

(19)



**Евразийское
патентное
ведомство**

(21) **202491764** (13) **A1**

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

(43) Дата публикации заявки
2024.11.06

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

(22) Дата подачи заявки
2023.01.24

(54) **КОМПОЗИЦИЯ, СОДЕРЖАЩАЯ ЭКСТРАКТ ВЫЖИМКИ ОТ ВИНА NERO DI TROIA**

(31) **102022000001190**

(72) Изобретатель:

(32) **2022.01.25**

**Ботгалико Микеле, Челламаре
Саверио (ИТ)**

(33) **ИТ**

(86) **PCT/EP2023/051627**

(74) Представитель:

(87) **WO 2023/144120 2023.08.03**

Нилова М.И. (RU)

(71) Заявитель:

ПЛАНБИО КОСМЕТИКС СРЛ (ИТ)

(57) В изобретении описана гелевая композиция для местного применения, содержащая активные ингредиенты для предотвращения вызванного окислительным стрессом повреждения из-за воздействия солнца и для предотвращения кожных новообразований. Изобретение относится, в частности, к композиции, содержащей глицириновый экстракт *Vitis vinifera*, полученный из выжимки от вина Nero di Troia, и ксантановую камедь, необязательно с добавлением солнцезащитных фильтров, где указанный глицириновый экстракт необязательно получен с помощью ультразвуковой экстракции.

202491764

A1

A1

202491764

КОМПОЗИЦИЯ, СОДЕРЖАЩАЯ ЭКСТРАКТ ВЫЖИМКИ ОТ ВИНА NERO DI TROIA

ОБЛАСТЬ ТЕХНИКИ

5 Настоящее изобретение относится к гелевой композиции для местного применения, содержащей активные ингредиенты для предотвращения повреждения, вызванного окислительным стрессом в результате воздействия солнца, и предотвращения кожных новообразований. Изобретение относится, в частности, к композиции, содержащей глицериновый экстракт винограда культурного (*Vitis vinifera*),
10 полученный из выжимки от вина Nero di Troia, и ксантановую камедь, необязательно с добавлением солнцезащитных фильтров, в которой указанный глицериновый экстракт необязательно получен с помощью ультразвуковой экстракции.

УРОВЕНЬ ТЕХНИКИ

15 Известно, что факторы воспаления и окислительный стресс, который также стимулируется воздействием солнечного света, вовлечены в формирование и рост кожных новообразований. Также известен антиоксидантный эффект ресвератрола.

В заявке на патент США US2016287531 A1 изложены способы лечения кожных расстройств путем введения композиции, в частности, в виде наноэмульсии, содержащей
20 терапевтическое количество замещенного цис- или транс-стильбена или гибрида стильбена, предпочтительно, аналога ресвератрола, и по меньшей мере один антибиотик. Указано, что заявленные соединения и способы применимы для лечения состояний кожи, характеризующихся воспалением, в частности, новообразований. Предыдущие исследования ресвератрола в контексте канцерогенеза и использования в качестве
25 химиопрофилактического агента показали, что эта молекула подавляет три стадии канцерогенеза. Было показано, что ресвератрол обладает антиоксидантными свойствами, которым также приписывается противовоспалительная активность.

В заявке на патент США US2019201318 A1 упоминается косметическая композиция для местного применения для борьбы с признаками старения, содержащая
30 помимо других активных ингредиентов, присутствующих в пихтовом экстракте, полифенолы, выбранные из мономеров и олигомеров проантоцианидинов, гидроксистильбенов, мономеров и олигомеров флавоноидов и их производных и смесей.

Заявка на патент США US2010310615 A1 относится к композициям для косметического, диетического и терапевтического применения, содержащим полифенольные стильбеновые производные, применимые для предотвращения и контроля патологий и старения живых организмов и тканей.

5 Известно применение полифенолов в области фармацевтики, нутрицевтики и косметологии, в частности, ресвератрола из экстрактов винограда *Vitis Vinifera*.

Концентрация стильбеновых полифенолов в указанных экстрактах варьирует в зависимости от сорта виноградного вина и также в зависимости от частей растения, из которых получен экстракт.

10 Сравнительное исследование содержания флавоноидов и стильбена в сортах красного винограда Susumaniello, Uvalino и Nero di Troia (специфический биотип с небольшими плодами), проведенное Суриано и соавторами (Suriano et al., Conference Paper, August 2011, www.researchgate.net/publication/271518705) на различных частях
15 плода (кожура, семена и сок), показало, что нутрицевтические вещества, присутствующие в указанных трех сортах, значительно различаются с точки зрения качества и количества. В частности, сорт Uvalino характеризуется более высоким содержанием стильбеновых соединений, тогда как другие два сорта содержат более высокую среднюю концентрацию по сравнению с другими сортами итальянского красного винограда, и Nero di Troia имеет самое высокое общее содержание
20 флавоноидов, полифенолов и проантоцианидинов.

Исследования, проведенные Антонацци и соавторами (*Antonacci et al.*, L'Enologo, n.3 - March 2015), показали, что сорт *Vitis Vinifera* Nero di Troia содержит высокую концентрацию полифенолов, которая даже выше в сорте с небольшими плодами по сравнению с крупноплодным сортом.

25 Различные способы экстракции также оказывают влияние на концентрацию восстановленных полифенолов, в частности, ресвератрола, как показано Розелли и соавторами (*AФKelli et. al*, Clinical Immunology, Endocrine & Metabolic Drugs, 2015, 2, 8-12) в сравнительном исследовании между микроволновой экстракцией и экстракцией с помощью конвекционного нагрева выжимки Uva di Troia Canosina.

30 Каталан с соавторами (*Catalan et. al*, Hindawi Publishing Corporation, ISRN Analytical Chemistry, том 2013 г.) провели исследование для оценки содержания полифенолов в сорте винограда Uva Di Troia Canosina. Семена и кожуру, собранные на

четырёх различных стадиях ферментационного процесса, экстрагировали путем мацерации и очищенные экстракты анализировали для исследования влияния ферментации на содержание полифенолов. Экстракцию семян осуществляли путем многоэтапной мацерации с этанолом и ацетоном, кроме того, экстракты очищали с помощью чистого этилацетата. С другой стороны, экстракцию кожуры осуществляли путем одного этапа мацерации в метаноле и очистки с помощью бромированной синтетической адсорбирующей смолы. Оценку выхода экстракции и содержания полифенолов проводили с помощью анализов с использованием TLC (тонкослойной хроматографии), спектроскопии в ультрафиолетовой и видимой областях (UV/VIS, UltraViolet/VISible) и LC/DAD (жидкостной хроматографии с детектором с фотодиодной матрицей). Характерные полифенолы (катехин, эпикатехин и процианидин B1 и B2) присутствовали в экстрактах семян, применимых для разработки нутрицевтического продукта, обладающего антиоксидантными свойствами, тогда как в экстрактах кожуры винограда *Vitis canosine* не было обнаружено ресвератрола, также с помощью анализа с использованием LC/MS-MS (жидкостной хроматографии - tandemной масс-спектрометрии).

ОПИСАНИЕ ИЗОБРЕТЕНИЯ

Объектом настоящего изобретения является гелевая композиция для местного применения, содержащая ксантановую камедь, глицериновый экстракт выжимки винограда *Vitis vinifera* от вина Negro di Troia вместе с фармацевтически приемлемыми вспомогательными веществами.

В соответствии с одним аспектом изобретения, глицериновый экстракт присутствует в композиции в количестве, варьирующем от 10% до 60% по массе, предпочтительно, от 20% до 50% по массе.

В соответствии с другим аспектом, ксантановая камедь присутствует в композиции в количестве от 0,5% до 4% по массе, предпочтительно, от 1% до 2% по массе.

Более того, в соответствии с дополнительным аспектом, композиция согласно изобретению содержит UVA-, UVB-солнцезащитные фильтры в количестве, достаточном для достижения защиты уровня SPF50.

Дополнительной целью настоящего изобретения является применение композиции, описанной выше, для предотвращения повреждения, вызванного окислительным стрессом в результате воздействия солнца, и для предотвращения кожных новообразований. Рак кожи представляет собой наиболее распространенный тип рака и в целом развивается на подверженных воздействию солнца участках кожи, и люди со светлой кожей (менее пигментированной кожей) имеют больший риск развития данного заболевания. Наиболее частые формы рака кожи представляют собой базальноклеточную карциному (примерно 80%), плоскоклеточный рак кожи (примерно 16%) и меланому (примерно 4%).

10 Глицериновый экстракт выжимки *Vitis vinifera* от вина Nero di Troia предпочтительно можно получать с помощью ультразвуковой экстракции при комнатной температуре в течение 4-10 минут в смеси 50-80% по массе глицерина и 20-50% по массе воды.

15 Способ получения указанного глицеринового экстракта выжимки *Vitis vinifera* от вина Nero di Troia фактически включает экстракцию с помощью ультразвука при комнатной температуре в течение 4-10 минут в смеси 50-80% по массе глицерина и 20-50 % по массе воды.

Дополнительной целью настоящего изобретения является глицериновый экстракт, полученный с помощью указанного способа.

20 Способ получения композиции согласно настоящему изобретению включает смешивание ксантановой камеди с глицериновым экстрактом выжимки *Vitis vinifera* от вина Nero di Troia вместе с фармацевтически приемлемыми вспомогательными веществами.

25 Термин «выжимка» в настоящей заявке относится к остатку после прессования винограда, состоящему из гребней, кожуры и семян и также содержащему определенное количество вина или ферментированного суслу.

30 Таким образом, настоящее изобретение также обладает преимуществом применения природных и отработанных сырьевых материалов, полученных в процессе получения вина. Выжимка фактически используется для получения гликолевого экстракта согласно настоящему изобретению без необходимости отделения гребней от кожуры или от семян.

Подразумевается, что термин «ксантановая камедь» или «ксантан» относится в настоящей заявке к сложному полисахариду, состоящему из гексоз, главным образом D-глюкозы и D-маннозы, и D-глюкуроновой и пировиноградной кислот. Этот высокомолекулярный полисахарид получают с помощью бактериальной ферментации простого углеводорода, такого как глюкоза или сахароза. Ксантановую камедь также применяют в продовольственном секторе, где она используется в качестве сгущающей и стабилизирующей добавки, обозначенной кодом E415. Добавление минимального количества этой добавки (0,5-1% или менее) значительно повышает вязкость жидкой композиции. Ксантановая камедь коммерчески доступна от различных поставщиков, таких как компания Vema Cosmetici srl, расположенная в Борсеа, Ровиго.

Предполагается, что термин «фармацевтически приемлемые вспомогательные вещества» относится в настоящей заявке к вспомогательным веществам стандартного типа, т.е. соединениям, которые являются инертными по отношению к активному ингредиенту и фармацевтической форме и не являются токсичными для субъекта, которому они вводятся. В случае настоящего изобретения применимые классы таких вспомогательных веществ представляют собой, например, разбавители (соединения, которые добавляют, когда масса активного ингредиента является не достаточной для получения композиции) и антиоксиданты-противомикробные агенты (используемые для увеличения срока хранения продукта). Примеры таких фармацевтически приемлемых вспомогательных веществ приведены в источнике Remington's Pharmaceutical Sciences, 18th Ed. (1990, Mack Publishing Co., Easton, Pa. 18042, стр. 1435-712).

В соответствии с данными, полученными авторами настоящего изобретения и изложенными в настоящей заявке в разделе «Примеры», глицериновый экстракт выжимки *Vitis vinifera* от вина Nero di Troia приводит к статистически значимому снижению уровня активных форм кислорода (АФК) на *in vitro* модели антиоксидантной активности в кератиноцитах человека.

Более того, исследование, проведенное авторами настоящего изобретения и изложенное в настоящей заявке в разделе «Примеры», обеспечивает количественную оценку веществ, таких как эйкозапентаенамид (ЕРМ), 24-гидроксиарахидонат (24-НАС) и гинкголиевая кислота (ГКА), присутствующих в глицериновом экстракте выжимки *Vitis vinifera* от вина Nero di Troia. В частности, присутствие ЕРМ и 24-НАС, производных полиненасыщенных кислот и ГКА (6-тридецилсалициловой кислоты),

которые могут применяться в качестве поверхностно-активного/отмывающего вещества и эмульгирующего агента в косметических средствах, сподвигло авторов изобретения на получение композиции согласно изобретению, т.е. гелевой композиции для местного применения, содержащей ксантановую камедь, глицериновый экстракт выжимки *Vitis vinifera* от вина Nero di Troia (NdT) вместе с фармацевтически приемлемыми вспомогательными веществами.

Наконец, открытие того, что экстракты выжимки, в частности, NdT, можно использовать в качестве новых и перспективных природных источников производных полиненасыщенных кислот для модулирования реологических свойств при производстве косметических средств, делает данную инновацию эффективным примером безотходной экологичной экономики.

Некоторые (неограничивающие) примеры настоящего изобретения представлены ниже.

15 ОПИСАНИЕ ГРАФИЧЕСКИХ МАТЕРИАЛОВ

Фигура 1 – На Фигуре 1 представлены трехмерные круговые диаграммы, показывающие содержание флавоноидов и терпеноидов в глицериновых экстрактах, полученных из выжимок Nero di Troia (NdT) (1a) и Primitivo (1b), как описано в Примере 1.

Фигура 2 – На Фигуре 2 представлены трехмерные круговые диаграммы, показывающие содержание флавоноидов и терпеноидов в глицериновых экстрактах, полученных из выжимок Aglianico (2a) и Falanghina (2b), как описано в Примере 1.

Фигура 3 – На Фигуре 3 представлен масс-спектр, полученный при ионизации электрораспылением (ESI) (сканирование в режиме регистрации положительно заряженных ионов) экстракта выжимки NdT, демонстрирующий самые интенсивные m/z -зависимые сигналы (с границей пропускания при 10% интенсивности).

Фигура 4 – На Фигуре 4 представлен масс-спектр, полученный при ESI (сканирование в режиме регистрации положительно заряженных ионов) экстракта выжимки Primitivo, демонстрирующий самые интенсивные m/z -сигналы (с границей пропускания при 10% интенсивности).

Фигура 5 – На Фигуре 5 представлен масс-спектр, полученный при ESI (сканирование в режиме регистрации положительно заряженных ионов) экстракта выжимки Aglianico,

демонстрирующий самые интенсивные m/z-сигналы (с границей пропускания при 10% интенсивности).

Фигура 6 – На Фигуре 6 представлен масс-спектр, полученный при ESI (сканирование в режиме регистрации положительно заряженных ионов) экстракта выжимки Falanghina, демонстрирующий самые интенсивные m/z-сигналы (с границей пропускания при 10% интенсивности).

ПРИМЕРЫ

Пример 1 - Получение глицеринового экстракта выжимки *Vitis vinifera* от вина Nero di Troia

Глицериновый экстракт выжимки *Vitis vinifera* от вина Nero di Troia получали путем приготовления смеси, содержащей 60% по массе глицерина, 25% по массе выжимки и 15% воды.

Указанную смесь затем обрабатывали ультразвуком при комнатной температуре в течение 5 минут для получения экстракта. Затем экстракт фильтровали с получением прозрачной или немного опалесцирующей жидкости темно-фиолетового цвета.

Затем к указанному экстракту добавляли следующие консерванты: 0,60% по массе бензилового спирта, 0,18% по массе бензоата натрия и 0,12% по массе сорбата калия.

Полученный таким образом глицериновый экстракт (также называемый **GExtract NdT**) использовали для анализов, представленных в следующих далее Примерах 4-6.

Пример 2 - Получение композиции в виде геля для местного применения, содержащего глицериновый экстракт выжимки *Vitis vinifera* от вина Nero di Troia

Гель для местного применения получали путем разведения GExtract NdT, полученного в Примере 1, водой в различных пропорциях в зависимости от предполагаемых концентраций композиций: 1:1, 1:2 или 1:4.

После разведения постепенно добавляли ксантановую камедь по 1 - 2 грамма на каждые 100 грамм полученной жидкой смеси и смешивали до получения желаемой плотности. Затем полученный гель оставляли в состоянии покоя на 24-48 часов.

Пример 3 – Предотвращение вызванного окислительным стрессом повреждения в результате воздействия солнца

Эффективность композиции, полученной в Примере 2, отдельно или по сравнению с другими композициями, содержащими другие экстракты выжимки *Vitis vinifera*, оценивали путем проведения одного или более из следующих исследований/анализов.

Анализ	Тип	Измеряемое свойство	Замечание/Ссылка
Захват ABTS ^{•+}	Химико-физический	Неспецифичная общая антиоксидантная активность	Спектрофотометрический анализ на основе взаимодействия между видом антиоксиданта и катион-радикалом ABTS ^{•+} , образованным из персульфата калия (PP) и ABTS [2,20-азино-бис(3-этилбензотиазолин-6-сульфоновой кислоты)]. Ссылки: а) Re, R. et al. Antioxidant activity applying an improved ABTS radical cation decolorization assay. Free Radic. Biol. Med. 1999, 26, 1231–1237; б) Int. J. Mol. Sci. 2020, 21, 1131.
Захват DPPH	Химико-физический	Неспецифичная общая антиоксидантная активность	Спектрофотометрический анализ на основе взаимодействия между видом антиоксиданта и DPPH [2,2-дифенил-1-(2,4,6-тринитрофенил)гидразилом]. Ссылка: Sagar B. Kedare et al. Genesis and development of DPPH method of antioxidant assay. J Food Sci. Technol. 2011 Aug; 48(4): 412–422.
Анализ по железо-восстанавливающей активности плазмы (FRAP-анализ)	Химико-физический	Неспецифичная общая антиоксидантная активность	Колориметрический анализ, позволяющий измерять антиоксидантный потенциал на основе восстановления Fe(III) до Fe(II). Ссылка: Benzie et al. The ferric reducing ability of plasma (FRAP) as a measure of "antioxidant power": the FRAP assay. Anal. Biochem. 1996 Jul 15;239(1):70-6.
Анализ способности поглощения кислородных радикалов (ORAC-анализ)	Химико-физический	Неспецифичная общая антиоксидантная активность	Спектрофотометрический анализ (анализ способности поглощения кислородных радикалов) на основе взаимодействия между антиоксидантом и акцептором пероксидных радикалов в присутствии флуоресцентного индикатора).

			Ссылка: Ou, B. et al. Development and validation of an improved oxygen radical absorbance capacity assay using fluorescein as the fluorescent probe. Journal of Agricultural and Food Chemistry, 49, 4619–4626
МТТ-тест	<i>In vitro</i> (клеточный)	Нейропротекторная активность на клеточной линии Нуро E22 (гипоталамус крысы)	Спектрофотометрический анализ, связанный с жизнеспособностью клеток после подвержения вызванному H ₂ O ₂ окислительному стрессу. Ссылка: Chiavaroli A. et al. Phenolic Characterization and Neuroprotective Properties of Grape Pomace Extracts. Molecules 2021, 26, 6216.
Клеточный антиоксидантный анализ (САА)	<i>In vitro</i> (клеточный)	Антиоксидантная активность на раковой клеточной линии	Спектрофотометрический анализ активности, позволяющий измерять способность предотвращать образование дихлорфлуоресцеина из 2,2'-азобис(2-амидинпропан)дигидрохлорида (АВАР), образованного из радикалов, в клетках гепатоклеточной карциномы человека (HepG2). Ссылка: Kelly L Wolfe et al. Cellular antioxidant activity (САА) assay for assessing antioxidants, foods, and dietary supplements. J Agric Food Chem. 2007 Oct 31;55(22):8896-907.
Анализ оксида азота	<i>In vitro</i> (клеточный)	Антиоксидантная активность на раковой клеточной линии	Колориметрический анализ, позволяющий измерять высвобождение NO в макрофагах крысы (RAW 264.7), стимулированных липополисахаридами. Ссылка: Nathan S. Bryan et al. Methods to Detect Nitric Oxide and its Metabolites in Biological

			Samples. Free Radic Biol Med. 2007 Sep 1; 43(5): 645–657.
Скрининг агентов для предотвращения меланомы	<i>In vitro</i> (клеточный)	Пролиферативная активность клеточных линий меланомы	Снижение биомаркеров рака (аннексин V, человеческий лейкоцитарный антиген HLA-DR; E-кадгерин, N-кадгерин) в меланоцитах, подверженных физическому (УФ) и химическому окислительному стрессу. Ссылки: а) E. Elmore et al. Development and characteristics of a human cell assay for screening agents for melanoma prevention. Melanoma Research 2007, 17:42–50. б) G. K. Couto. The Melding of Drug Screening Platforms for Melanoma. Front Oncol. 2019; 9: 512.

Пример 4 – Эффект GExtract NdT на жизнеспособность клеток: *in vitro* исследование на клетках HaCaT

5 Целью настоящего исследования была *in vitro* оценка эффекта GExtract NdT (полученного в Примере 1) на жизнеспособность клеточной линии кератиноцитов человека HaCaT. Оценку проводили на клетках, подверженных воздействию GExtract NdT в 2%-ом разведении в полной ростовой среде в течение 24 часов.

10 Жизнеспособность клеток измеряли с помощью колориметрического MTS-анализа путем измерения абсорбции, полученной в результате превращения биовосстановленного тетразолиевого соединения из жизнеспособных клеток в окрашенный формазан, растворимый в культуральной среде.

Результаты

15 Клетки HaCaT подвергали воздействию 2% GExtract NdT и Тритона-X100 в течение 24 часов и затем оценивали жизнеспособность с помощью MTS-анализа. Результаты представлены в Таблице 1.

В клетках HaCaT, подвергаемых в течение 24 часов воздействию Тритона-X100 (используемого в качестве положительного контроля) в повышающихся концентрациях, регистрировали выраженный отрицательный эффект на жизнеспособность клеток уже при самой низкой исследуемой концентрации. Поверхностно-активное вещество

приводило к лизису всех клеток, начиная с концентрации 0,01%. Обработка GExtract NdT не оказывала эффекта на жизнеспособность клеток при концентрации 2%.

5 Таблица 1 – Эффект GExtract NdT и Тритона-X100 на клетки HaCat. Результаты выражены как процентное значение, нормированное к контрольной группе (CTR).

Исследуемый агент	% (по объему)	%CTR	%STD
	CTR	100	3,3
GExtract NdT	2	95,26	4,52
ТРИТОН-X 100	0,001	84,54	-
	0,001	67,19	-
	0,005	52,098	-
	0,01	0	-
	0,05	0	-
	0,5	0	-

Заключение

10 В ходе исследования не было обнаружено бактериальной контаминации в камере для обработки, при этом в клетках, обработанных поверхностно-активным веществом Тритон-X100 (используемым в данном эксперименте в качестве лизирующей клетки

15 обработки), регистрировали зависимое от концентрации снижение количества жизнеспособных клеток. Исследование, таким образом, может считаться достоверным. Не наблюдалось статистически значимых эффектов на клетках, обработанных GExtract NdT в течение 24 часов в концентрации 2% по объему.

20 На основе данных, полученных с помощью *in vitro* исследования, описанного в настоящей заявке, и при указанных экспериментальных условиях, можно заключить, что: GExtract NdT не приводит к статистически значимому снижению жизнеспособности клеток HaCaT, подвергаемых в течение 24 часов его воздействию в концентрации, составляющей 2% по объему.

Пример 5 – Антиоксидантная эффективность GExtract NdT в *in vitro* исследовании на клетках HaCaT

Целью настоящего исследования была оценка *in vitro* антиоксидантного эффекта GExtract NdT (полученного в Примере 1) на клеточной линии кератиноцитов человека HaCaT. Оценку проводили на клетках, подвергаемых воздействию лекарственной формы в 2%-ном разведении в течение 24 часов и затем обработанных менадионом (в качестве окислительного стимула).

Антиоксидантную активность количественно оценивали с помощью анализа дихлорфлуоресцеиндиацетата как снижение уровня активных форм кислорода (АФК), индуцированного при подвержении воздействию только менадиона.

Результаты

Предварительная обработка клеток GExtract NdT в концентрации 2% по объему обеспечивала защиту от окислительного стимула в обоих случаях: фактически было зарегистрировано снижение АФК примерно на 20% и примерно на 5% соответственно при обработке менадионом в концентрации 50 мкл и 100 мкл. Результаты подвержения воздействию менадиона после предварительной обработки GExtract NdT представлены в Таблице 2.

Таблица 2 - Антиоксидантный эффект GExtract NdT в концентрации, составляющей 2% по объему. Результаты выражены как относительные единицы флуоресценции.

Менадион (мкМ)	В отсутствие GExtract NdT		В присутствии GExtract NdT			
	Среднее	Стандартное отклонение	Среднее	Стандартное отклонение	% Снижение	Статистическая значимость (р-значение)
50	3131,00	50,91	2755,67	134,84	11,99	< 0,001
100	3430,00	46,67	3240,20	51,29	5,53	< 0,001

Заключение

Исследование может считаться достоверным, поскольку в камере для обработки не было обнаружено бактериальной контаминации и в клетках, обработанных менадионом (в данном эксперименте использовался в качестве обработки окислителем), регистрировали повышенную флуоресценцию, зависимую от концентрации.

С точки зрения антиоксидантной эффективности положительный эффект был обнаружен в клетках, предварительно обработанных GExtract NdT. Указанный эффект был выраженным в случае предварительной обработки GExtract NdT в концентрации 2% по объему с процентным снижением окислительного стресса примерно на 12% и 5% соответственно при использовании менадиона в концентрации от 50 до 100 мкМ.

На основе результатов, полученных с использованием *in vitro* анализов, описанных в настоящей заявке, и при указанных экспериментальных условиях, можно заключить, что: GExtract NdT приводит к статистически значимому снижению уровня активных форм кислорода (АФК) через 24 часа после обработки в нецитотоксической концентрации в исследовании на кератиноцитах человека, стимулированных менадионом.

В свете данных, выявленных при экспериментальных условиях согласно изобретению, подтверждается антиоксидантная активность GExtract NdT.

Пример 6: - Сравнительное исследование на предмет содержания флавоноидов и терпеноидов в экстрактах четырех сортов виноградного вина

Глицериновые экстракты, полученные из четырех различных сортов вин (Nero di Troia [NdT], Primitivo, Aglianico и Falanghina), получали с использованием одного и того же протокола, как описано в Примере 1, и хранили при температуре -20°C до начала проведения цикла анализов. Точно взвешенное количество каждого экстракта анализировали с помощью времяпролетной квадрупольной масс-спектрометрии с ионизацией электрораспылением (MS-ESI-QTOF) для определения относительных профилей наиболее репрезентативных веществ в указанных образцах, таких как полифенолы, терпены и основные метаболиты.

Результаты также представлены в следующих далее Таблицах А - D и на трехмерных круговых диаграммах, представленных на Фигурах 1 и 2. В частности, в следующих далее таблицах представлены названия некоторых соединений, предварительно идентифицированных с помощью формулы на основе точных моноизотопных масс (ChemCalc).

ТАБЛИЦА А

Выжимка	Формула	Экспериментальное значение m/z [M+H] ⁺	Рассчитанное значение m/z [M+H] ⁺	Пример соединения природного происхождения (класс)	Ссылки
NdT	C ₂₀ H ₃₁ O ₃	320,237	320,235	20-гидроксиарахидонат (жирная кислота)	PubChem CID 40490645
	C ₂₂ H ₃₄ O ₃	321,237	321,242	Изокупрессиновая кислота или гинкголиевая кислота (C13:0) (терпеноидная кислота)	D. Tsimogiannis и V. Oreopoulou Polyphenols in Plants. 2019 Elsevier
	C ₂₀ H ₃₆ O ₅	357,259	357,2641	Эуницелланететрол (трициклический терпен)	Dictionary of Natural Products Supplement 1-1995
	C ₂₂ H ₃₂ O ₄	361,241	361,2408	Макрофорин А (терпенциклогексенонэпокс)	T. Sassa et al. Agric. BioI. Chem. , 47(I), 187~189, 1983
	C ₁₉ H ₃₆ O ₇	377,2582	377,2539	Мирсиниозид D (циклогексилбутангликозид)	PubChemCID10384912
	C ₂₃ H ₄₀ O ₄	381,290	381,2998	Персин (жирная кислота)	PubChemCID5283266
	C ₂₂ H ₃₃ O ₆	393,241	393,2277	Мангромицин E4 (циклопентадекановый скелет с тетрагидрофурановым звеном)	T. Nakashima et al. The Journal of Antibiotics (2014) 67, 533–539
	C ₂₉ H ₂₄ O ₅	453,1676	453,1701	Чамуваритин (флаванон)	PubChem CID100418

ТАБЛИЦА В

Выжимка	Формула	Экспериментальное значение m/z [M+H] ⁺	Рассчитанное значение m/z [M+H] ⁺	Пример соединения природного происхождения (класс)	Ссылки
Primitivo	C ₈ H ₁₀ O ₆	203,0542	203,0555	Сукцинилацетоацетат	Metabolism Vitis vinifera (wine grape). KEGG-T01084: 100244395
	C ₁₁ H ₁₈ O ₇	263,1120	263,1130	Сукцинил-D-дигиноза	K. Ishii et al. The Journal Of Antibiotics Apr. 1983
	C ₂₂ H ₃₄ O ₃	321,237	321,2429	Изокупрессиновая кислота или гинкголиевая кислота (C13:0)	D. Tsimogiannis et al Polyphenols in Plants. 2019 Elsevier

				(терпеноидная кислота)	
	$C_{17}H_{17}O_{10}$	381,082	381,0801	5-O-b-D- глюкопиранозил-8 гидроксипсорален	Boeira et al. Ciência Rural, v,52, n,9, 2022
	$C_{23}H_{40}O_4$	381,3007	381,2998	Персин (жирная кислота)	PubChemCID5283266
	$C_{26}H_{36}O_3$	397,274	397,2742	Стронгилофорин-24 (меротерпеноиды)	M. Birringer et al. RSC Adv., 2018, 8, 4803
	$C_{27}H_{48}O_5$	453,3723	452,3501	Химерол или буфол (аналоги холестана)	Dictionary of Marine Natural Products
	$C_{35}H_{26}O_{10}$	607,1600	607,1603	6''-(2-гидрокси-3-метил-3-бутенил)аментофлавон	Al-Shagdari et al. Natural Product Communications Vol. 8 (9) 2013

ТАБЛИЦА С

Выжимка	Формула	Экспериментальное значение m/z [M] ⁺ /[M+H] ⁺	Рассчитанное значение m/z [M] ⁺ /[M+H] ⁺	Пример соединения природного происхождения (класс)	Ссылки
Aglianico	$C_{17}H_{34}O_5$	318,222	318,2406	Метилвый эфир алеуритиновой кислоты (жирная кислота)	G. Tedeschi et al. ACS Sustainable Chem. Eng. 2018, 6, 11, 14955–14966
			318,2042	Сеприлоза (углевод)	SEPRILOSE(ncats.io)
	$C_{20}H_{31}O_3$	320,234	320,235	20-гидроксиарахидонат (жирная кислота)	PubChem CID40490645
	$C_{20}H_{32}O_3$	321,240	321,242	Изокупрессиновая кислота или гинкголиевая кислота (C13:0)	R. Nicoletti et al. Agriculture 2015, 5(4), 918-970;

				(терпеноидная кислота)	
	$C_{22}H_{40}O_6$	401,288	401,2902	Чалмикрин (маннитовый эфир моноциклофарнезола)	T. Fex, Phytochemistry, Volume 21, Issue 2, 1982, 367-369
	$C_{29}H_{44}O_7$	505,3194	505,3165	Капитастерон (экдистероиды)	Lei Fang et al. Molecules 2017, 22, 1310;
	$C_{33}H_{52}O_9$	593,3723	593,3689	Нуатигенин-3-бета- D-глюкопиранозид или агавозид А (сапониновые моносахариды)	Gunstone, Frank D., John L. Harwood, и Albert J. Dijkstra (2007). The lipid CD- ROM. CRC Press

ТАБЛИЦА D

Выжимка	Формула	Экспериментальное значение m/z [M] ⁺ /[M+H] ⁺	Рассчитанное значение m/z [M] ⁺ /[M+H] ⁺	Пример соединения природного происхождения (класс)	Ссылки
Falanghina	$C_{20}H_{31}O_3$	320,238	320,235	20-гидроксиарахидонат (жирная кислота, тритерпеноид)	Ting Zheng et al. Front. Nutr. 2021, 8:715528
	$C_{17}H_{17}O_{10}$	381,082	381,0801	5-O-b-D-глюкопиранозил-8 гидроксипсорален (фуранокумарины)	Boeira et al. Ciência Rural, v,52, n,9, 2022
	$C_{22}H_{28}O_{10}$	453,1737	453,1760	Флорибундал (иридоиды, циклопентанпиранмонотерпены)	Wang C, et al. Molecules. 2020 Jan 10;25(2):287.
	$C_{38}H_{48}O_2$	537,3621	537,3732	C38-изоноркантаксантин (кетокaroteиноид)	L. Ngamwonglumlert, Encyclopedia of

					Food Chemistry, 2019
	$C_{37}H_{66}O_9$	655,4784	655,4785	Сальзманолин (ацетогенины, поликетид)	Emerson F. Queiroz et al. J. Nat. Prod. 2003, 66, 755-758

Результаты также представлены на Фигурах 3-6 как изображения МС-сканов образцов в режиме регистрации положительно заряженных ионов. В большинстве случаев было возможно сопоставить репрезентативную структуру с наиболее интенсивными m/z-зависимыми сигналами (см. условные обозначения для каждого масс-спектру) путем преобразования точных моноизотопных масс в элементную формулу (с помощью ChemCalc) и тщательного поиска в доступных базах данных.

Предварительная оценка позволила авторам изобретения выявить значительные различия в паттернах сигналов для трех экстрактов красных вин и одного экстракта белого вина (Falanghina).

Оказалось, что количество и молекулярное многообразие было намного выше в образцах красного вина с преобладанием производных жирных кислот по сравнению с ферментационными метаболитами, что является признаком более высокой стабильности выжимок, полученных из красных вин.

15 Заключение

С некоторых пор в литературе появилось множество статей с многочисленными цитированиями, нацеленных на определение и сравнение композиций выжимок из различных сортов винограда. Тем не менее, практически нет исследований, за исключением некоторых работ, направленных на определение липидов, обладающих антиоксидантными свойствами или применимых в качестве полезных питательных веществ в режимах питания (Ivana Dimic' et al., Antioxidants 2020, 9, 568, Mariana Spinei et al., Foods 2021, 10(4), 867 and Yolanda Carmona-Jiménez et al., Molecules 2022, 27(20), 6980).

Насколько известно авторам изобретения, не существует исследований, обеспечивающих количественную оценку веществ, таких как эйкозапентаенамид (EPM), 24-гидроксиарахидонат (24-НАС) и гинкголиевая кислота (GKA), которые при этом

выявляются с преобладающими сигналами в образцах, полученных из выжимок красных вин, в частности, в образце Nero di Troia (NDT).

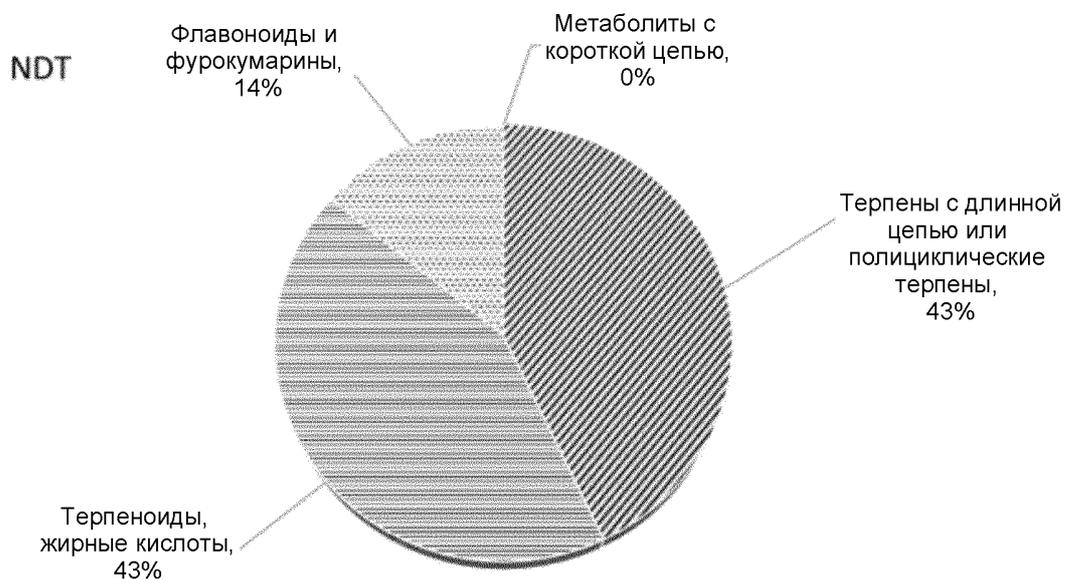
5 В частности, несмотря на то что ЕРМ и 24-НАС, производные полиненасыщенных кислот и ГКА, 6-тридецилсалициловая кислота вызывали интерес с точки зрения их терапевтического потенциала (Sebastià Parets et al., *Frontiers in Cell and Developmental Biology*, 8, 2020 and Cinzia Giordano et al., *Int J Mol Sci* 2020 Mar 26;21(7):2279), их возможное применение в качестве поверхностно-активного/отмывающего вещества и эмульгирующего агента в косметических средствах не было известно.

10 Теперь в свете полученных авторами данных можно подтвердить на эффективном примере безотходной экологичной экономики, что экстракты выжимки, в частности, экстракты выжимки NdT, можно использовать в качестве новых и перспективных природных источников производных полиненасыщенных кислот для модулирования реологических свойств при производстве косметических средств.

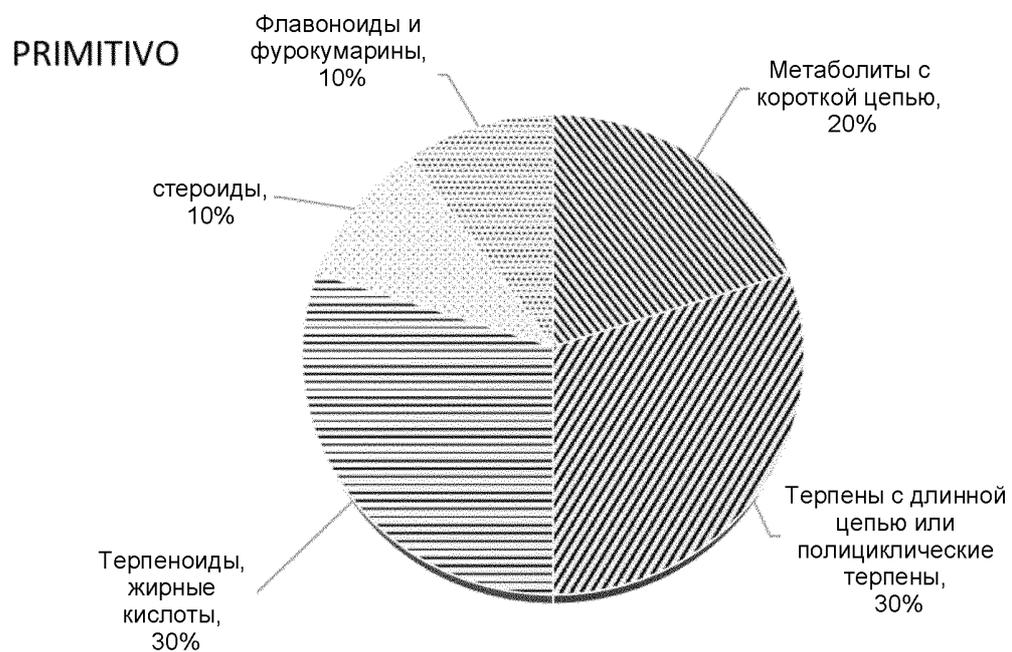
Формула изобретения

1. Гелевая композиция для местного применения, содержащая ксантановую камедь, глицериновый экстракт выжимки *Vitis vinifera* от вина Nero di Troia и фармацевтически приемлемые вспомогательные вещества.
- 5 2. Композиция по п. 1, отличающаяся тем, что глицериновый экстракт присутствует в количестве от 10% до 60% по массе, предпочтительно, от 20% до 50% по массе.
3. Композиция по п. 1, отличающаяся тем, что ксантановая камедь присутствует в количестве, варьирующем от 0,5% до 4% по массе, предпочтительно, от 1% до 2% по массе.
- 10 4. Композиция по п. 1, содержащая UVA-, UVB-солнцезащитные фильтры.
5. Композиция по п. 4, отличающаяся тем, что солнцезащитные фильтры присутствуют в достаточном количестве для достижения защиты уровня SPF50.
6. Применение композиции по любому из предшествующих пп. для предотвращения кожных заболеваний.
- 15 7. Применение композиции по п. 5, отличающееся тем, что кожное заболевание представляет собой форму рака кожи, необязательно меланому.
8. Применение композиции по п. 3 для предотвращения вызванного окислительным стрессом повреждения в результате воздействия солнца.
9. Глицериновый экстракт выжимки *Vitis vinifera* от вина Nero di Troia, который
20 можно получать с помощью ультразвуковой экстракции при комнатной температуре в течение 4-10 минут из смеси 50-80% по массе глицерина и 20-50% воды.
10. Способ получения глицеринового экстракта выжимки *Vitis vinifera* от вина Nero di Troia с помощью ультразвуковой экстракции при комнатной температуре в
25 течение 4-10 минут из смеси 50-80% по массе глицерина и 20-50% по массе воды.
11. Глицериновый экстракт, полученный с помощью способа по п. 10.
12. Способ получения композиции по любому из пп. 1 - 4, включающий смешивание ксантановой камеди, глицеринового экстракта выжимки *Vitis vinifera* от вина Nero di Troia и фармацевтически приемлемых вспомогательных веществ.

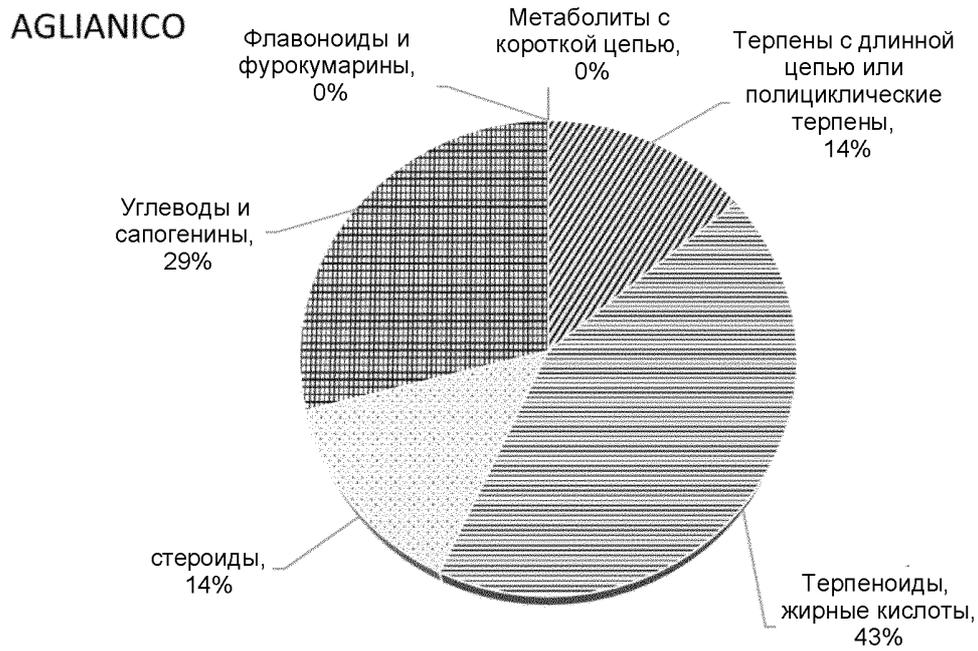
Фигура 1А



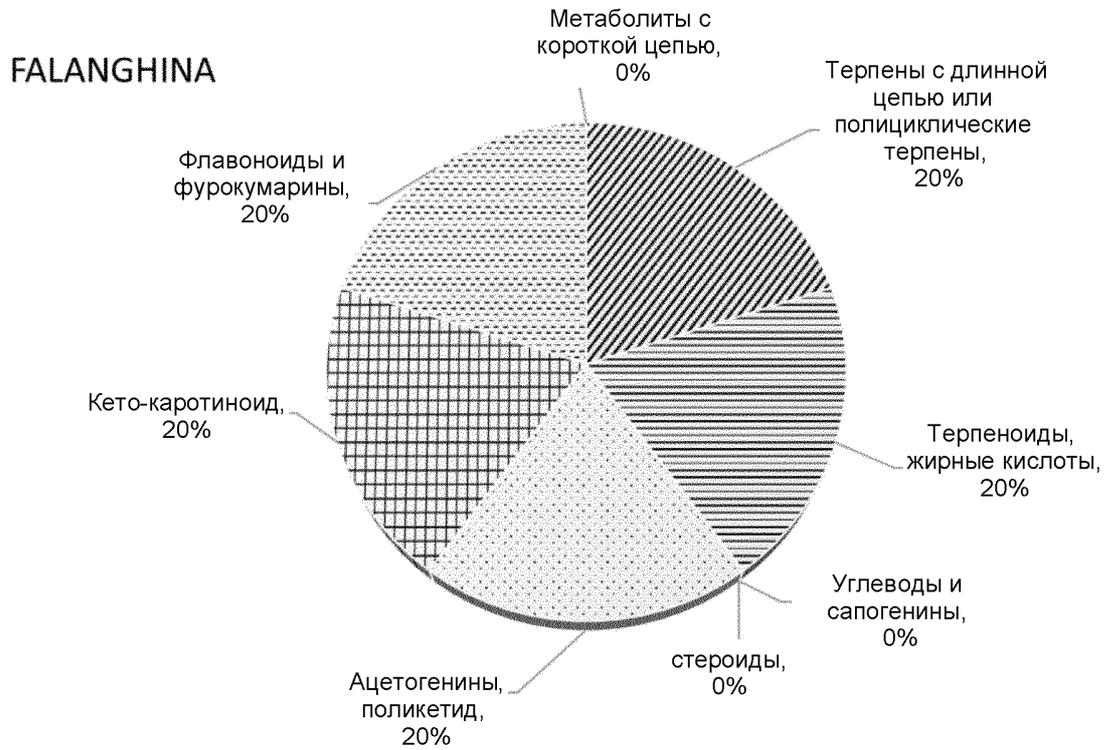
Фигура 1В

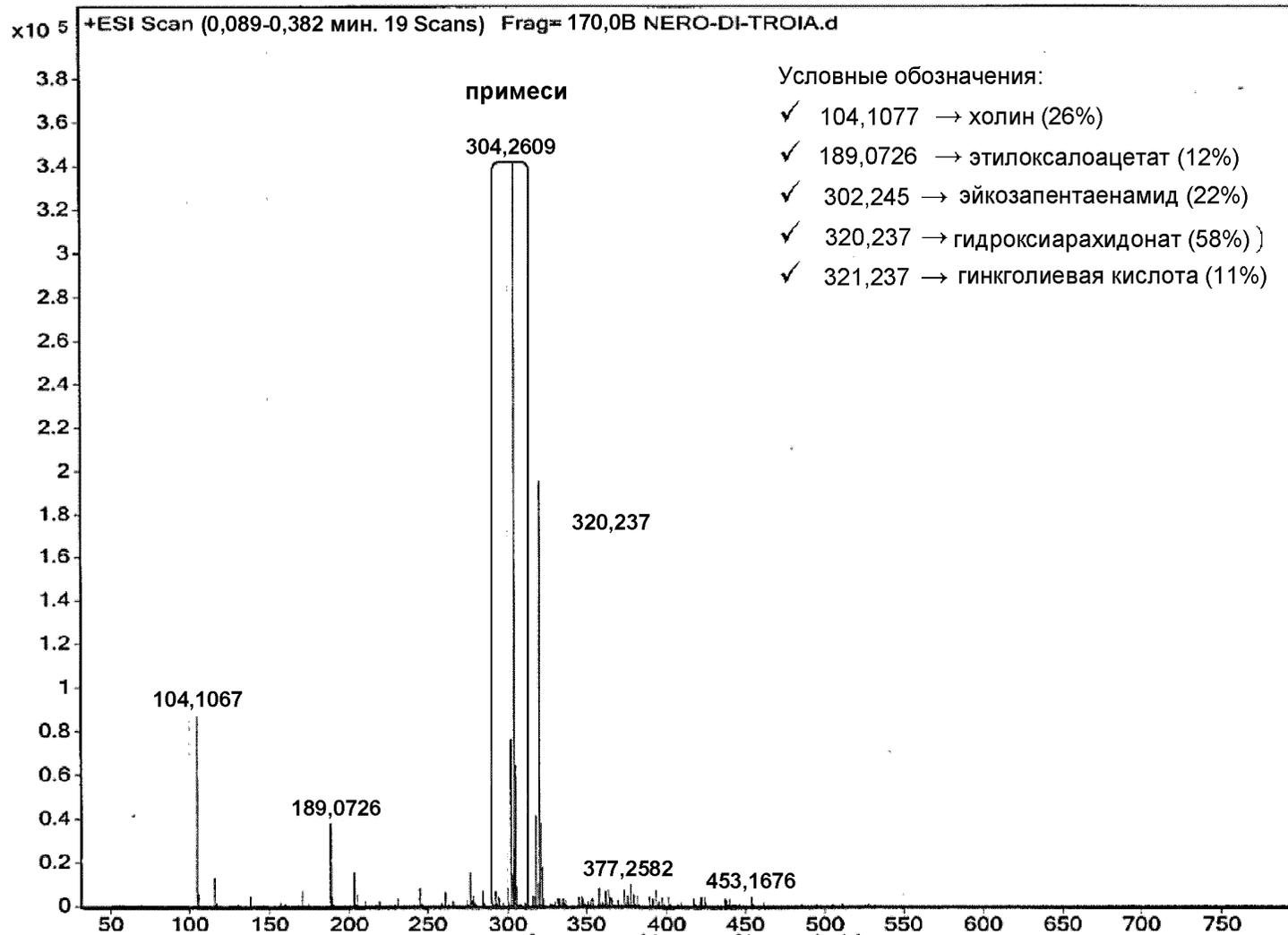


Фигура 2А

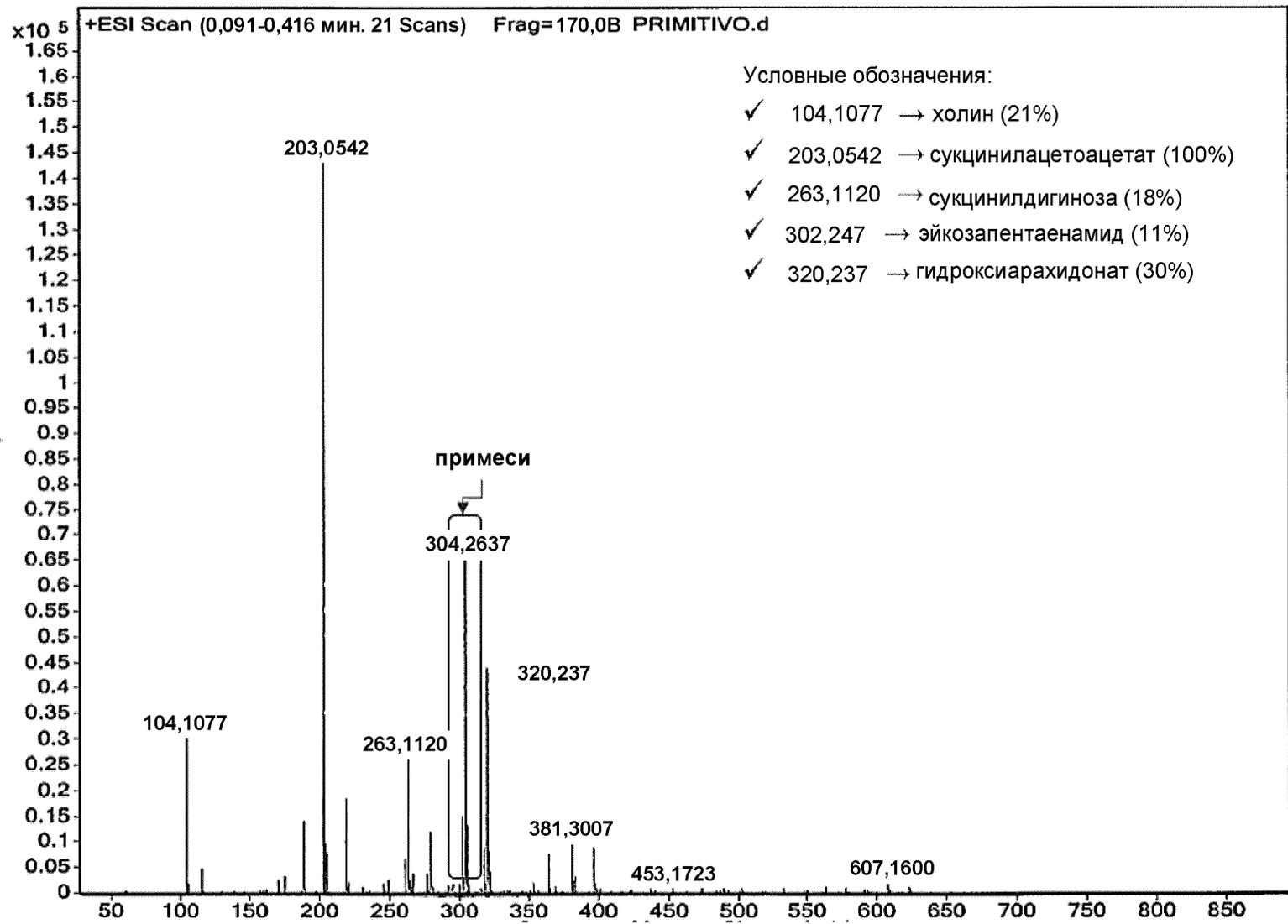


Фигура 2В

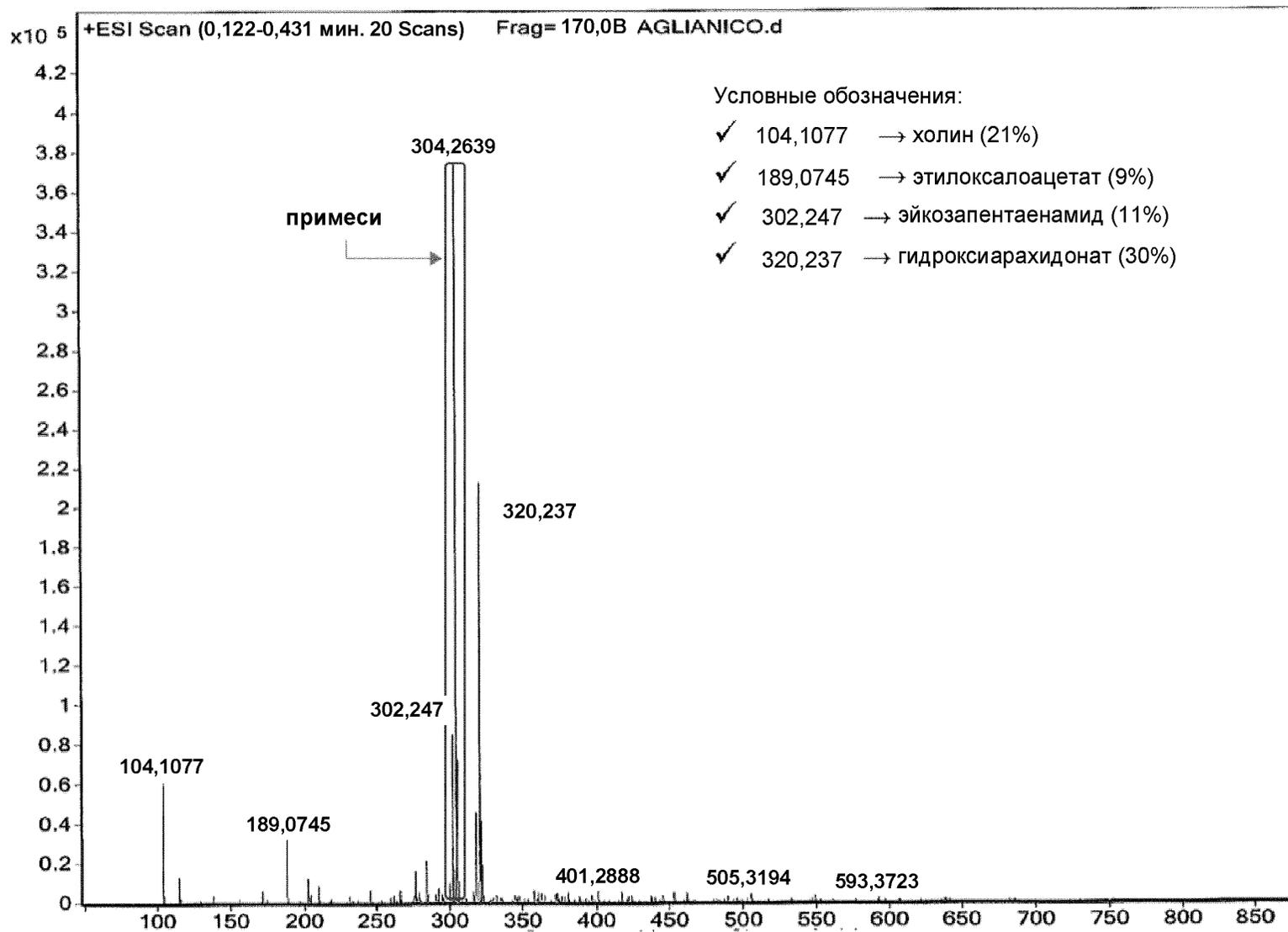




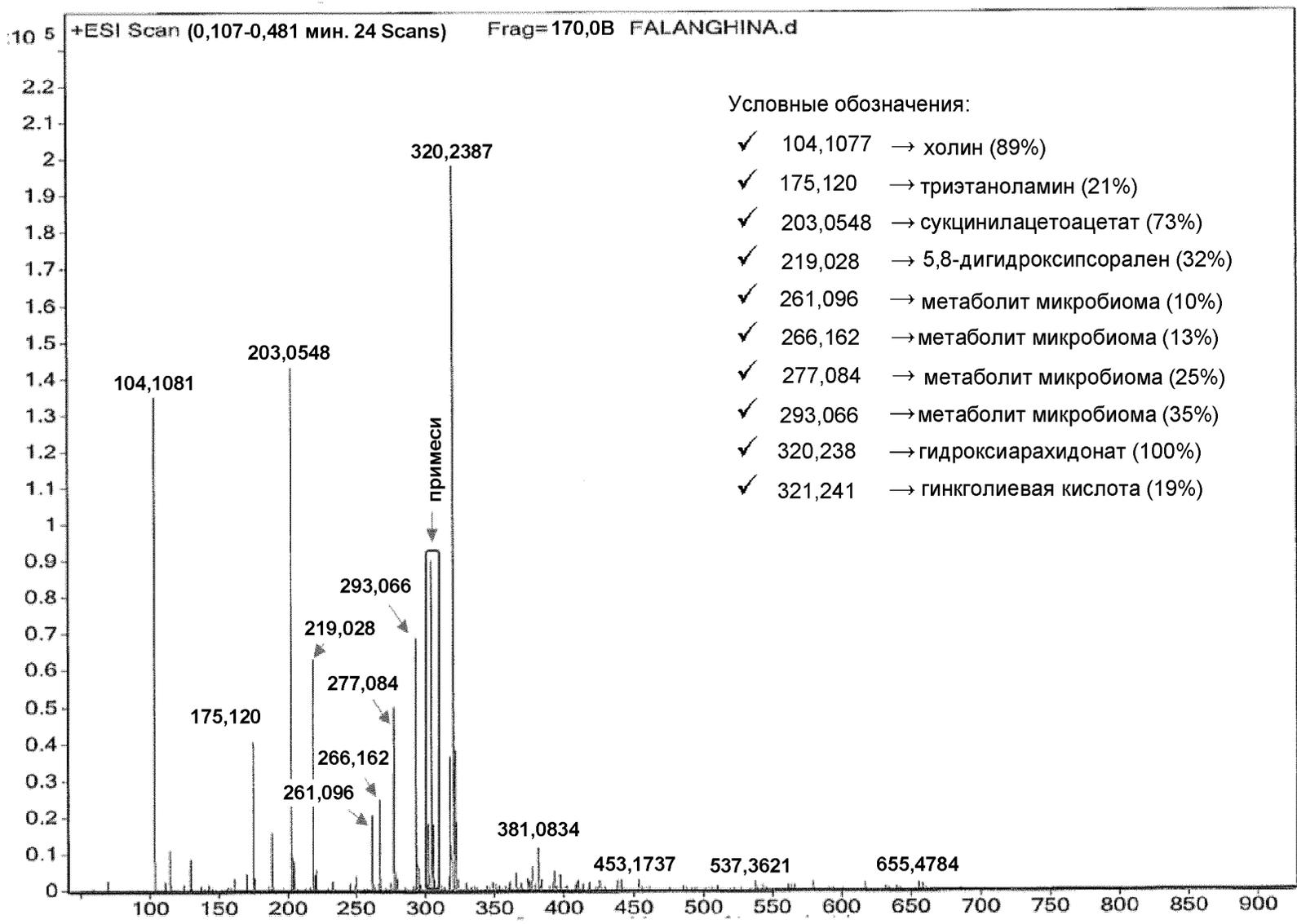
Фигура 3



Фигура 4



Фигура 5



Фигура 6