



(12) 发明专利申请

(10) 申请公布号 CN 115003268 A

(43) 申请公布日 2022. 09. 02

(21) 申请号 202180011051.2	A61K 31/122 (2006.01)
(22) 申请日 2021.01.29	A61K 31/4415 (2006.01)
(30) 优先权数据	A61K 31/51 (2006.01)
2020-015610 2020.01.31 JP	A61K 31/525 (2006.01)
(85) PCT国际申请进入国家阶段日	A61K 31/714 (2006.01)
2022.07.26	A61K 45/00 (2006.01)
(86) PCT国际申请的申请数据	A61P 17/00 (2006.01)
PCT/JP2021/003375 2021.01.29	A61P 17/18 (2006.01)
(87) PCT国际申请的公布数据	A61Q 17/04 (2006.01)
W02021/153776 JA 2021.08.05	A61K 36/286 (2006.01)
(71) 申请人 株式会社资生堂	A61K 36/31 (2006.01)
地址 日本东京都	A61K 36/535 (2006.01)
(72) 发明人 宫泽和之 R·吉莱 B·麦卡锡	A61K 36/744 (2006.01)
金丸哲也	A61K 36/9066 (2006.01)
(74) 专利代理机构 北京市中咨律师事务所	A61K 8/24 (2006.01)
11247	A61K 8/29 (2006.01)
专利代理师 马妮楠 段承恩	A61K 8/31 (2006.01)
(51) Int.Cl.	A61K 8/31 (2006.01)
A61K 8/27 (2006.01)	A61K 8/41 (2006.01)
A61K 31/015 (2006.01)	A61K 8/46 (2006.01)
A61K 31/07 (2006.01)	A61K 8/49 (2006.01)
	A61K 8/64 (2006.01)
	A61K 8/67 (2006.01)

(续)

权利要求书1页 说明书8页

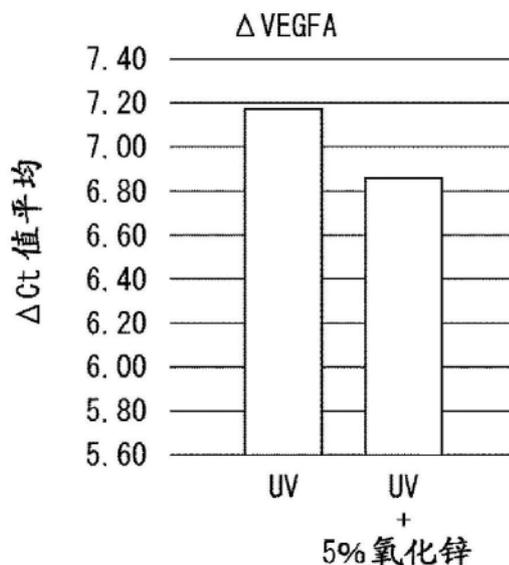
序列表1页 附图2页

(54) 发明名称

血管新生抑制剂

(57) 摘要

提供新的血管新生抑制剂。提供含有波长转换物质作为有效成分的血管新生抑制剂、含有这样的血管新生抑制剂的组合物和制品、以及使用了它们的抑制皮肤中血管新生的方法。通过本发明,通过抑制由紫外线引起的血管新生,从而可以发挥对皮肤有利的作用。



CN 115003268 A

[转续页]

[接上页]

(51) Int.Cl.

A61K 8/9789 (2006.01)

A61K 8/9794 (2006.01)

C12N 15/12 (2006.01)

A61K 33/06 (2006.01)

A61K 33/30 (2006.01)

A61K 33/42 (2006.01)

A61K 38/16 (2006.01)

1. 一种血管新生抑制剂,是含有波长转换物质作为有效成分,抑制由皮肤暴露于包含紫外线的光引起的血管新生的血管新生抑制剂,

所述波长转换物质转换入射光所包含的紫外线的波长而放出与所述紫外线的波长相比长的波长的出射光。

2. 根据权利要求1所述的血管新生抑制剂,所述紫外线在200nm~400nm具有峰波长。

3. 根据权利要求1或2所述的血管新生抑制剂,所述出射光在450nm~700nm具有峰波长。

4. 根据权利要求1~3中任一项所述的血管新生抑制剂,所述波长转换物质包含选自别藻蓝蛋白、C-藻蓝蛋白、R-藻蓝蛋白、藻红蓝蛋白、B-藻红蛋白、b-藻红蛋白、C-藻红蛋白、和R-藻红蛋白中的1种或多种藻胆蛋白;选自氧化锌荧光体、钛酸镁荧光体、和磷酸钙荧光体中的1种或多种无机荧光体;选自维生素A、β胡萝卜素、维生素K、维生素B1、维生素B2、维生素B6、维生素B12、叶酸、烟酸、番茄红素、栀子、红花、姜黄、胭脂虫红、紫苏、紫甘蓝、黄酮类、类胡萝卜素、醌型化合物、卟啉类、花色素苷类、和多酚类中的1种或多种成分;以及/或选自红色401号、红色227号、红色504号、红色218号、橙色205号P、黄色4号、黄色5号、绿色201号、绿色204号、蓝色1号、2,4-二氨基苯氧基乙醇盐酸盐、紫色201号、紫色401号、黑色401号、红色226号、黄色401号、黄色205号、蓝色404号、红色104号、和间氨基苯酚中的1种或多种色素。

5. 根据权利要求4所述的血管新生抑制剂,所述波长转换物质包含选自别藻蓝蛋白、C-藻蓝蛋白、R-藻蓝蛋白、藻红蓝蛋白、B-藻红蛋白、b-藻红蛋白、C-藻红蛋白、和R-藻红蛋白中的1种或多种藻胆蛋白;选自氧化锌荧光体、钛酸镁荧光体、和磷酸钙荧光体中的1种或多种无机荧光体;以及/或选自维生素B1、维生素B2、维生素B6、和维生素B12中的1种或多种维生素B。

6. 一种组合物,其含有权利要求1~5中任一项所述的血管新生抑制剂。

7. 根据权利要求6所述的组合物,所述组合物为皮肤外用组合物,其用于抑制由皮肤暴露于包含紫外线的光引起的血管新生。

8. 一种用于抑制由对象的皮肤暴露于包含紫外线的光引起的血管新生的美容方法,其包含:将权利要求6或7所述的组合物涂抹于对象的皮肤。

9. 一种制品,其含有权利要求1~5中任一项所述的血管新生抑制剂。

10. 根据权利要求9所述的制品,所述制品用于抑制由皮肤暴露于包含紫外线的光引起的血管新生。

11. 一种用于抑制由对象的皮肤暴露于紫外线引起的血管新生的美容方法,其包含:使包含紫外线的光通过权利要求9或10所述的制品。

血管新生抑制剂

技术领域

[0001] 本发明涉及含有波长转换物质的血管新生抑制剂、含有这样的血管新生抑制剂的组合物和制品、以及使用了它们的抑制皮肤中的血管新生的方法。

背景技术

[0002] 作为由紫外线引起的对皮肤的有害影响,例如,有皮肤癌、光老化、斑、皱纹、炎症这样的不良影响,从健康、美容的观点考虑也是不优选的。对于皮肤血管系统,由紫外线而诱导血管新生。皮肤血管系统具有氧、营养的供给、废物的排出这样的功能。然而,报导了由紫外线诱导了的血管引起炎症细胞的浸润、基质降解酶的产生、弹性蛋白纤维等真皮基质成分的损伤、皮肤修复机制的紊乱、皮肤的结构变化等,参与以皱纹形成为代表的皮肤老化过程。

[0003] 因此,采取了大量用于对肌肤防御紫外线的对策。可举出例如,防晒剂的使用、不接触日光那样的室内的活动、进行了抗UV加工的帽子、衣服、抗紫外线膜的使用等。

[0004] 现有技术文献

[0005] 专利文献

[0006] 专利文献1:日本专利第6424656号公报

[0007] 专利文献2:日本专利第6361416号公报

[0008] 专利文献3:国际公开第2018/004006号

[0009] 专利文献4:日本特开2018-131422号公报

[0010] 专利文献5:日本特开平5-117127号公报

[0011] 专利文献6:日本专利第4048420号公报

[0012] 专利文献7:日本专利第4677250号公报

[0013] 专利文献8:日本专利第3303942号公报

[0014] 专利文献9:日本特开2017-88719号公报

[0015] 专利文献10:国际公开第2018/117117号

发明内容

[0016] 发明所要解决的课题

[0017] 本发明的课题是提供用于抑制由紫外线引起的血管新生的新的血管新生抑制剂。

[0018] 用于解决课题的手段

[0019] 本发明人等深入研究的结果,发现如果紫外线经由转换紫外线的波长的波长转换物质而照射到皮肤细胞,则血管新生诱导因子的表达降低,想到了含有波长转换物质的血管新生抑制剂。

[0020] 本申请提供以下发明。

[0021] (1) 一种血管新生抑制剂,是含有波长转换物质作为有效成分,抑制由皮肤暴露于包含紫外线的光引起的血管新生的血管新生抑制剂,

[0022] 上述波长转换物质转换入射光所包含的紫外线的波长而放出与上述紫外线的波长相比长的波长的出射光。

[0023] (2) 根据(1)所述的血管新生抑制剂,上述紫外线在200nm~400nm具有峰波长。

[0024] (3) 根据(1)或(2)所述的血管新生抑制剂,上述出射光在450nm~700nm具有峰波长。

[0025] (4) 根据(1)~(3)中任一项所述的血管新生抑制剂,上述波长转换物质包含选自别藻蓝蛋白、C-藻蓝蛋白、R-藻蓝蛋白、藻红蓝蛋白、B-藻红蛋白、b-藻红蛋白、C-藻红蛋白、和R-藻红蛋白中的1种或多种藻胆蛋白;选自氧化锌荧光体、钛酸镁荧光体、和磷酸钙荧光体中的1种或多种无机荧光体;选自维生素A、β胡萝卜素、维生素K、维生素B1、维生素B2、维生素B6、维生素B12、叶酸、烟酸、番茄红素、梔子(クチナシ)、红花(ベニバナ)、姜黄(ウコン)、胭脂虫红(コチニール)、紫苏(シソ)、紫甘蓝(赤キャベツ)、黄酮类(flavonoid)、类胡萝卜素、醌型化合物(quinoid)、卟啉类、花色素苷类、和多酚类中的1种或多种成分;以及/或选自红色401号、红色227号、红色504号、红色218号、橙色205号P、黄色4号、黄色5号、绿色201号、绿色204号(Pyranine Conc)、蓝色1号、2,4-二氨基苯氧基乙醇盐酸盐、紫色201号(Alizurine Purple SS)、紫色401号、黑色401号、红色226号(Helindone Pink)、黄色401号、黄色205号、蓝色404号、红色104号、和间氨基苯酚中的1种或多种色素。

[0026] (5) 根据(4)所述的血管新生抑制剂,上述波长转换物质包含选自别藻蓝蛋白、C-藻蓝蛋白、R-藻蓝蛋白、藻红蓝蛋白、B-藻红蛋白、b-藻红蛋白、C-藻红蛋白、和R-藻红蛋白中的1种或多种藻胆蛋白;选自氧化锌荧光体、钛酸镁荧光体、和磷酸钙荧光体中的1种或多种无机荧光体;以及/或选自维生素B1、维生素B2、维生素B6、和维生素B12中的1种或多种维生素B。

[0027] (6) 一种组合物,其含有(1)~(5)中任一项所述的血管新生抑制剂。

[0028] (7) 根据(6)所述的组合物,上述组合物为皮肤外用组合物,其用于抑制由皮肤暴露于包含紫外线的光引起的血管新生。

[0029] (8) 一种用于抑制由对象的皮肤暴露于包含紫外线的光引起的血管新生的美容方法,其包含:将(6)或(7)所述的组合物涂抹于对象的皮肤。

[0030] (9) 一种制品,其含有(1)~(5)中任一项所述的血管新生抑制剂。

[0031] (10) 根据(9)所述的制品,上述制品用于抑制由皮肤暴露于包含紫外线的光引起的血管新生。

[0032] (11) 一种用于抑制由对象的皮肤暴露于紫外线引起的血管新生的美容方法,其包含:使含有紫外线的光通过(9)或(10)所述的制品。

[0033] 发明的效果

[0034] 本发明基于通过抑制由紫外线引起的皮肤血管新生,从而可以发挥对皮肤有利的作用这样的认识。此外,本发明对以往主要作为色素、颜料、紫外线散射剂、紫外线吸收剂、营养成分、抗氧化剂等而被利用的上述化合物提供新的用途。进一步,关于本发明,即使是迄今为止因为美容、健康上的理由而尽量避开了紫外线的人,有时也带来感觉想要积极地外出这样的生活品质的提高。

附图说明

[0035] 图1为实验1的示意图。

[0036] 图2显示使用实验2中的波长转换物质而照射了UV时的培养细胞中的VEGFA的表达量的变化。纵轴表示 ΔCt 值的平均。

[0037] 图3显示使用实验3中的波长转换物质而照射了UV时的培养细胞中的ANGPT1的表达量的变化。纵轴表示 ΔCt 值的平均。

具体实施方式

[0038] 本发明的血管新生抑制剂含有波长转换物质作为有效成分。所谓波长转换物质，是指转换入射光所包含的紫外线的波长而放出与上述紫外线的波长相比长的波长的出射光的物质。

[0039] 紫外线可以包含UVA、UVB、UVC等。在某实施方式中，紫外线是在200nm~400nm具有峰波长的光。此外，例如在太阳光这样的入射光中可以包含紫外线。或者，入射光可以为紫外线，也可以使用人工生成的紫外线。紫外线能够对皮肤带来各种作用。作为一例，已知紫外线引起晒斑、晒黑这样的晒伤、对细胞造成DNA的损伤。对于受到了紫外线照射的细胞，细胞活性变化，基因表达变化。作为一例，因紫外线照射而血管新生诱导因子的表达增强，血管新生抑制因子的表达降低。此外，已知紫外线、特别是UV-B引起血管新生。也报导了由紫外线诱导了的血管新生引起面部潮红、酒渣鼻、炎症、炎症细胞的浸润、弹性蛋白纤维等真皮基质成分的损伤、皮肤修复机制的紊乱、皮肤的结构变化、以皱纹、松弛为代表的皮肤老化这样的不良影响。期待抑制由紫外线引起的血管新生预防/改善这样的不良影响。

[0040] 通过波长转换物质而被放出的出射光与紫外线相比波长长，优选在450nm~700nm，更优选在500nm~700nm具有峰波长。出射光例如虽然没有限定，但可以在450nm、460nm、470nm、480nm、490nm、500nm、510nm、520nm、530nm、540nm、550nm、560nm、570nm、580nm、590nm、600nm、610nm、620nm、630nm、640nm、650nm、660nm、670nm、680nm、690nm、700nm、或这些数值的任意的范围内具有1个或多个峰，或可以为红色光、橙色光、绿色光、蓝色光等。在某实施方式中，波长转换物质用200nm~400nm的激发光进行了激发时发出的光的主波长显示450nm~700nm，更优选显示500nm~700nm。

[0041] 作为波长转换物质的例子，可举出以下成分：可举出别藻蓝蛋白、C-藻蓝蛋白、R-藻蓝蛋白、藻红蓝蛋白、B-藻红蛋白、b-藻红蛋白、C-藻红蛋白、R-藻红蛋白等藻胆蛋白；维生素A、 β 胡萝卜素、维生素K、维生素B1、维生素B2、维生素B6、维生素B12、叶酸、烟酸、番茄红素、栀子、红花、姜黄、胭脂虫红、紫苏、紫甘蓝、黄酮类、类胡萝卜素、醌型化合物、卟啉类、花色苷类、多酚类等天然来源或合成成分；红色401号、红色227号、红色504号、红色218号、橙色205号P、黄色4号、黄色5号、绿色201号、绿色204号、蓝色1号、2,4-二氨基苯氧基乙醇盐酸盐、紫色201号、紫色401号、黑色401号、红色226号、黄色401号、黄色205号、蓝色404号、红色104号、间氨基苯酚等色素；掺杂在无机化合物中而使其具有荧光的荧光体，例如，日本专利第6424656号所记载的包含非晶质二氧化硅粒子、铈、和磷和/或镁的蓝色荧光体和日本专利第6361416号所记载的包含对碱土金属硫化物与镓化合物的混晶物进行活化而得的化合物的红色荧光体、国际公开第2018/004006号所记载的氧化锌荧光体、日本特开2018-131422号所记载的氧化锌荧光体；日本特开平5-117127号所记载的无机荧光体；等。在某实

施方式中,无机荧光体为选自下述荧光体中的1种或多种荧光体,所述荧光体为:将可以如 $ZnO:Zn$ 、 Zn_{1+z} 、 ZnO_{1-x} 那样表示的氧化锌用国际公开第2018/004006号所记载的例如硫化锌、硫酸锌等硫化盐和/或硫酸盐这样的含硫化合物进行掺杂而得的荧光体、将 $MgTiO_3$ 、 Mg_2TiO_4 这样的钛酸镁用锰进行掺杂而得的钛酸镁荧光体、和将 $Ca(H_2PO_4)_2$ 、 $CaHPO_4$ 、 $Ca_3(PO_4)_2$ 这样的磷酸钙用铈进行掺杂而得的磷酸钙荧光体。

[0042] 波长转换物质可以从动物、植物、藻类等天然物通过提取等方法来获得,也可以通过化学合成这样的人工方法来获得。例如,藻胆蛋白可以通过将螺旋藻(*Spirulina platensis*)等蓝藻类、紫球藻(*Porphyridium purpureum*)等红藻类这样的藻类通过例如日本专利第4048420号、日本专利第4677250号、日本专利第3303942号等所记载的方法进行提取来调制。氧化锌荧光体可以通过例如国际公开第2018/004006号、日本特开2018-131422号、日本特开平5-117127号所记载的方法来制造。钛酸镁荧光体可以通过日本特开2017-88719号所记载的方法来制造。磷酸钙荧光体可以通过国际公开第2018/117117号所记载的方法来制造。

[0043] 只要不损害本发明的波长转换效果,这些波长转换物质就可以由上面例示的成分构成,可以包含上面例示的成分,可以单独使用也可以混合多种。例如,可以在上述藻胆蛋白、无机物荧光体中混合其它波长转换物质例如维生素B(维生素B1、维生素B2、维生素B6、维生素B12等)而以协同效果作为目标。然而,这些成分是例示,也可以使用发挥本发明的波长转换效果的任何物质。

[0044] 此外,只要不损害本发明的波长转换效果,本发明的血管新生抑制剂、组合物或制品中的波长转换物质的含量就没有特别限定,可以根据波长转换物质的种类、血管新生抑制剂或组合物的用途来适当确定。例如,在0.01~99.99重量%、0.1%~999重量%等范围内是任意的。

[0045] 如果向本发明的血管新生抑制剂照射紫外线则产生出射光,出射光可以使皮肤细胞中血管新生相关蛋白质的表达变化。作为血管新生相关蛋白质的表达的变化,可举出血管新生诱导因子的表达的抑制、血管新生抑制因子的表达的增强。作为血管新生诱导因子,作为一例,可举出VEGFA等VEGF家族、ANGPT1等血管生成素家族)等。作为血管新生抑制因子,作为一例,可举出THBS1等血小板反应蛋白家族等。本发明的血管新生抑制剂可以通过吸收紫外线,并且放出出射光而抑制紫外线起因性的血管新生。本发明的血管新生抑制剂可以使用于任意的对象,可以被应用于在室外等暴露于紫外线的对象。

[0046] VEGFA为血管内皮细胞生长因子(VEGF:vascular endothelial growth factor)的一种,通过与VEGFR-1、VEGFR-2结合而作用,从而促进血管新生。

[0047] ANGPT1为血管生成素的一种的糖蛋白,参与脉管形成、血管结构的成熟、稳定化等,与在血管内皮中表达的Tie2结合而促进血管新生。

[0048] 血管新生抑制效果的测定例如如实施例那样,可以通过测定VEGFA、ANGPT1等血管新生诱导因子的表达抑制来进行,也可以测定THBS1这样的血小板反应蛋白等血管新生抑制因子的表达增强,也可以为其它测定,可以使用任意的的方法。例如,血管新生诱导因子的表达量与未被抑制的状态相比,例如以将显著水平设为5%的统计学上的显著性差异(例如,Dunnett的检验等)减少,或在减少例如5%以上、10%以上、20%以上、30%以上、或其以上的情况下,可以判断为血管新生被抑制了。

[0049] 本发明的血管新生抑制剂和组合物的施与形态是任意的,但为了抑制由皮肤暴露于包含紫外线的光引起的血管新生,有时优选药品、准药品、化妆品等皮肤外用剂。在使用本发明的血管新生抑制剂或组合物作为皮肤外用剂的情况下,剂型、涂抹法、施与次数等可以任意地确定。例如,可以以化妆水、喷雾、油、霜、乳液、凝胶、防晒剂、晒黑剂这样的形态,定期或不定期地,例如早晨、白天、傍晚等1天1次~数次,在外出、野外活动、海洋运动、滑雪等预想暴露于阳光之前等每次涂抹于皮肤。

[0050] 此外,本发明的血管新生抑制剂和组合物可以根据需要可选地选择例如,赋形剂、保存剂、增稠剂、粘合剂、崩解剂、分散剂、稳定剂、胶凝剂、抗氧化剂、表面活性剂、保存剂、油分、粉末、水、醇类、增稠剂、螯合剂、有机硅类、抗氧化剂、保湿剂、香料、各种药效成分、防腐剂、pH调节剂、中和剂等添加剂而并用。进一步,为了提高本发明的效果,可以并用其它血管新生抑制剂等。

[0051] 此外,本发明也提供包含本发明的血管新生抑制剂的、用于抑制由皮肤暴露于包含紫外线的光引起的血管新生的例如遮阳板、帽子、衣服、手套、屏幕膜、窗用喷雾、窗用霜、窗材料、墙壁材料这样的制品。与上述同样地,本发明的制品中的添加剂等的使用、制品的形态等也是任意的。

[0052] 此外,本发明也提供本发明的血管新生抑制剂、组合物或制品的制造方法。此外,也提供用于抑制由对象的皮肤暴露于包含紫外线的光引起的血管新生的方法,这里,该方法包含将本发明的血管新生抑制剂或组合物涂抹于对象的皮肤,或包含使包含紫外线的光通过本发明的制品,该血管新生抑制剂、组合物和制品转换入射光所包含的紫外线的波长而放出与上述紫外线的波长相比长的波长的出射光,优选使在200nm~400nm具有峰波长的紫外线通过而成为优选在450nm~700nm,更优选在500nm~700nm具有峰波长的光。用于抑制由对象的皮肤暴露于包含紫外线的光引起的血管新生的方法有时以美容为目的,而不是医生、医疗从业者使用的治疗方法。此外,本发明也提供包含向对象提示本发明的美容方法、血管新生抑制剂、组合物或制品的、支援对象的美容行为的美容咨询方法。

[0053] 实施例

[0054] 接下来通过实施例进一步详细地说明本发明。需要说明的是,本发明不限于此。

[0055] 实验1:由各种波长转换物质的应用带来的基因表达的变化

[0056] 实验1-1:波长转换物质的调制

[0057] 作为波长转换物质,使用氧化锌荧光体,分散于醇而调制出5%的分散液。作为氧化锌荧光体,使用了堺化学工业株式会社制的Lumate G。Lumate G为如国际公开第2018/004006号所记载那样将ZnO用含硫化合物进行掺杂而得的氧化锌荧光体,吸收光谱在365nm具有峰波长,发光光谱在510nm具有峰波长。

[0058] 实验1-2:细胞试样的调制

[0059] 如以下那样调制出细胞试样。

[0060] 1.作为人皮肤角质形成细胞,使用了PromoCell社制的Normal Human Epidermal Keratinocytes。将用液氮保存了的细胞悬浮液(1mL)供于热水浴(37℃)而解冻为小的冰颗粒残留的程度,接着用9mL的温KGM培养基稀释。

[0061] 2.将稀释物温和地混合后转移到T75烧瓶中,在37℃下孵育了一晚。

[0062] 3.第二天,将培养基更换为10mL的新鲜培养基。

- [0063] 4. 将培养基定期地 (2~3天1次) 更换, 继续进行细胞的增殖。其间, 使用显微镜观察细胞, 确认了细胞以正确的形态增殖。
- [0064] 5. 在细胞达到约80%的汇合 (confluent) 后, 将细胞传代。
- [0065] 6. 细胞的传代通过用10mL的温PBS将细胞洗涤1次后吸引来进行。
- [0066] 7. 将5mL的温胰蛋白酶加入到T75烧瓶中, 用胰蛋白酶溶液覆盖烧瓶的底面在室温下放置1分钟后吸引。
- [0067] 8. 对于角质形成细胞, 将烧瓶在37℃的烘箱内静置 (最大) 5分钟。使用显微镜观察细胞, 确认到细胞小且为椭圆形。
- [0068] 9. 然后, 轻轻地敲击T75烧瓶的侧面而使细胞游离。使用显微镜观察细胞, 确认到细胞自由活动。
- [0069] 10. 对于角质形成细胞, 再悬浮于5mL的温胰蛋白酶中和溶液, 转移到灭菌50mL Falcon管。将烧瓶进一步用5mL的温FGM冲洗而加入到Falcon管中从而确实地移动全部细胞。
- [0070] 11. 将细胞以10,000rpm离心5分钟 (4℃), 一边注意不打乱细胞颗粒一边除去上清液。
- [0071] 12. 角质形成细胞以 4×10^4 细胞/孔 (500 μ L) 的浓度再悬浮于KGM, 接种于胶原被膜玻璃底4孔室载玻片。
- [0072] 13. 将培养基每2~3天更换, 使细胞增殖直到达到60~70%的汇合 (根据实验的种类而不同) 为止。
- [0073] 14. 在照射的24小时前, 变更为不添加补充剂的培养基。
- [0074] 实验1-3: 紫外线的照射
- [0075] 1. 在照射的至少30分钟前接通太阳模拟器的电源而使灯变热。太阳模拟器为使用UG11滤光片的设定。UG11滤光片为仅使UVB通过而截止其它波长光的滤光片。通过了UG11滤光片的UV光在300nm~385nm具有峰波长。
- [0076] 2. 将温度控制板接通而设定为33℃。
- [0077] 3. 将在实验1-2中调制的细胞用温PBS洗涤1次。
- [0078] 4. 在各孔中加入了0.5mL的加温了的Martinez溶液 (145mM NaCl, 5.5mM KCl, 1.2mM MgCl₂·6H₂O, 1.2mM NaH₂PO₄·2H₂O, 7.5mM HEPES, 1mM CaCl₂, 10mM D-葡萄糖)。
- [0079] 5. 如图1所示那样, 将细胞孔载置在板上, 进一步在其上, 将在实验1-1中调制的包含波长转换物质的溶液0.4ml注入到24孔板的各孔中, 以覆盖加有细胞的孔的方式载置, 波长转换物质的溶液不与细胞溶液直接接触, UV光通过波长转换物质的溶液而被照射到细胞溶液。
- [0080] 6. 以合计成为100mJ/cm²的剂量的方式进行了照射。此外, 作为对照, 制作出在细胞孔上不载置波长转换物质的板而向细胞直接照射了UV光的试样、和不向细胞照射UV光而在暗处进行了培养的试样。
- [0081] 7. 照射后, 将Martinez溶液与加温了的KGM (不添加补充剂) 更换, 将板返回到37℃的培养箱中, 孵育了24小时。
- [0082] 实验2: VEGFA的RT-PCR
- [0083] 实验2-1: RNA提取

[0084] 1.对于在实验1-3中在紫外线照射后孵育了24小时的细胞试样,按照制品说明书使用RNeasy试剂盒(Qiagen)而提取了RNA。

[0085] 2.关于各样品记录了浓度和A260/280值。

[0086] 实验2-2:逆转录

[0087] 按照制品说明书使用SuperScript VIL0 cDNA合成试剂盒,每1容器添加1pg~2.5 μg的RNA,以25℃10分钟、42℃60分钟、85℃5分钟、4℃储存的设定将PCR系统运转。

[0088] 实验2-3:RT-PCR

[0089] 将被逆转录了的样品用无RNase水稀释为50倍,进一步调制5倍5倍的稀释系列,调制下述反应体系,通过实时PCR装置(Applied Biosystems)进行了测定(图2)。

[0090] [表1]

[0091]	反应体系	μl/孔
	未扩增的稀释cDNA	5
	Platinum Sybr green qPCR Super Mix-UDG	12.5
	引物混合物(F/R) (5μM)	1
	ROX参比染料	0.5
	无RNase水	6
	合计	25

[0092] [表2]

[0093]	引物名	序列	序列号
	VEGFA正向	GCAGCTTGAGTTAAACGAACG	1
	VEGFA反向	GGTTCCCGAAACCCTGAG	2

[0094] 实验3:ANGPT1的RT-PCR

[0095] 对于在实验1-3中在紫外线照射后孵育了24小时的细胞试样,使用Thermo Fisher Scientific社的TaqMan(注册商标)基因表达检测(FAM)(制品编号:4331182, Assay ID Hs00919202_m1, https://www.thermofisher.com/taqman-gene-expression/product/Hs00919202_m1?CID=&ICID=&subtype)进行了测定。具体而言,按照上述制品的规程,使用Ambion(注册商标)RNA分离试剂盒(Applied Biosystems)而提取RNA,使用Applied Biosystems社的高容量RNA-to-cDNA试剂盒(制品编号:4387406)或高容量cDNA逆转录试剂盒(制品编号:4368813、4374966)进行逆转录,使用被逆转录了的样品调制下述反应体系,利用实时PCR装置(Applied Biosystems)进行了测定(图3)。

[0096] [表3]

反应体系	$\mu\text{l}/\text{孔}$
cDNA 模板(1-100ng)	4.0
20X TaqMan®基因表达检测	1.0
2X TaqMan®基因表达预混液	10.0
无 RNase 水	5.0
合计	20.0

[0097]

[0098] 通过这些结果,可知波长转换物质发挥抑制由UV照射引起的血管新生的效果。如果在皮肤的细胞中抑制血管新生,则期待面部潮红、酒渣鼻、炎症、皱纹、松弛、皮肤老化等的预防/改善。

[0099] 以上,对本发明的实施方式进行了说明。然而,本发明不限于它们,化妆料、药品组合物等,能够在不超出发明的宗旨的范围适当变更。

序列表

<110>	株式会社资生堂	
<120>	血管新生抑制剂	
<130>	P200730W0	
<140>	JP 2020-015610	
<150>	2020-01-31	
<160>	2	
<170>	PatentIn版本3.5	
<210>	1	
<211>	21	
<212>	DNA	
<213>	人工序列	
<220>	VEGFA正向	
<223>	引物	
<400>	1	
	gcagcttgag ttaaacgaac g	21
<210>	2	
<211>	18	
<212>	DNA	
<213>	人工序列	
<220>	VEGFA反向	
<223>	引物	
<400>	2	
	ggttccccgaa accctgag	18

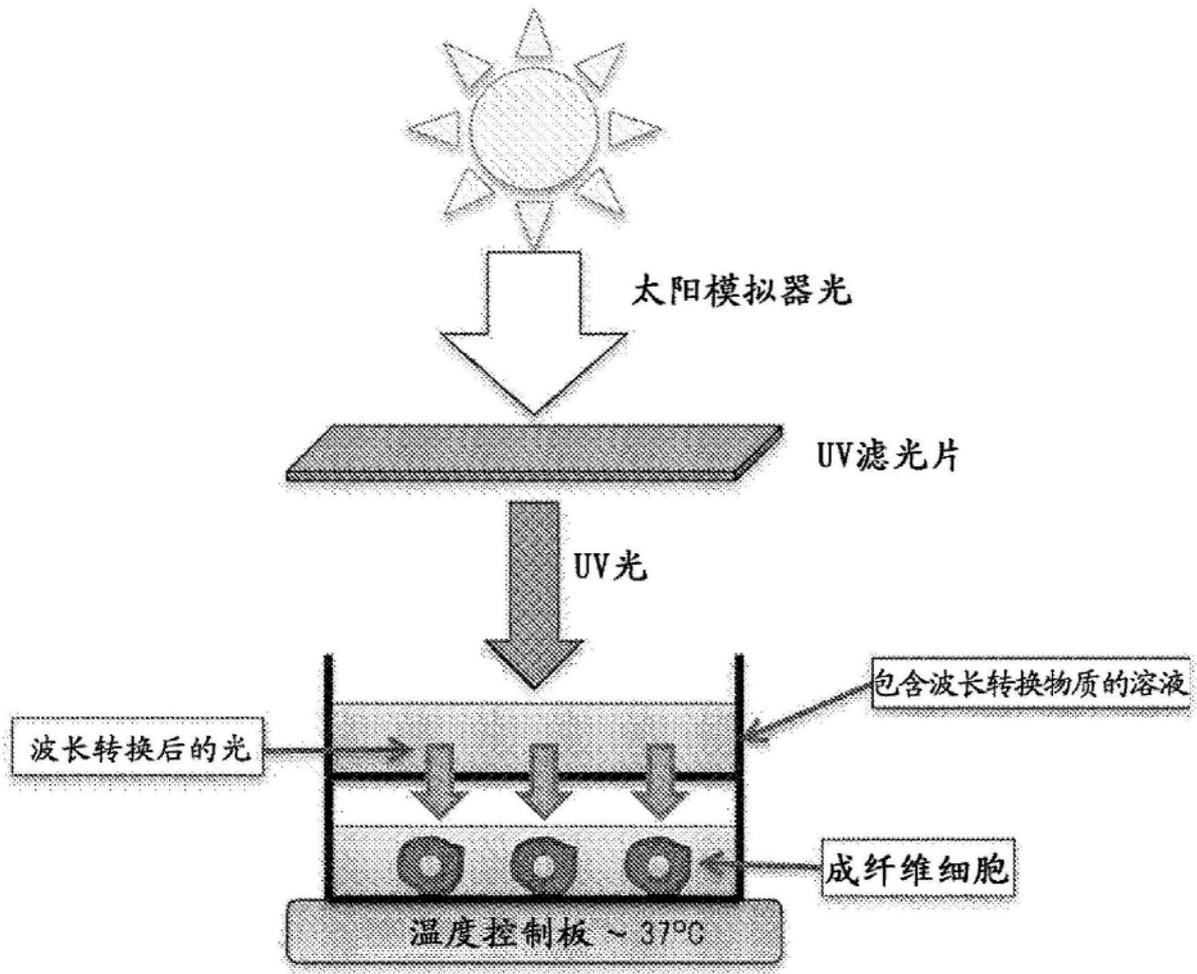


图1

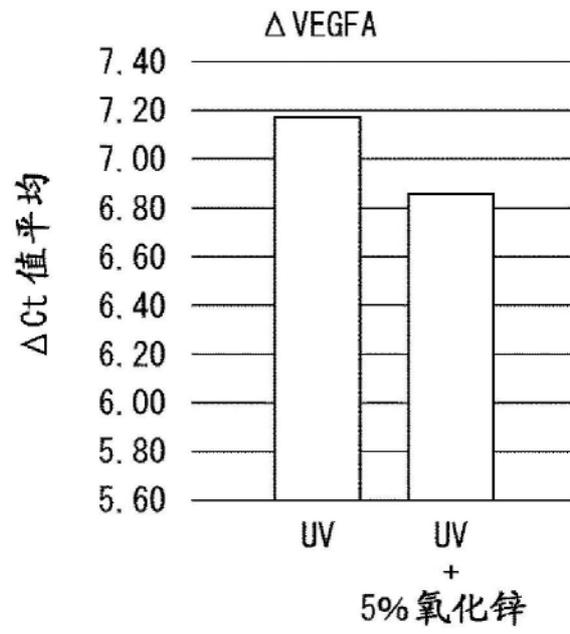


图2

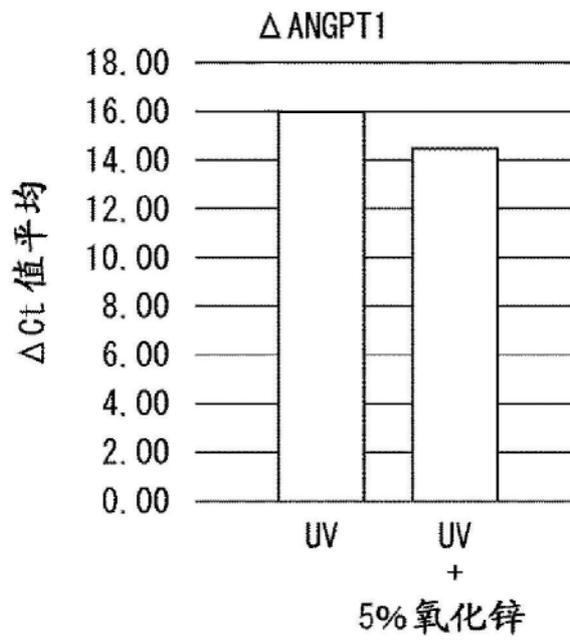


图3