

(19)日本国特許庁(JP)

(12)特許公報(B2)

(11)特許番号
特許第7674241号
(P7674241)

(45)発行日 令和7年5月9日(2025.5.9)

(24)登録日 令和7年4月28日(2025.4.28)

(51)国際特許分類	F I	
C 1 2 P 21/02 (2006.01)	C 1 2 P 21/02	C
C 0 7 K 14/78 (2006.01)	C 0 7 K 14/78	
C 0 7 K 1/12 (2006.01)	C 0 7 K 1/12	
A 6 1 K 38/39 (2006.01)	A 6 1 K 38/39	
A 6 1 P 19/08 (2006.01)	A 6 1 P 19/08	
請求項の数 19 (全39頁) 最終頁に続く		

(21)出願番号	特願2021-524289(P2021-524289)	(73)特許権者	521189075 ジェリータ アーゲー
(86)(22)出願日	令和1年11月6日(2019.11.6)		ドイツ連邦共和国 6 9 4 1 2 エーバー
(65)公表番号	特表2022-513591(P2022-513591 A)		バツハ, ウーファーシュトラッセ 7
(43)公表日	令和4年2月9日(2022.2.9)	(74)代理人	110002572 弁理士法人平木国際特許事務所
(86)国際出願番号	PCT/EP2019/080421	(72)発明者	ハウズマンズ, シュテファン ドイツ連邦共和国 6 9 1 2 6 ハイデル
(87)国際公開番号	WO2020/094728		ベルク, ヘラヴェグ 2 2
(87)国際公開日	令和2年5月14日(2020.5.14)	(72)発明者	フレッヒ, ハンス-ウルリッヒ ドイツ連邦共和国 6 9 4 6 9 ヴァイン
審査請求日	令和4年10月27日(2022.10.27)		ハイム, テレマンシュトラッセ 1 2
(31)優先権主張番号	102018218916.1	(72)発明者	オエッセー, シュテフェン ドイツ連邦共和国 2 4 9 6 0 グリュック
(32)優先日	平成30年11月6日(2018.11.6)		クスブルク, ダイヒヴェグ 1 7
(33)優先権主張国・地域又は機関	ドイツ(DE)		最終頁に続く
(31)優先権主張番号	102019200790.2		
(32)優先日	平成31年1月23日(2019.1.23)		
	最終頁に続く		

(54)【発明の名称】 コラーゲンペプチド調製物の組換え製造およびその使用

(57)【特許請求の範囲】

【請求項 1】

組換えコラーゲンペプチドを有するコラーゲンペプチド調製物の製造方法であって、
 a) 少なくとも1つの発現カセットを有する発現系を提供する方法工程であって、前記発現カセットは、8~100kDaの範囲内の分子量を有する脊椎動物のコラーゲンペプチドをコードする少なくとも1つのヌクレオチド配列を有する方法工程と、
 b) 前記コラーゲンペプチドの発現を可能にする条件下で、前記発現系をインキュベートする方法工程と、
 c) 前記コラーゲンペプチドを回収する方法工程と、
 d) 平均分子量が1~5kDaであるコラーゲンペプチドを有するコラーゲンペプチド調製物が製造される条件下で、前記コラーゲンペプチドを少なくとも1つの細菌および/または微生物のエンドプロテアーゼを用いて酵素により加水分解する方法工程であって、加水分解されたコラーゲンペプチドの5.5重量%以下が500Da未満の分子量を有し、加水分解されたコラーゲンペプチドの2.8重量%以下が7500Daと13500Daの間の分子量を有し、加水分解されたコラーゲンペプチドの35~60重量%が1500Daと3500Daの間の分子量を有する、方法工程と、
 e) 前記コラーゲンペプチド調製物を回収する方法工程とを含む、方法。

【請求項 2】

前記発現系が、細菌細胞、酵母細胞、真菌細胞、哺乳類細胞、昆虫細胞および植物細胞

からなる群から選択される宿主細胞である、請求項1に記載の方法。

【請求項3】

前記脊椎動物が、哺乳類、鳥類、魚類、両生類及び爬虫類から選択される、請求項1または2に記載の方法。

【請求項4】

前記発現系が、前記発現したコラーゲンペプチドのプロリン残基、リジン残基またはプロリン残基およびリジン残基をヒドロキシル化することができる宿主細胞である、請求項1に記載の方法。

【請求項5】

前記宿主細胞が、プロリル-4ヒドロキシラーゼをコードするポリヌクレオチド配列を有する少なくとも1つの発現カセットを有し、方法工程e)において、イン・ピボでヒドロキシル化されたコラーゲンペプチド調製物を回収する、請求項4に記載の方法。

10

【請求項6】

前記宿主細胞が、リシルヒドロキシラーゼをコードするポリヌクレオチド配列を有する少なくとも1つの発現カセットを有し、方法工程e)において、イン・ピボでヒドロキシル化されたコラーゲンペプチド調製物を回収する、請求項4に記載の方法。

【請求項7】

前記発現系が、前記発現されたコラーゲンペプチドのプロリン残基、リジン残基またはプロリン残基およびリジン残基のヒドロキシル化を生じさせることができない、請求項1に記載の方法。

20

【請求項8】

前記方法工程c)と前記方法工程d)の間に方法工程x1)を含み、前記方法工程x1)において、前記方法工程c)で回収されたコラーゲンペプチドを、方法工程d)の実施前にヒドロキシル化し、方法工程e)において、溶解前(praelysal)にエクス・ピボでヒドロキシル化されたコラーゲンペプチド調製物を回収する、請求項7に記載の方法。

【請求項9】

前記方法工程d)と前記方法工程e)の間に方法工程x2)を含み、前記方法工程x2)において、前記方法工程d)で製造されたコラーゲンペプチド調製物を、方法工程d)の実施後にヒドロキシル化し、方法工程e)において、溶解後(postlysal)にエクス・ピボでヒドロキシル化されたコラーゲンペプチド調製物を回収する、請求項7に記載の方法。

30

【請求項10】

宿主細胞において製造された8~100kDaの範囲内の分子量を有する組換えコラーゲンペプチドの加水分解により製造される脊椎動物のコラーゲンペプチド調製物であって、前記コラーゲンペプチド調製物は、平均分子量が1~5kDaであるコラーゲンペプチドを有し、加水分解されたコラーゲンペプチドの5.5重量%以下が500Da未満の分子量を有し、加水分解されたコラーゲンペプチドの2.8重量%以下が7500Daと13500Daの間の分子量を有し、加水分解されたコラーゲンペプチドの35~60%重量%が1500Daと3500Daの間の分子量を有する、コラーゲンペプチド調製物。

【請求項11】

ヒドロキシル化されていないか、部分的にヒドロキシル化されているか、または完全にヒドロキシル化されている、請求項10に記載のコラーゲンペプチド調製物。

40

【請求項12】

前記コラーゲンペプチド調製物は、溶解前にエクス・ピボでヒドロキシル化されたコラーゲンペプチド調製物であるか、または溶解後にエクス・ピボでヒドロキシル化されたコラーゲンペプチド調製物である、請求項10または11に記載のコラーゲンペプチド調製物。

【請求項13】

骨の健康の維持および改善、骨粗鬆症の予防および/もしくは治療、サルコペニアの予防および/もしくは治療、筋肉量の退行性低下の予防および/もしくは治療、筋力の向上

50

、ミトコンドリア活性の低下を特徴とする病態の予防および/もしくは治療、体脂肪低下の刺激、体重の減少、ならびに/または変形性関節症の予防および/もしくは治療、軟骨疾患の予防および/もしくは治療、腱および靭帯の疾患の予防および/もしくは治療、皮膚疾患の予防および/もしくは治療、創傷の治療、神経変性疾患の予防および/もしくは治療、認知症の予防および/もしくは治療、アルツハイマー病の予防および/もしくは治療、精神機能の低下を特徴とする病態の予防および/もしくは治療、血液脳関門の機能不全に関連する疾患の予防および/もしくは治療、腸疾患の予防および/もしくは治療、心臓血管系の疾患の予防および/もしくは治療、ならびに/または歯周組織 (Zahnhalteapparats) の疾患の予防もしくは治療のための医薬の調製に使用するための、請求項 1_0 または請求項 1_1 に記載のコラーゲンペプチド調製物。

10

【請求項 1 4】

前記ミトコンドリア活性の低下を特徴とする病態が、持久力の低下を特徴とする病態である、請求項 1 3 に記載のコラーゲンペプチド調製物。

【請求項 1 5】

皮膚を視覚的および構造的に改善するための、爪の成長を促進するための、および/もしくは爪の脆さを低減するための、毛髪を視覚的および構造的に改善するための、ミトコンドリア数および/もしくはミトコンドリア活性を増加させるための、持久力を向上させるための、ならびに/または精神機能を向上させるための、請求項 1_0 または請求項 1_1 に記載のコラーゲンペプチド調製物の非治療的使用。

【請求項 1 6】

請求項 1_0 または請求項 1_1 に記載のコラーゲンペプチド調製物と、少なくとも1つの添加物とを含む、製品。

20

【請求項 1 7】

請求項 1_0 または請求項 1_1 に記載のコラーゲンペプチド調製物と、食品に許容される少なくとも1つの添加物とを含む、栄養補助食品。

【請求項 1 8】

請求項 1_0 または請求項 1_1 に記載のコラーゲンペプチド調製物と、製薬学的に許容される少なくとも1つの添加物とを含む、医薬組成物。

【請求項 1 9】

請求項 1_0 または請求項 1_1 に記載のコラーゲンペプチド調製物と、少なくとも1つの皮膚適合性添加物とを含む、化粧品。

30

【発明の詳細な説明】

【技術分野】

【0001】

本発明は、組換えコラーゲンペプチドを有するコラーゲンペプチド調製物の製造方法、該方法で製造されたコラーゲンペプチド調製物、該コラーゲンペプチド調製物を含む製品、ならびに該調製物および製品の使用に関する。

【背景技術】

【0002】

コラーゲンは、哺乳類、鳥類および魚類などの動物に含まれる細胞外構造タンパク質である。これは、通常は結合組織内で特に細胞外マトリックスの構成要素として存在している。腱、靭帯、軟骨および骨には特にコラーゲンが多く含まれている。一方、コラーゲンは、植物や単細胞生物には存在しない。

40

【0003】

コラーゲンには、構造的にも機能的にも様々な異なる種類があり、特にその構造、機能および由来が異なる。コラーゲンを構成するポリペプチド鎖は、細胞内で小胞体のリボソームにて比較的大きな前駆体分子の形で個別に合成され、広範な反復配列 (Gly - X - Y)_n を有しており、ここで、XおよびYは、いずれのアミノ酸であってもよいが、通常はプロリンおよび4 - ヒドロキシプロリンである。

【0004】

50

これらの前駆体ポリペプチド鎖は、小胞体で翻訳後にヒドロキシル化され、ポリペプチド鎖のプロリン残基およびリジン残基にヒドロキシプロリン残基およびヒドロキシリジン残基が形成される。ヒドロキシル化は、細胞内でそれぞれ3本の前駆体ポリペプチド鎖から形成される右巻き三重らせん（プロコラーゲン）の隣接するコラーゲンポリペプチド鎖を安定化させる役割を果たす。

【0005】

このようにして形成されたプロコラーゲンは、細胞内でグリコシル化され、グリコシル化された三重らせん状の形態（トロポコラーゲン）で細胞から分泌され、その後、ペプチダーゼを介した末端残基の切断によりコラーゲンが形成される。これがフィブリル化の過程で集まってコラーゲンフィブリルとなり、これがその後共有結合により架橋して、コラーゲン線維を形成する。

10

【0006】

コラーゲンは、変性した形態（その場合にはゼラチンと称される）、または加水分解物の形態でもしばしば使用される。

【0007】

ゼラチンおよびコラーゲンを加水分解プロセス、特に酵素加水分解に供すると、使用するコラーゲンの種類および由来、ならびに酵素の条件に応じて様々な組成および用途特性のコラーゲン加水分解物を製造することができる。これらのコラーゲン加水分解物は、分子量が特定のサイズ範囲内に分布するペプチドの混合物である。このようなコラーゲン加水分解物を、例えば栄養補助食品や化粧用助剤として、特に骨、関節または結合組織に関連する疾患の予防および/または治療に使用することは、長い間知られている。

20

【0008】

国際公開第2012/065782号には、豚皮ゼラチンから得られたコラーゲン加水分解物が記載されている。この加水分解物は、肌細胞による細胞外マトリックスタンパク質の生合成を刺激する働きがあり、特に化粧用途に適している。

【0009】

国際公開第2012/117012号には、平均分子量が1500~8000Daのウシの皮革（Rinderspalt）由来の酵素加水分解コラーゲンが開示されており、これは骨粗鬆症の予防および/または治療のためにプレバイオティクスと一緒に使用することができる。

【0010】

多くの用途や消費者層では、動物材料から得られたコラーゲン加水分解物の使用は有利であるが、特定の消費者層や用途特性では、そのようにして得られたコラーゲン加水分解物の使用が望ましくない場合もある。例えば、特定の消費者層は、例えばプロセス助剤などの健康に有害な微生物や薬剤による汚染や望ましくない免疫反応が懸念されることからせよ、あるいは宗教的もしくは倫理的な動機からせよ、動物材料から得られた原材料に対して根本的に批判的または否定的である。また、動物材料から得られるコラーゲン加水分解物を得るために使用される製造プロセスは、煩雑かつ高コストの生成、精製および後処理工程を伴うことが多い。結果的には、特定の用途について、その由来および組成に関して標準化され、厳密かつ確実に定められ、有利に低コストで工業的規模での製造も可能であるコラーゲン加水分解物を提供することが有用であり得る。

30

40

【0011】

このような背景から、遺伝子組換え技術を用いてゼラチンおよびコラーゲン、ならびにその加水分解物を製造する方法が開発されたのは当然のことである。

【0012】

例えば国際公開第2006/052451号には、ヒトのプロリルヒドロキシラーゼをも発現するピキア・パストリス（*Pichia pastoris*）株における組換えIII型コラーゲンの製造が開示されている。

【0013】

国際公開第2005/012356号には、ヒトI型コラーゲンと、それぞれ完全にヒドロキシル化された、部分的にヒドロキシル化されたおよびヒドロキシル化されていない形態の50

50

kDa、65kDaおよび100kDaのサイズの個々のコラーゲンペプチド種からのゼラチンの製造が開示されている。

【0014】

国際公開第01/34646号にも同様に個々の組換えゼラチン種の製造が開示されており、これらのゼラチン種は、それぞれが組換えによる製造経路により生じた所定の分子量を有しており、ヒドロキシル化されていない、部分的にヒドロキシル化された、または完全にヒドロキシル化された形態で存在し得る。

【0015】

しかし、天然源から得られたコラーゲンやコラーゲン加水分解物と同等または少なくとも類似した構造および機能的特性を有する組換えコラーゲンまたはその加水分解物の製造には問題がある。これは特に、コラーゲンの自然な形成が、一連の細胞内および細胞外の影響因子によって特徴付けられる比較的複雑な生理学的プロセスであり、グリコシル化やヒドロキシル化などの翻訳後の合成工程も含まれるためである。これらの翻訳後の合成工程、特にプロリンおよびリジンのヒドロキシル化の特定の位置決めおよび範囲は、安定したトロポコラーゲンの提供を確実なものとし、これが最終的に会合してフィブリルおよび線維を形成する。例えばWangら (Engineering Biology, 2017 (1), 18-23) から、現在の組換えによるコラーゲンの製造は、低収率、高コストであること、また特にネイティブなコラーゲンの形成で生じるような翻訳後の合成工程がないかまたは逸脱していることが特徴的であることが知られている。また、まさにこれらの翻訳後修飾が、コラーゲンの自然な構造および機能のみならず、コラーゲンやコラーゲン加水分解物を使用する用途にも不可欠であることも知られている。

【0016】

そのため、天然のコラーゲンやそれから得られたコラーゲン加水分解物と同一の構造、特に翻訳後修飾の質および量、特にヒドロキシル化およびグリコシル化の程度、ならびにヒドロキシル化およびグリコシル化の位置を有する組換えにより製造されたコラーゲンまたはコラーゲン加水分解物は、現在のところ知られていない。

【発明の概要】

【0017】

狙いどおりに従来の方法で製造されたコラーゲンやコラーゲン加水分解物とは異なる特性プロファイルを有する組換えにより製造されたコラーゲンやコラーゲン加水分解物を提供することは、とりわけ上述の状況、特に出発物質や製造方法の多様性ゆえ、容易ではない。特に、組換えタンパク質の工業的製造に適した原核生物においては、組換えコラーゲンの製造には特に、通常は翻訳後の合成工程も組換え技術によって細胞内に導入しなければならず、その結果追加の代謝負荷が発生して目的のコラーゲンペプチドの発現や回収が困難または不可能になるという点で問題がある。また、外来タンパク質の発現が宿主細胞に毒性を示す場合があり、組換えにより製造されたタンパク質を宿主細胞内でまたは宿主細胞から回収することが技術的または経済的に不可能な場合があり、回収された発現産物の安定性が低すぎる場合があり、また宿主細胞の成長障害や増殖障害などの他の影響が生じる場合もある。

【0018】

そのため、様々な分野で使用するための、特にまた治療目的での、特にヒトおよび動物の筋肉、関節、骨および皮膚に関連する症状または疾患を予防または治療するための、組換えにより製造されたコラーゲン加水分解物の提供の必要性は、依然として高い。

【0019】

したがって本発明は、上述の欠点を克服し、特に標準化され、確実性が高くかつ厳密に定められた形態で、より大規模工業的かつ低コストの規模でも組換えにより製造することができ、筋肉、関節、骨および皮膚の健康維持、ならびにヒトおよび動物の筋肉、関節、骨および皮膚に関連する疾患の予防または治療に関して、相応して動物材料から得られたコラーゲン加水分解物と同等の、特にそれよりも改善された特性、特に有効性を示し、特に生物学的有効性を発揮するコラーゲンペプチド調製物の製造方法、およびこのようにし

10

20

30

40

50

て得られた組換えコラーゲンペプチド調製物を提供するという技術的課題に基づく。

【0020】

本発明は、独立請求項の教示、特にまた本明細書及び従属請求項の好ましい実施形態の教示を提供することにより、その基礎となる技術的課題を解決するものである。

【0021】

本発明は特に、組換えコラーゲンペプチドを有するコラーゲンペプチド調製物の製造方法であって、

a) 少なくとも1つの発現カセットを有する発現系を提供する方法工程であって、発現カセットは、8~100kDaの範囲内の分子量を有するコラーゲンペプチドをコードする少なくとも1つのヌクレオチド配列を有する方法工程と、

b) コラーゲンペプチドの発現を可能にする条件下で、発現系をインキュベートする方法工程と、

c) コラーゲンペプチドを回収する方法工程と、

d) 平均分子量が1~7kDaでかつ分子量が0.1~13.5kDaの範囲内であるコラーゲンペプチドを有するコラーゲンペプチド調製物が製造される条件下で、コラーゲンペプチドを加水分解する方法工程と、

e) コラーゲンペプチド調製物を回収する方法工程とを含む、方法に関する。

【0022】

本発明により提供されるコラーゲンペプチド調製物の製造方法は特に、組換えにより製造された、8~100kDaの特定のサイズの少なくとも1つの、好ましくは厳密に定められたコラーゲンペプチドから、加水分解によって、組換えにより製造されたコラーゲンペプチド調製物であって、加水分解に使用される特定の組換えコラーゲンペプチド種およびその後の方法工程、特に加水分解工程、特にヒドロキシル化特性から有利に生じる分子量分布および構造を有し、かつその組換えによる製造にもかかわらず、直接的にさらなる調整工程なしに有利な生物学的活性を有するコラーゲンペプチド調製物が提供されることを特徴とする。

【0023】

本発明により提供されるコラーゲンペプチド調製物は、その組換えによる製造様式ゆえに、その構造の点で、特にヒドロキシル化およびグリコシル化などの翻訳後合成工程により導入された修飾に関して、天然源から得られるコラーゲン加水分解物とは明らかな差異を有する。驚くべきことに、該コラーゲンペプチド調製物は、望ましくない汚染を伴わずに、工業的規模であっても多種多様な発現系で提供することができ、またそれと同時に、特に骨、軟骨、皮膚、毛髪および爪の健康を維持および改善するための用途に関して有利な生物学的有効性を示す。

【0024】

本発明により見出された、本明細書で提供される組換えコラーゲンペプチド調製物の生物学的有効性は、さらなる処理工程を必要とせずに、加水分解から直接得られた調製物にすでにもたらされている。

【0025】

本発明により見出された、組換えにより製造された本発明のコラーゲンペプチド調製物に起因する生物学的有効性は、特に、骨芽細胞、線維芽細胞および軟骨細胞における細胞外マトリックスタンパク質の合成の刺激に関するイン・ビトロ試験に基づいて確認することができ、好ましくは、骨芽細胞、線維芽細胞および軟骨細胞における細胞外マトリックスタンパク質またはこれらのタンパク質をコードするmRNAの合成の刺激に関するイン・ビトロ試験に基づいて、特に、骨芽細胞、線維芽細胞および軟骨細胞における細胞外マトリックスタンパク質の合成の刺激に関する実施例3~7、特に実施例3~5に示されたイン・ビトロ試験に基づいて確認することができる。

【0026】

好ましい一実施形態では、本発明により製造された組換えコラーゲンペプチドを有する

10

20

30

40

50

本発明のコラーゲンペプチド調製物は、骨芽細胞、線維芽細胞および軟骨細胞における細胞外マトリックスタンパク質の合成の刺激に関する少なくとも1つのイン・ビトロ試験において、特に、骨芽細胞、線維芽細胞および軟骨細胞における細胞外マトリックスタンパク質の合成の刺激に関する実施例3~7、特に実施例3~5に示されたイン・ビトロ試験のうち少なくとも1つ、好ましくは少なくとも2つ、好ましくはすべてにおいて、生物学的有効性を示す。

【0027】

本発明により製造された組換えコラーゲンペプチドを有する本発明のコラーゲンペプチド調製物は、骨芽細胞、線維芽細胞および軟骨細胞における細胞外マトリックスタンパク質の合成の刺激に関する少なくとも1つのイン・ビトロ試験において、特に、骨芽細胞、線維芽細胞および軟骨細胞における細胞外マトリックスタンパク質の合成の刺激に関する実施例3~7、特に実施例3~5に示されたイン・ビトロ試験のうち少なくとも1つ、好ましくは少なくとも2つ、好ましくはすべてにおいて、天然源から単離されたコラーゲンペプチド調製物、特に組換えにより製造されたものではないコラーゲンペプチド調製物と同等の生物学的有効性を示す。

10

【0028】

特に好ましくは、本発明により製造された組換えコラーゲンペプチドを有する本発明のコラーゲンペプチド調製物は、骨芽細胞、線維芽細胞および軟骨細胞における細胞外マトリックスタンパク質の合成の刺激に関する少なくとも1つのイン・ビトロ試験において、特に、骨芽細胞、線維芽細胞および軟骨細胞における細胞外マトリックスタンパク質の合成の刺激に関する実施例3~7、特に実施例3~5に示されたイン・ビトロ試験のうち少なくとも1つ、好ましくは少なくとも2つ、好ましくはすべてにおいて、天然源から単離されたコラーゲンペプチド調製物、特に組換えにより製造されたものではないコラーゲンペプチド調製物よりも良好な生物学的有効性を示す。

20

【0029】

本発明の好ましい一実施形態では、工程a)で提供される発現系は、細胞ベースのまたは無細胞の発現系である。

【0030】

好ましくは、工程a)で提供される発現系、特に細胞ベースの発現系は、宿主細胞、特に原核細胞または真核細胞である。

30

【0031】

好ましくは、発現系、特に細胞ベースの発現系は、細菌細胞、酵母細胞、真菌細胞、哺乳類細胞、昆虫細胞および植物細胞からなる群から選択される宿主細胞である。

【0032】

好ましくは、発現系、特に細胞ベースの発現系は、細菌細胞、特に大腸菌 (*Escherichia coli*) または枯草菌 (*Bacillus subtilis*) の種の細菌細胞である。

【0033】

もう1つの好ましい実施形態では、発現系、特に細胞ベースの発現系は、酵母細胞、特にサッカロミセス・セレビシエ (*Saccharomyces cerevisiae*)、ピキア・パストリス (*Pichia pastoris*) またはオガタエア・アングスタ (*Ogataea angusta*) (ハンセヌラ・ポリモルファ (*Hansenula polymorpha*)) の種の酵母細胞である。

40

【0034】

好ましくは、発現系、特に細胞ベースの発現系は、真菌細胞、特にアスペルギルス・ニゲル (*Aspergillus niger*) の種の真菌細胞である。

【0035】

本発明のもう1つの好ましい実施形態では、発現系、特に細胞ベースの発現系は、哺乳類細胞、特にCHO細胞、HeLa細胞またはHEK293細胞である。

【0036】

好ましくは、発現系、特に細胞ベースの発現系は、昆虫細胞、特にSf-9、Sf-21またはTn-5細胞である。

50

【0037】

好ましくは、発現系、特に細胞ベースの発現系は、植物細胞、特にトウモロコシ細胞またはタバコ細胞である。

【0038】

本発明のもう1つの好ましい実施形態では、工程a)で提供される発現系は、発現されたコラーゲンペプチドのプロリン残基、リジン残基またはプロリン残基およびリジン残基をヒドロキシル化することができる発現系、特に細胞ベースの発現系である。好ましくは、工程a)で提供される発現系は、発現されたコラーゲンペプチドのプロリン残基、リジン残基またはプロリン残基およびリジン残基をヒドロキシル化することができる宿主細胞である。

10

【0039】

好ましくは、工程a)で提供される発現系は、プロリルヒドロキシラーゼ活性および/またはリシルヒドロキシラーゼ活性を示す発現系、特に細胞ベースの発現系である。好ましくは、工程a)で提供される発現系は、プロリルヒドロキシラーゼ活性および/またはリシルヒドロキシラーゼ活性を示す宿主細胞である。

【0040】

好ましい一実施形態では、工程a)で提供される発現系は、プロリル-4ヒドロキシラーゼをコードするポリヌクレオチド配列を含む少なくとも1つの発現カセットを有する細胞ベースの発現系である。特に好ましくは、工程a)で提供される発現系は、プロリル-4ヒドロキシラーゼをコードするポリヌクレオチド配列を含む少なくとも1つの発現カセットを有する細胞ベースの発現系であり、したがって、方法工程e)において、イン・ビボでヒドロキシル化されたコラーゲンペプチド調製物が回収される。

20

【0041】

好ましい一実施形態では、工程a)で提供される発現系は、リシルヒドロキシラーゼをコードするポリヌクレオチド配列を含む少なくとも1つの発現カセットを有する細胞ベースの発現系である。特に好ましくは、工程a)で提供される発現系は、リシルヒドロキシラーゼをコードするポリヌクレオチド配列を含む少なくとも1つの発現カセットを有する細胞ベースの発現系であり、これにより、方法工程e)において、イン・ビボでヒドロキシル化されたコラーゲンペプチド調製物が回収される。

【0042】

本発明のもう1つの好ましい実施形態では、工程a)で提供される発現系は、プロリル-4ヒドロキシラーゼをコードするポリヌクレオチド配列を含む少なくとも1つの発現カセットと、リシルヒドロキシラーゼをコードするポリヌクレオチド配列を含む少なくとも1つの発現カセットとを有する細胞ベースの発現系である。特に好ましくは、工程a)で提供される発現系は、プロリル-4ヒドロキシラーゼをコードするポリヌクレオチド配列を含む少なくとも1つの発現カセットと、リシルヒドロキシラーゼをコードするポリヌクレオチド配列を含む少なくとも1つの発現カセットとを有する細胞ベースの発現系であり、これにより、方法工程e)において、イン・ビボでヒドロキシル化されたコラーゲンペプチド調製物が回収される。

30

【0043】

したがって本発明は、組換えコラーゲンペプチドを有するコラーゲンペプチド調製物の製造方法、特にイン・ビボでヒドロキシル化されたコラーゲンペプチド調製物の製造方法であって、

40

a) 少なくとも1つの発現カセットを有する細胞ベースの発現系を提供する方法工程であって、発現カセットは、8~100kDaの範囲内の分子量を有するコラーゲンペプチドをコードする少なくとも1つのヌクレオチド配列を有し、細胞ベースの発現系は、発現されたコラーゲンペプチドのプロリン残基、リジン残基またはプロリン残基およびリジン残基をヒドロキシル化することができる方法工程と、

b) コラーゲンペプチドの発現およびヒドロキシル化を可能にする条件下で、発現系をインキュベートし、特に細胞ベースの発現系を培養する方法工程と、

50

c) コラーゲンペプチド、特にイン・ビボでヒドロキシル化されたコラーゲンペプチドを回収する方法工程と、

d) 平均分子量が1~7kDaでかつ分子量が0.1~13.5kDaの範囲内であるコラーゲンペプチド、特にイン・ビボでヒドロキシル化されたコラーゲンペプチドを有するコラーゲンペプチド調製物が製造される条件下で、コラーゲンペプチド、特にイン・ビボでヒドロキシル化されたコラーゲンペプチドを加水分解する方法工程と、

e) コラーゲンペプチド調製物、特にイン・ビボでヒドロキシル化されたコラーゲンペプチド調製物（以下、コラーゲンペプチド調製物Aとも称する）を回収する方法工程とを含む、方法をも含む。

【0044】

したがって、前述の方法により、使用される細胞ベースの発現系に応じて、特定のパターンの翻訳後修飾、特にヒドロキシル化およびグリコシル化によって特徴付けられる、特定の分子量および特定の平均分子量を有する、イン・ビボでヒドロキシル化された組換えにより製造されたコラーゲンペプチドを有するコラーゲン調製物を有利に得ることができる。このようにして、有利なことに特に、直接、すなわちコラーゲンペプチド調製物のコラーゲンペプチドの事後的な修飾を必要とすることなく、生物学的有効性を有するコラーゲンペプチド調製物を得ることができる。

【0045】

好ましい一実施形態では、本発明により製造された組換えコラーゲンペプチドを有するイン・ビボでヒドロキシル化されたコラーゲンペプチド調製物、すなわちコラーゲンペプチド調製物Aは、骨芽細胞、線維芽細胞および軟骨細胞における細胞外マトリックスタンパク質の合成の刺激に関する少なくとも1つのイン・ビボ試験において、特に、骨芽細胞、線維芽細胞および軟骨細胞における細胞外マトリックスタンパク質の合成の刺激に関する実施例3~7、特に実施例3~5に示されたイン・ビボ試験のうち少なくとも1つ、好ましくは少なくとも2つ、好ましくはすべてにおいて、生物学的有効性を示す。

【0046】

好ましくは、本発明により製造された組換えコラーゲンペプチドを有するイン・ビボでヒドロキシル化されたコラーゲンペプチド調製物、すなわちコラーゲンペプチド調製物Aは、骨芽細胞、線維芽細胞および軟骨細胞における細胞外マトリックスタンパク質の合成の刺激に関する少なくとも1つのイン・ビボ試験において、特に、骨芽細胞、線維芽細胞および軟骨細胞における細胞外マトリックスタンパク質の合成の刺激に関する実施例3~7、特に実施例3~5に示されたイン・ビボ試験のうち少なくとも1つ、好ましくは少なくとも2つ、好ましくはすべてにおいて、天然源から単離されたコラーゲンペプチド調製物、特に組換えにより製造されたものではないコラーゲンペプチド調製物と同等の生物学的有効性を示す。

【0047】

特に好ましくは、本発明により製造された組換えコラーゲンペプチドを有するイン・ビボでヒドロキシル化されたコラーゲンペプチド調製物、すなわちコラーゲンペプチド調製物Aは、骨芽細胞、線維芽細胞および軟骨細胞における細胞外マトリックスタンパク質の合成の刺激に関する少なくとも1つのイン・ビボ試験において、特に、骨芽細胞、線維芽細胞および軟骨細胞における細胞外マトリックスタンパク質の合成の刺激に関する実施例3~7、特に実施例3~5に示されたイン・ビボ試験のうち少なくとも1つ、好ましくは少なくとも2つ、好ましくはすべてにおいて、天然源から単離されたコラーゲンペプチド調製物、特に組換えにより製造されたものではないコラーゲンペプチド調製物よりも良好な生物学的有効性を示す。

【0048】

本発明のもう1つの実施形態によれば、工程a)で提供される発現系は、発現されたコラーゲンペプチドのプロリン残基、リジン残基またはプロリン残基およびリジン残基のヒドロキシル化を生じさせることができない発現系であり、特に、工程a)で提供される発現系は、プロリルヒドロキシラーゼ活性およびリシルヒドロキシラーゼ活性を示さない。

10

20

30

40

50

【0049】

したがって、本発明は、組換えコラーゲンペプチドを有するコラーゲンペプチド調製物の製造方法、特にヒドロキシル化されていないコラーゲンペプチド調製物の製造方法であって、

a) 少なくとも1つの発現カセットを有する発現系を提供する方法工程であって、発現カセットは、8～100kDaの範囲内の分子量を有するコラーゲンペプチドをコードする少なくとも1つのヌクレオチド配列を有し、発現系は、発現されたコラーゲンペプチドのプロリン残基、リジン残基またはプロリン残基およびリジン残基のヒドロキシル化を生じさせることができない方法工程と、

b) コラーゲンペプチドの発現を可能にする条件下で、発現系をインキュベートする方法工程と、

c) コラーゲンペプチド、特にヒドロキシル化されていないコラーゲンペプチドを回収する方法工程と、

d) 平均分子量が1～7kDaでかつ分子量が0.1～13.5kDaの範囲内であるコラーゲンペプチドを有するコラーゲンペプチド調製物が製造される条件下で、コラーゲンペプチド、特にヒドロキシル化されていないコラーゲンペプチドを加水分解する方法工程と、

e) コラーゲンペプチド調製物、特にヒドロキシル化されていないコラーゲンペプチド(以下、コラーゲンペプチド調製物Bとも称する)を回収する方法工程とを含む、方法をも含む。

【0050】

好ましい一実施形態では、本発明により製造された組換えコラーゲンペプチドを有するヒドロキシル化されていないコラーゲンペプチド調製物、すなわちコラーゲンペプチド調製物Bは、骨芽細胞、線維芽細胞および軟骨細胞における細胞外マトリックスタンパク質の合成の刺激に関する少なくとも1つのイン・ビトロ試験において、特に、骨芽細胞、線維芽細胞および軟骨細胞における細胞外マトリックスタンパク質の合成の刺激に関する実施例3～7、特に実施例3～5に示されたイン・ビトロ試験のうち少なくとも1つ、好ましくは少なくとも2つ、好ましくはすべてにおいて、生物学的有効性を示す。

【0051】

好ましくは、本発明により製造された組換えコラーゲンペプチドを有するヒドロキシル化されていないコラーゲンペプチド調製物、すなわちコラーゲンペプチド調製物Bは、骨芽細胞、線維芽細胞および軟骨細胞における細胞外マトリックスタンパク質の合成の刺激に関する少なくとも1つのイン・ビトロ試験において、特に、骨芽細胞、線維芽細胞および軟骨細胞における細胞外マトリックスタンパク質の合成の刺激に関する実施例3～7、特に実施例3～5に示されたイン・ビトロ試験のうち少なくとも1つ、好ましくは少なくとも2つ、好ましくはすべてにおいて、天然源から単離されたコラーゲンペプチド調製物、特に組換えにより製造されたものではないコラーゲンペプチド調製物と同等の生物学的有効性を示す。

【0052】

特に好ましくは、本発明により製造された組換えコラーゲンペプチドを有するヒドロキシル化されていないコラーゲンペプチド調製物、すなわちコラーゲンペプチド調製物Bは、骨芽細胞、線維芽細胞および軟骨細胞における細胞外マトリックスタンパク質の合成の刺激に関する少なくとも1つのイン・ビトロ試験において、特に、骨芽細胞、線維芽細胞および軟骨細胞における細胞外マトリックスタンパク質の合成の刺激に関する実施例3～7、特に実施例3～5に示されたイン・ビトロ試験のうち少なくとも1つ、好ましくは少なくとも2つ、好ましくはすべてにおいて、天然源から単離されたコラーゲンペプチド調製物、特に組換えにより製造されたものではないコラーゲンペプチド調製物よりも良好な生物学的有効性を示す。

【0053】

本発明の好ましい一実施形態では、方法工程c)で回収されたコラーゲンペプチドを、方法工程d)の実施前に方法工程x1)においてヒドロキシル化し、方法工程e)において、溶

10

20

30

40

50

解前 (praelysal) に、すなわち加水分解の前にエクス・ピボでヒドロキシル化されたコラーゲンペプチド調製物を回収する。

【0054】

したがって本発明は、組換えコラーゲンペプチドを有するコラーゲンペプチド調製物の製造方法、特に溶解前にエクス・ピボでヒドロキシル化されたコラーゲンペプチド調製物の製造方法であって、

a) 少なくとも1つの発現カセットを有する発現系を提供する方法工程であって、発現カセットは、8~100kDaの範囲内の分子量を有するコラーゲンペプチドをコードする少なくとも1つのヌクレオチド配列を有し、発現系は、発現されたコラーゲンペプチドのプロリン残基、リジン残基またはプロリン残基およびリジン残基のヒドロキシル化を生じさせることができない方法工程と、

10

b) コラーゲンペプチドの発現を可能にする条件下で、発現系をインキュベートする方法工程と、

c) コラーゲンペプチドを回収する方法工程と、

x1) 工程c) で回収されたコラーゲンペプチドを、エクス・ピボでヒドロキシル化する方法工程と、

d) 平均分子量が1~7kDaでかつ分子量が0.1~13.5kDaの範囲内であるコラーゲンペプチド、特にエクス・ピボでヒドロキシル化されたコラーゲンペプチドを有するコラーゲンペプチド調製物が製造される条件下で、コラーゲンペプチド、特にエクス・ピボでヒドロキシル化されたコラーゲンペプチドを加水分解する方法工程と、

20

e) コラーゲンペプチド調製物、特に溶解前にエクス・ピボでヒドロキシル化されたコラーゲンペプチド調製物 (以下、コラーゲンペプチド調製物Cとも称する) を回収する方法工程と

を含む、方法をさらに含む。

【0055】

好ましい一実施形態では、本発明により製造された組換えコラーゲンペプチドを有する溶解前にエクス・ピボでヒドロキシル化されたコラーゲンペプチド調製物、すなわちコラーゲンペプチド調製物Cは、骨芽細胞、線維芽細胞および軟骨細胞における細胞外マトリックスタンパク質の合成の刺激に関する少なくとも1つのイン・ビトロ試験において、特に、骨芽細胞、線維芽細胞および軟骨細胞における細胞外マトリックスタンパク質の合成の刺激に関する実施例3~7、特に実施例3~5に示されたイン・ビトロ試験のうち少なくとも1つ、好ましくは少なくとも2つ、好ましくはすべてにおいて、生物学的有効性を示す。

30

【0056】

好ましくは、本発明により製造された溶解前にエクス・ピボでヒドロキシル化されたコラーゲンペプチド調製物、すなわちコラーゲンペプチド調製物Cは、骨芽細胞、線維芽細胞および軟骨細胞における細胞外マトリックスタンパク質の合成の刺激に関する少なくとも1つのイン・ビトロ試験において、特に、骨芽細胞、線維芽細胞および軟骨細胞における細胞外マトリックスタンパク質の合成の刺激に関する実施例3~7、特に実施例3~5に示されたイン・ビトロ試験のうち少なくとも1つ、好ましくは少なくとも2つ、好ましくはすべてにおいて、天然源から単離されたコラーゲンペプチド調製物、特に組換えにより製造されたものではないコラーゲンペプチド調製物と同等の生物学的有効性を示す。

40

【0057】

特に好ましくは、本発明により製造された組換えコラーゲンペプチドを有する溶解前にエクス・ピボでヒドロキシル化されたコラーゲンペプチド調製物、すなわちコラーゲンペプチド調製物Cは、骨芽細胞、線維芽細胞および軟骨細胞における細胞外マトリックスタンパク質の合成の刺激に関する少なくとも1つのイン・ビトロ試験において、特に、骨芽細胞、線維芽細胞および軟骨細胞における細胞外マトリックスタンパク質の合成の刺激に関する実施例3~7、特に実施例3~5に示されたイン・ビトロ試験のうち少なくとも1つ、好ましくは少なくとも2つ、好ましくはすべてにおいて、天然源から単離されたコラーゲ

50

ンペプチド調製物、特に組換えにより製造されたものではないコラーゲンペプチド調製物よりも良好な生物学的有効性を示す。

【0058】

本発明のもう1つの好ましい実施形態では、方法工程c)で回収されたコラーゲンペプチドを、方法工程d)の実施後に方法工程x2)においてヒドロキシル化し、方法工程e)において、溶解後(postlysal)に、すなわち加水分解の後にエクス・ピボでヒドロキシル化されたコラーゲンペプチド調製物を回収する。

【0059】

したがって本発明は、組換えコラーゲンペプチドを有するコラーゲンペプチド調製物の製造方法、特に溶解後にエクス・ピボでヒドロキシル化されたコラーゲンペプチド調製物の製造方法であって、

a)少なくとも1つの発現カセットを有する発現系を提供する方法工程であって、発現カセットは、8~100kDaの範囲内の分子量を有するコラーゲンペプチドをコードする少なくとも1つのヌクレオチド配列を有し、発現系は、発現されたコラーゲンペプチドのプロリン残基、リジン残基またはプロリン残基およびリジン残基のヒドロキシル化を生じさせることができない方法工程と、

b)コラーゲンペプチドの発現を可能にする条件下で、発現系をインキュベートする方法工程と、

c)コラーゲンペプチドを回収する方法工程と、

d)平均分子量が1~7kDaでかつ分子量が0.1~13.5kDaの範囲内であるコラーゲンペプチドを有するコラーゲンペプチド調製物が製造される条件下で、コラーゲンペプチドを加水分解する方法工程と、

x2)工程d)で得られたコラーゲンペプチド調製物のコラーゲンペプチドを、エクス・ピボでヒドロキシル化する方法工程と、

e)コラーゲンペプチド調製物、特に溶解後にエクス・ピボでヒドロキシル化されたコラーゲンペプチド調製物(以下、コラーゲンペプチド調製物Dとも称する)を回収する方法工程と

を含む、方法をさらに含む。

【0060】

好ましい一実施形態では、本発明により製造された組換えコラーゲンペプチドを有する溶解後にエクス・ピボでヒドロキシル化されたコラーゲンペプチド調製物、すなわちコラーゲンペプチド調製物Dは、骨芽細胞、線維芽細胞および軟骨細胞における細胞外マトリックスタンパク質の合成の刺激に関する少なくとも1つのイン・ビトロ試験において、特に、骨芽細胞、線維芽細胞および軟骨細胞における細胞外マトリックスタンパク質の合成の刺激に関する実施例3~7、特に実施例3~5に示されたイン・ビトロ試験のうち少なくとも1つ、好ましくは少なくとも2つ、好ましくはすべてにおいて、生物学的有効性を示す。

【0061】

好ましくは、本発明により製造された組換えコラーゲンペプチドを有する溶解後にエクス・ピボでヒドロキシル化されたコラーゲンペプチド調製物、すなわちコラーゲンペプチド調製物Dは、骨芽細胞、線維芽細胞および軟骨細胞における細胞外マトリックスタンパク質の合成の刺激に関する少なくとも1つのイン・ビトロ試験において、特に、骨芽細胞、線維芽細胞および軟骨細胞における細胞外マトリックスタンパク質の合成の刺激に関する実施例3~7、特に実施例3~5に示されたイン・ビトロ試験のうち少なくとも1つ、好ましくは少なくとも2つ、好ましくはすべてにおいて、天然源から単離されたコラーゲンペプチド調製物、特に組換えにより製造されたものではないコラーゲンペプチド調製物と同等の生物学的有効性を示す。

【0062】

特に好ましくは、本発明により製造された組換えコラーゲンペプチドを有する溶解後にエクス・ピボでヒドロキシル化されたコラーゲンペプチド調製物、すなわちコラーゲンペ

プチド調製物Dは、骨芽細胞、線維芽細胞および軟骨細胞における細胞外マトリックスタンパク質の合成の刺激に関する少なくとも1つのイン・ビトロ試験において、特に、骨芽細胞、線維芽細胞および軟骨細胞における細胞外マトリックスタンパク質の合成の刺激に関する実施例3~7、特に実施例3~5に示されたイン・ビトロ試験のうち少なくとも1つ、好ましくは少なくとも2つ、好ましくはすべてにおいて、天然源から単離されたコラーゲンペプチド調製物、特に組換えにより製造されたものではないコラーゲンペプチド調製物よりも良好な生物学的有効性を示す。

【0063】

本発明の好ましい一実施形態によれば、少なくとも1つの発現カセットの少なくとも1つのヌクレオチド配列は、コドン最適化されており、すなわち、提供された発現系、特に提供された細胞ベースの発現系、特に提供された宿主細胞の翻訳系によって使用されないまたは優先的に使用されないヌクレオチド配列中のコドンが、提供された発現系、特に提供された細胞ベースの発現系、特に提供された宿主細胞の翻訳系によって優先的に使用されるコドンに置き換えられ、この置き換えによって、コードされるペプチドまたはタンパク質のアミノ酸配列が変化することはない。

10

【0064】

本発明の好ましい一実施形態では、ヌクレオチド配列によってコードされるコラーゲンペプチドは、脊椎動物、特に哺乳類、例えばヒト、または非ヒト哺乳類、例えばウマ、ロバ、カンガルー、ヒツジ、齧歯類、ブタまたはウシ、鳥類、例えばニワトリ、魚類、両生類、爬虫類または無脊椎動物、例えばクラゲのコラーゲンペプチドである。

20

【0065】

好ましくは、ヌクレオチド配列によってコードされるコラーゲンペプチドは、I型、II型、III型、IV型、V型、VI型、VII型、VIII型、IX型、X型、XI型、XII型、XIII型、XIV型、XV型、XVI型、XVII型、XVIII型、XIX型、XX型、XXI型、XXII型、XXIII型、XXIV型、XXV型、XXVI型、XXVII型のコラーゲン中に存在するアミノ酸配列を有し、好ましくはI型、II型またはIII型、好ましくはI型、好ましくはII型、好ましくはIII型のコラーゲン中に存在するアミノ酸配列を有する。

【0066】

好ましくは、ヌクレオチド配列によってコードされるコラーゲンペプチドは、I型、II型またはIII型であり、好ましくはI型またはII型であり、特に好ましくはI型である。

30

【0067】

好ましくは、ヌクレオチド配列によってコードされるコラーゲンペプチドは、脊椎動物、特に魚類、両生類、爬虫類、鳥類および哺乳類のコラーゲン中に存在するアミノ酸配列を有し、特にI型、II型またはIII型、好ましくはI型、好ましくはII型、好ましくはIII型のヒト、ウシ、ブタ、ウマまたは鳥類のコラーゲン中に存在するアミノ酸配列を有する。

【0068】

特に好ましくは、ヌクレオチド配列によってコードされるコラーゲンペプチドは、ヒトコラーゲン中に存在するアミノ酸配列を有し、特にヒトI型コラーゲン、好ましくはヒトI型コラーゲンの1鎖中に存在するアミノ酸配列を有する。

【0069】

特に好ましくは、ヌクレオチド配列によってコードされるコラーゲンペプチドは、非ヒトコラーゲン中に存在するアミノ酸配列を有し、特に非ヒトI型コラーゲン、好ましくは非ヒトI型コラーゲンの1鎖中に存在するアミノ酸配列を有し、特にウシ、ブタ、ウマまたは鳥類のコラーゲン中に存在するアミノ酸配列を有する。

40

【0070】

好ましくは、ヌクレオチド配列によってコードされるコラーゲンペプチドは、天然に存在するコラーゲンペプチドである。本発明のもう1つの好ましい実施形態では、ヌクレオチド配列によってコードされるコラーゲンペプチドは、天然に存在するコラーゲンペプチドではない。好ましくは、ヌクレオチド配列によってコードされるコラーゲンペプチドは、遺伝子組換えコラーゲンペプチドである。本発明の特に好ましい一実施形態では、ヌク

50

レオチド配列によってコードされるコラーゲンペプチドは、天然に存在するコラーゲンペプチドのアミノ酸配列のうち少なくとも1つのアミノ酸、好ましくは天然に存在するコラーゲンペプチドのアミノ酸配列のうち少なくとも1つの非必須アミノ酸、特にAla、Asn、Asp、Glu、Serが、少なくとも1つの極めて特定のアミノ酸、特に少なくとも1つの必須アミノ酸、特にIle、Leu、Lys、Met、Phe、Thr、Trp、Val、His、Cys、Tyr、特に好ましくはTrpで置き換えられている、遺伝子組換えコラーゲンペプチドである。

【0071】

好ましくは、本発明によれば、ヌクレオチド配列によってコードされるコラーゲンペプチドは、天然に存在するコラーゲンペプチドのアミノ酸配列に、少なくとも1つのアミノ酸、好ましくは少なくとも1つの必須アミノ酸、特にIle、Leu、Lys、Met、Phe、Thr、Trp、Val、His、Cys、Tyr、特に好ましくはTrpが付加された、遺伝子組換えコラーゲンペプチドである。この場合、本発明によれば、少なくとも1つのアミノ酸、好ましくは少なくとも1つの必須アミノ酸、特にIle、Leu、Lys、Met、Phe、Thr、Trp、Val、His、Cys、Tyr、特に好ましくはTrpが、天然に存在するコラーゲンペプチドのN末端、C末端および/またはアミノ酸配列内に付加されていることを提供することができる。

10

【0072】

本発明の好ましい一実施形態によれば、少なくとも1つのヌクレオチド配列は、好ましくは8~95kDa、好ましくは8~90kDa、好ましくは8~85kDa、好ましくは8~80kDa、好ましくは9~95kDa、好ましくは9~90kDa、好ましくは9~85kDa、好ましくは9~80kDa、好ましくは10~95kDa、好ましくは10~90kDa、好ましくは10~85kDa、好ましくは10~80kDaの範囲内の分子量を有するコラーゲンペプチドをコードする。

20

【0073】

本発明の特に好ましい一実施形態では、加水分解は、酵素または酸触媒による加水分解であり、好ましくは酵素による加水分解、好ましくは酸触媒による加水分解である。特に好ましくは、工程c)で回収されたコラーゲンペプチドの加水分解は、少なくとも1つの細菌または微生物のプロテアーゼ、特に少なくとも1つの細菌および/または微生物のセリンプロテアーゼ、システインプロテアーゼ、アスパラギン酸プロテアーゼおよび/またはメタロプロテアーゼ、好ましくは少なくとも1つの細菌および/または微生物のエキソプロテアーゼを加えることによって行われる。

30

【0074】

本発明のもう1つの好ましい実施形態では、工程d)におけるコラーゲンペプチドの加水分解は、平均分子量が1~3kDaでかつ分子量が0.1~10kDa、好ましくは0.18~10kDa、好ましくは0.2~10kDaの範囲内であるコラーゲンペプチドを有するコラーゲンペプチド調製物が製造される条件下で行われる。

【0075】

本発明の好ましい一実施形態では、工程d)におけるコラーゲンペプチドの加水分解は、平均分子量が1~5kDaでかつ分子量が0.1~12kDa、好ましくは0.18~12kDa、好ましくは0.2~12kDaの範囲内であるコラーゲンペプチドを有するコラーゲンペプチド調製物が製造される条件下で行われる。

40

【0076】

本発明はさらに、本発明による前述の方法のいずれかによって製造されたコラーゲンペプチド調製物、特に平均分子量が1~7kDaでかつ分子量が0.1~13.5kDa、好ましくは0.18~13.5、好ましくは0.2~13.5の範囲内であるコラーゲンペプチドを有するコラーゲンペプチド調製物に関する。

【0077】

本発明の好ましい一実施形態では、本発明による前述の方法のいずれかによって製造されたコラーゲンペプチド調製物、特に平均分子量が1~7kDaでかつ分子量が0.1~13.5kDaの範囲内であるコラーゲンペプチドを有するコラーゲンペプチド調製物は、ヒドロキシル化されていない、部分的にヒドロキシル化されている、または完全にヒドロキシル化され

50

ているコラーゲンペプチド調製物であり、好ましくはヒドロキシル化されていないコラーゲンペプチド調製物、好ましくは部分的にヒドロキシル化されているコラーゲンペプチド調製物、好ましくは完全にヒドロキシル化されているコラーゲンペプチド調製物である。

【0078】

好ましくは、本発明による前述の方法のいずれかによって製造されたコラーゲンペプチド調製物、特に平均分子量が1~7kDaでかつ分子量が0.1~13.5kDaの範囲内であるコラーゲンペプチドを有するコラーゲンペプチド調製物は、コラーゲンペプチドのプロリル残基、好ましくはリシル残基、特に好ましくはプロリル残基およびリシル残基の少なくとも1%、好ましくは少なくとも2%、好ましくは少なくとも3%、好ましくは少なくとも4%、好ましくは少なくとも5%、好ましくは少なくとも10%、好ましくは少なくとも15%、好ましくは少なくとも20%、好ましくは少なくとも25%、好ましくは少なくとも30%、好ましくは少なくとも35%、好ましくは少なくとも40%、好ましくは少なくとも45%、好ましくは少なくとも50%がヒドロキシル化されており、好ましくはイン・ピボでヒドロキシル化されており、好ましくはエクス・ピボでヒドロキシル化されており、特に溶解前にエクス・ピボでヒドロキシル化されているか、または溶解後にエクス・ピボでヒドロキシル化されているコラーゲンペプチド調製物である。

10

【0079】

特に好ましくは、本発明による前述の方法のいずれかによって製造されたコラーゲンペプチド調製物、特に平均分子量が1~7kDaでかつ分子量が0.1~13.5kDaの範囲内であるコラーゲンペプチドを有するコラーゲンペプチド調製物は、コラーゲンペプチドのプロリル残基、好ましくはリシル残基、特に好ましくはプロリル残基およびリシル残基の最大95%、好ましくは最大90%、好ましくは最大85%、好ましくは最大80%、好ましくは最大75%、好ましくは最大70%、好ましくは最大65%、好ましくは最大60%、好ましくは最大55%、好ましくは最大50%、好ましくは最大45%、好ましくは最大40%、好ましくは最大35%、好ましくは最大30%、好ましくは最大25%、好ましくは最大20%、好ましくは最大15%、好ましくは最大10%、好ましくは最大5%がヒドロキシル化されており、好ましくはイン・ピボでヒドロキシル化されており、好ましくはエクス・ピボでヒドロキシル化されており、特に溶解前にエクス・ピボでヒドロキシル化されているか、または溶解後にエクス・ピボでヒドロキシル化されているコラーゲンペプチド調製物である。

20

【0080】

本発明のもう1つの好ましい実施形態では、本発明による前述の方法のいずれかによって製造されたコラーゲンペプチド調製物、特に平均分子量が1~7kDaでかつ分子量が0.1~13.5kDaの範囲内であるコラーゲンペプチドを有するコラーゲンペプチド調製物は、コラーゲンペプチドのプロリル残基、好ましくはリシル残基、特に好ましくはプロリル残基およびリシル残基の0.5~80%、好ましくは1~75%、好ましくは5~70%、好ましくは5~65%、好ましくは10~60%、好ましくは15~55%、好ましくは20~50%、好ましくは25~50%、好ましくは30~50%、好ましくは35~50%、好ましくは40~50%がヒドロキシル化されており、好ましくはイン・ピボでヒドロキシル化されており、好ましくはエクス・ピボでヒドロキシル化されており、特に溶解前にエクス・ピボでヒドロキシル化されているか、または溶解後にエクス・ピボでヒドロキシル化されているコラーゲンペプチド調製物である。

30

40

【0081】

本発明の好ましい一実施形態では、本発明による方法のいずれかによって製造されたコラーゲンペプチド調製物、特に平均分子量が1~7kDaでかつ分子量が0.1~13.5kDaの範囲内であるコラーゲンペプチドを有するコラーゲンペプチド調製物は、そのコラーゲンペプチドがグリコシル化されているコラーゲンペプチド調製物である。好ましくは、コラーゲンペプチドは、イン・ピボでグリコシル化されており、好ましくはエクス・ピボでグリコシル化されている。好ましくは、ヒドロキシル残基の少なくとも1%、好ましくは少なくとも2%、好ましくは少なくとも3%、好ましくは少なくとも4%、好ましくは少なくとも5%、好ましくは少なくとも6%、好ましくは少なくとも7%、好ましくは少なくとも8%、好

50

ましくは少なくとも9%、好ましくは少なくとも10%、好ましくは少なくとも15%、好ましくは少なくとも20%がグリコシル化されており、好ましくはイン・ビボでグリコシル化されており、好ましくはエクス・ビボでグリコシル化されている。

【0082】

本発明のもう1つの好ましい実施形態では、本発明による方法のいずれかによって製造されたコラーゲンペプチド調製物は、そのコラーゲンペプチドがグリコシル化されていないコラーゲンペプチド調製物である。

【0083】

本発明の好ましい一実施形態では、コラーゲンペプチド調製物、特に平均分子量が1~7kDaでかつ分子量が0.1~13.5kDaの範囲内であるコラーゲンペプチドを有するコラーゲンペプチド調製物は、イン・ビボでヒドロキシル化されたコラーゲンペプチド調製物、すなわちコラーゲンペプチド調製物Aである。

10

【0084】

本発明の好ましい一実施形態では、コラーゲンペプチド調製物、特に平均分子量が1~7kDaでかつ分子量が0.1~13.5kDaの範囲内であるコラーゲンペプチドを有するコラーゲンペプチド調製物は、ヒドロキシル化されていないコラーゲンペプチド調製物、すなわちコラーゲンペプチド調製物Bである。

【0085】

本発明のもう1つの好ましい実施形態では、コラーゲンペプチド調製物、特に平均分子量が1~7kDaでかつ分子量が0.1~13.5kDaの範囲内であるコラーゲンペプチドを有するコラーゲンペプチド調製物は、エクス・ビボでヒドロキシル化されたコラーゲンペプチド調製物、すなわちコラーゲンペプチド調製物CまたはDである。

20

【0086】

好ましくは、コラーゲンペプチド調製物、特に平均分子量が1~7kDaでかつ分子量が0.1~13.5kDaの範囲内であるコラーゲンペプチドを有するコラーゲンペプチド調製物は、溶解前に、すなわち加水分解の前にエクス・ビボでヒドロキシル化されたコラーゲンペプチド調製物、すなわちコラーゲンペプチド調製物Cである。

【0087】

本発明のもう1つの実施形態によれば、コラーゲンペプチド調製物、特に平均分子量が1~7kDaでかつ分子量が0.1~13.5kDaの範囲内であるコラーゲンペプチドを有するコラーゲンペプチド調製物は、溶解後に、すなわち加水分解の後にエクス・ビボでヒドロキシル化されたコラーゲンペプチド調製物、すなわちコラーゲンペプチド調製物Dである。

30

【0088】

特に、本発明は、コラーゲンペプチド調製物、特に宿主細胞において組換えにより製造された8~100kDaの範囲内の分子量を有するコラーゲンペプチドの加水分解によって製造された、ヒドロキシル化されたまたはヒドロキシル化されていないコラーゲン調製物であって、該コラーゲンペプチド調製物は、平均分子量が1~7kDaでかつ分子量が0.1~13.5kDaの範囲内であるコラーゲンペプチドを有する、コラーゲンペプチド調製物にも関する。

【0089】

コラーゲンペプチド調製物の有効性に寄与するコラーゲンペプチド調製物の特徴的なペプチドの存在は、特に質量分析法、好ましくはESI(エレクトロスプレーイオン化法)またはMALDI質量分析法によって決定することができ、特徴的なペプチドは、質量スペクトルにおいてピークとして現れる。特徴的なペプチドは、MALDI質量分析法で求めた分子量分布において、その周辺に比べて少なくとも2倍の強度、さらに好ましくは少なくとも4倍の強度を有する。

40

【0090】

本発明によるコラーゲンペプチド調製物、特にコラーゲンペプチド調製物A、コラーゲンペプチド調製物B、コラーゲンペプチド調製物Cおよびコラーゲンペプチド調製物Dは、1,500~3,500Daのサイズの特徴的なペプチドをさらに有してもよい。

【0091】

50

本発明のもう1つの好ましい実施形態では、本発明によるコラーゲンペプチド調製物、特にコラーゲンペプチド調製物A、コラーゲンペプチド調製物B、コラーゲンペプチド調製物Cおよびコラーゲンペプチド調製物Dは、 $< 500\text{Da}$ のサイズを有するコラーゲンペプチドを、最大5.5%、好ましくは最大5%、好ましくは最大4.5%、好ましくは最大4%、好ましくは最大3.5%有する。

【0092】

本実施形態によれば、 500Da 未満のサイズを有するペプチドの割合が特に低いため、従来技術で知られている調製物と比較して、コラーゲンペプチド調製物の味が改善され、特にコラーゲンペプチド調製物の苦味が低減される。

【0093】

本発明によるコラーゲンペプチド調製物、特にコラーゲンペプチド調製物A、コラーゲンペプチド調製物B、コラーゲンペプチド調製物Cおよびコラーゲンペプチド調製物Dのコラーゲンペプチドの、好ましくは35~60%、好ましくは35~55%、好ましくは35~50%、好ましくは36~48%、好ましくは36~46%、好ましくは37~45%、好ましくは38~44%が、 1500Da ~ 3500Da の範囲内のサイズを有する。

【0094】

本発明によるコラーゲンペプチド調製物、特にコラーゲンペプチド調製物A、コラーゲンペプチド調製物B、コラーゲンペプチド調製物Cおよびコラーゲンペプチド調製物Dは、 7500Da ~ 13500Da の範囲内のサイズを有するコラーゲンペプチドを、好ましくは最大2.8%、好ましくは最大2.75%、好ましくは最大2.7%、好ましくは最大2.65%、好ましくは最大2.6%、好ましくは最大2.55%、好ましくは最大2.5%、好ましくは最大2.45%、好ましくは最大2.4%、好ましくは最大2.35%、好ましくは最大2.3%有する。

【0095】

本発明の特に好ましい一実施形態によれば、本発明によるコラーゲンペプチド調製物、特にコラーゲンペプチド調製物A、コラーゲンペプチド調製物B、コラーゲンペプチド調製物Cおよびコラーゲンペプチド調製物Dのコラーゲンペプチドの少なくとも93%、好ましくは少なくとも93.5%、好ましくは少なくとも94%、好ましくは少なくとも94.5%、好ましくは少なくとも95%が、 500Da ~ 7500Da の範囲内のサイズを有する。

【0096】

本発明によるコラーゲンペプチド調製物、特にコラーゲンペプチド調製物A、コラーゲンペプチド調製物B、コラーゲンペプチド調製物Cおよびコラーゲンペプチド調製物Dのコラーゲンペプチドの、好ましくは少なくとも94.5%、好ましくは少なくとも95%、好ましくは少なくとも95.5%、好ましくは少なくとも95.6%、好ましくは少なくとも95.7%、好ましくは少なくとも95.6%、好ましくは少なくとも95.7%、好ましくは少なくとも95.8%、好ましくは少なくとも95.9%、好ましくは少なくとも96%、好ましくは少なくとも96.1%、好ましくは少なくとも96.2%、好ましくは少なくとも96.3%、好ましくは少なくとも96.4%、好ましくは少なくとも96.5%が、 500Da ~ 13500Da の範囲内のサイズを有する。

【0097】

好ましい一実施形態では、本発明によれば、コラーゲンペプチド調製物は、局部的に、特に局所的に、または全身的に、特に腸内に、好ましくは経口的に施与される。

【0098】

本発明の好ましい一実施形態によれば、コラーゲンペプチド調製物は、栄養補助食品の形態で施与される。特に有利に、本発明による栄養補助食品は、溶液、懸濁液またはゲルとして例えばアンプル内に、顆粒または粉末として存在する。その溶解性が良好であることから、コラーゲンペプチド調製物は、濁りを生じることなく様々な飲料に添加することもできる。

【0099】

本発明の好ましい一実施形態によれば、本発明により提供される栄養補助食品は、コラーゲンペプチド調製物以外に、さらなるタンパク質またはタンパク質加水分解物を含まな

10

20

30

40

50

い。

【0100】

本発明の一実施形態によれば、本発明による栄養補助食品は、コラーゲンペプチド調製物以外に、さらなる生理学的活性成分、特にタンパク質またはタンパク質加水分解物を含まない。

【0101】

本発明はさらに、本発明によるコラーゲンペプチド調製物と、少なくとも1つの添加物とを含む製品に関する。

【0102】

本発明の対象はさらに、本発明によるコラーゲン調製物と、少なくとも1つのさらなる成分、特に食品に許容される少なくとも1つの添加物とを含む栄養補助食品である。

10

【0103】

一実施形態では、コラーゲンペプチド調製物は、食品または嗜好品、例えばチョコレートバー、プロテインバー、シリアルバー、牛乳、乳製品、例えばヨーグルト、ホエイまたはクワルク、ならびに乳製品代替品、例えば豆乳、ライスミルク、アーモンドミルクおよびココナッツミルクに添加することができる（いわゆる機能性食品）。

【0104】

したがって、本発明によるコラーゲン調製物を含む食品または嗜好品も、本発明の対象である。

【0105】

本発明によれば、コラーゲンペプチド調製物を医薬組成物の形態で施与することをさらに提供することができる。特に有利に、本発明による医薬組成物は、例えば錠剤、トローチ剤（Lutschtabletten）、チュアブル錠剤、カプセル剤、バイトカプセル剤、糖衣錠剤、トローチ剤（Pastillen）、液剤、ゲル剤または軟膏剤の形態で施与される。

20

【0106】

本発明によるコラーゲンペプチド調製物と、製薬学的に許容される少なくとも1つの添加物とを含む医薬組成物も、本発明の対象である。

【0107】

もう1つの実施形態では、コラーゲンペプチド調製物を化粧用組成物の形態で施与することを提供することができる。特に有利に、本発明による化粧用組成物は、例えばローション、軟膏、クリーム、ゲル、パウダー、シリンジ（Spritzen）またはスプレーの形態で施与される。

30

【0108】

本発明はまた、本発明によるコラーゲンペプチド調製物と、少なくとも1つの皮膚適合性添加物とを含む化粧用組成物にも関する。

【0109】

本発明の好ましい一実施形態によるコラーゲンペプチド調製物が、製品、特に栄養補助食品、食品または嗜好品、医薬組成物または化粧用組成物の唯一の生理学的活性成分として使用されないことを条件として、これを、全般的な健康、特に持久力に良い影響を与える1つ以上の他の成分と組み合わせてもよい。そのような成分は、好ましくは、ビタミンC、各種ビタミンB、D、EおよびK、オメガ3脂肪酸、オメガ6脂肪酸、共役リノール酸、カフェインおよびその誘導体、ガラナ抽出物、緑茶抽出物、エピガロカテキンガレート、クレアチン、L-カルニチン、コリン、セリン、リポ酸、N-アセチルシステイン、NADH、D-リボース、アスパラギン酸マグネシウム、抗酸化物質、例えばアントシアニン、カロチノイド、フラボノイド、レスベラトロール、グルタチオンおよびスーパーオキシドディスムターゼ（SOD）、カンナビノイド、例えばカンナビジオール（CBD）、アダプトゲン、例えばロディオアラロゼア（*Rhodiola rosea*）、パナックスジンセン（*Panax ginseng*）、ウィザニアソムニフェラ（*Withania somnifera*）、シイタケ、レイシ（*Ganoderma lucidum*）、マカ（*Lepidium meyenii*）、ミネラル物質、例えば鉄、マグネシウム、カルシウム、亜鉛、セレンおよびリン、ならびに他のタンパク質、加水分解物およびペプチド、例えばダ

40

50

イズタンパク質、コムギタンパク質およびホエイプロテインからなる群から選択される。

【0110】

本発明の好ましい一実施形態では、コラーゲンペプチド調製物は、1~40g/日、好ましくは1~30g/日、好ましくは1~20g/日、好ましくは1~15g/日、好ましくは2.5~30g/日、好ましくは2.5~20g/日、好ましくは2.5~15g/日、好ましくは2.5~10g/日、好ましくは4~15g/日、好ましくは4~12g/日、さらに好ましくは5~25g/日、好ましくは5~15g/日、さらに好ましくは10~25g/日、好ましくは12~22g/日、特に12.5~20g/日、特に好ましくは6~15g/日、特に2.5~7.5g/日、好ましくは2.5~5g/日の量で施与される。

【0111】

本発明はまた、骨の健康を維持および改善するための治療的方法、骨粗鬆症を予防および/または治療するための治療的方法、サルコペニアを予防および/または治療するための治療的方法、筋肉量の退行性低下を予防および/または治療するための治療的方法、筋力を向上させるための治療的方法、脂肪分解を刺激するための治療的方法、体重を減少させるための治療的方法に使用するための、本発明によるコラーゲンペプチド調製物にも関する。

【0112】

好ましい一実施形態では、本発明はさらに、骨疾患、特に骨粗鬆症を予防および/または治療する方法に使用するための、本発明によるコラーゲンペプチド調製物に関する。

【0113】

好ましい一実施形態では、本発明は、サルコペニアを予防および/または治療する方法に使用するための、本発明によるコラーゲンペプチド調製物に関する。

【0114】

好ましい一実施形態では、本発明は、筋肉量の退行性低下を予防および/または治療する方法に使用するための、本発明によるコラーゲンペプチド調製物に関する。

【0115】

好ましい一実施形態では、本発明は、軟骨疾患、特に関節症または関節炎を予防および/または治療する方法に使用するための、本発明によるコラーゲンペプチド調製物に関する。

【0116】

好ましい一実施形態では、本発明は、筋力を向上させる方法に使用するための、本発明によるコラーゲンペプチド調製物に関する。

【0117】

好ましい一実施形態では、本発明は、ミトコンドリア活性の低下を特徴とする病態を予防および/または治療する方法、特に持久力の低下を特徴とする病態を予防および/または治療する方法に使用するための、本発明によるコラーゲンペプチド調製物に関する。

【0118】

好ましい一実施形態では、本発明は、脂肪分解を刺激する方法に使用するための、本発明によるコラーゲンペプチド調製物に関する。

【0119】

好ましい一実施形態では、本発明は、体重を減少させる方法に使用するための、本発明によるコラーゲンペプチド調製物に関する。

【0120】

好ましい一実施形態では、本発明は、変性関節疾患、特に関節症、関節リウマチ、リウマチ性疾患、脊椎炎および/または結合組織病を予防および/または治療する方法に使用するための、本発明によるコラーゲンペプチド調製物に関する。

【0121】

好ましい一実施形態では、本発明は、腱または靭帯の疾患を予防および/または治療する方法に使用するための、本発明によるコラーゲンペプチド調製物に関する。

【0122】

10

20

30

40

50

好ましい一実施形態では、本発明は、皮膚疾患、特に尋常性乾癬、にきび、アトピー性皮膚炎、慢性掻痒および/または酒さ様皮膚炎を予防および/または治療する方法に使用するための、本発明によるコラーゲンペプチド調製物に関する。

【0123】

好ましい一実施形態では、本発明は、創傷、特に慢性創傷、急性創傷および/または熱傷を治療する方法に使用するための、本発明によるコラーゲンペプチド調製物に関する。

【0124】

好ましい一実施形態では、本発明は、神経変性疾患を予防および/または治療する方法に使用するための、本発明によるコラーゲンペプチド調製物に関する。

【0125】

好ましい一実施形態では、本発明は、認知症を予防および/または治療する方法に使用するための、本発明によるコラーゲンペプチド調製物に関する。

【0126】

好ましい一実施形態では、本発明は、アルツハイマー病を予防および/または治療する方法に使用するための、本発明によるコラーゲンペプチド調製物に関する。

【0127】

好ましい一実施形態では、本発明は、精神機能の低下を特徴とする病態を予防および/または治療する方法に使用するための、本発明によるコラーゲンペプチド調製物に関する。

【0128】

好ましい一実施形態では、本発明は、血液脳関門、特に髄膜の構造および/または機能の機能不全に関連する疾患を予防および/または治療する方法に使用するための、本発明によるコラーゲンペプチド調製物に関する。

【0129】

好ましい一実施形態では、本発明は、腸疾患、特に慢性炎症性腸疾患を予防および/または治療する方法に使用するための、本発明によるコラーゲンペプチド調製物に関する。

【0130】

好ましい一実施形態では、本発明は、心臓血管系の疾患、特に血管の構造および/または機能の疾患、特に血管壁の構造および/または機能の疾患を予防および/または治療する方法に使用するための、特に高血圧および/または血行障害を予防および/または治療する方法に使用するための、本発明によるコラーゲンペプチド調製物に関する。

【0131】

好ましい一実施形態では、本発明は、歯周組織 (Zahnhalteapparats) の疾患を予防および/または治療する方法に使用するための、本発明によるコラーゲンペプチド調製物に関する。

【0132】

本発明はさらに、骨の健康を維持および改善するための非治療的方法、骨粗鬆症を予防するための非治療的方法、サルコペニアを予防および/もしくは治療するための非治療的方法、筋肉量の退行性低下を予防するための非治療的方法、筋力を向上させるための非治療的方法、脂肪分解を刺激するための非治療的方法、体重を減少させるための非治療的方法、ならびに/または変形性関節症を予防するための非治療的方法に使用するための、本発明によるコラーゲンペプチド調製物に関する。

【0133】

好ましい一実施形態では、本発明はさらに、皮膚を視覚的および構造的に改善するための、特にしわの形成を減少させるための、皮膚の弾力性を向上させるための、皮膚の張りを高めるための、皮膚の水分量を増加させるための、セルライトを減少させるための、および/またはストレッチマーク、特に妊娠線を減少させるための、本発明によるコラーゲンペプチド調製物の非治療的使用に関する。

【0134】

もう1つの好ましい実施形態では、本発明は、爪の成長を促進するための、および/または爪の脆さを低減するための、本発明によるコラーゲンペプチド調製物の非治療的使用

10

20

30

40

50

に関する。

【0135】

好ましい一実施形態では、本発明はさらに、毛髪を視覚的および構造的に改善するための、特に髪質を改善するための、枝毛を減少させるための、および/または抜け毛を減少/遅延させるための、本発明によるコラーゲンペプチド調製物の非治療的使用に関する。

【0136】

もう1つの好ましい実施形態では、本発明は、ミトコンドリア数および/またはミトコンドリア活性を増加させるための、本発明によるコラーゲンペプチド調製物の非治療的使用に関する。

【0137】

もう1つの好ましい実施形態では、本発明は、持久力を向上させるための、本発明によるコラーゲンペプチド調製物の非治療的使用に関する。

【0138】

もう1つの好ましい実施形態では、本発明は、精神機能を向上させるための、本発明によるコラーゲンペプチド調製物の非治療的使用に関する。

【0139】

本発明の好ましい一実施形態では、本発明によるコラーゲンペプチド調製物は、本発明により提供される用途のいずれかに使用するために、単独で、すなわち他の物質を含まずに使用される。

【0140】

本発明のもう1つの実施形態では、本発明によるコラーゲンペプチド調製物は、本発明により提供される用途において生物学的有効性を示す唯一の作用物質として使用される。

【0141】

もう1つの好ましい実施形態では、本発明によるコラーゲンペプチド調製物は、本発明により提供される用途において、少なくとも1つのさらなる作用物質、特に生物学的有効性を示すもう1つの作用物質とともに使用される。

【0142】

本発明は、治療的に十分な量の本発明によるコラーゲンペプチド調製物を、必要に応じて添加物とともにヒトまたは動物の身体に施与する、前述の適応症、特に前述の治療適応症を予防および/または治療する方法にも関する。

【0143】

本発明はまた、筋力を向上させるための、筋肉量を増加させるための、脂肪分解を刺激するための、体重を減少させるための、骨の健康を維持および/もしくは改善するための、皮膚の健康を維持および/もしくは改善するための、腸の健康を維持および/もしくは改善するための、血管構造を維持および/もしくは改善するための、心臓血管系の健康を維持および/もしくは改善するための、歯周組織 (Zahnhalteapparats) を維持および/もしくは改善するための、ヒトもしくは動物の身体の爪および毛髪の健康を維持および/もしくは改善するための、ミトコンドリア数および/もしくはミトコンドリア活性を維持および/もしくは増加させるための、持久力を維持および/もしくは向上させるための、または精神機能を維持および/もしくは向上させるための、非治療的な方法であって、本発明による少なくとも1つのコラーゲンペプチド調製物をヒトまたは動物の身体に施与する、方法にも関する。

【0144】

本発明はさらに、フィルム、シートおよびコーティングの製造方法に使用するための、本発明によるコラーゲンペプチド調製物に関する。コーティングとは、例えば、ペイントおよびワニス、特に特定の光学的効果を有するペイントおよびワニス、または自浄性表面を生じさせるためのコーティングであり得る。

【0145】

好ましい一実施形態では、本発明における「コラーゲン」という用語は、当該技術分野で慣用されているとおりに、特に例えば国際公開第01/34646号に定義されているよう

10

20

30

40

50

に理解される。好ましい一実施形態では、「コラーゲン」という用語は、I~XXVII型コラーゲンに関する。もう1つの好ましい実施形態では、「コラーゲン」という用語は、配列グリシン - プロリン、グリシン - 4 - ヒドロキシプロリンまたはグリシン - X - 4 - ヒドロキシプロリン、好ましくは反復モチーフ (Gly - X - Y)_nを有するペプチドを意味すると理解され、ここで、XおよびYは、いずれのアミノ酸であってもよく、好ましくはプロリンおよび4 - ヒドロキシプロリンであってよい。特に好ましくは、「コラーゲン」という用語は、反復モチーフ (Gly - Pro - Y)_nおよび/または (Gly - X - Hyp)_mを有するペプチドを意味すると理解され、ここで、XおよびYは、いずれのアミノ酸であってもよい。

【0146】

「ゼラチン」という用語は、本発明において、好ましくは、当該技術分野で慣用されているとおりに、特に例えば国際公開第01/34646号で定義されているように理解される。

10

【0147】

本発明において、「コラーゲンペプチド」という用語は、好ましくは、上述の定義によるコラーゲン中に存在するアミノ酸配列を有するペプチドを意味すると理解される。「コラーゲンペプチド」という用語は、好ましくは、天然に存在するコラーゲンペプチドのアミノ酸配列を改変して得られた遺伝子組換えコラーゲンペプチドをも意味すると理解される。ここで、本発明による方法の工程e)で得られた、「コラーゲンペプチド」から回収されたコラーゲンペプチド調製物は、好ましくは、骨芽細胞、線維芽細胞および軟骨細胞における細胞外マトリックスタンパク質の合成の刺激に関する少なくとも1つのイン・ビトロ試験において、特に、骨芽細胞、線維芽細胞および軟骨細胞における細胞外マトリックスタンパク質の合成の刺激に関する実施例3~7、特に実施例3~5に示されたイン・ビトロ試験のうち少なくとも1つ、好ましくは少なくとも2つ、好ましくはすべてにおいて、生物学的有効性を示し、好ましくは、天然源から単離されたコラーゲンペプチド調製物、特に組換えにより製造されたものではないコラーゲンペプチド調製物と同等の生物学的有効性を示し、特に好ましくは、天然源から単離されたコラーゲンペプチド調製物、特に組換えにより製造されたものではないコラーゲンペプチド調製物よりも良好な生物学的有効性を示す。

20

【0148】

本発明において、「組換えDNA」という用語は、遺伝子工学的手法によってイン・ビトロで製造された人工的に製造または操作されたDNA分子を意味する。好ましい一実施形態では、組換えDNAは、起源の異なる生物の成分から構成されている。

30

【0149】

本発明において、「組換えコラーゲンペプチドまたは組換えにより製造されたコラーゲンペプチド」とは、組換えDNAによってコードされるコラーゲンペプチドを意味すると理解される。

【0150】

本発明において、「発現カセット」という用語は、DNAセグメントであって、該セグメントにコードされている情報をRNA、特にmRNAに転写する役割を担い、かつ少なくとも1つのプロモーターと、およびタンパク質をコードする1つのヌクレオチド配列とを有し、通常は、少なくとも1つのプロモーターと、タンパク質をコードする少なくとも1つのヌクレオチド配列と、必要に応じてターミネーターと、を有するものを意味すると理解される。

40

【0151】

本発明において、「ヌクレオチド配列」とは、核酸、特に核酸鎖、特にDNAまたはRNA鎖のヌクレオチドの配列を意味すると理解される。したがって、「ヌクレオチド配列」とは、情報単位であると同時に、その情報を物理的に表現しているDNAまたはRNA鎖であると理解すべきである。

【0152】

本発明において、「発現系」という用語は、対象となる制御されたタンパク質の生合成を行うことができる系を意味すると理解される。本発明によれば、「発現系」という用語には、タンパク質の生合成に必要な成分が細胞内に存在しない、すなわちタンパク質の生

50

合成が細胞外で行われる無細胞発現系と、タンパク質の生合成が生細胞内で行われる細胞ベースの発現系との双方が含まれる。本発明において、無細胞発現系とは、好ましくは、大腸菌 (*E. coli*)、昆虫細胞、コムギ胚芽、タバコ細胞または哺乳類細胞、特にCHO細胞またはウサギの網状赤血球からの溶解産物または抽出物で、タンパク質の生合成に必要な成分、特に翻訳系および転写系を有するものである。

【0153】

本発明において、「宿主細胞」とは、外来DNA、特に組換えDNAによってコードされるペプチドまたはタンパク質を発現することができる生細胞を意味すると理解される。

【0154】

本発明において、「溶解前 (praelysal)」および「溶解後 (postlysal)」という用語は、加水分解の前または後の時点、特に酵素または酸触媒による加水分解の前または後の時点の意味する。

10

【0155】

本発明において、「インキュベートする」という用語は、細胞ベースの発現系、特に宿主細胞を培養することと、無細胞の発現系を特定の条件にさらすこととの双方を意味すると理解される。

【0156】

本発明によれば、方法工程c)による「コラーゲンペプチドの回収」および方法工程e)による「コラーゲンペプチド調製物の回収」という用語は、既知の単離法、例えば遠心分離法、特に分画遠心分離法および/または密度勾配遠心分離法、クロマトグラフィー法、特にゲルろ過クロマトグラフィー、イオン交換クロマトグラフィー、アフィニティクロマトグラフィーおよび/または高速液体クロマトグラフィー、電気泳動法、ろ過法および/または抽出法により、複数の成分を含む組成物からコラーゲンペプチドまたはコラーゲンペプチド調製物を単離するための当業者に知られた方法を指し、多成分を含む組成物からの当該成分の濃縮および精製は、好ましくは複数の単離法を連続的に適用することによって達成することができる。

20

【0157】

本発明によれば、「コラーゲンペプチドの発現を可能にする条件」とは、特に温度、圧力、時間、光、ならびに誘導剤および/または抑制剤の存在または非存在など、コラーゲンペプチドの発現を活性化または増強する条件を意味すると理解される。好ましい一実施形態では、コラーゲンペプチドの発現は、高細胞密度発酵の範囲内で、特に高圧下、好ましくは高気圧下で行われる。コラーゲンペプチドの発現を可能にする具体的な条件は、当業者には知られており、使用される発現系および使用される発現カセット、特にその中に含まれるプロモーターに依存する。コラーゲンペプチドの発現は、発現カセットの構造に応じて、構成的発現であっても誘導的発現であってもよい。

30

【0158】

本発明において、「コラーゲンペプチド調製物が製造される条件下でコラーゲンペプチドを加水分解する」という用語は、特に加水分解の種類、任意に加水分解に使用される少なくとも1つの酵素の種類および量、pH値、加水分解時間、加水分解温度といった、8~100kDaの範囲内の分子量を有する組換えにより製造されたコラーゲンペプチドから平均分子量が1~7kDaでかつ分子量が0.1~13.5kDaの範囲内であるコラーゲンペプチドが得られる条件を意味すると理解される。8~100kDaの範囲内の分子量を有する組換えにより製造されたコラーゲンペプチドから平均分子量が1~7kDaでかつ分子量が0.1~13.5kDaの範囲内であるコラーゲンペプチドを得るのに適した条件は、例えば実施例1に示されている。

40

【0159】

本発明によるコラーゲンペプチド調製物中のコラーゲンペプチドの分子量分布に関して示された割合は、それぞれ、当該コラーゲンペプチド調製物に含まれるすべてのコラーゲンペプチドに対する重量%を意味する。

【0160】

50

本発明において、「含む (umfassend)」および「有する (aufweisend)」という用語は、これらの用語によって明示的に対象となる要素に加えて、明示的に言及されていないそれ以外の要素が追加されてもよいことを意味すると理解される。本発明において、これらの用語は、明示的に言及された要素のみが対象となり、それ以外の要素が存在しないこととも理解される。この特定の実施形態では、「含む」および「有する」という用語の意味は、「からなる (bestehend aus)」という用語と同義である。さらに、「含む」および「有する」という用語は、明示的に言及された要素に加えて、言及されていないが機能的および質的に従属的な性質を有するそれ以外の要素も含む組成物も対象とする。この実施形態では、「含む」および「有する」という用語の意味は、「実質的に～からなる (im Wesentlichen bestehend aus)」という用語と同義である。

10

【0161】

本発明において、「および/または」という用語は、「および/または」という用語によって接続された群のすべての構成要素が、互いに代替的に、およびそれぞれ互いに累積的に任意の組み合わせで開示されていることを意味すると理解される。これは、「A、Bおよび/またはC」という表現について、これは以下の開示内容、すなわちa) AまたはBまたはC、またはb) (AおよびB)、またはc) (AおよびC)、またはd) (BおよびC)、またはe) (AおよびBおよびC)と理解されるべきであることを意味している。

【0162】

さらなる好ましい実施形態は、従属請求項から明らかである。

【0163】

以下、一般的な発明の思想を限定することなく、図、表および付属の実施例を参照しながら本発明を説明する。

20

【図面の簡単な説明】

【0164】

【図1】比較例製品1および2、ならびに所定の分子量範囲における実施例1.3、1.4および1.5によるコラーゲンペプチド調製物の、個々のコラーゲンペプチドの割合(%)を示す図である。

【図2A】比較例製品1の1%溶液のクロマトグラムである。対数目盛の横座標に分子量をプロットした。

【図2B】比較例製品2の1%溶液のクロマトグラムである。対数目盛の横座標に分子量をプロットした。

30

【図3A】実施例1.3によるコラーゲンペプチド調製物の1%溶液のクロマトグラムである。対数目盛の横座標に分子量をプロットした。

【図3B】実施例1.4によるコラーゲンペプチド調製物の1%溶液のクロマトグラムである。対数目盛の横座標に分子量をプロットした。

【図4】実施例1.5によるコラーゲンペプチド調製物の1%溶液のクロマトグラムである。対数目盛の横座標に分子量をプロットした。

【図5】コラーゲンペプチドの非存在下での(対照1)、0.5mg/mlの、100kDaのコラーゲンペプチド(対照2)、平均分子量1.8kDaの本発明によるヒドロキシル化されていないコラーゲンペプチド調製物(サンプル1)、平均分子量2.4kDaの本発明によるヒドロキシル化されていないコラーゲンペプチド調製物(サンプル2)、または平均分子量3.4kDaの本発明によるヒドロキシル化されていないコラーゲンペプチド調製物(サンプル3)の存在下での、ヒト初代線維芽細胞のコラーゲン合成の刺激の比較を示す図である。エラーバーは、標準偏差を示す。

40

【図6】コラーゲンペプチドの非存在下での(対照1)、0.5mg/mlの、100kDaのコラーゲンペプチド(対照2)、平均分子量1.8kDaの本発明によるヒドロキシル化されていないコラーゲンペプチド調製物(サンプル1)、平均分子量2.4kDaの本発明によるヒドロキシル化されていないコラーゲンペプチド調製物(サンプル2)、または平均分子量3.4kDaの本発明によるヒドロキシル化されていないコラーゲンペプチド調製物(サンプル3)の存在下での、ヒト初代線維芽細胞のエラスチン合成の刺激の比較を示す図である。エラー

50

バーは、標準偏差を示す。

【図7】コラーゲンペプチドの非存在下での（対照1）、0.5mg/mlの、100kDaのコラーゲンペプチド（対照2）、平均分子量1.8kDaの本発明によるヒドロキシル化されていないコラーゲンペプチド調製物（サンプル1）、平均分子量2.4kDaの本発明によるヒドロキシル化されていないコラーゲンペプチド調製物（サンプル2）、または平均分子量3.4kDaの本発明によるヒドロキシル化されていないコラーゲンペプチド調製物（サンプル3）の存在下での、ヒト初代線維芽細胞のプロテオグリカン合成の刺激の比較を示す図である。エラーバーは、標準偏差を示す。

【図8】コラーゲンペプチドの非存在下での（対照1）、0.5mg/mlの、平均分子量7kDaの本発明によるヒドロキシル化されたコラーゲンペプチド調製物（サンプル4）、平均分子量5.6kDaの本発明によるヒドロキシル化されたコラーゲンペプチド調製物（サンプル5）、または平均分子量1.3kDaの本発明によるヒドロキシル化されたコラーゲンペプチド調製物（サンプル6）の存在下での、ヒト初代線維芽細胞のコラーゲン合成の刺激の比較を示す図である。エラーバーは、標準偏差を示す。

【図9】コラーゲンペプチドの非存在下での（対照1）、0.5mg/mlの、平均分子量7kDaの本発明によるヒドロキシル化されたコラーゲンペプチド調製物（サンプル4）、平均分子量5.6kDaの本発明によるヒドロキシル化されたコラーゲンペプチド調製物（サンプル5）、または平均分子量1.3kDaの本発明によるヒドロキシル化されたコラーゲンペプチド調製物（サンプル6）の存在下での、ヒト初代線維芽細胞のエラスチン合成の刺激の比較を示す図である。エラーバーは、標準偏差を示す。

【図10】コラーゲンペプチドの非存在下での（対照1）、0.5mg/mlの、平均分子量7kDaの本発明によるヒドロキシル化されたコラーゲンペプチド調製物（サンプル4）、平均分子量5.6kDaの本発明によるヒドロキシル化されたコラーゲンペプチド調製物（サンプル5）、または平均分子量1.3kDaの本発明によるヒドロキシル化されたコラーゲンペプチド調製物（サンプル6）の存在下での、ヒト初代線維芽細胞のプロテオグリカン合成の刺激の比較を示す図である。エラーバーは、標準偏差を示す。

【実施例】

【0165】

実施例1 コラーゲンペプチドの製造

1.1 ピキア・パストリス (*Pichia pastoris*) で組換えにより製造されたサイズ45kDaのウシ由来のヒドロキシル化されていないコラーゲンペプチドの、中性プロテアーゼによる加水分解

0.789%のコラーゲン溶液を、50mlの瓶内にてクライオスタット (Kryostat) でまず50 に加温した。次いで、この加温したコラーゲン溶液に (コラーゲンの乾燥固形分 (Trockensubstanz (TS)) ベースで) 200ppmのCaCl₂ · 2H₂Oを加え、この溶液のpH値を10%NaOH溶液により6.2に調整した。次の工程で、このコラーゲン溶液に (コラーゲンのTSベースで) 0.8%のSumizyme BNP-Lを加えた。

【0166】

このコラーゲンペプチドの180分の加水分解時間後の平均分子量を求めたところ、5.04kDaであった。

【0167】

1.2 ピキア・パストリス (*Pichia pastoris*) で組換えにより製造されたサイズ45kDaのウシ由来のヒドロキシル化されていないコラーゲンペプチドの、アルカリ性プロテアーゼによる加水分解

0.792%のコラーゲン溶液を、50mlの瓶内にてクライオスタットでまず63 に加温した。次いで、この加温したコラーゲン溶液に (コラーゲンのTSベースで) 200ppmのCaCl₂ · 2H₂Oを加え、この溶液のpH値を10%NaOH溶液により7.75に調整した。次の工程で、このコラーゲン溶液に (コラーゲンのTSベースで) 0.3%のAlcalase 2.4Lを加えた。

【0168】

このコラーゲンペプチドの180分の加水分解時間後の平均分子量を求めたところ、3.01

kDaであった。

【0169】

1.3 ピキア・パストリス (*Pichia pastoris*) で組換えにより製造されたサイズ25kDaのヒト由来のヒドロキシル化されていないコラーゲンペプチドの、アルカリ性プロテアーゼによる加水分解

2.85%のコラーゲン溶液を、50mlの瓶内にてクライオスタットでまず63 に加温した。次いで、この加温したコラーゲン溶液に(コラーゲンのTSベースで)200ppmのCaCl₂・2H₂Oを加え、この溶液のpH値を10%NaOH溶液により7.6に調整した。次の工程で、このコラーゲン溶液に(コラーゲンのTSベースで)0.3%のAlcalase 2.4Lを加えた。

【0170】

このコラーゲンペプチドの45分の加水分解時間後の平均分子量は、1.8kDaであった。

【0171】

1.4 ピキア・パストリス (*Pichia pastoris*) で組換えにより製造されたサイズ100kDaのヒト由来のヒドロキシル化されていないコラーゲンペプチドの、アルカリ性プロテアーゼによる加水分解

まず、2.85%のコラーゲン溶液を50mlの瓶内にてクライオスタットで63 に加温した。次いで、この加温したコラーゲン溶液に(コラーゲンのTSベースで)200ppmのCaCl₂・2H₂Oを加え、この溶液のpH値を10%NaOH溶液により7.6に調整した。次いで、このコラーゲン溶液に(コラーゲンのTSベースで)0.4%のAlcalase 2.4Lを加えた。

【0172】

45分の加水分解時間後、この溶液は平均分子量2.4kDaのコラーゲンペプチドを有していた。得られたこの本発明によるコラーゲンペプチド調製物を、実施例6でサンプル2として使用した。

【0173】

1.5 ピキア・パストリス (*Pichia pastoris*) で組換えにより製造されたサイズ100kDaのヒト由来のヒドロキシル化されていないコラーゲンペプチドの、アルカリ性プロテアーゼによる加水分解

1.5%のコラーゲン溶液を、50mlの瓶内にてクライオスタットで63 に加温した。次いで、この加温したコラーゲン溶液に(コラーゲンのTSベースで)200ppmのCaCl₂・2H₂Oを加え、この溶液のpH値を10%NaOH溶液により7.6に調整した。最後に、このコラーゲン溶液に(コラーゲンのTSベースで)0.3%のAlcalase 2.4Lを加えた。

【0174】

このコラーゲンペプチドの60分の加水分解時間後の平均分子量は、1.8kDaであった。得られたこの本発明によるコラーゲンペプチド調製物を、実施例6でサンプル1として使用した。

【0175】

1.6 ピキア・パストリス (*Pichia pastoris*) で組換えにより製造されたサイズ25kDaのヒト由来のヒドロキシル化されていないコラーゲンペプチドの、アルカリ性プロテアーゼによる加水分解

2.85%のコラーゲン溶液を、50mlの瓶内にてクライオスタットでまず63 に加温した。次いで、この加温したコラーゲン溶液に(コラーゲンのTSベースで)200ppmのCaCl₂・2H₂Oを加え、この溶液のpH値を10%NaOH溶液により7.6に調整した。次の工程で、このコラーゲン溶液に(コラーゲンのTSベースで)0.1%のAlcalase 2.4Lを加えた。

【0176】

このコラーゲンペプチドの60分の加水分解時間後の平均分子量は、3.4kDaであった。得られたこの本発明によるコラーゲンペプチド調製物を、実施例6でサンプル3として使用した。

【0177】

1.7 ピキア・パストリス (*Pichia pastoris*) で組換えにより製造されたサイズ45kDaのウシ由来のヒドロキシル化されたコラーゲンペプチドの、アルカリ性プロテアーゼによ

10

20

30

40

50

る加水分解

5.53%のコラーゲン溶液を、250mlのガラス瓶内にてクライオスタットでまず55 に加温した。次いで、この加温したコラーゲン溶液に（コラーゲンのTSベースで）200ppmのCaCl₂・2H₂Oを加え、この溶液のpH値を2%NaOH溶液により7.59に調整した。次の工程で、このコラーゲン溶液に（コラーゲンのTSベースで）0.2%のAlcalase 2.4Lを加えた。

【0178】

このコラーゲンペプチドの150分の加水分解時間後の平均分子量を求めたところ、7kDaであった。得られたこの本発明によるコラーゲンペプチド調製物を、実施例7でサンプル4として使用した。

10

【0179】

1.8 ピキア・パストリス（*Pichia pastoris*）で組換えにより製造されたサイズ45kDaのウシ由来のヒドロキシル化されたコラーゲンペプチドの、アルカリ性プロテアーゼによる加水分解

5.00%のコラーゲン溶液を、100mlのガラス瓶内にてクライオスタットでまず55 に加温した。次いで、この加温したコラーゲン溶液に（コラーゲンのTSベースで）200ppmのCaCl₂・2H₂Oを加え、この溶液のpH値を2%NaOH溶液により7.60に調整した。次いで、このコラーゲン溶液に（コラーゲンのTSベースで）0.25%のNZ37071を加えた。

【0180】

このコラーゲンペプチドの240分の加水分解時間後の平均分子量は、5.6kDaであった。得られたこの本発明によるコラーゲンペプチド調製物を、実施例7でサンプル5として使用した。

20

【0181】

1.9 ピキア・パストリス（*Pichia pastoris*）で組換えにより製造されたサイズ45kDaのウシ由来のヒドロキシル化されたコラーゲンペプチドの、アルカリ性プロテアーゼによる加水分解

実施例1.7により得られたコラーゲンペプチド加水分解物から出発して、この加水分解物の高分子成分を、5000Daのサイズ排除膜を備えた濃縮装置（例えばVivaspin 20）により除去した。

【0182】

このようにして得られたコラーゲンペプチドについて平均分子量を求めたところ、1.3kDaであった。この本発明によるコラーゲンペプチド調製物を、実施例7でサンプル6として使用した。

30

【0183】

1.10 コラーゲンペプチド加水分解物のゲルクロマトグラフィー分析

実施例1.3～1.5で得られたコラーゲンペプチド加水分解物の分子量分布と、平均分子量2.3kDaおよび1.7kDaの市販の2つの比較例製品の分子量分布とを、ゲルクロマトグラフィー（Knauer、ドイツ）により求めた。WinGPCソフトウェア（PSS GmbH、ドイツ・マインツ）により統計解析を行った。ゲルクロマトグラフィーには以下のパラメータを用いた。

40

【0184】

固定相 TSK 2000 SW XL（TOSOH Bioscience GmbH）

移動相 0.4mol/l リン酸二水素ナトリウム、pH5.3

流量 0.5ml/min

校正用標準物質 所定のコラーゲンタイプ1断片（FILK）

検出 214nmでのUV検出（Knauer）

サンプル濃度 1%

【0185】

異なるコラーゲンペプチド加水分解物について、表1および図1に示す、所定の分子量範囲における個々のコラーゲンペプチドの割合（%）が得られた。

50

【 0 1 8 6 】

【表 1】

表 1: 所定の分子量範囲における個々のコラーゲンペプチドの割合の評価。分析は、所定の 1 型コラーゲンペプチド標準物質を用いたゲルクロマトグラフィーにより行った。

	比較例 製品 1 2.3kDa	比較例 製品 2 1.7kDa	実施例 1.3	実施例 1.4	実施例 1.5
個々のペプチドの 分子量範囲(Da)	重量割合 (%)	重量割合 (%)	重量割合 (%)	重量割合 (%)	重量割合 (%)
< 500	5.81	13.09	2.72	2.47	3.26
1500 ~ 500	43.63	50.84	45.78	37.69	47.84
3500 ~ 1500	31.87	25.52	43.67	40.82	39.29
7500 ~ 3500	15.63	8.93	7.64	16.74	9.23
13500 ~ 7500	2.88	1.41	0.19	2.28	0.38
> 13500	0.2	0.21	0	0	0

10

20

【 0 1 8 7 】

比較例製品と実施例 1.3 ~ 1.5 によるコラーゲンペプチド調製物とのそれぞれの 1% 溶液のクロマトグラムを、図 2 ~ 4 に示す。分子量分布が狭く、高分子ペプチドが存在せず、かつ本発明による加水分解を実施することによって、500Da 未満のペプチドの割合を大幅に低下させることができ、なおかつ平均分子量が 2kDa 未満の生成物を得ることができる。それと同時に、好ましい 1500 ~ 3500Da のサイズ範囲のペプチドの数が大幅に増加する。1500Da 超のペプチドは、当業者には味覚的にニュートラルであると考えられているのに対して、特に 500Da 未満の低分子ペプチドは、コラーゲンペプチド生成物の苦味の大きな一因である。

30

【 0 1 8 8 】

このようなペプチドの形成を避けることは、感覚的にも官能的にも優れておりかつ消費者が「ニュートラル」な味であると分類するコラーゲンペプチドを製造する上で、さらなる利点となる。また、3 ~ 7kDa の範囲の高い平均分子量を有する生成物についても同様である。

【 0 1 8 9 】

上述の実施例から、本発明による方法により、すなわち加水分解の出発物質として均一な組換えコラーゲン断片を使用することにより、加水分解条件の選択に応じて通常は 4 ~ 6 個の特徴的なピークを有する狭い分子量分布で好ましい個々のペプチドを形成することが可能であるとの推断ができる（図 3A、図 3B、図 4）。

40

【 0 1 9 0 】

このような個々のペプチドの形成は、出発断片の選択に加えて加水分解条件の選択によっても狙いどおりに制御することができるが、このことは、動物の出発物質を使用した場合にはその不均一性ゆえにほぼ不可能である。

【 0 1 9 1 】

実施例 2 コラーゲン断片のエクス・ピボでのヒドロキシル化

エクス・ピボでのコラーゲン断片の翻訳後修飾（プロリン残基のヒドロキシル化）に、特異的な 4-OH プロリルヒドロキシラーゼ（P4H）を、補因子である α -ケトグルタル酸、第一鉄イオンおよび O_2 の存在下で使用したが、非特異的なヒドロキシラーゼを使用することも考えられる。そのため、8mM のコラーゲン断片を、14mM の α -ケトグルタル酸、

50

0.5mMの硫酸第一鉄および1.5mMのL-アスコルビン酸の存在下で、総体積1mLの50mMのMES緩衝剤(pH6.5)および酵素溶液中で、サーモミキサーで37℃にて振とう(300rpm)しながら14~18時間インキュベートした。あるいは前述の条件でのインキュベーションを、インキュベーター内で行ってもよい。

【0192】

実施例3 骨芽細胞の活性(特に骨の健康)

本発明によるコラーゲンペプチド調製物の、骨の健康維持ならびに骨疾患の予防および治療に関する生物学的有効性を分析するために、骨芽細胞によるマトリックスの形成および石灰化に關与するマトリックスタンパク質および酵素の合成に対するその刺激効果をイン・ビトロで調べた。これは、対応するmRNAの発現量を、リアルタイムPCRおよび半定量的評価により(コラーゲン加水分解物を含まない対照に対して)測定することにより行う。

10

【0193】

このために、まず、膝関節から、7mg/mlのヒアルロニダーゼタイプIおよびIII-Sならびに5mg/mlのプロナーゼを添加したハンクス液中で37℃にて強度に攪拌しながら骨材料を1時間インキュベートすることにより、ヒト骨芽細胞を単離した。次いで、16mg/mlのコラーゲナーゼタイプCLS IVを添加したハンクス液中で37℃にて3~5時間消化を続ける。この酵素による消化の後に、得られた初代骨芽細胞を、10%のウシ胎児血清、20U/mlのペニシリン-ストレプトマイシン、50µg/mlのパートリジン(Partricin)、0.05mg/mlのアスコルビン酸および0.15mg/mlのグルタミンを添加したハムF12培地内で培養する。また、生物学的有効性を調べるために、初代骨芽細胞(製品番号C-127602019)をPromoCell GmbH(ドイツ・ハイデルベルク)より購入することもできる。その後、10%のウシ胎児血清、20U/mlのペニシリン-ストレプトマイシン、50µg/mlのパートリジンおよび0.15mg/mlのグルタミンを添加したハムF12培地内でこの細胞を培養する。

20

【0194】

生物学的有効性を調べるために、単離したヒト骨芽細胞の単層細胞培養物を、それぞれのコラーゲンペプチド調製物を0.5mg/ml添加した培地で24時間インキュベートする。対照は、それぞれ調製物を含まない培地でインキュベートする。次いで、それぞれのmRNAの発現量を測定する。

30

【0195】

実施例4 線維芽細胞の活性(特に皮膚の健康)

実施例4.1 mRNA合成の刺激

コラーゲン(I型)ならびにプロテオグリカンであるビグリカンおよびパーシカンの合成の刺激を、イン・ビトロでヒト真皮線維芽細胞(皮膚細胞)にて測定した。このために、低分子コラーゲンペプチド調製物または本発明によるコラーゲンペプチド調製物をそれぞれ0.5mg/ml用いて細胞を24時間インキュベートし、次いで、コラーゲンRNA、ビグリカンRNAおよびパーシカンRNAの発現量をリアルタイムPCRで測定し、半定量的に(調製物を含まない対照に対して)評価する。

【0196】

実施例4.2 結合組織のタンパク質の合成の刺激

本発明によるコラーゲンペプチド調製物による結合組織のタンパク質の合成の刺激を測定するために、ヒト初代真皮線維芽細胞を、酵素による消化の後にまず、10%のFCS、20U/mlのペニシリン-ストレプトマイシン、50µg/mlのパートリジン、0.05mg/mlのアスコルビン酸および0.15mg/mlのグルタミンを含むハムF12培地内で培養する。80%のコンフルエントに達した後、それぞれの培養液を、コラーゲンペプチドを含まない培地(対照)または試験するコラーゲンペプチド調製物を0.5mg/ml含む培地に置き換え、それぞれの培地でヒト初代線維芽細胞を少なくとも14日間、好ましくは14~21日間、特に14日間培養する。その後、適切なアッセイを用いて、結合組織の異なるタンパク質の発現量を測定し、評価することができる(例えば、実施例6および7参照)。

40

50

【0197】

実施例5 軟骨細胞の活性(特に軟骨の健康)

細胞培養のため、ブタまたはヒトの軟骨細胞を軟骨組織から既知の方法で単離し、約350,000細胞/cm²の密度で培養プレートに播種する。培養液として、10%のウシ胎児血清、10µg/mlのゲンタマイシンおよび5µg/mlのアンフォテリジンBを含むハムF12培地を使用する。10µg/mlのゲンタマイシンに代えて、10µg/mlのペニシリン-ストربتマイシンを使用することもできる。培養を、酸素低減雰囲気(5%O₂、5%CO₂および90%N₂)中で37℃にて行った。

【0198】

コラーゲンの生合成の測定

軟骨細胞によって合成されたコラーゲン(基本的にはII型)の定量化を、コラーゲンに取り込まれた¹⁴C-プロリンによる放射性標識によって行う。

【0199】

培養液にまず¹⁴C-プロリンを加え、この条件下で軟骨細胞を測定時点までインキュベートする。検出時に、取り込まれた¹⁴C-プロリンと取り込まれていない¹⁴C-プロリンとを区別できるように、同位体を含む培養液を純粋な培養液に3日間にわたって置き換える。次いで、培養液を廃棄し、付着した細胞層を蒸留水と混合して、浸透圧ストレスにより細胞膜を破壊し、結合していない細胞質の¹⁴C-プロリンを放出させる。遠心分離により、合成された細胞外マトリックスとともに細胞の残渣をペレット化する。このペレットを新鮮な蒸留水に再懸濁させ、キシレンシンチレーションカクテルを加える。その後、カウンタで¹⁴C-プロリンを検出することで、合成されたコラーゲンの量を定量化することができる。

【0200】

あるいは、製造者の指示に従って、Sircol Collagen Assay Kit(製品番号054S5000、2019、tebu-bio(ドイツ・オッフェンバッハ)またはBiocolor Ltd.(英国))を用いて定量することもできる(実施例6および7参照)。

【0201】

プロテオグリカンの生合成の測定

軟骨細胞から合成されたプロテオグリカンを、プロテオグリカンの構成成分であるグリコサミノグリカン(GAG)のアルシアンブルー染色および測光により定量した。

【0202】

細胞培養物中のGAG含有量を測定するために、まず培養液を廃棄し、付着した細胞層をPBSバッファー(pH7)でリンスする。次いで、PBS中の10%ホルムアルデヒド溶液中で細胞を4℃で2時間固定する。ホルムアルデヒドを除去した後、アルシアンブルー染色試薬(3%酢酸中の5%アルシアンブルー)を細胞層に加え、4℃で一晩インキュベートする。結合していないアルシアンブルーを廃棄し、PBSで3~4回慎重にリンスして洗い流す。酸性グアニジン溶液(8mol/l)を加えることにより、細胞層からGAG複合体を溶出させる。その後、グリコサミノグリカンの量を620nmの波長で測光的に定量化することができる。

【0203】

あるいは、製造者の指示に従って、Blyscan Glycosaminoglycan Assay Kit(製品番号054B3000、2019、tebu-bio(ドイツ・オッフェンバッハ)またはBiocolor Ltd.(英国))を用いて定量することもできる(実施例6および7参照)。

【0204】

実施例6 本発明によるヒドロキシル化されていないコラーゲンペプチド調製物によるヒト初代線維芽細胞におけるコラーゲン、エラスチンおよびプロテオグリカンの合成の刺激
コラーゲン、エラスチンおよびプロテオグリカンの合成の刺激を測定するために、実施例4.2によるヒト初代真皮線維芽細胞を、少なくとも14日間、好ましくは14~21日間、特に14日間にわたって、コラーゲンペプチドを含まない培地中で(対照1)、ならびに0.5mg/mlの、100kDaのコラーゲンペプチド(対照2)、平均分子量1.8kDaのコラーゲンペプチド調製物(サンプル1)、平均分子量2.4kDaのコラーゲンペプチド調製物(サン

10

20

30

40

50

ル2) および平均分子量3.4kDaのコラーゲンペプチド調製物(サンプル3)の存在下でインキュベートした。

【0205】

実施例6.1 コラーゲン合成の刺激の測定

ヒト初代真皮線維芽細胞によるコラーゲン合成の測定を、製造者の指示に従って、Sircol Collagen Assay Kit(製品番号054S5000、2019、tebu-bio(ドイツ・オッフエンバッハ)またはBiocolor Ltd.(英国))を用いて行った。試験の結果を、表2および図5に示す。

【0206】

【表2】

表2: Sircol Collagen Assay(tebu-bio(ドイツ・オッフエンバッハ)またはBiocolor Ltd.(英国))によるコラーゲン合成の確認(波長450nmの吸光度(OD)測定)

	対照1	対照2 (分子量 =100kDa)	サンプル1 (平均分子量 =1.8kDa)	サンプル2 (平均分子量 =2.4kDa)	サンプル3 (平均分子量 =3.4kDa)
平均(OD ₄₅₀)	1	1.01	1.2	1.24	1.21
標準偏差	0	0.01	0.07	0.1	0.06

10

【0207】

実施例6.2 エラスチン合成の刺激の測定

ヒト初代真皮線維芽細胞によるエラスチン合成の測定を、製造者の指示に従って、Fastin Elastin Assay(製品番号054F2000、2019、tebu-bio(ドイツ・オッフエンバッハ)またはBiocolor Ltd.(英国))を用いて行った。試験の結果を、表3および図6に示す。

【0208】

【表3】

表3: Fastin Elastin Assay(tebu-bio(ドイツ・オッフエンバッハ)またはBiocolor Ltd.(英国))によるエラスチン合成の確認(波長450nmの吸光度(OD)測定)

	対照1	対照2 (分子量 =100kDa)	サンプル1 (平均分子量 =1.8kDa)	サンプル2 (平均分子量 =2.4kDa)	サンプル3 (平均分子量 =3.4kDa)
平均(OD ₄₅₀)	1	0.96	1.28	1.25	1.38
標準偏差	0	0.22	0.13	0.02	0.3

20

30

【0209】

実施例6.3 グリコサミノグリカン合成の刺激の測定

ヒト初代真皮線維芽細胞によるグリコサミノグリカン合成の測定を、製造者の指示に従って、Blyscan Glycosaminoglycan Assay(製品番号054B3000、2019、tebu-bio(オッフエンバッハ)またはBiocolor Ltd.(英国))を用いて行った。試験の結果を、表4および図7に示す。

【0210】

40

50

【表 4】

表 4 Blyscan Glycosaminoglycan Assay(tebu-bio(ドイツ・オッフエンバッハ)または Biocolor Ltd.(英国))によるグリコサミノグリカン合成の確認(波長 450nm の吸光度(OD)測定)

	対照 1	対照 2 (分子量 =100kDa)	サンプル 1 (平均分子量 =1.8kDa)	サンプル 2 (平均分子量 =2.4kDa)	サンプル 3 (平均分子量 =3.4kDa)
平均(OD ₄₅₀)	1	1	1.28	1.26	1.2
標準偏差	0	0.09	0.08	0.08	0.06

10

【0 2 1 1】

実施例 7 本発明によるヒドロキシル化されたコラーゲンペプチド調製物によるヒト初代線維芽細胞におけるコラーゲン、エラスチンおよびプロテオグリカンの合成の刺激

コラーゲン、エラスチンおよびプロテオグリカンの合成の刺激を測定するために、実施例 4.2 によるヒト初代真皮線維芽細胞を、少なくとも 14 日間、好ましくは 14 ~ 21 日間、特に 14 日間にわたって、コラーゲンペプチドを含まない培地中で (対照 1)、ならびに 0.5 mg / ml の、平均分子量 7.0 kDa のコラーゲンペプチド調製物 (サンプル 4)、平均分子量 5.6 kDa のコラーゲンペプチド調製物 (サンプル 5) および平均分子量 1.3 kDa のコラーゲンペプチド調製物 (サンプル 6) の存在下で、インキュベートした。

20

【0 2 1 2】

実施例 7 . 1 コラーゲン合成の刺激の測定

ヒト初代真皮線維芽細胞によるコラーゲン合成の測定を、製造者の指示に従って、Sircol Collagen Assay Kit (製品番号 054S5000、2019、tebu - bio (ドイツ・オッフエンバッハ) または Biocolor Ltd. (英国)) を用いて行った。試験の結果を、表 5 および図 8 に示す。未処理対照 (対照 1) について求めた平均値を 1 として標準化した。

【0 2 1 3】

【表 5】

表 5 Sircol Collagen Assay(tebu-bio(ドイツ・オッフエンバッハ)または Biocolor Ltd.(英国))によるコラーゲン合成の確認(吸光度(OD)測定)

30

	対照 1	サンプル 4 (平均分子量 =7.0kDa)	サンプル 5 (平均分子量 =5.6kDa)	サンプル 6 (平均分子量 =1.3kDa)
平均	1	1.35	1.36	1.39
標準偏差	0	0.16	0.1	0.09

【0 2 1 4】

実施例 7 . 2 エラスチン合成の刺激の測定

ヒト初代真皮線維芽細胞によるエラスチン合成の測定を、製造者の指示に従って、Fastin Elastin Assay (製品番号 054F2000、2019、tebu - bio (ドイツ・オッフエンバッハ) または Biocolor Ltd. (英国)) を用いて行った。試験の結果を、表 6 および図 9 に示す。未処理対照 (対照 1) について求めた平均値を 1 として標準化した。

40

【0 2 1 5】

50

【表 6】

表 6 Fastin Elastin Assay(tebu-bio(ドイツ・オッフエンバッハ)または Biocolor Ltd.(英国))によるエラスチン合成の確認(吸光度(OD)測定)

	対照 1	サンプル 4 (平均分子量 =7.0kDa)	サンプル 5 (平均分子量 =5.6kDa)	サンプル 6 (平均分子量 =1.3kDa)
平均	1	1.32	1.33	1.31
標準偏差	0	0.11	0.07	0.04

10

【 0 2 1 6 】

実施例 7 . 3 グリコサミノグリカン合成の刺激の測定

ヒト初代真皮線維芽細胞によるグリコサミノグリカン合成の測定を、製造者の指示に従って、Blyscan Glycosaminoglycan Assay (製品番号054B3000、2019、tebu - bio (オッフエンバッハ) またはBiocolor Ltd. (英国)) を用いて行った。試験の結果を、表7および図10に示す。未処理対照(対照1)について求めた平均値を1として標準化した。

【 0 2 1 7 】

【表 7】

表 7 Blyscan Glycosaminoglycan Assay(tebu-bio(ドイツ・オッフエンバッハ)または Biocolor Ltd.(英国))によりグリコサミノグリカン合成の確認(吸光度(OD)測定)

	対照 1	サンプル 4 (平均分子量 =7.0kDa)	サンプル 5 (平均分子量 =5.6kDa)	サンプル 6 (平均分子量 =1.3kDa)
平均	1	1.37	1.41	1.40
標準偏差	0	0.15	0.11	0.12

20

30

本発明は、以下の実施形態を包含する。

- [1] 組換えコラーゲンペプチドを有するコラーゲンペプチド調製物の製造方法であって、
- a) 少なくとも1つの発現カセットを有する発現系を提供する方法工程であって、前記発現カセットは、8~100kDaの範囲内の分子量を有するコラーゲンペプチドをコードする少なくとも1つのヌクレオチド配列を有する方法工程と、
- b) 前記コラーゲンペプチドの発現を可能にする条件下で、前記発現系をインキュベートする方法工程と、
- c) 前記コラーゲンペプチドを回収する方法工程と、
- d) 平均分子量が1~7kDaでかつ分子量が0.1~13.5kDaの範囲内であるコラーゲンペプチドを有するコラーゲンペプチド調製物が製造される条件下で、前記コラーゲンペプチドを加水分解する方法工程と、
- e) 前記コラーゲンペプチド調製物を回収する方法工程とを含む、方法。

40

[2] 前記発現系が、細菌細胞、酵母細胞、真菌細胞、哺乳類細胞、昆虫細胞および植物細胞からなる群から選択される宿主細胞である、[1] に記載の方法。

[3] 前記ヌクレオチド配列によってコードされるコラーゲンペプチドが、脊椎動物、特に哺乳類、鳥類、魚類、両生類、爬虫類または無脊椎動物のコラーゲンペプチドである、[1] または [2] に記載の方法。

50

〔 4 〕前記発現系が、前記発現したコラーゲンペプチドのプロリン残基、リジン残基またはプロリン残基およびリジン残基をヒドロキシル化することができる宿主細胞である、〔 1 〕から〔 3 〕のいずれかに記載の方法。

〔 5 〕前記宿主細胞が、プロリル - 4ヒドロキシラーゼをコードするポリヌクレオチド配列を有する少なくとも1つの発現カセットを有し、方法工程e)において、イン・ビボでヒドロキシル化されたコラーゲンペプチド調製物を回収する、〔 4 〕に記載の方法。

〔 6 〕前記宿主細胞が、リシルヒドロキシラーゼをコードするポリヌクレオチド配列を有する少なくとも1つの発現カセットを有し、方法工程e)において、イン・ビボでヒドロキシル化されたコラーゲンペプチド調製物を回収する、〔 4 〕または〔 5 〕に記載の方法。

〔 7 〕前記発現系が、前記発現されたコラーゲンペプチドのプロリン残基、リジン残基またはプロリン残基およびリジン残基のヒドロキシル化を生じさせることができない、〔 1 〕から〔 3 〕のいずれかに記載の方法。

〔 8 〕前記方法工程c)で回収されたコラーゲンペプチドを、方法工程d)の実施前に方法工程x1)においてヒドロキシル化し、方法工程e)において、溶解前 (praelysal) にエクス・ビボでヒドロキシル化されたコラーゲンペプチド調製物を回収する、〔 7 〕に記載の方法。

〔 9 〕前記方法工程d)で製造されたコラーゲンペプチド調製物を、方法工程d)の実施後に方法工程x2)においてヒドロキシル化し、方法工程e)において、溶解後 (postlysal) にエクス・ビボでヒドロキシル化されたコラーゲンペプチド調製物を回収する、〔 7 〕に記載の方法。

〔 10 〕前記加水分解が、酵素または酸触媒による加水分解である、〔 1 〕から〔 9 〕のいずれか一項に記載の方法。

〔 11 〕〔 1 〕から〔 10 〕のいずれかに記載の方法により製造可能である、コラーゲンペプチド調製物。

〔 12 〕宿主細胞において製造された8 ~ 100kDaの範囲内の分子量を有する組換えコラーゲンペプチドの加水分解により製造されるコラーゲンペプチド調製物であって、前記コラーゲンペプチド調製物は、平均分子量が1 ~ 7kDaでかつ分子量が0.1 ~ 13.5kDaの範囲内であるコラーゲンペプチドを有する、コラーゲンペプチド調製物。

〔 13 〕ヒドロキシル化されていないか、部分的にヒドロキシル化されているか、または完全にヒドロキシル化されている、〔 11 〕または〔 12 〕に記載のコラーゲンペプチド調製物。

〔 14 〕前記コラーゲンペプチド調製物は、溶解前にエクス・ビボでヒドロキシル化されたコラーゲンペプチド調製物であるか、または溶解後にエクス・ビボでヒドロキシル化されたコラーゲンペプチド調製物である、〔 11 〕から〔 13 〕のいずれかに記載のコラーゲンペプチド調製物。

〔 15 〕骨の健康を維持および改善する方法、骨粗鬆症を予防および/もしくは治療する方法、サルコペニアを予防および/もしくは治療する方法、筋肉量の退行性低下を予防および/もしくは治療する方法、筋力を向上させる方法、ミトコンドリア活性の低下を特徴とする病態を予防および/もしくは治療する方法、特に持久力の低下を特徴とする病態を予防および/もしくは治療する方法、体脂肪低下を刺激する方法、体重を減少させる方法、ならびに/または変形性関節症を予防および/もしくは治療する方法、軟骨疾患を予防および/もしくは治療する方法、腱および靭帯の疾患を予防および/もしくは治療する方法、皮膚疾患を予防および/もしくは治療する方法、創傷を治療する方法、神経変性疾患を予防および/もしくは治療する方法、認知症を予防および/もしくは治療する方法、アルツハイマー病を予防および/もしくは治療する方法、精神機能の低下を特徴とする病態を予防および/もしくは治療する方法、血液脳関門の機能不全に関連する疾患を予防および/もしくは治療する方法、腸疾患を予防および/もしくは治療する方法、心臓血管系の疾患を予防および/もしくは治療する方法、ならびに/または歯周組織 (Zahnhalteapparat) の疾患を予防もしくは治療する方法に使用するための、〔 11 〕から〔 14 〕のいずれか一項に記載のコラーゲンペプチド調製物。

10

20

30

40

50

[1 6] 皮膚を視覚的および構造的に改善するための、爪の成長を促進するための、および/もしくは爪の脆さを低減するための、毛髪を視覚的および構造的に改善するための、ミトコンドリア数および/もしくはミトコンドリア活性を増加させるための、持久力を向上させるための、ならびに/または精神機能を向上させるための、[1 1] から [1 4] のいずれかに記載のコラーゲンペプチド調製物の非治療的使用。

[1 7] [1 1] から [1 4] のいずれかに記載のコラーゲンペプチド調製物と、少なくとも1つの添加物とを含む、製品。

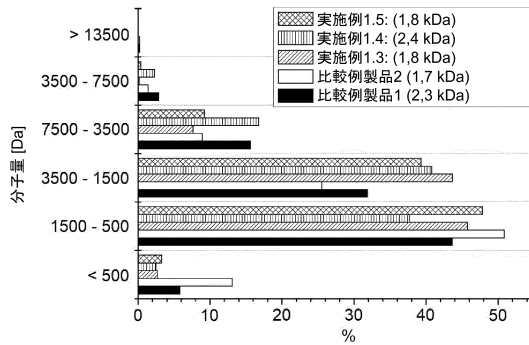
[1 8] [1 1] から [1 4] のいずれかに記載のコラーゲンペプチド調製物と、食品に許容される少なくとも1つの添加物とを含む、栄養補助食品。

[1 9] [1 1] から [1 4] のいずれかに記載のコラーゲンペプチド調製物と、製薬学的に許容される少なくとも1つの添加物とを含む、医薬組成物。

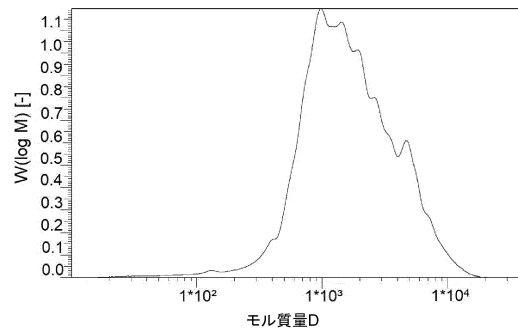
[2 0] [1 1] から [1 4] のいずれかに記載のコラーゲンペプチド調製物と、少なくとも1つの皮膚適合性添加物とを含む、化粧品。

【 図 面 】

【 図 1 】



【 図 2 A 】



10

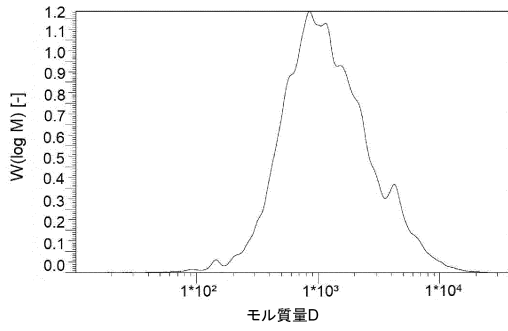
20

30

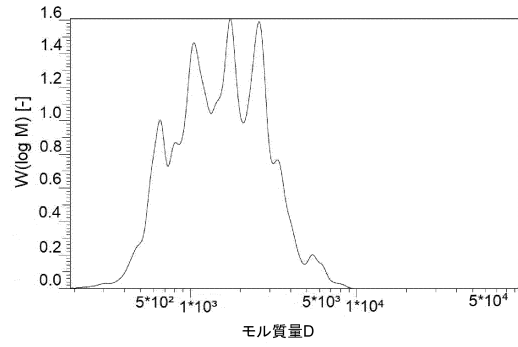
40

50

【図 2 B】

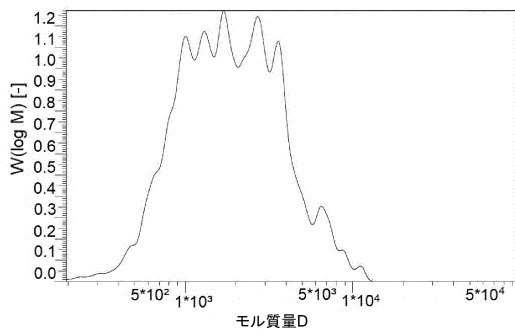


【図 3 A】

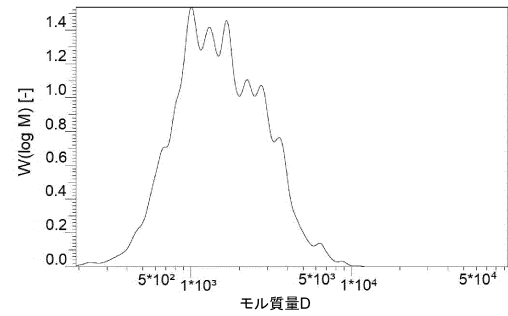


10

【図 3 B】



【図 4】



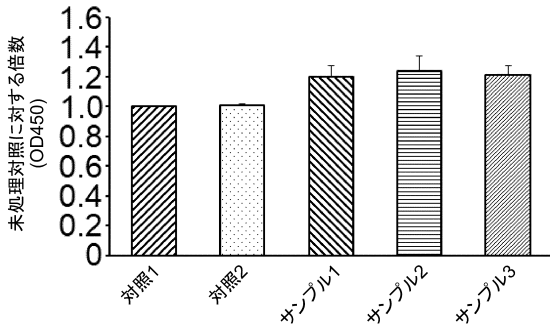
20

30

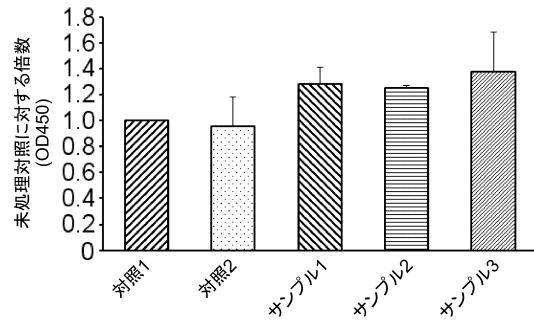
40

50

【 図 5 】



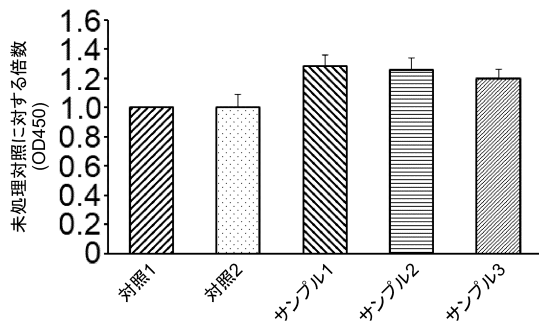
【 図 6 】



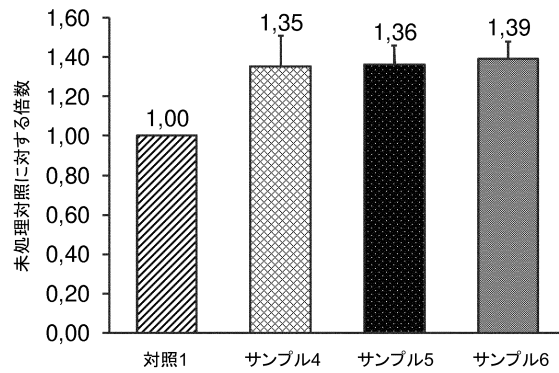
10

20

【 図 7 】



【 図 8 】

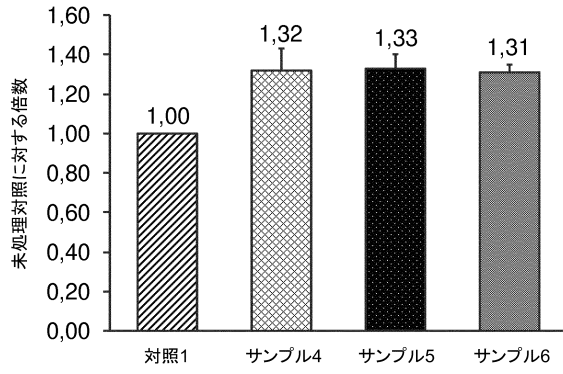


30

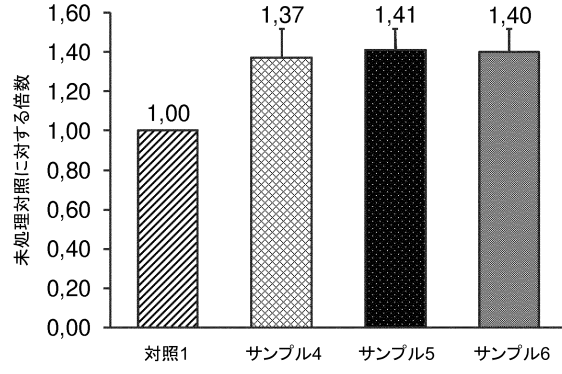
40

50

【 図 9 】



【 図 10 】



10

20

30

40

50

フロントページの続き

(51)国際特許分類	F I	
A 6 1 P 19/10 (2006.01)	A 6 1 P 19/10	
A 6 1 P 21/00 (2006.01)	A 6 1 P 21/00	
A 6 1 P 43/00 (2006.01)	A 6 1 P 43/00	1 0 5
A 6 1 P 19/02 (2006.01)	A 6 1 P 19/02	
A 6 1 P 19/04 (2006.01)	A 6 1 P 19/04	
A 6 1 P 19/00 (2006.01)	A 6 1 P 19/00	
A 6 1 P 17/00 (2006.01)	A 6 1 P 17/00	
A 6 1 P 17/02 (2006.01)	A 6 1 P 17/02	
A 6 1 P 25/00 (2006.01)	A 6 1 P 25/00	
A 6 1 P 25/28 (2006.01)	A 6 1 P 25/28	
A 6 1 P 1/00 (2006.01)	A 6 1 P 1/00	
A 6 1 P 9/00 (2006.01)	A 6 1 P 9/00	
A 6 1 P 1/02 (2006.01)	A 6 1 P 1/02	
A 6 1 P 25/18 (2006.01)	A 6 1 P 25/18	
A 6 1 Q 19/00 (2006.01)	A 6 1 Q 19/00	
A 6 1 Q 3/00 (2006.01)	A 6 1 Q 3/00	
A 6 1 K 8/65 (2006.01)	A 6 1 K 8/65	
A 2 3 L 33/18 (2016.01)	A 2 3 L 33/18	

(33)優先権主張国・地域又は機関

ドイツ(DE)

(31)優先権主張番号 102019202606.0

(32)優先日 平成31年2月26日(2019.2.26)

(33)優先権主張国・地域又は機関

ドイツ(DE)

(72)発明者 ハーン, マルティン

ドイツ連邦共和国 4 8 5 9 9 グローナウ, アルファートリング 7 6

審査官 小倉 梢

(56)参考文献 特表2003-516730(JP,A)

特開2011-120576(JP,A)

(58)調査した分野 (Int.Cl., DB名)

C 1 2 P 2 1 / 0 0 - 2 1 / 0 8

C 0 7 K 1 / 0 0 - 1 9 / 0 0

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 p l u s / M E D L I N E / E M B A S E / B I O S I S (S T N)