



(12) 发明专利申请

(10) 申请公布号 CN 113316472 A

(43) 申请公布日 2021.08.27

(21) 申请号 201980086446.1

(22) 申请日 2019.12.24

(30) 优先权数据

2018-245318 2018.12.27 JP

(85) PCT国际申请进入国家阶段日

2021.06.25

(86) PCT国际申请的申请数据

PCT/JP2019/050479 2019.12.24

(87) PCT国际申请的公布数据

W02020/138023 JA 2020.07.02

(71) 申请人 三得利控股株式会社

地址 日本大阪府

(72) 发明人 赤泽壮太

(74) 专利代理机构 北京信慧永光知识产权代理  
有限责任公司 11290

代理人 洪俊梅 杨国强

(51) Int.Cl.

A61P 43/00 (2006.01)

A61P 17/00 (2006.01)

A61K 36/185 (2006.01)

A61K 36/28 (2006.01)

A61K 36/31 (2006.01)

A61K 36/48 (2006.01)

A61K 36/736 (2006.01)

A61K 36/76 (2006.01)

A61K 36/882 (2006.01)

权利要求书2页 说明书13页

(54) 发明名称

变性弹性蛋白的分解降低的抑制剂、正常的弹性蛋白纤维的维持剂、弹性蛋白-抑弹性蛋白酶蛋白复合体形成抑制剂及具有弹性蛋白-抑弹性蛋白酶蛋白复合体形成抑制作用的物质的筛选方法

(57) 摘要

本发明的目的在于,提供可抑制弹性蛋白-抑弹性蛋白酶蛋白复合体形成的弹性蛋白-抑弹性蛋白酶蛋白复合体形成抑制剂、弹性蛋白-抑弹性蛋白酶蛋白复合体形成抑制用组合物、具有弹性蛋白-抑弹性蛋白酶蛋白复合体形成抑制作用的物质的筛选方法、抑制弹性蛋白-抑弹性蛋白酶蛋白复合体的形成的方法、抑制变性弹性蛋白的分解降低的方法及维持正常的弹性蛋白纤维的方法等。本发明涉及一种变性弹性蛋白的分解降低的抑制剂等,其特征在于,含有选自西番莲萃取物、金盏菊萃取物、白芥萃取物、药蜀葵萃取物、白柳萃取物、菖蒲萃取物、桃仁萃取物及大豆萃取物中的1种以上的植物萃取物作为有效成分。

1. 一种抑制变性弹性蛋白的分解降低的制剂,其特征在於,含有选自西番莲萃取物、金盏菊萃取物、白芥萃取物、药蜀葵萃取物、白柳萃取物、菖蒲萃取物、桃仁萃取物及大豆萃取物中的1种以上的植物萃取物作为有效成分。

2. 一种维持正常的弹性蛋白纤维的制剂,其特征在於,含有选自西番莲萃取物、金盏菊萃取物、白芥萃取物、药蜀葵萃取物、白柳萃取物、菖蒲萃取物、桃仁萃取物及大豆萃取物中的1种以上的植物萃取物作为有效成分。

3. 根据权利要求1或2所述的制剂,其特征在於,抑制弹性蛋白-抑弹性蛋白酶蛋白复合体的形成。

4. 一种抑制弹性蛋白-抑弹性蛋白酶蛋白复合体形成的制剂,其特征在於,含有选自西番莲萃取物、金盏菊萃取物、白芥萃取物、药蜀葵萃取物、白柳萃取物、菖蒲萃取物、桃仁萃取物及大豆萃取物中的1种以上的植物萃取物作为有效成分。

5. 根据权利要求4所述的抑制弹性蛋白-抑弹性蛋白酶蛋白复合体形成的制剂,其特征在於,通过抑制弹性蛋白-抑弹性蛋白酶蛋白复合体形成,用于促进弹性蛋白纤维的周转。

6. 根据权利要求1~5中任一项所述的制剂,其特征在於,所述植物萃取物为选自西番莲萃取物、金盏菊萃取物及白芥萃取物中的1种以上。

7. 一种变性弹性蛋白的分解降低的抑制用的组合物,其特征在於,含有权利要求1、3或6所述的抑制变性弹性蛋白的分解降低的制剂。

8. 一种正常的弹性蛋白纤维的维持用的组合物,其特征在於,含有权利要求2、3或6所述的维持正常的弹性蛋白纤维的制剂。

9. 一种弹性蛋白-抑弹性蛋白酶蛋白复合体形成抑制用的组合物,其特征在於,含有权利要求4~6中任一项所述的抑制弹性蛋白-抑弹性蛋白酶蛋白复合体形成的制剂。

10. 根据权利要求7~9中任一项所述的组合物,其特征在於,为皮肤外用剂。

11. 根据权利要求7~10中任一项所述的组合物,其特征在於,为化妆品。

12. 根据权利要求7~9中任一项所述的组合物,其特征在於,为饮食品。

13. 一种具有弹性蛋白-抑弹性蛋白酶蛋白复合体形成抑制作用的物质的筛选方法,其特征在於,含有以下工序:在存在或不存在被检测物质的情况下,使抑弹性蛋白酶蛋白与固相化弹性蛋白接触的工序(a),

检测基于所述被检测物质的存在的所述抑弹性蛋白酶蛋白与固相化弹性蛋白的结合的阻碍的工序(b),及,

因所述被检测物质的存在抑弹性蛋白酶蛋白与固相化弹性蛋白的结合得到阻碍时,将所述被检测物质作为具有弹性蛋白-抑弹性蛋白酶蛋白复合体形成抑制作用的物质来选择的工序(c)。

14. 一种抑制弹性蛋白-抑弹性蛋白酶蛋白复合体的形成的方法,其特征在於,投用选自西番莲萃取物、金盏菊萃取物、白芥萃取物、药蜀葵萃取物、白柳萃取物、菖蒲萃取物、桃仁萃取物及大豆萃取物中的1种以上的植物萃取物。

15. 一种抑制变性弹性蛋白的分解降低的方法,其特征在於,投用选自西番莲萃取物、金盏菊萃取物、白芥萃取物、药蜀葵萃取物、白柳萃取物、菖蒲萃取物、桃仁萃取物及大豆萃取物中的1种以上的植物萃取物。

16. 一种维持正常的弹性蛋白纤维的方法,其特征在於,投用选自西番莲萃取物、金盏

菊萃取物、白芥萃取物、药蜀葵萃取物、白柳萃取物、菖蒲萃取物、桃仁萃取物及大豆萃取物中的1种以上的植物萃取物。

17. 一种选自西番莲萃取物、金盏菊萃取物、白芥萃取物、药蜀葵萃取物、白柳萃取物、菖蒲萃取物、桃仁萃取物及大豆萃取物中的1种以上的植物萃取物的应用,其特征在于,用于抑制弹性蛋白-抑弹性蛋白酶蛋白复合体的形成。

18. 一种选自西番莲萃取物、金盏菊萃取物、白芥萃取物、药蜀葵萃取物、白柳萃取物、菖蒲萃取物、桃仁萃取物及大豆萃取物中的1种以上的植物萃取物的应用,其特征在于,用于抑制变性弹性蛋白的分解降低。

19. 一种选自西番莲萃取物、金盏菊萃取物、白芥萃取物、药蜀葵萃取物、白柳萃取物、菖蒲萃取物、桃仁萃取物及大豆萃取物中的1种以上的植物萃取物的应用,其特征在于,用于维持正常的弹性蛋白纤维。

## 变性弹性蛋白的分解降低的抑制剂、正常的弹性蛋白纤维的维持剂、弹性蛋白-抑弹性蛋白酶蛋白复合体形成抑制剂及具有弹性蛋白-抑弹性蛋白酶蛋白复合体形成抑制作用的物质的筛选方法

### 技术领域

[0001] 本发明涉及变性弹性蛋白的分解降低的抑制剂、正常的弹性蛋白纤维的维持剂及弹性蛋白-抑弹性蛋白酶蛋白复合体形成抑制剂。本发明还涉及变性弹性蛋白的分解降低的抑制用组合物、正常的弹性蛋白纤维的维持用组合物及弹性蛋白-抑弹性蛋白酶蛋白复合体形成抑制用组合物。本发明进一步涉及具有弹性蛋白-抑弹性蛋白酶蛋白复合体形成抑制作用的物质的筛选方法。此外,本发明涉及抑制弹性蛋白-抑弹性蛋白酶蛋白复合体的形成的方法、抑制变性弹性蛋白的分解降低的方法及维持正常的弹性蛋白纤维的方法等。此外,本发明涉及用于抑制弹性蛋白-抑弹性蛋白酶蛋白复合体的形成的植物萃取物的应用、用于抑制变性弹性蛋白的分解降低的植物萃取物的应用、用于维持正常的弹性蛋白纤维的植物萃取物的应用。

### 背景技术

[0002] 弹性蛋白为弹性蛋白纤维(弹性纤维)的主要构成成分,在皮肤、血管、肺等需要弹性来表现其功能的组织中广泛表达。例如在皮肤真皮中,弹性蛋白纤维赋予皮肤弹力性,具有保持紧致的功能,因年龄增加、紫外线等要因,变性而失去伸缩性等。尤其,皮肤常年暴露于紫外线,真皮中变性弹性蛋白积累并沉着,缺乏弹力性,被认为是皱纹多的日光弹性纤维症的原因。

[0003] 作为表现日光弹性纤维症一般的局部累积变性弹性蛋白的原因之一,考虑变性弹性蛋白分解的降低。在暴露于紫外线的真皮中,观察到弹性蛋白纤维和抑弹性蛋白酶蛋白的共同存在,暗示弹性蛋白与抑弹性蛋白酶蛋白形成蛋白质复合体。抑弹性蛋白酶蛋白为弹性蛋白酶的阻碍剂,弹性蛋白与抑弹性蛋白酶蛋白结合形成复合体(弹性蛋白-抑弹性蛋白酶蛋白复合体)时,对于基于弹性蛋白酶的分解表现抵抗性。

[0004] 而在植物萃取物中,报告有存在具有各种有用的作用的物质。例如专利文献1中,作为黑色素生成抑制剂记载有白芥子萃取物。

[0005] 专利文献

[0006] 专利文献1:日本特开2005-154375号公报

### 发明内容

[0007] 如上所述,弹性蛋白与抑弹性蛋白酶蛋白结合形成弹性蛋白-抑弹性蛋白酶蛋白复合体时,该复合体对弹性蛋白酶表现出抗性。从而弹性蛋白-抑弹性蛋白酶蛋白复合体的形成,使弹性蛋白的分解降低,延缓弹性蛋白纤维的周转(turnover)。只要可抑制弹性蛋白-抑弹性蛋白酶蛋白复合体形成,例如可抑制变性弹性蛋白的分解降低,促进弹性蛋白纤维的周转。此外,期待可抑制或改善变性弹性蛋白的累积,可维持正常的弹性蛋白纤维。专

利文献1中,作为黑色素生成抑制剂记载有白芥子萃取物,但是关于具有弹性蛋白-抑弹性蛋白酶蛋白复合体形成抑制作用的物质并未进行研究。

[0008] 本发明的目的在于提供一种可抑制弹性蛋白-抑弹性蛋白酶蛋白复合体形成的弹性蛋白-抑弹性蛋白酶蛋白复合体形成抑制剂及弹性蛋白-抑弹性蛋白酶蛋白复合体形成抑制用组合物。此外,本发明的目的在于提供一种具有弹性蛋白-抑弹性蛋白酶蛋白复合体形成抑制作用的物质的筛选方法。此外,本发明的目的在于提供一种抑制弹性蛋白-抑弹性蛋白酶蛋白复合体的形成的方法、抑制变性弹性蛋白的分解降低的方法及维持正常的弹性蛋白纤维的方法等。

[0009] 本发明者为了解决上述课题进行深入研究,发现西番莲等特定的植物的萃取物,具有弹性蛋白-抑弹性蛋白酶蛋白复合体形成抑制作用,从而完成了本发明。

[0010] 本发明并不限于以下,但包含以下弹性蛋白-抑弹性蛋白酶蛋白复合体形成抑制剂等。

[0011] [1]一种抑制变性弹性蛋白的分解降低的制剂,其特征在于,含有选自西番莲萃取物、金盏菊萃取物、白芥萃取物、药蜀葵萃取物、白柳萃取物、菖蒲萃取物、桃仁萃取物及大豆萃取物中的1种以上的植物萃取物作为有效成分。

[0012] [2]一种维持正常的弹性蛋白纤维的制剂,其特征在于,含有选自西番莲萃取物、金盏菊萃取物、白芥萃取物、药蜀葵萃取物、白柳萃取物、菖蒲萃取物、桃仁萃取物及大豆萃取物中的1种以上的植物萃取物作为有效成分。

[0013] [3]根据上述[1]或[2]所述的制剂,其特征在于,抑制弹性蛋白-抑弹性蛋白酶蛋白复合体的形成。

[0014] [4]一种抑制弹性蛋白-抑弹性蛋白酶蛋白复合体形成的制剂,其特征在于,含有选自西番莲萃取物、金盏菊萃取物、白芥萃取物、药蜀葵萃取物、白柳萃取物、菖蒲萃取物、桃仁萃取物及大豆萃取物中的1种以上的植物萃取物作为有效成分。

[0015] [5]根据上述[4]所述的抑制弹性蛋白-抑弹性蛋白酶蛋白复合体形成的制剂,其特征在于,通过抑制弹性蛋白-抑弹性蛋白酶蛋白复合体形成,用于促进弹性蛋白纤维的周转。

[0016] [6]根据上述[1]~[5]中任一项所述的制剂,其特征在于,所述植物萃取物为选自西番莲萃取物、金盏菊萃取物及白芥萃取物中的1种以上。

[0017] [7]一种变性弹性蛋白的分解降低的抑制用的组合物,其特征在于,含有上述[1]、[3]或[6]所述的抑制变性弹性蛋白的分解降低的制剂。

[0018] [8]一种正常的弹性蛋白纤维的维持用的组合物,其特征在于,含有上述[2]、[3]或[6]所述的维持正常的弹性蛋白纤维的制剂。

[0019] [9]一种弹性蛋白-抑弹性蛋白酶蛋白复合体形成抑制用的组合物,其特征在于,含有上述[4]~[6]中任一项所述的抑制弹性蛋白-抑弹性蛋白酶蛋白复合体形成的制剂。

[0020] [10]根据上述[7]~[9]中任一项所述的组合物,其特征在于,为皮肤外用剂。

[0021] [11]根据上述[7]~[10]中任一项所述的组合物,其特征在于,为化妆品。

[0022] [12]根据上述[7]~[9]中任一项所述的组合物,其特征在于,为饮食品。

[0023] [13]一种具有弹性蛋白-抑弹性蛋白酶蛋白复合体形成抑制作用的物质的筛选方法,其特征在于,含有以下工序:在存在或不存在被检测物质的情况下,使抑弹性蛋白酶蛋

白与固相化弹性蛋白接触的工序(a),检测基于上述被检测物质的存在的上述抑弹性蛋白酶蛋白与固相化弹性蛋白的结合的阻碍的工序(b),及因上述被检测物质的存在抑弹性蛋白酶蛋白与固相化弹性蛋白的结合得到阻碍时,将所述被检测物质作为具有弹性蛋白-抑弹性蛋白酶蛋白复合体形成抑制作用的物质来选择的工序(c)。

[0024] [14]一种抑制弹性蛋白-抑弹性蛋白酶蛋白复合体的形成的方法,其特征在于,投用选自西番莲萃取物、金盏菊萃取物、白芥萃取物、药蜀葵萃取物、白柳萃取物、菖蒲萃取物、桃仁萃取物及大豆萃取物中的1种以上的植物萃取物。

[0025] [15]一种抑制变性弹性蛋白的分解降低的方法,其特征在于,投用选自西番莲萃取物、金盏菊萃取物、白芥萃取物、药蜀葵萃取物、白柳萃取物、菖蒲萃取物、桃仁萃取物及大豆萃取物中的1种以上的植物萃取物。

[0026] [16]一种维持正常的弹性蛋白纤维的方法,其特征在于,投用选自西番莲萃取物、金盏菊萃取物、白芥萃取物、药蜀葵萃取物、白柳萃取物、菖蒲萃取物、桃仁萃取物及大豆萃取物中的1种以上的植物萃取物。

[0027] [17]一种选自西番莲萃取物、金盏菊萃取物、白芥萃取物、药蜀葵萃取物、白柳萃取物、菖蒲萃取物、桃仁萃取物及大豆萃取物中的1种以上的植物萃取物的应用,其特征在于,用于抑制弹性蛋白-抑弹性蛋白酶蛋白复合体的形成。

[0028] [18]一种选自西番莲萃取物、金盏菊萃取物、白芥萃取物、药蜀葵萃取物、白柳萃取物、菖蒲萃取物、桃仁萃取物及大豆萃取物中的1种以上的植物萃取物的应用,其特征在于,用于抑制变性弹性蛋白的分解降低。

[0029] [19]一种选自西番莲萃取物、金盏菊萃取物、白芥萃取物、药蜀葵萃取物、白柳萃取物、菖蒲萃取物、桃仁萃取物及大豆萃取物中的1种以上的植物萃取物的应用,其特征在于,用于维持正常的弹性蛋白纤维。

[0030] 根据本发明,可提供可抑制弹性蛋白-抑弹性蛋白酶蛋白复合体形成的弹性蛋白-抑弹性蛋白酶蛋白复合体形成抑制剂及弹性蛋白-抑弹性蛋白酶蛋白复合体形成抑制用组合物等。此外,根据本发明,可提供具有弹性蛋白-抑弹性蛋白酶蛋白复合体形成抑制作用的物质的筛选方法。

[0031] 通过抑制弹性蛋白-抑弹性蛋白酶蛋白复合体形成,可抑制变性弹性蛋白的分解降低。此外,抑制弹性蛋白-抑弹性蛋白酶蛋白复合体形成,也可有助于维持正常的弹性蛋白纤维。根据本发明,可提供抑制弹性蛋白-抑弹性蛋白酶蛋白复合体的形成的方法、抑制变性弹性蛋白的分解降低的方法及维持正常的弹性蛋白纤维的方法等。

## 具体实施方式

[0032] 以下,对本发明进行说明。然而,本发明不限于以下实施方式,可在不改变本发明的要旨的范围内适当变更来适用。

[0033] 本发明的弹性蛋白-抑弹性蛋白酶蛋白复合体形成抑制剂含有选自西番莲萃取物、金盏菊萃取物、白芥萃取物、药蜀葵萃取物、白柳萃取物、菖蒲萃取物、桃仁萃取物及大豆萃取物中的1种以上的植物萃取物作为有效成分。

[0034] 如后述实施例所示,上述植物萃取物具有阻碍弹性蛋白与抑弹性蛋白酶蛋白结合形成复合体(弹性蛋白-抑弹性蛋白酶蛋白复合体)的作用。上述植物萃取物用于抑制弹性

蛋白-抑弹性蛋白酶蛋白复合体形成。抑制弹性蛋白-抑弹性蛋白酶蛋白复合体形成,也可阻碍弹性蛋白与抑弹性蛋白酶蛋白的结合。

[0035] 如上所述,由于弹性蛋白-抑弹性蛋白酶蛋白复合体的形成,弹性蛋白的分解降低。通过抑制弹性蛋白-抑弹性蛋白酶蛋白复合体的形成,可抑制变性弹性蛋白的分解降低。通过抑制变性弹性蛋白的分解降低,弹性蛋白纤维的周转得到促进,期待皮肤等的组织中的变性弹性蛋白的积累得到抑制或改善。此外,期待可维持正常的弹性蛋白纤维。

[0036] 本发明中,正常的弹性蛋白纤维是指具有弹性蛋白纤维本来的功能及物性(强度、粘弹性等)的弹性蛋白纤维。变性弹性蛋白是指与本来相比所具有的功能或物性损坏的弹性蛋白纤维及其构成因子(原弹性蛋白、弹性蛋白分解物等)。

[0037] 本发明中,仅称弹性蛋白时,以及弹性蛋白-抑弹性蛋白酶蛋白复合体中的弹性蛋白,包括作为弹性蛋白纤维的基础的原弹性蛋白、弹性蛋白纤维中所含的弹性蛋白、及伴随年龄增长或刺激可见一部分结构的变化、分解或片段化的原弹性蛋白或弹性蛋白纤维。

[0038] 所谓正常的弹性蛋白纤维的维持是指抑制正常的弹性蛋白纤维的量以及本来的功能及物性的降低。抑制正常的弹性蛋白纤维的量以及本来的功能及物性的降低,在本发明中与未使用作为有效成分所使用的植物萃取物的情况相比,正常的弹性蛋白纤维的量及该本来的功能及物性的降低得到抑制即可。

[0039] 一种方式中,本发明的弹性蛋白-抑弹性蛋白酶蛋白复合体形成抑制剂,由于抑制弹性蛋白-抑弹性蛋白酶蛋白复合体形成,适合用于促进弹性蛋白纤维的周转。此外,上述植物萃取物抑制弹性蛋白-抑弹性蛋白酶蛋白复合体的形成,因此可用于抑制变性弹性蛋白的分解降低及维持正常的弹性蛋白纤维。

[0040] 本发明还包含一种变性弹性蛋白的分解降低的抑制剂及正常的弹性蛋白纤维的维持剂,其特征在于,含有选自西番莲萃取物、金盏菊萃取物、白芥萃取物、药蜀葵萃取物、白柳萃取物、菖蒲萃取物、桃仁萃取物及大豆萃取物中的1种以上的植物萃取物作为有效成分。

[0041] 以下将本发明的弹性蛋白-抑弹性蛋白酶蛋白复合体形成抑制剂、变性弹性蛋白的分解降低的抑制剂及正常的弹性蛋白纤维的维持剂统称复合体形成抑制剂等。

[0042] 本发明的复合体形成抑制剂等中,也可将2种以上上述植物萃取物组合作为有效成分使用。其中,由于弹性蛋白-抑弹性蛋白酶蛋白复合体形成抑制作用高,作为植物萃取物,优选选自西番莲萃取物、金盏菊萃取物及白芥萃取物中的1种以上。

[0043] 本发明中,西番莲是指西番莲科西番莲属(*Passifloraceae Passiflora*)的水果西番莲(*Passiflora edulis*(学名))的果实。金盏菊是指菊科金盏菊属(*Asteraceae Calendula*)的*Calendula officinalis*(学名)。金盏菊别名也称作*Calendula*。白芥是指十字花科白芥属(*Brassicaceae Sinapis*)的*Sinapis alba*(或*Brassica alba*)(学名)。药蜀葵是指锦葵科蜀葵属(*Malvaceae Althaea*)的*Althaea officinalis*(学名)。药蜀葵别名也称作*Usubenitachioai*。白柳是指杨柳科杨柳属(*Salicaceae Salix*)的*Salix alba*(学名)。菖蒲是指菖蒲科菖蒲属(*Acoraceae Martinov Acorus*)的*Acorus calamus*(学名)。桃仁是指蔷薇科桃属(*Rosaceae Amygdalus*)的*Prunus persica*(或*Prunus persica var. davidiana*)(学名)的种子(桃仁)。大豆是指豆科大豆属(*Fabaceae Glycine*)的*Glycine max*(学名)。

[0044] 西番莲萃取物为水果西番莲的果实的萃取物。桃仁萃取物是桃的种子的萃取物。金盏菊、白芥、药蜀葵、白柳、菖蒲及大豆的萃取物可通过用溶剂对这些植物的任意部分(例如根、根茎、茎、叶、树皮、花、果实、种子)进行萃取来制造。萃取中,可将多部位组合使用。

[0045] 金盏菊萃取物优选金盏菊花的萃取物。白芥萃取物优选白芥种子的萃取物。药蜀葵萃取物优选药蜀葵根的萃取物。白柳萃取物优选白柳树皮的萃取物。菖蒲萃取物优选菖蒲根茎的萃取物。大豆萃取物优选大豆芽的萃取物。

[0046] 为了获得植物萃取物的植物萃取方法并无特别限定,可通过植物成分的萃取中所使用的通常的萃取方法来获得。萃取方法可适当设定,萃取条件也无特别限定。例如,优选通过在常温或加温下用溶剂(萃取溶剂)对上述植物进行萃取来获得植物萃取物。在植物萃取物的制备中,可直接将作为原料的上述植物添加至萃取工序,也可粉碎、切断或干燥后添加至萃取工序。本发明中,植物萃取物可为直接对上述植物进行萃取而得的萃取物,也可为从将该植物粉碎、切断或干燥后的物质中萃取而得的萃取物。优选为从将上述植物粉碎、切断或干燥后的物质中所得的萃取物。

[0047] 植物萃取物的制备中所用的萃取溶剂可适当选择,可使用植物成分的萃取中通常使用的物质。做为萃取溶剂,例如可列举水;甲醇、乙醇、丙醇、丁醇等碳原子数1~5的一元醇;乙二醇、丙二醇、1,2-丁二醇、1,3-丁二醇、1,4-丁二醇、2,3-丁二醇等碳原子数2~5的多元醇;丙酮、甲基乙基酮等酮;乙酸甲酯、乙酸乙酯等酯;四氢呋喃、乙醚等链状及环状醚;聚乙二醇等聚醚;角鲨烷等。这些可单独使用,也可使用将2种以上组合的混合溶剂(混合液)。作为碳原子数1~5的一元醇,优选碳原子数1~4的物质,更优选碳原子数2~4的物质,进一步优选乙醇。作为碳原子数2~5的多元醇,优选碳原子数2~4的二元或三元醇,更优选二元醇,进一步优选1,3-丁二醇。其中,作为萃取溶剂,优选水、碳原子数1~5的一元醇、碳原子数2~5的多元醇、这些的2种以上的混合溶剂,更优选水、碳原子数2~4的一元醇或其水溶液、碳原子数2~4的二元醇或其水溶液,进一步优选水、乙醇、乙醇水溶液、1,3-丁二醇、1,3-丁二醇水溶液,特别优选水、乙醇水溶液或1,3-丁二醇水溶液。在一种方式中,乙醇水溶液及1,3-丁二醇水溶液优选乙醇或1,3-丁二醇浓度为10~98体积%,更优选30~90体积%,进一步优选30~70体积%。作为本发明的植物萃取物,可优选使用上述溶剂萃取物。

[0048] 在一种方式中,作为西番莲萃取物、金盏菊萃取物及药蜀葵萃取物,优选使用1,3-丁二醇水溶液对上述植物进行萃取而得的萃取物。作为白柳萃取物、菖蒲萃取物及桃仁萃取物,优选使用乙醇水溶液对上述植物进行萃取而得的萃取物。作为白芥萃取物及大豆萃取物,优选使用水(优选热水)对上述植物进行萃取而得的萃取物。

[0049] 萃取时可添加酸或碱来调节萃取溶剂的pH。萃取后,优选从萃取液中去除植物残渣(萃取后的植物体或其部分)。从萃取液中去除植物残渣的方法并无特别限定,可列举过滤,离心分离等的公知的分离方法。

[0050] 作为植物的萃取方法的一个示例,例如可使用以下方法。直接将植物或干燥后的植物粉碎,以重量计加入0.1~30倍量的萃取溶剂,于常压下,于室温下优选萃取10分钟~15天,更优选30分钟~10天,进一步优选1小时~7天,或在萃取溶剂的沸点附近,优选萃取10分钟~1天(更优选10分钟~2小时)左右后过滤得到滤液。萃取时可静置,也可进行适当搅拌。此外,可直接将所得滤液(植物萃取液)作为植物萃取物,也可根据需要进行稀释、浓缩或干燥等。

[0051] 本发明中,通过萃取而得的植物萃取液可直接作为植物萃取物使用。此外,只要不损害本发明的效果,也可通过公知的方法稀释、浓缩或干燥,制成稀释液、浓缩物或粉末,还可制备成膏状使用。作为干燥方法,例如可列举冷冻干燥、喷雾干燥等。进一步,关于上述植物萃取液、其浓缩物或干燥粉末等,在不损害本发明的效果的范围内,根据需要,也可进一步实施脱臭、脱色等精制。这样的精制方法,可任意选择通常的方法来实施。

[0052] 本发明的植物萃取物,包含通过上述萃取方法所得的各种溶剂萃取液、其稀释液、其浓缩物或其干燥粉末、它们的精制物。此外,萃取物,也可通过与萃取溶剂不同的溶剂来稀释或溶解使用。

[0053] 此外,市售有上述植物萃取物,也可使用市售品。

[0054] 本发明的复合体形成抑制剂等可由上述植物萃取物构成,也可进一步调配其他成分或添加剂等以组合物的方式使用。

[0055] 本发明的弹性蛋白-抑弹性蛋白酶蛋白复合体形成抑制剂、变性弹性蛋白的分解降低的抑制剂及正常的弹性蛋白纤维的维持剂,可将其自身作为弹性蛋白-抑弹性蛋白酶蛋白复合体形成抑制剂、变性弹性蛋白的分解降低的抑制剂及正常的弹性蛋白纤维的维持剂使用。此外,可调配至后述弹性蛋白-抑弹性蛋白酶蛋白复合体形成抑制用组合物等中使用。本发明的复合体形成抑制剂等优选作为弹性蛋白-抑弹性蛋白酶蛋白复合体形成抑制用组合物等的有效成分使用。

[0056] 含有上述本发明的弹性蛋白-抑弹性蛋白酶蛋白复合体形成抑制剂的弹性蛋白-抑弹性蛋白酶蛋白复合体形成抑制用组合物也为本发明之一。含有本发明的变性弹性蛋白的分解降低的抑制剂的变性弹性蛋白的分解降低的抑制用组合物也为本发明之一。含有本发明的正常的弹性蛋白纤维的维持剂的正常的弹性蛋白纤维的维持用组合物也为本发明之一。

[0057] 也将本发明的弹性蛋白-抑弹性蛋白酶蛋白复合体形成抑制用组合物、变性弹性蛋白的分解降低的抑制用组合物及正常的弹性蛋白纤维的维持用组合物统称复合体形成抑制用组合物等。本发明的复合体形成抑制用组合物等含有上述植物萃取物作为有效成分。植物萃取物及其优选方式如上所述。

[0058] 本发明的复合体形成抑制剂等及复合体形成抑制用组合物等,例如可优选用于抑制皮肤的弹性蛋白-抑弹性蛋白酶蛋白复合体的形成、用于抑制皮肤的变性弹性蛋白的分解降低,或用于在皮肤中维持正常的弹性蛋白纤维。

[0059] 本发明的复合体形成抑制剂等及复合体形成抑制用组合物等可适用于治疗用途(医疗用途)或非治疗用途(非医疗用途)的任一种。

[0060] 含有上述植物萃取物作为有效成分的本发明的复合体形成抑制剂等及复合体形成抑制用组合物等,例如可用于希望抑制弹性蛋白-抑弹性蛋白酶蛋白复合体形成的状态或症状的预防或改善。在一种方式中,本发明的复合体形成抑制剂等及复合体形成抑制用组合物等,例如,由于抑制弹性蛋白-抑弹性蛋白酶蛋白复合体形成,可用于日光弹性症等的预防或改善。此外,本发明的复合体形成抑制剂等及复合体形成抑制用组合物等,由于抑制弹性蛋白-抑弹性蛋白酶蛋白复合体形成,对于皮肤的弹性的维持、皱纹及/或松弛的预防或改善等美容目的也有用。预防包含发病的防止、发病的延迟、发病率的降低等。改善包含症状的减轻、症状的好转、症状的发展抑制、症状的治愈等。

[0061] 本发明的复合体形成抑制用组合物等可用于化妆料、饮食品、医药品、医药部外品等各种用途。本发明的复合体形成抑制用组合物等,其自身可为用于抑制弹性蛋白-抑弹性蛋白酶蛋白复合体形成、用于抑制变性弹性蛋白的分解降低,或用于维持正常的弹性蛋白纤维的化妆料、饮食品、医药品或医药部外品,或也可为调配于该化妆料、饮食品、医药品或医药部外品等中使用的素材或制剂等。

[0062] 本发明的复合体形成抑制用组合物等,例如优选作为皮肤外用剂使用。皮肤外用剂包括化妆料、医药品、医药部外品,优选为化妆料。在一种实施方式中,用于抑制皮肤的弹性蛋白-抑弹性蛋白酶蛋白复合体形成、用于抑制皮肤的变性弹性蛋白的分解降低或用于在皮肤中维持正常的弹性蛋白纤维时,优选将复合体形成抑制用组合物等制成皮肤外用剂,更优选化妆料。

[0063] 本发明的复合体形成抑制用组合物等可作为皮肤外用剂以外的医药品或医药部外品使用。

[0064] 在其他实施方式中,可将复合体形成抑制用组合物等制成饮食品。以下针对将本发明的复合体形成抑制用组合物等制成化妆料、医药品、医药部外品等皮肤外用剂、饮食品等的情况进行说明。

[0065] 将本发明的复合体形成抑制用组合物等制成皮肤外用剂时,剂型等并无特别限定,例如可制成溶液、乳液、乳霜、凝胶、粉末、喷雾式药剂、细雾、胶囊及膜等任意的形态。皮肤外用剂优选为化妆料。化妆料的制品形态也无特别限定,例如可列举洗面奶、卸妆水、化妆水、美容液、面膜、乳液、乳霜、防晒霜等护肤化妆料;粉底、妆前乳、口红、眼影、眼线、睫毛膏、眉笔、腮红、指甲油等彩妆化妆料;洗发水、护发液、发胶、染发剂、养发剂等毛发化妆料;肥皂、沐浴露等清洁剂;入浴剂等。

[0066] 上述化妆料中,在不损害本发明的效果的范围内,可适当含有化妆料所允许的载体、添加剂等成分,例如,水、醇类、油剂、表面活性剂、增粘剂、金属皂、凝胶化剂、粉体、螯合剂、水溶性高分子、膜形成剂、树脂、包接化合物、抗菌剂、消臭剂、盐类、pH调节剂、紫外线吸收剂、来自上述以外的动植物及微生物的萃取物、角质溶解剂、酶、荷尔蒙类、其他维生素类、保湿剂、杀菌剂、消炎剂、香料等的1种或2种以上。化妆料可通过一般的制造法制造。例如,可将上述植物萃取物与1种或2种上述化妆料中可使用的成分混合后,加工成所期望的形态而得。

[0067] 将皮肤外用剂制成医药品或医药部外品时,在不损害本发明的效果的范围内,也可使用医药品或医药部外品所允许的载体、添加剂等成分。作为这样的成分,例如可列举赋形剂、结合剂、崩解剂、润滑剂、抗氧化剂、着色剂等1种或2种以上,这些可根据需要使用。

[0068] 本发明的复合体形成抑制用组合物等还可制成上述皮肤外用剂以外的医药品、医药部外品。这样的医药品或医药部外品,可口服投用,也可非口服投用。医药品或医药部外品可制成口服投用制剂(内服剂)或非口服投用制剂的形态。作为口服投用制剂的剂型,可列举液剂、片剂、粉剂、细粒剂、颗粒剂、糖衣片剂、胶囊剂、悬浊液、乳剂、咀嚼剂等。作为非口服投用制剂的剂型,可列举注射剂、输液剂等。这样的医药品或医药部外品中,也可使用医药品或医药部外品所允许的载体、添加剂等成分。作为这样的成分,例如可列举赋形剂、结合剂、崩解剂、润滑剂、抗氧化剂、着色剂、矫味剂等1种或2种以上,这些可根据需要使用。医药品、医药部外品可通过一般的制造法制造。例如,可将上述植物萃取物与1种或2种

以上可在医药品或医药部外品使用的成分混合后,加工成所期望的形态而得。

[0069] 将本发明的复合体形成抑制用组合物等制成饮食品时,饮食品并无特别限定,例如可列举一般的饮食品、健康食品、功能性标示食品、特定保健用食品等。饮食品的形态也无特别限定。上述健康食品、功能性标示食品、特定保健用食品,例如可制成液剂、片剂、粉剂、细粒剂、颗粒剂、糖衣片剂、胶囊剂、悬浊液、乳剂、咀嚼剂、流动食物等的各种制剂形态。

[0070] 对于上述饮食品,在不损害本发明的效果的范围内,可调配饮食品所允许的成分,例如,其他饮食品材料、饮食品中调配的添加剂等。这样的饮食品,可通过一般的制造法来制造。例如,在饮食品的制造中,向饮食品材料等中调配上述植物萃取物即可。

[0071] 本发明的复合体形成抑制用组合物等为皮肤外用剂、皮肤外用剂以外的医药品或医药部外品、饮食品的任一种形态时,上述植物萃取物的含量,在该组合物中,例如作为该萃取物的干燥物换算的重量,优选0.0000001~100重量%,更优选0.000001~100重量%,进一步优选0.00001~10重量%。就上述含量而言,含有2种以上的植物萃取物时,为其合计含量。

[0072] 本发明的复合体形成抑制用组合物等的使用量并无特别限定,只要为可获得抑制弹性蛋白-抑弹性蛋白酶蛋白复合体的形成的效果的量即可,可根据对象者的状态、体重、性别、年龄或其他要因进行适当设定。为化妆料等皮肤外用剂时,例如,成人(60kg)每人每天,作为上述植物萃取物(干燥物换算),例如优选0.01~500mg。经口投用医药品或医药部外品时的投用量,例如,成人(60kg)每人每天,作为上述植物萃取物(干燥物换算),例如优选0.01~500mg。为饮食品时,其摄取量,例如,成人(60kg)每人每天,作为上述植物萃取物(干燥物换算),例如优选0.01~500mg。可单次或分数次摄取或投用上述量的植物萃取物。将含有上述植物萃取物的皮肤外用剂适用(投用)于皮肤的时机,摄取或投用饮食品、医药品或医药部外品的时机并无特别限定。

[0073] 作为本发明的复合体形成抑制用组合物等的适用对象(也可称作投用对象),并无特别限定,可适用于人类或非人类哺乳动物等,优选人类。作为适用对象,例如可列举希望或需要抑制弹性蛋白-抑弹性蛋白酶蛋白复合体形成的对象、希望或需要抑制变性弹性蛋白的分解降低的对象、希望或需要维持正常的弹性蛋白的对象等。作为这样的对象,例如可列举因伴随紫外线暴露(特别是过度紫外线暴露)、年龄增长所不期望的皮肤变化,特别是皱纹及/或松弛而烦恼的男性及女性。

[0074] 本发明包括以下应用及方法。

[0075] 一种选自西番莲萃取物、金盏菊萃取物、白芥萃取物、药蜀葵萃取物、白柳萃取物、菖蒲萃取物、桃仁萃取物及大豆萃取物中的1种以上的植物萃取物的应用,其特征在于,用于抑制弹性蛋白-抑弹性蛋白酶蛋白复合体形成,用于抑制变性弹性蛋白的分解降低,或用于维持正常的弹性蛋白纤维。

[0076] 一种抑制弹性蛋白-抑弹性蛋白酶蛋白复合体形成的方法,其特征在于,投用选自西番莲萃取物、金盏菊萃取物、白芥萃取物、药蜀葵萃取物、白柳萃取物、菖蒲萃取物、桃仁萃取物及大豆萃取物中的1种以上的植物萃取物;一种抑制变性弹性蛋白的分解降低的方法,其特征在于,投用上述植物萃取物;一种维持正常的弹性蛋白纤维的方法,其特征在于,投用上述植物萃取物。

[0077] 上述植物萃取物优选适用于皮肤,适合用于抑制皮肤的弹性蛋白-抑弹性蛋白酶

蛋白复合体形成,用于抑制皮肤的变性弹性蛋白的分解降低,或用于维持皮肤的正常的弹性蛋白纤维。

[0078] 在上述应用及方法中,植物萃取物、投用其的对象及它们的优选方式等,与上述本发明的复合体形成抑制剂等及复合体形成抑制用组合物等中相同。植物萃取物,可直接使用,也可与其他成分组合使用。也可使用本发明的复合体形成抑制剂等或复合体形成抑制用组合物等。植物萃取物可以上述皮肤外用剂、饮食品等形态来使用。

[0079] 上述应用可为治疗性应用,也可为非治疗性应用。上述方法可为治疗性方法,也可为非治疗性方法。所谓非治疗性,是不包含医疗行为,即人类的手术、治疗或诊断的概念。

[0080] 本发明的其他方式还为一种上述植物萃取物的应用,其特征在于,用于制造弹性蛋白-抑弹性蛋白酶蛋白复合体形成抑制剂或弹性蛋白-抑弹性蛋白酶蛋白复合体形成抑制用组合物;一种上述植物萃取物的应用,其特征在于,用于制造变性弹性蛋白的分解降低抑制剂或变性弹性蛋白的分解降低的抑制用组合物;一种上述植物萃取物的应用,其特征在于,用于制造正常的弹性蛋白纤维维持剂或正常的弹性蛋白纤维的维持用组合物。植物萃取物及它们的优选方式等,与上述本发明的复合体形成抑制剂等及复合体形成抑制用组合物等中相同。

[0081] 本发明还包含具有弹性蛋白-抑弹性蛋白酶蛋白复合体形成抑制作用的物质的筛选方法。接着,对本发明的筛选方法进行说明。

[0082] 本发明的具有弹性蛋白-抑弹性蛋白酶蛋白复合体形成抑制作用的物质的筛选方法,包含以下工序:在存在或不存在被检测物质的情况下,使抑弹性蛋白酶蛋白与固相化弹性蛋白接触的工序(a),检测基于上述被检测物质的存在的所述抑弹性蛋白酶蛋白与固相化弹性蛋白的结合的阻碍的工序(b),及因上述被检测物质的存在抑弹性蛋白酶蛋白与固相化弹性蛋白的结合得到阻碍时,将所述被检测物质作为具有弹性蛋白-抑弹性蛋白酶蛋白复合体形成抑制作用的物质来选择的工序(c)。本发明筛选方法为体外的筛选方法。

[0083] 在工序(a)中,在存在或不存在被检测物质的情况下,使抑弹性蛋白酶蛋白与固相化弹性蛋白接触。

[0084] 弹性蛋白预先固相化至固相载体使用。使用固相化弹性蛋白时,洗净等操作变得容易。

[0085] 优选使用原弹性蛋白、 $\alpha$ 弹性蛋白等作为进行固相化的弹性蛋白。特别优选使用人类的上述弹性蛋白。市售有人类等的弹性蛋白,可使用市售品。也可使用附加有标签肽等修饰的物质作为弹性蛋白。

[0086] 固相载体并无特别限定,例如可使用微量培养板、微型芯片、载玻片等形态。固相载体的材质并无特别限定,可使用塑料、玻璃、陶瓷、金属氧化物等材质的物质。

[0087] 例如,作为固相载体,使用96孔等的微量培养板时,将使弹性蛋白溶解或悬浮于缓冲液的弹性蛋白溶液,分注入微量培养板的各孔,通过于4~37°C下放置0.5~30小时,可使弹性蛋白固相化。用于制备弹性蛋白溶液的缓冲液并无特别限定,可使用碳酸缓冲液、磷酸缓冲生理盐水(PBS)等缓冲液。弹性蛋白溶液中的弹性蛋白的浓度优选1~100 $\mu$ g/mL。

[0088] 固相化的弹性蛋白及固相载体,在实施工序(a)之前,优选用PBS等缓冲液进行清洗,去除未结合的弹性蛋白。此外,去除未结合的弹性蛋白后,优选添加封闭液(含有1~10%脱脂牛乳、白蛋白等的PBS)进行封闭。

[0089] 抑弹性蛋白酶蛋白优选使用人类的抑弹性蛋白酶蛋白。市售有人类等的抑弹性蛋白酶蛋白,可使用市售品。此外,抑弹性蛋白酶蛋白,只要与固相化的弹性蛋白结合即可,也可使用附加有标签肽等修饰的物质。抑弹性蛋白酶蛋白并不限于全长蛋白质,也可使用由在抑弹性蛋白酶蛋白的全长蛋白质的氨基酸序列中1个或多个(例如1~9个、1~5个、1~3个、1~2个或1个)氨基酸缺失、取代、插入及/或附加的氨基酸序列构成的与弹性蛋白结合的蛋白质。

[0090] 被检测物质并无特别限定,例如可列举植物萃取液、细胞萃取液、细胞培养上清液、发酵产物、蛋白质、肽、维生素类、合成化合物等。这些可为已知物质,也可为新型物质。

[0091] 在存在被检测物质的情况下,使抑弹性蛋白酶蛋白与固相化弹性蛋白接触的方法并无特别限定,例如可在含有被检测物质的溶液中,对抑弹性蛋白酶蛋白及固相化弹性蛋白进行孵育来实施。在不存在被检测物质的情况下,实施工序(a)时,在不含被检测物质的溶液中,对抑弹性蛋白酶蛋白及固相化弹性蛋白进行孵育即可。溶液中,可使用PBS等缓冲液。溶液中的抑弹性蛋白酶蛋白的浓度并无特别限定,优选设置为0.1~10 $\mu$ g/mL。被检测物质的浓度,进行适当设定即可,例如,可设置为1~100 $\mu$ g/mL。溶液的pH(25 $^{\circ}$ C),优选3~12。工序(a)中使用的溶液中也添加血清等。使抑弹性蛋白酶蛋白及固相化弹性蛋白接触时的温度优选4~40 $^{\circ}$ C。使抑弹性蛋白酶蛋白及固相化弹性蛋白接触的时间,通常设置为15分钟~24小时即可,优选30分钟~2小时。

[0092] 在工序(a)之后,实施工序(b)之前,优选用PBS等缓冲液进行清洗,去除未反应的被检测物质或抑弹性蛋白酶蛋白。

[0093] 工序(b)中,对基于上述被检测物质的存在的上述抑弹性蛋白酶蛋白与固相化弹性蛋白结合阻碍进行检测。上述结合阻碍的检测,可对在工序(a)中于存在或不存在被检测物质的情况下与固相化弹性蛋白结合的抑弹性蛋白酶蛋白的量进行定量,并通过对在存在被检测物质的情况下与固相化弹性蛋白结合的抑弹性蛋白酶蛋白的量,与在不存在被检测物质的情况下与固相化弹性蛋白结合的抑弹性蛋白酶蛋白的量进行比较来实施。

[0094] 与固相化弹性蛋白结合的抑弹性蛋白酶蛋白的定量方法并无特别限定,可通过Enzyme Linked Immunosorbent Assay (ELISA)来实施。例如,使经过工序(a)的固相化弹性蛋白与抗抑弹性蛋白酶蛋白抗体反应,清洗去除未反应的抗体后,使其与与抗抑弹性蛋白酶蛋白抗体进行反应的二抗发生反应,清洗去除未反应的二抗。二抗可使用例如辣根过氧化物酶(HRP)、碱性磷酸酶(AP)等酶、或与以荧光色素进行标识的抗抑弹性蛋白酶蛋白抗体反应的抗体。使其与对应于与二抗结合的HRP、AP等酶的底物反应获得发色或发光,或通过激发获得荧光,通过用酶标仪对该发色或发光或荧光进行定量,可对与固相化弹性蛋白结合的抑弹性蛋白酶蛋白进行定量。

[0095] 此外,在其他实施方式中,使经过工序(a)的固相化弹性蛋白与HRP、AP等酶或以荧光色素进行标识的抗抑弹性蛋白酶蛋白抗体反应,清洗未反应的抗体后,使其与对应于与抗体结合的HRP、AP等酶的底物反应获得发色或发光,或通过激发获得荧光,通过用酶标仪对该发色或发光或荧光进行定量,可对与固相化弹性蛋白结合的抑弹性蛋白酶蛋白进行定量。

[0096] 作为上述荧光色素,可使用Alexa Fluor(注册商标)488、Alexa Fluor(注册商标)596(Thermo Fisher Scientific Inc.)等。

[0097] 对在存在及不存在被检测物质的情况下与固相化弹性蛋白结合的抑弹性蛋白酶蛋白的量进行比较,存在被检测物质的一方,与不存在的情况相比,与固相化弹性蛋白结合的抑弹性蛋白酶蛋白的量少时,该被检测物质被评价为阻碍抑弹性蛋白酶蛋白与固相化弹性蛋白的结合。

[0098] 在上述工序(b)中,在存在被检测物质的情况下,与不存在被检测物质的情况相比,检测出与固相化弹性蛋白结合的抑弹性蛋白酶蛋白的量少时,判定因该被检测物质的存在,抑弹性蛋白酶蛋白与固相化弹性蛋白的结合得到阻碍。在工序(c)中,因该被检测物质的存在,抑弹性蛋白酶蛋白与固相化弹性蛋白的结合得到阻碍时,将该被检测物质作为具有弹性蛋白-抑弹性蛋白酶蛋白复合体形成抑制作用的物质进行选择。

[0099] 根据本发明的筛选方法,可简便有效地筛选具有弹性蛋白-抑弹性蛋白酶蛋白复合体形成抑制作用的物质。

[0100] 实施例

[0101] 以下基于实施例对本发明进行说明,但本发明并不限于这些实施例。

[0102] <实施例1>

[0103] 使用以下植物萃取物作为样本。

[0104] (1) 西番莲萃取物:西番莲(水果西番莲的果实)的萃取物

[0105] (2) 金盏菊萃取物:金盏菊的花的萃取物

[0106] (3) 白芥萃取物:白芥的种子的萃取物

[0107] (4) 药蜀葵萃取物:药蜀葵的根的萃取物

[0108] (5) 白柳萃取物:白柳的树皮的萃取物

[0109] (6) 菖蒲萃取物:菖蒲的根茎的萃取物

[0110] (7) 桃仁萃取物:桃的种子的萃取物

[0111] (8) 大豆萃取物:大豆芽的萃取物

[0112] 上述植物萃取物为通过以下方法所得的物质:从用溶剂对上述植物进行萃取而得的萃取液中通过过滤去除植物残渣,用蒸发仪对滤液进行浓缩后,进行干燥。上述(1)、(2)及(4)分别将植物的粉碎物浸入重量的10倍量的1,3-丁二醇水溶液中,于室温下,1天施加1次搅拌操作萃取10分钟~7天。对于上述(5)、(6)及(7),代替1,3-丁二醇水溶液使用30~90vol%乙醇水溶液,用上述方法进行萃取。对于上述(3)及(8),代替1,3-丁二醇水溶液使用热水,用上述方法进行萃取。将所得的粉末状植物萃取物用于以下评价。

[0113] 通过Solid phase binding assay,评价样本的弹性蛋白-抑弹性蛋白酶蛋白复合体形成抑制作用。Solid phase binding assay以以下方法实施。使用含0.5%血清白蛋白的磷酸缓冲生理盐水(PBS)作为稀释缓冲剂。植物萃取物(粉末)溶解于二甲基亚砜(DMSO)来使用。

[0114] 将用重碳酸缓冲剂(14mM碳酸氢钠、6mM碳酸钠)将原弹性蛋白及血清白蛋白稀释至20 $\mu$ g/mL的物质,分别添加100 $\mu$ L至96孔板。

[0115] 用石蜡膜对盖进行密封后,于4 $^{\circ}$ C下反应24小时。去除反应液,添加每孔150 $\mu$ L的冲洗缓冲剂(0.5%Tween20 in PBS)后,去除冲洗缓冲剂。重复该操作3次。以下将该步骤作为“清洁”。接着,添加每孔100 $\mu$ L的封闭缓冲剂(含5%脱脂牛乳的PBS)后,于室温下反应1小时。实施封闭缓冲剂的清洁后,实施复合体形成反应。在样本的复合体形成反应中,添加每

孔50 $\mu$ L的复合体反应液(含抑弹性蛋白酶蛋白(最终浓度1 $\mu$ g/mL)、上述植物萃取物(最终浓度10 $\mu$ g/mL)及DMSO(最终浓度0.1%)的稀释缓冲剂),于37 $^{\circ}$ C下反应1小时。

[0116] 对复合体反应液进行清洗后,添加抑弹性蛋白酶蛋白识别一抗反应液,于37 $^{\circ}$ C下反应1小时。对一抗反应液进行清洗后,添加辣根过氧化物酶标识特异性二抗反应液,于室温下反应1小时。对二抗反应液进行清洗后,添加每孔100 $\mu$ L的TMB(3,3',5,5'-四甲基联苯胺)溶液,于室温下反应30分钟。添加每孔100 $\mu$ L的1M磷酸停止反应后,用酶标仪测定吸光度(波长450nm)。

[0117] 作为阴性对照,在复合体形成反应中,代替含有上述抑弹性蛋白酶蛋白及植物萃取物的复合体反应液,将含有抑弹性蛋白酶蛋白(最终浓度1 $\mu$ g/mL)及DMSO(最终浓度0.1%)的稀释缓冲剂以每孔50 $\mu$ L添加并实施反应。作为背景,在复合体形成反应中,代替含有上述抑弹性蛋白酶蛋白及植物萃取物的复合体反应液,将含有DMSO(最终浓度0.1%)的稀释缓冲剂(不含抑弹性蛋白酶蛋白及植物萃取物)以每孔50 $\mu$ L添加并实施反应。除上述以外,以与添加植物萃取物的样本相同的方法实施与抗体反应液的反应,使用酶标仪测定吸光度(波长450nm)。

[0118] 上述测定中使用的试剂等均使用市售品。原弹性蛋白使用非修饰的全长人类原弹性蛋白(Sigma-Aldrich公司,#T0706),抑弹性蛋白酶蛋白使用C末端附加聚组氨酸标签(His标签)的全长人类抑弹性蛋白酶蛋白(Sino Biological Inc.,#12187-H08H)。

[0119] 由植物萃取物(样本)、阴性对照及背景的450nm的吸光度,通过下述计算式,计算弹性蛋白-抑弹性蛋白酶蛋白复合体形成抑制率(%)。另外,上述试验,针对植物萃取物、阴性对照及背景以各n=4~6实施试验,由450nm的吸光度的平均求取复合体形成抑制率。

[0120] 复合体形成抑制率(%) =  $100 - 100 \times (\text{Ab}(S) - \text{Ab}(NC)) / (\text{Ab}(PC) - \text{Ab}(NC))$

[0121] 上述式中、Ab(S)表示植物萃取物(样本)的波长450nm吸光度,Ab(NC)表示背景的波长450nm吸光度,Ab(PC)表示阴性对照的波长450nm吸光度。显著差异检验,通过Dunnett检验实施(vs. 阴性对照)(显著性水平:p<0.05)。

[0122] 植物萃取物的弹性蛋白-抑弹性蛋白酶蛋白复合体形成抑制率示于表1。对于西番莲萃取物、金盏菊萃取物及白芥萃取物的复合体形成抑制率,与阴性对照相比确认具有显著差异(p<0.05)。

[0123] [表1]

[0124]

样本	复合体形成抑制率(%)
西番莲萃取物	16
金盏菊萃取物	14
白芥萃取物	17
药蜀葵萃取物	8
白柳萃取物	3
菖蒲萃取物	5
桃仁萃取物	15
大豆萃取物	5

[0125] 在实施例1记载的方法中,代替上述植物萃取物使用任意的被检测物质,可筛选具有弹性蛋白-抑弹性蛋白酶蛋白复合体形成抑制作用的物质。作为具有弹性蛋白-抑弹性蛋

白酶蛋白复合体形成抑制作用的物质而被选择的被检测物质,可作为用于变性弹性蛋白的分解降低的抑制、正常的弹性蛋白纤维的维持或弹性蛋白-抑弹性蛋白酶蛋白复合体形成抑制的有效成分使用。