

(19)



Евразийское
патентное
ведомство

(11) 044823

(13) B1

(12) ОПИСАНИЕ ИЗОБРЕТЕНИЯ К ЕВРАЗИЙСКОМУ ПАТЕНТУ

(45) Дата публикации и выдачи патента
2023.10.04

(21) Номер заявки
201892030

(22) Дата подачи заявки
2017.03.10

(51) Int. Cl. C07D 487/04 (2006.01)
C07D 209/12 (2006.01)
A61K 8/49 (2006.01)

(54) МАЛАССЕЗИН И ЕГО АНАЛОГИ В КАЧЕСТВЕ ОСВЕТЛЯЮЩИХ КОЖУ АГЕНТОВ

(31) 62/306,468

(32) 2016.03.10

(33) US

(43) 2019.02.28

(86) PCT/US2017/021843

(87) WO 2017/156424 2017.09.14

(71)(72)(73) Заявитель, изобретатель и
патентовладелец:

АЙНЦИГЕР МАЙКЛ; СИМПСОН
ЭНН МАРИ (US)

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

(56) WILLE G. ET AL.: "Malassezin-a novel agonist of the Arylhydrocarbon receptor from the yeast *Malassezia furfur*", BIOORGANIC & MEDICINAL CHEMISTRY, PERGAMON, GB, vol. 9, no. 4, 1 April 2001 (2001-04-01), pages 955-960, XP027414447, ISSN: 0968-0896 [retrieved on 2001-04-01], compounds 1 and 7, biological activity in page 957

THOLANDER J. ET AL.: "Synthesis of 6-Formylindolo[3,2-b]carbazole, an Extremely Potent Ligand for the Aryl Hydrogen (Ah) Receptor", TETRAHEDRON LETTERS, ELSEVIER, AMSTERDAM, NL, vol. 39, no. 12, 19 March 1998 (1998-03-19), pages

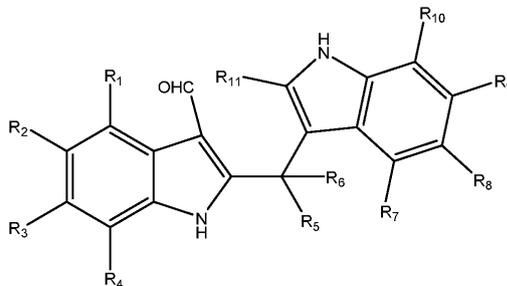
1619-1622, XP004108114, ISSN: 0040-4039, DOI: 10.1016/S0040-4039(97)10832-2, compounds 1 and 2, first paragraph

THOLANDER J. ET AL.: "Syntheses of 6,12-Disubstituted 5,11-Dihydroindolo[3,2-b]carbazoles, Including 5,11-Dihydroindolo[3,2-b]carbazole-6,12-dicarbaldehyde, an Extremely Efficient Ligand for the TCDD (Ah) Receptor", TETRAHEDRON, ELSEVIER SCIENCE PUBLISHERS, AMSTERDAM, NL, vol. 55, no. 43, 22 October 1999 (1999-10-22), pages 12577-12594, XP004179346, ISSN: 0040-4020, DOI: 10.1016/S0040-4020(99)00733-4, compounds 2 and 24 in p. 12582

THOLANDER J. ET AL.: "Syntheses of 6-Substituted Indolo[3,2-b]carbazoles, Including 6-Formylindolo[3,2-b]carbazole, an Extremely Efficient Ligand for the TCDD (Ah) Receptor", TETRAHEDRON, ELSEVIER SCIENCE PUBLISHERS, AMSTERDAM, NL, vol. 55, no. 19, 7 May 1999 (1999-05-07), pages 6243-6260, XP004164554, ISSN: 0040-4020, DOI: 10.1016/S0040-4020(99)00268-9, compounds 2 and 22

CHRIS L. WALLER ET AL.: "Three-Dimensional Quantitative Structure-Activity Relationships of Dioxins and Dioxin-like Compounds: Model Validation and Ah Receptor Characterization", CHEMICAL RESEARCH IN TOXICOLOGY, vol. 8, no. 6, 1 September 1995 (1995-09-01), pages 847-858, XP055364142, US, ISSN: 0893-228X, DOI: 10.1021/tx00048a005, compounds 86, 89, 92 (Table 5), page 849, biological data

(57) Изобретение относится к косметической композиции для осветления кожи, содержащей соединение, имеющее структуру формулы (II)



(II)

где R₁, R₂, R₃, R₄, R₅, R₆, R₇, R₈, R₉, R₁₀ и R₁₁ независимо выбраны из группы, состоящей из водорода и метила; и способу осветления кожи. Композиции и способы согласно настоящему изобретению в общем случае включают соединения, вырабатываемые дрожжами *Malassezia*, и их химические аналоги. Кроме применений, связанных с осветлением кожи, соединения, композиции и способы согласно настоящему изобретению можно использовать для модуляции активности меланоцитов,

B1

044823

044823

B1

индукции апоптоза меланоцитов, агонизации арил-гидрокарбонового рецептора (AhR), снижения гиперпигментации, вызванной гиперпигментационным расстройством, и модуляции выработки меланина, биогенеза меланосом и переноса меланосом.

044823

B1

B1

044823

Перекрестная ссылка на родственные заявки

Настоящее изобретение заявляет приоритет предварительной заявки на патент США номер 62/306468, поданной 10 марта 2016 г. Полное содержание этой заявки включено посредством ссылки.

Область техники

Настоящее изобретение относится к химическим аналогам соединений, вырабатываемых дрожжами *Malassezia*. Изобретение включает в себя композиции, содержащие соединения, вырабатываемые дрожжами *Malassezia*, а также химические аналоги соединений, вырабатываемых дрожжами *Malassezia*. Также рассматриваются способы применения соединений (включая их аналоги) и композиций согласно настоящему изобретению.

Уровень техники

Люди по всему миру используют осветляющие кожу агенты для достижения нескольких косметических целей, включая оказание антивозрастного эффекта, коррекцию вызванных солнечными лучами повреждений и соответствие определенным культурным стандартам красоты. Многие коммерчески доступные осветляющие кожу продукты, хоть и являются в разной степени эффективными, содержат вредные ингредиенты, некоторые из которых связаны с риском развития рака. Следовательно, существует потребность в новых осветляющих кожу агентах и препаратах, которые демонстрируют более высокие уровни безопасности и/или эффективности, чем агенты, имеющиеся в настоящее время на рынке.

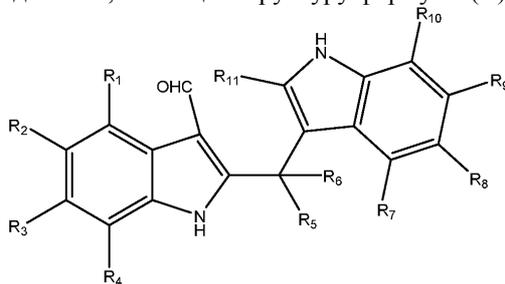
Malassezia представляют собой род липофильных дрожжей, обычно обнаруживаемых в нормальной флоре человеческой кожи. *Malassezia* отвечает за некоторые заболевания кожи, включая разноцветный лишай (отрубевидный лишай), себорейный дерматит и атопический дерматит.

Разноцветный лишай является незаразным заболеванием кожи, вызываемым разрастанием *Malassezia*, что локально меняет уровни пигментации. Дрожжи имеют два метаболических пути синтеза меланиновых и получаемых из триптофана индоловых пигментов. Индоловые пигменты включают малассезин, триптофановый метаболит *Malassezia*, который может вызывать апоптоз меланоцитов и вносит свой вклад в депигментационные характеристики разрастания *Malassezia*.

В описанном в данном документе изобретении применяются компоненты, вырабатываемые дрожжами *Malassezia*, включая малассезин и его химические аналоги, в качестве основы для безопасных и эффективных композиций для осветления кожи.

Сущность изобретения

Один вариант реализации настоящего изобретения относится к косметической композиции для осветления кожи, содержащей соединение, имеющее структуру формулы (II)



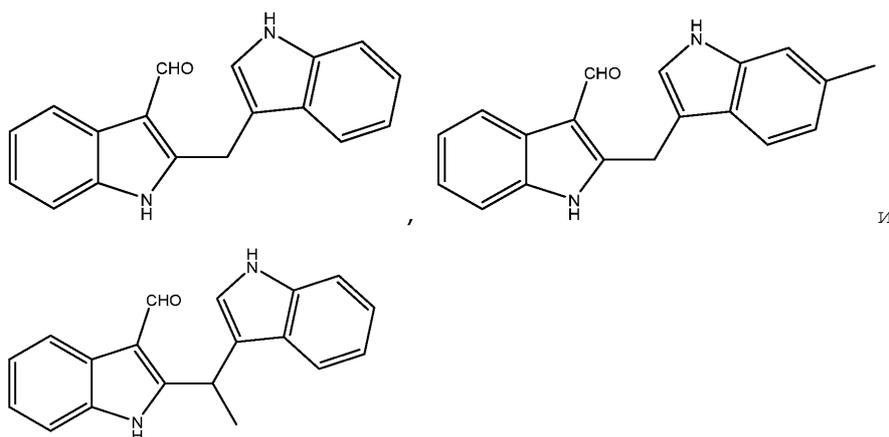
(II)

где $R_1, R_2, R_3, R_4, R_5, R_6, R_7, R_8, R_9, R_{10}$ и R_{11} независимо выбраны из группы, состоящей из водорода и метила;

или косметически приемлемую соль, и косметически приемлемый наполнитель, разбавитель или носитель, и дополнительно содержащая один или несколько ингредиентов, выбранных из группы, состоящей из отдушек, эстрогена, витамина А, витамина С, витамина Е, пировиноградной кислоты, молочной кислоты, гликолевой кислоты, ланолина, вазелина, алоэ вера, метилпарабена, пропилпарабена и пигментов.

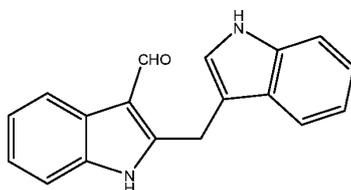
Другой вариант реализации настоящего изобретения относится к композиции, которая представляет собой композицию для местного или трансдермального введения, выбранную из группы, состоящей из порошков, спреев, мазей, паст, кремов, лосьонов, гелей, пластырей, эмульсий, суспензий, аэрозолей и ингаляторов.

Дополнительный вариант реализации настоящего изобретения относится к косметической композиции, в которой соединение выбрано из группы, состоящей из:



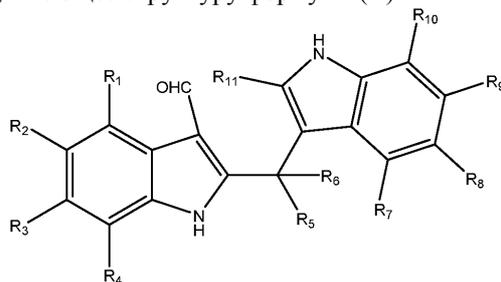
или их косметически приемлемой соли.

Дополнительный вариант реализации настоящего изобретения относится к композиции, в которой соединение представляет собой



или его косметически приемлемую соль.

Другой вариант реализации настоящего изобретения относится к способу осветления кожи у субъекта-человека, содержащему нанесение на субъекта-человека косметической композиции для осветления кожи, содержащей соединение, имеющее структуру формулы (II)



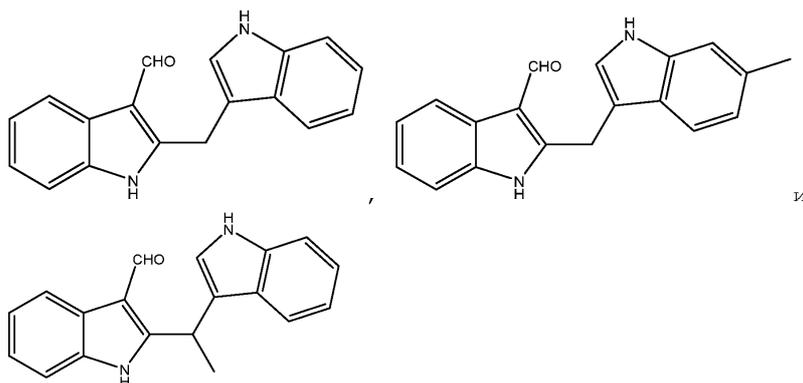
(II)

где R₁, R₂, R₃, R₄, R₅, R₆, R₇, R₈, R₉, R₁₀ и R₁₁ независимо выбраны из группы, состоящей из водорода и метила;

или косметически приемлемую соль, и косметически приемлемый наполнитель, разбавитель или носитель, и дополнительно содержащая один или несколько ингредиентов, выбранных из группы, состоящей из отдушек, эстрогена, витамина А, витамина С, витамина Е, пировиноградной кислоты, молочной кислоты, гликолевой кислоты, ланолина, вазелина, алоэ вера, метилпарабена, пропилпарабена и пигментов.

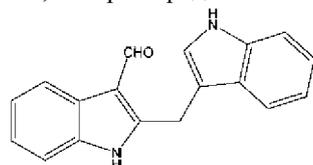
Другой вариант реализации настоящего изобретения относится к способу осветления кожи у субъекта-человека, содержащему нанесение на субъекта-человека косметической композиции для осветления кожи, которая представляет собой композицию для местного или трансдермального введения, выбранную из группы, состоящей из порошков, спреев, мазей, паст, кремов, лосьонов, гелей, пластырей, эмульсий, суспензий, аэрозолей и ингаляторов.

Дополнительный вариант реализации настоящего изобретения относится к способу осветления кожи у субъекта-человека, содержащему нанесение на субъекта-человека косметической композиции для осветления кожи, содержащей соединение, которое выбрано из группы, состоящей из:



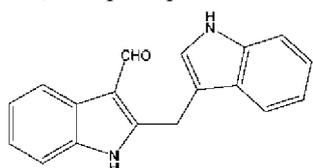
и их косметически или фармацевтически приемлемой соли.

Дополнительный вариант реализации настоящего изобретения относится к способу осветления кожи у субъекта-человека, содержащему нанесение на субъекта-человека косметической композиции для осветления кожи, содержащей соединение, которое представляет собой:



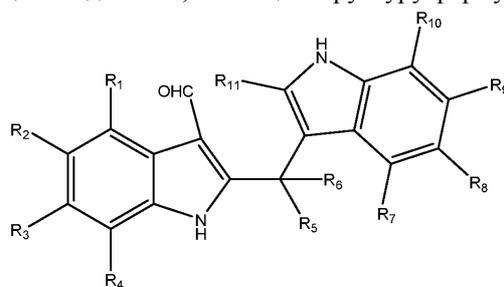
или его косметически или фармацевтически приемлемую соль.

Дополнительный вариант реализации настоящего изобретения относится к способу осветления кожи у субъекта-человека, содержащему нанесение на субъекта-человека косметической композиции для осветления кожи, содержащей соединение, которое представляет собой:



или его косметически или фармацевтически приемлемую соль.

Другой вариант реализации настоящего изобретения относится к фармацевтической композиции для осветления кожи, содержащей соединение, имеющее структуру формулы (II)



(II)

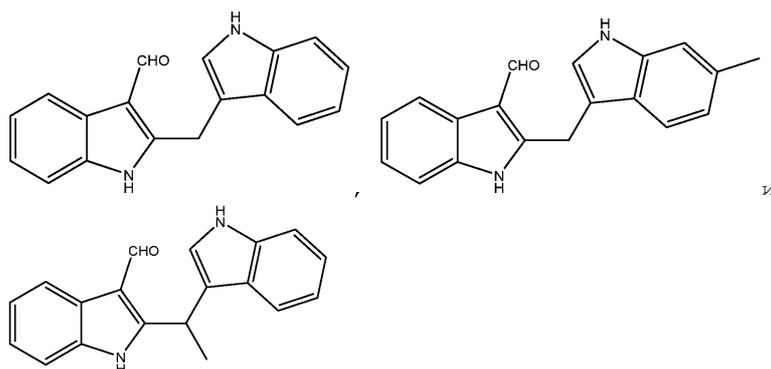
где R_1 , R_2 , R_3 , R_4 , R_5 , R_6 , R_7 , R_8 , R_9 , R_{10} и R_{11} независимо выбраны из группы, состоящей из водорода и метила;

или фармацевтически приемлемую соль, и фармацевтически приемлемый наполнитель, разбавитель или носитель, и дополнительно содержащая один или несколько ингредиентов, выбранных из группы, состоящей из отдушек, эстрогена, витамина А, витамина С, витамина Е, пировиноградной кислоты, молочной кислоты, гликолевой кислоты, ланолина, вазелина, алоэ вера, метилпарабена, пропилпарабена и пигментов.

Дополнительный вариант реализации настоящего изобретения относится к способу осветления кожи у субъекта. Способ включает приведение субъекта в контакт с любым из соединений или любой из композиций, описанных в данном документе.

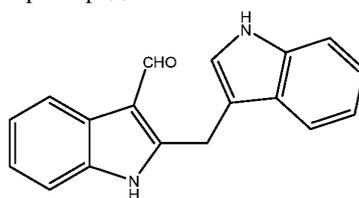
Дополнительный вариант реализации настоящего изобретения относится к фармацевтической композиции, которая представляет собой композицию для местного или трансдермального введения, выбранную из группы, состоящей из порошков, спреев, мазей, паст, кремов, лосьонов, гелей, пластырей, эмульсий, суспензий, аэрозолей и ингаляторов.

Дополнительный вариант реализации настоящего изобретения относится к фармацевтической композиции, которая содержит соединение, выбранное из группы, состоящей из:



или их фармацевтически приемлемой соли.

Дополнительный вариант реализации настоящего изобретения относится к фармацевтической композиции содержащей соединение, которое представляет собой:



или его косметически или фармацевтически приемлемую соль.

Другой вариант реализации настоящего изобретения относится к косметической или фармацевтической композиции, которая представляет собой эмульсию или микроэмульсию.

Дополнительный вариант реализации настоящего изобретения относится к косметической или фармацевтической композиции, которая представляет собой эмульсию или микроэмульсию типа "вода в масле" или типа "масло в воде".

Дополнительный вариант реализации настоящего изобретения относится к способу осветления кожи у субъекта-человека, содержащему нанесение на субъекта-человека косметической композиции для осветления кожи, которая представляет собой эмульсию или микроэмульсию.

Дополнительный вариант реализации настоящего изобретения относится к способу осветления кожи у субъекта-человека, содержащему нанесение на субъекта-человека косметической композиции для осветления кожи, которая представляет собой эмульсию или микроэмульсию типа "вода в масле" или типа "масло в воде".

Краткое описание графических материалов

Файл патента или заявки содержит по меньшей мере один рисунок, выполненный в цвете. Копии публикации этого патента или патентной заявки с цветными графическими материалами будут предоставляться патентным бюро после осуществления запроса и необходимого платежа.

На фиг. 1А приведена схематическая диаграмма слоев, составляющих кожу. На вставленной диаграмме показан клеточный состав эпидермиса и дермы. На фиг. 1В приведена схематическая диаграмма, показывающая потенциальные механизмы действия вызывающих гипопигментацию агентов.

На фиг. 2 приведен ряд схем синтеза малассезина и производных малассезина: фиг. 2А: малассезин и индоло[3,2-*b*]карбазол; фиг. 2В: соединения I и IV; фиг. 2С: соединение II.

На фиг. 3А приведена суммарная таблица со значениями EC_{50} Для индукции аннексина V для некоторых соединений согласно настоящему изобретению в клетках MeWo и WM115. На фиг. 3В-3М представлены линейные графики, демонстрирующие процентное содержание клеток MeWo (фиг. 3В-3Г) или WM115 (фиг. 3Н-3М), меченых аннексином V, после воздействия различных концентраций перечисленных соединений.

На фиг. 4А-4Д представлены таблицы с приведенными уровнями аннексина V (%) в клетках MeWo и WM115 после воздействия различных концентраций перечисленных соединений для 6, 24, 48 и 72 ч. На фиг. 4Е-4J представлены гистограммы, демонстрирующие результаты с фиг. 4А-4Д. На фиг. 4К и 4Л представлены гистограммы, демонстрирующие процентное содержание клеток MeWo (фиг. 4К) и WM115 (фиг. 4Л), меченых аннексином V, после 6-часового воздействия перечисленных соединений в указанных концентрациях.

На фиг. 5А-5К представлены микрофотографии, демонстрирующие морфологию клеток MeWo после 6 ч обработки различными концентрациями CV-8684, CV-8685, CV-8688, ДМСО и стауроспорина.

На фиг. 6А-6К представлены микрофотографии, демонстрирующие морфологию клеток MeWo после 24 ч обработки различными концентрациями CV-8684, CV-8685, CV-8688, ДМСО и стауроспорина.

На фиг. 7А-7К представлены микрофотографии, демонстрирующие морфологию клеток MeWo после 48 ч обработки различными концентрациями CV-8684, CV-8685, CV-8688, ДМСО и стауроспорина.

На фиг. 8А-8К представлены микрофотографии, демонстрирующие морфологию клеток MeWo по-

сле 72 ч обработки различными концентрациями CV-8684, CV-8685, CV-8688, ДМСО и стауроспорина.

На фиг. 9А-9К представлены микрофотографии, демонстрирующие морфологию клеток WM115 после 6 ч обработки различными концентрациями CV-8684, CV-8685, CV-8688, ДМСО и стауроспорина.

На фиг. 10А-10К представлены микрофотографии, демонстрирующие морфологию клеток WM115 после 24 ч обработки различными концентрациями CV-8684, CV-8685, CV-8688, ДМСО и стауроспорина.

На фиг. 11А-11К представлены микрофотографии, демонстрирующие морфологию клеток WM115 после 48 ч обработки различными концентрациями CV-8684, CV-8685, CV-8688, ДМСО и стауроспорина.

На фиг. 12А-12К представлены микрофотографии, демонстрирующие морфологию клеток WM115 после 72 ч обработки различными концентрациями CV-8684, CV-8685, CV-8688, ДМСО и стауроспорина.

На фиг. 13А-13Д представлены таблицы, демонстрирующие процентное содержание жизнеспособных клеток MeWo и WM115, оставшихся после обработки различными концентрациями CV-8684 (фиг. 13А), CV-8685 (фиг. 13В), CV-8688 (фиг. 13С) или стауроспорина (фиг. 13Д) в течение 6, 24, 48 и 72 ч. Жизнеспособность клеток анализировали с помощью CellTiter-Glo®. На фиг. 13Е-13Ж представлены гистограммы, демонстрирующие результаты с фиг. 13А-13Д. На фиг. 13К представлена суммарная таблица со сравнением процентного содержания жизнеспособных клеток MeWo и WM115 после воздействия перечисленных концентраций малассезина, индолокарбазола, соединения II и стауроспорина в течение 24, 48 и 72 ч.

На фиг. 14А-14Д представлены таблицы, демонстрирующие уровни высвобождения лактатдегидрогеназы ("ЛДГ") из клеток MeWo и WM115 после обработки различными концентрациями CV-8684 (фиг. 14А), CV-8685 (фиг. 14В), CV-8688 (фиг. 14С) или стауроспорина (фиг. 14Д) в течение 6, 24, 48 и 72 ч. На фиг. 14Е-14Ж представлены гистограммы, демонстрирующие результаты с фиг. 14А-14Д. На фиг. 14К и 14Л представлены гистограммы, демонстрирующие уровни лактатдегидрогеназы после воздействия на клетки MeWo (фиг. 14К) и WM115 (фиг. 14Л) перечисленных концентраций малассезина, карбазола, соединения II и стауроспорина в течение 24 ч.

На фиг. 15А-15Е приведены исходные данные и линейные графики активации арил-гидрокарбонowego рецептора ("AhR") в клетках HepG2, стабильно трансфицированных плазмидой с репортерным геном AhR-чувствительной люциферазы, после воздействия различных концентраций омега-3 (фиг. 15А), CV-8684 (фиг. 15В), CV-8685 (фиг. 15С), CV-8686 (фиг. 15Д) и CV-8688 (фиг. 15Е). На фиг. 15F приведены значения EC₅₀ для каждого исследуемого соединения.

На фиг. 16А-16К представлены фотографии матриц MelanoDerm™ на 0 сутки или 7 сутки в отсутствие обработки (фиг. 16А), после воздействия стерильной деионизированной воды (фиг. 16В), 1% койевой кислоты (фиг. 16С), 0,2% ДМСО (фиг. 16Д), 0,05% ДМСО (фиг. 16Е), 200 мкМ CV-8684 (фиг. 16F), 50 мкМ CV-8684 (фиг. 16G), 200 мкМ CV-8686 (фиг. 16H), 50 мкМ CV-8686 (фиг. 16I), 200 мкМ CV-8688 (фиг. 16J) и 50 мкМ CV-8688 (фиг. 16K).

На фиг. 17А-17К представлены микрофотографии с 15X-увеличением матриц MelanoDerm™ на 0 сутки или 7 сутки в отсутствие обработки (фиг. 17А), после воздействия стерильной деионизированной воды (фиг. 17В), 1% койевой кислоты (фиг. 17С), 0,2% ДМСО (фиг. 17Д), 0,05% ДМСО (фиг. 17Е), 200 мкМ CV-8684 (фиг. 17F), 50 мкМ CV-8684 (фиг. 17G), 200 мкМ CV-8686 (фиг. 17H), 50 мкМ CV-8686 (фиг. 17I), 200 мкМ CV-8688 (фиг. 17J) и 50 мкМ CV-8688 (фиг. 17K).

На фиг. 18А-18F представлены фотографии данио в отсутствие обработки (фиг. 18А), после воздействия ДМСО (фиг. 18В), фенилтиомочевины ("ФТМ") (фиг. 18С) и соединения II при 2,5 мкМ (фиг. 18Д), 5 мкМ (фиг. 18Е) и 10 мкМ (фиг. 18F). Красные стрелки указывают нормальные меланоциты.

На фиг. 19А-19F представлены фотографии данио в отсутствие обработки (фиг. 19А), после воздействия ДМСО (фиг. 19В), фенилтиомочевины ("ФТМ") (фиг. 19С) и соединения II при 0,3 мкМ (фиг. 19Д), 1 мкМ (фиг. 19Е) и 3 мкМ (фиг. 19F). Красные стрелки указывают нормальные меланоциты. Желтые стрелки указывают аномально мелкие меланоциты.

На фиг. 20 представлена суммарная таблица с приведенным числом и процентным содержанием данио со сниженной пигментацией кожи после воздействия перечисленных условий. В последних шести рядах приведен эффект от различных концентраций соединения II.

На фиг. 21А-21Е представлены фотографии данио в отсутствие обработки (фиг. 21А), после воздействия ДМСО (фиг. 21В), ФТМ (фиг. 21С), 0,5 мкМ (фиг. 21Д) и 1,5 мкМ (фиг. 21Е). Нижние панели включают области изменения цветовой схемы.

На фиг. 22А и 22В представлены гистограммы, демонстрирующие плотность пигментации, определяемую по числу пигментированных пикселей/мм³ (фиг. 22А) и общему числу пикселей (фиг. 22В) на фотографиях эмбрионов данио, приведенных в качестве примеров на фиг. 21А-21Е.

На фиг. 23А-23С представлены масс-спектры CV-8684 в ДМСО (фиг. 23А), среде RPMI (фиг. 23В) и DMEM (фиг. 23С). На фиг. 23D-23F представлены масс-спектры CV-8686 в ДМСО (фиг. 23D), среде RPMI (фиг. 23Е) и DMEM (фиг. 23F). На фиг. 23G-23I представлены масс-спектры CV-8688 в ДМСО

(фиг. 23G), среде RPMI (фиг. 23H) и DMEM (фиг. 23I). На фиг. 23J представлена суммарная таблица с приведенным процентным содержанием исследуемого соединения, оставшегося в указанном растворе, после двухчасовой инкубации.

Подробное описание изобретения

Один вариант реализации настоящего изобретения относится к соединению для осветления кожи. Соединение представляет собой химический аналог соединения, вырабатываемого дрожжами *Malassezia*, или его кристаллическую форму, гидрат или косметически или фармацевтически приемлемую соль.

В контексте данного документа термин "соединение" относится к двум или более атомам, которые соединены одной или более химическими связями. В настоящем изобретении химические связи включают, но не ограничиваются этим, ковалентные связи, ионные связи, водородные связи и ван-дер-ваальсово взаимодействие. Ковалентные связи согласно настоящему изобретению включают одинарные, двойные и тройные связи. Соединения согласно настоящему изобретению включают, но не ограничиваются этим, органические молекулы.

Органические соединения/молекулы согласно настоящему изобретению включают линейные, разветвленные и циклические углеводороды с функциональными группами или без них. Подразумевается, что термин " C_{x-y} ", применяемый в сочетании с химической группой, такой как алкильная, алкенильная, алкинильная или алкокси-группа, включает группы, которые содержат от x до y атомов углерода в цепи. Например, термин " C_{x-y} алкил" обозначает замещенные или незамещенные насыщенные углеводородные группы, включая алкильные группы с линейной цепью и алкильные группы с разветвленной цепью, которые содержат от x до y атомов углерода в цепи, включая галогеналкильные группы, такие как трифторметил и 2,2,2-трифторэтил и т.д. Термины " C_{x-y} алкенил" и " C_{x-y} алкинил" относятся к замещенным или незамещенным ненасыщенным алифатическим группам, аналогичным по длине и возможным заменам описанным выше алкилам, но содержащим по меньшей мере одну двойную или тройную связь соответственно.

В контексте данного документа термин "алифатическая" обозначает группу, состоящую из атомов углерода и водорода, которая не содержит ароматических колец. Соответственно, алифатические группы включают алкильные, алкенильные, алкинильные и карбоциклические группы.

Термин "алкил" обозначает радикал насыщенных алифатических групп, который не имеет кольцевой структуры, включая алкильные группы с линейной цепью и алкильные группы с разветвленной цепью.

В контексте данного документа термин "алкенил" обозначает алифатическую группу, содержащую по меньшей мере одну двойную связь.

В контексте данного документа термин "алкинил" обозначает алифатическую группу, содержащую по меньшей мере одну тройную связь.

В контексте данного документа "ароматическое соединение", "ароматическое вещество" или соединение, содержащее "ароматическое кольцо", представляет собой арильное или гетероарильное соединение. В контексте данного документа термин "арил" включает замещенные и незамещенные ароматические группы с одним кольцом, в которых каждый атом кольца представляет собой углерод. Предпочтительно кольцо представляет собой 3-8-членное кольцо, более предпочтительно 6-членное кольцо. Термин "арил" также включает полициклические кольцевые системы, имеющие два или более циклических колец, в которых два или более атомов углерода являются общими для двух смежных колец, при этом по меньшей мере одно из колец является ароматическим, например, другие циклические кольца могут представлять собой циклоалкилы, циклоалкенилы, циклоалкинилы, арилы, гетероарилы и/или гетероциклилы. Арильные группы включают бензен, нафтаден, фенантрен, фенол, анилин и т.д. Термин "гетероарил" включает замещенные или незамещенные ароматические структуры с одним кольцом, предпочтительно 3-8-членными кольцами, более предпочтительно 5-7-членными кольцами, даже более предпочтительно 5-6-членными кольцами, чьи кольцевые структуры содержат по меньшей мере один гетероатом, предпочтительно от одного до четырех гетероатомов, более предпочтительно один или два гетероатома. Термин "гетероарил" также включает полициклические кольцевые системы, имеющие два или более циклических колец, в которых два или более атомов углерода являются общими для двух смежных колец, при этом по меньшей мере одно из колец является гетероароматическим, например, другие циклические кольца могут представлять собой циклоалкилы, циклоалкенилы, циклоалкинилы, арилы, гетероарилы и/или гетероциклилы. Гетероарильные группы включают, например, пиррол, фуран, тиофен, индол, имидазол, оксазол, тиазол, пиразол, пиридин, пиразин, пиридазин и пиримидин и т.д. Предпочтительно некоторые соединения согласно настоящему изобретению содержат по меньшей мере одну, предпочтительно две индольные группы, а также по меньшей мере одну альдегидную группу.

Термин "замещенный" обозначает группы, содержащие по меньшей мере один заместитель, который замещает атом водорода на одном или более атомах углерода каркаса. Следует понимать, что "замещение" или "замещенный на" подразумевает, что такая замена проведена в соответствии с допустимой валентностью замещенного атома, и что замена приводит к получению стабильного соединения, например, которое не подвергается спонтанной трансформации, например, посредством перестройки, циклизации, элиминации и т.д. Допустимыми заместителями могут быть одно или более, а также одинаковые

или разные подходящие органические соединения.

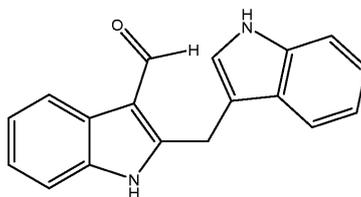
В контексте данного документа выражение "осветление кожи" и его грамматические вариации в целом относятся к любому объективному или субъективному снижению пигментации кожи. Способы осветления кожи применяются для снижения пигментации гиперпигментированных участков кожи вследствие возраста, воздействия солнечных лучей или гиперпигментационного расстройства. Применение соединений и композиций согласно настоящему изобретению, например, к коже субъекта может снижать пигментацию так, что кожа становится более светлой или белой, чем до указанного применения. Пигментацию кожи можно оценить несколькими путями, включая, но не ограничиваясь этим, визуальную оценку с применением, например, хроматической шкалы фон Лушана, определения типа кожи по Фицпатрику (Fitzpatrick et al., 1988) и шкалы гиперпигментации Тейлора (Taylor et al., 2005), а также методов отражательной спектрофотометрии (Zonios, et al., 2001). Например, тест для определения типа кожи по Фицпатрику включает шесть типов кожи (I-VI), и, в соответствии с применяемым в данном документе термином, если тип кожи VI становится типом V или менее, говорят, что кожа "осветлена". Как дополнительно обсуждается ниже, осветление кожи может происходить в результате некоторого количества явлений, включая, но не ограничиваясь этим, модуляцию активности меланоцитов, индукцию апоптоза меланоцитов, агонизм арил-гидрокарбонового рецептора (AhR) или модуляцию выработки меланина, биогенез меланосом или перенос меланосом.

Некоторые соединения согласно настоящему изобретению вырабатываются дрожжами *Malassezia* или выделены или могут быть выделены из них. Дрожжи *Malassezia* представляют собой дрожжи рода *Malassezia* и включают, но не ограничиваются этим, *Malassezia globosa*, *Malassezia restricta*, *Malassezia furfur*, *Malassezia sympodialis*, *Malassezia slooffiae*, *Malassezia obtusa*, *Malassezia pachydermatis*, *Malassezia dermatis*, *Malassezia japonica*, *Malassezia nana*, *Malassezia yamatoensis*, *Malassezia equine*, *Malassezia caprae* и *Malassezia cuniculi*. (Guého, et al., 1996; Gaitanis, et al., 2013). Дрожжи *Malassezia* являются частью нормальной человеческой кожной флоры и, как правило, не имеют патогенного действия. Однако дрожжи *Malassezia* могут стать причиной некоторого количества заболеваний, включая, но не ограничиваясь этим, разноцветный лишай (обе вариации гиперпигментированную и гипопигментированную), себорейный дерматит, перхоть, атопический дерматит, вызванный *Malassezia* фолликулит, псориаз и сливающийся папулезный папилломатоз. (Gaitanis, et al., 2013).

В контексте данного документа термин "химический аналог" относится к соединению, которое родственно по структуре родительскому соединению и содержит отличные функциональные группы или заместители. Например, родительским соединением согласно настоящему изобретению является малассезин, а химические аналоги малассезина содержат определенные функциональные группы и заместители, которые отличаются от малассезина. Химические аналоги согласно настоящему изобретению могут иметь существенные преимущества над данным родительским соединением, включая фармакокинетический профиль, подходящий для косметического применения. В некоторых вариантах реализации химический аналог получен из родительской молекулы с помощью одной или более химических реакций. В других вариантах реализации можно использовать альтернативные схемы синтеза, которые не опираются на родительское соединение, чтобы создать химические аналоги согласно настоящему изобретению.

Соединение согласно настоящему изобретению "вырабатывается дрожжами *Malassezia*", если в течение своего жизненного цикла дрожжи *Malassezia* синтезируют, секретируют, накапливают или каким-либо другим образом производят соединение в подходящих для роста условиях. Дрожжи *Malassezia* секретируют разные соединения в зависимости от добавок в среде для роста. (Nazzaro-Porto, et al., 1978). Настоящее изобретение включает в себя любое соединение, вырабатываемое дрожжами *Malassezia* в любых условиях роста, но предпочтительные соединения включают, например, малассезин и его химические аналоги.

В одном аспекте этого варианта реализации соединение, вырабатываемое дрожжами *Malassezia*, имеет структуру формулы (I)



(I)

В другом аспекте этого варианта реализации соединение является химическим аналогом малассезина.

Малассезин является одним из примеров соединения, вырабатываемого дрожжами *Malassezia* согласно настоящему изобретению. Малассезин, также известный как 2-(1H-индол-3-илметил)-1H-индол-3-карбальдегид, представляет собой метаболит триптофана, впервые выделенный из *Malassezia furfur*. Малассезин является известным агонистом арил-гидрокарбонового рецептора (AhR) - рецептора, вовлеченного в клеточный рост, дифференцировку и генную экспрессию. (Wille et al., 2001). Малассезин также

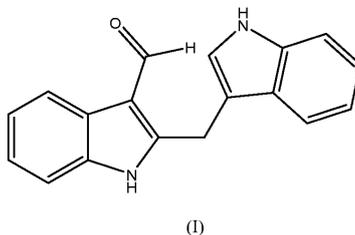
индуцирует апоптоз первичных человеческих меланоцитов. (Krämer, et al., 2005). Недавно некоторые химические аналоги малассезина были синтезированы Winston-McPherson и коллегами, которые исследовали активность аналогов агониста AhR. (Winston-McPherson, et al., 2014).

Другой вариант реализации настоящего изобретения относится к соединению для индукции апоптоза меланоцитов. Соединение представляет собой химический аналог соединения, вырабатываемого дрожжами *Malassezia*, или его кристаллическую форму, гидрат или косметически или фармацевтически приемлемую соль.

В контексте данного документа термин "меланоцит" относится к дендритной клетке эпидермиса, которая обычно синтезирует тирозиназу и, в меланосомах, пигмент меланин. Меланоциты согласно настоящему изобретению демонстрируют повышенную регуляцию некоторых генов, включая, но не ограничиваясь этим, гены: тирозиназы (окулокутаный альбинизм IA), микрофтальмия-ассоциированного транскрипционного фактора, альфа-2-макроглобулина, тирозиназа-зависимого белка 1, семейства переносчиков растворенных веществ 16, белка GS3955, V-комплекта Харди-Цукерман 4 онкогена кошачьей саркомы, глазного альбинизма 1, белка Rag D, гликогена 2, сопряженного с G-протеином рецептора, семейство C, окулокутанного альбинизма II, удаленного при раке пищевода 1, мелан-A, SRV-бокса 10, АТФазы, класса V, типа 10С, матриксной металлопротеиназы 1, латентного трансформирующего фактора роста бета b, АТФ-связывающей кассеты, подсемейства C, гидроксипростагландин дегидрогеназы 15, представителя 1 трансмембранного суперсемейства 7, глутаминил-пептид циклотрансферазы и другие гены, выявленные Lee и коллегами. (Lee, et al., 2013).

Меланоциты, как и многие другие типы клеток, подвержены запрограммированной клеточной гибели или апоптозу. Пути апоптоза меланоцитов известны специалистам в данной области (Wang, et al., 2014), а общий обзор путей апоптоза был сделан Elmore (Elmore, 2007). Соединение или композиция согласно настоящему изобретению "индуцирует" апоптоз меланоцитов, например, вызывая активацию определенных проапоптотических путей передачи сигнала или вызывая репрессию определенных антиапоптотических путей в меланоцитах. Подразумевается, что соединение или композиция согласно настоящему изобретению может напрямую активировать/репрессировать связанный с апоптозом путь, непосредственно взаимодействуя с сигнальной молекулой пути или опосредованно взаимодействуя с молекулой пути посредством прямого взаимодействия с одной или более промежуточными молекулами, которые обычно не задействованы в этом пути.

В одном аспекте этого варианта реализации соединения, вырабатываемое дрожжами *Malassezia*, имеет структуру формулы (I)

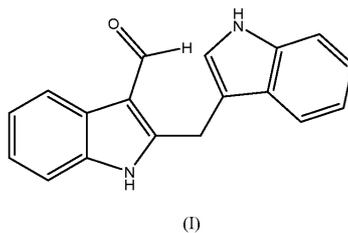


В другом аспекте этого варианта реализации соединения является химическим аналогом малассезина.

Дополнительный вариант реализации настоящего изобретения относится к соединению для модуляции активности меланоцитов. Соединение представляет собой химический аналог соединения, вырабатываемого дрожжами *Malassezia*, или его кристаллическую форму, гидрат или косметически или фармацевтически приемлемую соль.

Активность меланоцитов можно модулировать несколькими способами, рассматриваемыми в настоящем изобретении, включая, но не ограничиваясь этим, индукцию апоптоза меланоцитов или изменение генной экспрессии меланоцитов, подвижности клеток, роста клеток, выработки меланина, биогенеза меланосом или переноса меланосом.

В одном аспекте этого варианта реализации соединения, вырабатываемое дрожжами *Malassezia*, имеет структуру формулы (I)



В другом аспекте этого варианта реализации соединения является химическим аналогом малассезина.

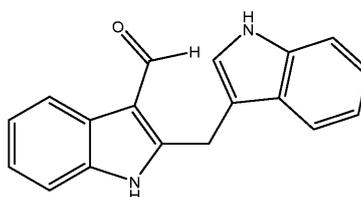
Дополнительный вариант реализации настоящего изобретения относится к соединению для агони-

зации арил-гидрокарбонового рецептора (AhR). Соединение представляет собой химический аналог соединения, вырабатываемого дрожжами *Malassezia*, или его кристаллическую форму, гидрат или косметически или фармацевтически приемлемую соль.

В контексте данного документа термины "агонист", "агонизация" и их грамматические вариации относятся к молекуле, которая запускает (например, инициирует или стимулирует), частично или полностью усиливает, стимулирует или активирует один или более видов биологической активности. Агонисты согласно настоящему изобретению включают вещества природного происхождения, а также синтетические вещества.

Арил-гидрокарбоновый рецептор (AhR) согласно настоящему изобретению представляет собой любой арил-гидрокарбоновый рецептор, который естественным образом находится в организме субъекта, как описано в данном документе. Арил-гидрокарбоновые рецепторы известны специалистам в данной области. (Noakes, 2015). Агонисты арил-гидрокарбоновых рецепторов включают, но не ограничиваются этим, родственные триптофану соединения, такие как кинуренин, кинуреновая кислота, циннабариновая кислота и 6-формилиндоло[3,2-b]карбазол (FICZ). Малассезин также известен как агонист арил-гидрокарбонового рецептора. (Wille, et al., 2001).

В одном аспекте этого варианта реализации соединения, вырабатываемое дрожжами *Malassezia*, имеет структуру формулы (I)



(I)

В другом аспекте этого варианта реализации соединения является химическим аналогом малассезина.

Другой вариант реализации настоящего изобретения относится к соединению для улучшения гиперпигментации, вызванной гиперпигментационным расстройством. Соединение представляет собой химический аналог соединения, вырабатываемого дрожжами *Malassezia*, или его кристаллическую форму, гидрат или косметически или фармацевтически приемлемую соль.

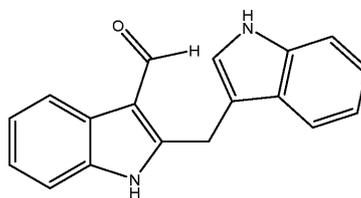
В контексте данного документа соединения, композиции и способы согласно настоящему изобретению можно применять для снижения гиперпигментации, вызванной гиперпигментационным расстройством, например, путем снижения уровня гиперпигментации на участках, пораженных гиперпигментационным расстройством, замедления дальнейшей гиперпигментации или предотвращения появления дальнейшей гиперпигментации. Однако, так как не каждый субъект может демонстрировать ответ на конкретный протокол, схему или процесс дозирования, для снижения гиперпигментации, вызванной гиперпигментационным расстройством, не является необходимым достижение желаемого физиологического ответа или результата у всех без исключения субъектов или во всей популяции субъектов. Соответственно, данный субъект или данная популяция субъектов может не продемонстрировать ответ или продемонстрировать неадекватный ответ на дозирование, но другие субъекты и популяции субъектов могут демонстрировать ответ и, следовательно, испытывать улучшение в отношении своего гиперпигментационного расстройства.

В контексте данного документа термин "гиперпигментация" относится к объективному или субъективному кожному расстройству или потемнению. Кожное нарушение может быть объективным, например, связанным с возрастом, чрезмерным воздействием солнечных лучей или заболеванием или патологическим состоянием, приводящим к появлению темных участков кожи. Темные участки кожи могут иметь форму пятен или относительно крупных участков темного цвета. Кожное нарушение также может быть субъективным, например, связанным с мнением индивида, что его/ее кожа является слишком темной. Индивид может иметь желание осветлить тон кожи косметическим способом.

Гиперпигментационные расстройства представляют собой расстройства, при которых гиперпигментация является первичным симптомом, а также расстройства, при которых гиперпигментация проявляется как вторичный симптом. Гиперпигментационные расстройства согласно настоящему изобретению включают, но не ограничиваются этим, наследственные гиперпигментационные расстройства и приобретенные гиперпигментационные расстройства. Наследственные гиперпигментационные расстройства согласно настоящему изобретению включают, но не ограничиваются этим, те, которые связаны с эпидермальной гиперпигментацией (невоцитарный невус, невус Шпиз и пятнистый невус), дермальной гиперпигментацией (синий невус, невус Оты, дермальный меланоз, невус Ито и монгольские пятна), веснушки, ретикулярную акропигментацию, Spitzepigment/акропигментацию и лентигоноз (генерализованный лентигоноз, синдром леопарда, наследственный узорчатый лентигоноз, синдром Карни, синдром Пейтца-Егерса, синдром Ложье-Хунцикера-Баран и синдром Кронкхайта-Канада). (Yamaguchi, et al., 2014). При-

обретенные гиперпигментационные расстройства согласно настоящему изобретению включают, но не ограничиваются этим, старческие лентиго/лентиго, мелазму/хлоазму, меланоз Рилиа, лабиальные меланотические пятна, пенильный/вульвовагинальный меланоз, эритромеланоз фолликулярный лица и шеи Китамуры, УФ-индуцированную пигментацию (загар и пигментация *retaloides actinica*), поствоспалительную пигментацию (фрикционный меланоз и пепельный дерматоз), пигментацию, индуцированную химическими/лекарственными препаратами (полихлорированным бифенилом, мышьяком, 5-FU, блеомицином, циклофосфамидом, метотрексатом, хлорпромазином, фенитоином, тетрациклином и хлорохином), пигментарные разграничительные линии и отложения чужеродных материалов (таких как каротен, серебро, золото, ртуть, висмут и татуировки). Гиперпигментация, связанная с системными расстройствами, включает расстройства метаболизма/ферментные расстройства (гемохроматоз, болезнь Вильсона, болезнь Гоше, болезнь Ниманна-Пика, амилоидоз, охроноз, акантокератодермию и позднюю порфирию кожи), эндокринные расстройства (болезнь Аддисона, синдром Кушинга и гипертиреоз), нарушения питания (пеллагру, дефицит витамина B12, дефицит фолиевой кислоты, болезнь бродяг и пигментарную почесуху), мастоцитоз, коллагеновые болезни, печеночную недостаточность и почечную недостаточность. Гиперпигментация также может быть связана с инфекционными заболеваниями (корь, сифилис и вызванная *Malassezia* перхоть) и синдромами (болезнь Реклингхаузена, синдром Сотоса, ROEMS-синдром, синдром Негели, синдром Канту, синдром МакКьюна-Олбрайта, синдром Ватсона и синдром Блума). (Yamaguchi, et al., 2014).

В одном аспекте этого варианта реализации соединение, вырабатываемое дрожжами *Malassezia*, имеет структуру формулы (I):



(I)

В другом аспекте этого варианта реализации соединение является химическим аналогом малассезина.

Дополнительный вариант реализации настоящего изобретения относится к соединению для модуляции выработки меланина. Соединение представляет собой химический аналог соединения, вырабатываемого дрожжами *Malassezia*, или его кристаллическую форму, гидрат или косметически или фармацевтически приемлемую соль.

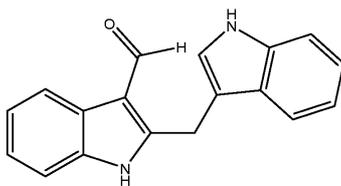
Меланин представляет собой вырабатываемый естественным образом пигмент, который придает цвет коже и волосам. Схематическая диаграмма кожи приведена на фиг. 1А. Меланин вырабатывается меланоцитами в органеллах, известных как меланосомы. Соединение или композиция согласно настоящему изобретению модулирует выработку меланина у субъекта, например, путем модуляции биогенеза меланосом и прямого или косвенного ингибирования синтеза меланина на ферментативном уровне.

Биогенез меланосом происходит в четыре стадии: Стадия I характеризуется наличием премеланосом, которые представляют собой преимущественно непигментированные вакуоли. На стадии II у пре-меланосом развивается исчерченность, в которой откладывается меланин на стадии III. Стадия IV приводит к появлению зрелых меланосом, имеющих высокое содержание меланина. Соединения или композиции согласно настоящему изобретению модулируют биогенез меланосом, ингибируя или ослабляя биологические процессы, которые обычно стимулируют любую или все эти стадии. (Wasmeier, et al., 2008).

В синтезе меланина задействованы, главным образом, три фермента: тирозиназа, тирозиназа-зависимый белок 1 и допахром таутомераза. Дополнительные факторы, которые влияют на внутриклеточную миграцию этих ферментов, включают, но не ограничиваются этим, BLOC-1, OA1 и SLC4A2. Соединения или композиции согласно настоящему изобретению могут модулировать выработку меланина, например, ингибируя или ослабляя активность любого из этих ферментов или факторов. (Yamaguchi, et al., 2014).

После образования меланосом и синтеза меланина меланосомы должны переноситься из эпидермальных меланоцитов в кератиноциты кожи и волос. Меланосомы появляются вблизи ядра меланоцитов и переносятся к периферии меланоцитов вдоль микротрубочек и актиновых филаментов. Соединения или композиции согласно настоящему изобретению модулируют перенос меланосом, создавая помехи для любого из биологических процессов, которые приводят к переносу меланосом из околоядерной области к периферии меланоцита и в смежные кератиноциты. Схематическая диаграмма синтеза меланина, транспорта меланина и апоптоза меланоцитов приведена на фиг. 1В.

В одном аспекте этого варианта реализации соединение, вырабатываемое дрожжами *Malassezia*, имеет структуру формулы (I)

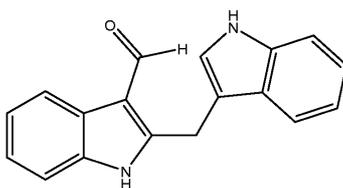


(I)

В другом аспекте этого варианта реализации соединения является химическим аналогом малассезина.

Дополнительный вариант реализации настоящего изобретения относится к соединению для модуляции биогенеза меланосом. Соединение представляет собой химический аналог соединения, вырабатываемого дрожжами *Malassezia*, или его кристаллическую форму, гидрат или косметически или фармацевтически приемлемую соль.

В одном аспекте этого варианта реализации соединения, вырабатываемое дрожжами *Malassezia*, имеет структуру формулы (I)

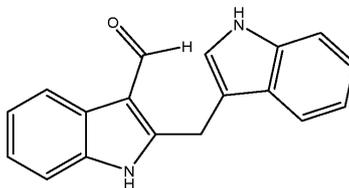


(I)

В другом аспекте этого варианта реализации соединения является химическим аналогом малассезина.

Другой вариант реализации настоящего изобретения относится к соединению для модуляции переноса меланосом. Соединение представляет собой химический аналог соединения, вырабатываемого дрожжами *Malassezia*, или его кристаллическую форму, гидрат или косметически или фармацевтически приемлемую соль.

В одном аспекте этого варианта реализации соединения, вырабатываемое дрожжами *Malassezia*, имеет структуру формулы (I):



(I)

В другом аспекте этого варианта реализации соединения является химическим аналогом малассезина.

Дополнительный вариант реализации настоящего изобретения относится к композиции. Композиция содержит дрожжи *Malassezia* и косметически или фармацевтически приемлемый наполнитель, разбавитель или носитель.

Дополнительный вариант реализации настоящего изобретения относится к композиции. Композиция содержит соединение, выделенное или поддающееся выделению из дрожжей *Malassezia*, и косметически или фармацевтически приемлемый наполнитель, разбавитель или носитель.

Соединение, выделенное из дрожжей *Malassezia*, согласно настоящему изобретению обязательно находится перед выделением в дрожжах *Malassezia* или вырабатывается дрожжами *Malassezia*. Следовательно, соединение, выделенное из дрожжей *Malassezia*, получено из настоящих дрожжевых клеток. Специалистам в данной области известны стандартные протоколы экстрагирования соединений из клеточного материала.

Соединение, которое может быть выделено из дрожжей *Malassezia*, не обязательно должно быть получено из настоящих дрожжевых клеток. Вместо этого можно применять реакции синтеза, чтобы создать соединения, вырабатываемые в дрожжах, без привлечения настоящих дрожжевых клеток. Реакции органического синтеза хорошо известны специалистам в данной области и могут быть использованы в этой связи.

Другой вариант реализации настоящего изобретения относится к композиции. Композиция содержит любое из описанных в данном документе соединений, включая аналоги, и косметически или фармацевтически приемлемый наполнитель, разбавитель или носитель.

Дополнительный вариант реализации настоящего изобретения относится к способу осветления ко-

жи у субъекта. Способ включает приведение субъекта в контакт с любым из соединений или любой из композиций, описанных в данном документе.

В контексте данного документа термин "приведение в контакт" и его грамматические вариации относятся к приведению двух или более материалов в достаточную близость так, чтобы они могли взаимодействовать. Таким образом, исключительно в иллюстративных целях, соединение согласно настоящему изобретению может контактировать с меланоцитом, например, взаимодействуя с рецептором на поверхности меланоцита. Аналогично, композиция согласно настоящему изобретению может контактировать с меланоцитом, например, при непосредственном применении к коже субъекта.

В контексте данного документа "субъект" обозначает клетку, ткань, организм млекопитающего или популяции млекопитающих. Субъекты согласно настоящему изобретению предпочтительно представляют собой людей, включая человеческие клетки, ткани и человеческих существ, но в ином случае включают приматов, сельскохозяйственных животных, домашних животных, лабораторных животных и т.д. Некоторые примеры сельскохозяйственных животных включают коров, свиней, лошадей, коз и т.д. Некоторые примеры домашних животных включают собак, кошек и т.д. Некоторые примеры лабораторных животных включают приматов, крыс, мышей, кроликов, морских свинок и т.д.

Дополнительный вариант реализации настоящего изобретения относится к способу индукции апоптоза меланоцитов у субъекта. Способ включает приведение субъекта в контакт с любым из соединений или любой из композиций, описанных в данном документе.

Другой вариант реализации настоящего изобретения относится к способу модуляции активности меланоцитов у субъекта. Способ включает приведение субъекта в контакт с любым из соединений или любой из композиций, описанных в данном документе.

Дополнительный вариант реализации настоящего изобретения относится к способу агонизации арил-гидрокарбонового рецептора (AhR). Способ включает приведение субъекта в контакт с любым из соединений или любой из композиций, описанных в данном документе.

Дополнительный вариант реализации настоящего изобретения относится к способу снижения гиперпигментации, вызванной гиперпигментационным расстройством, у нуждающегося в этом субъекта. Способ включает приведение субъекта в контакт с любым из соединений или любой из композиций, описанных в данном документе.

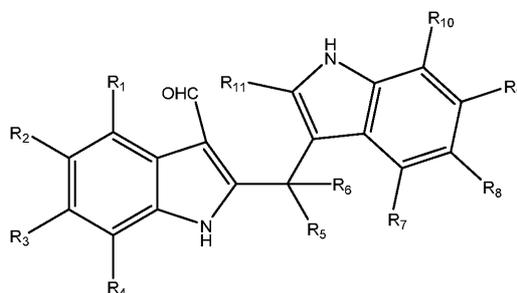
В контексте данного документа субъект, "нуждающийся" в снижении гиперпигментации, вызванной гиперпигментационным расстройством, включает субъектов с реальной или субъективной необходимостью в улучшении.

Другой вариант реализации настоящего изобретения относится к способу модуляции выработки меланина у субъекта. Способ включает приведение субъекта в контакт с любым из соединений или любой из композиций, описанных в данном документе.

Дополнительный вариант реализации настоящего изобретения относится к способу модуляции биогенеза меланосом у субъекта. Способ включает приведение субъекта в контакт с любым из соединений или любой из композиций, описанных в данном документе.

Дополнительный вариант реализации настоящего изобретения относится к способу модуляции переноса меланосом у субъекта. Способ включает приведение субъекта в контакт с любым из соединений или любой из композиций, описанных в данном документе.

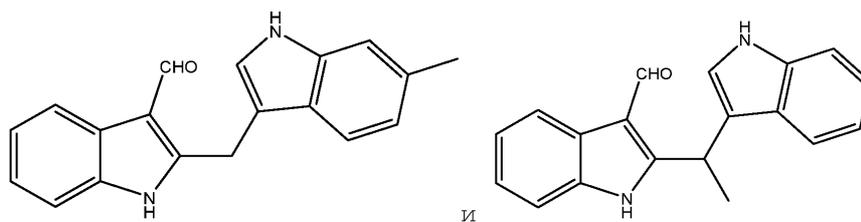
Другой вариант реализации настоящего изобретения относится к соединению. Соединение имеет структуру формулы (II)



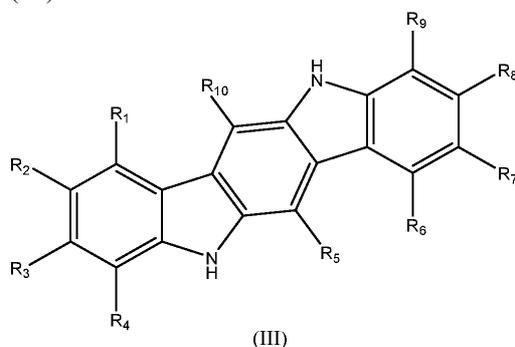
(II)

где R_1 , R_2 , R_3 , R_4 , R_5 , R_6 , R_7 , R_8 , R_9 , R_{10} и R_{11} независимо выбраны из группы, состоящей из водорода и метила, и по меньшей мере один из R_1 , R_2 , R_3 , R_4 , R_5 , R_6 , R_7 , R_8 , R_9 , R_{10} и R_{11} представляет собой метил или его кристаллическую форму, гидрат или косметически или фармацевтически приемлемую соль.

В одном аспекте этого варианта реализации соединение выбрано из группы, состоящей из:

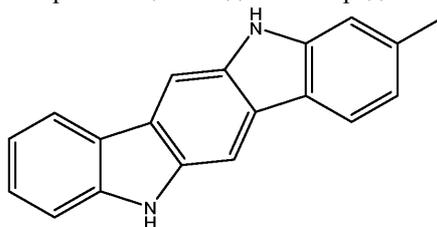


Дополнительный вариант реализации настоящего изобретения относится к соединению. Соединение имеет структуру формулы (III)

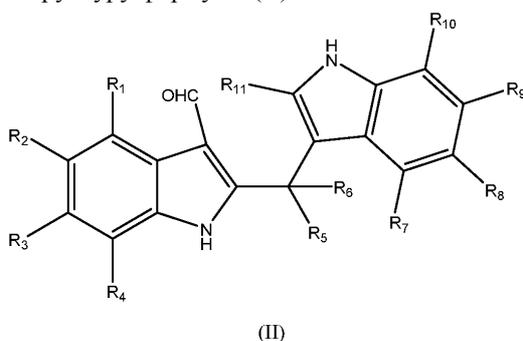


где $R_1, R_2, R_3, R_4, R_5, R_6, R_7, R_8, R_9$ и R_{10} независимо выбраны из группы, состоящей из водорода и метила, и по меньшей мере один из $R_1, R_2, R_3, R_4, R_5, R_6, R_7, R_8, R_9$ и R_{10} представляет собой метил или его кристаллическую форму, гидрат или косметически или фармацевтически приемлемую соль.

В одном аспекте этого варианта реализации соединение представляет собой



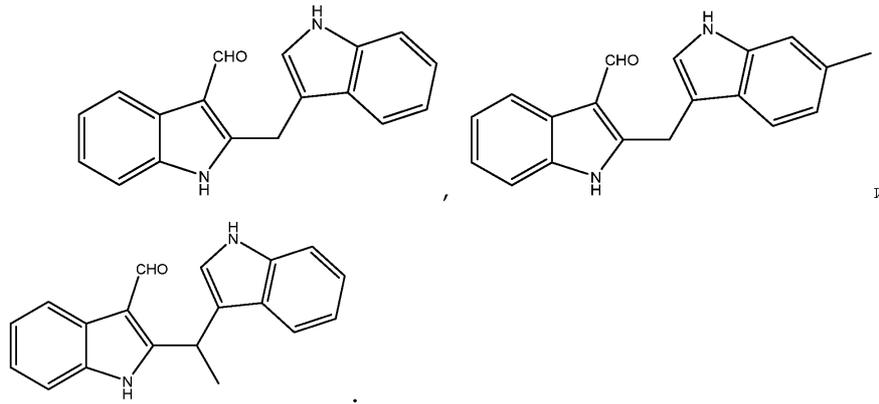
Дополнительный вариант реализации настоящего изобретения относится к соединению для осветления кожи. Соединение имеет структуру формулы (II):



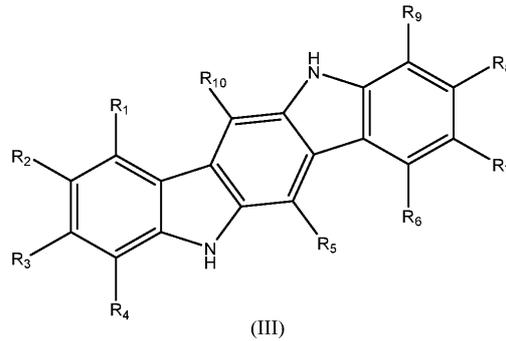
где $R_1, R_2, R_3, R_4, R_5, R_6, R_7, R_8, R_9, R_{10}$ и R_{11} независимо выбраны из группы, состоящей из водорода и метила;

или представляют собой их кристаллическую форму, гидрат или косметически или фармацевтически приемлемую соль.

В одном аспекте этого варианта реализации соединение выбрано из группы, состоящей из:



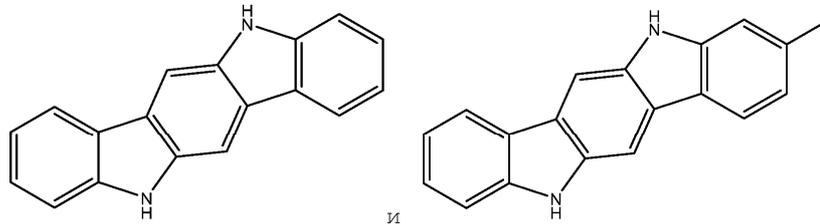
Другой вариант реализации настоящего изобретения относится к соединению для осветления кожи. Соединение имеет структуру формулы (III)



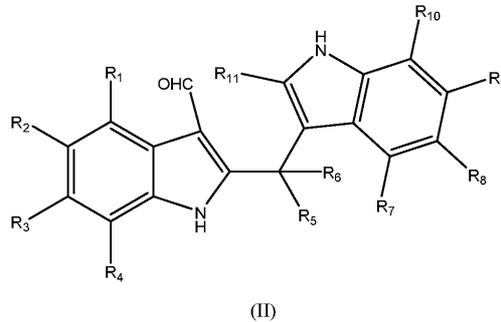
где $R_1, R_2, R_3, R_4, R_5, R_6, R_7, R_8, R_9$ и R_{10} независимо выбраны из группы, состоящей из водорода и метила;

или представляют собой их кристаллическую форму, гидрат или косметически или фармацевтически приемлемую соль.

В одном аспекте этого варианта реализации соединение выбрано из группы, состоящей из:



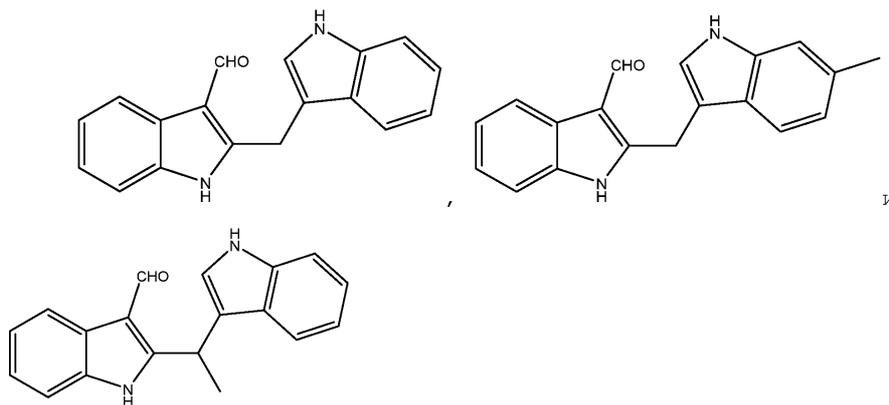
Дополнительный вариант реализации настоящего изобретения относится к соединению для индукции апоптоза меланоцитов. Соединение имеет структуру формулы (II)



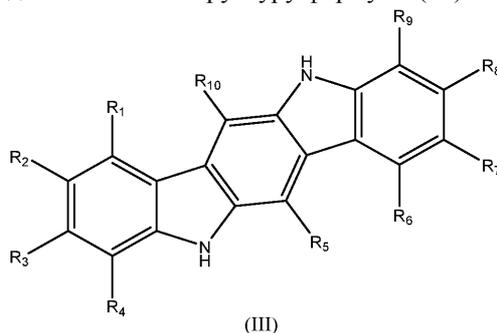
где $R_1, R_2, R_3, R_4, R_5, R_6, R_7, R_8, R_9, R_{10}$ и R_{11} независимо выбраны из группы, состоящей из водорода и метила;

или представляют собой их кристаллическую форму, гидрат или косметически или фармацевтически приемлемую соль.

В одном аспекте этого варианта реализации соединение выбрано из группы, состоящей из:



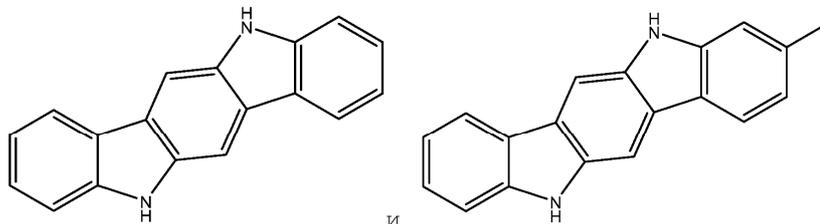
Дополнительный вариант реализации настоящего изобретения относится к соединению для индукции апоптоза меланоцитов. Соединение имеет структуру формулы (III)



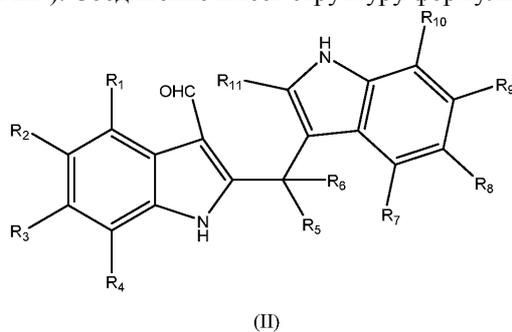
где $R_1, R_2, R_3, R_4, R_5, R_6, R_7, R_8, R_9$ и R_{10} независимо выбраны из группы, состоящей из водорода и метила;

или представляют собой их кристаллическую форму, гидрат или косметически или фармацевтически приемлемую соль.

В одном аспекте этого варианта реализации соединение выбрано из группы, состоящей из:



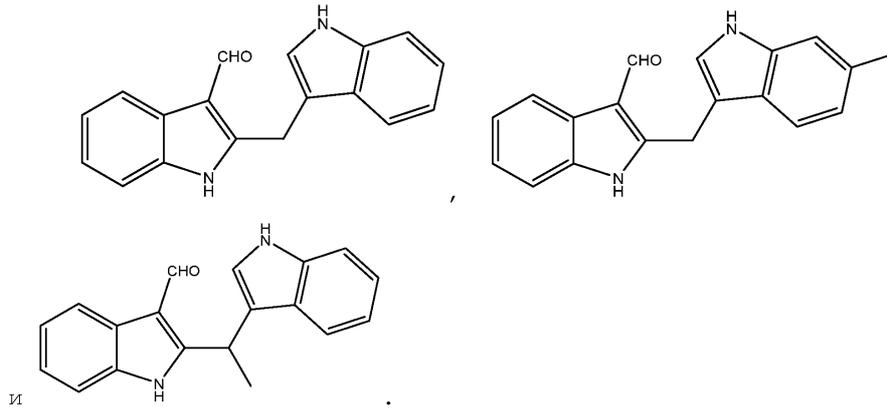
Другой вариант реализации настоящего изобретения относится к соединению для агонизации арил-гидрокарбонового рецептора (AhR). Соединение имеет структуру формулы (II)



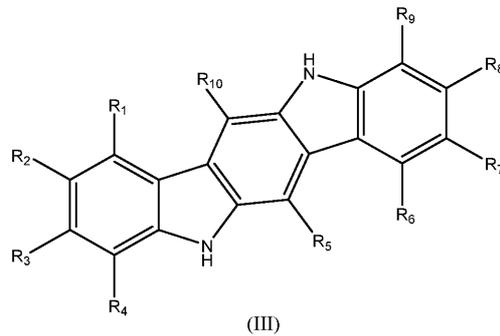
где $R_1, R_2, R_3, R_4, R_5, R_6, R_7, R_8, R_9, R_{10}$ и R_{11} независимо выбраны из группы, состоящей из водорода и метила;

или представляют собой их кристаллическую форму, гидрат или косметически или фармацевтически приемлемую соль.

В одном аспекте этого варианта реализации соединение выбрано из группы, состоящей из:



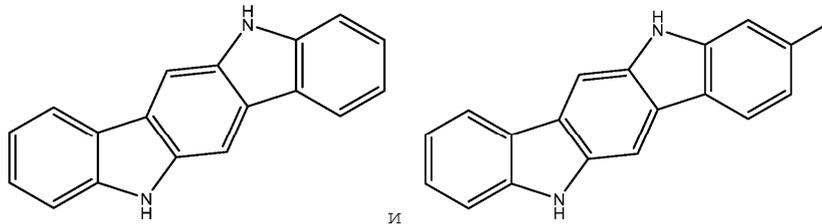
Дополнительный вариант реализации настоящего изобретения относится к соединению для агонизации арил-гидрокарбонового рецептора (AhR). Соединение имеет структуру формулы (III)



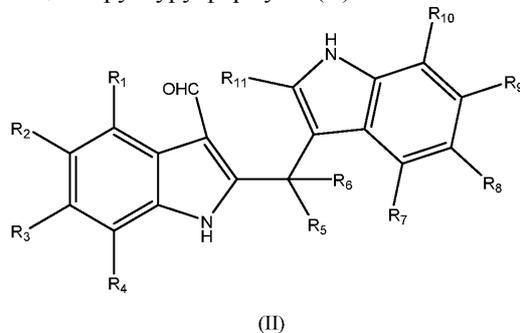
где $R_1, R_2, R_3, R_4, R_5, R_6, R_7, R_8, R_9$ и R_{10} независимо выбраны из группы, состоящей из водорода и метила;

или представляют собой их кристаллическую форму, гидрат или косметически или фармацевтически приемлемую соль.

В одном аспекте этого варианта реализации соединения выбрано из группы, состоящей из:



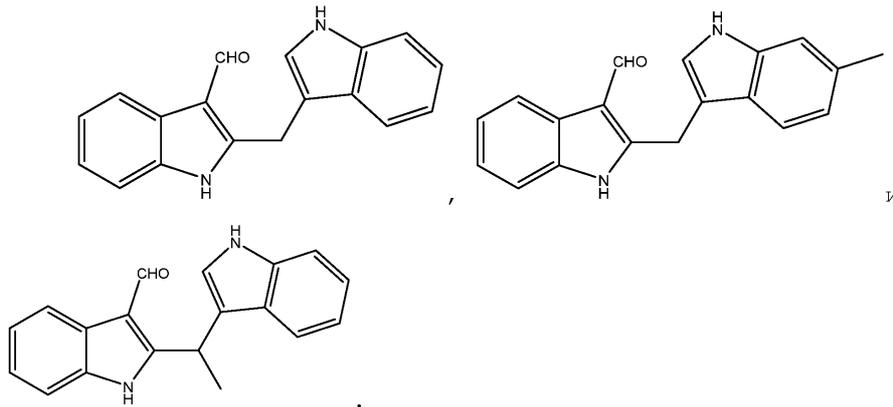
Дополнительный вариант реализации настоящего изобретения относится к композиции. Композиция содержит соединение, имеющее структуру формулы (II)



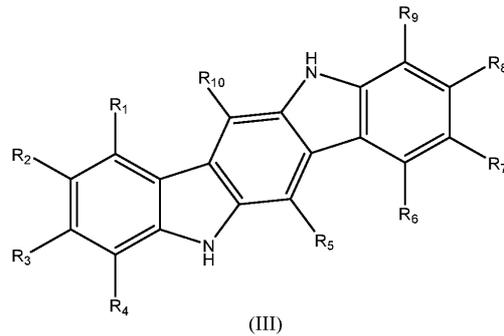
где $R_1, R_2, R_3, R_4, R_5, R_6, R_7, R_8, R_9, R_{10}$ и R_{11} независимо выбраны из группы, состоящей из водорода и метила;

или представляющее ее кристаллическую форму, гидрат или косметически или фармацевтически приемлемую соль, и косметически или фармацевтически приемлемый наполнитель, разбавитель или носитель.

В одном аспекте этого варианта реализации соединения выбрано из группы, состоящей из:



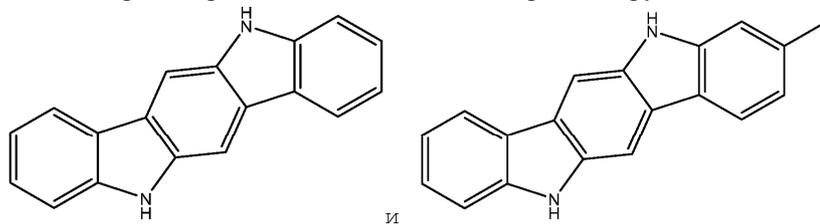
Другой вариант реализации настоящего изобретения относится к композиции. Композиция содержит соединение, имеющее структуру формулы (III)



где $R_1, R_2, R_3, R_4, R_5, R_6, R_7, R_8, R_9$ и R_{10} независимо выбраны из группы, состоящей из водорода и метила;

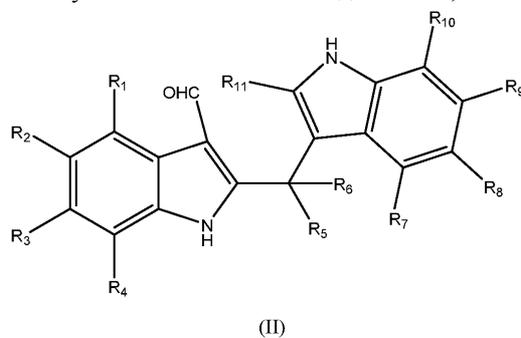
или представляющее ее кристаллическую форму, гидрат или косметически или фармацевтически приемлемую соль, и косметически или фармацевтически приемлемый наполнитель, разбавитель или носитель.

В одном аспекте этого варианта реализации соединение выбрано из группы, состоящей из:



Дополнительный вариант реализации настоящего изобретения относится к способу осветления кожи у субъекта.

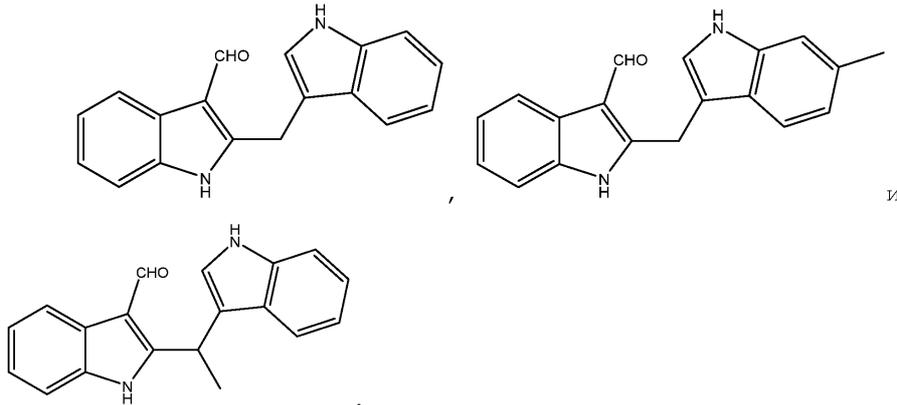
Способ включает приведение субъекта в контакт с соединением, имеющим структуру формулы (II)



где $R_1, R_2, R_3, R_4, R_5, R_6, R_7, R_8, R_9, R_{10}$ и R_{11} независимо выбраны из группы, состоящей из водорода и метила;

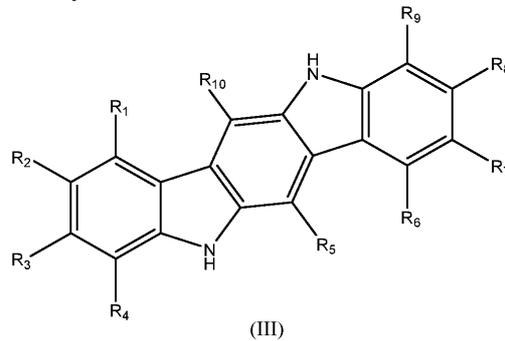
или представляют собой их кристаллическую форму, гидрат или косметически или фармацевтически приемлемую соль.

В одном аспекте этого варианта реализации соединение выбрано из группы, состоящей из:



Дополнительный вариант реализации настоящего изобретения относится к способу осветления кожи у субъекта.

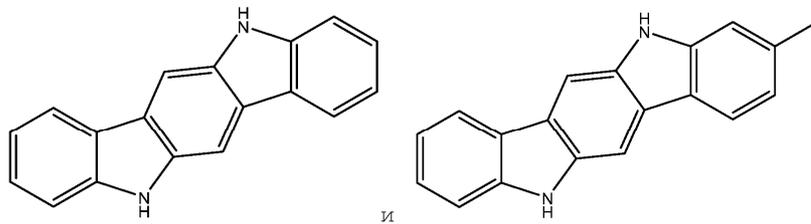
Способ включает приведение субъекта в контакт с соединением, имеющим структуру формулы (III)



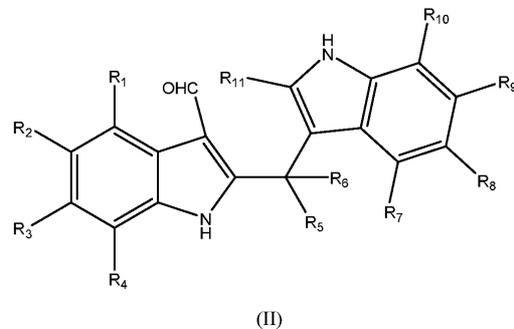
где $R_1, R_2, R_3, R_4, R_5, R_6, R_7, R_8, R_9$ и R_{10} независимо выбраны из группы, состоящей из водорода и метила;

или представляют собой их кристаллическую форму, гидрат или косметически или фармацевтически приемлемую соль.

В одном аспекте этого варианта реализации соединение выбрано из группы, состоящей из:



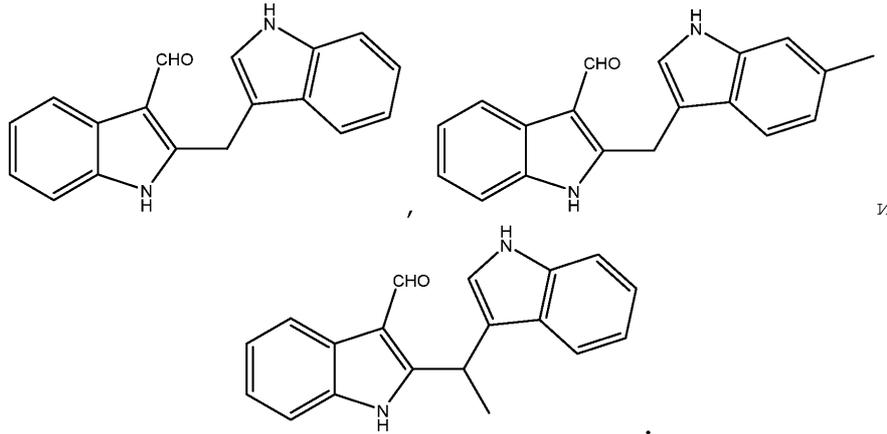
Другой вариант реализации настоящего изобретения относится к способу индукции апоптоза меланоцитов у субъекта. Способ включает приведение субъекта в контакт с соединением, имеющим структуру формулы (II)



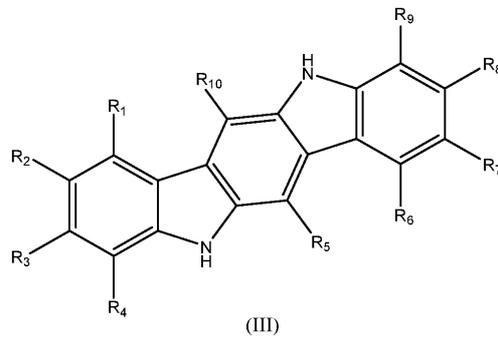
где $R_1, R_2, R_3, R_4, R_5, R_6, R_7, R_8, R_9, R_{10}$ и R_{11} независимо выбраны из группы, состоящей из водорода и метила;

или представляют собой их кристаллическую форму, гидрат или косметически или фармацевтически приемлемую соль.

В одном аспекте этого варианта реализации соединение выбрано из группы, состоящей из:



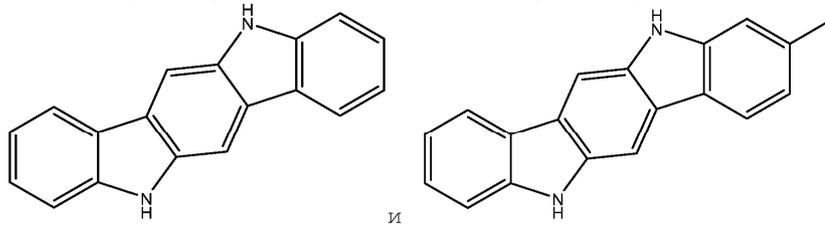
Дополнительный вариант реализации настоящего изобретения относится к способу индукции апоптоза меланоцитов у субъекта. Способ включает приведение субъекта в контакт с соединением, имеющим структуру формулы (III)



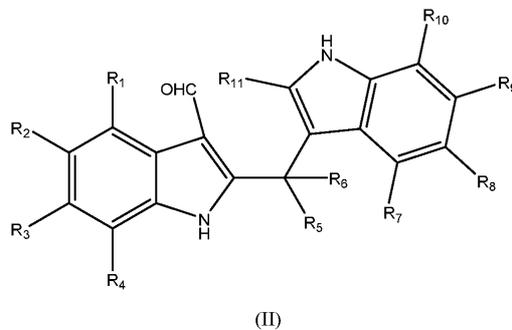
где $R_1, R_2, R_3, R_4, R_5, R_6, R_7, R_8, R_9$ и R_{10} независимо выбраны из группы, состоящей из водорода и метила;

или представляют собой их кристаллическую форму, гидрат или косметически или фармацевтически приемлемую соль.

В одном аспекте этого варианта реализации соединение выбрано из группы, состоящей из:



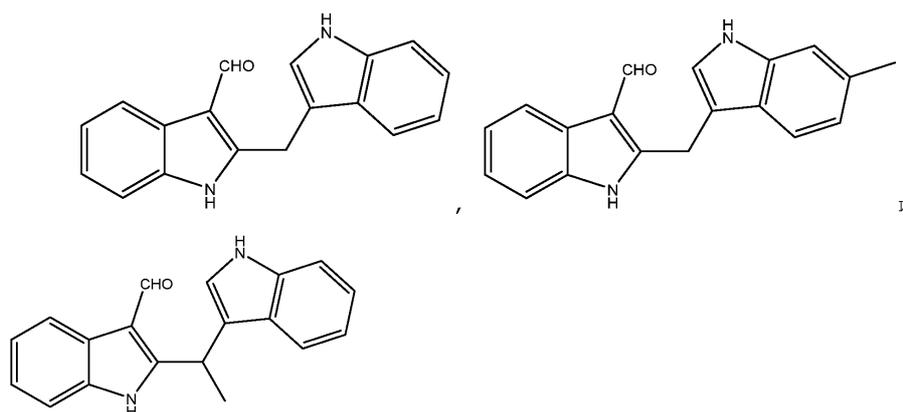
Дополнительный вариант реализации настоящего изобретения относится к способу агонизации арил-гидрокарбонowego рецептора (AhR) у субъекта. Способ включает приведение субъекта в контакт с соединением, имеющим структуру формулы (II)



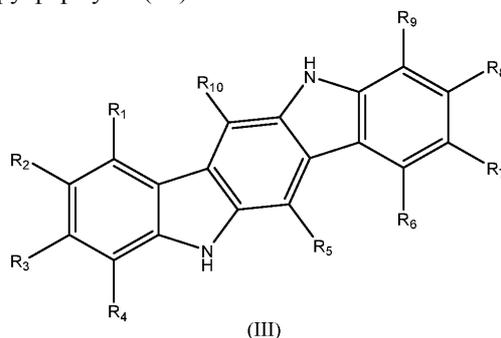
где $R_1, R_2, R_3, R_4, R_5, R_6, R_7, R_8, R_9, R_{10}$ и R_{11} независимо выбраны из группы, состоящей из водорода и метила;

или представляют собой их кристаллическую форму, гидрат или косметически или фармацевтически приемлемую соль.

В одном аспекте этого варианта реализации соединение выбрано из группы, состоящей из:



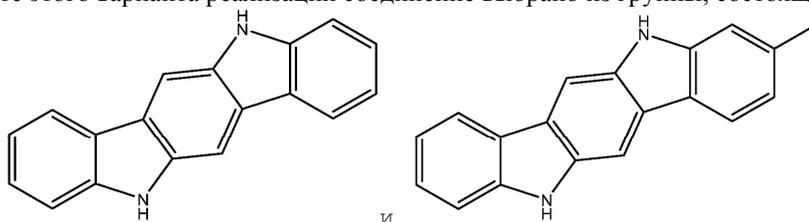
Другой вариант реализации настоящего изобретения относится к способу агонизации арил-гидрокарбонowego рецептора (AhR) у субъекта. Способ включает приведение субъекта в контакт с соединением, имеющим структуру формулы (III)



где $R_1, R_2, R_3, R_4, R_5, R_6, R_7, R_8, R_9$ и R_{10} независимо выбраны из группы, состоящей из водорода и метила;

или представляют собой их кристаллическую форму, гидрат или косметически или фармацевтически приемлемую соль.

В одном аспекте этого варианта реализации соединение выбрано из группы, состоящей из:



В контексте данного документа термин "композиция" обозначает вещество, содержащее соединение согласно настоящему изобретению, а также вещество, которое получено, напрямую или косвенно, из комбинаций соединения согласно настоящему изобретению с другими ингредиентами. Композиции согласно настоящему изобретению можно использовать, например, в качестве *in vitro* или *in vivo* реагентов для исследований. Композиции согласно настоящему изобретению также можно применять непосредственно к коже субъекта-человека или отличного от человека субъекта для оказания косметического действия.

Композиции согласно настоящему изобретению можно вводить любым необходимым и эффективным путем: для перорального приема внутрь или для парентерального или другого введения любым подходящим путем, таким как внутрибрюшинный, подкожный, местный, внутрикожный, ингаляционный, внутрилегочный, ректальный, вагинальный, подъязычный, внутримышечный, внутривенный, внутриартериальный, интратекальный или внутрилимфатический. Кроме того, композиции согласно настоящему изобретению можно вводить в сочетании с другими композициями. В случае необходимости, композиции согласно настоящему изобретению могут быть инкапсулированы или каким-либо другим образом защищены от желудочного или других соков.

Композиции согласно изобретению содержат один или более активных ингредиентов в смеси с одним или более косметически или фармацевтически приемлемыми носителями и, необязательно, одним или более другими соединениями, ингредиентами и/или материалами. Вне зависимости от выбранного пути введения соединения и композиции согласно настоящему изобретению готовят в косметически или фармацевтически приемлемых дозированных формах традиционными способами, известными специали-

стам в данной области.

Косметически или фармацевтически приемлемые наполнители, разбавители и носители хорошо известны в данной области и включают материалы, подходящие для контакта с тканями людей и отличных от людей существ без проявлений излишней токсичности, несовместимости, нестабильности, раздражения, аллергической реакции и т.д. Косметически или фармацевтически приемлемые наполнители, разбавители и носители включают любое нетоксичное вещество, традиционно используемое, например, для местного, перорального, брюшинного или подкожного введения косметических или фармацевтических средств, в котором соединения и композиции согласно настоящему изобретению останутся стабильными и биодоступными при применении, приеме внутрь, инъекции или каком-либо другом введении субъекту-человеку или отличному от человека субъекту. Косметически или фармацевтически приемлемые носители, подходящие для местного применения, известны специалистам в данной области и включают косметически или фармацевтически приемлемые жидкости, кремы, масла, лосьоны, мази, гели или твердые вещества, такие как традиционные косметические ночные кремы, кремы-основы, лосьоны для загара, солнцезащитные средства, лосьоны для рук, макияж и основы под макияж, маски и т.д. Носители, подходящие для выбранной дозированной формы и предполагаемого пути введения, хорошо известны в данной области, а специалист может определить приемлемые носители для выбранной дозированной формы и способа введения.

Композиции согласно настоящему изобретению могут содержать другие ингредиенты, традиционные в косметологии, включая отдушки, эстроген, витамины А, С и Е, альфа-гидрокси- и альфа-кетокислоты, такие как пировиноградная, молочная или гликолевая кислоты, ланолин, вазелин, алоэ вера, метил- или пропилопарабен, пигменты и т.д. Неограничивающие варианты косметически или фармацевтически приемлемых наполнителей, разбавителей и носителей согласно настоящему изобретению включают сахара (например, лактозу, сахарозу, маннит и сорбит), крахмалы, препараты целлюлозы, фосфаты кальция (например, дикальций фосфат, трикальций фосфат и вторичный кислый фосфат кальция), цитрат натрия, воду, водные растворы (например, солевой раствор, инъекцию хлорида натрия, инъекцию Рингера, инъекцию декстрозы, инъекцию декстрозы и хлорида натрия, лактатную инъекцию Рингера), спирты (например, этиловый спирт, пропиловый спирт и бензиловый спирт), полиолы (например, глицерин, пропиленгликоль и полиэтиленгликоль), органические сложные эфиры (например, этилолеат и триглицериды), биоразлагаемые полимеры (например, полилактид-полигликолид, сложные поли(ортоэфир) и поли(ангидриды)), эластомерные матрицы, липосомы, микросферы, масла (например, кукурузное, зародышей пшеницы, оливковое, касторовое, кунжутное, хлопковое и арахисовое), кокосовое масло, воск (например, воск для суппозитория), парафин, силикон, тальк, силикат и т.д.

Композиции согласно изобретению могут, необязательно, содержать дополнительные ингредиенты и/или материалы, обычно используемые в косметических композициях. Эти ингредиенты и материалы хорошо известны в данной области и включают, например, (1) филлеры или экстендеры, такие как крахмалы, лактоза, сахароза, глюкоза, маннит и кремниевая кислота; (2) связующие вещества, такие как карбоксиметилцеллюлоза, альгинаты, желатин, поливинилпирролидон, гидроксипропилметилцеллюлоза, сахароза и аравийская камедь; (3) увлажнители, такие как глицерин; (4) разрыхлители, такие как агар-агар, карбонат кальция, картофельный или тапиоковый крахмал, альгиновая кислота, некоторые силикаты, натрия крахмалгликолят, перекрестно-сшитая карбоксиметилцеллюлоза натрия и карбонат натрия; (5) замедлители схватывания растворов, такие как парафин; (6) ускорители всасывания, такие как четвертичные аммониевые соединения; (7) смачивающие агенты, такие как цетиловый спирт и глицерина моностеарат; (8) абсорбенты, такие как каолин и бентонитовая глина; (9) лубриканты, такие как тальк, стеарат кальция, стеарат магния, твердые полиэтиленгликоли и лаурилсульфат натрия; (10) суспендирующие агенты, такие как этоксилированные изостеариловые спирты, полиоксиэтиленовый сорбит и сложные эфиры сорбитана, микрокристаллическая целлюлоза, метагидроксид алюминия, бентонин, агар-агар и трагакант; (11) буферные агенты; (12) вспомогательные вещества, такие как лактоза, молочные сахара, полиэтиленгликоли, животные и растительные жиры, масла, воски, парафины, кокосовое масло, крахмалы, трагакант, производные целлюлозы, полиэтиленгликоль, силиконы, бентониты, кремниевая кислота, тальк, салицилат, оксид цинка, гидроксид алюминия, силикаты кальция и полиамидный порошок; (13) инертные разбавители, такие как вода или другие растворители; (14) консерванты; (15) поверхностно-активные агенты; (16) диспергирующие агенты; (17) агенты, регулирующие высвобождение или замедляющие всасывание, такие как гидроксипропилметилцеллюлоза, другие полимерные матрицы, биоразлагаемые полимеры, липосомы, микросферы, моностеарат алюминия, желатин и воски; (18) затумнители; (19) адьюванты; (20) смачивающие агенты; (21) эмульсифицирующие и суспендирующие агенты; (22), солибилизирующие агенты и эмульсификаторы, такие как этиловый спирт, изопропиловый спирт, этилкарбонат, этилацетат, бензиловый спирт, бензилбензоат, пропиленгликоль, 1,3-бутиленгликоль, масла (в частности, хлопковое, арахисовое, кукурузное, масло зародышей пшеницы, оливковое, касторовое и кунжутное масла), глицерин, тетрагидрофуриловый спирт, полиэтиленгликоли и сложные эфиры жирных кислот сорбита; (23) пропелленты, такие как хлорфторуглеродороды и летучие незамещенные углеводороды, такие как бутан и пропан; (24) антиоксиданты; (25) агенты, придающие составу изотоничность с кровью предполагаемого реципиента, такие как сахара и хлорид натрия; (26)

загустители; (27) материалы для покрытия, такие как лецитин; и (28) подсластители, ароматизаторы, красители, отдушки и консерванты. Каждый такой ингредиент или материал должен быть "приемлемым" в смысле совместимости с другими ингредиентами состава и не нести вреда для субъекта. Ингредиенты и материалы, подходящие для выбранной дозированной формы и предполагаемого пути введения, хорошо известны в данной области, а специалист может определить приемлемые ингредиенты и материалы для выбранной дозированной формы и способа введения.

Композиции согласно настоящему изобретению, подходящие для перорального введения, могут иметь форму капсул, саше, пилюль, таблеток, порошков, гранул, раствора или суспензии в водной или не водной жидкости, эмульсии типа "масло в воде" или "вода в масле", эликсира или сиропа, пастилки, болюса, электуария или пасты. Эти составы можно готовить известными в данной области способами, например, с помощью традиционных процессов предварительного покрытия, смешивания, грануляции или лиофилизации.

Твердые дозированные формы для перорального введения (капсулы, таблетки, пилюли, драже, порошки, гранулы и т.д.) можно готовить, например, путем смешивания активного(ых) ингредиента(ов) с одним или более косметически или фармацевтически активными носителями и, необязательно, одним или более филлерами, экстендерами, связующими веществами, увлажнителями, разрыхлителями, агентами, замедляющими схватывание раствора, усилителями всасывания, смачивающими агентами, абсорбентами, лубрикантами и/или красителями. Твердые композиции аналогичного типа можно применять в качестве филлеров в мягких и наполненных твердым веществом желатиновых капсулах, используя подходящее вспомогательное вещество. Таблетки можно получать путем прессования или формовки, необязательно, с одним или более вспомогательными ингредиентами. Прессованные таблетки можно готовить, используя подходящее связующее вещество, лубрикант, инертный разбавитель, консервант, разрыхлитель, поверхностно-активный или диспергирующий агент. Формованные таблетки можно получать с помощью формовки на подходящей машине. Таблетки и другие твердые дозированные формы, такие как капсулы, пилюли и гранулы, необязательно, могут иметь линию разлома или быть приготовлены с покрытием и оболочкой, таким как кишечнорастворимое покрытие и другие покрытия, хорошо известные в области изготовления косметики. Также их можно готовить так, чтобы обеспечить медленное или контролируемое высвобождение содержащегося в них активного ингредиента. Их можно стерилизовать, например, посредством фильтрации через задерживающий бактерии фильтр. Эти композиции также могут необязательно содержать замутнители и могут относиться к такому типу композиции, в которой высвобождается только активный ингредиент или, предпочтительно, высвобождение происходит в определенной части желудочно-кишечного тракта, необязательно, с замедлением. Активный ингредиент также может находиться в микроинкапсулированной форме.

Жидкие дозированные формы для перорального введения включают косметически или фармацевтически приемлемые эмульсии, микроэмульсии, растворы, суспензии, сиропы и эликсиры. Жидкие дозированные формы могут содержать подходящие инертные разбавители, обычно применяемые в данной области. Кроме инертных разбавителей пероральные композиции также могут содержать адьюванты, такие как смачивающие агенты, эмульсифицирующие и суспендирующие агенты, подсластители, ароматизаторы, красители, отдушки и консерванты. Суспензии могут содержать суспендирующие агенты.

Композиции согласно настоящему изобретению для ректального или вагинального введения могут быть представлены в виде суппозитория, который может быть приготовлен путем смешивания одного или более активных ингредиентов с одним или более подходящими нераздражающими носителями, которые являются твердыми при комнатной температуре, но жидкими при температуре тела и, следовательно, растают в ректальной или вагинальной полости с высвобождением активного соединения. Композиции согласно настоящему изобретению, которые подходят для вагинального введения, также включают формы в виде пессариев, тампонов, кремов, гелей, паст, пен или спрея, содержащие такие косметически или фармацевтически приемлемые носители, являющиеся подходящими, как известно в данной области.

Дозированные формы для местного или трансдермального введения включают порошки, спреи, мази, пасты, кремы, лосьоны, гели, растворы, пластыри, капли, эмульсии, суспензии, аэрозоли и ингаляторы. В состав можно добавлять любые традиционные наполнители, вспомогательные вещества и, необязательно, дополнительные активные ингредиенты.

Предпочтительные вспомогательные вещества относятся к группе, содержащей консерванты, антиоксиданты, стабилизаторы, солубилизаторы, витамины, красители, ароматизаторы, пленкообразователи, загустители и увлажнители.

Растворы и эмульсии могут содержать традиционные наполнители, такие как растворители, солубилизаторы и эмульсификаторы, например, воду, этанол, изопропанол, этилкарбонат, этилацетат, бензиловый спирт, бензилбензоат, пропиленгликоль, 1,3-бутилгликоль, масла, в частности, хлопковое масло, арахисовое масло, кукурузное масло, оливковое масло, касторовое масло и кунжутное масло, глицериновые сложные эфиры жирных кислот, полиэтиленгликоли и сложные эфиры жирных кислот сорбита, или смеси этих веществ.

Эмульсии могут существовать в различных формах. Таким образом, они могут представлять собой, например, эмульсию или микроэмульсию типа "вода в масле" (В/М) или типа "масло в воде" (М/В), или

многокомпонентную эмульсию, например, типа "вода в масле в воде" (В/М/В).

Композиции в соответствии с изобретением также могут находиться в форме не содержащих эмульсию дисперсных препаратов. Например, они могут представлять собой гидродисперсии или эмульсии Пикеринга.

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

Пасты, мази, гели и кремы могут содержать традиционные наполнители, например, животные и растительные жиры, воски, парафины, крахмал, трагакант, производные целлюлозы, полиэтиленгликоли, силиконы, бентониты, кремниевую кислоту, тальк и оксид цинка, или смеси этих веществ.

Масла для лица и тела могут содержать традиционные наполнители, такие как синтетические масла, такие как сложные эфиры жирных кислот, жирные спирты, силиконовые масла, природные масла, такие как растительные масла и жирные растительные экстракты, парафиновые масла, ланолиновые масла, или смеси этих веществ.

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

Композиции согласно настоящему изобретению, подходящие для парентерального введения, содержат одно или более соединений в комбинации с одним или более косметически или фармацевтически приемлемыми стерильными изотоническими водными или неводными растворами, дисперсиями, суспензиями или эмульсиями, или стерильные порошки, которые перед применением можно восстанавливать в стерильных растворах или дисперсиях для инъекций, которые могут содержать подходящие антиоксиданты, буферы, растворенные вещества, которые придают составу изотоничность с кровью предполагаемого реципиента, или суспендирующие или загущающие агенты. Надлежащую текучесть можно поддерживать, например, путем применения материалов для покрытия, путем поддержания требуемого размера частиц в случае дисперсий и путем применения поверхностно-активных веществ. Эти композиции также могут содержать подходящие адъюванты, такие как смачивающие агенты, эмульсифицирующие агенты и диспергирующие агенты. Также может существовать необходимость включения изотонических агентов. Кроме того, пролонгированное всасывание инъекционной косметической формы может быть обеспечено включением агентов, которые замедляют всасывание.

В некоторых случаях, для продления действия необходимо замедлить всасывание при подкожной или внутримышечной инъекции. Это можно осуществить посредством применения жидкой суспензии кристаллического или аморфного материала, имеющего плохую растворимость в воде.

Тогда скорость всасывания активного агента/лекарства будет зависеть от скорости его растворения, которая, в свою очередь, может зависеть от размера кристалла и кристаллической формы. В альтернативном варианте замедленное всасывание парентерально вводимой композиции можно обеспечить посредством растворения или суспендирования активной композиции в масляном наполнителе. Инъекционные депо-формы можно получать путем создания микроинкапсулированных матриц активного ингредиента в биоразлагаемых полимерах. В зависимости от соотношения между активным ингредиентом и полимером и природы конкретного применяемого полимера, можно контролировать скорость высвобождения активного ингредиента. Депо-инъекционные составы также готовят путем включения лекарства в липосомы или микроэмульсии, которые совместимы с тканями организма. Инъекционные материалы можно стерилизовать, например, путем фильтрации через задерживающий бактерии фильтр.

Композиции согласно настоящему изобретению могут быть представлены в однодозовых или многодозовых герметичных контейнерах, например, ампулах и флаконах, и могут храниться в лиофилизированном состоянии, требующим только добавления стерильного водного носителя, например, воды для инъекций, непосредственно перед применением. Приготовленные для немедленного приема инъекционные растворы и суспензии можно готовить из стерильных порошков, гранул и таблеток описанного выше типа.

В настоящем изобретении термин "кристаллическая форма" означает наличие кристаллической структуры у соединения. Соединение может существовать в одной или более кристаллических формах, которые могут иметь разные структурные, физические, фармакологические или химические характеристики. Разные кристаллические формы можно получать с помощью вариаций в образовании центров кристаллизации, кинетике роста, агломерации и разрушении. Образование центров кристаллизации происходит при превышении энергетического барьера фазового перехода, таким образом, обеспечивая возможность образования частиц из перенасыщенного раствора. Рост кристалла представляет собой увеличение частиц кристалла, вызванное отложением химического соединения на существующей поверхности кристалла. Относительная скорость образования центров кристаллизации определяет распределение образующихся кристаллов по размеру.

Термодинамической движущей силой как для образования центров кристаллизации, так и для роста является перенасыщение, которое по определению является отклонением от термодинамического равно-

весия. Агломерация представляет собой процесс образования более крупных частиц вследствие слипания двух или более частиц (например, кристаллов) и образования более крупной кристаллической структуры.

В контексте данного документа термин "гидрат" обозначает твердую или полутвердую форму химического соединения, содержащую воду в молекулярном комплексе. Вода в общем случае присутствует в стехиометрическом количестве по отношению к химическому соединению.

В контексте данного документа "косметически или фармацевтически приемлемая соль" относится к производному описанных в данном документе соединений, при этом соединения модифицированы путем превращения их в кислые или основные соли. Примеры косметически или фармацевтически приемлемых солей включают, но не ограничиваются этим, соли минеральных или органических кислот основных остатков, таких как амины; щелочные или органические соли кислых остатков, таких как карбоновые кислоты; и т.д. Например, такие соли включают соли, полученные из аммиака, L-аргинина, бетаина, бене-тамина, бензатина, гидроксида кальция, холина, динола, диэтаноламина (2,2'-иминобис(этанол)), диэти-ламина, 2-(диэтиламино)-этанол, 2-аминоэтанол, этилендиамина, N-этилглюкамина, гидрабамина, 1H-имидазола, лизина, гидроксида магния, 4-(2-гидроксиэтил)-морфолина, пиперазина, гидроксида калия, 1-(2-гидроксиэтил)-пирролидина, гидроксида натрия, триэтаноламина (2,2',2"-нитрилотрис(этанол)), тро-метамин, гидроксида цинка, уксусной кислоты, 2,2-дихлоруксусной кислоты, адипиновой кислоты, аль-гиновой кислоты, аскорбиновой кислоты, L-аспарагиновой кислоты, бензенсульфоновой кислоты, бен-зойной кислоты, 2,5-дигидроксibenзойной кислоты, 4-ацетамидобензойной кислоты, (+)-камфорной ки-слоты, (+)-камфор-10-сульфоновой кислоты, угольной кислоты, коричной кислоты, лимонной кислоты, цикламовой кислоты, декановой кислоты, додецилсерной кислоты, этан-1,2-дисульфоновой кислоты, этансульфоновой кислоты, 2-гидроксиэтансульфоновой кислоты, этилендиамонотетрауксусной кислоты, муравьиной кислоты, фумаровой кислоты, галактаровой кислоты, гентизиновой кислоты, D-глюкогептоновой кислоты, D-глюконовой кислоты, D-глюкуроновой кислоты, глутаминовой кислоты, глутаминовой кислоты, глутаровой кислоты, 2-оксоглутаровой кислоты, глицерофосфорной кислоты, глицина, гликолевой кислоты, гексановой кислоты, гиппуровой кислоты, бромистоводородной кислоты, хлористоводородной кислоты, изомаляной кислоты, DL-молочной кислоты, лактобионовой кислоты, лауриновой кислоты, лизина, малеиновой кислоты, (-)-L-яблочной кислоты, малоновой кислоты, DL-миндальной кислоты, метансульфоновой кислоты, галактаровой кислоты, нафтаден-1,5-дисульфоновой кислоты, нафтаден-2-сульфоновой кислоты, 1-гидрокси-2-нафтойной кислоты, никотиновой кислоты, азотной кислоты, октановой кислоты, олеиновой кислоты, оротовой кислоты, щавелевой кислоты, паль-митиновой кислоты, палеиновой кислоты (эмбоновой кислоты), фосфорной кислоты, пропионовой ки-слоты, (-)-L-пироглутаминовой кислоты, салициловой кислоты, 4-аминосалициловой кислоты, себациновой кислоты, стеариновой кислоты, янтарной кислоты, серной кислоты, дубильной кислоты, (+)-L-винной кислоты, тиоциановой кислоты, p-толуолсульфоновой кислоты и ундециленовой кислоты. Дополни-тельные косметически или фармацевтически приемлемые соли могут образовываться с катионами металлов, таких как алюминий, кальций, литий, магний, калий, натрий, цинк и т.д.

Косметически или фармацевтически приемлемые соли согласно настоящему изобретению можно синтезировать из описанного в данном документе соединения, которое содержит основной или кислый компонент, традиционными химическими способами. В общем случае такие соли можно получать с по-мощью реакции форм этих соединений в виде основе свободных кислот или оснований с достаточным количеством соответствующего основания или кислоты в воде или органическом разбавителе, таком как эфир, этилацетат, этанол, изопропанол или ацетонитрил, или их смесь.

Подразумевается, что соединения и композиции согласно настоящему изобретению могут быть включены в косметические или фармацевтические композиции.

Используемая в данном документе терминология применяется только для описания конкретных ва-риантов и не подразумевает ограничения. Использование в данном описании и в прилагаемой формуле изобретения форм единственного числа включает ссылку на множественное число, если в контексте явно не указано иное.

В случае указания в данном документе числовых диапазонов, с той же степенью точности явным образом подразумевается и каждое промежуточное число в них. Например, для диапазона 6-9 подразу-меваются числа 7 и 8 в дополнение к 6 и 9, а для диапазона 6,0-7,0 явным образом подразумеваются чис-ла 6,0, 6,1, 6,2, 6,3, 6,4, 6,5, 6,6, 6,7, 6,8, 6,9 и 7,0.

Следующие примеры приведены, чтобы дополнительно проиллюстрировать способы согласно на-стоящему изобретению. Эти примеры являются исключительно иллюстративными и никоим образом не подразумевают ограничения объема изобретения.

Примеры

Пример 1. Материалы и методы.

Выделение соединений, вырабатываемых *Malassezia*.

Малассезин выделяют, используя, например, процедуры, описанные в Wille et al., 2001. Протокол кратко описан ниже.

Среда.

Среду, состоящую из Твин 80 (30 мл), циклогексимида (0,5 г), хлорамфеникола (0,05 г), агара (20 г) и объема воды, достаточного для 1000 мл смеси, стерилизуют и смешивают с 0,3% стерильно профильтрованным L-триптофаном в концентрации 0,3 г% при 50°C, 10 мл порции вливают в 10 см чашки Петри и доводят pH до 5,5 с помощью 0,1 М HCl.

Культивирование *Malassezia furfur* и выделение соединений, вырабатываемых *M. Furfur*.

Malassezia furfur наносят на описанную выше среду и инкубируют в течение 14 дней при 30°C. Содержание чашки Петри пюрируют и экстрагируют этилацетатом в течение 12 ч. Экстракт фильтруют через стекловату, выпаривают до сухости и растворяют в метаноле. Затем экстракт фракционируют на Sephadex LH-20 с метанолом в качестве элюента. Дополнительное разделение осуществляют с помощью препаративной тонкослойной хроматографии с применением толуола:этилформата:муравьиной кислоты (10:5:3). Основные зоны разделяют между водой и этилацетатом. Фракции анализируют в отношении представляющей интерес активности. Соединения из представляющих интерес фракций выделяют с помощью ВЭЖХ.

Синтез малассезина и химических аналогов малассезина.

Малассезин синтезируют в соответствии с протоколом, приведенным в Wille et al., 2001. Химические аналоги малассезина синтезируют в соответствии с новыми протоколами синтеза, а также описанными в Winston-McPherson, et al., 2014.

Протоколы скрининга.

Эффективные осветляющие кожу соединения оценивают, используя как протоколы скрининга, известные специалистам в данной области, так и новые методы скрининга. Например, малассезин и его химические аналоги оценивают с помощью анализа с тирозиназой, как описано выше. Используются и другие протоколы скрининга, включающие как *in vitro* клеточные, так и *in vivo* тканевые модели, включая анализ связывания арил-гидрокарбонового рецептора (AhR).

Биоанализ с тирозиназой.

Биоанализ с тирозиназой проводят, как описано в Wille et al., 2001. Вкратце, L-DOPA смешивают с ферментом тирозиназой. В течение 1 мин измеряют экстинкцию, что указывает на образование допахинона. Используя, например, описанные выше фракции, эти фракции растворяют в ДМСО и добавляют непосредственно в реакцию с тирозиназой, при этом чистый ДМСО служит контролем. Ингибиторную активность тирозиназы измеряют как снижение повышения экстинкции по сравнению с контролем.

Анализ связывания арил-гидрокарбонового рецептора.

Анализ связывания AhR проводят в соответствии с протоколом, описанным, например, в Song, et al., 2002. Вкратце, человеческие и мышьи AhR экспрессируют *in vitro*, используя, например, реакцию быстросопряженной системы лизата ретикулоцитов от TnT (Promega, Madison, WI). В исследованиях связывания лиганда рецептора используется скоростное осаждение на градиенте сахарозы, как описано в Karchner, et al., 1999.

Анализ EROD.

Соединения, композиции и составы согласно настоящему изобретению также оценивают, применяя анализ с этоксирезорифин-О-деэтилазой (EROD), известный специалистам в данной области. (Donato, et al., 1993; Whyte, et al., 2000; Wille et al., 2001).

Анализ апоптоза меланоцитов.

Кандидатные соединения оценивают в отношении индуцирующей апоптоз активности в меланоцитах. Меланоциты эпидермиса человека культивируют в среде 254, дополненной добавкой для роста человеческих меланоцитов (HMGS) (Thermo-Fisher Scientific, Waltham, MA), или базальной среде для дермальных клеток (ATCC, Manassas, VA). Дополнительные компоненты среды для роста человеческих меланоцитов могут включать, но не ограничиваются этим, инсулин (5 мкг/мл), аскорбиновую кислоту (50 мкг/мл), L-глутамин (6 мМ), эпинефрин (1,0 мкМ) и хлорид кальция (0,2 мМ). Культуры человеческих меланоцитов поддерживают при 37°C в 5% CO₂.

Кандидатные соединения разводят в ДМСО и смешивают непосредственно с культурами меланоцитов. Эквивалентные объемы чистого ДМСО используют в качестве контроля. Анализ цитотоксичности, известный специалистам в данной области, проводят в соответствии с инструкциями производителя. Варианты анализа цитотоксичности, которые применяются в настоящем изобретении, включают, но не ограничиваются этим, анализ цитотоксичности с зеленым красителем CellTox™, анализ с флуоресцентной каспазой Apo-ONE, анализ ApoTox-Glo™ и анализ с каспазой-Glo® (Promega, Madison, WI). Регистрацию флуоресценции проводят с помощью стандартного анализа FACS или микроскопического анализа, которые известны специалистам в данной области, включая описанные в Kramer, et al., 2005.

Используются дополнительные средства для оценки апоптоза, включая анализ FACS для аннексина V и Вестерн-блоттинг для экспрессии каспазы-9. Вестерн-блоттинг проводят в соответствии с методами, известными специалистам в данной области.

Анализ мышинных ксенотрансплантатов.

В соответствии с известными в данной области протоколами создают мышинные ксенотрансплантатные модели человеческой кожи. (Black, et al., 1985; Manning et al., 1973; Reed, et al., 1973; Plenat, et al., 1992; Scott et al., 1998; Otulakowski, et al., 1994). После приживания мышинные ксенотрансплантатные модели подвергают воздействию соединений согласно настоящему изобретению и наблюдают за изменениями в пигментации по сравнению с контролем. Изменения в пигментации кожи оценивают, используя разные шкалы пигментации, известные специалистам в данной области, включая, но не ограничиваясь этим, тест на определение типа кожи по Фицпатрику и шкалу гиперпигментации Тейлора. (Taylor, et al., 2005).

Анализ на людях.

Соединения, композиции и составы согласно настоящему изобретению применяют к людям, например, к человеческой коже, и сравнивают с контрольными веществами. Изменения в пигментации кожи оценивают, используя разные шкалы пигментации, известные специалистам в данной области, включая, но не ограничиваясь этим, тест на определение типа кожи по Фицпатрику и шкалу гиперпигментации Тейлора.

Пример 2.

Биохимическая цель малассезина и его аналогов.

Ожидается, что соединения и композиции согласно настоящему изобретению будут демонстрировать, например, ингибирование тирозиназы и активность агонистов AhR, сравнимую с малассезином. Ожидается, что соединения и композиции согласно настоящему изобретению будут демонстрировать, например, более эффективное ингибирование тирозиназы и более сильный агонизм AhR по сравнению с малассезином. Аналогично, ожидается, что некоторые соединения и композиции согласно настоящему изобретению будут менее эффективными ингибиторами тирозиназы и агонистами AhR по сравнению с малассезином. Такие соединения, композиции и составы могут иметь более предпочтительные профили токсичности по сравнению с более эффективными соединениями.

Пример 3.

In Vitro эффективность.

Ожидается, что соединения и композиции согласно настоящему изобретению будут индуцировать апоптоз меланоцитов и модулировать активность меланоцитов, выработку меланина, биогенез меланосом и/или перенос меланосом по меньшей мере так же эффективно, как и малассезин. Также предполагается, что определенные соединения и композиции согласно настоящему изобретению будут воздействовать на эти биологические процессы менее эффективно, чем малассезин. Такие соединения и композиции могут иметь более предпочтительные профили токсичности по сравнению с более эффективными соединениями.

Пример 4.

In Vivo эффективность.

Ожидается, что соединения и композиции согласно настоящему изобретению будут по меньшей мере такими же эффективными, как и малассезин, в отношении осветления кожи и снижения гиперпигментации, вызванной гиперпигментационными расстройствами. Дополнительно ожидается, что соединения и композиции согласно настоящему изобретению будут демонстрировать благоприятные фармакокинетические профили, например, в терминах времени полувыведения и всасывания. Некоторые соединения будут демонстрировать большее время полувыведения, тогда как другие будут демонстрировать меньшее время полувыведения. Аналогично, определенные соединения будут демонстрировать разные профили всасывания, когда для некоторых соединений требуется большее время для полного всасывания, а для других требуется меньшее время для полного всасывания.

Пример 5.

Синтез малассезина и производных малассезина.

Малассезин ("CV-8684") и его циклизированное производное индоло[3,2-b]карбазол ("CV-8685") синтезировали в соответствии со схемой, приведенной на фиг. 2А.

Синтез трет-бутил (2-йодофенил)карбамата, соединение 1.

В раствор 2-йодоанилина (25,0 г, 0,114 моль) в тетрагидрофуране (250 мл) при 0°C медленно добавляли LiHMDS (251,0 мл, 1 М в ТГФ, 0,251 моль), поддерживая внутреннюю температуру ниже 5°C в течение 40 мин. Через 30 мин перемешивания при 0°C медленно добавляли раствор ВОС-ангидрида (27,0 г, 0,125 моль) в ТГФ (50 мл), поддерживая внутреннюю температуру ниже 5°C в течение 40 мин. Реакционную смесь нагревали до температуры окружающей среды и перемешивали в течение 1 ч. Для погашения реакции добавляли насыщенный раствор NH₄Cl (250 мл). Органический слой отделяли и промывали водой (150 мл). Объединенный водный слой экстрагировали этилацетатом (2×150 мл) и разделяли слои. Слой этилацетата объединяли с исходным органическим слоем и концентрировали в условиях вакуума для получения коричневого масла. Неочищенный продукт очищали с помощью колоночной хроматогра-

фии (0-5% этилацетат/гексаны). Соединение 1 получали в виде светло-желтой жидкости (29,0 г, 80%).

Синтез соединения 2.

Йодид меди (0,95 г, 10 молярных процентов) и $\text{PdCl}_2(\text{PPh}_3)_4$ (1/75 г, 5 молярных процентов) добавляли в дегазированный раствор соединения 1 (16,0 г, 0,05 моль), пропаргилового метилового эфира (4,25 г, 0,06 моль) в триэтиламин (200 мл) при температуре окружающей среды. После перемешивания при температуре окружающей среды в течение 2 ч реакция была завершена (по данным ТЖХ с применением 10% этилацетата/гексанов). Реакционную смесь разводили этилацетатом (300 мл), промывали водой, насыщенным раствором NaCl и сушили над Na_2SO_4 . Растворитель фильтровали и концентрировали в условиях вакуума для получения коричневого масла. Неочищенный продукт очищали с помощью колоночной хроматографии (10% этилацетат/гексан). Соединение 2 получали в виде светло-желтой жидкости (13,0 г, 99%).

Синтез соединения 3.

В высушенную в духовом шкафу колбу добавляли PtCl_2 (0,26 г, 0,001 моль), Na_2CO_3 (1,6 г, 0,015 моль), индол (2,32 г, 0,02 моль) и соединение 2 (2,6 г, 0,01 моль) в диоксане (120 мл). Колбу дегазировали азотом, герметизировали и нагревали до 100°C в течение ночи. После этого реакция была завершена (по данным ТЖХ с применением 10% этилацетата/гексанов). Растворитель выпаривали при пониженном давлении. Реакционную смесь разводили этилацетатом (200 мл), промывали водой, насыщенным раствором NaCl и сушили над Na_2SO_4 . Растворитель фильтровали и концентрировали в условиях вакуума для получения коричневого масла.

Эту реакцию повторяли, используя соединение 2 (2,6 г, 0,01 моль) из другой партии. Неочищенные соединения из обеих партий объединяли и очищали с помощью колоночной хроматографии (10% этилацетат/гексан). Соединение 3 получали в виде светло-коричневого твердого вещества (3,8 г, 55%).

Синтез соединения 4.

Карбонат калия (4,6 г, 0,0329 моль) добавляли в раствор соединения 3 (3,8 г, 0,0109 моль) в смеси метанола (150 мл) и воды (50 мл) при температуре окружающей среды. Полученную в результате суспензию нагревали до рефлюкса в течение ночи. После этого реакция была завершена (по данным ТЖХ с применением 20% этилацетата/гексанов). Реакционную смесь охлаждали до температуры окружающей среды и концентрировали с растворителем в условиях вакуума. Остаток растворяли в этилацетате (200 мл) и промывали водой и соевым раствором, затем сушили (сульфат натрия), фильтровали, концентрировали с растворителем в условиях вакуума для получения коричневого твердого вещества. Неочищенное соединение очищали с помощью колоночной хроматографии (20% этилацетат/гексан). Соединение 4 получали в виде твердого вещества оранжевого цвета (2,2 г, 81%).

Синтез соединения малассезина (CV-8684).

В сухую 100 мл круглодонную колбу с двумя горловинами в атмосфере аргона при 0°C добавляли диметилформамид (20 мл). Медленно добавляли POCl_3 (0,75 г, 0,0048 моль), поддерживая внутреннюю температуру ниже 5°C в течение 10 мин. Через 30 мин перемешивания при 0°C медленно добавляли раствор соединения 4 (1,0 г, 0,004 моль) в диметилформамиде (5 мл), поддерживая внутреннюю температуру ниже 5°C в течение 10 мин. Полученную в результате смесь перемешивали при температуре окружающей среды в течение ночи. После этого реакция была завершена (по данным ТЖХ с применением 20% этилацетата/гексанов). Реакционную смесь вливали в насыщенный водный раствор бикарбоната натрия (150 мл) и перемешивали в течение 1 ч. Полученную в результате смесь экстрагировали этилацетатом (2×100 мл). Органические слои объединяли и промывали водой, насыщенным раствором NaCl и сушили над Na_2SO_4 . Растворитель фильтровали и концентрировали в условиях вакуума для получения коричневого твердого вещества. Неочищенный продукт очищали с помощью колоночной хроматографии (0-20% этилацетат/гексаны). Соединение малассезин (CV-8684) получали в виде светло-розового твердого вещества (0,82 г, 74%).

Очистка по ВЭЖХ: 97,8% (площадь%). ^1H -ЯМР, ^{13}C -спектр, соответствующий структуре. ИЭР-МС: Рассч. для $\text{C}_{18}\text{H}_{15}\text{N}_2\text{O}$ ($\text{M}+\text{H}$) $^+$: 275, полученное значение: 275,2.

Синтез соединения индоло[3,2-b]карбазола (CV-8685).

Концентрированную HCl (0,25 мл) добавляли в раствор малассезина (0,75 г) в тетрагидрофуране (120 мл) при температуре окружающей среды. Полученную в результате смесь нагревали до рефлюкса в течение ночи. После этого реакция была завершена (по данным ТЖХ с применением 40% этилацетата/гексанов). Реакционную смесь охлаждали до температуры окружающей среды и перемешивали в течение 1 ч. Фильтровали твердое вещество, промывали тетрагидрофураном (20 мл) и сушили для получения индоло[3,2-b]карбазола (CV-8685) в виде светло-желтого твердого вещества (0,55 г, 78%).

Очистка по ВЭЖХ: 96,22% (площадь%). ^1H -ЯМР, ^{13}C -спектр, соответствующий структуре. ИЭР-МС: Рассч. для $\text{C}_{18}\text{H}_{13}\text{N}_2$ ($\text{M}+\text{H}$) $^+$: 257, полученное значение: 257,5.

Соединение I ("CV-8686") и соединение IV ("CV-8687") синтезировали в соответствии со схемой, приведенной на фиг. 2В.

Синтез соединения 5.

В высушенную в духовом шкафу колбу добавляли PtCl_2 (1,0 г, 0,0038 моль), Na_2CO_3 (6,1 г, 0,057 моль), 6-метилиндол (10,0 г, 0,076 моль) и соединение 2 (10,0 г, 0,038 моль) в диоксане (250 мл). Колбу

дегазировали азотом, герметизировали и нагревали до 100°C в течение ночи. После этого реакция была завершена (по данным ТЖХ с применением 10% этилацетата/гексанов). Растворитель выпаривали при пониженном давлении. Реакционную смесь разводили этилацетатом (400 мл), промывали водой, насыщенным раствором NaCl и сушили над Na₂SO₄. Растворитель фильтровали и концентрировали в условиях вакуума для получения коричневого масла. Неочищенное соединение очищали с помощью колоночной хроматографии (10% этилацетат/гексан). Соединение 5 получали в виде светло-коричневого твердого вещества (6,5 г, 47%).

Синтез соединения 6.

Карбонат калия (7,4 г, 0,054 моль) добавляли в раствор соединения 5 (6,5 г, 0,018 моль) в смеси метанола (150 мл) и воды (50 мл) при температуре окружающей среды. Полученную в результате суспензию нагревали до рефлюкса в течение ночи. После этого реакция была завершена (по данным ТЖХ с применением 20% этилацетата/гексанов). Реакционную смесь охлаждали до температуры окружающей среды и концентрировали с растворителем в условиях вакуума. Остаток растворяли в этилацетате (200 мл) и промывали водой и соевым раствором, затем сушили (сульфат натрия), фильтровали, концентрировали с растворителем в условиях вакуума для получения коричневого твердого вещества. Неочищенное соединение очищали с помощью колоночной хроматографии (20% этилацетат/гексан). Соединение 6 получали в виде твердого вещества оранжевого цвета (3,3 г, 72%).

Синтез соединения I (CV-8686).

В сухую 100 мл круглодонную колбу с двумя горловинами в атмосфере аргона при 0°C добавляли диметилформамид (20 мл). Медленно добавляли POCl₃ (0,6 г, 0,0038 моль), поддерживая внутреннюю температуру ниже 5°C в течение 10 мин. Через 30 мин перемешивания при 0°C медленно добавляли раствор соединения 6 (1,0 г, 0,0038 моль) в диметилформамиде (5 мл), поддерживая внутреннюю температуру ниже 5°C в течение 10 мин. Полученную в результате смесь перемешивали при температуре окружающей среды в течение ночи. После этого реакция была завершена (по данным ТЖХ с применением 20% этилацетата/гексанов). Реакционную смесь вливали в насыщенный водный раствор бикарбоната натрия (150 мл) и перемешивали в течение 1 ч. Полученную в результате смесь экстрагировали этилацетатом (2×100 мл). Органические слои объединяли и промывали водой, насыщенным раствором NaCl и сушили над Na₂SO₄. Растворитель фильтровали и концентрировали в условиях вакуума для получения коричневого твердого вещества. Неочищенный продукт очищали с помощью колоночной хроматографии (0-20% этилацетат/гексаны). Соединение I (CV-8686) получали в виде светло-розового твердого вещества (0,84 г, 75%).

Очистка по ВЭЖХ: 97,01% (площадь%). ¹H-ЯМР, ¹³C-спектр, соответствующий структуре. ИЭР-МС: Рассч. для C₁₉H₁₇N₂O (M+H)⁺: 289, полученное значение: 289,1.

Синтез соединения IV (CV-8687).

Концентрированную HCl (0,3 мл) добавляли в раствор соединения I (1,0 г) в тетрагидрофуране (125 мл) при температуре окружающей среды. Полученную в результате смесь нагревали до рефлюкса в течение ночи. После этого реакция была завершена (по данным ТЖХ с применением 40% этилацетата/гексанов). Реакционную смесь охлаждали до температуры окружающей среды и перемешивали в течение 1 ч. Фильтровали твердое вещество, промывали тетрагидрофураном (20 мл) и сушили для получения соединения IV (CV-8687) в виде светло-желтого твердого вещества (0,84 г, 89%).

Очистка по ВЭЖХ: 98,4% (площадь%). ¹H-ЯМР, ¹³C-спектр, соответствующий структуре. ИЭР-МС: Рассч. для C₁₉H₁₅N₂ (M+H)⁺: 271, полученное значение: 271,3.

Соединение II ("CV-8688") синтезировали в соответствии со схемой, приведенной на фиг. 2С.

Синтез соединения 7.

Йодид меди (0,53 г, 10 молярных процентов) и PdCl₂(PPh₃)₄ (1/0 г, 5 молярных процентов) добавляли в дегазированный раствор соединения 1 (9,0 г, 0,03 моль), 3-метокси-1-бутин (2,8 г, 0,035 моль) в триэтиламин (150 мл) при температуре окружающей среды. После перемешивали при температуре окружающей среды в течение 2 ч. Реакция была завершена (по данным ТЖХ с применением 10% этилацетата/гексанов). Реакционную смесь разводили этилацетатом (300 мл), промывали водой, насыщенным раствором NaCl и сушили над Na₂SO₄. Растворитель фильтровали и концентрировали в условиях вакуума для получения коричневого масла. Неочищенный продукт очищали с помощью колоночной хроматографии (10% этилацетат/гексан). Соединение 7 получали в виде светло-желтой жидкости (7,0 г, 90%).

Синтез соединения 8.

В высушенную в духовом шкафу колбу добавляли PtCl₂ (0,68 г, 0,0025 моль), Na₂CO₃ (4,0 г, 0,038 моль), индол (6,0 г, 0,05 моль) и соединение 7 (10,0 г, 0,025 моль) в диоксане (250 мл). Колбу дегазировали азотом, герметизировали и нагревали до 100°C в течение ночи. После этого реакция была завершена (по данным ТЖХ с применением 10% этилацетата/гексанов). Растворитель выпаривали при пониженном давлении. Реакционную смесь разводили этилацетатом (400 мл), промывали водой, насыщенным раствором NaCl и сушили над Na₂SO₄. Растворитель фильтровали и концентрировали в условиях вакуума для получения коричневого масла. Неочищенное соединение очищали с помощью колоночной хроматографии (10% этилацетат/гексан). Соединение 8 получали в виде светло-коричневого твердого вещества (3,5 г, 77%).

Синтез соединения 9.

Карбонат калия (3,8 г, 0,027 моль) добавляли в раствор соединения 8 (3,3 г, 0,0091 моль) в смеси метанола (75 мл) и воды (25 мл) при температуре окружающей среды. Полученную в результате суспензию нагревали до рефлюкса в течение ночи. После этого реакция была завершена (по данным ТЖХ с применением 20% этилацетата/гексанов). Реакционную смесь охлаждали до температуры окружающей среды и концентрировали с растворителем в условиях вакуума. Остаток растворяли в этилацетате (200 мл) и промывали водой и солевым раствором, затем сушили (сульфат натрия), фильтровали, концентрировали с растворителем в условиях вакуума для получения коричневого твердого вещества. Неочищенное соединение очищали с помощью колоночной хроматографии (20% этилацетат/гексан). Соединение 9 получали в виде твердого вещества оранжевого цвета (2,1 г, 88%).

Синтез соединения II (CV-8688).

В сухую 100 мл круглодонную колбу с двумя горловинами в атмосфере аргона при 0°C добавляли диметилформамид (20 мл). Медленно добавляли POCl₃ (0,76 г, 0,005 моль), поддерживая внутреннюю температуру ниже 5°C в течение 10 мин. Через 30 мин перемешивания при 0°C медленно добавляли раствор соединения 9 (1,3 г, 0,005 моль) в диметилформамиде (5 мл), поддерживая внутреннюю температуру ниже 5°C в течение 10 мин. Полученную в результате смесь перемешивали при температуре окружающей среды в течение ночи. После этого реакция была завершена (по данным ТЖХ с применением 20% этилацетата/гексанов). Реакционную смесь вливали в насыщенный водный раствор бикарбоната натрия (150 мл) и перемешивали в течение 1 ч. Полученную в результате смесь экстрагировали этилацетатом (2×100 мл). Органические слои объединяли и промывали водой, насыщенным раствором NaCl и сушили над Na₂SO₄. Растворитель фильтровали и концентрировали в условиях вакуума для получения коричневого твердого вещества. Неочищенное соединение кристаллизовали в хлороформе (25 мл). Соединение II (CV-8688) получали в виде светло-розового твердого вещества (0,81 г, 53%).

Очистка по ВЭЖХ: 98,94% (площадь%). ¹H-ЯМР, ¹³C-спектр, соответствующий структуре. ИЭР-МС: Рассч. для C₁₉H₁₇N₂O (M+H)⁺: 289, полученное значение: 289,0.

Пример 6.

Морфология клеток.

Типичная морфология клеток после разных видов обработки показана на фиг. 5A-5K, 6A-6K, 7A-7K, 8A-8K, 9A-9K, 10A-10K, 11A-11K и 12A-12K. На морфологию обеих линий клеток существенно влияла обработка 100 мкМ CV-8684 и CV-8688, а также обработка стауроспорином через 6 ч. CV-8685 оказывал влияние только на WM115 при 100 мкМ.

Пример 7.

Апоптоз-индуцирующая активность малассезина и производных малассезина - предварительный анализ с аннексином V.

Материалы и реагенты.

Набор для анализа с аннексином V-FITC был приобретен у Beyotime Biotechnology, среда RPMI 1640 и среда Игла, модифицированная по способу Дульбекко ("DMEM"), были приобретены у Gibco, фетальная бычья сыворотка ("ФБС") была приобретена у Invitrogen, стабилизированный противогрибковый раствор с антибиотиком (100×) был приобретен у Sigma, а 0,25% трипсин-ЭДТУ (1X), феноловый красный были приобретены у Invitrogen.

Клеточная культура.

Клетки MeWo (ATCC® HTB-65™) и WM115 (ATCC® CRL-1675) были приобретены у ATCC (Manassas, VA) и хранились в следующих условиях: для MeWo: DMEM, дополненная 10% ФБС; для WM115: RPMI 1640, дополненная 10% ФБС (10% ФБС, 1% стабилизированный противогрибковый раствор с антибиотиком).

Обзор исследования.

На промежуточных стадиях апоптоза происходит перемещение фосфатидилсерина ("ФС") из внутреннего во внешний слой клеточной мембраны, подвергая ФС воздействию внеклеточной среды, в которой его можно зарегистрировать. Характеризующиеся сильной флуоресценцией конъюгаты аннексина V обеспечивают быстрые и надежные методы регистрации для исследований экстернализацит ФС.

Во время первого сета исследований клетки MeWo и WM115 обрабатывали исследуемыми соединениями в 10 дозах, начиная со 100 мкМ с 3-кратным разведением. Стауроспорин использовали в качестве положительного контроля. После 6-часовой обработки оценивали апоптоз клеток, применяя анализ с аннексином V. Оцениваемыми исследуемыми соединениями были CV-8684, CV-8685, CV-8686, CV-8687 и CV-8688.

Аналитические процедуры.

Для посева клеток клетки собирали и определяли число клеток, используя цитометр Countess®. Затем клетки разводили культуральной средой до необходимой плотности. 40 мкл клеточной суспензии на лунку добавляли в необходимое число лунок в 384-луночном планшете (Corning 3712 - планшет с прозрачным дном). Конечная плотность клеток составляла 6000 клеток/лунка. После высевания планшеты инкубировали при 37°C и 5% CO₂ в течение ночи.

Для приготовления планшета-источника соединения каждое исследуемое соединение растворяли в ДМСО до 10 мМ исходного раствора. Проводили 3-кратное серийное разведение, используя жидкостный манипулятор EVO200™ (TECAN) для создания десяти концентраций исследуемого соединения. 0,1% ДМСО использовали в качестве контрольного (отрицательного) наполнителя. Затем планшет-источник соединения центрифугировали при комнатной температуре при 1000 об/мин в течение 1 мин и встряхивали, используя планшетный шейкер, в течение 2 мин.

Для обработки соединением 40 нл соединения переносили из планшета-источника соединения в 384-луночный культуральный планшет, используя жидкостный манипулятор Echo550 (LabCyte Inc.). После 6-часовой инкубации планшеты забирали из инкубатора для проведения выявления.

Для предварительного анализа с аннексином V планшеты забирали из инкубатора и оставляли уравниваться при комнатной температуре в течение 15 мин. Затем удаляли культуральную среду. В каждую лунку добавляли по 20 мкл предварительно смешанного рабочего раствора аннексина V-FITC и красителя Hoechst33342. Затем клетки инкубировали при комнатной температуре в течение 20 мин. Планшеты герметизировали и центрифугировали в течение 1 мин при 1000 об/мин для удаления пузырьков. После этого планшеты считывали, используя планшет-ридер Acumen eX3. Относительную активность рассчитывали по следующей формуле: $\text{Активность (\%)} = 100\% \times (\text{число}_{\text{Аннексин V}} / \text{число}_{\text{Все клетки}})$, и EC₅₀ рассчитывали с помощью GraphPad Prism (v. 5.01).

Результаты.

В предварительном скрининговом анализе, описанном выше, CV-8688 заметно повышали окрашивание аннексином V клеток MeWo с EC₅₀ 908,57 нМ. Стауроспорин, положительный контроль, сильно повышал окрашивание аннексином V в обеих линиях клеток. (Фиг. 3А-3М).

Пример 8.

Апоптоз-индуцирующая активность малассезина и производных малассезина - дополнительная оценка с помощью анализа с аннексином V.

Обзор исследования.

Чтобы дополнительно изучить влияние исследуемых соединений на апоптоз, проводили множественный сбор данных, охватывающий разные стадии апоптоза, для клеток MeWo и WM115. Оба типа клеток обрабатывали исследуемыми соединениями в 3 дозах (100 мкМ, 10 мкМ и 1 мкМ). Стауроспорин использовали в качестве положительного контроля. После необходимого периода обработки (6, 24, 48 или 72 ч) оценивали апоптоз путем измерения процентной доли клеток, демонстрирующих связывание аннексина V после воздействия исследуемых соединений. Оцениваемыми исследуемыми соединениями были CV-8684, CV-8685 и CV-8688.

Аналитические процедуры.

Посев клеток проводили, как описано выше, со следующими исключениями: конечная плотность клеток составляла 4000 клеток/лунка для 6-часового и 24-часового выявления, тогда как для 48-часового и 72-часового выявления использовали 2000 клеток/лунка. Для каждого момента времени готовили 384-луночные планшеты с прозрачным дном (Corning 3712) и твердые планшеты с белым дном (Corning 3570). Планшеты инкубировали, как описано выше.

Для приготовления планшета-источника соединения каждое исследуемое соединение растворяли в ДМСО до 10 мМ исходного раствора. Две дополнительные концентрации получали путем 10-кратного разведения до 1 мМ и 0,1 мМ. Стауроспорин использовали в качестве положительного контроля, а 1% ДМСО использовали в качестве базового (отрицательного) контроля. Планшет-источник соединения центрифугировали при комнатной температуре при 1000 об/мин в течение 1 мин и встряхивали, используя планшетный шейкер, в течение 2 мин.

400 нл исследуемого соединения переносили из планшета-источника соединения в 384-луночные культуральные планшеты, используя жидкостный манипулятор Echo550. Через 6, 24, 48 и 72 ч планшеты забирали из инкубатора для проведения выявления.

Для анализа с аннексином V планшеты забирали из инкубатора и оставляли уравниваться при комнатной температуре в течение 15 мин. Культуральную среду удаляли и дважды промывали клетки ФСБ. В каждую лунку добавляли по 20 мкл предварительно смешанного рабочего раствора аннексина V-FITC. Клетки инкубировали при комнатной температуре в течение 20 мин. Планшеты считывали, используя Acumen eX3, чтобы подсчитать число FITC-положительных клеток. Относительную активность рассчитывали по следующей формуле:

$$\text{Относительная активность (\%)} = 100\% \times (\text{число}_{\text{образец}} / \text{число}_{\text{наполнитель}}).$$

Результаты.

CV-8684 индуцировал апоптоз в наибольшей исследуемой концентрации через 6 ч обработки как в клетках MeWo, так и WM115. CV-8685 после 24 ч обработки демонстрировал индукционное действие на WM115, тогда как 48 ч обработки вызывали апоптоз в обоих типах клеток. И наконец, CV-8688 после 6 ч обработки дозозависимым образом демонстрировал индукционное действие в обоих типах клеток (фиг. 4А-4L).

Пример 9.

Жизнеспособность клеток после воздействия малассезина и производных малассезина - анализ CellTiter-Glo®.

Аналитические процедуры.

Набор для анализа CellTiter-Glo® 2.0 был приобретен у Promega. Посев клеток, приготовление планшета-источника соединения и воздействие на клетки исследуемым соединением проводили, как описано в примере 8.

Для анализа CellTiter-Glo® планшеты забирали из инкубатора и уравнивали при комнатной температуре в течение 15 мин. Реагенты CellTiter-Glo® размораживали и доводили до комнатной температуры перед проведением эксперимента. Затем в каждую лунку добавляли по 40 мкл реагента CellTiter-Glo® для проведения выявления (в соотношении 1:1 с культуральной средой). Затем планшеты инкубировали при комнатной температуре в течение 30 мин и считывали, используя планшет-ридер EnSpire (PerkinElmer). Остаточную активность рассчитывали по следующей формуле:

$$\text{Остаточная активность (\%)} = 100\% \times (\text{Люм}_{\text{образец}} - \text{Люм}_{\text{фон}}) / (\text{Люм}_{\text{наполнитель}} - \text{Люм}_{\text{фон}}).$$

Результаты.

CV-8684 демонстрировал дозозависимое ингибирование жизнеспособности клеток в обеих исследуемых линиях клеток, хотя ингибиторное действие сильнее проявлялось в клетках MeWo. CV-8685 демонстрировал ингибиторное действие на жизнеспособность клеток WM115 дозозависимым образом только после 24-часовой обработки. CV-8688 дозозависимым образом ингибировал жизнеспособность обоих типов клеток. Стауроспорин, положительный контроль, демонстрировал 100% ингибирование жизнеспособности клеток в обеих линиях клеток после 24-часовой обработки. (Фиг. 13А-13К).

Пример 10.

Цитотоксичность малассезина и производных малассезина анализ высвобождения лактадегидрогеназы.

Обзор исследования.

Анализ ЛДГ позволяет проводить количественное измерение лактадегидрогеназы ("ЛДГ"), высвобождаемой в среду из поврежденных клеток, в качестве биомаркера цитотоксичности и цитолиза.

Аналитические процедуры.

Набор для анализа гомогенной целостности мембран CytoTox-ONE™ был приобретен у Promega. Посев клеток, приготовление планшета-источника соединения и воздействие на клетки исследуемым соединением проводили, как описано в примере 8.

Для анализа высвобождения ЛДГ планшеты забирали из инкубатора и уравнивали при комнатной температуре в течение 15 мин. Затем планшеты центрифугировали при 1000 об/мин в течение 1 мин. 20 мкл клеточной культуральной среды переносили в новый 384-луночный черный твердый планшет. Затем в каждую лунку добавляли по 20 мкл CytoTOX-ONE™ и инкубировали при комнатной температуре в течение 10 мин. После этого в каждую лунку добавляли по 10 мкл стоп-раствора и встряхивали планшеты при 500 об/мин в течение 1 мин. Планшеты считывали, используя длину волны возбуждения 560 нм и длину волны испускания 590 нм, на EnSpire. Относительную активность рассчитывали по следующей формуле:

$$\text{Относительная активность (\%)} = 100\% \times (\text{Люм}_{\text{образец}} - \text{Люм}_{\text{фон}}) / (\text{Люм}_{\text{наполнитель}} - \text{Люм}_{\text{фон}}).$$

Результаты.

CV-8684 не индуцировал существенное высвобождение в любой из линий клеток после 72-часовой инкубации. CV-8685 демонстрировал дозозависимое индукционное действие на высвобождение ЛДГ из клеток WM115, но не MeWo, после 24-часовой обработки. CV-8688 индуцировал высвобождение ЛДГ в наибольшей исследуемой концентрации. (Фиг. 14А-14Л).

Пример 11.

Эффективность активации арил-гидрокарбонового рецептора для малассезина и производных малассезина.

Аналитические процедуры.

Клетки HerG2-AhR-Luc были приобретены у Pharmagon, система для анализа с люциферазой One-Glo была приобретена у Promega, DMEM был приобретен у Hyclone, а пенициллин/стрептомицин был приобретен у Solabio.

Культуральную среду для стабильно трансфицированных клеток HerG2 готовили, дополняя DMEM большим количеством глюкозы и L-глутамина, а также 10% ФБС.

Клетки HerG2-AhR-Luc культивировали в колбах T-75 при 37°C, 5% CO₂ и относительной влажности 95%. Клеткам давали достичь 80-90% конfluence перед отсоединением и разделением.

Культивируемые клетки промывали 5 мл ФБС. ФБС отсасывали обратно, в колбу добавляли 1,5 мл трипсина и инкубировали клетки при 37°C приблизительно в течение 5 мин или до тех пор, пока клетки не отсоединились и не всплывали. Трипсин активировали путем добавления избытка содержащей сыворотку среды.

Клеточную суспензию переносили в коническую пробирку и центрифугировали при 120 g в течение

10 мин для осаждения клеток. Клетки ресуспендировали в среде для посева при необходимой плотности. 40 мкл клеток переносили в 384-луночный культуральный планшет (5×10^3 клеток/луночка). Планшеты помещали в инкубатор при 37°C на 24 ч.

После этого готовили исходные растворы исследуемых соединений и омепразола в качестве положительного контроля. 40 нл растворов соединений переносили в аналитический планшет, используя Echo550. Затем планшет помещали обратно в инкубатор для обработки соединениями.

Позже, через 24 ч обработки, планшет забирали из инкубатора и оставляли охлаждаться до температуры окружающей среды. В каждую лунку добавляли 30 мкл реагента One-Glo, эквивалентного находящемуся в культуральной среде. Клетки оставляли для прохождения лизиса по меньшей мере на 3 минуты, а затем проводили измерения на люминометре.

Строили графики ответов в зависимости от дозы, используя нелинейный регрессионный анализ в XLfit, и также рассчитывали значения EC_{50} .

Результаты.

Результаты анализа с AhR-люциферазой приведены на фиг. 15A-15F.

Пример 12.

Анализ MelanoDerm™.

Обзор исследования.

Целью этого исследования является оценка потенциального раздражения кожи, вызываемого исследуемым препаратом в модели кожи MelanoDerm™ после повторного воздействия, для выбора дозы для последующего исследования. Токсичность будут определять путем измерения относительного преобразования МТТ (3-[4,5-диметилтиазол-2-ил]-2,5-дифенилтетразолий бромид) в обработанных исследуемым препаратом тканях по сравнению с тканями, обработанными отрицательным контролем/контрольным раствором.

В этом исследовании будет использоваться модель кожи MelanoDerm™, поставляемая корпорацией MatTek (Ashland, MA). Ткань MelanoDerm™ состоит из нормальных эпидермальных кератиноцитов (НЭКЧ) и меланоцитов (НМЧ) человеческого происхождения, которые культивировали до образования многослойной, высокодифференцированной модели человеческого эпидермиса. НМЧ в совместных культурах претерпевают спонтанный меланогенез, приводящий к образованию тканей с разным уровнем пигментации. Культуры выращивают на клеточных культуральных вставках на границе раздела воздух-жидкость, что обеспечивает возможность местного применения модуляторов кожи. Модель MelanoDerm™ демонстрирует *in vivo*-подобные морфологические и ультраструктурные характеристики. НМЧ, локализованные в базальном клеточном слое тканей MelanoDerm™, являются дендритными и спонтанно вырабатывают гранулы меланина, которые прогрессивно заселяют слои ткани. Таким образом, исследовательскую систему можно использовать для проведения скрининга в отношении материалов, которые могут ингибировать или стимулировать выработку меланина по сравнению с отрицательным контролем.

Экспериментальный дизайн этого исследования состоит из определения pH чистых исследуемых препаратов, если это возможно (и/или раствора для дозирования в зависимости от обстоятельств), и определительного анализа для определения относительной жизнеспособности тканей после повторного воздействия. Модель кожи MelanoDerm™ будут подвергать воздействию исследуемых препаратов всего в течение 7 дней. Исследуемый препарат будет применять местным образом к модели кожи MelanoDerm™ каждые 48 ч (во временных рамках 48 ± 2 ч от предыдущей обработки). Токсичность исследуемого препарата будут определять по NAD(P)H-зависимому микросомальному ферментативному восстановлению МТТ (и, в меньшей степени, по индуцированному сукцинатдегидрогеназой восстановлению МТТ) в контрольных и обработанных исследуемым препаратом тканях. (Berridge et al., 1996). Данные будут представлены в форме относительной выживаемости (преобразование МТТ по сравнению с отрицательным контролем).

Материалы.

Среда для поддержания MelanoDerm™ (EPI-100-LLMM) и модель кожи MelanoDerm™ (MEL-300-A) поставлялись корпорацией MatTek. 1% койевая кислота (приготовленная в стерильной деионизированной воде) и МТТ (3-[4,5-диметилтиазол-2-ил]-2,5-дифенилтетразолий бромид) поставлялись Sigma. Среда Игла, модифицированная по способу Дульбекко (DMEM), содержащая 2 mM L-глутамина (добавочная среда для МТТ), поставлялась Quality Biological. Изопропанол поставлялся Aldrich. Стерильный, не содержащий Ca^{++} и Mg^{++} фосфатно-солевой буфер Дульбекко (CMF-DPBS) поставлялся Invitrogen или аналогичным поставщиком. Стерильная деионизированная вода поставлялась Quality Biological или аналогичным поставщиком. ДМСО поставлялся CiVenti Chem.

Аналитические процедуры.

Исследуемые препараты в общем случае будут исследовать в чистом виде или согласно указаниям Спонсора (смотрите Приложение 1 к Протоколу) Десять микролитров (10 мкл) или 25 мкл каждого исследуемого препарата будут применять непосредственно к ткани так, чтобы покрыть верхнюю поверхность. В зависимости от природы исследуемого препарата (жидкости, гели, кремы, пены и т.д.) может понадобиться применение устройства для дозирования, сита или другого вспомогательного устройства

для обеспечения равномерного распределения исследуемого препарата по поверхности ткани.

В дни применения каждый исследуемый препарат будут разводить по меньшей мере 200-кратно, используя соответствующий объем EPI-100-LLMM (или альтернативного растворителя, определенного во время исследования растворимости). Для каждого дозирования будут готовить свежее разведение в EPI-100-LLMM. Конечное разведение, которое необходимо проводить для препарата раствора для дозирования, будут определять по упомянутой выше оценке растворимости и заносить в рабочий журнал исследования.

ДМСО, разведенный до 0,5% (об./об.) в EPI-100-LLMM, будут использовать в качестве контрольного наполнителя и применять к тканям (в дозах 10 мкл и 25 мкл) на основании той же процедуры, что и для исследуемых препаратов и аналитического контроля.

Исследуемые препараты будут применять местным образом к ткани MelanoDerm™ каждые 48 ч (во временных рамках 48 ± 2 ч от предыдущей обработки) во время 7-дневного исследования. Десять и 25 микролитров, соответственно, каждого исследуемого препарата будут применять к каждой ткани. Двадцать пять микролитров положительного и отрицательного контроля, соответственно, будут применять к каждой ткани.

По возможности будут определять pH чистого жидкого исследуемого препарата (и/или раствора для дозирования в зависимости от ситуации). pH будут определять с помощью индикаторной бумаги для определения pH (например, с диапазоном pH 0-14 для оценки и/или диапазоном pH 5-10 для определения более точной величины). Типичные значения инкремента pH на индикаторной бумаге для определения pH с более узким диапазоном составляют приблизительно от 0,3 до 0,5 единиц pH. Максимальный инкремент на индикаторной бумаге для определения pH составляет 1,0 единиц pH.

Определительный анализ будет включать отрицательный контроль и положительный контроль. Ткани MelanoDerm™, отнесенные к аналитическому отрицательному контролю, будут обрабатывать 25 мкл стерильной деионизированной воды. Двадцать пять микролитров 1% койевой кислоты (приготовленной в стерильной деионизированной воде и профильтрованной во время приготовления) будут использовать для применения к тканям, отнесенным к аналитическому положительному контролю. 1% койевую кислоту будут хранить в пробирке, закрытой алюминиевой фольгой, до применения в пределах 2 ч от времени приготовления. Время воздействия положительного и отрицательного контроля будет идентичным применяемому для исследуемых препаратов.

Необходимо оценить способность каждого исследуемого препарата к прямому восстановлению МТТ. Будут готовить 1,0 мг/мл раствор МТТ в добавочной среде для МТТ, как описано ниже. Приблизительно 25 мкл исследуемого соединения будут добавлять к 1 мл раствора МТТ и инкубировать смесь в темноте при $37 \pm 1^\circ\text{C}$ в течение от 1 до 3 ч. Одновременно будут исследовать отрицательный контроль - 25 мкл стерильной деионизированной воды. Если цвет раствора МТТ становится синим/пурпурным, исследуемый препарат предположительно восстанавливает МТТ. Нерастворимые в воде исследуемые материалы могут демонстрировать прямое восстановление (потемнение) только на поверхности раздела между исследуемым препаратом и средой.

Определение прямого восстановления МТТ для исследуемого(ых) соединения(ий) могло проводиться ранее в независимом исследовании. В таких случаях результаты исследования прямого восстановления МТТ можно использовать и в этом конкретном исследовании со ссылкой на исходное исследование.

Воздействие на ткань: По меньшей мере через 16 ч после инициации культур будут делать фотографии двух тканей MelanoDerm™ (считающиеся необработанными на день 0) с помощью цифровой камеры, чтобы помочь с визуальной оценкой степени пигментации тканей в нулевое время анализа. Точные процедуры, применяемые для получения изображений тканей, будут описаны в рабочем журнале и отчете об исследовании. Ткани MelanoDerm™ будут промывать CMF-DPBS, блотировать в сухом виде на стерильную абсорбирующую бумагу и очищать от избытка жидкости. Ткани MelanoDerm™ будут переносить в соответствующие содержащие МТТ лунки после промывки и обрабатывать в анализе МТТ, как описано в разделе МТТ анализа.

По меньшей мере через 16 ч после инициации культур ткани будут переносить в новый 6-луночный планшет, содержащий 0,9 мл свежего, предварительно нагретого EPI-100-LLMM. Исследование будут проводить в течение 7-дневного периода времени. Две ткани будут местным образом обрабатывать в первый день и каждые 48 ч (во временных рамках 48 ± 2 ч от предыдущей обработки) 10 и 25 микролитрами, соответственно, каждого исследуемого препарата. Среду будут обновлять ежедневно (во временных рамках 24 ± 2 ч от предыдущей обработки); ткани будут переносить в новый 6-луночный планшет, содержащий 0,9 мл свежего, предварительно нагретого EPI-100-LLMM.

Две ткани будут местным образом обрабатывать в первый день и каждые 48 ч (во временных рамках 48 ± 2 ч от предыдущей обработки) 25 микролитрами положительного и отрицательного контроля, соответственно. Среду будут обновлять ежедневно (во временных рамках 24 ± 2 ч от предыдущей обработки); ткани будут переносить в новый 6-луночный планшет, содержащий 0,9 мл свежего, предварительно нагретого EPI-100-LLMM. Ткани будут инкубировать при $37 \pm 1^\circ\text{C}$ в увлажненной атмосфере

5±1% CO₂ на воздухе (стандартные культуральные условия) в течение соответствующего времени воздействия.

В дни применения ткани MelanoDerm™ будут сначала аккуратно три раза промывать с помощью ~500 мкл CMF-DPBS, чтобы удалить любой остаточный исследуемый препарат. Затем ткани будут переносить в новый 6-луночный планшет, содержащий 0,9 мл свежего, предварительно нагретого EPI-100-LLMM и обрабатывать соответствующим исследуемым препаратом, отрицательным или положительным контролем. Ткани будут инкубировать при 37±1°C в увлажненной атмосфере 5±1% CO₂ на воздухе (стандартные культуральные условия) в течение соответствующего времени воздействия. Точная процедура промывки будет указана в рабочем журнале.

В конце 7-дневного исследования ткани MelanoDerm™, обработанные отрицательным или положительным контролем и каждым исследуемым препаратом будут фотографировать с помощью цифровой камеры, чтобы помочь с визуальной оценкой степени пигментации тканей в конце анализа (день 7). Точные процедуры, применяемые для получения изображений тканей, будут описаны в рабочем журнале и отчете об исследовании. Затем будут определять жизнеспособность тканей по восстановлению МТТ, как указано ниже.

Анализ МТТ: 10X исходный раствор МТТ, приготовленный в ФСБ (профильтрованный во время приготовления партии) будут размораживать и разводить в теплой добавочной среде для МТТ, чтобы получить 1,0 мг/мл раствора, не более чем за 2 ч до применения. 300 мкл раствора МТТ будут добавлять в каждую обозначенную лунку предварительно меченого 24-луночного планшета.

По истечении времени воздействия каждую ткань MelanoDerm™, предназначенную для анализа МТТ, будут промывать CMF-DPBS, блотировать в сухом виде на стерильную абсорбирующую бумагу и очищать от избытка жидкости. Ткани MelanoDerm™ будут переносить в соответствующие содержащие МТТ лунки после промывки. 24-луночные планшеты будут инкубировать в стандартных условиях в течение 3±0,1 ч.

Через 3±0,1 ч ткани MelanoDerm™ будут блотировать на стерильную абсорбирующую бумагу, очищать от избытка жидкости и переносить в предварительно меченый 24-луночный планшет, содержащий 2,0 мл изопропанола в каждой обозначенной лунке. Планшеты будут покрывать парафильмом и хранить в морозильной камере (2-8°C) до сбора образцов для последнего времени воздействия. В случае необходимости планшеты можно хранить в течение ночи (или до 24 ч после сбора образцов для последнего времени воздействия) в морозильной камере перед экстракцией МТТ. Затем планшеты будут встряхивать в течение по меньшей мере 2 ч при комнатной температуре. В конце периода экстракции жидкость в клеточных культуральных вставках будут сцеживать в лунку, из которой была взята клеточная культуральная вставка. Раствор экстракта будут смешивать и переносить 200 мкл в соответствующие лунку 96-луночного планшета. В лунки, обозначенные как пустой контроль, будут добавлять двести мкл изопропанола. Поглощение на 550 нм (ОП550) для каждой лунки будут измерять с помощью планшетридера Molecular Devices Vmax (с включенной функцией AUTOMIX).

В случаях, когда показано, что исследуемый препарат восстанавливает МТТ, проблему составляют только те исследуемые препараты, которые остаются связанными с тканью после промывки, что приводит к ложному сигналу о восстановлении МТТ. Чтобы продемонстрировать, что действие возможного остаточного исследуемого препарата напрямую не приводит к восстановлению МТТ, проводили функциональную проверку в определительном анализе, чтобы показать, что исследуемый материал не связывается с тканью и не приводит к ложному сигналу восстановления МТТ.

Чтобы определить, приводит ли действие остаточного исследуемого препарата к восстановлению МТТ, использовали убитую заморозкой контрольную ткань. Убитую заморозкой ткань готовят в IVS, помещая необработанные ткани MelanoDerm™/EpiDerm™ (Melanoderm™ без меланоцитов) в морозильную камеру при -20°C по меньшей мере на ночь, размораживая до комнатной температуры, а затем повторно замораживая. После умерщвления ткань можно неограниченное время хранить в морозильной камере. Убитые заморозкой ткани можно получать в готовом виде от корпорации MatTek и хранить в морозильной камере при -20°C до использования. Чтобы исследовать остаточное снижение количества исследуемого препарата, убитые ткани обрабатывают исследуемым препаратом обычным образом. Аналитические процедуры будут проводить таким же образом, как и для жизнеспособной ткани. Параллельно будут исследовать по меньшей мере один убитый контроль, обработанный стерильной деионизированной водой (отрицательный убитый контроль), так как ожидается некоторое восстановление МТТ из остаточного NADH и ассоциированных ферментов в убитой ткани.

Если в обработанном исследуемым препаратом убитом контроле наблюдается небольшое восстановление МТТ или его отсутствие, наблюдаемое восстановление МТТ в обработанной исследуемым препаратом жизнеспособной ткани можно приписать жизнеспособным клеткам. Если в обработанном исследуемым препаратом убитом контроле наблюдается значительное восстановление МТТ (по сравнению с обработанной жизнеспособной тканью), следует предпринять дополнительные шаги, чтобы учесть химическое восстановление исследуемого препарата, или же исследуемый препарат можно считать неисследуемым в рамках данной системы. Значения ОП550 для убитых контрольных образцов будут анали-

зировать, как описано ниже.

Будут записывать исходные данные по поглощению и сохранять в виде файла печати и импортировать в таблицу в формате Excel. Будут рассчитывать среднее значение ОП550 для пустых лунок. Скорректированное среднее значение ОП550 для отрицательных контрольных образцов будут определять, вычитая среднее значение ОП550 для пустых лунок из их средних значений ОП550. Скорректированные значения ОП550 для воздействия отдельными исследуемыми препаратами и воздействия положительным контролем будут определять, вычитая из каждого среднее значение ОП550 для пустых лунок. Все расчеты будут проводить, используя таблицу в формате Excel. Хотя обсуждаемые алгоритмы используют для расчета, проводимого для конечной точки анализа на уровне группы обработки, такие же самые расчеты можно применять в отношении отдельных опытов.

Скорр. ОП550 для воздействия исследуемым препаратом=ОП550 для воздействия исследуемым препаратом - Среднее ОП550 для пустых лунок.

Если используется убитый контроль (УК), будут проводить следующие дополнительные расчеты, чтобы скорректировать количество МТТ, восстановленного непосредственно остатками исследуемых препаратов. Исходное значение ОП550 для обработанного отрицательным контролем убитого контроля будут вычитать из исходных значений ОП550 для каждого из обработанных исследуемыми препаратами убитых контрольных образцов, чтобы определить чистые значения ОП550 для обработанных исследуемыми препаратами убитых контрольных образцов.

Чистое ОП550 для каждого обработанного исследуемым препаратом УК=Исходное ОП550 обработанного исследуемым препаратом УК - Исходное ОП550 обработанного отрицательным контролем УК.

Чистые значения ОП550 представляют количество восстановленного МТТ вследствие прямого восстановления остатками исследуемого препарата при конкретных временах воздействия. В целом, если чистое значение ОП550 превышает 0,150, чистое значение восстановления МТТ будут вычитать из скорректированных значений ОП550 жизнеспособных обработанных тканей, чтобы получить конечное скорректированное значение ОП550. Эти конечные скорректированные значения ОП550 затем будут использовать для определения % жизнеспособности контрольных образцов.

Конечное скорректированное ОП550=Скорректированное ОП550 для исследуемого соединения (жизнеспособные образцы) - Чистое ОП550 для исследуемого соединения (УК).

И наконец, будут проводить следующие расчеты % от контроля:

$$\% \text{ жизнеспособности} = \left[\frac{\text{Конечное скорректированное ОП550 для исследуемого препарата или положительного контроля}}{\text{Скорректированное среднее ОП550 для отрицательного контроля}} \right] \times 100$$

Результаты.

Результаты анализа MelanoDerm™ приведены на фиг. 16А-16К. Обработанные малассезином, соединением I и соединением II ткани демонстрировали снижение пигментации на 7 день эксперимента. На фиг. 17А-17К приведены изображения с 15X увеличением образцов MelanoDerm™, подверженных указанным вариантам обработки.

Пример 13.

Анализ с данио.

Аналитические процедуры.

Соединения: соединения будут предоставлены Спонсором исследования в виде основного исходного раствора (ОР) в наивысшей растворимой концентрации в воде/ФСБ или ДМСО.

Стандартные процедуры получения эмбрионов: Данио АВ от Phylonix будут получать путем естественного скрещивания или используя систему для массового получения эмбрионов (MEPS, Aquatic Habitats). На одну самку данио будет приходиться приблизительно 50 новорожденных данио. Данио будут содержать в воде для рыб при 28°C. Данио будут чистить (убирать мертвых данио) и сортировать по стадии развития. Так как данио получают питание из присоединенного желточного мешка, в течение 6 дней после оплодотворения (дпо) питание не требуется.

Растворимость соединений: основной исходный раствор (ОР) (с применением наибольшей концентрации) будут разводить в чистом ДМСО для получения дополнительных исходных растворов (ДР), т.е.: 10, 50, 100, 200, 300 мМ и т.д. Воду для рыб [200 мг морской соли от Instant Ocean (Aquarium Systems) на литр деионизированной воды; рН 6,6-7,0, поддерживаемый 2,5 мг/л нейтрального регулятора (Seachem Laboratories Inc.); проводимость 850-950 мкСм], поставляемую Phylonix, будут распределять в емкость для исследований, 4 мл/емкость.

Для создания раствора исследуемого соединения (ИР) 4 мкл каждого ДР будут добавлять непосредственно в воду для рыб. Пример: 4 мкл 10 мМ ДР, добавленного в воду для рыб, позволит получить 10 мкМ ИР; конечная концентрация ДМСО составит 0,1%. В альтернативном варианте, чтобы получить такие же конечные концентрации ИР и ДМСО, можно добавлять по 10 мкл ДР в 10 мл/емкость воды для рыб. Для вариантов анализа, в которых приемлемое содержание ДМСО может составлять до 1%, можно использовать 40 мкл ДР для получения 100 мкМ ИР. При применении 10 мл воды для рыб, объем ДР следует пропорционально увеличить, чтобы получить такие же конечные концентрации ИР и ДМСО. Раствор будут инкубировать при 28°C в течение отрезка времени, определенного для каждого анализа, и

ежедневно визуально исследовать в отношении наличия осаждения.

Максимальная переносимая концентрация (МПК): МПК (ЛК10) будут использовать в качестве стандартного критерия летальности соединения, определяемого по 10 концентрациям соединения. После определения наибольшей растворимой концентрации соединения Спонсор исследования выберет 10 концентраций.

Тридцать ~2 дпо хорионированных данио дикого типа АВ от Phylonix будут распределять по лункам 6-луночных микропланшетов, содержащих 4 мл/лунка воды и ДМСО в концентрации в диапазоне 0,1-1% в зависимости от растворимости соединения.

Изначально будут исследовать 10 концентраций (т.е. 0,01, 0,05, 0,1, 0,5, 1, 5, 10, 50, 100 и 500 мкМ (или вплоть до концентрации, которую позволяет получить растворимость соединения). В случае необходимости будут исследовать большие (до 2000 мкМ) или меньшие (до 0,001 мкМ) концентрации.

Данио будут инкубировать с каждой концентрацией исследуемого соединения в темноте при 28°C в течение 3 дней. Необработанных и обработанных 0,1-1% ДМСО данио будут использовать в качестве аналитического контроля и контроля наполнителя. Чтобы рассчитать % летальности после обработки будут подсчитывать число мертвых данио и удалять их. На 5 дпо будут подсчитывать мертвых животных, чтобы рассчитать % летальности (= общее число мертвых данио/30). Следует отметить, что в случае разложения мертвых данио, число мертвых данио будут вычислять, подсчитывая число живых данио.

Для оценки МПК будут строить кривые летальности путем построения графика зависимости % летальности от концентрации, используя программное обеспечение EXCEL. Для получения среднего значения и СО для МПК эксперименты будут проводить по 3 раза.

Визуальная оценка действия соединения на пигментацию кожи данио: пигментные клетки кожи данио, включая ксантофоры, иридофоры и меланофоры (меланоциты) происходят из клеток нервного гребня. У данио дифференцированные кожные пигментные клетки-предшественницы экспрессируют пигмент на ~ 24 дпо. Это исследование сфокусировано на меланоцитах, которые экспрессируют меланин, черный пигмент на поверхности кожи. Сначала меланоциты появляются в виде небольших участков черного цвета на тыльной области головы. В ходе развития данио число таких участков возрастает и они сливаются с образованием полос, которые идут к хвостовой области. В противоположность этому, мутантные данио-альбиносы демонстрируют разрозненную пигментацию кожи. Соединения будут применять на 2 дпо, чтобы оценить, могут ли соединения приостановить непрерывный процесс эмбриональной пигментации, который завершается к 5 дпо. Для каждого соединения будут исследовать три концентрации - МПК, 50% МПК и 25% МПК.

Тридцать 2 дпо самостоятельно вылупившихся данио дикого типа АВ от Phylonix будут обрабатывать концентрацией каждого соединения в течение 3 дней. Необработанных и обработанных 0,1% ДМСО данио будут использовать в качестве контроля. Положительный контроль: фенилтиомочевина (ФТМ, 0,03%).

Данио будут ежедневно визуально исследовать, используя микроскоп для препарирования; обработанных соединениями и ФТМ данио будут сравнивать с необработанными и обработанными наполнителем контрольными данио. Ежедневно будут подсчитывать число данио, демонстрирующих снижение пигментации, и выражать в виде % от исследуемых животных; будут предоставлять репрезентативные изображения. Чтобы определить оптимальную концентрацию соединения и время обработки для снижения пигментации, будут строить кинетическую кривую путем построения графика зависимости % данио, демонстрирующих снижение пигментации кожи, от времени (дпо). Для определения, является ли действие соединения значимым, будут использовать точный критерий Фишера ($P < 0,05$).

Дополнительную визуальную оценку действия соединения на пигментацию кожи данио будут проводить после обработки: 0,1, 1 и 3 мкМ. 32 дпо самостоятельно вылупившихся данио дикого типа АВ от Phylonix будут обрабатывать концентрацией каждого соединения в течение 3 дней. Необработанных и обработанных 0,1% ДМСО данио будут использовать в качестве контроля. Положительный контроль: фенилтиомочевина (ФТМ, 0,003%). Данио будут ежедневно визуально исследовать, используя микроскоп для препарирования; обработанных соединениями и ФТМ данио будут сравнивать с необработанными и обработанными наполнителем контрольными данио.

На 5 дпо будут подсчитывать число данио, демонстрирующих снижение пигментации, и выражать в виде % от исследуемых животных; будут предоставлять репрезентативные изображения. Чтобы определить оптимальную концентрацию соединения и время обработки для снижения пигментации, будут строить кинетическую кривую путем построения графика зависимости % данио, демонстрирующих снижение пигментации кожи, от концентрации. Для определения, является ли действие соединения значимым, будут использовать точный критерий Фишера ($P < 0,05$).

Количественное действие соединения на пигментацию кожи данио. На основании результатов визуальной оценки мы будем использовать оптимальные условия (концентрацию, время обработки соединением), чтобы количественно оценить действие соединения на пигментацию кожи данио.

Двадцать данио дикого типа АВ от Phylonix на оптимальной стадии, определенной по результатам визуальной оценки, будут обрабатывать оптимальной концентрацией соединения. Необработанных и обработанных 0,1% ДМСО данио будут использовать в качестве контроля. Положительный контроль:

фенилтиомочевина (ФТМ, 0, 03%).

Полное изображение данио сзади будут получать с помощью камеры SPOT при увеличении 2X. Задняя область головы и туловища будет определена как область интереса (ОИ) с помощью функции выбора в Adobe Photoshop. Черная пигментация на коже в ОИ будет выделена с помощью функции выделения в Photoshop. Общий пигментный сигнал (ПС) в пикселях будут определять с помощью функции гистограммы в Photoshop.

Если соединение влияет на рост данио, длина (Д) тела и ширина (Ш) туловища будут меньшими, что повлияет на площадь ОИ и конечное значение ПС. Следовательно, мы будем нормализовать измерение конечного сигнала (КС), используя $КС = ПС / Д \times Ш$.

Ожидается, что необработанные и обработанные наполнителем данио будут демонстрировать аналогичный КС, чтобы показать, что наполнитель не оказывает никакого действия. Ожидается, что обработанные ФТМ данио будут демонстрировать низкий КС, чтобы валидировать анализ. Обработанных соединений данио будут сравнивать с обработанными наполнителем контрольными данио.

Чтобы определить, является ли действие соединения значимым ($P < 0,05$), средний КС для обработанных соединений данио будут сравнивать со средним КС обработанных наполнителем данио, используя t-критерий Стьюдента.

Дополнительную количественную оценку действия соединения на пигментацию кожи данио будут проводить после обработки: концентрациями соединений 0,5 и 1,5 мкМ.

22 дпо данио дикого типа АВ от Phylonix будут обрабатывать концентрациями соединений 0,5 и 1,5 мкМ. Необработанных и обработанных 0,1% ДМСО данио будут использовать в качестве контроля. Положительный контроль: фенилтиомочевина (ФТМ, 0,003%).

Полное изображение данио сзади будут получать с помощью камеры SPOT при увеличении 2X. Задняя область головы будет определена как область интереса (ОИ) с помощью функции выбора в Adobe Photoshop. Черная пигментация на коже в ОИ будет выделена с помощью функции выделения в Photoshop. Общий пигментный сигнал (ПС) в пикселях будут определять с помощью функции гистограммы в Photoshop.

Если соединение влияет на рост данио, длина (Д) тела будет короче и ширина (Ш) туловища будет меньшей, что повлияет на площадь ОИ и конечное значение ПС. Следовательно, мы будем нормализовать конечный сигнал (КС), используя $КС = ПС / Д \times Ш$.

Ожидается, что необработанные и обработанные наполнителем данио будут демонстрировать аналогичный КС, чтобы подтвердить отсутствие действия наполнителя. Ожидается, что обработанные ФТМ данио будут демонстрировать низкий КС, что позволит валидировать анализ. Обработанных соединений данио будут сравнивать с обработанными наполнителем контрольными данио.

Чтобы определить, является ли действие соединения значимым ($P < 0,05$), средний КС для обработанных соединений данио будут сравнивать со средним КС обработанных наполнителем данио, используя t-критерий Стьюдента.

Результаты.

Результаты визуальной оценки данио, подверженных воздействию соединения II, приведены на фиг. 18А-18F и фиг. 19А-19F. Таблица с обобщенными результатами по связанной с визуальной оценкой части исследования приведена на фиг. 20.

Количественная оценка областей интереса и результаты для данио, подверженных воздействию соединения II, приведены на фиг. 21А-21Е и фиг. 22А-22В.

Пример 14.

Стабильность малассезина и производных малассезина в ДМСО и клеточной культуральной среде.

Исследуемые соединения готовили в концентрации 100 мкМ в ДМСО и культуральной среде. Растворы инкубировали при комнатной температуре в течение 2 ч и анализировали с помощью ЖХ-МС. Площадь пика использовали для оценки соединения, оставшегося в растворителе.

Результаты.

Результаты ЖХ-МС приведены на фиг. 23А-23J. Эти результаты свидетельствуют о том, что соединения являются стабильными в культуральной среде после двухчасовой инкубации.

Ссылки

- Berridge, M.V., Tan, A.S., McCoy, K.D., Wang, R. The Biochemical and Cellular Basis of Cell Proliferation Assays That Use Tetrazolium Salts. *Biochemica* 4:14-19 (1996).
- Black, et al. Athymic Nude Mice and Human Skin Grafting. B: Maibach, et al. (eds.). *Models in Dermatology Vol. 1*. Karger, Basel, 1985, 228-39.
- Costin, G.-E., Raabe, R. Optimized in vitro pigmentation screening assay using a reconstructed three dimensional human skin model. *Rom. J. Biochem.* 50 (1), 15-27 (2013).
- Donato, et al. A Microassay for Measuring Cytochrome P450IA1 and P450IIB1 Activities in Intact Human and Rat Hepatocytes Cultured on 96-Well Plates. *Anal Biochem.* 1993; 213(1):29-33.
- Elmore. Apoptosis: A Review of Programmed Cell Death. *Toxicologic Pathology* 2007; 35:495-516.
- Fitzpatrick, et al. The Validity and Practicality of Sun-Reactive Skin Types I Through VI. *Arch Dermatol.* 1988; 124(6):869-871.
- Gaitanis, et al. Skin Diseases Associated With *Malassezia* Yeasts: Facts and Controversies. *Clinics in Dermatology* 2013; 31:455-463.
- Guého, et al. The Genus *Malassezia* With Description of Four New Species. *Antonie Van Leeuwenhoek* 1996; 69:337-55.
- Karchner, et al. Identification and Functional Characterization of Two Highly Divergent Aryl Hydrocarbon Receptors (AHR1 and AHR2) in the Teleost *Fundulus heteroclitus*. *The Journal of Biological Chemistry* 1999; 274(47):33814-24.
- Krämer, et al. Malassezin, A Novel Analyt of the Aryl Hydrocarbon Receptor From The Yeast *Malassezia furfur*, Induces Apoptosis in Primary Human Melanocytes. *ChemBioChem* 2005; 6:860-5.
- Lee, et al. Comparison of Gene Expression Profiles Between Keratinocytes, Melanocytes and Fibroblasts. *Ann Dermatol.* 2013; 25(1):35-45.
- Manning, et al. Maintenance of Skin Xenografts of Widely Divergent Phylogenetic Origin on Congenitally Athymic (Nude) Mice. *J Exp Med* 1973; 138:488-94.
- Nazzaro-Porro, et al. Identification of Tyrosinase

Inhibitors in Cultures of *Pityrosporum*. The Journal of Investigative Dermatology 1978; 71:205-208.

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

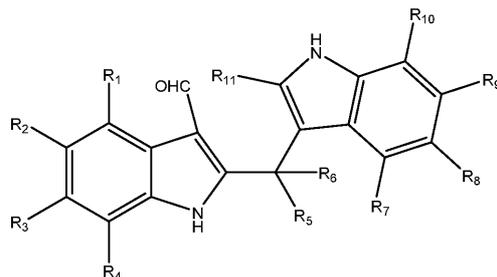
Zonios, et al. Skin Melanin, Hemoglobin, and Light Scattering Properties can be Quantitatively Assessed In Vivo Using Diffuse Reflectance Spectroscopy. *J Invest Dermatol.* 2001; 117:1452-1457.

Все документы, процитированные в этом изобретении, включены в данный документ посредством ссылки, как если бы они цитировались в полном объеме.

Хотя в данном документе были описаны иллюстративные варианты реализации настоящего изобретения, следует понимать, что изобретение не ограничено этими описанными вариантами, а специалисты в данной области могут вносить различные другие изменения или модификации, не отступая от объема и сущности изобретения.

ФОРМУЛА ИЗОБРЕТЕНИЯ

1. Косметическая композиция для осветления кожи, содержащая соединение, имеющее структуру формулы (II)



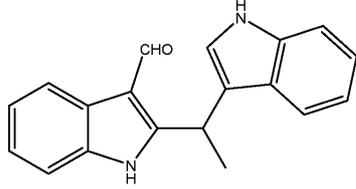
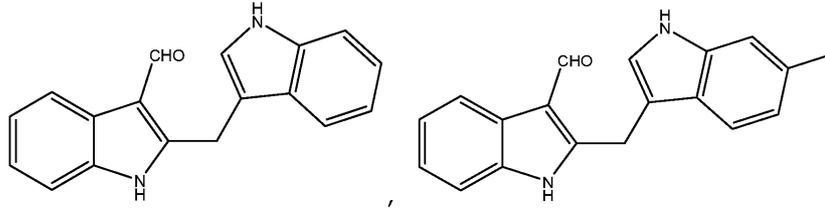
(II)

где R₁, R₂, R₃, R₄, R₅, R₆, R₇, R₈, R₉, R₁₀ и R₁₁ независимо выбраны из группы, состоящей из водорода и метила;

или косметически приемлемую соль, и косметически приемлемый наполнитель, разбавитель или носитель, и дополнительно содержащая один или несколько ингредиентов, выбранных из группы, состоящей из отдушек, эстрогена, витамина А, витамина С, витамина Е, пировиноградной кислоты, молочной кислоты, гликолевой кислоты, ланолина, вазелина, алоэ вера, метилпарабена, пропилпарабена и пигментов.

2. Композиция по п.1, отличающаяся тем, что представляет собой композицию для местного или трансдермального введения, выбранную из группы, состоящей из порошков, спреев, мазей, паст, кремов, лосьонов, гелей, пластырей, эмульсий, суспензий, аэрозолей и ингаляторов.

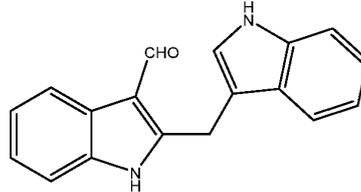
3. Косметическая композиция по п.2, отличающаяся тем, что соединение выбрано из группы, состоящей из:



и

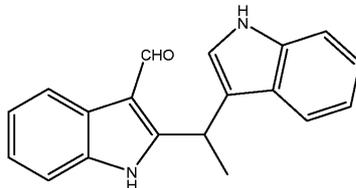
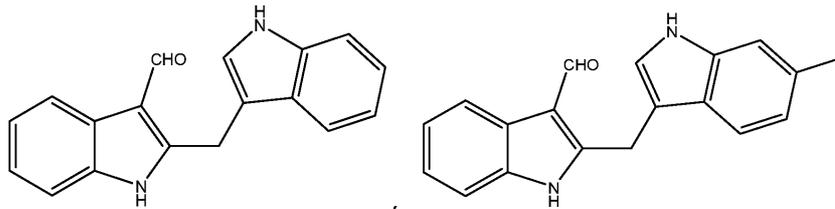
или их косметически приемлемой соли.

4. Композиция по п.3, отличающаяся тем, что соединение представляет собой



или его косметически приемлемую соль.

5. Способ осветления кожи у субъекта-человека, содержащий нанесение на субъекта-человека соединения, выбранного из группы, состоящей из:



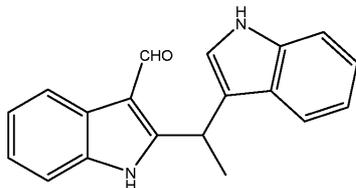
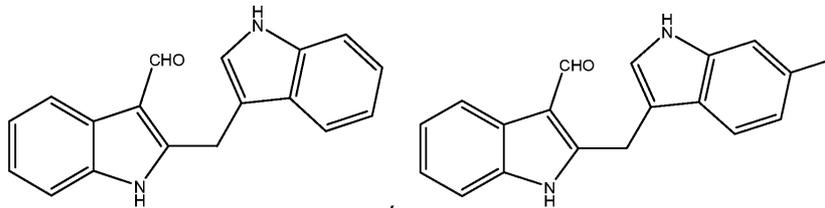
и

или их косметически или фармацевтически приемлемой соли.

6. Способ для осветления кожи у субъекта-человека, содержащий нанесение на субъекта-человека композиции по п.1.

7. Способ для осветления кожи у субъекта-человека, содержащий нанесение на субъекта-человека композиции по п.2.

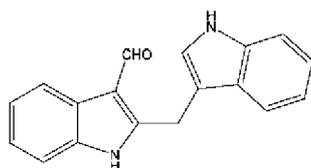
8. Способ по п.7, отличающийся тем, что соединение выбрано из группы, состоящей из:



и

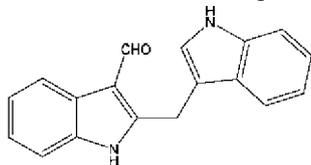
или их косметически или фармацевтически приемлемой соли.

9. Способ по п.5, отличающийся тем, что соединение представляет собой:



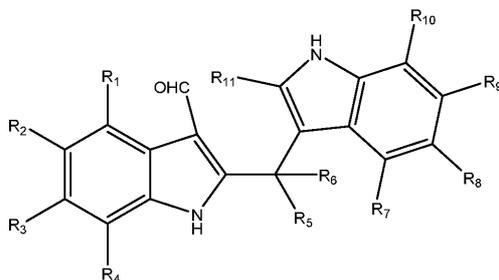
или его косметически или фармацевтически приемлемую соль.

10. Способ по п.8, отличающийся тем, что соединение представляет собой



или его косметически или фармацевтически приемлемую соль.

11. Фармацевтическая композиция для осветления кожи, содержащая соединение, имеющее структуру формулы (II)



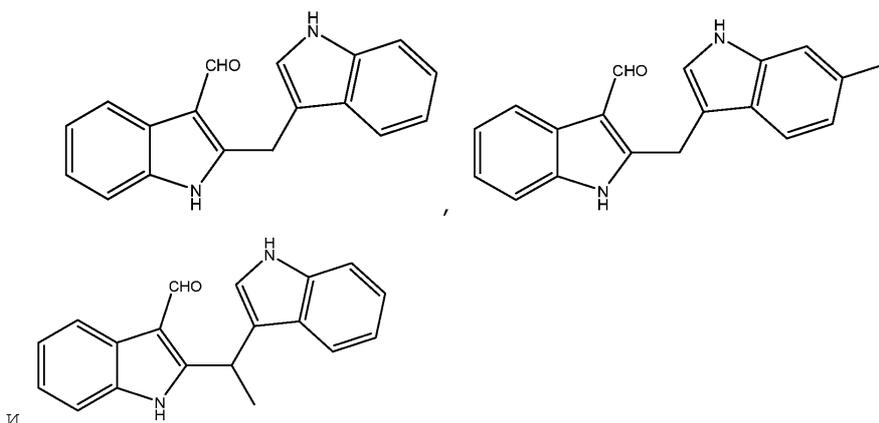
(II)

где R₁, R₂, R₃, R₄, R₅, R₆, R₇, R₈, R₉, R₁₀ и R₁₁ независимо выбраны из группы, состоящей из водорода и метила;

или фармацевтически приемлемую соль, и фармацевтически приемлемый наполнитель, разбавитель или носитель, и дополнительно содержащая один или несколько ингредиентов, выбранных из группы, состоящей из отдушек, эстрогена, витамина А, витамина С, витамина Е, пировиноградной кислоты, молочной кислоты, гликолевой кислоты, ланолина, вазелина, алоэ вера, метилпарабена, пропилпарабена и пигментов.

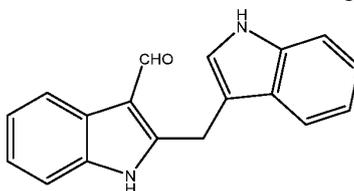
12. Фармацевтическая композиция по п.11, отличающаяся тем, что представляет собой композицию для местного или трансдермального введения, выбранную из группы, состоящей из порошков, спреев, мазей, паст, кремов, лосьонов, гелей, пластырей, эмульсий, суспензий, аэрозолей и ингаляторов.

13. Фармацевтическая композиция по п.12, отличающаяся тем, что соединение выбрано из группы, состоящей из:



или их фармацевтически приемлемой соли.

14. Композиция по п.13, отличающаяся тем, что соединение представляет собой



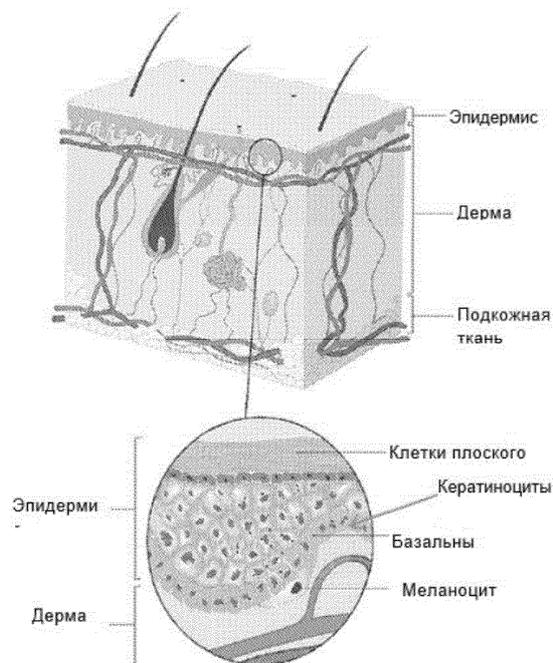
или его косметически или фармацевтически приемлемую соль.

15. Композиция по любому из пп.1-4 и 11-14, причем композиция представляет собой эмульсию или микроэмульсию.

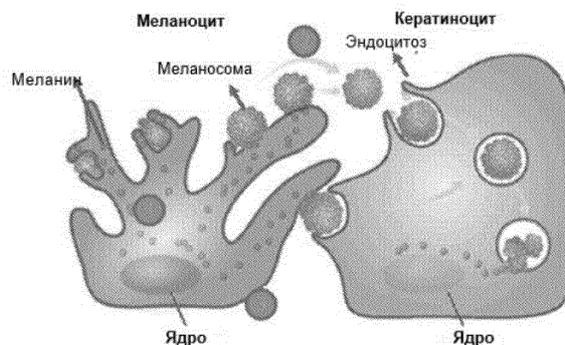
16. Композиция по п.15, причем композиция представляет собой эмульсию или микроэмульсию типа "вода в масле" или типа "масло в воде".

17. Способ по любому из пп.6-8 и 10, причем композиция представляет собой эмульсию или микроэмульсию.

18. Способ по п.17, причем композиция представляет собой эмульсию или микроэмульсию типа "вода в масле" или типа "масло в воде".

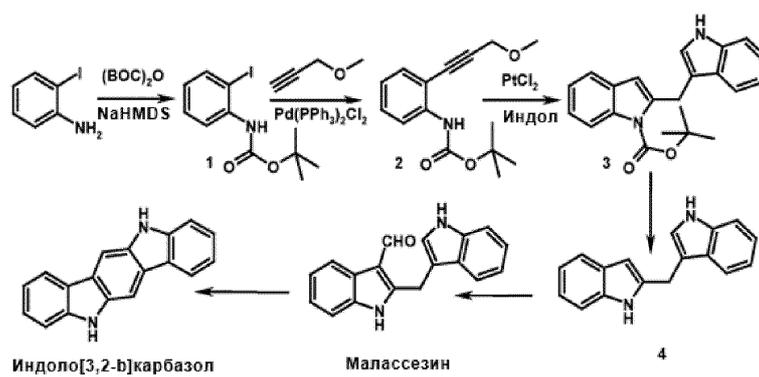


Фиг. 1А

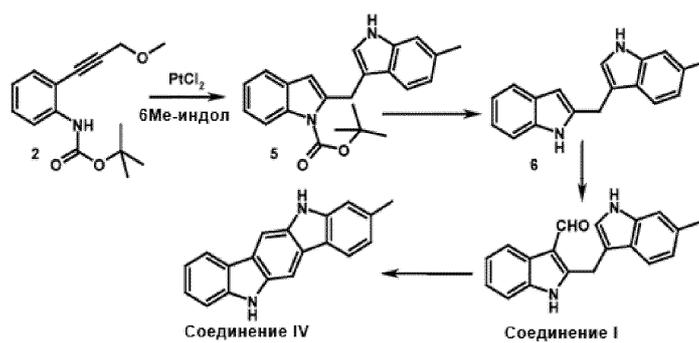


- 1 – Ингибирование синтеза меланина – ингибирование тирозиназы
- 2 – Ингибирование транспорта меланина в кератиноциты
- 3 – Апоптоз меланоцитов

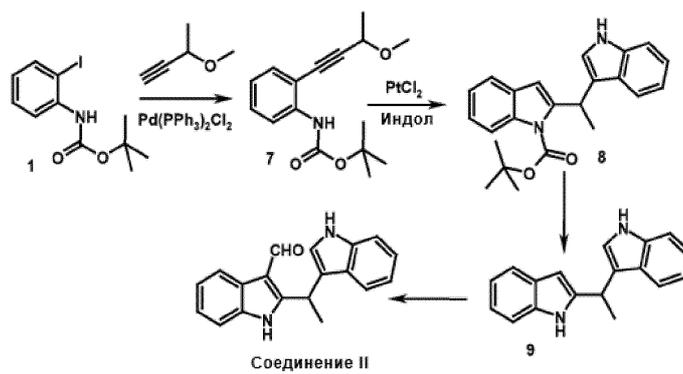
Фиг. 1В



Фиг. 2А



Фиг. 2В

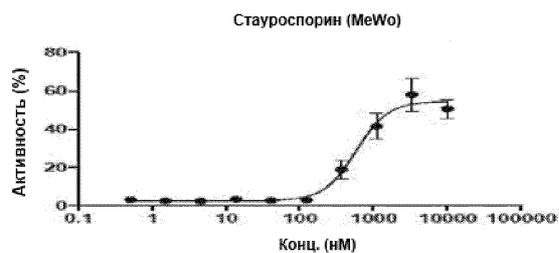


Фиг. 2С

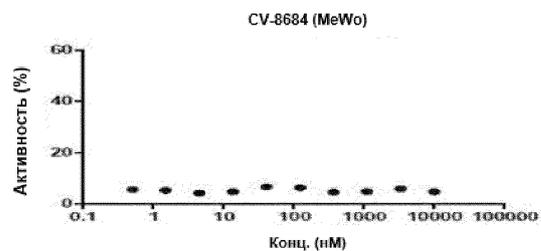
Номер соединения	EC50 [нМ] на MeWo	EC50 [нМ] на WM115
Стауроспорин	580,28	801,66
CV-8684	>10000	>10000
CV-8685	>10000	>10000
CV-8686	>10000	>10000
CV-8687	>10000	>10000
CV-8688	908,57	>10000

Фиг. 3А

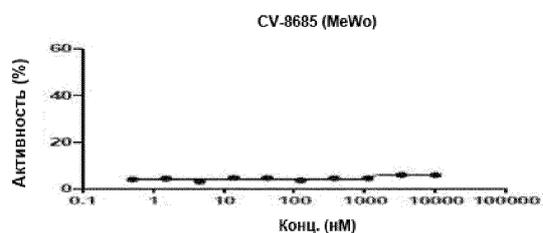
B



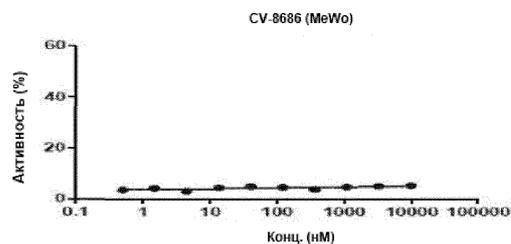
C



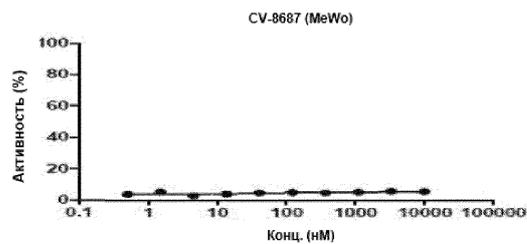
D



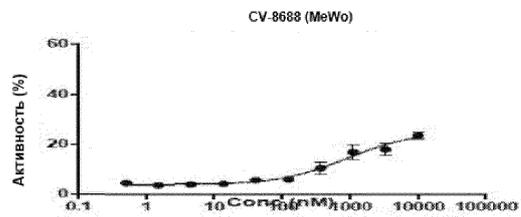
E



F

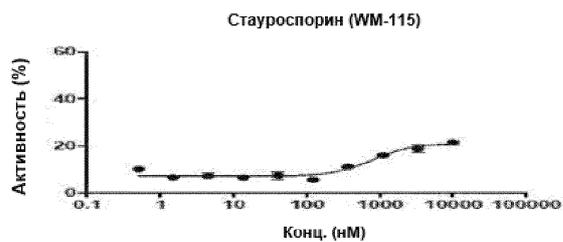


G

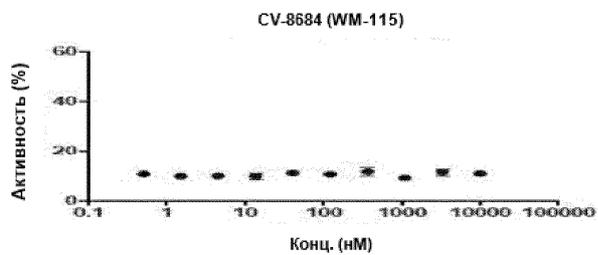


Фиг. 3В-3Г

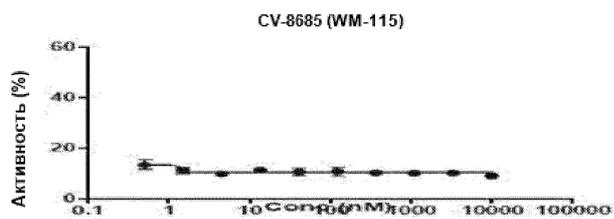
Н



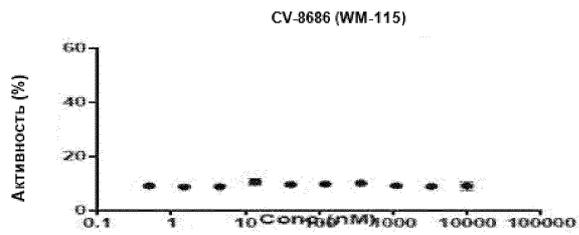
И



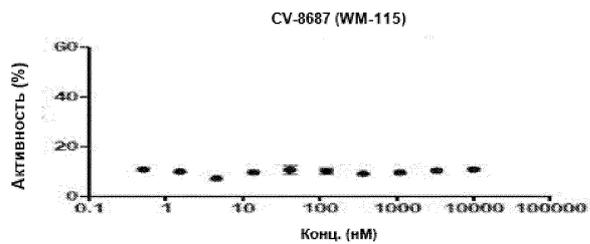
Ж



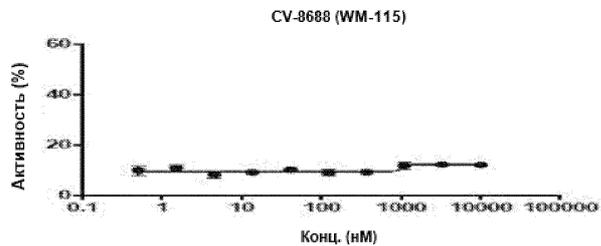
К



Л



М



Фиг. 3Н-3М

Время анализа	MeWo Аннексин V Доза	CV-8684				WM115 Аннексин V Доза	CV-8684			
		Относительный уровень аннексина V (%)					Относительный уровень аннексина V (%)			
		n=1	n=2	Среднее	CO		n=1	n=2	Среднее	CO
6 ч	100	255,88	282,35	269,12	18,72	100	124,91	153,90	139,41	20,50
	10	88,24	145,59	116,91	40,55	10	138,29	49,07	93,68	63,09
	1	136,76	158,82	147,79	15,60	1	104,83	111,52	108,18	4,73
24 ч	100	95,89	72,14	84,02	16,80	100	106,24	116,06	111,15	6,94
	10	90,62	80,06	85,34	7,47	10	126,74	99,60	113,17	19,19
	1	87,98	42,23	65,10	32,35	1	121,83	106,24	114,04	11,02
48 ч	100	125,45	105,45	115,45	14,14	100	23,31	29,97	26,64	4,71
	10	130,91	103,64	117,27	19,28	10	49,95	47,45	48,70	1,77
	2	74,55	54,55	64,55	14,14	1	74,09	67,43	70,76	4,71
72 ч	100	30,94	8,84	19,89	15,63	100	55,13	59,27	57,20	2,93
	10	75,14	26,52	50,83	34,38	10	147,98	130,57	139,27	12,31
	1	39,78	66,30	53,04	18,75	1	113,99	118,13	116,06	2,93

Фиг. 4А

Время анализа	MeWo Аннексин V Доза	CV-8685				WM115 Аннексин V Доза	CV-8685			
		Относительный уровень аннексина V (%)					Относительный уровень аннексина V (%)			
		n = 1	n = 2	Среднее	CO		n = 1	n = 2	Среднее	CO
6 ч	100	110,29	127,94	119,12	12,48	100	89,22	66,91	78,07	15,77
	10	202,94	101,47	152,21	71,75	10	149,44	75,84	112,64	52,05
	1	75,00	79,41	77,21	3,12	1	120,45	113,75	117,10	4,73
24 ч	100	106,45	60,70	83,58	32,35	100	146,08	143,49	144,79	1,84
	10	146,04	112,61	129,33	23,64	10	133,38	106,53	119,96	18,99
	1	85,34	122,29	103,81	25,13	1	118,95	105,95	112,45	9,19
48 ч	100	187,27	330,91	259,09	101,57	100	127,37	198,96	163,16	50,62
	10	107,27	214,55	160,91	75,85	10	125,70	59,94	90,32	50,03
	1	92,73	81,82	87,27	7,71	1	74,92	69,93	72,42	3,53
72 ч	100	79,56	114,92	97,24	25,00	100	67,56	77,51	72,54	7,03
	10	88,40	83,98	86,19	3,13	10	106,11	112,75	109,43	4,69
	1	30,94	92,82	61,88	43,75	1	98,65	97,41	98,03	0,88

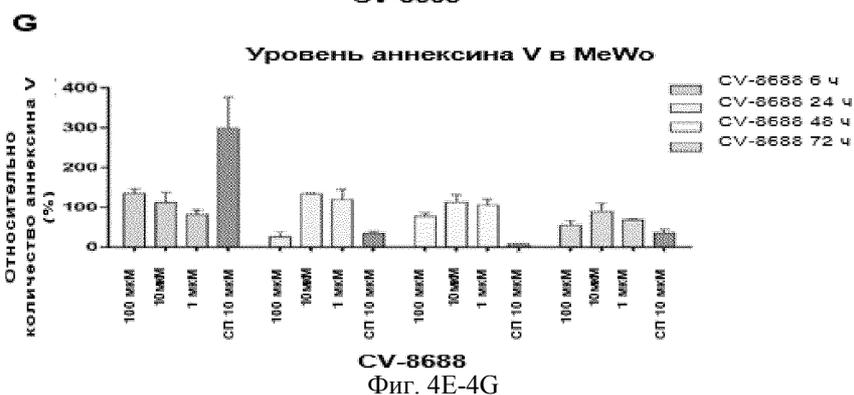
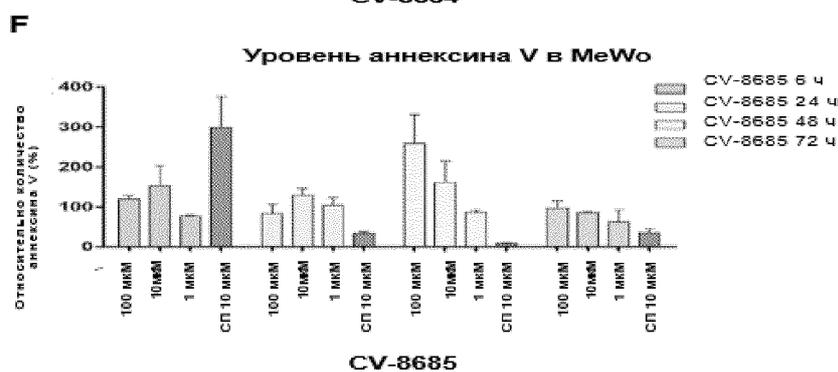
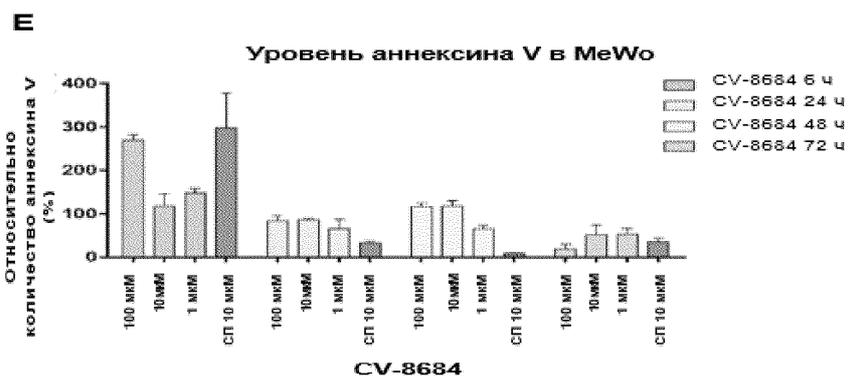
Фиг. 4В

Время анализа	MeWo Аннексин V Доза	CV-8688				WM115 Аннексин V Доза	CV-8688				
		Относительный уровень аннексина V (%)					Относительный уровень аннексина V (%)				
		n = 1	n = 2	Среднее	CO		n = 1	n = 2	Среднее	CO	n = 1
6 ч	100	123,53	145,59	134,56	15,60	100	180,67	194,05	187,36	9,46	
	10	136,76	88,24	112,50	34,32	10	122,68	198,51	160,59	53,62	
	1	92,65	70,59	81,62	15,60	1	89,22	140,52	114,87	36,28	
24 ч	100	36,95	13,20	25,07	16,80	100	17,32	15,59	16,46	1,22	
	10	131,09	134,60	132,84	2,49	10	99,31	105,09	102,20	4,08	
	1	144,28	95,01	119,65	34,84	1	114,90	66,40	90,65	34,30	
48 ч	100	85,45	69,09	77,27	11,57	100	14,25	7,49	10,82	4,71	
	10	94,55	130,91	112,73	25,71	10	89,97	120,71	104,89	22,37	
	1	120,00	90,91	105,45	20,57	1	130,70	125,70	128,20	3,53	
72 ч	100	66,30	44,20	55,25	15,63	100	2,49	1,66	2,07	0,59	
	10	66,30	110,50	88,40	31,25	10	108,19	114,40	111,30	4,40	
	1	70,72	66,30	68,51	3,13	1	96,99	113,99	105,49	12,02	

Фиг. 4С

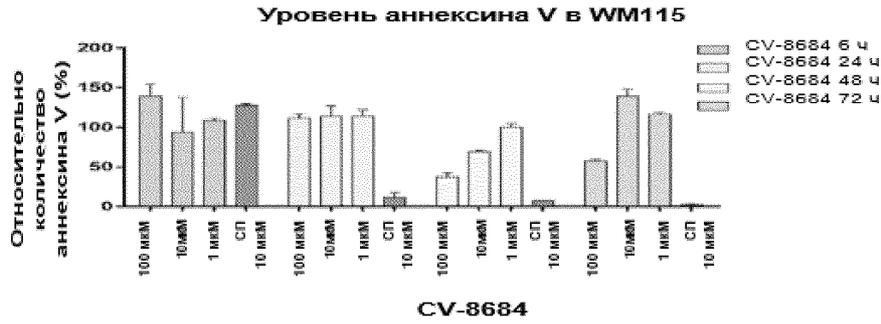
Время анализа	MeWo Аннексин V Доза	Стауроспорин Относительный уровень аннексина V (%)				WMX15 Аннексин V Доза	Стауроспорин Относительный уровень аннексина V (%)			
		n = 1	n = 2	Среднее	СО		n = 1	n = 2	Среднее	СО
6 ч	10	377,03	218,92	297,97	111,80	10	124,91	129,37	127,14	3,15
24 ч	10	29,03	37,83	33,43	6,22	10	5,77	17,90	11,84	8,57
48 ч	10	9,09	7,27	8,18	1,29	10	7,49	6,66	7,08	0,59
72 ч	10	44,20	26,52	35,36	12,50	10	3,32	1,24	2,28	1,47

Фиг. 4D

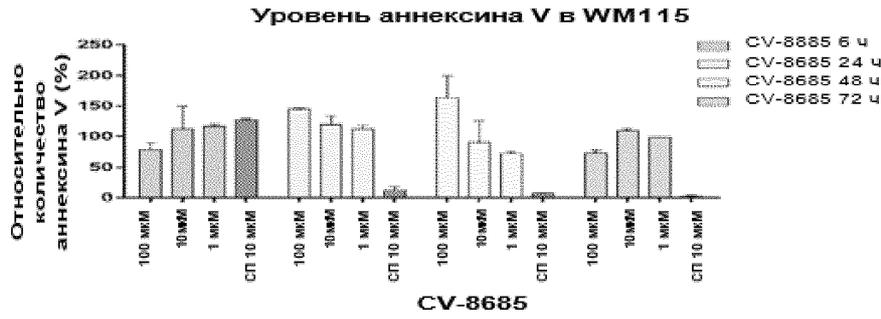


Фиг. 4E-4G

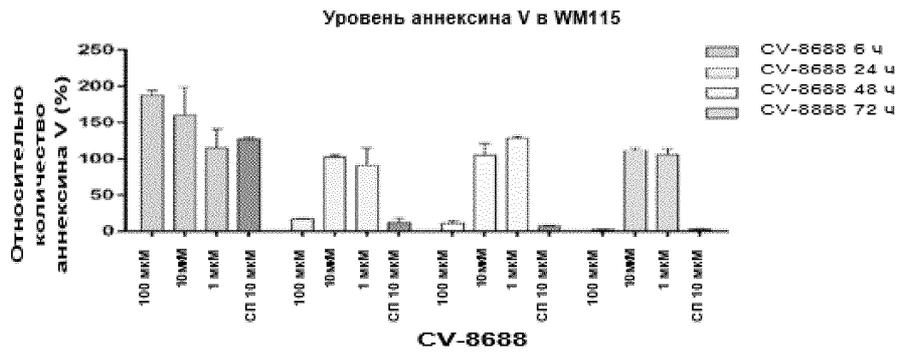
H



I

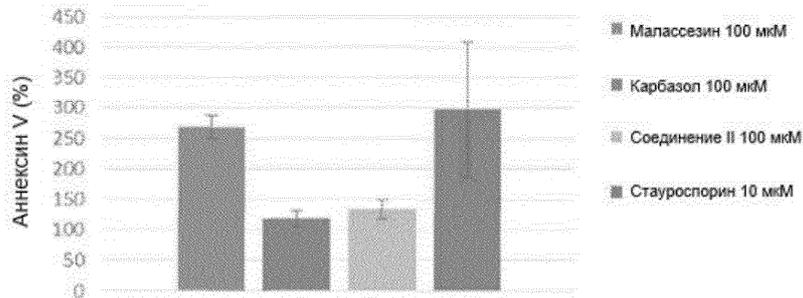


J



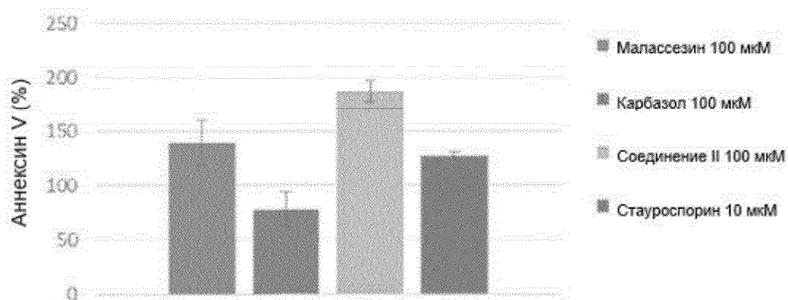
Фиг. 4H-4J

**Аннексин V (6 ч инкубации)
Линия клеток MeWo**

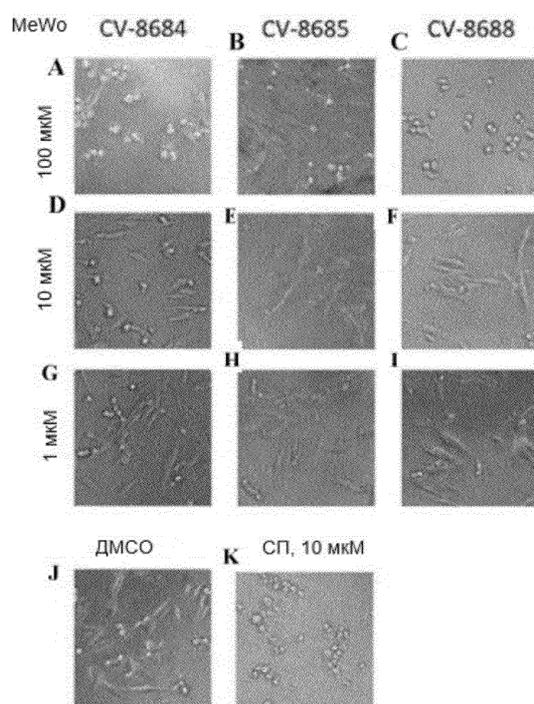


Фиг. 4K

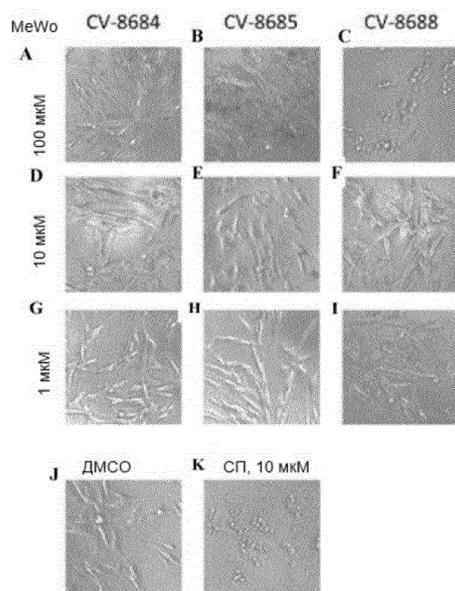
Аннексин V (6 ч инкубации)
Линия клеток WM115



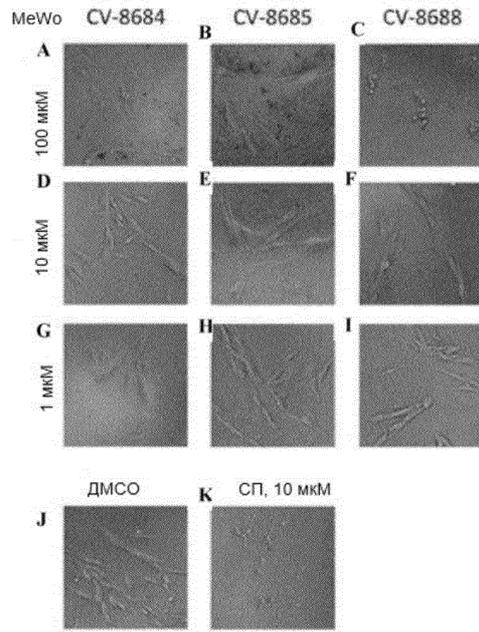
Фиг. 4L



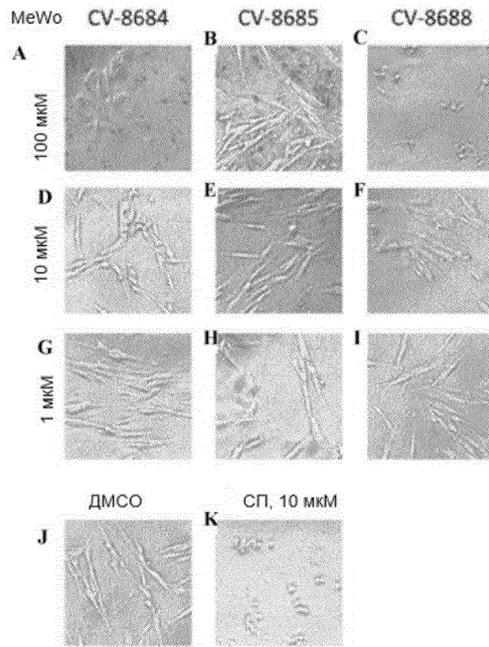
Фиг. 5A-5K



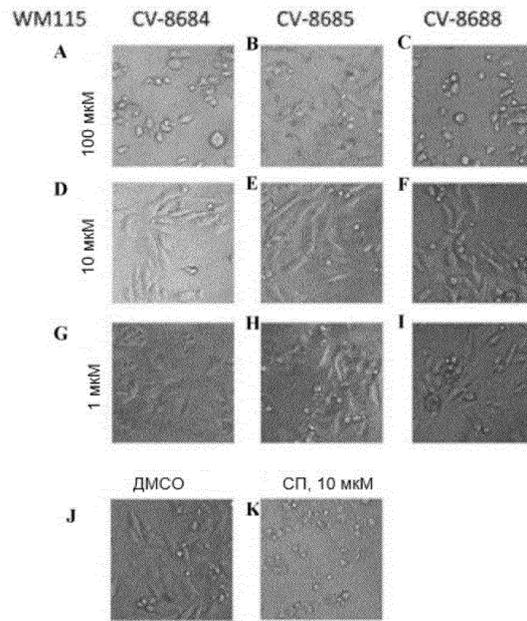
Фиг. 6A-6K



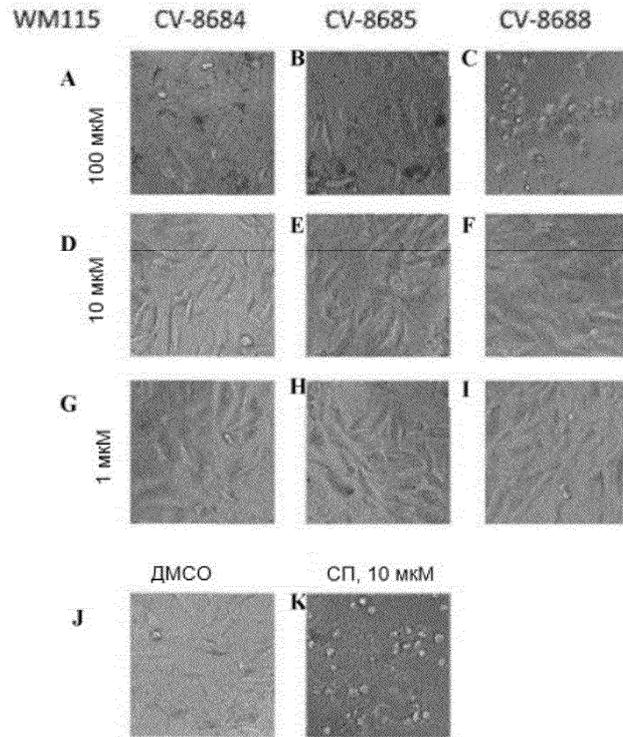
Фиг. 7А-7К



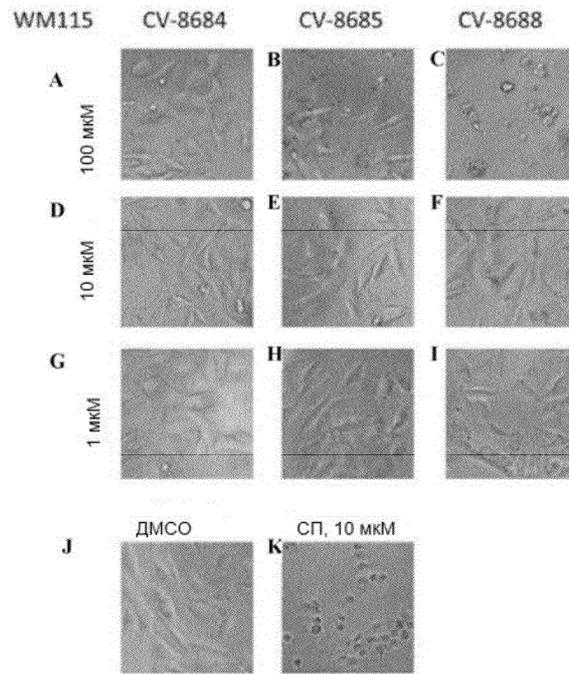
Фиг. 8А-8К



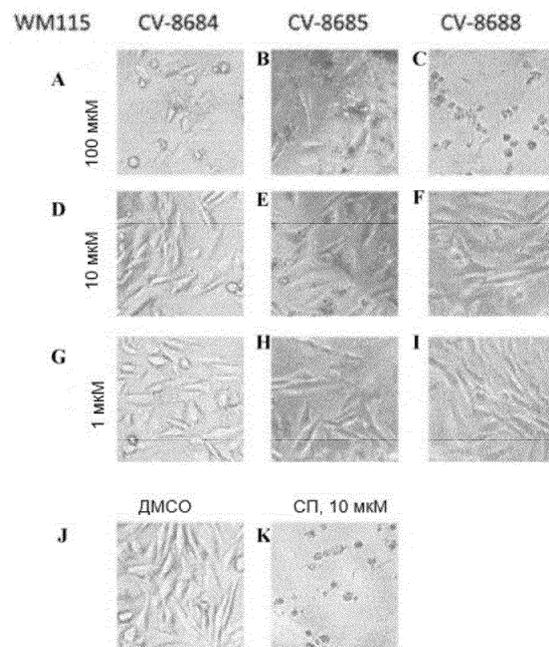
Фиг. 9А-9К



Фиг. 10А-10К



Фиг. 11А-11К



Фиг. 12А-12К

Время анализа	MeWo СТГ Доза	CV-8684 Жизнеспособность оставшихся клеток (%)				WM115 СТГ Доза	CV-8684 Жизнеспособность оставшихся клеток (%)			
		n = 1	n = 2	Среднее	СО		n = 1	n = 2	Среднее	СО
6 ч	100	34,50	32,55	33,52	1,38	100	62,71	45,31	54,01	12,30
	10	102,35	106,61	104,48	3,02	10	96,60	94,06	95,33	1,79
	1	101,49	95,16	98,33	4,47	1	102,04	103,31	102,67	0,90
24 ч	100	52,20	49,76	50,98	1,73	100	65,85	62,96	64,40	2,04
	10	90,73	83,62	87,18	5,03	10	92,21	88,80	90,51	2,41
	1	93,70	88,36	91,03	3,77	1	99,16	95,49	97,33	2,60
48 ч	100	49,17	47,86	48,52	0,93	100	42,46	32,16	37,31	7,28
	10	59,57	62,18	60,87	1,84	10	84,08	73,57	78,82	7,43
	1	76,02	71,82	73,92	2,97	1	98,16	90,59	94,38	5,35
72 ч	100	27,45	23,17	25,31	3,02	100	42,63	39,39	41,01	2,29
	10	38,51	35,78	37,14	1,93	10	112,60	110,28	111,44	1,64
	1	57,32	60,65	58,99	2,36	1	127,43	116,77	122,10	7,54

Фиг. 13А

Время анализа	MeWo СТГ Доза	CV-8685 Жизнеспособность оставшихся клеток (%)				WM115 СТГ Доза	CV-8685 Жизнеспособность оставшихся клеток (%)			
		n = 1	n = 2	Среднее	СО		n = 1	n = 2	Среднее	СО
6 ч	100	75,16	79,98	77,57	3,40	100	89,53	90,26	89,90	0,51
	10	98,08	98,08	98,08	0,00	10	100,41	96,60	98,50	2,69
	1	98,65	95,79	97,22	2,02	1	99,14	98,96	99,05	0,13
24 ч	100	87,18	91,92	89,55	3,35	100	65,58	62,31	63,94	2,32
	10	94,89	93,11	94,00	1,26	10	87,49	87,10	87,29	0,28
	1	90,14	88,36	89,25	1,26	1	94,70	92,74	93,72	1,39
43 ч	100	100,26	94,13	97,19	4,33	100	57,17	57,80	57,49	0,45
	10	80,59	80,21	80,40	0,27	10	85,34	82,61	83,97	1,93
	1	97,07	92,52	94,80	3,22	1	97,32	96,06	96,69	0,89
72 ч	100	73,74	65,54	69,64	5,80	100	75,99	67,19	71,59	6,23
	10	69,51	69,56	69,53	0,04	10	108,89	101,01	104,95	5,57
	1	61,97	66,74	64,35	3,37	1	122,79	118,16	120,47	3,28

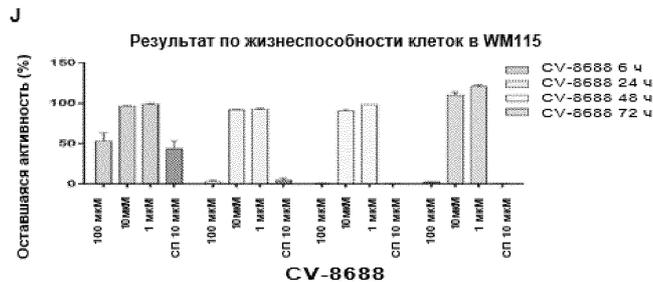
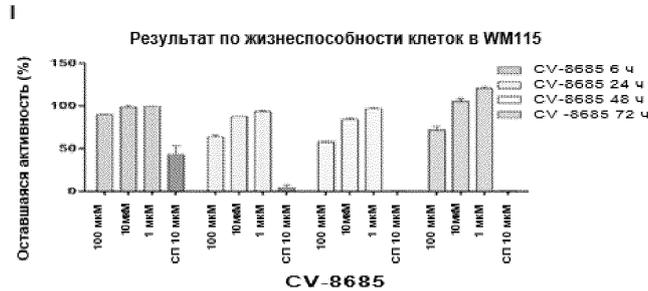
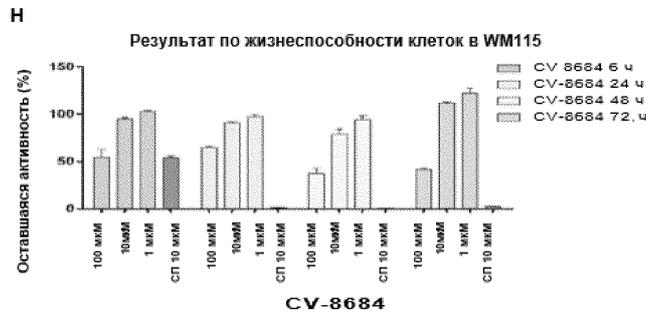
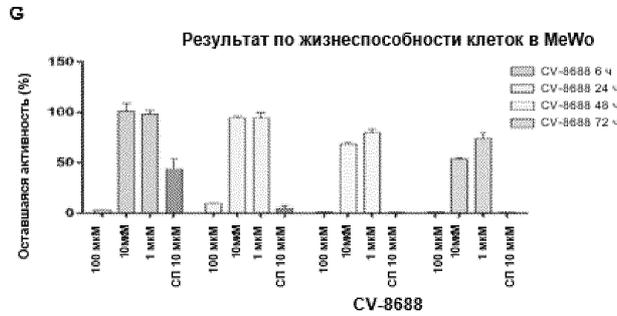
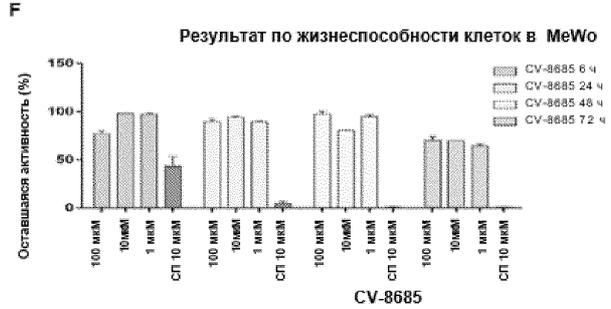
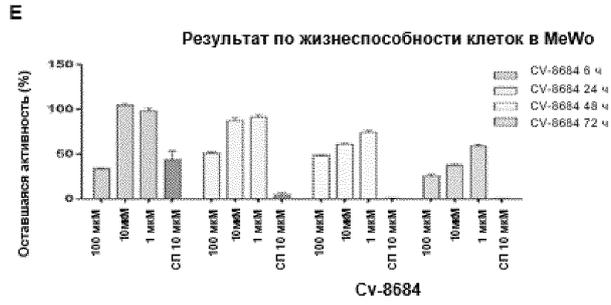
Фиг. 13В

Время анализа	MeWo СТГ Доза	CV-8688 Жизнеспособность оставшихся клеток (%)				WM115 СТГ Доза	CV-8688 Жизнеспособность оставшихся клеток (%)			
		n = 1	n = 2	Среднее	СО		n = 1	n = 2	Среднее	СО
6 ч	100	3,33	2,70	3,02	0,45	100	63,25	42,41	52,83	14,74
	10	108,32	93,82	101,07	10,25	10	96,78	95,51	96,15	0,90
	1	101,76	94,50	98,13	5,13	1	97,87	99,50	98,69	1,15
24 ч	100	9,91	8,85	9,38	0,74	100	4,32	2,25	3,29	1,47
	10	96,07	91,92	94,00	2,94	10	92,08	91,16	91,62	0,65
	1	88,36	99,63	94,00	7,97	1	91,56	93,00	92,28	1,02
48 ч	100	1,01	0,75	0,88	0,18	100	1,05	0,78	0,91	0,19
	10	70,14	66,56	68,35	2,53	10	91,85	88,91	90,38	2,08
	1	83,54	76,01	79,78	5,33	1	97,95	97,95	97,95	0,00
72 ч	100	0,90	0,72	0,81	0,13	100	2,53	2,33	2,43	0,14
	10	54,30	52,34	53,32	1,38	10	113,52	106,57	110,05	4,91
	1	79,95	67,49	73,72	8,81	1	122,79	118,62	120,71	2,95

Фиг. 13С

Время анализа	MeWo СТГ Доза	Стауроспорин Жизнеспособность оставшихся клеток (%)				WM115 СТГ Доза	Стауроспорин Жизнеспособность оставшихся клеток (%)			
		n = 1	n = 2	Среднее	СО		n = 1	n = 2	Среднее	СО
6 ч	10	33,39	53,30	43,34	14,08	10	55,46	51,29	53,38	2,95
24 ч	10	6,94	2,53	4,73	3,11	10	1,29	1,16	1,23	0,09
48 ч	10	0,84	0,61	0,73	0,16	10	0,54	0,55	0,55	0,00
72 ч	10	0,62	0,63	0,63	0,01	10	2,65	2,78	2,71	0,09

Фиг. 13D



Фиг. 13Е-13Ж

Соединение	Жизнеспособность клеток (% жизнеспособных клеток)					
	Линия клеток MeWo			Линия клеток WM115		
	24ч	48ч	72ч	24ч	48ч	72ч
Малассезин (100 мкМ)	51%	49%	25%	64%	37%	41%
Индолюкарбазол (100 мкМ)	90%	97%	70%	64%	57%	72%
Соединение II (100 мкМ)	9%	1%	1%	3%	1%	2%
Стауроспорин (10 мкМ)	5%	1%	1%	1%	1%	3%

Фиг. 13К

Время анализа	MeWo ЛДГ Доза	CV-8684 Уровень ЛДГ (%)				WM115 ЛДГ Доза	CV-8684 Уровень ЛДГ (%)			
		n = 1	n = 2	Среднее	CO		n = 1	n = 2	Среднее	CO
6 ч	100	107,53	88,80	98,17	13,25	100	105,30	107,71	106,50	1,71
	10	99,34	93,34	96,34	4,24	10	88,26	93,07	90,67	3,40
	1	100,67	93,76	97,22	4,89	1	95,04	88,86	91,95	4,37
24 ч	100	128,00	113,06	120,53	10,56	100	137,11	110,90	124,00	18,53
	10	104,34	91,17	97,75	9,31	10	111,28	108,83	110,06	1,73
	1	116,42	104,79	110,61	8,22	1	109,44	113,59	111,52	2,94
48 ч	100	108,45	129,84	119,14	15,12	100	141,09	120,98	131,04	14,21
	10	112,21	119,13	115,67	4,89	10	71,47	105,67	88,57	24,18
	1	114,69	112,52	113,60	1,53	1	87,84	108,38	98,11	14,52
72 ч	100	88,08	86,69	87,39	0,98	100	172,24	145,78	159,01	18,71
	10	89,41	85,17	87,29	3,00	10	134,39	125,37	129,88	6,38
	1	83,42	75,05	79,24	5,91	1	155,11	144,29	149,70	7,65

Фиг. 14А

Время анализа	MeWo ЛДГ Доза	CV-8685 Уровень ЛДГ (%)				WM115 ЛДГ Доза	CV-8685 Уровень ЛДГ (%)			
		n = 1	n = 2	Среднее	CO		n = 1	n = 2	Среднее	CO
6 ч	100	94,68	89,90	92,25	3,38	100	91,36	80,17	85,76	7,91
	10	85,58	92,47	89,03	4,87	10	94,90	95,37	95,14	0,33
	1	92,44	92,44	92,44	0,01	1	87,67	95,81	91,74	5,76
24 ч	100	142,99	104,54	123,76	27,19	100	213,02	234,98	224,00	15,53
	10	92,63	89,87	91,25	1,95	10	150,57	137,26	143,91	9,41
	1	101,78	105,21	103,49	2,43	1	94,63	109,59	102,11	10,58
48 ч	100	125,18	122,77	123,97	1,70	100	222,63	224,48	223,55	1,30
	10	108,43	111,15	109,79	1,92	10	143,57	113,47	128,52	21,28
	1	114,41	112,82	113,62	1,12	1	86,50	105,02	95,76	13,10
72 ч	100	82,24	56,05	72,14	22,76	100	262,72	259,96	261,34	1,95
	10	72,96	72,35	72,66	0,43	10	175,23	171,15	173,19	2,89
	1	77,93	74,86	76,40	2,17	1	147,09	145,42	146,75	0,47

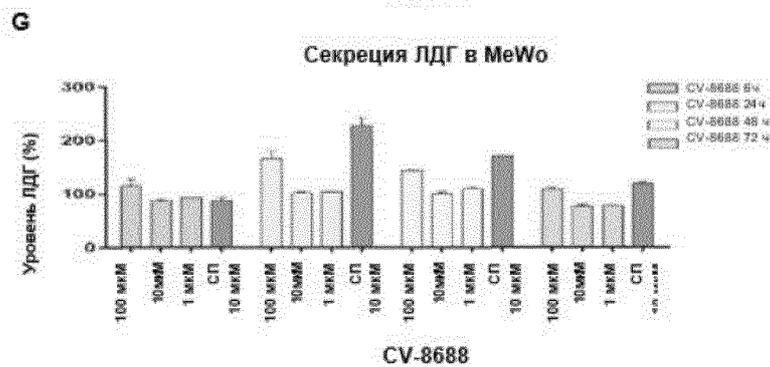
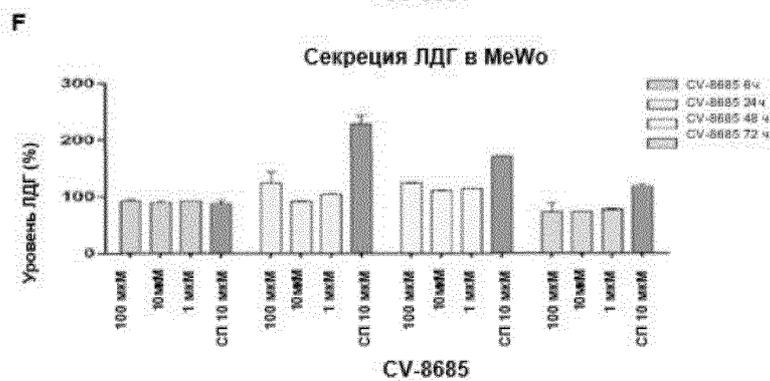
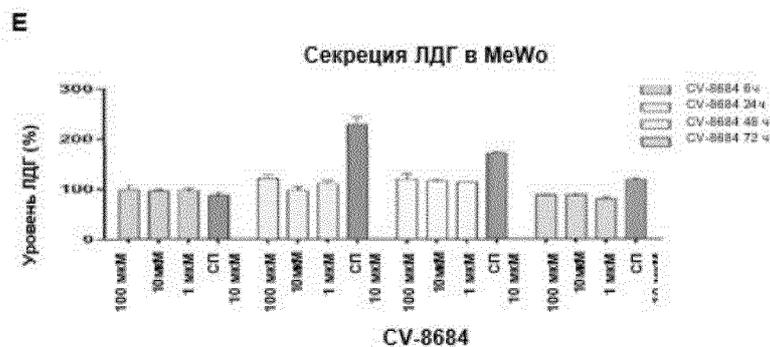
Фиг. 14В

Анализ Время	MeWo ЛДГ Доза	CV-8688 Уровень ЛДГ (%)				WM115 ЛДГ Доза	CV-8688 Уровень ЛДГ (%)			
		n = 1	n = 2	Среднее	CO		n = 1	n = 2	Среднее	CO
6 ч	100	127,34	101,13	114,23	18,53	100	113,29	126,97	120,13	9,68
	10	89,41	84,00	86,70	3,82	10	95,94	90,02	92,98	4,18
	1	92,90	92,24	92,57	0,47	1	93,07	89,66	91,36	2,41
24 ч	100	180,63	150,41	165,52	21,37	100	405,53	379,09	392,81	19,41
	10	103,64	99,45	101,55	2,96	10	115,00	102,91	108,96	8,55
	1	104,70	103,26	103,98	1,02	1	99,80	113,95	106,87	10,00
48 ч	100	142,36	143,69	143,03	0,94	100	240,09	276,78	258,43	25,95
	10	97,14	103,68	100,41	4,63	10	71,88	98,21	85,04	18,62
	1	107,03	111,80	109,42	3,37	1	91,02	93,94	92,48	2,07
72 ч	100	104,85	111,78	108,32	4,90	100	262,85	264,08	263,47	0,87
	10	72,51	79,43	75,97	4,89	10	108,06	111,37	109,71	2,34
	1	78,39	75,68	77,03	1,91	1	148,60	143,38	145,99	3,69

Фиг. 14С

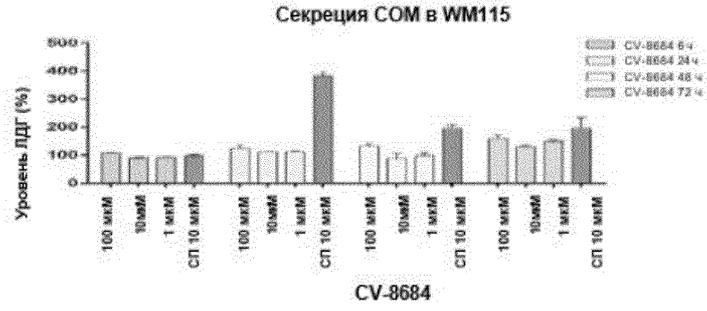
Анализ Время	MeWo ЛДГ Доза	Стауроспорин Уровень ЛДГ (%)				WM115 ЛДГ Доза	Стауроспорин Уровень ЛДГ (%)			
		n = 1	n = 2	Среднее	CO		n = 1	n = 2	Среднее	CO
6 ч	10	80,82	93,35	87,09	8,86	100	96,35	101,90	99,13	3,92
24 ч	10	243,09	212,50	227,80	21,63	100	394,99	371,77	383,38	16,42
48 ч	10	170,60	171,35	170,98	0,53	100	207,76	185,08	196,42	16,04
72 ч	10	114,91	122,19	118,55	5,15	100	158,74	233,56	196,15	52,91

Фиг. 14D

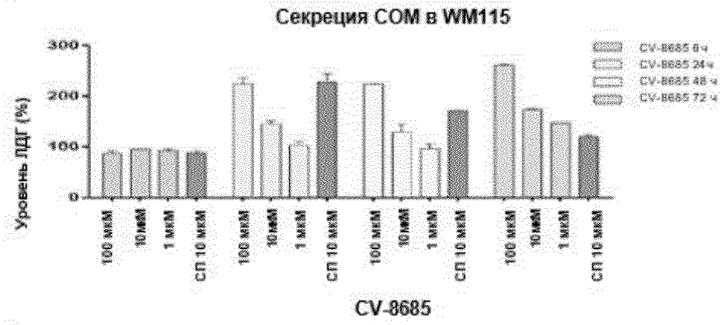


Фиг. 14E-14G

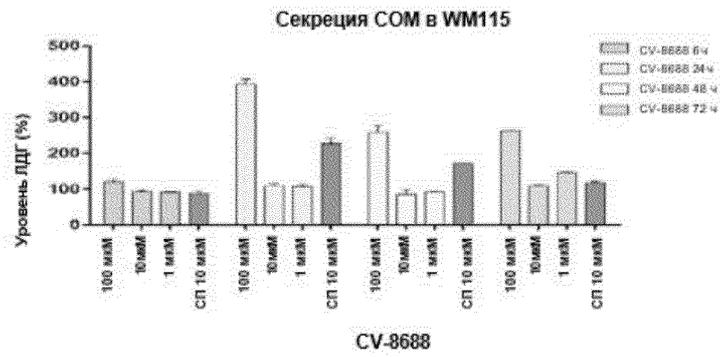
H



I

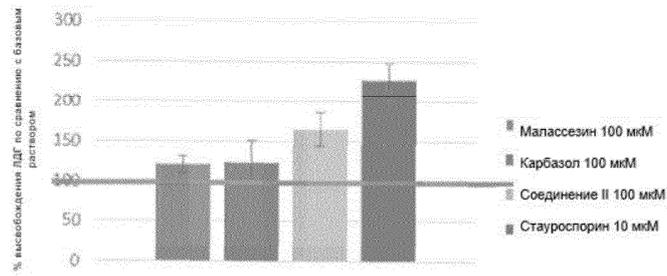


J



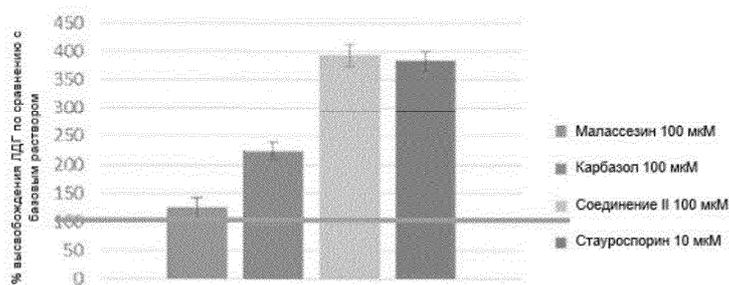
Фиг. 14H-14J

ЛДГ (24 ч инкубации)
Линия клеток MeWo

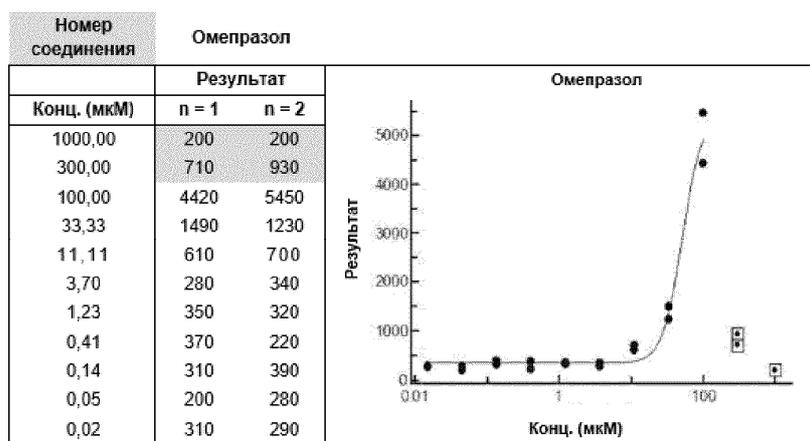


Фиг. 14K

ЛДГ (24 ч инкубации)
Линия клеток WM115

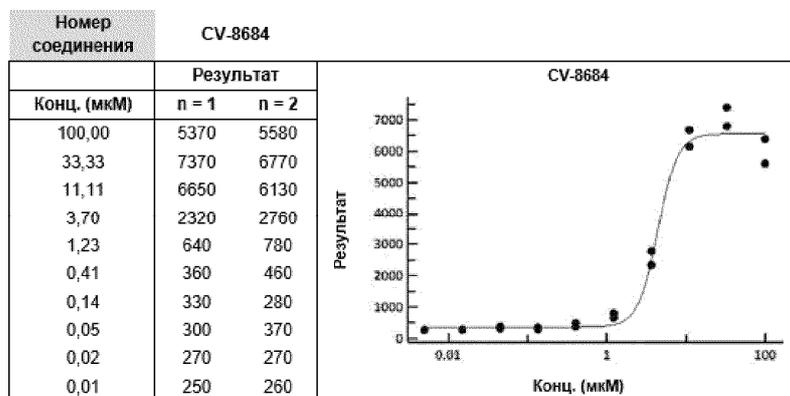


Фиг. 14L



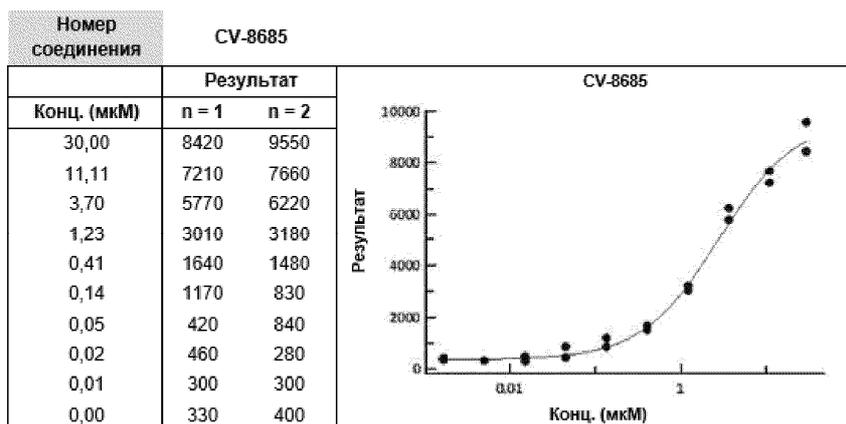
EC50 (мкМ) 51,01

Фиг. 15А



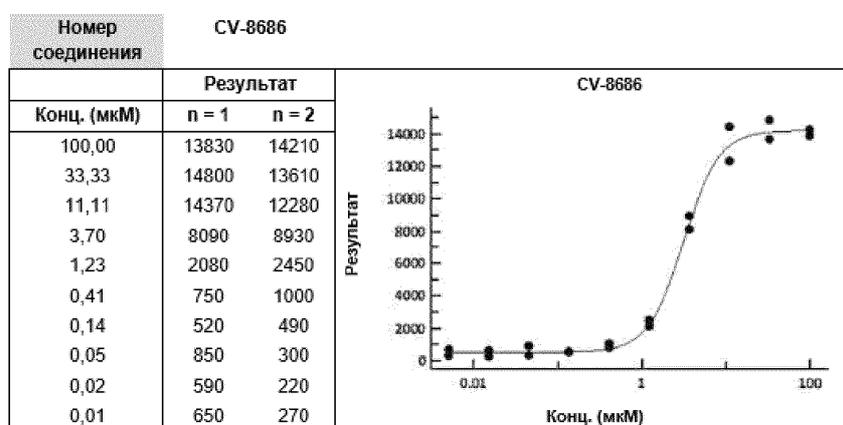
EC50 (мкМ) 4,39

Фиг. 15В



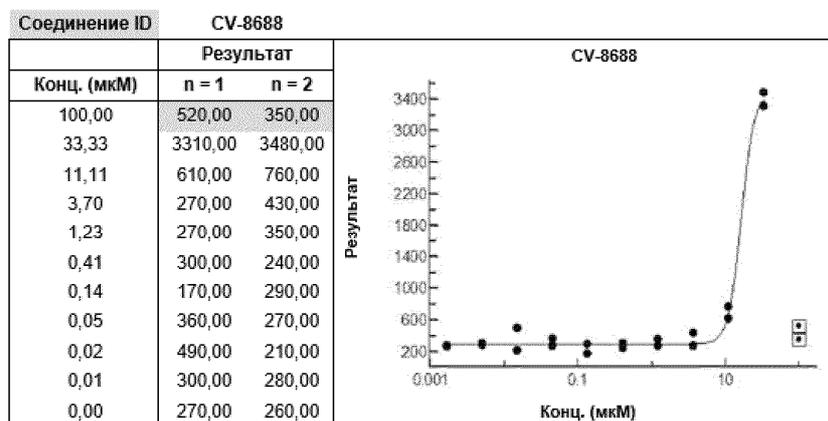
EC50 (мкМ) 2,80

Фиг. 15C



EC50 (мкМ) 3,13

Фиг. 15D

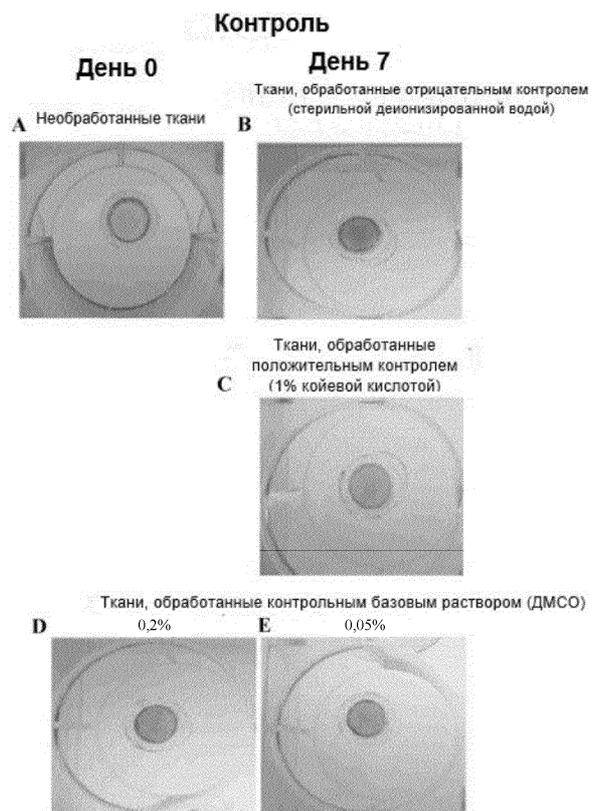


EC50 (мкМ) 16,41

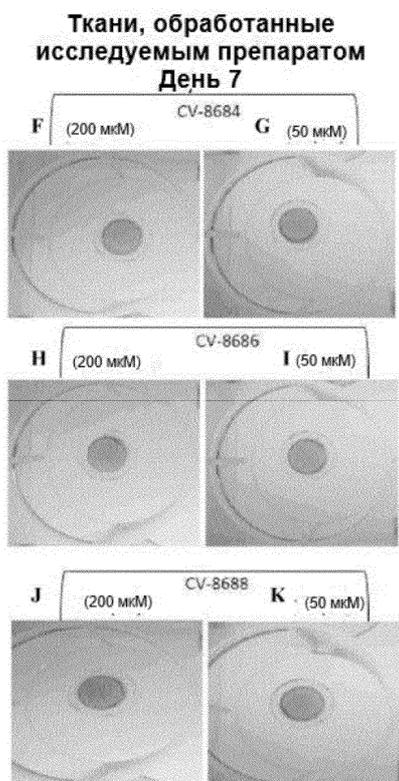
Фиг. 15E

Код соединений	Номер соединения	EC50 (мкМ)
PC	Омепразол	51,01
Cpd01	CV-8684	4,39
Cpd02	CV-8685	2,80
Cpd03	CV-8686	3,13
Cpd04	CV-8688	16,41

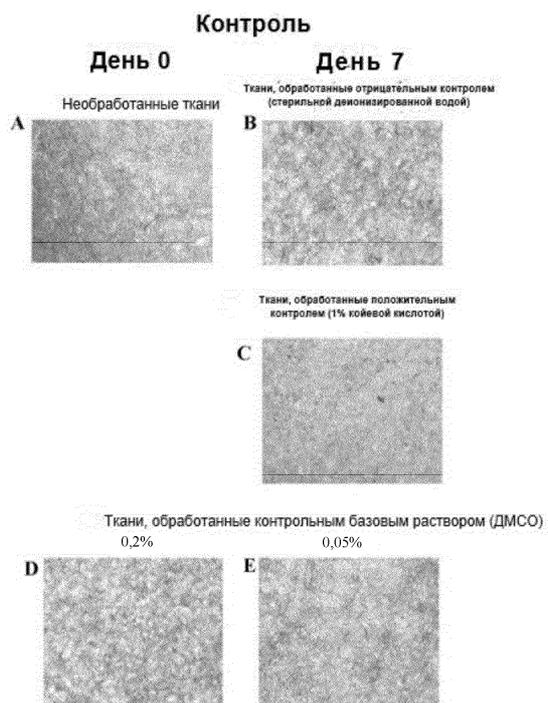
Фиг. 15F



Фиг. 16А-16Е

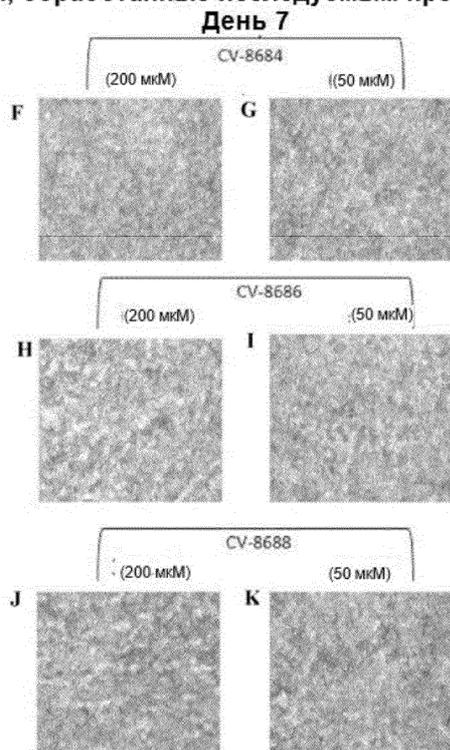


Фиг. 16F-16K

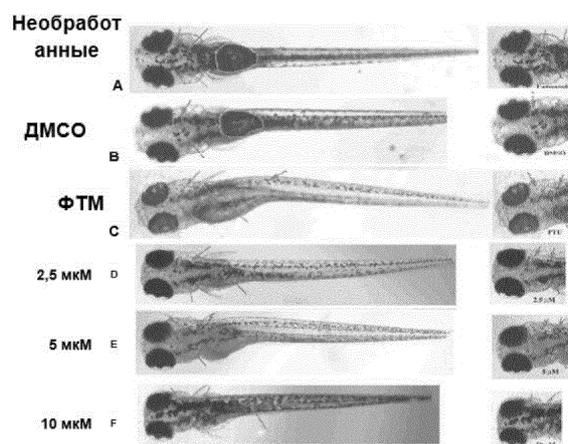


Фиг. 17А-17Е

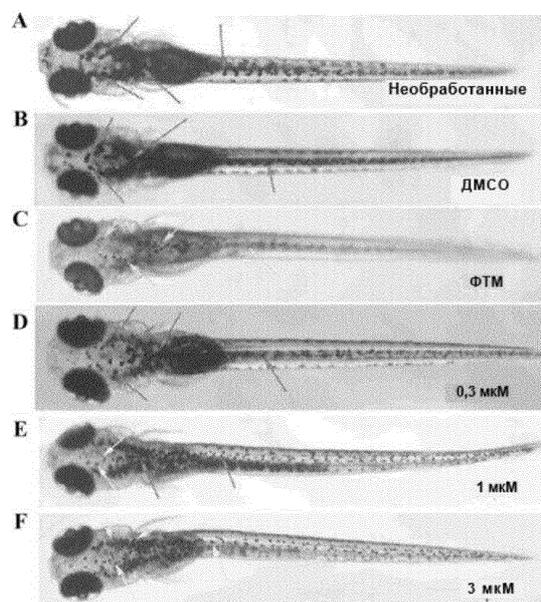
Ткани, обработанные исследуемым препаратом



Фиг. 17F-17K



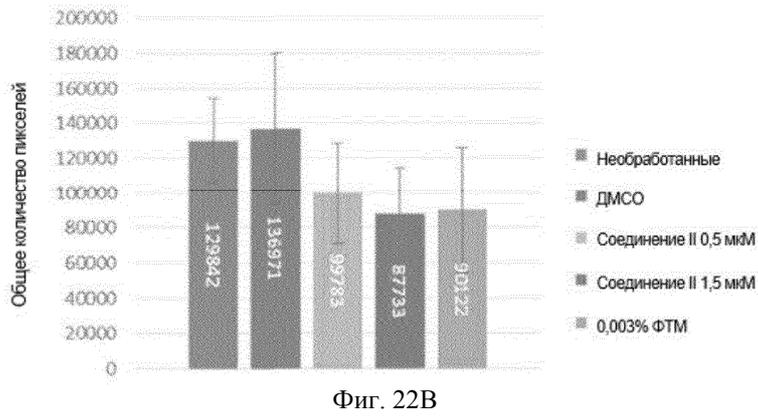
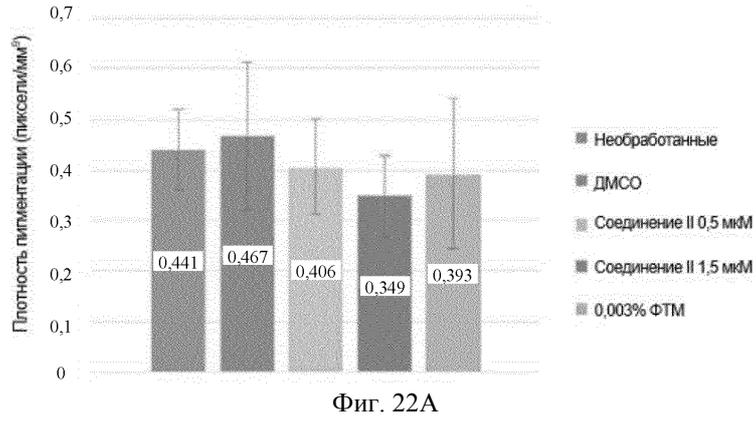
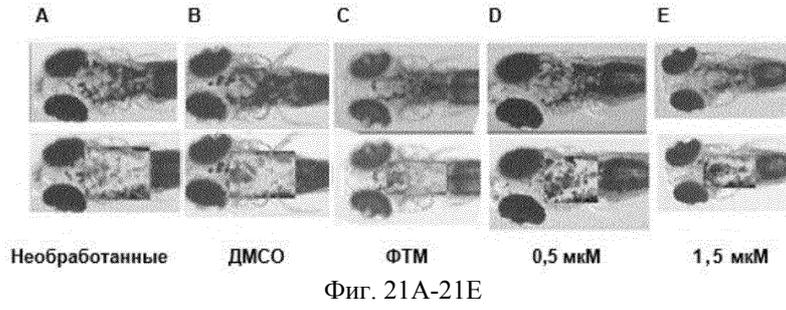
Фиг. 18А-18F



Фиг. 19А-19F

Условия	число данио со сниженной пигментацией кожи			Всего	% данио со сниженной пигментацией кожи
	Лунка 1	Лунка 2	Лунка 2		
Необработанные	1	0	0	1	3,3
ДМСО	1	0	0	1	3,3
0,03% ФТМ	10	10	10	30	100,0
0,3 мкМ	0	3	0	3	10,0
1 мкМ	2	6	7	15	50,0
2,5 мкМ	9	10	10	29	96,7
3 мкМ	9	7	7	23	76,7
5 мкМ*	7	5	8	20	66,7
10 мкМ*	0	0	1	1	3,3

Фиг. 20



Линия#1

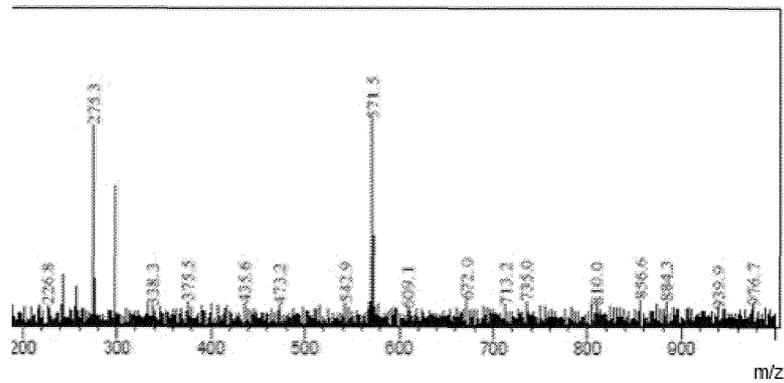
Р.Время:2.645(Скан#:231)

Масс-пик:912

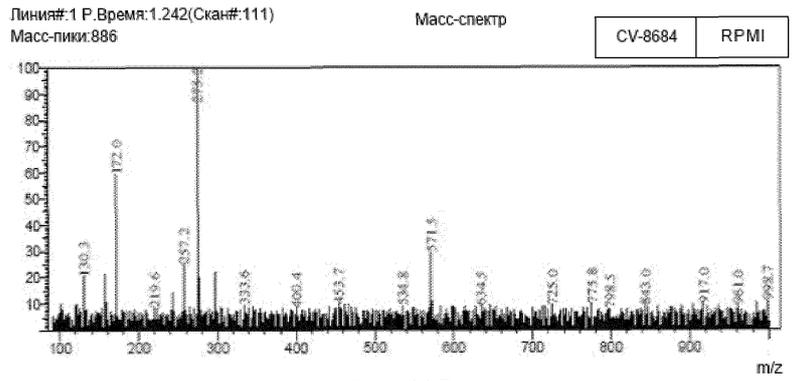
Масс-спектр

CV-8684

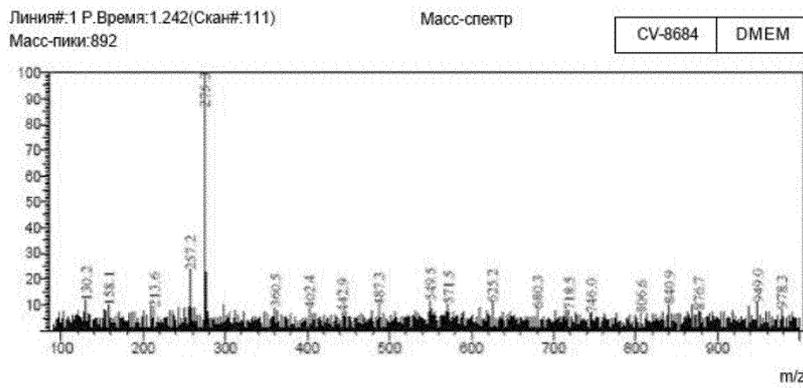
ДМСО



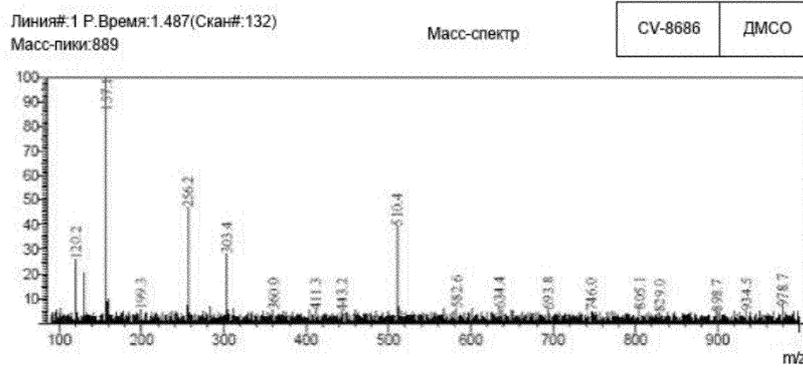
044823



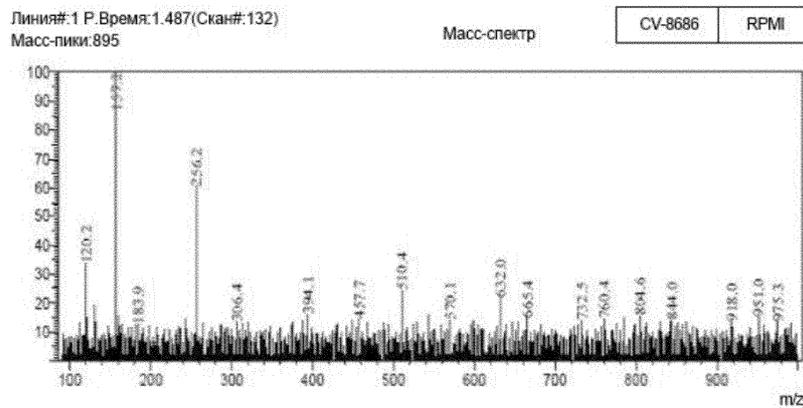
Фиг. 23В



Фиг. 23С

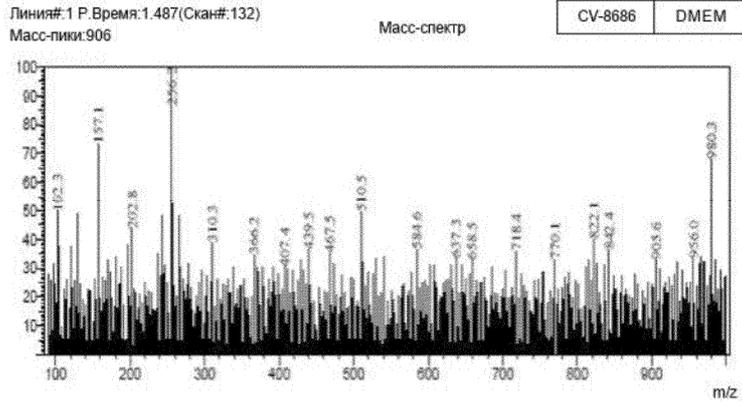


Фиг. 23D

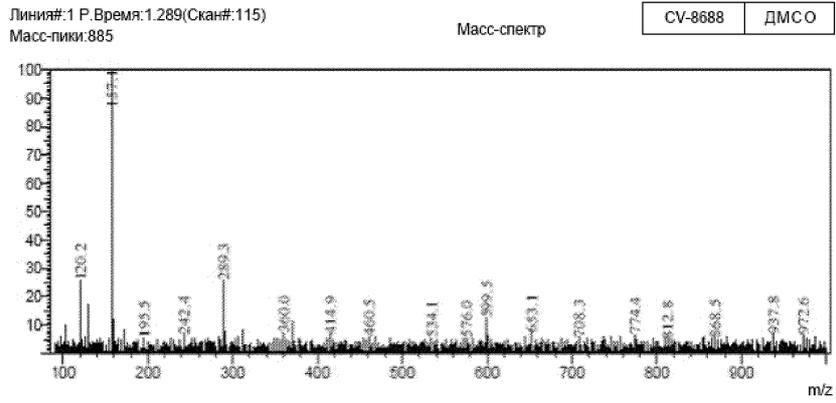


Фиг. 23Е

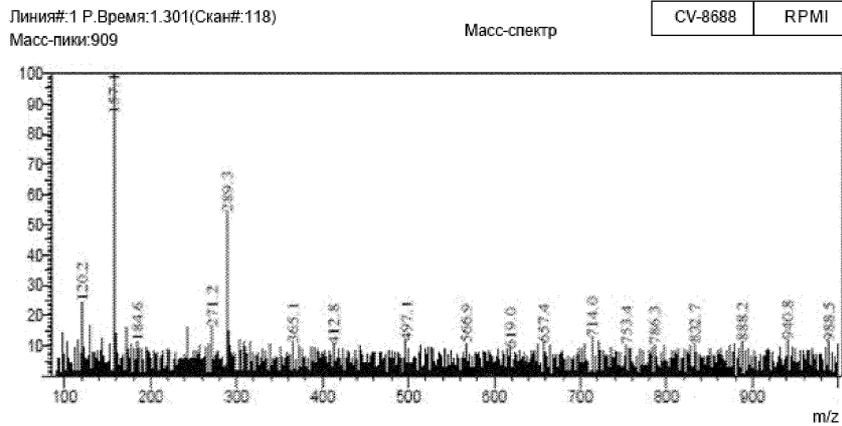
044823



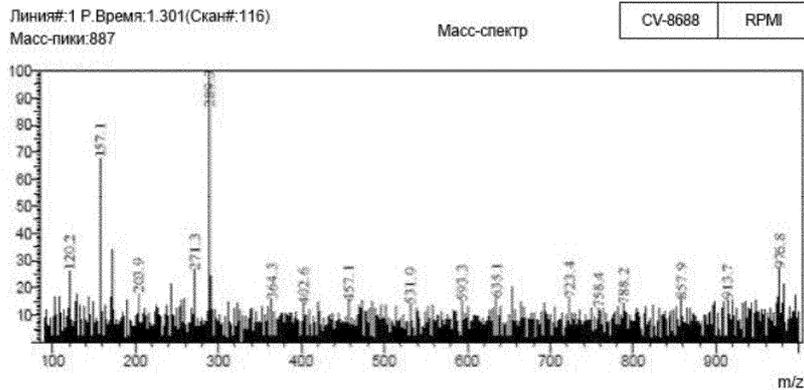
Фиг. 23F



Фиг. 23G



Фиг. 23H



Фиг. 23I

Соединение	Среда	Конц. (мкМ)	время инкубации (ч)	ID	Хроматограмма		
					Уд. время	Площадь	Остаток %
CV-8684	DMCO	100	2	1	2,65	576025,00	100,00
	RPMI	100	2	2	1,25	538008,00	93,40
	DMEM	100	2	3	1,24	618641,00	107,40
CV-8686	DMCO	100	2	4	1,49	928029,00	100,00
	RPMI	100	2	5	1,49	924480,00	99,62
	DMEM	100	2	6	1,49	898129,00	96,78
CV-8688	DMCO	100	2	7	1,29	313314,00	100,00
	RPMI	100	2	8	1,31	333242,00	106,36
	DMEM	100	2	9	1,30	340709,00	108,74

Фиг. 23J



Евразийская патентная организация, ЕАПВ

Россия, 109012, Москва, Малый Черкасский пер., 2