

(19)



**Евразийское
патентное
ведомство**

(21) **202092655** (13) **A1**

(12) ОПИСАНИЕ ИЗОБРЕТЕНИЯ К ЕВРАЗИЙСКОЙ ЗАЯВКЕ

(43) Дата публикации заявки
2021.02.25

(22) Дата подачи заявки
2019.05.07

(51) Int. Cl. **C07D 487/04** (2006.01)
A61K 8/49 (2006.01)
A61Q 19/02 (2006.01)
C07D 209/12 (2006.01)
A61P 17/00 (2006.01)
A61K 31/404 (2006.01)

(54) ФОТОЗАЩИТНЫЕ КОМПОЗИЦИИ, СОДЕРЖАЩИЕ ПОЛУЧЕННЫЕ ИЗ MALASSEZIA СОЕДИНЕНИЯ И/ИЛИ ИХ ХИМИЧЕСКИЕ АНАЛОГИ

(31) **62/668,007; 62/685,800; 62/686,912;
62/722,412; 62/742,657**

(32) **2018.05.07; 2018.06.15; 2018.06.19;
2018.08.24; 2018.10.08**

(33) **US**

(86) **PCT/US2019/031072**

(87) **WO 2019/217387 2019.11.14**

(71)(72) Заявитель и изобретатель:
**АЙНЦИГЕР МАЙКЛ; СИМПСОН
ЭНН МАРИ (US)**

(74) Представитель:
Медведев В.Н. (RU)

(57) Настоящее изобретение относится к соединениям, композициям и способам для модулирования пигментации кожи и лечения или предупреждения у субъекта УФ-индуцированного повреждения кожи, эритемы, старения кожи, солнечного ожога и гиперпигментации. Соединения, композиции и способы согласно настоящему изобретению, как правило, содержат соединения, полученные из *Malassezia*, включая малассезин и индирубин и/или их химические аналоги. Другие применения соединений и композиций, раскрытых в настоящем документе, включают в себя без ограничения уменьшение гиперпигментации, вызванное гиперпигментационным нарушением, индукцию апоптоза меланоцитов и модулирование активности рецептора ароматических углеводов (AhR), меланогенеза, продукции меланина, биогенеза меланосом, переноса меланосом, активности меланоцитов и концентрации меланина.

A1

202092655

202092655

A1

ОПИСАНИЕ ИЗОБРЕТЕНИЯ

2420-565938EA/011

ФОТОЗАЩИТНЫЕ КОМПОЗИЦИИ, СОДЕРЖАЩИЕ ПОЛУЧЕННЫЕ ИЗ *MALASSEZIA* СОЕДИНЕНИЯ И/ИЛИ ИХ ХИМИЧЕСКИЕ АНАЛОГИ ПЕРЕКРЕСТНАЯ ССЫЛКА НА РОДСТВЕННЫЕ ЗАЯВКИ

[0001] По настоящей заявке испрашивается приоритет по предварительной заявке на патент США № 62/656,769, поданной 12 апреля 2018 года, предварительной заявке на патент США № 62/668,007, поданной 7 мая 2018 года, предварительной заявке на патент США № 62/685,800, поданной 15 июня 2018 года, предварительной заявке на патент США № 62/686,912, поданной 19 июня 2018 года, предварительной заявке на патент США № 62/722,412, поданной 24 августа 2018 года, и предварительной заявке на патент США № 62/742,657, поданной 8 октября 2018 года. Полное содержание упомянутых выше заявок включено в настоящий документ посредством ссылки. Кроме того, полное содержание предварительной заявки на патент США №62/306,468, поданной 10 марта 2016 года, предварительной заявки на патент США 62/656,769, поданной 12 апреля 2018 года, предварительной заявки на патент США 15/455,932, поданной 10 марта 2017 года, в настоящий момент патента США № 10,131,631, и предварительной заявки на патент США 16/382,891, поданной 12 апреля 2019 года, включено в настоящий документ посредством ссылки.

ОБЛАСТЬ ТЕХНИКИ, К КОТОРОЙ ОТНОСИТСЯ ИЗОБРЕТЕНИЕ

[0002] Настоящее изобретение относится к соединениям, продуцируемым дрожжами *Malassezia* или полученным из них, а также к их химическим аналогам. Наряду с другими полезными свойствами, соединения согласно настоящему изобретению и композиции, содержащие упомянутые соединения, характеризуются фотозащитными свойствами. Также предусмотрены способы использования соединений и композиций согласно настоящему изобретению.

ПРЕДПОСЫЛКИ СОЗДАНИЯ ИЗОБРЕТЕНИЯ

[0003] Люди во всем мире используют осветляющие кожу агенты для достижения целого ряда косметических целей, включая оказание антивозрастного эффекта, коррекцию повреждений, вызванных солнечными лучами, и соответствие определенным культурным стандартам красоты. Многие коммерчески доступные осветляющие кожу продукты, будучи в разной степени эффективными, содержат вредные ингредиенты, некоторые из которых связаны с риском развития злокачественной опухоли. Поэтому, существует потребность в новых осветляющих кожу агентах и составах, которые демонстрируют более высокие уровни безопасности и/или эффективности, чем агенты, присутствующие на рынке в настоящее время.

[0004] *Malassezia* представляют собой род липофильных дрожжей, обычно обнаруживаемых в нормальной флоре кожи человека. *Malassezia* является причиной целого ряда заболеваний кожи, включая разноцветный лишай (отрубевидный лишай), себорейный дерматит и атопический дерматит.

[0005] Естественной средой обитания *M. furfur* является верхняя часть эпидермиса. Однако, воздействие ультрафиолетовым светом разрушает микроорганизм в естественной среде обитания. Поэтому, для выживания микроорганизма могут быть необходимы УФ-фильтрующие агенты. Были идентифицированы два таких УФ-фильтрующих индолы, продуцируемых микроорганизмом: пителиацитрин и пителиалактон. Пителиацитрин, впервые описанный в документе Mayser *et al.*, 2002, синтезируется *M. furfur*. Он представляет собой стабильное желтое липофильное соединение, обладающее широким спектром поглощения в УФ-А, УФ-В и УФ-С областях. Сходное соединение, полученное из рода *Paracoccus*, было выделено и запатентовано в качестве УФ-защитного агента (Zhang *et al.*, 2018).

[0006] В документе Gambichler *et al.*, 2007 был исследован УФ-защитный эффект пителиацитрина у людей с использованием методов тестирования *in vitro* и *in vivo*. Спектрофотометрию крема, содержащего пителиацитрин, и несущей среды проводили в диапазоне длин волн 290-400 нм. Для кремов с разным составом оценивали УФ-пропускание и солнцезащитный фактор («SPF»). С использованием колориметрии авторы количественно оценивали эритему и пигментацию после облучения защищенной кремом или незащищенной кожи у здоровых субъектов. Значения пропускания для УФ-В, а также УФ-А, снижались с увеличением концентраций пителиацитрина. Повышение концентрации пителиацитрина, равной 1,25, 2,5 и 5%, связывали с незначительным повышением значений SPF, равных 1,4, 1,5 и 1,7, соответственно. В тестах *in vivo* была подтверждена корректность определенного *in vitro* значения SPF для крема, содержащего 5% пителиацитрина. Таким образом, УФ-защитный эффект пителиацитрина был очень слаб, наводя на мысль, что в случае белого отрубевидного лишая пителиацитрин, по-видимому, является лишь кофактором развития гипопигментации при повреждениях после солнечного воздействия.

[0007] Дополнительные исследования УФ-фильтрующих эффектов пителиацитрина проводились на микрофлоре кожи человека (Machowinski *et al.*, 2006). Авторы обнаружили, что пителиацитрин обладает УФ-защитным эффектом в отношении *Candida albicans* и стафилококков без проявления токсичности в протестированном диапазоне. УФ-защитные свойства пителиалактона также были подтверждены в модели на дрожжах (Mayser *et al.*, 2003). По всей видимости, пителиалактон ответственен за желтую флуоресценцию разноцветного лишая при обследовании с лампой Вуда.

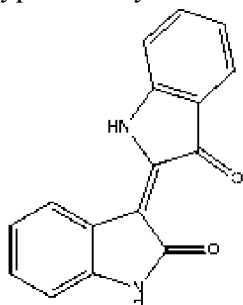
[0008] Разноцветный лишай представляет собой неконтагиозное заболевание кожи, вызванное разрастанием *Malassezia*, которое локально изменяет уровни пигментации. Дрожжи имеют два метаболических пути синтеза меланина и индольных пигментов, полученных из триптофана. Индольные пигменты включают в себя малассезин и индирубин представляют собой триптофановые метаболиты *Malassezia*, которые могут вносить вклад в депигментацию, характерную для разрастания *Malassezia*.

[0009] В изобретении, раскрытом в настоящем документе, соединения, продуцируемые дрожжами *Malassezia* или полученные из них, включая малассезин,

индирубин и их химические аналоги, используются в качестве основы композиций для безопасного и эффективного осветления кожи и потемнения кожи. Фотозащитные композиции, содержащие малассезин, индирубин и их химические аналоги, также раскрыты в настоящем документе.

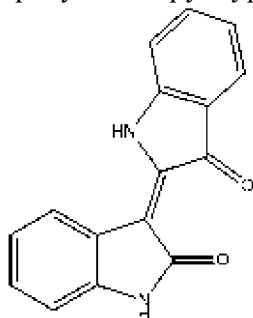
КРАТКОЕ ОПИСАНИЕ СУЩНОСТИ ИЗОБРЕТЕНИЯ

[0010] Один вариант осуществления согласно настоящему изобретению представляет собой соединение для осветления кожи. Соединение характеризуется структурой следующей формулы:



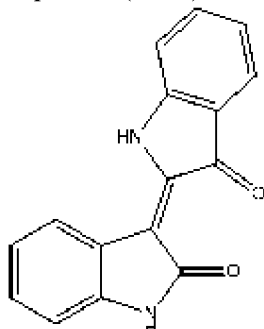
или его химическим аналогом, кристаллической формой, гидратом или фармацевтически или косметически приемлемой солью.

[0011] Другой вариант осуществления согласно настоящему изобретению представляет собой соединение для индукции апоптоза меланоцитов. Соединение характеризуется структурой следующей формулы:



или ее химическим аналогом, кристаллической формой, гидратом или фармацевтически или косметически приемлемой солью.

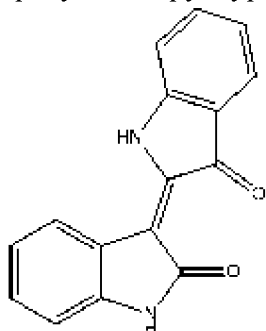
[0012] Дополнительный вариант осуществления согласно настоящему изобретению представляет собой соединение для модулирования активности рецептора ароматических углеводов (AhR). Соединение характеризуется структурой следующей формулы:



или ее химическим аналогом, кристаллической формой, гидратом или

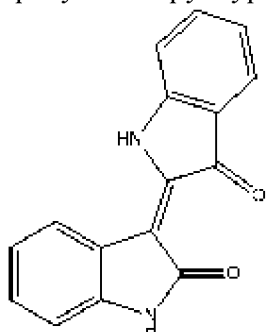
фармацевтически или косметически приемлемой солью.

[0013] Дополнительный вариант осуществления согласно настоящему изобретению представляет собой соединение для модулирования меланогенеза. Соединение характеризуется структурой следующей формулы:



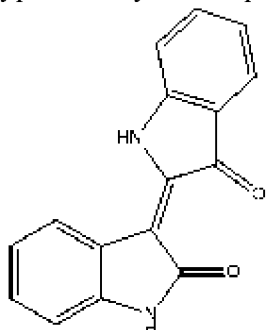
или ее химическим аналогом, кристаллической формой, гидратом или фармацевтически или косметически приемлемой солью.

[0014] Другой вариант осуществления согласно настоящему изобретению представляет собой соединение для модулирования концентрации меланина. Соединение характеризуется структурой следующей формулы:



или ее химическим аналогом, кристаллической формой, гидратом или фармацевтически или косметически приемлемой солью.

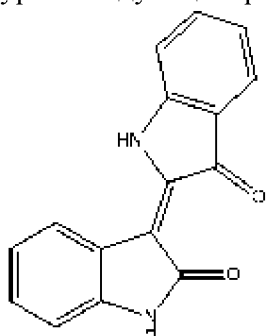
[0015] Дополнительный вариант осуществления согласно настоящему изобретению представляет собой композицию, содержащую соединение. Соединение характеризуется структурой следующей формулы:



или ее химическим аналогом, кристаллической формой, гидратом или фармацевтически или косметически приемлемой солью.

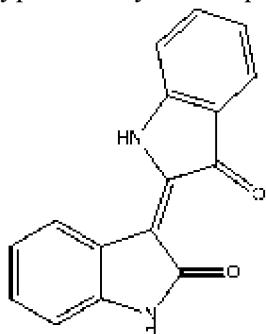
[0016] Дополнительный вариант осуществления согласно настоящему изобретению представляет собой способ осветления кожи у субъекта. Способ включает в себя

приведение субъекта в контакт с соединением, причем соединение характеризуется структурой следующей формулы:



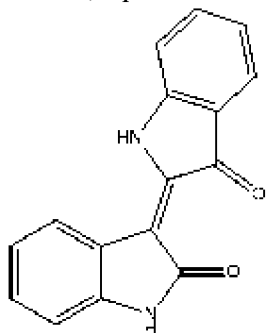
или ее химическим аналогом, кристаллической формой, гидратом или фармацевтически или косметически приемлемой солью.

[0017] Другой вариант осуществления согласно настоящему изобретению представляет собой способ индукции апоптоза меланоцитов у субъекта. Способ включает в себя приведение субъекта в контакт с соединением, причем соединение характеризуется структурой следующей формулы:



или ее химическим аналогом, кристаллической формой, гидратом или фармацевтически или косметически приемлемой солью.

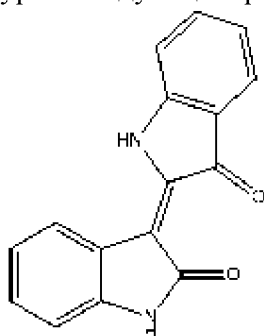
[0018] Дополнительный вариант осуществления согласно настоящему изобретению представляет собой способ модулирования активности рецептора ароматических углеводородов (AhR) у субъекта. Способ включает в себя приведение субъекта в контакт с соединением, причем соединение характеризуется структурой следующей формулы:



или ее химическим аналогом, кристаллической формой, гидратом или фармацевтически или косметически приемлемой солью.

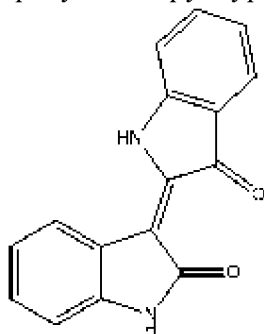
[0019] Дополнительный вариант осуществления согласно настоящему изобретению представляет собой способ модулирования меланогенеза у субъекта. Способ включает в

себя приведение субъекта в контакт с соединением, причем соединение характеризуется структурой следующей формулы:



или ее химическим аналогом, кристаллической формой, гидратом или фармацевтически или косметически приемлемой солью.

[0020] Другой вариант осуществления согласно настоящему изобретению представляет собой способ модулирования концентрации меланина у субъекта. Способ включает в себя приведение субъекта в контакт с соединением, причем соединение характеризуется структурой следующей формулы:



или ее химическим аналогом, кристаллической формой, гидратом или фармацевтически или косметически приемлемой солью.

[0021] Дополнительный вариант осуществления согласно настоящему изобретению представляет собой композицию. Композиция содержит одно или несколько из соединений, перечисленных в Таблице 1 или на Фиг. 3, или их химический аналог, кристаллическую форму, гидрат или фармацевтически или косметически приемлемую соль.

[0022] Дополнительный вариант осуществления согласно настоящему изобретению представляет собой способ осветления кожи у субъекта. Способ включает в себя приведение субъекта в контакт с одним или несколькими из соединений, перечисленных в Таблице 1 или на Фиг. 3, или их химическим аналогом, кристаллической формой, гидратом или фармацевтически или косметически приемлемой солью.

[0023] Другой вариант осуществления согласно настоящему изобретению представляет собой способ индукции апоптоза меланоцитов у субъекта. Способ включает в себя приведение субъекта в контакт с одним или несколькими из соединений, перечисленных в Таблице 1 или на Фиг. 3, или их химическим аналогом, кристаллической формой, гидратом или фармацевтически или косметически приемлемой солью.

[0024] Дополнительный вариант осуществления согласно настоящему изобретению

представляет собой способ модулирования активности рецептора ароматических углеводов (AhR) у субъекта. Способ включает в себя приведение субъекта в контакт с одним или несколькими из соединений, перечисленных в Таблице 1 или на Фиг. 3, или их химическим аналогом, кристаллической формой, гидратом или фармацевтически или косметически приемлемой солью.

[0025] Дополнительный вариант осуществления согласно настоящему изобретению представляет собой способ модулирования меланогенеза у субъекта. Способ включает в себя приведение субъекта в контакт с одним или несколькими из соединений, перечисленных в Таблице 1 или на Фиг. 3, или их химическим аналогом, кристаллической формой, гидратом или фармацевтически или косметически приемлемой солью.

[0026] Другой вариант осуществления согласно настоящему изобретению представляет собой способ модулирования концентрации меланина у субъекта. Способ включает в себя приведение субъекта в контакт с одним или несколькими из соединений, перечисленных в Таблице 1 или на Фиг. 3, или их химическим аналогом, кристаллической формой, гидратом или фармацевтически или косметически приемлемой солью.

[0027] Дополнительный вариант осуществления согласно настоящему изобретению представляет собой композицию. Композиция содержит одно или несколько из соединений, перечисленных в Таблице 1 или на Фиг. 3, или их химический аналог, кристаллическую форму, гидрат или фармацевтически или косметически приемлемую соль.

[0028] Дополнительный вариант осуществления согласно настоящему изобретению представляет собой композицию для осветления кожи. Композиция содержит одно или несколько из соединений, перечисленных в Таблице 1 или на Фиг. 3, или их химический аналог, кристаллическую форму, гидрат или фармацевтически или косметически приемлемую соль.

[0029] Другой вариант осуществления согласно настоящему изобретению представляет собой композицию для индукции апоптоза меланоцитов. Композиция содержит одно или несколько из соединений, перечисленных в Таблице 1 или на Фиг. 3, или их химический аналог, кристаллическую форму, гидрат или фармацевтически или косметически приемлемую соль.

[0030] Дополнительный вариант осуществления согласно настоящему изобретению представляет собой композицию для модулирования активности рецептора ароматических углеводов (AhR). Композиция содержит одно или несколько из соединений, перечисленных в Таблице 1 или на Фиг. 3, или их химический аналог, кристаллическую форму, гидрат или фармацевтически или косметически приемлемую соль.

[0031] Дополнительный вариант осуществления согласно настоящему изобретению представляет собой композицию для модулирования меланогенеза. Композиция содержит одно или несколько из соединений, перечисленных в Таблице 1 или на Фиг. 3, или их химический аналог, кристаллическую форму, гидрат или фармацевтически или косметически приемлемую соль.

[0032] Другой вариант осуществления согласно настоящему изобретению

представляет собой композицию для модулирования концентрации меланина. Композиция содержит одно или несколько из соединений, перечисленных в Таблице 1 или на Фиг. 3, или их химический аналог, кристаллическую форму, гидрат или фармацевтически или косметически приемлемую соль.

[0033] Дополнительный вариант осуществления согласно настоящему изобретению представляет собой способ осветления кожи у субъекта. Способ включает в себя приведение субъекта в контакт с композицией, причем данная композиция содержит одно или несколько из соединений, перечисленных в Таблице 1 или на Фиг. 3, или их химический аналог, кристаллическую форму, гидрат или фармацевтически или косметически приемлемую соль.

[0034] Дополнительный вариант осуществления согласно настоящему изобретению представляет собой способ индукции апоптоза меланоцитов у субъекта. Способ включает в себя приведение субъекта в контакт с композицией, причем данная композиция содержит одно или несколько из соединений, перечисленных в Таблице 1 или на Фиг. 3, или их химический аналог, кристаллическую форму, гидрат или фармацевтически или косметически приемлемую соль.

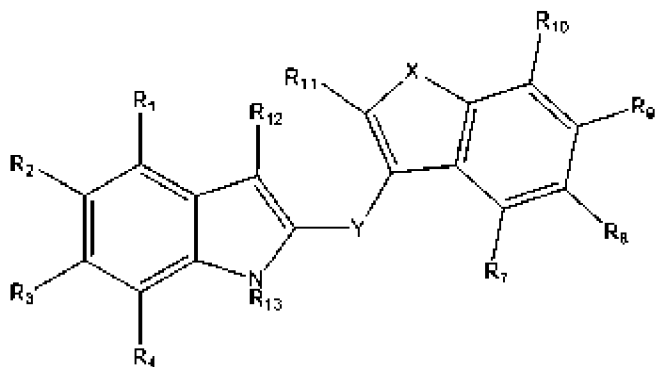
[0035] Другой вариант осуществления согласно настоящему изобретению представляет собой способ модулирования активности рецептора ароматических углеводородов (AhR) у субъекта. Способ включает в себя приведение субъекта в контакт с композицией, причем данная композиция содержит одно или несколько из соединений, перечисленных в Таблице 1 или на Фиг. 3, или их химический аналог, кристаллическую форму, гидрат или фармацевтически или косметически приемлемую соль.

[0036] Дополнительный вариант осуществления согласно настоящему изобретению представляет собой способ модулирования меланогенеза у субъекта. Способ включает в себя приведение субъекта в контакт с композицией, причем данная композиция содержит одно или несколько из соединений, перечисленных в Таблице 1 или на Фиг. 3, или их химический аналог, кристаллическую форму, гидрат или фармацевтически или косметически приемлемую соль.

[0037] Дополнительный вариант осуществления согласно настоящему изобретению представляет собой способ модулирования концентрации меланина у субъекта. Способ включает в себя приведение субъекта в контакт с композицией, причем данная композиция содержит одно или несколько из соединений, перечисленных в Таблице 1 или на Фиг. 3, или их химический аналог, кристаллическую форму, гидрат или фармацевтически или косметически приемлемую соль.

[0038] Другой вариант осуществления согласно настоящему изобретению представляет собой композицию. Композиция содержит дрожжи *Malassezia* и косметически или фармацевтически приемлемую дрожжи несущую среду, разбавитель или носитель.

[0039] Дополнительный вариант осуществления согласно настоящему изобретению представляет собой композицию. Композиция содержит соединение, характеризующееся структурой следующей формулы:



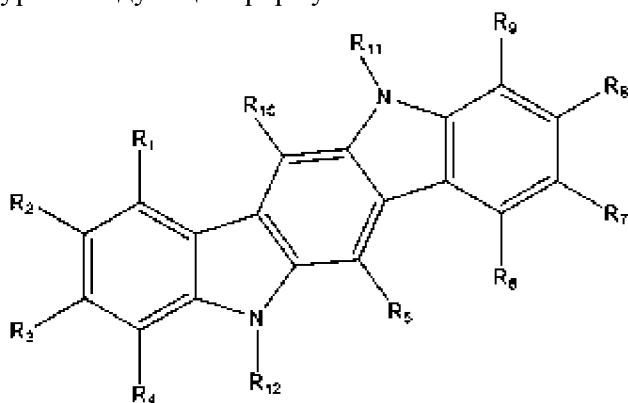
где:

X выбран из группы, состоящей из NR₁₄ и O; Y представляет собой ковалентную связь, CR₅R₆, O или NR₁₅; R₁, R₂, R₃, R₄, R₇, R₈, R₉, R₁₀ и R₁₁ независимо выбраны из группы, состоящей из водорода, галогена, CN, гидроксила, R₁₆ или OR₁₆; R₁₃, R₁₄ и R₁₅ независимо представляют собой водород или R₁₆; R₅ и R₆ независимо выбраны из группы, состоящей из водорода, гидроксила, OR₁₆, R₁₆ и C₃₋₆-циклоакила, или R₅ и R₆ объединены с формированием оксо (=O) группы или C₃₋₆-циклоакила; R₁₂ выбран из группы, состоящей из водорода, -COR^a и R₁₆; каждый R₁₆ независимо представляет собой формил, C₁₋₉-алкил, C₂₋₉-алкенил или C₂₋₉-алкинил; и R^a выбран из группы, состоящей из водорода, гидроксила и OR₁₆;

или его кристаллическую форму, гидрат или косметически или фармацевтически приемлемую соль,

и косметически или фармацевтически приемлемую несущую среду, разбавитель или носитель.

[0040] Дополнительный вариант осуществления согласно настоящему изобретению представляет собой композицию. Композиция содержит соединение, характеризующееся структурой следующей формулы:



где:

R₁, R₄, R₅, R₆, R₉ и R₁₀ независимо выбраны из группы, состоящей из водорода, гидроксила, галогена, CN, R₁₃, OR₁₃, OCOR₁₃ и -CHO; R₂ и R₃ независимо выбраны из группы, состоящей из водорода, гидроксила, галогена, CN, R₁₃, OR₁₃, OCOR₁₃ и CHO, или R₂ и R₃ объединены с формированием 5- или 6-членного гетероцикла; R₇ и R₈ независимо выбраны из группы, состоящей из водорода, гидроксила, галогена, CN, R₁₃, OR₁₃, OCOR₁₃

и СНО, или R₇ и R₈ объединены с формированием 5- или 6-членного гетероцикла; R₁₁ и R₁₂ независимо представляют собой водород или R₁₃; и каждый R₁₃ независимо представляет собой C₁-алкил, C₂-алкенил или C₂-алкинил;

или его кристаллическую форму, гидрат или косметически или фармацевтически приемлемую соль,

и косметически или фармацевтически приемлемую несущую среду, разбавитель или носитель.

[0041] Другой вариант осуществления согласно настоящему изобретению представляет собой композицию. Композиция содержит соединение, перечисленное в Таблице 1 или на Фиг. 3, или его химический аналог, кристаллическую форму, гидрат или косметически или фармацевтически приемлемую соль,

и косметически или фармацевтически приемлемую несущую среду, разбавитель или носитель.

[0042] Дополнительный вариант осуществления согласно настоящему изобретению представляет собой способ лечения или предупреждения УФ-индуцированного повреждения кожи у субъекта. Способ включает в себя приведение субъекта в контакт с любой из композиций, раскрытых в настоящем документе.

[0043] Дополнительный вариант осуществления согласно настоящему изобретению представляет собой способ лечения или предупреждения УФ-индуцированной эритемы у субъекта. Способ включает в себя приведение субъекта в контакт с любой из композиций, раскрытых в настоящем документе.

[0044] Другой вариант осуществления согласно настоящему изобретению представляет собой способ лечения или предупреждения УФ-индуцированного старения кожи у субъекта. Способ включает в себя приведение субъекта в контакт с любой из композиций, раскрытых в настоящем документе.

[0045] Дополнительный вариант осуществления согласно настоящему изобретению представляет собой способ лечения или предупреждения солнечного ожога у субъекта. Способ включает в себя приведение субъекта в контакт с любой из композиций, раскрытых в настоящем документе.

[0046] Дополнительный вариант осуществления согласно настоящему изобретению представляет собой способ лечения или предупреждения УФ-индуцированной гиперпигментации у субъекта. Способ включает в себя приведение субъекта в контакт с любой из композиций, раскрытых в настоящем документе.

[0047] Другой вариант осуществления согласно настоящему изобретению представляет собой способ осветления кожи у субъекта. Способ включает в себя приведение субъекта в контакт с любой из композиций, раскрытых в настоящем документе.

[0048] Дополнительный вариант осуществления согласно настоящему изобретению представляет собой способ индукции апоптоза меланоцитов у субъекта. Способ включает в себя приведение субъекта в контакт с любой из композиций, раскрытых в настоящем документе.

[0049] Дополнительный вариант осуществления согласно настоящему изобретению представляет собой способ модулирования активности рецептора ароматических углеводов (AhR) у субъекта. Способ включает в себя приведение субъекта в контакт с любой из композиций, раскрытых в настоящем документе.

[0050] Другой вариант осуществления согласно настоящему изобретению представляет собой способ модулирования меланогенеза у субъекта. Способ включает в себя приведение субъекта в контакт с любой из композиций, раскрытых в настоящем документе.

[0051] Дополнительный вариант осуществления согласно настоящему изобретению представляет собой способ модулирования концентрации меланина у субъекта. Способ включает в себя приведение субъекта в контакт с любой из композиций, раскрытых в настоящем документе.

КРАТКОЕ ОПИСАНИЕ ЧЕРТЕЖЕЙ

[0052] Фиг. 1-2 представляют собой таблицы, в которых представлены данные относительно средней жизнеспособности тканей и концентрации меланина, полученные в отдельных экспериментах на субстратах MelanoDerm™, обработанных различными концентрациями представленных тестируемых образцов.

[0053] На Фиг. 3 представлены соединения, продуцируемые *Malassezia*.

[0054] Фиг. 4-5 представляют собой таблицы, в которых представлены данные относительно средней жизнеспособности тканей и концентрации меланина, полученные в отдельных экспериментах на субстратах MelanoDerm™, обработанных различными концентрациями представленных тестируемых образцов/тестируемых соединений.

[0055] На Фиг. 6А-6В представлены схемы синтеза соединений АВ17590 (Фиг. 6А) и АВ17653, АВ17654, АВ17655, АВ17656, АВ17657 и АВ17658 (Фиг. 6В).

[0056] Фиг. 7 представляет собой схематическое изображение шаблона для обработки кожи для пациентов с IV типом кожи. Значения означают дозу УФ в мДж/см² для данного участка.

[0057] Фиг. 8 представляет собой таблицу со шкалой Dualight для I-VI типов кожи.

[0058] Фиг. 9 представляет собой таблицу с измерениями меланина и эритемы, полученными на сутки 8 с использованием Mexameter MX 16 после облучения на сутки 7.

[0059] Фиг. 10 представляет собой таблицу с измерениями меланина и эритемы, полученными на сутки 15 с использованием Mexameter MX 16 после облучения на сутки 14.

[0060] Фиг. 11 представляет собой таблицу со шкалой эритемы, выраженной в числовых значениях, ассоциированных с различными степенями эритемы.

[0061] Фиг. 12 представляет собой фотографию с изображением кожи субъекта спустя 24 часа после облучения различными дозами УФ в соответствии с шаблоном для обработки кожи, представленным на Фиг. 7. Минимальная эритемная доза («МЭД») составила 120 мДж/см²

УФ-В спустя 24 часа после облучения.

[0062] Фиг. 13 представляет собой фотографию с изображением участков тестирования кожи субъекта на сутки 7.

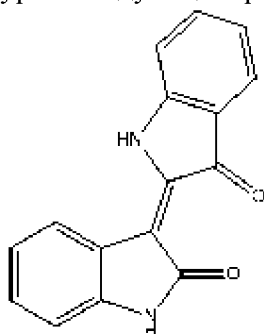
[0063] Фиг. 14 представляет собой фотографию с изображением участков тестирования кожи субъекта на сутки 8 спустя 24 часа после облучения 120 мДж/см² УФ-В.

[0064] Фиг. 15 представляет собой фотографию с изображением участков тестирования кожи субъекта на сутки 14 после дополнительной терапии малассезином в течение недели. Участки обрабатывали УФ-В в дозе 120 мДж/см².

[0065] Фиг. 16 представляет собой фотографию с изображением участков тестирования кожи субъекта на сутки 15 спустя 24 часа после облучения 120 мДж/см² УФ-В. Отмечается эритема для участка с обработкой несущей средой для суток 7 и 9. Также отмечена эритема (от слабой до умеренной) для участков с обработкой 1% малассезином на сутки 14, 10 и 8, и остаточной эритемой на сутки 1 и 3.

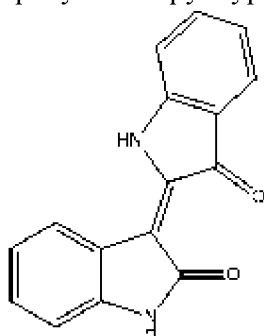
ПОДРОБНОЕ ОПИСАНИЕ ИЗОБРЕТЕНИЯ

[0066] Один вариант осуществления согласно настоящему изобретению представляет собой соединение для осветления кожи. Соединение характеризуется структурой следующей формулы:



или его химическим аналогом, кристаллической формой, гидратом или фармацевтически или косметически приемлемой солью.

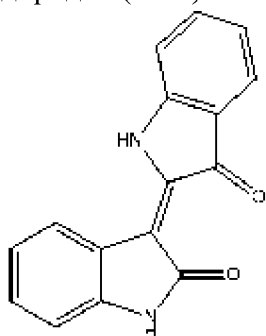
[0067] Другой вариант осуществления согласно настоящему изобретению представляет собой соединение для индукции апоптоза меланоцитов. Соединение характеризуется структурой следующей формулы:



или его химическим аналогом, кристаллической формой, гидратом или фармацевтически или косметически приемлемой солью.

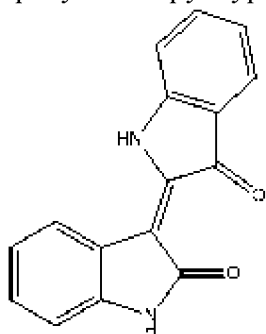
[0068] Дополнительный вариант осуществления согласно настоящему изобретению

представляет собой соединение для модулирования активности рецептора ароматических углеводов (AhR). Соединение характеризуется структурой следующей формулы:



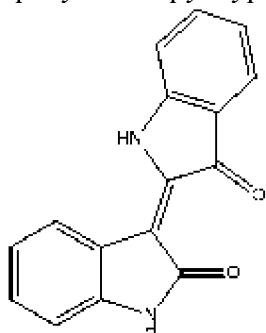
или его химическим аналогом, кристаллической формой, гидратом или фармацевтически или косметически приемлемой солью.

[0069] Дополнительный вариант осуществления согласно настоящему изобретению представляет собой соединение для модулирования меланогенеза. Соединение характеризуется структурой следующей формулы:



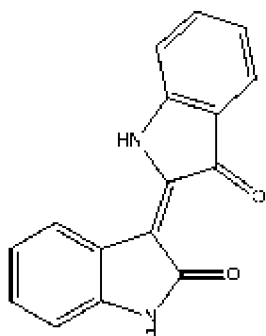
или его химическим аналогом, кристаллической формой, гидратом или фармацевтически или косметически приемлемой солью.

[0070] Другой вариант осуществления согласно настоящему изобретению представляет собой соединение для модулирования концентрации меланина. Соединение характеризуется структурой следующей формулы:



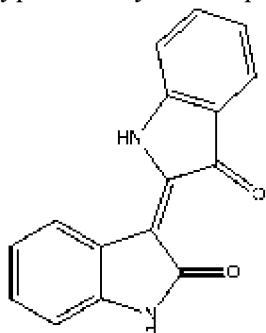
или его химическим аналогом, кристаллической формой, гидратом или фармацевтически или косметически приемлемой солью.

[0071] Дополнительный вариант осуществления согласно настоящему изобретению представляет собой композицию, содержащую соединение. Соединение характеризуется структурой следующей формулы:



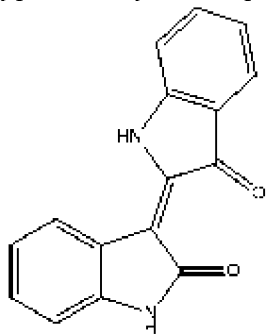
или его химическим аналогом, кристаллической формой, гидратом или фармацевтически или косметически приемлемой солью.

[0072] Дополнительный вариант осуществления согласно настоящему изобретению представляет собой способ осветления кожи у субъекта. Способ включает в себя приведение субъекта в контакт с соединением, причем соединение характеризуется структурой следующей формулы:



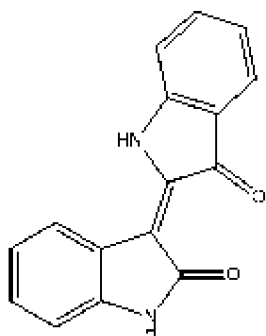
или его химическим аналогом, кристаллической формой, гидратом или фармацевтически или косметически приемлемой солью.

[0073] Другой вариант осуществления согласно настоящему изобретению представляет собой способ индукции апоптоза меланоцитов у субъекта. Способ включает в себя приведение субъекта в контакт с соединением, причем соединение характеризуется структурой следующей формулы:



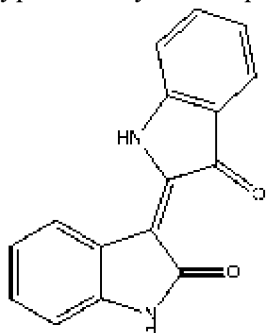
или его химическим аналогом, кристаллической формой, гидратом или фармацевтически или косметически приемлемой солью.

[0074] Дополнительный вариант осуществления согласно настоящему изобретению представляет собой способ модулирования активности рецептора ароматических углеводов (AhR) у субъекта. Способ включает в себя приведение субъекта в контакт с соединением, причем соединение характеризуется структурой следующей формулы:



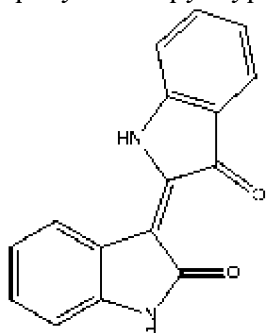
или его химическим аналогом, кристаллической формой, гидратом или фармацевтически или косметически приемлемой солью.

[0075] Дополнительный вариант осуществления согласно настоящему изобретению представляет собой способ модулирования меланогенеза у субъекта. Способ включает в себя приведение субъекта в контакт с соединением, причем соединение характеризуется структурой следующей формулы:



или его химическим аналогом, кристаллической формой, гидратом или фармацевтически или косметически приемлемой солью.

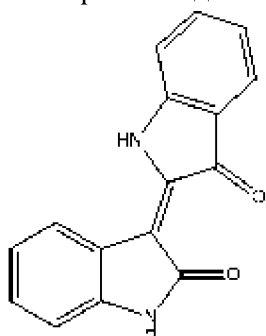
[0076] Другой вариант осуществления согласно настоящему изобретению представляет собой способ модулирования концентрации меланина у субъекта. Способ включает в себя приведение субъекта в контакт с соединением, причем соединение характеризуется структурой следующей формулы:



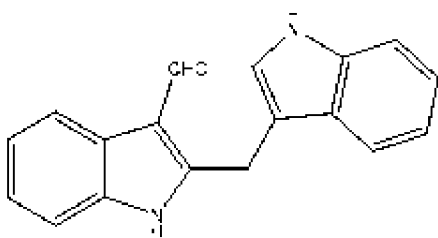
или его химическим аналогом, кристаллической формой, гидратом или фармацевтически или косметически приемлемой солью.

[0077] Дополнительный вариант осуществления согласно настоящему изобретению представляет собой композицию. Композиция содержит одно или несколько из соединений, перечисленных в Таблице 1 или на Фиг. 3, или их химический аналог, кристаллическую форму, гидрат или фармацевтически или косметически приемлемую соль.

[0078] Согласно одному аспекту данного варианта осуществления, композиция содержит первое соединение, характеризующееся структурой следующей формулы:



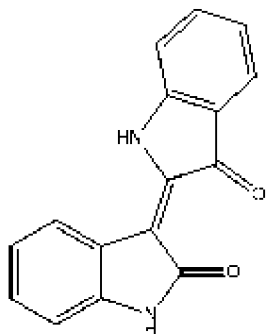
или его химический аналог, кристаллическую форму, гидрат или фармацевтически или косметически приемлемую соль; и второе соединение, характеризующееся структурой следующей формулы:



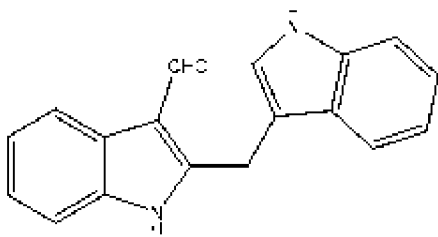
или его химический аналог, кристаллическую форму, гидрат или фармацевтически или косметически приемлемую соль.

[0079] Дополнительный вариант осуществления согласно настоящему изобретению представляет собой способ осветления кожи у субъекта. Способ включает в себя приведение субъекта в контакт с одним или несколькими из соединений, перечисленных в Таблице 1 или на Фиг. 3, или их химическим аналогом, кристаллической формой, гидратом или фармацевтически или косметически приемлемой солью.

[0080] Согласно одному аспекту данного варианта осуществления, субъекта приводят в контакт с первым соединением, характеризующимся структурой следующей формулы:



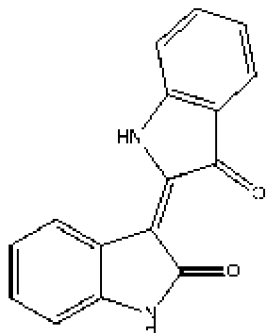
или его химическим аналогом, кристаллической формой, гидратом, или фармацевтически или косметически приемлемой солью; и вторым соединением, характеризующимся структурой следующей формулы:



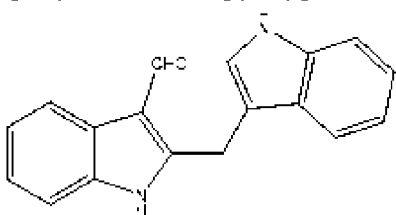
или его химическим аналогом, кристаллической формой, гидратом или фармацевтически или косметически приемлемой солью.

[0081] Другой вариант осуществления согласно настоящему изобретению представляет собой способ индукции апоптоза меланоцитов у субъекта. Способ включает в себя приведение субъекта в контакт с одним или несколькими из соединений, перечисленных в Таблице 1 или на Фиг. 3, или их химическим аналогом, кристаллической формой, гидратом или фармацевтически или косметически приемлемой солью.

[0082] Согласно одному аспекту данного варианта осуществления, субъекта приводят в контакт с первым соединением, характеризующимся структурой следующей формулы:



или его химическим аналогом, кристаллической формой, гидратом, или фармацевтически или косметически приемлемой солью; и вторым соединением, характеризующимся структурой следующей формулы:

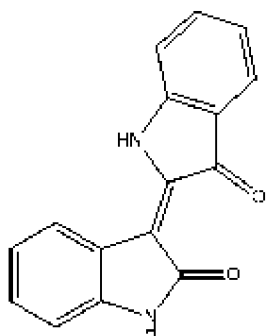


или его химическим аналогом, кристаллической формой, гидратом или фармацевтически или косметически приемлемой солью.

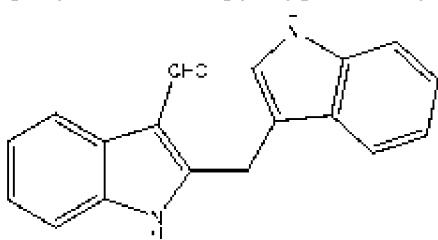
[0083] Дополнительный вариант осуществления согласно настоящему изобретению представляет собой способ модулирования активности рецептора ароматических углеводородов (AhR) у субъекта. Способ включает в себя приведение субъекта в контакт с одним или несколькими из соединений, перечисленных в Таблице 1 или на Фиг. 3, или их химическим аналогом, кристаллической формой, гидратом или фармацевтически или косметически приемлемой солью.

[0084] Согласно одному аспекту данного варианта осуществления, субъекта

приводят в контакт с первым соединением, характеризующимся структурой следующей формулы:



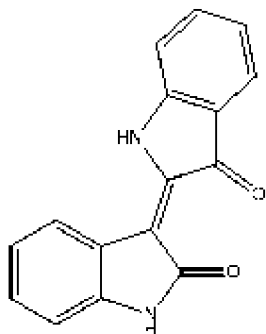
или его химическим аналогом, кристаллической формой, гидратом, или фармацевтически или косметически приемлемой солью; и вторым соединением, характеризующимся структурой следующей формулы:



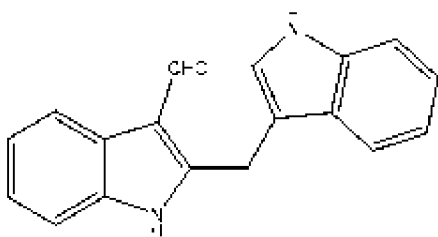
или его химическим аналогом, кристаллической формой, гидратом или фармацевтически или косметически приемлемой солью.

[0085] Дополнительный вариант осуществления согласно настоящему изобретению представляет собой способ модулирования меланогенеза у субъекта. Способ включает в себя приведение субъекта в контакт с одним или несколькими из соединений, перечисленных в Таблице 1 или на Фиг. 3, или их химическим аналогом, кристаллической формой, гидратом или фармацевтически или косметически приемлемой солью.

[0086] Согласно одному аспекту данного варианта осуществления, субъекта приводят в контакт с первым соединением, характеризующимся структурой следующей формулы:



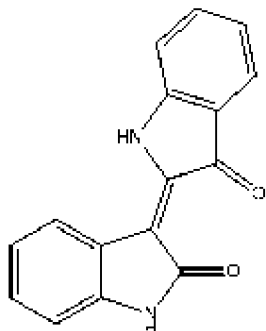
или его химическим аналогом, кристаллической формой, гидратом, или фармацевтически или косметически приемлемой солью; и вторым соединением, характеризующимся структурой следующей формулы:



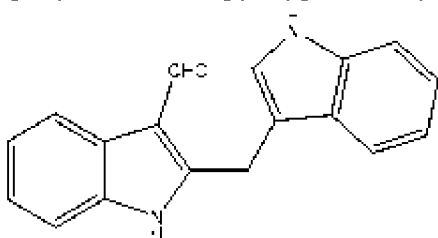
или его химическим аналогом, кристаллической формой, гидратом или фармацевтически или косметически приемлемой солью.

[0087] Другой вариант осуществления согласно настоящему изобретению представляет собой способ модулирования концентрации меланина у субъекта. Способ включает в себя приведение субъекта в контакт с одним или несколькими из соединений, перечисленных в Таблице 1 или на Фиг. 3, или их химическим аналогом, кристаллической формой, гидратом или фармацевтически или косметически приемлемой солью.

[0088] Согласно одному аспекту данного варианта осуществления, субъекта приводят в контакт с первым соединением, характеризующимся структурой следующей формулы:



или его химическим аналогом, кристаллической формой, гидратом, или фармацевтически или косметически приемлемой солью; и вторым соединением, характеризующимся структурой следующей формулы:



или его химическим аналогом, кристаллической формой, гидратом или фармацевтически или косметически приемлемой солью.

[0089] Дополнительный вариант осуществления согласно настоящему изобретению представляет собой композицию. Композиция содержит одно или несколько из соединений, перечисленных в Таблице 1 или на Фиг. 3, или их химический аналог, кристаллическую форму, гидрат или фармацевтически или косметически приемлемую соль.

[0090] Дополнительный вариант осуществления согласно настоящему изобретению представляет собой композицию для осветления кожи. Композиция содержит одно или несколько из соединений, перечисленных в Таблице 1 или на Фиг. 3, или их химический

аналог, кристаллическую форму, гидрат или фармацевтически или косметически приемлемую соль.

[0091] Другой вариант осуществления согласно настоящему изобретению представляет собой композицию для индукции апоптоза меланоцитов. Композиция содержит одно или несколько из соединений, перечисленных в Таблице 1 или на Фиг. 3, или их химический аналог, кристаллическую форму, гидрат или фармацевтически или косметически приемлемую соль.

[0092] Дополнительный вариант осуществления согласно настоящему изобретению представляет собой композицию для модулирования активности рецептора ароматических углеводов (AhR). Композиция содержит одно или несколько из соединений, перечисленных в Таблице 1 или на Фиг. 3, или их химический аналог, кристаллическую форму, гидрат или фармацевтически или косметически приемлемую соль.

[0093] Дополнительный вариант осуществления согласно настоящему изобретению представляет собой композицию для модулирования меланогенеза. Композиция содержит одно или несколько из соединений, перечисленных в Таблице 1 или на Фиг. 3, или их химический аналог, кристаллическую форму, гидрат или фармацевтически или косметически приемлемую соль.

[0094] Другой вариант осуществления согласно настоящему изобретению представляет собой композицию для модулирования концентрации меланина. Композиция содержит одно или несколько из соединений, перечисленных в Таблице 1 или на Фиг. 3, или их химический аналог, кристаллическую форму, гидрат или фармацевтически или косметически приемлемую соль.

[0095] Дополнительный вариант осуществления согласно настоящему изобретению представляет собой способ осветления кожи у субъекта. Способ включает в себя приведение субъекта в контакт с композицией, причем данная композиция содержит одно или несколько из соединений, перечисленных в Таблице 1 или на Фиг. 3, или их химический аналог, кристаллическую форму, гидрат или фармацевтически или косметически приемлемую соль.

[0096] Дополнительный вариант осуществления согласно настоящему изобретению представляет собой способ индукции апоптоза меланоцитов у субъекта. Способ включает в себя приведение субъекта в контакт с композицией, причем данная композиция содержит одно или несколько из соединений, перечисленных в Таблице 1 или на Фиг. 3, или их химический аналог, кристаллическую форму, гидрат или фармацевтически или косметически приемлемую соль.

[0097] Другой вариант осуществления согласно настоящему изобретению представляет собой способ модулирования активности рецептора ароматических углеводов (AhR) у субъекта. Способ включает в себя приведение субъекта в контакт с композицией, причем данная композиция содержит одно или несколько из соединений, перечисленных в Таблице 1 или на Фиг. 3, или их химический аналог, кристаллическую форму, гидрат или фармацевтически или косметически приемлемую соль.

[0098] Дополнительный вариант осуществления согласно настоящему изобретению представляет собой способ модулирования меланогенеза у субъекта. Способ включает в себя приведение субъекта в контакт с композицией, причем данная композиция содержит одно или несколько из соединений, перечисленных в Таблице 1 или на Фиг. 3, или их химический аналог, кристаллическую форму, гидрат или фармацевтически или косметически приемлемую соль.

[0099] Дополнительный вариант осуществления согласно настоящему изобретению представляет собой способ модулирования концентрации меланина у субъекта. Способ включает в себя приведение субъекта в контакт с композицией, причем данная композиция содержит одно или несколько соединений, перечисленных в Таблице 1 или на Фиг. 3, или их химический аналог, кристаллическую форму, гидрат или фармацевтически или косметически приемлемую соль.

[0100] Согласно предпочтительным вариантам осуществления, композиции согласно настоящему изобретению содержат соединения, перечисленные в Таблице 5.

[0101] Согласно другим предпочтительным вариантам осуществления, композиции согласно настоящему изобретению содержат соединения, перечисленные в Таблице 6.

[0102] Согласно дополнительным предпочтительным вариантам осуществления, композиции согласно настоящему изобретению содержат соединения, перечисленные в Таблице 7.

[0103] Согласно дополнительным предпочтительным вариантам осуществления, композиции согласно настоящему изобретению содержат соединения, перечисленные в Таблице 8.

[0104] Согласно другим предпочтительным вариантам осуществления, композиции согласно настоящему изобретению содержат соединения, перечисленные в Таблице 9.

[0105] Согласно дополнительным предпочтительным вариантам осуществления, способы согласно настоящему изобретению включают в себя приведение субъекта в контакт с композицией, содержащей соединения, перечисленные в Таблице 5.

[0106] Согласно дополнительным предпочтительным вариантам осуществления, способы согласно настоящему изобретению включают в себя приведение субъекта в контакт с композицией, содержащей соединения, перечисленные в Таблице 6.

[0107] Согласно другим предпочтительным вариантам осуществления, способы согласно настоящему изобретению включают в себя приведение субъекта в контакт с композицией, содержащей соединения, перечисленные в Таблице 7.

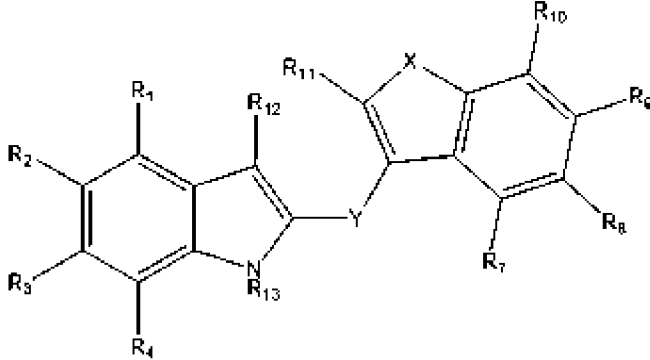
[0108] Согласно дополнительным предпочтительным вариантам осуществления, способы согласно настоящему изобретению включают в себя приведение субъекта в контакт с композицией, содержащей соединения, перечисленные в Таблице 8.

[0109] Согласно дополнительным предпочтительным вариантам осуществления, способы согласно настоящему изобретению включают в себя приведение субъекта в контакт с композицией, содержащей соединения, перечисленные в Таблице 9.

[0110] Другой вариант осуществления согласно настоящему изобретению

представляет собой композицию. Композиция содержит дрожжи *Malassezia* и косметически или фармацевтически приемлемую несущую среду, разбавитель или носитель.

[0111] Дополнительный вариант осуществления согласно настоящему изобретению представляет собой композицию. Композиция содержит соединение, характеризующееся структурой следующей формулы:



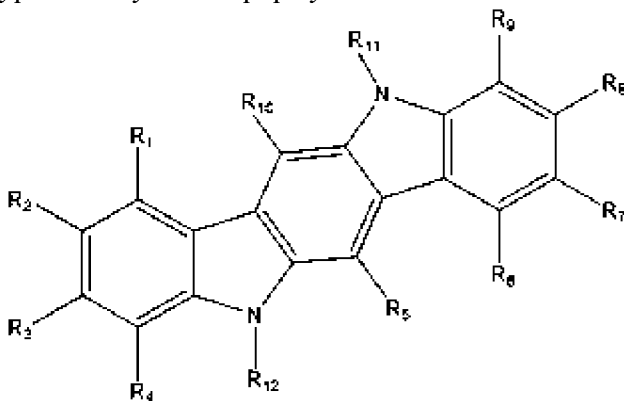
где:

X выбран из группы, состоящей из NR₁₄ и O; Y представляет собой ковалентную связь, CR₅R₆, O или NR₁₅; R₁, R₂, R₃, R₄, R₇, R₈, R₉, R₁₀ и R₁₁ независимо выбраны из группы, состоящей из водорода, галогена, CN, гидроксила, R₁₆ или OR₁₆; R₁₃, R₁₄ и R₁₅ независимо представляют собой водород или R₁₆; R₅ и R₆ независимо выбраны из группы, состоящей из водорода, гидроксила, OR₁₆, R₁₆ и C₃₋₆-циклоакила, или R₅ и R₆ объединены с формированием оксо (=O) группы или C₃₋₆-циклоакила; R₁₂ выбран из группы, состоящей из водорода, -COR^a и R₁₆; каждый R₁₆ независимо представляет собой формил, C₁₋₉-алкил, C₂₋₉-алкенил или C₂₋₉-алкинил; и R^a выбран из группы, состоящей из водорода, гидроксила и OR₁₆;

или его кристаллическую форму, гидрат или косметически или фармацевтически приемлемую соль,

и косметически или фармацевтически приемлемую несущую среду, разбавитель или носитель.

[0112] Дополнительный вариант осуществления согласно настоящему изобретению представляет собой композицию. Композиция содержит соединение, характеризующееся структурой следующей формулы:



где:

R₁, R₄, R₅, R₆, R₉ и R₁₀ независимо выбраны из группы, состоящей из водорода, гидроксила, галогена, CN, R₁₃, OR₁₃, OCOR₁₃ и -CHO; R₂ и R₃ независимо выбраны из группы, состоящей из водорода, гидроксила, галогена, CN, R₁₃, OR₁₃, OCOR₁₃ и CHO, или R₂ и R₃ объединены с формированием 5- или 6-членного гетероциклила; R₇ и R₈ независимо выбраны из группы, состоящей из водорода, гидроксила, галогена, CN, R₁₃, OR₁₃, OCOR₁₃ и CHO, или R₇ и R₈ объединены с формированием 5- или 6-членного гетероциклила; R₁₁ и R₁₂ независимо представляют собой водород или R₁₃; и каждый R₁₃ независимо представляет собой C₁-алкил, C₂-алкенил или C₂-алкинил;

или его кристаллическую форму, гидрат или косметически или фармацевтически приемлемую соль,

и косметически или фармацевтически приемлемую несущую среду, разбавитель или носитель.

[0113] Другой вариант осуществления согласно настоящему изобретению представляет собой композицию. Композиция содержит соединение, перечисленное в Таблице 1 или на Фиг. 3, или его химический аналог, кристаллическую форму, гидрат или косметически или фармацевтически приемлемую соль,

и косметически или фармацевтически приемлемую несущую среду, разбавитель или носитель.

[0114] Согласно предпочтительным вариантам осуществления, любая из композиций согласно настоящему изобретению предупреждает УФ-индуцированную эритему у субъекта.

[0115] Согласно предпочтительным вариантам осуществления, любая из композиций согласно настоящему изобретению снижает содержание эпидермального меланина у субъекта.

[0116] Согласно предпочтительным вариантам осуществления, любая из композиций согласно настоящему изобретению вызывает фотозащитный или УФ-защитный эффект у субъекта.

[0117] Согласно предпочтительным вариантам осуществления, любая из композиций согласно настоящему изобретению фильтрует, поглощает или отражает УФ.

[0118] Согласно предпочтительным вариантам осуществления, любая из композиций согласно настоящему изобретению предупреждает гиперпигментацию и/или промотирует гипопигментацию.

[0119] Согласно предпочтительным вариантам осуществления, любая из композиций согласно настоящему изобретению представляет собой солнцезащитное средство, фотозащитное средство и/или УФ-защитное средство.

[0120] Дополнительный вариант осуществления согласно настоящему изобретению представляет собой способ лечения или предупреждения УФ-индуцированного повреждения кожи у субъекта. Способ включает в себя приведение субъекта в контакт с любой из композиций, раскрытых в настоящем документе.

[0121] Дополнительный вариант осуществления согласно настоящему изобретению

представляет собой способ лечения или предупреждения УФ-индуцированной эритемы у субъекта. Способ включает в себя приведение субъекта в контакт с любой из композиций, раскрытых в настоящем документе.

[0122] Другой вариант осуществления согласно настоящему изобретению представляет собой способ лечения или предупреждения УФ-индуцированного старения кожи у субъекта. Способ включает в себя приведение субъекта в контакт с любой из композиций, раскрытых в настоящем документе.

[0123] Дополнительный вариант осуществления согласно настоящему изобретению представляет собой способ лечения или предупреждения солнечного ожога у субъекта. Способ включает в себя приведение субъекта в контакт с любой из композиций, раскрытых в настоящем документе.

[0124] Дополнительный вариант осуществления согласно настоящему изобретению представляет собой способ лечения или предупреждения УФ-индуцированной гиперпигментации у субъекта. Способ включает в себя приведение субъекта в контакт с любой из композиций, раскрытых в настоящем документе.

[0125] Другой вариант осуществления согласно настоящему изобретению представляет собой способ осветления кожи у субъекта. Способ включает в себя приведение субъекта в контакт с любой из композиций, раскрытых в настоящем документе.

[0126] Дополнительный вариант осуществления согласно настоящему изобретению представляет собой способ индукции апоптоза меланоцитов у субъекта. Способ включает в себя приведение субъекта в контакт с любой из композиций, раскрытых в настоящем документе.

[0127] Дополнительный вариант осуществления согласно настоящему изобретению представляет собой способ модулирования активности рецептора ароматических углеводородов (AhR) у субъекта. Способ включает в себя приведение субъекта в контакт с любой из композиций, раскрытых в настоящем документе.

[0128] Другой вариант осуществления согласно настоящему изобретению представляет собой способ модулирования меланогенеза у субъекта. Способ включает в себя приведение субъекта в контакт с любой из композиций, раскрытых в настоящем документе.

[0129] Дополнительный вариант осуществления согласно настоящему изобретению представляет собой способ модулирования концентрации меланина у субъекта. Способ включает в себя приведение субъекта в контакт с любой из композиций, раскрытых в настоящем документе.

Определения

[0130] Используемый в настоящем документе термин «соединение» относится к двум или нескольким атомам, которые соединены одной или несколькими химическими связями. В настоящем изобретении, химические связи включают в себя без ограничения ковалентные связи, ионные связи, водородные связи и Ван-дер-Ваальсовы взаимодействия. Ковалентные связи согласно настоящему изобретению включают в себя одинарные,

двойные и тройные связи. Соединения согласно настоящему изобретению включают в себя без ограничения органические молекулы.

[0131] Органические соединения/молекулы согласно настоящему изобретению включают в себя неразветвленные, разветвленные и циклические углеводороды с функциональными группами или без них. Подразумевается, что термин «C_{x-y}», применяемый в сочетании с химическим фрагментом, таким как алкил, алкенил, алкинил или алкокси, включает в себя группы, которые содержат от x до y атомов углерода в цепи. Например, термин «C_{x-y}алкил» обозначает замещенные или незамещенные насыщенные углеводородные группы, включая неразветвленные алкильные и разветвленные алкильные группы, которые содержат от x до y атомов углерода в цепи, включая галогеналкильные группы, такие как трифторметил и 2,2,2-трифторэтил и т. п. Термины «C_{x-y}алкенил» и «C_{x-y}алкинил» относятся к замещенным или незамещенным ненасыщенным алифатическим группам, аналогичным по длине и возможным заменам описанным выше алкилам, но содержащим по меньшей мере одну двойную или тройную связь, соответственно.

[0132] Используемый в настоящем документе термин «алифатическая группа» обозначает группу, состоящую из атомов углерода и водорода, которая не содержит ароматических колец. Соответственно, алифатические группы включают в себя алкильные, алкенильные, алкинильные и карбоциклические группы.

[0133] Используемый в настоящем документе термин «алкил» означает ациклические неразветвленные и разветвленные углеводородные группы, например, «C₁-C₂₀алкил» относится к алкильным группам, содержащим 1-20 атомов углерода. Алкильная группа может быть неразветвленной или разветвленной. Примеры алкильных групп включают в себя без ограничения метил, этил, н-пропил, изопропил, бутил, изобутил, *втор-*бутил, *трет-*бутил, пентил, изопентил, *трет-*пентил, гексил, изогексил и т. п. Другие алкильные группы будут очевидны специалистам в данной области с учетом преимущества настоящего раскрытия. Алкильная группа может быть незамещенной или замещенной одним или несколькими заместителями, описанными в настоящем документе. Например, алкильная группа может быть замещена одним или несколькими (например, 1, 2, 3, 4, 5 или 6 независимо выбранными заместителями) из галогена, -CO₂R', -COOH, -CN, -OH, -OR', -NH₂, -NHR', -N(R')₂, -SR' или -SO₂R', где в каждом случае R' независимо представляет собой C₁-C₃алкил. Согласно вариантам осуществления, алкил является незамещенным. Согласно вариантам осуществления, алкил является замещенным (например, 1, 2, 3, 4, 5 или 6 заместителями, описанными в настоящем документе). Например, термин «гидроксиалкил» относится к алкильной группе, описанной в настоящем документе, содержащей гидроксильный (-OH) заместитель, и включает в себя такие группы, как CH₂OH.

[0134] Используемый в настоящем документе термин «алкенил» означает любые неразветвленные и разветвленные углеводородные цепи, содержащие одну или несколько ненасыщенных двойных углерод-углеродных связей, которые могут располагаться в любом стабильном положении в цепи, например, «C₂-C₂₀алкенил» относится к алкенильной

группе, содержащей 2-20 атомов углерода. Например, алкенильная группа включает в себя проп-2-енил, бут-2-енил, бут-3-енил, 2-метилпроп-2-енил, гекс-2-енил, гекс-5-енил, 2,3-диметилбут-2-енил и т. п. Согласно вариантам осуществления, алкенил содержит 1, 2 или 3 двойные углерод-углеродные связи. Согласно вариантам осуществления, алкенил содержит единственную двойную углерод-углеродную связь. Согласно вариантам осуществления, множественные двойные связи (например, 2 или 3) являются конъюгированными. Алкенильная группа может быть незамещенной или замещенной одним или несколькими заместителями, описанными в настоящем документе. Например, алкенильная группа может быть замещена одним или несколькими (например, 1, 2, 3, 4, 5 или 6 независимо выбранными заместителями) из галогена, $-\text{CO}_2\text{R}'$, $-\text{CN}$, $-\text{OH}$, $-\text{OR}'$, $-\text{NH}_2$, $-\text{NHR}'$, $-\text{N}(\text{R}')_2$, $-\text{SR}'$ или $-\text{SO}_2\text{R}'$, где в каждом случае R' независимо представляет собой C_1 - C_3 алкил. Согласно вариантам осуществления, алкенил является незамещенным. Согласно вариантам осуществления, алкенил является замещенным (например, 1, 2, 3, 4, 5 или 6 заместителями, описанными в настоящем документе).

[0135] Используемый в настоящем документе термин «алкинил» означает любую углеводородную цепь неразветвленной и разветвленной конфигурации, содержащую одну или несколько ненасыщенных тройных углерод-углеродных связей, которые располагаются в любом стабильном положении в цепи, например, « C_2 - C_{20} алкинил» относится к алкинильной группе, содержащей 2-20 атомов углерода. Примеры алкинильной группы включают в себя проп-2-инил, бут-2-инил, бут-3-инил, пент-2-инил, 3-метилпент-4-инил, гекс-2-инил, гекс-5-инил и т. п. Согласно вариантам осуществления, алкинил содержит одну тройную углерод-углеродную связь. Алкинильная группа может быть незамещенной или замещенной одним или несколькими заместителями, описанными в настоящем документе. Например, алкинильная группа может быть замещена одним или несколькими (например, 1, 2, 3, 4, 5 или 6 независимо выбранными заместителями) из галогена, $-\text{CO}_2\text{R}'$, $-\text{CN}$, $-\text{OH}$, $-\text{OR}'$, $-\text{NH}_2$, $-\text{NHR}'$, $-\text{N}(\text{R}')_2$, $-\text{SR}'$ или $-\text{SO}_2\text{R}'$, где в каждом случае R' независимо представляет собой C_1 - C_3 алкил. Согласно вариантам осуществления, алкинил является незамещенным. Согласно вариантам осуществления, алкинил является замещенным (например, 1, 2, 3, 4, 5 или 6 заместителями, описанными в настоящем документе).

[0136] Используемый в настоящем документе термин «циклоалкил» означает неароматическую насыщенную циклическую группу, например, « C_3 - C_{10} циклоалкил». Согласно вариантам осуществления, циклоалкил является моноциклическим. Согласно вариантам осуществления, циклоалкил является полициклическим (например, бициклическим или трициклическим). В полициклических циклоалкильных группах, отдельные кольца могут быть конденсированными, соединенными мостиковой связью или спироциклическими. Примеры циклоалкильной группы включают в себя циклопропил, циклобутил, циклопентил, циклогексил, норборнанил, бицикло[3.2.1]октанил, октагидропенталенил и спиро[4.5]деканил, и т. п. Термин «циклоалкил» может использоваться взаимозаменяемо с термином «карбоцикл». Циклоалкильная группа может

быть незамещенной или замещенной одним или несколькими заместителями, описанными в настоящем документе. Например, циклоалкильная группа может быть замещена одним или несколькими (например, 1, 2, 3, 4, 5 или 6 независимо выбранными заместителями) из галогена, $-\text{CO}_2\text{R}'$, $-\text{CN}$, $-\text{OH}$, $-\text{OR}'$, $-\text{NH}_2$, $-\text{NHR}'$, $-\text{N}(\text{R}')_2$, $-\text{SR}'$ или $-\text{SO}_2\text{R}'$, где в каждом случае R' независимо представляет собой C_1 - C_3 алкил. Согласно вариантам осуществления, циклоаклил является незамещенным. Согласно вариантам осуществления, циклоаклил является замещенным (например, 1, 2, 3, 4, 5 или 6 заместителями, описанными в настоящем документе).

[0137] Используемый в настоящем документе термин «галоген» означает фтор, хлор, бром или йод.

[0138] В контексте настоящего документа «ароматическое соединение», «ароматическая группа» или соединение, содержащее «ароматическое кольцо», представляет собой арильное или гетероарильное соединение. Используемый в настоящем документе термин «арил» включает в себя замещенные и незамещенные однокольцевые ароматические группы, в которых каждый атом кольца представляет собой углерод. Предпочтительно, кольцо представляет собой 3-8-членное кольцо, более предпочтительно 6-членное кольцо. Термин «арил» также включает полициклические кольцевые системы, содержащие два или несколько колец, в которых два или несколько атомов углерода являются общими для двух соединенных колец, причем по меньшей мере одно из колец является ароматическим, например, другие кольца могут представлять собой циклоалкилы, циклоалкенилы, циклоалкинилы, арилы, гетероарилы и/или гетероциклилы. Арильные группы включают в себя бензол, нафталин, фенантрен, фенол, анилин и т. п. Термин «гетероарил» включает в себя замещенные или незамещенные ароматические однокольцевые структуры, предпочтительно 3-8-членные кольца, более предпочтительно 5-7-членные кольца, еще более предпочтительно 5-6-членные кольца, причем кольцевые структуры содержат по меньшей мере один гетероатом, предпочтительно от одного до четырех гетероатомов, более предпочтительно один или два гетероатома. Термин «гетероарил» также включает полициклические кольцевые системы, содержащие два или несколько колец, в которых два или несколько атомов углерода являются общими для двух соединенных колец, причем по меньшей мере одно из колец является гетероароматическим, например, другие кольца могут представлять собой циклоалкилы, циклоалкенилы, циклоалкинилы, арилы, гетероарилы и/или гетероциклилы. Гетероарильные группы включают в себя, например, пиррол, фуран, тиофен, индол, имидазол, оксазол, тиазол, пиразол, пиридин, пиразин, пиридазин и пиримидин и т. п. Предпочтительно, определенные соединения согласно настоящему изобретению содержат по меньшей мере одну, предпочтительно две индольные группы, а также по меньшей мере одну альдегидную группу.

[0139] Термин «замещенный» обозначает фрагменты, содержащие по меньшей мере один заместитель, который замещает атом водорода на одном или нескольких атомах углерода каркаса. Следует понимать, что «замещение» или «замещенный» включает в себя

безоговорочное условие, что такая замена находится в соответствии с разрешенной валентностью замещенного атома и заместителя, и что замещение приводит к получению стабильного соединения, например, которое не претерпевает спонтанную трансформацию, например, посредством перегруппировки, циклизации, элиминации и т. п. Разрешенными заместителями для соответствующих органических соединений могут являться один или несколько одинаковых или разных заместителей.

[0140] Используемый в настоящем документе термин «гетероцикл» или «гетероциклическая группа» означает моноциклическую, бициклическую или трициклическую кольцевую систему, содержащую по меньшей мере один гетероатом. Гетероатомы включают в себя без ограничения кислород, азот и серу.

[0141] Моноциклическое гетероциклическое кольцо, например, состоит из 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9 или 10-членного кольца, содержащего по меньшей мере один гетероатом. Типичные примеры моноциклических гетероциклических колец включают в себя без ограничения азетидинил, азепанил, азиридинил, диазепанил, 1,3-диоксанил, 1,3-диоксоланил, 1,3-дитиоланил, 1,3-дитианил, имидазолинил, имидазолидинил, изотиазолинил, изотиазолидинил, изоксазолинил, изоксазолидинил, морфолинил, оксадиазолинил, оксадиазолидинил, оксазолинил, оксазолидинил, пиперазинил, пиперидинил, пиранил, пиразолинил, пиразолидинил, пирролинил, пирролидинил, тетрагидрофуранил, тетрагидротиенил, тиadiaзолинил, тиadiaзолидинил, тиазолинил, тиазолидинил, тиоморфолинил, 1,1-диоксидотиоморфолинил (тиоморфолинсульфон), тиопиранил и тритианил.

[0142] В качестве неограничивающего примера, бициклическое гетероциклическое кольцо представляет собой моноциклическое гетероциклическое кольцо, конденсированное с дистальным арильным кольцом, или моноциклическое гетероциклическое кольцо, конденсированное с дистальным циклоалкильным кольцом, или моноциклическое гетероциклическое кольцо, конденсированное с дистальным циклоалкенильным кольцом, или моноциклическое гетероциклическое кольцо, конденсированное с дистальным моноциклическим гетероциклическим кольцом, или моноциклическое гетероциклическое кольцо, конденсированное с дистальным моноциклическим гетероарильным кольцом. Типичные примеры бициклических гетероциклических колец включают в себя без ограничения 1,3-бензодиоксолил, 1,3-бензодитиолил, 2,3-дигидро-1,4-бензодиоксинил, 2,3-дигидро-1-бензофуранил, 2,3-дигидро-1-бензотиенил, 2,3-дигидро-1Н-индолил и 1,2,3,4-тетрагидрохинолинил.

[0143] В качестве неограничивающего примера, трициклическое гетероциклическое кольцо представляет собой бициклическое гетероциклическое кольцо, конденсированное с фенильной группой, или бициклическое гетероциклическое кольцо, конденсированное с циклоалкильной группой, или бициклическое гетероциклическое кольцо, конденсированное с циклоалкенильной группой, или бициклическое гетероциклическое кольцо, конденсированное с другим моноциклическим гетероциклическим кольцом. Типичные примеры трициклических гетероциклических колец включают в себя без

ограничения 2,3,4,4a,9,9a-гексагидро-1H-карбазолил, 5a,6,7,8,9,9a-гексагидродибензо[b, d]фуранил и 5a,6,7,8,9,9a-гексагидродибензо[b, d]тиенил.

[0144] Гетероциклы согласно настоящему изобретению могут быть замещены заместителями, в качестве неограничивающего примера независимо выбранными из алкенила, алкокси, алкоксиалкила, алкоксиалкинила, алкоксикарбонила, алкоксикарбонилалкила, алкокси-NH=C(алкил)-, алкила, алкилкарбонила, алкилкарбонилалкила, алкилкарбонилокси, алкилсульфонила, алкилтио, алкинила, арила, арилалкокси, арилалкила, арилкарбонила, арилокси, карбокси, карбоксиалкила, циано, цианоалкила, циклоалкила, карбонила, циклоалкилалкила, форма, галогена, галогеналкила, гидрокси, гидроксиалкила, гидроксициклоалкила, меркапто, нитро, оксо и фенила.

[0145] Используемый в настоящем документе термин «модулирование пигментации кожи» и его грамматические варианты, как правило, относится к эффектам осветления кожи, а также потемнения кожи, соединений и композиций согласно настоящему изобретению.

[0146] Используемый в настоящем документе термин «осветление кожи» и его грамматические варианты как правило, относится к любому объективному или субъективному уменьшению пигментации кожи. Способы осветления кожи применяют для уменьшения пигментации гиперпигментированных участков кожи, являющейся результатом возраста, воздействия солнечных лучей или гиперпигментационного нарушения. Нанесение соединений и композиций согласно настоящему изобретению, например, на кожу субъекта может уменьшать пигментацию, поэтому кожа выглядит более светлой или белой, чем до упомянутого нанесения. Пигментация кожи может быть оценена различными способами, включая без ограничения визуальную оценку с использованием, например, хроматической шкалы фон Лушана, теста фототипирования кожи по Фитцпатрику (Fitzpatrick *et al.*, 1988) и шкалы гиперпигментации Тейлора (Taylor *et al.*, 2005), а также методов спектрофотометрии в отраженном свете (Zonios *et al.*, 2001). Например, тест фототипирования кожи по Фитцпатрику различает шесть типов кожи (I-VI), и, согласно используемому в настоящем документе термину, VI тип кожи, который становится V типом или меньшим, является «осветленным». Как дополнительно обсуждается ниже, осветление кожи может являться результатом целого ряда процессов, включая без ограничения модулирование активности меланоцитов, индукцию апоптоза меланоцитов или модулирование активности рецептора ароматических углеводов (AhR), меланогенеза, биогенеза меланосом, переноса меланосом или концентрации меланина.

[0147] По аналогии, используемый в настоящем документе термин «потемнение кожи» и его грамматические варианты как правило, относится к любому объективному или субъективному усилению пигментации кожи. Способы потемнения кожи применяют для усиления пигментации гипопигментированных участков кожи, являющейся результатом гипопигментационного нарушения. Нанесение соединений и композиций согласно

настоящему изобретению, например, на кожу субъекта может усиливать пигментацию, поэтому кожа выглядит более темной, чем до упомянутого нанесения.

[0148] Определенные соединения согласно настоящему изобретению продуцируются дрожжами *Malassezia*, выделяются из них, производятся ими, или являются выделяемыми из них. Дрожжи *Malassezia* представляют собой дрожжи рода *Malassezia* и включают в себя без ограничения *Malassezia globosa*, *Malassezia restricta*, *Malassezia furfur*, *Malassezia sympodialis*, *Malassezia slooffiae*, *Malassezia obtusa*, *Malassezia pachydermatis*, *Malassezia dermatis*, *Malassezia japonica*, *Malassezia nana*, *Malassezia yamatoensis*, *Malassezia equine*, *Malassezia caprae* и *Malassezia cuniculi* (Guého, *et al.*, 1996; Gaitanis, *et al.*, 2013). Дрожжи *Malassezia* являются частью нормальной кожной микрофлоры человека и обычно не вызывают патогенных эффектов. Тем не менее, дрожжи *Malassezia* могут являться причиной целого ряда заболеваний, включая без ограничения разноцветный лишай (как форму с гиперпигментацией, так и форму с гипопигментацией), себорейный дерматит, отрубевидное шелушение, атопический дерматит, индуцированный *Malassezia* фолликулит, псориаз и сливающийся папулезный папилломатоз (Gaitanis, *et al.*, 2013).

[0149] Используемый в настоящем документе термин «химический аналог» относится к соединению, которое структурно родственно родительскому соединению и содержит различные функциональные группы или заместители. Например, родительские соединения согласно настоящему изобретению включают в себя малассезин и индирубин, и химические аналоги малассезина и индирубина содержат определенные функциональные группы и заместители, которые отличны от малассезина и индирубина, соответственно. Химические аналоги согласно настоящему изобретению могут обладать существенными преимуществами перед данным родительским соединением, включая фармакокинетический профиль, подходящий для косметического или фармацевтического применения. Согласно некоторым вариантам осуществления, химический аналог получают из родительской молекулы посредством одной или нескольких химических реакций. Согласно другим вариантам осуществления, для получения химических аналогов согласно настоящему изобретению могут быть использованы альтернативные схемы синтеза, которые не ведут свое начало от родительского соединения.

[0150] Соединение согласно настоящему изобретению продуцируется дрожжами *Malassezia*, если в ходе своего жизненного цикла дрожжи *Malassezia* синтезируют, секретируют, накапливают или иным образом производят соединение в соответствующих условиях роста. Дрожжи *Malassezia* секретируют различные соединения в зависимости от того, что добавлено в их ростовую среду (Nazzaro-Poggo, *et al.*, 1978). Настоящее изобретение включает в себя любое соединение, продуцируемое дрожжами *Malassezia* в любых условиях роста, но предпочтительные соединения включают в себя, например, малассезин, индирубин и их химические аналоги.

[0151] Соединение согласно настоящему изобретению получают их дрожжей *Malassezia*, если в любой момент времени в течение жизненного цикла дрожжей соединение находится на дрожжах или внутри них.

[0152] Малассезин является одним примером соединения согласно настоящему изобретению, продуцируемого дрожжами *Malassezia*. Малассезин, также известный как 2-(1*H*-индол-3-илметил)-1*H*-индол-3-карбальдегид, представляет собой метаболит триптофана, изначально выделенный из *Malassezia furfur*. Малассезин является известным агонистом рецептора ароматических углеводов (AhR), связанного с ростом и дифференцировкой клеток и экспрессией генов (Wille et al., 2001). Малассезин также индуцирует апоптоз в первичных меланоцитах человека (Krämer, et al., 2005). Недавно, определенные химические аналоги малассезина были синтезированы Winston-McPherson и коллегами, которые исследовали аналоги на агонистическую активность в отношении AhR (Winston-McPherson, et al., 2014).

[0153] Индирубин является другим примером соединения согласно настоящему изобретению, продуцируемого дрожжами *Malassezia*. Индирубин представляет собой метаболит, выделенный из *Malassezia furfur*. Индирубин является известным агонистом рецептора ароматических углеводов (AhR), связанного с ростом и дифференцировкой клеток и экспрессией генов.

[0154] Используемый в настоящем документе термин «меланоцит» относится к дендритной клетке эпидермиса, которая в норме синтезирует тирозиназу и пигмент меланин в меланосомах. Меланоциты согласно настоящему изобретению демонстрируют повышенную регуляцию определенных генов, включая без ограничения один или несколько из следующих генов: тирозиназы (окулокутаный альбинизм IA), ассоциированного с микрофтальмией фактора транскрипции, альфа-2-макроглобулина, тирозиназа-зависимого белка 1, семейства 16 переносчиков растворенных веществ, белка GS3955, онкогена v-kit кошачьей саркомы Харди-Цукермана-4, глазного альбинизма 1, белка Rag D, гликогенина 2, сопряженного с G-протеином рецептора семейства C, окулокутанного альбинизма II, делетированного при раке пищевода 1, мелан-A, SRY-box 10, АТФазы класса V типа 10C, матриксной металлопротеиназы 1, латентного трансформирующего фактора роста бета b, АТФ-связывающей кассеты подсемейства C, гидроксипростагландин-дегидрогеназы 15, представителя 1 трансмембранного суперсемейства 7, глутаминилпептидциклотрансферазы и других генов, выявленных Lee и коллегами (Lee, et al., 2013).

[0155] Меланоциты, подобно многим другим типам клеток, претерпевают запрограммированную гибель клеток или апоптоз. Пути апоптоза меланоцитов известны специалистам в данной области (Wang, et al., 2014) и были в общем рассмотрены Elmore (Elmore, 2007). Соединение или композиция согласно настоящему изобретению «индуцирует» апоптоз меланоцитов, например, посредством активации определенных проапоптотических путей передачи сигналов или посредством подавления определенных антиапоптотических путей передачи сигналов в меланоците. Предполагается, что соединения и композиции согласно настоящему изобретению могут самостоятельно активировать/подавлять связанный с апоптозом путь передачи сигналов путем непосредственного взаимодействия с сигнальной молекулой пути передачи сигналов или

путем опосредованного взаимодействия с молекулой через непосредственное взаимодействие с одной или несколькими промежуточными молекулами, которые обычно не принимают участия в функционировании пути передачи сигналов.

[0156] Активность меланоцитов можно модулировать целым рядом способов, предусмотренных настоящим изобретением, включая без ограничения индукцию апоптоза меланоцитов или изменение экспрессии генов меланоцитов, подвижности клеток, роста клеток, продукции меланина, биогенеза меланосом или переноса меланосом.

[0157] Используемые в настоящем документе термины «модулировать», «модулирование» и их грамматические варианты относятся к корректировке биологической активности или процесса до целевого уровня. Предполагается, что «модулирование» согласно настоящему изобретению включает в себя корректировки, которые повышают или снижают уровни биологической активности или процесса.

[0158] Используемые в настоящем документе термины «агонист», «агонистическое действие» и их грамматические варианты относятся к молекуле, которая запускает (например, инициирует или промотирует), частично или полностью усиливает, стимулирует или активизирует один или несколько видов биологической активности. Агонисты согласно настоящему изобретению могут взаимодействовать с рецептором или активировать его, инициируя тем самым физиологический или фармакологический ответ, характерный для данного рецептора. Агонисты согласно настоящему изобретению включают в себя вещества природного происхождения, а также синтетические вещества.

[0159] Используемые в настоящем документе термины «антагонист», «антагонистическое действие» и их грамматические варианты относятся к молекуле, которая частично или полностью подавляет, ингибирует или дезактивирует один или несколько видов биологической активности. Антагонисты согласно настоящему изобретению могут конкурентно связываться рецептором по тому же участку, что и агонист, но не активируют внутриклеточный ответ, инициированный активной формой рецептора. Антагонисты согласно настоящему изобретению могут ингибировать внутриклеточные ответы на действие агониста или частичного агониста.

[0160] Рецептор ароматических углеводов (AhR) согласно настоящему изобретению представляет собой любой рецептор ароматических углеводов, который существует в природе у субъекта, описанного в настоящем документе. Рецепторы ароматических углеводов известны специалистам в данной области (Noakes, 2015). Агонисты рецепторов ароматических углеводов включают в себя без ограничения родственные триптофану соединения, такие как кинуренин, кинуреновая кислота, циннабариновая кислота и 6-формилиндоло[3,2-b]карбазол (FICZ). Малассезин также известен в качестве агониста рецептора ароматических углеводов (Wille, *et al.*, 2001).

[0161] В контексте настоящего документа соединения, композиции и способы согласно настоящему изобретению могут быть использованы для уменьшения гиперпигментации, вызванной гиперпигментационным нарушением, например, путем уменьшения уровня гиперпигментации в пораженных гиперпигментационным нарушением

областях, замедления дальнейшей гиперпигментации или предупреждения возникновения дальнейшей гиперпигментации. Однако, поскольку каждый субъект может не отвечать на конкретный протокол, схему или способ введения дозы, для уменьшения гиперпигментации, вызванной гиперпигментационным нарушением, не требуется, чтобы желаемый физиологический ответ или результат был достигнут у каждого без исключения субъекта или в совокупности субъектов. Соответственно, у данного субъекта или совокупности субъектов ответ может не наблюдаться или не соответствовать вводимой дозе, но у других субъектов или совокупностей субъектов может наблюдаться ответ, а значит продемонстрировано улучшение их гиперпигментационного нарушения.

[0162] Используемый в настоящем документе термин «гиперпигментация» представляет собой объективное или субъективное ухудшение состояния кожи с избыточным ее потемнением. Ухудшение состояния кожи может быть объективным, например, связанным с возрастом, избыточным воздействием солнечных лучей или заболеванием или патологическим состоянием, приводящим к появлению темных участков кожи. Темные участки кожи могут иметь форму пятен, сыпи или относительно крупных участков темного цвета. Ухудшение состояния кожи также может быть субъективным, например, основанном на мнении индивида, что тон его/ее кожи является слишком темным. Индивид может иметь желание осветлить тон кожи в косметических целях.

[0163] Гиперпигментационные нарушения представляют собой нарушения, при которых гиперпигментация является первичным симптомом, а также нарушения, при которых гиперпигментация возникает в качестве вторичного симптома. Гиперпигментационные нарушения согласно настоящему изобретению включают в себя без ограничения врожденные гиперпигментационные нарушения и приобретенные гиперпигментационные нарушения. Врожденные гиперпигментационные нарушения согласно настоящему изобретению включают в себя без ограничения нарушения с эпидермальной гиперпигментацией (невоцитарный невус, невус Шпиц и пятнистый невус), дермальной гиперпигментацией (синий невус, невус Оты, дермальный меланоз, невус Ито и монгольские пятна), веснушки, ретикулярную акропигментацию, Spitzepigment/акропигментацию и лентигиноз (генерализованный лентигиноз, синдром LEOPARD, наследственный узорчатый лентигиноз, синдром Карни, синдром Пейтца-Егерса, синдром Ложье-Хунцикера-Баран и синдром Кронкхайта-Канада) (Yamaguchi, *et al.*, 2014). Приобретенные гиперпигментационные нарушения согласно настоящему изобретению включают в себя без ограничения старческие лентигинозы/лентиго, мелазму/хлоазму, меланоз Рия, лабиальные меланотические пятна, пенильный/вульвовагинальный меланоз, фолликулярный эритромеланоз лица и шеи (Китамуры), УФ-индуцированную пигментацию (загар и пигментация *Petaloides actinica*), поствоспалительную пигментацию (фрикционный меланоз и пепельный дерматоз), пигментацию, индуцированную химическими соединениями/лекарствами (полихлорбифенилом, мышьяком, 5-FU, блеомицином, циклофосфамидом, метотрексатом, хлорпромазином, фенитоином, тетрациклином и хлорохином), пигментарные

разграничительные линии и отложения чужеродных материалов (таких как каротин, серебро, золото, ртуть, висмут и татуировки). Гиперпигментация, связанная с системными нарушениями, включает в себя нарушения метаболизма/функции ферментов (гемохроматоз, болезнь Вильсона, болезнь Гоше, болезнь Ниманна-Пика, амилоидоз, охроноз, акантокератодермию и позднюю порфирию кожи), эндокринные нарушения (болезнь Аддисона, синдром Кушинга и гипертиреоз), нарушения питания (пеллагру, дефицит витамина B12, дефицит фолиевой кислоты, болезнь бродяг и пигментарную почесуху), мастоцитоз, коллагенозы, печеночную недостаточность и почечную недостаточность. Гиперпигментация также может быть связана с инфекционными заболеваниями (корь, сифилис и вызванная *Malassezia* перхоть) и синдромами (болезнь Реклингхаузена, синдром Сотоса, синдром POEMS, синдром Негели, синдром Канту, синдром МакКьюна-Олбрайта, синдром Ватсона и синдром Блума) (Yamaguchi, *et al.*, 2014).

[0164] Меланин представляет собой продуцируемый в естественных условиях пигмент, который придает цвет коже и волосам. Меланин продуцируется меланоцитами в органеллах, известных как меланосомы. Соединение или композиция согласно настоящему изобретению модулирует продукцию меланина (также известную как меланогенез) у субъекта, например, путем модулирования биогенеза меланосом и прямого или опосредованного ингибирования синтеза меланина на уровне ферментов.

[0165] Биогенез меланосом происходит в четыре стадии: Стадия I характеризуется наличием премеланосомы, которые представляют собой по существу непигментированные вакуоли. На стадии II у премеланосомы появляется исчерченность, на которой на стадии III откладывается меланин. Стадия IV приводит к зрелым меланосомам с высоким содержанием меланина. Соединения или композиции согласно настоящему изобретению модулируют биогенез меланосом путем ингибирования или ослабления биологических процессов, которые в норме частично или полностью стимулируют указанные стадии (Wasmeier, *et al.*, 2008).

[0166] В синтезе меланина участвуют, главным образом, три фермента: тирозиназа, тирозиназа-зависимый белок 1 и дофахромтаутомераза. Дополнительные факторы, которые влияют на внутриклеточную миграцию указанных ферментов, включают в себя без ограничения BLOC-1, OA1 и SLC45A2. Соединения или композиции согласно настоящему изобретению могут модулировать продукцию меланина, например, путем ингибирования или ослабления активности любого из указанных ферментов или факторов (Yamaguchi, *et al.*, 2014).

[0167] После формирования меланосомы и синтеза меланина, меланосомы должны переноситься из эпидермальных меланоцитов в кератиноциты кожи и волос. Меланосомы возникают вблизи ядра меланоцитов и переносятся к периферии меланоцитов вдоль микротрубочек и актиновых филаментов. Соединения или композиции согласно настоящему изобретению модулируют перенос меланосом, препятствуя любому из биологических процессов, которые приводят к переносу меланосом из перинуклеарной области к периферии меланоцита и в прилегающие кератиноциты.

[0168] Концентрация меланина может модулироваться, например, путем усиления или ослабления меланогенеза, или путем промотирования деградации меланина у субъекта или выведения меланина из организма субъекта.

[0169] Соединение согласно настоящему изобретению, выделенное из дрожжей *Malassezia*, в обязательном порядке присутствует до выделения в дрожжах *Malassezia* или продуцируется дрожжами *Malassezia*. Поэтому, выделенное из дрожжей *Malassezia* соединения выделяют из активных дрожжевых клеток. Стандартные методики экстрагирования соединений из клеточного материала известны специалистам в данной области.

[0170] Соединение, возможное к выделению из дрожжей *Malassezia*, не требует выделения из активных дрожжевых клеток. Вместо этого, для получения продуцируемых дрожжами соединений без использования активных дрожжевых клеток могут быть использованы реакции синтеза. Реакции органического синтеза хорошо известны специалистам в данной области и могут быть использованы с этой целью.

[0171] Используемый в настоящем документе термин «эпидермальный меланин» относится к меланину, который продуцируется в эпидермисе, транспортируется в него или иным образом обнаруживается в нем.

[0172] Используемый в настоящем документе термин «снижать» и его грамматические варианты означает осуществление снижения уровня данного биологического процесса или соединения. Например, соединения и композиции согласно настоящему изобретению снижают эпидермальный меланин у субъекта, что означает, что соединения и композиции согласно настоящему изобретению индуцируют снижение уровня эпидермального меланина у субъекта. Термин «снижать» и его грамматические варианты может означать, например, снижение уровня данного биологического процесса или соединения по меньшей мере на 5%, 10%, 25%, 50%, 75% или 100%.

[0173] Используемый в настоящем документе термин «приведение в контакт» и его грамматические варианты относятся к приведению двух или более веществ в непосредственную близость, достаточную того, чтобы они могли взаимодействовать. Таким образом, исключительно в иллюстративных целях, соединение согласно настоящему изобретению может вступать в контакт с меланоцитом, например, путем взаимодействия с рецептором на поверхности меланоцита. По аналогии, композиция согласно настоящему изобретению может вступать в контакт с меланоцитом, например, при непосредственном нанесении на кожу субъекта.

[0174] Используемый в настоящем документе термин «субъект» обозначает клетку, ткань, организм млекопитающего или их совокупности. Субъекты согласно настоящему изобретению предпочтительно представляют собой человека, включая клетки, ткани человека и собственно человека, но в других случаях включают в себя приматов, сельскохозяйственных животных, домашних животных, лабораторных животных и т. п. Некоторые примеры сельскохозяйственных животных включают коров, свиней, лошадей, коз и т. п. Некоторые примеры домашних животных включают собак, кошек и т. п.

Некоторые примеры лабораторных животных включают приматов, крыс, мышей, кроликов, морских свинок и т. п.

[0175] Используемый в настоящем документе термин «нуждающийся» в уменьшении гиперпигментации, вызванной гиперпигментационным нарушением, включает в себя субъектов с объективной или субъективной необходимостью в снижении.

[0176] Используемые в настоящем документе термины «лечить», «осуществление лечения» или «лечение» и их грамматические варианты означает подвергнуть отдельного субъекта действию протокола, схемы, процесса лечения или лекарственного средства, при котором у данного субъекта, например, у пациента, желательно получить физиологический ответ или результат. В частности, способы и композиции согласно настоящему изобретению могут быть использованы для замедления развития симптомов заболевания или отсрочивания возникновения заболевания или состояния, или для прекращения прогрессирования заболевания. Однако, поскольку не каждый подвергнутый лечению субъект может отвечать на конкретный протокол, схему, процесс лечения или лекарственное средство, проведение лечения не требует того, чтобы целевой физиологический ответ или результат достигался у каждого без исключения субъекта или совокупности субъектов, например, совокупности пациентов. Соответственно, данный субъект или совокупность субъектов, например, совокупность пациентов, могут не отвечать или ненадлежащим образом отвечать на лечение.

[0177] Используемые в настоящем документе термины «предупреждать», «предотвращение», «предупреждение» и их грамматические варианты означают, что соединения согласно настоящему изобретению применимы при введении пациенту, у которого не было продиагностировано предположительное наличие нарушения или заболевания в момент введения, но у которого, как правило, предполагается появление нарушения или заболевания, или у которого повышен риск возникновения нарушения или заболевания. Соединения и композиции согласно настоящему изобретению, например, замедляют развитие симптомов нарушения или заболевания, отсрочивают начало нарушения или заболевания, или вовсе предупреждают развитие нарушения или заболевания у индивидуума. Предупреждение также включает в себя введение соединений согласно настоящему изобретению тем индивидуумам, которые считаются предрасположенными к развитию нарушения или заболевания по причине возраста, анамнеза, генетических или хромосомных аномалий, и/или по причине присутствия одного или нескольких биологических маркеров нарушения или заболевания.

[0178] Используемый в настоящем документе термин «промотировать» и его грамматические варианты означает предоставлять возможность, усиливать, позволять, способствовать, поддерживать, содействовать, индуцировать или иным образом помогать в достижении успеха.

[0179] Используемый в настоящем документе термин «вызывать» и его грамматические варианты означает являться причиной случайного возникновения, появления или возникновения конкретного результата. В качестве неограничивающего

примера, соединения и композиции согласно настоящему изобретению вызывают у субъекта фотозащитный или УФ-защитный эффект.

[0180] Используемый в настоящем документе термин «эритема» относится к покраснению кожи. Эритема может быть вызвана расширением и/или раздражением поверхностных капилляров. Термин «УФ-индуцированная эритема» относится к покраснению кожи, которое развивается в результате УФ-воздействия. Используемый в настоящем документе термин «солнечный ожог» и его грамматические варианты относятся к УФ-индуцированной эритеме, вызванной воздействием солнечного света или источников искусственного УФ (например, соляриев).

[0181] Используемый в настоящем документе термин «гиперпигментация», как правило, относится к участку кожи, в котором пигментация выше, чем в прилегающей коже (например, пигментное пятно, возрастное пятно, родимое пятно, и т. п.). Гиперпигментация согласно настоящему изобретению включает в себя без ограничения местную гиперпигментацию за счет гиперактивности меланоцитов, другую локализованную гиперпигментацию за счет доброкачественной гиперактивности и пролиферации меланоцитов, вызванную заболеванием гиперпигментацию и случайную гиперпигментацию, такую как гиперпигментацию вследствие фотосенсибилизации, набора генов, попадания внутрь химического вещества или другого воздействия (например, УФ-воздействия), возраста и рубцевания после повреждения. Используемый в настоящем документе термин «УФ-индуцированная гиперпигментация» относится к любой гиперпигментации, вызванной воздействием естественного или искусственного УФ.

[0182] Используемый в настоящем документе термин «гипопигментация», как правило, относится к участку кожи, в котором пигментация ниже, чем в прилегающей коже. Гипопигментация согласно настоящему изобретению включает в себя без ограничения витилиго, депигментацию, белый атрофический питириаз, фокальную гипопигментацию, поствоспалительную гипопигментацию, пегую кожу, альбинизм, разноцветный лишай, фоточувствительность, лейцизм, гипомеланоз, атопический дерматит, псориаз, и т. п.

[0183] Используемый в настоящем документе термин «УФ-индуцированное повреждение кожи» означает повреждение кожи в результате воздействия УФ, включая УФ-А, УФ-В и UVC. УФ-индуцированное повреждение кожи согласно настоящему изобретению включает в себя без ограничения морщины, гиперпигментацию, дисплазии, актинический кератоз и злокачественные опухоли кожи.

[0184] Используемый в настоящем документе термин «УФ-индуцированное старение кожи» означает старение кожи в результате воздействия УФ, включая УФ-А, УФ-В и UVC. УФ-индуцированное старение кожи согласно настоящему изобретению проявляет себя, например, в виде морщин, мелких и тонких морщин, возрастных пятен, родимых пятен, сухости, истончения или снижения эластичности кожи, неровного тона кожи и других изменений блеска, структуры, упругости, плотности, степени дряблости и яркости кожи, вызванных, полностью или частично, УФ-воздействием.

[0185] При использовании для описания эффектов соединений и композиций

согласно настоящему изобретению, используемый в настоящем документе термин «фотозащитный» и его грамматические варианты означает, что описанные в настоящем документе соединения и композиции предупреждают и/или смягчают повреждение, вызванное светом, в частности солнечным светом. По аналогии, «фотозащитные средства» согласно настоящему изобретению представляют собой такие описанные в настоящем документе соединения и композиции, которые предупреждают и/или смягчают повреждение, вызванное светом, в частности солнечным светом.

[0186] При использовании для описания эффектов соединений и композиций согласно настоящему изобретению, используемый в настоящем документе термин «УФ-защитный» и его грамматические варианты означает, что описанные в настоящем документе соединения и композиции предупреждают и/или смягчают повреждение, вызванное ультрафиолетовым («УФ») светом. По аналогии, «УФ-защитные средства» согласно настоящему изобретению представляют собой такие описанные в настоящем документе соединения и композиции, которые предупреждают и/или смягчают повреждение, вызванное УФ. Ультрафиолетовый свет согласно настоящему изобретению включает в себя, например, УФ-А (320-400 нм), УФ-В (290-320 нм) и УФ-С (200-290 нм).

[0187] Используемый в настоящем документе термин «фильтр» и его грамматические варианты означают блокирование, отражение, поглощение или рассеяние УФ. «Солнцезащитные средства» согласно настоящему изобретению включают в себя все соединения и композиции согласно настоящему изобретению, которые блокируют, отражают, поглощают или рассеивают УФ.

[0188] Используемый в настоящем документе термин «поглощать» и его грамматические варианты означает поглощение энергии УФ или преобразование энергии УФ в тепловую энергию. В качестве неограничивающего примера, соединения и композиции согласно настоящему изобретению могут поглощать УФ и в результате излучать тепловую энергию в окружающее их пространство.

[0189] При использовании в контексте УФ, используемый в настоящем документе термин «отражать» и его грамматические варианты означает возврат или отражение УФ назад без его поглощения.

[0190] Используемый в настоящем документе термин «композиция» обозначает вещество, содержащее одно или несколько соединений согласно настоящему изобретению, а также любое вещество, которое является результатом прямого или опосредованного комбинирования одного или нескольких соединений согласно настоящему изобретению с другими ингредиентами. Композиции согласно настоящему изобретению могут быть использованы, например, в качестве реагентов для исследований *in vitro* или *in vivo*. Композиции согласно настоящему изобретению также можно наносить непосредственно на кожу субъекта-человека или отличного от человека субъекта для получения косметического или фармацевтического эффекта. Кроме того, композиции согласно настоящему изобретению содержат одно или несколько соединений, перечисленных в Таблице 1 или на Фиг. 3, или их химический аналог, кристаллическую форму, гидрат или

фармацевтически или косметически приемлемую соль.

[0191] Композиция согласно настоящему изобретению может быть введена любым необходимым и эффективным способом для применений *in vitro* и *in vivo*: для перорального приема внутрь или для парентерального или другого введения любым подходящим способом, таким как внутривенный, подкожный, местный, внутрикожный, ингаляционный, внутрилегочный, ректальный, вагинальный, подъязычный, внутримышечный, внутривенный, внутриартериальный, интратекальный или внутрилимфатический. Кроме того, композиция согласно настоящему изобретению может быть введена вместе с другими композициями. При необходимости, композиции согласно настоящему изобретению могут быть заключены в капсулы или иным образом защищены от действия желудочного сока или других секретов.

[0192] Композиции согласно изобретению содержат один или несколько активных ингредиентов в смеси с одним или несколькими косметически или фармацевтически приемлемыми носителями и, необязательно, с одним или несколькими другими соединениями, ингредиентами и/или веществами. Вне зависимости от выбранного пути введения, соединения и композиции согласно настоящему изобретению приготавливают в виде косметически или фармацевтически приемлемых дозированных форм традиционными способами, известными специалистам в данной области.

[0193] Косметически или фармацевтически приемлемые несущие среды, разбавители и носители хорошо известны в данной области и включают в себя вещества, подходящие для контакта с тканями людей и отличных от людей субъектов без проявления чрезмерной токсичности, несовместимости, нестабильности, раздражения, аллергической реакции и т. п. Косметически или фармацевтически приемлемые несущие среды, разбавители и носители включают в себя любое нетоксичное вещество, традиционно используемое, например, для местного, перорального, брюшинного или подкожного введения косметических или фармацевтических средств, в котором соединения и композиции согласно настоящему изобретению останутся стабильными и биодоступными при применении, приеме внутрь, инъекционном введении или ином введении субъекту-человеку или отличному от человека субъекту. Косметически или фармацевтически приемлемые носители, подходящие для местного применения, известны специалистам в данной области и включают в себя косметически или фармацевтически приемлемые жидкости, кремы, масла, лосьоны, мази, гели или твердые вещества, такие как традиционные косметические ночные кремы, кремы-основы, лосьоны для загара, солнцезащитные средства, лосьоны для рук, макияж и основы под макияж, маски и т. п. Носители, подходящие для выбранной дозированной формы и предполагаемого пути введения, хорошо известны в данной области, и приемлемые для выбранной дозированной формы и способа введения носители могут быть легко определены специалистом в данной области.

[0194] Композиции согласно настоящему изобретению могут содержать другие ингредиенты, традиционные в косметологии, включая отдушки, эстроген, витамины А, С и

Е, альфа-гидрокси- и альфа-кетокислоты, такие как пировиноградная, молочная или гликолевая кислоты, ланолин, вазелин, алоэ вера, метил- или пропилпарабен, пигменты и т. п. Неограничивающие косметически или фармацевтически приемлемые несущие среды, разбавители и носители согласно настоящему изобретению включают в себя сахара (например, лактозу, сахарозу, маннит и сорбит), крахмалы, препараты целлюлозы, фосфаты кальция (например, дикальций фосфат, трикальций фосфат и вторичный кислый фосфат кальция), цитрат натрия, воду, водные растворы (например, солевой раствор, инъекционный раствор хлорида натрия, инъекционный раствор Рингера, инъекционный раствор декстрозы, инъекционный раствор декстрозы и хлорида натрия, инъекционный раствор Рингера с добавлением лактата), спирты (например, этиловый спирт, пропиловый спирт и бензиловый спирт), полиолы (например, глицерин, пропиленгликоль и полиэтиленгликоль), органические сложные эфиры (например, этилолеат и триглицериды), биоразлагаемые полимеры (например, полилактид-полигликолид, сложные поли(ортоэфиры) и поли(ангидриды)), эластомерные матрицы, липосомы, микросферы, масла (например, кукурузное, зародышей пшеницы, оливковое, касторовое, кунжутное, хлопковое и арахисовое), масло какао, воски (например, воски для суппозитория), парафины, силикон, тальк, салицилат, и т. п.

[0195] Композиции согласно изобретению могут необязательно содержать дополнительные ингредиенты и/или вещества, обычно используемые в косметических композициях. Такие ингредиенты и вещества хорошо известны в данной области и включают в себя, например, ((1) наполнители или сухие разбавители, такие как крахмалы, лактоза, сахароза, глюкоза, маннит и кремниевая кислота; (2) связующие вещества, такие как карбоксиметилцеллюлоза, альгинаты, желатин, поливинилпирролидон, гидроксипропилметилцеллюлоза, сахароза и аравийская камедь; (3) увлажнители, такие как глицерин; (4) разрыхлители, такие как агар-агар, карбонат кальция, картофельный или тапиоковый крахмал, альгиновая кислота, определенные силикаты, натрия крахмалгликолят, перекрестно-сшитая карбоксиметилцеллюлоза натрия и карбонат натрия; (5) замедлители растворения, такие как парафин; (6) ускорители всасывания, такие как соединения четвертичного аммония; (7) смачивающие агенты, такие как цетиловый спирт и глицерина моностеарат; (8) абсорбенты, такие как каолин и бентонитовая глина; (9) лубриканты, такие как тальк, стеарат кальция, стеарат магния, твердые полиэтиленгликоли и лаурилсульфат натрия; (10) суспендирующие агенты, такие как этоксилированные изостеариловые спирты, полиоксиэтиленсорбит и сложные эфиры сорбитана, микрокристаллическая целлюлоза, метагидроксид алюминия, бентонит, агар-агар и трагакант; (11) буферные агенты; (12) наполнители, такие как лактоза, молочные сахара, полиэтиленгликоли, животные и растительные жиры, масла, воски, парафины, масло какао, крахмалы, трагакант, производные целлюлозы, полиэтиленгликоль, силиконы, бентониты, кремниевая кислота, тальк, салицилат, оксид цинка, гидроксид алюминия, силикаты кальция и полиамидный порошок; (13) инертные разбавители, такие как вода или другие растворители; (14) консерванты; (15) поверхностно-активные агенты; (16) диспергирующие

агенты; (17) агенты, регулирующие высвобождение или замедляющие всасывание, такие как гидроксипропилметилцеллюлоза, другие полимерные матрицы, биоразлагаемые полимеры, липосомы, микросферы, моностеарат алюминия, желатин и воски; (18) замутнители; (19) адьюванты; (20) смачивающие агенты; (21) эмульгирующие и суспендирующие агенты; (22), солюбилизующие агенты и эмульсификаторы, такие как этиловый спирт, изопропиловый спирт, этилкарбонат, этилацетат, бензиловый спирт, бензилбензоат, пропиленгликоль, 1,3-бутиленгликоль, масла (в частности, хлопковое, арахисовое, кукурузное, масло зародышей пшеницы, оливковое, касторовое и кунжутное масла), глицерин, тетрагидрофуриловый спирт, полиэтиленгликоли и сложные эфиры жирных кислот сорбитана; (23) пропелленты, такие как хлорфторуглеводороды и летучие незамещенные углеводороды, такие как бутан и пропан; (24) антиоксиданты; (25) агенты, наделяющие состав изотоничностью по отношению к крови предполагаемого реципиента, такие как сахара и хлорид натрия; (26) загустители; (27) материалы для покрытия, такие как лецитин; и (28) подсластители, ароматизаторы, красители, отдушки и консерванты. Каждый такой ингредиент или вещество должны быть «приемлемым» в точки зрения совместимости с другими ингредиентами состава и не являться опасными для субъекта. Ингредиенты и вещества, подходящие для выбранной дозированной формы и предполагаемого пути введения, хорошо известны в данной области, и приемлемые для выбранной дозированной формы и способа введения ингредиенты и вещества могут быть легко определены специалистом в данной области.

[0196] Композиции согласно настоящему изобретению, подходящие для перорального введения, могут находиться в форме капсул, саше, пилюль, таблеток, порошков, гранул, раствора или суспензии в водной или неводной жидкости, эмульсии типа «масло в воде» или «вода в масле», эликсира или сиропа, пастилки, болюса, электуария или пасты. Указанные составы могут быть приготовлены известными в данной области способами, например, посредством традиционных процессов дражирования, смешивания, гранулирования или лиофилизации.

[0197] Твердые дозированные формы для перорального введения (капсулы, таблетки, пилюли, драже, порошки, гранулы и т. п.) могут быть приготовлены, например, путем смешивания активного(ых) ингредиента(ов) с одним или несколькими косметически или фармацевтически активными носителями и необязательно с одним или несколькими наполнителями, сухими разбавителями, связующими веществами, увлажнителями, разрыхлителями, агентами, замедлителями растворения, ускорителями всасывания, смачивающими агентами, абсорбентами, лубрикантами и/или красителями. Твердые композиции аналогичного типа можно применять в качестве наполнителей в мягких и твердых наполненных желатиновых капсулах с использованием подходящего наполнителя. Таблетки могут быть получены путем прессования или формования, необязательно с одним или несколькими вспомогательными ингредиентами. Прессованные таблетки могут быть приготовлены с использованием подходящего связующего вещества, лубриканта, инертного разбавителя, консерванта, разрыхлителя, поверхностно-активного или

диспергирующего агента. Формованные таблетки могут быть получены путем формования на подходящей машине. Таблетки и другие твердые дозированные формы, такие как капсулы, пилюли и гранулы, могут быть необязательно снабжены насечкой или быть приготовлены с нанесением покрытий и оболочек, таких как кишечнорастворимые покрытия и другие покрытия, хорошо известные в области изготовления косметики. Они также могут быть приготовлены так, чтобы обеспечить замедленное или регулируемое высвобождение содержащегося в них активного ингредиента. Они могут быть простерилизованы, например, посредством фильтрации через удерживающий бактерии фильтр. Указанные композиции также могут необязательно содержать замутнители и могут представлять собой такую композицию, из которой активный ингредиент высвобождается исключительно или предпочтительно в определенной части желудочно-кишечного тракта, необязательно замедленным образом. Активный ингредиент также может находиться в микроинкапсулированной форме.

[0198] Жидкие дозированные формы для перорального введения включают в себя косметически или фармацевтически приемлемые эмульсии, микроэмульсии, растворы, суспензии, сиропы и эликсиры. Жидкие дозированные формы могут содержать подходящие инертные разбавители, обычно используемые в данной области. Помимо инертных разбавителей, пероральные композиции также могут содержать адъюванты, такие как смачивающие агенты, эмульгирующие и суспендирующие агенты, подсластители, ароматизаторы, красители, отдушки и консерванты. Суспензии могут содержать суспендирующие агенты.

[0199] Композиции согласно настоящему изобретению для ректального или вагинального введения могут быть представлены в виде суппозитория, который может быть приготовлен путем смешивания одного или нескольких активных ингредиентов с одним или несколькими подходящими не вызывающими раздражения носителями, которые являются твердыми при комнатной температуре, но жидкими при температуре тела, а потому будут размягчаться в ректальной или вагинальной полости с высвобождением активного соединения. Композиции согласно настоящему изобретению, которые подходят для вагинального введения, также включают в себя лекарственные формы в виде пессариев, тампонов, кремов, гелей, паст, пен или спрея, содержащие такие косметически или фармацевтически приемлемые носители, которые являются подходящими и известными из уровня техники.

[0200] Дозированные формы для местного или трансдермального введения включают в себя порошки, спреи, мази, пасты, кремы, лосьоны, гели, растворы, пластыри, капли, эмульсии, суспензии, аэрозоли и летучие препараты. В состав могут быть добавлены любые традиционные несущие среды, вспомогательные вещества и необязательно дополнительные активные ингредиенты.

[0201] Предпочтительные вспомогательные вещества относятся к группе, включающей в себя консерванты, антиоксиданты, стабилизаторы, солюбилизаторы, витамины, красители, ароматизаторы, пленкообразователи, загустители и увлажнители.

[0202] Растворы и эмульсии могут содержать традиционные несущие среды, такие как растворители, солюбилизаторы и эмульгаторы, например, воду, этанол, изопропанол, этилкарбонат, этилацетат, бензиловый спирт, бензилбензоат, пропиленгликоль, 1,3-бутилгликоль, масла, в частности, хлопковое масло, арахисовое масло, кукурузное масло, оливковое масло, касторовое масло и кунжутное масло, сложные эфиры жирных кислот и глицерина, полиэтиленгликоли и сложные эфиры жирных кислот и сорбитана, или смеси указанных веществ.

[0203] Эмульсии могут существовать в различных формах. Так, они могут представлять собой, например, эмульсию или микроэмульсию типа «вода в масле» (В/М) или типа «масло в воде» (М/В), или множественную эмульсию, например, типа «вода в масле в воде» (В/М/В).

[0204] Композиции в соответствии с изобретением также могут находиться в форме не содержащих эмульгатора диспергированных препаратов. Они могут представлять собой, например, гидродисперсии или эмульсии Пикеринга.

[0205] Суспензии могут содержать традиционные несущие среды, такие как жидкие разбавители, например, воду, этанол или пропиленгликоль, суспензионные среды, например, этоксилированные изостеариловые спирты, полиоксиэтиленовые сложные эфиры сорбита и полиоксиэтиленовые сложные эфиры сорбитана, микрокристаллическую целлюлозу, метагидроксид алюминия, бентонит, агар-агар и трагакант, или смеси указанных веществ.

[0206] Пасты, мази, гели и кремы могут содержать традиционные несущие среды, например, животные и растительные жиры, воски, парафины, крахмал, трагакант, производные целлюлозы, полиэтиленгликоли, силиконы, бентониты, кремниевую кислоту, тальк и оксид цинка, или смеси указанных веществ.

[0207] Масла для лица и тела могут содержать традиционные несущие среды, такие как синтетические масла, такие как сложные эфиры жирных кислот, жирные спирты, силиконовые масла, природные масла, такие как растительные масла и жирные растительные экстракты, парафиновые масла, ланолиновые масла, или смеси указанных веществ.

[0208] Спреи могут содержать традиционные пропелленты, например, хлорфторуглероды, пропан/бутан или диметиловый эфир.

[0209] Композиции согласно настоящему изобретению, подходящие для парентерального введения, содержат одно или несколько соединений в комбинации с одним или несколькими косметически или фармацевтически приемлемыми стерильными изотоническими водными или неводными растворами, дисперсиями, суспензиями или эмульсиями, или стерильными порошками, которые перед применением могут быть восстановлены до стерильных инъеклируемых растворов или дисперсий, которые могут содержать подходящие антиоксиданты, буферы, растворенные вещества, которые наделяют состав изотоничностью по отношению к крови предполагаемого реципиента, или суспендирующие или загущающие агенты. Надлежащую текучесть может поддерживаться,

например, путем использования веществ для покрытия, путем поддержания требуемого размера частиц в случае дисперсий и путем использования поверхностно-активных веществ. Такие композиции также могут содержать подходящие адъюванты, такие как смачивающие агенты, эмульгирующие агенты и диспергирующие агенты. Также может быть желательным включение изотонических агентов. Кроме того, пролонгированное всасывание инъекционной косметической формы может обеспечиваться включением в состав агентов, которые замедляют всасывание.

[0210] В некоторых случаях, для пролонгирования эффекта желательно замедлить всасывание подкожной или внутримышечной инъекции. Это может быть осуществлено путем использования жидкой суспензии кристаллического или аморфного вещества, обладающего плохой растворимостью в воде.

[0211] Скорость всасывания активного агента/лекарства будет тогда зависеть от скорости его растворения, которая, в свою очередь, может зависеть от размера кристаллов и кристаллической формы. В качестве альтернативы, замедленное всасывание парентерально вводимой композиции может быть обеспечено посредством растворения или суспендирования активной композиции в масляной основе. Инъекционные депо-формы могут быть получены путем формирования микроинкапсулированных матриц активного ингредиента в биоразлагаемых полимерах. В зависимости от соотношения между активным ингредиентом и полимером и природы конкретного используемого полимера, можно регулировать скорость высвобождения активного ингредиента. Инъекционные депо-составы также готовят путем заключения лекарства внутри липосом или микроэмульсий, которые совместимы с тканью организма. Инъекционные вещества могут быть простерилизованы, например, путем фильтрации через удерживающий бактерии фильтр.

[0212] Композиции согласно настоящему изобретению могут быть представлены в однодозовых или многодозовых герметичных контейнерах, например, в ампулах и флаконах, и могут храниться в лиофилизированном состоянии, требующем лишь добавления стерильного жидкого носителя, например, воды для инъекций, непосредственно перед применением. Инъекционные растворы и суспензии для немедленного приема могут быть приготовлены из стерильных порошков, гранул и таблеток описанного выше типа.

[0213] Используемый в настоящем изобретении термин «кристаллическая форма» означает кристаллическую структуру соединения. Соединение может существовать в одной или нескольких кристаллических формах, которые могут характеризоваться разными структурными, физическими, фармакологическими или химическими характеристиками. Разные кристаллические формы могут быть получены с использованием вариаций в формировании центров кристаллизации, кинетике роста, укрупнении и разрушении. Формирование центров кристаллизации происходит при преодолении энергетического барьера фазового перехода, обеспечивая тем самым возможность формирования частиц из перенасыщенного раствора. Рост кристалла представляет собой увеличение частиц

кристалла, вызванное отложением химического соединения на существующей поверхности кристалла. Относительная скорость формирования центров кристаллизации определяет распределение формирующихся кристаллов по размеру. Термодинамической движущей силой как для формирования центров кристаллизации, так и для роста, является перенасыщение, которое согласно определению является отклонением от термодинамического равновесия. Укрупнение представляет собой процесс формирования более крупных частиц посредством слипания двух или нескольких частиц (например, кристаллов) и формирования более крупной кристаллической структуры.

[0214] Используемый в настоящем документе термин «гидрат» обозначает твердую или полутвердую форму химического соединения, содержащую воду в составе молекулярного комплекса. Вода, как правило, содержится в стехиометрическом количестве по отношению к химическому соединению.

[0215] Используемый в настоящем документе термин «косметически или фармацевтически приемлемая соль» относится к производному описанных в настоящем документе соединений, где соединения модифицированы путем получения их кислых или основных солей. Примеры косметически или фармацевтически приемлемых солей включают в себя без ограничения соли неорганических или органических кислот и остатков оснований, таких как амины; соли щелочей или органические соли остатков кислот, таких как карбоновые кислоты; и т. п. Например, такие соли включают в себя соли аммония, L-аргинина, бетаина, бенетамина, бензатина, гидроксида кальция, холина, динола, диэтанолamina (2,2'-иминобис(этанол)), диэтиламина, 2-(диэтиламино)этанола, 2-аминоэтанола, этилендиамина, N-этилглюкамина, гидрабамина, 1H-имидазола, лизина, гидроксида магния, 4-(2-гидроксиэтил)морфолина, пиперазина, гидроксида калия, 1-(2-гидроксиэтил)пирролидина, гидроксида натрия, триэтанолamina (2,2',2''-нитрилотрис(этанол)), трометамина, гидроксида цинка, уксусной кислоты, 2,2-дихлоруксусной кислоты, адипиновой кислоты, альгиновой кислоты, аскорбиновой кислоты, L-аспарагиновой кислоты, бензенсульфоновой кислоты, бензойной кислоты, 2,5-дигидроксибензойной кислоты, 4-ацетамидобензойной кислоты, (+)-камфорной кислоты, (+)-камфор-10-сульфоновой кислоты, угольной кислоты, коричной кислоты, лимонной кислоты, цикламовой кислоты, декановой кислоты, додецилсерной кислоты, этан-1,2-дисульфоновой кислоты, этансульфоновой кислоты, 2-гидроксиэтансульфоновой кислоты, этилендиамонотетрауксусной кислоты, муравьиной кислоты, фумаровой кислоты, галактаровой кислоты, гентизиновой кислоты, D-глюкогептоновой кислоты, D-глюконовой кислоты, D-глюкуроновой кислоты, глутаминовой кислоты, глутатионовой кислоты, глutarовой кислоты, 2-оксоглutarовой кислоты, глицерофосфорной кислоты, глицина, гликолевой кислоты, гексановой кислоты, гиппуровой кислоты, бромистоводородной кислоты, соляной кислоты, изомаляной кислоты, DL-молочной кислоты, лактоглутатионовой бионовой кислоты, лауриновой кислоты, лизина, малеиновой кислоты, (-)-L-яблочной кислоты, малоновой кислоты, DL-миндальной кислоты, метансульфоновой кислоты, галактаровой кислоты, нафталин-1,5-дисульфоновой кислоты, нафталин-2-

сульфоновой кислоты, 1-гидрокси-2-нафтойной кислоты, никотиновой кислоты, азотной кислоты, октановой кислоты, олеиновой кислоты, оротовой кислоты, щавелевой кислоты, пальмитиновой кислоты, палмовой кислоты (эмбоновой кислоты), фосфорной кислоты, пропионовой кислоты, (-)-L-пироглутаминовой кислоты, салициловой кислоты, 4-аминосалициловой кислоты, себациновой кислоты, стеариновой кислоты, янтарной кислоты, серной кислоты, дубильной кислоты, (+)-L-винной кислоты, тиоциановой кислоты, пара-толуолсульфоновой кислоты и ундециленовой кислоты. Дополнительные косметически или фармацевтически приемлемые соли могут быть сформированы с катионами металлов, таких как алюминий, кальций, литий, магний, калий, натрий, цинк, и т. п.

[0216] Косметически или фармацевтически приемлемые соли согласно настоящему изобретению могут быть синтезированы традиционными химическими способами из описанного в настоящем документе соединения, которое содержит фрагмент основания или кислоты. В общем, такие соли могут быть получены путем осуществления взаимодействия указанных соединений в форме свободной кислоты или основания с достаточным количеством соответствующего основания или кислоты в воде или органическом разбавителе, таком как простой эфир, этилацетат, этанол, изопропанол или ацетонитрил, или их смесь.

[0217] Предполагается, что соединения и композиции согласно настоящему изобретению могут быть включены в состав косметических или фармацевтических композиций для применений как *in vitro*, так и *in vivo*.

[0218] Предполагается, что соединения и композиции согласно настоящему изобретению, включая одно или несколько соединений, перечисленных в Таблице 1 или на Фиг. 3, или их химический аналог, кристаллическую форму, гидрат или фармацевтически или косметически приемлемую соль, могут вводиться субъекту совместно для целей модулирования пигментации кожи согласно настоящему изобретению.

[0219] Также предполагается, что композиции согласно настоящему изобретению могут содержать одно или несколько соединений, перечисленных в Таблице 1 или на Фиг. 3, или их химический аналог, кристаллическую форму, гидрат или фармацевтически или косметически приемлемую соль. Например, композиция согласно настоящему изобретению содержит индирубин или его химические аналоги в комбинации с малассезином или его химическими аналогами.

[0220] В дополнение предполагается, что соединения согласно настоящему изобретению включают в себя соединения, продуцируемые *Malassezia*, или их химический аналог, кристаллическую форму, гидрат или фармацевтически или косметически приемлемую соль. Кроме того предполагается, что композиции и способы согласно настоящему изобретению могут включать в себя одно или несколько соединений, продуцируемых *Malassezia*, или их химический аналог, кристаллическую форму, гидрат или фармацевтически или косметически приемлемую соль. Например, соединения, продуцируемые *Malassezia* или полученные из них, включают в себя без ограничения

соединения, представленные на Фиг. 3.

[0221] Кроме того предполагается, что способы согласно настоящему изобретению могут включать в себя совместное введение двух или нескольких соединений и/или композиций согласно настоящему изобретению для целей модулирования пигментации кожи согласно настоящему изобретению.

[0222] Совместно вводимые соединения и композиции согласно настоящему изобретению могут, например, приводиться в контакт с субъектом по существу в то же самое время или одно за другим.

[0223] Композиции согласно настоящему изобретению, содержащие одно или несколько соединений, полученных из *Malassezia*, или их химические аналоги, могут демонстрировать синергические эффекты применительно к различным критериям эффективности, включая без ограничения среднюю жизнеспособность тканей, концентрацию меланина, осветление кожи, потемнение кожи, индукцию апоптоза меланоцитов и модулирование активности рецептора ароматических углеводородов (AhR), меланогенеза или концентрации меланина, по сравнению с входящими в состав композиции отдельными соединениями.

[0224] Используемая в настоящем документе терминология используется лишь для описания конкретных вариантов осуществления и не рассматривается как ограничивающая. Если контекстом прямо не определено иное, то использованные в настоящем описании и в прилагаемой формуле изобретения формы единственного числа включают в себя ссылки на множественное число.

[0225] При представлении в настоящем документе числовых диапазонов, каждое число, находящееся внутри диапазона с той же степенью точности, предусмотрено в явном виде. Например, для диапазона 6-9 в дополнение к 6 и 9 предусмотрены числа 7 и 8, а для диапазона 6,0-7,0 в явном виде предусмотрены числа 6,0, 6,1, 6,2, 6,3, 6,4, 6,5, 6,6, 6,7, 6,8, 6,9 и 7,0.

[0226] Последующие примеры приведены для дополнительной иллюстрации способов согласно настоящему изобретению. Указанные примеры являются лишь иллюстративными и никоим образом не предназначены для ограничения объема настоящего изобретения.

ПРИМЕРЫ

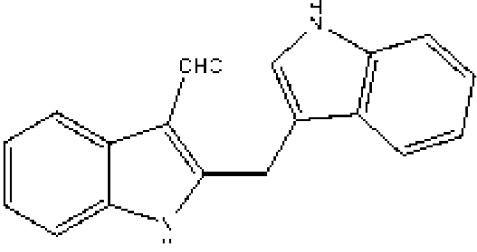
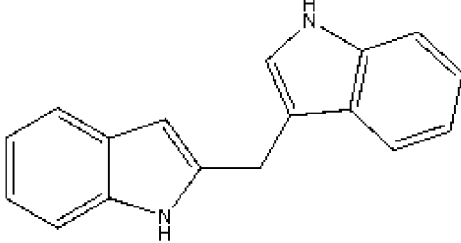
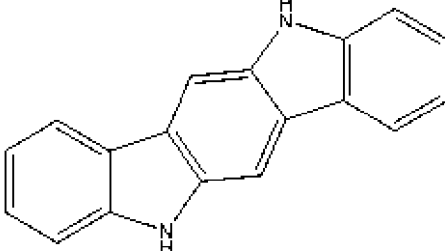
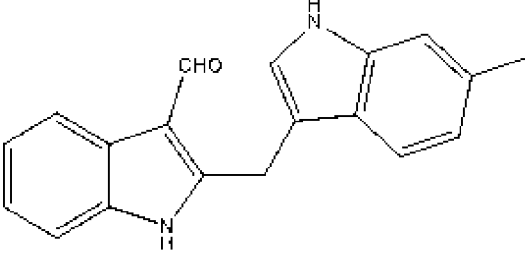
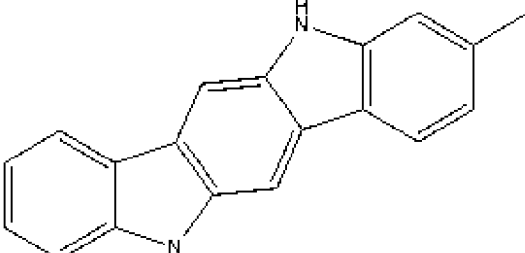
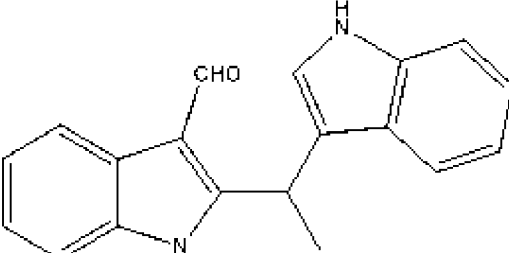
Пример 1

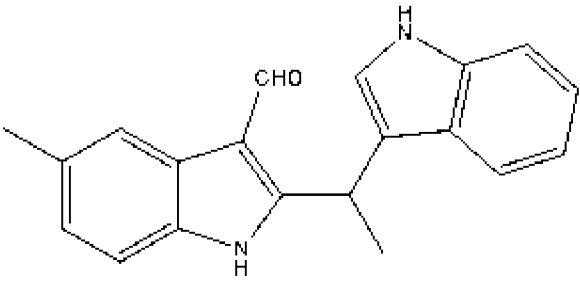
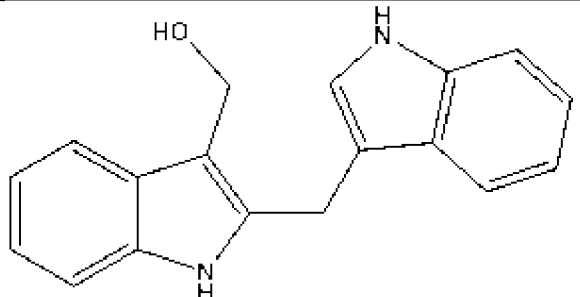
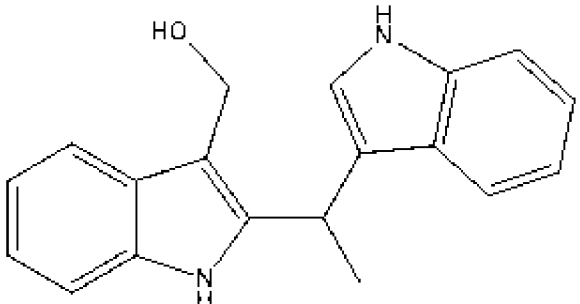
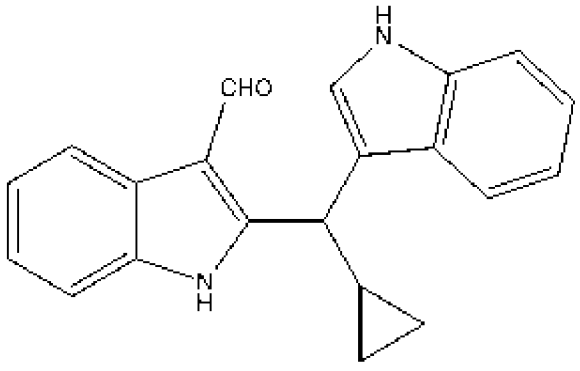
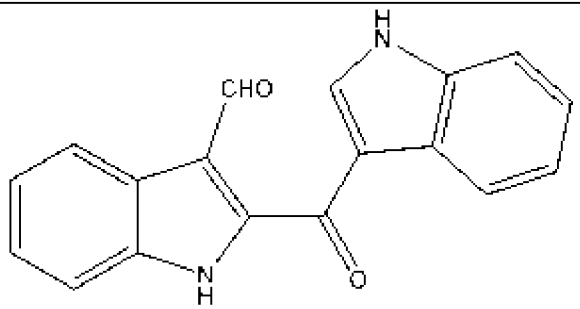
Обозначение соединений

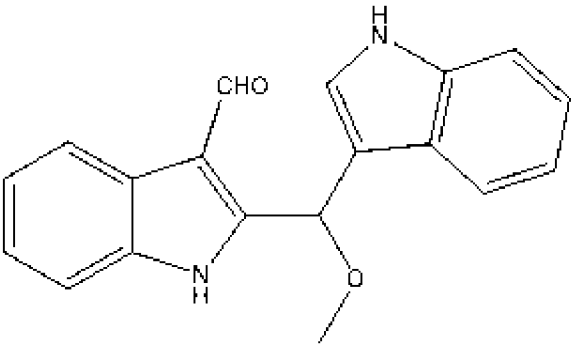
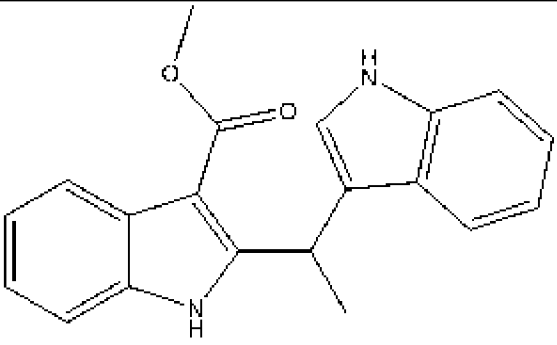
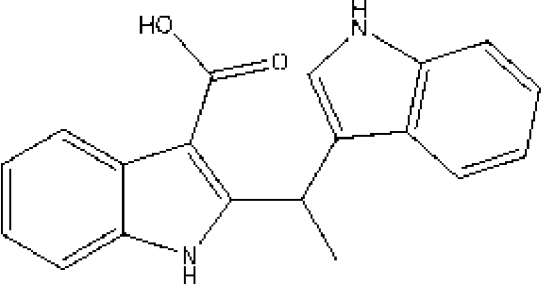
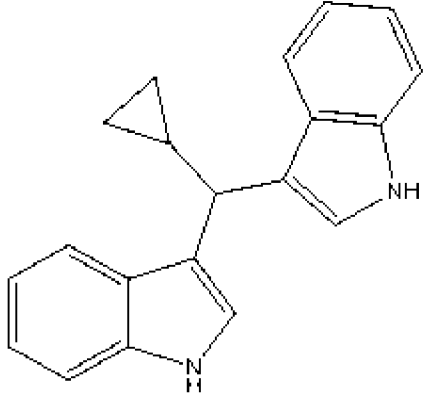
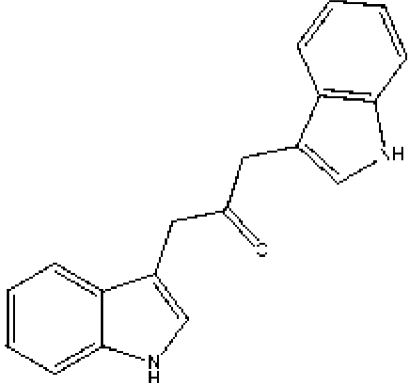
[0227] В представленной ниже Таблице 1 указаны структуры и названия соединений согласно настоящему изобретению.

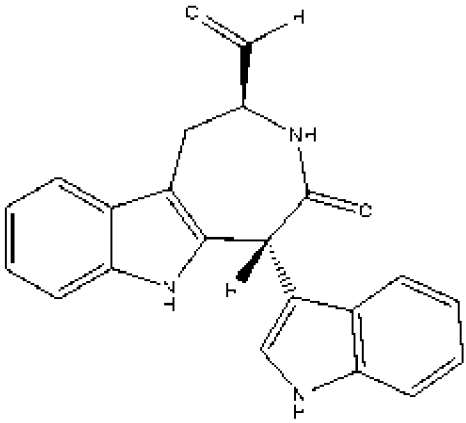
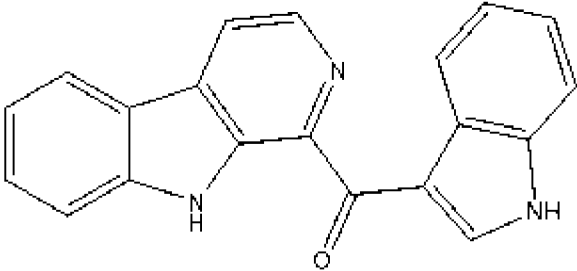
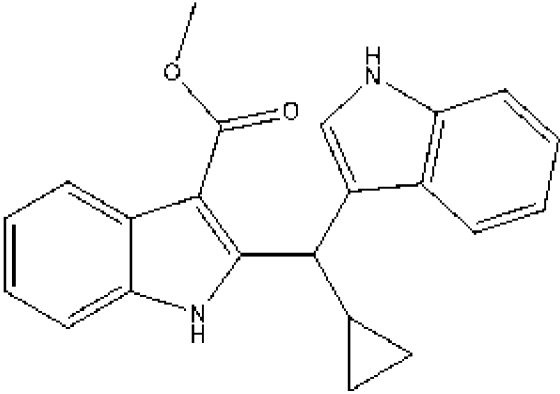
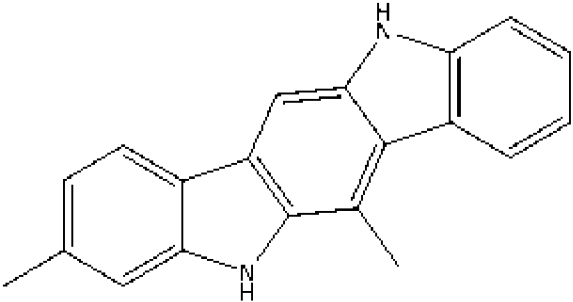
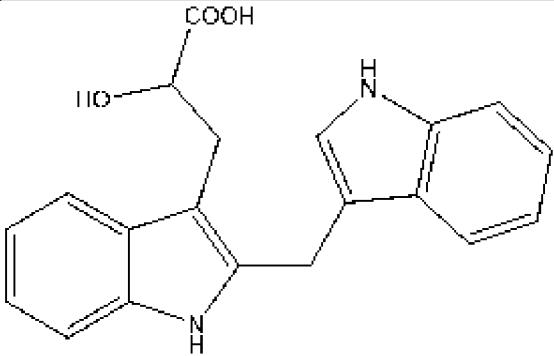
Таблица 1

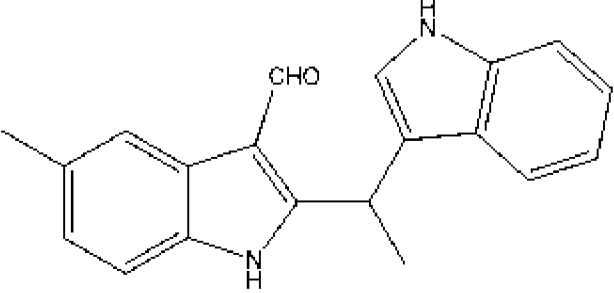
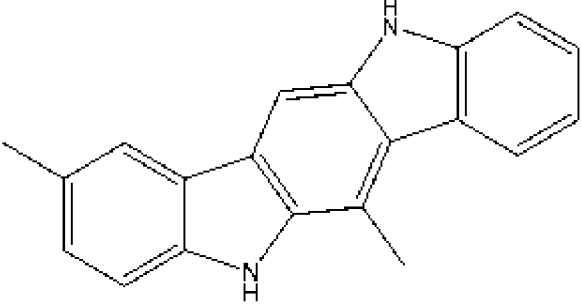
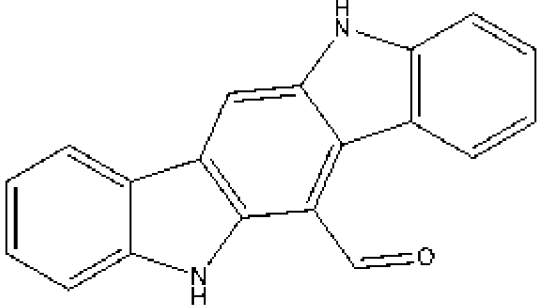
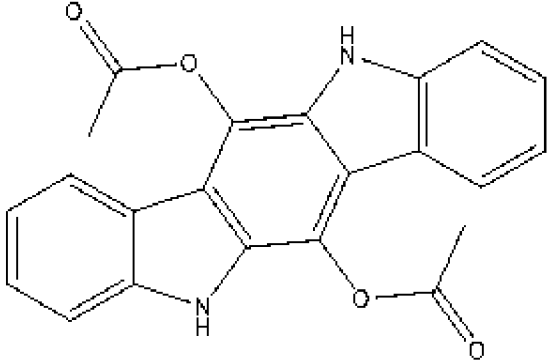
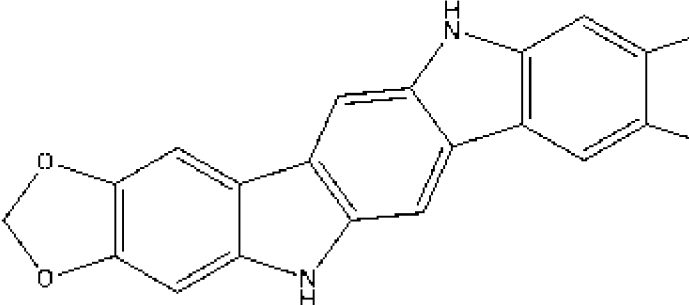
Код соединения	Название соединения	Структура
----------------	---------------------	-----------

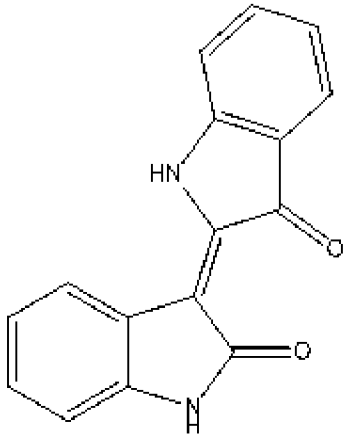
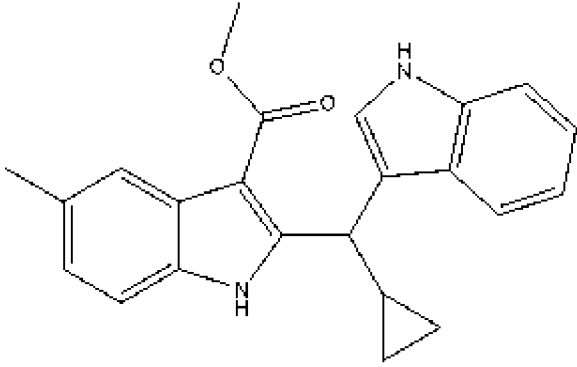
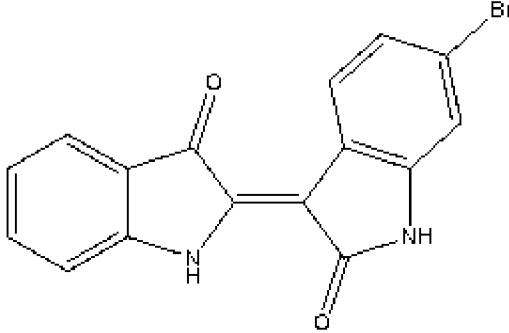
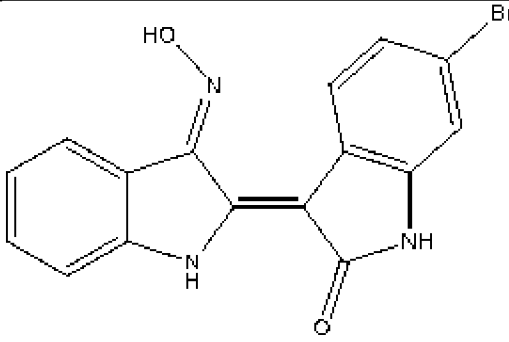
CV-8684	малассезин	
N/A	Предшественник малассезина	
CV-8685	Индоло[3,2-b]карбазол	
CV-8686	Соединение I	
CV-8687	Соединение IV	
CV-8688	Соединение II	

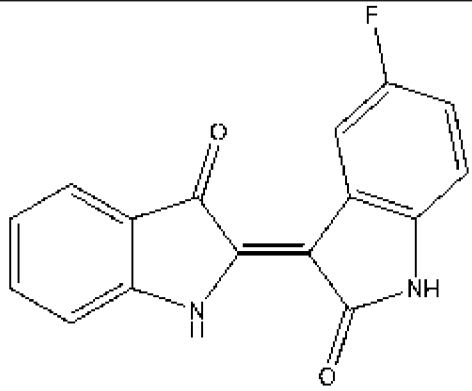
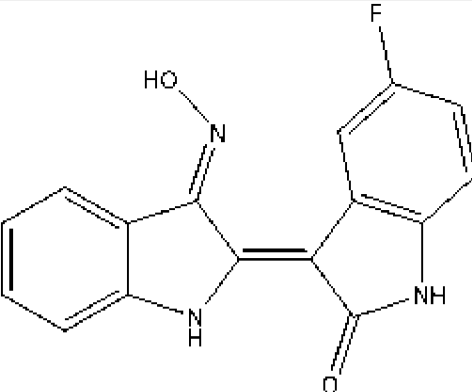
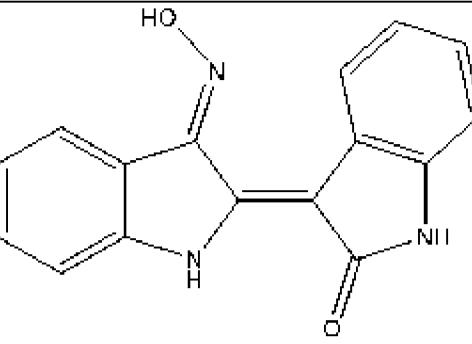
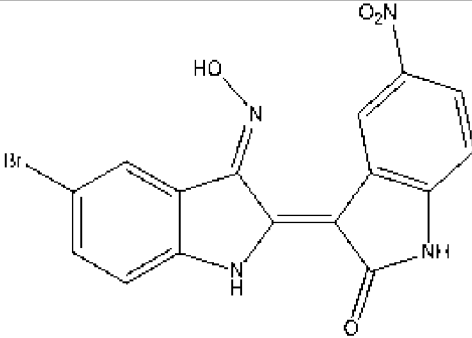
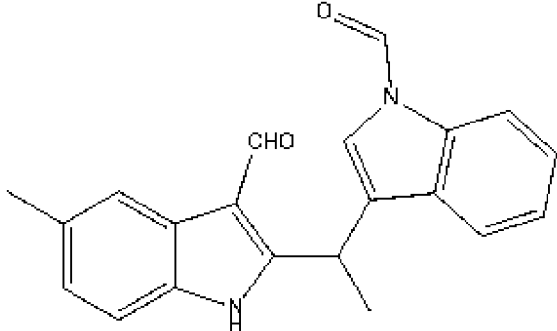
CV-8802	Соединение С	
CV-8803	Соединение К	
CV-8804	Соединение А	
AB12508	Соединение Е	
CV-8819	Соединение А5	

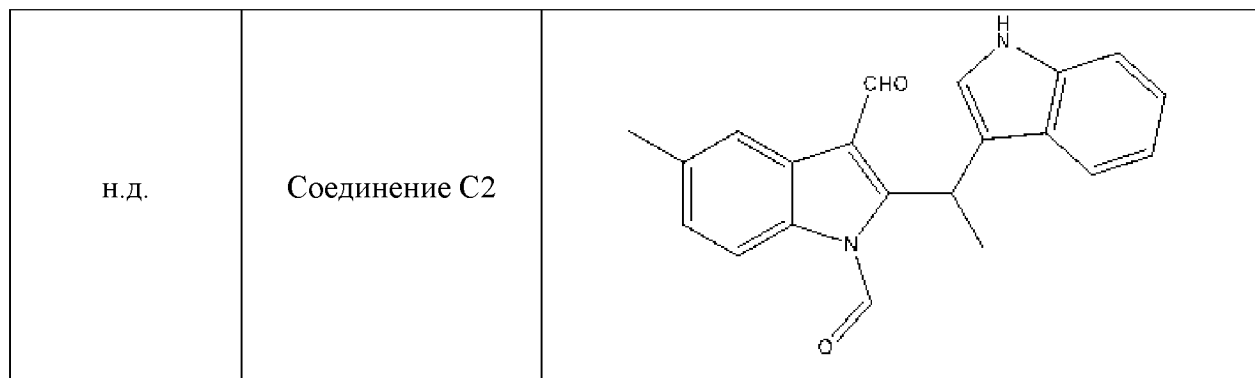
AB12509	Соединение Н	
CV-8877	Соединение В	
N/A	Соединение В10	
AB11644	н.д.	
AB12976	O52	

AB17011	<i>Malassezia</i> индол А	
AB17014	пителиацитрин	
AB17151	н.д.	
AB17225	Соединение VI	
AB17227	<i>Malassezia</i> МОЛОЧНАЯ КИСЛОТА	

AB12507	н.д.	
AB17219	Соединение V	
н.д.	FICZ	
AB17220	Соединение VIII	
AB17221	Соединение VII	

н.д.	индирубин	 <p>The structure shows two indole-3-pyridone rings connected at their 2-positions by a double bond. Each ring has a carbonyl group at the 4-position and a nitrogen atom at the 1-position.</p>
AB17590	н.д.	 <p>The structure features a central carbon atom bonded to four different groups: a methyl group, a 3-methylindole-2-ylidene group, a 2-(1H-indol-3-yl)ethylidene group, and a 2-(1H-indol-3-yl)ethylidene group with a methoxy group at the 3-position of the indole ring.</p>
AB17653	н.д.	 <p>The structure consists of two indole-3-pyridone rings connected at their 2-positions by a double bond. The left ring has a carbonyl group at the 4-position. The right ring has a carbonyl group at the 4-position and a bromine atom at the 5-position of the indole ring.</p>
AB17654	н.д.	 <p>The structure consists of two indole-3-pyridone rings connected at their 2-positions by a double bond. The left ring has a hydroxyl group at the 3-position of the indole ring and a carbonyl group at the 4-position. The right ring has a carbonyl group at the 4-position and a bromine atom at the 5-position of the indole ring.</p>

AB17655	н.д.	
AB17656	н.д.	
AB17657	н.д.	
AB17658	н.д.	
н.д.	Соединение С1	



Пример 2

Апоптоз-индуцирующая активность индирубина и производных индирубина

Реагенты

[0228] Набор для анализа мертвых клеток/апоптоза с Alexa Fluor 488/аннексином V, фетальная бычья сыворотка (FBS), 0,25% трипсин-EDTA (1×), набор для анализа Caspase-Glo 3/7, среда RPMI 1640, модифицированная по способу Дульбекко среда Игла и антибиотический/противогрибковый раствор (100×).

[0229] Линии клеток MeWo (ATCC® HTB-65™), WM115 (ATCC® CRL-1675) и B16F1 (ATCC® CRL-6323) поддерживают в следующих культуральных средах: культуральная среда для MeWo и B16F1: DMEM с добавлением 10% FBS; культуральная среда для WM115: RPMI 1640 с добавлением 10% FBS.

Экспериментальные данные

[0230] Клетки собирают, и определяют число клеток с использованием счетчика клеток Countess. Клетки разбавляют культуральной средой до требуемой плотности. Конечная плотность клеток может составлять, например, 4000 клеток на лунку для обработки в течение 6 ч и 24 ч, и 2000 клеток на лунку для обработки в течение 48 ч и 72 ч. Для анализа с аннексином V используют 384-луночные планшеты с прозрачным дном (Corning 3712), тогда как для анализа с Caspase-Glo используют белые 384-луночные планшеты с непрозрачным дном (Corning 3570). Все планшеты накрывают крышкой и помещают на ночь в условия 37°C и 5% CO₂ для прикрепления клеток.

[0231] Тестируемые соединения растворяют в DMSO до 30 мМ маточного раствора. Для получения концентраций 3 мМ и 0,3 мМ проводят 10-кратные разбавления. В качестве положительного контроля используют 0,9 мМ стауроспорин, и в качестве отрицательного контроля (NC) используют DMSO. С использованием устройства для обращения с жидкостями Echo550 из планшета-источника соединения в 384-луночные культуральные клеточные планшеты переносят 132,5 нл соединений. После указанного времени инкубирования, планшеты удаляют из инкубатора для проведения измерений.

[0232] Для анализа с аннексином V, планшеты удаляют из инкубатора, и удаляют культуральную среду. Клетки дважды промывают 40 мкл PBS, и в каждую лунку добавляют 15 мкл рабочего раствора из предварительно смешанных аннексина V-FITC и красителя Hoechst 33342. Планшеты инкубируют при комнатной температуре в течение 20 мин, герметизируют и центрифугируют в течение 1 мин при 1000 об/мин для удаления пузырей.

Сбор данных с планшетов производят с использованием ImageXpress Nano.

[0233] Для анализа с Caspase-Glo, планшеты удаляют из инкубатора и уравнивают при комнатной температуре в течение 15 мин. Реагенты Caspase-Glo 3/7 также размораживают и уравнивают до комнатной температуры до проведения эксперимента. Реагент Caspase-Glo добавляют в требуемые лунки в соотношении 1:1 с культуральной средой. Планшеты инкубируют при комнатной температуре в течение 15 мин, и проводят сбор данных с использованием планшетного ридера EnSpire™. Кратность индукции рассчитывают в соответствии со следующей формулой: Кратность индукции= $Lum_{образец}/Lum_{NC}$.

Анализ с аннексином V и анализ каспазы-3/7

Результаты

[0234] Ожидается, что соединения и композиции согласно настоящему изобретению, включая индирубин и его химические аналоги, будут индуцировать гибель клеток. Ожидается, что химические аналоги индирубина будут демонстрировать, например, более эффективную апоптоз-индуцирующую активность по сравнению с индирубином. По аналогии, ожидается, что определенные химические аналоги индирубина будут демонстрировать, например, менее эффективную апоптоз-индуцирующую активность по сравнению с индирубином. Такие соединения могут характеризоваться более выигрышными профилями токсичности по сравнению с более эффективными веществами.

Пример 3

Жизнеспособность клеток после воздействия индирубином производными индирубина

Реагенты

[0235] Анализ с CellTiter-Glo® 2.0

Экспериментальные данные

[0236] Для анализа CellTiter-Glo, тестируемые соединения приготавливали в виде 10 мМ раствора в DMSO. Соединения последовательно разбавляли с получением 12 концентраций. В каждую лунку 384-луночного планшета (Corning 3570) вносили 40 мкл клеток из суспензии с плотностью 100000 клеток на мл. Планшеты инкубировали в течение ночи при 37°C, 5% CO₂ и влажности 95%. Тестируемые соединения добавляли, используя DMSO в качестве контроля с несущей средой. Планшеты инкубировали при 37°C, 5% CO₂ и влажности 95% в течение 6, 24 или 48 часов, и добавляли в лунки 40 мкл реагента CellTiter-Glo для оценки жизнеспособности клеток.

Результаты

[0237] Ожидается, что соединения и композиции согласно настоящему изобретению, включая индирубин и его химические аналоги, будут индуцировать гибель клеток. Ожидается, что химические аналоги индирубина будут демонстрировать, например, более эффективную апоптоз-индуцирующую активность по сравнению с индирубином. По аналогии, ожидается, что определенные химические аналоги индирубина будут демонстрировать, например, менее эффективную апоптоз-индуцирующую активность по

сравнению с индирубином. Такие соединения могут характеризоваться более выигрышными профилями токсичности по сравнению с более эффективными веществами.

Пример 4

Способность индирубина и производных индирубина активировать рецептор ароматических углеводов

Аналитические процедуры

[0238] Культуральную среду для стабильно трансфицированных клеток HepG2 приготавливают путем добавления DMEM с высоким содержанием глюкозы и L-глутамина, а также 10% FBS.

[0239] Клетки HepG2-AhR-Luc культивируют в колбах T-75 при 37°C, 5% CO₂ и относительной влажности 95%. Клетки оставляют достигать степени срастания 80-90%, после чего отделяют и разъединяют.

[0240] Культивированные клетки промывают 5 мл PBS. PBS удаляют аспирацией, в колбу добавляют 1,5 мл трипсина, и инкубируют клетки при 37°C приблизительно в течение 5 мин или до тех пор, пока клетки не отделяются, оставаясь на плаву. Трипсин инактивируют путем добавления избытка содержащей сыворотку среды.

[0241] Суспензию клеток переносят в коническую пробирку и центрифугируют при 120g в течение 10 мин для осаждения клеток. Клетки ресуспендируют в посевной среде с нужной плотностью. В 384-луночный культуральный планшет переносят 40 мкл клеток (5×10^3 клеток на лунку). Планшеты помещают в инкубатор при 37°C на 24 часа.

[0242] После этого, приготавливают маточные растворы тестируемых соединений и положительный контроль с омепразолом. Растворы соединений переносят с использованием Echo550 в аналитический планшет. Затем, планшет возвращают в инкубатор для обработки соединением.

[0243] Позднее, после обработки в течение 24 часов, планшет удаляют из инкубатора и оставляют охлаждаться при температуре окружающей среды. В каждую лунку добавляют 30 мкл реагента One-Glo, равных по объему культуральной среде. Клетки оставляют для лизиса по меньшей мере на 3 мин, а затем проводят измерение на люминометре.

[0244] Дозовый ответ отображают в виде графиков с использованием нелинейного регрессионного анализа в программном обеспечении XLfit, и также рассчитывают значения EC₅₀.

Результаты

[0245] Ожидается, что соединения и композиции согласно настоящему изобретению, включая индирубин и его химические аналоги, будут модулировать активность AhR. Ожидается, что химические аналоги индирубина будут демонстрировать, например, более эффективную агонистическую активность в отношении AhR по сравнению с индирубином. По аналогии, ожидается, что определенные химические аналоги индирубина будут демонстрировать, например, менее эффективную агонистическую активность в отношении AhR по сравнению с индирубином.

Пример 5

Анализ с MelanoDerm™

[0246] Целью данного исследования являлась оценка на модели кожи MelanoDerm™ потенциального действия тестируемых соединений в качестве модуляторов меланогенеза в коже после повторных воздействий. Во-вторых, целью данного исследования являлась оценка возможного раздражения кожи на модели кожи MelanoDerm™ после повторных воздействий тестируемым образцом.

Токсичность определяли путем измерения относительного преобразования МТТ (3-[4,5-диметилтиазол-2-ил]-2,5-дифенилтетразолия бромид) в тканях, обработанных тестируемым образцом, по сравнению с тканями, обработанными отрицательным контролем/контролем с растворителем. Потенциальное влияние на продукцию меланина определяли путем измерения концентрации меланина, продуцируемого тканями, обработанными тестируемым образцом, по сравнению с тканями, обработанными отрицательным контролем/контролем с растворителем.

Идентификация тестируемых веществ и контролей исследования

Таблица 2

Образцы, протестированные в форме разбавления

Обозначение тестируемого образца	Обозначение спонсора	Дозируемая концентрация	Инструкции по приготовлению
17AA70	DMSO (контроль с растворителем)	0,5% (об./об.)	Тестируемый образец разбавляли (об./об.) EPI-100-LLMM до конечной концентрации 0,5%; разбавленный тестируемый образец перемешивали на вортексе по меньшей мере в течение 1 мин и дозированно наносили на ткани в дозируемом объеме 25 мкл. Для каждой обработки ткани приготавливали общий объем ~0,5 мл.
17AD45	соединение К (CV-8803)	500 мкМ	Используя исходный предоставленный маточный раствор, тестируемый образец разбавляли (об./об.) EPI-100-LLMM до конечной концентрации 500 мкМ. Разбавление тестируемого образца перемешивали на вортексе по меньшей мере в течение 1 мин, нагревали при 37°±1°С (на водяной бане) в течение 15 мин, снова перемешивали на вортексе по
17AJ41	малассезин (CV-8684)	500 мкМ	
17AJ43	соединение В (CV-8877)	500 мкМ	
17AJ44	соединение Е (AB12508)	500 мкМ	
18AA14	соединение	500 мкМ	

	AB17151		меньшей мере в течение 1 мин, и дозированно наносили на ткани в дозируемом объеме 25 мкл. Для каждой обработки ткани приготавливали общий объем ~0,5 мл.
18AD42	индирубин	500 мкМ	Используя исходное предоставленное твердое вещество, приготавливали ~100 мМ маточный раствор в DMSO. Маточный раствор хранили при температуре от -15°C до -25°C. Из полученного тем самым маточного раствора, тестируемый образец дополнительно разбавляли EPI-100-LLMM до конечной концентрации 500 мкМ. Разбавление тестируемого образца перемешивали на вортексе по меньшей мере в течение 1 мин, нагревали при 37°±1°C (на водяной бане) в течение 15 мин, снова перемешивали на вортексе по меньшей мере в течение 1 мин, и дозированно наносили на ткани в дозируемом объеме 25 мкл. Для каждой обработки ткани приготавливали общий объем ~0,5 мл.

Таблица 3

Образцы, протестированные в форме комбинаций

Обозначение тестируемого образца	Обозначение спонсора	Дозируемая концентрация	Инструкции по приготовлению
17AJ41	малассезин (CV-8684)	250 мкМ	Для каждой обработки ткани общий объем ~1,0 мл комбинированного

18AD42	индирубин	250 мкМ	<p>тестируемого образца приготавливали следующим образом:</p> <p>2 мкл 17AJ41 (100 мМ)</p> <p>2 мкл 18AD42 (100 мМ)</p> <p>796 мкл EPI-100-LLMM</p> <p>Комбинированный тестируемый образец перемешивали на вортексе по меньшей мере в течение 1 мин, нагревали при $37^{\circ}\pm 1^{\circ}\text{C}$ (на водяной бане) в течение 15 мин, снова перемешивали на вортексе по меньшей мере в течение 1 мин, и дозированно наносили на ткани в дозируемом объеме 25 мкл.</p>
18AD42	индирубин	250 мкМ	<p>Для каждой обработки ткани общий объем ~1,0 мл комбинированного тестируемого образца приготавливали следующим образом:</p> <p>2 мкл 18AD42 (100 мМ)</p> <p>2 мкл 18AA14 (100 мМ)</p> <p>796 мкл EPI-100-LLMM</p> <p>Комбинированный тестируемый образец перемешивали на вортексе по меньшей мере в течение 1 мин, нагревали при $37^{\circ}\pm 1^{\circ}\text{C}$ (на водяной бане) в течение 15 мин, снова перемешивали на вортексе по меньшей мере в течение 1 мин, и дозированно наносили на ткани в дозируемом объеме 25 мкл.</p>
18AA14	AB17151	250 мкМ	
17AJ44	соединение E (AB12508)	100 мкМ	<p>Для каждой обработки ткани общий объем ~1,0 мл комбинированного</p>

17AJ43	соединение В (CV-8877)	100 мкМ	тестируемого образца приготавливали следующим образом: 1 мкл 17AJ44 (100 мМ) 1 мкл 17AJ43 (100 мМ) 998 мкл EPI-100-LLMM Комбинированный тестируемый образец перемешивали на вортексе по меньшей мере в течение 1 мин, нагревали при $37^{\circ}\pm 1^{\circ}\text{C}$ (на водяной бане) в течение 15 мин, снова перемешивали на вортексе по меньшей мере в течение 1 мин, и дозированно наносили на ткани в дозируемом объеме 25 мкл.
17AJ43	соединение В (CV-8877)	100 мкМ	Для каждой обработки ткани общий объем ~1,0 мл комбинированного
18AA14	соединение AB17151	100 мкМ	тестируемого образца приготавливали следующим образом: 1 мкл 17AJ43 (100 мМ) 1 мкл 18AA14 (100 мМ) 998 мкл EPI-100-LLMM Комбинированный тестируемый образец перемешивали на вортексе по меньшей мере в течение 1 мин, нагревали при $37^{\circ}\pm 1^{\circ}\text{C}$ (на водяной бане) в течение 15 мин, снова перемешивали на вортексе по меньшей мере в течение 1 мин, и дозированно наносили на ткани в дозируемом объеме 25 мкл.

[0247] Контроли включают в себя: положительный контроль - 1% койевая кислота; отрицательный контроль - стерильная деионизированная вода; и контроль с растворителем - DMSO (диметилсульфоксид) в EPI-100-LLMM.

[0248] Для данного исследования, отрицательный контроль не использовали. Вместо этого, контроль с растворителем (17AA70) использовали для корректировки данных,

полученных для тканей, обработанных положительным контролем и тестируемым образцом, соответственно.

[0249] Кроме того, тестируемый образец и контроли наносили на группы из 4 тканей, в которых 2 ткани использовали для получения показателя жизнеспособности ткани (МТТ), и 2 ткани для получения показателя меланина, соответственно.

Тест-система

[0250] В данном исследовании использовали модель кожи MelanoDerm™ производства MatTek Corporation (Ashland, MA). Ткань MelanoDerm™ состоит из нормальных полученных от человека эпидермальных кератиноцитов (ННЕК) и меланоцитов (ННМ), которые культивировали до формирования многослойной, высокодифференцированной модели эпидермиса человека. ННМ в сокультурах претерпевают спонтанный меланогенез, приводящий к формированию тканей с различающимися уровнями пигментации. Сокультуры выращивали во вставках для клеточных культур на границе раздела воздух-жидкость, что позволяло производить местное нанесение модуляторов кожи. Модель MelanoDerm™ обладает морфологическими и ультраструктурными характеристиками, подобными встречающимся *in vivo*. ННМ, локализованные в базальном слое клеток тканей MelanoDerm™, являются дендритными и спонтанно продуцируют гранулы меланина, которые поступательно заселяют слои ткани. Таким образом, тест-систему используют для проведения скрининга веществ, которые могут ингибировать или стимулировать продукцию меланина по сравнению с отрицательным контролем.

Дизайн и методология эксперимента

[0251] Дизайн эксперимента при проведении данного исследования состоял из определения значения pH тестируемого образца в чистом виде при наличии возможности (и/или дозируемого раствора в соответствующих случаях) и определяющего анализа на модели кожи MelanoDerm™ для определения относительной жизнеспособности тканей и возможного действия тестируемого образца в качестве модулятора меланогенеза после повторных воздействий. Модель кожи MelanoDerm™ подвергали воздействию тестируемых образцов всего в течение 7 суток. Тестируемые образцы местно наносили на модель кожи MelanoDerm™ каждые 48 часов (в пределах временного интервала 48 ± 2 часа от предыдущей обработки). Токсичность тестируемого образца определяли по NAD(P)H-зависимому микросомальному ферментативному восстановлению МТТ (и, в меньшей степени, по восстановлению МТТ сукцинатдегидрогеназой) в тканях, обработанных контролем и тестируемым образцом. Данные представляли в виде относительной выживаемости (преобразование МТТ по сравнению с отрицательным контролем/контролем с растворителем). Потенциальное влияние на продукцию меланина оценивали путем измерения концентрации меланина, продуцируемого тканями, обработанными тестируемым образцом, по сравнению с тканями, обработанными отрицательным контролем/контролем с растворителем. Данные представляли в форме концентрации меланина, продуцируемого обработанными тестируемым образцом тканями, с

использованием калибровочной кривой содержания меланина. В качестве альтернативы, данные могут быть представлены в виде выраженного в процентах изменения концентрации меланина по сравнению с тканями, обработанными отрицательным контролем/контролем с растворителем.

[0252] Используемые способы представляют собой модификацию методик, предоставленных MatTek Corporation.

Среды и реагенты

[0253] Поддерживающую среду MelanoDerm™ (EPI-100-LLMM) приобретали у MatTek Corporation. Модель кожи MelanoDerm™ (MEL-300-A) приобретали у MatTek Corporation. 1% койевую кислоту (приготовленную в стерильной деионизированной воде) приобретали у Sigma. МТТ (3-[4,5-диметилтиазол-2-ил]-2,5-дифенилтетразолия бромид) приобретали у Sigma. Модифицированную по способу Дульбекко среду Игла (DMEM), содержащую 2 мМ L-глутамин (среда для добавления МТТ), приобретали у Quality Biological. Экстракционный растворитель (изопропанол) приобретали у Aldrich. Стерильный фосфатно-солевой буфер Дульбекко без Ca^{++} и Mg^{++} (CMF-DPBS) приобретали у Invitrogen. Меланин приобретали у Sigma. Стерильную деионизированную воду приобретали у Quality Biological. Solvable приобретали у Perkin Elmer.

Приготовление и доставка тестируемого образца

[0254] Если в данном протоколе не указано иное, то 25 мкл каждого тестируемого образца наносили непосредственно на ткань так, чтобы покрыть верхнюю поверхность. В зависимости от природы тестируемого образца (жидкости, гели, кремы, пены и т. д.) может понадобиться использование дозирующего устройства, сита или другого вспомогательного устройства для обеспечения равномерного распределения тестируемого образца по поверхности ткани.

Путь введения

[0255] В процессе исследования в течение 7 суток, тестируемые образцы местно наносили на ткань MelanoDerm™ каждые 48 часов (в пределах временного интервала 48 ± 2 часа от предыдущей обработки). На каждую ткань наносят 25 микролитров каждого тестируемого образца. На каждую ткань наносят 25 микролитров положительного/отрицательного контроля и контроля с растворителем, соответственно.

Определение pH

[0256] При наличии возможности определяли значение pH для жидкого тестируемого образца в чистом виде (и/или дозируемого раствора в соответствующих случаях). Значение pH определяли с использованием pH-индикаторной бумаги (например, с диапазоном pH 0-14 для оценки и/или с диапазоном pH 5-10 для определения более точной величины). Типичные значения инкремента для pH-индикаторной бумаги с более узким диапазоном определения pH составляли приблизительно от 0,3 до 0,5 единиц pH. Максимальный инкремент для pH-индикаторной бумаги для определения pH составлял 1,0 единицу pH.

Контроли

[0257] Определяющий анализ включал в себя отрицательный контроль, положительный контроль и один контроль с растворителем (DMSO). Ткани MelanoDerm™, принятые за отрицательный контроль анализа, обрабатывали 25 мкл стерильной деионизированной воды. Для нанесения на ткани, принятые за положительный контроль метода анализа, использовали 25 микролитров 1% койевой кислоты (приготовленной в стерильной деионизированной воде и профильтрованной в момент приготовления). До применения 1% койевую кислоту хранили в пробирке, закрытой алюминиевой фольгой, не более 2 часов от времени приготовления. Значения длительности воздействия положительным и отрицательным контролями были идентичны таковым, использованным для тестируемых образцов. В качестве контролей также использовали необработанные ткани.

Оценка самостоятельного восстановления МТТ тестируемым образцом

[0258] Было необходимо оценить способность каждого тестируемого образца самостоятельно восстанавливать МТТ. 1,0 мг/мл раствор МТТ приготавливали в среде для добавления МТТ. Приблизительно 25 мкл тестируемого образца добавляли к 1 мл раствора МТТ, и инкубировали смесь в темноте при $37\pm 1^\circ\text{C}$ в течение 1-3 часов. Отрицательный контроль, 25 мкл стерильной деионизированной воды, тестировали одновременно. Если цвет раствора МТТ становится синим/пурпурным, то имелись основания предполагать, что тестируемый образец восстанавливал МТТ. Нерастворимые в воде тестируемые образцы могут демонстрировать прямое восстановление (потемнение) только на границе фаз между тестируемым образцом и средой.

Описание методики MelanoDerm™

[0259] Согласно описанию методики к набору MelanoDerm™ (MatTek Corporation), растворы хранили, как указано производителем. Ткани MelanoDerm™ хранили при $2-8^\circ\text{C}$ до момента использования.

[0260] В день получения (за сутки до дозированного введения), соответствующий объем поддерживающей среды MelanoDerm™ (EPI-100-LLMM) удаляли и нагревали приблизительно до 37°C . В соответствующие лунки 6-луночных планшетов добавляли 0,9 мл аликвоты EPI-100-LLMM. Перед раскрытием герметизированной упаковки каждую ткань MelanoDerm™ проверяли на наличие пузырей воздуха между агарозным гелем и вставкой культуры клеток. Ткани с пузырями воздуха, покрывающими более 50% области вставки культуры клеток, не использовали. 24-луночные контейнеры для транспортировки извлекали из пластикового мешка, и дезинфицировали их поверхности 70% этанолом. Соответствующее число тканей MelanoDerm™ асептически переносили из 24-луночных контейнеров для транспортировки в 6-луночные планшеты. С целью адаптивирования, ткани MelanoDerm™ инкубировали при $37\pm 1^\circ\text{C}$ в увлажненной атмосфере $5\pm 1\%$ CO_2 в воздухе (стандартные условия культивирования) в течение ночи (по меньшей мере 16 часов). После открытия мешка, любые неиспользованные ткани, остающиеся на транспортировочном агаре в момент переноса тканей, кратко обрабатывали атмосферой 5% $\text{CO}_2/95\%$ воздуха, мешок герметизировали и хранили при $2-8^\circ\text{C}$ для последующего использования.

Определяющий анализ

[0261] Обработка ткани: Спустя по меньшей мере 16 часов после инициации культур, пять тканей MelanoDerm™ (считающихся необработанными на сутки 0) фотографировали цифровой камерой для содействия визуальной оценке степени пигментации тканей в начальный момент времени анализа. Две ткани MelanoDerm™ промывали CMF-DPBS, промокивали насухо стерильной впитывающей бумагой и очищали от избытка жидкости. После промывки, ткани MelanoDerm™ переносили в соответствующие содержащие МТТ лунки и подвергали анализу с МТТ. Три ткани MelanoDerm™ промывали CMF-DPBS, промокивали насухо стерильной впитывающей бумагой и очищали от избытка жидкости. Ткани MelanoDerm™ удаляли из вставки с использованием стерильных скальпелей, помещали в помеченную микроцентрифужную пробирку емкостью 1,5 мл и хранили при $<-60^{\circ}\text{C}$ для последующего анализа меланина.

[0262] Спустя по меньшей мере 16 часов после инициации культур, оставшиеся ткани переносили в новый 6-луночный планшет, содержащий 0,9 мл/лунку свежей предварительно нагретой EPI-100-LLMM. Исследование проводили в течение 7 суток. Пять тканей обрабатывали местно на первые сутки и каждые 48 часов (в пределах временного интервала 48 ± 2 часа от предыдущей обработки) 25 мкл каждого тестируемого образца. Среду каждые сутки обновляли (в пределах временного интервала 24 ± 2 часа от предыдущей «подпитки»); ткани переносили в новый 6-луночный планшет, содержащий 0,9 мл/лунку свежей предварительно нагретой EPI-100-LLMM.

[0263] Пять тканей обрабатывали местно на первые сутки и каждые 48 часов (в пределах временного интервала 48 ± 2 часа от предыдущей обработки) 25 мкл положительного контроля и отрицательного контроля/контроля с растворителем, соответственно. Среду каждые сутки обновляли (в пределах временного интервала 24 ± 2 часа от предыдущей «подпитки»); ткани переносили в новый 6-луночный планшет, содержащий 0,9 мл/лунку свежей предварительно нагретой EPI-100-LLMM. Ткани инкубировали при $37\pm 1^{\circ}\text{C}$ в увлажненной атмосфере $5\pm 1\%$ CO_2 в воздухе (стандартные условия культивирования) в течение соответствующего времени воздействия.

[0264] На сутки дозированного введения, для удаления любого остаточного количества тестируемого образца, ткань MelanoDerm™ сначала осторожно трижды промывали ~500 мкл CMF-DPBS в каждую промывку. CMF-DPBS осторожно вносили пипеткой в лунку, а затем удаляли стерильным аспиратором. Ткани переносили в новый 6-луночный планшет, содержащий 0,9 мл/лунку свежей предварительно нагретой EPI-100-LLMM и обрабатывали соответствующим тестируемым образцом, отрицательным контролем/контролем с растворителем или положительным контролем. Ткани инкубировали при $37\pm 1^{\circ}\text{C}$ в увлажненной атмосфере $5\pm 1\%$ CO_2 в воздухе (стандартные условия культивирования) в течение соответствующего времени воздействия.

[0265] По завершению исследования в течение 7 суток, ткани MelanoDerm™, обработанные отрицательным контролем/контролем с растворителем или положительным контролем и каждым тестируемым образцом, фотографировали цифровой камерой для

содействия визуальной оценке степени пигментации тканей в конце исследования (сутки 7). Затем, по восстановлению МТТ определяли жизнеспособность двух тканей, обработанных положительным и отрицательным контролем, соответственно, и каждым тестируемым образцом. По завершению исследования в течение 7 суток, определяли количество меланина, продуцированного тремя тканями, обработанными каждым тестируемым образцом, положительным контролем и отрицательным контролем/контролем с растворителем, соответственно.

[0266] Анализ с МТТ: Не более чем за два часа до момента использования, $10\times$ маточный раствор МТТ, приготовленный в PBS (профильтрованный в момент приготовления партии) размораживали и разбавляли теплой средой для добавления МТТ с получением 1,0 мг/мл раствора. В каждую помеченную лунку предварительно размеченного 24-луночного планшета добавляют 300 мкл раствора МТТ.

[0267] По завершению воздействия, каждую ткань MelanoDerm™, предназначенную для МТТ анализа, промывали CMF-DPBS (использовали пульверизатор, подходящий для этой стадии), промакивали насухо стерильной впитывающей бумагой и очищали от избытка жидкости. После промывки, ткани MelanoDerm™ переносили в соответствующие содержащие МТТ лунки. 24-луночные планшеты инкубируют в стандартных условиях в течение $3\pm 0,1$ часа.

[0268] Спустя $3\pm 0,1$ часа, ткани MelanoDerm™ промакивали насухо стерильной впитывающей бумагой, очищали от избытка жидкости и переносили в предварительно размеченный 24-луночный планшет, содержащий 2,0 мл изопропанола в каждой помеченной лунке. Планшеты покрывали парафильмом и хранили в холодильнике ($2-8^{\circ}\text{C}$) до момента сбора образцов для последнего времени воздействия. В случае необходимости, планшеты хранили в течение ночи (или до 24 часов после сбора образцов для последнего времени воздействия) в холодильнике до экстрагирования МТТ. Затем, планшеты перемешивали встряхиванием по меньшей мере в течение 2 часов при комнатной температуре. По завершению периода экстрагирования, жидкость во вставках для клеточных культур декантировали в лунку, из которой была взята вставка для клеточных культур. Раствор экстракта смешивали, и переносили 200 мкл в соответствующие лунку 96-луночного планшета. В лунки, помеченные как холостой контроль, добавляли 200 мкл изопропанола. Оптическую плотность при 550 нм (OD_{550}) в каждой лунке измеряли на планшетном ридере Molecular Devices Vmax.

[0269] Анализ меланина: По завершению соответствующего времени воздействия, для удаления любых остаточных количеств тестируемого образца или избытка фенолового красного из культуральной среды ткани MelanoDerm™, предназначенные для анализа меланина, осторожно трижды промывали ~ 500 мкл CMF-DPBS в каждую промывку, промакивали насухо стерильной впитывающей бумагой и очищали от избытка жидкости. Ткани MelanoDerm™ фотографировали с использованием цифровой камеры по завершению анализа. Ткани MelanoDerm™ удаляли из вставки для клеточных культур с использованием стерильных скальпелей, помещали в помеченную микроцентрифужную

пробирку емкостью 1,5 мл и хранили при $<-60^{\circ}\text{C}$ для последующего анализа меланина.

[0270] На сутки экстрагирования меланина, отделенные ткани размораживали при комнатной температуре приблизительно в течение 10 мин. В каждую микроцентрифужную пробирку добавляли 250 мкл Solvable, и инкубировали пробирки по меньшей мере в течение 16 часов при $60\pm 2^{\circ}\text{C}$. Путем растворения меланина в Solvable приготавливали 1 мг/мл маточный раствор стандарта меланина. Серию стандартов меланина в диапазоне концентраций от 0 мг/мл до 0,33 мг/мл приготавливали из 1 мг/мл маточного раствора. Серию стандартов приготавливали путем добавления 0,6 мл 1 мг/мл маточного раствора стандарта меланина к 1,2 мл Solvable, с последующим приготовлением серии еще из пяти разбавлений (кратность разбавления 3). Solvable использовали в качестве нулевого стандарта. Серии стандартов меланина и Solvable инкубировали по меньшей мере в течение 16 часов при $60\pm 2^{\circ}\text{C}$.

[0271] Спустя по меньшей мере 16 часов после начала экстрагирования меланина, содержащие образцы пробирки (представляющие собой меланин, экстрагированный из тканей MelanoDerm™) и стандарты охлаждали до комнатной температуры и центрифугировали при 13000 об/мин в течение 5 мин при комнатной температуре. В соответствующие лунки 96-луночного планшета переносили 200 мкл образцов (один повтор) или стандартов (два повтора). В лунки, обозначенные как холостые, в двух повторах переносили 200 мкл Solvable. Оптическую плотность при 490 нм (OD_{490}) для каждой лунки измеряли на планшетном ридере Molecular Devices Vmax (с выбранной функцией Automix).

Инактивированные контроли для оценки восстановления МТТ остаточными количествами тестируемого образца

[0272] Для того, чтобы продемонстрировать, что остаточные количества тестируемого образца самостоятельно не восстанавливают МТТ, в процессе определяющего анализа проводили функциональную проверку с целью показать, что тестируемый образец не связывается с тканью и не приводит к ложному сигналу о восстановлении МТТ.

[0273] Для того, чтобы определить, восстанавливают ли МТТ остаточные количества тестируемого образца, использовали инактивированную заморозкой контрольную ткань. Инактивированную заморозкой ткань получали путем помещения необработанных тканей MelanoDerm™/EpiDerm™ (Melanoderm™ без меланоцитов) в морозильную камеру при -20°C по меньшей мере на ночь, размораживания до комнатной температуры с последующим повторным замораживанием. После инактивации, ткань может неограниченное время храниться в морозильной камере. Инактивированные заморозкой ткани могут быть получены в готовом виде от MatTek Corporation и храниться в морозильной камере при -20°C до момента использования. Для исследования восстановления остаточными количествами тестируемого образца, инактивированные ткани обычным образом обрабатывали тестируемым образцом. Все аналитические процедуры проводили тем же образом, что и для жизнеспособной ткани. По причине того, что в результате присутствия

в инактивированной ткани остаточного количества NADH и ассоциированных ферментов ожидается незначительное восстановление МТТ, параллельно тестировали по меньшей мере один инактивированный контроль, обработанный стерильной деионизированной водой (отрицательный инактивированный контроль).

[0274] Если в инактивированном контроле, обработанном тестируемым образцом, наблюдается незначительное восстановление МТТ, или оно отсутствует, то наблюдаемое восстановление МТТ в жизнеспособной ткани, обработанной тестируемым образцом, может быть приписано жизнеспособным клеткам. Если в инактивированном контроле, обработанном тестируемым образцом, наблюдается значительное восстановление МТТ (по сравнению с обработанной жизнеспособной тканью), то следует предпринять дополнительные шаги с целью учета химического восстановления, или тестируемый образец не может считаться пригодным для тестирования в данной системе. Значения OD₅₅₀ для инактивированных контрольных образцов анализируют, как описано ниже.

[0275] Анализ данных

[0276] Рассчитывали среднее значение OD₅₅₀ для холостых лунок. Скорректированное среднее значение OD₅₅₀ для отрицательного контроля/контроля с растворителем определяли путем вычитания среднего значения OD₅₅₀ для холостых лунок из их средних значений OD₅₅₀. Скорректированные значения OD₅₅₀ для воздействий отдельным тестируемым образцом и воздействия положительным контролем определяли путем вычитания среднего значения OD₅₅₀ для холостых лунок из каждого из значений. Все расчеты проводили с использованием электронной таблицы Excel. Хотя обсуждаемые алгоритмы используют для расчета конечного показателя при анализе на групповом уровне обработки, те же расчеты могут применяться в отношении отдельных повторов.

Скорректированное значение OD₅₅₀ для воздействия тестируемым образцом = Значение OD₅₅₀ для воздействия тестируемым образцом - Среднее значение OD₅₅₀ для холостого контроля

[0277] В случае использования инактивированного контроля (КС), для корректировки количества МТТ, самостоятельно восстановленного остаточными количествами тестируемого образца, проводили следующие дополнительные расчеты. Для определения действительных значений OD₅₅₀ для инактивированных контролей, обработанных тестируемыми образцами, исходное значение OD₅₅₀ для инактивированного контроля, обработанного отрицательным контролем, вычитали из исходных значений OD₅₅₀ для каждого из инактивированных контролей, обработанных тестируемыми образцами.

Действительное значение OD₅₅₀ для каждого КС, обработанного тестируемым образцом = Исходное значение OD₅₅₀ для каждого КС, обработанного тестируемым образцом - Исходное значение OD₅₅₀ для КС, обработанного отрицательным контролем/контролем с растворителем

[0278] Действительные значения OD₅₅₀ представляют собой количество МТТ, восстановленного путем самостоятельного восстановления остаточными количествами

тестируемого образца при конкретных значениях времени воздействия. В общем, если действительное значение OD_{550} превышает 0,150, то для получения конечного скорректированного значения OD_{550} действительное значение восстановления МТТ вычитают из скорректированных значений OD_{550} жизнеспособных обработанных тканей. Эти конечные скорректированные значения OD_{550} затем используют для определения выраженной в процентах жизнеспособности контрольных образцов.

Конечное скорректированное значение OD_{550} = скорректированное значение OD_{550} для обработанных тестируемым образцом тканей (жизнеспособных) - Действительное значение OD_{550} для обработанных тестируемым образцом тканей (КС)

[0279] В завершение, могут быть проведены следующие расчеты, выраженные в процентах к контролю:

Жизнеспособность (%) = [(Конечное скорректированное значение OD_{550} для тестируемого образца или положительного контроля)/(скорректированное среднее значение OD_{550} для отрицательного контроля/контроля с растворителем)] \times 100

[0280] Анализ меланина: Исходные данные оптической плотности собирали, сохраняли в виде файла печати и импортировали в электронную таблицу Excel. Собирали исходные данные оптической плотности. Определяли значение OD_{490} для каждого тестируемого образца (представляющего собой меланин, экстрагированный из необработанной ткани MelanoDerm™ на сутки 0, ткани MelanoDerm™, обработанной каждым тестируемым образцом, отрицательным контролем/контролем с растворителем или положительным контролем на сутки 7) и стандартов меланина. Скорректированное значение OD_{490} для тестируемых образцов и каждого стандарта меланина определяли путем вычитания значения OD_{490} для холостой лунки. Калибровочную кривую строили в виде концентрационной зависимости стандартов в мг/мл (ось Y) относительно соответствующей скорректированной оптической плотности. Количество меланина в каждой отдельной ткани интерполировали из калибровочной кривой (линейно). В завершение, рассчитывали среднюю концентрацию меланина для каждой группы с обработкой тестируемым образцом или контролем, соответственно.

Результаты

[0281] На Фиг. 1 обобщены результаты анализа средней выживаемости тканей и концентрации меланина для тестируемых образцов, положительного контроля и необработанных тканей. Предварительные результаты указывают на то, что определенные составы с карбазольными соединениями согласно настоящему изобретению могут независимо демонстрируют умеренную способность осветлять кожу, что смягчает эффект карбазолов, приводящих к потемнению кожи.

[0282] На Фиг. 2 обобщены результаты анализа средней выживаемости тканей и концентрации меланина для тестируемых образцов и необработанных тканей, наблюдавшиеся в отдельном эксперименте. Комбинированные виды обработки, включая, например, обработку малассезином и индирубином, демонстрируют более выраженные эффекты осветления кожи, чем любое из соединений само по себе.

Пример 6

Способность индирубина и производных индирубина индуцировать меланогенез

[0283] Целью данного исследования являлось наблюдение и документирование меланогенеза и жизнеспособности меланоцитов B16, подвергнутых воздействию индирубина и производных индирубина.

Материалы и реагенты

[0284] Посевная среда содержит DMEM без L-глутамин, FBS, пенициллин/стрептомицин и L-глутамин. Аналитическая среда содержит DMEM без фенолового красного и L-глутамин, FBS, пенициллин/стрептомицин, L-глутамин и aMSH. Другие реагенты включают в себя койевую кислоту, DMSO и МТТ. Тестируемыми клетками являются клетки B16 (ATCC CRL-6475).

Протокол

[0285] Меланоциты B16 культивируют до степени срастания 70% и собирают. Клетки высевают в 96-луночные планшеты с плотностью 4000 клеток на лунку и оставляют для прикрепления в течение ночи. На следующие сутки, тестируемые образцы и контроли разбавляют аналитической средой B16. После инкубации в течение ночи, среду удаляют путем аспирации, и добавляют 200 мкл тестируемых образцов и контролей. Клетки инкубируют при 37°C и 10% CO₂ в течение 72 часов. После инкубации в течение 72 часов, собирают данные оптической плотности при 540 нм. Среду удаляют, заменяют 100 мкл посевной среды с 1 мг/мл МТТ и инкубируют в течение 2 часов при 37°C и 10% CO₂. Среду с МТТ удаляют, заменяют 200 мкл смеси 95% этанол/5% изопропанол и оставляют перемешиваться встряхиванием в течение 15 мин. Затем, собирают данные оптической плотности МТТ при 570 нм.

Результаты

[0286] Ожидается, что соединения и композиции согласно настоящему изобретению, включая индирубин и его химические аналоги, будут ингибировать меланогенез. Ожидается, что химические аналоги индирубина будут демонстрировать, например, более эффективную способность ингибировать меланогенез по сравнению с индирубином. По аналогии, ожидается, что определенные химические аналоги индирубина будут демонстрировать, например, менее эффективную способность ингибировать меланогенез по сравнению с индирубином.

Пример 7

Эффективность *in vitro*

[0287] Ожидается, что соединения и композиции согласно настоящему изобретению будут индуцировать апоптоз меланоцитов и модулировать активность меланоцитов, продукцию меланина, биогенез меланосом и/или перенос меланосом по меньшей мере так же эффективно, как и индирубин. Также предполагается, что определенные соединения и композиции согласно настоящему изобретению будут влиять на указанные биологические процессы с меньшей эффективностью, чем индирубин. Такие соединения и композиции могут характеризоваться более выигрышными профилями токсичности по сравнению с

более эффективными веществами.

Пример 8

Эффективность *in vivo*

[0288] Ожидается, что соединения и композиции согласно настоящему изобретению будут по меньшей мере так же эффективны, как и индирубин, модулировать пигментацию кожи, включая осветление кожи и коррекцию гиперпигментации/гипопигментации, вызванных различными нарушениями. Также ожидается, что соединения и композиции согласно настоящему изобретению будут демонстрировать выигрышные фармакокинетические профили, например, применительно к времени полувыведения и всасывания. Определенные соединения будут демонстрировать большее время полувыведения, тогда как другие будут демонстрировать меньшее время полувыведения. По аналогии, определенные соединения будут демонстрировать разные профили всасывания, причем для некоторых соединений для полного всасывания потребуется большее время, а для других для полного всасывания потребуется меньшее время.

Пример 9

Апоптоз-индуцирующая активность композиций, содержащих полученные из *Malassezia* соединения и/или их химические аналоги

Реагенты

[0289] Набор для анализа мертвых клеток/апоптоза с Alexa Fluor 488/аннексином V, фетальная бычья сыворотка (FBS), 0,25% трипсин-EDTA (1×), набор для анализа Caspase-Glo 3/7, среда RPMI 1640, модифицированная по способу Дульбекко среда Игла и антибиотический/противогрибковый раствор (100×).

[0290] Линии клеток MeWo (ATCC® HTB-65™), WM115 (ATCC® CRL-1675) и B16F1 (ATCC® CRL-6323) поддерживают в следующих культуральных средах: культуральная среда для MeWo и B16F1: DMEM с добавлением 10% FBS; культуральная среда для WM115: RPMI 1640 с добавлением 10% FBS.

Экспериментальные данные

[0291] Клетки собирают, и определяют число клеток с использованием счетчика клеток Countess. Клетки разбавляют культуральной средой до требуемой плотности. Конечная плотность клеток может составлять, например, 4000 клеток на лунку для обработки в течение 6 ч и 24 ч, и 2000 клеток на лунку для обработки в течение 48 ч и 72 ч. Для анализа с аннексином V используют 384-луночные планшеты с прозрачным дном (Corning 3712), тогда как для анализа с Caspase-Glo используют белые 384-луночные планшеты с непрозрачным дном (Corning 3570). Все планшеты накрывают крышкой и помещают на ночь в условия 37°C и 5% CO₂ для прикрепления клеток.

[0292] Тестируемые соединения растворяют в DMSO до 30 мМ маточного раствора. Для получения концентраций 3 мМ и 0,3 мМ проводят 10-кратные разбавления. В качестве положительного контроля используют 0,9 мМ стауроспорин, и в качестве отрицательного контроля (NC) используют DMSO. С использованием устройства для обращения с жидкостями Echo550 из планшета-источника соединения в 384-луночные культуральные

клеточные планшеты переносят 132,5 нл соединений. После указанного времени инкубирования, планшеты удаляют из инкубатора для проведения измерений.

[0293] Тестируемые соединения растворяют в DMSO, EPI-100-LLMM или другом подходящем растворителе, и могут быть получены в соответствии с инструкциями, представленными ниже в Таблицах 2-7. Подходящие растворители хорошо известны специалистам в данной области.

[0294] Для анализа с аннексином V, планшеты удаляют из инкубатора, и удаляют культуральную среду. Клетки дважды промывают 40 мкл PBS, и в каждую лунку добавляют 15 мкл рабочего раствора из предварительно смешанных аннексина V-FITC и красителя Hoechst 33342. Планшеты инкубируют при комнатной температуре в течение 20 мин, герметизируют и центрифугируют в течение 1 мин при 1000 об/мин для удаления пузырей. Сбор данных с планшетов производят с использованием ImageXpress Nano.

[0295] Для анализа с Caspase-Glo, планшеты удаляли из инкубатора и уравнивали при комнатной температуре в течение 15 мин. Реагенты Caspase-Glo 3/7 также размораживали и уравнивали до комнатной температуры до проведения эксперимента. Реагент Caspase-Glo добавляли в требуемые лунки в соотношении 1:1 с культуральной средой. Планшеты инкубировали при комнатной температуре в течение 15 мин и проводили сбор данных с использованием планшетного ридера EnSpire™. Кратность индукции рассчитывали в соответствии со следующей формулой: Кратность индукции= $Lum_{образец}/Lum_{NC}$.

Анализ с аннексином V и анализ каспазы-3/7

Результаты

[0296] Ожидается, что соединения и композиции согласно настоящему изобретению, включая композиции #1-5, будут индуцировать гибель клеток. Ожидается, что композиции согласно настоящему изобретению будут демонстрировать, например, более эффективную апоптоз-индуцирующую активность по сравнению по меньшей мере с одним отдельным соединением, входящим в состав композиции. По аналогии, ожидается, что определенные композиции согласно настоящему изобретению будут демонстрировать, например, менее эффективную апоптоз-индуцирующую активность по сравнению по меньшей мере с одним отдельным соединением, входящим в состав композиции. Такие композиции могут характеризоваться более выигрышными профилями токсичности по сравнению с более эффективными веществами.

Пример 10

Жизнеспособность клеток после воздействия композициями, содержащими полученные из *Malassezia* соединения и/или их химические аналоги

Реагенты

[0297] Анализ с CellTiter-Glo® 2.0

Экспериментальные данные

[0298] Для анализа CellTiter-Glo, тестируемые соединения приготавливали в виде 10 мМ раствора в DMSO. Соединения последовательно разбавляли с получением 12

концентраций. В каждую лунку 384-луночного планшета (Corning 3570) вносили 40 мкл клеток из суспензии с плотностью 100000 клеток на мл. Планшеты инкубировали в течение ночи при 37°C, 5% CO₂ и влажности 95%. Тестируемые соединения добавляли, используя DMSO в качестве контроля с несущей средой. Планшеты инкубировали при 37°C, 5% CO₂ и влажности 95% в течение 6, 24 или 48 часов, и добавляли в лунки 40 мкл реагента CellTiter-Glo для оценки жизнеспособности клеток.

[0299] Тестируемые композиции растворяют в DMSO, EPI-100-LLMM или другом подходящем растворителе, и могут быть приготовлены в соответствии с инструкциями, представленными ниже в Таблицах 2-7. Подходящие растворители хорошо известны специалистам в данной области.

Результаты

[0300] Ожидается, что соединения и композиции согласно настоящему изобретению, включая композиции #1-5, будут индуцировать гибель клеток. Ожидается, что композиции согласно настоящему изобретению будут демонстрировать, например, более эффективную апоптоз-индуцирующую активность по сравнению по меньшей мере с одним отдельным соединением, входящим в состав композиции. По аналогии, ожидается, что определенные композиции согласно настоящему изобретению будут демонстрировать, например, менее эффективную апоптоз-индуцирующую активность по сравнению по меньшей мере с одним отдельным соединением, входящим в состав композиции. Такие композиции могут характеризоваться более выигрышными профилями токсичности по сравнению с более эффективными веществами.

Пример 11

Способность композиций, содержащих полученные из *Malassezia* соединения и/или их химические аналоги, активировать рецептор ароматических углеводов

Аналитические процедуры

[0301] Культуральную среду для стабильно трансфицированных клеток HepG2 приготавливают путем добавления DMEM с высоким содержанием глюкозы и L-глутамин, а также 10% FBS.

[0302] Клетки HepG2-AhR-Luc культивируют в колбах T-75 при 37°C, 5% CO₂ и относительной влажности 95%. Клетки оставляют достигать степени срастания 80-90%, после чего отделяют и разъединяют.

[0303] Культивированные клетки промывают 5 мл PBS. PBS удаляют аспирацией, в колбу добавляют 1,5 мл трипсина, и инкубируют клетки при 37°C приблизительно в течение 5 мин или до тех пор, пока клетки не отделяются, оставаясь на плаву. Трипсин инактивируют путем добавления избытка содержащей сыворотку среды.

[0304] Суспензию клеток переносят в коническую пробирку и центрифугируют при 120g в течение 10 мин для осаждения клеток. Клетки ресуспендируют в посевной среде с нужной плотностью. В 384-луночный культуральный планшет переносят 40 мкл клеток (5×10^3 клеток на лунку). Планшеты помещают в инкубатор при 37°C на 24 часа.

[0305] После этого, приготавливают маточные растворы тестируемых соединений,

тестируемых композиций и положительный контроль с омепразолом. Растворы соединений и композиций переносят с использованием Echo550 в аналитический планшет. Затем, планшет возвращают в инкубатор для обработки соединением/композицией.

[0306] Позднее, после обработки в течение 24 часов, планшет удаляют из инкубатора и оставляют охлаждаться при температуре окружающей среды. В каждую лунку добавляют 30 мкл реагента One-Glo, равных по объему культуральной среде. Клетки оставляют для лизиса по меньшей мере на 3 мин, а затем проводят измерение на люцинометре.

[0307] Дозовый ответ отображают в виде графиков с использованием нелинейного регрессионного анализа в программном обеспечении XLfit, и также рассчитывают значения EC₅₀.

Результаты

[0308] Ожидается, что соединения и композиции согласно настоящему изобретению, включая композиции #1-5, будут модулировать активность AhR. Ожидается, что композиции согласно настоящему изобретению будут демонстрировать, например, более эффективную агонистическую активность в отношении AhR по сравнению по меньшей мере с одним отдельным соединением, входящим в состав композиции. По аналогии, ожидается, что определенные что композиции согласно настоящему изобретению будут демонстрировать, например, менее эффективную агонистическую активность в отношении AhR по сравнению по меньшей мере с одним отдельным соединением, входящим в состав композиции. Ожидается, что композиции согласно настоящему изобретению также будут демонстрировать, например, более эффективную антагонистическую активность в отношении AhR по сравнению по меньшей мере с одним отдельным соединением, входящим в состав композиции. По аналогии, ожидается, что определенные что композиции согласно настоящему изобретению будут демонстрировать, например, менее эффективную антагонистическую активность в отношении AhR по сравнению по меньшей мере с одним отдельным соединением, входящим в состав композиции.

Пример 12

Анализ с MelanoDerm™

[0309] Целью данного исследования являлась оценка на модели кожи MelanoDerm™ потенциального действия тестируемых соединений в качестве модуляторов меланогенеза в коже после повторных воздействий. Во-вторых, целью данного исследования являлась оценка на модели кожи MelanoDerm™ возможного раздражения кожи после повторных воздействий тестируемым образцом. Токсичность определяли путем измерения относительного преобразования МТТ (3-[4,5-диметилтиазол-2-ил]-2,5-дифенилтетразолия бромид) в тканях, обработанных тестируемым образцом, по сравнению с тканями, обработанными отрицательным контролем/контролем с растворителем. Потенциальное влияние на продукцию меланина определяли путем измерения концентрации меланина, продуцируемого тканями, обработанными тестируемым образцом, по сравнению с тканями, обработанными отрицательным контролем/контролем с растворителем.

Идентификация тестируемых веществ и контролей исследования

Таблица 4

Образцы, протестированные в форме разбавления

Обозначение тестируемого образца	Обозначение спонсора	Дозируемая концентрация	Инструкции по приготовлению
18АН47	DMSO (контроль с растворителем)	0,5% (об./об.)	Контроль с растворителем разбавляли (об./об.) EPI-100-LLMM до конечной концентрации 0,5%; разбавленный контроль с растворителем перемешивали на вортексе по меньшей мере в течение 1 мин и дозированно наносили на ткани в дозируемом объеме 25 мкл. Для каждой обработки ткани приготавливали общий объем ~0,5 мл.
17AJ41	Малассезин (CV-8684) (положительный контроль)	500 мкМ	Используя исходный маточный раствор, предоставленный спонсором/приготовленный из предоставленного спонсором твердого вещества, тестируемый образец/контроль разбавляли (об./об.) EPI-100-LLMM до указанной дозируемой концентрации. Разбавление тестируемого образца перемешивали на вортексе по меньшей мере в течение 1 мин, нагревали при $37^{\circ}\pm 1^{\circ}\text{C}$ (на водяной бане) в течение 15 мин, снова перемешивали на вортексе по меньшей мере в течение 1 мин, и дозированно наносили на ткани в дозируемом объеме 25 мкл. Для каждой обработки ткани приготавливали общий объем ~0,5 мл.
17AJ55	O52	650 мкМ	
18AA21	<i>Malassezia</i> индол А	650 мкМ	
18AF50	AB17151	300 мкМ	
18АН15	AB17590	300 мкМ	
18АН21	AB11644	650 мкМ	
18АН38	индол-3-карбальдегид	500 мкМ	
18АН39	D-индол-3-молочная кислота	500 мкМ	

Таблица 5

Композиция #1

Обозначение тестируемого образца	Обозначение спонсора	Инструкция для приготовления рабочих маточных растворов	Дозируемая концентрация	Инструкция для приготовления разбавлений, используемых для дозированного нанесения на ткани
17AD42	индокарбазол (ICZ)	Рабочий 360 мкМ маточный раствор приготавливали из предоставленного маточного раствора в DMSO следующим образом: Маточный раствор размораживали при комнатной температуре и перемешивали на вортексе в течение ~1 мин. Соответствующий объем, необходимый для приготовления ~0,5 мл/1,0 мл рабочего маточного раствора переносили в новый флакон и разбавляли EPI-100-LLMM до 360 мкМ. Разбавление перемешивали на вортексе по меньшей мере в течение 1 мин, нагревали при 37°±1°С (на водяной бане) в течение 15 мин и снова перемешивали на вортексе по меньшей мере в течение 1	Дозируемая концентрация каждого из компонентов составляла 18 мкМ.	Пятьдесят (50) мкл каждого рабочего маточного раствора переносили в новый флакон (суммарный объем 700 мкл) и смешивали с 300 мкл EPI-100-LLMM с получением общего объема 1000 мкл. Разбавление перемешивали на вортексе по меньшей мере в течение 1 мин, после чего наносили на ткани.
17AJ41	малассезин (CV-8684) (положительный контроль)			
17AJ47	соединение A5 (также известно как кетомалассезин)			
17AJ55	O52			
18AA21	<i>Malassezia</i> индол А			
18AA22	пителиацитрин			
18AA24	FICZ			
18AD42	индирубин			
18AH16	трипантрин			
18AH20	<i>Malassezia</i> -молочная кислота			
18AH24	2-гидрокси-1-(1H-индол-3-ил)этанол			
18AH38	индол-3-карбальдегид			

18АН39	D-индол-3-молочная кислота	мин, после чего производили разбавление.		
18АН44	(индол-3-ил)-пировиноградная кислота			

Таблица 6

Композиция #2

Обозначение тестируемого образца	Обозначение спонсора	Инструкция для приготовления рабочих маточных растворов	Дозируемая концентрация	Требуемый объем (мкл)	Инструкция для приготовления разбавлений, используемых для дозированного нанесения на ткани
17AD42	индолокарбазол (ICZ)	Рабочий 360 мкМ маточный раствор приготавливали из предоставленного маточного раствора в DMSO следующим образом: Маточный раствор размораживали при комнатной температуре и перемешивали на вортексе в течение ~1 мин. Соответствующий объем, необходимый для приготовления ~0,5 мл/1,0 мл рабочего маточного раствора переносили в новый флакон и разбавляли EPI-100-LLMM до 360	12,6 мкМ	35	Объем дозируемого маточного раствора для каждого компонента переносили в новый флакон и смешивали с 297 мкл EPI-100-LLMM. Разбавление
17AJ41	малассезин (CV-8684) (положительный контроль)		50,4 мкМ	140	
17AJ47	соединение A5 (также известно как кетомалассезин)		10,1 мкМ	28	
17AJ55	O52		10,1 мкМ	28	
18AA21	<i>Malassezia</i> индол А		10,1 мкМ	28	
18AA22	пителиацитрин		50,4 мкМ	140	
18AA24	FICZ		10,1 мкМ	28	
18AD42	индирубин		24,5 мкМ	68	
18АН16	триптантрин		24,5 мкМ	68	
18АН20	<i>Malassezia</i> -молочная кислота	10,1 мкМ	28		

18АН24	2-гидрокси-1-(1Н-индол-3-ил)этанон	мкМ. Разбавление перемешивали на вортексе по меньшей мере в течение 1 мин, нагревали при $37^{\circ}\pm 1^{\circ}\text{C}$ (на водяной бане) в течение 15 мин и снова перемешивали на вортексе по меньшей мере в течение 1 мин, после чего производили разбавление.	10,1 мкМ	28	перемешивали на вортексе по меньшей мере в течение 1 мин, после чего наносили на ткани.
18АН38	индол-3-карбальдегид		10,1 мкМ	28	
18АН39	D-индол-3-молочная кислота		10,1 мкМ	28	
18АН44	(индол-3-ил)-пировиноградная кислота		10,1 мкМ	28	

Таблица 7

Композиция #3

Обозначение тестируемого образца	Обозначение спонсора	Инструкция для приготовления рабочих маточных растворов	Дозируемая концентрация (мкМ)	Требуемый объем (мкл)	Инструкция для приготовления разбавлений, используемых для дозированного нанесения на ткани
17AJ41	малассезин (CV-8684) (положительный контроль)	Рабочий 360 мкМ маточный раствор приготавливали из предоставленного маточного раствора в DMSO следующим образом: Маточный раствор размораживали при комнатной температуре и перемешивали на вортексе в течение ~1 мин. Соответствующий объем, необходимый для приготовления ~0,5	50,4	140	Объем дозируемого маточного раствора для каждого компонента переносили в новый флакон и
17AD46	соединение A5 (также известно как кетомалассезин)		10,1	28	
17AJ55	O52		10,1	28	
18AA21	<i>Malassezia</i> индол А		10,1	28	
18AD42	индирубин		24,5	68	

18АН20	АВ17227 (также известно как <i>Malassezia</i> -молочная кислота)	мл/1,0 мл рабочего маточного раствора переносили в новый флакон и разбавляли EPI-100-LLMM до 360 мкМ. Разбавление перемешивали на вортексе по меньшей мере в течение 1 мин, нагревали при 37°±1°С (на водяной бане) в течение 15 мин и снова перемешивали на вортексе по меньшей мере в течение 1 мин, после чего производили разбавление.	10,1	28	смешивали с 568 мкл EPI-100-LLMM. Разбавление перемешивали на вортексе по меньшей мере в течение 1 мин, после чего наносили на ткани.
18АН24	2-гидрокси-1-(1H-индол-3-ил)этанол		10,1	28	
18АН38	индол-3-карбальдегид		10,1	28	
18АН39	D-индол-3-молочная кислота		10,1	28	
18АН44	(индол-3-ил)- пировиноградная кислота		10,1	28	

Таблица 8

Композиция #4

Обозначение тестируемого образца	Обозначение спонсора	Инструкция для приготовления рабочих маточных растворов	Дозируемая концентрация (мкМ)	Требуемый объем (мкл)	Инструкция для приготовления разбавлений, используемых для дозированного нанесения на ткани
17AD42	CV-8685 (также известно как индолакарбазол или ICZ)	Рабочий 360 мкМ маточный раствор приготавливали из предоставленного маточного раствора в DMSO следующим образом: Маточный раствор размораживали при комнатной	12,6	35	Объем дозируемого маточного раствора для каждого
17AJ41	малассезин (CV-8684) (положительный контроль)		50,4	140	

17AD46	соединение A5 (CV-8819) (также известно как кетомалассезин)	температуре и перемешивали на вортексе в течение ~1 мин.	10,1	28	компонента переносили в новый флакон и смешивали с 505 мкл EPI-100-LLMM. Разбавление перемешивали на вортексе по меньшей мере в течение 1 мин, после чего наносили на ткани.
17AJ55	O52 (AB12976)	Соответствующий объем, необходимый для приготовления ~0,5 мл/1,0 мл	10,1	28	
18AA21	<i>Malassezia</i> индол А (AB17011)	рабочего маточного раствора	10,1	28	
18AA24	FICZ	переносили в новый флакон и разбавляли EPI-100-LLMM до 360 мкМ.	10,1	28	
18AD42	индирубин	Разбавление перемешивали на вортексе по меньшей мере в течение 1 мин, нагревали при 37 \pm 1 $^{\circ}$ C (на водяной бане) в течение 15 мин и снова перемешивали на вортексе по меньшей мере в течение 1 мин, после чего производили разбавление.	24,5	68	
18AH20	AB17227 (также известно как <i>Malassezia</i> -молочная кислота)		10,1	28	
18AH24	2-гидрокси-1-(1H-индол-3-ил)этанон		10,1	28	
18AH38	индол-3-карбальдегид		10,1	28	
18AH39	D-индол-3-молочная кислота		10,1	28	
18AH44	(индол-3-ил)-пировиноградная кислота		10,1	28	

Таблица 9

Композиция #5

Обозначение тестируемого образца	Обозначение спонсора	Инструкция для приготовления рабочих маточных растворов	Дозируемая концентрация (мкМ)	Требуемый объем (мкл)	Инструкция для приготовления разбавлений, используемых для дозированного нанесения на ткани
----------------------------------	----------------------	---	-------------------------------	-----------------------	---

17AD42	CV-8685 (также известно как индолокарбазол или ICZ)	Рабочий 360 мкМ маточный раствор приготавливали из предоставленного маточного раствора в DMSO следующим образом: Маточный раствор размораживали при комнатной температуре и перемешивали на вортексе в течение ~1 мин. Соответствующий объем, необходимый для приготовления ~0,5 мл/1,0 мл рабочего маточного раствора переносили в новый флакон и разбавляли EPI-100-LLMM до 360 мкМ. Разбавление перемешивали на вортексе по меньшей мере в течение 1 мин, нагревали при 37°±1°С (на водяной бане) в течение 15 мин и снова перемешивали на вортексе по меньшей мере в течение 1 мин, после чего производили разбавление.	74,9	208	Объем дозируемого маточного раствора для каждого компонента переносили в новый флакон и смешивали с 306 мкл EPI-100-LLMM. Разбавление перемешивали на вортексе по меньшей мере в течение 1 мин, после чего наносили на ткани.
17AJ41	малассезин (CV-8684) (положительный контроль)		10,1	28	
18AA22	пителиацитрин (AB17014)		10,1	28	
18AA24	FICZ		74,9	208	
18AD42	индирубин		24,8	69	
18AH16	триптантрин		10,1	28	
18AH24	2-гидрокси-1-(1H-индол-3-ил)этанон		10,1	28	
18AH39	D-индол-3-молочная кислота		24,8	69	
18AH44	(индол-3-ил)- пировиноградная кислота	10,1	28		

[0310] Контроли включают в себя: положительный контроль - малассезин (CV-8684) (500 мкМ) (17AJ41) и контроль с растворителем - DMSO (диметилсульфоксид) в EPI-100-LLMM.

[0311] Кроме того, тестируемый образец и контроли наносили на группы из 4 тканей, в которых 2 ткани использовали для получения показателя жизнеспособности ткани (МТТ), и 2 ткани для получения показателя меланина, соответственно.

Тест-система

[0312] В данном исследовании использовали модель кожи MelanoDerm™ производства MatTek Corporation (Ashland, MA). Ткань MelanoDerm™ состоит из нормальных полученных от человека эпидермальных кератиноцитов (NHEK) и меланоцитов (NHM), которые культивировали до формирования многослойной, высокодифференцированной модели эпидермиса человека. NHM в сокультурах претерпевают спонтанный меланогенез, приводящий к формированию тканей с различающимися уровнями пигментации. Культуры выращивали во вставках для клеточных культур на границе раздела воздух-жидкость, что позволяло производить местное нанесение модуляторов кожи. Модель MelanoDerm™ обладает морфологическими и ультраструктурными характеристиками, подобными встречающимся *in vivo*. NHM, локализованные в базальном слое клеток тканей MelanoDerm™, являются дендритными и спонтанно продуцируют гранулы меланина, которые поступательно заселяют слои ткани. Таким образом, тест-систему используют для проведения скрининга веществ, которые могут ингибировать или стимулировать продукцию меланина по сравнению с отрицательным контролем.

Дизайн и методология эксперимента

[0313] Дизайн эксперимента при проведении данного исследования состоял из определения значения pH тестируемого образца в чистом виде при наличии возможности (и/или дозируемого раствора в соответствующих случаях) и определяющего анализа на модели кожи MelanoDerm™ для определения относительной жизнеспособности тканей и возможного действия тестируемого образца в качестве модулятора меланогенеза после повторных воздействий. Модель кожи MelanoDerm™ подвергали воздействию тестируемых образцов всего в течение 7 суток. Тестируемые образцы местно наносили на модель кожи MelanoDerm™ каждые 48 часов (в пределах временного интервала 48 ± 2 часа от предыдущей обработки). Токсичность тестируемого образца определяли по NAD(P)H-зависимому микросомальному ферментативному восстановлению МТТ (и, в меньшей степени, по восстановлению МТТ сукцинатдегидрогеназой) в тканях, обработанных контролем и тестируемым образцом. Данные представляли в виде относительной выживаемости (преобразование МТТ по сравнению с отрицательным контролем/контролем с растворителем). Потенциальное влияние на продукцию меланина оценивали путем измерения концентрации меланина, продуцируемого тканями, обработанными тестируемым образцом, по сравнению с тканями, обработанными отрицательным контролем/контролем с растворителем. Данные представляли в форме концентрации

меланина, продуцируемого обработанными тестируемым образцом тканями, с использованием калибровочной кривой содержания меланина. В качестве альтернативы, данные могут быть представлены в виде выраженного в процентах изменения концентрации меланина по сравнению с тканями, обработанными отрицательным контролем/контролем с растворителем.

[0314] Используемые способы представляют собой модификацию методик, предоставленных MatTek Corporation.

Среды и реагенты

[0315] Поддерживающую среду MelanoDerm™ (EPI-100-LLMM) приобретали у MatTek Corporation. Модель кожи MelanoDerm™ (MEL-300-A) приобретали у MatTek Corporation. 1% койевую кислоту (приготовленную в стерильной деионизированной воде) приобретали у Sigma. МТТ (3-[4,5-диметилтиазол-2-ил]-2,5-дифенилтетразолия бромид) приобретали у Sigma. Модифицированную по способу Дульбекко среду Игла (DMEM), содержащую 2 мМ L-глутамин (среда для добавления МТТ), приобретали у Quality Biological. Экстракционный растворитель (изопропанол) приобретали у Aldrich. Стерильный фосфатно-солевой буфер Дульбекко без Ca^{++} и Mg^{++} (CMF-DPBS) приобретали у Invitrogen. Меланин приобретали у Sigma. Стерильную деионизированную воду приобретали у Quality Biological. Solvable приобретали у Perkin Elmer.

Приготовление и доставка тестируемого образца

[0316] Если в данном протоколе не указано иное, то 25 мкл каждого тестируемого образца наносили непосредственно на ткань так, чтобы покрыть верхнюю поверхность. В зависимости от природы тестируемого образца (жидкости, гели, кремы, пены и т. д.) может понадобиться использование дозирующего устройства, сита или другого вспомогательного устройства для обеспечения равномерного распределения тестируемого образца по поверхности ткани.

Путь введения

[0317] В процессе исследования в течение 7 суток, тестируемые образцы местно наносили на ткань MelanoDerm™ каждые 48 часов (в пределах временного интервала 48 ± 2 часа от предыдущей обработки). На каждую ткань наносят 25 микролитров каждого тестируемого образца. На каждую ткань наносят 25 микролитров положительного/отрицательного контроля и контроля с растворителем, соответственно.

Определение pH

[0318] При наличии возможности определяли значение pH для жидкого тестируемого образца в чистом виде (и/или дозируемого раствора в соответствующих случаях). Значение pH определяли с использованием pH-индикаторной бумаги (например, с диапазоном pH 0-14 для оценки и/или с диапазоном pH 5-10 для определения более точной величины). Типичные значения инкремента для pH-индикаторной бумаги с более узким диапазоном определения pH составляли приблизительно от 0,3 до 0,5 единиц pH. Максимальный инкремент для pH-индикаторной бумаги для определения pH составлял 1,0 единицу pH.

Контроли

[0319] Определяющий анализ включал в себя отрицательный контроль, положительный контроль и один контроль с растворителем (DMSO). Ткани MelanoDerm™, принятые за отрицательный контроль анализа, обрабатывали 25 мкл стерильной деионизированной воды или DMSO. Для нанесения на ткани, принятые за положительный контроль метода анализа, использовали 25 микролитров 1% койевой кислоты, малассезина (CV-8684) (17AJ41) 500 мкМ или композиции #2. До применения 1% койевую кислоту хранили в пробирке, закрытой алюминиевой фольгой, не более 2 часов от времени приготовления. Значения длительности воздействия отрицательным контролем/контролем с растворителем и положительным контролем были идентичны таковым, использованным для тестируемых образцов. В качестве контролей также использовали необработанные ткани.

Оценка самостоятельного восстановления МТТ тестируемым образцом

[0320] Было необходимо оценить способность каждого тестируемого образца самостоятельно восстанавливать МТТ. 1,0 мг/мл раствор МТТ приготавливали в среде для добавления МТТ. Приблизительно 25 мкл тестируемого образца добавляли к 1 мл раствора МТТ, и инкубировали смесь в темноте при $37\pm 1^\circ\text{C}$ в течение 1-3 часов. Отрицательный контроль (25 мкл стерильной деионизированной воды) или контроль с растворителем (25 мкл DMSO) тестировали одновременно. Если цвет раствора МТТ становится синим/пурпурным, то имелись основания предполагать, что тестируемый образец восстанавливал МТТ. Нерастворимые в воде тестируемые образцы могут демонстрировать прямое восстановление (потемнение) только на границе фаз между тестируемым образцом и средой.

Описание методики MelanoDerm™

[0321] Согласно описанию методики к набору MelanoDerm™ (MatTek Corporation), растворы хранили, как указано производителем. Ткани MelanoDerm™ хранили при $2-8^\circ\text{C}$ до момента использования.

[0322] В день получения (за сутки до дозированного введения), соответствующий объем поддерживающей среды MelanoDerm™ (EPI-100-LLMM) удаляли и нагревали приблизительно до 37°C . В соответствующие лунки 6-луночных планшетов добавляли 0,9 мл аликвоты EPI-100-LLMM. Перед раскрытием герметизированной упаковки каждую ткань MelanoDerm™ проверяли на наличие пузырей воздуха между агарозным гелем и вставкой культуры клеток. Ткани с пузырями воздуха, покрывающими более 50% области вставки культуры клеток, не использовали. 24-луночные контейнеры для транспортировки извлекали из пластикового мешка, и дезинфицировали их поверхности 70% этанолом. Соответствующее число тканей MelanoDerm™ асептически переносили из 24-луночных контейнеров для транспортировки в 6-луночные планшеты. С целью адаптирования, ткани MelanoDerm™ инкубировали при $37\pm 1^\circ\text{C}$ в увлажненной атмосфере $5\pm 1\%$ CO_2 в воздухе (стандартные условия культивирования) в течение ночи (по меньшей мере 16 часов). После открытия мешка, любые неиспользованные ткани, остающиеся на транспортировочном

агаре в момент переноса тканей, кратко обрабатывали атмосферой 5% CO₂/95% воздуха, мешок герметизировали и хранили при 2-8°C для последующего использования.

Определяющий анализ

[0323] Обработка ткани: Спустя по меньшей мере 16 часов после инициации культур, пять тканей MelanoDerm™ (считающихся необработанными на сутки 0) фотографировали цифровой камерой для содействия визуальной оценке степени пигментации тканей в начальный момент времени анализа. Две ткани MelanoDerm™ промывали CMF-DPBS, промакивали насухо стерильной впитывающей бумагой и очищали от избытка жидкости. После промывки, ткани MelanoDerm™ переносили в соответствующие содержащие МТТ лунки и подвергали анализу с МТТ. Две или три ткани MelanoDerm™ промывали CMF-DPBS, промакивали насухо стерильной впитывающей бумагой и очищали от избытка жидкости. Ткани MelanoDerm™ удаляли из вставки с использованием стерильных скальпелей, помещали в помеченную микроцентрифужную пробирку емкостью 1,5 мл и хранили при <-60°C для последующего анализа меланина.

[0324] Спустя по меньшей мере 16 часов после инициации культур, оставшиеся ткани переносили в новый 6-луночный планшет, содержащий 0,9 мл/лунку свежей предварительно нагретой EPI-100-LLMM. Исследование проводили в течение 7 суток. Четыре или пять тканей обрабатывали местно на первые сутки и каждые 48 часов (в пределах временного интервала 48±2 часа от предыдущей обработки) 25 мкл каждого тестируемого образца. Среду каждые сутки обновляли (в пределах временного интервала 24±2 часа от предыдущей «подпитки»); ткани переносили в новый 6-луночный планшет, содержащий 0,9 мл/лунку свежей предварительно нагретой EPI-100-LLMM.

[0325] Четыре или пять тканей обрабатывали местно на первые сутки и каждые 48 часов (в пределах временного интервала 48±2 часа от предыдущей обработки) 25 мкл положительного контроля и отрицательного контроля/контроля с растворителем, соответственно. Среду каждые сутки обновляли (в пределах временного интервала 24±2 часа от предыдущей «подпитки»); ткани переносили в новый 6-луночный планшет, содержащий 0,9 мл/лунку свежей предварительно нагретой EPI-100-LLMM. Ткани инкубировали при 37±1°C в увлажненной атмосфере 5±1% CO₂ в воздухе (стандартные условия культивирования) в течение соответствующего времени воздействия.

[0326] На сутки дозированного введения, для удаления любого остаточного количества тестируемого образца, ткань MelanoDerm™ сначала осторожно трижды промывали ~500 мкл CMF-DPBS в каждую промывку. CMF-DPBS осторожно вносили пипеткой в лунку, а затем удаляли стерильным аспиратором. Ткани переносили в новый 6-луночный планшет, содержащий 0,9 мл/лунку свежей предварительно нагретой EPI-100-LLMM и обрабатывали соответствующим тестируемым образцом, отрицательным контролем/контролем с растворителем или положительным контролем. Ткани инкубировали при 37±1°C в увлажненной атмосфере 5±1% CO₂ в воздухе (стандартные условия культивирования) в течение соответствующего времени воздействия.

[0327] По завершению исследования в течение 7 суток, ткани MelanoDerm™,

обработанные отрицательным контролем/контролем с растворителем или положительным контролем и каждым тестируемым образцом, фотографировали цифровой камерой для содействия визуальной оценке степени пигментации тканей в конце исследования (сутки 7). Затем, по восстановлению МТТ определяли жизнеспособность двух тканей, обработанных положительным и отрицательным контролем, соответственно, и каждым тестируемым образцом. По завершению исследования в течение 7 суток, определяли количество меланина, продуцированного тремя тканями, обработанными каждым тестируемым образцом, положительным контролем и отрицательным контролем/контролем с растворителем, соответственно.

[0328] Анализ с МТТ: Не более чем за два часа до момента использования, $10\times$ маточный раствор МТТ, приготовленный в PBS (профильтрованный в момент приготовления партии) размораживали и разбавляли теплой средой для добавления МТТ с получением 1,0 мг/мл раствора. В каждую помеченную лунку предварительно размеченного 24-луночного планшета добавляют 300 мкл раствора МТТ.

[0329] По завершению воздействия, каждую ткань MelanoDerm™, предназначенную для МТТ анализа, промывали CMF-DPBS (использовали пульверизатор, подходящий для этой стадии), промакивали насухо стерильной впитывающей бумагой и очищали от избытка жидкости. После промывки, ткани MelanoDerm™ переносили в соответствующие содержащие МТТ лунки. 24-луночные планшеты инкубируют в стандартных условиях в течение $3\pm 0,1$ часа.

[0330] Спустя $3\pm 0,1$ часа, ткани MelanoDerm™ промакивали насухо стерильной впитывающей бумагой, очищали от избытка жидкости и переносили в предварительно размеченный 24-луночный планшет, содержащий 2,0 мл изопропанола в каждой помеченной лунке. Планшеты покрывали парафильмом и хранили в холодильнике ($2-8^{\circ}\text{C}$) до момента сбора образцов для последнего времени воздействия. В случае необходимости, планшеты хранили в течение ночи (или до 24 часов после сбора образцов для последнего времени воздействия) в холодильнике до экстрагирования МТТ. Затем, планшеты перемешивали встряхиванием по меньшей мере в течение 2 часов при комнатной температуре. По завершению периода экстрагирования, жидкость во вставках для клеточных культур декантировали в лунку, из которой была взята вставка для клеточных культур. Раствор экстракта смешивали, и переносили 200 мкл в соответствующие лунку 96-луночного планшета. В лунки, помеченные как холостой контроль, добавляли 200 мкл изопропанола. Оптическую плотность при 550 нм (OD_{550}) в каждой лунке измеряли на планшетном ридере Molecular Devices Vmax.

[0331] Анализ меланина: По завершению соответствующего времени воздействия, для удаления любых остаточных количеств тестируемого образца или избытка фенолового красного из культуральной среды ткани MelanoDerm™, предназначенные для анализа меланина, осторожно трижды промывали ~ 500 мкл CMF-DPBS в каждую промывку, промакивали насухо стерильной впитывающей бумагой и очищали от избытка жидкости. Ткани MelanoDerm™ фотографировали с использованием цифровой камеры по

завершению анализа. Ткани MelanoDerm™ удаляли из вставки для клеточных культур с использованием стерильных скальпелей, помещали в помеченную микроцентрифужную пробирку емкостью 1,5 мл и хранили при $<-60^{\circ}\text{C}$ для последующего анализа меланина.

[0332] На сутки экстрагирования меланина, отделенные ткани размораживали при комнатной температуре приблизительно в течение 10 мин. В каждую микроцентрифужную пробирку добавляли 250 мкл Solvable, и инкубировали пробирки по меньшей мере в течение 16 часов при $60\pm 2^{\circ}\text{C}$. Путем растворения меланина в Solvable приготавливали 1 мг/мл маточный раствор стандарта меланина. Серию стандартов меланина в диапазоне концентраций от 0 мг/мл до 0,33 мг/мл приготавливали из 1 мг/мл маточного раствора. Серию стандартов приготавливали путем добавления 0,6 мл 1 мг/мл маточного раствора стандарта меланина к 1,2 мл Solvable, с последующим приготовлением серии еще из пяти разбавлений (кратность разбавления 3). Solvable использовали в качестве нулевого стандарта. Серии стандартов меланина и Solvable инкубировали по меньшей мере в течение 16 часов при $60\pm 2^{\circ}\text{C}$.

[0333] Спустя по меньшей мере 16 часов после начала экстрагирования меланина, содержащие образцы пробирки (представляющие собой меланин, экстрагированный из тканей MelanoDerm™) и стандарты охлаждали до комнатной температуры и центрифугировали при 13000 об/мин в течение 5 мин при комнатной температуре. В соответствующие лунки 96-луночного планшета переносили 200 мкл образцов (один повтор) или стандартов (два повтора). В лунки, обозначенные как холостые, в двух повторах переносили 200 мкл Solvable. Оптическую плотность при 490 нм (OD_{490}) для каждой лунки измеряли на планшетном ридере Molecular Devices Vmax (с выбранной функцией Automix).

Инактивированные контроли для оценки восстановления МТТ остаточными количествами тестируемого образца

[0334] Для того, чтобы продемонстрировать, что остаточные количества тестируемого образца самостоятельно не восстанавливают МТТ, в процессе определяющего анализа проводили функциональную проверку с целью показать, что тестируемый образец не связывается с тканью и не приводит к ложному сигналу о восстановлении МТТ.

[0335] Для того, чтобы определить, восстанавливают ли МТТ остаточные количества тестируемого образца, использовали инактивированную заморозкой контрольную ткань. Инактивированную заморозкой ткань получали путем помещения необработанных тканей MelanoDerm™/EpiDerm™ (Melanoderm™ без меланоцитов) в морозильную камеру при -20°C по меньшей мере на ночь, размораживания до комнатной температуры с последующим повторным замораживанием. После инактивации, ткань может неограниченное время храниться в морозильной камере. Инактивированные заморозкой ткани могут быть получены в готовом виде от MatTek Corporation и храниться в морозильной камере при -20°C до момента использования. Для исследования восстановления остаточными количествами тестируемого образца, инактивированные ткани обычным образом

обрабатывали тестируемым образцом. Все аналитические процедуры проводили тем же образом, что и для жизнеспособной ткани. По причине того, что в результате присутствия в инактивированной ткани остаточного количества NADH и ассоциированных ферментов ожидается незначительное восстановление МТТ, параллельно тестировали по меньшей мере один инактивированный контроль, обработанный стерильной деионизированной водой (отрицательный инактивированный контроль).

[0336] Если в инактивированном контроле, обработанном тестируемым образцом, наблюдается незначительное восстановление МТТ, или оно отсутствует, то наблюдаемое восстановление МТТ в жизнеспособной ткани, обработанной тестируемым образцом, может быть приписано жизнеспособным клеткам. Если в инактивированном контроле, обработанном тестируемым образцом, наблюдается значительное восстановление МТТ (по сравнению с обработанной жизнеспособной тканью), то следует предпринять дополнительные шаги с целью учета химического восстановления, или тестируемый образец не может считаться пригодным для тестирования в данной системе.

Анализ данных

[0337] Рассчитывали среднее значение OD_{550} для холостых лунок. Скорректированное среднее значение OD_{550} для отрицательного контроля/контроля с растворителем определяли путем вычитания среднего значения OD_{550} для холостых лунок из их средних значений OD_{550} . Скорректированные значения OD_{550} для воздействий отдельным тестируемым образцом и воздействия положительным контролем определяли путем вычитания среднего значения OD_{550} для холостых лунок из каждого из значений. Все расчеты проводили с использованием электронной таблицы Excel. Хотя обсуждаемые алгоритмы используют для расчета конечного показателя при анализе на групповом уровне обработки, те же расчеты могут применяться в отношении отдельных повторов.

Скорректированное значение OD_{550} для воздействия тестируемым образцом = Значение OD_{550} для воздействия тестируемым образцом - Среднее значение OD_{550} для холостого контроля

[0338] В случае использования инактивированного контроля (КС), для корректировки количества МТТ, самостоятельно восстановленного остаточными количествами тестируемого образца, проводили следующие дополнительные расчеты. Для определения действительных значений OD_{550} для инактивированных контролей, обработанных тестируемыми образцами, исходное значение OD_{550} для инактивированного контроля, обработанного отрицательным контролем, вычитали из исходных значений OD_{550} для каждого из инактивированных контролей, обработанных тестируемыми образцами.

Действительное значение OD_{550} для каждого КС, обработанного тестируемым образцом = Исходное значение OD_{550} для каждого КС, обработанного тестируемым образцом - Исходное значение OD_{550} для КС, обработанного отрицательным контролем/контролем с растворителем

[0339] Действительные значения OD_{550} представляют собой количество МТТ,

восстановленного путем самостоятельного восстановления остаточными количествами тестируемого образца при конкретных значениях времени воздействия. В общем, если действительное значение OD_{550} превышает 0,150, то для получения конечного скорректированного значения OD_{550} действительное значение восстановления МТТ вычитают из скорректированных значений OD_{550} жизнеспособных обработанных тканей. Эти конечные скорректированные значения OD_{550} затем используют для определения выраженной в процентах жизнеспособности контрольных образцов.

Конечное скорректированное значение OD_{550} = скорректированное значение OD_{550} для обработанных тестируемым образцом тканей (жизнеспособных) - Действительное значение OD_{550} для обработанных тестируемым образцом тканей (КС)

[0340] В завершение, могут быть проведены следующие расчеты, выраженные в процентах к контролю:

Жизнеспособность (%) = [(Конечное скорректированное значение OD_{550} для тестируемого образца или положительного контроля)/(скорректированное среднее значение OD_{550} для отрицательного контроля/контроля с растворителем)] × 100

[0341] Анализ меланина: Исходные данные оптической плотности собирали, сохраняли в виде файла печати и импортировали в электронную таблицу Excel. Собирали исходные данные оптической плотности. Определяли значение OD_{490} для каждого тестируемого образца (представляющего собой меланин, экстрагированный из необработанной ткани MelanoDerm™ на сутки 0, ткани MelanoDerm™, обработанной каждым тестируемым образцом, отрицательным контролем/контролем с растворителем или положительным контролем на сутки 7) и стандартов меланина. Скорректированное значение OD_{490} для тестируемых образцов и каждого стандарта меланина определяли путем вычитания значения OD_{490} для холостой лунки. Калибровочную кривую строили в виде концентрационной зависимости стандартов в мг/мл (ось Y) относительно соответствующей скорректированной оптической плотности. Количество меланина в каждой отдельной ткани интерполировали из калибровочной кривой (линейно). В завершение, рассчитывали среднюю концентрацию меланина для каждой группы с обработкой тестируемым образцом или контролем, соответственно.

Результаты

[0342] На Фиг. 4 обобщены результаты анализа средней выживаемости тканей и концентрации меланина для тестируемых образцов, тестируемых композиций, положительного контроля и контроля с растворителем. Соединения, содержащие композиции #1 и #2, демонстрируют синергические эффекты, будучи объединенными в одну композицию.

[0343] На Фиг. 5 обобщены результаты анализа средней выживаемости тканей и концентрации меланина для тестируемых образцов, тестируемых композиций, положительного контроля и контроля с растворителем. Соединения, содержащие композиции #2, #3, #4 и #5, демонстрируют синергические эффекты, будучи объединенными в одну композицию.

Пример 13

Способность композиций, содержащих полученные из *Malassezia* соединения и/или их химические аналоги, индуцировать меланогенез

[0344] Целью данного исследования являлось наблюдение и документирование меланогенеза и жизнеспособности меланоцитов В16, подвергнутых воздействию композиций, содержащих полученные из *Malassezia* соединения и/или их химические аналоги.

Материалы и реагенты

[0345] Посевная среда содержит DMEM без L-глутамин, FBS, пенициллин/стрептомицин и L-глутамин. Аналитическая среда содержит DMEM без фенолового красного и L-глутамин, FBS, пенициллин/стрептомицин, L-глутамин и aMSH. Другие реагенты включают в себя койевую кислоту, DMSO и МТТ. Тестируемыми клетками являются клетки В16 (ATCC CRL-6475).

Протокол

[0346] Меланоциты В16 культивируют до степени срастания 70% и собирают. Клетки высевают в 96-луночные планшеты с плотностью 4000 клеток на лунку и оставляют для прикрепления в течение ночи. На следующие сутки, тестируемые образцы, тестируемые композиции и контроли разбавляют аналитической средой В16. После инкубации в течение ночи, среду удаляют путем аспирации, и добавляют 200 мкл тестируемых образцов и контролей. Клетки инкубируют при 37°C и 10% CO₂ в течение 72 часов. После инкубации в течение 72 часов, собирают данные оптической плотности при 540 нм. Среду удаляют, заменяют 100 мкл посевной среды с 1 мг/мл МТТ и инкубируют в течение 2 часов при 37°C и 10% CO₂. Среду с МТТ удаляют, заменяют 200 мкл смеси 95% этанол/5% изопропанол и оставляют перемешиваться встряхиванием в течение 15 мин. Затем, собирают данные оптической плотности МТТ при 570 нм.

Результаты

[0347] Ожидается, что соединения и композиции согласно настоящему изобретению, включая композиции #1-5, будут ингибировать меланогенез. Ожидается, что композиции согласно настоящему изобретению будут демонстрировать, например, более эффективную способность ингибировать меланогенез по сравнению по меньшей мере с одним отдельным соединением, входящим в состав композиции. По аналогии, ожидается, что определенные композиции будут демонстрировать, например, менее эффективную способность ингибировать меланогенез по сравнению по меньшей мере с одним отдельным соединением, входящим в состав композиции.

Пример 14

Эффективность *in vitro*

[0348] Ожидается, что соединения и композиции согласно настоящему изобретению будут индуцировать апоптоз меланоцитов и модулировать активность меланоцитов, продукцию меланина, биогенез меланосом и/или перенос меланосом. Также предполагается, что определенные соединения и композиции согласно настоящему

изобретению будут влиять на указанные биологические процессы с меньшей эффективностью. Такие соединения и композиции могут характеризоваться более выигрышными профилями токсичности по сравнению с более эффективными веществами.

Пример 15

Эффективность *in vivo*

[0349] Ожидается, что соединения и композиции согласно настоящему изобретению будут модулировать пигментацию кожи, включая осветление кожи и коррекцию гиперпигментации/гипопигментации, вызванных различными нарушениями. Также ожидается, что соединения и композиции согласно настоящему изобретению будут демонстрировать выигрышные фармакокинетические профили, например, применительно к времени полувыведения и всасывания. Определенные соединения будут демонстрировать большее время полувыведения, тогда как другие будут демонстрировать меньшее время полувыведения. По аналогии, определенные соединения будут демонстрировать разные профили всасывания, причем для некоторых соединений для полного всасывания потребуется большее время, а для других для полного всасывания потребуется меньшее время.

Пример 16

Синтез химических аналогов малассезина и индирубина

Синтез соединения АВ17590

[0350] Как представлено на Фиг. 6А, к раствору соединения 1а (25,0 г, 0,357 моль, 1,0 экв.) в тетрагидрофуране (250 мл) при 0°C добавляли этинилмагнийбромид (0,5 М в THF, 1,07 L, 0,535 моль, 1,5 экв.), реакционную смесь нагревали до комнатной температуры и перемешивали в течение 2 ч. Затем, смесь гасили добавлением насыщенного водного хлорида аммония и экстрагировали этилацетатом. Органический слой сушили над безводным Na₂SO₄ и концентрировали в условиях пониженного давления. Остаток очищали методом хроматографии на силикагеле (0-10% этилацетат в петролейном эфире) с получением соединения 1b (9,5 г, 27%). TLC: PE:EA=20:1, 254 нм; R_f (соединение 1а)=0,3; R_f (соединение 1b)=0,7.

[0351] К смеси соединения 1b (9,5 г, 98,96 ммоль, 1,0 экв.) в тетрагидрофуране (100 мл) при 0°C в атмосфере азота добавляли 60% раствор гидрида натрия (4,7 г, 0,119 моль, 1,2 экв.) в диметилформамиде (50 мл). Спустя 30 мин, при 0°C добавляли диметилсульфат (22,4 г, 0,178 моль, 1,8 экв.). После добавления, реакционную смесь оставляли нагреваться до комнатной температуры и перемешивали при комнатной температуре в течение 30 мин, а затем медленно добавляли уксусную кислоту (1 мл). Продукт отгоняли непосредственно из реакционной смеси. Таким образом, получали соединение 1с (10,0 г, выход 91%).

[0352] К раствору соединения 1 (8,0 г, 24,02 ммоль, 1,0 экв.) и соединения 1с (2,9 г, 26,43 ммоль, 1,1 экв.) в триэтилаmine (80 мл) при комнатной температуре в атмосфере азота добавляли йодид меди (456 мг, 2,40 ммоль, 0,1 экв.) и Pd(PPh₃)₂Cl₂ (337 мг, 0,480 ммоль, 0,02 экв.). Смесь перемешивали при комнатной температуре в течение 2 ч. Развитие реакции отслеживали методом TLC. Реакционную смесь разбавляли водой и экстрагировали

этилацетатом. Органический слой сушили над безводным сульфатом натрия и концентрировали в условиях пониженного давления. Остаток очищали методом хроматографии на силикагеле (0~10% этилацетат в петролейном эфире) с получением соединения 2 (7,0 г, 92%). TLC: PE:EA=10:1, 254 нм; R_f (соединение 1)=0,8; R_f (соединение 2)=0,6.

[0353] В высушенную в печи колбу добавляли смесь дихлорида платины (694 мг, 2,06 ммоль, 0,1 экв.), карбонат натрия (3,3 г, 30,95 ммоль, 1,5 экв.), трис(пентафторфенил)фосфин (2,2 г, 4,13 ммоль, 0,2 экв.), 6-метилиндол (4,8 г, 41,27 ммоль, 2,0 экв.) и соединение 2 (6,5 г, 20,63 ммоль, 1,0 экв.) в диоксане (650 мл). Колбу дегазировали азотом, герметизировали и нагревали до 100°C в течение 16 ч. Развитие реакции отслеживали методом TLC. Растворитель концентрировали в условиях пониженного давления. Остаток разбавляли этилацетатом и экстрагировали водой и насыщенным солевым раствором. Органический слой сушили над безводным сульфатом натрия и концентрировали в условиях пониженного давления. Остаток очищали методом хроматографии на силикагеле (0~10% этилацетат в петролейном эфире) с получением соединения 3 (3,0 г, 36%). TLC: PE:EA=10:1, 254 нм; R_f (соединение 2)=0,6; R_f (соединение 3)=0,2.

[0354] К раствору соединения 3 (3,0 г, 7,50 ммоль, 1,0 экв.) в тетрагидрофуране (30 мл) при 0°C добавляли метанолят натрия (5 М в MeOH, 6,0 мл, 29,98 ммоль, 4,0 экв.). Реакционную смесь оставляли нагреваться до комнатной температуры и перемешивали в течение 2 ч. Развитие реакции отслеживали методом TLC. Реакционную смесь концентрировали в условиях пониженного давления. Остаток очищали методом хроматографии на силикагеле (0~10% этилацетат в петролейном эфире) с получением соединения 4 (1,5 г, 66%). TLC: PE:EA=5:1, 254 нм; R_f (соединение 3)=0,7; R_f (соединение 4)=0,4.

[0355] В высушенную трехгорлую круглодонную колбу емкостью 500 мл в атмосфере аргона при 0°C добавляли диметилформамид (10 мл). Затем, медленно добавляли оксихлорид фосфора (1,2 г, 7,60 ммоль, 1,2 экв.), поддерживая внутреннюю температуру ниже 5°C в течение 10 мин. После перемешивания при 0°C в течение 30 мин, медленно добавляли раствор соединения 4 (1,9 г, 6,33 ммоль, 1,0 экв.) в диметилформамиде (20 мл), поддерживая внутреннюю температуру ниже 5°C в течение 10 мин. Полученную смесь перемешивали при комнатной температуре в течение 16 ч. После завершения реакции (отслеживали методом TLC с использованием 20% этилацетат в гексанах), реакционную смесь вливали в насыщенный водный раствор бикарбоната натрия (50 мл) и перемешивали в течение 1 ч. Полученную смесь экстрагировали этилацетатом (2×100 мл). Объединенные органические слои промывали водой и насыщенным солевым раствором и сушили над сульфатом натрия. Растворитель фильтровали и концентрировали в условиях пониженного давления. Остаток очищали методом хроматографии на силикагеле (10-50% этилацетат в петролейном эфире) с получением соединения 5 (1,8 г, 89%). TLC: PE:EA=1:1, 254 нм; R_f (соединение 4)=0,8; R_f (соединение 5)=0,5.

[0356] К раствору соединения 5 (1,8 г, 5,49 ммоль, 1,0 экв.) в тетрагидрофуране (20 мл) при 0°C добавляли ди-*трет*-бутилдикарбонат (3,0 г, 13,72 ммоль, 2,5 экв.) и 4-диметиламинопиридин (1,4 г, 11,25 ммоль, 2,05 экв.). Реакционную смесь нагревали до комнатной температуры и перемешивали в течение 3 ч. Развитие реакции отслеживали методом TLC. Реакционную смесь концентрировали в условиях пониженного давления, остаток разбавляли этилацетатом и промывали 1н соляной кислотой, насыщенным водным бикарбонатом натрия (300 мл) и соевым раствором (300 мл). Органические слои разделяли, сушили над безводным сульфатом натрия, фильтровали и концентрировали. Остаток очищали методом хроматографии на силикагеле (0-10% этилацетат в петролейном эфире) с получением соединения 6 (2,4 г, 82%). TLC: PE:EA=10:1, 254 нм; R_f (соединение 5)=0,1; R_f (соединение 6)=0,5.

[0357] К раствору соединения 6 (2,4 г, 4,55 ммоль, 1,0 экв.) в *трет*-бутаноле (60 мл) добавляли 2-метил-2-бутен (30 мл), а затем при 0°C добавляли хлорит натрия (8,2 г, 90,91 ммоль, 20,0 экв.), натрия дигидрофосфат (14,2 г, 90,91 ммоль, 20,0 экв.) и воду (60 мл). Смесь медленно нагревали до комнатной температуры и перемешивали при комнатной температуре в течение 15 ч. Развитие реакции отслеживали методом TLC. Реакционную смесь разбавляли дихлорметаном (100 мл) и разделяли. Органический слой промывали водой (80 мл), соевым раствором (80 мл), сушили над безводным сульфатом натрия и концентрировали в условиях пониженного давления с получением неочищенного соединения 7 (2,5 г, 99%). TLC: PE:EA=2:1, 254 нм; R_f (соединение 6)=0,7; R_f (соединение 7)=0,3.

[0358] К раствору соединения 7 (2,5 г, 4,60 ммоль, 1,0 экв.) в диметилформамиде (30 мл) при 0°C добавляли карбонат калия (952 мг, 6,89 ммоль, 1,5 экв.) и метилйодид (978 мг, 6,89 ммоль, 1,5 экв.). Реакционную смесь нагревали до комнатной температуры и перемешивали в течение 2 ч. Развитие реакции отслеживали методом TLC. Реакционную смесь разбавляли этилацетатом (100 мл) и промывали водой (100 мл) и соевым раствором (100 мл). Органический слой сушили над безводным сульфатом натрия и концентрировали в условиях пониженного давления. Остаток очищали методом хроматографии на силикагеле (5-17% этилацетат в петролейном эфире) с получением соединения 8 (2,3 г, 89%). TLC: PE:EA=5:1, 254 нм; R_f (соединение 7)=0,1; R_f (соединение 8)=0,6.

[0359] Смесь соединения 8 (1,3 г, 2,33 ммоль, 1,0 экв.) в соляной кислоте (3 М в EA, 30 мл) перемешивали при комнатной температуре в течение 16 ч. Реакцию отслеживали методом TLC. Затем, смесь концентрировали в условиях пониженного давления. Остаток очищали методом хроматографии на силикагеле (10-25% этилацетат в петролейном эфире) с получением соединения АВ17590 (502 мг, 61%) в виде желтого твердого вещества. TLC: PE:EA=3:1, 254 нм; R_f (соединение 8)=0,8; R_f (соединение АВ17590)=0,5; LC-MS: 359 (M+1)⁺; ¹H-ЯМР (400 МГц, CDCl₃) δ 8,12 (д, J=19,7 Гц, 2H), 7,94 (с, 1H), 7,42 (с, 1H), 7,35 (д, J=8,1 Гц, 1H), 7,13 (т, J=7,8 Гц, 1H), 7,04 (д, J=8,2 Гц, 1H), 6,93 (дд, J=15,7, 8,6 Гц, 2H), 5,04 (д, J=9,1 Гц, 1H), 3,95 (с, 3H), 2,45 (с, 3H), 1,42 (д, J=8,4 Гц, 1H), 0,78-0,68 (м, 1H), 0,62 (д, J=4,8 Гц, 1H), 0,54-0,41 (м, 2H).

Синтез соединения АВ17653

[0360] Как представлено на Фиг. 6В, смесь соединения 1 (721 мг, 3,20 ммоль, 1,0 экв.), соединения 1а (560 мг, 3,20 ммоль, 1,0 экв.) и карбоната натрия (866 мг, 8,17 ммоль, 2,55 экв.) в метаноле (10 мл) перемешивали при комнатной температуре в течение 3 ч в атмосфере азота. Развитие реакции отслеживали методом TLC. После завершения реакции, смесь фильтровали, и промывали осадок на фильтре метанолом и водой с получением соединения АВ17653 (979 мг, 89%) в виде красного твердого вещества. TLC: PE/EA=3/1, 254 нм; R_f (соединение 1)=0,6; R_f (соединение АВ17653)=0,4; LC-MS: 338,95 (M-1)⁻; ¹H-ЯМР (400 МГц, d6-DMSO) δ 11,01 (д, J=21,5 Гц, 2H), 8,64 (д, J=8,3 Гц, 1H), 7,62 (д, J=7,7 Гц, 1H), 7,55 (т, J=7,6 Гц, 1H), 7,39 (д, J=8,1 Гц, 1H), 7,18 (д, J=8,4 Гц, 1H), 7,00 (дд, J=8,8, 4,6 Гц, 2H).

Синтез соединения АВ17654

[0361] Как представлено на Фиг. 6В, смесь соединения АВ17653 (979 мг, 2,88 ммоль, 1,0 экв.) и гидроксиламина гидрохлорида (520 мг, 7,49 ммоль, 2,6 экв.) в пиридине (30 мл) перемешивали при 120°C в течение 2 ч в атмосфере азота. Развитие реакции отслеживали методом LCMS. После завершения реакции, смесь концентрировали в условиях пониженного давления, и добавляли 1н HCl до появления твердого вещества. Смесь фильтровали, и растворяли осадок на фильтре в 1н NaOH. Затем, добавляли 3н HCl для корректировки до pH=5 и фильтровали. Осадок на фильтре промывали 1н HCl с получением соединения АВ17654 (500 мг, 48%) в виде красного твердого вещества. LC-MS: 357,95 (M+1)⁺; ¹H-ЯМР (400 МГц, d6-DMSO) δ 13,59 (с, 1H), 11,71 (с, 1H), 10,82 (с, 1H), 8,53 (д, J=8,4 Гц, 1H), 8,19 (д, J=7,7 Гц, 1H), 7,42-7,35 (м, 2H), 7,11-6,96 (м, 3H).

Синтез соединения АВ17655

[0362] Как представлено на Фиг. 6В, смесь соединения 2 (637 мг, 3,86 ммоль, 1,0 экв.), соединения 1а (676 мг, 3,86 ммоль, 1,0 экв.) и карбоната натрия (1044 мг, 9,84 ммоль, 2,55 экв.) в метаноле (10 мл) перемешивали при комнатной температуре в течение 3 ч в атмосфере азота. Развитие реакции отслеживали методом TLC. После завершения реакции, смесь фильтровали, и промывали осадок на фильтре метанолом и водой с получением соединения АВ17655 (1027 мг, 95%) в виде красного твердого вещества. LC-MS: 281,05 (M+1)⁺; ¹H-ЯМР (400 МГц, d6-DMSO) δ 11,06 (с, 1H), 10,86 (с, 1H), 8,54 (дд, J=10,5, 2,7 Гц, 1H), 7,67-7,53 (м, 2H), 7,41-7,38 (м, 1H), 7,09-6,98 (м, 2H), 6,85 (дд, J=8,5, 4,8 Гц, 1H).

Синтез соединения АВ17656

[0363] Как представлено на Фиг. 6В, смесь соединения АВ17655 (1027 мг, 3,67 ммоль, 1,0 экв.) и гидроксиламина гидрохлорида (663 мг, 9,54 ммоль, 2,6 экв.) в пиридине (30 мл) перемешивали при 110°C в течение 2 ч в атмосфере азота. Развитие реакции отслеживали методом LCMS. После завершения реакции, смесь концентрировали в условиях пониженного давления, и добавляли 1н HCl до появления твердого вещества. Смесь фильтровали, и растворяли осадок на фильтре в 1н NaOH. Затем, добавляли 3н HCl для корректировки до pH=5 и фильтровали. Осадок на фильтре промывали 1н HCl с получением соединения АВ17656 (500 мг, 48%) в виде красного твердого вещества. LC-MS:

296,00 (M+1)⁺; ¹H-ЯМР (400 МГц, d6-DMSO) δ13,60 (с, 1H), 11,77 (с, 1H), 10,69 (с, 1H), 8,43 (с, 1H), 8,20 (д, J=7,7 Гц, 1H), 7,39 (д, J=5,7 Гц, 2H), 7,02 (с, 1H), 6,91 (с, 1H), 6,83 (д, J=4,9 Гц, 1H).

Синтез соединения АВ17657

[0364] Как представлено на Фиг. 6В, смесь соединения 3 (362 мг, 2,46 ммоль, 1,0 экв.), соединения 1а (431 мг, 2,46 ммоль, 1,0 экв.) и карбоната натрия (666 мг, 6,28 ммоль, 2,55 экв.) в метаноле (10 мл) перемешивали при комнатной температуре в течение 3 ч в атмосфере азота. Развитие реакции отслеживали методом TLC. После завершения реакции, смесь фильтровали, и промывали осадок на фильтре метанолом и водой с получением соединения 4 (606 мг, 93%). TLC: PE/EA=1/1, 254 нм; R_f (соединение 3)=0,7; R_f (соединение 4)=0,5.

[0365] Смесь соединения 4 (606 мг, 2,31 ммоль, 1,0 экв.) и гидроксиламина гидрохлорида (418 мг, 6,01 ммоль, 2,6 экв.) в пиридине (20 мл) перемешивали при 120°C в течение 2 ч в атмосфере азота. Развитие реакции отслеживали методом TLC. После завершения реакции, смесь концентрировали в условиях пониженного давления, и добавляли 1н HCl до появления твердого вещества. Смесь фильтровали, и растворяли осадок на фильтре в 1н NaOH. Затем, добавляли 3н HCl для корректировки до pH=5 и фильтровали. Осадок на фильтре промывали 1н HCl с получением соединения АВ17657 (500 мг, 78%) в виде коричневого твердого вещества. TLC: PE/EA=1/1, 254 нм; R_f (соединение 4)=0,5; R_f (соединение АВ17657)=0,4; LC-MS: 278,10 (M+1)⁺; ¹H-ЯМР (400 МГц, d6-DMSO) δ13,60 (с, 1H), 11,77 (с, 1H), 10,69 (с, 1H), 8,43 (с, 1H), 8,20 (д, J=7,7 Гц, 1H), 7,39 (д, J=5,7 Гц, 2H), 7,02 (с, 1H), 6,91 (с, 1H), 6,83 (д, J=4,9 Гц, 1H).

Синтез соединения АВ17658

[0366] Как представлено на Фиг. 6В, смесь соединения 5а (337 мг, 1,73 ммоль, 1,0 экв.), соединения 5b (554 мг, 1,73 ммоль, 1,0 экв.) и гидроксида калия (1114 мг, 3,46 ммоль, 2,0 экв.) в ацетонитриле (10 мл) перемешивали при 35°C в течение 1,5 ч в атмосфере азота. Развитие реакции отслеживали методом TLC. После завершения реакции, смесь концентрировали в условиях пониженного давления, и очищали остаток методом хроматографии на силикагеле с получением соединения 5с (436 мг, 99%). TLC: PE/EA=1/1, 254 нм; R_f (соединение 5а)=0,8; R_f (соединение 5с)=0,5.

[0367] Смесь соединения 5 (330 мг, 1,72 ммоль, 1,0 экв.), соединения 5с (436 мг, 1,72 ммоль, 1,0 экв.) и карбоната натрия (465 мг, 4,38 ммоль, 2,55 экв.) в метаноле (10 мл) перемешивали при комнатной температуре в течение 3 ч в атмосфере азота. Развитие реакции отслеживали методом TLC. После завершения реакции, смесь фильтровали, и промывали осадок на фильтре метанолом и водой с получением соединения 6 (617 мг, 93%). TLC: PE/EA=1/1, 254 нм; R_f (соединение 5)=0,5; R_f (соединение 6)=0,4.

[0368] Смесь соединения 6 (617 мг, 1,60 ммоль, 1,0 экв.) и гидроксиламина гидрохлорида (290 мг, 4,17 ммоль, 2,6 экв.) в пиридине (20 мл) перемешивали при 110°C в течение 2 ч в атмосфере азота. Развитие реакции отслеживали методом TLC. После завершения реакции, смесь концентрировали в условиях пониженного давления, и

добавляли 1н HCl до появления твердого вещества. Смесь фильтровали, и растворяли осадок на фильтре в 1н NaOH. Затем, добавляли 3н HCl для корректировки до pH=5 и фильтровали. Осадок на фильтре промывали 1н HCl с получением соединения AB17658 (500 мг, 78%) в виде красного твердого вещества. TLC: PE/EA=1/1, 254 нм; R_f (соединение б)=0,4; R_f (соединение AB17658)=0,3; LC-MS: 402,95 (M+1)⁺; ¹H-ЯМР (400 МГц, d₆-DMSO) δ 11,86 (с, 1H), 11,39 (с, 1H), 9,40 (д, J=2,2 Гц, 1H), 8,33 (д, J=1,8 Гц, 1H), 8,06 (дд, J=8,6, 2,4 Гц, 1H), 7,59 (дд, J=8,4, 2,0 Гц, 1H), 7,43 (д, J=8,6 Гц, 1H), 7,02 (д, J=8,6 Гц, 1H).

Пример 17

Оценка фотозащитных свойств малассезина, других соединений, полученных из *Malassezia*, и их химических аналогов *in vivo*

Состав с 1% малассезина

[0369] Состав с 1% малассезина, использованный в настоящем исследовании, содержал следующие ингредиенты: вода - 65,939%; диметилизосорбид - 20,000%; Glycereth-8 эфиры оливкового масла - 3,000%; глицерин - 2,991%; кокосовые алканы - 2,700%; сополимер гидроксиэтилакрилата/акрилоилдиметилтаурата натрия - 1,700%; малассезин - 1,000%; пентиленгликоль - 1,000%; феноксиэтанол - 0,640%; коко-каприлат/капрат - 0,300%; каприлилгликоль - 0,200%; хлорфенезин - 0,160%; сорбитана изостеарат - 0,140%; токоферол - 0,100%; полисорбат 60-0,080%; и двунариевая соль ЭДТА - 0,050%.

Схема эксперимента

[0370] В данное исследование обоснованности концепции была включена 39-летняя женщина с IV типом кожи.

[0371] На сутки 1 эксперимента, у субъекта оценивали минимальную эритемную дозу («МЭД») с использованием специального устройства широкого спектра Dualight UVB. Шаблон из 6 квадратов (1,5 см × 1,5 см) размещали на левой стороне нижней части спины тестируемого субъекта (см. Фиг. 7).

[0372] Значения доз для разных типов кожи субъектов при проведении фототеста на МЭД представлены в мДж/см² на Фиг. 8. Спустя 24 часа после облучения, субъект возвращался для оценки МЭД. Как представлено на Фиг. 12, значение МЭД для субъекта составило 120 мДж/см².

[0373] Затем, на верхний тестируемый квадрат на правой части спины дважды в сутки в течение 7 суток субъекту наносили 1% малассезин. Второй нижний правый квадрат обрабатывали дважды в сутки от суток 4 до суток 7, а на третий медиальный квадрат нанесение проводили однократно на сутки 7. Несущую среду продукта наносили дважды в сутки в течение 7 суток на левую часть спины (см. Фиг. 13). Субъект возвращался в исследовательский центр для облучения на сутки 7 (см. Фиг. 9). Каждый тестируемый участок облучали УФ-В в дозе 120 мДж/см². Субъект возвращался через 24 часа для оценки фототоксичности/фотозащиты (см. Фиг. 14).

[0374] Субъект продолжал участие в эксперименте, получая 1% малассезин всего в течение 14 суток. На Фиг. 15-16 представлены участки кожи субъекта, подвергнутые

следующей обработке: на участке 14 1% малассезин наносили дважды в сутки в течение 14 суток; на участке 10 1% малассезин наносили дважды в сутки в течение 11 суток; на участке 8 1% малассезин наносили дважды в сутки в течение 8 суток; на участке 3 1% малассезин наносили дважды в сутки в течение 3 суток; на участке 1 1% малассезин наносили однократно; и на участках с нанесением несущей среды последнюю наносили дважды в сутки в течение 7 и 9 суток, соответственно.

[0375] Как представлено на Фиг. 14, спустя 24 часа после воздействия УФ-В, на участке с нанесением несущей среды у субъекта наблюдали эритему с оценкой от 1+ до 2+ (см. Фиг. 11 для шкалы оценки эритемы). В отличие от этого, на участке с обработкой 1% малассезином в течение 7 суток отмечали меньшую степень эритемы (слабую). При оценке участков, обработанных в течение 3 суток, была обнаружена минимальная эритема, и для участка с нанесением в течение 1 суток было обнаружено ее отсутствие. Для каждого участка с использованием Mexameter MX16 проводили колориметрические измерения, которые подтвердили клинические наблюдения. Максимальные показатели эритемы наблюдали для участка с нанесением несущей среды, за которым следовал участок с обработкой малассезином на 7 суток. Наименьшие показатели наблюдали для участков с обработкой малассезином на сутки 3 и сутки 1, соответственно (см. Фиг. 9).

[0376] Субъект продолжал участие в эксперименте и возвращался для повторного УФ-В облучения на сутки 14 с интерпретацией на сутки 15 (см. Фиг. 15). Клиническая оценка на сутки 15 выявила умеренную эритему для участка с нанесением несущей среды на сутки 7 и значительно меньшую на сутки 9 (см. Фиг. 16). Меньшую эритему (слабую) отмечали для участков с обработкой 1% малассезином, включая участки для суток 14, суток 10 и суток 8. Минимальную эритему отмечали для участков с обработкой 1% малассезином для суток 1 и суток 3. Для каждого участка проводили колориметрические измерения для оценки эритемы и уровня меланина. Результаты подтвердили клинические наблюдения относительно меньшей эритемы для участков с обработкой 1% малассезином (см. Фиг. 10).

[0377] На участках с нанесением несущей среды на сутки 9 и для участков с обработкой 1% малассезином на сутки 1 и 3 проводили биопсию. Образцы анализировали путем окрашивания гематоксилином-эозином, по методу Фонтана-Массон и MART-1 для количественной оценки меланоцитов и аффиметрических исследований.

[0378] Диагноз: (А) Кожа - обработанная на сутки 1 (1% малассезин): «переплетенный» роговой слой, нормальный вид меланоцитов (подтверждено иммунопероксидазным окрашиванием с Mart-1) и уровень эпидермального меланина (подтверждено иммунопероксидазным окрашиванием по методу Фонтана-Массон).

[0379] Диагноз: (В) Кожа - обработанная на сутки 3 (1% малассезин): «переплетенный» роговой слой, меньшее количество меланоцитов кожи (подтверждено иммунопероксидазным окрашиванием с MART-1/Melan A) по сравнению с С и D, с небольшим снижением уровня эпидермального меланина в виде непораженных участков (подтверждено иммунопероксидазным окрашиванием по методу Фонтана-Массон).

[0380] Диагноз: (С) Кожа - нанесение несущей среды: нормальный вид меланоцитов

(подтверждено иммунопероксидазным окрашиванием с Mart-1) и уровень эпидермального меланина (подтверждено иммунопероксидазным окрашиванием по методу Фонтана-Массон).

[0381] Диагноз: (D) Кожа - нормальная: нормальный вид меланоцитов (подтверждено иммунопероксидазным окрашиванием с Mart-1) и уровень эпидермального меланина (подтверждено иммунопероксидазным окрашиванием по методу Фонтана-Массон).

Заключения

[0382] Результаты данного исследования обоснованности концепции демонстрируют УФ-защитные свойства малассезина.

[0383] Предполагается, что в дальнейших исследованиях с привлечением дополнительных пациентов будут продемонстрированы эквивалентные или более эффективные УФ-защитные свойства малассезина. Также предполагается, что в дополнительных исследованиях будут выяснены молекулярные пути передачи сигналов, ассоциированные с малассезин-индуцированной фотозащитой.

Документы

Berridge, M.V., Tan, A.S., McCoy, K.D., Wang, R. The Biochemical and Cellular Basis of Cell Proliferation Assays That Use Tetrazolium Salts. *Biochemica* 4:14-19 (1996).

Black, *et al.* Athymic Nude Mice and Human Skin Grafting. In: Maibach, *et al.* (eds.). *Models in Dermatology Vol. 1.* Karger, Basel, 1985, 228-39.

Costin, G.-E., Raabe, R. Optimized in vitro pigmentation screening assay using a reconstructed three dimensional human skin model. *Rom. J. Biochem.* 50 (1), 15-27 (2013).

Donato, *et al.* A Microassay for Measuring Cytochrome P450IA1 and P450IB1 Activities in Intact Human and Rat Hepatocytes Cultured on 96-Well Plates. *Anal Biochem.* 1993; 213(1):29-33.

Elmore. Apoptosis: A Review of Programmed Cell Death. *Toxicologic Pathology* 2007; 35:495-516.

Fitzpatrick, *et al.* The Validity and Practicality of Sun-Reactive Skin Types I Through VI. *Arch Dermatol.* 1988; 124(6):869-871.

Gaitanis, *et al.* Skin Diseases Associated With *Malassezia* Yeasts: Facts and Controversies. *Clinics in Dermatology* 2013; 31:455-463.

Gambichler, *et al.* Quantification of Ultraviolet Protective Effects of Pityriacitrin in Humans. *Archives of Dermatological Research* 2007; 299(10):517-520.

Guého, *et al.* The Genus *Malassezia* With Description of Four New Species. *Antonie Van Leeuwenhoek* 1996; 69:337-55.

Karchner, *et al.* Identification and Functional Characterization of Two Highly Divergent Aryl Hydrocarbon Receptors (AHR1 and AHR2) in the Teleost *Fundulus heteroclitus*. *The Journal of Biological Chemistry* 1999; 274(47):33814-24.

Krämer, *et al.* Malassezin, A Novel Analyst of the Aryl Hydrocarbon Receptor From The Yeast *Malassezia furfur*, Induces Apoptosis in Primary Human Melanocytes. *ChemBioChem*

2005; 6:860-5.

Lee, *et al.* Comparison of Gene Expression Profiles Between Keratinocytes, Melanocytes and Fibroblasts. *Ann Dermatol.* 2013; 25(1):35-45.

Machowinski, *et al.* Pityriacitrin-A Potent UV filter Produced by *Malassezia furfur* and its Effect on Human Skin Microflora. *Mycoses* 2006; 49(5):388-392.

Manning, *et al.* Maintenance of Skin Xenografts of Widely Divergent Phylogenetic Origin on Congenitally Athymic (Nude) Mice. *J Exp Med* 1973; 138:488-94.

Mayser, *et al.* Pityriacitrin-An Ultraviolet-Absorbing Indole Alkaloid from the Yeast *Malassezia furfur*. *Archives of Dermatological Research* 2002; 294(3):131-134.

Mayser, *et al.* Pityrialactone-A New fluorochrome from the Tryptophan Metabolism of *Malassezia furfur*. *Antonie van Leeuwenhoek* 2003; 84(3):185-191.

Nazzaro-Porro, *et al.* Identification of Tyrosinase Inhibitors in Cultures of *Pityrosporum*. *The Journal of Investigative Dermatology* 1978; 71:205-208.

Noakes. The Aryl Hydrocarbon Receptor: A Review of Its Role in the Physiology and Pathology of the Integument and Its Relationship to the Tryptophan Metabolism. *Journal of Tryptophan Research* 2015; 8: 17-18.

Otulakowski, *et al.* Use of a Human Skin-Grafted Nude Mouse Model for the Evaluation of Topical Retinoic Acid Treatment. *J Invest Dermatol* 1994; 102:515-8.

Park, J.I., Lee, H.Y., Lee, J.E., Myung, C.H., Hwang, J.S. Inhibitory effect of 2-methylnaphtho[1,2,3-de]quinolin-8-one on melanosome transport and skin pigmentation. *Sci. Rep.* Jul. 6:6:29189. Doi: 10.1038/srep29189 (2016).

Plenat, *et al.* Host-Donor Interactions in Healing of Human Split-Thickness Skin Grafts Onto Nude Mice: In Situ Hybridization, Immunohistochemical and Histochemical Studies. *Transplantation* 1992; 53:1002-10.

Reed, *et al.* Long-Term Maintenance of Normal Human Skin on Congenitally Athymic (Nude) Mice. *Proc Soc Exp Biol Med* 1973; 143:350-3.

Scott, *et al.* The Permeability of Grafted Human Transplant Skin in Athymic Mice. *J Pharm Pharmacol* 1988; 40:128-9.

Song, *et al.* A Ligand For The Aryl Hydrocarbon Receptor Isolated From Lung. *PNAS* 2002; 99(23):14694-9.

Taylor, *et al.* The Taylor Hyperpigmentation Scale: a new visual assessment tool for the evaluation of skin color and pigmentation. *Cutis.* 2005 Oct; 76(4):270-4.

Wang, *et al.* Stress-Induced RNASET2 Overexpression Mediates Melanocyte Apoptosis Via The TRAF2 Pathway *In Vitro*. *Cell Death and Disease* 2014; 5:e1022

Wasmeier, *et al.* Melanosomes At A Glance. *Journal of Cell Science* 2008; 121:3995-3999.

Wille, *et al.* Malassezin - A Novel Agonist of the Arylhydrocarbon Receptor From The Yeast *Malassezia furfur*. *Bioorganic & Medicinal Chemistry* 2001; 9:955-60.

Winston-McPherson, *et al.* Synthesis and Biological Evaluation of 2,3'-diindolylmethanes as Agonists of Aryl Hydrocarbon Receptor. *Bioorganic & Medicinal Chemistry Letters* 2014; 24:4023-4025.

Whyte, *et al.* Ethoxyresorufin-*O*-deethylase (EROD) Activity in Fish As A Biomarker of Chemical Exposure. *Critical Reviews in Toxicology* 2000; 30(4):347-570.

Yamaguchi, *et al.* Melanocytes and Their Diseases. *Cold Spring Harb Perspect Med* 2014; 4:a017046.

Zonios, *et al.* Skin Melanin, Hemoglobin, and Light Scattering Properties can be Quantitatively Assessed In Vivo Using Diffuse Reflectance Spectroscopy. *J Invest Dermatol.* 2001; 117:1452-1457.

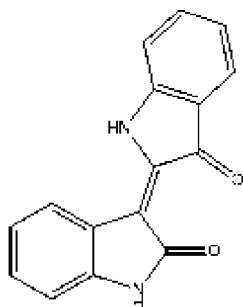
Zhang, *et al.* Environmental Adaptability for Quorum Sensing: Regulating Iron Uptake During Biofilm Formation in *Paracoccus* Denitrifications. *Applied and Environmental Microbiology*, AEM. 00865-18 (2018).

[0384] Все документы, процитированные в настоящей заявке, включены в настоящий документ посредством ссылки, как если бы они были процитированы в полном объеме.

[0385] Хотя в настоящем документе были описаны иллюстративные варианты осуществления согласно настоящему изобретению, следует понимать, что настоящее изобретение не ограничивается данными описанными вариантами, и что специалисты в данной области могут вносить различные другие изменения или модификации, не отступая от объема и сущности настоящего изобретения.

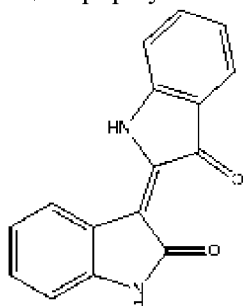
ФОРМУЛА ИЗОБРЕТЕНИЯ

1. Соединение для осветления кожи, характеризующееся структурой следующей формулы:



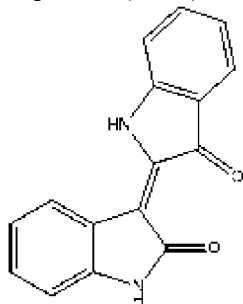
или его химический аналог, кристаллическая форма, гидрат или фармацевтически или косметически приемлемая соль.

2. Соединение для индукции апоптоза меланоцитов, характеризующееся структурой следующей формулы:



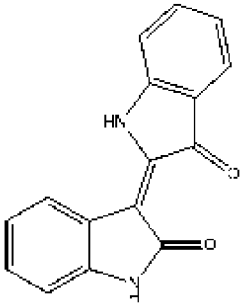
или его химический аналог, кристаллическая форма, гидрат или фармацевтически или косметически приемлемая соль.

3. Соединение для модулирования активности рецептора ароматических углеводородов (AhR), характеризующееся структурой следующей формулы:



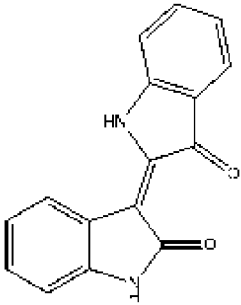
или его химический аналог, кристаллическая форма, гидрат или фармацевтически или косметически приемлемая соль.

4. Соединение для модулирования меланогенеза, характеризующееся структурой следующей формулы:



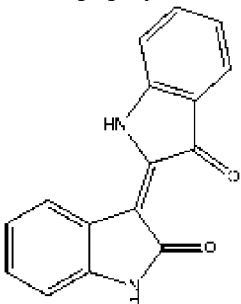
или его химический аналог, кристаллическая форма, гидрат или фармацевтически или косметически приемлемая соль.

5. Соединение для модулирования концентрации меланина, характеризующееся структурой следующей формулы:



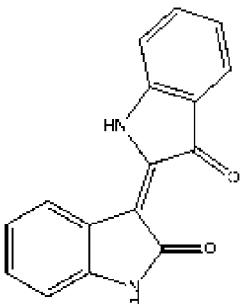
или его химический аналог, кристаллическая форма, гидрат или фармацевтически или косметически приемлемая соль.

6. Композиция, содержащая соединение, характеризующееся структурой следующей формулы:



или его химический аналог, кристаллическую форму, гидрат или фармацевтически или косметически приемлемую соль.

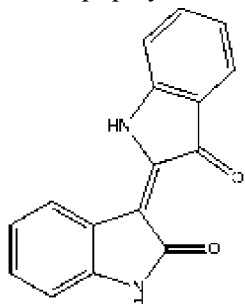
7. Способ осветления кожи у субъекта, причем способ включает в себя приведение субъекта в контакт с соединением, характеризующимся структурой следующей формулы:



или его химическим аналогом, кристаллической формой, гидратом или

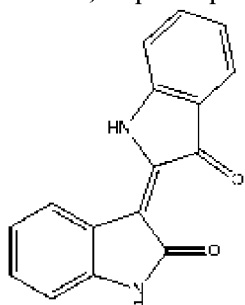
фармацевтически или косметически приемлемой солью.

8. Способ индукции апоптоза меланоцитов у субъекта, причем способ включает в себя приведение субъекта в контакт с соединением, характеризующимся структурой следующей формулы:



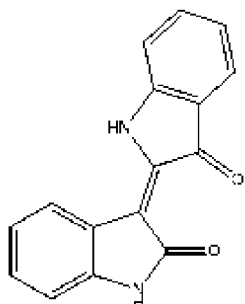
или его химическим аналогом, кристаллической формой, гидратом или фармацевтически или косметически приемлемой солью.

9. Способ модулирования активности рецептора ароматических углеводородов (AhR) у субъекта, причем способ включает в себя приведение субъекта в контакт с соединением, характеризующимся структурой следующей формулы:



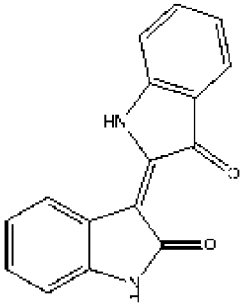
или его химическим аналогом, кристаллической формой, гидратом или фармацевтически или косметически приемлемой солью.

10. Способ модулирования меланогенеза у субъекта, причем способ включает в себя приведение субъекта в контакт с соединением, характеризующимся структурой следующей формулы:



или его химическим аналогом, кристаллической формой, гидратом или фармацевтически или косметически приемлемой солью.

11. Способ модулирования концентрации меланина у субъекта, причем способ включает в себя приведение субъекта в контакт с соединением, характеризующимся структурой следующей формулы:



или его химическим аналогом, кристаллической формой, гидратом или фармацевтически или косметически приемлемой солью.

По доверенности

ФИГ. 1

Номер тестируемого образца	Концентрация	Обозначение спонсора	рН (Сутки 0, 2, 4, 6) [^]	Средняя жизнеспособность тканей(%) ¹	Концентрация меланина (мкг/мл) - из линейной кривой.
				Сутки 7	
18AB74	В чистом виде	2767-09 84-030118E w/ AB17011 @ 200 м.д.	5.0; 5.0; 5.0; 5.0	35.6	31.929
18AB75	В чистом виде	2767-07 84-030118C w/ AB17219 @ 200 м.д.	5.0; NCC; 5.0; 5.0	54.9	31.319
18AB76	В чистом виде	2767-11 84-030118G w/ CV-8685 @ 200 м.д.	5.0; 4.5; 4.5; 4.5	30.8	33.761
18AB77	В чистом виде	2767-12 84-030118H w/ CV-8687 @ 200 м.д.	5.0; 4.5; 4.5; 4.5	67.8	36.050
18AB78	В чистом виде	2767-08 84-030118D w/ AB17225 @ 200 м.д.	5.0; 5.0; 5.0; 5.0	27.8	26.740
18AB79	В чистом виде	2767-10 84-03011D w/ AB17220 @ 200 м.д.	5.0; 5.0; 5.0; 5.0	19.1	26.587
18AB80	В чистом виде	2767-06 84-030118A w/ BASE @ 200 м.д.	5.0; NCC; 5.0; 5.0	71.9	37.882
18AD25	В чистом виде	Гидрохинон	3.0; 3.0; 3.0; 4.0	34.8	408.476
18AD41	В чистом виде	ОБРАБОТКА ДЛЯ ОСВЕТЛЕНИЯ	5.0; 5.0; 5.0; 5.0	47.0	33.761
18AD42	500 мкМ	Индирубин	8.5; 8.5; 8.5; 8.5	65.2	34.219
17AA70	0,5% об./об.	DMSO	8.5; 8.5; 8.0; 8.5	100.0 ⁴	59.556
17AJ41	500 мкМ	Малассезин (CV-8684)	8.5; 9.0; 8.0; 8.0	73.2	42.003
17AD43	500 мкМ	CV-8804	8.5; 8.5; 8.0; 8.5	86.6	35.898
17AD45	500 мкМ	CV-8803	8.5; 8.5; 8.0; 8.5	81.6	34.829
17AJ44/18AD36	200 мкМ/ 20% (об./об.)	Соединение E (AB12508)/ Линолевая кислота	7.5; 8.0; 7.5; 8.0	70.2	38.493
17AJ44/18AA22/18AD42 + УФ	200 мкМ	Соединение E (AB12508)/ Птириацин (AB17014)/ Индирубин	8.0; 8.5; 8.5; 8.0	67.1	34.371
17AJ44/18AA22/18AD42 Темнота	200 мкМ	Соединение E (AB12508)/ Птириацин (AB17014)/ Индирубин	8.0; 8.5; 8.5; 8.0	64.6	33.914
17AJ44/18AA22 + УФ	200 мкМ	Соединение E (AB12508)/ Птириацин (AB17014)	8.0; 8.0; 8.0; 7.5	58.8	33.150
17AJ44/18AA22 Темнота	200 мкМ	Соединение E (AB12508)/ Птириацин (AB17014)	8.0; 8.0; 8.0; 7.5	77.7	29.945
17AJ41/17AJ47	200 мкМ	Малассезин CV-8684)/ Соединение A5 (CV-8819)	8.0; 8.0; 8.0; 7.5	62.3	35.287

ФИГ. 1 (продолжение)

17AJ41/18AB74	200 мкМ/ В чистом виде	Малассезин (CV-8684)/ 2767-09 84-030118E w/ AB17011 @ 200 м.д.	8.0/5.0; 7.0/5.0; 7.5/5.0; 7.0/5.0	70.8	33.456
17AJ44/18AA14	200 мкМ	Соединение E (AB12508)/ (AB17151)	8.5; 7.5; 8.0; 7.5	30.5	24.908
Положительный контроль	1% (w/v)	Койевая кислота	4.0; 4.5; 4.0; 4.5	105.5	25.977
Необработанные ткани	н.д.	н.д.	н.д.	1003	21.398

1 – Рассчитано относительно контроля с растворителем (17AA70 – DMSO)

2 – Значение контроля с растворителем, принятое за 100% (фоновый уровень)

3 – Значение контроля для необработанных тканей (сутки 0), принятое за 100% (фоновый уровень)

4 – Значение жизнеспособности для контроля с растворителем (сутки 7), принятое за 100% (по умолчанию)

NA – н.д. (нет данных)

НСС –Изменение цвета отсутствует (для pH-бумаги)

ФИГ. 2

Номер тестируемого образца	Концентрация	Обозначение спонсора	рН (Сутки 0, 2, 4, 6) [^]	Средняя жизнеспособность тканей(%) ¹	Концентрация меланина (мкг/мл) - из линейной кривой.
				Сутки 7	
17AA70	0,5% об./об.	DMSO	8.0; 8.5; 8.5; 8.5	100 ²	67.20
17AD43	750 мкМ	Соединение А	8.5; 8.5; 8.5; 8.5	87.4	53.79
17AJ41	500 мкМ	Малассезин (CV-8684)	8.5; 8.5; 8.5; 8.5	72.4	48.07
18AE73	750 мкМ	Соединение II	8.5; 8.5; 8.5; 8.5	92.9	50.71
18AD42	500 мкМ	Индирубин	8.5; 8.5; 8.5; 8.5	62.5	44.77
17AD45	650 мкМ	CV-8803	8.5; 8.5; 8.5; 8.5	87.6	50.93
	750 мкМ		8.5; 8.5; 8.5; 8.5	81.9	51.37
17AJ43	650 мкМ	Соединение В (CV-8877)	8.5; 8.5; 8.5; 8.5	63.0	36.19
	750 мкМ		8.5; 8.5; 8.5; 8.5	25.9	32.89
17AJ44	600 мкМ	Соединение Е (AB12508)	8.5; 8.5; 8.5; 8.5	77.4	37.95
	700 мкМ		8.5; 8.5; 8.5; 8.5	56.9	33.11
	800 мкМ		8.5; 8.5; 8.5; 8.5	40.0	43.01
18AA14	225 мкМ	AB17151	8.0; 8.0; День4*; 8.0	107.5	37.73
	300 мкМ		8.0; 8.0; 8.5; 8.0	78.8	32.01
	375 мкМ		8.0; 8.0; 8.5; 8.5	53.4	32.89
	450 мкМ		8.0; 8.5; 8.5; 8.5	36.5	35.53
18AE71	650 мкМ	Неизвестная композиция	8.5; 8.5; 8.5; 8.5	87.0	35.09
	750 мкМ		9.0; 8.5; 8.5; 8.5	83.0	38.39
17AJ41/18AD42	250 мкМ	Малассезин(CV-8684)/Индирубин	8.0; 9.0; 8.5; 8.0	61.8	36.63
18AD42/18AA14	250 мкМ	Индирубин/AB17151	8.5; 8.0; 8.5; 8.5	34.3	34.43
17AJ44/17AJ43	100 мкМ	Соединение Е (AB12508)/ Соединение В (CV-8877)	8.0; 8.5; 8.0; 8.0	105.9	47.19
17AJ43/18AA14	100 мкМ	Соединение В (CV-8877)/ AB17151	8.0; 8.0; 8.0; 8.0	108.4	42.35
17AJ44/18AA14	100 мкМ	Соединение Е (AB12508)/ AB17151	8.0; 8.0; 8.0 ; 8.5	92.2	39.93
Необработанные ткани	Н.д	Н.д	Н.д	100 ³	31.57

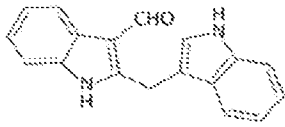
¹ – Рассчитано относительно контроля с растворителем (17AA70 – DMSO)

² – Значение жизнеспособности для контроля с растворителем (сутки 7), принятое за 100% (фоновый уровень)

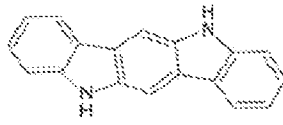
ФИГ. 2 (продолжение)

³ – Значение контроля для необработанных тканей (сутки 0), принятое за 100% (фоновый уровень)
NA – н.д. (нет данных).

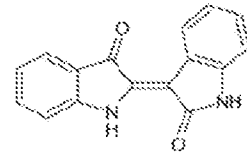
ФИГ. 3



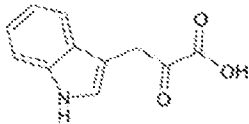
1. Малассезин (3388)



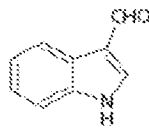
2. Индоло[3,2-в]карбазол (3708)



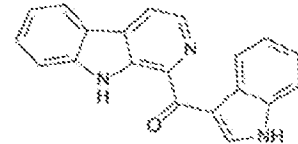
3. Индирубин (3720)



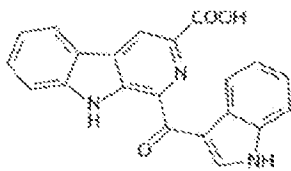
4. (Индол-3-ил)пировиноградная кислота



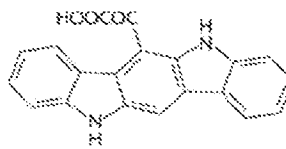
5. Индол-3-карбальдегид



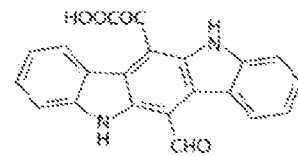
6. Питириацин (215)



7. Питириацин (157)

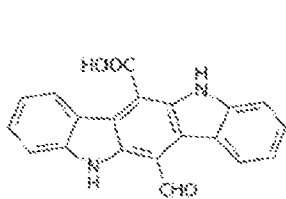


8. Малассезиазол А (158)

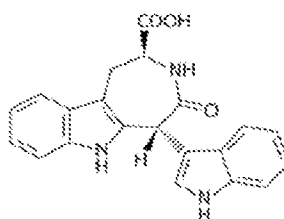


9. Малассезиазол В (158)

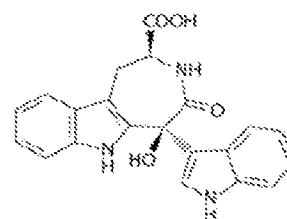
ФИГ. 3 (продолжение)



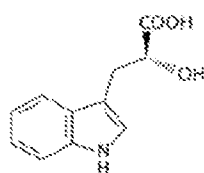
10. Малассезиол С (138)



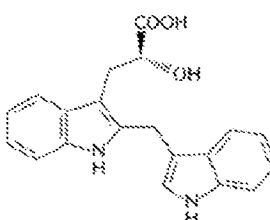
11. Малассезиол А (137)



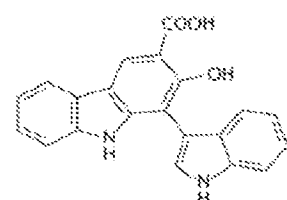
12. Малассезиндол В (137)



13. D-индол-3-молочная кислота

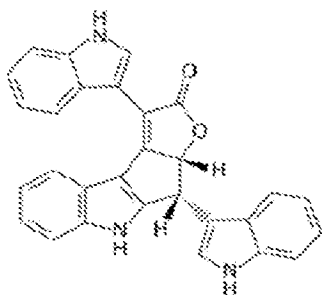


14. Malassezia-молочная кислота (137)

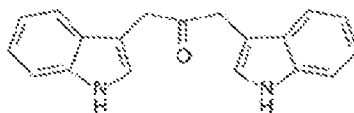


15. Птириацин (137)

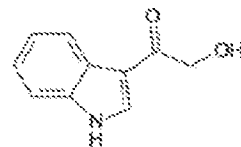
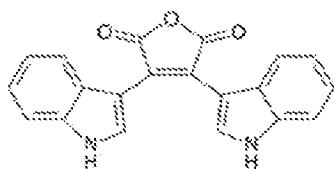
ФИГ. 3 (продолжение)



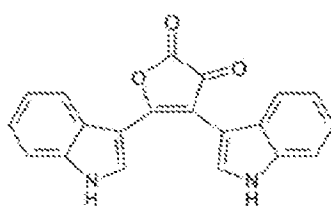
16. Малассезиациктрин (157)



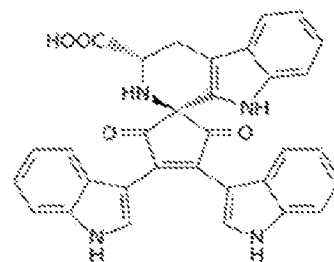
17. Малассезион (157)

18. 2-гидрокси-1-(1H-индол-3-ил)
этанон (157)

19. Питириангидрид (157)

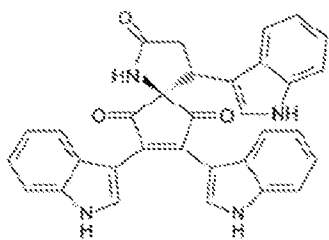


20. Питириалактон (216)

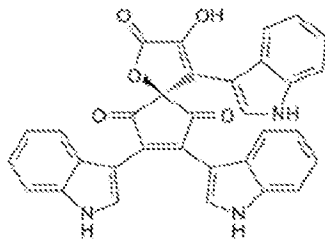


21. Питириарубин (158)

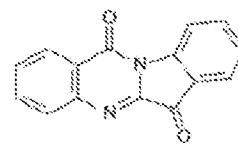
ФИГ. 3 (продолжение)



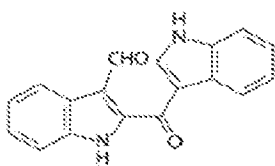
22. Питириарубин (158)



23. Питириарубин С (158)



24. Триптанрин



25. Кетомалассезин (158)

Номер тестируемого образца	Концентрация	Обозначение спонсора	рН	Средняя жизнеспособность тканей(%) ¹	Концентрация меланина (мкг/мл) - из линейной кривой.
				Сутки 7	
18АН47	0,5% об./об.	DMSO (Контроль с растворителем)	8.0	100 ²	66.52
17АJ41	500 мкМ	Малассезин (CV-8684) (Положительный контроль)	8.0	78.2	42.97
17АJ55	650 мкМ	O52 (AB129761)	8.5	94.7	49.91
18AA21	650 мкМ	Malassezia Индол (AB17011)	8.5	100.1	55.59
18AF50	300 мкМ	Соединение AB17151	8.0	57.5	30.99
18АН15	300 мкМ	Соединение AB17590	8.0	28.6	34.98
18АН21	650 мкМ	AB11644	8.5	95.2	66.52
18АН38	500 мкМ	Индол-3-карбальдегид	8.5	101.9	53.90
18АН39	500 мкМ	D-индол-3-молочная кислота	8.5	98.8	64.21
17AD42/17AJ41/17AJ47 /17AJ55/18AA21/18AA22/18AA24/18AD42/18АН16/18АН20/18АН24/18АН38/18АН39/18АН44	См. Таблицу 3	Композиция #1	8.5	61.7	32.67
	См. Таблицу 4	Композиция #2	8.5	75.6	33.72
Необработанные ткани	н.д.	н.д.	н.д.	100 ³	20.89

¹ – Рассчитано относительно контроля с растворителем (18АН47 – DMSO)

² – Значение жизнеспособности для контроля с растворителем (сутки 7), принятое за 100% (фоновый уровень)

³ – Значение контроля для необработанных тканей (сутки 0), принятое за 100% (фоновый уровень)

NA – н.д. (нет данных)

Номер тестируемого образца	Концентрация	Обозначение спонсора	рН	Средняя жизнеспособность тканей (%) ¹	Концентрация меланина (мкг/мл) - из линейной кривой.
				Сутки 7	
18АН47	0,5% об./об.	DMSO (Контроль с растворителем)	8.0	100 ²	53.69
17AD42/17AJ41/17AD46/17AJ55/18AA21/18AA22/18AA24/18AD42/18АН16/18АН20/18АН24/18АН38/18АН39/18АН44	См. Таблицу 4	Композиция #2 (Положительный контроль)	7.5	64.8	30.59
17AJ41/17AD46/17AJ55/18AA21/18AD42/18АН20/18АН24/18АН38/18АН39/18АН44	См. Таблицу 5	Композиция #3	8.0	65.2	25.93
17AD42/17AJ41/17AD46/17AJ55/18AA21/18AA24/18AD42/18АН20/18АН24/18АН38/18АН39/18АН44	См. Таблицу 6	Композиция #4	7.5	63.0	31.70
17AD42/17AJ41/18AA22/18AA24/18AD42/18АН16/18АН24/18АН39/18АН44	См. Таблицу 7	Композиция #5	8.0	63.9	34.15
Необработанные ткани	н.д.	н.д.	н.д.	100 ³	16.60

¹ – Рассчитано относительно контроля с растворителем (18АН47 – DMSO)

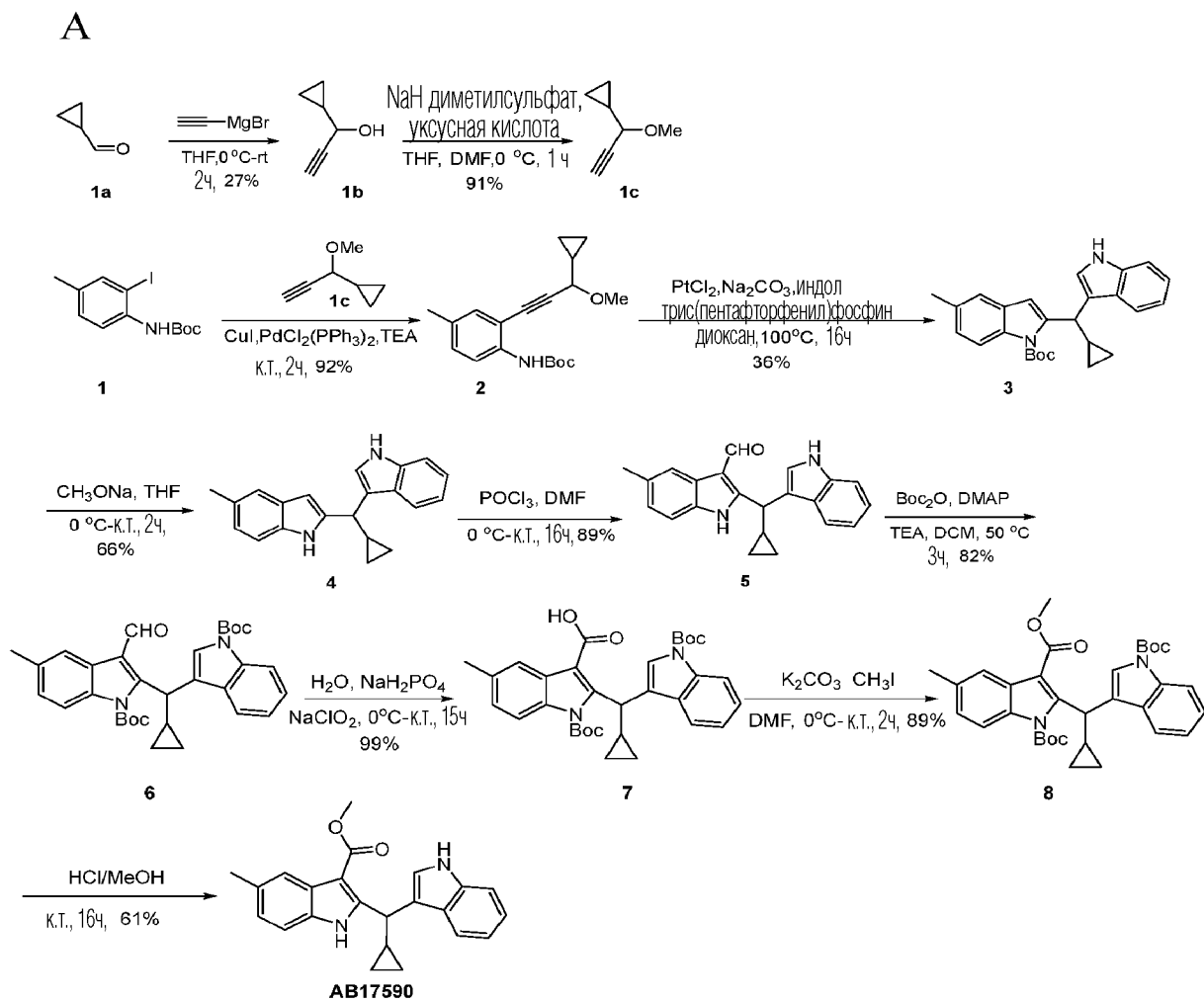
² – Значение жизнеспособности для контроля с растворителем (сутки 7), принятое за 100% (фоновый уровень)

³ – Значение контроля для необработанных тканей (сутки 0), принятое за 100% (фоновый уровень)

NA – н.д. (нет данных)

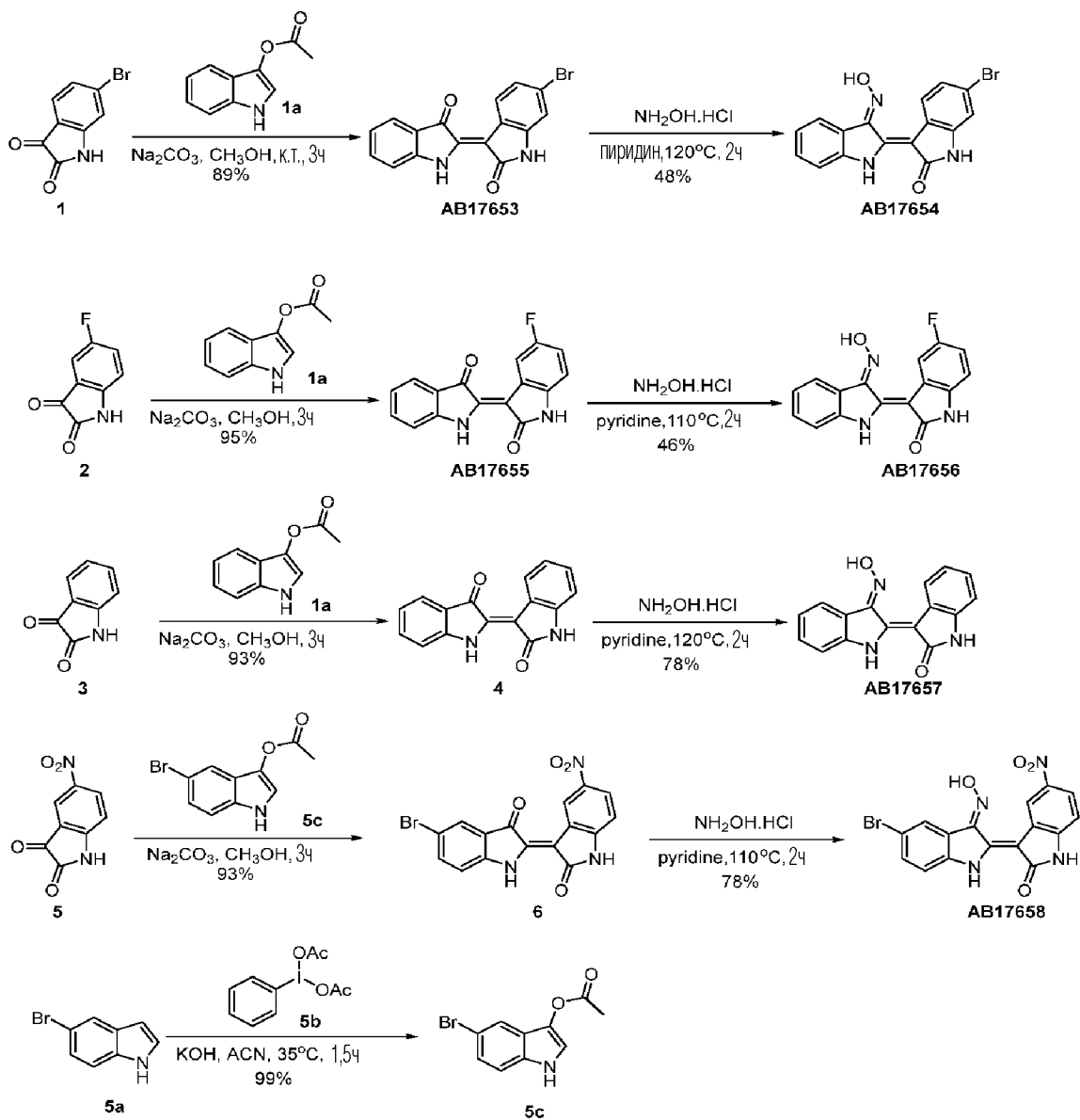
ФИГ. 5

ФИГ. 6А

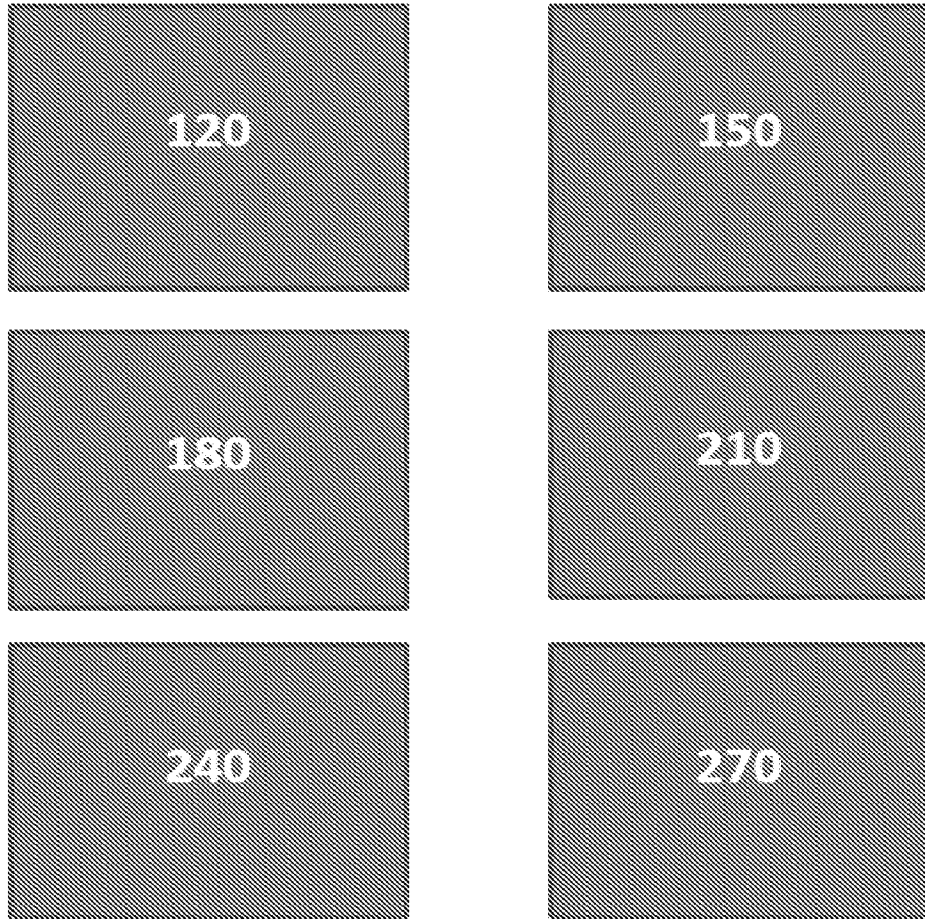


ФИГ. 6В

В



ФИГ. 7



14/23

ФИГ. 8

Последовательность дозирования	Тип кожи					
	I	II	III	IV	V	VI
1st	40	70	90	120	150	240
2nd	60	90	120	150	180	270
3rd	70	105	150	180	210	300
4th	90	120	180	210	240	330
5th	105	150	210	240	270	360
6th	120	180	240	270	300	390

ФИГ. 9

Область обработки	Меланин	Эритема
Нормальная кожа	471	600
	471	611
	470	610
	470	607
Несущая среда	477	627
	477	627
	475	627
	476	627
Сутки 7	459	615
	455	609
	453	617
	459	611
	456	619
	453	614
	456	614
Сутки 3	468	613
	473	608
	471	604
	469	600
	470	595
		470
Сутки 1	474	579
	475	585
	474	583
	474	582

ФИГ. 10

Область обработки	Меланин	Эритема
Сутки 9 Несущая среда крема	473	619
	472	622
	473	621
	472	620
Сутки 7 Несущая среда крема	473	608
	473	610
	471	610
	472	609
М Сутки 7	465	638
	465	636
	465	633
	463	639
	465	637
Без обработки	474	594
	474	594
	474	591
	474	593
М Сутки 14	467	601
	471	593
	466	600
	469	603
	468	599
М Сутки 10	475	590
	475	594
	473	595
	474	593

ФИГ. 10 (продолжение)

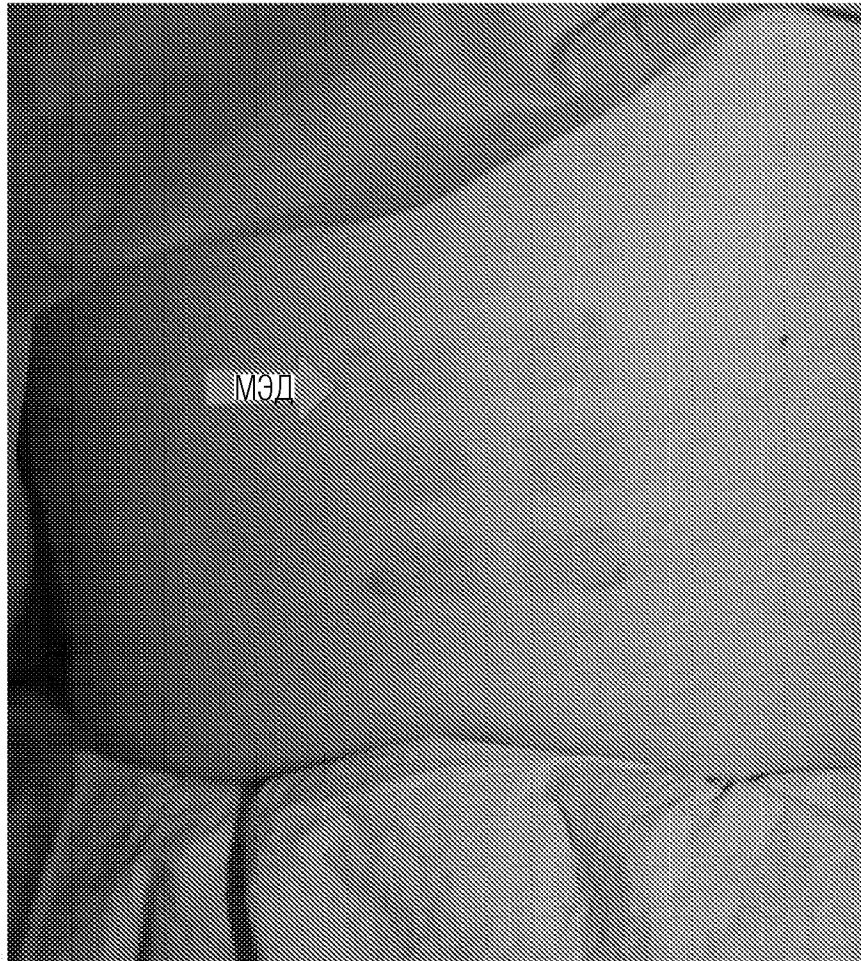
Область обработки	Меланин	Эритема
М Сутки 8	483	602
	483	602
	484	605
	483	603
М Сутки 3	474	609
	473	610
	476	610
	474	610
М Сутки 1	481	585
	479	600
	474	607
	478	596
Сразу 15 мин	477	591
	482	602
	485	599
	492	605
	491	607
	485	601

ФИГ. 11

0	Нет - отсутствие порозовения или покраснения
1	Минимальный - незначительное порозовение или покраснение
2	Слабый - значительное порозовение или покраснение
3	Умеренный - умеренное порозовение или покраснение
4	От умеренного до тяжелого - существенное порозовение или покраснение
5	Тяжелый- очень существенное порозовение или покраснение

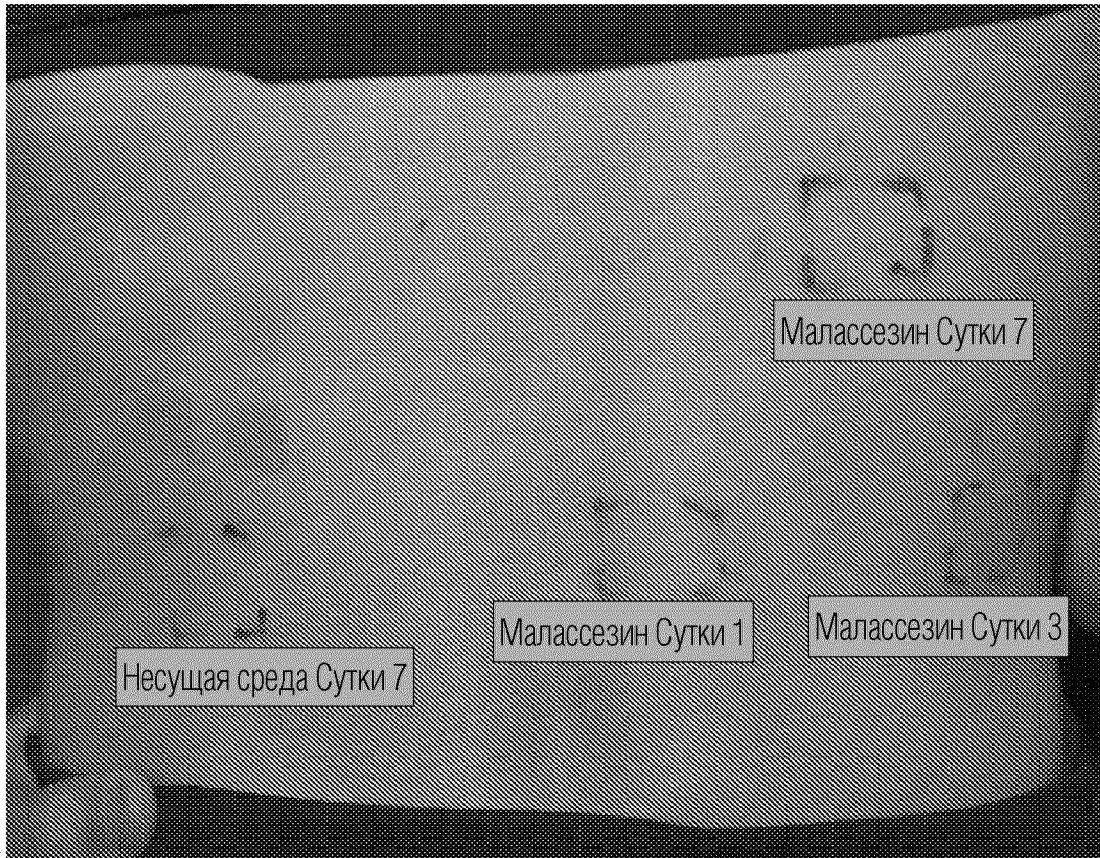
19/23

ФИГ. 12

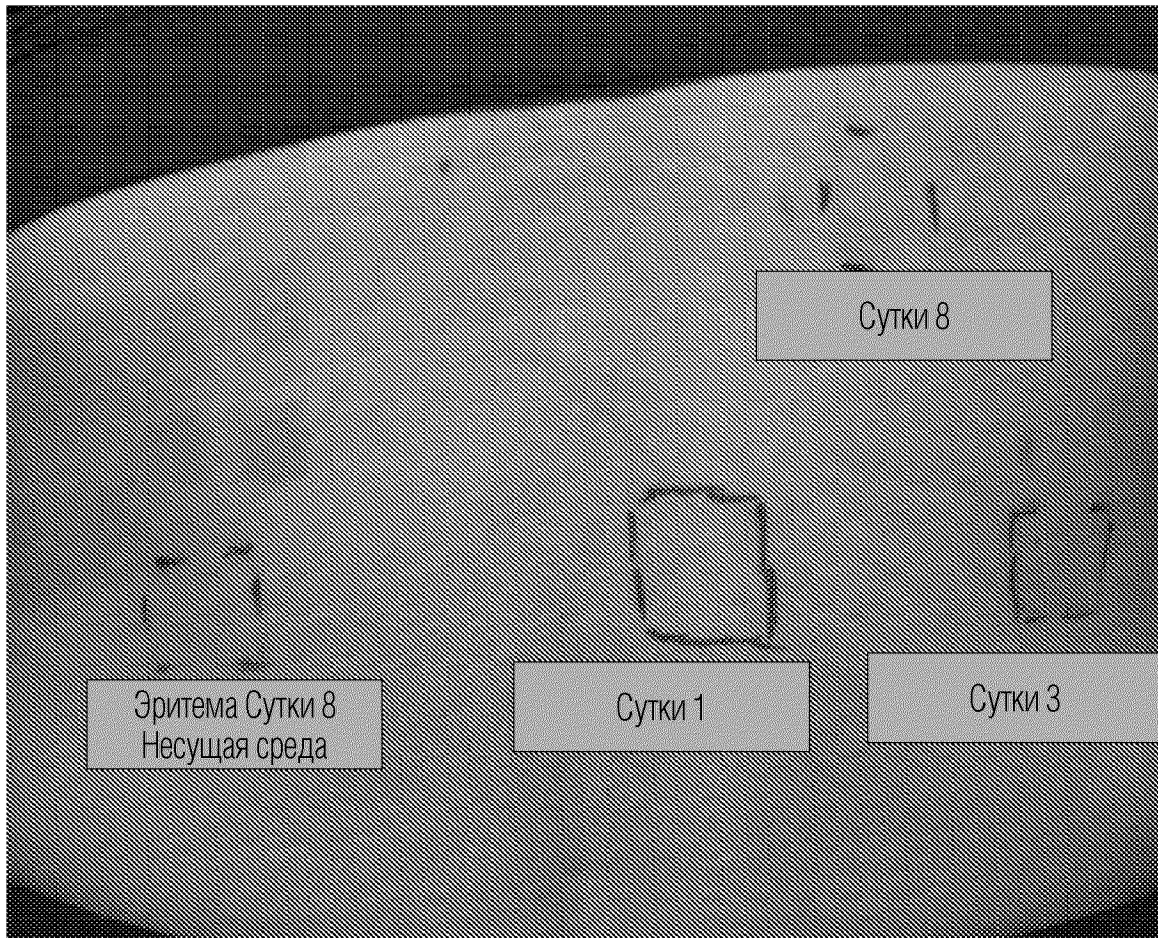


20/23

ФИГ. 13

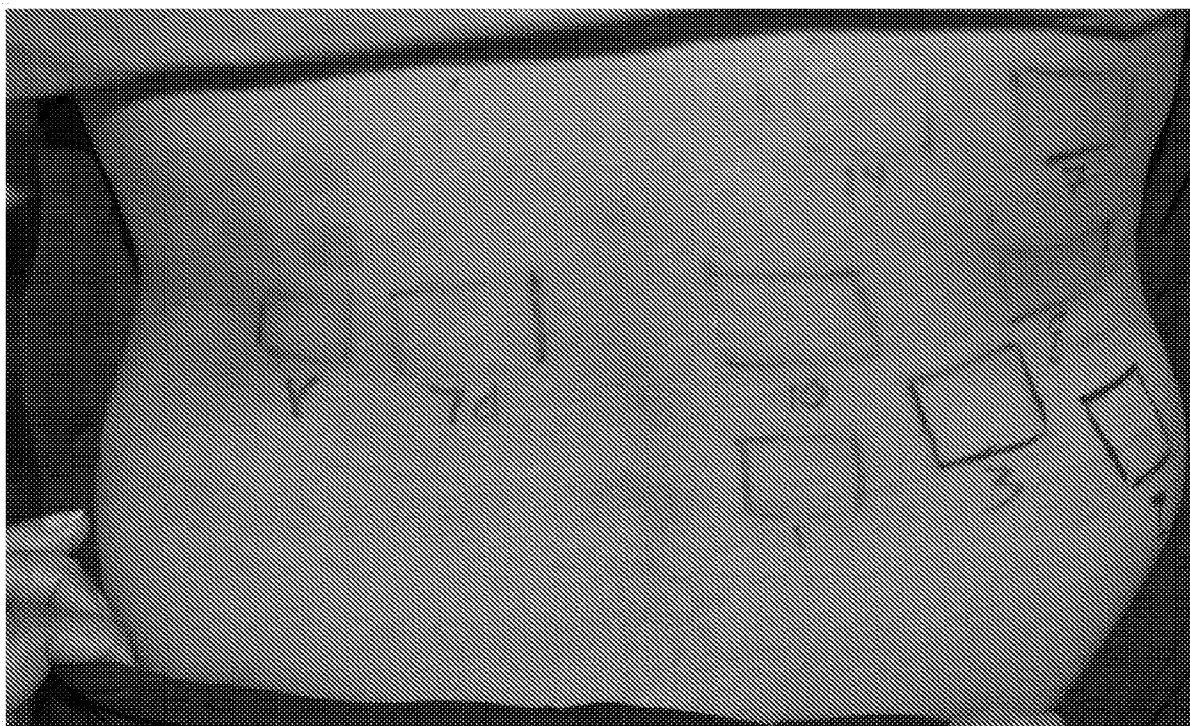


ФИГ. 14



22/23

ФИГ. 15



ФИГ. 16

