(19)国家知识产权局

(12)发明专利申请

(10)申请公布号 CN 119173249 A
(43)申请公布日 2024.12.20

(21)申请号 202380038458.3
(22)申请日 2023.05.04
(30)优先权数据
2206529.6 2022.05.05 GB
2210574.6 2022.07.19 GB
(85)PCT国际申请进入国家阶段日
2024.11.05
(86)PCT国际申请的申请数据
PCT/EP2023/061743 2023.05.04
(87)PCT国际申请的公布数据
WO2023/213918 EN 2023.11.09
(71)申请人 奇华顿股份有限公司
地址 瑞士
(72)发明人 A•哈迈奥 M•梅内尔
A•斯坎多勒拉 A•德彼泽蒙特
R•雷诺德
(74)专利代理机构 中国贸促会专利商标事务所有限公司 11038
专利代理师 王贵杰
(51)Int.Cl.
A61K 8/9717(2006.01)
A61Q 19/08(2006.01)

权利要求书1页 说明书19页 附图2页

(54)发明名称

制备宽果藻提取物的方法

(57)摘要

公开了一种制备宽果藻提取物的方法以及该提取物的化妆品用途。

CN 119173249 A

1.制备宽果藻(Mastocarpus stellatus)提取物的方法,包括以下步骤:

(i)宽果藻的水性提取,以获得第一液相和第一固相;

(ii)在升高的温度下,所述第一固相的酸性水解;

(iii)相分离,以获得第二液相和第二固相;和

(iv)将所述第一液相和所述第二液相合并,以获得所述宽果藻提取物。

2.根据权利要求1所述的方法,其中在所述水性提取之前,将所述宽果藻干燥和/或切割和/或研磨。

3.根据权利要求1或2所述的方法,其中所述水性提取包括在约10至30℃、更优选在约20℃的温度下,将所述宽果藻以约2至10%、更优选约4至5%的浓度浸渍在水中、特别是在去离子水中约5至60分钟、更优选约15分钟。

4.根据权利要求1至3中任一项所述的方法,其中通过离心、筛分和过滤中的一种或多种,将所述第一液相和所述第一固相分离。

5.根据权利要求1至4中任一项所述的方法,其中所述酸性水解在约1至4的pH下,更优选在约1.5至2.5的pH下,并且最优选在约2的pH下进行。

6.根据权利要求1至5中任一项所述的方法,其中所述酸性水解在约50至90℃的温度下,更优选在约70至90℃的温度下,并且最优选在约80℃的温度下进行。

7.根据权利要求1至6中任一项所述的方法,进一步包括在酸性水解后,将pH调节至约4至8的pH,更优选调节至约4.5至6的pH,特别是调节至约5的pH的步骤。

8.根据权利要求1至7中任一项所述的方法,其中步骤(iii)中的相分离包括离心、过滤、振动式筛分和绞拧中的一种或多种。

9.通过根据权利要求1至8中任一项所述的方法获得或可通过根据权利要求1至8中任一项所述的方法获得的宽果藻提取物。

10.化妆品组合物,其包含根据权利要求9所述的宽果藻提取物和化妆品可接受的赋形剂。

11.根据权利要求10所述的化妆品组合物,其为护肤组合物。

12.减小重颏的方法,所述方法包括向所述重颏局部施用宽果藻提取物,特别是根据权利要求9所述的宽果藻提取物或根据权利要求10或11所述的化妆品组合物的步骤。

13.根据权利要求9所述的宽果藻提取物或根据权利要求10或11所述的化妆品组合物用于减小重颏、用于增强脂肪分解、用于增加皮肤弹性、用于刺激胶原蛋白合成、用于水合皮肤、用于减小皮肤老化影响和/或用于防止皮肤老化影响的用途。

制备宽果藻提取物的方法

[0001] 本发明涉及一种制备宽果藻(Mastocarpus stellatus)提取物的方法、由此获得的宽果藻提取物、包含所述宽果藻提取物的化妆品组合物及其在化妆品中的用途。

[0002] 宽果藻,通常称为角叉聚糖苔藓或假爱尔兰苔藓,是红藻门(Rhodophyceae division)(红藻海藻门)中的物种。宽果藻通常出现在中和低潮间带的岩石上。它通常在爱尔兰和英国的大多数海岸上发现。其他记录的地点包括:法国(英吉利海峡,东北大西洋),冰岛,法罗群岛,北俄罗斯到里奥德奥罗,加拿大(纽芬兰)到美国(北卡罗来纳州)。

[0003] 宽果藻从盘状固着柄生长,并且叶(fronds)有沟槽,与扁平的爱尔兰苔藓(Chondrus crispus)不同。它生长到10-20厘米的高度并且叉状分枝。叶是软骨质的和红棕色的,且具有绿色或紫色的色彩。成熟的藻类显示出在直径达1mm的直立丝状体上发育的生殖结构。在颜色上它是红棕色、紫色或漂白色。

[0004] 根据Michael Guiry,收集爱尔兰海藻的最早记录由12世纪修道士的诗歌证明。在2001年爱尔兰海藻水产养殖市场分析中,宽果藻(M.stellatus)和爱尔兰苔藓(C.crispus)的估计合并的全国海藻年度收成不到100吨。在配子体生命阶段期间收获宽果藻,因为具有更多硫酸化角叉聚糖的后期更难以从其岩石中取下。食品和制药工业对海藻的抗氧化、抗凝血和增稠或胶凝特性感兴趣。除了其健康性质和应用之外,宽果藻的胶凝性质可以产生可生物降解的膜,其可以是用于食品保存和功能食品开发的塑料的可持续和可食用替代物。

[0005] EP1743628A1涉及一种化妆品组合物,其包含红藻提取物和载体,所述红藻提取物包含质量比为1:5的25-50wt%的弗罗里多苷(floridoside)和10-25wt%的羟乙磺酸的组合。该组合物可用于水合皮肤和/或防止皮肤老化。

[0006] FR2946878B1涉及弗罗里多苷或红藻提取物作为黑色素生成抑制剂的化妆用途。

[0007] 令人惊讶的是,现已发现,通过使用特殊的提取方法,可以获得具有脂肪分解活性并且能够增加皮肤弹性的宽果藻提取物,从而允许减小重颏。

[0008] 因此,在第一个方面中,本发明提供制备宽果藻提取物的方法。该方法包括以下步骤:

[0009] (i)宽果藻的水性提取,以获得第一液相和第一固相;

[0010] (ii)在升高的温度下,所述第一固相的酸性水解;

[0011] (iii)相分离,以获得第二液相和第二固相;和

[0012] (iv)将所述第一液相和所述第二液相合并,以获得所述宽果藻提取物。

[0013] 在第二方面中,本发明涉及通过本发明的方法获得或可通过本发明的方法获得的宽果藻提取物。

[0014] 在第三方面中,本发明涉及化妆品组合物,其包含本发明的宽果藻提取物和化妆品可接受的赋形剂。

[0015] 在第四方面中,本发明涉及减小重颏的方法,其包括向所述重颏局部施用宽果藻提取物,特别是本发明的宽果藻提取物或本发明的化妆品组合物的步骤。

[0016] 在第五方面中,本发明涉及本发明的宽果藻提取物或本发明的化妆品组合物用于

减小重颏、用于增强脂肪分解、用于增加皮肤弹性、用于刺激胶原蛋白合成、用于水合皮肤、用于减小皮肤老化影响和/或用于防止皮肤老化影响的用途。

[0017] 下面将更详细地描述本发明及其优选特征。

[0018] 为避免疑义,除非上下文另有说明,否则针对本发明的给定方面、特征或参数指示的优选方案、选项、特定特征等应被视为与针对本发明的相同或其他方面、特征和参数指示的任何和所有其他优选方案、选项、特定特征等组合公开。

[0019] 本发明的方法包括宽果藻的水性提取以获得第一液相和第一固相。

[0020] 可以在整个宽果藻植物上进行水性提取。或者,也可以仅使用植物的某些部分,例如柄和/或叶。

[0021] 在所述水性提取之前,可以将宽果藻干燥和/或例如通过切割或研磨或压碎或切碎或本领域技术人员已知的任何其他合适的方法加工成较小的碎片。

[0022] 因此,在一个实施方案中,在所述水性提取之前将宽果藻干燥。藻类可以通过任何合适的方法干燥,例如在低温(例如约40℃)下的烘箱中或在阳光下干燥。使用干燥的藻类有利于储存和物流。或者,也可以使用例如新鲜藻类或冷冻藻类。

[0023] 在一个实施方案中,在所述水性提取之前,将宽果藻加工,特别是切割和/或研磨成较小的碎片。这提高了提取过程的效率。优选地,在水性提取之前,将宽果藻加工成约15至20mm长的碎片(例如,碎片可以具有以下尺寸分布:5-10%在>2360μm,1000μm<80-90%<2360μm,10-15%在<1000μm)。这允许优化提取过程,同时避免在第一提取步骤中提取角叉聚糖。在本发明的方法中,优选将藻类中包含的所有角叉聚糖进行酸性水解。

[0024] 所述水性提取通常使用水,特别是去离子水进行。或者,也可以使用例如常规自来水,或含有添加剂,例如甘油、丙二醇、乙醇或其他极性溶剂,或缓冲剂的水。

[0025] 在一个实施方案中,所述水性提取包括在水中,特别是在去离子水中浸渍宽果藻。

[0026] 所述水性提取,特别是在水中的浸渍,可以在水中以合适浓度的宽果藻进行。

[0027] 在一个实施方案中,所述水性提取包括在水中,特别是在去离子水中,以约2至10%,更优选约4至5%,例如约4.8%的浓度浸渍宽果藻。

[0028] 在整个本公开中,如果没有另外说明,百分比(%)的指示是指重量百分比(w/w)。

[0029] 所述水性提取,特别是在水中的浸渍,可以在室温下进行。或者,也可以使用略高或略低的温度。

[0030] 在一个实施方案中,所述水性提取包括在约10至30℃,更优选约20℃的温度下浸渍所述宽果藻。

[0031] 取决于所使用的温度和/或浓度,所述水性提取,特别是在水中的浸渍,可以进行合适的一段时间。

[0032] 在一个实施方案中,所述水性提取包括将宽果藻浸渍约5至60分钟,更优选约15分钟。

[0033] 在一个具体实施方案中,所述水性提取包括在约10至30℃、更优选在约20℃的温度下,将所述宽果藻以约2至10%、更优选约4至5%的浓度浸渍在水中、特别是在去离子水中约5至60分钟、更优选约15分钟。

[0034] 可以使用任何合适的方法,分离所述第一液相和所述第一固相。优选的方法可以根据例如所述水性提取的规模而变化,但也可以根据其他因素如粒度、液相的粘度或可用

的设备而变化。离心、筛分和/或过滤是特别合适的方法。

[0035] 在一个实施方案中,通过离心、筛分和过滤中的一种或多种来分离所述第一液相和所述第一固相。

[0036] 在所述第一相分离之后,可以在合适的条件下储存所述第一液相。例如,在剩余的提取过程期间,所述第一液相可以在环境温度下避光储存几小时(例如约3-4h)。此外,可以通过添加合适的稳定剂,例如(极性)溶剂来稳定所述第一液相。例如,可以通过添加20%的丙二醇来稳定所述第一液相。

[0037] 特别地,使用所述第一固相的酸性水解来水解藻类材料中所含的角叉聚糖。

[0038] 所述第一固相的酸性水解可以在合适的pH下进行。根据所需的水解程度,可以选择略高或略低的pH。

[0039] 在一个实施方案中,所述酸性水解在约1至4的pH下,更优选在约1.5至2.5的pH下,最优选在约2的pH下进行。

[0040] 通过加入合适的酸可以获得所需的pH。硫酸、盐酸、柠檬酸及其混合物是特别合适的。

[0041] 在一个实施方案中,所述酸性水解包括添加硫酸、盐酸、柠檬酸或其任何混合物。

[0042] 还可以根据所需的水解程度来调节宽果藻与酸的比例。合适的比例为例如约3-6%的硫酸,优选约4.5%的硫酸。

[0043] 所述酸性水解在升高的温度下进行。根据所需的水解度,可以选择更高或更低的温度。

[0044] 在一个实施方案中,所述酸性水解在约50至90℃的温度下,更优选在约70至90℃的温度下,并且最优选在约80℃的温度下进行。

[0045] 所述酸性水解的持续时间也可以根据所需的水解程度进行调节。持续时间越长,聚合度越低。

[0046] 在一个实施方案中,所述酸性水解进行约1小时至3小时的时间段,更优选约2小时。

[0047] 例如,可以通过增加pH或降低温度来停止所述酸性水解。

[0048] 在一个实施方案中,本发明的方法还包括在所述酸性水解后将pH调节至约4至8的pH,更优选约4.5至6的pH,且特别是约5的pH的步骤。

[0049] 可以通过添加合适的碱,例如无机碱,例如氢氧化钠来调节pH。

[0050] 在所述酸性水解和任选地调节pH之后,进行相分离以获得第二液相和第二固相。该相分离可以通过任何合适的方式实现,例如通过离心、过滤、振动式筛分和/或绞拧。

[0051] 因此,在一个实施方案中,步骤(iii)中的相分离包括离心、过滤、振动式筛分和绞拧中的一种或多种。

[0052] 任选地,可以在将所述第二液相与所述第一液相合并之前将合适的稳定剂添加到所述第二液相中。例如,可以通过添加(极性)溶剂,例如20%的丙二醇来稳定所述第二液相。优选地,相同的稳定剂用于所述第一液相和所述第二液相两者。

[0053] 最后,将所述第一液相和所述第二液相合并以获得本发明的宽果藻提取物。

[0054] 任选地,可以在将所述第一液相和所述第二液相合并后,过滤本发明的宽果藻提取物,例如至多0.3μm。

[0055] 任选地,在将所述第一液相和所述第二液相合并后,可以将本发明的宽果藻提取物加热至例如约60℃。这可能是通过破坏色素,例如藻红蛋白,可以减少提取物的粉红色。

[0056] 下表提供了所述第一液相、所述第二液相和本发明的宽果藻提取物的比较:

[0057]

	第一液相	第二液相	本发明的宽果藻提取物
最终pH	6.06-6.77	4.84-5.21	5.45-6.10
干物质(%)	0.98-1.51	2.19-2.43	1.63-1.78
弗罗里多苷(g/l)	0.87-1.72	0.25-0.74	0.83-0.86
辛诺灵(Shinorine)(g/l)	0.13-0.20	0.03-0.07	0.07-0.11
全部中性糖(g/l)	无数据	无数据	10.42

[0058] 根据预期的用途和所需的浓度,可以原样使用所述宽果藻提取物,或者可以将其稀释或浓缩。

[0059] 本发明的宽果藻提取物可以在合适的条件下储存,例如在环境温度下储存,并且优选避光。

[0060] 本发明还涉及通过本发明的方法获得或可通过本发明的方法获得的宽果藻提取物。

[0061] 如本领域技术人员将理解的,如本文所用的术语“可从.....获得”是指提取物可以从植物获得或可以从植物分离,或可以从替代来源获得,例如通过化学合成或酶促生产。而本文所用的术语“获得”是指提取物直接源自植物来源。

[0062] 已经发现本发明的宽果藻提取物具有几种有利的美容效果,这已经通过体外和临床研究证明(参见下面的实施例)。

[0063] 特别地,发现所述宽果藻提取物能够减小重颏,增强脂肪分解,增加皮肤弹性,刺激胶原蛋白合成,水合皮肤,减小皮肤老化的影响并防止皮肤老化的影响。

[0064] 所述宽果藻提取物有利地局部施用于皮肤上。

[0065] 在进一步的方面中,本发明提供种化妆品组合物,其包含本发明的宽果藻提取物和化妆品可接受的赋形剂。本发明的化妆品组合物旨在用于局部施用。

[0066] 应当选择化妆组合物中的宽果藻提取物的浓度,使得实现期望的效果。

[0067] 在制备用于人皮肤的化妆品制剂中常用的任何赋形剂均可用于本发明。合适的赋形剂包括但不限于可影响所述宽果藻提取物的感官特性、皮肤渗透和生物利用度的成分。更具体地,它们包括液体,例如水、油或表面活性剂,包括石油、动物、植物或合成来源的那些,例如但不限于花生油、大豆油、矿物油、芝麻油、蓖麻油、聚山梨醇酯、脱水山梨糖醇酯、醚硫酸盐、硫酸盐、甜菜碱、糖苷、麦芽糖苷、脂肪醇、壬苯醇醚、泊洛沙姆、聚氧乙烯、聚乙二醇、右旋糖、甘油、洋地黄皂苷等。

[0068] 用于局部施用于皮肤的制剂可以采取任何物理形式。例如,化妆品组合物,特别是护肤组合物,可以是脂质体组合物、混合脂质体、油质体、类脂质体、醇质体、毫颗粒、微粒、纳米颗粒和固体-脂质纳米颗粒、囊泡、胶束、表面活性剂的混合胶束、表面活性剂-磷脂混合胶束、微球、微球和纳米球、脂球、毫米胶囊、微胶囊和纳米胶囊,以及微乳液和纳米乳液,其可以被添加以实现所述宽果藻提取物的更大渗透。

[0069] 化妆品组合物,特别是护肤组合物,可以以可用于局部施用于皮肤或通过透皮施用的任何固体、液体或半固体形式制备。因此,这些局部或透皮施用的制剂包括但不限于乳

膏、多重乳液,例如但不限于水包油和/或聚硅氧烷乳液、油和/或聚硅氧烷包水乳液、水/油/水或水/聚硅氧烷/水型乳液,和油/水/油或聚硅氧烷/水/聚硅氧烷型乳液、微乳液、乳液和/或溶液、液晶、无水组合物、水性分散体、油、乳液(milks)、香脂、泡沫、水性或油性洗剂、水性或油性凝胶、乳膏、水-醇溶液、水-二元醇溶液、水凝胶、搽剂、精华液、肥皂、面膜、精华液、多糖膜、软膏、摩丝、润发油、糊剂、粉末、条、笔和喷雾剂或气溶胶(喷雾剂)。包括免洗型和洗去型制剂。

[0070] 因此,本发明还提供护肤组合物。

[0071] 本发明的化妆品组合物可以任选地进一步包含其他化妆品活性剂,例如抗老化剂、保湿剂或水合剂。

[0072] 在一个实施方案中,本发明的化妆品组合物进一步包含抗老化剂,所述抗老化剂包含甘露糖-6-磷酸和甘露糖的混合物,如WO2020/201185中所述。WO2020/201185关于化妆品活性剂及其实施方案和用途的公开内容通过引用并入本文。

[0073] 在进一步的方面中,本发明还提供减小重颏的方法,该方法包括向重颏局部施用宽果藻提取物,特别是根据本发明的宽果藻提取物或根据本发明的化妆品组合物的步骤。

[0074] 在进一步的方面中,本发明还涉及本发明的宽果藻提取物或本发明的化妆品组合物用于减小重颏的用途。

[0075] 在进一步的方面中,本发明还涉及本发明的宽果藻提取物或本发明的化妆品组合物用于增强脂肪分解的用途。

[0076] 在进一步的方面中,本发明还涉及本发明的宽果藻提取物或本发明的化妆品组合物用于增加皮肤弹性的用途。

[0077] 在进一步的方面中,本发明还涉及本发明的宽果藻提取物或本发明的化妆品组合物用于刺激胶原蛋白合成的用途。

[0078] 在进一步的方面中,本发明还涉及本发明的宽果藻提取物或本发明的化妆品组合物用于水合皮肤的用途。

[0079] 在进一步的方面中,本发明还涉及本发明的宽果藻提取物或本发明的化妆品组合物用于减小皮肤老化影响的用途。

[0080] 在进一步的方面中,本发明还涉及本发明的宽果藻提取物或本发明的化妆品组合物用于预防皮肤老化影响的用途。

[0081] 通过以下非限制性实施例进一步说明本发明:

[0082] 实施例1:宽果藻提取物

[0083] 制备4.8%宽果藻干物质在水中的悬浮液(20g干燥的藻类+396.67g渗透水)。首先用剪刀将藻类材料切割成9mm长的碎片,然后在室温(22℃)下在搅拌下浸渍15分钟。通过过滤(Whatman过滤器,40μm),分离生物质(=第一固相)和上清液(=第一液相)。将1,3-丙二醇以总量20%的浓度添加到上清液中,得到提取物1。然后将其在室温下避光储存约3-4小时,同时制备提取物2。

[0084] 将先前提取的不溶部分(=第一固相)再次悬浮在渗透水中至4.8%的干物质。然后搅拌悬浮液,用96%硫酸溶液酸化至pH=2,然后加热至80℃。酸水解在80℃下持续2h。2h后,将悬浮液冷却并用10M氢氧化钠溶液中和至pH=5。将提取物离心(4500rpm,20℃,20min),将上清液与固体分离,并将1,3-丙二醇以总量20%的浓度添加到上清液(=第二液

相)中,得到提取物2。

[0085] 最后,将两种提取物1和2合并,搅拌并加热至60℃。加热30分钟后,立即将混合物依次在2.5μm和0.3μm下过滤,以获得根据本发明的宽果藻提取物。

[0086] 由此获得的提取物具有约5.45的pH、约1.63%的干质量含量、约2.1的加德纳色度和约0.86g/l的弗罗里多苷含量。

[0087] 实施例2:在人成纤维细胞上的转录组学分析

[0088] 将正常人皮肤成纤维细胞(NHDFs)以每孔300'000个细胞接种在6孔板中。在补充有10%FCS的Dulbecco改良Eagle培养基中培养48小时后,用磷酸盐缓冲盐水(PBS)冲洗NHDFs两次,并使其在不含FCS的培养基中静置过夜,然后刺激。用0.5%的宽果藻提取物刺激细胞,并与未处理的条件进行比较。刺激6小时和18小时后,通过Extract-all方法(Rio DC,Ares M Jr,Hannon GJ,Nilsen TW.Purification of RNA using TRIzol(TRI reagent).Cold Spring Harb Protoc.2010Jun;2010(6):pdb.prot5439.doi:10.1101/pdb.prot5439.PMID:20516177),提取总RNA。控制RNA质量并进行逆转录以获得cDNA。在设计用于研究参与NHDFs的皮肤弹性的不同基因的转录组学表达的特定板上进行RT-qPCR,其中每孔10ng cDNA。根据PES1(Pescadillo核糖体生物发生因子1)、GADD45A(生长停滞和DNA损伤诱导型α)和HMBS(羟甲基胆烷合酶)管家基因,归一化用成纤维细胞获得的基因表达的结果。数据以相对于未处理条件的倍数变化表示。

[0089] 结果

[0090] 为了探索宽果藻提取物是否能够改善皮肤弹性,对用0.5%宽果藻提取物处理的成纤维细胞进行转录组学研究,并分析参与皮肤弹性的各种基因的表达。

[0091] 在处理6小时后,宽果藻提取物使参与弹性纤维组织的基因(例如FBLN5、LOXL1和MFAP2)的表达分别显著增加+34%、+32%和+10%。它还使HPSE(一种编码参与弹性纤维降解的蛋白质的基因)的表达降低约-53%。

[0092] 有趣的是,在用宽果藻提取物处理18h后,FBLN5和MFAP2的表达仍然分别显著增加+24%和+24%,并且HPSE的表达降低-40%。

[0093] 宽果藻提取物还分别刺激参与细胞外基质结构的基因(例如COL3A1和CD44)的表达+33%和+58%。

[0094] 结果总结在下表中:

[0095]

	皮肤弹性的改善-转录组学研究(倍数变化vs.未处理条件)					
时间	路径	基因	倍数变化	SEM	P值	
6h	弹性纤维组织	FBLN5	1.344	0.01	0.0001	***
		LOXL1	1.318	0.03	0.0014	**
		MFAP2	1.103	0.03	0.0412	*
	降解	HPSE	-1.534	0.06	0.0183	*
18h	弹性纤维组织	FBLN5	1.243	0.08	0.088	#
		MFAP2	1.244	0.03	0.008	**
		MFAP5	1.063	0.02	0.081	#
	细胞外基质	COL3A1	1.327	0.1	0.073	#
		CD44	1.579	0.21	0.098	#
	降解	HPSE	-1.401	0.06	0.0267	*

[0096] 该转录组学研究证实了宽果藻提取物作为改善皮肤弹性的有希望的候选物。

[0097] 实施例3:人皮肤外植体的蛋白质组分析

[0098] 在蛋白质组水平上进一步评估宽果藻提取物对皮肤弹性的影响。

[0099] 样品制备

[0100] 来自年轻供体(28岁)和来自成熟供体(59岁)的皮肤外植体在空气-液体界面中保持存活。来自年轻供体的皮肤外植体保持未处理,而来自成熟供体的皮肤外植体用1%的宽果藻提取物局部处理,并与未处理的条件进行比较。每天更新处理和培养基(来自Biopredic International的MIL217C),持续5天。在这5天的刺激后,用PBS冲洗皮肤外植体两次,并在-80℃下冷冻。

[0101] 样品处理

[0102] 将剪切的组织加入氧化锆珠混合物中,并加入700μl的iST LYSE缓冲液(脱氧胆酸盐、TCEP和氯乙酰胺)。通过两轮珠搅打循环,裂解样品。将匀浆物转移到Diagenode蛋白质提取管中,并通过微空化(Bioruptor Pico,Diagenode),剪切共提取的核酸和细胞器。通过在iST LYSE缓冲液(脱氧胆酸盐、TCEP和氯乙酰胺)中煮沸来溶解、还原和烷基化蛋白质。通过BCA方法(Walker JM.The bicinchoninic acid(BCA)assay for protein quantitation.Methods Mol Biol.1994;32:5-8.doi:10.1385/0-89603-268-X:5.PMID:7951748),测定蛋白质浓度。根据iST方法(在Stage Tips中),制备肽提取物。用LysC和胰蛋白酶的混合物,消化50μg蛋白质。通过混合模式反相阳离子交换SPE(固相提取;PreOmics GmbH),纯化肽,干燥并在100μl的3%乙腈-0.1%甲酸水溶液中增溶。使用BCA方法,测定肽浓度。

[0103] LC-MS/MS

[0104] 对于每个样品,一式三份注射300ng肽。使用Ultimate 3000(Di-onex)设备,使用C18(75μm×50cm,2μm材料)柱,在预柱上3分钟的捕获步骤后,在120分钟内以300nL/min的流速采用2.5%至35%乙腈的梯度,进行色谱法。使用Q-Exactive(Thermo)质谱仪,获取数

据。以70'000的分辨率和60ms的累积时间,进行MS扫描。在每个循环的10个最强离子上以17'500的分辨率进行MS/MS扫描,累积时间为60ms。进行6545个循环,因此每个色谱峰平均17个循环。

[0105] 蛋白质鉴定

[0106] 使用SEQUEST-HT算法(Tabb DL.The SEQUEST family tree.JAm Soc Mass Spectrom.2015;26(11):1814-1819.doi:10.1007/s13361-015-1201-3),针对从UNIPROT挖掘的收集人参考蛋白质组和用于消化的酶的数据库,鉴定蛋白质。搜索参数为:酶=胰蛋白酶(全);允许的错误间隔=2;前体误差容限=10ppm;片段误差容限=0.02Da;动态修改=氧化(M),脱酰胺(N/Q);蛋白质末端修饰=乙酰化;静态修饰=脲基甲基(C)。

[0107] 使用Percolator算法(Spivak M,Weston J,Bottou L,Käll L,Noble WS.Improvements to the percolator algorithm for Peptide identification from shotgun proteomics data sets.J Proteome Res.2009Jul;8(7):3737-45.doi:10.1021/pr801109k.PMID:19385687;PMCID:PMC2710313),进行错误发现率(FDR)测定。

[0108] 通过SEQUEST-HT,以低于高的置信度报告,因此认为未鉴定的所有光谱,通过MS Amanda 2.0算法,针对与上述相同的数据库进行再处理。搜索参数为:酶=胰蛋白酶(全);允许的错误间隔=2;前体误差容限=10ppm;片段误差容限=0.02Da;动态修改=氧化(M)(P),脱酰胺(N/Q);蛋白质末端修饰=乙酰化、Met-缺失、Met-缺失+乙酰基;静态修改=脲基甲基(C)。使用Percolator算法,进行错误发现率(FDR)测定。

[0109] 蛋白质定量

[0110] 使用用于Proteome Discoverer 2.3软件(Thermo Fisher Scientific)的Minora和特征映射器,处理数据。峰积分参数为:采集后重新校准=真(精细参数);最小迹线长度=5;同位素的最小数量=2;同位素的最大ΔRT=0.2min;用于积分的PSM(肽-光谱匹配)置信水平=高。

[0111] 色谱比对参数为:RT比对=真;参数调整=精细;最大RT偏移=5min;质量容差10ppm。特征映射参数为:RT容差=自动;质量容差=自动;S/N阈值=2。

[0112] 使用用于Proteome Discoverer 2.4软件(Thermo Fisher Scientific)的前体离子计量器节点(Precursors Ions quantifier node),进行统计分析。

[0113] 一般定量设置为:待使用的肽=独特+RAZOR(独特=不同蛋白质或蛋白质组不共享的肽;RAZOR=多个蛋白质组共享的肽,但仅用于定量具有最大数量的独特肽和最长氨基酸序列的蛋白质);考虑肽独特性的蛋白质组=真;具有缺失通道的拒绝Quan结果=假。前体定量设置为:基于面积的前体丰度;最小数量重复特征=50%(必须在用于定量的至少50%的一组样品中检测到肽)。归一化设置为:总肽量(计算在所有鉴定的肽上每次注射的丰度值的总和,具有最高总丰度的注射用作参考,以通过每次注射的恒定因子校正所有其他注射中的丰度值,使得在结束时所有注射的总丰度是相同的)。

[0114] 数据选择

[0115] 通过仅选择受老化显著影响(成熟供体相对于年轻供体)并被宽果藻提取物逆转(处理的成熟供体相对于未处理的成熟供体)的蛋白质来进行第一选择。在这种蛋白质选择中,鉴定了参与皮肤真皮结构和弹性的蛋白质:突出显示了5种蛋白质。

[0116] 结果

[0117] 首先,通过比较年轻供体(28岁)与成熟供体(59岁)来评估皮肤老化对蛋白质组的影响。发现参与弹性纤维组织的蛋白质如MFAP4、TIMP1和FBLN5(分别为(-10%、-60%和-76%)和真皮的其他结构蛋白如COL1A1和COL2A1(各自为-75%)的表达显著降低。这证实了皮肤老化对真皮结构的负面影响。

[0118] 与年轻供体相比的结果总结在下表中:

[0119]

老化的影响 - 蛋白质组研究(倍数变化 vs.年轻供体)				
路径	基因	倍数变化	P 值	
弹性纤维组织	MFAP4	-1.098	<0.0001	***
	FBLN5	-1.756	<0.0001	***
真皮结构和保护	TIMP1	-1.596	<0.0001	***
	COL1A1	-1.747	<0.0001	***
	COL2A1	-1.748	<0.0001	***

[0120] 其次,研究了宽果藻提取物对其真皮结构因老化而改变的成熟供体的影响。发现与年轻供体相比降低的上述五种蛋白质的表达在用宽果藻提取物处理5天后显著增加。实际上,关于弹性纤维组织,MFAP4、TIMP1和FBLN5的表达分别增加了+64%、+23%和+95%。以相同的方式,采用宽果藻提取物,COL1A1和COL2A1的表达分别增加了+17%和+14%。

[0121] 与成熟供体相比的结果总结在下表中:

[0122]

皮肤弹性的改善 - 蛋白质组研究(倍数变化 vs.成熟供体)				
路径	基因	倍数变化	P 值	
弹性纤维组织	MFAP4	1.641	<0.0001	***
	FBLN5	1.953	<0.0001	***
真皮结构和保护	TIMP1	1.229	<0.0001	***
	COL1A1	1.168	<0.0001	***
	COL2A1	1.141	<0.0001	***

[0123] 这些结果在蛋白质水平上证实了宽果藻提取物有益于真皮结构和弹性纤维组织。

[0124] 实施例4:皮肤生物力学特性分析

[0125] 样品制备

[0126] 来自年轻供体(19岁)和来自成熟供体(49岁)的皮肤外植体在空气-液体界面中保持存活。来自年轻供体的皮肤外植体保持未处理,而来自成熟供体的皮肤外植体用1%的宽果藻提取物局部处理,并与未处理的条件进行比较。每天更新处理和培养基,持续3天。在这3天的刺激后,将皮肤外植体用PBS冲洗两次,在OCT™化合物封固剂中冷冻保存,并以20μm厚度冷冻切片。

[0127] 用原子力显微镜(AFM)分析杨氏模量

[0128] 本研究中使用的原子力显微镜是具有添加的落射荧光显微镜(Leica DMi8)的Bioscope Resolve(Bruker)。这种配置允许AFM探针在样品上的精确定位。这种独特的组合

还允许从机械到荧光采集获取相关图像。

[0129] 在本研究中使用QNM(定量纳米机械映射)**Peakforce®**模式。AFM探针具有0.4N/m的理论弹簧常数和<10nm的曲率半径。在每次使用之前,在蓝宝石上测量探针偏转灵敏度,并且还通过热噪声方法校准其弹簧常数(Kim Y,Mandriota N,Goodnight D,Sahin O.Calibration of T-shaped atomic force microscope cantilevers using the thermal noise method.Rev Sci Instrum.2020Aug 1;91(8):083703.doi:10.1063/5.0013091.PMID:32872926;PMCID:PMC7413748)。在空气(PBS1X,批号:CP20-3404)中进行力测量。

[0130] AFM测量包括获取真皮上的力-体积,如图1所示。图像的每个像素对应于力-压痕曲线,从该力-压痕曲线提取弹性模量(Ea)。从一个区域到另一个区域的值的数量可能存在差异,因为一些异常数据被软件抑制。

[0131] 通过双光子显微镜进行胶原纤维组织分析

[0132] ZEISS LSM880倒置共聚焦显微镜用于SHG(二次谐波生成)成像。使用的激光器是相干双光子脉冲Cameleon激光器。物镜是"C-Apochromat"水×40物镜。为了使胶原成像,在900nm波长下激发样品,并用滤光器在445nm下收集光。每种条件制备3个600μm×600μm大小的大图像。

[0133] 使用image J,进行数据分析,并分析每个图像50×50μm尺寸的3个表面上的平均灰度值。

[0134] 使用Rozeta软件,在每个图像50×50μm的3个区域上进行胶原纤维取向的研究。

[0135] 结果:皮肤弹性恢复

[0136] 弹性模量的测量证明了皮肤老化对表皮和真皮两者的影响。实际上,与19岁供体相比,49岁供体的弹性模量显著且强烈地增加。这意味着与年轻皮肤相比,AFM探针需要更大的力来使成熟皮肤变形,从而导致皮肤柔软度随着老化而丧失。

[0137] 然而,在成熟皮肤表面上应用宽果藻提取物显著降低了表皮和真皮中的弹性模量,从而证明皮肤柔软度的改善。结果总结在下表中:

[0138]

皮肤柔软度(弹性模量,单位 kPa)			
	年轻皮肤	成熟皮肤	成熟皮肤+宽果藻提取物(1%)
平均	2.529	24.509	3.037
SEM	0.887	4.234	0.913
P 值 vs.年轻皮肤		<0.0001***	
P 值 vs.成熟皮肤	0.05*		<0.0001***

[0139] 结果:真皮支架的修复

[0140] 皮肤柔软性/刚性特性主要由真皮支架组织诱导。为了理解弹性模量如何受到老化的影响,研究了真皮中胶原纤维的组织。

[0141] 发现年轻供体中的胶原纤维呈现2D组织,这意味着纤维在至少两个方向上取向,从而构成支架。另一方面,来自成熟供体的真皮中的纤维呈现更各向同性的组织,这意味着

纤维主要在一个方向上取向,从而显示真皮支架的损失。胶原纤维取向随年龄的这种变化导致支架的损失,可能与皮肤柔软性的损失直接相关。

[0142] 有趣的是,在成熟供体皮肤外植体上局部施用宽果藻提取物导致2D组织中胶原纤维的重新定向。这种2D组织有利于真皮支架的重组,这可以解释由AFM显示的皮肤生物力学性质的改善。图2示出了在图中分析的两个维度上胶原纤维取向的分布。对于每个方向,条越长,在相应方向上定向的纤维越多。

[0143] 实施例5:脂肪分解活性

[0144] 涉及重颏形成的另一个因素是脂肪组织在颏中的积累。为了确定宽果藻提取物是否能够通过减少脂肪组织含量来减小重颏体积,将成熟脂肪细胞包埋在3D基质中。

[0145] 人成熟脂肪细胞的3D培养

[0146] 成熟脂肪细胞从来自30岁女性的皮下脂肪组织获得,所述女性具有28.7kg/m^2的体重指数(BMI)并在知情同意下给予她的组织。用胶原酶消化后,从皮下脂肪组织中分离成熟脂肪细胞。将分离的脂肪细胞用洗涤缓冲液洗涤并包封在肽水凝胶中以形成25μL大小的3D脂肪细胞胶囊。脂肪细胞胶囊的形成遵循内部标准化方案,以在胶囊之间具有大约相同数量的脂肪细胞。然后将细胞在37℃下孵育24h以进行稳定化。在第0天开始用0.5%的宽果藻提取物处理,更换培养基;并且每天更换培养基直至培养4天。在每次培养基更换时,收集细胞分泌物,离心并在-80℃下冷冻用于进一步分析。每种培养条件一式三份进行。

[0147] 甘油和脂联素的胞外分泌的定量

[0148] 收集处理72h后的培养基。根据制造商的建议,使用特定试剂盒(脂联素试剂盒,Duoset,DY1065,R&D Systems;甘油试剂盒,Randox,GY105),分别通过ELISA和比色测定,评估脂联素和甘油的浓度。

[0149] 结果:甘油释放

[0150] 在处理72h后,在脂肪细胞培养基中进行脂肪细胞释放的甘油的评估。1μM的异丙肾上腺素(阳性对照)通过其对脂肪细胞的脂肪分解作用使甘油释放显著增加+196%,从而验证了该模型。0.5%的宽果藻提取物也具有显著效果,在处理72h后甘油释放+36%,从而证明了脂肪分解活性。

[0151] 结果总结在下表中:

[0152]

甘油释放(%未处理)			
	未处理	异丙肾上腺素	宽果藻提取物(0.5%)
平均	100%	295.6	135.7
SEM	9.673	17.51	4.983
P值 vs.未处理		0.05*	0.05*

[0153] 结果:脂联素分泌

[0154] 脂联素是成熟脂肪细胞分泌的另一种因子。发现0.5%的宽果藻提取物在处理72h后使脂联素分泌显著增加+48%,从而证实了其对脂肪组织的溶解活性。

[0155] 结果总结在下表中:

[0156]

脂联素分泌(%未处理)		
	未处理	宽果藻提取物(0.5%)
平均	100%	147.5
SEM	5.533	9.248
P值vs.未处理		0.05*

[0157] 实施例6:临床研究-皮肤生物力学特性、重颏减小和V型的改进

[0158] 制剂

[0159] 对于下文所述的第一组临床研究,使用具有以下INCI配方的化妆品制剂:

[0160] 水/水(AQUA/WATER)、鲸蜡醇、硬脂酸甘油酯、PEG-75硬脂酸酯、鲸蜡醇聚醚-20、硬脂醇聚醚-20、新戊酸异癸酯、宽果藻提取物、甘油、苯氧基乙醇、聚二甲基硅氧烷、苯氧基乙醇、对羟基苯甲酸甲酯、对羟基苯甲酸丙酯、对羟基苯甲酸乙酯、香料

[0161] 在安慰剂组合物中,省略了宽果藻提取物。

[0162] 更详细地:

[0163]

INCI	活性物	安慰剂
水/水	88.30	87.30

[0164]

鲸蜡醇、硬脂酸甘油酯、PEG-75 硬脂酸酯、鲸蜡醇聚醚-20、硬脂醇聚醚-20	5	5
新戊酸异癸酯	4.5	4.5
宽果藻提取物	1	--
甘油	1	1
苯氧基乙醇	0.695	0.695
聚二甲基硅氧烷	0.3	0.3
苯氧基乙醇、对羟基苯甲酸甲酯、对羟基苯甲酸丙酯、对羟基苯甲酸乙酯	0.105	0.105
香料	0.1	0.1

[0165] 专门小组的说明

[0166] 对44名具有干燥皮肤(皮肤湿度测量值<70a.u)并呈现鱼尾纹皱纹和颏下垂的志愿者进行单中心研究。将志愿者分成两组,每组22名志愿者,如下:

[0167] -第1组:22名平均年龄为49±6岁的女性,测试含有宽果藻提取物的乳膏

[0168] -第2组:22名平均年龄为49±5岁的女性,测试安慰剂乳膏

[0169] 该研究根据Bio EC的标准操作程序进行,并符合"Guía para investigaciones con seres humanos"(人类研究指南(Guidelines for Research on Human Beings))和消费者安全科学委员会(Scientific Committee on Consumer Safety)(SCCS)的指南中制定的规定。

[0170] 志愿者每天在早晨和晚上分别施用含有1%宽果藻提取物的乳膏和安慰剂乳膏,

持续28天。

[0171] 在该研究期间,使用Cutometery®分析并通过如下所述的AEVAHE®的条纹保护来分析生物力学性质。

[0172] 用Cutometer®测量皮肤生物力学特性

[0173] 皮肤的机械性质的测量使得能够评估弹性组织结构(弹性纤维、连接束的曲率、角质层的皱纹)和粘性表现的组织结构(间质液、内部粘附物)的功能状态。

[0174] 使用Courage&Khazaka的Cutometer®MPA 580,进行研究。测量原理基于抽吸法:在装置中产生负压,并将皮肤拉入探针的圆柱形孔(直径2mm)中。在探针内部,通过光学测量系统,确定穿透深度。每个抽吸阶段之后是松弛阶段。

[0175] 在本研究中使用以下程序:

[0176] -循环长度:4秒(抽吸:2秒;松弛:2秒)

[0177] -负压:450毫巴

[0178] -腔室直径:2mm

[0179] -测量的面积:鱼尾纹

[0180] 在每次测量结束时,将被负压吸起的皮肤的阻力及其返回其原始位置的能力显示为曲线。根据这些曲线,可以计算参数:

[0181] -在抽吸阶段期间,负压引起的皮肤变形首先确定弹性阻力,然后确定粘性分量,它们一起代表皮肤紧致度。

[0182] -在松弛阶段期间,皮肤的立即恢复决定了皮肤的完全弹性,而皮肤延迟返回到其初始位置测量了粘弹性分量。

[0183] 该研究集中于以下参数:

[0184] -R0或Uf,其表示在抽吸阶段期间皮肤的振幅:在相等的压力下,皮肤越柔韧,振幅越大。因此,该参数评价粘弹性分散性,或者换句话说,评价皮肤的紧致度。

[0185] -R5表示净弹性(Ur/Ue):松弛区域的弹性部分(Ur)除以抽吸区域的弹性部分(Ue)。

[0186] 在D0和D28测量这些参数。

[0187] 用AEVA HE®分析:焦点重颏体积(V形整形)

[0188] 基于授权的(US7,821,649),与立体成像技术组合的条纹投影单元,AEVA-HE®系统允许从皱纹减少到身体重塑的不同测量。它被设计用于量化化妆、美学和皮肤病学产品和治疗的功效。

[0189] 特别地,它可以用于评估面部下垂和重颏。

[0190] 统计分析

[0191] 对于体内研究,使用Shapiro Wilk检验,验证原始数据是否遵循高斯定律。在正态分布数据的情况下,使用未配对或配对学生t检验中的任一种来比较平均值。在非正态分布数据的情况下,对配对数据和未配对数据分别使用Wilcoxon(配对)和Kruskal-Wallis检验,然后使用Mann-Whitney U(未配对)检验。

[0192] 无论使用何种统计检验,结果被认为是显著的,如下:#p<0.1,*p<0.05,**p<0.01和***p<0.001。

[0193] 关于自我评估问卷和每日日志结果的分析,进行卡方检验(二分分析,其在于比较相关答案的数量)。

[0194] 结果:增加皮肤紧致度和弹性

[0195] 在第一个临床研究中,在面部施用含有1%宽果藻提取物™的乳膏或安慰剂乳膏后,测量皮肤的皮肤生物力学性质。在施用28天后,使用**Cutometer®**评估皮肤性质,从而测量R0和R5参数。

[0196] 对皮肤紧致度的影响:

[0197] 施用28天后,观察到R0参数的降低,这表明与安慰剂相比,用宽果藻提取物的紧致度增加(-7%)。

[0198] 此外,发现宽果藻提取物的效果与安慰剂效果显著不同,显示在研究期间紧致度显著增加多达7倍,这从以下数据中可以看出:

[0199]

	紧致度影响(R0)	具有1%宽果藻提取物的乳膏(活性)乳膏	安慰剂乳膏	活性物vs安慰剂
D0	平均值+/-SD (任意单位)	0.290±0.040	0.278±0.035	
D28	平均值+/-SD (任意单位)	0.271±0.029	0.275±0.041	
	平均变化vs D0	-7%	-1%	
	配对t检验vs D0	**p<0.01	ns	
	未配对t检验			#p<0.1

[0200] 对皮肤弹性的影响:

[0201] 在施用28天后,与D0相比,用宽果藻提取物观察到R5参数的显著增加。使用安慰剂,相对于D0显示出轻微的增加。相对于安慰剂乳膏,测量进一步显示出含有宽果藻提取物的乳膏改善的皮肤弹性(+8%),这从以下数据可以看出:

[0202]

	弹性(R5)	具有1%宽果藻提取物的乳膏(活性乳膏)	安慰剂乳膏	活性物vs安慰剂
D0	平均值+/-SD (任意单位)	0.348±0.059	0.375±0.044	
D28	平均值+/-SD (任意单位)	0.374±0.042	0.386±0.042	
	平均变化vs D0	+8%	+3%	
	配对t检验vs D0	**p<0.01	#p<0.1	
	未配对t检验			#p<0.1

[0203] 结果:重颏体积减小

[0204] AEVA**HE®**用于测量对重颏体积的影响。

[0205] 在施用含有1%宽果藻提取物的活性乳膏28天后,观察到重颏体积明显减小:

[0206]

	重颏体积 [mm^3]	具有1%宽果藻提取物的乳膏(活性乳膏)	安慰剂乳膏	活性物vs安慰剂
D0	平均值+/-SD (mm^3)	587±643.8	673.7±278.8	
D28	平均值+/-SD (mm^3)	569±647.3	683.0±287.8	
	平均体积变化vs D0	-18mm^3	+9mm^3	
	配对t检验vs D0	ns	#p<0.1	
	未配对t检验			*p<0.05

[0207] 图3示出了施用含有1%宽果藻提取物的乳膏的志愿者之一的**AEVA/HE®**测量的说明性照片。

[0208] 结果:V形形状的改善

[0209] 在该研究期间,在每天两次施用含有宽果藻提取物的乳膏与安慰剂乳膏56天后,通过**SiAscope®**测量面部椭圆上的胶原水平。

[0210] 在施用28天和56天后,与D0相比,用宽果藻提取物观察到平均胶原蛋白分别显著增加+2.4%和+4.2%。对于安慰剂,在56天后相对于D0显示出轻微增加。将含有宽果藻提取物的产品与安慰剂相比,发现宽果藻提取物在28天后能够改善胶原蛋白3.4倍,在56天后能够改善胶原蛋白2.8倍。

[0211] 数据如下表所示:

[0212]

	胶原蛋白水平	具有1%宽果藻提取物的乳膏(活性乳膏)	安慰剂乳膏	活性物 vs 安慰剂
D0	平均值+/-SD (任意单位)	142.21±9.1	142.63±12.5	
D28	平均值+/-SD (任意单位)	145.67±10.5	143.68±11.6	
	平均变化 vs D0	+2.4%	+0.7%	
	配对 t 检验 vs D0	**	ns	
	未配对 t 检验			# p<0.1
D56	平均值+/-SD (任意单位)	148.18±11.5	144.72±14.6	
	平均变化 vs D0	+4.2%	+1.5%	
	配对 t 检验 vs D0	***	#	
	未配对 t 检验			* p<0.05

[0213] 此外,使用线场光学相干断层扫描(LC**OCT®**)来说明在D0和D56时,面部椭圆水平处的真皮纤维网络。**LC-OCT®**是一种非侵入性皮肤成像技术,该技术结合共聚焦显微镜的高分辨率来拍摄面部照片,以便可视化胶原蛋白的作用。

[0214] 在施用含有1%宽果藻提取物的乳膏56天后,清楚地观察到面部V形上长胶原蛋白纤维的出现。

[0215] 另一方面,在施用安慰剂乳膏56天后,没有观察到长胶原蛋白纤维。

[0216] 此外,进行弹性测试,其包括将20g的质量通过线悬挂并通过条带附接到面部的椭圆形上。该测试在D0、D28和D56时进行。

[0217] 发现在施用含有1%的宽果藻提取物的乳膏28天和56天后,皮肤具有更高的张力和更紧致的紧致度。

[0218] 对于安慰剂乳膏,在施用28天和56天后没有观察到效果。

[0219] 实施例7:临床研究-皮肤水合

[0220] 制剂

[0221] 对于下文所述的第二组临床研究,使用具有以下INCI配方的化妆水:

[0222] 水/水,宽果藻提取物苯甲酸钠

[0223] 在安慰剂洗剂中,省略了宽果藻提取物。

[0224] 更详细地:

[0225]

INCI	活性物	安慰剂

水/水	98.50	99.50
宽果藻提取物	1	/
苯甲酸钠	0.5	0.5

[0226] 专门小组的说明

[0227] 对在脸颊上具有水合水平<50a.u.的干燥皮肤的40名志愿者进行单中心研究。将志愿者分成两组,每组20名志愿者,如下:

[0228] -第1组:20名平均年龄为47±6岁的志愿者,测试含有宽果藻提取物的洗剂

[0229] -第2组:20名平均年龄为48±5岁的志愿者,测试安慰剂洗剂

[0230] 志愿者每隔一天施用含有1%宽果藻提取物的洗剂或安慰剂洗剂,持续56天。使用拉曼光谱评估水合。

[0231] 结果

[0232] 为了评估前臂上的水合水平,在每天两次施用两个月后,通过拉曼光谱测量角质层中的总水含量,以%计。

[0233] 在施用含有1%宽果藻提取物的洗剂56天后,与D0相比,观察到角质层中总水含量显著增加+41.9%。对于安慰剂,在56天后相对于D0显示出显著增加。

[0234] 相比之下,56天后,相对于安慰剂,含有1%宽果藻提取物的洗剂显示皮肤水合作用改善+10.3%。

[0235] 数据可以在下表中找到:

[0236]

在SCTW中平均的总水含量(a.u.)	1%宽果藻提取物			安慰剂			未配对t检验vs.安慰剂
	平均值±SD(任意单位)	平均变化vs.D0	配对t检验vs D0	平均值±SD(任意单位)	平均变化vs.D0	配对t检验vs D0	
D0	29.47±6.35			28.90±9.52			
T24h	32.51±10.48	+10.3%	ns	30.06±10.56	+4.0%	ns	ns
D28	37.21±9.09	+26.7%	**	34.73±7.25	+20.2%	*	ns
D56	41.82±7.12	+41.9%	**	38.04±8.81	+31.6%	**	*p<0.05

[0237] 实施例8:透明质酸酶抑制测试(在tubo中)

[0238] 在其天然底物的存在下,透明质酸的聚合物被透明质酸酶裂解。酶抑制剂的存在导致水解速率降低。通过测量未裂解底物的量,用比浊法测定测试提取物对透明质酸酶活性的抑制作用。

[0239] 在96孔微孔板中进行测定。

[0240] 测试以下样品:

[0241]

样品:	说明:
提取物1	在本发明方法的步骤(i)中获得的第一液相
提取物2	在本发明方法的步骤(iii)中获得的第二液相

本发明的宽果藻提取物	在本发明方法的步骤(iv)中合并第一和第二液相

[0242] 将20μL每一样品与10μL Mcllvaine缓冲液(pH 4.6)混合。加入20μL透明质酸酶和20μL透明质酸。

[0243] 还测试了由溶剂、Mcllvaine缓冲液(pH 4.6)和透明质酸组成的阴性对照,以及另外包含透明质酸酶的阳性对照。

[0244] 此外,制备含有相应样品、缓冲液和酶的空白样品,并对每种提取物样品进行测试。

[0245] 在各种浓度下测试样品。每个稀释的样品一式三份运行。

[0246] 色甘酸二钠(DSCG)的标准范围用作抑制剂参考。

[0247] 搅拌混合物并使其在37℃下静置40分钟。

[0248] 最后,向所有孔中加入180μL CTAB(西曲溴铵)以沉淀未水解的透明质酸聚合物。

[0249] 将混合物在室温下温育20分钟,并使用分光光度计,测量600nm处的光密度(OD)。

[0250] 抑制百分比计算如下:

[0251] $$\%\text{抑制} = \frac{OD(\text{样品}) - OD(\text{空白样品})}{OD(\text{阴性对照}) - OD(\text{阳性对照})} * 100\%$$

[0252] 基于这些测量,计算IC_{50},即透明质酸酶活性被抑制50%时的样品浓度。结果如下表所示:

[0253]

样品:	IC_{50}:
提取物1	10.8μl/ml
提取物2	8.4μl/ml
本发明的宽果藻提取物	4.5μl/ml

[0254] 可以看出,本发明的宽果藻提取物的IC50显著低于提取物1和2的IC50,从而揭示了在本发明的提取物中观察到的协同效应。

[0255] 实施例9:抗糖化活性测试(在tubo中)

[0256] 糖化是可以在真皮的心脏中发生的非酶化学反应。葡萄糖分子与蛋白质反应,这导致真皮的解体(糖化蛋白质)。糖化蛋白质积累,因为它们不能被消除。葡萄糖被固定在胶原蛋白和弹性蛋白纤维周围,这将变硬并最终断裂(皮肤弹性丧失)。这个过程是不可逆的。

[0257] 在96孔微孔板中进行抗糖化活性测试。

[0258] 再次在各种浓度下测试与实施例8中相同的样品。每个稀释的样品一式三份运行。

[0259] 还测试了含有磷酸钠缓冲液和BSA(牛血清白蛋白)的阴性对照和含有磷酸钠缓冲液、BSA和核糖的阳性对照。

[0260] 最后,制备两个空白样品并对每个提取物样品进行测试:

[0261] -具有磷酸盐缓冲液、BSA和提取物

[0262] -具有磷酸盐缓冲液、核糖和提取物

[0263] 使用标准范围的氨基胍作为抑制剂参考。

[0264] 将40μL每一品与50μL BSA和10μL核糖混合。

[0265] 将混合物搅拌并在37℃下温育17h。用$\lambda_{\text{激发}}$=340nm和$\lambda_{\text{发射}}$=420nm测定荧光(FI)。

[0266] 如下计算抗糖化活性:

[0267] $$\%AGEs形成的抑制 = [1-\frac{FI(样品)-FI(空白样品(核糖或BSA))}{FI(阳性对照)-FI(阴性对照)}]*100\%$$

[0268] 基于这些测量,计算IC_{50},即AGEs形成被抑制50%时的样品浓度。结果如下表所示:

[0269]

样品:	IC_{50}:
提取物1	180.4μl/ml
提取物2	177.4μl/ml
本发明的宽果藻提取物	39.4μl/ml

[0270] 上述结果揭示了对于本发明的提取物观察到的强协同效应。

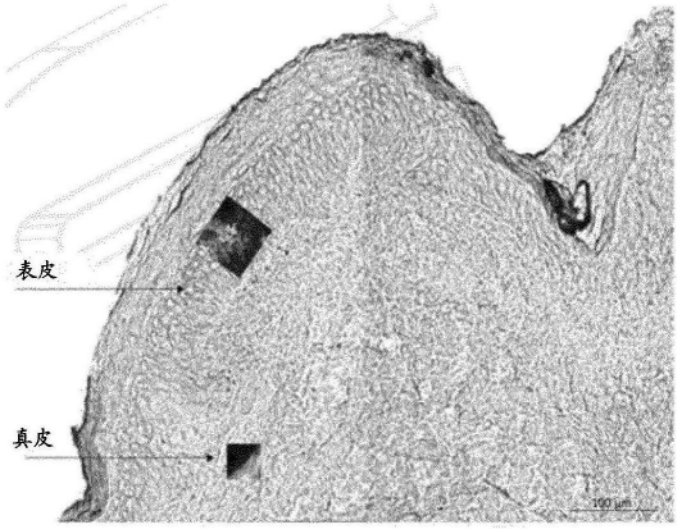

表皮
真皮

图1

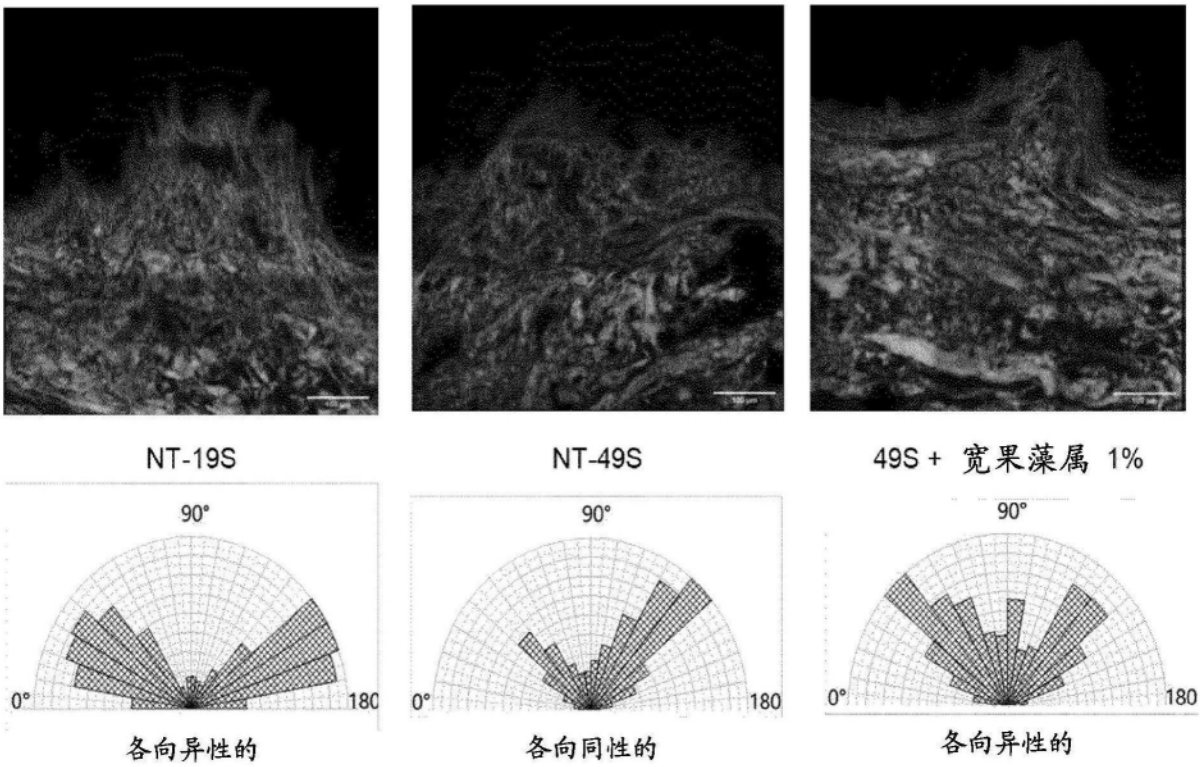

NT-19S
NT-49S
49S + 宽果藻属 1%
90°
0°
180
各向异性的
90°
0°
180
各向同性的
90°
0°
180
各向异性的

图2

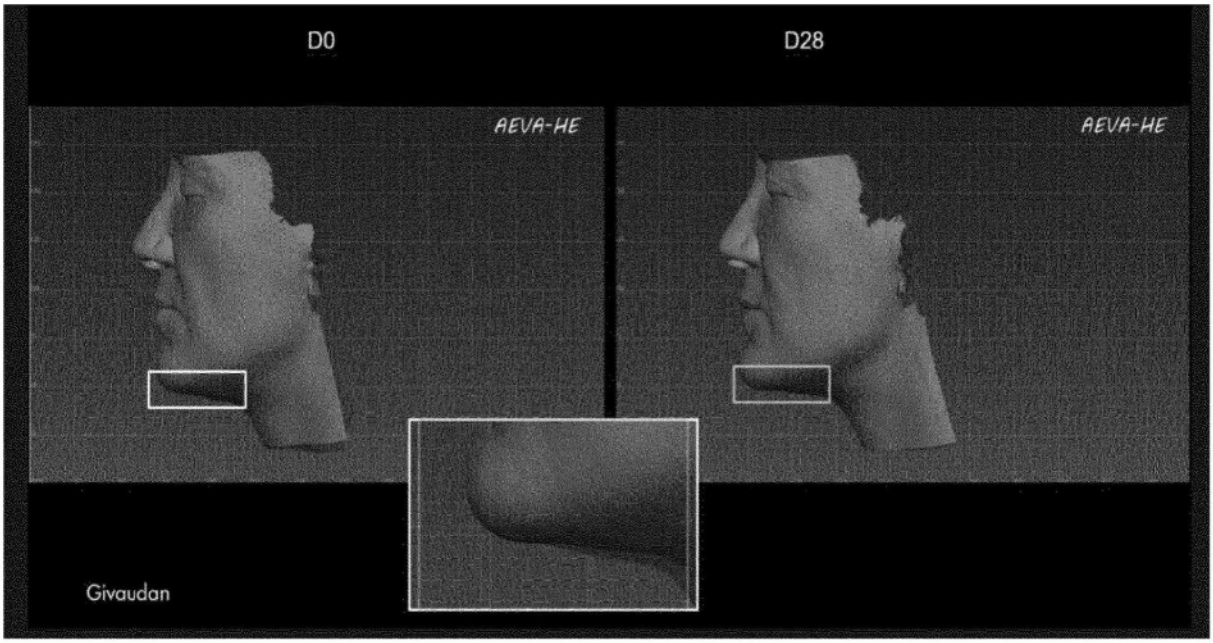


图3