(19)国家知识产权局

(12)发明专利申请

(10)申请公布号 CN 115942931 A
(43)申请公布日 2023.04.07

(21)申请号 202180042861.4
(22)申请日 2021.06.15
(30)优先权数据
2009109.6 2020.06.16 GB
(85)PCT国际申请进入国家阶段日
2022.12.15
(86)PCT国际申请的申请数据
PCT/EP2021/066062 2021.06.15
(87)PCT国际申请的公布数据
WO2021/255003 EN 2021.12.23
(71)申请人 奇华顿股份有限公司
地址 瑞士韦尔涅
(72)发明人 A·哈迈奥 M·梅内尔
R·雷诺德 A·斯坎多勒拉
(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 谭玮
(51)Int.Cl.
A61K 8/9711(2006.01)
A61K 8/34(2006.01)
A61K 36/03(2006.01)
A61Q 19/02(2006.01)
A61Q 19/08(2006.01)

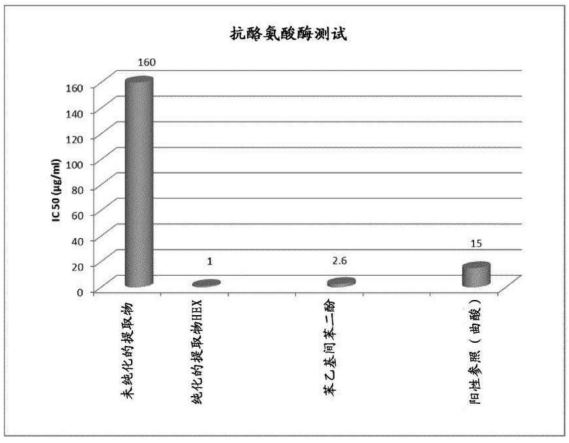
权利要求书1页 说明书16页 附图19页

(54)发明名称

有机化合物的改进或与其相关的改进

(57)摘要

提供了伸长海条藻的提取物以及包含载体和所述提取物的化妆品组合物。该提取物和该组合物显示增白和抗衰老活性。



CN 115942931 A

1.一种伸长海条藻的提取物。

2.根据权利要求1所述的提取物,其是水性提取物。

3.根据权利要求1或2所述的提取物,其包含褐藻多酚的混合物。

4.根据权利要求1至3中任一项所述的提取物,其包含褐藻多酚和多酚的混合物,其中多酚的浓度为1-30g/L。

5.一种化妆品组合物,其包含载体和作为第一活性化妆品成分的根据权利要求1至3中任一项所述的伸长海条藻的提取物。

6.根据权利要求4所述的化妆品组合物,其中所述伸长海条藻的提取物以所述化妆品组合物的2重量%-5重量%的量存在。

7.根据权利要求4或5所述的化妆品组合物,其中所述化妆品组合物是皮肤护理组合物。

8.根据权利要求6所述的化妆品组合物,其用于皮肤增白。

9.根据权利要求6所述的化妆品组合物,其用于抗老化处理。

10.一种皮肤处理的方法,其包括将包含根据权利要求1至3中任一项所述的伸长海条藻的提取物的化妆品组合物施用至皮肤的步骤。

11.根据权利要求9所述的方法,其用于皮肤增白。

12.根据权利要求9所述的方法,其用于抗老化处理。

13.根据权利要求1至3中任一项所述的伸长海条藻提取物在皮肤护理中的用途。

14.一种制备活性化妆品成分的方法,其包括提取伸长海条藻的步骤。

有机化合物的改进或与其相关的改进

[0001] 本发明涉及伸长海条藻(Himanthalia elongata)提取物及其用于皮肤处理的用途。本发明进一步涉及包含伸长海条藻提取物的化妆品组合物。

[0002] 伸长海条藻是可食用的褐藻,也称为海意面(sea spaghetti)。它是具有两步形态的半年生藻类:营养形式(vegetative form)和生殖形式(reproductive form)。生殖形式具有看起来像毛发的长带。

[0003] 在波罗的海、北海和从斯堪的纳维亚南部到葡萄牙的东北大西洋中发现了伸长海条藻。例如,该藻类可以在法国布列塔尼(Brittany,France)的北部,例如在Roscoff附近或在Landrellec附近,优选地在Ile Grande与Pleubian之间的区域,在5月至8月(但优选地在7月或8月)收获。

[0004] 伸长海条藻含有许多可能对于皮肤化妆品受关注的原始分子。例如,该褐海藻含有两种多元醇。第一种即D-甘露糖醇对褐藻是常见的,但第二种即D-阿卓糖醇或D-塔罗糖醇在自然界中首次被发现于伸长海条藻中并且被认为是稀有糖。该多元醇参与细胞内渗透调节、能量储存和生物大分子的保护。伸长海条藻还富含肽和氨基酸,并且含有多糖(藻酸盐、昆布多糖、岩藻聚糖)和多酚。

[0005] 出人意料地发现,伸长海条藻提取物、并且尤其是其特定级分,可以具有令人印象深刻的皮肤护理特性。

[0006] 在第一方面,本发明提供了伸长海条藻提取物。所述提取物可用于皮肤处理的组合物和方法。特别地,它们是化妆品、非治疗性组合物和方法。

[0007] 伸长海条藻提取物是通过在酸性条件下处理冷冻藻类而获得的水性提取物。特别地,通过用酸水溶液处理获得提取物。

[0008] 本发明的伸长海条藻提取物是富集的提取物并且含有多酚并且特别是褐藻多酚(phlorotannin)。褐藻多酚是大型藻类特有的一组间苯三酚(1,3,5-三羟基苯)的复杂聚合物。这些酚类化合物是褐藻中细胞壁的整体结构组分,但也起到许多次要的生态作用,诸如保护免受UV照射和防御擦伤。提取物包含脂肪酸、柠檬酸、D-甘露糖醇、D-阿卓糖醇和呈低聚物的形式的不同的褐藻多酚以及具有不同聚合度(DP)的间苯三酚聚合物。

[0009] 图1中显示了存在于伸长海条藻中的褐藻多酚的一些实例。

[0010] 在伸长海条藻提取物的首次管内(in tubo)筛选中,已经观察到抗酪氨酸酶、抗透明质酸酶、抗胶原酶和抗弹性蛋白酶活性(实施例3-6),其在皮肤护理领域中是受关注的。

[0011] 抗酪氨酸酶活性与化妆品中所寻求的皮肤增白有关。伸长海条藻提取物能够与酪氨酸酶(用于控制黑色素的产生的酶)相互作用。

[0012] 在与其天然底物接触时,酪氨酸酶催化L-DOPA氧化成反应性中间体多巴醌,其进一步反应,最终产生黑色素低聚物。该酶的抑制剂的存在使得降低多巴醌形成的速率成为可能。

[0013] 伸长海条藻提取物的抗透明质酸酶、抗胶原酶和抗弹性蛋白酶活性与抗老化特性,例如减少细纹和皱纹,增加皮肤弹性、紧实度和水合作用,以及在化妆品和皮肤护理中也寻求的其他特性有关。

[0014] 透明质酸是在皮肤的真皮中天然产生的化合物，并且被称为透明质酸酶的酶连续降解。因此，随着年龄增长，由细胞所合成的透明质酸与由透明质酸酶所降解的透明质酸之间的比率降低。这导致真皮保湿的减少和进行性下垂，这导致皱纹的出现。抑制透明质酸酶(抗透明质酸酶活性)将允许减少真皮中降解的透明质酸的量并且因此限制皱纹的出现。

[0015] 胶原酶能够降解分子诸如弹性蛋白、纤连蛋白和胶原。存在于真皮中的这些蛋白质在细胞外基质(ECM)中具有重要作用，并且它们的降解导致皮肤的过早老化。因此，抑制胶原酶活性(显示抗胶原酶活性)的药剂可以通过防止真皮基质的降解而对维持健康皮肤具有有益的作用。胶原酶能够裂解其氨基末端被封闭的合成肽的“X-gly”键。

[0016] 弹性蛋白是真皮蛋白，其是细胞外基质(ECM)的成分，并且其主要有助于皮肤的紧实度和弹性。随着时间的推移，ECM蛋白的代谢减慢。同时，酶活性增加，包括分解弹性蛋白的弹性蛋白酶的酶活性。防止这样的弹性丧失的一种方式是使用具有能够抑制这些酶的抗胶原酶活性的活性成分。

[0017] 因此，观察到的伸长海条藻提取物的抗酪氨酸酶、抗透明质酸酶、抗胶原酶和抗弹性蛋白酶活性表明提取物的增白和抗老化特性。结论是，包含伸长海条藻的提取物的化妆品组合物能够减少细纹和皱纹，并且增加皮肤弹性、紧实度和水合作用。还得出包含伸长海条藻的提取物的化妆品组合物能够增白和/或增亮皮肤的结论。

[0018] 将伸长海条藻提取物与苯乙基间苯二酚(其是市场上可获得的增白化合物)的比较已经显示相当的或甚至更好的增白效果。另外，伸长海条藻提取物显示抗老化特性。此外，伸长海条藻提取物是从可再生来源可获得的天然产物。

[0019] 更详细地研究了伸长海条藻提取物的增白活性。

[0020] 首先，观察到伸长海条藻提取物对正常人黑素细胞的黑色素合成的抑制，证实了在体外水平下的增白活性。

[0021] 管内(in tubo)测试证明，伸长海条藻提取物具有强的抗酪氨酸酶活性。因此，它对色素沉着过度障碍诸如色素沉着老化斑可以非常有效。实际上，酪氨酸酶是参与黑色素生物发生的关键酶，其负责皮肤颜色。该酶的过度活性导致皮肤病学障碍，其中老化斑可以分为两种类型，称为老年性和日光性着色斑。

[0022] 因此，在下一步骤中，进行关于老年性着色斑(实施例7)和日光性着色斑(实施例8)的老化斑的离体测试。发现伸长海条藻提取物能够降低黑色素含量、减少氧化蛋白、控制与日光性着色斑相关的炎症以及改善皮肤屏障。

[0023] 老年性着色斑与细胞衰老的增加并且尤其是紧密沿着真皮-表皮连接的真皮成纤维细胞有关。由于SDF-1(基质细胞源性因子1)释放，它们对控制皮肤色素沉着起积极作用。不幸地，随着衰老，观察到SDF-1表达急剧下降，导致色素沉着过度和色素沉着老化斑形成。

[0024] 日光性着色斑由UV暴露介导，其导致细胞衰老并且因此出人意料地导致与色素沉着控制的丧失相关的SDF-1表达的随后降低。此外，由于与角质层厚度的增加相关的蛋白酶体活性的降低，UV暴露还导致氧化蛋白质的增加。作为结果，观察到脂褐质的强烈增加，众所周知其涉及老化斑形成。同时，观察到与黑素原生成的过度刺激相关的UV诱导的炎症增加。所有这些破坏的机制导致色素沉着过度和色素沉着老化斑形成。

[0025] 在文献中已经描述了SDF-1与真皮的成纤维细胞衰老相关。实际上，在衰老条件下，这些成纤维细胞丧失其表达SDF-1的能力(Yoon等人，2018)。另一方面，已知UV照射在来

自皮肤的成纤维细胞和角质形成细胞中诱导细胞衰老(Debacq-Chainiaux等人,2012;Amaro-Ortiz等人,2014)。因此,假定参与日光性着色斑形成的UV照射也可以诱导皮肤衰老。在这样的情况下,将预期UV照射对乳头状真皮中SDF-1表达的影响,但在文献中未描述。

[0026] 出人意料地,已经表明,SDF-1参与与导致日光性着色斑的UV暴露相关的色素沉着过度。进一步表明,该效应可以受到用伸长海条藻提取物处理的影响。

[0027] 发现伸长海条藻提取物对老年性和日光性着色斑具有影响(参见实施例7和8)。可以得出结论,即包含伸长海条藻的提取物的化妆品组合物能够增加SDF1表达,从而激活色素沉着控制。还可以得出结论,即,如通过黑色素含量的减少所观察到的,包含伸长海条藻的提取物的化妆品组合物能够减少黑色素生物发生。

[0028] 然后,对来自不同种族(包括高加索人、亚洲人和非洲人来源)的皮肤外植体进行离体研究(实施例9)。显示伸长海条藻提取物具有增白活性,其引起无色素沉着细胞的增加和高度色素沉着细胞的减少。伸长海条藻提取物对各种种族的皮肤具有增白功效。效果与苯乙基间苯二酚的效果相当或甚至更好。

[0029] 最后,在临床研究中测试了伸长海条藻提取物的增白活性。在第一个试验中,研究了高加索人志愿者的手上的色素沉着斑的减少(实施例10)。在第二个试验中,研究了亚洲人志愿者的面部的色素沉着斑的减少(实施例11)。在第三个试验中,研究了非洲人志愿者的面部的色素沉着斑的减少(实施例12)。总之,证明了伸长海条藻提取物可以减少皮肤上、特别是手和面部的色素沉着斑。

[0030] 已经证明,通过在皮肤上施用伸长海条藻提取物,可以实现以下效果中的一项或多项:酪氨酸酶的抑制、透明质酸酶的抑制、弹性蛋白酶的抑制、胶原酶的抑制、SDF1表达的增加、黑色素生物发生的减少、黑色素含量的减少、UV暴露之后氧化蛋白的减少、UV暴露之后脂褐质体(lipofuscin body)累积的减少、UV暴露之后炎症的减少、UV暴露之后角质层厚度的减少,

[0031] 已经证明,通过在皮肤上施用伸长海条藻提取物,可以观察到以下效果中的一项或多项:皮肤增白、色素沉着控制的激活、色素沉着或色素沉着过度的减少、皮肤发红的减少、可见斑的减少、老化斑的减少、皮肤老化的减少。

[0032] 在另外的方面,本发明提供了化妆品组合物,其包含载体和作为第一活性化妆品成分的伸长海条藻提取物。伸长海条藻提取物应当以化妆品组合物的2-5重量%、优选地2.5-3.5重量%、更优选地3重量%的量存在。化妆品组合物可以包含另外的活性化妆品成分。化妆品组合物中的载体应当是皮肤病学可接受的载体。

[0033] 在本发明的另外的方面,提供了化妆品组合物,其是皮肤护理组合物。典型的皮肤护理组合物是例如面霜(cream)、精华液(serum)、精华素(essence)、面膜(mask)或乳液(lotion)。

[0034] 在本发明的另外的方面,提供了皮肤处理的方法,其包括将包含伸长海条藻的提取物的化妆品组合物施用至皮肤的步骤。特别地,所施用的化妆品组合物是皮肤护理组合物。

[0035] 在本发明的另外的方面,提供了用于皮肤增白的皮肤处理的方法。此外,所提供的皮肤处理的方法用于抗老化处理。

[0036] 在本发明的另外的方面,提供了伸长海条藻提取物在皮肤护理中的用途。

[0037] 在另外的方面，本发明涉及制备活性化妆品成分的方法，其包括提取伸长海条藻的步骤。

[0038] 为了提取伸长海条藻，将冷冻的藻类研磨并且悬浮在水中，加热并且在高温下用酸处理。酸性水解之后，将反应混合物冷却，并且将pH设置为2.2。将溶液离心并过滤以得到第一提取物。然后通过吸附在树脂上，用水洗涤并且用乙醇解吸附来纯化该提取物。然后将乙醇蒸发，并且添加水。将pH调节至3，然后在0.2μm下过滤。在过滤结束时，添加甘油。所获得的提取物含有1-30g/L的多酚(定量为无水没食子酸当量)、优选地3-25g/L的多酚、更优选地5-20g/L的多酚、甚至更优选地9-18g/L的多酚。

[0039] 现在借助于以下非限制性实施例进一步说明本发明：

[0040] 概述：通过Shapiro-Wilk测试分析从体外至体内实验的所有原始数据，以便确定数据是否遵循高斯定律。如果是，则使用参数配对或非配对t学生检验分析数据。如果否，则使用非参数Wilcoxon检验或非参数Mann-Whitney检验分析数据。如果$p<0.1$#、$p<0.05$*、$p<0.01$**并且$p<0.001$***，则结果被认为是显著的。

[0041] 实施例1：伸长海条藻提取物(HEX)的制备

[0042] 图2显示了分两个步骤a)和b)进行的提取方法的流程图。

[0043] a)未纯化的提取物

[0044] 制备4％的伸长海条藻的干物质(在布列塔尼的北部收获)在水中的悬浮液。首先将海藻切成小块，在搅拌下浸渍10分钟，并且然后用ultra-turrax(12 000rpm)粗磨3分钟。然后将溶液搅拌并加热。当温度达到65℃时，添加柠檬酸(所添加的柠檬酸的量对应于悬浮液的干物质的7.5％)。然后，添加1N硫酸以设定pH＝2.2。酸水解在70℃下持续2h。2h之后，将溶液冷却，并且经由170μm的筛过滤。可以将未纯化的提取物离心(12000g，18℃，15分钟)，然后与大孔吸附树脂(例如Diaion HP20)接触。

[0045] b)纯化的提取物(HEX)

[0046] 在搅拌下将未纯化的提取物(约4000g)与一批树脂(约1600g，湿形式)接触放置1h。吸附阶段之后，将树脂用水洗涤三次(3×4.6L)，持续5分钟，以去除盐和极性化合物(例如糖和蛋白质)。然后将吸附在树脂上的化学品用90％乙醇解吸附(最大密度0.835，1×4.6L和3×3.8L，持续30分钟)。最后用3L水进行新的持续5分钟的洗涤。

[0047] 将乙醇级分和最终的水洗脱液合并以在真空旋转蒸发仪下蒸发，直到乙醇含量低于1％，并且浓缩溶液的质量是初始提取物的质量的1/85。将pH用氢氧化钠调节至3.0并且将产物过滤至0.2μm。通过在甘油中稀释两次(w/w)获得最终产物(纯化的提取物)。它含有9-18g/L的多酚(定量为无水没食子酸当量)。

[0048] 实施例2：伸长海条藻提取物中存在的褐藻多酚的分析

[0049] a)褐藻多酚的浓度

[0050] 将伸长海条藻的水性提取物(实施例1中所获得的纯化的提取物)用蒸馏水稀释，并且在分液漏斗中与正庚烷+乙腈+甲基-叔丁基醚混合。在混合和倾析之后，分离三个所得不混溶液相(上部相1UP1、中间相MP1、下部相LP1)。

[0051] 将下部相LP1用蒸馏水稀释并且与乙腈+甲基-叔丁基醚混合。分离两个所得液相(上部相UP2和下部相LP2)。最终将上部相UP2与MP1混合。在真空下蒸发溶剂，得到富含褐藻多酚的级分，记为E-Phlor。

[0052] b)分级分离

[0053] 富含褐藻多酚的提取物E-Phlor已经通过离心分配色谱法(CPC)在**FCPE300®**仪器上通过Rousselet-Robatel-Kromaton在以下条件下分级分离:

[0054] • 进样质量1.5g的E-Phlor

[0055] • 两相溶剂体系:甲基-叔丁基醚/乙腈/水(4/1/5,v/v)

[0056] • 固定相:两相溶剂体系的下部相(上升模式)

[0057] • 流动相:两相溶剂体系的上部相

[0058] • 柱转速:1200rpm

[0059] • 20mL/min的流速

[0060] 将流动相泵送通过固定相持续60分钟。在该洗脱步骤期间,在柱的出口处收集对流动相具有亲和力的有机化合物。然后,挤出固定相。在该挤出步骤期间,回收留在柱中的所有化合物。

[0061] c)级分分析

[0062] 获得十一个连续的CPC级分F01至F11。在配备有冷冻探针的Bruker Avance AVIII-600光谱仪(Karlsruhe,德国)上通过^{13}C NMR分析所有级分。所有CPC级分含有显著量的褐藻多酚,如表1中所总结的,其中*意指以更低量存在并且**意指以更高量存在具有所指示的聚合度的褐藻多酚。还进行了LC/MS分析以初步区分CPC级分中所含有的褐藻多酚的各种化学结构。

[0063] 表1:褐藻多酚在CPC级分中的分布。

[0064]

CPC级分	质量(mg)	%粗提取物	褐藻多酚分布																							
			6.1 min	6.4 min	6.6 min	7.4 min	7.5 min	8.1 min	8.3 min	8.5 min	8.6 min	9.3 min	9.4 min	10.1 min	10.2 min	10.5 min	10.6 min	10.9 min	11.1 min	11.4 min	11.6 min	11.9 min	12.3 min	12.4 min	12.6 min	12.7 min
			DP 2	DP 4	DP 3	DP 3	DP 3	DP 4	DP 6	DP 4	DP 7	DP 7	DP 5	DP 8	DP 6	DP 11	DP 9	DP 7	DP 10	DP 11	DP 12	DP 12	DP 13	DP 14	DP 15	DP 16
01	351	23.4%	*										*	*	*	*		*	*	**	**	*	*	**	**	**
02	183	11.7%	*			*		*		*	*		*		*	*	*	*	*	**	**	*	*	**	**	**
03	98	6.5%	**			*	*	*		*	*			*		*	*	*	*	*	*	*	*		*	*
04	30	2.0%	**				*	*					*	*		*	*	*	*	*	*	*	*		*	*
05	49	3.3%	**		*				**		*		*	*		*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*
06	57	3.8%	**		*		**	**	**	**	**			**		*		*	*	**	*	*	**	*	*	*
07	44	2.9%		*			*	*		*	*		*	**		*		*	*	*	*	**	**	*	*	*
08	46	3.0%		*										*		**		*	*	*	**	**	*	*	*	*
09	30	1.9%							*					*		**	**	*	*	*	**	**	*	*	*	*
10	325	21.7%														*						*	*	**	**	**
11	135	9.0%									*					*					*	*	*	**	**	**

[0065] DP=褐藻多酚的聚合度

[0066] 其他具有更高聚合度的褐藻多酚也存在于CPC级分中,但通过MS检测不到。

[0067] 实施例3:伸长海条藻提取物的抗酪氨酸酶活性的管内(in tubo)评价

[0068] 已经测试了如实施例1中所获得的伸长海条藻的未纯化的和纯化的提取物抑制酪氨酸酶的能力,以确定用于化妆品应用的令人感兴趣的增白活性。

[0069] 在其天然底物的情况下,酪氨酸酶将裂解L-DOPA。酶的抑制剂的存在允许降低水解速度。该活性的揭示对应于底物水解之后介质中所释放的多巴醌的吸光度测量值(OD)。当酶不被抑制时,所释放的多巴醌的浓度增加,并且观察到棕色着色。

[0070] 所得结果以IC50(mg/ml)表示。半数最大抑制浓度(IC50)是物质抑制特定生物学或生物化学功能的有效性的量度。IC50越低,提取物在低浓度下的生物学活性越强。

[0071] 该测定适用于96孔微孔板。将40μL的样品与60μL的磷酸盐缓冲液pH 6.8混合。然后,添加40μl的酪氨酸酶。将反应混合物振荡并且在37℃下预温育15min。然后,添加40μL的L-DOPA溶液。将微孔板在37℃下温育并且在15分钟期间每5分钟在475nm的波长下读取。使用曲酸作为阳性参照。

[0072] 已经对不同浓度下的纯化的提取物进行了测试。结果显示在图3a中。所获得的结果以酪氨酸酶的抑制%表示。

[0073] 在图3b中显示了在伸长海条藻提取物(如在实施例1a中所获得的)上、在纯化的提取物HEX(如在实施例1b中获得的,具有更高含量的多酚)上相对于苯乙基间苯二酚所获得的结果。纯化的提取物的活性是苯乙基间苯二酚(基准)活性的2.6倍,并且是未纯化的提取物活性的160倍。表明伸长海条藻提取物可以抑制酪氨酸酶。

[0074] 实施例4:伸长海条藻提取物的抗透明质酸酶活性的管内(in tubo)评价

[0075] 通过浊度法评价抗透明质酸酶活性基于通过将透明质酸聚合物与表面活性剂CTAB(十六烷基三甲基溴化铵)接触放置所获得的沉淀物的形成。

[0076] 在酶促反应期间,透明质酸(由20至12,500个单元形成)被透明质酸酶降解以得到尺寸减小的聚合物。因此,所获得的二糖和尺寸小于8kDA的聚合物在CTAB的存在下不沉淀,而未降解的透明质酸的聚合物和尺寸大于8kDA的聚合物与CTAB接触时沉淀。

[0077] 测定已在96孔微板中进行。首先将20μl的样品与10μl的Mac Ilvaine缓冲液pH 4.6混合。然后添加20μl的透明质酸酶和20μl的透明质酸。将混合物振荡并且在37℃下温育40min。最后在所有孔中添加180μl的CTAB以使未水解的透明质酸聚合物沉淀。将混合物在室温下温育20min,并且通过分光光度法测量在600nm下的吸光度。使用DSCG(色甘酸二钠)作为阳性对照。

[0078] 褐藻多酚未纯化和纯化的伸长海条藻提取物(如分别在实施例1a和1b中所获得的)上相对于在苯乙基间苯二酚上所获得的结果显示于图4中。表明伸长海条藻的纯化提取物具有最好的抗透明质酸酶活性,并且伸长海条藻的全提取物具有显著的抗透明质酸酶活性。表明伸长海条藻提取物可以抑制透明质酸酶。

[0079] 实施例5:伸长海条藻提取物的抗弹性蛋白酶活性的管内(in tubo)评价

[0080] 与其天然底物接触时,弹性蛋白酶将裂解N-琥珀酰-(Ala)3-对硝基苯胺。该酶的抑制剂的存在使得降低水解的速率成为可能。

[0081] 该活性的揭示对应于底物水解之后介质中所释放的对硝基苯胺的吸光度测量值(OD)。当酶不被抑制时,所释放的对硝基苯胺的浓度增加,并且观察到黄色。

[0082] 所采用的抗弹性蛋白酶测定基于分光光度法并且在96孔微板中进行。使用猪胰弹性蛋白酶作为酶以及N-琥珀酰-(Ala)3-对硝基苯胺作为底物,监测对硝基苯胺的释放。反应混合物含有25μL的样品、25μL的0.2M Tris-HCl缓冲液(pH 8)、25μL的弹性蛋白酶。将混合物在37℃下预温育15min。然后,添加100μL的作为底物的N-琥珀酰-(Ala)3-对硝基苯胺。在37℃下温育30min之后,在405nm下监测吸光度。使用弹性蛋白酶抑制剂作为阳性对照。

[0083] 在褐藻多酚中的不同的未纯化和纯化的伸长海条藻提取物(如分别在实施例1a和1b中所获得的)相对于苯乙基间苯二酚所获得的结果显示于图5中。表明伸长海条藻的纯化

提取物具有最好的抗弹性蛋白酶活性，而伸长海条藻的未纯化提取物具有显著的抗弹性蛋白酶活性。表明伸长海条藻提取物可以抑制弹性蛋白酶。

[0084] 实施例6：伸长海条藻提取物的抗胶原酶活性的管内(in tubo)评价

[0085] 通过确定提取物延迟细菌溶组织梭状芽孢杆菌(Clostridium histolyticum)(ChC)的胶原酶与荧光肽底物(MMP-2)的酶促反应的能力，通过在320nm(激发)和405nm(发射)下的荧光分光光度法进行抗衰老活性的评估。使用PADS(膦酰二肽硫酸二钠)作为阳性参照。

[0086] 对于伸长海条藻提取物(如分别在实施例1a和1b中所获得的)相对于苯乙基间苯二酚所获得的结果显示于图6中。显示伸长海条藻的纯化提取物以及伸长海条藻的未纯化提取物具有显著的抗胶原酶活性。表明伸长海条藻提取物可以抑制胶原酶。

[0087] 实施例7：老化斑-老年性着色斑的离体测试

[0088] i)皮肤外植体处理

[0089] 通过用以200μM的H_2O_2进行2小时的化学全身性处理诱导人新鲜皮肤外植体(来自女性供体，35岁)的真皮成纤维细胞衰老。为了评价伸长海条藻提取物局部应用的影响，对外植体进行了如下处理：

[0090] 在衰老诱导之后，用新鲜培养基更新皮肤培养基，并且a)用3％(v/v)伸长海条藻提取物(纯化的提取物)局部处理皮肤外植体，或者b)对于未处理的衰老条件，不处理皮肤外植体。未处理的基础对照的其他皮肤外植体不进行处理，并且仅每天更新它们的培养基。

[0091] 每天重复这些条件持续5天。取样之后，将皮肤外植体固定在福尔马林中，然后脱水并且包埋在石蜡中。

[0092] ii)色素沉着过度(SDF1)

[0093] 方法：SDF1免疫染色

[0094] 将包埋在石蜡中的外植体切成4μm厚，然后脱蜡。在EDTA(乙二胺四乙酸)pH 8缓冲液中进行抗原修复，然后用牛血清白蛋白饱和皮肤样品的非特异性位点。然后将样品与抗SDF1抗体在4℃下温育过夜，随后冲洗并且与偶联至Alexa Fluor 488的二抗在室温下在黑暗中再温育45min。冲洗样品并且用盖玻片和含有DAPI(4′,6-二脒基-2-苯基吲哚)的封固剂组装。对SDF1表达的阳性细胞进行评分。

[0095] 结果：通过SDF1表达控制色素沉着过度

[0096] 与未处理的皮肤(图7a，左侧)相比，证实了衰老诱导显著减少了表达SDF1的成纤维细胞的数目(图7a，中间)，这意味着色素沉着控制的丧失。用3％的HEX处理衰老外植体持续5天之后，观察到SDF1表达的显著增加(图7a，右侧)，导致色素沉着控制的潜在激活。

[0097] 对于每种条件，在真皮表皮连接处附近表达SDF1的成纤维细胞的数目的评分(图7b)也证实了所述结果。

[0098] 表明伸长海条藻提取物可以增加SDF1表达，从而激活色素沉着控制、特别是与老年性着色斑有关的色素沉着控制。

[0099] iii)色素沉着过度(Fontana Masson染色)

[0100] 方法：使用Fontana Masson染色和成像分析的黑色素定量

[0101] 将福尔马林固定和石蜡包埋的外植体切成4μm厚，然后脱蜡，并且然后用Fontana Masson银方法对黑色素染色。用Axio Observer倒置荧光显微镜(Zeiss)以明场模式收集图

像。

[0102] 使用两个开源光学成像软件程序定量黑色素。在GIMP-GNU图像处理程序中打开Fontana-Masson组织切片的显微照片(jpeg格式)。选取对应于染色切片上黑色素颗粒的棕黑色信号、复制并且粘贴成新的图像并且保存为jpeg文件;该jpeg文件仅由白色背景上的黑色/棕色(黑色素颗粒)组成。随后使用ImageJ程序打开该图像。创建图像的直方图,其将图像中的像素的总数分成255个跨越可见光谱的颜色类别。通过对来自黑色素峰的每个通道的适当计数进行切割并求和来确定对应于棕黑色(黑色素)的峰。供选择地,可以将对应于色素峰的数字粘贴到Excel电子表格中并求和。色素沉着指数是通过取由Image J确定的代表性20×场中黑色像素的绝对数并且将其乘以10^{-3}获得的。

[0103] 结果:使用Fontana Masson染色和成像分析控制色素沉着过度

[0104] 在相同的皮肤外植体上,进行Fontana Masson染色以使施用前后的黑色素含量可视化(图8a)。

[0105] 证实了与未处理的条件相比,H_2O_2已经通过抑制SDF1表达诱导黑色素含量的显著增加。该结果证明,模型模拟了在老年性着色斑中发现的色素沉着过度。

[0106] 局部施用3%的HEX持续5天使黑色素含量急剧降低到与我们在未处理的条件下观察到的相同的水平,这可能是由于由衰老成纤维细胞对SDF1表达的再激活。

[0107] 使用成像分析计算色素沉着指数(图8b)证明如通过在H_2O_2存在下的结果所观察到的,存在伴随衰老诱导的显著色素沉着过度,为+145%。局部施用3%的HEX持续5天导致黑色素生物发生的显著减少,如通过黑色素含量的减少所观察到的(图8c)。

[0108] 实施例8:老化斑-日光性着色斑的离体测试

[0109] i)皮肤外植体处理

[0110] 每天用UV-A(9J/cm^2)和UV-B(0.33J/cm^2,比率UV-A/UV-B=27)照射人新鲜皮肤外植体(来自女性供体,35岁)持续5天,总共5次单次照射。在每次单次照射之后,用3%(v/v)伸长海条藻提取物(纯化的提取物)局部处理三个外植体,并且其他外植体不进行处理,用于未处理的UV暴露条件。对照组的外植体未接受任何照射或处理。取样之后,将外植体切成两部分,一部分保存在OCT中并且用于进行羰基评分成像,并且另一部分固定在福尔马林中,然后脱水并且包埋在石蜡中用于Fontana Masson染色和互补免疫化学。照射后8小时的最后一天收集上清液以便测量IL-8的产生。

[0111] ii)色素沉着过度(SDF1)

[0112] 对于方法,参见实施例7ii)

[0113] 结果:通过SDF1表达控制色素沉着过度

[0114] 文献中描述了每日UV暴露通过诱导皮肤的细胞衰老而导致皮肤过早老化。通过进行SDF1免疫染色,证明了UV诱导的衰老对SDF1表达的影响。还显示了伸长海条藻提取物如何可以改变该现象。

[0115] 与未处理的皮肤(图9a,左侧)相比,证实了UV暴露显著减少了表达SDF1的成纤维细胞的数目(图9a,中间),这意味着色素沉着控制的丧失。用3%的HEX处理UV照射的外植体持续5天之后,观察到SDF1表达的显著增加(图9a,右侧),导致色素沉着控制的潜在激活。

[0116] 对于每种条件,在真皮表皮连接附近表达SDF1的成纤维细胞的数目的评分(图9b)也证实了所述结果。表明伸长海条藻提取物可以增加SDF1表达,从而激活色素沉着控制、特

别是与日光性着色斑有关的色素沉着控制。

[0117] iii)色素沉着过度(Fontana Masson染色)

[0118] 对于方法,参见实施例7iii)

[0119] 结果:使用Fontana Masson染色和成像分析控制色素沉着过度

[0120] 已显示与未处理的条件相比,如使用Fontana Masson染色观察到的,UV暴露诱导皮肤外植体中黑色素含量的增加(参见图10a上图和中间图)。局部施用3%的HEX持续5天减少了UV诱导的色素沉着过度(图10a下图)。

[0121] 使用成像分析计算色素沉着指数(图10b、10c)表明,存在由UV暴露诱导的显著色素沉着过度,其在5天之后通过局部施用3%的HEX显著减少。

[0122] 表明伸长海条藻提取物可以减少由UV暴露诱导的色素沉着过度。

[0123] iv)氧化蛋白质的减少

[0124] 方法:通过羰基评分测量定量氧化蛋白质

[0125] 使用低温恒温器(Leica)获得4μm厚的外植体切片,并且用含有95%乙醇和5%乙酸的溶液固定。使用特异性荧光探针(Ex=480nm/Em=530nm)标记羰基化蛋白,该探针与羰基部分和DAPI(4',6-二脒基-2-苯基吲哚)反应用于核标记。

[0126] 用落射荧光显微镜(EVOS M5000成像系统;Thermo Fisher Scientific)收集荧光图像并且用ImageJ软件分析(Schneider,2012)。使用相同的放大倍数(10×或60×物镜)采集条件获得不同条件的图像比较。

[0127] 结果:UV暴露之后氧化蛋白质的减少

[0128] 证明UV暴露诱导氧化蛋白质的增加,如通过红色荧光检测的强度所观察到的。该效应与负责检测和消除氧化蛋白质的蛋白酶体活性的降低相关。

[0129] 局部施用3%的HEX持续5天之后,观察到氧化蛋白质的显著减少。因此,证明HEX能够再激活在日光性着色斑中受到严重影响的蛋白酶体活性(图11a)。

[0130] 信号的定量证实了观察结果并且显示在UV暴露之后氧化蛋白质显著增加+24%,这通过局部施用3%的HEX而显著降低,为-40%(图11b)。

[0131] 表明伸长海条藻提取物可以减少UV暴露之后的氧化蛋白质的存在。

[0132] v)UV暴露之后脂褐素体累积的减少

[0133] 方法:苏丹黑B染色

[0134] 使用低温恒温器获得8μm厚度的冷冻切片并且用10%福尔马林固定10分钟。在固定之后,在60℃下在以下连续浴中进行着色:在无水丙二醇中12分钟,在无水丙二醇中制备的0.7%苏丹黑B溶液中15分钟,随后在丙二醇85°和三次蒸馏水浴中漂洗。将盖玻片添加到具有水性封固剂的冷冻切片上,并且用Axio Observer倒置荧光显微镜(Zeiss)以明场模式收集图像。

[0135] 脂褐质累积的定量:

[0136] 使用两个开源光学成像软件程序定量脂褐质。在Image J软件中打开苏丹黑B组织切片的显微照片(Tif格式),并且将颜色通道分割。选择并保存更能代表苏丹黑B染色的绿色通道,然后在GIMP-GNU图像处理程序中打开。选取对应于染色切片上脂褐质的深色信号、复制并且粘贴成新的图像并且保存为jpeg文件;该jpeg文件仅由白色背景上的深色脂褐质组成。随后使用ImageJ程序打开该图像并且反转以得到呈黑色的背景和呈白色的脂褐质染

色,其对应于待测量的信号。在表皮区域中测量染色强度,得到对应于脂褐质的量的值。

[0137] 结果:UV暴露之后脂褐素体累积的减少

[0138] 评价氧化蛋白质的累积是否会导致表皮中脂褐质体的形成。使用特异性地检测脂质的苏丹黑B染色,以便在UV暴露之后使脂褐质累积可视化(Evangelou等人2017)。

[0139] 苏丹黑B染色证明UV暴露之后脂褐素体累积显著增加+69%。与未处理的条件相比,这通过UV暴露之后蓝色染色的增加而清楚可见(图12a上图和中间图、图12b))。

[0140] 在5天之后,局部施用3%的HEX将UV诱导的脂褐质体累积显著减少-39%,这也通过照片中蓝色染色的减少而观察到(图12a下图、12b)。

[0141] 该结果表明,HEX具有抗脂质氧化的保护作用,允许减少表皮中的皮肤老化的标志物脂褐质体的累积。表明伸长海条藻提取物可以减少UV暴露之后脂褐质体的累积。

[0142] vi)促炎症细胞因子(IL-8)

[0143] 方法:促炎症细胞因子(IL-8)的定量

[0144] 对于来自未照射的外植体的皮肤外植体的上清液以1:5稀释,并且对于来自照射的外植体的皮肤外植体的上清液以1:20稀释。使用人IL-8Quantikine ELISA试剂盒(Biotechne)通过ELISA剂量定量来自外植体的IL-8释放。ELISA按照供应商说明书进行。用Tecan微板读板仪(Spark)读取由该比色测定得到的光密度。

[0145] 结果:UV暴露之后炎症的减少

[0146] 已经观察到炎症反应的增加,尤其是通过促炎症细胞因子IL-8的定量,其已经证明随着UV暴露强烈增加+121%。

[0147] 局部施用3%的HEX显著且大幅减少UV诱导的IL-8的过度产生,证明HEX能够控制与日光性着色斑相关的炎症(图13)。

[0148] 表明伸长海条藻提取物可以减少UV暴露之后的炎症。

[0149] vii)UV暴露之后角质层厚度的减少

[0150] 方法:丝聚蛋白免疫染色

[0151] 将包埋在石蜡中的外植体切成4μm厚,然后脱蜡。在EDTA pH 8缓冲液中进行抗原修复,然后用牛血清白蛋白饱和皮肤样品的非特异性位点。然后将样品与抗丝聚蛋白抗体在室温下温育2小时,随后冲洗并且与偶联至Alexa Fluor 488的二抗在室温下在黑暗中再温育1小时。将样品冲洗并且用盖玻片和含有DAPI(4′,6-二脒基-2-苯基吲哚)的封固剂组装。在允许使角质层可视化的特异性丝聚蛋白染色之后,通过ImageJ软件测量角质层厚度。

[0152] 结果:表明UV暴露对皮肤屏障完整性具有影响,这是由于角质层厚度增加,转化为角质细胞之间内聚力的丧失。通过观察丝聚蛋白免疫染色,表明局部施用3%的HEX显著降低了角质层厚度,随后是丝聚蛋白表达(绿色荧光,图14a)。

[0153] 实际上,在UV暴露之后显示11μm至15μm的+26%的增厚。观察到局部施用3%的HEX使角质层厚度恢复到接近未照射条件,显示11μm的厚度,恢复了-27%(图14b)。表明伸长海条藻提取物可以减少UV暴露之后的角质层厚度。

[0154] 实施例9:增白功效的离体测试

[0155] i)皮肤外植体处理

[0156] 将来自3名亚洲人、3名非洲人和3名高加索人受试者的皮肤碎片切成1cm2的片,并且使用抗生素洗涤三次。使用手术刀在立体显微镜下机械去除皮下脂肪和下层真皮(lower

dermis)。

[0157] 将皮肤活检标本置于培养插入物上的空气/液体界面处的上皮最高处(过滤器孔径12μm;Costar,VWR International,Fontenay-sous-Bois,France)。将这些插入物置于十二孔板上,在37℃下在具有5%CO_2的加湿培养箱中温育14天。

[0158] 将培养基添加至孔中,使得培养基的表面与过滤器齐平。用含有抗生素、L-谷氨酰胺、牛垂体提取物、生长因子和胎牛血清(DAP,Neuf-Brisach,France)的杜氏(Dulbecco's)最低必需培养基(Invitrogen Corporation,Paisley,UK)保存器官培养物。

[0159] 与未处理的皮肤相比,在14天期间每天将伸长海条藻提取物3%(未纯化的提取物)、作为阳性对照的苯乙基间苯二酚0.5%和氢醌2%(SIGMA H9003)局部施用在皮肤碎片的表皮上。

[0160] 比较了4种条件(一式三份进行):

[0161] -未处理的皮肤

[0162] -被伸长海条藻提取物3%(v/v)处理的皮肤

[0163] -被苯乙基间苯二酚0.5%(w/v)处理的皮肤

[0164] -被氢醌2%(w/v)处理的皮肤。

[0165] ii)方法:Fontana Masson染色组织学分析和专家增白评分

[0166] 为了测试脱色素产品,与未处理的皮肤相比,评价来自处理的皮肤的表皮的基底细胞层的黑素细胞和邻近的角质细胞中存在的黑色素。

[0167] 在第14天将样品用福尔马林固定并石蜡包埋。然后通过Fontana Masson银方法将切片(4μm)进行黑色素的染色(参见实施例4iii)。

[0168] 在光学显微镜下以×40放大倍数对表皮的约300个基底细胞进行含有黑色素的细胞的定量计数。

[0169] 计数两种类型的细胞:

[0170] -得分1:无色素沉着细胞或呈现在细胞质中分离的稀少黑色素的细胞

[0171] -得分3:在整个细胞质中呈现显著黑色素的细胞

[0172] 将表皮黑色素含量计算为每种得分中表皮细胞的百分比。

[0173] 结果:

[0174] a)高加索人皮肤外植体的增白(图15a、b)

[0175] 经14天局部施用3%的未纯化的伸长海条藻提取物在高加索人皮肤外植体上显著降低了高度色素沉着细胞的百分比(-21.6%),并且显著增加了无色素沉着细胞(+36.7%),证明3%的伸长海条藻提取物在高加索人皮肤上的增白功效。

[0176] 相比之下,苯乙基间苯二酚仅显著增加无色素沉着细胞的百分比(+38.8%),但对高度色素沉着细胞没有影响(-4.2%)。可以得出结论,在高加索人皮肤外植体上,3%伸长海条藻提取物比苯基乙基间苯二酚更有效。

[0177] 3%的伸长海条藻提取物也显著优于2%的氢醌,2%的氢醌在高加索人皮肤上对无色素沉着细胞或高度色素沉着细胞未显示任何显著的影响。

[0178] b)亚洲人皮肤外植体的增白(图16a、b)

[0179] 经14天局部施用3%的未纯化的伸长海条藻提取物在亚洲人皮肤外植体上显著降低了高度色素沉着细胞的百分比(-18.9%),并且显著增加了无色素沉着细胞(+75.9%),

证明3%的伸长海条藻提取物在亚洲人皮肤上的增白功效。

[0180] 局部施用苯乙基间苯二酚显著增加无色素沉着细胞的百分比(+110.7%)并且显著降低色素沉着细胞的百分比(-29.2%)。因此,在亚洲人皮肤外植体上,3%伸长海条藻提取物与苯乙基间苯二酚一样有效。

[0181] 3%的伸长海条藻提取物对增白活性也与2%的氢醌一样有效,其引起亚洲人皮肤上无色素沉着细胞的显著增加(+54.1%)和如果是高度色素沉着细胞的话则显著减少(-25.8%)。

[0182] c)非洲人皮肤外植体的增白(图17a、b)

[0183] 经14天局部施用3%的未纯化的伸长海条藻提取物在非洲人皮肤外植体上显著降低了高度色素沉着细胞的百分比(-23.6%),并且显著增加了无色素沉着细胞(+88.4%),证明3%的伸长海条藻提取物在非洲人皮肤上的增白功效。

[0184] 用苯乙基间苯二酚处理也显著增加了无色素沉着细胞的百分比(+91.7%),并且显著降低了色素沉着细胞的百分比(-22.7%),表明在非洲人皮肤外植体上,3%伸长海条藻提取物与苯乙基间苯二酚一样有效。

[0185] 然而,在局部施用在非洲人皮肤上之后,3%的伸长海条藻提取物对增白活性比2%的氢醌更有效,该氢醌对无色素沉着细胞和高度色素沉着细胞未显示任何显著的结果。

[0186] 表明伸长海条藻提取物对不同类型的皮肤具有增白作用。

[0187] 实施例10:临床测试-高加索人志愿者的手上的色素沉着斑的减少

[0188] i)所使用的INCI配方

[0189]

INCI名称	安慰剂配方(%)	苯乙基间苯二酚配方(%)	HEX配方(%)
水(AQUA)/水(WATER)	89.70	89.40	86.70
鲸蜡醇,甘油硬脂酸酯,PEG-75硬脂酸酯,鲸蜡醇聚醚-20,硬脂醇聚醚-20	5.0	5.0	5.0
新戊酸异癸酯	4.5	4.5	4.5
苯乙基间苯二酚	-	0.3	-
伸长海条藻提取物(纯化的提取物)	-	-	3.0
苯氧乙醇,对羟基苯甲酸甲酯,对羟基苯甲酸丙酯,对羟基苯甲酸乙酯	0.4	0.4	0.4
二甲聚硅氧烷	0.3	0.3	0.3
芳香剂,水杨酸苄酯,芳樟醇,D-柠檬烯	0.1	0.1	0.1

[0190] ii)小组描述

[0191] 本研究是双盲、随机和安慰剂对照研究。评估基于用3%的霜剂HEX(活性产品)、0.3%的霜剂苯乙基间苯二酚和霜剂安慰剂所获得的结果之间的受试者内比较。在受控气氛中在21±1℃的温度和50±10%的湿度下进行测量。本研究对39名志愿者(年龄50至75岁的健康高加索妇女,平均年龄:61.7±5.6岁)进行,在他们的手上具有色素沉着老化斑。

[0192] iii)处理

[0193] 对2组进行研究,每组约20名志愿者(总共39名志愿者,年龄为50至70岁)。在手上

每天施用两次霜剂配方。在处理之前以及28和56天之后进行评价。第1组在一只手上施用了安慰剂，并且在另一只手上施用了3％的HEX，第2组在一只手上测试了3％的HEX，而在另一只手上测试了0.3％的苯乙基间苯二酚。

[0194] iv)方法：**Mexameter®**分析

[0195] 测量基于吸收原理。MEXAMETER MX 18探针发射三种限定波长的辐射。接收器测量由皮肤反射的光的反射。发射器和接收器的位置确保仅测量漫射光。用限定量的发射光，可以计算由皮肤所吸收的光的量。由两种波长测量黑色素。根据黑色素的不同吸收峰选择波长。对于红斑(皮肤发红)的测量，使用两种不同的波长来测量表皮的吸收能力。其中之一对应于血红蛋白的吸收光谱。选择其他波长以具有影响皮肤的颜色的其他色素。

[0196] v)结果：

[0197] a)黑色素含量的降低(图18)

[0198] 相对于D0，3％的HEX能够显著降低28天和56天之后皮肤的黑色素含量，分别为-13.8％和-21.3％。

[0199] 安慰剂霜剂在本研究期间引起轻微的增白作用，但是3％的HEX比安慰剂显著更多地降低黑色素含量，在HEX施用28天之后显示2.2倍更有效的增白活性。

[0200] 用0.3％苯乙基间苯二酚获得与用3％的HEX相同的黑色素减少功效，因为在两种产品之间未观察到显著差异。

[0201] 表明伸长海条藻提取物可以减少皮肤的黑色素含量，从而减少皮肤上的色素沉着斑，特别是高加索人志愿者的手上的色素沉着斑。

[0202] b)皮肤发红的减少(图19)

[0203] 相对于D0，3％的HEX能够显著减少28天和56天之后皮肤的皮肤发红，分别为-8.9％和-14.8％。

[0204] 安慰剂在本研究期间引起发红的轻微减少，但3％的HEX对皮肤发红的减少比安慰剂显著更有效，显示与安慰剂相比，在HEX施用56天之后1.6倍更有效的发红减少。

[0205] 苯乙基间苯二酚证明了与我们用安慰剂所获得的相同的功效。该结果证明HEX比苯乙基间苯二酚更有效地减少手上的色素沉着老化斑上的皮肤发红。

[0206] 表明伸长海条藻提取物可以减少色素沉着老化斑上的皮肤发红、特别是在高加索人志愿者的手上的色素沉着老化斑的皮肤发红。

[0207] vi)使用**DermaScop®**的说明性图片

[0208] 在产品施用之前和之后，通过Dermascop@在手上的特定色素沉着老化斑上拍摄说明性图片。这些图片仅用于效果的定性评价。类似于0.3％的苯乙基间苯二酚功效，观察到3％的HEX对老化斑减少的明显的积极效果。安慰剂对其未显示任何积极影响。

[0209] 实施例11：临床测试-亚洲人志愿者的面部色素沉着斑的减少

[0210] i)所使用的INCI配方

[0211] 使用了实施例10i)中所描述的配方。

[0212] ii)小组描述

[0213] 本研究是双盲、随机和安慰剂对照研究。评估基于用3％的霜剂HEX(活性产品)、0.3％的霜剂苯乙基间苯二酚和霜剂安慰剂所获得的结果之间的受试者间比较。在受控气氛中在21±1℃的温度和50±10％的湿度下进行测量。本研究对72名志愿者(年龄45至65岁

的健康亚洲妇女)进行,在他们的面部具有色素沉着老化斑。

[0214] iii)处理

[0215] 对2组进行研究,每组36名志愿者(总共72名志愿者)。在面部每天施用两次霜剂配制品。在处理之前以及28和56天之后进行评价。第1组在脸的一侧上施用了安慰剂,并且在脸的另一侧上施用了3%的HEX。第2组在脸的一侧上测试了3%的HEX,而在脸的另一侧上测试了0.3%的苯乙基间苯二酚。

[0216] iv)方法:通过VISIA CR2.0的老化斑分析

[0217] 使用了来自**CANFIELD®**成像系统的装置$VISIA_R$。其允许用不同类型的照明和非常快速的图像捕获来拍摄图片。重新定位的控制直接发生在数据处理屏幕上,在每次采集时使用图像的叠加可视化。

[0218] 在多光谱成像和分析(白光、UV或偏振光-平行或交叉)下拍摄的一系列照片允许捕获影响肤色健康和外观的视觉信息:

[0219] 在标准光下,可以评价可见斑,特别是通过棕色或红色皮肤病变的可视化,包括雀斑、痤疮疤痕、色素沉着过度和血管病变。用交叉偏振光结合Canfield **RBX®**技术,可以评价褐斑,特别是通过分析表面下的黑色素状况。Canfield **RBX®**技术分离红色和棕色皮肤组分的独特颜色特征,用于导致颜色集中的病症(诸如蜘蛛状血管病、色素沉着过度、炎症和其他病症)的不均衡可视化。结果以病变的数量给出,病变的数量是由装置检测到的病变计数,无论其大小或强度如何。

[0220] v)结果:

[0221] a)面部可见斑的减少(图20)

[0222] 使用VISIA图片,分析了可见斑的数量。

[0223] 相对于D0,在施用28天和56天之后,3%的HEX显著减少了可见斑的数量,分别为-5.6%和-3.8%。

[0224] 安慰剂霜剂轻微减少了可见斑的数量,但明显不如含有3%的HEX的霜剂有效。此外,与安慰剂相比,3%的HEX引起可见斑的显著减少,在HEX霜剂施用56天之后功效是2.9倍。

[0225] 含有0.3%的苯乙基间苯二酚的霜剂具有非常接近用3%的HEX所获得的功效,在两种产品之间无显著差异,表明HEX与苯乙基间苯二酚一样有效地减少面部区域上的可见斑。

[0226] 表明伸长海条藻提取物可以减少面部、特别是亚洲人志愿者面部的可见斑。

[0227] b)面部褐斑的减少(图21)

[0228] 凭借VISIA分析评价了与面部的色素沉着老化斑相关的褐斑。

[0229] 相对于D0,在施用28天和56天之后,含有3%的HEX的霜剂显著减少了褐斑,分别为-3.4%和-2.7%。另外,3%的HEX比安慰剂显著更有效,在HEX霜剂28天之后,褐斑显著减少4.9倍。

[0230] 与在0.3%下的苯乙基间苯二酚相比,表明在面部褐斑的减少方面的活性略优于HEX,在两种产品之间无显著差异,表明3%的HEX对面部褐斑的减少与苯乙基间苯二酚一样有效。表明伸长海条藻提取物可以减少面部、特别是亚洲人志愿者面部的褐斑。

[0231] vi)方法:分光比色计测量

[0232] 用配备有8mm直径头的MINOLTA CM700-d**分光光度计®**进行皮肤比色测量。**分光光度计®**将被人感知的颜色转换为由三个参数组成的数字代码：

[0233] L*:对于清晰度(从暗到亮)，

[0234] a*:对于绿到红光谱，

[0235] b*:对于蓝到黄光谱。

[0236] a*和b*是色度参数,并且L*是亮度参数。

[0237] 可以描述看起来是相同颜色的两个皮肤区域之间的最细微差异。在校准阶段之后,使用脉冲氙光源和双光束系统直接在皮肤上进行测量,该双光束系统被设计成测量透射的光并且校正任何轻微偏差。

[0238] 在对色素斑点的研究期间研究参数b*(皮肤黑色素黄色)。通过计算个体类型角(ITA°)来利用b*参数,其根据下式考虑皮肤清晰度(L*)和黑色素参数(b*)来定义受试者的皮肤色素沉着程度：

[0239] $ITA^{\circ} = [Arc\ tan((L^{*}-50)/b)^{*})]x180/\pi$

[0240] vii)结果:面部色素沉着斑区域b*参数的减小(图22)

[0241] 使用分光比色计并且尤其是聚焦于b*参数,对来自色素沉着老化斑区域的颜色进行了补充分析。

[0242] 含有3％的HEX的霜剂显著减小作为黄色色素沉着的b*参数,其可能与褐黑素含量(黄色天然色素)相关。3％的HEX也显著优于安慰剂,显示在施用28天和56天之后两种产品之间存在显著差异。

[0243] 关于苯乙基间苯二酚的功效,通过在施用28天和56天之后b*参数的显著减小(意味着皮肤黄色的降低)观察到了与3％的HEX相同的增白功效。因此3％HEX与0.3％苯乙基间苯二酚对亚洲人志愿者面部关于色素沉着老化斑的b*参数的减小一样有效。表明伸长海条藻提取物可以减小面部、特别是亚洲人志愿者面部的关于色素沉着老化斑的b*参数。

[0244] 实施例12:临床测试-非洲人志愿者的面部的色素沉着过度斑的减少

[0245] i)所使用的INCI配方

[0246] 使用了实施例10i)中所描述的配方。

[0247] ii)小组描述

[0248] 本研究是双盲、随机和安慰剂对照研究。评估基于用3％的霜剂HEX(活性产品)、0.3％的霜剂苯乙基间苯二酚和霜剂安慰剂所获得的结果之间的受试者间比较。在受控气氛中在20℃的温度和40％的湿度下进行测量。本研究对70名志愿者(年龄19至57岁)进行,在他们的面部具有色素沉着过度斑。

[0249] iii)处理

[0250] 对3组进行研究。在整个面部每天施用两次霜剂配制品。在处理之前以及28和56天之后进行评价。第1组和第2组各自具有25名志愿者,分别施用了安慰剂和3％的HEX,并且第3组具有20名志愿者,施用了0.3％的苯乙基间苯二酚。

[0251] iv)方法：**Mexameter®**分析

[0252] 参见实施例10iv)

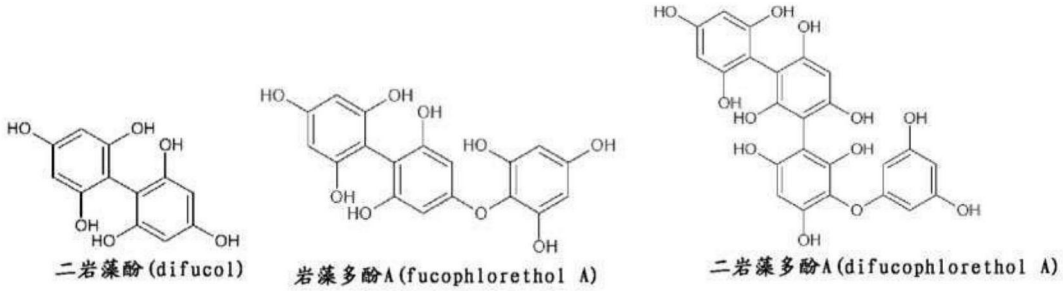
[0253] v)结果：

[0254] 黑色素含量的降低(图23)

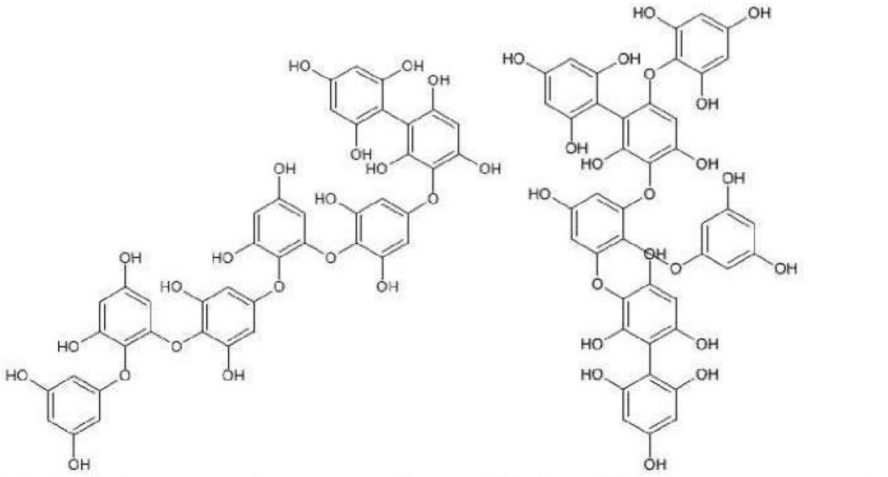
[0255] 相对于D0,3%的HEX能够显著降低56天之后的黑色素含量,为-3.4%。在施用56天之后,该效果也显著不同于安慰剂,为-4.9%(图23左图)。

[0256] 此处作为基准使用的苯乙基间苯二酚仅在28天之后引起色素沉着过度区域上黑色素含量的轻微降低,具有-2.1%的显著效果,其在56天之后未保持。仅在施用28天之后,该效果显著不同于安慰剂,为-4.3%(图23右图)。该结果证明,苯乙基间苯二酚对来自非洲人皮肤的色素沉着过度斑的减少似乎不如伸长海条藻提取物有效。

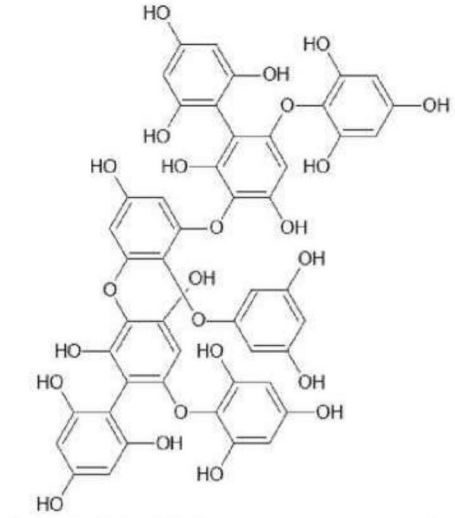
[0257] 已经比较了两种产品的功效,并且观察到无相关差异,证明伸长海条藻提取物对与D0和安慰剂的比较相关的非洲人皮肤上的色素沉着过度斑的减少与基准一样有效。表明伸长海条藻提取物可以减少皮肤上、特别是非洲人志愿者皮肤上的色素沉着过度斑。



二岩藻酚(difucol) 岩藻多酚A(fucophlorethol A) 二岩藻多酚A(difucophlorethol A)



岩藻戊多酚A(fucopentaphlorethol A) 或 双岩藻四多酚A(bisfucotetraphlorethol A)



双岩藻戊多酚A(Bisfucopentaphlorethol A)

图1

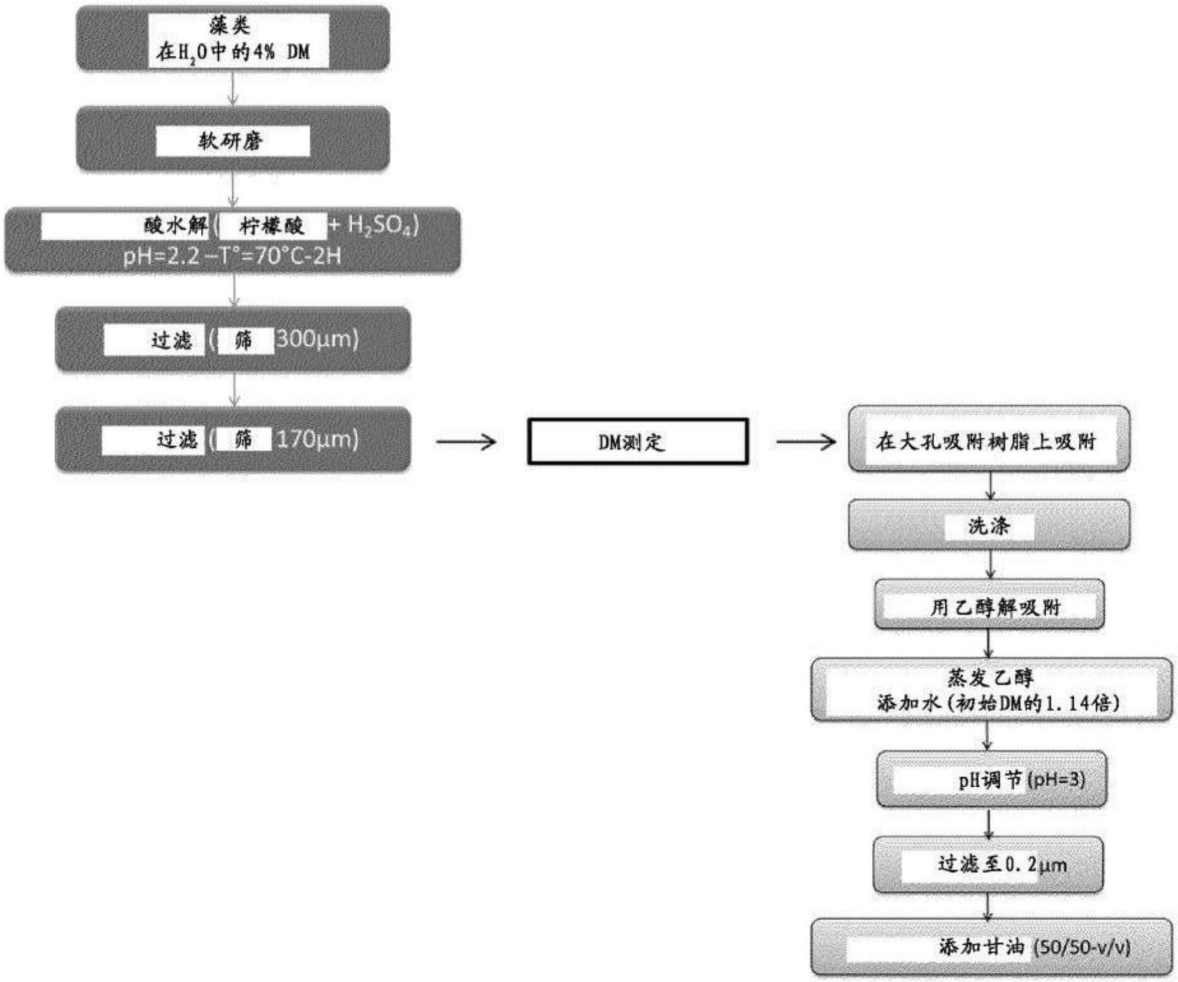

藻类
在H_2O中的4% DM
软研磨
酸水解(柠檬酸+H_2SO_4)
pH=2.2 -T°=70°C-2H
过滤(筛300μm)
过滤(筛170μm)
DM测定
在大孔吸附树脂上吸附
洗涤
用乙醇解吸附
蒸发乙醇
添加水(初始DM的1.14倍)
pH调节(pH=3)
过滤至0.2μm
添加甘油(50/50-v/v)

图2

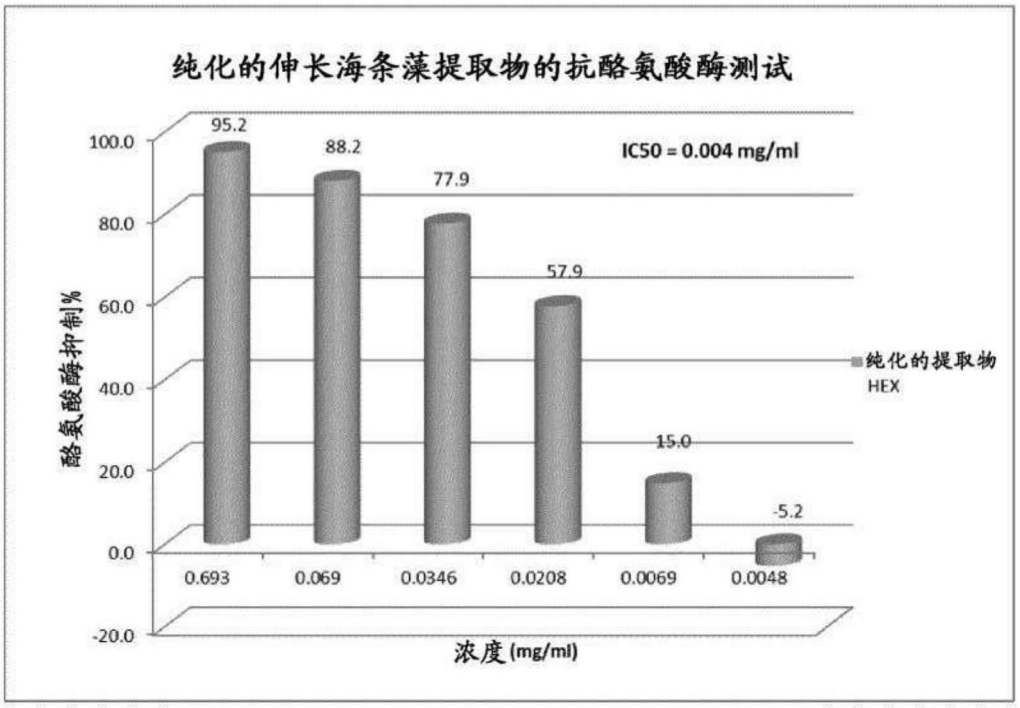

纯化的伸长海条藻提取物的抗酪氨酸酶测试
酪氨酸酶抑制%
100.0
80.0
60.0
40.0
20.0
0.0
-20.0
95.2
88.2
77.9
57.9
15.0
-5.2
IC50 = 0.004 mg/ml
0.693
0.069
0.0346
0.0208
0.0069
0.0048
浓度(mg/ml)
纯化的提取物HEX

图3a

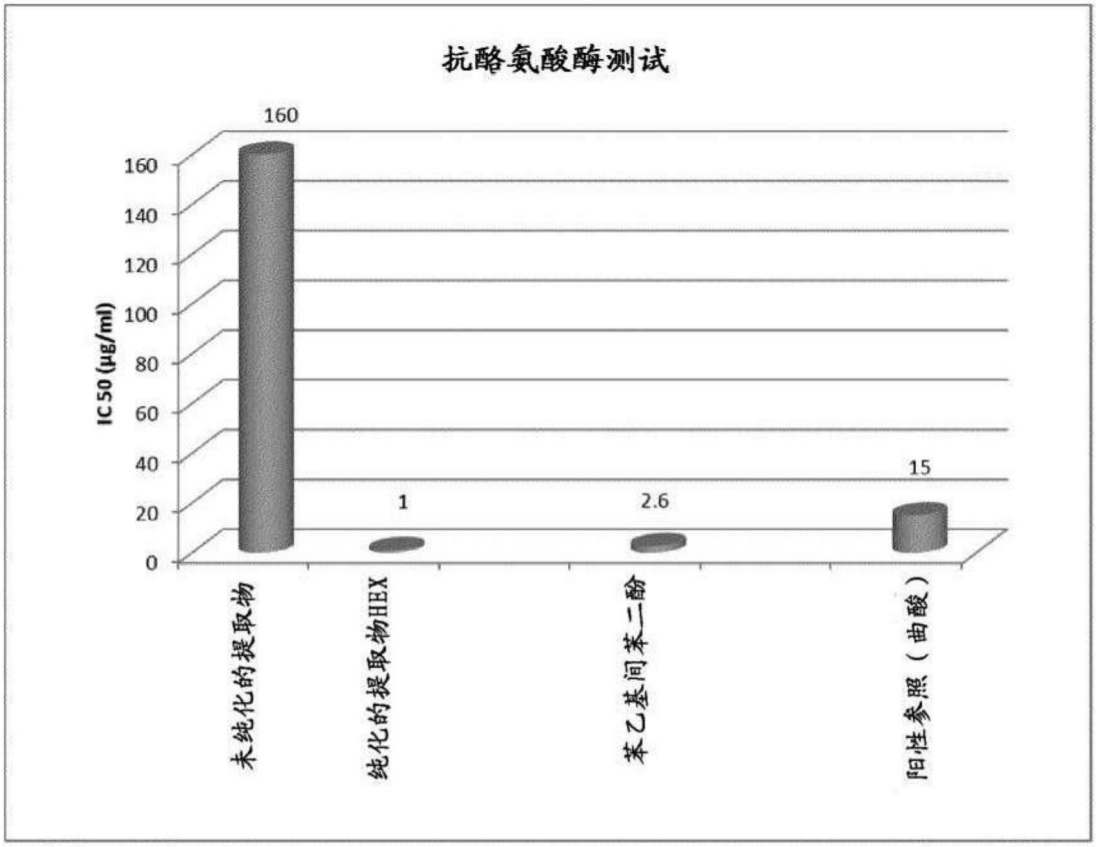

抗酪氨酸酶测试
IC 50 (μg/ml)
160
140
120
100
80
60
40
20
0
160
1
2.6
15
未纯化的提取物
纯化的提取物HEX
苯乙基间苯二酚
阳性参照（曲酸）

图3b

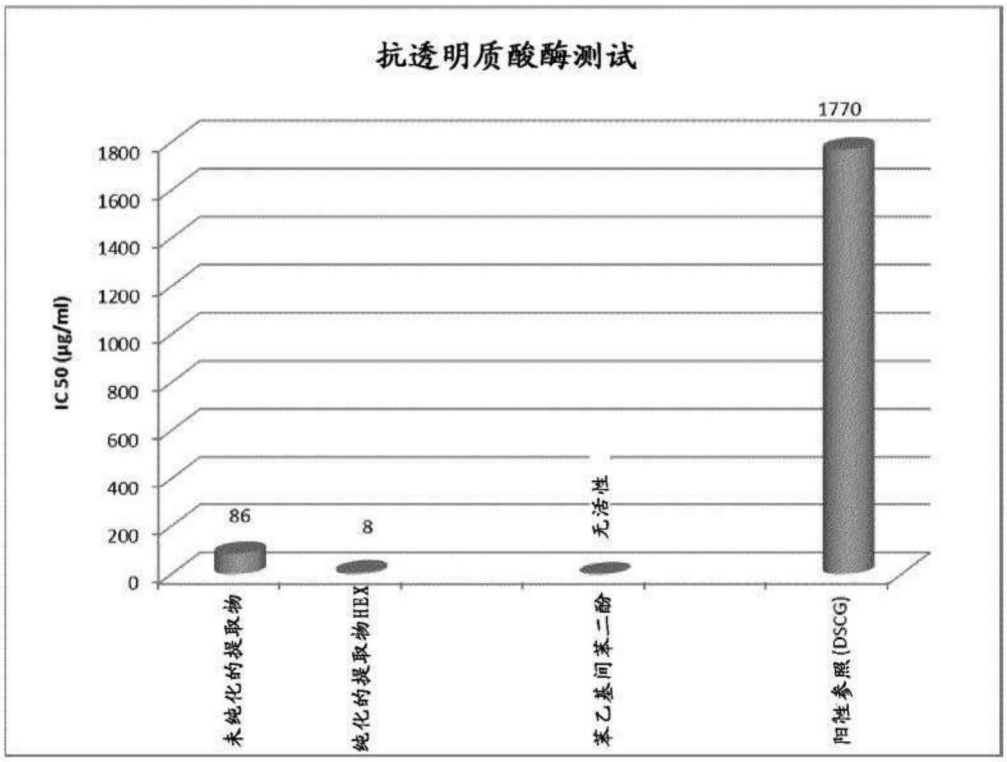

抗透明质酸酶测试
IC 50 (μg/ml)
1800
1600
1400
1200
1000
800
600
400
200
0
86
8
无活性
1770
未纯化的提取物
纯化的提取物HEX
苯乙基间苯二酚
阳性参照(DSCG)

图4

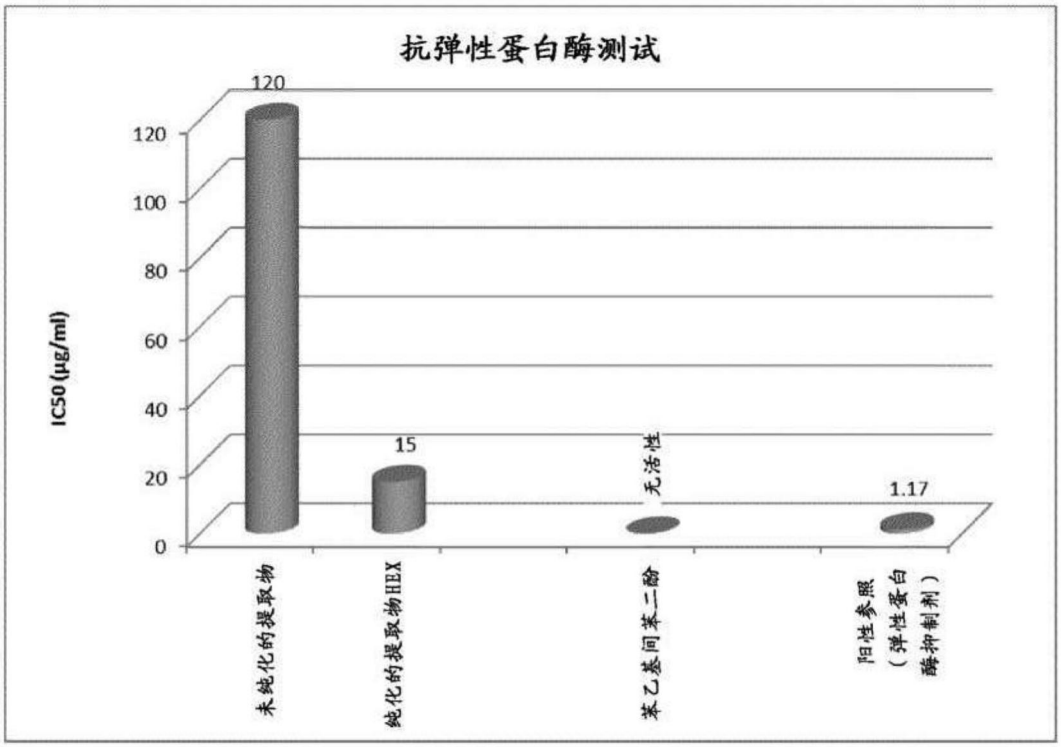

抗弹性蛋白酶测试
IC50 (μg/ml)
120
100
80
60
40
20
0
120
15
无活性
1.17
未纯化的提取物
纯化的提取物HEX
苯乙基间苯二酚
阳性参照
(弹性蛋白
酶抑制剂)

图5

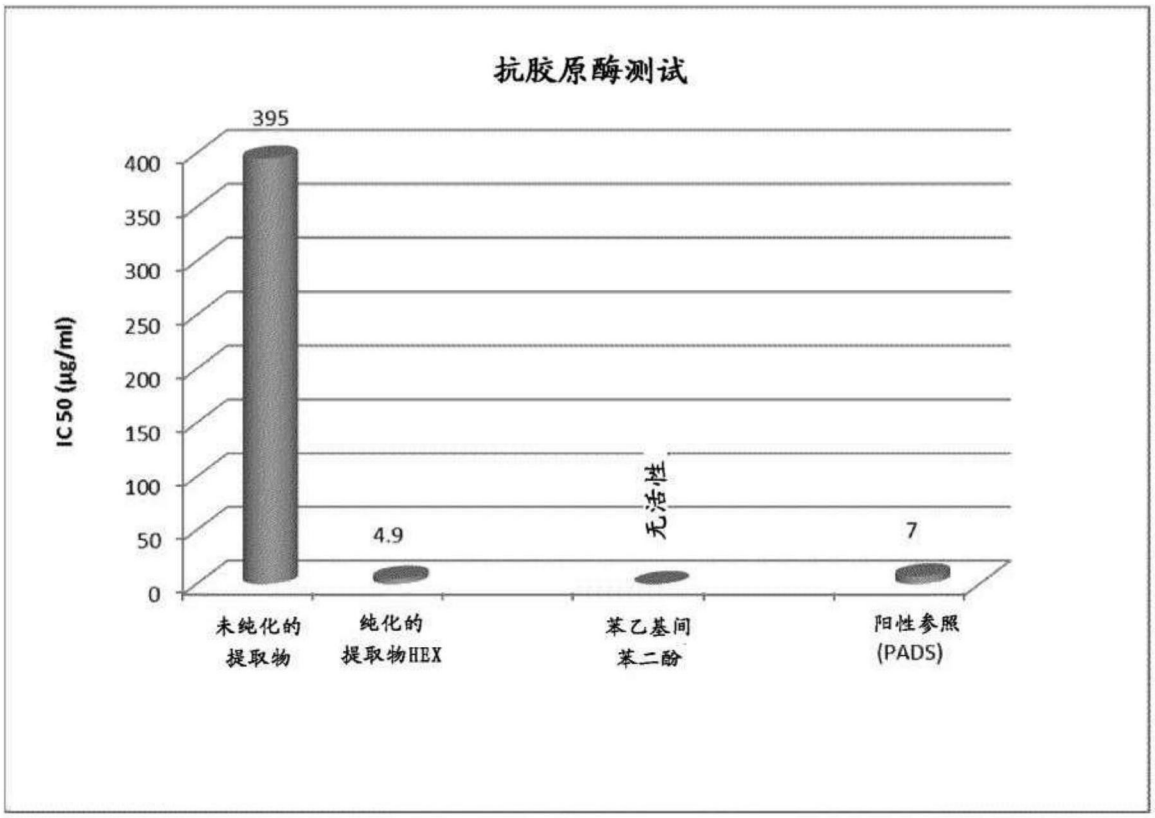
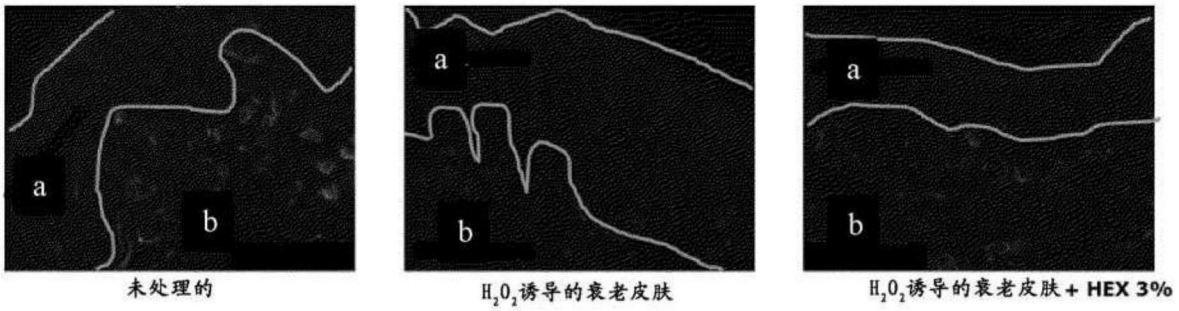


图6



a) 表皮 b)乳头状真皮

图7a

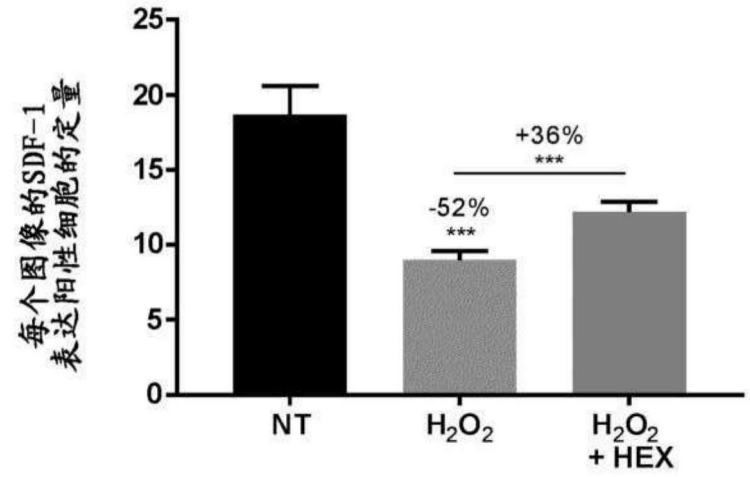

每个图像的SDF-1表达阳性细胞的定量
25
20
15
10
5
0
+36%
***
-52%
***
NT
H_2O_2
H_2O_2 + HEX

图7b

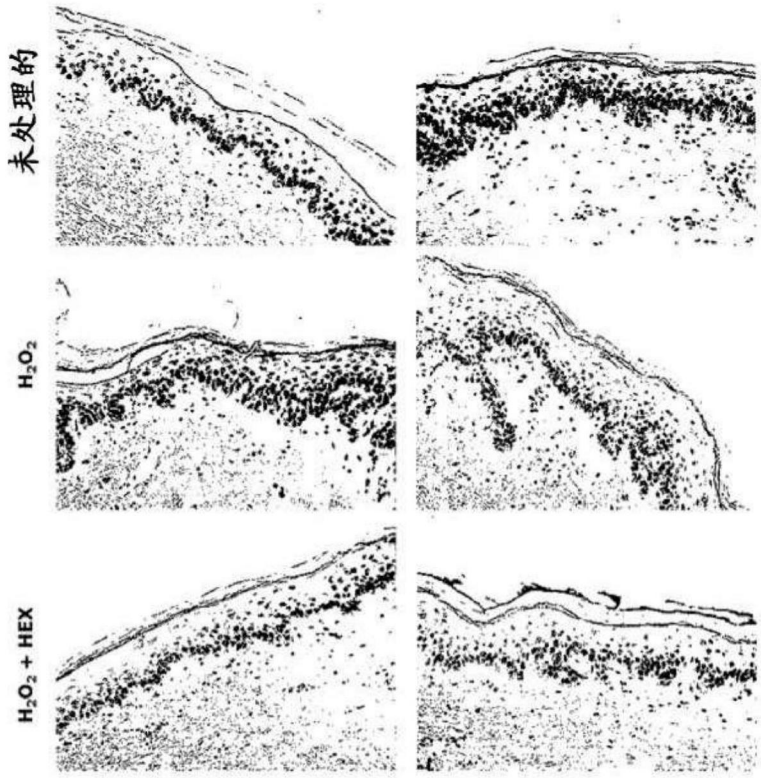

未处理的
H_2O_2
H_2O_2 + HEX

图8a

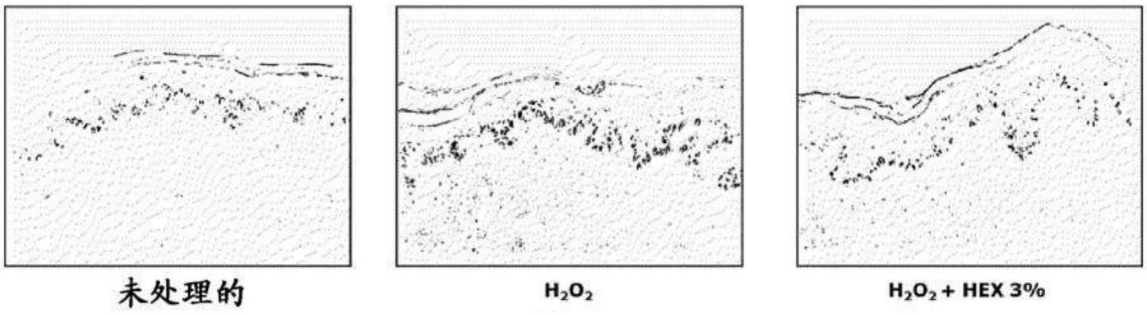


图8b

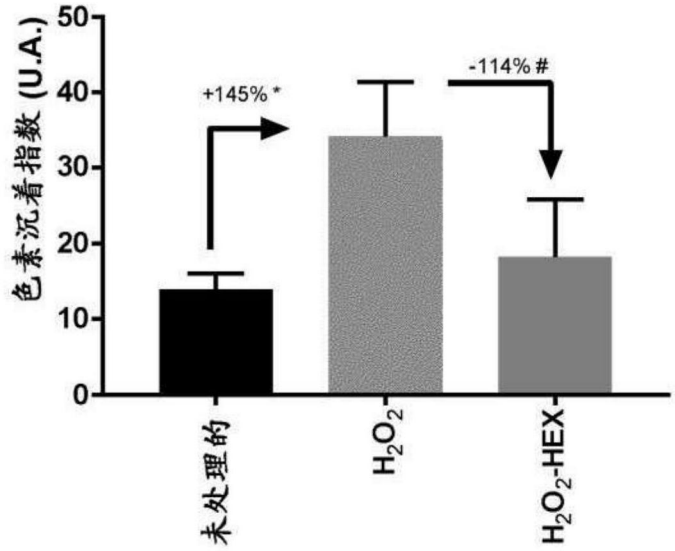
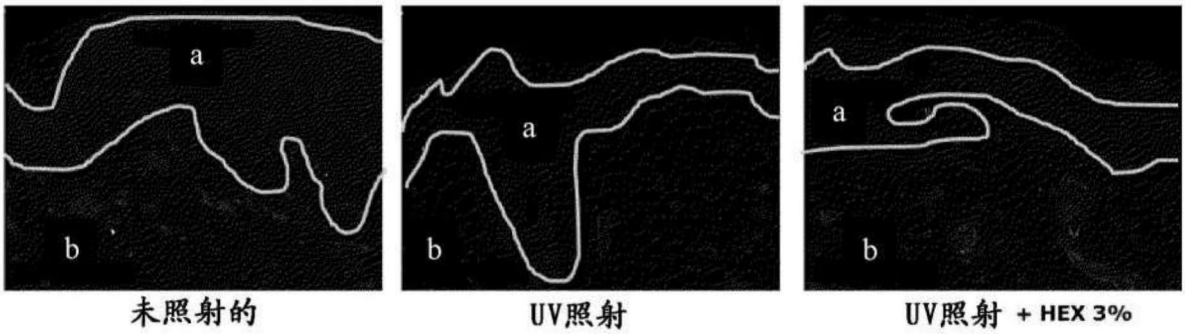


图8c



a) 表皮 b) 乳头状真皮

图9a

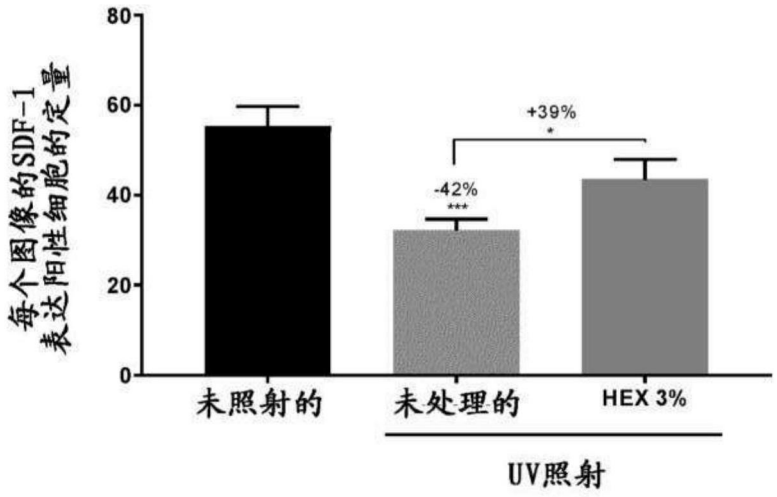

每个图像的SDF-1表达阳性细胞的定量
80
60
40
20
0
+39%
*
-42%
***
未照射的
未处理的
HEX 3%
UV照射

图9b

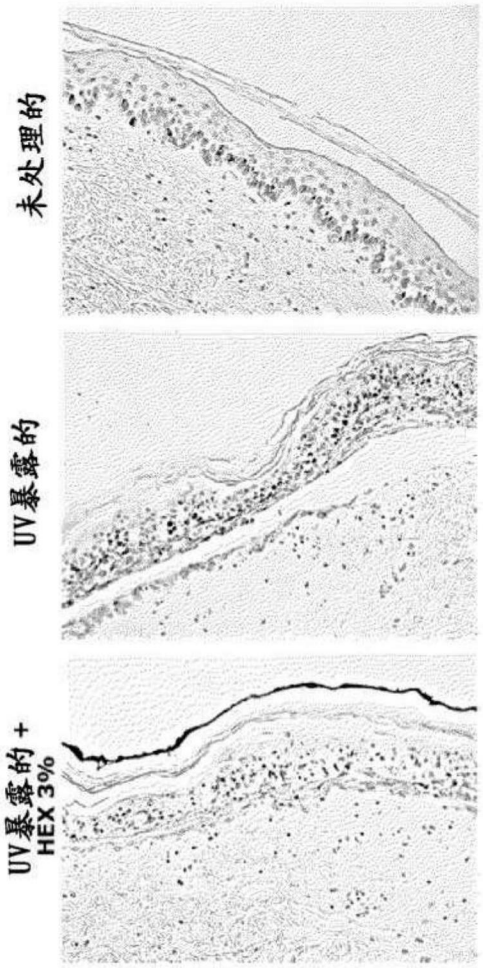

未处理的
UV暴露的
UV暴露的 + HEX 3%

图10a

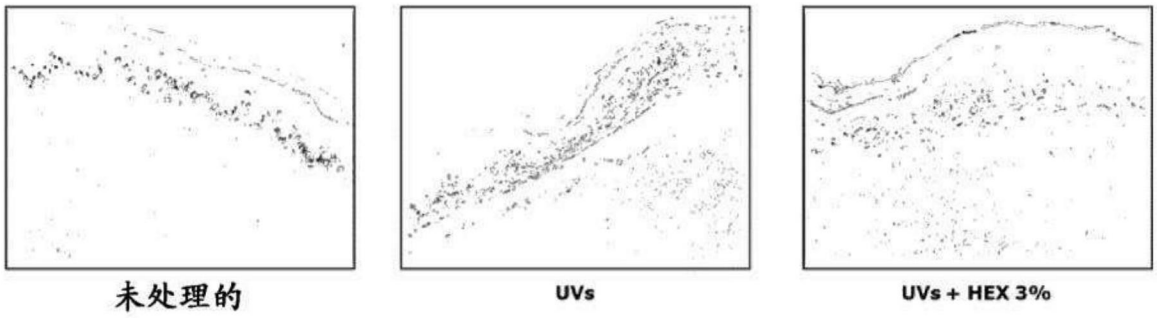


图10b

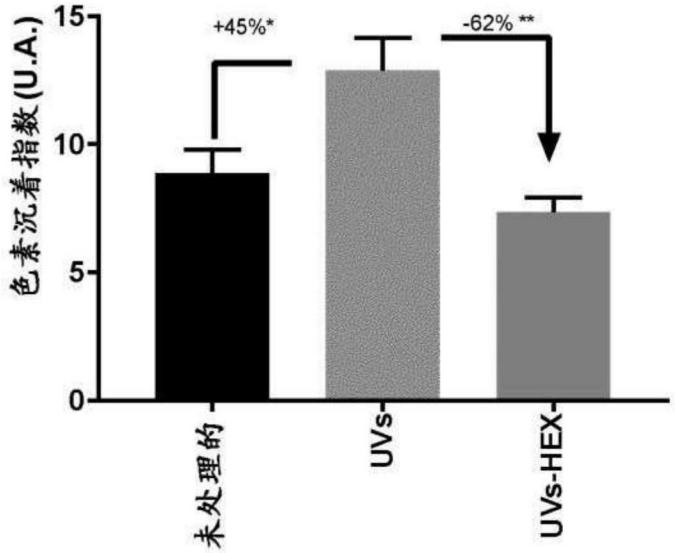


图10c

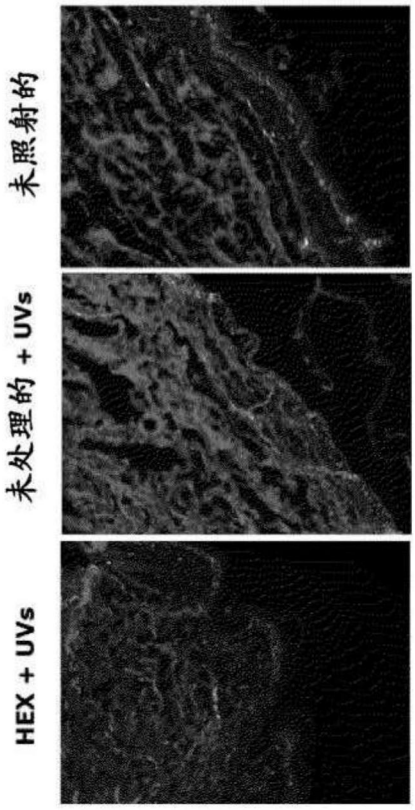

未照射的
未处理的 + UVs
HEX + UVs

图11a

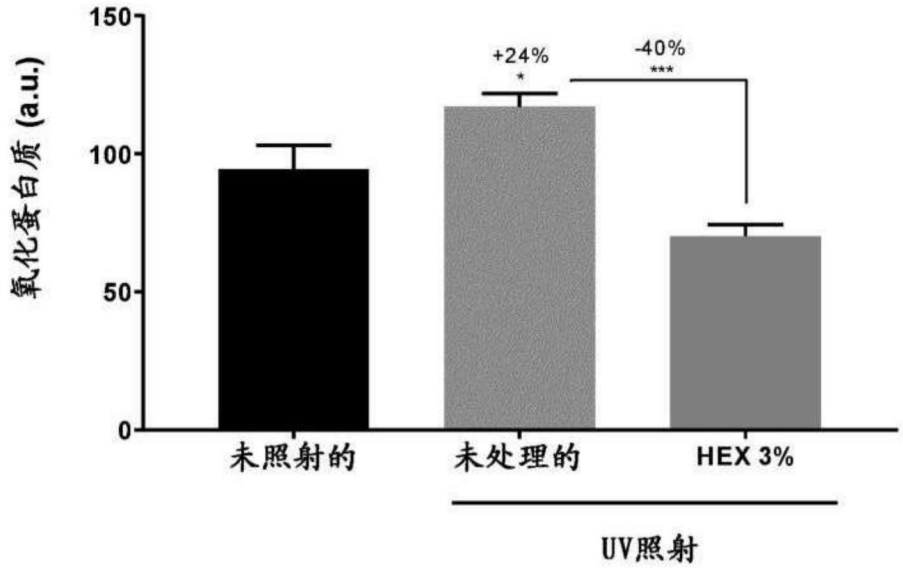

氧化蛋白质 (a.u.)
150
100
50
0
+24%
*
-40%
***
未照射的
未处理的
HEX 3%
UV照射

图11b

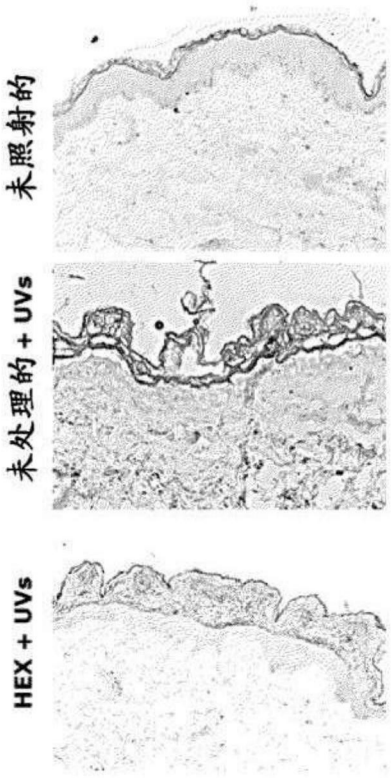

未照射的
未处理的 + UVs
HEX + UVs

图12a

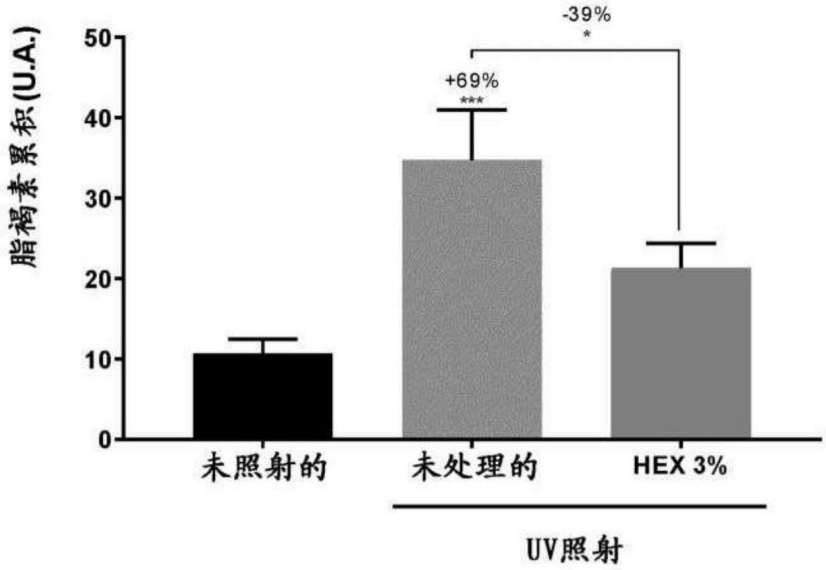

脂褐素累积(U.A.)
50
40
30
20
10
0
-39%
*
+69%
***
未照射的
未处理的
HEX 3%
UV照射

图12b

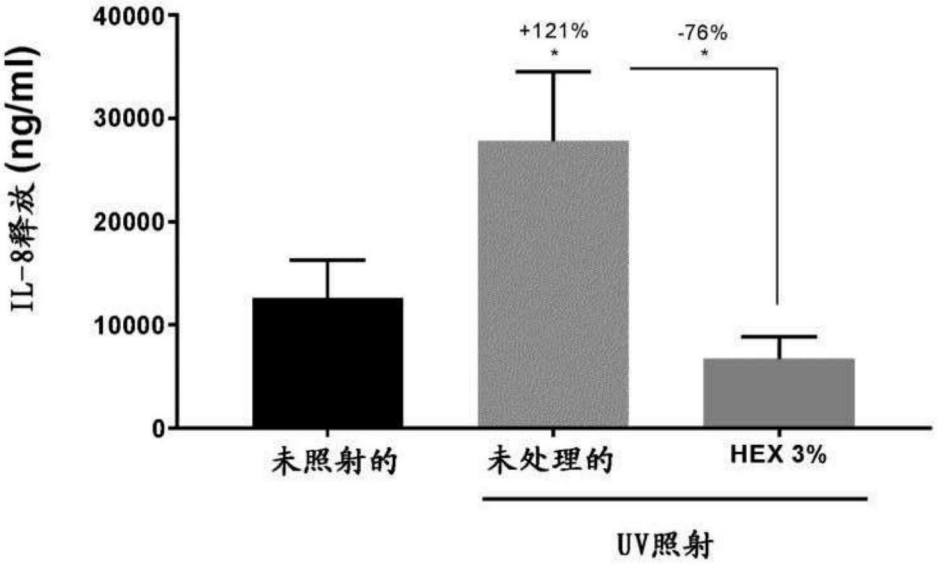

IL-8释放 (ng/ml)
40000
30000
20000
10000
0
+121%
*
-76%
*
未照射的
未处理的
HEX 3%
UV照射

图13

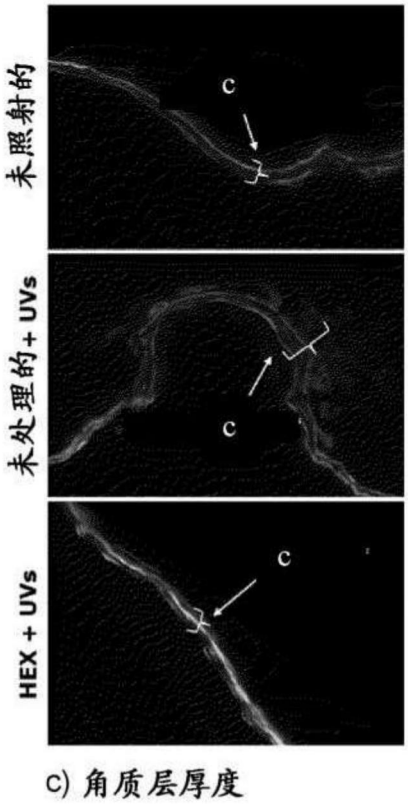

未照射的
未处理的+ UVs
HEX + UVs
c
c
c
c) 角质层厚度

图14a

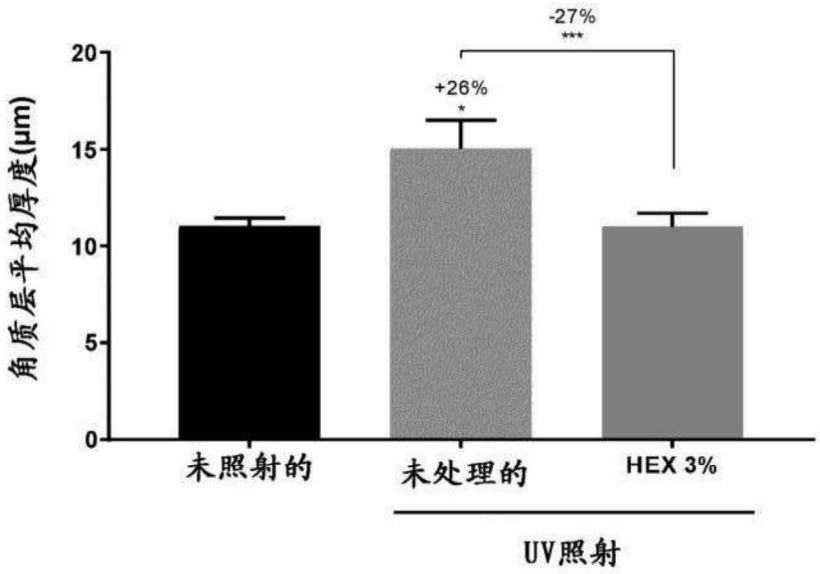

-27%
***
+26%
*
20
15
10
5
0
角质层平均厚度(μm)
未照射的
未处理的
HEX 3%
UV照射

图14b

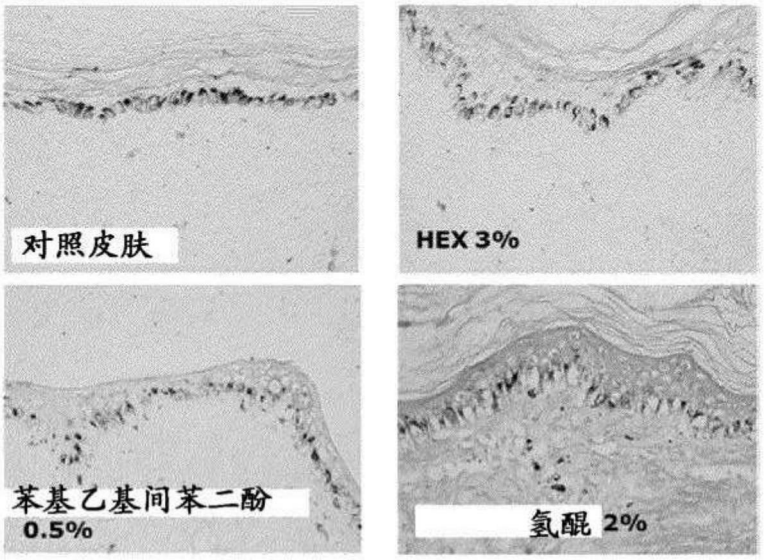

对照皮肤
HEX 3%
苯基乙基间苯二酚
0.5%
氢醌 2%

图15a

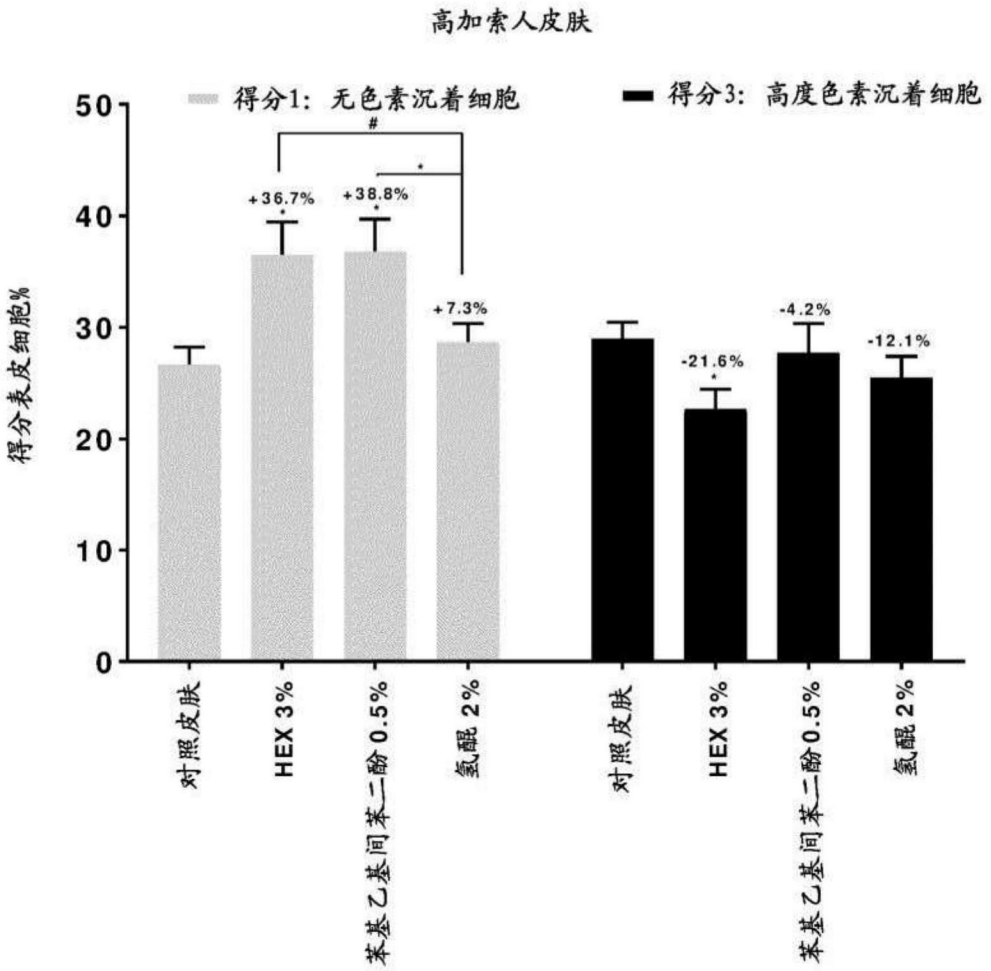

高加索人皮肤
得分1：无色素沉着细胞
得分3：高度色素沉着细胞
得分表皮细胞%
50
40
30
20
10
0
#
*
+36.7%
+38.8%
+7.3%
-21.6%
-4.2%
-12.1%
对照皮肤
HEX 3%
苯基乙基间苯二酚0.5%
氢醌 2%
对照皮肤
HEX 3%
苯基乙基间苯二酚0.5%
氢醌 2%

图15b

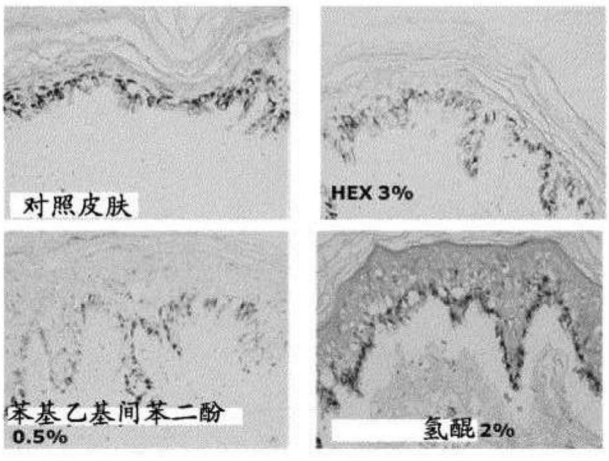

对照皮肤
HEX 3%
苯基乙基间苯二酚
0.5%
氢醌2%

图16a

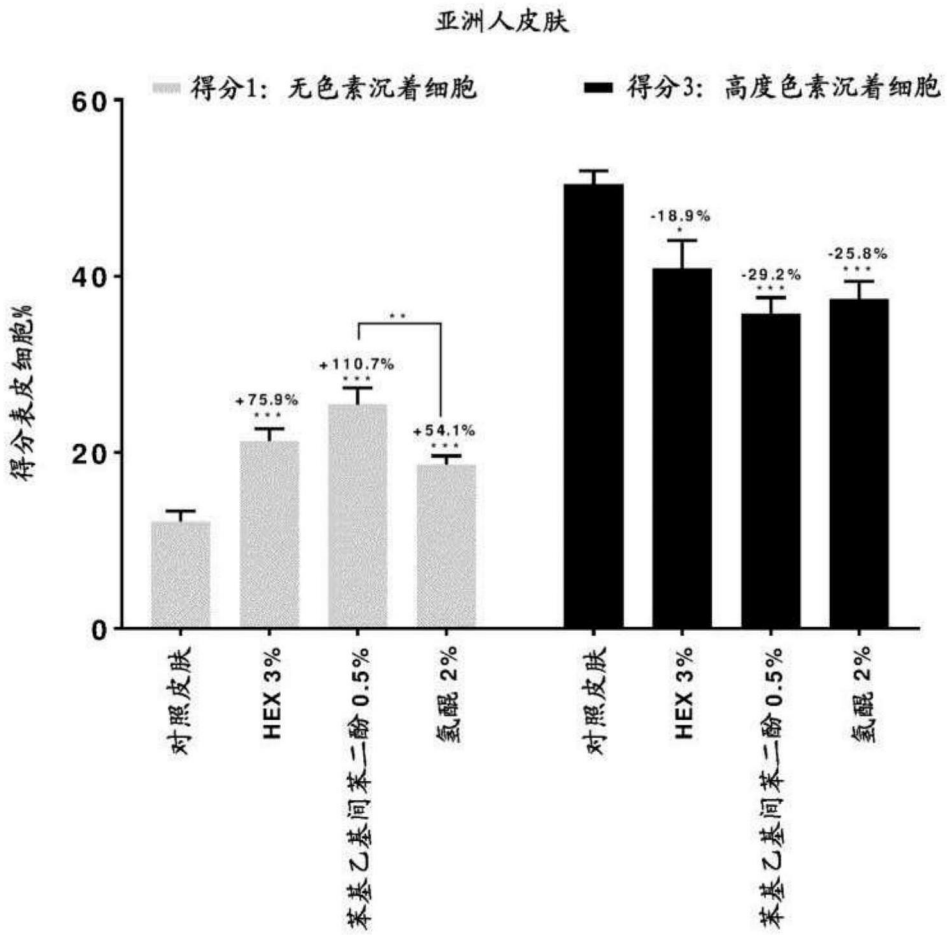

亚洲人皮肤
得分1：无色素沉着细胞
得分3：高度色素沉着细胞
得分表皮细胞%
60
40
20
0
+75.9%
+110.7%
+54.1%
-18.9%
-29.2%
-25.8%
对照皮肤
HEX 3%
苯基乙基间苯二酚 0.5%
氢醌 2%
对照皮肤
HEX 3%
苯基乙基间苯二酚 0.5%
氢醌 2%

图16b

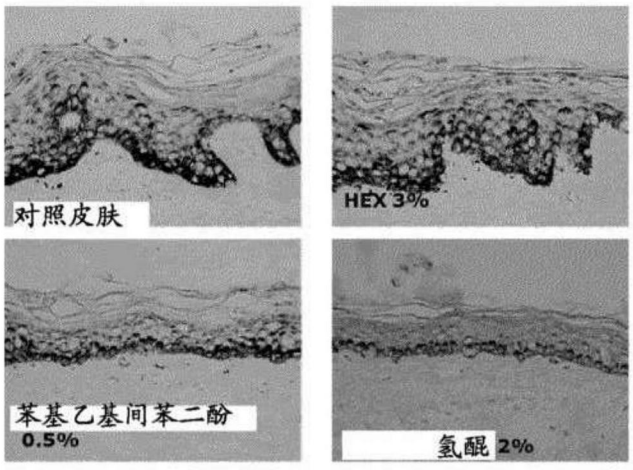

对照皮肤
HEX 3%
苯基乙基间苯二酚
0.5%
氢醌 2%

图17a

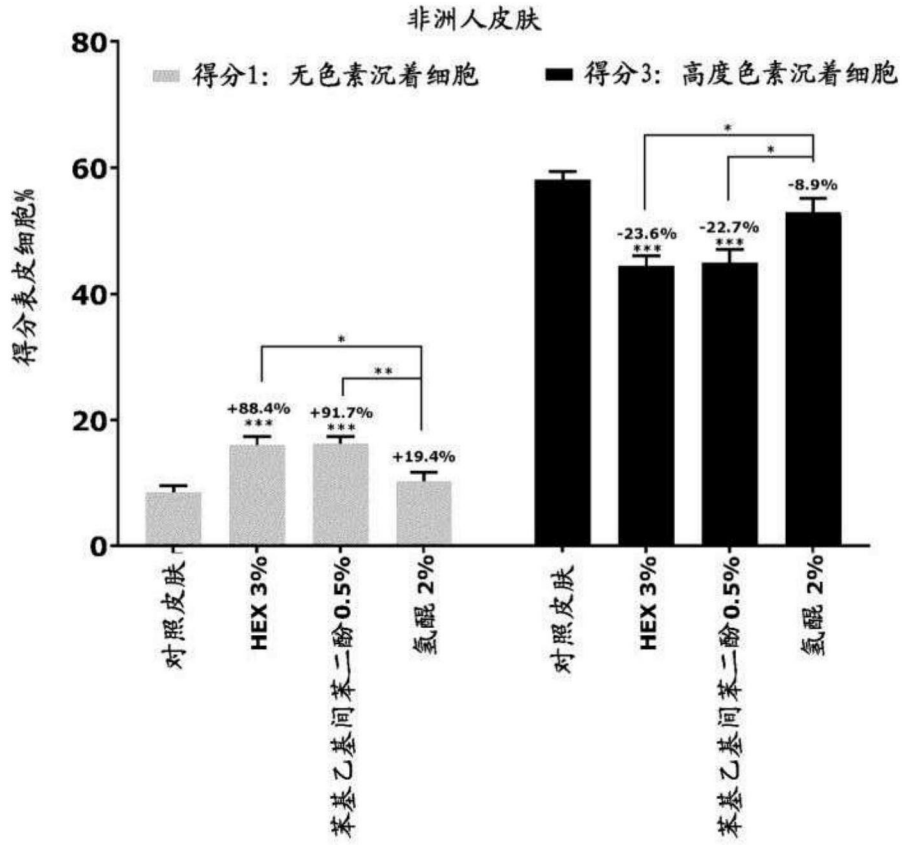

非洲人皮肤
得分1：无色素沉着细胞
得分3：高度色素沉着细胞
得分表皮细胞%
80
60
40
20
0
+88.4%
***
+91.7%
***
+19.4%
-23.6%
***
-22.7%
***
-8.9%
*
**
*
对照皮肤
HEX 3%
苯基乙基间苯二酚0.5%
氢醌 2%
对照皮肤
HEX 3%
苯基乙基间苯二酚0.5%
氢醌 2%

图17b

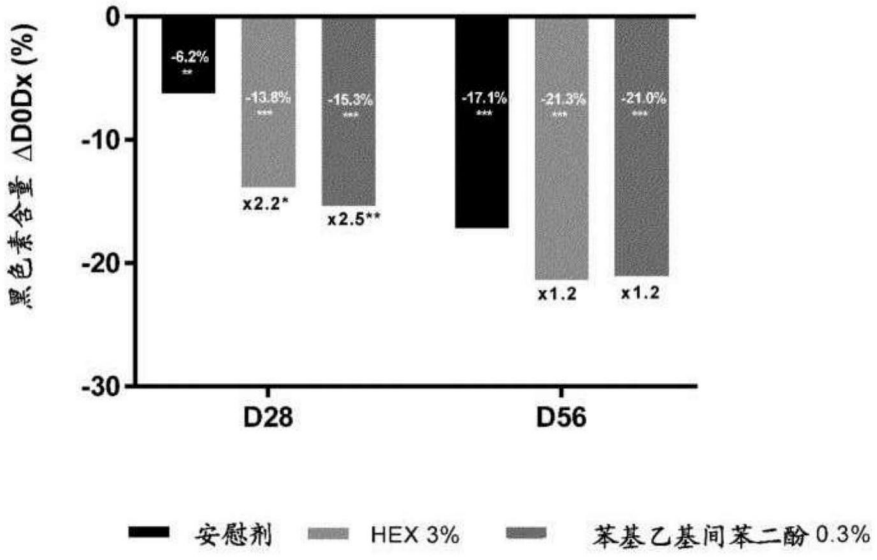

黑色素含量 ΔD0Dx (%)
0
-10
-20
-30
-6.2%
**
-13.8%
***
x2.2*
-15.3%
***
x2.5**
-17.1%
***
-21.3%
***
x1.2
-21.0%
***
x1.2
D28
D56
安慰剂
HEX 3%
苯基乙基间苯二酚 0.3%

图18

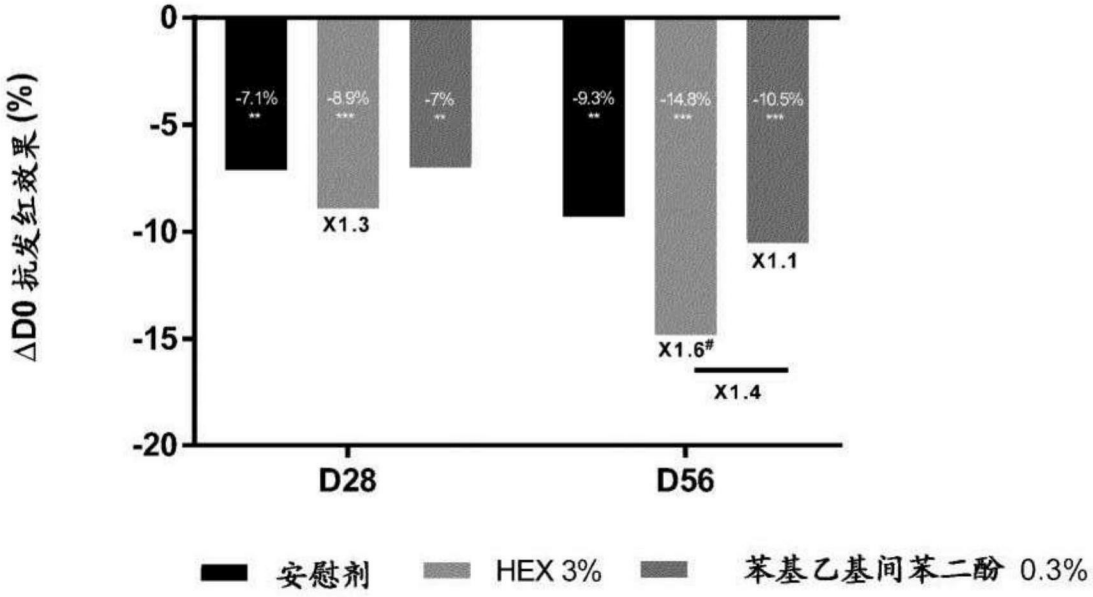

ΔD0 抗发红效果 (%)
0
-5
-10
-15
-20
-7.1%
**
-8.9%
***
X1.3
-7%
**
-9.3%
**
-14.8%
***
X1.6#
X1.4
-10.5%
***
X1.1
D28
D56
安慰剂
HEX 3%
苯基乙基间苯二酚 0.3%

图19

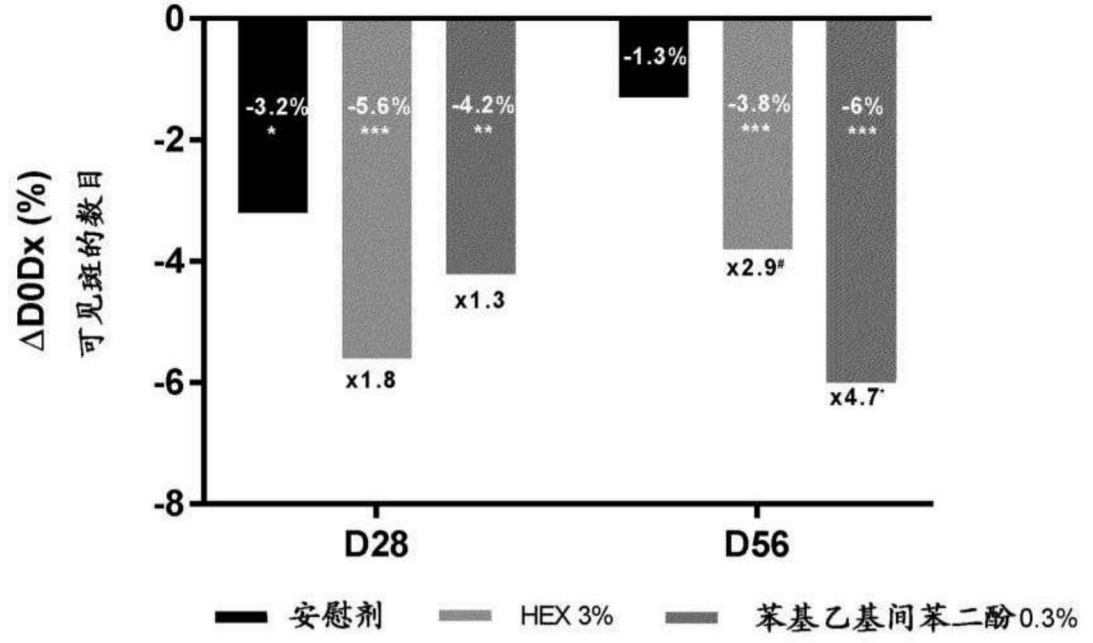

ΔD0Dx (%)
可见斑的数目
0
-2
-4
-6
-8
-3.2%
*
-5.6%
***
x1.8
-4.2%
**
x1.3
-1.3%
-3.8%
***
x2.9#
-6%
***
x4.7
D28
D56
安慰剂
HEX 3%
苯基乙基间苯二酚0.3%

图20

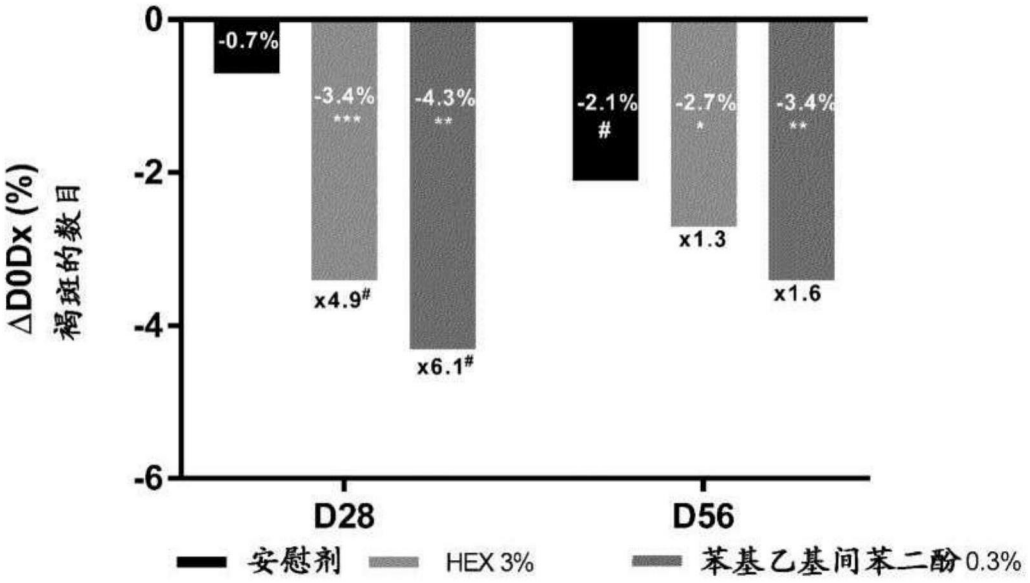

0
-2
-4
-6
ΔD0Dx (%)
褐斑的数目
-0.7%
-3.4%
***
x4.9#
-4.3%
**
x6.1#
-2.1%
#
-2.7%
*
x1.3
-3.4%
**
x1.6
D28
D56
安慰剂
HEX 3%
苯基乙基间苯二酚 0.3%

图21

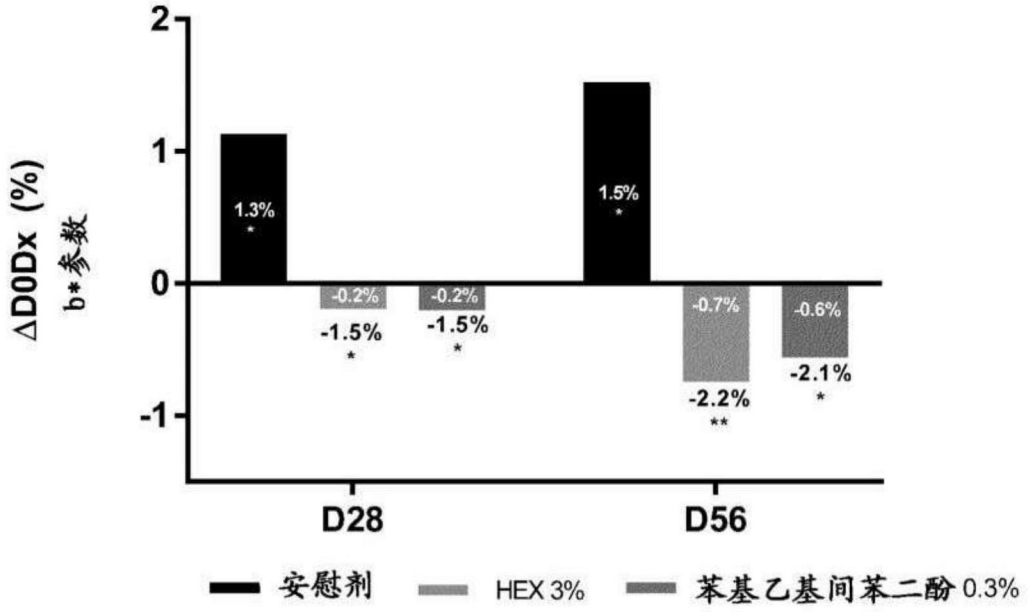

2
1
0
-1
ΔD0Dx (%)
b*参数
1.3%
*
-0.2%
-1.5%
*
-0.2%
-1.5%
*
1.5%
*
-0.7%
-2.2%
**
-0.6%
-2.1%
*
D28
D56
安慰剂
HEX 3%
苯基乙基间苯二酚 0.3%

图22

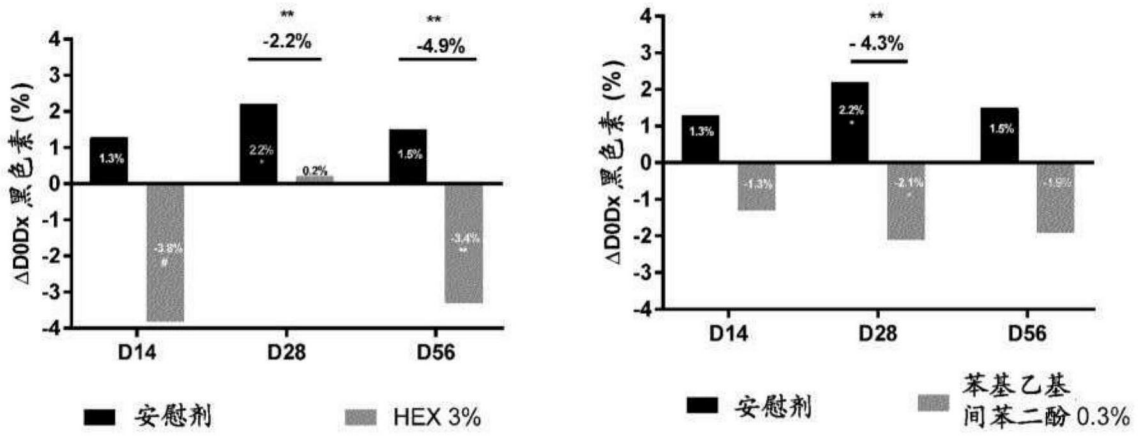

**
-2.2%
**
-4.9%
ΔD0Dx 黑色素 (%)
4
3
2
1
0
-1
-2
-3
-4
1.3%
2.2%
0.2%
1.5%
-3.8%
#
-3.4%
**
D14
D28
D56
安慰剂
HEX 3%
**
- 4.3%
ΔD0Dx 黑色素 (%)
1.3%
-1.3%
2.2%
*
-2.1%
*
1.5%
-1.9%
D14
D28
D56
安慰剂
苯基乙基
间苯二酚 0.3%

图23