

(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2018-512440  
(P2018-512440A)

(43) 公表日 平成30年5月17日(2018.5.17)

(51) Int.Cl.	F 1	テーマコード (参考)
A 61 K 36/185 (2006.01)	A 61 K 36/185	4 B 06 4
A 61 P 17/02 (2006.01)	A 61 P 17/02	4 C 07 6
A 61 K 38/27 (2006.01)	A 61 K 38/27	4 C 08 3
A 61 K 8/9789 (2017.01)	A 61 K 8/9789	4 C 08 4
A 61 K 8/9794 (2017.01)	A 61 K 8/9794	4 C 08 8

審査請求 未請求 予備審査請求 未請求 (全 45 頁) 最終頁に続く

(21) 出願番号	特願2017-554388 (P2017-554388)	(71) 出願人	517357125 バイチュラス バイオテック, ソシエダ リミタダ スペイン国, テラサ 08221, カレル サン ガイエタ, 121, 2オー
(86) (22) 出願日	平成28年4月11日 (2016.4.11)	(74) 代理人	110000659 特許業務法人広江アソシエイツ特許事務所
(85) 翻訳文提出日	平成29年11月28日 (2017.11.28)	(72) 発明者	エクスピント タレス, オスカル スペイン国, テラサ 08221, カレル サン ガイエタ, 121, 2オー
(86) 國際出願番号	PCT/EP2016/057885	(72) 発明者	ハネフォント, アルベルト スペイン国, テラサ 08221, カレル サン ガイエタ, 121, 2オー
(87) 國際公開番号	W02016/166047		
(87) 國際公開日	平成28年10月20日 (2016.10.20)		
(31) 優先権主張番号	15163515.8		
(32) 優先日	平成27年4月14日 (2015.4.14)		
(33) 優先権主張国	歐州特許庁 (EP)		

最終頁に続く

(54) 【発明の名称】皮膚細胞に対する若返り活性および／または創傷治癒活性を有する無細胞植物細胞培養懸濁液上清

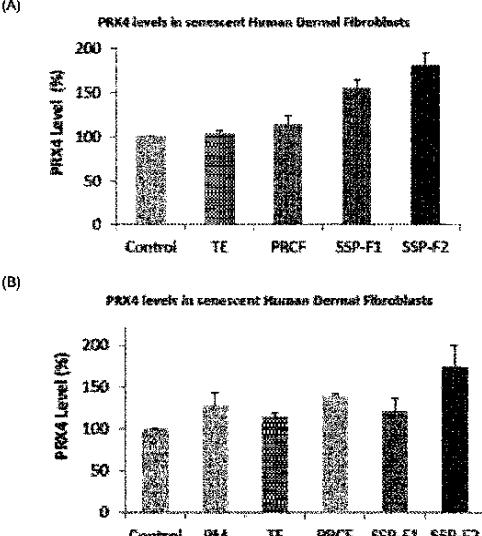
## (57) 【要約】

【課題】本発明は皮膚細胞に対する若返り活性および／または創傷治癒活性を有する無細胞植物細胞培養懸濁液上清に関する。

【解決手段】本発明は、脱分化した植物細胞懸濁培地の増殖を先にサポートした無細胞上清（馴化培地）または当該無細胞上清の画分であって、当該無細胞上清または当該画分は、4～30アミノ酸長の、ペプチド植物成長因子および植物転写因子等のペプチドを含み、細胞溶解による細胞質性細胞内含有物ならびに膜および／または細胞壁を有していない、無細胞上清または当該無細胞上清の画分に関する。本発明はさらに、当該上清の画分および皮膚の若返りを促進する化粧用途に関する。

【選択図】図3 a

FIG. 3



**【特許請求の範囲】****【請求項 1】**

皮膚治療のための薬剤として使用するための、脱分化した植物細胞懸濁培地の増殖を先にサポートした無細胞上清または前記無細胞上清の画分であって、

前記無細胞上清または前記画分は、4～300アミノ酸長の、ペプチド植物成長因子、植物転写因子、エピジェネティック因子、およびこれらの混合物から選択されるペプチドを含み、

前記無細胞上清または前記画分は、細胞溶解による細胞質性細胞内含有物ならびに膜および／または細胞壁を有していない、無細胞上清またはその画分。

**【請求項 2】**

前記無細胞上清または前記画分は、5～300アミノ酸長の、ペプチド植物成長因子、植物転写因子、およびこれらの混合物から選択されるペプチドを含み、前記無細胞上清または前記画分は、細胞溶解による細胞質性細胞内含有物ならびに膜および／または細胞壁を有していない、請求項1に記載の使用するための無細胞上清またはその画分。

**【請求項 3】**

前記薬剤は、瘢痕形成皮膚用剤としての使用および／または皮膚創傷治癒剤としての使用および／または皮膚若返り剤としての使用のためのものである、請求項1～2のいずれか一項に記載の使用するための無細胞上清またはその画分。

**【請求項 4】**

前記脱分化した植物細胞培養懸濁液は、ニンジン (*Daucus carota*)、ツボクサ (*Centella asiatica*)、ザクロ (*Punica granatum*)、ワタ (*Gossypium herbaceum*)、*Sarcocapnos crassifolia*、ウコン (*Curcuma longa*)、アマ (*Linum usitatissimum*)、ブドウ (*Vitis vinifera*)、*Lithops pseudotruncatella*、アルニカ (*Arnica montana*)、ヤエヤマアオキ (*Morinda citrifolia*)、ヒレハリソウ (*Sympodium officinale*)、アサ (*Cannabis sativa*)、オリーブ (*Olea europaea*)、およびカメリアシネンシス (*Camellia sinensis*) からなる群から選択される植物由来である、請求項1～3のいずれか一項に記載の使用するための無細胞上清またはその画分。

**【請求項 5】**

前記上清または前記無細胞上清の画分は、ファイトスルフォカイン-（PSK-）、ファイトスルフォカイン-（PSK-）、硫酸化チロシン-1を含む植物ペプチド (PSY1)、RALF (Rapid Alkalization Factor)、管状要素分化抑制因子 (TDIF)、Clavata-3 (CLV3)、CLE (Clavata-Embryo Surrounding Region-Related)、TPD1 (Tapetum Determinant-1)、表皮パターン形成因子-1 (EPF1)、花の器官脱離欠損 (IDA)、ESR (Embryo Surrounding Region-Related)、Polarisペプチド (PLS)、根分裂組織成長因子 (RGF)、EC1 (Egg Cell-Secreted Protein)、CEP (C-terminal Encoded peptide)、初期ノジュリン40 (ENOD40)、システミン、SCR (S-locus Cystein Rich protein)、およびこれらの混合物からなる群から選択される植物ペプチド成長因子を含む、請求項1～4のいずれか一項に記載の使用するための無細胞上清またはその画分。

**【請求項 6】**

前記無細胞上清またはその画分は、

(a) 液体栄養培養培地中で脆いカルス由来の脱分化した植物細胞を5～15日間増殖させ、前記脱分化した植物細胞の増殖をサポートする馴化培地を得ることと、

(b) 前記細胞を溶解させることなく前記馴化培地から植物細胞全体を取り除き、

10

20

30

40

50

4～300アミノ酸長の、ペプチド植物成長因子、植物転写因子、エピジェネティック因子、およびそれらの混合物から選択されるペプチドを含む無細胞上清を得ることと、

(c) 場合により、クロマトグラフィー、ろ過、限外ろ過、タンパク質沈殿、およびこれらの組み合わせからなる群から選択される分離技術を用いてタンパク質分離プロセスを実行し、前記無細胞上清の画分を得ることと  
を含む方法によって得ることができる、請求項1～5のいずれか一項に記載の使用するための無細胞上清またはその画分。

#### 【請求項7】

前記無細胞上清またはその画分は、ステップ(b)の後に前記無細胞上清を凍結乾燥して、凍結乾燥上清を得ることを含む方法によって得ることができる、請求項6に記載の使用するための無細胞上清またはその画分。 10

#### 【請求項8】

前記無細胞上清またはその画分は、前記得られた凍結乾燥無細胞上清をさらに100～500倍濃縮することによって得ることができる、請求項7に記載の使用するための無細胞上清またはその画分。 10

#### 【請求項9】

前記脱分化した植物細胞懸濁培地は、 $1 \times 10^5$ 細胞/懸濁培地mL～ $1 \times 10^7$ 細胞/懸濁培地mLの、懸濁培地の体積単位あたりの細胞数として表される細胞密度で培養される、請求項1～8のいずれか一項に記載の使用するための無細胞上清またはその画分。 20

#### 【請求項10】

前記脱分化した植物細胞懸濁培地は、誘導プロセスを用いることによりストレス条件に供される、請求項1～9のいずれか一項に記載の使用するための無細胞上清またはその画分。 20

#### 【請求項11】

ニンジン(*Daucus carota*)、ツボクサ(*Centella asiatica*)、ザクロ(*Punica granatum*)、ワタ(*Gossypium herbaceum*)、*Sarcocapnos crassifolia*、ウコン(*Curcuma longa*)、アマ(*Linum usitatissimum*)、ブドウ(*Vitis vinifera*)、*Lithops pseudotruncatella*、アルニカ(*Arnica montana*)、ヤエヤマアオキ(*Morinda citrifolia*)、ヒレハリソウ(*Symphytum officinale*)、アサ(*Cannabis sativa*)、オリーブ(*Olea europaea*)、およびカメリアシネンシス(*Camellia sinensis*)からなる群から選択される植物由来の脱分化した植物細胞培養懸濁培地の増殖を先にサポートした無細胞上清の画分であって、 30

- 4～300アミノ酸長の、ペプチド植物成長因子、植物転写因子、エピジェネティック因子、およびこれらの混合物から選択されるペプチドを含み、前記画分は細胞溶解による細胞質性細胞内含有物ならびに膜および/または細胞壁を有しておらず、

(a) 液体栄養培養培地中で脆いカルス由來の前記脱分化した植物細胞を5～15日間増殖させ、前記脱分化した植物細胞の増殖をサポートする馴化培地を得ることと、 40

(b) 前記細胞を溶解させることなく前記馴化培地から植物細胞全体を取り除き、4～300アミノ酸長のペプチドを含む無細胞上清を得ることと、

(c) 固相抽出クロマトグラフィー、サイズ排除クロマトグラフィー、ろ過、限外ろ過、タンパク質沈殿、およびこれらの組み合わせからなる群から選択される分離技術を用いてタンパク質分離プロセスを実行し、前記無細胞上清の画分を得ることと  
を含む方法によって得ることができる、画分。 40

#### 【請求項12】

前記画分は、

- 5～300アミノ酸長の、ペプチド植物成長因子、植物転写因子、およびこれらの混合物から選択されるペプチドを含み、前記画分は細胞溶解による細胞質性細胞内含有物 50

ならびに膜および／または細胞壁を有しておらず、

(a) 液体栄養培養培地中で脆いカルス由来の前記脱分化した植物細胞を5～15日間増殖させ、前記脱分化した植物細胞の増殖をサポートする馴化培地を得ることと、

(b) 前記細胞を溶解させることなく前記馴化培地から植物細胞全体を取り除き、5～300アミノ酸長のペプチドを含む無細胞上清を得ることと、

(c) 固相抽出クロマトグラフィー、サイズ排除クロマトグラフィー、ろ過、限外ろ過、タンパク質沈殿、およびこれらの組み合わせからなる群から選択される分離技術を用いてタンパク質分離プロセスを実行し、前記無細胞上清の画分を得ることとを含む方法によって得ることができる、請求項11に記載の無細胞画分。

#### 【請求項13】

ステップ(c)は固相抽出クロマトグラフィーによって実行される、請求項11～12のいずれか一項に記載の無細胞画分。

#### 【請求項14】

請求項11～13のいずれか一項に定義される脱分化した植物細胞懸濁培地の上清の無細胞画分の有効量と、1つまたは複数の適切な局所用の薬学的にまたは美容的に許容される賦形剤または担体とと一緒に含む、皮膚局所用組成物。

#### 【請求項15】

局所用の薬学的にまたは美容的に許容される賦形剤のうち少なくとも1つとしてグリセリンを含む、請求項14に記載の皮膚局所用組成物。

#### 【発明の詳細な説明】

##### 【技術分野】

##### 【0001】

本発明は、植物細胞培養懸濁馴化培地に由来する組成物、および局所用の薬学的組成物および化粧用組成物に使用されるこれらの培地を得る方法、より詳細には、皮膚の老化プロセスおよび／または皮膚の創傷治癒に対応する局所用組成物に関する。

##### 【背景技術】

##### 【0002】

植物抽出物は、それから誘導可能な活性成分ゆえに有用な組成物の調製のために製剤および化粧品において広く使用されている。特定の溶媒または混合物を用いた抽出プロセスが標準化されているが、それらは費用のかかるプロセスであり、植物中の化合物の特定の画分(抽出プロセスで使用される溶媒と相溶性がある、すなわち混和性のもの)のみを得ることができる。さらに、植物からの抽出は、植物が利用可能であることを意味し、乾燥した貯蔵植物または植物の一部からも一部の化合物を抽出することができるが、他の場合では、所望のまたは目的の化合物または化合物群が新鮮な材料のみに存在する場合、または新鮮な材料において適切な形態でのみ存在する場合、所望のまたは目的の化合物または化合物群を確実に得るために新鮮な植物が必要とされる。したがって、化粧品に使用する植物抽出物または植物の一部は、とりわけ、季節による制限、種の保護、限られた貯藏能力、栽培上の問題、および異なる起源の異なる供給元に起因する種類の非均質性といった欠点を示唆する。

##### 【0003】

この理由から、植物化合物を使用する化粧品および製剤における現在の話題は、目的の化合物を製造するための植物細胞培養の使用に関する。植物細胞培養は、植物のさまざまな部分(葉、果実、茎、根、苗条など)からの細胞の単離を可能にし、単離された植物細胞は分化全能性に達するまで細胞脱分化に供される。これらの脱分化した全能細胞は、細胞が目的の1つまたは複数の化合物を産生するように刺激または特定のストレス条件に付すことができる。植物細胞培養技術を用いて作業することは、季節および供給元とは無関係な、目的の化合物の標準化された継続的な生産という利点を意味する。

##### 【0004】

植物細胞培養懸濁液またはその抽出物(通常、懸濁液中の植物細胞の溶解に由来する)の使用を開示している多くの文献がある。これらの例としては、リポソームに封入した全

10

20

30

40

50

培地プロスにおいて U t t w i l e r S p a e t l a u b e r (スイス起源のリンゴの品種) の細胞溶解物を含み、皮膚幹細胞の増殖、保護および活性化を促進し、さらに毛囊を保護するのに有用な化粧用皮膚科学的組成物を開示している特許文献 1 が挙げられる。

#### 【0005】

同様に、特許文献 2 は、水溶性馴化培地およびイネ (*Oryza sativa*) の細胞内部の水溶性化合物を含む化粧用組成物を開示している。この組成物は、ヒトの皮膚細胞に局所的に適用された場合、若い、より具体的には内因性および外因性老化した哺乳類の皮膚細胞において DNA 遺伝子プロモータのメチル化を調節することができ、したがって、皮膚をより若く健康な状態にするのに適している。

#### 【0006】

特許文献 3 は、脱分化を経ないナス科植物の形成層由来の先天的に未分化の幹細胞を開示している。これらの幹細胞および細胞の増殖を先に支えた (previously supported) 馴化培地は、化粧用組成物中の抗薬剤 (anti-agent) 活性成分として提案されている。著者らは、脱分化プロセス中に染色体に起こり得る重大な変化を回避するために、形成層から誘導 / 単離した幹細胞を用いることを提案している。興味深い結果が、ストレスを受けたヒト線維芽細胞のモデルで培地を除去した後の幹細胞の DMSO 抽出物により示される。他方で、培地の 10% 希釈を用いた結果も示されているが、培地のこの 10% 希釈用の溶媒は言及されていないため、十分には開示されていない。したがって、この興味深い結果は、幹細胞から培養培地を希釈するために使用され、線維芽細胞を増殖させるために使用される想定される DMEM 培地からの栄養素の供給の結果であり得る。

10

20

#### 【0007】

興味深いとはいえ、細胞培養懸濁液溶解物 (すなわち、異なる培地に再懸濁し、細胞を破壊するためにさらに均質化された培地からの細胞画分) およびこれらの細胞の抽出物を得ることによって、植物細胞カクテル化合物全体ではなく細胞内に存在する化合物の一部の回収のみが可能になる。これらの組成物は、コラーゲンおよびプロコラーゲン合成に実際の効果を示し、例えば、抗しわ皮膚治療薬、瘢痕形成治療剤および / または皮膚創傷治癒剤として有用である。

#### 【0008】

他方では、いくつかの利点を提供し、細胞をあらかじめ増殖させた培地の中で維持された細胞溶解物またはあらかじめ培地から単離された細胞溶解物は、タンパク質および細胞内部からの他の成分による毒性を避けるために、用量の細かな調整を必要とするであろう。

30

#### 【先行技術文献】

#### 【特許文献】

#### 【0009】

【特許文献 1】米国特許出願公開第 2014/072619 号明細書

【特許文献 2】国際公開第 2012/130783 号明細書

【特許文献 3】欧州特許第 2436759 号明細書

#### 【発明の概要】

#### 【発明が解決しようとする課題】

#### 【0010】

これらすべての理由から、植物細胞培養に由来する代替的な組成物および化合物であって、植物細胞培養溶解物と同じ方法で化粧品または製剤、より詳細には、化粧品または治療的適応症において使用され得、容易かつ貸借可能 (rentable) な方法で得られる組成物および化合物が必要とされている。

40

#### 【課題を解決するための手段】

#### 【0011】

本発明者らは、植物の脱分化した細胞培養懸濁液中の細胞全体を除去して得られる無細胞上清が実際に化合物のカクテルを含み、これらの植物細胞の増殖を支持 (support) する上清に含まれる他の細胞外生成物と相乗的に作用することを試験し、立証した。これらの無細胞上清は、驚くべきことに、損傷したまたは古い動物細胞、特に哺乳類の真皮 (線

50

維芽細胞)および表皮(ケラチノサイト)細胞を再生する目的に役立つ。加えて、これらの上清のいくつかの画分は、細胞間のシグナル伝達化合物(以下参照)として植物において一般に作用し、植物防御、成長および発達に関する小さなシグナル伝達ポリペプチドとも呼ばれるいわゆるペプチド植物成長因子に富んでいる。

#### 【0012】

無細胞上清のこれらのペプチド画分は、無細胞上清およびペプチド自体よりも高い効果を生じさえする。さらに、本明細書に開示されるように、無細胞上清およびその任意の画分を得る方法は、化学合成と比較して、環境に優しく、容易であり、かつ高価ではない。これらのペプチド植物成長因子の大部分は、通常、植物または植物の部分に対して直接行われる抽出プロセスでは回収されないことにも留意されたい。これらのペプチド植物成長因子は、その固有のシグナル伝達機能ゆえに一般に細胞外の化合物であることから、多くの場合細胞内よりも細胞外に存在するため、細胞培養溶解物に対する抽出プロセスからでも回収することができない。当該溶解物は、培地から細胞を分離し、特定の溶媒で抽出しながら溶解させることによって得られる。

10

#### 【0013】

したがって、第1の態様では、本発明は、皮膚治療のための薬剤として使用するための脱分化した植物細胞懸濁培地の増殖を先にサポートした無細胞上清または当該無細胞上清の画分であって、当該無細胞上清または当該画分は、4~300アミノ酸長の、ペプチド植物成長因子、植物転写因子およびこれらの混合物から選択されるペプチドを含み、当該無細胞上清または画分は細胞溶解による細胞質性細胞内含有物を有しておらず、また膜および/または細胞壁を有していない、無細胞上清または画分に関する。無細胞上清または画分は、動物の皮膚細胞の修復剤および/または再生剤としての使用のためのものである。

20

#### 【0014】

したがって、本発明は、脱分化した植物細胞懸濁培地の増殖を先にサポートした無細胞上清である皮膚への局所使用のための薬剤、または皮膚における(医療または化粧用の)局所使用のための当該無細胞上清の画分を提供する。

#### 【0015】

懸濁培地における脱分化した植物細胞は、創傷または損傷した組織(カルス)の場合に植物に実際に現れるであろう細胞であるため、植物防御、成長および発達に関するいわゆる小さなシグナル伝達ポリペプチドを合成する(Ryanら、「Poly peptide Hormones」、The Plant Cell、2002年、S251~S264別冊参照)。これらのペプチドは、分化または細胞増殖を促進するために、細胞間の適切な通信ネットワークを促進するための細胞外シグナル伝達物質として作用するようである。換言すれば、植物の再生および損傷した植物組織の瘢痕形成に関する植物化合物(ペプチド)である。本発明の上清またはその任意の画分は、特に、ペプチド性のこれらのいわゆる植物成長因子(VEGF、PDGF、EGF等の動物ペプチド成長因子と同様)を含む。

30

#### 【0016】

特に、脱分化した植物細胞懸濁培地の増殖を先にサポートした無細胞上清、または当該無細胞上清の画分は、真皮細胞および表皮細胞の再生に使用するためのものである。より詳細には、それらは、皮膚の真皮層の老化線維芽細胞の再生に使用するためのものである。老化線維芽細胞については、以下のパラメータ、すなわち、-ガラクトシダーゼの細胞発現(5-ブロモ-4-クロロ-3-インドリル-ガラクトシド(X-Gal)との酵素反応による染色で測定される)、形態学的变化(顕微鏡での視覚化によって測定したときに分散しているよりもむしろ円形の細胞)、顕微鏡での視覚化によって測定された複製指数(replicative index)、および活性酸素種の產生のうちの少なくとも1つによって定義される表現型を有するものと理解されるべきである。インビトロ分析では、老化線維芽細胞は、培地において少なくとも20回継代された細胞であると考えられる。

40

50

## 【0017】

ヒト線維芽細胞における老化（複製老化）のマーカーとしての - ガラクトシダーゼの使用は、Goberdhanらの文献「A biomarker that identifies senescent human cells in culture and in aging skin in vivo」 Proc. Natl. Acad. Sci. 1995年、Vol. 92、pp. : 9363 ~ 9367 に広く詳述される。

## 【0018】

したがって、ペプチド植物成長因子および／または植物転写因子を含有する無細胞上清またはその画分は、皮膚細胞（すなわち、線維芽細胞）における老化を回復させることにより、皮膚の修復剤および／または再生剤としての使用のためのものである。皮膚細胞（すなわち、線維芽細胞）における老化表現型を回復させるこの能力により、4～300アミノ酸長のペプチドを有する無細胞上清または任意の画分は、通常深いしわ、および表情線を表す年老いた動物の皮膚、特に老人の皮膚の治療に有用なものとなる。これにより、無細胞上清または任意の画分が皮膚の早期老化の治療および／または予防にも使用可能なものとなる。皮膚の早期老化（一般に光老化としても知られている）は、早期の、すなわち20～50歳のヒトのしわ、変化した色素沈着、および肌の色調の喪失を含む皮膚の外観によって定義される特定の光老化である。光老化した皮膚は、結合組織のコラーゲン性細胞外マトリックスの顕著な変化と、I型、II型およびIII型コラーゲンの分解を担う酵素であるメタロプロテイナーゼ1（MMP1）の発現増加を示す。皮膚の早期老化はさまざまな原因によって起こるプロセスであるが、遺伝子的素因に加えて、蓄積されたUVおよびIR放射線、有毒物質摂取（喫煙）およびストレスを含む環境要因がこの障害の真の原因であると証明されている。10

## 【0019】

以下の実施例に示すように、ペプチド植物成長因子および／または植物転写因子（少なくとも4～300アミノ酸長のペプチド）を含む無細胞上清またはその画分は、他の従来技術の組成物がもはや有効でなくとも、上記の状態すべての治療に有効であり、これは、これらの状態に関連する症状が、これらの従来技術の組成物では改善されず、本発明の無細胞上清またはその画分で改善されることを意味する。20

## 【0020】

「老化を回復させる」とは、本発明の意味において、細胞におけるマーカーまたは若い細胞の適切な機能の促進を意味する。すなわち、特に、健康な若い細胞に関連するタンパク質につながる遺伝子の発現または抑制のパターンの促進である。当業者が細胞を老化しているまたは幼若であるとして分類することを可能にするマーカー（酵素、転写因子、クロマチン領域、表皮細胞の核タンパク質および基底膜のタンパク質）の例としては、非限的な例として、Ki67タンパク質、p21（CDKN1A）タンパク質、ヒストンH2AX、細胞老化特異的ヘテロクロマチン構造（SAHF）、酵素である細胞老化特異的 - ガラクトシダーゼ（Sen-Gal）、DNA修復タンパク質Ku70およびKu80、核タンパク質PARP（ポリ-ADPリボースポリメラーゼ）、ペルオキシレドキシン4（Prx IVまたはPRX4）酵素、構造タンパク質インテグリン1、インテグリン4、ラミニンB3/5、ケラチン15、酵素キノンレダクターゼおよびグルタチオン-S-トランスフェラーゼ、ならびに細胞ストレスマーカーである熱ショックタンパク質およびS-プロテオソームが挙げられる。30

## 【0021】

本発明者らの知見によれば、ペプチド植物成長因子および／または植物転写因子を含む植物無細胞上清またはその画分が、動物の皮膚細胞で使用され、古い皮膚のモデルに対して効果が証明されたのは初めてである。したがって、本発明は、植物の組織再生または分化プロセスにおいて植物が一般に使用する活性成分を含み、動物の皮膚細胞に安全かつ効果的に適用することができる活性成分を含む組成物を有することを最終目的として、当該活性成分を容易に回収する方法を想定している。40

## 【0022】

10

20

30

40

50

細胞質の内部含有物を有しておらず、また細胞膜および／または細胞壁を有していないこれらの上清は、ここでは馴化栄養培地または馴化培地または馴化細胞培地と呼ばれる。本発明者らは、血液を遠心分離して、遠心分離機の受け皿の底に血液細胞（赤血球、単核細胞および血小板）を集め、液体上清（血漿、血清）を上部に集めた場合に得られる血漿または血清に当該上清が類似していると提案する。したがって、本発明の無細胞上清は、脱分化した植物細胞が増殖し、消費されなかった培養培地中に最初に存在する化合物の量だけでなく、脱分化した植物細胞を培地に放出する他の化合物も含む。したがって、動物細胞、特に哺乳類、さらに詳細にはヒトの真皮細胞および／または表皮細胞の再生を促進するために、脱分化した細胞を含まず、これらのペプチド植物成長因子および／または転写因子を含むこれらの馴化培地またはその画分の使用が提案される。

10

## 【0023】

植物成長因子または植物転写因子または植物エピジェネティック因子である4～300アミノ酸長のペプチドを含む当該無細胞上清の画分は、4～300アミノ酸長のペプチドを含み、脱分化した植物細胞懸濁培地の増殖を先にサポートした無細胞上清から得ることができる「単離された」組成物（または単離された画分）として定義することもできる。特に、そのような組成物の単離は、少なくともタンパク質分離プロセスによってペプチド植物成長因子を含む当該上清から液体を分離または回収することを含み、当該タンパク質分離プロセスは、クロマトグラフィー（固相抽出（SPE）、サイズ排除クロマトグラフィー（SEC）、およびそれらのカスケード状の組み合わせから選択される）、ろ過（特にタンジェンシャルフローろ過（TFF）による）、タンパク質沈殿のうちの少なくとも1つおよびそれらの組み合わせを含む。このようにして得たペプチド植物成長因子および／または植物転写因子および／またはエピジェネティック因子を含むこれらの組成物は、特に、上記で明らかにした動物の皮膚細胞の修復剤および／または再生剤としての使用のためのものである。

20

## 【0024】

本発明はまた、特定の植物種の植物細胞懸濁培地に由来する、またはこれから得られ、かつ上に開示された効果を有するこれらの無細胞上清の特に新しい画分を提供する。

## 【0025】

したがって、本発明は、第2の態様として、ニンジン (*Daucus carota*)、ツボクサ (*Centella asiatica*)、ザクロ (*Punica granatum*)、ワタ (*Gossypium herbaceum*)、*Sarcocapnos crassifolia*、ウコン (*Curcuma longa*)、アマ (*Linum usitatissimum*)、ブドウ (*Vitis vinifera*)、*Lithops pseudotruncatella*、アルニカ (*Arnica montana*)、ヤエヤマアオキ (*Morinda citrifolia*)、ヒレハリソウ (*Sympodium officinale*)、アサ (*Cannabis sativa*)、オリーブ (*Olea europaea*)、およびカメリアシネンシス (*Camellia sinensis*) からなる群から選択される植物由来の脱分化した植物細胞懸濁培地の増殖を先にサポートした無細胞上清の画分であって、

30

- 4～300アミノ酸長の、ペプチド植物成長因子、植物転写因子、エピジェネティック因子、およびこれらの混合物から選択されるペプチドを含み、前記画分は細胞溶解による細胞質性細胞内含有物ならびに膜および／または細胞壁を有しておらず、

40

(a) 液体栄養培養培地中で脆いカルス由来の脱分化した植物細胞を5～15日間増殖させ、脱分化した植物細胞の増殖をサポートする馴化培地を得ることと、

(b) 細胞を溶解させることなく馴化培地から植物細胞全体を取り除き、4～300アミノ酸長のペプチドを含む無細胞上清を得ること、

(c) 固相抽出クロマトグラフィー、サイズ排除クロマトグラフィー、ろ過、限外ろ過、タンパク質沈殿、およびこれらの組み合わせからなる群から選択される分離技術を用いてタンパク質分離プロセスを実行し、無細胞上清の画分を得ることとを含む方法によって得られる、画分を有する。

50

## 【0026】

以下の実施例から導かれるように、ペプチド性の植物成長因子および／または転写因子および／またはエピジェネティック因子（4～300アミノ酸長）を含む上清またはその任意の画分は両方とも、ヒトの古い線維芽細胞培地（12～13回、さらには20回よりも多く継代した培地由来のもの）における老化プロセスを回復することができ、したがって、細胞の「老化状態」を示す異なる細胞マーカーに従って細胞の若返りを促進する。

## 【0027】

上記で定義したこれらの無細胞上清またはその画分の使用は、哺乳類の皮膚（真皮細胞および／または表皮細胞）に適用した場合に毒性が低いかまたはない組成物を使用するという利点を意味する。これは、細胞の内部またはさらには膜からの免疫原性化合物の存在がないためである。さらに、これらの上清または画分組成物は、細胞溶解物由来の組成物ほど複雑ではなく、したがって、懸濁液の全成分に対する活性化合物（ペプチド植物成長因子、転写因子またはエピジェネティック因子）の割合は、植物細胞懸濁液溶解物よりも高い。このように、目的のペプチドは、組成物が目的のペプチドを自然に多く含むという意味で、直接精製される。さらに、細胞懸濁溶解物からの植物抽出物または溶媒抽出物に関連して、本発明の上清の使用は、抽出物中に存在し得、抽出物の固有の複雑さおよび非活性であるが皮膚損傷性である化合物（皮膚でアレルギー反応を引き起こす化合物等）を分離することが難しいために、常に回収される毒性化合物の存在なしにペプチドがより高い割合で容易に回収できるという利点もある。

10

## 【0028】

このように、本発明の別の態様は、有効量の上記に定義した脱分化した植物細胞懸濁培地の上清の無細胞画分を含む皮膚局所用組成物であり、当該画分は、1つまたは複数の適切な局所用の薬学的にまたは美容的に許容される賦形剤（または添加物、excipients）または担体と共に、ペプチド植物成長因子、ペプチド植物転写因子、エピジェネティック因子およびこれらの混合物から選択される、4～300アミノ酸長のペプチドを含む。

20

## 【0029】

本発明は、さらに、化粧品における使用のための、特に真皮細胞および表皮細胞の老化状態を回復させるため再生に使用するための脱分化した植物細胞懸濁培地の無細胞上清または当該無細胞上清の画分に関する。

30

## 【0030】

本発明による使用のための、本発明の無細胞上清またはその任意の画分は、脱分化した植物細胞を培養することによって得ることができることもまた、注目に値する。この脱分化した植物細胞は、容易に得られ、化粧品または製剤中の活性特性を持つ特定の二次代謝産物の产生に広く使用されてきた。さらに、細胞を含まないこの馴化培地（細胞質含有物ならびに膜および／または細胞壁）は、対照および参考組成物との関連で低用量でさえ明らかな効果を有する化合物のカクテルを含む。馴化培地（無細胞上清）中の化合物の例としては、とりわけ下記に記載するものの中でも、アミノ酸、脂質、炭化水素、抗酸化化合物、いくつかの分泌された二次代謝産物（主にフェノール、フラボノイド、フェノール、アルカロイドおよびフィトステロール）、4～300アミノ酸長のペプチドが挙げられる。いずれの理論にも束縛されるものではないが、本発明者らは、細胞培養を支持した上清中に見出される化合物の相乗的拳動に起因する驚くべき若返り効果（老化回復）を提案する。当該化合物は、損傷を受けた植物組織または増殖もしくは再生を担う植物細胞の細胞外マトリックスに見出される実際の化合物と最も似ている。本発明は、まったく異なる生物、植物および動物が実際に再生／修復／分化組織プロセスに際して同様に作用するという証拠を仮定しているが、これは、植物由来の細胞外空間からのこうしたペプチドまたは成分が、動物細胞に対して動物由来の同等のペプチド／成分（特に血漿のもの）が起こすのと同様の効果を起こすからである。

40

## 【図面の簡単な説明】

## 【0031】

【図1】図1は、ニンジン（Daucus carota）の培地の無細胞上清（凍結乾

50

燥サンプル 0 1、 0 2 および 0 3 ) およびペプチド性の化合物のみを含む無細胞上清の 2 つの固相抽出 ( S P E 0 1、 0 2 ) 画分の S D S - P A G E 電気泳動の画像である。タンパク質バンドは、クマシーブルー染色によって検出される。

【図 2】図 2 は、 H D F におけるペルオキシレドキシン 4 ( P R X 4 ) の百分率 ( % ) での濃度を示すグラフである。ペルオキシレドキシン 4 は、ヒト皮膚線維芽細胞 ( H D F ) において増加したマーカーであり、老化表現型をより若い表現型へと回復させる。ペルオキシレドキシン 4 は、 E L I S A アッセイによって測定した。それぞれ濃度を左側の棒で示すエラグ酸 ( 9 5 % 超、純粋な分子と命名 ) の組成物、それぞれ濃度を真ん中の棒で示すザクロ ( P unica granatum ) の ( 4 0 % のエラグ酸 ) 抽出物 ( 4 0 % のエラグ酸を含有、 P R C F と命名 ) 、およびそれぞれ濃度を右側の棒で示すザクロ ( P unica granatum ) 細胞溶解物 ( 0 . 4 % のエラグ酸を含有 ) を試験した。 H D F に対する各サンプルの試験濃度は、 C 1 ( 0 . 0 0 1 9 μ g / m L ) 、 C 2 ( 0 . 0 0 3 7 5 μ g / m L ) 、および C 3 ( 0 . 0 0 7 5 μ g / m L ) であった。 P R C F ( 細胞因子が豊富な血漿由来 ) は、ザクロ ( P unica granatum ) の乾燥細胞溶解物から生じ、培地中に存在し、かつ懸濁液中の細胞によって消費されない培地中に存在する物質の中でも、ペプチド植物成長因子およびペプチド植物転写因子 ( 両方とも、以下では単純に細胞因子と呼ぶ ) だけでなく、細胞質の含有物、細胞膜および細胞壁断片も含む。

【図 3 a】図 3 a は、ニンジン ( D a u c u s c a r o t a ) ( パネル A ) およびザクロ ( P unica granatum ) ( パネル B ) からのいくつかの組成物を用いた処理後の H D F 中のペルオキシレドキシン 4 濃度を示す。 T E は植物の通常の抽出物であり、対照は老化線維芽細胞中の P R X 4 であり ( 1 0 0 % とみなされる ) 、 P R C F はニンジン ( D a u c u s c a r o t a ) の場合はグリセリン中の細胞溶解物に対応し、ザクロ ( P unica granatum ) の場合は乾燥細胞溶解物に対応する。 S S P F 1 は、各植物の凍結乾燥された無細胞上清に対応し、 S S P - F 2 は、 3 0 k D a 以下の分子量を有するペプチドを含む S P E 画分に対応する。 P M ( 純粋な分子由来 ) はエラグ酸 ( 陽性対照 ) である。 P A P R 1 は、一本鎖 D N A ( s s D N A ) 切断の修復に関する酵素であり、 D N A 損傷による老化に関与すると考えられているので、 H D F における老化回復試験に役立つ別のマーカーである。

【図 3 b】図 3 b は、ニンジン ( D a u c u s c a r o t a ) ( パネル C ) およびザクロ ( P unica granatum ) ( パネル D ) からのいくつかの組成物を用いた処理後の H D F 中の、ポリ [ A D P - リボース ] ポリメラーゼ 1 ( P A R P - 1 ) 濃度を示す。 T E は植物の通常の抽出物であり、対照は老化線維芽細胞中の P R X 4 であり ( 1 0 0 % とみなされる ) 、 P R C F はニンジン ( D a u c u s c a r o t a ) の場合はグリセリン中の細胞溶解物に対応し、ザクロ ( P unica granatum ) の場合は乾燥細胞溶解物に対応する。 S S P F 1 は、各植物の凍結乾燥された無細胞上清に対応し、 S S P - F 2 は、 3 0 k D a 以下の分子量を有するペプチドを含む S P E 画分に対応する。 P M ( 純粋な分子由来 ) はエラグ酸 ( 陽性対照 ) である。 P A P R 1 は、一本鎖 D N A ( s s D N A ) 切断の修復に関する酵素であり、 D N A 損傷による老化に関与すると考えられているので、 H D F における老化回復試験に役立つ別のマーカーである。

【図 4】図 4 は、ツボクサ ( C e n t e l l a a i a t i c a ) の細胞懸濁培地の凍結乾燥された無細胞上清を用いて 8 日間処理する前および後の、古い H D F ( 上に開示したように、 2 0 回を超える継代 ) の培地の写真である。

【図 5】図 5 は、 H D F ( 2 0 回を超える継代 ) における細胞生存率 ( 細胞染色による最終数 / 初期数として測定した生細胞の % ) を示すグラフである。図 1 と同じ濃度 ( C 1 ~ C 3 ) の各種の細胞溶解物 ( P R C F ) を用いたニンジン ( D a u c u s c a r o t a ) ( パネル A ) およびザクロ ( P unica granatum ) ( パネル B ) の抽出物をパネルで比較する。

【図 6】図 6 は、実施例 2 に関する、ザクロ ( P unica granatum ) ( パネル A ) 由来およびニンジン ( D a u c u s c a r o t a ) ( パネル B ) 由来のいくつか

の組成物で処理したヒト皮膚線維芽細胞（HDF）におけるKi67タンパク質の発現（Y軸におけるKi67濃度（%））を示す棒グラフである。エラグ酸は陽性対照（PM、純粋な分子由来）であり、PRCFは、各植物の細胞溶解物であり、TEは、各植物の通常の抽出物であり、SSPF1は無細胞上清であり、SSPF2は、30kDa以下の分子量を有するペプチドを含む無細胞上清の画分であり、対照または参照値は、未処理老化線維芽細胞中のKi67タンパク質であった（100%とみなされる）。

【図7】図7は、これもまた実施例2に関する、ザクロ（*Punica granatum*）（パネルA）由来およびニンジン（*Daucus carota*）（パネルB）由來のいくつかの組成物で処理したヒト皮膚線維芽細胞（HDF）におけるSen---Gal濃度（Y軸におけるSen---Galレベル（%）の発現を示す棒グラフである。エラグ酸は陽性対照（PM；純粋な分子由来）であり、PRCFは、各植物の細胞溶解物であり、TEは、各植物の通常の抽出物であり、SSPF1は無細胞上清であり、SSPF2は、30kDa以下の分子量を有するペプチドを含む無細胞上清の画分であり、対照または参照値は、未処理老化線維芽細胞中のSen---Gal濃度であった（正規化後0%とみなされる）。

【図8】図8は、実施例3に関連して、いくつかの組成物で処理した場合の毛囊真皮乳頭細胞（HFDP）の増殖指数（%）のグラフである。Ctrl-BMは、増殖指数の100%値と一致する基礎対照（未処理HFDP）を意味する。FGFは線維芽細胞成長因子を意味し、VEGFは血管内皮成長因子を意味し、C1およびC2は、表2に示すように試験した種の異なる濃度の無細胞上清に対応する。植物種の名称は表2にも示すように略記した。Y軸における増殖指数は百分率（%）である。

【図9A】図9Aは、実施例5に関連するものであり、いくつかの組成物の治癒面積（μm<sup>2</sup>）を示したものである。表6に示すように、BCは基礎対照を意味し；Ctrl+は、陽性対照（特にウシ胎仔血清（FBS）および組織成長因子-1（TGF-1））であり、C1およびC2は、試験した種の無細胞上清画分（3kDaまたは30kDaろ過）それぞれの異なる濃度に対応する。植物種の名称も表6に示されるように略記されている。4Aa、4AaS1および4AaS2は、それぞれ、配列番号1、2および3のペプチドである。

【図9B】図9Bは、実施例5に関連するものであり、48時間の治療後の基礎対照に対する創傷治癒增加率を示したものである。表6に示すように、BCは基礎対照を意味し；Ctrl+は、陽性対照（特にウシ胎仔血清（FBS）および組織成長因子-1（TGF-1））であり、C1およびC2は、試験した種の無細胞上清画分（3kDaまたは30kDaろ過）それぞれの異なる濃度に対応する。植物種の名称も表6に示されるように略記されている。4Aa、4AaS1および4AaS2は、それぞれ、配列番号1、2および3のペプチドである。

#### 【発明を実施するための形態】

##### 【0032】

本出願において本明細書で使用されるすべての用語は、特に指示しない限り、当該技術分野で知られている通常の意味で理解されるものとする。本出願で使用される特定の用語の他のより具体的な定義は、以下に述べるものであり、明確に規定された定義がより広い定義を与えない限り、明細書および特許請求の範囲全体を通して一様に適用されることが意図される。

##### 【0033】

用語「ペプチド植物成長因子」は、最近発見され、4～300個のアミノ酸配列を含む植物防御、成長および発達に関与するいわゆるシグナル伝達ポリペプチドを包含する（上記のRylanら、および以下のCzyzewiczら参照）。ペプチドに関して、植物転写因子は、それらが由来する植物において、茎分裂組織の形成、幹細胞維持および体細胞分化のレギュレータとして作用する4～300アミノ酸長のペプチドも包含する。

##### 【0034】

「脱分化した植物細胞懸濁培地の増殖を先にサポートした無細胞上清」という表現は、

10

20

30

40

50

単純に、任意の目的（二次代謝産物の產生、バイオマス生産等）の培養培地中で懸濁状態での増殖または培養中に脱分化した植物細胞を含む液体を意味する。無細胞上清は、植物細胞の溶解から放出された細胞質内含有物およびその破壊から生じる植物細胞の任意の部分（膜断片、細胞壁断片等）は含まない。無細胞上清は、消費されていない最初の培養培地の成分の中でもとりわけ、植物細胞によって細胞外培地に分泌された化合物をさらに含む。これらの化合物にペプチド植物成長因子がある。無細胞上清は、馴化栄養培地もしくは馴化培地または馴化細胞培地とも呼ばれる（本明細書では区別なく使用される）。無細胞上清が「細胞溶解による細胞質性細胞内含有物を有しておらず、また膜および／または細胞壁を有さない」と言われる場合、微量のいくらかの膜および／または細胞壁ならびに細胞質成分（核成分、オルガネラ等）は、培養プロセス中に時折生じる単離された細胞の自発的破壊のため存在し得ると理解されたい。

10

## 【0035】

「4～300アミノ酸長のペプチドを含む無細胞上清の画分」とは、本発明の意味では、最初に回収された無細胞上清の一部（特に液体部分）であると理解されるべきであるが、この部分はペプチドの回収を可能にする手段、例えばクロマトグラフィー技術、篩過またはタンパク質沈殿によって精製された。

20

## 【0036】

「修復剤および／または再生剤」とは、4～300アミノ酸長のペプチドを有する上清およびその任意の画分が、（創傷により、老化により）損傷したまだ生存可能な皮膚組織を回復させる能力、ならびに（ここでも例えれば、創傷において）新たな組織を生成するための前駆皮膚細胞からの細胞分裂を促進する能力を有することであると理解すべきである。

20

## 【0037】

無細胞上清またはその画分の「有効量」とは、その適用後に治療効果または美容効果を提供する活性成分（少なくとも当該上清または画分のペプチド植物成長因子）の量を指す。

## 【0038】

「薬学的に許容される」という用語は、医療用途の組成物を調製するための製薬技術での使用に適した賦形剤または担体を指す。

30

## 【0039】

本明細書において同じ意味で用いられる「美容的に許容される」または「皮膚科学的に許容される」という用語とは、とりわけ過度の毒性、配合禁忌、不安定性、アレルギー反応なしにヒトの皮膚と接触させて使用するのに適した賦形剤（または添加物、excipients）または担体を指す。

## 【0040】

「皮膚局所用組成物」は、従来の意味では、それが適用され、例えば、いくつかの皮膚疾患の治療におけるように、それを必要とする対象の皮膚または粘膜の所定の領域に効果を及ぼす組成物を意味すると理解されるべきである。局所投与は、全身的効果ではなく局所的効果を提供することを意図している。局所用組成物とは、組成物が異なる皮膚層（表皮、真皮）または粘膜層に到達し得るという事実とは独立して、皮膚、頭皮、および粘膜表面に適用されることを意味する。本発明の組成物は、口腔粘膜、生殖器粘膜、および肛門粘膜を含む皮膚、頭皮および粘膜表面上での局所使用に適している。

40

## 【0041】

第1の態様では、本発明は、皮膚治療のための薬剤として使用するための脱分化した植物細胞懸濁培地の増殖を先にサポートした無細胞上清または当該無細胞上清の画分であって、当該無細胞上清または当該画分は、4～300アミノ酸長のペプチドを含み、細胞溶解による細胞質性細胞内含有物を有しておらず、また膜および／または細胞壁を有していない、無細胞上清または画分に関する。

## 【0042】

特定の実施形態において、それらは、瘢痕形成皮膚用剤としての使用および／または皮

50

膚創傷治癒剤としての使用および／または皮膚若返り剤としての使用のためのものである。これらのすべての効果は、真皮細胞および表皮細胞における老化を回復させる無細胞上清またはその画分の能力に起因する。したがって、5～300アミノ酸長のペプチドを含む無細胞上清またはその任意の画分は、皮膚（真皮細胞および／または表皮細胞）の老化を介して起こり、皮膚の早期老化、皮膚の瘢痕形成、皮膚創傷治癒およびこれらの障害の組み合わせからなる群から選択される、疾患または状態の予防および／または治療に用いるためのものである。別の特定の実施形態では、それらは、皮膚の早期老化および光老化から選択される状態または疾患の治療で使用するためのものであり、当該状態は、細かいおよび粗いしわ、不規則でまだらな色素沈着、褐色のしみ、ざらつき、黄変、くも状静脈と呼ばれる小さく表面的な血管または毛細管拡張症、およびこれらすべての状態の組み合せを含む。

10

#### 【0043】

これはまた、真皮細胞および／または表皮細胞の老化により生じる疾患または状態の予防および／または治療のための薬剤の調製のための、ペプチド植物成長因子および／またはペプチド植物転写因子および／またはエピジェネティック因子から選択される、特にペプチド植物成長因子および／またはペプチド植物転写因子から選択される、4～300アミノ酸長のペプチドを両方ともが含む、脱分化した植物細胞懸濁培地の無細胞上清またはその画分の皮膚局所用途として処方され得る。これはまた、ペプチド植物成長因子および／またはペプチド植物転写因子および／またはエピジェネティック因子から選択される、特にペプチド植物成長因子および／またはペプチド植物転写因子から選択される、4～300アミノ酸長のペプチドを両方ともが含む、有効量の脱分化した植物細胞懸濁培地の無細胞上清またはその画分を、このような治療を必要とする哺乳類に投与することを含む、真皮細胞および／または表皮細胞の老化により生じる疾患または状態の予防および／または治療のための方法にさらにに関する。

20

#### 【0044】

言い換えると、脱分化した植物細胞懸濁培地の増殖を先にサポートした無細胞上清または当該無細胞上清の画分は、局所用皮膚治療剤として用いるためのものであり、治療剤は皮膚瘢痕形成剤および／または皮膚創傷治癒剤としてのものであり、当該無細胞上清または当該画分は、4～300アミノ酸長の、ペプチド植物成長因子、植物転写因子、エピジェネティック因子、およびこれらの混合物から選択されるペプチドを含み、当該無細胞上清または当該画分は細胞溶解による細胞質性細胞内含有物ならびに膜および／または細胞壁を有していない。

30

#### 【0045】

実施例に示すように、ペプチド植物成長因子および／またはペプチド植物転写因子および／またはエピジェネティック因子、特に植物成長因子および／またはペプチド植物転写因子を含む本発明の植物無細胞上清およびその画分の両方が培養された老化線維芽細胞に適用されたとき、20回を超える継代を重ねた線維芽細胞における細胞老化は、より若い表現型へと回復する。最初の老化線維芽細胞の老化表現型またはより若い表現型は、ペルオキシレドキシン4およびポリ-A DPリボースポリメラーゼの発現レベルによって決定された。

40

#### 【0046】

第1の態様の別の特定の実施形態では、薬剤として使用するための無細胞上清または当該無細胞上清の画分は、4～300アミノ酸長、より具体的には5～300アミノ酸長、さらにより具体的には4～70アミノ酸長、特に5～70アミノ酸長のペプチド植物成長因子を含む。別の特定の実施形態では、それらは、4～25アミノ酸長、さらにより具体的には5～25アミノ酸長のペプチド植物成長因子を含む。ペプチドの長さ（植物転写因子であるペプチドでさえも）は、植物細胞膜および植物細胞壁を通る転座を条件付けるパラメータである。

#### 【0047】

この第1の態様のさらに別の特定の実施形態において、脱分化した植物細胞培養懸濁液

50

は、ニンジン (*Daucus carota*)、ツボクサ (*Centella asiatica*)、ザクロ (*Punica granatum*)、ワタ (*Gossypium herbaceum*)、*Sarcocapnos crassifolia*、ウコン (*Curcuma longa*)、アマ (*Linum usitatissimum*)、ブドウ (*Vitis vinifera*)、*Lithops pseudotruncatella*、アルニカ (*Arnica montana*)、ヤエヤマアオキ (*Morinda citrifolia*)、ヒレハリソウ (*Symphytum officinale*)、アサ (*Cannabis sativa*)、オリーブ (*Olea europaea*)、およびカメリアシンensis (*Camellia sinensis*) からなる群から選択される植物由来である。より詳細には、ニンジン (*Daucus carota*)、ツボクサ (*Centella asiatica*)、ザクロ (*Punica granatum*)、ワタ (*Gossypium herbaceum*)、*Sarcocapnos crassifolia*、ウコン (*Curcuma longa*)、アマ (*Linum usitatissimum*)、ブドウ (*Vitis vinifera*)、*Lithops pseudotruncatella*、ヤエヤマアオキ (*Morinda citrifolia*)、ヒレハリソウ (*Symphytum officinale*)、アサ (*Cannabis sativa*)、およびオリーブ (*Olea europaea*) からなる群から選択される植物由来である。別の特定の実施形態において、脱分化した植物細胞培養懸濁液は、ニンジン (*Daucus carota*)、ツボクサ (*Centella asiatica*)、およびザクロ (*Punica granatum*) からなる群から選択される植物由来である。10  
20

#### 【0048】

別の特定の実施形態では、場合により上記または下記の任意の実施形態と組み合わせて、ペプチド植物成長因子は、ファイトスルフォカイン-1 (PSK-1)、ファイトスルフォカイン-2 (PSK-2)、硫酸化チロシン-1を含む植物ペプチド (PSY1)、RALF (Rapid Alkalization Factor)、管状要素分化抑制因子 (Tracheary Element Differentiation Inhibitory Factor、TDIF)、Clavata-3 (CLV3)、CLE (Clavata-Embryo Surrounding Region-Related)、TPD1 (Tapetum Determinant-1)、表皮パターン形成因子-1 (Epidermal Patterning Factor-1、EPF1)、花の器官脱離欠損 (Inflorescence Deficient in Abscession、IDA)、ESR (Embryo Surrounding Region-Related)、Polarisペプチド (PLS)、根分裂組織成長因子 (RGF)、EC1 (Egg Cell-Secreted Protein)、CEP (C-terminally Encoded peptide)、初期ノジュリン40 (Early Nodulin 40、ENOD40)、システミン、SCR (S-locus Cystein Rich protein)、およびこれらの混合物 (これらすべての、2つのみ、3つのみ、4つのみ、または列挙したペプチドをすべて含むまでの3つ以上の組み合わせを意味する) からなる群から選択される。30  
40

#### 【0049】

ペプチド植物成長因子以外のペプチドは、脱分化した植物細胞懸濁培地の増殖を先にサポートした無細胞上清または当該無細胞上清の画分の特定の実施形態にも存在する。これらのペプチドは、特にWIND (Wound-Induced Dedifferentiation)、Wusche1 (WUS)、TCP (Teosinte Branched1/Cycloidea/Proliferating Cell Factor)、および根分裂組織維持のための転写因子 (PLETHORA)、およびこれらの混合物等のペプチド植物転写因子である。これらの転写因子は、茎分裂組織形成、幹細胞維持および体細胞分化を調節する。

#### 【0050】

50

これらのペプチド植物成長因子およびペプチド植物転写因子はすべて、例えば、Czyzewiczら、「Message in a bottle: small signalling peptide outputs during growth and development」、Journal of Experimental Botany、2013年、vol. no. 64 (17)、pp. : 5281~5296に開示されている。

#### 【0051】

エピジェネティック因子として通常知られている微量の他の化合物もまた、培養中のいくつかの細胞の残存破壊 (residual disruption) のために(上記のように)、無細胞上清または当該無細胞上清の画分に含まれ、これは核および細胞質の含有量を最小限に抑えながらではあるが培養培地内で維持する。これらの植物エピジェネティック因子の例は、NAメチル化プロセスに関するクロモメチラーゼ(CMT)、ドメイン再編成メチルトランスフェラーゼ(DRM)、メチルトランスフェラーゼ(MET)、およびいくつかのオーキシン；クロマチンの脱凝縮およびリモデリングに関する、CHPファミリーのクロマチンリモデリング因子PICKLE(CHDタンパク質の名前は、配列相同性のある3つのドメインの存在、すなわち、Chromatin organization modifierドメイン(クロモドメイン)、SWI2/SNF2ATPアーゼ/ヘリカーゼドメイン(モチーフはDNA結合ドメインに対して配列相同性を有する)、およびクロマチンリモデリング因子DDM1(Decrease In DNA Methylation-1から)に由来する)；ヒストンのリモデリングに関する、ヒストンH3メチルトランスフェラーゼクリプトナイト(KYP)；小RNA分子；ならびにこれらすべてのタンパク質および化合物の混合物からなる群から選択される。エピジェネティック因子は、遺伝子の発現またはサイレンシングを制御するDNAのための細胞中の標識を制御する、特にペプチド性の生体分子として理解されるべきである。

#### 【0052】

上記で示すように、本発明による使用のための無細胞上清は、細胞から培地に分泌される、ペプチド植物成長因子、植物転写因子および場合により植物エピジェネティック因子以外の化合物をさらに含む。実際、この無細胞上清(すなわち、馴化培地)は、細胞によって消費されなかった最初の培養培地の化合物および培養培地中で増殖する間にこれらの植物細胞によって分泌された化合物を含む。したがって、本発明による無細胞上清は、特定の実施形態において、

- 培地の残留化合物、例えば、タンパク質、脂質(例えば、脂肪酸、リン脂質、およびグリセリド)、ポリアルコール(例えば、ソルビトールおよびマンニトール)、オーキシン、糖タンパク質および糖脂質、ビタミン、抗酸化活性を有する化合物(NADH)、無機塩、ならびに炭化水素(例えば、グルコースおよびフルクトースのような单糖類、スクロースのような二糖類、オリゴ糖および多糖類)、ならびに

- 場合により、細胞が培地にもたらしたであろう二次代謝産物(例えば、フラボノイド、フェノール、アルカロイド、フィトステロール、およびテルペノイド(植物カロチノイドを含む))をさらに含む。

#### 【0053】

脱分化した植物細胞懸濁培地の増殖を先にサポートした無細胞上清(またはその任意の画分)において、炭化水素は、それらが培地に懸濁した細胞によって消費されたため、少量で存在することに留意すべきである。実際、残留している炭化水素濃度は、以下に開示されるように、細胞密度とともに、または細胞密度とは独立して、培地の増殖をモニタするために通常使用される。当業者であれば、細胞懸濁培地の増殖をモニタする方法を知っている。

#### 【0054】

場合により上記または下記の任意の実施形態と組み合わせた別の特定の実施形態では、皮膚治療のための薬剤として使用するための無細胞上清またはその画分は、当該無細胞上清またはその画分が、

10

20

30

40

50

(a) 液体栄養培養培地中で脆いカルス由来の脱分化した植物細胞を5～15日間増殖させ、脱分化した植物細胞の増殖を支持する馴化培地を得ること、

(b) 細胞を溶解させることなく馴化培地から植物細胞全体を取り除き、4～300アミノ酸長のペプチドを含む無細胞上清を得ること、

(c) 場合により、クロマトグラフィー、ろ過、限外ろ過、タンパク質沈殿、およびこれらの組み合わせからなる群から選択される分離技術を用いてタンパク質分離プロセスを実行し、無細胞上清の画分を得ることと  
を含む方法によって得ることができるものである。

#### 【0055】

さらなる特定の実施形態では、無細胞上清は、ステップ(a)において液体栄養培養培地中で脆いカルス由来の脱分化した植物細胞を10～12日間増殖させ、脱分化した植物細胞の増殖を支持する馴化培地を得ることを含む方法によって得ることができる。10

#### 【0056】

示されるように、馴化培地(無細胞上清)を得るためのステップ(a)を行う代替的な方法は、培養培地中の炭化水素(例えばスクロース)の、細胞消費により時間とともに減少する濃度を制御することによる。懸濁培地における脱分化した植物細胞の増殖を制御する別の代替的な方法は、培地中の細胞密度(細胞数/mL)を求めるこによる。したがって、第1の態様の別の特定の実施形態では、場合により上記または下記の任意の実施形態と組み合わせて、無細胞上清は脱分化した植物細胞懸濁培地を支持するものであり、細胞密度(懸濁培地の体積単位あたりの細胞数として表される)は、 $1 \times 10^5$ 細胞/懸濁培地mL～ $1 \times 10^7$ 細胞/懸濁培地mL、より詳細には $1 \times 10^6$ 細胞/懸濁培地mLから $3 \times 10^6$ 細胞/懸濁培地mLである。20

#### 【0057】

別の特定の実施形態では、薬剤として使用するための、上で示したような無細胞上清は、ステップ(a)の前に、インビトロでオーキシン、サイトカイニン、ジベレリン、およびこれらの混合物から選択される植物成長調節剤を含む脱分化培地に植物細胞を供することによって、植物組織から植物細胞を脱分化させるステップを含む方法によって得られる。30

#### 【0058】

馴化培地から植物細胞を溶解させることなく植物細胞全体を除去するための特定の方法の中でも、重力、遠心分離(特に4000～4600rpm)、細胞を保持するためのメッシュまたはフィルタによるろ過および上清の回収、ならびに固体(細胞)沈殿による細胞の沈降が含まれる。

#### 【0059】

第1の態様の別の特定の実施形態では、場合により上記または下記の任意の実施形態と組み合わせて、無細胞上清または画分は、上記に開示され、ステップ(b)の後に、無細胞上清を凍結乾燥して凍結乾燥上清を得ることを含む方法によって得られるものである。さらなる特定の実施形態では、この凍結乾燥無細胞上清を10～30倍に濃縮する。凍結乾燥上清の濃縮は、例えば、凍結乾燥上清全体を、凍結乾燥される前の初期無細胞上清体積よりも少ない体積の溶媒溶液(一般に緩衝液)に再懸濁することによって達成することができる。40

#### 【0060】

本発明の第1の態様の他の特定の実施形態は、場合により上記または下記の任意の実施形態と組み合わせて、局所的皮膚治療のための薬剤として使用するための無細胞上清を含み、脱分化した植物細胞懸濁培地は、二次代謝産物の産生を増強するための誘導プロセスを用いることによりストレス条件に供する。特定の誘導プロセスとしては、酵母細胞壁、菌糸壁、真菌胞子、多糖類(例えば、アルギン酸塩、ペクチンおよびキトサン)、オリゴ糖、シクロデキストリン、ペプチドおよびタンパク質(例えば、グルタチオン、セルラーゼ、エリシチン、ペクチナーゼ、およびタンパク質キナーゼ)、低分子量有機酸(例えば、酢酸、吉草酸、シュウ酸、乳酸、クエン酸、およびリンゴ酸)、揮発性物質、ジャスマ50

ン酸化合物（例えば、ジャスモン酸メチル）、サリチル酸塩から選択される生物的エリシターを用いた誘導が挙げられる。他の特定の誘導プロセスとしては、UV照射、IR照射、オゾン処理、マイクロ波、超音波、温度、浸透ストレス（高塩分）、酸化還元環境、可視光波長、無機塩、概日リズム障害プロセス、および光周期から選択される非生物エリシターを用いた誘導が挙げられる。

#### 【0061】

真皮（線維芽細胞）細胞および表皮（ケラチノサイト）細胞への影響ゆえに、4～300アミノ酸のペプチドを含む無細胞上清またはその画分を皮膚に（局所的に）適用すると、皮膚の外観全体が改善する。したがって、化粧用途、特に皮膚に対する若返り効果がさらに推測される。したがって、脱分化した植物細胞懸濁培地の増殖を先にサポートした無細胞上清または当該無細胞上清の画分の局所用皮膚若返り剤としての使用もまた、本発明の一部であり、当該無細胞上清または当該画分は4～300アミノ酸長の、ペプチド植物成長因子、植物転写因子、エピジェネティック因子、およびこれらの混合物から選択されるペプチドを含み、当該無細胞上清または当該画分は細胞溶解による細胞質性細胞内含有物ならびに膜および/または細胞壁を有していない。

10

#### 【0062】

特に、化粧用途とは、ニンジン (*Daucus carota*)、ツボクサ (*Centella asiatica*)、ザクロ (*Punica granatum*)、ワタ (*Gossypium herbaceum*)、*Sarcocapnos crassifolia*、ウコン (*Curcuma longa*)、アマ (*Linum usitatissimum*)、ブドウ (*Vitis vinifera*)、*Lithops pseudotruncatella*、アルニカ (*Arnica montana*)、ヤエヤマアオキ (*Morinda citrifolia*)、ヒレハリソウ (*Symphytum officinale*)、アサ (*Cannabis sativa*)、オリーブ (*Olea europaea*)、およびカメリアシンensis (*Camellia sinensis*) からなる群から選択される植物由来の脱分化した植物細胞培養懸濁液を使用することを意味する。より詳細には、ニンジン (*Daucus carota*)、ツボクサ (*Centella asiatica*)、ザクロ (*Punica granatum*)、ワタ (*Gossypium herbaceum*)、*Sarcocapnos crassifolia*、ウコン (*Curcuma longa*)、アマ (*Linum usitatissimum*)、ブドウ (*Vitis vinifera*)、*Lithops pseudotruncatella*、ヤエヤマアオキ (*Morinda citrifolia*)、ヒレハリソウ (*Symphytum officinale*)、アサ (*Cannabis sativa*)、およびオリーブ (*Olea europaea*) からなる群から選択される植物由来のものである。

20

#### 【0063】

より詳細には、本発明による使用において、無細胞上清またはその画分は、

(a) 液体栄養培養培地中で脆いカルス由来の脱分化した植物細胞を5～15日間増殖させ、脱分化した植物細胞の増殖を支持する馴化培地を得ることと、

(b) 細胞を溶解させることなく馴化培地から植物細胞全体を取り除き、4～300アミノ酸長の、ペプチド植物成長因子、植物転写因子、エピジェネティック因子、および混合物から選択されるペプチドを含む無細胞上清を得ることと、

30

(c) 場合により、クロマトグラフィー、ろ過、限外ろ過、タンパク質沈殿、およびこれらの組み合わせからなる群から選択される分離技術を用いてタンパク質分離プロセスを実行し、無細胞上清の画分を得ることと  
を含む方法によって得ることができる。

#### 【0064】

化粧用若返り剤として使用される場合の無細胞上清またはその画分は、特に、ステップ(b)の後に無細胞上清を凍結乾燥して、凍結乾燥上清を得ることを含む方法によって得ることができる。加えて、これらの無細胞上清またはその画分は、得られた凍結乾燥無細

40

50

胞上清を100～500倍にさらに濃縮することによって得ることができる。医療用途に関する上記で示されるように、脱分化した植物細胞懸濁培地は、 $1 \times 10^5$ 細胞／懸濁培地mL～ $1 \times 10^7$ 細胞／懸濁培地mLの、懸濁培地の体積単位あたりの細胞数として表される細胞密度で培養される。さらに、場合により、脱分化した植物細胞懸濁培地は、誘導プロセスを用いることによりストレス条件に供する。

#### 【0065】

無細胞上清の画分が局所用皮膚若返り剤として使用される場合、当該画分は、ニンジン(*Daucus carota*)、ツボクサ(*Centella asiatica*)、ザクロ(*Punica granatum*)、ワタ(*Gossypium herbaceum*)、*Sarcocapnos crassifolia*、ウコン(*Curcuma longa*)、アマ(*Linum usitatissimum*)、ブドウ(*Vitis vinifera*)、*Lithops pseudotruncatella*、アルニカ(*Arnica montana*)、ヤエヤマアオキ(*Morinda citrifolia*)、ヒレハリソウ(*Symphytum officinale*)、アサ(*Cannabis sativa*)、オリーブ(*Olea europaea*)、およびカメリアシネンシス(*Camellia sinensis*)からなる群から選択される植物由来の脱分化した植物細胞培養懸濁培地の増殖を先にサポートした無細胞上清由来のものである。当該画分は、

4～300アミノ酸長の、ペプチド植物成長因子、植物転写因子、エピジェネティック因子、およびこれらの混合物から選択されるペプチドを含み、画分は細胞溶解による細胞質性細胞内含有物ならびに膜および／または細胞壁を有しておらず、

(a) 液体栄養培養培地中で脆いカルス由来の脱分化した植物細胞を5～15日間増殖させ、脱分化した植物細胞の増殖を支持する馴化培地を得ること、

(b) 細胞を溶解させることなく馴化培地から植物細胞全体を取り除き、4～300アミノ酸長のペプチドを含む無細胞上清を得ること、

(c) 固相抽出クロマトグラフィー、サイズ排除クロマトグラフィー、ろ過、限外ろ過、タンパク質沈殿、およびこれらの組み合わせからなる群から選択される分離技術を用いてタンパク質分離プロセスを実行し、無細胞上清の画分を得ることとを含む方法によって得ることができる。

#### 【0066】

上記で明らかになったように、本発明は、さらに、ニンジン(*Daucus carota*)、ツボクサ(*Centella asiatica*)、ザクロ(*Punica granatum*)、ワタ(*Gossypium herbaceum*)、*Sarcocapnos crassifolia*、ウコン(*Curcuma longa*)、アマ(*Linum usitatissimum*)、ブドウ(*Vitis vinifera*)、*Lithops pseudotruncatella*、アルニカ(*Arnica montana*)、ヤエヤマアオキ(*Morinda citrifolia*)、ヒレハリソウ(*Symphytum officinale*)、アサ(*Cannabis sativa*)、オリーブ(*Olea europaea*)、およびカメリアシネンシス(*Camellia sinensis*)からなる群から選択される植物由来の脱分化した植物細胞培養懸濁培地の増殖を先にサポートした無細胞上清の画分を目的として有している。より詳細には、ニンジン(*Daucus carota*)、ツボクサ(*Centella asiatica*)、ザクロ(*Punica granatum*)、ワタ(*Gossypium herbaceum*)、*Sarcocapnos crassifolia*、ウコン(*Curcuma longa*)、アマ(*Linum usitatissimum*)、ブドウ(*Vitis vinifera*)、*Lithops pseudotruncatella*、ヤエヤマアオキ(*Morinda citrifolia*)、ヒレハリソウ(*Symphytum officinale*)、アサ(*Cannabis sativa*)、およびオリーブ(*Olea europaea*)からなる群から選択される植物由来のものである。当該画分は、4～300アミノ酸長のペプチドを含み、細胞溶解に

10

20

30

40

50

よる細胞質性細胞内含有物ならびに膜および／または細胞壁を含んでいない。

【0067】

上で定義した方法によって得られるこの無細胞画分の特定の実施形態では、ステップ(c)は、固相抽出(SPEと略される)クロマトグラフィーにより実行される。より詳細には、SPEは、30kDa未満の分子量を有する無細胞上清からのペプチドの回収を可能にする。これらのペプチドの中には、ペプチド植物成長因子、エピジェネティック因子、および植物転写因子がある。

【0068】

SPEによって、または開示された上記のような別のタンパク質分離プロセスと組み合わせたSPEによっても得られる上清の他の特定の無細胞画分としては、10kDa未満またはさらには3kDa未満の分子量を有するペプチドを含む画分が挙げられる。110Daのアミノ酸あたりの中央分子量値を考慮すると、SPEによって得ることができる本発明のこれらの画分は、30～300アミノ酸長のペプチドを含む。

10

【0069】

タンパク質分離技術の組み合わせによって、異なるサイズ(アミノ酸長)のペプチドを含む画分を無細胞上清から単離することができる。したがって、特定の画分は、4～1000アミノ酸長、5～1000アミノ酸長、他は5～50アミノ酸長、または4～300アミノ酸長、または5～300アミノ酸長、または4～100アミノ酸長、または5～100アミノ酸長、または4～30アミノ酸長、または5～30アミノ酸長のペプチドを有する。

20

【0070】

本発明の画分の別の特定の実施形態では、場合により上記または下記の任意の実施形態と組み合わせて、ろ過技術はタンジェンシャルフローろ過(TFF)である。この技術は、細孔サイズに従って試験サンプルを分画するために、さまざまなサイズの細孔(分子量カット)を有するフィルタを使用する。TFFは、フィード流の大部分がフィルタ内ではなくフィルタの表面を接線方向に移動するため、その名が付けられている。TFFの主な利点は、ろ過ケーキ(フィルタを覆う可能性がある)がろ過プロセス中に大体が洗い流され、フィルタユニットが動作可能な時間が長くなることである。これは、バッチ式デッドエンドろ過とは異なり、連続的なプロセスであり得る。フィルタは、酢酸セルロースまたはポリエーテルスルホンから作られてよい。

30

【0071】

特定の実施形態では、画分は、ファイトスルフォカイン-(PSK-)、ファイトスルフォカイン-(PSK-)、硫酸化チロシン-1を含む植物ペプチド(PSY1)、RALF(Rapid Alkalization Factor)、管状要素分化抑制因子(TDIF)、Clavata-3(CLV3)、CLE(Clavata-Embryo Surrounding Region-Related)、TPD1(Tapetum Determinant-1)、表皮パターン形成因子-1(EPF1)、花の器官脱離欠損(IDA)、ESR(Embryo Surrounding Region-Related)、Polarisペプチド(PLS)、根分裂組織成長因子(RGF)、EC1(Egg Cell-Secreted Protein)、CEP(C-terminally Encoded peptide)、初期ノジュリン40(ENOD40)、システミン、SCR(S-locus Cystein Rich protein)、およびこれらの混合物(これらすべての、2つのみ、3つのみ、4つのみ、または列挙したペプチドをすべて含むまでの3つ以上の組み合わせを意味する)からなる群から選択されるペプチド植物成長因子を含む。本発明の画分の別の特定の実施形態では、場合により上記または下記の任意の実施形態と組み合わせて、ペプチド植物転写因子は、特にWIND(Wound-Induced Dedifferentiation)転写因子、Wusche1(WUS)転写因子、TCP(Teosinte Branched1/Cycloidea/Proliferating Cell Factor)、および根分裂組織維持のための転写因子(PLETHORA)、およびこ

40

50

これらの混合物から選択される。本発明の画分の別の特定の実施形態では、場合により上記または下記の任意の実施形態と組み合わせて、エピジェネティック因子は、N A メチル化プロセスに関するクロモメチラーゼ (C M T) 、ドメイン再編成メチルトランスフェラーゼ (D R M ) 、メチルトランスフェラーゼ (M E T ) 、およびいくつかのオーキシン；クロマチンの脱凝縮およびリモデリングに関する、C H P ファミリーのクロマチンリモデリング因子 P I C K L E (C H D タンパク質の名前は、配列相同性のある 3 つのドメインの存在、すなわち、C h r o m a t i n o r g a n i z a t i o n m o d i f i e r ドメイン (クロモドメイン) 、 S W I 2 / S N F 2 A T P アーゼ / ヘリカーゼドメイン (モチーフは D N A 結合ドメインに対して配列相同性を有する) 、およびクロマチンリモデリング因子 D D M 1 (D e c r e a s e I n D N A M e t h y l a t i o n - 1 から) に由来する) ；ヒストンのリモデリングに関する、ヒストン H 3 メチルトランスフェラーゼクリプトナイト (K Y P ) ；小 R N A 分子；ならびにこれらすべてのタンパク質および化合物の混合物からなる群から選択される。

10

#### 【 0 0 7 2 】

本発明による使用のための脱分化した植物細胞懸濁培地の無細胞上清およびその任意の画分は両方とも、特定の実施形態において、凍結乾燥組成物として提供される。別の特定の実施形態では、これらは液状である。

20

#### 【 0 0 7 3 】

本発明は、有効量の上記に定義した脱分化した植物細胞懸濁培地の上清のこれら無細胞画分のいずれかを含む皮膚局所用組成物を包含し、当該画分は、1つまたは複数の適切な局所用の薬学的にまたは美容的に許容される賦形剤または担体と共に、4 ~ 3 0 0 アミノ酸長の、ペプチド植物成長因子、ペプチド植物転写因子、植物エピジェネティック因子、およびこれらの混合物から選択されるペプチドを含む。

20

#### 【 0 0 7 4 】

本発明の皮膚局所用組成物は皮膚のケアのために使用できる。したがって、本発明は、皮膚ケア剤として上記に定義したようにペプチド植物成長因子および / またはペプチド植物転写因子および / またはエピジェネティック因子を含む、脱分化した植物細胞懸濁培地の無細胞上清または当該無細胞上清の画分の局所使用も包含する。皮膚ケアは、真皮細胞および / または表皮細胞の老化を回復させることによって、以下の症状、すなわち、皮膚のざらつき、かさつき、乾燥、つっぱり感、あかぎれ、弾力性、およびかゆみのうち少なくとも1つを改善することを含む。皮膚ケアは、特に皮膚の早期老化および光老化のためのものである。

30

#### 【 0 0 7 5 】

別の特定の実施形態では、場合により上記または下記の任意の実施形態と組み合わせて、局所用組成物は薬学的にまたは美容的に許容される賦形剤または担体としてグリセリンを含む。別の特定の実施形態において、局所用の薬学的または美容的な賦形剤または担体は、皮膚保護回復剤、水和剤、皮膚軟化剤、乳化剤、増粘剤、保湿剤、p H 調節剤、抗酸化剤、防腐剤、ビヒクル、およびこれらの混合物からなる群から選択される。

30

#### 【 0 0 7 6 】

本発明はまた、ニンジン (D a u c u s c a r o t a ) またはニンジン属の植物の脱分化した植物細胞懸濁培地の無細胞上清または当該無細胞上清の画分も包含し、当該上清および画分は、4 ~ 3 0 0 アミノ酸長、特に 5 ~ 3 0 0 アミノ酸長のペプチド植物成長因子および / またはペプチド植物転写因子および / またはエピジェネティック因子を含み、細胞溶解による細胞質性細胞内含有物ならびに膜および / または細胞壁を有していない。ニンジン (D a u c u s c a r o t a ) またはニンジン属の植物のこれらの上清および画分は、化粧品および薬剤としての使用するためのものである。特定の実施形態では、それらは、皮膚の真皮細胞および表皮細胞の老化状態を回復させる化粧品における、または薬剤として使用するためのものである。したがって、それらは、皮膚の早期老化および光老化から選択される状態または疾患の治療に用いるためのものであり、当該状態は、細かいおよび粗いしわ、不規則でまだらな色素沈着、褐色のしみ、ざらつき、黄変、くも状静

40

50

脈と呼ばれる小さく表面的な血管または毛細管拡張症、およびこれらすべての状態の組み合わせを含む。特に、それらは線維芽細胞の老化を回復させるために使用するものである。特定の実施形態において、ニンジン (*Daucus carota*) またはニンジン属の植物のこれらの上清または画分は、任意の植物細胞培養で上記に開示したように得ることができる。ニンジン (*Daucus carota*) またはニンジン属の植物のこれらの上清および画分は、1つまたは複数の適切な局所用の薬学的にまたは美容的に許容される賦形剤または担体と一緒に、有効量で皮膚局所用組成物に含まれ得る。

#### 【0077】

本発明はまた、ツボクサ (*Centella asiatica*) またはツボクサ属の植物の脱分化した植物細胞懸濁培地の無細胞上清または当該無細胞上清の画分も包含し、当該上清および画分は、4～300アミノ酸長、特に5～300アミノ酸長のペプチド植物成長因子および/またはペプチド植物転写因子および/またはエピジェネティック因子を含み、細胞溶解による細胞質性細胞内含有物ならびに膜および/または細胞壁を有していない。ツボクサ (*Centella asiatica*) またはツボクサ属の植物のこれらの上清および画分は、化粧品および薬剤としての使用するためのものである。特定の実施形態では、皮膚の真皮細胞および表皮細胞の老化状態を回復させる化粧品における、または薬剤として使用するためのものである。したがって、それらは、皮膚の早期老化および光老化から選択される状態または疾患の治療に用いるためのものであり、当該状態は、細かいおよび粗いしわ、不規則でまだらな色素沈着、褐色のしみ、ざらつき、黄変、くも状静脈と呼ばれる小さく表面的な血管または毛細管拡張症、およびこれらすべての状態の組み合わせを含む。特に、線維芽細胞の老化を回復させるためである。特定の実施形態において、ツボクサ (*Centella asiatica*) またはツボクサ属の植物のこれらの上清または画分は、任意の植物細胞培養で上記に開示したように得ることができる。ツボクサ (*Centella asiatica*) またはツボクサ属の植物のこれらの上清および画分は、1つまたは複数の適切な局所用の薬学的にまたは美容的に許容される賦形剤（または添加物、excipients）または担体と一緒に、有効量で局所用の薬学的または美容的組成物に含まれ得る。

#### 【0078】

本発明はまた、ザクロ (*Punica granatum*) またはザクロ属の植物の脱分化した植物細胞懸濁培地の無細胞上清または当該無細胞上清の画分も包含し、当該上清および画分は、4～300アミノ酸長、特に5～300アミノ酸長のペプチド植物成長因子および/またはペプチド植物転写因子および/またはエピジェネティック因子を含み、細胞溶解による細胞質性細胞内含有物ならびに膜および/または細胞壁を有していない。ザクロ (*Punica granatum*) またはザクロ属の植物のこれらの上清および画分は、化粧品および薬剤としての使用するためのものである。特定の実施形態では、皮膚の真皮細胞および表皮細胞の老化状態を回復させる化粧品における、または薬剤として使用するためのものである。したがって、それらは、皮膚の早期老化および光老化から選択される状態または疾患の治療に用いるためのものであり、当該状態は、細かいおよび粗いしわ、不規則でまだらな色素沈着、褐色のしみ、ざらつき、黄変、くも状静脈と呼ばれる小さく表面的な血管または毛細管拡張症、およびこれらすべての状態の組み合わせを含む。特に、線維芽細胞の老化を回復させるためである。特定の実施形態において、ザクロ (*Punica granatum*) またはザクロ属の植物のこれらの上清または画分は、任意の植物細胞培養で上記に開示したように得ることができる。ザクロ (*Punica granatum*) またはザクロ属の植物のこれらの上清および画分は、1つまたは複数の適切な局所用の薬学的にまたは美容的に許容される賦形剤または担体と一緒に、有効量で局所用の薬学的または美容的組成物に含まれ得る。

#### 【0079】

本発明はまた、ワタ (*Gossypium herbaceum*) またはワタ属の植物の脱分化した植物細胞懸濁培地の無細胞上清または当該無細胞上清の画分も包含し、当該上清および画分は、4～300アミノ酸長、特に5～300アミノ酸長のペプチド植物成

10

20

30

40

50

長因子および／またはペプチド植物転写因子および／またはエピジェネティック因子を含み、細胞溶解による細胞質性細胞内含有物ならびに膜および／または細胞壁を有していない。ワタ (*Gossypium herbaceum*) またはワタ属の植物のこれらの上清および画分は、化粧品および薬剤としての使用するためのものである。特定の実施形態では、皮膚の真皮細胞および表皮細胞の老化状態を回復させる化粧品における、または薬剤として使用するためのものである。したがって、それらは、皮膚の早期老化および光老化から選択される状態または疾患の治療に用いるためのものであり、当該状態は、細かいおよび粗いしわ、不規則でまだらな色素沈着、褐色のしみ、ざらつき、黄変、くも状静脈と呼ばれる小さく表面的な血管または毛細管拡張症、およびこれらすべての状態の組み合わせを含む。特に、線維芽細胞の老化を回復させるためである。特定の実施形態において、ワタ (*Gossypium herbaceum*) またはワタ属の植物のこれらの上清および画分は、任意の植物細胞培養で上記に開示したように得ることができる。ワタ (*Gossypium herbaceum*) またはワタ属の植物のこれらの上清および画分は、1つまたは複数の適切な局所用の薬学的にまたは美容的に許容される賦形剤または担体と一緒に、有効量で局所用の薬学的または美容的組成物に含まれ得る。

10

20

30

40

## 【0080】

本明細書および特許請求の範囲を通して、「含む (comprise)」という語およびその活用形は、他の技術的特徴、添加剤、成分またはステップを排除することを意図しない。さらに、「含む (comprise)」という語は、「からなる (consisting of)」の場合を包含する。本発明のさらなる目的、利点、および特徴は、本明細書を検討することにより当業者に明らかになるか、または本発明の実践によって習得されるであろう。以下の実施例は説明のために提供され、本発明を限定することを意図したものではない。さらに、本発明は、本明細書に記載の特定の実施形態および好ましい実施形態のすべての可能な組み合わせを包含する。

20

30

40

## 【0081】

<実施例1：古い皮膚のモデル（ダルベッコ培地中で20回を超えて継代したヒト皮膚線維芽細胞）に対する4～300アミノ酸長のペプチドを含む無細胞上清およびその画分のアッセイ>

## &lt;1.1 無細胞上清を得る方法&gt;

ニンジン (*Daucus carota*)、ザクロ (*Punica granatum*) およびツボクサ (*Centella asiatica*) からの細胞懸濁培地を、200mLで増殖させた細胞懸濁液の接種材料から得た。接種材料（培地の全体積に対して1/5の接種材料）を、20～30g/Lのスクロース（例えば、30g）およびホルモン（ニンジン (*Daucus carota*) については1～3mg/Lの2,4-D；ザクロ (*Punica granatum*) については0.2mgf g/Lの酢酸ナフタレン（ANA）および1mg/Lのカイネチン；およびツボクサ (*Centella asiatica*) については2mg/Lの2,4-Dおよび0.1mg/LのBAP）を補充した800mLのMS液体培地を含む2000mLフラスコに接種し、25°の暗所で100rpmの回転式振とう機に入れた。細胞培地を12日間増殖させ、10分間、4600rpmでの遠心分離によりそれらを清澄化し（すなわち、細胞を除去して溶解を回避する）、馴化培地を得た。この馴化培地をさらに試験した。

30

40

## 【0082】

400mLの3つのサンプルを凍結乾燥（lyophilization）のためにビーカーに分け、-80°で冷凍し、一晩凍結乾燥した。

50

## 【0083】

凍結乾燥された生成物を400mLから20mLになるまで生理食塩水緩衝液中で濃縮し、この体積のうち1mLを分析のために取り出した（以下参照）。したがって、最初に凍結乾燥された生成物は、HDFで試験した時点で20倍に濃縮されたものであった。

50

## 【0084】

<1.2.ペプチド植物成長因子および／またはペプチド植物転写因子および／または

50

エピジェネティック因子（細胞因子）を含む馴化培地（CM）の画分 >

分画の前に、1.1のCM（無細胞上清）それぞれを、ペプチドサイズスペクトルを求める（タンパク質フィンガープリンティングとしても知られている）ために分析した。したがって、タンパク質の状態を変性させる電気泳動（SDS-PAGE）を各CMを用いて実行した。これにより、各植物種の無細胞上清中に存在するおよそのタンパク質およびペプチド類の分子量を可視化できる。

【0085】

所望の分子量範囲を有するペプチドを含む無細胞上清の画分を回収するために、クロマトグラフィー技術を行った。

【0086】

この目的のために、OASIS HLBカートリッジ（HPLC水中にて1カラム体積（CV）のトリフルオロ酢酸0.1%（TFA）、HPLCアセトニトリル（Acetonitrile、ACN）中にて1CVのTFA 0.1%、およびHPLC水中にて1CVのTFA 0.1%を用いて前もってコンディショニングした）での固相抽出（SPE）のために40mLのサンプルを使用した。投入、FT、洗浄からの残留体積を維持した。

【0087】

SPEはタンパク質およびペプチドのみをCMから回収することを可能にし、30kDa超のタンパク質（30kDa膜効率と同様）を既に除外していたため、0~30kDaの範囲の分子量（5~300アミノ酸長のペプチドを含む画分）を有するペプチド（植物成長因子および植物転写因子およびエピジェネティック因子）を含む、ニンジン（Daucus carota）、ツボクサ（Centella asiatica）、およびザクロ（Punica granatum）の馴化培地の画分が回収された。

【0088】

SPEの溶出は、HPLC ACN中の1CVのTFA 0.1%で行い、65で2時間乾燥させた。

【0089】

すべての画分および乾燥中間生成物を一晩 + 4 に保った。

【0090】

SPEからの乾燥生成物を2mLの生理食塩水緩衝液に再懸濁した。このようにして、画分を200倍に濃縮した。次に、次の表1のデータに従って、総タンパク量およびSDS-PAGEによってサンプルを分析した（図1は、ニンジン（Daucus carota）、ツボクサ（Centella asiatica）およびザクロ（Punica granatum）の馴化培地およびSPE画分についての各電気泳動レーンのクマシーブルーペプチドバンドも示す）。

【0091】

10

20

30

## 【表1】

表1 ニンジン(*Daucus carota*)、ツボクサ(*Centella asiatica*)、  
およびザクロ(*Punica granatum*)の凍結乾燥馴化培地(CM)  
(それぞれ凍結乾燥01、02、03)  
および無細胞上清由来のSPE画分(ニンジン(*Daucus carota*)の溶出01  
およびツボクサ(*Centella asiatica*)の溶出02)の  
SDS-PAGE電気泳動におけるレーンの詳細な同定

レーン	サンプルコード	サンプルの説明	ロード
1	N/A	MWラダー	2.5μg
2	170215-01	凍結乾燥01	5μg
3	170215-02	凍結乾燥02	< 1μg
4	N/A	N/A	N/A
5	170215-03	凍結乾燥03	5μg
6	N/A	N/A	N/A
7	N/A	N/A	N/A
8	170215-03	SPE溶出01	5μg
9		N/A	
10	160215-02	SPE溶出02	< 5μg

10

20

30

## 【0092】

実験データ1.1および1.2のいずれにおいてもタンパク質分離を行うための材料は以下である。

## 【0093】

## &lt;材料&gt;

- HPLC 水中のTFA 0.1%
- HPLC ACN 中のTFA 0.1%
- OASIS HLB カートリッジ
- Biowead タンパク質定量キット
- トリスグリシン 4 ~ 12% PAGE ゲル
- トリスグリシンサンプル緩衝液 2 x プラス DTT
- トリスグリシンランニング緩衝液 1 x
- 生理食塩水緩衝液 (リソゲル液またはリン酸緩衝液)

## 【0094】

40

## &lt;装置&gt;

- 遠心分離器
- 真空システム
- 冷凍器 (-80)
- 凍結乾燥装置
- 電気泳動システム
- プレートリーダ

## 【0095】

タンパク質分析は、Biowead タンパク質定量キット (使用されたプロトコルは、<http://www.biowead.com/webroot/web/pdf/lisr>

50

/ literature / Bulletin\_9004.pdf に基づく Bio Rad によって推奨されたものである) および SDS PAGE 分析を用いて行い、各サンプル中の総タンパク質濃度を求めた。

#### 【0096】

< 1.3. 古い皮膚のモデル (ダルベッコ中で 20 回を超えて継代したヒト皮膚線維芽細胞 ; 複製老化) に対する無細胞上清およびその画分の試験 >

無細胞上清およびその画分の効果を試験するために、古いヒト皮膚線維芽細胞 (HDF) の培地を使用した。

#### 【0097】

##### < 細胞モデル >

若いドナー (0 ~ 3 歳) の手術からの余剰である包皮サンプルから正常ヒト皮膚線維芽細胞 (HDF) を得、外植片増殖および増殖する細胞の酵素解離の標準的方法を用いて確立した。細胞を増殖培地 (GM) (10 % ウシ胎仔血清 (FBS、PAA) ; 2 mM の L - グルタミン (Lonza 社) ; および抗生物質 (100 µg / mL ベニシリンおよび 100 U / mL ストレプトマイシン、Lonza 社) を補充したダルベッコの 1 g / L グルコース培地) 中に播種し、増殖させた。ルーチンの継代培養および初代培地の増殖のために、細胞を PBS (リン酸塩緩衝生理食塩水、pH 7.4) で 2 回洗浄し、トリプシン - EDTA (Gibco) を用いて回収し、ノイバウエル計算板で計数した後、新しい細胞培養フラスコ (Facon、75 cm<sup>2</sup>) に播種した。

#### 【0098】

次に、老化 HDF を得るために、初代培地をルーチンの継代培養方法を用いて、80 ~ 90 % のコンフルエンスになる度に継代培養を繰り返した。行った実験すべてにおいて、老化 HDF は継代 / 継代培養 22 ~ 26 回で使用された。これらの細胞は事前特性決定され、形態学的および構造的变化 (細胞サイズの増加、細長い紡錘形状から扁平で不規則な形状への変化、膜の剛性および不規則性の増大、液胞数の増加)、増殖指数の低下 (60 時間超の倍加時間) および -Gal 陽性染色によりはっきりと老化表現型を示した。幼若 HDF は、実施された実験すべてにおいて 3 ~ 5 回の継代で使用された。

#### 【0099】

##### < 有効性の研究 >

細胞培養条件 : 幼若 HDF および老化 HDF を、増殖培地中で 25,000 細胞 / ウェル (6.25 × 10<sup>3</sup> 細胞 / cm<sup>2</sup>) の密度で細胞培養 12 ウェルプレート (Corning) に播種し、次いで 24 ~ 48 時間、細胞培養標準条件 (37 °C、5 % CO<sub>2</sub> および 90 % RH) にて培養した。

#### 【0100】

##### < 試験化合物の調製 >

試験生成物を、それぞれの適用の直前に、維持培地 (1 % ウシ胎仔血清 (FBS、PAA) ; 2 mM の L - グルタミン (Lonza 社) ; および、抗生物質 (100 µg / mL ベニシリンおよび 100 U / mL のストレプトマイシン、Lonza 社) ; を補充したダルベッコの 1 g / L グルコース培地) 中で希釈することにより、所定の最終濃度で調製した。

#### 【0101】

10

20

30

40

## 【表1A】

## &lt;評価濃度&gt;

試験生成物	評価濃度	C1	C2	C3	C4	C5	C6
ニンジン (通常の抽出物)	mg/mL	1,25	0,625	0,31	-	-	-
ニンジン (PHYTURE)	mg/mL	1,25	0,63	0,31	-	-	-
ザクロ (通常の抽出物)	mg/mL	0,00938	0,005	0,0023	1,9E-05	9,4E-06	4,7E-06
ザクロ (PHYTURE)	mg/mL	0,01875	0,00938	0,00469	-	-	-
SPE溶出01 (ニンジン)	μg/mL	1	0,5	0,25	-	-	-
SPE溶出02 (ツボクサ)	μg/mL	Dil.1/3	Dil.1/6	Dil.1/12	-	-	-
SPE溶出03 (ザクロ)	μg/mL	0,5	0,25	0,125	-	-	-
Lyo01 (ニンジン)	μg/mL	0,5	0,25	0,125	-	-	-
Lyo02 (ツボクサ)	μg/mL	10	1	0,5	-	-	-
Lyo溶出03 (ザクロ)	μg/mL	0,1	0,05	0,025	-	-	-
エラグ酸	μg/mL	3,75	1,875	0,9375	0,0075	0,00375	0,00188

10

20

30

40

## 【0102】

## &lt;細胞の処理&gt;

細胞を試験生成物を用いて8日間処理し、2~3日ごとに適用した（総適用回数：3）。

## 【0103】

## &lt;試験対照&gt;

- 1) 維持培地における未処理老化HDF：治療期間中、維持培地で培養された細胞。
- 2~3日ごとに培地を除去した。この状態が評価された異なるマーカー／タンパク質の細胞基底レベルを示す基準である。

## 【0104】

- 2) 増殖培地における未処理老化HDF：治療期間中、増殖培地で培養された細胞。
- 2~3日ごとに培地を除去した。この状態は、培地補充物として使用されるウシ胎仔血清中で成長因子、補助因子およびタンパク質の効果を示すため、内部陽性対照である。

## 【0105】

- 3) 維持培地における未処理幼若HDF：治療期間中、維持培地で培養された幼若HDF。2~3日ごとに培地を除去した。この実験条件は、維持培地（低濃度のウシ胎仔血

50

清を含む培地)における若い細胞の評価された異なるマーカー/タンパク質の濃度を示す。

**【0106】**

4) 増殖培地における未処理幼若HDF:治療期間中、増殖培地で培養された幼若HDF。2~3日ごとに培地を除去した。この実験条件は、最適な培養条件における若い細胞の評価された異なるマーカー/タンパク質の最大濃度を示す。

**【0107】**

第1に、本発明の有効組成物の供給源を説明するために、本発明者らはアッセイを行ったところ、細胞懸濁培地および誘導体(細胞溶解物)が活性化合物の強力な供給源であることを示した。これを行うために、いくつかの濃度のいくつかの活性組成物を用いてHDF(複製老化、すなわち20回を超える継代による老化線維芽細胞)について試験した。試験組成物およびデータを図2に示す。簡単に説明すると、組成物は、それぞれ濃度を左側の棒で示すエラグ酸(95%超、純粋な分子と命名)、それぞれ濃度を真ん中の棒で示すザクロ(*Punica granatum*)の(40%エラグ酸)抽出物(40%のエラグ酸を含有、PRCFと命名)、およびそれぞれ濃度を右側の棒で示すザクロ(*Punica granatum*)細胞溶解物(0.4%のエラグ酸を含有)であった。

10

**【0108】**

このデータは、ペルオキシレドキシン4の百分率(%)での濃度を示すグラフである。ペルオキシレドキシン4は、ヒト皮膚線維芽細胞(HDF)において増加したマーカーであり、老化表現型をより若い表現型に戻す。ペルオキシレドキシン4は、ELISAアッセイによって測定した。

20

**【0109】**

図2は、PRCFが、各試験濃度(C1~C3)においての抽出物よりも高い程度で老化の回復を促進することを示す。これはまた、植物の脱分化/再生に有用であり、また動物細胞に対して活性である化合物のカクテルを含有する細胞溶解物の可能性を引き出す。動物細胞(HDF)に対するこれらのPCR(F(細胞溶解物))の安全な適用性は、図5から見てとれ、図5ではHDF(20回を超える継代)の細胞生存率(生細胞の%)が示される。同じ濃度(C1~C3; C1(0.0019μg/mL)、C2(0.00375μg/mL)、およびC3(0.0075μg/mL))の各種の細胞溶解物(PCR(F))を用いたニンジン(*Daucus carota*)パネルA)およびザクロ(*Punica granatum*)パネルB)の抽出物を比較する。PRCFは比較抽出物よりも毒性が小さかった。さらに、100%を超える細胞生存を促進する細胞溶解物は、細胞増殖作用を促進するものとして読み取ることもできる。

30

**【0110】**

次に、1.1の上記開示のように得られたニンジン(*Daucus carota*)およびザクロ(*Punica granatum*)の無細胞上清(凍結乾燥馴化培地)および1.2のSPE画分を試験した。老化線維芽細胞における若返りを促進する能力を試験するために、ペルオキシレドキシン4およびPARPを分析した(ELISAアッセイ)。

40

**【0111】**

図3は、1.1および1.2で調製したニンジン(*Daucus carota*)およびザクロ(*Punica granatum*)の無細胞上清(SSP-F1)および画分(SSP-F2)で(上記で開示したように)処理した後の、線維芽細胞培地において観察されたPRX4(パネルAおよびB)およびPARP(パネルCおよびD)の濃度を示す。それらはさらに、各植物の細胞溶解物(各図A~CのPRCF)および各植物種の抽出物と比較される。

**【0112】**

データは、無細胞上清からのSPEによって得られたペプチド画分が最良の老化回復(若返り効果)を達成したことを見たと示している。試験したサンプルはすべて、それらに含まれる活性化合物の濃度に関して同等であった。さらに、無細胞上清(凍結乾燥無

50

細胞上清、SSP-F1)からのデータは、細胞溶解物(PCR-CF)のデータと同等またはそれ以上の効果を生じたが、さほど複雑でない混合物ゆえに毒性の問題は小さい。

#### 【0113】

それらは、植物細胞懸濁培地の増殖を支持する無細胞上清(馴化培地)を用いて古い皮膚細胞の老化回復を達成することができることを最初に示しているため、実に興味深いデータである。第2に、この効果は、これらの無細胞上清に含まれるペプチド植物成長因子および/または植物転写因子および/またはエピジェネティック因子の精製によって増強することができる。液体から凍結乾燥および再懸濁までの無細胞上清の処理および/またはクロマトグラフィー(特にSPE)によるペプチドの回収により、当該無細胞上清またはそこに含まれる任意のペプチドは、10~500倍に濃縮されることに留意されたい。したがって、従来の抽出プロセスに関連する高いコストを回避しながら、あまり複雑ではない組成物を、非常に効果的かつ環境にやさしいプロセスによって高収率で得ることができると考えられる。さらに、これらの無細胞上清およびその画分の使用は、通常廃棄される植物細胞懸濁培地の一部の再度の価値付け(re-valorisation)を意味する。

10

#### 【0114】

さらに、両方とも4~300アミノ酸長のペプチドを含む植物細胞培養の無細胞上清およびその画分の効果を巨視的に説明するために、図4は、1.1で開示したようにして得られたツボクサ(Centella asiatica)細胞懸濁培地の凍結乾燥無細胞上清を用いて8日間処理する前と後に撮った(上記開示の)古いHDFの培地の写真を示す。

20

#### 【0115】

写真は、線維芽細胞および細胞外マトリックスの組織化の減少および散在する細胞ではなく円形細胞を特徴とする老化表現型がわずか8日間でより大きな細胞密度および細胞外マトリックスの組織化ならびに細胞の散在した形態を特徴とする若い表現型へと回復することを示している。

#### 【0116】

これらのデータはすべて、4~300アミノ酸長または5~300アミノ酸長のペプチドに富む無細胞上清およびその画分が、古い皮膚細胞に関する皮膚状態(例えば光老化した皮膚または皮膚の早期老化)の治療に使用するのに有効な活性組成物であると結論づける。

30

#### 【0117】

<実施例2:古い皮膚のモデル(ダルベッコ中で20回を超えて継代したヒト皮膚線維芽細胞;複製老化)に対する無細胞上清およびその画分の追加試験>

実施例1(1.3)と同じスキームに従って、実施例1.3の老化HDFのモデルに対するKi67タンパク質および老化関連-Galactosidase(Sen--Gal)の濃度を決定した。試験した生成物は、ザクロ(Punica granatum)およびニンジン(Daucus carota)の上述された通常の抽出物、すなわち、各植物の細胞溶解物(本明細書ではPCR-CFと命名);ペプチドを含み、実施例1.2で開示したようにして得た無細胞上清(SSP-F1、すなわち馴化培地)および画分(SSP-F2)であった。エラグ酸は陽性対照(PM;純粋な分子由来)であり、対照または参照値は、老化線維芽細胞におけるKi67タンパク質およびSen--Galの濃度であった(Ki67については100%、-Galでは0%と考えられる)。

40

#### 【0118】

老化細胞では、Ki67タンパク質は減少し、Sen--Galは増加する。したがって、無細胞上清(SSP-F1、すなわち馴化培地)および画分(SSP-F2)によりKi67タンパク質濃度が上昇した場合、これは若返りを促進することを意味する。逆に、無細胞上清(SSP-F1、すなわち馴化培地)および画分(SSP-F2)により、Sen--Galが対照と比較して減少する場合、これは細胞の若返りを促進することを意味する。

50

## 【0119】

Ki67タンパク質濃度を、ELISA試験((ヒトKi-67タンパク質ELISAキット、YH Biosearch Laboratories、参照番号YHB1799HU-96T)により測定し、Sen---Galの濃度をELISA(濃度についてはヒトGLB(ガラクトシダーゼベータ)Elisaキット、Elabscience、参照番号E-EL-H0991、培地の細胞化学分析および顕微鏡分析については老化検出キット、Abcam、参照番号ab6535)により測定した。

## 【0120】

結果を図6(Ki67濃度)および図7(Sen---Gal濃度)に示す。図6(パネルA)は、ザクロ(*Punica granatum*)のデータを示し、図6(パネルB)はニンジン(*Daucus carota*)のデータを示す。図7(パネルA)はザクロ(*Punica granatum*)のデータを示し、図7(パネルB)はニンジン(*Daucus carota*)のデータを示す。

10

## 【0121】

両方の種において、ペプチドを含む無細胞上清(SSP-F1)および画分(SSP-F2)は、対照参照と比較した各マーカーの濃度から導かれる通り、老化線維芽細胞の若返りを促進した。特に、画分(SSP-F2)は、試験した通常の抽出物よりも高く有意性のある水準で若返りを促進した。

## 【0122】

<実施例3：毛囊真皮乳頭細胞(HFDP-C)のヒト線維芽細胞の増殖アッセイ>

20

さらに、増殖アッセイをヒト毛囊乳頭細胞(CELL APPLICATIONS, INC; 側頭部頭皮からの正常なヒト毛囊、単一ドナー：54歳白人男性、参照番号602-05a、ロット2922)に対して行った。

## 【0123】

次の表2は、試験材料および対照を示す：

## 【0124】

## 【表2】

アッセイしたサンプル
基礎対照:培養培地で維持された未処理細胞
線維芽細胞成長因子(FGF)で処理した陽性対照細胞
血管内皮成長因子(VEGF)で処理した陽性対照細胞
ミノキシジル(99%以上(TLC))、SIGMA、参照番号M4145。原液:エタノール中 16.67 mg/mL(25 mg ミノキシジル+1.5 mL エタノール)
ツボクサ( <i>Centella asiatica</i> )(CA) 3.0 µg/mL のC1および 6.0 µg/mL のC2
ウコン( <i>Curcuma longa</i> )(CL): 3.0 µg/mL のC1および 6.0 µg/mL のC2
ニンジン( <i>Daucus carota</i> )(DC): 1.6 µg/mL のC1および 1.5 µg/mL のC2(48時間)
ブドウ( <i>Vitis vinifera</i> )(VV): 6.3 µg/mL のC1および 12.5 µg/mL のC2
<i>Sarcocapnos crassifolia</i> (SC): 12.5 µg/mL のC1および 25.0 µg/mL のC2
ヤエヤマアオキ( <i>Morinda citrifolia</i> )(MC): 3.1 µg/mL のC1および 6.0 µg/mL のC2
オリーブ( <i>Olea europaea</i> )(OE): 25.0 µg/mL のC1および 50.0 µg/mL のC2
リトープス種(LP): 3.0 µg/mL のC1および 1.5 µg/mL のC2

30

40

## 【0125】

培養培地は、増殖補充物キット(相対組成：ウシ胎児血清、成長因子および抗生物質、

50

適用：6% v / v)を補充した乳頭細胞基礎培地であった。

【0126】

無細胞上清(Pre-pre-LyoP3とも名付けられる)は、特に次のようにして得た。

【0127】

ニンジン(*Daucus carota*)、ザクロ(*Punica granatum*)、およびツボクサ(*Centella asiatica*)について実施例1.1に示したようにすべての種で得られた培地の上清を4で4600 rpmで、または30分間遠心分離した。得られた生成物のFFF(タンジェンシャルフローろ過)を行った。このプロセスは、ブラックステップ、平衡化、ろ過、ダイアフィルトレーション、および最終の衛生化ステップを含んでいた。このプロセスの間に、2.5LのPBS、2.5Lの20%エタノール、およびNaOH 1Nを使用した。その後、逆相精製(RP)を行った(オリゴ精製)。精製は9つのステップ、すなわち、5カラム体積(CV)のトリフルオロ酢酸(TFA)0.1%水溶液の添加、5CVのCAN TFA 0.1%の添加、5CVのTFA 0.1%水溶液の包含(inclusion)および0.1%を達成するまでのTFAの添加を含んでいた。次にサンプルをロードし、収集し、1CVのTFA 0.1%水溶液を用いて洗浄した。溶出物をTFA 0.1%を用いて25-50-5-100%のCANで分画した。生成物を蒸発させ、RP Aに再懸濁した。この精製の終わりに、あらかじめ馴化した培地2(プレ無細胞上清)を得た。

10

【0128】

このあらかじめ馴化した培地2は、CEX(陽イオン交換クロマトグラフィー)およびAEX(Empphazeハイブリッド精製器)を用いて精製した。プロセスは16ステップ、すなわち、5CVのCEXA(酢酸ナトリウム50mM、pH 4.5)、5CVのCEXB(酢酸ナトリウム50mM、NaCl 1M、pH 4.5)、および5CVのCEXAの添加を含んでいた。さらに、CEXAを用いた1:5希釈およびpH 4.5への調節、ならびにそのようなサンプルのロード、サンプルの収集、1CVのCEXAを用いた洗浄、および125mM-250mM-500mM-1MのCEXBによる分画溶出も行った。溶出は、5CVのAEX A(グリシン50mM、pH 9)、5CVのAEX B(グリシン50mM、NaCl 1M、pH 9)、および5CVのAEXのAを受け取った。AEX A中の1:5希釈およびpH 9への調整、ならびにサンプルのロード、サンプルの収集、1CVのCEXAを用いた洗浄、および125mM-250mM-500mM-1MのAEX Bによる分画溶出を行った。最終的な無細胞懸濁液(Pre-pre-LyoP3と名付けられた)を得た。次いで、これを凍結乾燥し、所望の濃度で使用するために再懸濁した。

20

30

【0129】

増殖を評価して、増殖指数(%)を決定した。細胞DNA複製を、処理した細胞のDNAに取り込まれたプロモデオキシリジン(BrdU)により定量化した。BrdUアッセイは、細胞周期のS期の間に細胞がBrdUを取り込む能力に基づいて細胞増殖を測定することを可能にする。分裂している細胞は、抗体および免疫細胞化学的検出によってさらに検出されるBrdUを取り込んだ。

40

【0130】

細胞を96ウェルプレート中でコンフルエントで播種した。細胞培地が安定し同調した後、試験生成物を(表2に示す最終濃度で)添加した。その後、BrdUを培地に添加し、HF DPCを完全にBrdUを取り込むまで37でインキュベートした。BrdU量は、処理した培地の細胞分裂数、すなわち、増殖に比例した。

【0131】

データを図8に示す。図8では、増殖指数の100%の値に一致する基礎対照(未処理HF DPC)に対する増殖の百分率として計算されているHF DPCの増殖指数(%)が示される。

【0132】

50

図8で見るように、培地で培養した未処理細胞を参照または基礎対照とすると、本発明の無細胞上清は細胞増殖を促進した。いくつかの種について、30kDa以下の分子量を有するペプチドを含む無細胞上清は、増殖指数が陽性対照よりもはるかに高かった。そうでない場合、増殖指数は陽性対照と同じ程度であった。

#### 【0133】

ミノキシジルのデータは、この化合物が毛囊真皮乳頭の増殖に関わる脱毛治療として通常使用されるために加えられた。無細胞上清のいくつかは、ミノキシジルに匹敵する効果を有することに注意すべきである。

#### 【0134】

<実施例4：インビボ若返り（老化防止）アッセイ>

実施例1で明らかになったようにして得られ、下記（表3）に示すように調合されるツボクサ（Centella asiatica）の馴化培地を、実際の皮膚における若返り効果（または老化防止効果）を促進し得るかどうかを判断するためにインビボで試験した。

#### 【0135】

#### 【表3】

表3:試験化合物: プラセボおよび実施例1のように調製し、グリセリンであらかじめ希釈した(1/2)。

ツボクサ(Centella asiatica)無細胞懸濁培地 0.5~5.0% (w/w)を含むクリーム。

次の表3は、定性的組成を示す。

10

20

30

プラセボ(白色クリーム、pH=6.34、粘度(cP):21760)
グリセリルステアレート／PEG-100ステアレート、セテアリルアルコール、イソヘキサデカン、中鎖トリグリセリド、グリセリン、EDTA二ナトリウム、水、ナトリウムポリアクリレート(および)水添ポリデセン(および)トリデセス-6、ソルビン酸、ベンジルアルコール&サリチル酸&グリセリン&ソルビン酸
ツボクサ(Centella asiatica)クリーム(CA)(白色クリーム、pH=6.32、粘度(cP):23800)
グリセリルステアレート／PEG-100ステアレート、セテアリルアルコール、イソヘキサデカン、中鎖トリグリセリド、グリセリン、EDTA二ナトリウム、水、ナトリウムポリアクリレート(および)水添ポリデセン(および)トリデセス-6、ソルビン酸、ベンジルアルコール&サリチル酸&グリセリン&ソルビン酸、および実施例1のように調製し、グリセリンであらかじめ希釈した(1/2)ツボクサ(Centella asiatica)無細胞懸濁培地

#### 【0136】

この目的で、40人の女性ボランティア（51歳以上）が採用され、先に光線性損傷の存在について明らかにした。生成物の有効性は、画像解析によるVISAならびに臨床効果および認識される効果による客観的分析を用いて、抗しわおよび抗腫脹治療の観点から判断された。VISA定量化パラメータは、しみ、しわ、質感、毛穴、UVスポット、褐色斑点、赤色の領域およびポルフィリンであった。

40

#### 【0137】

<表4 VISA 詳細>

## 【表4】

機器:	VISIA CR
シリアル番号:	930567
モデル:	Visia v531
製造業者:	Canfield Imaging Systems
ソフトウェア	Visia v531 バージョン:v5.3.3 2011-1208a

10

## 【0138】

皮膚の平滑度、皮膚の明るさ、「より輝く皮膚」、皮膚の再生、しわの少ない皮膚、完全な滑らかさの皮膚、腫脹の軽減（抗腫脹）といったパラメータも（臨床的有効性および認識される有効性として）試験された。

## 【0139】

バイオメトリック測定は、2mmの開口部を有するプローブを備えた機器 Cutometer MPA 580 (CK electronic、ドイツ) を用いて各部位において行われ、各回の皮膚の硬さ (skin firmness) および弾力性を評価した。3秒間の吸引、続いて 200 mbar の圧力での3秒間の弛緩を 10 サイクル行ってそれぞれ測定した。

## 【0140】

ボランティアは、試験の少なくとも 24 時間前に試験対象の皮膚の領域に保湿剤または化粧品を一切使用しないことが求められた。その領域はまず、ベースライン評価のために室内試験で 30 分間適当な状態にし (condition)、t = 0 を表す写真をデジタル画像で撮影した。試験のために、顔の半分を処置し、残りの半分にはプラセボを投与した。眼域の領域を定め、試験生成物の適用回数に応じて治療の対照として保持した。

## 【0141】

画像は、治療の開始後 28 日目および治療の開始後 56 日目に撮影した。

## 【0142】

また、20人のボランティア (20~25歳) が t = 0 の場合のみ参照群として用いられた。

## 【0143】

結果の統計的処理は、テューキー法を用いて Prism 4.0 ソフトウェアを用いて行った。

## 【0144】

すべてのボランティア (51歳以上) において、VISIA および Cutometer のパラメータはすべて、若い皮膚に似ており改善した。

## 【0145】

Cutometer (皮膚の変形対時間を決定する) に関連して、以下のパラメータを決定した。

- Ue パラメータ (皮膚の硬さ) : パラメータの低下は皮膚の硬さの増大を示す。
- CF パラメータ (皮膚の硬さ係数) ;  $CF_{ti} = Ue(t_0) / Ue(t_i)$  (式中、t は試験時間である)
- 皮膚弾力性パラメータ ( $Ur / Uf$  ; 式中、Ur は中間収縮率であり、Uf は皮膚全体の変形である) ; Ur / Uf の増加は皮膚弾力性の増加を示す。
- 皮膚弾力性係数 (CE) ;  $CE_{ti} = (Ur / Uf)_{ti} / (Ur / Uf)_{t0}$

## 【0146】

次の表5は、プラセボおよび試験化合物を用いて得られる結果を示す。

## 【0147】

20

30

40

50

<表5 Cutometer結果>  
【表5】

	T28d				T56d			
	<i>Ue</i>	<i>CF</i>	<i>Ur/Uf</i> 28-0	<i>CE</i>	<i>Ue</i>	<i>CF</i>	<i>Ur/Uf</i> 56-0	<i>CE</i>
プラセボ	n.s. <i>p</i> >0.05	n.s.	n.s. <i>p</i> >0.05	n.s.	6.40%, s.s. <i>p</i> <0.05	s.s.	n.s. <i>p</i> >0.05	s.s. <i>p</i> <0,05
	15.9%, s.s. <i>p</i> <0,05		p>0.05		6.8%, s.s. <i>p</i> <0.05		18.8%, s.s. <i>p</i> <0,005	

10

20

30

40

## 【0148】

ツボクサ (*Centella asiatica*) のクリームは、試験初期の結果を有意に改善した。

- *Ue* パラメータ (皮膚の硬さ) : *Ue* は 28 日目に 15.9%、56 日目に 18.8% 減少し、28 日目にボランティアの 86.4%、56 日目には 90% において顔の皮膚の硬さが増した。

- 皮膚弾力性 : *Ur/Uf* は 28 日目に 6.8%、56 日目に 7.8% 増加し、28 日目にボランティアの 81.8%、56 日目には 86.4% において顔の弾力性が増した。

## 【0149】

したがって、ツボクサ (*Centella asiatica*) クリームは、*t* = 0 に対して、28 日目および 56 日目で皮膚の硬さおよび弾力性を増加させた。56 日目で、その差は徐々に大きくなり、プラセボに対して有意であった。

## 【0150】

<実施例 5 : ヒト歯肉線維芽細胞 (HGF) に対する 5 ~ 300 アミノ酸 (約 3 ~ 30 KDa) 長のペプチドを含む馴化培地 (CM) の画分を用いた創傷治癒試験 (またはスクラッチ試験) >

ヒト歯肉線維芽細胞を 24 ウエルプレートに播種し、コンフルエントになるまで増殖させた。2 mm 幅のスクラッチを単層培地に対して行った。次いで、培養培地中に試験生成物を加え、瘢痕形成プロセスの後に位相差顕微鏡法を行った。この目的で、スクラッチ前の試験の初期 (*T* = 0 時間) および処置後 (12 時間および 72 時間) に写真を撮影した。瘢痕形成プロセスは、各時点における創傷面積の減少を定量化することによって評価した。

## 【0151】

次の表 6 は、試験した生成物および対照の特徴を示す。

## 【0152】

<表 6 創傷治癒試験でアッセイしたサンプル>

## 【表6】

アッセイしたサンプル
基礎対照(BC)0.1%ウシ胎仔血清(FBS)
陽性対照(Ctrl+)10%(FBS)
陽性対照(Ctrl+)組織成長因子-β1(TGF-β1)
ツボクサ( <i>Centella asiatica</i> )(CA)画分: 0.05 µg/mLの30 kDa画分および3 kDa画分
ウコン( <i>Curcuma longa</i> )(CL)画分: 0.03 µg/mLの30 kDa画分および3 kDa画分
ニンジン( <i>Daucus carota</i> ): 0.1 µg/mLの30 kDa画分および0.07 µg/mLの3 kDa画分
ブドウ( <i>Vitis vinifera</i> ) (VV): 0.1 µg/mLの30 kDa画分および3 kDa画分
<i>Sarcocapnos crassifolia</i> (SC): 0.1 µg/mLの30 kDa画分および0.01 µg/mLの3 kDa画分
オリーブ( <i>Olea europaea</i> )(OE): 0.05 µg/mLの30 kDa画分および3 kDa画分
リトープス種(LP): 0.052 µg/mLの30 kDa画分および0.03 µg/mLの3 kDa画分
ペプチド4Aa(配列番号1): 5 µg/mLおよび0.05 µg/mL
ペプチド4AaS1(配列番号2): 5 µg/mLおよび0.05 µg/mL
ペプチド4AaS2(配列番号3): 5 µg/mLおよび0.05 µg/mL

10

20

30

40

50

## 【0153】

無細胞植物細胞培養上清の画分の入手を実施例1(1.2)に示したように実施した。以下に詳述するように、0~3 kDaおよび0~30 kDaのペプチドを含む画分の特定の分離が特に達成された。

## 【0154】

ニンジン(*Daucus carota*)、ザクロ(*Punica granatum*)、およびツボクサ(*Centella asiatica*)について実施例1.1に示したように得られたすべての種の培地上清を4で4600 rpmで、または30分間遠心分離した。得られた生成物のFFF(タンジェンシャルフローろ過)を行った。このプロセスは、フラックスステップ、平衡化、ろ過、ダイアフィルトレーションおよび最終の衛生化ステップを含んでいた。このプロセスの間に、2.5 LのPBS、2.5 Lの20%エタノールおよびNaOH 1Nを使用した。その後、逆相精製(RP)および最終ろ過を行った。RPについては、精製は9つのステップ、すなわち、5カラム体積(CV)のトリフルオロ酢酸(TFA)0.1%水溶液の添加、5CVのCAN-TFA 0.1%の添加、5CVのTFA 0.1%水溶液の包含および0.1%を達成するまでのTFAの添加を含んでいた。次いで、サンプルをRP-Aにロードし、100%CANで溶出させ、最後のステップは生理食塩水緩衝液中での再懸濁であった。最終ろ過は、3 kDaまたは30 kDaのAmicro Ultra フィルタを用いて行った。

## 【0155】

## &lt;材料&gt;

RP-A: TFA 0.1%水溶液

RP-B: CAN-TFA 0.1%

CEX-A: 酢酸ナトリウム50 mM pH 4.5

CEX-B: 酢酸ナトリウム50 mM pH 4.5

AEX-A: グリシン50 mM、pH 9

AEX-B: グリシン50 mM、NaCl 1M、pH 9

## 【0156】

試験されたペプチドは、 $\text{CH}_3 - \text{C}(\text{O}) - \text{YIYT} - \text{NH}_2$ （配列番号1）、 $\text{Xaa}_1$ が硫酸化Y（サルフェート基、 $\text{SO}_3\text{H}$ ）である $\text{CH}_3 - \text{C}(\text{O}) - \text{Xaa}_1 \text{IYT} - \text{NH}_2$ （配列番号2）、および $\text{Xaa}_1$ が硫酸化Yである $\text{CH}_3 - \text{C}(\text{O}) - \text{YIXaa}_2 \text{T} - \text{NH}_2$ （配列番号3）に対応していた。それらは、懸濁した植物細胞の馴化培地から単離された、ファイトスルフォカイン-（PSK-）と名付けられた4アミノ酸ペプチドに似た合成ペプチドである（Matsubayashiら、「Phytosulfokine, sulphated peptides that induce the proliferation of single mesophyll cells of Asparagus officinalis L.」、Proc. Natl. Acad. Sci. 1996年、vol. no. 93、pp. : 7623~7627参照）。

10

#### 【0157】

アッセイされたペプチド配列は、Rinkアミド樹脂でのFmocベースの保護スキームを使用する固相方法によって組み立てた。Tyr(Y)残基の側鎖はt-ブチル基で保護されていた。N末端のフルオレニルメチルオキシカルボニルクロリド(Fmoc)基の脱保護を、20%ピペリジンジメチルホルムアミド(DMF)溶液を用いて5分間行った。合成はPrelude自動合成装置(Protein Technologies、米国アリゾナ州トゥーソン)を行った。鎖の組み立て後、ペプチド樹脂を90%トリフルオロ酢酸-5%トリイソプロピルシラン-5%水で1時間処理し、対応する濾液を3倍量の冷却したエチルエーテルで処理してペプチドを沈殿させた。遠心分離後、上清を注意深く除去し、ペレット(ペプチドを含む)を酢酸水溶液(5%v/v)に再溶解し、凍結乾燥した。粗生成物の精製は、水/アセトニトリル勾配(共に0.05%トリフルオロ酢酸を含む)を用いた分取逆相HPLCによって行った。精製されたペプチドはHPLCによると均一(95%超)であり、エレクトロスプレー質量分析法により予想される分子量を有していた。

20

#### 【0158】

試験終了時(5日間の処置)のデータを図9Aに示す。図9Aでは、創傷治癒の潜在能力を、植物の試験した画分それぞれまたはアッセイしたペプチドそれぞれに対する治癒面積( $\mu\text{m}^2$ )として描写した。

30

#### 【0159】

図9Bは、48時間の処置後の基礎対照に対する創傷治癒増加率(百分率%)を描写している。

#### 【0160】

結果は三重反復試験から導かれる。瘢痕形成面積の値(または瘢痕形成%)は平均値である。

#### 【0161】

この図9(図9A、図9B)から、試験したすべての画分が基礎対照よりも効果的であり、陽性対照またはそれ以上の効果を提供することが直接推測される。このデータは、3~30kDaの濃縮されたペプチドを有する馴化培地の画分が実際の創傷治癒促進剤であることを認めるものである。一方で、試験したペプチドも所望の効果をもたらし、ペプチド自体が画分の効果に寄与することを証明した。

40

#### 【0162】

完全なものにするために、さまざまな本発明の態様を以下の番号付けした項目に記載する。

#### 【0163】

<項目1>

薬剤として使用するための脱分化した植物細胞懸濁培地の増殖を先にサポートした無細胞上清または当該無細胞上清の画分であって、当該無細胞上清または当該画分は、5~300アミノ酸長の、ペプチド植物成長因子、植物転写因子、およびこれらの混合物から選択されるペプチドを含み、当該無細胞上清または当該画分は細胞溶解による細胞質性細胞

50

内含有物を有しておらず、また膜および／または細胞壁を有していない、無細胞上清または無細胞上清の画分。

【0164】

<項目2>

薬剤は、瘢痕形成皮膚用剤としての使用および／または皮膚創傷治癒剤としての使用および／または皮膚若返り剤としての使用のためのものである、項目1に記載の使用するための無細胞上清またはその画分。

【0165】

<項目3>

脱分化した植物細胞培養懸濁液は、ニンジン (*Daucus carota*)、ツボクサ (*Centella asiatica*)、ザクロ (*Punica granatum*)、ワタ (*Gossypium herbaceum*)、*Sarcocapnos crassifolia*、ウコン (*Curcuma longa*)、アマ (*Linum usitatissimum*)、ブドウ (*Vitis vinifera*)、*Lithops pseudotruncatella*、アルニカ (*Arnica montana*)、ヤエヤマアオキ (*Morinda citrifolia*)、ヒレハリソウ (*Symphytum officinale*)、アサ (*Cannabis sativa*)、オリーブ (*Olea europaea*)、およびカメリアシンensis (*Camellia sinensis*) からなる群から選択される植物由来である、項目1～2のいずれか1つに記載の使用するための無細胞上清またはその画分。 10

20

【0166】

<項目4>

当該上清または当該無細胞上清の画分は、ファイトスルフォカイン-（PSK-）、ファイトスルフォカイン-（PSK-）、硫酸化チロシン-1を含む植物ペプチド (PSY1)、RALF (Rapid Alkaline Factor)、管状要素分化抑制因子 (TDIF)、Clavata-3 (CLV3)、CLE (Clavata-Embryo Surrounding Region-Related)、TPD1 (Tapetum Determinant-1)、表皮パターン形成因子-1 (EPF1)、花の器官脱離欠損 (IDA)、ESR (Embryo Surrounding Region-Related)、Polarisペプチド (PLS)、根分裂組織成長因子 (RGF)、EC1 (Egg Cell-Secreted Protein)、CEP (C-terminal Encoded Peptide)、初期ノジュリン40 (ENOD40)、システミン、SCR (S-locus Cystein Rich protein)、およびこれらの混合物からなる群から選択される植物ペプチド成長因子を含む、項目1～3のいずれか1つに記載の使用するための無細胞上清またはその画分。 30

30

【0167】

<項目5>

無細胞上清またはその画分は、

(a) 液体栄養培養培地中で脆いカルス由来の脱分化した植物細胞を5～15日間増殖させ、脱分化した植物細胞の増殖を支持する馴化培地を得ることと、

(b) 細胞を溶解させることなく馴化培地から植物細胞全体を取り除き、5～30アミノ酸長の、ペプチド植物成長因子、植物転写因子、エピジェネティック因子、および混合物から選択されるペプチドを含む無細胞上清を得ることと、

(c) 場合により、クロマトグラフィー、ろ過、限外ろ過、タンパク質沈殿、およびこれらの組み合わせからなる群から選択される分離技術を用いてタンパク質分離プロセスを実行し、無細胞上清の画分を得ることと  
を含む方法によって得ることができる、項目1～4のいずれか1つに記載の使用するための無細胞上清またはその画分。

40

40

【0168】

50

## &lt;項目6&gt;

無細胞上清またはその画分は、ステップ( b )の後に無細胞上清を凍結乾燥して、凍結乾燥上清を得ることを含む方法によって得ることができる、項目5に記載の使用するための無細胞上清またはその画分。

## 【0169】

## &lt;項目7&gt;

無細胞上清またはその画分は、得られた凍結乾燥無細胞上清をさらに100～500倍濃縮することによって得ることができる、項目6に記載の使用するための無細胞上清またはその画分。

## 【0170】

10

## &lt;項目8&gt;

脱分化した植物細胞懸濁培地は、1・105細胞／懸濁培地m1～1・107細胞／懸濁培地m1の、懸濁培地の体積単位あたりの細胞数として表される細胞密度で培養される、項目1～7のいずれか1つに記載の使用するための無細胞上清またはその画分。

## 【0171】

## &lt;項目9&gt;

脱分化した植物細胞懸濁培地は、誘導プロセスを用いることによりストレス条件に供される、項目1～8のいずれか1つに記載の使用するための無細胞上清またはその画分。

## 【0172】

20

## &lt;項目10&gt;

ニンジン(*Daucus carota*)、ツボクサ(*Centella asiatica*)、ザクロ(*Punica granatum*)、ワタ(*Gossypium herbaceum*)、*Sarcocapnos crassifolia*、ウコン(*Curcuma longa*)、アマ(*Linum usitatissimum*)、ブドウ(*Vitis vinifera*)、*Lithops pseudotruncatella*、アルニカ(*Arnica montana*)、ヤエヤマアオキ(*Morinda citrifolia*)、ヒレハリソウ(*Symphytum officinale*)、アサ(*Cannabis sativa*)、オリーブ(*Olea europaea*)、およびカメリアシネンシス(*Camellia sinensis*)からなる群から選択される植物由来の脱分化した植物細胞培養懸濁培地の増殖を先にサポートした無細胞上清の画分であって、

- 5～300アミノ酸長の、ペプチド植物成長因子、植物転写因子、およびこれらの混合物から選択されるペプチドを含み、画分は細胞溶解による細胞質性細胞内含有物ならびに膜および／または細胞壁を有しておらず、

(a) 液体栄養培養培地中で脆いカルス由来の脱分化した植物細胞を5～15日間増殖させ、脱分化した植物細胞の増殖を支持する馴化培地を得ることと、

(b) 細胞を溶解させることなく馴化培地から植物細胞全体を取り除き、5～300アミノ酸長のペプチドを含む無細胞上清を得ることと、

(c) 固相抽出クロマトグラフィー、サイズ排除クロマトグラフィー、ろ過、限外ろ過、タンパク質沈殿、およびこれらの組み合わせからなる群から選択される分離技術を用いてタンパク質分離プロセスを実行し、無細胞上清の画分を得ることとを含む方法によって得ることができる、画分。

30

## 【0173】

## &lt;項目11&gt;

ステップ(c)は固相抽出クロマトグラフィーによって実行される、項目10に記載の無細胞画分。

## 【0174】

40

## &lt;項目12&gt;

1つまたは複数の適切な局所用の薬学的にまたは美容的に許容される賦形剤または担体と一緒に含む、有効量の項目10～11のいずれか1つに定義される脱分化した植物細胞

50

懸濁培地の上清の無細胞画分を含む皮膚局所用組成物。

【0175】

<項目13>

局所用の薬学的にまたは美容的に許容される賦形剤のうち少なくとも1つとしてグリセリンを含む、項目12に記載の皮膚局所用組成物。

【0176】

<参考文献>

- ・米国特許出願公開第2014/072619号明細書
- ・国際公開第2012/130783号明細書
- ・欧州特許第2436759号明細書
- ・Ryanら，“Poly peptide Hormones”，The Plant Cell，S251-S264 Supplement (2002)
- ・Czyziewiczら，“Message in a bottle：small signalling peptide outputs during growth and development”，Journal of Experimental Botany，vol. no. 64(17)，pp.：5281-5296 (2013)
- ・Goberdhanら，“A biomarker that identifies senescent human cells in culture and in aging skin in vivo”，Proc. Natl. Acad. Sci.，Vol No. 92，pp.：9363-9367 (1995)
- ・Matsubayashiら，“Phytosulfokine, sulphated peptides that induce the proliferation of single mesophyll cells of Asparagus officinalis L”，Proc. Natl. Acad. Sci.，vol. no. 93，pp.：7623-7627 (1996)

【図1】

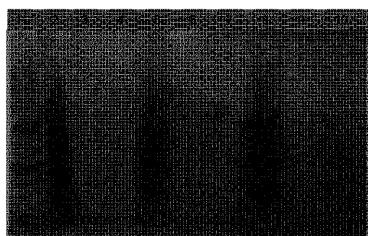
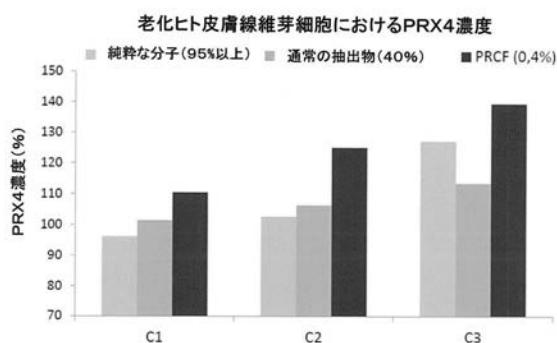
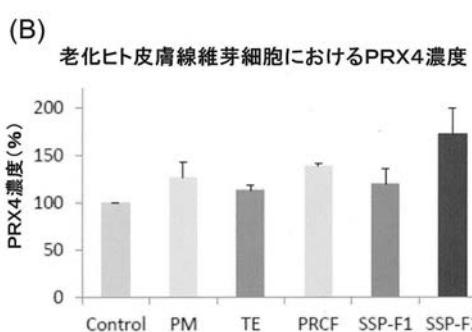
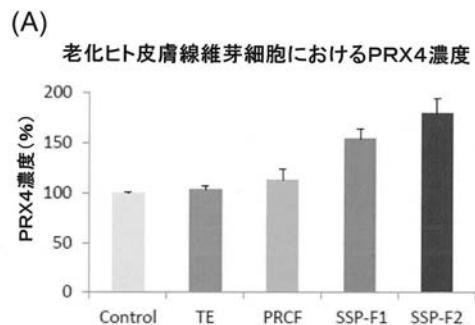


FIG.1

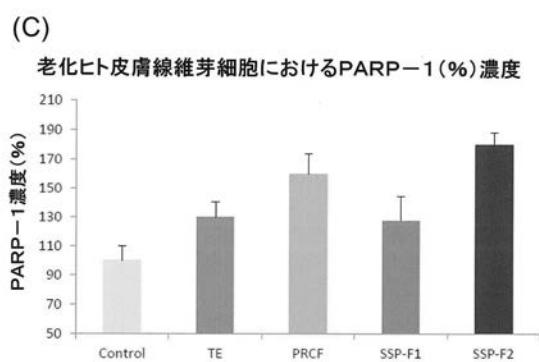
【図2】



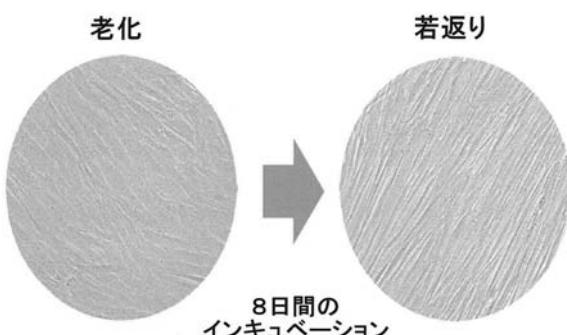
【図3 a】



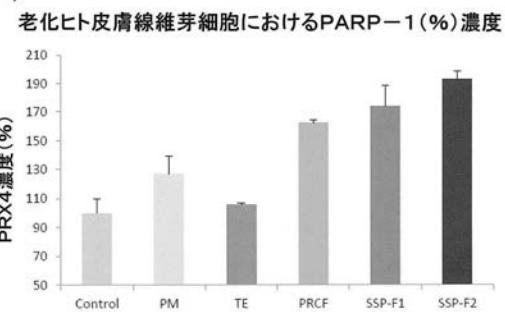
【図3 b】



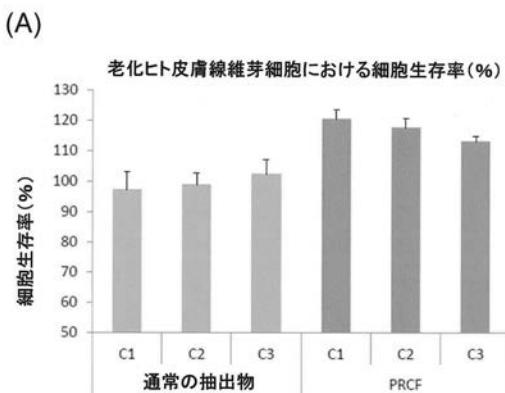
【図4】



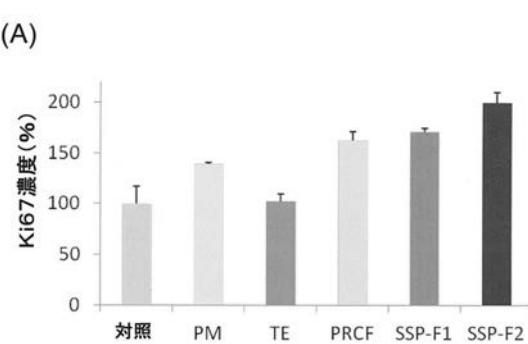
(D)



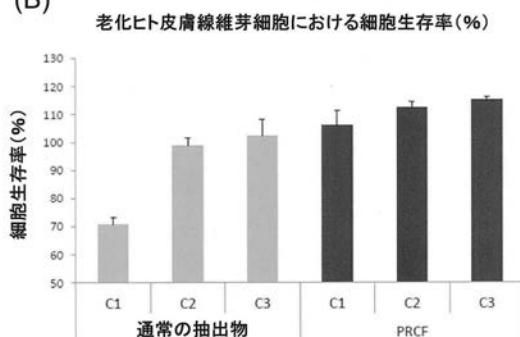
【図5】



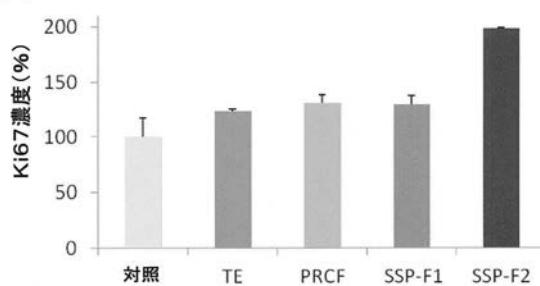
【 図 6 】



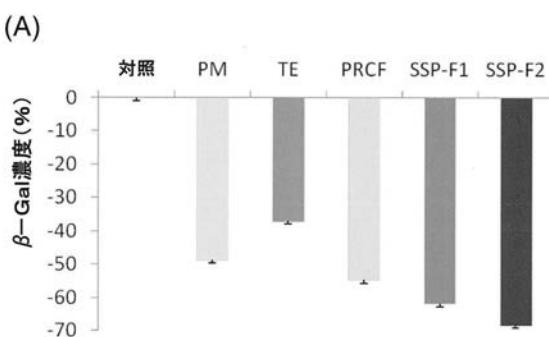
(B)



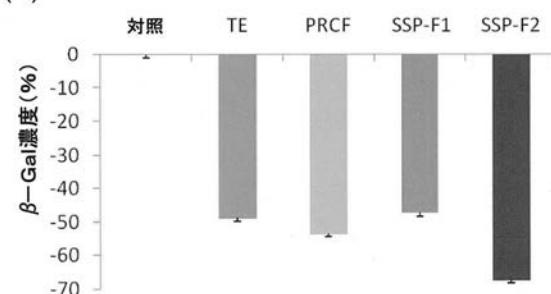
(B)



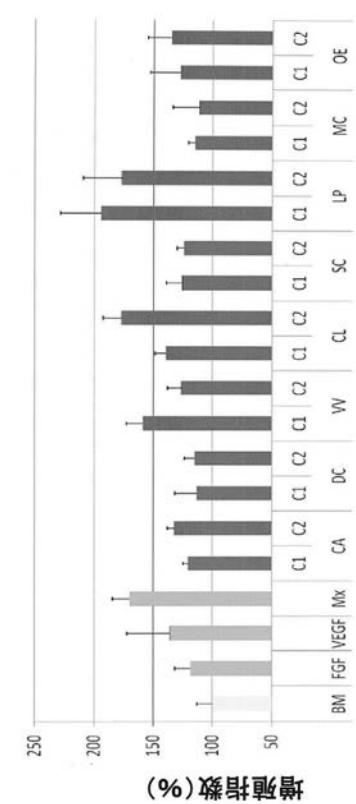
【 図 7 】



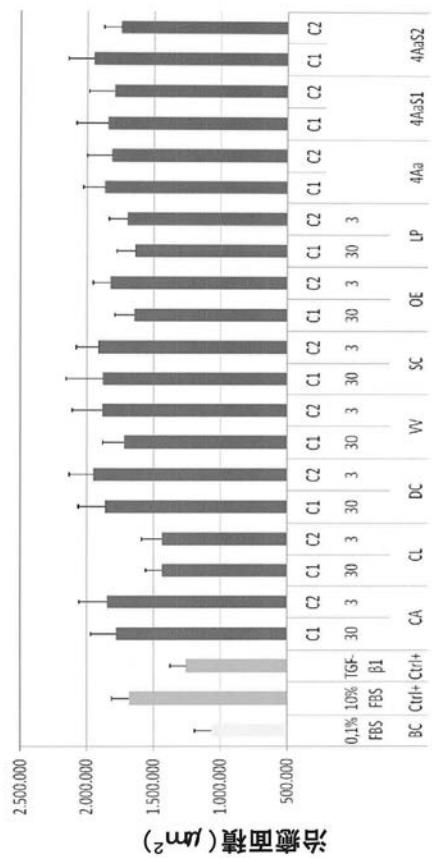
(B)



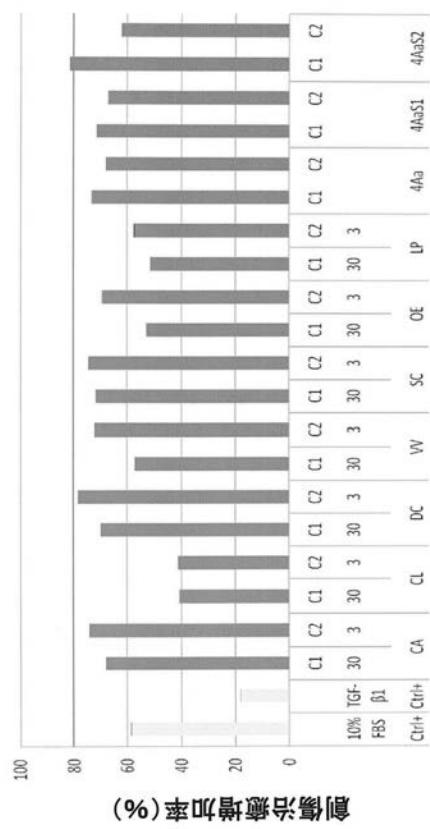
【 図 8 】



【図 9 A】



【図 9 B】



【配列表】

2018512440000001.app

## 【国際調査報告】

INTERNATIONAL SEARCH REPORT		International application No PCT/EP2016/057885									
<b>A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER</b> INV. A61K36/185 A61K38/00 A61K8/00 A61K36/23 C12N5/04 ADD.											
According to International Patent Classification (IPC) or to both national classification and IPC											
<b>B. FIELDS SEARCHED</b> Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols) A61K C12N											
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 practicable, search terms used)  EPO-Internal, BIOSIS, EMBASE, WPI Data											
<b>C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT</b> <table border="1" style="width: 100%; border-collapse: collapse;"> <thead> <tr> <th style="text-align: left; padding: 2px;">Category*</th> <th style="text-align: left; padding: 2px;">Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages</th> <th style="text-align: left; padding: 2px;">Relevant to claim No.</th> </tr> </thead> <tbody> <tr> <td style="padding: 2px;">X</td> <td style="padding: 2px;">DE 198 17 177 A1 (LOHMANN RUDOLF LOMAPHARM [DE]) 21 October 1999 (1999-10-21) page 4, line 6; claims; examples -----</td> <td style="padding: 2px;">1-15</td> </tr> <tr> <td style="padding: 2px;">X</td> <td style="padding: 2px;">CHOI J -H; YOON S K; LEE K H; SEO M S; KIM D H; HONG S B; KIM J -Y; PAIK H -D; KIM C H: "Antitumor activity of cell suspension culture of green tea seed (<i>Camellia sinensis L.</i>)", BIOTECHNOLOGY AND BIOPROCESS ENGINEERING, vol. 11, no. 5, 1 September 2006 (2006-09-01), pages 396-401, XP055206569, KR ISSN: 1226-8372 the whole document ----- -/-</td> <td style="padding: 2px;">1-15</td> </tr> </tbody> </table>			Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.	X	DE 198 17 177 A1 (LOHMANN RUDOLF LOMAPHARM [DE]) 21 October 1999 (1999-10-21) page 4, line 6; claims; examples -----	1-15	X	CHOI J -H; YOON S K; LEE K H; SEO M S; KIM D H; HONG S B; KIM J -Y; PAIK H -D; KIM C H: "Antitumor activity of cell suspension culture of green tea seed ( <i>Camellia sinensis L.</i> )", BIOTECHNOLOGY AND BIOPROCESS ENGINEERING, vol. 11, no. 5, 1 September 2006 (2006-09-01), pages 396-401, XP055206569, KR ISSN: 1226-8372 the whole document ----- -/-	1-15
Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.									
X	DE 198 17 177 A1 (LOHMANN RUDOLF LOMAPHARM [DE]) 21 October 1999 (1999-10-21) page 4, line 6; claims; examples -----	1-15									
X	CHOI J -H; YOON S K; LEE K H; SEO M S; KIM D H; HONG S B; KIM J -Y; PAIK H -D; KIM C H: "Antitumor activity of cell suspension culture of green tea seed ( <i>Camellia sinensis L.</i> )", BIOTECHNOLOGY AND BIOPROCESS ENGINEERING, vol. 11, no. 5, 1 September 2006 (2006-09-01), pages 396-401, XP055206569, KR ISSN: 1226-8372 the whole document ----- -/-	1-15									
<input checked="" type="checkbox"/> Further documents are listed in the continuation of Box C.		<input checked="" type="checkbox"/> See patent family 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 application or patent 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  15 July 2016	Date of mailing of the international search report  21/07/2016										
Name and mailing address of the ISA/ European Patent Office, P.O. 5818 Patentlaan 2 NL-2280 HV Rijswijk Tel: (+31-70) 340-2040, Fax: (+31-70) 340-3016	Authorized officer  Friederich, Martin										

## INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No
PCT/EP2016/057885

C(Continuation). DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT	
Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages  ----- Relevant to claim No.
X	EP 2 687 592 A1 (GREENOVATION BIOTECH GMBH [DE]) 22 January 2014 (2014-01-22) claims; examples -----
X	EP 1 498 475 A1 (MERISTEM THERAPEUTICS S A [FR]) 19 January 2005 (2005-01-19) claims; examples -----
X	EP 2 708 596 A1 (CASEN FLEET S L U LAB [ES]) 19 March 2014 (2014-03-19) the whole document -----

**INTERNATIONAL SEARCH REPORT**

Information on patent family members

International application No  
PCT/EP2016/057885

Patent document cited in search report	Publication date	Patent family member(s)		Publication date
DE 19817177	A1 21-10-1999	NONE		
EP 2687592	A1 22-01-2014	AU 2013291990 A1		29-01-2015
		CA 2882100 A1		23-01-2014
		CN 104769102 A		08-07-2015
		EP 2687592 A1		22-01-2014
		EP 2875123 A1		27-05-2015
		JP 2015522287 A		06-08-2015
		KR 20150031292 A		23-03-2015
		US 2015147811 A1		28-05-2015
		WO 2014013045 A1		23-01-2014
EP 1498475	A1 19-01-2005	NONE		
EP 2708596	A1 19-03-2014	NONE		

## フロントページの続き

(51) Int.Cl.	F I	テーマコード(参考)
A 6 1 Q 19/00 (2006.01)	A 6 1 Q 19/00	
A 6 1 K 36/23 (2006.01)	A 6 1 K 36/23	
A 6 1 K 36/9066 (2006.01)	A 6 1 K 36/9066	
A 6 1 K 36/55 (2006.01)	A 6 1 K 36/55	
A 6 1 K 36/87 (2006.01)	A 6 1 K 36/87	
A 6 1 K 36/28 (2006.01)	A 6 1 K 36/28	
A 6 1 K 36/746 (2006.01)	A 6 1 K 36/746	
A 6 1 K 36/30 (2006.01)	A 6 1 K 36/30	
A 6 1 K 36/63 (2006.01)	A 6 1 K 36/63	
A 6 1 K 36/82 (2006.01)	A 6 1 K 36/82	
A 6 1 K 47/10 (2006.01)	A 6 1 K 47/10	
A 6 1 K 9/10 (2006.01)	A 6 1 K 9/10	
C 1 2 P 21/00 (2006.01)	C 1 2 P 21/00	Z N A A

(81)指定国 AP(BW,GH,GM,KE,LR,LS,MW,MZ,NA,RW,SD,SL,ST,SZ,TZ,UG,ZM,ZW),EA(AM,AZ,BY,KG,KZ,RU,TJ,TM),EP(AL,AT,BE,BG,CH,CY,CZ,DE,DK,EE,ES,FI,FR,GB,GR,HR,HU,IE,IS,IT,LT,LU,LV,MC,MK,MT,NL,NO,PL,PT,R0,RS,SE,SI,SK,SM,TR),OA(BF,BJ,CF,CG,CI,CM,GA,GN,GQ,GW,KM,ML,MR,NE,SN,TD,TG),AE,AG,AL,AM,AO,AT,AU,AZ,BA,BB,BG,BH,BN,BR,BW,BY,BZ,CA,CH,CL,CN,CO,CR,CU,CZ,DE,DK,DM,D0,DZ,EC,EE,EG,ES,FI,GB,GD,GE,GH,GM,GT,HN,HR,HU,ID,IL,IN,IR,IS,JP,KE,KG,KN,KP,KR,KZ,LA,LC,LK,LR,LS,LU,LY,MA,MD,ME,MG,MK,MN,MW,MX,MY,MZ,NA,NG,NI,NO,NZ,OM,PA,PE,PG,PH,PL,PT,QA,RO,RS,RU,RW,SA,SC,SD,SE,SG,SK,SL,SM,ST,SV,SY,TH,TJ,TM,TN,TR,TT,TZ,UA,UG,US

(72)発明者 ラプラナ ラシエラ , サラ

スペイン国 , テラサ 0 8 2 2 1 , カレル サン ガイエタ , 1 2 1 , 2 オー

(72)発明者 マス ドゥアルテ , マリア

スペイン国 , テラサ 0 8 2 2 1 , カレル サン ガイエタ , 1 2 1 , 2 オー

(72)発明者 ルイス メディナ , タリク

スペイン国 , テラサ 0 8 2 2 1 , カレル サン ガイエタ , 1 2 1 , 2 オー

(72)発明者 ロメロ ルエダ , ジェシカ

スペイン国 , リポレット 0 8 2 9 1 , カレル ベルジェ デ ムンツェラト , 2 1 , プエルタ  
エヌオ - 2 5 3

F ターム(参考) 4B064 CA11 CE03 CE07 CE10 DA03

4C076 BB31 CC18 CC19 DD38

4C083 AA111 AA112 AC012 AC072 AC121 AC122 AC152 AC182 AC272 AC402

AC422 AC472 AC532 AD022 AD092 CC05 DD27 DD31 EE12 EE13

FF01

4C084 AA01 AA02 AA06 CA13 CA56 DB52 MA63 NA14 ZA891 ZA892  
ZC521 ZC522

4C088 AB12 AB13 AB14 AB26 AB40 AB45 AB56 AB64 AB81 AC20  
BA06 CA14 CA17 CA19 MA63 NA14 ZA89 ZC52