物角质组织(诸如皮肤或毛发)的组合物。

[0161] 用于局部或经皮应用的组合物可以任何固体、液体或半固体调配物形式制备,诸如且不限于乳膏、多重乳剂(诸如且不限于水包油和/或水包有机硅乳剂、油包水和/或有机硅乳剂、水/油/水或水/有机硅/水型乳剂以及油/水/油或有机硅/水/有机硅型乳剂)、无水组合物、水分散体、油、乳、香膏、泡沫、乳液、凝胶、乳膏凝胶、水醇溶液、水甘醇溶液、水凝胶、搽剂、浆液、肥皂、洗发水、护发素、精华液、多糖膜、软膏、摩丝、润发油、粉末、棒、笔以及喷雾剂或气雾剂(喷雾剂),包括免洗和冲洗调配物。这些局部或透皮应用调配物可以使用本领域技术人员已知的技术掺入到不同类型的固体辅料中,例如且不限于绷带、纱布、t恤、袜子、紧身衣、内衣、腰带、手套、尿布、卫生巾、敷料、床罩、抹布、粘附贴剂、非粘附贴剂、闭塞贴剂、微电贴剂或面膜,或者其可以并入到不同的化妆产品中,诸如化妆粉底(诸如液体粉底和粉饼)、卸妆液、卸妆乳、眼部遮瑕膏、眼影、口红、护唇膏、唇彩和唇粉等。

[0162] 本发明的组合物可呈选自以下的形式:乳膏、多重乳剂、溶液、液晶、无水组合物、水分散体、油、乳、香膏、泡沫、乳液、凝胶、乳膏凝胶、水醇溶液、水甘醇溶液、水凝胶、搽剂、肥皂、洗发水、护发素、精华液、多糖膜、软膏、摩丝、润发油、粉末、棒、笔、喷雾剂或气雾剂。

[0163] 本发明的组合物可以包含增加本发明化合物的经皮吸收的药剂,例如且不限于,二甲亚砜、二甲基乙酰胺、二甲基甲酰胺、表面活性剂、氮酮(1-十二烷基氮杂环庚烷-2-酮)、醇、脲、乙氧基二甘醇、丙酮、丙二醇或聚乙二醇等。

[0164] 具体地讲,组合物为局部施用,并且为毛发护理组合物,诸如调理剂、护理剂、生发剂、定型凝胶、摩丝、洗发剂、发胶、润发油、定型液、着色和持久烫发组合物。出于本发明的目的,特别令人感兴趣的是生发剂、调理剂、护理剂和定型凝胶,它们可以是凝胶、洗剂、酊剂、喷雾剂、摩丝、清洁组合物或泡沫的形式,并且可以根据个体需要施加,例如,作为洗剂、酊剂、摩丝或喷雾剂每天一次;或者作为调理剂或护理剂,每周一次或两次。特别地,本发明上下文中的合适组合物是洗剂、洗发剂、精华素或睫毛膏。具体地讲,化妆品组合物为精华素。术语“精华素”是本领域技术人员众所周知的,是指澄清的基于凝胶的组合物或液体组

合物。精华素具有流体质地,而且比标准护理产品具有浓度更高的活性剂。

[0165] 此外,该组合物可包括其他活性成分,例如抗皱剂、肉毒杆菌样剂和/或抗衰老剂;紧致剂、皮肤弹性剂和/或重构剂;保湿剂;抗光衰老剂、和/或蓝光防护剂;DNA保护剂、DNA修复剂和/或干细胞保护剂;自由基清除剂和/或抗糖化剂、解毒剂、抗氧化剂和/或防污染剂;止汗剂;黑色素合成刺激或抑制剂;美白剂或脱色剂;促色素剂;仿晒黑剂;脂解剂或刺激脂解的药剂、生脂剂等。另外的示例可以在CTFA International Cosmetic Ingredient Dictionary&Handbook,第12版(2008)中找到。

[0166] 抗皱剂、肉毒杆菌样剂和/或抗衰老剂可为 **Oxygestkin**[®] [INCI:旱金莲 (*Tropaeolum majus*) 花/叶/茎提取物] 或 **Eclaline**[™]。来自 SILAB 的 [INCI:水解羽扇豆蛋白辛烯基琥珀酸酯];司达玛 (Sederma)/禾大 (Croda) 销售的 **Matrixyl**[®] [INCI:棕榈酰基五肽-4]、**Matrixyl**[®] 3000[®] [INCI:棕榈酰基四肽-7、棕榈酰基寡肽]、**Matrixyl**[®] Synthe' 6 [INCI:甘油、水、羟丙基环糊精、棕榈酰基三肽-38]、**Matrixyl**[®] Morphomics[™] [INCI:戊二醇、辛甘醇]、**Essenskin**[™] [INCI:羟基蛋氨酸钙]、**Renovage** [INCI:替普瑞酮 (Teprenone)]、**Dermaxyl**[®] [INCI:棕榈酰基寡肽]、**Calmosensine** [INCI:丁二醇、乙酰基二肽-1鲸蜡基酯]、**Volulip** [INCI:鲸蜡硬脂醇乙基己酸酯、山梨坦异硬脂酸酯、毛马齿苋提取物、蔗糖-椰油酸酯、棕榈酰基三肽-38]、**Subliskin** [INCI:苜蓿中华根瘤菌发酵物、鲸蜡基羟乙基纤维素、卵磷脂]、生物肽 CL [INCI:棕榈酰基寡肽]、生物肽 EL [INCI:棕榈酰基寡肽]、丽晶肽 (Rigin) [INCI:棕榈酰基四肽-3]、**Biobustyl** [INCI:甘油聚甲基丙烯酸酯、拉恩氏菌/大豆蛋白发酵物、棕榈酰基寡肽]、**Dynalift** [INCI:聚磺苯乙烯钠、高粱茎汁、甘油]、**Idealift** [INCI:乙酰基二肽-1鲸蜡基酯]、**豨莶** [INCI:豨莶属提取物]、**Ovaliss** [INCI:椰油基葡萄糖苷、辛甘醇、醇、海罂粟碱]、**Juvinity**[™] [INCI:香叶基香叶醇异丙醇]、**Prolevis** [INCI:水解植物蛋白]、**Idealift**[™] [INCI:羟乙基纤维素、乙酰基二肽-1鲸蜡基酯]、**Beautifeye**[™] [INCI:合欢树皮提取物、豨莶苷]、**Chromocare**[™] [INCI:豨莶属提取物、冬凌草提取物] 或 **Resistem**[™] [INCI:提议的:心叶球花发酵物]。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**[®]-**Coll** [INCI:棕榈酰三肽-5]、**Phytaluronate** [INCI:长角豆 (*Ceratonia Siliqua*) (角豆) 胶]、**Preregen**[®] [INCI:野大豆 (*Glycine soja*) (大豆) 蛋白、氧化还原酶]、**Pepha-Nutrix** [INCI:天然营养因子]、**Pepha-Tight** [INCI:藻提取物、普鲁兰]、**Pentacare-NA** [INCI:水解小麦谷蛋白、长角豆 (*Ceratonia Siliqua*) 胶]、**Syn**[®]-**Tacks** [INCI:甘油、棕榈酰二肽-5二氨基丁酰羟基苏氨酸、棕榈酰二肽-6二氨基羟基丁酸酯]、**BeauActive MTP** [INCI:水解乳蛋白]、**Syn**[®]-**TC** [INCI:十四烷基氨基丁酰缬氨酰胺基丁酸脲三氟乙酸盐、棕榈酰三肽-5、棕榈酰二肽-5二氨基丁酰羟基苏氨酸]、**Syn**[®]-**Hycan** [INCI:十四烷基氨基丁酰缬氨酰胺基丁酸脲三氟乙酸盐]、**Syn**[®]-**Glycan** [INCI:十四烷基氨基丁酰缬氨酰胺基丁酸脲三氟乙酸盐]、**Regu-Age** [INCI:水解米糠蛋白、氧化还原酶、野大豆 (*Glycine Soja*) 蛋白]、**Pepha-Timp** [INCI:人寡肽-20]、**Pepha-Age** [INCI:盐生杜氏藻 (*Dunaliella Salina*) 提取物]、**Colhibin** [INCI:水解

大米蛋白]、Elhibin[INCI:野大豆(Glycine Soja)蛋白、椰油酰两性基二乙酸二钠]或All-Q™Plus[INCI:泛醌、生育酚乙酸酯];Laboratoires Sérobiologiques/科宁(Cognis)/巴斯夫(BASF)销售的Myoxinol™[INCI:水解咖啡黄葵(Hibiscus esculentus)提取物]、Myoxinol™LS 9736[INCI:水解咖啡黄葵(Hibiscus esculentus)提取物、糊精]、Syniorage™[INCI:乙酰基四肽-11]、Dermican™[INCI:乙酰基四肽-9]、**DN-AGE®**LS[INCI:翅荚决明(Cassia alata)叶提取物]、Hyalufix GL[INCI:大高良姜(Alpinia Galanga)叶提取物]、NeurobioX[INCI:欧蓍草(Achillea Millefolium)提取物]、Deliner[INCI:玉蜀黍(Zea Mays)(玉米)仁提取物]、Lys'lastine V[INCI:黄花前胡(Peucedanum Graveolens)(茺蔚)提取物]、Extracellium[INCI:水解马铃薯蛋白]、Proteasyl TP LS 8657[INCI:豌豆(Pisum Sativum)提取物]、Flavagrum PEG[INCI:PEG-6异硬脂酸酯、橙皮素月桂酸酯]、Micromerol[INCI:苹果(Pyrus Malus)果实提取物]、Extracellium[INCI:水解马铃薯蛋白]、Marine Filling Spheres[INCI:季戊四醇四异硬脂酸酯、二甲基甲硅烷基化硅石、硫酸软骨素钠、去端肽胶原]、Triactigen[INCI:甘露醇、环糊精、酵母提取物、琥珀酸二钠]、Eterniskin[INCI:灰树花(Grifola Frondosa)子实体提取物、麦芽糊精]、Ascotide[INCI:抗坏血酸磷酸酯琥珀酰五肽-12]、Hyalurosmooth[INCI:狭叶番泻(Cassia Angustifolia)籽多糖]、Indinyl CA[INCI:狭叶番泻(Cassia Angustifolia)籽多糖]、Arganyl[INCI:刺阿干树(Argania Spinosa)叶提取物]、Sphingoceryl Veg[INCI:植物神经酰胺]、Vit-A-Like[INCI:乌头叶豇豆(Vigna Acontifolia)籽提取物]、Peptiskin[INCI:精氨酸/赖氨酸多肽]、Prodejine[INCI:甘露醇、环糊精、酵母提取物、琥珀酸二钠]、Aqu'activ[INCI:二十二醇、甘油油酸酯、椰油酰胺MIPA、柠檬酸钙]、Elestan[INCI:甘油、人心果(Manilkara)叶提取物]、Hibiscin HP[INCI:咖啡黄葵(Hibiscus Esculentus)籽提取物]、**Collalift®**18[INCI:非洲楝(Khaya Senegalensis)树皮]、Collrepair™DG[INCI:己二醇、烟酸]或Litchiderm[INCI:荔枝(Litchi Chinensis)果皮提取物]; **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:二氨基丙酰三肽-33]、**Decorinyl®**[INCI:三肽-10瓜氨酸]、**Decorinol®**[INCI:三肽-9瓜氨酸]、**Trylagen®**[INCI:假交替单胞菌(Pseudoalteromonas)发酵产物提取物、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:乙酰基精氨酸色氨酸二苯基甘氨酸]、**Thermostressine®**[INCI:乙酰基四肽-22]、Lipochroman™[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棕榈酸酯]、**Antarcticine®**[INCI:假交替单胞菌(Pseudoalteromonas)发酵产物提取物]、**dGlyage®**[INCI:赖氨酸HCl、卵磷脂、三肽-9瓜氨酸]、Vilastene™[INCI:赖氨酸HCl、卵磷脂、三肽-10瓜氨酸]、**Hyadisine®**[INCI:假交替单胞菌(Pseudoalteromonas)发酵产物提取物]、Hyanify™

[INCI:糖类同分异构体]、**Diffuporine**[®] [INCI:乙酰基六肽-37]、**Silusyne**[®] [INCI:大豆(野大豆(Glycine Soja))油、倍半油酸山梨坦、异十六烷、透明质酸钠、月桂基二甲基铵羟丙基水解大豆蛋白、乙酰基六肽-39]、**Adifyline**[®] [INCI:乙酰基六肽-38]、**Delisens**[™] [INCI:乙酰基六肽-46]、**Telangyn**[™] [INCI:乙酰基四肽-40]、**Reproage**[™] 肽 [INCI:乙酰基六肽-8]、**Cellynkage**[™] 海洋成分 [INCI:糖类同分异构体]、**Eyedeline**[™] 海洋成分 [INCI:浮游生物提取物]、**Uplevity**[™] [INCI:乙酰基四肽-2]、**Seacode**[™] 海洋成分 [INCI:假交替单胞菌(Pseudoalteromonas) 发酵产物提取物] 或 **Serilesine**[®] 肽溶液 [INCI:六肽-10]；利普泰(Lipotec)/路博润(Lubrizol) 销售的 **Argireline**[®] Amplified [INCI:乙酰基六肽-8]、**Dawnergy**[™] [INCI:九肽-1]；Lipotruue 销售的 **Sirtalice**[™] [INCI:芽孢杆菌(Bacillus) 发酵产物]、**Epitensive**[™] [INCI:本氏烟(Nicotiana Benthiana) 六肽-40SH-寡肽-1]、**Scelleye**[™] [INCI:本氏烟(Nicotiana Benthiana) SH-寡肽-2]、**Seadermium** [INCI:含水、甘油、芽孢杆菌(Bacillus) 发酵产物]、**Pauseile** [INCI:含水、甘油、芽孢杆菌(Bacillus) 发酵产物] 或 **Neoclair pro** [INCI:含水、甘油、辛甘醇、乙酰基四肽-2]；温森斯(Vincience)/ISP/亚什兰(Ashland) 销售的 **Collaxyl**[®] IS [INCI:六肽-9]、**Laminixyl** IS[™] [INCI:七肽]、**Orsirtine**[™] GL [INCI:稻(Oryza sativa) (大米) 提取物]、**D' Orientine**[™] IS [INCI:海枣(Phoenix dactylifera) (椰枣) 籽提取物]、**Phytoquintescence**[™] [INCI:单粒小麦(一粒小麦(Triticum monococcum)) 提取物]、**Quintescence**[™] IS [INCI:二肽-4]、**Peptide Vinci 01** [INCI:十五肽-1]、**Peptide Vinci 02**[™] [INCI:六肽-3]、**Aquarize** IS[™] [INCI:水解大米提取物]、**Lanablue** [INCI:藻提取物]、**Ederline**[™] [INCI:苹果(Pyrus Malus) (苹果) 籽提取物]、**Dynachondrine**[™] ISR [INCI:水解大豆蛋白]、**Prolixir S20**[™] [INCI:二聚体三肽-43]、**Phytocohe sine**[™] PSP [INCI:β-谷甾醇硫酸酯钠、β-谷甾醇]、**Perenityl**[™] IS [INCI:西洋梨(Pyrus Communis) (梨) 籽提取物]、**Caspaline 14**[™] [INCI:六肽-42]、**Peptide Q10**[™] [INCI:五肽-34三氟乙酸盐]、**Survixyl** IS[™] [INCI:五肽-31]、**ChroN0gen**[™] [INCI:四肽-26]、**Elixiance** [INCI:柔毛肖乳香(Schinus Molle) 提取物]、**Harmoniance**[™] [INCI:莲(Nelumbo Nucifera) 花提取物]、**Serenityl** [INCI:南美牛奶藤(Marsdenia Condurango) 树皮提取物]、**Natriance Wrinkle-less** [INCI:水解玉米蛋白]、**Phytoneomatrix** [INCI:水解大豆提取物]、**Prolixir ICE** [INCI:水解大米蛋白]、**PhytoRNx Baobab**[™] [INCI:水解猴面包树(Adansonia Digitata) 提取物]、**Natriance Renovate Extract** [INCI:水解亚麻籽提取物]、**Natriance Self-Hydrate Extract** [INCI:豌豆(Pisum Sativum) 提取物]、**Actopontine YST** [INCI:水解酵母蛋白] 或 **Telosense**[™] [提议的INCI:水解大豆蛋白、水解酵母蛋白]；Infinitec Activos 销售的 **BONT-L-Peptide** [INCI:棕榈酰六肽-19]、**TIMP Peptide** [INCI:乙酰基六肽-20]、**ECM Moduline** [INCI:棕榈酰三肽-28]、**Renaissance** [INCI:水解小麦蛋白、棕榈酰十肽-21、十肽-22、寡肽-78、棕榈酰九肽-14锌] 或 **X50Antiaging** [INCI:乳酸/乙醇酸共聚物、聚乙烯醇、棕榈酰七肽-14铜、七肽-15棕榈酸酯]；Coletica/恩格尔哈德(Engelhard)/巴斯夫(BASF) 销售的 **EquiStat** [INCI:苹果(Pyrus malus) 果实提取物、野大豆(Glycine soja) 籽提取物]、**Juvenesce** [INCI:乙氧基二甘醇和辛酸甘油三酯、视黄醇、熊果酸、植物甲萘醌、伊洛马司他]、**Ursolisome** [INCI:卵磷脂、熊果

酸、去端肽胶原、黄原胶、硫酸软骨素钠]、Basaline[INCI:水解麦芽提取物]、Phytokine[INCI:水解大豆蛋白];米百乐生化公司(Mibelle Biochemistr)销售的Ameliox[INCI:肌肽、生育酚、水飞蓟(*Silybum marianum*)果提取物]或PhytoCellTec Malus Domestica[INCI:苹果(*Malus domestica*)果实细胞培养物]、Lipobelle Soyaglicane[INCI:大豆异黄酮]、RoyalEpigen P5[INCI:牛油果(*Butyrospermum Parkii*)油、氢化卵磷脂、麦芽糊精、五肽-48、苯乙醇、乙基己基甘油、甘油、含水]或DermCom[INCI:黄金番红花(*Crocus Chrysanthus*)鳞茎提取物、阿拉伯胶树(*Acacia Senegal*)胶、含水/水];Active Organics/Arch销售的ActiMatrix[INCI:基于肽的蘑菇提取物]、Peptamide 6[INCI:六肽-11];以及它们的组合。

[0167] 紧致剂、皮肤弹性剂和/或重构剂可选自由以下项组成的组:巴斯夫(BASF)销售的Argassential[INCI:C10-16烷基糖苷、二辛基醚、甘油]或Replexium BC[INCI:异山梨醇二甲醚、聚山梨酸酯20、含水、乙酰基四肽-11、乙酰基四肽-9];司达玛(Sederma)/禾大(Croda)销售的Prolevis[INCI:水解植物蛋白]或Poretect[INCI:辛酸/癸酸甘油三酯、山梨坦三油酸酯、芹菜(*Apium Graveolens*)籽提取物、亚麻(*Linum Usitatissimum*)籽提取物];利普泰(Lipotec)/路博润(Lubrizol)销售的Actifirm Ultra Advanced植物成分[INCI:积雪草(*Centella Asiatica*)提取物、迷迭香(*Rosmarinus Officinalis*)叶提取物、二丙二醇、醇、狭叶松果菊(*Echinacea Angustifolia*)叶提取物]或Actifcol Advanced植物成分[INCI:含水、甘油、柠檬酸钠、香菇(*Lentinus Edodes*)提取物、山梨酸钾、苯甲酸钠、植酸];米百乐(Mibelle)销售的DensorphinTM[INCI:穗花牡荆(*Vitex Agnus Castus*)提取物、含水、麦芽糊精]或PhytoCellTecTM **nunatak[®]** [INCI:益寿糖、含水、阿尔卑斯石竹珍珠花(*Saponaria Pumila*)愈伤组织提取物、卵磷脂];以及它们的组合。

[0168] 保湿剂可选自由以下项组成的组:Infinitec销售的qua Shuttle[INCI:山梨醇、掌状海带(*Laminaria Digitata*)提取物、硅藻土];温森斯(Vincienc) /ISP/亚什兰(Ashland)销售的Aqua-OsmolineTM [INCI:长角豆(*Ceratonia Siliqua*) (角豆)籽提取物];卢卡斯梅耶化妆品公司(Lucas Meyer Cosmetics) /Unipex销售的HydralphatineTM Asia [INCI:氢化淀粉水解物、泛醇、龙头竹笋(*Bambusa Vulgaris Shoot*)提取物、莲(*Nelumbo Nucifera*)花提取物、白睡莲(*Nymphaea Alba*)根提取物]或HydraporineTM [INCI:甜菜碱、氢化卵磷脂、蜂蜜、果胶];L.Serobiologiques/科宁(Cognis)/巴斯夫(BASF)销售的Patch20TM [INCI:海藻糖、脲、丝氨酸、甘油聚丙烯酸酯、藻胶、透明质酸钠、普鲁兰]、Aqu'activTM [INCI:二十二醇、甘油油酸酯、椰油酰胺MIPA]、**Irwinol[®]** [INCI:辛基十二烷醇、野生芒果(*Irvingia Gabonensis*)果仁脂、氢化椰油甘油混合酯]、**Lipodermol[®]** [INCI:辛基十二烷醇、花生醇丙酸酯、生育酚乙酸酯、棕榈酸视黄酯、亚油酸乙酯、亚麻酸乙酯]或**Seanamin[®]** SU [INCI:山梨醇、藻提取物、皱波角叉菜(*Chondrus Crispus*) (角叉菜胶)、墨角藻(*Fucus Vesiculosus*)提取物、藻胶];米百乐(Mibelle)销售的雪藻粉(Snow Algae Powder) [INCI:雪藻(*Coenochloris Signiensis*)提取物];Pentapharm/DSM销售的Hyasol BT [INCI:透明质酸钠]、Syn-UpTM [INCI:苄基磺酰基D-丝氨酰高苯丙氨酸脒基苯甲酰胺乙酸盐]或**Pentavitin[®]** [INCI:糖类同分异构体];司达玛(Sederma)/禾大(Croda)销售的AqualanceTM [INCI:赤藓糖醇、龙虾肌碱盐酸盐]、HydraprotectolTM [INCI:甘油聚甲基丙烯酸酯、紫胶桐

酸、酵母提取物 (Faex)、糖蛋白]、Moist 24TM [INCI: 白茅 (*Imperata Cylandrica*) 根提取物]、Optim HyalTM [INCI: 水解酵母提取物、鲸蜡基羟乙基纤维素、聚葡萄糖醛酸]、**Osmocide**[®] 4 [INCI: 甘油、丙烯酸酯/C10-30烷基丙烯酸酯交联聚合物] 或 RevidrateTM [INCI: 棕榈酸乙基己酯、油酸山梨坦、月桂酸山梨坦、肉豆蔻基苹果酸酯磷酸]; 利普泰 (Lipotec) / 路博润 (Lubrizon) 销售的 **Xpertmoist**[®] 分子膜 [INCI: 甘油、假交替单胞菌 (*Pseudoalteromonas*) 发酵产物提取物、黄原胶、脯氨酸、丙氨酸、丝氨酸、乙基己基甘油、辛甘醇] 或 Actizyme GL advanced 植物成分 [INCI: 甘油、米赫毛霉 (*Mucor miehei*) 提取物、含水、柠檬酸钠、山梨酸钾、苯甲酸钠、植酸]; 以及它们的组合。

[0169] 抗光老化剂和/或蓝光防护剂可选自由以下项组成的组: 碧高科 (Greenaltech) 销售的 Algaktiv Genofix CPD [INCI: 浮游生物提取物、含水、卵磷脂]; 亚什兰 (Ashland) 销售的 BlumilightTM Biofunctional [提议的 INCI: 水/含水 (和) 丁二醇 (和) 可可 (*Theobroma Cacao*) (可可树) 籽提取物]; 巴斯夫 (BASF) 销售的 Lys' Sun [INCI: 北美金缕梅 (*Hamamelis Virginiana*) 叶提取物、含水、戊二醇、辛甘醇、黄原胶]; 意迪那 (Indena) 销售的 Vitachelox [INCI: 葡萄 (*Vitis Vinifera*) 籽提取物、茶 (*Camellia Sinensis*) 叶提取物、夏栎 (*Quercus Robur*) 木提取物]; Freshine Bio-technology 销售的 L-VCG [INCI: 抗坏血酸葡萄糖苷]; 利普泰 / 路博润 销售的 **Lumicease**[®] 蓝色成分 [INCI: 甘油、含水、水解豌豆蛋白、葡萄糖、氯化钠]; Naolys 公司销售的 Lightwaves Defense [JS+M] [INCI: 茉莉 (*Jasminum Sambac*) 叶细胞提取物]; Oleos-Hallstar 销售的 Blue Oleoactif [INCI: 野大豆 (*Glycine Soja*) 油、聚甘油-3 二异硬脂酸酯、稻 (*Oryza Sativa*) 胚芽提取物、稻 (*Oryza Sativa*) 提取物]; 司达玛 (Sederma) 销售的 Majestem [INCI: 甘油、高山火绒草 (*Leontopodium Alpinum*) 愈伤组织提取物、黄原胶] 或 Senestem [INCI: 甘油、长叶车前 (*Plantago Lanceolata*) 叶提取物、黄原胶]; 素莱碧雅 (Solabia) 销售的 Blueshield [INCI: 甘油、辣椒 (*Capsicum Annuum*) 果提取物、黄原胶]; 以及它们的组合。

[0170] DNA 保护剂、DNA 修复剂和/或干细胞保护剂可选自由以下项组成的组: 温森斯 (Vincience) / ISP / 亚什兰 (Ashland) 销售的 GP4G SP [INCI: 含水、甘油、卤虫 (*Aretmia*) 提取物]、Heliostatine [INCI: 含水、甘油、豌豆 (*Pisum Sativum*) 提取物]、Orsirtine [INCI: 含水、甘油、稻 (*Oryza Sativa*) 提取物]、Chronogen [INCI: 含水、丁二醇、四肽 (提议的 INCI)]、Survixyl IS [INCI: 水、丁二醇、五肽-31] 和 Chronodricare [INCI: 含水、丁二醇五肽-28]; Atrium Innovations / 卢卡斯梅耶化妆品公司 (Lucas Meyer Cosmetics) 销售的 **Lanacityn**[®] [INCI: 甘油、含水、交替单胞菌 (*Alteromonas*) 发酵产物提取物、金黄洋甘菊 (*Chysanthellum indicum*) 提取物] 或 Melinoil [INCI: 棕榈酸异丙酯、卵磷脂、含水、乙酰基六肽-1]; CLR 销售的 Repair Complex [INCI: 二裂酵母 (*Bifida*) 发酵产物溶胞物]; 康缔肤 (Codif) 销售的 Phycojuvenine [INCI: 掌状海带 (*Laminaria Digitata*)]; Induchem 销售的 Unirepair T-43 [INCI: 丁二醇、乙酰酪氨酸、脯氨酸、水解植物蛋白、三磷酸腺苷]; 德之馨 (Symrise) 销售的 Dragosine [INCI: 肌肽]; Laboratoires Serobiologiques / 科宁 (Cognis) / 巴斯夫 (BASF) 销售的 DN-Age [INCI: 翅荚决明 (*Cassia Alata*) 叶提取物]; 米百乐生化公司 (Mibelle Biochemistry) 销售的 Helioguard [INCI: 包封到脂质体中的脐形紫菜 (*Porphyra Umbilicalis*)]; PhytoCellTec Malus Domestica [INCI: PhytoCellTec Malus

Domestica]或PhytoCellTec Argan[INCI:刺阿干树(Argania Spinosa)芽细胞提取物、益寿糖、卵磷脂、苯甲酸钠、含水];Pentapharm/DSM销售的Pepha-Protect[INCI:西瓜提取物];锐昂(Rahn)销售的Celligent[INCI:向日葵(Helianthus Annuus)籽油、阿魏酸乙酯、聚甘油-5三油酸酯、迷迭香(Rosmarinus Officinalis)叶提取物、含水、尿苷磷酸二钠]或Defensil[INCI:辛基十二烷醇、车前叶蓝蓟(Echium Plantagineum)籽油、倒地铃(Cardiospermum Halicacabum)提取物、向日葵(Helianthus Annuus)籽油不皂化物];司达玛(Sederma)/禾大(Croda)销售的Venuceane[INCI:嗜热栖热菌(Thermus Thermophilus)发酵产物、甘油]、UV-Soft[INCI:酵母提取物]、Renovage[INCI:辛酸/癸酸甘油三酯、替普瑞酮]、Juvinity[INCI:辛酸/癸酸甘油三酯、香叶酰香叶酰丙醇(所提议)]、Phytessence Holyherb[INCI:丁二醇、北美圣草(Eriodictyon Californicum)(圣草)花/叶/茎提取物]或Resistem[INCI:甘油、心叶球花(Globularia Cordifolia)发酵产物];米百乐(Mibelle)销售的Infraguard[INCI:刺云实果荚提取物、丙二醇、含水、向日葵(Helianthus Annuus)芽提取物、苯甲酸钠、苯氧乙醇];茜莱博(Silab)销售的Heliomoduline[INCI:棉籽中的低分子量肽]或Stem-C-Guard[水解豌豆];以及它们的组合。

[0171] 反应性羰基物质清除剂、自由基清除剂和/或抗糖化剂、解毒剂、抗氧化剂和/或防污染剂可选自例如但不限于由以下项形成的组:肌肽及其衍生物;温森斯(Vincienc) / ISP/亚什兰(Ashland)销售的GHK[INCI:三肽-1]及其盐和/或衍生物或Quintescence IS[INCI:二肽-4];Pentapharm/DSM销售的Preregen[INCI:野大豆(Glycine Soja)(大豆)蛋白、氧化还原酶]、Edelweiss GC[INCI:高山火绒草(Leontopodium Alpinum)提取物]、Lipogard[INCI:角鲨烷、泛醌]、Nectapure[INCI:大叶醉鱼草(Buddleja Davidii)提取物、百里香(Thymus Vulgaris)提取物]、Alpaflor Nectapure[INCI:大叶醉鱼草(Buddleja Davidii)提取物、百里香(Thymus Vulgaris)提取物、甘油、水]或Dismutin-BT[INCI:来自酿酒酵母(Saccharomyces cerevisiae)的天然酵母菌株的高纯SOD];利普泰(Lipotec)/路博润(Lubrizon)销售的**Preventhelia**[®][INCI:二氨基丙酰三肽-33]、**Aldenine**[®][INCI:水解小麦蛋白、水解大豆蛋白、三肽1]、Lipochroman[™][INCI:二甲基甲氧基苯并二氢吡喃醇]、**Thermostressine**[®][INCI:乙酰基四肽-22]、Pollushield[™]功能成分[INCI:己二酸二异丙酯、卵磷脂、丙烯酸/丙烯酰胺甲基丙烷磺酸共聚物、二甲基甲氧基苯并二氢吡喃醇、黄原胶]或**Bodyfensine**[®][INCI:乙酰基二肽-3氨基己酸酯];Laboratoires Sérobiologiques/科宁(Cognis)/巴斯夫(BASF)销售的unactyl[INCI:甘露醇、豌豆(Pisum Sativum)提取物、组氨酸盐酸盐、精氨酸、环糊精、糊精、酵母提取物、乙酰酪氨酸、盐酸吡哆醇、非洲楝(Khaya Senegalensis)树皮提取物、烟酰胺、腺嘌呤二核苷酸、琥珀酸二钠、天冬氨酸]、Imidinyl[INCI:酸豆(Tamarindus Indica)籽多糖]、Phystrogene[INCI:丁二醇、欧锦葵(Malva Sylvestris)(锦葵)提取物、黄原胶]或Purisoft[INCI:翼籽辣木(Moringa Pterogysperma)籽提取物];米百乐生化公司(Mibelle Biochemistry)销售的AquaCacteen[INCI:甘油、仙桃仙人掌(Opuntia Ficus Indica)茎提取物、苯氧乙醇、含水]、Trimoist(KMF)[INCI:硬脂酰乳酸钠、鲸蜡醇、Olus植物油、生育酚乙酸酯、甘油、野大豆(Glycine soja)甾醇、乳酸钠、羧甲基 β -葡聚糖钠、肌肽、乳酸]、MelanoBronze[INCI:穗花牡荊(Vitex Agnus Castus)提取物(圣洁莓(Monk's pepper berries)提取物(植物内啡肽))、乙酰酪氨

酸]、CM-Glucan[INCI:羧甲基 β -葡聚糖钠、苯氧乙醇、SunActin[INCI:向日葵(Helianthus Annuus)(葵花)芽提取物、生育酚、甘油、卵磷脂、苯氧乙醇、含水]、GSP-T skin[INCI:甘油、醇、含水、PEG-40氢化蓖麻油、欧亚种葡萄(Vitis Vinifera)(葡萄)籽提取物]或Detoxophane[INCI:家独行菜(Lepidium Sativum)芽提取物、卵磷脂、苯氧乙醇、甘油、水];司达玛(Sederma)/禾大(Croda)销售的Bacocalmine[INCI:PEG-8、假马齿苋(Bacopa Monniera)提取物、水(含水)、羟乙基纤维素]、Kombuchka[INCI:酵母(Saccharomyces)/木醋杆菌(Xylinum)红茶发酵产物、甘油、羟乙基纤维素]、Citystem[INCI:甘油、欧夏至草(Marrubium Vulgare)提取物]或Prodizia[INCI:合欢(Albizia Julibrissin)提取物、甘油];赛比克(Seppic)销售的Extramel C[INCI:羟丙基三甲基氯化铵麦芽糊精交联聚合物、甜瓜(Cucumis Melo)(香瓜)果提取物];茜莱博(Silab)销售的Defensine[INCI:普通小麦(Triticum Vulgare)胚芽提取物]、**Apolluskin**[®][INCI:欧蒲公英(Taraxacum officinale)(蒲公英)提取物]、**Detoxyl**[®][INCI:水、丁二醇、牛油果(Butyrospermum parkii)(乳木果油)籽饼提取物]或Antiglyskin[INCI:含水、向日葵(Helianthus Annuus)籽提取物];以及它们的组合。

[0172] 本发明的组合物液可包含其他活性成分,诸如维生素、矿物质、蛋白质、肽、脂肪酸、抗氧化剂、抗炎剂、颜色加深剂和/或它们的混合物。特别地,化妆品组合物可以包含用于促进毛发生长和/或防止毛发脱落的其他活性成分。在本发明的上下文中,合适的非限制性实例是由Hallstar销售的Growth**Oléoactif**[®][INCI:Helianthus Annuus(向日葵)籽油(和)聚甘油基-3二异硬脂酸酯(和)Carthamus Tinctorius(红花)花提取物(和)玫瑰茄(Hibiscus Sabdariffa)花提取物]。由Sederma销售的WidelashTM[INCI:甘油,水(Aqua),泛醇,生物素三肽-1];由Symrise销售的**SymPeptide**[®]Xlash[INCI:甘油(和)Aqua(和)肉豆蔻酰基五肽-17],**SymLash**[®]1631[INCI:戊二醇(和)球等鞭金藻(Isochrysis Galbana)提取物];由Lipotrue销售的AnargyTM[INCI:水(和)丁二醇(和)寡肽-2(和)本生烟(Nicotiana Benthamiana)六肽-40SH-多肽-9(和)本生烟六肽-40SH-多肽-86];由Lucas Meyer销售的CapixylTM[INCI:丁二醇(和)Aqua(和)葡聚糖(和)乙酰四肽-3(和)红苜蓿(Trifolium Pratense)(红花苜蓿)花提取物];由Nanovetores销售的Nano lashes[INCI:Aqua,油蜡树(Simmondsia Chinensis)籽提取物,聚山梨酸酯20,羟丙基瓜尔胶,苯甲酸钠,山梨酸钾];由Spec-chem销售的Specped SC-MH16[INCI:Aqua,甘油,肉豆蔻酰基六肽-16,辛甘醇,乙基己基甘油],肉豆蔻酰基五肽-17[INCI:肉豆蔻酰基五肽-17],**SpecPed**[®]BT1[INCI:生物素三肽-1],**SpecPed**[®]LashLD[INCI:生物素三肽-1,甘油,水,辛酰基乙二醇和乙基己基甘油,泛醇,海藻糖],**SpecPed**[®]MP17P[INCI:肉豆蔻酰基五肽-17];由Sederma销售的ProcapilTM[INCI:丁二醇(和)Aqua(和)PPG-26-Buteth-26(和)PEG-40氢化蓖麻油(和)芹菜素(和)齐墩果酸(和)生物素三肽-1];由Mibelle销售的AnaGainTM[INCI:Pisum Sativum(豌豆)芽提取物(和)异麦芽酮糖醇(和)Aqua],PhytoCellTecTMMalus Domestica Hair[INCI:苹果树(Malus Domestica)果实细胞培养提取物(和)黄原胶(和)甘油(和)卵磷脂(和)苯氧乙醇(和)Aqua/水],SantenergyTM[INCI:生物类黄酮(和)戊二醇(和)醇(和)Aqua],

RootBioTecTMHW[INCI:罗勒(Ocimum Basilicum)毛状根培养提取物(和)醇(和)Aqua/水], RootBioTecTMHO[INCI:罗勒毛状根培养提取物(和)Helianthus Annuus(向日葵)籽油(和)Cocos Nucifera(椰子)油];由Vytrus Biotech销售的CAPILIA LONGA PPF[INCI:Curcuma Longa(姜黄)愈伤组织培养条件培养基(和)水];由Solabia销售的**Cressatine**[®][INCI:甘油(和)Aqua(和)西洋菜提取物(和)旱金莲提取物];由Peptron销售的AlotideTM[INCI:磷酸抗坏血酸铜琥珀酰三肽-34];由Ichimaru Pharcos销售的BURGEON-UP[INCI:Aqua(和)醇(和)西洋菜叶/茎杆提取物];由Exysmol销售的**Capalgin**[®][INCI:角叉菜(Chondrus Crispus)提取物];由BASF销售的**Dermosaccharides**[®]GY[INCI:Aqua(和)甘油(和)糖原(和)苯氧乙醇(和)对羟基苯甲酸甲酯],TrichogenTMVEG LS 9922[INCI:水(和)人参(Panax Ginseng)根提取物(和)精氨酸(和)乙酰酪氨酸(和)五月牛蒡(Arctium Majus)根提取物(和)水解大豆蛋白(和)聚季铵盐-11(和)PEG-12聚二甲基硅氧烷(和)泛酸钙(和)葡萄糖酸锌(和)烟酰胺(和)鸟氨酸盐酸盐(和)瓜氨酸(和)氨基葡萄糖盐酸盐(和)生物素];由CLR销售的FollicusanTMDP[INCI:Aqua(和)变性酒精(和)泛基乙基醚(和)肌醇(和)乳蛋白质(和)乳糖(和)乙酰半胱氨酸(和)乙酰甲硫氨酸(和)柠檬酸钠(和)柠檬酸];由Greentech销售的**Hairline**[®][INCI:丙二醇(和)水(Aqua)(和)乌药(Lindera Strychnifolia)根提取物];由Provital销售的KerascalpTM[INCI:丙二醇(和)甘油(和)余甘子(Phyllanthus Emblica)果实提取物],BaicapilTM[INCI:丙二醇(和)水(和)精氨酸(和)乳酸(和)野生大豆(Glycine Soja)(大豆)胚芽提取物(和)Triticum Vulgare(小麦)胚芽提取物(和)黄芩(Scutellaria Baicalensis)根提取物(和)苯甲酸钠(和)葡萄糖酸内酯(和)葡萄糖酸钙];由Seppic销售的BIOENERGIZERTMP BG PF[INCI:Aqua/水,丁二醇,泛醇,丙二醇,沟鹿角菜(Pelvetia Canaliculata)提取物,掌状海带(Laminaria Digitata)提取物];由Ashland销售的ProtectagenTM[INCI:Aqua(和)甘油(和)水解大米蛋白];由Givaudan销售的**Redensyl**[®][INCI:甘油(和)Aqua(和)焦亚硫酸钠(和)欧洲落叶松(Larix Europaea)木提取物(和)甘氨酸(和)氯化锌(和)野茶树(Camellia Sinensis)叶提取物];由B&G销售的**GANOTHER**[®][INCI:甘油(和)水(和)灵芝(Ganoderma Lucidum)(蘑菇)菌丝体发酵滤液];由Silab销售的**Hairgenyl**[®][INCI:酿酒酵母(Saccharomyces Cerevisiae)提取物],**Anageline**[®][INCI:水解羽扇豆蛋白];由Shanghai GREAF Biotech销售的Hairdian AP[INCI:丙二醇(和)]侧柏(Thuja Orientalis)提取物(和)姜(Zingiber Officinale)(姜)根提取物(和)红车轴草(Trifolium Pratense)(三叶草)叶提取物(和)艾(Artemisia Argyi)叶提取物),NatureinTM小麦低聚肽(INCI:水(aqua)(和)水解小麦蛋白)或来自Givaudan,KeraMatchTMV(INCI:水(和)水解豌豆蛋白(和)水解植物蛋白),来自Croda Personal care。

[0173] 应用

[0174] 本发明基于以下发现:本发明的蛋白质水解产物有效减轻和/或预防环境暴露组对皮肤和/或毛发的不利影响。环境暴露组的不利影响包括由于空气污染、阳光和/或温室气体引起的不利影响。还发现蛋白质水解产物有效减轻化学处理或热应力对毛发的不利影响。此外,已经发现蛋白质水解产物在维持和/或改善皮肤的物理屏障功能方面是有效的。

皮肤的物理屏障功能在本文中也称为皮肤的物理屏障、皮肤的渗透性屏障或简称为皮肤屏障。此屏障由角质层和表皮中的紧密连接提供。

[0175] 在一个方面,本发明提供本文所述的蛋白质水解产物或选自以下的化合物:

[0176] (i)Val-Ala-Glu-Gln-Glu-Gln-Glu-Gln-Ala-Lys-Arg-Gln(SEQ ID No.1);

[0177] (ii)Leu-Pro-Gln-Gln-Glu-Gln-Gly-His-Asp-Arg(SEQ ID No.2);

[0178] (iii)Val-Asp-Ala-Gln-Pro-Glu-Glu-Gln-Gln-Arg(SEQ ID No.3);

[0179] (iv)Gly-Ile-Asn-Ala-Glu-Asn-Asn-Gln-Arg-Asn-(SEQ ID No.4);

[0180] (v)Glu-Tyr-Thr-Gly-Asp-Ala-Ala-Gly-Arg(SEQ ID No.5),以及

[0181] 它们的立体异构体和美容上可接受的盐、或所述蛋白质水解产物或所述化合物与通过微生物明串珠菌发酵萝卜根获得的滤液的组合,用于处理和/或护理皮肤和/或毛发。具体地讲,皮肤和/或毛发的处理和/或护理是美容的和非治疗性的。

[0182] 本文所述的蛋白质水解产物、化合物或组合的用途可用于减轻和/或预防环境暴露组对毛发的不利影响;减轻和/或预防空气污染对毛发的不利影响;减轻和/或预防阳光对毛发的不利影响;减轻和/或预防化学应力对毛发的不利影响;减轻和/或预防热应力对毛发的不利影响;减轻或预防由毛发中脂质的过氧化和/或由毛发中蛋白质的羰基化引起的对毛发的不利影响。本文所述的蛋白质水解产物、化合物或组合的用途可用于减轻和/或预防空气污染和阳光对毛发的不利影响。对毛发的不利影响可以受损毛发的形式表现出来。因此,蛋白质水解产物可用于减少毛发损伤。对毛发的不利影响可表现为以下形式:具有更多毛发分叉的毛发;减少的纤维排列和/或增加的卷曲。因此,毛发是不易处理的。因此,蛋白质水解产物可用于增加毛发可处理性,特别是通过减少毛发分叉和/或增加纤维排列和/或减少卷曲和/或减少蓬松度来增加毛发可处理性。

[0183] 因此,提供了本文所述的蛋白质水解产物、化合物或组合用于毛发的美容、非治疗性处理和/或护理的用途,其中毛发的处理和/或护理是减轻或预防环境暴露组对毛发的不利影响。

[0184] 提供了本文所述的蛋白质水解产物、化合物或组合用于毛发的美容、非治疗性处理和/或护理的用途,其中毛发的处理和/或护理是减轻或预防空气污染对毛发的不利影响,特别是在空气污染含有颗粒物质的情况下。

[0185] 空气污染包括例如颗粒物。颗粒物是包括固体颗粒的空气传播污染物。颗粒物可包括灰尘、污物、烟灰或烟。颗粒物可来自人类来源和天然存在的来源,包括汽车(例如,来自汽车内燃机的废气排放)、发电厂、工厂、火、柴炉、来自空地或建筑的灰尘、来自道路的灰尘(例如,刹车、轮胎和道路磨损颗粒)、花粉(例如,杉树花粉)和来自烟草的烟雾(例如,香烟烟雾)。颗粒物可具有10微米或更小的尺寸(也称为PM₁₀和“灰尘”)。颗粒物可来自汽车内燃机(例如柴油颗粒,诸如在柴油颗粒物NIST1650B中存在的那些)。该特定物质可包括花粉(例如杉树花粉)。

[0186] 提供了本文所述的蛋白质水解产物、化合物或组合用于毛发的美容、非治疗性处理和/或护理的用途,其中毛发的处理和/或护理是减轻或预防含有颗粒物质的空气污染对毛发的不利影响,其中所述颗粒物来源于道路灰尘、来源于柴油、或者是花粉。

[0187] 提供了本文所述的蛋白质水解产物、化合物或组合用于毛发的美容、非治疗性处理和/或护理的用途,其中毛发的处理和/或护理是减轻或预防阳光对毛发的不利影响。阳

光可包含UV-A照射。

[0188] 提供了本文所述的蛋白质水解产物、化合物或组合用于毛发的美容、非治疗性处理和/或护理的用途,其中毛发的处理和/或护理是减轻或预防漂白或染色对毛发的不利影响。

[0189] 提供了本文所述的蛋白质水解产物、化合物或组合用于毛发的美容、非治疗性处理和/或护理的用途,其中毛发的处理和/或护理是减轻或预防热应力对毛发的不利影响。

[0190] 提供了本文所述的蛋白质水解产物、化合物或组合用于毛发的美容、非治疗性处理和/或护理的用途,其中毛发的处理和/或护理是减轻或预防由毛发中脂质的过氧化和/或毛发中蛋白质的羰基化引起的对毛发的不利影响。

[0191] 提供了本文所述的蛋白质水解产物、化合物或组合用于毛发的美容、非治疗性处理和/或护理的用途,其中毛发的处理和/或护理是增加毛发可处理性;和/或增加纤维排列和/或减少卷曲和/或减少蓬松度。

[0192] 本文所述的蛋白质水解产物、化合物或组合的用途可用于减轻和/或预防环境暴露组对皮肤的不利影响;减轻和/或预防空气污染对皮肤的不利影响;减轻和/或预防阳光对皮肤的不利影响;减轻和/或预防由温室气体引起的不利影响;和/或维持和/或改善皮肤的物理屏障功能。本文所述的蛋白质水解产物、化合物或组合的用途可用于减轻和/或预防空气污染和阳光对皮肤的不利影响。对皮肤的不利影响可表现为以下形式:屏障功能降低;皮肤的暗淡外观;皮肤的增亮、亮度和/或光泽的损失;皮肤肌理均匀性的损失;皮肤粗糙度的增加;出现暗斑;和/或红斑(皮肤发红)。

[0193] 因此,提供了本文所述的蛋白质水解产物、化合物或组合用于皮肤的美容、非治疗性处理和/或护理的用途,其中皮肤的处理和/或护理是减轻或预防环境暴露组对皮肤的不利影响。

[0194] 提供了本文所述的蛋白质水解产物、化合物或组合用于皮肤的美容、非治疗性处理和/或护理的用途,其中皮肤的处理和/或护理是减轻或预防含有颗粒物质的空气污染对皮肤的不利影响,其中所述颗粒物来源于道路灰尘、来源于柴油、或者是花粉。

[0195] 提供了本文所述的蛋白质水解产物、化合物或组合用于皮肤的美容、非治疗性处理和/或护理的用途,其中皮肤的处理和/或护理是减轻或预防阳光对皮肤的不利影响。阳光可包含UV-A照射。

[0196] 不利影响可表现为皮肤屏障功能丧失的形式。因此,提供了本文所述的蛋白质水解产物、化合物或组合用于皮肤的美容、非治疗性处理和/或护理的用途,其中皮肤的处理和/或护理是维持和/或改善皮肤的物理屏障功能。

[0197] 不利影响可表现为以下形式:具有暗淡外观;和/或具有不太明亮的外观;和/或具有亮度较低的外观和/或具有光泽较少的外观。因此,提供了本文所述的蛋白质水解产物、化合物或组合用于皮肤的美容、非治疗性处理和/或护理的用途,其中皮肤的处理和/或护理是增加皮肤增亮和/或增加皮肤光泽和/或增加皮肤亮度。

[0198] 不利影响也可能导致暗斑的出现。因此,提供了本文所述的蛋白质水解产物、化合物或组合用于皮肤的美容、非治疗性处理和/或护理的用途,其中皮肤的处理和/或护理减少了暗斑。具体地讲,处理和/或护理可包括减少皮肤中的黑色素。

[0199] 不利影响可表现为以下形式:肤色和/或皮肤肌理均匀性的降低和/或皮肤粗糙度

的增加。因此,提供了本文所述的蛋白质水解产物、化合物或组合用于皮肤的美容、非治疗性处理和/或护理的用途,其中皮肤的处理和/或护理是增加肤色和/或增加皮肤肌理的均匀性和/或降低皮肤粗糙度。

[0200] 不利影响可表现为以下形式:红斑或皮肤发红。因此,提供了本文所述的蛋白质水解产物、化合物或组合用于皮肤的美容、非治疗性处理和/或护理的用途,其中皮肤的处理和/或护理减少皮肤发红。

[0201] 在一个方面,本发明涉及处理和/或护理皮肤和/或毛发的方法,该方法包括将根据本发明第一方面的红小豆蛋白质水解产物或选自以下的化合物:

[0202] (i) Val-Ala-Glu-Gln-Glu-Gln-Glu-Gln-Ala-Lys-Arg-Gln (SEQ ID No.1);

[0203] (ii) Leu-Pro-Gln-Gln-Glu-Gln-Gly-His-Asp-Arg (SEQ ID No.2);

[0204] (iii) Val-Asp-Ala-Gln-Pro-Glu-Glu-Gln-Gln-Arg (SEQ ID No.3);

[0205] (iv) Gly-Ile-Asn-Ala-Glu-Asn-Asn-Gln-Arg-Asn- (SEQ ID No.4);

[0206] (v) Glu-Tyr-Thr-Gly-Asp-Ala-Ala-Gly-Arg (SEQ ID No.5), 以及

[0207] 它们的立体异构体和美容上可接受的盐、或所述化合物与通过微生物明串珠菌发酵萝卜根获得的滤液的组合,施用于受试者。处理和/或护理可以是美容的、非治疗性的处理和/或护理。上述蛋白质水解产物、化合物或组合可存在于化妆品组合物中,例如本文所述的化妆品组合物。该方法可用于如以上关于本发明的蛋白质水解产物、化合物和/或组合的应用(用途)所描述的对皮肤和/或毛发进行处理和/或护理。

[0208] 处理和/或护理为减轻或预防环境暴露组对皮肤和/或毛发的不利影响;减轻或预防空气污染对皮肤和/或毛发的不利影响;减轻或预防阳光对皮肤和/或毛发的不利影响;减轻或预防化学处理对毛发的不利影响;减轻或预防热应力对毛发的不利影响;和/或维持和/或改善皮肤的物理屏障功能。

[0209] 在本发明的蛋白质水解产物、化合物和组合的应用中,处理和/或护理可以是预防性的,因为其用于保护皮肤和/或毛发免受不利影响。在这种情况下,在暴露于应激物之前将本发明的蛋白质水解产物、化合物和组合施用于皮肤和/或毛发。处理和/或护理可以是修复的或恢复的,即,其中减轻具有修复或恢复作用(例如相对于美容特性)。在这种情况下,可在暴露于应激物期间或之后将本发明的蛋白质水解产物、化合物和组合施用于皮肤和/或毛发。

[0210] 对于以上描述的本发明的方法,局部或经皮施用可以通过离子电渗、超声促渗、电穿孔、机械压力、渗透压梯度、包扎护理、显微注射、借助于压力的无针注射、通过微电子贴剂、面膜或其任何组合来进行。

[0211] 对于以上描述的本发明的方法,根据每个受试者的需要,应用或施用频率可能相差很大,其中应用建议为一个月一次至一天十次、优选地一周一次至一天四次、更优选地一周三次至一天两次、甚至更优选地一天一次。

[0212] 本发明还提供了本发明的蛋白质水解产物在皮肤的治疗性处理中的用途。因此,本发明提供用作药物的如本文所公开的蛋白质水解产物。具体地讲,本发明提供如本文所公开的蛋白质水解产物,其用于预防或处理与环境暴露组、皮肤暴露于空气污染、阳光和/或温室气体相关的、和/或与受损的皮肤物理屏障功能相关的病症或失调。本发明还提供了一种式(I)化合物、其立体异构体和/或其药学上可接受的盐的用途,其用于制备用于处理

或预防疾病或病症的药物。

[0213] 通过以下非限制性实施例进一步限定了本发明。

[0214] 实施例1

[0215] 制备磨碎的红小豆

[0216] 第一步是将生豆加工成褐色颗粒状外观的细粉。该阶段的目的是尽可能地减小颗粒尺寸以促进蛋白质溶解。将红小豆磨碎成粉并筛除较大的碎片。

[0217] 实施例2

[0218] 酶促水解

[0219] 2.1豆粉的预处理

[0220] 在加入酶之前,初步处理磨碎的红小豆(在本文中也称为“豆粉”),增加水解介质中水溶性蛋白质的含量。将豆粉以21.8g豆粉/Kg水(w/w)的浓度悬浮在去离子水中,并转移到配备有提供实时监测的pH和温度探针的合适反应容器中。通过加入碱性溶液(即,NaOH 1N)将初始pH从6.5-6.8升高至7.0,并且当需要时,加入更多溶剂以达到期望的浓度。该条件在室温($25\pm 2^{\circ}\text{C}$)下维持1小时。得到的悬浮液称为“蛋白质悬浮液”-它是磨碎的红小豆在水中的悬浮液,含有来自磨碎的红小豆的已经溶解的蛋白质。

[0221] 2.2.酶促水解

[0222] 将酶加入到蛋白质悬浮液中并将混合物在室温($25\pm 2^{\circ}\text{C}$)下搅拌1小时。调节搅拌条件以确保均匀且剧烈的搅拌,同时将泡沫形成保持在最低水平。然后,将碱性蛋白酶加入到蛋白质悬浮液中。碱性蛋白酶是枯草杆菌蛋白酶类型的酶。优选的水解条件通过使用枯草杆菌蛋白酶类型的碱性蛋白酶AF 2.4L(CAS编号9014-01-1,EC 3.4.21.62, Novozymes[®])来限定。

[0223] 通过pH的变化监测水解的适当进程。pH的下降与肽片段的释放和随后酸性羧酸的积累有关。典型地,粗水解产物在该过程中经历轻微酸化(pH单位下降0.2-0.3)。

[0224] 2.3酶失活

[0225] 酶促水解后,通过将温度升高到至少70 $^{\circ}\text{C}$ 并维持该温度持续至少20分钟来使酶失活。所得到的水解产物在下文中称为“粗水解产物”。

[0226] 实施例3

[0227] 纯化

[0228] 为了富集混合物中期望的活性组分(即,肽),可以如下文更详细描述进行另外的澄清和透析步骤。

[0229] 3.1.离心

[0230] 水解的红小豆悬浮液(“粗水解产物”)在10.000xG下以连续流(即,使用Westfalia CSA-1离心机或类似设备)最佳地离心,最佳流速为50l/h。收集上清液,而将沉淀作为废料丢弃。取代表性样品,在整个操作过程中控制上清液浊度,并在600nm下维持低于0.2AU/g蛋白质(相对于这些条件下的适当空白)。

[0231] 3.2.前滤

[0232] 从步骤3.1.中获得的上清液在泵产生的压力下通过不同尺寸的过滤器。首先,使用1,2 μm 孔过滤器来除去在离心过程中未除去的大颗粒块。此第一过滤步骤是任选的,其目的是减少所需的小孔径过滤器的数量。然后,所得滤液随后通过0.45 μm 和0.22 μm 孔径的过

滤器过滤。

[0233] 3.3.超滤

[0234] 在实施例3.2.中获得的滤液通过超滤膜(即Millipore ref.P2PLBCC05,0.5m²/盒)进一步超滤,以除去分子量高于3KDa的片段。所得滤液也称为“纯化水解产物”或“渗透物”。

[0235] 实施例4

[0236] 纯化的水解产物表征

[0237] 分析如实施例1至实施例3所述获得的十二个不同批次的纯化水解产物以确定干重、蛋白质含量和抗氧化活性。

[0238] -干重通过110℃干燥后的重量差来确定。

[0239] -使用BCA测定试剂盒来确定蛋白质含量。

[0240] -通过DPPH(2,2-二苯基-1-苦基肼基)测定来确定抗氧化活性。

[0241] 简而言之,将50μL 100μM DPPH的EtOH溶液与50μL纯化的水解产物混合,并在37℃黑暗中温育20分钟,在517nm处测量吸光度。

[0242] 抑制百分比由下式计算:

$$[0243] \quad \text{抑制(\%)} = \frac{(\text{空白吸光度} - \text{样品吸光度})}{\text{空白吸光度}} \times 100$$

[0244] -通过福林-西奥卡特(Folin-Ciocalteu)方法来确定多酚含量。

[0245] 不同批次的干重平均为2mg至5mg干重/纯化的水解产物。

[0246] 蛋白质含量范围为19%至35%(w/w)。

[0247] DPPH活性范围为74%至80%。

[0248] 多酚含量为0.15mg/mL至0.30mg/mL。

[0249] 实施例5

[0250] 对来自头皮的毛囊真皮乳突细胞的体外修复效果

[0251] 使用毛囊真皮乳突细胞生长培养基,在37℃、5% CO₂的条件下培养来源于头皮的人类毛囊真皮乳突细胞(Human Follicle Dermal Papilla Cells,HFDPC)。使用0.1μg/cm²的颗粒物(PM)(得自欧洲参考物质(European Reference Material);Ref.CZ100)对这些细胞进行应激处理,随后在1X PBS缓冲液(磷酸盐缓冲盐水,pH 7.4)中进行UV-A照射(LED源,发射峰365nm,3J/cm²)。用应激物处理细胞13分钟。暴露于应激后,立即用实施例3的在培养基中为1%(v/v)的纯化水解产物处理细胞。抗氧化剂N-乙酰基-半胱氨酸(NAC)用作阳性对照。测量细胞内蛋白羰基化水平后两(2)小时。

[0252] 蛋白羰基化分析:

[0253] 使用荧光探针原位标记毛干或HFDPC中的羰基化蛋白,该荧光探针经官能化以特异性结合蛋白中的羰基[Baraibar MA等人,“Proteomic quantification and identification of carbonylated proteins upon oxidative stress and during cellular aging”J Proteomics(2013)30;92:63-70]。收集每个实验组(n=6)的特异性荧光信号(相对荧光单位)并用ImageJ软件分析。相对于基础对照,获得每个实验组的羰基化水平的相对值(%)。

[0254] 根据以下公式获得实验组的修复值(%)：

[0255] $\text{修复值} = [(\text{羰基化应力} - \text{羰基化基团X}) / (\text{羰基化应力} - \text{羰基化对照})] \times 100$

[0256] 认为对照组处于最大效率(100%)，并且应激组处于最小效率(0%)：

	实验组	平均值± SEM	修复效率 (%)
[0257]	对照	100 ± 3.3	100%
	应激 (PM + UV-A)	126.9 ± 3.0	0%
	红小豆 1% (v/v) + 应激	119.4 ± 3.0	28%

[0258] 表1

[0259] 经纯化的水解产物得到显著修复并受到保护，免受颗粒物质和UV-A照射的有害作用。

[0260] 实施例6

[0261] 对来自头皮的毛囊真皮乳突细胞的体外保护评估

[0262] 使用HFDPC生长培养基，在37℃、5% CO₂的条件下培养来源于头皮的人类毛囊真皮乳突细胞(Human Follicle Dermal Papilla Cells, HFDPC)。将这些细胞用在培养基中为1% (v/v)的根据实施例3的纯化水解产物在37℃和5% CO₂条件下处理24小时(应激前)。第二天，使用0.1μg/cm²的颗粒物质(得自欧洲参考物质(European Reference Material)；Ref.CZ100)和杉树花粉(Ref.Cedar Pollen-Cj*；LG-5280Euromedex；5ng/cm²)对细胞进行应激处理，随后在1X PBS缓冲液(磷酸盐缓冲盐水，pH 7.4)中进行UV-A照射(LED源，发射峰365nm，3J/cm²)。应激处理进行13分钟。处理后，将细胞固定并原位标记羰基蛋白。通过落射荧光显微镜对固定的细胞进行蛋白质氧化(羰基化)的检测。

[0263] 在处理和应激暴露后，立即用乙醇/醋酸溶液将细胞(HFDPC)固定在平板上。使用官能化以特异性结合羰基基团的荧光探针(Ex=647nm/Em=650nm)原位标记羰基化的蛋白质。用落射荧光显微镜(ThermoFisher, Evos M5000)收集荧光图像，并用ImageJ软件(Schneider, 2012)分析。使用相同的采集条件(40X物镜)实现不同条件的图像收集。

[0264] 在0至65535的特定信号强度范围内收集原始图像，并用ImageJ软件进行分析。羰基化强度通过由所评估的面积归一化的特定荧光信号的积分来确定。

[0265] 根据以下公式获得实验组的功效值(%)：

[0266] $\text{样品的功效}\% = [(\text{测试样品中的氧化水平应激} - \text{氧化水平}) / (\text{氧化水平应激} -$

[0267] $\text{氧化水平对照})] \times 100$

[0268] 作为参考，认为对照组处于最大效率(100%)，并且应激组处于最小效率(0%)：

	实验组	平均值± SEM	保护功效 (%)
[0269]	对照	100 ± 0.4****	100%
	应激 (PM + UV-A+杉树花粉)	130 ± 2.9	0%
	红小豆 1% (v/v) + 应激	117 ± 1.0**	43%

通过ANOVA方差分析，随后通过Dunnett's事后检验来获得p值，用于与应激比较的多重比较。****p值<0,0001 ***p值<0,001 **p值<0,01 *p值<0,05

表2

[0270] 保护纯化水解产物免受由应激物引起的不利影响(羰基化)。

[0271] 实施例7

[0272] 在白种人毛干中的体外保护评估(体外)

[0273] 白种人毛干(女性供体;淡棕色)用1% (v/v) 的实施例3的水解产物(活性成分溶解在超纯水中,静置(无洗涤步骤))处理30分钟,在室温下轻轻运动。此后,将毛干在室温下干燥并用150µg/cm²的颗粒物质(得自欧洲参考物质(European Reference Material); Ref.CZ100)施加应激,接着用UV-A照射(LED源,发射峰在365nm,84J/cm²)6小时。

[0274] 在暴露于应激后,如实施例5所述确定蛋白质羰基化。

	羰基化水平%	平均值± SEM	保护功效
	基础控制	100 ± 8.06 ****	100%
	应激未处理	214 ± 9.01	0%
[0275]	红小豆 1% (v/v) (应激)	149.8 ± 5.71 ***	56.34%
	阳性对照 NAC (应激)	166.8 ± 5.41 **	41.39%
通过 ANOVA 方差分析,随后通过 Dunnett's 事后检验来获得 p 值,用于与应激比较的多重比较。****p 值< 0.0001; ***p 值< 0.001; **p 值< 0.01			
表 3			

[0276] 结果证实了纯化水解产物的保护作用。

[0277] 实施例8

[0278] 亚洲人毛干的体外保护评估

[0279] 将亚洲人毛干用1% (v/v) 的根据实施例3的纯化水解产物(活性成分溶解在超纯水中,静置(无洗涤步骤))处理30分钟,在室温下轻轻运动。此后,将毛干在室温下自然蒸发干燥并用杉树花粉(Ref.Cedar Pollen-Cj*;LG-5280Euromedex;500ng/cm²)施加应激,随后施用颗粒物质(150µg/cm²,以粉末形式施用;得自欧洲参考物质(European Reference Material);Ref.ERM-CZ100),接着用UV-A照射(LED源,发射峰在365nm,84J/cm²;照射6小时)。

[0280] 在暴露于应激后,测量蛋白质羰基化。从每个实验条件取毛干样品,在Cryomatrix (OCT) 中低温保存,快速冷冻到液氮中并保持在-80℃直至OxiProteome View分析。使用低温恒温器(Leica)获得厚度为3µm的毛干横截面(垂直于毛干,径向视图)用于分析。为了进行侧向(表皮)观察,将羰基化蛋白质标记在整个毛干上。使用经官能化以特异性结合羰基的荧光探针(Ex = 647nm/Em = 650nm)原位标记羰基化蛋白质。用落射荧光显微镜(ThermoFisher,Evos M5000)收集荧光图像,并用ImageJ软件(Schneider,2012)分析。使用相同的采集条件(40X物镜)实现不同条件的图像收集。在0至65535的特定信号强度范围内收集原始图像,并用ImageJ软件进行分析。羰基化强度通过由所评估的面积归一化的特定荧光信号的积分来获得。对于毛干横截面,在每个图像中,对于不同隔层(表皮或皮质)和对于整个毛发独立地获得羰基化水平的定量。每个条件使用三(3)个图像来定量羰基化水平;得到平均值和标准偏差。使用graphPad Prism(La Jolla,加利福尼亚州,美国)进行数据处理和统计分析。

[0281] 根据以下公式获得实验组的功效值(%)。

[0282] 功效% (测试组x) = [氧化水平 (应力) - 氧化水平 (组X)] / [氧化水平

[0283] (应力) - 氧化水平 (对照) * 100

[0284] 作为参考, 认为对照组处于最大效率 (100%), 并且应激组处于最小效率 (0%):

[0285]	完整毛发		
	实验组	平均值± SEM	保护功效 (%)
	对照	100 ± 10.2 ****	100%
	应激 (PM + UV-A)	215 ± 4.1	0%
	红小豆 1% + 应激	114 ± 2.9 ****	88%
	表皮		
	实验组	平均值± SEM	保护功效 (%)
	对照	100 ± 15.5 ***	100%
	应激 (PM + UV-A)	250 ± 3.2	0%
	红小豆 1% + 应激	164 ± 13.1 **	57%
	皮质		
	实验组	平均值± SEM	保护功效 (%)
	对照	100 ± 5.7 ***	100%
	应激 (PM + UV-A)	190 ± 10.1	0%
	红小豆 1% + 应激	83 ± 3.8 ****	100%

[0286] 通过ANOVA方差分析, 随后通过Dunnett's事后检验来获得p值, 用于与应激比较的多重比较。****p值<0,0001***p值<0.001**p值<0,01*p值<0,05

[0287] 表4

[0288] 实施例9

[0289] 非洲人毛干的体外保护评估

[0290] 将非洲人毛干用1% (v/v) 的实施例3的红小豆水解产物 (活性成分溶解在超纯水中, 静置 (无洗涤步骤)) 处理30分钟, 在室温下轻轻运动。此后, 将毛干在室温下干燥并用颗粒物 (150μg/cm², 以粉末形式施用; 得自欧洲参考物质 (European Reference Material); Ref.ERM-CZ100) 和UV-A照射 (LED源, 发射峰在365nm, 84J/cm²) 施加应激。应激处理进行6小时。

[0291] 在暴露于应激后, 如实施例8中所确定来测量蛋白质羰基化。

[0292]	完整毛发		
	实验组	平均值± SEM	保护功效 (%)
	对照	100 ± 2.0****	100%
	应激 (PM + UV-A)	159 ± 5.7	0%
	红小豆 1% + 应激	131 ± 2.9**	46%
	表皮		
	实验组	平均值 SEM	保护功效 (%)
	对照	100 ± 3.2****	100%
	应激 (PM + UV-A)	177 ± 3.5	0%
	红小豆 1% + 应激	148 ± 4.6**	38%
	皮质		
	实验组	平均值± SEM	保护功效 (%)
	对照	100 ± 2.2**	100%
	应激 (PM + UV-A)	138 ± 0.9	0%
	红小豆 1% + 应激	121 ± 8.1 ^{IS}	44%

[0293] 通过ANOVA方差分析,随后通过Dunnett's事后检验来获得p值,用于与应激比较的多重比较。****p值<0.0001;***p值<0.001;****p值<0.0001;

[0294] **p值<0.01;*p值<0.05;1S p值<0,10

[0295] 表5

[0296] 实施例10

[0297] 拉丁美洲人毛干的体外防御评估

[0298] 将拉丁美洲人卷曲毛干用市售染料产品(巧克力色)与1% (v/v) (活性成分溶解在染色产品中)的实施例3的红小豆纯化水解产物接触处理30分钟。

[0299] 通过落射荧光显微镜或毛发横截面进行荧光素扩散的原位检测。将来自每个实验条件的毛干浸入荧光团溶液(荧光素;Ex=498nm/Em=517nm)中。然后,用超纯水通过大量洗涤步骤除去过量的荧光团,并且取毛干样品,低温保存在Cryomatrix (OCT) 中,快速冷冻到液氮中并保持在-80℃直至进行分析。使用低温恒温器(Leica)获得厚度为3μm的毛干横截面(垂直于毛干,径向视图)用于分析。用落射荧光显微镜(ThermoFisher, Evos M5000)收集荧光图像,并用ImageJ软件(Schneider, 2012)分析。使用相同的采集条件(40X物镜)实现不同条件的图像收集。

[0300] 在0至65535的特定信号强度范围内收集原始图像,并用ImageJ软件进行分析。通过在渗透轴(从表皮到皮质)之间的特异性荧光信号的积分获得并定量扩散荧光团的最大强度。

[0301] 每个条件使用三(3)个图像来定量荧光强度水平(R.F.U.);得到平均值和标准偏差。使用graphPad Prism(La Jolla,加利福尼亚,美国)进行数据处理和统计学分析,并包括在附随文件(Annex1-OxiProteomeView-D06CB.xlsx)中。

[0302] 根据以下公式获得实验组的功效值(%),在附随的excel文件中报告。功效%(测试组X)=[荧光强度(应力)-荧光强度(测试组)]/[荧光强度

[0303] (应力)-荧光强度(对照)]*100

[0304] 作为参考,认为对照组处于最大效率(100%),并且应激组处于最小效率(0%):

[0305]	实验组	平均值± SEM	防御功效 (%)
	对照	100 ± 1.04 ****	100%
	染色	233 ± 11.96	0%
	红小豆 1% + 染色	151 ± 8.31 ***	62%

通过 ANOVA 方差分析, 随后通过 Dunnett's 事后检验来获得 p 值, 用于与应激比较的多重比较。****p 值< 0.001; ***p 值< 0.001; **p 值< 0.01; *p 值< 0.05

[0306] 表6

[0307] 实施例11

[0308] 非洲人毛干的体外修复功效

[0309] 非洲人毛干在95℃下热应力处理30分钟。在暴露于应激后, 毛干用1% (v/v) (溶解在超纯水中的活性成分) 的红小豆纯化的水解产物处理30分钟。

[0310] 通过落射荧光显微镜或毛发横截面进行荧光素扩散的原位检测。

[0311] 处理之后, 将来自每个实验条件的毛干浸入荧光团溶液 (荧光素; Ex = 498nm/Em = 517nm) 中。然后, 用超纯水通过大量洗涤步骤除去过量的荧光团, 并且取毛干样品, 低温保存在Cryomatrix (OCT) 中, 快速冷冻到液氮中并保持在 -80℃ 直至进行分析。使用低温恒温器 (Leica) 获得厚度为3μm 的毛干横截面 (垂直于毛干, 径向视图) 用于分析。用落射荧光显微镜 (ThermoFisher, Evos M5000) 收集荧光图像, 并用ImageJ软件 (Schneider, 2012) 分析。使用相同的采集条件 (40X物镜) 实现不同条件的图像收集。

[0312] 在0至65535的特定信号强度范围内收集原始图像, 并用ImageJ软件进行分析。通过在渗透轴 (从表皮到皮质) 之间的特异性荧光信号的积分获得并定量扩散荧光团的最大强度。每个条件使用三 (3) 个图像来定量荧光强度水平 (R.F.U.); 得到平均值和标准偏差。使用graphPad Prism (La Jolla, 加利福尼亚州, 美国) 进行数据处理和统计分析

[0313] 根据以下公式获得实验组的功效值 (%):

[0314] 功效% (测试组X) = [荧光强度 (应力) - 荧光强度 (测试组)] / [荧光强度

[0315] (应力) - 荧光强度 (对照)] * 100

[0316] 认为对照组处于最大效率 (100%), 并且应激组处于最小效率 (0%):

实验组	平均值± SEM	修复功效 (%)
对照	100 ± 11.0*	100%
加热	212 ± 26.3	0%
红小豆 1% (v/v) + 加热	114 ± 24.5*	87%

[0317] 通过 ANOVA 方差分析, 随后通过 Dunnett's 事后检验来获得 p 值, 用于与应激比较的多重比较。*p 值< 0.05

[0318] 表7

[0319] 实施例12

[0320] 对毛发样品中脂质过氧化的保护和防御

[0321] 制备2% (v/v, 在水中) 的根据实施例3的纯化水解产物的水溶液 (“活性成分”)。

[0322] 对于保护测试: 将300mg 毛发称重于Flacon管 (测试) 中并加入3mL 活性成分并留在轨道式震荡器上2小时。在与活性成分一起温育后, 将毛发在纤维素纸上干燥30分钟。干燥后, 将150mg 经处理的毛发称重于皮氏培养皿 (Petri Dishes) 中并置于太阳模拟器中以进行照射。

[0323] 对于保护和防御测试:将300mg毛发称重于Falcon管(测试)中并加入3mL活性成分并留在轨道式震荡器上1小时30分钟。在与活性成分一起温育后,将毛发在纤维素纸上干燥30分钟。一旦样品干燥,将150mg经处理的毛发称重到Falcon管中,并再次加入1.5mL活性成分,从而使其在照射处理期间也存在。将溶液涡旋并将所有内容物(活性成分+毛发)转移至皮氏培养皿(Petri dish)中以进行太阳照射。

[0324] 用于防御测试:将150mg未经处理的毛发称重到Falcon管中,并加入1.5mL活性成分,从而使其在照射处理期间存在。将溶液涡旋并将所有内容物(活性成分+毛发)转移至皮氏培养皿(Petri dish)中以进行太阳照射。

[0325] 对于对照应激样品(未用活性成分处理,但经照射的毛发),在皮氏培养皿(Petri dishes)上称重150mg毛发用于太阳照射。

[0326] 所有样品在太阳模拟器(太阳模拟器SOL500 Honle, 4-5mW/cm²)中照射2小时。

[0327] 用于HPLC分析的样品制备:来自保护测试的样品直接用于HPLC分析,而“保护和防御”的样品;和“防御”测试样品,在纤维素纸上干燥30分钟。称重15mg-30mg毛发样品并加入1mL MeOH并超声处理15分钟。超声处理后,在10mL玻璃管中,加入以下试剂:500μL样品(预先在MeOH中提取)、750μL H₃PO₄、在NaOH 1N和450μL H₂O-MilliQ中的42mM的250μL 2-硫代巴比妥酸溶液。将管涡旋并在90℃温育60分钟。随后,加入1.95mL碱性MeOH并涡旋,然后进行HPLC分析。Kromasil 100C-18, 5μm, 25x 4.5cm柱与高效液相色谱(Shimadzu)一起使用:在15分钟内40%B的等度方法(A:50mM磷酸缓冲液pH 6.8, B:MeOH), 1mL/min, 在36℃下注入50μL。使用的检测器是λ_{ex}=527nm和λ_{em}=551nm的荧光检测器。

保护			
	对照	2 小时 UV	2%红小豆
[0328] 平均值	44.8	100.0	69.8
SEM	1.0	4.9	3.9
P 值			< 0.0001
%功效			30.2

[0329] 表8A

保护+防御			
	对照	2 小时 UV	2% AZUKI
[0330] 平均值	48.6	100.0	63.9
SEM	8.4	7.8	9.5
P 值			< 0.0001
%功效			36.1

[0331] 表8B

防御			
	对照	2 小时 UV	2% AZUKI
[0332] 平均值	54.4	100.0	82.3
SEM	2.7	7.5	7.0
P 值			0.0181
%功效			17.7

[0333] 表8C

[0334] 实施例13

[0335] 人真皮成纤维细胞和人表皮角质形成细胞(体外),保护和防御评估。

[0336] 将人真皮成纤维细胞(HDFa)和人表皮角质形成细胞(HEKa)分别在补充M106培养基和补充KGM2培养基中,在37℃,5% CO₂湿润空气条件下培养。第二天,将细胞用在培养基中1% (v/v)的实施例3的红小豆水解产物在37℃,5% CO₂湿润空气条件下处理1小时。在保护处理之后,新鲜培养基补充有1% (v/v)的实施例3的红小豆水解产物,并且细胞用2.34μg/cm²的颗粒物(Diesel颗粒物NIST1650B)进行应激,随后进行太阳照射(太阳模拟器SOL500 Honle,32.4-36J/cm²)。照射处理120分钟。太阳照射后,将细胞在38℃,20% CO₂湿润空气中培养2小时。在暴露于应激后,立即使用Prestoblue™试剂测量细胞活力。

[0337] 细胞活力分析:

[0338] 刃天青(Resazurin),PrestoBlue™试剂的活性成分,是无毒的、细胞可渗透的化合物,其实际上是无荧光的。在进入活细胞时,细胞还原环境将刃天青还原成试卤灵,一种高度发荧光的化合物。活细胞连续地将刃天青转化为试卤灵,增加了细胞周边的培养基的总荧光,与每个孔中活细胞的数目成正比。

[0339] 简而言之,吸出培养基并加入100μl/孔的PrestoBlue™在1xDPBS中的1/20稀释液。然后将平板在37℃,5% CO₂湿润空气中避光温育10分钟。在微量滴定板读数器(Clariostar,BMG LABTECH)中,在激发波长=560nm和发射波长=590nm处读取所得荧光。

[0340] 每种条件至少在5个重复样/孔中测试,并且测试项目在3个独立实验中测定。

[0341]	%活力	平均值± SEM	保护功效 (%)
	对照	133.5 ± 4.75****	100
	未处理+应激	100.0 ± 3.44	0
	红小豆 1%+应激	120.6 ± 4.73**	61.53
	红小豆 2%+应激	125.0 ± 4.58****	74.51
通过 ANOVA 方差分析,随后通过 Dunnett's 事后检验来获得 p 值,用于与应激比较的多重比较。****p 值< 0.0001; **p 值< 0.01			

[0342] 表9

[0343] 实施例14

[0344] 人真皮成纤维细胞和人表皮角质形成细胞(体外),修复评估。

[0345] 将人真皮成纤维细胞(HDFa)和人表皮角质形成细胞(HEKa)分别在补充M106培养基和补充KGM2培养基中,在37℃,5% CO₂湿润空气中培养。第二天,加入新鲜培养基,并且用2.34μg/cm²的颗粒物(柴油颗粒物NIST1650B)对细胞进行应激,随后进行太阳照射(太阳模拟器SOL500 Honle,24.3-36J/cm²,照射90-120分钟)。太阳照射后,将细胞在38℃,20% CO₂湿润空气中培养22小时。暴露于应激后,洗涤细胞,并用在培养基中1%或2% (v/v)的实施例3的红小豆水解产物在37℃,5% CO₂湿润空气中处理6小时。

[0346] 然后,使用如实施例13中公开的Prestoblue试剂测量细胞活力。

[0347]	活力 (%)	平均值 ± SEM	修复功效 (%)
	CTR	142.6 ± 3.02****	100
	未处理+应激	100 ± 3.44	0

红小豆1% (v/v)+应激	123.4±2.24****	54.78
红小豆2% (v/v)+应激	116.9±3.01****	39.69

[0348] 通过ANOVA方差分析,随后通过Dunnett's事后检验来获得p值,用于与应激

[0349] 比较的多重比较。****p值<0.0001

[0350] 表10

[0351] 实施例15

[0352] 人表皮角质形成细胞中DNA氧化的体外保护

[0353] 在细胞核水平上,DNA对氧化损伤敏感。在四个DNA碱基中,2'-脱氧鸟苷(dG)具有最低的电离电位,因此对氧化最敏感。可发生dG氧化的位置之一是C8位,产生8-氧代-dG。8-氧代-dG是DNA中氧化损伤的有用生物标志物。如果不修复,该损伤和/或由其衍生的产物可能在复制过程中被聚合酶错误读取并导致与A的错配。然后,在下一轮复制期间,此A将正确地与T配对,导致G-T颠换突变。该复制序列证明了8-氧代-dG的诱变性质,并强调了保护细胞免受氧化性DNA损伤的重要性。[Edward Pelle等人,Ultraviolet-B-Induced Oxidative DNA Base Damage in Primary Normal Human Epidermal Keratinocytes and Inhibition by a Hydroxyl Radical Scavenger.J Invest Dermatol.2003]

[0354] 人表皮角质形成细胞(HEKa)在补充KGM2中,在37℃,5% CO₂湿润空气中培养。然后,将细胞用在培养基中1%或2% (v/v)的红小豆纯化水解产物,在37℃,5% CO₂湿润空气中处理1小时。然后,将细胞与纯化的水解产物一起在高温(38℃)和高水平CO₂(20% CO₂湿润空气)条件下温育过夜以模拟“温室效应”条件。加入新鲜培养基,并且用1.58μg/cm²的颗粒物(柴油颗粒物NIST1650B)对细胞进行应激,随后进行太阳照射(太阳模拟器SOL500 Honle,12.15-36J/cm²,照射45-120分钟)。暴露于应激后,用试剂盒“DNeasy Blood&Tissue Kit”在Qiacube中进行DNA提取,并用Nanodrop™进行DNA定量。

[0355] 酶促水解

[0356] 使用酶促水解将DNA样品消化成核苷。对于每个样品,加入7uL15mM 8-HQ(8-羟基喹啉)和50uL缓冲液(50mM乙酸铵,0.2mM ZnCl₂,pH 5.3)。然后加入3uL核酸酶P1(0.39单位/uL)和4uL碱性磷酸酶(1单位/uL,在10mM Tris中,pH 7.4),并将溶液在37℃温育60分钟。在LC-MS/MS分析之前,将溶液在14,000rpm下离心5分钟。

[0357] HPLC-MS/MS分析

[0358] HPLC-ESI-MS/MS系统是与SHIMADZU三重四极质谱仪(LCMS-8040型)串联的SHIMADZU HPLC(Nexera XR型),其配备有电喷雾电离源。使用氮气作为干燥和雾化气体。使用氩气作为CID的碰撞气。

[0359] 使用InfinityLab Poroshell 120-EC-C18柱(4.6x 75mm x 2.7μm),流速为0.5mL/min,维持在36℃。使用水+0.1%乙酸(溶剂A)至甲醇(溶剂B)的梯度溶剂体系进行分离。梯度条件为:0-9分钟5%B-90%B,9-12分钟90%B,12.1-17分钟5%B。使用串联电喷雾离子化质谱以正离子模式定量分析物。以多反应监测模式监测产物离子。

[0360] 8-氧代dG的质量转变为m/z 284.15>168.05,并且8-羟基鸟苷的质量转变为m/z 300.00>168.05。二级转变(分别为m/z 284.15>140.1和m/z 300.00>140.05)用于确认样品中8-氧代dG和8-羟基鸟苷的身份,它们是DNA氧化的生物标志物。注射体积为25uL。

[0361]	8-氧代 dG (%)	
		平均值± SEM
	对照	60.70 ± 8.08**
	未处理+应激	100.0 ± 8.90
	红小豆 1% (v/v) +应激	67.28 ± 7.52*
	红小豆 2% (v/v) +应激	53.67 ± 2.90***

[0362] 通过ANOVA方差分析,随后通过Dunnett's事后检验来获得p值,用于与应激比较的多重比较。***p值<0.001;**p值<0.01;*p值<0.05

[0363] 表11A

[0364]	8-羟基鸟苷 (%)	
		平均值± SEM
[0365]	对照	41.23 ± 5.90****
	未处理+应激	100.0 ± 6.05
	红小豆 1% +应激	79.15 ± 5.57*
	红小豆 2% +应激	65.25 ± 3.19***

[0366] 通过ANOVA方差分析,随后通过Dunnett's事后检验来获得p值,用于与应激比较的多重比较。****p值<0.0001;***p值<0.001;**p值<0.01;*p值<0.05。

[0367] 表11B

[0368] 与未处理的应激细胞相比,在用纯化的水解产物处理后,DNA氧化的两种生物标志物(8-氧代-dG和8-羟基鸟苷)都减少,证明了纯化的水解产物的保护作用。

[0369] 实施例16

[0370] 与其他成分组合的抗氧化活性

[0371] 将合适的防腐剂[1% (w/w)Dermosoft 700B(INCI:酮戊酸(和)乙酰丙酸钠(和)甘油(和)水),来自Active Micro Technologies(AMT)的4% (w/w)Leucidal™SF Max(INCI:乳杆菌发酵产物)或4% (w/w)Leucidal™液体(INCI:明串珠菌/萝卜根发酵滤液)在连续搅拌下加入去离子水中。将根据实施例3的纯化水解产物加到该溶液的顶部以获得44-88% (v/v)的浓度,这取决于样品干重。然后将纯化的蛋白质水解产物(INCI:红豆(Phaseolus Angularis)种子提取物)的最终浓度保持恒定在2.2g/Kg溶液(0.22% (w/w))。一旦所得溶液变得完全均匀,用柠檬酸将pH值调节至4.5-5.0。将样品在40℃或室温下维持3个月,并通过DPPH测定来确定抗氧化活性。

		% DPPH 抑制		
		t=0	3M	
			40℃	室温
[0372]	纯化的红小豆水解产物	73.76	未测试	未测试
	1% (w/w) Dermosoft 700B	0		
	0.5% (w/w) 苯甲酸钠	0		
	甘油:H ₂ O	0		
	4% Leucidal™液体	0		
	纯化的红小豆水解产物和 1% (w/w) Dermosoft 700B + 4% (w/w) Leucidal™ SF Max	86.0	71.8 (-16.5)	86.5
	在低 pH 下纯化的红小豆水解产物和 0.5% (w/w) 苯甲酸钠	64.7	53.4 (-17.4)	61.6
[0373]	纯化的红小豆水解产物和甘油:H ₂ O (80:20)	76.0	77.1 (+1.4)	78.3
	纯化的红小豆水解产物+ 4% Leucidal™液体	86.6	84.1 (-2.9)	87.0

[0374] 表12

[0375] 没有防腐剂显示出抗氧化活性。与4% Leucidal™液体的组合显示出在Leucidal™液体中纯化的水解产物和明串珠菌/萝卜根酵素之间的协同效应。

[0376] 实施例17

[0377] 活性肽的分离和鉴定

[0378] 将根据实施例3的纯化提取物通过使用半制备高效液相色谱 (HPLC) 进一步分级, 并通过DPPH测定抗氧化活性以鉴定活性级分或肽。

[0379] 半制备HPLC(Shimadzu Corporation) 与LC-8A二元泵、SCL-8A系统控制器、SIL-8A自动进样器(20mL回路)、SPD-6A UV波长检测器、C-R6A数据记录模块和级分收集器一起使用。将纯化的水解产物在水中的适当稀释液加载到反相C₁₈柱(PuriFlash® PP-15C18-F0080, 31x 205mm, 15μm; Interchim®) 中。使用由洗脱液A(水/三氟乙酸1000:1)和B(乙腈/三氟乙酸1000:1)组成的洗脱液系统来分离肽。使用以下梯度组合物以35ml/min的流速进行洗脱: 等度: 在3分钟内0% B、在10分钟内0至30% B和在7分钟内30至75% B, 监测在220nm处的洗脱峰的吸光度。

[0380] 如下分析所收集的管: 通过3.0mg/ml的分析HPLC, 使用Cortecs C18+柱(4.6x 50mm; 2.7μm; Waters®), 流速为1.6ml/min, 使用以下梯度组合物: 等度: 在2分钟内0% B、在5分钟内0至30% B和在5分钟内30至75% B, 监测在220nm处的洗脱峰的吸光度。从纯化水解产物中获得不同的级分并冻干用于进一步分析和分离。将级分在水中重构, 并通过使用上述方法测量DPPH抑制百分比来确定它们的抗氧化活性。

[0381] 将显示最高DPPH活性的级分进一步细分。将不同级分中所含的肽以25mg/ml的浓度溶解于水中, 并通过使用相同的PuriFlash柱在上述半制备HPLC系统中加载4mL来分离。使用以下梯度组合物以35ml/min的流速进行洗脱: 等度: 在3分钟内0% B、并在15分钟内5至15% B, 监测在220nm处的洗脱峰的吸光度。收集的管通过与上述类似的分析HPLC条件进行分析, 但是使用如下等度梯度: 0% B 2分钟, 随后5至15% B 6分钟。获得显示抗氧化活性的不同亚级分。

[0382] 通过高分辨率质谱鉴定抗氧化肽

[0383] 通过与高分辨LTQ Orbitrap Velos质谱仪(Thermo Fisher Scientific)偶联的反相纳米HPLC分离亚级分。使用与捕获纳米柱(ID 100 μ m, 2cm, 5 μ m粒径, Thermo Fisher Scientific)连接的C18纳米柱(ID 75 μ m, 15cm, 3 μ m粒径, Nikkyo Technos Co.LTD)进行肽分离。后续阶段中的120分钟梯度:使用0.1%甲酸/水(阶段A)和0.1%甲酸/乙腈(阶段B), 流速为300nL/min。通过以下方式实现实时电离和肽裂解:以30.000FHMW的分辨率获得FT谱, 随后进行FT-MS/MS扫描, 并且选择具有HCD裂解、35%的碰撞能量和0.5分钟的动态排除的10个最强离子。所有的光谱均以正离子模式获得。

[0384] 为了鉴定肽序列, 使用具有MASCOT 2.5的Proteome Discoverer1.4.0.288程序(Thermo)。使用Fmoc/tBu化学方案, 通过应用标准固相肽合成来单独合成鉴定的肽。起始树脂使用CTC-PS或HO-Trt-ChemMatrix[®]树脂。在后一种情况下, 通过与37% HCl的无水THF溶液反应过夜进行初始树脂氯化。在作为碱的DIEA的存在下, 将第一氨基酸以DMF溶液形式引入, 随后用MeOH将树脂封端。用DMF洗涤树脂, 然后用20%哌啶的DMF溶液处理以除去Fmoc基团, 然后在相同溶剂中洗涤。使用DIPCDI和Oxyma作为偶联剂, 将随后的残基掺入DMF。使用茚三酮试验确认反应完成后, 通过抽吸过滤掉溶剂。此后, 用DMF洗涤树脂, 并如上所述或在2% DBU的DMF溶液中重复Fmoc-脱保护步骤。重复偶联-脱保护循环以引入剩余的氨基酸, 从第6个残基开始增加除去Fmoc的处理时间。每当Asp残基已经掺入到生长的肽链中时, 将Oxyma (0.5M) 引入混合物中。

[0385] 用DMF、DCM和乙醚洗涤并干燥肽基树脂, 最后在真空下放置过夜以除去痕量溶剂。通过使用TFA和5%水作为清除剂的酸解来实现粗产物从固体载体的裂解和侧链保护基的除去。用Et₂O从酸性混合物中沉淀出肽, 随后用相同的溶剂洗涤并在减压下干燥。将粗三氟乙酸盐肽冻干并通过分析型HPLC-MS分析, 得到超过80%的肽纯度。

[0386] 进一步评价合成的肽抑制DPPH的能力, 作为它们的抗氧化潜力的参考。最具活性的肽以及它们的抗氧化活性(DPPH)和在纯化水解产物中的存在示于表15中。所有合成序列都表现出抑制DPPH的能力, 为SEQ. ID. NO 1、2、3、4和5, 抗氧化能力最强的肽存在于F' 2亚级分中。

SEQ ID No.	序列	DPPH抑制(%)	浓度(ppm)
1	VAEQEQEQAKRQ	78.7	0.023
2	LPQQEQGHDR	77.5	0.033
3	VDAQPEEQQR	100	0.024
4	GINAENNQRN	96.3	0.068
5	EYTGDAAGR	83.9	0.007

[0388] 表13

[0389] 实施例18

[0390] 对人表皮角质形成细胞的体外增殖测定

[0391] 在37°C和5% CO₂条件下, 用补充有补充混合物C39016-CaCl₂溶液(Promocell)的角质形成细胞生长培养基II(Promocell)培养来自成人的人表皮角质形成细胞(HEKa)。用在培养基中1% (v/v)的实施例3的纯化水解产物处理细胞。培养24小时后, 用PrestoBlue[™]细胞活力试剂(Thermo Fisher Scientific)定量活细胞。

[0392] -细胞活力分析:

[0393] 刃天青 (Resazurin), PrestoBlue™ 试剂的活性成分, 是无毒的、细胞可渗透的化合物, 其实际上是无荧光的。在进入活细胞时, 细胞还原环境将刃天青还原成试卤灵, 一种高度发荧光的化合物。活细胞连续地将刃天青转化为试卤灵, 增加了细胞周边的培养基的总荧光, 与每个孔中活细胞的数目成正比。

[0394] 简而言之, 吸出培养基并加入 100 μ l/孔的 PrestoBlue™ 在 1xDPBS 中的 1/20 稀释液。然后将平板在 37℃, 5% CO₂ 湿润空气中避光温育 10 分钟。在微量滴定板读数器 (Clariostar, BMG LABTECH) 中,

[0395] 在激发波长 = 560nm 和发射波长 = 590nm 处读取所得荧光。

[0396] 每种条件至少在 3 个重复样/孔中测试, 并且测试项目在 3 个独立实验中测定。

[0397]	被测剂量	细胞活力% (平均值 $\pm$ SEM)
	对照	100.00 $\pm$ 1.99
	红小豆 1% (v/v)	127.62 $\pm$ 14.23**

[0398] 统计学显著性: **p<0.01, 使用非配对学生 t 检验计算。

[0399] 表 18

[0400] 实施例 19

[0401] 来自太阳照射的脂质过氧化修复 (冲洗掉)

[0402] 在皮氏培养皿 (Petri Dishes) 中称重八百毫克 (800mg) 亚洲人毛发, 并在太阳模拟器 (太阳模拟器 SOL500 Honle, 32.4-36J/cm²) 中照射 2 小时。一旦照射时间结束, 在 Flacon 管中称重 600mg 受损毛发, 并以 22 μ g/mL 加入 6mL 红小豆纯化水解产物, 并留在轨道式震荡器上 30 分钟。在与红小豆纯化水解产物温育一定时间后, 在 30℃ 用水冲洗毛发 30 秒。然后, 将一半毛发留在纤维素纸中干燥, 剩余部分 (300mg) 再次用 22 μ g/mL 的 3mL 的红小豆纯化水解产物处理。将样品放置在轨道式震荡器上 30 分钟, 然后在 30℃ 用水冲洗毛发 30 秒, 并干燥直至其分析。未损伤的 (即, 未处理的) 亚洲人毛发用作对照样品。对于损伤对照样品 (“太阳照射损伤对照”), 使用施加太阳照射后的损伤毛发。

[0403] 在 Eppendorf 管中, 称重 15-30mg 毛发样品, 加入 1mL 甲醇并超声处理 15 分钟。超声处理后, 在 10mL 玻璃管中, 加入以下试剂: 500 μ L 样品 (预先在甲醇中提取)、750 μ L H₃PO₄、在 NaOH 1N 和 450 μ L H₂O-MilliQ 中的 42mM 的 250 μ L 2-硫代巴比妥酸溶液。将管涡旋并在 90℃ 温育 60 分钟。随后, 加入 1.95mL 碱性甲醇并涡旋, 然后进行 HPLC 分析。

[0404] 在以下条件下进行 HPLC 分析: Kromasil 100C-18, 5 μ m, 25x 4.5cm, 使用 40% B 的等度方法, 并且流动相是 A: 50mM 磷酸缓冲液 pH 6.8 和 B: MeOH, 使用 λ_{ex} = 527nm 和 λ_{em} = 551nm 的荧光检测器。

[0405] 结果:

[0406] 当在太阳照射损伤的毛发中以 22 μ g/mL 施用红小豆纯化水解产物一次时, 存在 35.6% 的脂质过氧化抑制, 如可在图 1 和表 I 中观察到的。

[0407]

	对照	2 小时 太阳照射	2 小时太阳照射+ 22μg/mL 红小豆纯化水解产物
平均值	44.8	100.0	64.4
SEM	1.0	5.3	2.8
P 值	-	-	< 0.001
%功效	-	-	35.6

[0408] 表18

[0409] 因此,结果证明红小豆纯化水解产物对太阳照射的保护作用。

[0410] 实施例20

[0411] 免洗型血清

[0412] 制备包含以下成分的免洗型血清:

[0413]

成分	重量%	
水	95.20	
DISSOLVINE NA2 P	0.20	
Carbopol® Ultrez 21 聚合物	0.35	
活性成分	水（含水）	1.96
	Leucidal™液体（明串珠菌/萝卜根发酵滤液）	0.04
	红小豆肽水解产物（红小豆种子提取物）	0.004
	柠檬酸	0.0004
聚山梨酯 20	1.05	
婴儿芦荟（PR155）	0.20	
EUXYL PE 9010（BC042）	0.50	
氢氧化钠（20% w/w）	0.50	

[0414] 表19

[0415] 实施例21

[0416] 面霜

[0417] 制备包含以下成分的面霜:

[0418]

成分		重量%
水（含水）		74.24
ZEMEA 丙二醇		7.00
SCHERCEMOL CO		5.00
甘油		2.00
葡聚糖 E-20 湿润剂		2.00
辛酸/癸酸甘油三酯		2.50
NOVEMER EC-2		2.00
DERMOSOFT 700B		1.00
CETIOL SB-45		0.50
DERMOSOFT GMCY		0.50
CARBOPOL ULTREZ 20 聚合物		0.30
氢氧化钠（20% w/w）		0.96
活性成分	水（含水）	1.96
	Leucidal™液体（明串珠菌/萝卜根发酵滤液）	0.04

[0419]

	红小豆肽水解产物 (红小豆种子提取物)	0.004
	柠檬酸	0.0004

[0420] 表20

[0421] 实施例22

[0422] 针对环境暴露组真实户外条件的毛发保护的体内功效

[0423] 这项研究进行了14天。这项研究中包括六十二 (62) 名年龄介于19岁与49岁之间的女性志愿者。根据Andre Walker Hair Typing System, 本研究中包括的志愿者具有不同的毛发类型, 并且她们中的至少50%的毛发被染色。将受试者分成两组。一组施用如实施例20所述的免洗型血清 (“活性免洗型血清”), 另一组施用除红小豆水解产物外具有相同组合物的安慰剂免洗型血清。无论哪一组, 每天在所有毛发上施用免洗型血清14天。在研究期间, 要求所有受试者每天在户外度过4小时以将毛发暴露于真实的户外条件。受试者充当其自身参考, 将在14天获得的结果与在初始时间获得的结果进行比较。

[0424] 志愿者的毛发在初始时间和产品施用14天后由专家进行临床评价。产品抗环境暴露组的真实室外条件的功效如下进行评估:

[0425] -由专家评估志愿者的毛发分叉, 该专家通过在初始时间和产品施用14天的量表对毛发分叉进行分级, 进行临床评价。

[0426]	平均毛发分叉差异 (%)	
	活性免洗型血清	安慰剂免洗型血清
	$[(T14 \text{ 天} - T0) / T0] \times 100$	
	-12.9 *	-7.4

[0427] 表21. 施用产品14天后, 活性血清和安慰剂免洗型血清的平均毛发分叉差异。使用配对样本Wilcoxon检验计算出* $p < 0.05$ 。

[0428] 结果表明, 在施用活性免洗型血清14天后, 相对于起始时间而言, 毛发分叉显著减少。

[0429] 由专家评估志愿者的毛发纤维排列, 该专家通过在初始时间和产品施用14天的量表对纤维排列进行分级, 进行临床评价。

[0430]	平均纤维排列差异 (%)	
	活性免洗型血清	安慰剂免洗型血清
[0431]	$[(T14 \text{ 天} - T0) / T0] \times 100$	
	22.2 **	16.1

[0432] 表22. 施用产品14天后, 活性血清和安慰剂免洗型血清的平均纤维排列差异。使用配对样本Wilcoxon检验计算出** $p < 0.01$ 。

[0433] 结果表明, 在施用活性免洗型血清14天后, 相对于起始时间而言, 纤维排列显著增加。

[0434] -由专家评估志愿者的毛发卷曲, 该专家通过在初始时间和产品施用14天的量表对卷曲进行分级, 进行临床评价。

[0435]	平均卷曲差异 (%)	
	活性免洗型血清	安慰剂免洗型血清
	$[(T14 \text{ 天} - T0) / T0] \times 100$	
	-13.6 **	-9.4 *

[0436] 表23. 施用产品14天后, 活性血清和安慰剂免洗型血清的平均卷曲差异。使用配对样本Wilcoxon检验计算出** $p < 0.01$ 且 * $p < 0.05$ 。

[0437] 结果表明,在施用活性免洗型血清14天后,相对于起始时间而言,卷曲显著减少。

[0438] 实施例23

[0439] 3型和4型毛发在针对环境暴露组真实户外条件的毛发保护的体内功效

[0440] 这项研究进行了14天。这项研究中包括二十一(21)名年龄介于23岁与44岁之间的女性志愿者。根据Andre Walker Hair Typing System,本研究中包括的志愿者具有3型毛发(卷曲的毛发)和4型毛发(盘绕的毛发),并且她们中的至少50%的毛发被染色。将受试者分成两组。一组施用如实施例20所述的免洗型血清(“活性免洗型血清”),另一组施用安慰剂免洗型血清。无论哪一组,每天在所有毛发上施用免洗型血清14天。在研究期间,要求所有受试者每天在户外度过4小时以将毛发暴露于真实的户外条件。受试者充当其自身参考,将在14天获得的结果与在初始时间获得的结果进行比较。

[0441] 志愿者的毛发在初始时间和产品施用14天后由专家进行临床评价。通过志愿者的毛发蓬松度差异对产品抗环境暴露组的真实室外条件的功效进行评估。

[0442] 由专家评估志愿者的毛发蓬松度,该专家通过在初始时间和产品施用14天的量表对毛发蓬松度进行分级,进行临床评价。

[0443]	平均毛发蓬松度差异(%)	
	活性免洗型血清	安慰剂免洗型血清
	$[(T14 \text{ 天} - T0) / T0] \times 100$	
	-19.9 (ls)	-13.6

[0444] 表24.施用产品14天后,活性免洗型血清和安慰剂免洗型血清的平均毛发蓬松度差异使用配对样本Wilcoxon检验计算为 $p < 0.1$ 。

[0445] 结果表明,具有3型和4型毛发的志愿者在施用活性免洗型血清14天后,相对于起始时间而言,毛发蓬松度显著减少。

[0446] 实施例24

[0447] 在多种族皮肤类型志愿者中针对环境暴露组真实户外条件的皮肤保护的体内功效

[0448] 这项研究进行了28天。这项研究中包括多种族的六十二(62)名年龄介于19岁与49岁之间的女性志愿者。将受试者分成两组。一组施用如实施例21所述的组合物(“活性乳膏”),另一组施用除红小豆蛋白质水解产物外具有相同组合物的安慰剂乳膏。无论哪一组,在早晨和下午每天两次在整个面部上施用乳膏28天。在研究期间,要求所有受试者每天在户外度过4小时以将皮肤暴露于真实的户外条件。受试者充当其自身参考,将在不同的研究时间获得的结果与在初始时间获得的结果进行比较。产品抗环境暴露组的真实室外条件的功效如下进行评估:

[0449] -经皮水分流失(TEWL)的屏障功能保护评价:当皮肤的屏障功能受损时,可预期TEWL的增加。在产品施用的初始时间、第14天和第28天对面颊进行Tewameter®测量。

[0450]	TEWL 差异(%)	
	活性乳膏	安慰剂乳膏
	$[(T14 \text{ 天} - T0) / T0] \times 100$	
	0.1	19.8
	$[(T28 \text{ 天} - T0) / T0] \times 100$	
	-0.8	12.2

[0451] 表25.在施用产品14天和28天后,活性乳膏和安慰剂乳膏的TEWL差异。使用配对样

本Wilcoxon检验计算的在施用14天时活性乳膏对安慰剂乳膏的显著性为 $*p<0.05$ 。

[0452] 结果表明,在施用活性乳膏14天后,相对于安慰剂乳膏,TEWL显著减少。

[0453] -通过志愿者面颊中色斑的平均周长来评估皮肤肌理不均匀性。用

[0454] **Colorface®**获取初始时间和产品施用28天的图像,并用Framescan软件测量感兴趣区域(Region Of Interest,R0I)中色斑的周长平均值。

[0455]	[(T28 天- T0) /T0] x100	色斑周长平均差异 (%)	
		活性乳膏	安慰剂乳膏
		-3.2 *	-0.2

[0456] 表26.施用产品28天后,活性乳膏和安慰剂乳膏的色斑周长平均差异。使用学生t检验计算出 $*p<0.05$ 。

[0457] 结果表明,在施用活性乳膏28天后,相对于起始时间,色斑周长显著减少,导致皮肤肌理不均匀性降低。

[0458] -由皮肤科医生评估肤色均匀性,该皮肤科医生通过在初始时间和产品施用28天的量表对肤色均匀性进行分级,进行临床评价。

[0459]	[(T28 天- T0) /T0] x100	肤色均匀性平均差异 (%)	
		活性乳膏	安慰剂乳膏
		12.5 *	6.7

[0460] 表27.施用产品28天后,活性乳膏和安慰剂乳膏的肤色均匀性差异。使用学生t检验计算出 $*p<0.05$ 。

[0461] 结果表明,在施用活性乳膏28天后,根据对初始时间的专家评估,肤色均匀性显著增加。

[0462] 实施例25

[0463] 在亚洲人种志愿者中针对环境暴露组真实户外条件的皮肤保护的体内功效

[0464] 这项研究进行了28天。这项研究中包括亚洲人种的七(7)名年龄介于23岁与49岁之间的女性志愿者。四(4)名受试者的整个面部在早晨和下午每天两次施用活性乳膏和三(3)份安慰剂乳膏28天。施用活性乳膏的受试者施用如实施例21所述的组合物,施用安慰剂乳膏的受试者施用除红小豆肽水解产物外相同的组合物。在研究期间,要求所有受试者每天在户外度过4小时以将皮肤暴露于真实的户外条件。受试者充当其自身参考,将在28天获得的结果与在初始时间获得的结果进行比较。

[0465] 志愿者的额头图像在初始时间和产品施用第28天通过**Colorface®**获得。通过从图像分析获得的不同参数评估产品对亚洲人种志愿者抗环境暴露组真实室外条件的功效:

[0466] -通过用于测量与红斑相关的颜色的a*参数的平均差异来评估皮肤红斑。

[0467]	[(T28 天- T0) /T0] x100	a*参数平均差异 (%)	
		活性乳膏	安慰剂乳膏
		-8.3 *	-1.7

[0468] 表28.施用产品28天后,活性乳膏和安慰剂乳膏的a*参数平均差异。使用配对学生t检验计算出 $*p<0.05$ 。

[0469] -通过用于测量与黑素相关的颜色的b*参数的平均差异来评估皮肤黑素。

[0470]		b*参数平均差异 (%)	
		活性乳膏	安慰剂乳膏
	$[(T28 \text{ 天} - T_0) / T_0] \times 100$	-10.5 (1s)	-2.7

[0471] 表29.施用产品28天后,活性乳膏和安慰剂乳膏的b*参数平均差异使用配对学生t检验计算为 $p < 0.1$ 。

[0472] 结果表明,在施用活性乳膏28天后,相对于安慰剂乳膏,亚洲人种志愿者的a*参数和b*参数显著减少。因此,亚洲人种志愿者施用产品28天后,皮肤红斑和皮肤黑素减少。这些参数分别与皮肤发红的视觉减少和皮肤增亮的改善有关。

[0473] 实施例26

[0474] 在高加索人种志愿者中针对环境暴露组真实户外条件的皮肤保护的体内功效

[0475] 这项研究进行了28天。这项研究中包括二十一(21)名年龄介于19岁与39岁之间的高加索人种女性志愿者。十(10)名受试者的整个面部在早晨和下午每天两次施用活性乳膏和十一(11)份安慰剂乳膏28天。施用活性乳膏的受试者施用如实施例21所述的组合物,施用安慰剂乳膏的受试者具有除红小豆水解产物外相同的组合物。在研究期间,要求所有受试者每天在户外度过4小时以将皮肤暴露于真实的户外条件。受试者充当其自身参考,将在28天获得的结果与在初始时间获得的结果进行比较。

[0476] 志愿者的脸颊图像在初始时间和产品施用第28天通过Colorface®获得。通过从图像分析获得的a*参数评估产品对高加索人种志愿者抗环境暴露组真实室外条件的功效。

[0477] 在初始时间和产品施用28天后评估皮肤红斑。通过用于测量与红斑相关的颜色的a*参数的平均差异来评估皮肤红斑。

[0478]		a*参数平均差异 (%)	
		活性乳膏	安慰剂乳膏
	[(T28 天- T0) /T0] x100	-4.5 *	-0.5

[0479] 表30.施用产品28天后,活性乳膏和安慰剂乳膏的a*参数平均差异。使用配对学生t检验计算出 $*p < 0.05$ 。

[0480] 结果是,在产品施用28天后,在高加索人种志愿者中,相对于安慰剂乳膏,a*参数显著降低,导致皮肤显示更少的红斑(即,皮肤发红)。

[0481] 实施例27

[0482] 在非洲人种志愿者中针对环境暴露组真实户外条件的皮肤保护的体内功效

[0483] 这项研究进行了28天。这项研究中包括非洲人种的十九(19)名年龄介于23岁与44岁之间的女性志愿者。九(9)名受试者的整个面部在早晨和下午每天两次施用活性乳膏和十(10)份安慰剂乳膏28天。施用活性乳膏的受试者施用如实施例21所述的组合物,施用安慰剂乳膏的受试者施用除红小豆水解产物外相同的组合物。在研究期间,要求所有受试者每天在户外度过4小时以将皮肤暴露于真实的户外条件。受试者充当其自身参考,将在28天获得的结果与在初始时间获得的结果进行比较。

[0484] 志愿者的脸颊图像在初始时间和产品施用第28天通过Colorface®获得。通过从图像分析获得的b*参数评估产品对非洲人种志愿者抗环境暴露组真实室外条件的功效。

[0485] 在初始时间和产品施用28天后评估黑素。通过用于测量与黑素相关的颜色的b*参

数的平均差异来评估皮肤黑素。

[0486]	b*参数平均差异 (%)	
	活性乳膏	安慰剂乳膏
	$[(T_{28 \text{ 天}} - T_0) / T_0] \times 100$	
	-4.6 *	-1.3

[0487] 表31.施用产品28天后,活性乳膏和安慰剂乳膏的b*参数平均差异。使用配对学生t检验计算出* $p < 0.05$ 。

[0488] 结果表明,在产品施用28天后,在非洲人种志愿者中,相对于安慰剂乳膏,b*参数显著降低,导致皮肤具有更少的黑素(即,更高的亮度)。