



(12) 发明专利

(10) 授权公告号 CN 112739322 B

(45) 授权公告日 2024.06.21

(21) 申请号 201980061260.0

A61K 8/9711 (2006.01)

(22) 申请日 2019.09.18

A61Q 19/02 (2006.01)

(65) 同一申请的已公布的文献号

A61K 36/22 (2006.01)

申请公布号 CN 112739322 A

A61K 36/21 (2006.01)

A61K 36/58 (2006.01)

(43) 申请公布日 2021.04.30

(30) 优先权数据

62/732,688 2018.09.18 US

(56) 对比文件

KR 100848800 B1, 2008.07.31

US 2016324762 A1, 2016.11.10

(85) PCT国际申请进入国家阶段日

2021.03.18

CN 108324601 A, 2018.07.27

路威酩轩香水部. 国妆备进字J20180471. 《纪梵希少女时光精华露》. 国家药品监督管理局, 2018,

(86) PCT国际申请的申请数据

PCT/US2019/051719 2019.09.18

水芝澳公司. 国妆备进字J20127156. 《水芝澳绿茶青春眼部精华露》. 国家药品监督管理局, 2012,

(87) PCT国际申请的公布数据

W02020/061184 EN 2020.03.26

Renata Longhini等. Trichilia catigua: therapeutic and cosmetic values. 《Revista Brasileira de Farmacognosia》. 2016, (第27期), 第254-271页.

(73) 专利权人 玫琳凯有限公司

地址 美国德克萨斯州

Min-Jin KIM 等. Melanogenesis inhibitory activity of Korean Undaria pinnatifida in mouse B16 melanoma cells. 《Interdiscip Toxicol》. 2014, 第7卷(第2期), 第89-92页.

(72) 发明人 大卫·甘 吉赛·卡拉哈斯蒂

(74) 专利代理机构 北京柏杉松知识产权代理事

务所(普通合伙) 11413

专利代理师 邱俊霞 王春伟

审查员 刘波

(51) Int. Cl.

A61K 8/9789 (2006.01)

A61K 36/03 (2006.01)

A61P 17/00 (2006.01)

权利要求书1页 说明书30页

(54) 发明名称

减少色素沉着过度的皮肤外观或提亮皮肤的植物提取物

的混合物中的至少一种、至少两种或全部三种。组合物的局部施用可以减少色素沉着过度的皮肤外观。

(57) 摘要

公开了一种用于减少色素沉着过度的皮肤外观的方法。所述方法可以包括向人的色素沉着过度的皮肤局部施用组合物, 所述组合物包含 (i) 有效量的肖乳香籽提取物, (ii) 有效量的包含巴西椴木树皮/茎提取物、南美菟根提取物和巴西鹧鸪花皮提取物的混合物, 和/或 (iii) 有效量的包含伸长海条藻提取物和裙带菜提取物

1. 组合物在制备用于减少人的由增加的黑色素产生导致的色素沉着过度的皮肤外观的制剂中的用途,其中所述组合物包含0.0001重量%至1重量%的包含巴西椴木树皮/茎提取物、南美菟根提取物和巴西鹧鸪花皮提取物的混合物以减少色素沉着过度的皮肤中的黑色素,

其中巴西椴木树皮/茎提取物、南美菟根提取物和巴西鹧鸪花皮提取物的局部施用减少了色素沉着过度的皮肤中的黑色素,和

其中组合物的局部施用减少了色素沉着过度的皮肤外观,和

其中巴西椴木树皮/茎提取物是水提取物,南美菟根提取物是水提取物,和巴西鹧鸪花皮提取物是水提取物。

2. 根据权利要求1所述的用途,其中色素沉着过度的皮肤是老年性雀斑样痣和/或有黑斑的皮肤。

3. 根据权利要求1所述的用途,其中组合物美白皮肤和/或均匀肤色。

4. 根据权利要求1所述的用途,其中组合物降低了皮肤中的黑色素生成活性。

5. 根据权利要求1所述的用途,其中组合物通过激活脂联素受体减少了黑色素生成活性。

6. 根据权利要求5所述的用途,其中脂联素受体是PAQR7。

7. 根据权利要求1所述的用途,其中组合物还包含肖乳香籽提取物。

8. 根据权利要求7所述的用途,其中肖乳香籽提取物是用超临界二氧化碳(CO₂)提取溶剂获得的。

9. 根据权利要求1所述的用途,其中混合物还包含水、丁二醇和PEG-40氢化蓖麻油。

10. 根据权利要求1所述的用途,其中组合物还含有包含伸长海条藻提取物和裙带菜提取物的混合物。

11. 根据权利要求10所述的用途,其中混合物还包含水。

12. 根据权利要求10所述的用途,其中伸长海条藻提取物是水提取物和/或裙带菜提取物是水提取物,其中每种提取物来自伸长海条藻和/或裙带菜的整个海藻生物体。

13. 根据权利要求7所述的用途,其中组合物包含0.00001重量/重量%至10重量/重量%的肖乳香籽提取物。

14. 根据权利要求10所述的用途,其中组合物包含0.00001重量/重量%至10重量/重量%的包含伸长海条藻提取物和裙带菜提取物的混合物。

15. 根据权利要求1所述的用途,其中组合物为乳液。

16. 根据权利要求15所述的用途,其中乳液为水包油乳液。

17. 根据权利要求1所述的用途,其中组合物为凝胶。

减少色素沉着过度的皮肤外观或提亮皮肤的植物提取物

[0001] 相关申请的交叉引用

[0002] 本申请要求2018年9月18日提交的美国临时申请第62/732688号的权益。参考申请的内容通过引用并入到本申请中。

[0003] 发明背景

发明领域

[0004] 本发明一般涉及局部皮肤用组合物和可用于提亮/美白皮肤、均匀肤色和/或治疗色素沉着过度的皮肤的方法。特别地,该组合物可以包含基于植物的材料,其选自肖乳香(*Schinus terebinthifolius*)籽提取物、巴西椴木(*Ptychopetalum olacoides*)树皮/茎提取物、南美苋(*Pfaffia paniculata*)根提取物、巴西鹌鹑花(*Trichilia catigua*)提取物、伸长海条藻(*Himanthalia elongata*)提取物或裙带菜(*Undaria pinnatifida*)提取物,或其任意组合,以提亮皮肤、均匀肤色或治疗色素沉着过度。

背景技术

[0005] 衰老、长期暴露于不利的环境因素、营养失调、疲劳等会以被认为是视觉上不希望的方式改变皮肤和组织的视觉外观、物理性质和/或生理功能。最显著和明显的改变包括细纹和皱纹的发展、弹性的损失、下垂的增加、紧实度的损失、颜色均匀性甚至肤色的丧失、粗糙的表面纹理和斑状色素沉着。

[0006] 对于颜色均匀性甚至肤色的丧失和斑状色素沉着,这可能是由黑色素生成增加引起的,这会导致皮肤色素沉着过度。特别地,人类皮肤的颜色是由黑色素引起的。黑色素在特殊的树突细胞,即黑色素细胞中生成,所述黑色素细胞存在于皮肤表皮的基底细胞下方或基底细胞之间(美国专利第5411741号)。黑色素通过由酪氨酸酶触发的级联反应来合成(美国专利第5262153号),其中酪氨酸转化为黑色素。黑色素的过度产生会导致色素沉着过度的皮肤,例如具有皮肤色素变化或异常色素沉着的皮肤。这可能在皮肤上出现不想要的雀斑或老年性雀斑样痣。老年性雀斑样痣通常称为黑斑、老年斑、肝斑或日光性雀斑样痣。色素沉着过度的其他类型包括由于擦伤、烧伤、刀伤或皮炎、痤疮、或光毒性反应导致的皮肤黑斑、炎症后色素沉着过度以及其他类似的小的、顽固的色素性病变。

[0007] 暴露于外在因素,例如太阳的紫外线(UV)辐射、皮肤刺激物和/或污染,会触发导致黑色素生成增加并最终导致皮肤色素沉着过度以及肤色不均的生物化学途径。进一步地,激素的变化也会触发这些生物化学途径并导致皮肤色素沉着过度以及肤色不均匀,例如黄褐斑。例如,角质形成细胞(皮肤的最外层细胞)可以释放信号分子,例如 α -黑色素细胞刺激素(α -MSH)和炎性细胞因子,其中每一个都会通过黑色素细胞导致黑色素生成增加。通常希望提亮这些色素沉着过度的区域或使皮肤的不规则色素沉着区域的外观均匀,以提供更好看的皮肤色调/肤色。人们还可能希望增白或降低皮肤中色素沉着的总体水平。在每种情况下,色素沉着过度或不均匀的肤色通常都被看作是美容方面不期望的。

[0008] 长期暴露于传统的脱色剂,例如氢醌、皮质类固醇和曲酸可以引起一些安全问题

(例如褐黄病、萎缩、癌变和其他局部或全身性的副作用)。在一些情况下,使用一种皮肤提亮成分对有显著的色素沉着过度,例如雀斑或老年斑的人可能没有效果。另外,先前组合各种皮肤提亮成分的尝试是无效的,并且在一些情况下,产生了负面结果,例如刺激炎性细胞因子产生、刺激皮肤、恢复期延长和/或未达到应有的皮肤益处。

[0009] 虽然已经尝试生成更多天然成分,但是这种尝试常常需要几种成分和/或不提供足够水平的效果。例如,韩国公布10-2005-0028920公开了洗去型肥皂用于清洗和美白皮肤的用途。该肥皂包含绿豆、糙米、薏苡、白豆(baektae)(即大豆(*Glycine max* L.Merr.))、干燥的艾(*Artemisia*)叶、干燥的桃仁、被白僵病杀死的蚕、Sangyak、鱼腥草(*houlttuynia cordata*)、干燥的菟丝子籽、橙皮、绿茶叶、裙带菜、巨藻和荞麦。

[0010] 因此,先前改善肤色或提亮皮肤的尝试已经显示出具有各种缺点,例如高成本、用药风险、皮肤刺激、恢复期延长或未达到应有的皮肤益处。

发明内容

[0011] 发明人已经确定了与治疗色素沉着过度的皮肤、美白或提亮皮肤和/或均匀肤色有关的至少一些问题的解决方案。该解决方案在于基于植物成分地发现,所述植物成分可以有效治疗这些皮肤状况和/或产生这些结果。特别地,发明人已经发现以下基于植物的提取物中的任意一种、任意组合或所有组合可以减少色素过度沉着的皮肤外观、美白或提亮皮肤、或均匀肤色:肖乳香籽提取物;巴西椴木树皮/茎提取物;南美菟根提取物;巴西鹧鸪花提取物;伸长海条藻提取物;和/或裙带菜提取物。在一些情况下,包含巴西椴木树皮/茎提取物、南美菟根提取物和巴西鹧鸪花提取物的混合物可以用于美白或提亮皮肤的制剂以及对应的使用方法中。在一些情况下,包含伸长海条藻提取物和裙带菜提取物的混合物可以用于美白或提亮皮肤的制剂以及对应的使用方法中。

[0012] 在本发明的一个方面,公开了用于减少人的色素沉着过度的皮肤外观或美白或提亮人的皮肤的方法。在本发明的上下文中,美白和提亮可互换地使用,并且与不在皮肤上使用本发明的组合物时相比,可以包括产生更少的黑色素。该方法可以包括向人的色素过度沉着的皮肤或想要提亮的皮肤局部施用以下组合物,所述组合物包含以下物质的至少一种、至少两种或所有三种:(i)有效量的肖乳香籽提取物;(ii)有效量的包含巴西椴木树皮/茎提取物、南美菟根提取物和巴西鹧鸪花提取物的混合物;或(iii)有效量的包含伸长海条藻提取物和裙带菜提取物的混合物。组合物的局部应用可以减少色素过度沉着的皮肤和/或提亮人的皮肤。然而,在其他方面,不必使用(ii)和(iii)中的混合物;本发明的方法和组合物中可以使用单一的成分和本发明的提取物的任意组合。然而,在本发明的一个方面,混合物(ii)可以包含巴西椴木树皮/茎提取物、南美菟根提取物和巴西鹧鸪花提取物与水、丁二醇和PEG-40氢化蓖麻油。在另一个方面,混合物(iii)可以包含伸长海条藻提取物和裙带菜提取物与水。在一些情况下,本发明的组合物可以包含(i)、(ii)和(iii)中的至少两种。在一些情况下,本发明的组合物可以包含(i)、(ii)和(iii)中的所有三种。在一些方面,色素过度沉着的皮肤可以是有黑斑的皮肤。在一些方面,色素过度沉着的皮肤可以是老年性雀斑样痣,其还可以称为黑斑、老年斑、肝斑或日光性雀斑样痣。因此,本发明的组合物可以用于治疗如老年性雀斑样痣的年龄相关性皮肤沉着过度,其常常在长期暴露于UV辐射或化学品以及存在于空气中的其他污染物和/或施用于皮肤的组合物之后出现在皮肤

上。在一些情况下,本发明的组合物可以用于至少20岁,优选至少30岁,更优选至少40岁,甚至更优选至少50岁或至少60岁或大于60岁的人。

[0013] 本发明的上下文中还公开了包括肖乳香籽提取物、巴西椴木树皮/茎提取物、南美菟根提取物、巴西鹧鸪花提取物、伸长海条藻提取物和裙带菜提取物中的至少一种、至少两种、至少三种、至少四种、至少物种或所有六种的局部皮肤用组合物,其中该组合物能够减少人的色素沉着过度的皮肤外观。在一些方面,如上所述,该组合物可以包括以下物质的至少一种、至少两种或所有三种:(i)有效量的肖乳香籽提取物;(ii)有效量的包含巴西椴木树皮/茎提取物、南美菟根提取物和巴西鹧鸪花提取物的混合物;或(iii)有效量的包含伸长海条藻提取物和裙带菜提取物的混合物。

[0014] 在一些情况下,色素沉着过度的皮肤或肤色不均匀的皮肤位于面部皮肤上,例如前额、脸颊、鼻子、下巴、眼眶部位的皮肤(在眼下、眼睑下、靠近鱼尾纹出现的地方等)或眉毛。或者,色素沉着过度的皮肤或肤色不均匀的皮肤位于非面部皮肤上(例如手、大腿、颈部、臀部、肩颈部、足部等)。因此,预期在本发明的情况下,组合物可以施用至面部皮肤或非面部皮肤。

[0015] 用于本发明的组合物的提取物可以各自分别由作为提取溶剂的水(例如水提取物)、作为提取溶剂的醇(例如醇提取物)、或作为提取溶剂的多元醇(例如多元醇提取物)或这些提取溶剂的任意组合(例如水-醇提取物、水-多元醇提取物、醇-多元醇提取物或水-醇-多元醇提取物)获得。醇的非限制性实例可以是甲醇、乙醇、丙醇、丁醇、戊醇、己醇、庚醇、辛醇等。多元醇的非限制性实例可以是乙二醇、丙二醇、甘油、赤藓糖醇、木糖醇、甘露醇、庚七醇等。另外,可以使用其他提取溶剂,例如另外的亲水溶剂或亲脂溶剂(例如甲烷、乙烷、丁烷、丙烷、己烷、庚烷、辛烷、二甲基亚砷(DMSO)、N-甲基-2-吡咯烷酮(NMP)、二氧化碳如二氧化碳在超临界萃取技术中的使用)。CO₂超临界萃取可以包括用研磨的干燥植物材料填充柱,并在非常高的压力(200巴至400巴)下使超临界液体二氧化碳泵送通过柱,然后收集所得提取物。

[0016] 在一些情况下,肖乳香籽提取物可以从肖乳香的籽部分中获得。这些籽提取物可以通过使用二氧化碳(CO₂)作为溶剂,将籽优选以压碎或浸渍的形式进行超临界提取过程来制备。然后,肖乳香籽的超临界提取物可用于本发明的组合物和方法中。在一些情况下,巴西椴木树皮/茎提取物可以从巴西椴木的树皮和茎中获得。所述树皮/茎提取物可以通过用水作为溶剂,将树皮和茎优选以压碎或浸渍的形式置于水溶液(优选100%的水)中来制备。然后,巴西椴木树皮/茎的水提取物可用于本发明的组合物和方法中。在一些方面,南美菟根提取物可以从南美菟根中获得。所述根提取物可以通过用水作为溶剂,将根优选以压碎或浸渍的形式置于水溶液(优选100%的水)中来制备。然后,南美菟根的水提取物可用于本发明的组合物和方法中。在一些方面,巴西鹧鸪花提取物可以从巴西鹧鸪花的皮中获得。所述巴西鹧鸪花的皮提取物可以通过用水作为溶剂,将皮优选以压碎或浸渍的形式置于水溶液(优选100%的水)中来制备。然后,巴西鹧鸪花的皮的水提取物可用于本发明的组合物和方法中。在一些方面,伸长海条藻提取物可以从伸长海条藻的整个植物/海藻中获得。所述伸长海条藻的整个海藻植物提取物可以通过用水作为溶剂,将整个海藻植物优选以压碎或浸渍的形式置于水溶液(优选100%的水)中来制备。然后,伸长海条藻整株海藻植物的水提取物可用于本发明的组合物和方法中。在一些方面,裙带菜提取物可以从裙带菜的整个

植物/海藻中获得。所述裙带菜的整株海藻植物提取物可以通过用水作为溶剂,将整株海藻植物优选以压碎或浸渍的形式置于水溶液(优选100%的水)中来制备。然后,裙带菜整株海藻植物的水提取物可用于本发明的组合物和方法中。

[0017] 本发明的组合物中的提取物(肖乳香籽提取物、巴西椴木树皮/茎提取物、南美菟根提取物、巴西鹧鸪花提取物、伸长海条藻提取物和/或裙带菜提取物)或提取物的组合或混合物中的每一种的有效量可以为0.00001重量/重量%至25重量/重量%或其间任意范围(例如,0.00001重量/重量%至10重量/重量%、0.00001重量/重量%至5重量/重量%、0.00001重量/重量%至2重量/重量%、0.00001重量/重量%至1重量/重量%、0.00001重量/重量%至0.5重量/重量%、或0.001重量/重量%至1重量/重量%、0.01重量/重量%至1重量/重量%、0.1重量/重量%至1重量/重量%或0.001重量/重量%至2重量/重量%、0.01重量/重量%至2重量/重量%或0.1重量/重量%至2重量/重量%)。在一些情况下,每种提取物的有效量可以为0.00001重量%至3重量%,优选0.0001重量%至2重量%,或更优选0.0001重量%至1重量%,甚至更优选0.0001重量%至0.5重量%。每种提取物可以单独以这些量存在。提取物的组合可以以这些量存在。提取物的混合物可以以这些量存在。混合物包括提取物和任选其他成分的混合物或组合,所述其他成分可形成单一成分,然后可以与其他成分组合以形成局部皮肤用组合物。通过比较,提取物和任选其他成分的组合每个都可以是单独的成分,其可以独立地与其他成分组合以形成局部皮肤用组合物。

[0018] 提取物(肖乳香籽提取物、巴西椴木树皮/茎提取物、南美菟根提取物、巴西鹧鸪花提取物、伸长海条藻提取物和/或裙带菜提取物)可以减少黑色素生成。在其他方面,提取物可以减少皮肤中的酪氨酸酶活性。在其他方面,提取物可以通过激活脂联素(Adipo Q)受体来减少黑色素生成。在一些情况下,Adipo Q受体是PAQR7。不希望被理论所束缚,相信每种提取物或其组合物可以用作PAQR7受体的激动剂,然后其可以导致皮肤细胞中黑色素细胞产生的下调。在本发明的另一方面,提取物可以增加皮肤中脂联素的生成。

[0019] 除了本发明的提取物之外,本发明的局部皮肤用组合物可以进一步包含本文所述的一种或多于一种成分。例如,组合物可以包含一种或多于一种附加成分,其选自一种或多于一种化妆品用成分或药物成分。在一些情况下,组合物可以包括一种或多于一种调节剂、保湿剂、pH调节剂、结构化剂、含硅酮的化合物、无机盐和/或防腐剂。在一些方面,局部用组合物进一步包含水,优选至少50重量%、60重量%、70重量%、80重量%或90重量%或多于90重量%的水,更优选为50重量%至90重量%的水。在一些方面,本发明的局部用组合物可以不包含一种或多于一种附加成分,所述附加成分选自一种或多于一种化妆品用成分或药物成分。在一些特定方面,本发明的组合物可以不包含肖乳香籽提取物、巴西椴木树皮/茎提取物、南美菟根提取物、巴西鹧鸪花提取物、伸长海条藻提取物和/或裙带菜提取物中的一种或多于一种。在一些情况下,局部用组合物不包含水。在一些情况下,本文的局部用组合物可以是无水的或基本上无水的。

[0020] 在特定的方面,本发明的组合物被配制为局部皮肤用组合物。组合物可以包含用于化合物和提取物的皮肤可接受的载剂或载体。组合物可以进一步包含保湿剂或湿润剂、表面活性剂、含硅酮的化合物、UV剂、油和/或本说明书所确定的其他成分或本领域中已知的其他成分。组合物可以是面膜、润肤露、霜、凝胶、精华素、乳液(例如,水包油、油包水、水包硅酮、硅酮包水、水包油包水、油包水包油、硅酮包水包油等)、溶液(例如水溶液或水醇溶

液)、无水基底(例如口红或散粉)、软膏、乳、糊状物、气溶胶、固体形式、眼部凝胶、凝胶精华素、凝胶乳液等。组合物可以配制为用于局部皮肤施用,在使用期间每天施用至少1次、2次、3次、4次、5次、6次、7次或多于7次。在本发明的其它方面,组合物可以是储存稳定或颜色稳定的,或是两者。还预期可以选择组合物的黏度以达到希望的结果,例如根据所需的组合物类型,这种组合物的黏度可以为约1cp至远超过1百万cp,或其中可得到的任意范围或整数(例如,在25°C下在布氏黏度计上用TC转子以2.5rpm的转速测量的2cp、3cp、4cp、5cp、6cp、7cp、8cp、9cp、10cp、20cp、30cp、40cp、50cp、60cp、70cp、80cp、90cp、100cp、200cp、300cp、400cp、500cp、600cp、700cp、800cp、900cp、1000cp、2000cp、3000cp、4000cp、5000cp、6000cp、7000cp、8000cp、9000cp、10000cp、20000cp、30000cp、40000cp、50000cp、60000cp、70000cp、80000cp、90000cp、100000cp、200000cp、300000cp、400000cp、500000cp、600000cp、700000cp、800000cp、900000cp、1000000cp、2000000cp、3000000cp、4000000cp、5000000cp、6000000cp、7000000cp、8000000cp、9000000cp、10000000cp等)。

[0021] 在非限制性方面,组合物的pH值可以为约6至约9。在其它方面,pH可以为1、2、3、4、5、6、7、8、9、10、11、12、13或14。组合物可以包含甘油三酯。非限制性实例包含短链、中链和长链甘油三酯。在某些方面,甘油三酯是中链甘油三酯(例如辛酸癸酸甘油三酯)。组合物还可以包含防腐剂。防腐剂的非限制性实例包括苯甲酸钠、碘丙炔醇丁基氨甲酸酯、对羟基苯甲酸甲酯、对羟基苯甲酸丙酯、或对羟基苯甲酸甲酯和对羟基苯甲酸丙酯的混合物。在一些实施方案中,组合物不含对羟基苯甲酸酯。

[0022] 本发明的组合物可以具有UVA和UVB吸收性质。该组合物可以具有2、3、4、5、6、7、8、9、10、11、12、13、14、15、20、25、30、35、40、45、50、55、60或大于60,或是其中任意整数或由其得到的防晒指数(SPF)。组合物可以是防晒乳液、喷雾或霜。

[0023] 本发明的组合物还可以包含以下附加成分的任意一种、任意组合或全部:水、螯合剂、保湿剂、防腐剂、增稠剂、含硅酮的化合物、精油、结构化剂、维生素、药物成分、抗氧化剂,或这类成分的任意组合或这类成分的混合物。在某些方面,组合物可以包含在之前句子中确定的这些附加成分中的至少二种、三种、四种、五种、六种、七种、八种、九种、十种或全部。这些附加成分的非限制性实例在本说明书全文确定,并通过引用并入本章节。这类成分的量以组合物的重量或体积计可以为0.0001%至99.9%,或者是在如本说明书其它章节中所公开的范围之间的任何整数或范围,其通过引用并入本段。

[0024] 也考虑了包含本发明的组合物的试剂盒。在特定的实施方案中,该组合物包含在容器中。所述容器可以是瓶子、分配器或包装。所述容器可以分配预定量的组合物。在某些方面,组合物以喷雾、薄雾、团块或液体形式分配。容器可以在其表面上包含标记。所述标记可以是单词、缩写、图片或符号。

[0025] 还考虑了在本说明书全文中所公开的组合物可以用作免洗或洗去型组合物。举例来说,免洗型组合物可以是局部施用至皮肤并在皮肤上保留一段时间(例如,至少5分钟、6分钟、7分钟、8分钟、9分钟、10分钟、20分钟或30分钟,或至少1小时、2小时、3小时、4小时、5小时、6小时、7小时、8小时、9小时、10小时、11小时、12小时、13小时、14小时、15小时、16小时、17小时、18小时、19小时、20小时、21小时、22小时、23小时或24小时,或者一夜或全天)的组合物。或者,洗去型组合物可以是旨在施用于皮肤然后在一段时间内,如小于5分钟、4分钟、3分钟、2分钟或1分钟,(例如用水)从皮肤去除或洗去的产品。洗去型组合物的实例可以

是皮肤清洁剂、洗发水、护发素或肥皂。免洗型组合物的实例可以是皮肤保湿剂、防晒剂、面膜、晚霜或日霜。

[0026] 预期对于本说明书所讨论的任何实施方案可以用本发明的任意方法或组合物来实施,反之亦然。此外,本发明的组合物可以用于实现本发明的方法。

[0027] 在一个实施方案中,本发明的组合物可以是可药用的或化妆品可用的,或可以具有舒适的触觉性质。“可药用的”、“化妆品可用的”和/或“舒适的触觉性质”描述了具有令皮肤感觉舒适的特定的触觉性质的组合物(例如,不太水或太油的组合物、具有丝滑质地的组合物、非黏性或黏性的组合物等)。可药用的或化妆品可用的还可以涉及组合物的乳脂状或润滑性能,或组合物的水分保留性能。

[0028] 还预期了包含本发明的组合物的产品。在非限制性方面,该产品可以是化妆品。该化妆品可以是本说明书其他章节所述的那些,或是本领域技术人员已知的那些。产品的非限制性实例包括保湿剂、霜、润肤露、柔肤水、凝胶、清洗剂、粉底、晚霜、口红、清洁剂、卸妆膏、爽肤水、防晒霜、面膜、抗老化产品、除臭剂、止汗剂、香水、古龙水等。

[0029] 还公开了本发明的以下实施方案1至20。实施方案1是用于减少人的色素沉着过度的皮肤外观的方法,该方法包括向人的色素沉着过度的皮肤局部施用以下组合物,所述组合物包含以下物质的至少一种:(i)有效量的肖乳香籽提取物;(ii)有效量的包含巴西椴木树皮/茎提取物、南美苋根提取物和巴西鹧鸪花皮的提取物的混合物;和/或(iii)有效量的包含伸长海条藻提取物和裙带菜提取物的混合物,其中组合物的局部施用减少了色素沉着过度的皮肤外观。实施方案2是实施方案1所述的方法,其中色素沉着过度的皮肤是老年性雀斑样痣和/或有黑斑的皮肤。实施方案3是实施方案1至2中任一项所述的方法,其中组合物美白皮肤和/或均匀肤色。实施方案4是实施方案1至3中任一项所述的方法,其中组合物减少了皮肤中黑色素生成活性。实施方案5是实施方案1至4中任一项所述的方法,其中组合物通过激活脂联素(Adipo Q)受体减少了皮肤中的黑色素生成活性。实施方案6是实施方案5所述的方法,其中Adipo Q受体是PAQR7。实施方案7是实施方案1至6中任一项所述的方法,其中组合物包含肖乳香籽提取物。实施方案8是实施方案7所述的方法,其中肖乳香籽提取物是用超临界二氧化碳(CO₂)提取溶剂获得的。实施方案9是实施方案1至8中任一项所述的方法,其中组合物包含混合物,所述混合物包含巴西椴木树皮/茎提取物、南美苋根提取物和巴西鹧鸪花皮提取物。实施方案10是实施方案9所述的方法,其中混合物进一步包含水、丁二醇和PEG-40氢化蓖麻油。实施方案11是实施方案9或10中任一项所述的方法,其中巴西椴木树皮/茎提取物是水提物,南美苋根提取物是水提物,和/或巴西鹧鸪花皮提取物是水提物。实施方案12是实施方案1至11中任一项所述的方法,其中组合物包含混合物,所述混合物包含伸长海条藻提取物和裙带菜提取物。实施方案13是实施方案12所述的方法,其中混合物进一步包含水。实施方案14是实施方案12或13任一项所述的方法,其中伸长海条藻提取物是水提物和/或裙带菜提取物是水提物,并且其中每种提取物都来自伸长海条藻和/或裙带菜的整个海藻生物体。实施方案15是实施方案1至14中任一项所述的方法,其中组合物包括(i)、(ii)和(iii)中的至少两种。实施方案16是实施方案15所述的方法,其中组合物包括(i)、(ii)和(iii)中的所有三种。实施方案17是实施方案1至16中任一项所述的方法,其中组合物包含:0.00001重量%至10重量%的肖乳香籽提取物;0.00001重量%至10重量%的包含巴西椴木树皮/茎提取物、南美苋根提取物和巴西鹧鸪花皮提取物的混

合物;和/或0.00001重量%至10重量%的包含伸长海条藻提取物和裙带菜提取物的混合物。实施方案18是实施方案1至17中任一项所述的方法,其中组合物是乳液,优选水包油乳液。实施方案19是实施方案1至18中任一项所述的方法,其中组合物是凝胶。实施方案20是局部皮肤用组合物,其包含以下物质的至少一种、至少两种或全部三种:(i)有效量的肖乳香籽提取物;(ii)有效量的包含巴西椴木树皮/茎提取物、南美菟根提取物和巴西鹧鸪花皮的提取物的混合物;和/或(iii)有效量的包含伸长海条藻提取物和裙带菜提取物的混合物,其中组合物能够减少人的色素沉着过度的皮肤外观。

[0030] “局部施用”是指将组合物施用或涂敷到嘴唇或角质组织的表面上。“局部皮肤用组合物”包括适合在皮肤和/或角质组织上局部施用的组合物。这类组合物一般为皮肤可接受的,这是因为当施用至皮肤和/或角质组织时,其不具有过度毒性、不相容性、不稳定性、过敏反应等。本发明的局部护肤组合物可以具有选定的黏度以避免施用到皮肤和/或角质组织后明显的滴落或淤积。

[0031] “角质组织”包括作为哺乳类动物最外保护层的含有角质的层,并且包括但不限于嘴唇、皮肤、毛发和指甲。

[0032] 术语“约”或“大约”定义为如本领域普通技术人员所理解的接近于。在一个非限制性实施方案中,术语定义为10%以内,优选5%以内,更优选1%以内,最优选0.5%以内。

[0033] 术语“基本上”及其变体是指10%以内、5%以内、1%以内或0.5%以内的范围。

[0034] 术语“抑制”或“减少”或这些术语的任何变体包括为了达到预期结果的任何可测量的减少或完全的抑制。术语“促进”或“增加”或这些术语的任何变体包括为了达到预期结果的蛋白质或分子(例如,基质蛋白如纤连蛋白、层粘连蛋白、胶原蛋白或弹性蛋白,或者分子如透明质酸)的任何可测量的增加或产生。

[0035] 如本说明书和/或权利要求中所使用的术语,术语“有效的”指足以实现预期的、期望的或想要的结果。

[0036] 当在权利要求和/或说明书中与术语“包含”、“包括”、“含有”或“具有”或这些术语的任何变体的一起使用时,要素前面不使用数量词可以表示“一个”,但是其也符合“一个或更多个”、“至少一个”和“一个或多于一个”的意思。

[0037] 术语“重量%”、“体积%”或“摩尔%”分别指基于包含该组分的材料的总重量、总体积或总摩尔的组分的重量百分数、体积百分数或摩尔百分数。在非限制性实例中,100克材料中的10克组分是10重量%的组分。术语“%重量/重量”与重量%具有相同的意思。

[0038] 如本说明书和权利要求所使用的,单词“包含”、“具有”、“包括”或“含有”是包括性的或开放式的,并且不排除附加的、未列举的要素或方法步骤。

[0039] 使用的组合物和方法可以“包含”“基本上组成为”或“组成为”本说明书通篇所公开的成分或步骤的任一个。对于短语“基本上组成为”,本发明的组合物和方法的基本和新颖性质是用上述基于植物的提取物的至少一种或任意组合或所有,来减少色素沉着过度的皮肤外观、美白或提亮皮肤,和/或均匀肤色(即皮肤色调)的能力。

[0040] 本发明的其它目的、特征和优点通过下面的详细描述将会变得明显。然而,应理解详细的描述和实施例在表明本发明的具体实施方案时仅以举例说明的方式给出。另外,预期通过该详细描述,本发明的精神和范围内的变化和修改对于本领域技术人员将会变得明显。

具体实施方式

[0041] 美国以及全球的许多人具有色素沉着过度或肤色不均。在许多情况下,通常希望提亮这些色素沉着或使皮肤的不规则色素沉着区域的外观均匀。另外,在某些文化中,人们将较亮的肤色或皮肤颜色与美丽相关联。因此,在这些文化中的人们可能想要使用皮肤提亮剂或化合物来提亮其天然的皮肤颜色。

[0042] 本发明的组合物提供了已知方法的有效替代,用于治疗色素沉着过度的皮肤或均匀肤色或提亮皮肤。该发现并不依赖于使用更传统的化合物,例如氢醌、皮质类固醇和曲酸。相反,该发现涉及使用基于植物的材料来产生所期望的皮肤提亮效果。这些基于植物的材料包括肖乳香籽提取物、巴西椴木树皮/茎提取物、南美苋根提取物、巴西鹌鹑花提取物、伸长海条藻提取物和/或裙带菜提取物或其组合。

[0043] 在以下章节中描述本发明的这些和其他非限制性方面。

[0044] A. 活性成分

[0045] 本发明基于发明人的发现,该发现为肖乳香籽提取物、巴西椴木树皮/茎提取物、南美苋根提取物、巴西鹌鹑花提取物、伸长海条藻提取物和/或裙带菜提取物可以用于抑制皮肤的色素沉着、美白皮肤、均匀肤色和/或治疗色素过度沉着。这可以通过抑制皮肤细胞中的黑色素合成来实现。

[0046] 肖乳香籽提取物是来自漆树科(腰果)的开花植物的籽的提取物,所述漆树科主要位于亚热带和热带南美洲。在一些情况下,肖乳香籽提取物可商购获得。在一些情况下,肖乳香籽提取物可以商品名ADIPOLIN™由Barnet Products Corporation提供。在优选的情况下,CO₂超临界提取可以用于获得肖乳香籽提取物。CO₂超临界萃取可以包括用研磨的干燥植物材料填充柱,并在非常高的压力(200巴至400巴)下使超临界液体二氧化碳泵送通过柱,然后收集所得提取物。

[0047] 巴西椴木树皮/茎提取物,也称为“巴西椴木提取物”,来自铁青树科的开花植物的树皮或茎,所述铁青树科主要位于亚马逊雨林。南美苋根提取物,也称为“巴西人参”提取物,来自苋科(参)的开花植物的根,所述苋科主要位于亚热带和热带南美洲。巴西鹌鹑花提取物,也称为“catabu”提取物,来自植物巴西鹌鹑花,其主要位于南美洲和中美洲大西洋森林的半落叶部分。在一些情况下,巴西椴木树皮/茎提取物、南美苋根提取物和巴西鹌鹑花提取物以混合物形式市售。在一些情况下,提取物的这种混合物可以以商品名SLIMBUSTER™ H由Chemunion提供。然而,在其他情况下,预期这些提取物可以在本发明的上下文中单独使用而不是作为混合物使用。在一些情况下,巴西椴木树皮/茎提取物、南美苋根提取物和巴西鹌鹑花提取物中的每一种都是水提取物,其中使用了作为提取溶剂的水溶液(优选100%的水)。可以将来自每种植物的研磨的干燥植物材料置于室温(例如,20°C至30°C)至最高为100°C的水溶液中,可以获得产生的液体溶液。在一些情况下,研磨的干燥植物材料包括巴西椴木树皮/茎、南美苋根和巴西鹌鹑花干燥植物材料中每一种的组合。在其他情况下,获得每一种的单独提取物。液体溶液(或溶液,如果制备了单独的提取物)可用于本发明的情况下。或者,可以干燥液体溶液(或溶液,如果制备了单独的提取物)以获得干燥的溶解物材料,然后其可用于本发明的情况下。除了水之外,水提取溶液可以包括醇(例如,甲醇、乙醇,或丙醇,或其混合物)、二醇(例如,丙二醇或丁二醇)、甘油或其组合。

[0048] 伸长海条藻提取物,也称为“绳藻”、“昆布”或“野生海藻”提取物,来自主要存在于

东北大西洋和北海的Himanthalia elongata (褐藻)。裙带菜提取物,也称为“海带”提取物,来自裙带菜(褐藻)主要存在于亚洲寒冷的沿海地区(例如日本、韩国和中国)。在一些情况下,伸长海条藻提取物和裙带菜提取物以混合物形式市售。在一些情况下,混合物可以以商品名**SLENDYL®**由Biosil Technologies, Inc.提供。然而,在其他情况下,预期这些提取物可以在本发明的情况下单独使用而不是作为混合物使用。提取物还能各自商购获得。在一些情况下,伸长海条藻提取物和裙带菜提取物中的每一种都是水提取物,其中使用了作为提取溶剂的水溶液(优选100%的水)。可以将来自每种植物的研磨的干燥植物材料置于室温(例如,20°C至30°C)至最高为100°C的水溶液中,可以获得产生的液体溶液。在一些情况下,研磨的干燥植物材料包括伸长海条藻提取物和裙带菜提取物干燥植物材料的组合。在一些情况下,获得每一种的单独提取物。液体溶液(或溶液,如果制备了单独的提取物)可用于本发明的情况下。或者,可以干燥液体溶液(或溶液,如果制备了单独的提取物)以获得干燥的溶解物材料,然后其可用于本发明的情况下。除了水之外,水提取溶液可以包括醇(例如,甲醇、乙醇,或丙醇,或其混合物)、二醇(例如,丙二醇或丁二醇)、甘油或其组合。

[0049] 本文描述的提取物可以通过本领域已知的提取方法及其组合而制备的提取物。提取方法的非限制性实例包括使用液-液萃取、固相萃取、水萃取、乙酸乙酯、醇、丙酮、油、超临界二氧化碳、加热、压力、压降萃取、超声萃取等。提取物可以是液体、固体、干燥液体、再悬浮固体等。在某些情况下,每一种提取物可以由以下步骤制备:(i) 获得期望的植物部分(例如叶、茎、皮、花、种子等)或整个植物;(ii) 捣碎或浸渍植物部分或整个植物;(iii) 任选地干燥经捣碎或经浸渍的植物部分或整个植物;(iv) 在室温下(例如20°C至30°C)或加热(例如大于30°C或大于比30°C更高的温度,优选30°C至小于溶剂沸点的温度)下,将经捣碎或经浸渍的植物或植物部分置于提取溶剂中足够的时间(例如1分钟、5分钟、10分钟、30分钟、或45分钟或多于45分钟,或1小时、6小时、12小时、或18小时或多于18小时,或2天、3天、4天、5天、6天或多于6天);(v) 收集包含提取溶剂和经提取的植物材料(例如液体提取物)的溶液;和(vi) 任选地在液体载剂(例如水、醇、二醇等)中重构经干燥的植物提取物。还预期在本发明的情况下,来自肖乳香籽提取物、巴西椴木树皮/茎提取物、南美苋根提取物、巴西鹧鸪花提取物、伸长海条藻提取物和/或裙带菜提取物中每一种的植物材料可以直接使用而不需要对植物材料使用提取技术。

[0050] B. 成分的量

[0051] 预期本发明的组合物可以包含任意量的本说明书所讨论的成分。该组合物还可以包含任意数量的在本说明书全文中所描述的附加成分的组合(例如,颜料或附加的化妆品或药物成分)。在该组合物中任意成分的浓度可以改变。例如,在非限制性实施方案中,该组合物在其最终形式中可以包含、主要由以下组分组成或由以下组分组成:例如至少约0.0001%、0.0002%、0.0003%、0.0004%、0.0005%、0.0006%、0.0007%、0.0008%、0.0009%、0.0010%、0.0011%、0.0012%、0.0013%、0.0014%、0.0015%、0.0016%、0.0017%、0.0018%、0.0019%、0.0020%、0.0021%、0.0022%、0.0023%、0.0024%、0.0025%、0.0026%、0.0027%、0.0028%、0.0029%、0.0030%、0.0031%、0.0032%、0.0033%、0.0034%、0.0035%、0.0036%、0.0037%、0.0038%、0.0039%、0.0040%、0.0041%、0.0042%、0.0043%、0.0044%、0.0045%、0.0046%、0.0047%、0.0048%、0.0049%、0.0050%、0.0051%、0.0052%、0.0053%、0.0054%、0.0055%、0.0056%、

0.0057%、0.0058%、0.0059%、0.0060%、0.0061%、0.0062%、0.0063%、0.0064%、0.0065%、0.0066%、0.0067%、0.0068%、0.0069%、0.0070%、0.0071%、0.0072%、0.0073%、0.0074%、0.0075%、0.0076%、0.0077%、0.0078%、0.0079%、0.0080%、0.0081%、0.0082%、0.0083%、0.0084%、0.0085%、0.0086%、0.0087%、0.0088%、0.0089%、0.0090%、0.0091%、0.0092%、0.0093%、0.0094%、0.0095%、0.0096%、0.0097%、0.0098%、0.0099%、0.0100%、0.0200%、0.0250%、0.0275%、0.0300%、0.0325%、0.0350%、0.0375%、0.0400%、0.0425%、0.0450%、0.0475%、0.0500%、0.0525%、0.0550%、0.0575%、0.0600%、0.0625%、0.0650%、0.0675%、0.0700%、0.0725%、0.0750%、0.0775%、0.0800%、0.0825%、0.0850%、0.0875%、0.0900%、0.0925%、0.0950%、0.0975%、0.1000%、0.1250%、0.1500%、0.1750%、0.2000%、0.2250%、0.2500%、0.2750%、0.3000%、0.3250%、0.3500%、0.3750%、0.4000%、0.4250%、0.4500%、0.4750%、0.5000%、0.5250%、0.5500%、0.5750%、0.6000%、0.6250%、0.6500%、0.6750%、0.7000%、0.7250%、0.7500%、0.7750%、0.8000%、0.8250%、0.8500%、0.8750%、0.9000%、0.9250%、0.9500%、0.9750%、1.0%、1.1%、1.2%、1.3%、1.4%、1.5%、1.6%、1.7%、1.8%、1.9%、2.0%、2.1%、2.2%、2.3%、2.4%、2.5%、2.6%、2.7%、2.8%、2.9%、3.0%、3.1%、3.2%、3.3%、3.4%、3.5%、3.6%、3.7%、3.8%、3.9%、4.0%、4.1%、4.2%、4.3%、4.4%、4.5%、4.6%、4.7%、4.8%、4.9%、5.0%、5.1%、5.2%、5.3%、5.4%、5.5%、5.6%、5.7%、5.8%、5.9%、6.0%、6.1%、6.2%、6.3%、6.4%、6.5%、6.6%、6.7%、6.8%、6.9%、7.0%、7.1%、7.2%、7.3%、7.4%、7.5%、7.6%、7.7%、7.8%、7.9%、8.0%、8.1%、8.2%、8.3%、8.4%、8.5%、8.6%、8.7%、8.8%、8.9%、9.0%、9.1%、9.2%、9.3%、9.4%、9.5%、9.6%、9.7%、9.8%、9.9%、10%、11%、12%、13%、14%、15%、16%、17%、18%、19%、20%、21%、22%、23%、24%、25%、26%、27%、28%、29%、30%、35%、40%、45%、50%、60%、65%、70%、75%、80%、85%、90%、95%或99%或其中可得到的任何范围的在本说明书的全文和权利要求所提及的至少一种成分。在非限制性方面，百分比可以按整个组合物的重量或体积进行计算。本领域普通技术人员会理解，给定组合物中的浓度可以根据成分的添加、替换和/或减少而改变。

[0052] C. 载体

[0053] 本发明的组合物可以包含所有类型的载体和载剂或被并入到所有类型的载体和载剂中。载体或载剂可以是药学上或皮肤可接受的载体或载剂。载体或载剂的非限制性实例包括水、甘油、醇、油、含硅酮的化合物、硅酮化合物和蜡。变体和其它合适的载体对于熟练技术人员是明显的，并且适用于本发明。在一些方面，化合物、成分和试剂的浓度和组合以这样的方式进行挑选，使得组合物是化学相容的并且不形成从完成的产物中沉淀出来的复合物。

[0054] D. 结构

[0055] 本发明的组合物可以被构造或配制成各种不同的形式。非限制性实例包括乳液（例如，油包水、水包油包水、水包油、水包硅酮、硅酮包水、油包水包油、硅酮包水包油的乳液）、霜、润肤露、溶液（水溶液或者水-醇溶液）、无水基质（例如口红和散粉）、凝胶、面膜、去角质膏和软膏。变体和其它结构对于熟练技术人员是明显的，并且适用于本发明。

[0056] E.其他成分

[0057] 除了发明人所公开的的成分的组合之外,组合物还可以包含附加成分,例如化妆品成分和药物有效成分。这些附加成分的非限制性实例在以下子章节中进行描述。

[0058] 1.化妆品成分

[0059] CTFA国际化妆品成分词典和手册(2004和2008)描述了多种可以在本发明的情况下使用的非限制性化妆品成分。这些成分种类的实例包括:香味剂(人造的和天然的;例如葡萄糖酸、苯氧乙醇和三乙醇胺)、染料和着色成分(例如Blue 1、Blue 1Lake、Red 40、二氧化钛、D&C蓝色4号、D&C绿色5号、D&C橙色4号、D&C红色17号、D&C红色33号、D&C紫色2号、D&C黄色10号和D&C黄色11号)、调味剂/芳香剂(例如,甜叶菊(*Stevia rebaudiana*)提取物和薄荷醇)、吸附剂、润滑剂、溶剂、保湿剂(包括例如润肤剂、湿润剂、成膜剂、闭塞剂和影响皮肤天然保湿机制的试剂)、拒水剂、紫外吸收剂(物理和化学吸收剂,例如对氨基苯甲酸(“PABA”)和相应的PABA衍生物、二氧化钛、氧化锌等)、精油、维生素(例如A、B、C、D、E和K)、微量元素(例如锌、钙和硒)、抗刺激物(例如类固醇和非-固醇类抗炎药)、植物提取物(例如芦荟(*Aloe vera*)、柑橘、黄瓜提取物、银杏(*Ginkgo biloba*)、人参和迷迭香)、抗菌剂、抗氧化剂(例如BHT和生育酚)、螯合剂(例如乙二胺四乙酸二钠和乙二胺四乙酸四钠)、防腐剂(例如对羟基苯甲酸甲酯和对羟基苯甲酸丙酯)、pH调节剂(例如氢氧化钠和柠檬酸)、吸收剂(例如淀粉辛烯琥珀酸铝、高岭土、玉米淀粉、燕麦淀粉、环糊精、滑石和沸石)、皮肤漂白和提亮剂(例如氢醌和烟酰胺乳酸盐/酯)、湿润剂(例如山梨醇、脲、甲基葡萄糖醇聚醚-20、糖类同分异构体和甘露醇)、剥离剂、阻水剂(例如氢氧化钠镁/铝硬脂酸盐)、皮肤调理剂(例如芦荟提取物、尿囊素、没药醇、神经酰胺、聚二甲基硅氧烷、透明质酸、生物糖胶-1、乙基己基甘油、戊二醇、氢化聚癸烯、辛基十二烷基油酸酯和甘草酸二钾)。这些成分中的一些的非限制性实例在以下子章节中提供。

[0060] a.紫外吸收和/或反射剂

[0061] 可以与本发明的组合物组合使用的紫外吸收和/或反射剂包括化学和物理防晒物质。可以使用的化学防晒霜的非限制性实例包括对氨基苯甲酸(PABA)、PABA酯(PABA甘油酯、戊基二甲醇PABA酯和辛基二甲醇PABA酯)、PABA丁酯、PABA乙酯、乙基二羟基丙醇PABA酯、二苯甲酮(氧苯酮、磺异苯酮、二苯甲酮和二苯甲酮-1到二苯甲酮12)、肉桂酸盐/酯(甲氧基肉桂酸辛酯(桂皮酸酯))、对-甲氧基肉桂酸异戊酯、肉桂酸辛基甲氧基肉桂酸酯、西诺沙酯、二异丙基肉桂酸甲酯、甲氧基肉桂酸DEA盐、二异丙基肉桂酸乙酯、甘油辛酸酯二甲氧基酯和甲氧基肉桂酸乙酯)、肉桂酸酯、水杨酸酯(均甲基水杨酸酯、水杨酸苄酯、乙二醇水杨酸酯、异丙基苄醇水杨酸酯等)、邻氨基苯甲酸盐/酯、尿刊酸乙酯、原膜散酯、水杨酸异辛酯、二苯甲酰基甲烷衍生物(例如阿伏苯宗)、奥克立林、辛基三嗪酮、倍酰倍酸三油酸酯、氨基苯甲酸甘油酯、含二羟基丙酮的指甲花醌、乙基己基三嗪酮、二辛基丁酰胺基三嗪酮、苯亚甲基丙二酸脂聚二甲基硅氧烷、对苯二亚甲基二苄酮磺酸、苯基二苯并咪唑四磺酸酯二钠、二乙氨基羟基苯甲酰基苯甲酸己酯、双二乙氨基羟基苯甲酰基苯甲酸酯、双苯并恶唑基苯基乙基己基亚氨基三嗪、甲酚曲唑三硅氧烷、亚甲基双苯并三唑基四甲基丁基苯酚和双乙基己基氧苯酚甲氧苯基三嗪、4-甲基苯亚甲基苄酮和4-甲氧基肉桂酸异戊酯。物理防晒霜的非限制性实例包括高岭土、滑石、凡士林和金属氧化物(例如二氧化钛和氧化锌)。

[0062] b.保湿剂

[0063] 可以与本发明的组合物一起使用的保湿剂的非限制性实例包含氨基酸、硫酸软骨素、双甘油、赤藓糖醇、果糖、葡萄糖、甘油、甘油聚合物、乙二醇、1,2,6-己三醇、蜂蜜、透明质酸、氢化蜂蜜、氢化淀粉水解物、肌醇、乳糖醇、麦芽糖醇、麦芽糖、甘露醇、天然保湿因子、PEG-15丁二醇、聚甘油山梨醇、吡咯烷酮羧酸的盐、PCA钾、丙二醇、糖类同分异构体、葡糖醛酸钠、PCA钠、山梨醇、蔗糖、海藻糖、脲和木糖醇。

[0064] 其他实例包括乙酰化羊毛脂、乙酰化羊毛脂醇、苏氨酸、赖氨酸、丙氨酸、藻类提取物、翠叶芦荟 (*Aloe barbadensis*)、翠叶芦荟提取物、翠叶芦荟凝胶、药蜀葵 (*Althea officinalis*) 提取物、杏子 (*Prunus armeniaca*) 仁油、精氨酸、精氨酸天冬氨酸酯、山金车 (*Arnica montana*) 提取物、天冬氨酸、鳄梨 (*Persea gratissima*) 油、屏障鞘脂、丁醇、蜂蜡、山萘醇、 β -谷甾醇、白桦 (*Betula alba*) 树皮提取物、琉璃苣 (*Borago officinalis*) 提取物、假叶树 (*Ruscus aculeatus*) 提取物、丁二醇、金盏花 (*Calendula officinalis*) 提取物、金盏花油、小烛树 (*Euphorbia cerifera*) 蜡、菜籽油、辛酸/癸酸甘油三酯、小豆蔻 (*Elettaria cardamomum*) 油、巴西棕榈 (*copernicia erifera*) 蜡、胡萝卜 (*Daucus carota sativa*) 油、蓖麻 (*Ricinus communis*) 油、神经酰胺、地蜡、鲸蜡硬脂醇聚醚-5、鲸蜡硬脂醇聚醚-12、鲸蜡硬脂醇聚醚-20、鲸蜡硬脂醇己酸乙酯酯、鲸蜡醇聚醚-20、鲸蜡醇聚醚-24、鲸蜡醇乙酸酯、鲸蜡醇辛酸酯、鲸蜡醇棕榈酸酯、洋甘菊 (*Anthemis nobilis*) 油、胆固醇、胆固醇酯、胆甾醇羟基硬脂酸酯、柠檬酸、鼠尾草 (*Salvia sclarea*) 油、可可 (*Theobroma cacao*) 脂、椰油醇-辛酸酯/癸酸酯、椰子 (*Cocos nucifera*) 油、胶原蛋白、胶原蛋白氨基酸、玉米 (*Zea mays*) 油、脂肪酸、油酸癸酯、聚二甲基硅氧烷共聚醇、聚二甲基硅氧烷醇、己二酸二辛酯、琥珀酸二辛酯、二聚季戊四醇六辛酸酯/六癸酸酯、DNA、赤藓糖醇、乙氧基二乙二醇、亚油酸乙酯、蓝桉 (*Eucalyptus globulus*) 油、月见草 (*Oenothera biennis*) 油、脂肪酸、斑点老鹳草 (*Geranium maculatum*) 油、葡萄糖胺、葡糖谷氨酸酯、谷氨酸、甘油聚氧乙烯醚-26、甘油、丙三醇、二硬脂酸甘油酯、羟基硬脂酸甘油酯、月桂酸甘油酯、亚油酸甘油酯、豆蔻酸甘油酯、油酸甘油酯、硬脂酸甘油酯、硬脂酸甘油酯SE、甘氨酸、乙二醇硬酯酸酯、乙二醇硬酯酸酯SE、葡糖氨基葡聚糖、葡萄 (*Vitis vinifera*) 籽油、榛子 (*Corylus americana*) 坚果油、榛子 (*Corylus americana*) 坚果油、己二醇、透明质酸、混合红花 (*Carthamus tinctorius*) 油、氢化蓖麻油、氢化椰油酸甘油酯、氢化椰子油、氢化羊毛脂、氢化卵磷脂、氢化棕榈油甘油酯、氢化棕榈仁油、氢化大豆油、氢化牛脂酸甘油酯、氢化植物油、水解胶原蛋白、水解弹性蛋白、水解葡糖氨基葡聚糖、水解角蛋白、水解大豆蛋白、羟基化羊毛脂、脯氨酸、羟基脯氨酸、硬脂酸异鲸蜡醇酯、异鲸蜡醇硬脂酰基硬脂酸酯、油酸异癸酯、异硬脂酸异丙酯、羊毛脂酸异丙酯、肉豆蔻酸异丙酯、棕榈酸异丙酯、硬脂酸异丙酯、异硬脂酰胺DEA、异硬脂酸、异硬脂醇乳酸酯、异硬脂醇新戊酸酯、茉莉 (*Jasminum officinale*) 油、霍霍巴 (*Buxus chinensis*) 油、巨藻、石栗 (*Aleurites moluccana*) 坚果油、乳酰胺MEA、羊毛脂醇聚醚-16、羊毛脂醇聚氧乙烯醚乙酸酯-10、羊毛脂、羊毛脂酸、羊毛脂醇、羊毛脂油、羊毛脂蜡、薰衣草 (*Lavandula angustifolia*) 油、卵磷脂、柠檬 (*Citrus medica limonum*) 油、亚油酸、亚麻酸、澳洲坚果 (*Macadamia ternifolia*) 油、麦芽糖醇、母菊 (*Chamomilla recutita*) 油、甲基葡糖倍半硬脂酸酯、甲基硅烷醇PCA、矿物油、貂油、黄褐色被孢霉油、肉豆蔻醇乳酸酯、肉豆蔻醇肉豆蔻酸酯、肉豆蔻醇丙酸酯、新戊二醇二辛酸酯/二癸酸酯、辛基月桂醇、辛基月桂醇肉豆蔻酸酯、辛基月桂醇硬脂酰基硬脂酸酯、羟基硬脂酸辛酯、棕榈酸辛酯、水杨酸辛酯、硬脂酸辛

酯、油酸、橄榄 (*Olea europaea*) 油、橙 (*Citrus aurantium dulcis*) 油、棕榈 (*Elaeis guineensis*) 油、棕榈酸、泛硫乙胺、泛醇、泛醇基乙基醚、石蜡、PCA、桃 (*prunus persica*) 仁油、花生 (*Arachis hypogaea*) 油、PEG-8C12-18酯、PEG-15椰油烷基胺、PEG-150二硬脂酸酯、PEG-60甘油异硬脂酸酯、PEG-5甘油硬脂酸酯、PEG-30甘油硬脂酸酯、PEG-7氢化蓖麻油、PEG-40氢化蓖麻油、PEG-60氢化蓖麻油、PEG-20甲基葡萄糖倍半硬脂酸酯、PEG-40失水山梨醇全油酸酯、PEG-5大豆甾醇、PEG-10大豆甾醇、PEG-2硬脂酸酯、PEG-8硬脂酸酯、PEG-20硬脂酸酯、PEG-32硬脂酸酯、PEG-40硬脂酸酯、PEG-50硬脂酸酯、PEG-100硬脂酸酯、PEG-150硬脂酸酯、十五酸内酯、胡椒薄荷 (*Mentha piperita*) 油、凡士林、磷脂、多氨基酸多糖缩合物、聚甘油二异硬脂酸酯-3、聚季铵盐-24、聚山梨醇酯20、聚山梨醇酯40、聚山梨醇酯60、聚山梨醇酯80、聚山梨醇酯85、肉豆蔻酸钾、棕榈酸钾、丙二醇、丙二醇二辛酸酯/二癸酸酯、丙二醇二辛酸酯、丙二醇二壬酸酯、丙二醇月桂酸酯、丙二醇硬脂酸酯、丙二醇硬脂酸酯SE、PVP、吡哆醇二棕榈酸酯、视黄醇、视黄醇棕榈酸酯、米 (*Oryza sativa*) 糠油、RNA、迷迭香 (*Rosmarinus officinalis*) 油、玫瑰油、红花 (*Carthamus tinctorius*) 油、鼠尾草 (*Salvia officinalis*) 油、檀香 (*Santalum album*) 油、丝氨酸、血清蛋白、芝麻 (*Sesamum indicum*) 油、牛油果 (*Butyrospermum parkii*) 脂、蚕丝粉、软骨素硫酸钠、透明质酸钠、乳酸钠、棕榈酸钠、PCA钠、聚谷氨酸钠、可溶性胶原、失水山梨醇月桂酸酯、失水山梨醇油酸酯、失水山梨醇棕榈酸酯、失水山梨醇倍半油酸酯、失水山梨醇硬脂酸酯、山梨醇、大豆 (*Glycine soja*) 油、鞘脂、角鲨烷、角鲨烯、硬脂酰胺MEA-硬脂酸酯、硬脂酸、硬脂氧基聚二甲基硅氧烷、硬脂氧基三甲基硅烷、硬脂醇、硬脂醇甘草亭酸酯、硬脂醇庚酸酯、硬脂醇硬脂酸酯、向日葵 (*Helianthus annuus*) 籽油、甜杏仁 (*Prunus amygdalus dulcis*) 油、合成蜂蜡、生育酚、乙酸生育酚酯、生育酚亚油酸酯、三山嵛酸甘油酯、十三烷醇新戊酸酯、十三烷醇硬脂酸酯、三乙醇胺、三硬脂酸甘油酯、脲、植物油、水、蜡、小麦 (*Triticum vulgare*) 胚芽油和依兰 (*Cananga odorata*) 油。

[0065] c. 抗氧化剂

[0066] 可以与本发明的组合物一起使用的抗氧化剂的非限制性实例包括乙酰半胱氨酸、抗坏血酸多肽、抗坏血酸二棕榈酸酯、抗坏血酸甲基硅烷醇果胶酸酯、抗坏血酸棕榈酸酯、抗坏血酸硬脂酸酯、BHA、BHT、叔丁基氢醌、半胱氨酸、半胱氨酸HCL、二戊基氢醌、二叔丁基氢醌、二鲸蜡醇硫代二丙酸酯、二油基生育酚甲基硅烷醇、抗坏血酸硫酸酯二钠、二硬脂醇硫代二丙酸酯、双十三烷醇硫代二丙酸酯、没食子酸月桂酯、异抗坏血酸、抗坏血酸酯、阿魏酸乙酯、阿魏酸、没食子酸酯、氢醌、巯基乙酸异辛酯、曲酸、抗坏血酸镁、抗坏血酸磷酸酯镁、甲基硅烷醇抗坏血酸酯、天然植物抗氧化剂例如绿茶或葡萄籽提取物、去甲二氢愈创木酸、没食子酸辛酯、苯巯基乙酸、磷酸抗坏血酸酯生育酚酯钾、亚硫酸钾、没食子酸丙酯、醌、迷迭香酸、抗坏血酸钠、亚硫酸氢钠、异抗坏血酸钠、偏亚硫酸氢钠、亚硫酸钠、超氧化物歧化酶、巯基乙酸钠、山梨醇缩糠醛、硫二甘醇、亚硫基二乙酰胺、硫二乙酸、巯基乙酸、硫代乳酸、硫代水杨酸、生育酚聚氧乙烯醚-5、生育酚聚氧乙烯醚-10、生育酚聚氧乙烯醚-12、生育酚聚氧乙烯醚-18、生育酚聚氧乙烯醚-50、生育酚、托可索伦、乙酸生育酚酯、亚油酸生育酚酯、烟酸生育酚酯、琥珀酸生育酚酯和亚磷酸三(壬基酚)酯。

[0067] d. 结构化剂

[0068] 在其它非限制性方面，本发明的组合物可以包含结构化剂。在某些方面，结构化剂

帮助向组合物提供流变学特征以促进组合物的稳定性。在其它方面,结构化剂还可以起乳化剂或表面活性剂的作用。结构化剂的非限制性实例包括硬脂酸、棕榈酸、硬脂醇、鲸蜡醇、山嵛醇、硬脂酸、棕榈酸、具有平均约1个到约21个亚乙基氧单元的硬脂醇的聚乙二醇醚、具有平均约1个到约5个亚乙基氧单元的鲸蜡醇的聚乙二醇醚及其混合物。

[0069] e. 乳化剂

[0070] 在本发明的特定方面,组合物不包含乳化剂。然而,在其它方面,组合物可以包含一种或多种乳化剂。乳化剂可以降低相间界面张力并改善乳液的配制和稳定性。乳化剂可以是非离子的、阳离子的、阴离子的和两性离子的乳化剂(参见McCutcheon's (1986); 美国专利5,011,681号;4,421,769号;3,755,560号)。非限制性实例包括甘油酯、丙二醇酯、丙二醇的脂肪酸酯、聚丙二醇的脂肪酸酯、山梨醇的酯、失水山梨醇酐酯、羧酸共聚物、葡萄糖的酯和醚、乙氧基化的酯、乙氧基化的醇、磷酸烷基酯、聚氧乙烯脂肪醚磷酸酯、脂肪酸酰胺、酰基乳酸酯、脂肪酸盐、TEA硬脂酸酯、DEA油醇聚氧乙烯-3醚磷酸酯、聚乙二醇20失水山梨醇单月桂酸酯(聚山梨醇酯20)、聚乙二醇5大豆甾醇、硬脂醇聚氧乙烯醚-2、硬脂醇聚氧乙烯醚-20、硬脂醇聚氧乙烯醚-21、鲸蜡硬脂醇聚醚-20、鲸蜡硬脂基葡萄糖苷、鲸蜡硬脂醇、C12-13链烷醇聚醚-3、PPG-2甲基葡萄糖醚二硬脂酸酯、PPG-5-鲸蜡醇聚醚-20、双-PEG/PPG-20/20二甲硅酮、鲸蜡醇聚醚-10、聚山梨醇酯80、鲸蜡醇磷酸酯、鲸蜡醇磷酸酯钾、二乙醇胺鲸蜡醇磷酸酯、聚山梨醇酯60、甘油硬脂酸酯、PEG-100硬脂酸酯、花生醇、花生醇葡萄糖苷、羟丙基环糊精及其混合物。

[0071] f. 含有硅酮的化合物

[0072] 在非限制性方面,含硅酮的化合物包括分子主链由交替的硅和氧原子与连接在硅原子上的侧基组成的聚合物产品家族中的任意成员。通过改变-Si-O-链的长度、侧基和交联,硅酮可以合成为各种各样的材料。它们的稠度可以从液体到凝胶到固体不等。

[0073] 可以在本发明的上下文中使用的含硅酮的化合物包含在本说明书中所描述的或本领域普通技术人员已知的那些。非限制性实例包括硅油(例如挥发性和非挥发性油)、凝胶和固体。在某些方面,含硅酮的化合物包括硅油,例如聚有机硅氧烷。聚有机硅氧烷的非限制性实例包括二甲聚硅氧烷、环聚二甲基硅氧烷、环己硅氧烷、聚硅酮-11、苯基三甲基聚硅氧烷、聚三甲基硅氨基二甲基硅氧烷、硬脂氧基三甲基硅烷或这些的混合物和其它任何给定比例的有机硅氧烷材料,以根据预期的应用(例如,对特定区域例如皮肤、毛发或眼睛)达到期望的稠度和应用特征。“挥发性硅油”包含具有低气化热的硅油,即通常低于约50卡每克硅油的硅油。挥发性硅油的非限制性实例包含:环聚二甲基硅氧烷,例如Dow Corning 344Fluid、Dow Corning 345Fluid、Dow Corning 244Fluid和Dow Corning 245Fluid、Volatile Silicon 7207(康涅狄格州丹伯里的Union Carbide Corp.);低黏度聚二甲基硅氧烷,即黏度大约为50cst或更低的聚二甲基硅氧烷(例如聚二甲基硅氧烷,例如Dow Corning 200-0.5cst Fluid)。Dow Corning Fluid可以从密歇根州米德兰的Dow Corning Corporation购得。在CTFA化妆品成分词典第三版中(通过引用并入),环聚二甲基硅氧烷和聚二甲基硅氧烷分别被描述为环状二甲基聚硅氧烷化合物和用三甲基硅氧基单元封端的完全甲基化的线性硅氧烷聚合物。可以在本发明的上下文中使用的其它非限制性挥发性硅油包含从纽约州沃特福德的General Electric Co.,Silicone Products Div.和密歇根州艾德里安的Stauffer Chemical Co.的SWS Silicones Div.可获得的那些。

[0074] g. 去角质剂

[0075] 去角质剂包含去除皮肤外表面上的死皮肤细胞的成分。这些实际可以通过物理、化学和或以其他方式起作用。物理去角质剂的非限制性实例包括研磨剂,例如浮石、二氧化硅、织物、纸、贝壳、珠、固体晶体、固体聚合物等。化学去角质剂的非限制性实例包括酸和酶去角质剂。可用作去角质剂的酸包括但不限于乙醇酸、乳酸、柠檬酸、 α -羟基酸、 β -羟基酸等。本领域技术人员已知的其他去角质剂也可考虑为在本发明的上下文中有用。

[0076] h. 精油

[0077] 精油包括来自药草、花、树和其它植物的油。这些油一般以植物细胞间微小的液滴存在,并可以通过本领域技术人员已知的若干方法(例如,蒸气蒸馏、脂吸法(即通过使用脂肪提取)、浸渍、溶剂提取或机械压榨)进行提取。当这些类型的油暴露于空气时,它们趋于挥发(即挥发性油)。因此,虽然许多精油是无色的,但是随着时间它们可以氧化并变得更深。精油不溶于水,但溶于醇、醚、非挥发油(植物油)和其他有机溶剂。在精油中发现的典型物理特征包括从约160°C到240°C变化的沸点和从约0.759到约1.096的密度。

[0078] 精油一般通过发现油的植物来命名。例如,玫瑰油或薄荷油分别来自玫瑰或薄荷植物。可以在本发明的情况下使用的精油的非限制性实例包括芝麻油、澳洲坚果油、茶树油、月见草油、西班牙鼠尾草油、西班牙迷迭香油、芫荽油、百里香油、多香果油、玫瑰油、茴香油、香脂花油、香柠檬油、玫瑰木油、香柏油、甘菊油、鼠尾草油、香紫苏油、丁香油、柏木油、桉油、茴香油、海茴香油、乳香油、香叶油、姜油、葡萄柚油、茉莉油、杜松子油、薰衣草油、柠檬油、柠檬草油、梨莓油、橘子油、甘牛至油、没药油、橙花油、橙皮油、广藿香油、胡椒油、黑胡椒油、苦橙叶油、松油、奥图玫瑰油、迷迭香油、檀香油、绿薄荷油、甘松油、香根草油、冬青油或依兰油。还预期本领域技术人员已知的其它精油在本发明的上下文中有用。

[0079] i. 增稠剂

[0080] 包括增稠剂或凝胶剂在内的增稠剂,包括可以增加组合物黏度的物质。增稠剂包括可以增加组合物黏度而基本上不改变组合物内活性成分功效的那些。增稠剂还可以增加本发明的组合物的稳定性。在本发明的一些方面,增稠剂包括氢化聚异丁烯、三羟基硬脂酸甘油酯、丙烯酰二甲基牛磺酸铵/VP共聚物或其混合物。

[0081] 可以在本发明的情况下使用的另外的增稠剂的非限制性实例包括羧酸聚合物、交联的聚丙烯酸酯聚合物、聚丙烯酰胺聚合物、多糖和胶。羧酸聚合物的实例包括含有一种或多种衍生自丙烯酸单体的交联化合物、经取代的丙烯酸和这些丙烯酸和经取代的丙烯酸的盐和酯,其中所述交联剂含有两个或多余两个碳-碳双键,并衍生自多元醇(参见美国专利第5087445号;第4509949号;第2798053号;CTFA国际化妆品成分词典,第四版,1991,第12和80页)。可商购获得的羧酸聚合物的实例包括卡波姆,其为丙烯酸与蔗糖或季戊四醇的烯丙基醚交联的均聚物(例如,购自B.F. Goodrich的CARBOPOL™900系列)。

[0082] 交联的聚丙烯酸酯聚合物的非限制性实例包括阳离子型和非离子型聚合物。实例描述于美国专利第5100660号、第4849484号、第4835206号、第4628078号、第4599379号。

[0083] 聚丙烯酰胺聚合物(包括非离子的聚丙烯酰胺聚合物,其包含经取代的支化或非支化聚合物)的非限制性实例包含聚丙烯酰胺、异构烷烃和月桂醇聚醚-7、丙烯酰胺和经取代的丙烯酰胺与丙烯酸和经取代的丙烯酸的多嵌段共聚物。

[0084] 多糖的非限制性实例包括纤维素、羧甲基羟乙基纤维素、乙酸丙酸羧酸纤维素、羟

乙基纤维素、羟乙基乙基纤维素、羟丙基纤维素、羟丙基甲基纤维素、甲基羟乙基纤维素、微晶纤维素、纤维素硫酸钠及其混合物。其他实例为烷基取代的纤维素,其中纤维素聚合物的羟基被羟烷基化(优选地羟乙基化或羟丙基化)以形成羟烷基化的纤维素,其然后用C10-C30直链或支链烷基基团通过醚键进行进一步改性。一般这些聚合物为C10-C30直链或带支链的醇与羟烷基纤维素的醚。其它有用的多糖包括硬葡聚糖,其包含每三个单元具有(1-6)个连接的葡萄糖的(1-3)连接的葡萄糖单元的直链。

[0085] 本发明可以使用的胶的非限制性实例包括阿拉伯树胶、琼脂、藻胶、藻酸、藻酸铵、支化淀粉、藻酸钙、角叉菜胶钙、肉毒碱、角叉菜胶、糊精、明胶、结冷胶、瓜尔豆胶、瓜尔胶羟丙基三甲基氯化铵、锂蒙脱石、透明质酸、水合二氧化硅、羟丙基壳聚糖、羟丙基瓜尔胶、卡拉亚胶、巨藻、角豆胶、纳豆胶、藻酸钾、角叉菜胶钾、藻酸丙二醇酯、菌核胶、羧甲基葡聚糖钠、角叉菜胶钠、黄蓍胶、黄原胶及其混合物。

[0086] j. 防腐剂

[0087] 可以在本发明的情况下使用的防腐剂的实例包括季铵盐防腐剂如聚季铵盐-1和苄烷铵卤化物(例如苯扎氯铵(“BAC”)和苯扎溴铵)、对羟基苯甲酸酯(例如对羟基苯甲酸甲酯和对羟基苯甲酸丙酯)、苯氧基乙醇、苄醇、氯丁醇、苯酚、山梨酸、硫汞撒或其组合。

[0088] 2. 药物成分

[0089] 还预期药物活性剂对本发明的组合物是有用的。药物活性成分的非限制性实例包括抗粉刺剂、用于处理酒渣鼻的试剂、止痛剂、麻醉剂、肛门直肠用药、抗组胺药、包括非甾体消炎药在内的消炎剂、抗生素、抗菌剂、抗病毒素、抗微生物剂、抗癌活性剂、抗疥螨剂、灭虱剂、抗肿瘤药、防汗药、止痒剂、抗牛皮癣药、抗脂溢剂、生物活性蛋白质和多肽、烧伤处理剂、烧灼剂、脱色剂、脱毛剂、尿布疹处理剂、酶、毛发生长刺激剂、包括DFMO及其盐和类似物在内的毛发生长抑制剂、止血剂、角质分离剂、口疮处理剂、唇疱疹处理剂、牙科或牙周处理剂、光敏感活性物、皮肤保护剂/屏障剂、包括激素和皮质激素的类固醇、晒伤处理剂、遮光剂、经皮活性剂、鼻活性剂、阴道活性剂、疣处理剂、创伤处理剂、创伤愈合剂等。

[0090] F. 试剂盒

[0091] 还考虑了用于本发明的一些方面的试剂盒。例如,本发明的组合物可以包含在试剂盒内。试剂盒可以包括容器。容器可以包括瓶子、金属管、层合管、塑料管、分配器、加压容器、屏障容器、包装、隔室、口红容器、压缩容器、能够保存化妆品组合物的化妆品盘或其它类型的容器如注射或吹塑成型的塑料容器,其中保存分散体或组合物或所需的瓶子、分配器或包装。试剂盒和/或容器在其表面可包含标记。例如,标记可以是字词、短语、缩写、图片或符号。

[0092] 所述容器可以分配预定量的组合物。在其他实施方案中,可以挤压容器(例如金属管、层压管或塑料管)以分配所需量的组合物。组合物可以分配为喷雾、气溶胶、液体、流体或半固体。容器可以具有喷雾、抽吸机构或挤压机构。试剂盒还可以包含使用试剂盒组分以及使用任何包含于容器内的组合物的说明书。说明书可以包括如何施用、使用和保存组合物的说明。

[0093] 实施例

[0094] 包括了以下实施例以说明本发明的优选实施方案。本领域技术人员应理解,以下

实施例中所公开的技术代表本发明人发现的在本发明的实践中发挥良好作用的技术,并因此可以被认为为其实践建立优选的模式。然而,根据本公开,本领域技术人员应理解,在不脱离本发明的精神和范围的情况下,在所公开的具体实施方案中可以做许多改变,并仍获得类似或相似的结果。

[0095] 本文所公开和要求保护的所有组合物和方法根据本公开可以不需要过度实验即而做出和实现。尽管本发明的组合物和方法已经按照优选实施方案进行了描述,但是对于本领域技术人员明显的是,在不脱离本发明的构思、精神和范围的情况下,可以对所述组合物和方法以及在本文所描述方法的步骤或步骤的顺序中实施变化。更具体地,明显的是化学上和生理上都相关的特定试剂可以替代本文所描述的试剂,同时实现相同或相似的结果。所有对本领域技术人员明显的这类相似的替代和改变都被视为在如由所附权利要求限定的本发明的构思、范围和构思内。

[0096] 实施例1

[0097] (体外活性)

[0098] B16黑色素生成分析:对以下表1中所确定的提取物中的每一种进行B16色素沉着分析。该分析测量了给定物质(本情况下的植物提取物)减少皮肤细胞中黑色素生成活性的能力。特别地,黑色素生成是黑色素细胞产生黑色素的过程,黑色素是天然产生的给予皮肤、毛发和眼睛颜色的色素。抑制黑色素生成有益于预防与衰老有关的皮肤暗沉和减轻黑斑。B16色素沉着生物分析采用了B16-F1黑色素细胞(ATCC),一种永生化的小鼠黑色素瘤细胞系,来分析表1中确定的植物提取物对黑色素产生的效果。该分析的终点是黑色素产生和细胞活力的分光光度测量。在37°C下10%的CO₂中与10%的胎牛血清(Mediatech)一起在标准DMEM生长培养基中培养B16-F1黑色素细胞,然后用在表1中显示的提取物的浓度处理6天。孵育之后,通过在405nm处的吸收测量黑色素分泌,定量细胞活力。经显示,肖乳香籽的超临界CO₂提取物(以商品名ADIPOLIN™由Barnet Products Corporation提供)以1重量%的浓度抑制了35%的黑色素生成。另外,显示来自巴西椴木树皮/茎、南美菟根和巴西鹧鸪花皮的水提物的组合(以商品名SLIMBUSTER™ H由Chemyunion提供)以0.05重量%的浓度抑制了17%的黑色素生成,以0.3重量%的浓度抑制了42%的黑色素生成。还显示来自伸长海条藻提取物和裙带菜提取物的整个植物的水提物的组合(以商品名SLENDYL®由Biosil Technologies提供)以2重量%的浓度抑制了12%的黑色素生成和以3重量%的浓度抑制了24%的黑色素生成。

[0099] 表1(B16黑色素生成数据)

成分	黑色素生成的抑制(%)
肖乳香籽提取物(ADIPOLIN™)	35% (1 重量%)
[0100] 巴西椴木树皮/茎提取物、南美苋根提取物和巴西鹧鸪花皮提取物(SLIMBUSTER™ H)	17% (0.05 重量%) 42% (0.3 重量%)
伸长海条藻提取物和裙带菜提取物(SLENDYL®)	12% (2 重量%) 24% (3 重量%)

[0101] Melanoderm (MatTek) 分析: Melanoderm (MatTek) 分析测量了给定物质 (在本案中的植物提取物) 在黑色素模型上抑制黑色素合成的能力。MatTek的MelanoDerm系统由正常、人来源的表皮角质形成细胞 (NHEK) 和黑色素细胞 (NHM) 组成, 它们被培养以形成人表皮的多层、高度分化模型。NHM经历了导致组织色素沉着的黑色素生成。Melanoderm用0.1重量%的肖乳香籽的超临界CO₂提取物 (以商品名ADIPOLIN™由Barnet Products Corporation提供) 处理, 其在色素沉着模型中产生了40%的减少。Melanoderm还用0.05重量%的来自巴西椴木树皮/茎提取物、南美苋根提取物和巴西鹧鸪花皮提取物的水提取物的组合 (以商品名SLIMBUSTER™ H由Chemunion提供) 处理, 其在色素沉着模型中产生了17%的减少。Melanoderm还用2重量%的伸长海条藻和裙带菜的整个植物的水提取物组合 (以商品名SLENDYL®由Biosil Technologies, Inc. 提供) 处理, 产生了其在色素沉着模型中产生了12%的减少。表2提供这些数据的总结。

[0102] 表2 (Melanoderm MatTek数据)

成分	黑色素生成的抑制(%)
肖乳香籽提取物(ADIPOLIN™)	40% (0.1 重量%)
[0103] 巴西椴木树皮/茎提取物、南美苋根提取物和巴西鹧鸪花提取物(SLIMBUSTER™ H)	17% (0.05 重量%)
伸长海条藻提取物和裙带菜提取物(SLENDYL®)	12% (2.0 重量%)

[0104] 脂联素表达测定: 在96孔板中培养人皮下前脂肪细胞并允许在没有测试的植物提取物的情况下分化。在用以下表3中确认的植物提取物处理之前的三天, 将细胞置于基础培养基中, 从而从细胞中除去所有血清和激素。在37°C下5%CO₂的湿润培养箱中保存细胞。然后, 该细胞在脂肪细胞培养基中用植物提取物和对照处理72小时, 再次在37°C下5%CO₂的湿润培养箱中保存。在处理阶段的结尾, 收集条件培养基并在-80°C下储存, 直至准备进行测定。使用Human Adiponectin ELISA Kit测定分泌的脂联素。取出20μl解冻的条件培养基并制备用于ELISA。ELISA中条件培养基的最终稀释度为25倍。在450nm读取板的吸光度。使

用在相同时间测定的脂联素标准溶液的吸光度值来计算测试样品的未知浓度。如表3所示, 当与对照比较时, 用1.0重量%的肖乳香籽的超临界CO₂提取物(以商品名ADIPOLIN™由Barnet Products Corporation提供) 进行的处理导致使脂联素分泌增加了29%。当与对照比较时, 用1.0重量%的巴西椴木树皮/茎、南美菟根和巴西鹧鸪花皮的水提物的组合(以商品名SLIMBUSTER™ H由Chemunion提供) 进行的处理导致使脂联素分泌增加了74%。

[0105] 表3(脂联素表达数据)

成分	脂联素分泌的增加(%)
[0106] 肖乳香籽提取物(ADIPOLIN™)	29% (1.0 重量%)
巴西椴木树皮/茎提取物、南美菟根提取物和巴西鹧鸪花提取物(SLIMBUSTER™ H)	74% (1.0 重量%)

[0107] 实施例2

[0108] (临床功效研究)

[0109] 选自肖乳香籽提取物、巴西椴木树皮/茎提取物、南美菟根提取物、巴西鹧鸪花提取物、伸长海条藻提取物和/或裙带菜提取物的基于植物的材料的组合可以在临床研究中进行测试, 以确定这些组合物在临床测试中的功效, 所述临床测试例如通过色度计测量的皮肤亮度和皮肤发红、通过皮肤科医生评分的斑状色素沉着的减少、临床医生评估中评分的皮肤光泽、皮肤紧实度和弹性的增加、在临床医生评估中评分的整体光损伤的减少以及在临床医生评估中评分的肤色均匀度的增加。另外的测试可以包括由临床研究参与者自我评分的红斑、发红、干燥、脱皮、剥落、刺激、灼伤、刺痛、瘙痒或酸麻程度。期望这些结果表明使用成分的组合的益处可能是协同作用的, 或表明肖乳香籽提取物、巴西椴木树皮/茎提取物、南美菟根提取物、巴西鹧鸪花提取物、伸长海条藻提取物和/或裙带菜提取物可以是氢醌的有效替代品, 同时避免不想要的副作用。氢醌是常用于皮肤提亮化妆品和治疗色素沉着异常的化合物。氢醌的一些潜在的不想要的副作用可以包括外因性赭色症(以蓝黑色色素沉着为特征的色素沉着异常)、彩纸样白癜风(以类似彩纸样病变为特征的色素沉着异常)、刺激性反应和过敏反应。

[0110] 可进行随机、对照、双盲临床研究, 以评估一种或多种皮肤治疗产品的用以提亮皮肤、均匀肤色或治疗色素沉着过度的耐受性和功效。一项这样的研究可能在九(9)周内进行, 其中第一周可以是“清洗期”, 以确保参与者先前的产品使用不会影响本研究, 接下来的八周可以包括测试产品使用。试验可以包括使用一种或多种测试产品, 所述产品含有肖乳香籽提取物、巴西椴木树皮/茎提取物、南美菟根提取物、巴西鹧鸪花提取物、伸长海条藻提取物和裙带菜提取物(在包括安慰剂的研究中提供给约一半的参与者或三分之一的参与者)、阳性对照或含有氢醌的比较产品(在包括安慰剂的研究中提供给约一半的参与者或三分之一的参与者), 和/或安慰剂(如果研究包括安慰剂, 在研究中提供给约三分之一的参与者)。临床研究可以包括所有参与者使用的补充产品。

[0111] 可以在处理的基线、第2周、第4周和第8周对皮肤亮度、肤色均匀性和色素沉着过度的改善进行皮肤评估。或者或另外, 可以在第1周、第3周、第5周和第7周对皮肤这些因素

的改善进行评估。用于评估的方法可以包括经过认证的皮肤科医生对耐受性的评估,专家对疗效的临床评估,和用于皮肤亮度的色度计。随着临床研究的进展,可将评分与氢醌或其他测试产品进行比较。

[0112] 参与者可以选自健康的志愿者,包括35岁至70岁的那些人,其中每个治疗组中最多两名年龄为66岁至70岁的参与者。参与者可具有I至III型Fitzpatrick皮肤(I-经常容易灼伤,从不晒黑;二-经常容易灼伤,轻微晒黑;和III中度灼伤,逐渐晒黑),并且可以是日常皮肤护理中面部清洁和保湿产品的常规用户。参与者应在筛选和基线随访时进行面部色素沉着测试,并且评分为中度严重程度,或采用0至9分制,评分为4至6分。

[0113] 可以指导参与者早晨例行和/或晚间例行使用测试产品。早晨例行使用可以包括在研究期间的每个早上使用面部清洁剂,然后将测试产品施用至整个面部和前额或至皮肤暗沉区域。晚间例行使用可以包括使用面部清洁剂和将“豌豆大小的”量的测试产品施用至整个面部和前额或至皮肤的暗沉区域,避开眼部区域。对于第0周至第2周,可以指导参与者与临床研究的其它周不同的频率施用测试产品,例如,与第3周至第8周的每天施用不同,每隔一天进行早晨例行使用。

[0114] 可以在临床研究期间收集与临床测试有关的分数和数据并进行比较,所述临床研究包括皮肤亮度与皮肤发红的色度计评分、皮肤科医生或临床医生对斑状色素沉着减少的评估、临床医生对皮肤光泽、皮肤紧实度和弹性增加的评估、临床医生对皮肤中整体光损伤减少的评估和临床医生对肤色均匀性增加的评估。可以将分数与基线测量值进行比较并与将氢醌用于皮肤提亮或色素沉着异常治疗进行比较。

[0115] 也可进行皮肤科耐受性测试。可以在基线和第2周、第4周和第8周结束时收集这些分数。或者或另外,可以在第1周、第3周、第5周和第7周结束时收集这些分数。皮肤科耐受性分数可在0分至3分的范围内,0分表示无影响(“无”),1分表示轻度影响,2分表示中度影响(“Mod”),3分表示重度影响。皮肤科耐受性可以测量皮肤中的红斑/发红、干燥、脱皮/剥落和刺激,并且随临床研究过程的进展,可将分数与氢醌或其他测试产品进行比较。

[0116] 参与者的耐受性也是舒适度和易用性的重要指标,因此也可以记录自我评估的耐受性。可以在基线和第2周、第4周和第8周结束时收集这些分数。或者或另外,可以在第1周、第3周、第5周和第7周结束时收集这些分数。自我评估的耐受性分数可在0分至3分的范围内,0分表示无影响(“无”),1分表示轻度影响,2分表示中度影响(“Mod”),3分表示重度影响。自我评估的耐受性可以测量皮肤中的灼伤、刺痛、发痒和酸麻感,并且随临床研究过程的进展,可将分数与氢醌或其他测试产品进行比较。

[0117] 实施例3

[0118] (附加分析)

[0119] 可以通过本领域普通技术人员已知的方法进行确定可以用于确定在本说明书全文和权利要求书中所公开的任意一种成分、或成分的任意组合、或具有所述成分的组合的组合物功效的分析。以下是可以在本发明的情况下使用的非限制性分析。应认识到,可以使用其它测试过程,包括例如客观的和主观的过程。

[0120] 蘑菇酪氨酸酶活性分析:在哺乳动物细胞中,酪氨酸酶在由酪氨酸(和由多巴色素聚合)合成黑色素多步生物合成中催化两个步骤。酪氨酸酶位于黑色素细胞中,并产生给予皮肤、毛发和眼睛颜色的黑色素(芳香醌化合物)。在存在或不存在本说明书公开的活性成

分、任一种成分组合或具有所述组合的组合物中的每一种的情况下,纯净蘑菇酪氨酸酶(Sigma)可以与其底物L-Dopa (Fisher)一起培育。可以在490nm处通过比色板读数来评估色素形成。蘑菇酪氨酸酶活性的抑制百分比可以通过与未处理的对照物进行比较来计算,以确定测试成分或其组合抑制纯净酶活性的能力。可以将测试提取物抑制与曲酸(Sigma)的进行比较。

[0121] 皮肤清透度和雀斑与老年斑减少的分析:使用Minolta Chromometer评估皮肤清透度和雀斑与老年斑的减少。可以使用Minolta Chroma Meter的a*值评估肤色变化,以确定由于产品处理引起的潜在刺激。a*值测量肤色在红色区域的变化。这用于确定本说明书中公开的每种活性成分、任一种成分组合或具有所述组合的组合物是否引起刺激。测量可以在脸的每一侧进行并进行平均,作为左边脸和右边脸的值。皮肤清透度也可以使用Minolta Meter来测量。测量值是Minolta Meter的a*值、b值和L值的组合,并与皮肤的亮度有关,而且很好地对应皮肤的光滑度和水合。皮肤测定如上进行。在一个非限制性方面,皮肤清透度可以描述为L/C,其中C是色度并定义为 $(a^2+b^2)^{1/2}$ 。

[0122] 胶原蛋白刺激测定:胶原蛋白是对皮肤结构关键的细胞外基质蛋白。增加的胶原蛋白合成帮助改善皮肤紧实度和弹性。使用生物分析检验由人类表皮成纤维细胞产生原胶原蛋白肽(胶原蛋白的前体)效果。该分析的终点是反映前胶原肽的存在和细胞活力的分光光度测量。该分析采用定量的三明治酶免疫分析技术,其中对前胶原肽特异的单克隆抗体预先涂覆在微孔板上。将标准品和样品移液到孔中,存在的所有原胶原蛋白肽由固定化的抗体结合。冲走所有未结合的物质后,在孔中添加对原胶原蛋白肽特异的酶联多克隆抗体。冲洗以去除任何未结合的抗体-酶试剂之后,向孔中加入底物溶液,使颜色显现与最初步骤中结合的前胶原肽的量成比例。终止颜色显现,使用酶标仪在450nm处测量颜色的强度。

[0123] 为了产生样品和对照,将亚汇合的正常人成熟表皮成纤维细胞(Cascade Biologics)在37°C下10%的CO₂中,用10%的胎牛血清(Mediatech)在标准DMEM生长培养基中培养。用每种测试成分和对照处理细胞3天。孵育之后,收集细胞培养基,并使用来自Takara(#MK101)的夹心酶联免疫吸附分析(ELISA)定量前胶原肽的分泌量,如上所述。

[0124] 抗氧化(AO)分析:测量本说明书中所公开的成分、成分的组合或具有所述组合的组合物中的任一种的总抗氧化能力的体外生物分析。所述分析依赖于样品中抗氧化剂抑制ABTS[®](2,2'-联氮-双-[3-乙基苯并噻唑啉磺酸盐])被正铁肌红蛋白氧化成ABTS[®]•⁺的能力。活生物体的抗氧化体系包含酶,例如超氧化物歧化酶、过氧化氢酶和谷胱甘肽过氧化物酶;高分子,例如白蛋白、血浆铜蓝蛋白和铁蛋白;和大量小分子,包括抗坏血酸、α-生育酚、β-胡萝卜素、还原型谷胱甘肽、尿酸和胆红素。内源和源自食物的抗氧化剂的总数表示细胞外液的总抗氧化能力。所有不同抗氧化剂的协作提供比单独的任何单个化合物更强的对抗反应性氧或氮自由基侵袭的保护。因此,总的抗氧化能力与测量单独组分获得的抗氧化能力相比可以给出更相关的生物信息,因为其考虑了血浆和体液中存在的所有抗氧化剂的累积效应。样品中抗氧化剂预防ABTS氧化的能力与水溶性生育酚类似物Trolox进行比较,并以Trolox的摩尔当量进行定量。来自Cayman Chemical(安娜堡,美国密歇根)的抗氧化能力试剂盒#709001可以用作体外生物分析,以测量说明书中公开的每种活性成分、任一种成分的组合或具有所述组合的组合物中的总抗氧化能力。方案可以根据制造商的建议进行。

[0125] ORAC分析:还可以通过测量这种成分或组合物的抗氧化活性来分析本说明书公开的活性成分、成分的组合或具有所述组合的组合物中任一种的氧自由基吸收(或吸收率)能力(ORAC)。抗氧化活性表示减少氧化试剂(氧化剂)的能力。该分析定量抑制氧化剂,例如已知导致损害细胞(例如皮肤细胞)的氧自由基的活动的程度及所用时长。可通过本领域普通技术人员已知的方法(参见美国专利公布第2004/0109905号和第2005/0163880号,以及可商购获得的试剂盒例如Zen-Bio ORAC抗氧化分析试剂盒(#AOX-2))来确定本说明书公开的活性成分、成分组合或具有所述组合的组合物中任一种的ORAC值。Zen-Bio ORAC抗氧化分析试剂盒测量了由于通过AAPH(2,2'-偶氮二-2-甲基丙基咪二盐酸盐)分解而形成过氧化氢-自由基的随时间的荧光素荧光的损失。作为水溶性维生素E的Trolox以剂量依赖的方式作为抑制荧光素衰变的阳性对照。

[0126] 基质金属蛋白酶3和基质金属蛋白酶9的酶活性(MMP3;MMP9)分析:体外基质金属蛋白酶(MMP)抑制分析。MMP3是胞外蛋白酶,其凭借广泛的底物特异性对许多正常的和疾病状态起作用。MMP3底物包括胶原蛋白、纤连蛋白和层粘连蛋白;而MMP9底物包括胶原蛋白VII、纤连蛋白和层粘连蛋白。使用来自BioMol International的用于MMP3(AK-400)和MMP-9(AK-410)的比色药物发现试剂盒,该分析设计用于测量MMP的蛋白酶活性,使用含硫多肽作为显色底物(Ac-PLG-[2-巯基-4-甲基-戊酰基]-LG-OC₂H₅)_{5,6}。MMP裂解位点的肽键由含硫多肽中的硫酯键替代。该键被MMP水解产生巯基,其与DTNB[5,5'-二硫代双(2-硝基苯甲酸),埃尔曼试剂]反应生成2-硝基-5-硫代苯甲酸,可以通过其在412nm处的吸光度进行检测(在pH为6.0和高于7时, $\epsilon = 13600\text{M}^{-1}\text{cm}^{-1}$)。可以分析说明书中公开的活性成分、任意一种成分的组合、或具有所述组合的组合物。

[0127] 基质金属蛋白酶1活性(MMP1)分析:体外基质金属蛋白酶(MMP)抑制分析。MMP是胞外蛋白酶,其凭借广泛的底物特异性对许多正常的和疾病状态起作用。MMP1底物包括胶原蛋白IV。分子探针Enz/Chek白明胶酶/胶原酶分析试剂盒(#E12055)利用荧光明胶底物来检测MMP1蛋白酶活性。在溶蛋白性裂解后,显示亮绿色荧光,并可以使用荧光酶标仪监测亮绿色荧光以测量酶活性。

[0128] 将来自Invitrogen的Enz/Chek白明胶酶/胶原酶分析试剂盒(#E12055)设计为体外分析以测量MMP1酶活性。可以分析说明书中公开的活性成分、任意一种成分组合、或具有所述组合的组合物。该分析依赖于纯净的MMP1酶降解荧光明胶底物的能力。一旦底物被MMP1特异地裂解,则显示亮绿色荧光,并可以使用荧光酶标仪监测亮绿色荧光。在纯净的酶和底物存在或不存在的条件下孵育测试物质以确定其蛋白酶抑制能力。

[0129] 环氧合酶(COX)分析:体外环氧合酶-1和环氧合酶-2(COX-1,COX-2)抑制分析。COX是展现环氧合酶和过氧化物酶两者活性的双功能酶。环氧合酶活性将花生四烯酸转化为过氧化氢内过氧化物(前列腺素G₂;PGG₂),过氧化物酶组分将内过氧化物(前列腺素H₂;PGH₂)还原为相应的醇、前列腺素、血栓素和环前列腺素的前体。该COX抑制剂筛选分析测量环氧合酶的过氧化物酶组分。过氧化物酶活性通过监测氧化的N,N,N',N'-四甲基-对苯二胺(TMPD)的出现进行比色分析。该抑制筛选分析包含COX-1和COX-2酶两者,以筛选同工酶特异性抑制剂。可以使用比色COX(绵羊)抑制剂筛选分析(#760111,Cayman Chemical)来分析本说明书中所公开的活性成分、任意一种成分的组合或具有所述组合的组合物中每一种对纯化的环氧合酶(COX-1或COX-2)活性的影响。根据制造商的指示,纯化的酶、血红素和测试

提取物可以在分析缓冲液中混合,并在室温下伴随摇动孵育15分钟。孵育之后,可以加入花生四烯酸和比色底物以开始反应。可以通过在590nm读取的比色板来评估颜色变化。COX-1或COX-2活性的抑制百分比可以通过与未处理的对照物比较来计算,以确定测试提取物抑制纯化酶活性的能力。

[0130] 脂肪氧合酶 (LO) 分析:体外的脂肪氧合酶 (LO) 抑制分析。LO是非血红素的含铁的加双氧酶,其催化分子氧加成到脂肪酸。亚油酸盐/酯和花生四烯酸盐/酯是植物和动物中LO的主要底物。然后,花生四烯酸可以转化为羟基二十三烯 (HETE) 酸衍生物,其随后转化为有效的炎症介质白三烯。该分析通过测量利用花生四烯酸培养的脂肪氧合酶 (5-LO、12-LO或15-LO) 产生的氢过氧化物提供一种精确的和方便的用于筛选脂肪氧合酶抑制剂的方法。可以使用比色LO抑制剂筛选试剂盒 (#760700, Cayman Chemical) 来确定本说明书中所公开的活性成分、任一种成分的组合或具有所述组合的组合物中每一种的抑制酶活性的能力。纯化的15-脂肪氧合酶和测试成分可以在分析缓冲液中混合,并在室温下摇晃培育10分钟。培育之后,可以加入花生四烯酸开始反应,混合物可以在室温下再培育另外10分钟。可以加入比色底物终止催化,颜色变化可以通过在490nm读取的荧光板进行评估。脂肪氧合酶活性的抑制百分比可以通过与未处理的对照物比较来计算,以确定说明书中所公开的每种活性成分、任意一种成分的组合、或具有所述组合的组合物抑制纯净酶活性的能力。

[0131] 弹性蛋白刺激分析:弹性蛋白是结缔组织蛋白,其帮助皮肤在伸展或收缩后恢复形状。弹性蛋白也是在需要储存机械能的位置使用的重要负载蛋白。弹性蛋白是由许多可溶性弹性蛋白原蛋白分子在由赖氨酰氧化酶催化的反应中连接而成。通过使用针对弹性蛋白的免疫荧光抗体来染色培养的人成纤维细胞,可以在培养的人成纤维细胞中监测弹性蛋白分泌和弹性蛋白纤维。

[0132] 层粘连蛋白和纤连蛋白刺激分析:层粘连蛋白和纤连蛋白是真皮-表皮连接 (DEJ) (也称为基膜) 中主要的蛋白质。DEJ位于真皮和表皮之间,并连结形成叫做网脊的指状突出。表皮细胞从真皮的血管中接收其养分。网脊增大了暴露于这些血管和所需养分的表皮表面积。DEJ提供两种组织室的粘连,并控制皮肤的结构完整性。层粘连蛋白和纤连蛋白是位于DEJ中的两种结构糖蛋白。考虑到将细胞保持在一起的胶,真皮成纤维细胞分泌层粘连蛋白和纤连蛋白以帮助促进表皮细胞与DEJ的细胞内和细胞间黏连。层粘连蛋白和纤连蛋白的分泌可以通过定量在培养的人成纤维细胞的细胞上清液中的层粘连蛋白和纤连蛋白来监测,培养的人成纤维细胞用含或不含测试成分的培养基处理3天。培养之后,在酶联免疫吸附测试 (ELISA) 中,可以使用针对每种蛋白质的免疫荧光抗体来测量层粘连蛋白和纤连蛋白含量。对细胞代谢活性的测量进行标准化,其由3-(4,5-二甲基噻唑-2-基)-5-(3-羧基甲氧基苯基)-2-(4-磺苯基)-2H-四唑 (MTS) 的生物转化来测定。

[0133] 肿瘤坏死因子- α (TNF- α) 分析:TNF超家族的原型配体TNF- α 是在炎症中起主要作用的多效细胞因子。其表达的增加与促炎活性上调有关。该生物分析可用于分析本说明书公开的任一种活性成分、成分的组合或具有所述组合的组合物对通过人表皮角化细胞的TNF- α 产生的作用。该分析的终点可以为反映TNF- α 的存在和细胞活性的分光光度测量。该分析采用定量的三明治酶免疫分析技术,其中对TNF- α 特异的单克隆抗体预先涂覆在微孔板上。可将标准品和样品移液到孔中,存在的所有TNF- α 由固定化的抗体结合。洗去所有未结合的物质后,可向孔中添加对TNF- α 特异的酶联多克隆抗体。冲洗以去除所有未结合的抗

体-酶试剂之后,可添加底物溶液到孔中,颜色显现与最初步骤中结合的TNF- α 的量成比例,使用酶标仪在450nm处检测。可以终止显色,并测量颜色的强度。在37°C下5%的CO₂中在EPILIFE™标准生长培养基(Cascade Biologics)中培养的次融合的正常人类成熟角质细胞(Cascade Biologics)可用佛波醇-12-豆蔻酸酯-13-乙酸酯(PMA,10ng/ml,Sigma Chemical,#P1585-1MG)和本说明书公开的活性成分、成分的组合或具有所述组合的组合物的任一种处理6小时。PMA已经显示导致TNF- α 分泌明显的增加,所述TNF- α 分泌在处理6小时后达到峰值。培育之后,可以收集细胞培养基,并使用来自R&DSystems(#DTA00C)的三明治酶联免疫吸附分析(ELISA)定量TNF- α 的分泌量。

[0134] 弹性蛋白酶分析:来自Molecular Probes(俄勒冈州尤金,美国)的EnzChek®弹性蛋白酶分析(试剂盒#E-12056)可以用作体外酶抑制分析以测量本说明书中所公开的活性成分、任一种成分组合或具有所述组合的组合中每一种的弹性蛋白酶活性的抑制。EnzChek试剂盒含有可溶的牛颈韧带弹性蛋白,其可用染料标记以使共轭物的荧光淬灭。非荧光的底物可以被弹性蛋白酶或其他蛋白酶消化以产生高度荧光的片段。产生的荧光增强可以用荧光酶标仪进行监测。来自弹性蛋白底物的消化产物在约505nm处具有吸收最大值,在约515nm处具有荧光发射最大值。当使用EnzChek弹性蛋白酶分析试剂盒以筛选弹性蛋白酶抑制剂时,可以将肽、N-甲氧基琥珀酰-Ala-Ala-Pro-Val-氯甲基酮用作选择性的、共同的弹性蛋白酶抑制剂。

[0135] 控油分析:用于测量皮脂腺中皮脂分泌的减少和/或皮脂腺中皮脂产生的减少的分析可以通过使用本领域普通技术人员已知的标准技术进行分析。在一种情况中,可以使用前额。可以将本说明书中所公开的活性成分、任一种成分的组合或具有所述组合的组合物中的每一种,每天一次或两次施用到前额的一部分设定天数(例如1天、2天、3天、4天、5天、6天、7天、8天、9天、10天、11天、12天、13天、14天或多于14天),而前额的其他部分不用所述组合物处理。在设定天数期满后,皮脂分泌可以通过将细吸油纸施用到处理过的和未处理的前额皮肤上进行分析。这是通过首先用湿的和干的布从处理过的和未处理的区域去除所有皮脂完成的。然后将吸油纸施用到处理过的和未处理的前额区域,并且围绕前额放置橡皮筋以轻轻地将吸油纸压到皮肤上。2小时后,可以移去吸油纸,使其干燥,然后进行透照。颜色越深的吸油纸对应于越多的皮脂分泌(或颜色较浅的吸油纸对应于减少的皮脂分泌)。

[0136] 红斑分析:测量皮肤发红减少的分析可以使用Minolta Chromometer进行评估。皮肤红斑可以通过在对象的前臂施用0.2%的十二烷基硫酸钠溶液来诱发。区域用封闭贴片保护24小时。24小时后,除去贴片并可以使用Minolta Chroma Meter的a*值对刺激诱发的发红进行评估。a*值测量肤色在红色区域的变化。读取后立即用本说明书公开的活性成分、任一种活性成分组合或含有所述组合的组合物处理该区域。可以定期进行重复测量以确定制剂减少发红和刺激的能力。

[0137] 皮肤水分/水合分析:皮肤水分/水合的益处可以通过利用以Nova Dermal Phase Meter进行的阻抗测量进行测量。阻抗计测量皮肤水分含量的变化。皮肤外层具有不同的电性质。当皮肤干燥时,其导电性很差。当其变得较为滋润时,产生增加的导电性。因此,皮肤阻抗(与导电性有关)的变化可以用于评价皮肤水合的变化。该仪器可以根据仪器说明对每个测试日进行校准。还可以对温度和相对湿度进行标记。可以对对象进行如下评估:测量前

使样品可以在限定湿度(例如30%至50%)和温度(例如68°C至72°C)的室内进行平衡。在脸的每一侧获取三个单独阻抗读数,并对其记录并取平均值。阻抗计可以使用T5设定,其对施用到脸上每五秒的阻抗值取平均值。变化可以以统计学方差和显著性进行报告。根据该方法可以测试本说明书中公开的活性成分、任一种成分的组合或含有所述组合的组合物的每一种。

[0138] 皮肤干燥、表面细纹、皮肤光滑度和肤色分析:皮肤干燥、表面细纹、皮肤光滑度和肤色可以用临床评分技术进行评估。例如,皮肤干燥的临床评分可以通过五分标准Kligman scale进行确定:(0)皮肤是柔软和湿润的;(1)皮肤呈现中性而没有可见的干燥;(2)皮肤触摸感觉轻微干燥而没有可见的剥落;(3)皮肤感觉干燥、粗糙并且具有有些鳞屑的发白的外观;以及(4)皮肤感觉非常干燥、粗糙并且具有有鳞屑的发白的外观。评估可以由两个临床医师独立进行并取平均分。

[0139] 肤色临床评分分析:肤色的临床评分可以通过十分模拟数值量度来实施:(10)平滑均匀的皮肤、粉红棕的颜色。手持放大镜检查时没有暗的、发红的或有脱皮的斑块。皮肤的细微纹理摸上去非常均匀;(7)不用放大镜观察均匀的肤色。没有脱皮区域,但是有由于色素淀积或红斑引起的轻微变色。没有直径大于1cm的色斑;(4)容易地注意到皮肤色斑和不均匀的纹理。少量脱皮。皮肤的某些区域摸上去粗糙;以及(1)不均匀的皮肤着色和纹理。多个区域的脱皮和变色,色素减退型、发红的或黑色的斑点。大面积的直径超过1cm的不均匀着色。评估可以由两个临床医师独立进行并取平均分。

[0140] 皮肤光滑度的临床评分分析:皮肤光滑度的临床评分可以通过十分模拟数值量度进行分析:(10)平滑的,皮肤是湿润的和光亮的,手指划过表面时没有阻力;(7)一定程度平滑的,微小的阻力;(4)粗糙的、可见地改变的,摩擦时有摩擦力;和(1)粗糙的、片状的、不均匀的表面。评估由两个临床医师独立进行并取平均分。

[0141] 用Packman等人(1978)公开的方法进行的皮肤光滑度和皱纹减少的分析:(1978):皮肤光滑度和皱纹的减少也可以通过使用Packman等人(1978)公开的方法进行可视化评估。例如,每个对象就诊时,对每个对象的外表面线(SFL)的深度、浅度和总数量都可以进行认真的评分和记录。通过将数量因子乘以深度/宽度/长度因子得到数字的分数。获得眼部区域和嘴部区域(左侧和右侧)的分数,将其加到一起作为总的皱纹分数。

[0142] 用Hargens Ballistometer进行的皮肤紧实度分析:皮肤紧实度可以用Hargens Ballistometer进行测量,其是通过使小物体落在皮肤上并记录前两个反弹峰来评估皮肤弹性和紧实度的装置。Ballistometry是使用相对钝的尖端(4平方毫米-接触面积)的小的轻量探针。探针轻轻地穿透进入皮肤,获得取决于皮肤外层性质的测量值,所述皮肤外层包括角质层和外表皮以及部分真皮层。

[0143] 用Gas Bearing Electrodynamometer进行的皮肤柔软度/柔韧性分析:皮肤柔软度/柔韧性可以使用Gas Bearing Electrodynamometer进行评估,其为测量皮肤应力/应变性质的仪器。皮肤的黏弹性与皮肤保湿有关。可以通过用双面胶将探针黏附在皮肤表面实现对脸颊区域预设位点的测量。大约3.5gm的力可以平行施加于皮肤表面,精确地测量皮肤的位移。然后可以计算皮肤的柔韧性,并以DSR(动态弹簧刚度,以gm/mm计)表示。

[0144] 用复制品进行的纹路和皱纹的显现分析:皮肤上纹路和皱纹的显现可以使用复制品进行评估,所述复制品是皮肤表面的印模。可以使用如硅橡胶的材料。复制品可以通过图

像分析进行分析。纹路和皱纹可见性的变化可以通过利用硅复制品形成对象的脸并用计算机图像分析系统分析复制品图像进行客观地定量。复制品可以从眼部区域和颈部区域获得,并用数码相机以低角度入射照明拍摄。数字图像可以用图像处理程序进行分析并确定复制品被皱纹和细纹覆盖的区域。

[0145] 用表面光度仪/触针法进行的皮肤表面轮廓分析:皮肤表面轮廓可以通过使用表面光度仪/触针法进行测量。这包括闪光或拖动触针穿过复制品表面。触针的垂直位移通过距离传感器可以录入计算机,并且在扫描固定长度的复制品后,皮肤轮廓的截面分析可以以二维曲面产生。该扫描可以沿着固定的轴重复任意次数以产生模拟的皮肤3-D图像。使用触针技术可以获得十个随机的复制品截面,并组合产生平均值。感兴趣的值包括 R_a ,其为通过积分相对于平均轮廓高度的轮廓高度计算得到的所有粗糙度(高度)值的算术平均数。 R_t ,其为最高峰和最低谷之间的最大垂直距离,以及 R_z ,其为平均峰振幅减去平均峰高度。数值以用mm为单位标定的数值给出。设备应在每次使用前通过扫描已知数值的金属标准品进行归一化。 R_a 值可以通过下式计算: $R_a = \text{归一化粗糙度}; l_m = \text{横向(扫描)长度}; \text{以及} y = \text{轮廓位置相对于平均轮廓高度}(x\text{轴})\text{的绝对值}。$

[0146] MELANODERM™分析:在其他非限制性方面,可通过使用皮肤类似物例如MELANODERMTM来评价本说明书中所公开的活性成分活性成分、任意一种成分组合或具有该组合的组合物中每一种的功效。黑色素细胞是皮肤类似物中细胞的一种,当暴露于L-二羧苯基丙氨酸(L-DOPA)(黑色素的前体)时呈阳性染色。皮肤类似物MELANODERM™可以如下处理:利用各种包含每种活性成分的基质、成分的任一组合或含有说明公开的组合的组合物来处理或将基质单独作为对照。或者,未处理的皮肤类似物样品可以用作对照物。

[0147] 丝聚合蛋白的产生:可测量角质形成细胞中由于本说明书中所公开的活性成分、任一种成分组合或具有该组合的组合物中每一种而导致的丝聚合蛋白产生的变化。丝聚合蛋白是皮肤中天然保湿因子(NMF)的前体。增加的NMF提高了皮肤中的水分含量。使用分析角质形成细胞裂解物中的丝聚合蛋白浓度的生物测试来测定在经处理和未经处理的角质形成细胞中的丝聚合蛋白的产生。可用于定量丝聚合蛋白产生的生物分析的非限制性实例为PROTEINSIMPLE®Simon™蛋白质免疫印迹法。对于每个样品,使正常人表皮角质形成细胞(NHEK)在来自Life Technologies(M-EP-500-CA)的含钙的EPI-200-Mattek EPILIFE®生长培养基中生长。在处理之前,在37°C下5%的CO₂中,使NHEK在生长培养基中孵育过夜。然后将NHEK在含有1%测试化合物/提取物的生长培养基或不含化合物/提取物(阴性对照)的生长培养基中孵育24小时至36小时。然后可将NHEK清洗、收集并于冰或更冷的物体上储存直至用裂解缓冲液和超声在冰上裂解。可确定样品的蛋白质浓度并用于使样品归一化。裂解物可在-80°C下存储直至在定量分析中使用。

[0148] PROTEINSIMPLE®Simon™蛋白质免疫印迹法生物分析使用定量的蛋白质免疫印迹免疫分析技术,该技术使用了对丝聚合蛋白特异性的抗体来定量检测样品中的丝聚合蛋白。将细胞样品裂解并对蛋白质浓度进行归一化。然后可以加载归一化的样品和分子量标准品,并使用毛细管电泳在变性的蛋白质分离凝胶上运行。将凝胶中的蛋白质固定并使用对丝聚蛋白特异的第一抗体进行免疫检测。然后,可以用结合第一抗体的酶联检测抗体对固定的蛋白质进行免疫检测。然后,可以将化学发光底物溶液加入到固定的蛋白质中,以允许与在固定化中结合的丝聚蛋白的量成比例的化学发光显影。在特定的时间停止化学

发光显影,可以测量化学发光信号的强度,并与阳性对照和阴性对照比较。。

[0149] 闭合蛋白的产生:可测定由于本说明书中所公开的活性成分、任一种成分组合的或具有该组合的组合物的一种而导致的在角质形成细胞中闭合蛋白产生的变化。闭合蛋白是对于紧密连结的形成和皮肤水分屏障功能重要的蛋白质。在经处理和未经处理的角质形成细胞中如何确定闭合蛋白产生的非限制性实例是通过使用分析在角质形成细胞裂解物中的闭合蛋白浓度的生物分析。实施**PROTEINSIMPLE®Simon™**蛋白质免疫印迹法进行该生物分析。对于样品,在37°C下5%的CO₂中,来自Life Technologies的成人表皮角质形成细胞(HEKa)(C-005-5C)在来自Life Technologies(M-EP-500-CA)的EPILIFE™生长培养基中生长24小时,EPILIFE™生长培养基含有钙,并补充有来自Life Technologies的Keratinocyte Growth Supplement(HKGS)(S-101-5)。然后使用测试化合物/提取物、作为阴性对照的无化合物/提取物或作为阴性对照的1mM的CaCl₂,使HEKa在生长培养基中孵育24小时至48小时。然后将HEKa清洗、收集并于冰或更冷的物体上储存直至使用裂解缓冲液和超声在冰上裂解。可确定样品的蛋白质浓度并用于使样品归一化。裂解物在-80°C下存储直至在生物测试中使用。

[0150] **PROTEINSIMPLE®Simon™**蛋白质免疫印迹法生物分析使用定量的蛋白质免疫印迹法分析技术,该技术使用了对闭合蛋白特异的抗体来定量检测样品中的闭合蛋白。将细胞样品裂解并对蛋白质浓度进行归一化。然后加载归一化的样品和分子量标准品,并使用毛细管电泳在变性的蛋白质分离凝胶上运行。然后固定凝胶中的蛋白质并使用对闭合蛋白特异的初代抗体进行免疫检测。将经固定的蛋白质和与初代抗体结合的酶联检测抗体免疫检测。然后向经固定的蛋白质中添加化学发光底物溶液以使化学发光显色与在固定化中结合的闭合蛋白的量成比例。可在特定的时间终止化学发光显色,并且可以测量化学发光信号的强度并与阳性对照和阴性对照比较。

[0151] 角化细胞单层渗透性:可测量由于本说明书中所公开的每种活性成分、任一种成分的组合或具有该组合的组合物而导致的角化细胞单层的渗透性变化。角化细胞单层的渗透性是皮肤屏障完整性的量度。作为非限制性实例,可以使用Millipore(ECM642)的体外血管渗漏分析测定经处理和未经处理的角化细胞中的角化细胞单层渗透性。该分析分析了内皮细胞吸附、输送和渗透。简略来说,来自Life Technologies(C-005-5C)的成人表皮角化细胞可被接种到在收集孔内的多孔胶原蛋白涂覆的膜上。在37°C下和5%的CO₂中,角化细胞在EPILIFE™生长培养基中培养24小时,EPILIFE™生长培养基含有来自Life Technologies的钙(M-EP-500-CA),补充有来自Life Technologies的Keratinocyte Growth Supplement(HKGS)(S-101-5)。培养时间使得细胞形成单层并封闭膜孔。然后将培养基替换成含有(测试样品)或不含有(未处理对照)测试化合物/提取物的新鲜培养基,并且该角化细胞在37°C下和5%的CO₂中培育另外48小时。在含有/不含有测试化合物/提取物的培育之后,为了测定角化细胞单层渗透性,培养基被替换成含有高分子量异硫氰酸荧光素(FITC)-Dextran的新鲜培养基,该角化细胞在37°C下和5%的CO₂中培养另外4小时。在4小时的培育期间,FITC可以以与单层膜的渗透性成比例的速率穿过该角化细胞单层和多孔膜进入收集孔。在4小时的培育后,可测定细胞活性和收集孔中FITC的含量。对于FITC含量,收集孔中的培养基被收集,并且在520nm处激发时在480nm(Em)处测定培养基的荧光。与未经处理的对照相比,渗透率百分比和变化百分比可以通过以下等式确定:渗透率百分比=

$(\text{测试样品的平均}E_x/E_m) / \text{平均}E_x / \text{未经处理的对照}E_m) * 100$; 变化百分比 = 测试样品的渗透率百分比 - 未经处理的对照的渗透率百分比。

[0152] 透明质酸的产生:可测量在人真皮成纤维细胞中的由于本说明书中所公开的每种活性成分、任一种成分组合或具有该组合的组合物而导致的透明质酸产生的变化。HA是与基质结构的稳定性有关的多糖,并且与向组织和细胞提供膨压有关。作为一个非限制性实例,可以使用来自R&D Systems的Hyaluronan DuoSet ELISA试剂盒(DY3614)测定在经处理和未经处理的成人真皮成纤维(HDFa)细胞中的HA的产生。在该分析中,对于样品的产生,在处理之前,在37°C和10%CO₂下在饥饿培养基中(在Dulbecco氏改良Eagle培养基中的0.15%的牛胎儿血清和1%的青霉素链霉素溶液)培育由Cascade Biologics获得的次融合的HDFa细胞(C-13-5C)72小时。然后,将细胞用新鲜饥饿培养基培育24小时,所述饥饿培养基含有测试化合物、阳性对照(来自Sigma-Aldrich的佛波醇12-肉豆蔻酸13-乙酸酯(P1585)和来自Sigma-Aldrich的血小板衍生生长因子(P3201)),或者不含添加剂。然后收集培养基并在-80°C下冷冻直至在ELISA测试中使用。

[0153] 简而言之,该ELISA分析采用定量的三明治酶免疫分析技术,因此对HA特异的捕获抗体可以预先涂覆在微孔板上。将标准品、来自经处理和未经处理的细胞的培养基移液至微孔板,以使存在的任意HA被经固定的抗体结合。洗去所有未结合的物质后,向孔中添加对HA特异的酶联检测抗体。冲洗以去除所有未结合的抗体-酶试剂之后,向孔中添加底物溶液,使得颜色显现能够与最初步骤中结合的HA的量成比例。在特定的时间停止颜色显现,颜色的强度可以使用酶标仪在450nm处测量。

[0154] 透明质酸酶活性的抑制可测定由于本说明书中所公开的活性成分、任意一种成分组合或具有该组合的组合物中的每一种而导致的透明质酸酶活性的变化。透明质酸酶是分解HA的酶。HA是与基质结构的稳定性有关的多糖,并且与向组织和细胞提供膨压有关。作为非限制性实例,可以使用由Sigma-Aldrich方案#EC 3.2.1.35改良的体外方案测定透明质酸活性。简略来说,向含有测试化合物或对照的微孔板反应孔中添加来自Sigma-Aldrich的1-S型透明质酸(H3506)。可使用鞣酸作为阳性对照抑制剂,对照的酶不添加测试化合物,含有测试化合物或阳性对照但不含透明质酸酶的孔可以用作背景阴性对照。在添加底物(HA)之前,孔在37°C下培养10分钟。添加底物,反应在37°C下培育45分钟。然后,将每个反应溶液的一部分转移在乙酸钠和pH为3.75的乙酸的溶液中并轻轻混合,以终止该部分反应(终止孔)。在将一部分反应溶液加入到终止孔中之后,终止孔和反应孔应该都含有相同体积的溶液。反应孔和终止孔均在室温下培养10分钟。然后测量反应孔和终止孔在600nm处的吸光度。抑制作用可以使用以下公式来计算:抑制剂(或对照)活性 = (在600nm处的抑制剂停止的孔吸光度 - 在600nm处的抑制剂反应孔吸光度); 初始活性 = 在600nm处的对照酶吸光度; 抑制百分数 = [(初始活性/抑制剂活性) × 100] - 100。

[0155] 过氧化物酶体增殖剂-激活的受体 γ (PPAR- γ) 的活性:可测定由于本说明书中所公开的每种活性成分、任一种成分组合或具有该组合的组合物而导致的PPAR- γ 活性变化。PPAR- γ 是对皮脂产生来说重要的受体。作为非限制性实例,使用分析测试化合物或组合物抑制配体结合的能力的生物测试来测定PPAR- γ 的活性。简略来说,可以使用荧光的小分子 pan-PPAR配体,从Life Technologies(PV4894)获得的FLUORMONE™Pan-PPAR Green,来确定测试的化合物或组合物是否能够抑制配体与PPAR- γ 结合。样品孔包括PPAR- γ 和荧光配体

和二者之一:测试化合物或组合物(测试);参考抑制剂;罗格列酮(阳性对照);或者没有测试化合物(阴性对照)。孔被培养设定的一段时间以使得配体有机会与PPAR- γ 结合。然后可测量每个样品孔的荧光偏振,并与阴性对照孔比对以确定测试化合物或组合物的抑制百分比。

[0156] 细胞因子阵列:人表皮角质形成细胞被培养至70%至80%的融合度。吸出板中的培养基并加入0.025%的胰蛋白酶/EDTA。当细胞变得丰满时,轻轻敲打培养皿以释放细胞。从培养皿中去除含有胰蛋白酶/EDTA的细胞并中和。将细胞在180xg下离心5分钟以形成细胞沉淀。吸出上清液。在EPILIFE™培养基(Cascade Biologics)中再悬浮获得的沉淀。该细胞以约10%至20%的融合度被接种到6孔板中。在细胞变为约80%融合度之后吸出培养基,将1.0ml的EPILIFE™,以及佛波醇13-十四酸酯12-乙酸酯(“PMA”(已知的炎症诱导剂)和测试组合物稀释物加入到两个重复的孔中(即1.0%(100X储备中的100 μ l)和0.1%(100X储备中的10 μ l)的测试组合物稀释为最终体积为1ml的EPILIFE™生长培养基)。轻轻地涡旋振荡培养基以确保充分混合。另外,在含有或不含有额外的PMA的情况下,向对照孔中添加1.0ml的EPILIFE™。然后,在定量给料之后,将板在 $37 \pm 1^\circ\text{C}$ 和 $5.0 \pm 1\% \text{CO}_2$ 中孵育约5小时。培育5小时后,将所有培养基收集在圆锥管中并在 -70°C 下冷冻。

[0157] 为了分析,将16格的杂交盒连接至16格的FAST基片,和16抗细胞因子抗体加实验对照组一式三份排列,将基片置于用于加工的FAST框架中(每框架4个基片)。在室温下用70ml S&S蛋白分析阻断缓冲剂(Whatman Schleicher and Scheull)将阵列阻断15分钟。去除阻断缓冲剂并向每个阵列添加70ml各自的上清液试样。在轻微振动下,阵列在室温下孵育3小时。用TBS-T将阵列清洗3次。用70ml混合型抗体处理阵列,所述抗体含有一种对应于每个阵列捕捉抗体的生物素化的抗体。在轻微振动下,阵列在室温下孵育1小时。用TBS-T将阵列清洗3次。在轻微振动下,在室温下使用70ml含有链霉亲和素-Cy5缀合物的溶液孵育1小时。用TBS-T将阵列清洗3次,在去离子水中快速冲洗并干燥。

[0158] 基片可以在Perkin-Elmer ScanArray 4000激光共聚焦成像系统中成像。使用Imaging Research ArrayVision软件可以保存并分析阵列图像。简言之,通过去除背景信号确定斑点强度。可以对来自每个样品条件的重复斑点进行平均,然后和适当的对照比对。

[0159] 内皮管形成:内皮管的形成和血管生成及毛细血管形成有关。毛细血管形成和血管生成可以导致皮肤发红和红斑痤疮。在存在或不存在测试提取物和化合物的情况下,在细胞培养系统中,使用具有预成型的原代人脐静脉内皮细胞(HUVEC)的毛细管破坏测试可以确定内皮细胞形成管的能力。

[0160] 简略来说,将HUVEC在细胞外基质进行体外培养,其刺激和内皮细胞的附着和管状形态发生以形成毛细管状的内腔结构。在许多方面,这些体外形成的毛细血管与人的血管毛细血管相似。毛细管测试是基于该现象的,并用于评价潜在的脉管系统靶向剂。

[0161] 在5% CO_2 、 37°C 下,HUVEC培养物在细胞恒温箱中生长。用于HUVEC的完整生长基为内皮管细胞基础培养基(EBM),其补充有2%的牛胎儿血清(FBS)、12 $\mu\text{g}/\text{ml}$ 的牛脑提取物、1 $\mu\text{g}/\text{ml}$ 的氢化可的松和1 $\mu\text{g}/\text{ml}$ 的GA-1000(庆大霉素-两性霉素B)。在第3代至第8代之间的HUVEC培养物可以用于所有的分析测试。

[0162] 用荧光试剂Calcein AM预标记HUVEC,并将其接种于使用其完全生长培养基的细胞外基质涂覆的96孔培养板中。在形态发生过程后约四小时,形成内皮毛细管。然后,作为

处理条件,对形成的毛细管培养物施用50 μ l体积的设定剂量的测试试剂。可以向未处理对照组加入测试试剂的载剂。索坦(Sutent)是FDA认证的抗血管生成药物,可以包括其一个浓度作为测定性能的对照。在处理约六小时后,通过显微镜检查每个孔中的内皮小管形态、使其成像,可以定量分析处理条件下的毛细管破坏活性。每个测试条件可以在两个孔中进行,包括对照。

[0163] 本文所公开和要求保护的所有组合物和/或方法可以不需要过度实验即可做出和实施。尽管本发明的组合物和方法已经按照优选的实施方式进行了描述,但是对于本领域技术人员明显的是,可以对所述组合物和/或方法以及在本文所描述方法的步骤或步骤的顺序进行改变,而不脱离本发明的构思、精神和范围。更具体地,明显的是化学上和生理上都相关的特定试剂可以替代本文所描述的试剂,同时实现相同或相似的结果。所有对本领域技术人员明显的这类相似的替代和改变都被视为在如由所附权利要求限定的本发明的构思、范围和构思内。