

(19)



**Евразийское
патентное
ведомство**

(21) **201891949** (13) **A1**

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

(43) Дата публикации заявки
2019.05.31

(51) Int. Cl. *A61Q 17/04* (2006.01)
A61Q 19/00 (2006.01)
A61K 8/97 (2017.01)

(22) Дата подачи заявки
2017.03.30

(54) **СПОСОБ ПОЛУЧЕНИЯ КОМПОЗИЦИИ ДЛЯ ЗАЩИТЫ КОЖИ ОТ ВЫСЫХАНИЯ И/ИЛИ ПОВРЕЖДЕНИЯ УФ-ЛУЧАМИ И/ИЛИ ВОСПАЛЕНИЯ**

(31) **16165271.4**

(32) **2016.04.14**

(33) **EP**

(86) **PCT/EP2017/057511**

(87) **WO 2017/178238 2017.10.19**

(71) Заявитель:

ЮНИЛЕВЕР Н.В. (NL)

(72) Изобретатель:

**Берри Марк Джон, Гунгабиссоон
Равин Энтони (GB)**

(74) Представитель:

Нилова М.И. (RU)

(57) Способ получения экстракта дедифференцированных стволовых клеток *Camellia sinensis*, включающий следующие стадии: (a.i.a) получение культуры клеток, содержащей дедифференцированные стволовые клетки *Camellia sinensis*; (a.i.b) осуществление экстракции указанной культуры клеток этанолом и/или метанолом в качестве экстрагирующего растворителя для получения экстракта дедифференцированных клеток *Camellia sinensis*.

201891949
A1

201891949

A1

СПОСОБ ПОЛУЧЕНИЯ КОМПОЗИЦИИ ДЛЯ ЗАЩИТЫ КОЖИ ОТ ВЫСЫХАНИЯ И/ИЛИ ПОВРЕЖДЕНИЯ УФ-ЛУЧАМИ И/ИЛИ ВОСПАЛЕНИЯ

Область техники

5

Настоящее изобретение относится к способу получения экстракта культуры дедифференцированных стволовых клеток *Camellia sinensis*, к композиции, содержащей указанный экстракт, и к применению указанного экстракта.

10 Уровень техники

Люди в большинстве своем предпочитают иметь здоровую кожу. Однако факторы окружающей среды вызывают повреждение кожи/волос и делают кожу/волосы менее здоровыми и менее стойкими к таким воздействиям, как ультрафиолетовое излучение и высыхание.

20

В общем случае, потребители находят удобным топическое нанесение композиций на кожу и даже покупают определенные продукты для обеспечения улучшенного внешнего вида или защиты кожи.

Кроме того, потребители в общем случае предпочитают натуральные компоненты и неохотно выбирают более синтетические композиции, в частности, если они используют указанную композицию.

25 В US2014/0186315 описана косметическая композиция, содержащая экстракт стволовых клеток зеленого чая. Эта композиция позиционируется как композиция против старения. Стволовые клетки зеленого чая получают путем культивирования тотипотентного каллуса в клеточной культуре. Активные ингредиенты, как указано, экстрагируют из культуры клеток. Однако не приведено
30 никаких подробностей, касающихся способа экстракции.

Следовательно, были бы желательны дальнейшие усовершенствования в указанной области.

35

Краткое описание изобретения

Авторы настоящего изобретения обнаружили, что определенные экстракты культуры клеток *Camellia sinensis* можно применять для улучшения здоровья 5
кожи. Конкретнее, авторы настоящего изобретения обнаружили, что экстракты культуры дедифференцированных стволовых клеток *Camellia sinensis* придают клеткам кожи стойкость к повреждениям под действием окружающей среды.

Следовательно, первый аспект настоящего изобретения относится к способу 10
получения экстракта дедифференцированных стволовых клеток *Camellia sinensis*, включающему следующие стадии:

- (a.i.a) получение культуры клеток, содержащей дедифференцированные стволовые клетки *Camellia sinensis*;
- 15 (a.i.b) осуществление экстракции указанной культуры клеток этанолом и/или метанолом в качестве экстрагирующего растворителя, для получения экстракта культуры дедифференцированных клеток *Camellia sinensis*.

20 Было обнаружено, что такой экстракт культуры дедифференцированных стволовых клеток обеспечивает неожиданную защиту клеток кожи от повреждения клеток, вызванного высыханием и воздействием ультрафиолетовых лучей, а также обеспечивает противовоспалительное действие.

25 Полагают, что этанол и метанол обеспечивают более высокую концентрацию некоторых активных веществ в экстракте стволовых клеток, таких как флаваноны, полифенолы и терпеноиды. Было обнаружено, что другие растворители обеспечивают заметно худший экстракт стволовых клеток.

30 Следовательно, согласно второму аспекту настоящее изобретение относится к композиции, содержащей экстракт культуры дедифференцированных стволовых клеток *Camellia sinensis*, получаемый способом согласно настоящему описанию.

Кроме того, было обнаружено, что такой экстракт дедифференцированных 35
стволовых клеток обладает более сильным и явным защитным действием на

клетки кожи, подвергающиеся высыханию или УФ-облучению, а также уменьшает воспаление.

5 Следовательно, согласно третьему аспекту настоящее изобретение относится к применению экстракта дедифференцированных стволовых клеток *Camellia sinensis* для защиты кожи от высыхания и/или повреждения УФ-лучами и/или воспаления.

10 **Подробное описание изобретения**

10

Чай представляет собой одно или более растений, относящихся к семейству *Camellia sinensis var. sinensis* и/или *Camellia sinensis var. assamica*. Чай занимает второе место среди употребляемых в мире напитков. Он является богатым источником мономерных и полимерных форм флавоноидов, и в его составе
15 флавоноиды могут составлять до 10 — 30 % по массе.

Согласно настоящему изобретению экстракты получают из дедифференцированных стволовых клеток чая. Дедифференцированные
20 стволовые клетки чая легко можно получить из каллуса, который образуется в ответ на поранение.

Растительный каллус представляет собой неорганизованные клетки паренхимы, полученные из ткани растения (эксплантаты). В биологии растений клетки каллуса представляют собой клетки, заживляющие повреждение растения.
25 Образование каллуса индуцируют в тканях растения после стерилизации поверхности и помещения на среду для культивирования тканей *in vitro*. Регуляторы роста растений, такие как ауксины, цитокины и гиббереллины, добавляют в культуральную среду для инициирования образования каллуса или соматического эмбриогенеза.

30

В общем, клетки растительного каллуса получают путем выращивания клеток в культуре. Материал растительного каллуса можно получить и вырезать из
35 эксплантата и перенести в культуральную среду. В культуральной среде клетки можно выращивать желаемое время до получения достаточного количества. Каллус можно выращивать на твердой ростовой среде, такой как агар, а затем

переносить в жидкую ростовую среду для увеличения объема продукции и для сбора активных компонентов путем экстракции.

5 Способ культивирования клеток можно осуществлять любым путем, известным в данной области техники.

Предпочтительно, среда для культуры клеток содержит гормоны 2,4-дихлорфеноксиуксусную кислоту (2,4-D), нафталинуксусную кислоту (NAA) и 6-бензиламинопурин (BAP).

10

Предпочтительно, среда для культуры клеток имеет значение pH от 5,6 до 6,0.

Предпочтительно, композиция согласно настоящему изобретению содержит экстракт стволовых клеток в концентрации более 0,01 % масс.

15

Композиция согласно настоящему изобретению, когда она представляет собой топическую композицию, содержит косметически приемлемую основу. Косметически приемлемая основа согласно настоящему изобретению представляет собой крем, лосьон, гель или эмульсию. Косметически приемлемая

20

основа предпочтительно содержит жирную кислоту или кремнийорганическое соединение. Когда косметически приемлемая основа содержит жирную кислоту, последняя предпочтительно присутствует в количестве от 1 до 25 % от массы композиции. Когда косметически приемлемая основа подходит для получения продукта в виде крема, лосьона или эмульсии, она в общем случае содержит

25

жирную кислоту. Из указанных форматов более предпочтительным является крем или лосьон, еще более предпочтительным является крем. Одним из вариантов является основа для быстро впитывающегося крема, содержащая от 3 до 25 %, более предпочтительно, от 5 до 20 % жирной кислоты, которая представляет собой предпочтительный формат композиции согласно

30

настоящему изобретению. В указанной композиции основа предпочтительно содержит от 0,1 до 10 %, более предпочтительно, от 0,1 до 3 % мыла. C₁₂ – C₂₀ жирные кислоты являются особенно предпочтительными в основах для быстро впитывающихся кремов, еще более предпочтительными являются C₁₄ – C₁₈ жирные кислоты. В кремах жирная кислота предпочтительно представляет собой,

35

по существу, смесь стеариновой кислоты и пальмитиновой кислоты. Мыла в

- основе для быстро впитывающегося крема включают соли жирных кислот и щелочных металлов, такие как соли натрия или калия. Мыло предпочтительно представляет собой калиевую соль смеси жирных кислот. Жирную кислоту в основе быстро впитывающегося крема часто получают с использованием
- 5 кислоты Hystric, которая по существу (в общем случае примерно на 90 – 95 %) представляет собой смесь стеариновой кислоты и пальмитиновой кислоты (обычно 55 % стеариновой кислоты и 45 % пальмитиновой кислоты). Так, включение кислоты Hystric и соответствующего мыла для получения основы быстро впитывающегося крема входит в объем настоящего изобретения.
- 10 Особенно предпочтительно, чтобы композиция содержала по меньшей мере 6 %, предпочтительно, по меньшей мере 10 %, более предпочтительно, по меньшей мере 12 % жирной кислоты. Косметически приемлемая основа обычно составляет от 10 до 99,9 %, предпочтительно, от 50 до 99 % от массы композиции. Другой предпочтительной основой является лосьон. Лосьоны в
- 15 общем содержат от 1 до 20 % жирной кислоты. Косметически приемлемая основа предпочтительно содержит воду. Вода предпочтительно составляет от 35 до 90 %, более предпочтительно, от 50 до 85 %, еще более предпочтительно, от 50 до 80 % от массы композиции.
- 20 Особенно подходящая косметически приемлема основа содержит эмульсию типа вода-в-масле, в которой непрерывную фазу составляют кремнийорганические масла. Эмульсии типа вода-в-масле предпочтительно содержат смесь сшитых кремнийорганических эластомеров.
- 25 Включение смеси кремнийорганических эластомеров в эмульсию типа вода-в-масле может использоваться в качестве косметически приемлемой основы для получения композиций согласно настоящему изобретению. Хотя можно применять кремнийорганические текучие среды, особенно предпочтительными являются сшитые кремнийорганические эластомеры. Создание поперечных
- 30 сшивок между линейными полимерами, такими как диметикон, превращает линейный полимер в кремнийорганический эластомер. В отличие от текучих кремнийорганических полимеров, физические свойства эластомеров обычно зависят от числа поперечных сшивок, а не от молекулярной массы. Способность кремнийорганических эластомеров к набуханию делает их идеальными
- 35 загустителями для масляной фазы. Эластомеры обеспечивают ощущение

гладкости и мягкости при нанесении на кожу или волосы. Также их можно применять в качестве агентов для доставки отдушек, витаминов и других добавок в косметических композициях.

- 5 Подходящие смеси или гели кремнийорганических эластомеров, которые коммерчески доступны и подходят для включения в композицию согласно настоящему изобретению и, как обнаружено, обеспечивают улучшенную стабильность: Dow Corning® EL-8051 IN смесь кремнийорганических эластомеров [Название по МНКИ: кроссполимер изодецилнеопентаноата (и) диметикона/бис-
10 изобутил-ППГ-20]; EL-8050 [Название по МНКИ: кроссполимер изододекана (и) диметикона/бис-изобутил-ППГ-20] DC9040, DC9041, DC9045 (кроссполимер диметикона); DC 9506, 9509 (кроссполимер диметикона/винилдиметикона); Shin-Etsu KSG-15, KSG-16, KSG-17 (кроссполимер диметикона/винилдиметикона). Кроме того, предпочтительно, чтобы композиция содержала от 5 до 50 %
15 кремнийорганического эластомера от массы композиции.

- Предпочтительно, в настоящем изобретении можно применять подходящие солнцезащитные агенты, например, неорганические солнцезащитные агенты. Они включают, например, оксид цинка, оксид железа, диоксид кремния, такой как
20 коллоидный диоксид кремния, или диоксид титана. Общее количество солнцезащитного агента, предпочтительно включаемого в композицию согласно настоящему изобретению, составляет от 0,1 до 5 % от массы композиции.

- Топическая композиция согласно настоящему изобретению может дополнительно
25 содержать отбеливающий кожу агент. Отбеливающий кожу агент предпочтительно выбран из соединения витамина В3 или его производного, например, ниацина, никотиновой кислоты, ниацинамида, или других широко известных отбеливающих кожу агентов, например, экстракта алоэ, лактата аммония, азелаиновой кислоты, койевой кислоты, сложных эфиров цитратов,
30 эллаговой кислоты, гликолевой кислоты, экстракта зеленого чая, гидрохинона, экстракта лимона, линолевой кислоты, аскорбилфосфата магния, витаминов, таких как витамин В6, витамин В12, витамин С, витамин А, дикарбоновой кислоты, производных резорцина, гидроксикарбоновой кислоты, такой как молочная кислота, и ее солей, например, лактата натрия, и смесей указанных
35 соединений. Соединение витамина В3 или его производное, например, ниацин,

никотиновая кислота, ниацинамид, являются более предпочтительными отбеливающими кожу агентами согласно настоящему изобретению, наиболее предпочтительным является ниацинамид. Ниацинамид, при применении, предпочтительно содержится в количестве, варьирующемся от 0,1 до 10 %, более предпочтительно, от 0,2 до 5 % от массы композиции.

Топическая композиция согласно настоящему изобретению также может содержать другие разбавители. Разбавитель действует как диспергатор или носитель для других материалов, содержащихся в композиции, таким образом, способствуя их распределению при нанесении композиции на кожу. Разбавители, помимо воды, могут включать жидкие или твердые смягчающие средства, растворители, увлажнители, загустители и порошки.

Топические композиции согласно настоящему изобретению могут содержать широкий ряд других факультативных компонентов. В Руководстве по косметическим ингредиентам Ассоциации по парфюмерно-косметическим товарам и душистым веществам (CTFA), второе издание, 1992 г., содержание которого полностью включено в настоящую заявку посредством ссылки, описан широкий ряд неограничительных косметических и фармацевтических ингредиентов, широко применяемых в области ухода за кожей, которые подходят для применения в композициях согласно настоящему изобретению. Примеры включают: антиокислители, связующие, биологические добавки, буферные агенты, красители, загустители, полимеры, вяжущие средства, отдушки, увлажнители, замутнители, кондиционеры, отшелушивающие агенты, регуляторы pH, консерванты, природные экстракты, эфирные масла, агенты, влияющие на ощущение кожи, агенты, успокаивающие кожу, и агенты, заживляющие кожу.

Когда композиция представляет собой композицию для перорального применения, композиция может иметь форму пищевого продукта или напитка. В общем, такой продукт для перорального применения может иметь любую подходящую форму потребляемого продукта, такую как напиток, батончик, мука или пищевая добавка.

Примеры

Культура клеток каллуса чая

- 5 • молодые листья клона Шри-Ланка 2 (*Camellia sinensis assamica*) стерилизовали следующим образом:
- Замачивали в воде с несколькими каплями твин-20 на 30 мин.
 - Промывали под проточной водой в течение 15 мин.
 - Стерилизовали поверхность в перексиде водорода в течение 2 мин.
- 10 ○ Промывали под проточной водой
- Стерилизовали поверхность в 70 % этаноле в течение 2 мин.
 - Промывали под проточной водой
 - Переносили в вытяжной шкаф и стерилизовали в 10 % бытовом отбеливателе в течение 30 мин.
- 15 ○ Промывали дистиллированной водой (в вытяжке)
- Нарезали листья на квадраты (эксплантаты) и переносили на среду в чашках Петри
- Состав твердой среды:
- Среда MS (соли и витамины)
- 20 ○ 30 г/л сахарозы
- 0,8 % агара
 - рН доводили до 5,8 при помощи 0,2 М КОН
 - гормоны 0,25 мг/л 2,4-дихлорфеноксиуксусной кислоты (2,4-D), 0,25 мг/л нафталинуксусной кислоты (NAA) и 1 мг/л 6-бензиламинопурина (BAP).
- 25 • Среду стерилизовали автоклавированием при 121 °С в течение 30 мин. После автоклавирования среду оставляли остыть до 60 °С, после чего разливали в 9 см чашки Петри (примерно по 10 мл на чашку). Затем агар отверждали путем охлаждения до 4 °С.
- 30 • От 5 до 10 эксплантатов листьев чая выращивали в каждой чашке Петри на твердой среде при 25 °С ± 2 в цикле 16 ч света и 8 ч темноты в шкафу для выращивания растений.
- Агломераты каллуса, развившиеся на поврежденных участках эксплантата, осторожно удаляли после достаточного роста и
- 35 дополнительно культивировали в новой чашке Петри с твердой средой.

- Агломераты каллуса переносили на свежую среду каждые 4 недели. Культивирование представляло собой простой перенос культуры каллуса на свежую среду. Это было необходимо, поскольку среда из твердого геля агара высыхает со временем (прибл. 3 – 4 недели), а растущий каллус необходимо поддерживать влажным.
- Через 12 недель каллус достигал достаточного размера (прибл. 1 – 2 см в диаметре) для продолжения эксперимента.
- На этой стадии каллус полностью высушивали замораживанием в течение 48 часов и хранили при -20°C до востребования.

Получение экстрактов клеток каллуса чая

- Готовили 20 % суспензию высушенного замораживанием материала каллуса в 96 % этаноле.
- 0,1 г высушенного замораживанием материала смешивали с 0,9 г 96 % этанола.
Примечание: это не является раствором каллуса в этаноле 10/90 % масс., поскольку большая часть материала каллуса является нерастворимой и остается в суспензии. Путем взвешивания сухой массы нерастворимого материала после экстракции растворителем вычисляли приблизительную конечную концентрацию растворимого экстракта 10 мг/мл. Следовательно, в испытаниях на выживание клеток 1 % = 0,1 мг растворимого экстракта.
- Суспензию интенсивно встряхивали в течение 1 мин, затем помещали в ультразвуковую ванну и обрабатывали ультразвуком в течение 30 мин. при температуре 0 – 4 °C.
- Суспензию центрифугировали при 13000 об./мин в течение 10 мин. при 4 °C и собирали надосадочную жидкость (маточный раствор экстракта стволовых клеток).
- Маточный раствор экстракта стволовых клеток хранили до использования при -20°C .

Испытание на защиту клеток кожи от высыхания

- Фибробласты кожи взрослого человека (№ по каталогу C-013-5C, Life Technologies) культивировали до примерно 90 % заселенности в планшетах на 24 ячейки, содержащих 0,5 мл среды 106 (№ по каталогу M-106-500, Life Technologies) с добавлением ростовой добавки с низким содержанием сыворотки (№ по каталогу S-003-10, Life Technologies) при 37 °C, 5 % CO₂
5
- Экстракт стволовых клеток добавляли в среду до конечной концентрации 0,1 %, 0,5 % или 1 %.
- Также готовили экспериментальный контроль, содержащий 1 % этанол (только носитель).
10
- Клетки выращивали еще в течение 24 часов.
- Клетки высушивали, полностью отсасывая среду из ячеек и оставляя на 10 мин в культуральном вытяжном шкафу с ламинарным потоком воздуха при комнатной температуре.
- Для каждого варианта готовили контроль без высушивания.
15
- Затем в каждую ячейку добавляли по 0,5 мл свежей среды и инкубировали клетки при 37 °C, 5 % CO₂
- Через 1 час добавляли в каждую ячейку по 50 мкл реагента для оценки жизнеспособности клеток AlamarBlue (Molecular Probes, № по каталогу DAL1025)
20
- Еще через 4 часа инкубирования при 37 °C, 5 % CO₂ из каждой ячейки отбирали по 200 мкл среды и помещали в планшет на 96 ячеек. Регистрировали интенсивность флуоресценции образцов при возбуждении 550 нм/ эмиссии 612 нм. Реагент AlamarBlue действовал как индикатор жизнеспособности клеток посредством превращения нефлуоресцирующего красителя (резазурин) в сильно флуоресцирующий краситель (резофурин) путем реакций восстановления в метаболически активных клетках.
25

30

Испытание на защиту клеток кожи от ультрафиолета

- Фибробласты кожи взрослого человека (№ по каталогу C-013-5C, Life Technologies) культивировали до примерно 90 %

- заселенности в 6 см чашках Петри, содержащих 1 мл DMEM (Life Technologies, № по каталогу 21063-029) с добавлением 1 мМ пирувата, 2 мМ глутамина и 10 % фетальной телячьей сыворотки при 37 °С, 5 % CO₂
- Экстракт стволовых клеток добавляли в среду до конечной концентрации 0,1 %, 0,5 % или 1 %.
 - Также готовили экспериментальный контроль, содержащий 1 % этанол (только носитель).
 - Клетки выращивали еще в течение 24 часов.
 - Затем убирали крышки с чашек Петри и облучали клетки в ультрафиолетовой камере Uvacube 400 (технология Honle UV) в течение 30 мин.
 - Старую среду удаляли и добавляли свежую среду того же типа.
 - Клетки инкубировали при 37 °С, 5 % CO₂ в течение 24 часов.
 - Затем добавляли в каждую ячейку по 100 мкл реагента для оценки жизнеспособности клеток AlamarBlue (Molecular Probes, № по каталогу DAL1025) и продолжали инкубирование еще в течение 24 часов.
 - из каждой ячейки отбирали по 200 мкл среды и помещали в планшет на 96 ячеек. Регистрировали интенсивность флуоресценции образцов при возбуждении 550 нм/ эмиссии 612 нм. Реагент AlamarBlue действовал как индикатор жизнеспособности клеток посредством превращения нефлуоресцирующего красителя (резазурин) в сильно флуоресцирующий краситель (резофурин) путем реакций восстановления в метаболически активных клетках.

Испытание на противовоспалительную активность

- Фибробласты кожи взрослого человека (№ по каталогу C-013-5C, Life Technologies) культивировали до концентрации 60000 клеток/ячейку в планшетах на 12 ячеек, содержащих 1 мл DMEM GlutaMAX (Gibco, № по каталогу 10566016) с добавлением 1 % фетальной телячьей сыворотки при 37 °С, 5 % CO₂

- Экстракт каллуса чая добавляли в каждую ячейку, содержащую 1 мл среды, до конечной концентрации 1 %. В это же время также добавляли форбол 12-миристат 13-ацетат (РМА, № по каталогу P8139 Sigma) в каждую ячейку до конечной концентрации 100 нм.
- 5 • Также готовили экспериментальный контроль, содержащий 1 % этанол (только носитель) и 100 нм РМА.
- Клетки выращивали еще в течение 24 часов при 37 °С, 5 % CO₂
- 10 • Затем удаляли культуральную среду и центрифугировали при 16000 об./мин в течение 1 мин. Собирали надосадочную жидкость и хранили при -20 °с до необходимости.
- Клетки промывали 3 раза ФСБ, а затем лизировали добавлением 1 мл на ячейку буфера для лизирования и экстракции RIPA (№ по каталогу 8990, Thermo Scientific) в течение 30 минут на льду.
- 15 • Клеточные лизаты собирали и центрифугировали при 16000 об./мин в течение 1 мин. Собирали надосадочные жидкости лизатов и анализировали на общее содержание белка при помощи набора для анализа белка BCA (№ по каталогу 23225, Thermo Scientific)
- 20 • Измеряли содержание ИЛ-6 в надосадочной жидкости при помощи набора для иммуноанализа ИЛ-6 человека Quantikine ELISA (№ по каталогу D6050, R&D Systems). Общее содержание белка для каждой ячейки использовали для нормализации измеренных концентраций ИЛ-6. Это обеспечивало возможность прямого сравнения уровней ИЛ-6 в каждом образце.

25

Испытание на высушивание клеток кожи (экстракт чая)

30 **Таблица 1: Измерения флуоресценции AlamarBlue в среде от фибробластов кожи человека, зарегистрированной при возб. 550 нм/ исп. 612 нм. Для каждой условий выполняли три повторения (образцы 1 – 3). Интенсивность флуоресценции среды и отдельно AlamarBlue (фоновая флуоресценция) получали из средних значений.**

	Образец 1	Образец 2	Образец 3	Среднее	Среднее – фон	Стандартное отклонение
Этанол 1 %	58628	56283	57194	57368	43116	1182
Этанол 1 % (высушенный)	15997	14981	15763	15580	1328	532
Экстракт каллуса чая 1 %	49562	48734	49178	49158	34906	414
Экстракт каллуса чая 1 % (высушенный)	49698	46815	47935	48149	33897	1453
Экстракт каллуса чая 0,5 %	51018	53845	51933	52265	38013	1443
Экстракт каллуса чая 0,5 % (высушенный)	52006	51307	50602	51305	37053	702
Экстракт каллуса чая 0,1 %	53646	54813	52708	53722	39470	1055
Экстракт каллуса чая 0,1 % (высушенный)	51737	52091	51445	51758	37506	323
Экстракт каллуса чая 0,01 %	54996	55830	57119	55982	41730	1070
Экстракт каллуса чая 0,01 % (высушенный)	29888	32796	32395	31693	17441	1576
Экстракт листьев чая 1 %	55931	53284	55993	55069	40817	1546
Экстракт листьев чая 1 % (высушенный)	26835	24405	24183	25141	10889	1471

Полученные результаты показали, что число жизнеспособных клеток после высушивания в образцах, обработанных экстрактом ствольных клеток чая выше, чем для клеток, обработанных только носителем (этанол). Кроме того, показано,

5

что концентрации выше 0,01 % обеспечивают весьма значительное защитное действие.

5 Также был получен сравнительный пример с экстрактом листьев чая без получения каллуса. Хотя он оказывал некоторое защитное действие, оно не было настолько значительным, как действие, обеспечиваемое экстрактом каллуса.

Испытание на высушивание клеток кожи (экстракт чая) с использованием различных растворителей для экстракции

10

- Готовили суспензию 20 % измельченного высушенного замораживанием материала каллуса в следующих растворителях: этанол, метанол, хлороформ, эфир, ацетон, вода.

15

- Суспензию интенсивно встряхивали в течение 1 мин, затем помещали в ультразвуковую ванну и обрабатывали ультразвуком в течение 30 мин. при температуре 4 °С.

- Суспензию центрифугировали при 13000 об./мин в течение 10 мин. при 4 °С и собирали надосадочную жидкость.

20

- Надосадочные жидкости высушивали в вакууме для выпаривания растворителей.

- Оставшийся твердый экстракт растворяли в 1 мл ДМСО (интенсивно встряхивали в течение 1 мин).

25

- Затем использовали экстракты в испытании на высушивание клеток в концентрации 1 % в конечной среде, как описано выше.

- Также готовили экспериментальный контроль, содержащий 1 % ДМСО (только носитель).

30 **Таблица 2: Измерения флуоресценции AlamarBlue в среде от фибробластов кожи человека, зарегистрированной при возб. 550 нм/ исп. 612 нм. Для каждого условия выполняли три повторения (образцы 1 – 3). Интенсивность флуоресценции среды и отдельно AlamarBlue (фоновая флуоресценция) получали из средних значений.**

	Образец 1	Образец 2	Образец 3	Среднее	Среднее – фон	Стандартное отклонение
Этанол	29326	31414	28234	29658	25556	1616
Метанол	25170	28037	26653	26620	22518	1434
Хлороформ	17636	16629	16577	16947	12845	597
Эфир	12086	11134	10611	11277	7175	748
Ацетон	14513	13648	13109	13757	9655	708
Вода	8318	8502	9652	8824	4722	723
1 % ДМСО	6473	7915	6600	6996	2894	798

Как можно видеть, клетки кожи, обработанные экстрактами культуры клеток, полученными в растворителях этаноле и метаноле, показали значительно лучшие результаты, чем результаты, полученные для других растворителей.

5

Испытание на защиту клеток кожи от ультрафиолета (экстракт чая)

10 **Таблица 3: Измерения флуоресценции AlamarBlue в среде от фибробластов кожи человека, зарегистрированной при возб. 550 нм/ исп. 612 нм. Для каждой условий выполняли три повторения (образцы 1 – 3). Интенсивность флуоресценции среды и отдельно AlamarBlue (фоновая флуоресценция) получали из средних значений.**

	Образец 1	Образец 2	Образец 3	Среднее	Среднее – фон	Стандартное отклонение
1 % этанол	79483	82725	78281	80163	68116	2231
1 % этанол УФ	45928	43754	40549	43410	31363	1760
Чай 0,1 %	83024	84153	80945	82707	70660	1607
Чай 0,1 % УФ	48142	49513	47035	48230	36183	1239

Чай 0,5 %	78582	84031	81842	81485	69438	1378
Чай 0,5 % УФ	55000	59546	56014	56853	44806	1845
Чай 1 %	85676	83877	81033	83529	71482	1551
Чай 1 % УФ	58303	64814	61758	61625	49578	1804

Полученные результаты показывают, что число жизнеспособных клеток после УФ-облучения в образцах, обработанных экстрактом клеток каллуса чая, было выше, чем для клеток, обработанных только носителем (этанол). По-видимому, действие является дозозависимым.

Испытание на противовоспалительное действие

Таблица 4: Показана концентрация интерлейкина-6 (пг ИЛ-6/ мкг общего белка клетки), выделенного фибробластами кожи взрослого человека под действием активатора воспалительного пути PMA и 1 % экстракта каллуса чая или 1 % этанола (контроль). Для каждой обработки выполняли три повторения (образцы 1 – 3). Результаты показали, что экстракт каллуса чая снижает количество ИЛ-6, выделяемого клетками под действием PMA, что указывает на противовоспалительное действие.

	Образец 1	Образец 2	Образец 3	Среднее	Стандартное отклонение
1 % экстракт каллуса чая + PMA	9,32	8,65	8,34	8,77	0,50
1 % этанол + PMA	11,16	10,78	10,74	10,89	0,23

Химический анализ общих галлатированных и негаллатированных катехинов в экстракте каллуса чая

Образцы:

- 5
- лист чая – листья, собранные в июне 2015 г.
 - каллус чая (старый) — более старая партия каллуса чая, выращенного в начале 2015 г.
 - каллус чая (новый) – более новая партия каллуса чая, выращенного в конце 2015 г./ начале 2016 г.

10

Аликвоту 10 мкл вводили в колонку ВЕН C18 (100 x 2,1 мм, 1,7 мкм, Waters) на приборе Waters Acquity СВЭЖХ с масс-спектрометром Xevo Triple Quadrupole. Подвижная фаза состояла из градиента метанола (0,1 % об./об. муравьиной кислоты)/ воды (0,1 % об./об. муравьиной кислоты) (от 10:90 до 60:40 за 10 мин.;

- 15 до 2:98 за 1 мин.; выдержка 2 мин.; до 10:90 за 1 мин.; выдержка 1 мин.) с расходом 0,2 мл/мин. и температурой колонки 40 °С. Данные представлены в программе Waters MassLynx 4.1. Количества каждого из метаболитов устанавливали, наблюдая за специфическими переходами в режиме MRM (эпикатехин/катехин: 289>245, эпигаллокатехин: 305>125, галлат эпикатехина: 20 441>169, галлат эпигаллокатехина: 457>169, метилгаллат: 183,1>124, галловая кислота: 169>125).

- Результаты показали, что образец листьев чая содержал значительно больше галлатов, чем образцы каллуса (например, ~100 раз больше в случае галлата 25 эпигаллокатехина).

Таблица 5: Измеренные концентрации различных компонентов чая. Данные представлены в относительных единицах как площадь под кривой (ППК).

	Лист чая	Каллус (А)	Каллус (В)
Галловая кислота	19749	349	588
Метилгаллат	138289	684	1702
Галлат эпигаллокатехина	697159	5798	7692

Эпикатехин	62686	13078	68280
Галлат эпикатехина	319658	4014	41479
Эпигаллокатехин	106309	1187	3950
Катехин	278696	154930	172515

ФОРМУЛА ИЗОБРЕТЕНИЯ

- 1
5 1 Способ получения экстракта дедифференцированных ствольных клеток *Camellia sinensis*, включающий следующие стадии:
- (a.i.a) получение культуры клеток, содержащей дедифференцированные ствольные клетки *Camellia sinensis*;
- (a.i.b) осуществление экстракции указанной культуры клеток этанолом и/или метанолом в качестве экстрагирующего растворителя, для получения экстракта культуры дедифференцированных клеток *Camellia sinensis*.
- 10
- 2 Способ по п. 1, отличающийся тем, что указанную культуру клеток получают путем культивирования клеток каллуса растения *Camellia sinensis*.
- 15
- 3 Способ по любому из пп. 1 — 2, отличающийся тем, что среда для культуры клеток содержит гормоны 2,4-дихлорфеноксиуксусную кислоту (2,4-D), нафталинуксусную кислоту (NAA) и 6-бензиламинопурин (BAP).
- 20
- 4 Способ по любому из пп. 1 — 3, отличающийся тем, что среда для культуры клеток имеет значение pH от 5,6 до 6,0.
- 5 Композиция, содержащая экстракт дедифференцированных ствольных клеток *Camellia sinensis*, по существу, не содержащий галлатов.
- 25
- 6 Композиция, содержащая экстракт дедифференцированных ствольных клеток *Camellia sinensis*, получаемый при помощи способа согласно любому из пп. 1 — 5.
- 30
- 7 Композиция по п. 5 или п. 6, представляющая собой пероральную композицию или композицию для топического применения на коже.

- 8 Композиция по любому из пп. 5 – 7, содержащая по меньшей мере 0,01 % масс. экстракта дедифференцированных стволовых клеток *Camellia sinensis*.
- 5 9 Композиция по п. 8, содержащая по меньшей мере 0,1 % масс. экстракта дедифференцированных стволовых клеток *Camellia sinensis*.
- 10 10 Применение экстракта дедифференцированных стволовых клеток *Camellia sinensis* для защиты кожи от высыхания и/или повреждения УФ-лучами.
- 10 11 Применение экстракта дедифференцированных стволовых клеток *Camellia sinensis* для защиты кожи от риска воспаления.
- 15 12 Применение по п. 10, отличающееся тем, что указанный экстракт дедифференцированных стволовых клеток был экстрагирован из культуры клеток при помощи этанола и/или метанола.

ИЗМЕНЕННАЯ ФОРМУЛА ИЗОБРЕТЕНИЯ

(поданная к ответу на письменное мнение органа международной предварительной экспертизы от 20.03.2018, для вступления в региональную фазу ЕАПО)

- 1 Способ получения экстракта дедифференцированных стволовых клеток *Camellia sinensis*, включающий следующие стадии:
 - (a.i.a) получение культуры клеток, содержащей дедифференцированные стволовые клетки *Camellia sinensis*;
 - (a.i.b) осуществление экстракции указанной культуры клеток только этанолом и/или метанолом в качестве экстрагирующего растворителя, для получения экстракта культуры дедифференцированных клеток *Camellia sinensis*.
- 2 Способ по п. 1, отличающийся тем, что указанную культуру клеток получают путем культивирования клеток каллуса растения *Camellia sinensis*.
- 3 Способ по любому из пп. 1 — 2, отличающийся тем, что среда для культуры клеток содержит гормоны 2,4-дихлорфеноксиуксусную кислоту (2,4-D), нафталинуксусную кислоту (NAA) и 6-бензиламинопурин (BAP).
- 4 Способ по любому из пп. 1 — 3, отличающийся тем, что среда для культуры клеток имеет значение pH от 5,6 до 6,0.
- 5 Композиция, содержащая экстракт дедифференцированных стволовых клеток *Camellia sinensis*, получаемый способом по любому из пп. 1 — 4.
- 6 Композиция по п. 5 или п. 6, представляющая собой пероральную композицию или композицию для топического применения на коже.

- 7 Композиция по любому из пп. 5 – 6, содержащая по меньшей мере 0,01 % масс. экстракта дедифференцированных стволовых клеток *Camellia sinensis*.

- 8 Композиция по п. 7, содержащая по меньшей мере 0,1 % масс. экстракта дедифференцированных стволовых клеток *Camellia sinensis*.