

(19) 日本国特許庁(JP)

(12) 公開特許公報(A)

(11) 特許出願公開番号

特開2005-60314
(P2005-60314A)

(43) 公開日 平成17年3月10日(2005.3.10)

(51) Int. Cl. ⁷	F I	テーマコード (参考)
A 6 1 K 7/48	A 6 1 K 7/48 Z N A	4 C O 8 3
A 6 1 K 7/00	A 6 1 K 7/00 J	4 H O 4 5
// C O 7 K 7/08	A 6 1 K 7/00 L	
	A 6 1 K 7/00 M	
	A 6 1 K 7/00 N	
審査請求 未請求 請求項の数 9 O L (全 26 頁) 最終頁に続く		

(21) 出願番号	特願2003-293045 (P2003-293045)	(71) 出願人	598164175 谷原 正夫 奈良県生駒市高山町8916-5 大学宿 舎A-206
(22) 出願日	平成15年8月13日 (2003.8.13)	(74) 代理人	100090686 弁理士 鎌田 充生
		(72) 発明者	谷原 正夫 奈良県生駒市高山町8916-5 大学宿 舎A-206
		(72) 発明者	大概 主税 奈良県生駒市高山町8916-5 大学宿 舎B-404
		(72) 発明者	三上 博 愛知県春日井市藤山台9-9-11
最終頁に続く			

(54) 【発明の名称】 化粧品

(57) 【要約】

【課題】 コラーゲンの優れた特性を有しながらも、病原体の感染や病原性因子の伝達を生じる危険性がなく、安全性の高い化粧料を提供する。

【解決手段】 化粧料は、少なくとも式-Pro-Y-Gly- (式中、YはProまたはHypを表す) で表されるアミノ酸配列を有し、かつコラーゲン様の構造を形成する合成ポリペプチドで構成されている。前記ポリペプチドは、円二色性スペクトルにおいて、波長220~230nmに正のコットン効果を示し、波長195~205nmに負のコットン効果を示していてもよい。前記ポリペプチドは、少なくとも一部が3重らせん構造を形成可能であってもよい。化粧料は、粉末状化粧料、固形又は半固形状化粧料、あるいは液状化粧料であってもよい。

【選択図】 なし

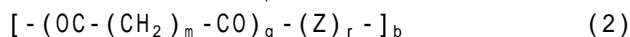
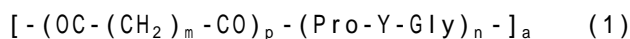
【特許請求の範囲】

【請求項 1】

ポリペプチドを含む化粧品であって、前記ポリペプチドが、少なくとも式Pro-Y-Gly(式中、YはPro又はHypを示す)で表されるアミノ酸配列を有し、かつコラーゲン様の構造を形成する合成ポリペプチドで構成されている化粧品。

【請求項 2】

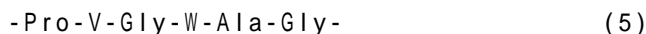
ポリペプチドが、下記式(1)~(3)で表されるペプチドユニットで構成されたポリペプチド(1)、及び下記式(4)で表されるアミノ酸配列を有するペプチドユニットと、下記式(5)で表されるアミノ酸配列を有するペプチドユニットとを含むポリペプチド(II)から選択された少なくとも一種のポリペプチドである請求項 1 記載の化粧品。



(式中、mは1~18の整数、p及びqは同一又は異なって0又は1、YはProまたはHypを表し、nは1~20の整数を表す。Zは1~10個のアミノ酸残基からなるペプチド鎖を表し、rは1~20の整数を表し、Rは直鎖状又は分岐鎖状アルキレン基を表す。aとbとの割合(モル比)はa/b=100/0~30/70であり、p=1及びq=0であるときc=a、p=0及びq=1であるときc=bであり、p=1及びq=1であるときc=a+bであり、p=0及びq=0であるときc=0である。)



(式中、Yは前記に同じ)



(式中、VはGln、Asn、Leu、Ile、ValまたはAla、WはIleまたはLeuを表す。)

【請求項 3】

ポリペプチド(1)において、mが2~12の整数、nが2~15の整数、Zが、Gly、Sar、Ser、Glu、Asp、Lys、His、Ala、Val、Leu、Arg、Pro、Tyr、Ileから選択された1~10個のアミノ酸残基から構成されているペプチド鎖、rが1~10の整数、RがC₂₋₁₂アルキレン基である請求項 2 記載の化粧品。

【請求項 4】

ポリペプチド(II)が、式(4)で表されるアミノ酸配列を有するペプチドユニットと、式(5)で表されるアミノ酸配列を有するペプチドユニットとを、ペプチドユニット(4)/ペプチドユニット(5)=99/1~30/70(モル比)の割合で含む請求項 2 記載の化粧品。

【請求項 5】

ポリペプチドが、円二色性スペクトルにおいて、波長220~230nmに正のコットン効果を示し、波長195~205nmに負のコットン効果を示す請求項 1 記載の化粧品。

【請求項 6】

ポリペプチドの少なくとも一部が3重らせん構造を形成可能である請求項 1 記載の化粧品。

【請求項 7】

ポリペプチドの分子量が $5 \times 10^3 \sim 500 \times 10^4$ の範囲にピークを示す請求項 1 記載の化粧品。

【請求項 8】

ポリペプチドがコラゲナーゼ分解性を有する請求項 1 記載の化粧品。

【請求項 9】

粉末状化粧品、固形又は半固形状化粧品、あるいは液状化粧品である請求項 1 記載の化粧品。

【発明の詳細な説明】

【技術分野】

10

20

30

40

50

【0001】

本発明は、病原体感染の危険性が無く、安全性の高いコラーゲン様ポリペプチドを含む化粧料に関する。

【背景技術】

【0002】

コラーゲンは、あらゆる多細胞動物にみられる繊維状蛋白質であり、皮膚や骨の主成分として哺乳類では全蛋白質の25%を占める。典型的なコラーゲン分子は、3本のコラーゲンポリペプチド鎖が三重らせん構造と呼ばれるロープ状の超らせん構造をとる。上記3重らせん構造を形成したポリペプチド鎖が自己集合して、直径が数nm~数十nmの原線維を形成し、さらにこれらの原線維が配列して直径が数 μ m~数十 μ mの繊維構造を形成することができる。

10

【0003】

また、コラーゲンは、高い保湿効果を有しており、基礎化粧料、メイクアップ用化粧料などを始め、多くの化粧料用途で広く用いられている。一般に、化粧品ではウシやブタ由来のコラーゲンを原料として用いることが多い。中でも、牛由来のコラーゲンは、物理化学的特性に優れ、原料臭が少ないため多用されてきた。

【0004】

しかし、哺乳動物由来コラーゲンに対する危険性が指摘されている。例えば、ウシの海綿状脳症やヒツジの振戦病の原因物質が、プリオンと呼ばれる伝染性蛋白質であり、この伝染性タンパク質がヒトのクロイツフェルドーヤコブ病伝染の原因の一つと言われている。プリオンは、蛋白質であり、通常の滅菌、殺菌方法では失活し難く、しかも種を越えて感染することが指摘されている(Nature Review, Vol.2, pp.118-126, 2001年(非特許文献1))。そのため、通常の滅菌、殺菌方法では除去できないプリオンなどの病原体(又は病原性因子)の感染(又は伝達)の危険性が常に存在している。

20

【0005】

このような病原体の感染の危険性を回避するため、特開平08-041425号公報(特許文献1)には、動物又は人間由来のコラーゲン中のプリオンを除去するために、コラーゲン溶液中の細胞および組織の断片を除去し、アルカリ処理する方法およびこの方法により得られるコラーゲンが記載されている。しかし、このような方法は、安全性の確認を必要とし、煩雑でコスト高となる。

30

【0006】

牛由来コラーゲンなどの代替品として、魚類由来のコラーゲンなどが提案されている。例えば、特開2001-302690号公報(特許文献2)には、牛や豚などの骨、皮、腱、あるいは魚皮由来のコラーゲン成分又はゼラチン成分を、コラゲナーゼ酵素を用いて特異的に分解して得られる特定のアミノ酸配列を有するトリペプチドが、高い皮膚浸透性を有し、化粧品などの外用剤として有用であることが開示されている。

【0007】

しかし、魚類由来のコラーゲンでは、化粧料の組成などによっては異臭を発生する場合がある。特開2003-146835号公報(特許文献3)では、魚由来のコラーゲンと親油化処理粉体とシリコーンとを含有する化粧料において、コラーゲン上にシリコーンの被膜を形成することにより、異臭の発生を防いでいる。しかし、このような方法では、コラーゲンの周囲に被膜が形成されているため、コラーゲンの保湿力を有効利用できない。また、粉体が必須であるため、用途が限られる。

40

【0008】

また、天然のコラーゲン中には種々の細胞接着サイトが含まれているため、用途に応じた細胞選択性が発揮できない。例えば、神経の軸索誘導材料としてコラーゲンをを用いると、軸索の伸長速度より周囲の繊維芽細胞の遊走、増殖速度が大きく癒痕組織化して軸索が伸長することができない。このため、繊維芽細胞の遊走を防ぐ材料でコラーゲンの周囲を覆うことなどの措置が必要となる。

【特許文献1】特開平08-041425号公報(特許請求の範囲)

50

【特許文献2】特開2001-302690号公報(請求項1、段落番号[0009]、[0012])

【特許文献3】特開2003-146835号公報(請求項1、段落番号[0008]及び[0009])

【非特許文献1】Nature Review, Vol.2, pp.118-126, 2001年。

【発明の開示】

【発明が解決しようとする課題】

【0009】

従って、本発明の目的は、コラーゲンの優れた特性を有しながらも、病原体の感染や病原性因子の伝達を生じる危険性がなく、安全性の高い化粧料を提供することにある。

10

【0010】

本発明の他の目的は、保湿性及び安定性が高く、臭気を生じさせることのない化粧料を安価に提供することにある。

【課題を解決するための手段】

【0011】

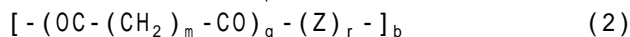
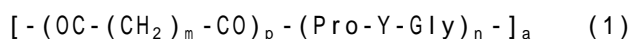
本発明者らは、前記課題を達成するため鋭意検討した結果、特定の合成ポリペプチドがコラーゲン様の特性を有し、高い保湿性及び安定性を有することを見だし、本発明を完成した。

【0012】

すなわち、本発明の化粧料は、ポリペプチドを含む化粧料であって、前記ポリペプチドは少なくとも式Pro-Y-Gly(式中、YはProまたはHypを表す)で表されるアミノ酸配列を有し、かつコラーゲン様の構造を形成する合成ポリペプチドで構成されている。前記ポリペプチドは、下記式(1)~(3)で表されるペプチドユニットで構成されたポリペプチド(I)、および及び下記式(4)で表されるアミノ酸配列を有するペプチドユニットと、下記式(5)で表されるアミノ酸配列を有するペプチドユニットとを含むポリペプチド(II)から選択された少なくとも一種のポリペプチドであってもよい。

20

【0013】



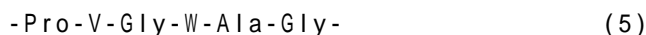
30

(式中、mは1~18の整数、p及びqは同一又は異なって0又は1、YはProまたはHypを表し、nは1~20の整数を表す。Zは1~10個のアミノ酸残基からなるペプチド鎖を表し、rは1~20の整数を表し、Rは直鎖状又は分岐鎖状アルキレン基を表す。aとbとの割合(モル比)はa/b=100/0~30/70であり、p=1及びq=0であるときc=a、p=0及びq=1であるときc=bであり、p=1及びq=1であるときc=a+bであり、p=0及びq=0であるときc=0である)。

【0014】



(式中、Yは前記に同じ)



40

(式中、VはGln、Asn、Leu、Ile、ValまたはAla、WはIleまたはLeuを表す)。

【0015】

前記ポリペプチド(I)において、mは2~12の整数、nは2~15の整数、Zは、Gly、Sar、Ser、Glu、Asp、Lys、His、Ala、Val、Leu、Arg、Pro、Tyr、Ileから選択された1~10個のアミノ酸残基からなるペプチド鎖、rは1~10の整数、RはC₂₋₁₂アルキレン基であってもよい。

【0016】

さらに、ペプチドユニット(4)とペプチドユニット(5)との割合(モル比)は、(4)/(5)=99/1~30/70程度であってもよい。

【0017】

50

前記ポリペプチドは、通常、円二色性スペクトルにおいて、波長220～230nmに正のコットン効果を示し、波長195～205nmに負のコットン効果を示す。このことは、ポリペプチドの少なくとも一部（一部または全部）が、3重らせん構造を形成することを示している。本発明のポリペプチドは、分子量 $5 \times 10^3 \sim 500 \times 10^4$ の範囲にピークを示してもよい。さらに、前記ポリペプチドは、生体内で分解し吸収される生体内分解性ポリペプチドであってもよい。すなわち、ポリペプチドはコラーゲナーゼ分解性を有していてもよい。

【0018】

前記化粧品は、粉末状化粧品、固形又は半固形状化粧品、あるいは液状化粧品であってもよい。

10

【発明の効果】

【0019】

本発明の化粧品は、コラーゲン様特性を有する特定の合成ポリペプチドを含むため、コラーゲンの優れた特性を有するにも拘わらず、病原体の感染や病原性因子の伝達を生じる危険性がなく、安全性が高い。また、保湿性及び安定性が高く、臭気を生じさせることがない。さらにポリペプチドを合成により得ることができるため、化粧品を安価に提供できる。

【発明を実施するための最良の形態】

【0020】

[ポリペプチド]

20

本発明においては各種アミノ酸残基を次の略号で記述する。

【0021】

Ala : L - アラニン残基
 Arg : L - アルギニン残基
 Asn : L - アスパラギン残基
 Asp : L - アスパラギン酸残基
 Cys : L - システイン残基
 Gln : L - グルタミン残基
 Glu : L - グルタミン酸残基
 Gly : グリシン残基
 His : L - ヒスチジン残基
 Hyp : L - ヒドロキシプロリン残基
 Ile : L - イソロイシン残基
 Leu : L - ロイシン残基
 Lys : L - リジン残基
 Met : L - メチオニン残基
 Phe : L - フェニルアラニン残基
 Pro : L - プロリン残基
 Sar : サルコシン残基
 Ser : L - セリン残基
 Thr : L - トレオニン残基
 Trp : L - トリプトファン残基
 Tyr : L - チロシン残基
 Val : L - バリン残基

30

40

また、本明細書においては、常法に従って、N末端のアミノ酸残基を左側に位置させ、C末端のアミノ酸残基を右側に位置させて、ペプチド鎖のアミノ酸配列を記述する。

【0022】

本発明の化粧品は、コラーゲン様の構造を形成する前記特定の合成ポリペプチドで構成されている。このポリペプチドは、少なくとも式Pro-Y-Gly（式中、YはPro又はHypを示す）で表されるアミノ酸配列を有している。前記アミノ酸配列は、3重らせん構造の安定

50

性に寄与するため、前記ポリペプチドは、コラーゲン組織（コラーゲン状の組織）又はコラーゲン様の構造を形成する限り種々のポリペプチドが使用できる。このようなポリペプチドには、前記ポリペプチド(1)と前記ポリペプチド(11)とが含まれる。

【0023】

前記ポリペプチド(1)において、構成するペプチドユニット(1) $[-(OC-(CH_2)_m-CO)_p-(Pro-Y-Gly)_n-]$ は、Pro-Y-Glyの繰返し配列を含むことが必要である。Pro-Y-Glyの繰返し数が、少ないと3重らせん構造の安定性が減少し、繰返し数が多すぎるとペプチドの合成が困難になる。従って、繰返し数nは、1~20、好ましくは2~15（例えば、3~15）、さらに好ましくは5~15程度である。

【0024】

前記式(1)において、Yは、Pro又はHypいずれであってもよいが、3重らせん構造の安定性からHypであるのがより好ましい。なお、Hypは、通常、4Hyp（例えば、trans-4-ヒドロキシ-L-プロリン）残基である。

【0025】

さらに、メチレン鎖(CH₂)の繰返し数を示すmは、ポリペプチドの物理的及び生物学的性質を損なわない範囲であればよいが、通常、1~18、好ましくは2~12、さらに好ましくは2~10（特に2~6）程度である。pは0又は1である。

【0026】

前記ペプチドユニット(2) $[-(OC-(CH_2)_m-CO)_q-(Z)_r-]$ において、Zは1~10個のアミノ酸残基で構成された任意の配列のペプチド鎖を表す。Zは、得られるポリペプチドの物理的及び生物学的性質を損なわない限り、どのような配列でもよい。ポリペプチドが有用な物理的及び生物学的性質を発揮するためには、例えば、ペプチド鎖Zは、通常、Gly、Sar、Ser、Glu、Asp、Lys、His、Ala、Val、Leu、Arg、Pro、Tyr、Ileから選択された1~10個のアミノ酸残基からなるペプチド鎖（すなわち、これらのアミノ酸から選択されたアミノ酸残基、又はこれらのアミノ酸から選択された2~10個のアミノ酸残基からなるペプチド鎖）、特に、Gly、Sar、Ser、Glu、Asp、Lys、Arg、Pro、Valから選択された1~10個のアミノ酸残基からなるペプチド鎖を有している場合が多い。ペプチド鎖Zは、Gly、Sar、Ser、Glu、Asp、Lys、Arg-Gly-Asp、Tyr-Ile-Gly-Ser-Arg、Ile-Lys-Val-Ala-Val、Val-Pro-Gly-Val-Gly、Asp-Gly-Glu-Ala、Gly-Ile-Ala-Gly、His-Ala-Val、Glu-Arg-Leu-Glu、Lys-Asp-Pro-Lys-Arg-Leu、Arg-Ser-Arg-Lysで示される配列を含むのが好ましい。

【0027】

ペプチド鎖Zの繰返し数を示すrは、得られるポリペプチドが物理的及び生物学的性質を発揮する範囲であればよい。繰返し数rが多すぎると合成が困難になり、また得られるポリペプチドの物理的性質が変化しやすい。従って、繰返し数rは、通常、1~20、好ましくは1~10、さらに好ましくは1~5程度である。

【0028】

メチレン鎖(CH₂)の繰返し数を示すmは、前記式(1)と同様に、1~18、好ましくは2~12、さらに好ましくは2~10（特に2~6）程度である。qは0又は1である。

【0029】

前記式(1)及び(2)において、p及びqのうち少なくとも一方が1であるとき、ポリペプチドは、前記式(3)で表されるユニット $[-HN-R-NH-]$ を含んでいる。この前記式(3)で表されるユニットにおいて、Rで表される直鎖状又は分岐鎖状アルキレン基は、ポリペプチドの物理的及び生物学的性質を損なわない範囲であればよく、例えば、メチレン、エチレン、プロピレン、トリメチレン、テトラメチレンなどのC₁₋₁₈アルキレン基が例示できる。前記アルキレン基Rは、直鎖状のメチレン鎖(CH₂)_s（sは1~18の整数を表す）であってもよい。好ましいRは、C₂₋₁₂アルキレン基（さらに好ましくはC₂₋₁₀アルキレン基、特にC₂₋₆アルキレン基）である。

【0030】

前記式(1)で表されるペプチドユニットと前記式(2)で表されるペプチドユニットとの割

10

20

30

40

50

合 (a / b) は、 1 0 0 / 0 ~ 3 0 / 7 0 (モル比) 、 好ましくは 1 0 0 / 0 ~ 4 0 / 6 0 (モル比) 、 さらに好ましくは 1 0 0 / 0 ~ 5 0 / 5 0 (モル比) 程度である。

【 0 0 3 1 】

さらに、前記式(3)で表されるユニットの割合は、前記式(1)の p の値、前記式(2)の q の値に応じて選択でき、 p = 1 及び q = 0 であるとき、 c = a であり、 p = 0 及び q = 1 であるとき、 c = b である。また、 p = 1 及び q = 1 であるとき c = a + b であり、 p = 0 及び q = 0 であるとき c = 0 である。

【 0 0 3 2 】

すなわち、前記ポリペプチド(I)には、(a) 前記式(1)で p = 0 であるペプチドユニット [-(Pro-Y-Gly)_n-] の繰り返し単位で構成されたポリペプチド、(b) 前記式(1)で p = 0 であるペプチドユニット [-(Pro-Y-Gly)_n-] と前記式(2)で q = 0 であるペプチドユニット [-(Z)_r-] とを a : b の割合 (モル%) で含む繰り返し単位で構成されたポリペプチド、(c) 前記式(1)で p = 1 であるペプチドユニット [-(OC-(CH₂)_m-CO)-(Pro-Y-Gly)_n-] と前記式(3)で表されるユニット [-HN-R-NH-] とを 1 : 1 の割合 (モル比) で含む繰り返し単位で構成されたポリペプチド、(d) 前記式(1)で p = 1 であるペプチドユニット [-(OC-(CH₂)_m-CO)-(Pro-Y-Gly)_n-] と前記式(2)で q = 1 であるペプチドユニット [-(OC-(CH₂)_m-CO)-(Z)_r-] と前記式(3)で表されるユニット [-HN-R-NH-] とを a : b : a + b の割合 (モル比) で含む繰り返し単位で構成されたポリペプチドが含まれる。

【 0 0 3 3 】

一方、前記ポリペプチド(II)は、-Pro-Y-Gly-で表されるアミノ酸配列を有するペプチドユニット(4)を含むことが必要である。-Pro-Y-Gly-で表される配列は、3重らせん構造の安定性に寄与するため、この配列の割合が少ないと3重らせん構造の安定性が減少する。

【 0 0 3 4 】

さらに、このユニット(4)は、3重らせん構造の安定性の点から、ポリペプチド中において、-(Pro-Y-Gly)_d-で表される繰返し構造を形成してもよい。この配列の繰返し数 d は、例えば、2 ~ 5 0 0 0 、 好ましくは 2 ~ 4 0 0 0 、 さらに好ましくは 3 ~ 3 0 0 0 程度である。Y は、Pro または Hyp のいずれであってもよいが、前記と同様に、3重らせん構造の安定性から Hyp [通常、4 Hyp (例えば、trans - 4 - ヒドロキシ - L - プロリン) 残基] であるのがより好ましい。

【 0 0 3 5 】

また、本発明におけるポリペプチド(II)は、-Pro-V-Gly-W-Ala-Gly-で表されるアミノ酸配列を有するペプチドユニット(5)を含むのが有用である。この配列を含まない場合や少なすぎる場合には、コラゲナーゼによる分解性が低下する。一方、この配列が多すぎると3重らせん構造の安定性が低下する。

【 0 0 3 6 】

V は Gln、Asn、Leu、Ile、Val または Ala のいずれであってもよいが、Gln、Asn、Leu、Val、Ala、特に Gln、Leu がより好ましい。W は Ile または Leu のいずれでもよいが、Ile がより好ましい。

【 0 0 3 7 】

V と W との組み合わせは、例えば、V が Gln、Asn、Leu、Ile、Val 及び Ala から選択された一種 (例えば、Gln 又は Leu) であり、W が Ile であるペプチドや、V が Gln、Asn、Leu、Ile、Val 及び Ala から選択された一種 (例えば、Gln 又は Leu) であり、W が Leu であるペプチドなどが挙げられる。

【 0 0 3 8 】

Y と V と W との組み合わせは、Y が Hyp、V が Gln、Asn、Leu、Ile、Val 及び Ala から選択された一種 (例えば、Gln 又は Leu) 、 W が Ile 又は Leu であるペプチドや、Y が Pro、V が Gln、Asn、Leu、Ile、Val 及び Ala から選択された一種 (例えば、Gln 又は Leu) 、 W が Ile 又は Leu であるペプチドなどが挙げられる。

【 0 0 3 9 】

10

20

30

40

50

さらに、得られるポリペプチドの物理的及び生物学的性質を損なわない限り、このポリペプチド(II)は他のアミノ酸残基やペプチド鎖(ユニット)を含んでいてもよい。他のアミノ酸残基又はペプチド鎖としては、前記ペプチドユニット(2)の $-(Z)_r$ -で表されるペプチド鎖などが挙げられる。すなわち、このポリペプチドが有用な物理的及び生物学的性質を発揮するためには、例えば、Gly、Sar、Ser、Glu、Asp、Lys、His、Ala、Val、Leu、Arg、Pro、Tyr、Ileから選択された1~10個のアミノ酸残基から構成されているペプチド鎖(すなわち、これらのアミノ酸から選択されたアミノ酸残基、又はこれらのアミノ酸から選択された2~10個のアミノ酸残基から構成されているペプチド鎖)、特に、Gly、Sar、Ser、Glu、Asp、Lys、Arg、Pro、Valから選択された1~10個のアミノ酸残基から構成されているペプチド鎖を有している場合が多い。具体的には、例えば、Gly、Sar、Ser、Glu、Asp、Lys、Arg-Gly-Asp、Tyr-Ile-Gly-Ser-Arg、Ile-Lys-Val-Ala-Val、Val-Pro-Gly-Val-Gly、Asp-Gly-Glu-Ala、Gly-Ile-Ala-Gly、His-Ala-Val、Glu-Arg-Leu-Glu、Lys-Asp-Pro-Lys-Arg-Leu、Arg-Ser-Arg-Lysで示されるアミノ酸残基やペプチド鎖を含むのが好ましい。

【0040】

前記ポリペプチド(II)において、前記ペプチドユニット(4)と前記ペプチドユニット(5)との割合(モル比)は、 $(4)/(5) = 99/1 \sim 30/70$ 、好ましくは $98/2 \sim 40/60$ 、さらに好ましくは $95/5 \sim 50/50$ 程度である。

【0041】

前記ペプチドユニット(4)及び前記ペプチドユニット(5)の合計量と、他のペプチドユニットとの割合(モル比)は、前者/後者 = $100/0 \sim 50/50$ 、好ましくは $100/0 \sim 60/40$ 、さらに好ましくは $100/0 \sim 70/30$ 程度である。

【0042】

このようなポリペプチド(I)及び(II)は、環化により6員環を形成することなく、鎖状のポリペプチドを形成しており、溶媒(水、ジメチルスルホキシドなどのスルホキシド類、ジメチルホルムアミド、ジメチルアセトアミド、N-メチルピロリドンなどの親水性溶媒又はそれらの混合溶媒)に可溶である。前記ポリペプチドは、水系ゲルパーミエーションクロマトグラフィ(GPC)において、球状蛋白質換算で、例えば、分子量 $5 \times 10^3 \sim 500 \times 10^4$ 、好ましくは分子量 $1 \times 10^4 \sim 300 \times 10^4$ 、好ましくは $3 \times 10^4 \sim 200 \times 10^4$ 、さらに好ましくは $5 \times 10^4 \sim 100 \times 10^4$ 程度の範囲にピークを示す。

【0043】

さらに、これらのポリペプチドは、円二色性スペクトルにおいて、波長 $220 \sim 230$ nmに正のコットン効果を示し、波長 $195 \sim 205$ nmに負のコットン効果を示す。そのため、ポリペプチドの少なくとも一部(すなわち、一部または全部)が3重らせん構造を形成可能であり、コラーゲン様ポリペプチドを形成する。なお、コットン効果とは、旋光性物質において特定の波長で左右の円偏光に対する吸収係数が異なるために起こる現象をいう。

【0044】

これらのポリペプチドは、コラーゲン組織(コラーゲン状の組織)を形成可能である。上記3重らせん構造を形成したポリペプチド鎖が自己集合して、数nm~数十nmの原線維を形成し、さらにこれらの原線維が配列して数nm~数十nmの繊維構造を形成することができる。これらは、透過型電子顕微鏡、走査型電子顕微鏡、あるいは原子間力顕微鏡により観察することができる。

【0045】

前記ポリペプチド(I)(II)は、生分解性、特に生体内分解性を有していてもよい。このような生分解性ポリペプチドはコラゲナーゼ分解性を有している。特に、前記ポリペプチド(II)は高い生分解性を示す。

【0046】

これらのポリペプチドは、生理学的又は薬理的に許容される塩であってもよく、例え

ば、無機酸（塩酸、硫酸、リン酸など）、有機酸（酢酸、トリフルオロ酢酸、乳酸、酒石酸、マレイン酸、フマル酸、シュウ酸、リンゴ酸、クエン酸、オレイン酸、パルミチン酸など）、金属（ナトリウム、カリウムなどのアルカリ金属、カルシウムなどのアルカリ土類金属、アルミニウムなど）、有機塩基（トリメチルアミン、トリエチルアミン、*t*-ブチルアミン、ベンジルアミン、ジエタノールアミン、ジシクロヘキシルアミン、アルギニンなど）との塩であってもよい。これらの塩形成化合物は、単独で又は二種以上組み合わせ使用できる。これらの塩は、通常の塩形成反応によって得ることができる。

【0047】

これらのポリペプチド(I)(II)は、アミノ酸やペプチドセグメントを縮合反応に供する慣用の方法により得ることができ、最終的に前記ユニットがポリペプチド中に含まれている限り特に制限されず、例えば、アミノ酸を縮合反応する方法や、ペプチドセグメントとアミノ酸を縮合する方法により得てもよいが、予め、前記アミノ酸配列を有するペプチド又はその誘導体などのペプチド成分を調製し、このペプチド成分を縮合する方法により得るのが好ましい。

10

【0048】

予め調製したペプチド成分を縮合する方法において、ペプチド成分のペプチド鎖の合成は、通常のペプチド合成方法に従って行うことができる。ペプチドは、例えば、固相合成法または液相合成法によって調製できるが、固相合成法が操作上簡便である〔例えば、日本生化学会編「続生化学実験講座2 タンパク質の化学(下)」(昭和62年5月20日株式会社東京化学同人発行)、第641-694頁参照〕。ペプチド合成には、慣用の方法、例えば、縮合剤を用いるカップリング方法、活性エステル法(*p*-ニトロフェニルエステル(ONp)、ペンタフルオロフェニルエステル(Opfp)などのフェニルエステル、*N*-ヒドロキシスクシンイミドエステル(ONSu)などの*N*-ヒドロキシジカルボン酸イミドエステル、1-ヒドロキシベンゾトリアゾールエステル(Obt)など)、混合酸無水物法、アジド法などが利用できる。好ましい方法では、少なくとも縮合剤(好ましくは後述する縮合剤、特に後述する縮合剤と縮合助剤との組合せ)を用いる場合が多い。

20

【0049】

さらに、ペプチドの合成では、アミノ酸又はペプチドフラグメントの種類に応じて、アミノ基、カルボキシル基、他の官能基(グアニジノ基、イミダゾリル基、メルカプト基、ヒドロキシル基、 β -カルボキシル基など)の保護基による保護と、接触還元や強酸処理(無水フッ化水素、トリフルオロメタンスルホン酸、トリフルオロ酢酸など)による保護基の脱離・除去とが繰り返し行われる。例えば、アミノ基の保護基には、ベンジルオキシカルボニル基(Z)、*p*-メトキシベンジルオキシカルボニル基(Z(OMe))、9-フルオレニルメトキシカルボニル基(Fmoc)、*t*-ブトキシカルボニル基(Boc)、3-ニトロ-2-ピリジンスルフェニル基(Npys)などが利用でき、カルボキシル基の保護基には、ベンジルオキシ基(Obzl)、フェナシルオキシ基(OPac)、*t*-ブトキシ基(Obu)、メトキシ基(OMe)、エトキシ基(OEt)などが利用できる。なお、ペプチド合成には自動合成装置を利用してもよい。

30

【0050】

より具体的には、前記ペプチド鎖の固相合成法による調製は、慣用の方法で行うことができる。固相樹脂(又は担体)としては、反応溶媒に不溶性の重合体、例えば、スチレン-ジビニルベンゼン共重合体、例えば、クロロメチル化樹脂、ヒドロキシメチル樹脂、ヒドロキシメチルフェニルアセトアミドメチル樹脂、4-メチルベンズヒドリルアミン樹脂などが利用できる。

40

【0051】

固相合成法では、通常、(i)前記重合体(樹脂)に対して、目的とするペプチドのC末端からN末端の方向に向かって、遊離の-COOH基を有するとともに官能基(少なくともN末端の-アミノ基など)が保護基で保護されたアミノ酸又はペプチド断片を結合させる操作と、(ii)結合したアミノ酸又はペプチド断片のうちペプチド結合を形成する-アミノ基の保護基を除去する操作と、(iii)上記結合操作と除去操作とを順次繰り返すこと

50

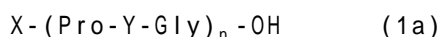
により、ペプチド鎖を伸長させて目的ペプチドに対応するペプチド鎖を形成する工程と、(iv)ペプチド鎖を重合体(樹脂)から脱離させ、かつ保護されている官能基から保護基を除去することにより、目的とするペプチドを生成させ、生成したペプチドを精製することにより、ペプチドを製造できる。前記アミノ酸又はペプチド断片を結合させる操作(i)では、前記ペプチド鎖のC末端に対応し、かつ遊離の-COOH基を有するとともに少なくともN末端が保護基で保護されたアミノ酸(例えば、Fmoc-アミノ酸、Boc-アミノ酸など)が使用される。なお、ペプチド鎖の重合体からの脱離及び保護基の除去は、トリフルオロ酢酸を用いて同時に行うのが副反応を抑制する観点から好ましい。また、生成したペプチドの精製は、逆相液体クロマトグラフィーやゲルパーミエーションクロマトグラフィーなどの分離精製手段を利用して行うことができる。

10

【0052】

ポリペプチド(1)は、例えば、少なくとも下記式(1a)で表されるペプチド又はその誘導体(A)を縮合し、ポリペプチドを調製する。

【0053】



(式中、XはH又は $\text{HOOC}-(\text{CH}_2)_m-\text{CO}-$ (mは前記に同じ)を表し、Y及びnは前記に同じ)。

【0054】

前記式(1a)で表されるペプチド又はその誘導体(A)は、下記式(2a)で示されるペプチド又はその誘導体(B)と共縮合させて、ポリペプチドを調製してもよい。

20

【0055】



(式中、XはH又は $\text{HOOC}-(\text{CH}_2)_m-\text{CO}-$ (mは前記に同じ)を表し、Z及びrは前記に同じ)。

【0056】

なお、前記 $X = \text{HOOC}-(\text{CH}_2)_m-\text{CO}-$ に対応する化合物としては、例えば、マロン酸、コハク酸、グルタル酸、アジピン酸、ピメリン酸、スベリン酸、アゼライン酸、セバシン酸などの C_{3-20} の脂肪族ジカルボン酸又はそれらの酸無水物などが例示できる。これらの化合物は、単独で又は二種以上組み合わせて使用できる。これらの化合物も慣用のアミド結合生成法(例えば、後述する第三級アミンなどを触媒とする反応など)反応や前記ペプチド合成法に従って反応させることにより、前記(1a)及び(2a)で示される化合物を得ることができる。

30

【0057】

ペプチド又はその誘導体(A)とペプチド又はその誘導体(B)との使用割合は、例えば、前者(A)/後者(B)=100/0~30/70(モル%)、好ましくは100/0~40/60(モル%)、さらに好ましくは100/0~50/50(モル%)程度である。

【0058】

さらに、前記式(1a)及び/又は式(2a)においてXがHである場合には必要ではないが、Xが $\text{HOOC}-(\text{CH}_2)_m-\text{CO}-$ (mは前記に同じ)であるとき、前記ペプチド又はその誘導体(A)及び/又はペプチド又はその誘導体(B)は、アミド基を形成するため、下記式(3a)で表される化合物(C)との共縮合反応に供される。

40

【0059】



(式中、Rは前記に同じ)。

【0060】

前記式(3a)で表される化合物としては、前記式(3)に対応するジアミン類、例えば、エチレンジアミン、トリメチレンジアミン、プロピレンジアミン、テトラメチレンジアミン、ヘキサメチレンジアミンなどの C_{1-18} アルキレンジアミン、ジエチレントリアミン、ヘキサメチレンテトラミンなどのポリアルキレンポリアミン類などが例示できる。これらの化合物は、単独で又は二種以上組み合わせて使用できる。

50

【0061】

前記ジアミン化合物(C)の使用量は、例えば、前記ペプチド又はその誘導体(A)(B)のうち一方のペプチド又はその誘導体が $X = \text{HOOC}-(\text{CH}_2)_m-\text{CO}-$ (m は前記に同じ)を有する場合、このような基を有するペプチド又はその誘導体1モルに対して、前記ジアミン化合物(C)の使用量は、実質的に1モル(例えば、0.95~1.05モル程度)用いる必要がある。

【0062】

ポリペプチド(II)の調製において、前記アミノ酸配列を有するペプチドを少なくとも含むペプチド成分を反応させる方法には、(a)式(4)及び(5)で表される双方のアミノ酸配列を有するペプチド(すなわち、式(4)で表されるアミノ酸配列を有するペプチドユニットと、式(5)で表されるアミノ酸配列を有するペプチドユニットとの双方のユニットを有するペプチド)を少なくとも含むペプチド成分を縮合する方法と、(b)式(4)で表されるアミノ酸配列を有するペプチドと、式(5)で表されるアミノ酸配列を有するペプチドとを少なくとも含むペプチド成分を縮合する方法とが含まれる。

10

【0063】

前者の方法(a)において、式(1)及び(2)で表される双方のアミノ酸配列を有するペプチドは、単独で又は二種以上組み合わせて使用できる。また、この方法において、ペプチド成分としては、前記ペプチドに加え、目的のポリペプチドに応じて他のペプチドを用いてもよい。他のペプチドとしては、例えば、式(1)で表されるアミノ酸配列を有するペプチド、式(2)で表されるアミノ酸配列を有するペプチドの他、前述の他のアミノ酸残基やペプチド鎖を含むペプチドなどが挙げられる。これらの他のペプチドも、単独で又は二種以上組み合わせて使用できる。なお、この方法において、式(1)又は(2)で表されるアミノ酸配列を有するペプチドを共縮合することにより、容易にユニット(1)又は(2)の割合を調整することができる。

20

【0064】

後者の方法(b)においても、式(1)で表されるアミノ酸配列を有するペプチド、式(2)で表されるアミノ酸配列を有するペプチドは、それぞれ、単独で又は二種以上組み合わせて使用できる。また、この方法においても、ペプチド成分として、これらのペプチド(1)及び(2)に加え、目的のポリペプチドに応じて他のペプチド、例えば、前述の他のアミノ酸残基やペプチド鎖を含むペプチドなどを用いてもよい。これらの他のペプチドも、単独で又は二種以上組み合わせて使用できる。

30

【0065】

これらのペプチド成分の縮合反応は、通常、溶媒中で行われる。溶媒は、上記ペプチド成分を溶解又は懸濁(一部または全部を溶解)可能であればよく、通常、水及び/又は有機溶剤が使用できる。溶媒としては、例えば、水、アミド類(ジメチルホルムアミド、ジメチルアセトアミド、ヘキサメチルホスホロアミドなど)、スルホキシド類(ジメチルスルホキシドなど)、窒素含有環状化合物(N-メチルピロリドン、ピリジンなど)、ニトリル類(アセトニトリルなど)、エーテル類(ジオキサン、テトラヒドロフランなど)、アルコール類(メチルアルコール、エチルアルコール、プロピルアルコールなど)、及びこれらの混合溶媒が例示できる。これらの溶媒のうち、水、ジメチルホルムアミド、ジメチルスルホキシドが繁用される。

40

【0066】

これらのペプチド成分の反応は、通常、少なくとも脱水剤(脱水縮合剤)又は縮合剤の存在下で行うことができ、脱水縮合剤と縮合助剤との存在下で反応させると、二量化や環化を抑制しつつ、円滑にポリペプチドを生成できる。

【0067】

脱水縮合剤は、前記溶媒中で脱水縮合を効率よく行える限り特に制限されず、例えば、カルボジイミド系縮合剤[ジイソプロピルカルボジイミド(DIPC)、1-エチル-3-(3-ジメチルアミノプロピル)-カルボジイミド(EDC=WSCI)、1-エチル-3-(3-ジメチルアミノプロピル)-カルボジイミド塩酸塩(WSCI·HCl)、ジシクロヘキシルカルボジ

50

イミド(DCC)など]、フルオロホスフェート系縮合剤[O-(7-アザベンゾトリアゾール-1-イル)-1,1,3,3-テトラメチルウロニウムヘキサフルオロホスフェート、O-ベンゾトリアゾール-1-イル-N,N,N,N-テトラメチルウロニウムヘキサフルオロホスフェート、ベンゾトリアゾール-1-イル-オキシ-トリス-ピロリジノホスホニウムヘキサフルオロホスフェート、ベンゾトリアゾール-1-イル-トリス(ジメチルアミノ)ホスホニウムヘキサフルオリン化物塩(BOP)など]、ジフェニルホスホリルアジド(DPPA)などが例示できる。これらの脱水縮合剤は単独で又は二種以上組み合わせて混合物として使用できる。好ましい脱水縮合剤は、カルボジイミド系縮合剤[例えば、1-エチル-3-(3-ジメチルアミノプロピル)-カルボジイミド、1-エチル-3-(3-ジメチルアミノプロピル)-カルボジイミド塩酸塩]である。

10

【0068】

縮合助剤は、上記縮合剤の反応を促進する限り特に制限されず、例えば、N-ヒドロキシ多価カルボン酸イミド類[例えば、N-ヒドロキシコハク酸イミド(HONSu)、N-ヒドロキシ-5-ノルボルネン-2,3-ジカルボン酸イミド(HONB)などのN-ヒドロキシジカルボン酸イミド類]、N-ヒドロキシトリアゾール類[例えば、1-ヒドロキシベンゾトリアゾール(HOBt)などのN-ヒドロキシベンゾトリアゾール類]、3-ヒドロキシ-4-オキソ-3,4-ジヒドロ-1,2,3-ベンゾトリアジン(HOObt)などのトリアジン類、2-ヒドロキシイミノ-2-シアノ酢酸エチルエステルなどが例示できる。これらの縮合助剤も単独で又は二種以上組み合わせて使用できる。好ましい縮合助剤は、N-ヒドロキシジカルボン酸イミド類[HONSuなど]、N-ヒドロキシベンゾトリアゾール又は

20

【0069】

前記脱水縮合剤と縮合助剤とは適当に組み合わせて使用できる。前記脱水縮合剤と縮合助剤との組合せとしては、例えば、DCC-HONSu(HOBt又はHOObt)、WSCl-HONSu(HOBt又はHOObt)などが例示できる。

【0070】

脱水縮合剤の使用量は、前記ペプチド成分(前記ジアミン化合物も含む)の総量1モルに対して、通常、水を含まない非水系溶媒を用いる場合0.7~5モル、好ましくは0.8~2.5モル、さらに好ましくは0.9~2.3モル(例えば1~2モル)程度である。水を含む溶媒(水系溶媒)においては、水による脱水縮合剤の失活があるので、脱水縮合剤の使用量は、前記ペプチド成分の総量1モルに対して、通常、2~500モル(例えば、2~50モル)、好ましくは5~250モル(例えば、5~25モル)、さらに好ましくは10~125モル(例えば、10~20モル)程度である。縮合助剤の使用量は、溶媒の種類に関係なく、前記ペプチド成分の総量1モルに対して、例えば、0.5~5モル、好ましくは0.7~2モル、さらに好ましくは0.8~1.5モル程度である。

30

【0071】

前記縮合反応において、反応系のpHを調節してもよく、反応に関与しない塩基を添加してもよい。pHの調節は、通常、無機塩基[水酸化ナトリウム、水酸化カリウム、炭酸ナトリウム、炭酸水素ナトリウムなど]、有機塩基、無機酸[塩酸など]や有機酸を用いて行うことができ、通常、反応溶液が中性付近(pH=6~8程度)にpH調整される。前記反応に関与しない塩基としては、第三級アミン類、例えば、トリメチルアミン、トリエチルアミン、ジイソプロピルエチルアミンなどのトリアルキルアミン類、N-メチルモルホリン、ピリジンなどの複素環式第三級アミン類などが例示できる。このような塩基の使用量は、通常、ペプチドの総モル数の1~2倍程度の範囲から選択できる。

40

【0072】

前記ポリペプチドが3重らせん構造を形成することは、通常、ポリペプチドの溶液について、円二色性スペクトルを測定することにより立証できる。特に、円二色性スペクトルにおいては、3重らせん構造を形成する天然のコラーゲン及びペプチド鎖が、波長220nm~230nmに正のコットン効果、及び波長195nm~205nmに負のコットン効果を実徴的に示すことが報告されている(J. M. Biol., Vol.63 pp.85-99, 1972年)。

50

【0073】

このようなポリペプチドは、哺乳動物由来のコラーゲンと異なり、病原体や病原性因子〔例えば、病原性に転化したタンパク質（例えば、異常型プリオンなど）など〕の感染や伝達の危険性がない。そのため、前記ポリペプチドは、安全性が高い。しかも、高い保湿性及び安定性を有しており、化粧料の成分として有用である。

【0074】

[化粧料]

本発明の化粧料は、少なくとも前記ポリペプチドを含んでいればよく、粉末状基剤を含む粉末状化粧料、固形又は半固形状基剤（水性基剤、ゲル基剤、又は油性基剤）を含む固形又は半固形状化粧料、液状基剤（水性又は油性基剤）を含む液状化粧料のいずれであってもよい。また、化粧料は、通常、基剤（又は担体）と有効成分（保湿剤など）と添加剤とを含んでおり、前記ポリペプチドは、これらの成分のうち少なくとも1つの成分として含有されていればよい。

10

【0075】

ポリペプチドの含有量は、化粧料の種類や剤形などに応じて広い範囲、例えば、0.001～99重量%程度の範囲から選択できる。ポリペプチドを基剤として用いる場合、ポリペプチドの割合は、化粧料全体に対して、例えば10～99重量%、好ましくは20～99重量%、さらに好ましくは30～95重量%程度であってもよい。有効成分として用いる場合、前記割合は、例えば0.001～95重量%、好ましくは0.01～90重量%、さらに好ましくは0.1～90重量%程度であってもよい。また、添加剤として用いる場合、前記割合は0.001～40重量%、好ましくは0.01～30重量%、さらに好ましくは0.1～20重量%程度であってもよい。

20

【0076】

ポリペプチドは、他の基剤と組み合わせてもよい。基剤のうち粉末状基剤としては、糖類（グルコース、ラクトース、デンプンなどの単糖類又は多糖類；ソルビトールなどの糖アルコールなど）、アミノ酸類（セリン、グリシン、スレオニン、アラニンなど）、金属石鹸類（脂肪酸金属塩、例えば、ステアリン酸カリウム、やし油脂肪酸ナトリウム、ミリスチン酸マグネシウム、ステアリン酸カルシウムなど）、樹脂類〔ポリエチレンなどのオレフィン系樹脂、スチレン系樹脂、アクリル系樹脂、ビニルアルコール系重合体、カルボン酸ビニルエステル系樹脂、ポリアミド系樹脂、ポリエステル系樹脂などの熱可塑性樹脂；フェノール樹脂、アミン樹脂（尿素樹脂、メラミン樹脂など）、熱硬化性アクリル樹脂、不飽和ポリエステル樹脂、アルキド樹脂、エポキシ樹脂、シリコーン樹脂（メチルポリシロキサンなど）などの熱硬化性樹脂など〕、無機粉末成分〔セリサイト、体質顔料（カオリン、タルク、雲母などの天然粘度鉱物；合成フッ素金雲母、六方晶窒化ホウ素など）など〕などが挙げられる。

30

【0077】

固形又は半固形状基剤としては、動植物由来の固形又は半固形状油性基剤（蜜ろう、木ろう、カルナバろう、キャンデリラろう、カカオ脂、牛脂；ラノリンなど）、鉱物由来の固形又は半固形状油性基剤（固形パラフィン、セレシン、ミクロクリスタリンワックス；ワセリンなど）の他、脂肪酸エステル（2-エチルヘキサン酸セチルなどの飽和又は不飽和脂肪酸アルキルエステル；リンゴ酸イソステアリルなどの飽和又は不飽和オキシ酸アルキルエステル；グリセリルモノステアレート、エチレングリコールジステアリン酸エステルなどの飽和脂肪酸と多価アルコールとのエステルなど）、高級アルコール（セチルアルコール、ステアリルアルコール、オレイルアルコールなどの飽和脂肪族アルコールなど）、高級脂肪酸（ステアリン酸、オレイン酸など）、ゲル基剤（粘液質など）などが挙げられる。前記ゲル基剤の粘液質としては、動植物系粘液質（クインシードガム、トラガントガム、キサンタンガムなどのガム類；ベクチン、デンプンなどの糖類；アイリッシュモス；アルギン酸ナトリウム、プロピレングリコールアルギネートなどのアルギン酸類；ヒアルロン酸、コンドロイチン硫酸ナトリウム、コンドロイチンヘパリンなどの多糖類；カゼイン、ビトロネクチン、フィブロネクチン、ケラチン、エラスチン、ローヤルゼリーなどのタン

40

50

パク質類など)、セルロース又はその誘導体(セルロース;メチルセルロース、エチルセルロース、カルボキシメチルセルロース、ヒドロキシエチルセルロースなど)、合成ポリマー(ポリアクリル酸ナトリウム、ポリビニルアルコール、ポリビニルメチルエーテル、ポリビニルピロリドン、カルボキシビニルポリマー、高分子量のポリオキシアルキレングリコール(ポリエチレングリコールなど)など)、無機系粘液質(ビーガム、ベントナイト、有機変性ベントナイト、膨潤性ベントナイトなど)などが挙げられる。

【0078】

液状基剤としては、油性基剤(ホホバ油、オリーブ油、やし油、つばき油、マカデミアンナツツ油、ひまし油、スクアランなど)、鉱物系油性基剤(流動パラフィン、ポリブテン、シリコン油など)、合成系油性基剤(合成エステル油、合成ポリエーテル油など)などの油性基剤;水性基剤、例えば、水、水溶性有機溶媒[低級脂肪族アルコール(エタノール、イソプロパノールなど);アルキレングリコール類(エチレングリコール、ジエチレングリコール、プロピレングリコール、ジプロピレングリコール、1,3-ブチレングリコール、ポリエチレングリコール、ジエチレングリコールモノエチルエステルなどの低分子量のポリオキシアルキレングリコール又はそのモノアルキルエステルなど);グリセリン、ペンタエリスリトールなどの多価アルコール類;乳酸、ピロリドンカルボン酸ナトリウムなどのカルボン酸類]などが挙げられる。基剤は、単独で又は二種以上組み合わせて使用できる。

【0079】

基剤の割合は、化粧品全体に対して、10~99.999重量%、好ましくは10~99重量%、さらに好ましくは20~95重量%程度であってもよい。また、ポリペプチドの割合は、基剤100重量部に対して、0.001~500重量部、好ましくは0.01~300重量部、さらに好ましくは0.1~100重量部(例えば、1~50重量部)程度であってもよい。

【0080】

ポリペプチドは、他の有効成分と組み合わせてもよい。有効成分としては、収れん剤(クエン酸、乳酸、酒石酸などのオキシ酸又はこれらの塩など;塩化アルミニウムなどのアルミニウム化合物;硫酸亜鉛、スルホフェノキシ亜鉛などの亜鉛化合物;プロアントシアニジン類;ハマメリス、白樺などのタンニン含有植物抽出物;ガイヨウエキス、ダイオウエキス、スギナエキスなど)、エモリエント剤(トリグリセリド油、スクワラン、エステル油などの油性成分を、モノグリセリドなどの非イオン乳化剤などにより乳化した乳化物など)、保湿剤、皮膚軟化剤(サリチル酸又はその誘導体、乳酸、尿素など)、抗酸化剤(トコフェロール又はその誘導体;アントシアニンなどのポリフェノール類など)、紫外線吸収剤や紫外線を散乱する無機顔料、美白剤(アスコルビン酸又はその誘導体、システイン、プラセンタエキス、アルブチン、コウジ酸、ルシノール、エラグ酸、カミツレ抽出物など)、制汗剤(アルミニウム化合物、亜鉛化合物、タンニンなどの収れん剤など)、肌荒れ防止剤(グリチルリチン酸塩、ビタミン類など)、抗炎症剤(アラントイン、グアイアズレン、グリチルリチン酸又はその塩、グリチルレチン酸又はその塩、-アミノカプロン酸、トラネキサム酸、イブプロフェン、インドメタシン、酸化亜鉛、或いはこれらの誘導体;アルニカ抽出物などの植物抽出物など)、殺菌剤又は抗菌剤(塩化ベンザルコニウム、塩化ジステアリルメチルアンモニウムなどの第四級アンモニウム塩;安息香酸、安息香酸ナトリウム、パラオキシ安息香酸エステルなどの安息香酸類;サリチル酸、サリチル酸ナトリウムなどのサリチル酸類;トリクロロカルバニリド、トリクロサンなど)、酵素(プロテアーゼ、リパーゼなど)、ビタミン類(ビタミンA、ビタミンB、ビタミンC、ビタミンD、ビタミンE、ビタミンKなど)、アミノ酸(トリプトファン、システインなど)、細胞賦活剤(リボフラビン、ピリドキシン、ニコチン酸、パントテン酸、-トコフェロール、又はこれらの誘導体;ユキノシタエキスなどの植物抽出物など)などが挙げられる。

【0081】

前記保湿剤としては、アルキレングリコール類(エチレングリコール、ジエチレングリ

10

20

30

40

50

コール、プロピレングリコール、ジプロピレングリコール、1,3-ブチレングリコール、ポリエチレングリコール、ジエチレングリコールモノエチルエステルなどのポリアルキレングリコール又はそのモノアルキルエステルなど)、グリセリン、ペンタエリスリトールなどの多価アルコール類; 乳酸、ピロリドンカルボン酸ナトリウム; アミノ酸類(セリン、グリシン、スレオニン、アラニンなど); 糖類(ソルビトールなどの糖アルコール; ヒアルロン酸、コンドロイチン硫酸ナトリウム、コンドロイチンヘパリンなどの多糖類など); タンパク質(ビトロネクチン、フィブロネクチン、ケラチン、エラスチン、ローヤルゼリーなど)などが挙げられる。

【0082】

前記紫外線吸収剤としては、オキシベンゾン、オキシベンゾンスルホン酸、ヒドロキシメトキシベンゾフェノンスルホン酸ナトリウムなどのベンゾフェノン系吸収剤; メトキシケイ皮酸オクチル、ジイソプロピルケイ皮酸メチル、ジイソプロピルケイ皮酸エチル、p-メトキシケイ皮酸イソプロピル、ジ-p-メトキシケイ皮酸モノ-2-エチルヘキサン酸グリセリルなどのケイ皮酸系吸収剤; p-アミノ安息香酸、p-アミノ安息香酸エチル、p-アミノ安息香酸オクチル、p-ジメチルアミノ安息香酸オクチルなどのp-アミノ安息香酸系吸収剤; サリチル酸オクチルなどのサリチル酸系吸収剤; 4-t-ブチル-4'-メトキシベンゾイルメタンなどのジベンゾイルメタン系吸収剤; ウロカニン酸又はそのエステル; -イソプロピルフラノン; -カロチンなどが挙げられる。前記紫外線を散乱する無機顔料としては、酸化チタン(二酸化チタン)、酸化ジルコニウム、酸化亜鉛、酸化鉄などが挙げられる。また、有効成分には、用途に応じて、毛髪用化粧料の有効成分(コンディショニング剤、ふけ抑制剤など)、しみそばかす用化粧料の有効成分(チロシナーゼ活性阻害剤、メラニン還元剤など)、ニキビ用化粧料の有効成分(硫黄などの角質軟化剤、消炎剤、副腎皮質ホルモン、皮脂分泌抑制剤など)なども含まれる。前記有効成分は単独で又は二種以上組み合わせて使用できる。

【0083】

有効成分の割合は、化粧料全体に対して、0.001~90重量%、好ましくは0.01~80重量%、さらに好ましくは0.1~60重量%程度であってもよい。なお、ポリペプチドを保湿剤として用いる場合、他の保湿剤(前記例示の保湿剤)に対する割合(重量比)は、ポリペプチド/他の保湿剤=0.1/99.9~100/0、好ましくは1/99~90/10、さらに好ましくは5/95~80/20程度であってもよい。

【0084】

ポリペプチドは、他の添加剤と併用してもよい。添加剤としては、界面活性剤、無機塩類(硫酸ナトリウム、炭酸水素ナトリウム、塩化カリウムなど)、着色剤、繊維(ナイロン繊維などの合成繊維、天然繊維など)、研磨剤(リン酸水素カルシウム、炭酸カルシウム、無水ケイ酸など)、発泡剤(ラウリル硫酸ナトリウムなど)、湿潤剤(ソルビット、グリセリンなど)、粘結剤(前記例示の粘液質、例えば、カルボキシメチルセルロース、カルボキシメチルセルロースナトリウム、カラギーナンなど)、不透明化剤、香料(合成香料、精油、精油成分など)、甘味剤(サッカリンナトリウムなど)、植物抽出物などが挙げられる。

【0085】

前記界面活性剤としては、陰イオン性界面活性剤(アルキル硫酸塩; アルキルエーテル硫酸ナトリウム、アルキルエーテル硫酸トリエタノールアミンなどのアルキルエーテル硫酸塩; アシルメチルタウリン塩; アシルグルタミン酸ナトリウムなどのアシルグルタミン酸塩; アミドエーテル硫酸塩; ソルビタンセスキオレイン酸エステルなどのソルビタン脂肪酸エステル類; グリセリルモノステアレートなどのグリセリン脂肪酸エステル類; ポリオキシエチレングリセリルモノステアレートなどのポリオキシエチレングリセリン脂肪酸エステルなど)、両性界面活性剤(アルキル酢酸ベタイン、アミド酢酸ベタイン、イミダゾリニウムベタイン(アミンオキシド型半極性界面活性剤)など)、非イオン性界面活性剤(ラウリン酸ジエタノールアミド、ヤシ脂肪酸ジエタノールアミドなどの脂肪酸アルカノールアミド; ポリオキシエチレンオレイルエーテル、ポリオキシエチレンオクチルドデ

シルエーテルなどのポリオキシエチレンアルキルエーテル；ポリオキシエチレン - ポリオキシプロピレンブロック共重合体；ポリオキシエチレン硬化ひまし油エステルなど）、陽イオン界面活性剤（塩化アルキルトリメチルアンモニウム塩、塩化ジアルキルジメチルアンモニウム塩など）などが挙げられる。

【0086】

前記着色剤（染顔料）としては、合成又は天然顔料（染料、色素）、例えば、タール色素、酸化鉄系無機顔料、黒酸化鉄レーキ、二酸化チタンなどの白色顔料；パール顔料（雲母チタン系、オキシ塩化ビスマス、魚鱗箔など）；赤色223号、橙色201号などの染料；天然色素（コチニール、カルサミンなど）などが挙げられる。

【0087】

さらに添加剤には、pH調整剤（炭酸水素ナトリウムなどの塩基；リン酸一水素ナトリウムなどの酸；ホウ砂など）、キレート剤（クエン酸などのオキシカルボン酸、メタリン酸などのリン酸など）、金属イオン封鎖剤（ポリリン酸塩、エチレンジアミン四酢酸塩など）、固化剤（前記基剤の項で例示の高級アルコール、飽和脂肪酸、ワックス類など）、可溶化剤（ポリオキシエチレン硬化ひまし油など）、可塑剤（カンファー、フタル酸ジブチルなどのフタル酸エステル、アセチルクエン酸トリブチルなどの脂肪族多塩基酸エステルなど）、ゲル化剤（有機変性ペントナイトなど）、増粘剤（前記基剤の項で例示の粘液質など）、有機溶剤（エタノール、ブタノールなどのアルコールなど）、還元剤（チオグリコール酸又はその塩、システインなど）、塩基性剤（アンモニア水、炭酸アンモニウム、エタノールアミンなど）、酸化剤（臭素酸ナトリウム、過酸化水素、過ホウ素酸ナトリウムなど）、防腐剤又は保存料（パラベン、安息香酸ナトリウムなど）、清涼剤（メントールなど）なども含まれる。前記添加剤は、単独で又は二種以上組み合わせ使用できる。

10

20

【0088】

前記添加剤の割合は、化粧品全体に対して、0.001～40重量%、好ましくは0.01～30重量%、0.1～20重量%程度であってもよい。

【0089】

前記基剤、有効成分及び添加剤は、塩の形態で用いてもよい。このような塩としては、生理的又は薬学上許容できる塩が好ましく、例えば、有機酸塩（例えば、酢酸塩、フマル酸塩、クエン酸塩などのカルボン酸塩；メタンスルホン酸塩などの有機スルホン酸塩など）、無機酸塩（例えば、塩酸塩など）、有機塩基との塩（例えば、トリメチルアミン塩、エタノールアミン塩などの第三級アミンとの塩など）、無機塩基との塩（例えば、アンモニウム塩；ナトリウム塩などのアルカリ金属塩；カルシウム塩などのアルカリ土類金属塩；アルミニウム塩など）が挙げられる。

30

【0090】

なお、基剤、有効成分及び添加剤は、前記ポリペプチドの特性を損なわない限り、ポリペプチドに対して相互作用性を有していてもよいが、通常、相互作用性（反応性、分解性など）を有しないのが好ましい。

【0091】

本発明の化粧品は、皮膚などに適用する外用組成物として利用できる。適用部位としては、特に制限されないが、例えば、頭、顔、首、腕、手、胴、足などの種々の部位の外皮の他、口腔内、頭髪、睫、眉毛などの体毛、爪などが例示できる。

40

【0092】

本発明の化粧品の形態は、特に制限されず、例えば、液剤（ローション、乳剤、懸濁液など）、半固形剤（ゲル剤、軟膏剤、硬膏剤、クリーム剤など）、固形剤（粉末、ケーキなど）などが挙げられる。液剤及び半固形剤は、基材（不織布、織布、紙、ポリマーフィルムなど）に含浸又は塗布した形態、例えば、パック、マスク、ウェットティッシュなどとして用いてもよい。

【0093】

前記液剤は、溶液、又は分散液（水性液剤に粉末が分散した分散液、水 - 非水系有機溶

50

媒の二層系液剤の分散液、水・非水系有機溶媒の二層系液剤に粉末が分散した分散液など)であってもよい。また、液剤は、スプレーやエアゾール剤として用いてもよく、スプレー又はエアゾール剤では、噴射される液剤は、霧状であってもよく、泡状であってもよい。なお、エアゾール剤の噴射剤としては、液化ガス(フッ化炭化水素、炭化水素類、液化石油ガス、ジメチルエーテルなど)、圧縮ガス(窒素ガス、二酸化炭素などの圧縮不活性ガスなど)などが使用できる。

【0094】

化粧料の使用形態としては、基礎化粧料(ローション、化粧水、ジェル状化粧水、乳液、クリーム、美容液など)、メイクアップ化粧料(液体又は粉末状ファンデーション、頬紅、アイシャドー、整髪剤など)、入浴料(浴用剤など)、洗浄料(洗顔料、クレンジング剤、石鹸、ボディシャンプー、シャンプー、リンス、コンディショナーなど)などが挙げられる。

10

【0095】

また、化粧料には、適用部位や用途(機能)に応じて、例えば、頭皮・頭髪用化粧料(シャンプー、ヘアリンス、ヘアトリートメント、毛髪用美容液、ヘアスタイリング剤、パーマ液、コールドウェーブローション、染毛料など)、部分用化粧料[アイライナー、マスカラなどのアイメイク用化粧料;リップクリーム、口唇用美容液、口紅、リップグロス、口紅用リムーバーなどの口唇用化粧料;口腔用化粧料(歯磨き剤、洗口剤、口中清涼剤など);爪用化粧料(爪用美容液、ネイルエナメル、エナメルリムーバーなど)など]、日焼け・日焼け止め用化粧料、しみそばかす用化粧料、ニキビ用化粧料、防臭化粧料(制汗剤など)なども含まれる。

20

【0096】

本発明の化粧料の用法及び用量は、化粧料の種類(用途)や形態などに応じて選択でき、例えば、1日あたり1~5回程度、所定部位に適用できる。例えば、パーマ液などの用途では、1週間乃至数ヶ月に1~3回程度、所定部位に適用でき、エナメルなどの用途では、1日乃至1週間に1~10回程度、所定部位に適用できる。また、洗浄料、毛髪料(リンス、コンディショナー、トリートメント、パーマ液など)などの用途では、化粧料を適用後、水や湯などにより洗い落としてもよい。

【産業上の利用可能性】

【0097】

本発明の化粧料は、特定のポリペプチドを含んでいるため、種々の化粧料用途、例えば、基礎化粧料、メイクアップ化粧料、入浴料、洗浄料などに有用である。また、適用部位や機能に応じて、頭皮・頭髪用化粧料、部分用化粧料(アイメイク用、口唇用、口腔用及び爪用化粧料など)の他、日焼け・日焼け止め化粧料、しみそばかす用化粧料、ニキビ用化粧料、防臭化粧料などに利用できる。

30

【実施例】

【0098】

以下に、実施例に基づいて本発明をより詳細に説明するが、本発明はこれらの実施例によって限定されるものではない。

【0099】

製造例1

式: $H-(Pro-Pro-Gly)_{10}-OH$ (配列番号: 1) で示されるペプチド((株)ペプチド研究所) 5mg (0.002mmol) を2mLのジメチルスルホキシドに懸濁し、室温で攪拌した。この混合液に、0.31mg (0.0024mmol) のジソプロピルエチルアミン、0.32mg (0.0024mmol) の1-ヒドロキシベンゾトリアゾール、0.46mg (0.0024mmol) の1-エチル-3-(3-ジメチルアミノプロピル)-カルボジイミド塩酸塩を添加して、さらに室温で7日間攪拌を続けた。

40

【0100】

反応溶液を水で20倍に希釈し、ゲルパーミエーションクロマトグラフィー(アマシャム・バイオサイエンス(株)製、AKTApurifierシステム、カラム: Superdex 200 HR 10/30

50

、流速：0.5mL/min、溶離液：150mMのNaClを含む10mM phosphate buffer (pH 7.4)) に供したところ、分子量が4万～20万の範囲にポリペプチドのピークが認められた。分子量はアマシャム・バイオサイエンス(株)製のGel Filtration LMW Calibration Kit及びGel Filtration HMW Calibration Kitを標準物質として使用し、算出した。

【0101】

得られた反応溶液を水で5倍に希釈し、水に対して3日間透析して、縮合剤などの試薬と未反応モノマーを除去した。得られたポリペプチドの円二色性スペクトルを測定したところ、227nmに正のコットン効果、199nmに負のコットン効果が観測され、3重らせん構造を形成していることが確認された。得られたポリペプチドをポリペプチド(1a)とする。

【0102】**製造例2**

式：H-(Pro-Pro-Gly)₅-OH(配列番号：2)で示されるペプチド鎖をペプチド自動合成装置を用いて固相合成法により合成した。すなわち、4-(N⁹-(フルオレニルメトキシカルボニル)-グリシン)-オキシメチル-フェノキシ-メチル基を0.65mmol/g(樹脂)の割合で含むスチレン-ジビニルベンゼン共重合体〔スチレンとジビニルベンゼンの構成モル比：99対1〕からなる粒状樹脂〔米国アプライド・バイオシステムズ社製、HM Pグリシン〕0.1mmolを用い、目的とするペプチドのカルボキシル末端からアミノ末端に向かって順次対応するアミノ酸を結合させた。結合反応において、アミノ酸として、米国アプライド・バイオシステムズ社製のN⁹-(フルオレニルメトキシカルボニル)-L-プロリン〔Fmocプロリン〕、N⁹-(フルオレニルメトキシカルボニル)-グリシン〔Fmocグリシン〕を、各結合ステップについてそれぞれ1mmolずつ用いた。

10

20

【0103】

得られたペプチド樹脂(ペプチドを結合した樹脂)を、10mLのジメチルホルムアミドに懸濁し、50mg(0.5mmol)の無水コハク酸と13mg(0.1mmol)のジイソプロピルエチルアミンを加えて、室温で12時間反応した。その後、メチルアルコールとジクロロメタンで交互に洗浄し、減圧乾燥した。

【0104】

得られたペプチド樹脂を、5%の水を含むトリフルオロ酢酸10mLで3時間処理した。得られた溶液をジエチルエーテルに加えて生じる沈殿をさらに数回ジエチルエーテルで洗浄して、ペプチドの脱保護と樹脂からの脱離を行った。粗生成物を、PD10カラム(アマシャム・バイオサイエンス(株)製)で精製してペプチドを得た。得られた精製ペプチドをアマシャム・バイオサイエンス(株)製「AKTA explorer10XT」〔カラム：ミリポア(株)製「ノバパックC18」 3.9mm × 150mm、移動相：トリフルオロ酢酸を0.05容量%含有するアセトニトリルと水の混合溶媒(アセトニトリル濃度を30分間で5容量%から50容量%に直線的に変化させた)、流速1.0mL/min〕に付したところ、リテンションタイム14.5minに単一のピークが示された。FAB法マスマスペクトルにより求めた精製ペプチドの分子量は1375であった(理論値：1374.52)。

30

【0105】

1.4mg(0.001mmol)のH₂N-(CH₂)₂-CO-(Pro-Pro-Gly)₅-OHと、0.06mg(0.001mmol)のエチレンジアミンとを0.05mLの水に懸濁し、混合液に、0.32mg(0.0024mmol)の1-ヒドロキシベンゾトリアゾール、4.6mg(0.024mmol)の1-エチル-3-(3-ジメチルアミノプロピル)-カルボジイミド塩酸塩を添加して、室温で3日間振盪した。

40

【0106】

反応溶液を水で100倍に希釈し、ゲルパーミエーションクロマトグラフィー(アマシャム・バイオサイエンス(株)製、AKTApurifierシステム、カラム：Superdex 200 HR 10/30、流速：0.5mL/min、溶離液：150mMのNaClを含む10mM phosphate buffer (pH 7.4))により分子量を測定したところ、分子量が3万～20万の範囲にポリペプチドのピークが認められた。分子量はアマシャム・バイオサイエンス(株)製のGel Filtration LMW Calibration Kit及びGel Filtration HMW Calibration Kitを標準物質として使用し、算出した。

【0107】

50

得られた反応溶液を水で5倍に希釈し、水に対して3日間透析して、縮合剤などの試薬と未反応モノマーを除去した。得られたポリペプチドの円二色性スペクトルを測定したところ、228nmに正のコットン効果、198nmに負のコットン効果が観測され、3重らせん構造を形成していることが確認された。得られたポリペプチドをポリペプチド(1b)とする。

【0108】**製造例3**

式： $H-(\text{Pro-Hyp-Gly})_{10}-OH$ (配列番号：3)で示されるペプチド((株)ペプチド研究所)5mg(0.0016mmol)を2mLのジメチルスルホキシドに懸濁し、室温で攪拌した。この混合液に、0.23mg(0.0018mmol)のジイソプロピルエチルアミン、0.24mg(0.0018mmol)の1-ヒドロキシベンゾトリアゾール、0.65mg(0.0034mmol)の1-エチル-3-(3-ジメチルアミノプロピル)-カルボジイミド塩酸塩を添加して、さらに室温で7日間攪拌を続けた。

10

【0109】

反応溶液を水で20倍に希釈し、ゲルパーミエーションクロマトグラフィー(アマシャム・バイオサイエンス(株)製、AKTApurifierシステム、カラム：Superdex 200 HR 10/30、流速：0.5mL/min、溶離液：150mMのNaClを含む10mM phosphate buffer(pH 7.4))に供したところ、分子量が6万~20万以上の範囲にポリペプチドのピークが認められた。分子量はアマシャム・バイオサイエンス(株)製のGel Filtration LMW Calibration Kit及びGel Filtration HMW Calibration Kitを標準物質として使用し、算出した。

【0110】

得られた反応溶液を水で5倍に希釈し、水に対して3日間透析して、縮合剤などの試薬と未反応モノマーを除去した。得られたポリペプチドの円二色性スペクトルを測定したところ、225nmに正のコットン効果、197nmに負のコットン効果が観測され、3重らせん構造を形成していることが確認された。得られたポリペプチドをポリペプチド(1c)とする。

20

【0111】

得られたポリペプチド(1c)の水懸濁液をフッ素樹脂(ポリテトラフルオロエチレン)シート上に流延した後、風乾することによりキャストフィルムを作製した。このフィルムに金を蒸着した後、走査型電子顕微鏡で観測すると、図1に示すような繊維状の構造物が観測された。

【0112】**製造例4**

式： $H-(\text{Pro-Pro-Gly})_5-OH$ (配列番号：2)で示されるペプチド((株)ペプチド研究所)3.5mg(0.0026mmol)と、実施例2と同様の方法で合成した0.92mg(0.0011mmol)の $H-(\text{Val-Pro-Gly-Val-Gly})_2-OH$ (配列番号：4)とを所定の割合(70モル%：30モル%)で1.5mLのジメチルスルホキシドに懸濁し、室温で攪拌した。この混合液に、0.52mg(0.0040mmol)のジイソプロピルエチルアミン、0.51mg(0.0038mmol)の1-ヒドロキシベンゾトリアゾール、1.45mg(0.0076mmol)の1-エチル-3-(3-ジメチルアミノプロピル)-カルボジイミド塩酸塩を添加して、さらに室温で7日間攪拌を続けた。

30

【0113】

反応溶液を水で20倍に希釈し、ゲルパーミエーションクロマトグラフィー(アマシャム・バイオサイエンス(株)製、AKTApurifierシステム、カラム：Superdex 200 HR 10/30、流速：0.5mL/min、溶離液：150mMのNaClを含む10mM phosphate buffer(pH 7.4))により分子量を測定したところ、分子量が8万~45万の範囲にポリペプチドのピークが認められた。分子量はアマシャム・バイオサイエンス(株)製のGel Filtration LMW Calibration Kit及びGel Filtration HMW Calibration Kitを標準物質として使用し、算出した。

40

【0114】

得られた反応溶液を水で5倍に希釈し、水に対して3日間透析して、縮合剤などの試薬と未反応モノマーを除去した。得られたポリペプチドの円二色性スペクトルを測定したところ、227nmに正のコットン効果、198nmに負のコットン効果が観測され、3重らせん構造を形成していることが確認された。得られたポリペプチドをポリペプチド(1d)とする。

50

【0115】

得られたポリペプチドの水懸濁液をフッ素樹脂（ポリテトラフルオロエチレン）シート上に流延した後、風乾することによりキャストフィルムを作製した。このフィルムを、150mMのNaClを含む10mM phosphate buffer (pH 7.4) に浸漬するとシート状のゲル状物が得られた。このシート状のゲル状物は、室温では透明であったが、40以上の温度で可逆的に白濁した。

【0116】

製造例 5

式： $H-(Pro-Hyp-Gly)_5-OH$ （配列番号：5）で示されるペプチド（（株）ペプチド研究所）5mg（0.0033mmol）を2 mLのジメチルスルホキシドに懸濁し、室温で攪拌した。この混合液に、0.44mg（0.0034mmol）のジイソプロピルエチルアミン、0.46mg（0.0033mmol）の1-ヒドロキシベンゾトリアゾール、1.3mg（0.0068mmol）の1-エチル-3-（3-ジメチルアミノプロピル）-カルボジイミド塩酸塩を添加して、さらに室温で14日間攪拌を続けた。

10

【0117】

反応溶液を水で20倍に希釈し、ゲルパーミエーションクロマトグラフィー（アマシャム・バイオサイエンス（株）製、AKTApurifierシステム、カラム：Superdex 200 HR 10/30、流速：0.5mL/min、溶離液：150mMのNaClを含む10mM phosphate buffer (pH 7.4)）に供したところ、分子量が4万～10万以上の範囲にポリペプチドのピークが認められた。分子量はアマシャム・バイオサイエンス（株）製のGel Filtration LMW Calibration Kit及びGel Filtration HMW Calibration Kitを標準物質として使用し、算出した。

20

【0118】

得られた反応溶液を水で5倍に希釈し、水に対して3日間透析して、縮合剤などの試薬と未反応モノマーを除去した。得られたポリペプチドの円二色性スペクトルを測定したところ、224nmに正のコットン効果、199nmに負のコットン効果が観測され、3重らせん構造を形成していることが確認された。得られたポリペプチドをポリペプチド(1e)とする。

【0119】

製造例 6

5mg（0.0016mmol）の式： $H-(Pro-Hyp-Gly)_{10}-OH$ （配列番号：3）で示されるペプチド（（株）ペプチド研究所）を0.5mLの10mMリン酸塩緩衝液（8.1mMの $Na_2HPO_4 \cdot 12H_2O$ 、1.5mMの KH_2PO_4 、2.7mMのKCl、pH 7.4）に溶解し、20 で攪拌した。この溶液に、0.24mg（0.0018mmol）の1-ヒドロキシベンゾトリアゾール、31mg（0.16mmol）の1-エチル-3-（3-ジメチルアミノプロピル）-カルボジイミド塩酸塩を添加して、さらに20 で24時間攪拌を続けた。

30

【0120】

反応溶液を水で60倍に希釈し、ゲルパーミエーションクロマトグラフィー（アマシャム・バイオサイエンス（株）製、AKTApurifierシステム、カラム：Superose 6 HR 10/30、流速：0.5mL/min、溶離液：150mMのNaClを含む10mMリン酸塩緩衝液（pH 7.4））に供したところ、平均分子量40万に相当するポリペプチドのピークが認められた。分子量はアマシャム・バイオサイエンス（株）製のGel Filtration LMW Calibration Kit及びGel Filtration HMW Calibration Kitを標準物質として使用し、算出した。

40

【0121】

得られた反応溶液を水で5倍に希釈し、水に対して3日間透析して、縮合剤などの試薬と未反応モノマーを除去した。得られたポリペプチドの円二色性スペクトルを測定したところ、225nmに正のコットン効果、197nmに負のコットン効果が観測され、3重らせん構造を形成していることが確認された。得られたポリペプチドをポリペプチド(1f)とする。

【0122】

製造例 7

式： $H-(Pro-Hyp-Gly)_1-OH$ で示されるペプチド（（株）ペプチド研究所）1 gを20 mLの10mMリン酸塩緩衝液（pH 7.4）に溶解し、473mgの1-ヒドロキシベン

50

ゾトリアゾール、3.35gの1-エチル-3-(3-ジメチルアミノプロピル)-カルボジイミド塩酸塩を加えて、4で2時間、その後20で46時間攪拌を続けた。反応液をミリQ水(超純水)に対して48時間透析した。

【0123】

得られた透析後の溶液を水で50倍に希釈し、ゲルパーミエーションクロマトグラフィー(アマシャム・バイオサイエンス(株)製、AKTApurifierシステム、カラム: Superdex 200 HR 10/30、流速: 0.5mL/min、溶離液: 150mMのNaClを含む10mM phosphate buffer (pH 7.4))に供したところ、分子量が10万~60万の範囲にポリペプチドのピークが認められた。

【0124】

また、得られた透析後の溶液を水で100倍に希釈し、円二色性スペクトルを測定したところ、225nmに正のコットン効果、198nmに負のコットン効果が観測され、3重らせん構造を形成していることが確認された。

【0125】

式: (Pro-Hyp-Gly)₁₀ (配列番号: 3) で示されるペプチド((株)ペプチド研究所)の215nmにおける吸光度から検量線を作成し、得られた3重らせん構造を形成するポリペプチドの濃度を測定すると約20mg/mLであった。得られたポリペプチドをポリペプチド(1h)とする。

【0126】

製造例8

式: H-(Pro-Hyp-Gly)₄-Pro-Gln-Gly-Ile-Ala-Gly-(Pro-Hyp-Gly)₄-OH (配列番号: 6) で示されるペプチド鎖を、ペプチド自動合成装置を用いて固相合成法により合成した。すなわち、4-(N-9-(フルオレニルメトキシカルボニル)-グリシン)-オキシメチル-フェノキシ-メチル基を0.65mmol/g(樹脂)の割合で含むスチレン-ジビニルベンゼン共重合体〔スチレンとジビニルベンゼンの構成モル比: 99対1〕からなる粒状樹脂〔米国アプライド・バイオシステムズ社製、HMPグリシン〕0.1mmolを用い、目的とするペプチドのカルボキシル末端からアミノ末端に向かって順次対応するアミノ酸を結合させた。結合反応において、アミノ酸として、米国アプライド・バイオシステムズ社製のN-9-(フルオレニルメトキシカルボニル)-L-プロリン〔Fmocプロリン〕、N-9-(フルオレニルメトキシカルボニル)-グリシン〔Fmocグリシン〕、N-9-(フルオレニルメトキシカルボニル)-N-トリチル-L-グルタミン〔Fmocグルタミン〕、N-9-(フルオレニルメトキシカルボニル)-L-イソロイシン〔Fmocイソロイシン〕、N-9-(フルオレニルメトキシカルボニル)-L-アラニン〔Fmocアラニン〕、バッケム社製のN-9-(フルオレニルメトキシカルボニル)-O-t-ブチル-L-ヒドロキシプロリン〔Fmocヒドロキシプロリン〕を、各結合ステップについてそれぞれ1mmolずつ用いた。

【0127】

得られたペプチド樹脂を、5%の水を含むトリフルオロ酢酸10mLで3時間処理した。得られた溶液をジエチルエーテルに加えて生じる沈殿をさらに数回ジエチルエーテルで洗浄して、ペプチドの脱保護と樹脂からの脱離を行った。粗生成物を、PD10カラム(アマシャム・バイオサイエンス(株)製)で精製してペプチドを得た。得られた精製ペプチドをアマシャム・バイオサイエンス(株)製「AKTA explorer10XT」〔カラム: ミリポア(株)製「ノバパックC18」 3.9mm × 150mm、移動相: トリフルオロ酢酸を0.05容量%含有するアセトニトリルと水の混合溶媒(アセトニトリル濃度を30分間で5容量%から50容量%に直線的に変化させた)、流速1.0mL/min〕に付したところ、リテンションタイム12.4minに単一のピークが示された。FAB法マスマスペクトルにより求めた精製ペプチドの分子量は2681.3であった(理論値: 2679.9)。

【0128】

2.5mg(0.0009mmol)のH-(Pro-Hyp-Gly)₄-Pro-Gln-Gly-Ile-Ala-Gly-(Pro-Hyp-Gly)₄-OHを1mLのジメチルスルホキシドに懸濁し、室温で攪拌した。この混合液に、0.12mg(0.00

10

20

30

40

50

09mmol) のジイソプロピルエチルアミン、0.12mg (0.0009mmol) の 1 - ヒドロキシベンゾトリアゾール、0.34mg (0.0018mmol) の 1 - エチル - 3 - (3 - ジメチルアミノプロピル) - カルボジイミド塩酸塩を添加して、さらに20 で2日間攪拌を続けた。得られた反応溶液を水で3倍に希釈し、水に対して3日間透析して、縮合剤などの試薬と未反応モノマーを除去し、ポリペプチド(IIa)を得た。ペプチドユニット(4)と(5)の割合(4)/(5)は8/1(88.9/11.1)(モル比)であった。

【0129】

得られたポリペプチド(IIa)をゲルパーミエーションクロマトグラフィー(アマシャム・バイオサイエンス(株)製、AKTApurifierシステム、カラム: Superose 6 HR GL、流速: 0.5mL/min、溶離液: 150mMのNaClを含む10mM phosphate buffer (pH 7.4))に供したところ、分子量が7万~100万の範囲にポリペプチドのピークが認められた。分子量はアマシャム・バイオサイエンス(株)製のGel Filtration HMW Calibration Kitを標準物質として使用し、算出した。

10

【0130】

得られたポリペプチド(IIa)の円二色性スペクトルを測定したところ、223nmに正のコットン効果、198nmに負のコットン効果が観測され、3重らせん構造を形成していることが確認された。

【0131】

製造例 9

1.2mg (0.00045mmol) の式: H-(Pro-Hyp-Gly)₁₀-OH(配列番号: 3)で示されるペプチド((株)ペプチド研究所)と、1.2mg (0.00045mmol) の製造例 8 で得られた式: H-(Pro-Hyp-Gly)₄-Pro-Gln-Gly-Ile-Ala-Gly-(Pro-Hyp-Gly)₄-OH(配列番号: 6)で示されるペプチドを0.25mLの10mMリン酸塩緩衝液(pH=7.4)に溶解し、0.12mg (0.0009mmol) の 1 - ヒドロキシベンゾトリアゾール、15.7mg (0.082mmol) の 1 - エチル - 3 - (3 - ジメチルアミノプロピル) - カルボジイミド塩酸塩を添加して、さらに20 で2日間攪拌を続けた。得られた反応溶液を水で10倍に希釈し、水に対して3日間透析して、縮合剤などの試薬と未反応モノマーを除去し、ポリペプチド(IIb)を得た。ペプチドユニット(4)と(5)の割合(4)/(5)は、18/1(94.7/5.3)(モル比)であった。

20

【0132】

得られたポリペプチド(IIb)をゲルパーミエーションクロマトグラフィー(アマシャム・バイオサイエンス(株)製、AKTApurifierシステム、カラム: Superose 6 HR GL、流速: 0.5mL/min、溶離液: 150mMのNaClを含む10mM phosphate buffer (pH 7.4))に供したところ、分子量が14万~100万の範囲にポリペプチドのピークが認められた。分子量はアマシャム・バイオサイエンス(株)製のGel Filtration HMW Calibration Kitを標準物質として使用し、算出した。

30

【0133】

得られたポリペプチド(IIb)の円二色性スペクトルを測定したところ、224nmに正のコットン効果、196nmに負のコットン効果が観測され、3重らせん構造を形成していることが確認された。

【0134】

製造例 10

2.2mg (0.00081mmol) の式: H-(Pro-Hyp-Gly)₁₀-OH(配列番号: 3)で示されるペプチド((株)ペプチド研究所)と、0.24mg (0.00009mmol) の製造例 8 で得られた式: H-(Pro-Hyp-Gly)₄-Pro-Gln-Gly-Ile-Ala-Gly-(Pro-Hyp-Gly)₄-OH(配列番号: 6)で示されるペプチドを0.25mLの10mMリン酸塩緩衝液(pH=7.4)に溶解し、0.12mg (0.0009mmol) の 1 - ヒドロキシベンゾトリアゾール、15.7mg (0.082mmol) の 1 - エチル - 3 - (3 - ジメチルアミノプロピル) - カルボジイミド塩酸塩を添加して、さらに20 で2日間攪拌を続けた。得られた反応溶液を水で10倍に希釈し、水に対して3日間透析して、縮合剤などの試薬と未反応モノマーを除去し、ポリペプチド(IIc)を得た。ペプチドユニット(4)と(5)の割合(4)/(5)は、98/1(99/1)(モル比)であった。

40

50

【0135】

得られたポリペプチド(IIc)をゲルパーミエーションクロマトグラフィー(アマシャム・バイオサイエンス(株)製、AKTApurifierシステム、カラム: Superose 6 HR GL、流速: 0.5mL/min、溶離液: 150mMのNaClを含む10mM phosphate buffer(pH 7.4))に供したところ、分子量が14万~40万の範囲にポリペプチドのピークが認められた。分子量はアマシャム・バイオサイエンス(株)製のGel Filtration HMW Calibration Kitを標準物質として使用し、算出した。

【0136】

得られたポリペプチド(IIc)の円二色性スペクトルを測定したところ、224nmに正のコットン効果、197nmに負のコットン効果が観測され、3重らせん構造を形成していることが確認された。 10

【0137】

試験例1

製造例8~10で得られたポリペプチドのそれぞれ0.025mgを、0.05mLの50mMのNaClと10mMのCaCl₂を含む50mM Tris/HCl緩衝液(pH=7.5)に溶解した。さらに、同じ緩衝液0.05mLに溶解した200ngのコラゲナーゼ(MMP-1, human rheumatoid synovial fibroblast)を添加し、37で24時間静置した。その後、0.1M HCl水溶液を0.01mL添加して、酵素反応を停止した後、150mMのNaClを含む10mM phosphate buffer(pH 7.4)で希釈して、ゲルパーミエーションクロマトグラフィー(アマシャム・バイオサイエンス(株)製、AKTApurifierシステム、カラム: Superose 6 HR GL、流速: 0.5mL/min、溶離液: 150mMのNaClを含む10mM phosphate buffer(pH 7.4))で分子量分布の変化を測定した。 20

【0138】

その結果、製造例8のポリペプチドではコラゲナーゼを加えない場合のピーク分子量約100万が約54万に低下した。同様に製造例9、10のポリペプチドでも、それぞれ約80万が約40万、約70万が約30万に低下した。

【0139】

製造例11

式: H-(Pro-Hyp-Gly)₄-Pro-Leu-Gly-Ile-Ala-Gly-(Pro-Hyp-Gly)₄-OH(配列番号: 7)で示されるペプチド鎖を、ペプチド自動合成装置を用いて固相合成法により合成した。すなわち、4-(N⁹-9-(フルオレニルメトキシカルボニル)-グリシン)-オキシメチル-フェノキシ-メチル基を0.65mmol/g(樹脂)の割合で含むスチレン-ジビニルベンゼン共重合体〔スチレンとジビニルベンゼンの構成モル比: 99対1〕からなる粒状樹脂〔米国アプライド・バイオシステムズ社製、HMPグリシン〕0.1mmolを用い、目的とするペプチドのカルボキシル末端からアミノ末端に向かって順次対応するアミノ酸を結合させた。結合反応において、アミノ酸として、米国アプライド・バイオシステムズ社製のN⁹-9-(フルオレニルメトキシカルボニル)-L-プロリン〔Fmocプロリン〕、N⁹-9-(フルオレニルメトキシカルボニル)-グリシン〔Fmocグリシン〕、N⁹-9-(フルオレニルメトキシカルボニル)-L-ロイシン〔Fmocロイシン〕、N⁹-9-(フルオレニルメトキシカルボニル)-L-イソロイシン〔Fmocイソロイシン〕、N⁹-9-(フルオレニルメトキシカルボニル)-L-アラニン〔Fmocアラニン〕、パッケム社製のN⁹-9-(フルオレニルメトキシカルボニル)-O^t-ブチル-L-ヒドロキシプロリン〔Fmocヒドロキシプロリン〕を、各結合ステップについてそれぞれ1mmolずつ用いた。 30 40

【0140】

得られたペプチド樹脂を、5%の水を含むトリフルオロ酢酸10mLで3時間処理した。得られた溶液をジエチルエーテルに加えて生じる沈殿をさらに数回ジエチルエーテルで洗浄して、ペプチドの脱保護と樹脂からの脱離を行った。粗生成物を、PD10カラム(アマシャム・バイオサイエンス(株)製)で精製してペプチドを得た。得られた精製ペプチドをアマシャム・バイオサイエンス(株)製「AKTA explorer10XT」〔カラム: ミリポア(株)製「ノバパックC18」 3.9mm × 150mm、移動相: トリフルオロ酢酸を0.05容量%含有するアセトニトリルと水の混合溶媒(アセトニトリル濃度を30分間で5容量%から50 50

容量%に直線的に変化させた)、流速1.0mL/min)に付したところ、リテンションタイム15 minに単一のピークが示された。F A B法マススペクトルにより求めた精製ペプチドの分子量は2666.3であった(理論値:2664.9)。

【0141】

1.2mg(0.00045mmol)のH-(Pro-Hyp-Gly)₄-Pro-Leu-Gly-Ile-Ala-Gly-(Pro-Hyp-Gly)₄-OHを0.25mLの10mMリン酸塩緩衝液(pH=7.4)に溶解し、0.12mg(0.0009mmol)の1-ヒドロキシベンゾトリアゾール、15.7mg(0.082mmol)の1-エチル-3-(3-ジメチルアミノプロピル)-カルボジイミド塩酸塩を添加して、さらに20℃で2日間攪拌を続けた。得られた反応溶液を水で10倍に希釈し、水に対して3日間透析して、縮合剤などの試薬と未反応モノマーを除去し、ポリペプチド(IIId)を得た。ペプチドユニット(4)と(5)の割合(4)/(5)は、8/1(88.9/11.1)(モル比)であった。

10

【0142】

得られたポリペプチド(IIId)をゲルパーミエーションクロマトグラフィー(アマシャム・バイオサイエンス(株)製、AKTApurifierシステム、カラム:Superose 6 HR GL、流速:0.5mL/min、溶離液:150mMのNaClを含む10mM phosphate buffer(pH 7.4))に供したところ、分子量が8万~100万の範囲にポリペプチドのピークが認められた。分子量はアマシャム・バイオサイエンス(株)製のGel Filtration HMW Calibration Kitを標準物質として使用し、算出した。

【0143】

得られたポリペプチド(IIId)の円二色性スペクトルを測定したところ、224nmに正のコットン効果、197nmに負のコットン効果が観測され、3重らせん構造を形成していることが確認された。

20

【0144】

実施例1(化粧水)

製造例7で得られたポリペプチド(Ih)を凍結乾燥することにより粉末状のポリペプチドを得た。このポリペプチド粉末0.1g、0.1gのポリエチレングリコール(PEG1500)、0.5gのプロピレングリコール、及び0.5gのグリセリンを、10mLの精製水に添加し、十分攪拌して、溶液を調製した。この溶液に、さらに1mLの1重量%パラベンのエタノール溶液を加え、十分攪拌した後、全体が20mLとなるように精製水で希釈することにより化粧水を調製した。

30

【0145】

実施例2(乳液)

実施例1と同様のポリペプチド粉末0.5g、プロピレングリコール5.0g、ポリエチレングリコール3.0g及びトリエタノールアミン1.0gを精製水70gに添加し、加熱して液温を70℃に調整し、水相を調製した。

【0146】

ステアリン酸2.0g、セチルアルコール1.0g、ワセリン2.0g、スクワラン5.0g及びグリセロールトリ-2-エチルヘキサン酸エステル2.0gの混合物を75℃に加熱して溶解し、さらにソルビタンモノオレイン酸エステル2.0g及びパラベン0.1gを添加した。得られた混合物の温度を70℃に調整し、油相を調製した。

40

【0147】

前記油相を前記水相に加えて攪拌、混合した後、さらにホモミキサーで乳化粒子を均一にし、脱気及びろ過を行い、ろ液を冷却することにより乳液を得た。

【0148】

実施例3(保湿美容液)

実施例1と同様のポリペプチド粉末0.4g、ソルビトール1.6g、プロピレングリコール1.0g及びポリエチレングリコール(PEG1500)1.4gを精製水14gに添加し、水溶液を調製した。

【0149】

別途、エタノール1.4gに、ポリオキシエチレンオレイルアルコールエーテル0.2

50

g、オリーブ油 40 mg、及びパラベン 20 mg を添加してエタノール溶液を調製した。このエタノール溶液に、前記水溶液を添加して混合し、美容液を調製した。

【0150】

実施例 4 (ハンドクリーム)

実施例 1 と同様のポリペプチド粉末 0.5 g、グリセリン 15.0 g、プロピレングリコール 3.0 g 及び水酸化カリウム 0.2 g を精製水 66.2 g に溶解し、加熱して液温を 70 に調整し、水相を調製した。

【0151】

ステアリン酸 3.0 g、ステアリン酸モノグリセリド 3.0 g、ワセリン 3.0 g、流動パラフィン 6.0 g 及びパラベン 0.1 g を混合し、加熱して、混合物の温度を 70 に調整し、油相を調製した。 10

【0152】

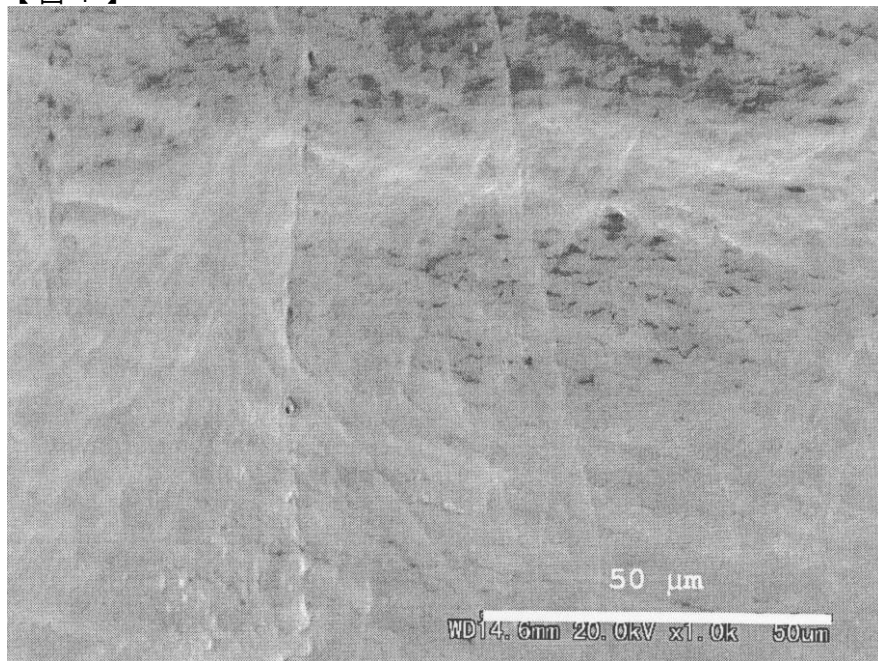
この油相を前記水相に添加し、攪拌混合した後、ホモミキサーで乳化粒子を均一にし、脱気及びろ過を行った。得られたる液を冷却することによりハンドクリームを得た。

【図面の簡単な説明】

【0153】

【図 1】 図 1 は製造例 3 で得られたフィルムを示す走査電子顕微鏡写真である。

【図 1】



【配列表】

[2005060314000001.app](#)

フロントページの続き

(51)Int.Cl.⁷

F I

テーマコード(参考)

C 0 7 K 7/08

(72)発明者 木下 久雄

奈良県生駒市小平尾町4 2 - 1 0

Fターム(参考) 4C083 AA122 AB032 AC012 AC022 AC072 AC102 AC122 AC132 AC182 AC242
AC422 AC442 AC482 AC542 AD042 AD411 AD412 BB51 CC01 CC02
CC04 CC05 CC11 CC13 CC17 CC19 CC22 CC23 CC25 CC28
CC31 CC38 CC41 DD17 DD21 DD22 DD23 DD27 DD31 DD38
EE09 EE12 FF01 FF05
4H045 AA30 BA10 BA15 BA17 BA18 BA50 CA40 DA00 EA15 FA34
GA21 GA22 HA03 HA05 HA06 HA07