



(12) 发明专利

(10) 授权公告号 CN 101018554 B

(45) 授权公告日 2010. 10. 27

(21) 申请号 200480043996. 9

(22) 申请日 2004. 09. 14

(85) PCT申请进入国家阶段日
2007. 03. 14

(86) PCT申请的申请数据

PCT/BE2004/000132 2004. 09. 14

(87) PCT申请的公布数据

W02006/029484 EN 2006. 03. 23

(73) 专利权人 味之素欧姆尼凯姆股份有限公司

地址 比利时蒙特 - 圣古贝特

专利权人 雅诗兰黛协调中心股份有限公司

(72) 发明人 L · 德克莱尔 H · 科斯特延斯

D · 梅斯 W · 范布鲁塞尔

G · 舍尔肯斯

(74) 专利代理机构 中国国际贸易促进委员会专

利商标事务所 11038

代理人 刘明海

(51) Int. Cl.

A61K 31/66 (2006. 01)

A61K 36/18 (2006. 01)

(56) 对比文件

WO 03086414 A1, 2003. 10. 23, 摘要, 权利要求 9-10.

JP 9-194493 A, 1997. 07. 29, 说明书第 2 页.

审查员 陈晏晏

权利要求书 2 页 说明书 13 页 附图 3 页

(54) 发明名称

含有磷酰化多酚的局部施用组合物

(57) 摘要

本发明提供含与局部施用可接受的载体结合的磷酰化多酚的局部施用组合物。本发明的组合物提供延缓输送多酚到角质组织, 例如皮肤、头发和指甲上的方式, 在采用角质组织的酶将多酚脱磷酰化的情况下, 使它返回到其天然的活性形式。该组合物尤其可用于调节皮肤病。

1. 施加到角质组织上的局部施用组合物,它包括与化妆品或药学上可接受的载体结合的至少一种磷酸化多酚;其中所述载体选自凝胶、乳霜、乳液、膏、摩丝、喷剂和固体棒状物,和其中所述至少一种磷酸化多酚是磷酸化形式的单宁。

2. 权利要求1的组合物,其中所述载体选自防晒剂、自晒黑剂、皮肤保湿剂和调理剂、剥落剂、抗痤疮组合物、抗老化组合物、彩色化妆品、唇膏、透明高光亮唇膏、粉底、眼影、胭脂、眼线笔、睫毛油、睫毛底涂油或涂覆产品、头发生长延迟组合物、头发生长促进组合物、香波或调理剂、指甲漆、指甲面漆、指甲底涂层、纹脉填料和指甲调理剂。

3. 权利要求1的组合物,其中至少一种磷酸化多酚是磷酸化缩合单宁。

4. 权利要求3的组合物,其中磷酸化缩合单宁是局部施用可接受的磷酸化类黄酮、磷酸化芪或磷酸化间苯三酚。

5. 权利要求3的组合物,其中磷酸化缩合单宁是磷酸化类黄酮或其混合物。

6. 权利要求5的组合物,其中磷酸化类黄酮选自如下化合物的磷酸化形式:黄烷酮、查耳酮、黄酮、异黄酮、黄酮醇、黄烷醇、香豆素、色酮、3,3'-亚甲基-4-双羟香豆素、苯并二氢吡喃-4-酮和苯并二氢吡喃醇。

7. 权利要求3的组合物,其中磷酸化缩合单宁是磷酸化芪。

8. 权利要求7的组合物,其中磷酸化缩合单宁是磷酸化白藜芦醇或磷酸化白藜芦醇衍生物。

9. 权利要求1的组合物,其中以磷酸化植物提取物形式提供磷酸化多酚。

10. 权利要求9的组合物,其中磷酸化多酚以选自下述的植物提取物形式提供:桉树、金合欢属、榉属、松属、银杏、胡枝子属、西番莲、水飞蓟属、柑桔、金缕梅、百里香属、果香菊属、蓍属、木贼属、槐属、荞麦属、接骨木花、桦属、葡萄属、山楂属、拉坦尼根、千屈菜属、金合欢属、柏木属、越橘属、茶藨子属、矢车菊属、蔷薇属、木槿属、山茶属、锦葵属、鬼臼属、五味子、Gaiacum、可可属、熊果属、紫藤、菜蓟、迷迭香属、鸡脚参属、一枝黄花、石榴、紫草、姜黄属、七叶树属、草木犀、阿密、山柳菊、当归、车叶草、中国没食子、葡萄种子、葡萄皮、绿茶、红茶、白茶、石榴、可可粉、红葡萄酒、柿子、柑桔类水果、大豆及其混合物的磷酸化提取物。

11. 权利要求1的组合物,其中磷酸化多酚是磷酸化的可水解单宁。

12. 权利要求1的组合物,它包括磷酸化白藜芦醇或磷酸化白藜芦醇衍生物。

13. 权利要求1的组合物,它包括至少一种选自如下的皮肤益处剂:收敛剂、抗氧化剂、自由基清除剂、抗痤疮剂、抗微生物剂、抗真菌剂、螯合剂、抗老化剂、抗皱纹剂、止痛剂、皮肤光亮剂、皮肤调理剂、抗刺激剂、消炎剂、抗脂肪团剂、保湿剂、润肤剂、有机防晒剂、无机防太阳剂、化学剥落剂、物理剥落剂、自晒黑剂、生物活性肽及其混合物。

14. 权利要求1的组合物在制备用于调节皮肤病的药剂中的用途。

15. 权利要求14的用途,其中待治疗的皮肤病选自湿疹、皮脂溢性皮炎、牛皮癣、干燥病、肿瘤生长、皮炎、毛囊炎、酒渣鼻和痤疮。

16. 权利要求14的用途,其中待治疗的皮肤病是一种或多种皮肤老化的迹象。

17. 权利要求16的用途,其中磷酸化多酚选自磷酸化类黄酮、芪及其混合物。

18. 权利要求17的用途,其中磷酸化类黄酮选自如下化合物的磷酸化形式:黄烷酮、查耳酮、黄酮、异黄酮、黄酮醇、黄烷醇、香豆素、色酮、3,3'-亚甲基-4-双羟基香豆素、苯并二氢吡喃-4-酮和苯并二氢吡喃醇。

19. 权利要求 16 的用途,其中磷酰化多酚是磷酰化白藜芦醇或磷酰化白藜芦醇衍生物。

20. 权利要求 1 的组合物在制备用于调节反应性氧物种对角质组织细胞的作用的药剂中的用途。

21. 磷酰化多酚在制备用于延缓输送多酚到皮肤上的药剂中的用途。

22. 使得水不溶性多酚变得水溶性的方法,该方法包括将不溶性多酚磷酰化到足以使得多酚水溶性的程度。

23. 权利要求 22 的方法,其中多酚是白藜芦醇或白藜芦醇衍生物。

含有磷酰化多酚的局部施用组合物

技术领域

[0001] 本发明涉及用于施加到皮肤上的组合物。特别地,本发明涉及含有稳定化多酚化组合物的局部施用组合物。背景技术

[0002] 被称为多酚的一组化合物显示出多种多样的生物活性,且广泛用于治疗皮肤的局部配方内。许多多酚的特别广泛利用的一种功能是作为抗氧化剂。在这一角色下,这些化合物可起到两个作用:它们可保护它们在其内被输送的组合物以免受氧化降解,以及提供对它们所施加到其上的皮肤的保护以免受自由基破坏。然而,令人啼笑皆非的是,这些保护分子本身易于受到外部来源的损坏。这些多用途化合物对通过暴露于热或光下的降解是高度敏感的,常常导致它们所包含在其内的组合物的变色,以及减少其当施加到皮肤上时的效力。由于这一弱点,其可利用性的真正范围尚未被完全实现。含有未保护的多酚的组合物不可能发挥其全部的生物潜力,且提供保存其活性所需的保护性包装或特殊操作在成本上太高,以致于在商业上大规模的情况下是不可行的。因此,继续需要具有改进的稳定性和保留的生物活性的含有多酚的组合物。发明内容发明概述

[0003] 本发明提供含有至少一种磷酰化多酚和局部施用可接受的载体的局部施用组合物;与未改性的多酚相比,这些组合物提供更大的生物活性稳定性以及可实现组成的完整性。本发明的组合物尤其可用于清除皮肤上的自由基,和治疗和减少皮肤上的老化症状的方法中。本发明还提供在皮肤上延缓释放多酚的方法,该方法包括将含有至少一种磷酰化多酚和局部施用可接受的载体的组合物施加到皮肤上。本发明还提供使不溶性多酚变为水溶性的方法,该方法包括将不溶性多酚磷酰化到足以使得多酚变为水溶性的程度。附图简述

[0004] 图 1 在上部图表中是白藜芦醇:未磷酰化的起始材料的 HPLC 分析,和在下部图表中是高度磷酰化的白藜芦醇的 HPLC 分析。

[0005] 图 2 是当用来自麦胚的酸性磷酸酶培育时,来自磷酰化白藜芦醇的白藜芦醇形成的时间函数关系。

[0006] 图 3 是当用人类 SC D- 鳞屑 (squame) 胶带剥离物 (tapestripping) 中的可提取级分培育时,来自磷酰化白藜芦醇的白藜芦醇形成的时间函数关系。

[0007] 图 4 是用增加浓度的来自麦胚的酸性磷酸酶培育时,磷酰化白藜芦醇的体外抗氧化活性的恢复。发明详述

[0008] 本发明的组合物利用多酚的磷酸酯作为活性组分。该活性组分是已通过将分子上的一个或多个羟基磷酰化而稳定化的多酚分子。尽管分子的磷酰化导致对降解敏感度的下降,但当除去磷酸酯基时,改性的化合物保持未改性多酚分子固有的生物活性。在一个实施方案中,本发明的组合物包含由式 $\text{ROP}(\text{O})(\text{OH})_2$ 、 $\text{ROP}(\text{O})(\text{OH})\text{OP}(\text{O})(\text{OH})_2$ 或 $\text{ROP}(\text{O})(\text{OH})\text{OP}(\text{O})(\text{OH})\text{OP}(\text{O})(\text{OH})_2$ 表示的多酚的磷酸酯,和 / 或这些之一的金属盐,其中 R 表示有机多酚分子,所述有机多酚分子可被改性为含有一个或多个磷酸酯基。

[0009] 在组合物中使用的水解物可以是化妆品或者药物上可接受的用于局部施用到哺乳动物皮肤上的任何多酚。“化妆品或者药物上可接受的”是指可在哺乳动物皮肤、毛发或指

甲上,优选在人类皮肤、毛发或指甲上以安全和有效量使用的化合物。生物活性的多酚是广泛已知的,且容易在天然来源,例如从各种植物提取物中发现。可用于本发明组合物中的多酚应理解为包括天然存在的多酚,多酚的合成衍生物,以及含有至少一种多酚类组分的植物提取物。

[0010] 在本发明的一个实施方案中,待磷酰化的多酚为具有一个带至少一个羟基的芳环

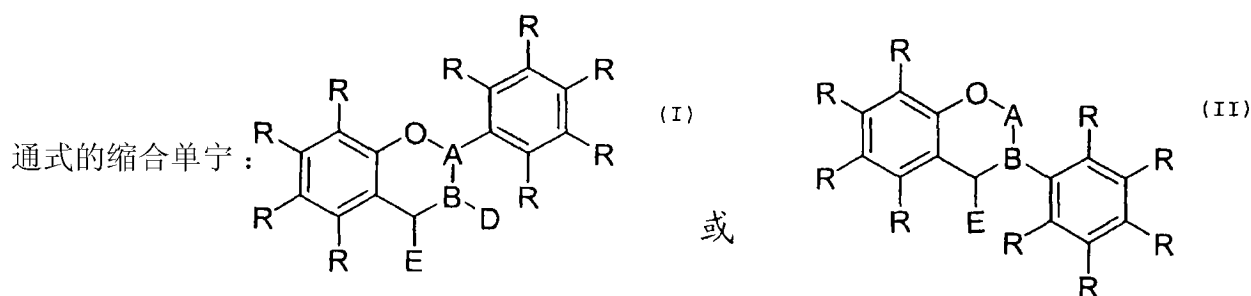
的简单化合物形式。这类化合物具有下述通式:

$$\begin{array}{c} \text{R}_4 \quad \text{R}_5 \\ \diagup \quad \diagdown \\ \text{C}_6\text{H}_2 \\ \diagdown \quad \diagup \\ \text{R}_2 \quad \text{R}_1 \end{array} \quad \text{OH}$$

其中 R_1 、 R_2 、 R_3 、 R_4 、 R_5 彼此独

立地各自表示氢、氢氧根 (hydroxide)、羧基、Z、OZ 或 COOZ , 优选其中取代基 R_1 、 R_2 、 R_3 、 R_4 、 R_5 中的至少一个是羟基或羧基, Z 是由 1-10 个碳原子组成的烷基链, 或者是 CHCHCOOY , 其中 Y = 氢或 1-4 个碳原子的烷基链。优选, 多于一个 R 取代基是羟基。这一组中典型的化合物包括具有两个羟基的儿茶酚、连苯三酚、愈创木酚和间苯二酚; 具有三个羟基的连苯三酚和羟基酸及其酯, 例如没食子酸、没食子酸甲酯、没食子酸乙酯、没食子酸丙酯和没食子酸辛酯; 具有一个羟基和一个羧基的水杨酸; 和羟基肉桂酸与酯, 其中一个 R 基是乙烯基类酸或酯, 例如对香豆酸、咖啡酸、阿魏酸、芥子酸 (sinapic acid)、绿原酸、姜黄和其中羧酸基用具有 1-10 个碳原子的简单醇酯化的类似物。

[0011] 然而, 在优选的实施方案中, 待磷酰化的可局部使用的多酚是选自通常称为单宁的化合物中的更加复杂的分子。单宁包括两个主要的类别, 缩合单宁和可水解单宁。本发明的磷酰化单宁可一般地用下述通式表示: ArOP(O)(OH)_2 产品、 $\text{ArOP(O)(OH)OP(O)(OH)}_2$ 或 $\text{ArOP(O)(OH)OP(O)(OH)OP(O)(OH)}_2$ 产品和 / 或这些之一的金属盐; 其中 Ar 表示缩合或可水解单宁。在 E. Haslam 为编者的标准著作“Chemistry of vegetable tannins (植物单宁化学)”, Academic Press, 伦敦, 1966 中充分公开了可水解和缩合单宁二者及其实例, 其内容在此通过参考引入。缩合单宁由下述酚衍生物组成, 所述酚衍生物是具有至少两个芳环的较大结构的一部分, 且不能完全被水解, 因为至少一个酚环通过至少一个碳碳键 (单键或双键) 或醚键连接到该分子的另一部分上。缩合单宁可以用下述通式表示或者对应于下述

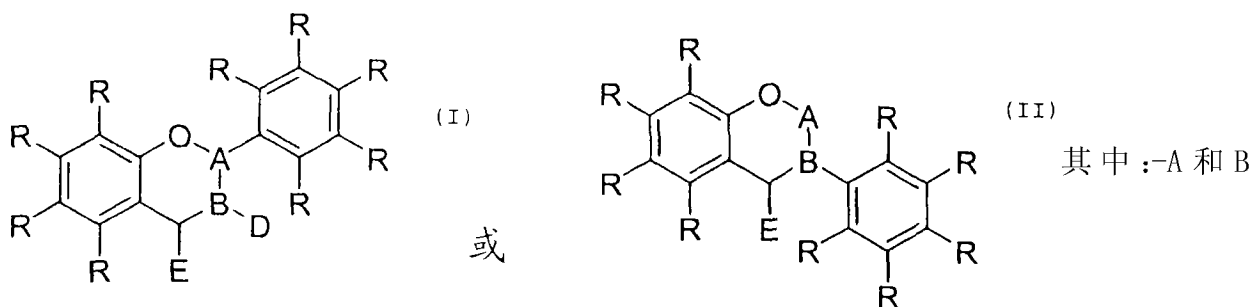


其中: -A 和 B 是通过单键或双键连接的碳原子, -D 是氢, 氢氧根, 或者用没食子酸或鞣花酸酯化的氢氧根, -E 是氢、氢氧根、O-葡萄糖或对应于式 (I) 或 (II) 的另一缩合单宁, -R 是氢、氢氧根、O-葡萄糖、含有 1-3 个碳原子的 O-烷基, 或选自 OP(O)(OH)_2 、 $\text{OP(O)(OH)OP(O)(OH)}_2$ 、 $\text{OP(O)(OH)OP(O)(OH)OP(O)(OH)}_2$ 和这些磷酸酯基的金属盐的磷酸酯基, 其中至少一个 R 是磷酸酯基。

[0012] 典型的产品种类是类黄酮、芪和间苯三酚, 其中每一类都含有可局部使用的多酚。

[0013] 在一个优选的实施方案中, 缩合单宁是类黄

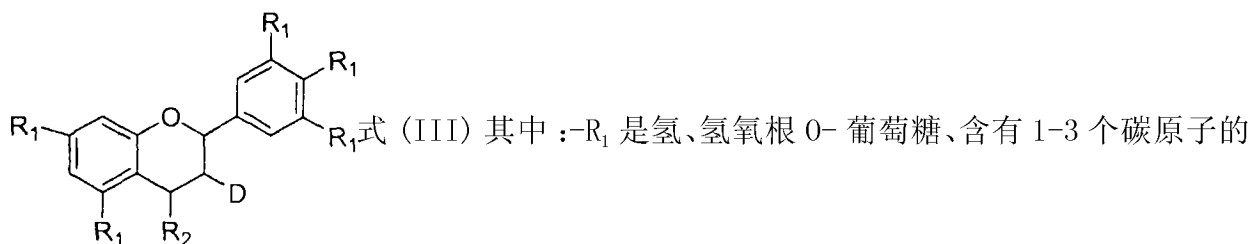
酮。类黄酮可定义为具有下述通式 (I) 或 (II) 的结构化合物：



是通过单键或双键连接的碳原子，-D 是氢，氢氧根，或者用没食子酸或鞣花酸酯化的氢氧根，-E 是氢、氢氧根、0-葡萄糖或对应于式 (I) 或 (II) 的另一磷酸化类黄酮，-R 是氢、氢氧根、0-葡萄糖、含有 1-3 个碳原子的 0-烷基，或选自 $OP(O)(OH)_2$ 、 $OP(O)(OH)OP(O)(OH)_2$ 、 $OP(O)(OH)OP(O)(OH)OP(O)(OH)_2$ 和这些磷酸酯基的金属盐的磷酸酯基，其中至少一个 R 是磷酸酯基。

[0014] 黄烷醇、黄酮醇、黄酮、黄烷酮、异黄烷、异黄烷酮全部属于以上定义的类型黄酮种类。这些术语是本领域的技术人员公知的（参见，例如 Peterson 等人，(1998)，J Am Diet Assoc 98 :682-5），且在局部施用中具有宽范围的可应用性。这种类黄酮可在天然产物，例如植物提取物内，作为更复杂得多的结构形式，例如作为以上定义的通式结构的二聚体或者低聚物形式，或者作为甚至更加复杂的其衍生物形式存在。

[0015] 在磷酸化缩合单宁类别中的一些优选的化合物是根据式 (III) 的化合物：



0-烷基，或选自 $OP(O)(OH)_2$ 、 $OP(O)(OH)OP(O)(OH)_2$ 、 $OP(O)(OH)OP(O)(OH)OP(O)(OH)_2$ 和这些磷酸酯基的金属盐中的磷酸酯基，其中至少一个 R₁ 是磷酸酯基 -D 是氢氧根，0-葡萄糖，或者具有 0-3 个的如对于 R₁ 所定义的磷酸酯基的没食子酰基 -R₂ 是氢或另一式 (III) 组分。

[0016] 根据这一化学式的典型产物种类是黄烷醇和黄烷 -3,4- 二醇。

[0017] 以下提供了可用于磷酸化的多酚的更全面的列举。简而言之，黄烷醇的典型实例是儿茶酸 (catechine)、表儿茶酸、儿茶酸或表儿茶酸的二聚体，儿茶酸或表儿茶酸的低聚物和聚合物，其中单体借助 C-C 键连接。该低聚物被称为原花色素 (proanthocyanidine)，该聚合物被称为缩合单宁。属于这一类别的另外的化合物组是花青素、花色素和原花青素 (procyanidin)。黄酮醇的典型实例是栲精、茨非醇或杨梅黄酮。

[0018] 另一组具有局部可应用性的含有缩合单宁的化合物是具有酚羟基官能团的芪衍生物。其典型实例是白藜芦醇的异构体。再另一组缩合单宁是间苯三酚，其由连苯三酚二聚体、低聚物和聚合物组成，其中连苯三酚结构部分借助醚键或者借助两个芳族碳原子之间的 C-C 键相连。定义为缩合单宁的所有这些化合物可进一步用酸，例如鞣花酸或没食子酸酯化。鞣花酸本身也可被视为缩合单宁。

[0019] 含有一类或多类缩合单宁的天然提取物的实例包括从诸如桉树 (*Eucalyptus*) 种、金合欢属 (*Acacia*) 种、破斧木属 (*Schinopsis*) 种 (白坚木)、栗属 (*Castanea*) 种、槲属 (*Quercus*) 种、红树属 (*Rhizophora*) 种、云杉属 (*Picea*) 种、松属 (*Pinus*) 种或落叶松属 (*Larix*) 种之类的树中,或者从其它植物来源,例如葡萄种子提取物、绿茶提取物、红茶提取物、白茶、可可提取物中提取的单宁提取物,葡萄酒多酚,来自水果或蔬菜的单宁,例如柿子或亚洲柿树单宁,来自葡萄、石榴、浆果、柑桔类水果或大豆的单宁,或者来自草本植物和香料,例如迷迭香的单宁。也可通过酚类化合物之间的偶联反应合成制备缩合单宁。这些化合物以通用名合成鞣剂 (Syntans) 而被公知。

[0020] 本发明的局部施用组合物可含有一种或多种可以全部或者部分磷酸化的缩合单宁。

[0021] 可水解的单宁是在天然产物内存在的复杂分子,它由向分子的中心核上酯化或者向该分子的芳族羟基官能团上酯化的具有羟基苯甲酸或羟基肉桂酸酯的中心核组成。这后一类化学键更公知被称为缩酚酸键。含有一个或两个缩酚酸键的产品的实例是双没食子酸和三没食子酸。这些羟基苯甲酸的实例是没食子酸和鞣花酸。羟基肉桂酸的实例是咖啡酸、阿魏酸或芥子酸。

[0022] 可水解的天然存在的单宁全部含有在葡萄糖上、在甘油上、在奎尼酸上、在莽草酸上、在碳水化合物或者一般指糖上酯化的这类酸或这些酸的混合物。

[0023] 最丰富的中心核是葡萄糖,例如在来自中国没食子和阿勒颇 (Aleppo) 坚果的单宁内,和奎尼酸,例如在刺云实单宁内。向这些中心核上酯化的最丰富的有机酸是没食子酸和 / 或鞣花酸。由鞣花酸组成的可水解的单宁被称为鞣花单宁。

[0024] 基于葡萄糖和没食子酸的可水解单宁典型地由没食子酸及其低聚物、单没食子酰基葡萄糖、二 -、三 -、四 -、五 -、六 -、七 -、八 -、九 -、十 -、十一 - 和十二 - 没食子酰基葡萄糖,和较少量的鞣花单宁组成。也可出现较高的取代度,但很少见。它们是以基本上取决于植物来源的比例的所提及化合物的混合物。

[0025] 典型地通过提取植物材料,例如中国没食子、紫柳 (BengalKino)、阿勒颇坚果、漆叶单宁、土耳其子单宁、刺云实单宁、槭叶单宁,获得可水解单宁。可水解单宁存在于所有植物内,且因此也可从其它植物来源中提取。局部施用可接受的可水解单宁提取物可广泛地商购。另选,可水解单宁也可由羟基苯甲酸的二聚体和低聚物,例如双没食子酸、鞣花酸、三没食子酸的二聚酯,和高级低聚物组成。可水解单宁也可由充当中心核的缩合单宁组成,在该中心核上没食子酸或鞣花酸被酯化。可使用具有不同性能的单宁的组合,以改进产物的工作性能。天然存在的其它衍生物包括没食子酸和 / 或鞣花酸与简单醇例如甲醇或乙醇形成的酯与醚。这些也可以与以上所述相同的方式结合成更加复杂的结构。磷酸化缩合或可水解单宁也可以是二聚或三聚磷酸酯,它由具有连接到其上的 2 或 3 个酚化合物的一个中心磷酸酯基组成。它们也可以是含有键合到彼此上的 2 或 3 个磷酸酯基的二磷酸酯或三磷酸酯。

[0026] 应理解的是,本文中在说明书和权利要求两者中所使用的术语“磷酸化多酚”或“磷酸化单宁”或者提到任何单个的化合物的表述,不仅包括以上所述的磷酸化基础化合物,而且包括任何磷酸化衍生物及其类似物,其混合物,以及任何磷酸化的植物提取物或其混合物。

[0027] 可通过使用无机碱,在含水介质中,使磷酰氯与多酚反应的步骤制备本发明中可使用的磷酰化多酚。在优选的实施方案中,这一含水介质是水。无机碱可以是金属氢氧化物、碳酸盐、磷酸盐和 / 或氨。最优选是氢氧化钠。可在添加磷酰化剂,即该试剂之前和 / 或期间添加碱。

[0028] 使用碱来增加反应混合物的 pH 到 5 至 13 的数值,这取决于羟基官能团的酸度。优选地,反应混合物的 pH 保持在 7 至 12。

[0029] 磷酰氯优选下述通式表示: R_nPOX_{3-n} (IV) 或 R_vPX_w (V) 其中 $n = 0, 1$ 或 2 , $v+w = 3$ 或 5 , x 是氯、溴或碘,和 R 是具有 1-8 个碳原子的烷基链的烷氧化物,或 0- 苯基或 0- 苄基。在本发明的实施方案中,磷酰氯是三氯化磷 ($POCl_3$)。

[0030] 以每 mol 酚羟基化合物计,优选以从 0.5 当量变化到超过 25 当量的比例采用用作磷酰化剂的磷酰氯,这取决于酚类抗氧化剂的结构,和更具体地取决于存在该分子内的羟基含量。可例如使用高压色谱控制磷酰化度。

[0031] 在磷酰化步骤之后,可将反应混合物酸化。优选地,通过添加无机酸获得约 2- 约 7 的 pH。

[0032] 优选地,构成起始材料的酚类化合物是比较复杂的多酚化合物,例如缩合和 / 或可水解的单宁。在水溶液中获得产物可原样使用,可通过蒸馏或者本领域技术人员已知的其它方式浓缩,和 / 或可干燥。本发明的磷酰化产物可原样或者以或多或少纯化的形式存在。

[0033] 从以上所指定的宽范围的组中,一些具体类型的多酚尤其优选作为磷酰化的起始材料,这是因为它们的公认的生物活性和对皮肤、毛发和 / 或指甲的益处。一般来说,与单芳族化合物,例如连苯三酚或没食子酸相比,优选更加复杂的多芳族多酚。类黄酮化合物尤其广泛用于局部应用中,且赋予宽范围的已知益处。在一个实施方案中,在本发明的组合物中使用的优选类型的类黄酮包括,但不限于,单独或者组合使用的磷酰化黄烷酮、查耳酮、黄酮、异黄酮、黄酮醇、黄烷醇、香豆素、色酮、3,3' - 亚甲基 -4- 双羟香豆素、苯并二氢吡喃 -4- 酮或苯并二氢吡喃醇。在另一实施方案中,在本发明组合物中非常有用的其它化合物是同样具有宽范围活性的磷酰化羟基芪,例如白藜芦醇,其异构体和衍生物。

[0034] 可在本发明的组合物中使用的具体化合物或化合物组不受限制地为下述化合物的磷酰化形式:儿茶酚及其衍生物,例如 DL-3,4- 二羟基苯基丙氨酸或 DL-DOPA; 儿茶酚胺,例如 3- 羟基酪胺或多巴胺;间苯三酚;酚酸,例如咖啡酸、二氢咖啡酸、阿魏酸、原儿茶酸、绿原酸、异绿原酸、2,5- 二羟基苯甲酸、尿黑酸、没食子酸、六羟基联苯甲酸、鞣花酸、迷迭香酸或紫草酸,及其衍生物,例如酯或其葡萄糖苷;姜黄、水杨酸、多羟基化香豆素、多羟基化木酚素或新木酚素;水飞蓟素、apigenol、luteolol、五羟黄酮、quercetagen、六羟黄酮、柯因、杨梅黄酮、鼠李亭、染料木黄酮、桑色素、棉子皮亭、茨非醇、芸香苷、柚苷、4,5', 7- 三羟黄烷酮、橙皮素、橙皮苷、地奥司明 (diosmin)、diosmoside、3', 8'' - 双 -4', 5,7- 三羟基黄酮、非瑟酮、牧荆葡基黄酮、异甘草素、橙皮苷甲基查耳酮、黄杉素 (taxifolol)、水飞蓟素、水飞蓟亭、水飞蓟宁、儿茶酸、表儿茶酸、棓儿茶酸、儿茶酸没食子酸酯、棓儿茶酸没食子酸酯、表儿茶酸没食子酸酯、表棓儿茶酸没食子酸酯和表棓儿茶酸;葡萄糖苷;原花色素;没食子酸丙酯、没食子酸异戊基辛酯和没食子酸十二烷酯;5-0- 没食子酰基葡萄糖;单宁酸;各种单宁,例如棓单宁、鞣花单宁、莽草酸和白藜芦醇 (3,4', 5' - 三羟基芪);和前述

化合物的任何衍生物或类似物。将公认的是,这些磷酸化形式的每种可单独或者与另一磷酸化多酚或未磷酸化的多酚结合使用。

[0035] 也将公认的是,可以显著纯的形式,即纯度大于或等于 80% 使用有用的化合物或化合物组,或者它们可以以植物提取物的一部分的形式提供。几乎每一植物含有某种形式的多酚,但有一些植物或植物提取物,其被公认为尤其富含的多酚来源。可产生在组合物中可用的提取物的植物的实例包括下述属的植物:银杏 (Ginkgo)、胡枝子属 (Lespedeza)、西番莲 (Passiflora)、水飞蓟属 (Silybum)、柑桔属 (Citrus)、金缕梅 (Hamamelis)、百里香属 (Thymus)、果香菊属 (Chamaemelum)、蓍属 (Achillea)、木贼属 (Equisetum)、槐属 (Sophora)、荞麦属 (Fagopyrum)、桉树 (Eucalyptus)、接骨木花 (Sambucus)、桦属 (Betula)、葡萄属 (Vitis)、松属 (Pinus)、山楂属 (Crataegus)、槲属 (Quercus)、拉坦尼根 (Ratanhia)、千屈菜属 (Lythrum)、金合欢属 (Acacia)、柏木属 (Cupressus)、越橘属 (Vaccinium)、茶藨子属 (Ribes)、矢车菊属 (Centaurea)、蔷薇属 (Rosa)、木槿属 (Hibiscus)、山茶属 (Camellia)、锦葵 (Malva)、鬼臼根 (Podophyllum)、五味子 (Schizandra)、Gaiacum、可可属 (Theobroma)、熊果属 (Arctostaphylos)、紫藤 (Glycine)、菜蓟 (Cynara)、迷迭香属 (Rosmarinus)、鸡脚参属 (Orthosiphon)、一枝黄花 (Solidago)、紫草 (Lithospermum)、姜黄属 (Curcuma)、七叶树属 (Aesculus)、草木犀 (Melilotus)、阿密属 (Ammi)、山柳菊 (Hieracium)、当归 (Angelica) 和车叶草 (Asperula)。特别地,公知尤其富含的多酚来源包括红葡萄酒、葡萄汁、葡萄皮、葡萄种子、笃斯越桔、柿子、桉树、可可、绿茶、红茶、白茶、石榴和中国没食子。因此,当在本发明的说明书和权利要求中提及磷酸化多酚时,这一术语意于不仅覆盖已被磷酸化的分离的化合物,而且覆盖含有多酚的植物材料的提取物,所述提取物也进行过磷酸化工序,从而使其内包含的多酚磷酸化。

[0036] 如实施例 5 所示,如此生产的磷酸化化合物相对于其未改性的对应物,在化妆品配方中显示出增强的稳定性。

[0037] 该化合物也可用于实现在待治疗的局部皮肤上延缓释放活性多酚分子。常常优选在一段时间内将局部施用组合物的活性延长,以便延长有益效果,且还可在单一的剂量内输送较大量的活性组分。如实施例 6 所示,磷酸化化合物可通过在皮肤中存在的磷酸酶而脱磷酸化,和脱磷酸化的化合物于是逐渐释放到皮肤内,而不是象相同分子的非磷酸化变体典型地那样,立即获得。因此,本发明的组合物提供双重潜在的益处:包含在其内的活性化合物不容易降解,因此可在配制时刻和施加时刻之间保持更多的活性,且向治疗的表面上的活性成分的延缓释放允许更有效地输送该化合物。

[0038] 如实施例 6 所示,用磷酸酶脱磷酸化导致恢复生物活性。

[0039] 额外的预料不到的优点是,一些多酚的磷酸化可导致其水溶解度增加。这已尤其采用白藜芦醇而证实,白藜芦醇在其未磷酸化形式下是相对水不溶性的。在分子上添加相对极性的磷酸酯基增加其极性,因此增加其在水和极性溶剂中的溶解度,正如实施例 2 所示。在水中缺少溶解度可能是配方的严重局限,因此,在配制局部施用的组合物中,磷酸化多酚可比其未磷酸化的对应物更加有用。

[0040] 可将磷酸化化合物与局部可接受的载体结合配制到组合物中,配制方式与其未磷酸化的对应物相同。载体是药学上或者化妆品上可接受的那些,亦即用于药物或者化妆品用途的意于施加到外部身体表面,例如皮肤、毛发或指甲上的赋形剂,当施加到意于被

治疗的表面上时,所述赋形剂输送活性组分到所意于的目标上且不引起对一般的人类或者其它接受体有机体的损害。此处所使用的“药物”或“化妆品”要理解为包括人类和动物二者,优选哺乳动物的药物或化妆品,其中活性组分可与之相容,例如凝胶、乳霜、乳液、膏、摩丝、喷剂、固体棒状物、粉剂、悬浮液、分散体和类似物。配制各类赋形剂的技术是本领域技术人员公知的,且可例如发现于 Chemistry and Technology of the Cosmetics and Toiletries Industry, (化妆品与盥洗用品工业的化学与技术) Williams 和 Schmitt, 编者, Blackie Academic and Professional, 第 2 版, 1996, Harry's Cosmeticology, 第 8 版, M. Reiger, 编者 (2000), 和 Remington: The Science and Practice of Pharmacy (药科学与实践), 第 20 版, A. Gennaro, 编者, (2003) 中, 这些中的每一篇的内容在此通过参考引入。载体的化学组成可根据活性成分的个性, 和所打算的最后用途而变化。然而, 可使用可用于局部输送的任何典型的组合物, 例如含水分散体, 液体、固体或粉末形式的无水组合物, 乳液 (油或水包硅酮、油或硅酮包水、多重乳液、微乳液、纳米乳液), 条件是各组分与所选的活性成分相容。可配制组合物以供施加到皮肤上, 例如皮肤护理产品, 例如防晒剂、自晒黑剂 (self-tanner)、皮肤保湿剂和调理剂、剥落剂、抗痤疮组合物、抗老化组合物和类似物; 或者彩色化妆品, 例如唇膏、透明高光亮唇膏、粉底、眼影、胭脂或眼线笔; 用于施加到毛发、睫毛和 / 或头皮上, 例如睫毛油、睫毛底涂油或涂覆产品、头发生长延迟组合物、头发生长促进组合物、香波或调理剂; 或用于施加到指甲上, 例如指甲漆、面漆、底涂层、纹脉 (ridge) 填料和指甲调理剂。由于这些多酚的许多未磷酰化的形式以前被配制用于局部用途, 因此本领域技术人员公知确定所研究特定磷酰化多酚的合适配方。掺入到载体内的磷酰化多酚的用量将取决于多酚的个性和所打算的结果而变化, 但在组合物内多酚的用量范围通常为组合物的约 0.0001- 约 99wt%, 优选约 0.001- 约 50wt%, 更优选约 0.01- 约 30%, 和最优选约 0.05- 约 10%。当使用含有多酚的提取物而不是分离的化合物时, 掺入的用量取决于提取物内多酚的浓度, 且可从以上对于多酚本身的指导值外推。该组合物也可含有可提高或者补充组合物活性的其它局部可用的组分。在组合物内附带成分的选择也取决于组合物所打算的应用。标准的局部可用的成分可例如发现于 The International Cosmetic Ingredient Dictionary and Handbook, 第 10 版, 2004 中, 其内容在此通过参考引入。可与磷酰化酚类结合的可用种类的局部可接受的成分的实例包括, 但不限于, 香料或精油; 颜料或着色剂; 配制助剂, 例如抗结块剂、消泡剂、填料和增量剂 (bulking agent)、增稠剂、胶凝剂、结构化剂和乳液稳定剂; 表面活性剂和乳化剂; 成膜剂, 以提高在所打算的目标上的粘合性和保留率; 推进剂、防腐剂和 pH 调节剂和中和剂。

[0041] 尤其优选用于加入到磷酰化多酚中的是对组合物将施加到其上的角质表面提供额外益处的那些成分, 下文称为“皮肤益处剂”。这种皮肤益处剂的实例包括, 但不限于, 收敛剂, 例如丁子香油、薄荷醇、樟脑、桉叶油、丁子香酚、乳酸 ~~基~~ 酯、金缕梅馏出物; 抗氧化剂或自由基清除剂, 例如抗坏血酸、其脂肪酸酯和磷酸酯, 生育酚及其衍生物, N-乙酰基半胱氨酸、山梨酸和硫辛酸; 抗痤疮剂, 例如水杨酸和过氧化苯甲酰; 抗微生物或抗真菌剂, 例如辛酰基二醇、三氯生、苯氧基乙醇、红霉素、发癣退、制霉菌素或克霉唑 (clotrimazole); 螯合剂, 例如 EDTA; 局部止痛药, 例如苯坐卡因、利度卡因或普鲁卡因; 抗老化 / 抗皱纹剂, 例如类视黄醇或羟基酸; 亮肤剂, 例如甘草、抗坏血酸基磷酸酯、氢醌或曲酸; 皮肤调理剂 (例如, 保湿剂, 包括 miscellaneous (混杂型) 和 occlusive (包藏型)), 抗刺激剂, 例如

可乐茶素 (cola)、红没药醇、芦荟或泛醇,消炎药,例如氢化可的松、氯倍他索、地塞米松、泼尼松、乙酰基水杨酸、甘草酸或甘草次酸;抗脂肪团剂,例如咖啡因和其它黄嘌呤;保湿剂,例如亚烷基多元醇或透明质酸;润肤剂,例如油状酯或矿脂;防晒剂(有机或无机),例如 avobenzene、羟基苯酮、甲氧基肉桂酸辛基酯、二氧化钛或氧化锌;剥落剂(化学或物理),例如 N-乙酰基葡萄糖胺、甘露糖磷酸酯、羟基酸、乳糖酸、桃仁或海盐;自动晒黑剂,例如二羟基丙酮;和生物活性肽,例如棕榈酰基五肽或 argireline(抗皱多肽)。这些补充的皮肤益处剂以当用于所意于的目的时通常已知对于该活性成分有效的用量来使用。

[0042] 本发明的组合物具有许多用途。如前所述,多酚作为一组形式拥有多种生物活性,且据报道,许多类型的多酚拥有多于一种的活性。例如,各种单宁,尤其类黄酮,据报道在活动减退或反应过度的皮肤病症的治疗中,例如特异反应性皮炎、湿疹、牛皮癣、毛囊炎、酒渣鼻和痤疮中具有活性(美国专利 No. 6180662);作为自由基清除剂和抗氧化剂可用于防止衰老迹象(US 4698360 和 6437004);和作为氧化一氮和细胞凋亡调节剂、抗肿瘤剂和氧化性 DNA 损坏的抑制剂(美国专利 No. 6696495)。类似地,芪,和特别是白藜芦醇,据说具有抑制皮肤蛋白质的糖化方面的活性(EP 1058864);刺激胶原合成或成纤维细胞增殖(US 6147121);抑制微生物生长(EP 953345);皮肤增亮(US6132740);预防和/或治疗皮肤癌、晒伤、湿疹、皮炎或牛皮癣(W001/30336);用于头发着色(EP 1013260);和用作植物雌激素(W099/04747)。所有前述专利文献的公开内容在此通过参考全文引入。因此,显然大量的多酚在调节角蛋白组织,尤其皮肤的状况中具有显著的可用性。本发明因此提供调节角蛋白组织,例如皮肤、毛发或指甲的状况的方法,该方法包括将含有效量的磷酸化多酚的组合物施加到该组织上。有效量的磷酸化多酚是能实现所预计的治疗效果的多酚量。它典型地在对于未磷酸化多酚而言所使用的用量范围内,无论如何,容易从已知化合物的范围外推得到。

[0043] 在本发明的特别应用中,所研究的活性是调节皮肤状况的能力。以上所述的引证,以及许多其它引证,说明了磷酸化多酚可在皮肤上具有的效果的多样性。应理解的是,此处所使用的术语“调节”皮肤状况是指治疗和预防皮肤病,尤其代表病理学的那些病况,以及尽管较不严重,但可引起不舒适或者存在不吸引人或者较不有感染力的外观的那些病况。可治疗、缓和、减轻或预防的皮肤病的实例包括,但不限于,湿疹、皮脂溢、牛皮癣、干燥病、肿瘤生长、皮炎、毛囊炎、酒渣鼻和痤疮。

[0044] 在优选的实施方案中,待调节的皮肤病是可统称为皮肤老化迹象的病况中的一种或多种。皮肤的外观通常随着年龄而变化,这是由于与时间有关的许多内部因素导致的。然而,皮肤也可因过度暴露于环境因素,例如太阳、污染或香烟烟雾下而过早地老化。此处所使用的调节因老化导致的皮肤病的过程意于包括随时间老化以及光或环境诱导的老化两者的迹象。老化过程的现象有许多,和可以是外部(即,立即可见的)或者内部(即,不是肉眼立即可见的)的。本领域的技术人员容易意识到老化迹象的许多实例。这些实例包括,但不限于,细纹和皱纹、深的皱纹、凹坑和隆起部分、增加的孔尺寸、角化病、皮肤易剥落或粗糙、皮肤色调的不均匀或斑化、皮肤变黄、暗的眼袋阴影或眼圈,皮肤弹性的丧失,下垂(包括眼睛区域和面颊的浮肿),弹性组织病变、皮肤坚固度或结实度的丧失、色素沉着过多、老年斑和雀斑、变态分化、角化过度、胶原分解、蜘蛛状静脉或毛细血管扩张。

[0045] 在调节皮肤病中观察到的部分活性可以是其作为自由基清除剂或抗氧化剂的公

知活性。现代人类常规地暴露于其下的许多环境试剂,例如各种饮食元素、杀虫剂、太阳光、香烟烟雾、空气污染物、麻醉剂和芳烃,以及各种内源性需氧反应,可产生高度反应性的氧物种,例如超氧化物阴离子自由基、过氧化氢和羟基离子,以及单线态氧(不严格来说是自由基,但此处为了方便起见,作为自由基形式被包括在内)。这些反应性氧物种已牵涉入可引起对细胞组分严重损坏的许多反应中,例如,氧化性自由基可进攻 DNA 的碱和糖分子,改变分子结构,于是干扰生物功能。它们也可与细胞膜内的不饱和脂肪酸相互作用,引起类脂过氧化,这不仅导致膜中蛋白质:类脂相互作用的改变,而且产生分解产物,所述分解产物可引起许多非所需的效果,例如抑制 DNA 合成、腺苷酸环化酶和葡萄糖-6-磷酸酯,增加毛细管渗透力并抑制血小板凝集。存在大量证据,未检测到的自由基反应在许多疾病状态中,例如气肿、炎症、癌症、动脉粥样硬化和白内障中具有某些牵连,如果不是主要起因的话。自由基反应还被广泛地视为对以上所述的自然老化过程具有主要的贡献性影响。由于许多多酚作为自由基清除剂和抗氧化剂的公知的活性,磷酸化多酚作为其生物等价物,被预期具有相同的可用性。因此,本发明还提供减少或预防自由基损坏的方法,该方法包括施加自由基清除有效量的至少一种磷酸化多酚到处于自由基损坏危险下的细胞上。这一方法应理解为包括治疗或预防其中贡献因素是反应性氧物种的负面作用的病理疾病。

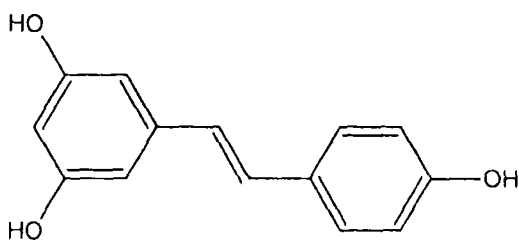
[0046] 按照类似的方式,磷酸化多酚可方便地在食品、化妆品、药物和类似物中用作防腐的抗氧化剂。对破坏敏感是一些类型配方,尤其类脂含量可能高的那些配方的性质,这是因为氧物种在其内容物上作用导致的。一种或多种磷酸化多酚可加入到这种配方中,以便保持其组分防止氧损坏,并防止酸败。类似地,由于其抗微生物活性,因此,在预防或降低因微生物活性导致的污染中它们可提供附加的防腐效果。

[0047] 施加本发明的局部施用组合物的方法可随磷酸化多酚的个性和该组合物所打算的最终用途而变化。一般地,为了调节各种皮肤病,或者为了预防或治疗与氧自由基有关的病况,可或者在事先暴露于潜在有害的因素(例如太阳光)下之前,或者在暴露之后,施加组合物以减轻因暴露导致可能发生的损坏。只要对有毒刺激的暴露继续,就可继续施加,或者当获得缓和时,可间歇施加。当用于治疗、减轻或预防比较持久的病况,例如每天暴露于太阳或环境损坏下,或者治疗或预防与随时间老化有关的迹象时,优选长期施加组合物,以预防病况的发生或再发生。为此,作为实例,建议从每周约一次到每天约 4 或 5 次,优选从约每周 3 次到每天约 3 次,最优选每天约 1 或 2 次,进行局部施加该组合物,其用量为约 $0.1\text{mg}/\text{cm}^2$ – $2\text{mg}/\text{cm}^2$ 待治疗的角质表面。“长期”施加在此是指局部施加的时间段可以是使用者的生命周期内,优选至少约 1 个月,更优选约 3 个月–约 20 年,更优选约 6 个月–约 10 年,更优选约 1 年–约 5 年,从而导致治疗、缓和、减轻或预防所研究的病况。

[0048] 在阅读本说明书的基础上,磷酸化多酚的其它用途是容易意识到的。通过下述非限制性实施例进一步阐述本发明。具体实施方式实施例 1 葡萄种子单宁的磷酸化

[0049] 在室温下,在氮气气氛中,将 100.0g 葡萄种子单宁(TANFOS167-134)溶解在 300ml 水中。用 29% NaOH 使溶液的 pH 达到 9,并在 1.5 小时的时间段内向该溶液中添加 26.6ml 三氯化磷。在这一添加过程中,添加更多 29% 的 NaOH,以维持 pH 在 9。在添加之后,搅拌反应混合物过夜,并通过 HPLC 分析。然后用 25% HCl 酸化产物到 pH3.1,并借助喷雾干燥分离,获得粉红色粉末。实施例 2 白藜芦醇的磷酸化

[0050] 被称为白藜芦醇(3,4,5-三羟基芪)的化合物的结构如下所示:



[0051] 可例如通过 Pettit 等人, J. Med. Chem. 2002, 45, 2534-2542 中所公开的操作步骤实现磷酸化。在氮气下将白藜芦醇 (25mmol, 5.7g) 和二甲基氨基吡啶 (7.5mmol, 0.93g) 在 100ml 乙腈内的溶液冷却到 -10°C 。在 10 分钟之后, 将 CCl_4 (375mmol, 36.2ml) 和 DIEA (159mmol, 27.7ml) 和该混合物维持在搅拌下 30 分钟。添加二苄基亚磷酸酯 (113mmol, 25.0ml), 并在室温下搅拌该混合物额外 12 小时。通过 TLC (Silica F254, 洗脱剂乙酸乙酯 / 正己烷 80/20v/v) 监控反应进程。添加 1 升 0.5M KH_2PO_4 , 然后用乙酸乙酯萃取该混合物。通过在硅胶上过滤而纯化所得产物三 (二苄基磷酸酯基) 白藜芦醇, 首先用乙酸乙酯 / 正己烷 (80/20v/v) 的混合物洗涤, 以除去任何残留的未反应的白藜芦醇, 然后用甲醇洗涤, 以获得黄色油状物。

[0052] 向在 0°C 下的 200ml 无水 DCM 内的三 (二苄基磷酸酯基) 白藜芦醇 (12.5mmol) 中添加溴甲基硅烷 (79mmol, 10.4ml)。在 2 小时之后, 添加 300ml 水, 并搅拌该反应混合物 1 小时。再次用乙酸乙酯洗涤水相, 然后冻干, 得到橙色油状物。

[0053] 向在 400ml 乙醇内增溶的以上获得的产物中添加 CH_3ONa (37mmol, 2.03g), 并在室温下搅拌反应 12 小时。在旋转蒸发仪上蒸发乙醇, 并将残余物在水中增溶。用乙酸乙酯洗涤水相并冻干。由此所得白色固体的质谱表明, 存在白藜芦醇三磷酸酯 ($\text{PM} = 468.1$), 且相对于白藜芦醇计总产率 $> 90\%$ 。实施例 3 白藜芦醇三磷酸酯的溶解度

[0054] 在 pH7 下, 在 1mM 的磷酸钾缓冲液中, 在室温下, 测试白藜芦醇的水中溶解度。将 10mg 白藜芦醇 (M. W. 228.24) 悬浮在 10ml 缓冲液中。在旋转摇动器内, 在 25°C 下, 在暗处搅动这一悬浮液 (相当于 1g/l 或 4.38mM 的浓度) 24 小时。在 14000rpm 下离心分离该样品 5 分钟, 并在 305nm 波长处测定到 OD 为 6.26, 在 305nm 波长处白藜芦醇的 ϵ mM 的数值为 28.1。假设白藜芦醇完全溶解, 则应当获得的 OD 为 123.1 (4.38×28.1)。在观察到的 OD 为 6.26 下, 溶解的白藜芦醇的百分数为 5.1% ($6.26 \times 100 / 123.1$) 或 5.1mg/l。

[0055] 相对照地, 在相同的条件下, 在范围为 4-9 的不同 pH 的水中, 在室温下测试白藜芦醇三磷酸酯的溶解度和稳定性。观察到白藜芦醇三磷酸酯的溶解度为 $> 30\% \text{ w/v}$, 表明与未改性的白藜芦醇相比, 溶解度增加。另外, 白藜芦醇三磷酸酯在固体和水溶液形式中均稳定超过 1 年的时间段。实施例 4 体外白藜芦醇三磷酸酯的脱磷酸化

[0056] 评价磷酸化的白藜芦醇, 和此处被称为白藜芦醇^{Pi}, 以确定是否可使该分子脱磷酸化, 返回到其活性的脱磷酸化状态。A. 白藜芦醇和白藜芦醇^{Pi} 的 HPLC 分析

[0057] 白藜芦醇的 HPLC 分析的实验条件如下所述: 技术: HPLC-UV 柱子: Alltech, Alltima C18 5 μ (250 $\times$ 4.6mm) 柱温: 30°C 流动相: A: 0.085% o-磷酸溶液 B: 乙腈注射柱: 10 μ l 流速: 1ml/min λ 检测: 310nm 保留时间: 白藜芦醇 8.2 分钟 白藜芦醇^{Pi} 40.7 分钟梯度:

时间 (min)	溶剂 A (%)	溶剂 B (%)
0	98	2
50	60	40

时间 (min)	溶剂 A (%)	溶剂 B (%)
55	0	100
65	0	100
72	98	2
85	98	2

[0058] 在图 1 的上部图表中示出了未磷酰化白藜芦醇的色谱图。这是起始材料的 HPLC 曲线,所述起始材料是用于磷酰化的起始材料。非磷酰化的白藜芦醇在约 40.7 分钟时迁移,且几乎是纯的,具有 98% 的面积百分数。在图 1 的下部图表中示出了高度磷酰化的白藜芦醇。在 8.2 分钟时的主峰是其中磷酸酯基取代所有三个羟基官能团时的完全磷酰化的白藜芦醇。这一取代引起极性显著增加,这通过保留时间急剧下降得到反映。可检测到两种“杂质”:二磷酰化白藜芦醇的两种异构体 (t_m 约 14.6 和 16.7 分钟) 和单磷酰化白藜芦醇 (t_m 约 23.3 和 26.7 分钟)。检测到仅仅非常小量的未磷酰化白藜芦醇。B. 白藜芦醇^{Pi} 的酶法脱磷酰化

[0059] 在 0.147M(NH₄)₂SO₄/0.81mM MgCl₂ pH5.5 中在来自麦胚的酸性磷酸酶 (Sigma, P3627 lot 081K7071) 存在下,培育磷酰化白藜芦醇。白藜芦醇^{Pi} 和酸性磷酸酶的浓度分别为 1.6mg/ml 和 0.056U/ml。在不同的时间间隔处取等分试样,并通过 HPLC (参见以上的条件) 分析。

[0060] 图 2 示出了结果。用酸性磷酸酶处理白藜芦醇^{Pi} 导致依赖于时间的白藜芦醇形成,同时三磷酰化白藜芦醇 (完全磷酰化) 逐渐减少。通过保留行为和 UV 光谱确证了峰的识别。白藜芦醇二磷酸酯的含量最初上升,在用酸性磷酸酶培育约 85 分钟的时间处达到最大值,然后逐渐下降。在用酶培育的起始时刻,较大部分的白藜芦醇完全被磷酰化,因此从三到二磷酰化白藜芦醇的转化占主导。这引起二磷酰化白藜芦醇的净增加。在较长的培育时间下,存在较少的白藜芦醇三磷酸酯,因此较少地转化成白藜芦醇二磷酸酯,且从二到单磷酰化白藜芦醇的转化占主导,这将引起在较长的培育时间 (> 85 分钟) 下白藜芦醇二磷酸酯总体减少。白藜芦醇单磷酸酯依赖于培育时间的浓度曲线类似于二磷酸酯的曲线。这与以上提出的形成 / 除去机理一致,但在此在更长的培育时间 (~ 300 分钟) 下达到白藜芦醇单磷酸酯的最大浓度。C. 结论

[0061] 为了增加配制剂中白藜芦醇的稳定性,用磷酸酯基 (~白藜芦醇^{Pi}) 替代白藜芦醇中的反应性羟基。磷酰化白藜芦醇的 HPLC 分析表明,磷酰化度非常高,这是因为只检测到非常小量的未磷酰化白藜芦醇。这一实验表明,来自麦胚的酸性磷酸酶能通过羟基替代白藜芦醇^{Pi} 中的磷酸酯基,和正因为如此,将磷酰化白藜芦醇转化成起始含羟基的白藜芦醇。实施例 5 含有等摩尔含量白藜芦醇三磷酸酯或未改性的白藜芦醇的化妆品配方的目测 (颜色) 稳定性

[0062] 制备三个基础配方,不含白藜芦醇的对照物,与该对照物相同但一个含有 0.1% 未改性的白藜芦醇和另一个含有 0.2% 磷酰化白藜芦醇 (白藜芦醇^{Pi}) 的另外两个配方。

材料	重量百分数
序列 1	
硬脂酸	2.400
甘油单硬脂酸酯	2.200
对羟基苯甲酸丁酯	0.100
羊毛脂醇 / 矿物油 / BHT	9.550
羊毛脂醇 / 矿脂 / BHT	2.000

材料	重量百分数
芝麻油	4.300
对羟基苯甲酸丙酯	0.100
序列 2	
去离子水	38.630
三乙醇胺	0.820
对羟基苯甲酸甲酯	0.300
EDTA 三钠	0.100
丙二醇	1.300
序列 3	
去离子水	35.000
序列 4	
丙二醇	3.000
磷酸化白藜芦醇	0.200

[0063] 对照物基础成分的颜色为白色,和在添加白藜芦醇的情况下,它为浅米色。一周一次地观察每一配方共 4 周的时间段,以确定在三种不同的环境条件:50℃、4℃和室温(RT)下颜色变化(指示改变色稳定性)的出现。获得的结果如下所述:1 周的稳定性赋形剂对照物 50- 白色 /4- 白色 /RT- 白色 0.1%白藜芦醇^{Pi} 50-1t(浅)米色 /4-1t 米色 /RT-1t 米色 0.2%白藜芦醇^{Pi} 50-1t 米色 /4-1t 米色 /RT-1t 米色 2 周的稳定性赋形剂对照物 50- 白色 /4- 白色 /RT- 白色 0.1%白藜芦醇^{Pi} 50-1t 米色 /4-1t 米色 /RT-1t 米色 0.2%白藜芦醇^{Pi} 50-1t 米色 /4-1t 米色 /RT-1t 米色 3 周的稳定性赋形剂对照物 50- 白色 /4- 白色 /RT- 白色 0.1%白藜芦醇^{Pi} 50-1t 米色(非常轻微地(vs1)更暗,具有轻微的(s1)顶部氧化)/4-1t 米色 /RT-1t 米色 0.2%白藜芦醇^{Pi} 50-1t 米色 /4-1t 米色(与其它情况相比,非常非常轻微地(vvs1)更浅)/RT-1t 米色 4 周的稳定性赋形剂对照物 50- 白色 /4- 白色 /RT- 白色 0.1%白藜芦醇^{Pi} 50- 米色(与 RT 相比,轻微地更暗,具有顶部氧化)/4-1t 米色(与 RT 相比,轻微更浅的米色)/RT-1t 米色 / 米色 0.2%白藜芦醇^{Pi} 50-1t 米色 /4-1t 米色(与其它情况相比,非常非常轻微地更浅)/RT-1t 米色

[0064] 这些结果表明,在四周末,与未改性的白藜芦醇相比,磷酸化白藜芦醇显示出较小的颜色显现,从而证实磷酸化材料的提高的颜色稳定性。实施例 6 通过角质层细胞将白藜芦醇三磷酸酯脱磷酸化 A. 白藜芦醇和白藜芦醇^{Pi} 的 HPLC 分析

[0065] 白藜芦醇的 HPLC 分析的实验条件如以上在实施例 4 中所述。梯度:

时间 (min)	溶剂 A(%)	溶剂 B(%)
0	98	2
40	68	32
47	5	95
57	5	95
62	98	2
75	98	2

[0066] 图 1 示出了未磷酸化白藜芦醇和通过 Omnicchem 制备的高度磷酸化白藜芦醇的色谱图。参见以上实施例 4 中所述的峰值分析。B. 白藜芦醇^{Pi} 的酶法脱磷酸化

[0067] 在一个受实验者的内部下臂上收集 D- 鳞屑胶带剥离物。将第 13 和 14 层汇集并放入试管内,并在室温下,在轻轻摇动下,用 pH 为 5.6 的 700 微升 100mM 邻苯二甲酸(phthallic acid) 和 0.25% Triton-X100 提取 90 分钟。将可提取级分转移到另一小瓶内,并与白藜芦醇^{Pi} 储备溶液混合。在培育过程中,白藜芦醇^{Pi} 的浓度为 0.22mg/ml 或 0.47mM。在各种培

育时间点下,在 25 微升 10mM 磷酸(邻磷酸)和 50 微升甲醇内稀释 25 微升的培育混合物等分试样,并注射到 HPLC 系统内。

[0068] 图 3 示出了结果。用 SC D- 鳞屑胶带剥离物的可提取级分培育白藜芦醇^{PI} 导致依赖于时间的白藜芦醇形成 ($r = 0.99, N = 15, p < 1 \times 10^{-6}$),而三磷酸化白藜芦醇(完全磷酸化)逐渐下降 ($r = -0.69, N = 15, p = 0.005$)。

[0069] 还观察到单磷酸化白藜芦醇形成的时间函数关系 ($r = 0.98, N = 15, p < 1 \times 10^{-6}$)。白藜芦醇的二磷酸化形式的总量没有作为时间的函数形式显著变化 ($r = -0.27, N = 15, p = 0.33$),这表明(来自完全磷酸化白藜芦醇的)二磷酸化白藜芦醇的形成与从二到单磷酸化白藜芦醇的转化同样快。C. 结论

[0070] 本发明的实验试图表明磷酸化白藜芦醇将被存在于皮肤内的酶脱磷酸化。例如通过皮肤内的酸性磷酸酶活性使磷酸化白藜芦醇就地酶法脱磷酸化的过程将重新构成起始的白藜芦醇,并伴随着生物活性增加。图 3 所示的结果表明,存在于皮肤上并通过 D- 鳞屑胶带剥离物取样的酸性磷酸酶能通过羟基替代白藜芦醇^{PI} 上的磷酸酯基。这导致依赖于时间的白藜芦醇形成和白藜芦醇^{PI} 的相应下降,于是支持当磷酸化多酚施加到皮肤上时,通过角质层酶的作用延缓释放活性白藜芦醇分子,或者任何磷酸化多酚的构思。实施例 6 在白藜芦醇三磷酸酯脱磷酸化之后的体外抗氧化活性

[0071] 在 37°C 下,在 20mM 具有 0.05% Triton-X100 的 pH 为 5 的柠檬酸缓冲液内,用各种浓度来自麦胚的酸性磷酸酶培育磷酸化白藜芦醇(白藜芦醇^{PI}) (0.256mM) 6 小时。酸性磷酸酶的浓度范围为 0.063–63mU/ml。由于磷酸化白藜芦醇的转化取决于酸性磷酸酶的浓度,因此预期在较高的酸性磷酸酶浓度下,将存在增加含量的脱磷酸化白藜芦醇。

[0072] 使用 2,2' - 偶氮双(2- 脒基丙烷) • 2HCl (在 2mM 下的 AAPH) 作为自由基引发剂,在含水体系中进行测定抗氧化剂效率的实验。通过在 234nm 下监控通过在 30°C 下,在 pH7.4 的 50mM 磷酸盐缓冲液的含水体系中将亚油酸 (0.16mM) 氧化而生成的共轭二烯烃氢过氧化物的生产。通过其猝灭自由基并因此减慢或终止亚油酸氧化的能力,测量抗氧化效率。

[0073] 图 4 示出了结果。在这一图中,x- 轴对应于采用固定浓度白藜芦醇^{PI} 培育的酸性磷酸酶的用量。增加酸性磷酸酶的浓度因此对应于增加脱磷酸化白藜芦醇的含量。这导致抗氧化活性的依赖于剂量的增加。

[0074] 总之,这些数据表明,磷酸化白藜芦醇的酶法脱磷酸化导致活性恢复,其作为对 AAPH 诱导的亚油酸氧化的体外抗氧化活性形式测量。

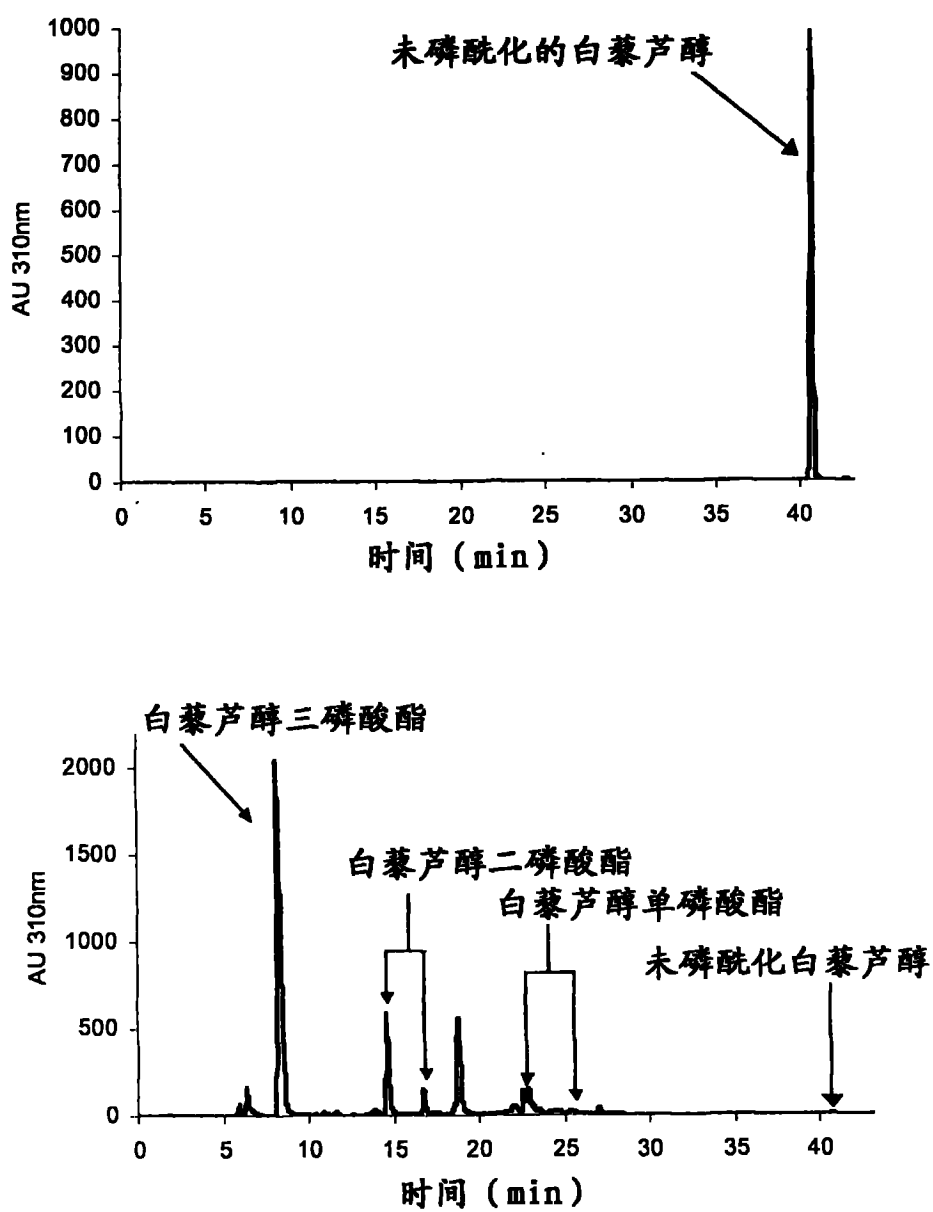


图 1

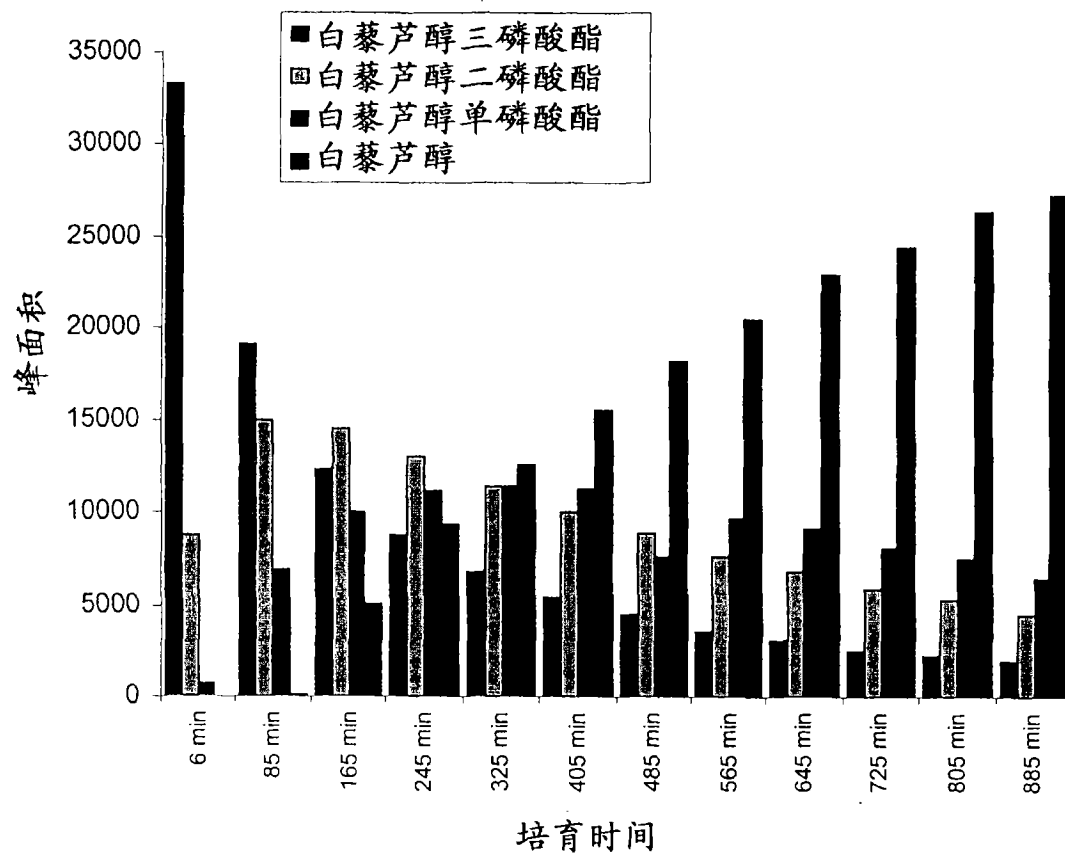


图 2

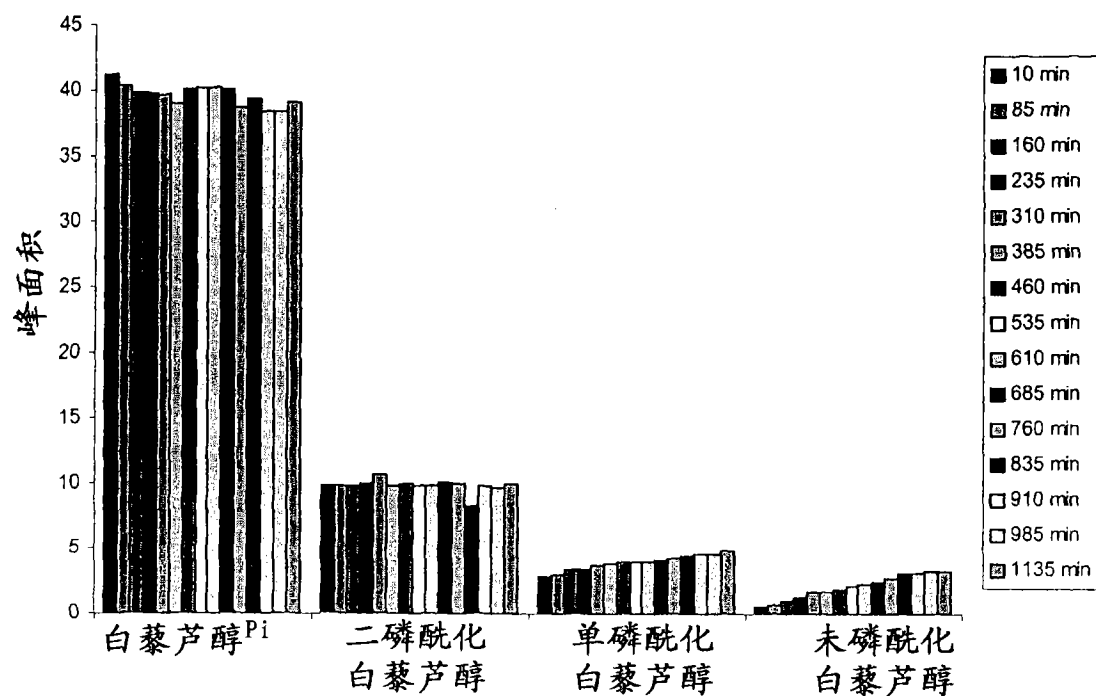


图 3

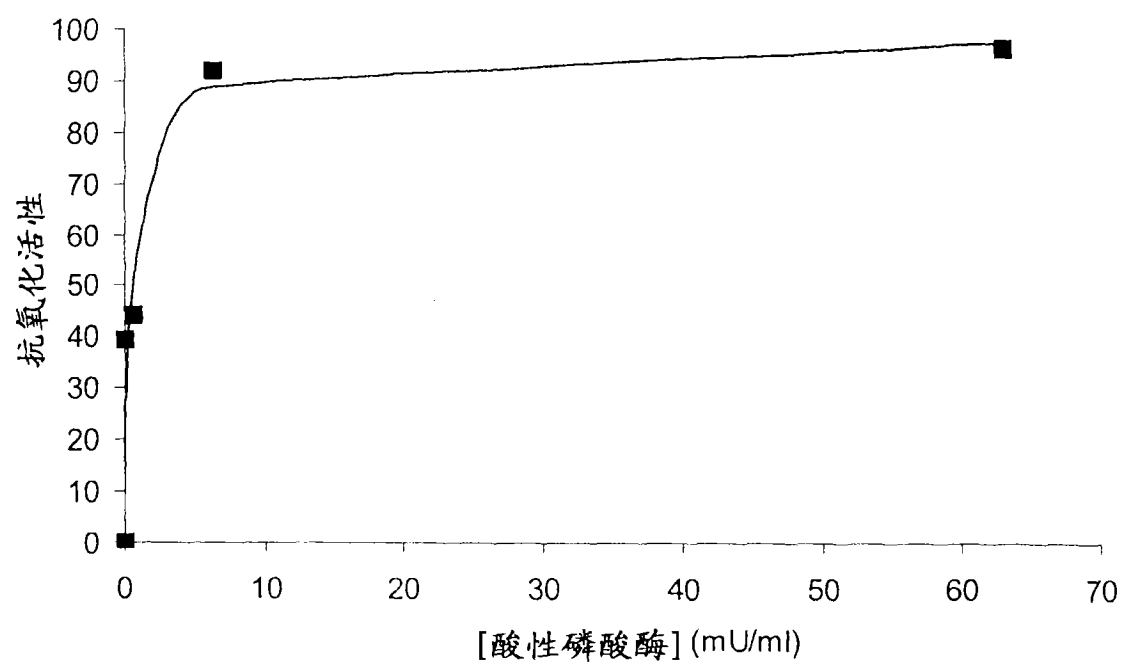


图 4