

(19)日本国特許庁(JP)

(12)公表特許公報(A)

(11)公表番号

特表2022-508676

(P2022-508676A)

(43)公表日 令和4年1月19日(2022.1.19)

(51)国際特許分類		F I		テーマコード (参考)
C 0 7 K	7/08 (2006.01)	C 0 7 K	7/08	4 C 0 8 3
A 6 1 Q	19/08 (2006.01)	A 6 1 Q	19/08	4 H 0 4 5
A 6 1 K	8/64 (2006.01)	A 6 1 K	8/64	
A 6 1 K	8/14 (2006.01)	A 6 1 K	8/14	
A 6 1 K	8/06 (2006.01)	A 6 1 K	8/06	
		審査請求 未請求 予備審査請求 有 (全22頁)		最終頁に続く

(21)出願番号	特願2021-544961(P2021-544961)	(71)出願人	521150710
(86)(22)出願日	令和1年10月10日(2019.10.10)		コロシウム・コンビナトリアル・ケミス
(85)翻訳文提出日	令和3年4月26日(2021.4.26)		トリー・センター・フォー・テクノロジー
(86)国際出願番号	PCT/IB2019/058641		ー・ソチエタ・ア・レスポンサビリティ・
(87)国際公開番号	WO2020/075108		リミタータ・イン・フォルマ・アップレ
(87)国際公開日	令和2年4月16日(2020.4.16)		ヴィアータ・チ4ティ・ソチエタ・ア・
(31)優先権主張番号	102018000009384		レスポンサビリティ・リミタータ
(32)優先日	平成30年10月11日(2018.10.11)		COLOSSEUM COMBINAT
(33)優先権主張国・地域又は機関	イタリア(IT)		ORIAL CHEMISTRY CEN
(81)指定国・地域	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,		TRE FOR TECHNOLOGY
	最終頁に続く		SOCIETA A RESPONSABILITA' LIMITATA IN F
			ORMA ABBREVIATA C4T
			S. R. L.
			イタリア00133ローマ、ヴィア・デ
			最終頁に続く

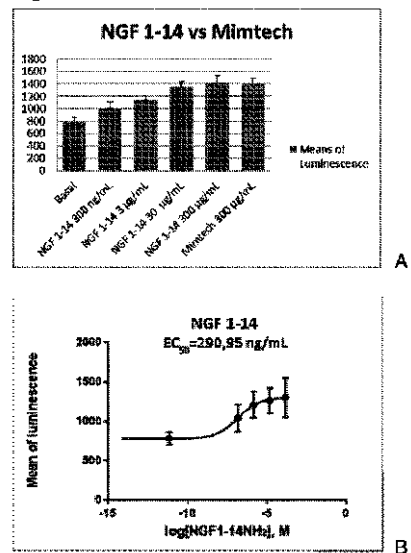
(54)【発明の名称】 皮膚の老化および光老化の処置および予防に有効なペプチド

(57)【要約】

本発明は皮膚の老化および光老化の処置および予防において、配列番号1およびそれらの化粧品組成物を含むペプチドの使用に関する。

【選択図】 図 1

Fig. 1



【特許請求の範囲】

【請求項 1】

皮膚の老化および光老化の処置および予防のために使用する、配列番号1を含む、もしくは配列番号1と少なくとも85%、より好ましくは90%、さらに好ましくは95%の配列同一性を有する配列を含むペプチドおよびその誘導体もしくは塩。

【請求項 2】

該ペプチドが16アミノ酸まで、好ましくは15アミノ酸まで、より好ましくは14アミノ酸の長さを有する、請求項1に記載の使用のためのペプチド。

【請求項 3】

該ペプチドが配列番号1からなる、または配列番号1と少なくとも85%、よりこの好ましくは少なくとも90%、さらに好ましくは少なくとも95%の配列同一性を有する配列、およびその誘導体もしくは塩からなる、請求項2に記載の使用のためのペプチド。

10

【請求項 4】

該誘導体が、化学的修飾または有機化合物で保護された該ペプチドのN-および/またはC-末端を含む、請求項1から3のいずれか一項に記載の使用のためのペプチド。

【請求項 5】

該有機化合物がホスホリル基、グリコシル基、アシル基、アルキル基、カルボキシル基、ヒドロキシル基、ビオチニル基、ユビキチニル基、およびアミド基からなる群から選択される、請求項4に記載の使用のためのペプチド。

【請求項 6】

皮膚の老化および光老化の処置および予防のために使用する、請求項1から5のいずれか一項において定義されたペプチド、および少なくとも一つの化粧品的に許容される賦形剤、を含む化粧品組成物。

20

【請求項 7】

該組成物が、該ペプチドまたはその誘導体および/もしくは塩の量を重量の0.00000001%から20%、好ましくは重量の0.000001%から15%、さらに好ましくは重量の0.0001%から10%、さらに好ましくは重量の0.0001%から5%の範囲で含む、請求項6に記載の使用のための化粧品組成物。

【請求項 8】

該少なくとも一つの化粧品的に許容される賦形剤が、化粧品的に許容される担体、揮発性および不揮発性溶媒、水、界面活性剤、防腐剤、吸収剤、キレート剤、潤滑剤、保湿剤、撥水剤、抗酸化剤、紫外線吸収剤、抗刺激剤、ビタミン、微量金属、抗菌剤、香料、染料および着色料、および/または構造化剤からなる群から選択される、請求項6に記載の使用のための化粧品組成物。

30

【請求項 9】

該化粧品的に許容される担体が、溶液、エアロゾル、水中油型エマルジョン、油中水型エマルジョン、ゲル、固体、リポソームを含む、請求項8に記載の使用のための化粧品組成物。

【請求項 10】

該化粧品組成物の形態が、ローション、クリーム、ゲル、スティック、スプレー、軟膏、ペースト、ムースおよび化粧品である、請求項8に記載の使用のための化粧品組成物。

40

【請求項 11】

請求項1から5のいずれか一項において定義されたペプチドおよび少なくとも一つの化粧品的に許容される賦形剤を含む化粧品組成物の局所適用を含む、それらを必要とする人への、皮膚の老化および光老化の処置および予防のための非治療的方法。

【請求項 12】

該方法が低周波ソノフォレシス(LFS)による皮膚の事前処置を含む、請求項11に記載の非治療的方法。

【発明の詳細な説明】

【技術分野】

50

【0001】

本発明は化粧品応用のためのペプチドに関する。特に、本発明は皮膚の老化および光老化の抑制が可能な配列番号1を有するペプチドに関する。さらに詳細には、本発明は配列番号1を有するペプチド、および少なくとも1つの化粧品的に許容される賦形剤を含む化粧品組成物にも関する。

【背景技術】

【0002】

神経成長因子(NGF)は主としてある標的ニューロンの成長、維持、増殖、および生存、の調節に関するとされる神経栄養因子および神経ペプチドである。

【0003】

NGFはセントルイス・ワシントン大学、動物学研究所のRita Levi-Montalcini教授によって発見され(Levi-Montalcini R., Harvey Lect., 60:217, 1966)、NGFの発見は、NGFがニューロンの生物学的機能の発達および保護、またその再生に影響し得ることから、神経細胞の成長および分化機構の研究に顕著な進歩をもたらした。この分子の発見と、末梢および中枢神経系両方におけるこの分子の生物学的機能を評価した功績から、

R.Levi-montalcini教授は、1986年のノーベル医学・生理学賞を受賞した。数多くのインビトロおよびインビボにおける研究が、外科的、化学的、機械的、および虚血状態によるニューロンの損傷の保護において、NGFの病態生理学的な重要性を実証してきたため、NGFはいくつかの状態の末梢および中枢神経系の処置に利用するのに理想的な候補分子とされてきた(Hefti F., J. Neurobiol., 25: 1418, 1994; Fricker J., Lancet, 349:480, 1997)。実際に、数年前からパーキンソン病およびアルツハイマー病の患者において、ネズミNGFの脳内投与による臨床試験が行われてきた(例えば、Olson L. et al., J. Neural Trans.: Parkinson's Disease and Dementia Section, 4: 79, 1992を参照)。これらの研究結果は動物モデルにおける観察結果を確かめ、ネズミNGFの投与によって起こり得る副作用がないことを示した。その後この特徴はヒト組み換えNGFにおいても確かめられた(Petty B.G. et al., Annals of Neurology, 36:244-246, 1994)。

【0004】

これらの事象はNGFによる、細胞表面にある2つのNGF受容体TrkAおよびp75への結合の結果として誘導される。p75受容体およびTrk-NGF受容体の2つの遺伝子の共発現は甚大なNGFへの応答を潜在的に引き起し得るとともに、付加的なレベルにおける神経栄養因子のファミリーの調節を示唆する(Chao MV, Hempstead BL, "p75 and Trk: a two-receptor system", Trends Neurosci. 1995;18:321-6)。

ニワトリ胚の感覚ニューロンは2つの異なる種類の神経栄養因子受容体;p75およびTrkをそれぞれ 10^{-9} Mおよび 10^{-11} Mの解離定数で発現しており、高親和性受容体の低い占有率が神経栄養因子の生物学的機能の誘導に要求されていること示唆する(Meakin SO, Shooter EM, "The nerve growth factor family of receptors", Trends Neurosci. 1992;15:323-31)。

【0005】

TrkAはチロシンキナーゼ活性を持つ受容体であり、NGFへの高親和性結合部位を形成する。

【0006】

p75は腫瘍壊死因子(TNF)受容体スーパーファミリーに属する、識別可能な細胞質の触媒ドメインを持たない膜貫通型タンパク質であり、NGFの低親和性結合部位を形成する。

【0007】

国際特許公報W02004026329A1、W02011116090、W02011049758A1、およびW02005019266A2は、ヒト神経成長因子(NGF)と相互作用、または結合する、およびNGFの機能を中和するペプチドまたは抗体に関する、およびNGF活性が有害となる日光性皮膚炎、白斑を含む種々の疾患および障害の予防および/または処置におけるそれ

10

20

30

40

50

らの使用に関する。

【0008】

上記の特許公報で提示された内容とは逆に、国際特許公報 WO2013065078A2では、NGFを含む薬剤の皮膚への局所投与が、色素沈着不全の影響を受けていない健康な皮膚において、皮膚の色を濃くする、すなわち色素を増加する効果があること、および白斑のような皮膚の色素欠乏、低色素症を伴う皮膚疾患の改善にも有効であることが開示されている。

【0009】

ヒトNGFの1-14配列を含むペプチド断片(NGF1-14)は、いくつかの参考文献で報告されているように疑似NGFとして知られている(P. Di Pietro et al., “Immobilization of Neurotrophin Peptides on Gold Nanoparticles by Direct and Lipid-Mediated Interaction: A New Multipotential Therapeutic Nanoplatfrom for CNS Disorders”, ACS Omega (2017), 2(8), 4071-4079 e C. Satriano et al., “Neurotrophin-mimicking peptides at the biointerface with gold respond to copper ion stimuli”, Physical Chemistry Chemical Physics (2016), 18(44), 30595-30604)。

10

【0010】

一方でNGF1-14は、TrkA受容体のみとの相互作用し、特にPI3/AktカスケードおよびCREBのリン酸化を活性化するが、p75受容体とは相互作用できず、ERK1/2のリン酸化を誘導できないことが示されている(A. Travaglia et al., “A small linear peptide encompassing the NGF N-terminus partly mimics the biological activities of the entire neurotrophin in PC12 cells”, ACS Chem Neurosci. 2015 Aug 19;6(8):1379-92)。

20

【0011】

最後に、WO99/39728はp75が単独で活性化されるとケラチノサイトおよびメラノサイトのアポトーシスをシグナル伝達するのに対し、Trkファミリー受容体と共に活性化されると細胞の生存をシグナル伝達することを開示した。

【発明の概要】

【発明が解決しようとする課題】

【0012】

最新の知見より始め、しばしば反駁するが、出願人はNGF1-14の化粧品応用への潜在的な有効性を調査した。

30

【0013】

NGF1-14の配列を以下に示す。

配列番号1 SSSHPIFHRGEFSV

【0014】

研究の進捗過程で、出願人は驚くべきことに、NGF1-14がメラノサイトのメラニン産生を活性化するだけでなく、プロコラーゲンIおよびエラスチンの産生を促進し得ることを見出した。この知見は皮膚の老化および光老化の処置および予防におけるNGF1-14の化粧品組成物としての使用を示唆する。

40

【0015】

さらに、出願人はNGF1-14ペプチドがrh-NGFの皮膚科学的使用に望ましい全ての効果を保持していることを見出した。

【0016】

出願人が見出したさらなる利点は、全長NGFと比較して、NGF1-14は従来のペプチド合成手法で簡便に合成が可能である点、および穏やかな条件下で長期間保存が可能な点である。

【0017】

これらの利点は生産コストの大幅な削減につながり、NGF1-14を化粧品用途に最適かつ魅力的なものとしている。

50

【0018】

出願人は加えて、NGF1-14の活性を実質的に改変せずにNGF1-14のアミノ酸の数や種類におけるいくつかの修飾が可能であることを見出した。

【課題を解決するための手段】

【0019】

したがって、本発明の第一の対象は皮膚の老化および光老化の処置および予防に使用するためのペプチドであって、配列番号1、または配列番号1と少なくとも85%、好ましくは少なくとも90%、より好ましくは少なくとも95%の配列同一性を有する配列を含むペプチド、およびその誘導体または塩に関する。

【0020】

さらに、本発明の第二の対象は皮膚の老化および光老化の処置および予防に使用するための化粧品組成物であって、配列番号1、または配列番号1と少なくとも85%、好ましくは少なくとも90%、より好ましくは少なくとも95%の配列同一性を有する配列を含むペプチド、およびその誘導体または塩、および少なくとも1つの化粧品的に許容される賦形剤を含む化粧品組成物に関する。

【0021】

本発明の第三の対象は、皮膚の老化および光老化の処置および予防を必要とする人に対する非治療的方法であって、配列番号1、または配列番号1と少なくとも85%、好ましくは少なくとも90%、より好ましくは少なくとも95%の配列同一性を有する配列を含むペプチド、およびその誘導体または塩、および少なくとも1つの化粧品的に許容される賦形剤を含む化粧品組成物の局所適用を含む方法に関する。

【0022】

好適には、本発明の非治療的方法は、低周波ソノフォレシス（LFS）による皮膚の前処置を含む。

【図面の簡単な説明】

【0023】

【図1】図1は、実施例1に記載するように、参照NegerminTM化合物とともに様々な濃度のNGF1-14の活性をプロットしたもの（図1A）と、EC50曲線（図1B）を示す。

【図2】図2は、実施例2に記載する実験の対象となる皮膚領域の処置計画を示す。

【図3】図3は実施例2に記載する処置後に計測したNGF1-14の表皮における発現量（図3A）と真皮における発現量（図3B）を示す。

【図4】図4は実施例2に記載する処置後に検出したTrkA受容体のリン酸化度合いを示す。

【図5】図5は実施例3に記載する一回投与試験後に計測した、ラット真皮におけるプロコラーゲンIの発現量（図5A）およびエラスチンの発現量（図5B）を示す。

【図6】図6は実施例3に記載する2週間の投与試験後に計測した、ラットの真皮におけるプロコラーゲンIの発現量（図6A）およびエラスチンの発現量（図6B）を示す。

【発明を実施するための形態】

【0024】

本発明の第一の対象は皮膚の老化および光老化の処置および予防に使用するための配列番号1を含むペプチドに関する。本発明で参照する、配列番号1の配列は以下のように示される：SSSHPIFHRGEFSV。

【0025】

本明細書で用いるアミノ酸配列の略称は以下の表Aに示すように、IUPAC-IUB命名法を参照した。

【0026】

10

20

30

40

50

【表 A】

表 A

アラニン	Ala	A	アルギニン	Arg	R
アスパラギン	Asn	N	アスパラギン酸	Asp	D
システイン	Cys	C	グルタミン酸	Glu	E
グルタミン	Gln	Q	グリシン	Gly	G
ヒスチジン	His	H	イソロイシン	Ile	I
ロイシン	Leu	L	リジン	Lys	K
メチオニン	Met	M	フェニルアラニン	Phe	F
プロリン	Pro	P	セリン	Ser	S
スレオニン	Thr	T	トリプトファン	Trp	W
チロシン	Tyr	Y	バリン	Val	V

【0027】

本発明によるペプチドは最適比較した際に配列番号1と少なくとも85%、少なくとも90%、そして少なくとも95%の配列同一性を有する。配列の最適比較は、様々な既知の方法および既知のアルゴリズムのコンピュータ上での実装によって行われ得る(例えば、BLAST, TFASTA, BESTFIT, such as in the Wisconsin Genetics Software Package, Release 7.0, Genetics Computer Group, Madison, WI)。アメリカ国立生物工学情報センター(www.ncbi.nlm.nih.gov/)より入手し得るソフトウェアであるBLASTアルゴリズムも同様に使用され得る。

【0028】

ペプチドの配列に関して、「配列同一性」は2つの配列間で一致した残基の割合をいう。配列同一性(%SI)は以下の式を用いて計算した。

$$\%SI = (nt - nd) \times 100 / nt$$

ここで、ntは元の配列の残基数、およびndは最大数のアミノ酸が一致するように比較した場合の、対峙する配列の非同一残基の総数である。そのため、配列SSSHPIFHRDEFSVは配列番号1と92.8%の配列同一性を有する(nd=1, nt=14)。

【0029】

本発明のペプチドは配列番号1と同じ長さを有し得る、または最大16アミノ酸を有し得る。

【0030】

本発明の、配列番号1を含むペプチドにおけるアミノ酸配列の種類は、ペプチドの活性に影響しないアミノ酸の保存的な置換を含む。

ペプチドの活性を維持できる置換は、(a)シートまたはヘリックス三次元構造などの、置換領域の元のペプチド構造の維持への有効性、(b)対象領域の分子の電荷および疎水性の

維持への有効性、または(c)側鎖の体積の維持への有効性、に基づいて選択される。

【0031】

保存的な置換の例は、塩基性アミノ酸(アルギニン、リジン、およびヒスチジン)、酸性アミノ酸(グルタミン酸、およびアスパラギン酸)、極性アミノ酸(グルタミン、およびアスパラギン)、疎水性アミノ酸(ロイシン、イソロイシン、バリン、およびメチオニン)、芳香族アミノ酸(フェニルアラニン、トリプトファン、およびチロシン)、そして小アミノ酸(グリシン、アラニン、セリン、およびスレオニン)からなるグループに属する。

【0032】

一般に特異的な活性を変化させないアミノ酸置換は、本発明の技術分野で知られている。

【0033】

最も一般的に行われる代替はAla/Ser, Val/Ile, Asp/Glu, Thr/Ser, Ala/Gly, Ala/Thr, Ser/Asn, Ala/Val, Ser/Gly, Tyr/Phe, Ala/Pro, Lys/Arg, Asp/Asn, Leu/Ile, Leu/Val, Ala/Glu, Asp/Gly、およびその逆である。その他の保存的な置換の例を以下の表Cに示す。

【0034】

10

20

30

40

50

【表 B】

表C

対象アミノ酸	可能な置換残基	推奨の置換残基
Ala (A)	V; L; I	V
Arg (R)	K; Q; N	K
Asn (N)	Q; H; D, K; R	Q
Asp (D)	E; N	E
Cys (C)	S; A	S
Gln (Q)	N; E	N
Glu (E)	D; Q	D
Gly (G)	A	A
His (H)	N; Q; K; R	R
Ile (I)	L; V; M; A; F;	L
Leu (L)	I; V; M; A; F	I
Lys (K)	R; Q; N	R
Met (M)	L; F; I	L
Phe (F)	L; V; I; A; Y	Y
Pro (P)	A	A
Ser (S)	T	T
Thr (T)	S	S
Trp (W)	Y; F	Y
Tyr (Y)	Trp; F; T; S	F
Val (V)	I; L; M; F; A;	L

10

20

30

【0035】

ペプチド長に応じて、本発明のペプチドは、例えばペプチド自動合成機などの周知の手法で合成、または遺伝子工学技術により産生し得る。例として、融合相手および本発明のペプチドを含む融合タンパク質をコードする融合遺伝子は遺伝子工学により調製され、そして融合タンパク質発現のために宿主細胞に導入される。その後、本発明のペプチドは目的ペプチド回収のためプロテアーゼまたは化合物をもちいて融合タンパク質から切断および単離される。この目的のために、第Xa因子もしくはエンテロキナーゼのようなプロテアーゼまたは、CNBrもしくはヒドロキシシルアミンのような化合物で切断可能なアミノ酸残基をコードするDNA配列を、融合相手および本研究のペプチドをコードするポリヌクレオチド間に挿入し得る。

40

【0036】

本発明の化粧品組成物は配列番号1 および、少なくとも一つの化粧品的に許容される賦

50

形剤を含む。

【0037】

本発明の化粧品組成物はペプチド、またはそれらの誘導体および/もしくは塩を重量の0.00000001%から20%、好ましくは0.000001%から15%、より好ましくは0.0001%から10%、さらに好ましくは0.0001%から5%含むことができる。

【0038】

本発明の化粧品組成物にはそのような組成物をより化粧品的もしくは美容品的に許容されるものにする、またはそれらに追加の使用効能を与えるために適した様々な他の任意の成分を含み得る。このような従来からある任意の成分は当業者にはよく知られている。

これらにはWenningerおよびMcEwen編集のCTFA国際化粧品成分辞書第7版(The Cosmetic, Toiletry, and Fragrance Association, Inc., Washington, D. C., 1997)に書かれた成分などの、化粧品的に許容されるいかなる成分も含まれる。

本明細書で用いる「化粧品的に許容された」とは皮膚、髪、または本明細書で下記に定義する他の適切な基質と接触して使用するのに適切な材料(例えば化合物もしくは組成物)を意味する。

【0039】

本発明で有用な化粧品的に許容される成分には、化粧品的に許容される担体、揮発性および不揮発性の溶媒、水、およびその他の追加成分、例えば、界面活性剤、防腐剤、吸収剤、キレート剤、潤滑剤、保湿剤、撥水剤、酸化防止剤、紫外線吸収剤、抗刺激剤、ビタミン、微量金属、抗菌剤、香料、染料および色成分、ならびに／または構造化剤などが含まれる。

【0040】

本明細書で用いる「化粧品的に許容される担体」という表現は1つ以上の適合する固体または液体の充填剤、希釈剤、増量剤など、本明細書上記で定義された化粧品的に許容されるものを意味する。

本明細書で用いる「適合する」という用語は、本発明の組成物の成分が、本発明の主成分と、互いに、通常の使用状況下で組成物の有効性を実質的に低下させ得る相互作用がないような方法で、組み合わせることができることを意味する。

【0041】

本発明で使用される担体の種類は所望の製品の種類に依存する。本発明で有用な組成物は製品の形態として多種多様であり得る。これらは以下に限らないが、ローション、クリーム、ゲル、スティック、スプレー、軟膏、ペースト、ムースまたは化粧品(例えばファンデーションを含む固体、半固体、または液体の化粧品)を含む。

【0042】

これらの製品の形態はいくつかの種類の担体、以下に限らないが、溶液、エアロゾル、エマルジョン(水中油型、油中水型を含む)、ゲル、固体、リポソームを含み得る。

【0043】

本発明の組成物は組成物の形態に依存して異なった量の水を含み得る。水の量は、存在する場合、組成物の総重量と比較した重量が1%未満から99%超までの範囲であり得る。本発明における水性組成物は特に、水性ローション、または油中水型もしくは水中油型のエマルジョン、または複合エマルジョン(油中水中油型または水中油中水型3層エマルジョン)である。このようなエマルジョンは知られており、一例としてC. FOX 著“Cosmetics and Toiletries” - November 1986 - Vol. 101 - pages 101 - 112.中に記載されている。

【0044】

固体組成物、スプレー組成物、または油中水型クリームは通常、組成物の総重量と比較した重量が10%以下、より好ましくは5%以下の水が含まれている。回転塗布型組成物、水性組成物、または防臭剤は通常、組成物の総重量と比較した重量が約15%から約99%、より好ましくは約30%から約90%、さらに好ましくは約50%から約80%の水が含まれている。

【0045】

本発明の組成物は一つ以上の揮発性溶媒を含み得る。存在する場合、揮発性溶媒または溶媒混合物は一般的に、組成物の総重量と比較した重量が約10%から約90%、より好ましくは約25%から約75%、さらに好ましくは約35%から約65%含まれる。本明細書で有用な溶媒は好ましくは揮発性有機溶媒である。

【0046】

本明細書で用いる「揮発性」とは当業者によく知られているように、周囲の状況下で顕著な量の蒸気圧を持つ物質を指す。

【0047】

本明細書で用いる揮発性溶媒は好ましくは25℃で約2kPaかそれ以上、より好ましくは約6kPaかそれ以上の蒸気圧を持つであろう。本明細書で用いる揮発性溶媒は通常大気圧(1atm)下で沸点が約150℃未満、より好ましくは約100℃未満、さらに好ましくは約90℃未満、さらに好ましくは約80℃未満であろう。好ましくは、本明細書で用いる揮発性溶媒は比較的無臭およびヒトの皮膚に使用して安全なでもの。適切な揮発性溶媒としては、以下に限らないが、C1-C4のアルコール、揮発性シリコン、およびそれらの混合物が挙げられる。さらに本明細書で使用するのに好ましいものはエタノールである。

【0048】

本明細書の組成物は一つ以上の不揮発性溶媒を含む場合もあり得る。存在する場合、不揮発性溶媒または溶媒混合物は一般的には組成物の総重量と比較した重量が約1%から約20%、より好ましくは約2%から約10%、さらに好ましくは約3%から約5%の基準にあるであろう。適切な不揮発性溶媒としては、以下に限らないが、安息香酸ベンジル、セテアリアルアルコール、セチルアルコール、フタル酸ジエチル、ミリスチン酸イソプロピル、ジメチコン、カプリルメチコン、およびそれらの混合物が挙げられる。

【0049】

いくつかのその他の追加成分が本発明の組成物に含まれていてもよい。これらには、以下に限らないが、ポリエチレングリコール(PEG)、ポリビニルピロリドン(PVP)、ヒドロキシプロピルメチルセルロース(HPMC)、ポロキサマーから選択される親水性ポリマー；ベンゾフェノン-3などの紫外線安定剤；酢酸トコフェロールなどの抗酸化剤；フェノキシエタノール、ベンジルアルコール、メチルパラベン、プロピルパラベンなどの防腐剤；乳酸、クエン酸、クエン酸ナトリウム、コハク酸、リン酸、水酸化ナトリウム、炭酸ナトリウムなどのpH調整剤；ファルネソール、フェノールスルホン酸亜鉛、エチルヘキシルグリセリンなどの消臭剤および抗菌剤；トリベヘニン、グリセリンなどの保湿剤；アラントインなどの皮膚改善剤；トリメチルイソプロピルブタナミド、メントールなどの清涼剤；パンテノール、パンテチン、パンテニルエチルエーテル、それらの混合物などの髪質改善成分；プロパン、イソプロパン、ブタン、イソブテンなどのプロペラント；酢酸カリウム、塩化ナトリウム、それらの混合物などの塩類全般；香料および染料が含まれる。

【0050】

存在する場合、これらの追加成分は、好ましくは組成物の総重量と比較した重量が10%未満、さらに好ましくは5%未満の基準であろう。

【0051】

本発明のペプチドはメラノサイトのメラニン産生を活性化し得るだけでなく、プロコラーゲンIおよびエラスチンの産生を促進し得る。したがって本発明の化粧品組成物は皮膚の老化および光老化の処置および予防に特に有効である。

本発明を以下の実施例でさらに説明するが、これらは特許請求の範囲に記載された発明の範囲を限定するものではない。

【実施例1】

【0052】

インビトロ活性

ラットの褐色細胞腫細胞株(PC12)におけるNGF処置は結果としてc-fos mRNAおよび

10

20

30

40

50

タンパク質を発現させる(J. Milbrandt, "Nerve growth factor rapidly induces c-fos mRNA in PC12 rat pheochromocytoma cells", Proc Natl Acad Sci U S A. 1986 Jul;83(13):4789-93)。

【0053】

Milbrandtの研究から始め、出願人はルシフェラーゼレポーター遺伝子(PC12-Luci)を駆動するヒトc-fosプロモーターを安定的にトランスフェクトしたクローン(B9)を用いてNGF受容体の活性を計測した。このクローンはNGF1-14の活性を評価するための機能的および定量的アッセイのセットアップに使用された。この実験は内因的にNGF受容体TrkAおよびp75を発現するPC12-Luci細胞で行った。細胞は以下の組成の完全培養液中で維持した。

- ・DMEM-F12混合物(DMEM-F12 Glutamax; Life Technologies, GIBCO 10565-018)
- ・5%牛胎児血清(FBS, Sigma Aldrich, F7524)
- ・10%馬血清(HS, Sigma Aldrich, H 1138)
- ・1%ペニシリン-ストレプトマイシン(Life Technologies, GIBCO 15140-122)

【0054】

継代のため、細胞は穏やかにPBSで洗い、そしてトリプシンとともに室温または37℃で5分間インキュベートした。培養液を加え細胞を再懸濁した(6-8回)。

【0055】

実験は事前に50 µg/mlのI型コラーゲンを塗布した黒の96ウェルを用いて2重に行った。

【0056】

PC-12-Luci細胞を完全培養液100 µl中、25000/ウェルになるように播種した。24時間後、細胞培養液を慎重に取り除いた。その後細胞は0.1%のBSAを加えた標準タイロード緩衝液(50 µl/ウェル)中で、5つの濃度のNGF1-14 (30 ng/ml-300 µg/mlの範囲、1:10段階希釈液)とともに37℃で4時間インキュベートした。参照として、参照Negermin™化合物(MimeTech Srl)を30 µg/ml加えた。NGF1-14の保存溶液は滅菌水に再懸濁し、分注および-20℃で保存した。Negermin™化合物の保存溶液は製剤緩衝液に再懸濁し-20℃で保管した。

【0057】

インキュベート後、基準値の蛍光をEnSpireマルチモードプレートリーダー(PerkinElmer)を用いて30秒間計測した。その後、トライトン-ルシフェリン混合液を細胞に量比1:1(50 µl/ウェル)で加え、細胞を溶解させた。得られた蛍光シグナルをさらに60秒間計測した。

【0058】

上記で用いた溶液および緩衝液は以下の組成であった。

- ・製剤緩衝液:50mM NaH₂PO₄、100mM NaCl、pH7.2
- ・タイロード緩衝液:130mM NaCl、5mM KCl、2mM CaCl₂、1mM MgCl₂、5mMのNaHCO₃、20mM HEPESをpH7.4の水に入れ、フィルター滅菌および4℃で保存。
- ・脂肪酸フリーのウシ血清アルブミン(BSA)(Sigma,A8806);保存溶液:10%になるようにタイロード緩衝液に溶かし、分注および-20℃で保存。
- ・トライトン溶解液保存溶液:25mM TRIS、25mM Na₂HPO₄、2mM DTT、10%グリセロール、2%トライトンX-100;分注および20℃で保存。
- ・ルシフェリン保存溶液:20mM トリシン、2.67mM MgSO₄、0.1mM EDTA、33.3mM DTT、270 µMコエンザイム、470 µM ルシフェリン、530 µM ATP;分注および-80℃で保存。

【0059】

全ての蛍光の値は基準値の蛍光と比較し標準化した。反応値は、反応速度論的に記録された蛍光の平均値として計算された。

【0060】

10

20

30

40

50

データをさらに解析(例えば、用量反応関係、およびEC50値の計算)およびグラフパットプリズム(GraphPad Software, Inc.)を用いてグラフ化した。この結果を図1に図示し、参照のNegermin™化合物と共に各濃度におけるNGF1-14の活性のプロット(図1A)、およびEC50曲線(図1B)を表した。この結果は、NGF1-14は用量依存的に基準蛍光値を増加させることを示した(Ec50=290.95 ng/ml)。

【0061】

結論として、これらの結果はインビトロでの力価が参照標準Negermin™化合物よりも高く、しかしrhNGFよりも低いことを示したことから、NGF1-14が機能的な活性をもつことを実証した。力価の低下は、提案されている化粧品用途と一致する。

【実施例2】

【0062】

前臨床試験

分布実験はNGF1-14ゲル製剤の角質層浸透能および真皮到達能を評価するために実行され、皮膚の浸透を促進するために超音波導入に似た手法も用いた。テープ脱毛、および超音波照射をメスの成熟Sprague Dawley(SD)ラット(10-12月齢)の剃毛した背中の領域におこなった。

【0063】

低周波超音波導入(LFS)はSonics Ultrasonic Processor Model VCX 400を用いて、一般的な臨床実例を参照して、周波数20KHz(先端変位2cm、連続モード)で6分または10分間動作させた。これは、使用に適切でない長時間の超音波導入は、皮膚浸透を増加させるだけでなく、かなりの熱損傷を与えることが知られているためである(Ref. International Journal of Health Sciences & Research 477 Vol.5; Issue: 5; May 2015: A Review on Ultrasound Parameters and Methods of Application in Transdermal Drug Delivery)。

【0064】

ビヒクル対照およびNGF1-14ゲル製剤は皮膚のLFS事前処置領域(S)、もしくは剃毛/テープ脱毛領域(NF)に投与した。ビヒクル対照とNGF1-14ゲル製剤の組成を以下の表1に示す。

【0065】

【表1】

表1

	溶媒対象	NGF1-14
ヒアルロン酸ナトリウムベースの ハイドロゲル	90-95%	90-95%
ポリビニルアルコール (Sigma Aldrich Mowiol®40-88)	5-10%	5-10%
パラベン安定化剤 (Sigma Aldrich)	1%以下	1%以下
NGF1-14	—	0.1%

【0066】

分子量が50-150KDaのヒアルロン酸ナトリウム(Contipro社製)を水に溶かして、ヒアルロン酸ナトリウムベースのハイドロゲルを調製した。

【0067】

処置は2時間後に繰り返し行い、2回目のゲル/NGF模倣品適用の2時間後にラットをサクリファイスし、皮膚サンプルを解剖した。

【0068】

処置のスキームを図2に示す。NおよびGはLFSなしでそれぞれNGF1-14およびビヒクルゲルで処置した領域を示し、NSおよびGSはLFSありでそれぞれNGF1-14およびビヒクルゲルで処置した領域を示す。NLおよびGLはLFS領域と隣接し重ならない皮膚領域を示す。

【0069】

超音波処理された(S)および超音波処理されていない(NS)皮膚領域由来の表皮および真皮をランセットを用いて分離し、PBSで洗い、2つの部分に切り分けた。前者は全タンパク質抽出および生化学的解析用の処理のために滅菌チューブに-80℃で保存した。

【0070】

肌領域を続く組織学および免疫組織化学的評価用の処理のために4%PFAに浸した。

【0071】

表皮および真皮由来のタンパク質抽出物はNGF1-14ゲル製剤の角質層浸透および真皮到達能力におけるLFS適用の効果を評価するために用いた。

【0072】

NGF1-14の定量は逆相C4カラム、溶出にリン酸緩衝液(pH7.4)およびアセトニトリルを用いたHPLC-UVで決定した。HPLC-UV法は線形性、質再現性および量再現性、および回収率で検証した。結果を図3Aおよび3Bに示す。ビヒクルでの処置と比較して、NGF1-14の顕著な増加が、LFS後の表皮及び真皮でみられた。NGF模倣品/LFS適用の有効性はNGF生存/栄養受容体TrkAの発現量および活性の解析により確かめられた。

【0073】

NGF1-14のTrkAリン酸化への影響は、一般的な実験室的方法を参照のもと、ペプチドで処置した培養PC12細胞由来タンパク質抽出物について、P-TrkA抗体を用いたウエスタンブロッティング法により検証した。

【0074】

図4に示すように、LFSの有無によらず、関連ビヒクル対照群と比較してNGF1-14適用を受けたすべての真皮由来サンプル中においてTrkAのリン酸化レベルの上昇がみられた。

【実施例3】

【0075】

皮膚の老化および光老化

細胞外マトリックスタンパク質コラーゲンおよびエラスチンは傷の治癒、皮膚の老化および光老化に関連することから、NGF1-14局所適用のこの二つのタンパク質発現量に対する影響も解析した。

【0076】

初めに一回投与試験、続いて2週間の投与試験におけるプロコラーゲンIおよびエラスチンを市販のElisa法キットを用いて測定した。

【0077】

一回投与試験の結果を図5にまとめた。2つのタンパク質の解析で似た傾向が観察された：超音波処理後、0.1%の投与量でNGF1-14処置されたラットの真皮中においてプロコラーゲンI(A)およびエラスチン(B)どちらも増加が検出された。超音波処理をしない場合、その効果は小さく検出された。エラスチンのわずかな増加が検出され、一方でコラーゲンIの値は実験誤差の範囲内でポジティブコントロールの値と同程度だった。

【0078】

一回および2週間の投与試験

NGF1-14の0.1%投与(P0.1%)の予防効果を、成人の皮膚を下位紅斑レベルのUV-B(MED-60mJ/cm²、一日に2回)に暴露させることで評価した。初めに一回投与試験(1日)、続いて処置の前に3週間暴露した。この実験的手順は老化中における構造的、分子的变化を引き起こすため、光老化モデル(PAG)とも呼ばれる。

【0079】

PAGおよびPAGでないラットの剃毛した背中の皮膚にP0.1%もしくはビヒクルゲルの局

10

20

30

40

50

所処置を2週間行った。最終週の処置の間もUV-B暴露(MED=60mJ/cm²、一日に一回)を行った。

【0080】

ラットをサクリファイスし、皮膚をランセットを用いて解剖し、PBSで洗浄し、二つの部位に切り分けた。前者を総タンパク質抽出および生化学的解析用の処理のために滅菌チューブに-80℃で保存した。後者を4%PFAに浸し、組織学的および免疫組織化学的評価のために処理した。

【0081】

一回投与試験と一致して、光老化は真皮におけるプロコラーゲンIの減少を誘導し(図6A)、エラスチンの発現が検出された(図6B)。

【0082】

P0.1%の適用はPAGでない、およびPAGどちらの真皮においてもプロコラーゲンIを増加させる結果となったが、健康な皮膚においてその効果はより顕著だった(図6A)。エラスチン濃度においてはその変化はあまり顕著ではなかった。

【実施例4】

【0083】

日焼け作用

NGF1-14の局所適用による、メラノサイトのメラニン産生を活性化する効果がこれまでに評価されている。

【0084】

すでに準備されたプロトコルを参照して、前培養のヒト通常メラノサイトをペトリ皿に播種し、いくつかの濃度のNGF1-14の存在下、非存在下で一週間培養した。メラミン含有量は酵素免疫アッセイELISAで測定した。ペプチドが豊富な条件での培養において増加を観察した。

【実施例5】

【0085】

皮膚刺激試験

皮膚刺激試験は皮膚化粧品用に改編したアッセイプロトコルを適用して実施した。すなわち、MTT比色アッセイとLDH放出アッセイである。

【0086】

MTT比色アッセイはミトコンドリアのコハク酸脱水素酵素の活性を測定する。これは生存細胞でのみ活性を持ち、MTT(黄色)と反応し、青色の塩を産生する。この工学密度(ODn)は、生存細胞数に比例し、波長570nmで分光光度的に定量される。

【0087】

LDH放出アッセイは培養溶液中に放出された細胞質酵素である、乳酸脱水化酵素の量を測定する。この酵素の放出は細胞膜の完全性の喪失を意味する。この量は特定の試薬を用いて、波長490nmで分光光度的に定量される。

【0088】

試験は三重で、Epi-100-ASYアッセイ培地中のEpiDermTM組織(MatTek Corporation, Bratislava, Slovakia)2サンプル(1および2)に対し、NGF1-14ゲル製剤を活性があった0.1%の三倍の濃度である、0.3%で投与し、実施した。陽性対照として1%トライトンX-100溶液を用いた。陰性対照として非ペプチド含有ゲル基質を用いた。陽性対照と陰性対照は二重で行った。サンプルは18時間、一晩中接触させた。

【0089】

この結果を以下の表2(MTT)および表3(LDH)にまとめた。

【0090】

10

20

30

40

50

【表 2】

表2

	平均値 (OD) ± SD	標準化後の値 ± SD
陰性対照	2.0 ± 0.1	100.0 ± 3.1
陽性対照	0.7 ± 0.0	33.3 ± 2.0
サンプル 1	1.8 ± 0.0	91.6 ± 1.8
サンプル 2	1.9 ± 0.1	99.3 ± 3.8

10

【0091】

【表 3】

表3

	平均値 (OD) ± SD	標準化後の値 ± SD
陰性対照	0.13 ± 0.00	1.0 ± 0.0
陽性対照	1.04 ± 0.04	8.0 ± 0.3
サンプル 1	0.24 ± 0.04	1.9 ± 0.3
サンプル 2	0.14 ± 0.05	1.1 ± 0.4

20

【0092】

MTTアッセイから、サンプルは生存率が陰性対照の70%比率の値よりも高い、「非刺激性」だといえる。LDHアッセイから、サンプルはLDH放出値が陰性対照として記録された値の5倍よりも低い、「非刺激性」だといえる。よってサンプル1および2はどちらも「非刺激性」だといえる。

【実施例 6】

【0093】

皮膚感作試験

30

皮膚感作試験はElisaキットを用いたIL-18放出アッセイを適用して実施した。

【0094】

IL-18放出アッセイは培養液中のインターロイキン18(IL-18)の量を測定する。IL-18は炎症誘導性のサイトカインで、アレルギー性の接触感作の誘導に重要な役割を果たす。この量の定量には直接ELISA法を用いた。すなわち、呈色が直接的に培養液中のサイトカイン量と比例する。

【0095】

試験は三重で、Epi-100-ASYアッセイ培地中のEpiDermTM組織(MatTek Corporation, Bratislava, Slovakia) 2サンプル(1および2)に対し、NGF1-14ゲル製剤を活性があった0.1%の三倍の濃度である、0.3%で投与し、実施した。陽性対照として0.15% DNCB(2,4-ジニトロクロロベンゼン)溶液を用いた。陰性対照として非ペプチド含有ゲル基質を用いた。陽性対照と陰性対照は二重で行った。サンプルは18時間、一晩中接触させた。

40

【0096】

この結果の以下の表4にまとめた。

【0097】

50

【表 4】

表4

	平均値(pg/ml) ± SD	標準化後の値± SD
陰性対照	27.0 ± 3.8	1.0 ± 0.1
陽性対照	252.3 ± 16.4	9.3 ± 0.6
サンプル1	38.3 ± 5.6	1.4 ± 0.2
サンプル2	45.6 ± 8.2	1.7 ± 0.3

10

【0098】

IL-18放出アッセイの結果から、サンプルは、IL-18放出値が陰性対照として記録された値の2倍よりも低い、「非感作性」だといえる。よってサンプル1および2はどちらも「非感作性」だといえる。

【実施例7】

【0099】

NGF1-14のpKaおよびLogP並びにD値の評価

実験的なpKaならびに分離、分配係数(LogPおよびLogD)は電位差自動滴定装置シリウスT3(Sirius Analytical Instruments Ltd., East Sussex, UK)を用いて決定され、これはAg/AgClダブルジャンクション参照PH電極、シリウスD-PASスペクトロメーターおよび濁度測定器を備えている。pH電極はpH1.8-12.2の範囲に滴定的に校正した。滴定過程の最中は、オーバーヘッドスターラーを用い、温度測定器で温度を測定した。滴定実験は気温25±1℃、アルゴン雰囲気中で0.15M KCl溶液(ISA 水)を用いて行った。すべての試験は滴定試薬として標準化された0.5M KOHおよび0.5M HClを用い、分配係数試験は分配溶液としてオクタノール飽和ISA水(ISA水に5%)を用いた。pKaは、pH測定による電位差滴定法で測定した。粉末(0.5mg前後)を1.5mlのISA水に溶かし、滴定はpH2.0-12.0の範囲で三重に行った。LogPは粉末(0.7mg前後)を1mlのISA水に溶かし、続いて3つの異なる濃度のオクタノール(一般に50%、60%、70%)でpH測定滴定を行うことにより三重に測定した。計測モデルのためのpKaの予測およびLogPの算出はACD/Perceptaを用いて実行された。

20

30

【0100】

この結果を以下の表5に示す。ペプチドは決して非極性分子ではないのでLogPの値は相対的な値だと考える必要がある。

【0101】

【表5】

表5

酸 pKa	4.42 ±0.05 (n=50)
塩基 pKa	7.41 ±0.07 (n=50)
塩基 pKa	6.43 ±0.06 (n=50)
Log P (w/o)	-8.50
Log D (7.4)	-7.90

40

50

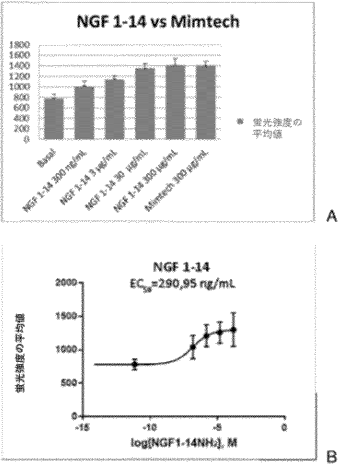
【 0 1 0 2 】

本発明はそのいくつかの具体的な実施形態を特に参照して開示されるが、しかし当業者によって添付の請求項で定義される発明の範囲から逸脱しない修正および変更はなされ得ることは理解されるべきである。

【図面】

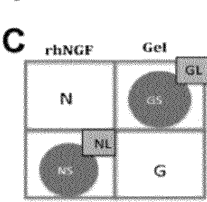
【図 1】

Fig. 1



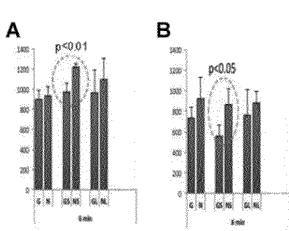
【図 2】

Fig. 2



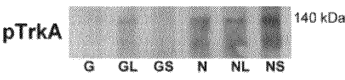
【図 3】

Fig. 3



【図 4】

Fig. 4



10

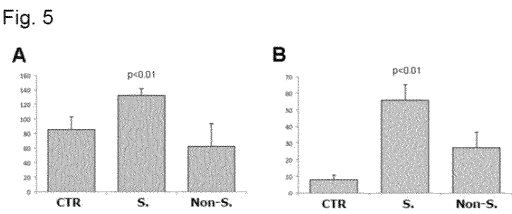
20

30

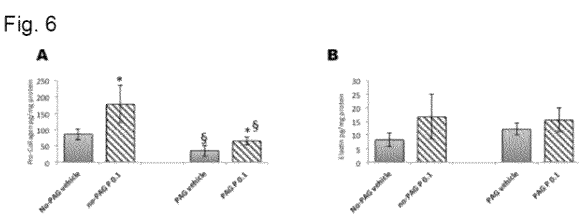
40

50

【図 5】



【図 6】



【配列表】
202250867600001.app

10

20

30

40

50

【国際調査報告】

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No
PCT/IB2019/058641

A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER INV. A61Q19/08 A61K47/36 A61K47/32 A61K47/14 A61K9/06 A61K9/00 A61K8/81 A61K8/73 A61K8/37 A61K8/04 ADD. According to International Patent Classification (IPC) or to both national classification and IPC		
B. FIELDS SEARCHED Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols) 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, EMBASE, BIOSIS		
C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT		
Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
A	WO 2013/065078 A2 (SAMPO S R L [IT]) 10 May 2013 (2013-05-10) claims 1-18	1-12
A	----- WO 99/39728 A2 (UNIV BOSTON [US]; GILCHREST BARBARA A [US] ET AL.) 12 August 1999 (1999-08-12) claims 1-31	1-12
A	----- KR 2017 0049299 A (INDUSTRY-ACADEMIC COOP FOUND GYEONGSANG NAT UNIV [KR] ET AL.) 10 May 2017 (2017-05-10) paragraph [0001] - paragraph [0016] claims 1-7	1-12
A	----- KR 2010 0058858 A (AMOREPACIFIC CORP [KR]) 4 June 2010 (2010-06-04) claims 1-6 ----- -/-	1-12
☒ Further documents are listed in the continuation of Box C. ☒ 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 16 December 2019		Date of mailing of the international search report 09/01/2020
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 Schifferer, Hermann

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No
PCT/IB2019/058641

C(Continuation). DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT		
Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X	WO 98/49308 A1 (GENENTECH INC [US]) 5 November 1998 (1998-11-05) sequences 1-16 claims 1-40 page 6, line 12 - page 20, line 15 -----	1-12
X	CN 107 286 233 A (STADSON BEIJING BIOPHARMACEUTICALS CO LTD) 24 October 2017 (2017-10-24) sequences 2-49 -----	1-12
X	CN 107 973 848 A (SINBIOWAY BIOMEDICINE CO LTD) 1 May 2018 (2018-05-01) sequences 1,2 claims 1-10 -----	1-12

10

20

30

40

50

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

Information on patent family members

International application No

PCT/IB2019/058641

Patent document cited in search report	Publication date	Patent family member(s)	Publication date
WO 2013065078 A2	10-05-2013	CA 2854271 A1 EP 2773318 A2 JP 6130846 B2 JP 2014532694 A US 2014242007 A1 WO 2013065078 A2	10-05-2013 10-09-2014 17-05-2017 08-12-2014 28-08-2014 10-05-2013
WO 9939728 A2	12-08-1999	AT 281175 T AU 755426 B2 CA 2320483 A1 DE 69921614 D1 EP 1053008 A2 US 2003175231 A1 WO 9939728 A2	15-11-2004 12-12-2002 12-08-1999 09-12-2004 22-11-2000 18-09-2003 12-08-1999
KR 20170049299 A	10-05-2017	NONE	
KR 20100058858 A	04-06-2010	NONE	
WO 9849308 A1	05-11-1998	AU 7154698 A AU 2002300365 A1 CA 2286558 A1 EP 0977860 A1 JP 2001527402 A WO 9849308 A1	24-11-1998 30-01-2003 05-11-1998 09-02-2000 25-12-2001 05-11-1998
CN 107286233 A	24-10-2017	NONE	
CN 107973848 A	01-05-2018	NONE	

10

20

30

40

50

フロントページの続き

(51)国際特許分類

F I

テーマコード (参考)

A 6 1 K 8/04 (2006.01)

A 6 1 K 8/04

C 0 7 K 14/48 (2006.01)

C 0 7 K 14/48

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,N
E,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,JO,JP,KE,K
G,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,N
I,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,UZ,VC,VN,ZA,ZM,ZW

(特許庁注：以下のものは登録商標)

1. トライトン

ツラ・リチエルカ・シエンティフィカ、センツァ・ヌメロ・チーヴィコ

(74)代理人 100145403

弁理士 山尾 憲人

(74)代理人 100122301

弁理士 富田 憲史

(74)代理人 100157956

弁理士 稲井 史生

(74)代理人 100170520

弁理士 笹倉 真奈美

(72)発明者 パブロ・ペッレグリーニ

イタリア、イー 2 0 1 2 3 ミラノ、コルソ・マジェンタ 4 6 番、コスモ・ソチエタ・ア・レスポン
サビリタ・リミタータ内

F ターム (参考) 4C083 AC482 AD112 AD332 AD411 AD412 BB01 BB13 BB14 BB21 BB41
BB45 BB46 BB47 BB48 BB60 CC04 CC05 DD08 DD11 DD21 DD22
DD23 DD27 DD32 DD33 DD41 DD45 EE03 EE06 EE07 EE12
4H045 AA10 AA30 BA16 CA40 DA21 EA15