

Koniugat kwasu jasmonowego i tetrapeptydu

Przedmiotem wynalazku jest koniugat kwasu jasmonowego i tetrapeptydu.

5 Kwas jasmonowy należy do jasmonidów - klasy hormonów roślinnych. Jest pochodną kwasu linolenowego. Główną funkcją kwasu jasmonowego i jego metabolitów jest regulacja odpowiedzi roślin na stresy abiotyczne i biotyczne, jak również wzrostu i rozwoju roślinnego. Kwas jasmonowy i jego pochodne są stosowane w kosmetykach.

Michelet J. F i współpracownicy (1) przeprowadzili badania nad zastosowaniem pochodnych kwasu jasmonowego w kosmetykach do pielęgnacji skóry. Pochodna kwasu jasmonowego, sól sodowa kwasu tetrahydrojasmonowego (nazwa handlowa LR2412) została opracowana w celu 10 zmniejszenia widocznych oznak starzenia się skóry. Badania *in vivo* potwierdzające skuteczność działania LR2412 przeprowadzono na zrekonstruowanym modelu skóry- Episkin™. Zaobserwowano wzrost procentu keratynocytów posiadających antygen Ki67 (białko jądrowe będące markerem komórkowej proliferacji) w warstwie podstawnej naskórka. Stwierdzono również 15 wzrost grubości naskórka. Ponadto, wyniki badań RTQPCR dowiodły wzrostu ekspresji syntezy hialuronianu 2 (HAS2) oraz syntezy hialuronianu 3 (HAS3). Ponadto stwierdzono ilość zawartości kwasu hialuronowego w podstawnej i ponadpodstawnej warstwie naskórka.

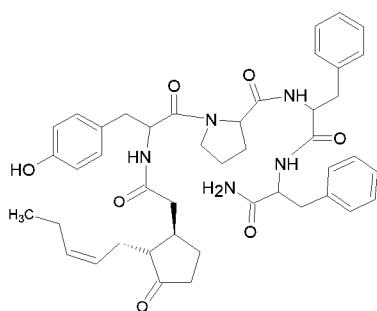
Tran, C., wraz z współpracownikami (2) badali *in vitro* skuteczność działania 20 przeciwstarzeniowego LR2412. Ocenę zdolności penetracyjnych LR2412 oceniono z wykorzystaniem wycinka ludzkiej skóry z powłok brzusznych oraz komory dyfuzyjnej Franz'a oraz wycinka ludzkiej skóry. Zaaplikowano 2 mg LR2412 na 1 cm² skóry (4% roztwór, niestety brak informacji, jaki to rozpuszczalnik). Badania te wykazały, że LR2412 penetruje naskórek oraz górne warstwy skóry właściwej, które są celem działania aktywnych substancji przeciwstarzeniowych. Po

24 godzinach umyto wycinki skóry i zbadano zawartość procentową substancji LR2412 w
25 poszczególnych warstwach skóry. Stwierdzono zawartość 0,93% zaaplikowanej ilości w warstwie
rogowej, 0,74% głębszych warstwach naskórka oraz 0,27% w górnych warstwach skóry właściwej.
W wyniku badan stwierdzono, że z formułacji uwolniło się ok 5,53% LR2412. Oceniono, że
właściwości zluszczające cząsteczki LR2412 oraz jej zdolność do interakcji z warstwą rogową
naskórka zbadano metodą mikroskopii elektronowej i dyfrakcji rentgenowskiej (eksperymenty
30 przeprowadzono na modelu skóry ludzkiej). Na podstawie wyników badań stwierdzono, że
LR2412 przyspiesza zluszczanie górnych warstw *stratum corneum* oraz poprawia właściwości
mechaniczne naskórka. Ponadto, badania *in vivo* wykorzystujące testy platkowe na skórze
pacjentów z objawami fotostarzenia dowiodły, że LR2412 ma wpływ na odkładanie się w warstwie
brodawkowej skóry właściwej włókien mikrofibrylowych bogatych w fibrylinę.

35 Pochodna kwasu jasmonowego w postaci soli sodowej kwasu tetrahydrojasmonowego
(LR2412) wykazuje niewielki procent uwolnienia z aplikowanej formułacji co sugeruje słabą
efektywność działania formułacji zawierających tę pochodną, ze względu na niewielki procent
uwalniania z formułacji ją zawierających.

Celem wynalazku było opracowanie/ związku będącego pochodną kwasu jasmonowego,
40 która charakteryzuje się lepszym uwalnianiem z formułacji kosmetycznej.

Przedmiotem wynalazku jest koniugat kwasu jasmonowego i tetrapeptydu o wzorze 1



(1)

Koniugat o wzorze 1 otrzymuje się m. in. w wyniku następującej reakcji:

Peptydy zostały zsyntezowane manualnie metodą Fmoc/tBu na fazie stałej. Fazę stałą
45 stanowiła żywica Wanga [(4-hydroksymetylo)-fenoksymetylo-kopoli(styren-1% diwinylobenzen)]
o stopniu osadzenia 0,6 mmol/g. Syntezę wykonywano w skali 0,3 mmol, a do jej przeprowadzenia
stosowano pięciokrotny nadmiar Fmoc-pochodnych aminokwasów. DIC i HOBt użyte zostały jako

50 odczynniki podczas sprzęgania, które każdorazowo prowadzone było przez 60 minut w temperaturze pokojowej z wytrząsaniem naczynia reakcyjnego. Stosunek molowy poszczególnych substratów – Fmoc-AA-OH:DIC:HOBt odpowiada stosunkowi 1:1:1. Użyto następujących pochodnych aminokwasów: Fmoc-L-Phe-OH, Fmoc-L-Pro-OH, Fmoc-L-Tyr(tBu)-OH. Przyłączanie kwasu jasmonowego do N-końca tetrapeptydu odbywało się na żywicy analogicznie jak w przypadku pochodnych aminokwasów.

55 Surowy peptyd był odszczepiany od żywicy za pomocą mieszaniny TFA:H₂O:TIS w proporcji objętościowej 92,5:2,5:5 przez okres 1,5 godziny w temperaturze pokojowej, zaś całość mieszana była za pomocą mieszadła magnetycznego przy 500 rpm. Na 100mg żywicy przypadła 1 ml mieszaniny. Następnie otrzymany roztwór poddano filtracji w celu oddzielenia ziaren żywicy. Za pomocą schłodzonego eteru dietylowego z przesączu wytrącono surowy peptyd, który przed oczyszczaniem zliofilizowano.

60 Szczegółowy opis syntezy podano w poniższym przykładzie wykonania.

W syntezie stosowano kwas jasmonowy (JA) pochodzący z firmy TCI (TOKYO CHEMICAL INDUSTRY CO., LTD.; mieszanina izomerów, czystość >85,0%, CAS 221682-41-3), zaś pozostałe odczynniki z firmy Sigma-Aldrich, Polska.

65 Synteza JA-YPPF w skali 0,3 mmol na żywicy Wanga (1% DVB, 200-400 mesh). Przed przystąpieniem do syntezy żywicę (1 g) umieszczono w mieszaninie DCM/DMF (v/v, 9:1; 15 ml mieszaniny na 1 g żywicy) na okres jednej godziny w temperaturze pokojowej w zamkniętej szklanej fiolce z wciskaną zatyczką w celu napęcznienia jej ziaren. Przyłączenie pierwszego aminokwasu - Fmoc-L-Phe-OH do polimeru żywicy odbywało się z użyciem 2,5 nadmiaru pochodnej aminokwasu względem zakładanego stopnia osadzenia żywicy (0,6 mmol/g). W 70 związku z tym na 1 gram żywicy wykorzystano 1,5 mmol pochodnej aminokwasu. Ilość wykorzystanej pochodnej Fmoc-L-Phe-OH (MW = 387,4 g/mol) wynosiła 585,1 mg. Zastosowana procedura przyłączania pierwszego aminokwasu do żywicy Wanga wymagała także użycia 1,5 mmol HOBt (HOBt monohydrat; MW = 153,1 g/mol), czyli 229,7 mg. Żywicę przeniesiono do naczynia reakcyjnego o pojemności 14 ml. Następnie usunięto rozpuszczalniki poprzez sączenie 75 pod zmniejszonym ciśnieniem. Do żywicy dodano Fmoc-L-Phe-OH i HOBt uprzednio całkowicie

rozpuszczone w 10 mL mieszaniny DCM/DMF (v/v, 9:1). W osobnym naczyniu rozpuszczono 0,06 mmol DMAP (MW = 122,2 g/mol), czyli 7,3 mg w 0,2 ml DMF. W pierwszej kolejności do żywicy dodano mieszaninę pochodnej aminokwasu i HOBt, a następnie 1,5 mmol DIC, a więc 232,3 μ l (MW = 126,2 g/mol, $\rho^{20^{\circ}\text{C}} = 0,815$ g/ml). Kolejnym etapem było dodanie roztworu DMAP. Reakcję prowadzono przez trzy godziny w temperaturze pokojowej z jednoczesnym wytrząsaniem naczynia reakcyjnego na wytrząsarce laboratoryjnej. Po tym czasie do mieszaniny dodano 1,2 mmol bezwodnika octowego oraz 1,2 mmol DIPEA - odpowiednio 113,4 μ l oraz 204,0 μ l (Ac_2O , MW = 102,1 g/mol, $\rho^{20^{\circ}\text{C}} = 1,08$ g/ml; DIPEA, MW = 129,2 g/mol, $\rho^{20^{\circ}\text{C}} = 0,76$ g/ml); w celu zabezpieczenia nieprzereagowanych grup hydroksylowych obecnych na żywicy. Reakcję 80 prowadzono przez 30 minut w temperaturze pokojowej wytrząsając naczynie reakcyjne. Następnie żywicę przepłukano serią rozpuszczalników (każde płukanie trwało 1 minutę, a objętość rozpuszczalnika wynosiła 10 ml), kolejno: dwukrotne płukanie DMF, dwukrotne przemywanie mieszaniną DMF/DCM (v/v, 1:1), dwukrotne przemywanie DCM, trzykrotne przemywanie eterem dietylowym. Rozpuszczalniki sączone były pod zmniejszonym ciśnieniem. Po wykonaniu serii 85 płukań żywica poddana była suszeniu w eksykatorze próżniowym przez dobę. Po tym czasie żywicę zważono i na podstawie przyrostu masy określono stopień osadzenia żywicy. Dodatkowo dokonano określenia stopnia osadzenia za pomocą metody spektrofotometrycznej, która opiera się na pomiarze absorbancji roztworu zawierającego uwolniony chromofor w postaci adduktu piperidyna-dibenzofulwenu, przy długości fali równej 290 nm. Dokonuje się tego poprzez 90 traktowanie żywicy 20% roztworem piperidyny w DMF (w tym przypadku 2 mg na 3 ml roztworu w trzech powtórzeniach) przez 10 minut z wytrząsaniem. Jako odniesienie służy absorbancja zmierzona dla 20% roztworu wyjściowego piperidyny w DMF. Wzór pozwalający określić osadzenie - $\text{Osadzenie [mmol/g]} = \frac{\text{Absorbancja}_{290\text{nm}}}{(\text{masa żywicy [mg]} \times 1,75)}$. Wykorzystując metodę wagową określono stopień osadzenia na 0,75 mmol/g, zaś wartość wyznaczona za 95 pomocą metody spektrofotometrycznej to 0,65 mmol/g. Wartości te uśredniono traktując metody 100 jako równoważne, w związku z czym uzyskano wartość osadzenia 0,70 mmol/g. Jako, że dalsza synteza odbywała się w skali ok. 0,3 mmol, do kolejnych etapów wykorzystano 430 mg żywicy. Wysuszoną żywicę należało ponownie poddać procesowi pęcznienia poprzez umieszczenie jej w

mieszaniu DCM/DMF (v/v, 9:1) na jedną godzinę w naczyniu reakcyjnym. Po tym czasie
105 dokonano deprotekcji grupy α -aminowej, odszczepiając ugrupowanie Fmoc (9-
fluorenylometoksykarbonylowe) za pomocą 20% roztworu piperidyny w DMF (8 ml), w czasie 10
minut przy jednoczesnym wytrząsaniu. Po etapie deprotekcji żywicę przemywano tak jak opisano
uprzednio z pominięciem przemywania eterem dietylowym (sumarycznie sześć przemywań,
ostatnie za pomocą DCM). Pobrano kilka ziaren żywicy za pomocą szklanej kapilary i
110 umieszczono w roztworze do testu chloranilowego na 10 minut po czym dokonywano obserwacji
zabarwienia ziaren (150 μ l; 1% acetaldehyd, 1% p-chloranil, w DMF). Identyczny co do procedury
test oraz przemywania miały miejsce po każdym etapie deprotekcji i sprzęgania, w tym z kwasem
jasmonowym. Pozytywny wynik testu chloranilowego (ziarna przybierają barwę od zielonej do
granatowej; obecne są wolne grupy aminowe) po etapie deprotekcji był rezultatem pożądanym i
115 pozwalał na przejście do etapu sprzęgania, zaś w przypadku wyniku negatywnego (ziarna
transparentne) etap deprotekcji należałoby powtórzyć (nie zaobserwowano). Reakcja sprzęgania z
kolejnymi aminokwasami oraz z kwasem jasmonowym przebiegała z pięciokrotnym nadmiarem
każdego z nich w stosunku do skali syntezy (skala 0,3 mmol, pięciokrotny nadmiar - 1,5 mmol). W
związku ze stechiometrią reakcji do każdej z reakcji kondensacji wykorzystano 1,5 mmol HOBt
120 (229,7 mg) oraz 1,5 mmol DIC (232,3 μ l). Do Fmoc- pochodnej aminokwasu (także kwasu
jasmonowego) oraz HOBt wprowadzano 8 ml mieszaniny DMF/DCM (v/v, 1:1), a następnie
dodano DIC. Po całkowitym rozpuszczeniu składników mieszaninę przenoszono do naczynia
reakcyjnego zawierającego żywicę. Reakcję prowadzono w temperaturze pokojowej przez godzinę
umieszczając naczynie na wytrząsarce laboratoryjnej. Po reakcji sprzęgania oczekiwano
125 negatywnego wyniku testu chloranilowego, zaś w przypadku uzyskania potwierdzenia obecności
wolnych grup aminowych etap sprzęgania powtarzano w tych samych warunkach. Dokładne ilości
wykorzystanych pochodnych aminokwasów i kwasu jasmonowego w kolejnych etapach: 585,1 mg
Fmoc-L-Phe-OH (MW = 387,4 g/mol), 506,1 mg Fmoc-L-Pro-OH (MW=337,37 g/mol), 689,3 mg
Fmoc-L-Tyr(tBu)-OH, 371,1 mg kwasu jasmonowego (MW = 210,3 g/mol, uwzględniono czystość
130 >85,0%).

Po zakończonej syntezie i serii płukań żywicę wysuszono w eksykatorze próżniowym, a następnie koniugat odszczepiano od żywicy poprzez zastosowanie mieszaniny TFA:H₂O:TIS w proporcji objętościowej 92,5:2,5:5 (1 ml na 100g) przez okres 1,5 godziny w temperaturze pokojowej, w efekcie otrzymując surowy peptyd, tak jak opisano to w punkcie 1.2. Teoretyczna
135 masa produktu przy 100% wydajności powinna wynosić 226,5 mg (0,7 mmol/g x 430 mg x 752,4 g/mol). Otrzymano 211,5 mg surowego koniugatu. Po jego oczyszczeniu uzyskano 168,6 mg (wydajność 74,4%) produktu o czystości >97%.

Zsyntezowany koniugat kwasu jasmonowego i peptydu oczyszczono za pomocą wysokosprawnego chromatografu cieczowego w układzie faz odwróconych (RP-HPLC), przy
140 wykorzystaniu kolumny Phenomenex Luna, 5 µm, C18(2), 100 Å, 10x250mm. Jako eluenty zastosowano wodę i acetonitryl zawierające 0,1% TFA. Oczyszczanie prowadzono w gradiencie rozpuszczalników przy wzrastającym udziale acetonitrylu (10-60%), w czasie 40 min, oraz przy objętościowym natężeniu przepływu 5 ml/min. Analizy czystości produktu dokonano w analogicznym układzie RP-HPLC, przy wykorzystaniu kolumny Phenomenex Luna, 5 µm, C18(2),
145 100 Å, 4,6x150mm. Czystość produktu końcowego koniugatu określono na >97%.

Koniugat JA-YPFF-NH₂, według wynalazku, charakteryzuje się następującymi właściwościami:

Masa związku: 764 Da.

150 Postać: biały proszek

Rozpuszczalność: związek dobrze rozpuszczalny w metanolu, etanolu; słabo rozpuszczalny w wodzie

Stabilność związku: związek stabilny; na podstawie analizy widma ESI-MS związku stwierdzono, że struktura koniugatu nie uległa zmianie przez okres roku przechowywania zarówno
155 w temperaturze 4 °C jak i 25°C. Stabilność związku w warunkach badania kinetyki uwalniania również została potwierdzona w oparciu o analizę widma spektrometrii mas (figura 6), gdzie zidentyfikowano pik o masie molekularnej 765,6 [JA-YPFF-NH₂+H]⁺.

Na rysunku na figurze 1 przedstawiono widmo mas związku JA-YPFF-NH₂ wykonane techniką ESI-MS, które potwierdza masę cząsteczkową koniugatu.

160 Na figurze 2 przedstawiono widmo IR koniugatu JA-YPFFNH₂. W tabeli 1 podano analizę widma IR. Analiza widma IR potwierdza strukturę koniugatu.

Tabela 1. Analiza wiązań chemicznych występujących w koniugacie.

Liczba falowa [cm ⁻¹]	Rodzaj wiązania
1738	C=O (amidowe)
2964	C-H (alkany)
1653	C-N (aminowe)
3028	=C-H (alkeny)
1518	C=C (aromatyczne)
3302	O-H (alkoholowe)
3070	N-H (aminowe)
708	C-H (aromatyczne)

W celu wykazania właściwości koniugatu przygotowano i przebadano serie emulsji oraz żeli
165 zawierających koniugat w celu określenia, która z formułacji gwarantuje większą biodostępność substancji czynnej, tj. z której formułacji uwalnia się najwięcej substancji aktywnej.

Przygotowanie formułacji kosmetycznych zawierających koniugat JA-YPFF.

Przygotowano cztery różne formułacje kosmetyczne:

- Emulsja 1 (typu o/w, przygotowana na ciepło),
- 170 • Emulsja 2 (typu w/o, przygotowana na ciepło),
- Emulsja 3 (typu o/w, przygotowana na zimno)
- Żel.
-

Każda z przygotowanych formułacji zawierała 0,5 % wagowych substancji aktywnej. W
175 Tabeli 2 przedstawiono uogólniony skład formułacji zawierających substancję aktywną.

Do badań eksperymentalnych przygotowano formułacje kosmetyczne (Tabela 3); każda z przygotowanych formułacji zawierała 0,5% substancji aktywnej.

Tabela 2

	Składnik	Zawartość [%, ±0.01]
Emulsja typu o/w	olej słonecznikowy	12,50
	monostearynian glicerolu	4,00
	alkohol cetylowy	6,00
	woda demineralizowana	76,050
	kwas cytrynowy	0,50
	koniugat JA-YPPFF-NH ₂	0,50
Żel	karbomer kwasu akrylowego	0,50
	10 % roztwór wodorotlenku sodu	1,00
	2-propanol	25,00
	woda demineralizowana	73,00
	koniugat JA-YPPFF-NH ₂	0,50

180

Preparatyka Emulsji 1 (typu o/w, przygotowana w temperaturze 70°C)

Składniki tworzące fazę tłuszczową emulsji (olej słonecznikowy, monostearynian glicerolu oraz alkohol cetylowy) odważono w temperaturze pokojowej, a następnie wprowadzono do umieszczonej na mieszadle magnetycznym zlewki, której zawartość ogrzano do temperatury 70 °C.

185 W tym samym czasie do kolejnej zlewki wprowadzono wodę demineralizowaną i kwas cytrynowy (w temperaturze pokojowej), składniki mieszano aż do całkowitego rozpuszczenia kwasu a następnie ogrzewano do uzyskania temperatury 75 °C. Po całkowitym roztopieniu składników fazy tłuszczowej, dodano do nich wodę demineralizowaną i rozpuszczony w niej kwas cytrynowy, cały czas mieszając układ na mieszadle magnetycznym aż do całkowitego połączenia się fazy

190 tłuszczowej i wodnej (prędkość mieszania 1200 obrotów/minuta- maksymalna prędkość mieszadła; prędkość ta jest kluczowa w tworzeniu emulsji ze względu na lepszą dyspersję składników fazy tłuszczowej w fazie wodnej). Po schłodzeniu otrzymanej emulsji do temperatury 30 °C dodano do niej substancję aktywną w procencie wagowym 0,50 i wstępnie wymieszano. Gotową emulsję zawierającą substancję aktywną homogenizowano 5 minut w celu zwiększenia jednorodności

195 uzyskanej formułacji (homogenizator YellowLine by IKA).

Preparatyka Emulsji 2 (typu w/o, przygotowana w temperaturze 70°C)

Składniki tłuszczowe (alkohol cetearylowy, parafina ciekła, palmitynian izopropylu, wazelina biała) odważono w temperaturze pokojowej, a następnie wprowadzono do zlewki

umieszczonej na mieszadle magnetycznym. Zawartość zlewki ogrzano do temperatury 70 °C.
200 Jednocześnie w drugiej zlewce rozpuszczono odmierzoną ilość kwasu cytrynowego w wodzie demineralizowanej w temperaturze pokojowej (faza wodna), którą następnie ogrzano do uzyskania tej samej temperatury, co dla składników fazy tłuszczowej. Po całkowitym roztopieniu składników fazy tłuszczowej, dodano do nich ogrzaną fazę wodną, układ cały czas mieszano intensywnie na mieszadle magnetycznym (prędkość mieszania 1200 obrotów/minuta- maksymalna prędkość
205 mieszadła; prędkość ta jest kluczowa w tworzeniu emulsji ze względu na lepszą dyspersję składników fazy wodnej w fazie tłuszczowej). Po otrzymaniu emulsji o jednolitej konsystencji i schłodzeniu jej do 30 °C, dodano do niej substancję aktywną w procencie wagowym 0,50 i wstępnie wymieszano. Gotową emulsję zawierającą substancję aktywną homogenizowano przez 5 minut w celu zwiększenia jednorodności uzyskanej formulacji (homogenizator YellowLine by
210 IKA).

Preparatyka Emulsji 3 (typu o/w, przygotowana w temperaturze 25°C)

Do zlewki umieszczonej na mieszadle magnetycznym wprowadzono składniki Creagel EZ7 (polakrylamid, uwodorniony polidecen, eter laurylowy polioksyetylenu- Laureth-7) oraz Alphaflow 20 (uwodorniony polidecen), stopniowo dodawano do nich wodę, cały czas intensywnie mieszając
215 (prędkość mieszania 1200 obrotów/minuta- maksymalna prędkość mieszadła; prędkość ta jest kluczowa w tworzeniu emulsji ze względu na lepszą dyspersję składników Creagel EZ7 oraz Alphaflow 20 w fazie wodnej). Po całkowitym wymieszaniu składników dodano substancję aktywną w ilościach wagowych 0,50 i wstępnie wymieszano, a następnie homogenizowano otrzymaną emulsję przez 5 minut (homogenizator YellowLine by IKA).

220 Preparatyka żelu (przygotowano w temperaturze 25°C)

Karbomer kwasu akrylowego dyspergowano w wodzie w temperaturze pokojowej za pomocą mieszadła magnetycznego przez dwie godziny (prędkość mieszania 1200 obrotów/minuta - maksymalna prędkość mieszadła; prędkość ta jest kluczowa w tworzeniu tej kompozycji ze względu na lepszą dyspersję karbomeru w wodzie). Po upływie tego czasu dodano 2- propanol, a
225 następnie intensywnie mieszając, wprowadzano porcjami roztwór wodorotlenku sodu do osiągnięcia wartości pH równej 6,5. Po uzyskaniu żelowej konsystencji produktu, dodano do niego

substancję aktywną w procencie wagowym 0,50. Po dodaniu substancji aktywnej układ wstępnie wymieszano, a następnie poddano homogenizacji (czas homogenizacji 5 minut) w celu zwiększenia jednorodności uzyskanej formulacji (homogenizator YellowLine by IKA).

230 W tabeli 3 podano szczegółowy skład poszczególnych emulsji.

Tabela 3.

Nazwa	Składnik	Producent	Zawartość [%, ±0.01]
Emulsja 1	olej słonecznikowy	Sigma-Aldrich (47123)	12,50
	monostearynian glicerolu	Sigma-Aldrich (M2015)	4,00
	alkohol cetylowy	Sigma-Aldrich (68824)	6,00
	woda demineralizowana	-	76,050
	kwas cytrynowy	Sigma-Aldrich (251275)	0,50
	koniugat JA-YPFF-NH ₂ lub kwas jasmonowy JA	-	0,50
Emulsja 2	alkohol cetearylowy	Evonik	10,00
	parafina ciekła	Sigma-Aldrich (76234)	15,00
	palmitynian izopropylu	Sigma-Aldrich (W515604)	5,00
	wazelina biała	Sigma-Aldrich (16415)	49,00
	kwas cytrynowy	Sigma-Aldrich (251275)	0,50
	woda demineralizowana	-	20,00
	koniugat JA-YPFF-NH ₂ lub kwas jasmonowy JA	-	0,50
Emulsja 3	Creagel EZ7 (polakrylamid, uwodorniony polidecen, eter laurylowy polioksyetylenu-Laureth-7)	Créations Couleurs	10,00
	Alphaflow 20 (uwodorniony polidecen)	Créations Couleurs	17,00
	woda demineralizowana	-	72,50
	koniugat JA-YPFF-NH ₂ lub kwas jasmonowy JA	-	0,50
Żel	karbomer kwasu akrylowego Tego Carbomer 140G	Evonik	0,50
	10 % roztwór wodorotlenku sodu	Chempur (168109336)	1,00
	2-propanol	Sigma- Aldrich (278475)	25,00
	woda demineralizowana	-	73,00
	koniugat JA-YPFF-NH ₂ lub kwas jasmonowy JA	-	0,50

Badanie lepkości przygotowanych formułacji kosmetycznych

Zbadano lepkość formułacji kosmetycznych (bazy). Badania wykonano na wiskozymetrze rotacyjnym RCO2 firmy Rheotec z nastawianym momentem ścinającym. Do zmierzenia lepkości przygotowanych formułacji wykorzystano wrzeciono R6.

Na figurze 3 przedstawiono wykres lepkości poszczególnych preparatów zawierających koniugat JA-YPFF-NH₂ lub kwas jasmonowy JA. Największą lepkością charakteryzuje się

Emulsja 2, natomiast najmniejszą- żel. Następnie po dodaniu składników aktywnych (JA lub
240 koniugat JA-YPFF-NH₂) i schłodzeniu preparatów do temperatury pokojowej ponownie zbadano
lepkość. Nie zaobserwowano wpływu dodatku substancji czynnych na lepkość przygotowanych
formulacji.

Badanie kinetyki uwalniania substancji czynnej z formulacji kosmetycznych

245 Badania uwalniania *in vitro* przeprowadzono z wykorzystaniem aparatury USP Apparatus 2
(Vankel 7010, Varian, USA), połączonej ze spektrofotometrem UV-Vis Cary 50 Bio (Varian,
USA). Każda formuacja kosmetyczna została umieszczona w komorze ekstrakcyjnej. Następnie
nałożono membranę dializacyjną o kształcie dopasowanym do komory ekstrakcyjnej. W badaniach
wykorzystano membranę celulozową (Cuprophan, Agilent Technologies Inc., USA, nr kat. 12-
250 1370), która została uprzednio inkubowana w roztworze akceptorowym przez godzinę przed jej
użyciem. Całość zabezpieczono nakrętką w celu unieruchomienia preparatu i membrany. Do badań
wykorzystano roztwór akceptorowy (medium), który stanowił mieszaniną etanolu oraz buforu
fosforanowego (K₂HPO₄ + KOH) (pH 5,8) w stosunku objętościowym 35:65. Pomiary uwalniania
koniugatu z otrzymanych preparatów kosmetycznych prowadzono temperaturze 32,3±0,5°C z
255 prędkością mieszania 100 rpm. Czas każdego pomiaru trwał łącznie 24 godziny, a próbki były
pobierane co 30 min. Stężenie substancji aktywnej uwolnionej z formulacji kosmetycznych do
medium było monitorowane za pomocą spektrofotometru UV-Vis przy długości fali 279 nm (dla
AcYPFF-NH₂), przy 277 nm (dla JA-YPFF-NH₂) oraz przy 290 nm (dla JA).

260 Obserwacja zjawiska uwalniania badanej substancji z podłoża kosmetycznego do medium
jest możliwa dzięki badaniu zmian absorbancji w czasie. Do obliczenia ilości uwolnionej substancji
w czasie skorzystano ze wzoru:

$$\% \text{ uwolnienia} = \left(\frac{A_p}{A_w} \right) \left(\frac{m_w [\text{mg}] \times C_w}{V_w [\text{ml}]} \right) \left(\frac{1}{D_w} \right) \left(\frac{V_p [\text{ml}]}{m_p [\text{ml}]} \right) \times 100\%$$

gdzie:

265 A_p- absorbancja próbki [-],
A_w- absorbancja wzorca [-],
m_w- masa wzorca [mg],

V_w - objętość roztworu wzorcowego [ml],
 C_w - czystość wzorca,
 D_w - rozcieńczenie wzorca,
270 m_p - masa substancji oznaczanej zawartej w próbce [mg],
 V_p - objętość medium [ml].

Na figurze 4 przedstawiono profil uwalniania koniugatu JA-YPPFF-NH₂ z różnych formułacji kosmetycznych w czasie - Emulsja 1, Emulsja 3, Emulsja 3 oraz Żel.

275 Zaobserwowano, że największa ilość koniugatu uwalnia się z żelu, natomiast najmniejsza- z Emulsji 2. Spośród przygotowanych formułacji Żel charakteryzuje się najniższą (7500 mPa s⁻¹) lepkością, natomiast Emulsja 2 ma największą lepkość (107300 mPa s⁻¹) (Rys. 4). Wnioskować można więc, że lepkość podłoża kosmetycznego ma znaczący wpływ na ilość uwolnionej z niego substancji; im mniejsza lepkość podłoża, tym większy procent uwolnionej substancji. Na tej
280 podstawie można stwierdzić, że najlepszym podłożem kosmetycznym dla koniugatu JA-YPPFF-NH₂ jest żel.

Ze względu na to, że najwięcej substancji aktywnej uwolniło się z żelu, to podłoże kosmetyczne wykorzystano w kolejnych badaniach.

Analizowano korelację pomiędzy obecnością grup chemicznych modyfikujących cząsteczkę
285 kwasu jasmonowego a ilością uwolnionej substancji aktywnej z podłoża kosmetycznego. Porównano szybkość uwalniania kwasu jasmonowego, tetrapeptydu oraz koniugatu kwasu jasmonowego i tetrapeptydu z żelu. Na figurze 5 przedstawiono profil uwalniania JA, Ac-YPPFF-NH₂ oraz JA-YPPFF-NH₂ z żelu w czasie.

Na podstawie wyników badań stwierdzono, że modyfikacja cząsteczki kwasu jasmonowego
290 (JA) przy użyciu tetrapeptydu (koniugat JA-YPPFF-NH₂) znacznie zwiększa jego procent uwolnienia z formułacji kosmetycznej.

Potwierdzenie stabilności substancji czynnej po jej uwolnieniu z formułacji kosmetycznych

Po zakończeniu badań uwalniania JA-YPPFF-NH₂ z formułacji kosmetycznych przeprowadzono analizę stabilności koniugatu JA-YPPFF-NH₂ w warunkach badania uwalniania
295 (temperatura 32,0°C ± 0,5°C, czas badania 24 godziny, roztwór akceptorowy: mieszanina buforu fosforanowego K₂HPO₄ + NaOH oraz etanolu w stosunku objętościowym 65:35). W tym celu

dokładnie wymieszano zawartość komory dyfuzyjnej, a następnie pobrano 5 ml roztworu akceptorowego zawierającego uwolniony koniugat. Próbkę tę poddano analizie z wykorzystaniem spektrometrii mas ESI-MS. Na figurze 6 przedstawiono Widmo ESI-MS roztworu akceptorowego zawierającego uwolniony z formułacji kosmetycznej JA-YPFF-NH₂. Na widmie zidentyfikowano 300 pik o masie molekularnej 763 [JA-YPFF-NH₂ - H], a także pik 803 [JA-YPFF+K]⁺, co świadczy o obecności cząsteczki koniugatu w badanej próbce a co za tym idzie, jego stabilności w warunkach badania kinetyki uwalniania.

305 **Ocena potencjalnego niekorzystnego działania koniugatu JA-YPFF-NH₂ na ludzką skórę**

Za pomocą programu Toxtree v.2.5.0 (<http://toxtree.sourceforge.net/>) oszacowano potencjalne niekorzystne działanie koniugatu JA-YPFF-NH₂. Na podstawie wprowadzonych do programu danych o strukturze uzyskano informację że związek ten nie jest kancerogeny i nie działa negatywnie oraz niszcząco na skórę.

310 Ponadto, przeprowadzono analizę toksyczności i alergenicności koniugatu. Probandi, którzy aplikowali Emulsję 3 zawierającą 5% wagowych koniugatu Ja-YPFF-NH₂ przez okres 30 dni nie zaobserwowali niepożądanych reakcji skórnych.

Otrzymany koniugat jest zbudowany z α-L-aminokwasów, będących naturalnie występującymi w organizmie aminokwasami biogennymi, dlatego są one dobrze tolerowane. D-aminokwasy występują w stanie wolnym, ścianie komórkowej bakterii oraz w antybiotykach 315 peptydowych i są nieprzyswajalne przez zwierzęta i człowieka.

Jak wykazały przeprowadzone badania koniugat JA-YPFF-NH₂ jest związkiem chemicznym który może znaleźć zastosowanie w kosmetykach wspomagających wygładzanie naskórka i jego 320 złuszczenie i / lub stymulujących odnowę naskórka. Przeprowadzone badania *in vivo* na grupie probantów cechujących się skórą wrażliwą dowiodły, na podstawie subiektywnej ocenie probantów, że związek ten wykazuje działanie redukujące wrażliwość skóry poprzez (zmniejszenie miejscowego podrażnienia i zaczerwienienia skóry po zastosowaniu preparatu zawierającego koniugat. Badania *in vitro* uwalniania udowodniły, że taka modyfikacja cząsteczki kwasu

325 jasmonowego ma pozytywny wpływ na ilość uwolnionej substancji z preparatu kosmetycznego. Związek ten jest stabilny, w związku z czym może być stosowany jako aktywna substancja kosmetyczna.

Ponadto JA-YPFF-NH₂ jest związkiem chemicznym, który może wykazywać właściwości zarówno kwasu jasmonowego jak i peptydu Ac-YPFF-NH₂.

330 Biorąc pod uwagę wszystkie te aspekty, koniugat JA-YPFF-NH₂ jest innowacyjną substancją, która może być stosowana w terapii skóry wrażliwej, ponieważ zmniejsza nadwrażliwość skóry, co potwierdziły testy przeprowadzone na probantach.

Ze względu na przewidywaną aktywność prosebogeniczną, JA-YPFF-NH₂ może być także substancją czynną w preparatach kosmetycznych przeznaczonych do suchej skóry z zaburzeniami 335 prawidłowego funkcjonowania gruczołów łojowych.

Ze względu na wielofunkcyjność koniugatu JA-YPFF-NH₂, istnieje wiele możliwości zastosowania tego związku w przemyśle kosmetycznym.

340 Literatura

1. Michelet J. F., Olive Ch., Rieux E., Fagot D., Simonetti L., Galey J. B., Dalko-Csiba M., Bernard B. A., Pereira R. 2012. The anti-ageing potential of a new jasmonic acid derivative (LR2412): in vitro evaluation using reconstructed epidermis episkinTM, *Experimental Dermatology*, 21 (5):398-400.

345 2. Tran, C., Michelet, J. F., Simonetti, L., Fiat, F., Garrigues, A., Potter, A.,... & Lacharrière, O. (2014). In vitro and in vivo studies with tetra-hydro-jasmonic acid (LR2412) reveal its potential to correct signs of skin ageing. *Journal of the European Academy of Dermatology and Venereology*, 28(4), 415-423.