



(12) 发明专利申请



(10) 申请公布号 CN 116370397 A

(43) 申请公布日 2023. 07. 04

(21) 申请号 202211569361.9

(22) 申请日 2015.11.02

(30) 优先权数据

14382430.8 2014.10.31 EP

(62) 分案原申请数据

201580071598.6 2015.11.02

(83) 生物保藏信息

CECT 8690 2014.07.29

(71) 申请人 利普泰个人股份有限公司

地址 西班牙巴塞罗那

(72) 发明人 A·索莱阿斯塔尔

N·阿尔米尼亚纳多梅内克

A·费勒蒙蒂埃尔

M·埃斯普卢加斯冈萨雷斯

(74) 专利代理机构 北京市中咨律师事务所

11247

专利代理师 张建 黄革生

(51) Int.Cl.

A61K 8/99 (2017.01)

A61Q 17/04 (2006.01)

A61Q 5/02 (2006.01)

A61Q 19/08 (2006.01)

A61Q 19/00 (2006.01)

A61K 35/74 (2015.01)

A61P 17/16 (2006.01)

A61P 35/00 (2006.01)

A61P 17/18 (2006.01)

A61P 17/00 (2006.01)

A61P 17/08 (2006.01)

A61P 29/00 (2006.01)

A61P 17/10 (2006.01)

权利要求书2页 说明书33页 附图1页

(54) 发明名称

包含来自南极假交替单胞菌的细菌细胞外产物的化妆品和/或药物组合物及其用途

(57) 摘要

细菌菌株的提取物,其用于皮肤和/或粘膜的治疗和/或护理,及其化妆品和/或皮肤药物组合物。具体地,细菌菌株的提取物用于皮脂减少和皮肤硬度。

1. 南极假交替单胞菌 (*Pseudoalteromonas Antarctica*) 种类的菌株产生的分子量低于10,000Da的提取物,其用于皮肤和/或粘膜的治疗。

2. 根据权利要求1的提取物,其中所述治疗是治疗和/或预防炎症、皮肤癌、粉刺、粟粒疹、痤疮、皮脂溢、脂溢性皮炎、化脓性汗腺炎或皮肤的光保护。

3. 根据权利要求1或2任一项的提取物,其中所述治疗抑制受体MC5R和/或刺激胶原蛋白合成。

4. 南极假交替单胞菌种类的菌株产生的分子量低于10,000Da的提取物在美容、非治疗性治疗和/或护理皮肤、粘膜和/或毛发中的用途。

5. 根据权利要求4的提取物的用途,其中所述美容、非治疗性治疗和/或护理是减少皮肤和/或毛发中的油脂的量的治疗、治疗和/或预防皮肤皱纹、治疗皮肤衰老、治疗和/或预防皮肤皱纹、治疗紧致度、预防皮肤紧致度缺失和/或用于毛发卫生保健。

6. 根据权利要求4或权利要求5的提取物的用途,其中所述美容、非治疗性治疗和/或护理是维持或改善皮肤的水化。

7. 根据权利要求4-6任一项的提取物的用途,其中所述美容、非治疗性治疗和/或护理抑制受体MC5R和/或刺激胶原蛋白合成。

8. 根据权利要求4-6任一项的提取物的用途,其中所述提取物的分子量高于50Da且低于10,000Da,且优选100Da-8,000Da。

9. 根据权利要求4-6任一项的提取物的用途,其中南极假交替单胞菌种类的菌株是具有保藏号CECT 8690的菌株。

10. 根据权利要求1-3任一项的提取物,其中所述分子量高于50Da且低于10,000Da,且优选100Da-8,000Da。

11. 根据权利要求1-3任一项的提取物,其中南极假交替单胞菌种类的菌株是具有保藏号CECT 8690的菌株。

12. 化妆品或皮肤药物组合物,其包含美容或皮肤药学有效量的根据权利要求1-3任一项的提取物和至少一种美容和/或皮肤药学上可接受的赋形剂、辅剂和/或成分。

13. 根据权利要求12的化妆品或皮肤药物组合物,其中将所述提取物掺入美容或皮肤药学上可接受的递送系统或缓释系统,所述美容或皮肤药学上可接受的递送系统或缓释系统选自:脂质体、复合型脂质体、油质体、类脂质体、短链醇类的磷脂脂质体、毫微型颗粒、微粒、纳米粒和固体脂质纳米粒、纳米结构的脂质载体、海绵状物、环糊精、囊泡、微胶粒、表面活性剂的混合型微胶粒、表面活性剂磷脂混合型微胶粒、毫微球、微球和纳米球、脂质体球、毫胶囊、微囊、纳米囊、微乳和纳米乳;或使所述提取物吸附在固体有机聚合物或选自滑石粉、膨润土、二氧化硅、淀粉或麦芽糖糊精的固体矿物支持物上。

14. 根据权利要求12-13任一项的化妆品或皮肤药物组合物,其中该组合物以一种制剂形式存在,其选自:多层乳剂、溶液、液晶、无水组合物、水分散体、油、奶、香膏、泡沫、水性或油性洗剂、水性或油性凝胶、乳膏、溶液、含水酒精溶液、水乙醇酸溶液、水凝胶、搽剂、浆液、肥皂、洗发水、调理剂、面膜、喷发剂、浆液、多糖膜、软膏、摩丝、润发油、糊剂、粉末、化妆棒、化妆笔、喷雾剂或气雾剂。

15. 根据权利要求12-13任一项的化妆品或皮肤药物组合物,将其掺入织物、非织造织物或医疗装置。

16. 根据权利要求12-15任一项的化妆品或皮肤药物组合物,其中所述赋形剂、辅剂和/或成分选自:减少皮脂产生的其它试剂、抗皮脂溢剂、控油剂、抗痤疮剂、刺激皮肤或表皮大分子的合成和/或能够抑制或预防其降解的试剂、胶原蛋白合成刺激剂、弹性蛋白合成刺激剂、核心蛋白聚糖合成-刺激剂、层粘连蛋白合成刺激剂、防卫素合成-刺激剂、伴侣蛋白合成-刺激剂、cAMP合成-刺激剂、调节AQP-3的试剂、调节水通道蛋白合成的试剂、来自水通道蛋白家族的蛋白质、透明质酸合成-刺激剂、糖胺聚糖合成-刺激剂、纤连蛋白合成-刺激剂、sirtuin合成-刺激剂、热休克蛋白、热休克蛋白合成-刺激剂、抑制神经元胞吐作用的药剂、其它抗胆碱能药、抑制肌肉收缩的药剂、抗老化剂、抗皱剂、止汗剂、抗炎剂和/或止痛剂、抗瘙痒剂、镇定剂、麻醉剂、乙酰胆碱受体聚集抑制剂、抑制乙酰胆碱酯酶的试剂、皮肤松弛剂、黑色素合成刺激或抑制剂、增白剂或脱色素剂、色素原化剂、自鞣剂、NO-合成酶抑制剂、5 α -还原酶抑制剂、赖氨酰和/或脯氨酰羟化酶抑制剂、抗氧化剂、自由基清除剂和/或抗大气污染的试剂、反应性羰基种类清除剂、抗糖化剂、抗组胺剂、抗病毒剂、抗寄生虫剂、乳化剂、软化剂、有机溶剂、液体推进剂、皮肤调理剂、保湿剂、保持水分的物质、 α 羟基酸、 β 羟基酸、增湿剂、表皮水解酶、维生素、氨基酸、蛋白质、颜料或着色剂、染料、生物聚合物、胶凝聚合物、增稠剂、表面活性剂、软化剂、乳化剂、粘合剂、防腐剂、能够减少或治疗眼袋的药剂、剥脱剂、角质溶解药、脱屑剂、抗微生物剂、抗真菌剂、抑真菌剂、杀菌剂、制菌剂、刺激脂质和角质层成分合成的试剂、神经酰胺、脂肪酸、抑制胶原蛋白降解的试剂、抑制基质金属蛋白酶的试剂、抑制弹性蛋白降解的试剂、抑制丝氨酸蛋白酶的试剂、刺激成纤维细胞增殖的试剂、刺激角质形成细胞增殖的试剂、刺激脂肪细胞增殖的试剂、刺激黑素细胞增殖的试剂、刺激角化细胞分化的试剂、刺激或延缓脂肪细胞分化的试剂、抗角化过度剂、粉刺消除剂、抗牛皮癣药、DNA修复剂、DNA保护剂、干细胞保护剂、稳定剂、用于治疗 and/或护理敏感皮肤的药剂、紧肤剂、抗伸长斑剂、粘合剂、脂肪分解剂或刺激脂肪分解的试剂、脂肪形成剂、调节PGC-1 α 表达的试剂、调节PPAR γ 活性的试剂、增加或降低脂肪细胞甘油三酯含量的试剂、抗蜂窝组织剂、抑制PAR-2活性的试剂、刺激愈合的试剂、辅助愈合的试剂、刺激上皮再生的试剂、辅助上皮再生剂、细胞生长因子、作用于毛细血管循环和/或微循环的试剂、刺激血管发生的药剂、抑制血管通透性的药剂、静脉强壮剂、作用于细胞代谢的药剂、改善真皮表皮交界部的药剂、诱导毛发生长的试剂、毛发生长抑制剂或阻滞剂、脱发阻滞剂、防腐剂、香料、气味吸收剂和/或体臭掩蔽除臭剂、螯合剂、植物提取物、精油、海产提取物、从生物技术方法得到的试剂、无机盐、细胞提取物、防晒剂和对紫外线A和/或B射线和/或红外线A射线有活性的有机或无机光保护剂,或其混合物。

包含来自南极假交替单胞菌的细菌细胞外产物的化妆品和/或药物组合物及其用途

[0001] 本申请是中国专利申请201580071598.6的分案申请,原申请的申请日是2015年11月2日,名称是“包含来自南极假交替单胞菌的细菌细胞外产物的化妆品和/或药物组合物及其用途”。

发明领域

[0002] 本发明涉及促进皮脂减少的细菌来源的细胞外产物。所述产物由南极假交替单胞菌(*Pseudoalteromonas Antarctica*)的菌株分泌。本发明还涉及细菌来源的细胞外产物在化妆品或皮肤药物组合物中的用途,所述化妆品或皮肤药物组合物用于治疗 and/或护理皮肤、粘膜和/或毛发。

[0003] 发明背景

[0004] 皮肤、粘膜、毛发和/或指甲构成生物体与其环境之间的物理屏障。皮肤由两种组织组成:表皮和真皮。表皮是皮肤的最外层,其是不渗透的,并因此提供对外部病原体的防护作用。它是一种自身不断更新的角质化多复层上皮细胞。

[0005] 表皮具有来自表皮中的主要类型的细胞(角质形成细胞)的高角蛋白含量、黑色素和在皮肤表面的角质层或亲水性膜中发现的较大含量的脂质。在覆盖皮肤表面的脂质膜中发现皮脂和角质形成细胞来源的脂质,其中这些脂质的主要部分具有皮脂来源。[A.Pappas,“Epidermal Surface Lipids”,*Dermato-Endocrinology* 2009,1,72-76]。

[0006] 皮脂分泌物在皮脂腺中产生,皮脂腺遍及身体以及手和脚掌中,并且发现它们在面部的密度为400-900个腺体/cm²。[K.R.Smith和D.M.Thiboutot,“Sebaceous gland lipids:friend or foe?”,*Journal of Lipid Research* 2008,49,271-281],主要与毛囊有关,其中皮脂分泌物通过其通道到达皮肤表面。皮脂腺分泌物皮脂是由主要由脂肪酸、甘油二酯、甘油三酯、胆固醇和角鲨烯构成的混合物组成的油状和蜡状物质,其提供了温度调节功能并减少了皮肤表面的水分流失。

[0007] 在人中,产生的皮脂量根据人口群体的不同在一定范围变化,这也取决于年龄和激素因素的调节。根据皮脂量的不同,其区别在于:

[0008] -油性皮肤。油性皮肤是由皮脂腺过多的功能引起的。当皮肤中存在过多的皮脂时,皮肤的特征在于较厚的质地、油腻和光亮的外观,以及存在扩张的孔和皮肤缺陷。

[0009] -组合皮肤。其特征在于同时存在干燥和油腻的区域。通常,油性区域位于前额、鼻子和下巴上(称为T区)。T区外面的部分通常是干燥区域,这归因于该区域的皮肤较薄,这增加了其脱屑。

[0010] -干性皮肤。皮脂缺乏意味着不能够保持足够的水合作用,这使得脆弱的皮肤具有较高的脱屑和细皱纹的倾向。由于显示出不可察觉的毛孔特征,所以屏障功能的能力降低意味着对有害外部因素例如UV、寒冷和风等的敏感性更高。

[0011] -正常皮肤。由于适量的皮脂能够保持良好的水分平衡,所以这种皮肤呈现出良好的弹性和抗性,几乎没有可见的毛孔和具有均匀的肤色。

[0012] 尽管在很大程度上依赖于年龄和种族来源,但存在大量平均的显示出油性皮肤的人群,以及存在具有与油性T区的组合皮肤的人群。

[0013] 与过量皮脂相关的一些皮肤病学障碍是:

[0014] -皮脂溢,即产生皮脂分泌过多的皮脂腺功能障碍,其导致红色、刺激性和鳞状皮肤。

[0015] -痤疮,即当皮肤毛孔中俘获皮脂、死细胞和细菌停止时发生的感染。

[0016] -粉刺,即硬化的皮脂和大量的角化细胞的积累,其导致堵塞卵泡的方式。

[0017] -粟粒疹或乳斑,即夹带在皮肤下的角化细胞和皮脂物质的蓄积。

[0018] 在皮脂腺内部,当成熟的皮脂腺细胞在腺体内部破裂时,皮脂被释放,并且皮脂通过毛囊的通道脱离至皮肤表面。在达到皮脂释放之前,腺体功能可以知晓在与毛囊相邻的层中存在一些未分化的细胞群,当它们移动到腺体的基层时开始其增殖,并且它们变成脂质-填充的皮脂腺细胞,因为它们到达腺体的中心部分,其中它们最终和进行性地发生 [C.Nieman and V.Horsley, "Development and Homeostasis of the sebaceous gland", *Seminars in Cell&Developmental Biology* 2012,23,928-936]。

[0019] 大量的化合物已经显示出它们在调节皮脂腺功能中的作用,例如雄激素、雌激素、类视色素、LXR型受体(肝X受体)、过氧化酶体激酶激活的受体、生长激素/胰岛素样生长因子和黑皮质素 [K.R.Smith和D.M.Thiboutot, "Sebaceous gland lipids: friend or foe?", *Journal of Lipid Research* 2008,49,271-281]。

[0020] 黑皮质素家族由与阿黑皮素 (proopiomelanocortin) (POMC) 结构相关的一组肽类与调节黑皮质素肽作用的黑皮质素受体 (MCR) 组成。MCR与G蛋白 (GPCR) 结合并通过不同的途径传递信号:产生环腺苷酸(cAMP),激活蛋白激酶A,并且增加 $[Ca^{2+}]$ 阳离子的浓度。

[0021] MC5R是已经在各种人体组织中表征的不同的黑皮质素受体之一,并且它牵涉脂质生产 [M.A.Bednarek等人, "Potent and Selective Peptide Agonists Of α -Melanocyte Stimulating Hormone (α MSH) Action at Human Melanocortin Receptor 5; their Synthesis and Biological Evaluation in vitro", *Chem.Biol.Drug.Des.* 2007,69,350-355]。例如,缺乏MC5R受体表达的转基因小鼠显示皮脂生成显著减少 [D.M.Thiboutot等人, "The Melanocortin 5Receptor is Expressed in Human Sebaceous Glands and Rat Preputial Cells", *J.Invest.Dermatol.* 2000,115,614-619]。此外,MC5R被认为是皮脂腺细胞分化的标记,因为在未分化的皮脂腺细胞中未检测到MC5R,而在分化的后期阶段在皮脂腺细胞中检测到MC5R,而在基底、未分化的皮脂腺细胞中检测不到MC5R。类似地,MC5R仅在分化开始时的体外培养物中和显示出显著的脂质颗粒的完全分化的皮脂腺细胞中可以被检测到 [L.Zhang等人, "Melanocortin-5receptor: A marker of human sebocyte differentiation", *Peptides* 2006,27,413-420]。由于MC5R是与导致皮脂生成的皮脂分化过程相关的标记,因此,该受体MC5R的抑制可用作减少皮脂产生并因此用于治疗 and/或预防与过量皮脂相关的障碍和/或疾病的策略。

[0022] 此外,已经证实MC5R受体的抑制在治疗脂溢性皮炎、癌症和炎症性疾病方面是有益的 (US 2009/221558)。例如,米尔-多里综合征由与体内腺癌(通常在结肠、前列腺、乳腺或卵巢)相关的皮脂腺中的腺瘤组成,并且通过抑制MC5R受体来预防皮脂腺细胞分化可以在治疗肿瘤生长中有效 (US 2009/221558)。还观察到,受体MC5R的抑制对于治疗厌食症或恶

病质(US 2003/110518)和用于治疗化脓性汗腺炎和耳垢过量产生(WO 03/040118A1)方面是有益的。

[0023] 还已知某些化合物,例如抑制皮脂腺的雌激素对胶原蛋白合成具有刺激作用,且由此具有皮肤紧致作用[A.Parchami,R.A.Fatahian Dehkordi,“Effect Of ovariectomy and chronic sex steroid administration On rabbit skin”,Global Veterinaria, 2010,4(6),610-615]。

[0024] 在现有技术中描述了来自海洋的胞外聚物质Matmarine™,其作用于MC5R受体[Soap,Perfumery&Cosmetics,Product Innovation2013,39页]。Matmarine™ Matmarine™据说可以降低皮脂率(8.4%),数量(20.5%)和毛孔面积(18.8%)。

[0025] 令人惊奇地,本发明的申请人已经发现,由南极假交替单胞菌菌株产生的分子量低于10kDa的提取物抑制MC5R受体并增加皮肤中的胶原蛋白合成。

[0026] 从现有技术中已知,由南极假交替单胞菌种类产生的糖蛋白具有愈合的特性(EP 1402898 B1)、保湿并修复皮肤角化障碍(EP 2337556A1)。现有技术还公开了具有分子重量为109KDa、52.5KDa、48KDa、44KDa、42KDa、34.5KDa、33KDa、31KDa和24KDa的南极假交替单胞菌膜囊上的蛋白谱图。主要蛋白质的平均分子量为98-112KDa[Morphological and physiological study of Pseudoalteromonas Antarctica NF3 and characterization of membrane vesicles present in the produced extracellular material,Doctoral Thesis of Maria Nevot,University Of Barcelona提交]。

[0027] 发明概述

[0028] 所公开的技术提供了通过南极假交替单胞菌种类菌株的提取物减少皮肤、粘膜和/或毛发中的浆液的溶液。

[0029] 附图简述

[0030] 图1:密度图显示在不同培养条件下生长的皮脂腺细胞的大小(FSC-A)和粒度(SSC-A)的形态学参数。未分化的皮脂腺细胞显示两个具有相似粒度水平但两种不同大小的主要细胞群体。分化的皮脂腺细胞表现出独特的细胞群,其特征在于高粒度水平和小的细胞大小。用2.5μg/ml根据实施例1得到的提取物处理的皮脂腺细胞显示与未分化的皮脂腺细胞相似的形态减少的粒度和增加的细胞大小的变化。

[0031] 本发明的描述

[0032] 本发明涉及通过南极假交替单胞菌种类生产的10,000Da以下的分子量提取物的化妆品和/或皮肤药物用途。令人惊奇地,本发明的发明人已经发现,上述举出的提取物减少皮肤和/或毛发中的皮脂的量,增加皮肤中的胶原蛋白合成,并且它们也是光保护剂。在一个实施方案中,MC5R受体的抑制减少了皮肤和/或头发中的皮脂产生,并且其减少了皮脂的量。

[0033] 定义

[0034] 为了便于对本发明的理解,包括了在本发明的上下文中使用的一些术语和表述的含义。

[0035] 在本发明的上下文中,“皮肤”应当被理解为包含它的从最上层或角质层到最下层或皮下组织(包括两者)的层。这些层由不同类型的细胞组成,例如角质形成细胞、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。

[0036] 在本说明书的上下文中使用的术语“治疗”当其不伴随“化妆品、非治疗性”的限制时,是指施用根据本发明的化合物以减轻或消除疾病或障碍或减少或消除与该疾病或障碍相关的一种或多种症状。术语“治疗”也涵盖减轻或消除疾病或障碍的生理后果的能力。

[0037] 当术语“治疗”伴随着“化妆品、非治疗性”的限制时,它们是指将化合物应用于皮肤、毛发和/或粘膜,特别是目的在于改善化妆品的皮肤、毛发和/或粘膜的美容质量,例如、但不限于其水合水平、弹性、坚固度、光泽、色调或质地等。本发明中的术语“护理”是指保持皮肤、毛发和/或粘膜的质量。这些品质经过健康受试者以及呈现皮肤和/或粘膜疾病和/或障碍的那些受试者中的皮肤、毛发和/或粘膜美容处理和/或护理而得到改善并维持,例如、但不限于皮肤上的溃疡和损伤、银屑病、皮炎、痤疮或玫瑰痤疮等。

[0038] 本发明中使用的术语“预防”是指本发明化合物在其出现之前预防、延缓或阻止疾病或障碍出现或发展的能力。

[0039] 在本发明的上下文中,术语“老化”是指皮肤随年龄(按时间顺序的老化(chronoaging)或通过暴露于日光(光老化)或环境因素例如烟草烟雾、寒冷、炎热或风的极端气候条件、化学污染物或污染物质所经历的变化,并包括通过触摸的所有外部可见和/或可察觉的变化,例如、但不限于皮肤上的不连续性的发展,例如皱纹、细线、沟、不规则或粗糙度、毛孔大小增加、弹性缺失、硬度缺失、光滑度缺失、从变形恢复的能力丧失、皮肤下垂例如下垂的颊部、眼袋出现或双下巴外观等;皮肤颜色的变化,例如痕迹、变红、眼袋或出现色素沉着过度的区域,例如老年斑或雀斑等;真皮、表皮、血管系统(例如蜘蛛状血管病或毛细血管扩张症的外观)或那些靠近皮肤的组织的异常分化、角化过度、弹性组织变性、角化病、脱发、陈皮样皮肤、胶原蛋白结构缺失和其它角质层的组织学改变等。术语“光老化”将由于皮肤长时间暴露于紫外线辐射导致的一组过程组合在一起,其导致皮肤过早老化,并呈现与衰老相同的物理特性,例如、但不限于松弛性、下垂、颜色变化或色素沉着异常、异常和/或过度角化。

[0040] 因此,本发明的第一个方面涉及通过用于治疗皮肤和/或粘膜的南极假交替单胞菌的种类的菌株产生的10,000Da以下的分子量的提取物。在一个实施方案中,所述治疗是指治疗和/或预防炎症、皮肤癌、黑头粉刺、粟粒疹、痤疮,皮脂溢、脂溢性皮炎、化脓性汗腺炎或皮肤光保护。在一个实施方案中,所述炎症选自,例如、但不限于银屑病、敏感性皮肤、皮炎、特应性皮炎、接触性皮炎、尿布皮炎、脂溢性皮炎、湿疹、红斑痤疮、痤疮,过度增生性皮肤病、烧伤、晒伤、甲壳炎、术后、用强脉冲光疗法(IPL)治疗后、用单色脉冲光疗法(激光)治疗后、用化学剥离剂治疗后或过度暴露于侵蚀性外用药物后的皮肤炎症、阴道粘膜炎症、口腔粘膜炎症、牙龈炎、牙周炎、鼻炎、过敏性鼻炎等。

[0041] 在另一个实施方案中,本发明涉及用于治疗癌症、厌食症或恶病质的由南极假交替单胞菌的种类的菌株产生的10,000Da以下的分子量的提取物。在一个实施方案中,癌症的治疗是抑制肿瘤生长或Muir-Torre综合征的治疗。在一个实施方案中,癌症治疗是抑制肿瘤生长或对米尔-多里综合征的治疗。

[0042] 在另一个方面,本发明涉及由南极假交替单胞菌的种类的菌株产生的10,000Da以下的分子量的提取物在美容、非治疗性治疗和/或护理皮肤、粘膜和/或毛发中的用途。在一个实施方案中,皮肤、粘膜和/或毛发的美容、非治疗性治疗和/或护理是治疗皮肤和/或毛发中皮脂量的减少,治疗和/或预防皮肤老化,治疗和/或预防皮肤皱纹,治疗皮肤紧致,防

止皮肤紧致度缺失和/或毛发卫生保健。

[0043] 在另一个实施方案中,皮肤和/或粘膜的治疗以及皮肤、粘膜和/或毛发的美容、非治疗性治疗和/或护理抑制MC5R受体。

[0044] 在另一个实施方案中,皮肤和/或粘膜的治疗以及皮肤、粘膜和/或毛发的美容、非治疗性治疗和/或护理刺激胶原蛋白合成。

[0045] 在另一个实施方案中,皮肤和/或粘膜的治疗以及皮肤、粘膜和/或毛发的美容、非治疗性治疗和/或护理通过局部或透皮应用进行。

[0046] 在另一个实施方案中,由南极假交替单胞菌的种类的菌株产生的提取物的分子量高于50Da且低于10,000Da,在100Da至8,000Da之间,150Da至6,000Da之间或300Da至5,000Da之间。

[0047] 在另一个实施方案中,南极假交替单胞菌的种类的菌株是具有保藏号CECT 8690的菌株。所述菌株已于2014年7月29日寄存在公共机构Colección **Española** de Cultivos Tipo (CECT) (Edificio 3CUE, Parc Científic Universitat de Valencia, Catedrático Agustín Escardino 9, 46980 Paterna, Valencia, Spain) 根据“布达佩斯条约”在1977年4月28日的国际承认微生物保藏条款 (International Recognition of the Deposit of Microorganisms) 而在法律上得到认可。

[0048] 在另一个实施方案中,分子量在10,000Da以下的提取物可以通过在适合的培养基中发酵南极假交替单胞菌种类的菌株获得,通常搅拌和通气以合成和分泌所述产物至培养基,随后是隔离和纯化。用于生产本发明提取物的发酵可以在介于5°C至37°C之间或在8°C至20°C之间的温度下搅拌和充气的培养基中进行,所述培养基具有在5.5-9之间或6.5-7.5的pH,如果需要在发酵过程中进行调整。发酵的时间期限为24至120小时或36至72小时。在一个实施方案中,在10,000Da下分子量的提取物的分离和纯化的方法通过本领域技术人员已知的方法进行,例如离心和过滤。在涉及从发现提取物的上清液中分离南极假交替单胞菌种类的菌株离心和过滤步骤之后,进行过滤以消除高分子量的分子,以便纯化该提取物,并且使用保留分子量大于10,000Da的分子的膜。在一个实施方案中,南极假交替单胞菌种类的菌株是具有保藏号CECT8690的菌株。

[0049] 在另一个实施方案中,10,000Da以下的分子量的南极假交替单胞菌种类的菌株的提取物在色谱分析高效液相色谱 (HPLC) 中具有5至20分钟或8至17分钟之间的保留时间,其中使用色谱柱TSK Gel G2000SWXL, 5m, **125Å** 7.8mm x 30mm (TOSOH Bioscience) 和具有0.1M pH=6.70±0.1M磷酸盐缓冲液+0.1M硫酸钠的水作为洗脱液。

[0050] 在一个实施方案中,在南极假交替单胞菌种类的菌株的发酵中,一些外源性糖,例如、但不限于半乳糖、葡萄糖、甘露糖、苦杏仁苷、纤维二糖、麦芽糖、淀粉、糖原、乳糖及其混合物和/或包含这些糖的混合物的提取物可以用作碳源。在一个实施方案中,提供2-40g/L或10-30g/L的外源葡萄糖供应。

[0051] 在另一个实施方案中,培养基包含额外的氮或碳源,例如酵母提取物、麦芽提取物或胨,其中这些成分的每一种的浓度为0.1-20g/L或0.5-10g/L。

[0052] 在另一个实施方案中,还提供用于南极假交替单胞菌种类的菌株的发酵培养的无机盐,并且该无机盐选自提供离子 Na^+ 、 K^+ 、 NH_4^+ 、 Ca^{2+} 、 Mg^{2+} 、 PO_4^{3-} 、 SO_4^{2-} 、 Cl^- 、 CO_3^{2-} 或微量元素,

例如Cu、Mn、Fe和Zn的盐。

[0053] 本发明的另一个方面涉及化妆品或皮肤用药物组合物,其特征在于它包含化妆品或皮肤药学有效量的由南极假交替单胞菌种类菌株的产生的10,000Da以下分子量的提取物和至少一种化妆品和/或皮肤药学可接受的赋形剂、辅剂和/或成分。所述组合物可以通过本领域技术人员已知的常规方法制备[“Harry’s Cosmetology”,第7版,(1982),Wilkinson J.B.,Moore R.J.编辑.Longman House,Essex,GB]。在一个实施方案中,南极假交替单胞菌种类的菌株是具有保藏号CECT8690的菌株。

[0054] 在本发明组合物中由南极假交替单胞菌种类菌株生产的10,000Da以下分子量的提取物的化妆品或皮肤药学上有效量以及其剂量将取决于许多因素,包括年龄、患者的状况、病症的性质或严重性、待治疗和/或护理的障碍或疾病、提取物的施用途和频率。

[0055] “化妆品或皮肤药学有效量”应当被理解为无毒性的、但由南极假交替单胞菌种类菌株产生的10,000Da以下分子量的提取物以提供期望的效果的足够量。本发明的提取物以化妆品或皮肤药物浓度使用以获得期望的效果;在一个实施方案中,该浓度占组合物总重的0.0000000001% (按重量计) -20% (按重量计);或0.00000001% (按重量计) -10% (按重量计)或0.000001% (按重量计) -5% (按重量计)或0.0001% (按重量计) -5% (按重量计)。

[0056] 在另一个实施方案中,本发明的提取物还可以并入化妆品和/或皮肤药物递送系统和/或缓释系统中。

[0057] 术语“递送系统”涉及与本发明提取物一起施用的稀释剂、辅剂、媒介物或添加剂。这些化妆品或药用载体可以是液体,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、山梨坦酯、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、葡萄糖、甘油、洋地黄皂苷等。本领域技术人员知晓可以在其中可以施用本发明的提取物的不同递送系统中使用的稀释剂、辅剂或添加剂。

[0058] 术语“缓释”以通常的含义使用,其涉及化合物的递送系统,该系统在一段时间期限内提供这种化合物的逐步释放,并且在一个实施方案中,尽管不一定但在一段时间期限内为相对恒定的化合物释放水平。

[0059] 递送或缓释系统的实例包括、但不限于脂质体、混合脂质体、油质体、类脂质体囊泡、短链醇类的磷脂脂质体、毫微粒(milliparticles)、微粒、纳米粒和固体脂质纳米粒、纳米结构的脂质载体、海绵、环糊精、囊泡、胶束、混合的表面活性剂胶束、表面活性剂-磷脂混合胶束、毫微球(millispheres)、微球和纳米球、脂质球(lipospheres)、微胶囊、微胶囊和纳米胶囊以及微乳和纳米乳,可以加入以实现本发明的活性成分更大的穿透力和/或改善其药代动力学和药效学特性。在一个实施方案中,所述递送或缓释系统是脂质体、表面活性剂-磷脂混合胶束和微乳以及具有内部反胶束结构的油包水型微乳和包含微乳的纳米胶囊。

[0060] 缓释系统可以通过现有技术中已知的方法制备,并且包含它们的组合物可以例如通过局部或透皮给药施用,包括粘合性贴剂、非粘性贴剂、封闭贴剂和微电子贴剂;或通过全身给药施用,例如、但不限于口服或胃肠外途径,包括鼻、直肠或皮下植入或注射,或直接植入或注入特定身体部位。在一个实施方案中,所述缓释系统应释放相对恒定量的本发明的提取物。缓释系统中包含的提取物的量将取决于例如施用的组合物、本发明的提取物的

释放动力学和持续时间以及待治疗或预防的病症、障碍和/或疾病的性质。

[0061] 包含本发明提取物的组合物也可以吸附在固体有机聚合物或固体矿物载体上,例如但不限于滑石粉、膨润土、二氧化硅、淀粉或麦芽糖糊精等。

[0062] 包含由南极假交替单胞菌种类菌株产生的10,000Da以下分子量的提取物的组合物也可以掺入到与皮肤直接接触的织物、无纺布或医疗装置中,从而释放本发明的提取物,无论是通过将结合系统生物降解到织物、无纺布或医疗装置中,还是归因于它们与身体之间的摩擦、身体的水分、皮肤的pH或体温。此外,本发明的提取物可以并入用于制造与身体直接接触的衣服的织物和无纺布中。在一个实施方案中,包含本发明提取物的织物、无纺布和医疗装置用于治疗 and/或预防通过抑制MC5R受体或通过刺激胶原蛋白合成而改善或预防的病症、障碍和/或疾病。

[0063] 织物、无纺布、衣服,医疗装置和用于将化合物固定在其上的装置的实例,其中有上述的递送系统和/或持续释放系统,可以在文献中找到,并且是现有技术中已知的[Schaab C.K.(1986)HAPPI May 1986;Nelson G.,“Application of microencapsulation in textiles”,(2002),Int.J.Pharm.,242(1-2),55-62;“Biofunctional Textiles and the Skin”(2006)Curr.Probl.Dermatol.第33卷,Hipler U.C.和Elsner P.编辑.S.Karger AG,Basel,Switzerland;Malcolm R.K.等人,”Controlled release of a model antibacterial drug from a novel self-lubricating silicone biomaterial“, (2004),J.Cont.Release,97(2),313-320]。优选的织物、无纺布、衣服和医疗装置是绷带、纱布、T恤、袜子、紧身衣、内衣、腰带、手套、尿布、卫生巾、敷料、床罩、擦拭物、粘合贴剂、非粘性贴剂、闭塞性贴片、微电子贴片和/或面罩。

[0064] 包含本发明提取物的化妆品或皮肤药物组合物可以用于局部或透皮应用的不同类型的组合物中,任选地包括配制期望的施用形式必不可少的化妆品和/或皮肤药学上可接受的赋形剂。

[0065] 局部或透皮应用的组合物可以被生产为任意的固体、液体或半固体制剂,例如、但不限于霜剂、复合型乳液(例如、但不限于水包油型乳剂和/或水包硅酮乳剂、油包水型乳剂和/或硅酮包水型乳剂、水/油/水或水/硅油/水型乳剂和油/水/油或硅酮/水/硅酮型乳剂)、无水组合物、水分散体、油、奶、香膏、泡沫、洗剂、凝胶、霜样凝胶、含水酒精溶液、水甘醇溶液、水凝胶、搽剂、浆液(sera)、肥皂、洗发水、调理剂、面膜、发胶、浆液(serum)、多糖膜、软膏、摩丝、润发油、粉末、化妆棒(bar)、化妆笔(pencil)和喷雾剂或气雾剂(喷雾剂),包括保留型(leave on)和冲洗型(rinse off)制剂。可以使用本领域的技术人员已知的技术将这些局部或透皮应用制剂掺入不同类型的固体配件中,例如、但不限于绷带、纱布、t-恤、袜子、紧身衣、内衣、腰带、手套、尿布、卫生巾、敷料、床罩、擦拭物、粘附贴剂、非粘附贴剂、封闭贴剂、微电子贴剂和/或面膜中;或可以将它们掺入不同化妆产品中,例如化妆粉底(例如粉底液和粉饼)、卸妆水、卸妆乳、眼下遮瑕膏、眼影、唇膏、润唇膏、保湿唇膏和唇粉等。

[0066] 本发明的化妆品或皮肤药物组合物可以包括增加本发明胞外多糖的经皮吸收的试剂,例如、但不限于二甲亚砜、二甲基乙酰胺、二甲基甲酰胺、表面活性剂、氮酮(1-正十二烷基氮杂环庚烷-2-酮)、醇、脲、乙氧基二甘醇、丙酮、丙二醇或聚乙二醇等。此外,本发明的化妆品或皮肤药物组合物可以通过离子透入、超声促渗、电穿孔、微电子贴剂、机械压力、渗

透压梯度、封闭疗法(occlusive cure)、显微注射或通过压力无针注射(例如通过氧气压力的注射)或其任意组合而被应用于待治疗的局部区域,以实现本发明提取物的更好的穿透力。应用区域将由待治疗和/或预防的病症、障碍和/或疾病的性质而确定。

[0067] 在本发明中所述的化妆品或皮肤药物组合物中包含的化妆品或皮肤药学上可接受的赋形剂、辅剂和/或成分是常用于化妆品或皮肤药物组合物中的另外的成分,例如、但不限于减少皮脂产生的其它试剂、抗皮脂溢剂、控油剂、抗痤疮剂、刺激皮肤或表皮大分子的合成和/或能够抑制或预防其降解的试剂、胶原蛋白合成刺激剂、弹性蛋白合成刺激剂、核心蛋白聚糖合成-刺激剂、层粘连蛋白合成刺激剂、防卫素合成-刺激剂、伴侣蛋白合成-刺激剂、cAMP合成-刺激剂、调节AQP-3的试剂、调节水通道蛋白合成的试剂、来自水通道蛋白家族的蛋白质、透明质酸合成-刺激剂、糖胺聚糖合成-刺激剂、纤连蛋白合成-刺激剂、sirtuin合成-刺激剂、热休克蛋白、热休克蛋白合成-刺激剂、抑制神经元胞吐作用的药剂、其它抗胆碱能药,抑制肌肉收缩的药剂,抗老化剂、抗皱剂、止汗剂、抗炎剂和/或止痛剂,抗瘙痒剂、镇定剂、麻醉剂、乙酰胆碱受体聚集抑制剂、抑制乙酰胆碱酯酶的试剂、皮肤松弛剂、黑色素合成刺激或抑制剂、增白剂或脱色素剂、色素原化剂(propigmenting agent)、自鞣剂、NO-合成酶抑制剂、5 α -还原酶抑制剂、赖氨酰和/或脯氨酰羟化酶抑制剂、抗氧化剂、自由基清除剂和/或抗大气污染的试剂、反应性羰基种类清除剂、抗糖化剂、抗组胺剂、抗病毒剂、抗寄生虫剂、乳化剂、软化剂、有机溶剂、液体推进剂、皮肤调理剂、保湿剂、保持水分的物质, α 羟基酸、 β 羟基酸、增湿剂、表皮水解酶、维生素、氨基酸、蛋白质、颜料或着色剂、染料、生物聚合物、胶凝聚合物、增稠剂、表面活性剂、软化剂、乳化剂、粘合剂、防腐剂,能够减少或治疗眼袋的药剂、剥脱剂、角质溶解药、脱屑剂、抗微生物剂、抗真菌剂、抑真菌剂、杀菌剂、制菌剂、刺激脂质和角质层成分合成的试剂、神经酰胺、脂肪酸、抑制胶原蛋白降解的试剂、抑制基质金属蛋白酶的试剂、抑制弹性蛋白降解的试剂、抑制丝氨酸蛋白酶例如激肽释放酶、白细胞弹性蛋白酶或组织蛋白酶G的试剂,刺激成纤维细胞增殖的试剂、刺激角质形成细胞增殖的试剂、刺激脂肪细胞增殖的试剂、刺激黑素细胞增殖的试剂、刺激角化细胞分化的试剂、刺激或延缓脂肪细胞分化的试剂、抗角化过度剂、粉刺消除剂(comedolytic agents)、抗牛皮癣药、DNA修复剂、DNA保护剂、干细胞保护剂、稳定剂、用于治疗 and/或护理敏感皮肤的药剂、紧肤剂、抗伸长斑剂、粘合剂、脂肪分解剂或刺激脂肪分解的试剂、脂肪形成剂、调节PGC-1 α 表达的试剂、调节PPAR γ 活性的试剂、增加或降低脂肪细胞甘油三酯含量的试剂、抗蜂窝组织剂、抑制PAR-2活性的试剂、刺激愈合的试剂、辅助愈合的试剂、刺激上皮再生的试剂、辅助上皮再生剂、细胞生长因子、作用于毛细血管循环和/或微循环的试剂、刺激血管发生的药剂、抑制血管通透性的药剂、静脉强壮剂(venotonic agents)、作用于细胞代谢的药剂、改善真皮表皮交界部的药剂、诱导毛发生长的试剂、毛发生长抑制剂或阻滞剂、脱发阻滞剂、防腐剂、香料、气味吸收剂和/或体臭掩蔽除臭剂、螯合剂、植物提取物、精油、海产提取物、从生物技术方法得到的试剂、无机盐、细胞提取物、防晒剂和对紫外线A和/或B射线和/或红外线A射线有活性的有机或无机光保护剂或其混合物,条件是它们与组合物中的其余成分在物理和化学上相容,且特别是南极假交替单胞菌种类菌株产生的提取物的分子量在10,000Da以下。同样,这些另外的成分的特性不应该不可接受地改变本发明提取物的有益性。这些另外的成分的特性可以是合成的或天然的,例如植物提取物,或来自生物技术方法,或来自合成方法和生物技术方法的组合。另外的实例可以在CTFA

International Cosmetic Ingredient Dictionary&Handbook,第12版(2008)中找到。在本发明的上下文中,生物技术方法应当被理解为在生物体或其部分中产生活性成分或其部分的任意方法。

[0068] 在一个实施方案中,本发明的化妆品和/或皮肤用药物组合物包含:

[0069] -0.0000000001% (按重量计) -20% (按重量计)的由南极假交替单胞菌种类菌株产生的10,000Da以下分子量的提取物;

[0070] -0.1% (按重量计) -20% (按重量计)的选自(INCI名称)甘油、丙二醇、丁二醇、戊二醇、辛酰二醇、乳酸、脲、透明质酸钠的保湿剂;

[0071] -0.1% (按重量计) -20% (按重量计)的选自(INCI名称)二甲硅油、硬脂酸甘油酯、辛酸/癸酸甘油三酯、鲸蜡硬脂醇、卵磷脂、苯甲酸C12-15烷基酯、角鲨烷、羊毛脂、山嵛醇、醋酸生育酚、泛醇、牛油树果黄油、棕榈酸视黄醇酯、视黄醇的软化剂或皮肤调理剂;

[0072] -0.1% (按重量计) -20% (按重量计)的选自(INCI名称)选自黄原胶、聚氧乙烯烷基硫酸钠、硬脂酸、聚山梨醇酯20、聚山梨醇酯80、十八烷醇、鲸蜡醇、硬脂醇聚醚-2、鲸蜡硬脂醇聚醚-20、椰油酰胺丙基甜菜碱。

[0073] 在一个实施方案中,减少皮脂产生的试剂、抗皮脂溢剂、控油剂(mattifying agent)、抗痤疮剂选自例如但不限于:Mat-XS Clinical[INCI:肌氨酸、黄原胶]、Mat-XS Bright[INCI:雄蕊鸡脚参(Orthosiphon Stamineus)叶提取物,麦芽糖糊精,黄原胶]、Betapur[INCI:Reumus Boldus叶提取物,黄原胶]或Neurobiox[INCI:BASF销售的欧蓍草(Achillea Millefolium)提取物,黄原胶];Evermat[INCI:绿花恩南番茄(Enantia Chlorantha)树皮提取物,齐墩果酸]、Sederma/Croda销售的Ac.net[INCI:丁二醇,Peg-60杏仁甘油酯类,辛酰二醇,甘油,卡波姆,去甲二氢愈创木酸,齐墩果酸]或Sebuless[INCI:麦芽糖糊精,欧洲丁香(Syringa Vulgaris) (Lilac)提取物]、Crodarom销售的Phytessence Purple Ginseng[INCI:甘油或拳参(Polygonum Bistorta)根提取物]、由Silab销售的P-Refinyl[INCI:Lens Esculenta (Lentil) 种子提取物]、由Codif销售的EPS Seamat[INCI:浮游生物表多糖-5,苯氧乙醇]或Epidermist 4.0[INCI:浮游生物提取物]、Alban Muller销售的Seborami[INCI:钻果大蒜芥(Sisymbrium Officinale) 提取物,牛蒡(Arctium Lappa)根提取物,柠檬酸,乙醇酸,PCA锌,菌类植物胶]、Mibelle销售的Poreaway[INCI:乳香黄连木(Pistacia Lentiscus)树胶/乳香黄连木(乳香脂)树胶,卵磷脂]、Provital销售的Citrustem[INCI:黄原胶,苯甲酸钠,葡萄糖酸内酯,葡萄糖酸钙]或Affipore[INCI:山布枯(Barosma Betulina)叶提取物,柠檬酸]、Laboratories Expanscience销售的Sweetone[INCI:糖水解物,麦芽糖糊精]、Solabia销售的Seboxyl[INCI:黑穗醋栗(Ribes Nigrum) (黑穗状醋栗)叶提取物,悬钩子(Rubus Idaeus) (覆盆子)叶提取物]或Saniskin[INCI:虎杖(Polygonum Cuspidatum)根提取物,肉豆蔻醇]、DSM销售的Alpaflor Alp-Sebum[INCI:弗来歇氏柳叶菜(Epilobium Fleischeri) 提取物,柠檬酸,山梨酸钾]或Regu-Seb[INCI:阿甘树(Argania Spinosa)仁提取物,锯叶棕(Serenoa Serrulata)果实提取物,芝麻(Sesam)种子提取物]、Aqua Bio Technology销售的Dermaclarine[INCI:水解卵蛋白(和)蛋白酶]、Lucas Meyer销售的Linumine[INCI:亚麻(Linum Usitatissimum) (亚麻仁)种子提取物]、Evonik销售的Granactive Acne[INCI:稻(Oryza Sativa) (稻米)糠提取物,齿叶乳香树(Boswellia Serrata)提取物,蜂蜜提取物,寡肽-10]、Seppic销售的Sepicontrol A5

[INCI:辛酰基甘氨酸,肌氨酸,锡兰肉桂(Cinnamomum Zeylanicum)树皮提取物]、Symrise销售的Sympeptide 380[INCI:肉豆蔻酰基六肽-23]或Laboratoires Serobiologiques/Cognis/BASF销售的Sebaryl[INCI:烟酰胺,酵母提取物,七叶树(Aesculus Hippocastanum)(马栗树)种子提取物,甘草酸铵,泛醇,丙二醇,葡萄糖酸锌,咖啡因,生物素]等。

[0074] 在一个具体的实施方案中,该抗皱纹和/或抗衰老剂选自(例如但不限于):葡萄(Vitis vinifera)、狗牙蔷薇(Rosa canina)、姜黄(Curcuma longa)、银杏(Ginkgo biloba)、高山火绒草(Leontopodium Alpinum)或盐生杜氏藻(Dunaliella salina)等的提取物;Sederma/Croda销售的**Matrixyl**[®][INCI:棕榈酰五肽-4]、**Matrixyl 3000**[®][INCI:棕榈酰四肽-7,棕榈酰寡肽]、**Matrixyl**[®] Synthe' 6TM[INCI:甘油,水,羟丙基环糊精,棕榈酰三肽-38]、EssenskinTM[INCI:羟基蛋氨酸钙]、Renovage[INCI:替普瑞酮]、ResistemTM[INCI:心叶球花(Globularia Cordifolia)发酵物]、Beautifeye[INCI:合欢花(Albizia Julibrissin)皮提取物,Darutoside]、Meiritage[INCI:膜荚黄芪(Astragalus Membranaceus)根提取物,白术(Atractylodes Macrocephala)根提取物,狭叶柴胡(Bupleurum Falcatum)根提取物]、Senestem[INCI:长叶车前(Plantago Lanceolata)叶提取物]、Venuceane[INCI:嗜热栖热菌(Thermus Thermophilus)发酵物]或**Dermaxyl**[®][INCI:棕榈酰寡肽];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:槐豆(长角豆(Ceratonia siliqua))胶]、Regu-Scence[INCI:龙须菜(Asparagus Officinalis)茎提取物,苯甲酸钠,山梨酸钾,葡糖酸内酯,葡萄糖酸钙]、Syn-TC[INCI:十四烷基氨基丁酰基缬氨酰基氨基丁酸脲三氟乙酸盐,棕榈酰三肽-5,棕榈酰二肽-5二氨基丁酰基羟基苏氨酸]或**Preregen**[®][INCI:大豆油(大豆)蛋白,氧化还原酶];Laboratoires Sérobiologiques/Cognis/BASF销售的MyoxinolTM[INCI:水解羊角豆(Hibiscus esculentus)提取物]、SyniorageTM[INCI:乙酰基四肽-11]、DermicanTM[INCI:乙酰基四肽-9]、Shadownyl[INCI:藻类提取物,2-甲-2,4-戊二醇,辛酰二醇,黄原胶]或DN-AGETM LS[INCI:翅荚决明(Cassia alata)叶提取物];Exsymol销售的Algisum**C**[®][INCI:甘露糖醛酸甲基硅烷醇酯]、Exage[INCI:咪唑基乙基二氨基丙酰胺]或Hydroxyprolisilane**CN**[®][INCI:甲基硅烷醇羟脯氨酸天冬氨酸酯];Lipotec/Lubrizol销售的**Argireline**[®][INCI:乙酰基六肽-8]、SNAP-7[INCI:乙酰基七肽-4]、SNAP-8[INCI:乙酰基八肽-3]、**Serilesine**[®][INCI:六肽-10]、**Leuphasyl**[®][INCI:五肽-18]、**Inyline**[®][INCI:乙酰基六肽-30]、**Aldenine**[®][INCI:水解小麦蛋白,水解大豆蛋白,三肽-1]、**Preventhelia**[®][INCI:二氨基丙酰基三肽-33]、DecorinylTM[INCI:三肽-10瓜氨酸]、**Decorinol**[®][INCI:三肽-9瓜氨酸]、**Trylagen**[®][INCI:假交替单胞菌属发酵提取物,水解小麦蛋白,水解大豆蛋白,三肽-10瓜氨酸,三肽-1]、**Eyeseryl**[®][INCI:乙酰基四肽-5]、Peptide AC29[INCI:乙

酰基三肽-30瓜氨酸]、RelistaseTM[INCI:乙酰基精氨酸色氨酸二苯基甘氨酸]、ThermostressineTM[INCI:乙酰基四肽-22]、LipochromanTM[INCI:二甲基甲氧基苯并二氢吡喃醇]、ChromabrightTM[INCI:二甲基甲氧基苯并二氢吡喃基棕榈酸酯]、**Antarcticine**[®][INCI:假交替单胞菌属发酵提取物]、dGlyageTM[INCI:盐酸赖氨酸,卵磷脂,三肽-9瓜氨酸]、VilasteneTM[INCI:盐酸赖氨酸,卵磷脂,三肽-10瓜氨酸]、HyadisineTM[INCI:假交替单胞菌属发酵提取物]、HyanifyTM[INCI:异构寡糖(Saccharide Isomerase)]、DiffuporineTM[INCI:乙酰基六肽-37]、SilusyneTM[INCI:大豆(大豆油)油,倍半油酸山梨坦,异十六烷,玻璃酸钠,月桂基二铵羟丙基水解大豆蛋白,乙酰基六肽-39]、AdifylineTM[INCI:乙酰基六肽-38]、UplevityTM[INCI:乙酰基四肽-2]、JuvelevenTM[INCI:乙酰基六肽-51酰胺]或TelangynTM[INCI:乙酰基四肽-40]或InylineTM[INCI:乙酰基六肽-40];Institut Europeen de Biologie Cellulaire销售的**Kollaren**[®][INCI:三肽-1,葡聚糖]、Vinciencence/ISP/Ashland销售的**Collaxyl**[®] IS[INCI:六肽-9]、Laminixyl ISTM[INCI:七肽]、OrsirtineTM GL[INCI:Oryza sativa(稻米)提取物]、D' OrientineTM IS[INCI:海枣(Phoenix dactylifera) (Date) 种子提取物]、PhytoquintescenceTM[INCI:单粒小麦(单粒小麦(Triticum monococcum)) 提取物]、肽Q10[INCI:五肽-34三氟乙酸盐]、Telosense[INCI:水解酵母蛋白,水解大豆蛋白]或QuintescenceTM IS[INCI:二肽-4]、Infinitec Activos销售的BONT-L-Peptide[INCI:棕榈酰基六肽-19]、Seppic销售的DeepalineTM PVB[INCI:棕榈酰基水解小麦蛋白]或**Sepilift**[®] DPHP[INCI:二棕榈酰基羟基脯氨酸]、Gattefossé销售的**Gatuline**[®] Expression[INCI:Acmella oleracea提取物]、**Gatuline**[®] In-Tense[INCI:金纽扣(Spilanthes acmella) 花提取物]或**Gatuline**[®] AgeDefense 2[INCI:胡桃(Juglans regia) (胡桃) 种子提取物]、Biotechmarine销售的ThalassineTM[INCI:藻类提取物]、Atrium/Unipex Innovations销售的ChroNolineTM[INCI:辛酰基四肽-3]或Thymulen-4[INCI:乙酰基四肽-2]、Coletica/Engelhard/BASF销售的EquiStat[INCI:苹果(Pyrus malus) 果实提取物,大豆油种子提取物]或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]、Mibelle Biochemistry销售的Ameliox[INCI:肌肽,生育酚,水飞蓟(Silybum marianum) 果实提取物]、PhytoCelltec Symphytum[INCI:异麦芽酮糖醇(Isomalt),聚合草(Symphytum Officinale) 根细胞培养物,卵磷脂,苯甲酸钠]、雪生藻类粉[INCI:Chlamydocapsa提取物,麦芽糖糊精,卵磷脂]、Dermcom[INCI:阿拉伯树胶,金番红花(Crocus Chrysanthus) 球茎提取物]、Anagain[INCI:豌豆(Pisum Sativum) (豌豆),籽苗提取物]或PhytoCellTec Malus Domestica[INCI:苹果(Malus domestica) 果实细胞培养物]、Silab销售的Bioxilift[INCI:大茴香籽(Pimpinella anisum) 提取物]、Vitagenyl[INCI:桃树(Prunus Persica) (桃子) 叶提取物]或SMS **Anti-Wrinkle**[®][INCI:番荔枝(Annona squamosa) 种子提取物]、Symrise销售的Symvital Agerepair[INCI:生姜(Zingiber Officinale) (生姜) 根提取物]、Provital销售的Citrustem[INCI:黄原胶,苯甲酸钠,葡糖酸内酯,葡萄糖酸钙]、Melavoid[INCI:黄细心(Boerhavia Diffusa) 根提取物]、Darkout[INCI:非洲马铃薯(Hypoxis

Rooperi)根茎提取物,刺云石(*Caesalpinia Spinosa*)树胶]或Linefill[INCI:二甲基异山梨醇酯,芝麻(*Sesame*)种子提取物]、Lucas Meyer销售的Adipofill' in[INCI:鸟氨酸,磷脂类,糖脂类]、Elix-IR[INCI:蒴藋蓼(*Polygonum Aviculare*)提取物]或Progeline[INCI:三氟乙酰基三肽-2]、Alban Muller销售的Amiperfect[INCI:平铺白珠树(*Gaultheria Procumbens*) (冬绿树)叶提取物]或Repulpami ER[INCI:猴面包树(*Adansonia Digitata*)果肉提取物,玫瑰茄(*Hibiscus Sabdariffa*)花提取物]、Codif销售的Celloxyl[INCI:Uapaca Bojeri叶提取物]或Resistress[INCI:槐米(*Sophora Japonica*)花提取物]、Solabia销售的Actiporine8G[INCI:叉珊瑚(*Jania Rubens*)提取物]或EPS Seafill[INCI:浮游生物提取物]、Induchem销售的Novhyal Biotech G[INCI:乙酰氨基葡萄糖磷酸二钠]或Rubixyl[INCI:六肽-47];Ca²⁺通道拮抗剂,例如、但不限于阿尔维林、锰或镁盐、某些仲胺或叔胺、视黄醇及其衍生物、艾地苯醌、辅酶Q10及其衍生物、乳香酸及其衍生物、GHK及其衍生物和/或盐、肌肽及其衍生物、DNA修复酶例如、但不限于光解酶、T4核酸内切酶V或氯化物通道激动剂等和/或其混合物。

[0075] 在另一个实施方案中,抗炎剂和/或止痛剂例如选自但不限于:羟基积雪草苷提取物、紫锥花属(*echinacea*)提取物、苋菜红种子油、檀香油、桃树叶提取物、真芦荟(*Aloe vera*)、山金车(*Arnica montana*)、艾(*Artemisia vulgaris*)、大叶马蹄香(*Asarum maximum*)、金盏花(*Calendula officinalis*)、辣椒属(*Capsicum*)、石胡荽(*Centipeda cunninghamii*)、母菊(*Chamomilla recutita*)、文殊兰(*Crinum asiaticum*)、北美金缕梅(*Hamamelis virginiana*)、钩果草(*Harpagophytum procumbens*)、金丝桃(*Hypericum perforatum*)、圣母百合(*Lilium candidum*)、锦葵(*Malva sylvestris*)、茶树(*Melaleuca alternifolia*)、甘牛至(*Origanum majorana*)、牛至(*Origanum vulgare*)、月桂樱(*Prunus laurocerasus*)、Rosmarinus officinalis、白柳(*Salix alba*)、水飞蓟、菊蒿(*Tanacetum parthenium*)、麝香草(*Thymus vulgaris*)、钩藤(*Uncaria guianensis*)或大荨麻(*Vaccinium myrtillus*)的提取物、Atrium Innovations/Unipex Group销售的 ω -3和 ω -6脂肪酸、NeutrazenTM[INCI:水,丁二醇,葡聚糖,棕榈酰基三肽-8]、Lipotec/Lubrizol销售的DelisensTM[proposed INCI:乙酰基六肽-46]、Institut Européen de Biologie Cellulaire/Unipex Group销售的**Meliprene**[®][INCI:葡聚糖,乙酰基七肽-1]、Laboratoires Serobiologiques/Cognis/BASF销售的SkinasensylTM[INCI:乙酰基四肽-15]或AnasensylTM[INCI:甘露糖醇,甘草酸铵,咖啡因,七叶树(*Hippocastanum*) (马栗树)提取物]、Sederma/Croda销售的CalmosensineTM[INCI:乙酰基二肽-1]、辅酶Q10或烷基甘油基醚类。

[0076] 在另一个实施方案中,所述紧肤剂和/或再增浓和/或重组剂选自、例如、但不限于:Malpighia punicitolia、朝鲜蓟(*Cynara scolymus*)、草棉(*Gossypium herbaceum*)、翠绿芦荟(*Aloe Barbadensis*)、稷(*Panicum miliaceum*)、黑桑(*Morus nigra*)、芝麻(*Sesamum indicum*)、大豆油(*Glycine soja*)、软粒小麦(*Triticum vulgare*)的提取物、Provital销售的**Pronalen**[®] Refirming HS C[INCI:Triticum Vulgare,Silybum Marianum,大豆油,Equisetum Arvense,Alchemilla Vulgaris,Medicago Sativa,Raphanus Sativus], Lipoout[INCI:浮游生物提取物]或**Polyplant**[®] Refirming[INCI:金花菊,落得打

(Asiatic Centella), 墨角藻属(Fucus), 胡芦巴]、Atrium Biotechnologies/Unipex Innovations销售的**Lanablue**[®] [INCI: 山梨醇, 藻类提取物]、Pentapharm/DSM销售的**Pepha**[®].Nutrix [INCI: 天然营养因子]、包含异黄酮类的植物提取物、Sederma/Croda销售的Biopeptide EL[™] [INCI: 棕榈酰基寡肽]、Biopeptide CL[™] [INCI: 棕榈酰基寡肽]、**Vexel**[®] [INCI: 水(水溶液), 丙二醇, 卵磷脂, 咖啡因, 棕榈酰基肉碱]、**Matrixyl**[®] [INCI: 棕榈酰基五肽-3]、**Matrixyl**[®] 3000 [INCI: 棕榈酰基四肽-3, 棕榈酰基寡肽]或Bio-Bustyl[™] [INCI: 聚甲基丙烯酸甘油酯, 拉恩菌属(Rahnella) 大豆蛋白发酵物, 水(水溶液), 丙二醇, 甘油, PEG-8, 棕榈酰基寡肽]、Laboratoires Serobiologiques/Cognis/BASF销售的**Dermosaccharides**[®] HC [INCI: 甘油, 水(水溶液), 糖胺聚糖类, 糖原]、**Aglycal**[®] [INCI: 甘露糖醇, 环糊精, 糖原, 熊果(Aratostaphylos Uva Ursi) 叶提取物]、**Cytokinol**[®] LS [INCI: 水解酪蛋白, 水解酵母蛋白, 赖氨酸HCl]或**Firmiderm**[®] LS9120 [INCI: 榄仁树(Terminalia Catappa) 叶提取物, Sambucus Negra花提取物, PVP, 单宁酸]、Silab销售的**Liftline**[®] [INCI: 水解小麦蛋白]、**Raffermine**[®] [INCI: 水解大豆粉]或Ridulisse **C**[®] [水解大豆蛋白]、Lipotec/Lubrizol销售的**Serilesine**[®] [INCI: 六肽-10]、Decorinyl[™] [INCI: 三肽-10瓜氨酸]、**Trylagen**[®] [INCI: 假交替单胞菌属发酵提取物, 水解小麦蛋白, 水解大豆蛋白, 三肽-10瓜氨酸, 三肽-1]、Silusyne[™] [INCI: 大豆(大豆油) 油, 倍半油酸山梨坦, 异十六烷, 玻璃酸钠, 月桂基二铵羟丙基水解大豆蛋白, 乙酰基六肽-39]或Adifyline[™] [INCI: 乙酰基六肽-38]、**Ursolisome**[®] [INCI: 卵磷脂, 熊果酸, 端胶原, 黄原胶, 硫酸软骨素钠]、Coletica/Engelhard/BASF销售的Eperuline [INCI: 麦芽糖糊精, 镰形木茛苏木(Eperua Falcata) 树皮提取物]或**Collalift**[®] [INCI: 水解麦芽提取物]、Pentapharm/DSM销售的**Syn**[®]-Coll [INCI: 棕榈酰基三肽-5]、Atrium Biotechnologies/Unipex Innovations销售的**Hydriame**[®] [INCI: 水(水溶液), 糖胺聚糖类, 菌类植物胶]、Sphingokine NP [INCI: Evonik销售的辛酰基植物鞘氨醇(Caprooyl Phytosphingosine)]、Lucas Meyer销售的Body3复合物 [INCI: 皂粘土, 牛油树果(Butyrospermum Parkii) (Shea) 坚果提取物, 牛油果(Persea Gratissima) (鳄梨树) 果实提取物]、Lonza销售的Prosynergen DF [INCI: 乳杆菌属(Lactobacillus)/Ulkenia Amoeboides发酵提取物过滤物]或Institut Europeen de Biologie Cellulaire/Unipex Innovations销售的IP2000 [INCI: 葡聚糖, 三氟乙酰基三肽-2]等。

[0077] 在另一个实施方案中, 刺激皮肤或表皮大分子的合成的试剂选自, 例如、但不限于: 胶原合成-刺激剂、弹性蛋白合成-刺激剂、核心蛋白聚糖合成-刺激剂、层粘连蛋白合成-刺激剂、伴侣蛋白合成-刺激剂、sirtuin的合成刺激剂、sirtuin激活剂、水通道蛋白合成-调节剂、纤连蛋白合成-刺激剂、抑制胶原蛋白降解的药剂、抑制弹性蛋白降解的药剂、抑制丝氨酸蛋白酶例如激肽释放酶、白细胞弹性蛋白酶或组织蛋白酶G的药剂、刺激成纤维

细胞增殖的药剂、刺激脂肪细胞增殖的药剂,加速或延缓脂肪细胞分化的药剂;以及DNA修复剂和/或DNA保护剂,例如、但不限于积雪草 (*Centella asiatica*)、啤酒糖酵母 (*Saccharomyces cerevisiae*)、马铃薯 (*Solanum tuberosum*)、迷迭香 (*Rosmarinus officinalis*)、厚叶越橘 (*Vaccinium angustifolium*) 的提取物、藻类巨藻 (*Macrocystis pyrifera*)、粉团扇藻 (*Padina pavonica*) 的提取物、大豆、麦芽、亚麻、红色三叶草、kakkon、白色羽扇豆植物的提取物、榛子提取物、玉米提取物、酵母提取物、山毛榉枝条提取物、莢豆种子提取物、植物激素提取物例如赤霉素、植物生长素或细胞因子等;或盐水浮游生物的提取物、牛奶与保加利亚乳杆菌 (*Lactobacillus Bulgaricus*) 的发酵产物、积雪草皂苷类及其衍生物、维生素C及其衍生物、肉桂酸及其衍生物、Sederma/Croda销售的 **Matrixyl**[®] [INCI:棕榈酰基五肽-3]、**Matrixyl**[®] 3000 [INCI:棕榈酰基四肽-3、棕榈酰基寡肽]或 Biopeptide CL[™] [INCI:聚甲基丙烯酸甘油酯,丙二醇,棕榈酰基寡肽]、Lipotec/Lubrizol 销售的 **Antarcticine**[®] [INCI:假交替单胞菌属发酵提取物]、**Decorinyl**[®] [INCI:三肽-10 瓜氨酸]、**Serilesine**[®] [INCI:六肽-10]、Lipeptide [INCI:水解蔬菜蛋白]、**Aldenine**[®] [INCI:水解小麦蛋白,水解大豆蛋白,三肽-1]、Relistase[™] [INCI:乙酰基精氨酸基三色氨酸基二苯基甘氨酸]、Thermostressine[™] [INCI:乙酰基四肽-22]、PeptideAC29 [INCI:乙酰基三肽-30 瓜氨酸]、Diffuporine[™] [INCI:乙酰基六肽-37]、Silusyne[™] [INCI:大豆(大豆油)油,倍半油酸山梨坦、异十六烷、玻璃酸钠,月桂基二铵羟丙基水解大豆蛋白,乙酰基六肽-39]或 Adifyline[™] [INCI:乙酰基六肽-38]、Alban Muller 销售的 **Drieline**[®] PF [INCI:酵母β-葡聚糖]、comercializado por Solabia 销售的 Phytovityl **C**[®] [INCI:水溶液,玉米须提取物]、Coletica/Engelhard/BASF 销售的 **Collalift**[®] [INCI:水解麦芽提取物]、Vincienc/ISP/Ashland 销售的 Phytocohesine PSP[™] [INCI:β谷固醇硫酸钠]、无机物例如钙等、维A酸及其衍生物、异黄酮、类胡萝卜素、特别是番茄红素、假二肽类、维A酸及其衍生物例如视黄醇或棕榈酸视黄酯等或类肝素等。

[0078] 应用

[0079] 在另一个方面,本发明涉及由南极假交替单胞菌种类菌株生产的10,000Da以下分子量的提取物在制备用于治疗 and/或护理皮肤、粘膜和/或毛发的化妆品或皮肤药物组合物中的用途。在一个实施方案中,所述皮肤、粘膜和/或头发的治疗和/或护理是指治疗和/或预防炎症、癌症、黑头粉刺、粟粒疹、痤疮、皮脂溢、脂溢性皮炎、化脓性汗腺炎、皮肤的光保护、治疗皮肤和/或毛发中的皮脂量的减少、治疗和/或预防皮肤衰老、治疗和/或预防皮肤皱纹、治疗皮肤紧致、预防皮肤紧致度和/或头发卫生保健缺失。在一个实施方案中,所述炎症选自、例如但不限于银屑病、敏感性皮肤、皮炎、特应性皮炎、接触性皮炎、尿布皮炎、脂溢性皮炎、湿疹、酒渣鼻、痤疮、过度增生性皮肤病、烧伤、晒伤、甲壳炎、手术后皮肤炎症、用强脉冲光疗法(IPL)治疗后,用单色脉冲光疗法(激光)治疗后,用化学剥离剂治疗或过度暴露于侵蚀性外用药物后、阴道粘膜炎症、口腔粘膜炎症、牙龈炎、牙周炎、鼻炎、过敏性鼻炎等。

[0080] 在另一个方面,本发明涉及南极假交替单胞菌种类的菌株产生的分子量在10,000Da以下的提取物在制备用于治疗癌症、厌食症或恶病质的药物组合物中的用途。在一个

实施方案中,癌症的治疗是治疗皮肤癌、处理肿瘤生长抑制或米尔-多里综合征。

[0081] 在另一个方面,本发明涉及南极假交替单胞菌种类的菌株产生的分子量在10,000Da以下的提取物在制备用于抑制MC5R受体的化妆品或皮肤用药物组合物中的用途。

[0082] 在另一个方面,本发明涉及南极假交替单胞菌种类的菌株产生的分子量在10,000Da以下的提取物在制备用于刺激胶原蛋白合成的化妆品或皮肤用药物组合物中的用途。

[0083] 本发明的另一个方面涉及治疗和/或护理皮肤、粘膜和/或毛发的方法,包含施用美容和/或皮肤用药学有效量的南极假交替单胞菌种类的菌株产生的分子量在10,000Da以下的提取物。在一个实施方案中,皮肤、粘膜和/或头发的治疗和/或护理指的是治疗和/或预防炎症、癌症、黑头粉刺、粟粒疹、痤疮、皮脂溢、脂溢性皮炎、化脓性汗腺炎、皮肤的光保护、治疗皮肤和/或毛发中皮脂量的减少、治疗和/或预防皮肤老化、治疗和/或预防皮肤皱纹、治疗皮肤紧致度、防止皮肤紧致度和/或头发的卫生保健缺失。在一个实施方案中,炎症选自例如、但不限于:牛皮癣、敏感性皮肤、皮炎、特应性皮炎、接触性皮炎、尿布皮炎、脂溢性皮炎、湿疹、酒渣鼻、痤疮、过度增生性皮肤病、烧伤、晒伤、甲沟炎、手术后、用强脉冲光疗法(IPL)治疗后、用单色脉冲光疗法(激光)治疗后、用化学剥离剂处理后或过度暴露于侵蚀性外用药物后的皮肤炎症、阴道粘膜炎症、口腔粘膜炎症、牙龈炎,牙周炎、鼻炎、过敏性鼻炎等。

[0084] 在另一个方面,本发明涉及一种治疗癌症、厌食症或恶病质的方法,包含施用美容和/或皮肤用药学有效量的由南极假交替单胞菌种类的菌株产生的分子量在10,000Da以下的提取物。在一个实施方案中,癌症的治疗是治疗皮肤癌、处理肿瘤生长抑制或治疗米尔-多里综合征。

[0085] 在另一个方面,本发明涉及抑制MC5R受体的方法,包含施用美容和/或皮肤用药学有效量的由南极假交替单胞菌种类的菌株产生的分子量在10,000Da以下的提取物。

[0086] 在另一个方面,本发明涉及刺激胶原蛋白合成的方法,包含施用美容和/或皮肤用药学有效量的由南极假交替单胞菌种类的菌株产生的分子量在10,000Da以下的提取物。

[0087] 在另一个实施方案中,由南极假交替单胞菌种类的菌株产生的提取物的分子量高于50Da且低于10,000Da,在100Da至8,000Da之间,在150Da至6,000Da之间或在300Da和5,000Da之间。

[0088] 在另一个实施方案中,南极假交替单胞菌种类的菌株是具有保藏号CECT 8690的菌株。

[0089] 在另一个方面,由南极假交替单胞菌种类的菌株产生的分子量在10,000Da以下的提取物可以通过任意方式施用,所述方式与哺乳动物、优选人的身体中的作用部位接触,并且在一个实施方案中为包含所述提取物的组合物的形式。通过南极假交替单胞菌种类的菌株产生的10,000Da以下的分子量的提取物的施用在局部或经皮上进行。在一个实施方案中,局部或透皮应用通过离子电渗疗法、超声促渗、电穿孔、机械压力、渗透压梯度、闭塞固化、显微注射、通过经压力的无针头注射、微电子贴片,面罩或其任何组合进行。

[0090] 应用或施用的频率可以根据每个受试者的需要的不同而广泛变化,这启示从每个月一次到每天10次、从每周一次到每天4次、从每周三次到每天三次或每天一次的应用或施用范围。

[0091] 生物材料的保藏

[0092] 将南极假交替单胞菌种类的菌株根据布达佩斯条约 (Budapest Treaty) 保藏在 Colección **Española** de Cultivos Tipo (CECT) (Edificio 3CUE, Parc Científic Universitat de Valencia, Catedrático Agustín Escardino 9, 46980 Paterna, Valencia, Spain)。保藏在2014年7月29日完成,且保藏号为CECT 8690。

实施例

[0093] 将上文涉及的对比文件各自通过引用的方式并入本文作为参考,包括要求保护优先权的任何先前申请,无论上述是否具体列出。举出任何文件并非承认这类对比文件符合现有技术或构成任何管辖范围内的技术人员的一般知识。除了实施例中,或者另外明确指出的是,本说明书中规定材料用量、反应条件、分子量、碳原子数等的所有数值定量应当被理解为近似的,即,经历所示值的 $\pm 5\%$ 、 $\pm 3\%$ 、 $\pm 1\%$ 、 $\pm 0.1\%$ 或 $\pm 0.01\%$ 的变异性。应当理解,本文举出的上限和下限用量、范围和比率限度可以独立地组合。类似地,本文描述的技术的每个要素的范围和用量可以与任意其它要素的范围或用量一起使用。

[0094] 实施例1:具有保藏号CECT 8690的南极假交替单胞菌种类的菌株分泌的提取物的制备和分离。

[0095] a) 具有保藏号CECT 8690的南极假交替单胞菌种类的菌株的培养方法。

[0096] 将具有保藏号CECT 8690的南极假交替单胞菌种类的菌株在 12°C 和 $\text{pH}=7.0$ 下在生物反应器中培养,其培养基包含 20g/L 葡萄糖、 7g/L 氯化铵和包含 1g/L NaCl、 1g/L 七水合硫酸镁、 5g/L 磷酸二钠、 2g/L 磷酸钾、 0.05g/L 氯化钙和 0.018g/L 七水合硫酸亚铁的盐溶液。接种物使用所需量的指数状态的预培养物形成,其具有 0.2AU (550nm) 的初始光密度。培养持续48小时,氧气浓度控制在30%空气饱和度,并以约 250rpm 的值搅拌。

[0097] b) 在 10KDa 以下的提取物的分离

[0098] 通过以 6000g 离心在1h期间将细菌与培养肉汤分离。用具有最终孔径为 $0.22\mu\text{m}$ 的膜过滤完成细菌的消除。随后,用具有 10KDa 的筛的聚醚砜膜过滤未纯化的提取物,且感兴趣的产物透过膜。

[0099] 实施例2:在具有保藏号CECT 8690的南极假交替单胞菌种类中的 10KDa 以下的提取物中的蛋白质浓度的定量。

[0100] 在实施例3至14中使用的根据实施例1纯化的 10KDa 以下的提取物的浓度值是用双金鸡宁酸法以及所使用试剂盒 (**Pierce**[®] BCA蛋白测定试剂盒, 23227) 供应商提供的说明测定的总蛋白浓度。

[0101] 根据实施例1得到的在 10KDa 以下提取物中测量的总蛋白质浓度为 $361.55\mu\text{g/ml}$ 。

[0102] 实施例3:色谱分析SE-HPLC-UV

[0103] 制备根据实施例1得到的产物为 $250\mu\text{g/ml}$ 的溶液,并通过HPLC-UV分析。将 $100\mu\text{l}$ 注射在高效液相色谱 (HPLC) LC20A SHIMADZU中。使用的色谱柱是TSK Gel G2000SWXL, 5m , **125Å**, $7.8\text{mm} \times 30\text{mm}$ (TOSOH Bioscience), 且具有 0.1M 磷酸盐缓冲液, $\text{pH}=6.70$ 和 0.1M 硫酸钠的水作为洗脱液。

[0104] 在这些条件下,产物在10分钟至15分钟之间显示出峰值,平均峰值在 10.75 分钟。

使用不同标准计算分子量：来自牛血清的白蛋白(66000Da)、来自牛胰腺I型的核糖核酸酶A(13700Da)和水杨酸(138Da)。分子量的对数与保留时间有关,以获得线性相关。使用这种相关性,产物显示7714Da和178Da之间的分子量。同样根据这种相关性,主峰最大值(10.75分钟)的停留时间相当于4381Da的分子量。

[0105] 实施例4:使用报道基因测定法对人黑素皮质素受体5(MC5R)启动子对转染的稳定未分化上皮乳腺细胞系(MCF7)的抑制的评价。

[0106] 在人MC5R启动子的一个区域上用包含萤火虫萤光素酶基因的质粒稳定转染未分化的上皮乳腺细胞系(MCF7)。用根据实施例1得到的提取物处理该细胞系的选择的克隆16MCF7-MC-16,以测定人MC5R启动子的抑制。

[0107] 在用聚-L-赖氨酸溶液处理的96-白板中的补充有10%FBS(胎牛血清)、1%青霉素-链霉素和1μg/ml嘌呤霉素的Dulbecco改进的Eagle培养基(DMEM)(高葡萄糖)中接种每孔3万MCF7-MC-16细胞用于萤光素酶活性测定。平行地,如上所述,将每孔3万个MCF7-MC-16细胞接种在用聚-L-赖氨酸溶液处理的96-透明孔板中,以通过结晶紫染色进行总细胞数定量。在开始处理之前24h,接种细胞,并在CO₂温育箱中在37℃和5%CO₂下温育。

[0108] 在处理当天,用包含氯化钙和氯化镁的Dulbecco磷酸盐缓冲液(DPBS)将MCF7-MC-16细胞洗涤2次,并在37℃在CO₂温育箱中与无酚红的DMEM高葡萄糖一起在37℃下温育6h。然后,用0.25μg/mL或2.5μg/mL浓度的根据实施例1得到的具有保藏号为CECT 8690的南极假交替单胞菌种类的提取物处理细胞。作为基础活化的对照,将细胞与单独的培养基一起温育。将细胞在不含酚红的DMEM高葡萄糖中温育并补充1%CS-FBS(活性炭剥离的胎牛血清)16-24h。

[0109] 在温育期后,在96-白孔板中测定通过与萤火虫萤光素酶反应产生的每秒相对光单位(RLU/秒),并在96-孔板中测定总细胞数/孔。

[0110] 萤光素酶活性测定

[0111] 根据制造商的说明书,将萤火虫萤光素酶底物(Steady-Glo Luciferase Assay System, Promega)加入到96-白色孔板中。简而言之,首先,裂解细胞并加入萤火虫萤光素酶底物。温育10-15min后,读取来自萤火虫萤光素酶活性的荧光。使用多板式(multiplate)发光计(Lumistar-BMG)对萤火虫萤光素酶与其底物之间的反应产生的每秒相对光单位(RLU/秒)进行定量。

[0112] 通过结晶紫染色测定法对总细胞数的测定

[0113] 将包含细胞的96-澄清孔板用DPBS洗涤,并在室温下在结晶紫溶液(0.05%结晶紫,4%福尔马林)中温育20min。细胞的DNA被结晶紫染料溶液染色。此后,除去晶体紫溶液,并用Milli Q水洗涤孔。由细胞吸收的结晶紫染料的量与每个孔中的细胞数成正比。最终,当将细胞在室温下干燥1-2小时时,加入0.1M HCl溶液且在微孔板吸光度读数器(Microplate Absorbance Reader)(Multiskan-Thermo Electro Corporation)中在630nm处读取吸光度。用测试剂量的总细胞数校准计算每秒萤火虫发光(RLU/秒)结果,并计算人MC5R启动子的诱导相对于基础对照的减少。

	产品	测试剂量	MC5R 启动子与基础对照相比的相对诱导率
[0114]	根据实施例 1 得到的提取物	0.25 $\mu\text{g/mL}$	-14.88 %
	根据实施例 1 得到的提取物	2.5 $\mu\text{g/mL}$	-15.72 %

[0115] 表1

[0116] 结果表明,在10KDa以下的南极假交替单胞菌的提取物减少人MC5R启动子的诱导。

[0117] 实施例5:使用脂质液滴荧光测定法的皮脂脂质在初级人皮脂腺细胞中的积累的抑制。

[0118] 通过在根据实施例1得到的具有保藏号CECT 8690的10KDa以下的提取物处理之后测定在条件分化培养基中尼罗红在初级人皮脂腺细胞中的荧光信号来测定脂质积累的抑制。

[0119] 将人皮脂腺细胞以5,000细胞/孔接种在胞外基质包被的在96-孔板上的皮脂腺细胞生长培养基(含血清的50%完全生长培养基和50%无血清培养基)中,并在3天期间在CO₂温育箱(37℃和5%CO₂)中温育。

[0120] 温育后,用条件分化培养基(皮脂腺细胞生长培养基中的10nM[Nle⁴,D-Phe⁷]- α -促黑激素,NDP- α -MSH)处理人皮脂腺细胞,作为脂质积累的基础对照或者在条件分化培养基中用0.25 $\mu\text{g/mL}$ 和2.5 $\mu\text{g/mL}$ 根据实施例1得到的具有具有保藏号CECT 8690的南极假交替单胞菌种类的10KDa以下的提取物处理。每次处理一式三份且平行地进行用于脂质积聚测定和细胞计数。在CO₂温育箱(37℃和5%CO₂)中4天期间将细胞在不同的处理中温育。

[0121] 在基础对照中,用条件分化培养基处理分化的皮脂腺细胞,其为最大分化条件和由此在该皮脂腺细胞模型中存在最大脂质蓄积。

[0122] 通过AdipoRedTM试剂测定法对皮脂脂质积累的定量

[0123] 按照制造商的说明书,用含有钙和镁的磷酸缓冲盐水(PBS)洗涤每种条件的人皮脂腺细胞,并加入稀释的AdipoRed试剂。完成试剂添加后,将人皮脂腺细胞在室温下温育15min。然后,使用分别具有485nm和530nm的激发和发射波长的FLUOstar Galaxy读出器测定中性脂质的荧光。

[0124] 通过细胞过数测定法对细胞密度(细胞数/mL)的定量。

[0125] 通过用胰蛋白酶处理从96-孔板上分离人皮脂腺细胞。从一式三份样品中采集体积后,将分离的细胞离心。弃去约80%的上清液以使用TC10TM自动化细胞计数器(Biorad)浓缩细胞进行细胞计数测定。

[0126] 然后,用细胞密度(细胞/mL)对每种条件的荧光信号进行标准化,以获得脂质蓄积的标准化值。最终,计算与基础对照相比标准化脂质蓄积的百分比。

[0127] 得到的结果表明,根据实施例1得到的具有保藏号CECT8690的南极假交替单胞菌种类的10KDa以下的提取物降低了人皮脂腺细胞培养物中皮脂脂质的百分比。

	产品	浓度	与基础对照相比的%脂质蓄积
[0128]	根据实施例 1 得到的提取物	0.25 $\mu\text{g/mL}$	67.98
	根据实施例 1 得到的提取物	2.5 $\mu\text{g/mL}$	64.77

[0129] 表3

[0130] 实施例6:使用成年人皮肤成纤维母细胞对针对模拟日光细胞毒性剂量的光保护的体外研究。

[0131] 当用细胞毒性剂量的模拟日光处理后24小时测量时,将光保护效能测定为活性染料中性红的吸收增加。

[0132] 将成人皮肤成纤维细胞维持在培养物中24小时,以在96-孔板中产生单层。然后,将细胞与PBS(磷酸缓冲盐水)一起预温育用于经照射的对照,或与2.5 $\mu\text{g/mL}$ 根据实施例1得到的具有保藏号为CECT 8690的南极假交替单胞菌种类的10KDa以下的提取物在黑暗中以37 $^{\circ}\text{C}$ 、5% CO_2 加湿空气预温育1h。

[0133] 然后,将温育的细胞在室温下暴露于 $\sim 30\text{-}60\text{J}/\text{cm}^2$ 的照射剂量150/180/210分钟。将另一个板同时保存在黑暗中,并且用作非照射对照。将包含温育的细胞的经过照射的板的培养基用新鲜培养基替换,并将板保持温育24h。通过吸收中性红来确定细胞活力,即在与中性红溶液(Sigma)温育2小时后裂解细胞,并在分光光度计中在540nm测量细胞裂解物的光密度。中性红是弱阳离子染料,其通过非扩散方式易于透入细胞膜。中性红细胞在胞内积累于未受损细胞的溶酶体中,并且在损伤或不活力细胞中几乎不吸收。为了计算细胞存活率百分比,将未处理的细胞用作参比。将测试产物的光保护潜能计算为处理的细胞相对于未经处理的照射细胞(用PBS处理)的细胞存活率的增加。结果如表4所示。

	产品	照射时间(min)	与对照组相比的细胞存活率增加
[0134]	根据实施例 1 得到的提取物	150 min	41.7%
	根据实施例 1 得到的提取物	180 min	99.3%
	根据实施例 1 得到的提取物	210 min	142.2%

[0135] 表4

[0136] 实施例7:通过酶联免疫吸附测定(ELISA)对人真皮成纤维细胞上的I型胶原蛋白合成的体外研究。

[0137] 用胰蛋白酶处理成年人皮肤成纤维细胞,并且将 5×10^4 个细胞/孔接种在48-孔板中。在37 $^{\circ}\text{C}$ 在5% CO_2 加湿空气中温育24h后,加入包含根据实施例1得到的12.5 $\mu\text{g/mL}$ 、6.25 $\mu\text{g/mL}$ 、2.5 $\mu\text{g/mL}$ 和1.25 $\mu\text{g/mL}$ 的具有保藏号CECT 8690的南极假交替单胞菌种类的10KDa以下提取物的新鲜培养基。每个浓度一式三份进行测试。将未经处理的人皮肤成纤维细胞作为对照接种在48-孔板中的6孔中。将人皮肤成纤维细胞在37 $^{\circ}\text{C}$ 在5% CO_2 加湿空气中再温育48h。然后,采集培养基以便通过ELISA分析。

[0138] 从1mg/ml的储备溶液开始,用来自小牛皮肤的I型胶原蛋白(Sigma)制备定量I型

胶原蛋白的标准曲线。将这些稀释液与先前采集的培养基一起转移到96-孔板中。将标准曲线稀释液和从细胞培养物处理中采集的上清液转移至96-孔板。样品中和标准曲线稀释液中的胶原蛋白在4℃下在加湿的气氛中将96-孔板的壁包被过夜。然后,用包含0.05% Tween-20 (Sigma) 的磷酸缓冲盐水 (PBS) 将孔板洗涤3次,并用3%牛血清白蛋白 (BSA) (Sigma) 的溶液封闭1h。封闭后,将孔板与抗-胶原蛋白I型抗体 (Sigma) 一起温育2h。该温育后,加入二次抗体 (山羊抗-小鼠IgG-HRP, Molecular Probes)。然后,在搅拌下将孔板与磷酸酶底物 (OPD, Sigma) 一起温育30分钟。通过加入3M H_2SO_4 终止反应。在微量滴定板读数器中读取490nm处的吸光度,并且使用I型胶原蛋白标准曲线的线性回归确定胶原蛋白浓度。胶原蛋白合成增加与未处理细胞相比的关系的结果如表5所示。

	产品	浓度	I 型胶原蛋白合成 与对照组相比的增加
[0139]	根据实施例 1 得到的提取物	12.5 $\mu\text{g/mL}$	128.4%
	根据实施例 1 得到的提取物	6.25 $\mu\text{g/mL}$	82.6%
	根据实施例 1 得到的提取物	2.5 $\mu\text{g/mL}$	67.8%
	根据实施例 1 得到的提取物	1.25 $\mu\text{g/mL}$	59.9%

[0140] 表5

[0141] 实施例8:通过TBARS测定法的脂质过氧化物的体外抑制的研究。

[0142] 使用脂质体作为细胞膜模型并且由于在TBARS测定(硫代巴比妥酸反应物质)期间MDA(丙二醛)与TBA(硫代巴比妥酸)之间形成加合物)来监测荧光测定脂质过氧化。将脂质体用根据实施例1得到的10KDa以下的具有保藏号CECT 8690的南极假交替单胞菌种类的提取物处理,并与基础对照进行比较,以研究脂质体的脂质过氧化作用的降低。

[0143] 脂质体的制备

[0144] 将溶解于氯仿:甲醇(1:1)中的包含30mM大豆磷脂酰胆碱(Emulmetik 930)的溶液在无氧 N_2 的气流气氛中干燥,得到薄膜。在高真空下除去最后痕量的溶剂3h。通过加入Tris-NaCl缓冲液(140mM NaCl, 20mM Tris pH=7.4)形成多层脂质体(MLV),然后搅拌5min以确保完全悬浮。然后将囊泡悬浮液超声处理以将磷脂囊泡分解成小单层脂质体(SUV)。

[0145] 脂质体过氧化

[0146] 将1ml的SUV悬浮液加入到试管中。然后,在不同的管中加入40 μl 不同浓度的10KDa以下的南极假交替单胞菌种类的提取物。加入40 μl Tris-NaCl缓冲液作为过氧化反应的基础对照。将试管在37℃下温育30min,并且一式两份测试每种浓度。

[0147] 通过加入40 μl 新鲜制备的AAPH(2,2'-偶氮双(2-脒基丙烷)二盐酸盐(270mM))引发脂质过氧化,然后将试管在37℃下温育1h,并以100rpm搅拌。通过加入200 μl BHT(丁羟甲苯)(在乙醇中4%w/v)并在-20℃冷冻样品来终止过氧化反应。

[0148] TBARS测定

[0149] 制备MDA的校准曲线:从5支试管中的通过酸水解TEP(1,1,3,3-四乙氧基丙烷)(在 H_2SO_4 1%中10mM)中得到的MDA溶液分别制备0、0.8、1.6、2.4和3.2nmol的MDA。最后,向每支试管中加入500 μl 蒸馏水和100 μl BHT(在乙醇中4%w/v)。

[0150] 为了与TBA反应,将样品解冻,用移液管取出600 μ l,并加入到250 μ l的SDS(十二烷基硫酸钠)(3%w/v)中。混合后,加入500 μ l新鲜制备的TBA(在热水中1%w/v)并混合。然后,加入500 μ l的7mM的HCl,搅拌并在95℃的水浴中温育15min。最后,将样品置于室温下,并且加入2ml的1-丁醇。将样品剧烈搅拌并以1500rpm离心5分钟。

[0151] 将每个样品的150 μ l每个孔的上部相置于不透明底部黑色96-孔板中,一式两份。在多板式荧光读出器(FluoStar Galaxy,BMG Labtech GmbH,Offenburg,Germany)中,在500nm的激发波长和530nm的发射波长下测定荧光。根据荧光测量值确定脂质过氧化,其中100%是基础对照条件的值。

	产品	浓度	与基础对照相比的脂质过氧化率
[0152]	根据实施例1得到的提取物	2.5 μ g/mL	96.0%
	根据实施例1得到的提取物	10 μ g/mL	92.2%
	根据实施例1得到的提取物	15.5 μ g/mL	83.7%

[0153] 表6

[0154] 实施例9:根据实施例1得到的10KDa以下的具有保藏号为CECT8690的南极假交替单胞菌种类的提取物对初级人皮脂腺细胞中MC5R蛋白质水平的影响

[0155] 将初级人皮脂腺细胞接种在用胞外基质(EM)包被的细胞外基质(EM)的T25 cm²烧瓶上,生长培养基条件为150,000个细胞,而在降低的血清培养基中的其余条件下为250,000个细胞。将细胞在CO₂温育箱(37℃和5%CO₂)中在3天期间在皮脂腺细胞生长培养基中温育。

[0156] 温育后,测定不同的条件:生长培养基中的皮脂腺细胞作为分化的阴性对照,在降低的血清培养基中的皮脂腺细胞作为分化的阳性对照,以及具有根据实施例1得到的0.25和2.5 μ g/ml的具有保藏号CECT 8690的南极假交替单胞菌种类的10KDa以下的提取物的皮脂腺细胞。

[0157] 处理后,制备细胞用于通过间接流式细胞术的免疫细胞化学。

[0158] 用于间接流式细胞术的样品制备。免疫细胞化学

[0159] 将细胞在1ml冰冷的磷酸缓冲盐水(PBS)、10%新生小牛血清(NCS)、1%叠氮化钠中再悬浮至约1-5 $\times 10^6$ 个细胞/ml。将包含用于每个条件的细胞的悬浮液分入两支试管,1支试管用初级抗体(抗-MC5R受体抗体[EPR8386],ABCAM)和二次抗体(对家兔IgG-H&L(APC)的山羊多克隆二次抗体)染色,ABCAM),而另1支试管仅用二次抗体(二次抗体对照)染色。

[0160] 将包含细胞的悬浮液在室温下在黑暗中用0.5%甲醛(Sigma)在PBS中固定。然后,通过用冰冷的PBS离心洗涤悬浮液。

[0161] 最后,将细胞在包含3%BSA和1%叠氮化钠的500 μ l冰冷的PBS中重新悬浮至约0.5-2.5 $\times 10^6$ 个细胞/ml。计数后,将细胞悬浮液在4℃在黑暗中储存过夜。

[0162] 用流式细胞仪测定细胞外MC5R蛋白水平

[0163] 将测定进行至少3次。使用于每次处理的细胞悬浮液通过流式细胞计数器(FACSCanto II,BD Biosciences)进行,并且采集100,000-200,000个事件,事件数取决于

每次具体测定。使用WinMDI 2.9软件分析数据。

[0164] 表示每个样品的形态学的光散射点图(SSC对FSC),并且拉出绘图区域或门(R1)以弃去细胞碎片。

[0165] 表示每个样品门(R1)的APC(荧光染料)与FSC(细胞大小)关系的荧光点图。将每个条件与其二次抗体对照进行比较,绘制门(R2)以定义阳性APC细胞(MC5R)。对于每个样品,区域R1+R2中包含的事件被量化。每个条件的阳性MC5R事件中被减去二次抗体对照。

[0166] 相对于减少的血清培养基条件计算MC5R蛋白质水平。如表7所示,根据实施例1得到的具有保藏号为CECT 8690的南极假交替单胞菌种类的10kDa以下的提取物降低血清减少培养基中初级人皮脂腺细胞中的MC5R蛋白质水平。

	产品	浓度	MC5R 蛋白质水平相应减少的血清培养基
[0167]	生长培养基	-	43.7
	根据实施例 1 得到的提取物	0.25 µg/mL	63.4
	根据实施例 1 得到的提取物	2.5 µg/mL	77.2

[0168] 表7

[0169] 实施例10:在10KDa以下的具有保藏号CECT 8690的南极假交替单胞菌种类的提取物对初级人皮脂腺细胞的分化过程的影响。

[0170] 将人皮脂腺细胞接种在胞外基质包被的T25 cm²烧瓶上,在皮脂腺细胞生长培养基(50%具有血清的完全生长培养基:50%无血清培养基)中以250,000个细胞/T25接种,并在3天期间在CO₂温育箱(37℃和5%CO₂)中温育。

[0171] 温育后,将人皮脂腺细胞用基础生长培养基作为分化的阴性对照、或条件分化培养基(10nM[Nle⁴,D-Phe⁷]-α-促黑激素,NDP-α-MSH,在皮脂腺细胞生长培养基中)作为分化的阳性对照、或条件分化培养基中根据实施例1得到的2.5µg/ml的具有保藏号CECT 8690的南极假交替单胞菌种类的10kDa以下的提取物进行处理。在CO₂温育箱(37℃和5%CO₂)中4天期间将细胞在不同的处理中温育。处理4天后,准备的细胞通过流式细胞术进行处理。

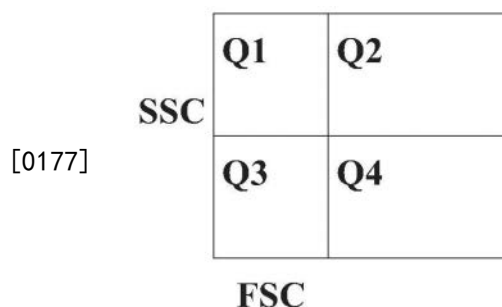
[0172] 流式细胞术的样品制备

[0173] 通过用冰冷的PBS在100g下离心5min将人皮脂腺细胞洗涤3次,并且在室温下用0.5%甲醛溶液(Sigma)固定10min,并用冰冷的PBS再洗涤1次。将细胞沉淀最终重新悬浮在包含3%牛血清白蛋白(BSA)和1%叠氮化钠的冰冷PBS中,并在黑暗中于4℃保存过夜。

[0174] 通过流式细胞术分析细胞形态学:大小(前向散射;FSC)和粒度(边散射;SSC)

[0175] 将测定进行至少3次。使包含用于每次处理的细胞的悬浮液通过流式细胞计数器(FACSCanto II,BD Biosciences)运行,并采集100,000-200,000个事件,事件数取决于每次具体测定。在流式细胞术技术中,FSC(前向散射)与细胞表面积或细胞大小成正比,而SSC(边散射)与细胞粒度或内部复杂度成正比。FSC与SSC的关系允许识别不同细胞类型的特定形态。使用WinMDI 2.9软件分析每次处理的皮脂腺细胞的形态学变化,且它们代表粒度与粒径的关系(SSC与FSC的关系)。绘制门以弃去细胞碎片,且门控细胞的细胞形态用SSC与FSC关系的密度图表示。通过设置对阴性和阳性分化对照的方向轴来评估形态学变化。

[0176] 流式细胞术数据的点图表示用于确定图表8中事件的分布,量化每个象限中的事件数。



[0178] 表8

[0179] 表9显示了进行的3次独立实验的一个代表性实验。在该测定中,相当于每次处理的细胞悬浮液通过流式细胞计数器运行并采集100,000个事件。表9显示了在不同培养条件下生长的皮脂腺细胞的大小与粒度关系的图形形态参数的每个象限中的事件数。分化的皮脂腺细胞与未分化的皮脂腺细胞比较显示形态特征的变化,其特征在于高粒度水平(Q2增加)和小细胞大小(增加Q3和减少Q4)。用根据实施例1得到的提取物处理的皮脂腺细胞显示与未分化的皮脂腺细胞相似的粒度减小(Q2减少)和细胞大小增加(减少Q3和增加Q4)的形态学变化。

SSC/FSC 总和		Q2	Q3	Q4
[0180]	未分化的皮脂腺细胞	0,5	13	87
	分化的皮脂腺细胞	7,6	61	31
	根据实施例 1 得到的 2.5ug/ml 提取物	4,8	21	75

[0181] 表9

[0182] 表9中的结果显示,根据实施例1得到的具有保藏号CECT 8690的南极假交替单胞菌种类的10KDa以下的提取物在分化条件培养基的存在下维持一些未分化的皮脂腺细胞。

[0183] 图1显示了在不同培养条件下生长的皮脂腺细胞的大小(FSC-A)和颗粒度(SSC-A)的形态学参数的密度图。未分化的皮脂腺细胞显示两个具有相似粒度水平、但两种不同大小的主要细胞群。分化的皮脂腺细胞表现出独特的细胞群,其特征在于高粒度水平和小细胞大小。用2.5μg/ml根据实施例1得到的提取物处理的皮脂腺细胞显示与未分化的皮脂腺细胞相似的形态粒度减小和细胞大小增加的形态变化。这些图像属于与表9中所示相同的实验。

[0184] 实施例11.人表皮角化细胞的基因表达谱的研究。

[0185] 通过用根据实施例1得到的具有保藏号CECT 8690的10KDa以下的南极假交替单胞菌种类的2.5μg/ml提取物处理,在人皮角化细胞的基因图谱内研究了基因集合显著增加/减少的次数,并且与未处理细胞中的基础水平(阴性对照)比较。

[0186] 将成人表皮角化细胞HEKa(Cascade Biologics)接种在用包被基质(15x10⁴个细胞/烧瓶T25)预处理的T25烧瓶上。将成人表皮角化细胞在具有5%CO₂的气氛中于37℃在完

整的Epilife培养基(补充EDGS的Epilife培养基,Cascade Biologics)中温育6天。温育后,在完全Epilife培养基中在具有5%CO₂的气氛中,用具有根据实施例1得到的具有保藏号CECT8690的南极假交替单胞菌种类的10KDa以下的2.5μg/ml的提取物将细胞在37℃下处理24小时,将完全Epilife培养基作为阴性对照。对于每个条件,温育和处理在至少4次生物测定(烧瓶)中进行。

[0187] 处理后,裂解细胞,并通过RNeasyPlus Mini试剂盒(Qiagen)从每个烧瓶和每种条件提取和纯化RNA。将裂解的细胞匀浆并将RNases灭活。通过使用gDNA Eliminator旋转柱从样品中除去基因组DNA。然后,将样品通过特殊的RNA结合柱,并经过几次微量离心洗涤以消除污染物和杂质,用50μl超纯水洗脱纯化的RNA。

[0188] 通过分光光度法(Nanodrop)和生物分析仪(Agilent Bioanalyzer)评估得到的RNA的纯度、完整性和浓度。

[0189] 随后,进行标记并将样品与人基因表达微阵列(ASurePrint G3,Agilent)杂交。

[0190] 将用处理得到的标准化值与用阴性对照得到的标准化值进行比较,以获得具有差异表达的基因。然后,通过Bioconductor软件对数据进行参数分析。然后通过GSEA(基因集合分析富集(Gene Set Analysis Enrichment))评估所得到的值,以便将在基因本体论和生物学途径方面具有差异表达的基因组合在一起。

[0191] 得到的结果如下表10至13中所示,其中将基因组合在一起。

	符号	名称	%折叠改变
			变
[0192]	CCL2	趋化因子(C-C 基元)配体 2	-35.68
	CSF1	集落刺激因子 1 (巨噬细胞)	-17.39
	CSF3	集落刺激因子 3 (粒细胞)	-53.46
	IL1A	白细胞介素 1, α	-41.72
	IL6	白细胞介素 6	-55.85
	IL8	白细胞介素 8	-33.19
	TNF	肿瘤坏死因子	-14.44
	PTGS2	前列腺素-内过氧化物合酶 2 (前列腺素 G/H 合酶和环加氧酶)	-29.67

[0193] 表10.由根据实施例1得到的提取物减量调节的牵涉炎症的基因。

	符号	名称	%折叠改变
	CYP1A1	细胞色素 P450, 家族 1, 亚族 A, 多肽 1	88.48
	SOD2	超氧化物歧化酶 2, 线粒体	64.35
	ALDH3A1	醛脱氢酶 3 家族, 成员 A1	112.12
[0194]	ATP7A	ATPase, Cu ⁺⁺ 转运, α 多肽	28.62
	CYP1B1	细胞色素 P450, 家族 1, 亚族 B, 多肽 1	25.71
	GCLC	谷氨酸-半胱氨酸连接酶, 催化亚单位	69.94
	GGT6	γ -谷氨酰转移酶 6	57.35
	GSTM1	谷胱甘肽 S-转移酶 mu 1	26.86
	NUDT7	nudix (二磷酸核苷连接的部分 X)-型基元 7	26.05

[0195] 表11. 由根据实施例1得到的提取物增量调节的氧化性应激和/或解毒作用中牵涉的基因。

	符号	名称	%折叠改变
[0196]	NLRP10	NLR 家族, 包含 10 的热蛋白域	35.39
	PGLYRP4	肽多糖识别蛋白 4	54.86

[0197] 表12. 由根据实施例1得到的提取物增量调节的抗炎反应中牵涉的基因。

	符号	名称	%折叠改变
[0198]	AQP9	水通道蛋白 9	51.27

[0199] 表13. 根据实施例1得到的提取物增量调节的牵涉水合的基因。

[0200] 实施例12: 人皮脂腺细胞的基因表达谱的研究。

[0201] 通过用根据实施例1得到的具有保藏号CECT 8690的10KDa以下的南极假交替单胞菌种类的2.5 μ g/ml提取物处理, 在人皮脂腺细胞的基因图谱内研究了基因集合显著增加/减少的次数, 并且与未处理细胞中的基础水平(阴性对照)比较。

[0202] 将人皮脂腺细胞(CELPROGEN)接种在用胞外基质(CELPROGEN)包被的T25烧瓶上(25x10⁴个细胞/烧瓶), 并在皮脂腺细胞生长培养基(50%人皮脂腺细胞完全生长培养基和50%人皮脂腺细胞无血清培养基, CELPROGEN)在37℃在5%CO₂气氛中温育3天。3天后, 从培养物中减少血清, 并用降低的血清培养基(5%人皮脂腺细胞完全生长培养基和95%人皮脂腺细胞无血清培养基, CELPROGEN)替代皮脂腺细胞生长培养基, 并将皮脂腺细胞温育3天。温育后, 在减少血清培养基中将细胞在37℃下在具有5%CO₂的气氛中用根据实施例1得到的具有保藏号CECT8690的南极假交替单胞菌种类的10KDa以下的2.5 μ g/ml的提取物中处理24小时, 将减少血清培养基作为阴性对照。对于每个条件, 温育和处理在至少4次生物测定(烧瓶)中进行。

[0203] 处理之后,将细胞裂解,并通过RNeasyPlus Mini试剂盒(Qiagen)从每个烧瓶和每个条件下提取和纯化RNA。将裂解的细胞匀浆并将RNases灭活。通过使用gDNA Eliminator 旋转柱从样品中除去基因组DNA。然后,将样品通过特殊的RNA结合柱,并经过几次微量离心洗涤以消除污染物和杂质后,用50 μ l超纯水洗脱纯化的RNA。

[0204] 通过分光光度法(Nanodrop)和生物分析仪(Agilent Bioanalyzer)评估所获RNA的纯度、完整性和浓度。

[0205] 随后进行标记并将样品与人基因表达微阵列(ASurePrint G3,Agilent)杂交。

[0206] 将用处理得到的标准化值与用阴性对照得到的标准化值进行比较,以获得具有差异表达的基因。然后,通过Bioconductor软件对数据进行参数分析。然后通过GSEA(基因集合分析富集)评估所得到的值,以便将在基因本体论和生物学途径方面具有差异表达的基因组合在一起。

[0207] 得到的结果如下表14至17中所示,其中将基因组合在一起。

符号	名称	%折叠改变
CCL2	趋化因子(C-C 基元)配体 2	-62.13
LTB	淋巴毒素 β (TNF 亚组, 成员 3)	-46.26
TLR2	toll-样受体 2	-25.10
TNF	肿瘤坏死因子	-36.57
[0208] CXCR7	趋化因子(C-X-C 基元)受体 7	-30.19
SAA1	血清淀粉样蛋白 A1	-55.36
IL8	白细胞介素 8	-28.03
CXCL1	趋化因子(C-X-C 基元)配体 1 (黑素瘤生长刺激活性, α)	-50.97
CXCL5	趋化因子(C-X-C 基元)配体 5	-45.32

[0209] 表14. 根据实施例1得到的提取物减少调节的牵涉炎症的基因。

符号	名称	%折叠改变
BORA	bora, aurora 激酶 A 激活剂	-24.02
[0210] CCNB1	细胞周期蛋白 B1	-22.58
CCND3	细胞周期蛋白 D3	-25.22
WNT5A	无翼型 MMTV 整合位点家族, 成员 5A	-20.85

[0211] 表15. 根据实施例1得到的提取物减少调节的牵涉皮脂腺细胞增殖和分化的基因。

	符号	名称	%折叠改变
[0212]	CYP1A1	细胞色素 P450, 家族 1, 亚族 A, 多肽 1	62.62
	GADD45A	生长停止和 DNA-损伤-诱导型, α	36.36

[0213] 表16. 根据实施例1得到的提取物增量调节的牵涉氧化性应激和DNA-修复的基因。

	符号	名称	%折叠改变
[0214]	RLBP1	视黄醛结合蛋白 1	83.26
	STRA6	维 A 酸 6 刺激的	47.36

[0215] 表17. 根据实施例1得到的提取物增量调节的牵涉类视色素代谢的基因。类视色素代谢与皮肤中皮脂产生相关。

[0216] 实施例13: 具有保藏号 CECT 8690 的南极假交替单胞菌种类的 10KDa 以下的提取物的化妆品组合物的制备。

[0217] 在适合的容器中, 在涡轮机搅拌下将 A 相的成分溶解在水中, 直到达到完全分散。随后在涡轮机搅拌下逐步加入 B 相 Novemer EC2 [INCI: 水 (水溶液), 丙烯酸钠, 甲基丙烯酸丙烯酸山萘醇聚醚-25 酯, 交联聚合物, 氢化聚癸烯, 月桂基葡萄糖苷]。

[0218] 然后, 加入根据实施例1得到的浓度为 62.5 $\mu\text{g}/\text{ml}$ 的南极假交替单胞菌种类 10KDa 以下的提取物的水溶液和水杨酸钠 (C 相)。

[0219] 成分清单在表18中。

	成分(INCI 名称)	%重量	相
	水(水溶液)	90.50	A
	根据实施例 1 得到的提取物的水溶液	5.00	C
	水杨酸钠	0.01	C
	水(水)	1.4	B
	丙烯酸钠/甲基丙烯酸山萘醇聚醚-25 酯/交联聚合物	0.83	B
[0220]	氢化聚癸烯	0.68	B
	月桂基葡萄糖苷	0.09	B
	苯氧乙醇	0.86	A
	对羟基苯甲酸甲酯	0.19	A
	对羟基苯甲酸丙酯	0.10	A
	对羟基苯甲酸乙酯	0.05	A
	EDTA 二钠	0.30	A

[0221] 表18

[0222] 实施例14: 具有保藏号 CECT 8690 的南极假交替单胞菌种类的 10KDa 以下的提取物

的化妆品组合物的制备。

[0223] 在适合的容器中,在涡轮机搅拌下将A相的成分溶解在水中,直到达到完全分散。将根据实施例1得到的10kDa以下的南极假交替单胞菌种类的提取物作为250 μ g/ml浓度的提取物的水溶液加入到A相中。

[0224] 随后,在涡轮机搅拌下,B相的组分逐步加入,直至完全分散。将pH调节为6.3-6.8。

[0225] 成分清单如表19中所示。

	成分(INCI 名称)	%重量	相
	水(水)	94.74	A
	根据实施例 1 得到的提取物	0.75	A
	水(水)	1.41	B
	丙烯酸钠/甲基丙烯酸山萮醇聚醚-25 酯/交联聚合物	0.83	B
	氢化聚癸烯	0.68	B
[0226]	月桂基葡萄糖苷	0.09	B
	苯氧乙醇	0.86	A
	对羟基苯甲酸甲酯	0.19	A
	对羟基苯甲酸丙酯	0.10	A
	对羟基苯甲酸乙酯	0.05	A
	EDTA 二钠	0.30	A
	水杨酸钠	0.01	A

[0227] 表19

[0228] 实施例15:具有保藏号CECT 8690的南极假交替单胞菌种类的10KDa以下的提取物对亚洲皮肤类型的志愿者的油性皮肤的效能的体内研究。

[0229] 本研究在20至35岁的20名亚洲女性志愿者中进行。志愿者将实施例14的组合物每天两次(早晚)应用于面部和前额28天。本研究测定在使用实施例14的组合物前的初始时间和第28天时分泌皮脂、斑点的活动性滤泡的数量和表面。受试者比较了它们在第28天时得到的结果与在初期得到的结果作为其自身的参比。用皮脂敏感性粘性膜 **Sebutape®** 测定效能。结果如表20中所示。

[0230]		变异性(%)
		(T+28 天- T0)/T0
	斑点数量	-9.5%
	斑点总表面	-27.2%

[0231] 表20

[0232] 结果显示,在20名志愿者中,分泌皮脂的活动性卵泡平均减少9.5%,而分泌皮脂的活动性卵泡表面平均减少27.2%。

[0233] 实施例16:具有保藏号CECT 8690的南极假交替单胞菌种类的10KDa以下的提取物的BB霜剂组合物的制备。

[0234] 在适合的容器中,在涡轮机搅拌下将A相[INCI:水,甲基葡萄糖醚-20,尿囊素,氢氧化钠,EDTA二钠,山梨酸钾]的成分溶解,并且将该混合物在50℃下加热直到总体分散完成。

[0235] 随后,使B1相[INCI: **CARBOPOL**®ULTREZ20丙烯酸酯类/丙烯酸C10-30烷基酯交联聚合物]保持湿润,且然后分散,并且加入B2相[INCI:黄原胶],使其保持湿润且然后也分散。

[0236] 接下来,加入相C的成分[INCI:CI 77891&水&甘油&黄原胶&柠檬酸钠,CI77492&水&甘油&黄原胶&柠檬酸钠,CI77491&水&甘油&黄原胶&柠檬酸钠,CI77499&水&甘油&黄原胶&柠檬酸钠],并通过搅拌使其颜色本身均匀化。当该混合物均匀时,将温度升至75℃。

[0237] 将D相成分[INCI:异硬脂酸异丙酯,辛酸癸酸甘油三酯,甲基葡萄糖倍半硬脂酸酯,山萘醇,二甲硅油,PEG-20甲基葡萄糖倍半硬脂酸酯,苯氧乙醇,醋酸维生素E)称重入另一个烧杯中,并在80℃加热该混合物。

[0238] 当达到相应的温度时,通过在搅拌下将D相混合物缓慢地加入到A、B1、B2和C相的混合物中制备乳剂(首先以600rpm且然后以10000rpm用turax 1分钟)。

[0239] 当混合物冷却至65℃时,加入E相[INCI:云母,氮化硼,云母]。然后,将根据实施例1得到的62.5μg/ml浓度的南极假交替单胞菌种类的10KDa以下的提取物的水溶液和水杨酸钠(F相)[INCI:水,假交替单胞菌属发酵提取物,水杨酸钠],并且当该批量处于30℃时,将G相[INCI:香料]加入到前述混合物中。

[0240] 成分清单如表21中所示。

	成分(INCI 名称)	%重量	相
	水	56,95	A
	甲基葡糖醇聚醚-20	5	A
	尿囊素	0,2	A
	氢氧化钠	0,15	A
	EDTA 二钠	0,1	A
	山梨酸钾	0,05	A
	卡波姆®ULTREZ 20 丙烯酸酯/C10-30 烷基丙烯酸酯交联聚合物	0,1	B
	黄原胶	0,3	B
	CI 77891 & 水 & 甘油 & 黄原胶 & 柠檬酸钠	6	C
	CI 77492 & 水 & 甘油 & 黄原胶 & 柠檬酸钠	0,6	C
[0241]	CI 77491 & 水 & 甘油 & 黄原胶 & 柠檬酸钠	0,4	C
	CI 77499 & 水 & 甘油 & 黄原胶 & 柠檬酸钠	0,2	C
	异硬脂酸异丙酯	5,9	D
	辛酸癸酸甘油三酯	4,1	D
	甲基葡萄糖倍半硬脂酸酯	3,4	D
	山萘醇	3	D
	二甲硅油	2	D
	PEG-20 甲基葡萄糖倍半硬脂酸酯	1,6	D
	苯氧乙醇	0,5	D
	醋酸维生素 E	0,2	D
	云母	3	E
	一氮化硼	3	E
	云母	1	E
[0242]	水、假交替单胞菌属发酵提取物、水杨酸钠	2	F
	香料	0,25	G

[0243] 表21

[0244] 实施例17:BB霜安慰剂组合物的制备。

[0245] 根据实施例16的介绍制备该组合物,但不使用南极假交替单胞菌提取物,该组合物具有如下表22中包括的成分。

	成分(INCI 名称)	%重量	相
	去离子水	58,95	A
	甲基葡糖醇聚醚-20	5	A
	尿囊素	0,2	A
	氢氧化钠	0,15	A
	EDTA 二钠	0,1	A
	山梨酸钾	0,05	A
	卡波姆®ULTREZ 20 丙烯酸酯/C10-30 烷基丙烯酸酯交联聚合物	0,1	B
	黄原胶	0,3	B
[0246]	CI 77891 & 水 & 甘油 & 黄原胶 & 柠檬酸钠	6	C
	CI 77492 & 水 & 甘油 & 黄原胶 & 柠檬酸钠	0,6	C
	CI 77491 & 水 & 甘油 & 黄原胶 & 柠檬酸钠	0,4	C
	CI 77499 & 水 & 甘油 & 黄原胶 & 柠檬酸钠	0,2	C
	异硬脂酸异丙酯	5,9	D
	辛酸癸酸甘油三酯	4,1	D
	甲基葡萄糖倍半硬脂酸酯	3,4	D
	山萘醇	3	D
	二甲硅油	2	D
	PEG-20 甲基葡萄糖倍半硬脂酸酯	1,6	D
	苯氧乙醇	0,5	D
	醋酸维生素 E	0,2	D
	云母	3	E
[0247]	一氮化硼	3	E
	云母	1	E
	香料	0,25	F

[0248] 表22

[0249] 实施例18:具有保藏号CECT8690的南极假交替单胞菌种类的低于10KDa的提取物在BB霜的持久的控油效果中的功效的体内研究。

[0250] 本研究在18至42岁之间的22名白人女性志愿者中进行。志愿者将实施例16的组合物应用于半面脸,而将安慰剂(实施例17)应用于另一半面脸。在单次产品应用之后,在使用该组合物之前的最初时间,在产品施用之后即刻以及在产品应用后2小时和8小时测定皮肤光泽度。使用 **Skin-Glossmeter**® GL 200测定效能。结果如表23中所示。

	变异性(%)	
	活性成分(TX 小时 - T0)/T0	安慰剂(TX 小时 - T0)/T0
[0251] 之后即刻的 T	-28.31%	-13.01%
T 2h	-25.18%	-14.61%
T 8h	-14.95%	7.17%

[0252] 表23

[0253] 在产品应用后即刻得到的测量值显示使用活性成分霜剂(实施例16的组合物,其中包含具有保藏号CECT 8690的南极假交替单胞菌种类的10KDa以下的提取物)导致的皮肤光泽度的下降高于安慰剂霜剂。2小时后发现类似的结果。然而,在产品施用8小时后,活性成分霜剂能够减少皮肤光泽度,而使用安慰剂霜剂皮肤光泽度增加。

[0254] 实施例19:用根据实施例1得到的具有保藏号CECT 8690的南极假交替单胞菌种类菌株分泌的细菌胞外产物进行的体内研究;用于白种人皮肤类型志愿者中油性皮肤处理的效能试验。

[0255] 本研究在28天期间进行,其中具有初始时间、14天后和28天后的测量值。包括20名志愿者,为年龄在20至35岁之间的白种人女性。受试者应用实施例13的凝胶霜,每天两次(早晚)。将受试者使用他们自身作为参比,并将在不同时间得到的结果与初始时得到的结果进行比较。

[0256] 产品的功效通过以下方法评价:

[0257] -用**Sebumeter®**测定以确定鼻子两侧上皮肤的皮脂率;结果如表24所示。

[0258] -用Epiflash数码照片,用于鼻子两侧上的毛孔图像分析;结果如表25所示。

[0259] -具有Visia-CR的数码照片,用于图像分析前额上的皮肤光泽;结果如表26所示。

	变异性(%)*	
	(T+14 天 - T0)/T0	(T+28 天 - T0)/T0
[0260] 皮脂比例	-8.4%	-9.4%

[0261] *根据平均值计算

[0262] 表24. 在14和28天时,有关皮脂总量相对于初始时间的百分比变化性。

[0263] 结果显示在产品应用14天后皮脂比例减少了8.4%。在28天后,皮脂比例减少至多为9.4%。

[0264]

	变异性(%)*	
	(T+14 天 - T0)/T0	(T+28 天 - T0)/T0
毛孔数	-20.5%	-18.0%
毛孔总面积	-18.8%	-18.7%

[0265] *根据平均值计算

[0266] 表25. 在14和28天时,斑点的数量和总面积相对于初始时间的百分比变化性。

[0267] 结果显示,在产品应用14天后毛孔数减少20.5%,而在应用28天后减少18.0%。关于毛孔总面积,发现在产品应用14和28天后分别下降了18.8%和18.7%。

[0268]	变异性(%)*	
	(T+14 天 - T0)/T0	(T+28 天 - T0)/T0
	光泽强度	-17.0%

[0269] *根据平均值计算

[0270] 表26. 在14和28天时,前额上皮肤光泽相对于初始时间的百分比变化性。

[0271] 结果显示在治疗14天后皮肤光泽强度降低了17%。产品应用28天后,皮肤光泽度降低至多为27.3%。

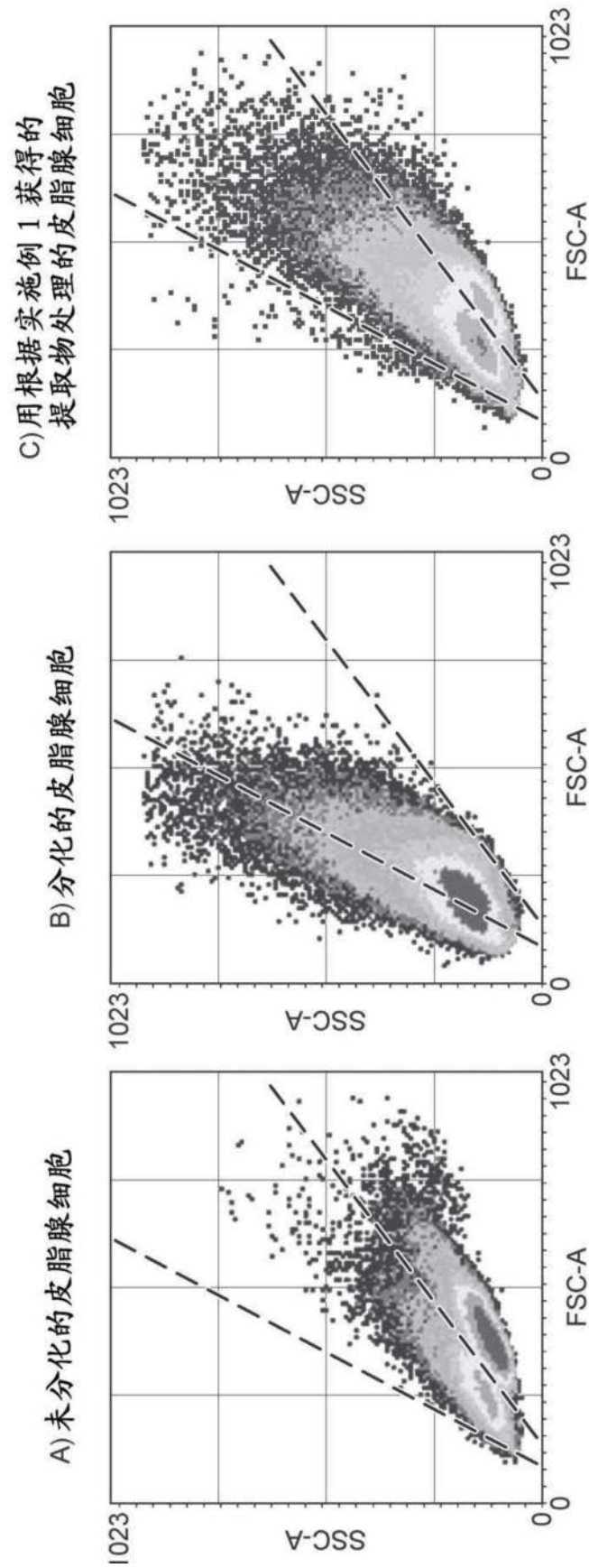


图1