

PŘIHLÁŠKA VYNÁLEZU

zveřejněná podle § 31 zákona č. 527/1990 Sb.

(19)
ČESKÁ
REPUBLIKA



ÚŘAD
PRŮMYSLOVÉHO
VLASTNICTVÍ

- (22) Přihlášeno: **05.09.2003**
(32) Datum podání prioritní přihlášky: **06.09.2002**
(31) Číslo prioritní přihlášky: **2002/951271**
(33) Země priority: **AU**
(40) Datum zveřejnění přihlášky vynálezu: **12.04.2006**
(Věstník č. 4/2006)
(86) PCT číslo: **PCT/AU2003/001152**
(87) PCT číslo zveřejnění: **WO 2004/002202**

(21) Číslo dokumentu:

2005-136

(13) Druh dokumentu: **A3**

(51) Int. Cl.:

<i>A61K 8/49</i>	(2006.01)
<i>A61K 31/12</i>	(2006.01)
<i>A61K 31/35</i>	(2006.01)
<i>A61K 31/40</i>	(2006.01)
<i>A61K 31/475</i>	(2006.01)
<i>A61Q 17/04</i>	(2006.01)

- (71) Přihlašovatel:
Novogen Research Pty Ltd, North Ryde, AU
- (72) Původce:
Kelly Graham Edmund, Nothbridge, AU
Husband Alan, McMahons Point, AU
Walker Cath, Balmain, AU
- (74) Zástupce:
PATENTSERVIS Praha, a.s., Jivenská 1273/1, Praha 4,
14021
- (54) Název přihlášky vynálezu:
Oprava mutagenního poškození DNA
- (57) Anotace:
Předmětem řešení jsou způsoby ochrany kůže před UV zářením indukovaným mutagenním poškozením DNA, které zahrnují podání jedné nebo více equolových, dehydroequolových, isoflav-3-enových a isoflavanových sloučenin ve směsi s dermálně přijatelným nosičem. A dále způsoby prevence vzniku rakoviny kůže.

CZ 2005 - 136 A3

Oprava mutagenního poškození DNA

Oblast techniky

Předložený vynález se týká použití equolových, dehydroequolových a isoflav-3-enových a isoflavanových sloučenin v podpoře opravy mutagenního poškození DNA.

Dosavadní stav techniky

Metalothioneiny (MT) jsou proteiny, které jsou syntetizovány nebo v nadbytku exprimovány v reakci na působení činitel poškozujících DNA, například ultrafialového (UV) záření (Hansen et al., 1997). Ve většině studií na zvířatech a tkáňových kulturách byly k indukci metalothioneinů použity vysoké dávky záření, a proto je těžké extrapolovat tyto výsledky na nízké hladiny nebo na opakované expozice UV záření u lidí (Cai et al., 1999). Indukovaná syntéza metalothioneinů je považována za jeden z mechanismů účastnících se adaptivní reakce na vystavení nízké dávce UV záření a zvýšené hladiny metalothioneinů jsou spojeny s ochranou před UV zářením a jsou pravděpodobně zprostředkovány skrze vychytávání reaktivních kyslíkových radikálů (ROS) v kůži (Hanada et al., 1992). Metalothioneiny jsou také zapojeny do ochrany vůči imunopresivním účinkům UV záření na buňkou mediované odezvy, jak bylo demonstrováno u knock-out myši s MT=I a II (Reeve et al., 2000). UV záření indukuje v keratinocytech a dermálních fibroblastech imunohistochemicky detegovatelné metalothioneiny, a to souběžně s fotoelektrickou produkcí p53, což naznačuje, že tyto proteinové systémy jsou systémy ochranné a ve své funkci komplementární.

Metalothioneiny jsou v kožních fibroblastech detegovatelné od 2 hodin po expozici UV záření (Anstey et al., 1996).

V současnosti ještě projednávané mezinárodní patentové přihlášce PCT/AU03/00427 a WO 98/08503, jež jsou zde zahrnuty v odkazech, jsou popsány equolové, dehydroequolové, isoflav-3-enové a isoflavanové sloučeniny a způsoby jejich získávání.

Podstata vynálezu

Expozice kůže UV záření způsobuje poškození DNA, což může způsobit karcinogenezi. Nejběžnějším tumorem u lidí je bazocelulární karcinom (BCC) následovaný skvamocelulárním karcinomem (SCC) a řidčeji maligním melanomem. Předkladatel této přihlášky zjistil, že když se sloučeniny předloženého vynálezu aplikují na kůži, tak se zvýší produkce metalothioneinů v kůži, a to zvláště v bazální vrstvě ozářené kůže.

Jak bylo uvedeno výše, metalothioneiny ovlivňují a podporují opravu mutagenního poškození DNA kůže vystavené UV záření.

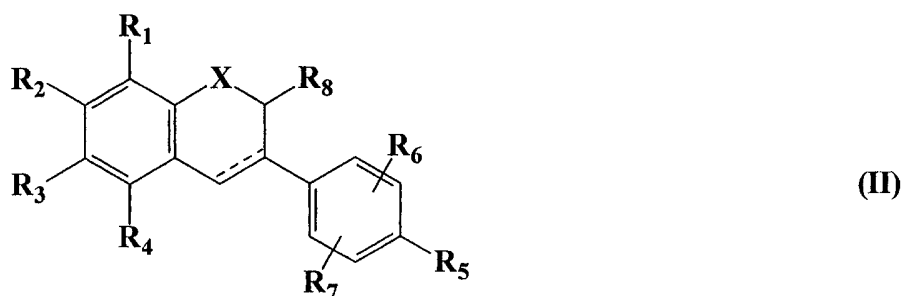
Předložený vynález popisuje použití equolových, dehydroequolových, isoflav-3-enových nebo isoflavanových struktur pro ochranu kůže před mutagenním poškozením DNA, které je spojeno s expozicí UV záření.

Předložený vynález dále popisuje použití equolových, dehydroequolových, isoflav-3-enových nebo isoflavanových struktur pro zvýšenou expresi metalothioneinů v kůži, zvláště v bazální vrstvě kůže.

Předložený vynález se dále týká způsobu ochrany kůže před UV zářením indukovaným mutagenním poškozením DNA a zahrnuje aplikaci přípravku na kůži, přičemž tento přípravek obsahuje jednu nebo více equolových, dehydroequolových, isoflav-3-enových nebo isoflavanových sloučenin ve směsi s

dermálně přijatelným nosičem.

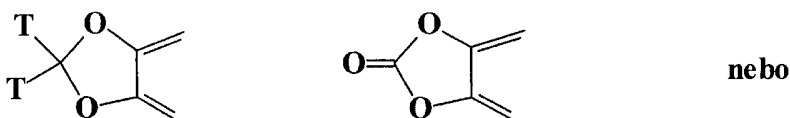
Isoflav-3-enové a isoflavanové sloučeniny mají obecný vzorec II,



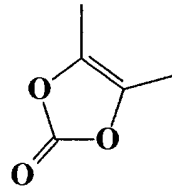
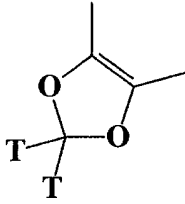
kde skupiny R_1 , R_2 , R_3 a R_4 jsou nezávisle vodík, hydroxyskupina, $-OR_9$, $-OC(O)R_{10}$, $-OS(O)R_{10}$, $-CHO$, $-C(O)R_{10}$, $-COOH$, $-CO_2R_{10}$, $-CONR_{11}R_{12}$, alkyl, halogenalkyl, arylalkyl, alkenyl, alkynyl, aryl, heteroaryl, alkylaryl, alkoxyaryl, thioskupina, alkylthioskupina, aminoskupina, alkylaminoskupina, dialkylaminoskupina, nitroskupina nebo halogen nebo skupiny R_3 a R_4 jsou definovány výše a R_1 a R_2 společně s uhlíkovými atomy, k nimž jsou navázány, tvoří pětičlenný kruh vybraný z kruhů



skupiny R_1 a R_4 jsou definovány výše a R_2 a R_3 společně s uhlíkovými atomy, k nimž jsou navázány, tvoří pětičlenný kruh vybraný z kruhů



skupiny R_1 a R_2 jsou definovány výše a R_3 a R_4 společně s uhlíkovými atomy, k nimž jsou navázány, tvoří pětičlenný kruh vybraný z kruhů



a kde

skupiny R_5 , R_6 a R_7 jsou nezávisle vodík, hydroxyskupina, $-OR_9$, $-OC(O)R_{10}$, $-OS(O)R_{10}$, $-CHO$, $-C(O)R_{10}$, $-COOH$, $-CO_2R_{10}$, $-CONR_{11}R_{12}$, alkyl, halogenalkyl, arylalkyl, alkenyl, alkynyl, aryl, heteroaryl, thioskupina, alkylthioskupina, aminoskupina, alkylaminoskupina, dialkylaminoskupina, nitroskupina nebo halogen,

R_8 je vodík, hydroxyskupina, alkyl, aryl, aminoskupina, thioskupina, $-NR_{11}R_{12}$, $-CONR_{11}R_{12}$, $-C(O)R_{13}$, kde R_{13} je vodík, alkyl, aryl, arylalkyl nebo aminokyselinový zbytek nebo $-CO_2R_{14}$, kde R_{14} je vodík, alkyl, halogenalkyl, aryl nebo arylalkyl,

R_9 je alkyl, halogenalkyl, aryl, arylalkyl, $-C(O)R_{13}$, kde R_{13} byla definována výše, nebo je to $-Si(R_{15})_3$, kde každá skupina R_{15} je nezávisle vodík, alkyl nebo aryl,

R_{10} je vodík, alkyl, halogenalkyl, aminoskupina, aryl, arylalkyl, aminokyselinový zbytek, alkylaminoskupina nebo dialkylaminoskupina,

R_{11} je vodík, alkyl, arylalkyl, alkenyl, aryl, aminokyselinový zbytek, $-C(O)R_{13}$, kde R_{13} byla definována výše, nebo $-CO_2R_{14}$, kde R_{14} byla definována výše,

R_{12} je vodík, alkyl nebo aryl nebo

skupiny R_{11} a R_{12} společně s dusíkovým atomem, k němuž jsou vázány, tvoří pyrrolidinyl nebo piperidinyl,

symbol $\overset{\sim}{\sim}$ označuje buď jednoduchou nebo dvojnou vazbu, s výhodou dvojnou vazbu,

T je nezávisle vodík, alkyl nebo aryl a

X je O, NR_{12} nebo S, s výhodou O,

v to zahrnujíc jejich farmaceuticky přijatelné soli a deriváty.

Equol odpovídá obecnému vzorci II, když $R_1, R_2, R_3, R_4, R_6, R_7$ a R_8 jsou vodík, R_5 je hydroxyskupina, X je O a symbol --- je jednoduchá vazba.

Dehydroequol odpovídá obecnému vzorci II, když $R_1, R_2, R_3, R_4, R_6, R_7$ a R_8 jsou vodík, R_5 je hydroxyskupina, X je O a symbol = je dvojná vazba.

Dermálně přijatelné nosiče a tekuté lékové formy jsou v oboru dobře známé a popsány jsou například v publikaci Remingtonovy farmaceutické vědy (Remington's Pharmaceutical Sciences), Gennaro A, 18. vydání, Mack Publishing Co., Easton, PA, 1990, strany 1492 až 1517. V přípravcích předloženého vynálezu lze použít jakýkoliv dermatologicky přijatelný nosič. Dermatologicky přijatelný nosič, jak se zde používá, se týká vehikul, ředících prostředků, nosičů, jež mohou zahrnovat adjuvancia, aditiva nebo pomocné látky, o nichž je známo, že se používají v dermatologických přípravcích. Přípravky předloženého vynálezu zahrnují, ale nejsou omezeny na krémy, masti, roztoky, tyčinky, stírací, čistící prostředky a/nebo gely. Sloučeniny předloženého vynálezu lze jednoduše smíchat, vmíchat nebo namíchat s vhodnými nosiči, aby vznikly přípravky vhodné k aplikaci na kůži. Dermálně přijatelné nosiče mohou zahrnovat jedno nebo více ochranných činidel před slunečním zářením. Činidla pro ochranu před slunečním zářením zahrnují takové materiály, které se běžně používají k blokování ultrafialového záření. Ilustrativní sloučeniny zahrnují deriváty cinnamátu, PABA (p-aminobenzoové kyseliny) a salicylátu. Lze také použít například oktylmethoxycinnamát a 2-hydroxy-4-methoxybenzofenon (také známý jako oxybenzon). Oktylmethoxycinnamát a 2-hydroxy-4-methoxybenzofenon jsou v uvedeném pořadí komerčně dostupné pod obchodními názvy Parsol MCX a Benzophenone-3. Přesné množství použitého činidla chránícího před slunečním zářením se může lišit v závislosti na stupni požadované ochrany před slunečním UV zářením.

Ve zvýhodněném provedení vynálezu se jedna nebo více sloučenin obecného

vzorci II vnesou do kosmetických přípravků. Příklady kosmetických přípravků zahrnují krémy, gely, prášky, pasty, hrudkové materiály a podobně. Typicky se tyto kosmetické přípravky nazývají líčidla a/nebo podklady (typicky používané k získání hladkého, rovnoměrného vzhledu kůže a jako základ pro barevné kosmetické prostředky).

Sloučeniny obecného vzorce II lze v přípravcích použít v množství 0,001 až 100 % hmotn., s výhodou 0,1 až 20 % hmotn., nejvýhodněji 0,1 až 10 % hmotn. Přípravky mohou například obsahovat 1 μmol až 500 mmol equolu nebo jiných sloučenin obecného vzorce II, jako i množství 20 μmol až 400 μmol . Zbylá část přípravku bude zahrnovat jeden nebo více dermatologicky přijatelných nosičů a pomocných látek, jak je v oboru známo. V přípravcích je možno využít jednu nebo více sloučenin, přičemž equol a dehydroequol jsou zvláště zvýhodněné. Přípravky lze podávat topicky na kůži, a to před, během a/nebo po vystavení slunci. Typicky se používají dávky 1 až 500 mg na den, přičemž dávky 2 až 100 mg na den jsou zvýhodněné.

V dalším aspektu se předložený vynález týká způsobu léčení nebo zlepšení stavu nebo prevence vzniku rakoviny kůže, jako je bazocelulární karcinom (BCC), skvamocelulární karcinom (SCC) a maligní melanom, kterýžto způsob zahrnuje aplikaci přípravku na kůži subjektu, přičemž tento přípravek obsahuje jednu nebo více equolových, dehydroequolových nebo isoflav-3-enových nebo isoflavanových sloučenin obecného vzorce II.

V dalším aspektu se předložený vynález týká způsobu zvýšení produkce metalothioneinu v kůži, jako v bazální vrstvě kůže a zahrnuje aplikaci jedné nebo více equolových, dehydroequolových, isoflav-3-enových nebo isoflavanových sloučenin na kůži, a to společně s dermálně přijatelným nosičem.

Přihlašovatel vynálezu dále zjistil, že sloučeniny tohoto vynálezu podporují opravu DNA. Podpora opravy DNA může účinkovat prostřednictvím jednoho

nebo více z následujících dějů, a to zvýšením rychlosti opravy cyklobutanpyrimidinových dimerů (CPDs), podporou opravy DNA snížením exprese p53 a/nebo podporou tvorby metalothioneinu (MT).

Tvorba CPD je považována za důležitý letální a mutagenní následek vystavení UV záření (Mitchell et al., 1989, Liardet et al., 2000). Modely na zvířatech prokázaly inverzní vztah mezi opravou epidermálních CDP a karcinogenezí kůže (Young et al., 1996). Protein p53 (TP53) je exprimován po poškození DNA UV zářením. P53 je transkripční faktor, který blokuje buněčnou řadu od fáze G1 do fáze S, a tak zabraňuje replikaci poškozené DNA (Campbell et al., 1993). Protein p53 může účinkovat jako činidlo podporující vznik nádoru (Murphey et al., 2001).

Tento vynález bude popsán odkazy na následující příklady, které ale nejsou příklady limitujícími jeho rámec.

Příklady provedení vynálezu

Příklad 1

Vliv equolu na indukci CPD

Vliv equolu na indukci CPD byl studován na kůži bezsrsté myši (standardní model pro dermatologické výzkumy pro lidi) vystavené simulovanému slunečnímu ultrafialovému záření (SSUV). V různých časech po vystavení SSUV se myši vyřízla hřbetní kůže, zafixovala 6 hodin ve standardní fixační tekutině (HistoChoiceTM, Amersco Inc., Solon, Ohio, USA), zpracovala a zalila do parafinu. Pyrimidinové dimery byly detegovány imunohistochemicky přes nalezení antigenu s citronovou kyselinou a H3 anti-pyrimidindimerových protilátek. Počet buněk pozitivních na dimery byl manuálně spočítán ve 30 polích

na myš při čtyřicetinásobném zvětšení.

Jestliže se equolová tekutá léková forma (obsahující 20 μM equolu) denně aplikovala po 7 dní před a po ozáření 1 x 3 MED (minimální erytémová dávka) SSUV, tak se účinek equolu projevil ve snížení počáteční indukce dimerů a ve zvýšení rychlosti jejich oprav, jak bylo dokázáno prostřednictvím sníženého počtu dimerů ve 24 hodinách (Tabulka 1).

Tabulka 1 Indukce epidermálních CDP-pozitivních buněk po ozáření UV zářením

Čas odebrání	Typ působení	CPD-pozitivní buňky/délkový cm
1 h po SSUV	Normální kůže	0
1 h po SSUV	Vehikulum + SSUV	300 \pm 18
1 h po SSUV	Equol + SSUV	238 \pm 22
24 h po SSUV	Vehikulum + SSUV	340 \pm 55
24 h po SSUV	Equol + SSUV	167 \pm 17

Aplikace equolu okamžitě po expozici SSUV (a při pokračování po 5 dnů) měla za výsledek významné snížení počtu dimerů v 1 dni po ozáření (významné snížení o 23 %) a ve 2 dnech (významné snížení o 42 %, údaje nejsou uvedeny).

Když se tekutá léková forma s equolem (20 μM) aplikovala jak 7 dní před, tak 5 dní po vystavení SSUV, bylo snížení počtu CPD evidentní okamžitě v 1, 24 a 48 hodinách po expozici ($p < 0,05$, 54%, 50% a 26% snížení v počtu CPD v uvedeném pořadí), a to ve srovnání s kontrolní skupinou (působení samotného vehikula).

Příklad 2

Na kůži pěti lidských dobrovolníků se aplikoval equol okamžitě po ozáření UV

zářením a po 4 hodinách a 6 hodinách po ozáření UV zářením. Byla použita také kontrolní tekutá léková forma neobsahující equol. Dvacet čtyři hodin po ozáření UV zářením se provedly odběry kůže a imunohistochemicky byla změřena produkce metalothioneinů.

V tabulce 2 jsou uvedeny počty buněk v bazální epidermis a povrchové dermis, jež vykazovaly pozitivní zbarvení na metalothioneiny. Přibližně polovina buněk bazální epidermis exprimovala metalothioneiny na základní úrovni, zatímco téměř žádné buňky v hořejších vrstvách epidermis metalothioneiny neexprimovaly. Po 24 hodinách od expozice 2,5 MED SSUV byly zřejmé značné rozdíly v expresi metalothioneinů v bazálních vrstvách epidermis mezi řezy, na které se působilo equolem a těmi řezy, na které se působilo DMSO v základní tekuté lékové formě (vehikulu). U všech 5 účastníků testu byla exprese metalothioneinů vyšší v kůži, na kterou se působilo equolem, přičemž velikost rozdílu byla v rozmezí 4 až 21 %.

Tabulka 2 Poměr buněk v epidermis pěti lidských dobrovolníků, jež se pozitivně vybarvily na MT, rozděleno podle typu působení

Objekt	působení	Celá epidermis			Svrchní epidermis			Bazální epidermis		
		neg	poz	%	neg	poz	%	neg	poz	%
N01DWH	základní úroveň	303	201	40	99	0	0	204	201	50
	10 min	255	179	41	72	0	0	183	179	49
	DMSO	282	185	40	70	0	0	212	185	47
	equol	303	382	56	185	2	1	118	380	76
N03PA	základní	227	109	32	97	0	0	130	109	46

	úroveň									
	10 min	231	237	51	77	4	5	154	233	60
	DMSO	317	236	43	96	4	4	221	232	51
	equol	270	271	50	82	0	0	188	271	59
N06MED	základní úroveň	420	413	50	169	0	0	251	413	62
	10 min	437	565	56	168	1	1	269	564	68
	DMSO	440	442	50	130	6	4	310	436	58
	equol	315	539	63	76	8	10	239	531	69
N13PDO	základní úroveň	267	217	45	112	0	0	155	217	58
	10 min	468	703	60	270	10	4	198	693	78
	DMSO	465	405	47	144	0	0	321	405	56
	equol	323	527	62	169	5	3	154	522	77
N14GBO	základní úroveň	270	127	32	113	0	0	157	127	45
	10 min	381	242	39	247	0	0	134	242	64
	DMSO	276	217	44	111	4	3	165	213	56
	equol	225	234	51	68	1	1	157	233	60

Poznámka: Termín základní úroveň se týká řezů kůže odebraných biopsií před expozicí 2,5 MED SSUV.

Termín 10 min se týká řezů kůže odebraných biopsií po 10 minutách expozice 2,5 MED SSUV. Na kůži se nepůsobilo ani DMSO v základním roztoku (vehikulu), ani equolem o koncentraci 200 μ M.

Termín DMSO se týká řezů kůže odebraných biopsií po 24 hodinách expozice 2,5 MED SSUV. Kůže byla z odebrána z oblasti, na kterou se působilo

DMSO v základním roztoku (vehikulu).

Termín equol se týká řezů kůže odebraných biopsií po 24 hodinách expozice 2,5 MED SSUV. Kůže byla odebrána z oblasti, na kterou se působilo equolem o koncentraci 200 μM .

Nejvyšší nárůst metalothioneinové imunoreaktivity v bazálních a suprabazálních keratinocytech UV zářením nedávno ozářených jedinců byl v kůži, na kterou se působilo equolem.

Příklad 3

Kožní biopsie pěti lidských dobrovolníků z příkladu 2 byly pomocí imunohistochemie otestovány na tvorbu cyklobutanpyrimidinových dimerů.

Tabulka 3 znázorňuje počty a procenta buněk, které byly pozitivně vybarveny protilátkou reagující na CPD. Tato data prokazují, že jak se očekávalo, tak před ozářením 2,5 MED v epidermis v podstatě nebyly žádné CPD-pozitivní buňky. Avšak kožní řezy odebrané ode všech účastníků 10 minut po expozici UV záření vykazovaly vysoké úrovně poškození DNA, s podílem pozitivně vybarvených buněk v rozmezí 36 (účastníci N01DWH a N03PPA) až 87 % (účastník N14GBO).

Kožní řezy odebrané 24 hodin po expozici UV záření vykazovaly u všech subjektů podstatně nižší hladiny poškození z CPD. U 4 z 5 účastníků měly kožní řezy, na které se působilo equolovou tekutou lékovou formou, proporcionálně méně CPD-pozitivních buněk, než kožní řezy, na které se působilo DMSO v základní tekuté lékové formě (vehikulu).

Tabulka 3 Počet buněk v epidermis pěti lidských dobrovolníků, jež se pozitivně vybarvily na CPD, rozděleno podle typu působení

Objekt	působení	Celá epidermis			Svrchní epidermis			Bazální epidermis		
		neg	poz	%	neg	poz	%	neg	poz	%
N01DWH	základní úroveň	345	0	0	134	0	0	211	0	0
	10 min	162	107	40	64	51	44	98	56	36
	DMSO	231	105	31	81	47	37	150	58	28
	equol	164	39	19	70	23	25	94	16	15
N03PA	základní úroveň	309	0	0	104	0	0	205	0	0
	10 min	204	191	48	56	106	65	148	85	36
	DMSO	179	25	12	55	20	27	124	5	4
	equol	349	18	5	70	17	20	279	1	0
N06MED	základní úroveň	309	0	0	90	0	0	219	0	0
	10 min	136	364	73	19	198	91	117	166	59
	DMSO	339	65	16	112	59	35	227	6	3
	equol	279	92	25	98	71	42	181	21	10
N13PDO	základní úroveň	205	0	0	60	0	0	145	0	0
	10 min	69	195	74	20	94	82	49	101	67
	DMSO	105	68	39	78	51	40	27	17	39
	equol	213	94	31	79	50	39	134	44	25
N14GBO	základní úroveň	255	0	0	98	0	0	157	0	0

	10 min	34	389	92	0	157	100	34	232	87
	DMSO	240	131	35	93	69	43	147	62	30
	equol	188	85	31	63	44	41	125	41	25

Poznámka: Termín základní úroveň se týká řezů kůže odebraných biopsií před expozicí 2,5 MED SSUV. Termín 10 min se týká řezů kůže odebraných biopsií po 10 minutách expozice 2,5 MED SSUV. Na kůži se nepůsobilo ani DMSO v základním roztoku (vehikulu), ani equolem o koncentraci 200 μ M. Termín DMSO se týká řezů kůže odebraných biopsií po 24 hodinách expozice 2,5 MED SSUV. Kůže byla odebrána z oblasti, na kterou se působilo DMSO v základním roztoku (vehikulu). Termín equol se týká řezů kůže odebraných biopsií po 24 hodinách expozice 2,5 MED SSUV. Kůže byla odebrána z oblasti, na kterou se působilo equolem o koncentraci 200 μ M.

Ze shromážděných dat ode všech účastníků lze vidět, že kožní řezy, na které se působilo equolem, měly po 24 hodinách od expozice mírně nižší úroveň poškození spojené s CPD.

Příklad 4

Biopsie kůže pěti lidských dobrovolníků z příkladu 2 se otestovaly na vybarvení na p53 po UV ozáření. Výsledky jsou uvedeny v tabulce 4.

Tabulka 4 Počet buněk v epidermis pěti lidských dobrovolníků, jež se pozitivně vybarvily na CPD, rozděleno podle typu působení

	Celá epidermis	Svrchní epidermis	Bazální epidermis
--	----------------	-------------------	-------------------

Objekt	působení	neg	poz	%	neg	poz	%	neg	poz	%
N01DWH	základní úroveň	261	0	0	115	0	0	146	0	0
	10 min	343	1	0	154	1	1	189	0	0
	DMSO	187	12	6	79	4	5	108	8	7
	equol	270	94	26	109	48	31	161	46	22
N03PA	základní úroveň	274	2	1	112	1	1	162	1	1
	10 min	316	2	1	114	2	2	202	0	0
	DMSO	223	55	20	81	31	28	142	24	14
	equol	337	87	21	165	72	30	172	15	8
N06MED	základní úroveň	412	1	0	134	0	0	278	1	0
	10 min	402	3	1	153	1	1	249	2	1
	DMSO	462	133	22	165	77	32	297	56	16
	equol	500	50	9	250	19	7	250	31	11
N13PDO	základní úroveň	325	0	0	141	0	0	184	0	0
	10 min	304	0	0	140	0	0	164	0	0
	DMSO	222	45	17	109	8	7	113	37	25
	equol	287	13	4	147	4	3	140	9	6
N14GBO	základní úroveň	321	0	0	149	0	0	172	0	0
	10 min	292	4	1	185	2	1	107	2	2
	DMSO	217	190	47	106	106	50	111	84	43

	equol	227	76	25	109	35	24	118	41	26
--	-------	-----	----	----	-----	----	----	-----	----	----

Poznámka: Termín základní úroveň se týká řezů kůže odebraných biopsií před expozicí 2,5 MED SSUV.

Termín 10 min se týká řezů kůže odebraných biopsií po 10 minutách expozice 2,5 MED SSUV. Na kůži se nepůsobilo ani DMSO v základním roztoku (vehikulu), ani equolem o koncentraci 200 μ M.

Termín DMSO se týká řezů kůže odebraných biopsií po 24 hodinách expozice 2,5 MED SSUV. Kůže byla z oblasti, na kterou se působilo DMSO v základním roztoku (vehikulu).

Termín equol se týká řezů kůže odebraných biopsií po 24 hodinách expozice 2,5 MED SSUV. Kůže byla z oblasti, na kterou se působilo equolem o koncentraci 200 μ M.

Jak se očekávalo, tak u všech účastníků v podstatě žádné buňky v epidermis neexprimovaly p53 před ozáření 2,5 MED. Podobně i kožní řezy odebrané účastníkům 10 minut po expozici UV záření měly zanedbatelné hladiny exprese p53, což je v souladu s literaturou.

Kožní řezy odebrané 24 hodin po expozici UV záření měly podstatně vyšší hladiny exprese p53, a to u všech testovaných subjektů. Procenta exprese p53 ve svrchní a/nebo bazální epidermis byla snížena u čtyřech z pěti subjektů, na něž se působilo equolem. Například u subjektů N13PDO a N14GBO byla procenta vybarvení na p53 ve srovnání s kontrolními pokusy s vehikulem významně snížena (obvykle o více než 50 %).

Závěry

V těchto studiích hodnocené biomarkery byly vybrány na základě jejich biologických vztahů k rakovině kůže (jež je přímo spojená s UV zářením

indukovaným mutagenním poškozením DNA).

UV zářením indukované oxidativní poškození se v současnosti považuje za potencionálně důležitý kauzální faktor pro rakovinu kůže. Metalothioneiny jsou molekuly s antioxidačními vlastnostmi, které se specificky indukují v reakci na expozici UV záření. Tato studie zajistila konzistentní důkaz, že v lidské kůži, na níž se působí equolem a jak se předpokládá i dalšími sloučeninami obecného vzorce II, se indukuje více metalothioneinů, než v kůži, na níž se působí pouze základní tekutou lékovou formou.

CPD jsou nejčasnějším indikátorem molekulárního poškození po expozici UV záření a jestliže toto poškození není opraveno, tak vede ke stálým mutacím v DNA buněk kůže. Jedním mechanismem působení po expozici by bylo zvýšení rychlosti opravy těchto poruch. V této studii provedené experimenty naznačují, že oprava CDP může být podpořena topickými přípravky s equolem a dalšími topickými přípravky obsahujícími jednu nebo více sloučenin obecného vzorce II.

P53 je tak jasně důležitým regulačním genem, který běžně mutuje u epidermálních typů kožních rakovin. Navíc v normálních kožních buňkách se po expozici UV záření zvyšuje množství p53, aby se zabránilo mitóze, dokud se neopraví poškození DNA. Equol moduloval v této studii expresi p53, a to u čtyřech z pěti subjektů způsoboval snížení počtu buněk exprimujících p53 ve svrchní nebo bazální vrstvě epidermis.

V celém tomto popisu a nárocích, které následují, tak pokud kontext nevyžaduje jinak, slovo zahrnují nebo variace tohoto slova, jako zahrnuje nebo zahrnující, implikuje začlenění pojmenovaného celku nebo kroku nebo skupiny celků nebo kroků, ovšem neznamená vyloučení kteréhokoliv jiného celku nebo kroku nebo skupiny celků nebo kroků.

Odkaz v tomto popisu na jakékoliv předchozí dílo v oboru není a neměl by být považován jako přiznání nebo jakoukoliv formu náznaku, že předchozí dílo v

oboru tvoří v Austrálii část běžného obecného poznání.

Literatura

Anstey, A., Marks R., Long C., Navabi H., Pearse A., Wynford-Thomas D. a Jasani B., In vivo photoinduction of metallothionein in human skin by ultraviolet irradiation. *Journal of Pathology* 178(1), 84-88 (1996).

Berne, B., Ponten J. a Ponten F., Decreased p53 expression in chronically sun-exposed human skin after topical photoprotection. *Photodermatology, Photoimmunology & Photomedicine* 14(5-6), 148-153 (1998).

Cai L., Satoh M., Tohyama C. a Cherian M.G., Metallothionein in radiation exposure: its induction and protective role. *Toxicology* 132(2-3), 85-98(1999).

Campbell C., Quinn A. G., Angus B., Farr P.M. a Rees J.L., Wavelength specific patterns of p53 induction in human skin following exposure to UV radiation. *Cancer Research* 53(12), 2697-2699 (1993).

Hanada K., Baba T., Hashimoto I., Fukui R. a Watanabe S., Possible role of cutaneous metallothionein in protection against photo-oxidative stress-epidermal localization and scavenging activity for superoxide and hydroxyl radicals. *Photodermatology, Photoimmunology & Photomedicine* 9(5), 209-213 (1992).

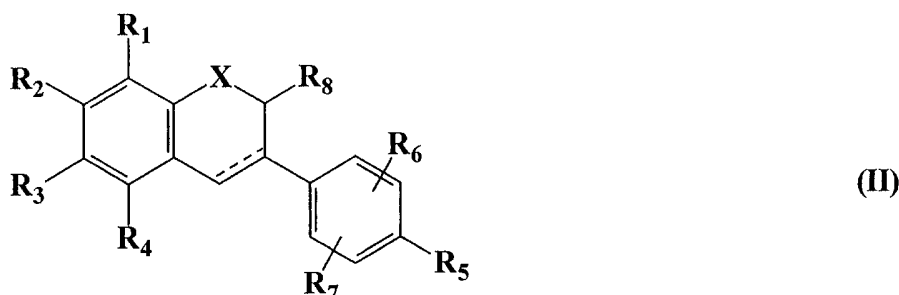
Hansen C., Ablett E., Green A., Stunn R.A., Dunn I.S., Fairlie D.P., West M.L. a Parsons P.G., Biphasic response of the metallothionein promoter to ultraviolet radiation in human melanoma cells. *Photochemistry & Photobiology* 65(3), 550-555 (1997).

Liardet S., Scaletta C., Panizzon R., Hohlfeld P. a Laurent-Applegate L., Protection against pyrimidine dimers, p53, and 8-hydroxy-2'-deoxyguanosine expression in ultraviolet-irradiated human skin by sunscreens: Difference between UVB + UVA and UVA alone sunscreens. *Journal of Investigative Dermatology* 117, 1437-1441 (2001).

- Mitchell D.L. a Nairn R.S., The biology of the (6-4) photoproduct. *Photochemistry & Photobiology* 49(6), 805-819 (1989).
- Murphy G., Young A.R., Wulf H.C., Kulms D. a Schwarz T., The molecular determinants of sunburn cell formation. *Experimental Dermatology* 10(3), 155-160 (2001).
- Ponten F., Berne B., Ren Z.P., Nister M. a Ponten J., Ultraviolet light induces expression of p53 and p21 in human skin: effect of sunscreen and constitutive p21 expression in skin appendages. *Journal of Investigative Dermatology* 105(3), 402-406 (1995).
- Reeve V.E., Nishimura N., Bosnic M., Michalska A.E. a Choo K.H., Lack of metallothionein-I and -II exacerbates the immunosuppressive effect of ultraviolet B radiation and cis-urocanic acid in mice. *Immunology* 100(3), 399-404 (2000).
- Rich T., Allen R. L. a Wyllie A.H. Defying death after DNA damage. *Nature* 407(6805), 777-783 (2000).
- Seite S., Motal D., Verdier M.P., Hourseau C. a Fourtanier A., Accumulated p53 protein and UVA protection level of sunscreens. *Photodermatology, Photoimmunology & Photomedicine* 16(1), 3-9 (2000).
- Vainio H. a Bianchini F., Eds. *Sunscreens*. IARC Handbooks of Cancer, Prevention. Lyon, International Agency for Research on Cancer, 2001.
- Young, A.R., Chadwick C.A., Harrison G.I., Hawk J.L., Nikaido O. a Potten C.S., The in situ repair kinetics of epidermal thymine dimers and 6-4 photoproducts in human skin types I and II. *Journal of Investigative Dermatology* 106(6), 1307-1313 (1996).

PATENTOVÉ NÁROKY

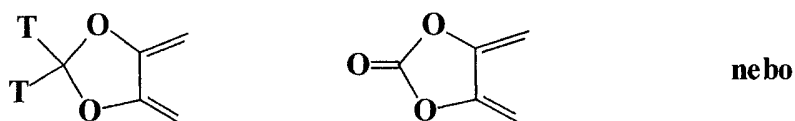
1. Způsob ochrany kůže před UV zářením indukovaným mutagenním poškozením DNA, vyznačující se tím, že se na kůži topicky podá ve směsi s dermatologicky přijatelným nosičem přípravek obsahující jednu nebo více sloučenin obecného vzorce II,



kde skupiny R_1 , R_2 , R_3 a R_4 jsou nezávisle vodík, hydroxyskupina, $-OR_9$, $-OC(O)R_{10}$, $-OS(O)R_{10}$, $-CHO$, $-C(O)R_{10}$, $-COOH$, $-CO_2R_{10}$, $-CONR_{11}R_{12}$, alkyl, halogenalkyl, arylalkyl, alkenyl, alkynyl, aryl, heteroaryl, alkylaryl, alkoxyaryl, thioskupina, alkylthioskupina, aminoskupina, alkylaminoskupina, dialkylaminoskupina, nitroskupina nebo halogen nebo skupiny R_3 a R_4 jsou definovány výše a R_1 a R_2 společně s uhlíkovými atomy, k nimž jsou navázány, tvoří pětičlenný kruh vybraný z kruhů



skupiny R_1 a R_4 jsou definovány výše a R_2 a R_3 společně s uhlíkovými atomy, k nimž jsou navázány, tvoří pětičlenný kruh vybraný z kruhů



skupiny R_1 a R_2 jsou definovány výše a R_3 a R_4 společně s uhlíkovými atomy, k

nimž jsou navázány, tvoří pětičlenný kruh vybraný z kruhů



a kde

skupiny R_5 , R_6 a R_7 jsou nezávisle vodík, hydroxyskupina, $-OR_9$, $-OC(O)R_{10}$, $-OS(O)R_{10}$, $-CHO$, $-C(O)R_{10}$, $-COOH$, $-CO_2R_{10}$, $-CONR_{11}R_{12}$, alkyl, halogenalkyl, arylalkyl, alkenyl, alkynyl, aryl, heteroaryl, thioskupina, alkylthioskupina, aminoskupina, alkylaminoskupina, dialkylaminoskupina, nitroskupina nebo halogen,

R_8 je vodík, hydroxyskupina, alkyl, aryl, aminoskupina, thioskupina, $-NR_{11}R_{12}$, $-CONR_{11}R_{12}$, $-C(O)R_{13}$, kde R_{13} je vodík, alkyl, aryl, arylalkyl nebo aminokyselinový zbytek nebo $-CO_2R_{14}$, kde R_{14} je vodík, alkyl, halogenalkyl, aryl nebo arylalkyl,

R_9 je alkyl, halogenalkyl, aryl, arylalkyl, $-C(O)R_{13}$, kde R_{13} byla definována výše, nebo je to $-Si(R_{15})_3$, kde každá skupina R_{15} je nezávisle vodík, alkyl nebo aryl,

R_{10} je vodík, alkyl, halogenalkyl, aminoskupina, aryl, arylalkyl, aminokyselinový zbytek, alkylaminoskupina nebo dialkylaminoskupina,

R_{11} je vodík, alkyl, arylalkyl, alkenyl, aryl, aminokyselinový zbytek, $-C(O)R_{13}$, kde R_{13} byla definována výše, nebo $-CO_2R_{14}$, kde R_{14} byla definována výše,

R_{12} je vodík, alkyl nebo aryl nebo

R_{11} a R_{12} společně s dusíkovým atomem, k němuž jsou vázány, tvoří pyrrolidinyl nebo piperidinyl,

symbol $\overset{\sim}{\sim}$ označuje buď jednoduchou nebo dvojnou vazbu, s výhodou dvojnou vazbu,

T je nezávisle vodík, alkyl nebo aryl a

X je O, NR_{12} nebo S, s výhodou O,

v to zahrnujíc jejich farmaceuticky přijatelné sole a deriváty.

2. Způsob ochrany kůže před UV zářením indukovaným mutagenním poškozením DNA podle nároku 1, v y z n a č u j í c í s e t í m, že jednou nebo více sloučeninami obecného vzorce II je equol a dehydroequol.

3. Způsob ochrany kůže před UV zářením indukovaným mutagenním poškozením DNA podle nároku 1, v y z n a č u j í c í s e t í m, že se zabraňuje vzniku rakoviny kůže.

4. Způsob prevence vzniku rakoviny kůže podle nároku 3, v y z n a č u j í c í s e t í m, že se zabraňuje vzniku bazocelulárního karcinomu, skvamocelulárního karcinomu a maligního melanomu.

5. Způsob ochrany kůže před UV zářením indukovaným mutagenním poškozením DNA podle nároku 1, v y z n a č u j í c í s e t í m, že se kůže ochrání před UV zářením indukovaným mutagenním poškozením prostřednictvím jednoho nebo více účinků na zvýšení rychlosti opravy cyklobutanpyrimidinových dimerů, na podporu tvorby metalothioneinu a na snížení exprese p53.

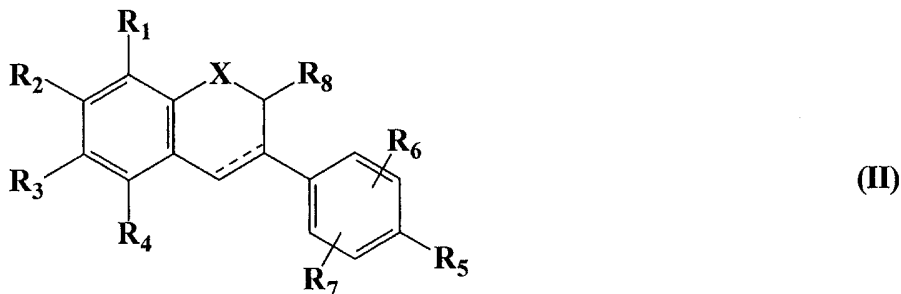
6. Způsob podle nároků 1 až 5, v y z n a č u j í c í s e t í m, že přípravek tohoto vynálezu se podává před, během a/nebo po expozici UV záření.

7. Způsob podle nároku 6, v y z n a č u j í c í s e t í m, že přípravek tohoto vynálezu se podává před expozicí UV záření.

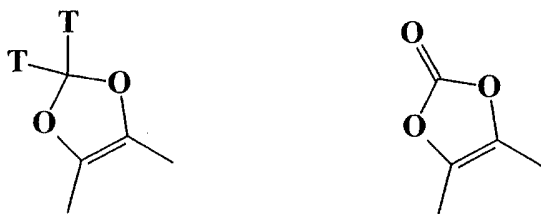
8. Způsob podle nároku 6, v y z n a č u j í c í s e t í m, že přípravek tohoto vynálezu se podává před a po expozici UV záření.

9. Způsob podle nároků 1 až 8, v y z n a č u j í c í s e t í m, že se použije přípravek tohoto vynálezu, který obsahuje 20 μ mol až 500 mmol sloučenin obecného vzorce II.

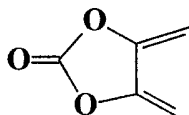
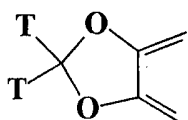
10. Použití jedné nebo více sloučenin obecného vzorce II,



kde skupiny R_1 , R_2 , R_3 a R_4 jsou nezávisle vodík, hydroxyskupina, $-OR_9$, $-OC(O)R_{10}$, $-OS(O)R_{10}$, $-CHO$, $-C(O)R_{10}$, $-COOH$, $-CO_2R_{10}$, $-CONR_{11}R_{12}$, alkyl, halogenalkyl, arylalkyl, alkenyl, alkynyl, aryl, heteroaryl, alkylaryl, alkoxyaryl, thioskupina, alkylthioskupina, aminoskupina, alkylaminoskupina, dialkylaminoskupina, nitroskupina nebo halogen nebo skupiny R_3 a R_4 jsou definovány výše a R_1 a R_2 společně s uhlíkovými atomy, k nimž jsou navázány, tvoří pětičlenný kruh vybraný z kruhů

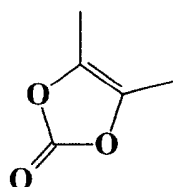
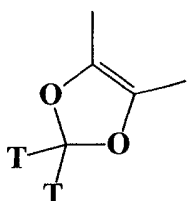


skupiny R_1 a R_4 jsou definovány výše a R_2 a R_3 společně s uhlíkovými atomy, k nimž jsou navázány, tvoří pětičlenný kruh vybraný z kruhů



nebo

skupiny R_1 a R_2 jsou definovány výše a R_3 a R_4 společně s uhlíkovými atomy, k nimž jsou navázány, tvoří pětičlenný kruh vybraný z kruhů



a kde

skupiny R_5 , R_6 a R_7 jsou nezávisle vodík, hydroxyskupina, $-OR_9$, $-OC(O)R_{10}$, $-OS(O)R_{10}$, $-CHO$, $-C(O)R_{10}$, $-COOH$, $-CO_2R_{10}$, $-CONR_{11}R_{12}$, alkyl, halogenalkyl, arylalkyl, alkenyl, alkynyl, aryl, heteroaryl, thioskupina, alkylthioskupina, aminoskupina, alkylaminoskupina, dialkylaminoskupina, nitroskupina nebo halogen,

R_8 je vodík, hydroxyskupina, alkyl, aryl, aminoskupina, thioskupina, $-NR_{11}R_{12}$, $-CONR_{11}R_{12}$, $-C(O)R_{13}$, kde R_{13} je vodík, alkyl, aryl, arylalkyl nebo aminokyselinový zbytek nebo $-CO_2R_{14}$, kde R_{14} je vodík, alkyl, halogenalkyl, aryl nebo arylalkyl,

R_9 je alkyl, halogenalkyl, aryl, arylalkyl, $-C(O)R_{13}$, kde R_{13} byla definována výše, nebo je to $-Si(R_{15})_3$, kde každá skupina R_{15} je nezávisle vodík, alkyl nebo aryl, R_{10} je vodík, alkyl, halogenalkyl, aminoskupina, aryl, arylalkyl, aminokyselinový zbytek, alkylaminoskupina nebo dialkylaminoskupina,

R_{11} je vodík, alkyl, arylalkyl, alkenyl, aryl, aminokyselinový zbytek, $-C(O)R_{13}$, kde R_{13} byla definována výše, nebo $-CO_2R_{14}$, kde R_{14} byla definována výše,

R_{12} je vodík, alkyl nebo aryl nebo

R_{11} a R_{12} společně s dusíkovým atomem, k němuž jsou vázány, tvoří pyrrolidinyl nebo piperidinyl,

symbol \equiv označuje buď jednoduchou nebo dvojnou vazbu, s výhodou dvojnou vazbu,

T je nezávisle vodík, alkyl nebo aryl a

X je O, NR₁₂ nebo S, s výhodou O, v to zahrnujíc jejich farmaceuticky přijatelné sole a deriváty, ve směsi s dermatologicky přijatelným nosičem pro výrobu topického přípravku pro ochranu kůže před mutagenním poškozením DNA spojeným s expozicí UV záření.

11. Použití přípravku tohoto vynálezu podle nároku 10, kde uvedenou jednou nebo více sloučeninami obecného vzorce II je equol a dehydroequol.

12. Použití přípravku tohoto vynálezu podle nároku 10, které zabraňuje vzniku rakoviny kůže.

13. Použití přípravku tohoto vynálezu podle nároku 12 v prevenci vzniku rakoviny kůže vybrané z bazocelulárního karcinomu, skvamocelulárního karcinomu a maligního melanomu.

14. Použití přípravku tohoto vynálezu podle nároku 10, kde se kůže chrání před mutagenním poškozením DNA prostřednictvím jednoho nebo více účinků na zvýšení rychlosti opravy cyklobutanpyrimidinových dimerů, na podporu tvorby metalothioneinu a na snížení exprese p53.

15. Použití přípravku tohoto vynálezu podle nároků 10 až 14, kde se tento přípravek podá před, během a/nebo po expozici UV záření.

16. Použití přípravku tohoto vynálezu podle nároku 15, kde se tento přípravek podá před expozicí UV záření.
17. Použití přípravku tohoto vynálezu podle nároku 15, kde se tento přípravek podá před a po expozici UV záření.
18. Použití přípravku tohoto vynálezu podle nároků 10 až 17, kdy tento přípravek obsahuje 20 μ mol až 500 mmol sloučenin obecného vzorce II.
19. Použití sloučenin obecného vzorce II k chránění kůže před mutagenním poškozením DNA spojeným s expozicí UV záření.
20. Způsob podle kteréhokoliv z nároků 1 až 9, v y z n a č u j í c í s e t í m, že se použije přípravek obsahující kosmetický prostředek nebo prostředek ochrany před slunečním zářením.
21. Použití přípravku a sloučenin tohoto vynálezu podle nároků 10 až 19, kde použitý přípravek obsahuje kosmetický prostředek nebo prostředek ochrany před slunečním zářením.
22. Kosmetický prostředek nebo prostředek ochrany před slunečním zářením, v y z n a č u j í c í s e t í m, že obsahuje jednu nebo více sloučenin obecného vzorce II ve spojení s jedním nebo více dermálně přijatelnými nosiči nebo pomocnými látkami.
23. Kosmetický prostředek podle nároku 22, v y z n a č u j í c í s e t í m, že obsahuje líčidlo nebo základní prostředek.