

(19)



Евразийское
патентное
ведомство

(21) 202091213 (13) A1

(12) ОПИСАНИЕ ИЗОБРЕТЕНИЯ К ЕВРАЗИЙСКОЙ ЗАЯВКЕ

(43) Дата публикации заявки
2020.08.13(51) Int. Cl. A61K 8/64 (2006.01)
A61Q 19/04 (2006.01)(22) Дата подачи заявки
2018.10.22

(54) ПЕПТИДЫ ДЛЯ ПОВЫШЕНИЯ СОДЕРЖАНИЯ МЕЛАНИНА В МЕЛАНОЦИТАХ

(31) 17201585.1

(72) Изобретатель:

(32) 2017.11.14

Чандрамоули Ганеш (IN), Стотт Иэн
Питер (GB), Тхиммаиах Сриниваса
(IN)

(33) EP

(86) PCT/EP2018/078916

(87) WO 2019/096546 2019.05.23

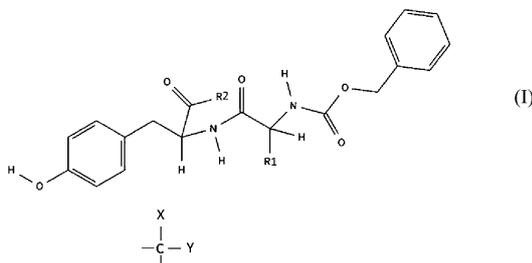
(71) Заявитель:

(74) Представитель:

ЮНИЛЕВЕР Н.В. (NL)

Фелицына С.Б. (RU)

(57) Описано применение соединения, имеющего формулу (I), для повышения количества меланина в меланоцитах



где R1 представляет собой группу $\begin{matrix} X \\ | \\ -C- \\ | \\ Z \end{matrix}$, где X представляет собой H, CH₃, (CH₂)_n-CH₃ или замещенную алкильную группу, Y представляет собой H, CH₃, (CH₂)_n-CH₃ или замещенную алкильную группу, Z представляет собой H или OH; R2 представляет собой H, OH, NH₂ или -O-(CH₂)_nβ, где n равен от 1 до 3, β представляет собой фенильную, нафтильную или алкильную группу, необязательно дополнительно замещенную галогеном, арилом или NH₂-группой, где соединение, имеющее формулу 1, не является соединением, в котором X представляет собой H, Y представляет собой CH₃ и Z представляет собой OH.

A1

202091213

202091213

A1

ПЕПТИДЫ ДЛЯ ПОВЫШЕНИЯ СОДЕРЖАНИЯ МЕЛАНИНА В МЕЛАНОЦИТАХ

Область техники, к которой относится изобретение

Настоящее изобретение касается способа, композиции и применения определенных пептидов для модулирования цвета человеческой кожи, в особенности для повышения количества меланина в меланоцитах, присутствующих в коже и волосах.

Предпосылки создания изобретения

Некоторые люди озабочены определенными свойствами своей кожи. Например, потребители со старческими пигментными пятнами или веснушками часто хотят, чтобы такие пигментные пятна были менее выражены. Некоторые другие потребители хотят уменьшить потемнение кожи, вызванное воздействием солнечного света, или, в других случаях, хотят осветлить свой природный цвет кожи. Эти желания потребителей привели к разработке продуктов, которые уменьшают или замедляют выработку меланина в меланоцитах (т.е. уменьшают меланогенез).

С другой стороны, есть люди, которые хотят иметь более темный тон кожи или выглядеть загорелыми.

Меланоциты переносят меланин в кератиноциты, находящиеся поблизости, где он (меланин) служит для защиты клеточной ДНК от наносимых УФ-излучением повреждений, благодаря своей способности поглощать УФ-излучение. Когда кожа подвергается воздействию УФ-света, синтез меланина усиливается, как и перенос меланина в кератиноциты. Это приводит к видимому потемнению цвета кожи, известному как загар. Загар вследствие повышенного воздействия УФ-света – это известное явление. Однако известно также, что такое воздействие УФ-лучей вызывает ускоренное старение, которое может приводить к повышению вероятности развития рака кожи.

Меланин представляет собой черный пигмент, присутствующий в наших волосах и коже, и синтезируется меланосомами из тирозина. Меланосомы – это органеллы, найденные в меланоцитах – типе клеток, присутствующем на границе дермы и эпидермиса. На тирозин воздействует фермент тирозиназа, и это ключевая стадия меланогенеза.

В меланосомах меланин синтезируется из мономеров и переносится в соседние клетки, называемые кератиноцитами. Кератиноциты делятся и дифференцируются, и таким образом транспортируют меланосомы к поверхности кожи. Оттенок или тон цвета кожи зависит от числа и размера меланоцитов, содержания меланина и скорости

образования и миграции/переноса меланосом в кератиноциты.

Известны несколько пептидов и пептидных производных, которые влияют на пигментацию кожи. В частности, известно, что тирозин-содержащие пептиды напрямую воздействуют на тирозиназу [Yasunobu et al. *J. Biol. Chem.* (1959) 234, #12, 3291-3295].

Известны тирозин-содержащие пентапептидные активаторы тирозиназы (US20150152139 A1, Escape Therapeutics Inc). Одна из последовательностей среди них представляет собой тирозин-серин-X-Y-Z.

С другой стороны, в качестве ингибиторов тирозиназы были описаны также более длинные гексамерные (US8338364 B2, Hantash Basil M, 2011) и октамерные пептиды (Schurink et al. *Peptides* 28(3):485-495).

В US2015/0274776 AA (Sederma) описаны пептиды, содержащие аминокислоту пролин.

Краткое описание сути изобретения

В первом аспекте настоящего изобретения описано применение соединения, имеющего формулу (I), для повышения количества меланина в меланоцитах.

Во втором аспекте настоящего изобретения описана косметическая композиция, содержащая соединение, имеющее формулу (I).

В другом аспекте настоящего изобретения описан способ повышения количества меланина в меланоцитах, включающий стадию применения соединения, имеющего формулу (I).

В другом аспекте настоящего изобретения описано применение соединения, имеющего формулу (I), в производстве композиции для повышения количества меланина в меланоцитах.

Эти и другие аспекты, отличительные признаки и преимущества станут понятны квалифицированному специалисту в данной области техники при прочтении приведенного далее подробного описания и формулы изобретения. Во избежание сомнений, любой признак одного аспекта настоящего изобретения может применяться и в любом другом аспекте настоящего изобретения. Термин «содержащий» означает "включающий", но необязательно "состоящий из". Другими словами, перечисленные стадии или опции не должны рассматриваться как исчерпывающие. Следует отметить, что приведенные ниже в описании примеры предназначены для более ясного описания изобретения и не должны рассматриваться как ограничивающие настоящее изобретение только описанными примерами. Аналогичным образом, все приведенные проценты представляют собой процент масса/масса, если иное не указано особо. За исключением примеров и сравнительных примеров, а также случаев, в которых явно указано иное, все

числа в настоящем описании, обозначающие количества вещества или условия реакций, физические свойства материалов и/или применение, должны пониматься как предваряемые термином «примерно».

Числовые диапазоны, выраженные в формате "от x до y" следует понимать как включающие x и y. Когда для какого-то признака приведены несколько предпочтительных диапазонов в формате "от x до y", следует понимать, что предусмотрены также все диапазоны, комбинирующие разные граничные точки.

При использовании в настоящем изобретении термин «содержащий» охватывает также термины «состоящий главным образом из» и «состоящий из». Когда применяется термин «содержащий», указанные стадии или опции не должны рассматриваться как исчерпывающие. Если не указано иное, числовые диапазоны, выраженные в формате "от x до y" следует понимать как включающие x и y. При указании любого диапазона значений или количеств, любое верхнее граничное значение или количество можно комбинировать с любым нижним граничным значением или количеством. За исключением примеров и сравнительных примеров, а также случаев, в которых явно указано иное, все числа в настоящем описании должны пониматься как предваряемые термином «примерно». Все проценты и соотношения, фигурирующие в настоящем изобретении, вычисляются по массе, если не указано иное. При использовании в настоящем изобретении использование единственного числа означает как «один», так и «один или более», если не указано иное. Различные признаки настоящего изобретения, упомянутые в отдельных разделах, применимы также и к другим разделам, с внесением необходимых изменений. Как следствие, признаки, приведенные в одном разделе, в подходящих случаях можно комбинировать с признаками, приведенными в других разделах. Все названия разделов добавлены исключительно в целях удобства и никаким образом не ограничивают настоящее раскрытие.

Подробное описание изобретения

Меланин образуется благодаря сложному набору реакций в меланоцитах, включающих на базовом уровне фермент тирозиназу и аминокислоту L-тирозин. Известно, что тирозиназа представляет собой неотъемлемый компонент синтеза меланина. Тирозиназа катализирует превращение L-тирозина в допахинон через L-DOPA (L-3,4-дигидроксифенилаланин) в качестве интермедиата. Допахинон претерпевает дальнейшие превращения с образованием меланина.

Повышение количества биологического пигмента «меланин» в меланоцитах обычно ассоциировано с цитотоксичностью и неконтролируемой пролиферацией. Некоторые известные агенты не так безопасны, как должно, и примеры таких агентов

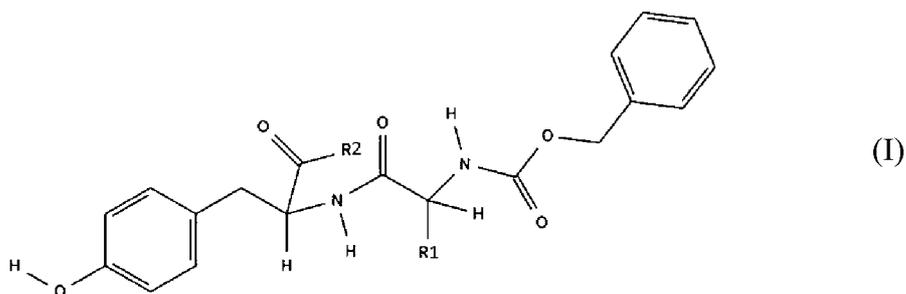
включают форсколин и IBMX (3-изобутил-1-метилксантин). Средства для искусственного загара используют в двух типах косметических продуктов. Наиболее традиционным из них является лосьон для автозагара. Его эффектом является достижение эффекта окрашивания кожи, эквивалентного тому, которое достигается после пребывания на солнце. Недавно появилась вторая категория продуктов. В ней небольшие количества средства для искусственного загара добавляют в обычный увлажняющий лосьон.

Наиболее известным из средств для искусственного загара является дигидроксиацетон ("DHA", который с химической точки зрения представляет собой 1,3-дигидрокси-2-пропанон). Считается, что DHA реализует свое действие через взаимодействия между его гидроксильными группами и аминогруппами аминокислот и пептидов, которое естественным образом происходит в гидролипидной пелликуле и первых слоях рогового слоя эпидермиса кожи. Считается, что эти реакции Майяра (см., например, Vobin et al., J. Soc. Cosmet. Chem. 35: 255 (1984)) приводят к образованию коричневых пигментов в коже, тем самым придавая ей внешний вид кожи с естественным загаром.

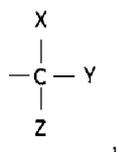
Авторы настоящего изобретения обнаружили, что некоторые дипептиды способны повышать количество меланина в меланоцитах. Авторы настоящего изобретения также наблюдали в условиях *in vitro*, что некоторые молекулы, которые можно изобразить в виде структур Маркуша, повышают содержание меланина в первичных меланоцитах человека. Считается, что эти вещества оказывают свое воздействие через сигнальные пути в клетках. В одном аспекте указанные меланоциты представляют собой меланоциты в коже человека. В альтернативном варианте указанные меланоциты представляют собой меланоциты человеческих волос.

Кроме того, авторы настоящего изобретения определили, что репрезентативные молекулы из упомянутых общих структур Маркуша эффективны в очень низкой дозировке и, таким образом, они отличаются от типичных химических красителей, которые непосредственно претерпевают химические реакции с получением более темных продуктов. Эффективность некоторых молекул сравнима с известными стандартами, такими как IBMX и форсколин, но без той цитотоксичности, которая обычно характерна для IBMX и форсколина.

В первом аспекте настоящего изобретения описано применение соединения, имеющего формулу (I), для повышения количества меланина в меланоцитах,



где:



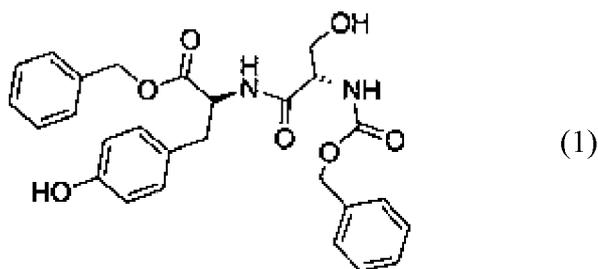
R1 представляет собой группу

где X представляет собой H, CH₃, (CH₂)_n-CH₃ или замещенную алкильную группу, Y представляет собой H, CH₃, (CH₂)_n-CH₃ или замещенную алкильную группу, и Z представляет собой H или OH; и R2 представляет собой H, OH, NH₂ или -O-(CH₂)_nβ, где n равен от 1 до 3, и β представляет собой фенильную, нафтильную или алкильную группу, необязательно дополнительно замещенную галогеном, арилом или NH₂ группой; где соединение, имеющее формулу 1, не является соединением, в котором X представляет собой H, Y представляет собой CH₃, и Z представляет собой OH.

В частности, предпочтительно X представляет собой H, Y также представляет собой H, а Z представляет собой OH. В альтернативном варианте предпочтительно X представляет собой CH₃, Y также представляет собой CH₃, а Z представляет собой H. Кроме того, в альтернативном варианте предпочтительно X представляет собой алкильную или замещенную алкильную группу, Y представляет собой H, а Z представляет собой H или OH.

Предпочтительно в соединении, имеющем формулу (I), X=Y=H, Z=OH, а R2 представляет собой -O-CH₂C₆H₅. Также предпочтительно в соединении, имеющем формулу (II), X=Y=CH₃, Z=H, и R2 представляет собой NH₂.

В частности, соединение, имеющее формулу (I), предпочтительно представляет собой:



Название

этого

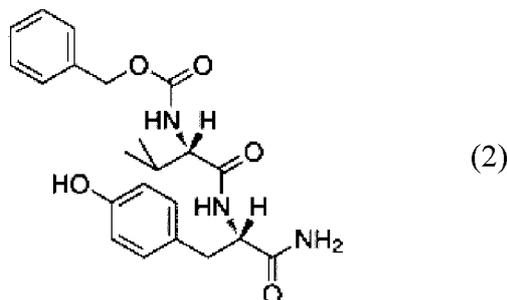
соединения:

бензил

(2S)-2-[[((2S)-2-

{[(бензилокси)карбонил]амино}-3-гидроксипропаноил)амино]-3-(4-гидроксифенил)пропаноат, доступен от SIGMA S786098.

В альтернативном варианте соединение, имеющее формулу (I), представляет собой:



Название этого соединения: бензил (1S)-1-({[(1S)-2-амино-1-(4-гидроксibenзил)-2-оксоэтил]амино}карбонил)-2-метилпропилкарбамат, доступен от SIGMA S776688.

Было обнаружено, что соединения, имеющие формулу (I), эффективны в концентрации от 1,5 до 50 мкмоль в условиях *in vitro*. Это наблюдение показывает, что данные молекулы могут быть эффективны в низкой дозировке в таких композициях, как косметические композиции, например композиции для искусственного загара.

Было также обнаружено, что применение по настоящему изобретению приводит к увеличению на 15 - 40% количества меланина в меланоцитах по сравнению с его базовым (естественным) количеством. Это значительный рост по сравнению с ростом, обычно обеспечиваемым стандартными/известными ингредиентами IBMX и форсколином в аналогичных условиях тестирования. Обычно соединения или ингредиенты, вызывающие загорелость/потемнение кожи, предрасположены к влиянию или изменению ферментативной активности тирозиназы. Однако применение соединения, имеющего формулу (I) по настоящему изобретению, не влияет и не изменяет ферментативную активность тирозиназы. Таким образом, биологическое действие соединения, имеющего формулу (I), в особенности формулу 1 и 2, скорее всего осуществляется через механизмы передачи сигнала на клеточном уровне.

Обычно такие соединения обладают цитотоксичностью, которая является неизбежным побочным эффектом. Однако было обнаружено, что, предпочтительно, жизнеспособность клеток у меланоцитов с повышенным уровнем меланина составляет более 75%, в более предпочтительном случае – более 90% и в наиболее предпочтительном случае – более 95%. Другими словами, цитотоксичность молекул, имеющих формулу (I), составляет менее 25%, предпочтительно менее 10%, и наиболее предпочтительно менее 5%. Эти цифры наблюдаются в условиях *in vitro*. Предпочтительно меланоциты находятся в коже или волосах человека.

Предпочтительно применение соединения, имеющего формулу (I), осуществляется

в нетерапевтических целях. Более предпочтительно применение осуществляется в косметических целях. Когда применение осуществляется в косметических целях, соответствующая косметическая композиция предпочтительно представляет собой композицию для искусственного загара, увлажняющий лосьон или средство для ухода за волосами.

В другом аспекте настоящего изобретения описан способ повышения количества меланина в меланоцитах, включающий стадию нанесения соединения, имеющего формулу (I).

Подходящая поверхность кожи включает кожу на лице, руках и кистях рук, на ногах и ступнях ног, а также на шее и груди. Представляет интерес кожа лица, включая лоб, область около рта, подбородок, область около глаз, нос и/или щеки. Другой поверхностью, подходящей для применения по настоящему изобретению, являются волосы человека.

В другом аспекте настоящего изобретения описано применение соединения, имеющего формулу (I), в производстве композиции для увеличения количества меланина в коже человека.

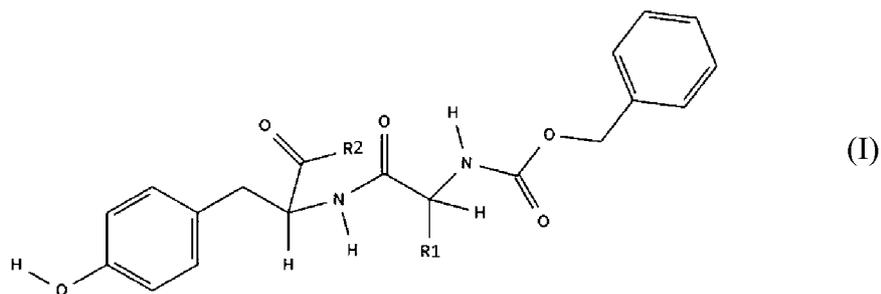
В другом аспекте настоящего изобретения описана косметическая композиция, содержащая соединение, имеющее формулу (I).

Композицию можно наносить и оставлять на желаемой поверхности в течение достаточного периода времени, или ее можно наносить достаточное количество раз. В некоторых вариантах осуществления время контакта больше, чем примерно 1 час, 2 часа, 6 часов, 8 часов, 12 часов или 24 часа. Время контакта – это время от нанесения композиции до момента удаления композиции. В некоторых вариантах осуществления композицию можно удалять смыванием или посредством мытья поверхности. Композицию можно удалять смыванием или посредством мытья кожи. Композицию можно наносить по меньшей мере один раз в сутки. В других вариантах осуществления композицию наносят по меньшей мере два раза в сутки. Множественные нанесения можно осуществлять в течение по меньшей мере примерно одной недели. В альтернативном варианте период применения может длиться больше, чем примерно 4 недели, или больше, чем примерно 8 недель. В некоторых вариантах осуществления период применения длится несколько месяцев (например, от 3 до 12 месяцев) или лет. В случае косметической композиции композицию можно наносить ежедневно в течение длительного периода времени.

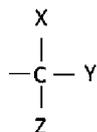
Композиции по настоящему изобретению

В другом аспекте настоящего изобретения описана косметическая композиция,

содержащая соединение, имеющее формулу (I),



где:



R1 представляет собой группу

где X представляет собой H, CH₃, (CH₂)_n-CH₃ или замещенную алкильную группу, Y представляет собой H, CH₃, (CH₂)_n-CH₃ или замещенную алкильную группу, и Z представляет собой H или OH; и R2 представляет собой H, OH, NH₂ или -O-(CH₂)_nβ, где n равен от 1 до 3, и β представляет собой фенильную, нафтильную или алкильную группу, необязательно дополнительно замещенную галогеном, арилом или NH₂ группой; где соединение, имеющее формулу 1, не является соединением, в котором X представляет собой H, Y представляет собой CH₃, и Z представляет собой OH; и где композиция дополнительно содержит косметически приемлемую основу, выбранную из водной основы, безводной основы или эмульсии.

Более предпочтительно косметически приемлемая основа представляет собой эмульсию.

Когда композиция включает водную основу, такая водная основа содержит воду. Она может дополнительно включать одно или более из следующих компонентов: поверхностно-активное вещество, умягчитель, загуститель или их комбинации. Когда композиция включает неводную основу, она может содержать масло, воск, безводный растворитель или их смеси. Когда композиция представляет собой эмульсию, она содержит и масляную фазу, и водную фазу, и дополнительно включает эмульгатор для стабилизации эмульсии.

Предпочтительно косметическая композиция представляет собой композицию для ухода за кожей или для очищения кожи. В альтернативном варианте она представляет собой продукт для ухода за волосами. Его примеры включают масла для ухода за волосами, кондиционеры, краски для волос и шампуни.

Предпочтительно косметические композиции по настоящему изобретению содержат от 0,05 до 10 мас. % соединения, имеющего формулу (I).

Авторы настоящего изобретения обнаружили, что композиция по настоящему изобретению способна придавать загорелость при применении соединения, имеющего формулу 1, без необходимости дополнительного использования дигидроксиацетона (DHA). DHA представляет собой хорошо известный компонент, способствующий загару, который применяется уже долгое время. Необходимость усиления эффективности создания загара у композиций по настоящему изобретению посредством включения в них какого-либо количества DHA отсутствует. Так, предпочтительно, композиция по настоящему изобретению содержит менее 1%, предпочтительно менее 0,5%, еще более предпочтительно менее 0,1% DHA от массы композиции; и в оптимальном случае DHA отсутствует в композиции.

Другие ингредиенты

Когда композиция по настоящему изобретению представляет собой косметическую композицию, как описано выше, она предпочтительно содержит одно или более из следующих веществ: отдушка, поверхностно-активное вещество, органический солнцезащитный фильтр, неорганический солнцезащитный фильтр, наполнитель, пигмент и консервант.

Солнцезащитные фильтры включают вещества, которые блокируют вредные ультрафиолетовые лучи. Предпочтительными солнцезащитными фильтрами являются производные п-аминобензойной кислоты (ПАВА), циннаматы и салицилаты. Например, можно применять авобензофенон (Parsol[®] 1789), октил метоксициннамат и 2-гидрокси-4-метоксибензофенон (известный также как оксибензон). Октил метоксициннамат и 2-гидрокси-4-метоксибензофенон коммерчески доступны под товарными знаками Parsol[®] MCX и бензофенон-3, соответственно. Также можно применять Ecamsule[®], бензилиденовое производное камфоры, и дрометризол трисилоксан, бензотриазол. Другие примеры включают октокрилен, фенилбензимидазолсульфоокислоту (известную также как Ensulizole[®]), этилгексилсалицилат, диэтилгексилнафтиллат, бимотризиол (товарный знак Tinosorb[®] S) и бисоктризол (Tinosorb[®] M). Неорганические солнцезащитные фильтры включают оксиды, такие как диоксид титана и оксид цинка, которые отражают или рассеивают солнечные лучи. Количество солнцезащитных фильтров в композициях может варьироваться в зависимости от необходимой степени защиты от УФ-излучения. Предпочтительно композиции содержат от 0,01 до 15 мас. %, более предпочтительно от 0,1 до 10 мас. %, и наиболее предпочтительно от 0,5 до 7,5 мас. % солнцезащитного агента.

Иллюстративные примеры типов отдушек, которые могут применяться в композициях, включают отдушки, содержащие терпены и производные терпенов, такие

как описаны в работе Bauer, K., et al., Common Fragrance and Flavor Materials, VCH Publishers (1990). Другие примеры включают мирцен, дигидромирценол, цитраль, тагетон, цис-гераниевую кислоту, цитронелловую кислоту и их смеси.

Носитель выступает как разбавитель или диспергатор для ингредиентов композиции. Носитель может иметь водную основу, может быть неводным или это может быть эмульсия, из которой в целом предпочтительной является эмульсия типа вода-в-масле или масло-в-воде. Если использование воды является желательным, на воду обычно приходится оставшаяся часть композиции, что наиболее предпочтительно составляет от 40 до 80 мас. % композиции.

В дополнение к воде в качестве вспомогательного носителя в композиции по настоящему изобретению необязательно можно включать органические растворители. Примеры включают алканола, такие как этиловый и изопропиловый спирт.

Другие подходящие органические растворители включают сложноэфирные масла, такие как изопропил миристат, цетил миристат, 2-октилдодецил миристат, масло авокадо, миндальное масло, оливковое масло и неопентилгликоль дикапрат. В типичном случае такие сложноэфирные масла помогают эмульгировать композиции, и их эффективные количества используют для того, чтобы получить стабильные композиции, наиболее предпочтительно имеющие тип вода-в-масле.

Также в качестве носителя при желании могут применяться умягчители. Предпочтительными являются спирты, такие как 1-гексадеканол (т.е. цетиловый спирт). Другие умягчители включают силиконовые масла и синтетические сложные эфиры. Силиконовые масла, подходящие для применения в качестве умягчителей, включают циклические или линейные полидиметилсилоксаны, содержащие от 3 до 9, предпочтительно от 4 до 5, атомов кремния. Нелетучие силиконовые масла, которые могут применяться в качестве умягчителей, включают полиалкилсилоксаны, полиалкиларилсилоксаны и сополимеры полиэфиров с силоксанами. Наиболее подходящими нелетучими полиалкилсилоксанами являются полидиметилсилоксаны. Также можно применять силиконовые эластомеры. Подходящими для опционального применения сложноэфирными умягчителями являются:

- (i) алкениловые или алкиловые эфиры жирных кислот, содержащих от 10 до 20 атомов углерода. Их примеры включают изоарахидил неопентаноат, изононил изонаноат, олеил миристат, олеил стеарат и олеил олеат;
- (ii) простоэфирные сложные эфиры, такие как сложные эфиры жирных кислот с этоксилированными жирными спиртами;
- (iii) сложные эфиры многоатомных спиртов. Моно- и диэфиры жирных

кислот с этиленгликолем, моно- и диэфиры жирных кислот с диэтиленгликолем, моно- и диэфиры жирных кислот с полиэтиленгликолем (200- 6000), моно- и диэфиры жирных кислот с пропиленгликолем, полипропиленгликоль 2000 моноолеат, полипропиленгликоль 2000 моностеарат, моностеарат этоксилированного пропиленгликоля, моно- и диэфиры жирных кислот с глицерином, полиглицериновые жирные полиэфиры, моностеарат этоксилированного глицерина, моностеарат 1,3-бутиленгликоля, дистеарат 1,3-бутиленгликоля, сложные эфиры жирных кислот с полиоксиэтиленполиолом, сложные эфиры жирных кислот с сорбитаном и сложные эфиры жирных кислот с полиоксиэтиленсорбитаном являются подходящими сложными эфирами многоатомных спиртов;

(iv) воскообразные сложные эфиры, такие как пчелиный воск, спермацет, стеарил стеарат и арахидил бегенат; и,

(v) сложные эфиры стерола, примерами которых являются сложные эфиры жирных кислот и холестерина.

Умягчители, когда они присутствуют в составе, обычно составляют от 0,1 до 50 мас. % композиции, включая все промежуточные поддиапазоны в этом диапазоне.

Жирные кислоты, содержащие от 10 до 30 атомов углерода, также могут быть включены в состав в качестве носителей. Примеры таких жирных кислот включают пеларгоновую, лауриновую, миристиновую, пальмитиновую, стеариновую, изостеариновую, олеиновую, линолевую, арахидиновую, бегоновую или эруковую кислоту, и их смеси.

Увлажнители типа многоатомных спиртов также могут применяться в композициях. Увлажнители часто помогают повысить эффективность умягчителя, уменьшают шелушение на поверхности кожи, стимулируют удаление накопленных ороговевших частиц и улучшают ощущение на коже. Типичные многоатомные спирты включают глицерин, полиалкиленгликоли и более предпочтительно алкиленполиолы и их производные, включая пропиленгликоль, дипропиленгликоль, полипропиленгликоль, полиэтиленгликоль и его производные, сорбит, гидроксипропил сорбит, гексиленгликоль, 1,3-бутиленгликоль, 1,2,6-гексантриол, этоксилированный глицерин, пропоксилированный глицерин и их смеси. Для достижения наилучших результатов, увлажнитель предпочтительно представляет собой пропиленгликоль или гиалуронат натрия. Другие увлажнители, которые можно включать в состав, включают гидроксипропилмочевину. Количество увлажнителя может составлять от 0,2 до 25 мас. %, и предпочтительно от 0,5 до 15 мас. % композиции.

пиритион являются примерами подходящих солей цинка.

Композиции, особенно содержащие воду, нуждаются в защите от вредных микроорганизмов. Могут быть необходимы противомикробные соединения, такие как триклозан, и консерванты. Подходящие консерванты включают алкиловые эфиры парагидроксibenзойной кислоты, производные гидантоина, пропионатные соли и различные четвертичные аммониевые соединения. Особенно предпочтительными консервантами являются метилапарбен, пропилпарабен, феноксиэтанол и бензиловый спирт. Консерванты составляют от 0,1 до 2 мас. % композиции.

Упаковкой может служить пластырь, бутылка, туба, роликовый аппликатор, аэрозоль с пропеллентом, сжимаемый контейнер или банка с крышкой.

Настоящее изобретение будет более подробно описано ниже с помощью неограничивающих примеров.

Примеры

Пример 1: Увеличение количества меланина в меланоцитах

Все протестированные соединения были куплены в SIGMA-ALDRICH в виде стоковых растворов с концентрацией 10 мМ в 100%-ном ДМСО. Их тестировали в различных концентрациях на культурах клеток (см. ниже). Форсколин (SIGMA Cat. # F6886) и IBMX (SIGMA Cat. #I5879) использовали в качестве соединений сравнения, поскольку известно их действие по увеличению содержания меланина. Меланоциты первичного эпидермиса из детской крайней плоти человека приобретали у Cascade Biologicals (labelled passage P0). Меланоциты выращивали в среде Medium 254CF (Cascade Cat. # M-254CF-500) с добавкой для роста человеческих меланоцитов (Cascade; Cat. # S-002-5), далее в тексте обозначается MGM. Клетки выращивали при 37°C в увлажненном инкубаторе в атмосфере с 5% CO₂.

Анализ жизнеспособности клеток и содержания меланина

50000 клеток высевали в 24-луночный планшет в MGM; через 24 часа в культуры добавляли разные концентрации тестируемых веществ и оставляли еще на 72 часа. Одновременно в параллели ставили тесты с контрольными образцами носителя 0,25% (об/об) ДМСО. В конце периода инкубирования определяли жизнеспособность клеток методом с использованием кальцеина.

Вкратце, удаляли среду из культур клеток, и клетки промывали один раз 0,4 мл раствором 1x PBS-Ca-Mg. Добавляли свежий 1 мкМ раствор кальцеин-AM (0,2 мл/лунку), включая контрольные лунки без клеток. Планшеты закрывали алюминиевой фольгой и инкубировали 30 минут при 37°C в обычном CO₂ инкубаторе. Затем измеряли флуоресценцию кальцеина ($\lambda_{\text{макс}}$ 490 нм и $\lambda_{\text{макс}}$ 520 нм) в планшет-ридере TECAN®

M1000 Infinite series.

Анализ содержания меланина

После измерения флуоресценции кальцеина, клетки промывали и добавляли 125 мкл свежего 1н. раствора NaOH (в 10% ДМСО) на лунку. Клетки лизировали посредством суспендирования и инкубирования (60°C/1 час.). Затем полученный лизат переносили в свежий 386-луночный планшет и определяли оптическую плотность OD_{405нм} в планшет-ридере TECAN M1000 (оценка относительного содержания меланина).

Вычисления

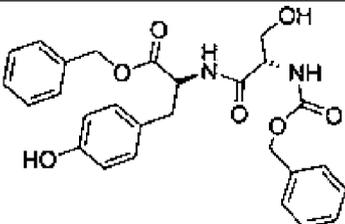
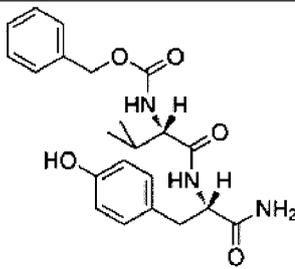
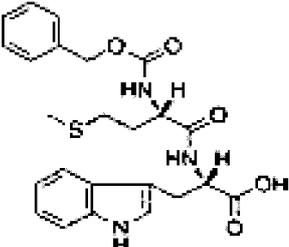
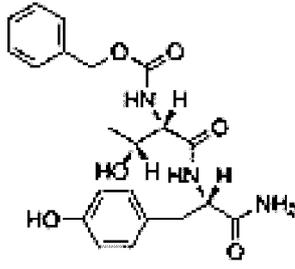
Значения флуоресценции кальцеина переводили в шкалу от 0 до 100 (% жизнеспособности), где 100 – это значение для образца с 0,25% ДМСО. Процент содержания меланина вычисляли как соотношение между значением OD_{405нм} данного образца и значением для образца сравнения с ДМСО. Нормализованное значение содержания меланина затем вычисляли следующим образом:

$$100 * (\% \text{ содержания меланина}) / (\% \text{ жизнеспособности клеток}).$$

Увеличение содержания меланина в процентах оценивали как [(нормализованное содержание меланина) - 100]

Были протестированы следующие четыре молекулы:

Таблица 1

По настоящему изобретению	
 <p>Бензил (2S)-2-[[[(2S)-2-[[[(бензилокси)карбонил]амино]-3-гидроксипропаноил)амино]-3-(4-гидроксифенил)пропаноат. (Соединение 1)</p>	 <p>Бензил (1S)-1-([[[(1S)-2-амино-1-(4-гидроксибензил)-2-оксоэтил]амино]карбонил)-2-метилпропилкарбамат (Соединение 2)</p>
Не по изобретению	
	

(2S)-2-[[[(2S)-2- {[(бензилокси)карбонил]амино}-4- (метилтио)бутаноил]амино}-3-(1H-индол-3- ил)пропановая кислота (Соединение 3)	Бензил (1S,2R)-1-({[(1S)-2-амино- 1-(4-гидроксibenзил)-2-оксоэтил]амино} карбонил)-2-гидроксипропилкарбамат. (Соединение 4)
--	--

Полученные данные обобщены в Таблицах 2 и 3. Все эксперименты проводили в концентрации 0,25 мкМ. Контрольным образцом служил ДМСО (диметилсульфоксид).

Таблица 2

Соединение	Флуоресценция кальцеина (условные единицы)	% Жизнеспособности	OD _{405нм}	% меланина	100* (%меланина)/ (%жизнеспособности)	% увеличения меланина	% роста активности тирозиназы
Контроль	100	100	0,113	100	100	0	0
1	107	107	0,153	135,4	126,5	26,5	3,5
2	81	81	0,125	110,6	136,5	36,5	2,0
3	99	99	0,120	106,2	107,3	7,3	1,8
4	110	110	0,116	102,7	93,4	-6,6	0,8

Данные Таблицы 2 ясно показывают, что соединения 1 и 2 (но не 3 или 4) приводят к существенному росту содержания меланина в меланоцитах. Когда соединения исследовали отдельно в тесте с тирозиназой, ни одно из них не повлияло на ферментативную активность. Поэтому биологическое действие соединений 1 и 2 осуществляется, скорее всего, через механизмы передачи сигнала на клеточном уровне.

Пример 2: Зависимость эффекта от дозы

Результаты обобщены в Таблице 3.

Таблица 3

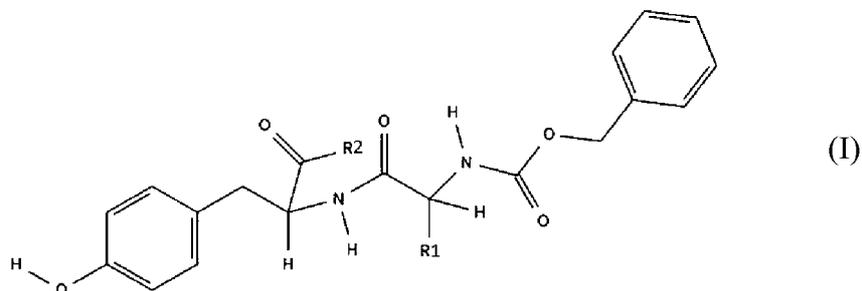
Тестируемое вещество % об/об	Флуоресценция кальцеина (условные единицы)	% Жизнеспособности	OD _{405нм}	% меланина	100* (%меланина)/ (%жизнеспособности)	% увеличения меланина
0,25 контроль	100	100	0,165	100	100,0	0
3,125 мкМ соединение 1	91,0	91,0	0,177	107,3	117,9	17,9
6,25 мкМ соединение 1	95,5	95,5	0,190	115,2	120,6	20,6
12,5 мкМ соединение 1	88,7	88,7	0,195	118,2	133,3	33,3
25 мкМ соединение 1	90,0	90,0	0,199	120,6	134,0	34,0
1,5 мкМ соединение 2	91,3	91,3	0,176	106,7	116,9	16,9
3,125 мкМ соединение 2	90,5	90,5	0,184	111,5	123,2	23,2
6,25 мкМ соединение 2	99,8	99,8	0,189	114,5	114,7	14,7
12,5 мкМ соединение 2	95,8	95,8	0,200	121,2	126,5	26,5

25 мкМ соединение 2	92,5	92,5	0,217	131,5	142,2	42,2
50 мкМ соединение 2	100,6	100,6	0,209	126,6	125,8	25,8
2,5 мкМ форсколин	95,6	95,6	0,184	111,5	116,6	16,6
5 мкМ форсколин	94,8	94,8	0,202	122,5	129,2	29,2
10 мкМ форсколин	90,5	90,5	0,204	123,7	136,7	36,7
12,5 мкМ IBMX	100,1	100,1	0,193	116,7	116,6	16,6
25 мкМ IBMX	95,2	95,2	0,196	118,8	124,8	24,8
50 мкМ IBMX	91,0	91,0	0,193	116,7	128,2	28,2

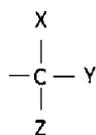
Данные Таблицы 3 показывают, что степень увеличения содержания меланина у соединений 1 и 2 сравнима с известными стандартными молекулами сравнения (форсколин и IBMX). Также, эффект наблюдается со сравнительно меньшими количествами соединений 1 и 2. Это опровергает любое потенциальное окисление фенольной боковой цепи тирозина у тех соединений, которые приводят к увеличению OD_{405nm} .

ФОРМУЛА ИЗОБРЕТЕНИЯ

1. Применение соединения, имеющего формулу (I), для повышения количества меланина в меланоцитах



где:



R1 представляет собой группу

где X представляет собой H, CH₃, (CH₂)_n-CH₃ или замещенную алкильную группу, Y представляет собой H, CH₃, (CH₂)_n-CH₃ или замещенную алкильную группу, и Z представляет собой H или OH; и R2 представляет собой H, OH, NH₂ или -O-(CH₂)_nβ, где n равен от 1 до 3, и β представляет собой фенильную, нафтильную или алкильную группу, необязательно дополнительно замещенную галогеном, арилом или NH₂ группой;

где соединение, имеющее формулу 1, не является соединением, в котором X представляет собой H, Y представляет собой CH₃, и Z представляет собой OH.

2. Применение по п. 1, где в соединении, имеющем формулу (I), X=Y=H, Z=OH, и R2 представляет собой OCH₂C₆H₅.

3. Применение по п. 1, где в соединении, имеющем формулу (I), X=Y=CH₃, Z=H, и R2 представляет собой NH₂.

4. Применение по любому из пп. 1-3, где указанное соединение эффективно в концентрации от 1,5 до 50 мкмоль в условиях *in vitro*.

5. Применение по любому из пп. 1-4, где указанное применение приводит к увеличению количества меланина в меланоцитах на 15-40% по сравнению с его базовым (естественным) количеством.

6. Применение по любому из пп. 1-5, где жизнеспособность меланоцитов с повышенным уровнем меланина составляет более 75%.

7. Применение по любому из пп. 1-6, где меланоциты содержатся в коже или волосах человека.

8. Применение по любому из пп. 1-7, где применение осуществляется в

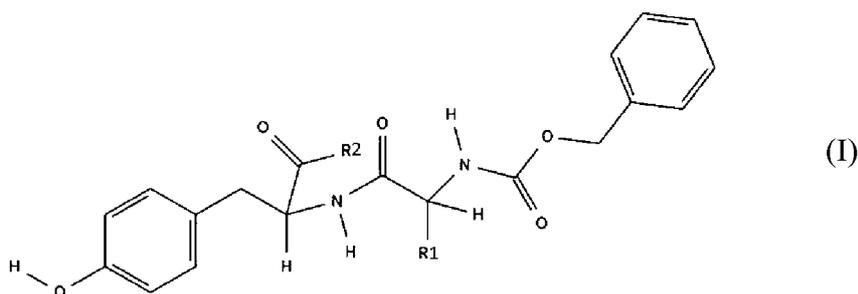
нетерапевтических целях.

9. Применение по п. 8, где указанное применение имеет место в косметической композиции.

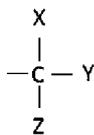
10. Применение по п. 9, где косметическая композиция представляет собой композицию для искусственного загара, увлажняющий лосьон или средство для ухода за волосами.

11. Применение композиции, содержащей соединение, имеющее формулу (I), для повышения количества меланина в меланоцитах.

12. Косметическая композиция, содержащая соединение, имеющее формулу (I),



где:



R1 представляет собой группу

где X представляет собой H, CH₃, (CH₂)_n-CH₃ или замещенную алкильную группу, Y представляет собой H, CH₃, (CH₂)_n-CH₃ или замещенную алкильную группу, и Z представляет собой H или OH; и R2 представляет собой H, OH, NH₂ или -O-(CH₂)_nβ, где n равен от 1 до 3, и β представляет собой фенильную, нафтильную или алкильную группу, необязательно дополнительно замещенную галогеном, арилом или NH₂ группой; где соединение, имеющее формулу 1, не является соединением, в котором X представляет собой H, Y представляет собой CH₃, и Z представляет собой OH; и

где композиция дополнительно содержит косметически приемлемую основу, выбранную из водной основы, безводной основы или эмульсии.

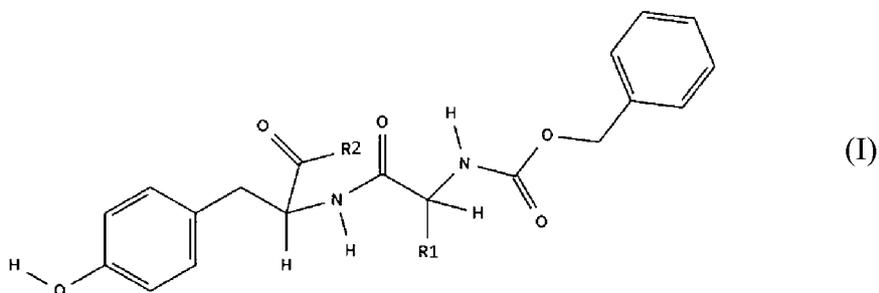
13. Способ повышения количества меланина в меланоцитах, включающий стадию нанесения соединения, имеющего формулу (I).

14. Способ по п. 13, где указанный способ по своей природе является нетерапевтическим.

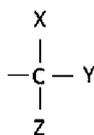
15. Применение соединения, имеющего формулу (I), в производстве композиции для повышения количества меланина в меланоцитах.

**ФОРМУЛА ИЗОБРЕТЕНИЯ, ИЗМЕНЕННАЯ ПО СТ. 34 РСТ,
ПРЕДЛОЖЕННАЯ ЗАЯВИТЕЛЕМ К РАССМОТРЕНИЮ**

1. Применение соединения, имеющего формулу (I), для повышения количества меланина в меланоцитах



где:



R1 представляет собой группу

где X представляет собой H, CH₃, (CH₂)_n-CH₃ или замещенную алкильную группу, Y представляет собой H, CH₃, (CH₂)_n-CH₃ или замещенную алкильную группу, и Z представляет собой H или OH; и R2 представляет собой H, OH, NH₂ или -O-(CH₂)_nβ, где n равен от 1 до 3, и β представляет собой фенильную, нафтильную или алкильную группу, необязательно дополнительно замещенную галогеном, арилом или NH₂ группой;

где соединение, имеющее формулу 1, не является соединением, в котором X представляет собой H, Y представляет собой CH₃, и Z представляет собой OH.

2. Применение по п. 1, где в соединении, имеющем формулу (I), X=Y=H, Z=OH, и R2 представляет собой OCH₂C₆H₅.

3. Применение по п. 1, где в соединении, имеющем формулу (I), X=Y=CH₃, Z=H, и R2 представляет собой NH₂.

4. Применение по любому из пп. 1-3, где указанное соединение эффективно в концентрации от 1,5 до 50 мкмоль в условиях *in vitro*.

5. Применение по любому из пп. 1-4, где указанное применение приводит к увеличению количества меланина в меланоцитах на 15-40% по сравнению с его базовым (естественным) количеством.

6. Применение по любому из пп. 1-5, где жизнеспособность меланоцитов с повышенным уровнем меланина составляет более 75%.

7. Применение по любому из пп. 1-6, где меланоциты содержатся в коже или волосах человека.

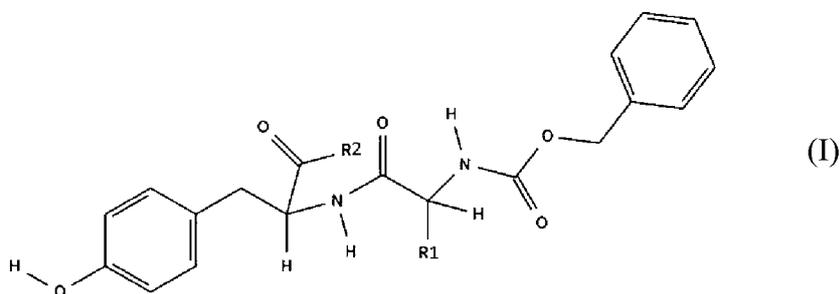
8. Применение по любому из пп. 1-7, где применение осуществляется в нетерапевтических целях.

9. Применение по п. 8, где указанное применение имеет место в косметической композиции.

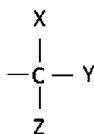
10. Применение по п. 9, где косметическая композиция представляет собой композицию для искусственного загара, увлажняющий лосьон или средство для ухода за волосами.

11. Применение композиции, содержащей соединение, имеющее формулу (I), для повышения количества меланина в меланоцитах.

12. Косметическая композиция, содержащая соединение, имеющее формулу (I),



где:



R1 представляет собой группу ,

где X представляет собой H, CH₃, (CH₂)_n-CH₃ или замещенную алкильную группу, Y представляет собой H, CH₃, (CH₂)_n-CH₃ или замещенную алкильную группу, и Z представляет собой H или OH; и R2 представляет собой H, OH, NH₂ или -O-(CH₂)_nβ, где n равен от 1 до 3, и β представляет собой фенильную, нафтильную или алкильную группу, необязательно дополнительно замещенную галогеном, арилом или NH₂ группой; где соединение, имеющее формулу 1, не является соединением, в котором X представляет собой H, Y представляет собой CH₃, и Z представляет собой OH; и

где композиция дополнительно содержит косметически приемлемую основу, представляющую собой эмульсию.

13. Способ повышения количества меланина в меланоцитах, включающий стадию нанесения соединения, имеющего формулу (I).

14. Способ по п. 13, где указанный способ по своей природе является нетерапевтическим.

15. Применение соединения, имеющего формулу (I), в производстве композиции для повышения количества меланина в меланоцитах.