(19)日本国特許庁(JP)　(12)公表特許公報(A)　(11)公表番号
特表2023-514530
(P2023-514530A)
(43)公表日　令和5年4月6日(2023.4.6)

(51)国際特許分類		FI		テーマコード（参考）
Ａ６１Ｋ	*8/9789(2017.01)*	Ａ６１Ｋ	8/9789	４Ｃ０８３
Ａ６１Ｋ	*8/44 (2006.01)*	Ａ６１Ｋ	8/44	
Ａ６１Ｋ	*8/34 (2006.01)*	Ａ６１Ｋ	8/34	
Ａ６１Ｑ	*19/08 (2006.01)*	Ａ６１Ｑ	19/08	
Ａ６１Ｑ	*19/00 (2006.01)*	Ａ６１Ｑ	19/00	

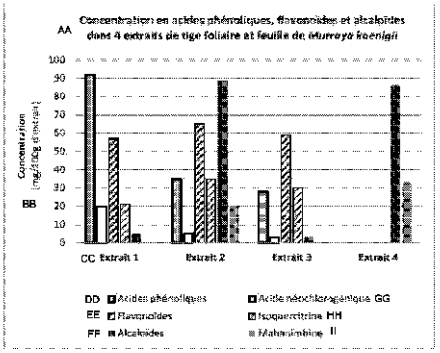
審査請求　未請求　予備審査請求　未請求　（全26頁）

(21)出願番号　特願2022-547125(P2022-547125)
(86)(22)出願日　令和3年1月27日(2021.1.27)
(85)翻訳文提出日　令和4年10月3日(2022.10.3)
(86)国際出願番号　PCT/FR2021/050150
(87)国際公開番号　WO2021/156556
(87)国際公開日　令和3年8月12日(2021.8.12)
(31)優先権主張番号　2001055
(32)優先日　令和2年2月3日(2020.2.3)
(33)優先権主張国・地域又は機関
フランス(FR)
(81)指定国・地域　AP(BW,GH,GM,KE,LR,LS,MW,MZ,NA,RW,SD,SL,ST,SZ,TZ,UG,ZM,ZW),EA(AM,AZ,BY,KG,KZ,RU,TJ,TM),EP(AL,AT,BE,BG,CH,CY,CZ,DE,DK,EE,ES,FI,FR,GB,GR,HR,HU,IE,IS,IT,LT,LU,LV,MC,
最終頁に続く

(71)出願人　505260338
ガットフォース・エスアーエス
フランス・Ｆ－６９８００・サン・プリースト・シュマン・ドゥ・ジェナ・３６
(74)代理人　100108453
弁理士　村山 靖彦
(74)代理人　100110364
弁理士　実広 信哉
(74)代理人　100133400
弁理士　阿部 達彦
(72)発明者　ヴィルジニー・シャルトン
フランス・６９７４０・ジュナ・リュ・ラマルティンヌ・９
(72)発明者　ニコラ・ベッシュトワル
フランス・６９５３０・ブリニェ・アレ
最終頁に続く

(54)【発明の名称】　オオバゲッキツ（Ｍｕｒｒａｙａ　ｋｏｅｎｉｇｉｉ）抽出物、及び化粧品におけるその使用

(57)【要約】
本発明は、皮膚老化と闘うためのオオバゲッキツ抽出物の使用に関する。



AA Concentration of phenolic acids, flavonoids and alcaloids in 4 extracts of the stem and leaf of Murraya koenigii
BB Concentration (mg/100g of extract)
CC Extract 1
Extract 2
Extract 3
DD Phenolic acids
EE Flavonoids
FF Alcaloids
GG Neochlorogenic acid
HH Isoquercitrin
II Mahanimbine

【特許請求の範囲】
【請求項１】
固/液抽出プロセス、続いて、第2の固/液分離工程によって、及び最後に液相を回収する第3の工程によって得ることができるオオバゲッキツの抽出物の又は皮膚老化と闘うための前記抽出物を含む組成物の使用であって、溶媒が、ベタイン、プロパンジオール及び水の混合物からなり、前記ベタイン:プロパンジオールのモル割合が、1:厳密に1.5未満であることを特徴とする、使用。
【請求項２】
皮膚弾性線維形成のプロセスを刺激するための、請求項1に記載の使用。
【請求項３】
皮膚弾性線維の形成を刺激するための、請求項1又は2に記載の使用。
【請求項４】
皮膚の細胞外マトリクスを緻密化するための、請求項1から3のいずれか一項に記載の使用。
【請求項５】
皮膚の弛みと闘うための、請求項1から4のいずれか一項に記載の使用。
【請求項６】
前記溶媒が、ベタイン、プロパンジオール及び水の混合物からなり、ベタイン:プロパンジオールのモル割合が、1:1であることを特徴とする、請求項1から5のいずれか一項に記載の使用。
【請求項７】
前記水が、前記溶媒の15～35質量%の間を表すことを特徴とする、請求項1から6のいずれか一項に記載の使用。
【請求項８】
前記溶媒が、1:1:5のモル割合のベタイン、プロパンジオール及び水の混合物からなることを特徴とする、請求項6又は7に記載の使用。
【請求項９】
固/液抽出プロセス、続いて、第2の固/液分離工程によって、及び最後に第3の液相回収工程によって得ることができるオオバゲッキツの抽出物であって、溶媒が、有利には1:1:5のモル割合の、ベタイン、プロパンジオール及び水の混合物からなることを特徴とする、抽出物。
【請求項１０】
有利には乾燥された、葉柄及び/又は葉の抽出物であることを特徴とする、請求項9に記載の抽出物。
【請求項１１】
アルカロイドを含まないことを特徴とする、請求項9又は10に記載の抽出物。
【請求項１２】
オオバゲッキツの葉茎及び/又は葉/溶媒の質量比が1:99～50:50の間であることを特徴とする、請求項9から11のいずれか一項に記載の抽出物。
【請求項１３】
請求項9から12のいずれか一項に記載の抽出物を含む化粧用組成物。
【発明の詳細な説明】
【技術分野】
【０００１】
本発明の分野
本発明は、オオバゲッキツの抽出物、及び前記抽出物を含む化粧用組成物に関する。本発明はまた、皮膚の処置のため、特に皮膚老化のための前記抽出物又は前記化粧用組成物の使用に関する。
【背景技術】
【０００２】

従来技術

真皮は、特に、弾性のコラーゲン線維を含有する細胞及び細胞外マトリクス(ECM)で構成された密度の高い線維弾性の結合組織である。真皮の機能は、表皮の栄養摂取とサポートを確実にすること、及び皮膚の力学的特性を支持することである。真皮の細胞の大部分を占める線維芽細胞は、ECM(コラーゲン、エラスチン、プロテオグリカン及び糖タンパク質)を形成するタンパク質だけでなく、ECMを分解してECMを新陳代謝又は修復するプロテアーゼ(コラゲナーゼ、エラスターゼ)を合成する。

【０００３】

弾性線維の形成は発生の初期段階に開始し、出生時にピークとなる。このプロセスは思春期頃に減速し、成人期にはほとんど存在しなくなる。成熟弾性線維の構造は、検討中の組織の生物学的機能を反映し、複雑かつ組織依存性である。

【０００４】

皮膚において、弾性線維は個別の線維として存在し、皮膚に伸縮性及び弾力をもたらす。更に、弾性線維は、これらの線維中に存在するエラスチンの割合に応じて異なる名前を有する。したがって、低エラスチン含有量の線維と90%超がエラスチンで構成される線維とを区別することが可能であり、それらはそれぞれ、オキシタラン線維、エラウニン線維及び成熟弾性線維と呼ばれる。表層(superficial)真皮において、オキシタラン線維は、真皮-表皮境界部に垂直な細かな樹枝状分岐を形成し、真皮乳頭層においてエラウニン線維と入り混じる。真皮網状層において、弾性線維は、より太く、真皮-表皮境界部に平行に配向される。

【０００５】

弾性線維は弾性線維形成中に合成され、これは、機能性弾性線維の超分子集合をもたらす細胞内及び細胞外プロセスのセットを指す。弾性線維のコアはエラスチンで構成され、これは、糖タンパク質、例えば、フィブリリン、フィビュリン、MAGP(ミクロフィブリル会合糖タンパク質-1)及びLTBP(潜伏TGF-β-結合タンパク質)で主に構成されるミクロフィブリル外包膜と会合している。弾性線維にその伸縮性及び弾力を与え、つままれた又は引っ張られた場合に皮膚がその元々の位置に戻ることを可能にしているのは、エラスチンである。

【０００６】

エラスチンは、タンパク質分解に非常に抵抗性のタンパク質であり、体の中で最も抵抗性のタンパク質のうちの1つである。成人の生理的条件下で、エラスチンの新陳代謝は、ほぼゼロであり、その半減期は70年と推定される。それにも関わらず、エラスチン合成は再活性化されて、加齢の間に損傷/分解された弾性線維を修復することがある。しかしながら、修復された弾性線維は、発生中に形成された弾性線維よりも機能性が低い。

【０００７】

ミクロフィブリルは、成熟線維との共有結合を形成する前にトロポエラスチンモノマーが堆積し、整列する糖タンパク質マトリクスを構成する。ミクロフィブリルは、フィブリリン、例えば、真皮において高度に発現されるフィブリリン-1(FBN-1)で主に構成される。フィビュリン、例えばフィビュリン-5(FBLN-5)は、フィブリリンと会合し、弾性線維形成のいくつかの重要な工程、例えば、トロポエラスチンへの結合及び弾性線維の超分子集合に関与する。

【０００８】

真皮は、時間による老化(chronoaging)(自然老化とも呼ばれる)により影響を受け、これは、一連の遺伝的にプログラムされた変化の結果である。線維芽細胞は多数ではなくなり、それらの代謝活性は減少し、例えば、コラーゲン及びエラスチン合成が減少する。臨床的には、この結果、細かなしわが現れ、伸縮性が徐々に失われ、治癒が遅くなる。時間による老化の間、線維芽細胞はまた、真皮ECM構成成分のタンパク質分解に関与するメタロプロテイナーゼ(MMP)をより多く合成する。次いで、これらの酵素は、弾性線維を含むエラスチン及びフィブリリンを分解することができる。組織学的観点から、本発明者らは、その数密度の減少及びこれらの線維の直径の減少と共に断片化しているように見

える弾性線維での弾性線維分解現象を調べる。

【０００９】

外因による老化(Extrinsic aging)は、汚染、生活様式及び太陽光曝露(又は光老化)を含む多くの環境因子の結果であり、その有害な効果は、時間による老化の効果に追加される。光老化は、真皮の大幅な変性を特徴とし、これは、深いしわの形成及び皮膚の伸縮性の大幅な喪失につながる。光老化の間に観察される変化は、反応性酸素種(ＲＯＳ)の生成に主に基づき、これは、過剰な組織分解を引き起こすタンパク質分解酵素の強い活性化をもたらす。プロテアーゼ、例えば、好中球エラスターゼ(線維芽細胞及び好中球浸潤に由来)及びＭＭＰ-１２(マクロファージに由来)は、ＵＶ光の影響下で分泌されて、トロポエラスチンを分解する。

【００１０】

先進国における平均余命の増加に伴い、皮膚の外見及び機能性に対する老化の影響は、多くの研究の主題となってきた主要課題である。

【００１１】

皮膚老化の生理学に関与する機序のより良好な理解が、その望ましくない効果を遅らせる、又は修復することが可能な新しい戦略の開発を可能にすることが明らかになった。

【００１２】

したがって、臨床研究は、ビタミンCベースのクリームの適用により、コラーゲン及び弾性線維合成の活性化を介して皮膚の全体的な外見が改善され、目だったしわが減少することを示した。

【００１３】

ビタミンAに由来するレチノイドは、コラーゲン線維の合成及びオキシタラン線維の再形成を刺激することによってしわの低減を助ける。更に、それらは、ＭＭＰの過剰発現を遮断することによって、ＥＣＭタンパク質の過剰なタンパク質分解を防止する。

【００１４】

ブドウ及びワイン、緑茶及び紅茶、果実並びに野菜中に天然に存在する抗酸化剤であるポリフェノールもまた、ＭＭＰの過剰発現を阻害する特性があるため、良候補である。

【００１５】

天然の多様な分子が豊富な植物抽出物もまた、光防護の内因性機序、例えば、細胞の抗酸化防御及びＭＭＰ酵素活性の阻害を刺激する良候補である。また、特に、文献ＦＲ２８５５９６８は、弾性線維の形成を刺激するヒメウイキョウ、カラント、カルダモン、ブラックラディッシュ、リトルホリー(little holly)、シナモン、カラスムギ、ジャガイモ及び絹の抽出物を記載している。

【００１６】

例えば、カレー又はカロピレ(kaloupile)の木として一般に知られる植物種オオバゲッキツ(Murraya koenigii (L.) Spreng)は、ミカン(Rutaceae)科に属する。オオバゲッキツ(Murraya koenigii又はM. koenigii)は、落葉性で芳香性の低木であり、最大樹高は6メートルに達しうる。インド及びスリランカを主に原産とし、南及び東南アジアにおいても見られる。その成長は熱帯又は亜熱帯気候の地域において最適である。

【００１７】

オオバゲッキツの異なる部分、例えば、葉柄(又は葉茎)、葉、樹皮、果実、種、根の植物化学組成は、従来技術によって十分記載されている。これは、カルバゾールタイプのアルカロイド、フェノール化合物(フラボノールタイプのフラボノイド、安息香酸及びp-ヒドロキシケイ皮酸に由来するフェノール酸、タンニン)、テルペノイド(サポニン、カロテノイド)、精油、鉱物、糖及びアミノ酸の存在を主に特徴とする。

【００１８】

オオバゲッキツ及び特にその葉茎及び葉は、伝統的に、食物及び医薬品に使用される。葉は、非常に多くの場合、カレー及びチャツネの調製に使用される。

【００１９】

美容用途に関連するいくつかの活性、すなわち、抗ヒアルロニダーゼ、抗菌性、保湿性

、抗酸化、脱色、育毛又は光防護もまた、文献においてオオバゲッキツについて報告されている。

【００２０】

例えば、本発明者らは、DERMALOGICA社によって開発されたAge Smart(登録商標)ナイトセラム、又はALDI-SUD社によって販売されているナイトクリームを挙げることができる。同様に、オオバゲッキツ葉の抽出物を含む植物抽出物を含む組成物を開示するUS2009/169651、及びオオバゲッキツ、ゲッキツ(M. paniculata)及びM.エキゾチカ(M. exotica)の気中部分、特に葉の酵素処理によって得られたThanakaを含む組成物を記載するWO2014/157910が参照されうる。

【００２１】

伝統的な医薬品において、オオバゲッキツの抽出物は、消化を促進し(制吐、抗嘔吐、抗下痢)、(マイコ)バクテリア、真菌、ウイルス及び寄生虫感染と闘うと言われている。抽出物は、細胞抗酸化系の刺激を介して酸化ストレスと闘う治療及び予防特性を有すると記載されている。抗炎症特性は、オオバゲッキツ抽出物に含有されるアルカロイドに主に帰する。有益な神経(抗不安、抗うつ及び抗ストレス)及び代謝(抗糖尿病及び抗肥満)効果もまた、オオバゲッキツ抽出物を供給された動物において観察される。

【００２２】

例として、WO2018/172436は、メタボリックシンドローム及び認知障害の処置において使用するためのメトホルミンを含むオオバゲッキツの乾燥葉粉末由来の活性成分を含む組成物を開示している。

【００２３】

しかしながら、従来技術から、オオバゲッキツ抽出物の効能及び生物学的特性が、前記抽出物中のアルカロイドの存在と関連することが分かる。

【００２４】

実際、既に言及した通り、オオバゲッキツは、特にカルバゾールタイプのアルカロイドの重要な供給源である。例えば、茎皮から単離されたカルバゾールは、ギリニンビン(girinimbine)、ムラヤニン又はマハニンビン(mahanimbine)であり、カルバゾールマハニンビン、イソマハニンビン、マハニン又はケノリンが、葉茎及び葉から単離される。

【００２５】

アルカロイドは、炭素、水素及びとりわけ窒素を含有する天然由来の分子群を表す。大部分のアルカロイドは、最も多くの場合、神経系(向精神性、精神賦活性、刺激物、ドーピング、強壮剤、嘔吐、鎮静、睡眠及び鎮痛)に対する生物学的作用を有する。精製形態において、これらの分子は、慣れ効果又は長期間の慢性毒性なしではないが、非常に多くの場合、急性毒性、及びより低用量では、鎮静の薬理活性を現わす。したがって、化粧用組成物において、これらの分子に関連する毒性のリスクを低減するためにアルカロイドを含む活性成分の濃度を低下させる必要がある場合がある。しかしながら、活性成分の用量のこの低下は、組成物の有効性を犠牲にする可能性がある。

【００２６】

上記から、化粧料中のアルカロイドの存在を制限するか、又は更には排除する必要があることが分かる。

【００２７】

葉柄(又は葉茎)及び葉はまた、安息香酸(没食子酸、プロトカテク酸、シリンガ酸等)及びp-クマル酸(p-クマル酸、フェルラ酸等)由来のフェノール酸だけでなく、フラボノールタイプのフラボノイド(ケルセチン)も含有する。これらの分子は、化粧品の分野において有用な生物学的特性、特に、抗菌性、抗酸化又は更には治癒特性を有する。

【００２８】

他方、抽出物を得るために利用可能な溶媒のうちで行われる選択は、一定数の難点を呈する。

【００２９】

水性溶媒は、その安定性を確実にするための微生物学的保存剤の添加を必要とする。し

かしながら、保存剤使用の分野は、特に必要な毒性学的データのために益々規制されている。プロピレングリコールは、潜在的に毒性であることが示され、現在は、製造業者によって回避されている。農業関連のブチレングリコールは比較的高価であり、このため、その産業使用は限定される。エタノールは、単独で、又は水と混合して、良好な抽出力を有するが、特に揮発性及び可燃性であり、輸送及び保存の問題につながる。他方、その乾燥特徴のために、この溶媒は、皮膚のハイドロ脂質膜(hydrolipidic film)を乱し、敏感な皮膚において刺激を生じることがある。

【００３０】

更に、植物抽出物は多くの場合化粧用組成物を配合するために使用されることになるため、少なくとも微量が必然的に抽出物中に見出されることになる塩又は酸を含む抽出溶媒を回避することが重要である。実際、ゲル又はエマルジョンにおける、0.1％の用量を超える塩ベース成分の配合は、特に複雑であることが周知である。更に、酸は得られる抽出物のpHを低下させるため、酸は、ゲル又はエマルジョンの配合を困難にする効果を有する。特に、皮膚への適用が意図される化粧料は、好適なpH、好ましくは皮膚のpHに近い(約pH5.5)か、又は中性のpHを有しなくてはならない。したがって、これらの条件下で、酸を含有する溶媒の使用には、賦形剤、とりわけpH調節剤の添加が必要である。

【先行技術文献】

【特許文献】

【００３１】

【特許文献１】FR2855968

【特許文献２】US2009/169651

【特許文献３】WO2014/157910

【特許文献４】WO2018/172436

【非特許文献】

【００３２】

【非特許文献１】Wisniewski JRら、Nat Methods. 2009;6(5):359～62

【発明の概要】

【発明が解決しようとする課題】

【００３３】

本発明が解決することを提案する課題は、特に、皮膚の伸縮性を保持又は改善することによって、皮膚老化と効果的に闘うための、上記で言及した不利益、特に、抽出物中のアルカロイドの存在に関連する不利益を有さない、既存の植物抽出物への代替物を見出すことである。

【課題を解決するための手段】

【００３４】

本発明の開示

本出願人は、実に驚くべきことに、オオバゲッキツの抽出物が、上記で言及した必要性を満たすことができることを見出した。

【００３５】

したがって、本発明は、皮膚及び/又は粘膜の美容処置法のため、特に、皮膚及び/又は粘膜の外見を改善するため、皮膚の強度及び/又は伸縮性を改善するため、皮膚老化、しわ又は皮膚の緩みを処置又は防止するための、好ましくは、非治療用の本発明によるオオバゲッキツの抽出物、又はそれを含む組成物の使用に向けられる。

【００３６】

第1の態様によると、本発明は、皮膚老化と闘うためのオオバゲッキツの抽出物又は前記抽出物を含む化粧用組成物に関する。

【００３７】

特定の一実施形態によると、本発明による抽出物又は前記抽出物を含む化粧用組成物は、皮膚の弾性線維形成プロセスを刺激するために使用される。

【００３８】

別の特定の実施形態によると、本発明による抽出物、前記抽出物を含む化粧用組成物は、皮膚弾性線維の形成を刺激するために使用される。

【００３９】

有利には、皮膚の弾性線維は、オキシタラン線維、エラウニン線維及び/又は成熟弾性線維である。

【００４０】

別の特定の実施形態によると、本発明による抽出物、前記抽出物を含む化粧用組成物は、皮膚の細胞外マトリクス(ＥＣＭ)を緻密化するために使用される。

【００４１】

本発明の意味において、「ＥＣＭを緻密化すること」によって、本発明者らは、ＥＣＭ(コラーゲン、エラスチン、プロテオグリカン又は糖タンパク質)を形成するタンパク質の品質を上昇させることを意味する。

【００４２】

別の特定の実施形態によると、本発明による抽出物又は前記抽出物を含む化粧用組成物は、皮膚の弛みと闘うために使用される。

【００４３】

別の特定の実施形態によると、本発明による抽出物又は前記抽出物を含む化粧用組成物は、皮膚を治癒するために使用される。

【００４４】

特定の一実施形態によると、前述の使用において用いられる本発明によるオオバゲッキツ抽出物は、溶媒が、ベタイン及び1,3-プロパンジオール又はプロパンジオールの混合物、有利には、ベタイン、プロパンジオール及び水の混合物からなることを特徴とする、固/液抽出プロセス、続いて、第2の固/液分離工程、及び最後に液相における第3の回収工程によって得ることができる。

【００４５】

溶媒は、水を含有してもよく、又は含有しなくてもよい。しかしながら、溶媒中の水の存在は、溶媒を薄め、したがって、抽出を促進する点で有利である。

【００４６】

特定の一実施形態によると、本発明による抽出物を得るために使用される抽出溶媒は、1:厳密に1.5未満のモル割合、有利には1:1のモル割合のベタイン及びプロパンジオールの混合物からなる。

【００４７】

別の特定の実施形態によると、本発明による抽出物を得るために使用される抽出溶媒は、1:厳密に1.5未満のモル割合のベタイン、プロパン及び水の混合物からなり、水は、溶媒の15～35質量％に相当する。

【００４８】

別の特定の実施形態によると、本発明による抽出物を得るために使用される抽出溶媒は、1:1のモル割合のベタイン、プロパンジオール及び水の混合物からなり、水は、有利には、溶媒の15～35質量％に相当する。

【００４９】

有利には、本発明による抽出物を得るために使用される抽出溶媒は、1:1:5のモル割合のベタイン、プロパンジオール及び水の混合物からなる。

【００５０】

特定の実施形態によると、オオバゲッキツ植物の全て又は一部が、皮膚老化と闘うための抽出物として使用されうる。実際には、抽出物として使用される植物の部分は、果実、花、種、根、葉、茎、葉柄(又は葉茎)及び新梢からなる群から選択される。

【００５１】

有利には、使用される植物の部分は、葉柄(又は葉茎)及び/又は葉である。

【００５２】

特定の実施形態によると、使用される植物部分は、新鮮なもの、冷凍されたもの、乾燥

されたもの、全体、切断されたもの及び/又は摩砕されたものである。
【００５３】
有利には、それは乾燥された葉柄及び/又は葉、好ましくは、乾燥及び摩砕された葉柄及び/又は葉である。
【００５４】
好ましくは、それは乾燥された葉柄、好ましくは乾燥及び摩砕された葉柄である。
【００５５】
別の態様によると、本発明は、溶媒が、ベタイン及びプロパンジオールの混合物、有利には、ベタイン、プロパンジオール及び水の混合物からなることを特徴とする、固/液抽出プロセス、続いて、第2の固/液分離工程、及び最後に第3の液相回収工程によって得ることができるオオバゲッキツ抽出物に関する。
【００５６】
特定の一実施形態によると、本発明による抽出物を得るために使用される抽出溶媒は、1:1:5のモル割合のベタイン、プロパンジオール及び水の混合物からなる。
【００５７】
本発明によると、オオバゲッキツ植物の全て又は一部が、本発明において使用されうる。実際には、抽出プロセスにおいて使用される植物の部分は、軸、葉、果実、花、種、根、葉柄(又は葉茎)及び新梢からなる群から選択される。
【００５８】
特定の好ましい様式において、使用される植物の部分は、葉柄及び/又は葉である。それは、新鮮な、冷凍された、乾燥された、全体の、切断された又は粉砕された葉茎及び/又は葉であってもよい。
【００５９】
有利には、それは乾燥された葉柄及び/又は葉、好ましくは、乾燥及び摩砕された葉柄及び/又は葉である。
【００６０】
好ましくは、それは乾燥された葉柄、好ましくは乾燥及び摩砕された葉柄である。
【００６１】
特定の実施形態によると、本発明によるオオバゲッキツ抽出物は、アルカロイド、有利には、カルバゾール、好ましくは、マハニンビン、ムラヤニン、ギリニンビン、イソマハニンビン、マハニン及び/又はケノリンを含まない。
【００６２】
本発明の目的で、「アルカロイドを含まない」とは、抽出物中のアルカロイドの非存在、又は抽出物100g当たり5mg未満の濃度の微量のアルカロイドの存在を意味する。
【００６３】
特定の実施形態によると、本発明によるオオバゲッキツ抽出物は、フェノール酸、好ましくは、p-ヒドロキシケイ皮酸誘導体及び/又は好ましくはフラボノールタイプのフラボノイドが豊富である。
【００６４】
本発明の意味において、「豊富」によって、本発明者らは、
- 抽出物1kg当たり100mg超、有利には、抽出物1kg当たり250mg超のフェノール酸の濃度、及び
- 抽出物1kg当たり50mg超、有利には、抽出物1kg当たり100mg超のフラボノイド濃度
を意味する。
【００６５】
本発明による溶媒は、室温において特に液体であり、これは、本発明の抽出物をもたらすプロセスの実行を促進する。
【００６６】
実際には、使用される溶媒は、ベタイン及びプロパンジオール、又はベタイン、プロパ

ンジオール及び水を、撹拌反応器において無色透明の混合物が得られるまで混合することによって生成できる。この混合は、2℃～100℃の間の温度で30分～6時間、好ましくは、40℃～70℃で1時間～2時間、行われうる。

【００６７】

本発明による抽出物は、固/液抽出工程を組み込むプロセスによって得ることができる。

【００６８】

固/液抽出は、当業者に周知の様々な技術、例えば、冷浸、再冷浸、消化、動的冷浸、煎出、流動層抽出、マイクロ波支援抽出、超音波支援抽出、向流抽出、パーコレーション、再パーコレーション、浸出、減圧下での抽出、ダイアコレーション(diacolation)によって実施されてもよい。

【００６９】

実際には、抽出工程に適用される植物/溶媒質量比は、1:99～50:50の間、有利には、3:97～10:90の間である。好ましくは、粉砕乾燥されたオオバゲッキツ葉柄(又は葉茎)及び/又は葉対溶媒の質量比は、1:99～50:50の間、好ましくは3:97～10:90の間である。抽出工程は、好ましくは、2～100℃の間、より好ましくは20～80℃の間の温度で実施される。抽出工程は、数分～数日間、維持されてもよい。

【００７０】

活性化合物の抽出を最適化する一方、これらの化合物を大気酸素による酸化から保護するために、固/液抽出工程は、有利には、撹拌下及び/又は窒素雰囲気下で実施される。

【００７１】

本発明によると、固/液抽出工程の後、固/液分離工程が続き、この目的は、活性材料を含有する、固/液分離ろ液とも呼ばれる液相を回収することである。この分離は、当業者に知られる任意の技術、特に、排水、プレス、脱水、遠心分離又はろ過によって実施されてもよい。

【００７２】

場合により、液/固分離工程の後に濃縮工程が続いてもよく、これにより、濃縮係数に依存して液体又は半固体形態の濃縮物を得ることが可能になる。実際には、濃縮工程は、減圧下での蒸発によって又は逆浸透によって実施されてもよい。

【００７３】

好ましくは、固/液分離ろ液又は濃縮物は、更に、1つ又は複数の清澄工程を受ける。この清澄工程を実施するために、当業者は、当技術分野で知られる任意の種類の前方及び/又は接線ろ過を使用できる。

【００７４】

本発明によると、液/固分離又は濃縮又は清澄工程の後に、場合により、分画工程が続いてもよく、これにより、濃縮係数に依存して液体又は半固体形態の1種又は複数の植物化学ファミリーの画分を得ることが可能になる。実際には、分画工程は、当業者に知られる任意の技術によって、特に、減圧下でのクロマトグラフィー、限外ろ過又はナノろ過によって実施されてもよい。

【００７５】

最後に、包装の観点から、本発明による液体抽出物を得るためのプロセスは、滅菌ろ過を含みうる。滅菌ろ過は、伝統的に、直径0.22μmの細孔を備えるフィルターを通して生成物をろ過することによって達成される。好ましくは、滅菌ろ過工程は、プロセスの最終工程である。

【００７６】

本出願人はまた、本発明によるオオバゲッキツ抽出物が、とりわけ皮膚のタンパク質合成を刺激する点で、特に興味深い生物学的特性を有することを発見した。

【００７７】

本発明によるオオバゲッキツ抽出物は、皮膚の伸縮性と関連するタンパク質の発現を調節することができる。

【００７８】
実際、実験の節で詳述される通り、本発明によるオオバゲッキツ抽出物は、弾性線維に属するタンパク質、特に、エラスチン、フィブリリン-1、フィブリリン-2又はフィビュリン-5の発現を刺激する特性を有する。したがって、本発明による抽出物は、美容使用のため、特に皮膚の外見を改善するため、又は皮膚の伸縮性を保持及び/若しくは改善するために特に興味深い。結果として、本発明による抽出物は、皮膚老化の効果、好ましくは、自然老化及び/又は外因による老化、特に光老化と闘うことを可能にする。
【００７９】
本発明による抽出物の利点は、
- アルカロイドの非存在下/低アルカロイド含有量で生物学上の(プロエラストジェニック)特性を有すること、
- 完全に天然である、すなわち、全ての構成成分が天然であること、及び
- 全ての美容ケア製品に適合性であり、それらに完全に配合されること
である。
【００８０】
別の態様によると、本発明は、本発明の抽出物を含む組成物、好ましくは、すなわち、皮膚及び/若しくは粘膜、並びに/又は外肢への局所適用に好適な化粧用組成物に関する。
【００８１】
特定の一実施形態によると、本発明による抽出物は、組成物の0.1％～10質量％、有利には、0.5％～5％に相当する。
【００８２】
特定の一実施形態によると、本発明による組成物は、スキンケア組成物、抗老化スキンケア組成物、又は日焼け止め組成物である。
【００８３】
本発明による組成物は、全て、皮膚及び/若しくは粘膜、並びに/又は外肢への局所適用に通常使用されるガレヌス形態、例えば、無水物形態、油中水エマルジョン、水中油エマルジョン、多層エマルジョン、シリコーンエマルジョン、マイクロエマルジョン、ナノエマルジョン、ゲル、水溶液又は水アルコール溶液の形態であってもよい。
【００８４】
この組成物は、大なり小なり流動性でありえ、例えば、クリーム、軟膏、ミルク、ローション、セラム又はゲルの形態であってもよい。
【００８５】
化粧用組成物は、化粧品分野において通常使用される賦形剤、例えば、脂肪、洗剤及び/又はコンディショニング界面活性剤、乳化剤及び共乳化剤、親水性又は親油性ゲル化剤、保存剤、抗酸化剤、溶媒、剥離剤、香料、フィラー、親水性及び親油性フィルター、着色剤、中和剤、浸透促進剤、並びにポリマーを含有してもよい。これらの種類の賦形剤は全て、当業者に周知である。
【００８６】
実際には、これらの様々な賦形剤の量は、考慮される分野において従来使用される量であり、賦形剤の合計は、好ましくは、組成物の総重量の0.01％～30％に相当する。
【００８７】
好適な脂肪としては、鉱油、動物油(例えば、ラノリン)、植物油、合成油(例えば、ミリスチン酸イソプロピル、オクチルドデシル、イソステアリン酸イソステアリル、オレイン酸デシル、パルミチン酸イソプロピル)、シリコーン油(シクロメチコン、ジメチコン)及びフッ素化油が挙げられる。脂肪アルコール、脂肪酸、ワックス及びガム、及び、特に、シリコーンエラストマーが脂肪として使用されてもよい。
【００８８】
好適な洗剤及び/又はコンディショニング界面活性剤としては、非イオン性、アニオン性、カチオン性又は両性界面活性剤及びその混合物、例えば、アルキルホスフェート、アルキルエーテルサルフェート、例えば、ラウリルエーテル硫酸ナトリウム、アルキルベタ

イン、例えば、コカミドプロピルベタイン又は4級アンモニウム塩が挙げられる。

【００８９】

好適な乳化剤及び共乳化剤としては、例えば、ポリグリセロール脂肪酸エステル、スクロース脂肪酸エステル、ソルビタン脂肪酸エステル、オキシエチレン化ソルビタン脂肪酸エステル、PEG脂肪アルコールエーテル、グリセロール脂肪酸エステル、アルキルサルフェート、アルキルエーテルサルフェート、アルキルホスフェート、アルキルポリグルコシド、ジメチコンコポリオールが挙げられる。

【００９０】

好適な親水性ゲル化剤としては、例えば、カルボキシビニルポリマー(カルボマー)、アクリル酸コポリマー、例えば、アクリレート/アルキルアクリレートコポリマー、ポリアクリルアミド、多糖類、例えば、キサンタンガム、グアーガム、天然ガム、例えば、セルロースガム及び誘導体、デンプン及びその誘導体、粘土、並びに2-アクリルアミド-2-メチルプロパン酸コポリマーが挙げられる。

【００９１】

好適な親油性ゲル化剤は、変性粘土、例えば、ベントン(bentone)、脂肪酸の金属塩、疎水性シリカ及びエチルセルロースである。

【００９２】

好適な保存剤としては、安息香酸、ソルビン酸、プロピオン酸、サリチル酸、デヒドロ酢酸及びそれらの塩、ベンジルアルコール、エチルヘキシルグリセリン、パラベン、それらの塩及びエステル、トリクロサン、イミダゾリジニル尿素、5-フェノキシエタノール、DMDMヒダントイン、ジアゾリジニル尿素、クロルフェネシンが挙げられる。

【００９３】

好適な抗酸化剤の例は、キレート剤、例えば、EDTA及びその塩、メタ重亜硫酸ナトリウム、サリチル酸、アスコルビン酸及びクエン酸並びにそれらの塩、酒石酸ナトリウム、グルコン酸ナトリウム、カロテノイド、並びにトコフェロールである。

【００９４】

化粧用組成物において使用することができる溶媒(抽出溶媒とは異なる)としては、水、グリセリン、プロピレングリコール又はソルビトールが挙げられる。

【００９５】

好適な剥離剤の例としては、化学剥離剤、例えば、AHA、及び物理剥離剤、例えば、天然又は合成粉末が挙げられる。

【００９６】

好適なフィラーとしては、タルク、カオリン、マイカ、セリサイト、炭酸マグネシウム、ケイ酸アルミニウム、ケイ酸マグネシウム、有機粉末、例えば、ナイロンが挙げられる。

【００９７】

好適な色素としては、親油性色素、親水性色素、顔料及び化粧用組成物において一般に使用される真珠光沢材料、並びにその混合物が挙げられる。

【００９８】

好適な中和剤としては、ソーダ灰、トリエタノールアミン、アミノメチルプロパノール又は水酸化カリウムが挙げられる。

【００９９】

好適な浸透促進剤は、例えば、アルコール及びグリコール(エタノール、プロピレングリコール)、エトキシジグリコール、アルコール及び脂肪酸(オレイン酸)、脂肪酸エステル又はジメチルイソソルビドである。

【０１００】

本発明の組成物はまた、本発明による抽出物以外の活性成分も含有してもよい。適切な活性成分として、本発明者らは、例えば、抗ラジカル、又はより一般的に抗酸化剤、美白剤、着色剤、軟化剤、保湿剤、抗脂漏剤(anti-seborrheic agent)、抗炎症剤、抗アクネ剤、角質溶解剤及び/若しくは角質剥離剤、抗しわ及び張筋剤、排水剤、抗刺激剤、鎮

静剤、ビタミン及びそれらの混合物、マット化剤、抗老化剤、例えば、レチノール、治癒剤、防腐剤、並びに精油に言及することができる。

【０１０１】

本発明及びその利点は、以下の実施形態から明らかになる。

【０１０２】

図面の簡単な説明

本発明が実施されうる方式及びその利点は、添付の図面において示される以下の例示的な非限定例からより明白となる。

【図面の簡単な説明】

【０１０３】

【図１】図1は、オオバゲッキツの4種の抽出物のフェノール酸、フラボノイド及びアルカロイドの含有量を示す。

【発明を実施するための形態】

【０１０４】

本発明の詳細な説明

1/ オオバゲッキツ抽出物の調製

抽出物1: 質量比8:92の植物及び溶媒の70℃において3時間にわたる連続撹拌下、モル比1:1:5(GHP115)のベタイン、プロパンジオール及び水の混合物からなる、本発明による溶媒による抽出によって、乾燥及び摩砕した葉茎及び葉から得たオオバゲッキツの抽出物。抽出後、植物残渣を、機械的処理(例えば、スピニング)によって除去し、粗抽出物を、0.22μmにろ過する。

抽出物1a: 植物/溶媒質量比が5:95であることを除き、上記の抽出物1について記載されるのと同じ操作条件下で得た抽出物。

抽出物2: 質量比8:92の植物及び溶媒の70℃において3時間にわたる連続撹拌下、質量比70:30のエタノール/水溶媒による抽出によって、乾燥及び摩砕した葉柄及び葉から得たオオバゲッキツの抽出物。抽出後、植物残渣を、機械的処理(例えば、スピニング)によって除去する。粗抽出物を、0.08%の活性炭素Acticarbone CPW CECAで脱色し、次いで、エタノールを減圧下で蒸発させ、得られた水性濃抽出物を、最終乾燥抽出物がヒドロエタノール抽出物の乾燥抽出物に等しくなるようにプロパンジオールに可溶化する。

抽出物3: ポリフェノールが富化され、アルカロイドをごく微量(画分100g当たり〈10mg)含有する、抽出物2について記載される脱色ヒドロエタノール抽出物の画分。画分を、抽出物2について記載される通りの活性炭上70:30脱色エタノール/水抽出物のAmberlite FPX 68樹脂でのカラムろ過によって得、非吸着ろ液が、抽出物3を構成する。

抽出物4: アルカロイドが富化され、ポリフェノールを含まない、抽出物2について記載される脱色ヒドロエタノール抽出物の画分。画分を抽出物2について記載される通り、70:30エタノール/水抽出物のカラム中Amberlite FPX 68樹脂でのろ過/吸着及び活性炭での脱色、次いで、樹脂に吸着された分子のエタノールによる脱着によって得る。

【０１０５】

2/ 様々なモル割合のベタイン/プロパンジオール/水溶媒によるオオバゲッキツの抽出粉末のキャラクタリゼーション

オオバゲッキツの葉柄(又は葉茎)及び葉からのポリフェノール及びアルカロイドの抽出性を、Table 1(表1)に示されるベタイン/プロパンジオール/水混合物の6種の組成物(モル比が異なる)について研究した。

【０１０６】

【表１】

[Table 1]

GHPモル比	1:1:4	1:1:5	1:1.5:3	1:1.5:5	1:2:3	1:2:6
ベタイン(g)	44.16	41.35	41.06	36.45	36.23	31.04
プロパンジオール(g)	28.68	26.86	40.00	35.52	47.06	40.32
水(g)	27.16	31.79	18.94	28.03	16.71	28.64

【０１０７】

各溶媒を、ベタイン、プロパンジオール及び水を、機械撹拌下、７０℃で約１時間混合することによって調製する。各抽出物は、５％の粉砕したオオバゲッキツ葉柄及び乾燥した葉及び９５％の溶媒の、７０℃で４時間の抽出によって得る。抽出後、植物残渣を、機械的処理によって除去し、粗抽出物を滅菌ろ過限界(０.２２μｍ)までろ過する。

【０１０８】

フラボノイド及びフェノール酸(ポリフェノール基に属する)を、ＲＰ-ＵＨＰＬＣ-ＵＶによって分析し、フェノール酸を、２８７ｎｍにおいてクロロゲン酸の較正線に対してスポッティング及び定量し、フラボノイドを、３５５ｎｍにおいてイソクエルシトリン較正線に対して同定及び定量した。Ｌｉｃｏ １００比色計により水中１/２ｍ/ｖに希釈した後、各抽出物のＧａｒｄｎｅｒ指数を測定した。

【０１０９】

ガラスボトル中に包装した６種の抽出物の物理的安定性(視認による)を、３つの異なる温度(４、２５及び４０℃)で７日間保存した後に観察した。

【０１１０】

各抽出物についてのフラボノイド及びフェノール酸濃度を、Ｔａｂｌｅ ２(表２)に示す。

【０１１１】

【表２】

[Table 2]

	濃度(mg/抽出物100g)		Gardener 指数
溶媒	フラボノイド	フェノール酸	
GHP 1:1:4	11	24	10
GHP 1:1:5	12	27	9
GHP 1:1.5:3	10	21	8
GHP 1:1.5:5	11	24	10
GHP 1:2:3	11	20	7
GHP 1:2:6	12	25	11

【０１１２】

6種の溶媒は、抽出物100g当たり10～12mgの間の濃度を特徴とする同様のフラボノイド抽出性能を示す。フェノール酸に関するそれらの抽出性能は、抽出物100g当たり20～27mgの間である。

【０１１３】

この例において試験した全ての溶媒は、化粧品における使用のために有効な数のフラボノイド及びフェノール酸を含むオオバゲッキツの抽出物を得るのに有効である。フラボノイド及びフェノール酸の抽出に最も効果的な溶媒は、1:1:5のモル割合のベタイン、プロパンジオール及び水の混合物からなる溶媒である。

【０１１４】

3/ 本発明によるオオバゲッキツ抽出物中のフェノール酸、フラボノイド及びアルカロイド含有量の他の抽出物との比較

実施例1に記載される4種のオオバゲッキツ抽出物のアルカロイド、フェノール酸及びフラボノイド含有量を、RP-HPLC-UVによって評価した。フェノール酸は、287nmにおいてネオクロロゲン酸較正線に対して同定及び定量し、フラボノイドは、355nmにおいてイソクエルシトリン較正線に対してスポッティング及び定量し、アルカロイドは、287nmにおいてマハニンビン較正線に対して同定及び定量した。

【０１１５】

得られた結果を、図1に例示する。

【０１１６】

4種の抽出物の組成は、研究した二次代謝産物の3つのファミリーに関して質的及び量的な観点から明らかに異なる。したがって、

- 抽出物1(本発明によるGHP115)は、最高濃度のフェノール酸、抽出物2及び3の濃度に等しいフラボノイドの濃度、並びに微量のアルカロイドの存在を特徴とし、
- 抽出物2は、3つのファミリーの化合物(フェノール酸、フラボノイド及びアルカロイド)の各々について顕著な濃度を特徴とし、
- 抽出物3は、ポリフェノールが抽出物2と同様の濃度であるが、ごく微量のアルカロイドを含有することを特徴とし、
- 抽出物4は、アルカロイドが抽出物2と同様の濃度であるが、ポリフェノールを含有しないことを特徴とする。

【０１１７】

前述から、1:1:5のモル割合のベタイン、プロパンジオール及び水の混合物からなる、本発明による溶媒によってのみ、フラボノイド及びフェノール酸が豊富であり、微量状態の非常に低含有量のアルカロイドを有するオオバゲッキツの抽出物を得ることが可能であることが明らかである。

【０１１８】

4/ 本発明によオオバゲッキツ抽出物中のフェノール酸、フラボノイド及びアルカロイド含有量の植物/溶媒比による比較

実施例1に記載されるオオバゲッキツの抽出物1及び1aのアルカロイド、フェノール酸及びフラボノイド含有量を、実施例3に記載される条件下でRP-HPLC-UVによって評価した。

【０１１９】

結果を、下記のTable 3(表3)に記載する。

【０１２０】

【表３】

[Table 3]

		濃度(mg/抽出物100g)		
抽出物	植物/溶媒比	フェノール酸	フラボノイド	アルカロイド
抽出物**1a**	5:95	45	26	微量
抽出物**1**	8:92	92	57	5

【０１２１】
上記から、植物/溶媒比の5:95(抽出物1a)への低下により、8:92比(抽出物1)と比較して、定量できない微量のアルカロイドのみを含有する一方、興味深い濃度のフェノール酸及びフラボノイドを提示する抽出物を得ることが可能になることが分かる。
【０１２２】
5/ 弾性線維の形成と関連するタンパク質の発現に対する本発明によるオオバゲッキツ抽出物(抽出物1)の効果の研究
5.1/ 方法
実施例1に記載されるオオバゲッキツの4種の抽出物(抽出物1、2、3及び4)で処理した又は処理していない正常なヒト真皮線維芽細胞におけるタンパク質含有量(プロテオーム)及びその発現の変動を、ナノ液体クロマトグラフィータンデム質量分析(ナノLC-MS/MS)法によって特定した。この分析法は、量的、感受性及び再現可能であり、バイオインフォマティクス分析(CORAVALID)によって細胞において発現されるタンパク質を同定することを可能にする。
【０１２３】
5.2/ プロトコル
プロテオミクス研究は、実施例1に記載される4種のオオバゲッキツ葉抽出物で処理した細胞と比較した、未処理(UT)細胞において発現されるタンパク質の質的及び量的分析からなる。4種の抽出物を、その最大非細胞毒性濃度で、すなわち、抽出物1(本発明)は0.2%で、抽出物2(プロパンジオール/水)は0.04%で、抽出物3(エタノール/水)は1%で、及び抽出物4(エタノール)は0.1%で試験し、細胞培養培地で24時間インキュベートした。
【０１２４】
次いで、線維芽細胞を、冷リン酸緩衝生理食塩水で洗浄し、回収し、-80℃で冷凍した。タンパク質ライセート及び対応するペプチド抽出物は、Wisniewski JRら、Nat Methods. 2009;6(5):359～62に記載される方法に従って得られる。
【０１２５】
250ngのペプチドを、C18プレカラム(300μm×5mm、粒子直径5μm;Thermo Scientific社)に注入し、次いで、C18カラム(75μm×500mm、粒径2μm;Thermo Scientific社)に溶出する。液体ナノクロマトグラフィーを、60～35%アセトニトリル勾配を300nl/分の流速で60分間適用することによって、Ultimate 3000機器(Dionex社)により実施する。データを、Q-Exactive質量分析計(Thermo Scientific社)により生成する。
【０１２６】
細胞のプロテオームを、SEQUEST-HTアルゴリズムをUNIPROTデータベースで使用して、分析する。タンパク質の定量化を、Minoraアルゴリズムを使用して実施し、オオバゲッキツ抽出物で処理した細胞/未処理細胞の比を、ペアワイズ比に基づく方法を使用して計算し、次いで、全ての生成データの幾何中央値として表す。

【０１２７】
研究は、3回の独立した実験(n=3)に基づく。実施した仮説検定は、未処理線維芽細胞のプロテオーム対実施例1に記載される4種のオオバゲッキツ抽出物で処理した線維芽細胞を比較する分散(ANOVA)の分析であった。
【０１２８】
5.3/ 結果
本研究では、オオバゲッキツのベタイン/プロパンジオール/水抽出物(モル比1:1:5)で処理した真皮線維芽細胞において弾性線維と関連し、発現が大幅に増加した4種のタンパク質を同定した。
【０１２９】
結果をTable 4(表4)に提示し、オオバゲッキツ抽出物での処理細胞/未処理細胞の発現比として表し、3回の実験に対して平均する。
【０１３０】
【表４】

[Table 4]

タンパク質	抽出物1/未処理比	p値
エラスチン	2.18	6.6E-14
フィブリリン-1	2.18	1.0E-17
フィブリリン-2	2.07	2.8E-12
フィビュリン-5	1.69	9.4E-11

【０１３１】
驚くべきことに、本発明によるオオバゲッキツ抽出物(抽出物1:GHP115)のみが、正常なヒト真皮線維芽細胞において、エラスチン及びその3種のパートナーであるフィブリリン-1、フィブリリン-2及びフィビュリン-5のタンパク質発現を大幅に増加させる。他の3種の抽出物(抽出物2:プロパンジオール/水、抽出物3:エタノール/水、及び抽出物4:エタノール)は、弾性線維タンパク質に対する効果を有さない(データ示さず)。
【０１３２】
5.4/ 結論
本発明による、すなわち、ベタイン/プロパンジオール/水混合物(モル比1:1:5;抽出物1)からなる溶媒によって得られたオオバゲッキツの抽出物は、弾性線維に属するタンパク質の発現を増加させる。したがって、本発明によるオオバゲッキツのベタイン/プロパンジオール/水抽出物で処理した正常なヒト真皮線維芽細胞は、皮膚弾性線維の再生成及び新陳代謝に好都合な表現型を示す。
【０１３３】
6/ 正常なヒト線維芽細胞の2D培養におけるエラスチン、フィブリリン-1及びフィビュリン-5合成の合成に対するオオバゲッキツ抽出物(抽出物1及び1a)の効果の研究
6.1/ 方法
この研究は、画像解析と連結したin situ蛍光免疫染色を使用して、本発明による(ベタイン/プロパンジオール/水、モル比1:1:5)オオバゲッキツの抽出物1及び1aで処理した又は処理していない真皮線維芽細胞の単層培養物に堆積したエラスチン、フィブリリン-1及びフィビュリン-5合成を測定する。
【０１３４】
6.2/ プロトコル
正常なヒト真皮線維芽細胞を、最終濃度0.2%の実施例1で得られた本発明による(ベタ

イン/プロパンジオール/水、モル比1:1:5)オオバゲッキツの抽出物(抽出物1及び1a)で48時間処理する。未処理(UT)細胞を対照として使用する。次いで、細胞をリン酸緩衝食塩水で洗浄した後、固定し、1%BSA(ウシ血清アルブミン)で30分間飽和させる。細胞を一次抗体(抗エラスチン、抗フィブリリン-1又は抗フィビュリン-5)と共に1時間インキュベートし、PBS緩衝液中で洗浄し、次いで、Alexa 594蛍光色素結合二次抗体と共に1時間インキュベートする。蛍光を、適切なフィルターを用いてCytation 5イメージング分光光度計(Biotek社)で読み取る。画像解析による蛍光測定は、一般的な取得パラメーターで実施する。

【0135】

研究は、3回の独立した実験(n=3)に基づく。統計検定は、2元ANOVAに続き、Bonferroni多重比較であり、未処理真皮線維芽細胞培養物対本発明によるオオバゲッキツの抽出物1及び1a(ベタイン/プロパンジオール/水、モル比1:1:5)で処理した線維芽細胞において堆積した目的のタンパク質の合成を比較する。

【0136】

6.3/ 結果

6.3.1/ エラスチン合成

本発明者らは、オオバゲッキツの抽出物1及び1a(ベタイン/プロパンジオール/水、モル比1:1:5)で処理した又は処理していない真皮線維芽細胞において堆積したエラスチン合成を定量した。結果をTable 5(表5)に提示し、未処理細胞(UT)の%として表す。値は、全3回の実験(n=3)における±平均標準偏差として表す。

【0137】

【表5】

[Table 5]

	未処理	抽出物1	抽出物1a
実験_1	100±34	158±38	150±22
実験_2	100±21	151±26	168±27
実験_3	100±23	178±21	172±20
n = 3		**62%±14**	**63%±12**
統計: ****: p<0.0001		****	****

【0138】

等価な方式で、本発明に従って得られたオオバゲッキツ抽出物1及び1a(ベタイン/プロパンジオール/水、モル比1:1:5)は、真皮線維芽細胞内での堆積エラスチンのタンパク質合成の大幅な増加(それぞれ、+62%及び+63%)を誘導する。

【0139】

抽出溶媒単独(オオバゲッキツなしのベタイン/プロパンジオール/水1:1:5モル比)は、堆積エラスチン合成の増加を誘導しない(データ示さず)。

【0140】

6.3.2/ フィブリリン-1の合成

本発明者らは、オオバゲッキツ抽出物1及び1a(ベタイン/プロパンジオール/水、モル比1:1:5)で処理した又は処理しなかった真皮線維芽細胞において堆積したフィブリリン-1の合成を定量した。結果をTable 6(表6)に提示し、未処理細胞(UT)の%として表す。値は、全3回の実験(n=3)における±平均標準偏差として表す。

【0141】

【表６】

[Table 6]

	未処理	抽出物1	抽出物1a
実験_1	100±11	189±16	152±30
実験_2	100±32	129±44	137±26
実験_3	100±43	140±38	128±33
n = 3		**53%±32**	**39%±12**
統計: ****: p<0.0001		****	**

【０１４２】

本発明に従って得られたオオバゲッキツ抽出物１及び１a(ベタイン/プロパンジオール/水、モル比1:1:5)は、真皮線維芽細胞において堆積したフィブリリン-1のタンパク質合成の大幅な増加を誘導する。抽出物１及び１aは、抽出物１が、抽出物１a(+３９%)よりも強く、真皮線維芽細胞においてフィブリリン-1のタンパク質合成を増加させる(+５３%)ものの、互いに統計的な差はない。

【０１４３】

抽出溶媒単独(オオバゲッキツなしのベタイン/プロパンジオール/水1:1:5モル比)は、堆積フィブリリン-1合成の増加を誘導しない(データ示さず)。

【０１４４】

6.3.3/ フィブリリン-5の合成

本発明者らは、オオバゲッキツの抽出物１及び１a(ベタイン/プロパンジオール/水、モル比1:1:5)で処理した又は処理していない真皮線維芽細胞において堆積したフィビュリン-5の合成を定量した。結果をTable 7(表7)に提示し、未処理細胞(UT)の%として表す。値は、全3回の実験(n=3)における±平均標準偏差として表す。

【０１４５】

【表７】

[Table 7]

	未処理	抽出物1	抽出物1a
実験_1	100±53	260±121	162±56
実験_2	100±56	222±133	196±74
実験_3	100±36	/	221±131
n = 3		141%±27	93%±30
統計: ****: p<0.0001		****	****

【０１４６】

本発明に従って得られたオオバゲッキツ抽出物１及び１a(ベタイン/プロパンジオール/水、モル比1:1:5)は、真皮線維芽細胞において堆積したフィブリリン-5のタンパク質合成の大幅な増加を誘導する。抽出物１は、抽出物１a(+９３%)よりも強く、真皮線維芽細胞においてフィビュリン-5のタンパク質合成を増加させる(+１４１%)。

【０１４７】

抽出溶媒単独(オオバゲッキツなしのベタイン/プロパンジオール/水1:1:5モル比)は、フィビュリン-5合成の増加を誘導しない(データ示さず)。

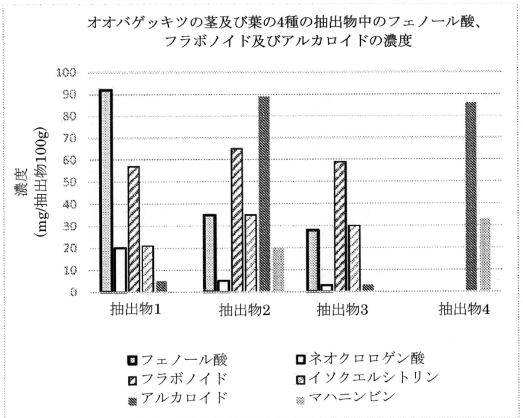
【０１４８】
6.4/ 結論
本発明によるオオバゲッキツの抽出物1及び1a(ベタイン/プロパンジオール/水、モル比1:1:5)は、真皮における弾性ネットワークのタンパク質合成の改善を誘導する。
【０１４９】
7/ 組成物の実施例 - 天然保湿クリームゲル
【０１５０】
【表８】

[Table 8]

成分名	組成(質量%)
Emulium(登録商標)Mellifera	2.5
天然スクアラン	2.0
炭酸ジカプリリル	15.0
脱塩水	QS100
グリセリン	20.0
タピオカデンプン	5.0
本発明によるオオバゲッキツ抽出物	2.0
エチルヘキシルグリセリン	0.1
フェノキシエタノール	0.9
香料	0.2
合計	100

【図面】
【図１】

[図1]



【国際調査報告】

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.
PCT/FR2021/050150

A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER

A61K 8/9789(2017.01)i; ***A61Q 19/08***(2006.01)i

According to International Patent Classification (IPC) or to both national classification and IPC

B. FIELDS SEARCHED

Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols)

A61K; A61Q

Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched

Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practicable, search terms used)

EPO-Internal, WPI Data

C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
A	anonymous. "Overnight Repair Serum" 21 March 2012 (2012-03-21), retrieved from www.gnpd.com, abstract No. Database accession no. 1759348, Retrieved from: GNPD [online] MINTEL XP055718305 abstract	1-13
A	anonymous. "Night Cream" 29 January 2019 (2019-01-29), retrieved from www.gnpd.com, abstract No. Database accession no. 6293269, Retrieved from: GNPD [online] MINTEL XP055718307 abstract	1-13
A	WO 2018172436 A1 (WIERNSPERGER NICOLAS [FR]; GELOEN ALAIN [FR] ET AL.) 27 September 2018 (2018-09-27) paragraph [0005] page 15 claims	1-13

☑ Further documents are listed in the continuation of Box C. ☑ See patent family annex.

* Special categories of cited documents:
"A" document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance
"E" earlier application or patent but published on or after the international filing date
"L" document which may throw doubts on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified)
"O" document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means
"P" document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed
"T" later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention
"X" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step when the document is taken alone
"Y" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other such documents, such combination being obvious to a person skilled in the art
"&" document member of the same patent family

Date of the actual completion of the international search	Date of mailing of the international search report
21 June 2021	**09 July 2021**
Name and mailing address of the ISA/EP **European Patent Office** **p.b. 5818, Patentlaan 2, 2280 HV Rijswijk** **Netherlands** Telephone No. **(+31-70)340-2040** Facsimile No. **(+31-70)340-3016**	Authorized officer **Perrone Dunet, S** Telephone No.

Form PCT/ISA/210 (second sheet) (January 2015)

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.
PCT/FR2021/050150

C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
A	US 2009169651 A1 (MAJEED MUHAMMED [US]) 02 July 2009 (2009-07-02) paragraphs [0011], [0012], [0038] - [0042], [0051] - [0053] e), f);paragraph [0120] claims 11, 12	1-13
A	WO 2014157910 A1 (AMOREPACIFIC CORP [KR]) 02 October 2014 (2014-10-02) paragraphs [0098] - [0099], [0111], [0130]; example 1; tables 1, 4 examples 6, 7, 9; tables 6, 7, 9 claims 1, 9 paragraphs [0006] - [0009]	1-13
A	Vandana Jain ET AL. "Murraya Koenigii: An Updated Review" *International Journal Of Ayurvedic And Herbal Medicine Plot Near Sanpada Railway station,* 01 January 2012 (2012-01-01), Retrieved from the Internet: http://interscience.org.uk/issue/V2-I5/3 ijahm.pdf [retrieved on 2021-01-01] XP055291059 pages 619-620 page 609	1-13
A	ALI GHASEMZADEH ET AL. "Optimization of ultrasound-assisted extraction of flavonoid compounds and their pharmaceutical activity from curry leaf (Murraya koenigii L.) using response surface methodology" *BMC COMPLEMENTARY AND ALTERNATIVE MEDICINE, BIOMED CENTRAL LTD., LONDON, GB,* Vol. 14, No. 1, 28 August 2014 (2014-08-28), page 318 DOI: 10.1186/1472-6882-14-318 ISSN: 1472-6882, XP021197070 the whole document	1-13

Form PCT/ISA/210 (second sheet) (January 2015)

INTERNATIONAL SEARCH REPORT
Information on patent family members

International application No.
PCT/FR2021/050150

Patent document cited in search report	Publication date (day/month/year)	Patent family member(s)	Publication date (day/month/year)
WO 2018172436 A1	27 September 2018	FR 3064180 A1	28 September 2018
		WO 2018172436 A1	27 September 2018
US 2009169651 A1	02 July 2009	NONE	
WO 2014157910 A1	02 October 2014	KR 20140117168 A	07 October 2014
		WO 2014157910 A1	02 October 2014

Form PCT/ISA/210 (patent family annex) (January 2015)

RAPPORT DE RECHERCHE INTERNATIONALE

Demande internationale n°
PCT/FR2021/050150

A. CLASSEMENT DE L'OBJET DE LA DEMANDE
INV. A61K8/9789 A61Q19/08
ADD.

Selon la classification internationale des brevets (CIB) ou à la fois selon la classification nationale et la CIB

B. DOMAINES SUR LESQUELS LA RECHERCHE A PORTE

Documentation minimale consultée (système de classification suivi des symboles de classement)
A61K A61Q

Documentation consultée autre que la documentation minimale dans la mesure où ces documents relèvent des domaines sur lesquels a porté la recherche

Base de données électronique consultée au cours de la recherche internationale (nom de la base de données, et si cela est réalisable, termes de recherche utilisés)
EPO-Internal, WPI Data

C. DOCUMENTS CONSIDERES COMME PERTINENTS

Catégorie*	Identification des documents cités, avec, le cas échéant, l'indication des passages pertinents	no. des revendications visées
A	DATABASE GNPD [Online] MINTEL; 21 mars 2012 (2012-03-21), anonymous: "Overnight Repair Serum", XP055718305, extrait de www.gnpd.com Database accession no. 1759348 abrégé ----- DATABASE GNPD [Online] MINTEL; 29 janvier 2019 (2019-01-29), anonymous: "Night Cream", XP055718307, extrait de www.gnpd.com Database accession no. 6293269 abrégé ----- -/--	1-13 1-13

[X] Voir la suite du cadre C pour la fin de la liste des documents

[X] Les documents de familles de brevets sont indiqués en annexe

* Catégories spéciales de documents cités:

"A" document définissant l'état général de la technique, non considéré comme particulièrement pertinent
"E" document antérieur, mais publié à la date de dépôt international ou après cette date
"L" document pouvant jeter un doute sur une revendication de priorité ou cité pour déterminer la date de publication d'une autre citation ou pour une raison spéciale (telle qu'indiquée)
"O" document se référant à une divulgation orale, à un usage, à une exposition ou tous autres moyens
"P" document publié avant la date de dépôt international, mais postérieurement à la date de priorité revendiquée
"T" document ultérieur publié après la date de dépôt international ou la date de priorité et n'appartenenant pas à l'état de la technique pertinent, mais cité pour comprendre le principe ou la théorie constituant la base de l'invention
"X" document particulièrement pertinent; l'invention revendiquée ne peut être considérée comme nouvelle ou comme impliquant une activité inventive par rapport au document considéré isolément
"Y" document particulièrement pertinent; l'invention revendiquée ne peut être considérée comme impliquant une activité inventive lorsque le document est associé à un ou plusieurs autres documents de même nature, cette combinaison étant évidente pour une personne du métier
"&" document qui fait partie de la même famille de brevets

Date à laquelle la recherche internationale a été effectivement achevée	Date d'expédition du présent rapport de recherche internationale
21 juin 2021	09/07/2021

Nom et adresse postale de l'administration chargée de la recherche internationale	Fonctionnaire autorisé
Office Européen des Brevets, P.B. 5818 Patentlaan 2 NL - 2280 HV Rijswijk Tel. (+31-70) 340-2040, Fax: (+31-70) 340-3016	Perrone Dunet, S

Formulaire PCT/ISA/210 (deuxième feuille) (avril 2005)

RAPPORT DE RECHERCHE INTERNATIONALE

Demande internationale n°
PCT/FR2021/050150

C(suite). DOCUMENTS CONSIDERES COMME PERTINENTS

Catégorie*	Identification des documents cités, avec, le cas échéant, l'indication des passages pertinents	no. des revendications visées
A	WO 2018/172436 A1 (WIERNSPERGER NICOLAS [FR]; GELOEN ALAIN [FR] ET AL.) 27 septembre 2018 (2018-09-27) alinéa [0005] page 15 revendications	1-13
A	US 2009/169651 A1 (MAJEED MUHAMMED [US]) 2 juillet 2009 (2009-07-02) alinéas [0011], [0012], [0038] - [0042], [0051] - [0053] e), f); alinéa [0120] revendications 11, 12	1-13
A	WO 2014/157910 A1 (AMOREPACIFIC CORP [KR]) 2 octobre 2014 (2014-10-02) alinéas [0098] - [0099], [0111], [0130]; exemple 1; tableaux 1, 4 exemples 6, 7, 9; tableaux 6, 7, 9 revendications 1, 9 alinéas [0006] - [0009]	1-13
A	Vandana Jain ET AL: "Murraya Koenigii: An Updated Review", International Journal Of Ayurvedic And Herbal Medicine Plot Near Sanpada Railway station, 1 janvier 2012 (2012-01-01), XP055291059, Extrait de l'Internet: URL:http://interscience.org.uk/issue/V2-I5/3 ijahm.pdf [extrait le 2021-01-01] pages 619-620 page 609	1-13
A	ALI GHASEMZADEH ET AL: "Optimization of ultrasound-assisted extraction of flavonoid compounds and their pharmaceutical activity from curry leaf (Murraya koenigii L.) using response surface methodology", BMC COMPLEMENTARY AND ALTERNATIVE MEDICINE, BIOMED CENTRAL LTD., LONDON, GB, vol. 14, no. 1, 28 août 2014 (2014-08-28), page 318, XP021197070, ISSN: 1472-6882, DOI: 10.1186/1472-6882-14-318 le document en entier	1-13

2

Formulaire PCT/ISA/210 (suite de la deuxième feuille) (avril 2005)

RAPPORT DE RECHERCHE INTERNATIONALE

Renseignements relatifs aux membres de familles de brevets

Demande internationale n°
PCT/FR2021/050150

Document brevet cité au rapport de recherche	Date de publication	Membre(s) de la famille de brevet(s)	Date de publication
WO 2018172436 A1	27-09-2018	FR 3064180 A1	28-09-2018
		WO 2018172436 A1	27-09-2018
US 2009169651 A1	02-07-2009	AUCUN	
WO 2014157910 A1	02-10-2014	KR 20140117168 A	07-10-2014
		WO 2014157910 A1	02-10-2014

Formulaire PCT/ISA/210 (annexe familles de brevets) (avril 2005)

フロントページの続き

MK,MT,NL,NO,PL,PT,RO,RS,SE,SI,SK,SM,TR),OA(BF,BJ,CF,CG,CI,CM,GA,GN,GQ,GW,KM,ML,MR,NE,SN,TD,TG),AE,AG,AL,AM,AO,AT,AU,AZ,BA,BB,BG,BH,BN,BR,BW,BY,BZ,CA,CH,CL,CN,CO,CR,CU,CZ,DE,DJ,DK,DM,DO,DZ,EC,EE,EG,ES,FI,GB,GD,GE,GH,GM,GT,HN,HR,HU,ID,IL,IN,IR,IS,IT,JO,JP,KE,KG,KH,KN,KP,KR,KW,KZ,LA,LC,LK,LR,LS,LU,LY,MA,MD,ME,MG,MK,MN,MW,MX,MY,MZ,NA,NG,NI,NO,NZ,OM,PA,PE,PG,PH,PL,PT,QA,RO,RS,RU,RW,SA,SC,SD,SE,SG,SK,SL,ST,SV,SY,TH,TJ,TM,TN,TR,TT,TZ,UA,UG,US,UZ,VC,VN,WS,ZA,ZM,ZW

・デ・カストール・２１
(72)発明者　フレデリック・ドゥマルヌ
フランス・１３００８・マルセイユ・リュ・デュ・コマンダン・ロラン・１２２・レジデンス・ラ・カドゥネル・レ・ルッセ・２

Ｆターム（参考）　4C083　AA082 AA111 AA112 AC022 AC072 AC121 AC122 AC172 AC332 AC372 AC422 AC711 AC712 AD242 BB51 CC05 DD41 EE12 EE13 FF01