

[19] 中华人民共和国国家知识产权局

[51] Int. Cl<sup>7</sup>

G01N 33/50

G01N 33/53 G01N 30/02

G01N 30/72 G01N 30/90



# [12] 发明专利申请公开说明书

[21] 申请号 03121795.8

[43] 公开日 2003 年 12 月 17 日

[11] 公开号 CN 1461952A

[22] 申请日 2003.3.6 [21] 申请号 03121795.8

[30] 优先权

[32] 2002. 3. 6 [33] US [31] 10/091,813

[71] 申请人 强生消费者公司

地址 美国新泽西州

[72] 发明人 K·黄 N·蒂尔尼 B·威甘德

[74] 专利代理机构 上海专利商标事务所

代理人 徐 迅

权利要求书 2 页 说明书 18 页 附图 2 页

[54] 发明名称 皮肤发炎或刺激的检测方法和试剂盒

[57] 摘要

本发明公开了一种非侵入性的体内方法，用于测定由于接触外用皮肤护理产品，暴露于外部侵害或者两者的结合而引起的哺乳动物皮肤亚临床或临床发炎或刺激。在一个实施方案中，所述方法包括用非侵入性收集装置从皮肤上收集类二十烷酸，并分析采自皮肤的类二十烷酸含量的步骤。发明还公开了一种用于测定皮肤刺激或发炎的标记物的试剂盒。该试剂盒包括用于收集皮肤表面分泌物的非侵入性收集装置，和用于测定分泌物中的类二十烷酸含量的免疫分析法。

I S S N 1 0 0 8 - 4 2 7 4

1. 一种测定哺乳动物皮肤临床或亚临床发炎或刺激的标记物的方法，其特征在于，该方法包括步骤：
- 5 (a)采用非侵入性收集程序从皮肤表面收集分泌物，所述非侵入性收集程序中利用了非侵入性收集装置；和
- (b)分析由所述装置收集到的皮肤表面分泌物中的至少一种类二十烷酸的含量。
2. 如权利要求 1 所述的方法，其特征在于，所述非侵入性装置选自未涂覆的无孔塑料膜、未涂覆的微孔塑料膜、涂覆了粘合剂的无孔塑料膜、涂覆了粘合剂的微孔塑料膜、纺织纤维网、无纺纤维网、天然海绵、人造海绵和泡沫塑料。
3. 如权利要求 1 所述的方法，其特征在于，所述类二十烷酸是前列腺素。
- 15 4. 如权利要求 1 所述的方法，其特征在于，类二十烷酸含量是用选自RIA, EIA 和 ELISA 的至少一种免疫测定技术分析的。
5. 如权利要求 1 所述的方法，其特征在于，类二十烷酸含量是用选自GC/MS, HPLC 和 TLC 的至少一种分析技术分析的。
6. 如权利要求 1 所述的方法，其特征在于，该方法还包括分析由所述装置从皮肤表面收集的分泌物中至少一种细胞因子的含量的步骤。
- 20 7. 如权利要求 8 所述的方法，其特征在于，所述细胞因子是白介素-1 $\alpha$ ，所述类二十烷酸是前列腺素 E2。
8. 一种测定哺乳动物细胞接触外用皮肤护理产品，暴露于外部侵害或两者的结合引起的亚临床或临床发炎或者刺激的方法，该方法包括步骤：
- 25 (a)用包括非侵入性收集装置的非侵入性收集程序从所述皮肤表面收集分泌物；
- (b)检测从所述皮肤表面收集的分泌物中类二十烷酸的基底水平；
- (c)使所述皮肤接触外用皮肤护理品、暴露于外部侵害或二者的结合之下；
- (d)在步骤(c)后用包括非侵入性收集装置的非侵入性收集程序收集所述皮
- 30 肤表面的分泌物；
- (e)在步骤(c)后检测从所述皮肤表面收集的分泌物中类二十烷酸的含量；
- 和

(f)比较步骤(e)中确定的类二十烷酸含量与步骤(b)中确定的类二十烷酸含量。

9. 一种用于测定哺乳动物皮肤临床或亚临床发炎或刺激的标记物的试剂盒，其特征在于，该试剂盒包括：

- 5 (a)用于从所述皮肤表面收集分泌物的非侵入性收集装置；和  
(b)用于测定所述分泌物中的类二十烷酸含量的免疫分析。

10. 如权利要求 9 所述的试剂盒，其特征在于，该试剂盒用于测定哺乳动物皮肤接触至少一种外用皮肤护理产品，暴露于至少一种外部侵害或两者的结合引起的亚临床或临床发炎或者刺激。

10

## 皮肤发炎或刺激的检测方法和试剂盒

## 5 对相关申请的交叉参考

本申请要求提交于 2001 年 9 月 6 日流水号为 60/317638 的同时待审的临时申请之权益。

## 发明领域

10 本发明涉及皮肤发炎或刺激的检测方法和试剂盒。更具体的，本发明涉及皮肤发炎或刺激的非侵入性体内检测方法和试剂盒。

## 发明背景

皮肤是人体最大的器官，其外观对一个人的自信和生活质量有巨大影响。事实上，对某人的最初印象(这种印象会持续很长时间)往往是由此人的外表(面部特征、头发颜色等)而产生的。

15 消费者用护肤产品来治疗他们的皮肤病(如粉刺、牛皮癣、细纹和皱纹)，改善皮肤健康(如干燥、鳞片状皮肤；油脂性皮肤)或遮盖皮肤上的小瑕疵。对于发展新型活性物质已进行了大量持续的研究，以提高治疗各种皮肤病的速度和效率，这导致生产了过多的新型护肤配方。这些产品往往能达到特定的皮肤护理效果，但需要持续较长时间(8 到 12 周或更长)以达到最佳效果。

20 这些外用皮肤护理产品需要较长时间才能达到它们的最终效果，这就需要建立一种能确定这些产品的刺激性，而不需要由消费者在使用过程中试验的方法。事实上，特别优选的是使用一次后，在还没有产生可见的副作用(即亚临床效果)，比如炎症、刺激、浮肿和红斑时就能确定其刺激性的灵敏测试方法。此外，受到诸如擦伤、磨伤、刮伤、日晒、风侵、烟熏和其他环境伤害的外部侵害，或者施加和除去粘性物质，如在皮肤上缠上或解下绷带，也

25 能伤害皮肤并导致发炎或刺激，其程度易受检测方式的影响。本发明提供对这种亚临床或临床效果进行检测和量化的新方法和装置。

由于护肤品或外部侵害而导致的皮肤发炎反应主要由皮肤中的角质化细胞，通过两个不同途径进行调节：细胞因子途径和花生四烯酸途径。在这些途

径中，表达、分泌或释放的各种介质被认为是原发或次级发炎介质。白介素-1 $\alpha$ (IL-1 $\alpha$ )被认为是细胞因子途径中主要的前发炎介质，而前列腺素 E<sub>2</sub>(PGE<sub>2</sub>)被认为是花生四烯酸途径主要的前发炎介质。

对于刺激或发炎的检测模式，存在两种主要的方法，即体外检测或体内检测。标题为“评价急性皮肤过敏潜在性的策略”的综述文章(Robinson 等, J. Pharmacol. Toxicol., 1999)提供了对现有皮肤侵蚀和刺激的体外检测方法的一个很好综述，此处全文引作参考。US-A-6020148 公开了代表性的皮肤侵蚀和刺激检测方法，其说明书此处全文引作参考，该申请公开了利用一种体外方法，来检测外用皮肤护理产品对眼睛或皮肤的刺激。眼睛或皮肤刺激是通过测量涂抹护肤品后模型细胞培养体系的存活力来进行量化。利用该技术可以测量不同的目标标记物，这可以随时进行监测。EP-A-049739 中公开了另一种方法，其说明书此处全文引作参考，该申请公开了利用一种包括人体皮肤的角质化细胞和成纤维细胞的共同培养物的体外模型，通过细胞毒性和预发炎终点来评价表面活性剂的刺激性。尽管这些方法能够提供有关潜在刺激性或其他临床安全问题的直接信息，但这些体外模型不能准确代表人体皮肤表现出的发炎和刺激。

此外，体内方法也已用于评价护肤产品的临床安全性。体内方法的例子包括：4 小时肤斑实验方法(见 Robinson 等的综述,或 Robinson 等在 Contact Dermatitis, 1998 中的“用于比较和研究性评价皮肤刺激的 4 小时人体肤斑实验方法的应用”)，评价小面积涂抹该产品后形成的红斑；在 24 小时肤斑接触后，利用排气液体(suction blister fluid)来检测 IL-1 $\alpha$ 和类二十烷酸(Muller-Decker 等, Toxicology and Applied Pharmacology,1998. “用表面活性剂贴片测试人皮肤产生的原发性刺激性皮炎中花生四烯酸代谢”)，用胶带剥离和辣椒素检测急性皮肤刺激中的类二十烷酸和细胞因子含量(Reilly 和 Green, Acta. Derm. Venereol., 1999, “胶带剥离和辣椒素引起的急性皮肤刺激中类二十烷酸和细胞因子的水平)。Rheins 等教导的另一种方法，即 WO 00/10579 “检测表皮中生物因子的方法”教导使用者刮擦皮肤或用胶带粘下皮肤，然后分析特定的多核苷酸/细胞因子。尽管这些方法采用了人体模型，但在其过程中都涉及到超常的使用条件或较高的侵入程度，从而限制了它们作为临床评估手段的

途。这在评价亚临床刺激时特别有影响。

最近几年中, Robinson 等公开了一种非侵入性方法, 其采用涂有粘合剂的微孔塑料膜的 Sebutape®(Cuderm Corporation, Dallas, Texas)来吸收发炎前的细胞因子作为炎症的标记物。1997 年, 证明该方法能用于检测不同人体部位, 以及不同年龄的个体的刺激(Perkins 等, 毒理学会年会, 1997, “评价人体皮肤刺激的非侵入性方法的发展”)。随后的开发表明, 这些发炎标记物可能与皮肤病相关。该方法的应用实例包括: 白介素-1 受体拮抗剂(IL-1ra)与尿布疹(diaper rash)严重程度相关(Perkins 等, 毒理学会年会, 1998, “评价人体皮肤刺激的非侵入性方法的进一步发展”), IL-1 $\alpha$ 与涂抹月桂基硫酸钠(SLS)导致的亚临床刺激(没有可见的红斑)相关(Perkins 等, 研究皮肤病学会年会, 1999, “评价化学处理之人体皮肤的炎症变化的非侵入性方法”), 以及用于评估发炎的头皮病症的严重性(Cardin 等, 毒理学会年会, 2001, “回收正常和受损头皮状况的分子标记的非侵入性方法的建立”)。利用白介素或其他蛋白质作为发炎的标记物时, 可能引起的潜在问题之一是它们与被检测护肤品潜在的相互作用。例如, 这些蛋白质与某些护肤产品中的阴离子表面活性剂的相互作用被认为可能导致蛋白质变性, 这可能影响蛋白质在分析中的表观含量。因此, 优选的是开发一种在各种护肤产品或其他受测化合物存在的情况下保持稳定, 并能克服上述与使用诸如白介素等蛋白质作为发炎/刺激标记物相关的困难的脂基标记物。此外, 该方法应不仅能检测外用皮肤护理产品对皮肤的影响, 还能检测皮肤暴露在以上提及的外部侵害下受到的影响。

#### 发明概述

一个实施方案中, 本发明涉及这样一种方法, 即通过收集和测定皮肤表面存在的类二十烷酸, 优选前列腺素, 更优选前列腺素 E<sub>2</sub>(PGE<sub>2</sub>)来检测哺乳动物(动物或人)皮肤的亚临床或临床发炎或刺激的标记物。本发明的方法包括以下步骤:

(a)用非侵入性收集方法收集皮肤表面的分泌物, 所述非侵入性收集方法利用非侵入性收集装置; 和

(b)分析由所述装置从皮肤表面收集的分泌物中的至少一种类二十烷酸的含量。

类二十烷酸的检测提供了区分非常温和的护肤产品或者暴露于外部侵害之间所必需的灵敏度，却消除了现有技术的方法引起蛋白质变性的担心。

本发明的另一个实施方案涉及检测由于哺乳动物皮肤暴露于外用皮肤护理产品、外部侵害或者二者的结合所产生的亚临床或临床的皮肤发炎或刺激的方法。本发明所述方法的这个实施方案包括以下步骤：

(a)用包括非侵入性收集装置的非侵入性收集方法收集所述皮肤表面的分泌物；

(b)检测从所述皮肤表面收集的分泌物中类二十烷酸的基础水平；

(c)将所述皮肤暴露在至少一种外用皮肤护理产品、至少一种外部侵害或二者的结合之下；

(d)在步骤(c)后用包括非侵入性收集装置的非侵入性收集方法收集所述皮肤表面的分泌物；

(e)在步骤(c)后检测从所述皮肤表面收集的分泌物中类二十烷酸的含量；和

(f)比较步骤(e)中确定的类二十烷酸含量与步骤(b)中确定的类二十烷酸含量。

优选，所述类二十烷酸是前列腺素，更优选的是前列腺素 E<sub>2</sub>。

优选，在步骤(c)后约 24 小时再进行该方法的步骤(d)。

非侵入性收集装置是选自未涂覆的无孔塑料膜、未涂覆的微孔塑料膜、涂覆了粘合剂的无孔塑料膜、涂覆了粘合剂的微孔塑料膜、纺织纤维网、无纺纤维网、天然海绵、人造海绵和泡沫塑料的装置。

另一个实施方案中，该方法还包括分析由该装置从皮肤表面收集的分泌物中至少一种细胞因子的含量的步骤。优选，所述细胞因子为白介素-1 $\alpha$ 。最优选，所述细胞因子为白介素-1 $\alpha$ 且类二十烷酸为前列腺素 E<sub>2</sub>。

再一个实施方案中，该方法还包括检测皮肤分泌物中蛋白质的含量，并将类二十烷酸含量与蛋白质含量归一化的步骤。

本发明的另一个方面涉及用于检测哺乳动物皮肤的临床或亚临床发炎或刺激的标记物的试剂盒。该试剂盒包括：

(a)用于从皮肤表面收集分泌物的非侵入性收集装置；和

(b)用于检测分泌物中类二十烷酸含量的免疫分析法。

附图简述

图 1 用于本发明某些实施方案的确定 PGE<sub>2</sub> 的免疫分析法的校正曲线。

图 2 用于本发明某些实施方案的确定 IL-1 $\alpha$ 的免疫分析法的校正曲线。

## 5 发明详述

皮肤上表达或分泌的诸如细胞因子(包括白介素-1 $\alpha$ )或类二十烷酸(包括前列腺素, 如 PGE<sub>2</sub>)等特异标记物的含量, 可用于对外用皮肤护理产品, 皮肤暴露于外部侵害或二者的结合在皮肤上诱导产生的亚临床或临床的皮肤刺激或发炎进行定量研究。此外, 检测诸如类二十烷酸和细胞因子的标记物组合可提供对有关亚临床或临床的皮肤刺激或发炎的程度更完全的了解。

10 此处所用术语“外用皮肤护理产品”指个人化妆品、化妆用具, 或护理产品如干或湿的擦剂、洗液、浴液、洗发水、凝胶、肥皂、唇膏、香膏、香粉、枕(pillows)、摩丝、喷雾剂, 乳液, 霜剂, 清洁组合物, 粉末, 油, 除臭剂, 浴油和其他用于洗浴的洗浴组合物。外用皮肤护理品可以包括, 但不限

15 于, 气溶胶, 蜡烛以及用喷雾器使用的物质。前面提及的外用皮肤护理品是本领域技术人员所熟知的。

此处所用术语“外部侵害”指个人护理品之外, 能引起皮肤刺激或炎症的刺激。外部侵害的实例包括擦伤、摩擦、刮伤、日晒、风吹、烟熏、其他环境损伤, 或将涂有粘合剂的装置, 比如粘性绷带包敷和固定在皮肤上以及

20 从皮肤上剥离。

此处所用术语“非侵入性收集方法”指在收集皮肤表面分泌物期间不会产生可见红斑的方法。

此处所用术语“非侵入性收集装置”指在收集皮肤表面分泌物期间不会产生可见红斑的装置。

25 本发明的方法能够检测用外用皮肤护理品进行护理、受到外部侵害或二者联合引起的皮肤过敏。外用皮肤护理品可用包括, 但不限于膏药、棉球、抹布、容器(chambers)等的各种装置施加到皮肤上。可用于将外用皮肤护理品施加到皮肤上的闭塞膏药的例子是 Hill Top chamber<sup>®</sup>(Hill Top Research, Cincinnati, Ohio)。该膏药包括一个模塑的塑料腔, 其中无纺的 Webril<sup>®</sup>

片(BBA Nonwovens, Simpsonville, SC)上有外用皮肤护理品。用半封闭的、低变应原性的粘胶带将该腔室施加到皮肤上。可以将外用皮肤护理品给皮肤施加不同时间,例如从1分钟到24小时。外部侵害的例子包括,但不限于洗衣服、抹布、座垫、浴室器具而产生的摩擦;皮肤暴露在太阳、烟雾、风或其他环境因素下;或者穿衣服引起的摩擦。暴露在外部侵害下的时间可从例如1分钟到1年,有时甚至可涵盖一生。

皮肤接触外用护肤品或外部侵害后,用非侵入性收集装置吸收或收集存在于皮肤表面的皮肤分泌物中含有的发炎介质。适用于吸收或收集皮肤上形成的介质的非侵入性装置的例子是涂有弱粘合剂的微孔塑料膜,比如 Sebutape®(Cuderm Corporation, Dallas, Texas 提供)。可在接触外用护肤品或外部侵害后的不同时间收集发炎介质,即可以在接触后立即收集直到接触后24小时或更长时间收集。例如,可在皮肤接触外用皮肤护理品或外部侵害后1小时、3小时或24小时收集发炎介质。我们在研究PGE<sub>2</sub>表达的动力学中发现,与较短时间相比,暴露后24小时的PGE<sub>2</sub>含量最高。然而,在累积效应的情况下,合适的作法是在整个接触期间以时间的函数来进行测量。

其他合适的非侵入性收集装置包括选自未涂覆的无孔塑料膜、未涂覆的微孔塑料膜、涂覆粘合剂的无孔塑料膜、涂覆粘合剂的微孔塑料膜、纺织纤维网、无纺纤维网、天然海绵、人造海绵和泡沫塑料的装置。

用非侵入性收集装置收集后,利用各种不同分析技术中的一种或多种来分析发炎介质的含量。可用于实施本发明的分析技术的实例包括,但不限于免疫分析技术和仪器分析技术。

可用于实施本发明的免疫分析技术的实例包括诸如放射免疫测定法(RIA)、荧光免疫测定法(FIA)、酶免疫测定法(EIA),以及酶联免疫吸附测定法(ELISA)等免疫测定技术。免疫测定技术用于利用抗体-抗原反应来鉴定和量化被分析物。用于免疫测定法的抗体可以是多克隆或单克隆抗体。在人称夹心免疫测定法的方法中,分析物的抗体被固定在固体表面,比如微珠或塑料(微量滴定)板上。将含有待测分析物的实验样品与抗体珠混合或者置于塑料板上,结果形成抗体-分析物复合物。然后将由承载了指示剂或与指示剂偶联的第二抗体组成的指示剂试剂加入混合物中。所述指示剂可以是用于RIA

的放射性同位素、用于 EIA 或 ELISA 的酶,或用于 FIA 的荧光团。EIA 或 ELISA 中最常用的酶是辣根过氧化物酶和碱性磷酸酶。抗体-指示剂偶联物结合到第一抗体-分析物复合物上,游离的抗体-指示剂偶联物被洗掉,用与指示剂相容的方法对抗体-分析物-抗体-指示剂复合物进行定量。例如,在酶免疫测定法中,通过加入与酶反应的底物来定量。

在已知的竞争结合免疫测定法这一可选方法中,样品中的待测分析物与用量已知的添加分析物进行竞争,所述添加分析物已用结合在固定化抗体上的指示剂(分析物-指示剂偶联物)标记。反应后,从固相中洗去游离的分析物-分析物-指示剂溶液。然后利用固相上或清洗溶液中存留的分析物-指示剂,相对于仅使用分析物-指示剂的对照检测,来确定样品中存在的分析物的量。这可以用测定例如酶活性、荧光、放射性等的适当方法进行。

在一种称为置换法的可选方法中,利用了置换反应而不是竞争反应,其中分析物置换了结合到抗体上的分析物-指示剂。

偶联涉及抗体或抗原与另一种分子,比如放射性同位素;诸如过氧化物酶、碱性磷酸酶或葡萄糖氧化酶的酶;或诸如荧光素或若丹明 B 的荧光团的化学连接。也可采用非共价法来偶联抗体和抗原。例如,在一种方法中,用生物素或链霉亲和素来标记抗原和/或抗体,然后该偶联物可用于竞争或置换免疫测定法。采用这种偶联物的优点是抗生物素蛋白-生物素复合物的亲和常数非常高,估计约为  $10^{14}$ L/mol。

传统上,EIA 是在多孔板,例如 96 孔微量滴定板上发展的,它为该测定法提供了固定化载体,反应容器,并且当其与基于分光光度计的读出计连接时,还能提供一种手段用于快速检测和定量底物与抗体-抗原-酶复合物相互作用而产生的颜色。

基本型 EIA 有许多变型。例如,EIA 可利用酶扩增来提高免疫测定法的速度和灵敏度。在该方法中,EIA 中的酶标记物产生一种底物,后者引发第二个酶基体系在很短时间内产生大量颜色。这样就无需直接检测抗原-抗体-酶复合物的酶活性的产物;而是把该产物作为开始第二个反应的催化剂。第二种酶体系能以较大数量存在,促进颜色快速形成,因为第二种酶不活泼并且不与检测体系反应,直到第一种反应产物将其触发。

另一种方法针对酶的活性，称为辅基标记免疫测定法(PGLIA)，使得 EIA 能以不需要清洗步骤的均相形式中进行。该方法的优点是进行测定时不需要分离步骤。

在实施本发明的方法时，用于确定 PGE<sub>2</sub> 含量的免疫测定法的实例是高敏  
5 感性 PGE<sub>2</sub> 酶免疫测定法#93001(Assay Designs,Inc.,Ann Arbor, MI)。

用于实施本发明的仪器分析技术的实例包括气相色谱法/质谱测定法(GC/MS)、高效液相色谱法(HPLC)、薄层色谱法(TLC)等，以及比色法或光谱法。用于实施本发明的比色法的实例是利用双辛可宁酸(BCA)的总蛋白质测定法(试剂盒#23225, Pierce Chemical Company, Rockford, IL)。

## 10 实施例

通过以下实施例来阐述本发明的优点以及发明所述方法和试剂盒的具体实施方案。但应当理解，本发明并不限于单个实施例提出的具体限制，而由所附的权利要求的范围界定。

在下述实施例中，PGE<sub>2</sub>、IL-1 $\alpha$ 以及蛋白质的含量分别用 Assay Designs,Inc.  
15 免疫测定法试剂盒#93001、Endogen,Inc. 免疫测定法试剂盒 EH2-IL1A 以及 Pierce BCA 蛋白质检测试剂来测定。以下简要描述这些测定方法：

### Assay Designs,Inc. PGE<sub>2</sub> 酶免疫测定法：

该分析在提供的羊抗鼠 IgG 96 孔微滴定板上进行。

通过顺次稀释含有 50000pg/mL PGE<sub>2</sub> 的标准溶液制备到 8 种 PGE<sub>2</sub> 标准溶  
20 液。这 8 种标准溶液分别含有 1000、500、250、125、62.5、31.25、15.63 和 7.81pg/mL PGE<sub>2</sub>。

用移液器将 100 $\mu$ L 测定缓冲液(assay buffer)加入非特异性结合(NSB)和 B<sub>0</sub>(0pg/mL)孔中。

用移液器将 100 $\mu$ L 每种 PGE<sub>2</sub> 标准溶液加入合适的孔中。

25 用移液器将 100 $\mu$ L 每种样品加入合适的孔中。

用移液器将 50 $\mu$ L 测定缓冲液加入 NSB 孔中。

将 50 $\mu$ L 蓝色偶联物(碱性磷酸酶偶联 PGE<sub>2</sub> 形成的蓝色溶液)用移液器加入总活性(TA)孔和空白孔之外的每个孔中。

将 50 $\mu$ L 黄色抗体(PGE<sub>2</sub> 的单克隆抗体的黄色溶液)用移液器加入空白孔、

TA 孔和 NSB 孔之外的每个孔中。

将覆盖了提供的板盖的微量滴定板在 4℃ 下培养过夜(18 到 24 小时)。

将孔吸空并向每个孔中加入 200μL 清洗液来洗涤。重复洗涤两次，总共清洗 3 次。最后一次清洗后，将孔吸空并将板紧贴在无棉绒的纸巾上，以除去任何残留的清洗缓冲液。

将 5μL 蓝色偶联物加入 TA 孔中。

将 200μL p-NPP(对硝基苯基磷酸酯)底物溶液加入每个孔中。

盖上微量滴定板并在 37℃ 下不震荡地培养 1 小时。

将 50μL 终止液(磷酸三钠)加入每个孔中。加入终止液后立即读板。

10 将板相对空白孔归零。读取每孔 405nm 处的光密度，优选在 570 和 590nm 间进行校正。

优选通过免疫测定法软件包如 Biosoft(Ferguson,MO)销售的“AssayZap”来计算样品中 PGE<sub>2</sub> 的浓度,所述软件包利用了 4 参数对数曲线拟和程序。替代的，可以如下计算 PGE<sub>2</sub> 浓度：

15 通过从平均光密度值(OD)中减去平均 NSB OD 来计算每种标准液和样品之间结合的平均净 OD。

平均净 OD = 平均结合 OD - 平均 NSB OD

用以下公式计算每对标准孔的结合，表示为最强结合孔(B<sub>0</sub>)的百分比：

结合百分比 = 净 OD / 净 B<sub>0</sub> OD x 100

20 用对数-对数坐标纸绘制标准样品的结合百分比相对 PGE<sub>2</sub> 浓度的曲线。未知样品的 PGE<sub>2</sub> 浓度可通过插值法确定。

结合百分比与 PGE<sub>2</sub> 浓度的典型标准曲线示于图 1。

#### Endogen, Inc. 白介素-1α ELISA

该测定在提供的预先包被抗人 IL-1α 的带状孔培养板中进行。

25 为了生成校正曲线，通过顺序稀释来制备 IL-1α 浓度为 400、160、64、25.6、10.24、6.12、3.06 和 0pg/mL 的标准液。

将 50ul 每种标准和样品成对加入测试孔中。用粘性板盖覆盖培养板，室温(20 到 25℃)下温育 1 小时。

将 50ul 生物素化的抗体试剂加入每个孔，用粘性板盖覆盖培养板，在室

温下再温育 1 小时。

保温结束时，仔细移去板盖，用清洗液将板洗 3 次。吸去第 3 次的洗液后，在纸巾或其他吸水材料上轻拍。

5 向每个孔中加入 100ul 链霉亲合素-辣根过氧化物酶(HRP)。加上一个新的粘性板盖，将板于室温下温育 30 分钟。

保温结束时，移去板盖，用清洗液将板洗 3 次。然后在纸巾或其他吸水材料上轻拍。

10 向每个孔中加入 100ul 3,3',5,5'-四甲基二盐酸联苯胺(TMB)底物溶液。使微量滴定板与底物室温下于暗处反应 30 分钟。30 分钟后，向每个孔中加入 100ul 终止液来终止反应。

终止反应的 30 分钟内，在设置为 450 和 550nm 的读出计上读板。从 450nm 的读数中减去 550nm 的读数。在两个波长读数可以纠正微量滴定板的光学偏差。

15 利用标准曲线来确定未知样品中的 IL-1 $\alpha$  的量。所述标准曲线是通过绘制得自每个标准的平均吸光度(450-550nm)相对 IL-1 $\alpha$  浓度的曲线确定的。典型的曲线示于图 2。利用图纸手工绘制或者曲线拟合统计软件包来绘制四参数对数曲线可以确定未知样品。每个样品中的 IL-1 $\alpha$  的量可以利用标准曲线通过由吸光度数值寻找 IL-1 $\alpha$  浓度来确定。

#### 使用 Pierce BCA 试剂的蛋白质测定法

20 Pierce BCA 蛋白质测定法结合了公知的由蛋白质在碱性介质中将  $\text{Cu}^{+2}$  还原为  $\text{Cu}^{+1}$  和利用含有双辛可宁酸的试剂比色检测一价铜离子的高敏感性和选择性。该测定法的紫色反应产物是通过两个 BCA 分子与一个一价铜离子螯合形成的。该水溶性复合物在 562nm 有强吸收，并且吸光度在很宽范围的蛋白质工作浓度内呈线性。

25 BCA 蛋白质测定法包括两种 BCA 试剂和清蛋白标准。BCA 试剂 A 含有溶于氢氧化钠溶液的碳酸钠，重碳酸钠，双辛可宁酸和酒石酸钠。BCA 试剂 B 含有 4%硫酸铜。BCA 工作试剂(WR)是通过将 50 份 BCA 试剂 A 与 1 份 BCA 试剂 B 混合制备的。WR 室温下在密闭容器中能稳定几天。

所述清蛋白标准含有溶于 0.9% 盐和 0.05% 叠氮化钠的浓度为

2.0mg/ml(2000ug/ml)的牛血清清蛋白(BSA)。可以用稀释剂将标准稀释制备浓度为 5ug/ml 的标准。

将 25ul 各种标准和未知样品用移液器加入微孔板的合适孔中。25ul 稀释剂作为空白孔。

- 5 向每个孔中加入 200ul WR。用培养板摇床将培养板混合 30 秒。盖上培养板，于 37℃温育 30 分钟。然后将培养板冷却到室温，在培养板读出计上读取每个孔 562nm 处的光吸收。

从所有标准和未知样品的读数中减去空白的平均 562nm 光吸收。用平均空白校正每个标准的读数，将读数对标准的浓度(ug/ml)作图来制备标准曲线。

- 10 该标准曲线可用于确定每个未知样品的蛋白质浓度。替代的，可以用前面提及的曲线拟合软件对未知样品定量。

#### 实施例 1-测量水对皮肤的刺激作用的方法

- 15 作为一种确定测量亚临床效果的方法的敏感性的手段，我们选择了两种温和的液体来确定接触后的发炎潜在性。容易想到的一些最温和的液体是清洁皮肤过程中存在的不同类型的水，它也是许多外用皮肤护理产品的一个主要成分。在本实施例中，我们用 PGE<sub>2</sub> 作为标记物测定了皮肤接触去离子水和自来水后的炎症反应。

#### 测定遵循以下方法：

- 20 1.沿受试者的手掌前臂测定皮肤表面存在的分泌物中所含 PGE<sub>2</sub> 的基底水平，这是通过将—个温和的涂覆粘合剂的微孔塑料膜，Sebutape®(Cuderm Corporation, Dallas,Texas)放置在皮肤上，使之与皮肤直接接触。1 分钟后从皮肤上揭下 Sebutape®，然后放在含有 500ul 盐水的小管中。该 Sebutape®收集过程再重复 3 次，每个 Sebutape®都接触 1 分钟。将收集到的样品保存在-70℃待分析(以下有描述)。
- 25 2.将含有 400ul 检测液体(去离子水或自来水)的 Hill Top Chambers®( Hill Top Research, Cincinnati, Ohio)施加到受试者的手掌前臂。接触 4 小时后，取下 Hill Top Chambers®，用自来水冲洗测试部位，拍干。

3.取下 Hill Top Chambers®后 24 小时，用步骤 1 中描述的 Sebutape 吸收法收集皮肤表面表达的含有 PGE<sub>2</sub> 的皮肤分泌物。虽然可以在皮肤接触测试品

或处理后任何时间收集炎症介质，优选在接触后约 24 小时测定皮肤上表达的 PGE<sub>2</sub> 的水平，因为一项 PGE<sub>2</sub> 表达动力学的研究表明，PGE<sub>2</sub> 的水平在接触后 24 小时而非短时间最高。

利用以下方法分析收集到的 Sebutape®样品。融化后，将样品超声处理 15 分钟，剧烈震荡。含有提取蛋白质和类二十烷酸的溶液，经免疫测定法(试验设计高灵敏度 PGE<sub>2</sub> 酶免疫分析试验#93001)分析 PGE<sub>2</sub> 水平，利用双辛可宁酸(BCA)蛋白测定法(试剂盒 23225, Pierce Chemical Company, Rockford,IL)分析总蛋白含量。

从每个测试部位取 4 份 Sebutape®样品。将 PGE<sub>2</sub> 的测定含量对从每个 Sebutape®上提取的蛋白质的总量归一化。然后将 4 个归一化数值平均来确定每个测试部位表达的 PGE<sub>2</sub> 含量(pg/ug)。考虑到人与人的差异，将每个受试者的 PGE<sub>2</sub> 含量进一步对从未处理对照测量到的 PGE<sub>2</sub> 含量进行归一化。

表 1 显示了用上述方法比较的自来水与去离子水引起的刺激程度。

表 1-归一化的 PGE<sub>2</sub> 含量(dimensionless units(无量纲单位))

| 受试者 | 去离子水 | 自来水  |
|-----|------|------|
| 1   | 0.40 | 0.52 |
| 2   | 0.56 | 0.85 |
| 3   | 0.62 | 0.89 |
| 4   | 0.69 | 0.72 |
| 5   | 0.92 | 1.41 |
| 6   | 0.84 | 1.51 |
| 7   | 0.93 | 1.40 |
| 8   | 1.71 | 1.45 |
| 9   | 1.01 | 2.33 |
| 10  | 0.94 | 2.08 |
| 均值  | 0.86 | 1.32 |

15 如表 1 所示，所述方法能够区分不同类水所引起的发炎或刺激，自来水比去离子水导致皮肤表面表达的炎症介质 PGE<sub>2</sub> 多 35%。

实施例 2-阴离子表面活性剂与白介素- $\alpha$  (IL-1 $\alpha$ )可能的相互作用

用 IL-1 $\alpha$  作为炎症或刺激的标记物的一个顾虑是它可能会与外用护肤组合物中经常含有的表面活性剂相互作用。本实施例测定到皮肤上表达的 IL-1 $\alpha$  的表观含量是测试液体中月桂基硫酸钠(SLS, Stepan Co., Northfield,IL)浓度的函数,从而阐明了这种相互作用。

- 5 利用实施例 1 描述的方法评估 SLS 稀释液引起的刺激程度,但使用白介素-1 $\alpha$  (IL-1 $\alpha$ )而非 PGE<sub>2</sub> 评估刺激程度。经免疫测定法测量 IL-1 $\alpha$  的含量(人 IL-1 $\alpha$  试剂盒#EH2- IL1 $\alpha$ , Endogen,Inc.,Woburn,MA)。与 PGE<sub>2</sub> 相同,将 IL-1 $\alpha$  的测定含量(pg/ml)相对从每个 Sebutape®条上提取的蛋白质的总量(ug/ml)进行归一化。考虑到人与人的差异,用测定到的未处理对照的 IL-1 $\alpha$  基底水平进一步将每个处理部位的 IL-1 $\alpha$  水平归一化。数据示于下表 2。

| 去离子水中的 SLS 浓度<br>(w/w%) | IL-1 $\alpha$ 的水平(无量纲单位) |
|-------------------------|--------------------------|
| 0                       | 1.35                     |
| 5                       | 2.83                     |
| 10                      | 2.71                     |
| 15                      | 1.00                     |

- 表 2 显示使皮肤接触不同浓度的 SLS 后, IL-1 $\alpha$  的剂量依赖数据。预期炎症标记物的量或反应随着阴离子表面活性剂含量增加而提高。在低的 SLS 含量观察到了这一现象,但在研究中检测的 SLS 最高浓度没有,这引起对该方法的可行性的怀疑。我们希望不被理论束缚,认为高浓度的阴离子表面活性剂,比如 SLS 可能与蛋白质(比如 IL-1 $\alpha$ )相互作用,导致蛋白质变性。这个过程将影响免疫测定,并且能导致实验中在最高 SLS 浓度时观察到较低的 IL-1 $\alpha$  表观含量。利用免疫测定分析 IL-1 $\alpha$  的含量时, SLS 可能改变蛋白质的构象,使它不被检测中使用的抗体识别。因此,由于这些潜在的表面活性剂-蛋白质相互作用,利用 IL-1 $\alpha$  的含量来评估刺激程度受到了局限。

- 20 实施例 3 温和洗脸液导致的发炎

将实施例 1 的方法扩展到测定一种温和洗脸液(Neutrogena Fresh Foaming Cleanser,Neutrogena Corporation,Los Angeles,California)的稀释溶液(8%w/w 溶于去离子水)与去离子水相比引起的发炎或刺激的程度。

表 3 列出了该清洁组合物的成分。

表 3-温和洗脸液的成分

|                                     |
|-------------------------------------|
| 纯净水                                 |
| 甘油                                  |
| 十二烷基葡糖苷                             |
| 癸基葡糖苷                               |
| 可可酰氨基丙基内铵盐 (cocamidopropyl Betaine) |
| 可可酰胺 DEA                            |
| Glycereth-7                         |
| 十二烷基磺酸铵                             |
| 可可酰肌氨酸钠                             |
| 乙二醇硬脂酸酯                             |
| PEG-120 甲基葡萄糖二油酸酯                   |
| EDTA 四钠                             |
| DMDM 乙内酰脲                           |
| 柠檬酸                                 |
| 香料                                  |

表 4 显示了利用上述方法测定 PGE<sub>2</sub> 表达量所指示的与去离子水相比，洗脸液引起的刺激程度。

5 表 4-PGE<sub>2</sub> 归一化含量(无量纲单位)

| 受试者 | 去离子水 | 洗脸液  |
|-----|------|------|
| 1   | 1.98 | 1.81 |
| 2   | 1.48 | 1.26 |
| 3   | 1.30 | 0.67 |
| 4   | 0.83 | 2.11 |
| 5   | 1.49 | 1.72 |
| 6   | 2.12 | 3.07 |
| 7   | 1.25 | 2.38 |

|    |      |      |
|----|------|------|
| 8  | 1.60 | 3.03 |
| 9  | 1.77 | 3.05 |
| 10 | 1.45 | 0.85 |
| 均值 | 1.53 | 2.00 |

表 4 的结果显示了利用上面提及的方法可以区分这些温和产品的炎症反应。皮肤接触该温和洗脸液导致比去离子水更强的发炎或刺激；但是，温和洗脸液导致的刺激比去离子水单独使用只高约 24%。

重要的是，要认识到此处引用的刺激的数字结果不是绝对的；而是从特定受试群体在一年的特定时间得到的。已知不同的人在接触相同的外用皮肤护理产品时，表现出不同的炎症反应。此外，一年中较温暖，湿润的时间(即夏天)受到侵袭比在冷，干燥的时间(即冬天)影响小。因此，重要的是不要将每种不同研究测定的实际数值进行交叉比较除非考虑到了这些变化。

#### 实施例 4-暴露在外部侵害中

本发明的方法还可以扩展到外部侵害，例如，检测外用皮肤护理产品的敷用器引起的刺激。在本实施例中，比较了用婴儿毛巾(Gerber®婴儿毛巾)擦和用普通毛巾(St.Mary's®-Division of Fieldcrest Cannon,Inc.)引起的发炎或刺激程度。

用于评估发炎或刺激的方法与实施例 1 的方法类似，只是用以下洗擦方法代替用 Hill Top Chamber®来给手臂施加刺激物。每条毛巾(婴儿棉毛巾 vs. 普通棉毛巾)用溶于自来水的 Johnson's® Head-to-Toe™ 婴儿洗液(Johnson&Johnson Consumer Products Company, Skillman, New Jersey,成分表如表 5 所示)的 8%(w/w)稀释液饱和。将前臂的每个部位擦洗 2 分钟。洗完，用水冲洗手臂，拍干。分析 PGE<sub>2</sub> 含量，在表 6 中报告。

表 5-婴儿洗液的成分

|                 |
|-----------------|
| 水               |
| PEG-80 山梨聚糖月桂酸酯 |
| 十二烷基硫酸钠         |
| 可可酰氨基丙基内铵盐      |
| PEG-150 硬脂酸盐    |

|                        |
|------------------------|
| 十二烷基两性 PG-乙酸磷酸钠        |
| 甘油                     |
| 聚季铵(Polyquaternium)-10 |
| 香料                     |
| 季铵(Quaternium)-5       |
| EDTA 四钠                |

表 6-PGE<sub>2</sub> 的归一化含量(无量纲单位)

| 受试者 | 婴儿毛巾 | 普通毛巾 |
|-----|------|------|
| 1   | 0.84 | 1.31 |
| 2   | 1.08 | 0.88 |
| 3   | 1.13 | 1.19 |
| 4   | 1.02 | 1.08 |
| 5   | 0.87 | 1.29 |
| 6   | 1.35 | 0.89 |
| 7   | 1.17 | 0.92 |
| 8   | 0.70 | 1.13 |
| 9   | 1.17 | 1.29 |
| 10  | 0.57 | 1.10 |
| 均值  | 0.99 | 1.11 |

正如在表 6 中看到的, 本发明的方法可用来区别暴露于外部侵害导致的发炎或刺激程度。本发明所述方法表明用婴儿毛巾比用普通毛巾擦洗有指向性的差别; 用婴儿毛巾擦洗比用普通毛巾引起的刺激要小。

#### 5 实施例 5-外部侵害与外用皮肤护理产品的结合

本发明的方法可以用于在暴露于外部侵害时, 对不同外用皮肤护理产品进行比较。本实施例中, 比较了用婴儿浴液的稀释液擦洗和单独用自来水擦。所述婴儿浴液是 Johnson's®Head-to-Toe™婴儿浴液(Johnson&Johnson Consumer Products Company, Skillman, New Jersey,成分表如前面表 5 所示)在自来水中的  
10 10%(w/w)稀释液。

如实施例 1 所述评估发炎或刺激, 但没有用 Hill Top Chamber®, 而是用

2ml 水或 2ml 婴儿浴液的稀释液利用 Dia-stroon Wash Simulator(cyberDERM Inc., Media,Pennsylvania)来洗前臂。每个部位擦 2 分钟。擦后,用水冲洗手臂,拍干。PGE<sub>2</sub> 结果列于表 7。

表 7-PGE<sub>2</sub> 的归一化含量(无量纲单位)

| 受试者 | 用自来水擦洗 | 用婴儿浴液擦洗 |
|-----|--------|---------|
| 1   | 0.68   | 0.62    |
| 2   | 0.76   | 0.62    |
| 3   | 1.22   | 0.50    |
| 4   | 1.28   | 0.30    |
| 5   | 1.29   | 0.67    |
| 6   | 0.90   | 0.65    |
| 7   | 0.47   | 0.44    |
| 8   | 1.40   | 0.66    |
| 9   | 0.21   | 0.11    |
| 10  | 0.11   | 0.17    |
| 均值  | 0.83   | 0.47    |

- 5 如表 7 所示,本发明的方法可以用于检测暴露于外部侵害的同时,外用皮肤护理产品的相对刺激。该表显示单独用自来水洗比用温和婴儿浴液刺激大。

#### 实施例 6 通过 IL-1 $\alpha$ 水平评估外部侵害

- 前面的实施例已经表明 PGE<sub>2</sub> 能区分接触外用皮肤护理品或者暴露于外部侵害导致的发炎或刺激的程度。此外,前面的工作还显示了细胞因子水平,例如 IL-1 $\alpha$ , 和十二烷基硫酸钠引起的发炎程度之间存在相关性,以及利用细胞因子来确定严重的疾病状况。在本实施例中,我们显示了如何运用本发明的方法来监测 IL-1 $\alpha$  水平,以便衡量外部侵害(例如,将外用皮肤护理产品施加到皮肤上的方法)引起的发炎或刺激程度。在本实施例中,比较了用婴儿毛巾擦引起的发炎或刺激的程度和用普通毛巾擦时的刺激程度。

利用实施例 1 的方法评估两种施用器导致的相对刺激,但是用以下擦洗方法代替 Hill Top Chamber®。每条毛巾(婴儿棉毛巾-Gerber® Baby Washcloth,

普通棉毛巾 -St.Mary's®-Division of Fieldcrest Cannon,Inc.)用溶于自来水的 Johnson's® Head-to-Toe™ 婴儿洗液 (Johnson&Johnson Consumer Products Company, Skillman, New Jersey,成分在前面表 5 列出)的 8%(w/w)稀释液饱和。将前臂的每个部位擦洗 2 分钟。洗完,用水冲洗手臂,拍干。同样与实施例 1 相反,监测 IL-1 $\alpha$  而非 PGE<sub>2</sub> 的水平,衡量发炎或刺激程度。经免疫分析法测定 IL-1 $\alpha$  的含量(Endogen 人 IL-1 $\alpha$ 试剂盒#EH2- IL1 $\alpha$ ),在表 8 中报告这些数值。

表 8 IL-1 $\alpha$  的归一化含量(无量纲单位)

| 受试者 | 用自来水擦洗 | 用婴儿浴液擦洗 |
|-----|--------|---------|
| 1   | 0.73   | 0.52    |
| 2   | 1.59   | 0.79    |
| 3   | 0.97   | 1.44    |
| 4   | 0.92   | 1.78    |
| 5   | 0.50   | 0.46    |
| 6   | 0.42   | 0.36    |
| 7   | 0.27   | 1.00    |
| 8   | 1.54   | 1.96    |
| 9   | 1.23   | 2.62    |
| 均值  | 0.91   | 1.22    |

从表 8 可以看到,测定 IL-1 $\alpha$  可以用来区别暴露于外部侵害,比如用不同类型的毛巾擦洗所导致的发炎或刺激的程度。用婴儿毛巾擦洗比用普通毛巾擦刺激小。

此外,通过将 IL-1 $\alpha$  与 PGE<sub>2</sub> 结合进行监测,可以得到对接触外用皮肤护理品和/或暴露于外部侵害引起的发炎或刺激的更完全的指示。将实施例 4 中显示的 PGE<sub>2</sub> 的结果与本实施例结合,能更全面地理解用不同类型的布擦洗对发炎的影响,因为我们同时测定了细胞因子途径和花生四烯酸途径的主要促发炎介质。

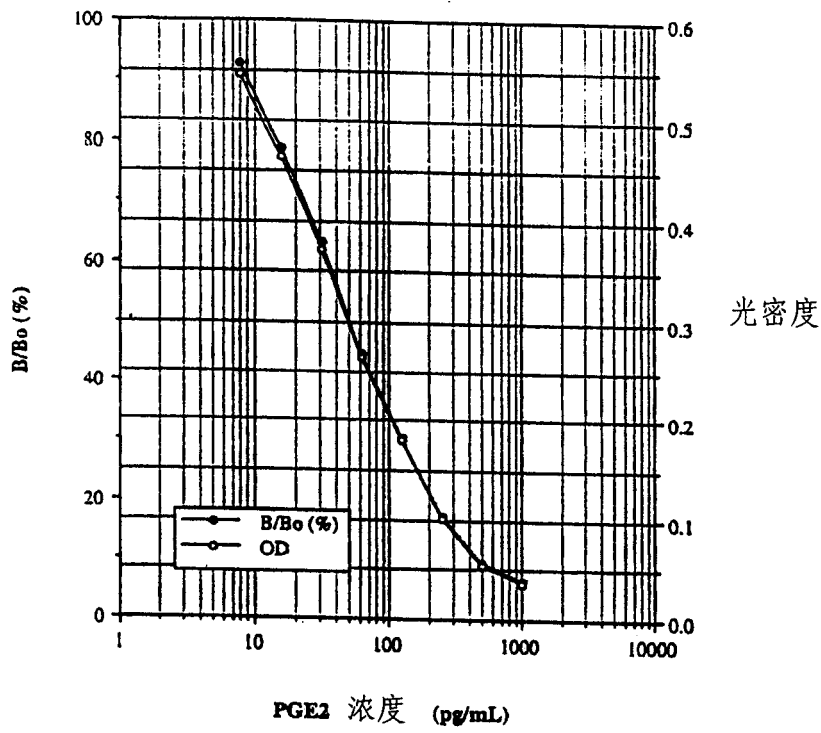


图 1

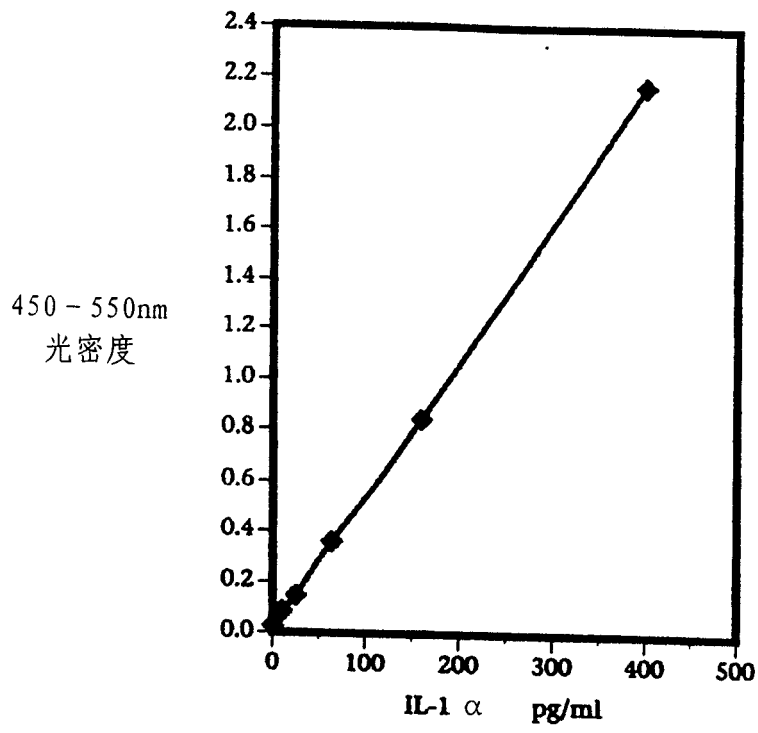


图 2

|                |  |         |            |
|----------------|--|---------|------------|
| 专利名称(译)        | 皮肤发炎或刺激的检测方法和试剂盒   |         |            |
| 公开(公告)号        | <a href="#">CN1461952A</a>   | 公开(公告)日 | 2003-12-17 |
| 申请号            | CN03121795.8   | 申请日     | 2003-03-06 |
| [标]申请(专利权)人(译) | 庄臣及庄臣视力保护公司  |         |            |
| 申请(专利权)人(译)    | 强生消费者公司  |         |            |
| 当前申请(专利权)人(译)  | 强生消费者公司  |         |            |
| [标]发明人         | K黄<br>N蒂尔尼<br>B威甘德   |         |            |
| 发明人            | K·黄<br>N·蒂尔尼<br>B·威甘德  |         |            |
| IPC分类号         | G01N33/50 A61B5/00 A61B5/107 G01N33/48 G01N33/53 G01N33/68 G01N33/88 G01N30/02 G01N30/72 G01N30/90 |         |            |
| CPC分类号         | G01N2800/20 G01N33/88 Y10T442/2525 G01N33/6893   |         |            |
| 代理人(译)         | 徐迅   |         |            |
| 优先权            | 10/091813 2002-03-06 US  |         |            |
| 外部链接           | <a href="#">Espacenet</a> <a href="#">SIPO</a>   |         |            |

#### 摘要(译)

本发明公开了一种非侵入性的体内方法，用于测定由于接触外用皮肤护理产品，暴露于外部侵害或者两者的结合而引起的哺乳动物皮肤亚临床或临床发炎或刺激。在一个实施方案中，所述方法包括用非侵入性收集装置从皮肤上收集类二十烷酸，并分析采自皮肤的类二十烷酸含量的步骤。发明还公开了一种用于测定皮肤刺激或发炎的标记物的试剂盒。该试剂盒包括用于收集皮肤表面分泌物的非侵入性收集装置，和用于测定分泌物中的类二十烷酸含量的免疫分析法。