

(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2018-505850
(P2018-505850A)

(43) 公表日 平成30年3月1日(2018.3.1)

(51) Int.Cl.	F I	テーマコード (参考)
C07K 7/06 (2006.01)	C07K 7/06 ZNA	4C083
A61P 17/00 (2006.01)	A61P 17/00	4C084
A61P 17/02 (2006.01)	A61P 17/02	4H045
A61P 17/10 (2006.01)	A61P 17/10	
A61P 43/00 (2006.01)	A61P 43/00 111	
審査請求 有 予備審査請求 未請求 (全 24 頁) 最終頁に続く		

(21) 出願番号 特願2017-529667 (P2017-529667)
 (86) (22) 出願日 平成27年7月21日 (2015.7.21)
 (85) 翻訳文提出日 平成29年6月2日 (2017.6.2)
 (86) 国際出願番号 PCT/KR2015/007554
 (87) 国際公開番号 W02016/088968
 (87) 国際公開日 平成28年6月9日 (2016.6.9)
 (31) 優先権主張番号 10-2014-0173957
 (32) 優先日 平成26年12月5日 (2014.12.5)
 (33) 優先権主張国 韓国 (KR)

(71) 出願人 510271129
 ケアジェン カンパニー, リミテッド
 CAREGEN CO., LTD.
 大韓民国 431-848 キョンギード
 アニョン-シ トンアン-グ エルエス
 -ロ 91ボン-ギル 46-38
 (74) 代理人 100107515
 弁理士 廣田 浩一
 (74) 代理人 100107733
 弁理士 流 良広
 (74) 代理人 100115347
 弁理士 松田 奈緒子
 (74) 代理人 100163038
 弁理士 山下 武志

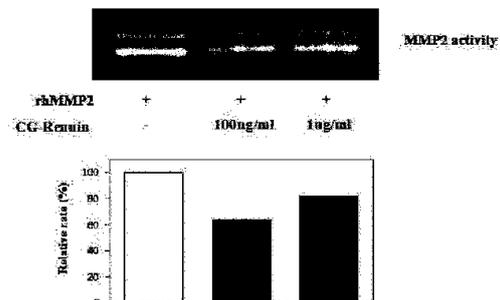
最終頁に続く

(54) 【発明の名称】 皮膚状態改善活性を有するペプチド及びその用途

(57) 【要約】

本発明は、皮膚状態改善活性を有するペプチドを提供する。本発明のペプチドは、MMP 2 活性を抑制し、皮膚状態の改善に非常に優れた効能を奏し、本発明のペプチドを含む組成物は、コラーゲン分解を抑制して、メラノソーム移動を抑制するなどの優れた生理活性を示し、しわの改善、皮膚再生、皮膚弾力の改善、皮膚老化の抑制、傷の再生、ニキビの改善、皮膚再生または皮膚美白に利用可能である。本発明のペプチドを含む組成物は、MMP - 活性関連疾患及び炎症疾患の予防または治療用薬剤学的組成物として利用できる。

【選択図】 図 4 a



【特許請求の範囲】

【請求項 1】

配列番号 1 または配列番号 2 のアミノ酸配列からなる皮膚状態改善活性を有するペプチド。

【請求項 2】

前記ペプチドは、MMP 2 (Matrix metalloproteinase - 2) の活性を抑制することを特徴とする、請求項 1 に記載のペプチド。

【請求項 3】

前記ペプチドは、コラーゲン分解を抑制することを特徴とする、請求項 1 に記載のペプチド。

【請求項 4】

前記ペプチドは、メラノソーム移動 (melanosome transfer) を抑制することを特徴とする、請求項 1 に記載のペプチド。

【請求項 5】

前記皮膚状態改善は、しわの改善、皮膚再生、皮膚弾力の改善、皮膚老化の抑制、傷の再生、ニキビの改善、皮膚再生または皮膚美白であることを特徴とする、請求項 1 に記載のペプチド。

【請求項 6】

請求項 1 乃至 5 のいずれかに記載のペプチドを有効成分として含む皮膚状態改善用組成物。

【請求項 7】

請求項 1 乃至 5 のいずれかに記載のペプチドを有効成分として含む、MMP - 活性関連疾患の予防または治療用薬剤学的組成物であって、前記マトリックス MMP - 活性関連疾患は、関節炎、糖尿病性網膜症、肥厚性癬痕、乾癬、粘膜及び上皮組織の潰瘍、自己免疫による炎症、基底膜の分解に係る疾病の狼瘡、自己免疫性神経障害、筋細胞破壊、緑内障、または過剰血管新生であることを特徴とする組成物。

【請求項 8】

請求項 1 乃至 5 のいずれかに記載のペプチドを有効成分として含む、炎症疾患の予防または治療用薬剤学的組成物。

【請求項 9】

前記炎症疾患は、歯周炎、喘息、湿疹、乾癬、アレルギー、リウマチ関節炎、乾癬関節炎 (psoriatic arthritis)、アトピー性皮膚炎、ニキビ、アトピー性鼻炎 (枯草熱)、アレルギー性皮膚炎 (湿疹)、慢性副鼻腔炎または脂漏性皮膚炎 (seborrheic dermatitis) であることを特徴とする、請求項 8 に記載の組成物。

【請求項 10】

請求項 1 乃至 5 のいずれかに記載のペプチドを対象 (subject) に投与する段階を含む皮膚状態改善方法。

【請求項 11】

請求項 1 乃至 5 のいずれかに記載のペプチドを対象 (subject) に投与する段階を含む炎症疾患の予防または治療方法。

【発明の詳細な説明】

【技術分野】

【0001】

本発明は、皮膚状態改善活性を有するペプチド及びその用途に関する。

【背景技術】

【0002】

MMP (Matrix metalloproteinase) は、コラーゲン、プロテオグリカン及びゼラチンのような巨大生分子を分解できるエンドペプチダーゼ類酵素であって、大きくコラゲナーゼ、ゼラチナーゼ、ストロメリシン及び膜型 MMP に分類され

10

20

30

40

50

る。MMPは、全部前駆酵素の形態で発現された後、一部分が切り離れることにより活性化される（非特許文献1～3）。

【0003】

コラゲナーゼは、三重螺旋型てんかん性コラーゲンとゼラチンなどに作用して、線維芽細胞コラゲナーゼ、好中球コラゲナーゼ及びコラゲナーゼ-3の3種類が知られており、第I、II及びIII型のコラーゲン細線維（Collagen fibrils）を切断すると報告されている（非特許文献4～5）。また、これら3種のコラゲナーゼは、互いに約50%以上の配列同一性を有すると知られている（非特許文献6～7）。

【0004】

MMPは、全ペプチド部位、触媒性部位及びC-末端部位の三つの部位に区分される。MMPは、全て活性のない潜伏型に生成分泌された後、N-末端の全ペプチド部位の80個のアミノ酸が切られており、このPRCGVPD配列を有する部位のシステインが除去されて活性化される（非特許文献8）。活性化されたMMPは、天然抑制剤のMMP組織阻害剤（Tissue Inhibitor of Matrix Metalloproteinase）と結合して活性が抑制されると知られているが、この結合は、触媒性部位により調節される（非特許文献9）。様々な形態のMMPは、基質特異性を有しており、正常的な細胞にも細胞外マトリックス（Extracellular Matrix）や他のコラーゲン構造を分解する必要がある場合、代謝過程で発現される。

【0005】

MMPにより媒介される疾患としては、動脈硬化症、中枢神経系の炎症疾患、アルツハイマー、皮膚老化、リウマチ関節炎、骨関節炎、角膜潰瘍、骨疾患、蛋白尿症、腹大動脈瘤疾患、外傷性関節損傷による退行性軟骨損失、神経系の脱髄疾患、肝硬変、腎系球体疾患、胚胎膜の未成熟破裂、炎症性腸疾患、歯根膜疾患、老化に係る黄斑変性、糖尿病性網膜病変、増殖性硝子体網膜病変、未成熟網膜病変、円錐角膜、シェーグレン症候群、近視、眼腫瘍、角膜移植拒否、血管新生、がんの浸潤と転移などがある。

【0006】

リウマチ関節炎と骨関節炎は、自己免疫異常が原因であるが、病気が進行されつつ、関節軟骨の細胞外マトリックスが破壊される。このような関節炎及び関節外傷において、ストロメリシンが主要な酵素と認識され、プロコラゲナーゼを活性コラゲナーゼに転換させることにおいて重要な役割をすることが明かされている。したがって、MMP活性を抑制することにより、関節炎進行を防ぐことができ、前記MMPは、浸透性白血球または線維芽細胞または外在的に微生物由来であることが報告されている。

【0007】

また、炎症媒介体の刺激により分泌されたコラゲナーゼ及び細菌から分泌されたコラゲナーゼは、歯周組織の基質であるコラーゲンを分解し、歯茎退縮を発生させて、だんだん進行され、歯周疾患を引き起こす。炎症を起こした歯茎から分離された線維芽細胞コラゲナーゼ及びストロメリシンの活性が確認されて、酵素の水準は、観察された歯齦炎の程度と相互関連されることが確認された（非特許文献10）。

【0008】

MMPは、様々な中枢神経系（CNS）の発病と関連がある。MMPは、炎症性の単核球細胞を中枢神経に流入させ、ミエリンを破壊するか、血液脳関門（Blood-Brain Barrier）を破壊して、アルツハイマー疾患では、アミロイドベータタンパク質の蓄積に関与すると推定されている（非特許文献11）。また、MMPは、アルツハイマー疾患の脳において、正常の脳よりその濃度が高いと報告されており（非特許文献12）、脳脊髄液におけるゼラチナーゼB水準は、多発性硬化症及びその他の神経性疾患と関連があつて（非特許文献13）、アミロイドベータタンパク質を分解して蓄積させることにも寄与すると報告されている（非特許文献14）。

【0009】

また、MMPは、皮膚老化を誘導するため、これを抑制すると、しわの治療及び予防作用が期待でき、さらに、MMPは、基底膜分解作用によって、血管新生、がんの浸潤と転

10

20

30

40

50

移を促進させる。したがって、MMPは、基底膜の分解を通じて、がんの浸潤と転移に非常に重要な役割をするだけでなく、これにより媒介される疾患が非常に多様であるため、これを抑制できる薬剤の開発が要求されている。しかし、このような抑制剤は、長期間使用時安全でなければ、理想的な治療剤として使用することができないため、MMP活性抑制剤として、毒性の低い製剤の開発が要求されている。MMPにより媒介される多様な疾患の効果的な治療のために、MMP抑制剤に対する研究が活発に進行されており、MMP抑制剤の開発は、多様な疾患の治療に効果的に使用される。

【先行技術文献】

【非特許文献】

【0010】

【非特許文献1】Bond, J. S., et al., Int. J. Biochem., 75, 565-574 (1985)

【非特許文献2】Chen, J.M., Chen, W.T., Cell, 48, 193-203 (1987)

【非特許文献3】Harris, E.D. et al., Coll Rel Res, 4, 493-512 (1984)

【非特許文献4】Goldberg, G.I., et al, J. Biol. Chem., 261, 6600-6605 (1986)

【非特許文献5】Fini, M.E., et al., Biochemistry, 26, 6155-6165 (1987)

【非特許文献6】Borkakoti, et al., Nature Struct. Biol., 1, 106-110 (1994)

【非特許文献7】EMBO, J., 13, 1263-1269 (1994)

【非特許文献8】Van Wart, H.E. et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 87, 5578-5582 (1990)

【非特許文献9】Murphy, et al., J. Biol. Chem., 267, 9612-9618 (1992)

【非特許文献10】Overall, C.M. et al., J. Periodontal Res. 22, 81-88 (1987)

【非特許文献11】Yong, VW, et al., Trends Neurosci 21(2), 75-80 (1998)

【非特許文献12】Leake A, Morris CM, & Whateley J. Neurosci Lett 291(3), 201-3 (2000)

【非特許文献13】Miyazaki, K, et al., Nature 362, 839~841 (1993)

【非特許文献14】Backstrom JR, et al., J neurosci 16(24), 7910-9 (1996)

【発明の概要】

【発明が解決しようとする課題】

【0011】

本発明者らは、生物学的に有効な活性を有する優れたペプチドを開発するために鋭意研究した結果、配列番号1と配列番号2のアミノ酸配列を有するペプチドがMMP2抑制活性及びコラーゲン分解抑制活性などを示して、皮膚状態改善に有用に利用できることを見出し、本発明を完成した。

【0012】

したがって、本発明の目的は、皮膚状態改善活性を有するペプチドを提供することにある。

【0013】

本発明の他の目的は、皮膚状態改善用組成物を提供することにある。

【0014】

10

20

30

40

50

本発明のまた他の目的は、MMP - 活性関連疾患の予防または治療用薬剤学的組成物を提供することにある。

【0015】

本発明のまた他の目的は、炎症疾患の予防または治療用薬剤学的組成物を提供することにある。

【0016】

本発明のまた他の目的は、皮膚状態改善方法を提供することにある。

【0017】

本発明のまた他の目的は、炎症疾患の予防または治療方法を提供することにある。

【課題を解決するための手段】

10

【0018】

本発明の一樣態によると、本発明は、配列番号1と配列番号2のアミノ酸配列からなる皮膚状態改善活性を有するペプチドを提供する。

【0019】

本発明者らは、生物学的に有効な活性を有する優れたペプチドを開発するために鋭意研究した結果、配列番号1または配列番号2のアミノ酸配列を有するペプチドがMMP2抑制活性及びコラーゲン分解抑制活性などを示して、皮膚状態改善に有用に利用できることを究明した。

【発明の効果】

【0020】

20

本発明の特徴及び利点を要約すると、以下のようである：

(a) 本発明は、皮膚状態改善活性を有するペプチドを提供する。

(b) 本発明のペプチドは、MMP2活性を抑制し、皮膚状態の改善に非常に優れた効果を奏し、本発明のペプチドを含む組成物は、コラーゲン分解を抑制して、メラノソーム移動を抑制するなどの優れた生理活性を示し、しわの改善、皮膚再生、皮膚弾力の改善、皮膚老化の抑制、傷の再生、ニキビの改善、皮膚再生または皮膚美白に利用可能である。

(c) 本発明のペプチドを含む組成物は、MMP - 活性関連疾患及び炎症疾患の予防または治療用薬剤学的組成物として利用できる。

【図面の簡単な説明】

【0021】

30

【図1a】本発明のペプチドに対するHPLC分析結果である((a)CG-Renuin)。

【図1b】本発明のペプチドに対するHPLC分析結果である((b)CG-Noverin)。

【図2a】本発明のペプチドによるヒト1次真皮線維芽細胞(Human primary dermal fibroblast Cells)の増殖促進効果を評価した結果である((a)CG-Renuin)。

【図2b】本発明のペプチドによるヒト1次真皮線維芽細胞(Human primary dermal fibroblast Cells)の増殖促進効果を評価した結果である((b)CG-Noverin)。

40

【図3a】ヒト1次真皮線維芽細胞において、本発明のペプチドによる信号伝達変化を確認した結果である((a)CG-Renuin)。

【図3b】ヒト1次真皮線維芽細胞において、本発明のペプチドによる信号伝達変化を確認した結果である((b)CG-Noverin)。

【図4a】本発明のペプチドによるMMP2活性抑制効果を評価した結果である((a)CG-Renuin)。

【図4b】本発明のペプチドによるMMP2活性抑制効果を評価した結果である((b)CG-Noverin)。

【図5a】線維芽細胞において、本発明のペプチドによるMMP2活性抑制効果を評価した結果である((a)CG-Renuin)。

50

【図5b】線維芽細胞において、本発明のペプチドによるMMP2活性抑制効果を評価した結果である((b)CG-Noverin)。

【図6a】本発明のペプチドによるコラーゲン分解抑制効果を評価した結果である((a)CG-Renuin)。

【図6b】本発明のペプチドによるコラーゲン分解抑制効果を評価した結果である((b)CG-Noverin)。

【図7a】本発明のペプチドによるコラーゲン分解抑制効果を評価した結果である((a)CG-Renuin)。

【図7b】本発明のペプチドによるコラーゲン分解抑制効果を評価した結果である((b)CG-Noverin)。

【図8a】CG-Renuinによるメラノソーム移動(melanosome transfer)抑制効果を評価した結果である。

【図8b】CG-Renuinによるメラノソーム移動(melanosome transfer)抑制効果を評価した結果である。

【図9】歯髄幹細胞(dental pulp stem cells)において、CG-Noverinによる抗炎症効果を評価した結果である。

【発明を実施するための形態】

【0022】

本発明によると、本発明のペプチドは、配列番号1または配列番号2のアミノ酸配列を含む。具体的に、本発明のペプチドは、必須的に配列番号1または配列番号2のアミノ酸配列から構成されている。

【0023】

本明細書で使用される用語‘ペプチド’は、ペプチド結合により、アミノ酸残基が互いに結合されて形成された線形の分子を意味する。本発明のペプチドは、当業界に公知された化学的合成方法、特に固相合成技術(solid-phase synthesis techniques; Merrifield, J. Amer. Chem. Soc. 85:2149-54(1963); Stewart, et al., Solid Phase Peptide Synthesis, 2nd. ed., Pierce Chem. Co.: Rockford, 111(1984))または液相合成技術(US登録特許第5,516,891号)によって製造できる。

【0024】

本発明のペプチドは、アミノ酸配列の一部部位を選定して、その活性を増加させるために、N-末端またはC-末端に変形を誘導することができる。このような変形を通じて、本発明のペプチドは、生体内投与時の半減期を増加させた、高い半減期を有することができる。

【0025】

また、本発明のペプチドのC-末端は、ヒドロキシ基(-OH)、アミノ基(-NH₂)、アジド(-NHNH₂)などに変形されており、ペプチドのN-末端は、アセチル基、フルオレニルメトキシカルボニル基、ホルミル基、パルミトイル基、ミリスチル基、ステアシル基及びポリエチレングリコール(PEG)からなる群から選択される保護基が結合される。

【0026】

上述のアミノ酸の変形は、本発明のペプチドの安定性を大きく改善する作用をする。本明細書において用語‘安定性’は、インビボ安定性だけではなく、貯蔵安定性(例えば、常温貯蔵安定性)も意味する。上述の保護基は、生体内のタンパク質切断酵素の攻撃から本発明のペプチドを保護する作用をする。

【0027】

本発明の一具現例によると、本発明のペプチドは、MMP2(Matrix metalloproteinase-2)の活性を直接的に抑制する機能を有するだけでなく、MMP2によるコラーゲン分解を抑制する機能を有する。また、本発明のペプチドは、

10

20

30

40

50

皮膚美白に關与するメラノソーム移動 (melanosome transfer) に対する抑制効果に優れている。このような結果は、本発明のペプチドが皮膚状態の改善に非常に優れた効能を有するというを意味する。

【0028】

本発明の他の様態によると、本発明のペプチドを有効成分として含む皮膚状態 (skin conditions) 改善用化粧量組成物を提供する。

【0029】

本発明の組成物は、上述の本発明のペプチドを有効成分として含むため、その共通する内容は、本明細書の過度なる複雑性を避けるために、その記載を省く。

【0030】

本発明の一具現例によると、本発明において皮膚状態の改善は、しわの改善、皮膚弾力の改善、皮膚老化の防止、皮膚保湿の改善、傷の除去、ニキビの改善、皮膚再生または美白である。

【0031】

本発明のペプチドは、他のタンパク質より分子量が遥かに小さいため、皮膚浸透率に非常に優れている。したがって、本発明の組成物を局所的に皮膚に塗布する場合、皮膚状態を効果的に改善することができる。

【0032】

本発明の一具現例によると、本発明の組成物は、(a) 上述の本発明のペプチドの化粧品学的有効量 (cosmetically effective amount)、及び (b) 化粧品学的に許容される担体を含む化粧品組成物である。

【0033】

本明細書において用語 '化粧品学的有効量' は、上述の本発明の組成物の皮膚改善効能を達成するに十分な量を意味する。

【0034】

本発明の化粧品組成物は、当業界で通常的に製造されるあらゆる剤形に製造でき、例えば、溶液、懸濁液、乳濁液、ペースト、ゲル、クリーム、ローション、パウダー、石鹸、界面活性剤含有クレンジング、オイル、粉末ファンデーション、乳濁液ファンデーション、ワックスファンデーション及びスプレーなどに剤形化することができるが、これに限定されるものではない。より詳しくは、柔軟化粧水、栄養化粧水、栄養クリーム、マッサージクリーム、エッセンス、アイクリーム、クレンジングクリーム、クレンジングフォーム、クレンジングウォーター、パック、スプレーまたはパウダーの剤形に製造することができる。

【0035】

本発明の剤形がペースト、クリームまたはゲルである場合は、担体成分として動物性油、植物性油、ワックス、パラフィン、デンプン、トラガカント、セルロース誘導体、ポリエチレングリコール、シリコン、ベントナイト、シリカ、タルク、または酸化亜鉛などが利用できる。

【0036】

本発明の剤形がパウダーまたはスプレーである場合は、担体成分としてラクトース、タルク、シリカ、アルミニウムヒドロキシド、カルシウムシリケート、またはポリアミドパウダーが利用でき、特にスプレーの場合は、クロロフルオロヒドロカーボン、プロパンノブタンまたはジメチルエーテルのような推進体をさらに含むことができる。

【0037】

本発明の剤形が溶液または乳濁液である場合は、担体成分として、溶媒、溶解化剤または乳濁化剤が利用されて、例えば、水、エタノール、イソプロパノール、エチルカーボネート、エチルアセテート、ベンジルアルコール、ベンジルベンゾエート、プロピレングリコール、1,3-ブチルグリコールオイル、グリセロール脂肪酸エステル、ポリエチレングリコール、またはソルビタンの脂肪酸エステルがある。

【0038】

10

20

30

40

50

本発明の剤形が懸濁液である場合は、担体成分として、水、エタノールまたはプロピレングリコールのような液状の希釈剤、エトキシ化イソステアリルアルコール、ポリオキシエチレンソルビトールエステル及びポリオキシエチレンソルビタンエステルのような懸濁剤、微小結晶性セルロース、アルミニウムメタヒドロキシド、ベントナイト、アガーまたはトラガカントなどが利用できる。

【0039】

本発明の剤形が界面活性剤含有クレンジングである場合は、担体成分として、脂肪族アルコールサルフェート、脂肪族アルコールエーテルサルフェート、スルホコハク酸モノエステル、イソチオネート、イミダゾリウム誘導體、メチルタウレート、サルコシネート、脂肪酸アミドエーテルサルフェート、アルキルアミドベタイン、脂肪族アルコール、脂肪酸グリセリド、脂肪酸ジエタノールアミド、植物性油、ラノリン誘導體、またはエトキシ化グリセロール脂肪酸エステルなどが利用できる。

10

【0040】

本発明の化粧品組成物に含まれる成分は、有効成分としてのペプチドと担体成分の他に、化粧品組成物に通常的に利用される成分を含むが、例えば、抗酸化剤、安定化剤、溶解化剤、ビタミン、顔料及び香料のような通常的な補助剤を含むことができる。

【0041】

本発明のまた他の様態によると、本発明は、本発明のペプチドを有効成分として含む MMP - 活性関連疾患の予防または治療用薬剤学的組成物であって、前記 MMP - 活性関連疾患は、関節炎、糖尿病性網膜症、肥厚性癬痕、乾癬、粘膜及び上皮組織の潰瘍、自己免疫による炎症、基底膜の分解に係る疾病の狼瘡、自己免疫性神経障害、筋細胞破壊、緑内障、または過剰血管新生であることを特徴とする組成物を提供する。

20

【0042】

本発明のペプチドは、MMP 2 の活性抑制、コラーゲン分解抑制及びメラノソーム移動抑制などの多様な生理活性を示すことにより、これに係る疾病の治療に有用に利用できる。

【0043】

本発明の好ましい具現例によると、本発明の組成物は、(a) 上述の本発明のペプチドの薬剤学的有効量、及び (b) 薬剤学的に許容される担体を含む薬剤学的組成物である。

【0044】

本明細書において用語「薬剤学的有効量」は、上述のペプチドの効能または活性を達成するに十分な量を意味する。

30

【0045】

本発明の薬剤学的組成物に含まれる薬剤学的に許容される担体は、製剤時に通常的に利用されるものであって、例えば、ラクトース、デキストロース、スクロース、ソルビトール、マンニトール、デンプン、アカシアゴム、リン酸カルシウム、アルギネート、ゼラチン、ケイ酸カルシウム、微細結晶性セルロース、ポリビニルピロリドン、セルロース、水、シロップ、メチルセルロース、メチルヒドロキシベンゾエート、プロピルヒドロキシベンゾエート、滑石、ステアリン酸マグネシウム、及びミネラルオイルなどを含むが、これらに限定されるものではない。本発明の薬剤学的組成物は、前記成分の他に、潤滑剤、湿潤剤、甘味剤、香味剤、乳化剤、懸濁剤、保存剤などをさらに含むことができる。適した薬剤学的に許容される担体及び製剤は、Remington's Pharmaceutical Sciences (19th ed., 1995) に詳細に記載されている。

40

【0046】

本発明の薬剤学的組成物は、経口または非経口、好ましくは、非経口で投与でき、非経口投与の場合は、筋肉注入、静脈内注入、皮下注入、腹腔注入、局所投与、経皮投与などにより投与できる。

【0047】

本発明の薬剤学的組成物の適した投与量は、製剤化方法、投与方式、患者の年齢、体重

50

、性、病的状態、飲食、投与時間、投与経路、排泄速度、及び反応感応性のような要因によって多様に処方できる。一方、本発明の薬剤学的組成物の好ましい投与量は、1日当たり0.0001~1000 µgである。

【0048】

本発明の薬剤学的組成物は、本発明の属する技術分野で通常の知識を有する者が容易に実施できる方法により、薬剤学的に許容される担体及び/または賦形剤を利用して製剤化することにより、単位容量形態に製造するか、または多用量容器内に入れて製造できる。ここで剤形は、オイルまたは水性媒質中の溶液、懸濁液または乳化液の形態であるか、エキス剤、粉末剤、顆粒剤、錠剤またはカプセル剤の形態であってもよく、分散剤または安定化剤をさらに含むことができる。

10

【0049】

本発明のまた他の様態によると、本発明は、本発明のペプチドを有効成分として含む、炎症疾患の予防または治療用薬剤学的組成物を提供する。

【0050】

本発明の一具現例によると、本発明の組成物が適用できる炎症疾患は、歯周炎、喘息、湿疹、乾癬、アレルギー、リウマチ関節炎、乾癬関節炎 (psoriatic arthritis)、アトピー性皮膚炎、ニキビ、アトピー性鼻炎 (枯草熱)、アレルギー性皮膚炎 (湿疹)、慢性副鼻腔炎または脂漏性皮膚炎 (seborrheic dermatitis) である。

20

【0051】

本発明のペプチドは、炎症反応に関する親-炎症性 (pro-inflammatory) サイトカイン PAR2 (Protease-activated receptor 2) 及び IL-1 の発現を抑制させて炎症反応を減少させることにより、これに係る炎症疾患の予防または治療に有用に利用できる。

【0052】

本発明の他の一様態によると、本発明は、本発明のペプチドを対象 (subject) に投与する段階を含む皮膚状態改善方法を提供する。

【0053】

本発明の他の一様態によると、本発明は、本発明のペプチドを対象 (subject) に投与する段階を含む炎症疾患の予防または治療方法を提供する。

30

【0054】

以下、実施例を通じて本発明をさらに詳細に説明するが、これら実施例は、本発明をより具体的に説明するためのものであって、本発明の範囲がこれら実施例に限定されないことは、本発明の属する技術分野で通常の知識を有する者にとっては自明なことであろう。

【実施例】

【0055】

合成例1：ペプチド合成

クロロトリチルクロライドレジン (Chloro trityl chloride resin; CTL resin, Nova biochem Cat No. 01-64-0021) 700mg を反応容器に入れて、メチレンクロライド (MC) 10ml を加えて3分間攪拌した。溶液を除去してジメチルホルムアミド (DMF) 10ml を入れて3分間攪拌した後、再び溶媒を除去した。反応器に10ml のジクロロメタン溶液を入れて、Fmoc-Gly-OH (Bachem, Swiss) 200mmole 及びジイソプロピルエチルアミン (DIEA) 400mmole を入れた後、攪拌してよく溶かし、1時間攪拌しながら反応した。反応後、洗浄して、メタノールと DIEA (2:1) を DCM に溶かして10分間反応して、過量の DCM / DMF (1:1) で洗浄した。溶液を除去して、ジメチルホルムアミド (DMF) を10ml 入れて、3分間攪拌した後、再び溶媒を除去した。脱保護溶液 (20% のピペリジン (Piperidine) / DMF) 10ml を反応容器に入れて、10分間常温で攪拌した後、溶液を除去した。同量の脱保護溶液を入れて、再び10分間反応を維持した後、溶液を除去し

40

50

、それぞれ3分間ずつDMFで2回、MCで1回、DMFで1回洗浄し、Gly-CTL Resinを製造した。新しい反応器に10mlのDMF溶液を入れて、Fmoc-Cys (Bachem, Swiss) 200mmole、Hobt 200mmole及びBop 200mmoleを入れた後、攪拌して、よく溶かした。反応器に400mmole DIEA (N, N-Diisopropylethylamine) を分画で2回にかけて入れた後、全ての固体が溶けるまで少なくとも5分間攪拌した。溶かしたアミノ酸混合溶液を、脱保護されたレジンの入った反応器に入れて、1時間常温で攪拌しながら反応した。反応液を除去して、DMF溶液で3回5分間ずつ攪拌した後、除去した。反応レジン少量取って、カイザーテスト (Nihydrin test) を利用して反応程度を点検した。上記と同様に脱保護溶液で2回脱保護反応し、Cys-Gly-CTL Resinを製造した。DMFとMCで十分洗浄し、再びカイザーテストを行った後、上記と同様に下記のアミノ酸付着実験を行った。選定されたアミノ酸配列に基づき、Fmoc-Ile, Fmoc-Trp, Fmoc-Lys (Boc), Fmoc-Glu (OtBu), Fmoc-Ser (tBu), Fmoc-Ser (tBu) 及びFmoc-Glu (OtBu) 順に連鎖反応を行った。Fmoc-保護基を脱保護溶液で10分間ずつ2回反応した後、よく洗浄して除去した。無水酢酸とDIEA、Hobt (Hydroxybenzotriazole) を入れて1時間アセチル化を行った後、製造されたペプチジルレジン DMF、MC及びメタノールでそれぞれ3回洗浄し、窒素空気を徐々に流して乾燥した後、五酸化リン (Phosphorus pentoxide, P₂O₅) 下で真空で減圧し、完全に乾燥した後、脱漏溶液 [TFA (Trifluoroacetic acid) 81.5%、蒸留水5%、チオアニソール (Thioanisole) 5%、フェノール5%、EDT 2.5%及びTIS 1%] 30mlを入れた後、常温で時々振りながら2時間反応を維持した。フィルタリングでレジンを濾過し、レジンを少量のTFA溶液で洗浄した後、母液と合わせた。減圧を利用して、全体容量が半分ぐらい残るように蒸留して、50mlの冷たいエーテルを加えて沈澱を誘導した後、遠心分離して沈澱を集め、さらに2回冷たいエーテルで洗浄した。母液を除去して窒素下で十分乾燥し、精製前のNH₂-Cys-Thr-Lys-Ile-Tyr-Asp-Pro-Val-Cys-COOH 配列番号1のペプチドを0.5g (収率: 95%)、NH₂-Cys-Pro-Arg-His-Phe-Asn-Pro-Val-Cys-COOH 配列番号2のペプチドを0.7g合成 (収率: 95%) した。分子量測定器を利用して測定時、配列番号1のペプチド分子量は、1041.2 (理論値: 1041.25)、配列番号2のペプチド分子量は、1072.2 (理論値: 1072.27) である。

【0056】

【表1】

ペプチド	アミノ酸配列	分析値(質量分析器)	
		分析値	理論値
配列1	CTKIYDPVC	1041.2	1042.25
配列2	CPRHFNPVC	1072.2	1072.27

【0057】

実施例1: ヒト真皮線維芽細胞の増殖促進

ヒト1次真皮線維芽細胞 (human primary dermal fibroblast cells) にCG-Renuin (配列番号1のペプチド) またはCG-Nonoverin (配列番号2のペプチド) を濃度別 (1ng/ml - 1µg/ml) に処理して、細胞培養器で72時間培養した後、ペプチド処理による細胞増殖変化をSRBアッセイ (OD 590nm) を通じて分析した。CG-RenuinまたはCG-Nonoverin処理量に依存的にヒト1次真皮線維芽細胞の増殖が増加された (図2a-2b)。

【0058】

10

20

30

40

50

実施例 2 : ヒト線維芽細胞において CG - Renuin または CG - Noverin の信号伝達

2 × 10⁵ 細胞 / ウェルの細胞密度で 6 - ウェルプレートに NIH3T3 (表皮細胞株) をシーディングして、一晩中培養した後、CG - Renuin または CG - Noverin ペプチドを濃度別 (1 - 10 μg / ml) に処理して、30 分間 37 °C 培養器で培養後、UVA (8 J) を照射して 24 時間培養した。細胞溶解バッファーを処理して溶解物を確保した後、タンパク質を定量した。細胞活性因子の発現確認のために、anti - pERK (Santa Cruz Biotechnology, USA)、p38 (Santa Cruz Biotechnology, USA) 抗体を使用してウェスタンブロットを行った。

10

【0059】

CG - Renuin または CG - Noverin を処理する場合、細胞の増殖、移動及び生存に關与する ERK 及び P38 のリン酸化増加が確認された (図 3 a ~ 3 b)。

【0060】

実施例 3 : CG - Renuin または CG - Noverin による rhMMP2 の抑制
rhMMP2 とペプチドを濃度別 (0.1 μg / ml, 1 μg / ml) に混合して常温で 1 時間培養後、ゼラチンザイモグラフィ (gelatin zymography) を行ってその発現を調べるために、まず、ゼラチン (2 mg / ml) を基質としてタンパク質電気泳動 (SDS - PAGE) を行った。電気泳動後、ゲルを 2.5 % Triton X - 100 に 30 分間浸しておいてから、再び 50 mM Tris - HCl、0.2 M NaCl、5 mM CaCl₂、1 % Triton X - 100 を組成とする緩衝剤で 24 時間 37 °C で培養した。培養後、ゲルは Coomassie Brilliant Blue R250 (Sigma) で染色して、5 % メタノールと 7.5 % アセト酸、蒸留水で組成された溶液で脱染色した。それからゼラチン加水分解により表れるバンドを観察したが、活性 (active) MMP - 2 は、66 kDa、pro - MMP - 2 は、72 kDa バンドを探して観察した。

20

【0061】

CG - Renuin 及び CG - Noverin により MMP2 の活性が直接的に抑制されることを、ゼラチンザイモグラフィを通じて確認した (図 4 a ~ 4 b)。

【0062】

30

実施例 4 : 線維芽細胞において CG - Renuin または CG - Noverin による rhMMP2 の抑制

3 × 10⁴ 細胞 / ウェルの細胞密度で 24 - ウェルプレートに (NIH3T3) をシーディングした。翌日、無血清培地で 24 時間培養して、TNF - α で MMP2 の発現及び活性化を誘導した後、CG - Renuin または CG - Noverin をそれぞれ濃度 (10 ng / ml, 100 ng / ml, 1000 ng / ml) 別に処理した後、24 時間培養した。14,000 × g で 10 分間遠心分離して得た上澄み液を培養後、ゼラチンザイモグラフィを行って、その発現を調べるために、ゼラチン (2 mg / ml) を基質としてタンパク質電気泳動 (SDS - PAGE) を行った。電気泳動後、ゲルを 2.5 % Triton X - 100 に 30 分間浸しておいてから、再び 50 mM Tris - HCl、0.2 M NaCl、5 mM CaCl₂、1 % Triton X - 100 を組成とする緩衝剤で 24 時間 37 °C で培養した。培養後、ゲルは、Coomassie Brilliant Blue R250 (Sigma) で染色して、5 % メタノールと 7.5 % アセト酸、蒸留水で組成された溶液で脱染色した。それからゼラチン加水分解により表れるバンドを観察したが、活性 MMP - 2 は、66 kDa、pro - MMP - 2 は、72 kDa バンドを探して観察した。

40

【0063】

MMP2 の活性を観察した結果、CG - Renuin 及び CG - Noverin により MMP2 の活性が抑制されることを確認した (図 5 a ~ 5 b)。

【0064】

50

実施例5：CG-RenuinまたはCG-Noverinによるコラーゲン分解抑制
HDF (Human dermal fibroblast) 細胞 (3×10^4 細胞) を24ウェルプレートにシーディングした。翌日、5%血清培地で42時間培養した後、MMP2 (20 ng/ml) (SIGMA/USA) とCG-Noverin、CG-Renuinをそれぞれ処理した後、6時間培養した。14,000×gで10分間遠心分離して得た上澄み液をpro-collagen type I kit (RND system/USA) を利用して分析した。

【0065】

HDF (Human dermal fibroblast) 細胞 (3×10^4 細胞) を24ウェルプレートにシーディングして、翌日5%血清培地に入れ替えた後、IGF-1 (100 ng/ml) (Sigma/USA) を処理して、44時間培養した後、MMP2 (20 ng/ml) とCG-Noverin、CG-Renuinを処理した後、4時間培養した。14,000×gで10分間遠心分離して得た上澄み液をpro-collagen type I kitを利用して分析した。

10

【0066】

CG-Renuin及びCG-Noverinが、MMP2により誘導されるコラーゲン分解を抑制する機能を有するかどうかについて実験を行った結果、MMP2を処理した時、細胞内コラーゲン分解が、対照群に比べて増加し、CG-RenuinまたはCG-Noverinと同時に処理した時、コラーゲン分解誘導が抑制されることを確認した (図6a-6b及び図7a-7b)。

20

【0067】

実施例6：CG-Noverin, CG-Renuinによるメラノソーム移動 (melanosome transfer)

メラノソーム移動を観察するために、HaCaT角質細胞を利用してファゴサイトーシス試験 (Phagocytosis assay) を進行した。ファゴサイトーシスのための物質としては、蛍光 (fluorescence) 物質の付いた生粒子 (bioparticle) を利用した。96-ウェル組織培養用平板に各ウェル当たり 3×10^3 細胞になるようにして、24時間培養後、無血清培地で6時間培養した。以後、ファゴサイトーシスを誘導するために、1 µg/mlのトリプシンを処理して、1 µg/mlのペプチドを48時間処理した。その結果、蛍光顕微鏡を通じて生粒子が角質細胞内にファゴサイトーシスされることを確認した。ファゴサイトーシス誘導群、即ち、トリプシン処理群を100%にしてデータ観察した時、CG-NoverinとCG-Renuin処理群でファゴサイトーシスが抑制されることを確認した。

30

【0068】

実施例7：CG-Noverinの抗-歯周疾患 (anti-periodontal) 機能

合成ペプチドによる歯周炎細胞における抗炎症効果

前記合成例で合成されたペプチドに歯周炎細胞における抗炎症効果を観察するために、ヒト歯根膜線維芽細胞 (Human periodontal ligament fibroblast cell) (ATCC, USA) を利用して実験を進行した。ヒト歯根膜線維芽細胞を6-ウェル組織培養用平板に各ウェル当たり 5×10^1 細胞になるようにして、24時間培養した。歯周細胞に炎症を誘導するために、10 µg/mlの濃度でトリプシン (シグマ、USA) を処理した後、本発明のペプチドを1 µg/mlの濃度で共に処理して4時間培養した後、対照群と、誘発物質、誘発物質とペプチドを処理した培養細胞からmRNAを抽出し、PAR-2、IL-1のプライマーを利用して逆転写重合酵素連鎖反応を行った。使用した各プライマーのヌクレオチド配列は、表2に示した。

40

【0069】

【表 2】

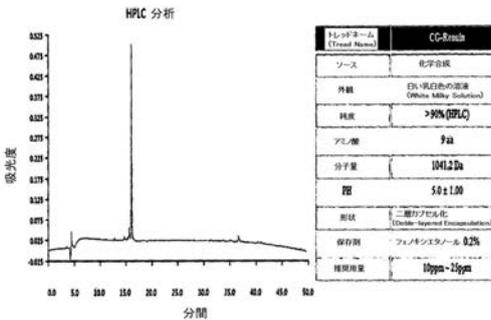
IL-1β	正方向	5' -CCGTGGACCTTCCAGGATCA-3'
	逆方向	5' -GATCCACACTCTCCAGCTGC-3'
PAR2	正方向	5' -GGGTTTGCCAAGTAACGGC-3'
	逆方向	5' -GGGAACCAGATGACAGAGAGG-3'

【0070】

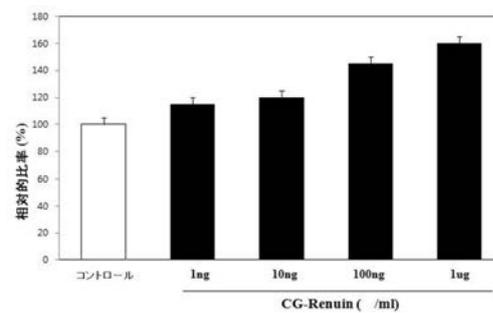
図9から分かるように、ヒト歯根膜線維芽細胞にトリプシンを処理して炎症を誘導した時、炎症性サイトカインであるPAR-2、IL-1の発現が増加することを観察することができて、本発明のペプチドを同時に処理した時には、上記2種の炎症性サイトカインの発現が著しく抑制されることを確認した(図9)。

10

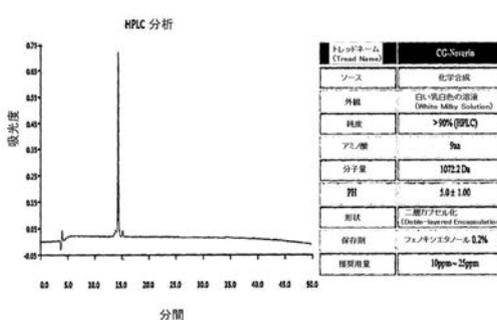
【図 1 a】



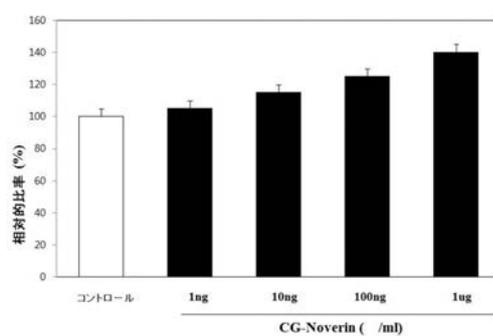
【図 2 a】



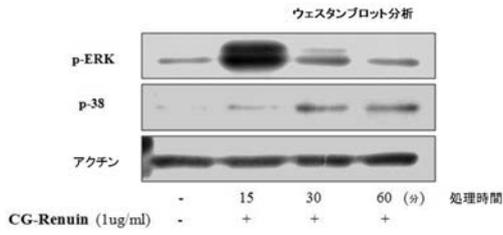
【図 1 b】



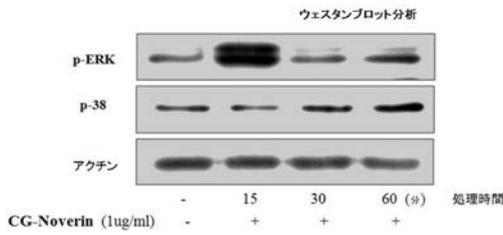
【図 2 b】



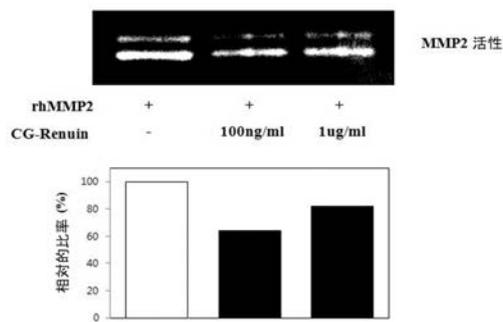
【 図 3 a 】



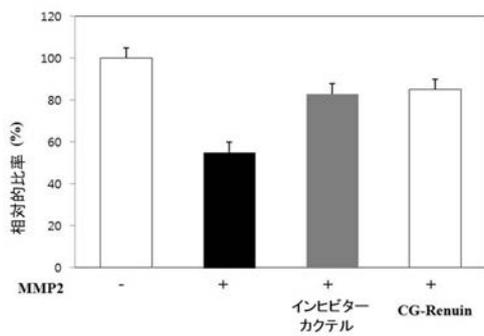
【 図 3 b 】



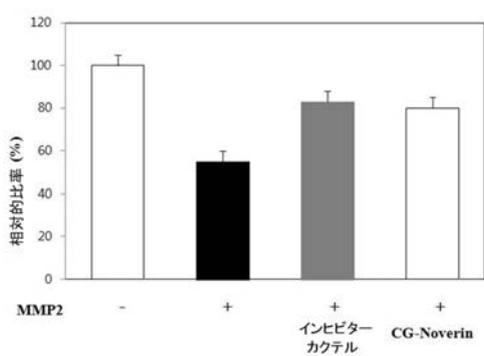
【 図 4 a 】



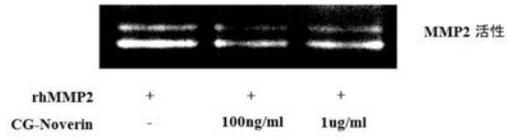
【 図 6 a 】



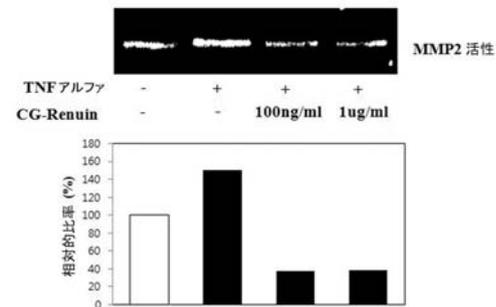
【 図 6 b 】



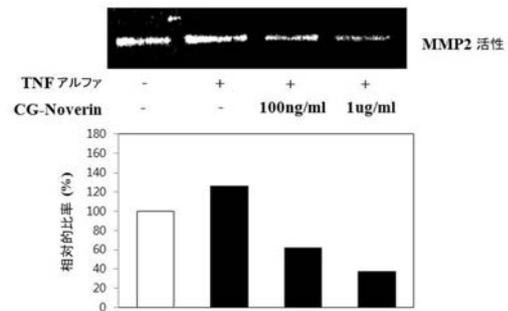
【 図 4 b 】



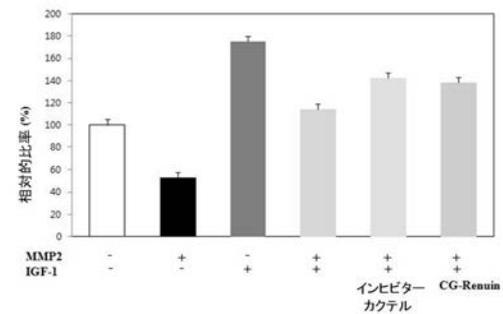
【 図 5 a 】



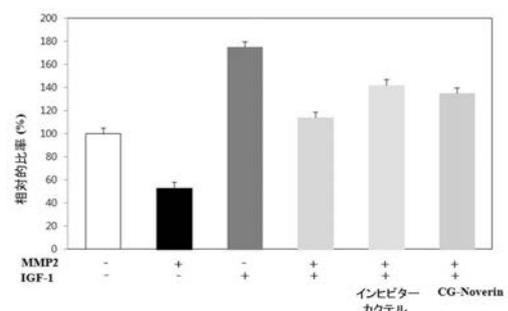
【 図 5 b 】



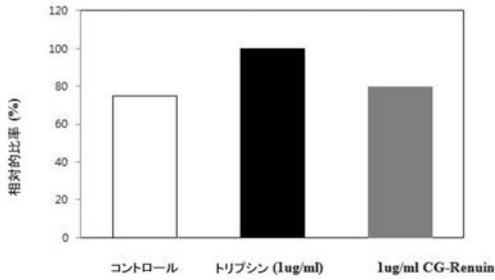
【 図 7 a 】



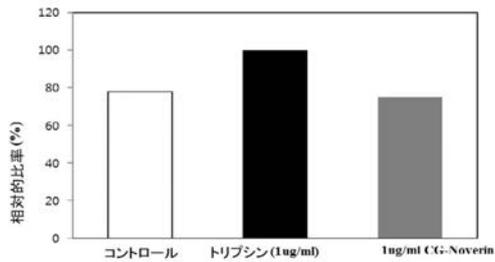
【 図 7 b 】



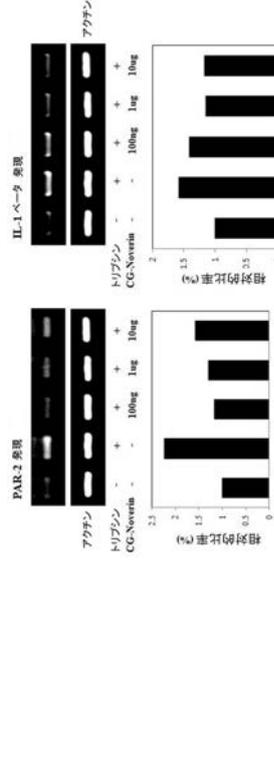
【図 8 a】



【図 8 b】



【図 9】



【配列表】

2018505850000001.app

【手続補正書】

【提出日】平成29年6月2日(2017.6.2)

【手続補正1】

【補正対象書類名】特許請求の範囲

【補正対象項目名】全文

【補正方法】変更

【補正の内容】

【特許請求の範囲】

【請求項1】

配列番号1または配列番号2のアミノ酸配列からなる皮膚状態改善活性を有するペプチド。

【請求項2】

前記ペプチドは、MMP2(Matrix metalloproteinase-2)の活性を抑制することを特徴とする、請求項1に記載のペプチド。

【請求項3】

前記ペプチドは、コラーゲン分解を抑制することを特徴とする、請求項1に記載のペプチド。

【請求項4】

前記ペプチドは、メラノソーム移動(melanosome transfer)を抑制することを特徴とする、請求項1に記載のペプチド。

【請求項5】

前記皮膚状態改善は、しわの改善、皮膚再生、皮膚弾力の改善、皮膚老化の抑制、傷の再生、ニキビの改善、皮膚再生または皮膚美白であることを特徴とする、請求項1に記載

のペプチド。

【請求項 6】

配列番号 1 のアミノ酸配列からなるペプチドと配列番号 2 のアミノ酸配列からなるペプチドとからなる群から選択される 1 種以上のペプチドを有効成分として含む皮膚状態改善用組成物。

【請求項 7】

配列番号 1 のアミノ酸配列からなるペプチドと配列番号 2 のアミノ酸配列からなるペプチドとからなる群から選択される 1 種以上のペプチドを有効成分として含む、MMP - 活性関連疾患の予防または治療用薬剤学的組成物であって、前記マトリックスMMP - 活性関連疾患は、関節炎、糖尿病性網膜症、肥厚性瘢痕、乾癬、粘膜及び上皮組織の潰瘍、自己免疫による炎症、基底膜の分解に係る疾病の狼瘡、自己免疫性神経障害、筋細胞破壊、緑内障、または過剰血管新生であることを特徴とする組成物。

【請求項 8】

配列番号 1 のアミノ酸配列からなるペプチドと配列番号 2 のアミノ酸配列からなるペプチドとからなる群から選択される 1 種以上のペプチドを有効成分として含む、炎症疾患の予防または治療用薬剤学的組成物。

【請求項 9】

前記炎症疾患は、歯周炎、喘息、湿疹、乾癬、アレルギー、リウマチ関節炎、乾癬関節炎 (psoriatic arthritis)、アトピー性皮膚炎、ニキビ、アトピー性鼻炎 (枯草熱)、アレルギー性皮膚炎 (湿疹)、慢性副鼻腔炎または脂漏性皮膚炎 (seborrheic dermatitis) であることを特徴とする、請求項 8 に記載の組成物。

【請求項 10】

配列番号 1 のアミノ酸配列からなるペプチドと配列番号 2 のアミノ酸配列からなるペプチドとからなる群から選択される 1 種以上のペプチドを対象 (subject) に投与する段階を含む皮膚状態改善方法。

【請求項 11】

配列番号 1 のアミノ酸配列からなるペプチドと配列番号 2 のアミノ酸配列からなるペプチドとからなる群から選択される 1 種以上のペプチドを対象 (subject) に投与する段階を含む炎症疾患の予防または治療方法。

【手続補正 2】

【補正対象書類名】明細書

【補正対象項目名】0011

【補正方法】変更

【補正の内容】

【0011】

本発明者らは、生物学的に有効な活性を有する優れたペプチドを開発するために鋭意研究した結果、配列番号 1 または配列番号 2 のアミノ酸配列を有するペプチドが MMP 2 抑制活性及びコラーゲン分解抑制活性などを示して、皮膚状態改善に有用に利用できることを見出し、本発明を完成した。

【手続補正 3】

【補正対象書類名】明細書

【補正対象項目名】0018

【補正方法】変更

【補正の内容】

【0018】

本発明の一樣態によると、本発明は、配列番号 1 または配列番号 2 のアミノ酸配列からなる皮膚状態改善活性を有するペプチドを提供する。

【 国際調査報告 】

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/KR2015/007554

A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER <i>C07K 7/06(2006.01)i, C07K 14/81(2006.01)i, A61K 38/08(2006.01)i, A61P 17/00(2006.01)i</i> 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) C07K 7/06; C07K 5/10; A61K 8/64; A61K 38/08; A61Q 19/00; C07K 7/00; A61K 38/55; A61K 8/97; C07K 14/81; A61P 17/00		
Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched Korean Utility models and applications for Utility models: IPC as above Japanese Utility models and applications for Utility models: IPC as above		
Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practicable, search terms used) eKOMPASS (KIPO internal) & Keywords: MMP2, skin state improvement, collagen degradation inhibiting, melanosome migration inhibiting, inflammation treatment		
C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT		
Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
A	KR 10-1363455 B1 (CAREGEN CO., LTD.) 21 February 2014 See abstract; claims 1, 3-12, 14, 16-20.	1-9
A	KR 10-2004-0023708 A (KIMBERLY-CLARK WORLDWIDE, INC.) 18 March 2004 See the entire document.	1-9
A	KR 10-2012-0058371 A (LIPOTEC, S.A.) 07 June 2012 See the entire document.	1-9
A	KR 10-2013-0104114 A (MIWON COMMERCIAL CO., LTD.) 25 September 2013 See the entire document.	1-9
A	US 2012-0156150 A1 (KIM et al.) 21 June 2012 See the entire document.	1-9
<input 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 "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 "I" 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 NOVEMBER 2015 (16.11.2015)		Date of mailing of the international search report 16 NOVEMBER 2015 (16.11.2015)
Name and mailing address of the ISA/KR  Korea Intellectual Property Office Government Complex-Daejeon, 189 Seomsa-ro, Daejeon 302-701, Republic of Korea Facsimile No. 82-42-472-7140		Authorized officer Telephone No.

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/KR2015/007554

Box No. II Observations where certain claims were found unsearchable (Continuation of item 2 of first sheet)

This international search report has not been established in respect of certain claims under Article 17(2)(a) for the following reasons:

1. Claims Nos.: 10-11
because they relate to subject matter not required to be searched by this Authority, namely:
Claims 10-11 pertain to a method for treatment of the human body, and thus pertain to subject matter on which the International Searching Authority is not required to carry out an international search under the provisions of PCT Article 17(2)(a)(i) and PCT Rule 39.1(iv).
2. Claims Nos.:
because they relate to parts of the international application that do not comply with the prescribed requirements to such an extent that no meaningful international search can be carried out, specifically:
3. Claims Nos.:
because they are dependent claims and are not drafted in accordance with the second and third sentences of Rule 6.4(a).

Box No. III Observations where unity of invention is lacking (Continuation of item 3 of first sheet)

This International Searching Authority found multiple inventions in this international application, as follows:

1. As all required additional search fees were timely paid by the applicant, this international search report covers all searchable claims.
2. As all searchable claims could be searched without effort justifying additional fees, this Authority did not invite payment of additional fees.
3. As only some of the required additional search fees were timely paid by the applicant, this international search report covers only those claims for which fees were paid, specifically claims Nos.:
4. No required additional search fees were timely paid by the applicant. Consequently, this international search report is restricted to the invention first mentioned in the claims; it is covered by claims Nos.:

- Remark on Protest**
- The additional search fees were accompanied by the applicant's protest and, where applicable, the payment of a protest fee.
- The additional search fees were accompanied by the applicant's protest but the applicable protest fee was not paid within the time limit specified in the invitation.
- No protest accompanied the payment of additional search fees.

INTERNATIONAL SEARCH REPORT
Information on patent family members

International application No.

PCT/KR2015/007554

Patent document cited in search report	Publication date	Patent family member	Publication date
KR 10-1363455 B1	21/02/2014	CN 104024271 A	03/09/2014
		EP 2754665 A1	16/07/2014
		JP 2014-526459 A	06/10/2014
		US 2014-0328782 A1	06/11/2014
		WO 2013-035931 A1	14/03/2013
KR 10-2004-0023708 A	18/03/2004	CA 2455883 A1	06/03/2003
		CA 2456158 A1	27/02/2003
		CN 1543503 A	03/11/2004
		CN 1543503 B	15/06/2011
		CN 1549722 A	24/11/2004
		EP 1423515 A1	02/06/2004
		EP 1513542 A2	16/03/2005
		KR 10-0944318 B1	03/03/2010
		KR 10-0996047 B1	22/11/2010
		KR 10-2004-0028974 A	03/04/2004
		US 2003-0096757 A1	22/05/2003
		US 2003-0148959 A1	07/08/2003
		US 2003-0166567 A1	04/09/2003
		US 2004-0127420 A1	01/07/2004
		US 2005-0239710 A1	27/10/2005
		US 6906036 B2	14/06/2005
		US 7071164 B2	04/07/2006
		US 7094754 B2	22/08/2006
		US 7186693 B2	06/03/2007
		US 7196162 B2	27/03/2007
		WO 03-016520 A1	27/02/2003
		WO 03-018748 A2	06/03/2003
		KR 10-2012-0058371 A	07/06/2012
CA 2716650 A1	03/09/2009		
CN 102015764 A	13/04/2011		
CN 102015764 B	29/10/2014		
EP 2254908 A1	01/12/2010		
EP 2254908 B1	21/11/2012		
JP 2011-514891 A	12/05/2011		
JP 5613062 B2	22/10/2014		
US 2011-0002969 A1	06/01/2011		
WO 2009-106343 A1	03/09/2009		
KR 10-2013-0104114 A	25/09/2013	WO 2013-137569 A1	19/09/2013
US 2012-0156150 A1	21/06/2012	KR 10-2012-0089407 A	10/08/2012

국제조사보고서		국제출원번호 PCT/KR2015/007554
A. 발명이 속하는 기술분류(국제특허분류(IPC)) C07K 7/06(2006.01)i, C07K 14/81(2006.01)i, A61K 38/08(2006.01)i, A61P 17/00(2006.01)i		
B. 조사된 분야 조사된 최소문헌(국제특허분류를 기재) C07K 7/06; C07K 5/10; A61K 8/64; A61K 38/08; A61Q 19/00; C07K 7/00; A61K 38/55; A61K 8/97; C07K 14/81; A61P 17/00 조사된 기술분야에 속하는 최소문헌 이외의 문헌 한국등록실용신안공보 및 한국공개실용신안공보: 조사된 최소문헌란에 기재된 IPC 일본등록실용신안공보 및 일본공개실용신안공보: 조사된 최소문헌란에 기재된 IPC		
국제조사에 이용된 전산 데이터베이스(데이터베이스의 명칭 및 검색어(해당하는 경우)) eKOMPASS(특허청 내부 검색시스템) & 키워드: MMP2, 피부 상태 개선, 콜라겐 분해 억제, 멜라노솜 이동 억제, 염증 치료		
C. 관련 문헌		
카테고리*	인용문헌명 및 관련 구절(해당하는 경우)의 기재	관련 청구항
A	KR 10-1363455 B1 ((주)케어젠) 2014.02.21. 요약; 청구항 1, 3-12, 14, 16-20 참조.	1-9
A	KR 10-2004-0023708 A (김벌리-클라크 월드와이드, 인크.) 2004.03.18. 전체 문헌 참조.	1-9
A	KR 10-2012-0058371 A (리포텍 에스.에이.) 2012.06.07. 전체 문헌 참조.	1-9
A	KR 10-2013-0104114 A (미원상사주식회사) 2013.09.25. 전체 문헌 참조.	1-9
A	US 2012-0156150 A1 (KIM 등) 2012.06.21. 전체 문헌 참조.	1-9
<input type="checkbox"/> 추가 문헌이 C(계속)에 기재되어 있습니다. <input checked="" type="checkbox"/> 대응특허에 관한 별지를 참조하십시오.		
* 인용된 문헌의 특별 카테고리: "A" 특별히 관련이 없는 것으로 보이는 일반적인 기술수준을 정의한 문헌 "E" 국제출원일보다 빠른 출원일 또는 우선일을 가지나 국제출원일 이후에 공개된 선출원 또는 특허 문헌 "L" 우선권 주장에 의문을 제기하는 문헌 또는 다른 인용문헌의 공개일 또는 다른 특별한 이유(이유를 명시)를 밝히기 위하여 인용된 문헌 "O" 구두 개시, 사용, 전시 또는 기타 수단을 언급하고 있는 문헌 "P" 우선일 이후에 공개되었으나 국제출원일 이전에 공개된 문헌 "T" 국제출원일 또는 우선일 후에 공개된 문헌으로, 출원과 상충하지 않으며 발명의 기초가 되는 원리나 이론을 이해하기 위해 인용된 문헌 "X" 특별한 관련이 있는 문헌. 해당 문헌 하나만으로 청구된 발명의 신규성 또는 진보성이 없는 것으로 본다. "Y" 특별한 관련이 있는 문헌. 해당 문헌이 하나 이상의 다른 문헌과 조합하는 경우로 그 조합이 당업자에게 자명한 경우 청구된 발명은 진보성이 없는 것으로 본다. "&" 동일한 대응특허문헌에 속하는 문헌		
국제조사의 실제 완료일 2015년 11월 16일 (16.11.2015)		국제조사보고서 발송일 2015년 11월 16일 (16.11.2015)
ISA/KR의 명칭 및 우편주소 대한민국 특허청 (35208) 대전광역시 서구 청사로 189, 4동 (둔산동, 정부대전청사) 팩스 번호 +82-42-472-7140		심사관 김승범 전화번호 +82-42-481-3371

서식 PCT/ISA/210 (두 번째 용지) (2015년 1월)

국제조사보고서

국제출원번호
PCT/KR2015/007554

제1기제관 핵산염기 및/또는 아미노산 서열(첫 번째 용지의 1.c의 계속)

1. 국제출원에 개시된 핵산염기 및/또는 아미노산 서열과 관련하여, 국제조사는 아래에 기초하여 수행되었습니다.

a. 아래의 형태로 출원시 국제출원의 일부를 구성하는 서열목록
부록 C/ST.25 텍스트 파일
서면 혹은 이미지 파일

b. PCT 규칙 13의3.1(a)에 따라 국제출원과 함께 국제조사만을 목적으로 부록 C/ST.25 텍스트 파일의 형태로 제출된 서열목록

c. 국제조사만을 목적으로 국제출원일 이후에 아래 형태로 제출된 서열목록
부록 C/ST.25 텍스트 파일 (규칙 13의3.1(a))
서면 혹은 이미지 파일 (규칙 제13의3.1(b) 및 시행세칙 713)

2. 추가로 서열목록에 대하여 하나 이상의 버전이나 사본이 제출된 경우, 후속 버전 또는 추가된 사본에 기재되어 있는 정보가 출원시 출원의 일부를 구성하는 정보와 동일하거나 또는 출원시의 개시범위를 벗어나지 않는다는 진술서가 제출되었습니다.

3. 추가 의견:

국제조사보고서

국제출원번호

PCT/KR2015/007554

제2기재란 일부 청구항을 조사할 수 없는 경우의 의견(첫 번째 용지의 2의 계속)

PCT 제17조(2)(a)의 규정에 따라 다음과 같은 이유로 일부 청구항에 대하여 본 국제조사보고서가 작성되지 아니하였습니다.

- 1. 청구항: 10-11
이 청구항은 본 기관이 조사할 필요가 없는 대상에 관련됩니다. 즉, 청구항 10-11은 인체의 치료방법에 관한 것이므로 PCT 제17조(2)(a)(i) 및 PCT 규칙 39.1(iv)의 규정에 의하여 국제조사기관이 국제 조사할 의무가 없는 대상에 해당됩니다.
- 2. 청구항:
이 청구항은 유효한 국제조사를 수행할 수 없을 정도로 소정의 요건을 충족하지 아니하는 국제출원의 부분과 관련됩니다. 구체적으로는,
- 3. 청구항:
이 청구항은 종속청구항이나 PCT규칙 6.4(a)의 두 번째 및 세 번째 문장의 규정에 따라 작성되어 있지 않습니다.

제3기재란 발명의 단일성이 결여된 경우의 의견(첫 번째 용지의 3의 계속)

본 국제조사기관은 본 국제출원에 다음과 같이 다수의 발명이 있다고 봅니다.

- 1. 출원인이 모든 추가수수료를 기간 내에 납부하였으므로, 본 국제조사보고서는 모든 조사 가능한 청구항을 대상으로 합니다.
- 2. 추가수수료 납부를 요구하지 않고도 모든 조사 가능한 청구항을 조사할 수 있었으므로, 본 기관은 추가수수료 납부를 요구하지 아니하였습니다.
- 3. 출원인이 추가수수료의 일부만을 기간 내에 납부하였으므로, 본 국제조사보고서는 수수료가 납부된 청구항만을 대상으로 합니다. 구체적인 청구항은 아래와 같습니다.
- 4. 출원인이 기간 내에 추가수수료를 납부하지 아니하였습니다. 따라서 본 국제조사보고서는 청구범위에 처음 기재된 발명에 한정되어 있으며, 해당 청구항은 아래와 같습니다.

이의신청에 관한 기재

- 출원인의 이의신청 및 이의신청료 납부(해당하는 경우)와 함께 추가수수료가 납부되었습니다.
- 출원인의 이의신청과 함께 추가수수료가 납부되었으나 이의신청료가 보정요구서에 명시된 기간 내에 납부되지 아니하였습니다.
- 이의신청 없이 추가수수료가 납부되었습니다.

국제조사보고서 대응특허에 관한 정보		국제출원번호 PCT/KR2015/007554	
국제조사보고서에서 인용된 특허문헌	공개일	대응특허문헌	공개일
KR 10-1363455 B1	2014/02/21	CN 104024271 A	2014/09/03
		EP 2754665 A1	2014/07/16
		JP 2014-526459 A	2014/10/06
		US 2014-0328782 A1	2014/11/06
		WO 2013-035931 A1	2013/03/14
KR 10-2004-0023708 A	2004/03/18	CA 2455883 A1	2003/03/06
		CA 2456158 A1	2003/02/27
		CN 1543503 A	2004/11/03
		CN 1543503 B	2011/06/15
		CN 1549722 A	2004/11/24
		EP 1423515 A1	2004/06/02
		EP 1513542 A2	2005/03/16
		KR 10-0944318 B1	2010/03/03
		KR 10-0996047 B1	2010/11/22
		KR 10-2004-0028974 A	2004/04/03
		US 2003-0096757 A1	2003/05/22
		US 2003-0148959 A1	2003/08/07
		US 2003-0166567 A1	2003/09/04
		US 2004-0127420 A1	2004/07/01
		US 2005-0239710 A1	2005/10/27
		US 6906036 B2	2005/06/14
		US 7071164 B2	2006/07/04
		US 7094754 B2	2006/08/22
		US 7186693 B2	2007/03/06
		US 7196162 B2	2007/03/27
		WO 03-016520 A1	2003/02/27
WO 03-018748 A2	2003/03/06		
KR 10-2012-0058371 A	2012/06/07	AU 2009-218680 A1	2009/09/03
		CA 2716650 A1	2009/09/03
		CN 102015764 A	2011/04/13
		CN 102015764 B	2014/10/29
		EP 2254908 A1	2010/12/01
		EP 2254908 B1	2012/11/21
		JP 2011-514891 A	2011/05/12
		JP 5613062 B2	2014/10/22
		US 2011-0002969 A1	2011/01/06
		WO 2009-106343 A1	2009/09/03
		KR 10-2013-0104114 A	2013/09/25
US 2012-0156150 A1	2012/06/21	KR 10-2012-0089407 A	2012/08/10

서식 PCT/ISA/210 (대응특허 추가용지) (2015년 1월)

フロントページの続き

(51) Int.Cl.	F I		テーマコード(参考)
A 6 1 K 38/08 (2006.01)	A 6 1 P	43/00	1 0 7
A 6 1 P 29/00 (2006.01)	A 6 1 K	38/08	
A 6 1 K 8/64 (2006.01)	A 6 1 P	29/00	
A 6 1 Q 19/02 (2006.01)	A 6 1 K	8/64	
A 6 1 Q 19/08 (2006.01)	A 6 1 Q	19/02	
	A 6 1 Q	19/08	

(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, 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, KN, KP, 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, UA, UG, US, UZ

(72) 発明者 ヨンジ・チョン

大韓民国 448-980 キョンギ-ド ヨンイン-シ スジ-ク ソンブク 2-口 86
ソンドン マウル エルジー ヴィレヅジ 1チャ アパート 101-1202

(72) 発明者 ウンミ・キム

大韓民国 448-739 キョンギ-ド ヨンイン-シ スジ-ク ソンブク 1-口 163
ボン-ギル 11 ボドゥルチ マウル キョンナム オーナーズヴィレ 2 チャ アパート
105-1103

Fターム(参考) 4C083 AD411 AD412 CC02 EE12 EE16

4C084 AA02 BA01 BA08 BA17 BA23 NA14 ZA891 ZA892 ZB111 ZB112

4H045 AA10 AA30 BA15 DA56 EA15 EA20 FA10