

(19) 日本国特許庁(JP)

(12) 特 許 公 報(B2)

(11) 特許番号

特許第6440637号
(P6440637)

(45) 発行日 平成30年12月19日(2018.12.19)

(24) 登録日 平成30年11月30日(2018.11.30)

(51) Int.Cl.		F I
A 6 1 K 38/08	(2006.01)	A 6 1 K 38/08
A 6 1 K 31/728	(2006.01)	A 6 1 K 31/728
A 6 1 K 47/36	(2006.01)	A 6 1 K 47/36
A 6 1 K 45/00	(2006.01)	A 6 1 K 45/00
A 6 1 K 47/54	(2017.01)	A 6 1 K 47/54

請求項の数 15 (全 15 頁) 最終頁に続く

(21) 出願番号 特願2015-559537 (P2015-559537)
 (86) (22) 出願日 平成26年2月24日(2014.2.24)
 (65) 公表番号 特表2016-510017 (P2016-510017A)
 (43) 公表日 平成28年4月4日(2016.4.4)
 (86) 国際出願番号 PCT/FR2014/050383
 (87) 国際公開番号 W02014/131974
 (87) 国際公開日 平成26年9月4日(2014.9.4)
 審査請求日 平成28年12月9日(2016.12.9)
 (31) 優先権主張番号 1351766
 (32) 優先日 平成25年2月28日(2013.2.28)
 (33) 優先権主張国 フランス (FR)

(73) 特許権者 515234635
 ラボラトワール テア エスアーエス
 フランス国、63100 クレルモン-フ
 ェラン、ジーイー デュ プレゼ、リュ
 プレリオ 12
 (74) 代理人 110001416
 特許業務法人 信栄特許事務所
 (72) 発明者 アラール, ジャン-クロード
 フランス国、エフ-62520 ル トゥ
 ケ、アレ デ マロニエ
 (72) 発明者 ルフェーヴル, ジャン-マリ
 フランス国、エフ-80000 アミアン
 、リュ デ 3 カイエー、30

最終頁に続く

(54) 【発明の名称】 局所性抗菌皮膚用組成物

(57) 【特許請求の範囲】

【請求項1】

人間医学および獣医学において使用するための眼科適用の局所性抗菌皮膚用組成物であって、脂質に結合している少なくとも1つのカチオン性抗菌ペプチド、および100kDaと800kDaとの間の分子量を備えるヒアルロン酸またはそれらの塩を組み合わせて含み、当該抗菌ペプチドがジスルフィド架橋を含みパルミチン酸に結合しているヘキサペプチドである、組成物。

【請求項2】

ヒアルロン酸が200kDaと600kDaとの間の分子量を有することを特徴とする、請求項1に記載の皮膚用組成物。

【請求項3】

ヒアルロン酸塩が、アルカリ金属塩およびアルカリ土類金属塩から選択されることを特徴とする、請求項1又は2に記載の組成物。

【請求項4】

ヒアルロン酸塩が、ヒアルロン酸ナトリウム、ヒアルロン酸カリウム、ヒアルロン酸カルシウム、またはヒアルロン酸マグネシウムであることを特徴とする、請求項3に記載の組成物。

【請求項5】

抗菌ペプチドが共有結合を介して脂質に結合していることを特徴とする、請求項1に記載の組成物。

【請求項 6】

キチンまたはキトサンをまた含むことを特徴とする、請求項 1 ~ 5 のいずれか 1 項に記載の組成物。

【請求項 7】

組成物の総重量に対して、0.005重量%と2重量%との間のヒアルロン酸、および0.001重量%と1重量%との間のカチオン性抗菌ペプチドを含むことを特徴とする、請求項 1 ~ 6 のいずれか 1 項に記載の組成物。

【請求項 8】

外用局所適用のための形態にあることを特徴とする、請求項 1 ~ 7 のいずれか 1 項に記載の組成物。

10

【請求項 9】

癒痕形成剤、抗炎症剤、抗感染剤、およびビタミン A またはビタミン E のようなビタミンから選択される 1 つ以上の二次活性剤をまた含むことを特徴とする、請求項 1 ~ 8 のいずれか 1 項に記載の組成物。

【請求項 10】

多糖による抗炎症剤をまた含むことを特徴とする、請求項 1 ~ 9 のいずれか 1 項に記載の組成物。

【請求項 11】

局所性抗菌皮膚用組成物が、眼瞼炎、マイボーム腺炎、または結膜炎の処置のためであることを特徴とする、請求項 1 ~ 10 のいずれか 1 項に記載の組成物。

20

【請求項 12】

抗菌ペプチドが両親媒性であることを特徴とする、請求項 1 ~ 11 のいずれか 1 項に記載の組成物。

【請求項 13】

ヒアルロン酸が加水分解ヒアルロン酸であることを特徴とする、請求項 1 ~ 12 のいずれか 1 項に記載の組成物。

【請求項 14】

人間医学および獣医学において使用するための眼科適用の局所性抗菌皮膚用組成物であって、共有結合を介して脂質に結合している少なくとも 1 つのカチオン性抗菌ペプチド、および 100 kDa と 800 kDa との間の分子量を備えるヒアルロン酸またはそれらの塩を組み合わせて含み、当該抗菌ペプチドが、両親媒性であり、ジスルフィド架橋を含みパルミチン酸に結合しているヘキサペプチドである、組成物。

30

【請求項 15】

抗菌ペプチドがパルミトイルヘキサペプチド - 26 を含むことを特徴とする、請求項 1 ~ 14 のいずれか 1 項に記載の組成物。

【発明の詳細な説明】

【技術分野】

【0001】

本発明は、治療において有用であり、および抗菌特性を有する新規な組成物に、ならびにより詳細には、細菌感染の処置のために、人間医学および獣医学において、特に皮膚科学および眼科学において有用である、ヒアルロン酸およびカチオン性抗菌ペプチドに基づく新規な組成物に関する。

40

【背景技術】

【0002】

皮膚は、生体解剖学的領域、および身体とその環境との間の受け渡し区域の両方であり、その有効性は、良好な恒常性の均衡の維持に影響を及ぼす。皮膚はそれ自身、表層（表皮）から始まり、真皮、および皮下組織の最深層に至るまで、いくつかの集積された層を含む 1 つの器官であり、これらの各層のそれぞれが機能を果たし、全体がその環境に反応および適合することを許容する。

【0003】

50

表皮は、主にケラチン生成細胞、メラニン細胞、およびランゲルハンス細胞からなり、身体の異なる部分によって変化する厚みを有し、そして身体をその外部環境に対して防御するための皮膚の外層を構成する。真皮は最も厚い層であり、神経線維および血管が張り廻らされ、そして主にコラーゲン、エラスチン、プロテオグリカン、およびグリコサミノグリカンからなり、主に真皮線維芽細胞によって合成される。コラーゲン線維は、皮膚に機械的強度および組織を与え、エラスチンはその弾力性を担い、そしてグリコサミノグリカンおよびプロテオグリカンは、皮膚の構造および湿潤化において重要な役割を果たす。皮膚の最深層は、皮下組織を形成し、脂質を産生し、そして筋肉、骨、および内蔵を衝撃から防御する脂肪層を形成する脂肪細胞を含む。

【 0 0 0 4 】

湿潤性の増加または種々の原因の炎症もしくは皮膚創傷の存在のような表皮の構造における変化、または皮膚病の発症は、病原性微生物による皮膚の定着および感染を促進する。結果として生じる微生物増殖は、瘢痕形成状態の改変を、それを遅延または阻止することにより、および初期創傷からの感染の拡散を促進することにより影響する。

【 0 0 0 5 】

従って、皮膚は病原性微生物による絶え間ない攻撃にさらされるが、表皮の角化層は、そのpH、比較的低い含水量、および殺菌作用を有する抗菌ペプチドの存在のために、これらの病原性微生物に対する最前線の抗菌防御物として作用する。

【 0 0 0 6 】

細菌コロニーの大部分は、生物膜（微生物生存のための膜構造）になり、抗菌防御プロセスが効率的に作用することを妨げる炎症を生じさせることにより、増殖因子および瘢痕形成因子を迂回する。非常に広範な、および場合によって過剰な、抗生物質の使用のために、細菌は抗生物質に耐性を生じ、このことは抗生物質の抗菌効果を制限し、さらには無効にする。生物膜細菌は、大部分の抗生物質および防腐剤に耐性であり、そしてそれゆえ、可能な限り皮膚の恒常性を配慮しながら、病原性微生物と効果的に闘い得、そしてヒトおよびその環境に有害である耐性株の発生を促進しないことが可能な、組成物を開発することが必要である。

【 0 0 0 7 】

カチオン性抗菌特性は、カチオン性ペプチドと、グラム陰性細菌の膜の外部構造に見出される負に荷電したリン脂質との間の静電的結合により、細菌の膜に対して効果を有し、一方グラム陽性細菌の場合において、結合は、そのペプチドと、細菌の原形質膜の周囲のペプチドグリカンの構成成分との間で行われることが知られる。抗菌ペプチドのカチオン性は、細菌のアニオン性膜に対するそれらの親和性を説明し、そして結合は、荷電の大きさに比例して容易である。結合後、ペプチドは膜透過性を改変して孔を形成し、これは浸透圧溶解、次いで細菌の死をもたらす。

【 0 0 0 8 】

従って、抗菌ペプチド、特にカチオン性ペプチドは、細菌の感染および炎症に対して皮膚を防御することにより、皮膚に対して作用する。

【 0 0 0 9 】

デフェンシンは、非特異的な、または先天性の免疫に関与する、天然の抗菌ペプチドのファミリーを構成する。それらは、小さなカチオン性抗菌ペプチドであり、36~42個のアミノ酸鎖から成り、分子内ジスルフィド架橋を含む。ヒトにおいて、それらは広範囲の非常に効果的な抗菌活性および抗真菌活性を有し、そして2つのグループ、主に、
- デフェンシンおよび
- デフェンシンに分類される。後者は、皮膚上皮、涙管、および類粘膜を含む全ての上皮に、ならびに多数の器官に存在し、そして感染に対する応答において重要な役割を果たす。
- デフェンシンは、特異的受容体、Toll様受容体(TLR)の活性化後に放出される。

【 0 0 1 0 】

研究は、共生細菌叢および病原菌叢が異なる
- デフェンシン誘導経路を有することを示した。従って、皮膚は、細菌を識別し、そして闘うための分子手段を有する。

10

20

30

40

50

【 0 0 1 1 】

「Toll様受容体」(TLR)は、病原性微生物の認識および先天性免疫の活性化において基本的な役割を有する、TLR遺伝子のファミリーによって発現される膜受容体である。それらは効果的な免疫に必要なサイトカインの産生を調節する。TLR4およびTLR2は、グラム陰性細菌に存在するリポ多糖(LPS)の認識の間、活性である。LPSは、炎症誘発性細菌内毒素である。より詳細には、TLR2はグラム陽性細菌のペプチドグリカン(ペプチド)を認識し、およびTLR4はグラム陰性細菌のLPSを認識する。皮膚において、タンパク質TLR2およびTLR4は、ケラチン生成細胞に、ならびにTLR2は、皮脂腺に発現される。

【 0 0 1 2 】

デフェンシンは、誘導因子(すなわち、生物の防御機構を誘発し得る分子)の独特な役割を果たす。従って、皮膚中に天然に存在し、それらは刺激されて、弱められた皮膚の防御を強化する。しばしば不利である環境において、健全なおよび健康な皮膚の質および状態を維持するために、生物学的機能を助けることは重要である。誘導因子の概念は、外部攻撃にさらされる場合、より良好に応答するために皮膚に存在する生物学的経路を誘発することを包含する。

【 0 0 1 3 】

ヒト - デフェンシン(HBD-3)の抗菌特性は、特許文献1に記載される。

【 0 0 1 4 】

ヒアルロン酸は、グルコシド結合を介して連結されるD-グルクロン酸およびN-アセチルグルコサミン単位を含む天然の二糖ベースのポリマーである。その特性は非常に可変性であり、その分子量に依存する。1000kDaよりも大きな高分子量を伴うヒアルロン酸は、それらが構成する親水性炭水化物網により、皮膚の湿潤化を促進するために本質的に使用される。約50kDa未満の低分子量のヒアルロン酸は、角質層境界を通過して、真皮においてヒアルロン酸の新規合成を担うCD44受容体を刺激し得る。

【 0 0 1 5 】

ヒアルロン酸は、コラーゲンのように、真皮の細胞外マトリクスの主な構成要素の1つであり、そしてこれは細胞増殖においておよび湿潤化の維持において、重要な役割を果たす。皮膚老化の過程において、真皮におけるその濃度の減少が観察される。ヒアルロン酸は、化粧品および皮膚科学的組成物において、一般にヒアルロン酸ナトリウムの形態で、特に、湿潤化を促進するために、ならびに皮膚の癒傷形成および天然の防御を刺激するために、しばしば使用されるグリコサミノグリカンである。これはまた、しわを充填するために美容外科において、関節症を闘うための医学的処置において、および眼科学において使用される。酵素分解に対して良好な耐性を示し、および化粧品組成物において特に使用され得る、種々の架橋されたまたは架橋されないヒアルロン酸誘導体は、例えば、特許文献2に記載されている。ヒアルロン酸の種々の形態は周知であり、そして市販されている。

【 0 0 1 6 】

ヒアルロン酸または誘導体と、特許文献3におけるように、コンドロイチン硫酸とを、または、特許文献4におけるように、レチノイドおよびオリゴ糖とを、組み合わせることが提案されている。ヒアルロン酸の重金属塩はまた、特許文献5に記載されるように抗菌組成物において提案されている。特許文献6は、低分子量、すなわち50~200kDaのヒアルロン酸を使用し、ペプチドまたはタンパク質、例えば成長ホルモンを取り込むマトリクスを形成する薬学的組成物を記載する。特許文献7は、好ましくは15~40個のアミノ酸を含有するペプチドに関し、これは一方でヒアルロン酸に、および他方でヒアルロン酸を含有する細菌カプセルに結合し得、そして脂質の存在下で使用されて、リポソームを形成し得る。ラクトフェリンおよびヒアルロン酸に由来するペプチドを含む薬学的組成物は、特許文献8に記載される。

【 先行技術文献 】

【 特許文献 】

10

20

30

40

50

【 0 0 1 7 】

【特許文献1】国際公開第01/92309号パンフレット(WO 01/92309)

【特許文献2】国際公開第2011/080450号パンフレット(WO 2011/080450)

【特許文献3】国際公開第2009/073437号パンフレット(WO 2009/073437)

【特許文献4】仏国特許発明第2894827号明細書(FR 2894827)

【特許文献5】国際公開第87/05517号パンフレット(WO 87/05517)

【特許文献6】米国特許第6180601号明細書(US 6180601)

【特許文献7】国際公開第2006/130974号パンフレット(WO 2006/130974)

【特許文献8】国際公開第2010/081800号パンフレット(WO 2010/081800)

【発明の概要】

【発明が解決しようとする課題】

【 0 0 1 8 】

出願人によって行われた研究は、カチオン性抗菌ペプチドと、中間分子量のヒアルロン酸とを組み合わせることにより、局所性消毒剤および抗菌剤の抗菌活性に等価な、有効な抗菌活性を得ることが可能であること、ならびにカチオン性ペプチドの抗菌活性は、
- デフェンシンの産生を刺激するヒアルロン酸との組み合わせによって増強されることを実証した。用語「抗菌活性」は、抗菌活性および/または抗ウイルス活性および/または抗真菌活性を意味する。

【 0 0 1 9 】

本発明の目的は、化学的な消毒剤または抗菌剤に頼ることなく、皮膚の細菌感染を効率的に処置すること、および皮膚の自然防御を増強することを可能にする、抗菌特性を有する新規な局所性組成物を提案することである。

【課題を解決するための手段】

【 0 0 2 0 】

従って、本発明の主題は、少なくとも1つのカチオン性抗菌ペプチドと、中間分子量のヒアルロン酸またはそれらの塩とを合わせて含む、皮膚用組成物である。

【 0 0 2 1 】

本発明の主題はまた、脂質に結合された少なくとも1つのカチオン性抗菌ペプチド、および100kDaと800kDaとの間の分子量を備える、ヒアルロン酸またはそれら塩を組み合わせる、局所性抗菌皮膚用組成物である。

【 0 0 2 2 】

最後に、本発明の主題は、皮膚、外皮、または粘膜の細菌感染の処置における使用のための、脂質に結合された少なくとも1つのカチオン性抗菌ペプチドと、中間分子量のヒアルロン酸またはそれらの塩とを、組み合わせる組成物である。

【 0 0 2 3 】

このような組成物は、その抗菌特性により、皮膚創傷を処置するためにヒト皮膚科学において有用である。

【 0 0 2 4 】

これはまた、皮膚科学および眼科学において、より詳細には、慢性急性創傷と関連される感染、毛囊炎、皮膚炎症性疾患の過剰感染、眼瞼炎、マイボーム腺炎、および結膜炎を処置するために有用である。

【 0 0 2 5 】

本発明によれば、カチオン性抗菌ペプチドは、好ましくは50個未満のアミノ酸、より好ましくは3個と30個との間のアミノ酸を含むペプチドであり、そしてグラム陽性細菌およびグラム陰性細菌に対して広範な抗菌スペクトルを有する。

【 0 0 2 6 】

例えば、らせん構造を伴う直鎖状ペプチド、1つ以上のジスルフィド架橋を含むペプチド、およびあるアミノ酸が豊富な直鎖状ペプチドから選択される、カチオン性抗菌ペプチドの使用がなされ得る。

【 0 0 2 7 】

50個未満の、および好ましくは30個未満のアミノ酸を含む本発明のカチオン性抗菌ペプチドが、例えば、マゲイニン、プロテグリン、インドリシジン、およびヒスタチンの誘導体から選択され得る。インドリシジンアナログであるオミガナンペンタヒドロクロリド、塩酸イセガナン（合成プロテグリン）、および酢酸ペキシガナン（マゲイニンアナログ）のような合成カチオン性ペプチドの使用がまたなされ得る。これらのペプチドは共有結合によって脂質と、および好ましくはパルミチン酸のような脂肪酸と結合される。より詳細には、この共有結合はリボソーム性ではない。オリゴペプチド-10（Grant Industries）またはShield Bact Peptide（Infinitec）（これはジスルフィド架橋を含みパルミチン酸に結合しているヘキサペプチドである）のような市販のペプチドの使用がまたなされ得る。

10

【 0 0 2 8 】

本発明の組成物の抗菌活性は、後述されるようにインビトロ研究およびエクスビボ研究を介して実証され、細菌エンドトキシンを中和してTo11様受容体に対する要求を最小化すること、-デフェンシンの作用を模倣して迅速な抗感染効果を提供すること、および炎症反応を調節することからなる3つの作用を実証した。

20

【 0 0 2 9 】

抗菌ペプチドは、好ましくは両親媒性であるべきである。この両親媒性の性質は、カチオン性ペプチドと、脂質、および特に、直鎖状または分岐状の、飽和または不飽和脂肪酸、好ましくは6~22個の炭素原子を含む、例えば、オレイン酸、リノール酸、ラウリン酸、サピエン酸、ステアリン酸、またはパルミチン酸とを、結合することにより増強される。ペプチドとの脂肪酸の結合は、好ましくは、ペプチドの少なくとも1つの構成アミノ酸との共有結合を介して行われる。共有結合は、例えば、ペプチドのN末端におけるアミド結合であり得る。行われた研究は、このように増強された両親媒性の性質が、細菌の表面へのカチオン性ペプチドの結合を促進し、そして結果として；

- 細菌膜の外層の構造破壊
 - 膜界面での、ミセルの形態における脂肪酸の集積
 - イオンチャンネルの作製によるこの二重膜の穿孔
- を有することを示す。

30

【 0 0 3 0 】

この三つの作用の結果は、その膜の不浸透性の喪失と、および細胞質内のアニオン性の標的に対するカチオン性ペプチドの作用と関連される溶菌である。

【 0 0 3 1 】

さらに、本発明のカチオン性抗菌ペプチドは、以下：

- グラム陰性細菌およびグラム陽性細菌、ならびに真菌、ウイルス、および寄生虫の感染を防御する広範囲の活性、
 - 細菌における、脂肪酸により攻撃された複数の標的と関連される高速の作用、
 - 従来抗生物質を用いて観察される耐性と比較した場合、耐性の出現の非常に低い危険性、
- を示す。

40

【 0 0 3 2 】

行われた研究はまた、本発明において使用された抗菌カチオン性ペプチドが、タイプに関係なく、細菌（グラム陰性細菌またはグラム陽性細菌）に依存して、それらが産生する細菌エンドトキシンに対する宿主細胞の応答を中和し得ることを示した。従って、これは、TLRの活性およびTNF- α の産生を制限することにより、先天性の免疫応答を調節し、これは炎症カスケードおよび生じるサイトカインストーム（IL-6、IL-1 β 、

50

IL - 1 a) を弱める。

【 0 0 3 3 】

これはまた、単球および多核好中球に対する走化性作用により、単球によるヒスタミンの放出により、ならびにプロテアーゼが組織破壊を制限しおよび組織修復を刺激することを阻害することにより、先天性免疫と関連した他の特性を有する。

【 0 0 3 4 】

行われた研究は、細菌攻撃の存在下でこの先天性免疫の防御機構が、好ましくはアミノ酸に連結されたカチオン性抗菌ペプチドと、中間分子量のヒアルロン酸とを組み合わせることによって最適化され得ることを示した。微生物に対する迅速な作用は、それらが分泌するエンドトキシンの中和化によって補足される。

10

【 0 0 3 5 】

結果として、炎症誘発性サイトカインの放出は減少され、そしてヒアルロン酸の内因性作用は次いで、Toll様受容体への促進された結合および - デフェンシンの増加された分泌により、十分に発現され得、従って、微生物に対する第2の防御手段を生み出す。並行して、真皮の防御効果を迅速に回復するために修復機構が刺激される。

【 0 0 3 6 】

本発明の記載によれば、用語「ヒアルロン酸」は、中間分子量の、すなわち、好ましくは、100と800kDaとの間の、およびより好ましくは200と600kDaとの間の、単独の形態にある、またはそれらのアルカリ金属塩またはアルカリ土類金属塩、例えば、ヒアルロン酸ナトリウム、ヒアルロン酸カリウム、ヒアルロン酸カルシウム、もしくはヒアルロン酸マグネシウムの形態にある、ヒアルロン酸を意味する。

20

【 0 0 3 7 】

本発明において使用され得るヒアルロン酸は、その意図される使用に適合される種々の形態で市販される。これは、ニワトリのトサカのような動物組織からの抽出により、細菌発酵により、またはあるいは植物物質、例えば小麦からバイオ技術プロセスを介して、大量に工業的に生産され得る。

【 0 0 3 8 】

例えば、200と600kDaとの間の分子量を備える加水分解ヒアルロン酸またはヒアルロン酸のナトリウム塩、例えば、300kDaに近い分子量を備えるPrimalHyal 300 (Soliance)、または450kDaの領域における分子量を備えるPrimalHyal 450の商品名のもとに市販される製品の使用がなされ得る。

30

【 0 0 3 9 】

本発明の組成物は、効果的な量の上述の各活性剤、例えば、組成物の総重量に対して、0.05重量%と2重量%との間のヒアルロン酸、および0.001重量%と1重量%との間のカチオン性抗菌ペプチドを含み得る。

【 0 0 4 0 】

本発明の組成物はまた、ヒアルロン酸と抗菌ペプチドとの組み合わせの活性を有利に増強または補足する1つ以上のさらなる活性剤を含み得、そしてこれらは混合可能であり、すなわち、互いに反応する傾向がなく、ならびにそのそれぞれの効果を遮蔽および制限する傾向がない。

40

【 0 0 4 1 】

例えば、それらはキトサン、またはキチンを含み得、これは、ヒアルロン酸と組み合わせることにより、ケラチノサイト増殖因子の内因性の産生を促進し、線維芽細胞活性を誘導し、コラーゲン産生を増加し、そして線維芽細胞および筋線維芽細胞の分化を加速する防御架橋網効果を有する。それらはまた、スフィンゴイド塩基、例えばスフィンガニン (sphingamine) およびフィトスフィンゴシンを含み得、これは抗菌効果を最適化し、そしてペプチドの抗炎症効果を増強する。

【 0 0 4 2 】

種々の二次活性剤が、組成物に有利に添加され得、そして例えば、瘢痕形成剤、抗炎症剤、抗感染剤、およびビタミンAまたはEのようなビタミンから選択され得る。瘢痕形成

50

剤は、例えば、亜鉛塩またはオリゴガラクトマンナンが豊富なイナゴマメ抽出物であり得る。抗炎症剤は、細胞接着を阻害し、そして炎症反応を制限する Rhamnosoft (登録商標) もしくは Teflose (登録商標) (Solabia) のような多糖、またはロイコトリエン合成の酵素的阻害を介して作用する Boswellia Serrata の抽出物 (Soothex (登録商標)) であり得る。さらなる抗感染剤は、シラノールおよびメチルカプロイルチロシナート (Defensamide (登録商標)) のような抗菌ペプチド形成活性化因子から選択され得る。

【0043】

本発明の組成物は、任意のガレナス製剤の形態にあり得、これは局所適用について、特に外用局所適用について共通である。それらは、例えば、水溶液または水性アルコール溶液、ミセル溶液、噴霧用溶液、洗髪液、分散液、美容液、ふき取り液、制御された放出を伴うパッチ、メッシュ、または包帯、ゲル (水性、無水性、親油性)、オレオゲル (oleogel) (脂質ゲル)、軟膏、懸濁液、イオン性または非イオン性のベシクル分散液、および液体または半液体 (例えば、乳液)、固体または半固体の乳濁液の形態にあり得る。乳濁液は、水中油 (O/W) または油中水 (W/O) のタイプ、例えば、ゲルまたはクリームであり得る。

10

【0044】

本発明の組成物の調製のために使用され得る賦形剤および支持体は、皮膚科学的使用のために調製物中で一般に使用されるものであり得、そして投与の選択された形態に応じて選択される。言及され得る例としては、乳化剤、増粘剤、ゲル化剤、軟化剤、保存剤、安定剤、懸濁剤、ならびにまた洗浄塩基および香料が挙げられる。

20

【0045】

乳化剤は、例えば、高分子量のカルボキシビニルポリマー、Polysorbate 20 (登録商標)、Tween 60 (登録商標) のようなポリソルベート、ソルビタンエステル、およびより詳細にはステアリン酸ソルビタン、パルミチン酸ソルビタン、またはラウリン酸ソルビタン、例えば、Arlacel (登録商標) から選択され得る。また使用され得る乳化剤としては、ステアリン酸またはパルミチン酸の誘導体、例えば、ステアリン酸ポリエチレングリコール、ステアリン酸グリセリル、PEG 100 stearate (登録商標) (例えば Arlacel 165 (登録商標))、ステアレス (steareth) もしくはセテアレス、ステアリルアルコール、カプリリルアルコール、もしくはセテアリルアルコールのような脂肪アルコール、例えば、Montanov 68 (登録商標)、または乳化シリコンが挙げられる。

30

【0046】

ゲル化剤および増粘剤は、その流動性を改善するために組成物中に取り込まれる。それらは、カーボポール (Carbopol) 型のポリアクリルアミド、アクリレート/アクリル酸コポリマー (例えば、Aculyn (登録商標))、架橋化アクリレート (例えば、Carbopol Ultrez (登録商標))、セルロース誘導体 (例えば、ヒドロキシプロピルセルロース)、または天然ゴム (例えば、キサンタンゴムおよびトラガントゴム) から選択され得る。

【0047】

組成物中で使用され得る湿潤剤および軟化剤は、例えば、プロピレングリコール、グリセロール、ブチレングリコールおよびシアバター、ならびにまた脂肪アルコールから選択され得る。適切な懸濁剤は、例えば、ベントナイトまたはスメクタイトのような粘土である。

40

【0048】

真皮への浸透を促進するコスモペリンのような薬剤がまた、有利に添加され得る。

【0049】

本発明の組成物は、投与の選択形態、ヒアルロン酸またはそれらの塩の所望の量に応じて、通常の技術を介して、抗菌ペプチド、ならびに必要に応じてキチンまたはキトサン、ならびに支持体および賦形剤とともに生理学的に受容される媒体中で混合され、調製され

50

る。

【0050】

本発明の目的のために、用語「生理学的に受容される」は、人間医学において皮膚用組成物に一般に使用されるタイプの支持体および腑形剤を意味し、これは使用される活性成分に関してニュートラルであり、毒性の影響をなんら有さず、そして皮膚に対して有害な副作用をなんら惹起しない。

【0051】

例えば、クリームの場合において、プロセスは、水中油乳濁液を得るために、または、逆に、油中水乳濁液を調製するために、水相中に脂肪相を分散することにより行われ得、活性成分は、どちらかの相に存在する。

10

【0052】

本発明の組成物は、例えばクリームの形態で、好ましくは、1日当たり2～3回、処置を必要とする皮膚の領域に、症状の重篤度に依存して数日から4週間にわたり得る期間、塗布される。

【発明を実施するための形態】

【0053】

以下の実施例は、本発明を、その範囲を制限することなくより詳細に説明する。以下の全て組成の例において、言及しない限り、割合は重量基準で表わされる。

【実施例1】

【0054】

水性ゲルを、以下に示される順に室温にて成分を混合することにより調製する。

20

【0055】

脱塩水	78.60
Carbopol Ultrez 20	0.80
水酸化ナトリウム(32%水溶液)	0.50
グリセロール	2.00
Shield Bact Peptide(登録商標)(0.1%溶液)	5.00
脱塩水	10.00
ヒアルロン酸(PrimalHyal 450(登録商標))	0.10
脱塩水	2.00
ペンチレングリコール	1.00

30

【0056】

このように構成された水性ゲルは、処置される症状の重篤度に依存して、典型的に、連続した数日間、1日当たり2～3回、使用され得る。

【実施例2】

【0057】

以下の組成を有するローションを、標準的な技術を介して調製する。

【0058】

脱塩水	82.65
Carbopol Ultrez 20	0.45
水酸化ナトリウム(32%水溶液)	0.30
脱塩水	7.00
ヒアルロン酸(PrimalHyal 450(登録商標))	0.10
グリセロール	2.00
Teflose(登録商標)(Solabia)	2.00
PEG-7 オリーブオイルエステル	2.00
Poly sorbate 20	0.50
Shield Bact Peptide(登録商標)(0.1%溶液)	3.00

40

【0059】

この溶液は、眼瞼炎のような眼の症状の処置のために、数日間、1日当たり1～2回、

50

使用され得る。

【実施例 3】

【0060】

抗菌クリームを、以下に示す成分を含む相を連続的に添加することにより、通常の技術を介して調製し、A相およびB相を加温（65～70）しながら混合し、次いで50にてC相を添加し、注意深く混合し、続いてD相を添加する。

【0061】

A相

非イオン性乳化剤 (Montanov 68)	4.00	
ミリスチルアルコール	2.00	10
ステアリルアルコール	0.50	
Cetiol RLF (登録商標)	3.00	
ステアリン酸グリセリル	3.00	
オレイン酸ヒマワリ油	4.00	

【0062】

B相

脱塩水	67.90	
Carbopol Ultrez 21 (登録商標)	0.45	
プロパンジオール	2.00	

【0063】

C相		20
グリセロール	2.00	
Shield Bact Peptide (登録商標) (0.1%溶液)	6.00	

【0064】

D相		
水酸化ナトリウム (32% 水溶液)	0.05	
脱塩水	5.00	
ヒアルロン酸 (Primal Hyal 300 (登録商標))	0.10	

【0065】

この組成物のpHを、32%水酸化ナトリウムの添加により、6.5に調製する。 30

【0066】

このクリームは、医師によって決定される期間、1日当たり1～2回、処置される皮膚の領域に塗布することにより使用され得、そして期間は、処置される症状の性質および重篤度に依存して、1～3週間にわたり得る。

【実施例 4】

【0067】

- デフェンシンの産生およびケラチン生成細胞増殖に対するヒアルロン酸の選択の効果を以下のように測定した。

【0068】

【表 1】

表 1

	β -デフェンシン	ケラチン生成細胞増殖
hmw HA	0	NS
mmw HA 1	++++	S
lmw HA 2	+	NS
vlmw HA 3	(+)	NS

10

【0069】

上述の表中、「+」符号は、非常に弱い(+)から非常に強い(++++)までの効力を示す。NSは、「有意でない」ことを示す。

【0070】

使用したヒアルロン酸(HA)は、高分子量(hmw)、本発明の中間分子量(mmw - 約450kDa)、低分子量(lmw)、または超低分子量(vlmw)である。

【0071】

- デフェンシンの産生:

コンフルエントなケラチン生成細胞培養物を、18時間、0.2%mmw HA、またはポジティブコントロール(大腸菌(*Escherichia coli*)由来のLPS 5 μ g/ml)で、または:

- ・一方は、高分子量ヒアルロン酸(hmw HA)
- ・他方は、低分子量ヒアルロン酸(20kDaのHAおよび10kDaのHA)で処理した。

20

【0072】

HBD2の放出を、ELISAキットを用いて上清において評価した。示した値は、結果の平均である。

【0073】

【表 2】

表 2

	コントロール	LPS	mmw HA	lmw HA	vlmw HA
pg/ml	11	43	105	20	18

30

【0074】

ケラチン生成細胞増殖:

D0において、創傷を、コンフルエントなケラチン生成細胞単層(HaCaT)上に作製する。次いで、細胞を、HAを含有しない(参照条件)または漸増する分子量(HA50、HA300、HA1000)のHAを含有する、2.5% FCS(胎児ウシ血清)中で、37にて処理する。

40

【0075】

創傷の2端間の幅を、D0およびD1にて、それぞれの処理について、同じ写真上で異なる3点にて測定する。各実験を5回独立して行う。平均を統計学的に処理する(分散の1因子分析、続いてDunnett検定(SigmaStat))。

【0076】

mmw HA(HA 300)のみが、ケラチン生成細胞増殖を介する皮膚修復プロセスを加速することを可能にする(HaCat)。

50

【0077】

細菌防御の刺激：

3つの溶液を調製する：

溶液A：0.10% mmw HA

溶液B：0.05% ヘキサペプチド

溶液C：0.05% ヘキサペプチド + 0.10% mmw HA

【0078】

使用するヘキサペプチドは、市販されるShield Bact Peptide（登録商標）である（Infinitec）。ヒアルロン酸（mmw HA）は、300kDaの平均分子量を有する。

10

【0079】

処理（溶液A、B、C、または媒体のみ）後のヒト皮膚生検由来のタンパク質を、5%酢酸およびプロテアーゼ阻害剤（0.02mM PMSF, 2ng/ml ペプスタチンおよび2ng/ml ロイペプチン）を含有する溶液中で、2時間、穏やかに攪拌して、抽出する。

【0080】

上清の可溶性タンパク質を減圧下で乾燥し、0.01%酢酸溶液中でホモジナイズする。

【0081】

10^4 細菌/mlのE. coli（ATCC 4157）を、リン酸緩衝液（pH 7.4）中の対数増殖培地に、100μlの最終容量でインキュベートする。

20

【0082】

このE. coli懸濁液と、30μgのタンパク質抽出物と、プロテアーゼ阻害剤を含有する10μlの0.01%酢酸溶液とを混合し（ネガティブコントロール）、混合液を120分間、37℃にてインキュベートする。

【0083】

インキュベーションの終了時に、10μlを採取し、そして1/10および1/100希釈物を、カゼイン-ダイズ液を含有するペトリ皿中に三連で播種し、そして37℃にて一晩、インキュベートする。

【0084】

ペトリ皿における播種および37℃にて一晩のインキュベーション後、CFU数を各サンプルについて測定する。

30

【0085】

以下の結果の表は、本発明の中間分子量のヒアルロン酸と、パルミチン酸と結合した抗菌ヘキサペプチドとの組み合わせ（溶液C）が、最も効果的であることを証明し、CFU形成の阻害パーセントは100%であることを示す。

【0086】

【表3】

表3

40

	コントロール	溶液A	溶液B	溶液C
阻害%	40	55	77	100

【実施例5】

【0087】

2つの臨床研究を、異なる品種のイヌに対して行い、および1つの臨床研究を、ヒト皮膚科学において、患者に対して行った。

【0088】

イヌに対する第1の研究：

50

両眼において感染性眼瞼結膜炎を示す3歳～10歳の異なる品種の5匹のイヌを、以下のように調製した溶液で処置した：

- 溶液A：本発明に従う、0.10%のmmw HAおよび0.03%のヘキサペプチドを含有するミセル溶液を右眼に滴下

- 溶液B：0.03%のヘキサペプチドを含有する溶液を、左眼に滴下。

【0089】

組成物のヒアルロン酸の平均分子量は450kDaであり、そしてヘキサペプチドは、Shield Bact Peptide (Infinitec)である。

【0090】

臨床的变化を、4、8、12、24、および48時間にて検査した。結果を以下の表に報告する。

10

【0091】

【表4】

表4

変化	イヌ	右眼	左眼
4時間	1	+	+
8時間	2	++	+(+)
12時間	3	+++	++
24時間	4	+++	++
48時間	5	++++	+++

20

【0092】

結果は、本発明に従う溶液Aで、感染の症状においてより迅速な改善を示し、これは、8時間目から表わされ、12および24時間にて裏付けされる。

【0093】

30

イヌに対する第2の研究：

症例1：数年間乾性角結膜炎を示し、およびシクロスポリンでの処理が首尾よくいかなかったエアデルテリア（10歳）。眼は乾燥し、過剰感染性結膜炎および瞼裂の減少を伴う。1日1回、8日間の、上述のローションAの滴下は、目覚ましい改善（澄明、開眼、疼痛の消失を伴う）をもたらす。

【0094】

症例2：通常の処置で改善を伴わず、長期間の知覚マヒ後に重篤な角膜潰瘍を示すマルチズピション（15歳）。眼は乾燥したままであり、潰瘍は深在し、そして疼痛は急性である。1日2回、8日間の、本発明に従うローションAの使用は、癒痕形成および疼痛の消失をもたらす。

40

【0095】

症例3：8mmの肉芽組織を伴う角膜腫瘍を示すウエストボクサー（7歳）。1日2回、8日間の、ローションAを使用することにより、治癒を得る。

【0096】

症例4：角膜潰瘍および疼痛を伴い、乾性角結膜炎を示すシーズバンス。3週間の従来処置は効果のないままである。1日2回、8日間の、本発明に従うローションAの使用は、痛みの実質的な低減をもたらし、潰瘍のいずれの顕著な変化も伴わない。シクロスポリンへの変更は、8日以内に潰瘍の臨床的改善をもたらす。

【0097】

症例5：眼球穿孔により悪化された重篤なコリーザを示す子猫。抗生物質治療は、任意

50

の改善を与えない。治療的眼瞼閉鎖の失敗。次いで、本発明に従うローション A を 1 日 3 回使用し、そして迅速な改善を得る。

【0098】

ヒトにおける研究：

アトピー性皮膚炎は、黄色ブドウ球菌 (*Staphylococcus aureus*) に対するある特定の感受性によって特徴づけられる。その役割は、湿疹突発の間に顕著であり、皮膚の表面上での増殖の制御は、症状を改善するために不可欠である。

【0099】

成人患者 4 人について、主な解剖学的折り畳み部分（腕の屈曲部、膝窩）に位置する過剰感染性湿疹突発を示す、18 歳～31 歳の、2 人の男性および 2 人の女性を 2 種類の液体乳濁液で処置した：

- 乳濁液 A ヘキサペプチドを単独で、0.05% にて含有し、右側に塗布；
- 乳濁液 B ヘキサペプチド (0.05%) および mmw HA (0.20%) を含有し、左側に塗布。

【0100】

ヒアルロン酸の平均分子量は 300 kDa である。ヘキサペプチドは、Shield Bact Peptide (Infinitec) である。

【0101】

掻痒、浸出、および過剰感染の基準を、変化値を規定するために、0～4 で記録した。

【0102】

【表 5】

表 5

症状	T0		T12		T24		T48		結果
	A	B	A	B	A	B	A	B	
掻痒	4	4	3	2	2	1	2	1	B>A
浸出	4	4	2	1	1	0	(1)	0	B>A
過剰感染	4	4	2	1	1	0	0	0	B>A

【0103】

これらの結果は、両方のクリームが効果的であるが、12 時間目から明らかであるように、クリーム B は、症状に対してより迅速な作用を有することを示す。

【0104】

過剰感染は、24 時間にて制御される。

【0105】

全体の改善は、本発明に従うクリーム B を用いてより顕著である。

10

20

30

フロントページの続き

(51)Int.Cl.		F I	
A 6 1 K	31/07 (2006.01)	A 6 1 K	31/07
A 6 1 K	31/355 (2006.01)	A 6 1 K	31/355
A 6 1 P	27/02 (2006.01)	A 6 1 P	27/02
A 6 1 P	31/04 (2006.01)	A 6 1 P	31/04
A 6 1 P	17/00 (2006.01)	A 6 1 P	17/00 1 0 1

(72)発明者 ペロ, ジャック
 フランス国、エフ - 6 3 0 0 0 クレルモン フェラン、リュ ブラタン、4 3

審査官 深草 亜子

(56)参考文献 特表2012-515151(JP,A)
 特表2001-526666(JP,A)
 国際公開第2011/109469(WO,A1)
 特表2007-512234(JP,A)
 特表2004-521911(JP,A)
 特表2008-537537(JP,A)
 J. Immunol., 2008年, Vol.181, p.2103-2110

(58)調査した分野(Int.Cl., DB名)
 A 6 1 K 3 8 / 0 0 - 3 8 / 5 8
 J S T P l u s / J M E D P l u s / J S T 7 5 8 0 (J D r e a m I I I)
 C A / M E D L I N E / E M B A S E / B I O S I S / W P I D S (S T N)