

(12) 发明专利申请

(10) 申请公布号 CN 101983051 A

(43) 申请公布日 2011. 03. 02

- (21) 申请号 200980112140. 5 *A61K 31/4184* (2006. 01)
- (22) 申请日 2009. 03. 31 *A61K 36/00* (2006. 01)
- (30) 优先权数据 *A61K 36/18* (2006. 01)
- PCT/JP2008/056421 2008. 03. 31 JP *A61K 36/23* (2006. 01)
- 274944/2008 2008. 10. 24 JP *A61K 36/73* (2006. 01)
- A61K 36/75* (2006. 01)
- (85) PCT申请进入国家阶段日 *A61K 36/81* (2006. 01)
- 2010. 09. 30 *A61K 36/896* (2006. 01)
- (86) PCT申请的申请数据 *A61K 45/00* (2006. 01)
- PCT/JP2009/056717 2009. 03. 31 *A61P 17/00* (2006. 01)
- A61Q 19/08* (2006. 01)
- (87) PCT申请的公布数据
- W02009/123215 JA 2009. 10. 08
- (71) 申请人 株式会社资生堂
- 地址 日本东京都
- (72) 发明人 入山俊介 松永由纪子 天野聪
- 海盐健一 草苜健 蛭间卓也
- (74) 专利代理机构 北京市中咨律师事务所
- 11247
- 代理人 段承恩 田欣
- (51) Int. Cl.
- A61K 8/46* (2006. 01)
- A61K 8/49* (2006. 01)
- A61K 31/17* (2006. 01)

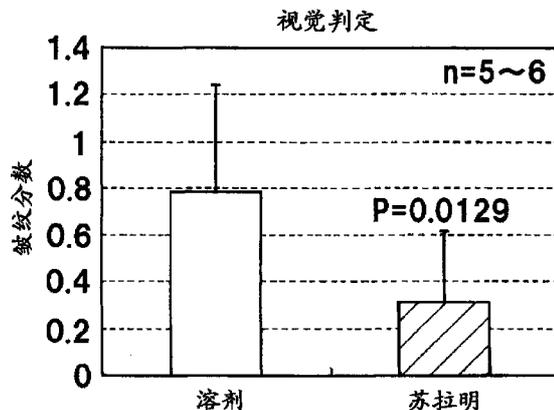
权利要求书 2 页 说明书 19 页 附图 9 页

(54) 发明名称

用于防止或改善皱纹的口服、注射、皮肤外用剂和美容方法

(57) 摘要

本发明公开了以控制乙酰肝素酶的物质为有效成分的口服、注射、皮肤外用剂,其用于改善皱纹。



1. 一种防止或改善皱纹的美容方法,其特征在于,控制皮肤中存在的乙酰肝素酶的作用。
2. 一种防止或改善皱纹的美容方法,其特征在于,作为控制皮肤中存在的乙酰肝素酶的作用的方法,应用抑制基因表达的物质。
3. 一种防止或改善皱纹的美容方法,其特征在于,作为控制皮肤中存在的乙酰肝素酶的作用的方法,应用抑制基因的翻译的物质。
4. 一种防止或改善皱纹的美容方法,其特征在于,作为控制皮肤中存在的乙酰肝素酶的作用的方法,应用抑制酶活性的物质。
5. 一种防止或改善皱纹的美容方法,其特征在于,作为控制皮肤中存在的乙酰肝素酶的作用的方法,应用抑制酶的活化的物质。
6. 一种防止或改善皱纹的美容方法,其特征在于,采用口服、注射、外用涂敷等方法给予抑制皮肤中存在的乙酰肝素酶的作用的物质。
7. 一种用于防止或改善皱纹的口服药剂,含有控制皮肤中存在的乙酰肝素酶的作用的物质作为有效成分。
8. 一种用于防止或改善皱纹的注射剂,含有控制皮肤中存在的乙酰肝素酶的作用的物质作为有效成分。
9. 一种用于防止或改善皱纹的皮肤外用剂,含有控制皮肤中存在的乙酰肝素酶的作用的物质作为有效成分。
10. 根据权利要求7~9的任一项所述的口服药剂、注射剂或皮肤外用剂,其特征在于,所述乙酰肝素酶抑制剂是苏拉明。
11. 一种包含苏拉明的皱纹改善剂。
12. 根据权利要求1~6的任一项所述的方法,其特征在于,所述物质是苏拉明。
13. 根据权利要求7~9的任一项所述的口服药剂、注射剂或皮肤外用剂,其特征在于,所述乙酰肝素酶抑制剂是4-(1H-苯并咪唑-2-基)-苯胺或其衍生物。
14. 一种包含4-(1H-苯并咪唑-2-基)-苯胺或其衍生物的皱纹改善剂。
15. 根据权利要求1~6的任一项所述的方法,其特征在于,所述物质是4-(1H-苯并咪唑-2-基)-苯胺或其衍生物。
16. 根据权利要求7~9的任一项所述的口服药剂、注射剂或皮肤外用剂,其特征在于,所述乙酰肝素酶抑制剂是包含选自缬草提取物、扁柏提取物、猕猴桃提取物、柠檬提取物、番茄提取物、大蒜提取物、百合提取物、滨海前胡(牡丹防风)提取物、橙皮提取物、无患子提取物、欧芹提取物、大枣提取物、陈皮提取物和荨麻提取物中的1种或2种以上的乙酰肝素酶活性抑制剂。
17. 一种皱纹改善剂,包含乙酰肝素酶活性抑制剂,所述乙酰肝素酶抑制剂包含选自缬草提取物、扁柏提取物、猕猴桃提取物、柠檬提取物、番茄提取物、大蒜提取物、百合提取物、滨海前胡(牡丹防风)提取物、橙皮提取物、无患子提取物、欧芹提取物、大枣提取物、陈皮提取物和荨麻提取物中的1种或2种以上。
18. 根据权利要求1~6的任一项所述的方法,其特征在于,所述物质是包含选自缬草提取物、扁柏提取物、猕猴桃提取物、柠檬提取物、番茄提取物、大蒜提取物、百合提取物、滨海前胡(牡丹防风)提取物、橙皮提取物、无患子提取物、欧芹提取物、大枣提取物、陈皮提

取物和荨麻提取物中的 1 种或 2 种以上的乙酰肝素酶活性抑制剂。

19. 一种抗皱纹效果的评价方法,其特征在於,使人或动物的皮肤、皮肤组织或细胞与被测物质接触,检测所述皮肤中的乙酰肝素酶的酶活性、基因表达水平或硫酸乙酰肝素链,以乙酰肝素酶的酶活性、基因表达水平或硫酸乙酰肝素链的变化作为指标来评价被测物质的抗皱纹效果。

20. 根据权利要求 19 所述的方法,其特征在於,使用表皮角质形成细胞。

21. 根据权利要求 19 所述的方法,其特征在於,使用真皮成纤维细胞。

用于防止或改善皱纹的口服、注射、皮肤外用剂和美容方法

技术领域

[0001] 本发明涉及用于防止或改善皱纹的口服、注射、皮肤外用剂和美容方法,以及抗皱纹效果的评价方法。

背景技术

[0002] 随着年龄的增长,皱纹作为一种皮肤老化现象在增加,从美容等观点出发,特别是对于女性而言,对皱纹的防止和改善的兴趣显著提高。皱纹根据其发生部位、发生机制等的不同而大体分成大皱纹、小皱纹、皱褶皱纹。大皱纹主要是由于光老化而在额头、颈后部等处产生的深皱纹,小皱纹是在眼梢、嘴角产生的比较浅的皱纹,皱褶皱纹是在老人的腹部等非暴露部位产生的褶状皱纹。

[0003] 其中,对于小皱纹,已报导了皱纹面积率在角质层水分量少的肌肤状态的人中显示较高值(参照芋川等人的 *Fragrance Journal* ;1992(11)29-42(非专利文献1)),并明确了小皱纹是由于肌肤粗糙、干燥引起的角质层水分量减少而恶化。现代女性由于空调的普及因而即使在夏季肌肤也常常置于干燥环境中,因而对小皱纹的烦恼增加,对小皱纹的关注也提高了。

[0004] 迄今为止,改善小皱纹的现状是,虽然已经提出了为了使降低了的角质层水分量恢复而在肌肤上涂敷甘油、NMF(天然保湿因子,natural moisturizing factor)相关成分、胶原衍生物等保湿成分来提高皮肤的水分保持的方法等,但是大体上还未开发出在保湿作用的基础上具有优异的小皱纹改善效果的药剂。

[0005] 然而近年来,已经确立了小皱纹模型,并阐明了皮肤中的生物化学变化(参照松永等人的 *British Journal of Dermatology*,2007,May ;156(5) :884-91(非专利文献2))。作为其中之一,已经明确了表皮中的ADAM(去整合蛋白和金属蛋白水解酶,A Disintegrin And Metalloproteinase)的活化和与此相伴的HB-EGF(肝素结合性EGF样生长因子;heparin-binding epidermal growth factor-like growth factor)和Amphiregulin等与表皮细胞的膜结合了的生长因子的游离会引起表皮肥厚、真皮肥厚,从而促进小皱纹形成。为了防止小皱纹形成,已经提出了例如配合了TAPI-1或4-甲氧基苯基异羟肟酸等ADAM活性抑制剂的、用于抑制皮肤老化的组合物(参照特开2006-137744(专利文献1)、特开2007-119444(专利文献2))。

[0006] 然而,对产生小皱纹的皮肤的蛋白水平、基因水平等各种生物化学水平的变化还未充分进行详细研究,因此强烈期望基于这样的详细研究来获得可以更有效地防止·改善小皱纹的口服、注射、外用剂或美容方法。

[0007] 专利文献1:特开2006-137744

[0008] 专利文献2:特开2007-119444

[0009] 专利文献3:特表2003-502054

[0010] 非专利文献1:*Fragrance Journal* ;1992(11)29-42

[0011] 非专利文献2:*British Journal of Dermatology*,2007,May ;156(5) :884-91

- [0012] 非专利文献 3 :Semin Cancer Biol. ,2002 ;12(2) :121-129
[0013] 非专利文献 4 :Mol Cancer Ther. ,2004 ;3(9) :1069-1077
[0014] 非专利文献 5 :Bioorg. Med. Chem. Lett. ,2006 ;(16) :409-412.

发明内容

[0015] 本发明是鉴于上述事实而提出的,其目的在于,阐明与皮肤中的小皱纹形成相关的生物化学变化,并且确定可以抑制该变化的物质,采用该物质来提供可以更有效地防止或改善皱纹的口服、注射、皮肤外用剂或美容方法。此外,本发明的目的在于,提供可以以上述生物化学变化的抑制作为指标来更有效且简便地评价被测物质的抗皱纹效果的方法。

[0016] 本发明者发现,对由小皱纹模型诱导的皱纹形成过程进行生物化学分析,结果发现,在皱纹形成过程中,乙酰肝素酶的表达增加,作为基底膜的硫酸乙酰肝素蛋白聚糖的串珠素(perlecan)的硫酸乙酰肝素链分解,并可以通过涂敷抑制乙酰肝素酶活性的物质来抑制皱纹形成,本发明是基于这些发现而完成的。

[0017] 因此,本申请包括以下发明。

[0018] (1) 一种防止或改善皱纹的美容方法,其特征在于,控制皮肤中存在的乙酰肝素酶的作用。

[0019] (2) 一种防止或改善皱纹的美容方法,其特征在于,作为控制皮肤中存在的乙酰肝素酶的作用的方法,应用抑制基因表达的物质。

[0020] (3) 一种防止或改善皱纹的美容方法,其特征在于,作为控制皮肤中存在的乙酰肝素酶的作用的方法,应用抑制基因的翻译的物质。

[0021] (4) 一种防止或改善皱纹的美容方法,其特征在于,作为控制皮肤中存在的乙酰肝素酶的作用的方法,应用抑制酶活性的物质。

[0022] (5) 一种防止或改善皱纹的美容方法,其特征在于,作为控制皮肤中存在的乙酰肝素酶的作用的方法,应用抑制酶的活化的物质。

[0023] (6) 一种防止或改善皱纹的美容方法,其特征在于,采用口服、注射、外用涂敷等方法给予抑制皮肤中存在的乙酰肝素酶的作用的物质。

[0024] (7) 一种用于防止或改善皱纹的口服药剂,含有控制皮肤中存在的乙酰肝素酶的作用的物质作为有效成分。

[0025] (8) 一种用于防止或改善皱纹的注射剂,含有控制皮肤中存在的乙酰肝素酶的作用的物质作为有效成分。

[0026] (9) 一种用于防止或改善皱纹的皮肤外用剂,含有控制皮肤中存在的乙酰肝素酶的作用的物质作为有效成分。

[0027] (10) 根据(7)~(9)的任一项所述的口服药剂、注射剂或皮肤外用剂,其特征在于,所述乙酰肝素酶抑制剂是苏拉明(Suramin)。

[0028] (11) 一种包含苏拉明的皱纹改善剂。

[0029] (12) 根据(1)~(6)的任一项所述的方法,其特征在于,所述物质是苏拉明。

[0030] (13) 根据(7)~(9)的任一项所述的口服药剂、注射剂或皮肤外用剂,其特征在于,所述乙酰肝素酶抑制剂是4-(1H-苯并咪唑-2-基)-苯胺或其衍生物。

[0031] (14) 一种包含4-(1H-苯并咪唑-2-基)-苯胺或其衍生物的皱纹改善剂。

[0032] (15) 根据 (1) ~ (6) 的任一项所述的方法, 其特征在于, 所述物质是 4-(1H- 苯并咪唑 -2- 基) - 苯胺或其衍生物。

[0033] (16) 根据 (7) ~ (9) 的任一项所述的口服药剂、注射剂或皮肤外用剂, 其特征在于, 所述乙酰肝素酶抑制剂是包含选自缬草提取物、扁柏提取物、猕猴桃提取物、柠檬提取物、番茄提取物、大蒜提取物、百合提取物、滨海前胡 (牡丹防风) 提取物、橙皮提取物、无患子提取物、欧芹提取物、大枣提取物、陈皮提取物和荨麻提取物中的 1 种或 2 种以上的乙酰肝素酶活性抑制剂。

[0034] (17) 一种皱纹改善剂, 包含乙酰肝素酶活性抑制剂, 所述乙酰肝素酶抑制剂包含选自缬草提取物、扁柏提取物、猕猴桃提取物、柠檬提取物、番茄提取物、大蒜提取物、百合提取物、滨海前胡 (牡丹防风) 提取物、橙皮提取物、无患子提取物、欧芹提取物、大枣提取物、陈皮提取物和荨麻提取物中的 1 种或 2 种以上。

[0035] (18) 根据 (1) ~ (6) 的任一项所述的方法, 其特征在于, 所述物质是包含选自缬草提取物、扁柏提取物、猕猴桃提取物、柠檬提取物、番茄提取物、大蒜提取物、百合提取物、滨海前胡 (牡丹防风) 提取物、橙皮提取物、无患子提取物、欧芹提取物、大枣提取物、陈皮提取物和荨麻提取物中的 1 种或 2 种以上的乙酰肝素酶活性抑制剂。

[0036] (19) 一种抗皱纹效果的评价方法, 其特征在于, 使人或动物的皮肤、皮肤组织或细胞与被测物质接触, 检测所述皮肤中的乙酰肝素酶的酶活性、基因表达水平或硫酸乙酰肝素链, 以乙酰肝素酶的酶活性、基因表达水平或硫酸乙酰肝素链的变化作为指标来评价被测物质的抗皱纹效果。

[0037] (20) 根据 (19) 所述的方法, 其特征在于, 使用表皮角质形成细胞。

[0038] (21) 根据 (19) 所述的方法, 其特征在于, 使用真皮成纤维细胞。

[0039] 通过应用本发明的口服、注射、皮肤外用剂, 此外, 通过本发明的美容方法, 可以控制皮肤中存在的乙酰肝素酶, 从而非常有效地防止或改善皱纹, 特别是小皱纹。此外, 可以通过本发明的评价方法来有效且简便地确定具有更高效果的抗皱纹物质。

附图说明

[0040] 图 1 显示乙酰肝素酶的基因表达的变化。结果以平均值 + 标准偏差显示。* : $p < 0.01$ 。

[0041] 图 2 是显示乙酰肝素酶引起的表皮基底膜上的硫酸乙酰肝素链的分解的历时变化的、采用了对串珠素核心蛋白质和硫酸乙酰肝素链的特异性抗体的免疫染色照片。(A)-(C) : 采用串珠素核心蛋白质特异性抗体进行免疫染色后的皮肤 : 第 0 天、第 2 天、第 7 天。(D)-(F) : 采用硫酸乙酰肝素特异性抗体免疫染色后的皮肤 : 第 0 天、第 2 天、第 7 天。

[0042] 图 3 显示乙酰肝素酶抑制剂苏拉明的抗皱纹效果。* : $P < 0.05$, $n = 5 \sim 6$ 。

[0043] 图 4 是显示苏拉明对表皮基底膜的硫酸乙酰肝素链的保护效果的显微镜照片。(A)-(D) : 采用硫酸乙酰肝素特异性抗体对皮肤进行免疫染色后的显微镜照片。(E)-(H) : 采用硫酸乙酰肝素特异性抗体对涂敷了 1mM 苏拉明的皮肤进行免疫染色后的显微镜照片。

[0044] 图 5 显示乙酰肝素酶抑制剂 1-[4-(1H- 苯并咪唑 -2- 基) - 苯基] -3-[4-(1H- 苯并咪唑 -2- 基) - 苯基] - 脲的抗皱纹效果。* * : $P < 0.001$, $n = 6$ 。

[0045] 图 6 是显示 1-[4-(1H- 苯并咪唑 -2- 基) - 苯基] -3-[4-(1H- 苯并咪唑 -2- 基) - 苯

基]-脲对表皮基底膜的硫酸乙酰肝素链的保护(分解抑制)效果的、采用串珠素核心蛋白质和硫酸乙酰肝素链特异性抗体进行免疫染色后的显微镜照片。(A):采用串珠素特异性抗体对涂敷了50%乙醇的皮肤进行染色后的显微镜照片。(B):采用串珠素特异性抗体对涂敷了1mM 1-[4-(1H-苯并咪唑-2-基)-苯基]-3-[4-(1H-苯并咪唑-2-基)-苯基]-脲的皮肤进行染色后的显微镜照片。(C):采用硫酸乙酰肝素特异性抗体对涂敷了50%乙醇的皮肤进行染色后的显微镜照片。(D):采用硫酸乙酰肝素链特异性抗体对涂敷了1mM 1-[4-(1H-苯并咪唑-2-基)-苯基]-3-[4-(1H-苯并咪唑-2-基)-苯基]-脲的皮肤进行染色后的显微镜照片。

[0046] 图7显示4-(1H-苯并咪唑-2-基)-苯胺的乙酰肝素酶活性抑制的评价结果。

[0047] 图8是显示4-(1H-苯并咪唑-2-基)-苯胺的采用了HT1080细胞的划痕损伤测定结果的HT1080细胞的显微镜观察照片。(A):刚划伤(scratch)后的照片。(B):在更换成添加了DMSO的培养基后进行划伤12小时后的照片。(C-E):在更换成添加了4-(1H-苯并咪唑-2-基)-苯胺(1 μ M;C,10 μ M;D,100 μ M;E)的培养基后进行划伤12小时后的照片。

[0048] 图9中的(A)、(B)均显示实施例中的乙酰肝素酶活性抑制的筛选的结果。

具体实施方式

[0049] 乙酰肝素酶是存在于各种细胞中,将各种硫酸乙酰肝素蛋白聚糖的硫酸乙酰肝素链特异性分解的酶。在皮肤中,构成表皮的表皮角质形成细胞和真皮的成纤维细胞、血管内皮细胞等中产生。已知在各种癌细胞中其产生也会增加,因此也暗示出与癌的恶性度有关系。已知,如果在癌细胞中乙酰肝素酶的产生较高,则转移性就会较高、血管新生的诱导能力也较高(参照Vlodavsky I., et. al., *Semin Cancer Biol.*, 2002;12(2):121-129(非专利文献3))。在本发明中新发现,对于小皱纹模型,乙酰肝素酶的表达和活性增强,硫酸乙酰肝素链分解。

[0050] 此外,在老年性色素斑组织中,与暴露部位皮肤进行比较,基底膜的硫酸乙酰肝素的分解明显。随着硫酸乙酰肝素的分解,在表皮表达的血管内皮细胞生长因子-A(VEGF-A)失控,由此由于真皮的血管、淋巴管的变化而产生炎症,并使黑素细胞活化。此外,由于在真皮表达的成纤维细胞生长因子-7(FGF-7)失控,因而促进在表皮细胞中从黑素细胞向黑素体转移。即,认为伴随乙酰肝素酶活化的硫酸乙酰肝素的分解通过促进炎症引起的黑素细胞的活化和FGF-7失控引起的黑素细胞转移,来协同地将黑素细胞蓄积在角质形成细胞中。

[0051] 硫酸乙酰肝素蛋白聚糖具有使肝素结合性生长因子(bFGF、HGF、VEGF、HB-EGF等)蓄积在细胞外的作用。作为硫酸乙酰肝素蛋白聚糖之一的串珠素也存在于在表皮和真皮的边界部所存在的表皮基底膜中,在皮肤中,通过使肝素硫酸结合性生长因子与表皮基底膜结合来控制表皮、真皮间的生长因子的移动。此外,已经明确了存在于表皮基底膜的串珠素还可控制生长因子对与基底膜结合的表皮基底细胞的作用,因而是表皮的良好增殖·分化所必须的。

[0052] 因此,认为乙酰肝素酶的活化或表达增强引起的串珠素的硫酸乙酰肝素链的分解会破坏所蓄积的生长因子的释放和表皮、真皮间的生长因子的控制,发生表皮的分化·增殖

失控和真皮的肥厚,这是小皱纹形成的 1 个重要机制。因此,尝试通过外用涂敷抑制乙酰肝素酶活性的苏拉明来抑制皮肤中的乙酰肝素酶活性,结果发现,可抑制硫酸乙酰肝素链的分解,并且可抑制皱纹,特别是小皱纹形成。

[0053] 通过抑制随着皮肤的阻挡破坏而增加的乙酰肝素酶的基因表达、翻译、酶的活化和活化酶可以抑制由皮肤的继续阻挡破坏而引起的皱纹形成,由此控制乙酰肝素酶,从而完成本发明的用于防止或改善皱纹的美容方法,而且,通过使乙酰肝素酶的控制剂通过口服、注射、皮肤外用等途径到达皮肤来完成皱纹形成的防止剂和改善剂。

[0054] 本发明的防止或改善皱纹的物质的特征在于,含有抑制皮肤中存在的乙酰肝素酶的活性的物质、抑制表达的物质、抑制翻译的物质、抑制活化的物质等乙酰肝素酶控制剂作为有效成分。

[0055] 此外,本发明的防止或改善皱纹的美容方法的特征在于,采用口服、注射或外用的方法对皮肤中存在的乙酰肝素酶给予上述乙酰肝素酶控制剂,从而控制皮肤的乙酰肝素酶。

[0056] 此外,作为上述乙酰肝素酶控制物质的实例,可列举抑制乙酰肝素酶的活性的物质,例如苏拉明。

[0057] 本发明还提供包含苏拉明的皱纹改善剂。这些化合物通过抑制乙酰肝素酶的活性而具有防止皱纹形成或改善已形成的皱纹的作用。

[0058] 在本说明书中,“乙酰肝素酶的控制”是指,不仅包括抑制乙酰肝素酶的酶活性,而且包括抑制基因的表达、蛋白质生物合成、抑制乙酰肝素酶的活化等抑制皮肤中的乙酰肝素酶作用的任意作用。

[0059] 本发明的抗皱纹效果的评价方法的特征在于,使人或动物的皮肤、皮肤组织、细胞或酶与被测物质接触,以上述皮肤、组织或细胞中的乙酰肝素酶的酶活性、基因表达水平或硫酸乙酰肝素链的变化作为指标来评价抗皱纹效果。

[0060] 在本说明书中,“抗皱纹效果”是指,防止皱纹的形成或改善已形成的皱纹的任意效果。

[0061] 在本发明的防止或改善皱纹的美容方法中,上述的控制乙酰肝素酶的物质只要是可以实现本发明的目的,就可以以任意形态使用,可以单独应用或与其它任意成分一起配合应用。在应用于皮肤的情况下,对皮肤的位置没有限制,包括含头皮在内的身体表面的所有皮肤。

[0062] 本发明的抗皱纹效果的评价方法包括使人或动物的皮肤、皮肤组织、细胞或酶与被测物质接触的步骤。

[0063] 可以在本评价方法中使用的人或动物的皮肤只要是可以实现本发明目的,就没有特别的限制。认为在本发明的评价方法中,例如,对于小皱纹模型,可以通过确定使被增强的基因表达降低的物质、抑制硫酸乙酰肝素链的分解的物质来有效地确定抗皱纹物质。

[0064] 以乙酰肝素酶的活性作为指标的一次评价可以如下进行:例如在下述实施例中所详细记载的那样,将生物素化了的硫酸乙酰肝素固定在 96 孔板中,然后在药剂、生药的存在下与乙酰肝素酶作用,与过氧化物酶标记的抗生物素蛋白作用、显色,用生物素化硫酸乙酰肝素的减少量来评价乙酰肝素酶活性。在一次评价中具有乙酰肝素酶活性抑制效果的药剂,在不同于一评价的乙酰肝素酶活性作为指标的二次评价中可以进行再现性和浓度依

赖性的评价。二次评价可以采用表达乙酰肝素酶的 HT1080 细胞来进行评价。已知,对于 HT1080 细胞,如果在铺满培养后划伤细胞,则细胞依赖于乙酰肝素酶活性进行迁移(参照 Ishida K., et. al., Mol Cancer Ther., 2004 ;3(9) :1069-1077. (非专利文献 4))。因此,通过添加评价药剂,由划伤部位的迁移(恢复)的程度来评价乙酰肝素酶抑制活性。

[0065] 其结果是,作为显著抑制乙酰肝素酶活性的化合物,发现了 4-(1H- 苯并咪唑 -2- 基)- 苯胺。在现有技术中完全不知道 4-(1H- 苯并咪唑 -2- 基)- 苯胺及其衍生物会显示乙酰肝素酶活性抑制作用、抗老化作用。需说明的是,“抗老化”是指,通过抑制与年龄增长、光老化引起的基底膜蛋白聚糖的硫酸乙酰肝素的分解所导致的硫酸乙酰肝素结合性生长因子的游离相伴的皮肤变化,具体为表皮分化异常、真皮血管新生、淋巴管扩张、弹性蛋白分解,来防止和改善皮肤的皱纹、松弛、硬化等,维持有弹力的年轻健康的肌肤状态。

[0066] 此外,进一步筛选的结果是,发现了显著抑制乙酰肝素酶活性的生药缬草提取物、扁柏提取物、猕猴桃提取物、柠檬提取物、番茄提取物、大蒜提取物、百合提取物、滨海前胡(牡丹防风)提取物、橙皮提取物、无患子提取物、欧芹提取物、大枣提取物、陈皮提取物和荨麻提取物。在现有技术中也完全不知道这些生药会显示出乙酰肝素酶活性抑制作用、抗老化作用。

[0067] 缬草提取物是属于败酱科缬草属 (Valeriana) 的多年生草本的缬草 (V. fauriei) 或其它近缘种的根和根茎提取得到的提取液。作为上述近缘种,可列举柔垂缬草 (V. flaccidissima)、宽叶缬草 (V. officinalis) 等。

[0068] 扁柏提取物是从属于柏科的扁柏属 (Chamaecyparis)、罗汉柏属 (Thujopsis) 的植物的、被称为天然扁柏、天然罗汉柏等树木的叶、枝和木材部分提取得到的、以桧木醇 (2- 羟基 -4- 异丙基 -2,4,6- 环庚三烯 -1- 酮 ;Hinokitiol) 作为主成分的提取液。桧木醇具有抗菌·杀菌·防虫·防霉·防腐等效果。作为上述天然扁柏,具体地优选使用日本产扁柏 (Chamaecyparis obtuse)、分布在台湾的中央山脉的台湾扁柏 (Chamaecyparis obtuse var. formosana, 或 C. taiwanensis) 等。作为上述天然罗汉柏,优选使用罗汉柏 (Thujopsis delabrata)、作为变种的罗汉柏 (T. d. var. hondae) 等。对于天然罗汉柏,在青森县生长的所谓津轻罗汉柏(也被称为陆奥罗汉柏、青森罗汉柏)是有名的。

[0069] 猕猴桃提取物是从属于猕猴桃科猕猴桃属 (Actinidia) 的猕猴桃 (A. chinensis) 的果实提取得到的提取液。除了包含维生素 C 以外,还包含蛋白质分解酶、氨基酸、丹宁、糖类等天然植物成分,具有保湿作用、收敛作用、皮肤软化作用、抗氧化作用。

[0070] 柠檬提取物是从属于芸香科柑橘属 (Citrus) 的柠檬 (C. limon) 的果实提取得到的提取液。包含维生素 A、维生素 B、维生素 C、维生素 P 等。具有美白、消炎效果。

[0071] 番茄提取物是从属于茄科番茄属 (Lycopersicon) 的番茄 (L. esculenrum) 的果皮、果实提取得到的提取液。特别是果皮中包含番茄特有的多酚,具有抗过敏活性。

[0072] 大蒜提取物是从属于百合科葱属 (Allium) 的大蒜 (A. sativum, 或 A. scorodoplasum) 的鳞茎提取获得的提取液。包含蒜素、增精素 (Scordinin)、酶、维生素类等,具有减轻疲劳·健胃·整肠作用等。大蒜的蒜素具有较强的杀菌、抗菌力,增精素具有强壮作用、促进新陈代谢,也具有提高维生素 B1 的效果的作用。

[0073] 百合提取物是从属于百合科百合属 (Lilium) 的圣母百合 (L. candidum。别名 Madonna lily) 的球根提取得到的提取液。除了包含花色苷、氧化酶以外,还包含大量淀

粉,具有保湿作用、保护作用、软化作用。

[0074] 滨海前胡(牡丹防风)提取物是从属于伞形科前胡属(*Peucedanum*)的植物、冲绳县野生的常绿多年生草本滨海前胡(牡丹防风)(*P. japonicum*)的叶和茎提取得到的提取液。大量包含胡萝卜素、维生素C、维生素E,具有抗氧化作用。

[0075] 橙皮提取物是从属于芸香科柑橘属(*Citrus*)的橙(*C. aurantium*)的果皮提取得到的提取液。将橙的成熟果皮称为橙皮(トウヒ)。橙皮提取物中包含1,8-萜二烯、橙皮苷、油性成分等。具有镇静效果、肌功能活化效果。

[0076] 无患子提取物是从属于无患子科无患子属(*Sapindus*)的无患子(*S. mkorossi*)的果皮提取得到的提取液。包含作为天然表面活性剂的无患子皂苷,除了具有洗涤效果以外,还具有抗炎症作用、抗菌作用。

[0077] 欧芹提取物是从属于伞形科欧芹属(*Petroselinum*)的欧洲原产的多年生草本欧芹(*P. crispum*)的叶提取得到的提取液。作为主成分,包含芹菜脑、肉豆蔻醚等。芹菜脑具有利尿作用。

[0078] 大枣提取物是从属于鼠李科枣属(*Ziziphus*)的枣(*Z. jujuba* var. *inermis*)的果实提取得到的提取液。作为主成分,除了包含皂苷、果糖等糖类、有机酸类以外,还包含作为核酸相关物质的环AMP等。该环AMP具有皮脂组织蛋白质的新生(再生)、皮脂分泌调节等作用。

[0079] 陈皮提取物是从属于中药的陈皮(陳皮)的、在日本属于芸香科柑橘属(*Citrus*)的温州蜜柑(*C. unshiu*),在中国为茶枝柑(*C. chachiensis*)等的果皮提取得到的提取液。多酚极多,具有抗炎症作用、促进血液循环作用。

[0080] 荨麻提取物是从属于荨麻科荨麻属(*Urtica*)的在山区背阴地方野生的多年生草本荨麻(*U. thunbergiana*、或*U. dioica*)的叶提取得到的提取液。具有收敛作用、除臭作用。

[0081] 上述各植物提取物可以通过常规方法获得,例如,可以将作为各提取物起源的植物与提取溶剂一起浸渍或加热回流,然后过滤、浓缩而获得。作为提取溶剂,只要是通常提取中使用的溶剂,就可以任意使用,可以将例如水、甲醇、乙醇、丙二醇、1,3-丁二醇、甘油等醇类,含水醇类、氯仿、二氯乙烷、四氯化碳、丙酮、乙酸乙酯、己烷等有机溶剂等分别单独使用或组合使用。上述溶剂提取得到的提取物原样或浓缩而得的提取物,可以采用吸附法例如离子交换树脂来除去杂质后使用,也可以采用多孔聚合物(例如アンバーライト XAD-2)的柱吸附,然后用甲醇或乙醇溶出、浓缩后使用。此外,还可使用对提取得到的提取物采用水蒸气蒸馏、分配法例如用水/乙酸乙酯提取的组合方法进行处理而获得的提取物等。

[0082] 上述各植物提取物的安全性高,并具有优异的乙酰肝素酶活性抑制作用。因此,对乙酰肝素酶活性引起的各种症状和疾病、病态等的治疗、预防、改善等有用。特别是,优选应用于基于抑制皮肤中的乙酰肝素酶活性的抗老化。更详细地说,优选应用于抑制年龄增长、光老化等引起的基底膜蛋白聚糖的硫酸乙酰肝素链的分解所引起的肝素结合性生长因子(HBGF)失控、和与由此引起的HBGF的游离(释放)相伴的皮肤变化,防止、改善皮肤的皱纹、松弛、硬化等,维持有弹力的年轻健康的肌肤状态等。

[0083] 在将本发明的乙酰肝素酶活性抑制剂配合至皮肤外用剂的情况下,在外用剂总量中上述各乙酰肝素酶活性抑制剂的配合量以干燥质量(固体成分质量)计优选为0.0001~1质量%,特别是0.0001~0.2质量%。如果低于0.0001质量%,则难以充分发

挥本发明的效果,另一方面,即使配合大于 1 质量%,也不会观察到那么大的效果的提高,而且难以制剂化,因此不优选。

[0084] 在将本发明的乙酰肝素酶活性抑制剂应用于例如皮肤外用剂的情况下,除了上述必须成分以外,在不破坏本发明效果的范围内,还可以根据需要适当配合通常化妆品、医药品等外用剂中使用的成分,例如,美白剂、保湿剂、抗氧化剂、油性成分、紫外线吸收剂、表面活性剂、增稠剂、醇类、粉末成分、着色剂、水性成分、水、各种皮肤营养剂等。

[0085] 此外,还可以适当配合乙二胺四乙酸二钠、乙二胺四乙酸三钠、柠檬酸钠、多磷酸钠、偏磷酸钠、葡糖酸等金属离子封锁剂,对羟基苯甲酸甲酯、对羟基苯甲酸乙酯、对羟基苯甲酸丁酯等防腐剂,咖啡因、丹宁、维拉帕米、凝血酸及其衍生物,甘草提取物、光甘草定、木瓜果实的热水提取物、各种生药、乙酸生育酚、甘草酸及其衍生物或其盐等药剂,维生素 C、抗坏血酸磷酸镁、抗坏血酸葡糖苷、熊果苷、曲酸等美白剂,葡萄糖、果糖、甘露糖、蔗糖、海藻糖等糖类,视黄酸、视黄醇、乙酸视黄醇酯、十六烷酸视黄醇酯等维生素 A 衍生物类等。

[0086] 此外,该皮肤外用剂可以是应用于外皮的化妆品、准药品等,特别优选广泛应用于化妆品,其剂型只要是可以应用于皮肤,就可以是任何剂型,适用溶液系、增溶系、乳化系、粉末分散系、水-油二层系、水-油-粉末三层系、软膏、化妆水、凝胶、气雾剂等任意剂型。

[0087] 使用形态也是任意的,可以以例如化妆水、乳液、霜、面膜等面部化妆品,粉底、口红、眼影等彩妆 (make-up) 化妆品,芳香化妆品、浴用剂等使用。

[0088] 此外,如果是彩妆化妆品,则可以以粉底等、作为化妆用具制品的美体皂、肥皂等形态广泛应用。此外,如果是准药品,则可以以各种软膏剂等形态广泛应用。而且,本发明的乙酰肝素酶活性抑制剂可采用的形态不限于这些剂型和形态。

[0089] 在使用本发明的乙酰肝素酶活性抑制剂作为医药制剂的情况下,该制剂适合于口服或非口服(静脉给药、腹腔内给药等)。剂型也是任意的,可以通过公知的方法来适当配制成例如片剂、颗粒剂、散剂、胶囊剂等口服用固体制剂,内服液剂、糖浆剂等口服用液体制剂,或注射剂等非口服用液体制剂等任意形态。这些医药制剂中可以适当使用通常使用的粘合剂、崩解剂、增稠剂、分散剂、再吸收促进剂、矫味剂、缓冲剂、表面活性剂、助溶剂、保存剂、乳化剂、等渗剂、稳定剂、pH 调节剂等赋形剂。

实施例

[0090] 以下,列举实施例来具体地说明本发明,但是本发明不限于下述实施例。

[0091] 乙酰肝素酶抑制剂苏拉明的抗皱纹效果的评价

[0092] 采用小皱纹模型(非专利文献 2)来研究作为乙酰肝素酶抑制剂的苏拉明的抗皱纹效果。

[0093] 如图 1 所示,在小皱纹模型中,乙酰肝素酶基因的表达上升了。如图 2 所示,在第 7 天的皮肤中,表皮·真皮接合部中存在的表皮基底膜上的硫酸乙酰肝素链的染色基本上消失了。

[0094] 在形成小皱纹的 2 周中,将苏拉明以 1mM 溶解在 50%乙醇水溶液中,将其每周 3 次每次 100 μ l 涂敷在小皱纹模型的皮肤上。涂敷 50%乙醇水溶液作为溶剂对照。

[0095] 通过视觉判定 2 周后的皱纹的发生状况来进行评分。皱纹的发生状况的评价基准为“无皱纹 ;0”,“浅皱纹 ;1”,“明显皱纹 ;2”,“深皱纹 ;3”,以 0.5 间隔进行记分。分数越

大,表示皱纹越深。计算各组的平均值和标准偏差,结果示于图 3。溶剂对照的分数的平均值为 0.78,与此相对,苏拉明为 0.31,将它们与溶剂对照进行比较,结果显示显著的皱纹抑制效果。即,对于皱纹分数,通过涂敷 1mM 苏拉明,与涂敷了 50%乙醇的溶剂对照进行比较,显示出显著抑制皱纹形成。

[0096] 接下来,对 2 天、1 周、2 周后的皮肤进行硫酸乙酰肝素链的免疫染色,染色结果示于图 4。溶剂对照的皮肤在 2 天至 1 周之后基底膜的硫酸乙酰肝素链的染色降低,而通过涂敷苏拉明保护了基底膜的硫酸乙酰肝素链的染色性。

[0097] 由这些结果可知,苏拉明通过抑制乙酰肝素酶来抑制小皱纹形成。

[0098] 乙酰肝素酶抑制剂 1-[4-(1H-苯并咪唑-2-基)-苯基]-3-[4-(1H-苯并咪唑-2-基)-苯基]-脲的抗皱纹效果的评价

[0099] 对作为乙酰肝素酶特异性抑制剂已知的 1-[4-(1H-苯并咪唑-2-基)-苯基]-3-[4-(1H-苯并咪唑-2-基)-苯基]-脲 (W. Pan, et. al., Bioorg. Med. Chem. Lett., 2006;(16):409-412。(非专利文献 5)) 的抗皱纹效果进行研究。

[0100] 将 1-[4-(1H-苯并咪唑-2-基)-苯基]-3-[4-(1H-苯并咪唑-2-基)-苯基]-脲与苏拉明同样地以 1mM 溶解在 50%乙醇水溶液中,每次 100 μ l 分次涂敷在皮肤上。作为溶剂对照,涂敷 50%乙醇水溶液。

[0101] 通过视觉来判定 2 周后的皱纹的发生状况进行评分。皱纹的发生状况的评价基准为“无皱纹;0”,“浅皱纹;1”,“明显皱纹;2”,“深皱纹;3”,以 0.5 间隔进行记分。分数越大,表示皱纹越深。计算各组的平均值和标准偏差,结果示于图 5。涂敷溶剂对照(50%乙醇水溶液)的分数的平均值为 1.31,与此相对,1-[4-(1H-苯并咪唑-2-基)-苯基]-3-[4-(1H-苯并咪唑-2-基)-苯基]-脲为 0.36,因而显著地抑制了皱纹形成。

[0102] 接下来,进行皮肤中的硫酸乙酰肝素链和串珠素核心蛋白质的免疫染色,染色结果示于图 6。对于溶剂对照,基底膜的硫酸乙酰肝素链的染色性显著降低,但是对于 1-[4-(1H-苯并咪唑-2-基)-苯基]-3-[4-(1H-苯并咪唑-2-基)-苯基]-脲涂敷组,基底膜的硫酸乙酰肝素链的染色性得以保护。

[0103] 由这些结果可知,1-[4-(1H-苯并咪唑-2-基)-苯基]-3-[4-(1H-苯并咪唑-2-基)-苯基]-脲通过抑制乙酰肝素酶来抑制小皱纹形成。

[0104] 乙酰肝素酶活性抑制的筛选 (1)

[0105] 一次评价

[0106] 以乙酰肝素酶活性抑制作为指标的评价

[0107] 采用加入 10%血清的 DMEM 培养基对 A431 细胞(浸润性人上皮癌细胞)进行培养。培养细胞采用 Lysis Buffer(50mM Tris,0.5% TritonX-100,0.15M NaCl, pH4.5) 增溶,采用刮刀回收,然后进行冲吸(pipetting),使其在冰上静置 30 分钟。然后,通过以 10,000rpm 离心 10 分钟来除去不溶解物,将上清液作为细胞提取液。细胞提取液中的蛋白量采用 BCAProtein Assay Kit(PIERCE, CA46141) 来测定。

[0108] 将细胞提取液采用测定 Buffer(50mM HEPES,50mM CH_3COONa ,150mM NaCl,9mM CaCl_2 ,0.1% BSA) 稀释成规定浓度,添加 4-(1H-苯并咪唑-2-基)-苯胺,进行混合,然后在固定了生物素化硫酸乙酰肝素的板中以 100 μ l/孔进行接种。在 37 $^{\circ}\text{C}$ 下使其反应 2 小时,用 PBS-T 洗涤 3 次,然后以 100 μ l/孔接种 10,000 倍稀释 HRP-抗生物素蛋白(Vector,

A-2004)/PBS-T, 在 37°C 下使其反应 1 小时。再次采用 PBS-T 洗涤 3 次, 以 100 μ L/ 孔接种 TMB 试剂 (BIO-RAD, 172-1066) 使其反应, 用 1N H_2SO_4 使反应停止, 然后测定 OD475nm (参照特表 2003-502054 (专利文献 3))。

[0109] 乙酰肝素酶活性, 由 A431 细胞提取液的标准曲线来计算活性, 通过相对于不添加药剂提取物的资料 (对照) 的值, 显示出抑制率 (%)。

[0110] 结果可知, 4-(1H- 苯并咪唑 -2- 基)- 苯胺浓度依赖地有效抑制乙酰肝素酶活性。该结果示于图 7。对照是使 DMSO 代替候选药剂进行作用的物质。

[0111] $IC_{50} = 256 \mu M$

[0112] 二次评价

[0113] 采用了 HT1080 细胞的划痕损伤测定法

[0114] 将 HT1080 细胞以 50 万个细胞 / 孔接种至 6 孔板中, 24 小时后更换成添加了各药剂的培养基, 采用 1000 μ L 枪头垂直地划伤。6 小时后拍摄照片, 观察划伤部位的变化。结果可知, 对于 4-(1H- 苯并咪唑 -2- 基)- 苯胺添加组, 细胞迁移活性浓度依赖地降低, 抑制乙酰肝素酶活性。该结果示于图 8。对照是使 DMSO 代替候选药剂发挥作用的物质。

[0115] 乙酰肝素酶活性抑制的筛选 (2)

[0116] 1. 样品的配制

[0117] (1) 植物提取物

[0118] 如表 1 所示, 将各植物分别在室温下在同表记载的溶剂中浸渍 1 周, 从而获得提取液。将该提取液进行浓缩来获得各植物提取物。

[0119] [表 1]

植物名称	部位	植物使用量 (g)	溶剂	溶剂使用量 (mL)	植物提取物产量 (g)
缬草 (<i>Valeriana fauriei</i>)	根茎	100	水	1000	缬草提取物 (17.2g)
扁柏 (<i>Chamaecyparis obtuse</i>)	干	500	水	5000	扁柏提取物 (1.3g)
猕猴桃 (<i>Actinidia chinensis</i>)	果实	100	30%乙醇水	1000	猕猴桃提取物 (10.5g)
柠檬 (<i>Citrus limon</i>)	果实	200	30%乙醇水	1000	柠檬提取物 (9.8g)
番茄 (<i>Lycopersicon esculentum</i>)	果实	200	水	1000	蕃茄提取物 (5.0g)
大蒜 (<i>Allium sativum</i>)	鳞茎	100	30%乙醇水	1000	大蒜提取物 (11.0g)
圣母百合 (<i>Lilium candidum</i>)	球根	100	80%乙醇水	1000	百合提取物 (6.9g)
滨海前胡(牡丹防风) (<i>Peucedanum japonicum</i>)	叶和茎	100	甲醇	1000	滨海前胡提取物 (13.2g)
橙 (<i>Citrus aurantium</i>)	果皮	100	30%乙醇水	1000	橙皮提取物 (38.0g)
无患子 (<i>Sapindus mukorossi</i>)	果皮	100	80%乙醇水	1000	无患子提取物 (7.3g)
欧芹 (<i>Petroselinum crispum</i>)	叶	100	50%乙醇水	1000	欧芹提取物 (1.6g)
枣 (<i>Ziziphus jujuba</i>)	果实	100	10%乙醇水	1000	大枣提取物 (42.0g)
温州蜜柑 (<i>Citrus unshiu</i>)	果皮	100	水	1000	陈皮提取物 (12.5g)
荨麻 (<i>Urtica thunbergiana</i>)	叶	100	80%乙醇水	1000	荨麻提取物 (8.4g)

[0120]

[0121] (2) 样品溶液

[0122] 将上述植物提取物溶解在二甲基亚砜 (DMSO) 中,使浓度为 1 质量%,从而制成含植物提取物的溶液。

[0123] 将该含植物提取物的溶液分别用测定用缓冲液 (包含 0.4M NaCl、10mM CaCl₂ 的 pH 值为 7.4 的 0.1M Tris) 稀释,将浓度分别调整成 0.05v/v%、0.5v/v%、5v/v%,使用它们作为样品溶液进行以下实验。

[0124] 2. 乙酰肝素酶抑制效果的评价方法及其结果

[0125] 采用上述植物提取物的样品溶液代替 4-(1H-苯并咪唑-2-基)-苯胺,按照上述一次和二次评价方法,对这些植物提取物进行乙酰肝素酶抑制效果的评价。

[0126] 结果示于图 1(A)、(B)。

[0127] 由图 1(A)、(B) 所示的结果证实,本发明中使用的缬草提取物、扁柏提取物、猕猴桃提取物、柠檬提取物、番茄提取物、大蒜提取物、百合提取物、滨海前胡(牡丹防风)提取物、橙皮提取物、无患子提取物、欧芹提取物、大枣提取物、陈皮提取物和荨麻提取物有效地抑制乙酰肝素酶活性。

[0128] 接下来显示处方例。需说明的是,以下的“POE”是指“聚氧乙烯”。

[0129] (配合处方例 1:霜)

[0130] (配合成分)

(质量%)

[0131] (1) 硬脂酸

3.0

[0132] (2) 硬脂醇

5.0

- | | | |
|--------|--|-------|
| [0133] | (3) 肉豆蔻酸异丙酯 | 18.0 |
| [0134] | (4) 甘油单硬脂酸酯 | 3.0 |
| [0135] | (5) 丙二醇 | 10.0 |
| [0136] | (6) 本乙酰肝素酶活性抑制剂(缬草提取物(50%乙醇水提取物。以固体成分换算)) | 1.0 |
| [0137] | (7) 氢氧化钾 | 0.2 |
| [0138] | (8) 亚硫酸氢钠 | 0.01 |
| [0139] | (9) 防腐剂 | 适量 |
| [0140] | (10) 香料 | 适量 |
| [0141] | (11) 离子交换水 | 残余 |
| [0142] | (制法) | |
| [0143] | 向(11)中加入(5)~(7)溶解,加热,保持70℃(水相)。将(1)~(4)、(8)~(10)混合,加热熔化,保持70℃(油相)。向水相中缓慢加入油相,全部添加完后保持该温度片刻,使其反应。此后,用均质混合机均匀地乳化,在充分搅拌下冷却至30℃。 | |
| [0144] | (配合处方例2:霜) | |
| [0145] | (配合成分) | (质量%) |
| [0146] | (1) 硬脂酸 | 2.0 |
| [0147] | (2) 硬脂醇 | 7.0 |
| [0148] | (3) 氢化羊毛脂 | 3.0 |
| [0149] | (4) 角鲨烷 | 4.0 |
| [0150] | (5) 2-辛基十二烷醇 | 6.0 |
| [0151] | (6) POE(25摩尔)鲸蜡醇醚 | 3.0 |
| [0152] | (7) 甘油单硬脂酸酯 | 2.0 |
| [0153] | (8) 丙二醇 | 6.0 |
| [0154] | (9) 本乙酰肝素酶活性抑制剂(扁柏提取物(70%乙醇水提取物。以固体成分换算)) | 0.2 |
| [0155] | (10) 亚硫酸氢钠 | 0.03 |
| [0156] | (11) 对羟基苯甲酸乙酯 | 0.3 |
| [0157] | (12) 香料 | 适量 |
| [0158] | (13) 离子交换水 | 残余 |
| [0159] | (制法) | |
| [0160] | 向(13)中加入(8),加热,保持70℃(水相)。将(1)~(7)、(9)~(12)混合,加热熔化,保持70℃(油相)。向水相中加入油相进行预乳化,用均质混合机均匀地乳化,然后在充分搅拌下冷却至30℃。 | |
| [0161] | (配合处方例3:霜) | |
| [0162] | (配合成分) | (质量%) |
| [0163] | (1) 固体石蜡 | 5.0 |
| [0164] | (2) 蜂蜡 | 10.0 |
| [0165] | (3) 凡士林 | 15.0 |

[0166]	(4) 液体石蜡	41.0
[0167]	(5) 甘油单硬脂酸酯	2.0
[0168]	(6) POE(20 摩尔) 失水山梨糖醇单月桂酸酯	2.0
[0169]	(7) 皂粉末	0.1
[0170]	(8) 硼砂	0.2
[0171]	(9) 本乙酰肝素酶活性抑制剂(猕猴桃提取物(乙醇提取物。以固体成分换算))	0.5
[0172]	(10) 亚硫酸氢钠	0.03
[0173]	(11) 对羟基苯甲酸乙酯	0.3
[0174]	(12) 香料	适量
[0175]	(13) 离子交换水	残余
[0176]	(制法)	

[0177] 向(13)水中加入(7)、(8),加热溶解,保持70℃(水相)。将(1)~(6)、(9)~(12)混合,加热熔化,保持70℃(油相)。在搅拌下将油相缓慢加入水相进行反应。反应结束后,用均质混合机均匀地乳化,乳化后在充分搅拌下冷却至30℃。

[0178] (配合处方例4:乳液)

[0179] (配合成分) (质量%)

[0180]	(1) 硬脂酸	2.5
[0181]	(2) 鲸蜡醇	1.5
[0182]	(3) 凡士林	5.0
[0183]	(4) 液体石蜡	10.0
[0184]	(5) POE(10 摩尔) 单油酸酯	2.0
[0185]	(6) 聚乙二醇 1500	3.0
[0186]	(7) 三乙醇胺	1.0
[0187]	(8) 羧基乙烯基聚合物	0.05
[0188]	(9) 本乙酰肝素酶活性抑制剂(柠檬提取物(50% 1,3-丁二醇水提取物。以固体成分换算))	0.03
[0189]	(10) 亚硫酸氢钠	0.01
[0190]	(11) 对羟基苯甲酸乙酯	0.3
[0191]	(12) 香料	适量
[0192]	(13) 离子交换水	残余
[0193]	(制法)	

[0194] 在少量的(13)中溶解(8)(A相)。向剩余的(13)中加入(6)、(7),加热溶解,保持70℃(水相)。将(1)~(5)、(9)~(12)混合,加热熔化,保持70℃(油相)。向水相中加入油相进行预乳化,加入A相,用均质混合机均匀乳化,乳化后在充分搅拌下冷却至30℃。

[0195] (配合处方例5:乳液)

[0196] (配合成分) (质量%)

[0197]	(1) 微晶蜡	1.0
[0198]	(2) 蜂蜡	2.0

[0199]	(3) 羊毛脂	20.0
[0200]	(4) 液体石蜡	10.0
[0201]	(5) 角鲨烷	5.0
[0202]	(6) 失水山梨糖醇倍半油酸酯	4.0
[0203]	(7) POE(20 摩尔) 失水山梨糖醇单油酸酯	1.0
[0204]	(8) 丙二醇	7.0
[0205]	(9) 本乙酰肝素酶活性抑制剂(番茄提取物(70% 1,3-丁二醇水提取物。以固体成分换算))	0.2
[0206]	(10) 亚硫酸氢钠	0.01
[0207]	(11) 对羟基苯甲酸乙酯	0.3
[0208]	(12) 香料	适量
[0209]	(13) 离子交换水	残余
[0210]	(制法)	
[0211]	向(13)中加入(8),加热,保持70℃(水相)。将(1)~(7)、(9)~(12)混合,加热熔化,保持70℃(油相)。在搅拌下将水相缓慢加入油相中,用均质混合机均匀乳化。乳化后在充分搅拌下冷却至30℃。	
[0212]	(配合处方例6:凝胶)	
[0213]	(配合成分)	(质量%)
[0214]	(1)95%乙醇	10.0
[0215]	(2) 双丙甘醇	15.0
[0216]	(3) POE(50 摩尔) 油醇醚	2.0
[0217]	(4) 羧基乙烯基聚合物	1.0
[0218]	(5) 氢氧化钠	0.15
[0219]	(6) L-精氨酸	0.1
[0220]	(7) 本乙酰肝素酶活性抑制剂(大蒜提取物(50%乙醇水提取物。以固体成分换算))	1.0
[0221]	(8) 2-羟基-4-甲氧基二苯甲酮磺酸钠	0.05
[0222]	(9) 乙二胺四乙酸三钠·2H ₂ O	0.05
[0223]	(10) 对羟基苯甲酸甲酯	0.2
[0224]	(11) 香料	适量
[0225]	(12) 离子交换水	残余
[0226]	(制法)	
[0227]	在(12)中均匀地溶解(4)(水相)。另一方面,在(1)中溶解(7)、(3)(醇相)。将该醇相添加至水相中。然后,向其中加入(2)、(8)~(11),然后用(5)、(6)来中和并增稠。	
[0228]	(配合处方例7:美容液)	
[0229]	(配合成分)	(质量%)
[0230]	(A相)	
[0231]	(1)95%乙醇	10.0

[0232]	(2) POE(20 摩尔) 辛基十二烷醇	1.0
[0233]	(3) 泛醇乙醚	0.1
[0234]	(4) 本乙酰肝素酶活性抑制剂(百合提取物(50% 1,3-丁二醇水提取物。以固体成分换算))	0.0225
[0235]	(5) 对羟基苯甲酸甲酯	0.15
[0236]	(B 相)	
[0237]	(6) 氢氧化钾	0.1
[0238]	(C 相)	
[0239]	(7) 甘油	5.0
[0240]	(8) 双丙甘醇	10.0
[0241]	(9) 亚硫酸氢钠	0.03
[0242]	(10) 羧基乙烯基聚合物	0.2
[0243]	(11) 纯化水	残余
[0244]	(制法)	
[0245]	将 A 相、C 相分别均匀地溶解,向 C 相中加入 A 相以增溶。接着,加入 B 相,然后进行填充。	
[0246]	(配合处方例 8:面膜)	
[0247]	(配合成分)	(质量%)
[0248]	(A 相)	
[0249]	(1) 双丙甘醇	5.0
[0250]	(2) POE(60 摩尔) 硬化蓖麻油	5.0
[0251]	(B 相)	
[0252]	(3) 本乙酰肝素酶活性抑制剂(滨海前胡提取物(70%乙醇水提取物。以固体成分换算))	0.0005
[0253]	(4) 橄榄油	5.0
[0254]	(5) 乙酸生育酚	0.2
[0255]	(6) 对羟基苯甲酸乙酯	0.2
[0256]	(7) 香料	0.2
[0257]	(C 相)	
[0258]	(8) 亚硫酸氢钠	0.03
[0259]	(9) 聚乙烯醇(皂化度为 90,聚合度为 2,000)	13.0
[0260]	(10) タノール	7.0
[0261]	(11) 纯化水	残余
[0262]	(制法)	
[0263]	将 A 相、B 相、C 相分别均匀地溶解,向 A 相中加入 B 相以增溶。接着,将其加入 C 相中,然后进行填充。	
[0264]	(配合处方例 9:固体粉底)	
[0265]	(配合成分)	(质量%)
[0266]	(1) 滑石	43.1

[0267]	(2) 高岭土	15.0
[0268]	(3) 绢云母	10.0
[0269]	(4) 氧化锌	7.0
[0270]	(5) 二氧化钛	3.8
[0271]	(6) 氧化铁黄	2.9
[0272]	(7) 氧化铁黑	0.2
[0273]	(8) 角鲨烷	8.0
[0274]	(9) 异硬脂酸	4.0
[0275]	(10) 单油酸 POE 失水山梨糖醇酯	3.0
[0276]	(11) 辛酸异鲸蜡醇酯	2.0
[0277]	(12) 本乙酰肝素酶活性抑制剂 (橙皮提取物 (乙醇提取物。以固体成分换算))	
0.00001		
[0278]	(13) 防腐剂	适量
[0279]	(14) 香料	适量
[0280]	(制法)	
[0281]	将 (1) ~ (7) 的粉末成分用搅拌器充分混合, 向其中加入 (8) ~ (11) 的油性成分、(12)、(13)、(14) 进行充分混炼, 然后填充至容器, 成型。	
[0282]	(配合处方例 10: 乳化型粉底 (霜型))	
[0283]	(配合成分)	(质量%)
[0284]	(粉体部)	
[0285]	(1) 二氧化钛	10.3
[0286]	(2) 绢云母	5.4
[0287]	(3) 高岭土	3.0
[0288]	(4) 氧化铁黄	0.8
[0289]	(5) 氧化铁红	0.3
[0290]	(6) 氧化铁黑	0.2
[0291]	(油相)	
[0292]	(7) 十甲基环五硅氧烷	11.5
[0293]	(8) 液体石蜡	4.5
[0294]	(9) POE 改性二甲基聚硅氧烷	4.0
[0295]	(水相)	
[0296]	(10) 纯化水	46.5
[0297]	(11) 1,3-丁二醇	4.5
[0298]	(12) 本乙酰肝素酶活性抑制剂 (无患子提取物 (30% 1,3-丁二醇水提取物。以固体成分换算))	0.0025
[0299]	(13) 失水山梨糖醇倍半油酸酯	3.0
[0300]	(14) 防腐剂	适量
[0301]	(15) 香料	适量
[0302]	(制法)	

[0303] 在加热搅拌水相后,添加充分混合粉碎后的粉体部并进行均质混合处理。再加入加热混合后的油相进行均质混合处理,然后在搅拌下添加香料并冷却至室温。

[0304] (配合处方例 11:乳液)

[0305] (配合成分)	(质量%)
[0306] (1) 二异硬脂酸甘油酯	15.0
[0307] (2) 角鲨烷	2.0
[0308] (3) 聚二甲基硅氧烷	2.0
[0309] (4) 硬脂醇	3.0
[0310] (5) 本乙酰肝素酶活性抑制剂(欧芹提取物(90%乙醇水提取物。以固体成分换算))	1.0
[0311] (6) 硬脂酰甲基牛磺酸钠	1.0
[0312] (7) POE(20) 山萘基醚	0.5
[0313] (8) 甘油	5.0
[0314] (9) 1,3-丁二醇	5.0
[0315] (10) 羧基乙烯基聚合物	0.2
[0316] (11) 防腐剂	适量
[0317] (12) 纯化水	残余

[0318] (制法)

[0319] 将均匀溶解(8)~(12)得到的混合物加热至60℃,在搅拌下向其中添加在70℃下(1)~(7)的混合物,使其均匀分散,冷却至30℃,从而获得乳液。

[0320] (配合处方例 12:化妆水)

[0321] (配合成分)	(质量%)
[0322] (1) 乙醇	5.0
[0323] (2) 甘油	0.5
[0324] (3) 双丙甘醇	2.0
[0325] (4) 1,3-丁二醇	5.5
[0326] (5) 柠檬酸	0.02
[0327] (6) 柠檬酸钠	0.08
[0328] (7) 六偏磷酸钠	0.03
[0329] (8) 羟丙基-β-环糊精	0.1
[0330] (9) 本乙酰肝素酶活性抑制剂(大枣提取物(70% 1,3-丁二醇水提取物。以固体成分换算))	0.015
[0331] (10) 薰衣草油	0.1
[0332] (11) 藻酸钠	0.001
[0333] (12) 纯化水	残余

[0334] (制法)

[0335] 根据常规方法使上述各成分混合溶解,从而获得化妆水。

[0336] (配合处方例 13:乳液)

[0337] (配合成分) (质量%)

[0338]	(1) 二甲基聚硅氧烷	3.0
[0339]	(2) 十甲基环五硅氧烷	4.0
[0340]	(3) 乙醇	5.0
[0341]	(4) 甘油	6.0
[0342]	(5) 1,3- 丁二醇	5.0
[0343]	(6) POE 甲基葡糖苷	3.0
[0344]	(7) 角鲨烷	2.0
[0345]	(8) 氢氧化钾	0.1
[0346]	(9) 六偏磷酸钠	0.05
[0347]	(10) 本乙酰肝素酶活性抑制剂 (陈皮提取物 (70%乙醇水提取物。以固体成分换算))	0.0002
[0348]	(11) 黄原胶	0.3
[0349]	(12) 羧基乙烯基聚合物	0.1
[0350]	(13) 丙烯酸烷基酯 / 甲基丙烯酸烷基酯共聚物	0.1
[0351]	(14) 对羟基苯甲酸甲酯	适量
[0352]	(15) 香料	适量
[0353]	(16) 纯化水	残余
[0354]	(制法)	
[0355]	向 (16) 中加入 (9)、(12)、(13) 使其溶解,再混合 (10) 和 (4) ~ (6)。向其中添加在 (3) 中加入了 (14)、(11)、(15) 并溶解而得的混合物,进行混合,再加入 (1)、(2)、(7) 的混合液并乳化,用 (8) 来中和并增稠。	
[0356]	(配合处方例 14 :乳液)	
[0357]	(配合成分)	(质量%)
[0358]	(1) 凡士林	1.0
[0359]	(2) 二甲基聚硅氧烷	3.0
[0360]	(3) 甲基苯基聚硅氧烷	3.0
[0361]	(4) 硬脂醇	0.5
[0362]	(5) 甘油	7.0
[0363]	(6) 双丙甘醇	3.0
[0364]	(7) 1,3- 丁二醇	7.0
[0365]	(8) 角鲨烷	1.0
[0366]	(9) 异硬脂酸	0.5
[0367]	(10) 硬脂酸	0.5
[0368]	(11) 单硬脂酸聚氧乙烯甘油酯	1.0
[0369]	(12) 单硬脂酸甘油酯	2.0
[0370]	(13) 氢氧化钾	0.05
[0371]	(14) 本乙酰肝素酶活性抑制剂 ((荨麻提取物 (乙醇提取物。以固体成分换算))	1.0
[0372]	(15) EDTA 三钠	0.05

[0373]	(16) 羧基乙烯基聚合物	0.1
[0374]	(17) 苯氧基乙醇	适量
[0375]	(18) 香料	适量
[0376]	(19) 纯化水	残余
[0377]	(制法)	

[0378] 向 (19) 中加入 (6)、(7)、(13), 加热, 保持 70℃ (水相)。另一方面, 将 (1) ~ (4)、(8) ~ (12) 和 (17) 进行混合, 加热熔融, 保持 70℃ (油相)。一边搅拌水相一边缓慢加入油相, 再加入 (15)、(16)、(18)、(5) 和 (14) 并用均质混合机均匀地乳化, 乳化后在充分搅拌下冷却至 30℃。

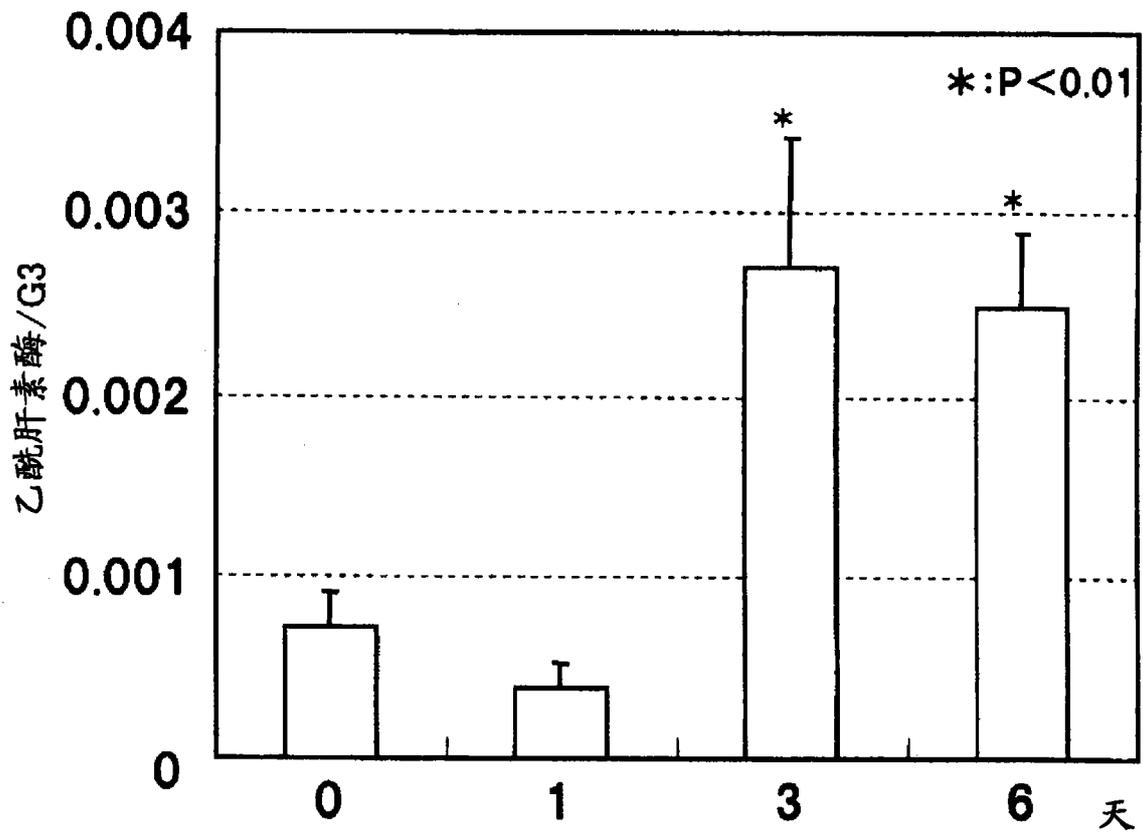


图 1

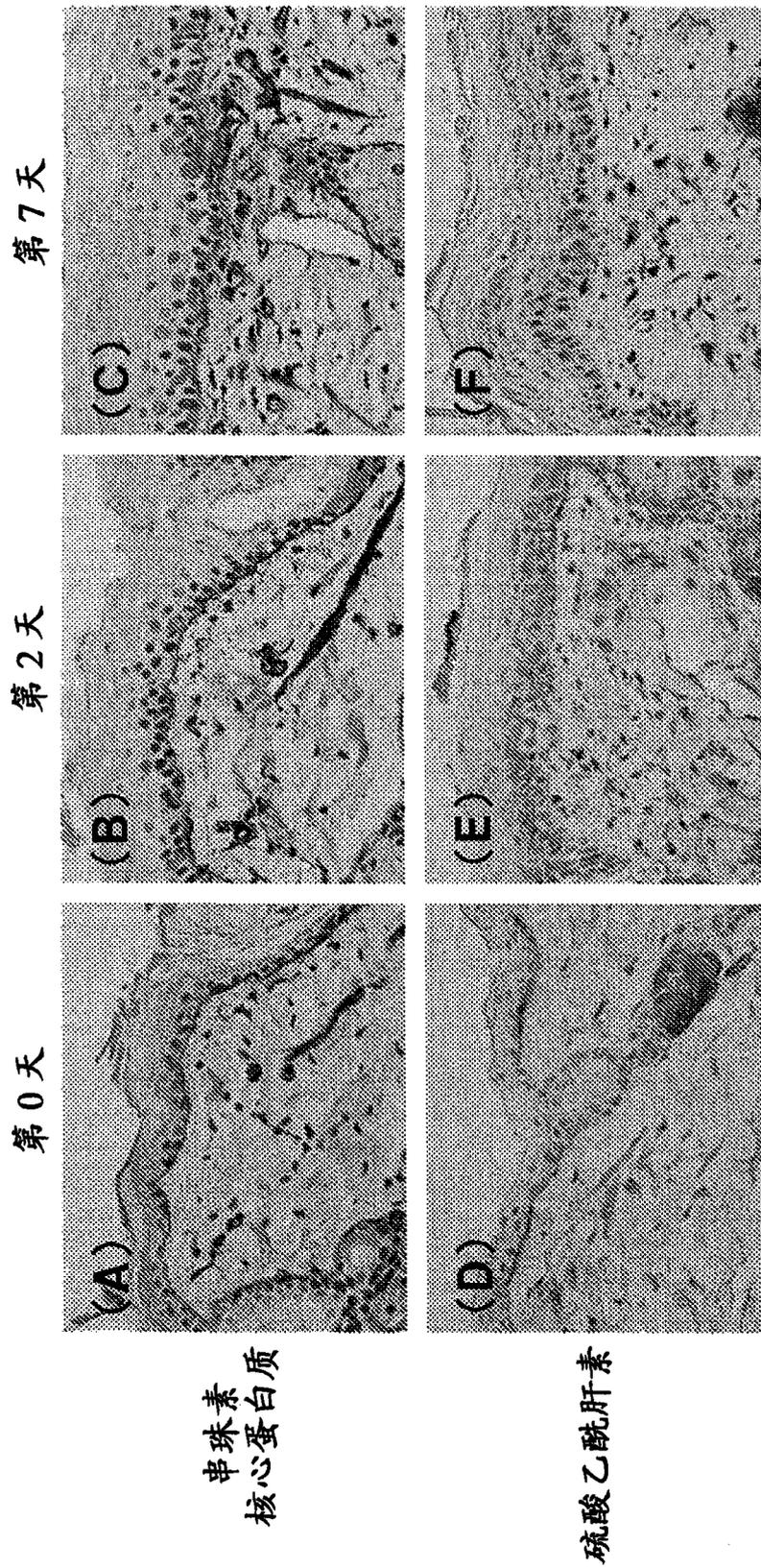


图 2

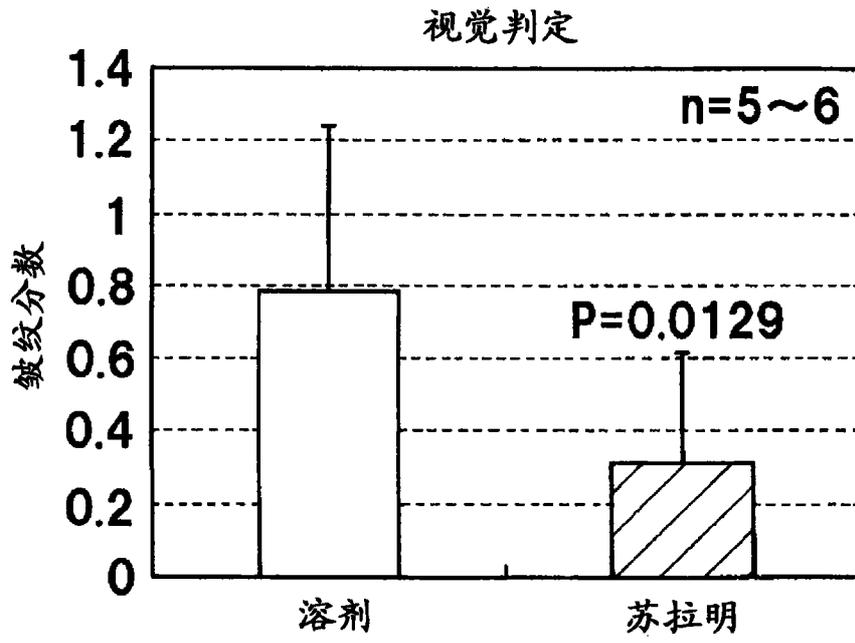


图 3

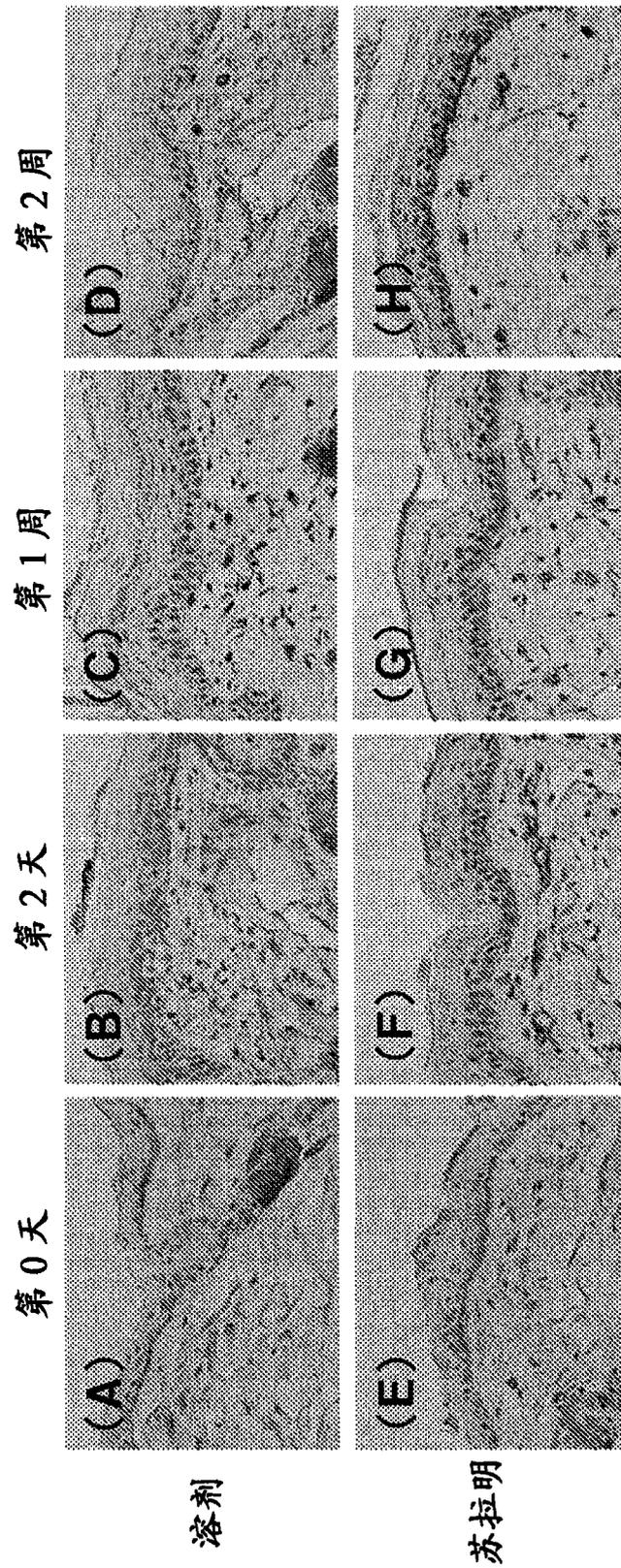


图 4

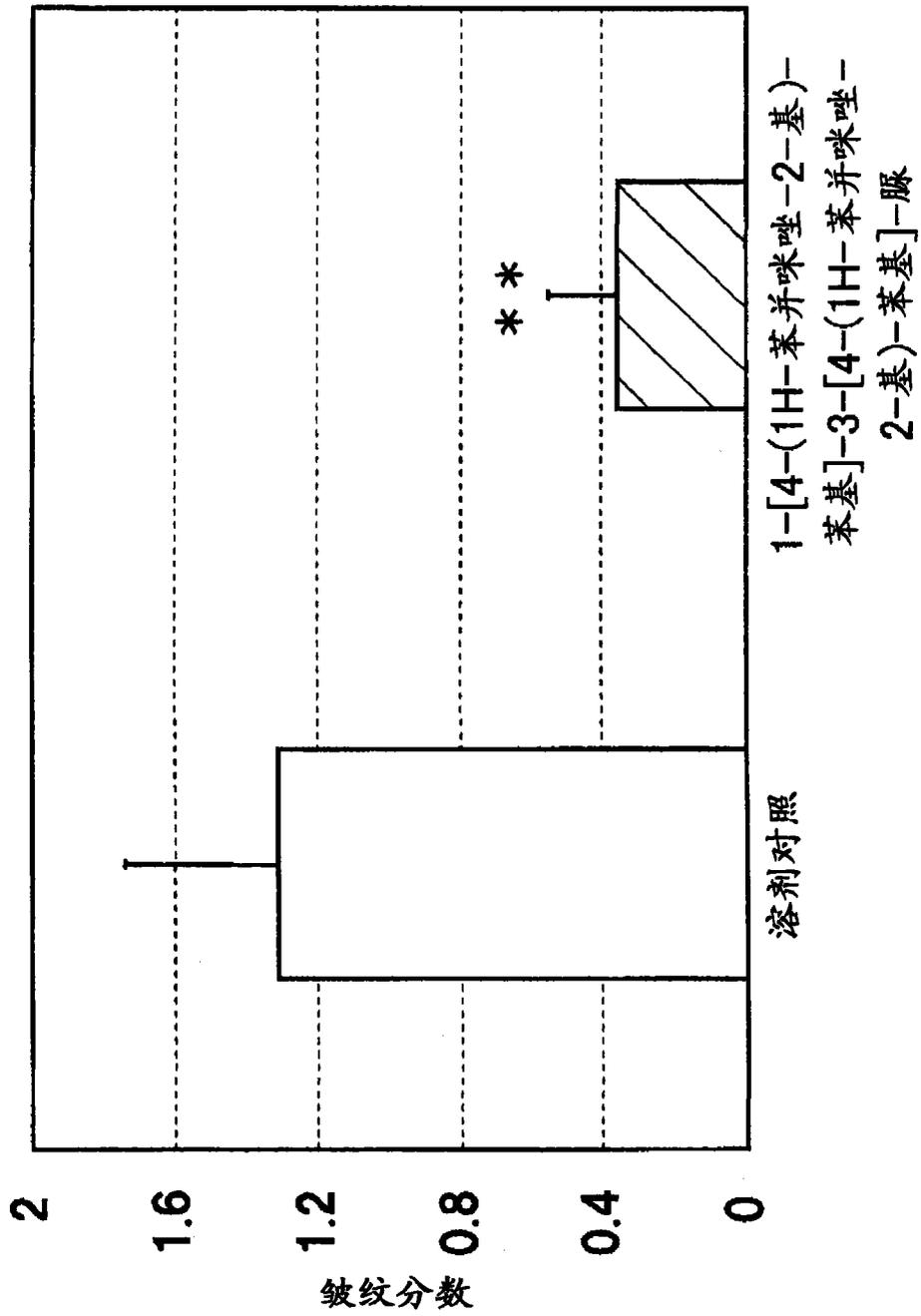
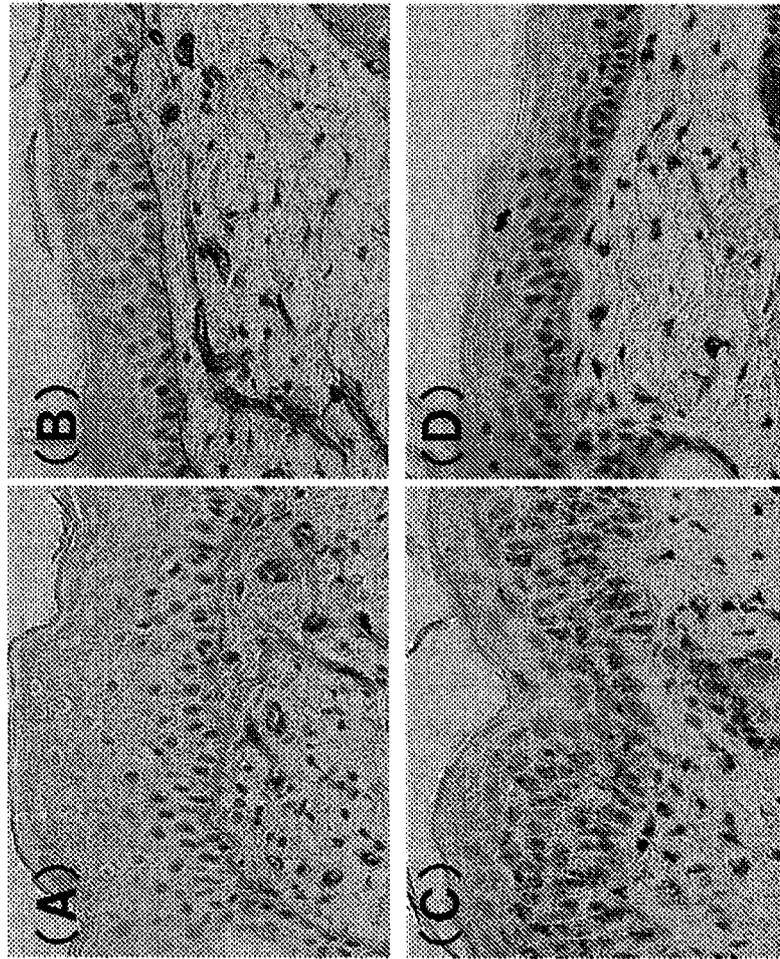


图 5

溶剂对照
1-[4-(1H-苯并咪唑-2-基)-苯基]-
3-[4-(1H-苯并咪唑-2-基)-苯基]-脲



串珠素
核蛋白质

硫酸乙酰肝素链

图 6

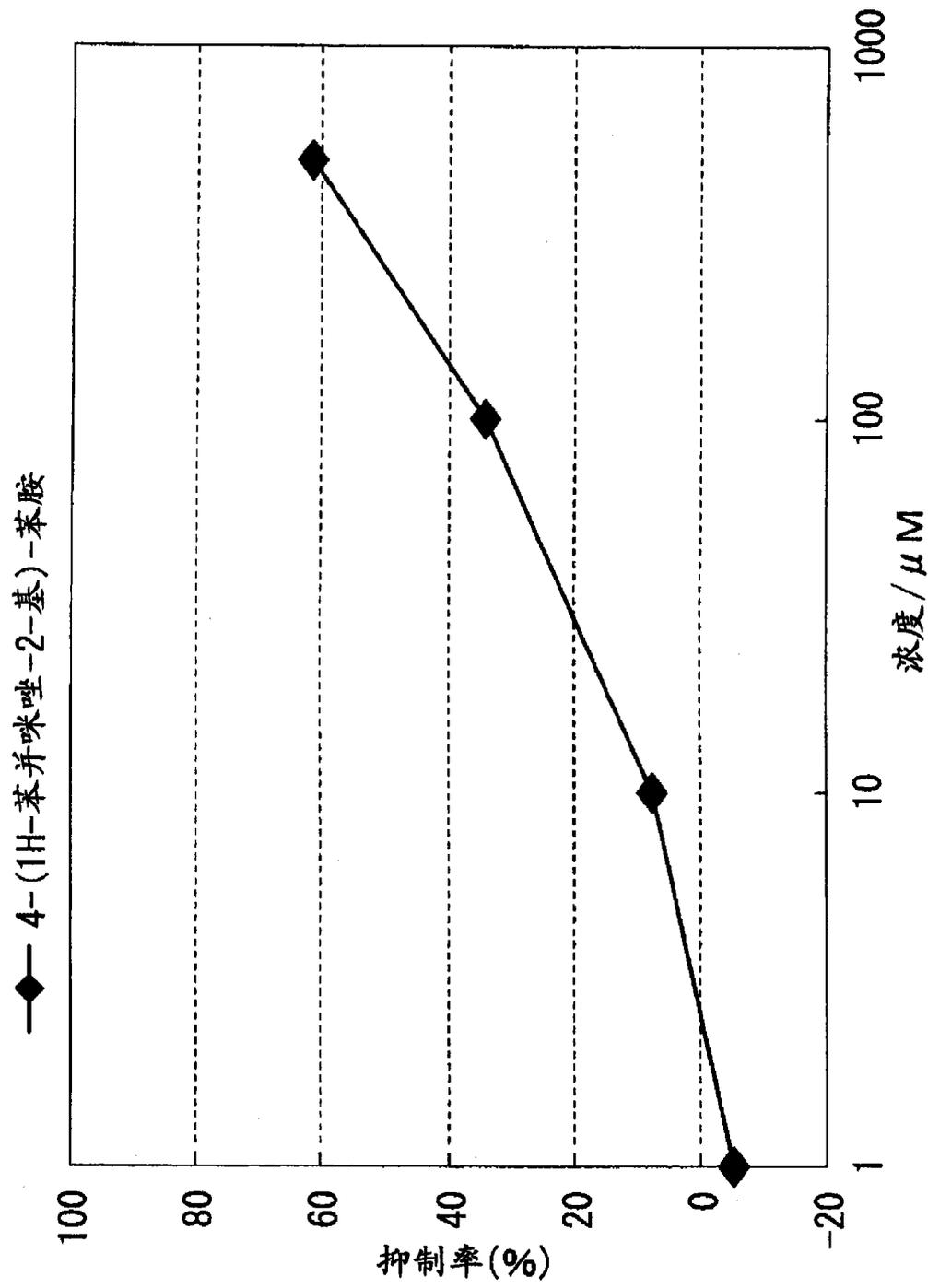


图 7

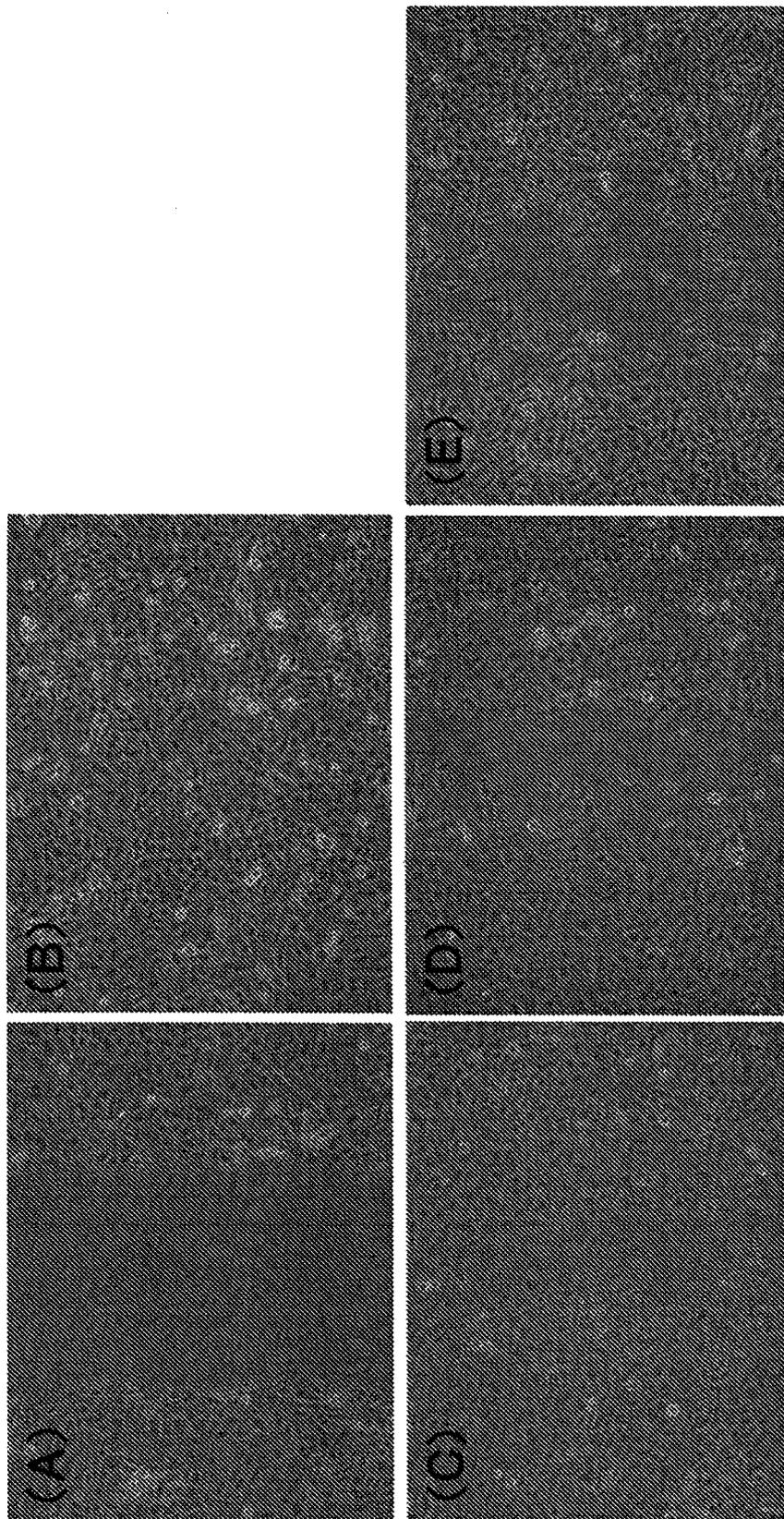


图 8

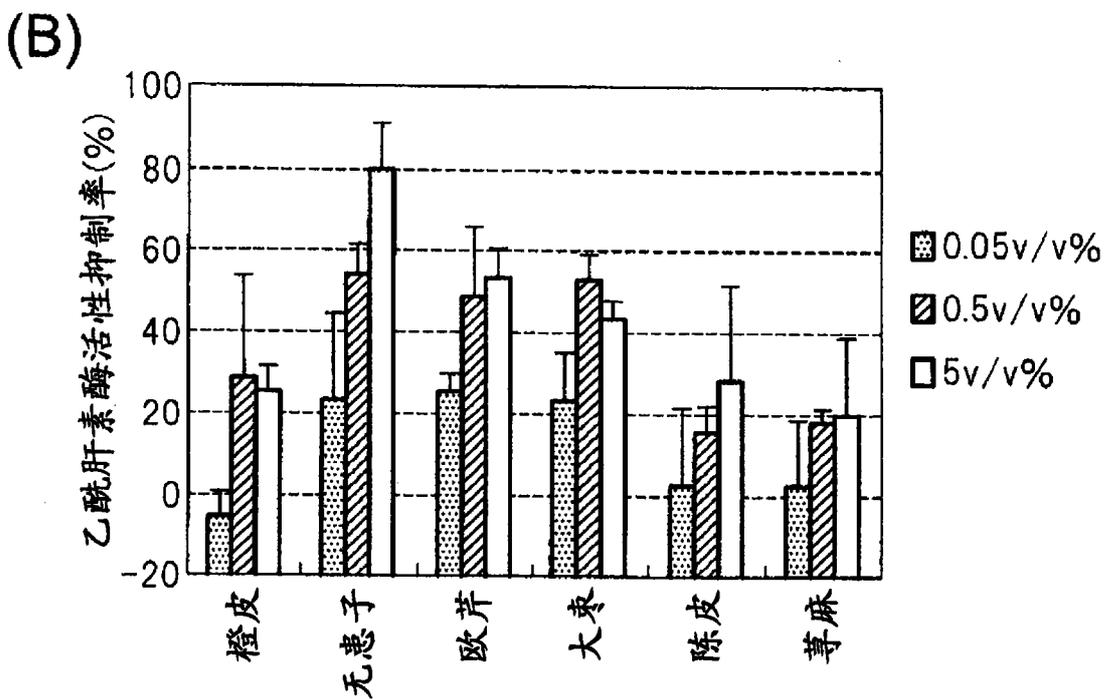
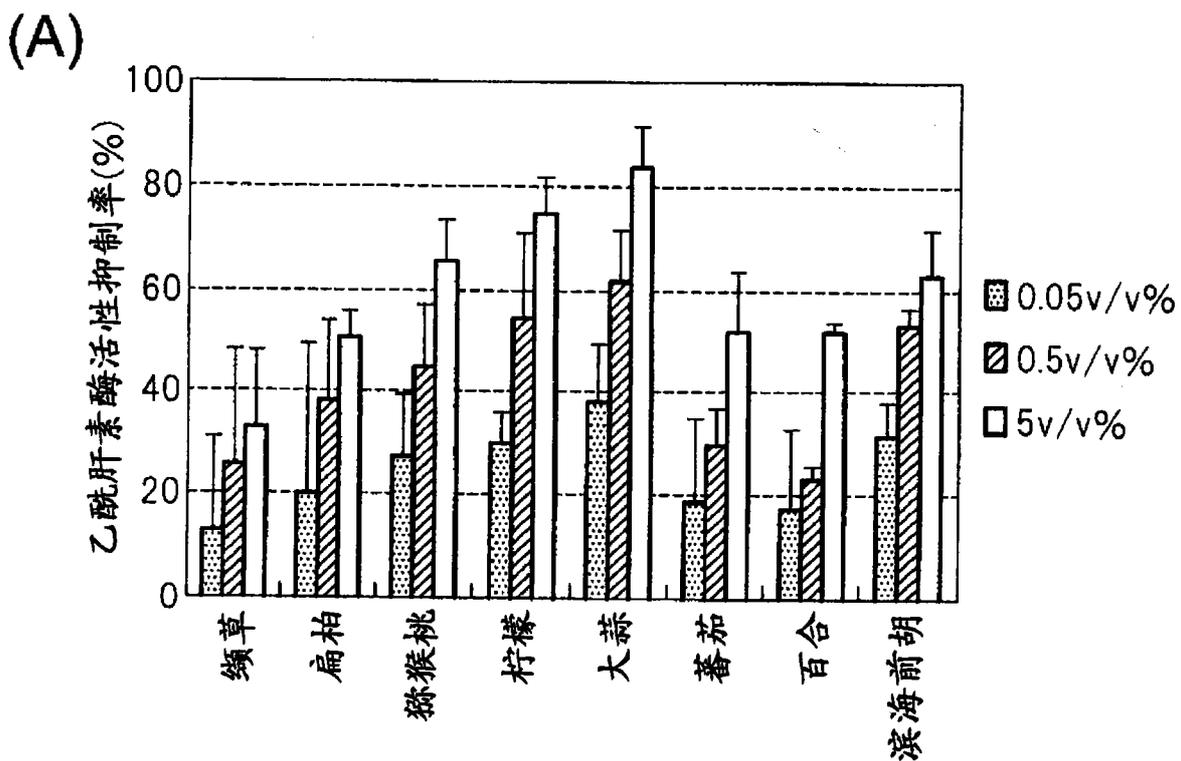


图 9