

(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2019-507780

(P2019-507780A)

(43) 公表日 平成31年3月22日 (2019. 3. 22)

(51) Int. Cl.	F I	テーマコード (参考)
<b>A 6 1 K 8/9789 (2017.01)</b>	A 6 1 K 8/9789	4 C 0 8 3
<b>A 6 1 Q 19/00 (2006.01)</b>	A 6 1 Q 19/00	
<b>A 6 1 Q 19/08 (2006.01)</b>	A 6 1 Q 19/08	
<b>A 6 1 K 8/92 (2006.01)</b>	A 6 1 K 8/92	
<b>A 6 1 K 8/37 (2006.01)</b>	A 6 1 K 8/37	

審査請求 未請求 予備審査請求 未請求 (全 52 頁) 最終頁に続く

(21) 出願番号 特願2018-547323 (P2018-547323)  
 (86) (22) 出願日 平成29年3月7日 (2017. 3. 7)  
 (85) 翻訳文提出日 平成30年11月5日 (2018. 11. 5)  
 (86) 国際出願番号 PCT/EP2017/055350  
 (87) 国際公開番号 W02017/153422  
 (87) 国際公開日 平成29年9月14日 (2017. 9. 14)  
 (31) 優先権主張番号 1600394  
 (32) 優先日 平成28年3月8日 (2016. 3. 8)  
 (33) 優先権主張国 フランス (FR)

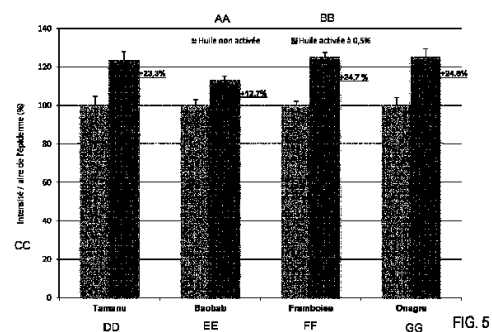
(71) 出願人 517006164  
 アイエスピー・インヴェストメンツ・リミ  
 テッド・ライアビリティ・カンパニー  
 アメリカ合衆国デラウェア州19805,  
 ウィルミントン, センター・ロード 10  
 11, スウィート 315  
 (74) 代理人 100099623  
 弁理士 奥山 尚一  
 (74) 代理人 100107319  
 弁理士 松島 鉄男  
 (74) 代理人 100125380  
 弁理士 中村 綾子  
 (74) 代理人 100142996  
 弁理士 森本 聡二

最終頁に続く

(54) 【発明の名称】 パパイヤ樹液の水不溶性フラクションにより活性化された脂肪および/またはワックス

(57) 【要約】

本発明は、パパイヤリパーゼが富化されたパパイヤ樹液の水不溶性フラクションを得る方法、この方法によって得ることができる水不溶性フラクション、パパイヤ樹液の前記水不溶性フラクションにより活性化脂肪および/または活性化ワックスを調製する方法、この方法により得ることが可能な活性化脂肪および/または活性化ワックス、前記活性化脂肪および/または前記活性化ワックスを一緒にした組成物、ならびにこれらの生成物の美容的使用に関する。



AA Non-activated oil  
 BB 0.5% activated oil  
 CC Intensity/area of the epidermis (%)  
 DD Tamanu  
 EE Baobab  
 FF Raspberry  
 GG Evening primrose

## 【特許請求の範囲】

## 【請求項 1】

パパイリパーゼが富化された、パパイヤ樹液の水不溶性フラクションを得るための方法であって、

a) 蒸留水中に乾燥パパイヤ樹液を、有利には 0.01 ~ 0.5 の間、好ましくは 0.05 ~ 0.25 の間、好ましくは 0.08 ~ 0.2 の間、特に好ましくは 0.1 を含む乾燥粗パパイヤ / 蒸留水の重量比で懸濁させるステップと、

b) ステップ a) において得られた前記懸濁液を、前記パパイヤ樹液の前記水不溶性フラクションを含有するペレットを得るように、有利には 5 分間 ~ 90 分間の間、好ましくは 15 分間 ~ 60 分間の間、好ましくは 20 ~ 40 分間の間を含む時間の間、および 2000 ~ 6000 rpm の間、好ましくは 3000 ~ 5000 rpm の間、好ましくは 4000 rpm を含む回転速度において遠心分離するステップと、

c) パパイリパーゼが富化された前記パパイヤ樹液の前記水不溶性フラクションを含有するペレットを回収するステップと

を含み、

ステップ a) の後かつステップ b) の前に、

a') ステップ a) において得られた前記懸濁液を、15 分間 ~ 240 分間の間を含む時間の間、有利には 30 分間 ~ 180 分間の間、好ましくは 60 分間 ~ 150 分間の間、特に好ましくは 120 分間の時間の間、および 10 ~ 30 の間を含む温度、有利には 15 ~ 25 の間の温度、好ましくは室温において攪拌するステップ、

## 【請求項 2】

ステップ b) の後かつステップ c) の前に、

b') 微粒子粉末が得られるまで前記湿潤ペレットを乾燥するステップ

を含み、パパイリパーゼが富化されたパパイヤ樹液の前記水不溶性フラクションが、微粒子粉末の形態で、ステップ c) において回収される、請求項 1 に記載の方法。

## 【請求項 3】

請求項 1 または 2 に記載の方法により得られた、パパイリパーゼが富化されたパパイヤの水不溶性フラクション。

## 【請求項 4】

脂肪をジアシルグリセロールで富化するため、および / またはワックスを脂肪アルコールで富化するための、請求項 3 に記載の前記水不溶性パパイヤフラクションの使用。

## 【請求項 5】

ジアシルグリセロール富化脂肪の調製方法であって、

i) 脂肪と、カルシウムイオンまたはマグネシウムイオンなどの二価イオンを好ましくは含有する水または生理食塩溶液とを、0.005 ~ 0.5 の間、好ましくは 0.01 ~ 0.4 の間を含む水または生理食塩溶液 / 脂肪の体積比で混合するステップと、

ii) エマルションが前記脂肪と前記水との間に得られるまで、この混合物を、30 ~ 70 の間を含む温度、有利には 50 において、好ましくは 1 ~ 30 分間の間、好ましくは 5 ~ 20 分間の間、および好ましくは 10 分間を含む時間の間、攪拌下に維持するステップと、

iii) 引き続き攪拌下および前記温度において、0.01 ~ 0.2 の間、有利には 0.05 ~ 0.015 の間、好ましくは 0.1 を含む、使用されるパパイヤ樹液の水不溶性フラクション / 脂肪の体積比で、前記ステップにおいて得られた前記混合物に、請求項 3 に記載の前記パパイヤ樹液の所与の体積の前記水不溶性フラクションを接触させるステップと、

iv) 前記ジアシルグリセロール富化脂肪が得られるよう、1 時間 ~ 6 時間の間、有利には 2 時間 ~ 5 時間の間、好ましくは 4 時間を含む時間、前記温度および攪拌を維持するステップと

を含む、方法。

10

20

30

40

50

## 【請求項 6】

ステップ i v) の後に、

v) 前記ジアシルグリセロール富化脂肪を含有する反応媒体から、パバイヤリパーゼが富化されたパバイヤ樹液の前記水不溶性フラクションを分離するよう、少なくとも 1 つの勾配フィルター、または多孔度の低下した少なくとも 2 つのフィルターであり、有利には、約 500 μm ~ 約 250 μm の多孔度の低下した少なくとも 2 つのフィルターを重ね合わせたものを少なくとも 1 つ好ましくは使用して、ステップ i v) において得られた前記混合物をろ過するステップ、を含む、請求項 5 に記載の方法。

## 【請求項 7】

ステップ v) の後、

無水硫酸マグネシウムのような乾燥剤により、前記ジアシルグリセロール富化脂肪を含有する前記反応媒体中に存在する残留水を除去するステップ、ならびに / または活性炭により前記ジアシルグリセロール富化脂肪を脱臭する、および / もしくはそのつやを改善するステップの 2 つのステップのうちの少なくとも 1 つ、有利にはこれらの両方を含む、請求項 6 に記載の方法。

## 【請求項 8】

前記脂肪が、動物、植物および / または海洋起源の油、バージンオイルまたは精製油、有利には、バージンオイルであり、前記油が、好ましくは植物および / または海洋起源、好ましくは植物起源のものである、請求項 5 ~ 7 のいずれか一項に記載の方法。

## 【請求項 9】

前記脂肪が、

12 ~ 26 の間、有利には 16 ~ 20 の間、特に好ましくは 16 ~ 18 の間の炭素数を有する脂肪酸の脂肪族炭化水素鎖であって、線状または分岐状の、有利には線状の飽和または不飽和であり、有利には不飽和であって、1 ~ 6 の間、好ましくは 1 ~ 3 の間の不飽和数を好ましくは有する不飽和である、前記脂肪族炭化水素鎖、または

モノもしくはポリヒドロキシ化、および / またはモノもしくはポリメトキシ化、および / またはモノもしくはポリ酸化、および / またはモノもしくはポリエポキシ化鎖を有するトリグリセリドを含む油である、請求項 5 ~ 8 のいずれか一項に記載の方法。

## 【請求項 10】

前記脂肪が油、好ましくはバージンオイルであり、テリハボクオイル、ラズベリーオイル、ツバキオイル、ツキミソウオイル、ブラジルナッツオイル、バオバブオイルおよびオリブオイル、またはこれらの油のうちの少なくとも 2 つの混合物から選択される油であり、前記油、好ましくはバージンオイルは、テリハボクオイル、ラズベリーオイル、ツバキオイル、ツキミソウオイル、ブラジルナッツオイルおよびバオバブオイルまたはこれらの油のうちの少なくとも 2 つの混合物から有利には選択され、特に好ましくは、前記脂肪は、テリハボクオイル、好ましくはバージンテリハボクオイルである、請求項 5 ~ 9 のいずれか一項に記載の方法。

## 【請求項 11】

前記ジアシルグリセロールが、式 (I) および (II) :

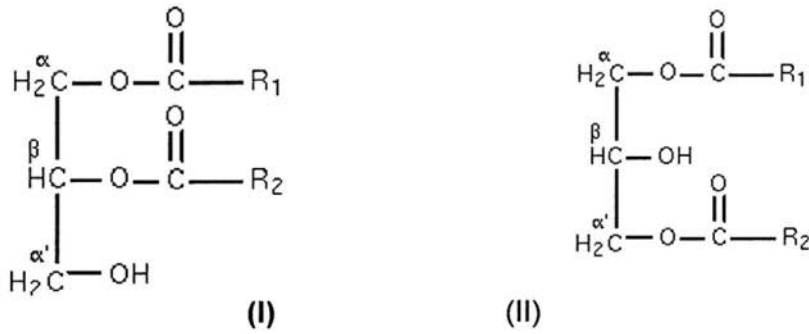
10

20

30

40

## 【化 1】



10

(式中、R 1 および R 2 は、

12 ~ 26 の間、有利には 16 ~ 20 の間、特に好ましくは 16 ~ 18 の間の炭素数を有する脂肪酸の脂肪族炭化水素鎖であって、線状または分岐状の、有利には線状の飽和または不飽和であり、有利には不飽和であって、1 ~ 6 の間、好ましくは 1 ~ 3 の間の不飽和数を好ましくは有する不飽和である、前記脂肪族炭化水素鎖、または

モノもしくはポリヒドロキシル化、および/またはモノもしくはポリメトキシ化、および/またはモノもしくはポリ酸化、および/またはモノもしくはポリエポキシ化鎖である。)

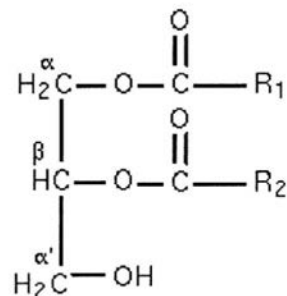
によりそれぞれ表される 1, 2 - ジアシルグリセロールおよび 1, 3 - ジアシルグリセロールからなる、請求項 5 ~ 10 のいずれか一項に記載の方法。

20

## 【請求項 1 2】

前記ジアシルグリセロールが、式 (I) :

## 【化 2】



(I)

30

(式中、R 1 および R 2 は、

12 ~ 26 の間、有利には 16 ~ 20 の間、特に好ましくは 16 ~ 18 の間の炭素数を有する脂肪酸の脂肪族炭化水素鎖であって、線状または分岐状の、有利には線状の飽和または不飽和であり、有利には不飽和であって、1 ~ 6 の間、好ましくは 1 ~ 3 の間の不飽和数を好ましくは有する不飽和である、前記脂肪族炭化水素鎖、または

モノもしくはポリヒドロキシル化、および/またはモノもしくはポリメトキシ化、および/またはモノもしくはポリ酸化、および/またはモノもしくはポリエポキシ化鎖である。)

40

により表される 1, 2 - ジアシルグリセロールを主に含み、好ましくは上記の 1, 2 - ジアシルグリセロールから本質的になる、請求項 5 ~ 11 のいずれか一項に記載の方法。

## 【請求項 1 3】

請求項 5 ~ 7 のいずれか一項に記載の方法を実施することを含む、脂肪アルコール富化ワックスを調製する方法であって、ワックスが脂肪として使用され、ジアシルグリセロール富化脂肪の代わりに、脂肪アルコール富化ワックス、有利には、式 (III) の脂肪アルコール :

(III) R' - OH

50

(式中、R<sup>n</sup>は、

10～34個の炭素原子、好ましくは12～26個の炭素原子、特に好ましくは16～22個の炭素原子を含有する脂肪アルコールの前記脂肪族炭化水素鎖であって、

線状または分岐状の、有利には線状の飽和または不飽和であり、好ましくは最大で6の不飽和数を有している、前記脂肪族炭化水素鎖、または

モノもしくはポリヒドロキシル化、および/またはモノもしくはポリメトキシ化、および/またはモノもしくはポリ酸化、および/またはモノもしくはポリエポキシ化鎖を表す。)

の脂肪アルコール富化ワックスが得られる、方法。

【請求項14】

前記ワックスが、

例えば、ビーワックスなどの動物起源のワックス、

無機物起源のワックス、または好ましくは、

ホホバ、カルナウバ、カンデリラワックスなどの植物起源のワックス、

またはそれらの混合物

から選択され、前記ワックスが、有利にはホホバワックスである、

請求項13に記載の方法。

【請求項15】

請求項5～12のいずれか一項に記載の方法により得られた、ジアシルグリセロール富化脂肪。

【請求項16】

前記脂肪が、5%～30%の間、好ましくは7%～18%の間を含むジアシルグリセロール含有量、15～50mg/gの間の酸性度指標、および5～30mg/gの間、好ましくは20mg/g未満の過酸化指標を有する、請求項15に記載のジアシルグリセロール富化脂肪。

【請求項17】

請求項13または14に記載の方法により得られた、脂肪アルコール富化ワックス。

【請求項18】

請求項15または16に記載の少なくとも1つのジアシルグリセロール富化脂肪と請求項17に記載の少なくとも1つの脂肪アルコール富化ワックスとのブレンドを、有利には、0.01～0.11の間、好ましくは、0.02～0.08の間、好ましくは0.03を含む、脂肪アルコール富化ワックス/ジアシルグリセロール富化脂肪の重量比で含む組成物。

【請求項19】

健常なヒト個体または動物、好ましくはヒトにおいて、

皮膚の老化の外観を遅延させる、もしくはその徴候を制限するため、ならびに/またはすべてのタイプの外部攻撃から、皮膚および/もしくはその付属器官を防御するため、ならびに/または

表皮分化を促進するため、ならびに/または

皮膚および/もしくはその付属器官のバリア機能を強化するための、

皮膚適用による、有効量の請求項15若しくは16に記載の少なくとも1つのジアシルグリセロール富化脂肪、請求項17に記載の少なくとも1つの脂肪アルコール富化ワックス、または請求項19に記載の組成物の美容的使用。

【発明の詳細な説明】

【技術分野】

【0001】

本発明は、化粧品分野に関する。より具体的には、本発明は、皮膚適用/経路により投与可能な活性化脂肪および/または活性化ワックスであって、化粧品において、特に、皮膚老化の外観の遅延もしくは徴候の限定、すべてのタイプの外部攻撃からの皮膚および

10

20

30

40

50

／もしくは外皮の防御、ならびに／または皮膚レベルにおける細胞分化の促進、または皮膚および／もしくは外皮のバリア機能の強化にとって有用な、活性化脂肪および／または活性化ワックスに関する。

【背景技術】

【0002】

皮膚は、センサー機能および防御機能、ならびに複数の外部攻撃に対する免疫機能、代謝機能または体温調節機能などの多機能（バリア機能）をもたらす重要器官である。これらの役割は、3つの個別した重なり合ったコンパートメント、すなわち表皮、真皮および皮下にある構造のおかげで可能になっている。表皮は、皮膚の外側構造を構成する表面上皮であり、その防御機能を確保している。この機能は、上皮細胞の密着性により、および  
10  
フィラメント状のレジスタントプロテイン、ケラチンの生成により確保されている。真皮は、基礎物質からなる結合組織であり、線維芽細胞、コラーゲン繊維およびエラスチン繊維、線維芽細胞により合成されるタンパク質繊維が覆われている。コラーゲン繊維は、真皮の強度の大部分をもたらす、弾力性、とりわけ皮膚および／または粘膜の張りに寄与している。真皮の下に、脂肪組織の層である、皮下が存在する。

【0003】

皮膚は、他のすべての器官と同様に老化する。皮膚老化プロセスに關与する要因は、様々であり、多数存在する。皮膚の時間による老化の現象は、とりわけ、細胞機能の減速、および細胞外マトリックスのある種のタンパク質の構造異常の外観を伴う。皮膚は、柔軟さが減り、薄さが増し、乾燥することが多くなるようになり、しわおよび小じわを伴って  
20  
、その弾力性を失う。

【0004】

表皮では、年齢に伴うケラチノサイト増殖および分化の減速は、老化中における皮膚の菲薄化を説明する要因である。表皮は萎縮し、皮膚はその防御能力を失う。真皮線維芽細胞もまた改変され、コラーゲンまたはエラスチンなどの細胞外マトリックスタンパク質の生成が低下する。

【0005】

紫外線および他の攻撃性の環境因子への慢性的な曝露は、皮膚の老化現象を加速させて、悪化させる。本発明者らは、光老化について述べている。

【0006】

老化プロセスにおける主要な役割を果たす機構の1つは、脂質膜、タンパク質、DNA、およびより具体的にはミトコンドリアDNAにおけるような、必須分子における酸化的損傷の蓄積である。したがって、これらの損傷の蓄積の重要な結果の1つは、細胞がATPを生成する能力の低下である。

【0007】

長年の間、健康および美容の専門家は、皮膚の老化現象と闘う方法、または少なくとも皮膚の老化現象を低減する方法、ならびに外部攻撃および皮膚が毎日受けているストレスに対する皮膚の耐性を向上する方法を探求し続けてきた。

【0008】

化粧品では、油は、天然化粧品の概念の基礎となるものである。天然処理により得られ、合成化学品が添加されていない植物油が、その潤い特性および防御特性のために伝統的に使用されている。  
40

【0009】

特殊な組成のため、化粧品に使用されている大部分の油は、長鎖多価不飽和酸、特にガンマ-リノレン酸から構成され、ガンマ-リノレン酸は、膜の流動性、経表皮水分蒸散量の低下、および皮膚老化の予防において特異な役割を果たしている。実際に、一部の脂肪酸は、皮膚の潤い度を改善または維持する可能性が高い。

【0010】

油は、賦形剤として最も多く使用されており、活性成分としては使用されていない。しかし、本出願人は、生理学的に許容される媒体中に、活性成分として、ある特定のジアシ  
50

ルグリセロール(「DAG」と略す)と特定の脂肪アルコールとの組合せを少なくとも含む、美容目的にとりわけ有用な組成物を以前に開発した。この組成物は、本出願人の名で、参照文献WO2004/093832A2で公開され、特許出願PCT/FR2004/000944に記載され、特許請求されている。

【0011】

ジアシルグリセロール(DAG)は、そのマーカ特性のため、先行技術において具体的に記載されている化合物である。それらは、特に、タンパク質キナーゼCに及ぼす作用による基礎的役割を果たし、こうして、細胞のアクチベーターの機能を有する。

【0012】

特許出願WO2004/093832に開示されている通り、DAGを得るための反応方法は、例えばトリグリセリド脂肪の加水分解など、酸性またはアルカリ性媒体中で実施される化学反応とすることができる。この加水分解はまた、例えば、リパーゼなどのヒドロラーゼを使用する生化学反応などの、酵素により実施され得る。好ましくは、WO2004/093832の組成物中に使用されるDAGは、具体的に、リパーゼによる酵素加水分解を受けたトリグリセリドを含む脂肪(動物、植物または合成油)から得られる。

10

【0013】

リパーゼは、グリセロールエステルを加水分解する酵素である。いくつかのタイプのリパーゼが、その異なる反応速度レベルに従って決定される。これらの酵素はまた、基質に関する、位置特異性または位置選択性、脂肪酸の性質に関する特異性またはタイプ選択性(typo-selectivity)、位置に関する特異性または立体特異性といった、その異なる特異性に従って、いくつかのグループに分類され得る。

20

【0014】

一部のリパーゼは、特定の特異性を有していない。他のものは位置選択的であり、すなわち、例えば、膵臓リパーゼおよび微生物起源のリパーゼであるアスペルギルス(Aspergillus)、リソプス・ミエヘイ(Rhysopus miehei)またはリゾムコール・ミエヘイ(Rhizomucor miehei)は、1,3選択的リパーゼである。位置選択的リパーゼは、脂肪産業および洗剤の両方において一般的に工業的に使用されている。キャンディダ(Candida)リパーゼなどの他のリパーゼは、立体特異性であり、これはsn2タイプの立体特異性を有する。snという命名は、Fisher投影法において表される不斉炭素の立体配置に従い、トリグリセリド骨格のsn1、sn2およびsn3位を決める。

30

【0015】

WO2004/093832において、sn3タイプ(すなわち、これは、トリグリセリドの3位での加水分解を可能にする)の立体特異的リパーゼが、有利に使用される。このようにこのリパーゼは、3位のトリグリセリドを加水分解して、1,2-DAGを優先的に形成する。使用されるリパーゼは、植物起源(パパイア(Carica papaya))または微生物起源(ペニセリウム・シクロピウム(Penicillium cyclopium))のものであることができる。好ましい実施形態によれば、トリグリセリドの加水分解は、WO2004/093832では、パパイアのリパーゼを用いて実施される(Villeneuve et al., JAOCS, 72, 6:753, 1995)。

40

【0016】

しかしながら、特許出願WO2004/093832の教示を実施することにより得られる組成物は、特に、皮膚レベルにおいて満足な美容特性を有するものの、本出願人は、10年を超える間、これらの組成物を調製するための方法を改善するための努力を行い、この方法は、WO2004/093832の実施例1に例示されている。より具体的には、およびこの実施例1に示されている通り、1,2-DAGを得るための酵素加水分解反応は、粗パパイア樹液を用いて可能であるが、水性媒体中での可溶化後のこの樹液の精製調製物を使用して、およびポリオールまたは凍結乾燥保存したものを使用しても可能である。実際に、WO2004/093832の実施例1の目的である調製方法は、実際に行

50

う場合、いくつかの実施上の難題が存在する。実際に、粗パパイヤ樹液の使用に關すると、このことは、粗パパイヤ樹液が目的のリパーゼだけではなく、リパーゼを分解するか、または少なくともその酵素活性に負の影響を及ぼす可能性が高いプロテアーゼ（これらのなかには、パpain、プロテアーゼシステインがある）も含有しているという観点から、特に不利である。

#### 【0017】

このように、W02004/093832の実施例1が、ポリオール（例えば、ソルビトール）中に保存されているか、または凍結乾燥された水性媒体中での可溶化後のこの樹液の精製調製物の使用を支持していることは理にかなっている。後者の可能性に關すると、凍結乾燥物にはいくつかの欠点があり、欠点のなかには、大気水分に対し極めて感受性が高いこと、およびその製造方法が複雑（および、したがって高価）であることが含まれることが、当業者に知られている。

10

#### 【0018】

ポリオール（ソルビトールなど）中の水性媒体および保存剤（*preservation*）に可溶化した後のパパイヤ樹液の精製調製物を使用する技術的解決策に關すると、この技法は、トリグリセリドの部分加水分解後に複雑な処理を必要とする特有の欠点を有することが判明している。実際に、トリグリセリドの部分加水分解反応を停止するために、ポリオール中で、とりわけ有機溶媒を使用して保存されたパパイヤリパーゼを含有する水性媒体のいくつかの洗浄工程を行う必要がある。

20

#### 【0019】

また、本出願人は、水性媒体中に可溶化し、かつポリオール中で保存されたパパイヤリパーゼが凍結を受けて、その結果、凍結形態でほとんど保存され得ない、またはまったく保存され得ないことさえある一方、このことが、経時的なパパイヤリパーゼの良好な品質、便利かつ安価な保存を確実にするという観点から、著しく望ましいと思われることを発見した。

#### 【発明の概要】

#### 【0020】

本研究により、本出願人は、上述の欠点のすべてまたは一部を克服するための、現実的な技術プラットフォームを開発した。この技術プラットフォームは、パパイヤ樹液の水不溶性（水に可溶ではない）フラクションを得て、これを使用することに主に基づくものである。よって、本発明の目的は、パパイヤリパーゼが富化された、パパイヤ樹液の水不溶性フラクションを得るための方法であって、

30

a) 蒸留水中に乾燥粗パパイヤ樹液を、有利には、約0.01~約0.5の間（好ましくは、0.01~0.5の間）、好ましくは、約0.05~約0.25の間（好ましくは、0.05~0.25の間）、好ましくは、約0.08~約0.2の間（好ましくは、0.08~0.2の間）、特に好ましくは、約0.1（好ましくは、0.1）を含む、乾燥粗パパイヤ/蒸留水の重量比で、懸濁させるステップ、

b) ステップa)において得られた懸濁液を、パパイヤ樹液の前記水不溶性フラクションを含有するペレットを得るように、有利には、約5分間~約90分間の間（好ましくは、5分間~90分間の間）、好ましくは、約15~約60分間の間（好ましくは、15分間~60分間の間）、好ましくは、約20~約40分間の間（好ましくは、20~40分間の間）を含む時間、および有利には、約2000~約6000rpmの間（好ましくは、2000~6000rpmの間）、好ましくは約3000~約5000rpmの間（好ましくは、3000~5000rpmの間）、好ましくは、約4000rpm（好ましくは、4000rpm）を含む回転速度において遠心分離するステップ、

40

c) パパイヤリパーゼが富化されたパパイヤ樹液の前記水不溶性フラクションを含有するペレットを回収するステップを含む、方法である。

#### 【0021】

特に有利な実施形態では、前記方法は、ステップa)の後であってステップb)の前に

50

、  
 a') ステップ a) )において得られた懸濁液を、約 15 分間～約 240 分間の間（好ましくは、15 分間～240 分間の間）を含む時間の間、有利には、約 30 分間～約 180 分間の間（好ましくは、30 分間～180 分間の間）、好ましくは、約 60 分間～約 150 分間の間（好ましくは、60 分間～150 分間の間）、特に好ましくは、約 120 分間（好ましくは、120 分間）の時間の間、および約 10 ～約 30 の間（好ましくは、10 ～30 の間）を含む温度、および約 15 ～約 25 の間（好ましくは、15 ～25 の間）の温度、好ましくは室温において攪拌するステップを含む。

【0022】

室温とは、約 20 ～約 25 の間を含む温度、（好ましくは 20 ～25 の間）、有利には、約 20 （好ましくは、20 ）の温度を意味する。

【0023】

好ましくは、前記方法は、ステップ b) )の後であってステップ c) )の前に、  
 b') 微粒子粉末が得られるまで湿潤ペレットを乾燥するステップ  
 を含み、パパイリパーゼが富化されたパパイヤ樹液の水不溶性フラクションが、微粒子粉末の形態で、ステップ c) )において回収される。

【0024】

本発明の別の目的は、上述の方法によって得ることができる、パパイリパーゼが富化されたパパイヤ樹液の水不溶性フラクションに関する。

【0025】

本発明はまた、上記の方法によって直接得られた、パパイリパーゼが富化されたパパイヤ樹液の水不溶性フラクションに関する。

【0026】

特に有利には、本出願人は、パパイリパーゼが富化されたパパイヤ樹液のこの水不溶性フラクションが、凍結により簡単に保存され得ることを発見した。さらに、パパイリパーゼ富化パパイヤ樹液のこの水不溶性フラクションを得るための方法は、実施がかなり簡単であり、安価である。

【0027】

本発明はまた、脂肪をジアシルグリセロールで富化する（すなわち、活性化脂肪を得る）ため、および/またはワックスを脂肪アルコールで富化する（すなわち、活性化ワックスを得る）ための、本発明に係るパパイヤ樹液の水不溶性フラクションの使用に関する。

【0028】

本発明の別の目的は、ジアシルグリセロール富化脂肪（活性化脂肪）を調製する方法であって、

i) 脂肪と、カルシウムイオンまたはマグネシウムイオンなどの二価イオンを好ましくは含有する水または生理食塩溶液とを、約 0.005～約 0.5 の間（好ましくは、0.005～0.5 の間）、好ましくは、約 0.01～約 0.4 の間（好ましくは、0.01～0.4 の間）を含む水または生理食塩溶液/脂肪の体積比で混合するステップ、

ii) 攪拌下（好ましくは、激しい攪拌、好ましくは、約 2000～約 3000 rpm（好ましくは、2000～3000 rpm）の速度であって、前記激しい攪拌は、エマルションを促進する装置により有利に得られる）に、約 30 ～約 70 の間（好ましくは、30 ～70 の間）、有利には、約 50 （好ましくは、50 ）の温度において、好ましくは約 1～約 30 分間の間（好ましくは、1～30 分間の間）、好ましくは約 5～約 20 分間の間（好ましくは、5～20 分間の間）、および好ましくは約 10 分間（好ましくは、10 分間）を含む時間の間、エマルションが脂肪と水との間に得られるまで、この混合物を維持するステップ、

iii) 引き続き攪拌下（好ましくは、中程度の攪拌、好ましくは約 200～約 300 rpm [好ましくは 200～300 rpm] の速度）で、前記温度において、約 0.01～約 0.2 の間（好ましくは、0.01～0.2 の間）、有利には約 0.05～0.01

10

20

30

40

50

5の間(好ましくは、0.05~0.015の間)、好ましくは約0.1(好ましくは、0.1)を含む、使用されるパイヤ樹液の水不溶性フラクション/脂肪の体積比で、前のステップで得られた混合物に、上述のパイヤ樹液の水不溶性フラクションを得るための方法を実施することにより得られるパイヤリパーゼが富化されたパイヤ樹液の所与の体積の水不溶性フラクションを接触させる、ステップ、

i v) ジアシルグリセロール富化脂肪が得られるよう、約1時間~約6時間(好ましくは、1時間~6時間)、有利には約2時間~約5時間(好ましくは、2時間~5時間)、好ましくは約4時間(好ましくは4時間)の時間、前記温度および攪拌を維持するステップを含む方法に関する。

10

#### 【0029】

特に好ましい一実施形態では、ジアシルグリセロール富化脂肪(活性化脂肪)を調製するためのこの方法は、ステップi v)の後、

v) ジアシルグリセロール富化脂肪を含有する反応媒体から、パイヤリパーゼが富化されたパイヤ樹液の前記水不溶性フラクションを分離するよう、少なくとも1つの勾配フィルター、または多孔度の低下した少なくとも2つのフィルターであって、有利には、約500 $\mu$ m~約250 $\mu$ m(好ましくは、500 $\mu$ m~250 $\mu$ m)の多孔度の低下した少なくとも2つのフィルターを重ね合わせたものを少なくとも1つ好ましくは使用して、ステップi v)において得られた混合物をろ過するステップを含む。

20

#### 【0030】

好ましくは、前記方法は、ステップv)の後、

- 無水硫酸マグネシウムなどの乾燥剤により、ジアシルグリセロール富化脂肪を含有する反応媒体中に存在する残留水を除去するステップ、ならびに/または
- 活性炭によりジアシルグリセロール富化脂肪を脱臭する、および/もしくはそのつやを改善するステップ

の2つのステップのうちの少なくとも1つ、有利にはそれらの両方を含む。

#### 【0031】

このろ過ステップv)により、ポリオール中に保存されているリパーゼを含有する、水性媒体による複数の洗浄ステップ(WO2004/093832の実施例1の方法の場合と同様)を必要とすることなく、脂肪中に含有しているトリグリセリドの部分加水分解反応を容易に停止させること、および有機溶媒の使用を回避することが可能になる。このろ過ステップv)に続いて、パイヤ樹液の水不溶性フラクションは、容易に回収されて、再利用することができる。

30

#### 【0032】

一般に、前述の生成方法によって得られるパイヤ樹液の水不溶性フラクションを使用することができるという事実により、部分加水分解後の脂肪の取り扱いが比較的容易となる。さらに、本出願人は、パイヤリパーゼ富化パイヤ樹液の水不溶性フラクションの使用により、有利な美容特性を有する不飽和脂肪酸が保存されることを発見した。

#### 【0033】

特定の実施形態によれば、ステップv)においてろ過された、パイヤリパーゼが富化されているパイヤ樹液の水不溶性フラクションは、本発明に係る、ジアシルグリセロール富化脂肪を調製する方法のステップi i i)において再利用される。

40

#### 【0034】

好ましくは、前記脂肪は、動物、植物および/または海洋起源の油、バージンオイルまたは精製油、有利には、バージンオイルであり、前記油は、好ましくは植物および/または海洋起源、好ましくは植物起源のものである。

#### 【0035】

パイヤ樹液の水不溶性フラクションを使用すると、バージンオイルと共に「働く」こと、すなわち、ジアシルグリセロールを含むバージンオイルを富化する(活性化する)こ

50

とが可能になり、このことは、特に、安全性および無毒性の理由のため（油などの精製に関連する有機溶媒の非存在）、特に望ましいことに留意することが、特に重要である。さらに、本発明に係る、ジアシルグリセロール富化脂肪を調製する方法は、バージンオイルのケン化不可フラクションが、前記方法により悪化しない限り、バージンオイルの富化に特に好適であり、使用される酸素活性は、トリアシルグリセロールエステルタイプである。これにより、ジアシルグリセロールによる富化方法の後に、バージンオイルの生物活性を保存することが可能である。この生物活性は、前記方法によってさらに改善される。

【0036】

好ましくは、前記脂肪は、

- 12 ~ 26の間、有利には16 ~ 20の間、特に好ましくは16 ~ 18の間の炭素数を有する脂肪酸の脂肪族炭化水素鎖であって、線状または分岐状の、有利には線状の飽和または不飽和であり、有利には不飽和であって、1 ~ 6の間、好ましくは1 ~ 3の間の不飽和数を好ましくは有する不飽和である、前記脂肪族炭化水素鎖、または

- モノもしくはポリヒドロキシル化、および/またはモノもしくはポリメトキシ化、および/またはモノもしくはポリ酸化、および/またはモノもしくはポリエポキシ化鎖を有するトリグリセリドを含む油である。

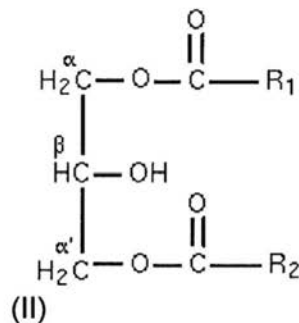
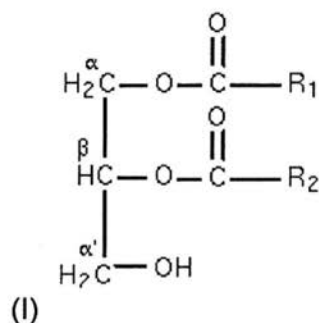
【0037】

本発明の特に好ましい実施形態によれば、油、好ましくはバージンオイルは、脂肪として使用され、テリハボク (*calophyllum inophyllum*) オイル、ラズベリーオイル、ツバキオイル、ツキミソウオイル、ブラジルナッツオイル、バオバブオイルおよびオリーブオイル、またはこれらのオイルのうちの少なくとも2つの混合物から選択され、前記油、好ましくはバージンオイルは、テリハボクオイル、ラズベリーオイル、ツバキオイル、ツキミソウオイル、ブラジルナッツオイルおよびバオバブオイル、またはこれらの油のうちの少なくとも2つの混合物から有利には選択され、前記油、好ましくはバージンオイルは、テリハボクオイル、ラズベリーオイル、ツキミソウオイルおよびバオバブオイル、またはこれらの油のうちの少なくとも2つの混合物から好ましくは選択され、特に好ましくは、前記脂肪は、テリハボクオイル、好ましくはバージンテリハボクオイルである。

【0038】

上記のジアシルグリセロールは、式 (I) および (II) :

【化1】



(式中、R1およびR2は、

- 12 ~ 26の間、有利には16 ~ 20の間、特に好ましくは16 ~ 18の間の炭素数を有する脂肪酸の脂肪族炭化水素鎖（言い換えると、R1およびR2は、その炭素数が11 ~ 25の間、有利には15 ~ 19の間、特に好ましくは、15 ~ 17の間である、脂肪族炭化水素鎖を表す）であって、線状または分岐状の、有利には線状の飽和または不飽和であり、有利には不飽和であって、1 ~ 6の間、好ましくは1 ~ 3の間の不飽和数を好ましくは有する不飽和である、前記脂肪族炭化水素鎖、または

- モノもしくはポリヒドロキシル化、および/またはモノもしくはポリメトキシ化、

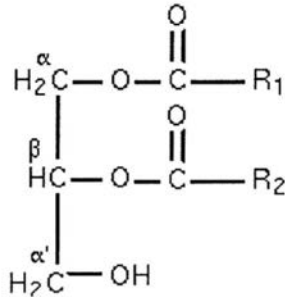
および/またはモノもしくはポリ酸化、および/またはモノもしくはポリエポキシ化鎖である)

によりそれぞれ表される 1, 2 - ジアシルグリセロールおよび 1, 3 - ジアシルグリセロールからなる。

【0039】

好ましくは、前記ジアシルグリセロールは、式(I)

【化2】



10

(I)

(式中、R1およびR2は、

20

- 12~26の間、有利には16~20の間、特に好ましくは16~18の間の炭素数を有する脂肪酸の脂肪族炭化水素鎖(言い換えると、R1およびR2は、その炭素数が11~25の間、有利には15~19の間、特に好ましくは、15~17の間である、脂肪族炭化水素鎖を表す)であって、線状または分岐状の、有利には線状の飽和または不飽和であり、有利には不飽和であって、1~6の間、好ましくは1~3の間の不飽和数を好ましくは有する不飽和である、前記脂肪族炭化水素鎖、または

- モノもしくはポリヒドロキシル化、および/またはモノもしくはポリメトキシ化、および/またはモノもしくはポリ酸化、および/またはモノもしくはポリエポキシ化鎖である)

により表される、1, 2 - ジアシルグリセロールを主に含み、好ましくは1, 2 - ジアシルグリセロールから本質的になる。

30

【0040】

本発明はまた、

- ワックスは、脂肪として使用される、および

- ジアシルグリセロール富化脂肪の代わりに、脂肪アルコール富化ワックス、有利には、式(III)の脂肪アルコール

(III) R''-OH

(式中、R''は、

- 10~34個の炭素原子、好ましくは12~26個の炭素原子、特に好ましくは16~22個の炭素原子を含有する脂肪アルコールの脂肪族炭化水素鎖であって、線状または分岐状の、有利には線状の飽和または不飽和であり、好ましくは最大で6の不飽和数を有している、前記脂肪族炭化水素鎖、または

40

- モノもしくはポリヒドロキシル化、および/またはモノもしくはポリメトキシ化、および/またはモノもしくはポリ酸化、および/またはモノもしくはポリエポキシ化鎖を表す)を得る、

という適用を行うことにより、脂肪アルコール富化ワックス(活性化ワックス)を調製する方法、上記のジアシルグリセロール富化脂肪を調製する方法を実施する方法に関する。

【0041】

言い換えると、本発明は、脂肪アルコール富化ワックス(活性化ワックス)を調製する方法であって、

50

i') ワックスと、カルシウムイオンまたはマグネシウムイオンなどの二価イオンを好ましくは含有する水または生理食塩溶液とを、約0.005～約0.5の間(好ましくは、0.005～0.5の間)、好ましくは、約0.01～約0.4の間(好ましくは、0.01～0.4の間)を含む水または生理食塩溶液/ワックスの体積比で混合するステップ、

ii') 約30～約70の間(好ましくは、30～70の間)を含む温度、有利には、約50(好ましくは、50)において、好ましくは有利には、約1～30分間(好ましくは、1～30分間)、好ましくは約5～約20分間の間(好ましくは、5～20分間の間)、好ましくは約10分間(好ましくは、10分間)を含む時間の間、エマルジョンが、ワックスと水との間に得られるまで、この混合物を攪拌下に維持するステップ、

iii') 引き続き攪拌下で前記温度において、約0.01～約0.2(好ましくは、0.01～0.2の間)、有利には約0.05～0.015の間(好ましくは、0.05～0.015の間)、好ましくは、約0.1(好ましくは、0.1)の、使用されるパイア樹液の水不溶性フラクション/ワックスの体積比で、前のステップにおいて得られた混合物に、前述のパイア樹液の水不溶性フラクションを得るための方法を行うことにより得られるパイアリパーゼが富化されたパイア樹液の、所与の体積の水不溶性フラクションを接触させるステップ、

iv') 脂肪アルコール中に富化したワックスが得られるよう、約1時間～約6時間の間(好ましくは、1時間～6時間の間)、有利には約2時間～約5時間の間(好ましくは、2時間～5時間の間)、好ましくは約4時間(好ましくは4時間)を含む時間、前記温度および攪拌を維持するステップを含む方法に関する。

#### 【0042】

好ましくは、この方法は、ステップiv')の後、

v') 脂肪アルコール富化ワックスを含有する反応媒体から、カリカ属(Carica)のリパーゼが富化されたパイア樹液の前記水不溶性フラクションを分離するよう、少なくとも1つの勾配フィルター、または多孔度の低下した少なくとも2つのフィルターであって、有利には、約500 $\mu$ m～約250 $\mu$ m(好ましくは、500 $\mu$ m～250 $\mu$ m)の多孔度の低下した少なくとも2つのフィルターを重ね合わせたものを少なくとも1つ好ましくは使用して、ステップiv')において得られた混合物をろ過するステップを含む。

#### 【0043】

好ましくは、前記方法は、ステップv')の後、

- 無水硫酸マグネシウムのような乾燥剤により、脂肪アルコール富化ワックスを含有する反応媒体中に存在する残留水を除去するステップ、ならびに/または
- 活性炭により脂肪アルコール富化ワックスを脱臭する、および/もしくはそのつやを改善するステップ

の2つのステップのうちの少なくとも1つ、有利にはそれらの両方を含む。

#### 【0044】

本発明の目的のために、ワックスは、

- 例えば、ビーワックスなどの動物起源のワックス、
- 無機物起源のワックス、または好ましくは、
- ホホバワックス、カルナウバワックス、カンデリラワックスまたはそれらの混合物などの、植物起源のワックス

から好ましくは選択され、

前記ワックスは、有利にはホホバワックスである。

#### 【0045】

特に重要な実施形態では、本発明はまた、本発明に係るジアシルグリセロール富化脂肪を調製する方法によって得ることができる、ジアシルグリセロール富化脂肪を、目的のた

10

20

30

40

50

め有する（上記を参照されたい）。当然ながら、本発明はまた、本発明に係るジアシルグリセロール富化脂肪を調製する方法によって直接得られる、ジアシルグリセロール富化脂肪に関する（上記を参照されたい）。

【0046】

好ましい実施形態によれば、前記脂肪は、約5%～約30%の間（好ましくは、5%～30%の間）、好ましくは約7%～約18%の間（好ましくは、7%～30%の間）を含むジアシルグリセロール含有量、約15～約50mg/g（好ましくは、15～50mg/g）の酸指数、および約5～30mg/g（好ましくは、5～30mg/g）、好ましくは、20mg/g未満の過酸化指標を有する。

【0047】

このジアシルグリセロール富化脂肪は、「活性化脂肪」とも呼ばれる。

【0048】

上記した通り、このジアシルグリセロール富化脂肪（活性化したもの）は、動物、植物および/または海洋起源の油、バージンオイルまたは精製油、有利にはバージンオイルであり、前記油は、好ましくは、植物および/または海洋起源、好ましくは植物起源のものである。

【0049】

特に好ましい実施形態では、このジアシルグリセロール富化脂肪（活性化したもの）は、テリハボクオイル、ラズベリーオイル、ツバキオイル、ツキミソウオイル、ブラジルナッツオイル、パオパブオイルおよびオリブオイル、またはこれらの油のうち少なくとも2つの混合物から選択される油、好ましくはバージンオイルであり、前記油、好ましくはバージンオイルは、テリハボクオイル、ラズベリーオイル、ツバキオイル、ツキミソウオイル、ブラジルナッツオイルおよびパオパブオイル、またはこれらの油のうち少なくとも2つの混合物から有利には選択され、特に好ましくは、前記脂肪は、テリハボクオイル、好ましくはバージンテリハボクオイルである。実際に、本出願人は、これら（好ましくは、バージンオイル）のジアシルグリセロール富化油、好ましくは、1, 2ジアシルグリセロールが、皮膚適用により投与されると、特に有利な美容特性を有することを発見した。これが、本発明が、活性化油を生成するために使用されるジアシルグリセロールを富化するための方法から独立して、上で定義したジアシルグリセロール富化油（活性化油）、有利には1, 2ジアシルグリセロールに一層、幅広く適用される理由である。

【0050】

本発明の別の目的は、上記の脂肪アルコール富化ワックスを調製するための方法により得ることが可能な、脂肪アルコール富化ワックス（活性化ワックス）に関する。当然ながら、本発明はまた、上記の脂肪アルコール富化ワックスを調製するための方法により直接得られる、脂肪アルコール富化ワックス（活性化ワックス）に関する。

【0051】

本発明はまた、別の目的のため、

組成物の総重量の $10^{-6}\%$ ～20%を表す量、好ましくは、最終組成物の総重量の、 $10^{-4}\%$ ～10%を表す量、好ましくは、 $10^{-3}\%$ ～2%を表す量、好ましくは0.01%～5%、さらにより優先的には、0.5～2.5%を表す量の、上記の少なくとも1つのジアシルグリセロール富化脂肪、および

- 少なくとも1つの生理学的に許容される賦形剤

を含む、これらから本質的になる、またはこれらからなる、化粧品組成物を有する。

【0052】

本発明はまた、別の目的のため、

組成物の総重量の $10^{-6}\%$ ～10%を表す量、好ましくは、最終組成物の総重量の、 $10^{-4}\%$ ～1%、好ましくは、0.01%～3%、さらにより好ましくは、0.1～2.0%を表す量の、上記の少なくとも1つの脂肪アルコール富化ワックス、および

- 少なくとも1つの生理学的に許容される賦形剤

を含む、これらから本質的になる、またはこれらからなる、化粧品組成物を有する。

10

20

30

40

50

## 【0053】

特に重要な実施形態では、本発明はまた、別の目的のため、上記の少なくとも1つのジアシルグリセロール富化脂肪と上記の少なくとも1つの脂肪アルコール富化ワックスとの混合物を含む、これらから本質的になる、またはこれらからなる化粧用組成物を、有利には0.01~0.11の間、好ましくは、0.02~0.08の間、好ましくは約0.03（好ましくは、0.03）を含む脂肪アルコール富化ワックス/ジアシルグリセロール富化脂肪の重量比で有する。

## 【0054】

本発明はまた、別の目的のため、

- 有利には、0.01~0.11の間、好ましくは、0.02~0.08の間、好ましくは、約0.03（好ましくは、0.03）を含む、脂肪アルコール富化ワックス/ジアシルグリセロール富化脂肪の重量比の、少なくとも1つの上記のジアシルグリセロール富化脂肪と少なくとも1つの上記の脂肪アルコール富化ワックスとの混合物、および

- 少なくとも1つの生理学的に許容される賦形剤

を含む、これらから本質的になる、またはこれらからなる、化粧用組成物を有する。

10

## 【0055】

本発明はまた、別の目的のため、

組成物の総重量の $10^{-6}\%$ ~20%を表す量、好ましくは、最終組成物の総重量の、 $10^{-4}\%$ ~10%、好ましくは、0.01%~5%、さらにより優先的には0.5~2.5%を表す量の、少なくとも1つの上記のジアシルグリセロール富化脂肪と少なくとも1つの上記の脂肪アルコール富化ワックスとの混合物、および

- 少なくとも1つの生理学的に許容される賦形剤

を含む、これらから本質的になる、またはこれらからなる、化粧用組成物を有する。

20

## 【0056】

本発明に係る組成物は、任意の適切な経路によって、特に、経口または外部局所によって適用され得、本組成物の製剤は、当業者により適合される。

## 【0057】

好ましくは、本発明に係る組成物は、局所適用に好適な形態である。したがって、これらの組成物は、生理学的に許容される媒体、すなわち、その適用中に不快になるリスクを伴わないで皮膚およびその付属器官と適合可能で、かつすべての好適な化粧品形態を網羅する媒体を含有する。

30

## 【0058】

局所適用によって、皮膚または粘膜の表面上に、本発明に係る組成物を適用すること、または広げることが意図されている。

## 【0059】

本発明の文脈では、生理学的に許容される賦形剤は、皮膚またはその付属器官の外側層に接触するのに好適なビヒクル、すなわち、毒性を示さず、かつ刺激、過度のアレルギー反応または不耐容反応を引き起こさないビヒクルを表す。生理学的に許容される賦形剤は、1つまたは複数の化合物を含んでもよい。

## 【0060】

適用の意図される分野において一般に使用される生理学的に許容される賦形剤として、例えば、溶媒、増粘剤、希釈剤、抗酸化剤、色素、日焼け防止剤、セルフタンニング剤（self-tanning agent）、顔料、充填剤、保存剤、香料、臭気吸収剤、エッセンシャルオイル、ビタミン、必須脂肪酸、界面活性剤、フィルム形成性ポリマーなどの、製剤化に必要な補助剤を言及することができる。

40

## 【0061】

すべての場合において、当業者は、これらの補助剤およびその割合が、本発明に係る組成物の望ましい有利な特性を害することのないよう選択されるようにするであろう。

## 【0062】

生理学的に許容される賦形剤は、1つまたは複数の化合物を含んでもよい。

50

## 【0063】

本発明を実施するための組成物は、とりわけ、水中油型エマルジョン、油中水型または多層エマルジョンからなる、水溶液、水性アルコール溶液または油性溶液の形態にあってもよく、それらはまた、皮膚、粘膜、唇および/または毛髪に適用するのに好適な、懸濁液の形態にあってもよく、または粉末の形態にさえあってもよい。

## 【0064】

これらの組成物は、多少なりとも流体であってもよく、クリーム剤、ローション剤、ミルク、セラム、軟膏剤、ゲル剤、ペースト剤または発泡剤の外観を有することもできる。それらはまた、スティックとして固体の形態とすることができるか、またはエアゾールの形態で、皮膚に適用することができる。

10

## 【0065】

適用の意図される分野において一般に使用される生理学的に許容される賦形剤として、例えば、溶媒、増粘剤、希釈剤、抗酸化剤、色素、日焼け防止剤、セルフトanning剤、顔料、充填剤、保存剤、香料、臭気吸収剤、エッセンシャルオイル、ビタミン、必須脂肪酸、界面活性剤、フィルム形成性ポリマーなどの、製剤化に必要な補助剤を言及することができる。

## 【0066】

すべての場合において、当業者は、これらの補助剤およびその割合が、本発明に係る組成物の望ましい有利な特性を害することのないよう選択されるようにするであろう。これらの補助剤は、例えば、組成物の総重量の0.01~20%に相当することができる。本発明に係る組成物がエマルジョンである場合、脂肪相は、組成物の総重量に対して、5~80重量%、好ましくは5~50重量%とすることができる。本組成物において使用される乳化剤および共乳化剤は、熟慮の元、本分野において従来的に使用されるものから選択される。例えば、それらは、組成物の総重量に対して、0.3~30重量%の範囲の割合で使用することができる。

20

## 【0067】

本発明の別の有利な実施形態によれば、本発明に係る活性成分は、化粧品分野において使用されるリポソームまたは任意の他のナノカプセルもしくはマイクロカプセルなどの、化粧用ベクター中にカプセル封入され得るか、もしくは含まれ得る、または粉末有機ポリマー、タルクおよびベントナイトのような無機支持体に吸着され得る。

30

## 【0068】

有利には、本発明に係る組成物は、本発明に係る活性成分に加えて、本発明のものと類似および/または相補性の美容作用を有する、少なくとも1つの他の活性成分を含むことができる。本発明によれば、この活性成分は、「追加の活性成分」として定義される。

## 【0069】

例えば、追加の活性成分は、暖かい印象、ならびに生き生きしたおよびほっそりした印象をもたらす、抗老化剤、引き締め剤、美白剤、保湿剤、排出剤(drainage)、微小循環促進剤、医薬剤、スクラブ剤、剥離剤、細胞外マトリックスを刺激するもの、エネルギー代謝活性化剤、抗細菌剤、抗真菌剤、鎮静剤、抗遊離ラジカル剤、抗UV剤、抗にきび剤、抗炎症剤、麻酔剤から選択することができる。

40

## 【0070】

そのような追加剤は、

- ビタミンA、ならびに特にレチノイン酸、レチノール、プロピオン酸レチノールおよびパルミチン酸レチノール、
- ビタミンB3、より具体的にはナイアシンアミド、ニコチン酸トコフェロール、
- ビタミンB5、ビタミンB6、ビタミンB12、パンテノール、
- ビタミンC、特にアスコルビン酸、アスコルビルグルコシド、テトラパルミチン酸アスコルビル、アスコルビルリン酸マグネシウムおよびアスコルビルリン酸ナトリウム、
- ビタミンE、F、H、K、PP、コエンザイムQ10、
- メタロプロテイナーゼ阻害剤、またはTIMPのアクチベーター、

50

- D H E A、その前駆体および誘導体、
- アルギニン、オルニチン、ヒドロキシプロリン、ジバルミチン酸ヒドロキシプロリン、パルミトイルグリシン、ヒドロキシリシン、メチオニンおよびその誘導体、N - アシルアミノ酸化合物などのアミノ酸、
- ジペプチド、トリペプチド、テトラペプチド、ペントペプチドおよびヘキサペプチド、ならびにそれらの脂溶性誘導体、異性体、ならびに金属イオン（例えば、銅、亜鉛、マンガン、マグネシウムなど）などの他の化学種と錯体形成したものを含めた、天然または合成ペプチド（例として、M A T R I X Y L（登録商標）、A R G I R E L I N E（登録商標）、C H R O N O G E N（商標）、L A M I N I X Y L I S（商標）、P E P T I D E Q 1 0（商標）、C O L L A X Y L（商標）（特許FR 2 8 2 7 1 7 0、A S H L A N D（登録商標））、P E P T I D E V I N C I 0 1（商標）（特許FR 2 8 3 7 0 9 8、A S H L A N D（登録商標））、P E P T I D E V I N C I 0 2（商標）（特許FR 2 8 4 1 7 8 1、A S H L A N D（登録商標））、A T P e p t i d e（商標）（特許FR 2 8 4 6 8 8 3、A S H L A N D（登録商標））という名称で知られている市販のペプチド、またはA S H L A N D（登録商標）による名称A T P e p t i d e（商標）で上市されている合成ペプチド配列のA r g - G l y - S e r - N H 2を言及することができる）、
- G P 4 G（商標）（FR 2 8 1 7 7 4 8、A S H L A N D（登録商標））という名称で上市されているアルテミア・サリナ（A r t e m i a s a l i n a）抽出物、
- アマニ抽出物（L i p i g e n i n e（商標）、特許FR 2 9 5 6 8 1 8、A S H L A N D（登録商標））、ダイズ、スペルトコムギ、ブドウのつる、なたね、アサ、コメ、トウモロコシおよびエンドウ抽出物などの植物ペプチド抽出物、
- 酵母抽出物、例えばD y n a g e n（商標）（特許FR 2 9 5 1 9 4 6、A S H L A N D（登録商標））またはA c t o p o n t i n e（商標）（特許FR 2 9 4 4 5 2 6、A S H L A N D（登録商標））、
- デヒドロ酢酸（D H A）、
- 合成または天然起源のフィトステロール、
- サリチル酸およびその誘導体、アルファおよびベータ - ヒドロキシ酸、シラノール、
- アミノ糖、グルコサミン、D - グルコサミン、N - アセチルグルコサミン、N - アセチル - D - グルコサミン、マンノサミン、N - アセチルマンノサミン、ガラクトサミン、N - アセチルガラクトサミン、
- ブドウ抽出物、マツ抽出物、オリーブ抽出物などのポリフェノール抽出物、イソフラボン、フラボノイド、
- セラミドもしくはリン脂質などの脂質、スクアレンもしくはスクワランなどの動物起源の油、スイートアーモンド、ココナッツ、トウゴマ、ホホバ、オリーブ、なたね、ピーナッツ、ヒマワリ、コムギ胚芽、トウモロコシ胚芽、ダイズ、ワタ、アルファルファ、ケシ、カボチャ、ツキミソウ、キビ、オオムギ、ライムギ、ベニバナ、パッションフラワー、ヘーゼルナッツ、パーム、アプリコットカーネル、アボカド、キンセンカなどの植物油、エトキシ化植物油およびシアバター、
- すべてのUVスクリーン剤および日焼け防止剤、
- 環式AMPおよびその誘導体、アデニル酸シクラーゼ酵素およびホスホジエステラーゼ酵素阻害剤の活性化剤、ツボクサ抽出物、アシアチコシドおよびアシアチン酸、メチルキサンチン、テイン、カフェインおよびその誘導体、テオフィリン、テオブロミン、フォルスコリン、エスクリンおよびエスクロシド、ACE阻害剤、Val - Trpペプチド、ニューロペプチドY阻害剤、エンケファリン、イチョウ（g i n g k o b i l o b a）の抽出物、ヤマノイモ（d i o s c o r e a）抽出物、ルチン、マテ茶抽出物、ガラナ抽出物、オリゴ糖、多糖類、カルニチン、セイヨウキズタ抽出物、ヒバマタ（f u c u s）抽出物、加水分解したウツボグサ（P r u n e l l a v u l g a r i s）抽出物、ケイトウ（C e l o s i a c r i s t a t a）の加水分解抽出物、アノゲイスス・レイオ

10

20

30

40

50

カルプス (Anogeissus leiocarpus) 抽出物、キャッサバ (Manihot utilisissima) 葉抽出物、パルミトイルカルニチン、カルノシン、タウリン、エルダーベリー抽出物、ダルス (Palmaria Palmata) 抽出物などの海草抽出物

を含む群から選択され得る。

【0071】

本発明の目的はまた、健常なヒトまたは動物個体（好ましくは、哺乳動物）、好ましくはヒトにおいて、

- 皮膚の老化の外観を遅延させる、もしくはその徴候を制限するため、ならびに / または

- すべてのタイプの外部攻撃から、皮膚および / もしくはその付属器官を防御するため、ならびに / または

- 表皮分化を促進するため、ならびに / または

- 皮膚および / もしくはその付属器官のバリア機能を強化するための、

皮膚適用による、本発明に係る有効量の少なくとも1つのジアシルグリセロール富化脂肪、本発明に係る有効量の少なくとも1つの脂肪アルコール富化ワックス、または本発明に係る有効量の組成物の美容的使用である。

【0072】

「皮膚老化の目視可能な徴候」は、老化による皮膚の外観の任意の変化、例えば、例として、小じわおよびしわ、色素性欠損、例えば、しみまたは輝きの欠如、目の下のたるみ、くま、萎縮；弾力性、引き締まりおよび / または皮膚の張りの喪失を意味するが、例えば、皮膚の菲薄化などの外観の変化、または汚染およびUV照射などの環境ストレスに起因する皮膚への内部損傷を体系的にもたらすことのない皮膚の内部変化も意味する。

【0073】

皮膚は器官であって、その上部、角質層およびそれを覆う水脂質膜 (hydro-lipidic film) が、外部環境から防御する物理障壁として作用する。「皮膚バリア機能」としてより一般に知られているこの障壁役割は、組織ホメオスタシスにおいて主に重要なものである。しかし、バリア機能の変質は、紫外線照射 (UVAおよびUVB)、冷却、乾燥、環境汚染、ある種の化学物質などの作用因子による外部攻撃に起因することが知られている。バリア機能の変質はまた、皮膚の老化中に観察され、とりわけ、減速および異常な表皮分化によるものであり、これは皮膚の透過性の増大をもたらし得る。

【0074】

本発明に係る組成物は、最適な表皮分化を有利に働かせることによって、これらの外部攻撃のすべてと闘うことを可能にし、これにより、皮膚により表されるこの必須のバリア機能を維持するのに十分な、機能的な組織学的構造および生理学的透過性を維持することが可能になる。

【0075】

本発明の目的はまた、皮膚の老化の外観を遅延またはその徴候を制限するため、ならびに / または皮膚レベルにおける細胞老化現象と闘うため、ならびに / またはすべてのタイプの外部攻撃から皮膚および / もしくはその付属器官を防御するため、ならびに / または皮膚レベルにおける細胞分化を促進するため、ならびに / または皮膚および / もしくは付属器官のバリア機能を強化するための美容的処置方法であって、上で定義した本発明に係る組成物の有効量を皮膚および / またはその付属器官の少なくとも一部に適用することからなる、方法である。

【0076】

完全性を目的として、パイヤ樹液の水不溶性フラクションを特徴付けるため、本出願人によって得られた実験データが、以下の発明を実施するための形態内に提示されている。この実験データは、図1~4を指し、以下に簡潔に提示されている。

【図面の簡単な説明】

【0077】

10

20

30

40

50

【図 1】パパイヤ樹液 ( 1 )、パパイヤ樹液の水不溶性フラクション ( 2 ) ( 「非水溶性」とも称される)、パパイヤ樹液の水中の可溶性フラクション ( 3 ) ( 「水溶性」とも称される)、市販のパパイン ( F l u k a ) ( 4 ) に存在するタンパク質、および、12% ポリアクリルアミドゲル上の分子量マーカー ( I n v i t r o g e n ) ( M ) のタンパク質の電気泳動プロファイルの図である。

【図 2】パパイヤ樹液 ( 1 )、パパイヤ樹液の水不溶性フラクション ( 2 )、パパイヤ樹液の水溶性フラクション ( 3 )、およびパパインを標的とする抗体を含む市販のパパイン ( 4 ) について行った、ウエスタンブロットの写真である。

【図 3】プロテアーゼ検出用に 10% カゼインを含有する 12% ポリアクリルアミドザイモグラムゲルであり、パパイヤ樹液 ( 1 )、パパイヤ樹液の水不溶性フラクション ( 2 )、パパイヤ樹液の水溶性フラクション ( 3 )、標準品のパパイン ( S i g m a、参照 P 4 7 5 2 ) ( 5 ) が置かれたザイモグラムゲルを示す図である。このザイモグラムゲルは、クマシーブルーで染色されている。

【図 4 A】クマシーブルーにより明らかにされた 14% ポリアクリルアミドゲルに関する非変性状態のザイモグラムゲルであり、パパイヤ樹液 ( 1 )、パパイヤ樹液の水不溶性フラクション ( 2 )、パパイヤ樹液の水溶性フラクション ( 3 )、市販のパパイン ( F l u k a ) ( 4 )、および分子量マーカー ( M ) が置かれたザイモグラムゲルを示す図である。

【図 4 B】オリーブオイルおよびピクトリアブルー ( B ) から構成されるゲルを覆うことにより明らかにされた 14% ポリアクリルアミドゲルに関する非変性状態のザイモグラムゲルであり、パパイヤ樹液 ( 1 )、パパイヤ樹液の水不溶性フラクション ( 2 )、パパイヤ樹液の水溶性フラクション ( 3 )、市販のパパイン ( F l u k a、参照 P 4 7 5 2 ) ( 4 )、および分子量マーカー ( M ) が置かれたザイモグラムゲルの図である。

【図 5】ヒト皮膚試料における、タマヌ、バオバブ、ラズベリーおよびツキミソウの 0.5% 活性化油および不活性化油のパンサイトケラチン標識の定量を示すグラフである。

【発明を実施するための形態】

【0078】

[定義]

脂肪。本発明の意味では、脂肪は、技術の現状において一般に許容される定義を有し、すなわち疎水特性を有する分子から構成される物質である。脂肪は、主に、グリセロールおよび 3 つの脂肪酸の分子に由来するエステルであるトリグリセリドから構成される。他の構成成分は、不ケン化フラクションまたは「不ケン化物」と呼ばれるものを形成する。主な脂肪は、

- 低い融点を有する不飽和脂肪酸から主になるので、室温では液体状態である油、
- より高い融点を有する飽和脂肪酸から大部分になるので、室温においてペースト状または固体である、脂肪

【0079】

上記の通り、本発明のため、動物、植物および / または海洋起源の油、バージンオイルまたは精製油、有利には、バージンオイルが脂肪として使用され、前記油は、好ましくは植物および / または海洋起源、好ましくは植物起源のものである。

【0080】

海洋起源の脂肪。海洋の脂肪は動物、植物、細菌とすることができ、かつ / または藻 (例えば、以下に示されている微細藻) とすることができる。例として、サメ肝油およびタラ肝油などの魚油、ならびにヘマトコッカス藻 ( h a e m o t o c o c c u s p l u v i a l i s ) などの藻および微細藻の油を言及することができる。

【0081】

植物起源の油 (または、より簡単には、「植物油」)。本発明の特に好ましい実施形態によれば、オリーブオイル、ナタネ油、ダイズ油、トウモロコシ油、スイートアーモンドオイル、アンディローバオイル、シルバースミスオイル ( S i l v e r m i t h s O i

10

20

30

40

50

1)、ババスオイル、ローレルベリーオイル、ルリチシャオイル、ブロッコリオイル、ブリティオイル (*buriti oil*)、テリハボクオイル、ツバキオイル、ベニバナオイル、クロフサスグリオイル、ヘンプオイル、ココナッツオイル、キューカンバーシードオイル、クランベリーオイル、ラズベリー種子オイル、パッションフルーツオイル、キーウシードオイル、ヘーゼルナッツオイル、ブラジルナッツオイル、シアオレインオイル (*shea olein oil*)、グレープシードオイル、アプリコットカーネルオイル、ゴマ油、米ぬか油、ナツメグシードオイル、トマトシードオイル、バオバブオイル、ツキミソウオイル、ツバキオイル、アマナズナオイル、マリアアザミオイル、グレープシードオイル、ニンジン油、セントジョンズワートオイル、アマニ油、クルミ油、ザクロシードオイル、ニゲラシードオイル (*nigella seed oil*)、ルリチシャオイル、カボチャシードオイル、エゴマ油、グリーンコーヒービーンオイル、アボカドオイル、ハイビスカスオイル、アルガンオイル、ベニバナオイル、ローズヒップオイル、クラウドベリーオイル (*cloudberry oil*)、チア (サルビア・ヒスパニカ (*salvia hispanica*)) オイルなどの植物油が使用されるが、また、バニラ、セントジョンズワート、ユリ、ニンジン、ヒナギク、アルニカ、アロエベラ、キンセンカ、ウチワサボテン (非網羅的リスト) などの花の油温浸物 (*macerate*) も使用される。上記した通り、これらの植物油のなかで、本発明の実施中に見出されたもの、すなわち、テリハボクオイル (好ましくはバージンオイル)、ラズベリーオイル (好ましくはバージンオイル)、ツバキオイル (好ましくはバージンオイル)、ツキミソウオイル (好ましくはバージンオイル)、ブラジルナッツオイル (好ましくはバージンオイル)、バオバブオイル (好ましくはバージンオイル) およびオリーブオイル (好ましくは) は、それらの特に興味深い美容特性のために好ましく、最初の6つを特に好ましい条件とする。

10

20

#### 【0082】

テリハボクオイル (カロフィルム・イノフィルム (*Calophyllum inophyllum*) L.; タマヌ)。タヒチのヒトによりタマヌと呼ばれ、マダガスカル of ヒトによりフォアラ (*Fohara*) と呼ばれている木である、カロフィルムは、皮膚に有益な作用をもたらす優れた油を生成する。これは、非常に芳香性であり、この油は、伝統的に、多くの皮膚病疾患 (湿疹、乾癬、帯状疱疹など) を処置するために使用される。

#### 【0083】

多数の検討により、カロフィルムオイルは、殺菌特性および防御特性を有する、多数の活性成分を含有し、これにより、皮膚の問題に対する価値のある協働体 (*ally*) になることが知られている。

30

#### 【0084】

ケン化可能フラクションは、リノール酸 (30 ~ 35%)、オレイン酸 (30 ~ 35%)、パルミチン酸 (15 ~ 20%)、ステアリン酸 (15 ~ 20%) から構成される。

#### 【0085】

不ケン化フラクションは、抗細菌性の殺菌作用のイノフィリン (*Inophyllin*) A、強力な治癒および皮膚修復のカラウストラリン (*Calaustraline*) およびイノフィロリド (*inophyllolide*)、抗酸化剤および治癒作用 (これらはまた、静脈循環に対して非常に強力な作用を有する) のポリフェノール、天然抗酸化剤のビタミンEから構成される。

40

#### 【0086】

バオバブオイル (アダンソニア・ジギタタ (*Adansonia digitata*))。バオバブオイルは、セネガル薬局方において、その抗アレルギー特性および抗炎症特性のために使用される。化粧品では、この非常に柔軟性かつ鎮静性の油は、乾燥した皮膚、裂けた皮膚およびひび割れした皮膚に特に有効である。治癒および再生でよく知られているので、火傷のケア用に推奨されている。ケン化可能フラクションは、リノール酸 (22 ~ 26%)、オレイン酸 (30 ~ 40%)、パルミチン酸 (20 ~ 25%)、ステアリン酸 (2 ~ 6%) を含む。不ケン化フラクションは、フィトステロール (ベータ-シトステロールを含む) およびビタミンEから構成される。

50

## 【0087】

ブラジルナッツオイル（ベルトレチア・エクセルサ（*Bertholletia excelsa*））。ブラジルナッツまたはアマゾンナッツは、ベルトレチア・エクセルサと呼ばれる、南アメリカの木に由来している。リン脂質、トコフェロールおよびフィステロールの植物源であるブラジルナッツオイルは、天然抗酸化剤として作用しながら、皮膚に柔らかさ、快適さおよび弾力性をもたらす。

## 【0088】

ケン化可能フラクションは、リノール酸（40～45%）、オレイン酸（オメガ-9）（30～35%）、パルミチン酸（10～15%）、ステアリン酸（5～10%）から構成される。不ケン化フラクションは、フィステロール（ベータ-シトステロールを含む）（細胞膜の構造および機能を維持して、炎症を軽減する）、スクアレン（皮膚表面の主要構造であり、柔軟特性および抗酸化特性を有する）、トコフェロール（脂肪酸の酸敗を予防し遊離ラジカルによる損傷から細胞を防御する強力な抗酸化剤である天然ビタミンE）、リン脂質（細胞膜を形成するものと類似の化合物、柔軟特性および防御特性）、セレン（抗酸化特性を有する微量元素）から構成される。

10

## 【0089】

ツキミソウオイル（エノテラ・ビennis（*Oenothera biennis*））。ツキミソウオイルは、リノール酸が非常に豊富であり、ガンマ-リノレン酸を含有する、希少油の1つである。細胞膜を再構築するこれらの必須脂肪酸は、驚く程の軟化特性、活力特性、再構築特性および抗しわ特性を有する。やはりビタミンEが豊富なツキミソウオイルは、早期老化から皮膚を防御する。

20

## 【0090】

ケン化可能フラクションは、リノール酸（70～75%）、ガンマ-リノレン酸（5～10%）、オレイン酸（4～8%）、パルミチン酸（4～8%）、ステアリン酸（1～4%）から構成される。

## 【0091】

不ケン化フラクション（1.5～2%）は、フィステロール（治癒作用および回復作用があり、また炎症を軽減する）、トリテルペン（抗ラジカル作用があり、退行から組織を防御する）、ビタミンEを含むステロール（天然抗酸化剤）から構成される。

## 【0092】

ツバキオイル（カメリア・シネンシス（*Camellia sinensis*）L.）。緑茶油とも呼ばれるツバキオイルは、チャノキの種子から抽出される。ツバキの植物油は、皮膚に対して、滋養特性、防御特性、軟化特性および保湿特性を有する。

30

## 【0093】

ケン化可能フラクションは、リノール酸（5～10%）、オレイン酸（75～80%）、パルミチン酸（5～10%）、ステアリン酸（1～5%）から構成される。

## 【0094】

不ケン化フラクション（1.5～2%）は、トリテルペン、スクアラン、サポニンおよびケンフェロールとそのグリコシドから構成され、これらは、ケルセチンなどの強力な抗炎症化合物である。これらは、炎症状態によって引き起こされる損傷から身体を防御する一助となる。

40

## 【0095】

ラズベリーオイル（ルブス・イダエウス（*Rubus idaeus*）L.）。ラズベリーオイルは、必須脂肪酸（オメガ-3およびオメガ-6）の含有量が非常に多いため、治癒特性を有しており、かゆみおよび湿疹を軽減するためにも使用される。ラズベリーオイルはまた、UVAおよびUVB光線の一部を吸収して、日光に対する光防御をもたらすことが知られている。ラズベリーオイルは、抗酸化剤およびカロテノイドが豊富であり、日焼けケアおよび日焼け後の修復に理想的な油でもある。

## 【0096】

ケン化可能フラクションは、リノール酸（50～55%）およびアルファ-リノレン酸

50

(30~35%)、オレイン酸(オメガ-9)(10~15%)、パルミチン酸(0~5%)から構成される。

【0097】

不ケン化フラクションは、ビタミンE(約5600mg/kg)(天然抗酸化剤)、没食子酸(天然抗酸化剤)、カロテノイド(ベータ-カロテン、ルテインおよびクリプトキサンチン)(抗ラジカル作用があり、退行から組織を防御する)から構成される。

【0098】

オリーブオイル(オレア・エウロパエア(Olea europaea)L.)。オリーブの木は、千年というその非常に長い寿命で知られている。オリーブの木は、世界の歴史において引用された最初の木でもある。

【0099】

その種子ではなく、その果肉の冷間圧縮によって得られるので、オリーブオイルは、オレイン酸の最も豊富な油の1つである。滋養性、軟化性および柔軟性があり、本発明者らは、伝統的なアレポ石鹼およびマルセル石鹼の組成中にオリーブオイルを見出している。

【0100】

オリーブオイルは、優れた治療剤であり、天候および日焼けの有害作用に対し抗酸化剤、鎮静および防御特色をもたらす不ケン化物を高い濃度で有する(約1~2%)。体内では、オリーブオイルは、消化性の障害、とりわけ胃の障害に推奨される、消化特性およびわずかな緩下特性を有する。

【0101】

ケン化可能フラクションは、リノール酸(15~20%)、オレイン酸(55~60%)、パルミチン酸(15~20%)、ステアリン酸(0~5%)から構成される。

【0102】

不ケン化フラクションは、フェノール性化合物(ヒドロキシチロソール)(主要な抗酸化剤)、フィトステロール(治療作用および回復作用)、スクアレン(皮膚表面の主要構成成分であり、柔軟特性および抗酸化特性を有する)、ビタミンE(アルファ-トコフェロール)、クロロフィル(天然抗酸化剤)から構成される。

【0103】

本発明のために使用される脂肪が油(好ましい実施形態)である場合、この油は、バージンオイルであってもよく、または精製されていてもよい。本発明の特に好ましい実施形態によれば、少なくとも1つのバージンオイル、好ましくはバージン植物油が使用される。実際に、本出願人により開発された技術プラットフォームは、精製油にする必要なしに、ジアシルグリセロールおよび/または脂肪アルコール(美容活性成分)が富化されているバージンオイル、好ましくはバージン植物油を得ることが可能であるという大きな利点を有する。

【0104】

バージン植物油。「バージン」と呼ばれる植物油は、一般に、栽培植物から最初の冷搾(最大温度60)により、果実、種子、仁から機械的方法により、単独で抽出された純粋な植物油である。これらの油は、その不ケン化フラクションおよびケン化可能フラクションを特徴とする。不ケン化フラクションは、残留フラクションであり、この残留フラクションは、水に不溶性であるが、ケン化後、有機酸に可溶となる。ケン化不能な脂肪含有量は、一般に、0.5~2%の範囲にある。これは、ステロール、炭化水素(スクアレンなど)、トリテルペン、脂肪アルコール(ワックス)、脂溶性顔料、ビタミンなどを含む複雑な混合物である。植物油の不ケン化フラクションは、その生物学的特性のため、化粧品への応用が見出されている。油のケン化可能フラクションは、脂肪酸、グリセリドおよびトリグリセリドを特徴とする。脂肪酸は、2つのタイプ、すなわち飽和脂肪酸、不飽和脂肪酸(一価不飽和/MUFAまたは多価不飽和/PUFA)である。脂肪としてこれらのバージン植物油を使用することは、本発明の意味内において特に好ましい。

【0105】

精製油。上記した通り、バージンオイル、好ましくはバージン植物油の使用が、本発明の意味において好ましいが、本発明はまた、精製油でも良好に働く。油が精製される場合、それは、熱圧縮を受けなければならない。これは、圧縮しながら、80 ~ 120 の間の温度において行われる。これにより、粗製油が生成され、この粗製油は、そのまま消費することはできず、望ましくない味および色調を取り除くため、長い一連の処理を受けなければならない。脱ガムステップは、加水分解をもたらす酸性水と共に攪拌することにより、不安定性、ならびに高温処理中の泡および煙（遊離脂肪酸、リン脂質）の生成に寄与する物質を除去することを含み、これにより、物質を分離する。次に、味は、重層溶液により中和される。この後に、漂白土により90 での漂白が続き、ろ過して、油からその顔料を除去する。この方法は、油の品質をよりよく保存するため、低圧水蒸気を使用する脱臭で終える。この方法で、風味がほとんどなく、澄んだ、臭いのない精製油が得られる。これらの油は、そのケン化可能フラクションを特徴としているに過ぎず、不ケン化フラクションは、この処理によって除去される。

10

20

30

40

50

#### 【0106】

本出願人は、不ケン化フラクションの構成成分、すなわちステロール、炭化水素（スクアレンなど）、トリテルペン、脂肪アルコール（ワックス）、脂肪可溶性顔料、およびビタミン（非網羅的リスト）は、本発明に係るこれらを含む含有している活性化脂肪および組成物の生物学的（美容）活性を増大させることができることを発見した。これが、この価値のある不ケン化フラクションを含むバージンオイル（好ましくはバージン植物油）の使用が、本発明に関して特に好ましい理由の1つであり、本発明を構成する技術プラットフォームは、バージンオイルの富化/活性化にかなり好適である。

#### 【0107】

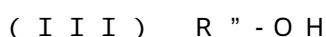
活性化脂肪/活性化油。本発明は、ジアシルグリセロール富化脂肪（好ましくは、油）、特に、1, 2 - ジアシルグリセロールを得ることを特に目的としている。ジアシルグリセロールは、皮膚適用の文脈において、こうして富化されて美容活性成分として作用する、脂肪/油中に存在している。言い換えると、ジアシルグリセロール富化脂肪は、皮膚レベルにおいて、改変された構造、および増大した生物学的（美容）活性を有する。これが、こうして富化された脂肪/油が、活性化脂肪/活性化油とも呼ばれる理由である。

#### 【0108】

ワックス。ワックスは、エチレングリコールと2つの脂肪酸とのエステル、または脂肪酸と長鎖アルコールとのモノエステルである。ワックスは、ビーワックスなどの動物起源、ホホバ、カルナウバもしくはカンデリラワックスなどの植物起源、または無機物起源とすることができる。

#### 【0109】

脂肪アルコールは、末端位における単一ヒドロキシル官能基を有する長い炭化水素鎖を有する脂肪族アルコールである。脂肪アルコールとは、式(III)の化合物：



(式中、R'' は、脂肪アルコールの脂肪族鎖を表す)を意味する。この脂肪アルコールは、10 ~ 34 個の炭素原子を含む炭素鎖によって構成されている。

#### 【0110】

本発明の特定の一実施形態によれば、脂肪アルコールは、その炭素数が12 ~ 26 個の間の炭素鎖を有する。本発明の別の好ましい実施形態によれば、脂肪アルコールは、その脂肪鎖上に、16 ~ 22 個の間の炭素原子を有する。

#### 【0111】

したがって、これらの脂肪アルコールは、飽和または不飽和な平均サイズの脂肪族鎖脂肪アルコールからなる群から好ましくは選択されよう。

#### 【0112】

さらに、脂肪アルコールの脂肪族鎖（すなわち、基R''）は、線状または分岐状の炭素鎖、および/または飽和もしくは不飽和とすることができ、不飽和数は、1 ~ 6 の間である。R'' 基はまた、モノもしくはポリヒドロキシル化、および/またはモノもしくはポリ

メトキシ化、および/またはモノもしくはポリ酸化、および/またはモノもしくはポリエポキシ化鎖とすることができる。したがって、これは、既存の天然形態のすべての中に存在することができる。

【0113】

これらの脂肪アルコールは、ワックス中に多量に見出される。これらのワックスは、ビーワックスなどの動物起源、またはホホバ、カルナウバもしくはカンデリラワックスなどの植物起源、または無機物起源とすることができる。

【0114】

したがって、例えば、ホホバ油ワックス（「ホホバワックス」と略す。ホホバ油の96%超を構成するワックス）の加水分解の制御は、その中に含有している主な脂肪族脂肪アルコールを放出する作用を有しており、これにより、飽和または不飽和線状炭化水素鎖の脂肪アルコールの混合物がもたらされる。

10

【0115】

特に、ホホバ油ワックスの加水分解により、その脂肪族鎖中に、16~22個の間の炭素原子を有する、高純度の脂肪アルコールの混合物を得ることが可能になる。

【0116】

ホホバ油ワックスは、南アリゾナおよびカリフォルニア、ならびに北西メキシコを原産とする低木植物である、ホホバ種子（シモンドシア・キネンシス（*Simmondsia chinensis*））中に含有している液体ワックスである。ホホバ種子は、その重量の約50%の油収率を有する。ホホバ油は、36~46個の炭素原子の鎖を有するワックス（*ceridic*）エステル混合物である。各分子は、エステル結合によって連結されている脂肪酸および脂肪アルコールからなる。ホホバ油は、10%のオレイン酸（ $C_{18}:1$ ）、70%のガドレイン酸（ $C_{20}:1$ ）、15%のエルカ酸（ $C_{22}:1$ ）、5%のネルボン酸（ $C_{24}:1$ ）および関連する脂肪アルコールであるオクタコセノール（ $C_{18}:1$ ）、エイコセノール（ $C_{20}:1$ ）、ドコセノール（ $C_{22}:1$ ）およびテトラコセノール（ $C_{24}:1$ ）の存在を特徴としている。したがって、ホホバワックスの加水分解の制御は、その中に含有している主な脂肪族脂肪アルコールを放出する作用を有しており、これにより、飽和または不飽和な直鎖脂肪アルコールがもたらされる。

20

【0117】

したがって、例えば、ホホバワックス（ホホバ油の96%超を構成するワックス）の加水分解の制御は、その中に含有している主な脂肪族脂肪アルコールおよび脂肪酸を放出する作用を有しており、これにより、飽和および不飽和な炭化水素をベースとする脂肪アルコールおよび脂肪酸が富化されたワックスを得ることが可能である。特に、本発明に係るホホバ油の加水分解により、18~24個の間の炭素原子を有する脂肪アルコール富化ワックスおよび脂肪酸を得ることが可能になる。したがって、この加水分解により、皮膚に作用することができる活性成分をすべて濃縮することが可能になる。

30

【0118】

本発明に係る脂肪酸および脂肪アルコールの混合物は、好ましくは、ホホバ油（シモンドシア・キネンシス）中に存在しているワックスの加水分解から得られるであろう。この加水分解により、このワックスの構成体である脂肪アルコールの放出が可能になる。この加水分解は、アルコールおよび酸を放出するため、その主な活性がエステル結合を加水分解することである、トリアシルグリセロールヒドロラーゼを使用して、酵素により実施され得る。本発明の特に有利な可能性の1つは、トリアシルグリセロールの加水分解に使用されるものと同じリパーゼを使用することである。

40

【0119】

好ましくは、本発明によれば、グループを構成する活性成分、すなわち、ジアシルグリセロール富化油、ならびに脂肪酸および脂肪アルコール中に富化されているワックスは、植物、海洋または動物起源となる。

【0120】

活性化ワックス。本発明は、特に、上で定義した、脂肪アルコール富化ワックス（好ま

50

しくは、ホホバ油ワックス、「ホホバワックス」と略す)を得ることが目的である。こうして富化されたワックス中に存在している脂肪アルコールは、有利には、皮膚適用の文脈において、活性化脂肪/油(上記を参照されたい)のジアシルグリセロールと組み合わせ、活性な日医用成分として作用する。言い換えると、脂肪アルコール富化ワックスは、皮膚レベルにおいて、改変された構造、および増大した生物学的(美容)活性を有する。これが、こうして富化されたワックスが、活性化ワックスとも呼ばれる理由である。

#### 【0121】

パパイヤのリパーゼ。リパーゼ(トリアシルグリセロールヒドロラーゼ; EC . 3 . 1 . 1 . 3)は、可逆性酵素であり、これは、反応の大部分の有利な意味において、グリセロールエステルを加水分解する。これらの酵素はまた、その異なる特異性に従い、いくつかのグループ、すなわち基質に関する特異性、位置特異性または立体特異性、脂肪酸の性質に関する特異性またはタイプ選択性、位置特異性または立体特異性に分類され得る。本発明では、sn3タイプの立体特異的リパーゼが使用される。すなわち、このリパーゼは、1-2ジアシルグリセロールを優先的に形成することによりトリグリセリドを加水分解する。使用されるリパーゼは、植物起源(例:パパイヤ)または微生物起源(例:ペニセリウム・シクロピウム)であることができる。本出願人によって開発された技術プラットフォームは、パパイヤリパーゼの使用に基づく(Villeneuve et al., JAOCs, 72, 6:753.1995)。

10

#### 【0122】

パパイヤ(カリカ・パパイヤ(Carica papaya))は、世界中の、主に熱帯および亜熱帯地域において育っている。パパイヤは、パパイヤ科(Caricaceae)のメンバーであり、これは、アブラナ科(Brassicales)に属する。パパイヤのラテックスは、パイン、キモパインおよびカリカインを含めた、システインの豊富な源である、エンドペプチダーゼが既に知られている。これらのプロテイナーゼは、水溶性ラテックスタンパク質として抽出され得る。リパーゼ活性の存在は、Giordaniらによって報告されている。最近まで、このラテックスフラクションからの酵素活性を可溶化するための試みはすべて、不成功であった。したがって、パパイヤラテックスリパーゼ(CPL)は、伝統的に、「天然の固定化」生物触媒と見なされている。リパーゼ活性を含有する乾燥粉末は、水でラテックス粒子を洗浄し遠心分離した後で得ることができる。パパイヤラテックスの粗製樹液の立体特異性およびタイプ選択性は、加水分解中およびアシル転移反応中の両方で検討された。加水分解工程中に、1,3-立体特異的活性は、好ましくはsn-3立体活性により、この生物触媒により決定された。

20

30

#### 【0123】

その実験手順の文脈では、本出願人は、記載されている実験条件下、本発明である、脂肪酸に対するこのリパーゼのある種のタイプ選択性を実証し、このリパーゼを、18~20の間の長さの長鎖脂肪酸を有し、かつ0~3の間の不飽和数を有するトリアシルグリセロールに向かわせた。実際に、以前に行われた試験では、本発明において使用した操作条件下で、1,2-ジアシルグリセロール富化油を得るための収率は、18~20個の間の炭素鎖長を有する脂肪酸を主に有し、かつ不飽和を有する油(例えば、オリーブオイル)の場合の方が、飽和脂肪酸が、それぞれ、8~10個の間の炭素(カプリル酸トリグリセリド/カプリン酸トリグリセリド-Mygliol(登録商標)812)、12~16個の炭素(動物性バター)、16~18個の炭素(パーム油)の鎖長を有する油の場合よりも高いことを示した。これらの結果が、以下の表1にまとめられている。

40

#### 【0124】

【表 1】

富化油	オリーブ オイル	Myglyol 812	バター (ミルク)	パーム油
酸性度指標 (mg/g)	17.5	10.2	3.2	13.6
1,2 ジアシルグ リセロール 含有量	15	6.8	1	8.9
1,3 ジアシルグ リセロール 含有量	3	2	0	3.2

表 1:パパイヤリパーゼを使用する、様々な脂肪からの DAG 富化収率の比較

## 【0125】

上記した通り、本出願人によって開発された技術プラットフォームは、パパイヤリパーゼの使用に基づいており、より具体的には、その樹液の水不溶性フラクションの使用に基づいている。しかし、本発明はまた、有利には、1, 2 - ジアシルグリセロールの場合、好ましくは上で定義されている式 (I) の 1, 2 - ジアシルグリセロールの場合、任意の好適なリパーゼによる (好ましくは、sn 3 タイプ、例えば、植物または微生物起源の立体特異的リパーゼによる) ジアシルグリセロール富化脂肪に一層幅広く適用され、前記脂肪は、テリハボクオイル (好ましくはバージンオイル)、ラズベリーオイル (好ましくはバージンオイル)、ツバキオイル (好ましくはバージンオイル)、ツキミソウオイル (好ましくはバージンオイル)、ブラジルナッツオイル (好ましくはバージンオイル) およびバオバブオイル (好ましくはバージンオイル) から選択され、前記脂肪は、テリハボクオイル (好ましくはバージンオイル) である。さらに、本発明はまた、前記ジアシルグリセロール富化脂肪 (有利には、1, 2 - ジアシルグリセロール、好ましくは上で定義した式 (I) の 1, 2 - ジアシルグリセロール) および脂肪アルコール富化ワックス (好ましくは、上で定義した式 (III) のもの) を含む、これらから本質的になる、またはこれらからなる組成物に適用される。

## 【0126】

パパイヤ樹液 (「粗パパイヤ樹液」とも呼ばれる)。パパイヤ樹液は、パパイヤラテックスから得られる。このラテックスは、まだ緑色の果実を切り刻むことにより採集される。緑色の果実は、表面を切って、空気に接触すると固化する白色ラテックスを採集する。これは、エンドペプチダーゼ酵素 (生のパピイン = パピイン、キモパピイン、パパイヤプロテイナーゼ; パピインは、23000ダルトンの分子量の212アミノ酸のタンパク質である)、リパーゼ (パパイヤのリパーゼ、英語ではパパイヤリパーゼと呼ぶ; Villeneuve et al. JAOCS, 72, 6: 753, 1995) を含めたタンパク質、ならびに糖およびビタミンから主に構成される。

## 【0127】

付属器官。付属器官は、集中的な角質化を特徴とする、表皮の目視可能な防御性産物である。毛髪、歯、爪および毛髪は、付属器官である。

## 【0128】

皮膚。本発明の意味内では、皮膚は、身体の被覆を構成する身体の構成成分として、幅広い意味で理解され、頭皮 (毛髪により覆われている頭蓋骨の皮膚) をとりわけ含む。

## 【0129】

精製パパイヤ樹液、より具体的にはこのパパイヤ樹液の水不溶性フラクション (非水溶性) の特徴付け

乾燥パパイヤ樹液が水中に懸濁している場合、脂肪分解活性およびプロテアーゼ活性を示す酵素は様々な溶解度を示した。プロテアーゼは、リパーゼ活性を担う酵素とは異なり

10

20

30

40

50

、可溶性である (Giordani et al., 1991)。この特性により、パパイヤ樹液を2つのフラクションに部分的に分離することが可能である (以下の表2を参照されたい)。

【0130】

【表2】

	乾燥物		タンパク質	
	割合	総量 /フラクション	百分率/ 乾燥物	総量 /フラクション
粗 パパイヤ 樹液	82 %	82 %	78 %	64.5 %
不溶性 フラクシ ョン	19 %	17 %	47 %	8 %
可溶性 フラクシ ョン	7 %	59 %	95 %	56 %

10

20

表2:パパイヤ樹液の分別の検討および特徴付け

【0131】

パパイヤ樹液の分別は、乾燥物の含有量、および得られたフラクションのタンパク質含有量を特徴としており、これらの値を樹液のそれと比較する。使用した樹液は18%の水分を有しており、その懸濁液は、水中の10%であり、遠心分離により2つのフラクションに分離することで、出発の乾燥物の92%および最初に存在するタンパク質の99.7%の回収量になる。これらのタンパク質のなかで、88%は、水溶性フラクション中に見出され、12%が水不溶性粒子フラクション中に見出される (上の表2を参照されたい)。第2のステップでは、分離方法によって得られたタンパク質をより正確に特徴付けた。したがって、プロテアーゼおよびリパーゼ酵素活性の検討後、これらの2つのフラクション中に存在するタンパク質の分子量を決定することが可能であった。粗製樹液中および各フラクション中に存在しているタンパク質の量は、ケルダール法に従って決定し、以下の表3に報告する。次に、プロテアーゼ活性および脂肪分解活性を、パパイヤ樹液について、ならびに水溶性フラクションおよび水不溶性フラクション中で測定した。

30

【0132】

【表 3】

	タンパク質分解活性			脂肪分解活性		
	粗パパイヤ樹液	可溶性フラクション	不溶性フラクション	粗パパイヤ樹液	可溶性フラクション	不溶性フラクション
酵素活性 (U/mg 乾燥物)	1.5	1.35	0.1	0.67	検出不可	0.66
特異的酵素活性 (U/mg タンパク質)	2.35	2.4	1.3	1.05	/	7.45
精製係数	/	1.02	/	/	/	7.1
全酵素活性	150	134	11	67	/	60

表 3:パパイヤ樹液、ならびに水溶性フラクションおよび水不溶性フラクションの特異的および総合的な酵素活性

## 【0133】

水中のパパイヤ樹液の懸濁液は、樹液中に最初に含まれている、リパーゼ活性からプロテアーゼ活性を効率よく分離することを可能にする。実際に、最初に存在しているタンパク質分解活性および脂肪分解活性の約90%は、それぞれ水溶性フラクションおよび水不溶性フラクション中に見出される。

20

## 【0134】

パパイヤ樹液中、ならびにその水溶性フラクションおよび水不溶性フラクション中に存在するタンパク質の分子量を、変性および還元条件下12%ポリアクリルアミドゲル上で決定した。こうして得られた電気泳動プロファイルが、図1に示されている。トラックMは、分子量マーカー (Invitrogen) に相当する。トラック1は、パパイヤ樹液に相当する。トラック2は、パパイヤ樹液の水中のフラクションに相当する。トラック3は、このパパイヤ樹液の水溶性フラクションに相当する。トラック4は、商業的に購入したパパイア (Fluka) に相当する。

30

## 【0135】

観察された主要なタンパク質の分子量は、表示  $\log PM = f(Rf)$  ( $Rf = \text{タンパク質からの移動距離} / \text{ゲルの前面からの移動距離}$ ) を使用して、分子量マーカーの分子量との相関関係により決定した。

## 【0136】

これらの分子量が、以下の表4に示されている。

## 【0137】

【表 4】

	粗乾燥 パパイヤ樹液	不溶性 フラクション	可溶性 フラクション	市販の精製 パパイン
タンパク質 の分子量 (kDa)	35 23 22 18	23	35 28 23 22 18 15	35 23 22 18 15

表 4: パパイヤ樹液、不溶性フラクションおよび水溶性フラクション中、ならびに市販のパパイン中に存在するタンパク質の分子量

## 【0138】

パパイヤ樹液は、それぞれ、18、22、23および35 kDaの分子量の4つの主要なタンパク質を有する。水不溶性フラクションは、23 kDaの分子量を有する単一タンパク質から構成されるように思われる。6つのタンパク質の水溶性フラクションは、15、18、22、23、28および35 kDaの分子量を有するので、15 kDaのタンパク質の存在は、パパイヤ樹液を懸濁している間に起こる加水分解によるものに違いない。脂肪分解活性を有していない市販のパパインは、パパイヤ樹液と同じ5種のタンパク質形態から構成される。電気泳動プロファイル間の類似性は、確かに、この市販の抽出物が、プロ酵素および/または成熟酵素の形態のパパイヤ樹液のエンドペプチダーゼの混合物であるということによる。

## 【0139】

これらの結果に基づくと、パパイヤリパーゼは、23 kDaの分子量を有するようと思われる。しかし、同じ分子量のタンパク質は、水溶性フラクションおよび市販のパパイン中にも存在しており、単一プロテアーゼ活性であることが明らかになった。

## 【0140】

[ウエスタンブロットによる特徴付け]

次に、パパインタイプの活性に対応するタンパク質の分子量を特定するため、ウエスタンブロットによるこれらの同じ試料の分析を行った。

## 【0141】

使用した抗体は、パパインを標的とするヤギ血清に由来するポリクローナル抗体であり、(Rockland、抗パパイン[パパイヤ])、35 kDaのタンパク質であることが主に判明する。より弱いシグナルが、分子量15~28 kDaの間のタンパク質に関して観察される。

## 【0142】

パパインは、21~23 kDaの範囲の分子量を有することが記載されている(Azarkan et al., 2003)。使用した抗体は、N-末端領域(134アミノ酸)を有するパパインのプロ酵素前駆体である、プロパパインに明らかに結合しており、次に、212アミノ酸から構成される成熟酵素に結合している。実際に、このプロ酵素は、345アミノ酸からなる(Taylor et al., 1999、Azarkan et al., 2003)。

## 【0143】

強度の低いシグナルのより詳細な分析により、不溶性フラクションおよび水不溶性フラクションの28 kDaの分子量を有するタンパク質、ならびに水溶性フラクションの22 kDaのタンパク質への抗体の特異的な結合はそれほど存在していないことを特定することが可能となる。

## 【0144】

水不溶性フラクションの場合、抗パイン抗体は、23 kDaの分子量を有するタンパク質に結合しなかった。これにより、このタンパク質は、パインタイプのプロテアーゼではなく、パイヤのリパーゼであることが確認される。

## 【0145】

[ ザイモグラムゲルによる特徴付け ]

ザイモグラムゲル技法により、タンパク質混合物中の酵素の存在を、それ自体の活性に着目することにより決定することが可能となる。特異的な基質は、ポリアクリルアミドゲルに既に含まれており、個別のトラックを形成し、同じ反応により明らかにされる酵素をアイソザイムと呼ぶ。

10

## 【0146】

様々な抽出物中の、プロテアーゼおよびパイヤリパーゼの存在を位置づけるために、2つのザイモグラムゲル（脂肪分解性およびタンパク質分解性）の実施を検討した。

## 【0147】

< - プロテアーゼを明らかにするザイモグラム >

使用される Novex Casein Zymogram のザイモグラムゲルは、12%のポリアクリルアミドから構成され、プロテアーゼの潜在的な基質である10%のカゼインを含有する分離用ゲルから構成される。このゲルは、酵素活性を維持するため、非還元条件下で生成される。タンパク質分解活性を有する酵素は、ゲルのカゼインを局所的に加水分解するであろう。クマシーブルーでゲルを染色した後、図3に示されるように、タンパク質が加水分解されているゾーンは、均一な青色の背景に白色で強調される。この図3では、トラック1はパイヤ樹液に相当し、トラック2は、パイヤ樹液の水不溶性フラクションに相当し、トラック3は、パイヤ樹液の水溶性フラクションに相当し、トラック4は、商業的に購入したパイン (Fluka) に相当する。

20

## 【0148】

カゼインの加水分解、したがって多少なりとも重要なプロテアーゼ活性の存在が、分析したすべてのフラクションに観察される（図3）。2つのアイソフォームが観察され、アイソフォーム2は、水溶性フラクションおよび市販のパインに対してより強い強度を有している。

30

## 【0149】

< - リパーゼを明らかにするザイモグラム >

リパーゼ酵素活性を検出するためのザイモグラムの生成は、プロテアーゼの場合よりも複雑である。文献は、2つのゲル、すなわちタンパク質が分離される第1のもの、および基質を含有する第2のものからなる系を記載している (Gilbert et al., 1991, Abousalam et al., 2000)。第1の工程では、タンパク質は、天然の条件下でポリアクリルアミドゲル上を移動する。次に、リパーゼの存在は、脂質基質および着色指示薬であるピクトリアブルー（その色は酸性媒体中では青色であり、塩基性媒体では赤色である (Yadav et al., 1997)）の両方を含有する、第2のポリアクリルアミドゲルから構成される被覆層を適用することにより明らかになる。したがって、このタイプのザイモグラムでは、リパーゼ活性の存在は、オリーブオイルのトリアシルグリセロールの加水分解ゾーン、したがってオレイン酸の生成に対応する青色の外観により表示される。

40

## 【0150】

2つのポリアクリルアミドゲルを、平行で実施する。第1の対照ゲルは、クマシーブルーにより染色され（図4A）、非変性条件において、タンパク質の移動プロファイルを示すことが可能になる。平行して、第2のザイモグラムゲルは、基質を含有する被覆層により明らかになる（図4Bを参照されたい）。

## 【0151】

より具体的には、図4Aは、クマシーブルーで明らかになった、14%のポリアクリルアミドゲルにおける、非変性条件でのザイモグラムゲルを表し、図4Bは、オリーブオイ

50

ルおよびピクトリアブルー（B）から構成されるゲルを被覆することにより明らかになった、14%のポリアクリルアミドゲルにおける、非変性条件でのゲルを表している。

【0152】

図4Aおよび4Bの対象物であるザイモグラムゲルのトラックは、同一であり、

- トラック1は、パパイヤ樹液、
- トラック2は、パパイヤ樹液の水不溶性フラクション、
- トラック3は、パパイヤ樹液の水溶性フラクション、
- トラック4は、商業的に購入したパパイン（Fluka）、および
- トラック（M）は、分子量マーカー

に相当する。

10

【0153】

非変性条件下では、移動は正確ではなく、2つのタンパク質実体しか観察されない（図4A）。

【0154】

ザイモグラム自体に関する、オレイン酸の生成に対応するゲルの青色の着色は、パパイヤ樹液およびその水不溶性フラクションに観察される。脂肪分解活性は、これらのフラクションにしか存在しない。

【0155】

市販のパパインは、リパーゼ活性を有していない。したがって、この抽出物中に存在している23kDaタンパク質は、様々なフラクションの酵素活性の検討が既に示唆されているので、リパーゼに相当するものではない（上の図2を参照されたい）。

20

【0156】

このザイモグラムの検討は、タンパク質分解活性および脂肪分解活性を明らかにすることが可能であり、これにより、パパイヤエンドペプチダーゼが、検討した抽出物において大きなタンパク質分解酵素活性を有するタンパク質のグループであることが確認された。

【0157】

この検討はまた、パパイヤ樹液およびその水不溶性フラクションしか、23kDaに近い分子量のタンパク質に結合している脂肪分解活性を有していないことを実証した。

【0158】

1, 2 - ジアシルグリセロールを定量するために使用するGPC（ガスクロマトグラフィー）方法

30

このアッセイは、内部標準に1, 3 - ジパルミチンを使用して、ガスクロマトグラフィーにより行う。この分析は、ChemStation（登録商標）ソフトウェアにより制御され、水素炎イオン化型検出器および自動インジェクタを有する、Agilent 7890ガスクロマトグラフィーを使用し、非極性タイプのキャピラリーカラム（HP5（30m×0.25mm×0.25mm）で行う。

【0159】

ベクターガスは、ヘリウム（1.0mL/分）であり、インジェクタおよび検出器は、330℃まで加熱し、オーブンは、325℃で30分間、等温でプログラム化されている。注入した試料の体積は、1μLである。これらの条件下では、1, 3 - ジパルミチンは、それぞれ13分間の保持時間を有する。様々なジアシルグリセロールは、以前の書誌検討、および質量分析法に連結したガスクロマトグラフィーにより実施された以前の分析である、標準品の使用によって決定した保持時間を有する。

40

【0160】

応答係数の決定（1, 2 - ジアシルグリセロールはすべて、1, 2 - ジオレインとして、同一の応答係数を有するという作業仮説である）では、1, 2 - ジオレインを参照分子として使用する。

【0161】

標準溶液：以下の質量を正確に秤量することにより、以下の通り4種の溶液を調製する。

50

【 0 1 6 2 】

【 表 5 】

生成物	溶液 1	溶液 2	溶液 3	溶液 4
1,3-ジパルミチン	20 mg	20 mg	10 mg	10 mg
1,2-ジオレイン	20 mg	10 mg	20 mg	10 mg
ピリジン	500 $\mu$ L			
HMDS	400 $\mu$ L			
TFA	50 $\mu$ L			

10

表 5 - 標準溶液の調製

【 0 1 6 3 】

本発明者らの分析条件下では、1, 2 - ジオレインの応答係数は 1 . 2 3 1 5 ( 1 . 6 3 % の C V ) である。

20

【 0 1 6 4 】

次に、富化油を以下の通り分析する。

【 0 1 6 5 】

【 表 6 】

生成物	溶液 5	溶液 6
1,2-ジアシルグリセロール富化油	100 mg	100 mg
1,3-ジパルミチン	15 mg	15 mg
ピリジン	500 $\mu$ L	
HMDS	400 $\mu$ L	
TFA	50 $\mu$ L	

30

40

表 6 - 富化油分析

【 0 1 6 6 】

次に、溶液中に含有している 1, 2 - ジアシルグリセロールの量を、以下の通り決定する。溶液中に含有する 1, 2 - ジオレインの質量を算出する：

$$m(Ech) = [ (Ech) \times A(Ech) \times m(SI) ] / A(SI)$$

[ 式中：m = 質量 ( mg )

A = ピーク下面積

= 応答係数

Ech = 試料 ( 1, 2 - ジアシルグリセロール )

50

S I = 内部標準 ( 1 , 3 - ジパルミチン ) ]

または

$m(1, 2 - \text{ジアシルグリセロール}) = [1.2315 \times A(1, 2 - \text{ジアシルグリセロール}) \times m(1, 3 - \text{ジパルミチン})] / A(1, 3 - \text{ジパルミチン})$

含有量の算出：含有量 (%) =  $[m(1, 2 - \text{ジアシルグリセロール}) / m(\text{富化油})] \times 100$

【0167】

[実施例1]

< パパイヤのリパーゼが富化された、パパイヤ樹液の水不溶性フラクションを得る方法 >  
リパーゼ富化パパイヤ抽出物は、900gの蒸留水中の乾燥粗パパイヤ100gの懸濁液を生成することにより得る。こうして、乾燥粗パパイヤ樹液は、懸濁した粒子および水溶性フラクションを含む二相懸濁液となる。

10

【0168】

この混合物を室温で2時間、1分間あたり500回の回転速度 (rpm) で、アンカータイプの攪拌器を用いて攪拌する。

【0169】

パパイヤ樹液の水不溶性 (非水溶性) フラクション (上記に特徴付けされている) を、30分間、1時間あたり200リットルの流速で、プレート遠心分離器などの遠心分離器を使用して、混合物の遠心分離によって可溶性フラクションから分離する。

20

【0170】

遠心分離のペレットは、目的のフラクション、すなわち粗パパイヤ樹液の水不溶性フラクションを有する。

【0171】

こうして、25%の乾燥重量を有する、20gの微粒子フラクションが得られる。

【0172】

[実施例2]

< 活性化1, 2 - ジアシルグリセロール富化油を調製する方法 >

この化合物を、2つの個別のステップで調製し、次に、単純な混合により、適切な割合でこれらの2つの方法からの生成物を一緒にする。

【0173】

30

1, 2 - ジアシルグリセロール富化油を、バージンのテリハボクオイル、またはラズベリーオイル、またはパオバブオイル、またはツキミソウオイル、またはブラジルナッツオイル、またはツバキオイル (それらは、本発明の意味内で、活性化されると、優れた皮膚美容特性をもたらす)、および油の体積の0.5 ~ 50%、好ましくは1 ~ 40%となる二価イオン (カルシウムイオンまたはマグネシウムイオンなど) を含有する、ある量の水または生理食塩溶液から調製する。サーモスタットにより制御されている槽内で、この混合物を30 ~ 70 の間の温度、好ましくは50 の温度で維持する。この混合物を、油と水との間にエマルションの形成を可能にするために、ステータロータタイプの装置を使用する攪拌下に維持する。

【0174】

40

次に、この混合物を、約0.01 ~ 約0.2の間、有利には約0.05 ~ 0.015の間、好ましくは約0.1を含んで使用される、パパイヤ樹液の水不溶性フラクション / 脂肪の体積比で、実施例1の方法を実施することにより得られた、パパイヤリパーゼ富化パパイヤ樹液の所与の体積の水不溶性フラクションの存在下で攪拌下のままにする。

【0175】

攪拌および温度は、1 ~ 6時間の間 (好ましくは、4時間) の時間、すなわち、形成するジアシルグリセロールの量を最大化するのに十分な時間、維持する。

【0176】

この反応のモニタリングは、慣用的な脂肪産業の指標 (酸性度指標 NF EN ISO 660 および過酸化物指標 NF ISO 3976 の測定) を決定することにより、および

50

特に、ジアシルグリセロールを特定してその含有量を定量するためのガスクロマトグラフィーによる、クロマトグラフィー法の使用により行う。

【0177】

次に、この反応媒体を物理化学的な精製技法により精製するが、その目標は、反応に最初に使用した油に最も近い色調を有する、光沢があって無臭の1, 2 - ジアシルグリセロール富化油を得ることである。

【0178】

最初に、反応媒体を、多孔度の低い(500 ~ 250 μm)一連のセルロースフィルターによつてろ過する。これにより、まずエマルションが分解して、次に媒体の濁りがなくなる。

10

【0179】

次に、無水硫酸マグネシウム吸水剤を使用して残留水を除去する。次に、こうして得られた油を脱臭して、活性炭(好ましくは、CN1タイプのCabot Norit(登録商標)活性炭)の手助けにより、光沢が付与される。

【0180】

こうして得られた油の特徴は、本発明において記載されている方法に特有の共通部分を有しているが、使用した油の性質に固有の特定の特徴をやはり有する。反応媒体は、主に、未加工のトリグリセリド、モノグリセリド、ならびに1, 2 - および1, 3型ジアシルグリセロールからなる。

【0181】

油は、15 ~ 50の間の酸性度指標、5 ~ 30の間の過酸化指数、および5 ~ 30%の間の1, 2 - ジアシルグリセロール比により一般に特徴付けられる。

20

【0182】

得られたジアシルグリセロールの性質は、油中に最初に存在しているトリアシルグリセロールに基づいている。

【0183】

以下の表7および8により、

- 本発明の意味において特に好ましい、6つのバージンオイルと、  
- 同一の6つのバージン1, 2 - ジアシルグリセロール富化油  
の1, 2 - ジアシルグリセロールおよび1, 3 - ジアシルグリセロールの酸性度指標、過酸化指数および含有量を比較することが可能である。

30

【0184】

【表 7】

初期バージン オイル	ラズベリー オイル	バオバブ オイル	ツキミソウ オイル	ブラジル ナッツ オイル	ツバキ オイル	テリハボク オイル
酸性度指標 (mg/g)	4	5	4	3	5	20
過酸化指標 (meq O <sub>2</sub> / Kg)	15	14	10	14	12	8
1,2 ジアシルグ リセロール 含有量	0.5	0	0	0	0.3	2
1,3 ジアシルグ リセロール 含有量	0.5	0	0	0	0.4	1

表 7 - 6 つの好ましいバージンオイルの酸性度指標、過酸化指標、ならびに 1,2-ジアシ  
ルグリセロールおよび 1,3-ジアシルグリセロール含有量

【 0 1 8 5 】

【表 8】

富化後の油	1,2DAG 富化ラズ ベリーオイル	1,2DAG 富化バオ バブオイル	1,2DAG 富化ツキ ミソウオ イル	1,2DAG 富化ブラ ジルナツ ツオイル	1,2DAG 富化ツバ キオイル	1,2DAG 富化 テリハボクオ イル
酸性度指標(mg/g)	21.8	27.1	21.6	18.2	22.3	48.6
過酸化指標 (meq O <sub>2</sub> /Kg)	29.6	2.5	25.8	18.7	12.9	4.2
1,2 ジアシルグリ セロール含有量	12	16	16.9	17.7	18	8
1,3 ジアシルグリ セロール含有量	2	3.5	2.5	2	2	1.5

表 8 - 1,2DAG 富化後の、6 つの好ましいバージンオイルの酸性度指標、過酸化指標、  
ならびに 1,2-ジアシルグリセロールおよび 1,3-ジアシルグリセロール含有量

【 0 1 8 6 】

さらに、液体脂肪アルコール富化ワックスは、上記の調製方法に必要な変更を行うことにより、すなわち油の代わりにワックスを使用し、脂肪アルコール富化ワックスを得ることにより、調製される。完全なものとするため、この方法を、以下に記載する。

【 0 1 8 7 】

第 1 に、ホホバワックスは、pH の修正なしに、前記ワックスと、ワックスの体積の 0 . 5 ~ 5 0 % 、好ましくは 1 ~ 4 0 % となる、カルシウムイオンまたはマグネシウムイオ

ンなどの二価イオンを含有するある量の水または生理食塩溶液とを混合することで、ステータロータタイプの攪拌器を使用して乳化する。サーモスタットにより制御されている槽内で、この混合物を30～70の間の温度、好ましくは50の温度に維持する。この混合物は、ワックスと水との間の安定したエマルションの形成が可能となるよう、ステータロータタイプの装置を使用する攪拌下に維持する。

【0188】

次に、この混合物を、約0.01～約0.2の間、有利には約0.05～0.015の間、好ましくは約0.1を含んで使用される、パパイヤ樹液の水不溶性フラクション/脂肪の体積比で、実施例1の方法を実施することにより得られた、パパイヤリパーゼ富化パパイヤ樹液の所与の体積の水不溶性フラクションの存在下で攪拌下のままにする。

10

【0189】

攪拌および温度を、1～6時間の間（好ましくは、6時間）の時間、すなわち、形成する脂肪アルコールの量を最大化するのに十分な時間、維持する。

【0190】

最初に、反応媒体を、多孔度の低い（500～250μm）一連のセルローズフィルターによつてろ過する。これにより、まずエマルションを分解して、次に媒体の濁りがなくなる。

【0191】

次に、無水硫酸マグネシウム吸水剤を使用して残留水を除去する。次に、こうして得られたワックスを脱臭して、活性炭（好ましくは、CN1タイプのCabot Norit（登録商標）活性炭）の手助けにより、光沢が付与される。

20

【0192】

反応生成物は、酸性度指標NF EN ISO 660を測定することにより、およびクロマトグラフィー方法を使用することにより、特に脂肪酸および脂肪アルコールを特定して、それらの含有量を定量することを可能にするガスクロマトグラフィーにより行われる。

【0193】

得られた生成物は、2～4%の間の脂肪アルコール含有量および5mg/ワックス1gの酸性度指標を好ましくは特徴とする。

【0194】

本発明の特定の実施形態では、組成物は、1,2-ジアシルグリセロール富化油（活性化油）、またはいくつかの1,2-ジアシルグリセロール富化油（活性化油）の混合物に相当する。

30

【0195】

本発明の特定の実施形態では、組成物は、脂肪アルコール富化液体ワックス（活性化ワックス）、またはいくつかの脂肪アルコール富化液体ワックス（活性化ワックス）の混合物に相当する。

【0196】

好ましい実施形態では、次に、本発明に係る組成物は、1,2-ジアシルグリセロール富化油（活性化油）と脂肪アルコール富化液体ワックス（活性化ワックス）とを、100～90%の間の富化油および0～10%の富化液体ワックスを含む重量割合で、単に混合することにより得られる。

40

【0197】

[実施例3]

<活性化油を含む化粧品製剤>

(3.1 アイコントゥールジェル)

【0198】

【表 9】

成分	商品名 / INCI 名	% w/w
段階 A		
精製水	水/アクア	100 になる量
実施例 2 による活性化タマヌオイル/活性化ホホバワックスブレンド	(提案した)加水分解したテリハボクシードオイルおよび加水分解したホホバエステル	1.50
Flexithix(商標)ポリマー	PVP	3.00
段階 B		
Si-Tec(商標)DM 350 シリコーン	ジメチコン	3.00
Si-Tec(商標)RE-100 シリコーン	シクロペンタシロキサン(および)ジメチコン/ビニルトリメチルシロキシシリケート交差ポリマー	10.00
シクロペンタシロキサン	シクロペンタシロキサン	5.00
段階 C		
Liquid germall plus 保存剤	プロピレングリコール(および)ジアゾリジニルウレア(および)ヨードプロピニルブチルカルバメート	0.50
BPD-500	HDI/トリメチロールヘキシルラクトン交差ポリマー&シリカ	0.50
合計		100.00

表 9 - 本発明による「アイコントール」ゲルの組成

特性：

外観：滑らかな半透明ゲル

pH：5.50 ~ 6.0

粘度 (D0) 15000 ~ 25000 (ブルックフィールド RVT / スピンドル B / 5 RPM / 1分 / 25 )

【0199】

この配合物は、実験室において3か月間の加速安定性試験を受けた。この配合物の保存は、28日間にわたる二重効力試験 (double efficacy test) により、確認した。しかし、保存剤は、その最低の効率レベルに最適化しなかった。

(3.2 - 二相フェイシャルセラム)

【0200】

10

20

30

40

【表 10 - 1】

成分	商品名 / INCI 名	% w/w
段階 A		
精製水	水/アクア	Qs 100
段階 B		
Blanose(商標)7H3SF CMC	カルボキシメチルセルロース	0.30
Zemea*	プロパンジオール	1.00
段階 C		
Rokonsal(商標)/Liquapar(商標)MEP 保存剤	フェノキシエタノール(および)メチルパラベン(および)エチルパラベン(および)プロピルパラベン	0.70
Neomatrix(商標) 二官能性	水/アクア(および)グリセリン(および)ペンタペプチド(提案した名称)	1.00
塩化ナトリウム	塩化ナトリウム	1.00
Unicert*ブルー-05601-J(0.1%溶液)	水/アクア(および)CI42090 (FD&C ブルーNo.1)	0.20
Unicert*イエロー-08005-J(0.1%溶液)	水/アクア(および)CI19140 (FD&C イエローNo.5)	0.60
段階 D		
Ceraphyl(商標)ODS エステル	ステアリン酸オクチルドデシル	7.00
Unicert*グリーン K7016-J	CI61565 (D&C グリーン No.6)	0.006
段階 E		
Optiphen(商標)保存剤	フェノキシエタノール(および)カプリリルグリコール	0.50
Ceraphyl(商標)375 エステル	ネオペンタン酸イソステアリル	3.00
実施例 2 による活性化タマヌオイル/活性化ホホバワックスブレンド	(提案した)加水分解したテリハボクシードオイルおよび加水分解したホホバエステル	2.50
Smart* 5	イソドデカン(および)水素化テトラデセニル/メチルペンタデセン	8.00
DC* FZ-3196	カプリリルメチコン	5.00

【表 10 - 2】

PF Absolute Perfection	香水/フレグランス(および)リナ ロール	0.10
合計		100.00

表 10 - 本発明による二相フェイシャルセラムの組成

特性：

外観：緑色および暗青色二相液体 - 使用前に振とう

pH：5.0～6.0

粘度(D0) N.A.

10

## 【0202】

この配合物は、実験室において3か月間の加速安定性試験を受けた。この配合物の保存は、28日間にわたる二重効力試験により確認した。しかし、保存剤は、その最低の効率レベルに最適化しなかった。

## 【0203】

## [実施例4]

<本発明に係る様々な活性化油の存在下で、エキスピボでのヒト皮膚における、サイトケラチンの発現の検討>

20

## (4.1 - サイトケラチンの序論)

サイトケラチンは、中間フィラメントのタンパク質であり、他のタンパク質と一緒にあって、細胞の細胞骨格を形成する。これらは、上皮構造の維持、損傷からの防御、および他の細胞質構成成分との伝達を含めた、多数の機能を有する(Fuertes L. et al., 2013)。

## 【0204】

これらは、様々な発現プロファイルがその位置に依存して、一対で発現され、その分子量および等電点に従い、1～20の番号でランク付けされる。サイトケラチンは、2つの群に分類される(Fuertes L. et al., 2013)：

- タイプIのサイトケラチンは、酸であり、一般に、低分子量を有するサイトケラチンに相当する。

30

- タイプIIのサイトケラチンは、塩基性であり、一般に、高分子量を有する。

## 【0205】

表皮分化の過程に、基底層のケラチノサイトは、その増殖可能性を喪失し、上部層に移動し、ケラチン5および14の発現が阻止される一方、ケラチン1および10の発現が増大する(Paladini RD et al., 1999)。

## 【0206】

## (4.2 検討の目的)

この検討の目的は、エキスピボでのヒト皮膚において、サイトケラチンの発現に及ぼす、実施例2の方法を実施することにより得られる、本発明に係る様々な活性化油/活性化ワックスブレンドの影響を決定することである。

40

## (4.3 - 試験した油)

試験した様々な油は、

天然のバージンタマヌオイルに対して、実施例2の方法により得られた、活性化タマヌオイル(テリハボク)/活性化ホホバワックスブレンド(実施例4の残りにおいて、「活性化タマヌオイル」と略す)、

天然のバージンパオバブオイルに対して、実施例2の方法により得られた、活性化パオバブオイル/活性化ホホバワックスブレンド(実施例4の残りにおいて、「活性化パオバブオイル」と略す)、

天然のバージンラズベリーオイルに対して、実施例2の方法により得られた、活性化ラ

50

ズベリーオイル/活性化ホホバワックスブレンド(実施例4の残りにおいて、「活性化ラズベリーオイル」と略す)、

天然のバージンツキミソウオイルに対して、実施例2の方法により得られた、活性化ツキミソウオイル/活性化ホホバワックスブレンド(実施例4の残りにおいて、「活性化ツキミソウオイル」と略す)

である。

【0207】

(4.3 - プロトコル)

直径が6mmであるヒト皮膚試料を、空気/液体界面において培養する。活性化油は、対応する非活性化油中に0.5%まで希釈する。20 $\mu$ Lの油を皮膚試料(1回のみ適用)に局所的に適用し、次に、これらの生検体を37 $^{\circ}$ Cにおいて24時間、インキュベートする。培養の終了時に、ヒト皮膚試料は、最適切削温度(OCT)ゲルに含まれている。OCTは、冷たいもの(液体窒素)に接触すると固化する。皮膚試料を含有するこれらのかたまりを-20 $^{\circ}$ Cにおいて保管する。

【0208】

次に、6 $\mu$ mの厚さの切片を採取する。次に、皮膚試料のこれらの切片を37 $^{\circ}$ Cでオープン乾燥し、次に、アセトン(予め-20 $^{\circ}$ Cまで冷却)により固定化する。

【0209】

免疫標識を、パンサイトケラチンに特異的なマウスモノクローナル抗体(Abcam、参照番号ab27988)、次いで蛍光色素を結合した抗マウス二次抗体(Invitrogen、参照番号A21202)を使用して行い、その後、皮膚試料の切片を落射蛍光顕微鏡(Zeiss Axiovert 200M)下で試験する。得られた写真からの蛍光の定量は、Volocityソフトウェアを用いて実施した。

【0210】

(4.4 - 結果)

顕微鏡観察により、対応する非活性化油と比較した、活性化タマヌオイル、活性化バオバブオイル、活性化ラズベリーオイルおよび活性化ツキミソウオイルにより処理した生検体の表皮において、かなり一層の強い蛍光が示される。得られたデータが、以下の表11~14中に示されている。

【0211】

【表11】

	0.5%活性化タマヌオイル	バージンタマヌオイル
サイトケラチン発現 (%)	123.3 $\pm$ 4,6	100 $\pm$ 4.7

表11 - サイトケラチン発現(%)活性化タマヌオイル対バージンタマヌオイル

【0212】

【表12】

	0.5%活性化バオバブオイル	バージンバオバブオイル
サイトケラチン発現 (%)	112.7 $\pm$ 2,6	100 $\pm$ 3.1

表12 - サイトケラチン発現(%)活性化バオバブオイル対バージンバオバブオイル

【0213】

10

20

30

40

## 【表 1 3】

	0.5%活性化ラズベリー オイル	バージンラズベリー オイル
サイトケラチン発現 (%)	124.7 ± 2.8	100 ± 2.2

表 13 - サイトケラチン発現(%)活性化ラズベリーオイル対バージンラズベリーオイル

## 【 0 2 1 4】

## 【表 1 4】

10

	0.5%活性化ツキミソウ オイル	バージンツキミソウ オイル
サイトケラチン発現 (%)	124.8 ± 4.6	100 ± 4.2

表 14 - サイトケラチン発現(%)活性化ツキミソウオイル対バージンツキミソウオイル

## 【 0 2 1 5】

統計学的解析を、対応する非活性化油に対して行った（平均値 ± 標準誤差、n = 8、\* \* \* : スチューデント t 検定によりかなり有意性がある）。

20

## 【 0 2 1 6】

活性化油と対応するバージンオイルとの間に観察された発現の差異を強調するため、得られたデータを、図 5 に示されているグラフにプロットした。

## 【 0 2 1 7】

( 4 . 5 - 結論 )

サイトケラチンの発現は、活性化タマヌオイル、活性化バオバブオイル、活性化ラズベリーオイルおよび活性化ツキミソウオイルによって、エクスピボのヒト皮膚において増大する。したがって、これらの活性化油は表皮分化を刺激し、したがって、興味深い美容特性を有する。

## 【 0 2 1 8】

( 4 . 6 - 書誌参照 )

30

## 【表 1 5】

Fuertes L., Santonja C., Kutzner H. and Requena L. Immunohistochemistry in Dermatopathology: a review of the most commonly used antibodies (Part I). *Actas Dermo-Sifiliográficas*. 104(2):99-127 (2013)

Paladini R.D. and Coulombe P.A. The functional diversity of epidermal keratins revealed by the partial rescue of the keratin 14 null phenotype by keratin 16. *The Journal of Cell Biology*. 146 (5):1185-1201 (1999)

40

【 図 1 】

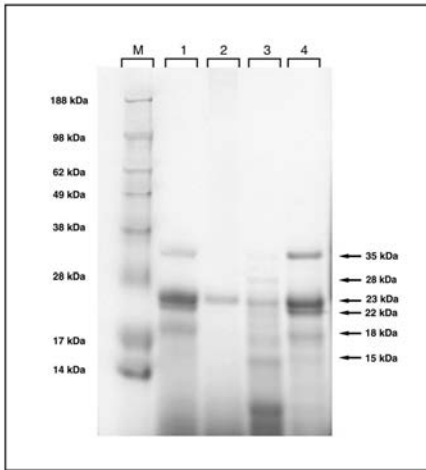


FIG. 1

【 図 2 】

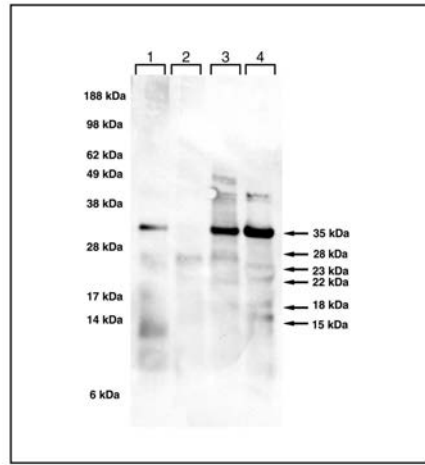


FIG. 2

【 図 3 】

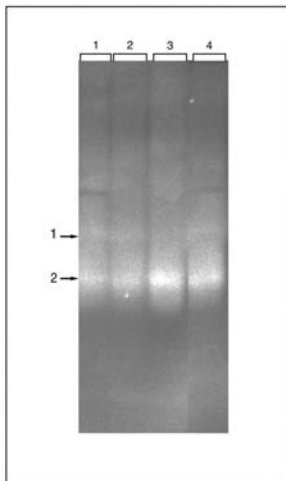


FIG. 3

【 図 4 A 】

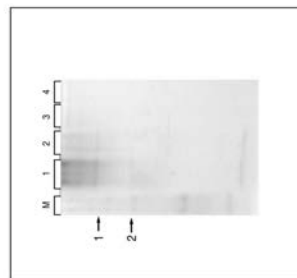


FIG. 4A

【 図 4 B 】

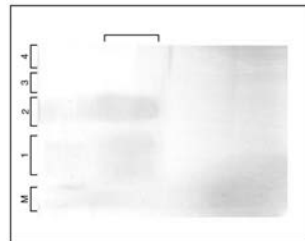


FIG. 4B

【 図 5 】

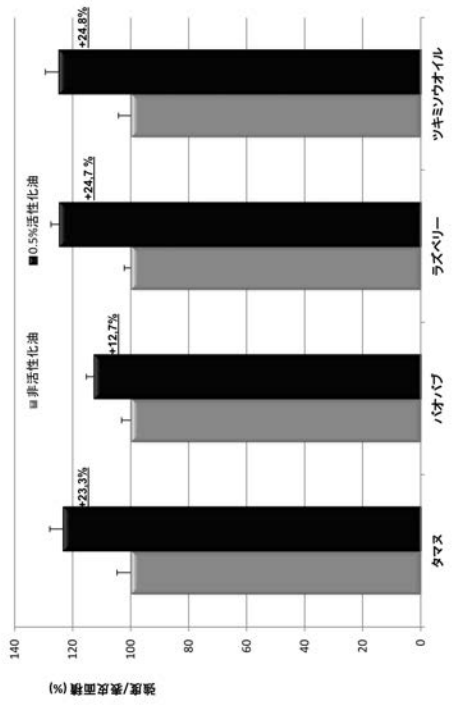


FIG. 5

## 【 国際調査報告 】

## INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No

PCT/EP2017/055350

<b>A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER</b>		
INV. A61Q19/08 A61K8/92 A61K8/97 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) A61Q A61K		
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, WPI Data		
<b>C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT</b>		
Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	
	Relevant to claim No.	
X	FR 2 853 834 A1 (VINCIENCE [FR]) 22 October 2004 (2004-10-22) cited in the application	1-19
Y	page 3, line 20 - page 4, line 18; claims 1-25; example 1	1-19
X	RIVERA I1 ET AL: "Plant lipases: partial purification of Carica papaya lipase", METHODS MOL BIOL., vol. 861, 1 January 2012 (2012-01-01), pages 115-122, XP009191177,	1-3
Y	.2.1 Purification of Carica papaya Latex Lipase; pages 118-121, paragraph 1.2.1 paragraphs [0002] - [0004]	1-19
	----- -/-- -----	
<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	"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	
"E" earlier application or patent but published on or after the international filing date	"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	
"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)	"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	
"O" document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means	"&" document member of the same patent family	
"P" document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed		
Date of the actual completion of the international search	Date of mailing of the international search report	
13 April 2017	15/05/2017	
Name and mailing address of the ISA/ European Patent Office, P.B. 5818 Patentlaan 2 NL - 2280 HV Rijswijk Tel. (+31-70) 340-2040, Fax: (+31-70) 340-3016	Authorized officer  Nopper, Agathe	

2

## INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No

PCT/EP2017/055350

C(Continuation). DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT		
Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X	ROGER GIORDANI, ANDRE MOULIN, ROBERT VERGER: "Tributyroylglycerol hydrolase activity in Carica papaya and other latices", PHYTOCHEMISTRY, vol. 30, no. 4, 1991, - 1991, pages 1069-1072, XP002761988, DOI: 10.1016/S0031-9422(00)95174-4	1-3
Y	Results and Discussion-Enrichment of lipolytic activity from Carica papaya latex; page 1069; figures 1-2; table 1 experimental; page 1071 Screening for tributyroylglycerol hydrolase activity in several latices and possible physiological implications; page 1071	1-19
A	----- VILLENEUVE P ET AL: "Carica papaya latex lipase:sn-3 stereoselectivity or short-chain selectivity? Model chiral triglycerides are removing the ambiguity", JOURNAL OF THE AMERICAN OIL CHEMISTS' SOCIETY (JAOCS), vol. 72, no. 6, 1 June 1995 (1995-06-01), pages 753-755, XP009191178, SPRINGER, DE ISSN: 0003-021X the whole document	1-4
A	----- Kumar D. Mukherjee: "Lipase-catalyzed synthesis of designer lipids with improved nutritional properties", Food, Nutrition and Well Being 18 October 1998 (1998-10-18), 20 October 1998 (1998-10-20), pages 167-169, XP002761989, 3RD KARLSRUHE NUTRITION SYMPOSIUM EUROPEAN RESEARCH TOWARDS SAFER AND BETTER FOOD REVIEW AND TRANSFER CONGRESS, KARLSRUHE, GERMANY Retrieved from the Internet: URL:https://publikationen.bibliothek.kit.edu/1000011778/867306 [retrieved on 2016-09-19] the whole document ----- -/--	1-17

## INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No

PCT/EP2017/055350

C(Continuation). DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT		
Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
A	<p>Fernanda Wiermann PAQUES et al.:  "Characterization of the lipase from  Carica papaya residues",  Braz. J. Food Technol.,  vol. 11, no. 1  2008, March 2008 (2008-03), pages 20-27,  XP002761990,  Retrieved from the Internet:  URL:http://www.ital.sp.gov.br/bj/artigos/b  jft/2008/v11n12407-21.pdf  [retrieved on 2016-07]  the whole document</p> <p>-----</p>	1-4
A	<p>PABLO DOMÍNGUEZ DE MARÍA, JOSÉ V.  SINIESTERRA, SHAU-WEI TSAI, ANDRÉS R.  ALCÁNTARA: "Carica papaya lipase (CPL):  An emerging and versatile biocatalyst",  BIOTECHNOLOGY ADVANCES,  vol. 24, no. 5, September 2006 (2006-09),  - October 2006 (2006-10), pages 493-499,  XP002761991,  DOI: 10.1016/j.biotechadv.2006.04.002  page 494, paragraph 2 - page 495; figure 1</p> <p>-----</p>	1-4

**INTERNATIONAL SEARCH REPORT**

Information on patent family members

International application No

PCT/EP2017/055350

Patent document cited in search report	Publication date	Patent family member(s)	Publication date	
FR 2853834	A1	22-10-2004	FR 2853834 A1	22-10-2004
			WO 2004093832 A2	04-11-2004

-----

## RAPPORT DE RECHERCHE INTERNATIONALE

Demande internationale n°

PCT/EP2017/055350

<b>A. CLASSEMENT DE L'OBJET DE LA DEMANDE</b> INV. A61Q19/08 A61K8/92 A61K8/97 ADD.		
Selon la classification internationale des brevets (CIB) ou à la fois selon la classification nationale et la CIB		
<b>B. DOMAINES SUR LESQUELS LA RECHERCHE A PORTE</b> Documentation minimale consultée (système de classification suivi des symboles de classement) A61Q A61K		
Documentation consultée autre que la documentation minimale dans la mesure où ces documents relèvent des domaines sur lesquels a porté la recherche		
Base de données électronique consultée au cours de la recherche internationale (nom de la base de données, et si cela est réalisable, termes de recherche utilisés) EPO-Internal, WPI Data		
<b>C. DOCUMENTS CONSIDERES COMME PERTINENTS</b>		
Catégorie*	Identification des documents cités, avec, le cas échéant, l'indication des passages pertinents	no. des revendications visées
X	FR 2 853 834 A1 (VINCIENCE [FR]) 22 octobre 2004 (2004-10-22) cité dans la demande	1-19
Y	page 3, ligne 20 - page 4, ligne 18; revendications 1-25; exemple 1	1-19
X	RIVERA I1 ET AL: "Plant lipases: partial purification of Carica papaya lipase", METHODS MOL BIOL,, vol. 861, 1 janvier 2012 (2012-01-01), pages 115-122, XP009191177,	1-3
Y	.2.1 Purification of Carica papaya Latex Lipase; pages 118-121, alinéa 1.2.1 alinéas [0002] - [0004]	1-19
	----- -/-	
<input checked="" type="checkbox"/> Voir la suite du cadre C pour la fin de la liste des documents <input checked="" type="checkbox"/> Les documents de familles de brevets sont indiqués en annexe		
* Catégories spéciales de documents cités: "A" document définissant l'état général de la technique, non considéré comme particulièrement pertinent "E" document antérieur, mais publié à la date de dépôt international ou après cette date "L" document pouvant jeter un doute sur une revendication de priorité ou cité pour déterminer la date de publication d'une autre citation ou pour une raison spéciale (telle qu'indiquée) "O" document se référant à une divulgation orale, à un usage, à une exposition ou tous autres moyens "P" document publié avant la date de dépôt international, mais postérieurement à la date de priorité revendiquée "T" document ultérieur publié après la date de dépôt international ou la date de priorité et n'appartenant pas à l'état de la technique pertinent, mais cité pour comprendre le principe ou la théorie constituant la base de l'invention "X" document particulièrement pertinent; l'invention revendiquée ne peut être considérée comme nouvelle ou comme impliquant une activité inventive par rapport au document considéré isolément "Y" document particulièrement pertinent; l'invention revendiquée ne peut être considérée comme impliquant une activité inventive lorsque le document est associé à un ou plusieurs autres documents de même nature, cette combinaison étant évidente pour une personne du métier "Z" document qui fait partie de la même famille de brevets		
Date à laquelle la recherche internationale a été effectivement achevée		Date d'expédition du présent rapport de recherche internationale
13 avril 2017		15/05/2017
Nom et adresse postale de l'administration chargée de la recherche internationale Office Européen des Brevets, P.B. 5818 Patentlaan 2 NL - 2280 HV Rijswijk Tel. (+31-70) 340-2040, Fax: (+31-70) 340-3016		Fonctionnaire autorisé  Nopper, Agathe

2

## RAPPORT DE RECHERCHE INTERNATIONALE

Demande internationale n°

PCT/EP2017/055350

C(suite). DOCUMENTS CONSIDERES COMME PERTINENTS		
Catégorie*	Identification des documents cités, avec, le cas échéant, l'indication des passages pertinents	no. des revendications visées
X	ROGER GIORDANI, ANDRE MOULIN, ROBERT VERGER: "Tributyroylglycerol hydrolase activity in Carica papaya and other latices", PHYTOCHEMISTRY, vol. 30, no. 4, 1991, - 1991, pages 1069-1072, XP002761988, DOI: 10.1016/S0031-9422(00)95174-4	1-3
Y	Results and Discussion-Enrichment of lipolytic activity from Carica papaya latex; page 1069; figures 1-2; tableau 1 experimental; page 1071 Screening for tributyroylglycerol hydrolase activity in several latices and possible physiological implications; page 1071	1-19
A	----- VILLENEUVE P ET AL: "Carica papaya latex lipase:sn-3 stereoselectivity or short-chain selectivity? Model chiral triglycerides are removing the ambiguity", JOURNAL OF THE AMERICAN OIL CHEMISTS' SOCIETY (JAOCS), vol. 72, no. 6, 1 juin 1995 (1995-06-01), pages 753-755, XP009191178, SPRINGER, DE ISSN: 0003-021X le document en entier	1-4
A	----- Kumar D. Mukherjee: "Lipase-catalyzed synthesis of designer lipids with improved nutritional properties", Food, Nutrition and Well Being 18 octobre 1998 (1998-10-18), 20 octobre 1998 (1998-10-20), pages 167-169, XP002761989, 3RD KARLSRUHE NUTRITION SYMPOSIUM EUROPEAN RESEARCH TOWARDS SAFER AND BETTER FOOD REVIEW AND TRANSFER CONGRESS, KARLSRUHE, GERMANY Extrait de l'Internet: URL:https://publikationen.bibliothek.kit.edu/1000011778/867306 [extrait le 2016-09-19] le document en entier	1-17
	----- -/--	

## RAPPORT DE RECHERCHE INTERNATIONALE

Demande internationale n°

PCT/EP2017/055350

C(suite). DOCUMENTS CONSIDERES COMME PERTINENTS		
Catégorie*	Identification des documents cités, avec, le cas échéant, l'indication des passages pertinents	no. des revendications visées
A	<p>Fernanda Wiermann PAQUES et al.:            "Characterization of the lipase from            Carica papaya residues",            Braz. J. Food Technol.,            vol. 11, no. 1            2008, mars 2008 (2008-03), pages 20-27,            XP002761990,            Extrait de l'Internet:            URL:http://www.ital.sp.gov.br/bj/artigos/b            jft/2008/v11n12407-21.pdf            [extrait le 2016-07]            le document en entier            -----</p>	1-4
A	<p>PABLO DOMÍNGUEZ DE MARÍA, JOSÉ V.            SINISTERRA, SHAU-WEI TSAI, ANDRÉS R.            ALCÁNTARA: "Carica papaya lipase (CPL):            An emerging and versatile biocatalyst",            BIOTECHNOLOGY ADVANCES,            vol. 24, no. 5, septembre 2006 (2006-09),            - octobre 2006 (2006-10), pages 493-499,            XP002761991,            DOI: 10.1016/j.biotechadv.2006.04.002            page 494, alinéa 2 - page 495; figure 1            -----</p>	1-4

**RAPPORT DE RECHERCHE INTERNATIONALE**

Renseignements relatifs aux membres de familles de brevets

Demande internationale n°

PCT/EP2017/055350

Document brevet cité au rapport de recherche		Date de publication	Membre(s) de la famille de brevet(s)		Date de publication
FR 2853834	A1	22-10-2004	FR	2853834 A1	22-10-2004
			WO	2004093832 A2	04-11-2004
-----					

## フロントページの続き

(51) Int.Cl.	F I	テーマコード (参考)
<b>A 6 1 K 8/98 (2006.01)</b>	A 6 1 K 8/98	
<b>A 6 1 K 8/9794 (2017.01)</b>	A 6 1 K 8/9794	

(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, RO, 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, DJ, DK, DM, DO, DZ, EC, EE, EG, ES, FI, GB, GD, GE, GH, GM, GT, HN, HR, HU, ID, IL, IN, IR, IS, JP, KE, KG, KH, KN, KP, KR, KW, 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

(74) 代理人 100166268  
弁理士 田中 祐

(74) 代理人 100170379  
弁理士 徳本 浩一

(74) 代理人 100180231  
弁理士 水島 亜希子

(74) 代理人 100096769  
弁理士 有原 幸一

(72) 発明者 コケ, コリーヌ  
フランス国, 0 6 2 2 0 シピエール, リュ・デュ・クレ 6 4

F ターム(参考) 4C083 AA081 AA111 AA112 AA121 AA122 AB172 AB271 AB272 AB332 AC012  
AC122 AC172 AC352 AC421 AC422 AC482 AC552 AC682 AC792 AC852  
AD072 AD092 AD152 AD162 AD172 AD272 BB11 CC03 CC04 CC05  
DD41 EE12 FF01