(19)日本国特許庁(JP)　(12)特　許　公　報(B2)　(11)特許番号

特許第4681087号
(P4681087)

(45)発行日　平成23年5月11日(2011.5.11)　(24)登録日　平成23年2月10日(2011.2.10)

(51)Int.Cl.　F I
A61K 8/66 (2006.01)　A61K 8/66
A61K 38/46 (2006.01)　A61K 37/54
A61P 17/00 (2006.01)　A61P 17/00
A61Q 19/00 (2006.01)　A61Q 19/00

請求項の数 18　(全 24 頁)

(21)出願番号　特願平10-501883
(86)(22)出願日　平成9年6月13日(1997.6.13)
(65)公表番号　特表2000-512298(P2000-512298A)
(43)公表日　平成12年9月19日(2000.9.19)
(86)国際出願番号　PCT/US1997/010427
(87)国際公開番号　WO1997/047283
(87)国際公開日　平成9年12月18日(1997.12.18)
審査請求日　平成14年10月2日(2002.10.2)
審判番号　不服2007-15168(P2007-15168/J1)
審判請求日　平成19年5月28日(2007.5.28)
(31)優先権主張番号　08/664,056
(32)優先日　平成8年6月13日(1996.6.13)
(33)優先権主張国　米国(US)

(73)特許権者　507173894
アクティブ　オーガニクス，エルピー
アメリカ合衆国　７５０５７　テキサス州，セント　ルイスビル，イエイツ　１０９７
(74)代理人　100091096
弁理士　平木　祐輔
(74)代理人　100096183
弁理士　石井　貞次
(74)代理人　100118773
弁理士　藤田　節
(72)発明者　ノートン，スコット，ジェイ．
アメリカ合衆国　７６２２６　テキサス州，アーガイル，ソーンリッジ　コート　１１０５

最終頁に続く

(54)【発明の名称】酸性プロテアーゼ酵素と酸性緩衝剤の組合せおよびその使用

(57)【特許請求の範囲】
【請求項１】
表皮の剥離を増強するための組成物であって、（１）ｐＨ５．５より低いｐＨでは酵素活性を示し、ｐＨ５．５またはそれ以上のｐＨではほとんど活性がない酸性プロテアーゼと；（２）皮膚に塗布した場合に皮膚の表面ｐＨを一時的に５．５より低いｐＨに下げる酸を含む酸性緩衝剤とを含む組成物であって、この酸性緩衝剤は自然の表皮プロセスによる中和を受け、そのためかかる組成物を塗布した皮膚の表面ｐＨはｐＨ５．５に戻り、ここで酸性プロテアーゼはペプシンではない、上記組成物。
【請求項２】
酸性プロテアーゼは、真菌プロテアーゼ、細菌プロテアーゼ、または哺乳動物プロテアーゼ、およびこれらの混合物よりなる群から選択される、請求項１記載の組成物。
【請求項３】
酸性プロテアーゼは、カテプシン、ヒト尿の酸性プロテアーゼ、リゾプスペプシン、ペニシロペプシン、エンドチアペプシン、およびこれらの混合物よりなる群から選択される、請求項２記載の組成物。
【請求項４】
酸性緩衝剤の酸成分は、無機酸、有機酸およびこれらの混合物よりなる群から選択される、請求項１～３のいずれか1項に記載の組成物。
【請求項５】
有機酸は、乳酸、クエン酸、ソルビン酸、グリコール酸、リンゴ酸、グルコン酸、および

これらの混合物よりなる群から選択される、請求項４記載の組成物。
【請求項６】
酸性緩衝剤の酸成分は、リン酸、ピロリン酸、三リン酸、ポリリン酸、重硫酸ナトリウム、重硫酸カリウム、およびこれらの混合物よりなる群から選択される無機酸である、請求項４記載の組成物。
【請求項７】
酸性緩衝剤は、製薬上または化粧上許容される担体、ビヒクル、または賦形剤をさらに含む、請求項１～６のいずれか1項に記載の組成物。
【請求項８】
酸性緩衝剤の製薬上または化粧上許容される担体、ビヒクル、または賦形剤成分は、医薬製剤で使用される親水性増ちょう剤、ローション剤、チンキ剤、クリーム剤、乳剤、ゲル剤、軟膏剤、水、水で練りうるクリーム、ポリビニルアルコール、ヒドロキシエチルセルロース、セルロース、親水性アクリルポリマー、皮膚軟化薬、皮膚加湿成分、酵素安定剤、グリセロール、界面活性剤、保存剤、およびこれらの混合物よりなる群から選択される、請求項７記載の組成物。
【請求項９】
酸性プロテアーゼは、最終組成物の０．１重量％～５０．０重量％の量で存在する、請求項８記載の組成物。
【請求項１０】
酸性プロテアーゼは、最終組成物の１．０重量％～５．０重量％の量で存在する、請求項９記載の組成物。
【請求項１１】
酸性プロテアーゼは、１．０～５０００HUT単位/mgの総比活性を有する、請求項１～１０のいずれか1項記載の組成物。
【請求項１２】
酸性プロテアーゼは、５０．０～３０００HUT単位/mgの総比活性を有する、請求項１１記載の組成物。
【請求項１３】
酸性プロテアーゼは、５００～１５００HUT単位/mgの総比活性を有する、請求項１２記載の組成物。
【請求項１４】
酸性緩衝剤の酸成分は、最終組成物の０．００１重量％～９５．０重量％の量で存在する、請求項１～１３のいずれか1項記載の組成物。
【請求項１５】
酸性緩衝剤の酸成分は、最終組成物の０．０１重量％～２５．０重量％の量で存在する、請求項１４記載の組成物。
【請求項１６】
酸性緩衝剤の酸成分は、最終組成物の１．０重量％～５．０重量％の量で存在する、請求項１５記載の組成物。
【請求項１７】
表皮の剥離を増強するための医薬組成物であって、（１）ｐＨ５．５より低いｐＨでは酵素活性を示し、ｐＨ５．５またはそれ以上のｐＨではほとんど活性がない、４０００HUT単位/mgの活性を有する最終組成物の４重量％の量で存在する、酸性プロテアーゼと；（２）皮膚に塗布した場合に皮膚の表面ｐＨを一時的に５．５より低いｐＨに下げる、最終組成物の３．０重量％の量で存在する乳酸を含む酸性緩衝剤とを含み、該組成物の有効量を、表皮の剥離を増強するために有効な時間にわたり、被験体の皮膚の領域に局所投与することにより上記増強を行い、酸性緩衝剤は自然の表皮プロセスによる中和を受け、そのためかかる組成物を塗布した皮膚の表面ｐＨはｐＨ５．５に戻る、上記医薬組成物。
【請求項１８】
表皮の剥離を増強するための医薬組成物であって、（１）ｐＨ５．５より低いｐＨでは酵

素活性を示し、ｐＨ５．５またはそれ以上のｐＨではほとんど活性がない、４０００HUT単位/mgの活性を有する最終組成物の４重量％の量で存在する、酸性プロテアーゼと；（２）皮膚に塗布した場合に皮膚の表面ｐＨを表皮の剥離を増強するために有効な時間にわたり一時的に５．５より低いｐＨに下げる、最終組成物の１．５重量％の量で存在する乳酸を含む酸性緩衝剤とを含み、酸性緩衝剤は自然の表皮プロセスによる中和を受け、そのためかかる組成物を塗布した皮膚の表面ｐＨはｐＨ５．５に戻る、上記医薬組成物。

【発明の詳細な説明】

１．発明の分野

本発明は、少なくとも１つの酸性プロテアーゼ酵素と酸性緩衝剤（この酸性緩衝剤は、酸と、薬剤または化粧品として許容される担体を含む）を含むことを特徴とする新規な組成物に関するものであり、そしてこの組成物は、異常な皮膚症状、疾患または障害の治療または予防、および／または皮膚のきめまたは外見の改善、および／または表皮剥離の増強、および／または表皮細胞の再生の増強のために有用である。本発明はまた、異常な皮膚症状、疾患または障害の治療または予防、および／または皮膚のきめまたは外見の改善、および／または表皮剥離の増強、および／または表皮細胞の再生の増強のための組成物の使用法に関する。

２．発明の背景

ヒトの皮膚の表皮層の剥離は、表皮細胞再生の速度の上昇を誘導することは充分な根拠により示されている（E. Philips, 1995, 米国特許第5,431,913号；W.P. Smith, 1994, Cosmetics and Toiletries 109:41-8）。ヒト表皮は、一定の再生状態にある層状の扁平上皮細胞の複数の層からなる。新しい細胞は、表皮の最も内部の膜である基底層で最初に形成される。これらの細胞は、さらに新しい細胞の産生により取って代わられ、次に表皮の外部層の角質層に輸送されて、そこで通常２～３週間毎に剥が（剥離）される。ヒトの皮膚の一般的健康状態および外見は、このプロセスの速度に大きく依存する。

加齢または環境への曝露のような、ある種の状況または条件は、この正常なプロセスを妨げ、そして細胞再生の速度の全般的な低下をもたらすことがある（VanScottとYu, 1984, J. Am. Acad. Dermatol. 11:867-79）。細胞の層が基底層から角質層に移動するのに要する時間が患者の年齢と共に増大するため、表皮細胞の再生の速度は低下する。典型的な２０歳のヒトでは、表皮の外層の細胞は平均して２週間毎にターンオーバーするのに対して、もっと成熟した皮膚の細胞ターンオーバー間隔は２倍ほど長いこともあることが報告されている（E. Phillips, 1985, 米国特許第5,431,913号）。加齢による細胞再生速度の低下は、太陽光線および他の気候条件への曝露のような環境条件により増悪しうる（K.E. Burke, 1990, Postgraduate Medicine 88（1）:207-27）。細胞再生速度の低下は、皮膚の外層の細胞が環境条件に曝露される時間を増大させ、そして損傷の助長および／または蓄積をもたらしうる。いくつかの研究は、表皮細胞ターンオーバー速度の上昇が、角質細胞間合着の上昇と関連することを示唆している（VanScottとYu, 1989, Cutis 43:222-28）。

表皮層の細胞は、半接着斑、接着斑、ギャップ結合、グリコサミノグリカン、プロテオグリカンのようなタンパク性成分、および皮膚に存在する他の成分により結合しており、そしてこれら全ては、相互におよび細胞成分に結合する能力を有する。表皮細胞のこの結合は、「角質細胞間合着」として説明され、関係する合着強度の程度は、水和およびｐＨのような因子により影響される。角質細胞間合着の増大っは、過角化症を引き起こし、そして表皮細胞の保持により引き起こされる厚くかつしばしば乾燥状または鱗状の皮膚を特徴とする。合着と細胞ターンオーバー速度の間に存在する均衡は、若い皮膚の正常な若返りの原因であり、そしてこれらの因子の不均衡により、成熟した表皮表面の老化した粗くかつ美しくない外見が生じうる。細胞再生速度と角質細胞間合着を均衡させる局所的活性のある成分の探索は、今日の皮膚科学研究において顕著である（VanScottとYu, 1984, J. Am. Acad. Dermatol. 11:867-79）。

この研究領域における最近の進歩は、この点に関して有望な多くの局所的活性のある酸性化合物を提供した（Yuら, 1978, 米国特許第4,105,783号；Yuら, 1982, 米国特許第4,363

,815号）。これらの酸性化合物による長期治療により、表皮細胞再生の速度が増大する。低分子量ヒドロキシまたはケト酸およびそのエステルのような、表皮に活性であることが知られている酸成分は、角質溶解剤／落屑剤としてのその有効性に関して充分に報告されている。高濃度のこれらの酸（例えば、サリチル酸およびグリコール酸）、ならびにトリクロロ酢酸のような他の酸は、適用部位の組織の破壊を引き起こす能力について知られている（W.L. Epstein, 1990, 「刺激性接触皮膚炎」（Irriant Contact Dermatitis）, Jackson and Glodner編, Marcel Decker, Inc., New YorkとBasel, pp. 127-165；Remington's Pharmaceutical Sciences, A. Osol編, 第１６版, Mack Publishing, Inc., Easton, PA., 1980）。低濃度では、これらの酸は、ケラチンの多い角質層の死細胞を遊離させ、角質間合着を妨害し、それによって落屑を促進する能力を有することが証明された；この活性は、「角質溶解活性」と呼ばれる（Remington's Pharmaceutical Sciences, A. Osol編, 第１６版, Mack Publishing, Inc., Easton, PA., 1980；W.P. Smith, 1994, Cosmetics and Toiletries 109:41-8）。

上にリストされるものを含めて、多くの角質溶解剤は、皮膚刺激性である。いくつかの角質溶解剤は、他のものよりも有効であるとして推奨されているが、これらの酸のそれぞれの治療指数を比較すると、特に有利なものはない。「治療指数」とは、成分の角質溶解性の効率とともに所定濃度の刺激のレベルを考慮する、これらの成分の有効性の評価の正確な方法である。低レベルでさえ（４％を超える酸濃度）これらの成分は著しい皮膚刺激を引き起こすことが証明されている。これらの成分のさらに低レベルの使用は刺激を低下させるが、一般に角質溶解の有効性を低下させる。さらに、この酸の長期使用は、細胞再生誘導の効率を低下させる（W.P. Smith, 1994, Cosmetics and Toiletries 109:41-8）。これらの欠点は、非刺激濃度におけるこれらの酸の角質溶解の有効性を増強するための方法論の必要性を指摘している。

やけどからの瘢痕除去および抗菌療法への補助手段のようなもののために、局所療法におけるタンパク質分解性酵素の適用がしばらく行われてきた（G. Rodeheaver, 1975, Am. J. Surg. 129（5）:537-544）。これらの酵素は、一般にパパイヤ（パパイン）、イチジク（フィシン）、およびパイナップル（ブロメリン）のような、植物供給源に制限されている酵素を含む。これらの植物からの抽出物を含有し、タンパク質分解作用により外部表皮層の除去を増強するとして奨励されている化粧品製剤が市販されている。基質特異性およびｐＨに関する活性のスペクトルは、これらの製剤のタンパク質分解作用が、外部表皮層での角質溶解活性をもたらすことを示唆しているが、局所療法に以前から使用されているタンパク質分解酵素は欠点がないわけではない。

現在化粧品の塗布に使用されているこれらの酵素（例えば、パパイン、ブロメリン、およびフィシン）は、一般にｐＨ３～ｐＨ９の広いｐＨ範囲にわたってタンパク質分解活性を示す（Glazer and Smith, 1971, The Enzymes, 第３巻, P. Boyer編, Academic Press, New York, pp. 501-546）。長期の皮膚曝露に関連する問題の少なくともいくつかの原因になっているのは、恐らくこれらの植物由来の酵素の広いｐＨ範囲である。ヒト表皮系は、層状の皮膚のｐＨ勾配を維持する；外層は、約５．５の平均ｐＨを示すことが報告されている（W.P. Smith, 1994, Cosmetics and Toiletries 109:41-48）。表皮の連続層のｐＨは、深さと共に上昇し、真皮層で最終ｐＨは生理学的範囲（ｐＨ約７．４）近くまで達する。上述の植物由来の酵素は、このｐＨ勾配にわたって活性を保つため、これらを皮膚に適用すると、これら植物酵素の活性へのｐＨ制御は存在しない。

タンパク質分解酵素の局所適用から得られる治療活性の程度は、これらの酵素の内在性触媒作用により支配されている。上記で考察されたプロテアーゼにより示される、ｐＨに関して広い範囲のタンパク質分解活性（ｐＨ３～９）により、生成物の処方によってタンパク質分解活性を制御することはほとんどまたは全然できない（GlazerとSmith, 1971, 「酵素」, 第３巻, P. Boyer編, Academic Press, New York, pp. 501-546）。これらの酵素が得られている植物は、そう痒、浮腫、および水疱を含む症状を伴う刺激性接触皮膚炎を引き起こすことが知られている。これらの酵素は、恐らく角質細胞間合着の過剰な低下のせいであるこれらの症状の主要な原因であることと提唱されている（W.L. Epstein, 19

90，「刺激性接触皮膚炎」（Irritant Contact Dermatitis），JacksonとGlodner編，Marcel Decker，Inc.，New YorkとBasel，pp. 127-165）。化粧品用に現在使用されている酵素は、表皮の全ての層にわたって基質依存性タンパク質分解活性を示すことができる。角質細胞間合着を安定化するのに役立つ表皮タンパク質の制御されないタンパク質分解は、この角質細胞間合着を過度に低下させ、そして続いて刺激を引き起こしうる。細胞再生が起こる表皮の基底層のタンパク質分解攻撃は、表皮細胞再生の速度における不均衡を引き起こしうる。水泡および浮腫は、基底膜のこのクラスの酵素による制御されないタンパク質分解の結果であろう。この可能性は、哺乳動物の皮膚へのこれらの植物酵素の注射が、皮膚の浮腫を引き起こすことが知られているという事実により支持される（Morimotoら，1987，Ensho 7（6）:563-567）。この知見を利用して、皮膚科学研究において実験的浮腫が作成されてきた。さらには、上記の刺激性接触皮膚炎の症状は、現在局所適用に使用されている最も有効な濃度の表皮に活性な酸成分により誘導される症状と同様である。したがって、局所適用に関してタンパク質分解活性へのさらに制御されたアプローチにより、これらの副作用のない望ましい結果を得ることができるはずである。

タンパク質分解酵素（例えば、ペプシン）といくつかの酸を含有する、密な壊死形成物（この形成物は、例えば、３度のやけどで観察される）の溶解のための組成物が報告されている（ソビエト連邦特許第439288号，1974年）。これらの組成物が表皮剥離の増強に有用であること、またはこれらの組成物が限定された時間にのみ活性であることは、示されていない。

本出願の背景における任意の参照文献の引用または同定は、このような参照文献が本発明の先行技術として利用可能であるということを容認するものと理解すべきではない。

３．発明の要約

本発明は、異常な皮膚症状、疾患、または障害を治療または予防するための、および／または皮膚のきめおよび／または外見を改善するための、および／または表皮の剥離を増強するための、および／または表皮の細胞の再生を増強するための、新規の医薬組成物および／または化粧品組成物に関する。本組成物は、少なくとも１つの酸性プロテアーゼと酸性緩衝剤を含む。本発明の目的において、酸性プロテアーゼは、皮膚の表面の平均ｐＨより低いｐＨでペプチジルヒドロラーゼ（タンパク質分解）活性を示し、皮膚の表面の平均ｐＨ（これは、ヒトではｐＨ約５．５である（W.P. Smith，1994，Cosmetics and Toiletries 109:41-8））より高いかまたは等しいｐＨではほとんど活性がない酵素である。男性では、皮膚の表面の平均ｐＨはｐＨ約５．３であり、女性ではｐＨ約６である（Ohman and Vahlquist，1994，Acta Dermato-Venereol．74（5）:375-379）。本発明の目的において、皮膚の表面の平均ｐＨ（これはｐＨ約５．５である）は、特に性に特異的な変動を含み、従って約５．５のｐＨは、男性の皮膚の表面の平均ｐＨであるｐＨ約５．３から、女性の皮膚の表面の平均ｐＨであるｐＨ約６までの範囲を含む。好ましくは、皮膚の表面の平均ｐＨ（ｐＨ約５．３～６）より大きいかまたは等しいｐＨでは、本発明で有用な酸性プロテアーゼは、皮膚の表面の平均ｐＨより低い各最適ｐＨで示す酵素活性の約１０％未満の活性を示す。

酸性プロテアーゼは、アポ酵素、ホロ酵素、イソ酵素、またはチモーゲン型でもよい。組成物の酸性プロテアーゼ成分は、最終組成物の約０．００１重量％～約７５重量％、好ましくは約０．１重量％～約５０重量％、より好ましくは約１重量％～約５重量％の量で存在することができる。このプロテアーゼは、Food Chemicals CODEX、第３版、（1981），pp. 496-497、National Academy Press，ワシントンＤ．Ｃ．に記載の方法をセクション５．１（後述）に記載のように変更した方法により測定する時、約１～約５，０００HUT単位/mgの比活性を有する。好ましくはプロテアーゼは、約５０～約３０００HUT単位/mg、より好ましくは約５００～約１５００HUT単位/mgの比活性を有する。

酸性緩衝剤は、皮膚に局所適用されると、皮膚の表面のｐＨを一時的にｐＨ５．５未満に低下させるが、ｐＨ１未満には低下させず、好ましくはｐＨ約２．５～ｐＨ約４．５の間にする組成物である。酸性緩衝剤組成物は、少なくとも１つの酸および薬剤または化粧品として許容される担体、ビヒクル、または賦形剤を有する。緩衝剤の酸成分は、１つまた

はそれ以上の無機酸、または１つまたはそれ以上の有機酸、または無機酸および／または有機酸の任意の組合せであり得る。酸性緩衝剤は、自然の表皮プロセス（例えば、発汗）により時間とともに皮膚の表面の平均ｐＨに中和される。酸性緩衝剤の中和、および従ってプロテアーゼの不活性化に必要な時間は、酸性緩衝剤の処方に依存する。例えば、表皮のアルカリ性に対抗するために酸性緩衝剤が弱酸または弱緩衝物質を含有するなら、時間は短くなり、強い酸が使用されるかまたは酸性緩衝剤中に強い緩衝剤が使用されているなら、時間は長くなる。緩衝剤の酸成分は、１つまたはそれ以上の無機酸、１つまたはそれ以上の有機酸、または無機酸および／または有機酸の任意の組合せであってよく、最終組成物の約０．００１重量％～約９５重量％、好ましくは約０．０１重量％～約２５重量％、より好ましくは約１重量％～約５重量％の量で存在する。

本発明の組成物の局所適用後に皮膚の表面のｐＨがｐＨ約５．５に戻るのに必要な時間の調節は、プロテアーゼ酵素の活性の調節を可能にする。本発明が、広いｐＨスペクトルのタンパク質分解酵素により引き起こされる、先行技術中の欠点や障害（例えば、かゆみ、やけど、水泡など）を克服するのは、このタンパク質分解活性の調節によってである。皮膚の表面ｐＨが約５．５に戻るのに必要な時間は、多くの要因（例えば、治療中の皮膚の症状、疾患または障害、および治療される特定の被験体の皮膚の感受性）により決定される。先行技術に存在する欠点や障害を避けるために、理想的な時間は、本発明の組成物の１回の適用は約４時間を超えず、好ましくは時間は、約５分～約４時間であり、より好ましくは約３０分～約２時間であり、最も好ましくは約３０分～約１時間である。

本発明の医薬組成物は、皮膚に投与された時、異常な生物学的症状、疾患、または障害を治療または予防する利点または作用を与えるものであることに注意されたい。異常な生物学的症状、疾患、または障害を治療または予防する利点または作用は、異常な症状、疾患、または障害の症状または原因の重症度の低下または消失である。異常な症状、疾患、または障害の症状または原因の重症度の低下または消失は、短期的であるかまたは長期的である。本発明の組成物を投与することにより治療されるそのような異常な生物学的症状、疾患、または障害には、乾燥皮膚、重症の乾燥皮膚、ふけ、にきび、角化症、乾癬、湿疹、皮膚のはがれ、そう痒症、老人斑、ほくろ、黒皮症、しわ（大きいものおよび小さいもの、内因性および外因性傷害を含む）、いぼ、皮膚の斑点、過色素沈着皮膚、過角化性皮膚、炎症性皮膚症、年齢関連皮膚変化、洗浄の必要な皮膚、および皮膚萎縮の影響があるが、これらに限定されない。

本発明の化粧品組成物は、皮膚に投与された時、必ずしも異常な生物学的症状、疾患、または障害を治療または予防する利点または作用を与えるものではないが、皮膚のきめや外見を改善し、または表皮の剥離および／または表皮の細胞の再生を増強するものであることに注意されたい。この意味で、皮膚のきめや外見を改善し、または表皮の剥離を増強し、および／または表皮の細胞の再生を増強することは、処置前の状態から皮膚の美しさおよび／またはなめらかさを向上させ、異常な生物学的症状、疾患、または障害の好ましくない微候を隠すように、自然に見えるおよび／または自然に感じる表面を提供することを包含する。これは、表皮に一時的な湿潤効果を提供することを含む。そのような異常な生物学的症状、または疾患には、乾燥皮膚、重症の乾燥皮膚、ふけ、にきび、角化症、乾癬、湿疹、皮膚のはがれ、そう痒症、老人斑、ほくろ、黒皮症、しわ（大きいものおよび小さいもの、内因性および外因性傷害を含む）、いぼ、皮膚の斑点、過色素沈着皮膚、過角化性皮膚、炎症性皮膚症、乾癬、年齢関連皮膚変化、洗浄の必要な皮膚、および皮膚萎縮の影響があるが、これらに限定されない。

さらに別の実施態様において、本発明は、乾燥皮膚、重症の乾燥皮膚、ふけ、にきび、角化症、乾癬、湿疹、皮膚のはがれ、そう痒症、老人斑、ほくろ、黒皮症、しわ（大きいものおよび小さいもの、内因性および外因性傷害を含む）、いぼ、皮膚の斑点、過色素沈着皮膚、過角化性皮膚、炎症性皮膚症、年齢関連皮膚変化、および洗浄の必要な皮膚を含む（しかし、これらに限定されない）、異常な皮膚症状、疾患、または障害を治療するための方法を包含する。この方法は、上記の症状、疾患、または障害を有する被験体の皮膚の領域に、ｐＨ約５．５未満では酵素活性を有する酸性プロテアーゼと皮膚の表面ｐＨを約

５．５未満に下げる酸性緩衝剤とを含む組成物の有効量を、上記の症状、疾患、または障害の治療に有効な時間、局所投与することからなり、酸性緩衝剤は正常な表皮プロセスにより中和される。

さらに別の実施態様において、本発明は、被験体の皮膚の領域に、ｐＨ約５．５未満では酵素活性を有する酸性プロテアーゼと皮膚の表面ｐＨを約５．５未満に下げる酸性緩衝剤とを含む組成物の有効量を、表皮剥離および／または表皮細胞の再生の増強に有効な時間、局所投与することからなる、表皮剥離および／または表皮細胞の再生を増強するための方法を提供し、酸性緩衝剤は正常な表皮プロセスにより中和される。

別の実施態様において、本発明は、被験体の皮膚の領域に、ｐＨ約５．５未満では酵素活性を有する酸性プロテアゼと皮膚の表面ｐＨを約５．５未満に下げる酸性緩衝剤とを含む組成物の有効量を、皮膚のきめと外見を改善するのに有効な時間、局所投与することからなる、皮膚のきめと外見を改善するための方法を提供し、酸性緩衝剤は正常な表皮プロセスにより中和される。

さらに別の実施態様において、本発明は、被験体の皮膚の領域に、ｐＨ約５．５未満では酵素活性を有する酸性プロテアーゼと皮膚の表面ｐＨを約５．５未満に下げる酸性緩衝剤とを含む組成物の有効量を、皮膚の萎縮の影響を制御するのに有効な時間、投与することからなる、皮膚の萎縮の影響を制御するための方法を提供し、酸性緩衝剤は正常な表皮プロセスにより中和される。

表皮の剥離および／または表皮細胞の再生を増強するための好適な実施態様において、組成物はペプシンと乳酸を含む。表皮の剥離および／または表皮細胞の再生を増強するためのこの好適な実施態様において、組成物は、約１０００HUT単位/mgの比活性を有する約１重量％のペプシンと約３重量％の乳酸とを含む。表皮の剥離および／または表皮細胞の再生を増強するための別の好適な実施態様において、組成物は、約１０００HUT単位/mgの比活性を有する約１重量％のペプシンと約１．５重量％の乳酸とを含む。さらに別の好適な実施態様において、組成物は、１重量％のペプシンと１重量％のリン酸とを含む。さらに別の好適な実施態様において、組成物は、１重量％のペプシンと３重量％のリン酸とを含む。さらに別の好適な実施態様において、組成物は、１重量％のペプシンと１重量％のクエン酸とを含む。さらに別の好適な実施態様において、組成物は、１重量％のペプシンと３重量％のクエン酸とを含む。

本発明の組成物と方法は驚くべきことに、これまで酸、α－ヒドロキシカルボン酸、サリチル酸、または広いｐＨスペクトルのプロテアーゼ自身では達成できなかった、皮膚疾患に対する薬剤活性または化粧品作用を証明する。

３．１　定義

本発明において、以下の用語は、下記を包含する：

酸性緩衝剤：皮膚に典型的に適用された時、皮膚の表面ｐＨを５．５未満に下げ、自然の皮膚のプロセスにより中和されて、自然の皮膚のプロセスが時間とともに皮膚の表面のｐＨを正常（これは約５．５である）に戻すような、酸と薬剤または化粧品として許容される担体、ビヒクル、または賦形剤を含む組成物。緩衝剤の酸成分は、１つまたはそれ以上の無機酸、１つまたはそれ以上の有機酸、または無機酸および／または有機酸の任意の組合せを含有することができる。

酸性プロテアーゼ：皮膚の表面の平均の正常ｐＨ（これは約５．５である）より低いｐＨでペプチジルヒドロラーゼ（タンパク質分解）活性を示し、正常な皮膚の表面ｐＨの平均より大きいかまたは等しいｐＨではほとんど活性がない（すなわち、ｐＨ約５．５未満のピーク活性と比較すると、ｐＨ約５．５またはこれ以上では約１０％未満の活性）酵素。酸性プロテアーゼは、アポ酵素、ホロ酵素、イソ酵素、またはチモーゲン型でもよい。

化粧品：必ずしも異常な生物学的症状または疾患を治療または予防する利点または作用を与えるものではないが、皮膚のきめや外見を改善する、皮膚に投与される調製物。そのような改善は、哺乳動物の表皮に一時的湿潤効果を提供することを含む。

有効量：治療すべき症状のポジティブな変化を大きく誘導するのに充分高いが、重篤な副作用を避けるのに充分低い量。組成物の有効量は、治療すべき特定の症状、治療される被

験体の年齢や身体症状、症状の重症度、治療の期間、併用療法の性質、使用される具体的な組成物、使用される特定の薬剤として許容される担体または化粧品として許容される担体、および当業者の知識と経験の範囲内の同様の要因により変化する。
表皮細胞の再生：新しい皮膚細胞が基底層中で形成され、外層（角質層）に移動し、次に剥離し、さらに新しい皮膚細胞により置換されるプロセス。
剥離：任意の組織表面から上皮の表面細胞が離れ、出ていくこと。
薬剤：異常な生物学的症状または疾患を治療または予防する利点または作用を与える、皮膚に投与される調製物。
皮膚萎縮の制御：哺乳動物の皮膚の萎縮のプロセスを、防止、遅延、阻止、治療、または反転させるプロセス。
皮膚萎縮：コラーゲンおよび／またはエラスチンの減少ならびに繊維芽細胞の数、サイズおよび二倍化能力の低下をしばしば特徴とする、哺乳動物の皮膚の真皮層が薄くなることおよび／または全体的な退化。皮膚萎縮は、老化の自然の結果であるが、自然の時間的老化、光傷害、やけどまたは化学的傷害、または汚染物質またはアレルゲン（例えば、たばこの煙）への曝露により、引き起こされる。皮膚萎縮は、しばしばα－ヒドロキシカルボン酸またはサリチル酸を用いる治療に起因する好ましくない副作用である。
本発明は、本発明の非限定的実施態様を例示することを目的とする、詳細な説明と実施例を参照することにより、より詳細に理解できるであろう。

【図面の簡単な説明】

図１は、２つの異なる量の酸性緩衝剤（乳酸）を有する異なる濃度の酸性プロテアーゼ（HUT単位×１０^{6}/g）（ペプシン）による、細胞再生速度に及ぼす効果を示す棒グラフである。■　１．５％乳酸、□　３％乳酸。
図２は、１．５％と３％の濃度の酸性緩衝剤単独（乳酸）の剥離／細胞再生速度の増加パーセントに対する、種々の濃度の酸性プロテアーゼ（HUT単位×１０^{6}/g）（ペプシン）の剥離／細胞再生速度の増加パーセントを示す棒グラフである。■　１．５％乳酸、□　３％乳酸。
図３は、ＨＵＴ測定法で異なるレベルのｐＨでの、ペプシンとＡＦＰ２０００（ソルベイ社（Solvay Inc.）、エルクハート、インディアナ州、真菌由来の酸性プロテアーゼ）の活性の差を示す棒グラフである。■　ＡＦＰ２０００、□　ペプシン。

５．発明の詳細な説明

５．１　組成物

本発明は、異常な皮膚症状、疾患または障害の治療または予防、および／または皮膚のきめまたは外見の改善、および／または表皮剥離の増強、および／または表皮細胞の再生の増強のための新規組成物を提供する。この組成物は、少なくとも１つの酸性プロテアーゼと酸性緩衝剤を含む。この組成物は、全身への影響または好ましくない副作用を最小にするために、好ましくは局所投与される。本発明者は、特定の作用モードに限定されるつもりはないが、本発明の組成物は、まず皮膚の表面のｐＨを皮膚の平均ｐＨ（これは人については約５．５である）より低い値に下げることにより、本発明の方法を達成すると考える。ｐＨの低下により、皮膚の表面ｐＨが約５．５より低い時にタンパク質分解／ケラチン分解活性を示す、組成物の酸性プロテアーゼ成分の活性化が可能になる。この期間は、個体の皮膚ｐＨの状況に依存し、酸性緩衝剤成分の調製により制御することができる。この期間を変更し所望の結果を達成できるように、調製物を調整することは、当業者にの技術の範囲内である。
この期間に、酸性緩衝剤は、自然の表皮プロセス（例えば、発汗）により中和され、皮膚の表面のｐＨは正常（これは約５．５である）に戻る。こうしてｐＨの上昇は、酸性プロテアーゼを不活性化し、タンパク質分解／ケラチン分解活性が停止する（すなわち、約９０％低下する）。皮膚の表面ｐＨが約５．５未満であり、プロテアーゼ成分が活性がある期間は、約１分～約４時間であり、好ましくは約３０分～約２時間、より好ましくは約３０分～約１時間である。
本発明の目的について、酸性プロテアーゼは、ｐＨ約５．５（これは、皮膚の表面の平均

ｐＨである）未満で高いペプチジルヒドロラーゼ（タンパク質分解）活性を示し、約５．５より高いかまたは等しいｐＨではほとんど活性がない酵素である。男性では、皮膚の表面の平均ｐＨはｐＨ約５．３であり、女性ではｐＨ約６である。本発明の目的において、皮膚の表面の平均ｐＨ（これはｐＨ約５．５である）は、特に性に特異的な変動を含み、従って約５．５のｐＨは、男性の皮膚の表面の平均ｐＨであるｐＨ約５．３から、女性の皮膚の表面の平均ｐＨであるｐＨ約６までの範囲を含む。例えば皮膚に適用された短時間後活性（セクション６．１に記載のように塩化ダンシルにより測定）と比較すると１０％であるかまたはこれより低い時、このプロテアーゼは有意に不活性である。本発明において有用な酸性プロテアーゼは、ｐＨが約５．５またはそれ以上でのインビトロ測定法で、特定のプロテアーゼの最適ｐＨ（約５．５未満）での同じインビトロ測定法で測定した酵素活性の約１０％未満を示す。例えば、セクション６．４（後述）を参照されたい。

酸性プロテアーゼは、アポ酵素、ホロ酵素、イソ酵素、またはチモーゲン型でもよい。さらに酸性プロテアーゼは、当業者に公知の任意の供給源（例えば、細菌、真菌、組織培養細胞、および動物）から単離することができる。酸性プロテアーゼ調製物は、最終組成物の約０．００１重量％～約７５重量％、好ましくは約０．１重量％～約５０重量％、最も好ましくは約１重量％～約５重量％の量で存在する。このプロテアーゼは、以下に記載するように変更した、Food Chemicals CODEX、第３版、（1981），496-497，National Academy Press，ワシントンＤ．Ｃ．に記載の方法により測定する時、約１～約５，０００HUT単位/mgの比活性、好ましくは約５０～約３０００HUT単位/mg、最も好ましくは約５００～約１５００HUT単位/mgの比活性を有する。

簡単に説明すると、まず以下のストック溶液を調製する：ヘモグロビン基質は、２ｇのウシヘモグロビンを８０mlの蒸留水中に混合して調製する。次に、溶液に例えばリン酸および／またはクエン酸を加えてｐＨ２にし、さらに蒸留水を加えて総量を１００mlにする。この溶液を４等分し、各画分を、５０％水酸化ナトリウムと５０％塩酸により、所望のｐＨにする。これらの最終溶液を次に、３０℃で２０分加熱し、次にガラスウールでろ過する。ＴＣＡストックは、トリクロロ酢酸を最終濃度５％（w/v）ＴＣＡになるように蒸留水に溶解して調製する。

次に、タンパク質分解活性を測定する各試料について、「Ｂ」および「Ｔ」と書いた試験管を準備する。各試験管に、４mlのヘモグロビン溶液を入れ、３７℃に置いて、試料を３７℃に予備加熱する。「Ｔ」試験管に１００μgの酵素溶液を加え、静かに回転し、３７℃で２０分インキュベートする。次に、各試験管に１０mlのＴＣＡストック溶液を加える。「Ｔ」試験管と、バックグランド吸光度の対照である「Ｂ」と記した試験管に等量の酵素を加える。各試験管を遠心分離し、各試料をシリンジフィルターでろ過し、ろ過した試料を石英キュベットに入れて、２８０nmで吸光度を読む。バックグランドから「Ｔ」試料の吸光度を引いて実際の吸光度を測定する。既知量のプロテアーゼ活性を測定して、標準曲線を作成することができる。

１HUT単位のタンパク質分解活性は、特定の測定条件下で１分間で、０．００６Ｎの塩酸中に１．１０μg/mlのチロシンを含有する溶液の吸光度と同じ２８０nmでの吸光度を有する加水分解物を産生する酵素の量であるとして定義する。HUT単位/gは、以下の式で測定される：

HUT/g＝（２８０nmでの吸光度×Ｖ）／（０．００８４×Ｔ×Ｗ）

（式中、Ｖは、試験溶液の最終容量であり、Ｔは、反応時間（分）であり、Ｗは、測定で使用した元々の酵素の乾燥重量（ｇ）である）。タンパク質濃度は、当該分野で公知の方法、例えばBradford Assay（これは、Current Protocols in Molecular Biology，Ausubel et al.，（編），John Wily & Sons，Inc.，New York，1994、に記載されている）により測定される。

このようなプロテアーゼの例には、ペプシン、カテプシン、ヒト尿の酸性プロテアーゼ、ノイロスポラ・オリザエ（Neurospora oryzae）、ムコール・プシルス（Mucor pusillus）、ムコール・ミエヘイ（Mucor miehei）、リゾプス・キネンシス（Rhizopus chinensis）、またはエンドチア・パラシチカ（Endothia parasitica）から得られる真菌プロテア

ーゼ、細菌性プロテアーゼであるリゾプスペプシン、ペニシロペプシン、およびアンドチアペプシンがあるが、これらに限定されない。さらに、プロテアーゼは遺伝子操作法および技術を用いて、胚、成熟、または誘導細胞を用いて、かつＤＮＡセグメント、プラスミド、ベクター、またはその発現物を含む生成物、または形質転換細胞または純粋培養物から得られる。重量％の組合せ量が上記範囲内にあるように、２つまたはそれ以上の酸性プロテアーゼを組合せて使用できることに注意されたい。

酸性緩衝剤は、皮膚に局所投与されると、皮膚の表面のｐＨを一時的にｐＨ約５．５未満に低下させるが、ｐＨ１未満には低下させず、好ましくはｐＨ約２．５～ｐＨ約４．５の間にする組成物である。酸性緩衝剤組成物は、少なくとも１つの酸、および薬剤または化粧品として許容される担体、ビヒクル、または賦形剤を有する。緩衝剤の酸成分は、自然の表皮プロセス（例えば、発汗）により時間とともに皮膚の表面の平均ｐＨに中和される。酸性緩衝剤の中和、および従ってプロテアーゼの不活性化に必要な時間は、酸性緩衝剤の処方に依存する。例えば、表皮の中和能に対して、酸性緩衝剤中の酸および／または緩衝剤が弱いなら、時間は短くなり、強い酸が使用されるかまたは酸性緩衝剤中に強い緩衝剤が使用されているなら、時間は長くなる。

組成物の酸性緩衝剤の酸成分は、１つまたはそれ以上の有機酸、１つまたはそれ以上の無機酸、または無機酸および／または有機酸の組合せであってよく、最終組成物の約０．００１重量％～約９５重量％、好ましくは約０．０１重量％～約２５重量％、より好ましくは約１重量％～約５重量％の量で存在してよい。酸成分の重量％は、酸強度とモル濃度に依存する。さらに、組成物中の酸成分の量と強度は、有効なレベルのタンパク質分解／ケラチン分解活性があるが、皮膚刺激の大きなレベルは存在しないものである。さらに、酸性緩衝剤の酸成分は、ケラチン分解活性を示すことが証明されていない酸であるが、単にプロテアーゼの活性化のための酸性環境を提供する酸を含むかまたは含まない。そのような酸の例には、表皮ｐＨを約０．１～約７の範囲のｐＨに緩衝化する任意の組成物中で操作できる任意の分子を含み、例えば乳酸、ソルビン酸、リン酸、クエン酸、グリコール酸、リンゴ酸、グルコン酸、ピロリン酸、三リン酸、ポリリン酸、重硫酸ナトリウム、および重硫酸カリウムを含むが、これらに限定されない。重量％の組合せ量が上記範囲内にあるように、２つまたはそれ以上の酸を組合せて使用できることに注意されたい。

酸性緩衝剤はまた、薬剤または化粧品として許容される担体、ビヒクル、または賦形剤である成分を含有する。このような薬剤として許容される担体、ビヒクル、または賦形剤の例は、当業者に公知であり、例えばRemington’s Pharmaceutical Sciences, 第１８版、A.R. Gennaro編, Mack Publishing, Co. Inc., Easton, Pennsylvania., 1990に見いだされる。このような化粧品として許容される担体、ビヒクル、または賦形剤の例は、当業者に公知であり、例えばCTFA International Cosmetic Ingredient Dictionary、第４版、J.M. Nikitakis編、The Cosmetic, Toiletry, and Fragrance Association、ワシントンＤ．Ｃ．、1991、に見いだされる。

局所適用用の本発明の組成物は、非毒性であり、薬剤として、化粧品としてまたは皮膚学的に許容されるローション剤、チンキ剤、クリーム剤、乳剤、ゲル剤、または軟膏剤を生成するために、担体、賦形剤、またはビヒクル成分（例えば、水、アセトン、エタノール、エチレングリコール、プロピレングリコール、ブタン－１，３－ジオール、ミリスチン酸イソプロピル、パルミチン酸イソプロピル、ミネラル油、およびこれらの混合物）を含有してもよい。さらに、所望であれば加湿剤または保湿剤を本発明の組成物に加えることができる。医薬組成物にとって有用なこのような追加の成分の例は、Remington’s Pharmaceutical Sciences, 第１８版、A.R. Gennaro編, Mack Publishing, Co. Inc., Easton, Pennsylvania., 1990に見いだされる。化粧品組成物に有用なこのような追加の成分の例は、CTFA International Cosmetic Ingredient Dictionary、第４版、J.M. Nikitakis編、The Cosmetic, Toiletry, and Fragrance Association、ワシントンＤ．Ｃ．、1991、に見いだされる。

これらのおよび当業者に公知の他のビヒクル以外に、本発明の医薬組成物および化粧品組成物は、他の成分、例えば老人斑、角化症、しわを改善または根絶するもの；鎮痛剤；麻

酔薬；抗にきび剤；殺菌剤；抗酵母剤；抗真菌剤；抗ウイルス剤；抗ふけ剤；抗ふけ剤；抗皮膚炎剤；抗そう痒剤；鎮吐薬；乗物酔治療薬；抗炎症剤；抗過角質溶解剤；抗乾燥皮膚剤；制汗薬；抗乾癬剤；抗脂漏性剤；ヘアコンヂショナーおよびヘアトリートメント剤；抗老化剤および抗しわ剤；抗ぜん息剤および気管支拡張剤；日焼け止め；抗ヒスタミン剤；皮膚軽減感剤；抗脱色剤；ビタミン剤；コルチコステロイド；なめし剤；ホルモン剤；レチノイド剤；局所心血管疾患剤；クロトリマゾール；ケトコナゾール；ミコナゾール；グリセオフルビン；ヒドロキシジン；ジフェンヒドラミン；プラモキシン；リドカイン；プロカイン；メピバカイン；モノベンゼン；エリチドカイン；プロカイン；メピバカイン；モノベンゼン；エリスロマイシン；テトラサイクリン；クリンダマイシン；メクロシリン；ヒドロキノン；ミノシクリン；ナプロキセン；イブプロフェン；テオフィリン；クロモリン；アルブテロール；レチノイン酸；１３－ｃｉｓレチノイン酸；ヒドロコルチゾン；ヒドロコルチゾン２１－アセテート；ヒドロ－コルチゾン１７－バレレート；ヒドロコルチゾン１７－ブチレート；ベータメタゾンバレレート；ベータメタゾンジプロピオネート；トリアミシノロンアセトニド；フルオシノニド；クロベタゾールプロピオネート；ベンジルペルオキシド；クロタミトン；プロプラノロール；プロメタジン；ビタミンＡパルミテート；ビタミンＥアセテート；薬剤で使用される親水性濃化剤；およびこれらの混合物のような他の成分を含むが、これらに限定されない。これらの成分の濃度は、使用目的（例えば、治療用または化粧品）により異なる。

本発明の組成物の局所投与後に皮膚の表面のｐＨがｐＨ約５．５の正常なｐＨに戻るのに必要な時間の調節は、プロテアーゼ酵素の活性の調節を可能にする。本発明が、先行技術中の欠点や障害（例えば、かゆみ、やけど、水泡、およびｐＨスペクトルの広いタンパク質分解酵素により引き起こされる好ましくない副作用）を克服するのは、このタンパク質分解活性の調節によってである。皮膚の表面がｐＨ約５．５の正常なｐＨに戻るのに必要な時間の測定は、多くの要因（例えば、治療される皮膚のタイプ、症状、疾患または障害、皮膚のタイプおよびその身体上の位置、および治療される特定の被験体の皮膚の感受性）により決定される。先行技術に存在する欠点や障害を避けるために、理想的な時間は、本発明の組成物の１回の適用について約４時間を超えてはならない。この時間制限は、多くの要因、例えば適用の目的（例えば日々の管理、粗い乾燥皮膚の除去、または治療的／薬剤的応用）に依存する。他の要因には、皮膚のタイプ、感受性、正常、非感受性、傷害を受けている、または重症の傷害を受けているかどうか、および適用様式（例えば、単回適用、または連続的洗浄、クリーム剤またはローション剤の塗布）を含む。プロテアーゼ活性は基質依存性であるため、他の要因は酸性プロテアーゼ成分で使用される１つまたはそれ以上の具体的なプロテアーゼである。

５．２　本発明の組成物の使用法

本発明は、表皮剥離の増強、および／または表皮細胞の再生の増強のため方法を提供する。この方法は、被験体の皮膚の領域に、ｐＨ約５．５未満ではタンパク質分解活性を有するが、約５．５またはそれ以上のｐＨではほとんど活性がない酸性プロテアーゼ酵素と、皮膚の表面のｐＨを約５．５未満に下げる酸性緩衝剤とを含む本発明の組成物の有効量を、表皮剥離および／または表皮細胞の再生の増強に有効な時間、局所投与することからなり、酸性緩衝剤は自然の表皮プロセスにより中和される。

本発明はまた、皮膚のきめと外見を改善するための方法を提供する。この方法は、被験体の皮膚の領域に、ｐＨ約５．５未満ではタンパク質分解活性を有するが、約５．５またはそれ以上のｐＨではほとんど活性がない酸性プロテアーゼ酵素と、皮膚の表面ｐＨを約５．５未満に下げる酸性緩衝剤とを含む本発明の組成物の有効量を、皮膚のきめと外見の改善に有効な時間、投与することからなり、酸性緩衝剤は自然の表皮プロセスにより中和される。

本発明はまた、皮膚の萎縮の影響を制御するための方法を提供する。この方法は、被験体の皮膚の領域に、ｐＨ約５．５未満ではタンパク質分解活性を有するが、約５．５またはそれ以上のｐＨではほとんど活性がない酸性プロテアーゼ酵素と、皮膚の表面ｐＨを約５．５未満に下げる酸性緩衝剤とを含む本発明の組成物の有効量を、皮膚の萎縮の影響の制

御に有効な時間、投与することからなり、酸性緩衝剤は正常な表皮プロセスにより中和される。
本発明はまた、異常な皮膚症状、疾患、または障害を治療または予防するための方法を提供する。この方法は、被験体の皮膚の領域に、ｐＨ約５．５未満ではタンパク質分解活性を有するが、約５．５またはそれ以上のｐＨではほとんど活性がない酸性プロテアーゼ酵素と、皮膚の表面ｐＨを約５．５未満に下げる酸性緩衝剤とを含む本発明の組成物の有効量を、異常な皮膚症状、疾患、または障害を治療または予防するのに有効な時間、投与することからなり、酸性緩衝剤は自然の表皮プロセスにより中和される。このような症状、疾患、または障害は、乾燥皮膚、重症の乾燥皮膚、ふけ、にきび、角化症、乾癬、湿疹、皮膚のはがれ、そう痒症、老人斑、ほくろ、黒皮症、しわ（大きいものおよび小さいもの、内因性および外因性傷害を含む）、皮膚の斑点、過色素沈着皮膚、過角化性皮膚、炎症性皮膚症、年齢関連皮膚変化、洗浄の必要な皮膚、および皮膚萎縮の影響を含むが、これらに限定されない。
前記の任意の方法について皮膚の領域上に本発明の組成物の有効量を投与する好適な方法は、局所適用によってである。最終組成物中の酸性緩衝剤と酸性プロテアーゼの量および皮膚への局所適用の頻度は、特定の皮膚障害、皮膚障害の重症度、関与する皮膚の位置および／またはタイプ、被験体の皮膚の感受性、所望の治療の程度のような要因に依存して変動する。被験体の必要性に応じて、適用量を制御することは、当業者の範囲内である。例として、局所適用は週約１回から日に約４または５回、好ましくは週約３回から日に約３回、最も好ましくは日に約１回から２回であることが、示唆される。局所適用の最終組成物は、約０．００１重量％～約９５重量％、好ましくは約０．０１重量％～約２５重量％、最も好ましくは約０．０１重量％～約５重量％の酸成分を含む。局所適用の最終組成物は、約０．００１重量％～約７５重量％、好ましくは約０．１重量％～約５０重量％、最も好ましくは約１重量％～約５重量％の酸性プロテアーゼ成分を含む。他の好適な投与様式は、慢性的投与である。本明細書において「慢性的」投与とは、局所適用の期間は、被験体の寿命にわたり、好ましくは少なくとも約１ヶ月、より好ましくは約３ヶ月～約２０年、より好ましくは約６ヶ月～約１０年、より好ましくは約１年～約５年であり、こうして異常な皮膚症状、疾患、または障害の治療または予防、または皮膚のきめと外見の改善、または表皮剥離および／または表皮細胞再生の増強、または皮膚萎縮の影響の制御が達成される。
本発明の別の実施態様において、前記方法では、酸性緩衝剤と酸性プロテアーゼとを含む組成物の有効量と、日焼け止め、抗炎症剤、抗酸化剤／ラジカル捕捉剤、キレート化剤、レチノイド、自己日焼け剤、および／またはベンゾフラン誘導体の１つまたはそれ以上の有効量との両方を、皮膚に同時に投与する。本明細書において「同時適用」または「同時に」とは、皮膚に物質を体の同じ部位にほぼ同じ時期に投与することを意味する。これは、物質を別々に皮膚に投与することにより行われるが、好適な方法は、すべての所望の物質を含む組成物を皮膚に投与することである。投与される日焼け止め剤の量は、一般に約０．０２mg～１mg/cm^{2}皮膚の範囲である。投与される抗炎症剤の量は、一般に約０．００５mg～約０．５mg、好ましくは約０．０１mg～約０．１mg/cm^{2}皮膚の範囲である。投与されるキレート化剤の量は、一般に約０．００１mg～約１mg、好ましくは約０．０１mg～約０．５mg、より好ましくは約０．０５mg～約０．１mg/cm^{2}皮膚の範囲である。投与されるレチノイドの量は、一般に約０．０００１mg～約０．０２mg/cm^{2}皮膚の範囲である。投与されるベンゾフラン誘導体の量は、一般に投与当たり約０．００１mg～約１mg/cm^{2}皮膚、好ましくは約０．０１mg～約０．５mg/cm^{2}皮膚の範囲である。投与される酸性緩衝剤と酸性プロテアーゼとを含む組成物の量は、一般に治療される症状の重症度、被験体の皮膚の感受性、被験体の治療部位の位置、および使用される化合物の効力に依存して、一般に約０．００１mg～約１mg/cm^{2}皮膚、好ましくは約０．０１mg～約０．５mg/cm^2、より好ましくは約０．０５mg～約０．２５mg/cm^{2}皮膚の範囲である。
６．実施例
本発明の本質および本発明の実施方法をさらに詳細に説明するために、以下の実施例が提

供されるが、これらは、決して本開示の残りの部分または本発明の範囲を限定するもの理解してはならない。
セクション６．１～６．４に記載される組成物および方法において以下の試薬を使用した：
ＡＦＰ２０００、真菌由来酸性プロテアーゼ（ソルベイ社（Solvay Inc.）、エルクハート、インディアナ州）；藻類抽出物／アロエ抽出物（アクティブ・オーガニクス社（Active Organics, Inc.）、ダラス、テキサス州）；アラントイン（サットン・ラボラトリーズ（Sutton Laboratories）、チャタム、ニュージャージー州）；アーラセル６５（Arlacel 65）（ＩＣＩサーファクタンツ（ICI Surfactants）、ウィルミントン、デラウェア州）；アスパラギン酸（アジノモトＵＳＡ社、ティーネック、ニュージャージー州）；ＢＨＴ（イーストマン・コダック社（Eastman Kodak, Co.）、ロチェスター、ニューヨーク州）；ブチレングリコール（ヘキスト・セラニーズ社（Hoechst Celanese, Co.）、シャーロット、ノースカロライナ州）；カーボマー（Carbomer）（Ｂ．Ｆ．グッドリッチ社（B. F. Goodrich, Co.）、ブレックスヴィル、オハイオ州）；セテアリールアルコール（cetearyl alcohol）（リポケミカルズ社（Lipo Chemicals, Inc.）、パターソン、ニュージャージー州）；セチルアルコール（リポケミカルズ社（Lipo Chemicals, Inc.）、パターソン、ニュージャージー州）；クエン酸（ロシュ・ビタミンズ・アンド・ファイン・ケミカルズ（Roche Vitamins and Fine Chemicals）、ナトリー、ニュージャージー州）；コスモワックス（Cosmowax）、クロダ・ケミカルズ社（Croda Chemicals, Ltd.）、パーシッパニー、ニュージャージー州）；シクロメチコン（cyclomethicone）（ダウ・ケミカルズＵＳＡ（Dow Chemicals USA）、ミッドランド、ミシガン州；ジヒドロキシアセトン（ロナ／Ｅ．メルク工業（Rona/E. Merck Industries）、ホーソーン、ニューヨーク州）；ジメチコン（dimethicone）（ダウ・ケミカルズＵＳＡ（Dow Chemicals USA）、ミッドランド、ミシガン州）；ＥＤＴＡ二ナトリウム（チバ・ガイギー社（Ciba-Geigy Co.）、グリーンズボロ、ノースカロライナ州）；ＤＬ－パンテノール（ロシュ・ビタミンズ・アンド・ファイン・ケミカルズ（Roche Vitamins and Fine Chemicals）、ナトリー、ニュージャージー州；エトキシジグリコール（ガッテフォッセ社（Gattefosse S.A.）、パリ、フランス）；グルコン酸（シグマ・ケミカルズ（Sigma Chemicals）、セントルイス、ミズーリ州）；グリセレス－２６（Glycereth-26）（アマーコール社（Amerchol Co.）、エディソン、ニュージャージー州）；グリセラルステアレート（glyceral stearate）（クロダ・ケミカルズ社（Croda Chemicals, Ltd.）、パーシッパニー、ニュージャージー州）；乳酸　ＵＳＰ　８８％（リタ社（Rita Corporation）、ウッドストック、イリノイ州）；レシチン／アジア酸（asiatic acid）（アクティブ・オーガニクス社（Active Organics, Inc.）、ダラス、テキサス州）；メチルグルセス－２０（gluceth-20）（アマーコール社（Amerchol Co.）、エディソン、ニュージャージー州）；メチルパラベン（ナップ社（Napp Co.）、ロディ、ニュージャージー州）；パルミチン酸オクチル（ＩＣＩサーファクタンツ（ICI Surfactants）、ウィルミントン、デラウェア州）；ネオペンタン酸オクチルドデシル（ＩＣＩサーファクタンツ（ICI Surfactants）、ウィルミントン、デラウェア州）；ＰＥＧ－７５（リポケミカルズ社（Lipo Chemicals, Inc.）、パターソン、ニュージャージー州）；ステアリン酸ＰＥＧ－４０（リポケミカルズ社（Lipo Chemicals, Inc.）、パターソン、ニュージャージー州）；ペプシン　１：１５，０００　ＮＦ（アメリカン・ラボラトリーズ社（American Laboratories, Inc.）、オマハ、ネブラスカ州）；リン酸８５％（シグマ・ケミカルズ（Sigma Chemicals）、セントルイス、ミズーリ州）；ポリアクリルアミド／Ｃ１３－１４イソパラフィン／ラウレス－７（laureth-7）（セピック社（Seppic, Co.）、パリ、フランス）；プロピレングリコール（ダウ・ケミカルズＵＳＡ（Dow Chemicals USA）、ミッドランド、ミシガン州）；プロピルパラベン（ナップ社（Napp Co.）、ロディ、ニュージャージー州）；パルミチン酸レチニル（ロシュ・ビタミンズ・アンド・ファイン・ケミカルズ（Roche Vitamins and Fine Chemicals）、ナトリー、ニュージャージー州）；サリチル酸（カラマ社（Kalama Co.）、シアトル、ワシントン州）；カルボキシル－メチルセルロースナトリウム７ＨＸＦ（アクアロン社（

Aqualon, Co.）、ウィルミントン、デラウェア州）；ヒアルロン酸ナトリウム（アクティブ・オーガニクス社（Active Organics, Inc.）、ダラス、テキサス州）；ステアレス－１０（stearety-10）（リポケミカルズ社（Lipo Chemicals, Inc.）、パターソン、ニュージャージー州）；酢酸トコフェリル（ロシュ・ビタミンズ・アンド・ファイン・ケミカルズ（Roche Vitamins and Fine Chemicals）、ナトリー、ニュージャージー州）；トリエタノールアミン９９％（バスフ社（BASF Co.）、マウントオリーブ、ニュージャージー州）；およびキサンタンガム（ケルコ（Kelco）、サンジエゴ、カリホルニア州）。

６．１　皮膚剥離の増強

本発明の組成物は、皮膚剥離および細胞再生の増強のために、個々のヒト掌側前腕で、異なる濃度の酸性プロテアーゼであるペプシン、１：１５，０００　ＮＦ（アメリカン・ラボラトリーズ社（American Laboratories, Inc.）、オマハ、ネブラスカ州）および酸性緩衝剤である乳酸で試験した。年齢３０～６０歳の被験者２０名が選択され、本試験法に関連して供給されるもの（合成石鹸を含む）を除いて、試験期間の前５日間と試験の間、いずれの製品もその掌側前腕で使用するのを控えることが求められた。被験者はいずれも、（１）妊娠または授乳しておらず、また試験後３ヶ月以内に妊娠の予定がなく；（２）１つまたはそれ以上の既知の伝染性疾患に罹っておらず；（３）試験時に他のいずれの臨床的試験にも関係しておらず；（４）乾癬、皮膚炎、および／または湿疹に罹患しておらず；（５）レチノイド、コルチコステロイド、または抗生物質を含む、試験結果を妨害する可能性があると考えられる薬物療法を受けておらず；（６）試験前の６ヶ月間レチノイド、コルチコステロイド、または抗生物質をとっておらず；および／または（７）タバコ製品を使用しておらず、敏感皮膚でなく、試験に不適切と考えられるタイプの皮膚ではなく、また試験に不適切になると考えられる他の特徴はなかった。

各被験者の各掌側前腕に、ペトロラタム中に粉砕した５％の超純粋なダンシルクロリドを１～２gm/cm^{2}に適用した４つの２×３cm接着包帯を貼り付けた。各前腕の包帯の３つは、試験部位として使用し、残りの１つは対照として使用した。

各被験者の各前腕の４つの部位を、ダンシルクロリドを装填した包帯で覆い、２４時間平静に保った。２４時間後、包帯を除去し、部位を洗浄し、そしてダンシルクロリドによる部位の染色を長波長ＵＶ光源で見て確認した。６つの非対照のダンシルクロリドは、ランダムに選択した表Ｉに記載される試験組成物の１～２ml/cm^{2}の１日２回の局所適用を受けた各被験者の試験部位を染色した。適用の際、試験組成物を皮膚の試験部位に、その部位の湿りがなくなるまで擦り込んだ。ダンシルクロリド染色を確認後、試験部位と対照部位を遮蔽なしのままにし、試験部位が試験の適用を受け、かつ対照部位がいずれの試験組成物も受けないことを除いて、同じ方法で操作した。

表Ｉ

試験組成物番号	乳酸(100%)重量％	酸性プロテアーゼ*重量％	HUT単位/ｇ*１０⁴	ソルビン酸保存剤重量％	脱イオン水重量％
1	0.00	0.00	0.0	0.05	99.95
2	1.50	0.00	0.0	0.05	98.45
3	1.50	0.02	0.02	0.05	98.43
4	1.50	0.20	0.2	0.05	98.25
5	1.50	1.00	1.0	0.05	97.45
6	1.50	2.00	2.0	0.05	96.45
7	1.50	4.00	4.0	0.05	94.45
8	3.00	0.00	0.0	0.05	96.95
9	3.00	0.02	0.02	0.05	96.93
10	3.00	0.20	0.2	0.05	96.75
11	3.00	1.00	1.0	0.05	95.95
12	3.00	2.00	2.0	0.05	94.95
13	3.00	4.00	4.0	0.05	92.95

＊　使用した酸性プロテアーゼはペプシン、１：１５，０００、ＮＦ（アメリカン・ラボラトリーズ社（American Laboratories, Inc.）、オマハ、ネブラスカ州）であった。

角質層の剥離／角質溶解は、染色の除去を測定するため長波長ＵＶ光源下で毎日ダンシルクロリド染色を可視化することにより測定した。角質層の剥離／角質溶解および付随する細胞再生の上昇パーセントは、以下の式により計算した：

上昇％＝［（未処理領域の除去にかかる日数－処理領域の除去にかかる日数）／未処理領域の除去にかかる日数］×１００

表II

試験組成物番号	乳酸濃度（％）	酸性プロテアーゼ*濃度（％）	HUT単位/ｇ*１０^6	組成物の作用（対照値に対する上昇％）	ペプシンの作用（乳酸対照値に対する上昇％）
1	0.00	0.00	0.0	0（対照）	0
2	1.50	0.00	0.0	14	0（対照）
3	1.50	0.02	0.02	14	0
4	1.50	0.20	0.2	17	21
5	1.50	1.00	1.0	25	79
6	1.50	2.00	2.0	28	100
7	1.50	4.00	4.0	33	136
8	3.00	0.00	0.0	18	0（対照）
9	3.00	0.02	0.02	18	0
10	3.00	0.20	0.2	23	28
11	3.00	1.00	1.0	31	72
12	3.00	2.00	2.0	33	83
13	3.00	4.00	4.0	36	100

* 使用した酸性プロテアーゼはペプシン、１：１５，０００、ＮＦ（アメリカン・ラボラトリーズ社（American Laboratories, Inc.）、オマハ、ネブラスカ州）であった。

試験から得られたデータは、表IIおよび図１と２に要約する。表II、カラム５に示されるように、酸性緩衝剤の乳酸は、１．５重量％および３重量％の濃度で単独である程度の正の角質溶解／細胞再生作用を有していた［対照（試験組成物１）に試験組成物２と８を比較されたい］。これらの正の角質溶解／細胞再生作用は、酸性プロテアーゼであるペプシンの存在下で著しく増強される（試験組成物３～７および９～１３を参照のこと）。また、この増強が、用量依存性であること、すなわち、酸性プロテアーゼの濃度が上昇するにしたがい角質層の剥離／細胞再生速度が上昇することも明らかである（表IIのカラム５を参照のこと）。図１は、カラム５のデータをグラフにより表す。

表IIのカラム６は、１．５重量％および３重量％の濃度での乳酸単独により得られる剥離／細胞再生速度に対する、種々の濃度の酸性プロテアーゼペプシンにより得られる剥離／細胞再生速度の上昇パーセントを反映する。カラム６のデータは、図２にグラフにより表される。酸性プロテアーゼ作用は、使用した両方の乳酸濃度で有意であるが、１．５重量％の乳酸濃度の酸性プロテアーゼペプシンで、より大きな増強パーセントが得られることが明らかである。

被験者の数名の皮膚では低レベルの発赤および腫脹が観察された（３重量％の乳酸濃度では皮膚試験部位の約７５％）が、１．５重量％の乳酸濃度ではほとんど観察されなかった。さらには、この知見は、ペプシンの存在にはほとんど無関係であった。すなわち、適切な濃度の酸性プロテアーゼの存在下で、低い非刺激性レベルの酸性緩衝剤を使用することにより、有意な剥離／細胞再生が達成される。生理学的ｐＨ範囲で活性なプロテアーゼとは対照的に、皮膚に適用される本明細書で規定された酸性プロテアーゼは、皮膚自体の自然のプロセスが皮膚表面のｐＨを約５．５のその正常値に上昇させるまでは、そのタンパク質分解活性を維持する。

６．２　本発明の方法に使用するための組成物

以下の表は、本発明の組成物の異なる実施例の処方を列挙する。以下の全ての組成物は、例えば希リン酸または水酸化ナトリウム（ＮａＯＨ）により、約３～３．２のｐＨに調整した。

表III

洗浄液ＡＰ－０１

	重量パーセント
アスパラギン酸	1.50
脱イオン水	82.50
メチルパラベン	0.20
ＰＥＧ７５	1.50
ＥＤＴＡ二ナトリウム	0.05
アラントイン	0.25
グリセレス２６	1.00
エトキシジグリコール	4.00
プロピレングリコール	4.00
ＡＦＰ２０００	5.00
合計	100.00

表IV

洗浄液ＡＰ－０２

	重量パーセント
リン酸　８５％	1.20
脱イオン水	86.80
メチルパラベン	0.20
ＰＥＧ７５	1.50
ＥＤＴＡ二ナトリウム	0.05
アラントイン	0.25
グリセレス２６	1.00
エトキシジグリコール	4.00
プロピレングリコール	4.00
ペプシン　１，０００HUT単位/mg	1.00
合計	100.00

表Ｖ

漿液ＡＰ－０３

	重量パーセント
サリチル酸	0.50
トリエタノールアミン　９９％	1.00
乳酸　ＵＳＰ　８８％	1.20
脱イオン水	82.70
カルボキシーメチルセルロース ナトリウム　７ＨＸＦ	0.60
メチルパラベン	0.20
ＰＥＧ７５	1.50
ＥＤＴＡ二ナトリウム	0.05
アラントイン	0.25
メチルグルセス２０	1.00
グリセレス２６	1.00
エトキシジグリコール	4.00
プロピレングリコール	4.00
レシチン／アジア酸	1.00
ペプシン　１，０００HUT単位/mg	1.00
合計	100.00

表VI

漿液ＡＰ－０４

	重量パーセント
グルコン酸	1.50
脱イオン水	84.08
メチルパラベン	0.02
カルボキシーメチルセルロース ナトリウム　７ＨＸＦ	0.60
ＰＥＧ７５	1.50
ＥＤＴＡ二ナトリウム	0.05
アラントイン	0.25
メチルグルセス－２０	1.00
グリセレス２６	1.00
エトキシジグリコール	4.00
プロピレングリコール	4.00
レシチン／アジア酸	1.00
ペプシン　１，０００HUT単位/mg	1.00
合計	100.00

表VII

ペプシンローションＡＰ－０５

	重量パーセント
脱イオン水	64.75
キサンタンガム	0.10
ＥＤＴＡ二ナトリウム	0.10
アラントイン	0.50
藻類抽出物（および）アロエ抽出物	6.00
メチルパラベン	0.20
ＤＬ－パンテノール	0.50
エトキシジグリコール	4.00
ブチレングリコール	5.00
セチルアルコール	2.00
ステアリン酸グリセリル	2.00
パルミチン酸オクチル	4.00
シクロメチコン	2.00
プロピルパラベン	0.10
ＢＨＴ	0.05
ポリアクリルアミド（および）Ｃ１３－１４イソパラフィン（および）ラウレス－７	1.50
ヒアルロン酸ナトリウム	3.00
パルミチン酸レチニル	0.10
酢酸トコフェリル	0.10
ペプシン　１，０００HUT単位/mg	1.00
クエン酸	3.00
合計	100.00

表VIII

再生ゲルＡＰ－０６

	重量パーセント
脱イオン水	89.60
カーボマー	1.50
サリチル酸	0.50
乳酸　ＵＳＰ　８８％	1.20
プロピレングリコール	6.00
ペプシン　１，０００HUT単位/mg	1.00
メチルパラベン	0.15
プロピルパラベン	0.05
合計	100.00

表IX

再生ゲルＡＰ－０７

	重量パーセント
脱イオン水	85.10
ポリアクリルアミド（および）Ｃ１３－１４イソパラフィン（および）ラウレス－７	4.00
サリチル酸	0.50
乳酸　ＵＳＰ　８８％	1.20
ブチレングリコール	8.00
ペプシン　１，０００HUT単位/mg	1.00
メチルパラベン	0.15
プロピルパラベン	0.05
合計	100.00

表X

自己日焼けローションＡＰ－０８

	重量パーセント
脱イオン水	48.15
キサンタンガム	0.75
プロピレングリコール	5.00
メチルパラベン	0.20
プロピルパラベン	0.10
ペプシン　１，０００HUT単位/mg	2.00
ステアレス－１０	0.70
アーラセル１６５１	1.20
ステアリン酸ＰＥＧ－４０	0.40
コスモワックスＪ２	1.00
セテアリールアルコール	1.50
シクロメチコン	5.00
ジメチコン	0.50
ネオペンタン酸オクチルドデシル	28.50
ジヒドロキシアセトン	5.00
合計	100.00

６．３　安定化組成物

ｐＨ３の以下の組成物は、３７℃で組成物を貯蔵した少なくとも３ヶ月の期間にわたりその酸性プロテアーゼ活性の少なくとも９０％を保持する。

	重量％
シクロメチコン	5.0
セチルアルコール	1.5
アーラセル１６５	1.5
ジメチコン	1.0
セピゲル３０５（Sepigel 305）	3.0
フェノキシエタノール	1.0
ＥＤＴＡ、二ナトリウム	0.1
ブチレングリコール	10.0
クエン酸／クエン酸ナトリウム	3.0
乳酸（１００％）	1.5
ソルビン酸	0.05
乳糖	1.0
ペプシン：１０００HUT単位/mg	1.0
H_2O	70.35

６．４　種々のｐＨレベルでのタンパク質分解活性

約５．５未満のｐＨでタンパク質分解活性を有するかどうか、およびその活性が最適ｐＨでの活性に比較して約１０％未満まで低下するかどうかを求めるために、ある範囲のｐＨ値にわたって２つの酸性プロテアーゼ酵素を試験した。タンパク質分解活性は、以下に記載されるようにHUT測定法を用いてヘモグロビンに及ぼすタンパク質分解作用を求めることにより測定した。２つの酸性プロテアーゼは、アメリカン・ラボラトリーズ社（American Laboratories, Inc.）（オマハ、ネブラスカ州）により供給されるペプシン　１：１５，０００　ＮＦ（約１０００HUT単位/mg）、およびソルベイ社（Solvay Inc.）（エルクハート、インディアナ州）により供給される真菌由来酸性プロテアーゼのＡＦＰ２０００（約１００HUT単位/mg）である。測定法は、最初にヘモグロビン基質（HEMOGLOBIN SUBSTRATE）ストック溶液とＴＣＡストック（TCA STOCK）を調製することにより実施された。ヘモグロビン基質は、２ｇのウシヘモグロビン（シグマ・ケミカルズ（Sigma Chemicals）、セントルイス、ミズーリ州）を８０mlの蒸留水に溶解することにより調製した。次にこの溶液を正確なｐＨ（ｐＨ２、３．５、５．５または６）に調整した。１と３の間のｐＨ値では、１．８ｇのリン酸を１００mMの最終濃度に溶解して、５０％水酸化ナトリウムまたは５０％塩酸によりｐＨを調整した。３と６の間のｐＨ値では、２ｇのクエン酸を１００ｍＭの最終濃度に溶解して、５０％水酸化ナトリウムまたは塩酸によりｐＨを調節した。蒸留水を加えることにより、溶液を１００mlの最終容量にした。次に異なるｐＨ値の基質を３０℃で２０分間インキュベートし、続いてグラスウールによりろ過した。５ｇのトリクロロ酢酸を１００mlの蒸留水に溶解することにより、ＴＣＡストック溶液を調製した。

次に１０mgのペプシンを１０mlの蒸留水に溶解し、１００mgのＡＦＰ２０００および３００mgのクエン酸を８mlの蒸留水に溶解することにより、酵素標準液を調製した。次に６ＭＨＣｌまたは５０％水酸化ナトリウムにより、この溶液のｐＨを約３．５に調整し、蒸留水の添加により最終容量を１０mlにした。

試料のそれぞれについて、４本の試験管を「Ｂ」、「Ｔ１」、「Ｔ２」および「Ｔ３」とマークし、そして４mlのヘモグロビン基質溶液を各試験管に加え、次にこれらを３７℃に置いた。１００μｌの酵素標準液を各「Ｔ」試験管、すなわち、Ｔ１、Ｔ２およびＴ３に加えた。次に試験管を、ペプシンについては３７℃で２０分間、そしてＡＦＰ２０００については３０分間インキュベートした。次に１０mlのＴＣＡストック溶液を全ての試験管に加え、そして１００μｌの酵素を試験管「Ｂ」に加えた。次に試験管を１０００rpmで１分間遠心分離した。各試験管の試料をシリンジフィルターにより濾過して石英キュベットに入れ、２８０nmで吸光度を測定した。バックグラウンド吸光度は、「Ｔ」の吸光度のそれぞれから差し引き、個々の「Ｔ１」、「Ｔ２」および「Ｔ３」の吸光度を、試験した各

ｐＨで各酵素について平均した。
図３は、両方の酵素がｐＨ２で最適活性を有したことを示す。さらに、両方の酵素とも、ｐＨ２での最適レベルに比較してｐＨ５．５およびそれ以上では１０％未満の活性であった。これらの酵素が、本発明において使用することができる酵素であることを、この測定は明白に証明している。さらに、このような測定法を用いることにより、さらにどの酵素が、本発明に使用するのに適しているかを決定することができる。
本明細書に開示される具体的な実施態様は、本発明のいくつかの側面の例示として意図されるため、本明細書に記載し特許請求される発明は、これらの実施態様により範囲を限定されるものではない。任意の同等な実施態様は、本発明の範囲に含まれることが意図される。実際、本明細書に示され記載されるところに加えて本発明の種々の修飾は、前述の説明から当業者には明らかであろう。このような修飾もまた、添付される請求の範囲に入ることが意図される。
多くの参照文献が本明細書に引用され、その全開示内容は、その全体が参考のため本明細書に組み込まれる。

【図１】

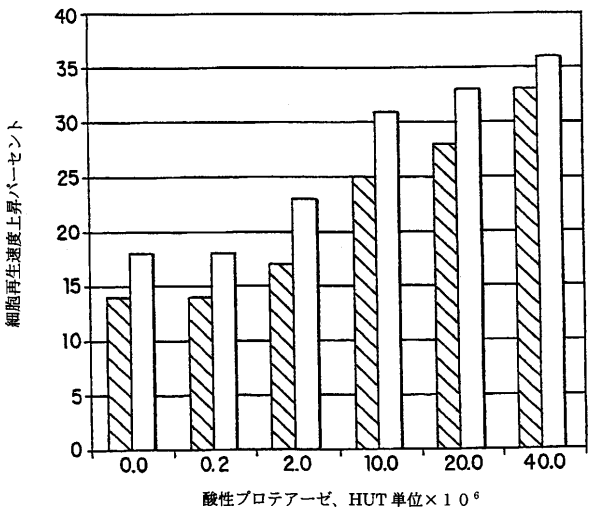


FIG.1

【図２】

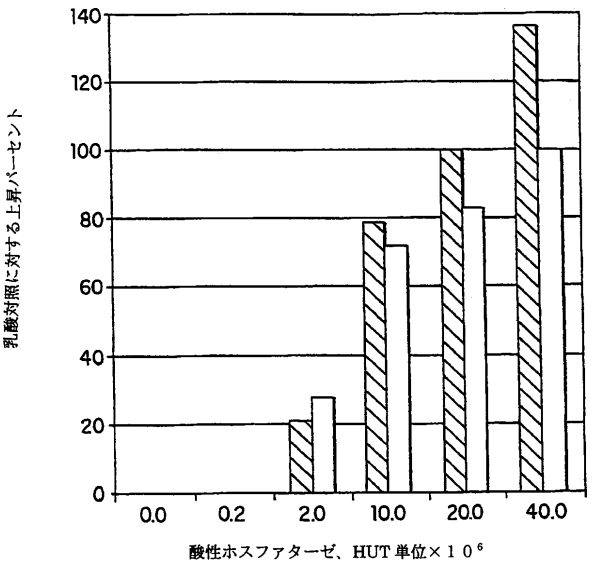


FIG. 2

【図３】

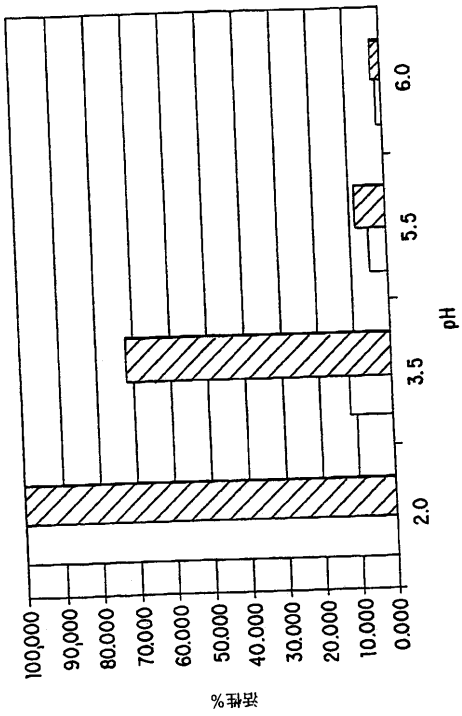

6.0
5.5
3.5
2.0
pH
100.000
90.000
80.000
70.000
60.000
50.000
40.000
30.000
20.000
10.000
0.000
活性%

FIG. 3

フロントページの続き

(72)発明者　ギリス，グレン
アメリカ合衆国　７６２０５　テキサス州，ルイスビル，モンテシト　ドライブ　３６０９
(72)発明者　ビショップ，マイケル
アメリカ合衆国　７５０２２　テキサス州，ダラス，ロックブルック　９４００

合議体
審判長　内田　淳子
審判官　内藤　伸一
審判官　穴吹　智子

(56)参考文献　ソ連国特許発明第４３９２８８（ＳＵ，Ａ）
特開昭６０－２１５６２１（ＪＰ，Ａ）
特表平７－５０５３８４（ＪＰ，Ａ）
特表平７－５０５３８３（ＪＰ，Ａ）
特開平２－１８８５３１（ＪＰ，Ａ）

(58)調査した分野(Int.Cl.，ＤＢ名)
A61K 38/00-38/58
CA(STN)
REGISTRY(STN)