

(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2006-513134

(P2006-513134A)

(43) 公表日 平成18年4月20日(2006.4.20)

(51) Int. Cl.	F I	テーマコード (参考)
A 6 1 K 8/00 (2006.01)	A 6 1 K 7/06	2 G 0 4 5
A 6 1 Q 5/00 (2006.01)	A 6 1 K 45/00	4 B 0 6 3
A 6 1 K 45/00 (2006.01)	A 6 1 P 17/16	4 C 0 8 3
A 6 1 P 17/16 (2006.01)	A 6 1 P 43/00 1 0 5	4 C 0 8 4
A 6 1 P 43/00 (2006.01)	C 1 2 Q 1/02	
	審査請求 有 予備審査請求 未請求	(全 39 頁) 最終頁に続く

(21) 出願番号	特願2004-510689 (P2004-510689)	(71) 出願人	391023932 ロレアル
(86) (22) 出願日	平成15年6月10日 (2003.6.10)		フランス国パリ, リュ ロワイヤル 1 4
(85) 翻訳文提出日	平成17年2月9日 (2005.2.9)	(74) 代理人	100064908 弁理士 志賀 正武
(86) 国際出願番号	PCT/FR2003/001728	(74) 代理人	100089037 弁理士 渡邊 隆
(87) 国際公開番号	W02003/103568	(74) 代理人	100108453 弁理士 村山 靖彦
(87) 国際公開日	平成15年12月18日 (2003.12.18)	(74) 代理人	100110364 弁理士 実広 信哉
(31) 優先権主張番号	02/07136	(72) 発明者	ステファヌ・コンモ フランス・F-75015・パリ・アヴニ ユ・ドゥ・ラ・ポルト・ドゥ・ラ・プレー ヌ・5
(32) 優先日	平成14年6月11日 (2002.6.11)		
(33) 優先権主張国	フランス (FR)		
(31) 優先権主張番号	60/389,736		
(32) 優先日	平成14年6月19日 (2002.6.19)		
(33) 優先権主張国	米国 (US)		

最終頁に続く

(54) 【発明の名称】 毛包メラノサイト保護剤としてのドーパクロムトートメラゼ (TRP-2) の発現誘導剤の使用、およびその使用

## (57) 【要約】

本発明は、毛包メラノサイト保護剤として、ドーパクロムトートメラゼの発現誘導剤を化粧品に使用することに関する。本発明はまた、化粧品として許容し得る媒質中にドーパクロムトートメラゼ (TRP-2) の発現誘導剤を少なくとも1つ含む、白髪に対抗するための特定の化粧品組成物およびその使用に関する。本発明はさらに、ドーパクロムトートメラゼの発現誘導剤を少なくとも1つ含む化粧品組成物を適用することによって、白髪を処置する方法およびグレーまたは白い毛の自然の色素形成を保持する方法に関する。最後に、本発明は、ドーパクロムトートメラゼ (TRP-2) の発現誘導剤を同定する方法およびその作用剤の細胞保護活性を評価する方法に関する。

## 【特許請求の範囲】

## 【請求項1】

毛包メラノサイト保護剤としての、ドーパクロムトートメラゼ発現誘導剤の化粧品への使用。

## 【請求項2】

ドーパクロムトートメラゼの発現を誘導する前記作用剤が、毛球の活性メラノサイトおよび毛包上面域の静態メラノサイトの集団を維持および/または再生することにより、毛包のメラノサイト消失に対抗することを意図したものであることを特徴とする請求項1に記載の使用。

## 【請求項3】

ドーパクロムトートメラゼの発現を誘導する前記作用剤が、毛包色素形成ユニットの周期的再生を促進することを意図したものであることを特徴とする請求項1または2に記載の使用。

## 【請求項4】

ドーパクロムトートメラゼの発現を誘導する前記作用剤が、白髪発現を防止および/または制限および/または阻止することを意図したものであることを特徴とする請求項1から3のいずれか一項に記載の使用。

## 【請求項5】

ドーパクロムトートメラゼの発現を誘導する前記作用剤が、グレーの頭髮および/または体毛の自然な色素形成を維持することを意図したものであることを特徴とする請求項1から3のいずれか一項に記載の使用。

## 【請求項6】

ドーパクロムトートメラゼの発現を誘導する前記作用剤が、ヘキサメチレンビスアセトアミド(HMBA)、ジエチルステイルベストロール、グリシルリチン、フォルスコリン、およびドーパクロムトートメラゼ(TRP-2)プロモーターの上流に位置する内因性因子のモジュレーターまたはドーパクロムトートメラゼ(TRP-2)をコードする発現ベクター、またはSox10などのドーパクロムトートメラゼ(TRP-2)の発現誘導剤をコードする発現ベクターの中から選択されることを特徴とする、請求項1から5のいずれか一項に記載の使用。

## 【請求項7】

化粧品として許容し得る媒質中に、ヘキサメチレンビスアセトアミド(HMBA)、グリシルリチン、およびドーパクロムトートメラゼ(TRP-2)プロモーターの上流に位置する内因性因子のモジュレーターまたはドーパクロムトートメラゼ(TRP-2)をコードする発現ベクターまたはSox10などのドーパクロムトートメラゼ(TRP-2)の発現誘導剤をコードする発現ベクターの中から選択されるドーパクロムトートメラゼ(TRP-2)の発現誘導剤を少なくとも1つ含む、白髪に対抗するための化粧品組成物。

## 【請求項8】

単位体積当たり、0.001~10重量%、好ましくは0.01~5重量%、さらに好ましくは0.1~1重量%のドーパクロムトートメラゼの発現誘導剤を含むことを特徴とする請求項7に記載の組成物。

## 【請求項9】

経口投与に好適であることを特徴とする請求項7または8に記載の組成物。

## 【請求項10】

頭皮および/または体毛に覆われている皮膚領域への局所適用に好適であることを特徴とする請求項7または8に記載の組成物。

## 【請求項11】

ヘアスタイリングクリームもしくはゲル、ヘアローション、特にヘアセットローションもしくはトリートメントローションもしくは髪再構築ローション、染色組成物、シャンプーまたはコンディショナーであることを特徴とする請求項10に記載の組成物。

## 【請求項12】

化粧品として許容し得る媒質中に、マイクロ球、ナノ球、オレオソームまたはナノカプ

10

20

30

40

50

セルなどの被膜に封入されたドーパクロムトートメラゼの発現誘導剤を少なくとも1つ含む、白髪に対抗するための組成物。

【請求項13】

ドーパクロムトートメラゼの発現を誘導する前記作用剤が封入された被膜の直径が、10 μm以下であることを特徴とする請求項12に記載の組成物。

【請求項14】

ドーパクロムトートメラゼの発現を誘導する前記作用剤が、ヘキサメチレンビスアセトアミド(HMBA)、ジエチルステイルベストロールおよび/またはエストラジオールなどのステロイドホルモン類、グリシルリチン、フォルスコリン、カンフェロール、ドーパクロムトートメラゼ(TRP-2)プロモーターの上流に位置する内因性因子のモジュレーターまたはドーパクロムトートメラゼ(TRP-2)をコードする発現ベクターまたはSox10などのドーパクロムトートメラゼ(TRP-2)の発現を誘導する前記作用剤をコードする発現ベクターから選択されることを特徴とする、請求項12または13に記載の組成物。

10

【請求項15】

ドーパクロムトートメラゼの発現を誘導する前記作用剤が、頭皮の落屑状態に対抗する作用剤、毛の再成長を促進する作用剤および色素形成促進活性を有する植物抽出物の中から選択される別の活性剤と併用されることを特徴とする、請求項7から14のいずれか一項に記載の組成物。

【請求項16】

請求項7から15のいずれか一項に記載のドーパクロムトートメラゼの発現誘導剤を少なくとも1つ含む組成物を、処置対象である領域に投与または適用することを特徴とする、白髪の美容処置方法。

20

【請求項17】

請求項7から15のいずれか一項に記載のドーパクロムトートメラゼの発現誘導剤を少なくとも1つ含む組成物を、処置対象である領域に投与または適用することを特徴とする、グレーまたは白の頭髮および/または体毛の自然の色素形成を維持することを意図した白髪の美容処置方法。

【請求項18】

a.メラノサイトがドーパクロムトートメラゼを発現しない培地で、メラノサイトの集団を培養する工程、  
b.ドーパクロムトートメラゼ発現の誘導活性を試験することが望まれる化合物を前記培地に添加する工程、  
c.前記化合物が誘導剤である場合にメラノサイトがドーパクロムトートメラゼを発現し得るに十分な期間、メラノサイトをインキュベートする工程、  
d.ドーパクロムトートメラゼの発現を測定する工程、および  
e.ドーパクロムトートメラゼの発現を誘導する化合物を選択する工程を含む、ドーパクロムトートメラゼの発現誘導剤を同定する方法。

30

【請求項19】

メラノサイトによるドーパクロムトートメラゼの発現を、ドーパクロムトートメラゼをコードするメッセンジャーRNAを測定することによって決定することを特徴とする、請求項18に記載の方法。

40

【請求項20】

ドーパクロムトートメラゼをコードするメッセンジャーRNAの測定を、RT-PCR法、ノーザンブロット法または示差表示法によって実施することを特徴とする請求項19に記載の方法。

【請求項21】

メラノサイトによるドーパクロムトートメラゼの発現を、ドーパクロムトートメラゼの測定によって決定することを特徴とする、請求項18に記載の方法。

【請求項22】

ドーパクロムトートメラゼの発現を、エンザイムイムノアッセイ法、ウェスタンブロ

50

ット法、免疫沈降法、免疫組織化学法、HPLCまたは塩基配列決定法によって検出することを特徴とする請求項21に記載の方法。

【請求項23】

メラノサイトによるドーパクロムトートメラゼの発現を、培地におけるドーパクロムトートメラゼ活性の測定によって決定することを特徴とする請求項18に記載の方法。

【請求項24】

白髪の発現を防止しかつ/もしくは制限しかつ/もしくは阻止するための、および/またはグレーもしくは白の頭髮および/または体毛の自然の色素形成を維持するための美容処置方法における、請求項18から23のいずれか一項に記載の方法によって同定されたドーパクロムトートメラゼ発現誘導剤の使用。

10

【請求項25】

白髪の発現を防止し、かつ/もしくは制限し、かつ/もしくは阻止すること、ならびに/またはグレーもしくは白の頭髮および/もしくは体毛の自然の色素形成を維持することを意図した化粧品組成物の調製のための、請求項18から23のいずれか一項に記載の方法によって選択されたドーパクロムトートメラゼ発現誘導剤の使用。

【請求項26】

a. レポーター遺伝子上流に位置するドーパクロムトートメラゼ遺伝子のプロモーター領域を含むプラスミドベクターを構築する工程、

b. 工程(a)で得られたプラスミドベクターを細胞集団に移入する工程、

c. ドーパクロムトートメラゼプロモーターの活性誘導能を測定することが望まれる化合物を、工程(b)で得られた2つの細胞集団のうち一方の細胞集団の培地に添加する工程、および

20

d. 工程(c)で得られた細胞集団におけるレポーター遺伝子の発現と、試験化合物と共にインキュベートしていない工程(b)で得られた細胞集団におけるレポーター遺伝子の発現とを比較することによって、ドーパクロムトートメラゼ(TRP-2)プロモーターの活性を誘導する化合物を選択する工程

を含むことを特徴とする、ドーパクロムトートメラゼ(TRP-2)プロモーターの活性誘導剤の同定方法。

【請求項27】

a. TRP-2の発現を低い基礎発現量に制限するような培地で、メラノサイトの集団を培養する工程、

b. ドーパクロムトートメラゼ発現を誘導する化合物を、前記培地に添加する工程、

c. メラノサイトがドーパクロムトートメラゼを発現し得るに十分な期間、メラノサイトをインキュベートする工程、

d. 前記細胞を、アポトーシスまたは老化を誘導する条件に曝露する工程、

e. 細胞毒性を測定する工程、および

f. 細胞保護効果を有する、ドーパクロムトートメラゼの発現を誘導する化合物を選択する工程

を含むことを特徴とする、請求項18から23のいずれか一項に記載の方法によって同定されたドーパクロムトートメラゼの発現誘導剤の細胞保護活性を評価する方法。

40

【請求項28】

工程(d)が細胞をシスプラチンで処理することから成ることを特徴とする請求項27に記載の方法。

【発明の詳細な説明】

【技術分野】

【0001】

本発明は、毛包メラノサイト保護剤として、ドーパクロムトートメラゼの発現誘導剤を化粧品に使用することに関する。特に、ドーパクロムトートメラゼの発現誘導剤によって毛球の活性メラノサイトおよび毛包上面域の静態メラノサイト(quiescent melanocytes)の集団を維持および/または再生することにより、毛包のメラノサイト消失に対抗す

50

ることを意図するものである。

【背景技術】

【0002】

毛包は、真皮深層にまで達する表皮の管状陥入鞘である。その基底部、すなわち毛球はそれ自体、陥入鞘を含んでおりそこには真皮乳頭がある。毛球の基底部は、毛髪を構成する角質化した細胞の前駆体が見られる細胞増殖域である。これら前駆体から誘導される上行性細胞は、毛球の上部において徐々に角質化し、この一群の角質化した細胞が毛幹を形成することになる。

【0003】

頭髪の色および体毛の色は、特に2つのグループのメラニン、すなわちユーメラニン(茶色および黒色素)とフェオメラニン(赤色および黄色色素)が様々な量および比率で存在することによって決まる。頭髪および体毛の色素形成には、毛包の球部にメラノサイトが存在することが必要である。これらメラノサイトは活性な状態にある。つまり、メラニンを産生する。これら色素は毛幹を形成すべく角化細胞に送られ、その結果色素形成した頭髪または体毛が成長することになる。以下、このような構造を「色素形成の毛包ユニット」と呼ぶ。

【0004】

哺乳動物の場合、メラニン形成には少なくとも3つの酵素、すなわちチロシナーゼ、ドーパクロムトートメラゼ(TRP-2、チロシナーゼ関与タンパク2)およびDHICA(ディーカ)オキシダーゼ(TRP-1、チロシナーゼ関与タンパク1)が関与している。

【0005】

チロシナーゼは、メラニンの生合成を開始する酵素である。チロシナーゼはまた、メラニン形成を制限する酵素であるとも言われる。

【0006】

TRP-2は、ドーパクロム5,6-ジヒドロキシインドール-2-カルボン酸(DHICA)の互変異性化を触媒する。TRP-2の非存在下では、ドーパクロムは自然に脱炭酸されて5,6-ジヒドロキシインドール(DHI)を形成する。

【0007】

DHICAとDHIはいずれも色素の前駆体であり、TRP-1はDHICA分子を酸化してキノン誘導体を形成する。(Pawelek JM and Charkraborty AK. The enzymology of melanogenesis. In :Nordlund JJ, Boissy RE, Hearing VJ, King RA, Ortonne J-P. The Pigmentary System: Physiology and Pathophysiology. New York: Oxford University Press; 1998. p.391-400)

【0008】

これら3つの酵素、チロシナーゼ、TRP-2およびTRP-1はメラニン形成に特異的に関与しているように思われる。また、これら3つの酵素の活性は、従来、ユーメラニンの生合成を最大限活性化するのに必要であると言われている。

【0009】

TRP-2の発現は、黒色マウスの毛の場合、毛球の活性メラノサイトおよび外側上皮鞘の静態メラノサイトの両者に認められる。また、黒色マウスにおいては、ドーパクロムトートメラゼ活性が成長期に高くなることは知られている。しかし、TRP-2の発現と色素形成の強さとの相関関係については、いまだ明らかにされていない(Sturm他、1995年)。

【0010】

また、TRP-2は、シス-ジクロロジアミン白金(II)などのDNAを損傷する作用剤に抵抗してメラノサイトが発現する酵素であるとも言われてきた(Chu他2000年およびPak他2000年)。これらの結果は、TRP-2がメラニン形成とは無関係な機能にも関与していること、すなわち、酵素TRP-2が細胞保護の役割を果たしているかもしれぬことを示唆するものである。

【0011】

頭髪および体毛には周期がある。この周期は、成長期(アナージェン)、退行期(カタージェ

ン)および休止期(テロゲン)を含んでおり、この休止期の後には新たな成長期が現れる。この毛周期のために、表皮色素形成ユニットとは異なり、毛包色素形成ユニットは周期的に再生される。

【0012】

最近、ヒトにおけるこのプロセスが説明されている(Commo S.およびBernard B., 2000年、Pigment Cell Res. 13:253-259)。テロゲンからアナーゲンへの移行期間にテロゲンカプセルに含まれる不活性メラノサイトの一部が増殖し、それらが新生毛球の真皮乳頭の周囲に位置して、メラニンの合成に必要な酵素の発現を開始すること、すなわちこのメラノサイトの集団が毛球の活性メラノサイトと一致することがより具体的に示されている。また、メラノサイトの他の部分が毛包の上面域に不活性のまま存在すること、すなわちこのメラノサイトの集団が毛包の上面域の静態メラノサイトに一致することが示されている。

10

【0013】

これらのメラニン形成酵素は、アナーゲン相の全期間にわたって毛球のメラノサイトにおいて発現されるが、カタージェンおよびテロゲンの両期間中にはもはや発現されない。ヒト毛包におけるメラノサイトの正常な周期には、毛包色素形成ユニットを再生するために周期的に活性化される毛包の上面域、別名「貯蔵庫」といわれる域に、静態メラノサイトが存在することが必要である。色素形成の維持に参与するこの細胞再生のメカニズムは、毛包色素形成ユニットに特異的なものであり、表皮色素形成ユニットには見られない。

【0014】

白髪(毛の自然な白化)が毛幹のメラニンの減少と関連していることは、一般に認められている。しかし、この減少の理由については、今日まで明らかにされていない。幾つかの仮説によれば、皮膚の色素形成のメカニズムからの類推によって、メラニン形成の活性の減少と関連づけられ、また、メラニン移送における障害または毛球におけるメラノサイト数の減少(TobinおよびPaus, 2001年)と関連づけられている。しかし、今日まで、毛の色素形成のいずれの論証も、これらの仮説を立証するにはいたっていない。

20

【0015】

ここで、本出願人は、白髪が毛球における活性メラノサイト数の減少および毛包の上面域における静態メラノサイト数の減少と関連があるとする前記仮説の正当性を初めて立証するような、2つの結果を明示する。このメラノサイトの時期尚早な減少および/または消失は、毛包に特異的であって、表皮に明らかな影響を及ぼすことはない。

30

【0016】

これまでは、白髪の毛包には静態メラノサイトが存在していると実際考えられていた(Takada他、1992年、Horikawa他、1996年、JennerおよびRandall、2000年)。

【0017】

しかし、本出願人は、白髪の進行が、限られた数であるが、メラニンを産生し運んでいる毛球のメラノサイトの数の減少と関連していることに気づいた。また本出願人は、意外なことにまた驚くべきことに、ヒト毛包の上面域(別名「貯蔵庫」とも呼ばれる)における静態メラノサイトの集団も、白髪プロセスの間に減少しており、その近傍の漏斗部および表皮とは異なり、白髪が非常に少数のメラノサイトしか有していないかまたはメラノサイトを全く有していないことに気づいた。このメラノサイトの消失が、毛に含まれるメラノサイトに時期尚早かつ特異的に影響を及ぼしているのである。

40

【0018】

したがって、白髪に対抗するためには、ヒト毛包のメラノサイトの消失、すなわち毛球の活性メラノサイトと毛包の上面域の静態メラノサイトの両者に影響を及ぼしているプロセスに対抗することが必要であるように思われる。

【0019】

また本出願人は、意外なことに、酵素TRP-2が、白人、アジア人およびアフリカ人の色素形成(茶、黒および赤)したヒト毛包のメラノサイトでは発現しないことに気づいた。この酵素は、毛球の活性メラノサイトおよびヒト毛包の上面域の静態メラノサイトいずれに

50

においても検出されないが、白人、アジア人およびアフリカ人の表皮および漏斗部においては発現する。TRP-2の欠損が、TRP-2を発現しないメラノサイト、つまり毛包の上面域の静態メラノサイトおよび毛球の活性メラノサイトの時期尚早な消失と関連しているのである。

【0020】

そこで、本出願人は、表皮色素形成ユニットにおけるメラニン形成(メラニン産生)に役割を果たしているTRP-2が、毛包色素形成ユニットにおいてまた別のそして今まで知られていなかった役割を果たすであろうことを立証した。すなわち、TRP-2の誘導によって、毛包の上面域の静態メラノサイトの集団および毛球の活性メラノサイトの集団が維持されかつ/または再生され、それによって頭髮、まつげおよび/または体毛の色素形成が確実に維持されるような毛包ユニットの周期的再生が促進されるであろうことを立証した。

10

【0021】

本出願人は、TRP-2の産生を誘導することが可能であることを明らかにした。本出願人は、TRP-2の産生を誘導することによって、毛の色素形成の原因となる毛包のメラノサイトの集団を維持しかつ/または再生する手段を確認した。また本出願人は、毛包メラノサイトのアポトーシスおよび/または老化を誘導する条件下でTRP-2誘導作用剤の細胞保護活性を評価した。

【特許文献1】欧州特許願第0375520号

【特許文献2】仏国特許願第0015686号

【特許文献3】仏国特許願第0101438号

20

【特許文献4】欧州特許願第0641557号

【特許文献5】欧州特許願第0705593号

【特許文献6】欧州特許願第0780115号

【特許文献7】仏国特許願第0113337号

【特許文献8】欧州特許願第1010413号

【特許文献9】欧州特許願第1010414号

【特許文献10】欧州特許願第1010415号

【特許文献11】欧州特許願第1010416号

【特許文献12】欧州特許願第1013338号

【特許文献13】欧州特許願第1016453号

30

【特許文献14】欧州特許願第1018363号

【特許文献15】欧州特許願第1020219号

【特許文献16】欧州特許願第1025898号

【特許文献17】欧州特許願第1120101号

【特許文献18】欧州特許願第1120102号

【特許文献19】欧州特許願第1129684号

【特許文献20】欧州特許願第1160005号

【特許文献21】欧州特許願第1172077号

【特許文献22】欧州特許願第0447318号

【特許文献23】欧州特許願第0557489号

40

【特許文献24】米国特許第4,139,619号

【特許文献25】米国特許第4,596,812号

【特許文献26】W096/09048

【特許文献27】欧州特許願第0648488号

【特許文献28】欧州特許願第0964852号

【特許文献29】欧州特許願第1068858号

【特許文献30】仏国特許第2768343号

【特許文献31】仏国特許第2782920A1号

【非特許文献1】Pawelek JM and Charkraborty AK. The enzymology of melanogenesis. In: Nordlund JJ, Boissy RE, Hearing VJ, King RA, Ortonne J-P. The Pigmentary Syst

50

em: Physiology and Pathophysiology. New York: Oxford University Press; 1998. p.391-400

【非特許文献2】Commo S.およびBernard B.、2000年、Pigment Cell Res. 13:253-259

【非特許文献3】Maniatis他のマニュアル、Molecular Cloning:A Laboratory Manual、Joseph Sambrook、E.F.Fritsch、T. Maniatis、Hardcover、Cold Spring Harbor Laboratory Press

【非特許文献4】Current Protocols in Molecular Biology、F.M.Ausubel他編、Wiley Interscience

【非特許文献5】Pawelek JM他、Nature、1980、286:617-619)

【非特許文献6】Aroca PF他、J.Biochem.Biophys.Methods 1990;21:35-46

10

【非特許文献7】Palumbo A他、Biochem.Biophys.Acta 1987;925:203-209

【発明の開示】

【発明が解決しようとする課題】

【0022】

本出願人に従って、白髪を発現を防止および/または制限および/または阻止する手段、およびグレーまたは白髪の毛髪および/または体毛の色素形成を維持する手段を同定した。

【0023】

したがって、本発明の第一の課題は、毛包メラノサイト保護剤として、ドーパクロムトートメラゼの発現誘導剤を化粧品に使用することに関する。

20

【0024】

「毛包メラノサイト保護剤」とは、メラノサイトを保護することができる作用剤、特に、毛包メラノサイトの老化および/またはアポトーシスの原因となる細胞毒性作用剤からメラノサイトを保護することができる作用剤を意味するものとする。細胞毒性作用剤としては、例えば、TNFアルファ、TGFベータ、Fas/CD95リガンド、IL1ベータ、第一鉄および第一銅イオン、シスプラチンおよびオキサリプラチンなどの遺伝子毒性化学化合物、またはシクロホスファアミドなどの化合物といった、遺伝子毒性を有する分子ならびに酸化的ストレスを誘導する分子が挙げられる。

【0025】

特に、本発明によるドーパクロムトートメラゼの発現誘導剤は、毛球の活性メラノサイトおよび毛包の上面域の静態メラノサイトの集団を維持および/または再生することによって、毛包のメラノサイトの消失に対抗することを意図したものである。

30

【0026】

また、本発明によるドーパクロムトートメラゼの発現誘導剤は、毛包色素形成ユニットの周期的再生を促進することを意図したものである。

【0027】

したがって、本発明は、ドーパクロムトートメラゼの発現誘導剤を使用して、白髪を発現を防止および/または制限および/または阻止することに関する。

【0028】

また、本発明は、ドーパクロムトートメラゼの発現誘導剤を使用して、グレーの頭髪および/または体毛の自然のままの色素形成を維持することに関する。

40

【0029】

「ドーパクロムトートメラゼの発現誘導剤」とは、酵素、ドーパクロムトートメラゼの産生を刺激することが可能な化合物を意味するものとする。

【0030】

このような作用剤は、ドーパクロムトートメラゼをコードする発現ベクターである。前記酵素を発現するためのこのようなベクターの構築には、組織特異的プロモーター、特に、メラノサイト特異的プロモーターを使用することが好ましかろう。

【0031】

ドーパクロムトートメラゼ(TRP-2)の発現誘導剤は、特に下記の化合物から選択する

50

ことができる。

- ・ヘキサメチレンビスアセトアミド(HMBA Fang他、2001年)
- ・ジエチルステイルベストロールおよび/またはエストラジオールなどのステロイドホルモン類(Kippenberger他、1998年)
- ・グリシルリチン(Jung他、2001年)
- ・フォルスコリン
- ・カンフェロール

【0032】

ドーパクロムトートメラゼの発現誘導剤は、Sox10の発現モジュレーターなどの、ドーパクロムトートメラゼ(TRP-2)プロモーター活性化能を有する内因性因子のモジュレーターであってもよい。

10

【0033】

本発明の別の変形態様においては、ドーパクロムトートメラゼの発現誘導剤は、Sox10などの、ドーパクロムトートメラゼの発現誘導剤をコードする発現ベクターであってもよい。

【0034】

誘導作用剤のためのこのような発現ベクターを構築するには、組織特異的プロモーター、特に、メラノサイトおよび/または角化細胞に特異的なプロモーターを使用することが好ましいであろう。

【0035】

好ましい変形態様においては、発現ベクターによるドーパクロムトートメラゼ誘導作用剤の発現それ自体が誘導可能である。

20

【0036】

本発明の別の課題は、化粧品として許容し得る媒質中に、ヘキサメチレンビスアセトアミド(HMBA)、グリシルリチン、およびドーパクロムトートメラゼ(TRP-2)プロモーターの上流に位置する内因性因子のモジュレーターまたはドーパクロムトートメラゼ(TRP-2)をコードする発現ベクターまたはSox10などのドーパクロムトートメラゼ(TRP-2)の発現誘導剤をコードする発現ベクターの中から選択されるドーパクロムトートメラゼ(TRP-2)の発現誘導剤を少なくとも1つ含む、白髪に対抗するための化粧品組成物である。

【0037】

本発明の組成物は、単位体積当たり、0.001~10重量%、好ましくは0.01~5重量%、さらに好ましくは0.1~1重量%のドーパクロムトートメラゼの発現誘導剤を含む。

30

【0038】

本発明の組成物は、経口投与してもよく、または皮膚(毛で覆われている身体の皮膚領域全域)および/もしくは頭皮もしくは頭髮に適用してもよい。

【0039】

経口によれば、本発明の組成物は、ドーパクロムトートメラゼの発現誘導剤とその他の活性化化合物を溶液中に含み、水溶液または水・アルコール溶液などの栄養液とすることができ、任意で風味づけすることもできる。作用剤は、摂取可能な固体の添加剤中に組み入れることもできるし、また、例えば顆粒、丸薬、錠剤または糖衣錠の形で提供することもできる。また溶液に入れて栄養液とし、任意でその栄養液を摂取可能なカプセルで包むこともできる。

40

【0040】

投与形態によっては、本発明の組成物は、特に化粧品学において通常使用されるガレヌス製剤のいずれかの形で提供することができる。本発明の好ましい組成物は、頭皮および/または皮膚への局所適用に好適な化粧品組成物である。

【0041】

局所適用の場合、本発明に従って使用し得る組成物は、特に、水溶液、水・アルコール溶液もしくは油溶液の形態、またはローションタイプもしくは乳清タイプの分散液の形態、または脂肪相を水相に分散するか(O/W)もしくはその逆(W/O)によって得られるような乳

50

タイプの液体濃度もしくは半液体濃度を有する乳液の形態、または水性もしくは無水性のクリームタイプもしくはゲルタイプの懸濁液もしくは乳液の形態、またはマイクロカプセルもしくは微粒子の形態、またはイオンタイプおよび/または非イオンタイプの小囊状分散液の形態であってよい。したがって、その組成物は膏薬、チンキ剤、クリーム剤、軟膏剤、散剤、貼付吸収薬、含浸パッド剤、液剤、乳剤もしくは小囊状分散剤、ローション剤、ゲル剤、噴霧剤、懸濁剤、シャンプー剤、エアゾル剤、または泡剤の形で提供することができる。これらは無水性であっても水性であってもよい。また、前記組成物は洗浄石鹼または洗浄固形石鹼を構成する固体製剤からなるものであってもよい。

【0042】

これら組成物は、常法に従って調製される。

10

【0043】

本発明に従って使用し得る組成物は、特にヘアケア用組成物であって、特にシャンプー、ヘアセットローション、トリートメントローション、ヘアスタイリングクリームもしくはジェル、場合によっては染料シャンプーの形態をとる染料(特に酸化染料)組成物、ヘア用再構築ローション、またはマスクとすることができる。

【0044】

本発明の化粧品組成物は、ヘアクリームもしくはローション、シャンプー、またはコンディショナーであることが好ましい。

【0045】

本発明に従って使用し得る組成物を構成する種々の成分の量は、当分野で従来使用されている量である。

20

【0046】

本発明に従って使用し得る組成物が乳剤の場合、脂肪相の割合は、組成物の総重量に対して5重量%~80重量%の範囲、好ましくは5重量%~50重量%の範囲である。乳剤の形態の組成物に使用される油類、ワックス類、乳化剤類および乳化補助剤類は、化粧品分野で従来使用されているものから選択される。乳化剤および乳化補助剤は、本組成物中に、組成物の総重量に対して0.3重量%~30重量%、好ましくは0.5重量%~20重量%の割合で存在する。乳剤はさらに脂質の小囊を含んでいてよい。

【0047】

本発明に従って使用し得る組成物が液剤または油性ゲル剤である場合、脂肪相は、組成物の総重量に対して90重量%を上回る割合で存在してよい。

30

【0048】

本発明の特に好ましい変形態様においては、本発明の組成物は、マイクロ球、ナノ球、オレオソームまたはナノカプセルなどの被膜に封入したドーパクロムトートメラゼの発現誘導剤を少なくとも1つ含むが、その被膜はドーパクロムトートメラゼの発現誘導剤の化学的性質によって選択することができる。

【0049】

マイクロ球は、一例として、欧州特許願第0375520号に記載の方法に従って調製することができる。

【0050】

ナノ球は、水性懸濁剤の形態で提供することができ、仏国特許願第0015686号および仏国特許願第0101438号に記載の方法に従って調製することができる。

40

【0051】

オレオソームは、水性相に分散された薄膜の液晶被膜を有する油性小球で構成される、O/W型乳剤から成る(欧州特許願第0641557号および欧州特許願第0705593号参照)。

【0052】

また、ドーパクロムトートメラゼの発現誘導剤は、シリコン界面活性剤から得られる薄膜の被膜から成るナノカプセルに封入することもできるが(欧州特許願第0780115号参照)、そのナノカプセルは水分散性ポリスルホン酸エステルをベースにして調整することもできる(仏国特許願第0113337号参照)。

50

## 【0053】

また、ドーバクロムトートメラゼの発現誘導剤は、陽イオンの油性小球表面において、小球の大きさに関係なく錯体を形成することもできる(欧州特許願第1010413号、欧州特許願第1010414号、欧州特許願第1010415号、欧州特許願第1010416号、欧州特許願第1013338号、欧州特許願第1016453号、欧州特許願第1018363号、欧州特許願第1020219号、欧州特許願第1025898号、欧州特許願第1120101号、欧州特許願第1120102号、欧州特許願第1129684号、欧州特許願第1160005号および欧州特許願第1172077号参照)。

## 【0054】

ドーバクロムトートメラゼの発現誘導剤は、最終的に、薄膜の被膜を備え(欧州特許願第0447318号および欧州特許願第0557489号参照)また表面に陽イオン界面活性剤を含有する(陽イオン界面活性剤に関して先に引用した文献を参照)ナノカプセルまたはナノ粒子の表面において錯体を形成することができる。

10

## 【0055】

特に、ドーバクロムトートメラゼの発現誘導剤を封入している被膜の直径が10 $\mu$ m未満または10 $\mu$ mであるような組成物は好ましい。

## 【0056】

ドーバクロムトートメラゼの発現誘導剤が封入されているような変形態様によれば、前記作用剤は、ヘキサメチレンビスアセトアミド(HMBA)、ジエチルステイルベストロールおよび/またはエストラジオールなどのステロイドホルモン類、グリシルリチン、フォルスコリン、カンフェロール、およびドーバクロムトートメラゼ(TRP-2)プロモーターの活性化能を有する内因性因子のモジュレーターまたはドーバクロムトートメラゼの発現誘導剤をコードする発現ベクターなどから選択することができる。

20

## 【0057】

知られている方法で、本発明の組成物は、親水性または親油性のゲル化剤、親水性または親油性の添加剤、保存剤、抗酸化剤、溶剤、香料、賦形剤、遮断剤、臭気吸収剤および着色剤を含むこともできる。これら各種佐剤の量は、化粧品分野で従来使用されている量であって、例えば、組成物の総重量に対して0.01重量%~10重量%である。これら佐剤は、その性質によって、脂肪相、水性相、および/または脂質小球に導入することができる。

## 【0058】

本発明で使用し得る油類またはワックス類の例としては、鉱油(流動パラフィン)、植物油(シアバターの液状留分、ひまわり油)、動物油(ペルヒドロスクワラン)、合成油(パーセリン油)、シリコン油もしくはワックス(シクロメチコン)、フッ素化油(ペルフルオロポリエーテル)、蜜蝋、カルナバ蝋、またはパラフィン蝋を挙げることができる。これら油類に脂肪アルコールおよび脂肪酸(ステアリン酸)を添加することもできる。

30

## 【0059】

本発明で使用し得る乳化剤の例としては、ステアリン酸グリセリル、ポリソルベート60およびGattefosse社からTefose(登録商標)の名で販売されているPEG-6/PEG-32/ステアリン酸グリコール混合物などが挙げられる。

## 【0060】

本発明で使用し得る溶媒の例としては、低級アルコール、特にエタノール、イソプロパノールおよびプロピレングリコールが挙げられる。

40

## 【0061】

本発明で使用し得る親水性ゲル化剤の例としては、カルボキシビニルポリマー(カーボマー)、アクリレート/アルキルアクリレートコポリマーなどのアクリル酸コポリマー、ポリアクリルアミド、ヒドロキシプロピルセルロースなどの多糖類、天然ゴム類および粘土類が挙げられる。一方、親油性ゲル化剤の例としては、ベントンの修飾粘土類、ステアリン酸アルミニウムなどの脂肪酸の金属塩、疎水性シリカ、エチルセルロース、ポリエチレンなどが挙げられる。

## 【0062】

本発明に従って使用し得る組成物は、TRP-2の発現誘導剤を少なくとも1種とその他の活

50

性剤を組み合わせたものであってよい。このような活性剤としては、下記の作用剤を例として挙げるができる。

- レチノールおよびそのエステル、ビタミンDおよびその誘導体、エストラジオールなどのエストロゲン、POMC誘導体などのcAMPモジュレーター、アデノシン、フォルスコリンおよびその誘導体、プロスタグランジン類およびその誘導体、ならびにトリオドトリオンおよびその誘導体などの、皮膚細胞の分化および/または増殖および/または色素形成を調節する作用剤、
- アヤメ科または大豆からの抽出物などの植物抽出物、これら抽出物はイソフラボンを含んでいてもいなくてもよい、
- 微生物抽出物、
- トコフェロールもしくはそのエステル、スーパーオキシドジスムターゼもしくはその模擬体、ある種の金属キレート化剤、またはアスコルビン酸およびそのエステルなどの抗ラジカル剤、
- ある種のイオウアミノ酸、13-シス-レチノイン酸および酢酸シプロテロンなどの抗脂滯剤、ならびに
- 亜鉛ピリチオン、二硫化セレン、クリンパゾール、ウンデシレン酸、ケトコナゾール、ピロクトンオラミン(オクトピロックス)およびシクロピロクトン(シクロピロックス)などの頭皮の落屑状態に対抗するその他の作用剤。特に、前記活性剤は、毛の再生を刺激しかつ/または毛の減少の減速を促進する活性剤とすることができ、その例として下記の作用剤を挙げるができるが、これらに限定されるものではない。
- 特にトコフェリルニコチネート、ベンジルニコチネート、およびメチルニコチネートまたはヘキシルニコチネートなどのC<sub>1</sub> ~ C<sub>6</sub>アルキルニコチネートを含むニコチン酸エステル、
- 米国特許第4,139,619号および米国特許第4,596,812号に記載の2,4-ジアミノ-6-ピペリジノピリミジン 3オキシドまたは「ミノキシジル」、W096/09048に記載のアミネキシルまたは2,4-ジアミノピリミジン 3オキシドなどのピリミジン誘導体、
- 本出願人が欧州特許願第0648488号に記載した作用剤などの、リポキシゲナーゼを阻害する作用剤または毛再生を促進するシクロオキシダーゼ誘導剤、
- マクロライド系、ピラノシド系およびテトラサイクリン系抗生物質、特にエリスロマイシンなどの抗菌剤、
- シンナリジン、ニモジピンおよびニフェジピンなどのカルシウム拮抗薬、
- エストリオールもしくはその類似体、またはチロキシンおよびその塩などのホルモン類、
- オキシンドロン、スピロノラクトンおよびフルタミドなどの抗アンドロゲン薬、
- 本出願人が欧州特許願第0964852号および欧州特許願第1068858号に記載したような作用剤またはフィナスチリドなどの、5- $\alpha$ -レダクターゼのステロイド系または非ステロイド系阻害剤、クロマカリムおよびニコランジルなどのATP-依存性カリウムチャンネル拮抗薬、ならびに
- 仏国特許第2768343号に記載のキク抽出物および仏国特許第2782920A1号に記載のワレモコウ抽出物などの色素形成促進活性を有する植物抽出物。

10

20

30

40

50

#### 【0063】

本発明の別の課題は、ドーパクロムトートメラゼの発現誘導剤を少なくとも1種含む先に定義済みの組成物を、投与するかまたは処置対象である領域に適用することを特徴とする、白髪を化粧品によって処置する方法に関する。

#### 【0064】

本発明はまた、ドーパクロムトートメラゼの発現誘導剤を少なくとも1種含む先に定義済みの組成物を、投与するかまたは処置対象である領域に適用することを特徴とする、グレーまたは白い頭髪および/または体毛の自然の色素形成を維持することを意図した美容処置方法に関する。

#### 【0065】

処置対象である領域は特に制限されないが、例えば、頭皮、眉毛、口髭および/または

あご髭、ならびに毛で覆われている皮膚の任意の領域である。

【0066】

特に、白髪 of 処置法およびグレーまたは白い頭髪および/または体毛の自然な色素形成は、先に記載の組成物を適用することから成る。

【0067】

白髪に対抗するための処置法ならびに/またはグレーまたは白い頭髪および/もしくは体毛の自然な色素形成を維持するための処置法は、例えば、晩に頭髪および頭皮に前記組成物を適用し—晩組成物が接触した状態を保ち、さらに場合によっては、朝この組成物を使って髪をシャンプーするかまたは洗浄して、すすぎ落とす前に再度組成物を数分間接触した状態にしておくことから成る。本発明の組成物は、ヘアローションの形態で適用した場合、場合によってすすぎ落とす、またはシャンプーの形態で適用した場合に特に有利であることが分かっている。

10

【0068】

本発明の別の課題において、本発明は、下記の工程を含む、ドーパクロムトートメラゼの発現誘導剤の同定方法に関する。

a- メラノサイトがドーパクロムトートメラゼをほとんど発現しないかまたは全く発現しない(低基礎発現)培地で、メラノサイトの集団を培養する工程、

b- ドーパクロムトートメラゼ発現の誘導活性を試験することが望まれる化合物を前記培地に添加する工程、

c- 前記化合物が誘導剤である場合にメラノサイトがドーパクロムトートメラゼを発現し得るに十分な期間、メラノサイトをインキュベートする工程、

d- ドーパクロムトートメラゼの発現を測定する工程、および

e- ドーパクロムトートメラゼの発現を誘導する化合物を選択する工程。

20

【0069】

ドーパクロムトートメラゼの発現誘導剤を同定する方法の各実施態様においては、細胞の培養を、インキュベーターにて37℃、5%CO<sub>2</sub>の条件下で行う。

【0070】

詳細には、工程(a)は以下のプロトコールに従って実施することができる。すなわち、メラノサイトをM2培地(PromoCell、ハイデルベルグ、独)で第0日に接種する。細胞付着に必要な時間、すなわち2~18時間が経過後、前記培地を、メラノサイトがドーパクロムトートメラゼほとんど発現しないかまたは全く発現しない(TRP-2基礎発現)、または不活性ドーパクロムトートメラゼを発現するような培地と取り替える。具体的には、DMEM:F12(Gibco BRL-42400-044)、Ultrosor G(Gibco BRL-15950-017)0.5%、PC-1(BioWhittaker 344022)0.5%、bFGF(Pepro Tech Inc 100-18B)5ng/ml、ヘパリン(シグマH-3149)75ng/ml、1%抗生物質、1%グルタミンである。細胞を、TRP-2の発現が減少するのに必要な時間、すなわち12~72時間この培地中に保持する。

30

【0071】

工程(b)は以下のプロトコールに従って実施することができる。すなわち、培養しているメラノサイトを、ドーパクロムトートメラゼ発現の誘導活性を試験することが望まれる化合物で、TRP-2の発現を誘導するのに必要な時間処理する。この処理時間は一般に12~72時間である。

40

【0072】

ドーパクロムトートメラゼの発現を測定するための工程(d)は、例えば、ドーパクロムトートメラゼをコードするメッセンジャーRNA(mRNA)を測定することによって評価することができる。

【0073】

TRP-2のmRNAは、RT-PCR、ノーザンプロット法、示差表示(differential display)法(これら方法のプロトコールに関しては、Maniatis他のマニュアル、Molecular Cloning:A Laboratory Manual、Joseph Sambrook、E. F. Fritsch、T. Maniatis、Hardcover、Cold Spring Harbor Laboratory Pressを参照)などの、mRNAの検出を可能にするような方法で

50

あればいずれの方法によっても同定することができる。

【0074】

プローブおよびプライマーは、ドーパクロムトートメラゼのmRNAの知られている配列から選択することができる(特にGenbank No.AJ000503、No.NM\_001922、No.S69231の配列を参照)。

【0075】

一例として、RT-PCR解析の場合には、以下のオリゴヌクレオチドを使用することができよう。すなわち、5'-TGT GGA GAC TGC AAG TTT GGC および5'-GAG TTC TTC ATT AGT CAC TGG AGG G。

【0076】

- ドーパクロムトートメラゼの測定。

TRP-2タンパクは、例えば、エンザイムイムノアッセイ法、ウェスタンブロット法、免疫沈降法、免疫組織化学法などの特異的抗体を使用する方法(免疫検出法)によって検出することができよう(ManiatisおよびCurrent Protocols in Molecular Biology、F. M. Ausubel他編、Wiley Interscienceを参照)。

【0077】

TRP-2タンパクはまた、HPLC、配列決定といったタンパク質解析の化学的方法によっても検出することができる(ManiatisおよびCurrent Protocols in Molecular Biology、F. M. Ausubel他編、Wiley Interscienceを参照)。

【0078】

- ドーパクロムトートメラゼ活性の測定。

標的細胞を抽出した後、ドーパクロムトートメラゼ活性を、例えば分光測光法によって、475nmにおけるL-ドーパクロムの脱色を測定する(Pawelek JM他、Nature、1980、286:617-619)かまたはDHICAの形成による308nmにおける吸収の増加を測定する(Aroca PF他、J. Biochem. Biophys. Methods 1990;21:35-46)ことで評価することができる。また、別法として、HPLCによってドーパクロムとDHICAとを分離し、UVにおける吸収を測定し、それらを定量する(Palumbo A他、Biochem. Biophys. Acta 1987;925:203-209)ことによって評価することができる。

【0079】

本発明はまた、白髪を発現を防止しかつ/もしくは制限しかつ/もしくは阻止するための、ならびに/またはグレーもしくは白の頭髮および/または体毛の自然の色素形成を維持するための美容処置方法において、先に記載の方法によって選択可能なドーパクロムトートメラゼの発現誘導剤を使用することに関する。

【0080】

本発明はまた、白髪を発現を防止しかつ/もしくは制限しかつ/もしくは阻止するための、ならびに/またはグレーもしくは白の頭髮および/または体毛の自然の色素形成を維持することを意図した化粧品組成物の調製のために、先に記載の方法によって選択可能なドーパクロムトートメラゼの発現誘導剤を使用することに関する。

【0081】

本発明の別の態様は、ヒトまたはその他の哺乳動物由来のドーパクロムトートメラゼ遺伝子のプロモーター領域の全部または一部を含むプラスミド構築物を使用して、ドーパクロムトートメラゼ(TRP-2)発現の促進を可能にするような化合物の活性を評価することによって、TRP-2プロモーターの活性誘導剤を同定する方法に関する。

【0082】

詳細には、前記ドーパクロムトートメラゼ(TRP-2)プロモーターの活性誘導剤の同定方法は、下記の工程を含む。

- a. レポーター遺伝子の upstream に位置するドーパクロムトートメラゼ遺伝子のプロモーター領域を含むプラスミドベクターを構築する工程、
- b. 工程(a)で得られたプラスミドベクターを細胞集団に移入する工程、
- c. ドーパクロムトートメラゼプロモーターの活性誘導能を測定することが望まれる化合

10

20

30

40

50

物を、工程(b)で得られた2つの細胞集団のうちの一方向の培地に添加する工程、および  
d.工程(c)で得られた細胞集団におけるレポーター遺伝子の発現と、試験化合物と共にインキュベートしていない工程(b)で得られた細胞集団におけるレポーター遺伝子の発現とを比較することによって、ドーパクロムトートメラゼ(TRP-2)プロモーターの活性を誘導する化合物を選択する工程。

【0083】

工程(a)を実施するために、例えば登録番号L38953でGenebank登録されているようなドーパクロムトートメラゼをコードするヒトの遺伝子のプロモーター領域を、レポーター遺伝子をコードする配列の上流の、工程(b)を実施するために細胞内への転移を可能にするような構築物の中に挿入する。

10

【0084】

発現レポーター遺伝子は、その産物が測定可能な遺伝子、例えば、 $\beta$ -ガラクトシダーゼ、ルシフェラーゼまたはクロラムフェニコールアセチルトランスフェラーゼの遺伝子などを意味するものとする。

【0085】

工程(b)の場合、前記細胞内への移入を可能にするような構築物は、例えばpBlue-TOPO(登録商標)(Invitrogen、Groningen、CH、N)などのプラスミドであり、この場合、転移はトランスフェクションまたはリポフェクションによって得られる。

【0086】

工程(b)で使用する細胞集団は、ヒトもしくはその他の哺乳動物からのメラノサイト型の細胞集団であるか、または線維芽細胞もしくは角化細胞などの別の細胞型の細胞集団であってよい。

20

【0087】

最後に、本発明は、白髪を発現を防止しかつ/もしくは制限しかつ/もしくは阻止するための、ならびに/またはグレーもしくは白の頭髮および/または体毛の自然のままの色素形成を維持するための美容処置方法において、先に記載の方法によって同定可能なドーパクロムトートメラゼプロモーターの活性誘導剤を使用することに関する。

【0088】

本発明はまた、白髪を発現を防止しかつ/もしくは制限しかつ/もしくは阻止することを意図し、ならびに/またはグレーもしくは白の頭髮および/または体毛の自然のままの色素形成を維持することを意図した化粧品組成物を調製するために、先に記載の方法によって選択可能なドーパクロムトートメラゼプロモーターの活性誘導剤を使用することに関する。

30

【0089】

本発明はまた、下記の工程

- a. TRP-2の発現を低い基礎発現量に制限するような培地で、メラノサイトの集団を培養する工程、
- b. ドーパクロムトートメラゼ発現を誘導する化合物を、前記培地に添加する工程、
- c. メラノサイトがドーパクロムトートメラゼを発現し得る十分な期間、メラノサイトをインキュベートする工程、
- d. 前記細胞を、アポトーシスまたは老化を誘導する条件に曝露する工程、
- e. 細胞毒性を測定する工程、および
- f. ドーパクロムトートメラゼの発現を誘導する化合物で細胞保護効果を有する化合物を選択する工程

40

を含む、先に記載の方法によって同定されるドーパクロムトートメラゼの発現誘導剤の細胞保護活性を評価する方法に関する。

【0090】

各実施態様においては、細胞の培養を、インキュベーターにて37℃、5%CO<sub>2</sub>の条件下で行う。

【0091】

50

詳細には、工程(a)は以下のプロトコールに従って実施することができる。すなわち、メラノサイトをM2培地(PromoCell、ハイデルベルグ、独)で第0日に接種する。細胞付着に必要な時間、すなわち2~18時間が経過後、前記培地を、メラノサイトがTRP-2をほとんど発現しないかまたは全く発現しない(低基礎発現)培地と取り替える。具体的には、DMEM:F12(Gibco BRL-42400-044)、Ultrosor G(Gibco BRL-15950-017)0.5%、PC-1(BioWhittaker 344022)0.5%、bFGF(Pepro Tech Inc 100-18B)5ng/ml、ヘパリン(シグマH-3149)75ng/ml、1%抗生物質、1%グルタミンである。細胞を、TRP-2の発現が減少するのに必要な時間、すなわち12~72時間この培地中に保持する。

#### 【0092】

工程(b)は以下のプロトコールに従って実施することができる。すなわち、培養しているメラノサイトを、ドーパクロムトートメラゼの発現を誘導する化合物で、TRP-2の発現を誘導するのに必要な時間処理する。この処理時間は一般に12~72時間である(工程c)

10

#### 【0093】

工程(d)は以下のプロトコールに従って実施することができる。すなわち、細胞を、培地において、アポトーシスの誘導に必要な期間シスプラチン(例えば5~50 $\mu$ M)で処理する。この処理期間は一般に12~24時間である。

#### 【0094】

工程(e)は、例えば以下のプロトコールに従って実施することができる。すなわち、販売元が提供するプロトコール(Roche 1-465-015)に従って「Cell Proliferation Kit II(XTT)」キットを使い、細胞毒性を測定する。アポトーシスは、販売元が提供するプロトコール(Roche 1 774 425)に従って「Cell Death Detection ELISA plus」キットを使い定量化することができる。

20

#### 【実施例】

#### 【0095】

(実施例1)pMel-17タンパク標識による、異なる白髪化段階における毛包メラノサイトの免疫組織化学的視覚化

年齢49~71歳の8人のドナーによって提供された生検試料から120を超える毛包を単離し、調べた。

#### 【0096】

A-完全な毛包を単離するためのプロトコール

(Commo SおよびBernard BA、Pigment Cell Res、2000;13:253-259)

生検試料断片を、ディスパーゼ(2.4U/ml、ベーリンガー・マンハイム社、独)中+04にて一晩培養する。双眼顕微鏡下、ピンセットを用いて毛髪を単離する。

30

#### 【0097】

B-完全な毛包に関する免疫標識プロトコール

(Commo SおよびBernard BA、Pigment Cell Res、2000;13:253-259)

完全な毛髪を、エタノール中-20にて10分間固定する。固定および標識の各工程終了後に、リン酸緩衝液(pH7.4(PBS))-Tween20(0.05%)中で洗浄する。特にことわりのない限り、全工程は室温で行うものとする。0.1%過酸化水素溶液中で10分間試料をインキュベートし、試料中の内因性ペルオキシダーゼを中和する。非特異的結合部位をブロックするために、試料をスキムミルクと共に15分間インキュベートする。タンパクpMel-17を特異的に認識する一次抗体(Ab)NK1-beteb(Monsan、パリ、仏)を、10%正常血清(X0907、DAKO、Trappes、仏)を含有するPBS-Tween0.05%中で1/40に希釈する。一次抗体Abを、毛髪上+04にて18時間インキュベートする。ビオチンと結合した二次抗体Ab(E-433、DAKO、Trappes、仏)を1/400に希釈し、30分間インキュベートする。次いで、毛髪をストレプトアビジン-ビオチン-ペルオキシダーゼ(K-0377、DAKO、Trappes、仏)の存在下で培養し、最終的に3-アミノ-9-エチルカルバゾール(AEC)(AECキット-101、シグマ、Saint Quentin Fallavier、仏)の存在下で免疫標識を視覚化する。

40

#### 【0098】

50

図1の像(B1)と像(B5)を比較すると、毛の色素形成の低下が毛球のメラニンの減少および毛球のメラノサイトの減少(C1およびC5参照)と関連していることが認められる。毛幹のメラニンが欠乏している白髪(B6)は毛球にメラノサイトを含んでいない(C6)。グレーおよび白の毛髪は外側上皮鞘の上面部に様々な量のメラノサイトを含んでおり、白髪の場合(A3~A6)、色素形成した髪(A1およびA2)とは異なり、その量はゼロにもなり得る。

#### 【0099】

(実施例2)コーカサス人の毛包メラノサイトおよび表皮メラノサイトにおけるドーパクロムトートメラゼ発現の差異の立証

A-共焦点レーザー顕微鏡を使用して分析した免疫組織学的研究

A.1-毛包凍結切片の作成

(Commo SおよびBernard BA、Pigment Cell Res、2000;13:253-259)

毛包を含む頭皮生検試料断片を、tissue-Tek-OCT(Miles、Naperville、イリノイ、米国)に埋め込み、ドライアイスで凍結する。次いで、凍結生検試料をクリオスタット(CM3050、Leica、Rueil-Malmaison、仏)を用いて断面(7 $\mu$ m)に切る。

#### 【0100】

A.2-完全な毛包および皮膚上皮断片を単離するためのプロトコール

(Commo SおよびBernard BA、Pigment Cell Res、2000;13:253-259)

生検試料断片を、ディスパーゼ(2.4U/ml、ベーリンガーマンハイム社、独)中+04にて一晩インキュベートする。双眼顕微鏡下、ピンセットを用いて真皮から上皮部分を分離する。次いで、毛包および表皮を分離するために上皮構造顕微解剖し、えり分ける。

#### 【0101】

A.3-完全な毛包、皮膚断片および凍結切片に関する免疫標識プロトコール

完全な毛髪、皮膚の上皮断片および凍結切片をエタノール中-20にて10分間固定する。固定および標識の各工程終了後に、リン酸緩衝液(pH7.4(PBS))-Tween20(0.05%)中で洗浄する。特にことわりのない限り、全工程は室温で行うものとする。0.1%過酸化水素溶液中で10分間試料をインキュベートし、試料中の内因性ペルオキシダーゼを中和する。非特異的結合部位をブロックするために、試料をスキムミルクと共に15分間インキュベートする。一次抗体(Ab)を、10%正常血清(X0907、DAKO、Trappes、仏)を含有するPBS-Tween0.05%中で希釈する。タンパクpMel-17を特異的に認識する一次抗体AbのNK1-beteb(1/40、Monsan、パリ、仏)と、ヒトタンパクTRP-2を特異的に認識する一次抗体AbのPEP8h(1/2000、Dr VJ Hearing、NIH、Bethesda、メリーランド、米国)(Virador他、2001年)とを、毛髪および皮膚の表皮断片上+04にて同時に18時間インキュベートする。Cy3(M32410、TEBU、le Perray en Yveline、仏)を結合させた、免疫グロブリン(Ig)G2bに対するヤギ二次抗体Abを1/80に希釈し、Cy5(111-175-144、Jackson Immunoresearch Lab. Inc. West Grove、ペンシルバニア、米国)を結合させたIgsに対する二次抗体Abを1/500に希釈し、それらを試料と共に30分間同時にインキュベートする。免疫標識を、共焦点顕微鏡(LSM510、Carl Zeiss、Oberkochen、独)を使用して分析する。観察に基づく結論:図2において、表皮メラノサイトにTRP-2の存在が認められる。一方、この酵素は、毛包上皮鞘のメラノサイトあるいは毛球のメラノサイトいずれにおいても発現していない。

#### 【0102】

B-ウェスタンブロット分析による生化学的研究

B.1-ヒト毛包およびメラノサイトからタンパクを抽出するためのプロトコール(Commo S他、Differentiation、2000;66:157-164)

- 毛包からのタンパクの抽出:頭皮生検試料をディスパーゼ(2.4U/ml、ベーリンガーマンハイム社、独)中+04にて一晩処理した後、毛包を単離する。毛球部分を単離するために、単離した毛包を顕微解剖する。このようにして単離した80個の毛球を、タンパク抽出およびウェスタンブロット分析用として適当な溶解用緩衝液中に置く。

- メラノサイト培養菌からのタンパク抽出:M2培地(PromoCell、ハイデルベルグ、独)で培養したメラノサイトを、タンパク抽出に用いるものと同じ適当な溶解用緩衝液を用いて溶解し、ウェスタンブロットで分析する。

10

20

30

40

50

## 【0103】

下記の抗体を用いてウェスタンブロット (Maniatis他のプロトコールを参照) を実施する。Dr VJ Hearing (NIH, Bethesda, メリーランド、米国) が提供する PEP8h およびヒト TRP-2 特異的ポリクローナル抗体、ならびにヒトチロシナーゼ特異的モノクローナル抗体、T311 (Novocastra, Newcastle, 英国)。

## 【0104】

## 図3の観察とコメント

チロシナーゼが毛球の抽出物に検出されることが観察される。この酵素は外側上皮鞘の抽出物中には検出されない。チロシナーゼの発現は調節されている。この酵素は、不活性メラノサイト (メラニンを産生しない) においては全く発現しないかまたはほとんど発現しない。コーカサス人の毛包間頭皮に含まれるメラノサイトがその例である。

10

## 【0105】

また、ドーパクロムトートメラゼ (TRP-2) は、毛球抽出物および外側上皮鞘抽出物のいずれにおいても検出されない。TRP-2 の発現は、チロシナーゼの発現およびメラニン形成の誘導の結果起こるものではなく、毛球の活性メラノサイトにおいては発現しない。

## 【0106】

(実施例3) ドーパクロムトートメラゼ (TRP-2) の発現に及ぼすフォルスコリンの誘導効果の実証

第1の工程 (a) において、メラノサイトを M2 培地 (PromoCell、ハイデルベルグ、独) で第0日に接種する。細胞附着に必要な時間、すなわち 2~18 時間が経過後、前記培地を、メラノサイトがドーパクロムトートメラゼがほとんど発現しないかまたは全く発現しない (低基礎 TRP-2 発現)、または不活性ドーパクロムトートメラゼを発現するような培地と取り替える。具体的には、DMEM:F12 (Gibco BRL-42400-044)、Ultrosor G (Gibco BRL-15950-017) 0.5%、PC-1 (BioWhittaker 344022) 0.5%、bFGF (Pepro Tech Inc 100-18B) 5ng/ml、ヘパリン (シグマ H-3149) 75ng/ml、1% 抗生物質、1% グルタミンである。細胞を、TRP-2 の発現が減少するのに必要な時間、すなわち 12~72 時間この培地中に保持する。

20

## 【0107】

工程 (b) において、前記培地にフォルスコリン (20 μM) を添加し、メラノサイトをこの培地で 24 時間培養する (工程 c)。

## 【0108】

TRP-2 濃度の視覚化 (工程 d) を、ヒト TRP-2 タンパクを特異的に認識する抗体 PEP8h の存在下、従来のウェスタンブロット法によって実施する (Virador 他、2001 年)。

30

## 【0109】

ビメンチン (メラノサイトの細胞骨格タンパク質) を用いて、それぞれの異なる試験においてタンパク質負荷量が同等であることを保証する。

## 【0110】

図4に示す結果から、対照と比べ、フォルスコリンがドーパクロムトートメラゼ (TRP-2) 発現誘導能を有することが明らかである。

## 【0111】

## (実施例4) 組成物

- ヘアローション		
ドーパクロムトートメラゼ誘導剤		0.5g
プロピレングリコール		20g
エタノール、95%		30g
水	十分量	100g

40

## 【0112】

このローションは、処置対象である領域に毎日適用され、好ましくは頭皮全体に少なくとも 10 日間、好ましくは 1~2 カ月間適用される。白髪またはグレーの髪の出現が減少し、次いで、グレーの髪に色素再沈着が見られる。

## 【0113】

50

## - トリートメントシャンプー

ドーパクロムトートメラゼ誘導剤	1.5g	
ポリグリセリル3-ヒドロキシアリールエーテル	26g	
ヒドロキシプロピルセルロース	2g	
(Hercules社からKlucell Gの商品名で販売されている)		
保存剤	十分量	
エタノール、95%	50g	
水	十分量	100g

## 【0114】

このシャンプー剤は、洗髪のために使用し、シャンプー剤をつけたらそのまま約1分間おく。長期間、すなわち約2カ月の使用によって、グレーの髪に徐々に色素が再沈着するようになる。

10

## 【0115】

このシャンプー剤は、毛髪が白くなるのを遅らせる目的で予防的に使用することもできる。

## 【0116】

## - トリートメントゲル

ドーパクロムトートメラゼ誘導剤	0.75g	
ユーカリエッセンシャル油	1g	
エコノゾール	0.2g	20
ラウリルポリグリセリル6セテアリルグリコエーテル	1.9g	
保存剤	十分量	
カーボポール934P	0.3g	
(BF Goodrich Corporation社から販売)		
中和剤	適量	pH7
水	適量	100g

## 【0117】

このゲル剤は、処置対象である領域に一日2回(朝と晩)適用され、適用領域にはマッサージを施すものとする。3カ月適用を続けると、処置した領域の体毛または頭髪に色素再沈着が認められる。

30

## 【図面の簡単な説明】

## 【0118】

【図1】図1は、アナーゲン相における毛包メラノサイトの分布を示す顕微鏡写真を寄せ集めた図であり、(A)は倍率40倍の一連の外側上皮鞘像であり、(B)は倍率20倍の一連の外側上皮鞘像(毛幹に焦点を合わせた)であり、(C)は倍率20倍の一連の毛球像であり、(1)は非常に黒みがかかった毛を、(2)は中程度に色素形成した毛を、(3)~(5)は異なる色合いのグレーの毛を、また(6)は白い毛を表している図である。

【図2】図2は、表皮および毛(外側上皮鞘および毛球)のメラノサイトにおけるTRP-2の発現を視覚化した写真であり、共焦点レーザー顕微鏡を使用して分析した免疫組織化学的研究を示す写真である。

40

【図3】図3は、実施例2Bに記載のウェスタンブロット試験を実施して得た結果を表す写真である。

【図4】図4は、TRP-2発現に及ぼすフォルスコリン(Fk)の誘導効果を対照と比較して示すウェスタンブロットの結果を表す写真である。

【 図 1 】

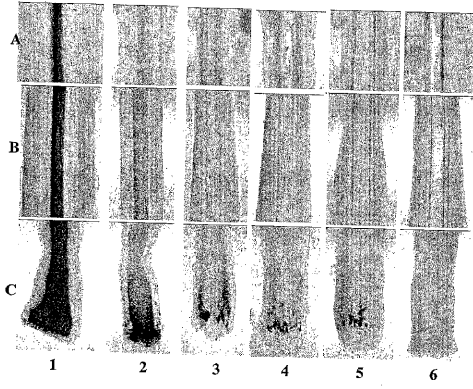


FIGURE 1

【 図 2 】

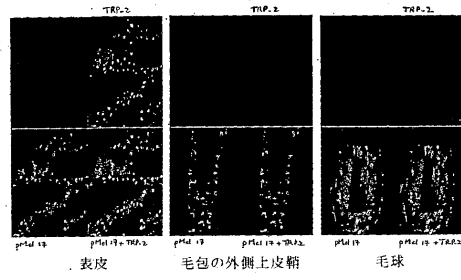


FIGURE 2

【 図 3 】

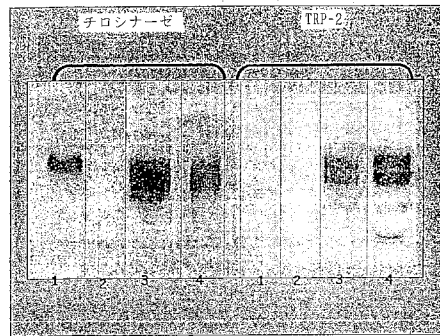


FIGURE 3

【 図 4 】

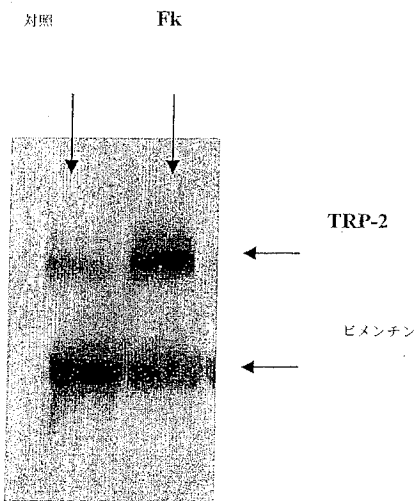


FIGURE 4

## 【 国際調査報告 】

## INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International Application No  
PCT/FR 03/01728

A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER IPC 7 A61K7/06		
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) IPC 7 A61K		
Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched		
Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practical, search terms used) EPO-Internal, CHEM ABS Data, BIOSIS, WPI Data, PAJ		
C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT		
Category *	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X	EP 0 124 077 A (MEDICAL HAIR RESEARCH K.K.) 7 November 1984 (1984-11-07)  the whole document -----	1-5,8, 10,11, 15-17
X	WD 98/11882 A (CODON PHARMACEUTICAL) 26 March 1998 (1998-03-26)  claims 1,2,12,13,22-27 -----	1-5, 8-11, 15-17
X	DATABASE WPI Week 198639 Derwent Publications Ltd., London, GB; AN 1986-255367 XP002234442 & JP 61 183207 A (KANEBO) 15 August 1986 (1986-08-15) abstract  -----  -/--	1-5, 8-11, 15-17
<input checked="" type="checkbox"/> Further documents are listed in the continuation of box C. <input checked="" type="checkbox"/> Patent family members are listed in 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 document 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 for 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		"T" 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 December 2003		Date of mailing of the international search report  16 MAR 2004
Name and mailing address of the ISA European Patent Office, P.B. 5818 Patentlaan 2 NL - 2280 HV Rijswijk Tel: (+31-70) 340-2040, Tx. 31 651 epo nl, Fax: (+31-70) 340-3016		Authorized officer  Fischer, J.P.

## INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International Application No

PCT/FR 03/01728

C.(Continuation) DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT		
Category	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X	PATENT ABSTRACTS OF JAPAN vol. 015, no. 238 (C-0841), 19 June 1991 (1991-06-19) & JP 03 074318 A (KATSUMI MIZUMAKI), 28 March 1991 (1991-03-28) abstract	1-5,8-11
X	----- DATABASE WPI Week 199836 Derwent Publications Ltd., London, GB; AN 1998-422294 XP002234443 & JP 10 175854 A (POLA CHEM IND) 30 June 1998 (1998-06-30) abstract	1-5,8-11
X	----- US 5 965 157 A (LI ET AL.) 12 October 1999 (1999-10-12) column 5, line 30 - line 39 column 19, line 11 - column 20, line 3 * exemples * column 30, line 44 - column 31, line 15; claims 1-10	1-17
X	----- EP 0 580 409 A (UNILEVER) 26 January 1994 (1994-01-26)  the whole document	1-5,8, 10,11, 15-17
X	----- FR 2 691 465 A (PIERRE FABRE MEDICAMENT) 26 November 1993 (1993-11-26)  the whole document	1-5,8, 10,11, 15-17
A	----- US 6 132 980 A (WANG RONG FU ET AL) 17 October 2000 (2000-10-17) column 4, line 53 - line 56	1-17
A	----- EP 0 327 345 A (BEECHAM GROUP PLC) 9 August 1989 (1989-08-09) the whole document	1-17
A	----- WO 02/30371 A (OREAL ;PRUCHE FRANCIS (FR)) 18 April 2002 (2002-04-18) the whole document	1-17
A	----- DATABASE BIOSIS [Online] BIOSCIENCES INFORMATION SERVICE, PHILADELPHIA, PA, US; June 2001 (2001-06), DUNN KAREN J ET AL: "In utero complementation of a neural crest-derived melanocyte defect using cell directed gene transfer." XP002234437 Database accession no. PREV200100385010 abstract	1-17
	-/--	

## INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International Application No  
PCT/FR 03/01728

C.(Continuation) DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT		
Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
	& GENESIS THE JOURNAL OF GENETICS AND DEVELOPMENT, vol. 30, no. 2, June 2001 (2001-06), pages 70-76, ISSN: 1526-954X -----	
A	DATABASE BIOSIS [Online] BIOSCIENCES INFORMATION SERVICE, PHILADELPHIA, PA, US; 1995, PROTA GIUSEPPE ET AL: "Comparative analysis of melanins and melanosomes produced by various coat color mutants." XP002234438 Database accession no. PREV199598424243 abstract & PIGMENT CELL RESEARCH, vol. 8, no. 3, 1995, pages 153-163, ISSN: 0893-5785 -----	1-17
A	DATABASE CAPLUS [Online] CHEMICAL ABSTRACTS SERVICE, COLUMBUS, OHIO, US; XP002234439 accession no. STN Database accession no. 1999:5979 abstract -----	1-17
A	DATABASE CAPLUS [Online] CHEMICAL ABSTRACTS SERVICE, COLUMBUS, OHIO, US; XP002234440 accession no. STN Database accession no. 2001:785322 abstract -----	1-17
A	DATABASE CAPLUS [Online] CHEMICAL ABSTRACTS SERVICE, COLUMBUS, OHIO, US; XP002234441 accession no. STN Database accession no. 1998:246143 abstract -----	1-17

## INTERNATIONAL SEARCH REPORT

Information on patent family members

International Application No

PCT/FR 03/01728

Patent document cited in search report		Publication date	Patent family member(s)	Publication date
EP 0124077	A	07-11-1984	JP 59204121 A AU 2728984 A DE 3479859 D1 EP 0124077 A2	19-11-1984 01-11-1984 02-11-1989 07-11-1984
WO 9811882	A	26-03-1998	AU 740783 B2 AU 4584297 A CA 2266496 A1 EP 0957903 A1 US 6290937 B1 US 2002141952 A1 US 6214888 B1 WO 9811882 A1 US 5990177 A US 6294585 B1 AU 6565998 A WO 9855085 A1	15-11-2001 14-04-1998 26-03-1998 24-11-1999 18-09-2001 03-10-2002 10-04-2001 26-03-1998 23-11-1999 25-09-2001 21-12-1998 10-12-1998
JP 61183207	A	15-08-1986	JP 1876744 C JP 6000690 B	07-10-1994 05-01-1994
JP 03074318	A	28-03-1991	NONE	
JP 10175854	A	30-06-1998	NONE	
US 5965157	A	12-10-1999	US 5753263 A US 5641508 A US 6261596 B1 US 2003059464 A1 US 5914126 A US 6224901 B1 AT 209887 T AU 6554594 A CA 2159626 A1 DE 69429337 D1 DE 69429337 T2 EP 0692972 A1 JP 2950520 B2 JP 8511510 T WO 9422468 A1	19-05-1998 24-06-1997 17-07-2001 27-03-2003 22-06-1999 01-05-2001 15-12-2001 24-10-1994 13-10-1994 17-01-2002 10-10-2002 24-01-1996 20-09-1999 03-12-1996 13-10-1994
EP 0580409	A	26-01-1994	AU 4208093 A BR 9302916 A CA 2100910 A1 CN 1088083 A EP 0580409 A2 JP 6157251 A ZA 9305234 A	27-01-1994 16-02-1994 21-01-1994 22-06-1994 26-01-1994 03-06-1994 20-01-1995
FR 2691465	A	26-11-1993	FR 2691465 A1	26-11-1993
US 6132980	A	17-10-2000	US 5831016 A US 5840839 A AT 251670 T AU 729497 B2 AU 1957297 A CA 2245702 A1 DE 69725428 D1	03-11-1998 24-11-1998 15-10-2003 01-02-2001 28-08-1997 14-08-1997 13-11-2003

## INTERNATIONAL SEARCH REPORT

Information on patent family members

International Application No

PCT/FR 03/01728

Patent document cited in search report		Publication date	Patent family member(s)	Publication date
US 6132980	A		DK 882130 T3	08-03-2004
			EP 1092770 A2	18-04-2001
			EP 0882130 A2	09-12-1998
			JP 2000506380 T	30-05-2000
			WO 9729195 A2	14-08-1997
			US 6083703 A	04-07-2000
			US 6087110 A	11-07-2000
EP 0327345	A	09-08-1989	AT 96014 T	15-11-1993
			AU 2954289 A	10-08-1989
			DE 68909963 D1	25-11-1993
			DE 68909963 T2	24-02-1994
			DK 48789 A	05-08-1989
			EP 0327345 A2	09-08-1989
			ES 2060748 T3	01-12-1994
			IE 890336 L	04-08-1989
			JP 1308218 A	12-12-1989
			NZ 227843 A	21-12-1989
			PH 25284 A	30-04-1991
			PT 89596 A	04-10-1989
			ZA 8900821 A	27-12-1989
			ZM 889 A1	30-06-1989
ZW 1389 A1	18-10-1989			
WO 0230371	A	18-04-2002	FR 2814947 A1	12-04-2002
			CA 2394882 A1	18-04-2002
			EP 1229890 A1	14-08-2002
			WO 0230371 A1	18-04-2002
			US 2003103917 A1	05-06-2003

## INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

ISR FR 03/01728

The International Searching Authority has determined that this international application contains more than one invention or group of inventions, namely:

1. Claims 1-17

1. YES (in part), claims 1-14: Cosmetic composition for controlling canities, including at least one dopachrome tautomerase expression inducer agent in a cosmetically acceptable medium, and the use of said composition.

2. Claims 18-26

2. NO, claims 18-26: Method for identifying a dopachrome tautomerase expression inducer agent, and the use of an agent identified by means of said method.

3. Claims 27, 28

3. NO, claims 27 and 28: Method for estimating the cytoprotective activity of a dopachrome tautomerase expression inducer agent identified by means of the method according to one of claims 18 to 26.

## INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/FR 03/01728

Continuation of Box I.2

Claim nos. 18-28

The present claims 1-15 relate to a very wide variety of compounds and methods. Indeed, the phrase "dopachrome tautomerase expression inducer agent" refers to a functional property. The same applies to the phrases "modulator for an endogenous factor capable of activating the dopachrome tautomerase promoter (TRP-2)" and "expression vector coding for a dopachrome tautomerase expression inducer agent". Furthermore, the term "steroid hormone" is defined by only three compounds.

However, support (CPI Article L.612-6) and/or disclosure (CPI Article L.612-5) can be found for only a very limited number of the claimed compounds and methods. In the present case, the claims so lack support and the disclosure of the invention in the description is so limited that it is impossible to carry out a meaningful search covering the entire scope claimed. Therefore, the search has been restricted to the parts of the claims which are supported and disclosed, that is the parts relating to the compounds defined in the claims and the description.

#### LACK OF UNITY

One of the problems that the present application is intended to solve is that of providing a means for controlling canities. The use of a dopachrome tautomerase expression inducer agent is proposed as a solution to this problem.

The subject matter of claims 18 to 26 does not constitute a solution to the above-mentioned problem. It relates to a method for identifying a dopachrome tautomerase expression inducer agent, and to the use of compounds identified by means of said method.

The subject matter of claims 27 and 28 does not constitute a solution to the above-mentioned problem. It relates to a method for estimating the cytoprotective activity of a dopachrome tautomerase expression inducer agent identified by means of the method described in claims 18 to 26.

## INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/FR 03/01728

The documents cited in the search report describe the use of compounds that have the property of inducing dopachrome tautomerase expression, in cosmetic hair care compositions, and for controlling canities in particular. The idea of using such compositions is thus known from the prior art and cannot be considered to be a single general inventive concept linking the use of such compositions to a method for identifying a dopachrome tautomerase expression inducer agent.

No other technical feature in the present application can be considered to be a "special technical feature" that determines a technical relationship between the various inventions claimed. As a result, the application fails to comply with the requirement of unity of invention. The various inventions do not form a single general inventive concept and each of the above-mentioned inventions is a separate invention characterised by its own special technical feature determining the contribution that each of the claimed inventions, considered as a whole, makes over the prior art.

Only the subject matter referred to under point 1 has been searched (in part).

Subject matter:

Point 1: YES (in part), claims 1-17: Cosmetic composition for controlling canities, including at least one dopachrome tautomerase expression inducer agent in a cosmetically acceptable medium, and the use of said composition.

Point 2: NO, claims 18-26: Method for identifying a dopachrome tautomerase expression inducer agent, and the use of an agent identified by means of said method.

Point 3: NO, claims 27 and 28: Method for estimating the cytoprotective activity of a dopachrome tautomerase expression inducer agent identified by means of the method according to one of claims 18 to 23.

The applicant's attention is drawn to the fact that claims or parts of claims relating to inventions in respect of which no international search report has been established need not be the subject of an international preliminary examination (PCT Rule 66.1(e)). The applicant is advised that the EPO policy when acting as an International Preliminary Examining Authority is normally not to carry out a preliminary examination on matter which has not been searched. This is the case irrespective of whether or not the claims are

**INTERNATIONAL SEARCH REPORT**

International application No.

PCT/FR 03/01728

amended following receipt of the search report or during any Chapter II procedure. In the event of the application being pursued in the regional phase before the EPO, the applicant is reminded that a search could be carried out during the examination procedure before the EPO (see EPO Guideline C-VI, 8.5), with the proviso that the problems that led to the statement under PCT Article 17(2) are resolved.

## RAPPORT DE RECHERCHE INTERNATIONALE

Demande Internationale No  
PCT/FR 03/01728

A. CLASSEMENT DE L'OBJET DE LA DEMANDE CIB 7 A61K/06		
Selon la classification internationale des brevets (CIB) ou à la fois selon la classification nationale et la CIB		
B. DOMAINES SUR LESQUELS LA RECHERCHE A PORTE		
Documentation minimale consultée (système de classification suivi des symboles de classement) CIB 7 A61K		
Documentation consultée autre que la documentation minimale dans la mesure où ces documents relèvent des domaines sur lesquels a porté la recherche		
Base de données électronique consultée au cours de la recherche internationale (nom de la base de données, et si réalisable, termes de recherche utilisés) EPO-Internal, CHEM ABS Data, BIOSIS, WPI Data, PAJ		
C. DOCUMENTS CONSIDERES COMME PERTINENTS		
Catégorie °	Identification des documents cités, avec, le cas échéant, l'indication des passages pertinents	no. des revendications visées
X	EP 0 124 077 A (MEDICAL HAIR RESEARCH K.K.) 7 novembre 1984 (1984-11-07)  le document en entier -----	1-5,8, 10,11, 15-17
X	WO 98/11882 A (CODON PHARMACEUTICAL) 26 mars 1998 (1998-03-26)  revendications 1,2,12,13,22-27 -----	1-5, 8-11, 15-17
X	DATABASE WPI Week 198639 Derwent Publications Ltd., London, GB; AN 1986-255367 XP002234442 & JP 61 183207 A (KANEBO) 15 août 1986 (1986-08-15) abrégé  -----  -/--	1-5, 8-11, 15-17
<input checked="" type="checkbox"/> Voir la suite du cadre C pour la fin de la liste des documents <input checked="" type="checkbox"/> Les documents de familles de brevets sont indiqués en annexe		
° Catégories spéciales de documents cités:		
"A" document définissant l'état général de la technique, non considéré comme particulièrement pertinent "E" document antérieur, mais publié à la date de dépôt international ou après cette date "L" document pouvant jeter un doute sur une revendication de priorité ou cité pour déterminer la date de publication d'une autre citation ou pour une raison spéciale (telle qu'indiquée) "O" document se référant à une divulgation orale, à un usage, à une exposition ou tous autres moyens "P" document publié avant la date de dépôt international, mais postérieurement à la date de priorité revendiquée "T" document ultérieur publié après la date de dépôt international ou la date de priorité et n'appartenant pas à l'état de la technique pertinent, mais cité pour comprendre le principe ou la théorie constituant la base de l'invention "X" document particulièrement pertinent; l'invention revendiquée ne peut être considérée comme nouvelle ou comme impliquant une activité inventive par rapport au document considéré isolément "Y" document particulièrement pertinent; l'invention revendiquée ne peut être considérée comme impliquant une activité inventive lorsque le document est associé à un ou plusieurs autres documents de même nature, cette combinaison étant évidente pour une personne du métier "Z" document qui fait partie de la même famille de brevets		
Date à laquelle la recherche internationale a été effectivement achevée  16 décembre 2003		Date d'expédition du présent rapport de recherche internationale  16 MAR 2004
Nom et adresse postale de l'administration chargée de la recherche internationale Office Européen des Brevets, P.B. 5818 Patentlaan 2 NL - 2280 HV Rijswijk Tel. (+31-70) 340-2040, Tx. 31 651 epo nl, Fax: (+31-70) 340-3016		Fonctionnaire autorisé  Fischer, J.P.

## RAPPORT DE RECHERCHE INTERNATIONALE

Demande Internationale No  
PCT/FR 03/01728

C.(suite) DOCUMENTS CONSIDERES COMME PERTINENTS		
Catégorie	Identification des documents cités, avec, le cas échéant, l'indication des passages pertinents	no. des revendications visées
X	PATENT ABSTRACTS OF JAPAN vol. 015, no. 238 (C-0841), 19 juin 1991 (1991-06-19) & JP 03 074318 A (KATSUMI MIZUMAKI), 28 mars 1991 (1991-03-28) abrégé	1-5,8-11
X	----- DATABASE WPI Week 199836 Derwent Publications Ltd., London, GB; AN 1998-422294 XP002234443 & JP 10 175854 A (POLA CHEM IND) 30 juin 1998 (1998-06-30) abrégé	1-5,8-11
X	----- US 5 965 157 A (LI ET AL.) 12 octobre 1999 (1999-10-12) colonne 5, ligne 30 - ligne 39 colonne 19, ligne 11 - colonne 20, ligne 3 * exemples * colonne 30, ligne 44 - colonne 31, ligne 15; revendications 1-10	1-17
X	----- EP 0 580 409 A (UNILEVER) 26 janvier 1994 (1994-01-26)  le document en entier	1-5,8, 10,11, 15-17
X	----- FR 2 691 465 A (PIERRE FABRE MEDICAMENT) 26 novembre 1993 (1993-11-26)  le document en entier	1-5,8, 10,11, 15-17
A	----- US 6 132 980 A (WANG RONG FU ET AL) 17 octobre 2000 (2000-10-17) colonne 4, ligne 53 - ligne 56	1-17
A	----- EP 0 327 345 A (BEECHAM GROUP PLC) 9 août 1989 (1989-08-09) le document en entier	1-17
A	----- WO 02/30371 A (OREAL ;PRUCHE FRANCIS (FR)) 18 avril 2002 (2002-04-18) le document en entier	1-17
A	----- DATABASE BIOSIS [Online] BIOSCIENCES INFORMATION SERVICE, PHILADELPHIA, PA, US; juin 2001 (2001-06), DUNN KAREN J ET AL: "In utero complementation of a neural crest-derived melanocyte defect using cell directed gene transfer." XP002234437 Database accession no. PREV200100385010 abrégé	1-17
	-/--	

## RAPPORT DE RECHERCHE INTERNATIONALE

Demande Internationale No  
PCT/FR 03/01728

C.(suite) DOCUMENTS CONSIDERES COMME PERTINENTS		
Catégorie	Identification des documents cités, avec, le cas échéant, l'indication des passages pertinents	no. des revendications visées
A	<p>&amp; GENESIS THE JOURNAL OF GENETICS AND DEVELOPMENT, vol. 30, no. 2, juin 2001 (2001-06), pages 70-76, ISSN: 1526-954X</p> <p>-----</p> <p>DATABASE BIOSIS [Online] BIOSCIENCES INFORMATION SERVICE, PHILADELPHIA, PA, US; 1995, PROTA GIUSEPPE ET AL: "Comparative analysis of melanins and melanosomes produced by various coat color mutants." XP002234438 Database accession no. PREV199598424243 abrégé</p>	1-17
A	<p>-----</p> <p>DATABASE CAPLUS [Online] CHEMICAL ABSTRACTS SERVICE, COLUMBUS, OHIO, US; XP002234439 accession no. STN Database accession no. 1999:5979 abrégé</p>	1-17
A	<p>-----</p> <p>DATABASE CAPLUS [Online] CHEMICAL ABSTRACTS SERVICE, COLUMBUS, OHIO, US; XP002234440 accession no. STN Database accession no. 2001:785322 abrégé</p>	1-17
A	<p>-----</p> <p>DATABASE CAPLUS [Online] CHEMICAL ABSTRACTS SERVICE, COLUMBUS, OHIO, US; XP002234441 accession no. STN Database accession no. 1998:246143 abrégé</p> <p>-----</p>	1-17

## RAPPORT DE RECHERCHE INTERNATIONALE

Renseignements relatifs aux membres de familles de brevets

Demande Internationale No

PCT/FR 03/01728

Document brevet cité au rapport de recherche		Date de publication	Membre(s) de la famille de brevet(s)	Date de publication
EP 0124077	A	07-11-1984	JP 59204121 A	19-11-1984
			AU 2728984 A	01-11-1984
			DE 3479859 D1	02-11-1989
			EP 0124077 A2	07-11-1984
WO 9811882	A	26-03-1998	AU 740783 B2	15-11-2001
			AU 4584297 A	14-04-1998
			CA 2266496 A1	26-03-1998
			EP 0957903 A1	24-11-1999
			US 6290937 B1	18-09-2001
			US 2002141952 A1	03-10-2002
			US 6214888 B1	10-04-2001
			WO 9811882 A1	26-03-1998
			US 5990177 A	23-11-1999
			US 6294585 B1	25-09-2001
			AU 6565998 A	21-12-1998
WO 9855085 A1	10-12-1998			
JP 61183207	A	15-08-1986	JP 1876744 C	07-10-1994
			JP 6000690 B	05-01-1994
JP 03074318	A	28-03-1991	AUCUN	
JP 10175854	A	30-06-1998	AUCUN	
US 5965157	A	12-10-1999	US 5753263 A	19-05-1998
			US 5641508 A	24-06-1997
			US 6261596 B1	17-07-2001
			US 2003069464 A1	27-03-2003
			US 5914126 A	22-06-1999
			US 6224901 B1	01-05-2001
			AT 209887 T	15-12-2001
			AU 6554594 A	24-10-1994
			CA 2159626 A1	13-10-1994
			DE 69429337 D1	17-01-2002
			DE 69429337 T2	10-10-2002
			EP 0692972 A1	24-01-1996
			JP 2950520 B2	20-09-1999
			JP 8511510 T	03-12-1996
WO 9422468 A1	13-10-1994			
EP 0580409	A	26-01-1994	AU 4208093 A	27-01-1994
			BR 9302916 A	16-02-1994
			CA 2100910 A1	21-01-1994
			CN 1088083 A	22-06-1994
			EP 0580409 A2	26-01-1994
			JP 6157251 A	03-06-1994
			ZA 9305234 A	20-01-1995
FR 2691465	A	26-11-1993	FR 2691465 A1	26-11-1993
US 6132980	A	17-10-2000	US 5831016 A	03-11-1998
			US 5840839 A	24-11-1998
			AT 251670 T	15-10-2003
			AU 729497 B2	01-02-2001
			AU 1957297 A	28-08-1997
			CA 2245702 A1	14-08-1997
			DE 69725428 D1	13-11-2003

# RAPPORT DE RECHERCHE INTERNATIONALE

Renseignements relatifs aux membres de familles de brevets

Demande Internationale No

PCT/FR 03/01728

Document brevet cité au rapport de recherche	Date de publication	Membre(s) de la famille de brevet(s)	Date de publication
US 6132980 A		DK 882130 T3	08-03-2004
		EP 1092770 A2	18-04-2001
		EP 0882130 A2	09-12-1998
		JP 2000506380 T	30-05-2000
		WO 9729195 A2	14-08-1997
		US 6083703 A	04-07-2000
		US 6087110 A	11-07-2000
EP 0327345 A	09-08-1989	AT 96014 T	15-11-1993
		AU 2954289 A	10-08-1989
		DE 68909963 D1	25-11-1993
		DE 68909963 T2	24-02-1994
		DK 48789 A	05-08-1989
		EP 0327345 A2	09-08-1989
		ES 2060748 T3	01-12-1994
		IE 890336 L	04-08-1989
		JP 1308218 A	12-12-1989
		NZ 227843 A	21-12-1989
		PH 25284 A	30-04-1991
		PT 89596 A	04-10-1989
		ZA 8900821 A	27-12-1989
		ZM 889 A1	30-06-1989
ZW 1389 A1	18-10-1989		
WO 0230371 A	18-04-2002	FR 2814947 A1	12-04-2002
		CA 2394882 A1	18-04-2002
		EP 1229890 A1	14-08-2002
		WO 0230371 A1	18-04-2002
		US 2003103917 A1	05-06-2003

Demande internationale No. PCT/FR 03/01728

## SUIVE DES RENSEIGNEMENTS INDICUES SUR PCT/ISA/ 210

L'administration chargée de la recherche internationale a trouvé plusieurs (groupes d') inventions dans la demande internationale, à savoir:

## 1. revendications: 1-17

1. OUI (partiellement), revendications 1-14: Composition cosmétique pour lutter contre la canitie comprenant dans un milieu cosmétiquement acceptable au moins un agent inducteur de l'expression de DOPAchrome tautomérase et utilisation d'une telle composition.

---

## 2. revendications: 18-26

2. NON, revendications 18-26  
: Méthode d'identification d'un agent inducteur de l'expression de la DOPAchrome tautomérase et utilisation d'un agent identifié par cette méthode.

---

## 3. revendications: 27-28

3. NON, revendications 27-28. Méthode d'évaluation de l'activité cytoprotectrice d'un agent inducteur de l'expression de la DOPAchrome tautomérase identifié par la méthode selon l'une des revendications 18-26

---

## RAPPORT DE RECHERCHE INTERNATIONALE

Demande internationale n°  
PCT/FR 03/01728**Cadre I Observations - lorsqu'il a été estimé que certaines revendications ne pouvaient pas faire l'objet d'une recherche (suite du point 1 de la première feuille)**

Conformément à l'article 17.2)a), certaines revendications n'ont pas fait l'objet d'une recherche pour les motifs suivants:

1.  Les revendications n<sup>os</sup> se rapportent à un objet à l'égard duquel l'administration n'est pas tenue de procéder à la recherche, à savoir:
2.  Les revendications n<sup>os</sup> 18-28 se rapportent à des parties de la demande internationale qui ne remplissent pas suffisamment les conditions prescrites pour qu'une recherche significative puisse être effectuée, en particulier:  
see FURTHER INFORMATION sheet PCT/ISA/210
3.  Les revendications n<sup>os</sup> sont des revendications dépendantes et ne sont pas rédigées conformément aux dispositions de la deuxième et de la troisième phrases de la règle 6.4.a).

**Cadre II Observations - lorsqu'il y a absence d'unité de l'invention (suite du point 2 de la première feuille)**

L'administration chargée de la recherche internationale a trouvé plusieurs inventions dans la demande internationale, à savoir:

voir feuille supplémentaire

1.  Comme toutes les taxes additionnelles ont été payées dans les délais par le déposant, le présent rapport de recherche internationale porte sur toutes les revendications pouvant faire l'objet d'une recherche.
2.  Comme toutes les recherches portant sur les revendications qui s'y prêtaient ont pu être effectuées sans effort particulier justifiant une taxe additionnelle, l'administration n'a sollicité le paiement d'aucune taxe de cette nature.
3.  Comme une partie seulement des taxes additionnelles demandées a été payée dans les délais par le déposant, le présent rapport de recherche internationale ne porte que sur les revendications pour lesquelles les taxes ont été payées, à savoir les revendications n<sup>os</sup>
4.  Aucune taxe additionnelle demandée n'a été payée dans les délais par le déposant. En conséquence, le présent rapport de recherche internationale ne porte que sur l'invention mentionnée en premier lieu dans les revendications; elle est couverte par les revendications n<sup>os</sup>  
1-17

Remarque quant à la réserve

- Les taxes additionnelles étaient accompagnées d'une réserve de la part du déposant.
- Le paiement des taxes additionnelles n'était assorti d'aucune réserve.

Demande internationale No. PCT/FR 03/01728

## SUITE DES RENSEIGNEMENTS INDIQUES SUR PCT/ISA/ 210

-----

Suite du cadre I.2

Revendications nos.: 18-28

Les revendications 1-15 présentes ont trait à une très grande variété de composés et de méthodes. En effet l'expression "agent inducteur de l'expression de DOPAchrome tautomérase" fait référence à une propriété fonctionnelle. Il en est de même pour les expressions "modulateur d'un facteur endogène capable d'activer le promoteur de la DOPAchrome tautomérase (TRP-2)" et "vecteur d'expression codant pour un agent inducteur de l'expression de la DOPAchrome tautomérase". D'autre part l'expression "hormone stéroïdienne" n'est définie que par 3 composés.

Un fondement au sens de l'Article L.612-6 CPI et/ou un exposé au sens de l'Article L.612-5 CPI ne peut cependant être trouvé que pour un nombre très restreint de ces composés et méthodes revendiqués. Dans le cas présent, les revendications manquent à un tel point de fondement et l'exposé de l'invention dans la description est si limité qu'une recherche significative couvrant tout le spectre revendiqué est impossible. Par conséquent, la recherche a été limitée aux parties des revendications qui présentent un fondement et un exposé, c'est à dire les parties ayant trait aux composés définis dans les revendications et la description.

## NON-UNITÉ:

L'un des problèmes à résoudre par la présente demande consistait à fournir un moyen pour lutter contre la canitie. L'utilisation d'un agent inducteur de l'expression de DOPAchrome tautomérase a été proposée comme solution pour ce problème.

Le sujet des revendications 18-26 n'est pas une solution du problème mentionné. Il s'agit d'une méthode d'identification d'un agent inducteur de l'expression de la DOPAchrome tautomérase et de l'utilisation de composés identifiés par cette méthode.

Le sujet des revendications 27-28 n'est pas une solution du problème mentionné. Il s'agit d'une méthode d'évaluation de l'activité cytoprotectrice d'un agent inducteur de l'expression de la DOPAchrome tautomérase identifiée par la méthode décrite dans les revendications 18-26 .

Les documents cités dans le rapport de recherche décrivent l'utilisation de composés, ayant la propriété d'induire l'expression de la DOPAchrome tautomérase, dans des compositions cosmétiques pour cheveux et en particulier pour lutter contre la canitie. L'idée d'utiliser de telles compositions est donc connue de l'art

Demande internationale No. PCT/R 03 01728

## SUIITE DES RENSEIGNEMENTS INDICUES SUR PCT/ISA/ 210

antérieur et ne peut donc pas être interprété comme seul concept inventif général liant l'utilisation de telle compositions à une méthode d'identification d'un agent inducteur de l'expression de la DOPAchrome tautomérase.

Dans la présente demande il n'y a pas d'autre élément technique pouvant être considéré comme "élément technique particulier" établissant une relation technique entre les différentes inventions revendiquées. Par conséquent la demande ne satisfait pas à l'exigence d'unité d'invention. Les différentes inventions ne forment pas un seul concept inventif général et chaque invention mentionnée est une invention distincte caractérisée par son propre élément technique particulier, qui détermine une contribution de chacune des inventions revendiquées, considérée comme un tout par rapport à l'état de la technique.

Uniquement le premier sujet a été recherché (partiellement).

## Sujets:

1. OUI (partiellement), revendications 1-17: Composition cosmétique pour lutter contre la canitie comprenant dans un milieu cosmétiquement acceptable au moins un agent inducteur de l'expression de DOPAchrome tautomérase et utilisation d'une telle composition.
2. NON, revendications 18-26: Méthode d'identification d'un agent inducteur de l'expression de la DOPAchrome tautomérase et utilisation d'un agent identifié par cette méthode
3. NON, revendications 27-28: Méthode d'évaluation de l'activité cytoprotectrice d'un agent inducteur de l'expression de la DOPAchrome tautomérase identifié par la méthode des revendications 18-23.

L'attention du déposant est attirée sur le fait que les revendications ayant trait aux inventions pour lesquelles aucun rapport de recherche n'a été établi ne peuvent faire obligatoirement l'objet d'un rapport préliminaire d'examen (Règle 66.1(e) PCT). Le déposant est averti que la ligne de conduite adoptée par l'OEB agissant en qualité d'administration chargée de l'examen préliminaire international est, normalement, de ne pas procéder à un examen préliminaire sur un sujet n'ayant pas fait l'objet d'une recherche. Cette attitude restera inchangée, indépendamment du fait que les revendications aient ou n'aient pas été modifiées, soit après la réception du rapport de recherche, soit pendant une quelconque procédure sous le Chapitre II. Si la demande devait être poursuivie dans la phase régionale devant l'OEB, il est rappelé au déposant qu'une recherche pourrait être effectuée durant la procédure d'examen devant l'OEB (voir Directive OEB C-VI, 8.5) à condition que les problèmes ayant conduit à la déclaration conformément à l'Article 17(2) PCT aient été résolus.

## フロントページの続き

(51) Int.Cl.	F I		テーマコード(参考)
<b>C 1 2 Q 1/02 (2006.01)</b>	C 1 2 Q	1/533	
<b>C 1 2 Q 1/533 (2006.01)</b>	C 1 2 Q	1/68	A
<b>C 1 2 Q 1/68 (2006.01)</b>	G 0 1 N	33/50	H
G 0 1 N 33/50 (2006.01)	G 0 1 N	33/53	D
G 0 1 N 33/53 (2006.01)			

(81) 指定国 AP(GH, GM, KE, LS, MW, MZ, SD, SL, SZ, TZ, UG, ZM, ZW), EA(AM, AZ, BY, KG, KZ, MD, RU, TJ, TM), EP(AT, BE, BG, CH, CY, CZ, DE, DK, EE, ES, FI, FR, GB, GR, HU, IE, IT, LU, MC, NL, PT, RO, SE, SI, SK, TR), OA(BF, BJ, CF, CG, CI, CM, GA, GN, GQ, GW, ML, MR, NE, SN, TD, TG), AE, AG, AL, AM, AT, AU, AZ, BA, BB, BG, BR, BY, BZ, CA, CH, CN, CO, CR, CU, CZ, DE, DK, DM, DZ, EC, EE, ES, FI, GB, GD, GE, GH, GM, HR, HU, ID, IL, IN, IS, JP, KE, KG, KP, KR, KZ, LC, LK, LR, LS, LT, LU, LV, MA, MD, MG, MK, MN, MW, MX, MZ, NI, NO, NZ, OM, PH, PL, PT, RO, RU, SC, SD, SE, SG, SK, SL, TJ, TM, TN, TR, TT, TZ, UA, UG, US, UZ, VC, VN, YU, ZA, ZM, ZW

(72) 発明者 ブリュノ・ベルナール

フランス・F - 9 2 2 0 0 ・ヌイリ・シュール・セーヌ・アヴニユ・ドゥ・ブレットヴィル・1 3

Fターム(参考) 2G045 AA24 CB16 DA36 FB03

4B063 QA06 QA13 QA18 QA19 QQ08 QQ39 QQ42 QQ52 QQ89 QR19  
 QR32 QR35 QR50 QR55 QR62 QR77 QS25 QS33 QS34 QX02  
 4C083 AA122 AC102 AC122 AC182 AC422 AC471 AC641 AC691 AD092 AD282  
 AD531 AD591 AD601 CC33 CC37 CC38 CC39 DD14 DD23 DD31  
 EE22 EE24  
 4C084 AA17 MA52 NA14 ZA92 ZB21 ZC20

专利名称(译)	用于诱导表达多巴色素互变异构酶 ( TRP-2 ) 作为毛囊黑素细胞保护剂的试剂的用途及其用途		
公开(公告)号	<a href="#">JP2006513134A</a>	公开(公告)日	2006-04-20
申请号	JP2004510689	申请日	2003-06-10
[标]申请(专利权)人(译)	欧莱雅		
申请(专利权)人(译)	欧莱雅		
[标]发明人	ステファヌコンモ ブリュノベルナール		
发明人	ステファヌ・コンモ ブリュノ・ベルナール		
IPC分类号	A61K8/00 A61Q5/00 A61K45/00 A61P17/16 A61P43/00 C12Q1/02 C12Q1/533 C12Q1/68 G01N33/50 G01N33/53 A61K8/34 A61K8/42 A61K8/63 A61K8/64 A61K31/7048 A61Q5/06 A61Q5/10 A61Q7/00		
CPC分类号	A61K8/34 A61K8/42 A61K8/63 A61K8/64 A61K31/7048 A61K2800/70 A61P17/00 A61P17/14 A61P17/16 A61Q5/00 A61Q5/065 A61Q5/10 A61Q7/00		
FI分类号	A61K7/06 A61K45/00 A61P17/16 A61P43/00.105 C12Q1/02 C12Q1/533 C12Q1/68.A G01N33/50.H G01N33/53.D		
F-TERM分类号	2G045/AA24 2G045/CB16 2G045/DA36 2G045/FB03 4B063/QA06 4B063/QA13 4B063/QA18 4B063/QA19 4B063/QQ08 4B063/QQ39 4B063/QQ42 4B063/QQ52 4B063/QQ89 4B063/QR19 4B063/QR32 4B063/QR35 4B063/QR50 4B063/QR55 4B063/QR62 4B063/QR77 4B063/QS25 4B063/QS33 4B063/QS34 4B063/QX02 4C083/AA122 4C083/AC102 4C083/AC122 4C083/AC182 4C083/AC422 4C083/AC471 4C083/AC641 4C083/AC691 4C083/AD092 4C083/AD282 4C083/AD531 4C083/AD591 4C083/AD601 4C083/CC33 4C083/CC37 4C083/CC38 4C083/CC39 4C083/DD14 4C083/DD23 4C083/DD31 4C083/EE22 4C083/EE24 4C084/AA17 4C084/MA52 4C084/NA14 4C084/ZA92 4C084/ZB21 4C084/ZC20		
代理人(译)	渡边 隆 村山彦		
优先权	2002007136 2002-06-11 FR 60/389736 2002-06-19 US		
外部链接	<a href="#">Espacenet</a>		

摘要(译)

美容剂 ( I ) 诱导DOPAchrome互变异构酶表达的化妆品, 该酶包括六亚甲基双乙酰胺 ( HMBA ), 甾体激素如己烯雌酚和/或雌二醇, 甘草甜素, 福司可林, 山奈酚, DOPAchrome互变异构酶 ( TRP-2 ) 上游的内源性因子调节剂。或编码 ( TRP-2 ) 的表达载体或编码 ( TRP-2 ) 的表达诱导物如Sox10的表达载体是新的。还要求保护独立权利要求: ( 1 ) 鉴定诱导DOPAchrome互变异构酶表达的试剂, 其包括以下步骤: ( a ) 在其中黑素细胞不表达DOPAchrome互变异构酶的培养基中培养黑素细胞群; ( b ) 添加测试化合物以测试 ( I ) 在培养基中的表达诱导活性; ( c ) 将黑素细胞孵育足够长的时间, 以使黑素细胞可以表达DOPAchrome互变异构酶; ( d ) 测量DOPAchrome互变异构酶的表达; ( e ) 选择诱导DOPAchrome互变异构酶表达的化合物; ( 2 ) 诱导DOPAchrome互变异构酶 ( TRP-2 ) 启动子活性的试剂的鉴定 ( M1 ) 包括: ( a ) 构建质粒载体, 该质粒载体包含位于报告基因上游的DOPAchrome互变异构酶基因的启动子区域。; ( b ) 用 ( a ) 中获得的

		(43) 公表日 平成18年4月20日 ( P200 )
(51) Int. Cl.	F I	テーマコード ( )
A 6 1 K 8/00 (2006.01)	A 6 1 K 7/06	2 G 0 4 5
A 6 1 Q 5/00 (2006.01)	A 6 1 K 45/00	4 B 0 6 3
A 6 1 K 45/00 (2006.01)	A 6 1 P 17/16	4 C 0 8 3
A 6 1 P 17/16 (2006.01)	A 6 1 P 43/00 1 0 5	4 C 0 8 4
A 6 1 P 43/00 (2006.01)	C 1 2 Q 1/02	
	審査請求 有 予備審査請求 未請求 (全 39 頁) 最	
(21) 出願番号	特願2004-510689 (P2004-510689)	(71) 出願人
(86) (22) 出願日	平成15年6月10日 (2003. 6. 10)	ロレアル
(85) 翻訳文提出日	平成17年2月9日 (2005. 2. 9)	フランス国パリ, リュ ロワイ
(86) 国際出願番号	PCT/FR2003/001728	(74) 代理人
(87) 国際公開番号	W02003/103568	弁理士 志賀 正武
(87) 国際公開日	平成15年12月18日 (2003. 12. 18)	(74) 代理人
(86) 優先権主張番号	02/07136	弁理士 渡邊 隆
(32) 優先日	平成14年6月11日 (2002. 6. 11)	(74) 代理人
(33) 優先権主張国	フランス (FR)	弁理士 村山 彦彦
(31) 優先権主張番号	60/389, 736	(74) 代理人
(32) 優先日	平成14年6月19日 (2002. 6. 19)	100110364
(33) 優先権主張国	米国 (US)	弁理士 実広 信哉
		(72) 発明者
		ステファヌ・コンモ
		フランス・F-75015・パリ
		ユドゥ・ラ・ポルト・ドゥ・ジ
		ヌ・5

质粒载体转化细胞群；(c)在(b)中获得的两个细胞群之一的培养基中加入待测化合物以诱导DOPochrome互变异构酶启动子激活的能力；(d)通过比较在步骤(c)中获得的细胞群中报告基因的表达与在(c)中获得的报告基因的表达进行比较，选择诱导DOPA铬互变异构酶(TRP-2)启动子活性的化合物。步骤(b)中获得的尚未与测试化合物一起孵育的细胞群；(3)通过上述方法鉴定的诱导DOPochrome互变异构酶表达的试剂的细胞保护活性的评估(M2)包括：(a)在限制TRP-2表达至弱碱基的培养基中培养黑素细胞群水平；(b)添加诱导表达的化合物到培养基中；(c)将黑素细胞孵育足够长的时间以促进DOPochrome互变异构酶的表达；(d)使细胞处于诱导凋亡或衰老的状态；(e)测量细胞毒性；(f)选择诱导通过表达细胞保护作用鉴定的DOPochrome互变异构酶表达的化合物。