

(19) 日本国特許庁(JP)

(12) 特 許 公 報(B2)

(11) 特許番号

特許第5913479号
(P5913479)

(45) 発行日 平成28年4月27日(2016.4.27)

(24) 登録日 平成28年4月8日(2016.4.8)

(51) Int.Cl.		F I
A 6 1 K 8/64	(2006.01)	A 6 1 K 8/64
A 6 1 K 8/14	(2006.01)	A 6 1 K 8/14
A 6 1 Q 7/00	(2006.01)	A 6 1 Q 7/00
A 6 1 K 38/27	(2006.01)	A 6 1 K 37/36
A 6 1 K 9/127	(2006.01)	A 6 1 K 9/127

請求項の数 6 (全 19 頁) 最終頁に続く

(21) 出願番号	特願2014-163596 (P2014-163596)	(73) 特許権者	508112841
(22) 出願日	平成26年8月11日(2014.8.11)		リゼロン、インク、
(62) 分割の表示	特願2008-535427 (P2008-535427) の分割		大韓民国、200-161、カンウォンド、 チュンチョン、ソヤンガン-ロ40、ハ イテックベンチャータウン B102-4 03
原出願日	平成17年10月12日(2005.10.12)	(74) 代理人	100121728
(65) 公開番号	特開2014-208711 (P2014-208711A)		弁理士 井関 勝守
(43) 公開日	平成26年11月6日(2014.11.6)	(74) 代理人	100165803
審査請求日	平成26年8月11日(2014.8.11)		弁理士 金子 修平
特許法第30条第3項適用	博覧会「IN-COSMETICS」(2005年4月12日から2005年4月14日)に出品	(72) 発明者	オ・タルギョン
			大韓民国、200-161、カンウォンド、 チュンチョン、フピョン1ドン、グッド ンヌルプルン エーピーティー、595

最終頁に続く

(54) 【発明の名称】 ヒト成長ホルモンを有効成分として含む発毛の促進用の組成物

(57) 【特許請求の範囲】

【請求項1】

リポソームに包囲されたヒト成長ホルモンを有効成分として含む、発毛の促進用の皮膚塗布組成物。

【請求項2】

前記リポソームは、ナノリポソームであることを特徴とする、請求項1に記載の組成物。

【請求項3】

前記ナノリポソームは、50~250nmの粒子サイズを有することを特徴とする、請求項2に記載の組成物。

【請求項4】

請求項1から3のいずれかーに記載の組成物を含み、皮膚に塗布する、発毛の促進用の化粧品。

【請求項5】

前記化粧品は、ペースト、ゲル、クリーム、ローション、パウダー、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であることを特徴とする、請求項4に記載の化粧品。

【請求項6】

請求項1から3のいずれかーに記載の組成物を含み、皮膚に塗布することを特徴とする、発毛促進剤。

【発明の詳細な説明】

【技術分野】

【0001】

本発明は、ヒト成長ホルモンを有効成分として含む皮膚状態改善用皮膚局所表面投与組成物、及びこれを利用する皮膚状態改善方法に関する。

【背景技術】

【0002】

ヒト成長ホルモンのような高分子（分子量約22kD）は、一般に皮膚角質層を通過できないと知られている。皮膚を通じて効率的に伝達できる分子量は、約500dalton以下と一般に認識されており、浸透補助剤（penetration enhancer）の助けがあっても、最大分子量は約2kDを超えないと報告されている。したがって、ヒト成長ホルモンのような高分子を正常皮膚に塗布し、ヒト成長ホルモンの作用による美容的、医学的効能を期待するということは、常識から外れることと認識されてきた。

【0003】

タンパク質のような高分子を正常的な皮膚に塗布し、真皮層に伝達する方法として、リポソームを利用する方法が模索された。リポソームで包んで伝達する場合、表皮層を通過するとの報告と、毛嚢を通じて伝達されるとの報告がある。毛嚢を介しての伝達には、リポソーム形態の運搬体や脂肪酸のような脂質を含む複合物が効率的であると報告された。しかしながら、たとえ効率は低いものの、エタノールのような有機溶媒を含む水溶液やポリエチレングリコールのようなポリマー高分子を含む水溶液も、毛嚢を介しての伝達に利用された。リポソームを利用したタンパク質の皮膚への伝達効率は、まだその事例が少なく経験的な部分が多いため、一貫した法則は、まだ明かされていない。但し、毛嚢を介してのタンパク質の皮膚伝達がだんだん説得力を得ている趨勢であるが、リポソームで包んで伝達する場合も、リポソーム自体が入るといよりは、リポソーム内外のpH及び電荷状態を含むリン脂質の種類と、リン脂質に付着されているカリン脂質が取り囲んでいるタンパク質の種類と、毛孔をなす様々な構成組織の構成成分、これらの三つの要素の複合的相互作用によって、今は一般的な法則に従うといよりは、経験的に伝達効率が決定されるように見える。但し、本発明と関連し、特記すべき点は、表皮の生きている細胞層と毛孔をなす付帯機関及び組織全般にかけてヒト成長ホルモンの受容体が存在するとの報告があるということである。

【0004】

ヒト成長ホルモンは、脳下垂体前葉から分泌されて、血液に乗って循環しながら人体の各機関に影響を及ぼすが、特に、成長期における骨格の成長、筋肉の増加、脂肪の分解、臓器の成長、性的な成熟などに係っている。その他、ヒト成長ホルモンを注射剤として、成人に生理的な範囲の血中濃度で投与した時、心臓循環系の強化、運動能力の向上、筋肉の強化、腹部肥満の減少、活力の増進、動脈硬化の改善、老人性鬱症の改善などの効果に対する主張が提起された。ヒト成長ホルモンの人体に対する効能は、それ自体に起因するよりは、ヒト成長ホルモンにより発現が促発され、主に肝で生産されて血中に分泌されるインシュリン様成長因子-1（IGF-1）の作用による効能として知られている。その理由は、ヒト成長ホルモンの血中半減期は15分内外である反面、IGF-1の血中半減期は約20時間であって、作用時間が遥かに長く持続されるためである。即ち、脳下垂体から分泌されたヒト成長ホルモンは、血中に存在するヒト成長ホルモン結合タンパク質と結合し、血液循環により運搬され、人体の各組織に広がっているヒト成長ホルモン受容体に会うと、ヒト成長ホルモン結合タンパク質と遊離されて、ヒト成長ホルモン受容体と結合し、その結合による信号伝達の結果としてIGF-1の合成と分泌が促進されるようになる。血液に分泌されたIGF-1は、再びIGF-1結合タンパク質と結合し、血流に乗って循環してから、再び人体の各組織に広がっているIGF-1受容体と結合することにより、ヒト成長ホルモンの分泌により引き起こされた様々な生理的な効能を発揮するようになる。したがって、皮膚に及ぼす注射剤ヒト成長ホルモンの効果は、もしかかる効果が事実であれば、それはIGF-1の作用による効果であって、そうだとしたら、その効

10

20

30

40

50

果は、当然血液と直接接触が可能な真皮細胞の表面に存在する I G F - 1 受容体の存在有無により左右されるはずである。もし I G F - 1 ではなく、ヒト成長ホルモンの直接的な影響を皮膚が受けるとしても、その影響は、当然血液と接触する部位に存在するヒト成長ホルモン受容体により伝達されるはずである。そのため、血液と接触しない正常な皮膚表面に、しかも皮膚表皮を全く通過できない分子サイズのヒト成長ホルモンを、化粧品と同様に皮膚に塗ることにより、ある効果を期待するという事は、常識を外れる行為と言える。本発明は、血液を通じてヒト成長ホルモンの効能が伝達される方式ではなく、血液が直接接触しない部分である正常皮膚表面に化粧品の用途として塗るような方式により、ヒト成長ホルモンがニキビの改善、シワの改善、アトピー性皮膚の改善、紫外線による皮膚損傷の改善、シミの改善、ソバカスの改善、乾性肌の改善、脂性肌の改善、毛孔の縮小などのような皮膚に対する美容的、医学的効能を奏することができるということを示した最初の発明である。

10

【 0 0 0 5 】

皮膚組織は、表皮と真皮と皮下とからなっている。皮膚の性質を決定づける部分は表皮であって、表皮は、外部から直接的且つ頻りに損傷を受けるため、表皮の修復と再生は非常に重要である。表皮は、上皮細胞の層からなっている。皮膚の上皮細胞を角質細胞ともいうが、これは、皮膚上皮細胞は分化しながら、表皮を強化する中間フィラメントタンパク質のケラチンを合成するからである。これらは、分化と共に層をなして表皮側に移動し、形も平たく変わりながら、細胞内部機能がだんだんなくなって死細胞に変わって行く。表皮の最も奥側に位置した細胞層は、基底膜と接しているが、この細胞層を基底層といい、この層をなす細胞を基底細胞といって、これらの中に表皮幹細胞が存在する。基底層の細胞が表皮側に分化していきながら、順に有棘層、顆粒層、淡明層、角質層を形成するが、顆粒層を境界に、下方は生きている細胞、上方は死んだ細胞層に分かれる。角質層の外側にある平たい鱗片状の組織を ' s q u a m e s ' ともいうが、ここにはケラチンが稠密に満たされている。顆粒層の外側に位置した細胞から末端角質層までの細胞は、原形質膜の内側表面が細くて頑丈な交差連結された (c r o s s - l i n k e d) タンパク質の層により強化されている。表皮の幹細胞から増殖されて角質層に分化されていきながら、表皮細胞は、ケラチンの交差連結により内部強化を図りながら、同じ層の他の細胞と固く連結されたデスモソームともケラチンにより連結されて、全体的な層構造を維持する。また、表皮細胞は、外表皮側に分化されていきながら、脂質を生産して分泌し、タンパク質で角質化された原形質膜に二重層からなる組織を形成することにより、皮膚表面をラップのように外部から封鎖する。ヒトの表皮は、2週間サイクルで入れ替わるため、表皮を組成する皮膚幹細胞の増殖能力は、実に莫大と言える。

20

30

【 0 0 0 6 】

最近、皮膚の多能な幹細胞が毛嚢の脂腺の真下のバルジ (b u l g e) 部位に位置するとの報告が発表された。このバルジ幹細胞は、表皮幹細胞、毛根幹細胞、脂腺幹細胞を作る根幹となる幹細胞である。バルジ幹細胞は、バルジにのみ位置し、幹細胞としての性質を維持しながら特有の組み合わせを発現させる。表皮幹細胞は、増殖をすると同時に自分も分化しながら表皮を維持して、毛根幹細胞は、髪の毛が抜けると、再び増殖して分化し、新しい髪の毛を作る。しかしながら、表皮幹細胞、毛根幹細胞や脂腺幹細胞の増殖能力と幹細胞の性質を維持する能力には、限界があって、例えば、大部分の表皮幹細胞は、3~6回の増殖をしてからは分化に入る。その反面、バルジ幹細胞は、増殖は他の三種の幹細胞より遅いが、ヒトが生きる間に無限に増殖しながら、表皮増殖細胞、毛根幹細胞、脂腺幹細胞を作ると同時に、自分の幹細胞性格を維持することができるように見える。本発明により、最初に、ヒト成長ホルモンが発現されて作用する位置がバルジ幹細胞の位置した部位であるという事実を明かした点は、本発明によりヒト成長ホルモンが様々な皮膚状態を改善する効果を奏するという事からみると、非常に意義深いことである。なお、特許文献1に、皮膚状態の改善効果を有する皮膚化粧料が開示されている。

40

【 先行技術文献 】

【 特許文献 】

50

【 0 0 0 7 】

【特許文献 1】特開 2 0 0 0 - 2 6 4 8 3 3

【発明の概要】

【発明が解決しようとする課題】

【 0 0 0 8 】

本発明者らは、皮膚状態を改善できる物質を開発するために鋭意研究した結果、ヒト成長ホルモンを皮膚に局所的に適用すると、皮膚状態を大いに改善できるということを見出し、本発明を完成した。

【 0 0 0 9 】

したがって、本発明の目的は、皮膚状態改善用皮膚局所表面投与組成物を提供することにある。また、本発明の目的は、皮膚状態改善方法を提供することにある。

10

【 0 0 1 0 】

なお、本発明の他の目的及び利点は、発明の詳細な説明、請求の範囲、及び図面によりさらに明確にされる。

【課題を解決するための手段】

【 0 0 1 1 】

上記課題を解決するための手段として、以下のような発明などを提供する。

【 0 0 1 2 】

本発明の様態によると、本発明は、ヒト成長ホルモンを有効成分として含む皮膚状態改善用皮膚局所表面投与組成物を提供する。

20

【 0 0 1 3 】

また、本発明の他の様態によると、本発明は、ヒト成長ホルモンを有効成分として含む組成物を、皮膚に局所的に塗布する段階を含む皮膚状態改善方法を提供する。

【 0 0 1 4 】

具体的には、以下の発明を提供する。

【 0 0 1 5 】

第一発明では、ヒト成長ホルモンを有効成分として含む、皮膚状態改善用皮膚局所表面投与組成物を提供する。

【 0 0 1 6 】

第二発明では、第一発明を基本と、さらに、前記ヒト成長ホルモンは、リポソームに包

30

囲されていることを特徴とする皮膚状態改善用皮膚局所表面投与組成物を提供する。

【 0 0 1 7 】

第三発明では、第二発明を基本とし、さらに、前記リポソームは、ナノリポソームであることを特徴とする皮膚状態改善用皮膚局所表面投与組成物を提供する。

【 0 0 1 8 】

第四発明では、第三発明を基本とし、さらに、前記ナノリポソームは、50～250nmの粒子サイズを有することを特徴とする皮膚状態改善用皮膚局所表面投与組成物を提供する。

【 0 0 1 9 】

第五発明では、第一発明を基本とし、さらに、前記皮膚状態の改善は、ニキビの治療、シワの改善、シミの除去、皮膚弾力の改善、発毛の促進、皮膚老化の防止、皮膚保湿の改善、または皮膚表皮幹細胞の増殖であることを特徴とする皮膚状態改善用皮膚局所表面投与組成物を提供する。

40

【 0 0 2 0 】

第六発明では、第一発明を基本とし、さらに、前記組成物は、化粧品組成物または薬学的組成物であることを特徴とする、皮膚状態改善用皮膚局所表面投与組成物を提供する。

【図面の簡単な説明】

【 0 0 2 1 】

【図 1】実施例 I で製造された A 剤形のヒト成長ホルモン (h G H) - 含有リポソームク

50

リーム剤形の電子顕微鏡写真である。

【図2】実施例Iで製造されたB剤形のhGH-含有リポソーム(Lipo-hGH)に対するゲル透過クロマトグラムである。

【図3】実施例Iで製造されたB剤形のLipo-hGHに包囲されたhGHに対するSDS-PAGE結果である。

【図4】実施例Iで製造されたB剤形のLipo-hGHに包囲されたhGHに対する逆相HPLCクロマトグラムである。

【図5】実施例Iで製造されたB剤形のLipo-hGHにおいて、リン脂質に対する逆相HPLCクロマトグラムである。

【図6】実施例Iで製造されたB剤形のLipo-hGHの安定性試験の結果を示すグラフである。

10

【図7】本発明のhGH-含有リポソームの安定性試験の結果を示すグラフである。

【図8】本発明のhGH-含有リポソームのシワ改善効能を、UV-誘導されたシワを有する無毛マウスを利用して実験した結果である。

【図9】本発明のhGH-含有リポソームに包囲されたヒト成長ホルモンの活性を調べた結果を示す。

【図10a】本発明のhGH-含有ナノリポソームがスプラグドリー(Sprague Dawley)ラットの毛孔を通じて皮膚に伝達される場合におけるヒト成長ホルモンのローカリゼーションを示す写真である。

【図10b】本発明のhGH-含有ナノリポソームがスプラグドリー(Sprague Dawley)ラットの皮膚の真皮層と毛嚢に及ぼす影響を示す写真である。

20

【図11a】本発明のhGH-含有ナノリポソームがICRマウス皮膚の表皮及び真皮に及ぼす影響を示す写真である。

【図11b】本発明のhGH-含有ナノリポソームがICRマウス真皮層において結合組織のリモデリングを誘導することを示す写真である。

【図12】本発明のhGH-含有ナノリポソームがヒト人工皮膚に及ぼす影響を示す写真である。

【図13】本発明のhGH-含有ナノリポソームに対する粒子大きさ分布の分析結果である。

【図14】本発明のhGH-含有ナノリポソームのシワ改善効能を示すグラフである。

30

【発明を実施するための形態】

【0022】

以下本発明を実施するための最良の形態について、図面を用いて詳細に説明する。なお、本発明はこれら実施の形態になんら限定されるものではなく、その要旨を逸脱しない範囲において種々なる態様で実施しうる。

<発明の構成>

本発明者らは、ヒト成長ホルモンの新規な用途を探るために、鋭意研究した結果、ヒト成長ホルモンを皮膚に局所的に適用すると、皮膚状態を大いに改善することができることを見出した。ヒト成長ホルモンによる現在の処置は、注射投与方式であって、主に小人症と成人のヒト成長ホルモン欠乏症を治療するためのものである。従来は、ヒト成長ホルモンの大きい分子量と教科書的なヒト成長ホルモンの作用経路に対する先入見のため、正常皮膚に局所的に適用して有効な効能を期待するということは、考えられないことであった。本発明は、このような当業界の通常的な常識または知識から大きく外れたものであって、ヒト成長ホルモンの正常皮膚に対する局所的適用の効能を最初に確認したことにその特徴がある。本発明は、ヒト成長ホルモンを毛孔と表皮の二つの経路を通じて皮膚に適用させる最初の発明である。

40

【0023】

本発明は、血液を通じてヒト成長ホルモンの効能が伝達される方式ではなく、血液が接触する部分と反対方向の正常皮膚表面に塗る方式により、ヒト成長ホルモンがニキビの改善、シワの改善、アトピー性皮膚の改善、紫外線による皮膚損傷の改善、シミの改善、ソ

50

バカスの改善、乾性肌の改善、脂性肌の改善、毛孔の縮小などのような皮膚に対する美容的、医学的効能を奏することができるということを示した最初の発明である。

【0024】

本発明で有効成分として利用されるヒト成長ホルモンとしては、ヒト成長ホルモン活性を示すなら、いかなるポリペプチドでも使用可能であり、例えば、「*mature hGH*」、「*Met-hGH*」、「*hGH variants*」、「*modified-hGH*」、「*hGH fragments*」または「*hGH analogues*」のいずれか一つを利用することができる。好ましくは、*mature hGH*または*Met-hGH*である。*mature hGH*は、人体血液内に存在する主(*major*)ヒト成長ホルモンのアミノ酸序列を有するヒト成長ホルモンを意味し、*Met-hGH*は、*mature hGH*のN-末端にメチオニンが添加されたヒト成長ホルモンを意味し、*hGH variants*は、人体内に存在する主ヒト成長ホルモン以外のヒト成長ホルモンのアミノ酸序列を有するヒト成長ホルモンを意味し、*modified-hGH*は、ヒト成長ホルモンの一つ以上のアミノ酸残基に*pegylation*や*glycation*などのような添加物の付着により変形されたヒト成長ホルモンを意味し、*hGH fragments*は、ヒト成長ホルモンのアミノ酸序列の一部を遺伝工学的な方法や生化学的方法により除去したヒト成長ホルモンを意味し、*hGH analogue*は、ヒト成長ホルモンのアミノ酸序列を遺伝工学的な方法により、類似した性質を有する他のアミノ酸序列に変形させたヒト成長ホルモンを意味する。本発明において、ヒト成長ホルモンの活性を有するという事は、次の二つの方法の一つにより特定できる。その一つは、ヒト成長ホルモン結合タンパク質またはヒト成長ホルモン受容体と結合して、ヒト成長ホルモンが誘発する信号伝達を起こすかどうかにより特定でき、他の一つは、ヒト成長ホルモンの作用に起因した生物学的効果が現れるかどうかにより特定できる。

10

20

【0025】

本発明において、ヒト成長ホルモンは、水溶液自体または担体を通じて皮膚に適用することができる。本発明の注目すべき特徴の一つは、実施例XII及び図10bに示されたように、ヒト成長ホルモン水溶液自体を直接皮膚に適用しても、所望の皮膚状態改善効果のある程度達成できるということである。ヒト成長ホルモン水溶液自体を局所的に皮膚に適用する場合にも、ヒト成長ホルモンは、毛嚢のバルジ幹細胞が位置した部位に到達して、皮膚状態改善効果を期待することができる。

30

【0026】

本発明の好ましい具現例によると、本発明の組成物は、リン脂質またはリポソーム組成を有して、より好ましくは、リポソーム組成を有する。有効成分であるヒト成長ホルモンは、リポソームに包圍されて皮膚に適用されることが好ましい。本発明のより好ましい具現例によると、本発明の組成物は、ナノリポソームの組成を有する。本明細書において、用語「ナノリポソーム」は、通常的なリポソームの形態を有するものであって、平均粒径が20~1000nmのリポソームを意味する。本発明の好ましい具現例によると、ナノリポソームの平均粒径は、50~500nmであり、より好ましくは、50~350nmであって、最も好ましくは、50~250nmである。

40

【0027】

リポソームは、自ら会合するコロイド粒子の球形リン脂質小胞体と定義されるが、水性ヘッド(親水基)と不溶性テイル(疎水基)を有する両親媒性分子から構成されたりポソームは、これらの相互作用により自発的に結合して整列された構造を示すが、その大きさと積層性(*lamellarity*)により、SUV(*small unilamellar vesicle*)、LUV(*large unilamellar vesicle*)、及びMLV(*multi lamellar vesicle*)に分類される。このように、多様な積層性を示すリポソームは、細胞膜に類似した二重膜構造を有する。

【0028】

本発明における(ナノ)リポソームは、リン脂質、ポリオール、界面活性剤、脂肪酸、塩及び/または水を利用して製造することができる。

50

【0029】

本発明の(ナノ)リポソームの製造に利用される成分であるリン脂質は、両側親和性脂質として利用されたもので、天然リン脂質(例えば、卵黄レシチンまたは大豆レシチン、スフィンゴミエリン)及び合成リン脂質(例えば、ジパルミトイルホスファチジルコリン(dipalmitoylphosphatidylcholine)または水添レシチン)を含み、好ましくは、レシチンである。より好ましくは、前記レシチンは、大豆または卵黄から抽出した天然由来の不飽和レシチンまたは飽和レシチンである。

【0030】

本発明の(ナノ)リポソームに利用できるポリオールは、特に制限されるものではなく、好ましくは、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、グリセリン、メチルプロパンジオール、イソプレングリコール、ペンチレングリコール、エリスリトール、キシリトール及びソルビトールを含む。

10

【0031】

本発明の(ナノ)リポソームの製造に利用できる界面活性剤は、当業界に公知されたいかなるものでも使用でき、例えば、アニオン性界面活性剤(例えば、アルキルアシルグルタメート、アルキルホスフェート、乳酸アルキル、ジアルキルホスフェート、及びトリアルキルホスフェート)、カチオン性界面活性剤、両性界面活性剤、及び非イオン性界面活性剤(例えば、アルコキシ化アルキルエーテル(alkoxylatedalkylether)、アルコキシ化アルキルエステル(alkoxylatedalkylester)、アルキルポリグリコシド、ポリグリセリルエステル、及びシュガーエステル)が使用できる。

20

【0032】

本発明の(ナノ)リポソームの製造に利用できる脂肪酸は、高級脂肪酸、好ましくは、C12~22アルキル鎖の飽和または不飽和脂肪酸であって、例えば、ラウリン酸、ミリスチン酸、パルミチン酸、ステアリン酸、オレイン酸、及びリノレイン酸を含む。

【0033】

本発明の(ナノ)リポソームの製造に利用される塩は、当業界に公知されたいかなるものでも使用できるが、例えば、リン酸塩、硫酸塩、硝酸塩、塩酸塩、水酸化塩、ナトリウム塩、カリウム塩、カルシウム塩、アンモニウム塩、アミノ酸塩、及びアミノ酸を含む。

【0034】

本発明の(ナノ)リポソームの製造に利用される水は、一般に脱イオン化された蒸留水である。

30

【0035】

本発明の好ましい具現例によると、本発明の(ナノ)リポソームは、リン脂質、塩と水のみにより製造されるが、その具体的な例は、下記の実施例に記載されている。

【0036】

本発明の好ましい具現例によると、本発明のhGH-含有ナノリポソームは、次の段階を含む工程により製造される:(a)リポソームを形成できるリン脂質(好ましくは、卵黄レシチンまたは大豆レシチン)を、ヒト成長ホルモンを含有した塩の緩衝水溶液に溶解する段階;及び(b)ヒト成長ホルモンとリン脂質を含有した水溶液を高圧均質器に反復的に通過させるが、通過回数が増加するにつれて、リン脂質の含量と高圧均質器の圧力を漸次増加させ、ヒト成長ホルモンを含有するナノリポソームを製造する段階。

40

【0037】

ヒト成長ホルモンを含有する水溶液は、pH6~8、好ましくは、約pH7の緩衝液(例えば、リン酸ナトリウム緩衝液)が好ましい。リン酸ナトリウム緩衝液が利用される場合は、その濃度は、5~100mM、より好ましくは、5~60mM、さらに好ましくは10~30mM、最も好ましくは、約20mMである。

【0038】

本発明の方法において、最も特異な側面は、リン脂質とhGH-含有水溶液の混合物を高圧均質器に数回通過させるが、通過回数が増加するにつれて、リン脂質の量と均質器の

50

圧力を漸次増加させることにある。本発明の好ましい具現例によると、均質器の圧力は、0 bar から 1000 bar まで、好ましくは、0 bar から 800 bar まで漸次増加させる。圧力は、50 bar または 100 bar、好ましくは、100 bar ずつ増加させることができる。本発明の好ましい具現例によると、リン脂質の量は、5 ~ 40 w/v (%)、5 ~ 30 w/v (%) まで漸次増加させる。

【0039】

このような漸次的なリン脂質含量と圧力の増加を含む高圧均質工程を通じて、hGH - 含有ナノリポソームが製造されて、好ましくは、液状のhGH - 含有ナノリポソームが製造される。

【0040】

本発明の組成物は、様々な皮膚状態の改善に利用できる。好ましくは、本発明の組成物は、ニキビの治療、シワの改善、シミの除去、皮膚弾力の改善、発毛の促進、皮膚老化の防止、皮膚保湿の改善、及び皮膚幹細胞と皮膚表皮幹細胞の増殖に有効であり、より好ましくは、ニキビの治療、シワの改善、及び発毛の促進に有効である。

【0041】

本発明の組成物は、化粧品組成物または薬剤学的組成物として製造できる。

【0042】

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hGH - 含有リポソームの他に、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、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、及び担体を含む。

【0043】

本発明の皮膚保護用化粧品組成物は、当業界で通常的に製造されるいかなる剤形にも製造でき、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。

【0044】

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。

【0045】

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/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。

【0046】

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、グリセロール脂肪族エステル、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。

【0047】

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

10

20

30

40

50

たはトラガカントなどが利用できる。

【0048】

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体、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、植物油、ラノリン誘導体、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。

【0049】

本発明の組成物が薬剤学的組成物に製造される場合は、薬剤学的に許容される担体を含むことができるが、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/またはミネラルオイルを含むことができる。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。適合する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。

【0050】

本発明の薬剤学的組成物は、皮膚局所投与目的で開発された。

【0051】

本発明の薬剤学的組成物の適合した投与量は、製剤化方法、投与方式、患者の年齢、体重、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り様々である。一方、本発明の薬剤学的組成物の皮膚局所投与量は、好ましくは、1日当たり、 $0.001 \sim 100 \text{ ng/cm}^2$ (皮膚表面積)、より好ましくは、 $0.01 \sim 10 \text{ ng/cm}^2$ 、最も好ましくは、 $0.1 \sim 2 \text{ ng/cm}^2$ である。

【0052】

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されるか、または多用量容器内に入れて製造できる。この際、剤形は、ナノリポソームを含む溶液形態が最も好ましい。

【0053】

本発明の組成物は、表皮幹細胞に作用し、毛嚢の数を増やして発毛を促進し、表皮層の角質細胞の増殖を誘発し皮膚老化を抑えて、紫外線により損傷された皮膚と紫外線により形成されたシワを改善すると共に、真皮層の結合組織をリモデリングし、皮膚弾力を改善して、シワを改善する作用をし、ニキビを治療して、シミを除去する効能を奏する。つまり、本発明の組成物は、皮膚状態を著しく改善させることができる。また、本発明の組成物は、人体に非常に安全であると共に、ナノリポソームに製造される場合は、安定性にも非常に優れるものである。

<発明の具体的実施例>

以下、具体的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 I : 様々な剤形のヒト成長ホルモン - 含有リポソーム (Lipo-hGH) の製造方法>>

<<< A 型 (クリーム型) : ヒト成長ホルモン - 含有クリーム剤形>>>

A 型の製造に利用されたリン脂質は、「lipoid S100 (Lipoid GmbH, Germany)」または「lipoid S75 (Lipoid GmbH, Ger

10

20

30

40

50

many)」である。

【0054】

機器出口(outlet)の温度が30を超えないように、熱交換機を装着した高圧均質器(max.output 5L/hr、最大圧力1200bar、Model HS-1002; manufactured by Hwasung Machinery Co., Ltd., South Korea)の熱交換機を氷水中に装置した後、蒸留水で機器内部を洗浄して作動準備した後、緩衝溶液(20mM NaH₂PO₄ pH6.5-7.5、1mM EDTA)に溶解されている1mg/ml濃度のヒト成長ホルモン(LG Life Sciences, Ltd)溶液にリン脂質を5w/v%比率で添加し、十分水和させて攪拌し、これを常温、低圧0barで3回以上均質器に通過させた。均質器処理をした溶液にリン脂質を6w/v%比率となるように添加して、十分水和させて攪拌して、100barで3回以上均質器を通過させた。その後、100bar条件で、均質器を経た溶液にリン脂質を7w/v%比率となるように添加して十分水和させて攪拌し、200barで3回以上均質器を通過させた。その後、200bar条件で、均質器を経た溶液にリン脂質を8w/v%比率となるように添加して十分水和させて攪拌し、300barで3回以上均質器を通過させた。前記均質器過程を経た溶液にリン脂質を9w/v%比率となるように添加して十分水和させて攪拌し、400barで3回以上均質器を通過させた。次いで、前記均質器過程を経た溶液にリン脂質を10w/v%比率となるように添加して十分水和させて攪拌し、500barで3回以上均質器を通過させた。その後、前記均質器過程を経た溶液にリン脂質を11w/v%比率となるように添加して十分水和させて攪拌し、600barで3回以上均質器を通過させた。その後、前記均質器過程を経た溶液にリン脂質を12w/v%比率となるように添加して十分水和させて攪拌し、800barで3回以上均質器を通過させて、最終的にクリーム型のヒト成長ホルモン-含有リポソーム(Lipo-hGH)を製造した。

【0055】

本実施例で製造されたヒト成長ホルモン-含有リポソームクリーム剤形の電子顕微鏡写真は、図1に示されている。本実施例で製造されたクリーム型リポソームをゴールドコーティングして、走査電子顕微鏡(HITACHI S2500)で観察した結果、屈曲して連結されている基物の形態はゲルと推定されて、球形の小さい粒は、ナノサイズ(0.02~0.3μm)のリポソームと判断される。

<<<B型(リポソーム型):ヒト成長ホルモン-含有リポソーム剤形>>>

B型の製造に利用されたリン脂質は、大豆レシチン(Shin Dong Bang Corp., South Korea)、Metarin P(Degussa Texturant Systems Deutschland GmbH & Co. KG)、Nutripur S(Degussa Texturant Systems Deutschland GmbH & Co. KG)、またはEmultop(Degussa Texturant Systems Deutschland GmbH & Co. KG)である。

【0056】

機器出口(outlet)の温度が30を超えないように、熱交換機を装着した高圧均質器(max.output 5L/hr、最大圧力1200bar、Model HS-1002; manufactured by Hwasung Machinery Co., Ltd., South Korea)の熱交換機を氷水中に装置した後、蒸留水で機器内部を洗浄して作動準備した後、緩衝溶液(20mM NaH₂PO₄ pH6.5-7.5、1mM EDTA)に溶解されている1mg/ml濃度のヒト成長ホルモン(LG Life Sciences, Ltd)溶液にリン脂質を10w/v%比率で添加し、十分水和させて攪拌し、これを常温、低圧0barで3回以上均質器に通過させた。次いで、前記均質器過程を経た溶液にリン脂質を14w/v%比率となるように添加して、十分水和させて攪拌して、100barで3回以上均質器を通過させた。その後、前記均質器の過程を経た溶液にリン脂質を18w/v%比率となるように添加して十分水和させて攪拌し、200barで3回以上均質器を通過させた。その後、前記均質器の過程を経た溶液にリン

脂質を20 w/v %比率となるように添加して十分水和させて攪拌し、300 barで3回以上均質器を通過させた。次いで、前記均質器の過程を経た溶液にリン脂質を22 w/v %比率となるように添加して十分水和させて攪拌し、400 barで3回以上均質器を通過させた。その後、前記均質器の過程を経た溶液にリン脂質を24 w/v %比率となるように添加して十分水和させて攪拌し、500 barで3回以上均質器を通過させた。その後、前記均質器の過程を経た溶液にリン脂質を26 w/v %比率となるように添加して十分水和させて攪拌し、600 barで3回以上均質器を通過させた。次いで、前記均質器の過程を経た溶液にリン脂質を28 w/v %比率となるように添加して十分水和させて攪拌し、700 barで3回以上均質器を通過させた。その後、前記均質器の過程を経た溶液を800 barで3回以上均質器を通過させた後、均質器から溶液を排出して、15、000 × gで30分間高速遠心分離し、上清液を分離した。この際、リポソーム内に入らなかったヒト成長ホルモンをゲル透過クロマトグラフィ (GE Healthcare, USA) で除去し、液相のリポソームを得た (参照: 図2)。

10

【0057】

B剤形において、溶液を、蒸留水及び緩衝溶液 pH 6.0 ~ 7.5 (20 mM NaH₂PO₄、1 mM EDTA, pH 6.0 - 7.5) を使用して製造した結果、リポソームの物性及び安定性に変わりはなく、また、結果物を15 ~ 30 で大豆レシチン10 w/v %以上で長期保管 (1ヶ月以上) したら、脂質層と水溶液との相分離が発生 (上層は水溶液、下層は脂質層) したが、10 w/v %未満の大豆レシチンでは相分離が起らず、安定性に優れていた。

20

<<実施例II: FPLC分離及びSDS-PAGE分析>>

前記実施例Iの剤形Bのヒト成長ホルモン-含有リポソームの分析のために、常温でFPLC (Acta explorer, Amersham Bioscience) に superdex 200 HR/30 カラムを装置して、カラムボリュームの二倍の緩衝溶液 (20 mM NaH₂PO₄、1 mM EDTA 及び 150 mM NaCl) で平衡化させた後、ヒト成長ホルモン-含有リポソームを分離及びその分画を分取し、これをSDS-PAGEで分析した。図3から確認できるように、約22 kDa付近で、ヒト成長ホルモンのバンドが見られる。

<<実施例III: リポソーム内のヒト成長ホルモンの定量>>

HPLC (Shimadzu) に C18 Delta pack カラム (Waters, USA) を装着して、溶媒Aは、0.1% TFAアセトニトリル、溶媒Bは、0.1% TFA H₂O を使用し、濃度勾配 (B 60 - 10% : 0 - 25 min, B 60% : 25.01 - 30 min) 方式により、流速1 ml/minで逆相-HPLCを行った。蛍光検出器 (excitation: 295 nm, range: 270 - 300 nm; emission: 350 nm, range: 300 - 400 nm) を利用して、オープン温度55、ランタイム30分の機器条件で標準試料 (International standard ヒト成長ホルモン NIBSC code 98/574) を定量した後、試料前処理過程 (ヒト成長ホルモンを含有したリポソーム溶液を、超音波を利用して破碎した後、50 mM Tris-HCl pH 8.0、1 mM EDTA、8 M ウレア、2% Tween 20 溶液を試料と同じ容量で添加後、ピペティングする) を経て、蛍光検出器を利用してHPLCで

30

40

【0058】

定量の結果、実施例Iの剤形BのLipo-hGHは、約3.69 µg/mlのヒト成長ホルモンを含有していることが分かった。

<<実施例IV: リン脂質含量の分析>>

HPLC (Shimadzu) に Spherisorb S5 NH₂ カラム (Waters) を装着して、溶媒として60%アセトニトリル、30%メタノール及び5% H₂O を使用して、等溶媒濃度勾配 (Isocratic gradient) 方式により、流速1 ml/minでHPLCを行った。紫外線検出器 (215 nm) を利用して、オープン温度35、ランタイム20分の機器条件でリン脂質を、メタノール: クロロホルム (90

50

% : 10%) の溶液に完全に溶解して定量した。同じ方式で本発明のヒト成長ホルモン - 含有リポソーム溶液を、メタノール : クロロホルム (90% : 10%) の溶液に完全に溶解させた後、HPLCで定量した (図5参照)。

【0059】

定量の結果、実施例Iの剤形BのLipo-hGHは、約3.26mg/mlのリン脂質を含有していることが分かった。

<<実施例V : 安定性試験>>

前記実施例Iで製造されたB剤形のヒト成長ホルモン - 含有リポソームの安定性試験を次のように行った : 0.1%メチルパラベンを含有した本発明のLipo-hGHを褐色瓶に入れて、それぞれ4及び15~30に放置し、1週間隔でhGH含量をHPLCで定量して、安定性を調べた。図6から確認できるように、本発明のLipo-hGHは、貯蔵10ヶ月後、4では初期hGH含量の87.5%存在して、室温では、75%存在することを確認した。したがって、本発明のLipo-hGHは、安定性に優れていることが分かる。

10

<<実施例VI : 安定性試験>>

本発明のヒト成長ホルモン含有リポソーム (実施例IのB剤形) の安全性を検査するために、ヒト角質細胞株であるHaCaT (DKFZ, Germany) とヒト胚芽繊維芽細胞であるHEF (gift from Prof. Lee, Jaeyong, Department of Biochemistry, School of Medicine, Hallam University) に対する細胞毒性を調べた。

20

【0060】

HaCaTとHEFを、それぞれ 1×10^5 細胞/ml及び 5×10^4 細胞/mlの濃度で10%FBS/DMEM (FD培地) に懸濁して、これを24ウェルプレートに1ml添加した後、37、5%CO₂インキュベータで一日間培養した。培養1日後、上層培地を注意深く除去し、適切な量の10%FD培地と濃度別に用意した試料をプレートのウェルに添加して、37、5%CO₂インキュベータで一日間反応した。試料として利用されたものは、緩衝液 (20mMNa-PI, pH7.0、1mMEDTAおよび0.1%メチルパラベン含有)、リポソーム、ヒト成長ホルモン、及び実施例IのB剤形のNanolipo-hGHである。反応後、細胞の生存力を、3-(4,5-ジメチルチアゾール-2-イル)-2,5-ジフェニルテトラゾリウムブロマイド (MTT: Sigma, USA) を利用して測定した (Shearman et al., Proc. Natl. Acad. Sci. 91 (4): 1470-4 (1994), Shearman et al., J. Neurochem. 65 (1): 218-27 (1995) 及び Kaneko et al., J. Neurochem. 65 (6): 2585-93 (1995))。MTT反応結果物に対し、ELIASリーダー (Molecular Devices, USA) を利用して、570nmにおける吸光度を測定した。各試料による生存度は、試料が添加されていないウェルの吸光度を100%として、相対的な値で示した (図7)。

30

【0061】

図7から確認できるように、本発明のhGH含有ナノリポソームは、HaCaTとHEFの細胞生存度に影響を及ぼさないことが分かり、つまり生体に非常に安全な剤形であることが分かる。

40

<<実施例VII : ナノリポソーム剤形のLipo-hGHのNb₂細胞増殖の分析>>

Nb₂nobl rat lymphoma cell line (NIBSC ECACC #97041101) 1×10^5 細胞/ml 50µlが入っている96ウェルプレートのウェルに、S-hGH (標準ヒト成長ホルモン、Standard human growth hormone, NIBSC code 98/574)、S-hGHに1000倍希釈された試料前処理溶液 (ヒト成長ホルモンを含有していないリポソーム溶液を超音波 (sonicator) を利用して破砕後、50mMTris-Cl pH8.0、1mMEDTA、8Murea, 2%Tween 20溶液を試料と同じ容量で添加後、ピペティング) が添加された試料、または、試料前処理過程 (ヒト成長ホルモンを含有した

50

リポソーム溶液を超音波 (sonicator) を利用して破碎後、50 mM Tris - Cl pH 8.0、1 mM EDTA、8 M urea、2 % Tween 20 溶液を試料と同じ容量で添加後、ピペティング) を経た実施例 I の B 剤形 Nanolipo - hGH (N - hGH) を 1000 倍希釈した溶液が添加された試料を添加した。5 日間、37、5 % CO₂ で培養した後、増殖された細胞の量を、MTT を利用して測定した。hGH が添加されていない対照群の平均吸光度を 100 % とした時、試料が添加された群の相対的な値を計算した。

【0062】

図 9 から分かるように、本発明の Nanolipo - hGH に包囲されたヒト成長ホルモンは、本来の活性を維持していることが分かる。

10

<<実施例 V I I I : 粒子大きさ分布の分析>>

前記実施例においてゲル透過クロマトグラフィで分離した剤形 B の Lipo - hGH を、Particle Size Analyzer (Mastersizer 2000/Malvern Instruments Ltd.) を利用して、屈折率 1.52 で粒子大きさ分布を分析した (図 13 参照)。図 13 から分かるように、本発明の Lipo - hGH の粒子大きさは、0.193 μm 大きさで最大分布を示し、剤形 B の Lipo - hGH は、ナノ大きさで存在することが分かる。

<<実施例 I X : シワ改善効能の分析>>

4 週齢の無毛マウス (韓国化学研究院から購入) と実施例 I の B 剤形 Nanolipo - hGH (N - hGH) を利用して実験した。動物飼育室の温度は、22 ± 2、湿度は、55 ~ 60 % に維持して、明暗循環が 12 時間サイクルで調節されるようにして、放射線照射で滅菌した固形飼料 (中央実験動物、Seoul, Korea) と滅菌した給水を自由に摂取するようにした。2 週間ほどの適応期間を経た。このようなヌードマウスの背中部位にシワを誘導するために、UVB - 20 mJ を 1 週 3 回照射する方式で 8 週間照射した。その後、化粧用ブラシを利用して、UVB が照射された背中に試料及び対照群溶液を 8 週間塗布した。その後、シワ改善効果を Donald 方法 (Hyun - Seok Kim et al, Mech. Ageing Dev. (2005.8.16 in press)) により評価した。

20

【0063】

実験結果は、図 8 及び図 14 に示されている。図 8 において、対照群 (n = 3) は、何の処理もしなかった群であり、UVB - 対照群 (n = 3) は、UVB - 20 mJ を処理してシワのみを誘導した群であり、リポソーム (n = 3) は、UVB - 20 mJ を処理してシワを誘導し、リポソームを処理した群であって、Nanolipo - hGH (n = 3) は、UVB - 20 mJ を処理してシワを誘導し、本発明の Nanolipo - hGH を処理した群である。図 8 及び図 14 から分かるように、本発明の Nanolipo - hGH は、UV により誘導されたシワを効果的に除去して、その効果は、局所投与後、約 2 週間後から明らかに現れていることが分かる。

30

<<実施例 X : ニキビ治療効能の分析>>

本発明のヒト成長ホルモン - 含有リポソームのニキビ治療効能を次のように調べた：

15 ~ 40 歳の女性のうち、顔の肌にニキビを有する 60 名を、20 名ずつランダムに三つのグループに分けて、前記実施例 I の hGH 含有リポソーム剤形 B 型 (剤形 1)、リポソームのみの比較溶液 (剤形 2)、比較緩衝溶液 (剤形 3) を、それぞれ 3 週間、朝/夜の一日 2 回ずつ、洗顔後最も先に使用するようにした。その他には、普段使用していた化粧品に対する制限はなかった。その後、使用者の意見により、ニキビに対する改善程度を下記の評価基準にしたがって判定した。試験結果は、表 1 に示した。

40

【0064】

評価基準：+++ (非常に良好な改善効果がある)、++ (相当な改善効果がある)、+ (若干の改善効果がある)、± (改善効果はないが、悪化してもいない)、- (悪化している)

【0065】

50

【表 1】

期間	剤形 1	剤形 2	剤形 3
1 週間後	+	±	±
2 週間後	++	+	±
3 週間後	+++	+	±

10

【 0 0 6 6 】

表 1 から分かるように、本発明の剤形は、ニキビに対する改善程度が非常に優れていることが分かり、ニキビ改善効果は、アプリケーション後約 2 週間後から明らかに現れ始めた。しかも、本発明の組成物は、皮膚に対する刺激、例えば、紅斑または痒みをほとんど誘発しなかった。

20

<<実施例 X I : シミ除去効能の分析>>

本発明のヒト成長ホルモン - 含有リポソームのシミ除去効能を次のように調べた：

40 ~ 60 歳の女性のうち、顔の肌にシミを有する 60 名を、20 名ずつランダムに三つのグループに分けて、前記実施例 I の hGH 含有リポソーム剤形 B 型（剤形 1）、リポソームのみの比較溶液（剤形 2）、比較緩衝溶液（剤形 3）を、それぞれ 8 週間、朝/夜の一日 2 回ずつ、洗顔後最も先に使用するようにした。その他には、普段使用していた化粧品に対する制限はなかった。その後、使用者の意見により、シミに対する改善程度を下記の評価基準にしたがって判定した。試験結果は、表 2 に示した。

30

【 0 0 6 7 】

評価基準：+++（非常に良好な改善効果がある）、++（相当な改善効果がある）、+（若干の改善効果がある）、±（改善効果はないが、悪化してもいない）、-（悪化している）

【 0 0 6 8 】

【表 2】

期間	剤形 1	剤形 2	剤形 3
1 週間後	±	±	±
2 週間後	±	±	±
3 週間後	+	±	±
4 週間後	+	±	±
5 週間後	++	+	±
6 週間後	++	+	±
7 週間後	++	+	±
8 週間後	++	+	±

10

20

【0069】

表 2 から分かるように、本発明の剤形は、シミに対する改善程度が非常に優れていることが分かり、シミ改善効果は、アプリケーション後約 3 ~ 5 週間後から明らかに現れ始めた。しかも、本発明の組成物は、皮膚に対する刺激、例えば、紅斑または痒みをほとんど誘発しなかった。

<<実施例 X I I : ナノリポソーム剤形の L i p o - h G H のローカリゼーション及び皮膚に及ぼす影響の分析>>

スプラグドリー (S p r a g u e D a w l e y) ラットの腹部部分を六つの区域 (それぞれ半径 1cm の円) に分けて、次の試料を処理した。0 . 1 % メチルパラベン緩衝液、0 . 1 % リポソーム、0 . 0 0 1 U h G H、0 . 0 0 0 1 U h G H、0 . 0 0 1 U L i p o - h G H、及び 0 . 0 0 0 1 U L i p o - h G H。

30

【0070】

24 時間毎に 50 μ l ずつ 2 回処理して、計 7 回処理した。そして、最後の試料処理後、24 時間が経ったら、ラットから組織を採取した。採取した組織を 40 μ m 厚に断片化して、1 次抗体としてポリクロナルラビット抗 - ヒト成長ホルモン抗体 (D A K O , U . S . A .) を処理した後、2 次抗体としてビオチンが結合されている a n t i - r a b b i t a n t i b o d y (V E C T O R . V E C T A S T A I N A B C k i t (R A B B I T I g G) , U . S . A .) を室温で 30 分間処理した。その後、V E C T A S T A I N A B C r e a g e n t (V E C T O R , U . S . A .) で室温で 30 分間処理し、D A B 基質 (D i a m i n o b e n z i d i n e , S i g m a , U S A) で発色反応させた。78 % エタノール、85 % エタノール、95 % エタノール、及び 100 % エタノールで順に脱水した後、キシレンで 5 分間処理した。組織をスライドガラスに固定した後、L i p o - h G H に含有されたヒト成長ホルモンの位置を観察した。

40

【0071】

図 10 a から分かるように、本発明の L i p o - h G H に包囲されたヒト成長ホルモンまたはラットが元々有しているラット成長ホルモンが、毛嚢のバルジ幹細胞と見なされる位置で確認されることが分かる。

【0072】

また、図 10 b から分かるように、本発明の L i p o - h G H (0 . 0 0 0 1 U の h G

50

H含有)が塗布されたラットの皮膚において真皮層が広がって、毛嚢の数が増えたことが分かる。さらに、図10bにおいて、hGH水溶液のみを皮膚に塗布した場合も、毛嚢のバルジ幹細胞位置にhGHが到達していることが分かるが、このような発見は、当業界の技術水準と常識からみて、非常に驚異的なことである。この結果は、リポソームで包囲されたhGHだけではなく、hGH水溶液自体を皮膚に塗布する場合も、皮膚状態の改善を達成することができるという可能性を示す。

<<実施例XIII：ナノリポソーム剤形のLipo-hGHがマウス皮膚に及ぼす影響の分析>>

実施例Iで製造した本発明のナノリポソーム剤形のLipo-hGHがICRマウスの皮膚に及ぼす影響をH&E(Hematoxylin & Eosin)染色により分析した。まず、ICRマウスの背中の毛を除去した後、脊椎を中心に分けて、対照群と本発明のLipo-hGHを4時間毎に2週間処理した：グループ1(3匹)、非処理；グループ2(3匹)、リポソーム/0.1U本発明のLipo-hGH処理；グループ3(3匹)、リポソーム/0.01U本発明のLipo-hGH処理；グループ4(3匹)、リポソーム/0.001U本発明のLipo-hGH処理。2週間処理後、マウスから組織を採取した。採取した組織をパラフィンブロックに作って、4μm厚に断片化し、スライドガラス上に載置した。次いで、前記断片から脱パラフィンした後、ヘマトキシリン溶液で室温で10分間処理した後、エオシン溶液で室温で1分間処理した。78%エタノール、85%エタノール、95%エタノール、及び100%エタノールで順に脱水した後、キシレンで5分間処理した。組織を固定化した後、顕微鏡下で染色された組織を観察した。

【0073】

図11aから分かるように、本発明のナノリポソーム剤形のLipo-hGHを処理した皮膚の表皮層で細胞の増殖が大いに増加することが分かり、真皮層では、結合組織のリモデリングが発生し、より緻密な結合組織が形成されることが分かる。図11bは、400倍拡大像であって、真皮層で結合組織のリモデリングが発生したことを、より明確に確認することができる。

<<実施例XIV：ナノリポソーム剤形のLipo-hGHが人工皮膚に及ぼす影響の分析>>

Neoderm-EDTM(Tego Science, South Korea)を利用して、本発明のナノリポソーム剤形のLipo-hGHが人工皮膚に及ぼす影響を分析した。Neoderm-EDTMは、インビトロ(In vitro)試験のための人間皮膚モデルであって、表皮と真皮マトリックスから構成されている。実験群は、グループ1は、非処理、グループ2は、緩衝液のみを処理、グループ3と4は、リポソーム処理、グループ5及び6は、それぞれ0.001unit及び0.01unitの本発明のLipo-hGH処理群である。パラフィン包埋及びH&E染色は、前記実施例と同様に行った。最終的に顕微鏡下で染色された組織を観察した。

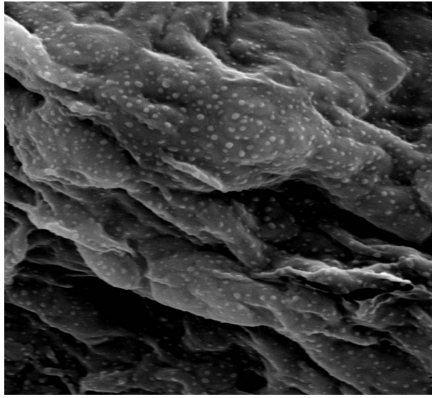
【0074】

図12から分かるように、本発明のナノリポソーム剤形のLipo-hGHを処理したNeoderm-EDTMの角質細胞層において、細胞の増殖が活発になされた。

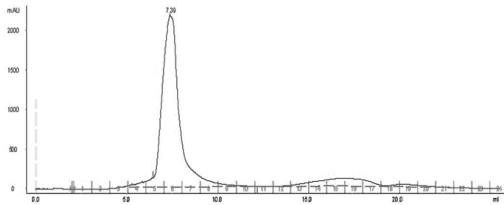
【0075】

以上、本発明の望ましい具現例を詳細に記述したが、当業界の通常の知識を有する者にとっては、このような具体的な記述はただ望ましい具現例に過ぎなく、これに本発明の範囲が限定されないことは明らかである。従って、本発明の実質的な範囲は、添付の請求項とその等価物により定義されると言える。

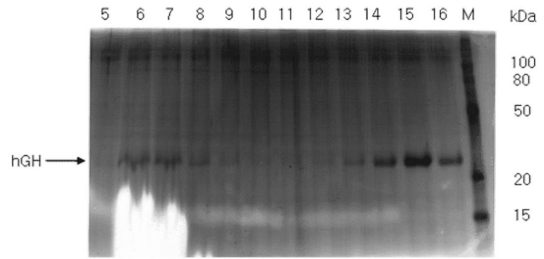
【図1】



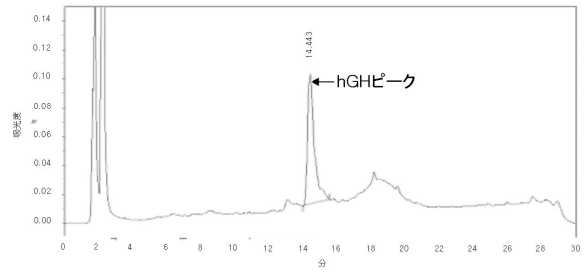
【図2】



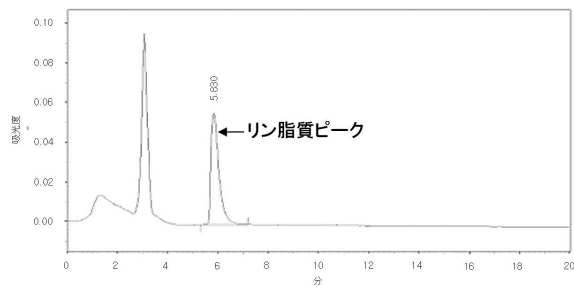
【図3】



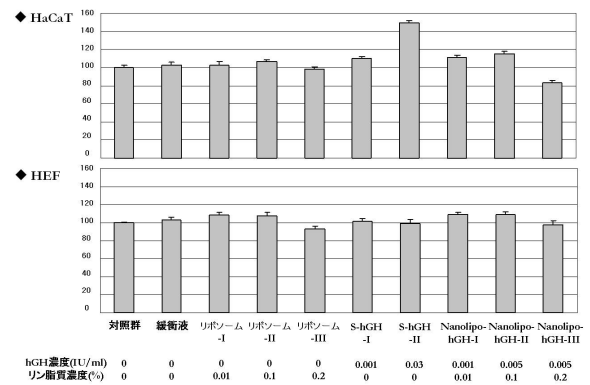
【図4】



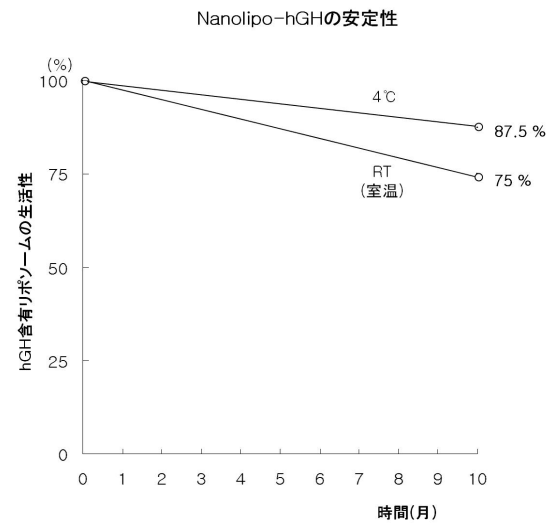
【図5】



【図7】



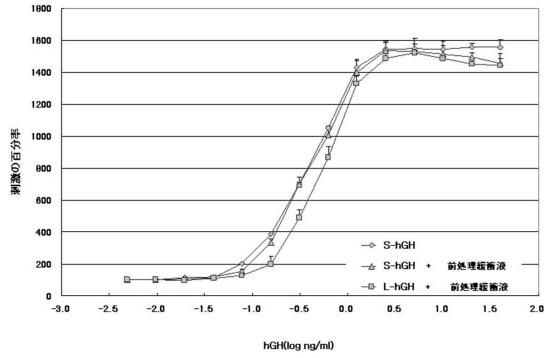
【図6】



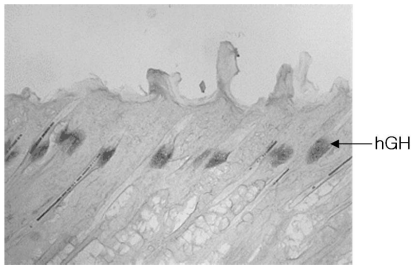
【図8】



【図9】

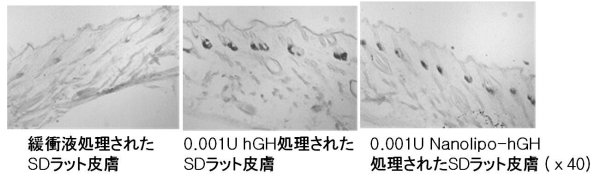


【図10a】

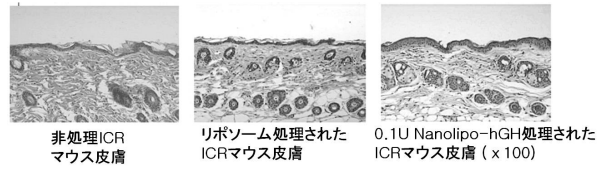


0.001 U Nanolipo-hGH処理されたSDラット皮膚 (x 40)

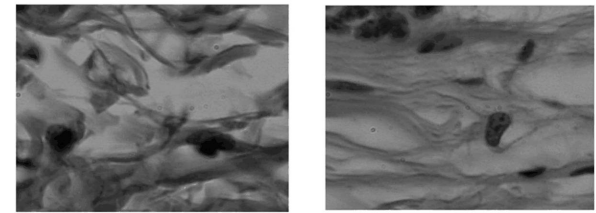
【図10b】



【図11a】



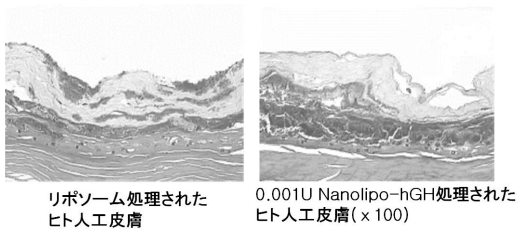
【図11b】



非処理ICRマウス皮膚

0.1U Nanolipo-hGH処理されたICRマウス皮膚 (x 400)

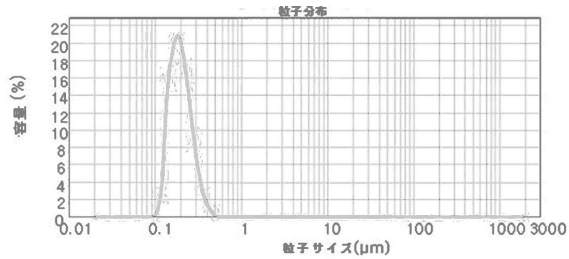
【図12】



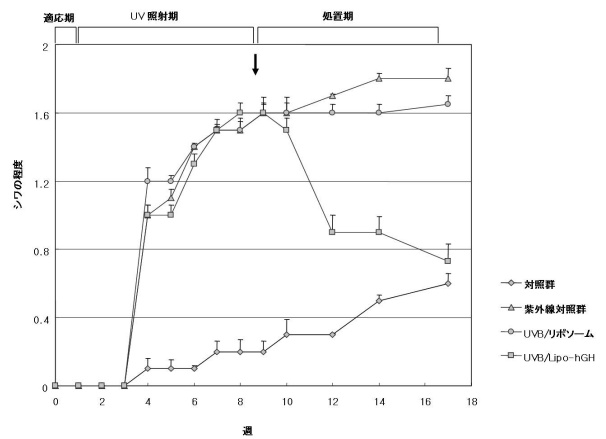
リポソーム処理されたヒト人工皮膚

0.001U Nanolipo-hGH処理されたヒト人工皮膚 (x 100)

【図13】



【図14】



フロントページの続き

(51)Int.Cl. F I
A 6 1 P 17/14 (2006.01) A 6 1 P 17/14
A 6 1 K 8/55 (2006.01) A 6 1 K 8/55

審査官 池田 周士郎

(56)参考文献 特表平05-506663(JP,A)
米国特許出願公開第2007/0224150(US,A1)
Kanga,V., Sophisticated cosmetic ingredients, Househ. Pers. Prod. Ind., Vol.42, No.6,
P.55,56,58,60,61
松山淳 外4名, (財) 博慈会 老人病研究所 紀要Vol.12(総説) 『本邦におけるアンチ・エイジ
ング医療の実情』, 未病と抗老化, 日本, 博慈会老人病研究所, 2003年 8月, Vol.12, No.1
, P.23-29

(58)調査した分野(Int.Cl., DB名)

A 6 1 K 8 / 0 0 - 8 / 9 9
A 6 1 Q 1 / 0 0 - 9 0 / 0 0
A 6 1 K 9 / 0 0 - 9 / 7 2
A 6 1 K 3 8 / 2 7
A 6 1 P 1 7 / 0 0 - 1 7 / 1 8
J S T P l u s / J M E D P l u s / J S T 7 5 8 0 (J D r e a m I I I)
M i n t e l G N P D