

(19)



**Евразийское
патентное
ведомство**

(11) **042208**

(13) **B1**

(12) **ОПИСАНИЕ ИЗОБРЕТЕНИЯ К ЕВРАЗИЙСКОМУ ПАТЕНТУ**

(45) Дата публикации и выдачи патента
2023.01.24

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

(21) Номер заявки
201892037

(22) Дата подачи заявки
2011.12.20

(54) **ТЕРАПЕВТИЧЕСКОЕ МЕСТНОЕ ПРИМЕНЕНИЕ НАРИНГЕНИНА**

(43) **2019.06.28**

(62) **201490613; 2011.12.20**

(71)(73) Заявитель и патентовладелец:
ОРИФЛЕЙМ КОСМЕТИКС АГ (СН)

(56) US-A-5665367
EP-A2-0774249
US-A-4297348

MOHAMED A. EL-MAHDY et al.,
Naringenin Protects HaCaT Human Keratinocytes
Against UVB-induced Apoptosis and Enhances the
Removal of Cyclobutane Pyrimidine Dimers from the
Genome. Photochemistry and Photobiology, 2008, 84:
307-316, весь текст

(72) Изобретатель:
**Гиллбро Йоханна Мария, Мэвон Алан
Роберт Пьер, Дюрашер Люси, Клак
Анке (SE), Кэттли Кевин (IE)**

(74) Представитель:
Нилова М.И. (RU)

(57) Изобретение относится к применению нарингенина для лечения и/или предупреждения повреждения кожи, выбранного из группы, состоящей из воспаления, лопнувших вен, покраснения, отека вокруг глаз, нарушения пигментации кожи, или повреждения кожи, возникшего в результате фотоиндуцированного старения, псориаза или розацеа, при этом указанное соединение входит в состав композиции для местного нанесения на кожу, тело и/или волосистую часть головы, и при этом композиция не содержит ретиноевую кислоту или ее производные.

B1

042208

042208

B1

Область техники

Настоящее изобретение относится к применению нарингенина для борьбы с проявлениями старения кожи и/или оказания благотворного воздействия, замедляющего старение. В частности, настоящее изобретение относится к нарингенину, оказывающему на кожу воздействие, сходное с влиянием ретиноевой кислоты, но без агрессивного воздействия и раздражения кожи, вызываемого применением ретиноевой кислоты.

Уровень техники

Старение - многофакторное явление. Старение кожи является, главным образом, результатом генетической предрасположенности человека (известно как хронологическое старение) и его психологической реакции на стресс, обусловленный воздействием окружающей среды (известно как актиническое старение). По-видимому, актиническое старение специфично для кожи. Его определяют как влияние внешней среды на биологический ответ кожи. Ответ кожи в виде актинического старения, который может быть вызван воздействием солнца и загрязненного воздуха, а также курением, обычно ассоциируется с недостатком нормального увлажнения, развитием телеангиэктазии (сосудистой сетки), обвисанием кожи и появлением мелких морщин и морщин. Кроме того, с возрастом могут происходить временные или даже необратимые изменения кожи, такие как гормон-ассоциированное акне, жирная или сухая кожа, кератозы, розацеа, фоточувствительность или воспалительная эритема. Еще одним фактором, определяющим внешность человека, является цвет кожи, и неровный тон кожи с видимыми или осязаемыми нарушениями целостности и отечность воспринимаются как признак более старой нездорово выглядящей кожи. Кроме того, многих людей волнует степень пигментации кожи, и, возможно, многие хотят уменьшить потемнение или даже осветлить свой "естественный" цвет кожи. Процессы дифференцировки кератиноцитов и шелушения необходимы как для полноценного выполнения барьерной функции кожи, так и для ее здорового вида. По мере нашего старения данные функции угасают, и в результате наступает нарушение барьерной функции, что приводит к потере влаги и, в конечном итоге, к сухости кожи, но также и к повышенной восприимчивости кожи к внешним повреждающим факторам, таким как инфекция и фотоповреждение. Воздействие солнца на кожу вызывает утолщение эпидермиса. Это явление может быть результатом выживания сенесцентных кератиноцитов и меланоцитов в течение длительного времени, возможно, вследствие нарушенного шелушения. Стимулирование кератиноцитов для поддержания баланса пролиферирующих и дифференцирующих кератиноцитов улучшает как барьерную функцию, так и внешний вид кожи, обеспечивая таким образом здоровый, более молодой вид кожи. Для стимулирования шелушения могут быть применены механические методы. Однако данные методы в общем случае также обладают протеолитическим и/или кератолитическим действием, приводящим к раздражению кожи. Таким образом, существует потребность в соединениях, стимулирующих шелушение и не характеризующихся невыгодной способностью наносить коже повреждения иного рода. Дополнительным признаком старения кожи является нарушение или замедление заживления ран. Заживление ран представляет собой сложный процесс, включающий миграцию, пролиферацию, дифференцировку и инфильтрацию клеток нескольких различных типов и образование многочисленных факторов роста, цитокинов и молекул, восстанавливающих ткань, в результате чего происходит синтез новой ткани и затягивание раны. Ретиноевая кислота является золотым стандартом ингредиента, замедляющего старение, но и ей присущи неприятные побочные эффекты, и ее применение ограничено регулирующими органами. Альтернативные ретиноидоподобные активные вещества характеризуются наличием схожих, но менее многочисленных, ограничений. Побочным эффектом местного применения ретиноидов является раздражение кожи. Для раздраженной кожи характерны покраснение, сухость и шелушение на месте обработки. На уровне гистологии наблюдается периваскулярное скопление мононуклеарных клеток, при этом нейтрофилы и моноциты рассеяны в слое дермы, и в слое дермы или эпидермисе наблюдаются отдельные микроабсцессы. Полностью транс-ретинол (витамин А), исходное соединение для ретиноевой кислоты, в большинстве случаев имеет менее раздражающее действие, чем ретиноевая кислота, но даже в случае с этим веществом у многих людей наблюдается значительное раздражение. Раздражение является главной причиной отсутствия приверженности лечению среди применяющих ретиноиды. Кроме того, чрезмерное раздражение может нейтрализовать благотворное влияние местного применения. Вследствие широкой распространенности раздражения кожи, возникающего в результате применения ретиноевой кислоты, существует острая потребность в альтернативных соединениях с полезным эффектом для кожи, схожим с эффектом ретиноевой кислоты, но без ассоциированных проблем с раздражением кожи. По-прежнему существует необходимость установления соединений, которые оказывают благотворное воздействие, замедляющее старение, отвечающих стремлению потребителя выглядеть моложе и исключают побочные эффекты применения ретиноидов.

Краткое описание изобретения

Согласно изобретению предложено применение нарингенина для лечения и/или предупреждения повреждения кожи, выбранного из группы, состоящей из воспаления, лопнувших вен, покраснения, отека вокруг глаз, нарушения пигментации кожи, или повреждения кожи, возникшего в результате фотоиндуцированного старения, псориаза или розацеа, при этом указанное соединение входит в состав композиции для местного нанесения на кожу, тело и/или волосистую часть головы, и при этом композиция не

содержит ретиноевую кислоту или ее производные.

Авторы настоящего изобретения обнаружили, что указанное соединение обладает свойствами, имитирующими свойства ретиноевой кислоты, и оказывает на кожу воздействие, схожее с воздействием, оказываемым ретиноевой кислотой. Соответственно, указанное соединение можно применять вместо ретиноевой кислоты или ее производных в композициях для ухода за кожей. Соответственно, авторы настоящего изобретения представили соединение нарингенин, которое можно применять в композициях вместо ретиноевой кислоты, которая могла применяться ранее. В частности, такие композиции можно применять для защиты от и/или смягчения признаков старения. Соединение согласно настоящему изобретению подходит для применения для лечения и/или профилактики повреждения кожи, выбранного из группы, состоящей из воспаления, лопнувших вен, покраснения, отека вокруг глаз, нарушения пигментации кожи, или повреждения кожи, возникшего в результате фотоиндуцированного старения, псориаза или розацеа, причем указанное повреждение кожи наблюдается на коже лица, тела или волосистой части головы субъекта. Под термином "кожа" предлагается понимать кожу лица, тела и волосистой части головы.

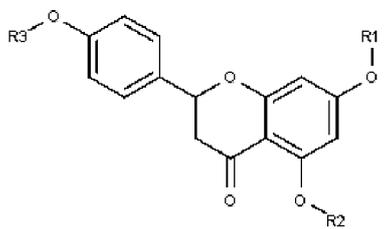
Соединение согласно настоящему изобретению, как было выгодно обнаружено, не раздражает кожу. Соответственно, соединение согласно настоящему изобретению можно применять в качестве растительного экстракта в составе композиции, не вызывая раздражения. В данном случае наблюдается преимущество перед применением ретиноевой кислоты или ее производных, поскольку, в отличие от ретиноевой кислоты или ее производных, нарингенин не раздражает кожу.

Специалисту в данной области техники понятно, что соединение согласно настоящему изобретению можно, таким образом, применять в качестве неочищенных экстрактов продуктов природного происхождения, таких как растительные экстракты, полученные из любой части растения, включая корни, стебли, листья, семена, цветок и плод.

Под "растительным экстрактом" подразумевается препарат в жидком, полутвердом или твердом состоянии, полученный из растительного или травяного сырья, которое обычно представлено в сухом виде. Можно выделить различные типы экстрактов. Стандартизированные экстракты скорректированы в рамках допустимой концентрации в соответствии с заданным содержанием компонентов при известной эффективности действия, стандартизации достигают путем корректировки состава экстракта с помощью инертного материала или путем смешивания серий экстрактов. Квантифицированные экстракты скорректированы по определенному набору компонентов, корректировку состава проводят путем смешивания серий экстрактов. Другие экстракты по существу определяют по их способу получения (состояние сырья, подлежащего экстрагированию, растворитель, условия экстрагирования) и спецификациям. Экстракты получают подходящими способами, применяя этиловый спирт или другие подходящие растворители, включая сверхкритический газ и жидкости. Различные серии травяного сырья для экстрагирования могут быть смешаны перед экстрагированием. Травяное сырье может быть подвергнуто предварительной обработке, например, инактивации ферментов, размолу или обезжириванию. Кроме того, ненужное сырье может быть удалено после экстрагирования.

Было обнаружено, что нарингенин легко проникает сквозь кожу, не вызывая раздражения.

Нарингенин представляет собой соединение флаванонового ряда, широко распространенное в цитрусовых фруктах (*Citrus var.*), включающих в качестве неограничивающих примеров грейпфрут (*Citrus Paradisi*), апельсин (*Citrus sinensis*); а также томат (*Solanum Lycopersicum*). Нарингенин (S)-2,3-дигидро-5,7-дигидрокси-2-(4-гидроксифенил)-4H-1-бензопиран-4-он в контексте настоящего изобретения является одним примером подходящих нарингенинов, которые могут быть представлены общей формулой:



где R_1 обозначает -H, гликозид или незамещенную, разветвленную или неразветвленную, ненасыщенную или насыщенную C_1-C_6 алкильную, аллильную или арильную группу. При этом R_1 представляет собой гликозид, группу сахара (моносахарид) или группу сахаров (олигосахарид), связанные посредством аномерного углерода с кислородом на структуре нарингенина с помощью O-гликозидной связи; R_2 обозначает -H, гликозид или незамещенную, разветвленную или неразветвленную, ненасыщенную или насыщенную C_1-C_6 алкильную, аллильную или арильную группу. При этом R_2 представляет собой гликозид, группу сахара (моносахарид) или группу сахаров (олигосахарид), связанные посредством аномерного углерода с кислородом на структуре нарингенина с помощью O-гликозидной связи; R_3 обозначает -H, гликозид или незамещенную, разветвленную или неразветвленную, ненасыщенную или насыщенную C_1-C_6 алкильную, аллильную или арильную группу. При этом R_3 представляет собой гликозид, группу

сахара (моносахарид) или группу сахаров (олигосахарид), связанные посредством аномерного углерода с кислородом на структуре нарингенина с помощью О-гликозидной связи. Особенно предпочтительными являются соединения, в которых $R_1=H$, $R_2=H$ и $R_3=H$. Термин "нарингенин" в контексте настоящей заявки включает производные нарингенина, как описано выше.

Соответственно, изобретение относится к применению нарингенина для лечения и/или профилактики повреждения кожи, выбранного из группы, состоящей из воспаления, лопнувших вен, покраснения, отека вокруг глаз, нарушения пигментации кожи, или повреждения кожи, возникшего в результате фотоиндуцированного старения, псориаза или розацеа.

Согласно одному варианту осуществления изобретения, в результате нанесения композиции на кожу, тело и/или волосистую часть головы:

- (i) уменьшается по меньшей мере одно из следующего: покраснение или воспаление кожи; или
- (ii) уменьшается отек вокруг глаз, сосудистая сетка и/или лопнувшие вены; или
- (iii) обеспечивается лечение гиперпигментации, вызванной УФ или воспалением.

Согласно одному варианту осуществления изобретения, нанесение композиции на кожу, тело и/или волосистую часть головы:

- (i) осветляет кожу;
- (ii) придает однородность тона и/или ослабляет проявление пигментации кожи и/или потемнения кожи; или
- (iii) усиливает блеск и здоровый цвет кожи.

Согласно одному варианту осуществления изобретения, композиция содержит 0,05-5 мас.% нарингенина.

Согласно одному варианту осуществления изобретения, нарингенин представляет собой 2S-нарингенин ((S)-2,3-дигидро-5,7-дигидрокси-2-(4-гидроксифенил)-4Н-1-бензопиран-4-он).

Предпочтительно нарингенин применяют на коже лица, тела или волосистой части головы субъекта, и его наносят на указанные места в составе подходящей композиции. Экстракты масел, содержащие данное соединение, могут также применяться в составе композиции. Подходящим образом, указанное соединение можно применять в соответствии с настоящим изобретением в тех случаях, когда указанное повреждение кожи является результатом биологического старения, вызванного внутренними факторами (естественного старения) или фотоиндуцированного старения (актинического старения), вызванного, например, воздействием УФ-излучения, загрязнением среды или стрессом.

Поддающиеся лечению и/или профилактике повреждение кожи, на которое благотворно влияет нанесение нарингенина согласно настоящему изобретению, включает по меньшей мере одно из следующего: воспаление, покраснение, пятна, опухшие глаза или темные круги и/или нарушения пигментации кожи.

Соединение согласно настоящему изобретению можно применять в целях по меньшей мере одного из следующего: осветления кожи, ускорения заживления ран, обеспечения ровного тона кожи путем уменьшения покраснения кожи, пятен или воспаления, осветления (отбеливания) цвета кожи или кожи волосистой части головы, обеспечения регенерации кожи с образованием более однородной, более плотной, более тонзированной и более эластичной кожи, продления жизни клеток, обеспечения сияния кожи, обеспечения однородности текстуры и тона кожи и/или ослабления пигментации кожи, лечения или профилактики язвенных поражений на некоторых участках или участках, подвергшихся кожному стрессу или поражению, вызванным воздействием УФ или воздействием раздражающего вещества и/или лечения акне или других дефектов кожи. Соединение согласно настоящему изобретению может быть включено в состав косметически приемлемой композиции для местного применения на по меньшей мере одном из участков: кожи, тела и/или кожи волосистой части головы.

Подходящим образом, композиции согласно настоящему изобретению содержат, в физиологически приемлемой среде, нарингенин. Нарингенин, как было обнаружено, особенно легко впитывается кожей лица, тела и/или волосистой части головы.

Нарингенин можно применять для ингибирования экспрессии матриксной металлопротеиназы (ММП), которая может быть индуцирована воздействием УФ и воспалительными процессами в коже. Подходящим образом, ММП может быть выбрана из по меньшей мере одного или комбинации двух или более из ММП-1, ММП-3, ММП-9, ММП-2, ММП-8 и ММП-13. Было показано, что нарингенин является мощным ингибитором указанных ММП.

Было показано, что нарингенин способствует экспрессии проколлагена 1. В частности, было обнаружено, что нарингенин особенно сильно способствует экспрессии проколлагена.

Было показано, что нарингенин ингибирует выработку провоспалительного цитокина интерлейкина-6 в фибробластах кожи. Таким образом, нарингенин нейтрализует повреждения, вызванные вредным воздействием света, а также повреждение, вызванное воспалением, являющееся результатом выработки провоспалительных цитокинов усиленной выработкой ММП в результате того же процесса, а также выработкой активных форм кислорода, наступившей в результате воспалительного процесса. В частности, было показано, что нарингенин ингибирует выработку провоспалительного цитокина интерлейкина-6 в фибробластах кожи. Подходящим образом, нарингенин можно применять для предупреждения и смягче-

ния симптомов воспаления кожи и связанных с ними воспалительных симптомов фотостарения, таких как потемнение кожи.

Было обнаружено, что нарингенин ингибирует ГМ-КСФи, следовательно, может быть применен для предупреждения и/или лечения нежелательной пигментации кожи и/или предупреждения и/или лечения покраснения, вызванного воспалением, связанным со старением и УФ-повреждением. Таким образом, симптомы повышенного уровня ГМ-КСФ можно предупредить или смягчить.

Было показано, что нарингенин ингибирует выработку ФРЭС, и в частности, было показано, что нарингенин оказывает ингибирующее воздействие на ФРЭС. Таким образом, нарингенин можно применять для лечения и/или смягчения по меньшей мере одного из следующих признаков старения кожи: покраснение кожи, вызванное УФ-излучением или воспалительным процессом, опухшие глаза и лопнувшие вены. Таким образом, соединение согласно настоящему изобретению можно успешно применять для нейтрализации указанного влияния старения на внешний вид кожи.

Было показано, что нарингенин стимулирует выработку фибронектина. Кроме того, было показано, что нарингенин стимулирует выработку фактора роста фибробластов. Нарингенин вызывает более интенсивную выработку ФРФ, чем ретиноевая кислота. Поскольку аутологичный фибронектин участвует в стимуляции заживления хронических кожных нарушений и в стимуляции реэпителиализации, а ФРФ является одним из факторов роста, задействованных в процессе заживления ран, и, как было показано, помогает устранять нарушения в случае замедленного заживления ран, он был предложен в качестве лечения для пациентов с дефектным заживлением ран (Greenhalgh et al.).

Было показано, что нарингенин индуцирует выработку калликреина 8. В частности, нарингенин обладает сильным индуцирующим действием в отношении калликреина 8. Таким образом, нарингенин можно применять для борьбы с признаками старения кожи или их смягчения путем повышения шелушения кожи, усиления увлажнения кожи, блеска и сияния кожи. Было показано, что нарингенин стимулирует выработку кератина 1/10. Таким образом, нарингенин можно применять для поддержания здорового состояния кожи и увлажнения, блеска и сияния кожи.

Подходящим образом, композиции согласно настоящему изобретению могут содержать вспомогательные вещества, подходящие для местного применения на коже, теле и/или волосистой части головы. Желательно, чтобы композиция в соответствии с настоящим изобретением была представлена в виде традиционных продуктов для ухода за кожей. Предпочтительно композиция представлена в виде крема, лосьона или сыворотки. В качестве альтернативы, композиция может быть представлена в виде традиционных продуктов для ухода за кожей, таких как гель, крем, молочко, лосьон, сыворотка, масло (например, массажное масло), скраб, порошок, маска, тоник, и т.п. Композиция может также быть представлена в виде мыла или очищающего средства (такого как очищающее средство для лица), шампуня, геля для душа или ванны. Кроме того, композиция может также представлять собой декоративный косметический продукт, такой как тональный крем, основа под макияж, корректор, компактная пудра, тушь или губная помада. Она также может быть включена в состав обертки или пленки, маски, пластыря, ткани или одеяла, тампона, полотна, салфетки, ручки или подобного. Наиболее предпочтительно, если продукт является неудалением продуктом для местного применения, то есть продуктом для нанесения на кожу без этапа целенаправленного смывания вскоре после его нанесения на кожу.

Подходящим образом, композиции согласно настоящему изобретению могут дополнительно содержать по меньшей мере одно из следующего: солнцезащитный или УФ-фильтр(ы), депигментирующие вещества для осветления тона кожи пациента, УФ-фильтры, увлажняющие вещества или дополнительные косметические вещества или компоненты, замедляющие старение.

Композиции согласно настоящему изобретению могут содержать по меньшей мере одно дополнительное косметически активное вещество, выбранное из группы, состоящей из: депигментирующих веществ, солнцезащитных или УФ-фильтров, органических фотозащитных веществ и/или по меньшей мере одно неорганическое фотозащитное вещество, отшелушивающие вещества, антиоксиданты, увлажняющие вещества, и т.д., и их смеси.

Композиции согласно настоящему изобретению могут дополнительно содержать вещества, выбранные из группы, состоящей из: силиконов, эмульгаторов, загустителей, порошков, пленкообразующих веществ, модификаторов реологических свойств, пропеллентов и их комбинаций. Специалисту в данной области техники понятно, что указанная композиция может содержать другие подходящие вспомогательные вещества. Например, композиция может дополнительно содержать вспомогательные вещества, такие как ароматизатор, замутнители, консерванты, красители, пигменты, буферные вещества, хелатирующие агенты, усилители восприятия, и т.д.

Композиции согласно настоящему изобретению могут дополнительно содержать активные вещества для ухода за кожей, такие как УФ-фильтры (например, такие как этилгексилметоксициннамат, октокрилен, этилгексилсалицилат, бутилметоксибензоилметан, диоксид титана или фенилбензимидазол сульфоновая кислота), активные вещества, замедляющие старение (например, витамины или белки), активные вещества против морщин, увлажняющие активные вещества, антиоксиданты, очищающие кожу активные вещества, отшелушивающие активные вещества, вещества, снижающие секрецию сальных желез, матирующие вещества, активные вещества - антиперспиранты, активные вещества для автозагара,

активные вещества, вызывающие набухание кожи, вещества, усиливающие барьерную функцию, поверхностно активные вещества и другие очищающие вещества, усилители доставки и тому подобное.

Подходящим образом, вещества, осветляющие кожу, такие как ингибиторы белка киназа А, ингибиторы белка киназа С-бета, ингибиторы ГТФ-циклогидролазы-1, агонисты рецептора гормона концентрации меланина, ингибиторы поглощения фенилаланина, ионотропных и метаболотропных антагонистов рецепторов глутамата и их смеси могут также быть включены в композицию в соответствии с настоящим изобретением.

Композиция дополнительно может содержать одно или более активных веществ для ухода за кожей, выбранных из группы, состоящей из альфагидроксикислот, бетагидроксикислот, полигидроксикислот, гиалуроновой кислоты, экстрактов водорослей, пептидов, производных витамина С, конъюгированной линолевой кислоты, аллантина, производных резорцина, альфа-арбутина, таннинов, флавоноидов, эллаговой кислоты, галловой кислоты и их смесей.

Композиции согласно настоящему изобретению могут также содержать растворитель, который может быть включен в состав для улучшения доставки активных веществ в кожу. Композиция для местного применения в соответствии с настоящим изобретением может быть получена способом, хорошо известным в области получения продуктов для ухода за кожей. Активные компоненты обычно включают в дерматологически приемлемый растворитель или носитель. Активные компоненты можно подходящим образом сначала растворить или диспергировать в части воды или другого растворителя или жидкости для включения в состав композиции.

Композиция может быть представлена в виде эмульсии, таких типов как "масло в воде", "вода в масле", "кремний в воде", "вода в кремнии", или множественной эмульсии, такой как тройная эмульсия (например, эмульсия вода/масло/вода (В/М/В), эмульсия температуры инверсии фаз (ТИФ), эмульсии типа "воск в воде", микроэмульсии или геля D-фазы или подобного. Композиции могут также быть представлены в виде крема, геля, раствора, дисперсии (например, гидродисперсии или липодисперсии), пасты или в твердом состоянии (например, твердая палочка, компактная пудра). В качестве альтернативы, композиции могут быть представлены в виде системы на основе спирта или аэрозоля.

Композиция может быть представлена в форме эмульсии, в частности, эмульсии типов "масло в воде" или "вода в масле".

Нарингенин можно применять в водосодержащих или безводных композициях, например, полученных и/или упакованных в безводной среде [состав или упаковка или инкапсулированная система доставки]. Безводные композиции особенно предпочтительны. Соединение согласно настоящему изобретению может быть получено так, чтобы оно содержалось внутри везикулярных систем, например, фосфолипида, лецитина. Твердые или полутвердые инкапсулирующие материалы оболочки могут быть применены для помещения в оболочку соединения настоящего изобретения или композиции, содержащей соединение согласно настоящему изобретению. В качестве альтернативы соединение или композиции, содержащие соединение, могут быть инкапсулированы в пористых органических полимерных микросферах (см. US5851538), золь-гелевых микрокапсулах (см. US2010255107) или мезопористых материалах, состоящих из микрочастиц (см. US20010236493).

Нарингенин может быть введен в состав осадителя (см. US6103267) или неводной системы и упакован в одной камере двухкамерного дозатора, такого как описан в WO9727841, для смешивания с композицией во второй камере незадолго до нанесения или непосредственно перед ним. Соединение может быть включено в состав по существу сухой формы, такой как порошковая композиция, которая может быть смешана или не смешана с водой (WO2011121540) или второй композицией непосредственно перед применением (такой способ был описан в WO201112112).

Композиция может быть упакована любым подходящим способом, например, в банку, бутылку, тубик, тубу, тубу с дозатором, тубу, распыляющую аэрозоль или пену, шариковый ролик, палочку, кисточку или саше. Она может также быть помещена в капсулу, ампулу или пипетку (например, капельницу).

УФ-фильтры могут присутствовать в косметической или дерматологической композиции в концентрации в пределах от примерно 0,1-30 мас.%, а более предпочтительно в пределах от примерно 0,5-10 мас.%, исходя из совокупной массы косметической композиции для местного применения. Композиция согласно настоящему изобретению может быть представлена в виде:

- (i) продукта для ухода, лечения, чистки или защиты кожи, включая лицо и/или волосистую часть головы;
- (ii) композиции против морщин или замедляющей старение для лица;
- (iii) композиции для раздраженной кожи;
- (iv) композиции, предохраняющей от вредного воздействия солнца;
- (v) композиции для искусственного загара для лица и/или тела;
- (vi) композиции для ухода за кожей после загара; или
- (vii) композиции против акне/против пятен.

Подходящим образом, композиции, описанные в настоящем документе, могут быть применены в соответствии с применением, замедляющим старение, описанным в настоящем документе.

Согласно настоящему изобретению предложено применение нарингенина для лечения и/или предупреждения повреждения кожи, выбранного из группы, состоящей из воспаления, лопнувших вен, покраснения, отека вокруг глаз, нарушения пигментации кожи, или повреждения кожи, возникшего в результате фотоиндуцированного старения, псориаза или розацеа, при этом указанное соединение входит в состав композиции для местного нанесения на кожу, тело и/или волосистую часть головы, и при этом композиция не содержит ретиноевую кислоту или ее производные.

Желательно, чтобы нанесение композиции согласно настоящему изобретению на кожу, тело и/или волосистую часть головы:

- (i) осветляло цвет кожи или волосистой части головы пациента путем предупреждения образования и/или удаления коричневых пигментных пятен и/или возрастных пятен и/или веснушек; и/или
- (ii) уменьшало по меньшей мере одно из покраснения кожи, пятен или воспаления; и/или
- (iii) обеспечивало более однородную, более плотную, более тонизированную и более эластичную кожу; и/или
- (iv) уменьшало отек глаз и/или темные круги.

Подходящим образом, концентрация нарингенина в композиции в соответствии с настоящим изобретением может находиться в диапазоне примерно 0,001-50 мас.%. Предпочтительно, чтобы концентрация нарингенина была в пределах 0,01-10 мас.%. Еще более предпочтительно, чтобы концентрация нарингенина была в пределах 0,05-5 мас.%. Термин "дерматологически приемлемый носитель" в контексте настоящего документа означает, что описанные носители подходят для применения в контакте с роговой тканью млекопитающих, не вызывая побочных эффектов, таких как, например, неспецифическая токсичность, несовместимость, нестабильность, аллергическая реакция.

Описание фигур

Дополнительные свойства и преимущества настоящего изобретения описаны и будут хорошо понятны из подробного описания изобретения и из чертежей, в которых:

на фиг. 1 показан профиль проникновения гиберелловой кислоты (ГК), нарингенина (НГ) и N-ацетиласпарагиновой кислоты (ААК) через 24 ч после нанесения на образец свиной кожи;

на фиг. 2 представлено ингибирование УФ-индуцированной выработки ММП-1, ММП-2, ММП-3, ММП-8, ММП-9 с помощью гиберелловой кислоты (ГА) или N-ацетиласпарагиновой кислоты (ААК);

на фиг. 3 показано подавление ингибирования выработки ММП-1, индуцированной воспалением с ФМА, с применением нарингенина (НГ) или гиберелловой кислоты (ГК), или N-ацетиласпарагиновой кислоты (ААК) в фибробластах кожи человека;

на фиг. 4 показано ингибирование выработки ММП-3, индуцированной воспалением с ФМА, с применением нарингенина (НГ) или гиберелловой кислоты (ГК), или N-ацетиласпарагиновой кислоты (ААК) в фибробластах кожи человека;

на фиг. 5 показана стимуляция проколлагена-1 в фибробластах кожи после 24-часовой стимуляции следующими соединениями: гиберелловой кислотой (ГК), нарингенином (НГ), N-ацетиласпарагиновой кислотой (ААК), β -эсцином (БЭ), арахидоновой кислотой (АК), кверцетином (КЦ) и докозагексаеновой кислотой (этиловым эфиром) (ДЭЭ), и контрольным ДМСО, ретиноевой кислотой (РК). На фигуре показано среднее по 3 отдельным экспериментам на 3 различных донорах;

на фиг. 6 представлена стимуляция фибронектина в кератиноцитах человека, стимулируемых полностью транс-ретиноевой кислотой (РК), ретинолом (Рол), арахидоновой кислотой (АК), β -эсцином (БЭ), докозагексаеновой кислотой (этиловым эфиром) (ДЭЭ) и кальцием (Ca^{2+}) в качестве положительного контроля;

на фиг. 7 показано ингибирование выработки интерлейкина-6 [ИЛ-6] в фибробластах кожи с помощью гиберелловой кислоты (ГК), нарингенина (НГ) и N-ацетиласпарагиновой кислоты (ААК) в сравнении с полностью транс-ретиноевой кислотой (РК), ретинолом;

на фиг. 8 показано ингибирование выработки ГМ-КСФ в фибробластах кожи человека с помощью гиберелловой кислоты (ГК), нарингенина (НГ) и N-ацетиласпарагиновой кислоты (ААК);

на фиг. 9 показано влияние местного лечения эксплантатов кожи с помощью 1% гиберелловой кислоты (ГК), нарингенина (НГ) и N-ацетиласпарагиновой кислоты (ААК) в пропиленгликоле на подавление УФ-индуцированной экспрессии ГМ-КСФ;

на фиг. 10 показано ингибирование индуцированного воспалением ФРЭС с помощью нарингенина (НГ), N-ацетиласпарагиновой кислоты (ААК), гиберелловой кислоты (ГК) и β -эсцина (БЭ) в сравнении с полностью транс-ретиноевой кислотой (РК), ретинолом;

на фиг. 11 показана стимуляция кератина-6 в кератиноцитах человека, стимулируемых нарингенином (НГ), β -эсцином (БЭ) и докозагексаеновой кислотой (этиловым эфиром) (ДЭЭ), ретиноевой кислотой (РК) и ретинолом (Рол) и кальцием в качестве положительного контроля;

на фиг. 12 показана стимуляция фибронектина в кератиноцитах человека, стимулируемых полностью транс-ретиноевой кислотой (РК), ретинолом (Рол), β -эсцином (БЭ), арахидоновой кислотой (АК), и докозагексаеновой кислотой (этиловым эфиром) (ДЭЭ) и кальцием (Ca^{2+}) в качестве положительного контроля;

на фиг. 13 показана стимуляция выработки ФРФ в эксплантатах кожи человека нарингенином (НГ), гибберелловой кислотой (ГК), N-ацетиласпарагиновой кислотой (ААК) и ретиноевой кислотой (РК);

на фиг. 14 показана значимая стимуляция калликрейна 8 гибберелловой кислотой (ГК), нарингенином (НГ), N-ацетиласпарагиновой кислотой (ААК), арахидоновой кислотой (АК) и докозагексаеновой кислотой (этиловым эфиром) (ДЭЭ), а также ретинолом и ретиноевой кислотой (РК) в качестве положительного контроля;

на фиг. 15 показан синтез кератина 1/10, выраженный в % от синтеза в группе контроля плацебо, в кератиноцитах человека при применении нарингенина (НГ), гибберелловой кислоты (ГК), N-ацетиласпарагиновой кислоты (ААК), арахидоновой кислоты (АК), β -эсцина (БЭ), докозагексаеновой кислоты (этилового эфира) (ДЭЭ), полностью транс-ретиноевой кислоты (РК) и ретинола (Рол).

Подробное описание изобретения

Настоящее изобретение относится к соединению нарингенину, характеризующемуся несколькими эффектами, замедляющими старение.

Авторы настоящего изобретения определили соединение нарингенин, имитирующее ретиноевую кислоту, которое обладает схожими с ретиноевой кислотой генно-регулирующими сигналами и которое можно применять в композициях для применения в косметологии. В частности, они определили ингредиент нарингенин, который может способствовать защите и смягчению признаков старения. Они продемонстрировали до сих пор неизвестную биологическую активность данного ингредиента, применив ряд тестов *in vitro*. В указанных тестах *in vitro* исследовали влияние соединения настоящего изобретения на ключевые биологические маркеры в коже, которые, как известно, оказывают влияние на старение кожи.

Кроме того, и это является преимуществом, было обнаружено, что соединение согласно настоящему изобретению не раздражает кожу при нанесении на нее в чистом виде.

Ингибиторы матричной металлопротеиназы [ММП] борются с морщинами и обвисшей кожей путем ингибирования/уменьшения разрушения коллагена.

UV-излучение повышает экспрессию ферментов матричной металлопротеиназы в коже (Fisher et al., 1997; Farage et al., 2008). ММП могут разрушать любые внеклеточные матричные белки (Fisher et al., 1997). ММП изначально синтезируются как неактивные ферменты с пропептидным доменом, который необходимо удалить до активации фермента. В нормальных условиях ММП участвуют в ремоделировании внеклеточного матрикса, например, в восстановлении тканей, но при избыточном индуцировании УФ-лучами или посредством воспалительной стимуляции действие ММП вызывает разрушение и ремоделирование тканей до такой степени, что в результате наступает повреждение соединительной ткани и преждевременное старение (Kahari and Saarialho-Kere 1997a; Fisher et al., 1997). ММП различных типов предпочитают разные субстраты. В разрушении коллагена участвуют несколько ММП: ММП-1 начинает с расщепления коллагена, который затем дополнительно разрушают ММП-3 и ММП-9. Также, в разрушении коллагена участвуют ММП-2, ММП-8 и ММП-13 (Kerkvliet et al., 1999). Соединения, ингибирующие экспрессию ММП, будут предупреждать или снижать индуцированные ММП потерю или разрушение коллагена.

Учитывая тот факт, что было показано, что соединение согласно настоящему изобретению ингибирует экспрессию ММП (фиг. 2 и 3), указанное соединение, таким образом, можно применять для профилактики/уменьшения образования морщин на коже и дряблости кожи, связанных с потерей или разрушением коллагена. Дополнительным преимуществом является то, что поддерживается здоровая целостность кожи.

Проколлаген 1 борется с морщинами и обвислой кожей, способствуя синтезу коллагена.

УФ-лучи не только способствуют разрушению коллагена, но также препятствуют текущему синтезу коллагена, ингибируя экспрессию генов проколлагена (Kahari and Saarialho-Kere 1997b).

Было показано, что соединение согласно настоящему изобретению - нарингенин - способствует экспрессии проколлагена 1 (фиг. 4). В частности, было обнаружено, что нарингенин особенно выражено способствует экспрессии проколлагена.

Результаты свидетельствуют о том, что соединение согласно настоящему изобретению можно применять для предупреждения эффектов снижения содержания коллагена в коже, то есть предупреждения или уменьшения образования морщин на коже и мелких морщин, уменьшения выраженности морщин на коже и предупреждения обвисания кожи и других признаков, ассоциированных со снижением уровня коллагена.

Провоспалительные цитокины воздействуют на воспаление.

Учитывая, что старение включает фотостарение, известно, что кожа становится более подверженной воспалению. Воспаление является защитным механизмом для кожи против различных форм агрессивного воздействия: физического, химического и биологического. УФ-лучи индуцируют разрушение коллагена посредством повышения выработки ММП, и воспаление также приводит к повышению экспрессии ММП (Bennett et al., 2008; Kahari and Saarialho-Kere 1997b). Провоспалительные цитокины, включая ИЛ-6, являются медиаторами, индуцирующими экспрессию нескольких ММП, включая ММП-1, ММП-2, ММП-3, ММП-9 (Dasu et al., 2003; Kossakowska et al., 1999; Parks et al., 2004). ИЛ-6 также был

задействован в индуцированной УФ-индукции ММП-1, разрушавшей коллаген (Wlaschek et al., 1993). Интерлейкин-6 (ИЛ-6) вырабатывается в очагах воспаления (Kessler-Becker et al., 2004), и уровень указанного цитокина повышен при состояниях, связанных с воспалением, таких как псориаз (Grossman et al., 1989). Экспрессия ИЛ-6 также связана с гиперплазией эпидермиса, наблюдаемой на коже пациентов с псориазом. Гиперплазия эпидермиса является одной из характеристик, связанных с кожей, подверженной фотостарению (Rijken and Bruijnzeel 2009).

Воспаление также приводит к выработке активных форм кислорода (АФК), которые задействованы в ряде разрушительных процессов в коже, дополнительно ускоряющих процесс старения (Meier et al., 1989) (Conner and Grisham 1996).

Необходимо, чтобы эффективное лечение морщин было направлено на повреждения, вызванные неблагоприятным воздействием света, но также на повреждения, вызванные воспалением, возникшие в результате выработки провоспалительных цитокинов, и усиленной выработкой ММП, вызванной той же причиной, и выработкой АФК, вызванной воспалительным процессом.

Было показано, что соединение согласно настоящему изобретению - нарингенин - ингибирует выработку провоспалительного цитокина интерлейкин-6 (фиг. 6) в фибробластах кожи. Таким образом, соединение согласно настоящему изобретению - нарингенин - можно применять для борьбы с воспалением и облегчения его симптомов и связанных воспалительных симптомов фотостарения, таких как образование морщин и потемнение кожи.

ГМ-КСФ борется с депигментацией кожи и предупреждает покраснение, вызванное воспалением.

Пигментация кожи вызвана присутствием меланина (пигмента, вырабатываемого в эпидермисе путем гидроксирования тирозина ферментом тирозиназой). Пигмент меланин синтезируется в специализированных клетках, называемых меланоцитами, упакованных в органеллы, называемые меланосомами, которые переносятся в кератиноциты для обеспечения правильного распространения в эпидермисе. Термины "отбеливающие/пигментные агенты" относятся к действующим агентам, которые могут снижать или менять пигментацию кожи, ограничивая выработку меланина, ингибируя созревание и перенос меланосом или стимулируя разрушение пигмента. Продукты, осветляющие кожу, коммерчески доступны для косметических целей, чтобы получить более светлый цвет кожи. В клинической практике их также применяют для лечения нарушений, связанных с гиперпигментацией, таких как меланодермия, кофейные пятна и солнечное лентиго. Все указанные соединения естественным образом воздействуют на выработку меланина, и многие традиционно применяемые вещества известны как конкурентные ингибиторы тирозиназы, одного из ключевых ферментов в меланогенезе (Hearing and Jimenez 1987).

Однако меланогенез контролирует не только тирозиназа, существует несколько факторов, которые играют важную роль в потемнении кожи (Gillbro and Olsson 2011), таких как перенос меланосом из меланоцитов в окружающие кератиноциты или паракринная выработка меланогенных факторов из кератиноцитов. (Thody and Graham 1998) (LERNER and MCGUIRE 1961; LERNER et al., 1954; LERNER and MCGUIRE 1964) (Schauer et al., 1994); (Jabbour 2003; Levine et al. 1991) (Abe et al., 1969; Busca and Ballotti 2000; Hunte et al., 1994; Im et al., 1998).

Важным механизмом, по-видимому, является паракринная выработка гранулоцитарно-макрофагального колониестимулирующего фактора (ГМ-КСФ). Кератиноциты отвечают на воздействие УФА и УФВ повышением выработки ГМ-КСФ (Imokawa et al., 1996; Hirobe et al., 2004). У меланоцитов имеются специфичные сайты связывания для ГМ-КСФ, и после связывания ГМ-КСФ повышает выработку пигмента в меланоцитах (Imokawa et al., 1996). Даже несмотря на то, что УФА и УФВ по-разному активируют кератиноциты, как УФА, так и УФВ приводят к выработке ГМ-КСФ. Таким образом, ГМ-КСФ важен для пигментации эпидермиса и может рассматриваться как биомаркер пигментации кожи. Было показано, что ГМ-КСФ играет важную роль в воспалении, и было показано, что ингибирование ГМ-КСФ уменьшает воспаление кожи (Hamilton 2008). Также было высказано предположение, что ГМ-КСФ участвует в замедлении воспалительного ответа путем ингибирования апоптоза моноцитов, таким образом способствуя переходу от острого к хроническому воспалительному заболеванию кожи (Bratton et al., 1995). Было показано, что соединение согласно настоящему изобретению ингибирует ГМ-КСФ (фиг. 7 и 8), и было показано, что нарингенин оказывает ингибирующее воздействие на ГМ-КСФ. Таким образом, соединение согласно настоящему изобретению можно применять для предупреждения нежелательной пигментации кожи и/или предупреждения покраснения, вызванного воспалением, ассоциированного с повышением уровня ГМ-КСФ, которое может быть вызвано старением и УФ-повреждениями.

Фактор роста эндотелия сосудов борется с покраснением, отеком глаз и лопнувшими венами.

Неблагоприятное воздействие света и солнечный ожог являются главными причинами старения, вызванного внешними факторами. Чрезмерное воздействие УФВ сопровождается эритемой (покраснением), отеком (припухлостью), вазодилатацией и ангиогенезом в результате повышения проницаемости сосудов. Фактор роста эндотелия сосудов (ФРЭС) является главным медиатором указанных изменений (Hirakawa et al., 2005).

Также умеренное воздействие УФВ-излучения индуцирует экспрессию ФРЭС (Brauchle et al., 1996a). Экспрессию ФРЭС также индуцирует воспаление (Salven et al., 2001). ФРЭС индуцирует УФ-

излучение как в фибробластах кожи, так и в кератиноцитах (Trompezinski et al., 2001), тогда как индуцированный воспалением ФРЭС экспрессирован, главным образом, в фибробластах дермы. Сверхэкспрессия ФРЭС в коже, облученной УФ, или в коже, активированной воспалением, может способствовать расширению микроциркуляторной части сосудистого русла, распространенной характеристики стареющей кожи.

Отек является причиной припухлости и развивается в результате повышения проницаемости сосудов, вызванного ФРЭС (Phelps 1990; Infanger et al., 2004).

Розацеа является распространенным заболеванием кожи, характеризующимся сосудистыми отклонениями от нормы на коже, приводящими к эритеме и телеангиэктазии (лопнувшим капиллярам). Поскольку розацеа является очень заметным заболеванием, влияние на качество жизни заболевших велико. Рецепторы для ФРЭС обычно экспрессированы в коже, пораженной розацеа. (Smith et al., 2007). В более ранних исследованиях было показано снижение размера и числа сосудов в экспериментальной модели псориаза после блокады ФРЭС (Schonthaler et al., 2009).

Свободные радикалы являются еще одной угрозой более молодой, более здоровой на вид коже. H_2O_2 является сильно окисляющим соединением и приводит к образованию свободных радикалов. Было показано, что ФРЭС также индуцирует H_2O_2 (Brauchle et al. 1996b). Медиаторы, выработанные во время воспаления, такие как ИЛ-6, вызывают появление свободных радикалов и H_2O_2 (Winrow et al., 1993), а также ФРЭС (Cohen et al. 1996).

Следовательно, снижение количества ФРЭС, образовавшегося под влиянием как УФ-излучения, так и воспаления, является способом борьбы с покраснением и припухлостью и поверхностными венами.

Было показано, что соединение согласно настоящему изобретению ингибирует выработку ФРЭС (фиг. 9), и было показано, что нарингенин оказывает ингибирующее воздействие на ФРЭС. Таким образом, соединение согласно настоящему изобретению можно применять для борьбы с покраснением кожи, вызванным УФ-излучением или воспалительным действием, отеками вокруг глаз и лопнувшими венами, все из которых оказывают старящее воздействие на кожу.

Фактор роста эпидермиса воздействует на улучшение заживления ран.

Члены семейства факторов роста эпидермиса (ФРЭ) являются важными факторами роста, задействованными в эпителизации во время заживления ран на коже. Было показано, что гепарин-связывающий ФРЭ-подобный фактор роста (ГС-ФРЭ), член семейства ФРЭ, играет важную роль в заживлении ран на коже, где он функционирует путем ускорения миграции кератиноцитов, а не пролиферации (Shirakata et al., 2005). Было показано, что соединение согласно настоящему изобретению (см. табл. 3) стимулирует выработку гепарин-связывающего фактора роста эпидермиса (на генном уровне) и, таким образом, может ускорить процесс заживления ран на коже. В табл. 3 представлены данные по стимуляции ГСФРЭ с помощью нарингенина при местном применении на эксплантатах кожи, на коже, показывающие доставку в кожу при местном применении на коже и наступающее в результате регулирование генов.

Фактор роста соединительной ткани воздействует на заживление ран.

Фактор роста соединительной ткани (ФРСТ) представляет собой ВКМ-ассоциированный гепарин-связывающий белок, который связывается непосредственно с интегринами. Он синтезируется фибробластами и стимулирует пролиферацию и хемотаксис указанных клеток. Также было показано, что ФРСТ необходим для реэпителизации при заживлении ран, т.к. способствует миграции клеток (Igarashi et al., 1993). Кроме того, ФРСТ является сильным стимулятором белков ВКМ, таких как коллаген I типа и фибронектин и их интегриновые рецепторы (Seeker et al., 2008).

Было показано, что соединение согласно настоящему изобретению (см. табл. 3) стимулирует выработку фактора роста соединительной ткани (на генном уровне) и, таким образом, может применяться для ускорения и/или усиления процессов заживления ран на коже. В табл. 3 представлены данные по генам для стимуляции ФРСТ соединением согласно настоящему изобретению при местном применении на эксплантатах кожи, показывающие доставку в кожу при местном применении на коже и наступающее в результате регулирование генов.

Фибронектин воздействует на заживление ран.

Аутологичный фибронектин участвует в стимуляции заживления хронических язв на коже и роговице. Фибронектин способствует заживлению ран, стимулируя гемостаз, помогая контролировать инфекцию и очищать раны и способствует реэпителизации, образованию грануляционной ткани и, наконец, соединительной ткани с адекватной прочностью на разрыв для заживления повреждения кожи.

Было показано, что соединение согласно настоящему изобретению стимулирует выработку фибронектина, и было показано, что, в частности, арахидоновая кислота, β -эсцин и докозагексаеновая кислота (этиловый эфир) (фиг. 11) стимулируют более высокую выработку фибронектина, чем ретиноевая кислота. Соединение согласно настоящему изобретению, таким образом, можно применять для ускорения процесса заживления ран на коже.

Фактор роста фибробластов воздействует на заживление ран.

Фактор роста фибробластов (ФРФ) является одним из факторов роста, участвующих в процессе заживления ран, и было показано, что он способствует устранению нарушений в нарушенном заживлении ран, и он был предложен в качестве лечения для пациентов с нарушенным заживлением ран. Также акти-

ватор плазминогена (PLAT) активируется полностью транс-ретиноевой кислотой, ААК и ГК. Возможно, активация системы активатора плазминогена - один из механизмов, с помощью которых полностью транс-ретиноевая кислота оказывает благотворное воздействие на заживление ран на коже. Было показано, что соединение согласно настоящему изобретению нарингенин стимулирует выработку фактора роста фибробластов (фиг. 12). Было показано, что нарингенин вызывает более высокую выработку ФРФ, чем ретиноевая кислота. Таким образом, указанное соединение можно применять для ускорения процесса заживления ран на коже.

Калликреин 8 воздействует на шелушение, увлажнение кожи, блеск и сияние кожи.

Восстановление кожи начинается с выработки новых кератиноцитов из стволовых клеток, находящихся в базальном слое, внутреннем слое эпидермиса. По мере образования новых клеток кератиноциты мигрируют вверх и дифференцируются в корнеоциты. Кератин, который является высокомолекулярным белком, вырабатывается во время процесса дифференцировки и вызывает отверждение клеточных стенок, образуя роговой слой (РС). Окончательная дифференцировка кератиноцитов в конечном итоге приводит к гибели клеток. Старые корнеоциты высыпаются из РС в процессе отшелушивания. Старение связано со снижением пролиферации эпидермиса.

Калликреины являются сериновыми протеазами и, как считают, отвечают за протеолиз десмосом во время шелушения (Komatsu et al., 2005). Калликреин 8 (КЛК8) задействован как в пролиферации эпидермиса, так и в осыпании корнеоцитов (Kishibe et al., 2007) как напрямую, так и с помощью индукции КЛК 6 и КЛК 7.

Несмотря на то что РК очень эффективно стимулирует процесс шелушения, индуцируя интенсивную выработку калликреина, известно, что она оказывает несколько провоспалительное воздействие, что активирует другие процессы, играющие отрицательную роль в старении кожи.

Было показано, что соединение согласно настоящему изобретению нарингенин индуцирует выработку калликреина 8 (фиг. 13). В частности, нарингенин оказывает сильное индуцирующее воздействие. Таким образом, соединение согласно настоящему изобретению можно применять для усиления шелушения кожи, усиления увлажнения кожи, блеска и светлого цвета кожи.

Кератин 1/10 воздействует на дифференцировку эпидермиса, увлажнение и здоровый вид кожи.

Кожа состоит из двух слоев: внешнего - эпидермиса, и внутреннего - дермы (Proksch et al., 2008). Кератиноциты составляют самый внешний слой эпидермиса, роговой слой, который обеспечивает физический и химический барьер для окружающей среды, предупреждающий проникновение инородных веществ и потерю воды и важных составляющих кожи и организма (Borgono et al., 2007). Кератиноциты во внутреннем слое эпидермиса, базальном слое, пролиферируют и не дифференцированы. Только с началом дифференцировки они выходят из клеточного цикла и начинают двигаться вверх в эпидермисе к поверхности кожи (Fuchs 2007). Кератиноциты связаны друг с другом с помощью прочных механических соединений, называемых десмосомами (Sandjeu and Haftek 2009). Кератин 1 и кератин 10 являются ранними маркерами дифференцировки кератиноцитов. Кератин 1 и кератин 10 действуют как димер (кератин 1/10) и экспрессированы вместе. По мере продолжения процесса дифференцировки экспрессия 1 и кератина 10 вновь снижается и они заменяются другими молекулами, т.е. инволюкрина и филагтрина (Lu et al., 1994). Имеются доказательства, свидетельствующие о том, что повышение уровня кератина 1/10 связано со снижением онкогенеза (Tiano et al., 2002). При дифференцировке кератиноциты поднимаются и становятся гранулярными кератиноцитами (ГК). ГК вырабатывают почти все белки и липиды, необходимые для функционирования защитного барьера, подвергаясь специально запрограммированной гибели клеток, называемой ороговением (Toulza et al., 2007). Процесс ороговения способствует появлению корнеоцитов, у них отсутствуют клеточные органеллы, и они состоят главным образом из кератина. В конечном итоге, корнеоциты в наиболее внешнем слое рогового слоя постепенно осыпаются и заменяются вновь кератинизированными клетками в процессе, называемом шелушением (Naga et al., 2011). Для сохранения гомеостаза и функционального барьера тонкое равновесие между пролиферацией и дифференцировкой кератиноцитов необходимо строго регулировать. Было показано, что соединение согласно настоящему изобретению нарингенин стимулирует выработку кератина 1/10. Таким образом, соединение согласно настоящему изобретению можно применять для поддержания здорового состояния кожи и увлажнения, блеска и светлого цвета кожи.

Примеры

Пример 1. Определение соединений, действующих при генном регулировании подобно ретиноевой кислоте, с помощью метода картирования связности.

Метод картирования связности (C_{map}) применяли для определения соединений, подобных ретиноевой кислоте.

Анализ экспрессии генов проводили на образцах кожи, взятых методом биопсии у здоровых женщин, которых подвергали местному применению третиноина (полностью транс-ретиноевая кислота) в концентрации 0,025% (Retin-A® компании Johnson & Johnson) в течение одной недели. Сигнатуры генов, полученные с обработанной третиноином кожи, проверяли по базе данных C_{map} . Определенные соединения, которые занимали высокие позиции в C_{map} , наносили способом местного применения на эксплантаты кожи, полученные во время пластической операции на молочной железе. Генетические чипы повто-

ряли на обработанных образцах через 24 ч после местного применения.

Пример 1.1. Материалы и методы.

Лечение кожи третиноином.

Брали биопсию кожи инсолированных предплечий 8 здоровых пациенток европеоидной расы в возрасте 50+ лет. Пациентки получали третиноин (Retin-A® в концентрации 0,025%) в течение одной недели. В конце недели брали пункционную биопсию 3 мм с каждого места лечения. Исследование было плацебо-контролируемым. Биопсию брали дважды на каждой руке для получения достаточной концентрации РНК. Образцы, взятые методом биопсии, сразу помещали на хранение в контролируемые условия при температуре 4°C на 24 ч до извлечения РНК.

Обработка эксплантатов кожи третиноином.

Подкожный жир из-под всей толщи кожи, взятый из материала хирургических отходов от операций по уменьшению молочной железы, отделяли с помощью скальпеля. Для данного исследования использовали трех здоровых женщин-доноров европеоидной расы в возрасте 23, 41 и 60 лет. Женщины-доноры были не теми, которые участвовали в исследовании лечения кожи, кратко описанном выше. Были взяты методом пункционной биопсии образцы кожи 8 мм (и указанные образцы кожи теперь именуется эксплантатами кожи). Эксплантаты кожи помещали на культуральные вставки Milipore (диаметром 12 мм). Вставки, содержащие эксплантаты кожи, помещали на 6-луночные планшеты (одна вставка/луночка), и в каждую луночку добавляли 1 мл среды с добавками кератиноцитов (компания Cascade Biologics).

Крем, содержащий третиноин (Aberela® компании Janssen): 0,05% третиноина в креме, наносили способом местного применения на каждый эксплантат (5 мкл/см²) с помощью пипетки с положительным вытеснением. Крем плацебо без третиноина использовали в качестве контроля. Эксплантаты кожи инкубировали с третиноином в течение 24 ч при температуре 37°C и 5% CO₂-увлажненном воздухе.

Жизнеспособность эксплантатов контролировали с помощью параллельного теста с добавлением красителя аламарового синего с применением протокола поставщиков (компания Invitrogen).

Извлечение РНК из образцов, взятых у человека методом биопсии.

Ручной мини-набор Qiagen Tissue Ruptor применяли для извлечения РНК из образцов кожи, взятых методом биопсии, в соответствии с протоколом поставщика. Qiagen Tissue Ruptor применяли для разрывания ткани в Qiazol (компания Qiagen), в соответствии с протоколом поставщика. Мини-набор Qiagen применяли для извлечения РНК в соответствии с протоколом производителя. РНК хранили при температуре -80°C до конверсии в кДНК.

Микроматричный анализ экспрессии генов.

Концентрацию РНК измеряли спектрофотометром ND-1000 (компания NanoDrop Technologies), а качество РНК оценивали с помощью биоанализатора Agilent 2100 (компания Agilent Technologies).

250 нанограммов тотальной РНК из каждой кожи или образца эксплантата кожи применяли для получения биотинилированной фрагментированной кРНК в соответствии с инструкцией к экспресс-набору GeneChip® 3'IVT (PN702646 Rev 1, компания Affymetrix Inc.).

Экспрессионные биочипы Affymetrix GeneChip® (Human Genome U133 Plus 2.0) гибридизировали в течение 16 ч при температуре 45°C в инкубаторе, вращаемом со скоростью 60 об./мин. В соответствии с инструкцией по промывке, окрашиванию и сканированию экспрессионных генных чипов (PN 702731 Rev 2, компания Affymetrix Inc.), биочипы промывали и окрашивали с помощью прибора Fluidics Station 450 и сканировали с помощью прибора GeneChip® Scanner 3000 7G.

Анализ данных по микроматрице.

Анализ данных по экспрессии генов проводили на языке статистических вычислений R (<http://www.r-project.org>), применяя пакеты, доступные в проекте Bioconductor (www.bioconductor.org). Исходные необработанные данные нормализовывали с помощью метода достоверного многочипового среднего (RMA). Для того, чтобы выявить дифференциально экспрессируемые гены в группах X образцов и Y образцов, затем применяли эмпирический модерируемый критерий Байеса с применением пакета "limma".

Пример 1.2. Результаты - определение соединений с сигнатурами генов, имитирующими ретиноевую кислоту.

Данные анализа C_{map} связывали сигнатуру генов обработанной ретиноевой кислотой человеческой кожи с новыми потенциальными соединениями со способностью имитировать действие ретиноевой кислоты.

Многие гены, как было показано для каждого из них, регулируются полностью транс-ретиноевой кислотой. В силу наличия межвариантных различий в пациентском материале между исследованием на эксплантатах и клиническим исследованием, использовали различные подходы. Профили экспрессии генов в образцах, взятых методом биопсии, после обработки полностью транс-ретиноевой кислотой в сравнении с контрольной группой, получавшей лечение плацебо, исследовали с помощью микрочипового анализа ДНК.

Проводили два отдельных исследования профилей экспрессии генов в коже человека после местного применения полностью транс-ретиноевой кислоты. Первое исследование проводили ex vivo путем

местного применения полностью транс-ретиноевой кислоты в течение 24 ч на эксплантатах кожи от 3 доноров до применения микрочипов. Второе исследование представляло собой клиническое исследование *in vivo* с местным применением полностью транс-ретиноевой кислоты в течение 1 недели на 8 здоровых добровольцах. Для генов, экспрессия которых повысилась более чем вдвое в исследовании на эксплантатах и в 1,4-2 раза в клиническом исследовании, создавали запрос в S_{map} .

Для выявления структур, которые предположительно имитировали бы действие ретиноевой кислоты на коже человека, сигнатуру генов после воздействия ретиноевой кислоты, которую получали в описанном выше исследовании на эксплантатах, проверяли в базе данных S_{map} . База данных S_{map} была подробно описана (Lamb et al., 2006). Согласно указанному методу сходство между результатами по микрочипам каждого исследователя (сигнатура запроса) и 453 результатами по микрочипам для 1309 соединений (эталонная сигнатура) в базе данных S_{map} оценивали с применением критерия Колмогорова-Смирнова, непараметрической, основанной на ранжировании стратегии сопоставления с эталоном. Каждой эталонной сигнатуре в базе данных присваивали балл, в зависимости от ее сходства с сигнатурой запроса, и степень сходства описывали как "балл связности". Балл связности находится в диапазоне от -1 до 1 ; значение, более близкое к -1 , означает большую степень сходства, 0 означает отсутствие сходства, значение, более близкое к 1 , означает противоположность. Для запроса применяли пробный идентификационный номер, определенный биочипом Affymetrix GeneChip Human Genome U133A (компания Affymetrix, Санта-Клара, Калифорния, США). В данном случае пробный идентификационный номер U133A, соответствующий сигнатурам после стимуляции в течение 24 ч в эксплантатах и 1 недели в клиническом исследовании *in vivo*, искали в базе данных S_{map} в Интернете (<http://www.broad.mit.edu/cmap>). "Пермутированные результаты" - результаты, которые состоят из арифметических средних баллов связности и статистической значимости реплик (рассчитано как "усиление" и "Р-значение пермутации" на S_{map}), применяли для оценки значимости баллов.

Первые 100 соединений, которые стали результатами поиска для двух исследований, описанных выше (исследования на эксплантатах и клинического исследования) дополнительно анализировали, следуя четким критериям отбора, т.е. значение усиления $>0,495$. Среди полученных в результате предложенных структур искали соединения природного происхождения. Вещества, для которых доказаны факты употребления в качестве наркотиков, такие как атропин, дигоксигенин или олеандомицин, вещества с известной токсичностью, такие как соланин или томатидин, а также соединения животного происхождения, исключали. В результате указанного виртуального опыта выбирали в общей сложности 8 агентов, которые принимали для дальнейшего исследования в качестве потенциальных действующих веществ, схожих с ретиноевой кислотой (табл. 1).

Важно, что согласно результатам обоих исследований полностью транс-ретиноевая кислота (третинонин) появлялась в качестве предлагаемого соединения, занимая очень высокие места в списках (4 позиция в S_{map} для исследования на эксплантатах и 1 позиция в S_{map} для клинического исследования), что подтверждает тот факт, что модель является подходящим инструментом для нахождения действующих веществ с желаемым действием, связанным с сигнатурой генов.

В табл. 1 представлен список природных соединений, которые были выявлены с помощью S_{map} и расположены в соответствии с позицией на S_{map} . Код соответствует кодам, использованным на полученных в результате графиках.

Таблица 1

Соединение	Код	Позиция в Star	Показатель усиления	р-значение	Молек. масса	Коэффициент Log p
Бета-эсцин	БЭ	20	0,697	0,00207	1131	
Нарингенин	НГ	20	0,673	0,02499	272	1,9
Докозагексаеновая кислота (этиловый эфир)	ДЭЭ	43	0,895	0,02312	356	
N-ацетиласпарагиновая кислота	ААК	47	0,673	0,02499	175	
Гибберелловая кислота	ГК	52	0,603	0,06477	346	0,24
Арахидоновая кислота	АК	61	0,775	0,02285	304	6,98
Кверцетин	ОС	73	0,550	0,03152	302	1,48
Витексин	ВКс	100	0,495	0,19057	432	1,5

Пример 2. Чрескожное проникновение *in vitro* гибберелловой кислоты, нарингенина и N-ацетиласпарагиновой кислоты.

Пример 2.1. Метод.

Гибберелловую кислоту, нарингенин и N-ацетиласпарагиновую кислоту вводили в концентрации 0,5 мас./мас.%, в базовый состав, как описано в табл. 2 ниже.

Таблица 2

Торговое наименование	Международная номенклатура косметических ингредиентов (INCI)	% масс./масс.
Глицерин	Глицерин	6,0
1,3-бутиленгликоль	бутиленгликоль	4,0
Keltrol CG ECO	Ксантановая камедь	0,1
Myritol 318 ECO	каприлил/каприл триглицериды	0,5
Viscolatum AT 100P	вода, полиакрилдиметилтаурат натрия, гидрогенизированный полидецен, тридецет-10	10,0
Не применимо	Гибберелловая кислота, нарингенин или N-ацетиласпарагиновая кислота	0,5
Nipadox ВНТ	БГТ	0,1
Phenonip ХВ	феноксизтанол, метилпарабен, этилпарабен, пропилпарабен	0,7
Деионизированная вода	Вода	в достаточном количестве 100

Эксперименты по чрескожному проникновению *in vitro* разрабатывали и утверждали в соответствии с руководством 428, принятым Организацией экономического сотрудничества и развития (Руководство ОЭСД по тестированию химических веществ. Впитывание в кожу: метод *in vitro*. Руководство 428 (Париж, апрель 2004 г., обновлено в январе 2011 г.)).

В данном исследовании применяли статичные стеклянные диффузионные ячейки Франца (компания Permegear, USA). Указанные ячейки состояли из камеры-донора и камеры-приемника, между которыми помещали кусок свиной кожи (толщина 800 мкм). Примерно 20 мг/см² каждого состава наносили на поверхность кожи через камеру-донор в трех параллельных испытаниях для каждого состава. Образцам свиной кожи давали отстояться в течение 30 мин, и удаляли пузырьки воздуха. Клетки хранили при постоянной температуре при циркулирующем потоке воды при температуре 37°C, и содержимое камеры-приемника (этиловый спирт/вода 50:50) постоянно перемешивали магнитными мешалками.

По истечении времени экспозиции (24 ч) диффузионные ячейки разбирали и анализировали каждое активное вещество в каждой камере:

неабсорбируемая доза: поверхность кожи мыли 10,0 мл метанола, и делали один соскоб липкой лентой для удаления остаточных донорских образцов;

потенциально абсорбируемая доза: процедуру соскоба липкой лентой применяли для отделения рогового слоя от образца кожи. Для указанной цели роговой слой на обработанном участке удаляли путем 14-кратного соскоба липкой лентой с применением D-Squam™ (φ=14 мм, компания CuDerm) при постоянном давлении (225 г/см²) в течение 5 с. Ленты помещали в янтарную пробирку с 4 мл метанола и взбалтывали в течение ночи;

абсорбируемая доза: после удаления рогового слоя с образцов кожи кожу нарезали на мелкие кусочки, и изучаемые вещества экстрагировали с 2 мл метанола в течение 24 ч при постоянном взбалтывании. Образцы жидкости-приемника разбавляли перед анализом.

На следующий день после процесса экстрагирования все образцы фильтровали через мембранный фильтр 0,22 мкм в пробирку для ВЭЖХ. Образцы с гибберелловой кислотой и нарингенином вместе с известными стандартами концентрации анализировали с помощью ВЭЖХ-УФ (компания Аджилент, США). Образцы с N-ацетиласпарагиновой кислотой и известные стандарты концентрации анализировали с помощью ЖК/масс-спектрометрии с электрораспылительной ионизацией (ЖК/ЭРИ-МС) (прибор Shimadzu LC-10AD, компания ThermoScientific).

Пример 2.2. Результаты.

Результаты (фиг. 1) показали, что местное применение гибберелловой кислоты, нарингенина и N-ацетиласпарагиновой кислоты 0,5 мас.%, в базовом составе в течение 24 ч приводило к проникновению каждого действующего вещества в кожу. На фиг. 1 показан диапазон содержания каждого ингредиента в неабсорбируемой дозе (поверхность кожи+1-я лента), потенциально абсорбируемой дозе (роговой слой действует как резервуар) и в абсорбируемой дозе (количество в коже и в жидкости-приемнике).

Пример 3. Ингибирующее действие гибберелловой кислоты и N-ацетиласпарагиновой кислоты в отношении ММП (против морщин, против обвисшей кожи).

Пример 3.1. Методы.

Обработка эксплантатов кожи человека исследуемыми соединениями Ингибирующее действие исследуемых соединений в отношении ММП было протестировано на эксплантатах кожи человека. Эксплантаты кожи брали у 2 здоровых женщин-доноров кожи с молочной железы европеоидной расы в возрасте 46 и 33 лет. Крем, содержащий полностью транс-ретиноевую кислоту (третиноин) (0,05%), добавляли способом местного применения с помощью пипетки с положительным вытеснением (5 мкл/см²) к каждому из эксплантатов. Схожую кремовую основу без третиноина применяли в качестве плацебо-контроля. N-ацетиласпарагиновую кислоту и гибберелловую кислоту готовили в пропиленгликоле (1%). Растворы держали под азотом и применяли сразу после приготовления. Пропиленгликоль в указанном

исследовании применяли в качестве плацебо-контроля для исследуемых соединений.

Обработка клеточных культур.

Ингибирующее действие исследуемых соединений в отношении ММП также оценивали на фибробластах кожи человека. Фибробласты кожи выращивали в среде Dulbecco's Modified Eagle Medium (DMEM) (компания Invitrogen) с 10% эмбриональной бычьей сыворотки (компания Invitrogen) и 1% пенициллина/стрептавидина (компания Invitrogen). Для индуцирования воспаления в клетках применяли ФМА (форболмиристацетат) (компания Sigma) в концентрации 10 нМ. Клетки предварительно обрабатывали гибберелловой кислотой (ГК), нарингенином (НГ) или N-ацетиласпарагиновой кислотой (ААК) или сравнительным контролем (ретинолом и ретиноевой кислотой (РК)) или положительным контролем для ингибирования воспаления: дексаметазоном (декс) (компания Sigma) в течение 1 ч до добавления ФМА в культуру. Клетки стимулировали в течение 24 ч, и супернатант клеточной культуры собирали и хранили при температуре -20°C до дальнейшего анализа.

Fluokine MultiAnalyte Profiling (xMAP) с применением двухчастотных лазерных сортирующих и детектирующих анализаторов BioPlex (компания Biorad), производства корпорации Luminex (Luminex, Остин, Техас) применяли для измерения уровней ММП в образцах подготовленных образцов среды стимулированных фибробластов кожи. Технология предполагала микросферы из полистирола, выкрашенные изнутри двумя спектрально различными флуорофорами в различных пропорциях для создания семейства различных спектрально направленных наборов гранул. Гранулы, применяемые в указанном исследовании, конъюгировали с помощью биотинилированного иммобилизованного антитела, специфичного для уникальных ММП. Анализ проводили без предшествующей деплеции сыворотки. Результаты сравнивали со средой из клеток, обработанных только плацебо (ДМСО). При анализе применяли формат 96-луночного, и его проводили в соответствии с протоколом производителя, включая создание стандартной кривой для каждого исследуемого объекта, полученной в фоновом растворе для разведения. Значения, попадавшие в линейный диапазон калибровочной кривой, принимали. Образцы анализировали с применением биоанализатора Bio-Plex Suspension Array System и программного обеспечения Bio-Plex Manager 4.0 (компания Bio-Rad Laboratories, Геркулес, Калифорния). Количество определяли путем сравнения со стандартными кривыми, полученными для различных ММП.

Пример 3.2. Результаты.

Нарингенин, гибберелловая кислота и N-ацетиласпарагиновая кислота показывают способность ингибировать выработку ММП, в результате чего снижается распад коллагена в коже (фиг. 2, 3 и 4). Потери коллагена вызывают появление нежелательных признаков старения кожи и фотоиндуцированного старения, и путем ингибирования выработки ММП указанные соединения могут уменьшать образование морщин и мелких морщин на коже и предупреждать распад белков, обеспечивающих целостность кожи, который приводит к снижению эластичности и к дряблости кожи.

Пример 4. Индуцирующее проколлаген-1 действие арахидоновой кислоты, кверцетина, N-ацетиласпарагиновой кислоты, докозагексаеновой кислоты (этиловый эфир), гибберелловой кислоты, нарингенина и β-эсцина (против морщин, против фотостарения).

Пример 4.1. Метод.

Клетки фибробластов выращивали, как изложено в примере 3.1, и обрабатывали исследуемыми соединениями.

Выработку проколлагена в супернатантах клеточной культуры анализировали с применением иммуноферментного анализа, специфичного для проколлагена-1 (#8003; компания Quidel). Результаты сравнивали с супернатантами клеточной культуры из клеток, обработанных плацебо в виде ДМСО. В анализах применяли формат 96-луночного микропланшета, и их проводили в соответствии с протоколом производителя, включая создание стандартной кривой, применяя разбавители, известные из более ранних анализов. Абсорбцию краски для анализа определяли с помощью спектрофотометра для чтения планшетов Synergy HT. Значения, попадавшие в линейный диапазон калибровочной кривой, принимали. Количества определяли с помощью сравнения со стандартной кривой, полученной для проколлагена-1.

Пример 4.2. Результаты.

На фиг. 5 показана стимуляция проколлагена-1 в фибробластах кожи после 24 ч стимулирования исследуемыми соединениями. На фиг. 5 показан средний из трех отдельных экспериментов для трех разных доноров.

N-ацетиласпарагиновая кислота и гибберелловая кислота значительно повышают выработку проколлагена 1 типа. Докозагексаеновая кислота (этиловый эфир), нарингенин и β-эсцин демонстрируют убедительную тенденцию к повышению выработки проколлагена 1 типа.

Пример 5. Положительное стимулирующее воздействие на фибронектин в кератиноцитах эпидермиса человека арахидоновой кислоты, р-эсцина и докозагексаеновой кислоты (этилового эфира), (против морщин).

Пример 5.1. Метод.

Кератиноциты выращивали в коммерчески доступной кератиноцитовой среде M154 (компания Cascade Biologics/Invitrogen) # M154500 с окончательным содержанием кальция 0,05 мкМ. Добавки добавля-

ли, соблюдая следующие окончательные концентрации факторов роста:

экстракт гипофиза быка (ЭГБ), 0,2% об/об. • бычий инсулин, 5 мкг/мл •
гидрокортизон 0,18 мкг/мл • бычий трансферрин, 5 мкг/мл • фактор роста эпидермиса
человека, 0,2 нг/мл.

Среду меняли через день. Клетки выращивали до 80% конfluence до стимуляции соединениями. Эксперименты проводили на 24-луночных планшетах. Клетки обрабатывали отдельными исследуемыми соединениями в течение 6 дней. Через 3 дня среду обновляли. Источник ионов кальция использовали в качестве положительного контроля. Через 6 дней среду тканевой культуры поместили на хранение при температуре -20°C до анализа.

Экспериментальный способ, описанный в примере 3.1, модифицировали для анализа уровней фибронектина, извлеченного из кератиноцитов, которые стимулировали в течение 6 дней полностью транс-ретиноевой кислотой, ретинолом, арахидоновой кислотой, β-эсцином и докозагексаеновой кислотой (этиловым эфиром) в различных концентрациях. Эксперименты проводили в двух параллельных анализах.

Пример 5.2. Результаты.

На фиг. 6 показано стимулирование фибронектина в кератиноцитах человека, стимулируемых полностью транс-ретиноевой кислотой, ретинолом, арахидоновой кислотой, β-эсцином, докозагексаеновой кислотой (этиловым эфиром) и положительным контролем в виде кальция. Соединения, исследуемые в данном примере, оказали более благоприятное воздействие на высвобождение фибронектина в кератиноцитах человека после 6 дней стимуляции в сравнении с полностью транс-ретиноевой кислотой и ретинолом. Ретиноевая кислота является известным активатором фибронектина в коже (Schwartz and Kligman 1995a). Снижение сократительной активности фибробластов и уменьшение экспрессии фибронектина задействованы в фотостарении кожи (Knott et al., 2010).

Пример 6. Ингибирующее действие гибберелловой кислоты, нарингенина и N-ацетиласпарагиновой кислоты (противовоспалительное, против покраснения, против сосудистой сетки, борется с отеком вокруг глаз).

Пример 6.1. Методы.

Культуры клеток фибробластов кожи человека получали в соответствии с примером 3.1.

Для индуцирования воспаления в клетках применяли ФМА (форболмиристацетат) (компания Sigma) в концентрации 10 нМ. Клетки предварительно обрабатывали гибберелловой кислотой (ГК), нарингенином (НГ) или N-ацетиласпарагиновой кислотой (ААК) или эталонным контролем (ретинолом и ретиноевой кислотой (РК)) или положительным контролем для ингибирования воспаления: дексаметазоном (декс) (компания Sigma) в течение 1 ч до добавления ФМА к культуре. Клетки стимулировали в течение 24 ч, и супернатант культуры собирали и хранили при температуре -20°C до последующего анализа.

Экспериментальный метод, описанный в примере 3.1, модифицировали для анализа уровней ИЛ-6, извлеченного из фибробластов кожи, стимулированных в течение 6 дней полностью транс-ретиноевой кислотой, ретинолом, арахидоновой кислотой, β-эсцином и докозагексаеновой кислотой (этиловым эфиром) в различных концентрациях.

Эксперименты проводили в двух параллельных анализах.

Пример 6.2. Результаты.

На фиг. 7 показано ингибирование выработки интерлейкина-6 [ИЛ-6] в фибробластах кожи гибберелловой кислотой, нарингенином и N-ацетиласпарагиновой кислотой.

Гибберелловая кислота, нарингенин и N-ацетиласпарагиновая кислота ингибируют выработку интерлейкина-6 и, таким образом, демонстрируют противовоспалительный эффект. Предупреждение воспаления может помочь в борьбе с краснотой кожи. Противовоспалительное действие может оказывать благоприятный эффект на снижение индуцированных ФРЭС признаков старения, таких как сосудистая сетка и отек вокруг области глаз.

Пример 7. Ингибирование ГМ-КСФ (осветляющее кожу действие гибберелловой кислоты, нарингенина и N-ацетиласпарагиновой кислоты, предупреждение красноты, индуцированной воспалением).

Пример 7:1. Методы.

Клеточные культуры получали в соответствии с примером 3.1.

Для индуцирования воспаления в клетках применяли ФМА (форболмиристацетат) (компания Sigma) в концентрации 10 нМ. Клетки предварительно обрабатывали гибберелловой кислотой (ГК), нарингенином (НГ) или N-ацетиласпарагиновой кислотой (ААК) или эталонным контролем (ретинол и ретиноевая кислота (РК)) или положительным контролем для ингибирования воспаления: дексаметазоном (декс) (компания Sigma) в течение 1 ч до добавления ФМА к культуре. Клетки стимулировали в течение 24 ч, и супернатант культуры собирали и хранили при температуре -20°C до последующего анализа.

Анализ цитокинеза.

Экспериментальный метод, описанный в примере 3.1, модифицировали для анализа уровней ГМ-

КСФР в фибробластах кожи человека, стимулированных полностью транс-ретиноевой кислотой, ретинолом, арахидоновой кислотой, β -эсцином и докозагексаеновой кислотой (этиловым эфиром) в различных концентрациях. Эксперименты проводили в двух параллельных анализах.

Пример 7.2. Результаты.

На фиг. 8 показано ингибирование выработки ГМ-КСФ в фибробластах кожи человека гиберелловой кислотой, нарингенином и N-ацетиласпарагиновой кислотой (также показано антипигментное действие).

Пример 7.3. Методы.

Собирали полнослойную кожу из хирургических отходов от операций по уменьшению молочных желез. Подкожный жир удаляли скальпелем. Пункционные биопсии 8 мм брали из кожи и называли эксплантатами кожи. После этого эксплантаты помещали на культуральные вставки Milipore (диаметром 12 мм). Вставки, содержащие эксплантаты кожи, помещали на 6-луночные планшеты (одна вставка/лунка), и в каждую лунку добавляли 1 мл среды с добавками кератиноцитов (компания Cascade Biologics) для обеспечения выживания и питания эксплантатов. Эксплантаты кожи обрабатывали 1 мас./мас.%, растворами гиберелловой кислоты, N-ацетиласпарагиновой кислоты и нарингенина в пропиленгликоле в течение 24 ч или эталонным контролем: третиноином (Aberela® компании Janssen) и соответствующим плацебо. После предварительной обработки эксплантаты подвергали УФ-облучению при 120 мДж/см² УФА и УФВ затем повторно стимулировали с помощью местного применения гиберелловой кислоты, нарингенина и N-ацетиласпарагиновой кислоты в течение 24 ч. Супернатанты затем собирали и анализировали на предмет выработки ГМ-КСФ.

Пример 7.4. Результаты.

На фиг. 9 показано влияние местного применения на эксплантатах кожи 1 мас./мас.%, раствора гиберелловой кислоты, нарингенина и N-ацетиласпарагиновой кислоты в пропиленгликоле на подавление УФ-индуцированной экспрессии ГМ-КСФ. Гиберелловая кислота, нарингенин и N-ацетиласпарагиновая кислота ингибируют паракринную выработку меланогенного фактора ГМ-КСФ, стимулируемую либо ФМА, либо УФ в фибробластах и эксплантатах кожи. Указанные результаты свидетельствуют об эффективности описанных ингредиентов при гиперпигментации, индуцированной УФ или воспалением. Ингибирование выработки ГМ-КСФ может привести к уменьшению пигментации кожи и пигментации кожи, индуцированной УФ, может уменьшить покраснение на коже и обеспечить более ровный цвет кожи.

Пример 8. Ингибирующее ФРЭС действие нарингенина, N-ацетиласпарагиновой кислоты, гиберелловой кислоты и β -эсцина (борьба с покраснением, лопнувшими венами, отеками глаз).

Пример 8.1. Метод.

Анализ клеточной культуры и цитокинов проводили на фибробластах кожи человека, как описано в примере 3.1. Методику адаптировали для анализа выработки ФРЭС.

Пример 8.2. Результаты.

НГ, ГК и ААК все снижают индуцированный воспалением синтез ФРЭС в культивируемых фибробластах кожи. В соответствии с известным провоспалительным эффектом РК, можно было наблюдать дополнительное повышение экспрессии ФРЭС в образцах, обработанных РК, вместе со стимулятором воспаления ФМА. Обработка ретинолом не давала такого эффекта, в результате него наступало небольшое, но незначительное снижение экспрессии. Обработка БЭ также приводила к снижению экспрессии ФРЭС, хотя и незначимому.

На фиг. 10 показано ингибирование ФРЭС, индуцированного воспалением, нарингенином, N-ацетиласпарагиновой кислотой, гиберелловой кислотой и β -эсцином.

Нарингенин, N-ацетиласпарагиновая кислота, гиберелловая кислота и β -эсцин ингибируют активность ФРЭС и, таким образом, могут быть полезны в качестве ингибиторов ангиогенеза для предупреждения ассоциированных нежелательных признаков старения кожи, такого как борьба с покраснением, лопнувшими венами и отеком вокруг глаз.

Пример 9. Нарингенин и докозагексаеновая кислота (этиловый эфир) стимулируют выработку кератина-6 в нормальных кератиноцитах человека [заживление ран].

Пример 9.1. Методы.

Клетки выращивали, как описано в примере 5.1, и методику, описанную в примере 3.1, адаптировали для анализа выработки кератина-6.

Пример 9.2. Результаты.

На фиг. 11 было показано стимулирование кератина 6 в кератиноцитах человека, стимулируемых исследуемыми соединениями, ретиноевой кислотой (РК) и ретинолом (Рол) и кальцием в качестве положительного контроля.

Соединения нарингенин и докозагексаеновая кислота (этиловый эфир) стимулировали выработку кератина-6 в нормальных кератиноцитах человека и могут способствовать процессу заживления ран и восстановления кожи.

Пример 10. N-ацетиласпарагиновая кислота, докозагексаеновая кислота (этиловый эфир) и β -эсцин

стимулируют выработку фибронектина в нормальных кератиноцитах человека [заживление ран].

Пример 10.1. Методы.

Клетки выращивали, как описано в примере 5.1, и методику, описанную в примере 3.1, адаптировали для анализа выработки фибронектина.

Пример 10.2. Результаты.

На фиг. 12 показано стимулирование фибронектина в кератиноцитах человека, стимулируемых полностью транс-ретиноевой кислотой, ретинолом, исследуемыми соединениями и кальцием в качестве положительного контроля.

Исследуемые соединения оказали более сильное влияние на высвобождение фибронектина в кератиноцитах человека после 6 дней стимуляции в сравнении с полностью транс-ретиноевой кислотой и ретинолом. Ретиноевая кислота является известным активатором фибронектина в коже (Schwartz and Kligman 1995b).

Пример 11. Соединения гибберелловая кислота, нарингенин и N-ацетиласпарагиновая кислота стимулируют выработку фактора роста фибробластов (ФРФ) в эксплантатах кожи человека [заживление ран].

Пример 11.1. Методы.

Эксплантаты кожи человека получали и обрабатывали, как описано в примере 7.3. Методику, описанную в примере 3.1, адаптировали для анализа выработки ФРФ на эксплантатах кожи.

Пример 11.2. Результаты.

На фиг. 13 показана стимуляция выработки ФРФ в эксплантатах кожи человека исследуемыми соединениями.

Стимуляция выработки ФРФ нарингенином, гибберелловой кислотой и N-ацетиласпарагиновой кислотой в эксплантатах кожи человека свидетельствует о наличии полезного эффекта в аспекте заживления ран от местного применения указанных соединений на коже.

Пример 12. Стимуляция факторов роста ФРСТ и ГСЭФР на геномном уровне в геномном чипе Affymetrix соединением настоящего изобретения.

Пример 12.1. Методы.

Эксплантаты кожи получали, как описано в примере 3.1. Соединения нарингенин и N-ацетиласпарагиновая кислота наносили способом местного применения на эксплантаты кожи на 24 ч и исследовали с помощью геномного чипа Affymetrix.

Пример 12.2. Результаты.

Таблица 3

Идент. номер	Название гена	Обозначение гена	НГ	ААК	Полностью транс-ретиноевая кислота
209101_at	Фактор роста соединительной ткани	ФРСТ	1,05	1,03	Эффект отсутствует
38037_at	гепарин-связывающий ФРЭ-подобный фактор роста	ГС-ФРЭ	1,19	Эффект отсутствует	1,21

В табл. 3 показано стимулирующее действие нарингенина и N-ацетиласпарагиновой кислоты на экспрессию ФРСТ, а также стимулирующее действие нарингенина на ГС-ФРЭ ($|\log_2\text{-отношение}| > 1$).

Применяли кратность изменений предельной концентрации $|\log_2\text{-отношение}| > 1$, анализ, который был предложен (Quackenbush J et al., 2002); геномный чип Affymetrix показывал на эксплантатах кожи, что нарингенин и N-ацетиласпарагиновая кислота индуцировали ФРСТ.

НГ также стимулировал экспрессию ГС-ФРЭ. Примечательно, что полностью транс-ретиноевая кислота не оказала никакого воздействия на ФРСТ.

Пример 13. Гибберелловая кислота, нарингенин, N-ацетиласпарагиновая кислота, арахидоновая кислота и докозагексаеновая кислота (этиловый эфир) стимулируют выработку калликреина 8 в нормальных кератиноцитах человека (шелушение /сияние кожи лица/депигментация).

Калликреин 8 участвует в поздней дифференцировке кератиноцитов: в процессе шелушения. Калликреин 8 является биомаркером обновления эпидермиса и отслаивания рогового слоя.

Пример 13.1. Метод.

Кератиноциты, примененные в экспериментах с калликреином 8, выращивали, как описано в примере 2.1. Эксперименты проводили в монослоях с конfluence 80%. Клетки стимулировали в течение 4 дней до анализа калликреина 8 различными действующими веществами, а затем супернатант культуры собирали и хранили при температуре -20°C до дальнейшего анализа. Выработку калликреина 8 анализировали в супернатантах культуры клеток из стимулированных кератиноцитов с помощью иммуноферментного анализа, специфичного для калликреина 8 (компания Uscn Life Science Inc, E90690Hu). Результаты сравнивали с супернатантами клеточной культуры из клеток, обработанных плацебо в виде ДМСО. В анализах применяли формат 96-луночного планшета, и их проводили в соответствии с протоколом производителя, включая создание стандартной кривой, применяя разбавители, известные из более

ранних анализов. Абсорбцию краски для анализа определяли с помощью спектрофотометра для чтения планшетов Synergy HT. Значения, попадавшие в линейный диапазон калибровочной кривой, принимали. Количества определяли путем сравнения со стандартными кривыми, полученными для KLK8.

Пример 13.2. Результаты.

На фиг. 14 показана значимая стимуляция калликреина 8 гиберелловой кислотой, нарингенином, N-ацетиласпарагиновой кислотой, арахидоновой кислотой и докозагексаеновой кислотой (этиловым эфиром), а также положительным контролем ретинолом и ретиноевой кислотой.

Гиберелловая кислота, нарингенин, N-ацетиласпарагиновая кислота, арахидоновая кислота и докозагексаеновая кислота (этиловый эфир) индуцировали значимое повышение синтеза калликреина 8 в нормальных кератиноцитах человека. Процесс шелушения необходим для поддержания целостности кожного барьера и для здорового вида кожи.

Усиленное обновление эпидермиса и шелушение могут привести к отслаиванию избыточной пигментации и, таким образом, способствовать борьбе с потемнением кожи вследствие присутствия меланина в коже, а также привести к усилению блеска и сияния кожи.

Пример 14. Соединение согласно настоящему изобретению стимулирует выработку кератина 1/10 в нормальных кератиноцитах человека.

Клетки выращивали, как описано в примере 5.1, и методику, описанную в примере 3.1, адаптировали для анализа выработки кератина 1/10.

Пример 14.2. Результаты.

На фиг. 15 показан синтез кератина 1/10, выраженный в % от синтеза плацебо-контроля. Нарингенин (150 микроМ) и гиберелловая кислота (1,2 микроМ) индуцировали значимое увеличение синтеза кератина 1/10 в нормальных кератиноцитах человека. Процесс дифференцировки кератиноцитов необходим для поддержания целостности кожного барьера и для здорового вида кожи.

Пример 15. Соединения гиберелловая кислота, нарингенин и N-ацетиласпарагиновая кислота ингибируют гены, задействованные в обострении акне.

Стимуляция андрогена является важным фактором акне у подростков и взрослых. Андроген вызывает повышение выработки секрета сальных желез (Thiboutot 2004). Ингредиенты Смар показывали экспрессию антистероидной 5- α -редуктазы и активность антигидроксистероид(17-бета) дегидрогеназы 2 (HSD17B2) в генных чипах компании Affymetrix, которая подразумевает контроль уровней эстрогенов и андрогенов в коже. Терапевтический потенциал указанного семейства ферментов в лечении акне был подробно описан. (Poirier 2003).

Пример 15.1. Метод.

Эксплантаты кожи получали так, как описано в примере 3.1. Соединения гиберелловую кислоту, нарингенин и N-ацетиласпарагиновую кислоту наносили способом местного применения на эксплантаты кожи на 24 ч и исследовали с помощью генного чипа Affymetrix.

Пример 15.2. Результаты.

Ингибирование генов, участвующих в обострении акне

Идент. номер	Название гена	Обозначение гена	ГК	НГ	ААК	Третинин
238669_at	Простагландин-эндопероксид синтаза 1 (простагландин G/H синтаза и циклооксигеназа)	PTGS1	-1,11	-3,51	-0,20	-1,03
204818_at	гидроксистероид (17-бета) дегидрогеназа 2	HSD17B2	-0,52	-0,83	-1,46	-0,48
243444_at	стероид 5 альфа-редуктаза 3	SRD5A3	-0,75	1,25	-1,54	0,29
206552_s_at	тахикинин, прекурсор 1	TAC1	-0,62	-2,78	-1,23	-4,01
204446_s_at	арахидонат 5-липосигеназа	ALOX5	-1,01	-0,69	0,15	-0,69

Применяли кратность изменений предельной концентрации $|\log_2\text{-отношение}| > 1$ в анализе, который был предложен Quackenbush et al. (Quackenbush 2002); генный чип Affymetrix на эксплантатах кожи показывал, что экспрессия ряда генов, отвечающих за воспаление, стимуляцию секрета сальных желез, андрогена и нейропептина, была снижена исследуемыми соединениями. N-ацетиласпарагиновая кислота оказывает ингибирующее воздействие на экспрессию стероид 5- α -редуктазы в генных чипах Affymetrix и гидроксистероид (17-бета) дегидрогеназы 2 (HSD17B2). Гиберелловая кислота, нарингенин и третиноин демонстрируют сильный эффект ингибирования циклооксигеназы I (ЦОГ I). Наблюдалось выраженное снижение нарингенином и N-ацетиласпарагиновой кислотой, а также третиноином уровня TAC1, который кодирует нейрокинин_A (вещество P). Гиберелловая кислота показывала ингибирующее действие в отношении арахидонат 5-липосигеназы.

Стимуляция андрогена является важным фактором для акне у подростков и взрослых. Андроген вызывает повышенную выработку секрета сальных желез (Thiboutot 2004). Ингредиенты Смар показывали ингибирование экспрессии стероид 5- α -редуктазы и действие против гидроксистероид (17-бета) дегидрогеназы 2 (HSD17B2) в генных чипах Affymetrix, что подразумевает контроль эстрогена и андрогена в коже человека. Терапевтический потенциал указанного фермента в лечении акне был подробно описан (Poirier 2003).

Регуляция нейропептидов играет важную роль в обострениях акне. А именно, вещество P участвует

в обострении акне с неврологической точки зрения, тогда как в исследованиях *in vitro* было показано, что вещество Р способствует как пролиферации, так и дифференцировке сальных желез (Toyoda et al., 2002). Наблюдалось сильное снижение ТАС1, который кодирует нейрокинин (вещество Р), НГ/ААК, а также третиноном.

Ингредиенты Стар показывали геннорегулирующее поведение, связанное со снижением экспрессии ферментов, участвующих в сигнальных путях лейкотриена и простагландина, т.е. арахидонат 5-липоксигеназы, циклооксигеназы, оба из которых, как было показано, были оценены в коже лица, пораженной акне (Alesta et al., 2006). Следует отметить, что ингибиторы ЦОГ, как было показано, эффективны в лечении предменструального акне. Нам также удалось показать, что ингредиенты Стар уменьшают выработку ИЛ-6 в фибробластах кожи, что свидетельствует о противовоспалительном действии на коже, являющемся важной целью при борьбе с акне. Например, долговременное лечение препаратом Зилеутон, действие которого направлено непосредственно на снижение содержания нейтральных липидов и высвобождение интерлейкина-6 (Zouboulis et al., 2009).

Пример 16. Гибберелловая кислота, нарингенин и N-ацетиласпарагиновая кислота не раздражают кожу.

В исследованиях раздражения кожи *in vitro*, проведенных на чистых гибберелловой кислоте, нарингенине и N-ацетиласпарагиновой кислоте на восстановленном человеческом эпидермисе (модель SkinEthic) в соответствии с руководством 439 ОЭСР, обнаруживали, что все соединения не раздражают кожу.

Исследования, целью которых являлась оценка способности исследуемого соединения вызывать эффекты раздражения кожи с помощью анализа цитотоксичности *in vitro* на восстановленном эпидермисе человека (SkinEthic), проводили в соответствии с протоколом ECVAM (Европейского центра валидации альтернативных методов) от 27 апреля 2007 г., методом В46 официального журнала Европейского Союза, датированного 14 августа, 2009 г., и руководством 439 ОЭСР.

Пример 17. Крем типа "масло в воде", типичный крем для лица.

	% масс.
ГИДРОГЕНИЗИРОВАННЫЙ ПОЛИИЗОБУТЕН	4,5
ЦИКЛОПЕНТАСИЛОКСАН	4,5
ДИМТИКОН	2,5
ГЛИЦЕРИЛСТЕАРАТ	2
ЦЕТИЛОВЫЙ СПИРТ	2
ПЭГ-40 СТЕАРАТ	1,25
АКРИЛАТ НАТРИЯ/АКРИЛОИЛДИМЕТИЛ ТАУРАТ СОПОЛИМЕР	1
АЦЕТАТ ТОКОФЕРОЛА	0,5
КОНСЕРВАНТЫ	QS
ОТДУШКА	QS
<i>Соединение настоящего изобретения</i>	1
ВОДА	до 100

Пример 18. Эмульсия "вода - силикон", типичный продукт на жидкой основе.

	%масс.
ЦИКЛОПЕНТАСИЛОКСАН	14
ПИГМЕНТЫ	9
ПОЛИГЛИЦЕРИЛ-4 ИЗОСТЕАРАТ	5
ИЗОДОДЕКАН	4
БУТИЛЕНГЛИКОЛЬ	2
БИС-ПЭГ/ППГ-14/14 ДИМТИКОН	2
ГИДРОГЕНИЗИРОВАННЫЙ ПОЛИИЗОБУТЕН	1,5
ПЧЕЛИНЫЙ ВОСК	1,2
СУЛЬФАТ МАГНИЯ	1
КОНСЕРВАНТЫ	QS
ОТДУШКА	QS
<i>Соединение настоящего изобретения</i>	0,5
ВОДА	до 100

Пример 19. Водно-спиртовой гель, типичный продукт для ухода за лицом сывороточного типа.

Сырье	% масс.
СИЛИКОНЫ	3,0
ГЛИЦЕРИН	3,0
БУТИЛЕНГЛИКОЛЬ	2,0
<i>Соединение настоящего изобретения</i>	2,0
ЗАГУСТИТЕЛЬ	1,0
ПЭГ-40 ГИДРОГЕНИЗИРОВАННОЕ КАСТОРОВОЕ МАСЛО	0,5
ПОЛИМЕР	0,2
ГИАЛУРОНАТ НАТРИЯ	0,03
ОТДУШКА	QSP
ТЕТРАГИДРОКСИПРОПИЛ ЭТИЛЕНДИАМИН	QSP
КОНСЕРВАНТЫ	QSP
ВОДА	до100

Специалисту в данной области техники должно быть очевидно, что приведенные в настоящем документе примеры представляют собой лишь обобщенные примеры и что другие условия и методы, которые могут воспроизвести настоящее изобретение, возможны и включены в объем настоящего изобретения.

Термины "содержит/содержащий" и термины "имеющий/включающий" при употреблении в контексте настоящего документа используются для обозначения наличия указанных признаков, чисел, этапов, компонентов или их групп.

Подразумевается, что определенные признаки настоящего изобретения, которые, для ясности, описаны в контексте отдельных вариантов реализации изобретения, могут также быть обеспечены в комбинации в одном варианте реализации. И наоборот, различные признаки настоящего изобретения, которые, для краткости, описаны в контексте одного варианта реализации, могут также быть обеспечены по отдельности или в любой подходящей подкомбинации.

Список литературы

- Abe, K., Butcher, R. W., Nicholson, W. E., Baird, C. E., Liddle, R. A., and Liddle, G. W. (1969). "Adenosine 3,5-monophosphate (cyclic AMP) as the mediator of the actions of melanocyte stimulating hormone (MSH) and norepinephrine on the frog skin." *Endocrinology*, 84(2), 362-368.
- Alestad, T., Ganceviciene, R., Fimmel, S., Muller-Decker, K., and Zouboulis, C. C. (2006). "Enzymes involved in the biosynthesis of leukotriene B4 and prostaglandin E2 are active in sebaceous glands." *J. Mol. Med. (Berl)*, 84(1), 75-87.
- Bennett, M. F., Robinson, M. K., Baron, E. D., and Cooper, K. D. (2008). "Skin immune systems and inflammation: protector of the skin or promoter of aging?" *J. Investig. Dermatol. Symp. Proc.*, 13(1), 15-19.
- Borgono, C. A., Gavigan, J. A., Alves, J., Bowles, B., Harris, J. L., Sotiropoulou, G., and Diamandis, E. P. (2007). "Defining the extended substrate specificity of kallikrein 1-related peptidases." *Biol. Chem.*, 388(11), 1215-1225.
- Bratton, D. L., Hamid, Q., Boguniewicz, M., Doherty, D. E., Kailey, J. M., and Leung, D. Y. (1995). "Granulocyte macrophage colony-stimulating factor contributes to enhanced monocyte survival in chronic atopic dermatitis." *J. Clin. Invest*, 95(1), 211-218.
- Brauchle, M., Funk, J. O., Kind, P., and Werner, S. (1996a). "Ultraviolet B and H2O2 are potent inducers of vascular endothelial growth factor expression in cultured keratinocytes." *J. Biol. Chem.*, 271(36), 21793-21797.
- Brauchle, M., Funk, J. O., Kind, P., and Werner, S. (1996b). "Ultraviolet B and H2O2 are potent inducers of vascular endothelial growth factor expression in cultured keratinocytes." *J. Biol. Chem.*, 271(36), 21793-21797.
- Busca, R., and Ballotti, R. (2000). "Cyclic AMP a key messenger in the regulation of skin pigmentation." *Pigment Cell Res.*, 13(2), 60-69.
- Cohen, T., Nahari, D., Cerem, L. W., Neufeld, G., and Levi, B. Z. (1996). "Interleukin 6 induces the expression of vascular endothelial growth factor." *J. Biol. Chem.*, 271(2), 736-741.
- Conner, E. M., and Grisham, M. B. (1996). "Inflammation, free radicals, and antioxidants." *Nutrition*, 12(4), 274-277.
- Dasu, M. R., Barrow, R. E., Spies, M., and Herndon, D. N. (2003). "Matrix metalloproteinase expression in cytokine stimulated human dermal fibroblasts." *Burns*, 29(6), 527-531.
- Farage, M. A., Miller, K. W., Elsner, P., and Maibach, H. I. (2008). "Intrinsic and extrinsic factors in skin ageing: a review." *Int. J. Cosmet. Sci.*, 30(2), 87-95.
- Fisher, G. J., Wang, Z. Q., Datta, S. C., Varani, J., Kang, S., and Voorhees, J. J. (1997). "Pathophysiology of premature skin aging induced by ultraviolet light." *N. Engl. J. Med.*, 337(20), 1419-1428.
- Fuchs, E. (2007). "Scratching the surface of skin development." *Nature*, 445(7130), 834-842.

- Gillbro, J. M., and Olsson, M. J. (2011). "The melanogenesis and mechanisms of skin-lightening agents--existing and new approaches." *Int. J. Cosmet. Sci.*, 33(3), 210-221.
- Gosain, A., and DiPietro, L. A. (2004). "Aging and wound healing." *World J. Surg.*, 28(3), 321-326.
- Griffiths, C. E., Kang, S., Ellis, C. N., Kim, K. J., Finkel, L. J., Ortiz-Ferrer, L. C., White, G. M., Hamilton, T. A., and Voorhees, J. J. (1995). "Two concentrations of topical tretinoin (retinoic acid) cause similar improvement of photoaging but different degrees of irritation. A double-blind, vehicle-controlled comparison of 0.1% and 0.025% tretinoin creams." *Arch. Dermatol.*, 131(9), 1037-1044.
- Grossman, R. M., Krueger, J., Yourish, D., Granelli-Piperno, A., Murphy, D. P., May, L. T., Kupper, T. S., Sehgal, P. B., and Gottlieb, A. B. (1989). "Interleukin 6 is expressed in high levels in psoriatic skin and stimulates proliferation of cultured human keratinocytes." *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.*, 86(16), 6367-6371.
- Hamilton, J. A. (2008). "Colony-stimulating factors in inflammation and autoimmunity." *Nat. Rev. Immunol.*, 8(7), 533-544.
- Hara, T., Miyazaki, M., Hakuno, F., Takahashi, S., and Chida, K. (2011). "PKC α promotes a proliferation to differentiation switch in keratinocytes via upregulation of p27Kip1 mRNA through suppression of JNK/c-Jun signaling under stress conditions." *Cell Death. Dis.*, 2, e157.
- Hearing, V. J., and Jimenez, M. (1987). "Mammalian tyrosinase--the critical regulatory control point in melanocyte pigmentation." *Int. J. Biochem.*, 19(12), 1141-1147.
- Hirakawa, S., Fujii, S., Kajiya, K., Yano, K., and Detmar, M. (2005). "Vascular endothelial growth factor promotes sensitivity to ultraviolet B-induced cutaneous photodamage." *Blood*, 105(6), 2392-2399.
- Hirobe, T., Furuya, R., Ifuku, O., Osawa, M., and Nishikawa, S. (2004). "Granulocyte-macrophage colony-stimulating factor is a keratinocyte-derived factor involved in regulating the proliferation and differentiation of neonatal mouse epidermal melanocytes in culture." *Exp. Cell Res.*, 297(2), 593-606.
- Hunt, G., Todd, C., Cresswell, J. E., and Thody, A. J. (1994). "Alpha-melanocyte stimulating hormone and its analogue Nle4DPhe7 alpha-MSH affect morphology, tyrosinase activity and melanogenesis in cultured human melanocytes." *J. Cell Sci.*, 107 (Pt 1), 205-211.
- Igarashi, A., Okochi, H., Bradham, D. M., and Grotendorst, G. R. (1993). "Regulation of connective tissue growth factor gene expression in human skin fibroblasts and during wound repair." *Mol. Biol. Cell*, 4(6), 637-645.
- Im, S., Moro, O., Peng, F., Medrano, E. E., Cornelius, J., Babcock, G., Nordlund, J. J., and Abdel-Malek, Z. A. (1998). "Activation of the cyclic AMP pathway by alpha-melanotropin mediates the response of human melanocytes to ultraviolet B radiation." *Cancer Res.*, 58(1), 47-54.

- Imokawa, G., Yada, Y., Kimura, M., and Morisaki, N. (1996). "Granulocyte/macrophage colony-stimulating factor is an intrinsic keratinocyte-derived growth factor for human melanocytes in UVA-induced melanosis." *Biochem. J.*, 313 (Pt 2), 625-631.
- Infanger, M., Schmidt, O., Kossmehl, P., Grad, S., Ertel, W., and Grimm, D. (2004). "Vascular endothelial growth factor serum level is strongly enhanced after burn injury and correlated with local and general tissue edema." *Burns*, 30(4), 305-311.
- Jabbour, S. A. (2003). "Cutaneous manifestations of endocrine disorders: a guide for dermatologists." *Am. J. Clin. Dermatol.*, 4(5), 315-331.
- Jimbow, K., Alena, F., Dixon, W., and Hara, H. (1992). "Regulatory factors of pheo- and eumelanogenesis in melanogenic compartments." *Pigment Cell Res.*, Suppl 2, 36-42.
- Kahari, V. M., and Saarialho-Kere, U. (1997a). "Matrix metalloproteinases in skin." *Exp. Dermatol.*, 6(5), 199-213.
- Kahari, V. M., and Saarialho-Kere, U. (1997b). "Matrix metalloproteinases in skin." *Exp. Dermatol.*, 6(5), 199-213.
- Kerkvliet, E. H., Docherty, A. J., Beertsen, W., and Everts, V. (1999). "Collagen breakdown in soft connective tissue explants is associated with the level of active gelatinase A (MMP-2) but not with collagenase." *Matrix Biol.*, 18(4), 373-380.
- Kessler-Becker, D., Smola, S., Krieg, T., and Eckes, B. (2004). "High plasminogen activator inhibitor type 2 expression is a hallmark of scleroderma fibroblasts in vitro." *Exp. Dermatol.*, 13(11), 708-714.
- Kishibe, M., Bando, Y., Terayama, R., Namikawa, K., Takahashi, H., Hashimoto, Y., Ishida-Yamamoto, A., Jiang, Y. P., Mitrovic, B., Perez, D., Iizuka, H., and Yoshida, S. (2007). "Kallikrein 8 is involved in skin desquamation in cooperation with other kallikreins." *J. Biol. Chem.*, 282(8), 5834-5841.
- Knott, A., Drenckhan, A., Reuschlein, K., Lucius, R., Doring, O., Bottger, M., Stab, F., Wenck, H., and Gallinat, S. (2010). "Decreased fibroblast contractile activity and reduced fibronectin expression are involved in skin photoaging." *J. Dermatol. Sci.*, 58(1), 75-77.
- Komatsu, N., Saijoh, K., Toyama, T., Ohka, R., Otsuki, N., Hussack, G., Takehara, K., and Diamandis, E. P. (2005). "Multiple tissue kallikrein mRNA and protein expression in normal skin and skin diseases." *Br. J. Dermatol.*, 153(2), 274-281.
- Kossakowska, A. E., Edwards, D. R., Prusinkiewicz, C., Zhang, M. C., Guo, D., Urbanski, S. J., Grogan, T., Marquez, L. A., and Janowska-Wieczorek, A. (1999). "Interleukin-6 regulation of matrix metalloproteinase (MMP-2 and MMP-9) and tissue inhibitor of metalloproteinase (TIMP-1) expression in malignant non-Hodgkin's lymphomas." *Blood*, 94(6), 2080-2089.
- Lamb, J., Crawford, E. D., Peck, D., Modell, J. W., Blat, I. C., Wrobel, M. J., Lerner, J., Brunet, J. P., Subramanian, A., Ross, K. N., Reich, M., Hieronymus, H., Wei, G., Armstrong, S. A., Haggarty, S. J., Clemons, P. A., Wei, R., Carr, S. A., Lander, E. S., and Golub, T. R. (2006). "The

- Connectivity Map: using gene-expression signatures to connect small molecules, genes, and disease." *Science*, 313(5795), 1929-1935.
- LERNER, A. B., and MCGUIRE, J. S. (1961). "Effect of alpha- and betamelanocyte stimulating hormones on the skin colour of man." *Nature*, 189, 176-179.
- LERNER, A. B., and MCGUIRE, J. S. (1964). "MELANOCYTE-STIMULATING HORMONE AND ADRENOCORTICOTROPHIC HORMONE. THEIR RELATION TO PIGMENTATION." *N. Engl. J. Med.*, 270, 539-546.
- LERNER, A. B., SHIZUME, K., FITZPATRICK, T. B., and Mason, H. S. (1954). "MSH: the melanocyte-stimulating hormone." *AMA Arch. Derm. Syphilol.*, 70(5), 669-674.
- Levine, N., Sheftel, S. N., Eytan, T., Dorr, R. T., Hadley, M. E., Weinrach, J. C., Ertl, G. A., Toth, K., McGee, D. L., and Hruby, V. J. (1991). "Induction of skin tanning by subcutaneous administration of a potent synthetic melanotropin." *JAMA*, 266(19), 2730-2736.
- Lu, B., Rothnagel, J. A., Longley, M. A., Tsai, S. Y., and Roop, D. R. (1994). "Differentiation-specific expression of human keratin 1 is mediated by a composite AP-1/steroid hormone element." *J. Biol. Chem.*, 269(10), 7443-7449.
- Meier, B., Radeke, H. H., Selle, S., Younes, M., Sies, H., Resch, K., and Habermehl, G. G. (1989). "Human fibroblasts release reactive oxygen species in response to interleukin-1 or tumour necrosis factor-alpha." *Biochem. J.*, 263(2), 539-545.
- Parks, W. C., Wilson, C. L., and Lopez-Boado, Y. S. (2004). "Matrix metalloproteinases as modulators of inflammation and innate immunity." *Nat. Rev. Immunol.*, 4(8), 617-629.
- Phelps, K. R. (1990). "Edema."
- Poirier, D. (2003). "Inhibitors of 17 beta-hydroxysteroid dehydrogenases." *Curr. Med. Chem.*, 10(6), 453-477.
- Proksch, E., Brandner, J. M., and Jensen, J. M. (2008). "The skin: an indispensable barrier." *Exp. Dermatol.*, 17(12), 1063-1072.
- Quackenbush, J. (2002). "Microarray data normalization and transformation." *Nat. Genet.*, 32 Suppl, 496-501.
- Rijken, F., and Bruijnzeel, P. L. (2009). "The pathogenesis of photoaging: the role of neutrophils and neutrophil-derived enzymes." *J. Investig. Dermatol. Symp. Proc.*, 14(1), 67-72.
- Salven, P., Anttonen, K., Repo, H., Joensuu, H., and Orpana, A. (2001). "Endotoxins induce and interferon alpha suppresses vascular endothelial growth factor (VEGF) production in human peripheral blood mononuclear cells." *FASEB J.*, 15(7), 1318-1320.
- Sandjeu, Y., and Haftek, M. (2009). "Desmosealin and other components of the epidermal extracellular matrix." *J. Physiol Pharmacol.*, 60 Suppl 4, 23-30.
- Schauer, E., Trautinger, F., Kock, A., Schwarz, A., Bhardwaj, R., Simon, M., Ansel, J. C., Schwarz, T., and Luger, T. A. (1994). "Proopiomelanocortin-derived peptides are synthesized and released by human keratinocytes." *J. Clin. Invest.*, 93(5), 2258-2262.

- Schonthaler, H. B., Huggenberger, R., Wculek, S. K., Detmar, M., and Wagner, E. F. (2009). "Systemic anti-VEGF treatment strongly reduces skin inflammation in a mouse model of psoriasis." *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.*, 106(50), 21264-21269.
- Schwartz, E., and Kligman, L. H. (1995a). "Topical tretinoin increases the tropoelastin and fibronectin content of photoaged hairless mouse skin." *J. Invest Dermatol.*, 104(4), 518-522.
- Schwartz, E., and Kligman, L. H. (1995b). "Topical tretinoin increases the tropoelastin and fibronectin content of photoaged hairless mouse skin." *J. Invest Dermatol.*, 104(4), 518-522.
- Secker, G. A., Shortt, A. J., Sampson, E., Schwarz, Q. P., Schultz, G. S., and Daniels, J. T. (2008). "TGFbeta stimulated re-epithelialisation is regulated by CTGF and Ras/MEK/ERK signalling." *Exp. Cell Res.*, 314(1), 131-142.
- Shirakata, Y., Kimura, R., Nanba, D., Iwamoto, R., Tokumaru, S., Morimoto, C., Yokota, K., Nakamura, M., Sayama, K., Mekada, E., Higashiyama, S., and Hashimoto, K. (2005). "Heparin-binding EGF-like growth factor accelerates keratinocyte migration and skin wound healing." *J. Cell Sci.*, 118(Pt 11), 2363-2370.
- Smith, J. R., Lanier, V. B., Braziel, R. M., Falkenhagen, K. M., White, C., and Rosenbaum, J. T. (2007). "Expression of vascular endothelial growth factor and its receptors in rosacea." *Br. J. Ophthalmol.*, 91(2), 226-229.
- Thiboutot, D. (2004). "Regulation of human sebaceous glands." *J. Invest Dermatol.*, 123(1), 1-12.
- Thody, A. J., and Graham, A. (1998). "Does alpha-MSH have a role in regulating skin pigmentation in humans?" *Pigment Cell Res.*, 11(5), 265-274.
- Tiano, H. F., Loftin, C. D., Akunda, J., Lee, C. A., Spalding, J., Sessoms, A., Dunson, D. B., Rogan, E. G., Morham, S. G., Smart, R. C., and Langenbach, R. (2002). "Deficiency of either cyclooxygenase (COX)-1 or COX-2 alters epidermal differentiation and reduces mouse skin tumorigenesis." *Cancer Res.*, 62(12), 3395-3401.
- Toulza, E., Mattiuzzo, N. R., Galliano, M. F., Jonca, N., Dossat, C., Jacob, D., de, D. A., Wincker, P., Serre, G., and Guerrin, M. (2007). "Large-scale identification of human genes implicated in epidermal barrier function." *Genome Biol.*, 8(6), R107.
- Toyoda, M., Nakamura, M., Makino, T., Kagoura, M., and Morohashi, M. (2002). "Sebaceous glands in acne patients express high levels of neutral endopeptidase." *Exp. Dermatol.*, 11(3), 241-247.
- Trompezinski, S., Pernet, I., Schmitt, D., and Viac, J. (2001). "UV radiation and prostaglandin E2 up-regulate vascular endothelial growth factor (VEGF) in cultured human fibroblasts." *Inflamm. Res.*, 50(8), 422-427.
- Winrow, V. R., Winyard, P. G., Morris, C. J., and Blake, D. R. (1993). "Free radicals in inflammation: second messengers and mediators of tissue destruction." *Br. Med. Bull.*, 49(3), 506-522.
- Wlaschek, M., Bolsen, K., Herrmann, G., Schwarz, A., Wilmroth, F., Heinrich, P. C., Goerz, G., and Scharffetter-Kochanek, K. (1993). "UVA-induced autocrine stimulation of fibroblast-derived collagenase by IL-6: a possible mechanism in dermal photodamage?" *J. Invest Dermatol.*, 101(2), 164-168.
- Zouboulis, C. C., Fischer, T. C., Wohlrab, J., Barnard, J., and Alio, A. B. (2009). "Study of the efficacy, tolerability, and safety of 2 fixed-dose combination gels in the management of acne vulgaris." *Cutis*, 84(4), 223-229.

ФОРМУЛА ИЗОБРЕТЕНИЯ

1. Применение нарингенина для лечения и/или предупреждения повреждения кожи, выбранного из группы, состоящей из воспаления, лопнувших вен, покраснения, отека вокруг глаз, нарушения пигментации кожи, или повреждения кожи, возникшего в результате фотоиндуцированного старения, псориаза или розацеа, при этом указанное соединение входит в состав композиции для местного нанесения на кожу, тело и/или волосистую часть головы, и при этом композиция не содержит ретиноевую кислоту или ее производные.

2. Применение по п.1, в котором в результате нанесения композиции на кожу, тело и/или волосистую часть головы:

- (i) уменьшается по меньшей мере одно из следующего: покраснение или воспаление кожи; или
- (ii) уменьшается отек вокруг глаз, сосудистая сетка и/или лопнувшие вены; или
- (iii) обеспечивается лечение гиперпигментации, вызванной УФ или воспалением.

3. Применение по п.1 или 2, отличающееся тем, что нанесение композиции на кожу, тело и/или волосистую часть головы:

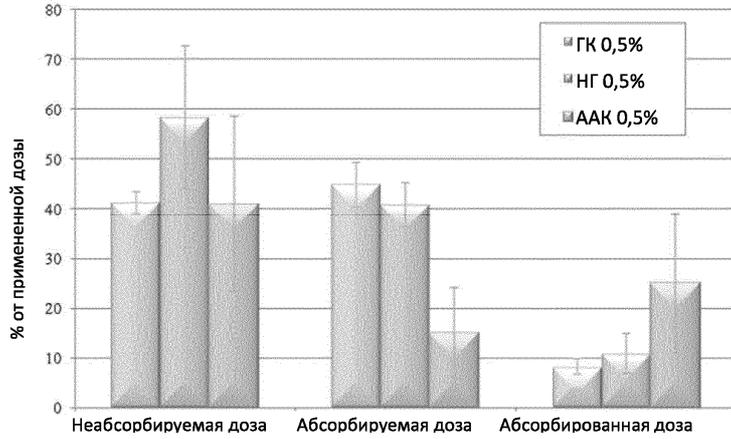
- (i) осветляет кожу;
- (ii) придает однородность тона и/или ослабляет проявление пигментации кожи и/или потемнения

кожи; или

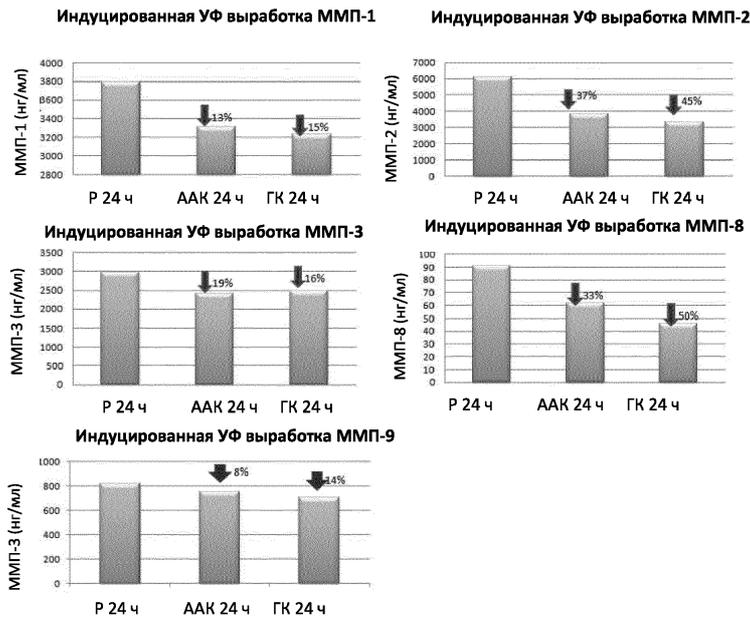
(iii) усиливает блеск и здоровый цвет кожи.

4. Применение по любому из пп.1-3, отличающееся тем, что композиция содержит 0,05-5 мас.% нарингенина.

5. Применение по любому из пп.1-4, отличающееся тем, что нарингенин представляет собой 2S-нарингенин ((S)-2,3-дигидро-5,7-дигидрокси-2-(4-гидроксифенил)-4H-1-бензопиран-4-он).

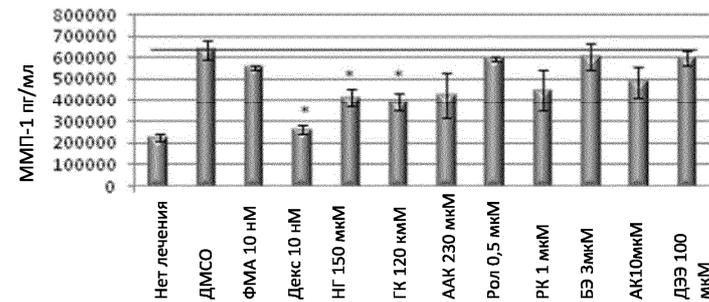


Фиг. 1



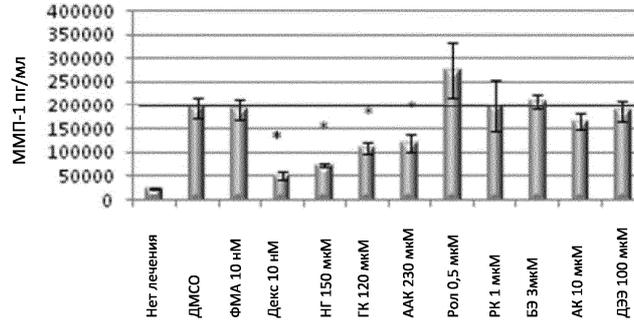
Фиг. 2

Выработка ММП-1 в фибробластах, индуцированная воспалением



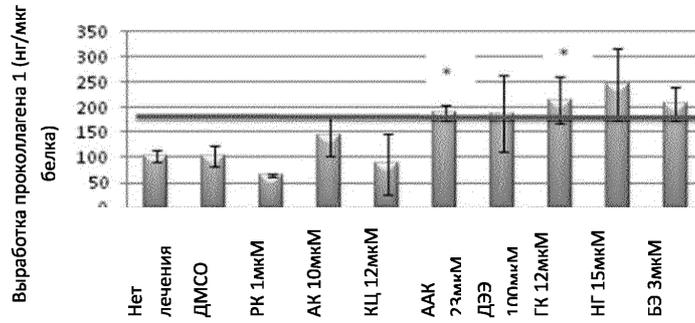
Фиг. 3

Выработка MMP-3 в фибробластах, индуцированная воспалением



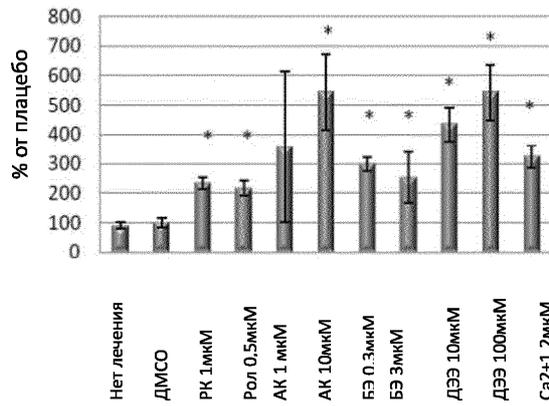
Фиг. 4

Выработка проколлагена 1 типа в фибробластах



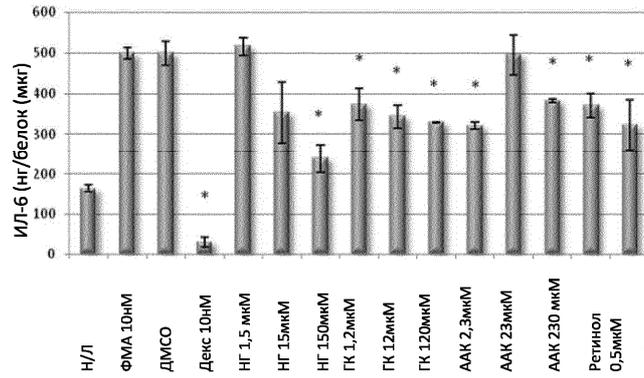
Фиг. 5

**Выработка фибронектина в КЦ
6 д лечения**



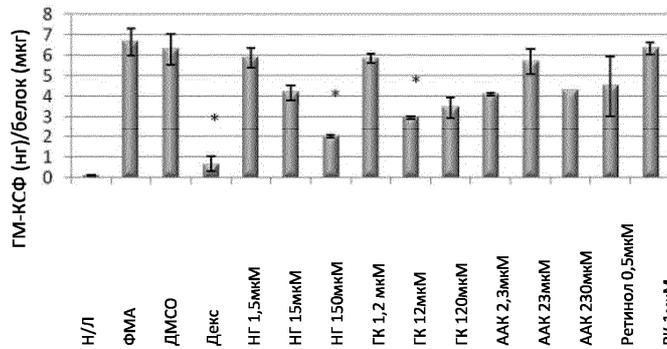
Фиг. 6

Ингибирование выработки интерлейкина-6 в фибробластах кожи человека



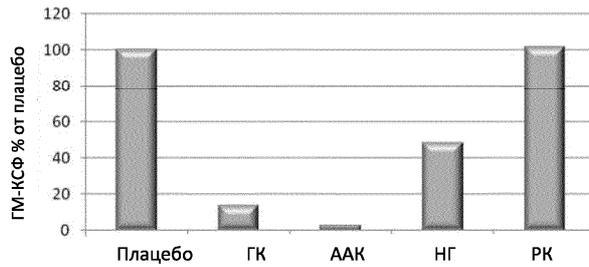
Фиг. 7

Ингибирование выработки ГМ-КСФ в фибробластах кожи человека



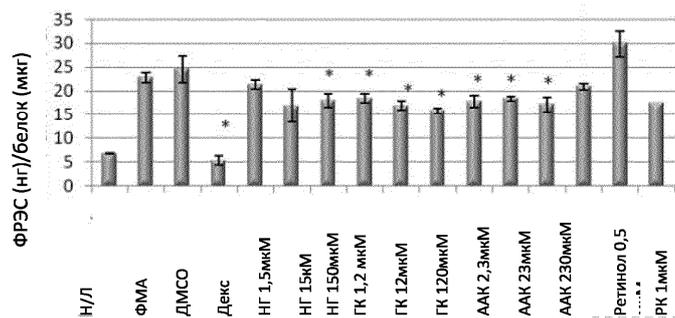
Фиг. 8

Индукцированная УФ выработка ГМ-КСФ в эксплантатах



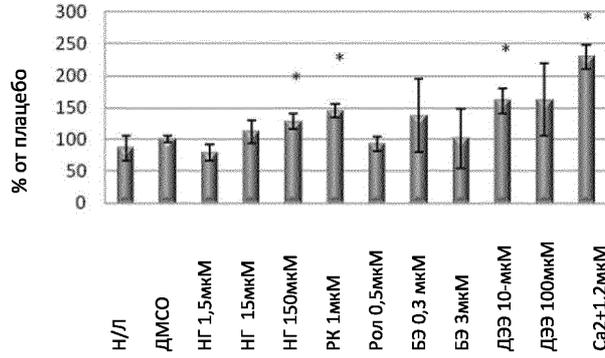
Фиг. 9

Ингибирование ФРЭС в фибробластах кожи человека



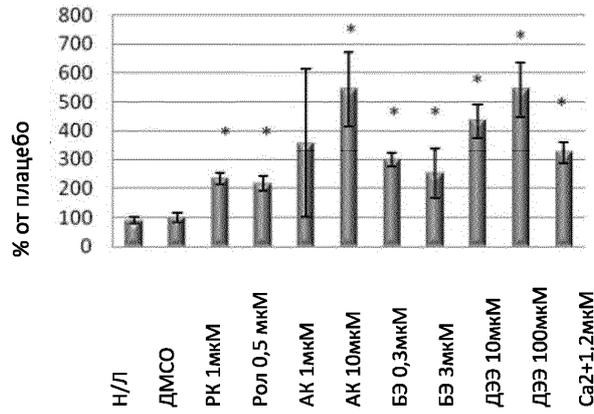
Фиг. 10

**Выработка кератина-6 в КЦ
6 день лечения**



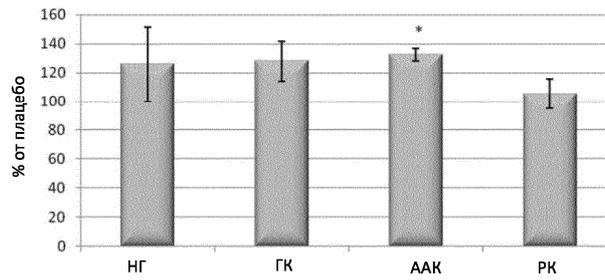
Фиг. 11

**Выработка фибронектина в КЦ
6 день лечения**



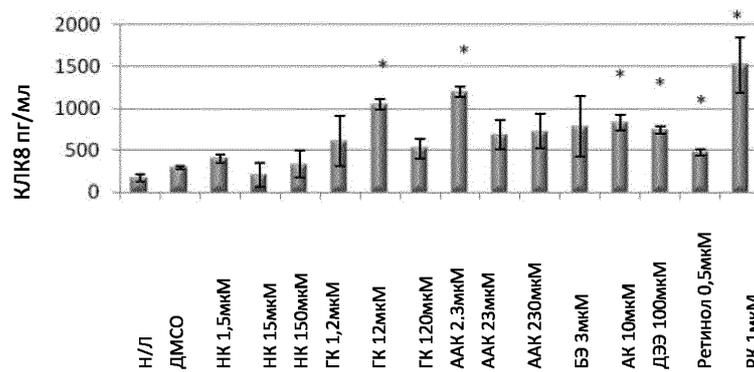
Фиг. 12

**Выработка ФРФ в эксплантатах
24 часа обработки**



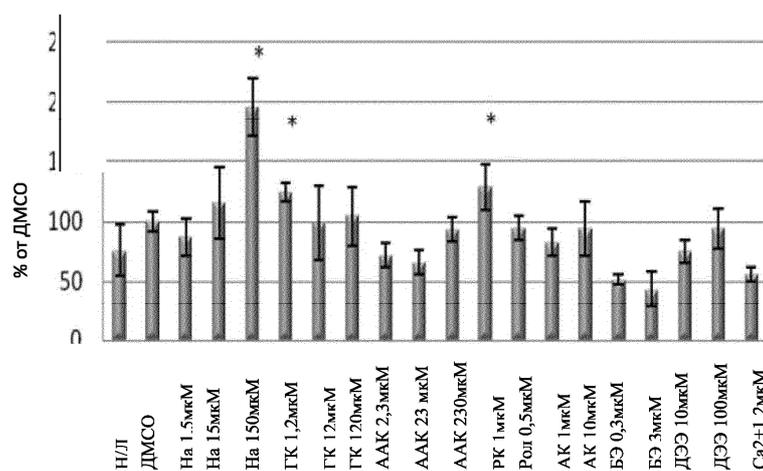
Фиг. 13

Выработка КЛК 8 в кератиноцитах человека



Фиг. 14

Выработка кератина 1, 10 в КЦ



Фиг. 15

