(19)日本国特許庁(JP)　(12)公表特許公報(A)　(11)特許出願公表番号
特表2005-501805
(P2005-501805A)
(43)公表日　平成17年1月20日(2005.1.20)

(51)Int.Cl.[7]	FI			テーマコード（参考）
C07K 14/195	C07K	14/195		4B064
A61K 7/00	A61K	7/00	J	4C076
A61K 7/075	A61K	7/00	K	4C083
A61K 7/11	A61K	7/00	M	4C084
A61K 7/155	A61K	7/00	N	4H045

審査請求 未請求　予備審査請求 有　（全 30 頁）　最終頁に続く

(21)出願番号　特願2002-566372(P2002-566372)
(86)(22)出願日　平成14年2月7日(2002.2.7)
(85)翻訳文提出日　平成15年8月20日(2003.8.20)
(86)国際出願番号　PCT/FR2002/000488
(87)国際公開番号　WO2002/066668
(87)国際公開日　平成14年8月29日(2002.8.29)
(31)優先権主張番号　01/02442
(32)優先日　平成13年2月21日(2001.2.21)
(33)優先権主張国　フランス(FR)

(71)出願人　501104591
セデルマ
ＳＥＤＥＲＭＡ
フランス共和国，エフ－７８６１０　ルペレー　アン　イヴリンヌ，ボワット　ポスタル　３３，リュ　デュ　シュマン　ヴェール，２９
(74)代理人　100075247
弁理士　最上　正太郎
(72)発明者　リンッネル　カール
フランス共和国７５０１６　パリ、リュ　デ　ラソンプシォン、６９

Ｆターム(参考)　4B064 AG01 CA02 CC06 CC15 CD21 DA01

最終頁に続く

(54)【発明の名称】Ｔｈｅｒｍｕｓ科の微生物の発酵によるタンパク質の生成のためのプロセス、このようにして得られたタンパク質の混合物、およびそれらを含有する美容用組成物

(57)【要約】
本発明は、Ｔｈｅｒｍｕｓ科由来の微生物、詳細には、大深度の熱水源に隣接する海水において収集された微生物のための発酵培地、特にＧＹ１２１１株を用いて得られた発酵培地の用途に関する。本発明はまた、特定の美容用組成物に関する。この美容用組成物は、前記微生物のための１つ以上のタイプの発酵培地を含み、詳細には、皮膚のケア、とりわけ顔面、身体、頭皮、および毛髪のケアのために、そして皮膚のセラミド濃度を調節するために、免疫系を刺激するために、詳細には酸素過酸化物に関する、シャペロン効果による防御、ならびに解毒効果および抗フリーラジカル効果を提供するために、用いられる。

【特許請求の範囲】
【請求項１】
微生物の発酵によるタンパク質の生成、その後の該生成したタンパク質の抽出のためのプロセスであって、該微生物が、Ｔｈｅｒｍｕｓ科の微生物である、プロセス。
【請求項２】
請求項１に記載のタンパク質の生成のためのプロセスであって、前記微生物が、大深度の熱水源に隣接して位置する海水由来である、プロセス。
【請求項３】
請求項１または２のいずれか１項に記載のタンパク質の生成のためのプロセスであって、前記微生物が、パリのパスツール研究所の国立微生物培養コレクションに受付番号１－２７１５として寄託された、ＧＹ１２１１株の微生物である、プロセス。
【請求項４】
請求項１～３のいずれか１項に記載のタンパク質の生成のためのプロセスであって、前記発酵が、約７．２のｐＨを有し、かつ約０．２５％から１％の濃度の酵母抽出物、塩化アンモニウム、１％を超えない濃度の塩化ナトリウム、および微量元素を含む栄養培地中で実行される、プロセス。
【請求項５】
請求項１～４のいずれか１項に記載のタンパク質の生成のためのプロセスであって、前記発酵が、撹拌を伴い、約７２℃から７５℃の間で生じる、プロセス。
【請求項６】
請求項１～５のいずれか１項に記載のタンパク質の生成のためのプロセスであって、前記発酵が、前記タンパク質の抽出を可能にする界面活性剤処理を伴う、プロセス。
【請求項７】
請求項１～６のいずれか１項に記載のタンパク質の生成のためのプロセスであって、前記発酵が、０．２μｍでの濾過の工程、および／または限外濾過の工程を伴う、プロセス。
【請求項８】
請求項１～７のいずれか１項に記載のプロセスによって得られるタンパク質の混合物であって、該タンパク質は、１００℃まで熱安定性である、タンパク質の混合物。
【請求項９】
メナキノンを含む、請求項８に記載のタンパク質の混合物。
【請求項１０】
請求項８に記載のタンパク質の混合物であって、該混合物は、酵素的、ペルオキシダーゼ的、カタラーゼ様、抗ラジカル的、グリコシル化の抑制的な活性、およびコラーゲンの合成の調節の活性を有する、タンパク質の混合物。
【請求項１１】
請求項８～１０のうちの１項に記載のタンパク質の混合物を含む美容用組成物または皮膚用医薬品組成物。
【請求項１２】
請求項１１に記載の美容用組成物または皮膚用医薬品組成物であって、前記発酵させた培地が、濃縮されるか、凍結乾燥されるか、または噴霧された培地については、一般に０．００１乾燥重量％（ｐ／ｐ）から２乾燥重量％（ｐ／ｐ）の間で、そして液体形態で発酵した培地については、一般に０．１％（ｐ／ｐ）から１０．０％（ｐ／ｐ）の間で、用いられる、美容用組成物または皮膚用医薬品組成物。
【請求項１３】
請求項１０～１２のうちの１項に記載の美容用組成物または皮膚用医薬品組成物であって、美容術または皮膚薬学において使用される、Ｏ／Ｗエマルジョン、およびＷ／Ｏエマルジョン、ミルク、ポマード、キャピラリーローション、シャンプー、石鹸、スティックおよびペンシル、スプレー、ボディーオイルの任意の生薬形態、
で存在する、美容用組成物または皮膚用医薬品組成物。
【請求項１４】

請求項１０～１３のうちの１項に記載の美容用組成物または皮膚用医薬品組成物であって、前記混合物が、リポソーム、カイロミクロン、マクロ粒子、ミクロ粒子およびナノ粒子、ならびに、マクロカプセル、ミクロカプセルおよびナノカプセルとして美容用ベクター中に組み込まれるか、または粉末化有機ポリマー、タルク、ベントナイト、もしくは他の鉱物支持体上に吸収される、美容用組成物または皮膚用医薬品組成物。

【請求項１５】

請求項１０～１４のうちの１項に記載の美容用組成物または皮膚用医薬品組成物であって、前記混合物が、化粧品中で従来用いられる、以下の任意の他の成分：

抽出された脂質、および／または合成された脂質、ゲル化ポリマー、および増粘剤、界面活性物質、および乳化剤、水溶性有効成分または脂溶性有効成分、他の植物の抽出物、組織抽出物、他の海洋抽出物、

とともに用いられる、美容用組成物または皮膚用医薬品組成物。

【請求項１６】

請求項１０～１５のいずれか１項に記載の美容用組成物または皮膚用医薬品組成物であって、クリーム、バーム、またはゲル、ローションまたは日焼け止めクリームまたは日焼け後クリーム、髭剃り後製品、脱毛クリームまたは脱毛後クリームの形態である、美容用組成物または皮膚用医薬品組成物。

【請求項１７】

請求項１０～１６に記載の美容用組成物または皮膚用医薬品組成物であって、皮膚のケアのために、詳細には、フリーラジカルの有害な影響に対して、および天然のＵＶまたは人工的ＵＶに対する暴露の間の皮膚の老化、生理学的老化、または早期老化に対するフリーラジカルの全ての結果に対して保護するために、ならびに皮膚、詳細には顔面、身体、頭皮、および毛髪のケアのために、皮膚のセラミド濃度を調節するために、免疫系を刺激するために、シャペロンの影響による防御的効果を得るために、そして異なる高反応性フリーラジカル、特にオゾンについての解毒物として、適合された、美容用組成物または皮膚用医薬品組成物。

【請求項１８】

請求項８～１０に記載の混合物、または請求項１１～１７に記載の美容用組成物または皮膚用医薬品組成物の使用であって、皮膚のケアのために適合された医薬の調製のため、詳細には、フリーラジカルの有害な影響に対して、および天然のＵＶに対する曝露の間の皮膚の老化、生理学的老化、または早期老化に対するフリーラジカルの全ての結果に対して保護するため、さもなければ皮膚、詳細には顔面、身体、頭皮、および毛髪のケアのための、使用。

【請求項１９】

寝間着または昼間用の衣類または下着類を作製するために用いられるように適合された織物、合成ファイバー、または天然のファイバー、ウール、および任意の材料中に、マクロ粒子、ミクロ粒子およびナノ粒子、または、マクロカプセル、ミクロカプセルおよびナノカプセルの形態で、結合されるか、または組み込まれるか、または吸収されるか、または吸着されて、直接皮膚または毛髪と接触して、連続的な局所適用が可能になる、請求項８～１０に記載の混合物、または請求項１１～１７に記載の美容用組成物または皮膚用医薬品組成物の、使用。

【発明の詳細な説明】

【技術分野】

【０００１】

皮膚は、他人の視線に対して各自が与える最初のイメージであり、そして常にその外見は関心のもたれている課題である。

【０００２】

生存期間中に、太陽ならびに種々の汚染物質に対する職業上の曝露（露光）および私的な曝露の両方によって、化学的および物理的な攻撃が生じ、これが異なる形態の酸素ラジカルの因子のリストの中の生成物をもたらす。これらの後者が、詳細には皮膚のレベルで、

不可逆な損傷を生じ、その結果は少なくとも紅斑、日射病、皮膚の早期老化、そしてひどければ皮膚癌である。

【０００３】

挫創の兆候の悪化、皮膚の柔軟性の消失、皮膚の乾燥、およびシワの出現は、老化の最初の肉眼的兆候に相当する。したがって、太陽に対する最初の曝露（露光）の際に出現する、皮膚細胞のレベルでの分子の変異（侵襲的かつ最先端の方法によってのみ計測され得る）は、なお一層悪性である。なぜなら、それらの変異は一般の人々には検出不能であるからである。

【０００４】

太陽が、酸素のフリーラジカルの生成の唯一の原因ではない。多数の重要な生化学的反応（例えば、アミノ酸の酸化または脂肪酸の酸化、プロスタグランジンの合成…）が、これらの高反応型の酸素を全く天然に生じ、この酸素は、全身の組織にとって、および特定の皮膚にとって極めて有毒である。

【０００５】

ヒトは、進化の過程で発達した以下のような生理学的調節によって、酸素ラジカルの有害な影響に対して天然に保護されている：春に開始する進行性の日焼け（紅斑に至らない皮膚への影響に対する）、スーパーオキシドジスムターゼおよびカタラーゼのような抗ラジカル酵素の存在、炎症反応および／または免疫反応の低下、表皮の肥厚、等々。

【背景技術】

【０００６】

これらの問題を解決するために、美容産業界は、太陽光フィルター、ＳＯＤ（スーパーオキシドディスムターゼ）のような皮膚に存在する天然の酵素を含む組成物、野菜抽出物などのいずれかを含有するあらゆる種類の製品を市場に出している。

【０００７】

別の天然の酵素であるカタラーゼは、美容用組成物および皮膚用医薬品組成物には用いられ得ない。なぜなら、カタラーゼは、１９９３年６月１４日の欧州指令（Ｅｕｒｏｐｅａｎ　Ｄｉｒｅｃｔｉｖｅ）９３／３５の付属文書ＩＩ（１）の美容用製品の組成物中に入れることができない物質のリストにみられる（７４番として）からである。

【発明の開示】

【発明が解決しようとする課題】

【０００８】

従って、美容産業界および皮膚用医薬品産業界においては、この化学的汚染物の有害な影響に対して皮膚が、よりよく抵抗し、なおかつ補充し、そして修復することを補助する製品を供給することが論理的である。

【課題を解決するための手段】

【０００９】

本出願の目的である本発明は、生物工学的な技術によって、従来用いられている微生物から、強力な抗ラジカル効果を有する有効成分を得ることを可能にするという発見に立脚する。

【００１０】

該当の微生物は、海底の熱噴出孔で発見された新しい系統の好熱性の集団の一部である。

【００１１】

これらの細菌は、通常はタンパク質が変性される温度で、そして細胞がその内部媒体と外部媒体との間で恒常性を維持できないような圧力下でも生存可能である。

【００１２】

現在まで、好熱生微生物は、「ＰＣＲ」（ポリメラーゼ連鎖反応）と呼ばれる、細胞の溶解物からの新しい増幅技術において有用なＤＮＡを調製するために、生物工学において用いられている。

【００１３】

従って、このような微生物からの有効成分の生成は、以下の２つの主な経路において興味

深い：
・リボソーム１６ＳのＲＮＡ配列を比較する系統発生的研究によって、全ての原核生物は、疑いなく同じ共通の好熱性の先祖から由来したことが示された。従って、これらの好熱性の集団は、おそらく元来の物質、およびそれらの新しい治療効果または美容的効果さえ有するように適合された元来の物質から構成される。
・これらの好熱性細菌によって生成される特定の代謝物は、熱安定性（このことはそれらの特性が高温でも維持されることをいう）である。分子の活性の寿命によって、それらは、最終の美容用製品中で長期にわたって安定にされ得る。
【００１４】
本出願による微生物の発酵によるタンパク質の生成のためのプロセスは、Ｔｈｅｒｍｕｓ属の株、詳細には、Ｔｈｅｒｍｕｓ ｔｈｅｒｍｏｐｈｉｌｕｓ、ＧＹ１２１１種を使用し、そしてこの株は、グアヤナ海盆（カルフォルニア湾）の東太平洋海嶺の海底の熱水噴出孔（深度２０００メートル）から単離した。これらは、グラム陰性の桿菌であり、その大きさは、実質的に０．５μｍ×１０μｍに等しく、そして好気性、ヘテロトロピック、非胞子形成性、好熱性、圧力耐性であり、そして培養時には、オレンジ色で、丸く、不規則でない、円滑な、波形でないコロニーを生じる。
【００１５】
この株は、パリのパスツール研究所の国立微生物培養コレクション（Ｎａｔｉｏｎａｌ Ｃｕｌｔｕｒｅ Ｃｏｌｌｅｃｔｉｏｎ ｏｆ Ｍｉｃｒｏ－ｏｒｇａｎｉｓｍ）において番号Ｉ－２７１５として登録されている。
【００１６】
本発明者らは、好熱性集団のこれらの株が、美容分野および皮膚用医薬品の分野において有用な多くの生理学的活性を有する分子を生成または提供し得ることを発見した。
【００１７】
それらの株がこれらの分子を排出するようにそれらを培養すること、または得られたバイオマスを使用することはいずれも特に興味深い。
【００１８】
以下の例は、これらの２つの目的を達成するための培養条件を最適化するために得られた結果を示す。
【００１９】
（バイオマスの生成の最適化）
産業的適用のためには、できるだけ簡単かつ経済的な培養培地を用いながら、最大のバイオマスを得ることが必要である。細菌培養に対する異なる物理化学的パラメーターの影響を評価し、それによって以下に列挙される限定要因を決定することが必要であった：
・ＧＹ／０１培地中の栄養素の組成物：酵母抽出物およびNH_4Cl。色および匂いのような従来の問題を回避するため、その濃度を必要最小限に制限することが必要である。酵母抽出物に関しては、０．２５％の濃度が限界濃度であること、および１．０％では、０．５％の時よりも多いバイオマスが得られるわけではないことが確認された。従って、選択された酵母抽出液の濃度は０．５％である。選択されるNH_4Clの使用の最適濃度は、０．３％である。
・塩および微量元素の組成
Ｔｈｅｒｍｕｓは海洋細菌であるため、塩化ナトリウムの含量は、極めて重要であり、そして本発明者らの条件下では、本発明者らは、培養倍地中に１．０％のＮａＣｌを用いることを選択した。より高い濃度では得られるバイオマスの量が低下する。
【００２０】
さらに、本発明者らは、培養の間に調節することなく、７．２に等しいｐＨで、撹拌しながら、７２～７５℃の温度で発酵を実行することを選択した。
【００２１】
これらの条件下では、集団が二倍になる時間は、４７分に等しく、０．３８６（H^{-1}）に等しい成長量μ_mをともなっている。

【００２２】
（タンパク質の生成の最適化）
ほとんどのタンパク質は一般に細胞内にある。
濾過（０．２μｍ）の後、その培地を最初に２０倍に濃縮した場合にのみ、ＧＹ１２１１を用いて発酵させた培地の一次元の電気泳動によって、いくつかのタンパク質バンドのうちに唯一の存在が、実証される。従って、タンパク質を細胞から離させるための技術的な方法を見出す必要があった。
【００２３】
多くの実験によって、本発明者らは大量のタンパク質抽出のいくつかの手順を開発することができた。その手順は、満足のゆくものであり、工業的用途にも完全に適する。
【００２４】
全体的満足度を与える手順の１つは以下の通りである：培養後、０．１％の最終濃度でＣｒｏｄａｓｉｎｉｃ　ＬＳ３０（ＣＲＯＤＡ）を３０分間、添加する。
【００２５】
培養培地中のタンパク質の用量は、一次元電気泳動によって多数のバンドの存在（従って、抽出された広範な種々のタンパク質）が実証されるとき、簡易熱量測定法によって、Ｔｈｅｒｍｕｓのタンパク質の０．２％に等しい最小濃度を示す。この処理がタンパク質の四次構造を変更しない（なぜなら測定された酵素活性は変更されていない）ことに注意のこと。最後に、相補的試験によって、２０分間１００℃の熱処理後に得られたタンパク質の電気泳動プロフィールの不変性が（質的および量的の両方で）実証されたことに注目することが重要である。この性質は、用いられた発酵プロトコールの妥当性を実証する。なぜなら、得られたタンパク質は、もとの微生物Ｔｈｅｒｍｕｓのタンパク質、そして特にＧＹ１２１１株のタンパク質と同じ特徴を有するからである。
【００２６】
あるいはこのＣｒｏｄａｓｉｎｉｃ　ＬＳ３０での界面活性剤処理の代わりに、高圧ホモジナイズによる従来の技術（ただし、この手順は長い）を用いてもよい。
【００２７】
従って、倍地中の細菌タンパク質を回収するための簡便かつコストの少ない方法として、発酵の最後にＣｒｏｄａｓｉｎｉｃ　ＬＳ３０を使用することによって全てのパラメーターを最適化した発酵のおかげで、本発明者らは、バイオマスの生成、およびＴｈｅｒｍｕｓから求めるタンパク質の質を最適化することに成功した。
【００２８】
本特許出願では回収の単一の例を記載しているが、タンパク質の発酵および抽出の他のプロセスを用いてもよく、従って他の任意のタンパク質の発酵および抽出のプロセスも本出願の範囲内で用いられ得る。
【００２９】
例えば、この製品中のタンパク質の量を増大するため、任意の物理的プロセスまたは化学的プロセス、例えば、限定はしないが、Ｃｒｏｄａｓｉｎｉｃ　ＬＳ３０の添加の前に細菌を濃縮するめの０．２μｍ濾過によって、さもなければ低分子量のカットの閾値での濾過（閾値２０ｋＤでの接線限外濾過）（これは、塩（沈殿の潜在的な原因）、小ペプチド（時々、着色、および所望されない匂いを生じる）、およびＣｒｏｄａｓｉｎｉｃ　ＬＳ３０の一部の排除を可能にする）によって、発酵培地を濃縮することが可能である。当業者は、生成の特定の必要性に応じて、それらの用途を最適化するために技術を適合および改変することができる。
【００３０】
発酵および濾過の後に得られた生成産物を、以下のような、種々のタイプの処理に供してもよい：浄化、濃縮または希釈、保存、精製、沈殿による分画、クロマトグラフィーによる分画、凍結乾燥、または噴霧。
【００３１】
本発明の好ましい実施形態の１つは、界面活性剤処理および限外濾過による濃縮後のＧＹ

１２１１の発酵培地によって、構成される。
【００３２】
処置のうちどれか１つ、またはいくつかの処置の後に得られる生成産物（溶液、粉末、結晶、エマルジョン、…）は、美容術および皮膚薬学において従来の任意の生薬形態で用いられてもよい。以下の２つの組成物は、非限定的な例のつもりで示す。
【実施例１】
【００３３】
実施例１．デイクリーム（ｄａｙ　ｃｒｅａｍ）

Ｖｏｌｐｏ　Ｓ２０	２．４
Ｖｏｌｐｏ　Ｓ２	２．６
Ｐｒｏｓｔｅａｒｙｌ　１５	８．０
蜜蝋	０．５
Ａｂｉｌ（登録商標）ＺＰ２４３４	３．０
プロピレングリコール	３．０
Ｃａｒｂｏｐｏｌ（登録商標）９４１	０．２５
トリエタノールアミン	０．２５
発酵した培地	５．０
水および防腐剤ＱＳＰ	１００ｇ

【実施例２】
【００３４】
実施例２，ボディミルク（ｂｏｄｙ　ｍｉｌｋ）

Ｃｒｉｌｌｅｔ　３	２．５
Ｎｏｖｏｌ	０．９
フルイラン（ｆｌｕｉｌａｎ）	２．５
Ｃａｒｂｏｐｏｌ（登録商標）９４０	０．３
蜜蝋	２．０
トリエタノールアミン	０．１
グリセリン	５．０
発酵した培地	３．０
水および防腐剤ＱＳＰ	１００ｇ

【００３５】
この生成物（製品）の使用の間に発見された多くの有益な効果のなかで、言及するに価するより重要な効果は、皮膚のセラミドの濃度の調節、ヒトのケラチノサイトのインビトロで観察されたＣＤ４０の免疫刺激効果、シャペロン型タンパク質の防御効果、および本出願による培養培地中のメナキノンの存在による異なる高反応性フリーラジカルに対する解毒効果である。このうち以下の実施例によって、過酸化水素のみに関する効果が示されるが、過酸化水素だけが問題のラジカルというわけではない。
【実施例３】
実施例３　インビトロでの「カタラーゼ様」活性
【００３６】
「カタラーゼ様（ｃａｔａｌａｓｅ－ｌｉｋｅ）」活性を実証するための最も簡易な方法は、以下の式によるH_2O_2の分解を分光光度法によって測定することにある：

カタラーゼ

$$H_2O_2 \rightarrow H_2O + {}^1/_2O_2$$

【００３７】
２４０ｎｍでのH_2O_2吸収（従って、２４０ｎｍでのＤＯの低下）は、H_2O_2の分解に比例し、これによって、ウシカタラーゼから測定されたスペクトルとの比較により、未知の標本の酵素活性または偽酵素活性を測定することが可能になる。
【００３８】

以下の表には、２５℃で実施した８つの独立した実験の間に、Ｃｒｏｄａｓｉｎｉｃまたは高圧（ＡＰＶ材料）のいずれかによって処理した培養培地のカタラーゼタイプの偽酵素活性（平均±ＳＥＭ）を整理して示してある。ここで［Ｃ］係数は、生成した培地の濃度を示す。

標本	〔C〕計数	Crodasinic	APV
発酵させない培地	×1	0	0
発酵させた培地	×1	0.37	0.45
限界濾過された発酵培地	×10	4.91	5.02

【００３９】
Ｔｈｅｒｍｕｓを用いて発酵した標本の全てについて、酵素活性が観察されるが、発酵されていない培養培地自体は、酵素活性を有さない。さらに、測定された活性の間の比は、生じた濃度の比と一貫している。
【００４０】
用いた処理が、得られた酵素活性に関して等価であることに注目することも可能である。
【００４１】
結局、ウシのカタラーゼの活性が、試験を実施する温度内におさまる場合（４５℃対２５℃で約２５％の活性）、Ｔｈｅｒｍｕｓを用いた発酵培地の偽酵素活性は、温度にともなってかなり増大する（ただし、４５℃では、４．５の係数を掛けられる）ことを指摘することが特に重要である。その天然の環境において、Ｔｈｅｒｍｕｓ　ＧＹ１２１１は、７０℃程度の温度で生存するので、これらの防御機構が、高温では特に有効であることは論理的である。美容的な観点から、この、熱による「活性化（ａｃｔｉｖａｔｉｏｎ）」は、かなりの利点を構成する。従って、太陽に曝される、そしてカタラーゼ様活性が最も必要なのは主に夏である。しかし、これらの条件下では、皮膚の温度は、３０℃より高い温度に達し得る。
【００４２】
４５℃を超えては活性を測定していない。なぜなら本発明者らは、次に、インビボにおける皮膚の温度と適合しない条件について述べているからである。
【００４３】
従って、ペルオキシダーゼ的な、カタラーゼ様の、抗ラジカルの、グリコシル化の阻害的な酵素活性、そしてコラーゲンの合成を改変する酵素活性を有する、上記の培養された培地は、天然のＵＶに対する曝露の間の、皮膚のケアのために、詳細には、フリーラジカルの有害な影響に対して、および老化（これは、皮膚の老化、生理学的老化、または早期老化である）に対するフリーラジカルのあらゆる結果に対して保護するために、さもなければ皮膚の、詳細には顔面、身体、頭皮、および毛髪のケアのために；皮膚のセラミド濃度を調節するために、免疫系を刺激するために、シャペロンの影響による防御的効果を得るために、そして異なる高反応性フリーラジカル、特にオゾンについての解毒物として（本出願の目的である培養培地中のメナキノンの存在によって）、用いられ得る。
【００４４】
本発明において用いられる組成物において、発酵された培地は一般に、濃縮された培地、凍結乾燥された培地、または噴霧された培地については、０．００１乾燥重量％（ｐ／ｐ）から２乾燥重量％（ｐ／ｐ）の間で、そして液体形態で発酵した培地については、一般に０．１％（ｐ／ｐ）から１０．０％（ｐ／ｐ）の間で用いられる。
【００４５】
この発酵した培地は、美容術または皮膚薬学において使用される、以下の任意の生薬形態で用いられ得る：Ｏ／Ｗエマルジョン、およびＷ／Ｏエマルジョン、ミルク、ローション、ポマード、キャピラリーローション、シャンプー、石鹸、スティックおよびペンシル、スプレー、ボディーオイル（ただし、このリストは限定的なものではない）。
【００４６】

この発酵した培地を、リポソーム、カイロミクロン、マクロ粒子、ミクロ粒子およびナノ粒子、ならびに、マクロカプセル、ミクロカプセルおよびナノカプセルのような美容用ベクター中に組みむこと、それらを粉末化有機ポリマー、タルク、ベントナイト、および他の鉱物支持体上に吸収させることが可能である。

【００４７】

この発酵した培地は、化粧品中で従来用いられる以下の任意の他の成分とともに美容用組成物中で合わせられ得る：抽出物、および／または合成された脂質、ゲル化ポリマー、および増粘ポリマー、テンシオアクティブ（ｔｅｎｓｉｏａｃｔｉｖｅ）、および乳化剤、水溶性有効成分または脂溶性有効成分、他の植物の抽出物、組織抽出物、他の海洋抽出物。

【００４８】

この発酵した培地を含有する美容用組成物または皮膚用医薬品組成物は、クリーム、バーム、またはゲル、またはローション、または日焼け止めクリーム、および日焼け後クリーム、髭剃り後製品、脱毛クリームまたは脱毛後クリームであってもよい。

【００４９】

この発酵した培地を含有する美容用組成物または皮膚用医薬品組成物は、皮膚のケアのために、詳細には、フリーラジカルの有害な影響に対して、および天然のＵＶまたは人工的ＵＶに対する暴露の間の皮膚の老化、生理学的老化、または早期老化に対するフリーラジカルの全ての結果に対して保護するために、ならびに皮膚、詳細には顔面、身体、頭皮、および毛髪のケアのために；皮膚のセラミド濃度を調節するために、免疫系を刺激するために、シャペロンの影響による防御的効果を得るために、そして特にオゾンに関して解毒物および抗ラジカルとして適合される。

【００５０】

この発酵した培地を含有する美容用組成物または皮膚用医薬品組成物は、皮膚のケアのため、詳細には、フリーラジカルの有害な影響に対して、および天然のＵＶに対する曝露の間の皮膚の老化、生理学的老化、または早期老化に対するフリーラジカルの全ての結果に対して保護するために、ならびに皮膚、詳細には顔面、身体、頭皮、および毛髪のケアのために；皮膚のセラミド濃度を調節するために、免疫系を刺激するために、シャペロンの影響による防御的効果を得るために、そして特にオゾンに関して解毒および抗ラジカル活性のために適合された医薬の調製のために用いられる。

【００５１】

この発酵した培地はまた、直接に皮膚へまたは毛髪と接触して連続的な局所適用を提供にするために、単独で用いられても、または美容用組成物もしくは皮膚用医薬品組成物中に組み込まれても、寝間着または昼間用の衣類または下着類を作製するために用いられるように適合された織物、合成ファイバー、または天然のファイバー、ウール、および任意の材料上にまたはその中に、適用するために、マクロ粒子、ミクロ粒子およびナノ粒子、または、マクロカプセル、ミクロカプセルおよびナノカプセルの形態として結合されても、または組み込まれても、または吸収されても、または吸着されてもよい。

【国際公開パンフレット】

(12) DEMANDE INTERNATIONALE PUBLIÉE EN VERTU DU TRAITÉ DE COOPÉRATION EN MATIÈRE DE BREVETS (PCT)

(19) Organisation Mondiale de la Propriété Intellectuelle
Bureau international

(43) Date de la publication internationale
29 août 2002 (29.08.2002)

PCT

(10) Numéro de publication internationale
WO 02/066668 A2

(51) Classification internationale des brevets⁷ : C12P 21/00

(21) Numéro de la demande internationale :
PCT/FR02/00488

(22) Date de dépôt international : 7 février 2002 (07.02.2002)

(25) Langue de dépôt : français

(26) Langue de publication : français

(30) Données relatives à la priorité :
01/02442 21 février 2001 (21.02.2001) FR

(71) Déposant *(pour tous les États désignés sauf US)* : SEDERMA [FR/FR]; 29 rue du Chemin Vert, BP 33, F-78612 Le Perray-en Yvelines Cedex (FR).

(72) Inventeur; et

(75) Inventeur/Déposant *(pour US seulement)* : LINTNER, Karl [FR/FR]; 69 rue de l'Assomption, -, F-75016 Paris (FR).

(81) États désignés *(national)* : AE, AG, AL, AM, AT, AU, AZ, BA, BB, BG, BR, BY, BZ, CA, CH, CN, CO, CR, CU, CZ, DE, DK, DM, DZ, EC, EE, ES, FI, GB, GD, GE, GH, GM, HR, HU, ID, IL, IN, IS, JP, KE, KG, KP, KR, KZ, LC, LK, LR, LS, LT, LU, LV, MA, MD, MG, MK, MN, MW, MX, MZ, NO, NZ, OM, PH, PL, PT, RO, RU, SD, SE, SG, SI, SK, SL, TJ, TM, TN, TR, TT, TZ, UA, UG, US, UZ, VN, YU, ZA, ZM, ZW.

(84) États désignés *(régional)* : brevet ARIPO (GH, GM, KE, LS, MW, MZ, SD, SL, SZ, TZ, UG, ZM, ZW), brevet eurasien (AM, AZ, BY, KG, KZ, MD, RU, TJ, TM), brevet européen (AT, BE, CH, CY, DE, DK, ES, FI, FR, GB, GR, IE, IT, LU, MC, NL, PT, SE, TR), brevet OAPI (BF, BJ, CF, CG, CI, CM, GA, GN, GQ, GW, ML, MR, NE, SN, TD, TG).

Publiée :
sans rapport de recherche internationale, sera republiée dès réception de ce rapport

En ce qui concerne les codes à deux lettres et autres abréviations, se référer aux "Notes explicatives relatives aux codes et abréviations" figurant au début de chaque numéro ordinaire de la Gazette du PCT.

(54) Title: METHOD FOR PRODUCING PROTEINS BY FERMENTATION OF MICROORGANISMS FROM THE THERMUS FAMILY, THE PROTEIN MIXTURE THUS OBTAINED AND COSMETIC COMPOSITIONS CONTAINING SAME

(54) Titre : PROCEDE DE FABRICATION DE PROTEINES PAR FERMENTATION DE MICRO-ORGANISMES DE LA FAMILLE THERMUS, MELANGE DE PROTEINES AINSI OBTENU ET COMPOSITION COSMETIQUES LES CONTENANT.

(57) Abstract: The invention relates to the use of fermentation media for microorganisms from the Thermus family, in particular microorganisms collected in marine waters close to very deep hydrothermal sources, especially those obtained with the GY1211 strain. The invention also relates to certain cosmetic compositions containing one or more types of fermentation media for said microorganisms and which are used, in particular, for skin care, notably for the face, body and scalp, and hair care and in order to modulate the cutaneous concentration of ceramides, to stimulate the immune system, to provide protection by means of the chaperone effect and a detoxifying and anti-free radical effect, particularly in relation to the oxygen peroxide.

(57) Abrégé : L' invention se rapporte à l'utilisation des milieux de fermentation de micro-organismes de la famille Thermus, notamment des micro-organismes récoltés dans les eaux marines près des sources hydrothermales de grande profondeur, en particulier ceux obtenus avec la souche GY1211. Elle se rapporte aussi à certaines compositions cosmétiques contenant un ou plusieurs types de milieux de fermentation de ces micro-organismes, utilisées notamment pour le soin de la peau, en particulier du visage, du corps et du cuir chevelu ainsi que pour le soin du cheveu; pour moduler la concentration cutanée en céramides, pour stimuler le système immunitaire, pour obtenir un effet protecteur par effet chaperon et comme détoxifiant et antiradicalaire vis à vis, notamment, du peroxyde d'oxygène.

WO 02/066668 A2

Titre: Procédé de fabrication de protéines par fermentation de micro-organismes de la famille Thermus, mélange de protéines ainsi obtenu et composition cosmétique les contenant.

La peau est la première image que chacun de nous offre au regard des autres et, de tout temps son aspect a été un sujet de préoccupation.

Au cours de la vie, tant professionnelle que privée, l'exposition au soleil ainsi que les diverses pollutions provoquent des agressions chimiques et physiques qui induisent la production, entre autres facteurs, de différentes formes radicalaires de l'oxygène. Ces dernières, notamment au niveau cutané, provoquent des dégâts irréversibles dont les conséquences sont *a minima* des érythèmes, *coups de soleil*, vieillissement prématuré de la peau, et, *a maxima*, des cancers de la peau.

L'aggravation des manifestations acnéiques, la perte de la souplesse cutanée, le dessèchement de la peau et l'apparition des rides correspondent aux premières manifestations macroscopiques du vieillissement. Au niveau des cellules cutanées, les modifications moléculaires mises en évidence dès les premières expositions au soleil, qui ne peuvent être décelées que par des méthodes invasives et très sophistiquées, sont donc encore plus pernicieuses puisque non détectables par la population en général.

Le soleil n'est pas le seul responsable de la production des radicaux libres de l'oxygène. Un grand nombre de réactions biochimiques vitales, (comme par exemple l'oxydation des acides aminés ou celle des acides gras, la synthèse de prostaglandines...), engendrent tout naturellement ces formes hyper-réactives de l'oxygène, extrêmement toxiques pour les tissus en général et pour la peau en particulier.

Les êtres humains sont *naturellement* protégés contre les effets délétères des formes radicalaires de l'oxygène par des régulations physiologiques, développées au cours de l'évolution: bronzage progressif à partir du printemps contre les conséquences sub-érythémateuses cutanées, présence d'enzymes antiradicalaires telles que des superoxyde-dismutases et des catalases, diminution de la réaction inflammatoire et/ou immunitaire, épaississement de l'épiderme....

Pour résoudre ces problèmes, l'Industrie Cosmétique a mis sur le marché toutes sortes de produits contenant soit des filtres solaires, des compositions renfermant des enzymes naturelles présentes dans la peau telles que la SOD (superoxyde-dismutase), des extraits végétaux et autres.

Une autre enzyme naturelle, la catalase, ne peut être utilisée dans les compositions cosmétiques et dermopharmaceutiques car elle figure (sous le N° 74) dans la *liste des substances qui ne peuvent entrer dans la composition des produits cosmétiques* de l'annexe II(1) de la Directive européenne 93/35 du 14Juin 1993.

Il est alors dans la logique des industries cosmétiques et dermo-pharmaceutiques de mettre au point des produits qui aident la peau à mieux supporter, voire à corriger et/ou à réparer, les effets néfastes de cette pollution chimique.

L'invention faisant l'objet de ce présent brevet, réside dans la découverte qu'il est possible d'obtenir, par des techniques de biotechnologie, des principes actifs possédant de puissants effets antiradicalaires à partir de micro-organismes convenablement utilisés.

Les micro-organismes concernés font partie de nouvelles souches de thermophiles découvertes au niveau de résurgences hydrothermales sous-marines.

Ces bactéries sont capables de survivre à des températures où normalement les protéines sont dénaturées ainsi que sous pressions telles que les cellules ne peuvent maintenir une homéostasie entre leur milieu intérieur et le milieu extérieur.

Jusqu'à maintenant, les micro-organismes thermophiles sont utilisés en biotechnologie pour préparer des ADN utilisables dans les nouvelles techniques d'amplification dite "PCR" (Polymerase Chain Reaction) à partir de lysats de cellules.

En effet, la production de principes actifs à partir de tels micro-organismes présente deux intérêts majeurs:

- Les études phylogénétiques comparant les séquences d'ARN ribosomaux 16S ont montré que tous les procaryotes dérivaient sans doute d'un même ancêtre commun thermophile. Ces thermophiles sont donc probablement constitués de substances originelles et originales susceptibles de posséder des effets thérapeutiques voire cosmétiques innovants.
- Certains métabolites produits par ces bactéries thermophiles sont thermostables, c'est à dire que leurs propriétés sont conservées à haute température. La durée de vie et l'activité des molécules pourraient en faire des actifs stables à long terme dans le produit cosmétique fini.

Le procédé de fabrication de protéines par fermentation de micro-organismes faisant l'objet de ce présent brevet utilise une souche du genre Thermus, en particulier Thermus thermophilus, variante GY1211, et ont été isolées à partir d'une résurgence hydrothermale sous-marine (à 2000 m de profondeur) de la dorsale est-Pacifique dans le bassin de Guaymas (golfe de Californie). Ce sont des Bacille Gram (-), dont la taille est sensiblement égale à 0,5

µm x 10 µm et qui sont aérobies, hétérotrophes, non-sporulés, thermophiles, barotolérants et qui, en culture, donnent des colonies orangées, rondes, régulières, lisses, non bombées.

La souche est enregistrée sous ne numéro d'ordre I-2715 auprès de la collection Nationale de Culture des Micro-organismes (CNCM) de l'Institut Pasteur de Paris.

Nous avons découvert que ces souches de thermophiles sont capables de produire ou de fournir des molécules qui possèdent de nombreuses activités physiologiques utilisables dans le domaine Cosmétique et Dermopharmaceutique.

Il est particulièrement intéressant de les cultiver soit pour leur faire excréter ces molécules, soit pour utiliser la biomasse obtenue.

Les exemples suivants indiquent les résultats que nous avons obtenus pour optimiser les conditions de culture pour obtenir ces deux objectifs.

Optimisation de la production de biomasse

Pour une application industrielle il fallait obtenir un maximum de biomasse tout en ayant un milieu de culture le plus simple et économique possible. Il a fallu évaluer l'influence des différents paramètres physico-chimiques sur la culture bactérienne et déterminer ainsi les facteurs limitants qui sont listés ci-dessous:

- Composition en éléments nutritionnels dans le milieu GY/01: l'extrait de levure et le NH_4Cl. Pour éviter les problèmes classiques que sont la coloration et l'odeur, il faut limiter leur concentration au minimum nécessaire. En ce qui concerne l'extrait de levure, il a été constaté que la concentration de 0,25% est la concentration limitante et qu'à 1, % on n'obtient pas plus de biomasse qu'à 0,5%. La concentration d'extrait de levure choisie est donc 0,5%. La concentration optimale d'utilisation du NH_4Cl choisie est trouvée à 0.3%
- Composition en sels et oligo-éléments
  Thermus étant une bactérie marine, la teneur en NaCl est capitale et, dans nos conditions, nous avons choisi d'utiliser 1,0 % de NaCl dans le milieu de culture, des concentrations supérieures réduisant la quantité de biomasse obtenue.

Par ailleurs, nous avons choisi de réaliser les fermentations entre 72 et 75 °C, sous agitation, avec un pH égal à 7,2 sans ajustement en cours de culture.

Dans ces conditions, le temps de doublement de la population est égal à 47 minutes avec un taux de croissance μ_m égal à 0.386 (H^{-1}).

Optimisation de la production de protéines

La majorité des protéines sont généralement endocellulaires.

Après filtration (0,2µm), une électrophorèse unidirectionnelle du milieu fermenté par GY1211 démontre la seule présence de quelques bandes protéiques, seulement si le milieu a été préalablement concentré 20 fois. Il fallait donc trouver un moyen technique de faire sortir les protéines de la cellule.

De nombreuses expérimentations nous ont permis de mettre au point plusieurs procédures d'extraction de protéines en quantité satisfaisante et tout à fait compatible avec une utilisation industrielle.

Une procédure donnant toute satisfaction est la suivante: après la culture, on ajoute du Crodasinic LS30 (CRODA) à la concentration finale de 0,1% pendant 30 minutes.

Le dosage des protéines dans le milieu de culture, par simple colorimétrie indique une concentration minimale de protéines de Thermus égale de 0,2% quand l'électrophorèse unidimensionnelle démontre la présence de nombreuses bandes et donc la grande variété de protéine extraites. Il est à noter que ce traitement n'altère pas la structure quaternaire des protéines car les activités enzymatiques mesurées ne sont pas altérées. Enfin, il est important de signaler que des essais complémentaires ont démontré l'invariance, tant qualitative que quantitative, du profil électrophorétique des protéines obtenues après un traitement thermique de 20 minutes à 100 °C, qualité qui démontre la pertinence du protocole de fermentation utilisé puisque les protéines obtenues ont les mêmes caractéristiques que celles du micro-organisme d'origine Thermus et notamment celles de la souche GY1211.

Alternativement à ce traitement détersif par le Crodasinic LS30 on peut employer la technique classique par homogénéisation haute pression, manipulation pourtant plus longue.

Ainsi, nous avons réussi à optimiser la production de biomasse et la qualité des protéines recherchée chez Thermus grâce à une fermentation dont tous les paramètres ont été optimisés et par l'utilisation du Crodasinic LS30 en fin de fermentation comme moyen simple et peu coûteux de récupérer les protéines bactériennes dans le milieu.

Bien qu'un seul exemple d'obtention soit décrit dans cette demande de brevet, d'autres procédés de fermentation et d'extraction de protéines ont été mis au point et, ainsi, tout autre procédé de fermentation et d'extraction de protéines peut être utilisé dans le cadre de ce brevet.

Par exemple, pour augmenter encore le taux de protéines dans le produit, il est possible de concentrer le milieu fermenté par tout procédé physique ou chimique comme, par exemple, sans que cela ne soit limitatif, par une filtration 0,2µm pour concentrer les bactéries avant l'ajout de Crodasinic LS30 ou encore, par une filtration sur seuil de coupure de petit poids

moléculaire (ultrafiltration tangentielle sur seuil 20kD), ce qui permettrait de se débarrasser des sels (cause potentielle de précipitation), des petits peptides (parfois cause de coloration et d'odeurs indésirables) et d'une partie du Crodasinic LS30. L'homme de l'art saura adapter et modifier ces techniques pour en optimiser l'utilisation selon les besoins spécifiques de la production.

Le produit obtenu après fermentation et filtration peut subir différents types de traitement: clarification, concentration ou dilution, conservation, purification, fractionnement par précipitation, par chromatographie, lyophilisation ou atomisation.

Une des réalisations préférées de l'invention est constituée par le milieu fermenté de GY1211 après traitement détersif et concentration par Ultrafiltration.

Les produits obtenus après l'un ou l'autre ou plusieurs de ces traitements (solutions, poudres, cristaux, émulsions, ...) peuvent être utilisés dans toutes les formes galéniques habituelles en cosmétique et en dermopharmacie. Les deux compositions suivantes sont données à titre d'exemples non limitatifs.

Exemple N° 1 - Crème de jour

Volpo S20	2,4
Volpo S2	2,6
Prostéaryl 15	8,0
Cire d'abeille	0,5
Abil® ZP2434	3,0
Propylène glycol	3,0
Carbopol® 941	0,25
Triéthanolamine	0,25
Milieu fermenté	5,0
Eau & conservateurs QSP	100g

Exemple N°2 - Lait corporel

Crillet 3	2,5
Novol	0,9
Fluilan	2,5
Carbopol 940	0,3
Cire d'abeille	2,0
Triéthanolamine	0,1

Glycérine	5,0
Milieu fermenté	3,0
Eau & conservateurs QSP	100g

Parmi les nombreux effets bénéfiques trouvés lors de la mise au point de ce produit, les plus importants méritants d'être mentionnés sont la régulation des concentrations de céramides cutanés, un effet immuno-stimulant du CD 40 observé *in vitro* sur les kératinocytes humains, une effet de protection de type protéine chaperonne, et un effet détoxifiant vis à vis des différents radicaux libres hyper-réactifs par la présence de ménaquinone dans le milieu de culture faisant l'objet de ce brevet dont l'exemple suivant démontre l'effet vis à vis du seul peroxyde d'oxygène mais qui n'est pas le seul radical libre concerné.

Exemple N°3 - Activité "catalase-like" *in vitro*

La méthode la plus simple pour mettre en évidence l'activité "catalase-like" consiste à suivre par spectrophotométrie la dégradation de l'H_2O_2 selon l'équation suivante:

$$H_2O_2 \xrightarrow{\text{Catalase}} H_2O + \tfrac{1}{2} O_2$$

L'H_2O_2 absorbe à 240 nm, donc la chute de DO à 240 nm est proportionnelle à la dégradation de H_2O_2 ce qui permet, par comparaison avec une gamme étalon réalisée à partir de catalase bovine, de mesurer l'activité enzymatique ou pseudoenzymatique de l'échantillon inconnu.

Le tableau suivant résume les activités pseudoenzymatiques de type catalase (moyennes ± SEM) des milieux de cultures traités soit par le Crodasinic soit par haute pression (matériel APV), lors de 8 expérimentations indépendantes réalisées à 25° C où Facteur [C] indique la concentration du milieu réalisée.

Activité exprimée en U/ml

Echantillon:	Facteur [C]	Crodasinic	APV
Milieu non Fermenté	x 1	0	0
Milieu Fermenté	x 1	0,37	0,45
Milieu fermenté ultrafiltré	x 10	4,91	5,02

On observe pour tous les échantillons fermentés par Thermus une activité enzymatique alors que les milieux de cultures non fermentés, eux, en sont dépourvus. De plus, le rapport entre les activités mesurées est cohérent avec celui de la concentration réalisée.

Il est possible également de constater que les traitements utilisés sont équivalents en terme d'activité enzymatique obtenue.

Enfin, il est particulièrement important de signaler que si l'activité de la catalase bovine chute avec la température à laquelle le test est réalisé (- 25% d'activité à 45°C vs 25°C), l'activité pseudoenzymatique des milieux de fermentation de Thermus augmente considérablement avec la température puisqu'à 45°C elle est multipliée par un facteur de 4,5. Comme dans son environnement naturel, Thermus GY1211 vit à des températures de l'ordre de 70°C, il est logique que ses mécanismes de défense soient particulièrement efficaces à haute température.

D'un point de vue cosmétique, cette « activation » par la chaleur constitue un atout considérable. En effet, c'est principalement l'été que l'on s'expose au soleil et où on a le plus besoin d'une activité catalase-like. Or dans ces conditions la température de la peau peut atteindre des températures supérieures à 30°C.

L'activité n'a pas été mesurée au delà de 45°C car on atteint alors des conditions incompatibles avec la température de la peau *in vivo*.

Ainsi, le milieu fermenté décrit précédemment qui possède des activités enzymatiques péroxydasiques, catalase-like, antiradicalaires, inhibitrices de la glycation, et de modulation de la synthèse de collagène, peut-être utilisé pour les soins de la peau, particulièrement pour lutter contre les effets délétères des radicaux libres et contre toutes leurs conséquences sur le vieillissement cutané, physiologique ou prématuré, lors d'exposition aux UV naturels ou ainsi que pour les soins de la peau, en particulier du visage, du corps, du cuir chevelu et du cheveu; pour moduler la concentration cutanée en céramides, pour stimuler le système immunitaire, pour obtenir un effet protecteur par effet chaperon et comme détoxifiant vis à vis des différents radicaux libres hyper-réactifs dont, notamment, le peroxyde d'oxygène, par la présence de ménaquinone dans le milieu de culture faisant l'objet de ce brevet.

Dans les compositions utilisées selon l'invention, les milieux fermentés sont utilisés généralement entre 0,001% et 2% (p/p) en poids sec pour des milieux concentrés, lyophilisés ou atomisés, généralement entre 0,1 et 10,0% (p/p) pour les milieux fermentés sous forme liquide.

Le milieu fermenté peut être utilisé dans toute forme galénique employée en cosmétique ou dermopharmacie: émulsions H/E et E/H, laits, lotions, pommades, lotions capillaires, shampooings, savons, sticks et crayons, sprays, huiles corporelles, sans que cette liste soit limitative.

Il est possible d'incorporer le milieu fermenté dans des vecteurs cosmétiques comme les liposomes, les chylomicrons, les macro-, micro- et nanoparticules ainsi que les macro-, micro- et nanocapsules, de les absorber sur des polymères organiques poudreux, les talcs, bentonites et autres supports minéraux.

Le milieu fermenté peut être combiné dans les compositions cosmétiques avec tout autre ingrédient habituellement utilisé en cosmétique: lipides d'extraction et/ou de synthèse, polymères gélifiants et viscosants, tensioactifs et émulsifiants, principes actifs hydro- ou liposolubles, extraits d'autres plantes, extraits tissulaires, autres extraits marins.

Les compositions cosmétiques ou dermopharmaceutiques contenant le milieu fermenté peuvent être des crèmes, baumes ou des gels ou des lotions ou crèmes solaires et après solaires, des produits après-rasage, des crèmes épilatoires ou post-épilatoires.

Ces compositions cosmétiques contenant le milieu fermenté ou dermopharmaceutiques sont destinées aux soins de la peau, particulièrement pour lutter contre les effets délétères des radicaux libres et contre toutes leurs conséquences sur le vieillissement cutané, physiologique ou prématuré, lors d'exposition aux UV naturels ou artificiels ainsi que pour les soins de la peau, en particulier du visage, du corps, du cuir chevelu et du cheveu; pour moduler la concentration cutanée en céramides, pour stimuler le système immunitaire, pour obtenir un effet protecteur par effet chaperon et comme détoxifiant et antiradicalaire vis à vis, notamment, du peroxyde d'oxygène.

Ces compositions cosmétiques contenant le milieu fermenté ou dermopharmaceutiques sont utilisées pour la préparation de médicaments destinés aux soins de la peau, particulièrement pour lutter contre les effets délétères des radicaux libres et contre toutes leurs conséquences sur le vieillissement cutané, physiologique ou prématuré, lors d'exposition aux UV naturels ou ainsi que pour les soins de la peau, en particulier du visage, du corps, du cuir chevelu et du cheveu; pour moduler la concentration cutanée en céramides, pour stimuler le système immunitaire, pour obtenir un effet protecteur par effet chaperon et comme détoxifiant et antiradicalaire vis à vis, notamment, du peroxyde d'oxygène.

Le milieu fermenté peut également être utilisé seul, ou incorporé dans des compositions cosmétiques ou dermopharmaceutiques, lié(es) ou incorporé(es) ou absorbé(es) ou adsorbé(es) sous forme de macro-, micro- et nanoparticules ou dans des macro-, micro- et nanocapsules pour une application sur ou dans les textiles, fibres synthétiques ou naturelles, laines et tout matériau susceptible d'être utilisé pour réaliser des vêtements et sous-vêtements de jour ou de nuit, directement au contact de la peau ou des cheveux pour en permettre une

délivrance topique continue.

REVENDICATIONS

1. Procédé de fabrication de protéines par fermentation de micro-organismes, puis extraction des protéines produites, caractérisé en ce que les micro-organismes sont de la famille Thermus.
2. Procédé de fabrication de protéines selon la revendication 1, caractérisé en ce que les micro-organismes sont issus d'eaux marines situées à proximité de sources hydrothermales de grande profondeur.
3. Procédé de fabrication de protéines selon l'un quelconque des revendications 1 ou 2, caractérisé en ce que les micro-organismes sont de la souche GY1211, enregistrée sous le numéro d'ordre I-2715 auprès de la collection Nationale de Culture des Micro-organismes de (CNCM) de l'Institut Pasteur de Paris.
4. Procédé de fabrication de protéines selon l'un quelconque des revendications précédentes, caractérisé en ce que la fermentation est effectuée grâce à un milieu nutritionnel présentant un pH d'environ 7,2 et renfermant de l'extrait de levure à une concentration comprise entre 0.25 % et 1 % environ, du chlorure d'ammonium, du chlorure de sodium à une concentration ne dépassant pas 1% et des oligo-éléments.
5. Procédé de fabrication de protéines selon l'un quelconque des revendications précédentes, caractérisé en ce que la fermentation a lieu entre 72 et 75°C environ, sous agitation.
6. Procédé de fabrication de protéines selon l'un quelconque des revendications précédentes, caractérisé en ce que la fermentation est suivie d'un traitement détersif permettant l'extraction des protéines.
7. Procédé de fabrication de protéines selon l'un quelconque des revendications précédentes, caractérisé en ce que la fermentation est suivie d'une étape de filtration à 0,2 µm et/ou une étape d'ultrafiltration.
8. Mélange de protéines obtenues par le procédé selon l'une des revendications précédentes caractérisé en ce que les protéines sont thermostables jusqu'à 100°C.
9. Mélange de protéines selon la revendication 8 caractérisé en ce qu'il renferme de la ménaquinone.
10. Mélange de protéines selon la revendication 8 caractérisé en ce qu'il possède des activités enzymatiques péroxydasiques, catalase-like, antiradicalaires, inhibitrices de la glycation, et de modulation de la synthèse de collagène.
11. Composition cosmétique ou dermopharmaceutique caractérisée en ce qu'elle renferme un mélange de protéines selon l'une des revendications 8 à 10.

12. Composition cosmétique ou dermopharmaceutique selon la revendication 11 caractérisée en ce que les milieux fermentés sont utilisés généralement entre 0,001% et 2% (p/p) en poids sec pour des milieux concentrés, lyophilisés ou atomisés, généralement entre 0,1 et 10,0% (p/p) pour les milieux fermentés sous forme liquide.

13. Composition cosmétique ou dermopharmaceutique selon l'une des revendications 10 à 12, caractérisée en ce qu'elle se présente sous toute forme galénique employée en cosmétique ou dermopharmacie: émulsion H/E et E/H, lait, pommade, lotion capillaire, shampooing, savon, stick et crayon, spray, huile corporelle.

14. Composition cosmétique ou dermopharmaceutique selon l'une des revendications 10 à 13, caractérisée en ce que le mélange est incorporé dans des vecteurs cosmétiques comme les liposomes, les chylomicrons, les macro-, micro- et nanoparticules ainsi que les macro-, micro- et nanocapsules ou absorbé sur des polymères organiques poudreux, les talcs, bentonites et autres supports minéraux.

15. Compositions cosmétique ou dermopharmaceutique selon l'une des revendications 10 à 14, caractérisée en ce que le mélange est utilisé avec tout autre ingrédient habituellement utilisé en cosmétique: lipides d'extraction et/ou de synthèse, polymères gélifiants et viscosants, tensioactifs et émulsifiants, principes actifs hydro- ou liposolubles, extrais d'autres plantes, extraits tissulaires, autres extraits marins.

16. Composition cosmétique ou dermopharmaceutique selon l'une des revendications 10 à 15, caractérisée en ce qu'elle est sous forme de crème, baume ou gel, de lotion ou crème solaire et après solaire, de produit après-rasage, de crème épilatoire ou post-épilatoire.

17. Composition cosmétique ou dermopharmaceutique selon les revendications 10 à 16, destinée aux soins de la peau, particulièrement pour lutter contre les effets délétères des radicaux libres et contre toutes leurs conséquences sur le vieillissement cutané, physiologique ou prématuré, lors d'exposition aux UV naturels ou artificiels ainsi que pour les soins de la peau, en particulier du visage, du corps, du cuir chevelu et du cheveu, pour moduler la concentration cutanée en céramides, pour stimuler le système immunitaire, pour obtenir un effet protecteur par effet chaperon et comme détoxifiant vis à vis des différents radicaux libres hyper-réactifs, notamment, du peroxyde d'oxygène.

18. Utilisation du mélange selon les revendications 8 à 10 ou d'une composition cosmétique ou dermopharmaceutique selon les revendications 11 à 17, pour la préparation de médicaments destinés aux soins de la peau, particulièrement pour lutter contre les effets délétères des radicaux libres et contre toutes leurs conséquences sur le vieillissement cutané,

physiologique ou prématuré, lors d'exposition aux UV naturels ou ainsi que pour les soins de la peau, en particulier du visage, du corps, du cuir chevelu et du cheveu.

19. Utilisation du mélange selon les revendications 8 à 10 ou d'une composition cosmétique ou dermopharmaceutique selon les revendications 11 à 17, lié(e) ou incorporé(e) ou absorbé(e) ou adsorbé(e) sous forme de macro-, micro- et nanoparticules ou dans des macro-, micro- et nanocapsules, dans les textiles, fibres synthétiques ou naturelles, laines et tout matériau susceptible d'être utilisé pour réaliser des vêtements et sous-vêtements de jour ou de nuit, directement au contact de la peau ou des cheveux pour en permettre une délivrance topique continue.

【国際公開パンフレット（コレクトバージョン）】

(12) DEMANDE INTERNATIONALE PUBLIÉE EN VERTU DU TRAITÉ DE COOPÉRATION EN MATIÈRE DE BREVETS (PCT)

(19) Organisation Mondiale de la Propriété Intellectuelle
Bureau international

(43) Date de la publication internationale
29 août 2002 (29.08.2002)

PCT

(10) Numéro de publication internationale
WO 02/066668 A3

(51) Classification internationale des brevets⁷ :
C12P 21/00, A61K 7/48 // (C12P 21/00, C12R 1:01)

(21) Numéro de la demande internationale :
PCT/FR02/00488

(22) Date de dépôt international : 7 février 2002 (07.02.2002)

(25) Langue de dépôt : français

(26) Langue de publication : français

(30) Données relatives à la priorité :
01/02442 21 février 2001 (21.02.2001) FR

(71) Déposant *(pour tous les États désignés sauf US)* : SEDERMA [FR/FR]; 29 rue du Chemin Vert, BP 33, F-78612 Le Perray-en Yvelines Cedex (FR).

(72) Inventeur; et
(75) Inventeur/Déposant *(pour US seulement)* : LINTNER, Karl [FR/FR]; 69 rue de l'Assomption, -, F-75016 Paris (FR).

(81) États désignés *(national)* : AE, AG, AL, AM, AT, AU, AZ, BA, BB, BG, BR, BY, BZ, CA, CH, CN, CO, CR, CU, CZ, DE, DK, DM, DZ, EC, EE, ES, FI, GB, GD, GE, GH, GM, HR, HU, ID, IL, IN, IS, JP, KE, KG, KP, KR, KZ, LC, LK, LR, LS, LT, LU, LV, MA, MD, MG, MK, MN, MW, MX, MZ, NO, NZ, OM, PH, PL, PT, RO, RU, SD, SE, SG, SI, SK, SL, TJ, TM, TN, TR, TT, TZ, UA, UG, US, UZ, VN, YU, ZA, ZM, ZW.

(84) États désignés *(régional)* : brevet ARIPO (GH, GM, KE, LS, MW, MZ, SD, SL, SZ, TZ, UG, ZM, ZW), brevet eurasien (AM, AZ, BY, KG, KZ, MD, RU, TJ, TM), brevet européen (AT, BE, CH, CY, DE, DK, ES, FI, FR, GB, GR, IE, IT, LU, MC, NL, PT, SE, TR), brevet OAPI (BF, BJ, CF, CG, CI, CM, GA, GN, GQ, GW, ML, MR, NE, SN, TD, TG).

Publiée :
avec rapport de recherche internationale

(88) Date de publication du rapport de recherche internationale: 18 décembre 2003

En ce qui concerne les codes à deux lettres et autres abréviations, se référer aux "Notes explicatives relatives aux codes et abréviations" figurant au début de chaque numéro ordinaire de la Gazette du PCT.

(54) Title: METHOD FOR PRODUCING PROTEINS BY FERMENTATION OF MICROORGANISMS FROM THE THERMUS FAMILY, THE PROTEIN MIXTURE THUS OBTAINED AND COSMETIC COMPOSITIONS CONTAINING SAME

(54) Titre : PROCEDE DE FABRICATION DE PROTEINES PAR FERMENTATION DE MICRO-ORGANISMES DE LA FAMILLE THERMUS, MELANGE DE PROTEINES AINSI OBTENU ET COMPOSITION COSMETIQUES LES CONTENANT.

(57) Abstract: The invention relates to the use of fermentation media for microorganisms from the Thermus family, in particular microorganisms collected in marine waters close to very deep hydrothermal sources, especially those obtained with the GY1211 strain. The invention also relates to certain cosmetic compositions containing one or more types of fermentation media for said microorganisms and which are used, in particular, for skin care, notably for the face, body and scalp, and hair care and in order to modulate the cutaneous concentration of ceramides, to stimulate the immune system, to provide protection by means of the chaperone effect and a detoxifying and anti-free radical effect, particularly in relation to the oxygen peroxide.

(57) Abrégé : L' invention se rapporte à l'utilisation des milieux de fermentation de micro-organismes de la famille Thermus, notamment des micro-organismes récoltés dans les eaux marines près des sources hydrothermales de grande profondeur, en particulier ceux obtenus avec la souche GY1211. Elle se rapporte aussi à certaines compositions cosmétiques contenant un ou plusieurs types de milieux de fermentation de ces micro-organismes, utilisées notamment pour le soin de la peau, en particulier du visage, du corps et du cuir chevelu ainsi que pour le soin du cheveu; pour moduler la concentration cutanée en céramides, pour stimuler le système immunitaire, pour obtenir un effet protecteur par effet chaperon et comme détoxifiant et antiradicalaire vis à vis, notamment, du peroxyde d'oxygène.

WO 02/066668 A3

【国際調査報告】

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International Application No
PCT/FR 02/00488

A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER
IPC 7 C12P21/00 A61K7/48 //(C12P21/00,C12R1:01)

According to International Patent Classification (IPC) or to both national classification and IPC

B. FIELDS SEARCHED

Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols)
IPC 7 C12P

Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched

Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practical, search terms used)
EPO-Internal, MEDLINE, EMBASE, WPI Data

C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category *	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X	PANTAZAKI A A ET AL: "Hyperalkaline and thermostable phosphatase in Thermus thermophilus." APPLIED BIOCHEMISTRY AND BIOTECHNOLOGY, vol. 75, no. 2-3, November 1998 (1998-11), pages 249-259, XP001031348 ISSN: 0273-2289 the whole document ---	1,4,6,8
A	MARTEINSSON VIGGO THOR ET AL: "Isolation and characterization of Thermus thermophilus Gy1211 from a deep-sea hydrothermal vent." EXTREMOPHILES, vol. 3, no. 4, November 1999 (1999-11), pages 247-251, XP001031285 ISSN: 1431-0651 the whole document ---	1-5

-/--

[X] Further documents are listed in the continuation of box C. [ ] Patent family members are listed in annex.

* Special categories of cited documents :

"A" document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance
"E" earlier document but published on or after the international filing date
"L" document which may throw doubts on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified)
"O" document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means
"P" document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed
"T" later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention
"X" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step when the document is taken alone
"Y" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other such documents, such combination being obvious to a person skilled in the art.
"&" document member of the same patent family

Date of the actual completion of the international search	Date of mailing of the international search report
20 May 2003	28/05/2003

Name and mailing address of the ISA	Authorized officer
European Patent Office, P.B. 5818 Patentlaan 2 NL - 2280 HV Rijswijk Tel. (+31-70) 340-2040, Tx. 31 651 epo nl, Fax: (+31-70) 340-3016	Andres, S

Form PCT/ISA/210 (second sheet) (July 1992)

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International Application No
PCT/FR 02/00488

C.(Continuation) DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category *	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
A	PATENT ABSTRACTS OF JAPAN vol. 017, no. 367 (C-1082), 12 July 1993 (1993-07-12) & JP 05 058871 A (SANSHO SEIYAKU CO LTD), 9 March 1993 (1993-03-09) abstract ---	8-18
X	YANG S ET AL: "PURIFICATION AND CHARACTERIZATION OF ALPHA GLUCOSIDASE FROM AN EXTREME THERMOPHILE THERMUS-THERMOPHILUS HB 8" ACTA MICROBIOLOGICA SINICA, vol. 32, no. 1, 1992, pages 23-29, XP001031324 ISSN: 0001-6209 Abrégé en anglais; page 29 ---	1,8,10
X	YANG S ET AL: "STUDIES ON THE THERMOSTABLE L LACTATE DEHYDROGENASE FROM THERMOPHILIC BACTERIA" ACTA MICROBIOLOGICA SINICA, vol. 31, no. 6, 1991, pages 438-442, XP001031322 ISSN: 0001-6209 Abrégé en anglais; page 442 ---	1,5,8
P,X	EISVOGEL M.: "Beauty from the ocean depths : extreme actives from an extreme environment" COSSMA, (2001) 2/6 (34-35)., XP001031366 the whole document ---	1-18
P,X	"Anti-ageing" COSSMA, vol. 2, no. 6, 2001, page 48 XP008017105 ISSN: 1439-7676 1ère formulation left-hand column -----	11-18

Form PCT/ISA/210 (continuation of second sheet) (July 1992)

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

Information on patent family members

International Application No
PCT/FR 02/00488

Patent document cited in search report	Publication date	Patent family member(s)	Publication date
JP 05058871 A	09-03-1993	JP 3219792 B2	15-10-2001

Form PCT/ISA/210 (patent family annex) (July 1992)

RAPPORT DE RECHERCHE INTERNATIONALE

Demande internationale No
PCT/FR 02/00488

A. CLASSEMENT DE L'OBJET DE LA DEMANDE
CIB 7 C12P21/00 A61K7/48 //(C12P21/00,C12R1:01)

Selon la classification internationale des brevets (CIB) ou à la fois selon la classification nationale et la CIB

B. DOMAINES SUR LESQUELS LA RECHERCHE A PORTE

Documentation minimale consultée (système de classification suivi des symboles de classement)
CIB 7 C12P

Documentation consultée autre que la documentation minimale dans la mesure où ces documents relèvent des domaines sur lesquels a porté la recherche

Base de données électronique consultée au cours de la recherche internationale (nom de la base de données, et si réalisable, termes de recherche utilisés)
EPO-Internal, MEDLINE, EMBASE, WPI Data

C. DOCUMENTS CONSIDERES COMME PERTINENTS

Catégorie *	Identification des documents cités, avec, le cas échéant, l'indication des passages pertinents	no. des revendications visées
X	PANTAZAKI A A ET AL: "Hyperalkaline and thermostable phosphatase in Thermus thermophilus." APPLIED BIOCHEMISTRY AND BIOTECHNOLOGY, vol. 75, no. 2-3, novembre 1998 (1998-11), pages 249-259, XP001031348 ISSN: 0273-2289 le document en entier	1,4,6,8
A	MARTEINSSON VIGGO THOR ET AL: "Isolation and characterization of Thermus thermophilus Gy1211 from a deep-sea hydrothermal vent." EXTREMOPHILES, vol. 3, no. 4, novembre 1999 (1999-11), pages 247-251, XP001031285 ISSN: 1431-0651 le document en entier	1-5

-/--

[X] Voir la suite du cadre C pour la fin de la liste des documents [ ] Les documents de familles de brevets sont indiqués en annexe

* Catégories spéciales de documents cités:

"A" document définissant l'état général de la technique, non considéré comme particulièrement pertinent

"E" document antérieur, mais publié à la date de dépôt international ou après cette date

"L" document pouvant jeter un doute sur une revendication de priorité ou cité pour déterminer la date de publication d'une autre citation ou pour une raison spéciale (telle qu'indiquée)

"O" document se référant à une divulgation orale, à un usage, à une exposition ou tous autres moyens

"P" document publié avant la date de dépôt international, mais postérieurement à la date de priorité revendiquée

"T" document ultérieur publié après la date de dépôt international ou la date de priorité et n'appartenenant pas à l'état de la technique pertinent, mais cité pour comprendre le principe ou la théorie constituant la base de l'invention

"X" document particulièrement pertinent; l'invention revendiquée ne peut être considérée comme nouvelle ou comme impliquant une activité inventive par rapport au document considéré isolément

"Y" document particulièrement pertinent; l'invention revendiquée ne peut être considérée comme impliquant une activité inventive lorsque le document est associé à un ou plusieurs autres documents de même nature, cette combinaison étant évidente pour une personne du métier

"&" document qui fait partie de la même famille de brevets

Date à laquelle la recherche internationale a été effectivement achevée	Date d'expédition du présent rapport de recherche internationale
20 mai 2003	28/05/2003

Nom et adresse postale de l'administration chargée de la recherche internationale	Fonctionnaire autorisé
Office Européen des Brevets, P.B. 5818 Patentlaan 2 NL - 2280 HV Rijswijk Tel. (+31-70) 340-2040, Tx. 31 651 epo nl, Fax: (+31-70) 340-3016	Andres, S

Formulaire PCT/ISA/210 (deuxième feuille) (juillet 1992)

RAPPORT DE RECHERCHE INTERNATIONALE

Demande internationale No
PCT/FR 02/00488

C.(suite) DOCUMENTS CONSIDERES COMME PERTINENTS

Catégorie *	Identification des documents cités, avec,le cas échéant, l'indicationdes passeges pertinents	no. des revendications visées
A	PATENT ABSTRACTS OF JAPAN vol. 017, no. 367 (C-1082), 12 juillet 1993 (1993-07-12) & JP 05 058871 A (SANSHO SEIYAKU CO LTD), 9 mars 1993 (1993-03-09) abrégé	8-18
X	YANG S ET AL: "PURIFICATION AND CHARACTERIZATION OF ALPHA GLUCOSIDASE FROM AN EXTREME THERMOPHILE THERMUS-THERMOPHILUS HB 8" ACTA MICROBIOLOGICA SINICA, vol. 32, no. 1, 1992, pages 23-29, XP001031324 ISSN: 0001-6209 Abrégé en anglais; page 29	1,8,10
X	YANG S ET AL: "STUDIES ON THE THERMOSTABLE L LACTATE DEHYDROGENASE FROM THERMOPHILIC BACTERIA" ACTA MICROBIOLOGICA SINICA, vol. 31, no. 6, 1991, pages 438-442, XP001031322 ISSN: 0001-6209 Abrégé en anglais; page 442	1,5,8
P,X	EISVOGEL M.: "Beauty from the ocean depths : extreme actives from an extreme environment" COSSMA, (2001) 2/6 (34-35)., XP001031366 le document en entier	1-18
P,X	"Anti-ageing" COSSMA, vol. 2, no. 6, 2001, page 48 XP008017105 ISSN: 1439-7676 1ère formulation colonne de gauche	11-18

Formulaire PCT/ISA/210 (suite de la deuxième feuille) (juillet 1992)

RAPPORT DE RECHERCHE INTERNATIONALE

Renseignements relatifs à membres de familles de brevets

Demande internationale No
PCT/FR 02/00488

Document brevet cité au rapport de recherche	Date de publication	Membre(s) de la famille de brevet(s)	Date de publication
JP 05058871 A	09-03-1993	JP 3219792 B2	15-10-2001

Formulaire PCT/ISA/210 (annexe familles de brevets) (juillet 1992)

フロントページの続き

(51)Int.Cl.[7]	FI		テーマコード（参考）
Ａ６１Ｋ 7/42	Ａ６１Ｋ 7/00	Ｐ	
Ａ６１Ｋ 7/48	Ａ６１Ｋ 7/00	Ｓ	
Ａ６１Ｋ 7/50	Ａ６１Ｋ 7/00	Ｔ	
Ａ６１Ｋ 9/08	Ａ６１Ｋ 7/075		
Ａ６１Ｋ 9/107	Ａ６１Ｋ 7/11		
Ａ６１Ｋ 9/127	Ａ６１Ｋ 7/155		
Ａ６１Ｋ 9/14	Ａ６１Ｋ 7/42		
Ａ６１Ｋ 9/48	Ａ６１Ｋ 7/48		
Ａ６１Ｋ 9/50	Ａ６１Ｋ 7/50		
Ａ６１Ｋ 9/51	Ａ６１Ｋ 9/08		
Ａ６１Ｋ 38/00	Ａ６１Ｋ 9/107		
Ａ６１Ｐ 17/16	Ａ６１Ｋ 9/127		
Ａ６１Ｐ 39/06	Ａ６１Ｋ 9/14		
Ｃ１２Ｐ 21/00	Ａ６１Ｋ 9/48		
	Ａ６１Ｋ 9/50		
	Ａ６１Ｋ 9/51		
	Ａ６１Ｐ 17/16		
	Ａ６１Ｐ 39/06		
	Ｃ１２Ｐ 21/00	Ａ	
	Ｃ１２Ｐ 21/00	Ｂ	
	Ａ６１Ｋ 37/02		

(81)指定国 AP(GH,GM,KE,LS,MW,MZ,SD,SL,SZ,TZ,UG,ZM,ZW),EA(AM,AZ,BY,KG,KZ,MD,RU,TJ,TM),EP(AT,BE,CH,CY,DE,DK,ES,FI,FR,GB,GR,IE,IT,LU,MC,NL,PT,SE,TR),OA(BF,BJ,CF,CG,CI,CM,GA,GN,GQ,GW,ML,MR,NE,SN,TD,TG),AE,AG,AL,AM,AT,AU,AZ,BA,BB,BG,BR,BY,BZ,CA,CH,CN,CO,CR,CU,CZ,DE,DK,DM,DZ,EC,EE,ES,FI,GB,GD,GE,GH,GM,HR,HU,ID,IL,IN,IS,JP,KE,KG,KP,KR,KZ,LC,LK,LR,LS,LT,LU,LV,MA,MD,MG,MK,MN,MW,MX,MZ,NO,NZ,OM,PH,PL,PT,RO,RU,SD,SE,SG,SI,SK,SL,TJ,TM,TN,TR,TT,TZ,UA,UG,US,UZ,VN,YU,ZA,ZM,ZW

Ｆターム(参考) 4C076 AA11 AA17 AA24 AA29 AA53 AA61 AA65 BB31 CC18 DD27A DD28A EE01A
4C083 AA081 AB431 AB441 AC071 AC121 AC181 AC441 AC541 AD011 AD091 AD161 AD41 AD411 AD511 CC02 CC03 CC04 CC05 CC18 CC19 DD08 DD11 DD14 DD17 DD23 DD30 DD32 DD33 DD45 EE12 EE17
4C084 AA01 CA04 DC50 MA13 MA17 MA22 MA24 MA28 MA37 MA38 MA43 MA63 NA14 ZA89
4H045 AA10 AA20 AA30 CA11 EA15 FA73 GA01