

说明书

发明名称: 一种大分子透皮微乳系统及其应用

技术领域

[0001] 本发明属于生物技术领域，具体涉及一种大分子透皮微乳系统及其应用。

背景技术

[0002] 经皮系统是药物通过皮肤吸收的一种方法，药物经由皮肤吸收进入人体血液循环并达到有效血药浓度、实现疾病治疗或预防的一种给药新途径。

[0003] 经皮给药系统存在诸多优势：能有效减轻患者注射用药时的疼痛，有效避免口服药物引起的刺激和副作用，有效改善药物的缓释效果，增强药物使用和治疗的安全性。经皮给药具有避免肝首过效应、血药浓度更加平稳、安全性高等诸多优势。

[0004] 但是，人体皮肤主要是起屏障作用，这种结构有利于“内维稳外防御”，保护人体不受外来刺激，同时也阻止了外来成分的进入，外来成分要想进入皮肤，首先需要穿过皮肤表皮层，进入皮肤内部发挥作用。

[0005] 皮肤由表皮、真皮、皮下组织三部分组成。其中表皮是皮肤的最浅层，表皮分为角质层、透明层、颗粒层、棘层、基底层，基底层借助基膜与真皮层连接。角质层是表皮的最外层，由5~15层角质形成细胞和细胞间脂质构成，该结构被形象地比喻为“砖墙结构”。角质层厚度为15~50 μm ，含水量非常低(5%~20%)，代谢不活跃，是化学物质透皮吸收的主要屏障。细胞间脂质主要由45%~50%神经酰胺、25%胆固醇、15%长链游离脂肪酸和5%其他脂质组成。真皮位于表皮下方，对表皮起支持作用，主要由结缔组织组成，包括胶原纤维、弹力纤维及基质。真皮中还有神经、血管、淋巴管、肌肉、毛囊、皮脂腺及大小汗腺等其他组织。

[0006] 由于皮肤存在致密角质层结构，使大部分药物不能被吸收进入体循环，生物利用度达不到临床需要，尤其对于大分子生物活性药物，更难以透过皮肤发挥出功效。因此，改善药物的经皮渗透是研究开发经皮给药制剂的关键和难点。

[0007] 物理上常用的透皮促渗技术有：微针、离子导入、电致孔技术、超声波导入技术和无针给药系统等；化学上常用的化学渗透促进剂包括经皮渗透促进剂和离子对。

[0008] 透皮促进剂是一种能促进药物经皮吸收的物质，这是一种首选的方法。目前经皮给药系统在药物开发上已经有了快速的发展，不断有新的产品上市，如雌二醇、睾酮等药物。在美容医美行业，也有一些比较高端的化妆品，为了达到比较好的效果，也会开发出乳剂类型透皮。

[0009] 但是目前还缺乏对大分子透皮较好的产品。

[0010] 发明内容

[0011] 本发明提供一种能让大分子活性物质有效经皮进行预定作用的大分子透皮微乳系统及其应用。

[0012] 为此，本发明提供了以下的技术方案。

[0013] 本发明提供一种大分子透皮微乳系统，其特征在于：含有有效量的能起到预定作用的大分子活性物质；其中，按占比所述透皮微乳系统总重的质量百分比计，所述大分子透皮微乳系统的组成为：油相占比为：7-36%；水相占比为：57%-88%；乳剂占比为：8%-20%。

[0014] 本发明提供的大分子透皮微乳系统，还具有这样的特征：其中，所述油相占比为20%-30%、水相占比为60%-70%、所述乳剂占比为8%-12%；和/或按质量比，所述透皮微乳系统的组成为：油相：水相：乳化剂为：2-2.5:6-7:1。

[0015] 本发明提供的大分子透皮微乳系统，还具有这样的特征：其中，所述大分子活性物质小于等于300kDa或小于等于150kD，和/或按占比所述透皮微乳系统总重的质量百分比计，所述透皮微乳系统中，所述大分子活性物质的有效量为：所述大分子活性物质的占比小于等于10%，或小于等于5%，或小于等于2%，或小于等于1%，优选地，所述大分子活性物质为能提供治疗、美容以及护肤的生物分子；另一优选地，所述大分子活性物质为水溶性。

[0016] 本发明提供的大分子透皮微乳系统，还具有这样的特征：其中，含有的所述大分子活性物质至少选自梭菌神经毒素、BSA、可溶性胶原蛋白以及弹性蛋白中的任意一种或多种，和/或由系统含有的酵母提取物提供，优选地，所述梭菌神经

毒素为A、B、C、D、E、F或G型肉毒毒素，和/或所述梭菌神经毒素的轻链含有与SEQ ID NO:1-7中任意一个具有至少35%、50%、60%、70%、75%、80%、85%、90%、99%或100%一致性的氨基酸序列；和/或所述梭菌神经毒素的重链含有与SEQ ID NO:8-14中任意一具有至少35%、50%、60%、70%、75%、80%、85%、90%、99%或100%的一致性氨基酸序列。

[0017] 本发明提供的大分子透皮微乳系统，还具有这样的特征：其中，按占比所述透皮微乳系统总重的质量百分比计，所述系统中：所述梭菌神经毒素的所述有效量为占比小于等于0.02%，优选为0.00001%–0.015%，更优选为0.0005%–0.015%或0.0008–0.0015%；可溶性胶原蛋白、BSA以及所述弹性蛋白的有效量均为占比小于等于5%，或小于等于2%，或小于等于1%；酵母提取物的占比为1–10%。

[0018] 本发明提供的大分子透皮微乳系统，还具有这样的特征：按占比所述透皮微乳系统总重的质量百分比计，所述系统的组成包括：5%–20%或10–20%或13–18%的甘油；5%–20%或5–15%或8–12%的乳化剂、1%–10%或3–8%的丁二醇或丙二醇、0.5–5%或1–3%的月桂氮卓酮、0.3%–3%或1–2%的羧甲基脱乙酰壳多糖或壳聚糖衍生物、55–80%或60–70%的水，以及所述有效量的所述大分子活性物质。

[0019] 本发明提供的大分子透皮微乳系统，还具有这样的特征：其中，所述乳化剂选自聚山梨酯80、聚山梨酯60、聚山梨酯20以及山梨坦油酸酯中的任意一种或多种。

[0020] 本发明提供的大分子透皮微乳系统，还具有这样的特征：含有防腐剂，优选地，按占比所述透皮微乳系统总重的质量百分比计：含有质量百分比为0.1–1%的防腐剂，再进一步地，所述防腐剂选自苯氧乙醇、羟苯甲酯、羟苯乙酯、羟苯丙酯、苯甲醇以及山梨酸中的任意一种或多种。

[0021] 本发明提供的大分子透皮微乳系统，还具有这样的特征：其中，所述透皮微乳系统的颗粒的粒径大小平均为10–15nm。

[0022] 本发明还提供一种大分子透皮微乳系统在实现治疗、美容以及护肤效果中的应用。

[0023] 本发明提供的前述的应用，其特征在于：使用时，通过涂抹、透皮仪器、贴附以及喷雾中的任意一种或多种方式进行透皮使用。

[0024] 本发明还提供一种大分子透皮微乳系统在制备实现治疗、美容以及护肤效果中的药物或产品中的应用。

[0025] 发明作用与效果

[0026] 本发明提供的大分子透皮微乳系统及其应用，由于所述大分子透皮微乳系统的组成中的油相、水相和乳剂占比合适，形成颗粒平均粒径纳米级的水包油微乳，能让大分子活性物质有效透皮被吸收，实现预定的作用。

附图说明

[0027] 图1为实施例4中BSA标准品按照四参数拟合的标准曲线；

[0028] 图2为实施例5中小鼠实验的脚趾并拢表型图。

具体实施方式

[0029] 以下结合附图来说明本发明的具体实施方式。对于实施例中所用到的具体方法或材料，本领域技术人员可以在本发明技术思路的基础上，根据已有的技术进行常规的替换选择，而不仅限于本发明实施例的具体记载。

[0030] 实施例中所使用的方法如无特殊说明，均为常规方法；所使用的材料、试剂等，如无特殊说明，均可从商业途径获得。

[0031] 乳剂(Emulsion)，是指互不相溶的两相液体，其中一相以小液滴状态分散于另一相液体中形成的非均匀分散的液体制剂。形成液滴的相称为分散相、内相或非连续相，另一相液体则称为分散介质、外相或连续相。

[0032] 乳剂由油相(用O表示)、乳化剂和水相(用W表示)组成。根据乳化剂的种类，性质及相体积比(ϕ)，可形成水包油(O/W)或油包水(W/O)型乳剂或复合乳。

[0033] 水相：水或水性溶液。水性溶液，指易溶于水的原料溶于水；

[0034] 油相：指不易溶于水的原料溶于油性物质。

[0035] 根据乳剂颗粒粒径大小，也即乳滴的大小，将乳剂分类为普通乳、亚微乳和纳米乳：

[0036] 1.普通乳：普通乳的乳滴大小一般在 $1\mu\text{m}$ — $100\mu\text{m}$ ，呈乳白色不透明的液体。

[0037] 2.亚微乳(Subemulsions)：乳滴大小一般在0.1 μ m-1.0 μ m，亚微乳常作为胃肠道给药的载体。静脉注射乳剂应为亚微乳，粒径一般在0.25 μ m-0.4 μ m范围内。

[0038] 3.纳米乳(Nanoemulsions)：乳滴的大小<100nm，一般在10-100nm范围内，纳米乳也被称作微乳(Microemulsions)。

[0039] 本发明提供的大分子透皮微乳系统，含有有效量的能起到预定作用的大分子活性物质；其中，按占比所述透皮微乳系统总重的质量百分比计，所述大分子透皮微乳系统的组成为：油相占比为：16-36%或20-30%；水相占比为：55%-88%或60-70%；乳剂占比为：8%-20%或10%-25%。

[0040] 大分子活性物质，指分子量较大的物质，主要是指生物分子。

[0041] Da全称道尔顿(Dalton)，是分子量常用单位，就是将分子中所有原子按个数求原子量的代数和。道尔顿(Da)在数值上等于相对分子质量。

[0042] 在生物化学、分子生物学和蛋白质组学中经常用于kDa(千道尔顿)表示蛋白质等生物大分子。1kDa表示相对分子质量为1000的分子，大分子指相对分子质量在5000以上，甚至超过百万的生物学物质，如多肽、蛋白质、核酸、多糖以及抗体等。

[0043] 本发明提供的大分子透皮微乳系统的组成如表1所示：

表 1	
按占比大分子透皮微乳系统总重的质量百分比计	
油相	7-36%
水相	57%-88%
乳化剂	8-20%

[0044] 表1中，指的是本发明的大分子透皮微乳系统的组成，分为油相、水相与乳化剂的三种类型，其中“有效量的能起到预定作用的大分子活性物质”，可能是油性的(溶于油性)，也可能是水性的(溶于水)。

[0045] 在一示例中，本发明的大分子活性物质是指小于等于接近300kDa或小于等于接近150kDa的生物分子，优选地，生物分子是水溶性地，也即加入后存在于水相中。

- [0046] 在一示例中，预定作用为能实现治疗、美容以及护肤效果效果中的任意一种或多种效果。
- [0047] 在一示例中，本发明的大分子透皮微乳系统的限定满足如表2中任意一种或两种所示：

表 2
第一种：按占比大分子透皮系统总重的质量百分比计： 油相：20-30%；水相：60-70%；乳化剂 8-12%
第二种：按质量比，所述透皮微乳系统的组成为： 油相：水相：乳化剂为：2-2.5:6-7:1

- [0048] 大分子活性物质能通过该系统发挥作用即可，按占比所述透皮微乳系统总重的质量百分比计，所述透皮微乳系统中，所述大分子活性物质的有效量为：所述大分子活性物质的占比小于等于10%，或小于等于5%，或小于等于2%，或小于等于1%。在该范围内，根据具体的大分子活性物质，进行调整，最后调整后，微乳系统总体的油相、水相和乳化剂满足前述的比例或占比要求即可。
- [0049] 在一示例中，含有的所述大分子活性物质至少选自梭菌神经毒素、可溶性胶原蛋白以及弹性蛋白中的任意一种或多种，和/或由系统含有的酵母提取物提供：也即含有的大分子活性物质，可以有表3所示的几种情况：

表 3 含有的大分子活性物质种类或来源	
第一种	仅选自梭菌毒素、可溶性胶原蛋白以及弹性蛋白中的任意一种或多种
第二种	排除第一种情况，透皮微乳系统中包括酵母提取物，大分子活性物质来自酵母提取物中的成分
第三种	第一种中的不同选择与第二种的组合

- [0050] 在一示例中，对于表3中任意一种情况，按占比所述透皮微乳系统总重的质量百分比计，含量有如下：
- [0051] 所述梭菌神经毒素的所述有效量为占比小于等于0.02%，优选为0.00001%–0.015%，更优选为0.0005%–0.015%或0.0008–0.0015%，梭菌神经毒素的含量为10 ng/ml–10 μg/ml；
- [0052] 可溶性胶原蛋白和所述弹性蛋白的有效量均为占比小于等于5%，或小于等于2%，或小于等于1%；

- [0053] 有效量为：由乳液系统中含有的占比为1-10%的酵母提取物提供，例如酵母提取物占比为10%，含有的大分子为5%，则有效量就是5%。
- [0054] 梭菌毒素可以作为治疗和美容等，例如肉毒毒素可通过与周围胆碱能神经末梢突触前膜受体特异性结合，通过裂解突触相关蛋白SNAP-25，干扰突触前膜囊泡的胞吐作用，抑制神经末梢乙酰胆碱(Ach)的释放，引起肌肉的化学性去神经支配，从而导致肌肉松弛、缓解肌肉痉挛发挥治疗作用。肉毒毒素的肌肉化学性去神经支配效应是调节肌张力亢进和运动障碍疾病以及动态性皱纹的理论基础；此外,其在靶标肌肉多次注射后可导致肌肉废用性萎缩而缩小肌肉体积，因此肉毒毒素也被用于身体塑形。目前，肉毒毒素在疾病治疗领域的应用包括：面肌痉挛、特发性眼睑痉挛、痉挛性斜颈、痉挛性脑瘫、脑卒中后肢体痉挛、震颤及其他各类肌张力障碍的疾病。肉毒毒素在微创整形领域的应用包括眉间纹、额纹、鱼尾纹等各类动态性皱纹的除皱；眉毛高低的调整、颈肌放松、下颌缘提升、颈部条索注射等面部轮廓的美化；以及缩小咬肌、缩小腓肠肌、缩小斜方肌等身体轮廓的塑形。
- [0055] 本文的梭菌毒素，是指天然的梭菌毒素，以及与天然的梭菌毒素具有类似结构和功能的毒素。
- [0056] 尽管各种类型毒素的氨基酸序列和免疫性存在差异，但它们均显示出相似的分子结构。梭菌神经毒素由产毒梭菌以无毒单链多肽形式产生，约150kD。经菌体蛋白酶或体外蛋白酶切割成为双链形式才具有活性，即由一个二硫键连接的轻链(L链，毒素氨基端，50kD)与重链(H链，毒素羧基端，100kD)组成。重链又由Hn(氨基端，50kD)和Hc(羧基端，50kD)两个结构域组成。
- [0057] 更进一步地，梭菌神经毒素为A、B、C、D、E、F或G型肉毒毒素，和/或梭菌神经毒素的轻链含有与SEQ ID NO:1-7中任意一个具有至少35%、50%、60%、70%、75%、80%、85%、90%、99%或100%一致性的氨基酸序列；和/或梭菌神经毒素的重链含有与SEQ ID NO:8-14中任意一具有至少35%、50%、60%、70%、75%、80%、85%、90%、99%或100%的一致性氨基酸序列。序列见表4所示。

表 4 序列表

SEQ NO	ID	
SEQ NO:1	ID	MPFVNKQFNKYKDPVNGVDIAYIKIPNVGQMOPVKAFKIHNKIWVIPERD TFTNP EEGDLNPPPEAKQVPVSYDSTYLSTDNEKDNYLKGVTKLFERIY STD LGRMLLTSIVRGIPFWGGSTIDTELKVIDTNCINVIQPDGSYRSEELNL VIIGPSADIIQFECKSFGHEVLNLTRNGYGSTQYIRFSPDFTFGFEESLEVD TNPLL GAGKFATDPAVTLAHELIIHAGHRLYGIAINPNRVFKVNTNAYYEM SGLEVSFEELRTFGGHD AKFIDSLQENEFRLYYNKFKDIASTLNKAKSIV GTTASLQYMKNVFK EKYLLSEDTSGKFSVDKLFKDKLYKMLTEIYTEDN FVKFFKVLNRKTYLNFDKAVFKINIVPKVNYTIIYDGFNLRNTNLAANFN GQNT EINN MNFTKLKNFTGLFEFYKLLCVRGIITSQTQS
SEQ NO:2	ID	MPVTINNFNYNDPIDNNNIIMMEPPFARGTGRYYKAFKITDRIWIIPERYT FGYKPEDFNKSSGIFNRDVCEYYDPDYLNTNDKKNIFLQTMIKLFNRIKS KPLGEKLLEMIINGIPYLGDRRVPLEEFNTNIASVTVNKLISNPGEVERKK GIFANLIIFGPGPVLNENETIDIGIQNHFA SREGFGGIMQMKFCPEYVSVFN NVQENKGASIFNRRGYFSDPALILMHELIIHVLHGLYGKVDLPIVPNEK KFFMQSTDAIQAEELYTFGGQDPSIITPSTDKSIYDKVLQNFRGIVDRLNK VLVCISDPNININIKNFKDKYKFVEDSEGKYSIDVESFDKLYKSLMFGF TETNIAENYKIKTRASYFSDSLPPVKIKNLLDNEIYTIEEGFNISDKNMEKE YRGQNKAINKQAYEEISKEHLAVYKIQMCKSVR
SEQ NO:3	ID	MPITINNFNYSDPVDNKNILYLDTHLNTLANEPEKA FRITGNIWVIPDRFS RNSNP NLNKPPRVTSPKSGYYDPNYLSTDSKDTFLKEIKLFRINSREIG EELIYRLSTDIPFGNNNTPI NTFDFDVFNSVDVKTRQGNNWVKTG SINP SVIITGP RENIIDPETSTFKLTNNTFAAQEGFGALSIISIPRFM LTYSNATN VGEGRFSKSEFCMDPILILMHELNHAMHNLYGIAIPNDQTISSVTSNIFY S QYNVKLEYAEIYAFGGPTIDLIPKSARKYFEEKALDYYSIAKRLNSITTA NPSSFNKYIGEYKQKLIRKYRFVVESSGEVTNVRNKFVELYNELTQIFTEF NYAKIYNVQNRKIYLSNVYTPVTANILDDNVYDIQNGFNIPKSNLNVLFM GQNLSRNPALRKVN PENMLYLFTKFCHKAIDGR
SEQ NO:4	ID	MTWPVKDFNYSDPVNDNDILYLRI PQNKLITTPVKAFMITQNIWVIPERFS SDTNPSLSKPPRPTSKYQSYDPSYLS TDEQKDTFLKGIIKLFKRINERDIG KKLINYL VVGSPFMGDSSTPEDTFDFTRHTTNI AVEKFENGSKVVTNIITP SVLIFGPLPNILDYASLT LQGQSNPSFEGFGTLSILKVAPEFLLTFSDVTS NQSSAVLGKSIFCMDPVIALMHELTHSLHQLYGINIPSDKRIRPQVSEGFFS QDGP NVQFEELYTFGGLDVEIIPQIERSQLREKALGHYKDI AKRLNNINKT IPSSWISNIDKYKKIFSEKYNFDKDNTGNFVVNIDKFNSLYSDLTNVMSEV VYSSQYNVKNRTHYFSRHYLPVFANILDDNIYTIRDGFNL TNKGFNIE NS GQNIERNPALQKLSSSVVDLFTKVCLRLTKNSR
SEQ NO:5	ID	MPTINSFN YNDPVNNRTILYIKPGGCQQFYKSFNIMKNIWIIPERNVIGTIP QDFLPPTSLKNGDSSYYDPNYLQSDQEKDKFLKIVTKIFNRINDNLSGRIL LEELSKANPYLGNDNTPDGDFIINDASAVPIQFSNGSQSILLPNVIIMGAEP

		DLFETNSSNISLRNNYMPSNHGFGSIAIVTFSPEYSFRFKDNSMNEFIQDPA LTLMHელიHSLHGLYGAKGITT KYTITQKQNPLITNIRGTNIEEFLTFGGTD LNIITSAQSNDIYTNLLADYKKIASKLSKVQVSNPLLNPYKDVFEAKYGL DKDASGLYSVNINKFNDIFKKLYSFTFEDLATKFQVKCRQTYIGQYKYFK LSNLLNDSIYNISEGYNNLNKVNFRGQANLNPRITPITGRGLVKKIIRF CKNIVSVKGIR
SEQ NO:6	ID	MPVAINSFNYNDPVNDDTILYMQIPYEEKSKKYYKA FEIMRNVWIIERN TIGTNPSDFDPPASLKNSSAYYDPNYLTDAEKDRYLKTTIKLFRKRSN PAGKVLLQEISYAKPYLGNDHTPIDFSPVTRTTSVNIKLSTNVESSMLLN LLVLGAGPDIFESCCYPVRKLIDPDVVDPSNYGFGSINIVTFSPEYEYTF NDISGGHNSSTESFIADPAISLAHELIHALHGLYGARGVTYEETIEVKQAP LMIAEKPIRLEEFLTFGGQDLNIITSAMKEKIYNLLANYEKIATRLSEVNS APPEYDINEYKDYFQWKYGLDKNADGSYTVNENKFNEIYKKLYSFTESD LANKFVKVCRNTYFIKYEFLKVPNLLDDDIYTVSEGFNIGNLAVNNRGQS IKLNPKIIDSIPDKGLVEKIVKFCKSVIPRKGTK
SEQ NO:7	ID	MPVNIKXFNYNDPINDDIIMMEPFNDPGPGTYKAFRIIDRIWIVPERFT YGFQPDQFNASTGVFSKDVYEEYDPTYLKTD AEKDKFLKTMIKLFNRIN SKPSGQRLLDMIVDAIPYLGNA STPPDKFAANVANVSINKKIIQPGAEDQI KGLMTNLIIFGPGPVLSDNFTDSMIMNGHSPISEGFGARM MIRFCPSCLN VFNNVQENKDT SIFSRRAYFADPALTMHELIHVLHGLYGIKISNLPITPNT KEFFMQHSDPVQAEELYTFGGHDP SVISPDMDNIYNKALQNFQDIANRL NIVSSAQSGIDISLYKQIYKNKYDFVEDPNGKYSVDKDKFDKLYKALM FGFTETNLAGEYGIKTRYSYFSEYLPPIKTEKLLDNTIYTQNEGFNIASKN LKTEFNGQNKAVNKEAYEEISLEHLVIYRIAMCKPVMYKNTGK
SEQ NO:8	ID	ALNDLCIKVNNWDLFFSPSEDNFTNDLNKGEEITSDTNIEAAEENISLDLI QQYYLTFFNFDNEPENISIENLSSDIIGQLELMPNIEFPNGKKYELDKYTM FHYLRAQEF EHGKSRIALTNSVNEALLNPSRVYTFSSDYVKVNKATEA AMFLGWVEQLVYDFTDETSEVSTTDKIADITIIPYIGPALNIGNMLYKDD FVGALIFSGAVILLEFIPEIAIPVLGTFALVSYIANKVLT VQTIDNALSKRNE KWDEVYKYIVTNWLAKVNTQIDLIRKKMKEALENQA EATKAIINYQYN QYTEEEKNNINFNIDDLSSKLNESINKAMININKFLNQCSVSYLMNSMIPY GVKRLED F D ASLKDALLKYIYDNRGTLIGQVDRLKDKVNNTLSTDIPFQ LSKYVDNQRLSTFT EYINNIINTSILNRYESNHLIDLSRYASKINIGSKVN FDPIDKNQIQLFNLESSKIEVILKNAIVYNSMYENFSTSFWRIPKYFNSISL NNEYTIINCMENNSGWK VSLNYGEI I WTLQDTQEIKQRVVF KY SQMINIS DYINRWIFVTITNRLNNSKIYINGRLIDQKPISNLGNIHASNNIMFKLDGC RDTHRYIWIKYFNLFDKELNEKEIKDLYDNQSN SGILKDFWGDYLYQYDK PYYMLNLYDPNKYVDVNNVGIRGYMYLKGPRGSVMTTNIYLNSSLYRG TKFIIKKYASGNKDNIVRNNDRVYINVVKNKEYRLATNASQAGVEKILS ALEIPDVGNLSQVVVMKSKNDQGITNKCKMNLQDNNGNDIGFIGFHQFN NIAKLVASNWYNRQIERSSRTLGC SWEFIPVDDGWGERPL

SEQ NO:9	ID	APGICIDVDNEDLFFIADKNSFSDDLKSKNERIEYDTQSNYIENRSSINELIL DTNLISKIELPSENTESLTDFNVDPVYEQPAIKKIFTDENTIFQYLYSQT PLDIRDISLTSSFFDALLFSNKVYSFFSMDYIKTANKVVEAGLFAGWVKQI VDDFVIEANKSSTMDKIADISLIVPYIGLALNVGNETAKGNFENAFEIAGA SILLEFIPELLIPVVGAFLLSYIDNKNKIIKTIDNALTNRDEKVIDMYGLIV AQWLSTVNTQFYTIKEGMYKALNYQAQALEEIIKYKYNISYEKEKSNINI DFNDINSKLNENINQAINNDFINECSVSYLMKKMIPLAVEKLLDFDNTL KKNLLNYIDENKLYLIGSAEYKSKVDKYLKTIIPFDLSMYTNNILIEIFN KYNSEILNNIILNLRDRDNNLIDLSGYGANVEVYDGVKLNNDKNQFKLTSS TNSEIRVTQNNIIFNSMFLDFSVSFWIRIPKYKNDGIQNYIHNEYTIINCIK NNSGWKISIRGNRIIWTLTIDINGKTKSVFFEYSIREDISDYINRWFFVTITN NSDNAKIYINGKLESNIDIKNIGEVIANGEIIFKLDGDIDRTQFIWMKYFSIF NTELSQSNIKEIYKIQSYSEYKDFWGNPLMYNKEYYMFNAGNKNSYIK LKKDSSVGEILTRSKYNQNSNYINRNLIGEKFIIRKSNSSQINDDIVRK EDYTYLDFFNSNREWRVYAYKDFKEEEKKLFLANIYDSNEFYKTIQKEY DEQPTYSCQLLFFKDEESTDEIGLIGIHRFYESGIVLKDYKNYFCISKWYL KEVKRKPYPNPNLGCNWQFIPKDEGWIE
SEQ NO:10	ID	SLYNKTLDCRELLVKNTDLPFIGDISDVKTDIFLRKDINEETEVIYYPDNV VDQVILSKNTSEHGQLDLLPSIDSESEILPGENQVFDNRQTQNVLYNS YYLESQKLSDNVEDFTFTRSIEEALDNSAKVYTYFPTLANKVNAGVQG GLFLMWANDVVEDFTTNILRKDTLDKISDVSAIPYIGPALNISNSVRRGN FTEAFVGTGVTILLEAFPEFTIPALGAFVIYSKVQERNEIIKTIDNCLEQRIK RWKDSYEWMMGTWLSRIITQFNNISYQMYDSLNYQAGAIKAKIDLEYK KYSGSDKENIKSQVENLNKSLDVKISEAMNNINKFIRECSVTYLFKNMLP KVIDELNEFDRNTKAKLINLIDSHNILLVGEVDKLLKAKVNNSFQNTIPFNIF SYTNNSLLKDIINEYFNNINDSKILSLQNRKNTLVDTSGYNAEVSEEGDV QLNPIFPDFDKLGSSGEDRGKVVITQENIVYNSMYESFSISFWIRINKWV SNLPGYTIIDSVKNNSGWSIGIISNFLVFTLKQNEDESEQINSFYDISNNAP GYNKWFFVTVTNNMMGMNKIYINGKLIDTIKVKELTGINFSKTITFEINKI PDTGLITSDSDNINMWIRDFYIFAKELDGKDINILFNSLQYTNVVKDYWG NDLRYNKEYYMVNIDYLNRYMYANSRQIVFNTRRNNNDNFNEGYKIIKRI RGNTNDTRVRGGDILYFDMTINNKAYNLFMKNETMYADNHSTEDIYAIG LREQTKDINDNIIFIQIPMNNTYYYASQIFKSNFNGENISGICSIGTYRFR GGDWYRHNYLVPTVKQGNYSALLESTSTHWGFVPVSE
SEQ NO:11	ID	DDSTCIKVKNRRLPYVADKDSISQEIFENKIITDETQNVQNYSDKFSLDESIL DGQVPINPEIVDPLLPNVNMEPLNLPGEIIVFYDDITKYVDYLNSYYYLE SQKLSNNVENITLTSVEEALGYSNKIYTFPLSLAEKVNKGVAQGLFLNW ANEVVEDFTTNIMKKDTLDKISDVSVIPIYIGPALNIGNSALRGNFNQAF TAGVAFLLEGFPFTIPALGVFTFYSSIQEREKIIKTIENTCLEQRVWRWDS YQWMVSNWLSRITTQFNHINYQMYDSLQYQADAIKAKIDLEYKKYSGS DKENIKSQVENLNKSLDVKISEAMNNINKFIRECSVTYLFKNMLPKVIDE LNKFDLRTKTELINLIDSHNILLVGEVDRLKAKVNESFENTMFPNIFSNTN NSLLKDIINEYFNSINDSKILSLQNKKNALVDTSGYNAEVRVGDNVQLNTI YTNDFKLSSSGDKIIVNLNNILYSAIYENSSVSFWIKSKDLTNSHNEYTII NSIEQNSGWKLCIRNGNIEWILQDVNRKYKSLIFDYSELSHTGYTNKWF FVTITNNIMGYMKLYINGELKQSQKIEDLDEVKLDKTIVFGIDENIDENQ MLWIRDFNIFSKELSNEDINIVYEGQILRNVIKDYWGNPLKFDTEYYIIND NYIDRYIAPESNVLVLVQYPDRSKLYTGNPITIKSVSDKNPYSRILNGDNII LHMLYNSRKYMIIRDTDITYATQGGECNQNCVYALKLQSNLGNYGIGIFSI KNIVSKNKYCSQIFSSFRENTMLLADIYKPWRFSFKNAYTPVAVTNYETK LLSTSSFWKFISRDPGWVE

SEQ NO:12	ID	KSICIEINNGELFFVASENSYNDDNINTPKEIDDTVTSNNNYENDLDQVIL NFNSESAPGLSDEKLNLTIQNDAYIPKYDSNGTSDIEQHDVNELNVFFYL DAQKVPEGENNVLNLTSSIDTALLEQPKIYTFFSSEFINNVNKPQAAALFVG WIQQVLVDFTTEANQKSTVDKIADISIVVPYIGLALNIGNEAQKGNFKDA LELLGAGILLEFEPELLIPTILVFTIKSFLGSSDNKNKVIKAINNALKERDEK WKEVYSFIVSNWMTKINTQFNKRKEQMYQALQNQVNALKAIIESKYNS YTLEEKNELTNKYDIEQIENELNQKVSAMNNIDRFLTESSISYLMKLINE VKINKLREYDENVKTYLLDYIIKHGSILGESQQELNSMVIDTLNNSIPFKL SSYTDDKILISYFNKFFKRIKSSSVLNMRYKNDKYVDTSGYDSNININGD VYKYPTNKNQFGIYNKDLSEVNISQNDYIIYDNKYKNFSISFWVRIPNYD NKIVNVNNEYTIINCMRDNNSGWKVS LNHNHIIWTLQDNSGINQKLAFN YGNANGISDYINKWIFVTITNDRLGDSKLYINGNLIDKK SILNLGNHIVSD NILFKIVNCSYTRYIGIRYFNIFDKELDETEIQTLYNNEPNANILKDFWGN LLYDKEYYLLNLVLPNNFINRRTDSTLSINNIRSTILLANRLYSGIKVKIQR VNNSSNDNLVRKNDQVYINFVASKTHLLPLYADTATTNKEKTIKISSSGN RFNQVVVMNSVGNCTMNFKNNGNNGNIGLLGFKADTVVASTWYYTHMR DNTNSNGFFWNFISEEHWQEK
SEQ NO:13	ID	APPRLCIRVNNSEFFVASESSYNENDINTPKEIDDTNLNNNYRNNLDEV ILDYNSQTIPQISNRTLNTLVQDNSYVPRYDSNGTSEIEEYDVDFNVFFYL LHAQKVPEGETNISLTSSIDTALLEESKDIFFSSEFIDTINKPVNAALFIDWI SKVIRDFTEATQKSTVDKIADISLIVPYVGLALNIIIEAEKGNFEEAFELLG VGILLEFVPELTIPVILVFTIKSYIDSYENKNKAIKAINNSLIEREAKWKEIY SWIVSNWLTRINTQFNKRKEQMYQALQNQVDAIKTAIEYKNNYTSDEK NRLESEYNINNIEEELNKKVSLAMKNIERFMTESSISYLMKLINEAKVGK LKKYDNHVKSDLLNYILDHRSILGEQTNELSDLVTSTLNSSIPFELSSYTN DKILIIFYFNRLYKKIKDSSILDMRYENNKFIDISGYGSNISINGNVYIYSTNR NQFGIYNSRLSEVNIAQNNDIYNSRYQNFSISFWVRIPKHYKPMNHNRE YTIINCMGNNNSGWKISLRTVRDCEIHWTLQDTSGNKENLIFRYEELNRIS NYINKWIFVTITNNRLGNSRIYINGNLIVEKSISNLGDIHVSDNILFKIVGC DDETYVVGIRYFKVFNTELDKTEIETLYSNEPDPSILKNYWGNYLLYNKKY YLFNLLRKDKYITLNSGILNINQQRGVTEGSVFLNYKLYEGVEVIIRKNGP IDISNTDNFVRKNDLAYINVVDGRGVEYRLYADTKSEKEKIIRTSNLNDSL GQIIVMDSIGNNCTMNFQNNNGSNIGLLGFHSNNLVASSWYYNNIRRTSS NGCFWSSISKENGWKE
SEQ NO:14	ID	SEQCIIVNNEDLFFIANKDSFSKDLAKAETIAYNTQNNTIENNF SIDQLILD NDLSSGIDLPNENTEPFTNFDDIDIPVYIKQSALKKIFVDGDSLFEYLHAQT FPSNIENLQLTNSLNDALRNNNKVYTFSTNLVEKANTVVGASLFVNWV KGVIDDFTSESTQKSTIDKVS DVSIIPYIGPALNVGNETAKENFKNAFEIG GAAILMEFIPELIVPIVGFFTLESYVGNGKGHIIMTISNALKKRDKQWTD MYGLIVSQWLSTVNTQFYTIKERMYNALNNQSQAIEKIHEDQYNNRYSEEDKM NINIDFNDIDFKLNQSINLAINNIDDFINQCSISYLMNRMIPLAVKKLKDFD DNLKRDLL EYIDTNELYLLDEVNILKSKVNRHLKDSIPFDLSLYTKDTILI QVFNNYISNISSNAILSLSYRGGRLIDSSGYGATMNVGSDVIFNDIGNGQF KLNNSENSNITAHQSKFVVYDSMFDNFSINFWVRTPKYNNDIQTYLQN EYTIISCIKNDSGWKVSIKGNRIIWLIDVNAKSKSIFFEYSIKDNISDYINK WFSITITNDRLGNANIYINGSLKKSEKILNLDRINSSNDIDFKLINCTD TTKFVWIKDFNIFGRELNATEVSSLYWQSSTNTLKDFWGNPLRYDTQYYL FNQGMQNIYIKYFSKASMGETAPRTNFNNAAINYQNLYLGLRFIGKASNSR NINNDNIVREGDYIYLNIDNISDESYRVYVLVNSKEIQTQLFLAPINDDPTF YDVLQIKKYEKTTCYQILCEKDTKTFGLFGIGKFVKDYG YVWD TYD NYFCISQWYLRRISENINKLRLGCMWQFIPVDEGWTE

- [0058] 肉毒毒素相关产品在临床痉挛性疾病、腺体分泌过度、神经性疼痛的治疗及美容除皱等领域有着广阔的应用前景。但由于属于大分子，目前这些产品都是注射的方式，很难直接透过皮肤进入作用部位发挥作用。
- [0059] 肉毒毒素目前只有A型和B型毒素可作为药物使用，但用于医学领域的绝大部分是A型肉毒素。现临床上应用的A型肉毒素包括由美国Allergan公司生产的保妥适(Botox)，英国Speywood公司生产的丽舒妥(Dysport)，以及我国兰州生物制品研究所生产的衡力(BTX-A)，肉毒毒素相关产品在临床痉挛性疾病、腺体分泌过度、神经性疼痛的治疗及美容除皱等领域有着广阔的应用前景。但目前这些产品都是注射的方式，而我们的的大分子透皮微乳系统，在小鼠体内通过药效实验验证了能让例如肉毒毒素的生物大分子透皮实现预定的作用。
- [0060] 酵母提取物(又称酵母味素，英文名称为Yeast extract)，缩写为YE，是根据中华药典之规定采用以蛋白质含量丰富的食用酵母为原料,采用自溶、酶解、分离、浓缩等现代生物高新技术，将酵母细胞内的蛋白质、核酸等进行降解后精制而成的一种棕黄色可溶性膏状或浅黄色粉状纯天然制品。酵母提取物的主要成分除了氨基酸、核苷酸，还含有单糖、多糖、矿物质、维生素等。
- [0061] 酵母提取物的主要应用功效是焕肤、抗衰老和锁水保湿。酵母提取物有很好的焕肤效果，主要经过三种作用方式达到焕肤功效：(1)减少已产生的黑色素向表层细胞转移；(2)促进含黑色素角质细胞的新陈代谢加速角质脱落；(3)促进合成表皮层蛋白质调节肌肤质地。酵母提取物有着很好的清除自由基抗衰老功效，可调节肌肤纹理，细纹和皱纹，增加皮肤弹性，使肌肤变得平顺、细致，也可减轻和预防皮肤在早期衰老过程中产生的肤色暗淡问题。酵母提取物也具有强大的锁水功效：富含天然保湿因子，促使角质层能更有效保持水分，给予肌肤深度润泽，防止肌肤干燥；经增加角质层中神经酰胺的含量来加强皮肤屏障功能，减少经皮水分流失；还可以修护受损的角质层脂质屏障，提高皮肤抵抗力，调节肌肤状况。
- [0062] 可溶性胶原是一种天然蛋白质，它在皮肤中具有重要的功能。胶原蛋白能够保持皮肤的弹性和紧致度，但随着年龄的增长，皮肤中的胶原蛋白会逐渐减少，

导致皮肤松弛和出现皱纹。而可溶性胶原作为一种能够更深入渗透皮肤的形式，可以补充皮肤中的胶原蛋白，从而改善皮肤的状态。

[0063] 可溶性胶原可以刺激和促进胶原蛋白的合成，帮助修复已损坏的胶原蛋白，并促进新的胶原蛋白的生成，从而改善皮肤的弹性和紧致度，改善皱纹和细纹。

[0064] 弹性蛋白是肌肤组成的重要成分，弹力蛋白是肌肤的青春之本。弹性蛋白肽具有促进皮肤损伤修复、血管再生和促进成纤维细胞增殖等功效。还可使人的皮肤弹性增强，从而使皮肤光滑而富有弹性。

[0065] 在一示例中，本发明的大分子透皮微乳系统的组成如表5所示：

表 5

组成名称	类别	按占比透皮组合物总重的质量百分比计
甘油	油相	5%-20%或 10-20%或 13-18%
丁二醇或丙二醇		1%-10%或 3-8%
桂氮卓酮		0.5-5%或 1-3%
乳化剂（例如聚山梨酯 80、聚山梨酯 60、聚山梨酯 20 以及山梨坦油酸酯中的任意一种或多种）	乳化剂	5%-20%或 5-15%或 8-12%
羧甲基脱乙酰壳多糖（壳聚糖）或壳聚糖的衍生物	水相	0.3%-3%或 1-2%
水		55-80%或 60-70%
大分子活性物质		前述的任意描述的成分类型和有效量

[0066] 优选地，所述表5的示例为表6的组成：

表 6		
组成名称	类别	按占比透皮组合物总重的质量百分比计
甘油	油相	10-20%或 13-18%
丁二醇或丙二醇		3-8%
桂氮卓酮		1-3%
乳化剂（例如聚山梨酯 80、聚山梨酯 60、聚山梨酯 20 以及山梨坦油酸酯中的任意一种或多种）	乳化剂	5-15%或 8-12%
羧甲基脱乙酰壳多糖（壳聚糖）或壳聚糖的衍生物	水相	1-2%
水		55-80%或 60-70%
大分子活性物质		水溶性，且含量小于等于小于等于 5%；或小于等于 2%；或小于等于 1%；或小于等于 0.05%；或小于等于 0.02%，优选为 0.00001%-0.015%，更优选为 0.0005%-0.015%或 0.0008-0.0015%

- [0067] 壳聚糖类，壳聚糖作为一种天然分子碱性多糖，具有成膜性、抗菌性、消炎、止血止痛止痒、祛疤、促进伤口愈合、抗氧化等作用。壳聚糖对细菌、酵母、真菌等微生物都有很好的抑制作用，对一般人体表皮存在的细菌如表皮葡萄球菌，大肠杆菌和热带白色念珠菌以及烧伤病人易出现的绿脓杆菌、金黄色葡萄球菌和化脓性金黄色葡萄球菌感染等都有显著的抑制作用。壳聚糖具有强大的保湿性，保湿能力甚至超过透明质酸钠，被誉为“超级保湿剂”。壳聚糖能吸附重金属，能吸附化妆品中的残留物。壳聚糖具有修复力，能修复肌肤屏障，对敏感肌、痘肌都有用。
- [0068] 在一示例中，大分子透皮微乳系统中还含有防腐剂，优选地，按占比透皮微乳系统总重总重的质量百分比计：含有质量百分比为0.1-1%的防腐剂。再进一步地，防腐剂选自苯氧乙醇、羟苯甲酯、羟苯乙酯、羟苯丙酯、苯甲醇以及山梨酸中的任意一种或多种。
- [0069] 本发明的大分子透皮微乳系统的颗粒的粒径大小平均为纳米级，优选地，平均为10-15nm。

[0070] 表5是本发明提供的大分子透皮微乳系统的组成的一个具体示例。

表 5		
组成名称	类别	按占比透皮组合物总重的质量百分比计
甘油	油相	5%-20%或 10-20%或 13-18%
丁二醇或丙二醇		1%-10%或 3-8%
桂氮卓酮		0.5-5%或 1-3%
乳化剂（例如聚山梨酯 80、聚山梨酯 60、聚山梨酯 20 以及山梨坦油酸酯中的任意一种或多种）	乳化剂	5%-20%或 5-15%或 8-12%
羧甲基脱乙酰壳多糖（壳聚糖）或壳聚糖的衍生物	水相	0.3%-3%或 1-2%
水		55-80%或 60-70%
A 类肉毒毒素		10 ng/ml-10 µg/ml

[0071] 本发明的大分子透皮微乳系统在实现治疗、美容以及护肤效果中进行应用，使用时，通过涂抹、透皮仪器、贴附以及喷雾中的任意一种或多种方式进行透在使用时，可以通过涂抹、透皮仪器、贴附以及喷雾中的任意一种或多种方式进行透皮使用。

[0072] 本发明的大分子透皮微乳系统还可以应用在制备实现治疗、美容以及护肤效果中的药物或产品。

[0073] 另外，本发明，水优选为蒸馏水、饮用水、无菌水、超纯水以及去离子水中的任意一种或多种的组合。

[0074] 以下实施例中是，涉及的一些成分说明如下：

[0075] 超氧化物歧化酶在化妆品上的应用主要包括：(1)作为化妆品添加剂，可防止皮肤老化，起到护肤效果；(2)预防和治疗有关皮肤病，这些在国外已经获得广泛应用。目前，国内外许多高级化妆品都添加了SOD，并将其制成面膜、奶液、霜剂。

[0076] 维生素是人体必需的有机物质，维生素A可以促进表皮细胞的增殖，增加真皮胶原蛋白和弹性蛋白的形成，具有抗衰老等作用。维生素E是天然抗氧化剂，能

促进新陈代谢、改善皮肤弹性。维生素C抗氧化性强，可促进胶原合成、抑制胶原分解，维生素C和维生素E具有协同清除自由基的作用。

[0077] 除了人体必需的维生素，目前已有多种植物天然活性成分被证明具有抗皱和紧致的功能，如积雪草提取物、奥氏海藻提取物、金盏花提取物等。这些原料目前已经被广泛用于抗皱、紧致的化妆品中。

[0078] 实施例1

[0079] 本实施例提供的大分子透皮微乳系统的配方如表6所示：

表 6		
	组成	用量（按质量百分比计）
1	甘油	15%
2	聚山梨醇酯-80	10%
3	丙二醇	5%
4	月桂氮卓酮	2%
5	羧甲基脱乙酰壳多糖	1.5%
6	苯氧乙醇	0.5%
7	肉毒蛋白 A	0.01%
8	纯化水	余量

[0080] 制备方法：

[0081] (1)使用电子天平按配方量依次称取纯化水、羧甲基脱乙酰壳多糖、肉毒蛋白A到3L的烧杯1中，室温搅拌溶解(转速：400～500rpm)。

[0082] (2)使用电子天平按配方量依次称取聚山梨醇酯-80、月桂氮卓酮、苯氧乙醇、丙二醇和甘油到2L的烧杯2中，室温搅拌均匀(转速：250～300rpm)。

[0083] (3)将烧杯2中的溶液加到烧杯1中，室温搅拌均匀(转速：400～500rpm)。

[0084] (4)向步骤3)所制备的溶液中加入纯化水，补足至1000g,室温搅拌混匀。

[0085] 实施例2

[0086] 本实施例提供的大分子透皮微乳系统的配方如表7所示。

表 7		
	组成	用量（按质量百分比计）
1	甘油	15%
2	聚山梨醇酯-80	10%
3	丁二醇	5%
4	羧甲基脱乙酰壳多糖	1.5%
5	酵母提取物	1%
6	生育酚（维生素 E）	1%
7	抗坏血酸磷酸酯钠	1%
8	超氧化物歧化酶（SOD）	0.5%
9	苯氧乙醇	0.5%
10	视黄醇棕榈酸酯	0.3%
11	（日用）香精	0.2%
12	纯化水	余量

- [0087] 制备方法：
- [0088] (1)使用电子天平按配方量依次称取纯化水、羧甲基脱乙酰壳多糖、酵母提取物、超氧化物歧化酶(SOD)和抗坏血酸磷酸酯钠到3L的烧杯1中，室温搅拌溶解(转速：400–500rpm)。
- [0089] (2)使用电子天平按配方量依次称取聚山梨醇酯–80、生育酚(维生素E)、视黄醇棕榈酸酯、苯氧乙醇、(日用)香精、丁二醇和甘油到2L的烧杯2中，室温搅拌均匀(转速：250–300rpm)。
- [0090] (3)将烧杯2中的溶液加到烧杯1中，室温搅拌均匀(转速：400–500rpm)。
- [0091] (4)向步骤(3)所制备的溶液中加入纯化水，补足，室温。
- [0092] 搅拌混匀。
- [0093] 实施例3
- [0094] 本实施例提供的大分子透皮微乳系统的配方如表8所示。

表 8		
序号	组成	用量 (按质量百分比计)
1	甘油	15%
2	聚山梨醇酯-80	10%
3	丁二醇	5%
4	羧甲基脱乙酰壳多糖	1.5%
5	酵母提取物	1%
6	生育酚(维生素E)	1%
7	抗坏血酸磷酸酯钠	1%
8	超氧化物歧化酶(SOD)	0.5%
9	苯氧乙醇	0.5%
10	视黄醇棕榈酸酯	0.3%
11	(日用)香精	0.2%
12	可溶性胶原	0.01%
13	弹性蛋白	0.01%

14	羟丙基四氢吡喃三醇	0.01%
15	肌肽	0.01%
16	聚谷氨酸钠	0.01%
17	奥氏海藻提取物	0.02%
18	金盏花提取物	0.02%
19	积雪草提取物	0.02%
20	芦荟提取物	0.02%
21	生物素	0.01%
22	纯化水	余量

- [0095] 制备方法：
- [0096] (1)使用电子天平按配方量依次称取纯化水、羟丙基四氢吡喃三醇、肌肽、聚谷氨酸钠、生物素、奥氏海藻提取物、金盏花提取物、积雪草提取物、芦荟提取物、羧甲基脱乙酰壳多糖、抗坏血酸磷酸酯钠、酵母提取物、超氧化物歧化酶(SOD)、可溶性胶原、弹性蛋白到3L的烧杯1中，室温搅拌溶解(转速：400–500rpm)。
- [0097] (2)使用电子天平按配方量依次称取聚山梨醇酯–80、生育酚(维生素E)、视黄醇棕榈酸酯、苯氧乙醇、(日用)香精、丁二醇和甘油到2L的烧杯2中，室温搅拌均匀(转速：250–300rpm)。
- [0098] (3)将烧杯2中的溶液加到烧杯1中，室温搅拌均匀(转速：400 ~ 500rpm)。
- [0099] (4)向步骤(3)所制备的溶液中加入纯化水，补足至1000g,室温搅拌混匀。

- [0100] 实施例1-3得到的制剂，乳化效果好，透明度高，不分层，经纳米粒度电位仪检测，平均粒度为10-15nm，特别是实施例3所得制剂，平均粒度为12.99nm。
- [0101] 对比例1
- [0102] 本对比例的配方如表9所示

表 9	
组成	用量（以质量百分比计）
油酸	10.283%
油醇	12.754%
丙二醇	11.592%
薄荷醇	1.000%
月桂氮卓酮	2.000%
聚山梨酯 80	35.574%
山梨坦油酸酯	13.118%
苯氧乙醇	0.500%
A 型肉毒蛋白	0.001%
纯化水	13.178%

- [0103] 制备方法：
- [0104] (1)酸酯到2L的烧杯中，搅拌5min；用电子天平按配方量称取油醇和油酸到烧杯中，搅拌5min；用电子天平按配方量称取月桂氮卓酮和苯氧乙醇到烧杯中，室温搅拌均匀(转速：200~250rpm，5min)。
- [0105] (2)用电子天平按配方量称取丙二醇和薄荷醇依次加入蓝盖瓶，加热至60℃(约10min)充分溶解后，加入到步骤1)所得的溶液中，室温搅拌均匀(转速：200~250rpm，5min)。
- [0106] (3)将10mg的肉毒蛋白A加入(2)所制备的溶液，室温搅拌混匀(转速：200~250rpm，5min)。
- [0107] (4)向步骤(3)所制备的溶液中加入纯化水，补足至1000g,室温搅拌混匀。
- [0108] 对比例2-10
- [0109] 对比例2-10的配方表10所示，按质量百分比计：

表 10									
名称	对比例 2	对比例 3	对比例 4	对比例 5	对比例 6	对比例 7	对比例 8	对比例 9	对比例 10
甘油	20.000%	15.000%	15.000%	15.000%	15.000%	15.000%	15.000%	15.000%	15.000%
聚山梨酯 80	2.000%	5.000%	5.000%	5.000%	5.000%	5.000%	10.000%	10.000%	10.000%
聚山梨醇酯-20	0.000%	0.000%	0.000%	0.000%	0.000%	0.000%	0.000%	5.000%	10.000%
山梨坦泊酸酯	0.000%	0.000%	0.000%	0.000%	0.000%	0.000%	3.750%	0.000%	0.000%
丙二醇	2.000%	5.000%	5.000%	5.000%	5.000%	5.000%	5.000%	5.000%	5.000%
月桂氮卓酮（月桂酸氮酮）	2.000%	0.000%	0.000%	0.000%	0.000%	0.000%	0.000%	0.000%	0.000%
苯氧乙醇	0.500%	0.500%	0.500%	0.500%	0.500%	0.500%	0.500%	0.500%	0.500%
羧甲基脱乙酰壳多糖（壳聚糖）	1.000%	1.000%	1.500%	1.500%	1.500%	1.500%	1.500%	1.500%	1.500%
酵母提取物	1.000%	1.000%	1.000%	1.000%	1.000%	1.000%	1.000%	1.000%	1.000%
生育酚（维生素 E）	0.000%	0.000%	1.000%	1.000%	0.000%	0.300%	0.000%	0.550%	0.450%
抗坏血酸磷酸酯钠	0.000%	0.000%	0.500%	0.500%	0.500%	0.500%	0.500%	0.500%	0.500%

视黄醇棕榈酸酯	0.000%	0.000%	0.900%	0.000%	0.500%	0.300%	0.000%	0.550%	0.400%
（日用）香精	0.100%	0.050%	0.200%	0.200%	0.200%	0.200%	0.200%	0.200%	0.200%
可溶性胶原	0.000%	0.000%	0.000%	0.000%	0.000%	0.000%	0.000%	0.000%	0.000%
金缕梅提取物	0.000%	0.000%	0.050%	0.050%	0.050%	0.050%	0.050%	0.050%	0.050%
积雪草提取物	0.000%	0.000%	0.050%	0.050%	0.050%	0.050%	0.050%	0.050%	0.050%
水	71.400%	72.450%	69.300%	70.200%	70.700%	70.600%	62.450%	60.100%	55.350%

- [0110] 按对比例2-10中的各个配方，分别将油相充分混合溶解，分别将水相充分混合溶解，然后相混合得到，具体制备方式，都是常规技术可选择可以参照前面的实施例，不再一一说明。
- [0111] 制备得到的对比例2-10，外观效果相比实施例1-3，都不佳，具体如表11：

表 11	
对比例	外观效果
对比例 2	乳剂效果不好、透明度不好、分层
对比例 3	乳剂效果不好、透明度不好、分层
对比例 4	乳剂效果不好、透明度不好、分层
对比例 5	乳剂效果不好、透明度不好、分层
对比例 6	乳剂效果不好、透明度不好、分层
对比例 7	乳剂效果不好、透明度不好、分层
对比例 8	乳剂效果不好、透明度不好、分层
对比例 9	黏腻感太强
对比例 10	黏腻感太强

- [0112] 实施例4
- [0113] 本实验进行透皮效率检测。
- [0114] 将实施例1和对比例1中添加的肉毒蛋白A更换为BSA蛋白，实施例1制备的BSA蛋白乳剂为1.0mg/ml，对比例1制备的BSA蛋白乳剂为0.62mg/ml，用Franz扩散池法进行透皮实验。
- [0115] 试验设备与材料
- [0116] 1.试剂
- [0117] 磷酸盐缓冲液、蛋白标准品、供试品、蛋白检测试剂盒(超高灵敏度)；
- [0118] 2.耗材
- [0119] 透皮评价用离体猪皮、离心管、EP管、枪头、预包被微孔板；
- [0120] 3.设备
- [0121] TP-6透皮扩散仪(天津精拓仪器科技有限公司)、多功能酶标仪(Thermo scientific, Varioskan Lux)，医用冰箱(青岛海尔生物医疗有限公司)，生化培养箱(上海一恒科学仪器有效公司)，移液器(Eppendorf AG)。
- [0122] 一、实验前准备：
- [0123] (1)实验所需的猪皮从-20℃冰箱拿出放在4度解冻，然后用生理盐水清洗，备用。

- [0124] (2)实验前清洗供给室、扩散室(接受室)接受从供给室过来的液体)、搅拌子。
- [0125] (3)水箱中加入纯水,与扩散池架平齐为宜,设置好温度32℃、转速。
- [0126] (4)TP-6透皮扩散仪温度升至设置温度后,将猪皮放置在供给室与扩散室之间。匀速搅拌使溶液保持等温状态及渗液的浓度均匀。
- [0127] 二、实验方法:
- [0128] (1)设置3个实验组,一个空白组。
- [0129] (2)加入BSA蛋白测试液:在前3个供给室中分别加入实施例1制备的BSA蛋白乳剂测试液150 μ l(1mg/ml),对比例1制备的BSA蛋白乳剂测试液150 μ l(0.62mg/ml),PBS溶解的BSA蛋白测试液150 μ l(1mg/ml),空白组加入PBS150 μ l。
- [0130] (3)接受室中充满PBS,取4个1.5ml EP管,每1h分别从接受室的取样口取400ul接受室的液体去进行后续的OD检测,并标记取样时间、实验组编号,总共取样6h。取样后每个接受室必须再补充400 μ l PBS,以维持接受室体积不变。
- [0131] (4)将所有收集的样品放4℃冰箱备用。
- [0132] 三、ELISA实验检测:
- [0133] 1试剂准备:
- [0134] a.使用前将所有试剂平衡至室温(18–25℃)。按照酶标仪说明书进行设置检测波长为450nm并在读板前预热15min。
- [0135] b.洗涤缓冲液:用580ml去离子水稀释20ml浓缩洗涤缓冲液,制备600ml洗涤缓冲液。
- [0136] c.标准工作液:首先,标准品1000g离心1 min,加入2ml标准品样品稀释液,使其与标准品样品稀释液混匀。吸取300 μ l的20000ng/ml标准品稀释液到第一个管内再混匀即为6666.7ng/ml工作液。再将300 μ l的溶液从前管移到后管中。在下次转移前,将每管彻底混匀。设定6个点稀释标准品,分别为20000ng/ml, 6666.7ng/ml, 2222.2ng/ml, 740.7ng/ml, 246.9ng/ml, 0ng/ml。
- [0137] d.检测试剂A工作液:实验前计算所需量(100 μ l/孔)。在准备工作中,应该准备比计算量多100–200 μ l。使用前将原液管稍许离心,用检测稀释液A将100 $\times$ 浓缩检测试剂A稀释至1 $\times$ 工作液溶液A(如:10 μ l检测试剂A+990 μ l检测试剂A稀释液)。

[0138] e.检测试剂B工作液:实验前计算所需量(100 μ l/孔)。在准备工作中,应该准备比计算量多100–200 μ l。使用前将原液管稍许离心,用检测稀释液B将100 $\times$ 浓缩检测试剂B稀释至1 $\times$ 工作液溶液B(如:10 μ l检测试剂B+990 μ l检测试剂B稀释液)。

[0139] 2.实验方法

[0140] (1)分别设置标准品孔,样本孔,空白孔。依次加入6个不同浓度的标准品(含零孔, 50 μ l/孔),其他孔加入50 μ l待测样本(从接受室取样口收集的样本),然后立即加入检测试剂A工作液, 50 μ l/孔,轻轻晃动混匀,盖上试剂盒提供的封板膜, 37 $^{\circ}$ C孵育60分钟。

[0141] (2)弃去所有孔中的液体,每孔加入350 μ l洗涤缓冲液,浸泡60秒再倒出每孔中液体并在干净的吸水纸上拍干。重复这个洗涤步骤,共3遍。

[0142] (3)每孔加入100 μ l的检测试剂B工作液,盖上封板膜, 37 $^{\circ}$ C孵育

[0143] 30分钟。

[0144] (4)弃去每孔中的液体,重复步骤2的洗涤过程5遍。

[0145] (5)每孔加入90 μ l的TMB试剂,盖上新的封板膜, 37 $^{\circ}$ C避光孵育

[0146] 10–20分钟。

[0147] (6)每孔加入50 μ l的终止液,顺序与加入显色液的顺序一致,轻轻晃动混匀。

[0148] (7)确保酶标板孔底无气泡水雾,并立即在450nm测量每孔的吸光

[0149] 度OD值,记录酶标仪读数。

[0150] 四、检测数据和结论

[0151] (1)BSA标准品按照四参数拟合的标准曲线如图1所示。

[0152] 标准曲线绘制:

[0153] 对检测的标准蛋白OD值数据进行处理:

[0154] 数据采用四参数拟合得到标准曲线,四参数拟合公式为:

$$y = bottom + \frac{top - bottom}{1 + \left(\frac{IC50}{x}\right)^{Hillslope}}$$

[0155] 具体标准曲线见图1。

[0156] (2)样品检测结果

[0157] 表12根据标准曲线换算的不同供测样品不同时间段透过皮肤的BSA的浓度。

表 12			
Time (h)	实施例 1 制备 BSA 乳剂 (ng/ml)	对比例 1 制备 BSA 乳剂 (ng/ml)	PBS 溶解 BSA (ng/ml)
0	0	0	0
1.5	105.8	95.2	68.0
3	151.8	147.1	108.7
6	148.6	129.1	110.0
12	125.8	142.7	125.4
24	239.6	134.1	114.7

[0158] 根据结果，进行透皮计算：

[0159] (1)实施例1制备的BSA乳剂蛋白测试液，经过24小时后，接受室中浓度为239.6ng/ml，其体积为15ml，而供给室中BSA浓度为1mg/ml，供给室中加入的体积为150ul，由此计算出实施例1制备BSA乳剂的透皮效率为2.40%。

[0160] (2)对比例2制备BSA乳剂蛋白测试液，经过24小时后，接受室中浓度为147.1ng/ml，其体积为15ml，而供给池中BSA浓度为0.62mg/ml，供给室中加入的体积为150ul，由此计算出实施例5制备BSA乳剂的透皮效率为2.37%。

[0161] (3)PBS溶解的BSA蛋白测试液，经过24小时后，接受室中125.4ng/ml，其体积为15ml，而供给室中BSA浓度为1mg/ml，供给室加入体积为150ul，由此计算出PBS的透皮效率为1.25%。

[0162] 可见，实施例1以及对比例2，相对对照，透皮效果都非常好，而实施例1的透皮效果比对比例2的更好。

[0163] 实施例5

[0164] 实施例1和对比例1中制得浓度均为10μg/ml肉毒蛋白A微乳在小鼠体内的药效验证实验。

[0165] 为了对比实施例1和对比例1对大分子活性物质的透皮效率的差异，我们使用17-19g SPF级CD-1(ICR)品种的小鼠,使用三溴乙醇麻醉后，右后腿部位皮肤剃毛，每次涂抹前使用医用棉签蘸10%酒精对涂抹部位进行清洗，晾干后再涂药，每天在小鼠右后腿部位皮肤上涂抹200μl肉毒蛋白A微乳，每天涂抹一次，连续使用7天。小鼠的左后腿不使用肉毒蛋白A涂抹。

- [0166] 实验结果发现：小鼠在涂抹肉毒蛋白A 2-3天后，右后腿的脚趾会出现并拢的表型(2-5趾并拢)，实施例1和对比例1实验结果如表13所示，实施例1配方中制得的乳剂在D2就出现了并趾情况：33%的实验小鼠并两趾，33%的实验小鼠并五趾；D3并趾情况：33%的实验小鼠并两趾，33%的实验小鼠并五趾；D4并趾情况：66%的实验小鼠并三趾，33%的实验小鼠并五趾；D5并趾情况：100%的实验小鼠并五趾。
- [0167] 对比例1配方中制得的乳剂在D2无并趾情况；D3并趾情况：33%的实验小鼠并两趾；D4并趾情况：66%的实验小鼠并二趾，33%的实验小鼠并三趾；D5并趾情况：33%的实验小鼠并三趾，66%的实验小鼠并四趾。

表 13 实施例 1 和对比例 1 中制得浓度均为 10 μg/ml 肉毒蛋白 A 微乳在小鼠体内的药效实验结果			
	组成	实施例 1 实验组	对比例 1 实验组
1	D0 并趾情况	100%无并趾	100%无并趾
2	D1 并趾情况	100%无并趾	100%无并趾
3	D2 并趾情况	33%并两趾，33%并五趾	100%无并趾
4	D3 并趾情况	33%并两趾，33%并五趾	33%并两趾
5	D4 并趾情况	66%并三趾，33%并五趾	66%并两趾，33%并三趾
6	D5 并趾情况	100%并五趾	33%并三趾，66%并四趾

- [0168] 表13中结果显示：实施例1中制得肉毒蛋白A微乳在小鼠体内的药效实验结果要明显优于对比例1，实施例1的微乳不仅起效得早，而且药效要比实施例1的微乳好。实施例1和对比例1脚趾并拢的表型如图2所示。
- [0169] 据文献报道，小鼠腓肠肌注射肉毒蛋白A后脚趾会出现并拢的表型。
- [0170] 可见，我们通过开发的乳液运输系统将肉毒蛋白A制成微乳，涂抹在小鼠皮肤上，也达到了注射肉毒蛋白A后的并趾表型，在小鼠体内证明了我们开发出的乳液系统，效果也更好。
- [0171] 实施例7
- [0172] 实施例3中制得抗皱紧致化妆品微乳在人体内的功效检测。

- [0173] 1、正常情况下，通过成年受试者按照说明连续使用产品28天，评估该产品是否具有保湿、修护、紧致、抗皱以及产品是否适用敏感皮肤、温和无刺激。
- [0174] 2、受试者：完成评估有效受试者共31人，敏感皮肤(SGS(通标标准技术服务有限公司)内部敏感肌问卷筛选)的中国健康女性，年龄31至60岁，平均年龄 52.65 ± 6.08 岁，符合受试者志愿入选和排除标准。评估区域为面部。
- [0175] 受试者入选及排除标准：
- [0176] 本次评估受试者筛选自SGS的CPCH功效实验室受试者信息数据库，选择符合如下入选和不符合如下排除标准的健康受试者
- [0177] (1)入选标准
- [0178] 健康女性，年龄：28–60岁；
- [0179] 种族：亚洲人(中国)；
- [0180] 受试者面部为敏感肌(通过SGS内部敏感肌问卷筛选)；
- [0181] 受试者自认为面部有(非持续性)发痒或刺痛感等不适症状4–7分(0–9分级，自评问卷)；
- [0182] 受试者自认为面部皮肤暗沉、松弛、缺乏弹性；
- [0183] 前额皱纹视觉评分3–6级，(根据SGS内部图谱)；
- [0184] 随机一侧外眼角皱纹视觉评分3–6级，(根据SGS内部图谱)；
- [0185] 一侧鼻唇沟皱纹(法令纹)视觉评分3–6级，(根据SGS内部图谱)；
- [0186] 一侧脸颊区域的经表皮失水率(TEWL) $>15\text{g/h/m}^2$ ；
- [0187] 一侧脸颊区域的角质层水分含量测量值 $<60\text{a.u.}$ ；
- [0188] 面部皮肤无明显皮损、伤疤、毛发等情况；
- [0189] 能很好按方案的要求配合评估项目，在研究期间能保持生活的规律性。
- [0190] (2)排除标准
- [0191] 凡具有下列任一条件的必须排除进入本项研究：
- [0192] 不同意签署知情同意书者；
- [0193] 不愿遵守方案要求者；
- [0194] 同时参加任何其他的临床研究者；
- [0195] 评估当天使用化妆品或/和药品；

- [0196] 自述处于怀孕期，哺乳期；
- [0197] 在研究期间正接受药物治疗；
- [0198] 患有传染性皮肤病或特应性皮炎的受试者；
- [0199] 评估部位有痣，毛细血管扩张等皮肤异常现象者；
- [0200] 在参加评估前3个月内接受过皮肤脱皮或皮肤治疗的受试者；
- [0201] 在参加评估前3个月内接受过免疫抑制剂治疗的受试者；
- [0202] 在参加评估前1个月内接受过全身性类固醇治疗或光疗的受试者；
- [0203] 在参加评估前2周内在涉及部位使用外用药物或/和特殊功效类(宣称保湿、修护、紧致、抗皱的)化妆品；
- [0204] 在评估区域有病变、明显痕迹或者其他异常，因此难以测量；
- [0205] 对化妆品，药物或一般光线照射有严重反应或过敏的受试者；
- [0206] 除上述事项外，根据项目负责人的判断认为不适合进行评估时。
- [0207] 3、使用方法：洁肤后，彻底清除油脂，保持肌肤干燥。取适量精华(微乳)滴管滴两滴，点涂至于肌肤眼角、额头、法令纹处、下额等有皱纹部位，按摩直至精华(微乳)吸收。每周7天建议每天使用。推荐4周为1个使用周期(非使用期间，请将产品放置于冰箱2~8℃恒温保存)。
- [0208] 4、评估周期：使用产品前(D0)，使用产品14天后(D14)，使用产品28天后(D28)。
- [0209] 5、评估参数：
- [0210] (1)图像采集
- [0211] Primos CR用于面部图像采集皮肤皱纹及照片分析。分析值变小，说明皮肤皱纹有改善。
- [0212] (2)皮肤弹性
- [0213] 皮肤弹性测定仪 **Cutometer**®MPA580用于检测皮肤弹性。R2、R5、R7测量值变大，说明皮肤弹性有改善。
- [0214] (3)皮肤紧致
- [0215] 皮肤弹性测定仪 **Cutometer**®MPA580用于检测皮肤紧致。F4测量值变小，说明皮肤紧致度有改善。

- [0216] (4)皮肤角质层水分含量
- [0217] 皮肤水分含量测定仪**Corneometer**[®] CM825用于检测皮肤角质层水分含量。测量值变大，说明皮肤角质层水分含量增加。
- [0218] (5)皮肤经皮水分流失率
- [0219] 皮肤水分流失测定仪**Tewameter**[®] TM Hex用于检测皮肤经皮水分流失率。测量值变小，说明皮肤屏障有改善。
- [0220] (6)TC值
- [0221] TC值是非创伤检测中二级参数，表示单位面积内含水量在单位时间内的经表皮失水量，分析值变小说明皮肤屏障功能有改善。
- [0222] (7)皮肤水分分布图
- [0223] 皮肤水分分布测定仪**MoistureMap** MM 200是基于电容法成像，观察水化分布和纹理特性的独特仪器。MGL代表皮肤水分分布平均灰度值均值，数值越小代表水分越高。
- [0224] (8)皮肤光泽度
- [0225] 皮肤光泽度测定仪**Glossymeter**[®] GL200用于检测皮肤光泽度。测量值变大，说明皮肤光泽度增加。
- [0226] (9)受试者自我评估
- [0227] 受试者根据自身使用情况进行自我评估。
- [0228] 6、评估方案设计：
- [0229] (1)使用产品前(D0)：
- [0230] 受试者到达SGS后使用洁面产品清洁面部，并用无屑干面巾纸擦干皮肤，在温度 $21 \pm 1^{\circ}\text{C}$ ， $50 \pm 10\% \text{RH}$ 的实验室中静坐30min，由皮肤科医生进行视觉评估，符合纳入标准的进入下一步评估；
- [0231] 由实验室技术员测量面部皮肤角质层水分含量(**Corneometer**)和经皮水分流失率(**Tewameter**)，符合纳入标准的进入下一步评估；
- [0232] 由实验室技术员对合格受试者进行采集**Primos CR**图像，**Moisture Map MM200**，**Cutometer**，**Glossymeter**测量值。
- [0233] (2)受试者填写问卷

- [0234] 实验室技术员向受试者讲解产品使用方法，分发产品，受试者在实验室技术员的监督下现场试用样品，若有不良反应需及时填写使用日志
- [0235] (3)使用产品14天后(D14)
- [0236] 受试者到达SGS后使用洁面产品清洁面部，并用无屑干面巾纸擦干皮肤，在温度 $21 \pm 1^{\circ}\text{C}$ ， $50 \pm 5\% \text{RH}$ 的实验室中静坐30min，由实验室技术员采集受试者面部Primos CR图像，和面部皮肤仪器Cutometer,Moisture Map MM200，Tewameter，Corneometer，Glossymeter测量值；
- [0237] 实验室技术员对产品进行称重并检查产品使用日志
- [0238] 受试者离开SGS。
- [0239] (4)使用产品28天后(D28)
- [0240] 受试者到达SGS后使用洁面产品清洁面部，并用无屑干面巾纸擦干皮肤，在温度 $21 \pm 1^{\circ}\text{C}$ ， $50 \pm 5\% \text{RH}$ 的实验室中静坐30min，由实验室技术员采集受试者面部Primos CR图像，和面部皮肤仪器Cutometer,Moisture Map MM200，Tewameter，Corneometer，Glossymeter测量值；
- [0241] 受试者填写使用问卷；
- [0242] 实验室技术员对产品进行称重、回收，并检查、回收产品使用日志；
- [0243] 受试者离开SGS。
- [0244] (5)数据统计：数据使用SPSS28.0进行统计，对评估数据进行正态分布检验，若评估数据为正态分布，则采用T检验方法进行统计分析；若评估数据为非正态分布，则采用秩和检验方法进行统计分析。等级资料采用秩和检验进行统计分析。统计方法显著性水平 $P < 0.05$ 。
- [0245] 通过31名敏感皮肤的中国健康女性受试者连续使用产品28天，评估结果表明该评估条件下，产品在14天已经具有保湿、修护、紧致、抗皱的功效以及适用敏感皮肤、温和无刺激。具体结果如下
- [0246] (1)仪器评估结果(表14)

表 14 实施例 3 中制得的微乳在人体内的功效检测结果					
评估参数 (评估仪器) (评估部位)	时间 点	变化率	与使用样品 前相比显著 性结果	改善人数 (改善人数 占比)	参数说明
皮肤皱纹平均 深度 (Primos CR) (前额)	D14	-10.25%	有显著性差 异	19 (61%)	分析值变小, 说明皮肤皱纹 有改善
	D28	-13.83%	有显著性差 异	23 (74%)	
皮肤皱纹数量 (Primos CR) (前额)	D14	-11.96%	有显著性差 异	10 (32%)	分析值变小, 说明皮肤皱纹 有改善
	D28	-19.57%	有显著性差 异	15 (48%)	
皮肤皱纹体积 (Primos CR)	D14	-18.47%	有显著性差 异	26 (84%)	分析值变小, 说明皮肤皱纹

表 14 实施例 3 中制得的微乳在人体内的功效检测结果					
评估参数 (评估仪器) (评估部位)	时间 点	变化率	与使用样品 前相比显著 性结果	改善人数 (改善人数 占比)	参数说明
(前额)	D28	-36.34%	有显著性差 异	31 (100%)	有改善
皮肤皱纹面积 (Primos CR) (前额)	D14	-9.47%	有显著性差 异	22 (71%)	分析值变小, 说明皮肤皱纹 有改善
	D28	-24.57%	有显著性差 异	29 (94%)	
皮肤皱纹长度 (Primos CR) (前额)	D14	-12.39%	有显著性差 异	19 (61%)	分析值变小, 说明皮肤皱纹 有改善
	D28	-23.41%	有显著性差 异	29 (94%)	
皮肤皱纹平均 深度 (Primos CR) (外眼角)	D14	-8.46%	有显著性差 异	23 (74%)	分析值变小, 说明皮肤皱纹 有改善
	D28	-10.87%	有显著性差 异	22 (71%)	
皮肤皱纹数量 (Primos CR) (外眼角)	D14	-10.87%	有显著性差 异	9 (29%)	分析值变小, 说明皮肤皱纹 有改善
	D28	-21.74%	有显著性差 异	16 (52%)	
皮肤皱纹体积 (Primos CR) (外眼角)	D14	-15.23%	有显著性差 异	25 (81%)	分析值变小, 说明皮肤皱纹 有改善
	D28	-26.16%	有显著性差 异	31 (100%)	
皮肤皱纹面积 (Primos CR) (外眼角)	D14	-5.43%	无显著性差 异	23 (74%)	分析值变小, 说明皮肤皱纹 有改善
	D28	-19.02%	有显著性差 异	30 (97%)	
皮肤皱纹长度 (Primos CR) (外眼角)	D14	-4.50%	无显著性差 异	21 (68%)	分析值变小, 说明皮肤皱纹 有改善
	D28	-23.60%	有显著性差 异	27 (87%)	
皮肤皱纹平均 深度 (Primos CR) (鼻唇沟)	D14	-4.59%	有显著性差 异	24 (77%)	分析值变小, 说明皮肤皱纹 有改善
	D28	-9.25%	有显著性差 异	25 (81%)	
皮肤皱纹体积 (Primos CR) (鼻唇沟)	D14	-5.46%	无显著性差 异	18 (58%)	分析值变小, 说明皮肤皱纹 有改善
	D28	-18.51%	有显著性差 异	28 (90%)	
皮肤皱纹面积 (Primos CR) (鼻唇沟)	D14	-1.41%	无显著性差 异	17 (55%)	分析值变小, 说明皮肤皱纹 有改善
	D28	-13.45%	有显著性差 异	26 (84%)	
皮肤皱纹长度	D14	-1.57%	无显著性差	15 (48%)	分析值变小,

表 14 实施例 3 中制得的微乳在人体内的功效检测结果					
评估参数 (评估仪器) (评估部位)	时间 点	变化率	与使用样品 前相比显著 性结果	改善人数 (改善人数 占比)	参数说明
(Primos CR) (鼻唇沟)			异		说明皮肤皱纹 有改善
	D28	-12.30%	有显著性差 异	22 (71%)	
皮肤弹性 R2 值 (Cutometer® dual MPA580) (脸颊)	D14	6.55%	有显著性差 异	26 (84%)	测量值变大, 说明皮肤弹性 有改善
	D28	13.71%	有显著性差 异	31 (100%)	
皮肤弹性 R5 值 (Cutometer® dual MPA580) (脸颊)	D14	12.84%	有显著性差 异	26 (84%)	测量值变大, 说明皮肤弹性 有改善
	D28	18.40%	有显著性差 异	29 (94%)	
皮肤弹性 R7 值 (Cutometer® dual MPA580) (脸颊)	D14	16.24%	有显著性差 异	29 (94%)	测量值变大, 说明皮肤弹性 有改善
	D28	22.92%	有显著性差 异	29 (94%)	
皮肤紧致 F4 值 (Cutometer® dual MPA580) (脸颊)	D14	-17.42%	有显著性差 异	31 (100%)	测量值变小, 说明皮肤紧致 度有改善
	D28	-29.53%	有显著性差 异	31 (100%)	
皮肤经皮水分 流失率 (Tewameter® TM Hex) (脸 颊)	D14	-5.62%	有显著性差 异	30 (97%)	测量值变小, 说明皮肤屏障 有改善
	D28	-15.53%	有显著性差 异	31 (100%)	
皮肤角质层水 分含量 (Corneometer® CM825) (脸 颊)	D14	20.76%	有显著性差 异	31 (100%)	测量值变大, 说明皮肤角质 层水分含量增 加
	D28	47.99%	有显著性差 异	31 (100%)	
TC 值	D14	-23.09%	有显著性差 异	31 (100%)	测量值变小, 说明皮肤屏障 有改善
	D28	-43.83%	有显著性差 异	31 (100%)	
平均灰度值均 值 MGL (MoistureMap MM 200) (脸 颊)	D14	-9.11%	有显著性差 异	29 (94%)	MGL 代表皮肤 水分分布平均 灰度值均值, 数值越小代表 水分越高
	D28	-21.24%	有显著性差 异	31 (100%)	
皮肤光泽度 (Glossmeter® GL200) (脸 颊)	D14	4.80%	有显著性差 异	31 (100%)	测量值变大, 说明皮肤光泽 度有改善
	D28	9.00%	有显著性差 异	31 (100%)	

[0247] (2)受试者自我评估(满意度)

[0248] 使用产品14天后，94%的受试者认为深层补水，94%的受试者认为肌肤水润饱满，94%的受试者认为保湿效果好，90%的受试者认为肌肤更紧致，87%的受试者认为肌肤变得有弹性，87%的受试者认为皱纹得到改善，87%的受试者认为细纹得到改善，87%的受试者认为改善肌肤整体状态，90%的受试者认为产品适合敏感肌使用，100%的受试者认为产品温和无刺激；

[0249] 使用产品28天后，100%的受试者认为深层补水，100%的受试者认为肌肤水润饱满，100%的受试者认为保湿效果好，100%的受试者认为肌肤更紧致，97%的受试者认为肌肤变得有弹性，94%的受试者认为皱纹得到改善，97%的受试者认为细纹得到改善，90%的受试者认为改善肌肤整体状态，100%的受试者认为产品适合敏感肌使用，100%的受试者认为产品温和无刺激，100%的受试者对产品整体效果/功效满意，100%的受试者愿意继续使用产品。

[0250] 评估结论：

[0251] 通过31名敏感皮肤的中国健康女性受试者连续使用产品28天，评估结果表明该评估条件下，实施例3的乳液制剂具有保湿、修护、紧致、抗皱的功效以及适用敏感皮肤、温和无刺激。

[0252] 综上可见：

[0253] 通过对BSA的透皮效率实验证实，本发明提供的大分子透皮微乳系统，能够有效实现对大分子物质的透皮；

[0254] 而进一步地，通过动物使用肉毒蛋白的实验证实本发明提供的大分子透皮微乳系统对于大分子物质具有非常好的透皮效果；

[0255] 再通过人体皮肤使用含有大分子活性成分的实验，也证明了本发明提供的大分子透皮微乳系统，对于大分子物质具有非常好的透皮效果。

[0256] 需要说明地是，上述实施例只是举例具体说明，本发明的保护，不限于实施例的具体范围。

权利要求书

- [权利要求 1] 一种大分子透皮微乳系统，其特征在于：
含有有效量的能起到预定作用的大分子活性物质；
其中，
按占比所述透皮微乳系统总重的质量百分比计，所述大分子透皮微乳系统的组成为：
油相占比为：7-36%；
水相占比为：57%-88%；
乳剂占比为：8%-20%。
- [权利要求 2] 根据权利要求1所述的大分子透皮微乳系统，其特征在于：
其中，所述油相占比为20%-30%、水相占比为60%-70%、所述乳剂占比为8%-12%；和/或
按质量比，所述透皮微乳系统的组成为：
油相：水相：乳化剂为：2-2.5:6-7:1。
- [权利要求 3] 根据权利要求1或2所述的大分子透皮微乳系统，其特征在于：
其中，所述大分子活性物质小于等于300kDa或小于等于150kD，
和/或
按占比所述透皮微乳系统总重的质量百分比计，所述透皮微乳系统中，所述大分子活性物质的有效量为：
所述大分子活性物质的占比小于等于10%，或小于等于5%，
或小于等于2%，或小于等于1%，
优选地，所述大分子活性物质为能提供治疗、美容以及护肤的生物分子；
另一优选地，所述大分子活性物质为水溶性。
- [权利要求 4] 根据权利要求1-3任意一项所述的大分子透皮微乳系统，其特征在于：

其中，含有的所述大分子活性物质至少选自梭菌神经毒素、BSA、可溶性胶原蛋白以及弹性蛋白中的任意一种或多种，和/或由系统含有的酵母提取物提供，

优选地，所述梭菌神经毒素为A、B、C、D、E、F或G型肉毒毒素，和/或所述梭菌神经毒素的轻链含有与SEQ ID NO:1-7中任意一个具有至少35%、50%、60%、70%、75%、80%、85%、90%、99%或100%一致性的氨基酸序列；和/或所述梭菌神经毒素的重链含有与SEQ ID NO:8-14中任意一具有至少35%、50%、60%、70%、75%、80%、85%、90%、99%或100%的一致性氨基酸序列。

[权利要求 5]

根据权利要求4所述的大分子透皮微乳系统，其特征在于：

其中，按占比所述透皮微乳系统总重的质量百分比计，所述系统中：

所述梭菌神经毒素的所述有效量为占比小于等于0.02%，优选为0.0001%–0.015%，更优选为0.0005%–0.015%或0.0008–0.0015%；

可溶性胶原蛋白、BSA以及所述弹性蛋白的有效量均为占比小于等于5%，或小于等于2%，或小于等于1%；

酵母提取物的占比为1–10%。

[权利要求 6]

根据权利要求1–5任意一项所述的大分子透皮微乳系统，其特征在于：

按占比所述透皮微乳系统总重的质量百分比计，所述系统的组成包括：

5%–20%或10–20%或13–18%的甘油；5%–20%或5–15%或8–12%的乳化剂、1%–10%或3–8%的丁二醇或丙二醇、0.5–5%或1–3%的月桂氮卓酮、0.3%–3%或1–2%的羧甲基脱乙酰壳多糖或壳聚糖衍生物、55–80%或60–70%的水，以及所述有效量的所述大分子活性物质。

- [权利要求 7] 根据权利要求6所述的大分子透皮微乳系统，其特征在于：
其中，所述乳化剂选自聚山梨酯80、聚山梨酯60、聚山梨酯20以及山梨坦油酸酯中的任意一种或多种。
- [权利要求 8] 根据权利要求1-7中任意一项所述的大分子透皮微乳系统，其特征在于：
还含有防腐剂，
优选地，按占比所述透皮微乳系统总重的质量百分比计：含有质量百分比为0.1-1%的防腐剂，
再进一步地，所述防腐剂选自苯氧乙醇、羟苯甲酯、羟苯乙酯、羟苯丙酯、苯甲醇以及山梨酸中的任意一种或多种。
- [权利要求 9] 根据权利要求1-8任意一项所述的大分子透皮微乳系统，其特征在于：
其中，所述透皮微乳系统的颗粒的粒径大小平均为10-15nm。
- [权利要求 10] 权利要求1-9中任意一种大分子透皮微乳系统在实现治疗、美容以及护肤效果中的应用。
- [权利要求 11] 根据权利要求10所述的应用，其特征在于：使用时，通过涂抹、透皮仪器、贴附以及喷雾中的任意一种或多种方式进行透皮使用。
- [权利要求 12] 权利要求1-9中任意一种大分子透皮微乳系统在制备实现治疗、美容以及护肤效果中的药物或产品中的应用。