

(19)



**Евразийское  
патентное  
ведомство**

(21) **202092219** (13) **A1**

(12) **ОПИСАНИЕ ИЗОБРЕТЕНИЯ К ЕВРАЗИЙСКОЙ ЗАЯВКЕ**

(43) Дата публикации заявки  
2021.07.06

(22) Дата подачи заявки  
2019.04.02

(51) Int. Cl. *A61Q 19/02* (2006.01)  
*A61K 8/35* (2006.01)  
*A61K 8/67* (2006.01)  
*A61Q 19/00* (2006.01)  
*A61Q 19/08* (2006.01)

---

(54) **КОМПОЗИЦИИ ДЛЯ УХОДА ЗА КОЖЕЙ И ИХ ПРИМЕНЕНИЕ**

---

(31) IN201841012637

(32) 2018.04.03

(33) IN

(86) PCT/US2019/025298

(87) WO 2019/195222 2019.10.10

(71) Заявитель:  
САМИ ЛАБС ЛИМИТЕД (IN)

(72) Изобретатель:

Маджид Мухаммед (IN),  
Нагабхушанам Кальянам (US),  
Мундкур Лакшми (IN)

(74) Представитель:

Харин А.В., Буре Н.Н., Стойко Г.В.  
(RU)

---

(57) Настоящее изобретение относится к синергетической композиции, содержащей 3-О-этиласкорбиновую кислоту и тетрагидрокуркуминоиды, для применения в качестве средства для осветления кожи. Изобретение также относится к способу ингибирования биосинтеза меланина и активности тирозиназы в клетках кожи млекопитающего с применением композиции, содержащей 3-О-этиласкорбиновую кислоту и тетрагидрокуркуминоиды.

---

**202092219**  
**A1**

**202092219**

**A1**

## КОМПОЗИЦИИ ДЛЯ УХОДА ЗА КОЖЕЙ И ИХ ПРИМЕНЕНИЕ

### ПЕРЕКРЕСТНАЯ ССЫЛКА НА РОДСТВЕННЫЕ ЗАЯВКИ

Данная заявка представляет собой заявку PCT, испрашивающую приоритет на основании предварительной заявки на патент Индии IN 201841012637, поданной 3 апреля 2018 г.

### ОБЛАСТЬ ТЕХНИКИ

Настоящее изобретение относится к новым композициям для ухода за кожей. Более конкретно, изобретение относится к композициям для осветления кожи, содержащим алкиласкорбиновую кислоту.

### УРОВЕНЬ ТЕХНИКИ

#### Описание уровня техники

[001] Гиперпигментация – это состояние, при котором участки кожи темнеют из-за чрезмерной выработки меланина. Она может быть вызвана множеством причин, включая возраст, кожные заболевания, такие как угревая сыпь, травмы кожи, хирургические операции и т. д. Возрастные пятна и гиперпигментация также возникают из-за чрезмерного воздействия вредного солнечного излучения УФ-А, УФ-В. Оно вызывает чрезмерную выработку меланина, который действует как щит от вредного излучения, что приводит к появлению загара и пигментации.

[002] Большинство методов лечения включают применение кремов, лосьонов, содержащих активные вещества, ингибирующие выработку меланина. Кремы, содержащие гидрохиноны и кортизон, широко используются в качестве средств для осветления кожи. Алкиласкорбиновая кислота в настоящее время используется в большинстве косметических препаратов из-за ее более высокой стабильности и антиоксидантных свойств. Она также известна как средство для осветления кожи. В перечисленных ниже документах уровня техники раскрыто применение алкиласкорбиновой кислоты, в частности, этиласкорбиновой кислоты, в качестве средства для ухода за кожей:

1. В патенте США № 6861050 раскрыта композиция, содержащая ингибитор полимеризации биологического дигидроксииндольного соединения и 3-О-этиласкорбиновую кислоту, для предотвращения потемнения кожи или ингибирования меланизации, вызванной облучением.

2. В заявке на патент США № 20120189564 раскрыты композиции, содержащие экстракт портулака и производное витамина С, выбранное из аскорбилглюкозида (ASG), аскорбилфосфата магния и этиласкорбиновой кислоты, для ингибирования образования меланина.
3. В WO/2016/163023 раскрыта композиция, содержащая 45-49 мас.% этоксилигликоля, 21-25 мас.% пропиленгликоля, 13-17 мас.% аскорбиновой кислоты, 3-7 мас.% 3-О-этиласкорбиновой кислоты, для отбеливания кожи.

**[003]** Из вышеупомянутых документов уровня техники очевидно, что этиласкорбиновая кислота широко используется в сочетании с другими ингредиентами для ингибирования меланина и эффекта отбеливания кожи. Однако большинство ингредиентов, используемых вместе с 3-О-этиласкорбиновой кислотой, имеют синтетическое происхождение и вызывают побочные действия, такие как кожные сыпи и раздражение. Необходима безопасная, эффективная и натуральная альтернатива, которую можно применять в сочетании с 3-О-этиласкорбиновой кислотой для ингибирования меланина и для применения в качестве средства для осветления кожи.

**[004]** Сообщалось, что растительные экстракты обладают эффектом осветления кожи (Zhu and Gao, The Use of Botanical Extracts as Topical Skin-Lightening Agents for the Improvement of Skin Pigmentation Disorders, Journal of Investigative Dermatology Symposium Proceedings 2008; 13:20–24, doi:10.1038/jidsymp.2008.8). В японском патенте JPH0782134 также раскрыта косметическая композиция для предотвращения повреждения из-за ультрафиолетовых лучей, содержащая L-3-О-этиласкорбиновую кислоту и натуральную молекулу койевой кислоты. Тем не менее, по-прежнему необходим безопасный и эффективный альтернативный натуральный ингредиент для применения в качестве средства для осветления кожи вместе с этиласкорбиновой кислотой. Куркуминоиды из *Curcuma longa*, как известно, подавляют фермент тирозиназу и выработку меланина (Tu et al., Curcumin inhibits melanogenesis in human melanocytes, Phytother Res. 2012; 26(2):174-9). Эффект осветления кожи другого ингредиента из *Curcuma longa*, тетрагидрокуркуминоидов, в сочетании с этиласкорбиновой кислотой еще не оценен. Настоящее изобретение относится к синергетической композиции, содержащей этиласкорбиновую кислоту и тетрагидрокуркуминоиды, для ингибирования выработки меланина и ингибирования тирозиназы.

**[005]** Основная задача изобретения заключается в создании композиции, содержащей алкиласкорбиновую кислоту и тетрагидрокуркуминоиды, для применения в качестве средства для осветления кожи.

[006] Еще одной задачей изобретения является создание способа ингибирования выработки меланина с применением композиции, содержащей алкиласкорбиновую кислоту и тетрагидрокуркуминоиды.

[007] Еще одной задачей изобретения является создание способа ингибирования активности фермента тирозиназы с применением композиции, содержащей алкиласкорбиновую кислоту и тетрагидрокуркуминоиды.

[008] Настоящее изобретение решает вышеуказанные задачи и обеспечивает дополнительные связанные с этим преимущества.

### **КРАТКОЕ ОПИСАНИЕ ИЗОБРЕТЕНИЯ**

[009] Настоящее изобретение относится к синергетической композиции, содержащей 3-О-этиласкорбиновую кислоту и тетрагидрокуркуминоиды, для применения в качестве средства для осветления кожи.

[0010] Изобретение также относится к способу ингибирования биосинтеза меланина в клетках кожи млекопитающего с применением композиции, содержащей 3-О-этиласкорбиновую кислоту и тетрагидрокуркуминоиды.

[0011] Кроме того, также раскрыт способ ингибирования активности фермента тирозиназы в клетках кожи млекопитающего с применением композиции, содержащей 3-О-этиласкорбиновую кислоту и тетрагидрокуркуминоиды.

[0012] Другие признаки и преимущества настоящего изобретения будут ясны из нижеследующего более подробного описания изобретения, иллюстрирующего, в качестве примера, принцип изобретения.

### **ОПИСАНИЕ ПРЕДПОЧТИТЕЛЬНЫХ ВАРИАНТОВ ОСУЩЕСТВЛЕНИЯ**

[0013] В предпочтительном варианте осуществления изобретение относится к косметической композиции, содержащей 3-О-алкиласкорбиновую кислоту и тетрагидрокуркуминоиды. В связанном аспекте 3-О-алкиласкорбиновая кислота предпочтительно представляет собой 3-О-этиласкорбиновую кислоту. В еще одном связанном аспекте тетрагидрокуркуминоиды состоят из тетрагидрокуркумина, тетрагидродеметоксикуркумина, тетрагидробисдеметоксикуркумина. В еще одном связанном аспекте тетрагидрокуркуминоиды состоят из тетрагидрокуркумина и тетрагидродеметоксикуркумина. В еще одном связанном аспекте тетрагидрокуркуминоиды предпочтительно более чем на 95 мас.% состоят из тетрагидрокуркумина. В еще одном связанном аспекте 3-О-алкиласкорбиновая кислота и

тетрагидрокуркуминоиды содержатся в концентрациях 1-4 мас.% и 0,1-2 мас.%, соответственно. В еще одном связанном аспекте композиция дополнительно включает разбавители, комплексообразующие агенты, загустители, увлажнители, эмульгаторы, смягчительные средства, антиоксиданты, солюбилизаторы и другие космецевтически приемлемые вспомогательные вещества. В еще одном связанном аспекте композицию применяют в качестве средства для осветления кожи путем ингибирования меланогенеза и активности тирозиназы.

**[0014]** В еще одном предпочтительном варианте осуществления изобретение относится к способу ингибирования меланогенеза в клетках кожи млекопитающего, включающему стадию приведения клеток кожи в контакт с композицией, содержащей 3-О-алкиласкорбиновую кислоту и тетрагидрокуркуминоиды, чтобы вызвать снижение синтеза меланина. В связанном аспекте 3-О-алкиласкорбиновая кислота предпочтительно представляет собой 3-О-этиласкорбиновую кислоту. В еще одном связанном аспекте тетрагидрокуркуминоиды состоят из тетрагидрокуркумина, тетрагидродеметоксикуркумина, тетрагидробисдеметоксикуркумина. В еще одном связанном аспекте тетрагидрокуркуминоиды состоят из тетрагидрокуркумина и тетрагидродеметоксикуркумина. В еще одном связанном аспекте тетрагидрокуркуминоиды предпочтительно более чем на 95 мас.% состоят из тетрагидрокуркумина. В еще одном связанном аспекте 3-О-алкиласкорбиновая кислота и тетрагидрокуркуминоиды содержатся в концентрациях 0,5-500 мкг/мл и 3-100 мкг/мл, соответственно. В еще одном связанном аспекте 3-О-алкиласкорбиновая кислота и тетрагидрокуркуминоиды содержатся в композиции в дозах 1-4 мас.% и 0,1-2 мас.%, соответственно. В еще одном связанном аспекте композиция дополнительно включает разбавители, комплексообразующие агенты, загустители, увлажнители, эмульгаторы, смягчительные средства, антиоксиданты, солюбилизаторы и другие космецевтически приемлемые вспомогательные вещества. В еще одном связанном аспекте клетки кожи млекопитающего предпочтительно представляют собой меланоциты. В еще одном связанном аспекте млекопитающее представляет собой человека.

**[0015]** В еще одном предпочтительном варианте осуществления изобретение относится к способу ингибирования активности тирозиназы в клетках кожи млекопитающего, включающему стадию приведения клеток кожи в контакт с композицией, содержащей 3-О-алкиласкорбиновую кислоту и тетрагидрокуркуминоиды, чтобы вызвать ингибирование активности тирозиназы. В связанном аспекте 3-О-алкиласкорбиновая кислота предпочтительно представляет собой 3-О-этиласкорбиновую кислоту. В еще одном

связанном аспекте тетрагидрокуркуминоиды состоят из тетрагидрокуркумина, тетрагидродеметоксикуркумина, тетрагидробисдеметоксикуркумина. В еще одном связанном аспекте тетрагидрокуркуминоиды состоят из тетрагидрокуркумина и тетрагидродеметоксикуркумина. В еще одном связанном аспекте тетрагидрокуркуминоиды предпочтительно более чем на 95 мас.% состоят из тетрагидрокуркумина. В еще одном связанном аспекте 3-О-алкиласкорбиновая кислота и тетрагидрокуркуминоиды содержатся в концентрациях 0,5-500 мкг/мл и 3-100 мкг/мл, соответственно. В еще одном связанном аспекте 3-О-алкиласкорбиновая кислота и тетрагидрокуркуминоиды содержатся в композиции в дозах 1-4 мас.% и 0,1-2 мас.%, соответственно. В еще одном связанном аспекте композиция дополнительно включает разбавители, комплексообразующие агенты, загустители, увлажнители, эмульгаторы, смягчительные средства, антиоксиданты, солюбилизаторы и другие космецевтически приемлемые вспомогательные вещества. В еще одном связанном аспекте клетки кожи млекопитающего предпочтительно представляют собой меланоциты. В еще одном связанном аспекте млекопитающее представляет собой человека.

**[0016]** В еще одном связанном аспекте изобретение относится к композиции, содержащей 3-О-алкиласкорбиновую кислоту и тетрагидрокуркуминоиды, для применения для ингибирования синтеза меланина. В связанном аспекте 3-О-алкиласкорбиновая кислота предпочтительно представляет собой 3-О-этиласкорбиновую кислоту. В еще одном связанном аспекте тетрагидрокуркуминоиды состоят из тетрагидрокуркумина, тетрагидродеметоксикуркумина, тетрагидробисдеметоксикуркумина. В еще одном связанном аспекте тетрагидрокуркуминоиды состоят из тетрагидрокуркумина и тетрагидродеметоксикуркумина. В еще одном связанном аспекте тетрагидрокуркуминоиды предпочтительно более чем на 95 мас.% состоят из тетрагидрокуркумина. В еще одном связанном аспекте 3-О-алкиласкорбиновая кислота и тетрагидрокуркуминоиды содержатся в концентрациях 0,5-500 мкг/мл и 3-100 мкг/мл, соответственно. В еще одном связанном аспекте 3-О-алкиласкорбиновая кислота и тетрагидрокуркуминоиды содержатся в композиции в дозах 1-4 мас.% и 0,1-2 мас.%, соответственно. В еще одном связанном аспекте композиция дополнительно включает разбавители, комплексообразующие агенты, загустители, увлажнители, эмульгаторы, смягчительные средства, антиоксиданты, солюбилизаторы и другие космецевтически приемлемые вспомогательные вещества. В еще одном связанном аспекте клетки кожи млекопитающего предпочтительно представляют собой меланоциты. В еще одном связанном аспекте млекопитающее представляет собой человека.

**[0017]** В еще одном предпочтительном варианте осуществления изобретение относится к композиции, содержащей 3-О-алкиласкорбиновую кислоту и тетрагидрокуркуминоиды, для применения для ингибирования активности тирозиназы в клетках кожи млекопитающего. В связанном аспекте 3-О-алкиласкорбиновая кислота предпочтительно представляет собой 3-О-этиласкорбиновую кислоту. В еще одном связанном аспекте тетрагидрокуркуминоиды состоят из тетрагидрокуркумина, тетрагидродеметоксикуркумина, тетрагидробисдеметоксикуркумина. В еще одном связанном аспекте тетрагидрокуркуминоиды состоят из тетрагидрокуркумина и тетрагидродеметоксикуркумина. В еще одном связанном аспекте тетрагидрокуркуминоиды предпочтительно более чем на 95 мас.% состоят из тетрагидрокуркумина. В еще одном связанном аспекте 3-О-алкиласкорбиновая кислота и тетрагидрокуркуминоиды содержатся в концентрациях 0,5-500 мкг/мл и 3-100 мкг/мл, соответственно. В еще одном связанном аспекте 3-О-алкиласкорбиновая кислота и тетрагидрокуркуминоиды содержатся в композиции в дозах 1-4 мас.% и 0,1-2 мас.%, соответственно. В еще одном связанном аспекте композиция дополнительно включает разбавители, комплексообразующие агенты, загустители, увлажнители, эмульгаторы, смягчительные средства, антиоксиданты, солюбилизаторы и другие космецевтически приемлемые вспомогательные вещества. В еще одном связанном аспекте клетки кожи млекопитающего предпочтительно представляют собой меланоциты. В еще одном связанном аспекте млекопитающее представляет собой человека.

**[0018]** В еще одном предпочтительном варианте осуществления изобретение относится к композиции, содержащей 3-О-алкиласкорбиновую кислоту и тетрагидрокуркуминоиды, для применения в качестве средства для осветления кожи. В связанном аспекте 3-О-алкиласкорбиновая кислота предпочтительно представляет собой 3-О-этиласкорбиновую кислоту. В еще одном связанном аспекте тетрагидрокуркуминоиды состоят из тетрагидрокуркумина, тетрагидродеметоксикуркумина, тетрагидробисдеметоксикуркумина. В еще одном связанном аспекте тетрагидрокуркуминоиды состоят из тетрагидрокуркумина и тетрагидродеметоксикуркумина. В еще одном связанном аспекте тетрагидрокуркуминоиды предпочтительно более чем на 95 мас.% состоят из тетрагидрокуркумина. В еще одном связанном аспекте 3-О-алкиласкорбиновая кислота и тетрагидрокуркуминоиды содержатся в концентрациях 0,5-500 мкг/мл и 3-100 мкг/мл, соответственно. В еще одном связанном аспекте 3-О-алкиласкорбиновая кислота и тетрагидрокуркуминоиды содержатся в композиции в дозах 1-4 мас.% и 0,1-2 мас.%, соответственно. В еще одном связанном аспекте композиция дополнительно включает

разбавители, комплексообразующие агенты, загустители, увлажнители, эмульгаторы, смягчительные средства, антиоксиданты, солюбилизаторы и другие космецевтически приемлемые вспомогательные вещества.

**[0019]** Конкретные иллюстративные примеры, раскрывающие наиболее предпочтительные варианты осуществления, приведены ниже в настоящем документе.

## **[0020] Примеры**

### **[0021] Пример 1. Ингибирование тирозиназы**

#### **[0022] Вводная информация**

**[0023]** Цвет кожи человека определяется синтезом и распределением пигмента меланина. Синтез меланина катализируется тирозиназой – скорость-лимитирующим медьсодержащим ферментом (Sigma, монофенолоксигеназа, EC1.14.18.1). Для предотвращения пигментации кожи применялись соединения, ингибирующие образование пигмента меланина путем ингибирования активности тирозиназы. Тирозиназа катализирует три разные реакции в пути биосинтеза меланина, которые включают гидроксирование тирозина до 3,4-дигидроксифенилаланина (ДОФА), окисление ДОФА до ДОФА-хинона; и окисление 5,6-дигидроксииндола (ДГИ) до индолхинона. Первая из этих реакций в синтезе меланина является наиболее биологически важной, поскольку остальная часть последовательности реакций может протекать спонтанно при физиологических условиях.

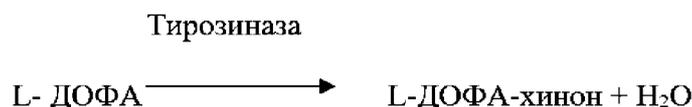
#### **[0024] Принцип:**

**[0025]** Тирозиназа катализирует три разные реакции в пути биосинтеза меланина. Гидроксирование тирозина до 3,4-дигидроксифенилаланина (ДОФА). Окисление ДОФА до ДОФА-хинона; и окисление 5,6-дигидроксииндола (ДГИ) до индолхинона. Первая из этих реакций в синтезе меланина является наиболее биологически важной, поскольку остальная часть последовательности реакций может протекать спонтанно при физиологическом pH.

**[0026]** Тирозиназа воздействует на L-тирозин, образуя комплекс розового цвета, интенсивность поглощения которого измеряют при 492 нм. Активность тирозиназы в присутствии и в отсутствие ингибитора анализируют спектрофотометрически при 492 нм с использованием считывающего устройства для микропланшетов.

#### Тирозиназа



**[0027] Методика:****[0028] Материалы**

Продукт	Источник	Хранение
Грибная тирозиназа	Sigma	-20 °C
Двунариевая соль L-тирозина	Sigma	2-8 °C
Гидрофосфат натрия	Merck	комнатная температура
Дигидрофосфат натрия	Fischer sci	комнатная температура
Диметилсульфоксид (ДМСО)	Sigma	комнатная температура

**[0029] Приготовление реагентов****Фосфатный буфер, 0,25 мМ (рН 6,5):**

Натрий-фосфатный буфер получали растворением по отдельности 1,4196 г гидрофосфата натрия (А) и 1,5601 г дегидрата дигидрофосфата натрия (В) в 100 мл бидистиллированной воды. Смешивали 68,5 мл раствора А и 31,5 мл раствора В, доводили объем до 400 мл и доводили рН до 6,5 с помощью 0,1 н. НСl или 0,1 н. NaOH.

**[0030] Фермент грибная тирозиназа:**

Фермент грибную тирозиназу готовили растворением всего содержимого в предварительно охлажденном 0,05 мМ ферментном буфере с рН 6,5 с получением 5000 Ед/мл. Легкое встряхивание в течение пяти минут способствует растворению фермента. Аликвоты исходного раствора распределяли по флаконам по 100 мкл в каждом и выдерживали при -80 °C до использования в течение не менее 2 месяцев. Следует избегать многократных циклов замораживания-размораживания фермента.

**[0031] Натриевая соль L-тирозина (2,53 мМ):**

Исходный раствор 2,50 мМ двунариевой соли L-тирозина (Sigma) готовили в 1,5 мМ фосфатном буфере (рН 6,5) путем растворения 2,845 мг/5 мл.

**[0032] Подготовка образцов:**

Образцы растворяли в ДМСО и проводили дальнейшие разведения в буфере.

**[0033] Методика анализа**

Анализ проводили в 96-луночном прозрачном микротитрационном планшете. Различные концентрации композиции, содержащей этиласкорбиновую кислоту и тетрагидрокуркуминоиды, предварительно инкубировали с 10 мкл 6000 Ед/мл исходного раствора грибной тирозиназы (конечная концентрация 6 Ед/лунку) при 37 °С в течение 10 минут. Реакцию инициировали добавлением 2,5 мМ динатриевой соли L-тирозина, и сразу же считывали поглощение ежеминутно в течение 15 минут с использованием считывающего устройства для микропланшетов при 492 нм. Для каждого образца готовили контрольную холостую лунку без фермента. Ферментативная реакция только с носителем служила контролем активности фермента. Койевую кислоту использовали в качестве положительного контроля.

#### [0034] Расчет:

Результаты выражали в виде значений IC<sub>50</sub> с использованием программного обеспечения Graphpad prism. Процент ингибирования меланина рассчитывали следующим образом:

$$\% \text{ Ингибирования} = \frac{C - T}{C} \times 100$$

Где С - поглощение в контроле, а Т - поглощение в исследуемом образце

#### [0035] Результаты

Результаты анализа ингибирования тирозиназы сведены в таблицу 1:

#### [0036] Таблица 1. Ингибирование активности тирозиназы этиласкорбиновой кислотой и тетрагидрокуркуминоидами

Этиласкорбиновая кислота (ЭАК)		Тетрагидрокуркуминоиды (ТГК)		Этиласкорбиновая кислота (ЭАК) + тетрагидрокуркуминоиды (ТГК)			
Концентрация (мкг/мл)	% ингибирования	Концентрация (мкг/мл)	% ингибирования	Концентрация (мкг/мл)		% ингибирования	Повышение активности
				ЭАК	ТГК		
500	28,266	90	34,08	500,0	90	76,14	18,12
250	11,558	45	22,56	250,0	45	58,24	41,42
125	Ноль	22,5	16,8	125,0	22,5	37,78	55,53
62,5	Ноль	11,25	13,92	62,5	11,25	21,59	35,53

[0037] Результаты показали, что комбинация тетрагидрокуркуминоидов и этиласкорбиновой кислоты приводила к синергетическому увеличению антитирозиназной активности с максимальной активностью при приблизительно 22,5 мкг/мл и 125 мкг/мл, соответственно.

## [0038] Пример 2. Активность ингибирования меланогенеза

### [0039] Вводная информация:

Пигмент меланин вырабатывается в базальном слое эпидермиса меланоцитами, которые впоследствии переносят его в кератиноциты для распределения в верхнем слое эпидермиса кожи. Меланин определяет цвет кожи, а также играет важную роль в предотвращении повреждения кожи. В16 F1 представляют собой клетки мышинной меланомы, которые продуцируют меланин при стимуляции меланоцитстимулирующим гормоном ( $\alpha$ -МСГ) в культуре клеток *in vitro*.

[0040] **Принцип:** внутриклеточный меланин в клетках мышинной меланомы В16 F1 экстрагируют 1 н. NaOH. Полученный таким образом меланин коричневого цвета оценивают при 405 нм. Синтез меланина ингибируется в присутствии ингибитора, что приводит к снижению поглощения при 405 нм.

### [0041] Методика:

### [0042] Материалы

Реагенты	Источник	Хранение
Среда Игла в модификации Дульбекко	Gibco	4-8 °C
Натрий-фосфатный буфер	Sigma	комнатная температура
Трипсин	Sigma	-20 °C
Фетальная бычья сыворотка	Gibco	-20 °C
Гентамицин	HiMedia	-20 °C
Ледяная уксусная кислота	Fisher	комнатная температура
Диметилсульфоксид	Sigma	комнатная температура
Бикарбонат натрия	Fischer	комнатная температура
NaOH	Fischer	комнатная температура

НС1	Merck	комнатная температура
Меланоцитстимулирующий гормон	Sigma	комнатная температура

**[0043] Приготовление реагентов****[0044] Среда DMEM:**

Все действия проводились внутри бокса биологической безопасности (БББ). Содержимое одного пакета растворяли в 1 л стерильной бидистиллированной воды и добавляли 3,7 г бикарбоната натрия для получения pH 7,2-7,6. Раствор фильтровали с использованием установки мембранной фильтрации. К фильтрованной среде добавляли 40 мкг/мл гентамицина и фетальную бычью сыворотку в конечной концентрации 10%, и хранили при 4 °С.

**[0045] PBS (pH 7,2 ± 0,5):**

Одну таблетку PBS растворяли в 200 мл бидистиллированной воды с получением буферного раствора из 137 мМ NaCl, 2,7 мМ KCl и 10 мМ фосфата (pH 7,4 при 25 °С), стерилизовали в автоклаве и хранили при 4° С.

**[0046] 1 нМ МСГ:**

Исходный раствор МСГ готовили в концентрации 1 мг/мл в дистиллированной воде. МСГ в конечной концентрации 1 нМ использовали для стимуляции меланогенеза.

**[0047] Методика анализа**

Клетки мышинной меланомы В16F1 культивировали в течение 24 часов в 96-луночном микротитрационном планшете при плотности посева 5000 клеток на лунку. Клетки обрабатывали различными нецитотоксическими концентрациями образца в течение 72 часов вместе с меланинстимулирующим гормоном ( $\alpha$ -МСГ), чтобы вызвать синтез пигмента меланина. Необработанные клетки и клетки без добавления  $\alpha$ -МСГ использовали в качестве положительного и отрицательного контроля. Меланин, продуцируемый клетками, экстрагировали 1 н. NaOH и считывали поглощение при 405 нм на считывающем устройстве для микропланшетов. Ингибирующее действие образца рассчитывали на основе степени ингибирования образования меланина.

**[0048] Расчет:**

Результаты выражали в виде значений IC<sub>50</sub> с использованием программного обеспечения Graphpad prism. Процент ингибирования меланина рассчитывали следующим образом:

$$C - T$$

$$\% \text{ Ингибирования} = \frac{\quad}{C} \times 100$$

Где С – поглощение из-за меланина в необработанных клетках

Т - поглощение из-за меланина в клетках, обработанных образцом

#### [0049] Результаты

Результаты сведены в таблицу 2:

#### [0050] Таблица 2. Способность композиции этиласкорбиновой кислоты и тетрагидрокуркуминоидов ингибировать меланогенез

Этиласкорбиновая кислота (ЭАК)		Тетрагидрокуркуминоиды (ТГК)		Этиласкорбиновая кислота (ЭАК) + тетрагидрокуркуминоиды (ТГК)			
Концентрация (мкг/мл)	% ингибирования	Концентрация (мкг/мл)	% ингибирования	Концентрация (мкг/мл)		% ингибирования	Повышение активности
				ЭАК	ТГК		
1,25	Ноль	6,25	8,72	1,25	6,25	11,36	23,23944
0,625	Ноль	3,125	Ноль	0,625	3,125	11,63	100%

[0051] Комбинация тетрагидрокуркуминоидов и этиласкорбиновой кислоты приводила к синергетическому ингибированию меланогенеза. В то же время тетрагидрокуркуминоиды и этиласкорбиновая кислота не продемонстрировали какого-либо ингибирования меланогенеза при 0,625 и 3,125 мкг/мл, соответственно. Комбинация тетрагидрокуркуминоидов и этиласкорбиновой кислоты в тех же концентрациях продемонстрировала ингибирование величиной 11,63%, что является неожиданным результатом.

#### [0052] Пример 3. Препарат, содержащий этиласкорбиновую кислоту и тетрагидрокуркуминоиды

[0053] Из композиции, содержащей этиласкорбиновую кислоту и тетрагидрокуркуминоиды, готовили препарат вместе с разбавителями, комплексообразующими агентами, загустителями, увлажнителями, эмульгаторами,

мягчительными средствами, антиоксидантами, солюбилизаторами и другими косметически приемлемыми вспомогательными веществами. В таблице 3 представлен иллюстративный пример препарата, содержащего этиласкорбиновую кислоту и тетрагидрокуркуминоиды.

**[0054] Таблица 3. Препарат, содержащий этиласкорбиновую кислоту и тетрагидрокуркуминоиды**

Фаза	Ингредиенты	Функции
А	Очищенная вода	Разбавитель
	Двунариевая соль ЭДТА	Комплексообразующий агент
	Кристаллы Вiorol	Загуститель
	Глицерин	Увлажнитель
В	Olivem 1000	Эмульгатор
	DUB CO	Мягчительное средство
	GMS SE	Эмульгатор
	Цетиловый спирт	Мягчительное средство
	Масло ши	Мягчительное средство
	Imex IN3	Мягчительное средство
	Tinogard TT	Антиоксидант
	Tinogard TS	Антиоксидант
С	Tween 20	Солюбилизатор
	Тетрагидрокуркуминоиды	Осветление/отбеливание кожи
D	Очищенная вода	Разбавитель
	3-О-этиласкорбиновая кислота	Осветление/отбеливание кожи
E	Euxyl PE 9010	Консервант
	Xiameter PMX 3031	Средство для уменьшения липкости
F	Очищенная вода	Разбавитель
	Метабисульфит натрия	Антиоксидант

**[0055]** Вышеуказанный препарат является лишь примером; любой препарат, содержащий вышеуказанный активный ингредиент, предназначенный для указанной цели, будет считаться эквивалентным.

**[0056]** Вышеуказанный препарат был протестирован на предмет его способности ингибировать меланогенез и тирозиназу. Результаты сведены в таблицу 4.

**[0057] Таблица 4. Способность препарата, содержащего этиласкорбиновую кислоту и тетрагидрокуркуминоиды, ингибировать меланогенез и тирозиназу**

<b>Активность ингибирования тирозиназы</b>	
Концентрация (мкг/мл) 2% ЭАК + 0,25% ТГК	% ингибирования
1000	11,86
100	6,31
10	0,37
<b>Активность ингибирования меланогенеза</b>	
Концентрация (мкг/мл) 2% ЭАК + 0,25% ТГК	% ингибирования
100	17,45

**[0058]** Результаты показали, что препарат показал хорошую активность ингибирования тирозиназы и меланогенеза и может применяться в качестве средства для осветления кожи.

**[0059]** Другие модификации и вариации изобретения будут очевидны для специалистов в данной области техники из приведенного выше описания и руководства. Таким образом, хотя в настоящем документе были конкретно описаны только некоторые варианты осуществления изобретения, должно быть понятно, что в него может быть внесено множество модификаций, не выходящих за пределы сущности и объема изобретения.

## ФОРМУЛА ИЗОБРЕТЕНИЯ

1. Способ ингибирования меланогенеза в клетках кожи млекопитающего, включающий стадию приведения клеток кожи в контакт с композицией, содержащей 3-О-алкиласкорбиновую кислоту и тетрагидрокуркуминоиды, чтобы вызвать снижение синтеза меланина.
2. Способ по п. 1, где 3-О-алкиласкорбиновая кислота предпочтительно представляет собой 3-О-этиласкорбиновую кислоту.
3. Способ по п. 1, где тетрагидрокуркуминоиды состоят из тетрагидрокуркумина, тетрагидродеметоксикуркумина, тетрагидробисдеметоксикуркумина.
4. Способ по п. 1, где тетрагидрокуркуминоиды состоят из тетрагидрокуркумина и тетрагидродеметоксикуркумина.
5. Способ по п. 1, где тетрагидрокуркуминоиды предпочтительно более чем на 95 мас.% состоят из тетрагидрокуркумина.
6. Способ по п. 1, где 3-О-алкиласкорбиновая кислота и тетрагидрокуркуминоиды содержатся в концентрациях 0,5-500 мкг/мл и 3-100 мкг/мл, соответственно.
7. Способ по п. 1, где 3-О-алкиласкорбиновая кислота и тетрагидрокуркуминоиды содержатся в композиции в дозах 1-4 мас.% и 0,1-2 мас.%, соответственно.
8. Способ по п. 1, где композиция дополнительно включает разбавители, комплексообразующие агенты, загустители, увлажнители, эмульгаторы, смягчительные средства, антиоксиданты, солюбилизаторы и другие космецевтически приемлемые вспомогательные вещества.
9. Способ по п. 1, где клетки кожи млекопитающего предпочтительно представляют собой меланоциты.
10. Способ по п. 1, где млекопитающее представляет собой человека.
11. Способ ингибирования активности тирозиназы в клетках кожи млекопитающего, включающий стадию приведения клеток кожи в контакт с композицией, содержащей 3-О-алкиласкорбиновую кислоту и тетрагидрокуркуминоиды, чтобы вызвать ингибирование активности тирозиназы.
12. Способ по п. 11, где 3-О-алкиласкорбиновая кислота предпочтительно представляет собой 3-О-этиласкорбиновую кислоту.

13. Способ по п. 11, где тетрагидрокуркуминоиды состоят из тетрагидрокуркумина, тетрагидродеметоксикуркумина, тетрагидробисдеметоксикуркумина.
14. Способ по п. 11, где тетрагидрокуркуминоиды состоят из тетрагидрокуркумина и тетрагидродеметоксикуркумина.
15. Способ по п. 11, где тетрагидрокуркуминоиды предпочтительно более чем на 95 мас.% состоят из тетрагидрокуркумина.
16. Способ по п. 11, где 3-О-алкиласкорбиновая кислота и тетрагидрокуркуминоиды содержатся в концентрациях 0,5-500 мкг/мл и 3-100 мкг/мл, соответственно.
17. Способ по п. 11, где 3-О-алкиласкорбиновая кислота и тетрагидрокуркуминоиды содержатся в композиции в дозах 1-4 мас.% и 0,1-2 мас.%, соответственно.
18. Способ по п. 11, где композиция дополнительно включает разбавители, комплексообразующие агенты, загустители, увлажнители, эмульгаторы, смягчительные средства, антиоксиданты, солюбилизаторы и другие косметически приемлемые вспомогательные вещества.
19. Способ по п. 11, где клетки кожи млекопитающего предпочтительно представляют собой меланоциты.
20. Способ по п. 11, где млекопитающее представляет собой человека.
21. Композиция, содержащая 3-О-алкиласкорбиновую кислоту и тетрагидрокуркуминоиды, для применения для ингибирования синтеза меланина.
22. Композиция по п. 21, где 3-О-алкиласкорбиновая кислота предпочтительно представляет собой 3-О-этиласкорбиновую кислоту.
23. Композиция по п. 21, где тетрагидрокуркуминоиды состоят из тетрагидрокуркумина, тетрагидродеметоксикуркумина, тетрагидробисдеметоксикуркумина.
24. Композиция по п. 21, где тетрагидрокуркуминоиды состоят из тетрагидрокуркумина и тетрагидродеметоксикуркумина.
25. Композиция по п. 21, где тетрагидрокуркуминоиды предпочтительно более чем на 95 мас.% состоят из тетрагидрокуркумина.
26. Композиция по п. 21, где 3-О-алкиласкорбиновая кислота и тетрагидрокуркуминоиды содержатся в концентрациях 0,5-500 мкг/мл и 3-100 мкг/мл, соответственно.

27. Композиция по п. 21, где 3-О-алкиласкорбиновая кислота и тетрагидрокуркуминоиды содержатся в композиции в дозах 1-4 мас.% и 0,1-2 мас.%, соответственно.
28. Композиция по п. 21, где клетки кожи млекопитающего предпочтительно представляют собой меланоциты.
29. Композиция по п. 21, где млекопитающее представляет собой человека.
30. Композиция, содержащая 3-О-алкиласкорбиновую кислоту и тетрагидрокуркуминоиды, для применения для ингибирования активности тирозиназы в клетках кожи млекопитающего.
31. Композиция по п. 30, где 3-О-алкиласкорбиновая кислота предпочтительно представляет собой 3-О-этиласкорбиновую кислоту.
32. Композиция по п. 30, где тетрагидрокуркуминоиды состоят из тетрагидрокуркумина, тетрагидродеметоксикуркумина, тетрагидробисдеметоксикуркумина.
33. Композиция по п. 30, где тетрагидрокуркуминоиды состоят из тетрагидрокуркумина и тетрагидродеметоксикуркумина.
34. Композиция по п. 30, где тетрагидрокуркуминоиды предпочтительно более чем на 95 мас.% состоят из тетрагидрокуркумина.
35. Композиция по п. 30, где 3-О-алкиласкорбиновая кислота и тетрагидрокуркуминоиды содержатся в концентрациях 0,5-500 мкг/мл и 3-100 мкг/мл, соответственно.
36. Композиция по п. 30, где 3-О-алкиласкорбиновая кислота и тетрагидрокуркуминоиды содержатся в композиции в дозах 1-4 мас.% и 0,1-2 мас.%, соответственно.
37. Композиция по п. 30, где клетки кожи млекопитающего предпочтительно представляют собой меланоциты.
38. Композиция по п. 30, где млекопитающее представляет собой человека.
39. Композиция, содержащая 3-О-алкиласкорбиновую кислоту и тетрагидрокуркуминоиды, для применения в качестве средства для осветления кожи.

40. Композиция по п. 39, где 3-О-алкиласкорбиновая кислота предпочтительно представляет собой 3-О-этиласкорбиновую кислоту.
41. Композиция по п. 39, где тетрагидрокуркуминоиды состоят из тетрагидрокуркумина, тетрагидродеметоксикуркумина, тетрагидробисдеметоксикуркумина.
42. Композиция по п. 39, где тетрагидрокуркуминоиды состоят из тетрагидрокуркумина и тетрагидродеметоксикуркумина.
43. Композиция по п. 39, где тетрагидрокуркуминоиды предпочтительно более чем на 95 мас.% состоят из тетрагидрокуркумина. В еще одном связанном аспекте 3-О-алкиласкорбиновая кислота и тетрагидрокуркуминоиды содержатся в концентрациях 0,5-500 мкг/мл и 3-100 мкг/мл, соответственно.
44. Композиция по п. 39, где 3-О-алкиласкорбиновая кислота и тетрагидрокуркуминоиды содержатся в композиции в дозах 1-4 мас.% и 0,1-2 мас.%, соответственно.
45. Композиция по п. 39, где композиция дополнительно включает разбавители, комплексообразующие агенты, загустители, увлажнители, эмульгаторы, смягчительные средства, антиоксиданты, солюбилизаторы и другие косметически приемлемые вспомогательные вещества.