

(19)



Евразийское
патентное
ведомство

(21) 202190888 (13) A1

(12) ОПИСАНИЕ ИЗОБРЕТЕНИЯ К ЕВРАЗИЙСКОЙ ЗАЯВКЕ

(43) Дата публикации заявки
2021.07.07(22) Дата подачи заявки
2019.10.10

(51) Int. Cl. *A61Q 19/08* (2006.01)
A61K 47/36 (2006.01)
A61K 47/32 (2006.01)
A61K 47/14 (2017.01)
A61K 9/06 (2006.01)
A61K 9/00 (2006.01)
A61K 8/81 (2006.01)
A61K 8/73 (2006.01)
A61K 8/37 (2006.01)
A61K 8/04 (2006.01)

(54) ПЕПТИД ДЛЯ ПРИМЕНЕНИЯ В КОСМЕТИКЕ

(31) 102018000009384

(32) 2018.10.11

(33) IT

(86) PCT/IB2019/058641

(87) WO 2020/075108 2020.04.16

(71) Заявитель:

КОЛОССИУМ КОМБИНАТОРИАЛ
КЕМИСТРИ СЕНТР ФО
ТЕКНОЛОДЖИ СОСЬЕТА А
РЕСПОНСАБИЛИТА' ЛИМИТАТА
ИН ФОРМА АББРЕВИАТА К4Т
С.Р.Л. (IT)

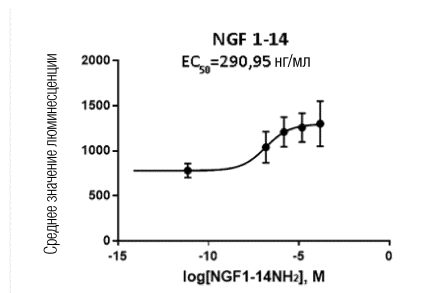
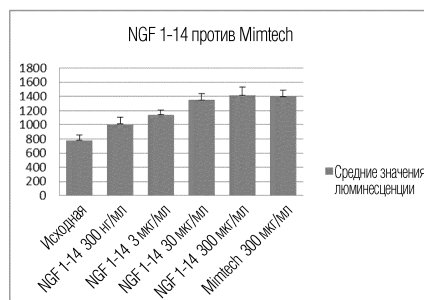
(72) Изобретатель:

Пеллегрини Пабло (IT)

(74) Представитель:

Медведев В.Н. (RU)

(57) Настоящее изобретение относится к применению пептида, содержащего последовательность ID NO: 1, и его косметической композиции для лечения и предупреждения старения кожи и фотостарения.



A1

202190888

202190888

A1

ОПИСАНИЕ ИЗОБРЕТЕНИЯ

2420- 567906EA/025

ПЕПТИД ДЛЯ ПРИМЕНЕНИЯ В КОСМЕТИКЕ

ОБЛАСТЬ ИЗОБРЕТЕНИЯ

Настоящее изобретение относится к пептиду для применения в косметике. В частности, настоящее изобретение относится к пептиду, имеющему Seq. ID No. 1, способному уменьшать старение кожи и фотостарение. Более конкретно, настоящее изобретение также относится к косметической композиции, содержащей пептид, имеющий Seq. ID No. 1, и по меньшей мере один косметически приемлемый эксципиент.

УРОВЕНЬ ТЕХНИКИ

Фактор роста нервов (NGF) представляет собой нейротрофический фактор и нейропептид, в основном вовлеченный в регуляцию роста, поддержания, пролиферации и выживания определенных нейронов-мишеней.

NGF был открыт Prof. Rita Levi-Montalcini, в Zoology Institute of the Washington University of St. Louis (Levi-Montalcini R., Harvey Lect., 60:217, 1966), и его открытие привело к значительным продвижениям в исследовании роста и дифференцировки нервных клеток, поскольку NGF способен влиять на развитие и сохранение биологических функций нейронов и их регенерацию. За открытие этой молекулы и за охарактеризацию ее биологической функции как в периферической, так и в центральной нервной системе в 1986 году Prof. R. Levi-Montalcini была удостоена Нобелевской премии по медицине и физиологии.

Ряд исследований *in vitro* и *in vivo* продемонстрировал патофизиологическую важность NGF для предупреждения нейронального повреждения хирургической, химической, механической и ишемической природы, сделав его идеальным кандидатом для применения для лечения нескольких состояний периферической и центральной нервной системы (Hefti F., J. Neurobiol., 25: 1418, 1994; Fricker J., Lancet, 349:480, 1997). В действительности, с тех пор много лет назад были проведены клинические испытания на пациентах, страдающих от болезни Паркинсона и болезни Альцгеймера посредством интрацеребрального введения NGF мыши (см., например, Olson L. et al., J. Neural Trans.: Parkinson's Disease and Dementia Section, 4: 79, 1992). Результаты этих испытаний подтвердили наблюдения, сделанные в моделях на животных, и продемонстрировали отсутствие возможных побочных эффектов после введения NGF мыши. Затем эти качества были подтверждены для рекомбинантного NGF человека (Petty B.G. et al., Annals of Neurology, 36:244-246, 1994).

Эти события опосредуются NGF в результате связывания с его двумя рецепторами клеточной поверхности: TrkA и p75. Совместная экспрессия двух генов для рецептора p75 и рецептора Trk NGF потенциально может привести к большей способности отвечать на NGF и предполагает дополнительные уровни регуляции семейства факторов-нейротрофинов (Chao MV, Hempstead BL., "p75 and Trk: a two-receptor system", Trends Neurosci. 1995;18:321-6. Чувствительные нейроны куриного эмбриона имеют два

различных класса рецепторов нейротрофинов: p75 и Trk с константами диссоциации 10^{-9} М и 10^{-11} М, соответственно, подразумевая, что только низкая занятость более высокоаффинного рецептора требуется для опосредования биологического действия нейротрофинов (Meakin SO, Shooter EM, "The nerve growth factor family of receptors", Trends Neurosci. 1992;15:323-31).

TrkA представляет собой рецептор с активностью тирозинкиназы, который формирует высокоаффинный участок связывания для NGF.

p75 представляет собой трансмембранный белок без поддающегося идентификации цитоплазматического каталитического домена, принадлежащего суперсемейству рецепторов фактора некроза опухоли (TNF), который формирует низкоаффинный участок связывания для NGF.

Международные публикации патентов WO2004026329A1, WO2011116090, WO2011049758A1 и WO2005019266A2 относятся к пептидам или антителам, которые взаимодействуют или связываются с фактором роста нервов (NGF) человека и нейтрализуют функцию NGF, и к их применению для предупреждения и/или лечения различных заболеваний и нарушений, при которых активность NGF является вредоносной, включая солнечные ожоги и витилиго.

В противоположность тому, что предложено в патентных публикациях, процитированных выше, в международной публикации патента WO2013065078A2 описано, что местное введение на кожу препаратов, содержащих NGF, является эффективным в отношении достижения интенсификации цвета кожи, т.е. для усиления пигментации, в случае здоровой кожи, не пораженной дисхроматозом, а также в отношении улучшения дерматологических состояний, вовлекающих ахромю или гипохромю кожи, как в случае витилиго.

Пептидный фрагмент, содержащий последовательность 1-14 NGF человека (NGF1-14), известен в данной области в качестве миметика NGF, как описано в некоторых источниках литературы (P. Di Pietro et al., "Immobilization of Neurotrophin Peptides on Gold Nanoparticles by Direct and Lipid-Mediated Interaction: A New Multipotential Therapeutic Nanoplatform for CNS Disorders", ACS Omega (2017), 2(8), 4071-4079 и C. Satriano et al., "Neurotrophin-mimicking peptides at the biointerface with gold respond to cuprum ion stimuli", Physical Chemistry Chemical Physics (2016), 18(44), 30595-30604).

С другой стороны, было продемонстрировано, что NGF1-14 взаимодействует только с рецептором TrkA, в частности, с активацией каскада PI3/Akt и фосфорилирования CREB, и неспособен взаимодействовать с рецептором p75 и индуцировать фосфорилирование ERK1/2 (A. Travaglia et al., "A small linear peptide encompassing the NGF N-terminus partly mimics the biological activities of the entire neurotrophin in PC12 cells", ACS Chem Neurosci. 2015 Aug 19;6(8):1379-92).

Наконец, в WO99/39728 описано, что p75 передает сигнал для апоптоза кератиноцитов и меланоцитов, когда он активируется отдельно, но вместо этого передает сигнал выживания клеток, когда он активируется вместе с рецепторами семейства Trk.

СУЩНОСТЬ ИЗОБРЕТЕНИЯ

Исходя из информации, полученной из уровня техники, иногда противоречивой, заявитель исследовал потенциальное применение NGF1-14 в косметике.

NGF1-14 соответствует следующей последовательности:

Seq. ID No. 1: SSSHPIFHRGEFSV

В ходе тщательного экспериментирования заявитель неожиданно обнаружил, что NGF1-14 способен способствовать продуцированию проколлагена I и эластина, а также активировать меланоциты для продуцирования меланина. Это открытие указало на возможность применения NGF1-14 в косметической композиции для лечения и предупреждения старения кожи и фотостарения.

Кроме того, заявитель обнаружил, что пептид NGF1-14 сохранял все эффекты rh-NGF, желаемые для дерматологического применения.

Следующим преимуществом, обнаруженным заявителем, является то, что NGF1-14, в противоположность целому белку, может быть без труда синтезирован посредством общепринятых подходов синтеза пептидов и может храниться в мягких условиях и в течение длительных периодов времени.

Эти преимущества привели к значительному сокращению стоимости продуцирования и сделали NGF1-14 в высокой степени пригодным и привлекательным для применения в косметике.

Кроме того, заявитель обнаружил, что может быть внесена некоторая модификация количества и типа аминокислот NGF1-14 без существенного изменения активности NGF1-14.

Таким образом, первая задача настоящего изобретения относится к пептиду, содержащему последовательность ID No. 1, или последовательность, обладающую по меньшей мере 85%, предпочтительно по меньшей мере 90%, и более предпочтительно по меньшей мере 95% идентичностью последовательности с последовательностью ID No. 1, и его производному или соли, для применения для лечения и предупреждения старения кожи и фотостарения.

Кроме того, вторая задача настоящего изобретения относится к косметической композиции, содержащей пептид, содержащий последовательность ID No. 1, или последовательность, обладающую по меньшей мере 85%, предпочтительно по меньшей мере 90%, и более предпочтительно по меньшей мере 95% идентичностью последовательности с последовательностью ID No. 1, и его производное или соль и по меньшей мере один косметически приемлемый эксципиент для применения для лечения и предупреждения старения кожи и фотостарения.

Третья задача настоящего изобретения относится к нетерапевтическому способу лечения и предупреждения старения кожи и фотостарения у индивидуума, нуждающегося в этом, включающему топическое нанесение косметической композиции, содержащей пептид, содержащий последовательность ID No. 1 или последовательность, обладающую по меньшей мере 85%, предпочтительно по меньшей мере 90% и более предпочтительно

по меньшей мере 95% идентичностью последовательности с последовательностью ID No. 1, и его производное или соль, и по меньшей мере один косметически приемлемый эксципиент.

Преимущественно, нетерапевтический способ по настоящему изобретению включает предварительную обработку кожи посредством низкочастотного сонофореза (LFS).

КРАТКОЕ ОПИСАНИЕ ЧЕРТЕЖЕЙ

На фиг.1 представлен график активности NGF1-14 в различных концентрациях вместе с эталонным соединением NegerminTM (фиг.1A) и кривая EC50 (фиг.1B), как описано в примере 1.

На фиг.2 представлена схема обработки области кожи, представляющей интерес в эксперименте, описанном в примере 2.

На фиг.3 представлены уровни NGF1-14 в эпидермисе (фиг.3A) и дерме (фиг.3B), измеренные после обработки, описанной в примере 2.

На фиг.4 представлены уровни фосфорилирования рецептора TrkA, обнаруженные после обработки, описанной в примере 2.

На фиг.5 представлены уровни проколлагена I (фиг.5A) и эластина (фиг.5B) в дерме крыс, измеренные после теста однократного введения, описанного в примере 3.

На фиг.6 представлены уровни проколлагена I (фиг.6A) и эластина (фиг.6B) в дерме крыс, измеренные после теста введения в течение двух недель, описанного в примере 3.

ПОДРОБНОЕ ОПИСАНИЕ ИЗОБРЕТЕНИЯ

Первая задача настоящего изобретения относится к пептиду, содержащему последовательность ID No. 1, для применения для лечения и предупреждения старения кожи и фотостарения.

Seq. ID No. 1 в соответствии с настоящим изобретением соответствует последовательности SSSHPIFHRGEFSV.

Сокращенные обозначения аминокислотных последовательностей, используемых в настоящем описании, соответствуют номенклатуре IUPAC-IUB, как указано в приведенной ниже таблице A.

Таблица A

Аланин	Ala	A	Аргинин	Arg	R
Аспарагин	Asn	N	Аспарагиновая кислота	Asp	D
Цистеин	Cys	C	Глутаминовая кислота	Glu	E
Глутамин	Gln	Q	Глицин	Gly	G
Гистидин	His	H	Изолейцин	Ile	I
Лейцин	Leu	L	Лизин	Lys	K
Метионин	Met	M	Фенилаланин	Phe	F
Пролин	Pro	P	Серин	Ser	S

Треонин	Thr	T	Триптофан	Trp	W
Тирозин	Tyr	Y	Валин	Val	V

Пептиды согласно изобретению могут обладать по меньшей мере 85%, по меньшей мере 90% и по меньшей мере 95% идентичностью последовательности с последовательностью ID No. 1 при оптимальном выравнивании. Оптимальное выравнивание последовательностей можно проводить различными известными способами и с помощью компьютеризованных воплощений известных алгоритмов (например, BLAST, TFASTA, BESTFIT, такие как в Wisconsin Genetics Software Package, Release 7.0, Genetics Computer Group, Madison, WI). Также можно использовать алгоритм BLAST (Altschul et al., Mol. Biol. (1990), 215, 403-410), для которого программное обеспечение может быть получено через National Center for Biotechnology Information (www.ncbi.nlm.nih.gov/).

"Процентная идентичность последовательностей" в отношении последовательности пептида относится к проценту остатков, которые являются идентичными в двух последовательностях. Процентную идентичность последовательностей (%SI) вычисляют по следующей формуле:

$$\%SI = (nt - nd) \times 100 / nt$$

где nt представляет собой количество остатков в основной последовательности и nd представляет собой общее количество неидентичных остатков в сопоставляемой последовательности при выравнивании так, чтобы максимальное количество аминокислот было идентичным. Таким образом, последовательность SSSHPIFHRRGDFSV обладает идентичностью последовательности приблизительно 92,8% с последовательностью ID. No 1 (nd=1 и nt=14).

Пептиды по изобретению могут иметь ту же длину последовательности, что и последовательность ID. No 1, или длину вплоть до 16 аминокислот.

Варьирование аминокислотной последовательности в пептидах, содержащих последовательность ID No. 1 по настоящему изобретению, включает консервативную замену аминокислот, которая не влияет на активность пептида. Замены, способны сохранять активность пептида, выбирают, исходя из (а) эффективности сохранения структуры пептидного остова в области замены, такой как трехмерные структуры листа или спирали, (b) эффективности сохранения электрического заряда или гидрофобности молекулы в данной области, или (с) эффективности сохранения объема боковой цепи.

Примеры консервативных замен принадлежат к группе, состоящей из основных аминокислот (аргинин, лизин и гистидин), кислотных аминокислот (глутаминовая кислота и аспарагиновая кислота сложение), полярных аминокислот (глутамин и аспарагин), гидрофобных аминокислот (лейцин, изолейцин, валин и метионин), ароматических аминокислот (фенилаланин, триптофан и тирозин) и небольших аминокислот (глицин, аланин, серин и треонин).

Аминокислотные замены, которые в основном не изменяют специфическую активность, известны в области настоящего изобретения.

Наиболее часто встречающимися изменениями являются Ala/Ser, Val/Ile, Asp/Glu, Thr/Ser, Ala/Gly, Ala/Thr, Ser/Asn, Ala/Val, Ser/Gly, Tyr/Phe, Ala/Pro, Lys/Arg, Asp/Asn, Leu/Ile, Leu/Val, Ala/Glu, Asp/Gly и обратные изменения. Другой пример консервативных замен представлен в приведенной ниже таблице С.

ТАБЛИЦА С

Исходная аминокислота	Возможная замена	Предпочтительная замена
Ala (A)	V; L; I	V
Arg (R)	K; Q; N	K
Asn (N)	Q; H; D, K; R	Q
Asp (D)	E; N	E
Cys (C)	S; A	S
Gln (Q)	N; E	N
Glu (E)	D; Q	D
Gly (G)	A	A
His (H)	N; Q; K; R	R
Ile (I)	L; V; M; A; F;	L
Leu (L)	I; V; M; A; F	I
Lys (K)	R; Q; N	R
Met (M)	L; F; I	L
Phe (F)	L; V; I; A; Y	Y
Pro (P)	A	A
Ser (S)	T	T
Thr (T)	S	S
Trp (W)	Y; F	Y
Tyr (Y)	Trp; F; T; S	F
Val (V)	I; L; M; F; A;	L

В зависимости от длины, пептид по настоящему изобретению можно синтезировать способом, хорошо известным в данной области, например, посредством автоматического устройства для синтеза пептидов, или получать посредством технологии генной инженерии. Например, слитый ген, кодирующий слитый белок, включающий партер по слиянию и пептид по настоящему изобретению, получают способами генной инженерии, а затем им трансформируют клетку-хозяина для экспрессии слитого белка. После этого, пептид по настоящему изобретению отщепляют и отделяют от слитого белка с использованием протеазы или соединения с получением желаемого пептида. Для этого последовательность ДНК, кодирующую аминокислотные остатки, которые могут расщепляться протеазой, такой как фактор Ха или энтерокиназа, или соединением, таким

как CNBr или гидроксилламин, можно встраивать между полинуклеотидами, кодирующими партнер по слиянию и пептид по настоящему изобретению.

Косметическая композиция по настоящему изобретению содержит пептид, содержащий последовательность ID No. 1, и по меньшей мере один косметически приемлемый эксципиент.

Косметическая композиция по настоящему изобретению может содержать количество пептида, или его производного и/или соли, находящееся в диапазоне от 0,00000001% до 20% по массе, предпочтительно от 0,000001% до 15% по массе, более предпочтительно от 0,0001% до 10% по массе, и еще более предпочтительно от 0,0001% до 5% по массе.

Косметическая композиция по настоящему изобретению может содержать множество других необязательных компонентов, пригодных для того, чтобы сделать такие композиции более приемлемыми с косметической или эстетической точки зрения, или для обеспечения им дополнительной пользы при применении. Такие общепринятые необязательные ингредиенты хорошо известны специалистам в данной области. Они включают любые косметически приемлемые ингредиенты, такие как ингредиенты, указанные в CTFA International Cosmetic Ingredient Dictionary and Handbook, 7-е издание, под редакций Wenninger and McEwen (The Cosmetic, Toiletry, and Fragrance Association, Inc., Washington, D. C., 1997). Как используют в рамках изобретения "косметически приемлемый" означает материал (например, соединение или композиция), который пригоден для применения в контакте с кожей, волосами или другим подходящим субстратом, как определено в настоящем описании ниже.

Косметически приемлемые ингредиенты, пригодные в рамках настоящего изобретения, включают косметически приемлемые носители, летучие и нелетучие растворители, воду и другие дополнительные ингредиенты, такие как поверхностно-активные вещества, консерванты, абсорбенты, хелатирующие агенты, смазывающие вещества, увлажнители, гидрофобизаторы, антиоксиданты, поглотители УФ-излучения, средства против раздражения, витамины, микроэлементы, противомикробные средства, отдушки, красители и цветные ингредиенты, и/или структурирующие вещества.

Выражение "косметически приемлемый носитель", как используют в рамках изобретения, означает один или несколько совместимых твердых или жидких наполнителей, разбавителей, сухих разбавителей и т.п., которые являются косметически приемлемыми, как определено в настоящем описании выше. Термин "совместимый", как используют в рамках изобретения, означает, что компоненты композиций по настоящему изобретению могут быть скомбинированы с основными активными веществами по настоящему изобретению и друг с другом так, чтобы не происходило взаимодействия, которое могло бы существенно снизить эффективность композиции в обычных ситуациях применения.

Тип носителя, используемого в рамках настоящего изобретения, зависит от желаемого типа продукта. Композиции, пригодные в рамках настоящего изобретения,

могут иметь множество форм продуктов. Они включают, но не ограничиваются ими, лосьоны, кремы, гели, карандаши, спреи, мази, пасты, муссы и косметику (например, твердое, полутвердое или жидкое средство макияжа, включая основы).

Эти формы продуктов могут содержать несколько типов носителей, включая, но не ограничиваясь ими, растворы, аэрозоли, эмульсии (в том числе типа "масло в воде" или "вода в масле"), гели, твердые вещества и липосомы.

Композиции по настоящему изобретению могут содержать воду в различных количествах в зависимости от формы композиции. Количество воды, если оно присутствует, может находиться в диапазоне от менее 1% до более 99% по массе в расчете на массу всей композиции. Водную композицию по настоящему изобретению, в частности, составляют в качестве водных лосьонов или эмульсий типа "масло в воде", или в качестве гетерогенных эмульсий (тройная эмульсия типа "масло в воде в масле" или "вода в масле в воде"). Такие эмульсии известны и описаны, например, С. FOX в "Cosmetics and Toiletries" - November 1986 - Vol. 101 - pages 101-112.

Твердые композиции, композиции спреев и кремы типа "вода в масле" обычно содержат количества воды менее 10%, более предпочтительно менее 5% по массе в расчете на общую массу композиции. Композиции с шариковым аппликатором, водные композиции и дезодорант обычно содержат количество воды от приблизительно 15% до приблизительно 99%, более предпочтительно от приблизительно 30% до приблизительно 90%, еще более предпочтительно от приблизительно 50% до приблизительно 80% по массе в расчете на общую массу композиции.

Композиции по настоящему изобретению могут содержать один или несколько летучих растворителей. Если он присутствует, летучий растворитель или смесь растворителей, как правило, присутствуют на уровне от приблизительно 10% до приблизительно 90%, более предпочтительно от приблизительно 25% до приблизительно 75%, еще более предпочтительно от приблизительно 35% до приблизительно 65%, по массе в расчете на общую массу композиции. Растворители, пригодные в рамках настоящего описания, предпочтительно представляют собой органические летучие растворители.

Как используют в рамках изобретения, "летучий" относится к веществам со значительным уровнем давления пара в условиях окружающей среды, как понятно специалистам в данной области.

Летучие растворители для применения в рамках настоящего изобретения предпочтительно имеют давление пара приблизительно 2 кПа или более, более предпочтительно приблизительно 6 кПа или более, при 25°C. Летучие растворители для применения в рамках настоящего изобретения предпочтительно имеют температуру кипения в нормальной атмосфере (1 атм.) менее чем приблизительно 150°C, более предпочтительно менее чем приблизительно 100°C, еще более предпочтительно менее чем приблизительно 90°C, еще более предпочтительно менее чем приблизительно 80°C.

Предпочтительно, летучие растворители для применения в рамках настоящего

изобретения являются относительно непахнущими и безопасными для применения на коже человека. Подходящие летучие растворители включают, но не ограничиваются ими, C1-C4 спирты, летучие силиконы и их смеси. Предпочтительными летучими растворителями являются C1-C4 спирты и их смеси. Более предпочтительным для применения в рамках настоящего изобретения является этанол.

Композиции по настоящему изобретению также могут содержать один или несколько нелетучих растворителей. При наличии нелетучий растворитель или смесь растворителей, как правило, присутствуют на уровне от приблизительно 1% до приблизительно 20%, более предпочтительно от приблизительно 2% до приблизительно 10%, еще более предпочтительно от приблизительно 3% до приблизительно 5% по массе в расчете на общую массу композиции. Подходящие нелетучие растворители включают, но не ограничиваются ими, бензилбензоат, цетеариловый спирт, цетиловый спирт, диэтилфталат, изопропилмирилат, диметикон, каприлилметикон и их смеси.

В композициях по настоящему изобретению может присутствовать несколько других дополнительных ингредиентов. Они включают, но не ограничиваются ими, гидрофильные полимеры, выбранные из полиэтиленгликолей (ПЭГ), поливинилпирролидонов (PVP), гидроксипропилметилцеллюлозы (HPMC) и полуксамеров; УФ-стабилизаторы, такие как бензофенон-3; антиоксиданты, такие как токоферилацетат; консерванты, такие как феноксиэтанол, бензиловый спирт, метилпарабен, пропилпарабен; средства для коррекции pH, такие как молочная кислота, лимонная кислота, цитрат натрия, янтарная кислота, фосфорная кислота, гидроксид натрия, карбонат натрия; дезодоранты и противомикробные средства, такие как фарнезол, фенолсульфонат цинка и этилгексилглицерин; увлажнители, такие как трибегенин, глицерин; кондиционирующие средства для кожи, такие как аллантоин; охлаждающие средства, такие как триметилизопропилбутанамид и ментол; кондиционирующие ингредиенты для волос, такие как пантенол, пантетин, пантотеин, пантенилэтиловый эфир и их комбинации; пропелленты, такие как пропан, изобутан, бутан и изобутен; соли, как правило, такие как ацетат калия и хлорид натрия и их смеси; отдушки и красители.

При наличии эти дополнительные ингредиенты предпочтительно присутствуют на уровне менее 10%, более предпочтительно менее 5%, по массе в расчете на общую массу композиции.

Пептиды по настоящему изобретению способны способствовать продуцированию проколлагена I и эластина, а также активировать меланоциты для продуцирования меланина. Таким образом, косметическая композиция по настоящему изобретению является особенно пригодной для лечения и предупреждения старения кожи и фотостарения.

Изобретение далее описано в приведенных ниже примерах, которые не ограничивают объем изобретения, описанный в формуле изобретения.

ПРИМЕР 1

Активность in vitro

Обработка посредством NGF клеточной линии феохромоцитомы крысы (PC12) приводит к экспрессии мРНК и белка c-fos (J. Milbrandt, "Nerve growth factor rapidly induces c-fos mRNA in PC12 rat pheochromocytoma cells", Proc Natl Acad Sci U S A. 1986 Jul;83(13):4789-93).

Начиная с работы Milbrandt, заявитель провел мониторинг активации рецептора NFG с использованием клона (B9), стабильно трансфицированного промотором c-fos человека, контролирующим репортерный ген люциферазы (PC12-Luci). Этот клон использовали для разработки функционального и количественного анализа для охарактеризации активности NGF1-14.

Эксперименты проводили в клетках PC12-Luci, которые эндогенно экспрессируют рецепторы NGF, TrkA и p75. Клетки поддерживали в следующей полной культуральной среде, содержащей:

- Смесь DMEM-F12 (DMEM-F12 Glutamax; Life Technologies, GIBCO 10565-018)
- 5% эмбриональную телячью сыворотку (FBS, Sigma Aldrich, F7524)
- 10% сыворотку лошади (HS, Sigma Aldrich, H1138)
- 1% пенициллин-стрептомицин (Life Technologies, GIBCO 15140-122).

Для пассирования клетки осторожно промывали PBS, а затем инкубировали с трипсином в течение 5 мин при комнатной температуре или 37°C. Добавляли среду и клетки ресуспендировали (6-8 раз).

Эксперименты проводили в шести повторениях в черном 96-луночном планшете, предварительно покрытом 50 мкг/мл коллагена типа I.

Клетки PC-12-Luci высевали в количестве 25000/лунка в 100 мкл полной среды для роста. Через 24 ч среду осторожно удаляли. Затем клетки инкубировали с пятью концентрациями (диапазон 30 нг/мл-300 мкг/мл, серийные разведения 1:10) NGF1-14 в стандартном буфере Tyrode с 0,1% BSA (50 мкл/лунка) в течение 4 ч при 37°C. В качестве эталона добавляли эталонное соединение NegerminTM (от MimeTech Srl) в концентрации 30 мкг/мл. Исходный раствор NGF1-14 ресуспендировали в стерильной воде, разделяли на аликвоты и хранили при -20°C. Исходный раствор соединения NegerminTM ресуспендировали в буфере для составления и хранили при -20°C.

После инкубации проводили мониторинг базального уровня в течение 30 секунд с использованием мультимодального устройства для считывания планшетов EnSpire (PerkinElmer). Затем к клеткам добавляли смесь Triton-люциферин (50 мкл/лунка), в соотношении 1:1, что приводило к лизису клеток. Мониторинг полученного люминесцентного сигнала проводили в течение дополнительных 60 секунд.

Растворы и буферы, упомянутые выше, имели следующий состав:

- Буфер для составления: 50 mM NaH₂PO₄, 100 mM NaCl, pH 7,2,
- Буфер Tyrode: 130 mM NaCl, 5 mM KCl, 2 mM CaCl₂, 1 mM MgCl₂, 5 mM NaHCO₃, 20 mM HEPES в воде при pH 7,4; подвергнутый стерильному фильтрованию и хранившийся при 4°C,
- Бычий сывороточный альбумин (BSA), свободный от жирных кислот (Sigma,

A8806); исходный раствор: 10% в буфере Tyrode; разделенный на аликвоты и хранившийся при -20°C,

- Исходный раствор для лизиса Triton: 25 mM TRIS, 25 mM Na₂HPO₄, 2 mM DTT, 10% глицерин, 2% TRITON X-100; разделенный на аликвоты и хранившийся при -20°C,

- Исходный раствор люциферина: 20 mM трицин, 2,67 mM MgSO₄, 0,1 mM EDTA, 33,3 mM DTT, 270 мкМ кофермент А, 470 мкМ люциферин, 530 мкМ АТФ; разделенный на аликвоты и хранившийся при -80°C.

Все величины люминесценции нормализовывали к исходному уровню люминесценции. Величину ответа вычисляли в качестве среднего значения люминесценции зарегистрированной кинетики.

Данные далее анализировали (например, вычисление кривых доза-эффект и величин EC50) и проводили построение графиков с использованием GraphPad Prism (GraphPad Software, Inc.). Результаты проиллюстрированы на фиг.1, на которой представлен график активности NGF1-14 при различных концентрациях вместе с эталонным соединением NegerminTM (фиг.1A) и кривая EC50 (фиг.1B). Результаты показали, что NGF1-14 повышает уровень исходной люминесценции зависимым от дозы образом (Ec50=290,95 нг/мл).

В заключение, эти результаты продемонстрировали, что NGF1-14 обладает функциональной активностью, демонстрируя более высокую эффективность *in vitro*, чем у соединения эталонного стандарта NegerminTM, но более низкую, чем у rhNGF (Ec50 rhNGF 1,4 нг/мл). Уменьшенная эффективность согласуется с косметическим применением.

ПРИМЕР 2

Доклиническое испытание

Эксперименты по распределению проводили для оценки способности препарата геля NGF1-14 проникать через роговой слой и достигать дермы, также с использованием подобных сонофорезу стратегий для облегчения проникновения через кожу.

Обработку липкой лентой и ультразвук применяли на выбритой области спины самок взрослых крыс Sprague Dawley (SD) (10-12 месяцев).

Низкочастотный сонофорез (LFS) применяли с использованием Sonics Ultrasonic Processor Model VCX 400, действующего с частотой 20 кГц (смещение вершины приблизительно 2 см, непрерывный режим) в течение 6 или 10 минут, в соответствии с распространенной клинической практикой, поскольку известно, что длительное применение сонофореза повышает проникновение через кожу, а также значительное температурное повреждение, что является непригодным для применения (см. International Journal of Health Sciences & Research 477 Vol.5; Issue: 5; May 2015: A Review on Ultrasound Parameters and Methods of Application in Transdermal Drug Delivery).

Контроль в виде носителя и препарат геля NGF1-14 вводили на часть кожи, обработанную LFS (S) или на выбритую/обработанную посредством липкой ленты кожу (NS).

Композиции контроля в виде носителя и препарата геля NGF1-14 приведены в

таблице 1 ниже.

ТАБЛИЦА 1

	Контроль в виде носителя	NGF1-14
Гидрогель на основе гиалуроната натрия	Приблизительно 90-95%	Приблизительно 90-95%
Поливиниловый спирт (Sigma Aldrich Mowiol® 40-88)	5-10%	5-10%
Стабилизаторы на основе парабенов (Sigma Aldrich)	Менее 1%	Менее 1%
NGF1-14	-	0,1%

Гидрогель на основе гиалуроната натрия получали посредством растворения гиалуроната натрия, имеющего молекулярную массу в диапазоне от 50 до 150 кДа (производимый Contipro) в воде.

Обработку повторяли через два часа и крыс умерщвляли для того, чтобы вырезать образцы кожи через 2 часа после второго применения геля/миметика NGF.

Схема обработки представлена на фиг.2, где N и G указывают на подвергнутую обработке область без LFS с гелем NGF1-14 и носителя, соответственно, и NS и GS указывают на подвергнутую обработке область с LFS с NGF1-14 и гелем носителя, соответственно. NL и GL указывают на области кожи, находящиеся рядом и не перекрывающиеся с областями LFS.

Эпидермис и дерму обработанных ультразвуком (S) и не обработанных ультразвуком (NS) областей кожи отделяли с использованием скальпеля, промывали PBS и разрезали на две части. Первую из них хранили в стерильной пробирке при -80°C для переработки для экстракции тотального белка и биохимического анализа.

Часть кожи погружали в PFA 4% для переработки для последующей гистологической и иммунохимической оценки.

Белковый экстракт из эпидермиса и дермы использовали для оценки эффекта применения LFS на способность препарата геля NGF1-14 проникать через роговой слой и достигать дермы.

Количественное определение NGF 1-14 проводили посредством ВЭЖХ-УФ, на обращенно-фазовой колонке C4, элюируя фосфатным буфером (pH 7,4) и ацетонитрилом. Способ ВЭЖХ-УФ проверяли в отношении линейности, повторяемости и воспроизводимости, и выхода.

Результаты представлены на фиг.3А и 3В. По сравнению с обработкой носителем было выявлено значительное повышение уровня NGF1-14 в эпидермисе и дерме после LFS.

Эффективность миметика NGF/применения LFS подтверждали посредством анализа уровней экспрессии и активации рецептора NGF TrkA, участвующего в выживании/трофике.

Эффект NGF(1–14) на фосфорилирование TrkA тестировали посредством анализа с использованием вестерн-блоттинга белковых экстрактов из клеточных культур PC12, обработанных пептидом, с использованием антител к P-TrkA, в соответствии с распространенной лабораторной практикой.

Как показано на фиг.4, увеличенные уровни фосфорилирования TrkA были обнаружены во всех образцах дермы, в которых проводили нанесение NGF1-14, с LFS или без него по сравнению с соответствующими контролями в виде носителя.

ПРИМЕР 3

Старение кожи и фотостарение

Поскольку белки коллаген и эластин внеклеточного матрикса вовлечены в заживление раны, старение кожи и фотостарение, также проводили анализ эффекта местного применения NGF1-14 на уровни этих белков.

Уровни проколлагена I и эластина определяли с использованием коммерческих наборов для Elisa, сначала в тесте однократной обработки, а затем в тесте обработки в течение двух недель.

Результаты теста однократного применения обобщенно представлены на фиг.5. Сходную тенденцию наблюдали при анализе двух белков: повышение уровня как проколлагена I (A), так и эластина (B) обнаруживалось в дерме крыс, которым проводили обработку NGF1-14 в дозе 0,1%, после обработки ультразвуком. Эффект был менее выраженным без применения ультразвука. Было обнаружено небольшое повышение уровня эластина, в то время как величина уровня коллагена I была сравнимой с величиной уровня положительного контроля в пределах погрешности эксперимента.

Тест однократного применения и тест применения в течение двух недель

Защитное действие NGF1-14 в дозе 0,1% (Р 0,1%) оценивали на взрослой коже, подвергнутой воздействию субэритематозных уровней УФ-В ($MED=60$ мДж/см² два раза в сутки) сначала в тесте однократного применения (одни сутки), а затем в тесте с оценкой в течение трех недель перед применением. Эту методику эксперимента также называют моделью фотостарения (PAG), поскольку она индуцирует структурные и молекулярные изменения, происходящие при старении.

Местную обработку Р 0,1% или гелем-носителем проводили на выбранной коже спины крыс с PAG и без PAG в течение двух недель. Воздействие УФ-В ($MED=60$ мДж/см², один раз в сутки) также проводили в ходе последней недели обработки.

Крыс умерщвляли и кожу вырезали с использованием скальпеля, промывали PBS и разрезали на две части. Первую из них хранили в стерильной пробирке при -80°C для переработки в отношении экстракции общего белка и биохимического анализа. Последнюю из них погружали в PFA 4% и обрабатывали для гистологической и иммуногистохимической оценки.

В соответствии с испытанием однократного введения фотостарение индуцировало снижение уровня проколлагена I в дерме (фиг.6А) и обнаруженной экспрессии эластина (фиг.6В).

Применение Р 0,1% приводило к повышению уровня проколлагена I в дерме как без РAG, так и с РAG, хотя эффект был более выраженным в здоровой коже (фиг.6А). Изменения были менее значительными в отношении концентрации эластина.

ПРИМЕР 4

Связанное с загаром действие

Проводили оценку эффекта местного применения NGF1-14 на активацию продукции меланина меланоцитами.

В соответствии с уже существующими протоколами, культуры первичных клеток нормальных меланоцитов человека высевали в чашки Петри и культивировали в течение недели с NGF 1-14 и без него в различных концентрациях. Измерение содержания меланина проводили посредством иммуноферментного анализа ELISA. В культурах, обогащенных пептидом, наблюдали его повышение.

ПРИМЕР 5

Тест раздражения кожи

Проводили тесты раздражения кожи с использованием модифицированных протоколов анализа для косметического применения на кожу, а именно, колориметрический анализ с МТТ и анализ высвобождения LDH.

Колориметрический анализ с МТТ измеряет активность митохондриального фермента сукцинатдегидрогеназы, который активен только в живых клетках и реагирует с МТТ (имеющим желтый цвет), образуя соль синего цвета, оптическую плотность которой (ODn), являющуюся пропорциональной количеству живых клеток, количественно определяют спектрофотометрически при длине волны 570 нм.

Анализ высвобождения LDH измеряет количество лактатдегидрогеназы, цитоплазматического фермента, в культуральной среде, высвобождение которой означает потерю целостности клеточной мембраны. Количество определяют спектрофотометрически посредством специального реагента при длине волны 490 нм.

Тесты проводили в трех экземплярах с двумя образцами (1 и 2) состава геля NGF1-14 в дозе 0,3%, в три раза превышающей активную дозу (0,1%), на ткани EpiDerm™ (MatTek Corporation, Братислава, Словакия) в среде для анализа EPI-100-ASY. В качестве положительного контроля использовали 1% раствор Triton X-100. В качестве отрицательного контроля использовали гелевый матрикс без пептида. Анализ положительного и отрицательного контролей проводили в двух повторениях. Образцы подвергали контакту в течение ночи на протяжении 18 часов.

Результаты тестов обобщенно представлены в следующих таблицах 2 (МТТ) и 3 (LDH).

ТАБЛИЦА 2

	Средняя величина (OD) $\pm$ SD	Нормализованная величина $\pm$
--	--------------------------------	--------------------------------

		SD
Отрицательный контроль	$2,0 \pm 0,1$	$100,0 \pm 3,1$
Положительный контроль	$0,7 \pm 0,0$	$33,3 \pm 2,0$
Образец 1	$1,8 \pm 0,0$	$91,6 \pm 1,8$
Образец 2	$1,9 \pm 0,1$	$99,3 \pm 3,8$

ТАБЛИЦА 3

	Средняя величина (OD) $\pm$ SD	Нормализованная величина $\pm$ SD
Отрицательный контроль	$0,13 \pm 0,00$	$1,0 \pm 0,0$
Положительный контроль	$1,04 \pm 0,04$	$8,0 \pm 0,3$
Образец 1	$0,24 \pm 0,04$	$1,9 \pm 0,3$
Образец 2	$0,14 \pm 0,05$	$1,1 \pm 0,4$

В анализе МТТ образец считается "не вызывающим раздражения", когда жизнеспособность превышает 70% относительно отрицательного контроля. В анализе с LDH образец считается "не вызывающим раздражения", когда величина высвобождения LDH менее чем в пять раз ниже величины, зарегистрированной для отрицательного контроля. Таким образом, оба из образцов 1 и 2 считались "не вызывающими раздражения".

ПРИМЕР 6

Тест сенсibilизации кожи

Тест сенсibilизации кожи с использованием анализа высвобождения IL-18 с набором для Elisa.

Анализ высвобождения IL-18 измеряет количество интерлейкина 18 (IL-18) в культуральную среду. IL-18 представляет собой провоспалительный цитокин, играющий ключевую роль в индукции сенсibilизации при контакте с аллергеном. Количество определяют способом прямого ELISA, т.е. развитие окрашивания прямо пропорционально количеству цитокинов в культуральной среде.

Тесты проводили в трех экземплярах и двумя образцами (1 и 2) состава геля NGF1-14 в дозе 0,3%, в три раза превышающей активную дозу (0,1%), на ткани EpiDermTM (MatTek Corporation, Братислава, Словакия) в среде для анализа EPI-100-ASY. В качестве положительного контроля использовали 0,15% раствор DNCB (2,4-динитрохлорбензол). В качестве отрицательного контроля использовали гелевый матрикс без пептида. Анализ положительного и отрицательного контролей проводили в двух повторениях. Образцы

подвергали контакту в течение ночи на протяжении 18 часов.

Результаты тестов обобщенно представлены в таблице 4 ниже.

ТАБЛИЦА 4

	Средняя величина (пг/мл) $\pm$ SD	Нормализованная величина $\pm$ SD
Отрицательный контроль	27,0 $\pm$ 3,8	1,0 $\pm$ 0,1
Положительный контроль	252,3 $\pm$ 16,4	9,3 $\pm$ 0,6
Образец 1	38,3 $\pm$ 5,6	1,4 $\pm$ 0,2
Образец 2	45,6 $\pm$ 8,2	1,7 $\pm$ 0,3

В анализе высвобождения IL-18 образец считается "не сенсibiliзирующим", когда величина высвобождения IL-18 ниже двукратной величины, зарегистрированной для отрицательного контроля. Таким образом, как образец 1, так и образец 2, считались "не сенсibiliзирующими".

ПРИМЕР 7

Охарактеризация pKa и Log P и D для NGF1-14

Экспериментальный pKa, а также коэффициенты распределения и разделения (log P и log D), определяли с использованием автоматического потенциометрического титратора Sirius T3 (Sirius Analytical Instruments Ltd., East Sussex, Великобритания), оборудованного pH-электродом Ag/AgCl сравнения с двойным переходом, спектрометром Sirius D-PAS и устройством, определяющим мутность. pH-электрод был откалиброван титрометрически в диапазоне pH 1,8-12,2. Использовали верхнеприводную мешалку и температурный датчик осуществлял мониторинг температуры в ходе титрования. Эксперименты по титрованию проводили в 0,15 М растворе KCl (вода ISA) в атмосфере аргона при температуре $25 \pm 1^\circ\text{C}$. Все тесты проводили с использованием стандартизованного 0,5 М KOH и 0,5 М HCl в качестве реагентов титрования, для тестов коэффициента распределения использовали насыщенный октанол в воде ISA (5% воды ISA) в качестве распределяющего растворителя. pKa определяют способом потенциометрии с использованием pH-метрического титрования. Порошок (приблизительно 0,5 мг) растворяли в 1,5 мл воды ISA и проводили титрование в трех экземплярах в диапазоне pH 2,0-12,0. Определение Log P проводят в трех экземплярах посредством растворения порошка (приблизительно 0,7 мг) в 1 мл воды ISA с последующим pH-метрическим титрованием в трех различных процентных содержаниях октанола (как правило, 50%, 60%, 70%). Прогнозирование pKa и вычисление log P для инструментального моделирования проводят с использованием ACD/Percepta.

Результаты проиллюстрированы в таблице 5 ниже. Величина Log P считается относительной величиной, поскольку пептиды никогда не являются нейтральными молекулами.

ТАБЛИЦА 5

Кислотный рКа	4,42 ±0,05 (n=50)
Основной рКа	7,41 ±0,07 (n=50)
Основной рКа	6,43 ±0,06 (n=50)
Log P (w/o)	-8,50
Log D (7,4)	-7,90

Настоящее изобретение описано с конкретной отсылкой к некоторым его конкретным вариантам осуществления, однако следует понимать, что модификации и изменения могут быть внесены специалистами в данной области без отклонения от объема изобретения, определенного в прилагаемой формуле изобретения.

ФОРМУЛА ИЗОБРЕТЕНИЯ

1. Пептид, содержащий последовательность ID No. 1 или последовательность, имеющую по меньшей мере 85%, предпочтительно по меньшей мере 90% и более предпочтительно по меньшей мере 95% идентичности последовательности с последовательностью ID No. 1, и его производное или соль, для применения в лечении и предупреждении старения кожи и фотостарения.

2. Пептид для применения по п.1, где указанный пептид имеет длину вплоть до 16 аминокислот, предпочтительно вплоть до 15 аминокислот и более предпочтительно 14 аминокислот.

3. Пептид для применения по п.2, где указанный пептид состоит из последовательности ID No. 1 или последовательности, имеющей по меньшей мере 85%, предпочтительно по меньшей мере 90% и более предпочтительно по меньшей мере 95% идентичности последовательности с последовательностью ID No. 1 и ее производным или солью.

4. Пептид для применения по любому из пп. 1-3, где указанное производное содержит N- и/или C-конец указанного пептида, который является химически модифицированным или защищен органическим соединением.

5. Пептид для применения по п.4, где указанное органическое соединение выбрано из группы, состоящей из фосфорила, гликозила, ацила, алкила, карбоксила, гидроксила, биотинила, убиквитинила и амидогруппы.

6. Косметическая композиция, содержащая пептид по любому из пп. 1-5 и по меньшей мере один косметически приемлемый эксципиент, для применения в лечении или предупреждении старения кожи или фотостарения.

7. Косметическая композиция для применения по п.6, где указанная композиция содержит некоторое количество указанного пептида или его производного и/или соли в диапазоне от 0,00000001% до 20% по массе, предпочтительно от 0,000001% до 15% по массе, более предпочтительно от 0,0001% до 10% по массе и еще более предпочтительно от 0,0001% до 5% по массе.

8. Косметическая композиция для применения по п.6, где указанный по меньшей мере один косметически приемлемый эксципиент выбран из группы, состоящей из косметически приемлемых носителей, летучих и нелетучих растворителей, воды, поверхностно-активных веществ, консервантов, абсорбентов, хелатирующих агентов, смазывающих веществ, увлажнителей, гидрофобизаторов, антиоксидантов, поглотителей УФ-излучения, средств против раздражения, витаминов, микроэлементов, противомикробных средств, отдушек, красителей и цветных ингредиентов, и/или структурирующих веществ.

9. Косметическая композиция для применения по п.8, где указанные косметически приемлемые носители включают растворы, аэрозоли, эмульсии типа "масло в воде", эмульсии типа "вода в масле", гели, твердые вещества и липосомы.

10. Косметическая композиция для применения по п.8, где указанная композиция

имеет форму лосьонов, кремов, гелей, карандашей, спреев, мазей, паст, муссов и косметики.

11. Нетерапевтический способ лечения и предупреждения старения кожи и фотостарения у индивидуума, нуждающегося в этом, включающий топическое нанесение косметической композиции, содержащей пептид по любому из пп. 1-5 и по меньшей мере один косметически приемлемый эксципиент.

12. Нетерапевтический способ по п.11, где указанный способ включает предварительную обработку кожи посредством низкочастотного сонофореза (LFS).

По доверенности

**ИЗМЕНЕННАЯ ФОРМУЛА ИЗОБРЕТЕНИЯ,
ПРЕДЛОЖЕННАЯ ЗАЯВИТЕЛЕМ ДЛЯ РАССМОТРЕНИЯ**

1. Пептид, содержащий последовательность ID No. 1 или последовательность, имеющую по меньшей мере 85%, предпочтительно по меньшей мере 90% и более предпочтительно по меньшей мере 95% идентичности последовательности с последовательностью ID No. 1, и его производное или соль, для применения в лечении и предупреждении старения кожи и фотостарения, где указанный пептид имеет длину вплоть до 16 аминокислот.

2. Пептид для применения по п.1, где указанный пептид имеет длину вплоть до 15 аминокислот и предпочтительно 14 аминокислот.

3. Пептид для применения по п.2, где указанный пептид состоит из последовательности ID No. 1 или последовательности, имеющей по меньшей мере 85%, предпочтительно по меньшей мере 90% и более предпочтительно по меньшей мере 95% идентичности последовательности с последовательностью ID No. 1 и ее производным или солью.

4. Пептид для применения по любому из пп. 1-3, где указанное производное содержит N- и/или C-конец указанного пептида, который является химически модифицированным или защищен органическим соединением.

5. Пептид для применения по п.4, где указанное органическое соединение выбрано из группы, состоящей из фосфорила, гликозила, ацила, алкила, карбоксила, гидроксила, биотинила, убиквитинила и амидогруппы.

6. Косметическая композиция, содержащая пептид по любому из пп. 1-5 и по меньшей мере один косметически приемлемый эксципиент для применения в лечении или предупреждении старения кожи или фотостарения.

7. Косметическая композиция для применения по п.6, где указанная композиция содержит некоторое количество указанного пептида или его производного и/или соли в диапазоне от 0,00000001% до 20% по массе, предпочтительно от 0,000001% до 15% по массе, более предпочтительно от 0,0001% до 10% по массе и еще более предпочтительно от 0,0001% до 5% по массе.

8. Косметическая композиция для применения по п.6, где указанный по меньшей мере один косметически приемлемый эксципиент выбран из группы, состоящей из косметически приемлемых носителей, летучих и нелетучих растворителей, воды, поверхностно-активных веществ, консервантов, абсорбентов, хелатирующих агентов, смазывающих веществ, увлажнителей, гидрофобизаторов, антиоксидантов, поглотителей УФ-излучения, средств против раздражения, витаминов, микроэлементов, противомикробных средств, отдушек, красителей и цветных ингредиентов, и/или структурирующих веществ.

9. Косметическая композиция для применения по п.8, где указанные косметически приемлемые носители включают растворы, аэрозоли, эмульсии типа "масло в воде", эмульсии типа "вода в масле", гели, твердые вещества и липосомы.

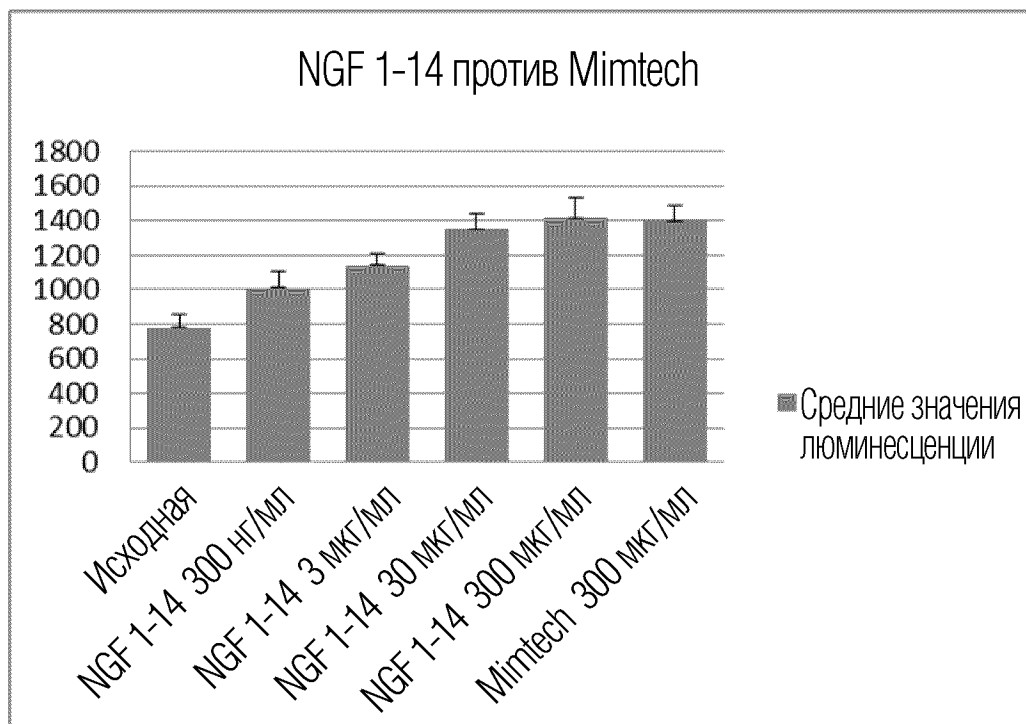
10. Косметическая композиция для применения по п.8, где указанная композиция имеет форму лосьонов, кремов, гелей, карандашей, спреев, мазей, паст, муссов и косметики.

11. Нетерапевтический способ лечения и предупреждения старения кожи и фотостарения у индивидуума, нуждающегося в этом, включающий топическое нанесение косметической композиции, содержащей пептид по любому из пп. 1-5 и по меньшей мере один косметически приемлемый эксципиент.

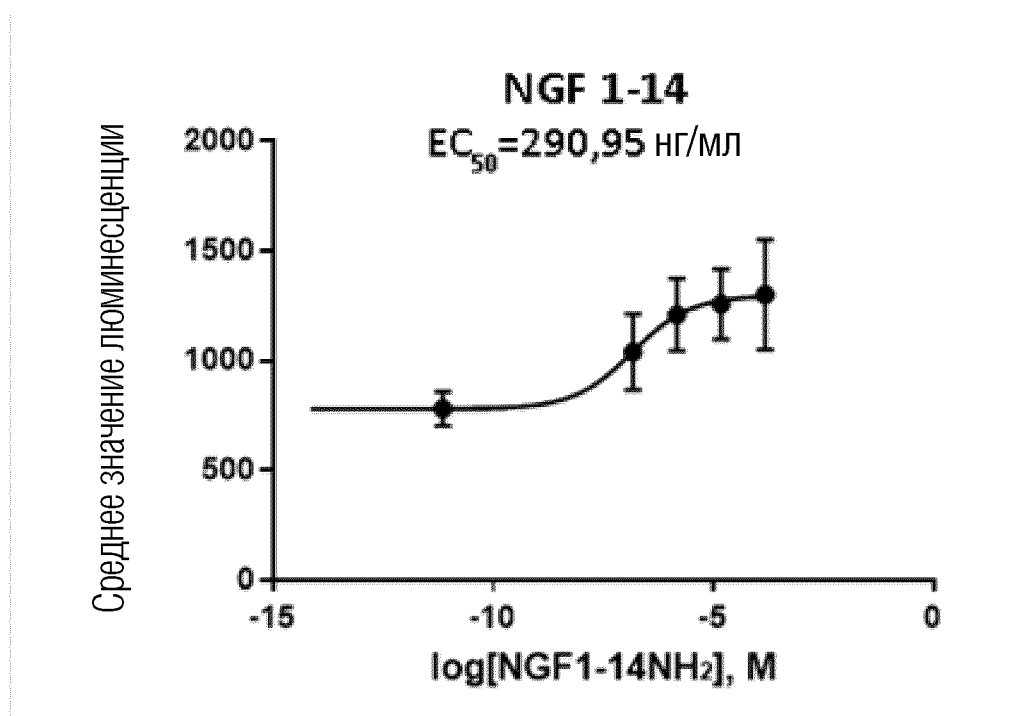
12. Нетерапевтический способ по п.11, где указанный способ включает предварительную обработку кожи посредством низкочастотного сонофореза (LFS).

По доверенности

ФИГ. 1

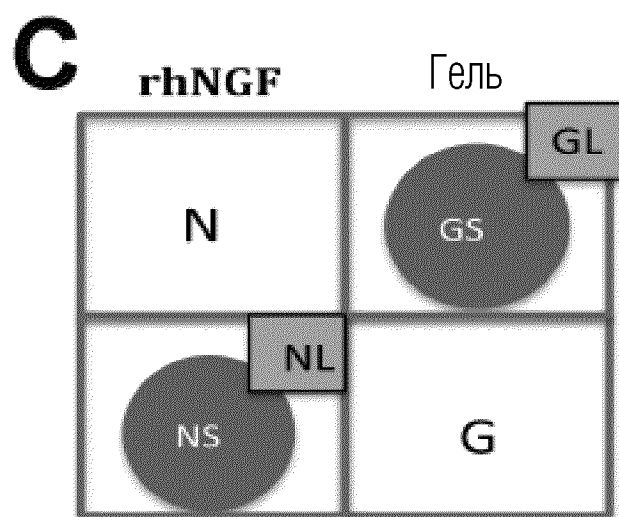


A

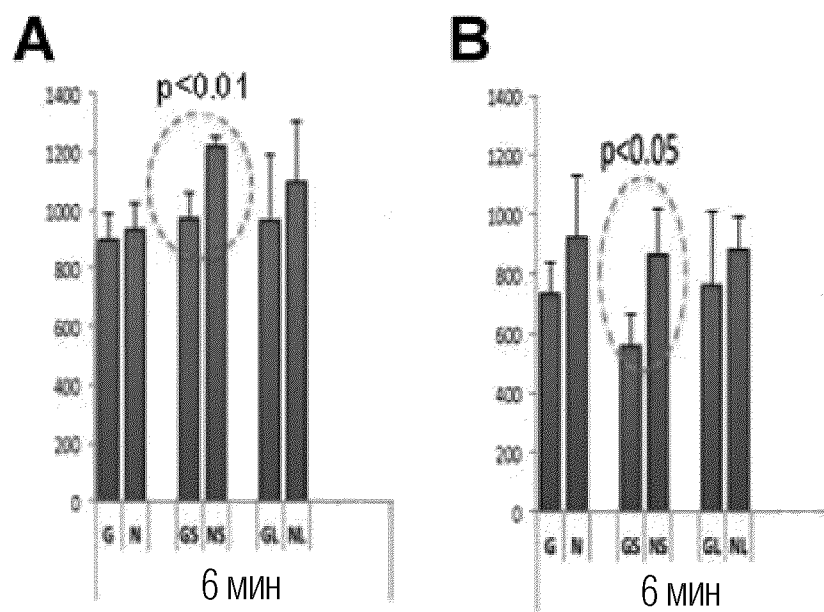


B

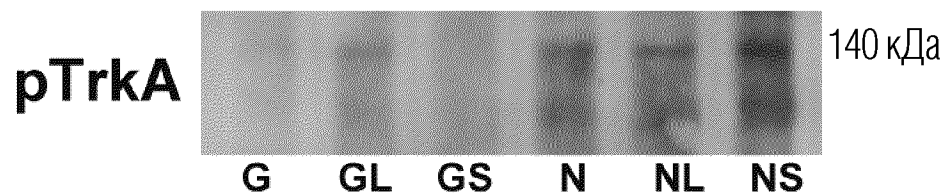
ФИГ. 2



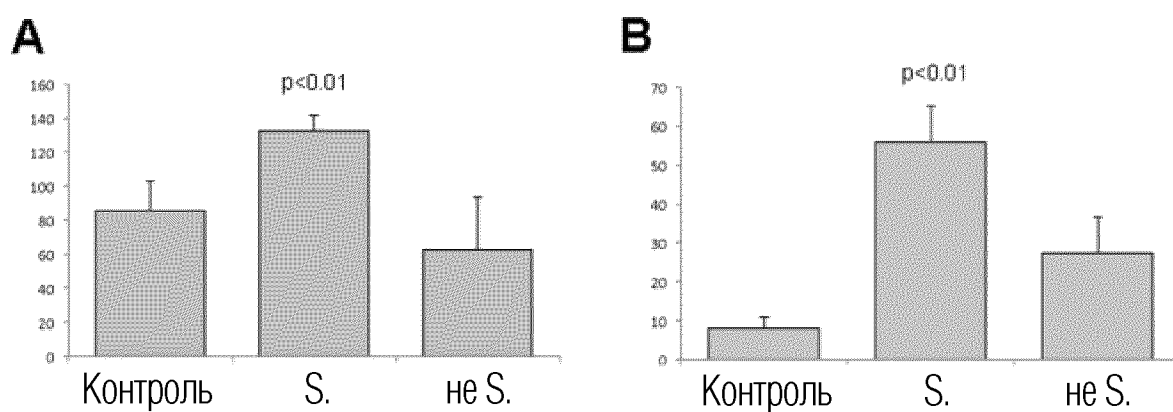
ФИГ. 3



ФИГ. 4



ФИГ. 5



ФИГ. 6

