

(19)日本国特許庁(JP)

(12)特許公報(B2)

(11)特許番号
特許第7641461号
(P7641461)

(45)発行日 令和7年3月7日(2025.3.7)

(24)登録日 令和7年2月27日(2025.2.27)

(51)国際特許分類		F I		
A 6 1 K	8/64 (2006.01)	A 6 1 K	8/64	
A 6 1 Q	19/00 (2006.01)	A 6 1 Q	19/00	
C 0 7 K	5/08 (2006.01)	C 0 7 K	5/08	Z N A
A 6 1 K	38/06 (2006.01)	A 6 1 K	38/06	
A 6 1 P	17/08 (2006.01)	A 6 1 P	17/08	
請求項の数 4 (全10頁)				
(21)出願番号	特願2022-534627(P2022-534627)	(73)特許権者	512104502	
(86)(22)出願日	令和2年12月9日(2020.12.9)		スパデリクサー インコーポレイテッド	
(65)公表番号	特表2023-505796(P2023-505796 A)		大韓民国 2 4 2 3 2 カンウォンード,	
(43)公表日	令和5年2月13日(2023.2.13)		チュンチョンーシ, フソクーロ 4 2 0	
(86)国際出願番号	PCT/KR2020/017836		ボンーギル 7 ハイーテック タワー 5	
(87)国際公開番号	WO2021/118199		2 3	
(87)国際公開日	令和3年6月17日(2021.6.17)		5 2 3, High-Tech Towe	
審査請求日	令和5年9月7日(2023.9.7)		r, 7, Huseok-ro 4 2 0	
(31)優先権主張番号	10-2019-0163920		beon-gil, Chuncheo	
(32)優先日	令和1年12月10日(2019.12.10)		n-si, Gangwon-do 2 4	
(33)優先権主張国・地域又は機関	韓国(KR)	(74)代理人	100188499	
			弁理士 勝又 政徳	
		(74)代理人	100127568	
				最終頁に続く

(54)【発明の名称】 P 5 3 活性化ペプチドを含む組成物

(57)【特許請求の範囲】

【請求項 1】

脂漏症を抑制または改善するための化粧料組成物であって、式 1：

<式 1>

Leu-X-Asp

(式中、

Xは、グルタミン酸 (Glu)、セリン (Ser)、グリシン (Gly)、アラニン (Ala)、グルタミン (Gln)、アルギニン (Arg)、リシン (Lys)、ロイシン (Leu)、チロシン (Tyr)、アスパラギン酸 (Asp)、フェニルアラニン (Phe)、アスパラギン (Asn)、システイン (Cys)、ヒスチジン (His)、イソロイシン (Ile)、メチオニン (Met)、プロリン (Pro)、スレオニン (Thr)、トリプトファン (Trp)、またはバリン (Val) であり、

－は、ペプチド結合である)

で示される 3 つのアミノ酸からなるペプチドを有効成分として含む、化粧料組成物。

【請求項 2】

前記ペプチドが、配列番号 2、3、4、6、7、9 または 1 8 のアミノ酸配列からなるペプチドである、請求項 1 に記載の化粧料組成物。

【請求項 3】

脂漏症を予防、改善または治療するための医薬組成物であって、式 1：

<式 1>

Leu-X-Asp

(式中、

Xは、グルタミン酸 (Glu)、セリン (Ser)、グリシン (Gly)、アラニン (Ala)、グルタミン (Gln)、アルギニン (Arg)、リシン (Lys)、ロイシン (Leu)、チロシン (Tyr)、アスパラギン酸 (Asp)、フェニルアラニン (Phe)、アスパラギン (Asn)、システイン (Cys)、ヒスチジン (His)、イソロイシン (Ile)、メチオニン (Met)、プロリン (Pro)、スレオニン (Thr)、トリプトファン (Trp)、またはバリン (Val) であり、

-は、ペプチド結合である)

で示される3つのアミノ酸からなるペプチドを有効成分として含む、医薬組成物。

【請求項4】

前記ペプチドが、配列番号2、3、4、6、7、9または18のアミノ酸配列からなるペプチドである、請求項3に記載の医薬組成物。

【発明の詳細な説明】

【技術分野】

【0001】

本発明は、p53を活性化させるペプチドを含む組成物に関する。より具体的には、本発明は、脂漏症を抑制または改善するための化粧品組成物、および脂漏症を予防、改善または治療するための医薬組成物に関する。これらの組成物は、有効成分として、p53とMDM2の相互作用を顕著に減少させることによりp53とRNAポリメラーゼII (POLII) の相互作用を顕著に増加させる活性を有するペプチドを含む。

【背景技術】

【0002】

皮脂腺の脂腺細胞から分泌される皮脂は、皮膚外部からの有害物質の侵入を防ぎ、皮膚の油水分を調節するといった有益な機能を持つ。一方で、思春期におけるホルモンの変化やストレスなどによって皮脂が過剰に分泌されると、機能不全を起こし、様々な皮膚疾患を引き起こす。脂漏症は、皮膚上で皮脂が過剰に分泌されたり、皮膚が皮脂膜で覆われたり、皮膚に痂皮や鱗屑が生じることなどを特徴とする皮脂腺の疾患または皮膚トラブルである。

【0003】

脂漏症は、主に、自分自身での石鹸洗浄や、シャンプーの使用などによる衛生管理によって抑制または改善することができる。薬物療法としては、硫化セレン、アゾール化合物、スルファセタミドナトリウム、テルビナフィンなどの抗真菌剤、およびステロイドなどの抗炎症剤が使用されている。しかし、このような治療法は、脂漏症の症状の緩和のみを目的としたものであり、脂漏症を根本的に抑制したり、改善したり、治療したりするものではない。したがって、脂漏症の根本的な抑制、改善または治療が可能な方法の開発が当技術分野において求められている。

【0004】

CD99は、糖鎖修飾された細胞外領域、膜貫通領域および短い細胞内領域からなる1型膜貫通タンパク質である (Banting, G. S., Pym, B., Darling, S. M., and Goodfellow P. N. (1989). The MIC2 gene product: epitope mapping and structural prediction analysis define an integral membrane protein. Mol. Immunol. 26: 181)。ユーイング肉腫 (EWS) 細胞に発現されたCD99分子が抗CD99モノクローナル抗体と結合すると、MDM2 (E3ユビキチンリガーゼ) が失われ、MDM2とp53の結合を阻止することが報告されている (Guerzoni C. et. al. (2015). CD99 triggering in Ewing sarcoma delivers a lethal signal through p53 pathway reactivation and cooperates with doxorubicin. Clin Cancer Res 21:146-156)。MDM2から解放されたp53は、細胞核内において、RNAポリメラーゼII (POLII) を含むRNAポリメラーゼ複合体を活性化し、TRAIL (腫瘍壊死因子関連アポトーシス誘導リガンド) などの下流の標的遺伝子の発現を増加させ、この結果、脂腺細胞のアポトーシスを引き起こす (Melnik B.C.

10

20

30

40

50

(2017). p53: key conductor of all anti-acne therapies. J Transl Med 15:195-206)。また、脂腺細胞の増殖と分化はIGF-1とc-Mycにより誘導されるが、p53は、IGF-1のシグナル伝達とc-Mycの機能を抑制する。

【0005】

したがって、MDM2とp53の結合を抑制し、かつp53とPOLIIの相互作用を増加させることによって、脂腺細胞の増殖と分化が抑制されるとともに、脂腺細胞のアポトーシスが誘導され、その結果、脂漏症の根本的な抑制、改善または治療が可能になると期待される。

【発明の概要】

【発明が解決しようとする課題】

【0006】

本発明者らは、特定のペプチドを使用することにより、PKA（タンパク質チロシンキナーゼ）とSHP2（Src相同領域2ドメイン含有ホスファターゼ2）の相互作用を顕著に増加させることによって、β1インテグリンのシグナル伝達を介したがん細胞の転移を抑制することができ、このペプチドを炎症性疾患の予防または治療に有用に適用できることを見出した（韓国特許公開第10-2018-0099092号）。驚くべきことに、この特定のペプチドは、p53とMDM2の相互作用を顕著に減少させて、p53とPOLIIの相互作用を顕著に増加させることから、脂漏症に対する抑制活性、改善活性または治療活性を発揮することが見出された。

【0007】

したがって、本発明は、この特定のペプチドを有効成分として含む、脂漏症を抑制または改善するための化粧品組成物を提供することを目的とする。

【0008】

また、本発明は、この特定のペプチドを有効成分として含む、脂漏症を予防、改善または治療するための医薬組成物を提供することを目的とする。

【課題を解決するための手段】

【0009】

本発明の一態様によれば、脂漏症を抑制または改善するための化粧品組成物であって、式1：

<式1>

Leu-X-Asp

（式中、

Xは、グルタミン酸（Glu）、セリン（Ser）、グリシン（Gly）、アラニン（Ala）、グルタミン（Gln）、アルギニン（Arg）、リシン（Lys）、ロイシン（Leu）、チロシン（Tyr）、アスパラギン酸（Asp）、フェニルアラニン（Phe）、アスパラギン（Asn）、システイン（Cys）、ヒスチジン（His）、イソロイシン（Ile）、メチオニン（Met）、プロリン（Pro）、スレオニン（Thr）、トリプトファン（Trp）、またはバリン（Val）であり、

-は、ペプチド結合である）

で示される3つのアミノ酸からなるペプチドを有効成分として含む化粧品組成物が提供される。

【0010】

本発明の別の一態様によれば、前記式1で示される3つのアミノ酸からなるペプチドを有効成分として含む、脂漏症を予防、改善または治療するための医薬組成物が提供される。

【0011】

本発明による化粧品組成物および医薬組成物に含まれる前記ペプチドは、好ましくは、配列番号2、3、4、6、7、9または18のアミノ酸配列からなるペプチドであってもよい。

【発明の効果】

【0012】

本発明において、式1のペプチド、すなわち、式1で示される3つのアミノ酸からなる

10

20

30

40

50

ペプチドが、p53とMDM2の相互作用を顕著に減少させて、p53とPOLIIの相互作用を顕著に増加させることが見出された。したがって、このペプチドは、脂腺細胞のアポトーシスを引き起こすサイトカイン（例えば、TRAIL（腫瘍壊死因子関連アポトーシス誘導リガンド））の発現を誘導することから、脂漏症を抑制または改善するための化粧品組成物および脂漏症を予防、改善または治療するための医薬組成物に有用に適用することができる。

【図面の簡単な説明】

【0013】

【図1】本発明のペプチドでヒトケラチノサイト（HaCaT細胞）を処理した際の、処理濃度に応じたp53とMDM2の相互作用の変化を示す。

【図2】本発明のペプチドでヒトケラチノサイト（HaCaT細胞）を処理した際の、処理時間に応じたp53のリン酸化およびMDM2の発現量の変化を示す。

【図3】本発明のペプチドでヒトケラチノサイト（HaCaT細胞）を処理した際の、p53とPOLIIの相互作用に対する効果を評価した結果を示す。

【発明を実施するための形態】

【0014】

本明細書において、「脂漏症」は、皮脂の過剰分泌を特徴とする皮脂腺疾患または皮膚トラブルを意味し、皮脂の過剰分泌を原因とするざ瘡を含む。

【0015】

本発明は、脂漏症を抑制または改善するための化粧品組成物であって、式1：

<式1>

Leu-X-Asp

（式中、

Xは、グルタミン酸（Glu）、セリン（Ser）、グリシン（Gly）、アラニン（Ala）、グルタミン（Gln）、アルギニン（Arg）、リシン（Lys）、ロイシン（Leu）、チロシン（Tyr）、アスパラギン酸（Asp）、フェニルアラニン（Phe）、アスパラギン（Asn）、システイン（Cys）、ヒスチジン（His）、イソロイシン（Ile）、メチオニン（Met）、プロリン（Pro）、スレオニン（Thr）、トリプトファン（Trp）、またはバリン（Val）であり、

-は、ペプチド結合である）

で示される3つのアミノ酸からなるペプチドを有効成分として含む、化粧品組成物を提供する。

【0016】

また、本発明は、前記式1で示される3つのアミノ酸からなるペプチドを有効成分として含む、脂漏症を予防、改善または治療するための医薬組成物を提供する。

【0017】

本発明による化粧品組成物および医薬組成物において、配列番号2、3、4、6、7、9または18のアミノ酸配列からなるペプチドは、p53とMDM2の相互作用を減少させて、p53とPOLIIの相互作用を増加させるのに特に優れた活性を有することが見出された。したがって、一実施形態において、前記ペプチドは、配列番号2、3、4、6、7、9または18のアミノ酸配列からなるペプチドであってもよい。

【0018】

本発明による化粧品組成物は、例えば、機能性化粧品組成物の形態で調製してもよい。本発明の化粧品組成物は、化粧品組成物分野における通常の方法に従って様々な形態で調製してもよい。例えば、本発明の化粧品組成物は、化粧品、化粧水、クリーム、ローションなどの形態で調製してもよく、これらを使用する際には、クレンジングウォーター、収れん液または保湿液で希釈してもよい。また、本発明の化粧品組成物は、化粧品組成物分野で通常使用されている安定剤、溶解補助剤、ビタミン、顔料、香料などの通常の添加剤を含んでいてもよい。本発明の化粧品組成物において、前記ペプチドは、脂漏症を抑制または改善する効果を発揮するのに有効な量で含まれていてもよく、例えば、本発明の化粧品組成物の総重量に対して、約0.00001～1重量%、好ましくは約0.001～0.1重量%の

10

20

30

40

50

量で含まれていてもよい。

【0019】

本発明の医薬組成物は、例えば、乳糖やトウモロコシ澱粉などの賦形剤、ステアリン酸マグネシウムなどの滑沢剤、現在入手可能な乳化剤、懸濁剤、緩衝剤、等張化剤などの薬学的に許容可能な担体を含んでいてもよい。本発明の医薬組成物は、経口投与形態または非経口投与形態に製剤化することができ、経皮投与、皮下投与、筋肉内投与などのための非経口投与形態に製剤化することが好ましい。必要に応じて、緩衝剤や等張化剤などの添加剤を非経口投与形態に使用することができる。本発明の医薬組成物は、リン酸緩衝生理食塩水（PBS）などの担体を含む水溶液の形態であってもよい。本発明の医薬組成物は、脂漏症を予防、改善または治療するのに適した量で患者に投与してもよく、例えば、1日あたり約0.01～10mg/kgの用量で患者に投与してもよいが、1日あたりの用量は、通常、患者の年齢、体重および状態に応じて変更してもよい。

10

【0020】

以下の実施例および試験例を参照することにより本発明をさらに詳しく説明する。しかし、これらの実施例および試験例は、本発明を説明するためのものであり、本発明の範囲はこれらの実施例および試験例に限定されない。

【実施例】

【0021】

実施例1：ペプチドの合成

自動ペプチド合成装置（PeptreX-R48、Pepton社製、大韓民国テジョン）を用いて、配列番号1～20のペプチド（以下の表1参照）をFMOC固相法により合成した。C18分析用RPカラム（資生堂カプセルパック）を使用した逆相高速液体クロマトグラフィー（逆相HPLC）（Prominence LC-20AB、島津製作所製、日本）を用いて、合成したペプチドを精製および分析し、質量分析計（HP1100シリーズLC/MSD、Hewlett-Packard社製、米国ロースビル）を使用して同定した。

20

30

40

50

【表 1】

ペプチド名	配列番号	アミノ酸配列
Pep1	配列番号 1	Leu－Glu－Asp
Pep2	配列番号 2	Leu－Ser－Asp
Pep3	配列番号 3	Leu－Gly－Asp
Pep4	配列番号 4	Leu－Ala－Asp
Pep5	配列番号 5	Leu－Gln－Asp
Pep6	配列番号 6	Leu－Arg－Asp
Pep7	配列番号 7	Leu－Lys－Asp
Pep8	配列番号 8	Leu－Leu－Asp
Pep9	配列番号 9	Leu－Tyr－Asp
Pep10	配列番号 10	Leu－Asp－Asp
Pep11	配列番号 11	Leu－Phe－Asp
Pep12	配列番号 12	Leu－Asn－Asp
Pep13	配列番号 13	Leu－Cys－Asp
Pep14	配列番号 14	Leu－His－Asp
Pep15	配列番号 15	Leu－Ile－Asp
Pep16	配列番号 16	Leu－Met－Asp
Pep17	配列番号 17	Leu－Pro－Asp
Pep18	配列番号 18	Leu－Thr－Asp
Pep19	配列番号 19	Leu－Trp－Asp
Pep20	配列番号 20	Leu－Val－Asp

【0022】

実施例 2：ペプチドを含有する組成物の調製

配列番号1～20のペプチドをリン酸緩衝生理食塩水（PBS）にそれぞれ溶解して、その濃度を1Mとした。得られたタンパク質溶液を使用して、以下の試験例を実施した。

【0023】

試験例 1：p53とMDM2の物理的結合に対するペプチドの効果の評価

本発明のペプチドで細胞を処理した後、p53とMDM2の物理的結合に対する本発明のペプチドの効果を、in situ PLA（近接ライゲーションアッセイ）法で評価した。24ウェルマイクロプレートの各ウェルに、10%ウシ胎児血清を含むDMEMとともにHaCaT細胞（ヒトケラチノサイト、CLS）を 4.5×10^4 個／ウェルの密度で加え、5%CO₂インキュベーターにおいて37℃で24時間培養した。培地中のペプチド濃度が1μM、5μM、10μMまたは20μMになるように実施例2のペプチド溶液を添加した後、同じ条件下で30分間インキュベートした。対照群には処理を行わなかった。各ウェルの細胞をPBSで洗浄し、2%ホル

ムアルデヒドで15分間処理して固定した後、0.1% TritonX-100で5分間処理することにより細胞への抗体の透過性を向上させた。抗p53ポリクローナル抗体 (Abcam、英国) および抗MDM2ポリクローナル抗体 (Santa Cruz、米国カリフォルニア州) を添加した。in situ PLAキット (Sigma-Aldrich) を使用して、PLAプローブを添加した後、ハイブリダイゼーション工程、ライゲーション工程、増幅工程および封入工程を製造業者のプロトコルに従って行った。p53とMDM2の物理的相互作用は、共焦点レーザー顕微鏡 (オリンパスfluoview FW1000; オリンパス、日本、東京) を用いて各細胞において検出された発光シグナル (PLAシグナル) を測定することによって定量した。この結果を図1に示す。

【0024】

図1に示した結果から、本発明のペプチドで処理した群は、処理を行っていない対照群と比較して、p53とMDMの相互作用が有意に減少したことが確認できる。

【0025】

試験例2: p53のリン酸化およびMDM2の消失に対するペプチドの活性の評価

p53のリン酸化およびMDM2の発現は、ウエスタンブロッティング法を使用して評価した。各ウェルにHaCaT細胞を 5×10^6 個/ウェルの密度で加え、培地中のペプチド濃度が $20 \mu\text{M}$ になるように実施例2のペプチド溶液を各ウェルに添加した後、前記と同じ条件下で15分間、30分間または60分間インキュベートした。各ウェルの細胞をPBSで3回洗浄した後、 $0.1 \mu\text{M}$ PMSP (フッ化フェニルメチルスルホニル)、 $1 \mu\text{g/ml}$ ペプスタチンA、 $10 \mu\text{g/ml}$ ロイペプチン、 $1 \mu\text{g/ml}$ アプロチニンおよび 1mM Na_3VO_4 を含む1% NP40溶解緩衝液 (1% Nonidet P40、 0.1M NaCl、 0.05M Tris (pH8.0)、 5mM EDTA) で溶解した。ブラッドフォードアッセイ法を使用して細胞溶解物を定量した後、電気泳動用のサンプルを調製した。10% ポリアクリルアミドゲル上で免疫沈降物の電気泳動を行った。展開したタンパク質をニトロセルロース膜に転写した後、ブロッキング溶液 (すなわち、0.05% Tween20と3% ウシ血清アルブミンを含むTris緩衝生理食塩水 (TBS)) を加えて室温で約1時間処理した。その後、抗p53ポリクローナル抗体 (Santa Cruz、米国カリフォルニア州) または抗MDM2ポリクローナル抗体 (Santa Cruz、米国カリフォルニア州) を含むTBS (0.5% ウシ血清アルブミンを含む) 中で2時間反応を行った後、0.05% Tween20を含むTBSで洗浄した。西洋ワサビペルオキシダーゼ標識抗ウサギIgG抗体 (Santa Cruz、米国カリフォルニア州) を加えて室温で1時間処理した後、0.05% Tween20を含むTBSで5回洗浄し、抗体検出キット (Ab frontier、韓国) を使用して発色させた。電気泳動した細胞溶解物が同じ量であったことを確認するため、抗 β アクチンモノクローナル抗体 (Santa Cruz、米国カリフォルニア州) を使用してアクチンを検出した。この結果を図2に示す。

【0026】

図2に示した結果から分かるように、実施例2のペプチドで処理すると15分の時点でp53のリン酸化が最大となった。また、実施例2のペプチドで処理すると60分の時点でMDM2の発現が消失した。

【0027】

試験例3: p53とRNAポリメラーゼII (POLII) の物理的結合に対するペプチドの効果の評価

本発明による様々なペプチドをそれぞれ使用して細胞を処理した後、p53とRNAポリメラーゼII (POLII) の物理的結合に対する本発明のペプチドの効果を、in situ PLA (近接ライゲーションアッセイ) 法で評価した。24ウェルマイクロプレートの各ウェルに、10% ウシ胎児血清を含むDMEMとともにHaCaT細胞 (ヒトケラチノサイト、CLS) を 4.5×10^4 個/ウェルの密度で加え、5% CO_2 インキュベーターにおいて 37°C で24時間培養した。培地中の各ペプチド濃度が $20 \mu\text{M}$ になるように実施例2の様々なペプチド溶液をそれぞれ添加した後、同じ条件下で1時間インキュベートした。対照群には処理を行わなかった。各ウェルの細胞をPBSで洗浄し、2%ホルムアルデヒドで15分間処理して固定した後、0.1% TritonX-100で5分間処理することにより細胞への抗体の透過性を向上させた。抗p53ポリクローナル抗体 (Abcam、英国) および抗POLIIポリクローナル抗体 (Santa Cruz

10

20

30

40

50

、米国カリフォルニア州)を添加した。in situ PLAキット (Sigma-Aldrich) を使用して、PLAプローブを添加した後、ハイブリダイゼーション工程、ライゲーション工程、増幅工程および封入工程を製造業者のプロトコルに従って行った。p53とPOLIIの物理的相互作用は、共焦点レーザー顕微鏡 (オリンパスfluoview FW1000 ; オリンパス、日本、東京) を用いて各細胞において検出された発光シグナル (PLAシグナル) を測定することによって定量した。この結果を図3に示す。

【0028】

図3に示した結果から、本発明による様々なペプチドのそれぞれで処理した群は、処理を行っていない対照群と比較して、p53とPOLIIの相互作用が有意に増加したことが確認できる。特に、p53とPOLIIの相互作用は、Pep2、Pep3、Pep4、Pep6、Pep7、Pep9またはPep18 (すなわち、配列番号2、配列番号3、配列番号4、配列番号6、配列番号7、配列番号9または配列番号18のペプチド) で処理した群において、対照群よりも顕著に高い増加 (2.5倍以上) が示されたことが確認できる。

10

20

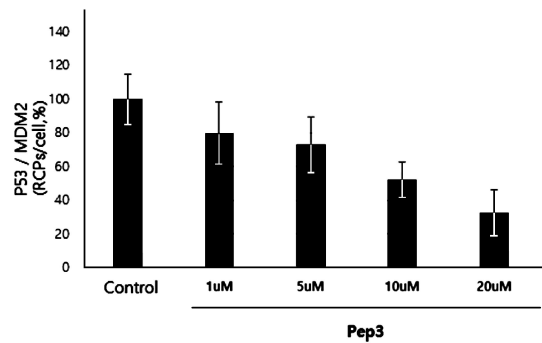
30

40

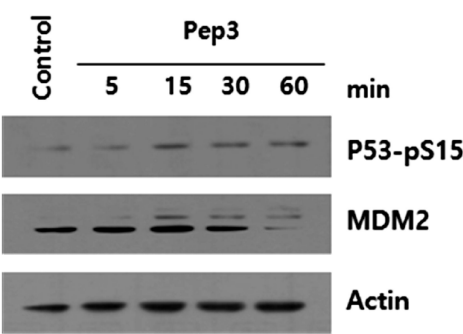
50

【図面】

【図 1】

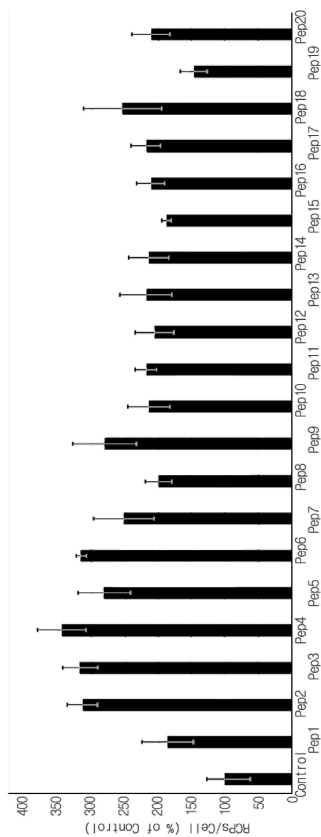


【図 2】



10

【図 3】



20

30

【配列表】

0007641461000001.app

40

50

フロントページの続き

弁理士 酒井 善典
(74)代理人 100171402
弁理士 上田 ▲茂▼
(74)代理人 100213779
弁理士 小川 有佳子
(74)代理人 100077012
弁理士 岩谷 龍
(72)発明者 ハン, チャンヒ
大韓民国 24375 カンウォンード, チュンチョンーシ, ナムチュンチョンセーギル 11 1
04-1401
(72)発明者 キム, ミンソ
大韓民国 24377 カンウォンード, チュンチョンーシ, トウエギェーロ 108 101-1
401
審査官 田中 雅之
(56)参考文献 特開2018-165286 (JP, A)
米国特許出願公開第2009/0143295 (US, A1)
国際公開第2010/105636 (WO, A1)
韓国公開特許第10-2018-0019964 (KR, A)
特表2013-507954 (JP, A)
(58)調査した分野 (Int.Cl., DB名)
A61K 8/00-8/99
A61Q 1/00-90/00
A61K 38/00-38/58
A61K 41/00-45/08
A61K 48/00-51/12
A61K 9/00-9/72
A61K 47/00-47/69
C07K 1/00-19/00