

(19)
ČESKÁ
REPUBLIKA



ÚŘAD
PRŮMYSLVÉHO
VLASTNICTVÍ

(21) Číslo přihlášky: 2020-207
(22) Přihlášeno: 09.04.2020
(40) Zveřejněno: 02.06.2021
(Věstník č. 22/2021)
(47) Uděleno: 22.04.2021
(24) Oznámení o udělení ve věstníku: 02.06.2021
(Věstník č. 22/2021)

C07K 7/06 (2006.01)
A61K 8/00 (2006.01)
A61K 8/30 (2006.01)
A61K 8/64 (2006.01)
A61K 8/72 (2006.01)
A61Q 19/00 (2006.01)
A61P 17/00 (2006.01)

(56) Relevantní dokumenty:
SCHAGEN S. K. et al.: „Topical peptide treatments with effective anti-aging results,“ Cosmetics, vol. 4, no. 2, 2017, str. 16, ISSN 2079-9284;
YASUMATSU H. et al.: „The casein peptide Asn-Pro-Trp-Asp-Gln enforces the interstitial tight junction partly by increasing occludin expression in Caco-2 cells,“ British Journal of Nutrition, vol. 104, no. 7, 2010, str. 951 - 956, ISSN 0007-1145; ROBINSON L. R. et al.: „Topical palmitoyl pentapeptide provides improvement in photoaged human facial skin,“ International Journal of Cosmetic Science, vol. 27, 2005, str. 155 – 160, ISSN 0142-5463.
CZ 308492; US 2016113853; WO 2015161179.

(73) Majitel patentu:
Contipro a.s., Dolní Dobrouč, CZ
(72) Původce:
Paulina Orzol, Gliwice 44-113, PL
Iva Dolečková, Polička, Horní Předměstí, CZ
Sergej Karel, Ústí nad Orlicí, Hylváty, CZ
Michaela Voleská, Litomyšl, Litomyšl-Město, CZ
Vladimír Velebný, Žamberk, CZ
(74) Zástupce:
Kania, Sedlák, Smola, s.r.o., Mendlovo náměstí
907/1a, 603 00 Brno, Staré Brno

(54) Název vynálezu:
Pentapeptid odvozený od kaseinu a kompozice, která jej zahrnuje a jejich topické použití

(57) Anotace:
Řešení se týká pentapeptidu odvozeného od kaseinu jako zesilovače kožních buněk s obecným vzorcem I
X-Asn-Pro-Trp-Asp-Gln-Z (I),
kde:
X je -NHX¹ skupina asparaginu na N-konci pentapeptidu,
kde X¹ je vybráno ze skupiny zahrnující H, acetyl,
oktanoyl, dekanoyl, lauroyl, myristoyl, palmitoyl,
stearoyl, elaidoyl, biotinoyl nebo lipoyl;
Z je -COZ¹ skupina glutaminu na C-konci pentapeptidu,
kde Z¹ je vybráno ze skupiny zahrnující OH, OCH₃,
OCH₂CH₃ nebo NH₂;
a topické kompozice, která ho zahrnuje, a jejího povrchového použití.

Pentapeptid odvozený od kaseinu a kompozice, která jej zahrnuje a jejich topické použití

Oblast techniky

Stávající vynález se týká pentapeptidu X-Asn-Pro-Trp-Asp-Gln-Z odvozeného od kaseinu, kompozice, která jej zahrnuje, a jejich topického použití. Týká se zejména použití peptidů odvozených od kaseinu pro ošetření kůže u lidí nebo zvířat pro kosmetické a dermo-farmaceutické účely.

Dosavadní stav techniky

Kůže chrání jako bariéra tělo před biologickými a chemickými faktory, reguluje průchod molekul a chrání proti fyzikálním vlivům, jako je UV záření. Tyto vnější vlivy často poškozují kůži a vyvolávají příslušné buněčné odpovědi, které nakonec způsobují stárnutí kůže [1, 2].

Stará kůže má porušenou funkci bariéry se změněnou propustností pro různé látky [3,4], většinou kvůli snížení obsahu lipidů ve stratum corneum. Předpokládá se, že starší kůže ztrácí přibližně 30 % ceramidů (molekul voskových lipidů) [5]. U některých nemocí, jako je atopická dermatitida, je kožní bariéra také poškozena, což umožňuje pronikání mikrobů a alergenů [6]. Z toho důvodu je zlepšení kožní bariéry jedním z hlavních trendů nejenom v kosmetologii, ale také v dermatologii.

Lidská epidermis sestává ze čtyř hlavních vrstev: stratum basale (SB), stratum spinosum (SS), stratum granulosum (SG) a stratum corneum (SC). Keratinocyty po proliferaci v SB diferencují a migrují vzhůru přes SS do SC. V různých vrstvách jsou exprimovány odlišné sady keratinových intermediálních filament. Keratiny jsou elastické fibrózní proteiny a tvoří heterodimery mezi kyselými (typ I) a zásaditými (typ II) proteiny. Keratiny tvoří filamenta a utvářejí trojrozměrný cytoskelet v cytoplazmě a kolem jádra. Tato filamenta jsou ukotvena v desmozomech, což jsou spojovací komplexy používané pro adhezi buňka-buňka [7, 8]. V poslední vrstvě SG buňky podstupují programovanou buněčnou smrt, která není klasickou „apoptózou“, ale je klasifikována jako „rohovatění“. Rohovatění (keratinizace) je podobné buněčné smrti epitelových buněk čoček a červených krvinek, v tom ohledu, že nejsou aktivovány typické proteiny spojené s apoptózou (např. kaspáza-3). [9, 10]. SC je nejsvrchnější vrstva a je složena z keratinocytů s kompletní keratinizací. [11, 12].

Jedním z hlavních faktorů, které přispívají k funkci kožní bariéry, jsou těsné spoje (TJ) [13, 14]. Těsné spoje jsou velmi komplexní struktury, které tvoří parabuněčnou bariéru, aby těsně regulovaly průchod molekul vysoce selektivním způsobem přes epitel [15]. Těsné spoje sestávají z kladudinů, occludinů, tricellulinu, zonula occludens a molekul adhesivních spojů [16].

Vypnutí nebo snížení syntézy většiny TJ proteinů bylo spojeno s dysfunkcí bariéry [17]. V souvislosti s tím bylo ukázáno, že TJ mají schopnost kompenzovat poškozenou nebo dokonce zcela chybějící SC. Tento jev se projevil zvýšením exprese TJ proteinů, jako je ZO-1 nebo occludin, které vedou k blokování molekul na TJ pozitivních místech [18, 19].

Několik studií buněk tenkého střeva ukázalo, že peptid Asn-Pro-Trp-Asp-Gln (NPWDQ) má specifický účinek na funkci epitelové bariéry. Tanabe a kol. studoval alergie na jídlo a ukázal inhibici prostupování ovalbuminu (známého potravinového alergenu) NPWDQ peptidem v buňkách střeva [20]. Pro demonstraci tohoto účinku použili Caco-2 buňky odvozené od adenokarcinomu tlustého střeva, ve kterých pozorovali pronikání FITC-označeného albuminu. Isobe a kol. dále pozorovali stejný účinek u krys. Poškozená funkce mukosální bariéry u tenkého střeva byla uvedena do původního stavu po podání NPWDQ peptidu [21]. Tyto vlastnosti uvedené výše jsou popsány v patentu: Intestinal permeation inhibitor allergens (JP 5058169 B2). Detailnější

zkoumání dále ukázalo, že NPWDQ peptid zabránil pronikání alergenu u buněk tenkého střeva zvýšením exprese proteinů těsného spojení [22]. Použitím metody mikroarray a následně RT-PCR a western blotové analýzy autoři ukázali zvýšení exprese occludinu u Caco-2 buněk ovlivněných NPWDQ, které bylo velmi specifické. Occludin je transmembránový protein a hraje důležitou roli při udržování těsných spojení [23].

Podstata vynálezu

Překvapivě byly nalezeny nové účinky Asp-Pro-Trp-Asp-Gln pentapeptidu na buňky kůže a zlepšení stavu kůže.

Předmětem stávajícího vynálezu je pentapeptid odvozený od kaseinu, jako látky zlepšující kožní buňky, mající obecný vzorec I



kde:

X je -NHX¹ skupina asparaginu na N-konci pentapeptidu, kde X¹ je vybraný ze skupiny zahrnující H, acetyl, oktanoyl, dekanoyl, lauroyl, myristoyl, palmitoyl, stearyl, elaidoyl, oleoyl, biotinoyl nebo lipoyl;

Z je -COZ¹ skupina glutaminu na C-konci pentapeptidu, kde Z¹ je vybraný ze skupiny zahrnující OH, OCH₃, OCH₂CH₃ nebo NH₂. S výhodou je X¹ H nebo acetyl a Z¹ je OH nebo NH₂.

Pentapeptid obecného vzorce I podle stávajícího vynálezu může být opticky čistý nebo složený z L- nebo D-izomerů nebo jejich směsí. L-izomery, které se také nachází v přírodě, jsou výhodné.

Na základě vybrané kyselé mobilní fáze během purifikace může být pentapeptid podle stávajícího vynálezu ve formě solí, zejména solí kyseliny chlorovodíkové nebo kyseliny octové nebo jakýchkoli solí běžně používaných v kosmetice.

Stávající vynález také zahrnuje deriváty pentapeptidu podle stávajícího vynálezu a jejich komplexy s jinými sloučeninami jako je kovový ion (např. měď, zinek, mangan, hořčík a jiné).

Dalším provedením podle stávajícího vynálezu je topická kompozice zahrnující alespoň jeden pentapeptid obecného vzorce I, jak je definován výše.

Podle výhodného provedení topické kompozice podle stávajícího vynálezu je koncentrace pentapeptidu obecného vzorce I, jak je uveden výše, v rozsahu od 0,001 do 70 % (hmotn./hmotn.), s výhodou v rozsahu od 0,001 do 0,5 % (hmotn./hmotn.), výhodněji od 0,001 do 0,05 % (hmotn./hmotn.). Množství pentapeptidu závisí na účelu kompozice a na požadovaném konečném účinku.

Stávající vynález také zahrnuje topickou kompozici, která obsahuje alespoň jeden pentapeptid podle stávajícího vynálezu v médiu vhodném pro povrchovou kožní aplikaci, který může být vybrán ze skupiny zahrnující krém (emulzi voda-v-oleji nebo olej-ve-vodě, mikro- nebo nano-emulzi), sérum (vodný nebo hydro-alkoholický roztok nebo gel, sterilní nebo nesterilní), bezvodý gel, pastu, disperzi váčků, prášek, nanovlákná, makro-, mikro- nebo nano-kapsle, makro-, mikro- nebo nano-sféry, lipozomy, oleosomy, nebo chylomikrony, makro-, mikro-, nebo nanočástice nebo makro-, mikro- nebo nano-houby (nano-sponges), které mohou být adsorbovány na organické polymerní prášky, mastky, bentonity a jiné anorganické nebo organické nosiče.

Podle jiného výhodného provedení topické kompozice podle stávajícího vynálezu je kompozice ve formě vybrané ze skupiny zahrnující krém, sérum nebo nanovlákná.

- 5 V případě topické kompozice podle stávajícího vynálezu je tato kompozice ve formě krému, koncentrace pentapeptidu obecného vzorce I, jak je uveden výše, je v rozsahu od 0,001 do 1 % (hmotn./hmotn.), s výhodou 0,001 % až 0,05 % (hmotn./hmotn.).

10 Topická kompozice podle stávajícího vynálezu obsahující alespoň jeden pentapeptid v kombinaci s jinými běžnými složkami používanými v kosmetice nebo dermo-farmaceutických produktech.

S výhodou kompozice ve formě krému dále zahrnuje alespoň jednu kosmetickou nebo dermo-farmaceutickou pomocnou složku vybranou ze skupiny zahrnující olej, vosk, máslo, emulgátor, pomocnou aktivní látku a ochranný prostředek.

- 15 S výhodou je množství oleje, vosku, másla nebo jejich směsi v kompozici podle stávajícího vynálezu v rozsahu od 20 do 55 % (hmotn./hmotn.). S výhodou je množství emulgátoru v kompozici podle stávajícího vynálezu v rozsahu od 2 do 7 % (hmotn./hmotn.). S výhodou je množství pomocné aktivní látky v kompozici podle stávajícího vynálezu v rozsahu od 0,001 do 10 % (hmotn./hmotn.). S výhodou je množství ochranného prostředku v kompozici podle
20 stávajícího vynálezu v rozsahu od 0,8 do 1,2 % (hmotn./hmotn.).

S výhodou je olej vybraný ze skupiny zahrnující arganový, kokosový, avokádový, mandlový, sezamový, olivový, slunečnicový, konopný, jojobový, makadamový, ricinový olej; máslo je vybráno ze skupiny zahrnující kokosové máslo, bambucké máslo, avokádové máslo; a vosk je
25 vybraný ze skupiny zahrnující lanolin, včelí vosk, karnaubu, kandelilový vosk a vazelinu.

Dále je emulgátor s výhodou vybraný ze skupiny zahrnující glyceryl stearat, lecithin, steryl alkohol, sorbitan oleát, polysorbát, stearovou kyselinu, cetyl alkohol a cetearyl alkohol, akrylát sodný, akryloyldimethyl taurát sodný kopolymer, izohexadekan, polysorbát 80.

30 Topická kompozice podle stávajícího vynálezu obsahující alespoň jeden pentapeptid podle stávajícího vynálezu může být také kombinována s dalšími pomocnými aktivními látkami, které mohou mít synergický nebo aditivní účinek pro zvýšení nebo rozšíření požadované aktivity popsané ve vynálezu. To může zahrnovat následující látky: látky proti-stárnutí, proti jemným
35 linkám a proti vráskám, zesvětlující, bělicí, proti skvrnám, pro pigmentaci, hydratační, zvlhčující, smáčedla, zeštíhlující, odlupovací, proti akné, proti zčervenání, protizánětlivé, antioxidanty, vychytávače radikálů, projasňující pleť, proti glykaci, zvětšující objem, restrukturalizační, omlazující, regenerující, proti karboxylaci, dermo-relaxační, zlepšující stratum corneum, dermo-epidermální spojení, produkující HSP protein, pevnost, elasticnost a tón pokožky, posilovače
40 kolagenu, oční kontury (tmavé kruhy a podoční vaky), podporující cirkulaci krve, atd.

Výše zmíněné pomocné aktivní látky mohou být syntetické nebo získané z rostlin, bakterií, hub, buněčných kultur nebo produkty jejich fermentace.

- 45 S výhodou je pomocná aktivní látka vybraná ze skupiny zahrnující vitamíny, A, D, E, K, C, B-skupinu vitaminů, koenzym Q10, alantoin, bisabolol, kyselinu mléčnou, aminokyseliny, peptidy, s výhodou Acetyl Hexapeptid-8, Palmitoyl Tripeptid-1, měďnatý tripeptid-1, peptidy Saccharomyces, Hexapeptid-1 a proteiny s výhodou protein rýžový, sójový protein, quinoa protein nebo pšeničný; polysacharidy, hyaluronovou kyselinu nebo její farmaceuticky a kosmeticky
50 přijatelnou sůl, karboxymethylglukan, schizofylan, glukomanan; panthenol; močovinu; glycerin; rostlinné extrakty, ovesné extrakty, konopné extrakty, brusinkový extrakt; bakterie, s výhodou *Lactobacillus*, *Thalassospira*, *Bifidobacterium*, *Halobacterium* nebo houbové extrakty z *Agaricus subrufescens*, *Choiromyces maeandriiformis*, *Cordyceps sinensis*, *Ganoderma lucidum*, *Grifola frondosa*, *Hypsizygus ulmarium*, *Inonotus obliquus*, *Lentinula edodes*, *Polyporus poddr.*, *Trametes versicolor*, *Tremella fuciformis*, *Tuber poddr.*, *Schizophyllum commune*.

Dále s výhodou je ochranný prostředek vybraný ze skupiny zahrnující aromatické kyseliny a jejich deriváty, s výhodou benzoovou kyselinu, salicylovou kyselinu, dehydrooctovou kyselinu, parabeny; alkoholy s výhodou etanol, isopropanol, benzylalkohol, fenoxietanol, fenethylalkohol; imidazol deriváty, s výhodou hydantoin, imidazolidinyl močovinu; kationtové povrchově aktivní činidla, s výhodou benzalkoniumchlorid.

Podle dalšího výhodného provedení topické kompozice podle stávajícího vynálezu je topická kompozice ve formě séra zahrnujícího pentapeptid obecného vzorce I podle stávajícího vynálezu v koncentraci od 0,001 do 1 % (hmotn./hmotn.), s výhodou od 0,01 do 0,5 % (hmotn./hmotn.).

Dále topická kompozice podle stávajícího vynálezu může s výhodou obsahovat alespoň jednu ve vodě rozpustnou pomocnou aktivní látku v rozsahu od 0,001 do 10 % (hmotn./hmotn.) a alespoň jeden ochranný prostředek, jak je definováno výše.

Dále je s výhodou ve vodě rozpustná pomocná aktivní látka vybraná ze skupiny zahrnující vitamín C; skupinu B vitamínů; aminokyseliny, peptidy s výhodou acetyl hexapeptid-8 argilin, palmitoyl tripeptid, měďnatý tripeptid-1, peptidy *Saccharomyces*, hexapeptid-1, a proteiny s výhodou rýžový protein, sójový protein, quinoa nebo pšeničný protein; dále ve vodě rozpustné polysacharidy s výhodou hyaluronovou kyselinu nebo její farmaceuticky a kosmeticky přijatelnou sůl, karboxymethyl glukon, schizofylan, glukomannan; panthenol; močovinu; glycerin; rostlinné extrakty s výhodou extrakt aloe vera, heřmánkový extrakt, extrakt z akácie, extrakt ze zeleného čaje, extrakt z řas, ovesný extrakt, konopný extrakt, brusinkový extrakt; bakterie s výhodou *Lactobacillus*, *Thalassospira*, *Bifidobacterium*, *Halobacterium* nebo extrakt z hub z *Agaricus subrufescens*, *Choiromyces meandriformis*, *Cordyceps sinensis*, *Ganoderma lucidum*, *Grifola frondosa*, *Hypsizygu ulmarium*, *Inonotus obliquus*, *Lentinula edodes*, *Polyporus poddr.*, *Trametes versicolor*, *Tremella fuciformis*, *Tuber poddr.*, *Schizofyllum commune*.

Množství vody v kompozici podle stávajícího vynálezu ve formě krému nebo séra obecně odpovídá množství vody přidané do 100 % (hmotn./hmotn.) kompozice.

Podle jiného výhodného provedení topické kompozice je tato kompozice ve formě nanovláken zahrnujících pentapeptid obecného vzorce I, jak je definován výše, a jeho koncentrace je v rozsahu 0,07 až 70 % (hmotn./hmotn.), s výhodou 0,07 až 7 % (hmotn./hmotn.) a alespoň jeden pomocný polymer.

Nanovlákná mohou s výhodou dále obsahovat kyselinu hyaluronovou nebo její farmaceuticky a kosmeticky přijatelnou sůl. Její koncentrace v nanovlákněch v topické kompozici podle stávajícího vynálezu je v rozsahu 5 až 80 % (hmotn./hmotn.) a koncentrace pomocného polymeru je v rozsahu 10 až 94 % (hmotn./hmotn.).

Dále je s výhodou pomocný polymer vybrán ze skupiny zahrnující polyethylenoxid, polyvinylalkohol nebo jejich směs.

Podle jiného výhodného provedení topické kompozice tato kompozice dále zahrnuje alespoň jednu pomocnou aktivní látku, jak je definováno výše.

Podle dalšího výhodného provedení topické kompozice jsou nanovlákná ve formě ve vodě rozpustné suché vrstvy.

Nové je použití pentapeptidu obecného vzorce I podle stávajícího vynálezu nebo použití kosmetických nebo dermo-farmaceutických kompozic obsahujících uvedený pentapeptid pro zlepšení stavu kůže a jejího vzhledu. Konkrétněji pentapeptid podle stávajícího vynálezu vykazuje aktivitu antioxidantu, zlepšuje funkci kožní bariéry stimulací produkce adheze, těsného spojení a proteinů rohovatění a zvyšuje také hydrataci pokožky indukci filaggrinu, jehož degradační

produkty jsou částí přirozeného zvlhčujícího faktoru kůže. Uvedený pentapeptid podle stávajícího vynálezu je zlepšovač stavu kožních buněk zejména dalším účinkem, tedy zvýšením keratinizace – procesu, který nastává pouze v buňkách kůže. Dále je uvedený pentapeptid podle stávajícího vynálezu také užitečný pro obnovení funkce kožní bariéry *in vivo* u epidermis člověka a pro zvýšení genové exprese proteinů zahrnutých ve funkci kožní bariéry a hydratace *in vivo* v epidermis člověka.

Uvedený pentapeptid topické kompozice podle stávajícího vynálezu je určen pro normální kůži a také pro kůži s porušenou funkcí bariéry spojenou s různými kožními nemocemi.

Podle dalšího výhodného provedení jsou pentapeptid obecného vzorce I podle stávajícího vynálezu a topická kompozice podle stávajícího vynálezu vhodné pro použití při léčbě kůže. S výhodou pro použití pro lékařské ošetření kožních nemocí vybraných ze skupiny zahrnující atopickou dermatitidu, psoriázu, nemoc odlupování kůže, ichthyózu. Nebo s výhodou pro použití pro kosmetické ošetření kůže.

Je známo, že kosmeticky a farmaceuticky přijatelné soli kyseliny hyaluronové jsou takové, které vznikají z kyselin, které tvoří netoxické kyselé anionty vybrané ze skupiny zahrnující sodík, draslík, vápník, hořčík, zinek.

Všechna % uvedená níže jsou, pokud není uvedeno jinak, % hmotnostní (hmotn./hmotn.). U topické kompozice podle stávajícího vynálezu znamenají celkovou hmotnost kompozice.

Objasnění výkresů

Obr. 1. Cytotoxicita NPWDQ a acetyl-Asn-Pro-Trp-Asp-Gln (ac-NPWDQ). Data představují průměr±SEM z alespoň 3 nezávislých experimentů.

Obr. 2. Antioxidační aktivita NPWDQ a ac-NPWDQ. Data představují průměr±SEM z alespoň 3 nezávislých experimentů. Pro statistickou analýzu byl použit Studentův T-test (* $p < 0,05$; ** $p < 0,01$; *** $p < 0,001$).

Obr. 3. Primární kožní dráždivý index (PDII) pro NPWDQ. NPWDQ peptid byl aplikován v okluzi na volární stranu předloktí u 15 dobrovolníků po 18 h. Ošetřená kůže byla potom ohodnocena a skórována na známky podráždění a byl spočítán PDII. U testovaných koncentrací NPWDQ peptidu: 200 a 100 $\mu\text{g/ml}$ nebyly žádné známky kožního podráždění a PDII byl pod 0,5 (limit pro nedráždivé látky).

Obr. 4. Obnovení TEWL (Transdermální ztráta vody) v lidské kůži *in vivo* po odlepení náplasti a aplikaci NPWDQ. NPWDQ peptid (200 $\mu\text{g/ml}$ v PBS) byl aplikován na kůži, ze které byla odlepena náplast na volární straně předloktí u 10 dobrovolníků. TEWL bylo měřeno bezprostředně po odlepení náplasti a po 48 h ošetření NPWDQ. Peptid NPWDQ přispěl k rychlejšímu obnovení TEWL v porovnání s kontrolou (PBS). Pro statistickou analýzu byl použit Studentův T-test (* $p < 0,05$; ** $p < 0,01$; *** $p < 0,001$).

Obr. 5. Snížení TEWL v lidské kůži po ošetření acetylovaným NPWDQ (ac-NPWDQ). Split-face studie na 16 dobrovolnících ukázala, že 6 týdnů aplikace ac-NPWDQ (0,001%) způsobuje snížení TEWL o 15 %. Pro statistickou analýzu byl použit Studentův T-test (* $p < 0,05$; ** $p < 0,01$; *** $p < 0,001$).

Obr. 6. Zvýšení hydratace pokožky po ošetření acetylovaným NPWDQ (ac-NPWDQ). Split-face studie na 16 dobrovolnících ukázala, že 6 týdnů aplikace ac-NPWDQ (0,001%) způsobila zvýšení hydratace pokožky o 8 %. Pro statistickou analýzu byl použit Studentův T-test (* $p < 0,05$; ** $p < 0,01$; *** $p < 0,001$).

Příklady uskutečnění vynálezu

5 Příklad 1 Cytotoxicita NPWDQ a ac-NPWDQ peptidů.

Cytotoxicita NPWDQ a ac-NPWDQ (acetylovaných) peptidů, které byly syntetizovány (viz příklady 8 a 9) byla testována na NIH-3T3 myších embryonálních fibroblastech. Buňky byly nasazeny na 96-jamkové destičky a kultivovány 24 hodin. Buněčná viabilita byla měřena 24 hodin po ošetření peptidy použitím postupu s 3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-2,5-difenyl-tetrazoliumbromidem (MTT). MTT zásobní roztok (20 μ l; koncentrace 5 mg/ml) byl přidán do buněčného kultivačního média (200 μ l) do každé jamky. Destičky byly inkubovány 2,5 h při 37 °C. Potom, po odstranění roztoku MTT, byl přidán lyzační roztok 220 μ l (45% isopropanol, 45% DMSO, 10% Triton-X, 0,3M HCl) a byla provedena buněčná lyze a rozpuštění formazanu 30 min při teplotě místnosti. Absorbance byla měřena na VERSAmax mikrodestičkovém readeru při 570 nm. Výsledky jsou ukázány na obr. 1. MTT test ukázal, že 24-h ošetření NPWDQ a ac-NPWDQ peptidem nemá žádný negativní účinek na viabilitu 3T3 buněk. Žádné významné negativní účinky na buněčnou viabilitu nebyly pozorovány v celém testovaném koncentračním rozsahu pro oba peptidy.

20

Příklad 2 Antioxidační aktivita NPWDQ a ac-NPWDQ peptidů.

Antioxidační aktivita NPWDQ a ac-NPWDQ, které byly syntetizovány (viz příklady 8 a 9) byla stanovena použitím 2,2-difenyl-1-pikrylhydrazyl (DPPH; Sigma-Aldrich) jako volného radikálu, který v přítomnosti antioxidantu mění barvu z fialové na žlutou. DPPH postup byl proveden, jak bylo popsáno dříve (Brand-Williams a kol., 1995), s menšími modifikacemi. Stručně, 100 μ l 0,01% DPPH naředěného v metanolu bylo přidáno k 100 μ l testované látky naředěné v 50mM Tris pH 7,1 v 96-jamkové destičce. Po 15 min byla absorbance měřena při 515 nm použitím VersaMax mikrodestičkového readeru (Molecular Devices). V DPPH postupu ukázaly peptidy NPWDQ a ac-NPWDQ významnou přímou antioxidační aktivitu. Ukázaly schopnost přímého vychytávání volných radikálů v testovaných koncentracích (obr. 2). Pro statistickou analýzu byl použit Studentův T-test (* p <0,05; ** p <0,01; *** p <0,001).

30

Příklad 3

35

Zvýšení syntézy proteinů těsných spojů a adhesivních molekul v HaCaT keratinocytech NPWDQ a ac-NPWDQ ošetřením.

HaCaT keratinocyty byly nasazeny na 6-jamkovou destičku a kultivovány 24 h. Potom byly ošetřeny 100 μ g/ml NPWDQ nebo ac-NPWDQ, které byly syntetizovány (viz příklady 8 a 9) a inkubovány 48 h. Celková RNA byla izolována ze vzorků použitím RNase mini kit (Qiagen) podle instrukcí poskytnutých dodavatelem. Koncentrace a čistota izolované RNA byla stanovena použitím NanoDropTM One/OneC Mikroobjemového UV-Vis spektrofotometru použitím 260/280 absorpčního poměru. 1 μ g izolované RNA byl použit pro reverzní transkripční reakci provedenou se soupravou High Capacity RNA to cDNA Kit (Invitrogen) v GenePro termálním cykleru (Bioer Technology) podle instrukcí výrobce. Následně bylo provedeno kvantitativní real-time PCR (qRT-PCR) s TaqMan postupem pro genovou expresi (TJP1, TJP2, CDH1, OCLN) a TaqMan Fast Advanced Mastermix (Applied Biosystems) podle doporučení dodavatele v StepOne real time PCR cykleru (Applied Biosystems). RPL13A byl použit jako referenční gen. Data byla analyzována použitím $2^{-\Delta\Delta C_t}$ metody.

50

Analýza ukázala zvýšenou genovou expresi adhesivních proteinů a proteinů těsných spojů (viz tab. 1 a tab. 2).

Tabulka 1. Expres genů kódujících proteiny těsných spojů TJP1, TJP2, OCLN a adhesivních molekul CDH1, DSG1 v HaCaT keratinocytech po ošetření NPWDQ (100 µg/ml) 48 h. Genová exprese byla stanovena qRT-PCR. Data představují průměr±SEM z alespoň 3 nezávislých experimentů. Pro statistickou analýzu byl použit Studentův T-test (*p<0,05; ** p<0,01; *** p<0,001).

Tabulka 1

NPWDQ			
Gen	Násobná změna/kontrola	SEM	p-hodnota (Studentův test)
<i>TJP1</i>	4,68	0,20	0,003
<i>TJP2</i>	3,25	0,22	0,010
<i>CDH1</i>	1,92	0,16	0,027
<i>OCLN</i>	2,55	0,19	0,015

Tabulka 2. Expres genů kódujících proteiny těsných spojů TJP1, TJP2, OCLN a adhesivních molekul CDH1, DSG1 v HaCaT keratinocytech po ošetření ac-NPWDQ (100 µg/ml) 48 h. Genová exprese byla stanovena qRT-PCR. Data představují průměr±SEM z alespoň 3 nezávislých experimentů. Pro statistickou analýzu byl použit Studentův T-test (*p<0,05; ** p<0,01; *** p<0,001).

Tabulka 2

Ac-NPWDQ			
Gen	Násobná změna/kontrola	SEM	p-hodnota (Studentův test)
<i>TJP1</i>	3,93	0,52	0,030
<i>TJP2</i>	2,63	0,14	0,007
<i>CDH1</i>	1,71	0,14	0,036
<i>OCLN</i>	1,53	0,28	0,202

Příklad 4 Index kožní dráždivosti pro NPWDQ.

Test s náplastí pro kožní dráždivost byl proveden s NPWDQ, který byl syntetizován (viz příklad 8), aplikován v okluzi na volární stranu předloktí u 15 dobrovolníků. Peptid byl aplikován v solném roztoku pufrovaném fosfátem (PBS) v koncentracích 100 a 200 µg/ml 18 h, PBS bylo aplikováno jako negativní kontrola. Po aplikaci bylo provedeno subjektivní ohodnocení a skórování ošetřené kůže (erytém, edém) v různých časových bodech: 0, 2, 24, 48, 72 h po odstranění náplasti. Byl vypočítán primární index kožní dráždivosti. NPWDQ peptid nemá žádný dráždivý účinek na lidskou kůži (obr. 3).

Příklad 5 Obnovení funkce kožní bariéry *in vivo* u lidské epidermis ošetřením NPWDQ.

Kožní bariéra na dvou 1,5 cm² plochách vzdálených 2 cm od sebe na volární straně předloktí 10 dobrovolníků byla narušena odtrhnutím náplasti (15 D-Squamózních disků na každé místo, CuDerm) horních vrstev SC. Dále TEWL bylo měřeno na obou místech použitím TM 30 tewametry (CK Electronics) a potom bylo aplikováno 0,2 mg/ml NPWDQ peptidu syntetizovaného (viz příklad 8) v PBS nebo samotné PBS šestkrát během 48 h, a to v 8 h, ve 14 h a ve 20 h každý den na dvou testovaných oblastech. Po 48 h jsme měřili TEWL znovu a pozorovali jeho větší snížení na místě, kde byl aplikován peptid. To ukazuje rychlejší obnovení funkce kožní bariéry NPWDQ peptidem (obr. 4). Pro statistickou analýzu byl použit Studentův T-test (*p<0,05; ** p<0,01; *** p<0,001).

Příklad 6 Zvýšení genové exprese proteinů zahrnutých ve funkci kožní bariéry a hydratace *in vivo* u lidské epidermis ošetřením NPWDQ.

Epidermis po odtržení náplasti u deseti dobrovolníků ošetřených NPWDQ, který byl syntetizován (viz příklad 8), byla po TEWL měření, jak je popsáno v příkladu 5, vzorkována použitím metody sacího puchýře. Potom byla epidermis homogenizována a RNA byla izolována ze vzorků guanidin thiokyanát-fenolovou extrakční metodou použitím RNeasy Lysis Buffer (Molecular Research Center) a soupravou RNase mini kit (Qiagen) podle instrukcí poskytnutých dodavateli. Dále byla provedena procedura (RT-PCR a real-time qPCR), jak je popsáno v příkladu 3.

Bylo pozorováno zvýšení exprese genů (viz tabulka 3 níže) kódujících protein těsných spojů 1 (TJP1) a také adhezni molekuly jako kadherin 1 (CDH1) a desmoglein 1 (DSG1) a také proteiny rohovatění jako involukrin (IVL) a filagrin (FLG) (tab. 3). Kromě jeho role při rohovatění filagrin také podstupuje degradaci na volné aminokyseliny a deriváty, jako je urokanová kyselina (UCA) a pyrrolidon karboxylová kyselina (PCA), které jsou souborně označovány jako přirozený zvlhčující faktor (NMF) zvyšující SC hydrataci [24]. Pro statistickou analýzu byl použit Studentův T-test (* $p < 0,05$; ** $p < 0,01$; *** $p < 0,001$).

Tabulka 3. Exprese genů kódujících protein těsných spojů 1 (TJP1), adhesivní molekuly kadherin 1 (CDH1), desmoglein 1 (DSG1) a proteiny rohovatění involukrin (IVL) a filagrin (FLG) u lidské epidermis *in vivo* po odtržení náplasti a aplikaci NPWDQ. NPWDQ peptid (200 $\mu\text{g/ml}$ v PBS) byl aplikován šestkrát během 48 h na kůži po odtržení náplasti na volárních stranách předloktí 10 dobrovolníků. Exprese CDH1, DSG1, TJP1, IVL a FLG byla stanovena použitím qRT-PCR u vzorků epidermis získaných technikou sacího puchýře. Ošetření NPWDQ zvýšilo expresi u všech vyhodnocených genů. Pro statistickou analýzu byl použit Studentův T-test (* $p < 0,05$; ** $p < 0,01$; *** $p < 0,001$).

Tabulka 3

Lidská epidermis			
Gen	Násobná změna/kontrola	SEM	p-hodnota (Studentův test)
<i>IVL</i>	13,44	3,97	0,056
<i>FLG</i>	18,93	4,04	0,004
<i>CDH1</i>	1,68	0,34	0,071
<i>TJP1</i>	10,18	3,00	0,022
<i>DSG1</i>	9,85	2,50	0,016

Příklad 7 Zlepšení funkce kožní bariéry *in vivo* acetylovaným NPWDQ.

16 dobrovolníkům byl aplikován acetylovaný NPWDQ (ac-NPWDQ) syntetizovaný (viz příklad 9) v krému (0,001%) na jednu polovinu tváře 6 týdnů dvakrát denně. Na druhou polovinu bylo aplikováno placebo. Bylo měřeno TEWL použitím TM 30 tewametru (CK Electronics) na začátku studie a potom po 2, 4 a 6 týdnech. Po 6 týdnech ac-NPWDQ aplikace jsme pozorovali snížení TEWL o 15 % v porovnání s placebem (obr. 5). Dále vedla aplikace peptidu ke zvýšení kožní hydratace o 8 % (obr. 6).

Příklad 8 Syntéza NPWDQ

NPWDQ peptid a jeho deriváty byly syntetizovány standardním postupem pro syntézu peptidů na pevné fázi použitím Fmoc/tBu strategie na Wang pryskyřice [25, 26]. Výsledné peptidy byly odštěpeny od pryskyřice a chránicí skupiny z vedlejších řetězců byly odstraněny použitím směsi TFA/H₂O/CH₂Cl₂/anisol/TIS (85:5:5:2,5:2,5)

Surové peptidy byly purifikovány na Shimadzu preparativním HPLC (série Prominence). XBridge OBD Preparativní kolona Reversní fáze 5 µm Sfěrický Hybrid, 50 mm x 50 mm byl použit pro separaci s průtokem 30 ml/min. Mobilní fáze sestávala z A 0,1% HCOOH ve vodě a B acetonitril a gradient od 10 do 16 % B 14 min byl použit pro eluci. Čistota peptidu byla ověřena na PDA a MS detektoru.

Příklad 9 Syntéza acetylovaného NPWDQ (ac-NPWDQ)

První část syntézy byla provedena, jak je popsáno v příkladu 8. Po odstranění chránicích skupin Fmoc a promytí byla přidána do reaktoru směs acetanhydridu a pyridinu (1/1, obj./obj.) v DMF. N-koncová acetylace byla prováděna 30 minut. Výsledný peptid byl odštěpen od pryskyřice a z vedlejších řetězců byly odstraněny chránicí skupiny použitím koktejlu TFA/H₂O/CH₂Cl₂/anisol/TIS (85:5:5:2,5:2,5).

Surové peptidy byly rozpuštěny v 50% acetonitrilu a purifikovány na Shimadzu preparativním HPLC (série Prominence). XBridge OBD Preparativní kolona Reversní fáze 5 µm Sfěrický Hybrid, 50 mm x 50 mm byl použit pro rozdělení s průtokem 30 ml/min. Mobilní fáze byla A 0,1% HCOOH ve vodě a B acetonitril a gradient od 10 do 30 % B po dobu 21 min byl použit pro eluci. Čistota peptidu byla ověřena PDA a MS detektorem.

Příklad 10 Syntéza lauroyl-NPWDQ (C₁₂-laur-NPWDQ)

První část syntézy byla provedena, jak je popsáno v příkladu 8. Po odstranění Fmoc-chránicích skupin a promytí byla přidána laurová kyselina a DIC k pryskyřici pro N-koncovou lauroylaci. Reakce byla prováděna 24 hodin. Výsledný peptid byl odštěpen z pryskyřice a chránicí skupiny z vedlejšího řetězce byly odstraněny použitím koktejlu TFA/H₂O/CH₂Cl₂/anisol/TIS (85:5:5:2,5:2,5).

Surové peptidy byly rozpuštěny ve 100% acetonitrilu a purifikovány na Shimadzu preparativním HPLC (série Prominence). XBridge OBD Preparativní kolona Reversní fáze 5 µm Sfěrický Hybrid, 50 mm x 50 mm byla použita pro separaci s průtokem 30 ml/min. Mobilní fáze byla A 0,1% HCOOH ve vodě a B acetonitril a gradient od 10 do 76 % B 19 min byl použit pro eluci. Čistota peptidu byla ověřena PDA a MS detektorem.

Příklad 11 Kompozice zahmující pentapeptidy podle stávajícího vynálezu: krém s NPWDQ nebo ac-NPWDQ.

Příklad krému (emulze olej ve vodě) obsahující pentapeptid podle stávajícího vynálezu NPWDQ a jeho deriváty.

Tabulka 4

Složka	INCI	% (hmotn./hmotn.)
Olejová fáze		
Krémový základ CA-20	Cetearyl alcohol, ceteareth-20	6
Makadamový olej	Macadamia Integrifolia Seedoil	7
Olivový olej	Olea Europaea Fruit oil	7
Jojobový olej	Simmondsia Chinensis (Jojoba) Seed Oil	6
Cetylalkohol	Cetyl alcohol	4
Vitamin E	Tocopheryl Acetate	1
Vodná fáze		
Voda	Aqua	54
Glycerin	Glycerin-	4

Gelový základ EMU	Sodium acrylate / sodium acryloyldimethyl taurate copolymer, isohexadecane, polysorbate 80	0,5
Močovina	Urea	3
Vitamin B3	Niacinamide	1,5
Fáze aktivní složky		
Voda	Aqua	5,19
NPWDQ	-	0,01
Ochranný prostředek		
Benzylalkohol-DHA	Benzylalcohol, dehydroacetic acid	0,8

Tabulka 5

Složka	INCI	% (hmotn./hmotn.)
Olejová fáze		
Emulzifikační vosk N200	Cetearyl Alcohol, PEG20 stearate	2
Makadamový olej	Macadamia Integrifolia Seed oil	6
Olivový olej	Olea Europaea Fruit oil	10
Jojobový olej	Simmondsia Chinensis Seed Oil	8
Cetyl alkohol	Cetyl alcohol	4
Vodná fáze		
Voda	Aqua	54,5
Glycerin	Glycerin	4
Gelový základ EMU	Sodium acrylate / sodium acryloyldimethyl taurate copolymer, isohexadecane, polysorbate 80	0,5
Močovina	Urea	3
Vitamin B3	Niacinamide	1,5
Fáze aktivní složky		
Voda	Aqua	5,19
NPWDQ	-	0,01
Ochranný prostředek		
Fenoxyetanol	Phenoxyetanol	0,8

5 Tabulka 6

Složka	INCI	% (hmotn./hmotn.)
Olejová fáze		
N200	Cetearyl Alcohol, PEG20 stearate	2
Makadamový olej	Macadamia Integrifolia Seed oil	6
Olivový olej	Olea Europaea Fruit oil	10
Jojobový olej	Simmondsia Chinensis Seed Oil	8
Cetyl alkohol	Cetyl alcohol	4
Vodná fáze		
Voda	Aqua	54,5
Glycerin	Glycerin	4
Gelový základ EMU	Sodium acrylate / sodium acryloyldimethyl taurate copolymer, isohexadecane, polysorbate 80	0,5
Močovina	Urea	3
Vitamin B3	Niacinamide	1,5
Fáze aktivní složky		
Voda	Aqua	5,189

NPWDQ	-	0,01
Inspira^{SEA}	Thalassospira xiamenensis lysate extract	0,001
Ochranný prostředek		
Fenoxietanol	Phenoxyetanol	0,8

Tabulka 7

Složka	INCI	% (hmotn./hmotn.)
Olejová fáze		
Krémový základ CA-20	Cetearyl alcohol, cetareth-20	5,5
Makadamový olej	Macadamia Integrifolia Seedoil	8
Olivový olej	Olea Europaea Fruit oil	8
Jojobový olej	Ricinus communis seed oil	4
Cetyl alkohol	Cetyl alcohol	1
Vitamin E	Tocopheryl Acetate	1
Vodná fáze		
Voda	Aqua	61,509
Gelový základ EMU	Sodium acrylate / sodium acryloyldimethyl taurate copolymer, isohexadecane, polysorbate 80	0,5
Močovina	Urea	3
Vitamin B3	Niacinamide	1,5
Fáze aktivní složky		
Voda	Aqua	5,19
lauroyl-NPWDQ	-	0,001
Ochranný prostředek		
Benzylalkohol-DHA	Benzylalcohol, dehydroacetic acid	0,8

5 Tabulka 8

Složka	INCI	% (hmotn./hmotn.)
Olejová fáze		
Krémový základ CA-20	Cetearyl alcohol, cetareth-20	5,5
Arganový olej	Argania spinosa Kernel Oil	7
Bambucké máslo	Butyrospermum parkii butter	7
Jojobový olej	Simmondsia Chinensis Seed Oil	6
Vitamin E	Tocopheryl Acetate	1
Vodná fáze		
Voda	Aqua	58,01
Glycerin	Glycerin	4
Gelový základ EMU	Sodium acrylate / sodium acryloyldimethyl taurate copolymer, isohexadecane, polysorbate 80	0,5
Močovina	Urea	3
Vitamin B3	Niacinamide	1,5
Fáze aktivní složka		
Voda	Aqua	5,19
oktanoyl-NPWDQ	-	0,5
Ochranný prostředek		
Benzylalkohol-DHA	Benzylalcohol, dehydroacetic acid	0,8

Tabulka 9

Složka	INCI	% (hmotn./hmotn.)
Olejová fáze		
Mandlový olej	Prunus amygdalus dulcis oil	16
Bambucké máslo	Butyrospermum parkii butter	5
Cetyl alkohol	Cetyl alcohol	4
Vodná fáze		
Voda	Aqua	52,9
Glycerin	Glycerin	4
Fáze aktivní složky		
Voda	Aqua	10
Panthenol	Panthenol	2
Tanaktin	Glucomannan	0,2
Schizophyllan	Schizophyllan	0,1
Močovina	Urea	4
ac-NPWDQ	-	1
Ochranný prostředek		
Benzylalkohol-DHA	Benzylalcohol, dehydroacetic acid	0,8

5 Tabulka 10

Složka	INCI	% (hmotn./hmotn.)
Olejová fáze		
Krémový základ CA-20	Cetearyl alcohol, cetearth-20	6
Makadamový olej	Macadamia Integrifolia Seed) oil	8
Olivový olej	Olea Europaea Fruit oil	8
Ricinový olej	Ricinus communis seed oil	4
Cetyl alkohol	Cetyl alcohol	4
Vitamin E	Tocopheryl Acetate	4,5
Vodná fáze		
Voda	Aqua	53,509
Gelový základ EMU	Sodium acrylate / sodium acryloyldimethyl taurate copolymer, isohexadecane, polysorbate 80	0,5
Močovina	Urea	3
Vitamin B3	Niacinamide	1,5
Vitamin C	sodium ascorbyl phosphate	1
Fáze aktivní složky		
Voda	Aqua	5,19
lauroyl-NPWDQ	-	0,001
Ochranný prostředek		
Benzylalkohol-DHA	Benzylalcohol, dehydroacetic acid	0,8

Tabulka 11

Složka	INCI	% (hmotn./hmotn.)
Olejová fáze		
Krémový základ CA-20	Cetearyl alcohol, cetearth-20	6
Arganový olej	Argania spinosa Kernel Oil	5
Bambucké máslo	Butyrospermum parkii butter	10
Jojobový olej	Simmondsia Chinensis Seed Oil	5

Vitamin E	Tocopheryl Acetate	1
Vodná fáze		
Voda	Aqua	57,11
Glycerin	Glycerin	4
Gelový základ EMU	Sodium acrylate / sodium acryloyldimethyl taurate copolymer, isohexadecane, polysorbate 80	0,5
Močovina	Urea	3
Vitamin B3	Niacinamide	1,5
Fáze aktivní složky		
Voda	Aqua	5,19
oktanoyl-NPWDQ	-	0,5
Ochranný prostředek		
Benzylalkohol-DHA	Benzylalcohol, dehydroacetic acid	0,8
2-fenoxyetanol	Phenoxyetanol	0,4

Po přípravě olejové a vodné fáze byly tyto zahřáty na 70 °C. Potom byly obě fáze smíchány dohromady a emulgovány za míchání (290 ot./min). Po míchání je emulze ochlazena na 40 °C a je přidána aktivní složka a ochranný prostředek. pH je kontrolováno a v případě, že není mezi 5,2 až 6,5, je upraveno 1 až 50% kyselinou citronovou nebo 1 až 50% KOH nebo NaOH.

Příklad 12 Kompozice s peptidy podle stávajícího vynálezu: sérum s NPWDQ nebo jeho deriváty.

Příklad séra obsahujícího pentapeptid podle stávajícího vynálezu NPWDQ.

Tabulka 12

	INCI	% (hmotn./hmotn.)
Voda	Aqua	98,199
Hyaluronát sodný	Sodium hyaluronate	1
NPWDQ	-	0,001
2-fenoxyetanol	Phenoxyetanol	0,8

Tabulka 13

Složka	INCI	% (hmotn./hmotn.)
Voda	Aqua	97,36
Hyaluronát sodný	Sodium hyaluronate	1,50
NaCl	Sodium chloride	0,80
Na ₂ HPO ₄ · 12 H ₂ O	Disodium phosphate dodecahydrate	0,29
KH ₂ PO ₄	Potassium dihydrogen phosphate	0,02
KCl	Potassium chloride	0,02
oleoyl-NPWDQ	-	0,0055
Benzylalkohol-DHA	Benzylalcohol, dehydroacetic acid	0,8

Tabulka 14

Složka	INCI	% (hmotn./hmotn.)
Voda	Aqua	95
Hyaluronát sodný	Sodium hyaluronate	1,5
Vitamin B3	Niacinamide	1,5

Tanaktin	Glucomannan	0,2
ac-NPWDQ	-	1
2-fenoxyetanol	Phenoxyetanol	0,8

Tabulka 15

Složka	INCI	% (hmotn./hmotn.)
Voda	Aqua	90
Hyaluronát sodný	Sodium hyaluronate	1,5
Vitamin B3	Niacinamide	1,5
Vitamin C	sodium ascorbyl phosphate	5
Tanaktin	Glucomannan	0,2
ac-NPWDQ	-	1
2-fenoxyetanol	Fenoxyetanol	0,8

5 Tabulka 16

Složka	INCI	% (hmotn./hmotn.)
Voda	Aqua	92,8
Hyaluronát sodný	Sodium hyaluronate	1,5
Vitamin B3	Niacinamide	1,5
Vitamin C	sodium ascorbyl phosphate	1,8
Tanaktin	Glucomannan	0,2
ac-NPWDQ	-	1
Benzoová kyselina	Benzoic acid	0,5
2-fenoxyetanol	Fenoxyetanol	0,7

Nejdříve je peptid NPWDQ přidán do vody a míchán, dokud se zcela nerozpustí. Potom je fenoxyetanol a hyaluronát sodný míchán s vodou, dokud se zcela nerozpustí.

10

Příklad 13 Kompozice s peptidy podle stávajícího vynálezu: nanovláknenná vrstva s NPWDQ nebo jeho deriváty.

Příklad nanovláknenná vrstvy obsahující peptid podle stávajícího vynálezu NPWDQ.

15

Tabulka 17

Složka	INCI	% (hmotn./hmotn.)
Hyaluronát sodný	Sodium hyaluronate	79,9
Polyetylenoxid	PEG-9M	20
NPWDQ nebo ac-NPWDQ	-	0.1

Tabulka 18

20

Složka	INCI	% (hmotn./hmotn.)
Hyaluronát sodný	Sodium hyaluronate	5
Polyetylenoxid	PEG-9M	25
ac-NPWDQ	-	70

Tabulka 19

Složka	INCI	% (hmotn./hmotn.)
Hyaluronát sodný	Sodium hyaluronate	4
Polyetylenoxid	PEG-9M	94
lauroyl-NPWDQ	-	2

5 Tabulka 1

Složka	INCI	% (hmotn./hmotn.)
Hyaluronát sodný	Sodium hyaluronate	43
Polyetylenoxid	PEG-9M	50
myristoyl-NPWDQ	-	7

Tabulka 2

Složka	INCI	% (hmotn./hmotn.)
Hyaluronát sodný	Sodium hyaluronate	50
Polyetylenoxid	PEG-9M	15
oktanoyl-NPWDQ	-	35

10

Po rozpuštění všech složek ve vodě jsou nanovlákná generována elektrostatickým zvlákňováním (4 SPIN, Contipro). Přesný protokol přípravy je popsán v české přihlášce vynálezu PV 2013-820.

Bibliografie

15

1. Gilchrest, B.A., Photoaging. J Invest Dermatol, 2013. 133(E1): str. E2-6.
2. Kohl, E., a kol., Skin ageing. J Eur Acad Dermatol Venereol, 2011. 25(8): str. 873-84.
3. Farage, M.A., a kol., Functional and physiological characteristics of the aging skin. Aging Clin Exp Res, 2008. 20(3): str. 195-200.
- 20 4. Hung, C.F., a kol., Evaluation of drug and sunscreen permeation via skin irradiated with UVA and UVB: comparisons of normal skin and chronologically aged skin. J Dermatol Sci, 2012. 68(3): str. 135-48.
5. Coderch, L., a kol., Ceramides and skin function. Am J Clin Dermatol, 2003. 4(2): str. 107-29.
- 25 6. Agrawal, R. a J.A. Woodfolk, Skin barrier defects in atopic dermatitis. Curr Allergy Asthma Rep, 2014. 14(5): str. 433.
7. Eckert, R.L., Structure, function, and differentiation of the keratinocyte. Physiol Rev, 1989. 69(4): str. 1316-46.
8. Watt, F.M., Terminal differentiation of epidermal keratinocytes. Curr Opin Cell Biol, 1989. 1(6): str. 1107-15.
- 30 9. Kroemer, G., a kol., Classification of cell death: recommendations of the Nomenclature Committee on Cell Death 2009. Cell Death Differ, 2009. 16(1): str. 3-11.
10. Eckhart, L., a kol., Cell death by cornification. Biochim Biophys Acta, 2013. 1833(12): str. 3471-3480.
- 35 11. Elias, P.M., Epidermal lipids, barrier function, and desquamation. J Invest Dermatol, 1983. 80 Suppl: str. 44s-49s.
12. Nemes, Z. a P.M. Steinert, Bricks and mortar of the epidermal barrier. Exp Mol Med, 1999. 31(1): str. 5-19.
- 40 13. Kirschner, N., a kol., Contribution of tight junction proteins to ion, macromolecule, and water barrier in keratinocytes. J Invest Dermatol, 2013. 133(5): str. 1161-9.

14. Yuki, T., a kol., Tight junction proteins in keratinocytes: localization and contribution to barrier function. *Exp Dermatol*, 2007. 16(4): str. 324-30.
15. Niessen, C.M., Tight junctions/adherens junctions: basic structure and function. *J Invest Dermatol*, 2007. 127(11): str. 2525-32.
- 5 16. Kirschner, N. a J.M. Brandner, Barriers and more: functions of tight junction proteins in the skin. *Ann N Y Acad Sci*, 2012. 1257: str. 158-66.
17. Svoboda, M., Z. Bilkova, a T. Muthny, Could tight junctions regulate the barrier function of the aged skin? *J Dermatol Sci*, 2016. 81(3): str. 147-52.
18. Celli, A., a kol., Tight junction properties change during epidermis development. *Exp Dermatol*, 2012. 21(10): str. 798-801.
- 10 19. Malminen, M., a kol., Immunohistological distribution of the tight junction components ZO-1 and occludin in regenerating human epidermis. *Br J Dermatol*, 2003. 149(2): str. 255-60.
20. Tanabe, S., a kol., Identification of a peptide in enzymatic hydrolyzate of cheese that inhibits ovalbumin permeation in Caco-2 cells. *J Agric Food Chem*, 2006. 54(18): str. 6904-8.
- 15 21. Isobe, N., a kol., Enzyme-modified cheese exerts inhibitory effects on allergen permeation in rats suffering from indomethacin-induced intestinal inflammation. *Biosci Biotechnol Biochem*, 2008. 72(7): str. 1740-5.
22. Yasumatsu, H. a S. Tanabe, The casein peptide Asn-Pro-Trp-Asp-Gln enforces the intestinal tight junction partly by increasing occludin expression in Caco-2 cells. *Br J Nutr*, 2010. 104(7): str. 951-6.
- 20 23. Rao, R., Occludin phosphorylation in regulation of epithelial tight junctions. *Ann N Y Acad Sci*, 2009. 1165: str. 62-8.
24. Sandilands, A., a kol., Filaggrin in the frontline: role in skin barrier function and disease. *J Cell Sci*, 2009. 122(Pt 9): str. 1285-94.
- 25 25. Amblard, M., a kol., Methods and protocols of modern solid phase Peptide synthesis. *Mol Biotechnol*, 2006. 33(3): str. 239-54.
26. Fields, G.B., Solid-phase peptide synthesis.: Acad. Press: San Diego, Calif., 1997; str. 780.

PATENTOVÉ NÁROKY

1. Pentapeptid odvozený od kaseinu jako zlepšovač stavu kožních buněk obecného vzorce I
5 X-Asn-Pro-Trp-Asp-Gln-Z (I),
kde:
10 X je -NHX¹ skupina asparaginu na N-konci pentapeptidu, kde X¹ je vybráno ze skupiny zahrnující H, acetyl, oktanoyl, dekanoyl, lauroyl, myristoyl, palmitoyl, stearyl, elaidoyl, oleoyl, biotinoyl nebo lipoyl;
Z je -COZ¹ skupina glutaminu na C-konci pentapeptidu, kde Z¹ je vybráný ze skupiny zahrnující
15 OH, OCH₃, OCH₂CH₃ nebo NH₂.
2. Pentapeptid podle nároku 1, kde X¹ je s výhodou H nebo acetyl a Z¹ je s výhodou OH nebo NH₂.
20 3. Topická kompozice **vyznačující se tím**, že zahrnuje alespoň jeden pentapeptid, jak je definován v nároku 1 nebo v nároku 2.
4. Topická kompozice podle nároku 3, **vyznačující se tím**, že koncentrace pentapeptidu obecného vzorce I je v rozsahu od 0,001 do 70 % (hmotn./hmotn.), s výhodou v rozsahu od 0,001
25 do 0,5 % (hmotn./hmotn.), výhodněji od 0,001 do 0,05 % (hmotn./hmotn.).
5. Topická kompozice podle nároku 3 nebo nároku 4, **vyznačující se tím**, že je ve formě vybrané ze skupiny zahrnující krém, sérum nebo nanovlákná.
30 6. Topická kompozice podle nároku 5, **vyznačující se tím**, že je ve formě krému, kde koncentrace pentapeptidu obecného vzorce I je v rozsahu od 0,001 do 1 % (hmotn./hmotn.), s výhodou 0,001 % do 0,05 % (hmotn./hmotn.).
7. Topická kompozice podle nároku 6, **vyznačující se tím**, že dále zahrnuje alespoň jednu
35 kosmetickou nebo dermo-farmaceutickou pomocnou složku vybranou ze skupiny zahrnující olej, vosk, máslo, emulgátor, pomocnou aktivní látku a ochranný prostředek.
8. Topická kompozice podle nároku 7, **vyznačující se tím**, že olej je vybrán ze skupiny zahrnující arganový, kokosový, avokádový, mandlový, sezamový, olivový, slunečnicový,
40 konopný, jojobový, makadamový, ricinový olej; máslo je vybráno ze skupiny zahrnující kokosové máslo, bambucké máslo, avokádové máslo; a vosk je vybráný ze skupiny zahrnující lanolin, včelí vosk, karnaubský, kandelilový vosk a vazelinu.
9. Topická kompozice podle nároku 7, **vyznačující se tím**, že emulgátor je vybráný ze skupiny
45 zahrnující glyceryl stearat, lecitin, sterylalkohol, sorbintan oleát, polysorbát, kyselinu stearovou, cetyl alkohol a cetearyl alkohol, akrylát sodný, akryloyldimetyltaurát sodný kopolymer, izohexadekan, polysorbát 80.
10. Topická kompozice podle nároku 7, **vyznačující se tím**, že pomocná aktivní látka je vybraná
50 ze skupiny zahrnující vitamíny A, D, E, K, C, B-skupinY, koenzym Q10, alantoin, bisabolol, kyselinu mléčnou, aminokyseliny, peptidy, s výhodou acetyl hexapeptid-8, palmitoyl tripeptid-1, měďnatý tripeptid-1, peptidy *Saccharomyces*, hexapeptid-1 a proteiny s výhodou rýžový, sójový protein, quinoa protein nebo pšeničný protein; polysacharidy, kyselinu hyaluronovou nebo její farmaceuticky a kosmeticky přijatelnou sůl, karboxymetyl glukán, schizofylan, glukomanan;
55 panthenol; močovinu; glycerin; rostlinné extrakty, s výhodou extrakt z aloe vera, heřmánkový

- extrakt, extrakt z akácie, extrakt ze zeleného čaje, extrakt z řas, ovesný extrakt, kanabis extrakt, brusinkový extrakt; bakterie s výhodou *Lactobacillus*, *Thalassospira*, *Bifidobacterium*, *Halobacterium* nebo extrakty z hub z *Agaricus subrufescens*, *Choiromyces meandriformis*, *Cordyceps sinensis*, *Ganoderma lucidum*, *Grifola frondosa*, *Hypsizygus ulmarium*, *Iononotus obliquus*, *Lentinula edodes*, *Polyporus poddr.* *Trametes versicolor*, *Tremella fuciformis*, *Tuber poddr.*, *Schizophyllum commune*.
11. Topická kompozice podle nároku 7, **vyznačující se tím**, že ochranný prostředek je vybraný ze skupiny zahrnující aromatické kyseliny a jejich deriváty, s výhodou benzoovou kyselinu, salicylovou kyselinu, dehydrooctovou kyselinu, parabeny; alkoholy s výhodou etanol, isopropanol, benzylalkohol, fenoxietanol, fenethylalkohol; imidazolové deriváty s výhodou hydantoin, imidazolidinyl močovinu; kationtová povrchově aktivní činidla s výhodou benzalkonium chlorid.
12. Topická kompozice podle nároku 5, **vyznačující se tím**, že je ve formě séra zahrnujícího pentapeptid obecného vzorce I, jak je definováno v nároku 1, v koncentraci od 0,001 do 1 % (hmotn./hmotn.), a s výhodou alespoň jednu ve vodě rozpustnou pomocnou aktivní látku a alespoň jeden ochranný prostředek podle nároku 11.
13. Topická kompozice podle nároku 12, **vyznačující se tím**, že koncentrace pentapeptidu obecného vzorce I je s výhodou od 0,01 do 0,5 % (hmotn./hmotn.).
14. Topická kompozice podle nároku 12, **vyznačující se tím**, že ve vodě rozpustná pomocná aktivní látka je vybraná ze skupiny zahrnující vitamín C; vitamíny skupiny B; aminokyseliny, peptidy s výhodou acetyl hexapeptid-8 Argilin, palmitoyl tripeptid, měďnatý tripeptid-1, peptidy *Saccharomyces*, hexapeptid-1, a proteiny s výhodou rýžový protein, sójový protein, quinoa protein nebo pšeničný protein; dále ve vodě rozpustné polysacharidy s výhodou kyselinu hyaluronovou nebo její farmaceuticky a kosmeticky přijatelnou sůl, karboxymetyl glukán, schizofylan, glukomanan, extrakt z akácie, extrakt ze zeleného čaje, extrakt z řas, ovesný extrakt, kanabis extrakt, brusinkový extrakt; bakterie s výhodou *Lactobacillus*, *Thalassospira*, *Bifidobacterium*, *Halobacterium* nebo houbové extrakty z *Agaricus subrufescens*, *Choiromyces maeandriformis*, *Cordyceps sinensis*, *Ganoderma lucidum*, *Grifola frondosa*, *Hypsizygus ulmarium*, *Inonotus obliquus*, *Lentinula edodes*, *Polyporus poddr.*, *Trametes versicolor*, *Tremella fuciformis*, *Tuber poddr.*, *Schizophyllum commune*.
15. Topická kompozice podle nároku 5, **vyznačující se tím**, že je ve formě nanovláken zahrnujících pentapeptid obecného vzorce I, jak je definováno v nároku 1 nebo nároku 2, a jeho koncentrace je v rozsahu od 0,07 % do 70 % (hmotn./hmotn.), s výhodou od 0,07 do 7 % (hmotn./hmotn.), a alespoň jeden pomocný polymer.
16. Topická kompozice podle nároku 15, **vyznačující se tím**, že dále obsahuje hyaluronovou kyselinu nebo její farmaceuticky a kosmeticky přijatelnou sůl a její koncentrace je v rozsahu 5 až 80 % (hmotn./hmotn.) a koncentrace pomocného polymeru je v rozsahu 10 až 94 % (hmotn./hmotn.).
17. Topická kompozice podle nároku 15 nebo nároku 16, **vyznačující se tím**, že pomocný polymer je vybraný ze skupiny zahrnující polyetylenoxid, polyvinylalkohol nebo jejich směs.
18. Topická kompozice podle kteréhokoliv z nároků 15 až 17, **vyznačující se tím**, že dále zahrnuje alespoň jednu pomocnou aktivní látku podle nároku 10.
19. Topická kompozice podle kteréhokoliv z nároků 15 až 18, **vyznačující se tím**, že nanovlákná jsou ve formě ve vodě rozpustné suché vrstvy.
20. Pentapeptid podle nároku 1 nebo nároku 2 nebo topická kompozice podle kteréhokoliv z nároků 3 až 19 pro použití pro ošetření kůže.

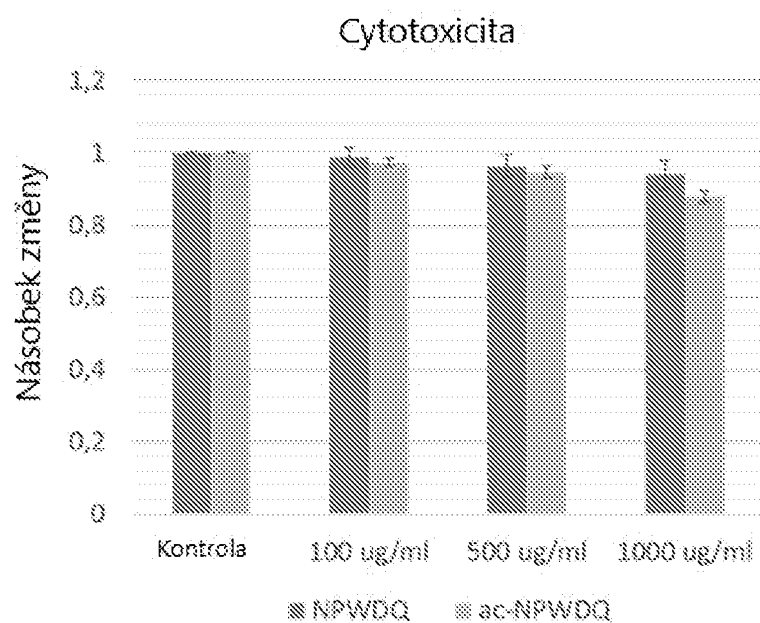
21. Pentapeptid nebo topická kompozice podle nároku 20 pro použití pro medicínské ošetření kožních chorob vybraných ze skupiny zahrnující atopickou dermatitidu, psoriázu, nemoc odlupování kůže, ichtyózu.

5

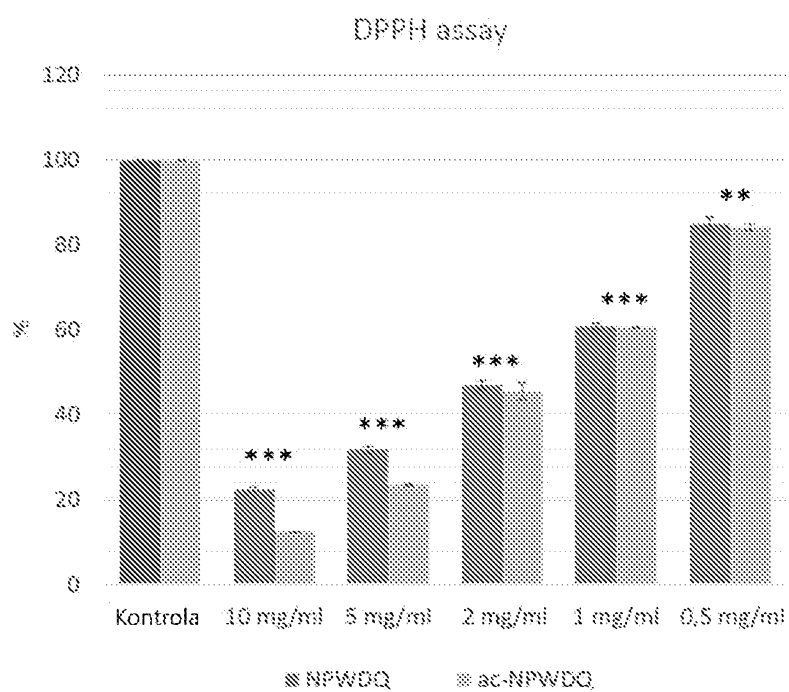
22. Pentapeptid nebo topická kompozice podle nároku 20 pro použití pro kosmetické ošetření kůže.

3 výkresy

10

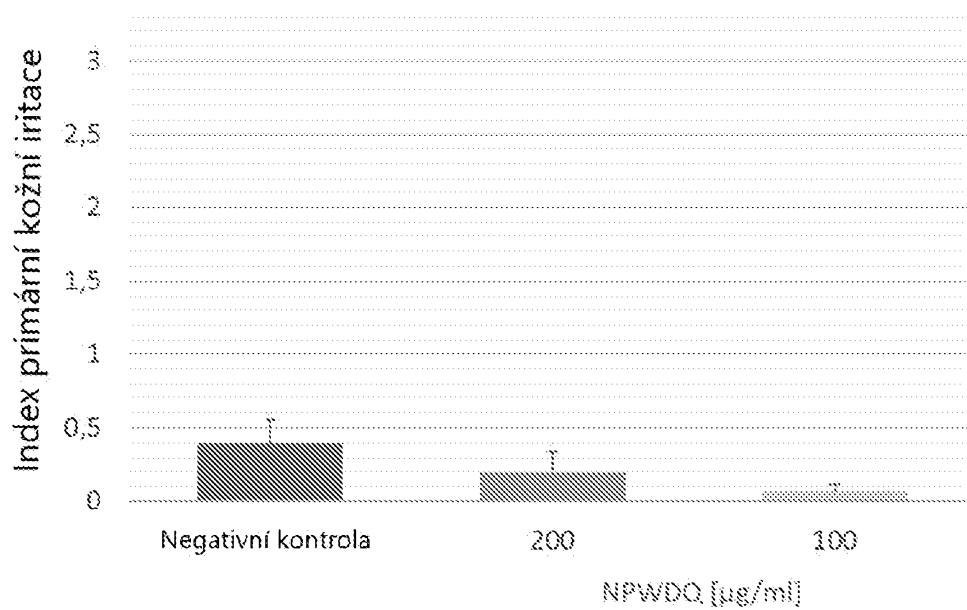


Obr. 1

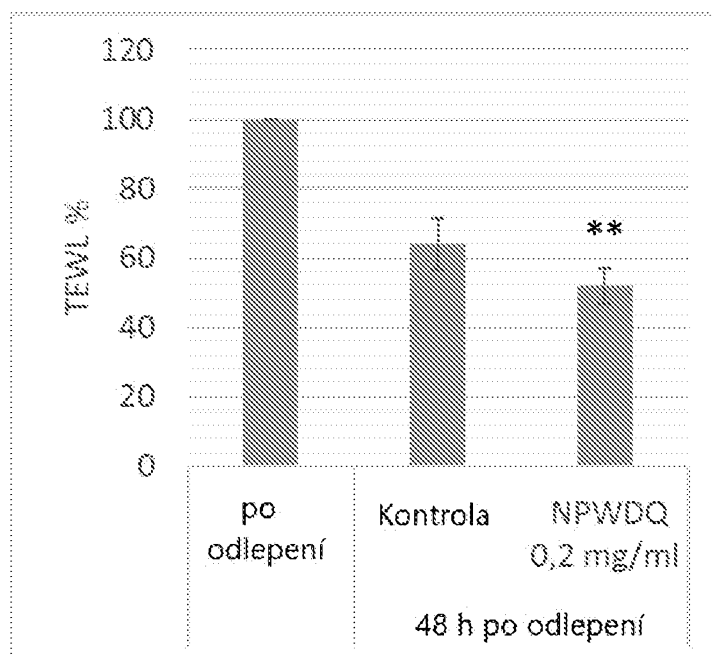


Obr. 2

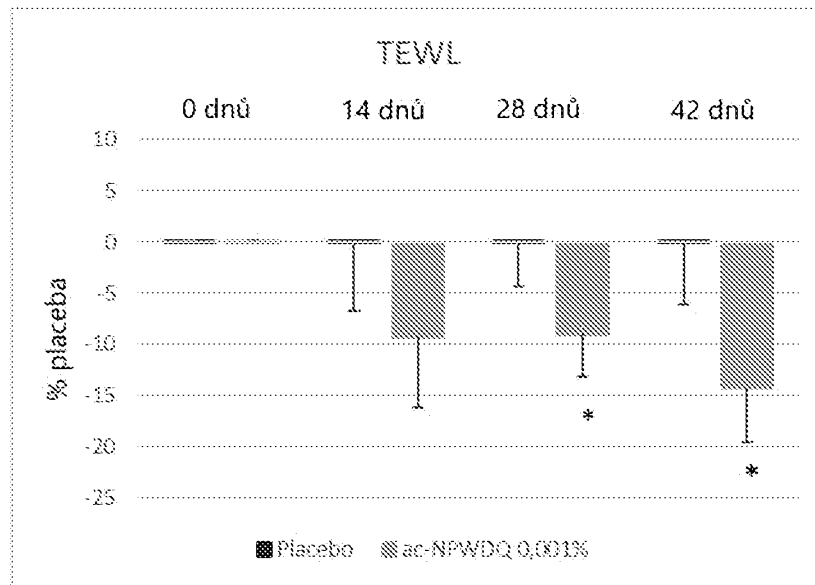
Index primární kožní iritace



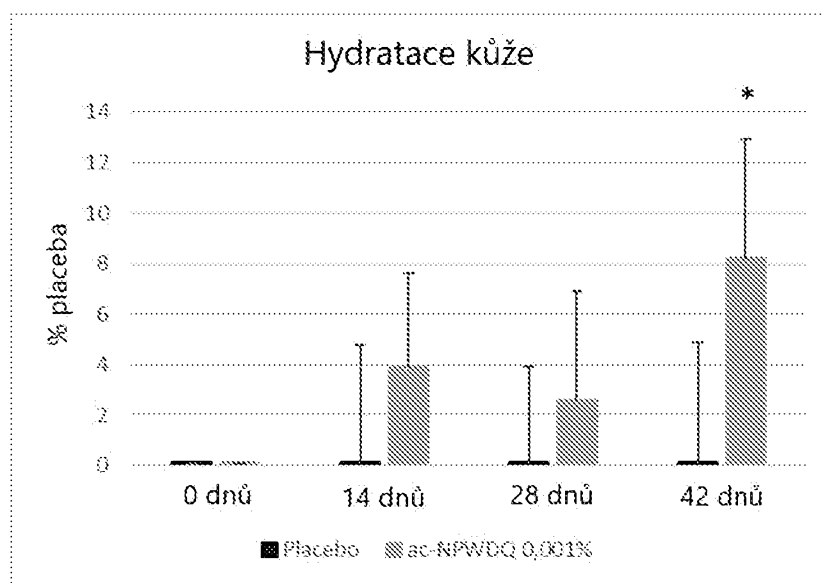
Obr. 3



Obr. 4



Obr. 5



Obr. 6