[19] 中华人民共和国国家知识产权局

[12] 发明专利说明书

专利号 ZL 200380109673.0

[51] Int. Cl.
A61K 8/64 (2006.01)
A61Q 5/08 (2006.01)
C07K 1/00 (2006.01)
C09B 29/00 (2006.01)
C09B 67/02 (2006.01)
C12N 1/20 (2006.01)

[45] 授权公告日 2008 年 7 月 16 日

[11] 授权公告号 CN 100402016C

[51] Int. Cl. (续)
C12N 9/00 (2006.01)
C12N 9/08 (2006.01)
C12P 21/04 (2006.01)
C12Q 1/68 (2006.01)

[22] 申请日 2003.12.11

[21] 申请号 200380109673.0

[30] 优先权

[32] 2002.12.12 [33] US [31] 60/432,678

[86] 国际申请 PCT/IL2003/001055 2003.12.11

[87] 国际公布 WO2004/052275 英 2004.6.24

[85] 进入国家阶段日期 2005.8.11

[73] 专利权人 R.B.T(洛东生物科技)有限公司

地址 以色列约克尼姆伊莱特

[72] 发明人 P·贝林基 H·拉斯塞
C·多索雷茨

[56] 参考文献

US5342765A 1994.8.30

US5486214A 1996.1.23

审查员 丁 伟

[74] 专利代理机构 中国专利代理(香港)有限公司

代理人 郭广迅 刘 玥

权利要求书 5 页 说明书 46 页 附图 11 页

[54] 发明名称

木质素过氧化物酶的生产方法及其在皮肤和毛发增亮中的应用

[57] 摘要

本发明提供了生产木质素过氧化物酶的方法。本发明还提供了适用于皮肤和毛发增亮的方法和化妆品组合物以及试剂盒和加工制品，其中包括用于皮肤和毛发增亮的活性成分。

1. 至少一种类型的木质素过氧化物酶在制备增亮受试者的皮肤区域或毛发的化妆品组合物中的用途。

2. 根据权利要求 1 的用途，其中所述的木质素过氧化物酶是同功酶 H1 或同功酶 H2 的修饰形式。

3. 根据权利要求 1 的用途，其中所述化妆品组合物被配制为用于局部施用。

4. 根据权利要求 1 的用途，其中所述化妆品组合物被配制为用于皮内或皮下施用。

5. 根据权利要求 1 的用途，其中所述的组合物还包含过氧化氢作为电子受体。

6. 根据权利要求 1 的用途，其中所述的组合物还包含藜芦基醇。

7. 根据权利要求 1 的用途，其中所述的组合物还包含至少一种类型的表皮渗透剂。

8. 根据权利要求 1 的用途，其中所述的组合物还包含至少一种类型的毛发渗透剂。

9. 一种用于增亮受试者的皮肤区域或毛发的化妆品组合物，其包含至少一种类型的木质素过氧化物酶和化妆品可接受的载体。

10. 根据权利要求 9 的化妆品组合物，其中所述的木质素过氧化物酶是同功酶 H1 或同功酶 H2 的修饰形式。

11. 根据权利要求 9 的化妆品组合物，还包含过氧化氢作为电子受体。

12. 根据权利要求 9 的化妆品组合物，其中所述的化妆品可接受的载体包括二甘醇单乙醚和/或丁二醇。

13. 根据权利要求 9 的化妆品组合物，其中所述的化妆品可接受的载体包括链烷醇胺。

14. 根据权利要求 9 的化妆品组合物，其中所述的木质素

过氧化物酶以至少 1 U/gr 的浓度提供。

15. 根据权利要求 11 的化妆品组合物，其中所述的过氧化氢以至少 0.005 %的浓度提供。

16. 根据权利要求 9 的化妆品组合物，还包含藜芦基醇。

17. 根据权利要求 16 的化妆品组合物，其中所述的藜芦基醇以至少 0.05 %的浓度提供。

18. 一种用于增亮皮肤区域或毛发的试剂盒，包括第一个容器，其中包含木质素过氧化物酶，以及第二个容器，其中包含过氧化氢作为电子受体。

19. 根据权利要求 18 的试剂盒，其中所述的第一个容器还包含藜芦基醇.

20. 根据权利要求 18 的试剂盒，其中所述的木质素过氧化物酶是同功酶 H1 或同功酶 H2 的修饰形式。

21. 根据权利要求 19 的试剂盒，其中所述的藜芦基醇以至少 0.05 %的浓度提供。

22. 根据权利要求 18 的试剂盒，其中所述的木质素过氧化物酶以至少 1 U/gr 的浓度提供。

23. 根据权利要求 18 的试剂盒，其中所述的过氧化氢以至少 0.005 %的浓度提供。

24. 根据权利要求 18 的试剂盒，其中所述的第一个和/或第二个容器还包含适用于表皮渗透的化妆品可接受的载体。

25. 根据权利要求 18 的试剂盒，其中所述的第一个和/或第二个容器还包含适用于毛发渗透的化妆品可接受的载体。

26. 根据权利要求 24 的试剂盒，其中所述的化妆品可接受的载体包括二甘醇单乙醚和/或丁二醇。

27. 根据权利要求 25 的试剂盒，其中所述的化妆品可接受的载体包括链烷醇胺。

28. 一种加工制品，其包括包装材料和用于增亮受试者的皮肤区域或毛发的化妆品组合物，所述化妆品组合物包含在所述包装材料中，所述化妆品组合物包含作为活性成分的木质素

过氧化物酶以及化妆品可接受的载体。

29. 根据权利要求 28 的加工制品，其中所述的木质素过氧化物酶是同功酶 H1 或同功酶 H2 的修饰形式。

30. 根据权利要求 28 的加工制品，其中所述的化妆品组合物还包含过氧化氢作为电子受体。

31. 根据权利要求 28 的加工制品，其中所述的化妆品组合物还包含藜芦基醇.

32. 根据权利要求 28 的加工制品，其中所述的化妆品可接受的载体包括适用于表皮或毛发渗透的组合物。

33. 编码木质素过氧化物酶的多核苷酸在制备用于增亮受试者的皮肤区域的化妆品组合物中的用途。

34. 根据权利要求 33 的用途，其中所述化妆品组合物还包含过氧化氢作为电子受体。

35. 根据权利要求 33 的用途，其中所述化妆品组合物还包含藜芦基醇。

36. 根据权利要求 33 的用途，其中所述多核苷酸被连接到表达载体中。

37. 根据权利要求 36 的用途，其中所述的表达载体是病毒载体。

38. 根据权利要求 36 的用途，其中所述的表达载体包含与木质素修饰酶编码序列功能连接的启动子。

39. 根据权利要求 38 的用途，其中所述的木质素过氧化物酶由 SEQ ID NO : 1 所示的多核苷酸序列编码。

40. 一种生产木质素过氧化物酶的方法，包括:

（a） 在含有甘油的搅拌和通气的培养基中，在多孔基质上培养黄胞原毛平革菌真菌预定的时间段;

（b）在所述的预定时间段之后，从所述的黄胞原毛平革菌真菌中提取可溶性级分，从而生产木质素过氧化物酶。

41. 根据权利要求 40 的方法，其中所述的培养基不含锰离子。

42. 根据权利要求 40 的方法，其中所述的通气的培养基是通过将所述培养基置于 0.1-1 升空气/升培养基/分钟的通气速率范围内而获得的。

43. 根据权利要求 40 的方法，其中所述的培养是在 37 °C 的温度下进行的。

44. 根据权利要求 40 的方法，其中所述的搅拌的培养基是通过以 50-300 rpm 范围内的速度搅拌所述培养基而获得的。

45. 根据权利要求 40 的方法，其中所述的搅拌的培养基是通过以 160 rpm 的速度搅拌所述培养基而获得的。

46. 根据权利要求 40 的方法，其中所述的预定的时间段选自 3-10 天的范围。

47. 根据权利要求 40 的方法，其中所述的预定的时间段是 7 天。

48. 根据权利要求 40 的方法，其中所述的甘油以 3-20 克/升的浓度提供。

49. 根据权利要求 40 的方法，其中所述的甘油以 6 克/升的浓度提供。

50. 根据权利要求 40 的方法，其中所述的培养基还包括藜芦基醇。

51. 根据权利要求 50 的方法，其中所述的藜芦基醇是以 0.5-4 mM 的浓度范围提供的。

52. 根据权利要求 50 的方法，其中所述的藜芦基醇是以 2mM 的浓度提供的。

53. 根据权利要求 40 的方法，其中所述的木质素过氧化物酶是同功酶 H1 或同功酶 H2 的修饰形式。

54. 根据权利要求 40 的方法，其中所述的多孔基质是聚氨酯泡沫。

55. 黄胞原毛平革菌真菌的水性提取物，其表现出 500-2000 单位/升范围内的木质素过氧化物酶酶活性。

56. 根据权利要求 55 的水性提取物，其中所述的木质素过

氧化物酶酶活性是 1500 单位/升。

57. 根据权利要求 55 的水性提取物，其中所述的木质素过氧化物酶酶活性是同功酶 H1 或同功酶 H2 的修饰形式。

58. 根据权利要求 2 的用途，其中所述同功酶 H1 或同功酶 H2 的修饰形式衍生自黄胞原毛平革菌真菌。

59. 根据权利要求 10 的化妆品组合物，其中所述同功酶 H1 或同功酶 H2 的修饰形式衍生自黄胞原毛平革菌真菌。

60. 根据权利要求 20 的试剂盒，其中所述同功酶 H1 或同功酶 H2 的修饰形式衍生自黄胞原毛平革菌真菌。

61. 根据权利要求 29 的加工制品，其中所述同功酶 H1 或同功酶 H2 的修饰形式衍生自黄胞原毛平革菌真菌。

木质素过氧化物酶的生产方法及其在皮肤和毛发增亮中的应用

技术领域

本发明涉及木质素过氧化物酶的生产方法及其在皮肤和毛发增亮中的应用。

背景技术

黑色素

人类皮肤和毛发的颜色受黑色素的数量、质量及分布的控制，黑色素是一种色素，也存在于植物和微生物中。

黑色素的合成是从前体 L-酪氨酸开始的，L-酪氨酸通过酪氨酸酶的作用转化为第二前体多巴醌。在哺乳动物黑色素的生物合成中，该中间产物可以通过两种主要途径聚合（图 1）。氨基的分子内亲核加成产生了吲哚衍生物无色多巴色素（leucodopachrome），其在聚合后产生了深褐色至黑色的色素真黑素。在硫醇化合物的存在下，形成了多巴的硫醚（thioesther）衍生物；与半胱氨酸的反应产生了半胱氨酰多巴，其在进一步氧化和聚合后，产生了黄色至红棕色的色素棕黑素。所以，真黑素主要由 5,6-二羟基吲哚（DHI）和 5,6-二羟基吲哚-2-羧酸（DHICA）单元构成，但棕黑素主要含有苯并噻嗪单元（Alaluf 等，2001）。这两种色素的可得性及相互之间的比例影响了聚合色素的化学组成。

黑色素的合成在微粒中进行，该微粒被称为黑色素体（Cooksey 等，1997），存在于表皮基层的黑素细胞中；这些细胞中黑色素的合成是由紫外线（UV）诱导的。在合成之后，黑色素迁移到表皮细胞中并分散于其中，在此处黑色素随着皮肤的代谢被脱色并在皮肤更新时以污垢的形式脱落。黑色素在临床上有重要意义，因为它保护皮肤免受由紫外线引起的不良反应。但是，高水平的黑色素可能引起不想要的皮肤和毛发变暗，而其不均匀分布可能会导致黄褐斑和雀斑，这在美学上可能是令人不快的。

增亮产品

皮肤增亮产品（lightening product）在过去几年中变得越来越流

行。皮肤增亮产品的主要目的是使皮肤变亮或变白，或治疗色素沉着疾病，例如黄褐斑、雀斑、妊娠斑及老年斑。目前有数种类型的皮肤增亮产品。

基于色素细胞退化和死亡的产品通常包括刺激性的化学品，例如氢醌、4-异丙基儿茶酚和氢醌单苯甲基醚，其促进皮肤变白及皮肤变亮，或弱化皮肤色素沉着。此类产品通常无效，并且可能对皮肤有害，因为连续外部施用这些产品可能导致永久性白斑病和副作用，例如色素异常症和皮疹。

其他的增亮产品基于对酪氨酸酶的抑制，即将前体 L-酪氨酸转化为第二前体多巴醌的酶。这组产品包括熊果苷，它是一种葡萄糖氢醌化合物，能够通过与铜离子螯合而抑制酪氨酸酶，从而抑制由多巴色素向 DHICA 的互变异构化。

Melanostat 是另一种通过酪氨酸酶起作用的增亮产品。Melanostat 是一种合成的肽，在使黑素细胞中的黑色素生成失活方面起作用。

几种能够抑制黑色素生成的抗氧化化合物也用于增亮产品中。由于黑色素的合成涉及氧化反应，所以在由酪氨酸/多巴向黑色素的氧化过程的不同点阻断该过程最终抑制了黑色素的合成。

用于阻断黑色素合成的一种抗氧化剂是 L-抗坏血酸（维生素 C），它作为黑色素中间体的还原剂发挥作用并阻断氧化反应；其它用于增亮产品的抗氧化剂包括生物类黄酮，通常是从桑树或甘草中提取的。

毛发增亮产品作用于毛发皮层内的黑色素。有几种化学品能够增亮毛发，包括盐酸、次氯酸钠和过氧化氢。

用于增亮毛发的最常用的化学品是过氧化氢。为了保持理想的有效性，过氧化氢溶液必须用化合物例如乙酰苯胺、稀酸、胶态二氧化硅、对羟基苯甲酸酯、硫酸羟喹啉、非那西汀和锡化合物（锡酸钠、氢氧化锡、辛酸亚锡）稳定化。在毛发被增亮前，向过氧化氢溶液中加入氨水以促进过氧化氢穿透表皮，毛发的外层，从而加速氧化反应。

在将本发明用于实践时，本申请人发现木质素过氧化物酶同功酶 H1 能够在体外氧化黑色素，还能在体内增亮皮肤和毛发。

因此，本发明提供了非常适用于皮肤和毛发增亮的化妆品组合物和方法。

发明内容

根据本发明的一个方面，提供了一种增亮受试者的皮肤区域或毛发的方法，包括以适于氧化所述皮肤区域或毛发的细胞中所含有的色素的方式，向所述皮肤区域或毛发施用至少一种类型的木质素修饰酶。

根据本发明的另一个方面，提供了一种用于增亮受试者的皮肤区域或毛发的化妆品组合物，包含至少一种类型的木质素修饰酶和化妆品可接受的载体。

根据本发明的另一个方面，提供了一种用于增亮受试者的皮肤区域或毛发的试剂盒，包含第一个容器，其中包括木质素修饰酶，以及第二个容器，其中包括电子受体。

根据本发明的另一个方面，提供了一种加工制品，包含包装材料和用于增亮受试者的皮肤区域或毛发的化妆品组合物，所述化妆品组合物包含在所述包装材料中，所述化妆品组合物包括作为活性成分的木质素修饰酶以及化妆品可接受的载体。

根据下面描述的本发明优选实施方式的其他特征，所述方法是通过局部施用包括至少一种类型的木质素修饰酶的制剂而实现的。

根据所描述的优选实施方式的其他特征，所述方法是通过包括至少一种类型的木质素修饰酶的制剂的皮内或皮下给予进行的。

根据所描述的优选实施方式的其他特征，所述的木质素修饰酶包含在为用于皮肤或毛发而配制的组合物中。

根据下面描述的本发明优选实施方式的其他特征，所述的木质素修饰酶是木质素过氧化物酶。

根据所描述的优选实施方式的其他特征，所述的木质素过氧化物酶是同功酶 H1 或同功酶 H2 的修饰形式。

根据所描述的优选实施方式的其他特征，所述的化妆品组合物还包含电子受体。

根据所描述的优选实施方式的其他特征，所述的电子受体是过氧化氢。

根据所描述的优选实施方式的其他特征，所述的化妆品组合物还包含藜芦基醇。

根据所描述的优选实施方式的其他特征，所述的组合物包含至少

一种类型的表皮渗透剂。

根据所描述的优选实施方式的其他特征，所述的组合物包含至少一种类型的毛发渗透剂。

根据所描述的优选实施方式的其他特征，所述方法的持续时间是按照期望的增亮水平选择的。

根据所描述的优选实施方式的其他特征，所述的化妆品可接受的载体包括二甘醇单乙醚（transcutol）和/或丁二醇。

根据所描述的优选实施方式的其他特征，所述的化妆品可接受的载体包括链烷醇胺。

根据所描述的优选实施方式的其他特征，所述化妆品组合物中的木质素过氧化物酶以至少 1 U/gr 的浓度提供。

根据所描述的优选实施方式的其他特征，所述化妆品组合物中的过氧化氢以至少 0.005 %的浓度提供。

根据所描述的优选实施方式的其他特征，所述化妆品组合物中的藜芦基醇以至少 0.05 %的浓度提供。

根据所描述的优选实施方式的其他特征，所述用于增亮皮肤区域或毛发的试剂盒的第一个容器还包含藜芦基醇。

根据所描述的优选实施方式的其他特征，所述用于增亮皮肤区域或毛发的试剂盒的第一个和/或第二个容器还包括适用于表皮渗透的化妆品可接受的载体。

根据所描述的优选实施方式的其他特征，所述用于增亮皮肤区域或毛发的试剂盒的第一个和/或第二个容器还包括适用于毛发渗透的化妆品可接受的载体。

根据本发明的其它方面，提供了一种用于增亮受试者的皮肤区域的方法，该方法包括以适于氧化所述皮肤区域的细胞中所含有的色素的方式，在所述皮肤区域的细胞内表达木质素修饰酶。

根据所描述的优选实施方式的其他特征，所述方法还包括向所述皮肤区域的细胞提供电子受体的步骤。

根据所描述的优选实施方式的其他特征，所述的电子受体是过氧化氢。

根据所描述的优选实施方式的其他特征，所述方法还包括向所述皮肤区域的细胞提供藜芦基醇的步骤。

根据所描述的优选实施方式的其他特征，表达是通过向所述细胞中引入能够表达所述木质素修饰酶的表达载体而实现的。

根据所描述的优选实施方式的其他特征，所述的表达载体是病毒载体。

根据所描述的优选实施方式的其他特征，所述的表达载体包含与木质素修饰酶的编码序列功能连接的启动子。

根据所描述的优选实施方式的其他特征，所述的木质素修饰酶是木质素过氧化物酶。

根据所描述的优选实施方式的其他特征，所述的木质素过氧化物酶由 SEQ ID NO : 1 所示的多核苷酸序列编码。

根据本发明的其它方面，提供了一种生产木质素过氧化物酶的方法，包括:（a） 在含有甘油的搅拌和通气的培养基中，在多孔基质上培养黄胞原毛平革菌（Phanerochaete chrysosporium）真菌预定的时间段;（b）在所述的预定时间段之后，从所述的黄胞原毛平革菌真菌中提取可溶性级分，从而生产木质素过氧化物酶。

根据所描述的优选实施方式的其他特征，所述的培养基不含锰离子。

根据所描述的优选实施方式的其他特征，所述的通气的培养基是通过将所述培养基置于 0.1-1 升/升/分钟的通气速率范围内而获得的。

根据所描述的优选实施方式的其他特征，所述的培养是在 37 °C 的温度下进行的。

根据所描述的优选实施方式的其他特征，所述的搅拌的培养基是通过以 50-300 rpm 范围内的速度搅拌所述培养基而获得的。

根据所描述的优选实施方式的其他特征，所述的搅拌的培养基是通过以 100 rpm 的速度搅拌所述培养基而获得的。

根据所描述的优选实施方式的其他特征，所述的预定的时间段选自 3-10 天的范围。

根据所描述的优选实施方式的其他特征，所述的预定的时间段是 7 天。

根据所描述的优选实施方式的其他特征，所述的甘油以 3-20 克/升的浓度提供。

根据所描述的优选实施方式的其他特征，所述的甘油以 6 克/升的

浓度提供。

根据所描述的优选实施方式的其他特征，所述的培养基还包括藜芦基醇。

根据所描述的优选实施方式的其他特征，所述的藜芦基醇是以0.5-4 mM 的浓度范围提供的。

根据所描述的优选实施方式的其他特征，所述的藜芦基醇是以2mM 的浓度提供的。

根据所描述的优选实施方式的其他特征，所述的木质素过氧化物酶是同功酶 H1 或同功酶 H2 的修饰形式。

根据所描述的优选实施方式的其他特征，所述的多孔基质是聚氨酯泡沫。

根据本发明的其它方面，提供了黄胞原毛平革菌真菌的水性提取物，其表现出 500-2000 单位/升范围内的木质素过氧化物酶酶活。

根据所描述的优选实施方式的其他特征，所述的木质素过氧化物酶酶活性是 1500 单位/升。

根据所描述的优选实施方式的其他特征，所述的木质素过氧化物酶酶活是同功酶 H1 或同功酶 H2 的修饰形式。

本发明提供了用于增亮受试者的皮肤区域或毛发的有效方法和组合物，从而成功地解决了目前已知配置（configuration）中的缺点。

除非另外定义，此处所用的所有技术和科学术语的含义与本发明所属技术领域的技术人员之一般理解相同。虽然与此处描述的方法和材料相似或等同的方法和材料可以用于实施或检验本发明，合适的方法和材料如下所述。在有冲突的情况下，该专利说明书包括定义将优先考虑。此外，所述的材料、方法和实施例仅仅是处于说明的目的，不是限制性的。

附图说明

仅以举例的方式参考附图描述了本发明。具体参考附图的细节，应该强调的是，所示的细节采用举例的方式，仅仅为了本发明优选实施方式的说明性讨论，提供这些细节的原因是提供据信最有用最易理解的本发明原理和概念方面的描述。在这一点上，没有试图示出比基本理解本发明所需要的细节更多的本发明的结构细节；对于本领域技

术人员来说，在结合说明书和附图之后，如何在实践中实现本发明的各种形式将变得更明显。

附图中:

图 1 是 Alaluf 等人，2001 年所采纳的哺乳动物黑色素生物合成的现有技术图示。

图 2 示出了通过固定在聚氨酯泡沫上的黄胞原毛平革菌生产木质素过氧化物酶所需的搅拌罐反应器（STR)。

图 3 示出了黄胞原毛平革菌发酵罐培养物中的 LIP 活性是培养时间的函数。如实施例部分的实施例 1 所述，黄胞原毛平革菌生长在 STR 发酵罐中。如实施例中所述，在藜芦基醇氧化成藜芦醛后，测定细胞外液中 LIP 活性。误差条（error bar）代表 3 次重复实验的标准差。

图 4 示出了在 pH 3.5 的 50 mM 酒石酸缓冲液中的 1.5 mM 藜芦基醇的存在下，初始浓度 70.5 μg/ml 的黑色素被 LIP（0.48 μM） 氧化，该氧化过程为逐渐增加的过氧化氢浓度的函数。黑色素的氧化通过测定 460 nm 处的吸收而确定，在酶反应开始时以及 160 秒后进行测定，计算氧化的黑色素的百分比。误差条代表 3 次重复实验的标准差。

图 5 示出了逐渐增加的过氧化氢浓度对 LIP 氧化黑色素的影响。黑色素的氧化程度通过与未加入过氧化氢（0 μM） 的酶反应进行比较，由颜色强度的下降观察出来。图下方的数字指出了以 μM 表达的 H_2O_2 浓度。

图 6 示出了在藜芦基醇（1.5 mM）和过氧化氢（600 μM）的存在下，在 pH 3.5 的 50 mM 酒石酸缓冲液中，LIP（0.48 μM） 对不同浓度黑色素的氧化程度。误差条代表 3 次重复实验的标准差。

图 7 示出了黑色素的氧化程度，其作为 LIP 浓度的函数。黑色素的氧化（70 μg/ml） 是在藜芦基醇（1.5 mM）和过氧化氢（700 μM）的存在下，在 pH 3.5 的 50 mM 酒石酸缓冲液中进行的，其中 LIP 浓度逐渐增加。误差条代表 3 次重复实验的标准差。

图 8a-b 示出了当 LIP 在乳膏中使用时，目测 LIP 对黑色素的氧化。在将活化剂乳膏加入到 LIP 乳膏（图 8b） 中之后，观察到黑色素脱色，但在 LIP 乳膏单独存在下则观察不到（图 8a)。

图 9a-b 示出了 LIP 乳膏对皮肤增白的效果。示出的是在施用乳

膏中的 LIP（每天两次）之后一周所拍摄的女性的手。用 LIP 处理的区域（图 9a，用黑线圈起来的区域）比这只手其它部分的皮肤要亮得多（图 9b）。

图 10 示出了 LIP 体内对毛发漂白的效果。将女性的毛发在 pH 11.5 的 50 mM 碳酸盐缓冲液中浸没 1 小时。将毛发与 25 U 的 LIP 预温育 10 秒钟，并在含有藜芦基醇（1.5 mM）和过氧化氢（8.8 mM）的 pH 3.5 的酒石酸缓冲液中浸没 1 小时。与在同样的但不含 LIP 的溶液中处理的毛发（图 10，左侧管）相比，用 LIP 处理过的毛发中观察到了显著的增亮效果（图 10，右侧管）。

图 11a-b 是 1 号研究受试者右前臂的彩色照片，示出了 LIP 增白乳膏对皮肤色素沉着的效果。图 11a－0 天时拍摄的照片；图 11b－21 天时拍摄的照片。

图 12a-c 示出了在 1 号研究受试者中 LIP 或氢醌乳膏对皮肤增白的效果。LIP 或氢醌乳膏施用在右前臂和左前臂的上面部分，而下面部分一直不进行处理。利用 Derma Spectrometer 间隔 7 天测定两只前臂中皮肤色素沉着的程度。图 12a－施用 LIP 乳膏；图 12b－施用氢醌乳膏；蓝色柱子＝用 LIP 乳膏处理的右前臂上面部分；浅蓝色柱子＝右前臂未处理的下面部分；粉色柱子＝用氢醌处理的左前臂上面部分；白色柱子＝左前臂未处理的下面部分；图 12c 是直线图，比较了在用 LIP 乳膏（图 12c，蓝线）或氢醌乳膏（图 12c，粉线）处理 21 天之后，上前臂皮肤色素沉着的减少。注意，在用 LIP 乳膏处理 21 天之后，皮肤色素沉着剧烈减少，而在用氢醌乳膏处理之后为中度减少。

图 13a-b 为 10 号研究受试者右前臂的彩色照片，示出了 LIP 增白乳膏对皮肤色素沉着的效果。图 13a－0 天时拍摄的照片；图 13b－21 天时拍摄的照片。

图 14a-c 示出了在 10 号研究受试者中 LIP 或氢醌乳膏对皮肤增白的效果。LIP 或氢醌乳膏施用在右前臂和左前臂的上面部分，而下面部分一直不进行处理。利用 Derma Spectrometer 间隔 7 天测定两只前臂中皮肤色素沉着的程度。图 14a－施用 LIP 乳膏；图 14b－施用氢醌乳膏；蓝色柱子＝用 LIP 乳膏处理的右前臂上面部分；浅蓝色柱子＝右前臂未处理的下面部分；粉色柱子＝用氢醌处理的左前臂上

面部分；白色柱子＝左前臂未处理的下面部分；图 14c 是直线图，比较了在用 LIP 乳膏（图 14c，蓝线）或氢醌乳膏（图 14c，粉线）处理 21 天之后，上前臂皮肤色素沉着的减少。注意，在用 LIP 乳膏处理 21 天之后，皮肤色素沉着剧烈减少，而在用氢醌乳膏处理之后为中度减少。

图 15a-b 是直线图，示出了在所有 12 个研究受试者中 LIP 和氢醌乳膏对皮肤增白的平均效果。图 15a－平均色素沉着分数；图 15b－色素沉着减少平均值，其作为初始色素沉着得分的分数（fraction）。

具体实施方式

本发明提供了可用于增亮受试者皮肤区域或毛发的方法和化妆品组合物。

具体地说，本发明的方法可用于治疗不均匀的肤色，其源于色素过度沉着相关的医学病况，例如黑斑病、黄褐斑、老年斑、雀斑、黄褐病和色斑。

在参考附图和所附的说明书后，可以更好地理解本发明的原理和操作。

在详细阐述本发明的至少一个实施方式之前，应当理解本发明在其应用方面不受后面的说明书中阐述的细节或实施例中举例说明的细节的限制。本发明能够采用其它实施方式或以不同方式实现或完成。也应当理解，此处所用的措辞和术语是处于说明的目的，不应该被认为是限制性的。

皮肤色素沉着的程度是在普通人群中较关心的内容。有些人遇到了老年斑和妊娠斑，并希望此类色素沉着斑点能够更不明显一些。其他人有雀斑、黄褐斑、黑斑病、黄褐病和色斑，通常是用皮肤增亮产品治疗的，这些皮肤增亮产品使皮肤的色素沉着变亮和变平和。但是，目前的皮肤增亮产品或者是可能导致永久性白斑病和副作用例如色素异常症和皮疹的刺激性化学品，例如氢醌，或者是不能足够有效地增亮皮肤。其中包括基于对酪氨酸酶的抑制的产品，即将前体 L-酪氨酸转化为第二前体多巴醌从而抑制黑色素合成的酶。其他产品被设计出来以在由酪氨酸/多巴向黑色素的氧化反应的不同点阻断该过程并最终抑制黑色素的合成。后一组产品包括抗氧化剂，例如 L-抗坏血酸（维

生素 C）和生物类黄酮。

毛发增亮产品组合使用高浓度过氧化氢和氨。这些产品可能会给被治疗的受试者带来不适。

在下面的实施例部分清楚地阐述了以下内容：本发明人发现木质素过氧化物酶，特别是其 H1 同功酶，能够有效地氧化黑色素，因而可被用于增亮受试者的皮肤或毛发。

虽然美国专利号 5,578,296 鉴定了 Basidiomycetes 真菌中的黑色素分解能力，并暗示了该真菌在治疗黄褐斑和雀斑中的用途，但到目前为止，该真菌中负责黑色素分解的具体的酶还没有被发现。

因此，按照本发明的一方面，提供了一种增亮受试者的皮肤或毛发的方法。

按照本发明这一方面的方法是通过如下方式实施的：以适于氧化受试者的皮肤区域或毛发的细胞中含有的色素（例如黑色素）的方式，向受试者的皮肤区域或毛发施用至少一种类型的木质素修饰酶。

此处所使用的短语“增亮皮肤区域或毛发”是指通过减少其中含有的黑色素的色素质量或浓度而减少皮肤或毛发的色调或颜色。

此处所使用的短语“受试者”是指哺乳动物，通常是人，优选那些具有过量皮肤或毛发色素沉着或皮肤瑕疵例如雀斑等的人。

本发明所用的木质素修饰酶优选为木质素过氧化物酶，其在木质素降解中发挥主要作用。该木质素修饰过氧化物酶的活性位点氨基酸序列及其氧化底物的机理与辣根过氧化物酶（HRP） 和大豆过氧化物酶（SBP）相似。木质素修饰过氧化物酶能够以高氧化还原势催化底物的氧化。这种独特的能力与低电子密度的血红素活性位点相一致，这一点由高氧化还原势指明 [Cai and Tien(1993). J Biotechnol 30: 79-90]。

虽然现有技术中已知的木质素过氧化物酶的任何同功酶都可以用于本发明（Rothschild 等，1997，Appl. Environ. Microbiol. 63: 857-861），但本发明优选采用 H1 同功酶，因为这种同功酶在体外和体内都表现出黑色素氧化活性，这一点在下面的实施例部分进行了阐述。

有数种方法可用于制备本发明所采用的木质素修饰酶。

例如，木质素过氧化物酶同功酶 H1 可由真菌黄胞原毛平革菌制备。当上述真菌生长于搅拌的罐状反应器（stirred tank reactor，STR）

发酵罐中，同时固定于聚氨酯泡沫上或处于悬液中时，高水平酶活的木质素过氧化物酶可从上述真菌生产出来（Dosoretz 等，1993，Appl Environ Microbiol. 59: 1919-26）。

按照本发明的优选实施方式，发酵罐与冷却系统相连以维持 37 °C 的培养温度，以 50-300 rpm 的速度搅拌，更优选 100-200 rpm，最优选 160 rpm。为了提高木质素过氧化物酶活性的产率，以每升培养基每分钟 0.1-1 升空气的通气率对发酵罐进行通气。按照目前优选的配置，以每升培养基每分钟 0.2 升空气的通气率对发酵罐进行通气。

如下面实施例部分的材料与试验方法中所述，黄胞原毛平革菌培养于无锰离子并且含有甘油作为碳源的条件下。本发明的甘油优选以 3-20 克/升的浓度提供。根据目前优选的配置，甘油以 6 克/升的浓度提供。

在从上述真菌中提纯木质素过氧化物酶同功酶 H1 的过程中，纯化出来的蛋白质的酶活通过 310 nm 处吸收的变化被进一步检测，该变化是由于藜芦基醇氧化为藜芦醛所致。

由于木质素过氧化物酶同功酶 H1 可由同功酶 H2 的翻译后去磷酸化而得到（Kuan and Tien，1989），因此，本发明所采用的木质素过氧化物酶可以通过将木质素过氧化物酶同功酶 H2 去磷酸化而制备。

本发明所采用的木质素修饰酶也可以从被修饰的表达木质素修饰酶的细菌细胞中提取，如美国专利 5,200,338 中所述。例如，细菌细胞，例如 E. coli，可以被包括 LIP 编码序列（SEQ ID NO：1） 的表达载体所转化，所述 LIP 编码序列置于强的组成性启动子（例如 SP6）的调控下。在表达之后，可裂解细菌细胞，可以通过色谱技术收集 LIP（细节参见 Billman-Jacobe，1996，Curr. Opin. Biotechnol. 7: 500-4; Harris and Emtage，1986，Microbiol. Sci. 3: 28-31）。

本发明所采用的木质素修饰酶也可以从哺乳动物细胞系中提取，例如 HeLa 细胞。在这种情况下，LIP 编码序列位于合适的表达载体（例如 pCDNA3. 1，Invitrogen Life Technologies，Frederick，MD，USA）中的强的哺乳动物启动子（例如 CMV）下。在用表达载体转染 HeLa 细胞之后，LIP 表达产物可以通过常规纯化和色谱技术从细胞或培养基（例如通过修饰 LIP 序列以包括分泌信号）中提取（详见

Cunha and Aires-Barros，2002. Mol. Biotechnol. 20: 29-40)。

虽然木质素修饰酶可以施用于皮肤或毛发而无需共同施用另外的化合物，但是当木质素修饰酶 LIP 在作为氧化激活剂的电子受体（也就是能氧化底物的分子）的存在下和/或酚类化合物例如藜芦基醇（Harvey 等，1992，Biochem Soc Trans 20: 345-9）及作为氧化介导剂的藜芦醚（Ward 等，Enzyme and Microbial Technology（2002），30: 490-498）存在下施用时，其增亮能力被提高。

因此，按照本发明的优选实施方式，木质素修饰酶在氧化激活剂例如过氧化氢和氧化介导剂例如藜芦基醇施用之前、同时或之后施用。

木质素修饰酶本身可以用于皮肤或毛发，但是，为了提高增亮效率，木质素修饰酶优选包含在化妆品组合物中，该化妆品组合物用于特定用途，例如一般性皮肤增亮、雀斑增亮或毛发增亮。这些化妆品组合物可以包含表皮渗透剂例如丁二醇和二甘醇单乙醚，以及毛发渗透剂例如烷醇胺。

此处所用的术语“化妆品组合物”是指包括本文所描述的活性成分（例如 LIP）和另外的化学成分例如生理学上合适的载体和赋形剂、氧化激活剂和/或氧化介导剂的制品。化妆品组合物的目的是便于将活性成分给予生物体。

此后，所使用的短语“合适的载体”是指不会对生物体产生显著干扰并且不会抵消木质素修饰酶的生物学活性和性质的载体或稀释剂。

此处术语“赋形剂”是指加入到化妆品组合物中以进一步方便活性成分给予的惰性物质。赋形剂的非限制性实例包括碳酸钙、磷酸钙、各种糖和各种类型的淀粉、纤维素衍生物、明胶、植物油和聚乙二醇。

化妆品组合物可以以局部方式施用，例如直接将化妆品组合物施用到患者的组织区域内。合适的施用途经可以包括例如局部、皮下和皮内注射。

本发明的化妆品组合物可以通过本领域公知的方法制备，例如通过常规的混合、溶解、造粒、包糖衣、研粉、乳化、作成胶囊、包埋或冻干法。

因此，用于本发明的化妆品组合物可以利用一种或多种生理学上

可以接受的包含赋形剂和辅剂的载体以常规方式配制，所述赋形剂和辅剂有助于将活性成分加工为制剂。适当的配方依赖于所选择的给药方法。

对于注射，化妆品组合物的活性成分可以在水溶液中配制，优选生理学相容的缓冲液例如 Hank's 溶液、Ringer's 溶液或生理盐水缓冲液。

或者，活性成分可以是干粉形式，在使用前与合适的赋形剂，例如基于无热原水的溶液，进行重构。

本领域技术人员能够确定治疗有效的量，特别是在阅读了本发明提供的细节之后。

对于本发明方法中所使用的任何制剂，治疗有效的量或剂量可以最初通过体外试验进行估计。如实施例部分所示，LIP 和过氧化氢的浓度可以通过体外试验最优化，并进一步适应于体内使用。此外，可以在组织培养体系或动物模型中准备剂量，以获得想要的浓度或滴度。此类信息可用于更准确地确定人类中有用的剂量。

取决于皮肤色素沉着疾病（例如黄褐斑、黑斑病、黄褐病和色斑）的严重程度以及皮肤的反应性，剂量可以是单次或多次给药，疗程持续数天至数周，或直到治愈或获得皮肤疾病的缓解。

当然，组合物的施用量将取决于所治疗的受试者、疾病的严重程度、给药方式、医师的判断等。

包含在本发明的化妆品组合物中的木质素修饰酶也可以以更高的浓度提供，可由医师作为治疗皮肤色素沉着疾病例如黄褐斑、黑斑病、黄褐病和色斑的药物组合物来开具处方。

下面描述了包含木质素修饰酶的用于皮肤或毛发增亮的配方。

皮肤增亮

为了最优化并控制皮肤增亮，木质素修饰酶优选包含在用于皮肤增亮目的的化妆品组合物中。

由于本发明的皮肤增亮化妆品组合物用于体内，因此该组合物优选具有高纯度并且基本不含可能有害的杂质，例如至少食品（National Food ，NF）级，一般至少分析级，优选至少药物级。如果给定的化合物必须在使用前合成，这样的合成或后续的纯化应当优选获得基本不含任何可能有毒的杂质的产品，所述杂质在所述合成或纯化步骤中

可能用到。

活性成分

包含在本发明的化妆品组合物中的木质素修饰酶，例如木质素过氧化物酶，的浓度选自 1-100 U/gr 的范围。根据目前已知的配置，包含在本发明的化妆品组合物中的木质素修饰酶以选自 5-100 U/gr 范围的浓度提供。可以理解，木质素修饰酶的优选浓度是根据该组合物的特定用途选择的，因此，对于一般性皮肤增亮而言，所采用的优选浓度是 5-20 U/gr，而对于雀斑增亮而言，采用的是更宽的浓度范围 5-100 U/gr。

皮肤增亮化妆品组合物中所使用的电子受体（氧化激活剂）优选是以至少 0.005 %的浓度提供的过氧化氢。过氧化氢稳定，但在中性或碱性条件下会分解形成水和活性氧。该活性氧的反应性是很强的。

化妆品组合物优选缓冲到 pH 为 4 或更低，因为木质素过氧化物酶只有在低于 4 的 pH 下才有活性，优选 pH 2.5-3. 5，过氧化氢在这样的 pH 下稳定。

任何能够维持 pH 4 或更低 pH 的缓冲液都可以使用。因此，采用乙酸、酒石酸、磷酸或柠檬酸的缓冲液可以用于皮肤增亮化妆品组合物。

如下面的实施例部分所示，本发明的过氧化氢用磷酸稳定在 pH 3.5。

本发明中所使用的氧化介导剂（oxidizing mediators）是芳香族小分子，或更具体地是甲氧基化合物，其提高了氧化势（oxidative potential）和木质素修饰酶的稳定性。本发明中所使用的优选氧化介导剂是藜芦基醇和藜芦醚。

如实施例部分所示，包含在本发明的化妆品组合物中的藜芦基醇优选在水中稀释到至少 0.05 %的浓度。

表皮渗透剂

为了提高活性成分（例如 LIP）的经皮吸收，可以向化妆品组合物中加入一系列试剂中的一种或多种，包括但不限于二甲亚砜、二甲基乙酰胺、二甲基甲酰胺、表面活性剂、azone、醇、丙酮、丙二醇和聚乙二醇。

如下面的实施例部分所示，木质素修饰酶 LIP 和活化剂过氧化氢

优选以最适于提高 LIP 皮肤渗透的方式和浓度与表皮渗透剂例如丁二醇和二甘醇单乙醚分别混合。本发明所用的丁二醇以至少 1%的浓度提供，二甘醇单乙醚 以至少 3%的浓度提供。

载体

除了此处所公开的试剂的药学有效量以外，本发明这一方面的化妆品组合物也包含皮肤病学可接受的载体。

术语“皮肤病学可接受的载体”是指适用于局部施用至皮肤即角质组织上，具有良好的美学性质，与本发明的活性剂和任何其它成分相容，用于哺乳动物安全无毒的载体。载体的有效量选自如下范围：按组合物重量计，约 50 % 至约 99.99 %，优选约 80 % 至约 99.9 %，更优选约 90 % 至约 98 %，最优选约 90 % 至约 95 %。

乳剂

本发明组合物中所用的载体可以是多种形式。这些形式包括乳剂载体，包括但不限于水包油、油包水、水包油包水（water-in-oil-in-water）及聚硅氧烷包水包油（oil-in-water-in-silicone）乳剂、乳膏、软膏、水溶液、洗剂或气溶胶。本领域技术人员可以理解，给定的组分将主要分布至水相或油/聚硅氧烷相中，这取决于组合物中该组分的水溶性/分散性。

根据本发明的乳剂一般含有药学有效量的此处公开的试剂以及脂质或油。脂质和油可以来自动物、植物或石油，可以是天然的或合成的（即人造的）。优选的乳剂也含有湿润剂，例如丙三醇。乳剂优选还含有按载体重量计约 1％至约 10％，更优选约 2％至约 5％的乳化剂。乳化剂可以是非离子型、阴离子型或阳离子型。合适的乳化剂描述于例如 1973 年 8 月 28 日授予 Dickert 等人的美国专利 US 3,755,560，1983 年 12 月 20 日授予 Dixon 等人的美国专利 US 4,421,769，以及 McCutcheon's Detergents and Emulsifiers，North American Edition，pages 317- 324（1986）。

乳剂还可以含有消泡剂，以使在应用于角质组织之后所起的泡沫最小化。消泡剂包括高分子量聚硅氧烷和用于此类用途的本领域公知的其它材料。

合适的乳剂可以具有较宽范围的粘度，这取决于预期的产品形式。优选的示例性低粘度乳剂具有约 50 厘泊或更小的粘度，更优选

约 10 厘泊或更小，最优选约 5 厘泊或更小。乳剂也可以含有消泡剂，以使在应用于角质组织之后所起的泡沫最小化。消泡剂包括高分子量聚硅氧烷和用于此类用途的本领域公知的其它材料。

一种类型的乳剂是聚硅氧烷包水乳剂。聚硅氧烷包水乳剂含有连续的聚硅氧烷相和分散的水相。优选的本发明聚硅氧烷包水乳剂包含按重量计约 1％至约 60％，优选约 5％至约 40％，更优选约 10％至约 20％的连续的聚硅氧烷相。连续的聚硅氧烷相作为外部相存在，其含有或包围着不连续的水相，下面将对此进行描述。

连续的聚硅氧烷相可以含有聚有机硅氧烷油。优选的聚硅氧烷包水乳剂系统被制备出来以提供氧化稳定的载体，用于运载此处公开的药学有效量的试剂。这些优选乳剂的连续的聚硅氧烷相包含按重量计约 50％至约 99.9％的有机聚硅氧烷油和按重量计小于约 50％的非聚硅氧烷油。在一个特别优选的实施方式中，连续聚硅氧烷相包含按连续聚硅氧烷相的重量计至少约 50％，优选约 60％至约 99.9％，更优选约 70％至约 99.9％，更优选约 80％至约 99.9％的聚有机硅氧烷油，以及按连续聚硅氧烷相的重量计最多约 50％的非聚硅氧烷油，优选小于约 40％，更优选小于约 30％，更优选小于约 10％，最优选小于约 2％。与相当的含有低浓度聚有机硅氧烷油的油包水乳剂相比，这些有用的乳剂系统可以提供持续时间更长的更强的氧化稳定性。在连续聚硅氧烷相中非聚硅氧烷油的浓度被最小化或被完全避免，以便可能进一步增强组合物中本发明的活性化合物的氧化稳定性。这种类型的聚硅氧烷包水乳剂在 1997 年 11 月 25 日授予 Mason 等人的美国专利 US 5,691,380 中进行了描述。

用于组合物中的有机聚硅氧烷油可以是挥发性的，非挥发性的，或挥发性和非挥发性聚硅氧烷的混合物。在该语境中使用的术语“非挥发性的”是指那些在室温条件下为液态并且闪点（在一个大气压下）大于约 100 摄氏度的聚硅氧烷。在该语境中使用的术语“挥发性的”是指所有其它的聚硅氧烷油。合适的有机聚硅氧烷可以选自大量的聚硅氧烷，覆盖较宽范围的挥发性和粘度。合适的有机聚硅氧烷油的实例包括聚烷基硅氧烷、环状聚烷基硅氧烷和聚烷基芳基硅氧烷，这对于本领域技术人员来说是已知的，并且商购可得。

连续聚硅氧烷相可以含有一种或多种非聚硅氧烷油。在连续聚硅

氧烷相中非聚硅氧烷油的浓度优选被最小化或被完全避免，以便进一步增强组合物中药学活性剂的氧化稳定性。合适的非聚硅氧烷油的熔点在约一个大气压下为约 25 °C 或更低。适用于连续聚硅氧烷相的非聚硅氧烷油的实例是局部人用产品化工领域公知的那些油包水乳剂形式的非聚硅氧烷油，例如矿物油、植物油、合成油、半合成油等。

本发明的有用的局部组合物包含约 30％至约 90％，更优选约 50％至约 85％，最优选约 70％至约 80％的分散水相。术语“分散相”对于本领域技术人员来说是公知的，它暗示该相以悬浮于连续相或被连续相包围的小颗粒或液滴的形式存在。分散相也已知为内部或不连续相。分散水相是分散的小的水性微粒或液滴，其悬浮于前述的连续聚硅氧烷相中或被连续聚硅氧烷相包围。水相可以是水，或水与一种或多种水溶性或水分散性成分的组合。此类任选成分的非限制性实例包括增稠剂、酸、碱、盐、螯合剂、树胶、水溶性或水分散性醇和多元醇、缓冲剂、防腐剂、防晒剂、着色剂等。

本发明的局部组合物的分散水相中通常含有按组合物重量计约 25％至约 90％，优选约 40％至约 80％，更优选约 60％至约 80％的水。

本发明的聚硅氧烷包水乳剂优选包含乳化剂。在一个优选实施方式中，组合物含有按组合物重量计约 0.1 ％ 至约 10 ％的乳化剂，更优选约 0.5 ％ 至约 7.5 ％，最优选约 1 ％ 至约 5 ％的乳化剂。乳化剂有助于水相在连续聚硅氧烷相中的分散和悬浮。

很多乳化剂可以用于此处以形成优选的聚硅氧烷包水乳剂。已知的或常规的乳化剂可以用于组合物中，前提是选定的乳化剂与组合物的必需组分在化学上和物理上相容，并且提供了预期的分散特征。合适的乳化剂包括聚硅氧烷乳化剂，例如有机修饰的有机聚硅氧烷，对本领域技术人员也已知为聚硅氧烷表面活性剂，含有非聚硅氧烷的乳化剂及其化合物，本领域技术人员已知其可用于局部人用产品。

有用的乳化剂包括很多聚硅氧烷乳化剂。这些聚硅氧烷乳化剂通常是有机修饰的有机聚硅氧烷，对本领域技术人员也已知为聚硅氧烷表面活性剂。合适的乳化剂描述于例如 McCutcheon's, Detergents and Emulsifiers, North American Edition (1986), Allured Publishing Corporation 出版；1991 年 4 月 30 日授予 Ciotti 等人的美国专利 US 5,011,681；1983 年 12 月 20 日授予 Dixon 等人的美国专利 US

4,421,769; 1973 年 8 月 28 日授予 Dickert 等人的美国专利 US 3,755,560 之中。

其它优选的局部载体包括水包油乳剂，具有连续的水相和分散于其中的疏水的、水不溶相（“油相”）。包含水包油乳剂的合适载体的实例描述于 1991 年 12 月 17 日授予 Turner, D. J. 等人的美国专利 5,073,371 和 1991 年 12 月 17 日授予 Turner, D. J. 等人的美国专利 5,073,372。下面详细描述了特别优选的水包油乳剂，其中含有结构剂（structuring agent）、亲水表面活性剂和水。

优选的水包油乳剂包含结构剂以助于形成液体结晶凝胶网络结构。不受理论限制，据信该结构剂有助于为组合物提供流变学特征，这对组合物的稳定性有好处。结构剂也可以作为乳化剂或表面活性剂起作用。优选的本发明组合物含有按组合物重量计约 0.5 % 至约 20 %，更优选约 1 % 至约 10 %，最优选约 1 % 至约 5 %的结构剂。优选的本发明结构剂选自硬脂酸、棕榈酸、十八烷醇、十六烷醇、山萮醇、硬脂酸、棕榈酸、具有平均约 1 至约 21 个氧化乙烯单元的十八烷醇的聚乙二醇醚、具有平均约 1 至约 5 个氧化乙烯单元的十六烷醇的聚乙二醇醚及其混合物。

大量的阴离子表面活性剂在此处也是有用的。参见例如 1975 年 12 月 30 日授予 Laughlin 等人的美国专利 US 3,929,678。此外，两性和两性离子表面活性剂在此处也是有用的。

优选的水包油乳剂包含约 0.05 % 至约 10 %，优选约 1 % 至约 6 %，更优选约 1 % 至约 3 %的至少一种亲水表面活性剂，其可以将亲水材料分散于水相中（百分比按局部载体的重量计）。表面活性剂最少必须足够亲水以在水中分散。合适的表面活性剂包括已知的大量阳离子型、阴离子型、两性离子和两性表面活性剂中的任何一种。参见 McCutcheon's, Detergents and Emulsifiers, North American Edition（1986）, Allured Publishing Corporation 出版; 1991 年 4 月 30 日授予 Ciotti 等人的美国专利 US 5,011,681; 1983 年 12 月 20 日授予 Dixon 等人的美国专利 US 4,421,769; 以及美国专利 US 3,755,560。所选的具体表面活性剂取决于组合物的 pH 和存在的其它组分。优选的是阳离子表面活性剂，特别是二烷基季铵化合物，其实例描述于 1992 年 9 月 29 日授予 McCall 等人的美国专利 US 5,151,209; 1992 年 9 月 29

日授予 Steuri 等人的美国专利 US 5,151,210；美国专利 US 5,120,532；美国专利 US 4,387,090；美国专利 US 3,155,591；美国专利 US 3,929,678；美国专利 US 3,959,461；McCutcheon's，Detergents & Emulsifiers（North American edition 1979） M. C. Publishing Co.；以及 Schwartz，等，Surface Active Agents，Their chemistry and Technology，New York: Interscience Publishers，1949。

或者，其它有用的阳离子乳化剂包括氨基－酰胺。这些阳离子乳化剂的非限制性实例包括氯化硬脂酰氨基丙基 PG-二甲基铵磷酸盐（stearamidopropyl pG-dimonium chloride phosphate），氯化山萮酰氨基丙基 PG-二甲基铵（behenamidopropyl PG dimonium chloride），乙代硫酸硬脂酰氨基丙基乙基二甲基铵（stearamidopropyl ethyldimonium ethosulfate），硬脂酰氨基丙基二甲基（乙酸肉豆蔻酯）氯化铵，硬脂酰氨基丙基二甲基十六-十八烷基（cetearyl）甲苯磺酸铵，硬脂酰氨基丙基二甲基氯化铵，硬脂酰氨基丙基二甲基乳酸铵及其混合物。

优选的水包油乳剂含有按局部载体重量计约 25 % 至约 98 %，优选约 65% 至约 95 %，更优选约 70 % 至约 90 %的水。

局部组合物

化妆品组合物可以以化妆品工业所采用的用于皮肤的多种形式中的任何一种进行配制，包括溶液、洗剂、喷雾剂、乳膏、软膏、油乳膏（salve）、凝胶等，如下文所述。

优选地，该化妆品组合物被配制为足够粘以保持在所处理的皮肤区域上，不会很快蒸发，和/或不易被水洗掉，但辅以肥皂、清洁剂和/或香波时则易于除去。

制备具有此类属性的组合物的方法是本领域技术人员公知的，详细描述于 Remington's Pharmaceutical Sciences，1990（supra）；和 Pharmaceutical Dosage Forms and Drug Delivery Systems，6th ed.，Williams & Wilkins（1995）。

载体

本发明的局部组合物包括但不限于洗剂和乳膏，可以包含皮肤病学可接受的润肤剂。此类组合物优选含有约 2% 至约 50%的润肤剂。此处所使用的“润肤剂”是指用于防止或缓解干燥以及用于保护皮肤

的材料。多种合适的润肤剂是已知的，并且可以用于此处。参见例如 Sagarin，Cosmetics，Science and Technology，2nd Edition，Vol. 1，pp. 3243（1972），其中含有适合用作润肤剂的材料的多个实例。优选的润肤剂是甘油。甘油的优选用量是约 0.001 至约 20 %，更优选约 0.01 至约 10 %，最优选约 0.1 至约 5 %，例如 3 %。

根据本发明的洗剂和乳膏一般包含溶液载体系统以及一种或多种润肤剂。洗剂通常包含约 1 % 至约 20 %，优选约 5 % 至约 10 % 的润肤剂；约 50 % 至约 90 %，优选约 60 % 至约 80 % 的水；以及药学有效量的此处所描述的试剂。乳膏通常包含约 5 % 至约 50 %，优选约 10 % 至约 20 % 的润肤剂；约 45 % 至约 85 %，优选约 50 % 至约 75 % 的水；以及药学有效量的此处所描述的试剂。

本发明局部施用的化妆品组合物也可以包括另外的成分，添加这些成分例如用于丰富化妆品组合物的香气和皮肤营养因子。

选择此类适用于人类角质组织而不会引起毒性、不相容、不稳定、过敏反应以及合理医学判断范围内的其它反应的组分。此外，此类任选组分是有用的，前提是它们不会无法令人接受地改变本发明活性化合物的益处。

CTFA Cosmetic Ingredient Handbook，Second Edition（1992）描述了大量护肤品工业中常用的非限制性化妆品成分，其适合用于本发明的组合物中。这些成分类别的实例包括：研磨剂、吸收剂、美学成分例如香料、色素、调色剂/着色剂、精油、皮肤 sensates、收敛剂等（例如丁香油、薄荷醇、樟脑、桉树油、丁香酚、甲基乳酸、橡子馏出物）、抗痤疮剂、抗结块剂、消泡剂、抗微生物剂（例如碘丙基丁基氨基甲酸酯）、抗氧化剂、粘合剂、生物添加剂、缓冲剂、膨胀剂、螯合剂、化学添加剂、着色剂、化妆品收敛剂、化妆品杀虫剂、变性剂、药物收敛剂、外部止痛剂、薄膜形成剂或材料，例如聚合物，用于辅助组合物的成膜性质和直接性（substantivity）（例如二十碳烯和乙烯吡咯烷酮的共聚物），不透明剂、pH 调节剂、推进剂、还原剂、多价螯合剂、皮肤调理剂（例如湿润剂，包括多样化的和闭合的）、皮肤光滑（soothing）剂和/或愈合剂（例如泛醇和衍生物（例如乙基泛醇）、真芦荟（aloe vera）、泛酸及其衍生物、尿囊素、红没药醇和甘草酸二钾（dipotassium glycyffhizinate））、皮肤治疗剂、增稠剂和

维生素及其衍生物。

化妆品组合物可直接施用到皮肤上。或者，可以通过本领域已知的各种透皮给药系统通过正常皮肤施用而给予，例如以时间释放方式（time released manner）将组合物释放到皮肤中的透皮贴剂。本领域已知的其它给药系统包括压力气溶胶瓶、离子电渗疗法或sonophoresis。离子电渗疗法用于提高皮肤渗透性和协助透皮运输。美国专利 US 5,667,487 和 5,658,247 公开了适用于超声波－离子电渗疗法介导的治疗剂穿过皮肤的转运的 ionosonic 装置。或者或此外，也可以使用脂质体或胶束作为运送载体。

包含在本发明化妆品组合物中的活性成分适用于通过黑色素的氧化而增亮皮肤。但是，需要时可以通过加入还原剂而控制和停止该氧化反应。这些试剂可以在单独的化妆品组合物中配制，在需要时施用到皮肤上。

毛发增亮剂

活性成分

按照本发明教导配制的毛发增亮组合物包括上述的氧化剂和介导剂。

如下面的实施例部分所示，毛发增亮可以在 1.5 mM 藜芦基醇和 pH 3.5 的酒石酸缓冲液中的 8.8 mM 过氧化氢存在下实现。

润肤剂

润肤剂包括但不限于烃油和蜡，例如矿物油，石油等，植物和动物油和脂肪，例如橄榄油，棕榈油，蓖麻油，玉米油，大豆油等，羊毛脂及其衍生物，例如羊毛脂，羊毛脂油，羊毛脂蜡，羊毛脂醇等。其它润肤剂包括具有 10 到 20 个碳原子的脂肪酸的酯，例如包括肉豆蔻酸酯、硬脂酸酯、异硬脂酸酯、棕榈酸酯等，例如肉豆蔻酸甲酯，肉豆蔻酸丙酯，肉豆蔻酸丁酯，硬脂酸酯丙，异硬脂酸丙酯，棕榈酸丙酯等。其它润肤剂包括具有 10 到 20 个碳原子的脂肪酸，包括硬脂酸，肉豆蔻酸，月桂酸，异硬脂酸，棕榈酸等。润肤剂也包括具有 10 到 20 个碳原子的脂肪醇，例如十六烷基醇，十四烷基醇，月桂基醇，异十八烷醇，十八烷醇等。

虽然有些是水溶性的，但多羟基醇和聚醚衍生物也包括在润肤剂中，包括乙二醇，甘油，山梨醇，聚亚烷基二醇等，例如丙二醇，二

丙二醇，聚乙二醇 200-500 等。水溶性实例是优选的。

表面活性剂

乳化剂/表面活性剂优选也用于本发明的毛发增亮组合物中。

表面活性剂的实例包括但不限于疏水烷基、烯基或烷基芳基官能团的聚氧代亚烷基氧化物（spolyoxyalkylene oxide）缩合产物，所述官能团具有可与亲水烯化氧、聚环氧乙烷、环氧丙烷、环氧丁烷、聚氧化乙烯或聚乙二醇缩合的游离活泼氢。特别有效的是辛基苯酚与约 7 到约 13 摩尔环氧乙烷的缩合产物（Rohm & Haas Company 出售，商标 TRITON 100® 系列产品）。

其它成分例如香料、稳定剂、染料、抗微生物剂、抗菌剂、抗凝剂、紫外线吸收剂等也包括在本发明的毛发增亮组合物中。

调理剂

对酸水解稳定的调理剂，例如具有至少一个季铵部分和乙氧基化 monoquat 的聚硅氧烷化合物，优选也被使用以稳定及任选地增稠本发明的毛发增亮组合物。

任选的增稠剂也可以包括进来以提高组合物的美学效果并辅助将组合物施用到毛发上。优选的非离子增稠剂的量是按重量计 0%至约 3%。示例性的增稠剂是甲基纤维素、羟基丁基甲基纤维素、羟基丙基纤维素、羟基丙基甲基纤维素、羟基乙基乙基纤维素和羟基乙基纤维素、二（氢化动物油）苯二甲酰胺、交联马来酸酐-甲基乙烯基醚共聚物、瓜尔胶、黄原胶和阿拉伯胶。

调理组合物的载体主要是水，但也可以包括有机溶剂以助于组合物的制备或提供美学性质，例如粘度控制。合适的溶剂包括低级醇例如乙醇和异丙醇；二醇醚，例如 2-丁氧基乙醇、乙二醇单乙醚、丙二醇和二乙二醇单乙醚或单甲醚及其混合物。非水性溶剂在本发明调理组合物中的存在量可以是按组合物中的载体总重量计约 1 % 至约 50 %，具体约 5% 至约 25%。

可以用在不透明调理物中的非限制性调理剂包括：硬脂基（stearyl）三甲基氯化铵；山萮基三甲基氯化铵（behenetrimethylammonium chloride）；十六烷基三甲基溴化铵；豆油基三甲基氯化铵（soytrimonium chloride）；牛脂基三甲基氯化铵（tallowtrimonium chloride）；二氢化牛脂基（dihyrogenated tallow）

二甲基氯化铵；山萮基三甲基（behentrimethyl）铵硫酸二甲酯（methosulfate）；Peg-2 Oleammonium chloride；二氢化牛脂基二甲基溴化铵；二氢化牛脂基二甲基铵硫酸二甲酯；棕榈基三甲基氯化铵；氢化牛脂基三甲基氯化铵；氢化牛脂基三甲基溴化铵；二鲸蜡基二甲基氯化铵；二硬脂基二甲基氯化铵；二棕榈基二甲基氯化铵；氢化牛脂基三甲基铵硫酸二甲酯；十六烷基三甲基甲苯磺酸铵：二十烷基三甲基氯化铵；以及二牛脂基二甲基氯化铵。

可以用在不透明组合物中的材料包括：脂肪酸酯，不透明聚合物，例如苯乙烯聚合物，例如来自 Morton，International，Inc.的 OPACIFIER 653；以及脂肪醇。下面是脂肪醇的非限制性示列：十六烷基醇；十八烷醇；十六烷基-十八烷基醇（cetearyl alcohol）；山萮醇和花生醇（arachidyl alcohol）。不透明的本发明调理组合物也可以包括 Lexamine S-13，双十六烷基氯化铵和 ceteareth 20。

如果需要的话，本发明的组合物可以置于分散装置或试剂盒中，配有适当的使用说明和标签，指明 FDA 已批准用于皮肤或毛发增亮。

用于增亮皮肤区域或毛发的试剂盒可以包括例如容器，其中包括与适当的缓冲液、载体、渗透剂等一起提供的木质素修饰酶，以及包括上述氧化剂和介导剂的另外的容器。

也可以通过使用本领域已知的分子生物学手段将木质素修饰酶引入到皮肤区域的细胞中。

因此，根据本发明另一方面，提供了一种增亮受试者皮肤区域的方法。根据本发明这一方面的方法是通过在皮肤区域的细胞内以适于氧化皮肤区域的细胞内所含有的色素的方式表达木质素修饰酶而实现的，

所述的表达可以通过用表达载体转化皮肤细胞而实现，所述表达载体包括与启动子序列功能连接的木质素修饰酶编码序列。

为了产生这样的表达载体，编码木质素修饰酶的多核苷酸片段（例如 LIP H1 同功酶，SEQ ID NO：1）可以被连接到市售的表达载体系统，所述表达载体系统适于转化哺乳动物细胞和指导木质素修饰酶在被转化细胞中的表达。可以理解，这样的市售载体系统可以通过常用的重组技术容易地进行修饰，以替换、复制或突变现有的启动子或增强子序列，和/或引入任何另外的多核苷酸序列，例如编码另外的选择

标记的序列或编码报告多肽的序列。

用于本发明的合适的哺乳动物表达载体包括但不限于可从 Invitrogen 获得的 pcDNA3、pcDNA3.1（+/-）、pZeoSV2（+/-）、pSecTag2、pDisplay、pEF/myc/cyto、pCMV/myc/cyto、pCR3.1，可从 Promega 获得的 pCI，可从 Stratagene 获得的 pBK-RSV 和 pBK-CMV，可从 Clontech 获得的 pTRES，以及它们的衍生物。

用于本发明这一方面的合适的表达载体是基于腺病毒的载体。腺病毒载体广泛用于药物应用，包括皮肤基因疗法（Ghazizadeh S，Taichman LB.（2000） Hum Gene Ther 11: 2247-51; Carter PJ，Samulski RJ.（2000）. Int J Mol Med 6 : 17-27）。

上述表达载体可以采用多种转运手段转运到细胞中，包括但不限于脂质体、表皮贴剂、离子电渗疗法或受体介导的胞饮作用。

在后一种方法中，已知将经历胞钡作用（endocytosis）的细胞表面受体的抗体或配体与编码木质素修饰酶的 DNA 序列通过共价连接的聚阳离子附加物（例如聚赖氨酸、鱼精蛋白）络合在一起。所述络合物保持了其对细胞表面的结合特异性，并且当其通过正常的胞饮作用进入核内体分隔（endosomal compartment）时被吸收到细胞中。此外，必须采取步骤以避免 DNA 在核内体-溶酶体中被降解。可以在转染过程中用缩溶酶体剂（lysosomatropic agent）氯喹处理细胞。或者，可以使用通过胞饮作用进行细胞并具有核内体“逃脱”（break out）能力的病毒成分。与配体-DNA 复合物偶联的复制缺陷型腺病毒提供了组织培养细胞的几乎 100 %的体外转染效率。初步研究已经证明了该方法在体内特异性地将 DNA 靶向至选定的细胞类型方面的潜力（Guy J，Drabek D，Antoniou M.（1995）. Mol Biotechnol 1995 3: 237-48）。

在靶细胞中表达后，所述的电子受体和介导剂优选被施用到所处理的区域以助于增亮。

在靶细胞中表达木质素修饰酶是特别有利的，因为它克服了酶本身的细胞内转运的需要，因此可能提高增亮效率。

本发明另外的目的、优点和新特征在本领域技术人员阅读下面的非限制性实施例后将变得更明显。此外，前面描述的以及下面的权利要求中要求保护的本发明的各种实施方式和方面中的每一个都能在下

面的实施例中找到实验支持。

实施例

现在将参考下面的实施例，其与上面的描述一起，以非限制性的方式解释了本发明。

一般而言，此处使用的术语和本发明中使用的实验程序包括分子、生化、微生物和重组 DNA 技术。这些技术在文献中有详尽的解释。参见例如，"Molecular Cloning: A laboratory Manual"Sambrook 等，(1989); "Current Protocols in Molecular Biology" Volumes I-III Ausubel, R. M., ed. (1994); Ausubel 等, "Current Protocols in Molecular Biology", John Wiley and Sons, Baltimore, Maryland (1989); Perbal, "A Practical Guide to Molecular Cloning", John Wiley & Sons, New York (1988); Watson 等, "Recombinant DNA", Scientific American Books, New York; Birren 等 (eds) "Genome Analysis: A Laboratory Manual Series", Vols. 1-4, Cold Spring Harbor Laboratory Press, New York (1998); 美国专利 US 4,666,828; 4,683,202; 4,801,531; 5,192,659 和 5,272,057 中所述的方法; "Cell Biology: A Laboratory Handbook", Volumes 1-111 Cellis, J. E., ed. (1994); "Current Protocols in Immunology" Volumes I-III Coligan J. E., ed. (1994); Stites et al. (eds), "Basic and Clinical Immunology" (8th Edition), Appleton & Lange, Norwalk, CT(1994); Mishell and Shiigi (eds), "Selected Methods in Cellular Immunology", W. H. Freeman and Co., New York (1980); 可用的免疫测试在专利和科学文献中有大量描述，参见例如，美国专利 US 3,791,932; 3,839,153; 3,850,752; 3,850,578; 3,853,987; 3,867,517; 3,879,262; 3,901,654; 3,935,074; 3,984,533; 3,996,345; 4,034,074; 4,098,876; 4,879,219; 5,011,771 以及 5,281,521; "Oligonucleotide Synthesis"Gait, M. J., ed. (1984); "Nucleic Acid Hybridization" Hames, B. D., and Higgins S. J., eds. (1985); "Transcription and Translation" Hames, B. D., and Higgins S. J., eds.(1984); "Animal Cell Culture" Freshney, R. I., ed. (1986); "Immobilized Cells and Enzymes"IRL Press, (1986); "A Practical Guide to Molecular Cloning"Perbal, B., (1984)

and"Methods in Enzymology"Vol. 1-317，Academic Press；"PCR Protocols: A Guide To Methods And Applications"，Academic Press，San Diego，CA（1990）；Marshak et al.，"Strategies for Protein Purification and Characterization-A Laboratory Course Manual"CSHL Press（1996）；所有这些文献都以引用的方式包括在本文中，好像它们被充分阐述一样。在该文件中提供了其它的一般性参考文献。其中的步骤据信在本领域是公知的并为了便于读者阅读而提供。其中所含有的全部信息都以引用的方式包括在本文中。

背景

黄胞原毛平革菌真菌中的木质素过氧化物酶

在黄胞原毛平革菌 BKM-F-1767 培养物的细胞外液中，有超过 12 种血红素蛋白显示木质素裂解活性。这些蛋白可以分为两种类型的糖基化血红素过氧化物酶，木质素过氧化物酶（LIP）和锰过氧化物酶（MNP）。同功酶 H1，H2，H6，H7，H8 和 H10 已被报道是 LIP，H3、H4、H5 和 H9 已被鉴定为 MNP（Farrell 黄胞原毛平革菌，1989）。黄胞原毛平革菌的 LIP 同功酶是由结构相关的基因家族编码的，在其物理性质、底物特异性和稳定性上不相同（Farrell 等，1989；Stewart 等，1992）。作为导致它们分泌的过程的一部分，LIP 同功酶被蛋白质裂解并糖基化（Ghose，1987；Ritch 等，1991；Tien and Kirk，1984）。此外，已报道 LIP 同功酶 H2、H6、H8 和 H10 在甘露糖 6-磷酸部分上被磷酸化，包含在精氨酸连接的寡糖上。成熟细胞外液分析产生了如下启示，即同功酶 HI 可能是由 H2 的翻译后去磷酸化得到的（Kuan and Tien，1989）。

黄胞原毛平革菌中木质素裂解酶的表达是由氮和碳受限而触发的自发（idiophasic）事件，高度依赖于培养条件和培养基成分（Dosoretz 和 Grethlein，1991；Faison and Kirk，1985；Stewart 等，1992；van der Woude 等，1993）。LIP 的形成特别依赖于培养物暴露于高氧压力下（Dosoretz 等，1990；Faison 和 Kirk，1985）。有人认为，氧向静态培养物的转移是受限制的，因此就需要培养物顶层有较高的氧分压以使下面的菌丝体获得足够的氧（Leisola 等，1983；Michel 等，1992）。在通过将真菌固定在非浸没液体培养基中的多孔支持物上而暴露于空

气的培养物中观察到了 LIP 的形成，上述措施提高了氧气对真菌的可得性（Dosoretz 等，1990; Popp 等，1990）。培养基中 Mn^{2+}的浓度对 LIP 和 MNP 的形成产生了不良影响。虽然 MNP 的形成依赖于 Mn，其提高了 MNP 的转录，但 LIP 的形式被 Mn 所抑制。Rothschild 等，（1999） 表明，在黄胞原毛平革菌的氮受限和氮过量培养物中，LIP 形成所需的较高的氧水平可被 Mn 缺乏所代替。

材料和实验方法

用于生产木质素过氧化物酶的黄胞原毛平革菌的生长

真菌黄胞原毛平革菌 BKMF-1767（ATCC 24725） 被维持在 4 °C 的 2 % 麦芽提取物琼脂培养板上（Difco，Detroit，MI，USA）。

制备孢子悬浮液

通过在含有高压灭菌的浓度为 39 g/升的马铃薯葡萄糖琼脂（Potato Dextrose Agar，PDA）的 Petri 皿中培养来自培养板的塞子来获得真菌孢子。然后在 37 °C 培养 PDA 板最多 2 周。为了制备孢子悬浮液，用 0.9 % NaCl 涂覆 PDA 板，通过无菌玻璃织物过滤分生孢子悬液，收集孢子悬浮液。然后在-80 °C 冰冻保存孢子悬浮液。

接种体制备

将孢子接种到无菌接种培养基中（参见下面的配方），至终浓度为 7.5×10^5 孢子/ml。将 90 ml 混合物加入到每一批次的发酵液中（Tien and Kirk，1988. Meth. Enzymol. 161: 238-490; Dosoretz 等，1990, Appl. Microbiol. Biotechnol. 34: 131-7），然后用棉花塞子密封这些批次。培养物在 37 °C 静态生长 48 h 作为粗培养物（shallow culture）。为接种培养物，将发酵批次中的物质用搅拌器（Waring，England）混合 2 min。

搅拌的罐状反应器（STR）发酵罐中真菌的生长

在真菌生长之前，聚氨酯泡沫被固定在发酵罐的冷却管附近，整个 STR 发酵罐被灭菌。然后向 STR 发酵罐中倒入 10 升发酵培养基（参见下面的配方）并加入 900 ml 混合接种体（10 个发酵批次的内容物）。发酵罐与冷却系统相连以维持 37°C 的温度，以 100 rpm 搅拌。以 2 ml/min 的速度将灭菌空气引入到发酵罐中。在生长两天后，将流速改为 4 ml/min。继续生长 3-5 天。

通过将下述溶液混合并用 0.45 μm 滤膜(MSI, Westborough, MA, USA)过滤除菌而制备接种培养基。对于制备 1 升液体培养基来说,将下列成分组合起来:

100 ml 黄胞原毛平革菌生长的基本培养基 ×10(见下面的配方)

10 ml $CaCl_2$ 贮液(13.2 g/1)(Sigma-Aldrich Corp., St Louis, MO, USA). 终浓度 0.132 g/L

12 ml 甘油贮液(50 g/100-ml)(Frutarom, Israel). 终浓度 6 g/L.

加入双蒸水至 1 升。

按下述方法制备发酵培养基并用 0.45 μm 滤膜(MSI, Westborough, MA, USA)过滤除菌。对于制备 10 升液体培养基来说,将下列成分组合起来:

100 ml $CaCl_2$ 贮液(13.2 g/1)(Sigma, USA). 终浓度 0.0132 g/l

120 ml 甘油贮液(50 g/100-ml)(Frutarom, Israel). 终浓度 6 g/l.

50 ml of 吐温-80 贮液(10.8 ml/100 ml)(Sigma, USA). 终浓度 0.54 ml/1

1000 ml 黄胞原毛平革菌生长的基本培养基 × 10(见下面的配方)

3.36 g of 藜芦基醇(Sigma, USA). 终浓度 2 mM

7.740 升双蒸水(DDW),最终体积 10 升。

黄胞原毛平革菌生长的基本培养基 ×10

按下述方法制备黄胞原毛平革菌生长的基本培养基 ×10: 将 7.07 gr 次氮基三乙酸(三钠盐) 溶于 4 升 DDW。然后加入下列试剂: 100 gr 无水 KH_2PO4, 72.7 gr $MgSO4 \cdot 7H_2O$(或 67.39 gr $MgSO4 \cdot 6H_2O$), 3.5 gr NaCl, 0.35 gr $FeSO4 \cdot 7H_20$, 0.63 gr $CoCl_2 \cdot 6H_2O$, 0.35 gr $ZnSO4 \cdot 7H_2O$, 0.055 gr $CuSO_4 \cdot 5H_2O$, 0.035 gr $AlK(SO_4)_2 \cdot 12H_2O$, 0.035 gr H_3BO_3, 0.035 gr $Na_2MoO_4 \cdot 2H_2O$, 500 ml 2M 乙酸缓冲液 pH 4.5, 10 gr 酒石酸铵和 50 mg 硫胺。所有试剂都由 Sigma-Aldrich Corp., St Louis, MO, USA 提供。培养基的 pH 用 NaOH 调节到 4.4-4.45,加入 DDW 至最终体积 5 升。于 4 °C 储存培养基。

从黄胞原毛平革菌的细胞外培养基中分离和纯化 LIP

通过玻璃纤维真空过滤细胞外培养基。然后将滤液通过 0.45 μm

滤膜（MSI，Westborough，MA，USA）除菌，通过中空纤维膜采用蠕动泵（MASTERFLEX，Vernon Hills，IL，USA）浓缩液体。浓缩后的细胞外液体随后通过 10-kDa-截留值的 PM-10 型膜（Amicon，Danvers，MA）进行超滤，再浓缩 25 倍，并用 Mono Q 柱（HR5/5，Pharmacia，Piscataway，NJ）通过 HPLC-阴离子交换层析利用两梯度 0.01-1.00 M 乙酸钠进行纯化。第一个梯度为 pH 6.0，第二个梯度为 pH 4.7，这与同功酶 H1 的等电点（pI）值相当。收集蛋白峰，利用前一批次的纯化 LIP 同功酶 H1 作为标准，检测蛋白峰的活性。LIP H1 级分的吸收在 280 nm 和 409 nm 处测定（Hewlett Packard，Waldbronn，德国）。纯度（RZ）大于 4.0，纯度是以纯化 LIP 同功酶 H1 在 409 nm 的吸收（A_{409}）和 280 nm（A_{280}）的吸收的比例计算的。LIP 浓度在 409 nm 通过 $169M^{-1}cm^{-1}$ 的消光系数确定。

LIP 活性检测

通过 Tien 和 Kirk（1988）描述的方法，在藜芦基醇氧化为藜芦醛的过程中，通过检测 310 处吸收的变化来测定 LIP 的活性。该检测试剂由 pH 2.5 的 100 mM 酒石酸缓冲液中的 4 mM 藜芦基醇和 0.88 mM H_2O_2 组成。用于检测的 0.5 ml 黄胞原毛平革菌细胞外培养基与 0.5 ml 试剂混合，记录 310 nm 处吸收的增加 40 sec。一单位的 LIP 被定义为每分钟 1 μmole 藜芦基醇被氧化为藜芦醛。

确定 LIP 对黑色素的氧化

在 pH 8.00 的 50 mM Tris 缓冲液中制备不同浓度的合成黑色素（Sigma，Cat # M8631，St Louis MO，USA）。在含有藜芦基醇的 pH 3.5 的酒石酸缓冲液中进行 LIP 对黑色素的氧化，通过加入过氧化氢启动酶反应。黑色素的氧化程度通过测定 460 nm 处吸收的下降而确定。

乳膏的制备

优选实施方式中的 LIP 乳膏由两种乳膏组成：酶乳膏和活化剂乳膏。每种乳膏由两相制备出来，即水相和油相。

酶乳膏

酶乳膏的水相：

0.35 %（w/w） DMDM 乙内酰脲（Sharon Lab，以色列）；

2 %（w/w） 丙三醇（Cognis，德国）；

0.1 %（w/w） 藜芦基醇（3-二甲氧基苄基醇，Sigma，美国）；

81.65 %（w/w） DDW（RO Water，以色列）；

0.2 %（w/w） Rhodicare D（黄原胶，Rhodia，法国）；

4 %（w/w）二甘醇单乙醚（PEG-400，乙氧基二甘醇，Gattefosse，法国）；

酶乳膏的油相：

5 % 轻矿物油；

2.5 %（w/w） dragorin 100 SEP（GMS & PEG-100 stearate，Dragoco，德国）；

3 %（w/w） 十六烷醇（Cognis，德国）；

0.2 %（w/w） 山梨酸钾（Chisso Corp.，日本）；

1 %（w/w） brij 721（Uniqema，意大利）。

酶乳膏的制备：将酶乳膏的水相和油相加热至 80 °C，然后混合。将混合物匀化 10 min 并冷却至 55 °C。然后用乳酸将 pH 调节到 3.5。

当混合物冷却到 40 °C 时，加入木质素过氧化物酶（20-50 单位/gr）。将酶混合物匀化 1 min。

活化剂乳膏

活化剂乳膏的水相：

82.888（w/w） DDW（RO Water，以色列）；

0.1 %（w/w） EDTA 二钠（Merck，德国）；

4 %（w/w）二甘醇单乙醚（PEG-400，乙氧基二甘醇，Gattefosse，法国）；

0.1 %（w/w） 山梨酸钾（Chisso Corp.，日本）：

活化剂乳膏的油相：

3.5 %（w/w） brij 72（Steareth-2，Uniqema，意大利）；

2.5 %（w/w） brij 721（Steareth-20，Uniqema，意大利）；

5 %（w/w） 矿物油；

1.3 %（w/w） 十六烷醇（Cognis，德国）；

0.5 %（w/w） silicon 350（Dimethicon，Dow Coming，美国）；

0.1 %（w/w） 山梨酸钾（Chisso Corp.，日本）。

活化剂乳膏的制备

将活化剂乳膏的水相和油相加热至 80 °C 并混合。将混合物匀化

10 min 并冷却至 45 °C，然后用磷酸将 pH 调节到 3.5。

当混合物冷却到 40 °C 时，加入过氧化氢（Riedel-de Haen，德国）（0.012 %（w/w）），缓慢搅拌，确认 pH 合适，并将活化剂混合物匀化 1 min。

确定体内的皮肤增亮效果

为了定量 LIP 的皮肤增亮效果，利用 Minolta 色度计（CR-200 Japan）的三个波长检测被治疗的手的皮肤颜色：Minolta L 检测暗度和亮度，Minolta A 检测红色调，Minolta B 检测黄色调。Minolta L 值的增加反应了皮肤的亮度，也就是说，越大的值对应越亮的皮肤。

实验结果

实施例 1

从黄胞原毛平革菌中纯化 LIP

从黄胞原毛平革菌中制备高纯度的 LIP－为了从黄胞原毛平革菌中纯化 LIP 同功酶 H1，将真菌生长于 STR 发酵罐（图 2）中，这在前面的方法部分有详细描述。在生长 48 小时后检测初始 LIP 活性，当生长维持到至多 120 小时时，检测到显著的活性增长（图 3）。为了纯化 LIP 同功酶 H1，收集峰值 LIP 活性（120 hr）的真菌细胞外液体。然后纯化 LIP 同功酶 H1 蛋白质，按方法部分所述确定其浓度。这样，利用上述装置和条件，可以可靠地生产 LIP，其 H1 同功酶可以通过 HPLC 纯化。

实施例 2

利用纯化 LIP 在水相中的黑色素氧化的优化

为了优化 LIP 氧化黑色素所需的条件，氧化反应中每个重要组分的最佳浓度都独立地被确定。

水相中 LIP 对黑色素的氧化是过氧化氢浓度的函数－首先就水相中 LIP 对黑色素的氧化与过氧化氢浓度的关系进行检测。在 1.5 mM 藜芦基醇和浓度逐渐增加的过氧化氢的存在下，用 0.48 μM 纯化的 LIP H1 氧化恒定浓度的黑色素（70.5 μg/ml）。通过检测黑色素在加入过氧化氢之前以及加入后 160 秒的 460 nm 的吸收来确定氧化程度，按百分比计算。一般而言，黑色素的氧化随着过氧化氢浓度的增加而增

加，直到在 700-900 μM 过氧化氢处达到平台（图 4）。过氧化氢浓度对黑色素氧化的影响通过与图 5 的反应混合物进行比较而得到进一步证实，其中，反应混合物随着过氧化氢浓度的增加而显著增亮。因此，这些结果证明，水相中 LIP 对黑色素的氧化明显依赖于过氧化氢浓度，氧化黑色素的最佳过氧化氢浓度是 600 μM 到 700 μM 之间。

水相中 LIP 对黑色素的氧化是黑色素初始浓度的函数－为了确定水相中 LIP 对黑色素的氧化所需的最佳黑色素浓度，在黑色素浓度逐渐升高的情况下进行进一步检测。在 1.5 mM 藜芦基醇和 600 μM 过氧化氢的存在下，用 0.48 μM 纯化的 LIP H1 氧化黑色素。黑色素初始浓度在 15 到 45 μg/ml 时，LIP 对黑色素的氧化依赖于黑色素的初始浓度。黑色素初始浓度在 45 到 85 μg/ml 时，达到黑色素的最大氧化（60％）（图 6）。因此，在黑色素的初始浓度超过 45 μg/ml 时，LIP 对黑色素的氧化明显不依赖于黑色素的初始浓度。

水相中 LIP 对黑色素的氧化部分依赖于 LIP 浓度－为了进一步优化黑色素氧化的条件，利用最佳的黑色素浓度（70 μg/ml），过氧化氢（700 μM）和藜芦基醇（1.5 mM）就 LIP 浓度对黑色素氧化的影响进行检测。当 LIP 浓度由 0.25 μM 增加到 0.40 μM 时，黑色素氧化由 10％迅速增加到 60％。但是，当 LIP 浓度超过 0.5 μM 时，没有观察到黑色素氧化的变化（图 7）。因此，体外黑色素氧化的最佳 LIP 浓度范围为 0.40-0.50 μM。

实施例 3

利用乳膏中的 LIP 氧化黑色素

为了进一步证实 LIP 同功酶 H1 氧化黑色素的能力，作为体内皮肤增亮的中间步骤，在乳膏配方中检测 LIP 对溶于水相的黑色素的活性。

水相中的黑色素被乳膏中的 LIP 氧化－制备了两种类型的乳膏：酶乳膏包含 LIP 同功酶 H1 级分（25 单位/gr 乳膏）和藜芦基醇（6 mmole/Kg 乳膏），活化剂乳膏包含过氧化氢（3.52 mmole/Kg 乳膏）。为了确定乳膏配方中 LIP 的活性，首先将酶乳膏（0.3 gr）与黑色素（140 μg/ml）混合，观察到了浅灰黑色（图 8a）。当活化剂乳膏（0.3 gr）加入到已含有黑色素的酶乳膏中时，颜色迅速变成浅棕色（图 8b）。

这些结果表明乳膏中的 LIP 在黑色素脱色中非常有效，可进一步用于人类皮肤测试。

实施例 4

乳膏中的纯化 LIP H1 的体内皮肤和毛发增亮

为了检测 LIP 体内增亮皮肤和毛发的能力，将乳膏和水剂中的酶分别加到皮肤和毛发上。

乳膏中的 LIP 体内增亮了皮肤－为了检测乳膏中的 LIP 体内增亮皮肤的能力，将酶乳膏施加到皮肤上并被皮肤吸收，然后以 5 min 的间隔将活化剂乳膏施加四次。当每天重复两次持续一周时，观察到被处理的皮肤区域被显著增亮（图 9）。当被处理的手的两个区域的肤色利用 Minolta 色度仪定量时，观察到施加两周 LIP 乳膏的清晰的皮肤增亮效果（表 1，% 变化）。因此，这些结果证明，以易于施用的乳膏形式制备的 LIP 可以简单有效地体内增亮皮肤，并且此处详述的所制备的 LIP 可以进一步适用于其它体内增亮应用。

表 1 体内皮肤增亮的定量

		Minolta L（亮）	Minolta A （红）	Minolta B（黄）
区域 I	基线	44.8	10.5	16.34
区域 I	2 周	48.8	10.6	17.93
区域 I	% 变化	8.9	----	9.7
区域 II	基线	49.91	10.38	19.28
区域 II	2 周	53.8	9.39	20.63
区域 II	% 变化	7.79	----	7.0

表 1 给出了从 Minolta 色度仪得到的关于被处理的手的两个区域的三组绝对值读数。区域 I 对应于图 9 中画圈的区域，区域 II 对应的数据未示出。

含水配方中的 LIP 体内增亮毛发－除了皮肤之外，也经常需要对黑色素富集的组织中的色素沉着进行增亮。为了进一步检测其体内增

亮效果，将 LIP 施加到人的毛发上。在施加 LIP 之前，首先将毛发浸在 pH 11.5 的 50 mM 碳酸盐缓冲液中 1 小时，然后转移到另一个含有 LIP（25 U/20 μl 水溶液）的管子中。将毛发与 LIP 温育 10 秒钟，然后转移到 pH 3.5 的酒石酸缓冲液中，其中存在藜芦基醇（1.5 mM）和过氧化氢（8.8 mM）。与在同样的但不含 LIP 的溶液中处理的毛发（图 10，左侧管）相比，在 LIP 存在下，1 小时之内观察到了显著的增亮效果（图 10，右侧管）。因此，这些结果证明，在很低浓度的过氧化氢存在下，含水配方中的 LIP 可以有效地体内增亮毛发。

实施例 5

LIP 制备工艺的放大

为了生产适用于商业目的的大量木质素过氧化物酶（LIP），利用放大的方案从黄胞原毛平革菌真菌中纯化 LIP。

通过放大的发酵方案获得的高活性 LIP－按照前面的方法部分所述，利用 90 L 发酵培养基在 100 L 发酵罐中进行发酵。发酵条件包括 160 rpm 搅拌和 0.2 vvm 空气流。采用与前面的方法部分所述的 10 L 发酵罐相同的方式进行接种。生长 7 天后，测定的 LIP 活性为 1600 单位/升。

这些结果证明，可以利用大发酵罐和本发明的放大方案从黄胞原毛平革菌真菌中生产大量高催化活性的 LIP。

实施例 6

LIP 乳膏的皮肤病学测试：低变应原的，敏感皮肤，和正常皮肤上的敏化和攻击（challenging）测试

为了表征 LIP 乳膏的皮肤病学性质，并作为用作化妆品产品的前提条件，对 LIP 乳膏进行几项皮肤病学测试：低变应原测试，正常皮肤的敏化和攻击测试，以及敏感皮肤的敏化和攻击测试。

方法

正常皮肤的皮肤病学测试的研究受试者：该研究包括 50 个志愿者，9 个男性，41 个女性，年龄范围为 18 到 64 岁。这些志愿者的一般健康状况良好，在有待贴片的区域没有可见的皮肤疾病或畸形。要求每个研究受试者阅读、理解并签署知情同意声明。排除条件如下：

孕妇或女性护士，在治疗区域患有严重疾病或进行性疾病和/或病患（pathology）的受试者，采用治疗（例如类维生素（retinoid）A，类固醇）和/或皮肤水合调节剂的受试者，体重不稳定或过度使用酒精或烟草的受试者。

研究受试者的特征总结于下面的表 2 中。

表 2

研究受试者的特征

性别	平均年龄（岁）	可能影响该研究的病史
F	40.36	无
M	34.33	无

敏感皮肤的皮肤病学测试的研究受试者－总共 50 个受试者，6 个男性和 44 个女性完成了测试：22 个受试者的年龄范围为 18 到 35 岁，11 个受试者的年龄范围为 36 到 45 岁，17 个受试者的年龄范围为 46 到 65 岁。

研究中的相关处理－在应用贴片期间，测试位点上不施用水；不允许改变皮肤的系统性或局部治疗；在进行评价的区域内不允许使用皮肤用药物或化妆品，包括清洁用品。

贴片制备－将 2 mg 的本发明 LIP 乳膏置于 Curates® F adhesive strip（Lohmann & Rauscher International GmbH & Co. KG，Rengsdort）中，用于低变应原测试。用于皮肤病学测试和敏感皮肤测试的每个贴片包括 Curates® F adhesive strip 中的 0.07-0.1 克 LIP 乳膏。

基本按照"Appraisal of the Safety of Chemicals in Foods，Drugs and Cosmetics" by J. H. Draize（the Association of Food and Drug Officials of the United States 出版）所述进行 Draize Repeated Insult patch 测试。

诱导期－将贴片施用到指定的接触位点，并保持在位置上 24 小时。在该阶段的末尾，除去贴片，检查位点上的皮肤反应。研究受试者被测试 24 小时，然后再次检查皮肤位点。然后在前面所采用的相

同位点上再次施用贴片。第二次施用与第一次相同，并保持在位置上24小时。该步骤重复9次。研究受试者检查位点上的任何皮肤反应，并在下一次施用前报告他们的观察结果。在研究过程中使用同样的位点。每次施用由Institute of Skin Research（Tel Aviv，Israel）的人员贴上和除去。质量控制人员监控对研究方案的遵守情况。

攻击期－在第9次施用后，有两周的休息期；此后，在诱导期所采用的同样位点以同样的方式施加攻击应用（challenge application）。攻击应用在24小时后除去，检查位点并就刺激或致敏特征进行评级。在攻击应用后48小时（除去贴片后24小时），以及除去后48小时和72小时，进行后继检查。

评级尺度－按照下面的尺度对诱导测试和攻击测试的结果进行评级："0"= 没有可见反应；" ?" = 可疑反应，即轻微的、很小的红斑，没有渗透物；"1"= 弱的阳性反应，即红斑，渗透物，没有离散的丘疹；"2"= 强的阳性反应，即红斑，渗透物，丘疹，离散的小泡；"3"= 额外的阳性反应，即严重的红斑，渗透物，聚集的小泡/大泡反应；"IR"= 刺激反应，即离散的红斑，没有渗透物/片状囊泡状红斑/出血的囊泡状脓疱；"NT"= 未测试。

皮肤病学测试结果

低变应原测试－在该测试中，在除去贴片之后20分钟、24小时和48小时，记录对含有LIP乳膏的贴片应用的反应。如下面的表3所示，所有50个研究受试者中均没有对LIP乳膏的可见皮肤反应。

表 3

低变应原测试结果

编号	受试者	性别	年龄	20 分钟	24 小时	48 小时
1	D.P.	M	37	0	0	0
2	G.B.	F	62	0	0	0
3	Z.A.	F	58	0	0	0
4	S.E.	F	64	0	0	0
5	E.R	F	61	0	0	0
6	G.C.	F	35	0	0	0
7	S.S.	F	26	0	0	0
8	D.P.	F	65	0	0	0
9	E.T.	F	46	0	0	0
10	I.M.	F	58	0	0	0
11	M.I.	F	40	0	0	0
12	G.O.	F	30	0	0	0
13	M.L.	F	49	0	0	0
14	S.A.	M	22	0	0	0
15	C.B.	F	38	0	0	0
16	B.A.	F	34	0	0	0
17	S.I.	F	45	0	0	0
18	K.S.	F	35	0	0	0
19	S.S.	F	28	0	0	0
20	F.H.	F	26	0	0	0
21	R.S.	F	44	0	0	0
22	A.A.	F	25	0	0	0
23	S.T.	M	21	0	0	0
24	F.A.	M	38	0	0	0
25	S.S.	F	42	0	0	0
26	S.R.	M	49	0	0	0
27	S.I.	M	19	0	0	0
28	C.T.	F	32	0	0	0
29	C.J.	M	35	0	0	0
30	H.P.	F	30	0	0	0
31	F.S.	F	36	0	0	0
32	P.A.	F	45	0	0	0
33	P.N.	M	51	0	0	0
34	M.R.	F	30	0	0	0
35	S.L.	F	31	0	0	0
36	T.I.	F	23	0	0	0
37	V.I.	F	30	0	0	0
38	L.A.	F	45	0	0	0
39	T.R.	F	43	0	0	0
40	C.D.	F	38	0	0	0
41	S.S.	F	36	0	0	0
42	L.B.	F	36	0	0	0
43	M.L.	F	31	0	0	0
44	A.T.	M	37	0	0	0
45	G.K.	F	42	0	0	0
46	B.P.	F	51	0	0	0
47	L.T.	F	56	0	0	0
48	I.V.	F	35	0	0	0
49	P.O.	F	43	0	0	0
50	C.P.	F	31	0	0	0

表 3: 在除去应用之后 20 分钟、24 小时或 48 小时评级的低变应原测试结果

用 LIP 乳膏敏化和攻击正常皮肤没有产生任何皮肤反应 - 将 LIP 乳膏导入贴片中，针对 50 个健康的志愿者进行 Draize Repeated Insult patch test。在每次应用贴片后，利用前面的方法部分所描述的评级尺度记录皮肤反应。如下面的表 4 所示，在所有 50 个志愿者中，在诱导期的全部 9 次乳膏应用以及在攻击期的最后一次应用之后，均没有可见的皮肤反应。

表 4

LIP 乳膏的诱导测试和攻击测试的结果

编号	受试者	性别	年龄	按照评级尺度的结果									
				1	2	3	4	5	6	7	8	9	10
1.	D.P.	M	37	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
2.	G.B.	F	62	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
3.	Z.A.	F	58	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
4.	S.E.	F	64	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
5.	E.R	F	61	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
6.	G.C.	F	35	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
7.	S.S.	F	26	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
8.	D.P.	F	65	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
9.	E.T.	F	46	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
10.	I.M.	F	58	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
11.	M.I.	F	40	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
12.	G.O.	F	30	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
13.	M.L.	F	49	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
14.	S.A.	M	22	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
15.	C.B.	F	38	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
16.	B.A.	F	34	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
17.	S.I.	F	45	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
18.	K.S.	F	35	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
19.	S.S.	F	28	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
20.	F.H.	F	26	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
21.	R.S.	F	44	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
22.	A.A.	F	25	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
23.	S.T.	M	21	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
24.	F.A.	M	38	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
25.	S.S.	F	42	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
26.	S.R.	M	49	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
27.	S.I.	M	19	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
28.	C.T.	F	32	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
29.	C.J.	M	35	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
30.	H.P.	F	30	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
31.	F.S.	F	36	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
32.	P.A.	F	45	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
33.	P.N.	M	51	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0

34.	M.R.	F	30	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
35.	S.L.	F	31	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
36.	T.I.	F	23	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
37.	V.I.	F	30	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
38.	L.A.	F	45	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
39.	T.R.	F	43	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
40.	C.D.	F	38	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
41.	S.S.	F	36	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
42.	L.B.	F	36	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
43.	M.L.	F	31	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
44.	A.T.	M	37	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
45.	G.K.	F	42	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
46.	B.P.	F	51	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
47.	L.T.	F	56	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
48.	I.V.	F	35	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
49.	P.O.	F	43	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
50.	C.P.	F	31	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0

表 4：诱导期（打分结果编号 1-9）和攻击期（打分结果编号 10）中每次施用贴片之后的评级分数。M＝ 男；F =女。

敏感皮肤的皮肤病学测试－为了进一步表征 LIP 乳膏的致敏性质，针对具有敏感皮肤的 50 个健康志愿者进行刺激贴片测试(irritation patch test)。在预测试中，发现 11 个受试者具有不同程度的刺痛：2 个具有严重的敏感皮肤，8 个具有中度敏感皮肤，1 个具有轻度敏感皮肤。将包括 LIP 乳膏的刺激贴片置于受试者的背上 48 小时。在 1 小时、24 小时和 48 小时之后检查测试区域，发现在 50 个志愿者中均没有皮肤反应。

这些结果排除了在正常和敏感皮肤中对 LIP 乳膏的低变应原和刺激反应。而且，Repeated Insult patch 测试的结果进一步暗示了 LIP 乳膏作为安全化妆品组合物的用途。

实施例 7

LIP 乳膏在增白皮肤色素沉着方面非常有效。

利用双盲测试就 LIP 乳膏在增白皮肤方面的效果与现有技术中的

乳膏进行了比较。

研究设计

研究受试者－该研究包括12个健康的男性和女性，年龄18-65岁，亚裔，没有疾病，没有皮肤病史或过敏症（哮喘、枯草热、过敏性鼻炎）病史，对任何待测物质以及化妆品制品中的任何成分均没有已知的敏感性。该研究排除下列候选者：正在接受抗炎药物、抗组胺药或皮质类固醇系统或局部治疗的候选者，除非该候选者在参加该研究之前，中断治疗2周（对于系统治疗而言）和3天（对于局部治疗而言）。该研究也排除下列候选者：处于任何诊断或治疗阶段的患有癌症、肾病或肝病的候选者，以及孕妇和哺乳妇女。

研究方案－该研究包括两种类型的乳膏，每种乳膏以双盲的方式施用到一只前臂上：包括LIP作为活性成分的本发明增白乳膏，以及市售产品，2％氢醌（Esomed Medibrands，以色列）。每天两次施用乳膏（即早上和晚上）。不处理前臂的下面部分。在研究开始时（0周），以及施用乳膏一周、两周和三周后，由Institute of Skin Research（Tel Aviv，Israel）的人员检查研究受试者。在每次检查中，记录皮肤色素沉着和副作用。

皮肤色素沉着的评价－采用Derma Spectrometer（Cortex Technology，Denmark）评价皮肤色素沉着，颜色照相采用相同的距离和曝光量，视觉检查由Brenner教授（Head of the Dermatological Department，Souraski Medical Center，Tel Aviv，Israel）和她的小组进行。

研究结果

施用3周后LIP乳膏减少皮肤色素沉着－为了评价LIP乳膏在皮肤增白方面的作用，每天两次将LIP乳膏施用到12名健康志愿者右臂的上面部分。如图11a-b和图13a-b所示，这两幅图中包括两位受试者的代表性照片，在乳膏施用三周后，右前臂的上面部分比乳膏施用前白了许多。

LIP乳膏比氢醌乳膏在皮肤增白方面更有效－LIP乳膏在减少皮肤色素沉着方面的效果与2％的氢醌进行了比较。在乳膏施用21天后，1号研究受试者LIP处理区域的色素沉着减少了3.33单位（图12a蓝色柱和图12c蓝色曲线）。另一方面，同一只前臂未处理区域的色素

沉着减少了 1.33 单位（图 12a，浅蓝色柱）。另一方面，在用氢醌乳膏处理 21 天后，处理区域的色素沉着只减少了 1 单位（图 12b 粉色柱和图 12c 粉色曲线）。如图 14a-c 所示，在其它研究受试者中，观察到了相似的作用。在总结来自全部 12 个研究受试者的结果时，发现 LIP 处理的前臂和氢醌处理的前臂的皮肤色素沉着的平均减少量分别为 1.57 单位（图 15a，蓝色曲线） 和 1.49（图 15a，粉色曲线） 单位。而且，在将皮肤色素沉着的减少量标准化到初始皮肤色素沉着时，LIP 处理的前臂和氢醌处理的前臂的皮肤色素沉着的平均减少量分别为 4.3 %（图 15b，蓝色曲线） 和 3. 8 %（图 15b，粉色曲线） 单位。

这些结果结合在一起证明 LIP 在减少皮肤色素沉着方面是非常有效的。而且，这些结果表明，LIP 乳膏的相对增白效果高于在使用 2 % 氢醌乳膏时观察到的相对增白效果。

可以理解，为了清楚起见，本发明的某些特征是在分开的实施方式的上下文中进行描述的，这些特征也可以在一个单独的实施方式中组合提供。相反，为了简洁起见，本发明的某些特征是在一个单独的实施方式中描述的，这些特征也可以分开提供或以任何合适的亚组合方式提供。

虽然结合具体实施方式对本发明进行了描述，但是很显然，很多替换、修改和变体对本领域技术人员来说将是明显的。因此，落入后附权利要求的精神和较宽范围的所有此类替换、修改和变体都被认为包括在本发明中。本说明书中给出的所有出版物、专利、专利申请及通过识别号给出的序列，均以引用的方式将其全部内容包括在本说明书中，如同每个具体的出版物、专利、专利申请及通过识别号给出的序列被专门地逐个指明以引用的方式包括在本文中一样。此外，本申请中任何文献的引用或列出均不应当解释为该文献是本申请的现有技术。

参考文献

1. Alaluf S, Heath A, Carter N, Atkins D, Mahalingam H, Barret K, Kolb R, Smit N. (2001). Variation in melanin content and composition in Type V and VI photoexposed and photoprotected human skin: the dominant role of DHI. Pigment Cell Res. 14: 337-347.

2. Cooksey CJ, Garratt PJ, Land EJ, Pavel S, Ramsden CA, Riley PA, Smit NPM. (1997). Evidence of the indirect formation of the catecholic intermediate substrate responsible for the autoactivation kinetics of tyrosinase. J. Biol. Chem. 272: 26226-35.

3. Farrell, R. L., Murtagh, K.E., Tien, M., Mozuch, M.D., Kirk, T.K. (1989). Physical and enzymatic properties of lignin peroxidase isoenzymes from *Phanerochaete chrysosporium*. Enzyme. Microb. Technol. 11: 322-328.

4. Ghose, T.K. (1987). Measurements of cellulase activities. Pure Appl. Chem. 59: 257-268.

5. Ritch, T.G., Nipper, V.J., Akileswaran, L., Smith, A.J., Pribnow, D.G., Gold, M.H. (1991). Lignin peroxidase from the basidiomycetes *Phanerochaete chrysosporium* is synthesized as a preproenzyme. Gene 107: 119-126.

6. Tien, M., and Kirk, T.K. (1984). Lignin degrading enzyme from *Phanerochaete chrysosporium*. Purification, characterization and catalytic properties of a unique H_2O_2-requiring oxygenase. Proc. Natl. Acad. Sci. USA. 81: 2280-2284.

7. Kuan, I.C. and Tien, M. (1989). Phosphorylation of lignin peroxidase from *Phanerochaete chrysosporium*. J. Biol. Chem. 264: 20350-20355.

8. Dosoretz, C.G. and Grethlein, H.E. (1991). Physiological aspects of the regulation of extracellular enzymes of *Phanerochaete chrysosporium*. Appl. Biochem. Biotechnol. 28: 253-265.

9. Stewart, P., Kersten, P., Van den Wymelenberg, A., Gaskell, J., Cullen, D. (1992). Lignin peroxidase gene family of *Phanerochaete chrysosporium*: complex regulation by carbon and nitrogen limitation and identification of a second dimorphic chromosome. J. Bacteriol. 174: 5036-5042.

10. van der Woude, M.W., Boominathan, K., Reddy, C. A. (1993). Nitrogen regulation of lignin peroxidase and manganese-dependent peroxidase production is independent of carbon and manganese regulation in *Phanerochaete chrysosporium.* Arch. Microbiol. 160: 1-4.

11. Dosoretz, C.G., Chen, H.C., Grethlein, H.E. (1990). Effect of oxygenation conditions on submerged cultures of *Phanerochaete chrysosporium.* Appl. Microbiol. Biotechnol. 34: 131-137.

12. Faison, B.D. and Kirk, T.K. (1985). Factors involved in the regulation of a ligninase activity in *Phanerochaete chrysosporium.* Appl. Environ. Microbiol. 49: 251-254.

13. Leisola, M., Ulmer, D., Fiechter, A. (1983). Problem of oxygen transfer during degragation of lignin by *Phanerochaete chrysosporium.* Eur. J. Appl. Microbiol. Biotechnol. 17: 113-116.

14. Michel, F.C., Grulcke, E.A., Reddy, C.A. (1992). Determination of the respiration kinetics for mycelial pellets of *Phanerochaete chrysosporium.* Appl. Environ. Microbiol. 58: 1740-1745.

15. Popp, J.L., Kalyanaraman, B., Kirk, T.K. (1990). Lignin peroxidase oxidation of Mn^{2+} in the presence of veratryl alcohol, malonic or oxalic acid, and oxygen. Biochemistry 29: 10475-10480.

16. Rothschild, N., Levkowitz, A., Hadar, Y., Dosoretz, C. (1999). Manganese deficiency can replace high oxygen levles needed for lignin peroxidase

formation by *Phanerochaete chrysosporium*. Appl. Environ. Microbiol. 65: 483-8.

序列表

<110> R.B.T (Rakuto Bio Technologies) Ltd.

<120> 木质素过氧化物酶的生产方法及其在皮肤和毛发增亮中的应用

<130> CPCH0562118P

<160> 1

<170> PatentIn version 3.1

<210> 1
<211> 1119
<212> DNA
<213> Phanerochaete chrysosporium

<400> 1
atggcgttca agcagctcct cgcagccctc tccgtcgccc tgaccctcca ggtcacccaa 60

gctgccccga acctcgacaa gcgcgtcgct tgccccgacg gcgtgcacac cgcctccaac 120

gcggcgtgct gtgcatggtt cccggtcctc gatgatatcc agcagaacct cttccacggt 180

ggccagtgcg gtgccgaggc ccacgaggcc cttcgtatgg tcttccatga ctccatcgct 240

atctcgccca agcttcagtc gcagggcaag tttggcggcg gcggcgcgga cggctcgatc 300

attaccttct cctcgatcga gaccacgtac cacccgaaca tcggcctcga cgaggtcgtc 360

gccatccaga agccgttcat cgcgaagcac ggcgtcacgc gcggcgattt catcgcgttc 420

gccggtgccg tcggcgtgag caactgcccg ggcgcgccgc agatgcagtt cttcctcggc 480

cgccccgagg cgacgcaggc cgcccccgac ggtctcgtgc ccgagccctt ccacaccatc 540

gatcaggttc tcgctcgcat gcttgatgct ggtggcttcg acgagatcga gactgtctgg 600

ctgctctctg cccactccat cgcggctgcg aacgacgtcg acccgaccat ctccggcctg 660

ccgttcgact ccacccctgg ccagttcgac tcccagttct tcgtcgagac gcagctccgc 720

ggtaccgcat tccctggcaa gactggtatc cagggcaccg tcatgtcccc gctcaagggc 780

gagatgcgtc tgcagacgga ccacttgttc gcgcgcgact cgcgcacggc gtgcgagtgg 840

cagtccttcg tcaacaacca gacgaagctg caggaggact tccagttcat cttcacggcg 900

ctctcgaccc tcggccacga catgaacgcc atgaccgact gctccgaggt catccccgcg 960

cccaagcccg tcaacttcgg cccgtcgttc ttccccgccg gtaagacgca cgccgacatc 1020

gagcaggcct gcgcatccac gccgttcccg acgctcatca ccgcccccgg tccctctgcg 1080

tccgtcgctc gcatcccccc gccgccgtcc cccaactaa 1119

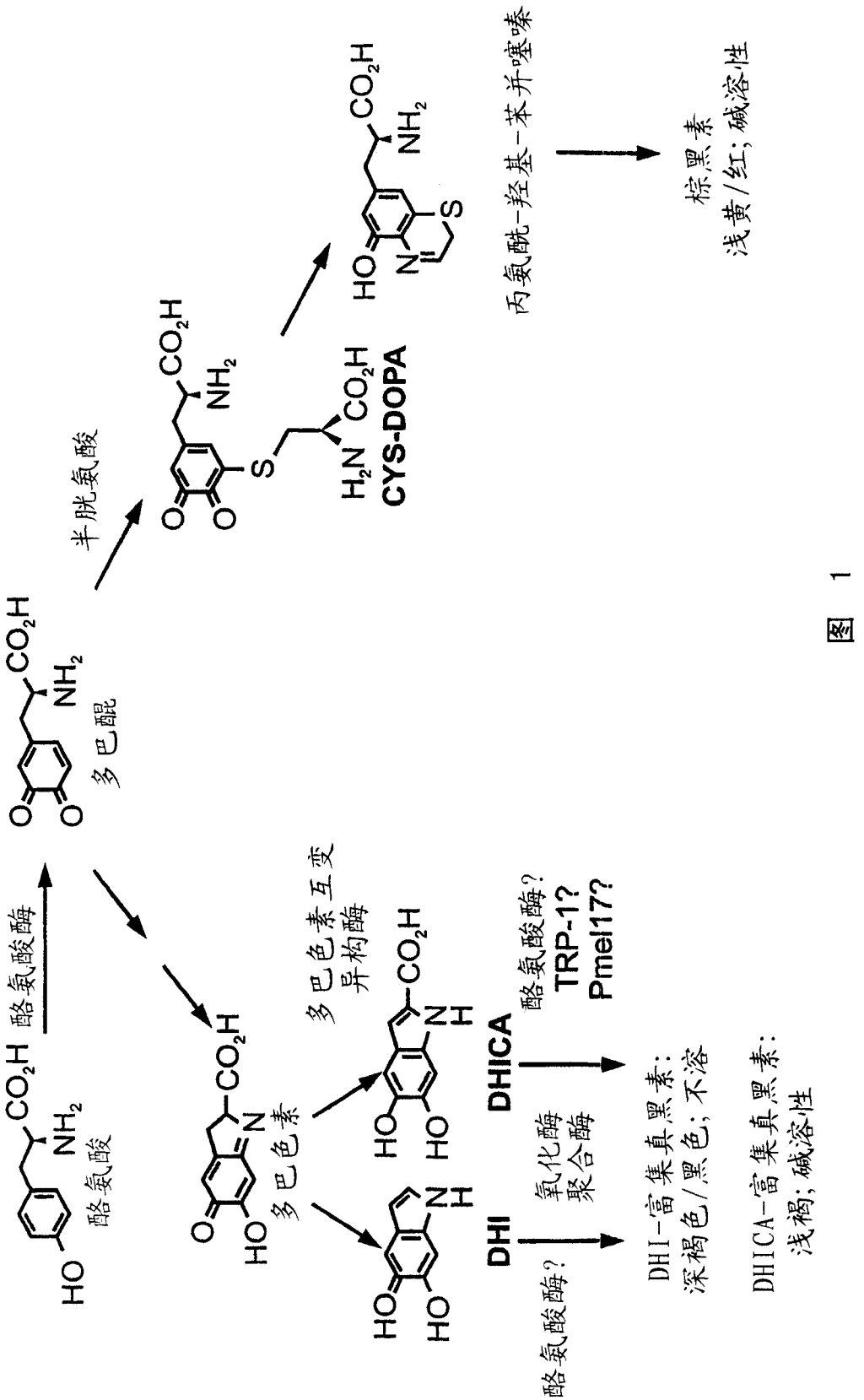

酪氨酸
酪氨酸酶
多巴醌
半胱氨酸
CYS-DOPA
丙氨酰-羟基-苯并噻嗪
棕黑素
浅黄/红;碱溶性
多巴色素
多巴色素互变异构酶
DHI
DHICA
酪氨酸酶?
氧化酶
聚合酶
酪氨酸酶?
TRP-1?
Pmel17?
DHI-富集真黑素:
深褐色/黑色;不溶
DHICA-富集真黑素:
浅褐;碱溶性

图 1

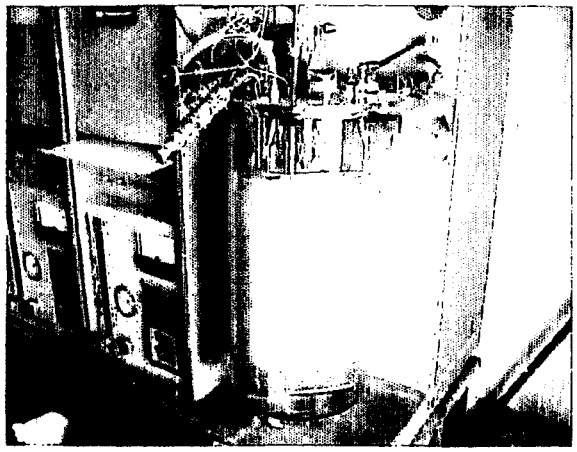


图 2

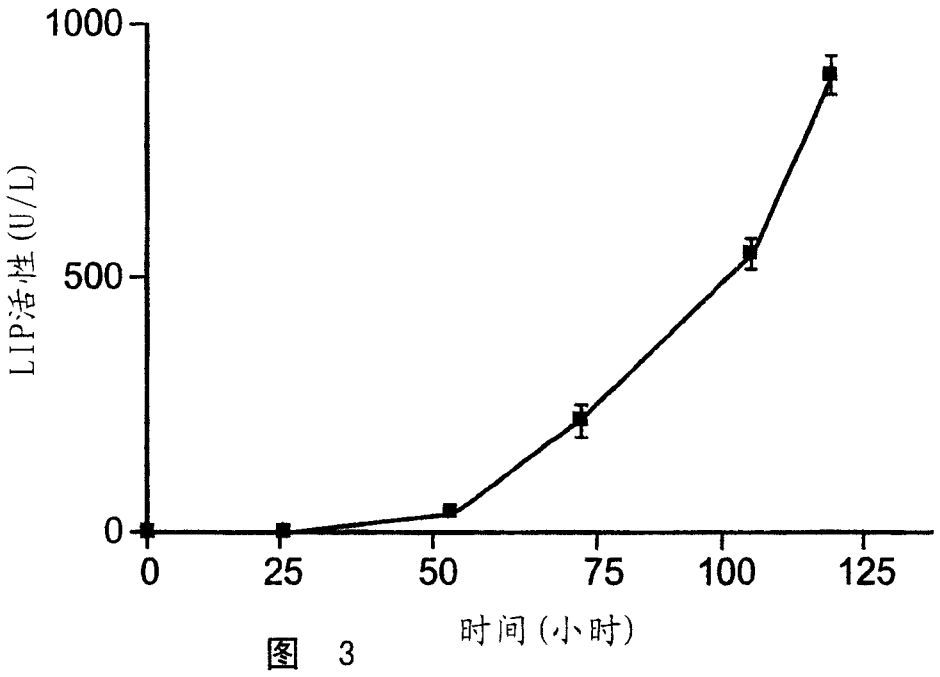

1000
500
0
LIP活性 (U/L)
0
25
50
75
100
125
时间 (小时)

图 3

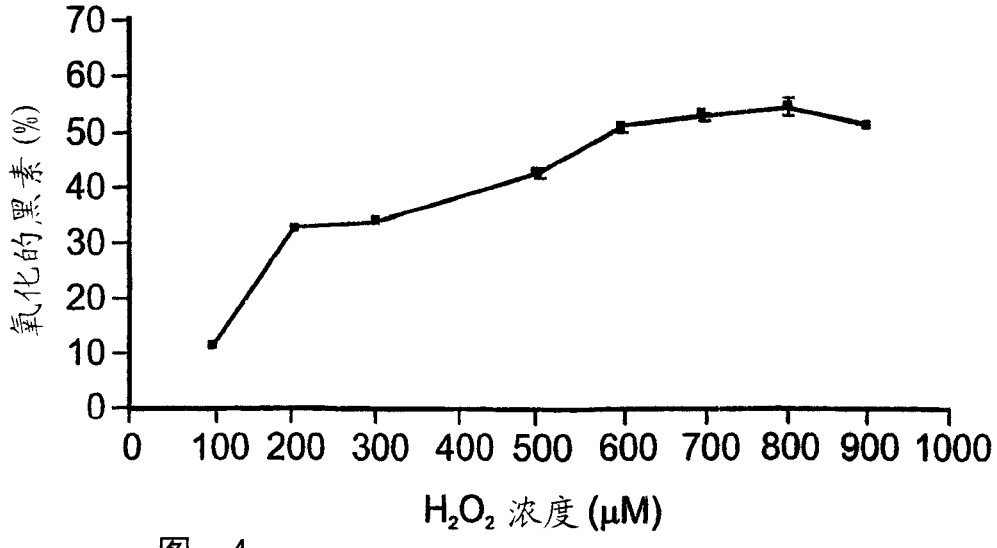

70
60
50
40
30
20
10
0
氧化的黑素 (%)
0
100
200
300
400
500
600
700
800
900
1000
H2O2 浓度 (μM)

图 4

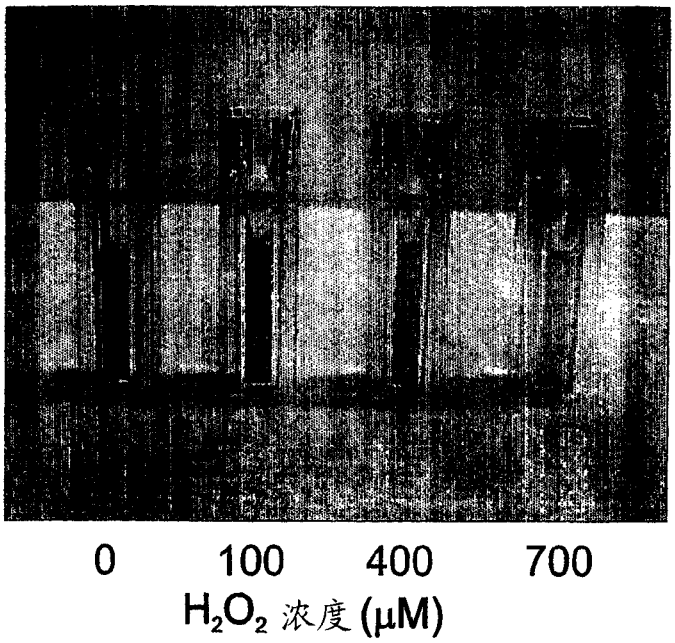


图 5

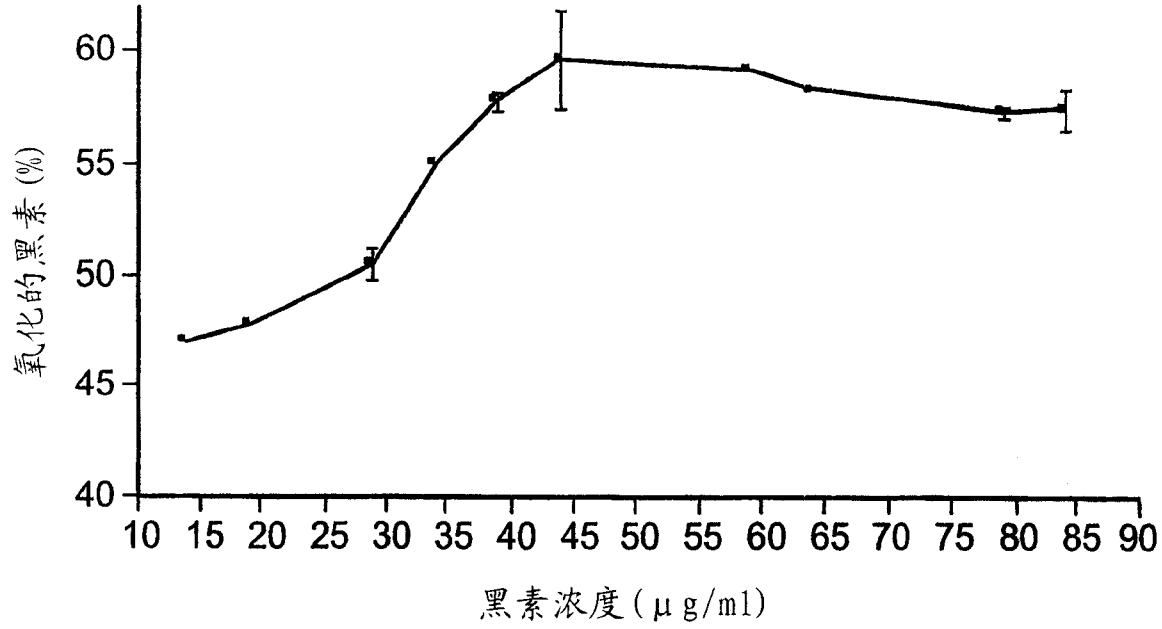

60
55
50
45
40
氧化的黑素(%)
10 15 20 25 30 35 40 45 50 55 60 65 70 75 80 85 90
黑素浓度(μg/ml)

图 6

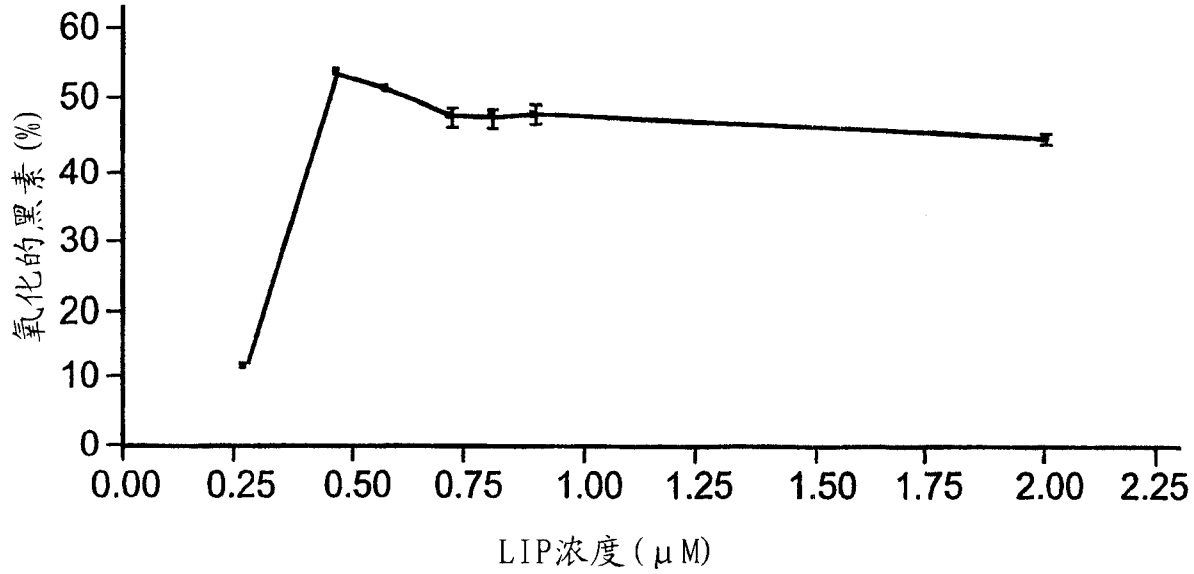

60
50
40
30
20
10
0
氧化的黑素(%)
0.00 0.25 0.50 0.75 1.00 1.25 1.50 1.75 2.00 2.25
LIP浓度(μM)

图 7

图 8a

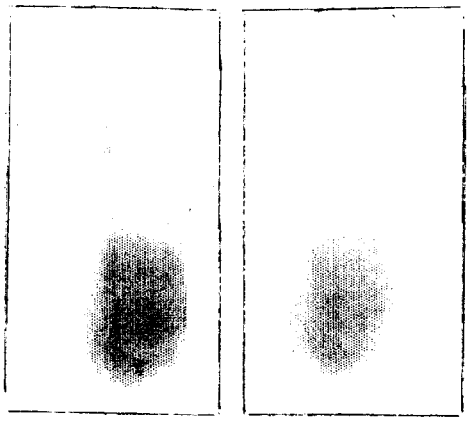


图 8b

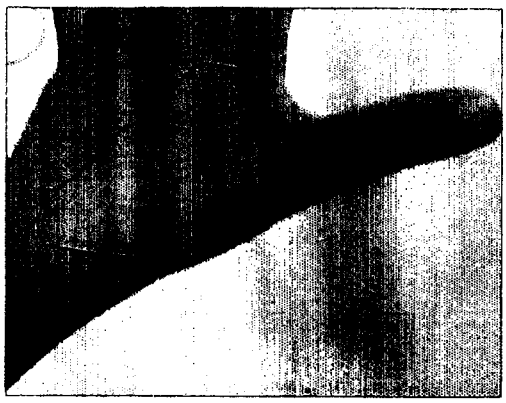


图 9a

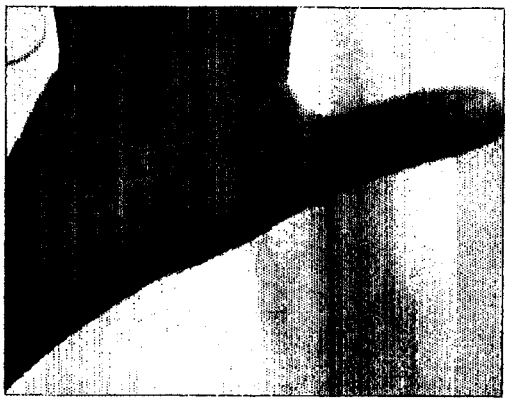


图 9b

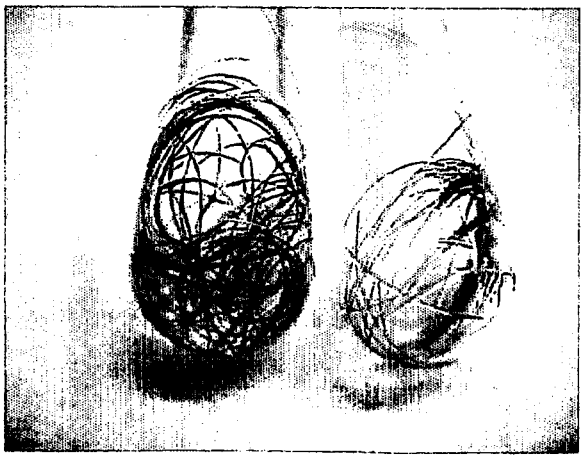


图 10



图 11a



图 11b

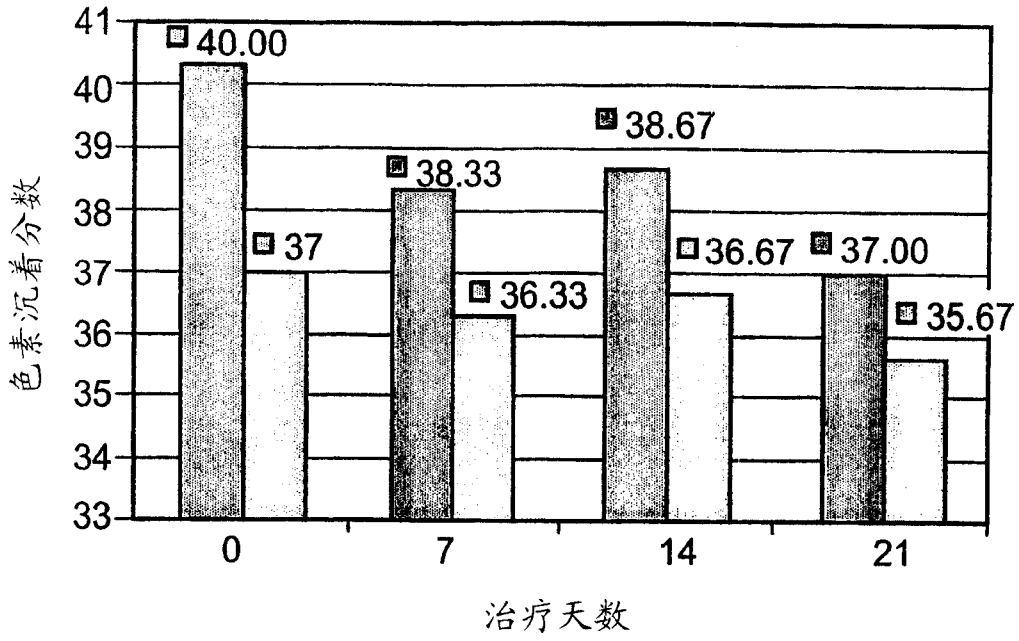

41
40
39
38
37
36
35
34
33
色素沉着分数
40.00
37
38.33
36.33
38.67
36.67
37.00
35.67
0
7
14
21
治疗天数

图 12a

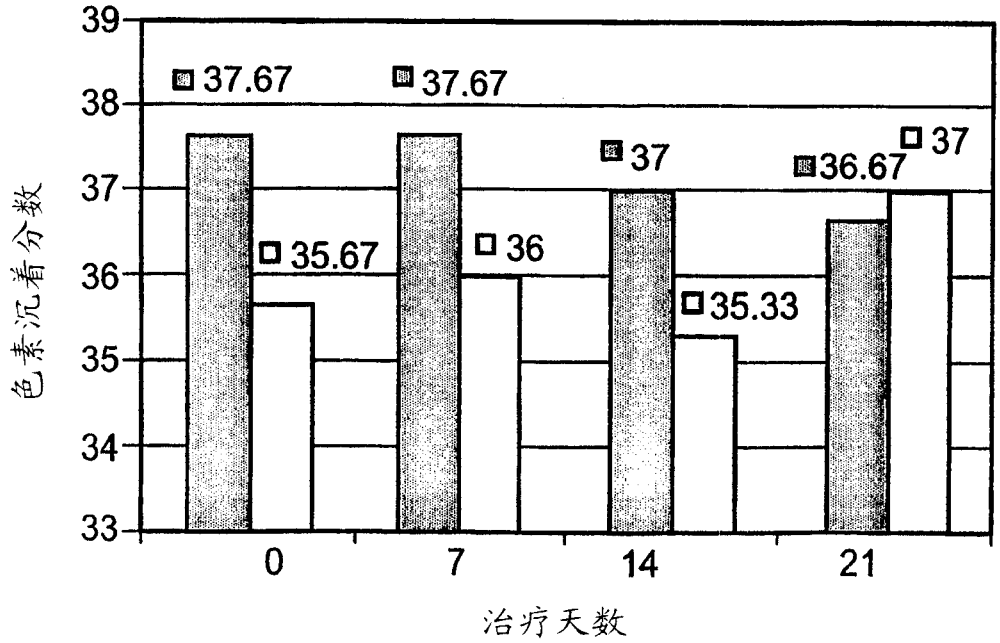

39
38
37
36
35
34
33
色素沉着分数
37.67
35.67
37.67
36
37
35.33
36.67
37
0
7
14
21
治疗天数

图 12b

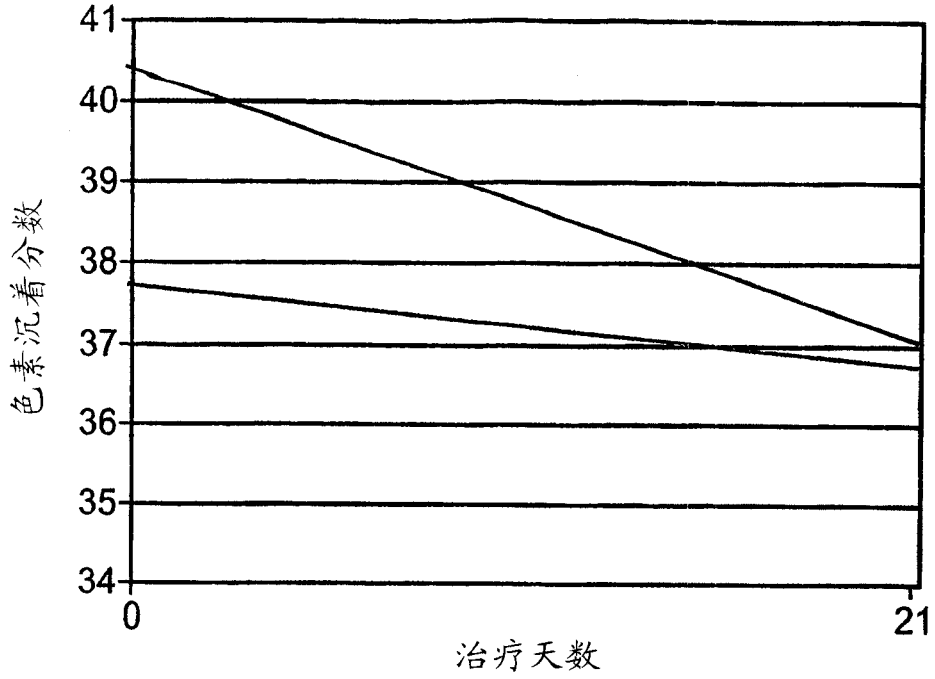


图 12c

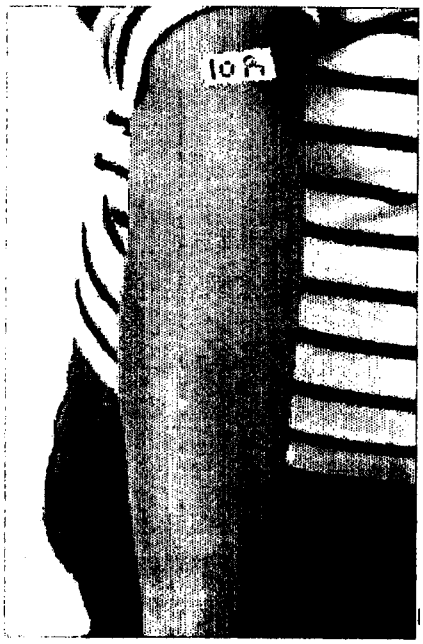


图 13a

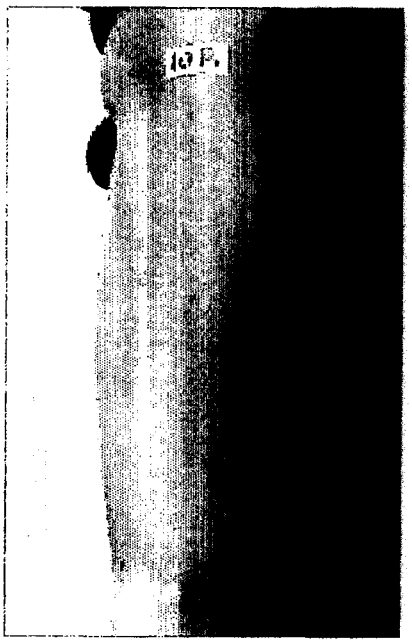


图 13b

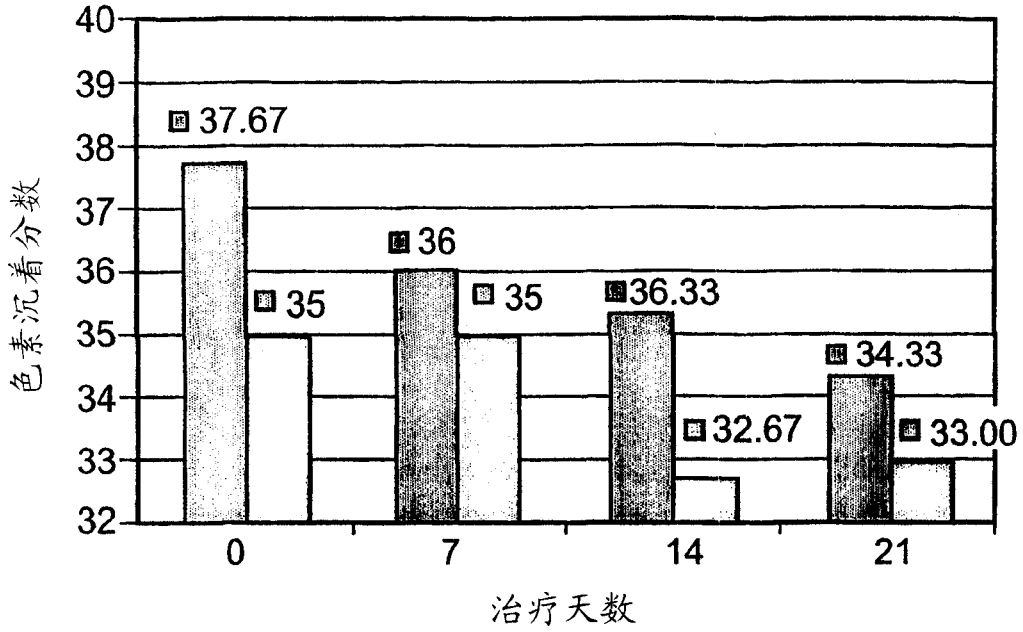

40
39
38
37
36
35
34
33
32
色素沉着分数
37.67
35
36
35
36.33
32.67
34.33
33.00
0
7
14
21
治疗天数

图 14a

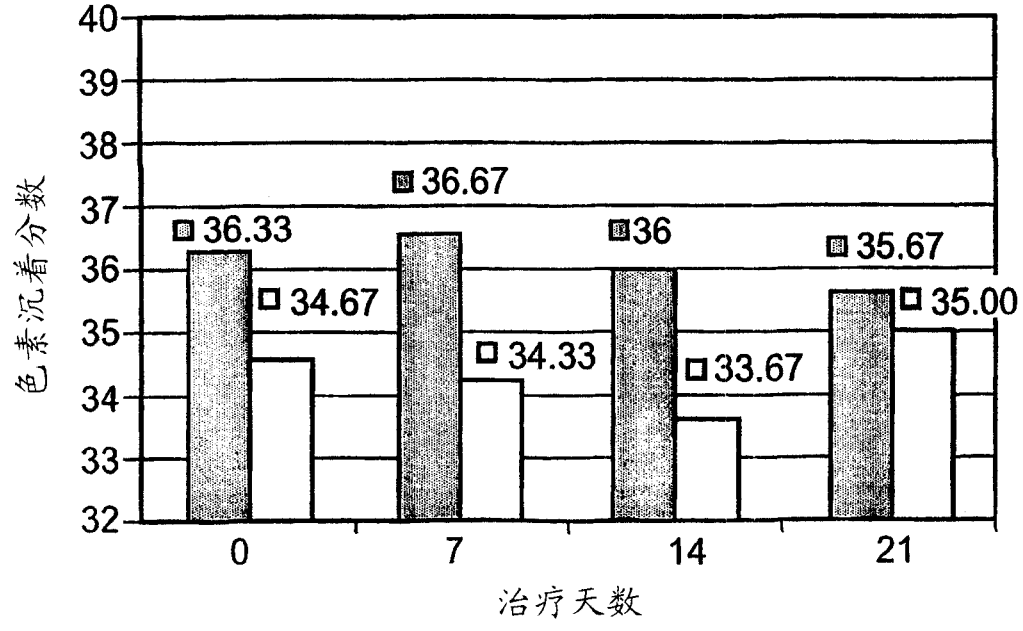

40
39
38
37
36
35
34
33
32
色素沉着分数
36.33
34.67
36.67
34.33
36
33.67
35.67
35.00
0
7
14
21
治疗天数

图 14b

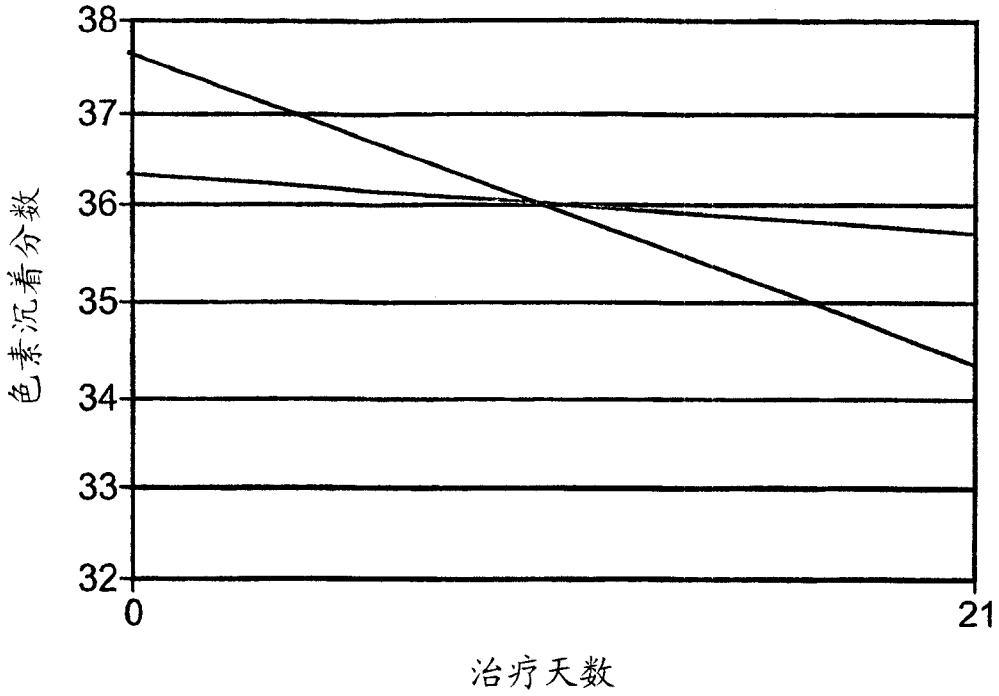


图 14c

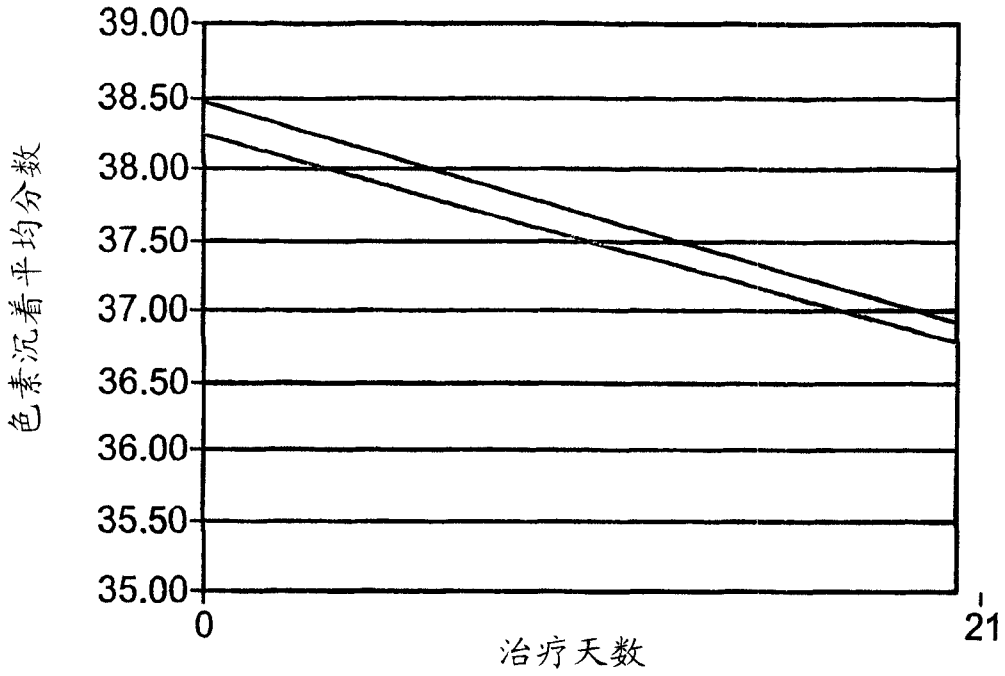

39.00
38.50
38.00
37.50
37.00
36.50
36.00
35.50
35.00
色素沉着平均分数
0
21
治疗天数

图 15a

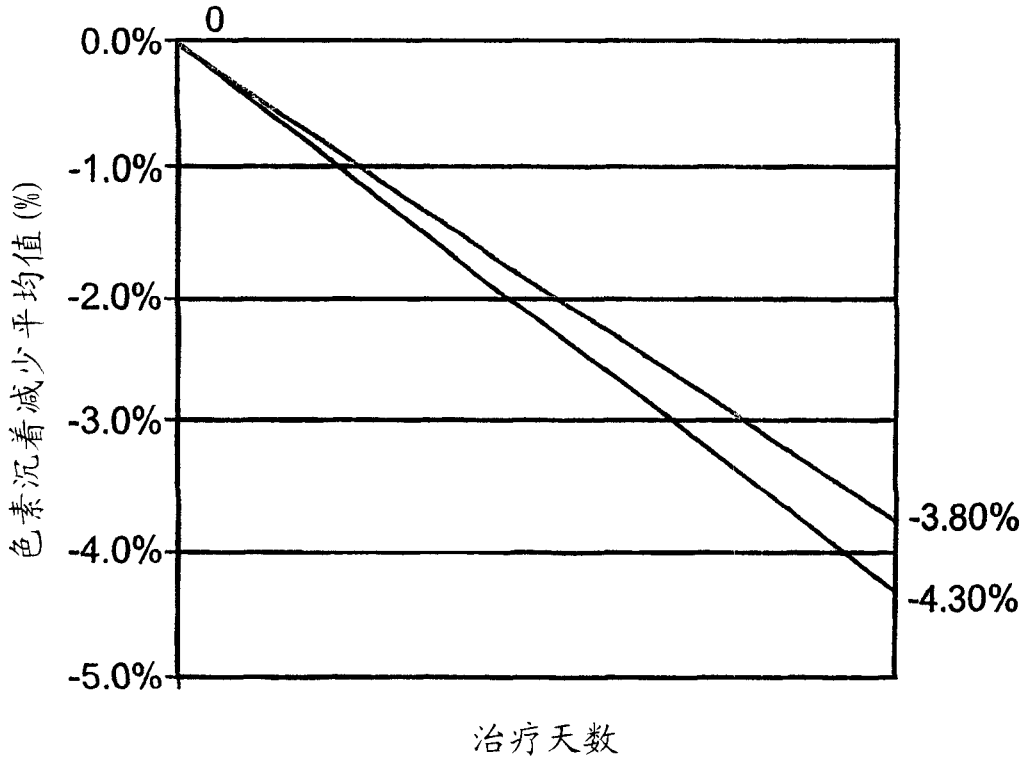

0
0.0%
-1.0%
-2.0%
-3.0%
-4.0%
-5.0%
色素沉着减少平均值(%)
-3.80%
-4.30%
治疗天数

图 15b