



(10) 授权公告号 CN 115243563 B

(45) 授权公告日 2025. 03. 25

(21) 申请号 202080098184.3

(22) 申请日 2020.03.06

(65) 同一申请的已公布的文献号
申请公布号 CN 115243563 A

(43) 申请公布日 2022.10.25

(85) PCT国际申请进入国家阶段日
2022.09.06

(86) PCT国际申请的申请数据
PCT/JP2020/009785 2020.03.06

(87) PCT国际申请的公布数据
W02021/176707 JA 2021.09.10

(73) 专利权人 碧艾奇恩股份有限公司
地址 日本东京都

(72) 发明人 田中郁郎 木村昌代 野崎勉
石原健夫

(74) 专利代理机构 北京铭硕知识产权代理有限公司 11286

专利代理师 周春燕 陈宇

(51) Int.Cl.
C07K 14/78 (2006.01)
A23L 19/00 (2016.01)

(56) 对比文件
JP 2018115143 A, 2018.07.26
Arapitsas Panagiotis. Identification and quantification of polyphenolic compounds from okra seeds and skins. Food Chemistry. 2008, 第110卷摘要, 图2-3, 表1.
Carini Marina et al.. Procyanidins from Vitis vinifera Seeds Inhibit the Respiratory Burst of Activated Human Neutrophils and Lysosomal Enzyme Release. Planta Med. 2001, 摘要, 图2.

审查员 白阳

权利要求书1页 说明书13页 附图3页

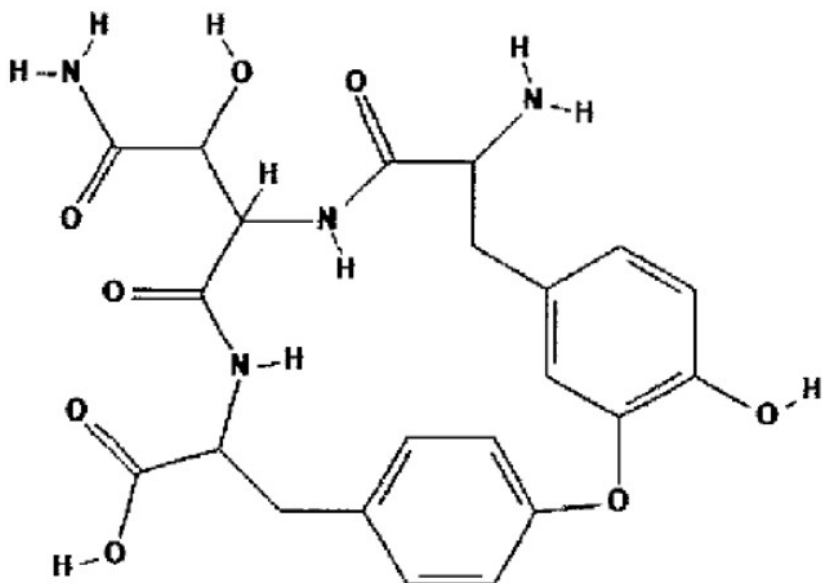
(54) 发明名称

用于抑制弹性蛋白酶的口服组合物及其应用、弹性蛋白酶抑制剂、口服摄入弹性蛋白酶抑制剂的抑制弹性蛋白酶活性的方法

(57) 摘要

提供一种用于抑制弹性蛋白酶的口服组合物及其应用、弹性蛋白酶抑制剂、以及口服摄入弹性蛋白酶抑制剂的弹性蛋白酶活性抑制方法，所述口服组合物用于使因紫外线、活性氧等外在因素、生物体的代谢功能降低等而产生的生物体组织中的弹性蛋白的降低恢复、改善皮肤的衰老症状等。一种用于抑制弹性蛋白酶的组合物，其特征在于，含有咖啡黄葵 (Abelmoschus esculentus) 的种子的加工物或来源于咖啡黄葵的种子的特定化合物作为有效成分。

1. 一种用于抑制来源于皮肤的成纤维细胞的弹性蛋白酶的组合物,其特征在于,含有来源于咖啡黄葵的种子的加工物或咖啡黄葵的种子的特定化合物作为有效成分,其中,所述特定化合物为环状肽“OF4949-II”:



2. 根据权利要求1所述的组合物,其特征在于,所述种子为成熟种子。
3. 根据权利要求1或2所述的组合物,其特征在于,所述加工物为咖啡黄葵种子的提取物、提取残渣、酶分解物或苗。
4. 根据权利要求3所述的组合物,其特征在于,所述提取物为热水提取物。
5. 根据权利要求3所述的组合物,其特征在于,所述酶分解物为经碱性蛋白酶和/或中性蛋白酶水解而得的分解物。
6. 根据权利要求4所述的组合物,其特征在于,所述酶分解物为经碱性蛋白酶和/或中性蛋白酶水解而得的分解物。
7. 权利要求1~6中任一项所述的组合物在制备用于抑制弹性蛋白酶的活性的组合物中的应用。
8. 一种弹性蛋白酶抑制剂,其特征在于,包含权利要求1~6中任一项所述的组合物。

用于抑制弹性蛋白酶的口服组合物及其应用、弹性蛋白酶抑制剂、口服摄入弹性蛋白酶抑制剂的抑制弹性蛋白酶活性的方法

技术领域

[0001] 本发明涉及用于抑制弹性蛋白酶的口服组合物及其应用、弹性蛋白酶抑制剂、以及口服摄入弹性蛋白酶抑制剂的抑制弹性蛋白酶活性的方法,所述用于抑制弹性蛋白酶的口服组合物的特征在于,含有咖啡黄葵(*Abelmoschus esculentus*)的种子的加工物。

[0002] 特别是,本发明涉及含有环状肽“OF4949-II”作为有效成分的用于抑制弹性蛋白酶的口服组合物及其应用、弹性蛋白酶抑制剂、以及口服摄入弹性蛋白酶抑制剂的抑制弹性蛋白酶活性的方法。

背景技术

[0003] 动物、鱼类的生物体组织一般分为皮肤的表皮、脏器的表面等上皮组织、主要构成肌肉的肌肉组织、遍布全身的神经的神经组织、以及保持并支撑身体结构的结缔组织。结缔组织也被称为支持组织,广义上有时骨、软骨、血液、脂肪等也被分类为结缔组织。

[0004] 其中,关于上皮组织、支持组织,自古以来就在皮肤、骨、脂肪等方面进行了研究和开发的投入,近年来,例如作为皮肤的衰老症状的一环,皮肤的张力、弹力的降低(皱纹、松弛等)的产生机理逐渐被查明,据称弹性蛋白(弹性纤维)与肌肤的皱纹、松弛有很大关系。

[0005] 弹性蛋白是存在于结缔组织中的纤维状的高分子蛋白质的一种,使作为高分子的蛋白质的胶原彼此结合为格子状,在其间隙形成有细胞外基质结构,所述细胞外基质结构存在以透明质酸、硫酸软骨素等粘多糖类为代表的各种细胞外成分。该细胞外基质结构承担着细胞和皮肤组织的支持、细胞间隙中的保水、皮肤的润滑性和柔软性的保持、保护皮肤组织免受紫外线、干燥环境、机械刺激、损伤、微生物感染等外部因素的影响等的作用。已知这些蛋白质、细胞外成分在生物体内由成纤维细胞产生(非专利文献1)。

[0006] 一般认为,生物体组织中的弹性蛋白含量在项韧带中为约78~80%,在动脉中为约50%,在肺中为约20%,在真皮中为约2~5%左右。另外,作为弹性蛋白的特征之一,与胶原、透明质酸不同,人出生时弹性蛋白的量基本为0%,随着成长而增加,在25岁左右迎来峰值。之后转为减少,过了40岁就会减少到50%以下。这表明,随着年龄的增长,代谢变化、紫外线、其他因素可能导致生物组织中的弹性蛋白分解或变性,推测其中一个原因是作为分解弹性蛋白的酶的弹性蛋白酶的活性亢进、过度诱导等。

[0007] 从这样的观点出发,公开了作为促进成纤维细胞的增殖的有效成分而应用由咖啡黄葵的种子得到的水性成分(专利文献1)。另外,为了防止真皮中的弹性蛋白、胶原等的含量的降低,进行了各种研究,有各种报告、提案,作为一例,作为改善皮肤的衰老(皱纹、弹力)的化妆品的有效成分而公开了视黄醇糖苷(专利文献2)。但是,视黄醇衍生物也已知有由过量给予引起的副作用,在安全性这一点上并不充分。

[0008] 另外,探索抑制弹性蛋白酶的活性的物质的尝试也多,迄今为止,作为植物来源成分、提取物,提出了欧白芷的提取物(专利文献3)、含有苯乙醇糖苷(松果菊苷

(echinacoside)和阿克苷(acteoside))的列当科植物的提取物(专利文献4)、从葡萄的芽和藤蔓提取出的白藜芦醇类(专利文献5)、石榴的花的粉末和/或提取物(专利文献6)、灵芝的提取物(专利文献7)、大豆蛋白水解物(专利文献8)等。

[0009] 在上述的现有技术文献中,记载了将这些成分、提取物配合到化妆品、皮肤外用剂中并涂布于皮肤而应用的内容。然而,在将这些成分、提取物用到化妆品、皮肤外用剂的情况下,在成分的经皮吸收性、易于清洗性等方面存在疑问、难点,作为皮肤的衰老症状对策,无法持续所期望的效果,无法在本质上改善皮肤组织的生理功能。另外,在口服摄入肽类的情况下,存在在胃肠内变质、被分解的风险,在实用方面能够表现出有效性的物质为数不多。因此,需要能够改善上述肌肤衰老症状的具有实效性的素材。

[0010] 应予说明,咖啡黄葵(*Abelmoschus esculentus*)是属于锦葵科秋葵属的植物,在世界的热带~温带地区生长,有作为蔬菜栽培并供食用的悠久历史。通常,将内含白色至黄白色的未成熟种子的果实(荚)作为生鲜蔬菜食用。

[0011] 作为在产业上利用加工咖啡黄葵而得到的提取物、成分的尝试,提出了上述专利文献1、含有咖啡黄葵提取物的透明质酸合成促进剂和配合该剂的化妆品、饮食品(专利文献9)、含有来源于咖啡黄葵种子的寡肽和特定植物提取物的抗衰老用皮肤外用剂(专利文献10)等。然而,没有提及咖啡黄葵的种子、加工物与弹性蛋白、弹性蛋白酶之间的关联。

[0012] 现有技术文献

[0013] 非专利文献

[0014] 非专利文献1:服部道广,「スキンケアの化学」(《护肤科学》),第6页~第14页及第15页~第83页,(株式会社)裳华房,1997年2月25日发行

[0015] 专利文献

[0016] 专利文献1:日本特开2018-115143号公报

[0017] 专利文献2:日本特开平10-158290号公报(权利要求1等)

[0018] 专利文献3:日本特开2012-201615号公报

[0019] 专利文献4:日本特开2009-263279号公报

[0020] 专利文献5:日本特开2008-239576号公报

[0021] 专利文献6:日本特开2005-53873号公报

[0022] 专利文献7:日本特开2005-23021号公报

[0023] 专利文献8:日本特开2004-182687号公报

[0024] 专利文献9:日本特开2004-51533号公报

[0025] 专利文献10:日本特开2008-74757号公报

[0026] 专利文献11:日本特开平02-288890号公报

发明内容

[0027] 技术问题

[0028] 鉴于所述现状,本发明的课题在于提供用于抑制弹性蛋白酶的口服组合物及其应用、弹性蛋白酶抑制剂、以及口服摄入弹性蛋白酶抑制剂的弹性蛋白酶活性抑制方法,所述组合物用于使因紫外线、活性氧等外在因素、生物体的代谢功能降低等而产生的生物体组织中的弹性蛋白的降低恢复、改善皮肤的衰老症状等。

[0029] 技术方案

[0030] 为了解决上述问题,本发明人等对抑制来源于成纤维细胞的弹性蛋白酶的活性的素材及其加工方法反复进行了深入研究,结果发现咖啡黄葵的种子的加工物是有效的。

[0031] 进而,本发明人等对抑制来源于成纤维细胞的弹性蛋白酶的活性的成分和其纯化方法持续进行了研究开发,结果发现由咖啡黄葵的成熟种子得到的环状肽“OF4949-II”是有效成分,从而完成了本发明。

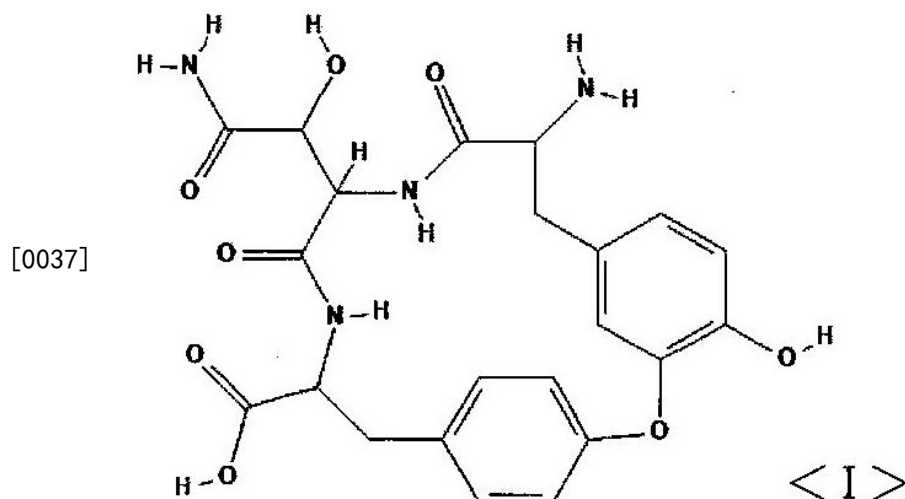
[0032] 也就是说,本发明的主要特征大致在于以下几个方面。

[0033] (1)一种用于抑制来源于皮肤的成纤维细胞的弹性蛋白酶的组合物,其特征在于,含有咖啡黄葵(*Abelmoschus esculentus*)的种子的加工物。

[0034] 在此,优选所述种子为成熟种子,所述加工物优选为咖啡黄葵种子的提取物、其提取残渣、酶分解物或苗中的任一种,所述提取的处理优选为热水提取,所述酶解处理优选为使用碱性蛋白酶和/或中性蛋白酶的水解。另外,所述组合物优选口服摄入或口服给予。

[0035] (2)一种用于抑制来源于皮肤的成纤维细胞的弹性蛋白酶的组合物,其特征在于,含有来源于咖啡黄葵的种子的特定化合物作为有效成分。

[0036] 在此,所述种子优选为成熟种子。另外,上述特定化合物优选为环状肽“OF4949-II”,上述肽优选为下述式I。



[0038] (3)一种组合物的应用,其特征在于,通过摄入或给予所述组合物,抑制弹性蛋白酶的活性。

[0039] 在此,所述组合物优选口服摄入或口服给予而应用,所述口服用组合物优选为饮食品的形态。另外,上述组合物的应用优选用于基于皮肤组织的弹性蛋白酶活性抑制作用的弹性蛋白增加,进一步优选用于改善皮肤组织的衰老症状。

[0040] (4)环状肽“OF4949-II”的应用,其特征在于,抑制弹性蛋白酶的活性。

[0041] 在此,优选将含有所述肽的组合物口服摄入或口服给予而应用,含有所述肽的口服用组合物优选为饮食品的形态。另外,上述组合物的应用优选用于基于皮肤组织的弹性蛋白酶活性抑制作用的弹性蛋白增加,进一步优选用于改善皮肤组织的衰老症状。

[0042] (5)一种弹性蛋白酶抑制剂,其特征在于,配合上述用于抑制弹性蛋白酶的组合物而成。

[0043] (6)一种弹性蛋白酶活性抑制方法,其特征在于,口服摄入上述弹性蛋白酶抑制

剂。

[0044] 发明效果

[0045] 本发明的由咖啡黄葵的成熟种子得到的加工物即热水提取物、经热水提取的残渣、蛋白质水解物及苗,以来源于咖啡黄葵种子的特定化合物即环状肽“OF4949-II”作为有效成分,即使微量也对来源于皮肤的成纤维细胞的弹性蛋白酶发挥强力的抑制效果。

[0046] 因此,含上述肽的本发明的用于抑制弹性蛋白酶的组合物及弹性蛋白酶抑制剂可以促进皮肤的更新,从而改善皮肤问题、衰老症状(皱纹、暗沉、松弛等),有助于促进美肤。另外,可以期待使皮肤组织中的弹性蛋白增强,有助于维持肌肤的健康。

[0047] 该效果通过口服摄入或口服给予本发明的用于抑制弹性蛋白酶的组合物而显著显现。因此,配合本发明的用于抑制弹性蛋白酶的组合物及组合物而成的抑制剂尤其在饮食品、医药品、动物饲料等领域中,可直接以上述制剂的形态或配合为上述领域的以往的各种制品的形态有效应用于皮肤改善。

附图说明

[0048] 图1是示出从咖啡黄葵成熟种子的提取物的溶液获得弹性蛋白酶抑制活性组分的工序的流程图。

[0049] 图2是将组分F的浓度以4mg/mL分离时的色谱图。

[0050] 图3是将组分F的浓度以4mg/mL分离时的色谱图。

[0051] 图4是以10mg/mL左右的浓度分取组分(5)-1时的纯化物的色谱图。

具体实施方式

[0052] 以下,对本发明进行详细地说明。首先,本发明的用于抑制弹性蛋白酶的组合物其特征在于,含有咖啡黄葵种子的加工物,所述组合物具有抑制分解存在于生物体组织、特别是皮肤的真皮组织中的弹性蛋白的酶即弹性蛋白酶的作用。

[0053] 另外,本发明的用于抑制弹性蛋白酶的组合物以来源于咖啡黄葵种子的特定化合物即环状肽“OF4949-II”作为有效成分。

[0054] 咖啡黄葵一般有荚的形状为五边形、八边形、圆形等的品种,有颜色为绿色、紫红色、白色等的品种。本发明的咖啡黄葵不限于这些种类,可以使用任意的咖啡黄葵。

[0055] 在本发明中,优选将上述咖啡黄葵的成熟的种子作为原料。成熟的种子是指从植物体生长出的果实(荚)收获的种子或自然产生的飞散的种子,成熟的种子呈深绿色~黑褐色,直径为5mm左右的尺寸,具有只要播种便可发芽的能力。

[0056] 另一方面,未成熟的种子包含在处于生长过程中的荚中,是白色~黄白色的直径约2~4mm的种子,通常可与荚一起供食用。咖啡黄葵的成熟种子是为了栽培咖啡黄葵而由种苗公司市售的种子,使用之是简便的。

[0057] 所述咖啡黄葵种子优选作为以下所述的加工物而采集,即咖啡黄葵种子的提取物、该提取残渣、酶水解物或芽。

[0058] 咖啡黄葵种子的提取物例如可以通过如下的加工处理来制作。将去皮或未去皮的种子粗粉碎或微粉碎,加水制成分散液后,在常温或加热下静置进行提取处理或边适当搅拌边进行提取处理。接着,通过离心分离、过滤等常规方法对该提取液进行处理而除去不溶

物,更加优选在常温或常温以下的低温下进行浓缩和干燥处理或冷冻干燥处理,由此能够制作本发明的提取物。

[0059] 应予说明,在上述提取工序中,在制作热水提取物的情况下,将水分散液设定为约30~约90℃、更加优选设定为约40~约60℃,进行约10分钟~数天、更加优选进行约30分钟~数小时的提取处理,在制作低温提取物的情况下,设定为约10~约30℃、更加优选设定为约15~约25℃,浸渍约30分钟~数天、更加优选浸渍数小时~1天进行提取处理即可。

[0060] 咖啡黄葵种子的提取残渣可以将在上述提取工序中除去的不溶物通过常规方法进行浓缩干燥或冷冻干燥处理来制作。在该情况下,为了防止由霉菌等的产生导致的污染,优选干燥的程度为使水分含量为5质量%以下。应予说明,在与本发明所期望的效果之间的关联方面,本发明的上述残渣优选为在制作上述低温提取物时被分离的残渣(低温提取残渣)。

[0061] 咖啡黄葵种子的酶分解物可以如下进行加工处理来制作。也就是说,将咖啡黄葵种子粉碎制成水分散液,并向其中添加相当于种子质量的约0.1~约5质量%、更加优选为约0.5~约2质量%的蛋白质水解酶,在常温或加温(约30~约90℃、更加优选为约40~约60℃)下静置或适当搅拌,进行约10分钟~数天、更加优选为30分钟~数小时的水解处理。该处理后,通过常规方法将酶加热而使其失活,接着进行离心分离或过滤处理而分离不溶物,优选在常温或常温以下的低温下进行浓缩、干燥处理或冷冻干燥处理,由此可以制作咖啡黄葵种子的酶分解物。应予说明,在本发明中,也可以使用将如上所述处理而得到的咖啡黄葵种子的提取物或提取残渣用水溶解或分散而成的液体代替上述水分散液,并同样地进行酶处理。

[0062] 上述蛋白质水解酶可以使用任何种类、类型的酶,在本发明中,优选碱性蛋白酶和/或中性蛋白酶,进一步优选碱性蛋白酶。在此,碱性蛋白酶只要是在底物的pH为约6.5~12时显示作用的蛋白酶就可以使用,中性蛋白酶只要是在底物的pH为约5~8时显示作用的蛋白酶就没有问题。另外,各蛋白酶不仅可以使用1种,也可以组合使用2种以上,使用后述那样的市售品是简便的。

[0063] 作为碱性蛋白酶,可以列举以下的具体例。但是,本发明并不受这些具体例的任何限定。

[0064] “Protin SD-AY10”、“Protease P“AMANO”3SD”、“プロレザー(注册商标)FG-F”(以上为天野酶(株式会社)制)、“アルカラーゼ(注册商标)2.4LFG”(诺维信公司制)、“オリエンターゼ(注册商标)22BF”(HBI(株式会社)制)、“アロアーゼ(注册商标)XA-10”(Yakult药品工业(株式会社)制)、“スミチーム(注册商标)MP”(新日本化学工业(株式会社)制)、“BIOPRASE OP、SP-20FG、AL-15FG、30G、APL-30和30L”(Nagase ChemteX(株式会社)制)、“OPTIMASE(注册商标)PR89L”、“MALTIFE CT(注册商标)PR6L”(以上,DaniscoUS公司制)、“蛋白酶K”、“胰凝乳蛋白酶”(以上,罗氏公司制)等。

[0065] 作为中性蛋白酶,可以例示出以下物质,但本发明并不受这些物质的任何限定。

[0066] “Flavourzyme(注册商标)”、“PROTAMEX(注册商标)MG”、“Neutrase”(以上为诺维信公司制)、“パンチダーゼ(注册商标)P和MP”、“アロアーゼ(注册商标)AP-10、NP-10及NS”(以上为Yakult药品工业(株式会社)制)、“ヌクレイシン(注册商标)”、“オリエンターゼ(注册商标)10NL及90N”(以上为HBI(株式会社)制)、“Protin P”(大和化成(株式会社)制)、

“Protease A“AMANO”G”、“PapainW40”、“Promeline F”(以上为天野酶(株式会社)制)、“スミチーム(注册商标)LP和PL”(新日本化学工业(株式会社)制)、“食品用精製Papain”、“DENATYME AP”(以上,Nagase ChemteX(株式会社)制)、“胰蛋白酶”(罗氏公司制)等。

[0067] 咖啡黄葵种子的芽可以通过以下方法制作:利用公知的方法使种子发芽、生长发育至萝卜苗型(カイワレ型),并栽培至长出绿叶且茎长达到约5~15cm,对其进行收获、水洗后,进行干燥处理或冷冻干燥处理。

[0068] 如上所述处理而得到的上述加工物是含有咖啡黄葵种子中所含的蛋白质、多糖蛋白复合物、多糖等和/或将它们水解而成的肽类、氨基酸类、低聚糖类、单糖或低聚糖类与肽或与氨基酸的结合体等各种成分的极其复杂的组合物。

[0069] 对构成上述咖啡黄葵种子加工物的复杂组合物进行了深入研究,结果发明人等发现含有环状肽“OF4949-II”作为有效成分。已知环状肽“OF4949-II”强力地抑制氨肽酶B的活性,并且由属于青霉(Penicillium)属的微生物生产(专利文献11),但没有环状肽“OF4949-II”包含在咖啡黄葵成熟种子中这样的报道。

[0070] 环状肽“OF4949-II”例如可以通过如下所述的纯化处理来制作。将咖啡黄葵的成熟种子在加热下静置进行提取处理或边适当搅拌边进行提取处理。接着,通过离心分离、过滤等常规方法对该提取液进行处理而除去不溶物,更加优选在常温或常温以下的低温下进行浓缩和干燥处理或冷冻干燥处理,由此得到提取物。对于得到的提取物,重复使用快速色谱或高效液相色谱浓缩目标组分从而进行纯化。

[0071] 应予说明,在上述纯化工序中,最终通过质量分析、核磁共振装置进行鉴定,确认是环状肽“OF4949-II”。

[0072] 在本发明中,不仅是所述来源于咖啡黄葵种子的环状肽“OF4949-II”,而且即使是由如上所述的微生物等得到的环状肽“OF4949-II”,也可以作为本申请发明的具有弹性蛋白酶抑制作用的有效成分而应用,可以期待同样的效果。

[0073] 在本发明中,可将上述咖啡黄葵种子的加工物直接或与糊精、纤维素、明胶、纯化水等公知的赋形剂合用,制备含有本发明的用于抑制弹性蛋白酶的组合物的液体状、粉末状、颗粒状、胶囊状的抑制剂。该制剂中的咖啡黄葵种子的加工物的含量大致为20质量%以上,如果低于该含量,则难以表现出本发明所期望的效果,因此咖啡黄葵种子的加工物/赋形剂(质量比例)优选为100~约20/0~约80,更加优选为100~约50/0~约50。

[0074] 本发明的用于抑制弹性蛋白酶的组合物及含有该组合物的弹性蛋白酶抑制剂通过口服摄入或口服给予,抑制皮肤组织中的弹性蛋白酶作用而防止弹性蛋白的降低,因此可作为用于改善皮肤的上述问题、恢复衰老症状、促进美肤的美容手段而应用。

[0075] 作为该优选方式,可制成将本发明的弹性蛋白酶抑制剂成型为固体状(粉末、颗粒)、凝胶状(胶状)、糊状或液体状(饮料、酒)的饮食品、医药品、动物饲料等制品。另外,可以适当合用为了制作这些制品而使用的公知的添加物(表面活性剂、增稠剂、抗氧化剂、着色剂、香料等)、不违背本发明的主旨的公知的素材(成纤维细胞增殖促进作用、胶原蛋白、透明质酸等细胞外成分产生促进作用、抗皮肤衰老作用、美肤促进作用等公知的来源于动植物的素材等),通过常规方法制成上述各种制品。

[0076] 实施例

[0077] 接着,列举实施例对本发明进行详细地说明,但本发明并不限于此。应予说明,

以下,只要没有特别说明,份、%为质量基准。

[0078] 实施例1

[0079] (咖啡黄葵种子加工物的制作例)

[0080] 制作例1

[0081] 将鹿儿岛县指宿产的咖啡黄葵的成熟种子用研磨机进行粗粉碎,向100g粗粉碎的种子中加入300 mL蒸馏水,边搅拌边加热,加热至58℃,制备分散液(pH 7.5),向分散液中添加1份蛋白质分解酶(HBI(株式会社)制,商品名:“オリエンターゼ22BF”,碱性蛋白酶),持续缓慢地搅拌5小时。然后,使酶失活(80℃下30分钟),通过离心分离除去不溶物,并进行冷冻干燥,得到酶分解物(样品1)。

[0082] 对比样品1

[0083] 作为对比样品1,使用作为具有弹性蛋白酶抑制作用的公知素材的来源于荔枝种子的市售品(ORIZA油化(株式会社)制,商品名:“荔枝种子提取物-WSP”)。

[0084] 对比样品2

[0085] 作为对比样品2,使用作为具有弹性蛋白酶抑制作用的公知素材的含有白藜芦醇组合物的市售品(BHN(株式会社)制,商品名:“白藜芦醇ε”)。

[0086] 对比样品3

[0087] 作为对比样品3,使用作为来源于植物的公知素材的滨海前胡叶粉末(BHN(株式会社)制,商品名:“滨海前胡叶粉末”)的市售品。

[0088] 对比样品4

[0089] 作为对比样品4,使用作为来源于植物的公知素材的芝麻叶粉末(BHN(株式会社)制,商品名:“芝麻叶粉末”)的市售品。

[0090] 对比样品5

[0091] 作为对比样品5,使用作为来源于咖啡黄葵的公知素材的咖啡黄葵种子粉末(销售者:(株式会社)松本交商,商品名:“Myoxonol LS 9736”)的市售品。

[0092] 制作例2

[0093] 将在制作例1中使用的成熟种子粗粉碎,向100g粗粉碎的种子中加入800 mL水,在80~90℃下加热60分钟后,冷却至室温,进行精密过滤(滤纸)并采集滤液。向该过滤残渣中再次加入600 mL水,并进行同样的处理来采集滤液。将两次的滤液合并、减压浓缩、冷冻干燥并粉碎以制作提取物(样品2)。

[0094] 制作例3

[0095] 将在制作例1中使用的成熟种子粗粉碎,向100g粗粉碎的种子中加入800 mL水,在15~25℃浸渍一晚后,进行精密过滤(滤纸)并采集滤液、减压浓缩、冷冻干燥并粉碎以制作提取物(样品3)。

[0096] 制作例4

[0097] 将制作例3中记载的过滤后的残渣冷冻干燥并粉碎以制作提取残渣(样品4)。

[0098] 制作例5

[0099] 将与制作例1相同的成熟种子在0℃~室温的水中浸渍8~20小时并除去水后,播种到栽培容器中,保存在室温~30℃、湿度75~90%的暗室中,通过适当地喷洒水使其发芽。发芽后转移到室内,在太阳光下、室温25~30℃适当地喷洒水,在5~7天后得到了萝卜苗型(カイ

ワレ型)的苗。对其进行水洗、冷冻干燥和粉碎来制作苗粉碎物(样品5)。

[0100] 对比制作例1

[0101] 在制作例1中,除了将成熟种子替换为未成熟种子以外,进行相同的处理,得到酶分解物(对比样品6)。

[0102] 对比制作例2

[0103] 在制作例1中,除了将成熟种子替换为来源于咖啡黄葵可食用部分(内包有未成熟种子的荚,以下相同)的市售品(エール有限公司制,商品名:“咖啡黄葵粉”)以外,进行相同的处理,得到酶分解物(对比样品7)。

[0104] 对比制作例3

[0105] 在制作例2中,除了将成熟种子替换为来源于咖啡黄葵可食用部分的市售品(エール有限公司制,商品名:“咖啡黄葵粉”)以外,进行相同的处理而得的提取物(对比样品8)。

[0106] 试验例

[0107] 用下述方法检查上述各样品对弹性蛋白酶活性的影响。

[0108] 试验例1:弹性蛋白酶抑制作用(其1)

[0109] 作为测定弹性蛋白酶活性的试验样品,使用上述样品1、对比样品1~4。将各试验样品溶解于100mM的Tris盐酸缓冲液(pH 8.0)中,制备终浓度为40.0~1000.0 μ g/ml的试验溶液。此时,在难以溶解的情况下,添加10%以内的DMSO。

[0110] 将25 μ l该试验溶液和25 μ l来源于人皮肤成纤维细胞的弹性蛋白酶溶液(此处,上述弹性蛋白酶溶液是将人皮肤成纤维细胞(Kurabo株式会社制),以汇合的方式进行预培养,用含有2% FBS的DMEM培养基培养24小时后,用PBS(-)洗涤2次后,加入0.1% triton X-100,通过超声波处理使其溶解。将该溶解液以12000 rpm离心5分钟,回收上清液,将冷冻干燥后的粉末作为粗酶粉末,在各试验中,每次用缓冲液使其溶解。)混合加入96微孔板,在37℃下预加热5分钟。

[0111] 应予说明,作为对照,对向该弹性蛋白酶溶液仅加入100mM的Tris盐酸缓冲液和DMSO而得的混合液也进行相同的处理。

[0112] 然后,加入50 μ l含有作为底物的N-琥珀酰-三丙氨酰-P-硝基苯胺的溶液(将底物溶解于最小量的DMSO,加入100mM Tris盐酸缓冲液(pH8.0)至5mM而得),使反应开始。经过2小时后,使用分光光度计(CORONA电气(株式会社)制,Microplate Reader SH9000 Lab)在405 nm波长光下测定因弹性蛋白酶的作用而游离的硝基苯胺,根据相对于未添加试验样品的对照的吸光度的检测样本的吸光度计算弹性蛋白酶抑制率。弹性蛋白酶抑制率由下述计算式求出。

[0113] 弹性蛋白酶抑制率(%) = {1 - (对照-样品) / (对照-空白)} $\times$ 100

[0114] 将该结果示于表1。在该表中,来源于成纤维细胞的弹性蛋白酶抑制率的程度以将同时实施的对照试验的值设为0时的相对值进行表示。

[0115] 由该表的数据可知,对成熟种子进行酶处理时(样品1),在试验样品的任意浓度下均显示出极高的弹性蛋白酶抑制作用。与此相对,确认了已知弹性蛋白酶抑制作用的荔枝种子提取物(对比样品1)、含有白藜芦醇的组合物(对比样品2)在高浓度时抑制作用提高,但在低浓度时抑制作用小,另外,来源于植物的滨海前胡叶粉末(对比样品3)和芝麻叶粉末(对比样品4)在任一浓度下抑制作用都弱。

表1 弹性蛋白酶抑制作用的程度

[0116]	试验样品及浓度 ($\mu\text{g}/\text{mL}$)		弹性蛋白酶抑制作用 (抑制率)
	对照		0.00
样品1	40		98.11
	200		99.56
	1000		99.85
对比样品1	40		2.55
	200		32.20
	1000		88.35
对比样品2	40		9.15
	200		39.66
	1000		90.85
对比样品3	40		1.50
	200		4.02
	1000		18.68
对比样品4	40		9.20
	200		15.54
	1000		32.69

[0117] 试验例2:弹性蛋白酶抑制作用(其2)

[0118] 在本试验例中,检查除了咖啡黄葵种子的酶分解物以外的加工物及除了成熟种子以外的加工物对弹性蛋白酶抑制作用的影响。在此,弹性蛋白酶抑制活性的测定、该抑制作用的程度的评价通过与试验例1相同的方法实施,但试验溶液的终浓度设定为0.4~10.0 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 。另外,试验样品使用上述的样品1、样品2~5、对比样品5~8。

[0119] 将该结果示于表2。在该表中,弹性蛋白酶抑制作用的程度(抑制率)以将同时实施的对照试验的值设为0时的相对值进行表示。

[0120] 根据该表的数据确认,作为咖啡黄葵的成熟种子的加工物的提取物(样品2、3)、提取残渣(样品4)及苗(样品5)显示出与酶分解物(样品1)相同程度的强力的弹性蛋白酶抑制作用,另一方面,在来源于咖啡黄葵的种子的粉末的情况下(对比样品5),弹性蛋白酶抑制作用差,在将未成熟种子进行酶分解的情况下(对比样品6)、将可食用部分(包含未成熟种子的荚)进行酶处理的情况下(对比样品7)以及热水提取的情况下(对比样品8),几乎未确认到弹性蛋白酶抑制作用。

表2 弹性蛋白酶抑制作用的程度

试验样品及浓度 ($\mu\text{g}/\text{mL}$)		弹性蛋白酶抑制作用 (抑制率)
对照		0.00
样品1	0.4	22.31
	2.0	57.56
	10.0	87.08
样品2	4	14.59
	2.0	42.19
	10.0	79.60
样品3	0.4	15.65
	2.0	39.61
	10.0	73.26
样品4	4	16.00
	2.0	42.08
	10.0	76.60
样品5	0.4	19.65
	2.0	65.75
	10.0	86.86
对比样品5	0.4	4.18
	2.0	14.20
	10.0	29.74
对比样品6	0.4	3.81
	2.0	4.68
	10.0	4.45
对比样品7	0.4	4.23
	2.0	4.00
	10.0	6.32
对比样品8	0.4	3.56
	2.0	4.41
	10.0	7.95

[0121]

[0122] 试验例3:人类监测试验

[0123] 以对以下的试验征得同意的志愿者的成年女性40名(30岁~55岁、平均年龄:44.5岁)为对象,分成两组,每组20名,1组1天2次口服摄入样品1(100mg),1组1天2次口服摄入安慰剂(100mg糊精),持续4周。用肌肤的干燥、色斑、皱纹、紧致、暗沉、松弛、法令纹、妆容贴合、毛孔粗大等项目,对摄入前后的肌肤的变化有无改善进行问卷调查,并进行评价。

[0124] 其结果是,在样品1组中,与摄入前相比,17名志愿者肌肤改善、2名无变化,1名恶化,在安慰剂组中,2名志愿者肌肤改善、14名无变化、4名恶化。肌肤发生了变化的17名志愿者特别是针对皱纹、紧致、松弛、法令纹的项目有选择两个以上项目的改善。另外,还选择了在安慰剂组中未见的皮肤干燥、毛孔粗大的改善。

[0125] 结果提示本发明的咖啡黄葵成熟种子加工物对通过抑制弹性蛋白酶活性而对肌肤的改善是有用的。

[0126] 实施例2

[0127] (环状肽“OF4949-II”的制作例)

[0128] 向从咖啡黄葵的成熟种子得到的5g提取物中加入10mL蒸馏水并充分搅拌,进行超声波处理,离心或静置后回收上清液,作为分离样本。将1mL该分离样本上样到装有制备性分离填料TOYOPEARL HW-40F(东曹)的色谱柱管,并使一定量的20%甲醇流过。

[0129] 如图1所示的流程图那样,将依次洗脱的溶液按每3mL分离到玻璃试管中。

[0130] 试验例

[0131] 通过以下所述的方法检查上述各组分对弹性蛋白酶活性的影响。

[0132] 试验例:弹性蛋白酶抑制作用

[0133] 作为测定弹性蛋白酶活性的试验样品,使用上述各组分。

[0134] 试验方法是在与上述试验例2相同的方法中,将试验溶液的终浓度设定为0.4~10.0 μ g/ml来实施。

[0135] 将该结果示于表3。在该表中,各组分的弹性蛋白酶抑制率的程度以将同时实施的对照试验的值设为0时的相对值进行表示。

[0136] 由该表的数据可知,组分F在其他组分的任意浓度下均显示出极高的弹性蛋白酶抑制作用(%)。

表3 组分A~F的弹性蛋白酶抑制作用的程度

	0.4 μ g/mL	2.0 μ g/mL	10.0 μ g/mL
[0137] 组分A	6.7	2.7	0.8
组分B	8.8	5.9	12.5
组分C	8.3	7.3	10.4
组分D	7.8	3.8	6.7
组分E	6.0	13.4	5.4
组分F	16.8	40.1	74.9

[0138] 然后,将上述组分F按以下方式处理并纯化。将上述组分F浓缩、干燥,以成为1~5mg/mL左右的浓度的方式溶解于蒸馏水。溶解后,使用高效液相色谱(HPLC)以0.7mL/min的流速使用C18柱5C₁₈-MS-II(Nacalai Tesque)进行梯度分析,得到5种组分(按洗脱顺序为(1)~(5)),对各组分的弹性蛋白酶抑制活性同样地进行测定,结果确认组分(5)具有最高的抑制活性。

[0139] 应予说明,在梯度分析中,HPLC的流动相中梯度使用含有0.1%甲酸的水(流动相A)和乙腈(流动相B),流动相B的比例为0-5(min):0%、15(min):50%、15-25(min):80%。

[0140] 进而,在同样的条件下将组分(5)分离成3种组分((5)-1~3)的情况下,实质上仅在(5)-1中确认到高抑制活性。将结果示于表4。

[0141] 将组分F的浓度以4mg/mL进行分离的情况下的色谱图示于图2、图3。在图2、3中,纵轴为紫外线吸收强度(mV),横轴为保持时间(min)。

表4 组分(5)~(5)-1~3的弹性蛋白酶抑制作用的程度

	0.4 $\mu\text{g/mL}$	2.0 $\mu\text{g/mL}$	10.0 $\mu\text{g/mL}$
[0142] 组分(5)	85.55	93.55	95.18
组分(5)-1	81.60	92.78	95.53
组分(5)-2	4.56	16.60	47.38
组分(5)-3	2.41	5.76	19.86

[0143] 对抑制活性高的组分(5)-1同样地进行重复的操作而得到足够的量后,使用作为氨基柱的Intrada Amino Acid(Imtakt)用HPLC以0.6mL/min的流速进行梯度分析,回收10.5分钟左右的峰,进行纯化。

[0144] 应予说明,在梯度分析中,HPLC的流动相中梯度使用含有0.1%甲酸的水(流动相A)和乙腈(流动相B),流动相B的比例为0-3(min):90%、10(min):0%、10-15(min):0%。

[0145] 例如,将以10mg/mL左右的浓度分取组分(5)-1情况下的纯化物的色谱图示于图4。在图4中,纵轴为紫外线吸收强度(mV),横轴为保持时间(min)。

[0146] 将在上述处理中得到的纯化物进样至直接注射/质量分析(DI/MS)和核磁共振分析(NMR),推定分子量为472、分子式为 $\text{C}_{22}\text{H}_{24}\text{N}_4\text{O}_8$,确认是上述式I所示的环状肽的“OF4949-II”(CAS编号:93375-50-9)。

[0147] 试做例1:硬胶囊制剂

[0148] 将上述样品1投入胶囊填充机,通过常规方法试做每1粒的内容量为100mg的明胶被覆硬胶囊制剂。在作为监测试验中口服摄入硬胶囊制剂(配合有制作例1的成熟咖啡黄葵种子的制剂)的情况下,得到了对皮肤的改善有用的认知。因此,本硬胶囊制剂可以用作用于改善皮肤的可口口服摄入的营养辅助食品、药品或动物用饲料。

[0149] 试做例2:片剂

[0150] 将以下所示的原料通过常规方法压片而试做成片剂。在此,作为成熟咖啡黄葵种子,使用上述样品1~5中的任一种。这些片剂均稳定且容易服用,可以用作营养辅助食品、医药品。

	(配合原料)	(每一片的质量(mg))
	1. 咖啡黄葵成熟种子	100
	2. 糊精	100
[0151]	3. 马铃薯淀粉	49
	4. 微晶纤维素	20
	5. 合成硅酸铝	30
	6. 硬脂酸钙	1

[0152] 试做例3:营养辅助食品

[0153] 将100mg上述样品1、400mg亮氨酸、250mg异亮氨酸、200mg缬氨酸和300mg精氨酸混合、过筛,将如此所得的粉末包装并填充以试做营养辅助食品。该营养辅助食品不仅可以用于人,也可以用于宠物食品。

[0154] 试做例4:食品(面类)

[0155] 将上述样品1设为10g、荞麦粉设为350g、高筋粉设为150g,将它们边混合边过筛,混合150ml水,试做面条。所制面条与市售品相比,风味、口感没有不适感。

[0156] 试做例5:清凉饮料水、饮剂

[0157] 在100mL市售的清凉饮料水和饮剂中加入500mg或100mg上述样品1或样品2并充分混合,试做饮料。该饮料与原来的清凉饮料水和饮剂相比,风味和保存稳定性没有任何颜色。它可以作为清凉饮料或饮剂而应用。

[0158] 产业上的可应用性

[0159] 由咖啡黄葵的成熟种子得到的加工物、特别是由咖啡黄葵的成熟种子得到的环状肽“0F4949-II”具有抑制来源于成纤维细胞的弹性蛋白酶活性的作用,因此,通过将其口服摄入或给予,能够作为有助于恢复皮肤本来的生理功能、皮肤问题的改善、美肤的促进等的饮食品、医药品、动物饲料等而有效应用。

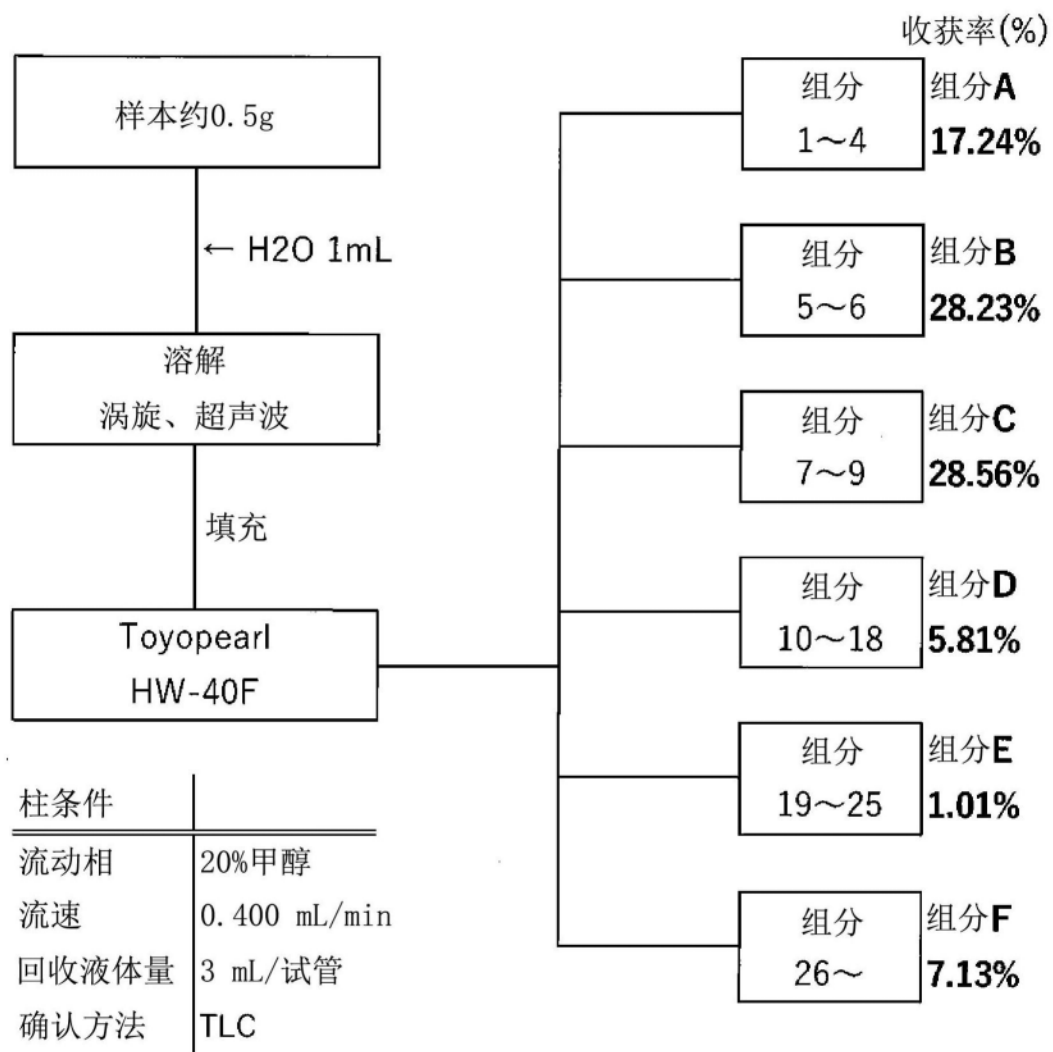


图1

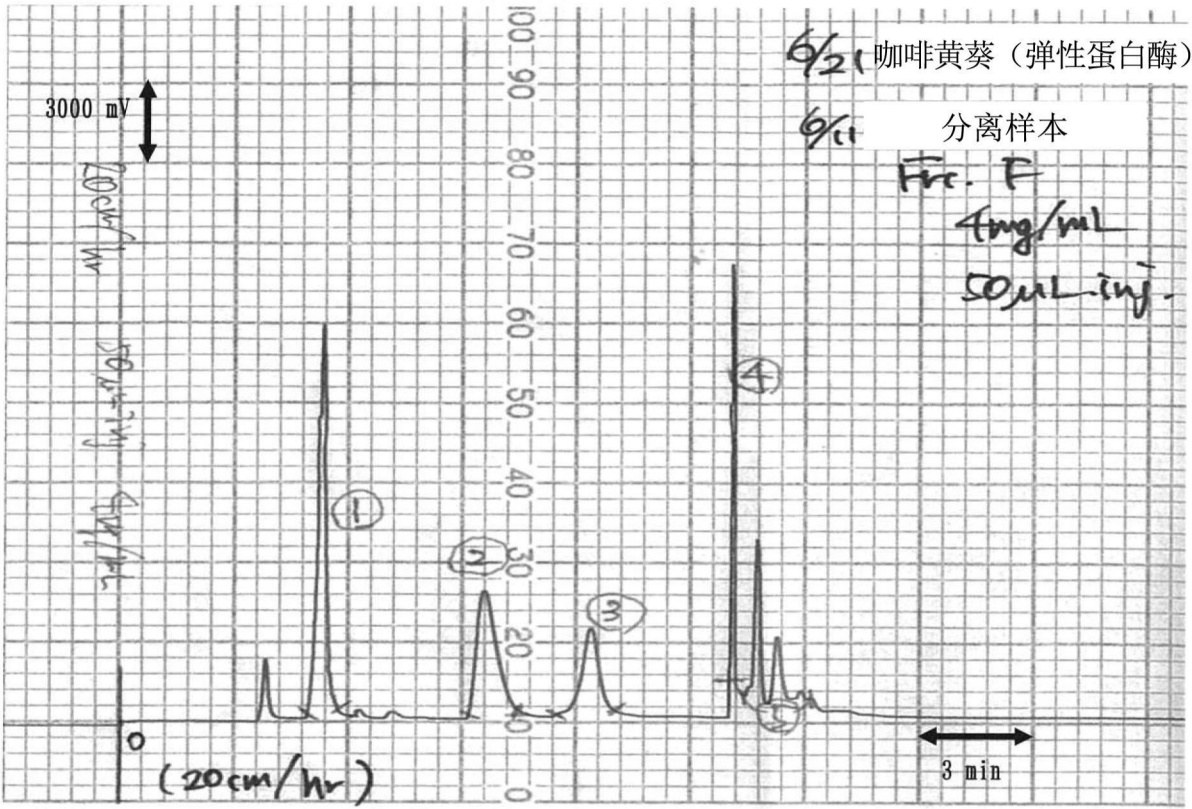


图2

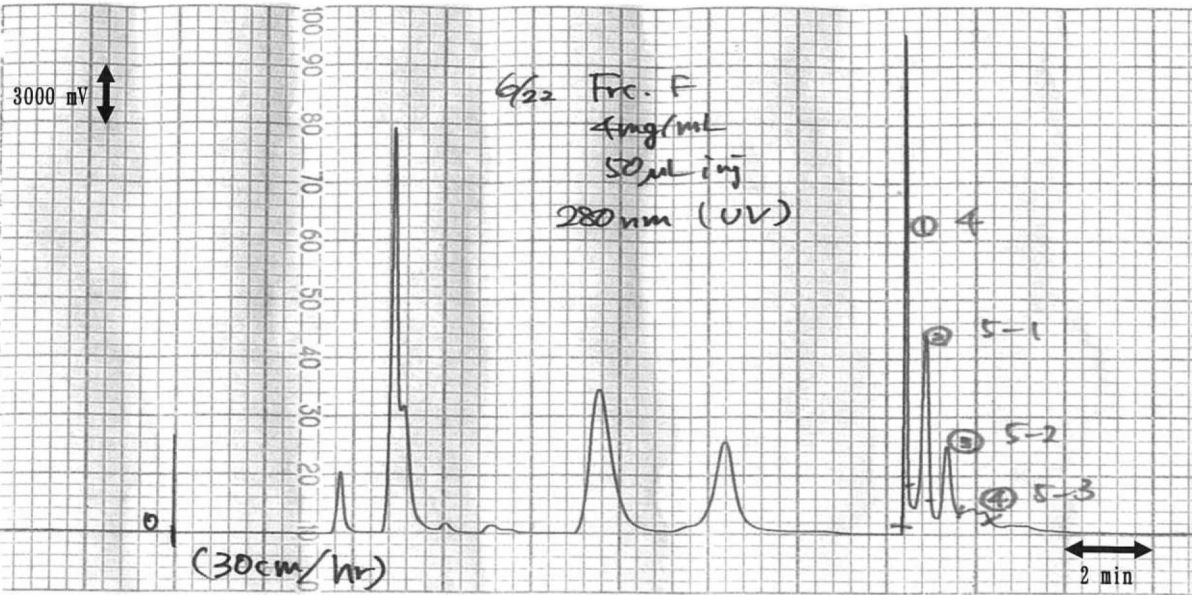


图3

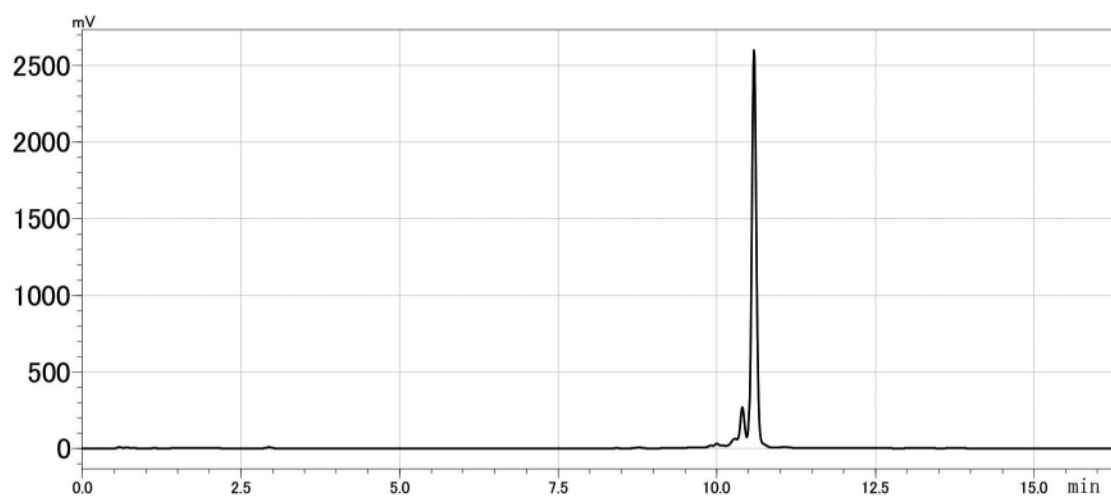


图4