

(19) 日本国特許庁(JP)

(12) 特許公報(B2)

(11) 特許番号

特許第6736036号
(P6736036)

(45) 発行日 令和2年8月5日(2020.8.5)

(24) 登録日 令和2年7月17日(2020.7.17)

(51) Int.Cl.		F I		
A 6 1 K	8/64	(2006.01)	A 6 1 K	8/64
A 6 1 K	47/42	(2017.01)	A 6 1 K	47/42
A 6 1 Q	19/00	(2006.01)	A 6 1 Q	19/00
C O 7 K	14/78	(2006.01)	C O 7 K	14/78
				Z N A

請求項の数 3 (全 11 頁)

<p>(21) 出願番号 特願2015-25675 (P2015-25675)</p> <p>(22) 出願日 平成27年2月12日 (2015.2.12)</p> <p>(65) 公開番号 特開2016-147830 (P2016-147830A)</p> <p>(43) 公開日 平成28年8月18日 (2016.8.18)</p> <p>審査請求日 平成30年1月10日 (2018.1.10)</p> <p>審判番号 不服2019-9786 (P2019-9786/J1)</p> <p>審判請求日 令和1年7月24日 (2019.7.24)</p>	<p>(73) 特許権者 504174135 国立大学法人九州工業大学 福岡県北九州市戸畑区仙水町1番1号</p> <p>(73) 特許権者 512083492 株式会社E&Cヘルスケア 鹿児島県鹿児島市上之園町24-2第12 川北ビル6階</p> <p>(74) 代理人 100090697 弁理士 中前 富士男</p> <p>(74) 代理人 100176142 弁理士 清井 洋平</p> <p>(72) 発明者 前田 衣織 福岡県飯塚市大字川津680-4 国立大 学法人九州工業大学内</p>
---	--

最終頁に続く

(54) 【発明の名称】 経皮吸収素材、並びに、経皮吸収式化粧品、及び、経皮吸収式薬剤

(57) 【特許請求の範囲】

【請求項1】

P h e - P r o - G l y - V a l - G l y の配列を4～10回繰り返したアミノ酸配列を有する第1のペプチド、又は、前記第1のペプチドに対して、1つ又は2つのアミノ酸が欠失、置換、又は付加された第2のペプチドからなる経皮吸収素材。

【請求項2】

P h e - P r o - G l y - V a l - G l y の配列を4～10回繰り返したアミノ酸配列を有する第1のペプチド、又は、前記第1のペプチドに対して、1つ又は2つのアミノ酸が欠失、置換、又は付加された第2のペプチドからなる経皮吸収素材を備えることを特徴とする経皮吸収式化粧品。

【請求項3】

P h e - P r o - G l y - V a l - G l y の配列を4～10回繰り返したアミノ酸配列を有する第1のペプチド、又は、前記第1のペプチドに対して、1つ又は2つのアミノ酸が欠失、置換、又は付加された第2のペプチドからなる経皮吸収素材を備えることを特徴とする経皮吸収式薬剤。

【発明の詳細な説明】

【技術分野】

【0001】

本発明は、特定のペプチドからなる経皮吸収素材と、それを含有する経皮吸収式化粧品及び経皮吸収式薬剤に関する。

【背景技術】

【0002】

皮膚から人体に有効成分を浸透させることが可能な素材（以下、「経皮吸収素材」とも言う）は、化粧品において有用であり、薬品においても、経皮薬物送達システムへの利用が期待される。そして、経皮吸収素材が他の物質を包含できれば、化粧品素材や薬品素材を人体に安定的に送り込むことが可能となる。

ところで、動物組織を構成する蛋白質として、エラスチンが知られている。エラスチンは、細胞からトロポエラスチンという蛋白質として分泌された後、ミクロフィブリルの周囲や間隙に自己集合し、分子間が架橋されて不溶性の弾性繊維となる。これは、エラスチンが有する自己集合能、所謂、コアセルベーションによるものであり、エラスチンのアミノ酸配列を基盤としたペプチドは、コアセルベーションを備えるものと考えられる（特許文献1参照）。

10

【先行技術文献】

【特許文献】

【0003】

【特許文献1】特開2012-126713号公報

【発明の概要】

【発明が解決しようとする課題】

【0004】

本願の発明者らは、コアセルベーションが物質の包含性に関連することを期待し、エラスチンのアミノ酸配列を基盤としたペプチドの経皮吸収素材としての利用可能性を検討した。

20

しかしながら、コアセルベーションにより、実際に物質を包含するか否かは未知数である。更に、エラスチンのアミノ酸配列を基盤としたペプチドは、アミノ酸配列の繰り返し数が小さいと、コアセルベーションを発現しないことが知られており、逆に、アミノ酸配列の繰り返し数が大きいと、高分子となって、皮膚浸透性が低下することが考えられる。また、エラスチンのアミノ酸配列を基としたペプチドにおいて、物質の包含性と共に、皮膚浸透性を備えるものを調査する試みはなされていなかった。

本発明は、かかる事情に鑑みてなされるもので、エラスチンのアミノ酸配列を基としたペプチドからなり、皮膚浸透性及び物質の包含性を有する経皮吸収素材、並びに、それを備える経皮吸収式化粧品及び経皮吸収式薬剤を提供することを目的とする。

30

【課題を解決するための手段】

【0005】

前記目的に沿う第1の発明に係る経皮吸収素材は、Phe-Pro-Gly-Val-Glyの配列を4～10回繰り返したアミノ酸配列を有する第1のペプチド、又は、前記第1のペプチドに対して、1つ又は2つのアミノ酸が欠失、置換、又は付加された第2のペプチドからなるものである。

第1、第2のペプチドは、皮膚浸透性と物質の包含性とを有することが実験によって確認された。

【0006】

40

前記目的に沿う第2の発明に係る経皮吸収式化粧品は、Phe-Pro-Gly-Val-Glyの配列を4～10回繰り返したアミノ酸配列を有する第1のペプチド、又は、前記第1のペプチドに対して、1つ又は2つのアミノ酸が欠失、置換、又は付加された第2のペプチドからなる経皮吸収素材を備える。

【0007】

前記目的に沿う第3の発明に係る経皮吸収式薬剤は、Phe-Pro-Gly-Val-Glyの配列を4～10回繰り返したアミノ酸配列を有する第1のペプチド、又は、前記第1のペプチドに対して、1つ又は2つのアミノ酸が欠失、置換、又は付加された第2のペプチドからなる経皮吸収素材を備える。

【発明の効果】

50

【0008】

第1の発明に係る経皮吸収素材は、第1、第2のペプチドが、皮膚浸透性と物質の包含性とを有することから、物質を皮膚から体内に浸透させるものとして、有効である。

また、このことから、第1の発明に係る経皮吸収素材を備える第2の発明に係る経皮吸収式化粧品、及び、同じく、第1の発明に係る経皮吸収素材を備える第3の発明に係る経皮吸収式薬剤は、有効成分を皮膚を介して体内に浸透させることが可能である。

【図面の簡単な説明】

【0009】

【図1】本発明の一実施の形態に係る経皮吸収素材の皮膚保湿性試験の実験結果を示すグラフである。

【図2】同経皮吸収素材の皮膚浸透性試験の実験結果を示すグラフである。

【図3】同経皮吸収素材の色素放出性試験の実験結果を示すグラフである。

【図4】同経皮吸収素材の色素放出性試験の実験結果を示すグラフである。

【図5】同経皮吸収素材の色素放出性試験の実験結果を示すグラフである。

【図6】同経皮吸収素材の色素放出性試験の実験結果を示すグラフである。

【図7】同経皮吸収素材の色素放出性試験の実験結果を示すグラフである。

【発明を実施するための形態】

【0010】

続いて、添付した図面を参照しつつ、本発明を具体化した実施の形態につき説明し、本発明の理解に供する。

本発明の一実施の形態に係る経皮吸収素材は、配列番号1の配列、即ち、Phe-Pro-Gly-Val-Gly（以下、「FPGVG」として表現することもある）の配列を4～10回繰り返したアミノ酸配列を有する第1のペプチドからなる経皮吸収素材、もしくは、第1のペプチドに対して、少なくとも1つのアミノ酸が欠失、置換、又は付加された第2のペプチドからなる経皮吸収素材である。

【0011】

ここで、「Phe」、「Pro」、「Gly」及び「Val」はそれぞれ、フェニルアラニン、プロリン、グリシン及びバリンであり、アミノ酸の欠失とは、アミノ酸が存在しないことを意味する。

また、第1のペプチドのC末端は、カルボシル基（-COOH）、カルボキシレート（-COO⁻）、アミド（-CONH₂）、及び、エステル（-COOR）のいずれかであってもよい。ここで、C末端がエステルである場合のRとしては、メチル、エチル、n-プロピル等のC₁～₆アルキル基や、シクロペンチル、シクロヘキシル等のC₃～₈シクロアルキル基や、フェニル等のC₆～₁₂アリール基等が挙げられる。

そして、第1のペプチドのN末端は、例えば、アセチル基、ホルミル基等の保護基で保護されていてもよい。

【0012】

第1のペプチドは、検証の結果、物質の包含性、及び、皮膚浸透性を有し、更に、包含した物質を放出する放出性を有することが確認された。従って、第1のペプチドは、有効成分を、皮膚から人体に浸透させて体内で放出することができる経皮吸収素材として採用可能である。

一方、FPGVGの繰り返し回数（重合度）が3以下のペプチドは、物質の包含性が不安定となることが確認された。そして、FPGVGの繰り返し回数が11以上のペプチドは、水溶性が低下して、皮膚から人体への浸透の安定性が確保できなくなることが検証によって確認された。

【0013】

また、第1のペプチドに対しわずかな差異のある、具体的には、第1のペプチドに対して、1つ、もしくは、数個（好ましくは1～8個、より好ましくは1～4個）のアミノ酸が欠失、置換、又は付加された第2のペプチドについても、物質の包含性、放出性、及び、皮膚浸透性があることが確認されている。従って、第2のペプチドも、第1のペプチドと

10

20

30

40

50

同様に、有効成分を、皮膚から人体に浸透させて体内で放出可能な経皮吸収素材として採用することができる。

更に、第1、第2のペプチドに、皮膚を保湿する性質（皮膚保湿性）も存在することが確認された。

【0014】

第1、第2のペプチドは、皮膚浸透性と、物質の包含性及び放出性を備えていることから、第1のペプチドからなる経皮吸収素材、又は、第2のペプチドからなる経皮吸収素材を含有する（即ち、備える）化粧品及び薬剤は、有効成分を皮膚から体内に安定的に送りこむことができる。よって、第1のペプチドからなる経皮吸収素材、又は、第2のペプチドからなる経皮吸収素材は、本発明の他の実施の形態に係る経皮吸収式化粧品及び経皮吸収式薬剤に含有して用いられるのが有効である。

10

ここで、経皮吸収式化粧品とは、皮膚から化粧品の有効成分（例えば、美白成分）を浸透させるタイプの化粧品の意味し、経皮吸収式薬剤とは、皮膚から体内に薬品の有効成分（例えば、鎮痛成分）を送り込むタイプの薬剤を意味する。

【実施例】

【0015】

次に、本発明の作用効果を確認するために行った実験について説明する。

化学合成したH-(FPGVG)₅-NH₂、即ち、FPGVGの配列が5回繰り返されたペプチドを対象に、皮膚保湿性、皮膚浸透性、及び、色素の包含放出性を試験した結果を以下に示す。なお、H-(FPGVG)₅-NH₂を、以下、「実施例のペプチド」とも言う。

20

皮膚保湿性試験及び皮膚浸透性試験では、株式会社ジャパン・ティッシュ・エンジニアリングのLabCyte（登録商標）EPI-MODEL 12のヒト3次元培養皮膚（以下、単に「培養皮膚」とも言う）を用いた。

【0016】

皮膚保湿性試験

皮膚保湿性試験においては、まず、実施例のペプチドを基に、溶媒に蒸留水（以下、「D.W.」として記す）を用いて、0.1w/w%溶液（100gの溶液に対して実施例のペプチドが0.1g含有された溶液、以下、単に「0.1%溶液」とも言う）、及び、1.0w/w%溶液（100gの溶液に対して実施例のペプチドが1.0g含有された溶液、以下、単位、「1.0%溶液」とも言う）を調整した。

30

【0017】

次に、0.1%溶液、及び、1.0%溶液それぞれについて、200μLの溶液を表面に適用（供給）した培養皮膚を、恒温振盪器によって、32℃で保温して30分間、振盪させ、その後、培養皮膚上の溶液を紙製のウェスでふき取り、32℃の環境下で1時間、乾燥した。上述した培養皮膚の表面に溶液を適用してから1時間の乾燥を終えるまでのサイクルを、3回、繰り返した（合計、3サイクル行った）後、乾燥処理を終えた培養皮膚の重量（以下、「湿重量」とも言う）を測定し、次に、乾燥器によって、培養皮膚を24時間、乾燥させ、培養皮膚の重量（以下、「乾燥重量」とも言う）を計測した。

40

【0018】

そして、以下の式1によって、培養皮膚内の含水率を求めた。

$$\text{含水率}(\%) = \{ (\text{湿重量} - \text{乾燥重量}) / \text{湿重量} \} \times 100 \quad \dots \text{(式1)}$$

また、0.1%溶液、及び、1.0%溶液と比較するため、実施例のペプチドを含有しないD.W.についても、0.1%溶液、及び、1.0%溶液の培養皮膚に対するのと同様の処理を行い、培養皮膚内の含水率を計測した。

【0019】

培養皮膚内の含水率は、図1に示すように、D.W.、0.1%溶液、及び、1.0%溶液を適用したそれぞれの場合において、64.8±4.9%、69.9±5.6%、及び、74.6±4.0%となった。

乾燥処理を含め、いかなる処理も行っていない培養皮膚の含水率は、76.3±1.8%

50

であったため、1.0%溶液を適用した培養皮膚は、いかなる処理も行っていない培養皮膚と同レベルの含水率まで回復したことが判明した。従って、実施例のペプチド溶液は、培養皮膚の含水率を維持、又は、増加させる皮膚保湿性があることが明らかになった。

【0020】

皮膚浸透性試験

皮膚浸透性試験では、まず、培養カップ内に入れられた培養皮膚上に、200 μ Lの実施例のペプチド溶液(1.0%溶液)を載せ、32に設定された恒温振盪器内に培養皮膚を収容した。

次に、恒温振盪器に収容してから5分後に、ウエスで培養皮膚上の実施例のペプチド溶液を取り除き、そのウエスを、1.5mLサンプルチューブに入れた。ウエスで実施例のペプチド溶液が拭き取られた培養皮膚は、0.1% TFA + 5% CH₃CN溶液と0.1% TFA + 95% CH₃CN溶液を1:1の割合で混合した混合溶液(以下、「抽出溶液」とも言う)0.5mLで洗浄され、表面がよく拭かれた後に、1.5mLサンプルチューブに入れられた。なお、「TFA」は、トリフルオロ酢酸を示す。

10

【0021】

そして、ウエスが入れられたサンプルチューブと、培養皮膚が入れられたサンプルチューブとにそれぞれ、抽出溶液を1.5mL入れ、32に保った環境下で、24時間、振盪を行った。

次に、ウエスが入れられたサンプルチューブ、及び、培養皮膚が入れられたサンプルチューブをそれぞれ、1万5千rpmで、15分間、遠心した後、各サンプルチューブ内の上清に含まれる実施例のペプチドの定量を、HPLC(高速液体クロマトグラフィー)によって行った。

20

【0022】

ウエスから抽出された実施例のペプチドは、培養皮膚内に浸透しなかったものであり、培養皮膚から抽出された実施例のペプチドは、培養皮膚内に浸透したものであると言えるため、培養皮膚から抽出された実施例のペプチドの量を、培養皮膚内に浸透した実施例のペプチドの量として扱うことができる。

なお、ウエスから抽出された実施例のペプチドの量と、培養皮膚から抽出された実施例のペプチドの量とを合算した量が、最初に、培養皮膚上に与えられた実施例のペプチドの量と等しくなることを確認している。

30

また、実施例のペプチド溶液を載せた後、培養皮膚を32に設定された恒温振盪器内に収容する時間を、15分間、30分間、60分間にそれぞれ延長した場合についても、上述した手順を行うことによって、培養皮膚内に浸透した実施例のペプチドの量を導出した。

【0023】

これらの実験で得た結果を基に、培養皮膚内に浸透する実施例のペプチドの量の時間経過による推移を求めた。その推移を図2に示す。

実施例のペプチド溶液を培養皮膚に5分間、適用することによって、図2に示すように、1枚の培養皮膚に浸透した実施例のペプチドの量は、2.1 μ gになることが確認された。そして、実施例のペプチド溶液を培養皮膚に適用した時間を15分、30分及び60分にしたそれぞれの場合では、1枚の培養皮膚に浸透した実施例のペプチドの量は、約15 μ gとなり、15分以上の時間の経過による大きな変化はみられなかった。

40

よって、実施例のペプチド溶液を皮膚に一定時間(例えば、15分間)以上、適用することにより、実施例のペプチドが皮膚に安定的に浸透することが確認された。

【0024】

色素の包含放出性試験

色素の包含放出性試験においては、まず、実施例のペプチド及び色素それぞれが所定量含有されたペプチド溶液を作製した。そして、作製したペプチド溶液を40の環境下で24時間、静置、又は、振盪させた後、40で24時間、静置、又は、振盪することによって、ペプチド溶液中の実施例のペプチドに色素を包含させ、次に、ペプチド溶液を40

50

の環境下で、3分間、1万rpmで遠心分離し、上清を回収した。

【0025】

回収した上清に対し、所定波長の吸光度を測定し、測定結果を基に、実施例のペプチドに包含された色素量を求めた。

そして、上清が回収されたペプチド溶液の残渣に、1mlの水を加え、40℃で24時間、静置、又は、振盪した後、再び、上清を回収し、回収した上清に対し、所定波長の吸光度を測定し、測定結果を基に、実施例のペプチドから放出された色素量を求めた。実施例のペプチドから放出された色素量を求める手順を、3週間、毎日繰り返し、放出される色素量の累積を調査した。

【0026】

以上の色素の包含放出性試験を、以下の表1に示す各条件で行った結果を、表2及び図3～図7に示す。表2は、各条件において、実施例のペプチドに含有された色素量を示したものである。そして、図3～図7は、実施例のペプチドから放出された色素量の累積を、各条件で比較した結果を示すグラフである。具体的には、図3が、条件(i)と条件(iii)の色素混入方法の比較、図4が、条件(i)と条件(iv)の包含させた色素量の比較、図5が、条件(v)と条件(vi)の静置・振盪の比較、図6が、条件(i)と条件(iii)の静置・振盪の比較、図7が、条件(i)と条件(v)のペプチド濃度の比較をそれぞれ示している。

【0027】

【表1】

色素包含・放出試験の条件

	ペプチド濃度 (mg/ml)	色素量 (mg/ml)	色素混入方法	放置条件
条件(i)	30	0.6	液体状態	静置
条件(ii)	30	0.6	液体状態	振盪
条件(iii)	30	0.6	粉末状態	静置
条件(iv)	30	0.06	液体状態	静置
条件(v)	10	0.6	液体状態	静置
条件(vi)	10	0.6	液体状態	振盪

【0028】

10

20

30

【表 2】

	包含量 (mg)	包含率 (%)
条件 (i)	0.599	99.8
条件 (ii)	0.599	99.8
条件 (iii)	0.598	99.7
条件 (iv)	0.057	94.6
条件 (v)	0.599	99.8
条件 (vi)	0.599	99.8

10

【 0 0 2 9 】

表 2 に示す結果より、実施例のペプチドは、条件 (i) ~ 条件 (v i) のいずれにおいても、94%以上の高包含率で色素を包含することが確認された。

20

そして、図 3 ~ 図 7 に示す結果より、実施例のペプチドは、最短でも、1週間、色素を継続的に放出することが確認できた。

また、実施例のペプチドと、その他の蛋白質との比較を行うため、比較例であるウシ血清アルブミン (B S A) を担体として、上述した手順と同様の手順により、色素の包含放出性の試験を行ったところ、ウシ血清アルブミンは、色素を包含しないことが確認された。従って、色素の包含放出性は、蛋白質に共通して備わっているものでないことが明らかである。

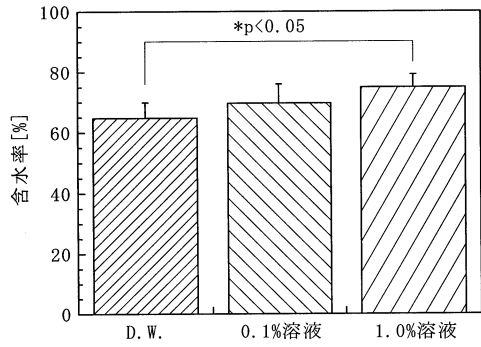
【 0 0 3 0 】

以上、本発明の実施の形態を説明したが、本発明は、上記した形態に限定されるものでなく、要旨を逸脱しない条件の変更等は全て本発明の適用範囲である。

30

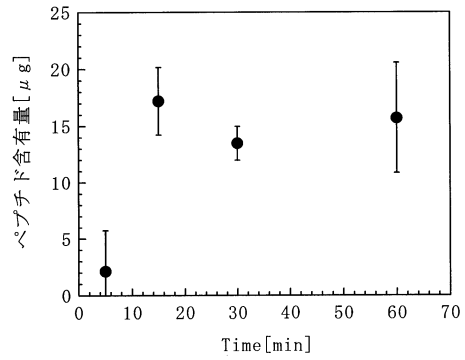
【 図 1 】

<1>



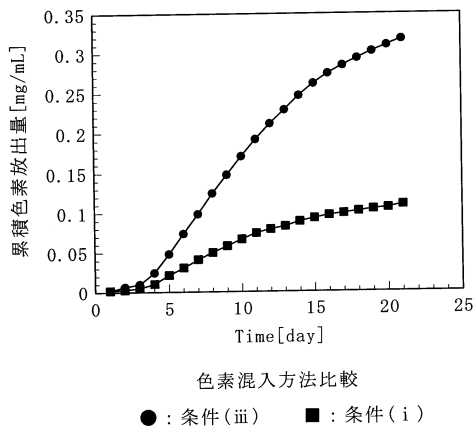
【 図 2 】

<2>



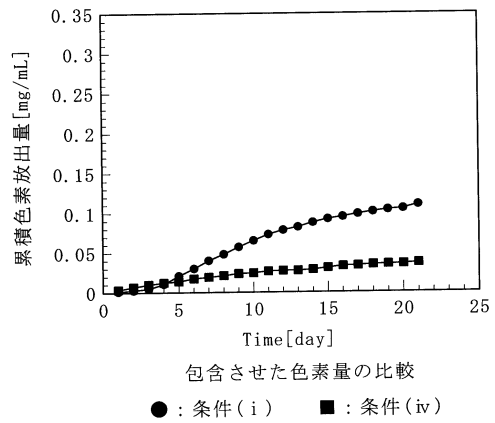
【 図 3 】

<3>



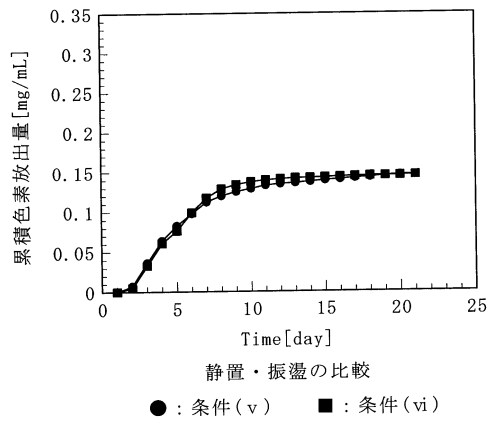
【 図 4 】

<4>



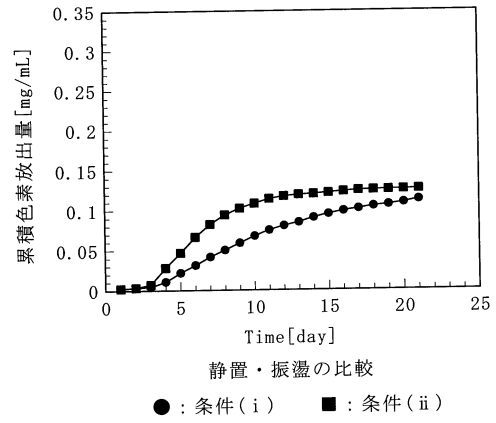
【 図 5 】

<5>



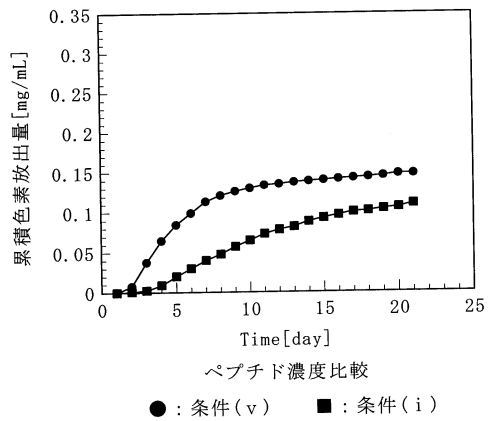
【 図 6 】

<6>



【 図 7 】

<7>



【配列表】

0006736036000001.app

フロントページの続き

- (72)発明者 引間 知広
福岡県飯塚市大字川津680-4 国立大学法人九州工業大学内
- (72)発明者 野瀬 健
福岡県福岡市西区元岡744 国立大学法人九州大学内

合議体

- 審判長 岡崎 美穂
審判官 富永 みどり
審判官 齋藤 恵

- (56)参考文献 特開2012-126713(JP,A)
特開2015-013850(JP,A)
特開2011-219427(JP,A)
特開2007-246461(JP,A)

(58)調査した分野(Int.Cl., DB名)

- A61K 8/00- 8/99
A61Q 1/00-90/00