

(19)



**Евразийское  
патентное  
ведомство**

(11) **035440**(13) **B1**(12) **ОПИСАНИЕ ИЗОБРЕТЕНИЯ К ЕВРАЗИЙСКОМУ ПАТЕНТУ**

(45) Дата публикации и выдачи патента  
**2020.06.15**

(21) Номер заявки  
**201890886**

(22) Дата подачи заявки  
**2016.10.04**

(51) Int. Cl. *A61Q 19/02* (2006.01)  
*A61K 8/67* (2006.01)  
*A61K 8/49* (2006.01)

**(54) КОМПОЗИЦИЯ ДЛЯ ОСВЕТЛЕНИЯ КОЖИ**(31) **15188360.0**(32) **2015.10.05**(33) **EP**(43) **2018.09.28**(86) **PCT/EP2016/073617**(87) **WO 2017/060211 2017.04.13**

(71)(73) Заявитель и патентовладелец:  
**ЮНИЛЕВЕР Н.В. (NL)**

(72) Изобретатель:  
**Дамодаран Анита, Джоши Маной  
Кумар, Кунджупиллай Балу, Шарифф  
Резван (IN)**

(74) Представитель:  
**Воробьев В.А., Фелицына С.Б. (RU)**

(56) **WO-A2-2013030794**

MOHAMMAD P. ET AL: "Evaluation of the effect of topical Picolinamide on epidermal melasma", BIOSCIENCES BIOTECHNOLOGY RESEARCH ASIA 20140801 ORIENTAL SCIENTIFIC PUBLISHING COMPANY IND, vol. 11, no. 2, August 2014 (2014-08), pages 1047-1050, XP002757361, ISSN: 0973-1245, abstract

EP-A1-2522331

WO-A1-2015061512

HAKOZAKI T. ET AL: "The effect of niacinamide on reducing cutaneous pigmentation and suppression of melanosome transfer", BRITISH JOURNAL OF DERMATOLOGY, OXFORD: WILEY-BLACKWELL, UK, vol. 147, no. 1, July 2002 (2002-07), pages 20-31, XP002333293, ISSN: 0007-0963, DOI: 10.1046/J.1365-2133.2002.04834.X, the whole document

(57) Настоящее изобретение относится к области композиций для ухода за собой, в частности композиций для осветления кожи. Полагают, что ниацинамид снижает перенос меланосом из меланоцитов в кератиноциты, причем посредством этого вызывается осветление кожи. Однако известно, что ниацинамид не оказывает или оказывает слабое действие непосредственно на содержание меланина в меланоцитах. Таким образом, остается потребность в композиции с несколькими типами действия, в которой объединяется снижение переноса меланосом и снижение содержания меланина в меланоцитах. Поэтому целью настоящего изобретения является композиция с синергетическими количествами пиколинамида и ниацинамида, обеспечивающая улучшенное ингибирование переноса меланосом. Было обнаружено, что синергетическое действие осветления кожи получают, когда ниацинамид комбинируют с его изомером пиколинамидом.

**B1****035440****035440 B1**

### **Область техники, к которой относится изобретение**

Настоящее изобретение относится к области композиций для личной гигиены (для ухода за телом), в частности композиций для осветления кожи.

#### **Предпосылки создания изобретения**

Большинство людей озабочены степенью пигментации их кожи. Например, люди со старческими пятнами или веснушками могут желать, чтобы такие пятна были менее выраженными, в то время как другие люди могут желать уменьшения потемнения кожи, вызываемого воздействием солнечного света, или осветления их природного цвета кожи. Для того, чтобы удовлетворить такую потребность, делалось множество попыток разработать продукты, снижающие выработку пигмента в меланоцитах. Однако вещества, идентифицированные до настоящего времени, склонны или к низкой эффективности или к нежелательному побочному действию, такому как, например, токсичность или раздражение кожи. Как следствие, сохраняется потребность в новых косметических средствах для осветления кожи с улучшенной общей эффективностью.

Обычные композиции для осветления кожи основаны на использовании отбеливающих кожу агентов, которые, как полагают, регулируют дисперсию меланина или ингибируют тирозинкиназу. Такие отбеливающие кожу агенты включают ниацинамид, карбоновые кислоты, подобные азелаиновой кислоте и койевой кислоте, растительные экстракты, гидрохинон и т.д. Ниацинамид является одним из широко используемых отбеливающих кожу агентов в композициях для топического применения.

Ниацинамид является амидной формой витамина В3 (ниацин). Витамин В3 является незаменимым водорастворимым витамином и обнаруживается в форме ниацина или ниацинамида в широком ряде пищевых продуктов, включая мясо, рыбу, бобовые, орехи, зерновые, грибы, дрожжи и кофе. Он вовлекается в различные клеточные функции, подобные репарации ДНК, дифференцировке кератиноцитов, синтезу липидов, пигментации и воспалению, наиболее важные из которых связаны с клеточной биоэнергетикой. Ниацинамид в форме пиридинового нуклеотида никотинамидадениндинуклеотида (NAD) важен для энергетического обмена. Питание с дефицитом В3 ведет к заболеванию, называемому пеллагра, характеризующемуся состояниями кожи с дерматитом и пигментацией. Это наблюдение привело к открытию ниацинамида как отбеливающего кожу агента четыре десятилетия назад.

Полагают, что ниацинамид снижает перенос меланосом из меланоцитов в кератиноциты, что приводит в результате к осветлению кожи. Однако известно, что ниацинамид не оказывает или оказывает слабое действие непосредственно на содержание меланина в меланоцитах.

Остается желательной композиция с несколькими типами действия, в которой объединяются снижение переноса меланосом и снижение содержания меланина в меланоцитах.

Документ WO 2013/030794 относится к композициям для депигментации кожи и/или волос, включающим производное пиридина и дерматологически приемлемые носители. В документе раскрывается пиколинамид, предпочтительно в концентрации 0,001-30 мас.%. В документе WO 2013/030794 также раскрывается, что композиция может включать благоприятный для кожи и/или волос агент из списка, включающего никотинамид.

Поэтому целью настоящего изобретения является композиция с синергетическими количествами пиколинамида и ниацинамида, обеспечивающая улучшенное ингибирование переноса меланосом.

Другой целью изобретения является достижение высокого ингибирования переноса меланосом при низкой концентрации активных компонентов.

Другой целью изобретения является достижение снижения содержания меланина в меланоцитах при более низкой концентрации активных компонентов.

Не желая связывать себя какой-либо теорией, авторы полагают, что хотя пиколинамид не является предшественником NAD<sup>+</sup>, он может оказывать действие на различные процессы, вовлеченные в пигментацию.

Не желая связывать себя какой-либо теорией, авторы полагают, что в отличие от ниацинамида, который, как показано, пагубно влияет на перенос меланосом, пиколинамид оказывает действие на выработку меланина с небольшим воздействием на перенос меланосом или без него. Таким образом, изобретение относится к композиции, включающей синергетическую комбинацию ниацинамида и пиколинамида для применения для осветления кожи.

Обнаружено, что синергетическое действие на осветление кожи достигается, когда ниацинамид комбинируют с его изомером пиколинамидом.

#### **Краткое раскрытие сущности изобретения**

Соответственно, в первом аспекте настоящее изобретение относится к композиции для осветления кожи, включающей 0,1-10 мас.% пиколинамида и 0,1-10 мас.% ниацинамида.

Во втором аспекте настоящее изобретение относится к применению композиции по изобретению для осветления кожи.

В третьем аспекте настоящее изобретение относится к способу осветления кожи человека, включающему стадию нанесения на кожу композиции по изобретению.

Эти и другие аспекты, особенности и преимущества будут очевидны специалистам в данной области техники после прочтения следующего далее подробного описания и прилагаемой формулы изобре-

ния. Для того чтобы избежать неясности, любой признак одного аспекта настоящего изобретения может быть использован в любом другом аспекте изобретения. Слово "содержащий" предназначено для обозначения "включающий", но не обязательно "состоящий из" или "составленный из". Иными словами, перечисленные стадии или опции не обязательно являются исчерпывающими. Отметим, что примеры, приведенные в описании ниже, предназначены для пояснения изобретения, и не предполагается ограничение изобретения этими примерами самими по себе. Аналогичным образом все проценты являются процентами масса/масса, если не указано иное. За исключением рабочих примеров, или сравнительных примеров, или случаев, где явно указано иное, все числа в настоящем описании, указывающие количества материала и условия реакции, физические свойства материалов и/или применений, должны пониматься как модифицированные словом "примерно". Числовые диапазоны, выраженные формулой "от x до y" понимаются как включающие x и y. Когда для конкретного признака приводится несколько предпочтительных диапазонов в формате "от x до y", предполагается, что также предусмотрены и все диапазоны, включающие различные указанные граничные точки.

### **Подробное описание изобретения**

Первый аспект изобретения относится к композиции для осветления кожи, причем композиция включает ниацинамид и пиколинамид.

#### **Ниацинамид**

Ниацинамид, также известный как никотинамид и как пиридин-3-карбоксамид, представляет собой активную водорастворимую форму витамина B3. Он необходим для работы коферментов NADH и NADPH и, как следствие, для более чем 200 ферментативных реакций в организме, включая образование АТФ.

Ниацинамид присутствует в композиции по настоящему изобретению в концентрации 0,1-10 мас.%, предпочтительно 0,5-9 мас.%, предпочтительнее 1-8 мас.%, еще предпочтительнее 2-7 мас.%, даже предпочтительнее 3-8 мас.%, еще предпочтительнее 4-7 мас.% или даже 5-6 мас.% от композиции.

#### **Пиколинамид**

Никотинамид - пиридин-3-карбоксамид имеет 2 других позиционных изомера при замещении в положении 2 и 4 пиридинового цикла - пиколинамид (пиридин-2-карбоксамид) и изоникотинамид (пиридин-4-карбоксамид), соответственно.

Синергетическое действие осветления кожи по настоящему изобретению достигается за счет ниацинамида в комбинации с пиколинамидом (пиридин-2-карбоксамидом) - позиционным изомером при замещении в положении 2 пиридинового цикла.

Пиколинамид присутствует в композиции по настоящему изобретению в концентрации 0,1-10 мас.%, предпочтительно 0,5-9 мас.%, предпочтительнее 1-8 мас.%, еще предпочтительнее 2-7 мас.%, даже предпочтительнее 3-8 мас.%, еще предпочтительнее 4-7 мас.% или даже 5-6 мас.% от композиции.

#### **Молярное отношение пиколинамида к ниацинамиду**

Синергетическое действие осветления кожи получают при молярном отношении пиколинамида к ниацинамиду не больше 20:1, предпочтительно не больше 16:1, предпочтительнее не больше 10:1, еще предпочтительнее не больше 8:1, даже предпочтительнее не больше 4:1.

Предпочтительно молярное отношение пиколинамида к ниацинамиду составляет по меньшей мере 10:1, предпочтительнее по меньшей мере 8:1, еще предпочтительнее по меньшей мере 4:1, даже предпочтительнее по меньшей мере 2:1, еще предпочтительнее по меньшей мере 1:1 и наиболее предпочтительно по меньшей мере 1,25:1.

Предпочтительно молярное отношение пиколинамида к ниацинамиду составляет от 20:1 до 1:20, предпочтительно от 16:1 до 1:16, предпочтительнее от 10:1 до 1:10, еще предпочтительнее от 8:1 до 1:8, даже предпочтительнее от 4:1 до 1:4, еще более предпочтительно от 2:1 до 1:2 и наиболее предпочтительно от 1,25:1 до 1:1,25.

Для наилучших результатов по ингибированию переноса меланосом молярное отношение пиколинамида к ниацинамиду составляет не более 2:1, предпочтительно не более 1,25:1.

#### **Другие активные компоненты**

Композиции для осветления кожи по настоящему изобретению могут дополнительно включать другое полезное для кожи средство, предпочтительно выбранное из группы, включающей гидроксикислоты, полигидроксикислоты, жирные гидроксикислоты, в частности 12-гидроксистеариновую кислоту, койевую кислоту, депигментирующие олигопептиды, галардин, полифенольные антиоксиданты, тиоловые антиоксиданты, гидрохлорид цистеина, гидрохинон, трет-бутилгидрохинон, производные витамина С, производные витамина Е, производные витамина В, ретиноиды, 4-замещенные производные резорцина и их смеси.

#### **Необязательные ингредиенты**

Композиция по настоящему изобретению может дополнительно включать косметически приемлемую среду, которая может действовать как разбавители, диспергирующие вещества и/или носители для отбеливающих кожу агентов, используемых в композиции, с тем чтобы облегчить их распределение, когда композицию наносят на кожу. Косметически приемлемая среда, подходящая для применения в настоящем изобретении, может быть водной, безводной или масляной эмульсией; причем водная среда или

масляная эмульсия, в особенности эмульсия вода-в-масле или масло-в-воде, наиболее предпочтительны. Вода, когда она присутствует, типично составляет баланс композиции, предпочтительно вода присутствует в концентрации 5-99 мас.%, предпочтительнее от 20 до 80 мас.%, еще предпочтительнее от 40 до 80 мас.% от композиции.

Кроме воды в качестве носителей в композициях по настоящему изобретению также могут служить органические растворители.

Смягчающие кожу средства также можно использовать в качестве косметически приемлемых носителей в композиции по настоящему изобретению. Смягчающие средства обычно находятся в форме силиконовых масел и синтетических сложных эфиров. Силиконовые масла могут быть летучими и нелетучими. Летучие силиконовые масла предпочтительно выбирают из циклических или линейных полидиметилсилоксанов, содержащих от 3 до 9, предпочтительно от 4 до 5 атомов кремния. Нелетучие силиконовые масла, применяемые в качестве смягчающего материала, включают полиалкилсилоксаны, полиалкиларилсилоксаны и сополимеры простых эфиров силоксанов. По существу нелетучие полиалкилсилоксаны, применяемые в настоящем изобретении, включают, например, полидиметилсилоксаны.

Сложноэфирные смягчающие кожу средства, которые можно использовать, перечислены далее.

1. Алкенил- или алкилэфиры жирных кислот с 10-20 атомами углерода. Их примеры включают изоарахидилнеопентаноат, изононилнонаноат, олеилмиристал, олеилстеарат и олеилолеат.

2. Эфиры простых эфиров, такие как эфиры жирных кислот этоксилированных жирных спиртов.

3. Сложные эфиры многоатомных спиртов. Подходящими эфирами многоатомных спиртов жирных кислот являются этиленгликолевые эфиры моно- и диэфиров жирных кислот, диэтиленгликолевые моно- и диэфиры жирных кислот, полиэтиленгликолевые (200-6000) моно- и диэфиры жирных кислот, пропиленгликолевые моно- и диэфиры жирных кислот, моноолеат пропиленгликоля 2000, моностеарат пропиленгликоля 2000, этоксилированный моностеарат пропиленгликоля, глицероловые моно- и диэфиры жирных кислот, эфиры полиглицерина и жирных кислот, этоксилированный глицерилмоностеарат, моностеарат 1,3-бутиленгликоля, дистеарат 1,3-бутиленгликоля, эфир полиоксиэтиленполиола и жирной кислоты, сорбитановые эфиры жирных кислот и полиоксиэтиленсорбитановые эфиры.

4. Сложные эфиры восков, такие как пчелиный воск, спермацет, миристилмиристал, стеарилстеарат и арахидилбегенат.

5. Эфиры стеролов, примерами которых являются эфиры холестерина и жирных кислот.

Смягчающие кожу средства могут присутствовать в композиции в количестве от 0,1 до 50 мас.%, предпочтительно от 1 до 20 мас.% от композиции.

Жирные кислоты, имеющие от 10 до 30 атомов углерода, также могут быть включены в качестве косметически приемлемых носителей в композицию по настоящему изобретению. Иллюстративными примерами таких жирных кислот являются пеларгоновая, лауриновая, миристиновая, пальмитиновая, стеариновая, изостеариновая, гидроксистеариновая, олеиновая, линолевая, рицинолевая, арахидоновая, бегеновая, эруковая кислоты и их смеси.

В качестве косметически приемлемых носителей в композиции по настоящему изобретению также могут быть использованы влагоудерживающие вещества типа многоатомных спиртов. Влагоудерживающее вещество способствует повышению эффективности смягчающего кожу средства, уменьшает образование чешуек, стимулирует удаление накопившихся чешуек и улучшает ощущение шелковистости кожи. Типичные многоатомные спирты включают глицерин, полиалкиленгликоли и, предпочтительнее, алкиленполиолы и их производные, включая пропиленгликоль, дипропиленгликоль, полипропиленгликоль, полиэтиленгликоль и его производные, сорбит, гидроксипропилсорбит, гексиленгликоль, 1,3-бутиленгликоль, 1,2,6-гексантиол, этоксилированный глицерин, пропоксилированный глицерин и их смеси. Для наилучших результатов влагоудерживающее вещество представляет собой предпочтительно пропиленгликоль или гиалуронат натрия. Концентрация влагоудерживающего вещества в композиции может колебаться от 0,5 до 30 мас.%, предпочтительно между 1 и 15 мас.% от композиции.

Загустители также могут использоваться как часть косметически приемлемого носителя в композициях по настоящему изобретению. Типичные загустители включают сшитые акрилаты (например, карбопол 982), гидрофобномодифицированные акрилаты (например, карбопол 1382), производные целлюлозы и природные камеди. К числу применимых производных целлюлозы относятся натрий карбоксиметилцеллюлоза, гидроксипропилметилцеллюлоза, гидроксипропилцеллюлоза, гидроксипропилцеллюлоза, этилцеллюлоза и гидроксиметилцеллюлоза. Природные камеди, подходящие для настоящего изобретения, включают гуар, ксантан, склеродий, каррагинан, пектин и комбинации таких камедей. Концентрация загустителя в композиции может колебаться от 0,0001 до 5 мас.%, обычно от 0,001 до 1 мас.%, оптимально от 0,01 до 0,5 мас.%.

Все вместе - вода, растворители, силиконы, сложные эфиры, жирные кислоты, влагоудерживающие вещества и/или загустители будут составлять косметически приемлемый носитель в количествах от 1 до 99,8 мас.%, предпочтительно от 80 до 99 мас.% композиции.

Поверхностно-активные вещества также могут присутствовать в композиции по настоящему изобретению. Общая концентрация поверхностно-активного вещества будет меняться от 0,1 до 40 мас.%, предпочтительно от 1 до 20 мас.%, необязательно от 1 до 5 мас.% от композиции. Поверхностно-

активное вещество можно выбирать из группы, включающей анионные, неионогенные, катионные и амфотерные активные вещества. Особенно предпочтительными неионогенными поверхностно-активными веществами являются поверхностно-активные вещества  $C_{10}$ - $C_{20}$  гидрофобные жирные спирты или кислоты, конденсированные с 2-100 молями этиленоксида или пропиленоксида на моль гидрофобного вещества;  $C_{10}$ - $C_{20}$  алкилфенолы, конденсированные с 2-20 молями алкиленоксида; моно- и диэфиры жирных кислот и этиленгликоля; моноглицериды жирных кислот; сорбитан, моно- и ди- $C_8$ - $C_{20}$  жирные кислоты; блоксополимеры (этиленоксид/пропиленоксид) и полиоксиэтиленсорбитан, а также их комбинации. Алкилполисахариды и жирные амиды сахаридов (например, метилглюканамиды) также являются подходящими неионогенными поверхностно-активными веществами.

Предпочтительные анионные поверхностно-активные вещества включают мыло, алкилэфирсульфаты и сульфонаты, алкилсульфаты и сульфонаты, алкил- и диалкилсульфосукцинаты,  $C_8$ - $C_{20}$  ацилизетионаты, ацилглутаматы,  $C_8$ - $C_{20}$  алкилэфирфосфаты и их комбинации.

Солнцезащитные средства включают материалы, обычно используемые для защиты от ультрафиолетового света. Характерными соединениями являются производные ПАВА, циннамат и салицилат. Например, можно использовать авобензофенон (Парсол 1789®), октилметоксициннамат и 2-гидрокси-4-метоксибензофенон (также известный как оксбензон). Октилметоксициннамат и 2-гидрокси-4-метоксибензофенон коммерчески доступны под товарными знаками Парсол МСХ и бензофенон-3, соответственно. Точное количество солнцезащитного средства, используемого в композиции, может меняться в зависимости от желательной степени защиты от УФ-излучения солнца. Также можно использовать добавки, которые отражают или рассеивают солнечные лучи. Такие добавки включают оксиды, подобные оксиду цинка и диоксиду титана.

Композиции по настоящему изобретению могут включать широкий спектр других необязательных компонентов. В документе CTFA Cosmetic Ingredient Handbook, Second Edition, 1992, полностью включенном в настоящее описание посредством ссылки, описываются различные неограничивающие косметические и фармацевтические ингредиенты, обычно используемые в производстве средств для косметического ухода за кожей, которые подходят для применения в композициях по настоящему изобретению. Примеры включают антиоксиданты, связующие вещества, биологические добавки, буферизирующие вещества, красители, полимеры, вяжущие вещества, душистые вещества, замутняющие компоненты, регуляторы pH, консерванты, природные экстракты, эфирные масла, компонент для восприятия кожи, компоненты, разглаживающие кожу, и компоненты для заживления кожи.

При получении композиции по настоящему изобретению нужные ингредиенты смешивают в любом порядке и обычно при температурах от примерно 70 до примерно 80°C и при атмосферном давлении.

Упаковкой для композиции по настоящему изобретению может быть пластырь, флакон, туба, шариковый аппликатор, устройство для аэрозоля с пропеллентом, сжимаемая тара или баночка с крышкой.

Во втором аспекте изобретение относится к применению композиции согласно изобретению для осветления кожи.

В третьем аспекте изобретение относится к способу осветления кожи человека, причем способ включает стадию нанесения на кожу композиции согласно изобретению.

Теперь изобретение будет проиллюстрировано приведенными далее неограничивающими примерами.

### Примеры

Пример 1. Исследование *in vitro* действия комбинации ниацинамида и пиколинамида на ингибирование меланина с использованием анализа на содержание меланина (МСА) самостоятельно разработанным методом.

#### Материалы

(i) человеческие первичные меланоциты крайней плоти новорожденных (кат. № НЕМn-DP-C-202-5C),

(ii) среда для выращивания меланоцитов (MGM) (Cascade Biologicals, кат. № M-254-500) и

(iii) добавка для выращивания меланоцитов человека (кат. № S-0002-5) (Cascade Biologicals),

(iv) пиколинамид (Sigma Aldrich, кат. № 104051-10G),

(v) ниацинамид (Sigma, кат. № N0636-100G),

(vi) ДМСО - диметилсульфоксид (Sigma, кат. № D2650),

(vii) NaOH (Merck, кат. № 61757305001730).

#### Метод

Человеческие первичные меланоциты выращивают в среде для выращивания меланоцитов (MGM) с добавкой для выращивания меланоцитов человека. В 24-луночный планшет высевает 500 мкл/луночка ( $5 \times 10^4$  клетки/луночка) этого раствора и инкубируют в инкубаторе (Thermo Scientific, модель 3111) при 37°C в атмосфере с 5%  $CO_2$ . После 24 ч инкубации культуры клеток обрабатывают указанными активными веществами, растворенными в воде. Контролем являются клетки, обработанные одной средой (водой). Клетки снова инкубируют в течение 72 ч в инкубаторе (Thermo Scientific, модель 3111; условия: 5%  $CO_2$ , при 37°C). По окончании инкубации культуральную среду заменяют 120 мкл/луночка реагента МСА

(10% ДМСО в 1N NaOH) и инкубируют в течение 1 ч при 60°C в шейкере-инкубаторе. Затем супернатант переносят в 384-луночный планшет. Измеряют поглощение методом спектрофотометрии при 405 нм с помощью планшет-ридера (GENios Pro, Tecan).

Вычисление содержания меланина

Определенную спектрофотометрией OD при 405 нм для необработанных клеток (без активного компонента, NO) рассматривают как 100% содержание меланина. При сравнении с необработанными клетками вычисляют процент ингибирования обработанных образцов клеток.

Результаты

Таблица I

Партия	Образец	Ингибирование, %, синтеза меланина (среднее $\pm$ SD)
1	Контроль	00
2	5 мМ ниацинамида	3 $\pm$ 0,4
3	10 мМ ниацинамида	8 $\pm$ 2,3
4	5 мМ пиколинамида	14 $\pm$ 0,9
5	10 мМ пиколинамида	23 $\pm$ 3,3
6	5 мМ ниацинамида + 5 мМ пиколинамида	26 $\pm$ 1,4
7	10 мМ ниацинамида + 10 мМ пиколинамида	34 $\pm$ 0,5

Приведенная выше табл. I иллюстрирует синергетическое снижение содержания меланина в меланоцитах, полученное с помощью комбинации пиколинамида и ниацинамида. Результаты в табл. I показывают, что ниацинамид сам по себе дает небольшое снижение (при 5 мМ и 10 мМ) содержания меланина в первичных человеческих меланоцитах. Однако, когда пиколинамид и ниацинамид комбинируют, происходит синергетическое снижение содержания меланина.

В условиях *in vivo* определяют цвет кожи по двум процессам: синтезу меланина и переносу меланосом. Полагают, что регулирование этих процессов будет регулировать цвет кожи. Приведенный выше пример показывает, что комбинация по изобретению оказывает синергетическое действие на содержание меланина в меланоцитах *in vitro*, и такое же действие можно ожидать на синтез меланина в условиях *in vivo*.

Пример 2. Исследования *in vitro* действия комбинации ниацинамида и пиколинамида на перенос меланосом с использованием анализа переноса меланосом (MTA) (Pigment Cell Melanoma Res. 2008 Oct; 21(5):559-64).

Материалы

(i) человеческие первичные меланоциты крайней плоти новорожденных (кат. № HEMn-DP-C-202-5C),

(ii) среда для выращивания меланоцитов (MGM) (Cascade Biologicals, кат. № M-254-500) и

(iii) добавка для выращивания меланоцитов человека (Cascade Biologicals, кат. № S-0002-5),

(iv) кератиноциты человека HaCat (Dr NE Fusenig, Hedelberg, Germany),

(v) среда для выращивания кератиноцитов (KGM) (Cascade Biologicals, кат. № Epilife MEPI-500CA)

и

(vi) добавка для выращивания кератиноцитов человека (Cascade Biologicals, F-001-5),

(vii) пиколинамид (Sigma Aldrich, кат. № 104051-50G),

(viii) ниацинамид (Sigma, кат. № N0636-100G),

(ix) буфер трипсин-ЭДТК (Gibco; каталожный № R-001),

(x) нейтрализатор трипсина (Gibco; каталожный № R-002),

(xi) параформальдегид (Sigma Aldrich; 15-812-7),

(xii) забуференный фосфатом физиологический раствор (PBS):

a) хлорид натрия (Fischer Scientific; каталожный № 27605),

b) хлорид калия (Merck; 61753305001730),

c) динатрийгидрофосфат (S.D Fine-Chemicals Ltd; продукт № 40158),

d) калийдигидрофосфат (S.D Fine Chemicals Ltd, 20203); (xiii) буфер для FACS:

a) сапонин (sigma, каталожный № 47036-50G-F),

b) сыворотка плода коровы (Gibco; каталожный № 16000).

Метод

Смешивают вместе  $1,3 \times 10^4$  клеток первичных меланоцитов человека (C-202-5C, Lonza), полученных в культуральной среде (MGM:KGM = 1:1), и  $2,6 \times 10^4$  кератиноцитов HaCat, полученных в культуральной среде (MGM:KGM = 1:1), высевают в 48-луночный планшет и инкубируют в инкубаторе для культивирования тканей (Thermo Scientific, модель 3111) при 37°C в атмосфере с 5% CO<sub>2</sub>. После 4 ч инкубации совместные культуры обрабатывают (добавляют к ним) образцами и снова инкубируют в течение 72 ч в том же инкубаторе в тех же условиях. После культивирования в течение требуемого периода (72 ч) получают клетки для анализа проточной цитометрией, следуя процедуре, описанной ниже.

1. Клетки выделяют из 48-луночного планшета в V-образный планшет (Torson, 941396) с помощью 200 мкл буфера трипсин-ЭДТК, активность трипсина нейтрализуют 200 мкл нейтрализатора трипсина и

осаждают при 350 g, используя рефрижераторную центрифугу (Plasto Crafts, модель № Roat 4R-V/FM).

2. К осадку добавляют 100 мкл 1% параформальдегида и инкубируют в течение 10 мин на льду.

3. Затем клетки центрифугируют (1000 G) со 100 мкл забуференного фосфатом физиологического раствора (PBS) в течение 10 мин и осадок используют для окрашивания раствором, описанным ниже на стадии 4. PBS получают, добавляя 4 г хлорида натрия, 0,1 г хлорида калия, 0,58 г динатрийгидрофосфата и 0,1 г калийдигидрофосфата к 500 мл автоклавированной воды Mili-Q.

Буфер для FACS (клеточный сортинг с активированной флуоресценцией) готовят, добавляя 0,1% сапонина и >0,05% (0,05%, масса/объем) сыворотки плода коровы в PBS, смешанных с козьим антителом анти-Trp-1, конъюгированным с Alexa 488 (TRP-1 Alexa 488 (TRP-1 - тирозинкиназа-родственный белок является специфическим маркерным белком меланосом, Santacruz, каталожный № sc-10443)) (1 мкл/100 мкл) и антителом против панцитокератина (панцитокератин, цитокератин является специфическим маркером для кератиноцитов; PE, Santacruz, каталожный № sc-8018) (1 мкл/100 мкл). Упомянутый выше буфер для FACS добавляют к осадку в каждой лунке (100 мкл/лунка) и инкубируют в течение 60 мин на льду.

4. Затем клетки промывают PBS и центрифугируют при ~1000 g с использованием рефрижераторной центрифуги (Plasto Crafts, модель № Roat 4R-V/FM).

5. Клеточные осадки суспендируют в PBS, переносят в круглодонный 96-луночный планшет и анализируют проточной цитометрией (BD Biosciences, модель - BD FacsCalibur с BD HTS).

Вычисление переноса меланосом (% переноса)

Кератиноциты, содержащие перенесенные меланосомы, обнаруживают анализом проточной цитометрией.

Вычисление % ингибирования

% переноса в необработанных клетках (без активного компонента, NO) принимают за 100%. При сравнении с необработанными клетками вычисляют процент переноса образцов обработанных клеток.

Результаты

Таблица II

Партия	Образец	Ингибирование, %, кератиноцитов, содержащих меланосомы (среднее ± SD)
8	Контроль	0 ± 0
9	Ниацинамид, 5 мМ	15 ± 0,4
10	Пиколинамид, 5 мМ	-5 (нет ингибирования) ± 2
11	Пиколинамид, 5 мМ + ниацинамид, 5 мМ	26,0 ± 1,7

Приведенная выше табл. II иллюстрирует синергетическое снижение кератиноцитов, содержащих меланосомы, полученное с помощью комбинации пиколинамида и ниацинамида.

В условиях *in vivo* определяют цвет кожи по двум процессам: синтезу меланина и переносу меланосом из меланоцитов в кератиноциты. Полагают, что регулирование этих процессов будет регулировать цвет кожи. Приведенный выше пример показывает, что комбинация по изобретению оказывает синергетическое действие на перенос меланосом из меланоцитов в кератиноциты *in vitro*, и можно ожидать влияния такого же эффекта на перенос меланосом *in vivo*.

Пример 3. Исследования *in vitro* действия комбинации ниацинамида и пиколинамида на перенос меланосом с использованием анализа переноса меланосом (MTA) (Pigment Cell Melanoma Res. 2008 Oct; 21(5):559-64).

Материалы

(i) человеческие первичные меланоциты крайней плоти новорожденных (кат. № HEMn-DP-C-202-5C),

(ii) среда для выращивания меланоцитов (MGM) (Cascade Biologicals, кат. № M-254-500) и

(iii) добавка для выращивания меланоцитов человека (Cascade Biologicals, кат. № S-0002-5),

(iv) кератиноциты человека HaCat (вид, поступивший от Dr NE Fusenig, Hedelberg, Germany),

(v) среда для выращивания кератиноцитов (KGM) (Cascade Biologicals, кат. № Epilife MEPI-500CA)

и

(vi) добавка для выращивания кератиноцитов человека (Cascade Biologicals, F-001-5),

(vii) пиколинамид (Sigma Aldrich, кат. № 104051-50G),

(viii) ниацинамид (Sigma, кат. № N0636-100G),

(ix) буфер трипсин-ЭДТК (Gibco; каталожный № R-001),

(x) нейтритализатор трипсина (Gibco; каталожный № R-002),

(xi) параформальдегид (Sigma Aldrich; 15-812-7),

(xii) забуференный фосфат физиологический раствор (PBS):

a) хлорид натрия (Fischer Scientific; каталожный № 27605),

b) хлорид калия (Merck; 61753305001730),

c) динатрийгидрофосфат (S.D Fine-Chemicals Ltd; продукт № 40158),

d) калийдигидрофосфат (S.D Fine Chemicals Ltd, 20203); (xiii) буфер для FACS:

- а) сапонин (sigma, каталожный № 47036-50G-F),  
 б) сыворотка плода коровы (Gibco; каталожный № 16000).

Метод

Смешивают вместе  $1,3 \times 10^4$  клеток первичных меланоцитов человека (C-202-5C, Lonza), полученных в культуральной среде (MGM:KGM = 1:1), и  $2,6 \times 10^4$  кератиноцитов HaCat, полученных в культуральной среде (MGM:KGM = 1:1), высевают в 48-луночный планшет и инкубируют в инкубаторе для культивирования тканей (Thermo Scientific, модель 3111) при 37°C в атмосфере с 5% CO<sub>2</sub>. После 4 ч инкубации совместные культуры обрабатывают образцами и снова инкубируют в течение 72 ч в том же инкубаторе в тех же условиях. После культивирования в течение требуемого периода (72 ч) получают клетки для анализа проточной цитометрией, следуя процедуре, описанной ниже.

1. Клетки выделяют из 48-луночного планшета в V-образный планшет (Torsion, 941396) с помощью 200 мкл буфера трипсин-ЭДТК, активность трипсина нейтрализуют 200 мкл нейтрализатора трипсина и осаждают при 350 g, используя рефрижераторную центрифугу (Plasto Crafts, модель № Roat 4R-V/FM).

2. К осадку добавляют 100 мкл 1% параформальдегида и инкубируют в течение 10 мин на льду.

3. Затем клетки центрифугируют (1000 G) со 100 мкл забуференного фосфатом физиологического раствора (PBS) в течение 10 мин и осадок используют для окрашивания раствором, описанным ниже на стадии 4. PBS получают, добавляя 4 г хлорида натрия, 0,1 г хлорида калия, 0,58 г динатрийгидрофосфата и 0,1 г калийдигидрофосфата к 500 мл автоклавируемой воды Mili-Q.

Буфер для FACS (клеточный сортинг с активированной флуоресценцией) получают, добавляя 0,1% сапонина и >0,05% (0,05%, масса/объем) сыворотки плода коровы в PBS, смешанных с козьим антителом анти-Trp-1, конъюгированным с Alexa 488 (TRP-1 Alexa 488 (TRP-1 - тирозинкиназа-родственный белок является специфическим маркерным белком меланосом, Santacruz, каталожный № sc-10443)) (1 мкл/100 мкл) и антителом против панцитокератина (панцитокератин, цитокератин является специфическим маркером для кератиноцитов; PE, Santacruz, каталожный № sc-8018) (1 мкл/100 мкл). Упомянутый выше буфер для FACS добавляют к осадку в каждой лунке (100 мкл/лунка) и инкубируют в течение 60 мин на льду.

4. Затем клетки промывают PBS и центрифугируют при ~1000 g с использованием рефрижераторной центрифуги (Plasto Crafts, модель № Roat 4R-V/FM).

5. Клеточные осадки суспендируют в PBS, переносят в круглодонный 96-луночный планшет и анализируют проточной цитометрией (BD Biosciences, модель - BD Facscalibur с BD HTS).

Вычисление переноса меланосом (% переноса)

Кератиноциты, содержащие перенесенные меланосомы, обнаруживают анализом проточной цитометрией.

Вычисление % ингибирования

% переноса в необработанных клетках (без активного компонента, NO) принимают за 100%. При сравнении с необработанными клетками вычисляют процент переноса образцов обработанных клеток.

Результаты

Таблица III

Обработка	Отношение	Ингибирование, %, переноса меланосом	Ср.- кв. откл.
Пиколинамид, 5 мМ	-	-8	3,78
Пиколинамид, 10 мМ	-	18	3,5
Пиколинамид, 15 мМ	-	Гибель клеток	0
Пиколинамид, 5 мМ + ниацинамид, 0,315 мМ	16:1	-1	0,89
Пиколинамид, 5 мМ + ниацинамид, 0,6255 мМ	8:1	7,9	0,58
Пиколинамид, 5 мМ + ниацинамид, 1,25 мМ	4:1	11,3	0,54
Пиколинамид, 6,25 мМ + ниацинамид, 5 мМ	1,25:1	56,9	2,3
Пиколинамид, 5 мМ + ниацинамид, 5 мМ	1:1	29,8	4,0
Пиколинамид, 5 мМ + ниацинамид, 6,25 мМ	1:1,25	31	0,02
Пиколинамид, 1,25 мМ + ниацинамид, 5 мМ	1:4	36,4	4,8
Пиколинамид, 0,6255 мМ + ниацинамид, 5 мМ	1:8	35	4,2
Ниацинамид, 5 мМ	-	16,5	2
Ниацинамид, 10 мМ	-	25	3,5
Ниацинамид, 15 мМ	-	Гибель клеток	0

Приведенная выше табл. III показывает, что синергетическое действие осветления кожи достигается только при специфических молярных отношениях пиколинамида к ниацинамиду.

ФОРМУЛА ИЗОБРЕТЕНИЯ

1. Композиция для осветления кожи, включающая

а) 0,1-10 мас.% пиколинамида и

б) 0,1-10 мас.% ниацинамида,



где молярное отношение пиколинамида к ниацинамиду составляет от 20:1 до 1:20.

2. Композиция для осветления кожи по п.1, в которой молярное отношение пиколинамида к ниацинамиду не превышает 10:1.

3. Композиция для осветления кожи по п.1, в которой молярное отношение пиколинамида к ниацинамиду составляет по меньшей мере 1:1.

4. Композиция для осветления кожи по любому из пп.1-3, при этом композиция включает 1-5 мас.% пиколинамида.

5. Композиция для осветления кожи по любому из пп.1-4, при этом композиция включает 1-5 мас.% ниацинамида.

6. Композиция для осветления кожи по любому из пп.1-5, дополнительно включающая полезное для кожи средство.

7. Композиция для осветления кожи по любому из пп.1-6 в форме топической композиции.

8. Применение композиции по любому из пп.1-7 для осветления кожи.

9. Способ осветления кожи человека, включающий стадию нанесения на кожу композиции по любому из пп.1-7.

