

[19] 中华人民共和国国家知识产权局



[12] 发明专利说明书

专利号 ZL 03826414.5

[51] Int. Cl.

A61K 38/17 (2006.01)

A61K 8/64 (2006.01)

A61Q 19/00 (2006.01)

A61K 35/20 (2006.01)

A61P 17/00 (2006.01)

A61P 43/00 (2006.01)

[45] 授权公告日 2009年8月19日

[11] 授权公告号 CN 100528223C

[22] 申请日 2003.5.7 [21] 申请号 03826414.5

[86] 国际申请 PCT/JP2003/005707 2003.5.7

[87] 国际公布 WO2004/098632 日 2004.11.18

[85] 进入国家阶段日期 2005.11.7

[73] 专利权人 雪印乳业株式会社

地址 日本北海道

[72] 发明人 森田如一 高田幸宏 鸟羽保宏

大井航 川上浩

[56] 参考文献

WO0205828A1 2002.1.24

审查员 周 洋

[74] 专利代理机构 上海专利商标事务所有限公司

代理人 陶家蓉

权利要求书 1 页 说明书 11 页

[54] 发明名称

皮肤胶原产生促进剂

[57] 摘要

本发明提供了一种用于防止皮肤皴裂、产生皱纹和皮肤健康状况恶化的皮肤胶原产生促进剂、促进皮肤胶原产生的食品或饮品以及促进皮肤胶原产生的化妆品。即，含有源自牛奶的碱性蛋白质组分和/或通过用蛋白质消化酶(例如胃蛋白酶或胰酶)消化上述碱性蛋白质组分获得碱性肽组分作为活性成分的一种皮肤胶原产生促进剂、促进皮肤胶原产生的食品或饮品和促进皮肤胶原产生的化妆品。上述碱性蛋白质组分和/或碱性肽组分具有增加皮肤胶原水平的作用。

1.一种皮肤胶原产生促进剂，其特征在于，该促进剂含有作为活性成分的源自牛奶的碱性蛋白质组分和/或利用蛋白酶使所述源自牛奶的碱性蛋白质组分降解所得的碱性肽组分，其中，所述源自牛奶的碱性蛋白质组分包含乳铁蛋白和乳过氧化物酶。

2.如权利要求1所述的皮肤胶原产生促进剂，其特征在于，所述源自牛奶的碱性蛋白质组分包含含有氨基酸组合物的组分，所述氨基酸组合物含有重量比为15%或更高的碱性氨基酸。

3.如权利要求1或2所述的皮肤胶原产生促进剂，其特征在于，所述源自牛奶的碱性蛋白质组分包含通过以下方式获得的组分：将牛奶或源自牛奶的物质与阳离子交换树脂接触以吸附碱性蛋白质；然后用盐浓度为0.1-1M的洗脱液洗脱吸附至树脂的组分。

4.一种促进皮肤胶原产生的食品或饮品，包含如权利要求1-2中任一项所述的皮肤胶原产生促进剂。

5.一种促进皮肤胶原产生的化妆品，包含如权利要求1-2中任一项所述的皮肤胶原产生促进剂。

皮肤胶原产生促进剂

技术领域

本发明涉及一种皮肤胶原促进剂、一种用于促进皮肤胶原产生的食品或饮品和用于促进皮肤胶原产生的化妆品，这些产品可用于防止皮肤皴裂、产生皱纹、恶化皮肤健康状况等情况。

背景技术

近年来，人们研究了皮肤的机制，结果证实了皮肤干燥感和皴裂的宏观原因除了因为年龄老化带来的代谢紊乱作用之外还与日光(紫外线)、干燥、氧化等作用复杂相关。人们发现这种因素造成的作用显著减少了真皮中最主要的基质—胶原纤维。胶原纤维维持的保持张力的机制(例如皮肤的健康或弹性)被紫外线等作用所破坏就会增加皮肤的皱纹或松弛。同时，胶原纤维可含有水分，这有助于皮肤保持湿润。因此，当胶原被外在因素破坏时，皮肤就变得干燥而粗糙。

由于上述的事实，需要无害并能通过促进真皮层主要成分之一的胶原的生物合成来防止皮肤皱纹和松弛的皮肤胶原产生促进剂。

发明内容

为解决这些问题，本发明人广泛地研究了食物中含有的对皮肤胶原产生施加促进作用的物质，并且结果发现源自牛奶的碱性蛋白质组分或通过用蛋白酶(例如胃蛋白酶或胰酶)降解碱性蛋白质组分得到的碱性肽组分可增加皮肤胶原的量。此外，本发明人还发现碱性蛋白质组分或碱性肽组分可用作皮肤胶原产生促进剂、用于促进皮肤胶原产生或用于促进皮肤胶原产生的化妆品的主要成分，籍此本发明得以完成。

因此，本发明的目的之一是提供皮肤胶原促进剂，包括具有促进皮肤胶原产生的源自牛奶的碱性蛋白质组分和/或碱性肽组分作为活性成分。此外，本

发明的另一个目的是提供用于促进皮肤胶原产生的食品或饮品和用于促进皮肤胶原产生的化妆品，二者均包括这种成分。

本发明的“皮肤胶原产生促进剂”指通过口服、敷用等方式对皮肤胶原产生可施加促进作用的物质。同时，本发明的“用于促进皮肤胶原生产的食物或饮品”指在皮肤胶原促进剂中配制成粉末、颗粒、片剂、胶囊、饮剂等后不进一步处理而用于口服或配制后施用并包括进营养添加剂、食物或饮品等物质。同时，本发明的“用于促进皮肤胶原生产的化妆品”指在皮肤胶原促进剂中配制进软膏剂、凝胶、乳膏剂、喷剂、贴剂、洗剂等的物质。此外，本发明中上述用于促进皮肤胶原生产的食物或饮品包括药学产品，并且为了方便，在配制后不额外处理就可口服施用的物质；而上述的用于促进皮肤胶原生产的化妆品包括药学产品，并且为了方便，在配制后就可施用于皮肤的物质。

本发明的最佳实施方式

本发明的皮肤胶原产生促进剂的特征在于，用源自牛奶的碱性蛋白质组分和/或通过用蛋白酶降解源自牛奶的碱性蛋白质组分得到的碱性肽组分作为活性组分。源自牛奶的碱性蛋白质组分可得自哺乳动物奶，例如牛奶、人奶、山羊奶或羊奶，而碱性肽组分可用蛋白酶与源自牛奶的碱性蛋白质组分反应得到。

源自牛奶的碱性蛋白质组分具有一些如测试实施例所示的特性。

- 1) 该组分包含几种分子量为 3,000 到 80,000 的蛋白质，分子量用十二烷基磺酸钠-聚丙烯酰胺凝胶电泳 (SDS-PAGE) 测定。
- 2) 该组分包含重量比为 95% 或更高的蛋白质。
- 3) 该蛋白质主要包括乳铁蛋白和乳过氧化物酶。
- 4) 该蛋白质的氨基酸组成包括碱性氨基酸，例如赖氨酸、组氨酸和精氨酸，每种氨基酸为重量比为 15% 或更高。

碱性氨基酸可用以下方式获得，例如，像脱脂奶等牛奶材料与阳离子交换树脂接触以吸收碱性蛋白质，吸收到树脂上的碱性蛋白质组分用盐浓度为 0.1 到 1M 的洗脱液洗脱，收集洗脱组分并通过反渗透 (RO) 膜、电渗析 (ED) 方法等进行脱盐和浓缩，然后如果需要可进行干燥处理。

同时，以下获得源自牛奶的碱性蛋白质组分的方法有已知的例子：通过将牛奶或源自牛奶的材料与阳离子交换树脂接触再用 pH 大于 5 且离子强度大于 0.5 的洗脱液将吸附在阳离子树脂上的碱性蛋白质洗脱获得该组分的方法 (JP-A-05-202098)、使用藻酸凝胶获得该组分的方法 (JP-A-61-246198)、使用无机多孔颗粒获得该组分的方法 (JP-A-01-086839) 和使用硫酸酯化合物从牛奶获得该组分的方法 (JP-a-63-255300)。

另一方面，源自牛奶的碱性肽组分与碱性蛋白质组分具有相同的氨基酸组成。例如，一种蛋白酶 (例如胃蛋白酶、胰蛋白酶、糜蛋白酶或胰酶制剂) 用于和上述方法之一得到的源自牛奶的碱性蛋白质组分反应，藉此获得平均分子量为 4,000 或低一些的碱性肽组合物。分子量的下限优选 500 或大一些。

当口服或敷用本发明的皮肤胶原产生促进剂时，其对皮肤胶原的产量施加促进作用。在口服本发明的皮肤胶原产生促进剂的情况下，作为活性成分的源自牛奶的碱性蛋白质组或碱性肽组分无需额外处理就可使用，但如按照常规方法该组分要在配制成粉末、颗粒、片剂、胶囊、饮剂等后才能使用。在本发明中，例如粉末、颗粒、片剂或胶囊的口服制剂通过常规方法使用，例如淀粉、乳糖、蔗糖、甘露醇、羧甲基纤维素、玉米淀粉、无机盐等配制。就这种制剂而言，除了上述的载体，还可能使用结合剂、崩解剂、表面活性剂、润滑剂、流动性促进剂、色素、调味剂等。更具体地说，结合剂的例子包括淀粉、糊精、粉状阿拉伯胶、明胶、羟丙基淀粉、羧甲基纤维素钠、甲基纤维素、乙基纤维素、结晶纤维素和聚乙烯吡咯烷酮。同时，崩解剂的例子包括淀粉、羟丙基淀粉、羧甲基纤维素、羧甲基纤维素钠、交联羧甲基纤维素钠和结晶纤维素。表面活性剂的例子包括大豆卵磷脂和蔗糖脂肪酸酯。润滑剂的例子包括滑石粉、蜡、蔗糖脂肪酸酯和氢化植物油。流动性促进剂的例子包括硅酞、干燥的氢氧化铝和硅酸镁。

此外，碱性蛋白质组分或碱性肽组分无需额外处理或在配制后就可包含进营养补充剂、一种食品或饮品等。此外，当碱性蛋白质组分或碱性肽组分与通常认为的具有促进皮肤胶原产生作用的成分 (例如维生素 C) 组合时，可期望有进一步促进皮肤胶原产生的作用。源自牛奶的碱性蛋白质组分或碱性肽组分相对热是稳定的，因此含有源自牛奶的碱性蛋白质组分或碱性肽组分的物质可在

常规条件下加热而保持稳定。

在应用本发明的皮肤胶原产生促进剂的情况中，促进剂可包含进一种已知的一般取决于预期用途使用的成分，藉此来制备各种剂型，例如液体剂型、固体剂型和半固体剂型。优选组合物的例子包括软膏剂、凝胶剂、油膏剂、喷剂、洗剂和粉剂。例如，本发明的皮肤胶原产生促进剂可与以下物质混合：烃类，例如凡士林；高级脂肪酸低级烷基酯，例如硬脂酰剂醇类或肉豆蔻异丙酯；动物油和脂肪，例如羊毛脂；聚醇，例如甘油；表面活性剂，例如甘油脂肪酸酯或一硬脂酸聚乙二醇酯；无机盐；蜡；树脂；水；并且如果需要，可与防腐剂混合，例如对羟基苯甲酸甲酯(methyl paraoxybenzote)或对羟基苯甲酸丁酯(butyl paraoxybenzote)，藉此生产促进皮肤胶原生产的化妆品或药学产品。

口服本发明皮肤胶原产生促进剂的有效量取决于促进剂的剂型、给药方法、预期用途以及患者的年龄、体重和症状来适当地确定，并且不是固定的。然而，使用大鼠进行的动物实验表明为了施加促进皮肤胶原生产的作用，大鼠的每公斤体重至少摄入量为 20mg 的碱性蛋白质组分和/或碱性肽组分。因此，按照外推法，当碱性蛋白质组分和/或碱性肽组分中的至少一种的摄入量为至少 20mg/天/成人时，一般可达到预期的效果。所以，该组分可包含进食品或饮品以实现需求或以药物施用。如果需要，一天可施用数次。

本发明的皮肤胶原产生促进剂应用的有效量依赖促进剂的剂型而变，但是以所有要应用的组合物的总量为碱性，包含进的碱性蛋白质组分或碱性肽组分优选重量比 0.001-2%。然而，当使用时产品的包含量要稀释，这样就可进一步增加沐浴粉。

以下将参考实施例和测试实施例详细描述本发明，但是这并不限制本发明，因为说明书仅说明了本发明的实施方案。

[实施例 1]

用去离子水彻底洗涤一根装有 400g 磺化 Chitopearl(由 Fuji Spinning Co., Ltd. 生产)作为阳离子交换树脂的柱(直径 5cm×高 30cm)，然后使 40 升未消毒的脱脂奶(pH6.7)以 25 ml/min 的流速流过该柱。流过后，该柱用去离子水彻底洗涤，吸附在树脂上的碱性蛋白质组分用含有 0.98M 氯化钠的 0.02M 碳酸盐缓冲液(pH7.0)洗脱。然后使洗脱液脱盐并用反渗透(RO)膜浓缩，接着

进行冻干，藉此获得 21g 粉末状的碱性蛋白质组分。如此获得的碱性蛋白质组分无需处理就可用作皮肤胶原产生促进剂。

[测试实施例 1]

通过十二烷基磺酸钠-聚丙烯酰胺凝胶电泳 (SDS-PAGE) 确定实施例 1 得到的碱性蛋白质组分。测得该组分的分布范围为 3,000 到 80,000。

[测试实施例 2]

分析实施例 1 所得碱性蛋白质组分的成分。结果示于表 1。如该表所示，大多数成分发现为蛋白质。

表 1

| | |
|-----|------------|
| 水 | 1.06 (重量%) |
| 蛋白质 | 96.50 |
| 脂类 | 0.56 |
| 灰分 | 0.27 |
| 其它 | 1.61 |

[测试实施例 3]

实施例 1 得到的碱性蛋白质组分子于 110°C 用 6N 盐酸水解 24 小时，然后使用氨基酸分析的设备 (L-8500 型，由 Hitachi, Ltd. 制造) 分析氨基酸组成。结果示于表 2。碱性蛋白质组分含有含 15 重量%或更多的碱性氨基酸的氨基酸组合物。

表 2

| | |
|------|------------|
| 天冬氨酸 | 10.1 (重量%) |
| 丝氨酸 | 5.3 |
| 谷氨酸 | 12.3 |
| 脯氨酸 | 4.7 |
| 丙氨酸 | 5.7 |
| 亮氨酸 | 10.2 |
| 赖氨酸 | 8.4 |

| | |
|-----|------|
| 组氨酸 | 2.5 |
| 精氨酸 | 7.2 |
| 其它 | 33.6 |

[实施例 2]

一根装有 30 kg SP Toyopearl(由 Tosoh 公司生产)作为阳离子交换树脂的柱(直径 100cm×高 10cm)用去离子水彻底洗涤,然后使已在 121℃加热 30 秒消毒的 3t 的干酪乳清(pH 6.2)以 10 升/分钟的流速流过该柱。流过后,该柱用去离子水彻底洗涤,吸附在树脂上的碱性蛋白质组分用含有 0.9M 氯化钠的 0.02M 柠檬酸缓冲液(pH 5.7)洗脱。然后,洗脱液脱盐并用电渗析(ED)方法浓缩,接着进行冻干,藉此获得 183g 粉末状碱性蛋白质组分。如此获得的碱性蛋白质组分无需处理就可用作皮肤胶原产生促进剂。

[实施例 3]

将 50g 得自实施例 2 的碱性蛋白质组分溶解于 10 升蒸馏水中,然后加入 Pancreatin(Sigma 生产)直至浓度达到 1%,接着在 37℃反应 2 小时。反应后,于 80℃热处理 10 分钟使酶失活,然后进行浓缩和冻干,藉此得到 48.3g 粉末状碱性肽组分。如此获得的碱性肽组分无需处理就可用作皮肤胶原产生促进剂。

[测试实施例 4]

使用大鼠进行动物实验以检测实施例 2 所得的碱性蛋白质组分和实施例 3 所得的碱性肽组分对皮肤具有生产的促进作用。7 周大的 Wistar 雄性大鼠分为 5 个测试组(n=6):施用生理盐水的组(组 A);以每公斤大鼠体重 20mg 的浓度施用实施例 2 所得碱性蛋白质组分的组(组 B);以每公斤大鼠体重 200mg 的浓度施用实施例 2 所得碱性蛋白质组分的组(组 C);以每公斤大鼠体重 20mg 的浓度施用实施例 3 所得碱性肽组分的组(组 D);以每公斤大鼠体重 200mg 的浓度施用实施例 3 所得碱性肽组分的组(组 E)。大鼠饲养 10 周同时每天用探针施用每个组分一次。

每只大鼠的真皮按照 Nimi 等的方法(见 Arch. Biochem. Biophys., p. 292, 1967)处理以检测皮肤胶原的量,然后测定可溶性组分中羟脯氨酸的量。羟脯

氨酸是仅存在于胶原中的一种特殊的氨基酸并且占构成胶原的所有氨基酸的约 10%，这样就可估计胶原的量（见 Ryuji Asano 等，Bio Industry, P. 12, 2001）。

结果示于表 3。

表 3

| 组 | 羟脯氨酸的量 ($\mu\text{g}/\text{ml}$) |
|-----|------------------------------------|
| 组 A | 0.35 \pm 0.3 ^a |
| 组 B | 0.72 \pm 0.07 ^{bc} |
| 组 C | 0.91 \pm 0.09 ^d |
| 组 D | 0.63 \pm 0.06 ^b |
| 组 E | 0.84 \pm 0.08 ^{cd} |

这些数值代表平均值 \pm 标准偏差 (n=6)。

同时，在不同字母之间具有显著的差异 (p<0.05)。

按照该结果，10 周后得到的组 B、C、D 和 E 的可溶性组分中羟脯氨酸显著高于组 A。

该结果表明碱性蛋白质组分和碱性肽组分均有促进皮肤胶原生产的作用并是有效的皮肤胶原产生促进剂。

此外，发现了碱性蛋白质组分或碱性肽组分以至少每公斤大鼠体重 20mg 的浓度施用才会施加促进皮肤胶原生产的作用。

[实施例 4]

具有表 4 所示组成的促进皮肤胶原生产的饮料按常规方法生产。生产的饮料具有良好的风味，这种风味即使在常温下保存 1 年后也未变差，并且不会产生沉淀。

表 4

| | |
|-------------------|------------|
| 混合的异构化的糖 | 15.0 (重量%) |
| 果汁 | 10.0 |
| 柠檬酸 | 0.5 |
| 碱性蛋白质组分粉末 (实施例 2) | 0.1 |
| 调味剂 | 0.1 |

| | |
|--------|------|
| 矿物质混合物 | 0.1 |
| 水 | 74.2 |

[实施例 5]

具有表 5 所示组成的面团按常规方法制备、成形并烘烤来生产促进皮肤胶原生产的饼干。

表 5

| | |
|-------------------|------------|
| 面粉 | 50.0 (重量%) |
| 糖 | 20.0 |
| 盐 | 0.5 |
| 人造黄油 | 12.5 |
| 鸡蛋 | 12.5 |
| 水 | 2.5 |
| 矿物质混合物 | 0.8 |
| 碱性蛋白质组合物粉末(实施例 2) | 1.2 |

[实施例 6]

具有表 6 所示组成的皮肤胶原产生促进剂按常规方法生产。

表 6

| | |
|------------------|------------|
| 结晶右旋糖一水合物 | 83.5 (重量%) |
| 碱性蛋白质组分粉末(实施例 2) | 10.0 |
| 矿物质混合物 | 5.0 |
| 糖酯 | 1.0 |
| 调味剂 | 0.5 |

[测试实施例 5]

使用正常的人成纤维细胞株[CCD45SK(ATCCRL 1506)收集自白种女人的皮肤]进行实验以检测实施例 2 所得的碱性蛋白质组分和实施例 3 所得的碱性肽组分对皮肤胶原生产的促进作用。用含有 10 体积%胎牛血清(以下简称为 FBS)的改进的 Eagle 培养基(MEM, 10-101, Dainippon Pharmaceutical Co., Ltd. 生产)将正常的人成纤维细胞株以 4×10^4 细胞/孔/0.4ml 的浓度接种至 24 孔

板。然后在含有 5%二氧化碳和饱和水蒸气条件下于 37°C 培养 24 小时，接着用含有 6 体积%的 FBS 的改进的 Eagle 培养基替换原培养基。然后，以 0.1 体积%的浓度将得自实施例 2 的碱性蛋白质组分和得自实施例 3 的碱性肽组分加入各孔并培养 24 小时。接着分别以 50 μ g/ml 和 1 μ Ci/ml 的浓度加入 β -氨基丙腈和氚-L-脯氨酸，再培养 24 小时得到培养基。按照 Webster 等所述方法(见, Analytical Biochemistry, p.220, 1979)从如此获得的培养基中分级胶原组分并测定胶原组分的放射性。注意要进行不加碱性蛋白质组分和碱性肽组分的类似的对照实验。结果示于表 7。

表 7

| | 胶原产生(%) |
|------------------|----------------------------|
| 对照 | 100 \pm 2.1 ^a |
| 碱性蛋白质组分粉末(实施例 2) | 212 \pm 4.1 ^c |
| 碱性肽组分粉末(实施例 3) | 196 \pm 3.2 ^b |

数值代表了平均值 \pm 标准偏差(n=6)。同时，不同字母之间有显著的差异。

按照该结果可以发现加入碱性蛋白质和碱性肽的组比不加的组(对照)施加了约两倍的促进皮肤胶原产生的能力。

该结果表明，碱性蛋白质组分和碱性肽组分影响皮肤胶原成纤维细胞并具有促进皮肤具有产量的作用，并且这说明该组分作为皮肤具有产生促进剂是有用的。

[实施例 7]

按照常规方法生产具有表 8 所示组成的洗剂。

表 8

| | 3(重量%) |
|---------------------|--------|
| 甘油 | |
| 1,3-丁二醇 | 3 |
| 聚氧乙烯山梨坦单油酸酯(20E.0.) | 0.5 |
| 对羟基苯甲酸甲酯 | 0.15 |
| 柠檬酸 | 0.1 |
| 柠檬酸钠 | 1 |

| | |
|------------------|-------|
| 调味剂 | 0.05 |
| 碱性蛋白质组分粉末(实施例 2) | 0.05 |
| 纯水 | 92.15 |

[实施例 8]

按照常规方法生产具有如表 9 所示组成的软膏剂。

表 9

| | |
|---------------------|--------|
| 液体石蜡 | 5(重量%) |
| 白蜂蜡 | 4 |
| 鲸蜡醇 | 3 |
| 角鲨烯 | 10 |
| 羊毛脂 | 2 |
| 硬脂酸 | 1 |
| 聚氧乙烯山梨坦单油酸酯(20E.0.) | 1.5 |
| 单硬脂酸甘油酯 | 3 |
| 1,3-丁二醇 | 6 |
| 对羟基苯甲酸甲酯 | 1.5 |
| 调味剂 | 0.1 |
| 碱性蛋白质组分粉末(实施例 2) | 0.5 |
| 纯水 | 62.4 |

[测试实施例 6]

使用实施例 7 得到的洗剂和实施例 8 得到的软膏剂进行实践使用测试。就进行比较的洗剂和软膏剂的组成而言,使用的洗剂和软膏剂除了不含急促蛋白质组分以外与实施例 7 和 8 的组成相同。

20 位脸上具有凹陷或细小皱纹并具有干性皮肤的成年妇女随即分为 2 组,每组有 10 位受试者(组 A 和 B),而 20 位手上有皴裂的成年妇女随即分为 2 组,每组有 10 位受试者(组 C 和 D)。本发明的洗剂、进行比较的洗剂、本发明的软膏剂和进行比较的软膏剂分别以和平常相同的方式施用于组 A 和组 B 的脸部以及组 C 和组 D 的手和手指上,每天进行 2 次共 10 天。结果显示,本发明的洗剂相比于进行比较的洗剂明显改善了干燥感和皮肤皴裂并具有优秀的促进皮

肤胶原产生的作用。同时，本发明的软膏剂相比于进行比较的软膏剂明显改善了干燥感和皮肤皴裂并具有抑制天然恶化(如皮肤皴裂)的作用。

[工业实用性]

本发明提供了一种皮肤胶原产生促进剂、一种促进皮肤胶原产生的食品或饮品和一种促进皮肤胶原产生的化妆品，以上每一种均含有源自牛奶的碱性蛋白质组分和/或碱性肽组分作为活性成分。

本发明的皮肤胶原产生促进剂、促进皮肤胶原产生的食品或饮品和促进皮肤胶原产生的化妆品均对皮肤具有产量具有促进作用并且在预防和治疗皮肤皱纹、凹陷、干燥感和皮肤皴裂中 useful。