

Перекрестная ссылка на родственные заявки

Данная заявка представляет собой РСТ заявку на основе заявки США № 14/614538, поданную 5 февраля 2015 г., которая является частичным продолжением заявки США № 12/979667, поданной 28 декабря 2010 г., с названием "Композиция на основе олеаноил-пептида и способ лечения старения кожи", которая, в свою очередь, является частичным продолжением заявки № 11/835165, поданной 7 августа 2007 г., с названием "Пептиды, модифицированные тритерпеноидами и небольшими органическими молекулами: синтез и применение в косметических средствах", обе из которых включены в данный документ посредством ссылки во всей своей полноте во всех отношениях.

Область техники

Настоящее изобретение относится к композиции, содержащей пептид SEQ ID NO: 1, связанный с олеаноловой кислотой, и ее применению в способе восстановления и повышения упругости кожи посредством регуляции экспрессии ассоциированных генов.

Предшествующий уровень техники

Внешний вид и состояние кожи могут ухудшаться вследствие воздействий факторов окружающей среды, имеющих природное происхождение (солнечный свет, абразивное действие ветра, влажность и т.д.), либо вызванных деятельностью человека (нагревание, атмосферные условия, загрязняющие вещества и т.д.), патологических процессов, таких как дерматологические заболевания, или естественного процесса старения. Различные повреждающие факторы, действию которых подвергается кожа, могут действовать по отдельности или синергетически. Для улучшения или предупреждения ухудшения качества кожи, которое может происходить с течением времени, возрастающий интерес со стороны потребителей вызывают новые или улучшенные косметические композиции и косметические способы ухода за кожей. Такие продукты или способы предупреждают, задерживают или обращают видимые признаки процесса старения, такие как появление морщин, мелких и тонких морщин или потеря тонуса кожи, истончение кожи, гиперпигментация или пятнистое поражение кожи и возрастные пятна. Такие продукты или способы улучшают внешний вид и состояние чувствительной, сухой или шелушащейся кожи и/или успокаивают кожу, раздраженную воздействием химических веществ, ветра или солнечного света, наряду с другими потенциальными раздражителями.

Со старением населения наблюдался рост исследований старения в отношении тела человека и, более конкретно, кожи человека. Например, лечение старения кожи, проявляющегося наличием мелких и тонких морщин, морщин и тому подобного, получило большое внимание. С кожными признаками старения, такими как мелкие и тонкие морщины, морщины, дряблость и гиперпигментация, велась борьба посредством многих тактик, включая хирургическое вмешательство, лазерное лечение и косметические средства. Косметический уход включает применение различных кремов и лосьонов для изменения эффектов старения кожи. Много литературы в предшествующем уровне техники фокусируется на применении единственного первичного компонента для предотвращения одного из нескольких пагубных повреждений при старении. Например, при одной тактике нужно было использовать одну или более чем одну гидроксикислоту или ретиноевую кислоту для стимуляции возобновления роста дермальных клеток без других компонентов. Данный подход является несовершенным, поскольку при нем не принимается во внимание то, что старение вызвано пагубным взаимным действием на кожу множества агентов из множества источников, вызывающих повреждение кожи через множество одновременных путей повреждения.

Потребители все больше ищут "омолаживающие" средства, которые лечат образование морщин, складок и борозд кожи. Появления дорогостоящих и болезненных косметических инъекций для лечения мимических морщин лица повысило интерес к нахождению альтернативных решений для местного применения, которые являлись бы эффективными и неинвазивными.

Мимические морщины представляют собой отдельный тип морщины, который встречается на лице в раннем взрослом возрасте. Они анатомически связаны с мимическими мышцами лица в периорбитальных, межбровных, лобных и периоральных областях. Активность данных мышц во время действий улыбки, прищуривания, сжатия губ и нахмуривания накладывает большее физическое напряжение на вышележащую кожу, чем в других областях на лице. По этой причине мимические морщины менее восприимчивы к тем местным видам лечения, которые фокусируются на несократительных элементах кожной анатомии, таких как эпидермис. Для большей эффективности лечение мимических морщин также должно вызывать подавление мимических мышц лица и элементов мышечных волокон, связанных с дермой. Огромное количество веществ, которые расслабляют поперечно-полосатые мышечные волокна, описано в предшествующем уровне техники в области косметологии. Трудность заключается в том, что миорелаксанты предшествующего уровня техники либо являются миорелаксантами медленного действия, либо недостаточно сильными, либо подавляющие эффекты не являются кумулятивными. Кроме того, ни один из данных миорелаксантов не уменьшает действие лицевых мышц. Вновь открытый растительный экстракт, который быстро подавляет деформацию дермы, позволяет повысить эффективность веществ, которые восстанавливают и омолаживают ее.

Мимическая морщина образуется, когда сама мимическая мышца лица сокращается или укорачивается под кожей и затем расслабляется и возвращается к своей протяженности в состоянии покоя. Кожа

может также укорачиваться и восстанавливаться, но не так же, как мышца. Таким образом, кожа имеет тенденцию сгибаться и складываться внутрь при сокращении мышцы. Способность кожи выдерживать укорачивание и восстановление нижележащей мышцы связана с качеством и состоянием верхнего слоя дермы. С увеличением возраста толщина, эластичность, содержание коллагена дермы и ее способность к восстановлению уменьшаются. Кожа больше не может восстановиться после данного действия, и волокнистый межклеточный матрикс дермы ослабевает и разрывается. На данном этапе на коже развивается постоянная морщина. Морщина будет продолжать углубляться, когда данная область кожи будет подвергаться постоянному напряжению мимики лица.

Анатомия мимических морщин.

Кожа, связанная с мимическими морщинами, гистологически отличается от кожи в каком-либо другом месте на лице. Междольковые перегородки субдермальной соединительной ткани содержат волокна поперечно-полосатой мышечной ткани (panniculus carnosus). Данные волокна происходят от нижележащих групп мышц лица. Они интегрированы в пределах коллагеновой сети нижнего (сетчатого) слоя дермы. Субпопуляция дермальных фибробластов в верхнем (сосочковом) слое дермы, известных как "миофибробласты", имеет собственные сократительные характеристики, сходные с поперечно-полосатой мышечной тканью. Сокращения в пределах данных дермальных фибробластов опосредованы тем же нейромедиатором, то есть ацетилхолином, как и волокнистые элементы поперечно-полосатой мышцы.

Мышечные волокна в коже лица оказывают прямое действие на гладкость ее поверхности, и модулирование поступления двигательных импульсов нейронов в данные мышечные волокна вызывает уменьшение морщин. Например, пациенты, которые страдают от паралича Белла лицевого нерва, имеют более гладкую кожу на парализованной стороне лица, чем на непарализованной стороне. Также косметические инъекции Botox™ не только иммобилизуют лоб и верхние мышцы бровей, но также разглаживают кожу за пределами данных мышц. Botox™ препятствует захвату ацетилхолина в пределах синапса афферентного двигательного нейрона мышечных волокон, тем самым предотвращая сокращение мышечной ткани, связанной с морщинами и бороздами. Лечение Botox™ пользуется большим спросом и, таким образом, целью ученых в области косметологии является разработка эквивалента для местного применения (см. A. Blitzer et al., Arch. Otolaryngol. Head Neck Surg., 119, сс. 1018-1022 (1993)) (см. J.D. Carruthers et al., J. Dermatol. Surg. Oncol., 18, сс. 17-21 (1992)).

Для удовлетворения требованиям потребителей было разработано много косметических композиций и косметических способов ухода за кожей и лечения кожи. Однако многие, если не большинство, из продуктов или способов лечения, описанных на сегодняшний день, приводят к несовершенным результатам или омрачены нежелательными побочными эффектами. Данные побочные эффекты могут включать раздражение кожи или расположенных рядом слизистых оболочек, образование избыточной жирности или сальности кожи или нарушение цвета кожи.

Восстановление дермы: способность дермы к регенерации решающим образом влияет на ее способность к тому, чтобы выдерживать хроническое мышечное сокращение и расслабление мимических мышц. Как следствие старения или повреждения кожи под действием солнца происходит уменьшение количества фибробластных клеток и кровеносных сосудов, необходимых для омоложения нижнего слоя дермы. Фибробласты в "базальном слое" верхнего слоя дермы воспроизводят новые клетки медленнее, теряют способность вырабатывать коллаген и в меньшей степени способны организовывать и сохранять сеть коллагеновых волокон. Так как дермальный матрикс является источником коллагена и основных влагоудерживающих молекул, то есть гликоаминогликанов и гиалуроновой кислоты, его сохранение необходимо для здорового состояния эпидермиса. Без непрерывного пополнения белков-предшественников, происходит дезорганизация и растворение сети коллагеновых волокон и внеклеточного матрикса. Результатом данного процесса является уплощение дермоэпидермального соединения и ослабление механического сопротивления верхнего слоя дермы. Таким образом, стареющая кожа обладает гораздо большей предрасположенностью к тому, чтобы временные деформации, происходящие во время мимики лица, становились необратимыми (см. Oikarinen, "The Aging of Skin: Chronoaging Versus Photoaging", Photodermatol. Photoimmunol. Formation, Photomed., т. 7, сс. 3-4, 1990). (см. Thalmann et al. "A Computational Skin Model: Fold and Wrinkle Formation" сс. 1-5).

В данной области техники существует несколько идей (пат. США № 6794362) (пат. США № 6777389), в которых обсуждаются отдельные молекулы или их композиции для усиления эластичности кожи или укрепления дермы. Их готовят из пептидов или пептидоподобных соединений, которые имитируют молекулярный состав эластина или пополняют его. Mitts с соавт. (пат. США № 6809075) постулировали, что композиция на основе пептида/ретиноида способна интегрироваться в эластиновый компонент дермы, повышая, таким образом, способность кожи восстанавливаться после деформации. Чаще данные предшествующего уровня техники свидетельствуют о том, что композиции на основе природного или синтетического пептида могут усиливать сеть коллагеновых волокон или внеклеточный субстрат дермального матрикса. Отсюда новая целостность (Lowe, N. et al., "Pharmacology of Retinols In Skin", т. 3 (1989), сс. 240-248). Однако нестабильность и раздражение, вызываемые ретиноидами, вызывают трудности. Подход, отстаиваемый Dioguardi (пат. США № 5198465), заключается в повышении со-

держания коллагена в коже посредством местного нанесения синтезированных молекул предшественника коллагена и коферментов метаболического пути коллагена. Замысел заключается в том, что прямое замещение посредством диффузии и адсорбции молекул предшественника укрепляет несовершенную кожу. Похожая концепция, сообщаемая Kludas (пат. США № 5055298), заключается в том, что, по существу, природная композиция может оказывать восстанавливающее и ремоделирующее действие на дермоэпидермальное соединение. Также последние данные в этой области (пат. США № 6906036, пат. США № 6884425) свидетельствуют о том, что ингибиторы матриксных металлопротеиназ способны предотвращать нарушения дермы, заживляя ее и облегчая возвращение к нормальному здоровому состоянию кожи. Ни в одном из упомянутых выше патентов не сообщается о способности стимулировать активность фибробластов и синтез предшественников коллагена; также в них не заявляется о восстановлении толщины дермы и сети коллагеновых волокон.

В недавнем патенте Varani с соавт. (пат. США № 6919072) идентифицирует композицию на основе ретиноида и ингибитора матриксной металлопротеиназы, которая ингибирует распад коллагена, поддерживает уровень коллагена посредством повышения синтеза проколлагена, повышает пролиферацию кератиноцитов и фибробластов. Изобретение восстанавливает толщину эпидермально-дермальной границы в коже, подверженной возрастному старению, и восстанавливает содержание коллагена в пределах верхнего слоя дермы до нормальных уровней. В этом заключается его свойство придавать коже прочность для того, чтобы выдерживать воздействие окружающей среды и физическое воздействие. Как в случае других ретиноидов, ретиноид по Lowe требует длительного применения и восстановление дермы является гораздо более медленным, чем в случае предпочтительного варианта осуществления настоящей заявки.

Значимость пептидов.

В ранних данных в этой области особое внимание было уделено описанию веществ, которые, как полагали, физически восполняют молекулы, строящие новый коллаген, или добавляющие вещества, которые раздражают или нарушают базальный слой, что вызывает его регенерацию и восстановление его здорового состояния. Более новые данные в этой области свидетельствуют о положительном воздействии лечения, основанного на местном применении пептидов, на стимуляцию верхнего слоя дермы с его обновлением в результате возобновления роста клеток. Это подтверждается сведениями о том, что организм содержит пептиды природного происхождения, способствующие стимуляции процесса заживления после образования раны на коже. Robinson сообщает (пат. США № 6492326) о различных композициях, содержащих комбинации пальмитоилпентапептида-3, производных пентапептидов и их смесей. Lintner (пат. США № 6620419) описывает формулы пептидов общей последовательности пальмитоил-лизил-треонил-треонил-лизил-серин (пальмитоильная группа, присоединенная к SEQ ID NO: 1), которые повышают синтез коллагена и гликозаминогликанов. Они действуют синергетически с излечением морщин и других форм старения кожи гораздо более эффективно, чем более ранние композиции. Ключевое отличие идеи Lintner от идеи Robinson заключается в добавлении цепи жирной кислоты к терминальному концу пентапептида, что делает данный липофильный модифицированный пептид очень эффективным в проникании в эпидермис и, следовательно, более эффективным в достижении образующих слоев дермы. Конечный результат заключается в увеличении толщины кожи посредством восстановления репаративной способности верхнего слоя дермы. Следовательно, кожа лучше способна выдерживать деформацию, накладываемую на нее активным сокращением и расслаблением мимических мышц и микросокращениями в пределах самой кожи.

В более обширных исследованиях обнаружили, что факторы окружающей среды, такие как стресс, воздействие солнца и примеси в пище, воде и воздухе, также пагубно влияют на компоненты эпидермального и дермального слоев кожи, что, в свою очередь, влияет на кожу и изменяет ее внешний вид, и приводит к возникновению преждевременного старения. Например, факторы, такие как свободные радикалы, реактивные формы азота ("RNS"), реактивные формы кислорода ("ROS") и другие окисляющие формы ("OOS") могут пагубно влиять на организм человека, включая кожу. Конкретные факторы, входящие в указанные выше группы, которые, как было обнаружено, влияют на кожу и пагубно воздействуют на ее внешний вид, включают окись азота, супероксидные радикалы, пероксид водорода и гидроксильные свободные радикалы. Данные факторы различным образом влекли за собой целый ряд состояний кожи, включая фотоповреждение, общее старение кожи, контактный дерматит, морщинистость, перекисное окисление липидов, ферментативную деструкцию, снижение уровня и распад коллагена и/или эластина, деструкцию и ингибированное репродуцирование ДНК, воспаление и общее повреждение кожной ткани.

Антиоксидантная активность представляет собой активность, которая снижает генерацию реактивных форм кислорода в организме и в то же самое время предотвращает окисление, приводящее к невосстанавливаемым повреждениям клеток. Кислород в основном или триплетном состоянии может быть активирован в результате воздействия факторов окружающей среды или биохимических факторов, таких как ферменты, восстановительный метаболизм, химические соединения, загрязняющие вещества и фотохимические реакции, и превращаться в реактивные формы кислорода (ROS), которые обладают высокой реакционной способностью, такие как супероксидные радикалы, гидроксильные радикалы и пероксид

водорода.

Соответственно это приводит к необратимому разрушению клеточных составляющих. Действия таких реактивных форм кислорода могут быть ослаблены антиоксидантными ферментами, такими как супероксиддисмутаза (SOD), каталаза и пероксидаза, и антиоксидантными веществами, такими как витамин С, витамин Е и глутатион, все из которых образуют защитную систему организма. Однако когда происходит нарушение работы такого защитного механизма в организме или воздействие избыточных реактивных форм кислорода, реактивные формы кислорода могут необратимо разрушать липиды, белки и ДНК. Результатом являются разные заболевания, включая старение, рак, множественный артериосклероз, артрит и болезнь Паркинсона.

На сегодняшний день разработаны синтетические антиоксиданты, такие как ВНА (бутилированный гидроксианизол), ВНТ (бутилированный гидрокситолуол) и NDGA (нордигидрогуайаретовая кислота). В качестве примеров природных антиоксидантов выступают антиоксидантные ферменты, такие как супероксиддисмутаза, пероксидаза, каталаза и глутатионпероксидаза; и неферментативные антиоксидантные вещества, такие как токоферол (витамин Е), аскорбиновая кислота (витамин С), каротиноид и глутатион.

Однако синтетические антиоксиданты могут вызывать аллергические реакции и онкогенез вследствие своей сильной токсичности для организма и легко разрушаются нагреванием вследствие температурной чувствительности. С другой стороны, природные антиоксиданты более безопасны для организма, чем синтетические антиоксиданты, но имеют недостаток более слабого воздействия. Таким образом, требуется разработка нового природного антиоксиданта, не имеющего проблемы безопасности применения и также обладающего прекрасной антиоксидантной активностью. Местно наносимые антиоксиданты действительно обладают достоинством для всех типов кожи, заключающимся в сохранении кожи здоровой, и помогают предотвращать повреждение под действием солнца и улучшать функцию клеток.

Антиоксиданты, как было убедительно показано, оказывают положительное воздействие на уменьшение раздражения и воспаления кожи, и это является ключевым этапом в создании или поддержании здоровой, полной жизни кожи и, таким образом, потенциально в уменьшении морщин (*International Journal of Experimental Pathology*, 2000:257-263; *Skin Pharmacology and Applied Skin Physiology*, 2000: 143-149).

Несколько сотен молекул, имеющих полифенольную (полигидроксифенольную) структуру (то есть несколько гидроксильных групп на ароматических кольцах), было идентифицировано в съедобных растениях. Данные молекулы представляют собой вторичные метаболиты растений и обычно участвуют в защите от ультрафиолетового излучения или агрессивного воздействия патогенов. Полифенолы представляют собой широко распространенные компоненты фруктов, овощей, злаков, сухих бобовых, шоколада и напитков, таких как чай, кофе или вино.

Данные соединения можно классифицировать на разные группы в зависимости от числа фенольных колец, которые они содержат, и от структурных элементов, которые связывают данные кольца одно с другим. Классы полифенолов включают фенольные кислоты, флавоноиды, стильбены и лигнаны. Существует два класса фенольных кислот: производные бензойной кислоты и производные коричной кислоты.

В действительности измерять все антиоксиданты до одного *in vivo* нецелесообразно. Также в настоящее время широко распространено предположение о том, что основным фактором, влияющим на окислительный стресс, является общий антиоксидантный статус системы, который предупреждает заболевания в результате устранения свободных радикалов и ROS. Таким образом, крайне необходимо иметь способ, позволяющий измерять суммарно внеклеточный антиоксидантный статус. Существуют способы измерения антиоксидантного статуса, основанные на ингибировании образованных свободных радикалов, достигающих индикаторные молекулы-мишени, посредством антиоксидантов. Общий признак анализов ингибирования заключается в генерации свободного радикала с взаимодействием с молекулой-мишенью, образуя, таким образом, конечное состояние, которое можно наблюдать и количественно оценивать. Добавление антиоксидантов ингибирует развитие данного конечного состояния. Хорошим примером этого является активность захвата свободных радикалов DPPH (1,2-дифенил-2-гидразил).

Эластин, обнаруженный в самых высоких концентрациях в эластических волокнах соединительных тканей, является ответственным за рельеф и тонус кожи. Эластаза, фермент сериновая протеаза, играет роль в диссоциации тканей, содержащих разветвленные межклеточные сети волокон. Избыточное продуцирование эластазы будет приводить к морщинистости кожи/преждевременному старению.

Жизненно важный белок - коллаген поддерживает тонус и структуру кожи. Коллагеназа представляет собой фермент - сериновую протеазу, которая очищает рану любой омертвевшей ткани, оставляя раневое ложе готовым к заживлению. Известно, что коллагеназа, интенсивно продуцируемая во время воспаления, играет роль в образовании морщин кожи посредством гидролиза жизненно важного белка коллагена, который поддерживает тонус и структуру кожи.

Другим механизмом омоложения является повышение содержания коллагена в коже. Активные вещества, которые могут физически восполнять молекулы, строящие новый коллаген, или добавляющие вещества, которые раздражают или разрушают базальный слой, что вызывает его регенерацию и восстановление его здорового состояния, являются превосходными для омолаживающих композиций. Более современные данные в этой области свидетельствуют о положительном воздействии видов лечения, ос-

нованного на местном применении пептидов, на стимуляцию верхнего слоя дермы с его обновлением в результате возобновления роста клеток. Это подтверждается сведениями о том, что организм содержит пептиды природного происхождения, способствующие стимуляции процесса заживления после образования раны на коже. Robinson сообщает (пат. США № 6492326) о различных композициях, содержащих пальмитоилпентапептид-3, производные пентапептидов и их смеси. Lintner (пат. США № 6620419) описывает формулы пептидов общей последовательности пальмитоил-лизил-треонил-лизил-серин (пальмитоильная группа, присоединенная к SEQ ID NO: 1), которые повышают синтез коллагена и гликозаминогликанов. Они действуют синергетически с излечением морщин и других форм старения кожи гораздо более эффективно, чем более ранние композиции.

В настоящем изобретении описана композиция, содержащая пептид SEQ ID NO: 1, связанный с олеаноловой кислотой, и ее эффективное применение в способе восстановления и повышения упругости кожи посредством регуляции экспрессии ассоциированных генов.

Соответственно основной целью настоящего изобретения является описание способа восстановления и повышения упругости кожи, включающего стадию приведения пентапептидного конъюгата олеаноловой кислоты в контакт с клетками кожи, так что реализуется эффект повышенного уровня клеточной коммуникации на молекулярном уровне с осуществлением экспрессии генов и белков в клетках кожи, что делает возможным восстановление и повышение упругости.

Настоящее изобретение достигает указанной выше цели и обеспечивает дополнительные соответствующие преимущества.

Краткое описание изобретения

Описан способ восстановления и повышения упругости кожи, включающий стадию приведения пентапептидного конъюгата олеаноловой кислоты в контакт с клетками кожи, так что реализуется эффект повышенного уровня клеточной коммуникации на молекулярном уровне с осуществлением экспрессии генов и белков в клетках кожи, что делает возможным восстановление и повышение упругости. Изобретение демонстрирует эффект пентапептидного конъюгата олеаноловой кислоты в повышении экспрессии генов трансформирующего фактора роста- β и фактора роста фибробластов в коже.

Другие признаки и преимущества настоящего изобретения станут очевидными из следующего ниже более подробного описания, в совокупности с прилагаемыми графическими материалами, которые в качестве примера иллюстрируют принцип данного изобретения.

Краткое описание графических материалов

На фиг. 1 показано графическое представление выраженного в процентах повышения экспрессии трансформирующего фактора роста- β (TGF- β) в клетках дермальных фибробластов человека (HDF) после воздействия различных концентраций композиции, содержащей пептид SEQ ID NO: 1, связанный с олеаноловой кислотой.

На фиг. 2 показано графическое представление выраженного в процентах повышения экспрессии фактора роста фибробластов в клетках дермальных фибробластов человека (HDF) после воздействия различных концентраций композиции, содержащей пептид SEQ ID NO: 1, связанный с олеаноловой кислотой.

На фиг. 3 показано выраженное в процентах повышение экспрессии гена HSP 90 в коже после воздействия различных концентраций композиции, содержащей пептид SEQ ID NO: 1, связанный с олеаноловой кислотой.

На фиг. 4 показано выраженное в процентах повышение экспрессии гена LOX в коже после воздействия различных концентраций композиции, содержащей пептид SEQ ID NO: 1, связанный с олеаноловой кислотой.

На фиг. 5 показано выраженное в процентах повышение экспрессии гена HSP-47 в коже после воздействия различных концентраций композиции, содержащей пептид SEQ ID NO: 1, связанный с олеаноловой кислотой.

На фиг. 6 показано выраженное в процентах повышение экспрессии гена TIMP в коже после воздействия различных концентраций композиции, содержащей пептид SEQ ID NO: 1, связанный с олеаноловой кислотой.

Подробное описание наиболее предпочтительных вариантов осуществления (фиг. 1-6)

В наиболее предпочтительных вариантах осуществления настоящее изобретение относится к способу повышения экспрессии трансформирующего фактора роста- β в фибробластах человека, включающему стадию приведения клеток фибробластов человека в контакт с эффективной концентрацией композиции, содержащей пептид SEQ ID NO: 1, связанный с олеаноловой кислотой, представленный STR#1, для осуществления регуляции белка внеклеточного матрикса, в частности синтеза коллагена.

В другом наиболее предпочтительном варианте осуществления настоящее изобретение относится к способу повышения экспрессии фактора роста фибробластов в фибробластах человека, включающему стадию приведения клеток фибробластов человека в контакт с эффективной концентрацией композиции, содержащей пептид SEQ ID NO: 1, связанный с олеаноловой кислотой, представленный STR#1, для достижения эффекта уменьшения рубцевания кожи.

В других наиболее предпочтительных вариантах осуществления настоящее изобретение также относится к следующим способам:

А. Способ повышения экспрессии гена HSP 90 в коже человека, включающий стадию приведения кожи человека в контакт с (обработку кожи человека) эффективной концентрацией композиции, содержащей пептид SEQ ID NO: 1, связанный с олеаноловой кислотой, представленный STR#1, для достижения эффекта восстановления и перестройки коллагена.

Б. Способ повышения экспрессии гена HSP 47 в коже человека, включающий стадию приведения кожи человека в контакт с (обработку кожи человека) эффективной концентрацией композиции, содержащей пептид SEQ ID NO: 1, связанный с олеаноловой кислотой, представленный STR#1, для достижения эффекта процессинга в синтезе проколлагена.

В. Способ повышения экспрессии гена LOX (лизилоксидаза) в коже человека, включающий стадию приведения кожи человека в контакт с (обработку кожи человека) эффективной концентрацией композиции, содержащей пептид SEQ ID NO: 1, связанный с олеаноловой кислотой, представленный STR#1, для достижения эффекта ремоделирования внеклеточного матрикса.

Г. Способ повышения экспрессии гена тканевых ингибиторов матриксных металлопротеиназ (TIMP) в коже человека, включающий стадию приведения кожи человека в контакт с (обработку кожи человека) эффективной концентрацией композиции, содержащей пептид SEQ ID NO: 1, связанный с олеаноловой кислотой, представленный STR#1, для осуществления ингибирования матриксных металлопротеиназ, таких как коллагеназа и эластаза.

В дополнительных иллюстративных вариантах осуществления настоящее изобретение также относится к следующим способам:

А. Способ повышения экспрессии генов, улучшающих барьерную функцию кожи, выбранных из группы, состоящей из корнеодесмозина (CDSN), клаудина-7 (CLDN7), филагтрина (FLG), позднего рогового конверта 3D (LCE3D), лорикрина (LOR) и интегрин бета-4 (ITGB4), включающий стадию приведения кожи человека в контакт с (обработку кожи человека) эффективной концентрацией композиции, содержащей пептид SEQ ID NO: 1, связанный с олеаноловой кислотой, представленный STR#1.

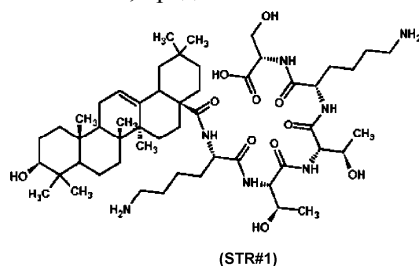
Б. Способ повышения экспрессии генов, повышающих дифференцировку кератиноцитов в коже человека, выбранных из группы, состоящей из лорикрина (LOR) и кальмодулин-подобного белка-5 (CALML5), включающий стадию приведения кожи человека в контакт с (обработку кожи человека) эффективной концентрацией композиции, содержащей пептид SEQ ID NO: 1, связанный с олеаноловой кислотой, представленный STR#1.

В. Способ повышения экспрессии генов, улучшающих клеточный цикл и пролиферацию клеток в коже, выбранных из группы, состоящей из рецептора, активируемого пероксисомным пролифератором (PPAR), опухолевого белка p63 (TP63) и антигена, идентифицируемого антителом Ki-67 (MKI67), включающий стадию приведения кожи человека в контакт с (обработку кожи человека) эффективной концентрацией композиции, содержащей пептид SEQ ID NO: 1, связанный с олеаноловой кислотой, представленный STR#1.

Г. Способ повышения уровня увлажнения кожи путем повышения экспрессии гена аквапорина 5 (AQP5) в коже, включающий стадию приведения кожи человека в контакт с (обработку кожи человека) эффективной концентрацией композиции, содержащей пептид SEQ ID NO: 1, связанный с олеаноловой кислотой, представленный STR#1.

Д. Способ повышения синтеза коллагена в коже путем повышения экспрессии ассоциированного гена трансформирующего фактора роста-бета 1 (TGFB1) в коже, включающий стадию приведения кожи человека в контакт с (обработку кожи человека) эффективной концентрацией композиции, содержащей пептид SEQ ID NO: 1, связанный с олеаноловой кислотой, представленный STR#1.

Е. Способ индукции меланогенеза в коже путем повышения экспрессии ассоциированного гена костного морфогенетического белка-2 (BMP2) в коже, включающий стадию приведения кожи человека в контакт с (обработку кожи человека) эффективной концентрацией композиции, содержащей пептид SEQ ID NO: 1, связанный с олеаноловой кислотой, представленный STR#1.



Для дальнейшего освещения наиболее предпочтительных вариантов осуществления настоящего изобретения в данный документ включены следующие иллюстративные примеры.

Пример 1. Оценка трансформирующего фактора роста-бета (TGF-β) и фактора роста фибробластов (FGF).

Клетки дермальных фибробластов человека (HDF) культивировали в среде DMEM (среда Игла в модификации Дульбекко) с 10% FBS (фетальная бычья сыворотка) и засеивали в 96-луночный планшет для тканевой культуры для исследования. Спустя 24 ч после посева HDF обрабатывали исследуемым образцом (композиция, содержащая пептид SEQ ID NO: 1, связанный с олеаноловой кислотой, представленный STR#1) в градуированных концентрациях и инкубировали в течение 48 ч в инкубаторе с 5% CO₂ при 37°C. По истечении 48 ч супернатант собирали из каждой лунки. Количество TGF-β и FGF, продуцированное различным образом обработанными HDF, определяли с использованием способа ELISA (иммуноферментный анализ) в соответствии с протоколом набора, поставленного производителем (R&D Systems), и поглощение измеряли при 450 нм с использованием Fluostar Optima. Калибровочную кривую получали посредством откладывания значений поглощения стандартов в зависимости от соответствующих концентраций TGF-β/FGF. Концентрации TGF-β/FGF контрольных и исследуемых образцов рассчитывали исходя из уравнения калибровочного графика. Повышение экспрессии, выраженное в процентах, в исследуемых образцах рассчитывали по отношению к необработанным клеткам. Результаты эксперимента представлены в качестве примера на фиг. 1 и 2 соответственно. Значимость TGF-β1 в синтезе внеклеточного матрикса хорошо обоснована в следующих источниках:

1. Yang T. et al., "miR-29 mediates TGFβ1-induced extracellular matrix synthesis through activation of PI3K-AKT pathway in human lung fibroblasts", *J Cell Biochem.* 2013 Jun; 114(6): 1336-42.
2. Tan J. et al., "MicroRNA-29 mediates TGFβ1 -induced extracellular matrix synthesis by targeting wnt/β-catenin pathway in human orbital fibroblasts" *Int J Clin Exp Pathol.* 2014 Oct 15;7(11):7571 -7.
3. Das D. et al., "TGF-beta1-Induced MAPK activation promotes collagen synthesis, nodule formation, redox stress and cellular senescence in porcine aortic valve interstitial cells", *J Heart Valve Dis.* 2013 Sep; 22(5):621-30.

Повышение экспрессии TGF-β в дермальных фибробластах человека, таким образом, отчетливо указывает на способность исследуемой композиции, содержащей пептид SEQ ID NO: 1, связанный с олеаноловой кислотой, представленный STR#1, стимулировать/строить коллаген.

Аналогично, способность фибробластов и миофибробластов к участию в заживлении раны была документально подтверждена в Ian. A. Derby, "Fibroblasts and myofibroblasts in wound healing", *Clin Cosmet Investig Dermatol.* 2014; 7: 301-311. Значимость фактора роста фибробластов и его биодоступности в микроокружении кожной ткани для координации с миофибробластами для поддержания гомеостаза кожи и физиологического восстановления ткани, включая рубцевание, обсуждалось в упомянутой выше ссылке. Повышение экспрессии фактора роста фибробластов в дермальных фибробластах человека, таким образом, отчетливо указывает на способность исследуемой композиции, содержащей пептид SEQ ID NO: 1, связанный с олеаноловой кислотой, представленный STR#1, к физиологическому восстановлению ткани.

Пример 2. Анализ экспрессии генов.

Целью данного исследования было понять, как применение исследуемой композиции, содержащей пептид SEQ ID NO: 1, связанный с олеаноловой кислотой, представленный STR#1, влияет на экспрессию генов в коже. Настоящее исследование проводили с использованием полнослойной *in vitro* модели культуры кожи (EFT-400, MatTek). 100 мкл исследуемого материала наносили на поверхность каждой исследуемой культуры и инкубировали в течение 24 ч.

Обработка и поддержание культур: 100 мкл исследуемой композиции, содержащей пептид SEQ ID NO: 1, связанный с олеаноловой кислотой, представленный STR#1, наносили в центр каждой культуры EFT-400. Для распределения исследуемого материала использовали стерильный стеклянный шпатель. Каждую культуру визуально осматривали для обеспечения равномерного распределения. После нанесения культуры возвращали в инкубатор при 37°C с 5% CO₂ на 24 ч. По истечении 24 ч исследуемые материалы смывали с поверхности каждой культуры стерильным PBS (фосфатно-солевой буфер). После удаления исследуемого материала каждую культуру нарезали на четыре части и помещали в раствор РНК.

Выделение РНК: РНК выделяли из тканей, используя набор Maxwell 16 LEV RNA Tissue, следуя инструкциям производителя (Promega), и проводили вакуумную концентрацию до достижения более 200 нг/мкл, как требуется для обработки OpenArray. Концентрацию РНК и чистоту определяли с использованием спектрофотометра Nanodrop 2000. Синтез кДНК (комплементарная ДНК): кДНК получали с использованием набора High Capacity cDNA Synthesis в соответствии с инструкциями производителя для обработки OpenArray (Life Technologies).

кПЦР (количественная ПЦР (полимеразная цепная реакция)) обработка: реакции кПЦР запускали с использованием аттестованных анализов экспрессии генов Taqman в формате OpenArray. OpenArray запускали на приборе Life Technologies QuantStudio 12K Flex.

Анализ данных.

Данные кПЦР импортировали в программное обеспечение RealTime StatMiner v4.2 для статистического анализа с использованием способа относительной количественной оценки (RQ). На первой стадии анализа RQ значение CT гена-мишени нормируют по значению CT гена внутреннего контроля для каждого образца с получением дельты CT (dCT).

На фиг. 3-6 показано выраженное в процентах повышение экспрессии в коже следующих генов после нанесения исследуемой композиции, содержащей пептид SEQ ID NO: 1, связанный с олеаноловой кислотой, представленный STR#1. Экспрессия генов и связанные с ними положительные воздействия на состояние кожи выделены ниже. Повышающая регуляция экспрессии соответствующих генов в коже после нанесения исследуемой композиции, содержащей пептид SEQ ID NO: 1, прямо указывает на осуществление положительных воздействий на состояние кожи, связанных с экспрессией генов.

1. HSP-90 (помогает в восстановлении ДНК и ремоделировании внеклеточного матрикса - Radovanac K. et al., "Stabilization of integrin-linked kinase by the Hsp90-CHIP axis impacts cellular force generation, migration and the fibrotic response", EMBO J. 2013 May 15; 32(10):1409-24).

2. HSP-47 (действует в качестве молекулярного шаперона, облегчая укладку и сборку проколлагеновых молекул, поддерживая неужеленные молекулы в пределах ЭПР (эндоплазматический ретикулум) и способствуя транспорту правильно уложенных молекул из ЭПР в аппарат Гольджи - Mohammed Tasab et al., "Hsp47: a molecular chaperone that interacts with and stabilizes correctly-folded procollagen", EMBO J. May 15, 2000; 19(10): 2204-2211).

3. LOX (помогает перекрестному сшиванию белков внеклеточного матрикса - Rucker R.B. et al., "Copper, lysyl oxidase and extracellular matrix protein cross-linking", Am J Clin Nutr. 1998 May; 67(5 Suppl):996S-1002S).

4. TIMP (тканевые ингибиторы матриксных металлопротеиназ контролируют активность матриксных металлопротеиназ и минимизируют дегенерацию матрикса - Dimitra Bourboulia et al., "Matrix MetalloProteinases (MMPs) and Tissue Inhibitors of MetalloProteinases (TIMPs): positive and negative regulators intumor cell adhesion", Semin Cancer Biol. Jun 2010; 20(3): 161-168).

Повышающая регуляция других важных генов посредством исследуемой композиции, содержащей пептид SEQ ID NO: 1, представлена в табл. I. Такая повышающая регуляция прямо указывает на способность исследуемой композиции, содержащей пептид SEQ ID NO: 1, осуществлять известные функции генов, тем самым содействуя разным аспектам здорового состояния кожи (гомеостаз, целостность и функция).

Таблица I

Ген	Название гена	Кратность увеличения	Функция гена
CDSN	корнеодесмосин	1,78	Барьерная функция
CLDN7	клаудин-7	1,69	Барьерная функция
FLG	филаггрин	2,23	Барьерная функция
LCE3D	поздний роговой конверт 3D	1,61	Барьерная функция
LOR	лорикрин	1,63	Барьерная/дифференцировка кератиноцитов
ITGB4	интегрин, бета-4	1,76	Клеточная адгезия/барьерная функция
PPARD	рецептор, активируемый пероксисомным пролифератором	1,59	Клеточный цикл/пролиферация клеток
TP63	опухолевый белок p63	1,56	Клеточный цикл/пролиферация клеток
MKI67	антиген, идентифицируемый антителом Ki-67	1,83	Пролиферация клеток
KLK5	калликреин-связанная пептидаза 5	2,44	Десквамация/внеклеточный матрикс
TGFB1	трансформирующий фактор роста, бета 1	1,72	Внеклеточный матрикс/синтез коллагена
DSG3	десмоглеин-3	2,19	Внеклеточный матрикс /клеточная адгезия
AQP5	аквапорин 5	1,97	Увлажнение
CALML5	кальмодулин-подобный белок-5	1,91	Дифференцировка кератиноцитов
BMP2	костный морфогенетический белок-2	1,80	Отбеливание/меланогенез

Понижающая регуляция других важных генов посредством исследуемой композиции, содержащей пептид SEQ ID NO: 1, представлена в табл. II. Такая понижающая регуляция прямо указывает на способность исследуемой композиции, содержащей пептид SEQ ID NO: 1, снижать эффекты известных функций генов, тем самым содействуя оптимальному здоровому состоянию кожи.

Таблица II

Ген	Название гена	Кратность уменьшения	Функция гена
IL1A	интерлейкин-1, альфа	-1,77	Воспалительный ответ
IL8	интерлейкин-8	-1,68	Воспалительный ответ
PTGS2	простагландин-эндопероксид-синтаза-2/ COX2 (циклоксигеназа-2)	-1,80	Воспалительный ответ
TNF	фактор некроза опухоли (TNF-суперсемейство, член)	-4,34	Воспалительный ответ
KRT10	кератин 10	-1,71	Дифференцировка кератиноцитов
KRT4	кератин 4	-2,11	Дифференцировка кератиноцитов

В то время как изобретение было описано со ссылкой на предпочтительный вариант осуществления специалистам в данной области техники следует четко понимать, что изобретение им не ограничивается. Скорее объем изобретения следует толковать только в совокупности с прилагаемой формой изобретения.

Перечень последовательностей.

<110> Маджид, Мухаммед
Нагабхушанам Кальянам
Чандрамоули Ренукешвар Х
Соод, Раттан
Пракаш, Суббалакшми
Татхапуди, Сусмитха Ананд

<120> КОМПОЗИЦИЯ ОЛЕАНОИЛ-ПЕПТИДА И СПОСОБ ЛЕЧЕНИЯ СТАРЕНИЯ КОЖИ

<130> PEP

<140>
<141>

<150> 11/835165
<151> 2007-08-07

<160> 1

<170> PatentIn version 3.5

<210> 1
<211> 5
<212> ПРТ
<213> Искусственная последовательность

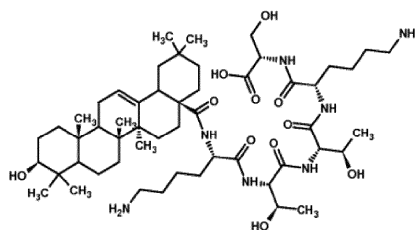
<220>
<223> Описание искусственной последовательности : Синтетический пептид

<400> 1

Lys Thr Thr Lys Ser
1 5

ФОРМУЛА ИЗОБРЕТЕНИЯ

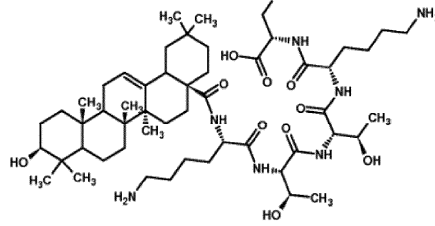
1. Применение композиции, содержащей пептид SEQ ID NO: 1, связанный с олеаноловой кислотой, представленный STR#1, для повышения экспрессии гена аквапорина 5 (AQP5) в недостаточно увлажненной коже человека для достижения эффекта опосредованного AQP5 переноса воды и повышения уровня ее увлажненности



(STR#1)

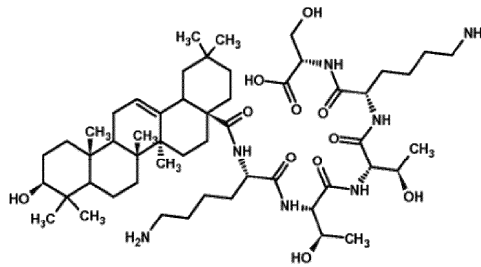
2. Применение композиции, содержащей пептид SEQ ID NO: 1, связанный с олеаноловой кислотой,

представленный STR#1, для повышения экспрессии генов, способных улучшить барьерную функцию кожи в недостаточно увлажненной коже человека путем предотвращения испарения воды, где указанные гены выбраны из группы, состоящей из корнеодесмозина (CDSN), клаудина-7 (CLDN7), филаггрина (FLG), позднего рогового конверта 3D (LCE3D), лорикрина (LOR) и интегрина бета-4 (ITGB4)



(STR#1)

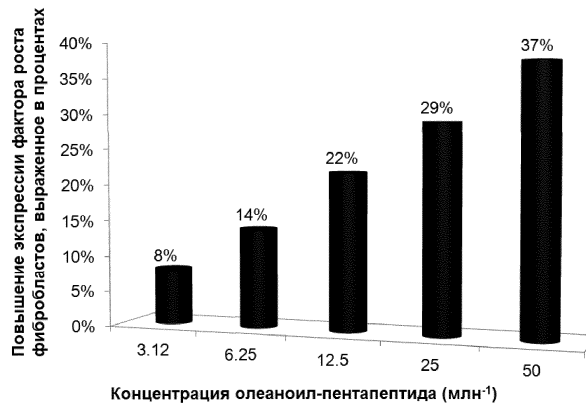
3. Применение композиции, содержащей пептид SEQ ID NO: 1, связанный с олеаноловой кислотой, представленный STR#1, для повышения экспрессии генов, способных повышать дифференцировку кератиноцитов в недостаточно увлажненной коже человека путем предотвращения испарения воды, где указанные гены выбраны из группы, состоящей из лорикрина (LOR) и кальмодулин-подобного белка-5 (CALML5)



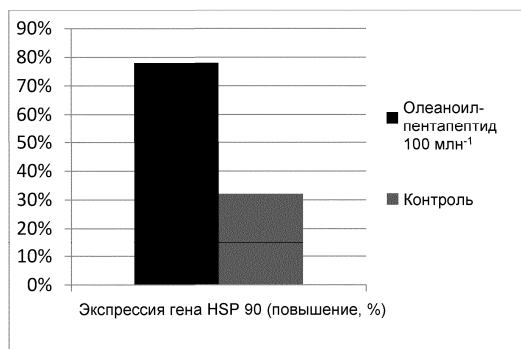
(STR#1)



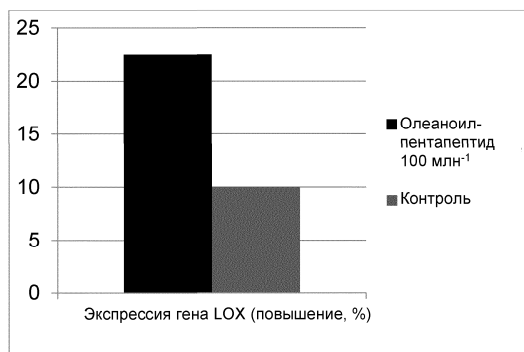
Фиг. 1



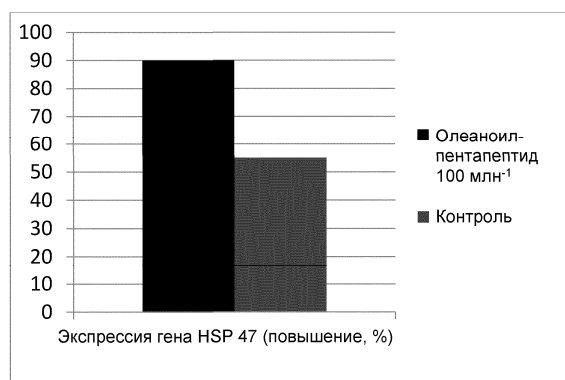
Фиг. 2



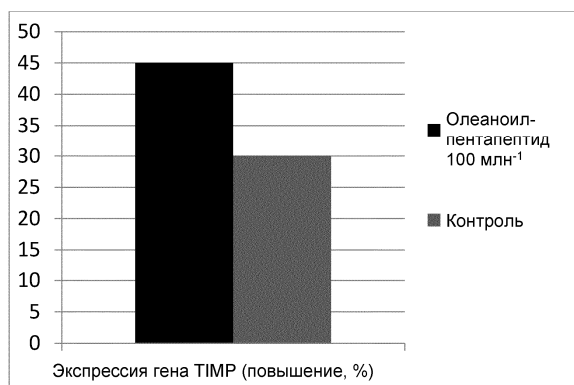
Фиг. 3



Фиг. 4



Фиг. 5



Фиг. 6

