



(12) 发明专利

(10) 授权公告号 CN 109311884 B

(45) 授权公告日 2021.09.14

(21) 申请号 201780027267.1

(22) 申请日 2017.03.10

(65) 同一申请的已公布的文献号

申请公布号 CN 109311884 A

(43) 申请公布日 2019.02.05

(30) 优先权数据

62/306,468 2016.03.10 US

(85) PCT国际申请进入国家阶段日

2018.11.01

(86) PCT国际申请的申请数据

PCT/US2017/021843 2017.03.10

(87) PCT国际申请的公布数据

W02017/156424 EN 2017.09.14

(73) 专利权人 M·因泽格

地址 美国加利福尼亚州

专利权人 A·M·辛普森

(72) 发明人 M·因泽格 A·M·辛普森

(74) 专利代理机构 北京市君合律师事务所

11517

代理人 顾云峰 吴龙瑛

(51) Int.Cl.

C07D 487/04 (2006.01)

(续)

(56) 对比文件

Joakim Tholander 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

权利要求书11页 说明书53页 附图50页

(54) 发明名称

作为皮肤增白剂的马拉色因及其类似物

(57) 摘要

本发明涉及用于增白皮肤的化合物、组合物和方法。本发明的化合物、组合物和方法通常涉及由马拉色菌属酵母产生的化合物及其化学类

Ligand for the TCDD (Ah) Receptor.

《Tetrahedron》.1999,第55卷第12577-12594页,第12577页introduction,第12582页Scheme 8.

Joakim Tholander 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》.1999,第55卷第6243-6260页,第6244页化合物2,第6250页Scheme 4.

Chris L. Waller et al..Three-Dimensional Quantitative Structure-Activity Relationships of Dioxins and Dioxin-like Compounds: Model Validation and Ah Receptor Characterization.《Chem. Res. Toxicol.》.1995,第8卷(第6期),第847-858页,第850页Table 5. (续)

审查员 吴永英

B CN 109311884 B

似物。除了皮肤增白应用之外,本发明的化合物、组合物和方法可用于调节黑素细胞活性、诱导黑素细胞凋亡、激动芳基烃受体(AhR)、改善由色素沉着过度病症引起的色素沉着过度,以及调节黑素产生、黑素体生物发生和黑素体转移。

[接上页]

(51) Int. Cl.

C07D 209/12 (2006.01)

A61K 8/49 (2006.01)

(56) 对比文件

Gregor Wille et al.. Malassezin—a novel agonist of the arylhydrocarbon receptor from the Yeast *Malassezia furfur*.《Bioorganic & Medicinal Chemistry》.2001, 第9卷第955-960页, 第956页 Figure 1, Scheme 1, 第957页左栏倒数第1段至右栏第1段.

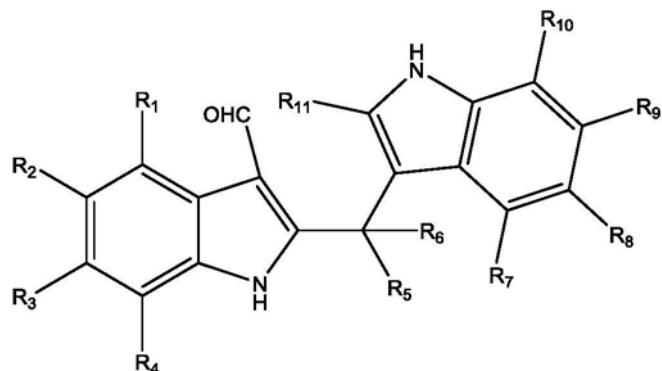
Chris L. Waller et al.. Three-Dimensional Quantitative Structure-Activity Relationships of Dioxins and Dioxin-like Compounds: Model Validation

and Ah Receptor Characterization.《Chem. Res. Toxicol.》.1995, 第8卷(第6期), 第847-858页, 第850页 Table 5.

Gregor Wille et al.. Malassezin—a novel agonist of the arylhydrocarbon receptor from the Yeast *Malassezia furfur*.《Bioorganic & Medicinal Chemistry》.2001, 第9卷第955-960页, 第956页 Figure 1, Scheme 1, 第957页左栏倒数第1段至右栏第1段.

Joakim Tholander et al.. Synthesis of 6-Formylindolo[3,2-b]carbazole, an Extremely Potent Ligand for the Aryl Hydrogen (Ah) Receptor.《Tetrahedron Letters》.1998, 第1619-1622页.

1. 一种化合物, 其具有式 (II) 的结构:



(II)

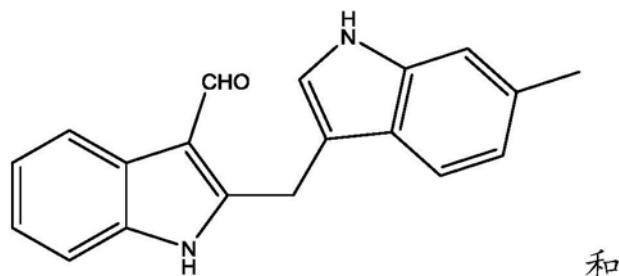
其中:

R1、R2、R3、R4和R11是氢, 并且R5、R6、R7、R8、R9和R10独立地选自由氢和甲基组成的组; 并且

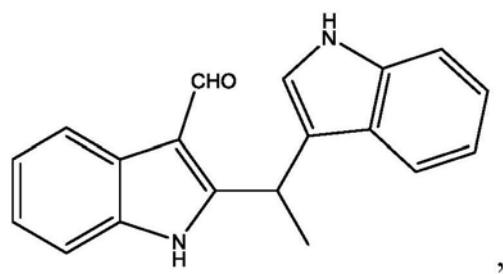
R5、R6、R7、R8、R9和R10中的至少一个是甲基;

或其化妆品上或药学上可接受的盐。

2. 根据权利要求1所述的化合物, 其中所述化合物选自由以下组成的组:



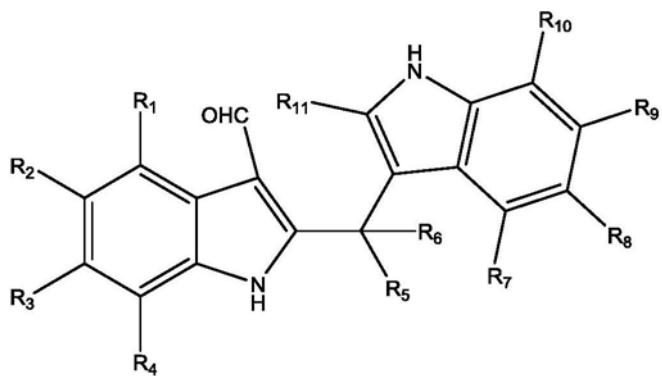
和



,

或其化妆品上或药学上可接受的盐。

3. 一种用于增白皮肤的的化合物, 所述化合物具有式 (II) 的结构:



(II)

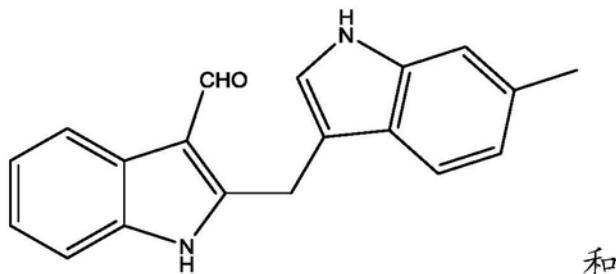
其中：

R1、R2、R3、R4和R11是氢，并且R5、R6、R7、R8、R9和R10独立地选自由氢和甲基组成的组；并且

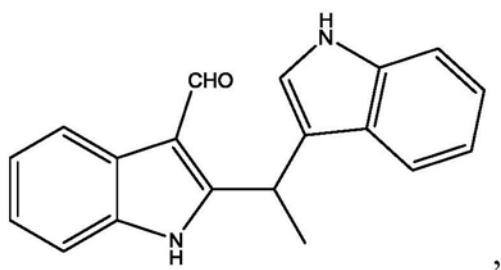
R5、R6、R7、R8、R9和R10中的至少一个是甲基；

或其化妆品上或药学上可接受的盐。

4. 根据权利要求3所述的化合物，其中所述化合物选自由以下组成的组：



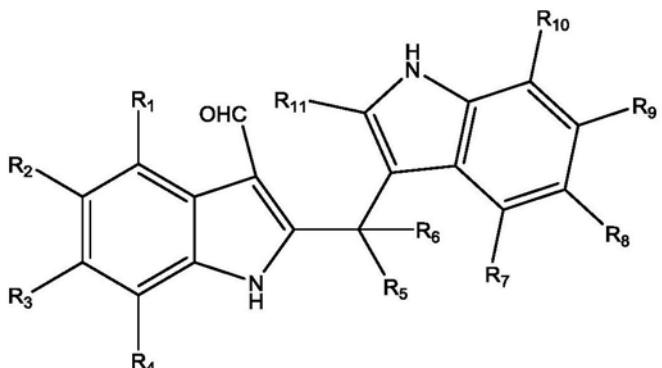
和



，

或其化妆品上或药学上可接受的盐。

5. 一种用于诱导黑素细胞凋亡的化合物，所述化合物具有式(II)的结构：



(II)

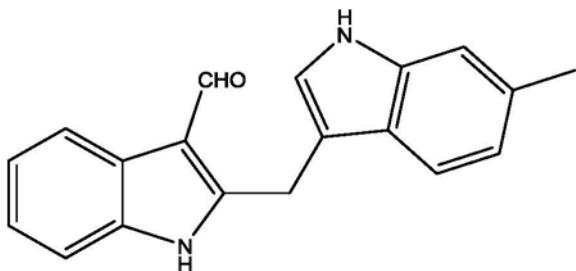
其中：

R1、R2、R3、R4和R11是氢，并且R5、R6、R7、R8、R9和R10独立地选自由氢和甲基组成的组；并且

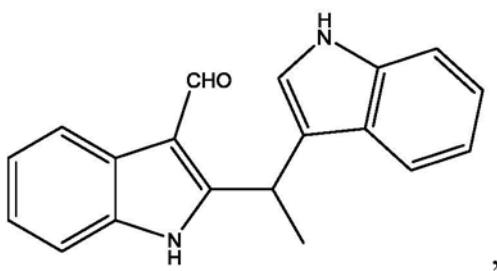
R5、R6、R7、R8、R9和R10中的至少一个是甲基；

或其化妆品上或药学上可接受的盐。

6. 根据权利要求5所述的化合物，其中所述化合物选自由以下组成的组：



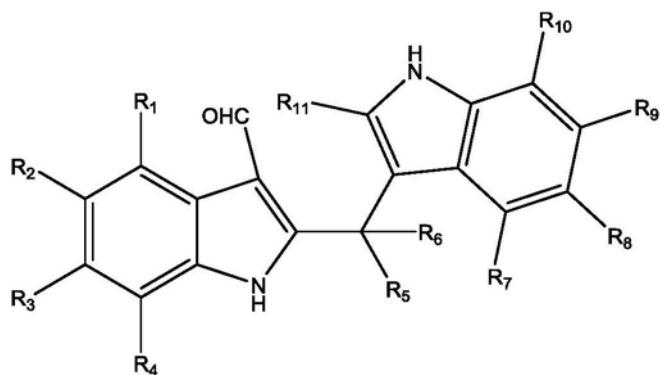
和



，

或其化妆品上或药学上可接受的盐。

7. 一种用于激动芳基烃受体(AhR)的化合物，所述化合物具有式(II)的结构：



(II)

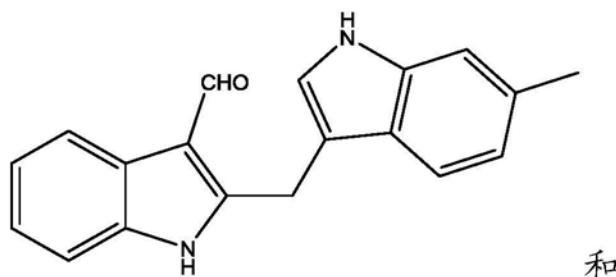
其中：

R1、R2、R3、R4和R11是氢，并且R5、R6、R7、R8、R9和R10独立地选自由氢和甲基组成的组；并且

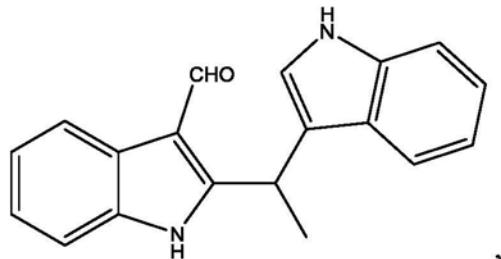
R5、R6、R7、R8、R9和R10中的至少一个是甲基；

或其化妆品上或药学上可接受的盐。

8. 根据权利要求7所述的化合物，其中所述化合物选自由以下组成的组：



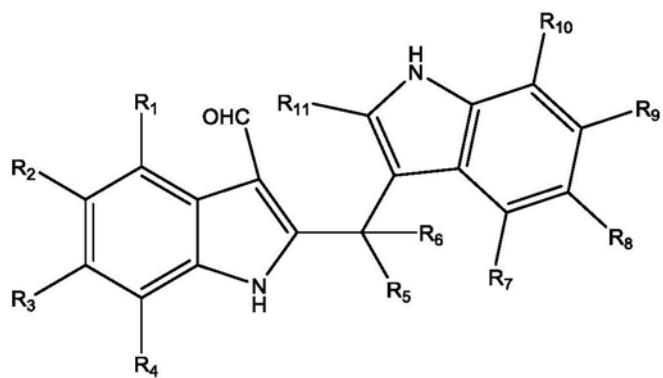
和



，

或其化妆品上或药学上可接受的盐。

9. 一种组合物, 其包含具有式 (II) 结构的化合物:



(II)

其中:

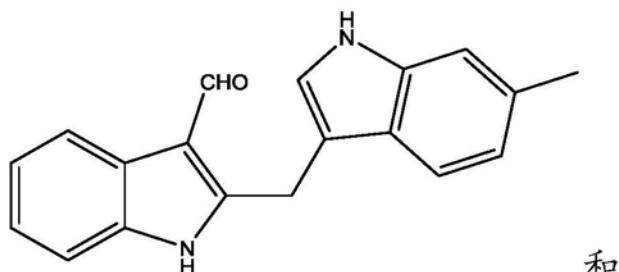
R1、R2、R3、R4和R11是氢, 并且R5、R6、R7、R8、R9和R10独立地选自由氢和甲基组成的组;
并且

R5、R6、R7、R8、R9和R10中的至少一个是甲基;

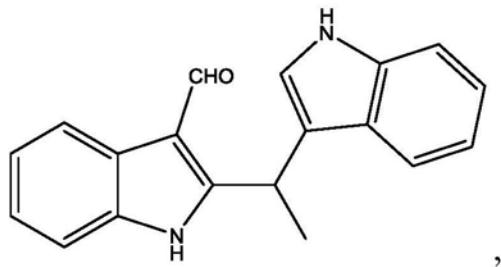
或其化妆品上或药学上可接受的盐,

以及化妆品上或药学上可接受的媒介物、稀释剂或载体。

10. 根据权利要求9所述的组合物, 其中所述化合物选自由以下组成的组:



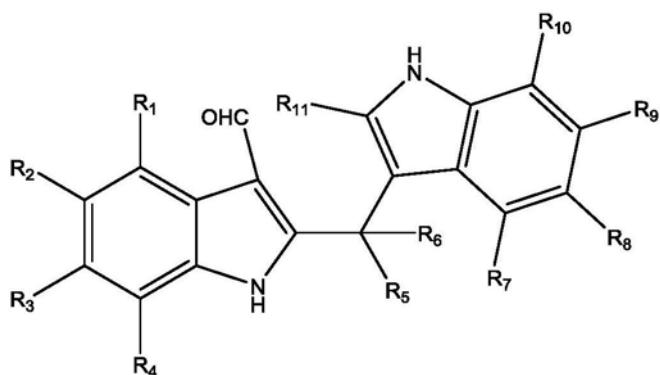
和



，

或其化妆品上或药学上可接受的盐。

11. 化合物在制备用于增白受试者的皮肤的药物中的用途，
其中所述化合物具有式 (II) 的结构：

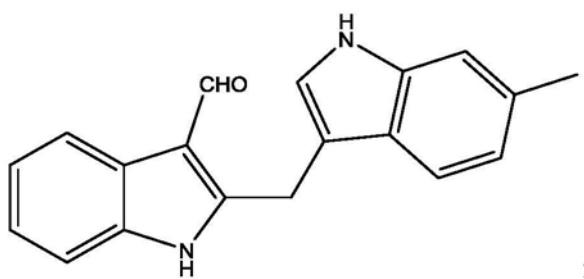
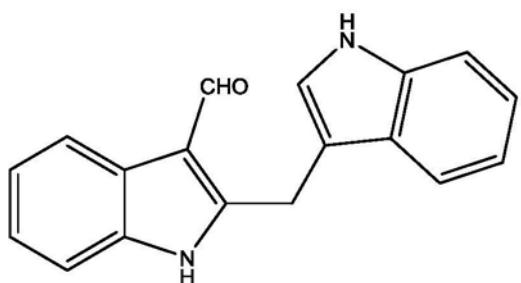


(II)

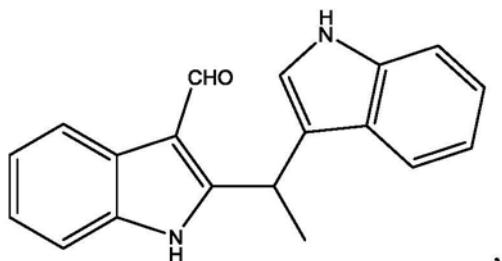
其中：

R1、R2、R3、R4和R11是氢，并且R5、R6、R7、R8、R9和R10独立地选自由氢和甲基组成的组；
或其化妆品上或药学上可接受的盐。

12. 如权利要求11所述的用途，其中所述化合物选自由以下组成的组：



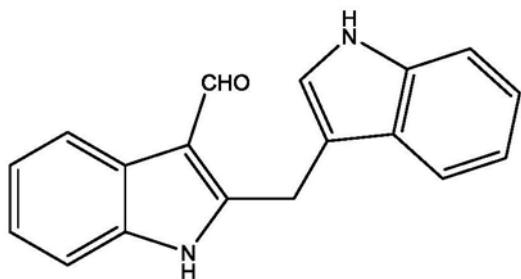
和



,

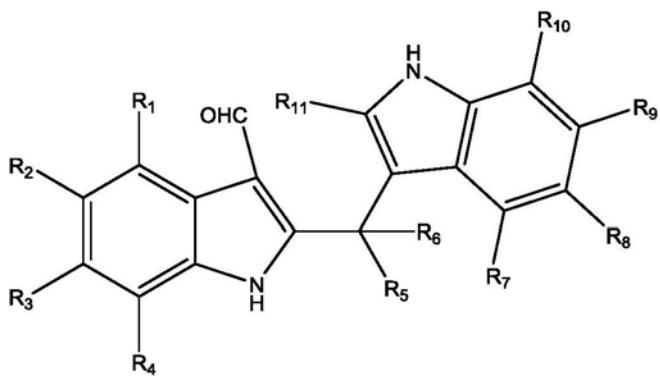
或其化妆品上或药学上可接受的盐。

13. 如权利要求11所述的用途,其中所述化合物是



或其化妆品上或药学上可接受的盐。

14. 化合物在制备用于诱导受试者中的黑素细胞凋亡的药物中的用途,
其中所述化合物具有式 (II) 的结构:

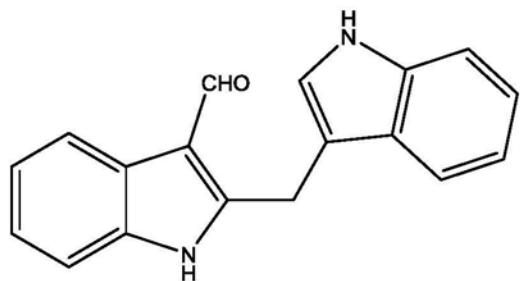


(II)

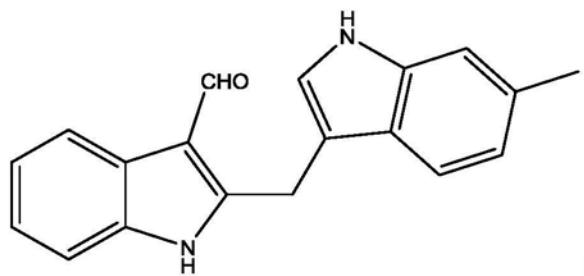
其中：

R1、R2、R3、R4和R11是氢，并且R5、R6、R7、R8、R9和R10独立地选自由氢和甲基组成的组；或其化妆品上或药学上可接受的盐。

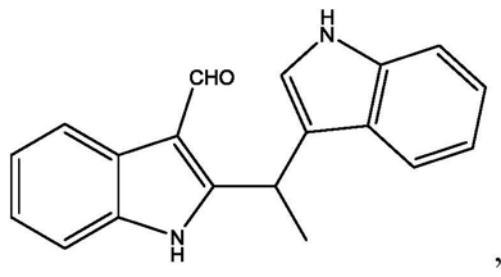
15. 如权利要求14所述的用途，其中所述化合物选自由以下组成的组：



、



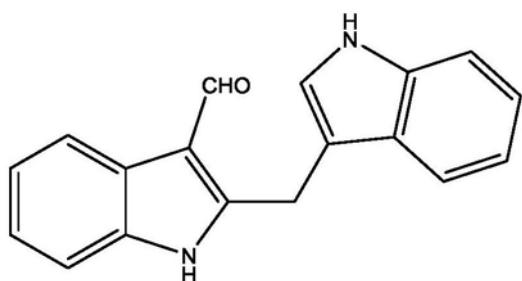
和



，

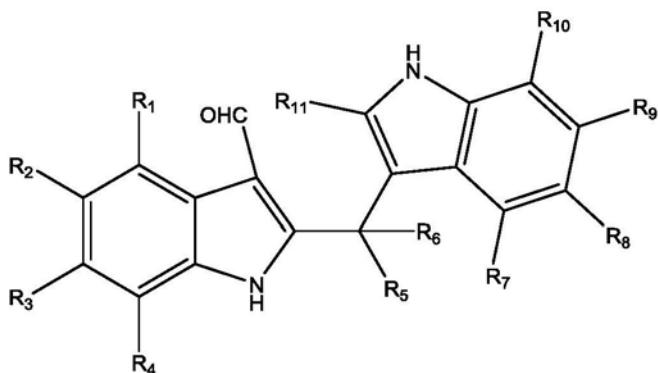
或其化妆品上或药学上可接受的盐。

16. 如权利要求14所述的用途，其中所述化合物是



或其化妆品上或药学上可接受的盐。

17. 化合物在制备用于激动受试者中的芳基烃受体 (AhR) 的药物中的用途，其中所述化合物具有式 (II) 的结构：



(II)

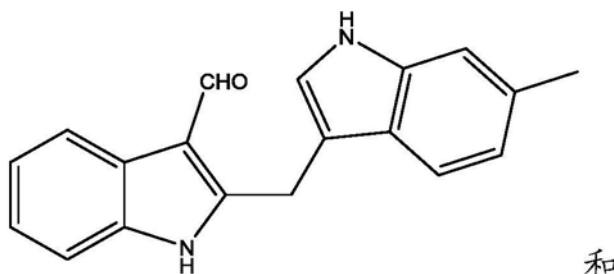
其中：

R1、R2、R3、R4 和 R11 是氢，并且 R5、R6、R7、R8、R9 和 R10 独立地选自由氢和甲基组成的组；并且

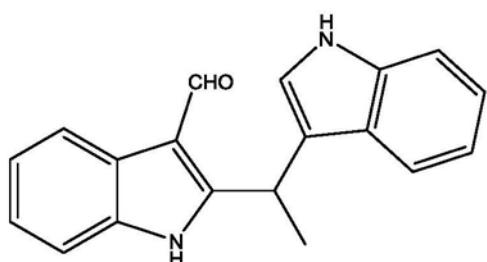
R5、R6、R7、R8、R9 和 R10 中的至少一个是甲基；

或化妆品上或药学上可接受的盐。

18. 如权利要求17所述的用途，其中所述化合物选自由以下组成的组：



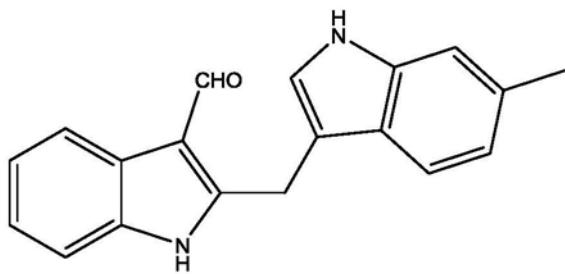
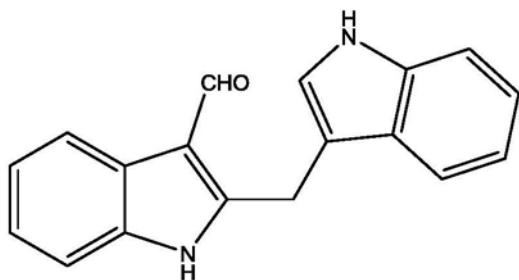
和



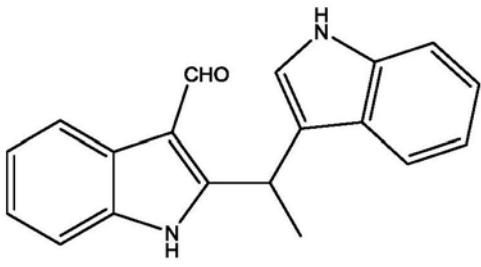
或其化妆品上或药学上可接受的盐。

19. 组合物在制备用于增白受试者的皮肤的药物中的用途，其中所述组合物包含选自

由以下组成的组的化合物：



和

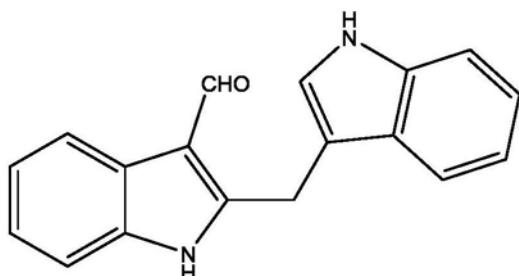


或其化妆品上或药学上可接受的盐，

，

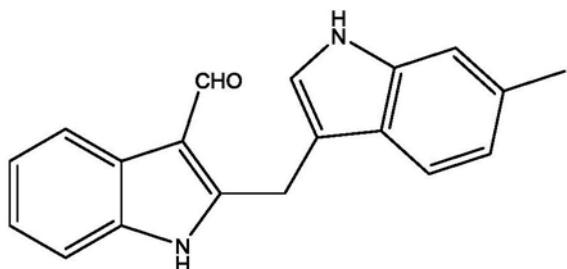
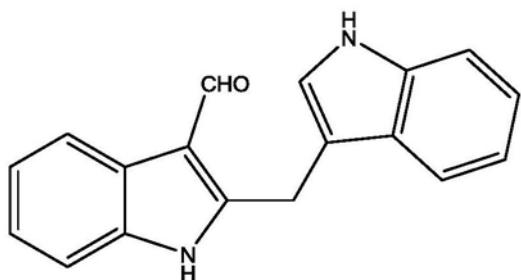
以及化妆品上或药学上可接受的媒介物、稀释剂或载体。

20. 如权利要求19所述的用途，其中所述化合物是

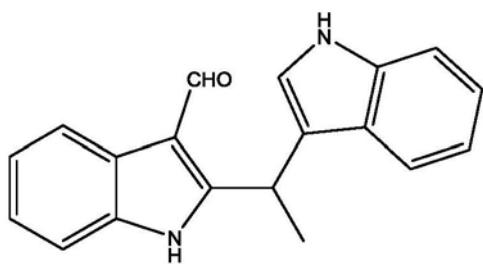


或其化妆品上或药学上可接受的盐。

21. 组合物在制备用于诱导受试者中的黑素细胞凋亡的药物中的用途，其中所述组合物包含选自由以下组成的组的化合物：



和

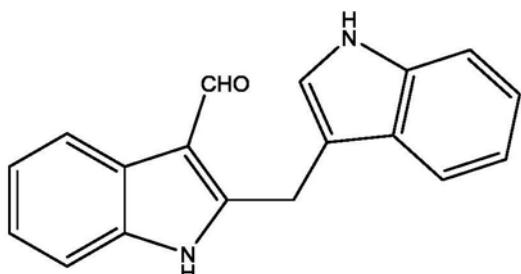


或其化妆品上或药学上可接受的盐，

，

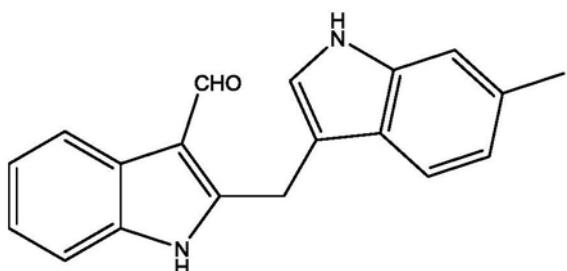
以及化妆品上或药学上可接受的媒介物、稀释剂或载体。

22. 如权利要求21所述的用途，其中所述化合物是

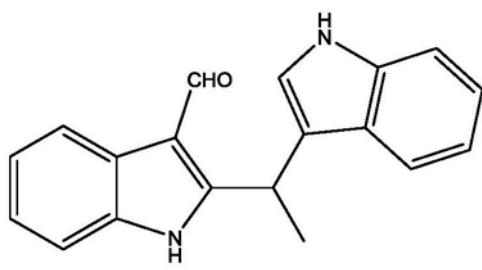


或其化妆品上或药学上可接受的盐。

23. 组合物在制备用于激动受试者中的芳基烃受体(AhR)的药物中的用途，其中所述组合物包含选自由以下组成的组的化合物：



和



或其化妆品上或药学上可接受的盐，

，

以及化妆品上或药学上可接受的媒介物、稀释剂或载体。

作为皮肤增白剂的马拉色因及其类似物

[0001] 相关申请的交叉引用

[0002] 本发明要求2016年3月10日提交的美国临时申请系列号62/306,468的权益。所述申请的全部内容以引用的方式并入。

发明领域

[0003] 本发明涉及由马拉色菌属(*Malassezia*)酵母产生的化合物的化学类似物。本发明包括组合物,所述组合物包含由马拉色菌属酵母产生的化合物以及由马拉色菌属酵母产生的化合物的化学类似物。还涵盖了使用本发明的化合物(包括其类似物)和组合物的方法。

[0004] 发明背景

[0005] 世界各地的个人使用皮肤增白剂来实现多个美容目标,包括产生抗衰老效果、纠正晒伤以及达到某些文化标准的美感。许多商业上可获得的皮肤增白产品虽然在不同程度上有效,但含有有害成分,其中一些有害成分与癌症相关。因此,需要与目前市场上的增白剂相比表现出更高水平的安全性和/或功效的新颖的皮肤增白剂和制剂。

[0006] 马拉色菌属是一种常见于人体皮肤正常菌群中的亲脂性酵母属。马拉色菌属导致多种皮肤病,包括花斑癣(花斑糠疹)、脂溢性皮炎和特应性皮炎。

[0007] 花斑癣是由局部改变色素沉着水平的马拉色菌属过度生长引起的非传染性皮肤病。马拉色菌属酵母具有两种合成黑素和色氨酸衍生的吲哚类色素的代谢途径。吲哚类色素包括马拉色因(*malassezin*),其是一种马拉色菌属的色氨酸代谢产物,其可引起黑素细胞凋亡并促成马拉色菌属过度生长特征性的褪色。

[0008] 本文所公开的本发明利用由马拉色菌属酵母产生的化合物以作为用于安全有效的皮肤增白组合物的基础,所述化合物包括马拉色因及其化学类似物。

发明内容

[0009] 本发明的一个实施方案是用于增白皮肤的化合物。所述化合物是由马拉色菌属酵母产生的化合物的化学类似物,或其结晶形式、水合物或化妆品上或药学上可接受的盐。

[0010] 本发明的另一个实施方案是用于诱导黑素细胞凋亡的化合物。所述化合物是由马拉色菌属酵母产生的化合物的化学类似物,或其结晶形式、水合物或化妆品上或药学上可接受的盐。

[0011] 本发明的再一实施方案是用于调节黑素细胞活性的化合物。所述化合物是由马拉色菌属酵母产生的化合物的化学类似物,或其结晶形式、水合物或化妆品上或药学上可接受的盐。

[0012] 本发明的另外的实施方案是用于激动芳基烃受体(AhR)的化合物。所述化合物是由马拉色菌属酵母产生的化合物的化学类似物,或其结晶形式、水合物或化妆品上或药学上可接受的盐。

[0013] 本发明的另一个实施方案是用于改善由色素沉着过度病症引起的色素沉着过度的化合物。所述化合物是由马拉色菌属酵母产生的化合物的化学类似物,或其结晶形式、水

合物或化妆品上或药学上可接受的盐。

[0014] 本发明的再一实施方案是用于调节黑素产生的化合物。所述化合物是由马拉色菌属酵母产生的化合物的化学类似物,或其结晶形式、水合物或化妆品上或药学上可接受的盐。

[0015] 本发明的另外的实施方案是用于调节黑素体生物发生的化合物。所述化合物是由马拉色菌属酵母产生的化合物的化学类似物,或其结晶形式、水合物或化妆品上或药学上可接受的盐。

[0016] 本发明的另一个实施方案是用于调节黑素体转移的化合物。所述化合物是由马拉色菌属酵母产生的化合物的化学类似物,或其结晶形式、水合物或化妆品上或药学上可接受的盐。

[0017] 本发明的再一实施方案是组合物。所述组合物包含马拉色菌属酵母和化妆品上或药学上可接受的媒介物、稀释剂或载体。

[0018] 本发明的另外的实施方案是组合物。所述组合物包含分离自或可分离自马拉色菌属酵母的化合物和化妆品上或药学上可接受的媒介物、稀释剂或载体。

[0019] 本发明的另一个实施方案是组合物。所述组合物包含本文所公开的任何化合物(包括类似物)和化妆品上或药学上可接受的媒介物、稀释剂或载体。

[0020] 本发明的再一实施方案是增白受试者的皮肤的方法。所述方法包括使受试者与本文所公开的任何化合物或组合物接触。

[0021] 本发明的另外的实施方案是用于诱导受试者中的黑素细胞凋亡的方法。所述方法包括使受试者与本文所公开的任何化合物或组合物接触。

[0022] 本发明的另一个实施方案是用于调节受试者中的黑素细胞活性的方法。所述方法包括使受试者与本文所公开的任何化合物或组合物接触。

[0023] 本发明的再一实施方案是用于激动受试者中的芳基烃受体(AhR)的方法。所述方法包括使受试者与本文所公开的任何化合物或组合物接触。

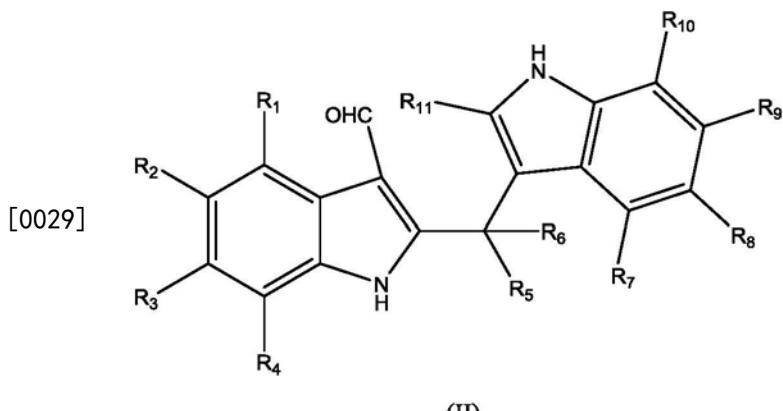
[0024] 本发明的另外实施方案是用于在有需要的受试者中改善由色素沉着过度病症引起的色素沉着过度的方法。所述方法包括使受试者与本文所公开的任何化合物或组合物接触。

[0025] 本发明的另一个实施方案是用于调节受试者中的黑素产生的方法。所述方法包括使受试者与本文所公开的任何化合物或组合物接触。

[0026] 本发明的再一实施方案是用于调节受试者中的黑素体生物发生的方法。所述方法包括使受试者与本文所公开的任何化合物或组合物接触。

[0027] 本发明的另外的实施方案是用于调节受试者中的黑素体转移的方法。所述方法包括使受试者与本文所公开的任何化合物或组合物接触。

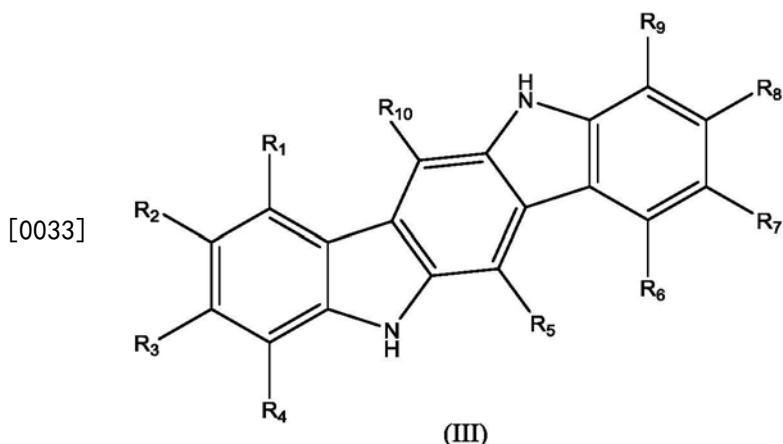
[0028] 本发明的另一个实施方案是化合物。所述化合物具有式 (II) 的结构:



[0030] 其中：

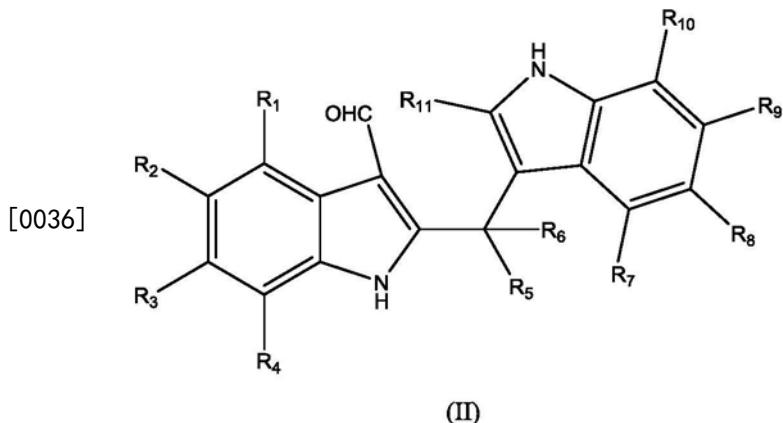
[0031] R1、R2、R3、R4、R5、R6、R7、R8、R9、R10和R11独立地选自由氢和甲基组成的组，并且R1、R2、R3、R4、R5、R6、R7、R8、R9、R10和R11中的至少一个是甲基；或其结晶形式、水合物或化妆品上或药学上可接受的盐。

[0032] 本发明的再一实施方案是化合物。所述化合物具有式 (III) 的结构：



[0034] 其中：R1、R2、R3、R4、R5、R6、R7、R8、R9和R10独立地选自由氢和甲基组成的组，并且R1、R2、R3、R4、R5、R6、R7、R8、R9和R10中的至少一个是甲基；或其结晶形式、水合物或化妆品上或药学上可接受的盐。

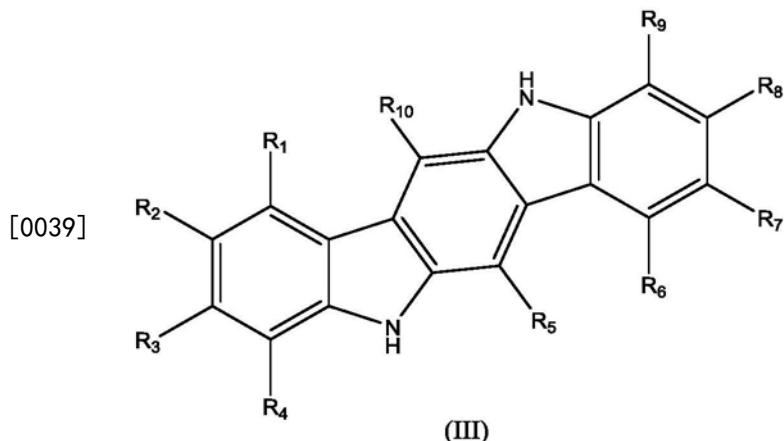
[0035] 本发明的另外的实施方案是用于增白皮肤的化合物。所述化合物具有式 (II) 的结构：



[0037] 其中：R1、R2、R3、R4、R5、R6、R7、R8、R9、R10和R11独立地选自由氢和甲基组成的组；

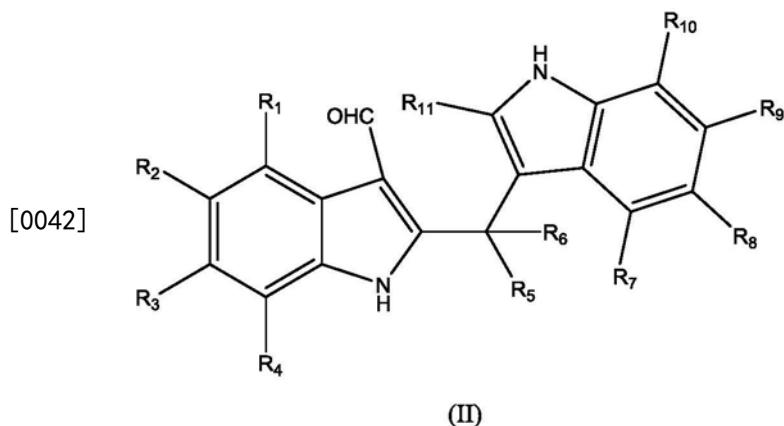
或其结晶形式、水合物或化妆品上或药学上可接受的盐。

[0038] 本发明的另一个实施方案是用于增白皮肤的化合物。所述化合物具有式(III)的结构：



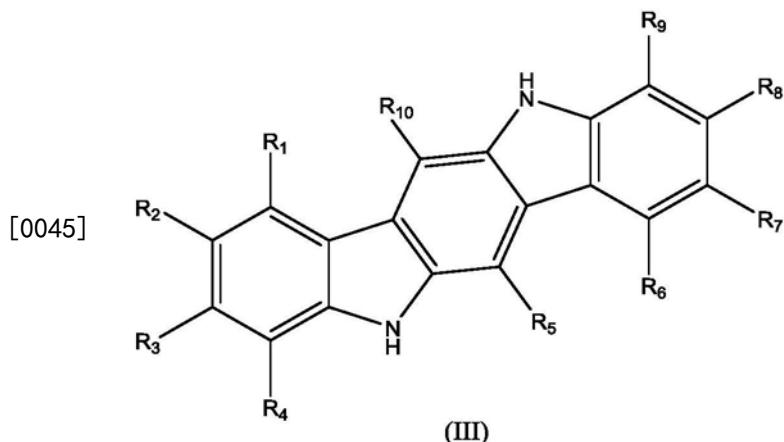
[0040] 其中：R1、R2、R3、R4、R5、R6、R7、R8、R9和R10独立地选自由氢和甲基组成的组；或其结晶形式、水合物或化妆品上或药学上可接受的盐。

[0041] 本发明的再一实施方案是用于诱导黑素细胞凋亡的化合物。所述化合物具有式(II)的结构：



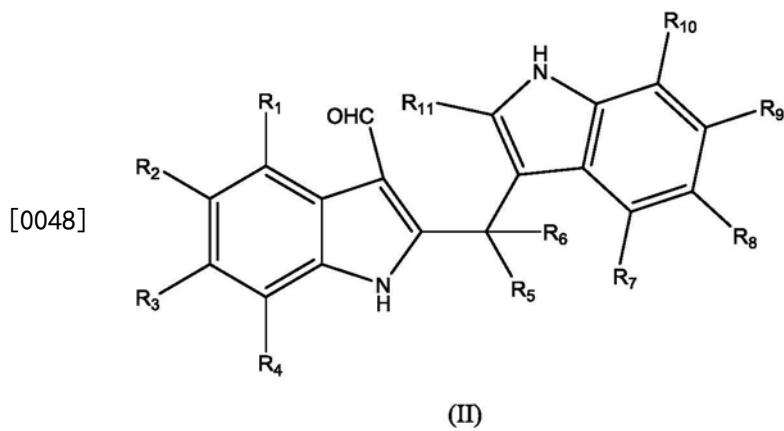
[0043] 其中：R1、R2、R3、R4、R5、R6、R7、R8、R9、R10和R11独立地选自由氢和甲基组成的组；或其结晶形式、水合物或化妆品上或药学上可接受的盐。

[0044] 本发明的另外的实施方案是用于诱导黑素细胞凋亡的化合物。所述化合物具有式(III)的结构：



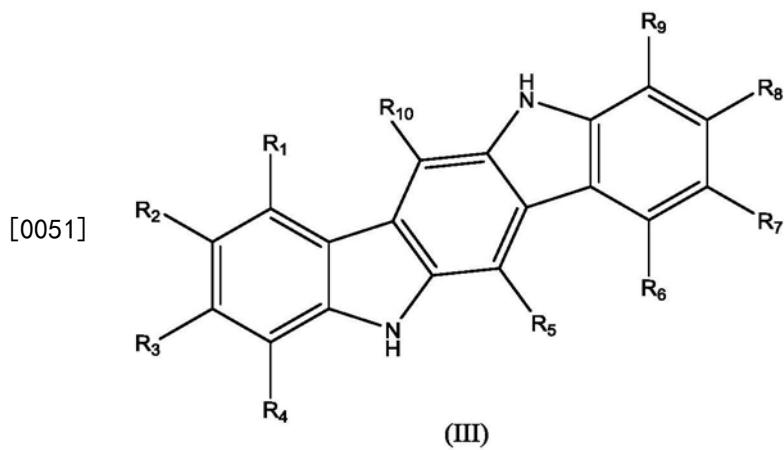
[0046] 其中:R1、R2、R3、R4、R5、R6、R7、R8、R9和R10独立地选自由氢和甲基组成的组;或其结晶形式、水合物或化妆品上或药学上可接受的盐。

[0047] 本发明的另一个实施方案是用于激动芳基烃受体(AhR)的化合物。所述化合物具有式(II)的结构:



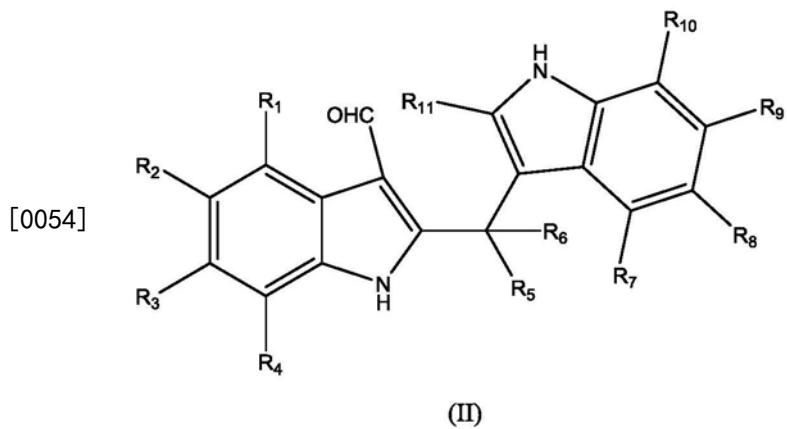
[0049] 其中:R1、R2、R3、R4、R5、R6、R7、R8、R9、R10和R11独立地选自由氢和甲基组成的组;或其结晶形式、水合物或化妆品上或药学上可接受的盐。

[0050] 本发明的再一实施方案是用于激动芳基烃受体(AhR)的化合物。所述化合物具有式(III)的结构:



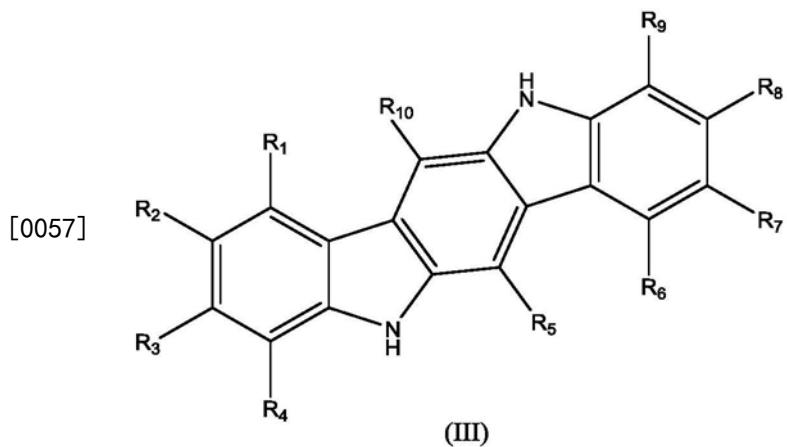
[0052] 其中:R1、R2、R3、R4、R5、R6、R7、R8、R9和R10独立地选自由氢和甲基组成的组;或其结晶形式、水合物或化妆品上或药学上可接受的盐。

[0053] 本发明的另外的实施方案是组合物。所述组合物包含具有式 (II) 结构的化合物：



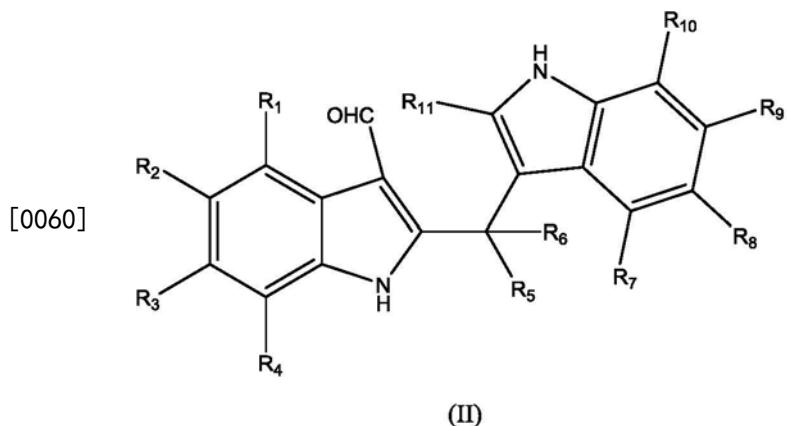
[0055] 其中:R1、R2、R3、R4、R5、R6、R7、R8、R9、R10和R11独立地选自由氢和甲基组成的组；或其结晶形式、水合物或化妆品上或药学上可接受的盐，以及化妆品上或药学上可接受的媒介物、稀释剂或载体。

[0056] 本发明的另一个实施方案是组合物。所述组合物包含具有式 (III) 结构的化合物：



[0058] 其中:R1、R2、R3、R4、R5、R6、R7、R8、R9和R10独立地选自由氢和甲基组成的组；或其结晶形式、水合物或化妆品上或药学上可接受的盐，以及化妆品上或药学上可接受的媒介物、稀释剂或载体。

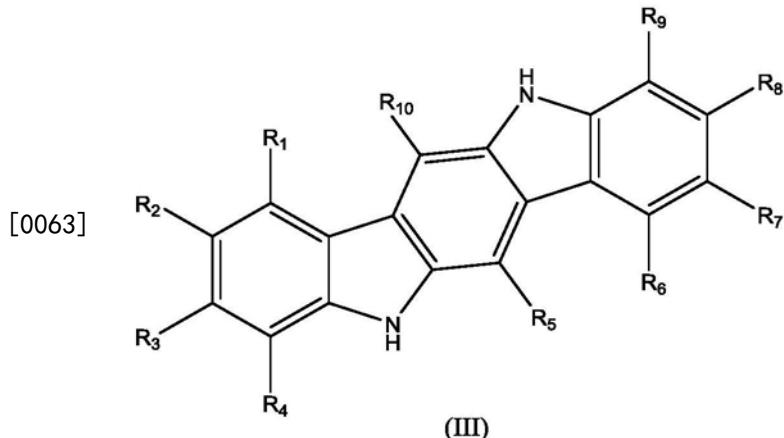
[0059] 本发明的再一实施方案是用于增白受试者的皮肤的方法。所述方法包括：使受试者与具有式 (II) 结构的化合物接触：



[0061] 其中:R1、R2、R3、R4、R5、R6、R7、R8、R9、R10和R11独立地选自由氢和甲基组成的组；

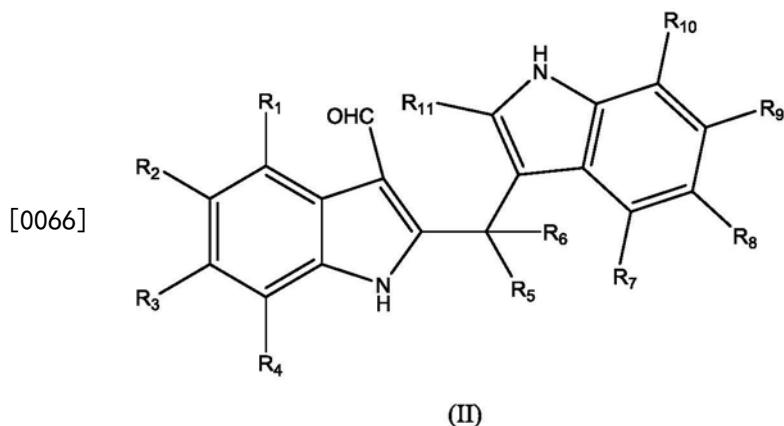
或其结晶形式、水合物或化妆品上或药学上可接受的盐。

[0062] 本发明的另外的实施方案是用于增白受试者的皮肤的方法。所述方法包括：使受试者与具有式(III)结构的化合物接触：



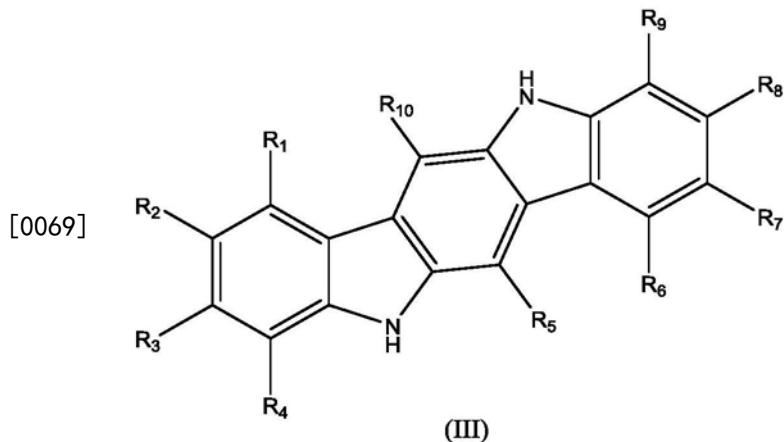
[0064] 其中：R1、R2、R3、R4、R5、R6、R7、R8、R9和R10独立地选自由氢和甲基组成的组；或其结晶形式、水合物或化妆品上或药学上可接受的盐。

[0065] 本发明的另一个实施方案是用于诱导受试者中的黑素细胞凋亡的方法。所述方法包括：使受试者与具有式(II)结构的化合物接触：



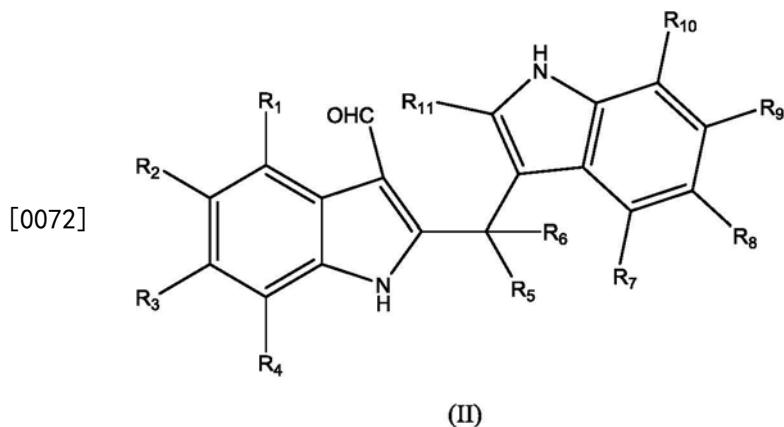
[0067] 其中：R1、R2、R3、R4、R5、R6、R7、R8、R9、R10和R11独立地选自由氢和甲基组成的组；或其结晶形式、水合物或化妆品上或药学上可接受的盐。

[0068] 本发明的再一实施方案是用于诱导受试者中的黑素细胞凋亡的方法。所述方法包括：使受试者与具有式(III)结构的化合物接触：



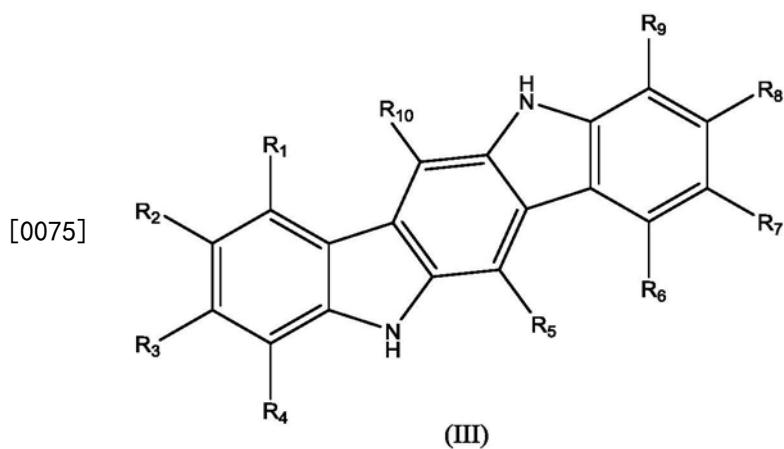
[0070] 其中:R1、R2、R3、R4、R5、R6、R7、R8、R9和R10独立地选自由氢和甲基组成的组;或其结晶形式、水合物或化妆品上或药学上可接受的盐。

[0071] 本发明的另一个实施方案是用于激动受试者中的芳基烃受体(AhR)的方法。所述方法包括:使受试者与具有式(II)结构的化合物接触:



[0073] 其中:R1、R2、R3、R4、R5、R6、R7、R8、R9、R10和R11独立地选自由氢和甲基组成的组;或其结晶形式、水合物或化妆品上或药学上可接受的盐。

[0074] 本发明的再一实施方案是用于激动受试者中的芳基烃受体(AhR)的方法。所述方法包括:使受试者与具有式(III)结构的化合物接触:



[0076] 其中:R1、R2、R3、R4、R5、R6、R7、R8、R9和R10独立地选自由氢和甲基组成的组;或其结晶形式、水合物或化妆品上或药学上可接受的盐。

附图说明

[0077] 本专利或申请文件包含至少一幅以彩色绘制出的附图。在提出请求并支付必要费用后,专利局将提供具有彩色附图的本专利或专利申请公布的副本。

[0078] 图1A是皮肤组成层的示意图。插图示出了表皮和真皮的细胞组成。图1B是示出引起色素减退的剂的潜在作用机制的示意图。

[0079] 图2是一组用于马拉色因和马拉色因衍生物的合成方案:图2A:马拉色因和吲哚并[3,2-b]咔唑;图2B:化合物I和IV;图2C:化合物II。

[0080] 图3A是示出在MeWo和WM115细胞中针对本发明某些化合物的膜联蛋白V诱导的EC₅₀的汇总图表。图3B-3M是线形图,其示出在暴露于各种浓度的所列化合物后标记有膜联蛋白V的MeWo(图3B-3G)或WM115(图3H-3M)细胞的百分比。

[0081] 图4A-4D是示出在暴露于各种浓度的所列化合物6小时、24小时、48小时和72小时后MeWo和WM115细胞中的相对膜联蛋白V水平(%)的图表。图4E-4J是示出图4A-4D的结果的直方图。图4K和4L是示出在暴露于所示浓度下的所列化合物6小时后标记有膜联蛋白V的MeWo(图4K)和WM115(图4L)细胞的百分比的直方图。

[0082] 图5A-5K是示出用各种浓度的CV-8684、CV-8685、CV-8688、DMSO和星形孢菌素处理6小时后的MeWo细胞形态的显微照片。

[0083] 图6A-6K是示出用各种浓度的CV-8684、CV-8685、CV-8688、DMSO和星形孢菌素处理24小时后的MeWo细胞形态的显微照片。

[0084] 图7A-7K是示出用各种浓度的CV-8684、CV-8685、CV-8688、DMSO和星形孢菌素处理48小时后的MeWo细胞形态的显微照片。

[0085] 图8A-8K是示出用各种浓度的CV-8684、CV-8685、CV-8688、DMSO和星形孢菌素处理72小时后的MeWo细胞形态的显微照片。

[0086] 图9A-9K是示出用各种浓度的CV-8684、CV-8685、CV-8688、DMSO和星形孢菌素处理6小时后的WM115细胞形态的显微照片。

[0087] 图10A-10K是示出用各种浓度的CV-8684、CV-8685、CV-8688、DMSO和星形孢菌素处理24小时后的WM115细胞形态的显微照片。

[0088] 图11A-11K是示出用各种浓度的CV-8684、CV-8685、CV-8688、DMSO和星形孢菌素处理48小时后的WM115细胞形态的显微照片。

[0089] 图12A-12K是示出用各种浓度的CV-8684、CV-8685、CV-8688、DMSO和星形孢菌素处理72小时后的WM115细胞形态的显微照片。

[0090] 图13A-13D是示出用各种浓度的CV-8684(图13A)、CV-8685(图13B)、CV-8688(图13C)或星形孢菌素(图13D)处理6小时、24小时、48小时和72小时后剩余的存活MeWo和WM115细胞的百分比的图表。使用CellTiter-Glo®测定细胞活力。图13E-13J是示出图13A-13D的结果的直方图。图13K是比较暴露于所列浓度的马拉色因、吲哚并咔唑、化合物II和星形孢菌素24小时、48小时和72小时后存活MeWo和WM115细胞的百分比的汇总图表。

[0091] 图14A-14D是示出用各种浓度的CV-8684(图14A)、CV-8685(图14B)、CV-8688(图14C)或星形孢菌素(图14D)处理6小时、24小时、48小时和72小时后从MeWo和WM115细胞释放的乳酸脱氢酶(“LDH”)水平的图表。图14E-14J是示出图14A-14D的结果的直方图。图14K和14L是示出将MeWo(图14K)和WM115(图14L)细胞暴露于所列浓度的马拉色因、咔唑、化合物

II和星形孢菌素24小时后的乳酸脱氢酶水平的直方图。

[0092] 图15A-15E显示在暴露于各种浓度的奥美拉唑(omeprazole)(图15A)、CV-8684(图15B)、CV-8685(图15C)、CV-8686(图15D)和CV-8688(图15E)时用AhR响应性荧光素酶报告基因质粒稳定转染的HepG2细胞中芳基烃受体(“AhR”)激活的原始数据和线形图。图15F示出了针对测试的每种化合物的EC₅₀值。

[0093] 图16A-16K是在暴露于不处理(图16A)、无菌去离子水(图16B)、1%曲酸(图16C)、0.2%DMSO(图16D)、0.05%DMSO(图16E)、200μM CV-8684(图16F)、50μM CV-8684(图16G)、200μM CV-8686(图16H)、50μM CV-8686(图16I)、200μM CV-8688(图16J)和50μM CV-8688(图16K)后第0天或第7天MelanoDermTM基质的照片。

[0094] 图17A-17K是在暴露于不处理(图17A)、无菌去离子水(图17B)、1%曲酸(图17C)、0.2%DMSO(图17D)、0.05%DMSO(图17E)、200μM CV-8684(图17F)、50μM CV-8684(图17G)、200μM CV-8686(图17H)、50μM CV-8686(图17I)、200μM CV-8688(图17J)和50μM CV-8688(图17K)后第0天或第7天MelanoDermTM基质的15倍放大照片。

[0095] 图18A-18F是暴露于未处理(图18A)、DMSO(图18B)、苯基硫脲(“PTU”)(图18C)和2.5μM(图18D)、5μM(图18E)和10μM(图18F)的化合物II的斑马鱼的照片。红色箭头指示正常的黑素细胞。

[0096] 图19A-19F是暴露于未处理(图19A)、DMSO(图19B)、苯基硫脲(“PTU”)(图19C)和0.3μM(图19D)、1μM(图19E)和3μM(图19F)的化合物II的斑马鱼的照片。红色箭头指示正常的黑素细胞。黄色箭头指示异常小的黑素细胞。

[0097] 图20是示出在暴露于所列条件后皮肤色素沉着减少的斑马鱼的数量和百分比的汇总图表。最后六行示出了不同浓度的化合物II的影响。

[0098] 图21A-21E是未处理的(图21A)、用DMSO(图21B)、PTU(图21C)、0.5μM(图21D)和1.5μM(图21E)处理的斑马鱼的照片。下图包括颜色方案反转的区域。

[0099] 图22A和图22B是示出通过着色像素/mm³测量的色素沉着密度(图22A)和来自图21A-21E中例示的斑马鱼胚胎照片的总像素(图22B)的直方图。

[0100] 图23A-23C是DMSO(图23A)、RPMI培养基(图23B)和DMEM(图23C)中CV-8684的质谱。图23D-23F是DMSO(图23D)、RPMI培养基(图23E)和DMEM(图23F)中CV-8686的质谱。图23G-23I是DMSO(图23G)、RPMI培养基(图23H)和DMEM(图23I)中CV-8688的质谱。图23J是示出在温育2小时后保留在所列溶剂中的测试化合物的百分比的汇总图表。

具体实施方式

[0101] 本发明的一个实施方案是用于增白皮肤的化合物。所述化合物是由马拉色菌属酵母产生的化合物的化学类似物,或其结晶形式、水合物或化妆品上或药学上可接受的盐。

[0102] 如本文所用,术语“化合物”是指通过一个或多个化学键连接的两个或更多个原子。在本发明中,化学键包括但不限于共价键、离子键、氢键和范德华相互作用。本发明的共价键包括单键、双键和三键。本发明的化合物包括但不限于有机分子。

[0103] 本发明的有机化合物/分子包括具有或不具有官能团的直链、支链和环状烃。术语“C_{x-y}”当与化学部分(诸如烷基、烯基、炔基或烷氧基)结合使用时意指包括链中含有x至y个碳的基团。例如,术语“C_{x-y}烷基”是指取代或未取代的饱和烃基,包括链中含有x至y个碳的

直链烷基和支链烷基,包括卤代烷基诸如三氟甲基和2,2,2-三氟乙基等。术语“ C_{x-y} 烯基”和“ C_{x-y} 炔基”是指在长度和可能性取代上类似于上述烷基但分别含有至少一个双键或三键的取代或未取代的不饱和脂族基团。

[0104] 如本文所用,术语“脂族”意指由碳原子和氢原子组成并不含有芳环的基团。因此,脂族基团包括烷基、烯基、炔基和碳环基。

[0105] 术语“烷基”意指不具有环结构的饱和脂族基团,包括直链烷基和支链烷基。

[0106] 如本文所用,术语“烯基”意指含有至少一个双键的脂族基团。

[0107] 如本文所用,术语“炔基”意指含有至少一个三键的脂族基团。

[0108] 如本文所用,“芳族化合物”、“芳族”或含有“芳族环”的化合物是芳基或杂芳基化合物。如本文所用,术语“芳基”包括取代或未取代的单环芳族基团,其中环的每个原子是碳。优选地,环是3至8元环,更优选是6元环。术语“芳基”还包括具有两个或更多个环的多环体系,其中两个或更多个碳为两个相邻环共用,其中至少一个环是芳族的,例如,其他环可以为环烷基、环烯基、环炔基、芳基、杂芳基和/或杂环基。芳基包括苯、萘、菲、苯酚、苯胺等。术语“杂芳基”包括取代或未取代的芳族单环结构,优选3至8元环,更优选5至7元环,甚至更优选5至6元环,其环结构至少包括一个杂原子,优选一至四个杂原子,更优选一个或两个杂原子。术语“杂芳基”还包括具有两个或更多个环的多环体系,其中两个或更多个碳为两个相邻环共用,其中至少一个环是杂芳族的,例如,其他环可以为环烷基、环烯基、环炔基、芳基、杂芳基和/或杂环基。杂芳基包括例如吡咯、呋喃、噻吩、吲哚、咪唑、噁唑、噻唑、吡唑、吡啶、吡嗪、哒嗪和嘧啶等。优选地,本发明的某些化合物包括至少一个,优选两个吲哚基团以及至少一个醛基。

[0109] 术语“取代的”意指具有至少一个取代基的部分,所述至少一个取代基置换主链的一个或多个碳上的氢原子。应当理解“取代”或“被...取代”包括隐含条件,即这种取代符合被取代原子和取代基的允许化合价,并且取代产生稳定化合物,例如不会自发地如通过重排、环化、消去等进行转化的化合物。对于适当的有机化合物,可允许的取代基可以是一个或多个并且可相同或不同。

[0110] 如本文所用,“皮肤增白”及其语法变化形式通常是指皮肤色素沉着的任何实际或感知的减少。已经使用皮肤增白方法来减少由于年龄、日照或色素沉着过度病症导致的色素沉着过度区域的色素沉着。将本发明的化合物和组合物施加于例如受试者的皮肤可以减少色素沉着,使得皮肤看起来比所述施加之前更亮或更白。皮肤色素沉着可以通过多种方式进行评估,所述方式包括但不限于视觉评估,例如使用von Luschan比色标度、Fitzpatrick皮肤分型测试(Fitzpatrick等人,1988)和Taylor色素沉着过度标度(Taylor等人,2005),和反射分光光度法(Zonios等人,2001)。例如,Fitzpatrick皮肤分型测试包括六种类型的皮肤(I-VI),并且变为V型或更小型的VI型皮肤得到“增白”,如该术语在本文中使用的那样。如下面进一步讨论的,皮肤增白可由于多种现象产生,包括但不限于对黑素细胞活性的调节、黑素细胞凋亡的诱导、芳基烃受体(AhR)的激动、或对黑素产生、黑素体生物发生或黑素体转移的调节。

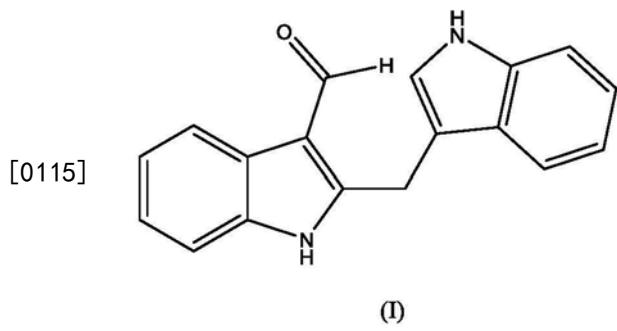
[0111] 本发明的某些化合物是由马拉色菌属酵母产生、分离自或可分离自马拉色菌属酵母。马拉色菌属酵母是马拉色菌属的酵母,并且包括但不限于球形马拉色菌(*Malassezia globosa*)、限制性马拉色菌(*Malassezia restricta*)、糠秕马拉色菌(*Malassezia*

furfur)、合轴马拉色菌 (*Malassezia sympodialis*)、斯洛菲马拉色菌 (*Malassezia slooffiae*)、圆头马拉色菌 (*Malassezia obtusa*)、厚皮马拉色菌 (*Malassezia pachydermatis*)、皮肤马拉色菌 (*Malassezia dermatis*)、日本马拉色菌 (*Malassezia japonica*)、纳娜马拉色菌 (*Malassezia nana*)、大和马拉色菌 (*Malassezia yamatoensis*)、马马拉色菌 (*Malassezia equine*)、羊马拉色菌 (*Malassezia caprae*) 和 *Malassezia cuniculi*。(Guého等人, 1996; Gaitanis等人, 2013)。马拉色菌属酵母是正常人类皮肤菌群的一部分, 并且通常不产生致病作用。然而, 马拉色菌属酵母可引起多种疾病, 包括但不限于花斑癣(色素沉着过度和色素减退种类)、脂溢性皮炎、头皮屑、特应性皮炎、马拉色菌毛囊炎、牛皮癣、以及融合性网状乳头瘤病。(Gaitanis等人, 2013)。

[0112] 如本文所用, 术语“化学类似物”是指在结构上与母体化合物相关并含有不同官能团或取代基的化合物。例如, 本发明的母体化合物是马拉色因, 并且马拉色因的化学类似物含有某些不同于马拉色因的官能团和取代基。与给定的母体化合物相比, 本发明的化学类似物可具有显著的优点, 包括适用于化妆品用途的药代动力学分布。在一些实施方案中, 通过一种或多种化学反应从母体分子产生化学类似物。在其他实施方案中, 不源自母体化合物的替代合成方案可用于产生本发明的化学类似物。

[0113] “如果在生命周期的过程中, 马拉色菌属酵母将在适当的生长条件下合成、分泌、积累或以其他方式产生本发明的化合物, 则本发明的化合物是“由马拉色菌属酵母产生”。马拉色菌属酵母根据其生长培养基补充的是什么而分泌不同的化合物。(Nazzaro-Porro等人, 1978)。本发明包括由马拉色菌属酵母在任何生长条件下产生的任何化合物, 但优选的化合物包括, 例如, 马拉色因及其化学类似物。

[0114] 在该实施方案的一个方面, 由马拉色菌属酵母产生的化合物具有式(I)的结构:



[0116] 在该实施方案的另一个方面, 所述化合物是马拉色因的化学类似物。

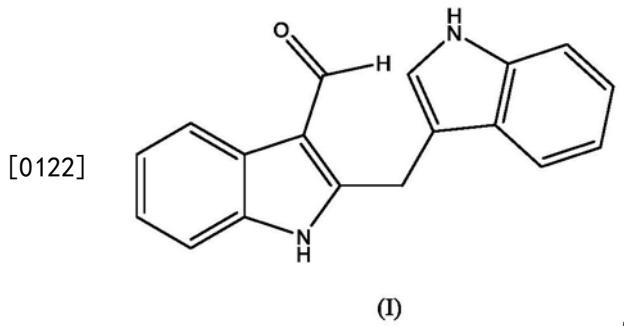
[0117] 马拉色因是本发明的由马拉色菌属酵母产生的化合物的一个实例。马拉色因, 也称为2-(1H-吲哚-3-基甲基)-1H-吲哚-3-甲醛, 是一种最初从糠秕马拉色菌中分离出来的色氨酸代谢产物。马拉色因是芳基烃受体 (AhR) 的已知激动剂, 所述芳基烃受体 (AhR) 是涉及细胞生长、分化和基因表达的受体。(Wille等人, 2001)。马拉色因还诱导原代人黑素细胞的细胞凋亡。(Krämer等人, 2005)。最近, 马拉色因的某些化学类似物由Winston-McPherson及其同事合成, 他们研究了类似物的AhR激动剂活性。(Winston-McPherson等人, 2014)。

[0118] 本发明的另一个实施方案是用于诱导黑素细胞凋亡的化合物。所述化合物是由马拉色菌属酵母产生的化合物的化学类似物, 或其结晶形式、水合物或化妆品上或药学上可接受的盐。

[0119] 如本文所用,术语“黑素细胞”是指表皮的树突细胞,其通常合成酪氨酸酶并且在黑素体内合成黑素。本发明的黑素细胞表现出某些基因的上调,所述基因包括但不限于以下中的一者或者者:酪氨酸酶(眼皮肤白化症IA)、小眼畸形相关转录因子、 α -2-巨球蛋白、酪氨酸酶相关蛋白1、溶质载体家族16、GS3955蛋白、v-kit Hardy-Zuckerman 4猫科肉瘤、眼白化症1、Rag D蛋白、糖原蛋白2、C族G蛋白偶联受体、眼皮肤白化症II、食道癌缺失1、黑色素A、SRY-box 10、V类10C型ATP酶、基质金属蛋白酶1、潜在转化生长因子 β b、ATP结合盒亚家族C、羟基前列腺素脱氢酶15、跨膜7超家族成员1、谷氨酰胺酰肽环转移酶,以及由Lee和同事确定的其他基因。(Lee等人,2013)。

[0120] 与许多其他细胞类型一样,黑素细胞经历程序性细胞死亡或细胞凋亡。黑素细胞凋亡途径是本领域技术人员已知的(Wang等人,2014),并且细胞凋亡途径已总体上由Elmore进行了综述(Elmore,2007)。本发明的化合物或组合物通过例如引起对某些促凋亡信号转导途径的激活或引起对黑素细胞中某些抗凋亡途径的阻遏来“诱导”黑素细胞凋亡。设想本发明的化合物或组合物可通过直接与途径的信号传导分子相互作用或通过与一种或多种通常不在途径内起作用的中间分子的直接相互作用而间接地与途径的分子相互作用来直接激活/阻遏细胞凋亡相关途径。

[0121] 在该实施方案的一个方面,由马拉色菌属酵母产生的化合物具有式(I)的结构:

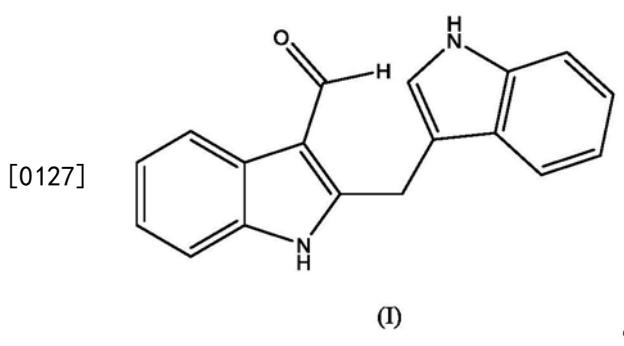


[0123] 在该实施方案的另一个方面,所述化合物是马拉色因的化学类似物。

[0124] 本发明的再一实施方案是用于调节黑素细胞活性的化合物。所述化合物是由马拉色菌属酵母产生的化合物的化学类似物,或其结晶形式、水合物或化妆品上或药学上可接受的盐。

[0125] 黑素细胞活性可以本发明所涵盖的多种方式调节,所述方式包括但不限于诱导黑素细胞凋亡或改变黑素细胞基因表达、细胞运动性、细胞生长、黑素产生、黑素体生物发生或黑素体转移。

[0126] 在该实施方案的一个方面,由马拉色菌属酵母产生的化合物具有式(I)的结构:



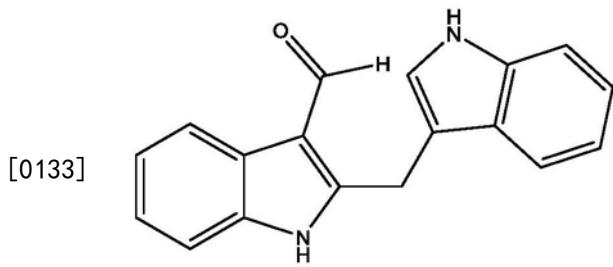
[0128] 在该实施方案的另一个方面,所述化合物是马拉色因的化学类似物。

[0129] 本发明的另外的实施方案是用于激动芳基烃受体(AhR)的化合物。所述化合物是由马拉色菌属酵母产生的化合物的化学类似物,或其结晶形式、水合物或化妆品上或药学上可接受的盐。

[0130] 如本文所用,术语“激动剂”、“激动”及其语法变化形式是指触发(例如,启动或促进)、部分或完全增强、刺激或激活一种或多种生物活性的分子。本发明的激动剂包括天然存在的物质以及合成物质。

[0131] 本发明的芳基烃受体(AhR)是天然存在于如本文所述的受试者中的任何芳基烃受体。芳基烃受体是本领域技术人员已知的。(Noakes, 2015)。芳基烃受体的激动剂包括但不限于色氨酸相关化合物,诸如犬尿氨酸、犬尿喹啉酸、朱砂精酸和6-甲酰基吲哚并[3,2-b]咔唑(FICZ)。马拉色因也称为芳基烃受体激动剂。(Wille等人,2001)。

[0132] 在该实施方案的一个方面,由马拉色菌属酵母产生的化合物具有式(I)的结构:



(I)

。

[0134] 在该实施方案的另一个方面,所述化合物是马拉色因的化学类似物。

[0135] 本发明的另一个实施方案是用于改善由色素沉着过度病症引起的色素沉着过度的化合物。所述化合物是由马拉色菌属酵母产生的化合物的化学类似物,或其结晶形式、水合物或化妆品上或药学上可接受的盐。

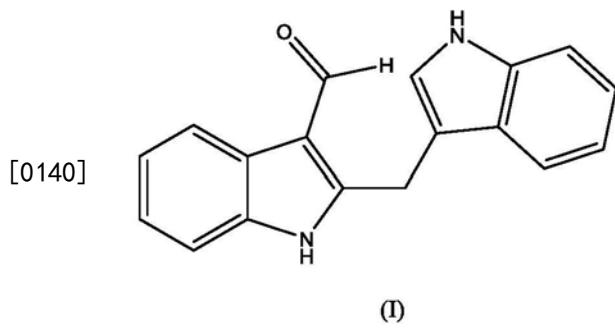
[0136] 如本文所用,本发明的化合物、组合物和方法可用于改善由色素沉着过度病症引起的色素沉着过度,例如,通过降低受色素沉着过度病症影响的区域中的色素沉着过度水平、减缓进一步的色素沉着过度或预防进一步出现色素沉着过度。然而,因为每个受试者可能不响应特定的给药方案、安排方案或过程,所以改善由色素沉着过度病症引起的色素沉着过度不需要在每个受试者或受试者群体中实现所需的生理响应或结果。因此,给定受试者或受试者群体可能无法对给药作出响应或不充分地响应给药,但是其他受试者或受试者群体可能响应并因此经历其过度色素沉着病症的改善。

[0137] 如本文所用,术语“色素沉着过度”是实际或感知的过度深色的皮肤病。皮肤损伤可以是实际的,例如,归因于年龄、过度日照或导致深色皮肤区域的疾病或疾患。深色皮肤区域可以是呈斑点、疹斑或相对较大的深色区域的形式。皮肤损伤还可以是感知的,例如,个体感觉他/她的皮肤色调太深。个体可能具有淡化皮肤色调的美容愿望。

[0138] 色素沉着过度病症是其中色素沉着过度是主要症状的病症,以及作为次要症状发生色素沉着过度的病症。本发明的色素沉着过度病症包括但不限于先天性色素沉着过度病症和获得性色素沉着过度病症。本发明的先天性色素沉着过度病症包括但不限于涉及以下的那些:表皮色素沉着过度(痣细胞性痣、斯皮茨痣和斑痣)、皮肤色素沉着过度(蓝色痣、太田痣(nevus Ohta)、真皮黑变病、伊藤痣(nevus Ito)和胎斑)、雀斑、网状肢端色素沉着症

(acropigmentation reticularis)、Spitzenpigment/肢端色素沉着症和黑子病(lentiginosis) (泛发性黑子病、LEOPARD综合征、遗传性图案状黑子病(inherit pattern lentiginosis)、Carney复合症、Peutz-Jeghers综合征、Laugier-Hunziker-Baran综合征和Cronkhite-Canada综合征)。(Yamaguchi等人,2014)。本发明的获得性色素沉着过度病症包括但不限于老年棕斑/斑点、黑斑/黄褐斑、瑞尔氏黑变病(Riehl's melanosis)、唇部黑素斑、阴茎/外阴阴道黑变病、Kitamura面部毛囊性红斑黑变病(erythromelanosis follicularis faciei)、紫外线引起的色素沉着(tanning and pigmentation petaloides actinica)、炎症后色素沉着(摩擦黑变病和灰色皮病)、化学/药物引起的色素沉着(多氯联苯、砷、5-FU、博来霉素、环磷酰胺、甲氨蝶呤、氯丙嗪、苯妥英、四环素和氯喹)、色素性分界线和异物沉积(诸如胡萝卜素、银、金、汞、铋和纹身)。与全身性病症相关的色素沉着过度包括代谢/酶障碍(血色素沉着症、威尔森氏病(Wilson's disease)、高雪氏病(Gaucher's disease)、尼曼匹克氏病(Niemann-Pick's disease)、淀粉样变性、褐黄病、黑棘皮病和迟发性皮肤卟啉症)、内分泌障碍(艾迪生氏病(Addison's disease)、库欣综合征和甲状腺功能亢进症),营养障碍(糙皮病、维生素B12缺乏症、叶酸缺乏症、寄生虫性黑皮病(vagabond's disease)和色素性痒疹)、肥大细胞增多症、胶原病、肝功能不良和肾功能不良。色素沉着过度也可能与传染病(麻疹、梅毒和糠秕马拉色菌)和综合征(雷克林霍曾氏病(von Recklinghausen's disease)、Sotos综合征、POEMS综合征、Naegeli综合征、Cantu综合征、McCune-Albright综合征、沃森(Watson)综合征和布卢姆(Bloom)综合征)有关。(Yamaguchi等人,2014)。

[0139] 在该实施方案的一个方面,由马拉色菌属酵母产生的化合物具有式(I)的结构:



[0141] 在该实施方案的另一个方面,所述化合物是马拉色因的化学类似物。

[0142] 本发明的再一实施方案是用于调节黑素产生的化合物。所述化合物是由马拉色菌属酵母产生的化合物的化学类似物,或其结晶形式、水合物或化妆品上或药学上可接受的盐。

[0143] 黑素是一种给予皮肤和毛发颜色的天然产生的色素。皮肤的示意图如图1A所示。黑素由黑素细胞在称为黑素体的细胞器中产生。本发明的化合物或组合物通过例如调节黑素体生物发生和直接或间接抑制酶促水平下的黑素合成来调节受试者中的黑素产生。

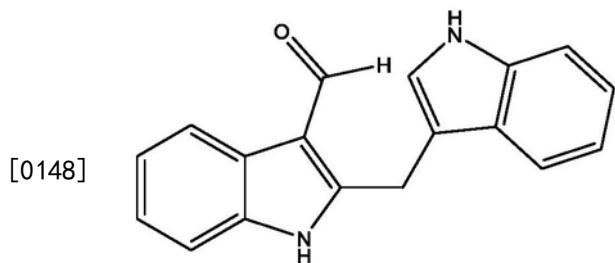
[0144] 黑素体生物发生通过四个阶段发生:阶段I的特征在于前黑素体,其基本上是非色素沉着的空泡。在阶段II中,前黑素体发展出条纹,在第III阶段中在所述条纹上沉积黑素。阶段IV产生黑素含量丰富的成熟黑素体。本发明的化合物和组合物通过抑制或减弱通常促进这些阶段中的任一个或全部的生物过程来调节黑素体生物发生。(Wasmeier等人,2008)。

[0145] 黑素合成主要涉及三种酶:酪氨酸酶、酪氨酸酶相关蛋白-1和多巴色素互变异构

酶。影响这些酶的细胞内运输的另外因子包括但不限于BLOC-1、OA1和SLC45A2。本发明的化合物和组合物可通过例如抑制或减弱这些酶或因子中的任一种的活性来调节黑素产生。(Yamaguchi等人,2014)。

[0146] 一旦已形成黑素体并合成黑素,就需要将黑素体从表皮黑素细胞转移到皮肤和毛发角质形成细胞。黑素体起源于黑素细胞的细胞核附近,并沿着微管和肌动蛋白丝转运到黑素细胞的周边。本发明的化合物和组合物通过干扰使得黑素体从核周区域转运至黑素细胞周边并进入相邻角质形成细胞中的任何生物学过程来调节黑素体转移。黑素合成、黑素转运和黑素细胞凋亡的示意图示出在图1B中。

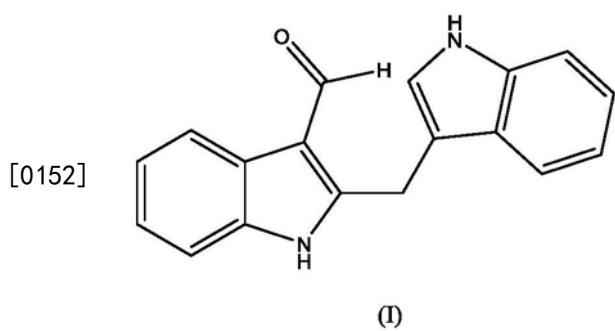
[0147] 在该实施方案的一个方面,由马拉色菌属酵母产生的化合物具有式(I)的结构:



[0149] 在该实施方案的另一个方面,所述化合物是马拉色因的化学类似物。

[0150] 本发明的另外的实施方案是用于调节黑素体生物发生的化合物。所述化合物是由马拉色菌属酵母产生的化合物的化学类似物,或其结晶形式、水合物或化妆品上或药学上可接受的盐。

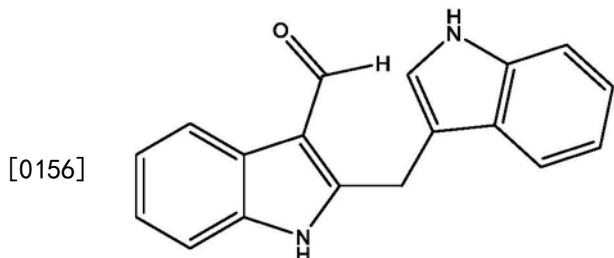
[0151] 在该实施方案的一个方面,由马拉色菌属酵母产生的化合物具有式(I)的结构:



[0153] 在该实施方案的另一个方面,所述化合物是马拉色因的化学类似物。

[0154] 本发明的另一个实施方案是用于调节黑素体转移的化合物。所述化合物是由马拉色菌属酵母产生的化合物的化学类似物,或其结晶形式、水合物或化妆品上或药学上可接受的盐。

[0155] 在该实施方案的一个方面,由马拉色菌属酵母产生的化合物具有式(I)的结构:



(I)

。

[0157] 在该实施方案的另一个方面,所述化合物是马拉色因的化学类似物。

[0158] 本发明的再一实施方案是组合物。所述组合物包含马拉色菌属酵母和化妆品上或药学上可接受的媒介物、稀释剂或载体。

[0159] 本发明的另外的实施方案是组合物。所述组合物包含分离自或可分离自马拉色菌属酵母的化合物和化妆品上或药学上可接受的媒介物、稀释剂或载体。

[0160] 本发明的分离自马拉色菌属酵母的化合物在分离之前必然存在于马拉色菌属酵母或由马拉色菌属酵母产生。因此,分离自马拉色菌属酵母的化合物源自实际的酵母细胞。用于从细胞材料中提取化合物的标准方案是本领域技术人员已知的。

[0161] 可分离自马拉色菌属酵母的化合物不需要源自实际的酵母细胞。而是,合成反应可用于生成在酵母中产生的化合物而不涉及实际的酵母细胞。有机合成反应是本领域技术人员熟知的并且可以用于这方面。

[0162] 本发明的另一个实施方案是组合物。所述组合物包含本文所公开的任一种化合物(包括类似物),和化妆品上或药学上可接受的媒介物、稀释剂或载体。

[0163] 本发明的再一实施方案是增白受试者的皮肤的方法。所述方法包括使受试者与本文所公开的任何化合物或组合物接触。

[0164] 如本文所用,术语“接触”及其语法变化形式是指使两种或更多种材料足够接近以使它们可以相互作用。因此,仅出于说明目的,本发明化合物可通过例如与黑素细胞表面上的受体相互作用而与黑素细胞接触。类似地,本发明的组合物可以通过例如直接施加至受试者的皮肤而接触人受试者。

[0165] 如本文所用,“受试者”意指哺乳动物细胞、组织、生物体或其群体。本发明的受试者优选是人,包括人细胞、组织和生物,但其他方面包括灵长类动物、农场动物、家畜、实验动物等。农业动物的一些实例包括牛、猪、马、山羊等。家畜的一些实例包括狗、猫等。实验室动物的一些实例包括灵长类动物、大鼠、小鼠、兔子、豚鼠等。

[0166] 本发明的另外的实施方案是用于诱导受试者中的黑素细胞凋亡的方法。所述方法包括使受试者与本文所公开的任何化合物或组合物接触。

[0167] 本发明的另一个实施方案是用于调节受试者中的黑素细胞活性的方法。所述方法包括使受试者与本文所公开的任何化合物或组合物接触。

[0168] 本发明的再一实施方案是用于激动芳基烃受体(AhR)的方法。所述方法包括使受试者与本文所公开的任何化合物或组合物接触。

[0169] 本发明的另外实施方案是用于在有需要的受试者中改善由色素沉着过度病症引起的色素沉着过度的方法。所述方法包括使受试者与本文所公开的任何化合物或组合物接触。

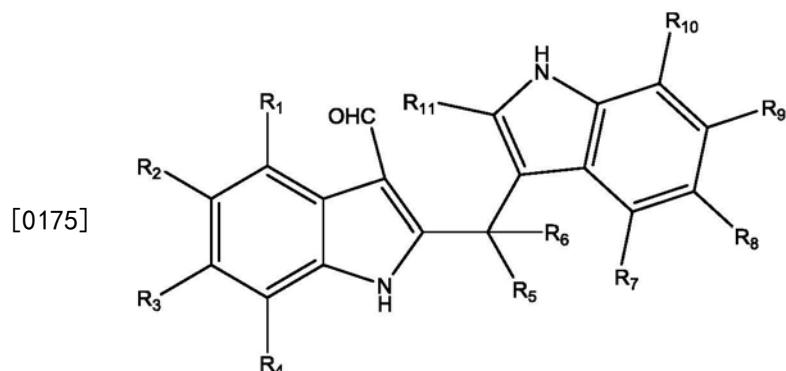
[0170] 如本文所用,“需要”改善由色素沉着过度病症引起的色素沉着过度的受试者包括具有真实需要或感知需要改善的受试者。

[0171] 本发明的另一个实施方案是用于调节受试者中的黑素产生的方法。所述方法包括使受试者与本文所公开的任何化合物或组合物接触。

[0172] 本发明的再一实施方案是用于调节受试者中的黑素体生物发生的方法。所述方法包括使受试者与本文所公开的任何化合物或组合物接触。

[0173] 本发明的另外的实施方案是用于调节受试者中的黑素体转移的方法。所述方法包括使受试者与本文所公开的任何化合物或组合物接触。

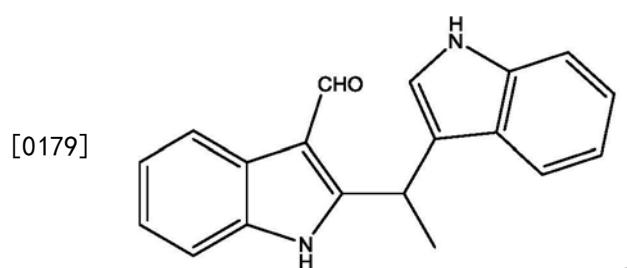
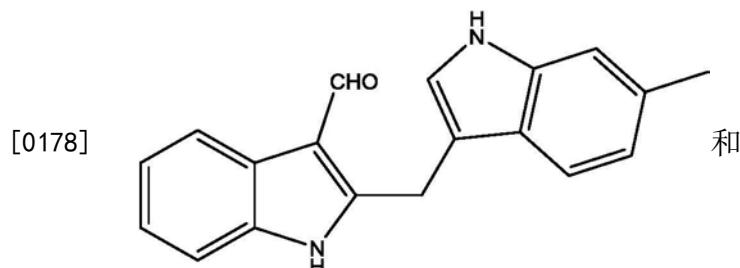
[0174] 本发明的另一个实施方案是化合物。所述化合物具有式 (II) 的结构:



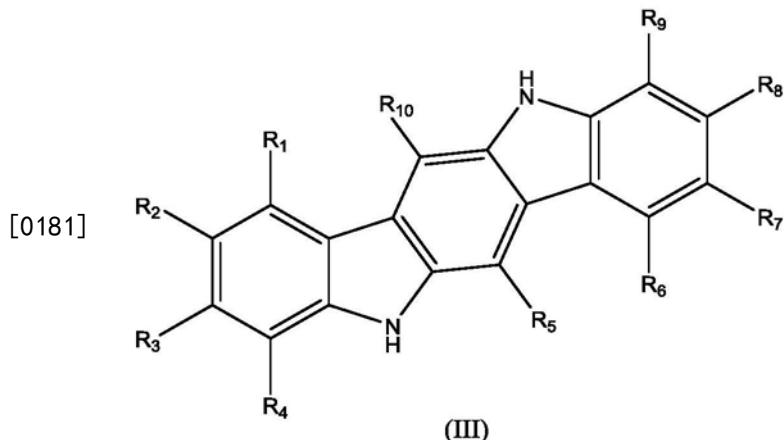
(II)

[0176] 其中:R1、R2、R3、R4、R5、R6、R7、R8、R9、R10和R11独立地选自由氢和甲基组成的组,并且R1、R2、R3、R4、R5、R6、R7、R8、R9、R10和R11中的至少一个是甲基;或其结晶形式、水合物或化妆品上或药学上可接受的盐。

[0177] 在该实施方案的一个方面,所述化合物选自由以下组成的组:

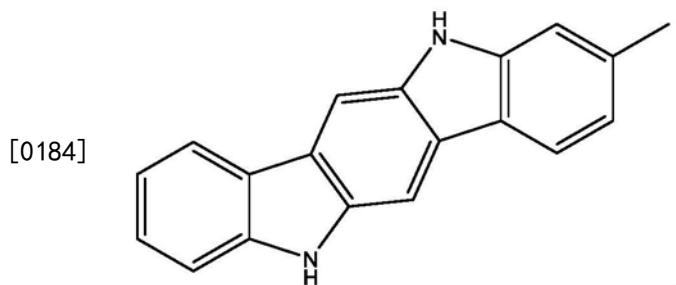


[0180] 本发明的再一实施方案是化合物。所述化合物具有式 (III) 的结构:

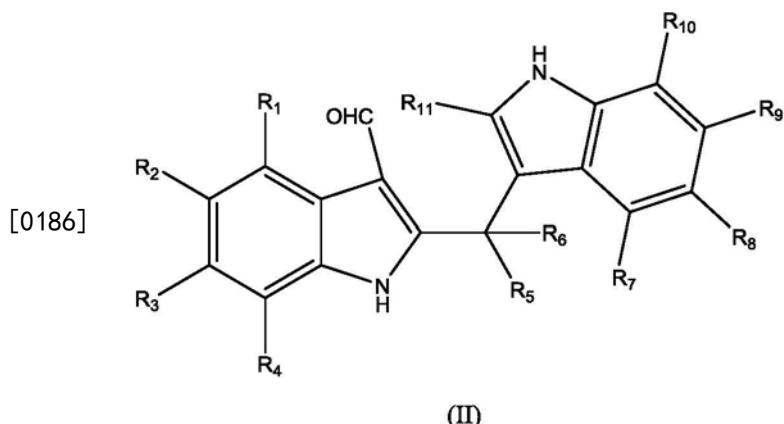


[0182] 其中:R1、R2、R3、R4、R5、R6、R7、R8、R9和R10独立地选自由氢和甲基组成的组,并且R1、R2、R3、R4、R5、R6、R7、R8、R9和R10中的至少一个是甲基;或其结晶形式、水合物或化妆品上或药学上可接受的盐。

[0183] 在该实施方案的一个方面,所述化合物是:

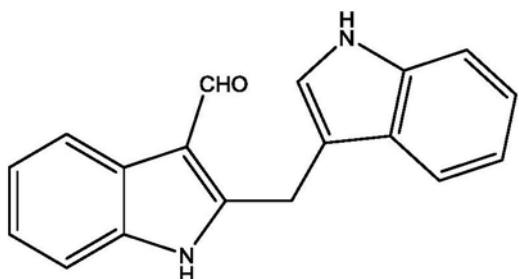


[0185] 本发明的另外的实施方案是用于增白皮肤的化合物。所述化合物具有式 (II) 的结构:



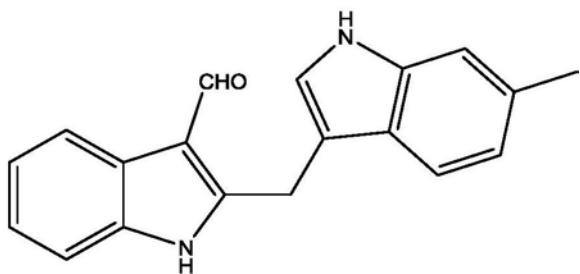
[0187] 其中:R1、R2、R3、R4、R5、R6、R7、R8、R9、R10和R11独立地选自由氢和甲基组成的组;或其结晶形式、水合物或化妆品上或药学上可接受的盐。

[0188] 在该实施方案的一个方面,所述化合物选自由以下组成的组:

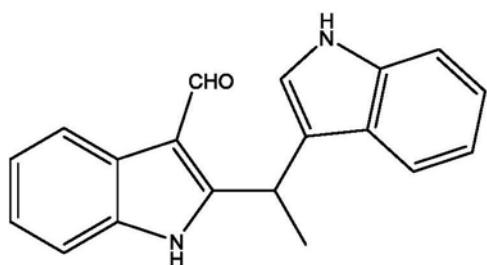


[0189]

和

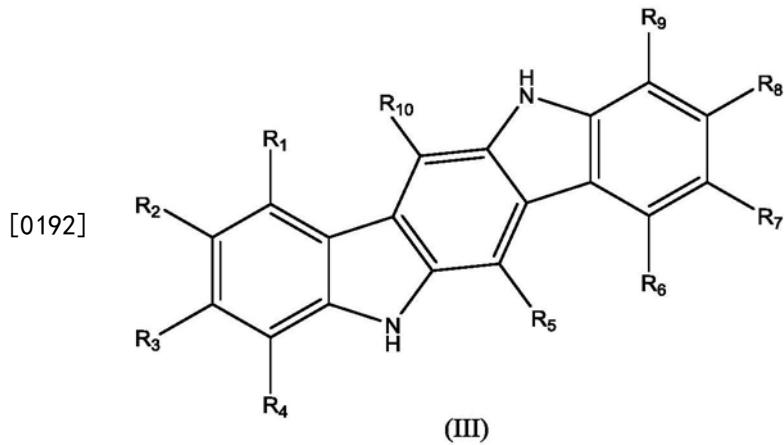


[0190]



。

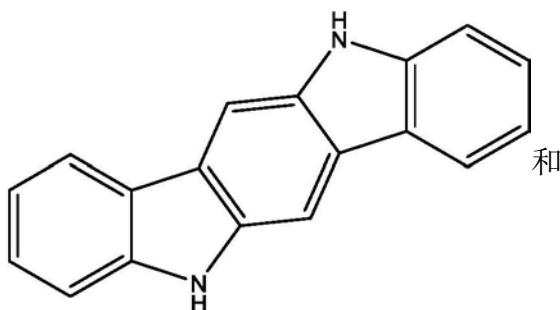
[0191] 本发明的另一个实施方案是用于增白皮肤的化合物。所述化合物具有式 (III) 的结构：



[0193] 其中：R1、R2、R3、R4、R5、R6、R7、R8、R9和R10独立地选自由氢和甲基组成的组；或其结晶形式、水合物或化妆品上或药学上可接受的盐。

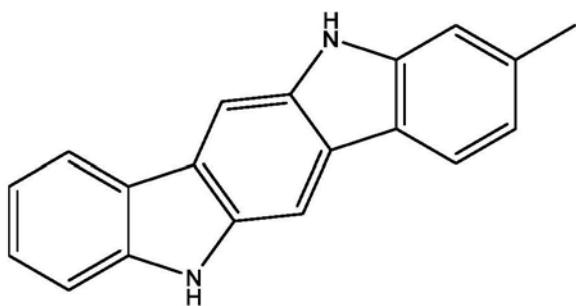
[0194] 在该实施方案的一个方面，所述化合物选自由以下组成的组：

[0195]



和

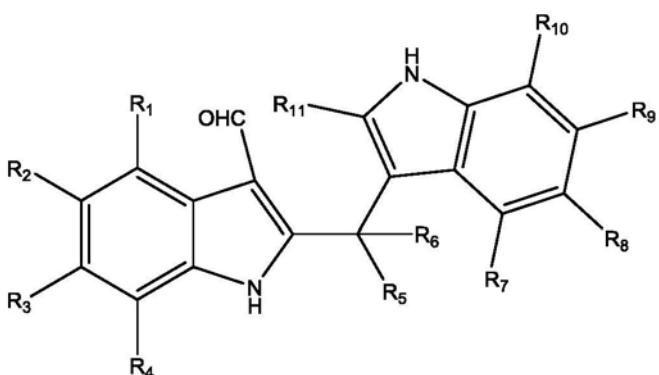
[0196]



。

[0197] 本发明的再一实施方案是用于诱导黑素细胞凋亡的化合物。所述化合物具有式(II)的结构：

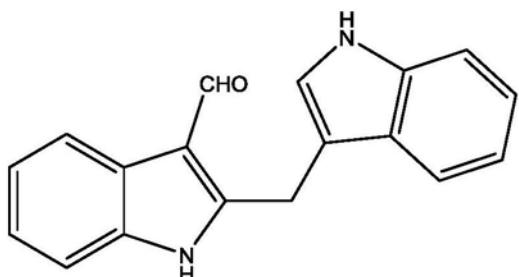
[0198]



(II)

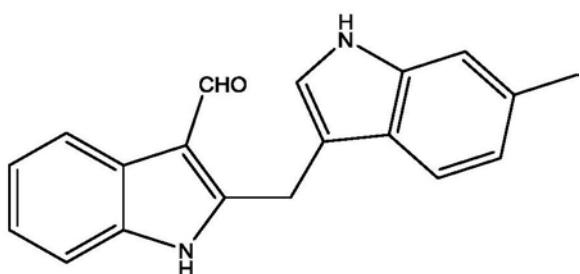
[0199] 其中：R1、R2、R3、R4、R5、R6、R7、R8、R9、R10和R11独立地选自由氢和甲基组成的组；或其结晶形式、水合物或化妆品上或药学上可接受的盐。

[0200] 在该实施方案的一个方面，所述化合物选自由以下组成的组：

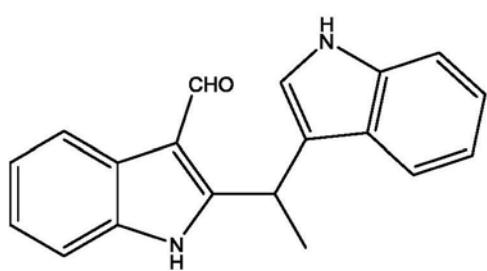


[0201]

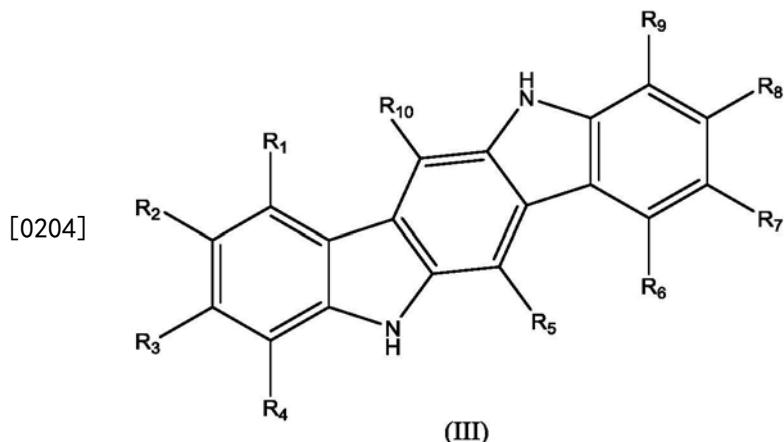
和



[0202]



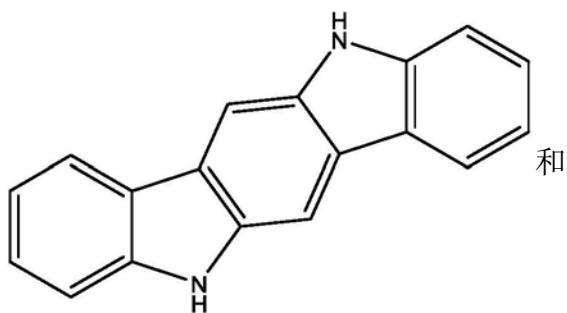
[0203] 本发明的另外的实施方案是用于诱导黑素细胞凋亡的化合物。所述化合物具有式(III)的结构：



[0205] 其中:R1、R2、R3、R4、R5、R6、R7、R8、R9和R10独立地选自由氢和甲基组成的组;或其结晶形式、水合物或化妆品上或药学上可接受的盐。

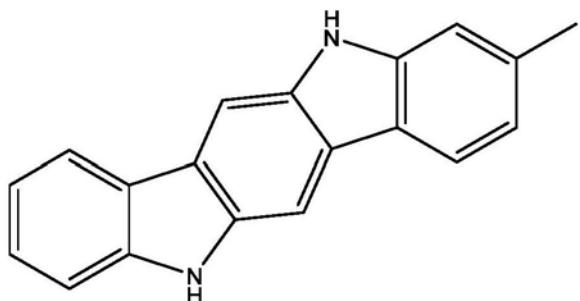
[0206] 在该实施方案的一个方面，所述化合物选自由以下组成的组：

[0207]



和

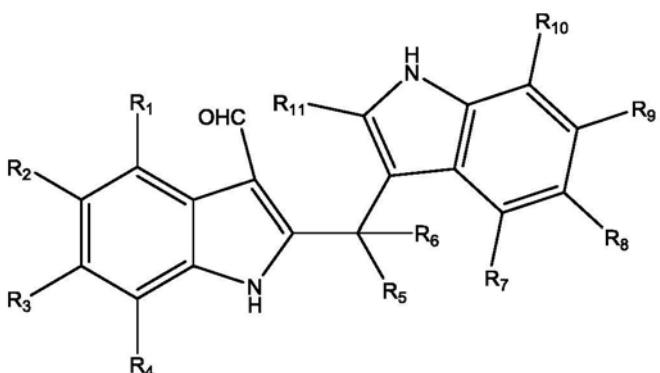
[0208]



。

[0209] 本发明的另一个实施方案是用于激动芳基烃受体 (AhR) 的化合物。所述化合物具有式 (II) 的结构：

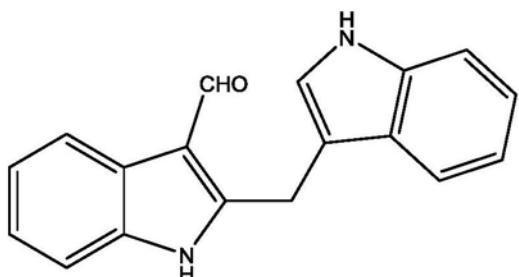
[0210]



(II)

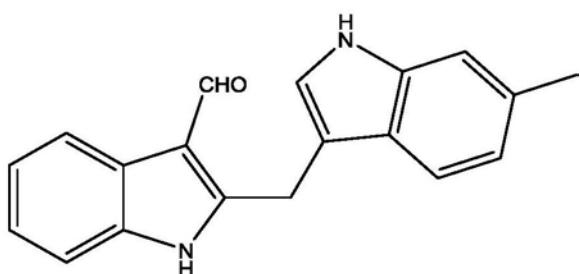
[0211] 其中：R1、R2、R3、R4、R5、R6、R7、R8、R9、R10和R11独立地选自由氢和甲基组成的组；或其结晶形式、水合物或化妆品上或药学上可接受的盐。

[0212] 在该实施方案的一个方面，所述化合物选自由以下组成的组：

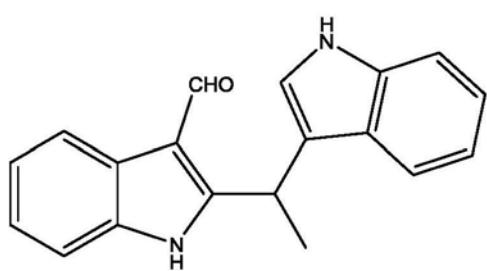


[0213]

和

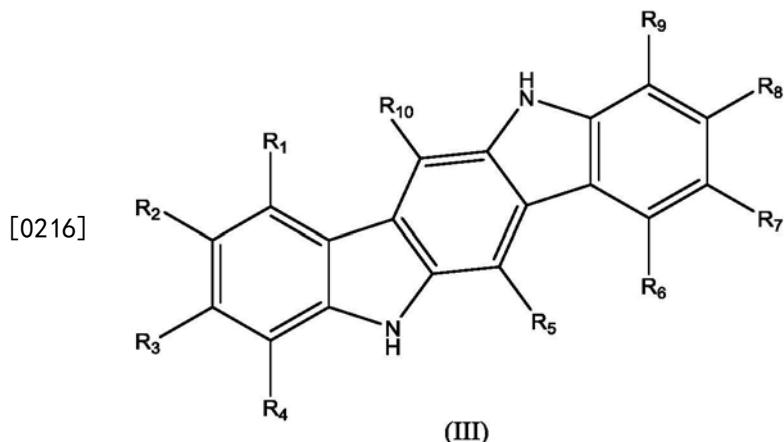


[0214]



8

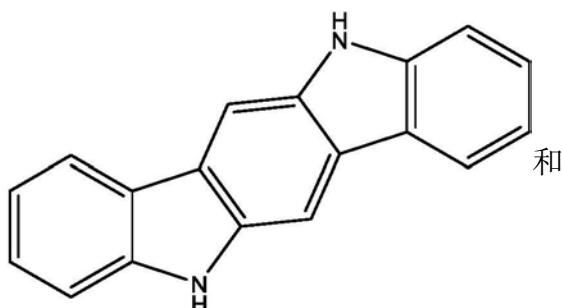
[0215] 本发明的再一实施方案是用于激动芳基烃受体(AhR)的化合物。所述化合物具有式(III)的结构：



[0217] 其中:R1、R2、R3、R4、R5、R6、R7、R8、R9和R10独立地选自由氢和甲基组成的组;或其结晶形式、水合物或化妆品上或药学上可接受的盐。

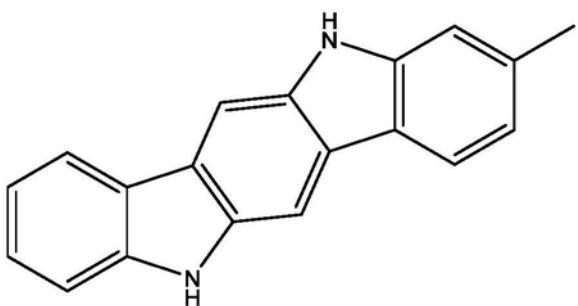
[0218] 在该实施方案的一个方面，所述化合物选自由以下组成的组：

[0219]



和

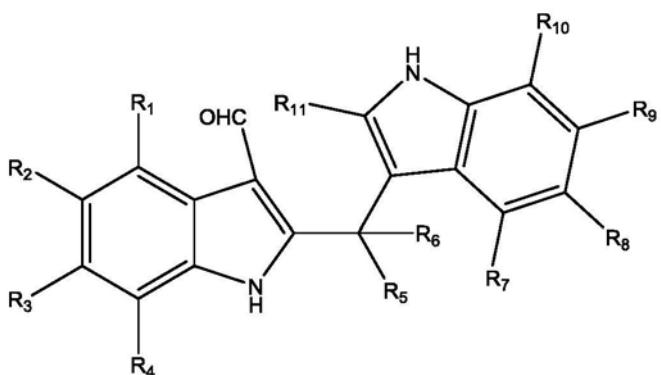
[0220]



。

[0221] 本发明的另外的实施方案是组合物。所述组合物包含具有式 (II) 结构的化合物

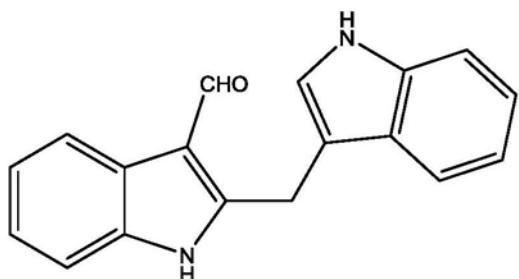
[0222]



(II)

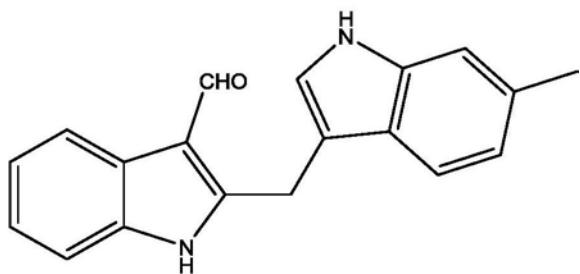
[0223] 其中:R1、R2、R3、R4、R5、R6、R7、R8、R9、R10和R11独立地选自由氢和甲基组成的组;或其结晶形式、水合物或化妆品上或药学上可接受的盐,以及化妆品上或药学上可接受的媒介物、稀释剂或载体。

[0224] 在该实施方案的一个方面,所述化合物选自由以下组成的组:

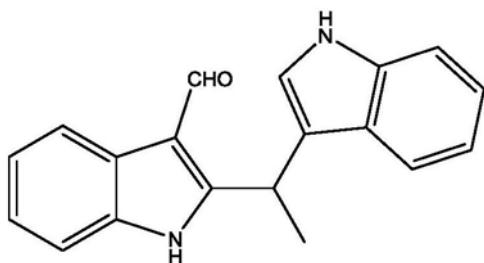


[0225]

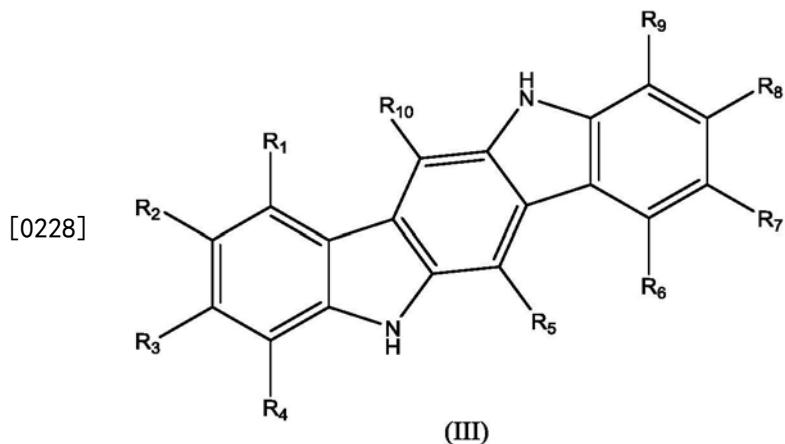
和



[0226]



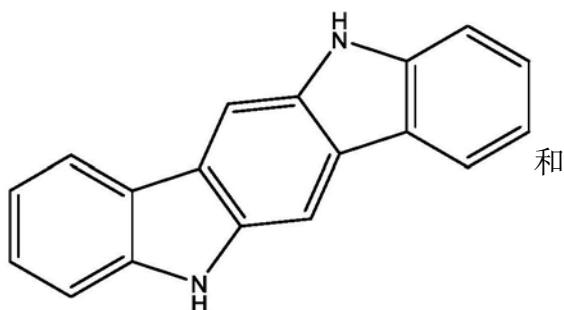
[0227] 本发明的另一个实施方案是组食物。所述组合物包含具有式 (III) 结构的化食物：



[0229] 其中:R1、R2、R3、R4、R5、R6、R7、R8、R9和R10独立地选自由氢和甲基组成的组;或其结晶形式、水合物或化妆品上或药学上可接受的盐,以及化妆品上或药学上可接受的媒介物、稀释剂或载体。

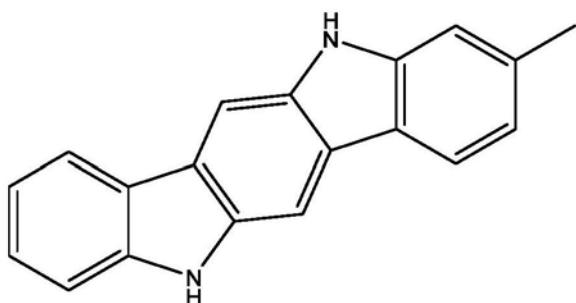
[0230] 在该实施方案的一个方面,所述化合物选自由以下组成的组:

[0231]



和

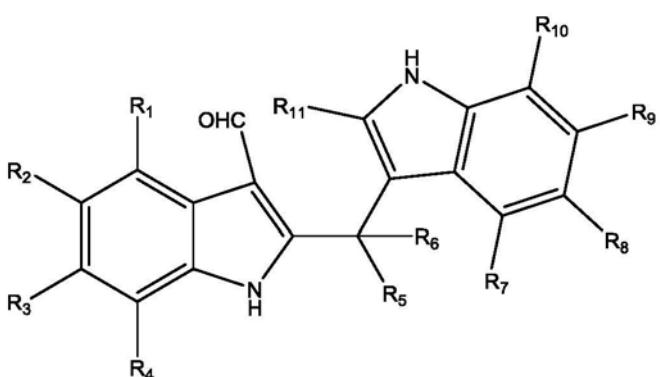
[0232]



。

[0233] 本发明的再一实施方案是用于增白受试者的皮肤的方法。所述方法包括：使受试者与具有式 (II) 结构的化合物接触：

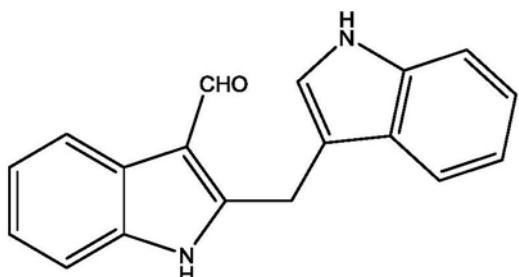
[0234]



(II)

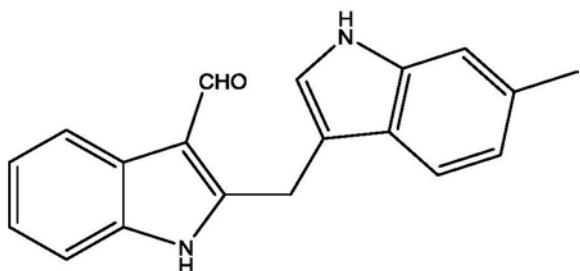
[0235] 其中：R1、R2、R3、R4、R5、R6、R7、R8、R9、R10和R11独立地选自由氢和甲基组成的组；或其结晶形式、水合物或化妆品上或药学上可接受的盐。

[0236] 在该实施方案的一个方面，所述化合物选自由以下组成的组：

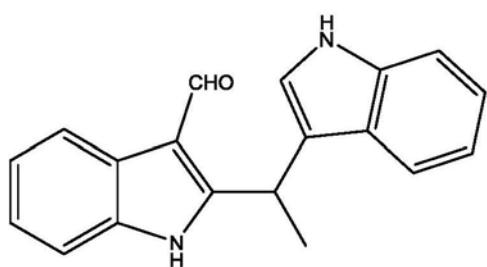


[0237]

和

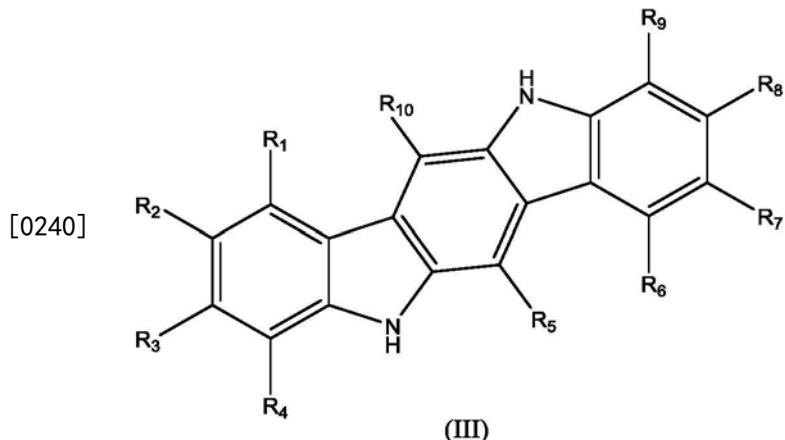


[0238]



。

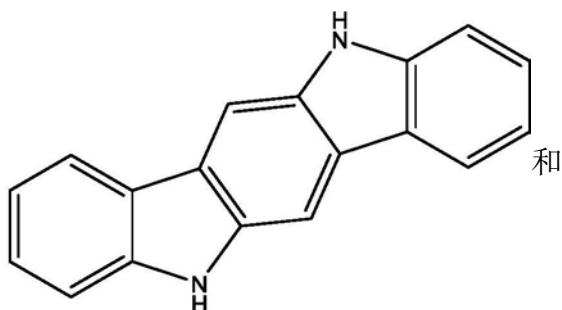
[0239] 本发明的另外的实施方案是用于增白受试者的皮肤的方法。所述方法包括：使受试者与具有式(III)结构的化合物接触：



[0241] 其中：R1、R2、R3、R4、R5、R6、R7、R8、R9和R10独立地选自由氢和甲基组成的组；或其结晶形式、水合物或化妆品上或药学上可接受的盐。

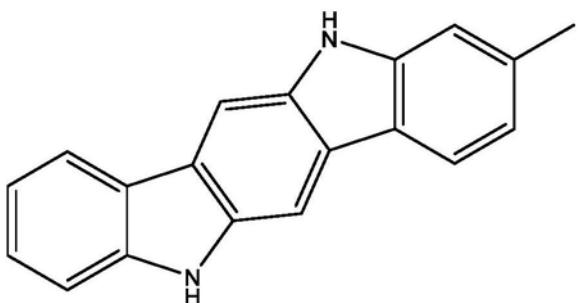
[0242] 在该实施方案的一个方面，所述化合物选自由以下组成的组：

[0243]



和

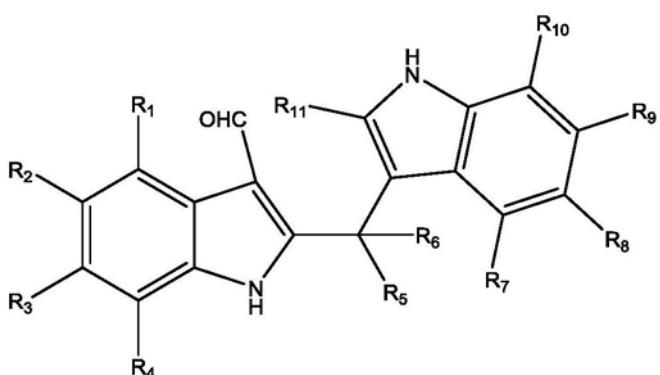
[0244]



。

[0245] 本发明的另一个实施方案是用于诱导受试者中的黑素细胞凋亡的方法。所述方法包括：使受试者与具有式 (II) 结构的化合物接触：

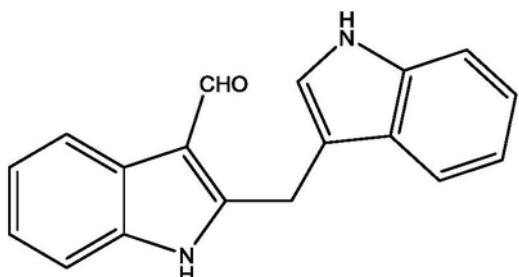
[0246]



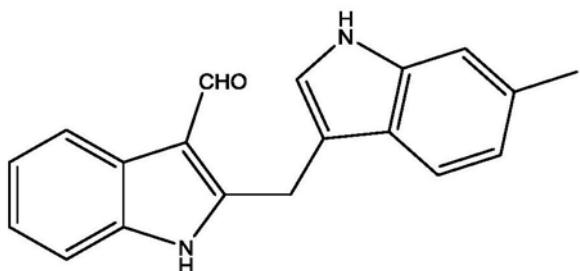
(II)

[0247] 其中：R1、R2、R3、R4、R5、R6、R7、R8、R9、R10和R11独立地选自由氢和甲基组成的组；或其结晶形式、水合物或化妆品上或药学上可接受的盐。

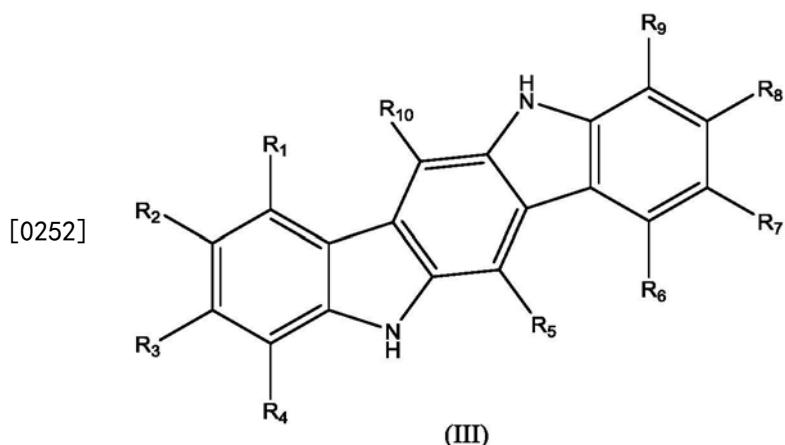
[0248] 在该实施方案的一个方面，所述化合物选自由以下组成的组：



[0249] 和



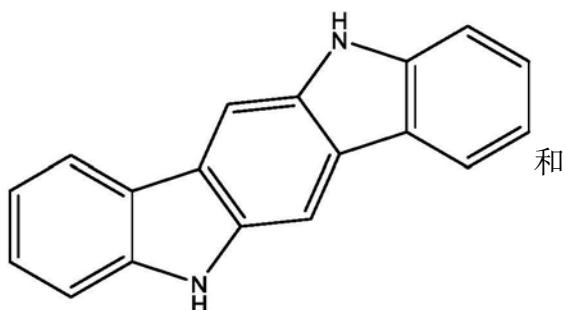
[0251] 本发明的再一实施方案是用于诱导受试者中的黑素细胞凋亡的方法。所述方法包括：使受试者与具有式(III)结构的化合物接触；



[0253] 其中:R1、R2、R3、R4、R5、R6、R7、R8、R9和R10独立地选自由氢和甲基组成的组;或其结晶形式、水合物或化妆品上或药学上可接受的盐。

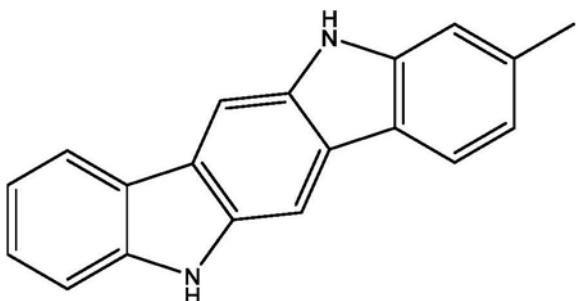
[0254] 在该实施方案的一个方面，所述化合物选自由以下组成的组：

[0255]



和

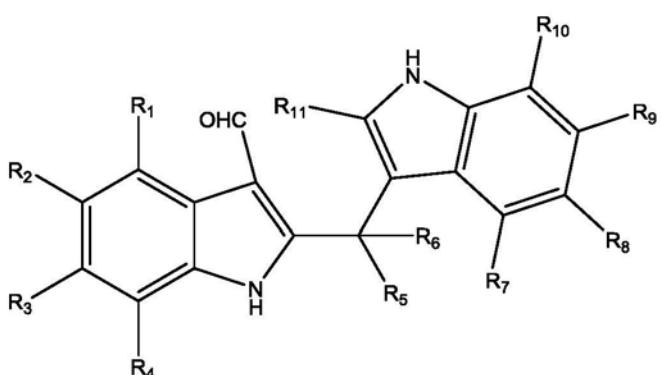
[0256]



。

[0257] 本发明的另外的实施方案是用于激动受试者中的芳基烃受体 (AhR) 的方法。所述方法包括:使受试者与具有式 (II) 结构的化合物接触:

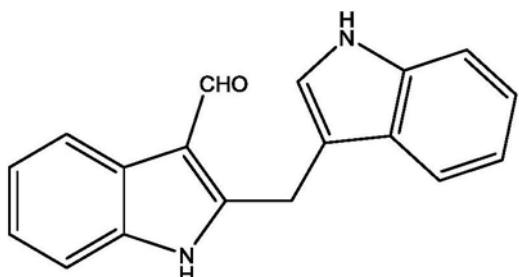
[0258]



(II)

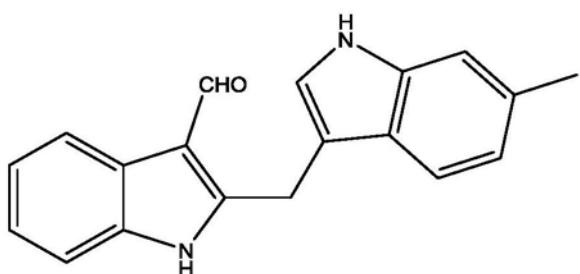
[0259] 其中:R1、R2、R3、R4、R5、R6、R7、R8、R9、R10和R11独立地选自由氢和甲基组成的组;或其结晶形式、水合物或化妆品上或药学上可接受的盐。

[0260] 在该实施方案的一个方面,所述化合物选自由以下组成的组:

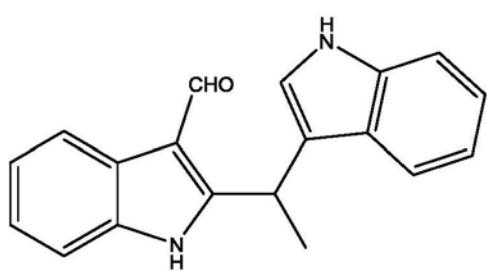


[0261]

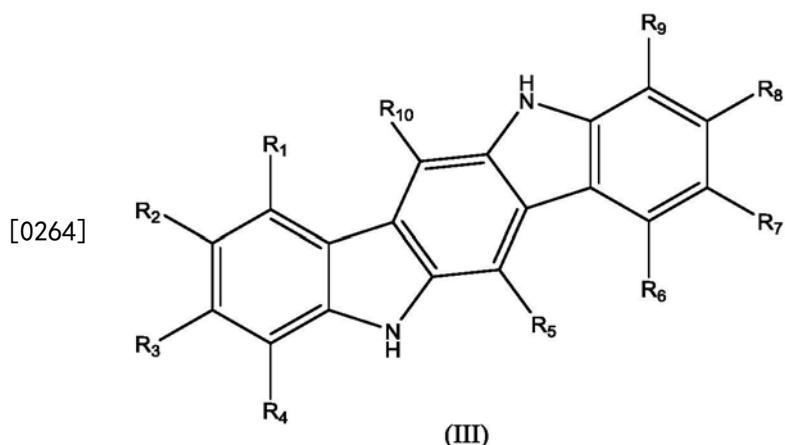
和



[0262]



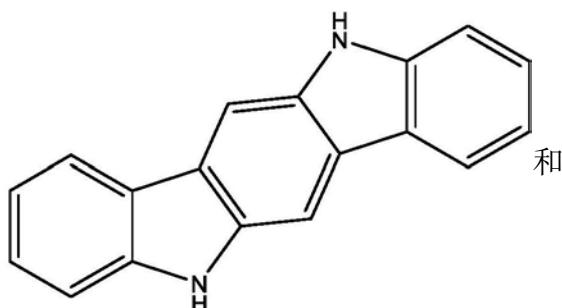
[0263] 本发明的另一个实施方案是用于激动受试者中的芳基烃受体(AhR)的方法。所述方法包括：使受试者与具有式(III)结构的化合物接触：



[0265] 其中:R1、R2、R3、R4、R5、R6、R7、R8、R9和R10独立地选自由氢和甲基组成的组;或其结晶形式、水合物或化妆品上或药学上可接受的盐。

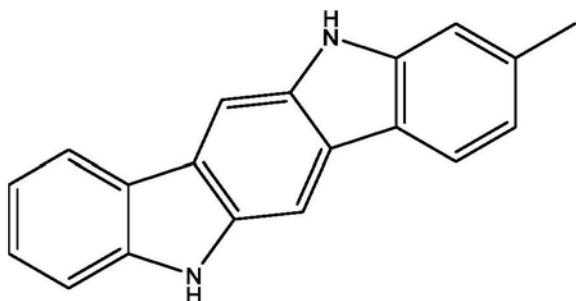
[0266] 在该实施方案的一个方面,所述化合物选自由以下组成的组:

[0267]



和

[0268]



。

[0269] 如本文所用,术语“组合物”意指包含本发明化合物的实体,以及直接或间接由本发明化合物与其他成分的组合产生的任何实体。本发明的组合物可用作例如体外或体内研究试剂。本发明的组合物还可以直接施加至人或非人受试者的皮肤以获得美容效果。

[0270] 本发明的组合物可以任何所需和有效的方式施用:用于口服摄入或以任何适当的方式进行肠胃外或其他施用,所述方式诸如腹膜内、皮下、局部、皮内、吸入、肺内、直肠、阴道、舌下、肌肉内、静脉内、动脉内、鞘内或淋巴管内。此外,本发明的组合物可以与其他组合物联合施用。如果需要,可以将本发明的组合物包封或以其他方式保护免受胃或其他分泌物的影响。

[0271] 本发明的组合物包含一种或多种活性成分与一种或多种化妆品上或药学上可接受的载体和任选的一种或多种其他化合物、成分和/或材料的混合物。无论选择的施用途径如何,通过本领域技术人员已知的常规方法将本发明的化合物和组合物配制成化妆品上或药学上可接受的剂型。

[0272] 化妆品上或药学上可接受的媒介物、稀释剂和载体是本领域熟知的并且包括适合与人和非人组织接触而没有不当毒性、不相容性、不稳定性、刺激性、过敏反应等的材料。化妆品上或药学上可接受的媒介物、稀释剂和载体包括常规可例如用于化妆品或药物的局部、口服、腹膜或皮下施用的任何基本上无毒的物质,在其中本发明的化合物和组合物将保持稳定并且当施加、摄取(*ingested*)或以其他方式施用至人或非人受试者时生物可利用。适用于局部施加的化妆品上或药学上可接受的载体是本领域技术人员已知的并且包括化妆品上或药学上可接受的液体、霜剂、油、洗剂、膏剂、凝胶或固体,诸如常规化妆品晚霜、粉底霜、晒黑乳液、防晒霜、洗手液、化妆品和化妆品粉底、面膜等。适用于所选剂型和预期施用途径的载体是本领域熟知的,并且可以使用本领域普通技术确定用于所选剂型和施用方法的可接受载体。

[0273] 本发明的组合物可含有化妆品中常规的其他成分,包括香料、雌激素、维生素A、C和E、 α -羟基酸或 α -酮酸(诸如丙酮酸、乳酸或乙醇酸)、羊毛脂、凡士林、芦荟、对羟基苯甲酸甲酯或对羟基苯甲酸丙酯、颜料等。本发明的非限制性化妆品上或药学上可接受的媒介物、

稀释剂和载体包括糖(例如,乳糖、蔗糖、甘露醇和山梨糖醇)、淀粉、纤维素制剂、磷酸钙(例如,磷酸二钙、磷酸三钙和磷酸氢钙)、柠檬酸钠、水、水溶液(例如,生理盐水、氯化钠注射液,林格氏注射液、右旋糖注射液、右旋糖和氯化钠注射液、乳酸林格氏注射液)、醇(例如,乙醇、丙醇和苯甲醇)、多元醇(例如,甘油、丙二醇和聚乙二醇)、有机酯(例如,油酸乙酯和甘油三酯)、可生物降解的聚合物(例如,聚丙交酯-聚乙交酯、聚(原酸酯)和聚(酸酐))、弹性体基质、脂质体、微球、油(例如,玉米、胚芽、橄榄、蓖麻、芝麻、棉籽和花生)、可可脂、蜡(例如,栓剂蜡)、石蜡、硅氧烷、滑石粉、硅酸盐等。

[0274] 任选地,本发明的组合物可含有通常用于化妆品组合物中的另外的成分和/或材料。这些成分和材料是本领域熟知的并且包括,例如,(1)填充剂或增量剂,诸如淀粉、乳糖、蔗糖、葡萄糖、甘露醇和硅酸;(2)粘合剂,诸如羧甲基纤维素、藻酸盐、明胶、聚乙烯吡咯烷酮、羟丙基甲基纤维素、蔗糖和阿拉伯胶;(3)保湿剂,诸如甘油;(4)崩解剂,诸如琼脂、碳酸钙、马铃薯或木薯淀粉、海藻酸、某些硅酸盐、羟基乙酸淀粉钠、交联的羧甲基纤维素钠和碳酸钠;(5)溶液阻滞剂(solution retarding agent),诸如石蜡;(6)吸收促进剂,诸如季铵化合物;(7)润湿剂,诸如鲸蜡醇和单硬脂酸甘油酯;(8)吸收剂,诸如高岭土和膨润土;(9)润滑剂,诸如滑石粉、硬脂酸钙、硬脂酸镁、固体聚乙二醇和十二烷基硫酸钠;(10)悬浮剂,诸如乙氧基化异硬脂醇、聚氧乙烯山梨糖醇和脱水山梨糖醇酯、微晶纤维素、偏氢氧化铝、膨润土、琼脂和黄蓍胶;(11)缓冲剂;(12)赋形剂,诸如乳糖、奶糖、聚乙二醇、动植物脂肪、油、蜡、石蜡、可可脂、淀粉、黄蓍胶、纤维素衍生物、聚乙二醇、硅氧烷、膨润土、硅酸、滑石粉、水杨酸盐、氧化锌、氢氧化铝、硅酸钙和聚酰胺粉末;(13)惰性稀释剂,诸如水或其他溶剂;(14)防腐剂;(15)表面活性剂;(16)分散剂;(17)控制释放剂或吸收延迟剂,诸如羟丙基甲基纤维素、其他聚合物基质、可生物降解聚合物、脂质体、微球、单硬脂酸铝、明胶和蜡;(18)遮光剂;(19)佐剂;(20)润湿剂;(21)乳化剂和悬浮剂;(22)增溶剂和乳化剂,诸如乙醇、异丙醇、碳酸乙酯、乙酸乙酯、苄醇、苯甲酸苄酯、丙二醇、1,3-丁二醇、油(特别是棉籽油、花生油、玉米油、胚芽油、橄榄油、蓖麻油和芝麻油)、甘油、四氢呋喃甲醇、聚乙二醇和脱水山梨糖醇的脂肪酸酯;(23)推进剂,诸如氯氟烃和挥发性的未取代烃,诸如丁烷和丙烷;(24)抗氧化剂;(25)使制剂与预期接受者的血液等渗的剂,诸如糖和氯化钠;(26)增稠剂;(27)包衣材料,诸如卵磷脂;和(28)甜味剂、调味剂、着色剂、芳香剂和防腐剂。每种这样的成分或材料在可与制剂的其他成分相容并且不损伤受试者的意义上必须是“可接受的”。适用于所选剂型和预期施用途径的成分和材料是本领域熟知的,并且可以使用本领域普通技术确定用于所选剂型和施用方法的可接受的成分和材料。

[0275] 适用于口服施用的本发明组合物可以是呈胶囊剂、扁囊剂、丸剂、片剂、粉剂、颗粒剂、水性或非水性液体中的溶液或悬浮液、水包油或油包水液体乳液、酏剂或糖浆、锭剂、大丸剂、药糖剂或糊剂的形式。这些制剂可通过本领域已知的方法制备,例如,通过常规的锅包衣方法、混合方法、制粒方法或冻干方法。

[0276] 可以例如通过以下方式制备用于口服施用的固体剂型(胶囊剂、片剂、丸剂、糖衣丸、粉剂、颗粒剂等):将活性成分与一种或多种化妆品上或药学上可接受的载体和任选的一种或多种填充剂、增量剂、粘合剂、保湿剂、崩解剂、溶液阻滞剂、吸收促进剂、润湿剂、吸收剂、润滑剂混合和/或着色剂。类似类型的固体组合物可以作为填充剂用于使用合适的赋形剂的软填充和硬填充明胶胶囊中。可以任选地与一种或多种辅助成分一起通过压制或模

制来制备片剂。可以使用合适的粘合剂、润滑剂、惰性稀释剂、防腐剂、崩解剂、表面活性剂或分散剂制备压缩片剂。模制片剂可以通过在合适的机器中模制来制备。可任选使片剂和其他固体剂型诸如胶囊剂、丸剂和颗粒剂具有刻痕或用包衣材料和外壳(诸如制化妆品领域熟知的肠溶衣和其他包衣)来制备。它们可以通过例如经由细菌截留过滤器过滤来灭菌。这些组合物还可任选含有遮光剂并且还可为使得仅在或优先在胃肠道的某一部分任选以延迟方式释放所述活性成分的组合物。活性成分也可以是呈微胶囊形式。

[0277] 用于口服施用的液体剂型包括化学品上或药学上可接受的乳液、微乳液、溶液、悬浮液、糖浆剂和酏剂。液体剂型可含有本领域常用的合适的惰性稀释剂。除惰性稀释剂外,口服组合物还可包含佐剂,诸如润湿剂、乳化剂和悬浮剂、甜味剂、调味剂、着色剂、芳香剂和防腐剂。悬浮液可以含有悬浮剂。

[0278] 用于直肠或阴道施用的本发明组合物可作为栓剂呈现,所述栓剂可通过将一种或多种化合物与一种或多种合适的无刺激性载体混合来制备,所述栓剂在室温下为固体,但在体温下为液体并且因此在直肠或阴道腔中将会融化并且释放活性化合物。适合用于阴道施用的本发明的组合物还包括包含本领域已知的适合的此类化妆品上或药学上可接受的载体的阴道栓剂、止血栓、霜剂、凝胶剂、糊剂、泡沫剂或喷雾制剂。

[0279] 用于局部或经皮施用的剂型包括粉剂、喷雾剂、膏剂、糊剂、霜剂、洗剂、凝胶剂、溶液、贴剂、滴剂、乳液、悬浮液、气雾剂和吸入剂。可以将任何期望的常规媒介物、助剂和任选的其他活性成分添加到制剂中。

[0280] 优选的助剂来源于包括以下的组:防腐剂、抗氧化剂、稳定剂、增溶剂、维生素、着色剂、气味改进剂、成膜剂、增稠剂和保湿剂。

[0281] 溶液和乳液可包含常规媒介物,诸如溶剂、增溶剂和乳化剂,例如水、乙醇、异丙醇、碳酸乙酯、乙酸乙酯、苄醇、苯甲酸苄酯、丙二醇,1,3-丁二醇、油(特别是棉籽油、花生油、玉米油、橄榄油、蓖麻油和芝麻油)、脂肪酸甘油酯、聚乙二醇和脱水山梨糖醇的脂肪酸酯或这些物质的混合物。

[0282] 乳液可以各种形式存在。因此,它们可以是,例如,油包水(W/O)型或水包油(O/W)型的乳液或微乳液,或例如水包油包水(W/O/W)型的多重乳液。

[0283] 根据本发明的组合物还可以是呈不含乳化剂的分散制剂的形式。它们可以是例如水类分散体(hydrodispersion)或皮克林乳液。

[0284] 悬浮液可包含常规媒介物,诸如液体稀释剂,例如水、乙醇或丙二醇、悬浮介质,例如乙氧基化异硬脂醇、聚氧乙烯山梨糖醇酯和聚氧乙烯脱水山梨糖醇酯、微晶纤维素、偏氢氧化铝、膨润土、琼脂和黄蓍胶或这些物质的混合物。

[0285] 糊剂、膏剂、凝胶剂和霜剂可包含常规媒介物,例如动植物脂肪、蜡、石蜡、淀粉、黄蓍胶、纤维素衍生物、聚乙二醇、硅氧烷、膨润土、硅酸、滑石粉和氧化锌或这些物质的混合物。

[0286] 面部和身体护理油可包含常规媒介物,诸如合成油,诸如脂肪酸酯、脂肪醇、硅油、天然油,诸如植物油和油性植物提取物、石蜡油、羊毛脂油或这些物质的混合物。

[0287] 喷雾剂可包含常规推进剂,例如氯氟烃、丙烷/丁烷或二甲醚。

[0288] 适用于肠胃外施用的本发明的组合物包含一种或多种化合物与一种或多种化学品上或药学上可接受的无菌等渗水性或非水溶液、分散体、悬浮液或乳液、在临用之前可被

重构成无菌可注射溶液或分散体的无菌粉末的组合,所述组合可含有合适的抗氧化剂、缓冲剂、使所述制剂与预期的接受者的血液等渗的溶质,或悬浮剂或增稠剂。适当流动性可例如通过使用包衣材料、在分散体的情况下通过维持所需粒径和通过使用表面活性剂来维持。这些组合物还可含有合适的佐剂,诸如润湿剂、乳化剂和分散剂。还可能需要包含等渗剂。此外,可通过包含延迟吸收的剂来实现可注射化妆品形式的延迟吸收。

[0289] 在一些情况下,为了延长效果,需要减缓其自皮下注射或肌肉内注射的吸收。这可通过使用具有差水溶性的结晶或无定形材料的液态悬浮液来实现。

[0290] 活性剂/药物的吸收速率则取决于其溶解速率,而溶解速率又可取决于晶体尺寸和晶形。可选地,肠胃外施用的组合物的延迟吸收通过将活性组合物溶解于或混悬于油媒介物中来实现。可通过在可生物降解聚合物中形成活性成分的微胶囊基质来制备可注射的储库形式。根据活性成分与聚合物之比和所采用的特定聚合物的性质,可控制活性成分的释放速率。还通过将药物包埋在与身体组织相容的脂质体或微乳液中来制备储库式可注射制剂。可注射材料可以通过例如经由细菌截留过滤器过滤来灭菌。

[0291] 本发明的组合物可存在于单位剂量或多剂量密封容器中,例如安瓿和小瓶,并且可以储存于冻干条件下,仅需在使用前即刻添加无菌液体载体,例如注射用水。即时注射溶液及悬浮液可从先前所述类型的无菌粉剂、颗粒剂和片剂制备。

[0292] 在本发明中,术语“结晶形式”意指化合物的晶体结构。化合物可以一种或多种结晶形式存在,所述一种或多种结晶形式可以具有不同的结构、物理、药理学或化学特征。利用成核、生长动力学、附聚和破裂的变化可以获得不同的晶形。当克服相变能垒时,发生成核,从而允许颗粒从过饱和溶液形成。晶体生长是由化学化合物沉积在晶体的现有表面上引起的晶体颗粒的增大。成核和生长的相对速率决定了形成的晶体的尺寸分布。成核和生长的热力学驱动力是过饱和度,其定义为与热力学平衡的偏差。附聚是通过两个或多个颗粒(例如,晶体)粘在一起并形成更大的晶体结构来形成较大的颗粒。

[0293] 如本文所用,术语“水合物”意指在分子络合物中含有水的化合物的固体或半固体形式。水通常相对于化合物为化学计量的量。

[0294] 如本文所用,“化妆品上或药学上可接受的盐”是指本文所公开的化合物的衍生物,其中化合物通过形成其酸或碱盐而进行改性。化妆品上或药学上可接受的盐的实例包括但不限于碱性残基(诸如胺)的无机酸或有机酸盐;酸性残基(诸如羧酸)的碱盐或有机盐;等。例如,此类盐包括来自以下的盐:氨、L-精氨酸、甜菜碱、苯乙苄胺(benethamine)、苄星青霉素、氢氧化钙、胆碱、丹醇、二乙醇胺(2,2'-亚氨基双(乙醇))、二乙胺、2-(二乙基氨基)-乙醇、2-氨基乙醇、乙二胺、N-乙基-葡萄糖胺、哈胺(hydrabamine)、1H-咪唑、赖氨酸、氢氧化镁、4-(2-羟乙基)-吗啉、哌嗪、氢氧化钾、1-(2-羟基-乙基)-吡咯烷、氢氧化钠、三乙醇胺(2,2',2"-次氨基三(乙醇))、氨丁三醇、氢氧化锌,乙酸、2,2'-二氯乙酸、己二酸、海藻酸、抗坏血酸、L-天冬氨酸、苯磺酸、苯甲酸、2,5-二羟基苯甲酸、4-乙酰胺基-苯甲酸、(+)-樟脑酸、(+)-樟脑-10-磺酸、碳酸、肉桂酸、柠檬酸、环己酸、癸酸、十二烷基硫酸、乙烷-1,2-二磺酸、乙磺酸、2-羟基-乙磺酸、乙二胺四乙酸、甲酸、富马酸、粘酸(galactaric acid)、龙胆酸,D-葡萄糖酸、D-葡萄糖酸、D-葡萄糖醛酸、谷氨酸、glutantic acid、戊二酸、2-氧代-戊二酸、甘油-磷酸、甘氨酸、乙醇酸、己酸、马尿酸、氢溴酸、盐酸异丁酸、DL-乳酸、乳糖酸、月桂酸、赖氨酸、马来酸、(-)-L-苹果酸、丙二酸、DL-扁桃酸、甲磺酸、半乳糖二酸、萘-1,5-二磺酸。

酸、萘-2-磺酸、1-羟基-2-萘甲酸、烟酸、硝酸、辛酸、油酸、乳清酸、草酸、棕榈酸、扑酸(双羟萘酸)、磷酸、丙酸、(-)-L-焦谷氨酸、水杨酸、4-氨基-水杨酸、癸二酸、硬脂酸、琥珀酸、硫酸、单宁酸、(+) -L-酒石酸、硫氰酸、对甲苯磺酸和十一烯酸。另外的化妆品上或药学上可接受的盐可以使用来自如铝、钙、镁、钾、钠、锌等金属的阳离子形成。

[0295] 本发明的化妆品上或药学上可接受的盐可通过常规化学方法自含有碱性或酸性部分的本文所公开的化合物合成。通常,此类盐可以通过使这些化合物的游离酸或游离碱形式与足量的适当的碱或酸在水中或在有机稀释剂(如乙醚、乙酸乙酯、乙醇、异丙醇或乙腈或其混合物)中反应来制备。

[0296] 设想本发明的化合物和组合物可包含在化妆品或药物组合物中。

[0297] 本文使用的术语只用于描述特定实施方案的目的,而不意图进行限制。如在说明书和所附权利要求中所用,除上下文另外明确规定,否则单数形式“一个(a)”、“一种(an)”和“所述(the)”包括复数指示物。

[0298] 对于本文数值范围的叙述来说,明确地涵盖具有相同精确度的介于其间的每个中间数字。例如,对于6-9的范围,除了6和9外还涵盖数字7和8,并且对于6.0-7.0的范围,明确涵盖了数字6.0、6.1、6.2、6.3、6.4、6.5、6.6、6.7、6.8、6.9以及7.0。

[0299] 提供以下实施例以进一步说明本发明的方法。这些实施例仅为说明性的,并且不意图以任何方式对本发明的范围进行限制。

[0300] 实施例

[0301] 实施例1

[0302] 材料和方法

[0303] 对由马拉色菌属产生的化合物的分离

[0304] 使用例如Wille等人,2001中概述的程序分离马拉色因。所述方案简要概述如下。

[0305] 培养基

[0306] 将由吐温80(30mL)、环己酰亚胺(0.5g)、氯霉素(0.05g)、琼脂(20g)和足以实现1000mL混合物的体积的水组成的培养基灭菌并在50℃下与浓度为0.3g%的0.3%无菌过滤的L-色氨酸混合。将10mL部分倒入10cm皮氏培养皿中并且用0.1M HCl将pH调节至5.5。

[0307] 培养糠秕马拉色菌并分离由糠秕马拉色菌产生的化合物

[0308] 将糠秕马拉色菌在上述培养基上擦拭,并在30℃下温育14天。将皮氏培养皿的内容物制成泥状并用乙酸乙酯萃取12小时。将萃取物用玻璃棉过滤、蒸发至干,并溶解于甲醇中。然后通过色谱法在Sephadex LH-20上将萃取物进行分级处理,用甲醇作为洗脱液。通过制备型薄层色谱法用甲苯:甲酸乙酯:甲酸(10:5:3)完成进一步的分离。主要区在水与乙酸乙酯之间分配。分析级分的感兴趣活性。通过HPLC分离来自感兴趣级分的化合物。

[0309] 马拉色因和马拉色因的化学类似物的合成

[0310] 根据Wille等人,2001中提出的方案合成马拉色因。根据新颖的合成方案以及Winston-McPherson等人,2014中描述的那些合成马拉色因的化学类似物。

[0311] 筛选方案

[0312] 使用本领域技术人员已知的筛选方案和新颖的筛选方法评价有效的皮肤增白化合物。例如,如上所述,通过酪氨酸酶生物测定法评价马拉色因及其化学类似物。利用了涉及体外细胞和体内组织模型的其他筛选方案,包括芳基烃受体(AhR)结合测定。

[0313] 酪氨酸酶生物测定

[0314] 酪氨酸酶生物测定如Wille等人,2001中所述进行。简而言之,将L-DOPA与酪氨酸酶混合。在1分钟内测量到消光,这表明形成多巴醌。使用例如上面讨论的级分,将这些级分溶解于DMSO中并直接添加到酪氨酸酶反应中,用纯DMSO作为对照。将酪氨酸酶抑制活性测量为相比于对照消光增加的减少量。

[0315] 芳基烃受体结合测定

[0316] 根据例如Song等人,2002中描述的方案进行AhR结合测定。简而言之,例如,使用TnT快速偶联网织红细胞裂解物系统反应(Promega, Madison, WI)体外表达人和鼠类AhR。受体配体结合研究利用蔗糖梯度上的沉降速度,如Karchner等人,1999中所述。

[0317] EROD测定

[0318] 还使用本领域技术人员已知的乙氧基试卤灵-0-脱乙基酶(EROD)测定评价本发明的化合物、组合物和制剂(Donato等人,1993; Whyte等人,2000; Wille等人,2001)。

[0319] 黑素细胞凋亡测定

[0320] 评价候选化合物在黑素细胞中的细胞凋亡诱导活性。将人表皮黑素细胞在补充有人黑素细胞生长补充物(HMGS)(Thermo-Fisher Scientific, Waltham, MA)或皮肤细胞基础培养基(ATCC, Manassas, VA)的培养基254中培养。人黑素细胞生长培养基的附加组分可包括但不限于胰岛素(5 μ g/ml)、抗坏血酸(50 μ g/ml)、L-谷氨酰胺(6mM)、肾上腺素(1.0 μ M)和氯化钙(0.2mM)。将人黑素细胞培养物保持在37°C的5%CO₂中。

[0321] 将候选化合物稀释在DMSO中并直接混合到黑素细胞培养物中。将等体积的纯DMSO用作对照。根据制造商的说明书进行本领域技术人员已知的细胞毒性测定。用于本发明的细胞毒性测定包括但不限于CellTox™ Green细胞毒性测定、Apo-ONE荧光半胱天冬酶测定、ApoTox-Glo™ 测定和 Caspase-Glo® 测定(Promega, Madison, WI)。荧光检测使用本领域技术人员已知的标准FACS或显微镜测定(包括Krämer等人,2005中描述的那些)来完成。

[0322] 使用了另外的评估细胞凋亡的手段,包括针对膜联蛋白V的FACS分析和针对半胱天冬酶-9表达的蛋白质印迹。根据本领域技术人员已知的方法进行蛋白质印迹法。

[0323] 小鼠异种移植测定

[0324] 根据本领域已知的方案产生人皮肤的小鼠异种移植模型。(Black等人,1985; Manning等人,1973; Reed等人,1973; Plenat等人,1992; Scott等人,1998; Otułakowski等人,1994)。一旦建立,将小鼠异种移植模型暴露于本发明的化合物,并且观察与对照相比色素沉着的变化。使用本领域技术人员已知的各种色素沉着标度评估皮肤色素沉着的变化,所述标度包括但不限于Fitzpatrick皮肤分型测试和Taylor色素沉着过度标度。(Taylor等人,2005)。

[0325] 人体测定

[0326] 将本发明的化合物、组合物和制剂施加于人,例如人皮肤上,并将其与对照物质进行比较。使用本领域技术人员已知的各种色素沉着标度评估皮肤色素沉着的变化,所述标度包括但不限于Fitzpatrick皮肤分型测试和Taylor色素沉着过度标度。

[0327] 实施例2

[0328] 马拉色因及其类似物的生化指标

[0329] 预期本发明的化合物和组合物将表现出例如与马拉色因相当的酪氨酸酶抑制和

AhR激动剂活性。与马拉色因相比,预期本发明的化合物和组合物表现出例如更加强有力的酪氨酸酶抑制和更强的AhR激动作用。同样地,预期本发明的某些化合物和组合物是与马拉色因相比不太有效的酪氨酸酶抑制剂和AhR激动剂。与更加强有力的化合物相比,这些化合物、组合物和制剂可具有更有利的毒性分布。

[0330] 实施例3

[0331] 体外功效

[0332] 预期本发明的化合物和组合物将至少与马拉色因一样强有力地诱导黑素细胞凋亡并调节黑素细胞活性、黑素产生、黑素体生物发生和/或黑素体转移。还预期本发明的某些化合物和组合物将比马拉色因不太强有力地有效影响这些生物学过程。与更加强有力的物质相比,此类化合物和组合物可具有更有利的毒性分布。

[0333] 实施例4

[0334] 体内功效

[0335] 预期本发明的化合物和组合物将至少与马拉色因一样有效地用于增白皮肤和改善由色素沉着过度病症引起的色素沉着过度。进一步预期本发明的化合物和组合物在例如半衰期和吸收方面将表现出有利的药代动力学分布。某些化合物表现出的半衰期较长,而其他化合物表现出的半衰期较短。类似地,某些化合物将表现出不同的吸收分布,一些化合物需要更长时间才能被完全吸收,而另一些化合物则需要更少的时间来完全吸收。

[0336] 实施例5

[0337] 马拉色因和马拉色因衍生物的合成

[0338] 根据图2A中所示的方案合成马拉色因 (“CV-8684”) 及其环化衍生物吲哚并[3,2-b]咔唑 (“CV-8685”)。

[0339] (2-碘-苯基)氨基甲酸叔丁酯,化合物1的合成

[0340] 在0℃下向2-碘-苯胺 (25.0g, 0.114mol) 于四氢呋喃 (250mL) 中的溶液中缓慢添加 LiHMDS (251.0mL, 1M THF溶液, 0.251mol), 同时维持内部温度低于5℃超过40分钟。在0℃下搅拌30分钟后,缓慢添加BOC酸酐 (27.0g, 0.125mol) 于THF (50mL) 中的溶液,同时维持内部温度低于5℃超过40分钟。将反应混合物温热至环境温度并搅拌1小时。添加饱和的NH₄Cl (250mL) 以淬灭反应。分离有机层并用水 (150mL) 洗涤。将合并的水层用乙酸乙酯 (2×150mL) 萃取,分离各层。将乙酸乙酯层与原始有机层合并,并真空浓缩,得到棕色油状物。通过柱色谱法 (0-5% 乙酸乙酯/己烷) 纯化粗化合物。获得呈淡黄色液体的化合物1 (29.0g, 80%)。

[0341] 化合物2的合成

[0342] 在环境温度下,将碘化铜 (0.95g, 10%mol) 和PdCl₂(PPh₃)₄ (1.75g, 5%mol) 添加到化合物1 (16.0g, 0.05mol)、炔丙基甲基醚 (4.25g, 0.06mol) 于三乙胺 (200mL) 中的脱气溶液中。在环境温度下搅拌2小时后,反应完成 (通过TLC使用10%乙酸乙酯/己烷监测)。将反应混合物用乙酸乙酯 (300mL) 稀释,将反应混合物用水、饱和NaCl洗涤并经Na₂SO₄干燥。将溶剂过滤并真空浓缩,得到棕色油状物。通过柱色谱法 (10% 乙酸乙酯/己烷) 纯化粗化合物。获得呈淡黄色液体的化合物2 (13.0g, 99%)。

[0343] 化合物3的合成

[0344] 向烘箱干燥的烧瓶中添加于二噁烷 (120mL) 中的PtCl₂ (0.26g, 0.001mol)、Na₂CO₃

(1.6g, 0.015mol)、吲哚(2.32g, 0.02mol)和化合物2(2.6g, 0.01mol)。将烧瓶用氮气脱气、密封并加热至100℃过夜。反应完成后(通过TLC使用10%乙酸乙酯/己烷监测)。减压蒸发溶剂。将反应混合物用乙酸乙酯(200mL)稀释,将反应混合物用水、饱和NaCl洗涤并经Na₂SO₄干燥。将溶剂过滤并真空浓缩,得到棕色油状物。

[0345] 使用化合物2(2.6g, 0.01mol)以不同批次重复该反应。将两批粗制化合物合并,并通过柱色谱法(10%乙酸乙酯/己烷)纯化。获得呈淡棕色固体的化合物3(3.8g, 55%)。

[0346] 化合物4的合成

[0347] 在环境温度下将碳酸钾(4.6g, 0.0329mol)添加到化合物3(3.8g, 0.0109mol)在甲醇(150mL)和水(50mL)混合物中的溶液中。将所得悬浮液加热至回流过夜。反应完成后(通过TLC使用20%乙酸乙酯/己烷监测)。冷却反应混合物至环境温度并真空浓缩溶剂。将残余物溶于乙酸乙酯(200mL)中,并用水和盐水洗涤,然后干燥(硫酸钠)、过滤、真空浓缩溶剂,得到棕色固体。通过柱色谱法(20%乙酸乙酯/己烷纯化粗制化合物。获得呈橙色固体的化合物4(2.2g, 81%)。

[0348] 化合物马拉色因(CV-8684)的合成

[0349] 在0℃下在氩气下向干燥的100mL双颈圆底烧瓶中添加二甲基甲酰胺(20mL)。缓慢添加POCl₃(0.75g, 0.0048mol),同时维持内部温度低于5℃超过10分钟。在0℃下搅拌30分钟后,缓慢添加化合物4(1.0g, 0.004mol)于二甲基甲酰胺(5mL)中的溶液,同时维持内部温度低于5℃超过10分钟。将所得的混合物在环境温度下搅拌过夜。反应完成后(通过TLC使用20%乙酸乙酯/己烷监测)。将反应混合物倒入饱和碳酸氢钠水溶液(150mL)中并搅拌1小时。将所得的混合物用乙酸乙酯(2x 100mL)萃取。将有机层合并,并且用水、饱和NaCl洗涤并用Na₂SO₄干燥。将溶剂过滤并真空浓缩,得到棕色固体。通过柱色谱法(0-20%乙酸乙酯/己烷)纯化粗化合物。获得呈淡粉红色固体的化合物马拉色因(CV-8684)(0.82g, 74%)。

[0350] HPLC纯度:97.8% (面积%)。¹H-NMR、¹³C谱与结构一致。ESI-MS:对于C₁₈H₁₅N₂O(M+H)⁺,计算值:275,实测值:275.2

[0351] 化合物吲哚并[3,2-b]咔唑(CV-8685)的合成。在环境温度下将浓HCl(0.25mL)添加到马拉色因(0.75g)于四氢呋喃(120mL)中的溶液中。将所得混合物加热至回流过夜。反应完成后(通过TLC使用40%乙酸乙酯/己烷监测)。将反应混合物冷却至环境温度并搅拌1小时。将固体过滤、用四氢呋喃(20mL)洗涤并干燥,得到淡黄色固体吲哚并[3,2-b]咔唑(CV-8685)(0.55g, 78%)。

[0352] HPLC纯度:96.22% (面积%)。¹H-NMR、¹³C谱与结构一致。ESI-MS:对于C₁₈H₁₃N₂(M+H)⁺,计算值:257,实测值:257.5。

[0353] 根据图2B中所示的方案合成化合物I("CV-8686")和化合物IV("CV-8687")。

[0354] 化合物5的合成

[0355] 向烘箱干燥的烧瓶中添加于二噁烷(250mL)中的PtCl₂(1.0g, 0.0038mol)、Na₂CO₃(6.1g, 0.057mol)、6-甲基吲哚(10.0g, 0.076mol)和化合物2(10.0g, 0.038mol)。将烧瓶用氮气脱气、密封并加热至100℃过夜。反应完成后(通过TLC使用10%乙酸乙酯/己烷监测)。减压蒸发溶剂。将反应混合物用乙酸乙酯(400mL)稀释,将反应混合物用水、饱和NaCl洗涤并经Na₂SO₄干燥。将溶剂过滤并真空浓缩,得到棕色油状物。通过柱色谱法(10%乙酸乙酯/己烷)纯化粗制化合物。获得呈淡棕色固体的化合物5(6.5g, 47%)。

[0356] 化合物6的合成

[0357] 在环境温度下将碳酸钾(7.4g, 0.054mol)添加到化合物5(6.5g, 0.018mol)在甲醇(150mL)和水(50mL)混合物中的溶液中。将所得悬浮液加热至回流过夜。反应完成后(通过TLC使用20%乙酸乙酯/己烷监测)。冷却反应混合物至环境温度并真空浓缩溶剂。将残余物溶于乙酸乙酯(200mL)中,并用水和盐水洗涤,然后干燥(硫酸钠)、过滤、真空浓缩溶剂,得到棕色固体。通过柱色谱法(20%乙酸乙酯/己烷)纯化粗制化合物。获得呈橙色固体的化合物6(3.3g, 72%)。

[0358] 化合物I (CV-8686) 的合成

[0359] 在0°C下在氩气下向干燥的100mL双颈圆底烧瓶中添加二甲基甲酰胺(20mL)。缓慢添加POCl₃(0.6g, 0.0038mol),同时维持内部温度低于5°C超过10分钟。在0°C下搅拌30分钟后,缓慢添加化合物6(1.0g, 0.0038mol)于二甲基甲酰胺(5mL)中的溶液,同时维持内部温度低于5°C超过10分钟。将所得的混合物在环境温度下搅拌过夜。反应完成后(通过TLC使用20%乙酸乙酯/己烷监测)。将反应混合物倒入饱和碳酸氢钠水溶液(150mL)中并搅拌1小时。将所得的混合物用乙酸乙酯(2x 100mL)萃取。将有机层合并,并且用水、饱和NaCl洗涤并用Na₂SO₄干燥。将溶剂过滤并真空浓缩,得到棕色固体。通过柱色谱法(0-20%乙酸乙酯/己烷)纯化粗化合物。获得呈淡粉红色固体的化合物I (CV-8686) (0.84g, 75%)。

[0360] HPLC纯度:97.01% (面积%)。¹H-NMR、¹³C谱与结构一致。ESI-MS:对于C₁₉H₁₇N₂O (M+H)⁺,计算值:289,实测值:289.1

[0361] 化合物IV (CV-8687) 的合成

[0362] 在环境温度下将浓HCl(0.3mL)添加到化合物I(1.0g)于四氢呋喃(125mL)中的溶液中。将所得混合物加热至回流过夜。反应完成后(通过TLC使用40%乙酸乙酯/己烷监测)。将反应混合物冷却至环境温度并搅拌1小时。将固体过滤、用四氢呋喃(20mL)洗涤并干燥,得到淡黄色固体化合物IV (CV-8687) (0.84g, 89%)。

[0363] HPLC纯度:98.4% (面积%)。¹H-NMR、¹³C谱与结构一致。ESI-MS:对于C₁₉H₁₅N₂ (M+H)⁺,计算值:271,实测值:271.3。

[0364] 根据图2C中所示的方案合成化合物II (“CV-8688”)。

[0365] 化合物7的合成

[0366] 在环境温度下,将碘化铜(0.53g, 10%mol)和PdCl₂(PPh₃)₄(1.0g, 5%mol)添加到化合物1(9.0g, 0.03mol)、3-甲氧基-1-丁炔(2.8g, 0.035mol)于三乙胺(150mL)中的脱气溶液中。在环境温度下搅拌2小时后,反应完成(通过TLC使用10%乙酸乙酯/己烷监测)。将反应混合物用乙酸乙酯(300mL)稀释,将反应混合物用水、饱和NaCl洗涤并经Na₂SO₄干燥。将溶剂过滤并真空浓缩,得到棕色油状物。通过柱色谱法(10%乙酸乙酯/己烷)纯化粗化合物。获得呈淡黄色液体的化合物7(7.0g, 90%)。

[0367] 化合物8的合成

[0368] 向烘箱干燥的烧瓶中添加于二噁烷(250mL)中的PtCl₂(0.68g, 0.0025mol)、Na₂CO₃(4.0g, 0.038mol)、吲哚(6.0g, 0.05mol)和化合物7(10.0g, 0.025mol)。将烧瓶用氮气脱气、密封并加热至100°C过夜。反应完成后(通过TLC使用10%乙酸乙酯/己烷监测)。减压蒸发溶剂。将反应混合物用乙酸乙酯(400mL)稀释,将反应混合物用水、饱和NaCl洗涤并经Na₂SO₄干燥。将溶剂过滤并真空浓缩,得到棕色油状物。通过柱色谱法(10%乙酸乙酯/己烷)纯化粗化合物。获得呈淡黄色液体的化合物8(7.0g, 90%)。

烷)纯化粗制化合物。获得呈淡棕色固体的化合物8(3.5g,77%)。

[0369] 化合物9的合成

[0370] 在环境温度下将碳酸钾(3.8g,0.027mol)添加到化合物8(3.3g,0.0091mol)在甲醇(75mL)和水(25mL)混合物中的溶液中。将所得悬浮液加热至回流过夜。反应完成后(通过TLC使用20%乙酸乙酯/己烷监测)。冷却反应混合物至环境温度并真空浓缩溶剂。将残余物溶于乙酸乙酯(200mL)中,并用水和盐水洗涤,然后干燥(硫酸钠)、过滤、真空浓缩溶剂,得到棕色固体。通过柱色谱法(20%乙酸乙酯/己烷)纯化粗制化合物。获得呈橙色固体的化合物9(2.1g,88%)。

[0371] 化合物II(CV-8688)的合成

[0372] 在0℃下在氩气下向干燥的100mL双颈圆底烧瓶中添加二甲基甲酰胺(20mL)。缓慢添加POC₃(0.76g,0.005mol),同时维持内部温度低于5℃超过10分钟。在0℃下搅拌30分钟后,缓慢添加化合物9(1.3g,0.005mol)于二甲基甲酰胺(5mL)中的溶液,同时维持内部温度低于5℃超过10分钟。将所得的混合物在环境温度下搅拌过夜。反应完成后(通过TLC使用20%乙酸乙酯/己烷监测)。将反应混合物倒入饱和碳酸氢钠水溶液(150mL)中并搅拌1小时。将所得的混合物用乙酸乙酯(2x 100mL)萃取。将有机层合并,并且用水、饱和NaCl洗涤并用Na₂SO₄干燥。将溶剂过滤并真空浓缩,得到棕色固体。将粗制化合物在氯仿(25mL)中结晶。获得呈淡粉红色固体的化合物II(CV-8688)(0.81g,53%)。

[0373] HPLC纯度:98.94%(面积%)。¹H-NMR、¹³C谱与结构一致。ESI-MS:对于C₁₉H₁₇N₂O(M+H)⁺,计算值:289,实测值:289.0。

[0374] 实施例6

[0375] 细胞形态

[0376] 各种处理后的典型细胞形态示于图5A-5K、6A-6K、7A-7K、8A-8K、9A-9K、10A-10K、11A-11K和12A-12K中。在6小时时,两种细胞系的形态受到100μM CV-8684和CV-8688以及星形孢菌素处理的显著影响。CV-8685似乎仅在100μM下影响WM115。

[0377] 实施例7

[0378] 马拉色因和马拉色因衍生物的细胞凋亡诱导活性-初步膜联蛋白V测定

[0379] 材料和试剂

[0380] 膜联蛋白V-FITC测定试剂盒购自Beyotime Biotechnology,RPMI 1640培养基和杜氏改良型伊格尔培养基(Dulbecco's modified Eagle medium)(“DMEM”)购自Gibco,胎牛血清(“FBS”)购自Invitrogen,稳定的抗生素抗霉菌溶液(100x)购自Sigma,并且0.25%胰蛋白酶-EDTA(1X),酚红购自Invitrogen。

[0381] 细胞培养

[0382] MeWo(ATCC®HTB-65TM)和WM115(ATCC®CRL-1675)细胞购自ATCC(Manassas,VA)并维持如下:对于MeWo:维持在补充有10%FBS的DMEM中;对于WM115:维持在补充有10%FBS(10%FBS,1%稳定的抗生素抗霉菌溶液)的RPMI 1640。

[0383] 研究概述

[0384] 在细胞凋亡的中间阶段,磷脂酰丝氨酸(“PS”)从细胞膜的内部小叶移位到外部小叶,从而将PS暴露于细胞外环境,在那里可以检测到它。高荧光膜联蛋白V缀合物为研究PS的外化提供了快速可靠的检测方法。

[0385] 在第一组研究期间,将MeWo和WM115细胞均用10个剂量的测试化合物处理,所述剂量从100 μ M开始,稀释度为3倍。将星形孢菌素用作阳性对照。处理6小时后,使用膜联蛋白V测定评估细胞凋亡。评价的测试化合物是CV-8684、CV-8685、CV-8686、CV-8687和CV-8688。

[0386] 测定程序

[0387] 对于细胞接种,收获细胞并使用Countess®细胞计数器测定细胞数。然后用培养基稀释细胞至所需密度。将每孔40 μ L细胞悬浮液添加到384孔板(Corning 3712-透明底板)中所需数量的孔中。最终细胞密度为6,000个细胞/孔。铺板后,将板在37°C和5%CO₂下温育过夜。

[0388] 为了制备化合物源板,将每种测试化合物在DMSO中溶解至10mM储备液。使用EVO200™液体处理器(TECAN)进行3倍连续稀释以产生十个浓度的测试化合物。采用0.1%DMSO作为媒介物(阴性)对照。然后将化合物源板在室温下以1,000RPM旋转1分钟,并使用板振荡器摇动2分钟。

[0389] 对于化合物处理,使用液体处理器Echo550(LabCyte Inc.)将40nL化合物从化合物源板转移至384孔培养板。温育6小时后,将板从培养箱中取出用于检测。

[0390] 对于初步膜联蛋白V测定,将板从培养箱取出并使其在室温下平衡15分钟。然后除去培养基。向每个孔中添加20 μ L预混合的膜联蛋白V-FITC和Hoechst 33342染料工作液。然后将细胞在室温下温育20分钟。将板密封并以1,000RPM离心1分钟以除去气泡。然后,使用Acumen eX3读板机读取板。根据下式计算相对活性:活性(%) = 100% x (计数_{膜联蛋白V}/计数_{总细胞}),并且使用GraphPad Prism(v.5.01)计算EC₅₀。

[0391] 结果

[0392] 在上面讨论的初步筛选中,CV-8688显著增加了MeWo细胞的膜联蛋白V染色,EC₅₀为908.57nM。阳性对照星形孢菌素在两种细胞系中均大大增加了膜联蛋白V染色。(图3A-3M)。

[0393] 实施例8

[0394] 马拉色因和马拉色因衍生物的细胞凋亡诱导活性-使用膜联蛋白V测定的附加评价

[0395] 研究概述

[0396] 为了进一步研究测试化合物对细胞凋亡的影响,在MeWo和WM115细胞上进行了覆盖细胞凋亡的不同阶段的多个读取。将两种细胞类型均用3种剂量(100 μ M、10 μ M和1 μ M)的测试化合物处理。将星形孢菌素用作阳性对照。在所需的处理期(6小时、24小时、48小时或72小时)后,通过测量暴露于测试化合物后展示出膜联蛋白V结合的细胞百分比来评估细胞凋亡。评价的测试化合物是CV-8684、CV-8685和CV-8688。

[0397] 测定程序

[0398] 如上所述那样进行细胞接种,但有以下不同之处:对于6小时和24小时检测最终细胞密度为4,000个细胞/孔,而对于48小时和72小时检测使用2,000个细胞/孔。对于每个时间点,制备384孔透明底板(Corning 3712)和固体白底板(Corning 3570)。如上所述那样温育平板。

[0399] 为了制备化合物源板,将每种测试化合物在DMSO中溶解至10mM储备液。另外两个浓度是以10倍稀释度产生的1mM和0.1mM。将星形孢菌素用作阳性对照并且将1%DMSO用作媒介物(阴性)对照。将化合物源板在室温下以1,000RPM旋转1分钟,并使用板振荡器摇动2

分钟。

[0400] 使用Echo550液体处理器将400nL测试化合物从化合物源板转移至384孔培养板。在6小时、24小时、48小时和72小时后,将板从培养箱中取出用于检测。

[0401] 对于膜联蛋白V测定,将板从培养箱取出并使其在室温下平衡15分钟。除去培养基并且用PBS洗涤细胞两次。向每个孔中添加20μL预混合的膜联蛋白V-FITC工作液。将细胞在室温下温育20分钟。使用Acumen eX3读取板以计数FITC阳性细胞的数量。根据下式计算相对活性:相对活性(%) = 100% x (计数_{样品}/计数_{媒介物})。

[0402] 结果

[0403] 在MeWo和WM115细胞上处理6小时后,CV-8684在最高测试浓度下诱导细胞凋亡。CV-8685在WM115上在24小时处理时显示出诱导效应,而48小时的处理似乎在两种细胞类型中均引起细胞凋亡。最后,在两种细胞类型中CV-8688以剂量依赖性方式显示出6小时处理内的诱导效应。(图4A-4L)。

[0404] 实施例9

[0405] 暴露于马拉色因和马拉色因衍生物后的细胞活力-CellTiter-Glo®测定

[0406] 测定程序

[0407] CellTiter-Glo®2.0测定购自Promega。如实施例8中所述进行细胞接种、化合物源板的制备和细胞对测试化合物的暴露。

[0408] 对于CellTiter-Glo®测定,将板从培养箱取出并使其在室温下平衡15分钟。将CellTiter-Glo®试剂解冻并在实验前平衡至室温。然后向每个孔中添加40μL CellTiter-Glo®试剂用于检测(与培养基的比例为1:1)。然后将板在室温下温育30分钟并使用EnSpire (PerkinElmer) 读板机读取。根据下式计算剩余活性:剩余活性(%) = 100% x (Lum_{样品} - Lum_{bkg}) / (Lum_{媒介物} - Lum_{bkg})。

[0409] 结果

[0410] CV-8684在测试的两种细胞系中均显示出细胞活力的剂量依赖性抑制,但抑制效应似乎在MeWo细胞中更强有力。CV-8685仅在24小时处理后以剂量依赖性方式表现出对WM115细胞活力的抑制效应。CV-8688以剂量依赖性方式抑制两种细胞类型的活力。在24小时处理后,阳性对照星形孢菌素在两种细胞系中均对细胞活力产生100%抑制。(图13A-13K)。

[0411] 实施例10

[0412] 马拉色因和马拉色因衍生物的细胞毒性-乳酸脱氢酶释放测定

[0413] 研究概述

[0414] LDH测定定量测量从受损细胞释放到培养基中的乳酸脱氢酶(“LDH”)以作为细胞毒性和细胞溶解的生物标记物。

[0415] 测定程序

[0416] CytoTox-ONE™均质膜完整性测定购自Promega。如实施例8中所述进行细胞接种、化合物源板的制备和细胞对测试化合物的暴露。

[0417] 对于LDH释放测定,将板从培养箱取出并使其在室温下平衡15分钟。然后将板以1,000RPM离心1分钟。将20μL细胞培养基转移到新的384孔黑色固体板中。然后,将20μL的CytoTOX-ONE™添加到每个孔中并在室温下温育10分钟。然后,向每个孔中添加10μL终止液,

并将板以500rpm摇动1分钟。在EnSpire上使用560nm的激发波长和590nm的发射波长读取板。根据下式计算相对活性: 相对活性 (%) = $100\% \times \frac{(\text{Lum}_{\text{样品}} - \text{Lum}_{\text{bkg}})}{(\text{Lum}_{\text{媒介物}} - \text{Lum}_{\text{bkg}})}$ 。

[0418] **结果**

[0419] 温育72小时后,CV-8684在任一细胞系中均未诱导显著释放。CV-8685在24小时处理后显示出对WM115的LDH释放的剂量依赖性诱导效应,但对MeWo细胞没有显示出。CV-8688在最高的测试浓度下诱导LDH释放。(图14A-14L)。

[0420] **实施例11**

[0421] **马拉色因和马拉色因衍生物的芳基烃受体激活潜力**

[0422] **测定程序**

[0423] HepG2-AhR-Luc细胞购自Pharmaron,One-Glo荧光素酶测定系统购自Promega,DMEM购自Hyclone,并且青霉素/链霉素购自Solabio。

[0424] 通过使DMEM补充有高葡萄糖和L-谷氨酰胺以及10%FBS来制备用于稳定转染的HepG2细胞的培养基。

[0425] 将HepG2-AhR-Luc细胞在T-75烧瓶中于37°C、5%CO₂和95%的相对湿度下培养。在脱离和拆分之前使细胞达到80-90%汇合。

[0426] 用5mL PBS冲洗培养的细胞。吸去PBS,向烧瓶中添加1.5mL胰蛋白酶,并且将细胞在37°C下温育大约5分钟或直至细胞脱离并漂浮。通过添加过量的含血清培养基使胰蛋白酶失活。

[0427] 将细胞悬浮液转移到锥形管中,并以120g离心10分钟以沉淀细胞。将细胞以适当的密度重悬于接种培养基中。将40μL细胞转移到384孔培养板(5x 10³个细胞/孔)。将板置于37°C的培养箱中24小时。

[0428] 然后,制备测试化合物和奥美拉唑阳性对照的储备溶液。使用Echo550将40nL化合物溶液转移到测定板中。然后将板放回培养箱中进行化合物处理。

[0429] 稍后,在处理24小时后,将板从培养箱中取出并使其在环境温度下冷却。在每个孔中添加与培养基的相等的30μL One-Glo试剂。使细胞裂解至少3分钟,然后在光度计中测量。

[0430] 使用XLfit中的非线性回归分析绘制剂量响应曲线,并且还计算了EC₅₀值。

[0431] **结果**

[0432] AhR-荧光素酶测定结果示出在图15A-15F中。

[0433] **实施例12**

[0434] **MelanoDerm™测定**

[0435] **研究概述**

[0436] 本研究的目的是评价在用于后续研究中的剂量选择的重复暴露后,测试物品对MelanoDerm™皮肤模型的潜在皮肤刺激。通过测量测试物品处理的组织中MTT(3-[4,5-二甲基噻唑-2-基]-2,5-二苯基四唑鎓溴化物)相比于阴性/溶剂对照处理的组织的相对转化率来确定毒性。

[0437] 将由MatTek公司(Ashland, MA)提供的MelanoDerm™皮肤模型用于本研究中。MelanoDerm™组织由正常的人源性表皮角质形成细胞(NHEK)和黑素细胞(NHM)组成,这些细胞已被培养以形成人表皮的多层、高度分化的模型。共培养物内的NHM经历自发的黑素生

成,导致具有不同水平的色素沉着的组织。将培养物在气-液界面处的细胞培养插入物上生长,从而允许局部施加皮肤调节剂。MelanoDermTM模型表现出体内样形态和超微结构特征。位于MelanoDermTM组织的基底细胞层中的NHM是树突状的并且自发地产生黑素颗粒,其逐渐填充组织的层。因此,测试系统可用于筛选相对于阴性对照可抑制或刺激黑素产生的材料。

[0438] 该研究的实验设计包括对纯测试物品(如果可能的话)(和/或视情况剂量溶液)的pH和用于确定重复暴露后的相对组织活力的确定性测定。MelanoDermTM皮肤模型将暴露于测试物品总共7天。将测试物品每隔48小时(在自先前处理的48±2小时的时间范围内)局部施加至MelanoDermTM皮肤模型。测试物品的毒性将通过对照物品和测试物品处理的组织中对MTT的NAD(P)H依赖性微粒体酶还原(以及在较小程度上,通过对MTT的琥珀酸脱氢酶还原)来确定。(Berridge等人,1996)。数据将以相对存活率(相对于阴性对照的MTT转化率)的形式表示。

[0439] 材料

[0440] MelanoDermTM维持培养基(EPI-100-LLMM)和MelanoDermTM皮肤模型(MEL-300-A)由MatTek Corporation提供。1%的曲酸(在无菌去离子水中制备)和MTT(3-[4,5-二甲基噻唑-2-基]-2,5-二苯基四唑鎓溴化物)由Sigma提供。含有2mM L-谷氨酰胺的杜氏改良型伊格尔培养基(DMEM)(MTT添加培养基)由Quality Biological提供。异丙醇由Aldrich提供。无菌不含Ca⁺⁺和Mg⁺⁺的杜氏磷酸盐缓冲盐水(CMF-DPBS)由Invitrogen或同等公司提供。无菌去离子水由Quality Biological或同等公司提供。DMSO由CiVenti Chem提供。

[0441] 测定程序

[0442] 测试物品通常以纯态测试或按照赞助商的指示进行测试(参见方案附件1)。将10微升(10μL)或25μL的每种测试物品直接施加在组织上以覆盖上表面。取决于测试物品的性质(液体、凝胶剂、霜剂、泡沫剂等),可能需要使用给药装置、网或其他辅助装置以实现测试物品在组织表面上均匀散布。

[0443] 在给药的时候,使用适当体积的EPI-100-LLMM(或在溶解度测试期间测定的替代溶剂)将每种测试物品稀释至少200倍。对于每次给药,将制备EPI-100-LLMM中的新鲜稀释液。待进行用于给药溶液制备的最终稀释液将根据上文的溶解度评估确定并记录在研究工作簿中。

[0444] 将在EPI-100-LLMM中稀释为0.5% (v/v)的DMSO用作媒介物对照,并基于与用于测试物品和测定对照的程序相同的程序给药到组织上(10μL和25μL剂量)。

[0445] 在7天试验期间将测试物品每隔48小时(在自先前处理的48±2小时的时间范围内)局部施加至MelanoDermTM组织。分别将十微升和25微升的每种测试物品施加到每个组织。分别将二十五微升的阳性和阴性对照施加至每个组织。

[0446] 如果可能的话,将确定纯液体测试物品(和/或视情况剂量溶液)的pH。使用pH试纸测定pH(例如,pH范围为0-14以进行估计,和/或pH范围为5-10以确定更精确的值)。在较窄范围的pH试纸上,典型的pH增量为约0.3至0.5个pH单位。pH试纸的最大增量为1.0个pH单位。

[0447] 确定性测定将包括阴性对照和阳性对照。指定给测定阴性对照的MelanoDermTM组织将用25μL无菌去离子水处理。将二十五微升1%曲酸(在无菌去离子水中制备并在制备时过滤)用于对指定给测定阳性对照的组织给药。将1%曲酸储存在覆盖有铝箔的管中,直到

在制备后2小时内使用。将阴性对照和阳性对照暴露时间将与用于测试物品的那些相同。

[0448] 有必要评估每种测试物品直接还原MTT的能力。如下所述,在MTT添加培养基中制备1.0mg/mL MTT溶液。将大约25 μ L的测试物品添加到1mL MTT溶液中,并将混合物在黑暗中于37°C±1°C温育一至三小时。同时测试阴性对照即25 μ L无菌去离子水。如果MTT溶液颜色变为蓝色/紫色,则推测测试物品还原了MTT。水不溶性测试材料可仅在测试物品与培养基之间的界面处显示直接还原(变暗)。

[0449] 测试物品的MTT直接还原测试可能先前已在独立研究中进行。在这种情况下,MTT直接还原测试的结果可用于该特定研究,并且将参考初始研究。

[0450] 组织暴露:在开始培养后至少16小时,将使用数码相机拍摄两个MelanoDermTM组织(在第0天认为是未处理的),以帮助目测评估对测定零时间时的组织的色素沉着程度。用于收集组织图像的确切程序将在研究工作簿和报告中详细说明。将MelanoDermTM组织用CMF-DPBS冲洗,在无菌吸水纸上吸干并清除多余的液体。在冲洗后将MelanoDermTM组织转移至适当的含MTT的孔中并如MTT测定部分所述那样在MTT测定中进行处理。

[0451] 在开始培养后至少16小时,将组织移至含有0.9mL新鲜的预热EPI-100-LLMM的新6孔板上。试验将在7天的时间范围内进行。在第一天并且每隔48小时(在自先前处理的48+/-2小时的时间范围内),将两个组织分别用10和25微升的每种测试物品局部处理。将培养基每天(在自先前重新进给的24+/-2小时的时间范围内)更新;将组织移至新的6孔板,该6孔板含有0.9mL新鲜的预热EPI-100-LLMM。

[0452] 在第一天并且每隔48小时(在自先前处理的48+/-2小时的时间范围内),将两个组织分别用25 μ L的阳性对照和阴性对照局部处理。将培养基每天(在自先前重新进给的24+/-2小时的时间范围内)更新;将组织移至新的6孔板,该6孔板含有0.9mL新鲜的预温热EPI-100-LLMM。将组织在37±1°C在空气中5±1%CO₂的湿润气氛(标准培养条件)中温育适当的暴露时间。

[0453] 在给药之日,首先使用~500 μ L CMF-DPBS轻轻冲洗MelanoDermTM组织三次,以除去任何残留的测试物品。然后将组织移至含有0.9mL新鲜的预温热EPI-100-LLMM的新6孔板中,并以适当的测试物品、阴性对照或阳性对照对其给药。将组织在37±1°C在空气中5±1%CO₂的湿润气氛(标准培养条件)中温育适当的暴露时间。确切的冲洗程序将记录在研究工作簿中。

[0454] 在7天的试验结束时,以阴性对照或阳性对照对MelanoDermTM组织给药,并且将使用数码相机拍摄每个测试物品,以帮助目测评估测定结束(第7天)时组织的色素沉着程度。用于收集组织图像的确切程序将在研究工作簿和报告中详细说明。然后,如下文所示,通过MTT还原来确定组织的活力。

[0455] MTT测定:将在PBS中制备的10X MTT储备液(在批量制备时过滤)解冻并在使用前不超过两小时在温热的MTT添加培养基中稀释以产生1.0mg/mL溶液。将三百 μ L MTT溶液添加到预先标记的24孔板的每个指定孔中。

[0456] 在暴露时间之后,将用CMF-DPBS冲洗指定用于MTT测定的每个MelanoDermTM组织,在无菌吸收纸上吸干,并清除多余的液体。冲洗后,将MelanoDermTM组织转移到适当的含MTT的孔中。将24孔板在标准条件下温育3±0.1小时。

[0457] 3±0.1小时后,将MelanoDermTM组织在无菌吸收纸上吸干,清除多余的液体,并转

移到每个指定孔中含有2.0mL异丙醇的预标记的24孔板中。将板用封口膜覆盖并储存在冰箱中(2-8°C)直至收获最后一次暴露时间。如果需要,可以在萃取MTT之前将板在冰箱中储存过夜(或在收获最后一次暴露时间后最多24小时)。然后将板在室温下振荡至少2小时。在萃取期结束时,将细胞培养插入物内的液体倾析到从其中取出细胞培养插入物的孔中。将萃取溶液混合并将200μL转移至96孔板的适当孔中。将二百μL异丙醇添加指定为空白的孔中。将用Molecular Devices Vmax读板机(AUTOMIX功能打开)测量每个孔的550nm吸光度(OD550)。

[0458] 在显示测试物品还原MTT的情况下,冲洗后保持与组织结合的仅有测试物品导致假MTT还原信号,这是一个问题。为了证明可能的残留测试物品不起直接还原MTT的作用,在确定性测定中进行功能检查以显示测试材料未与组织结合并未导致假MTT还原信号。

[0459] 为了确定残留的测试物品是否起直接还原MTT的作用,使用冷冻杀死的对照组织。通过以下方式来在IIVS制备冷冻杀死的组织:将未处理的MelanoDerm™/EpiDerm™(没有黑素细胞的Melanoderm™)组织在-20°C冷冻机中放置至少过夜,解冻至室温,然后再冷冻。一旦被杀死,组织可无限期地储存在冷冻机中。可以从MatTek Corporation获得已制备的冷冻杀死的组织,并将其储存在-20°C的冷冻机中直至使用。为了测试残留的测试物品还原,以正常方式用测试物品处理杀死组织。所有测定程序将以与用于存活组织的相同的方式进行。由于预期少量MTT还原是来自杀死组织内的残留NADH和相关酶,因此将平行测试至少一个用无菌去离子水处理的杀死对照(阴性杀死对照),。

[0460] 如果在测试物品处理的杀死对照中几乎没有或没有观察到MTT还原,则在测试物品处理的活组织中观察到的MTT还原可归因于活细胞。如果处理的灭活对照中存在明显的MTT还原(相对于处理的存活组织中的量),则必须采取额外的步骤以考虑化学还原,或者可认为测试物品在该系统中是不可测试的。如下所述分析来自杀死对照的OD550值

[0461] 捕获原始吸光度数据并将其保存为打印文件并导入到Excel电子表格中。计算空白孔的平均OD550值。通过从它们的平均OD550值中减去空白孔的平均OD550值来确定一个或多个阴性对照的校正性平均OD550值。各个测试物品暴露和阳性对照暴露的校正性OD550值通过从每个中减去空白孔的平均OD550值来确定。所有计算都将使用Excel电子表格进行。虽然执行所讨论的算法以计算处理组水平的最终终点分析,但是可以将相同的计算应用于各个重复品。

[0462] 校正性测试物暴露OD550=测试物暴露OD550-空白平均OD550

[0463] 如果使用杀死对照(KC),将进行以下额外的计算以校正由测试物残留物直接还原的MTT量。从每个测试物品处理的杀死对照的原始OD550值中减去阴性对照杀死对照的原始OD550值,以确定测试物品处理的杀死对照的净OD550值。

[0464] 每个测试物品KC的净OD550=原始OD550测试物品KC-原始OD550阴性对照KC

[0465] 净OD550值表示在特定暴露时间由于测试物品残留物的直接还原而导致的还原MTT的量。通常,如果净OD550值大于0.150,则将从存活的处理组织的校正性OD550值中减去MTT还原的净量,以获得最终校正的OD550值。然后将这些最终校正的OD550值用于确定对照活力的%。

[0466] 最终校正的OD550=校正性测试物品OD550(存活)-净OD550测试物品(KC)

[0467] 最后,将进行以下对照%计算:

[0468] %活力= [(测试物品或阳性对照的最终校正的OD550) / (阴性对照的校正性平均OD550)] x 100

[0469] 结果

[0470] MelanoDermTM测定结果示出在图16A-16K中。马拉色因-、化合物I-和化合物II-处理的组织在实验的第7天展示出减少的色素沉着。图17A-17K示出暴露于所列处理的MelanoDermTM样品的15X放大图像。

[0471] 实施例13

[0472] 斑马鱼测定

[0473] 测定程序

[0474] 化合物:化合物由研究赞助商作为在水/PBS或DMSO中具有最高可溶性浓度的主储备(MS)溶液提供。

[0475] 胚胎收集的标准程序:通过自然交配或使用大批量胚胎产生系统(MEPS, Aquatic Habitats)生成PhyloNix AB斑马鱼。每只雌性斑马鱼将产生大约50只斑马鱼。将斑马鱼维持在28°C的鱼水中。清理斑马鱼(除去死斑马鱼)并按发育阶段分类。因为斑马鱼从附着的卵黄囊中获得营养,所以受精后6天(dpf)不需要进给。

[0476] 化合物溶解度:将主储备溶液(MS)(使用最高浓度)在纯DMSO中稀释至亚储备溶液(SS),即:10mM、50mM、100mM、200mM、300mM等。将由PhyloNix提供的鱼水[200mg速溶海洋海盐(Aquarium Systems)/升去离子水;用2.5mg/升中性调节剂(Seachem Laboratories Inc.)维持的pH 6.6-7.0;电导率850-950μS]以4ml/容器分配到测试容器中。

[0477] 为了产生测试化合物溶液(TS),将4μl的每种SS直接添加到鱼水中。实施例:向鱼水中添加4μl的10mM SS将产生10μM TS;最终的DMSO浓度为0.1%。可选地,为了获得相同的最终TS和DMSO浓度,可以将10μl SS添加到10ml/容器的鱼水中。对于可耐受高达1%的DMSO的测定,可使用40μl SS产生100μM TS。如果使用10ml鱼水,应按比例增加SS的体积,以获得相同的最终TS和DMSO浓度。将溶液在28°C温育每个测定所规定的时长,并每天目测检查沉淀的存在。

[0478] 最大耐受浓度(MTC):将MTC(LC₁₀)用作化合物致死率的标准指标,使用10种化合物浓度测定。确定最高可溶性化合物浓度后,研究赞助商将选择10种浓度。

[0479] 将30只~2dpf绒毛状PhyloNix野生型AB斑马鱼分配到6孔微板的孔中,6孔微板含有4ml/孔鱼水和根据化合物溶解度浓度范围为0.1%-1%的DMSO。

[0480] 最初将测试10种浓度(即:0.01μM、0.05μM、0.1μM、0.5μM、1μM、5μM、10μM、50μM、100μM和500μM(或直至化合物溶解度允许的浓度))。如果需要,将测试额外的更高(高达2000μM)或更低(低至0.001μM)的浓度。

[0481] 将斑马鱼与各浓度的测试化合物在黑暗中于28°C温育3天。将未处理的斑马鱼和0.1-1%DMSO处理的斑马鱼用作测定对照和媒介物对照。为了计算致死率%,处理后,每天计数死斑马鱼的数量并将其除去。在5dpf时,对死亡动物计数以计算致死率%(=死斑马鱼的总数/30)。请注意,如果死斑马鱼解体,则将通过计数活的斑马鱼的数量来推断死斑马鱼的数量。

[0482] 为了估计MTC,将通过使用EXCEL软件绘制致死率%与浓度的关系来生成致死率曲线。为了获得MTC的平均值和SD,将进行3次实验。

[0483] 目视评估化合物对斑马鱼皮肤色素沉着的影响:斑马鱼皮肤色素细胞包括起源于神经嵴细胞的黄色素细胞、虹膜细胞和载黑素细胞(黑素细胞)。在斑马鱼中,分化的皮肤色素前体细胞在~24hpf时表达色素。这项研究的重点是在皮肤表面上表达黑素即黑色素的黑素细胞。黑素细胞最初在背侧头部区域呈现为黑色的小斑块。随着斑马鱼的发育,斑块的数量增加并融合形成延伸到尾部区域的条带。相反,突变体白化斑马鱼表现出稀疏的皮肤色素沉着。在2dpf时施用化合物以评估化合物是否阻止胚胎色素沉着的连续过程,这完成到5dpf。将测试每种化合物的三种浓度,MTC、50% MTC和25% MTC。

[0484] 将三十只2dpf自体孵化的PhyloNix野生型AB斑马鱼用每种化合物浓度处理3天。将未处理的斑马鱼和0.1%DMSO处理的斑马鱼用作对照。阳性对照:苯基硫脲(PTU,0.03%)。

[0485] 每天使用解剖光学显微镜对斑马鱼进行视觉检查;将化合物处理的和PTU处理的斑马鱼与未处理的对照斑马鱼和媒介物处理的对照斑马鱼进行比较。每天计数表现出色素沉着减少的斑马鱼的数量,并表示为测试动物的%;提供代表性图像。为了鉴定用减少色素沉着的最佳化合物浓度和处理时间,将通过绘制表现出皮肤色素沉着减少的斑马鱼%与时间(dp)的关系来生成动力学曲线。将费雪氏精确检验(Fisher's exact test)用于确定化合物效应是否显著($P<0.05$)。

[0486] 在用 $0.1\mu\text{M}$ 、 $1\mu\text{M}$ 和 $3\mu\text{M}$ 处理后,再对化合物对斑马鱼皮肤色素沉着的效应进行视觉评估。将三十只2dpf自体孵化的PhyloNix野生型AB斑马鱼用每种化合物浓度处理3天。将未处理的斑马鱼和0.1%DMSO处理的斑马鱼用作对照。阳性对照:苯基硫脲(PTU,0.003%)。每天使用解剖光学显微镜对斑马鱼进行视觉检查;将化合物处理的和PTU处理的斑马鱼与未处理的对照斑马鱼和媒介物处理的对照斑马鱼进行比较。

[0487] 在5dpf时,计数表现出色素沉着减少的斑马鱼的数量,并表示为测试动物的百分比;提供代表性图像。为了鉴定用减少色素沉着的最佳化合物浓度和处理时间,将通过绘制表现出皮肤色素沉着减少的斑马鱼%与浓度的关系来生成动力学曲线。将费雪氏精确检验用于确定化合物效应是否显著($P<0.05$)。

[0488] 定量化合物对斑马鱼皮肤色素沉着的效应:具有视觉评估的结果,我们将使用最佳条件(浓度、化合物处理时间)来定量化合物对斑马鱼皮肤色素沉着的效应。

[0489] 将通过视觉评估结果确定的最佳阶段的二十只PhyloNix野生型AB斑马鱼用最佳化合物浓度处理。将未处理的斑马鱼和0.1%DMSO处理的斑马鱼用作对照。阳性对照:苯基硫脲(PTU,0.03%)。

[0490] 将使用SPOT相机以2X捕获整个斑马鱼的背侧视图图像。使用Adobe Photoshop选择功能将背侧头部和躯干区域定义为感兴趣区域(ROI)。ROI中的黑色皮肤色素沉着将使用Photoshop突出显示功能突出显示。使用Photoshop直方图函数确定以像素计的总色素信号(PS)。

[0491] 如果化合物影响斑马鱼生长,则体长(L)和躯干宽度(W)将更小,这将影响ROI面积和最终PS。因此,我们将使用 $FS=PS/L\times W$ 来标准化最终信号(FS)的测量。

[0492] 预期未处理的斑马鱼和媒介物处理的斑马鱼表现出类似的FS,以证实媒介物没有效应。预期PTU处理的斑马鱼表现出低FS以验证该测定。将化合物处理的斑马鱼与媒介物处理的对照斑马鱼进行比较。

[0493] 为了确定化合物效应是否显著($P<0.05$) ,将使用学生t检验将化合物处理的斑马鱼的平均FS与媒介物处理的斑马鱼的平均FS进行比较。

[0494] 在用 $0.5\mu\text{M}$ 和 $1.5\mu\text{M}$ 化合物浓度处理后,再定量化合物对斑马鱼皮肤色素沉着的效应。

[0495] 将二十只2dpf Phylonix野生型AB斑马鱼用 $0.5\mu\text{M}$ 和 $1.5\mu\text{M}$ 化合物浓度处理。将未处理的斑马鱼和0.1%DMSO处理的斑马鱼用作对照。阳性对照:苯基硫脲(PTU,0.003%)。

[0496] 将使用SPOT相机以2X捕获整个斑马鱼的背侧视图图像。使用Adobe Photoshop选择功能将背侧头部区域定义为感兴趣区域(ROI)。ROI中的黑色皮肤色素沉着将使用Photoshop突出显示功能突出显示。使用Photoshop直方图函数确定以像素计的总色素信号(PS)。

[0497] 如果化合物影响斑马鱼生长,则体长(L)将更短并且躯干宽度(W)将更小,这将影响ROI面积和最终PS。因此,我们将使用 $\text{FS}=\text{PS}/\text{L}\times\text{W}$ 对最终信号(FS)测量进行标准化。

[0498] 预期未处理的斑马鱼和媒介物处理的斑马鱼表现出类似的FS以确认没有媒介物的效应。预期PTU处理的斑马鱼表现出低FS,从而验证该测定。将化合物处理的斑马鱼与媒介物处理的对照斑马鱼进行比较。

[0499] 为了确定化合物效应是否显著($P<0.05$) ,将使用学生t检验将化合物处理的斑马鱼的平均FS与媒介物处理的斑马鱼的平均FS进行比较。

[0500] 结果

[0501] 对暴露于化合物II的斑马鱼的视觉评估结果示出在图18A-18F和图19A-19F中。汇总来自研究的视觉评估部分的结果的图表示出在图20中。

[0502] 对暴露于化合物II的斑马鱼的定量评估的兴趣区域和结果示出在图21A-21E和图22A-22B中。

[0503] 实施例14

[0504] 马拉色因和马拉色因衍生物在DMSO和细胞培养基中的稳定性

[0505] 在DMSO和培养基中以 $100\mu\text{M}$ 制备测试的化合物。将溶液在室温下温育2小时,并使用LC-MS分析。使用峰面积来评价溶剂中残留的化合物。

[0506] 结果

[0507] LC-MS结果如图23A-23J中所示。结果表明,温育2小时后,化合物在培养基中是稳定的。

[0508] 文献

[0509] 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) .

[0510] Black,et al.Athymic Nude Mice and Human Skin Grafting.In:Maibach,et al. (eds.) .Models in Dermatology Vol.1.Karger,Basel,1985,228-39.

[0511] 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) .

[0512] Donato,et al.A Microassay for Measuring Cytochrome P4501A1 and

P45011B1 Activities in Intact Human and Rat Hepatocytes Cultured on 96-WellPlates. *Anal Biochem.* 1993;213(1):29-33.

[0513] Elmore. *Apoptosis: A Review of Programmed Cell Death.* *Toxicologic Pathology* 2007;35:495-516.

[0514] Fitzpatrick, et al. *The Validity and Practicality of Sun-Reactive Skin Types I Through VI.* *Arch Dermatol.* 1988;124(6):869-871.

[0515] Gaitanis, et al. *Skin Diseases Associated With Malassezia Yeasts: Facts and Controversies.* *Clinics in Dermatology* 2013;31:455-463.

[0516] Guého, et al. *The Genus Malassezia With Description of Four New Species.* *Antonie Van Leeuwenhoek* 1996;69:337-55.

[0517] 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.

[0518] Krämer, et al. *Malassezin, A Novel Analyst of the Aryl Hydrocarbon Receptor From The Yeast Malassezia furfur, Induces Apoptosis in Phmary Human Melanocytes.* *ChemBioChem* 2005;6:860-5.

[0519] Lee, et al. *Comparison of Gene Expression Profiles Between Keratinocytes, Melanocytes and Fibroblasts.* *Ann Dermatol.* 2013;25(1):35-45.

[0520] Manning, et al. *Maintenance of SkinXenografts of Widely Divergent Phylogenetic Origin on Congenitally Athymic (Nude) Mice.* *J Exp Med* 1973;138:488-94.

[0521] Nazzaro-Porro, et al. *Identification of Tyrosinase Inhibitors in Cultures of Pityrosporum.* *The Journal of lnyestigative Dermatology* 1978;71:205-208.

[0522] 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.

[0523] Otułakowski, 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.

[0524] 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).

[0525] 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.

[0526] Reed, et al. *Long-Term Maintenance of Normal Human Skin on Congenitally*

- Athymic (Nude) Mice. Proc Soc Exp Biol Med 1973;143:350-3.
- [0527] Scott, et al. The Permeability of Grafted Human Transplant Skin in Athymic Mice. J Pharm Pharmacol 1988;40:128-9.
- [0528] Song, et al. A Ligand For The Aryl Hydrocarbon Receptor Isolated From Lung. PNAS 2002;99 (23) :14694-9.
- [0529] 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.
- [0530] Wang, et al. Stress-Induced RNASET2 Overexpression Mediates Melanocyte Apoptosis Via The TRAF2 Pathway In Vitro. Cell Death and Disease 2014;5:e1022
- [0531] Wasmeier, et al. Melanosomes At A Glance. Journal of Cell Science 2008; 121:3995-3999.
- [0532] 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.
- [0533] Whyte, et al. Ethoxyresorufin-0-deethylase (EROD) Activity in Fish As A Biomarker of Chemical Exposure. Critical Reviews in Toxicology 2000;30 (4) :347-570.
- [0534] Yamaguchi, et al. Melanocytes and Their Diseases. Cold Spring Harb Perspect Med 2014;4:a017046.
- [0535] 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.
- [0536] 本申请中引用的所有文献均以引用的方式并入本文,如同在本文中完整叙述一样。
- [0537] 虽然本文已描述了本发明的说明性实施方案,但是应理解,本发明不限于所描述的那些,并且本领域技术人员可以在不脱离本发明的范围或精神的情况下进行各种其他改变或修改。

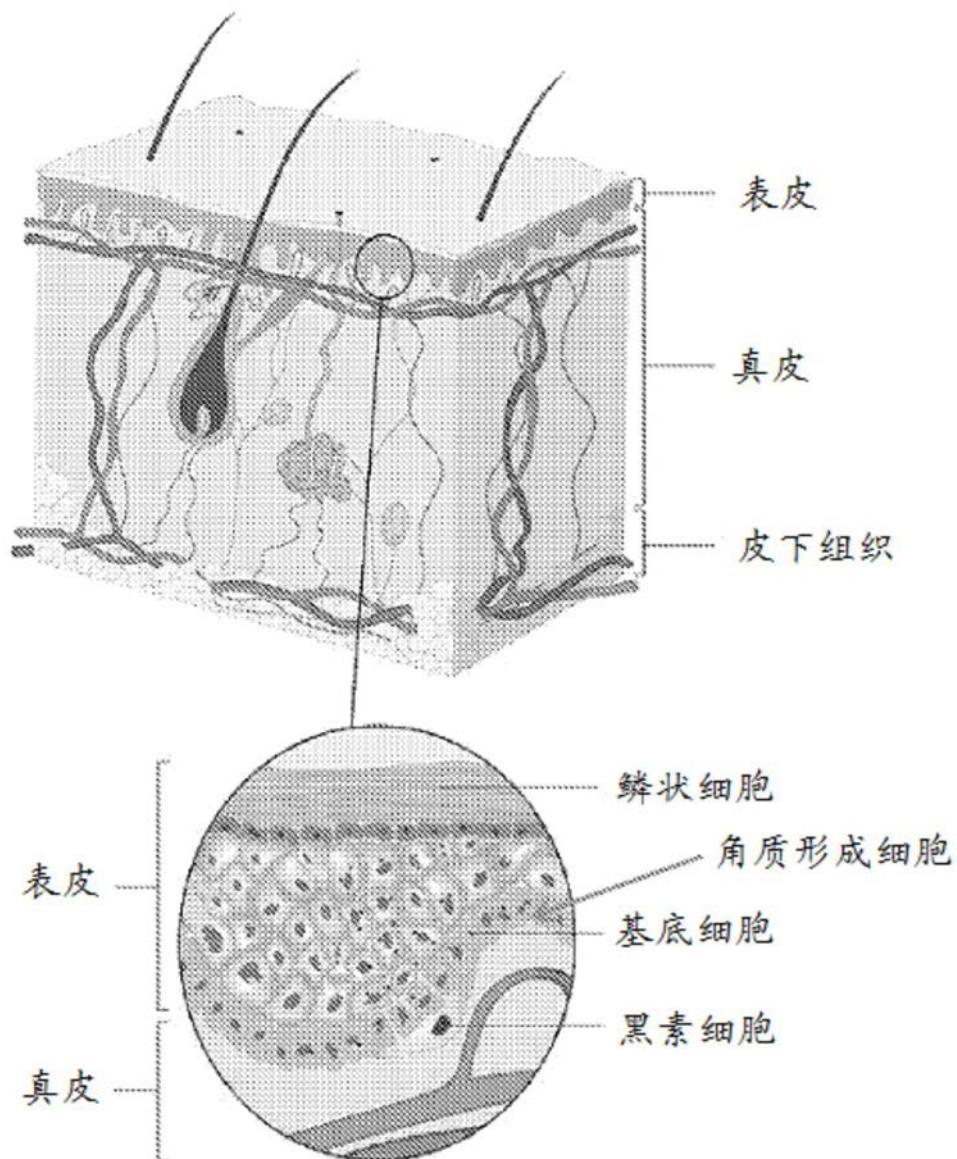
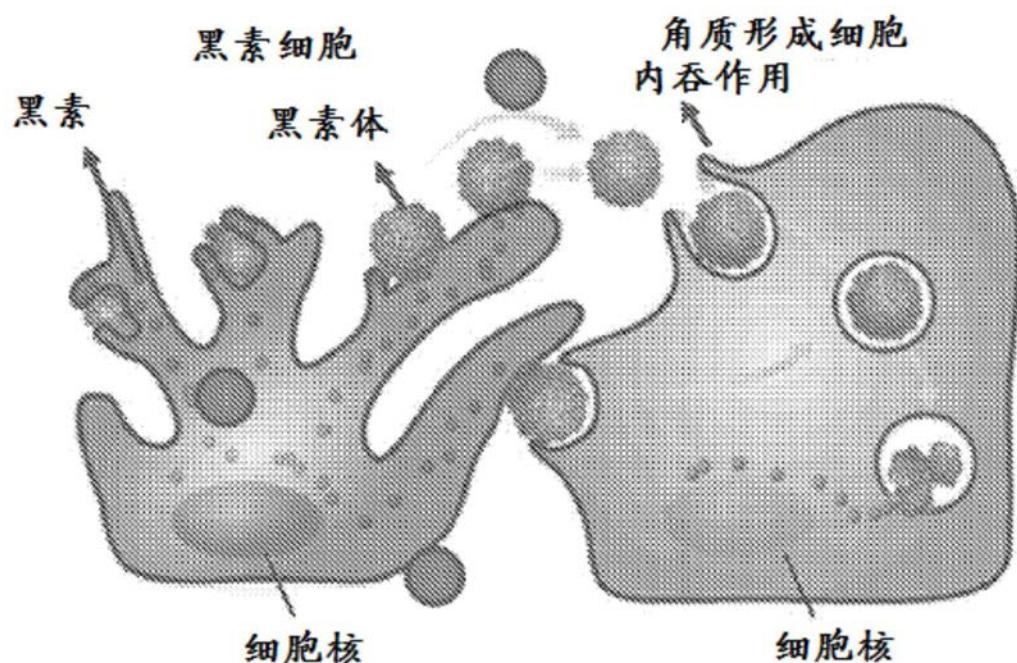


图1A



1... 对黑素合成的抑制-酪氨酸酶抑制

2... 对黑素至角质形成细胞转运的抑制

3... 黑素细胞的凋亡

图1B

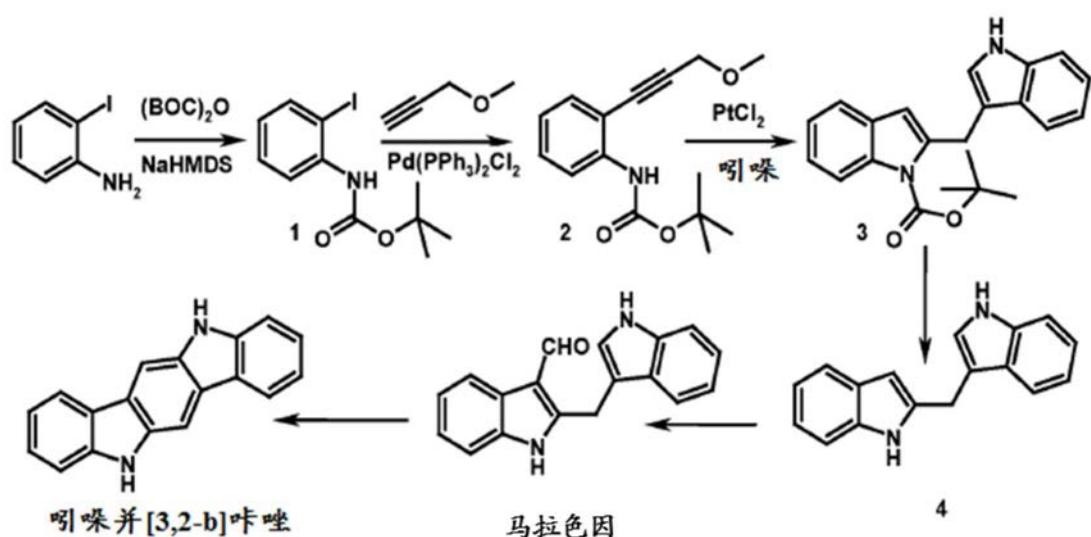


图2A

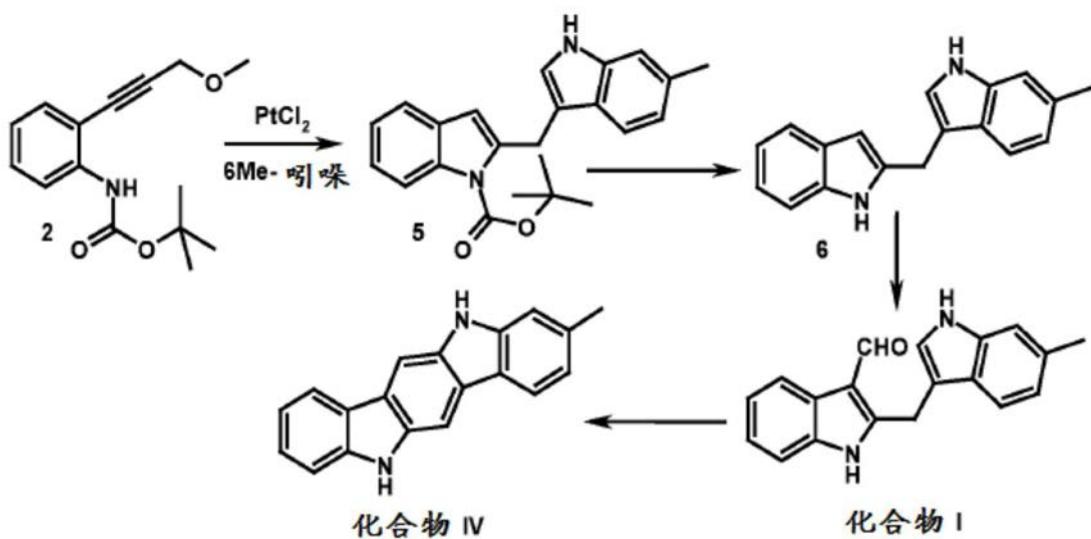


图2B

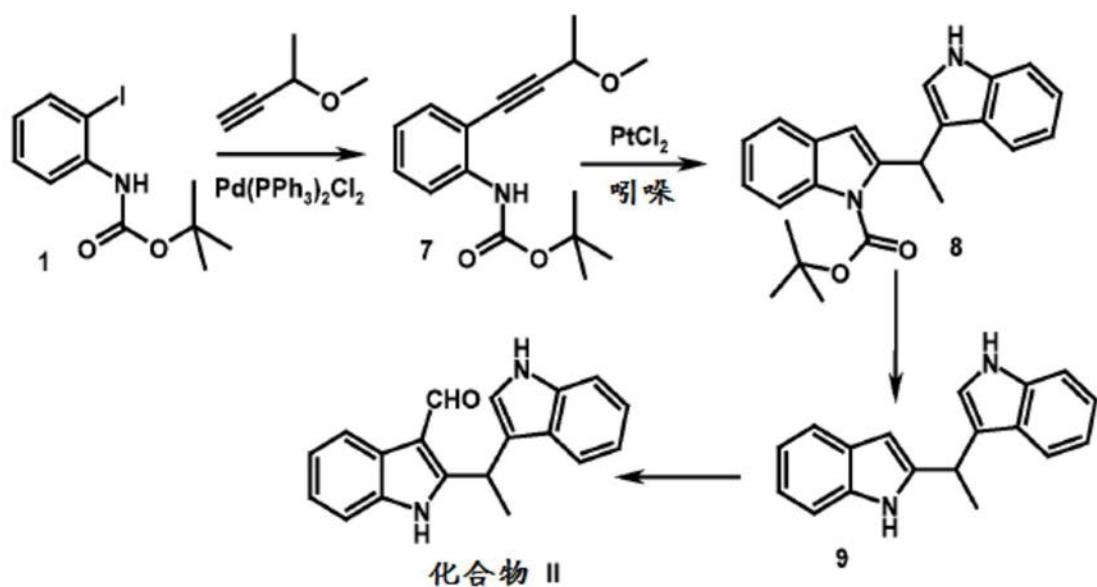
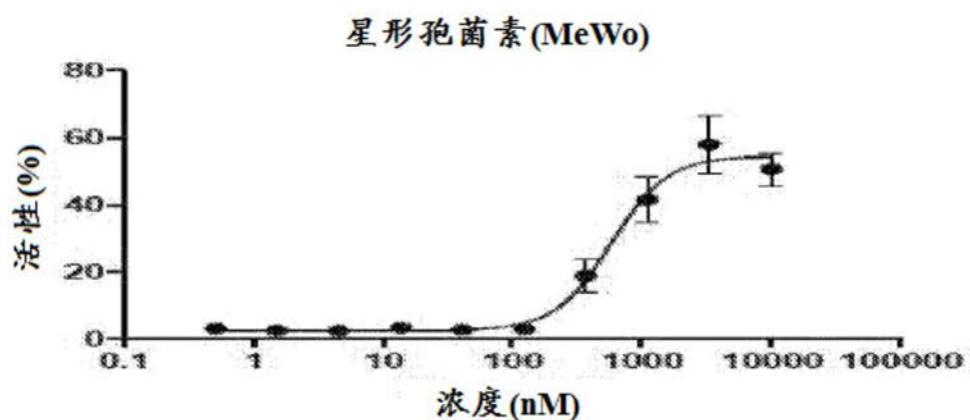


图2C

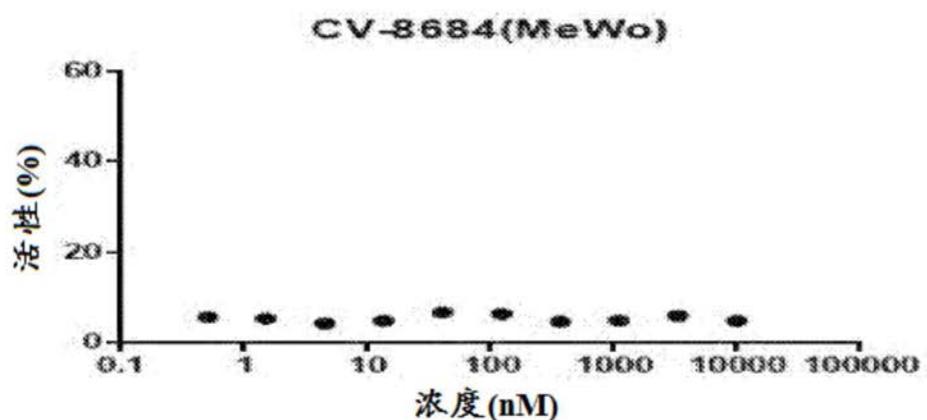
化合物ID	MeWo上的EC50 [nM]	WM115上的EC50 [nM]
星形孢菌素	580.28	801.66
CV-8684	>10000	>10000
CV-8685	>10000	>10000
CV-8686	>10000	>10000
CV-8687	>10000	>10000
CV-8688	908.57	>10000

图3A

B



C



D

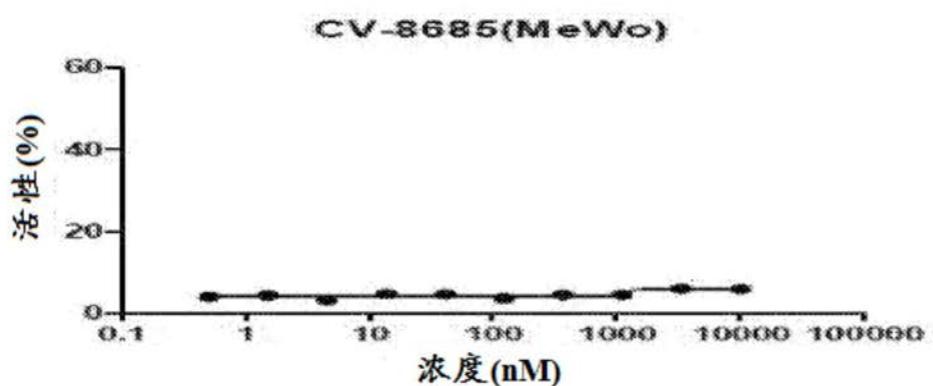
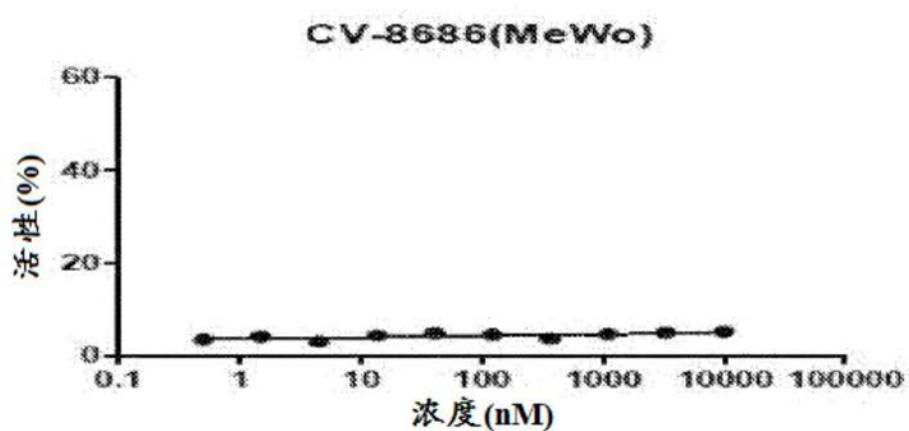
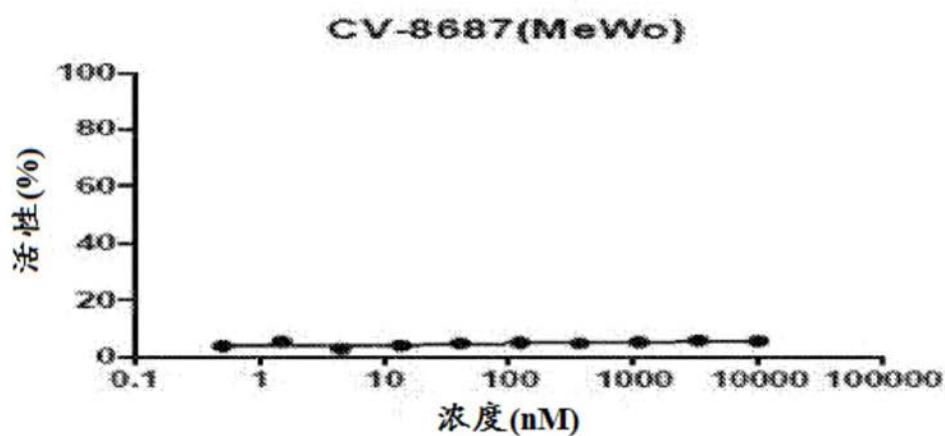


图3B-3D

E



F



G

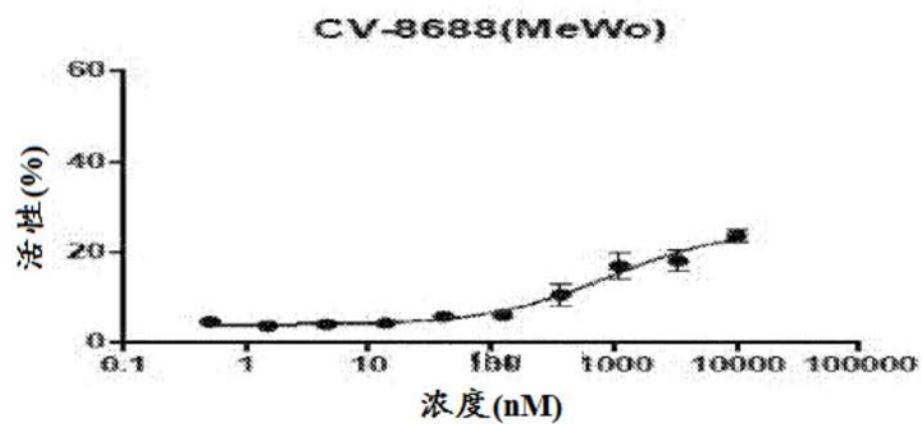
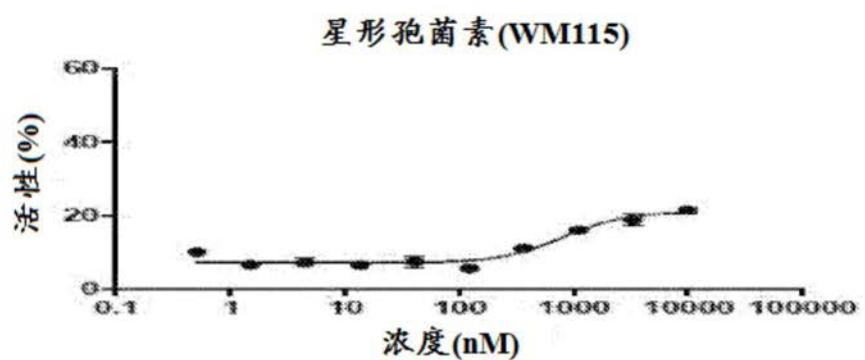
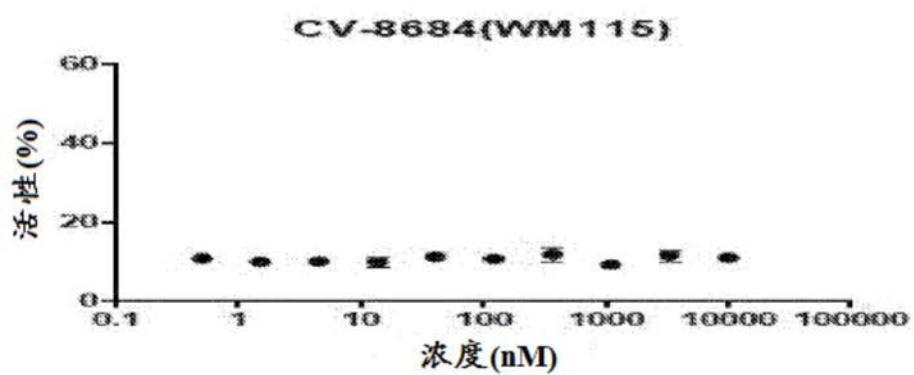


图3E-3G

H



I



J

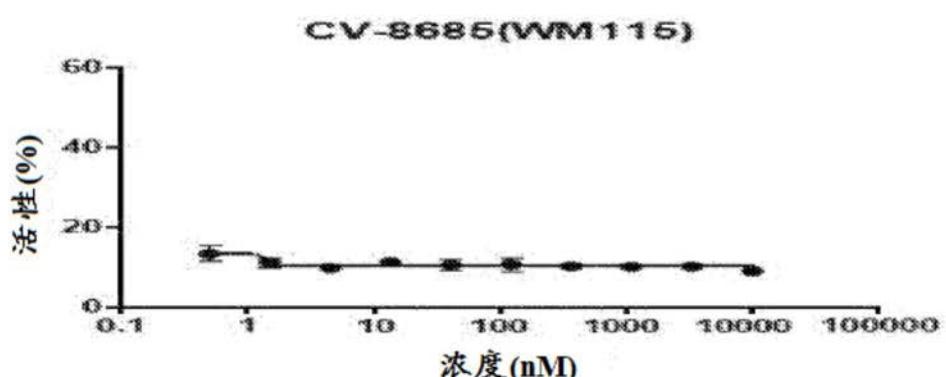
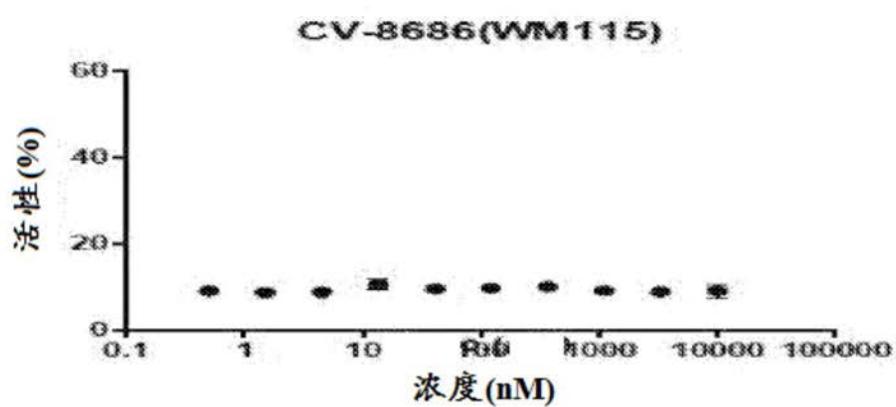
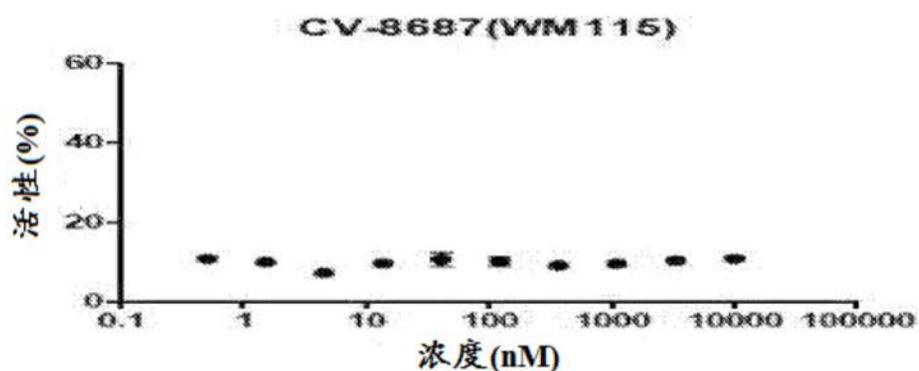


图3H-3J

K



L



M

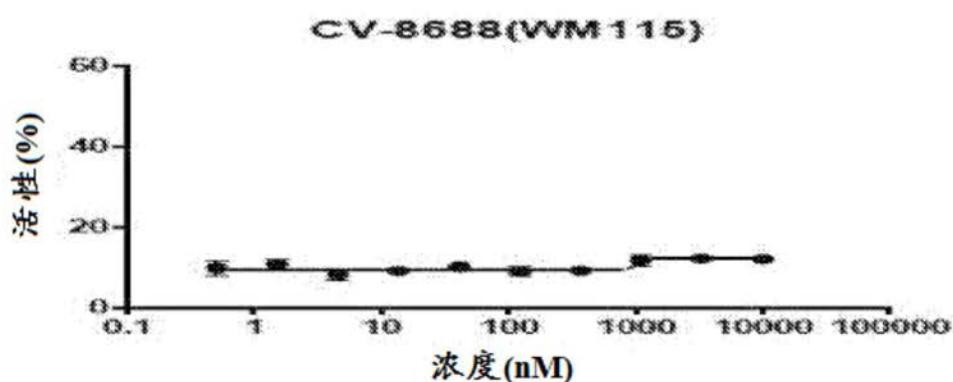


图3K-3M

测定时间	MeWo 膜联蛋白V 剂量	CV-8684				WM115 膜联蛋白V 剂量	CV-8684			
		相对膜联蛋白V水平 (%)		平均值	STD		相对膜联蛋白V水平 (%)		平均值	STD
6 小时	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 小时	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 小时	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
	1	74.55	54.55	64.55	14.14	1	74.09	67.43	70.76	4.71
72 小时	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

图4A

测定时间	MeWo 膜联蛋白V 剂量	CV-8685				WM115 膜联蛋白V 剂量	CV-8685			
		相对膜联蛋白V水平 (%)		平均值	STD		相对膜联蛋白V水平 (%)		平均值	STD
6 小时	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 小时	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	26.13	1	118.95	105.95	112.45	9.19
48 小时	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	54.94	90.32	50.03
	1	92.73	81.82	87.27	7.71	1	74.92	69.93	72.42	3.53
72 小时	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

图4B

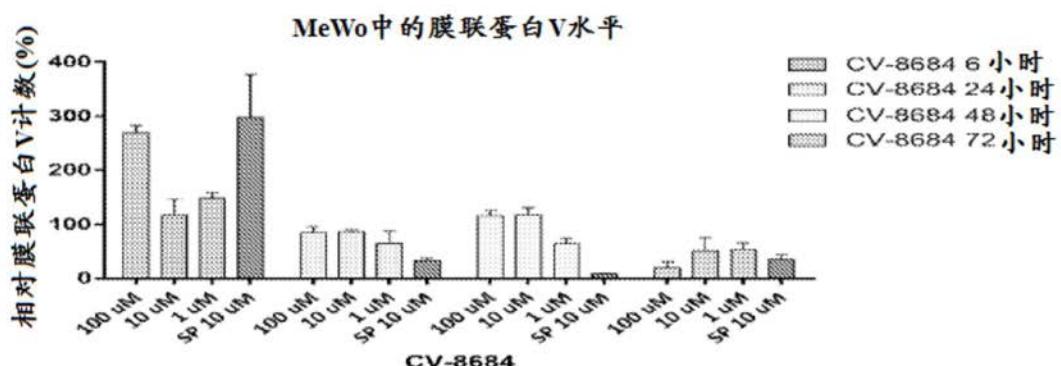
测定时间	MeWo 膜联蛋白V 剂量	CV-8688				WM115 膜联蛋白V 剂量	CV-8688			
		相对膜联蛋白V水平 (%)		平均值	STD		相对膜联蛋白V水平 (%)		平均值	STD
6 小时	100	123.53	145.59	134.56	15.60	100	180.67	194.05	187.36	9.46
	10	136.76	88.24	112.50	34.32	10	122.68	198.51	160.59	53.62
	1	92.65	70.59	81.62	15.60	1	89.22	140.52	114.87	36.28
24 小时	100	36.95	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 小时	100	85.45	69.09	77.27	11.57	100	14.15	7.49	10.82	4.71
	10	94.55	130.91	112.73	25.71	10	89.07	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 小时	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

图4C

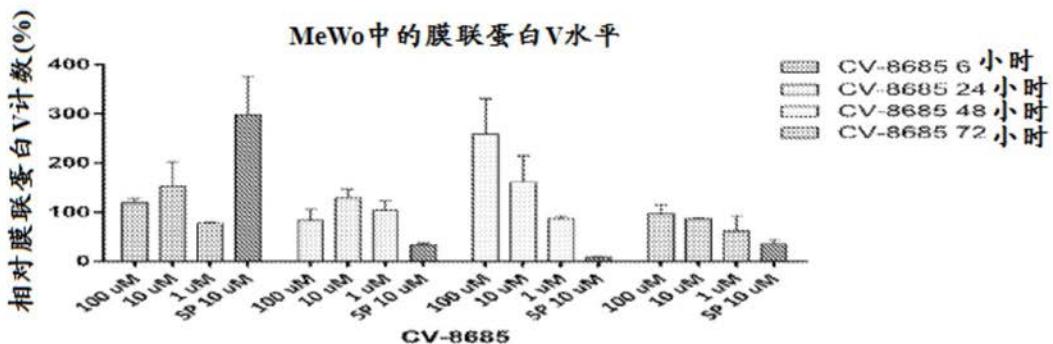
测定时间	MeWo 膜联蛋白V 剂量	星形孢菌素				WM115 膜联蛋白V 剂量	星形孢菌素			
		相对膜联蛋白V水平 (%)		平均值	STD		相对膜联蛋白V水平 (%)		平均值	STD
n=1	n=2						n=1	n=2		
6 小时	10	377.03	218.92	297.97	111.80	10	124.91	129.37	127.14	3.15
24 小时	10	29.03	37.83	33.43	6.22	10	5.77	17.90	11.84	8.57
48 小时	10	9.09	7.27	8.13	1.29	10	7.49	6.66	7.08	0.59
72 小时	10	44.20	26.52	35.36	12.50	10	3.32	1.24	2.28	1.47

图4D

E



F



G

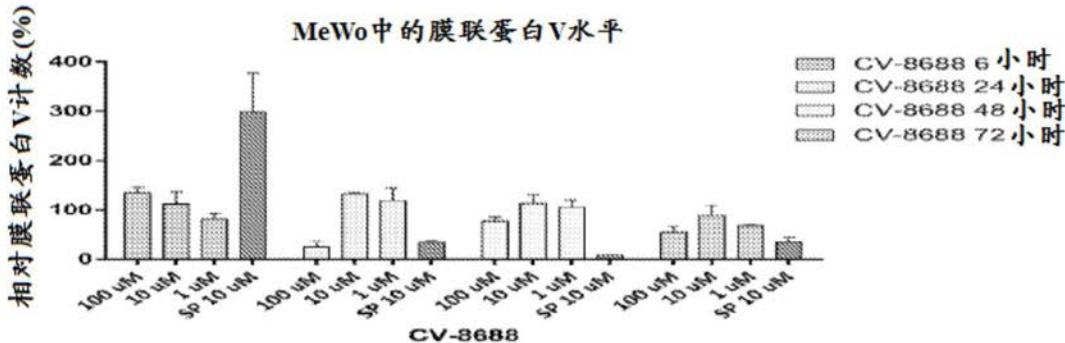
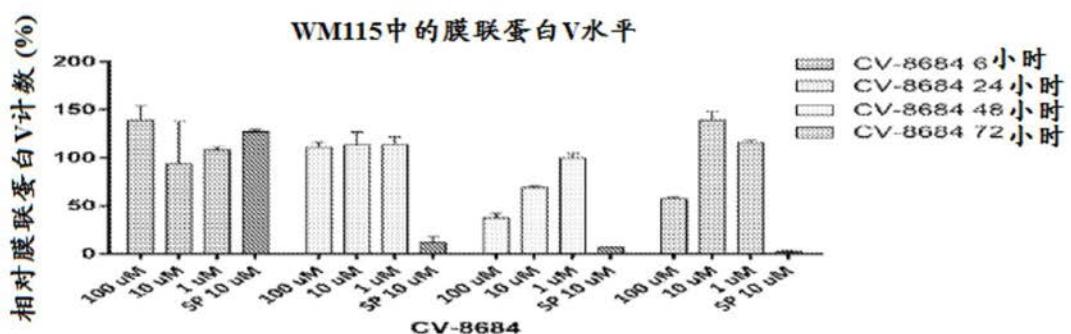
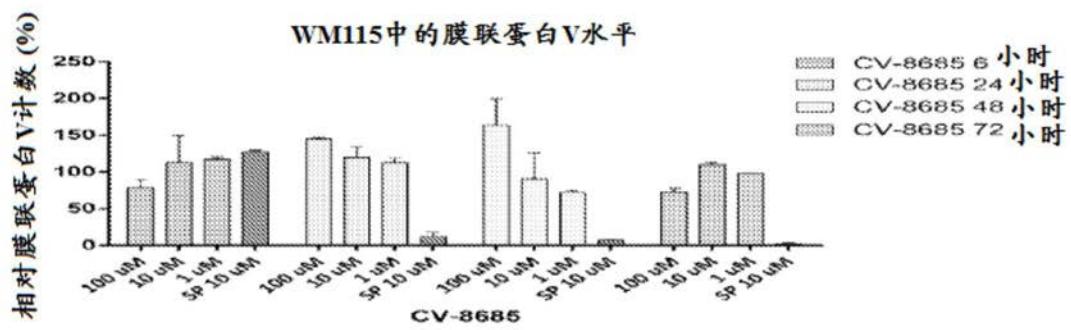


图4E-4G

H



I



J

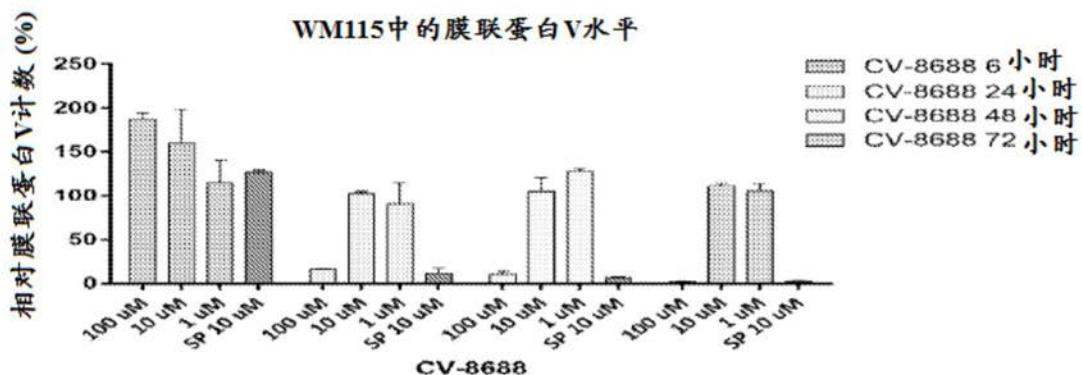


图4H-4J

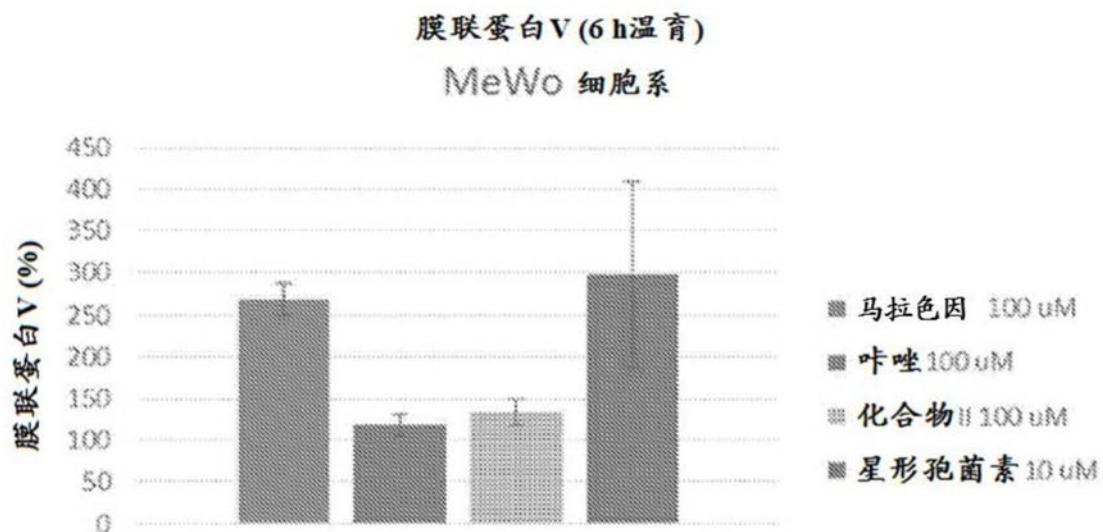


图4K

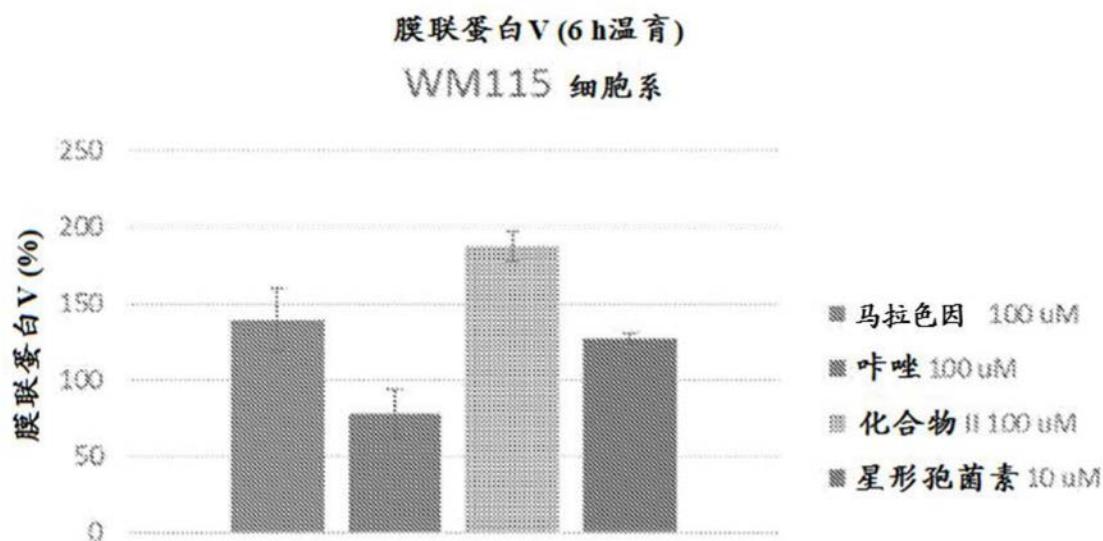


图4L

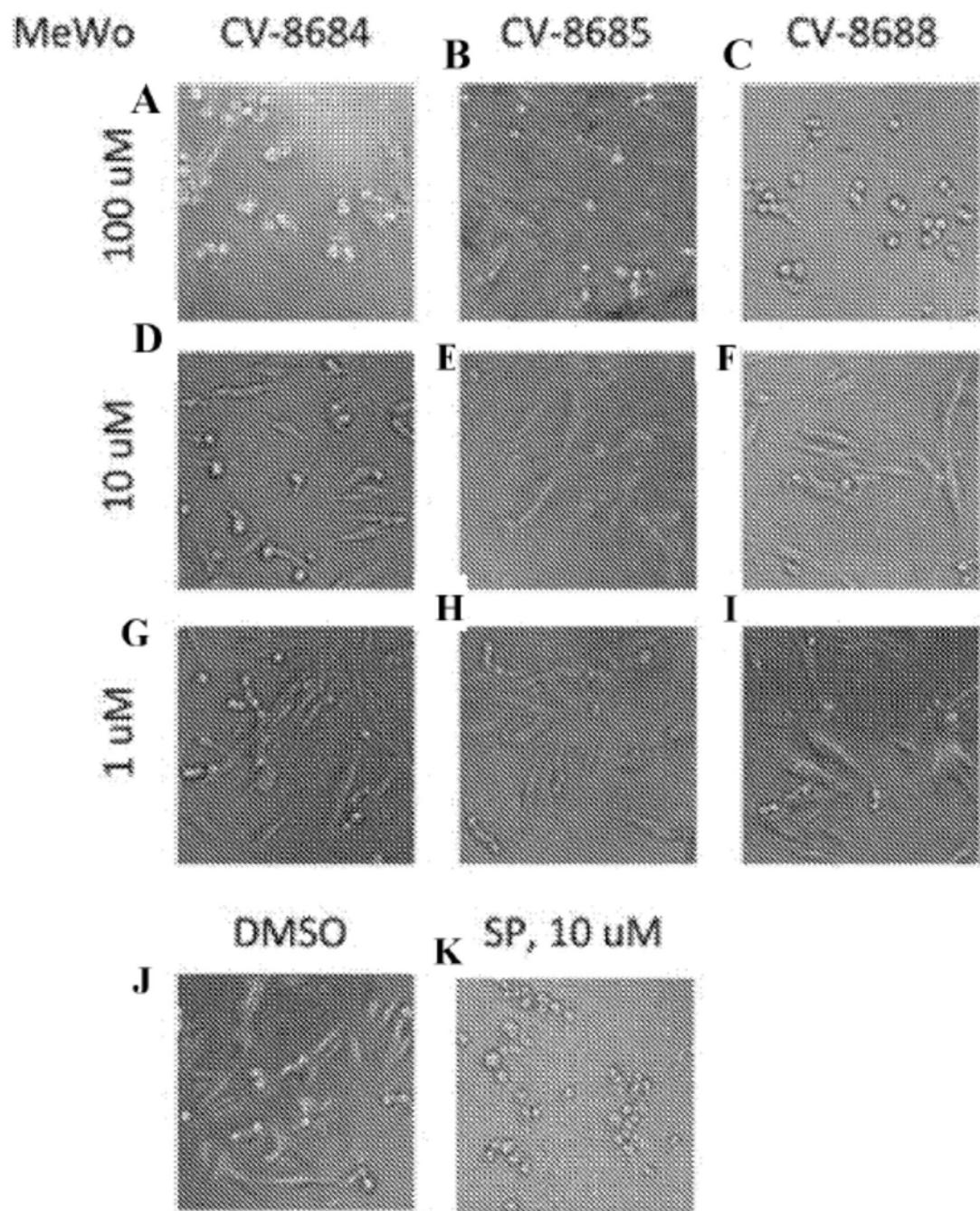


图5A-5K

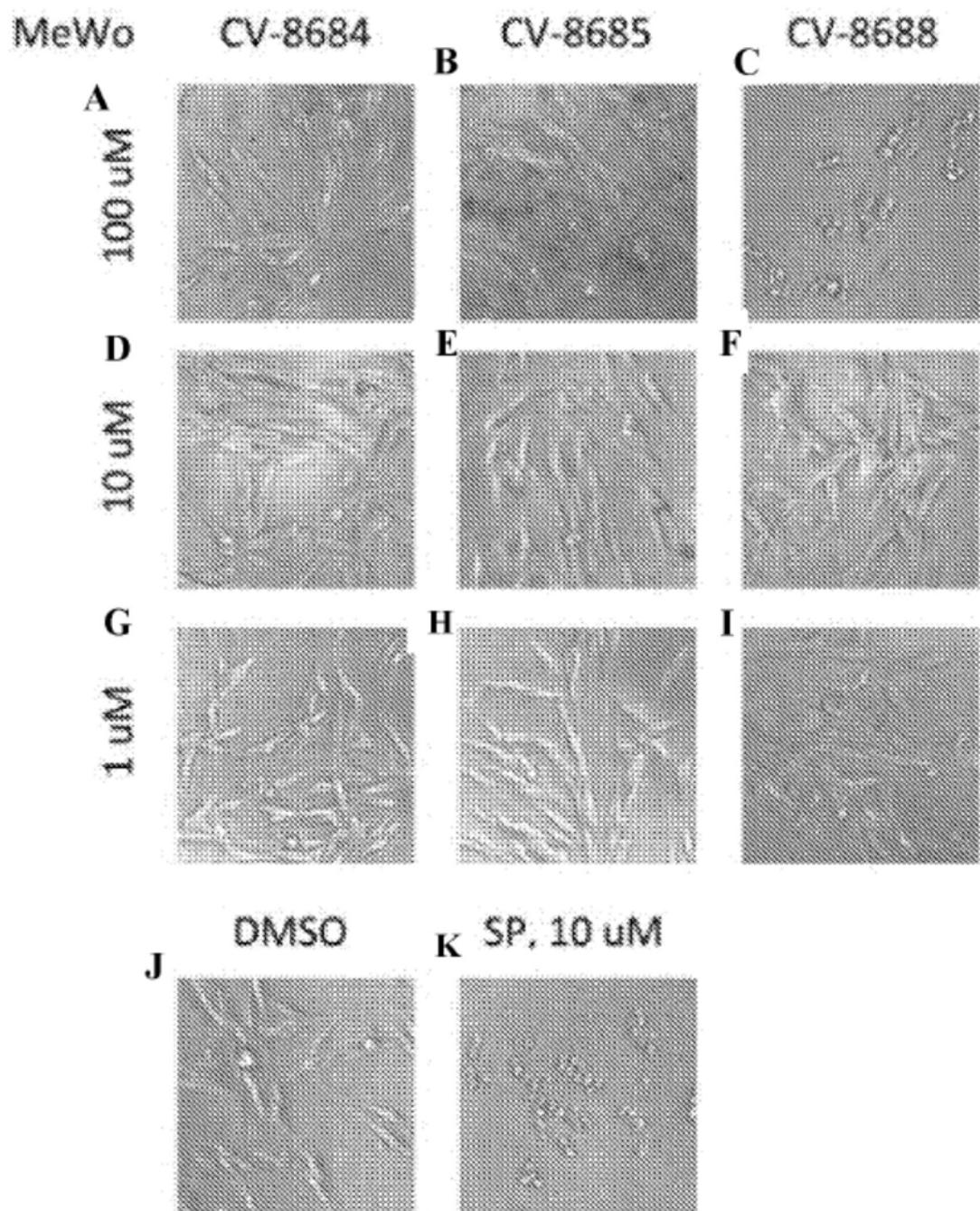


图6A-6K

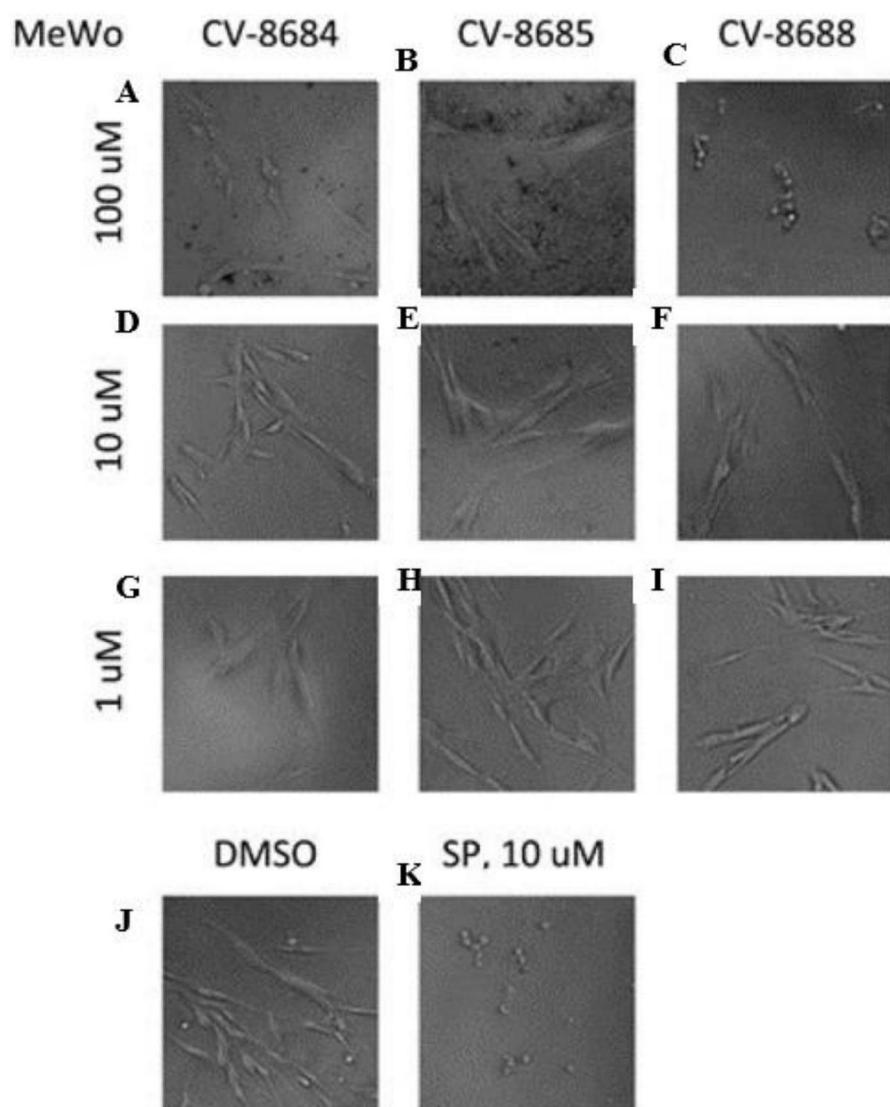


图7A-7K

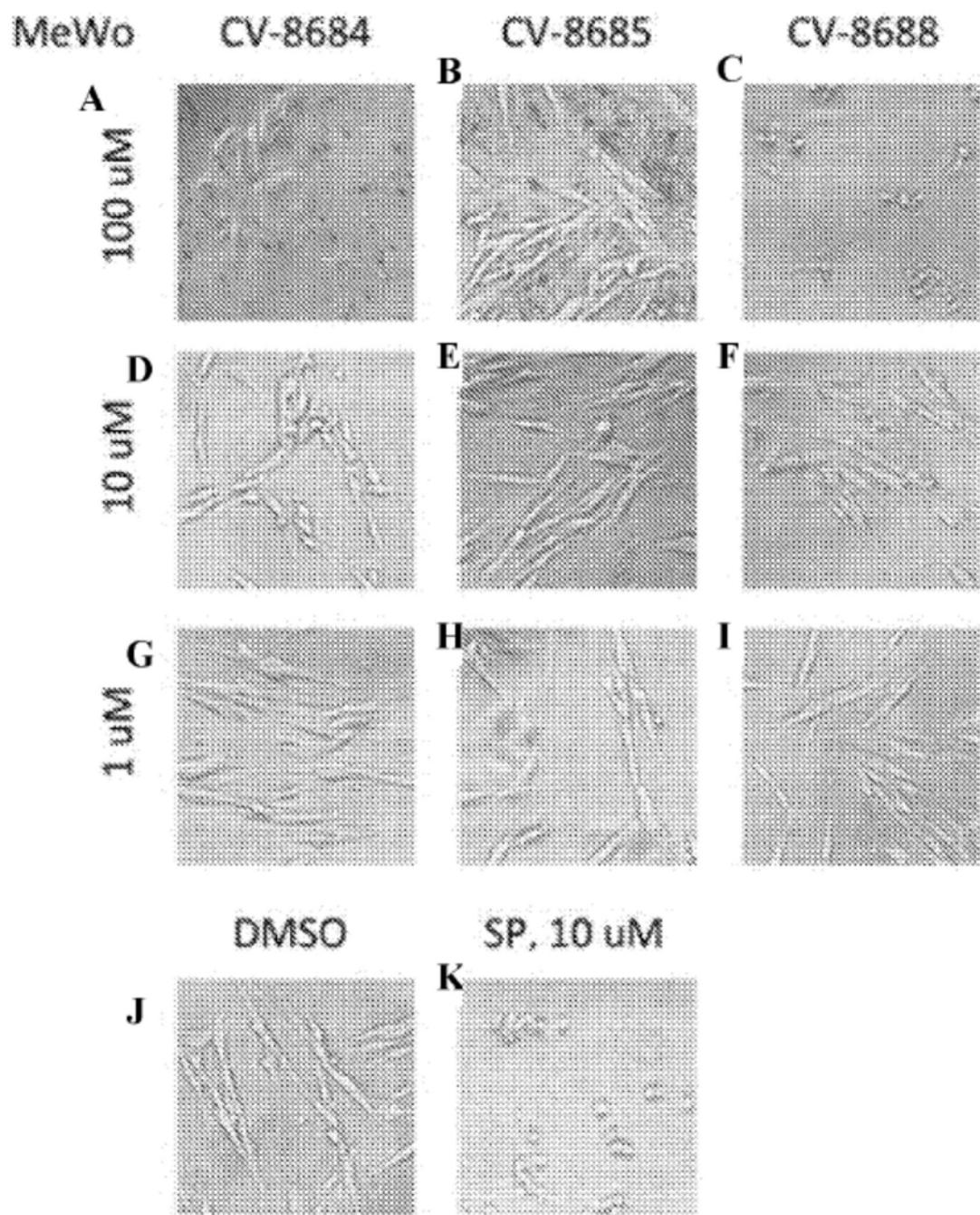


图8A-8K

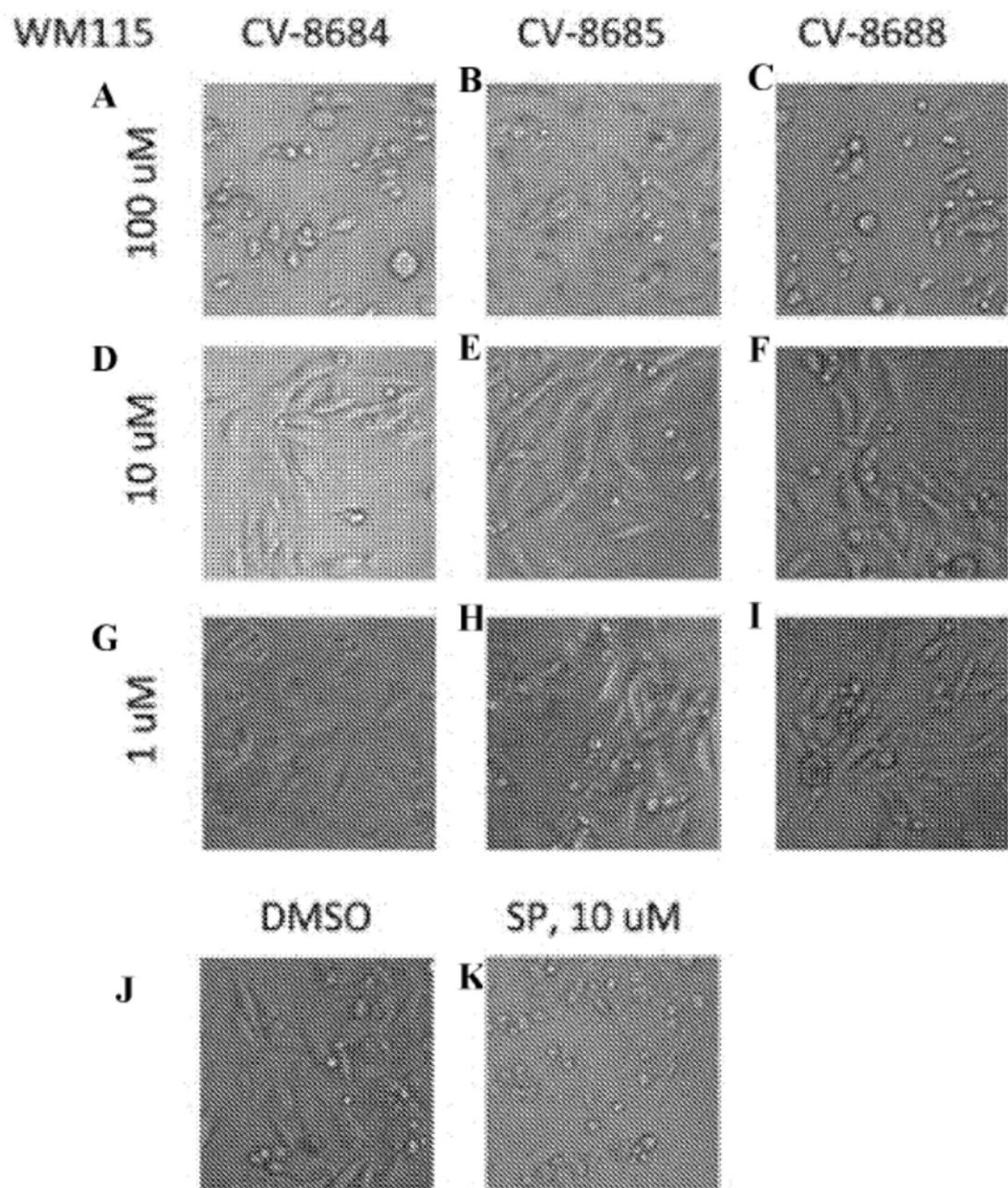


图9A-9K

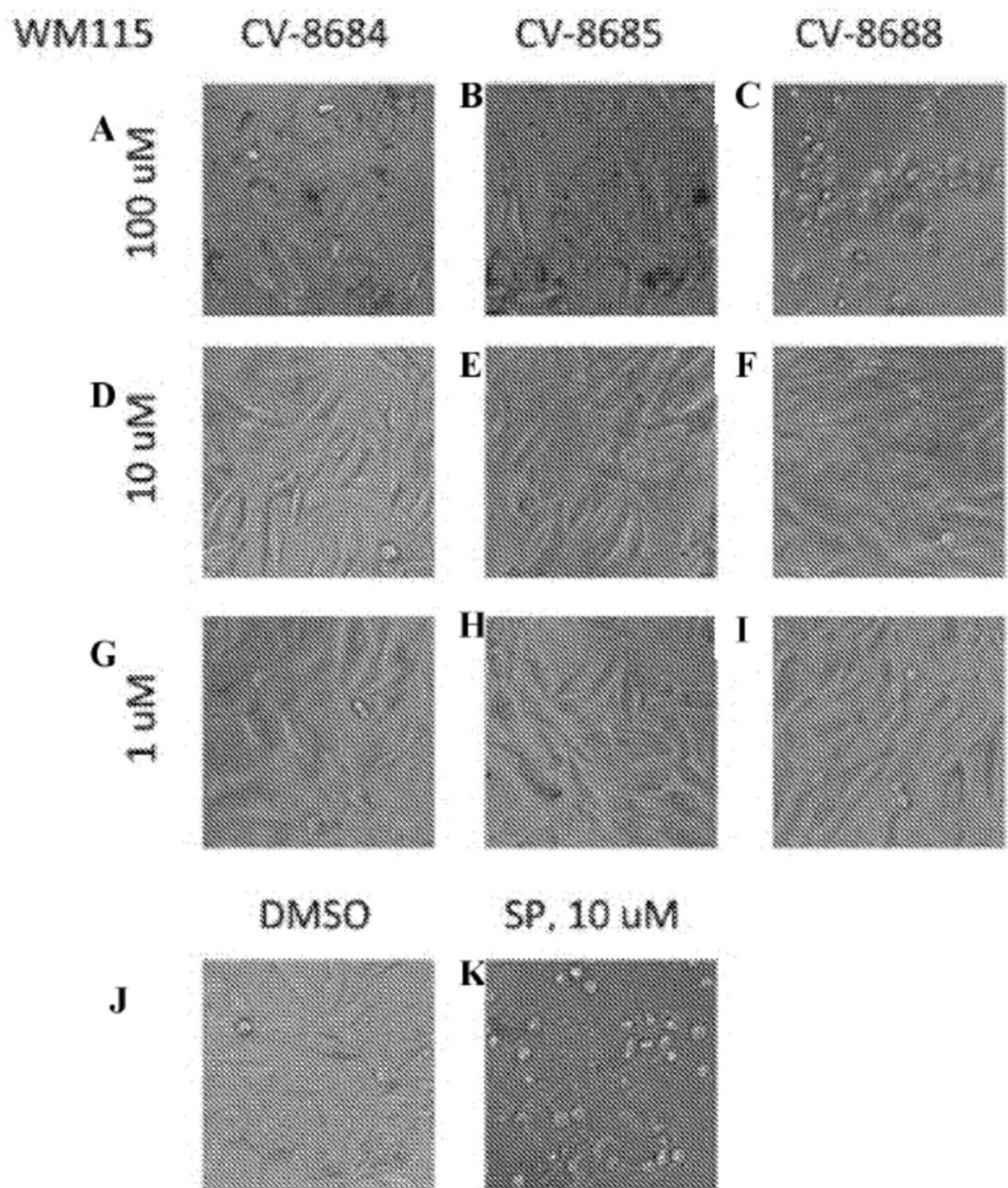


图10A-10K

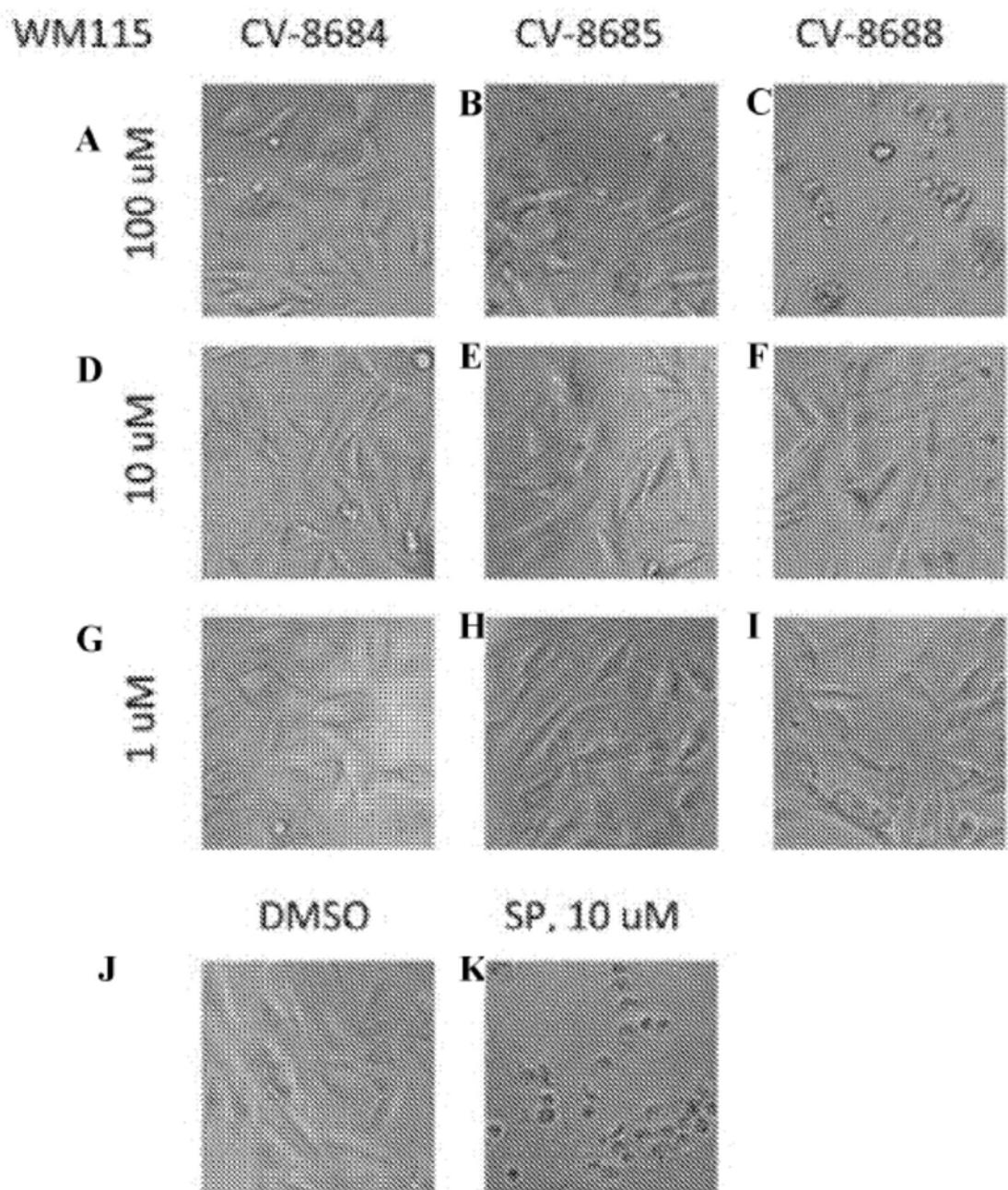


图11A-11K

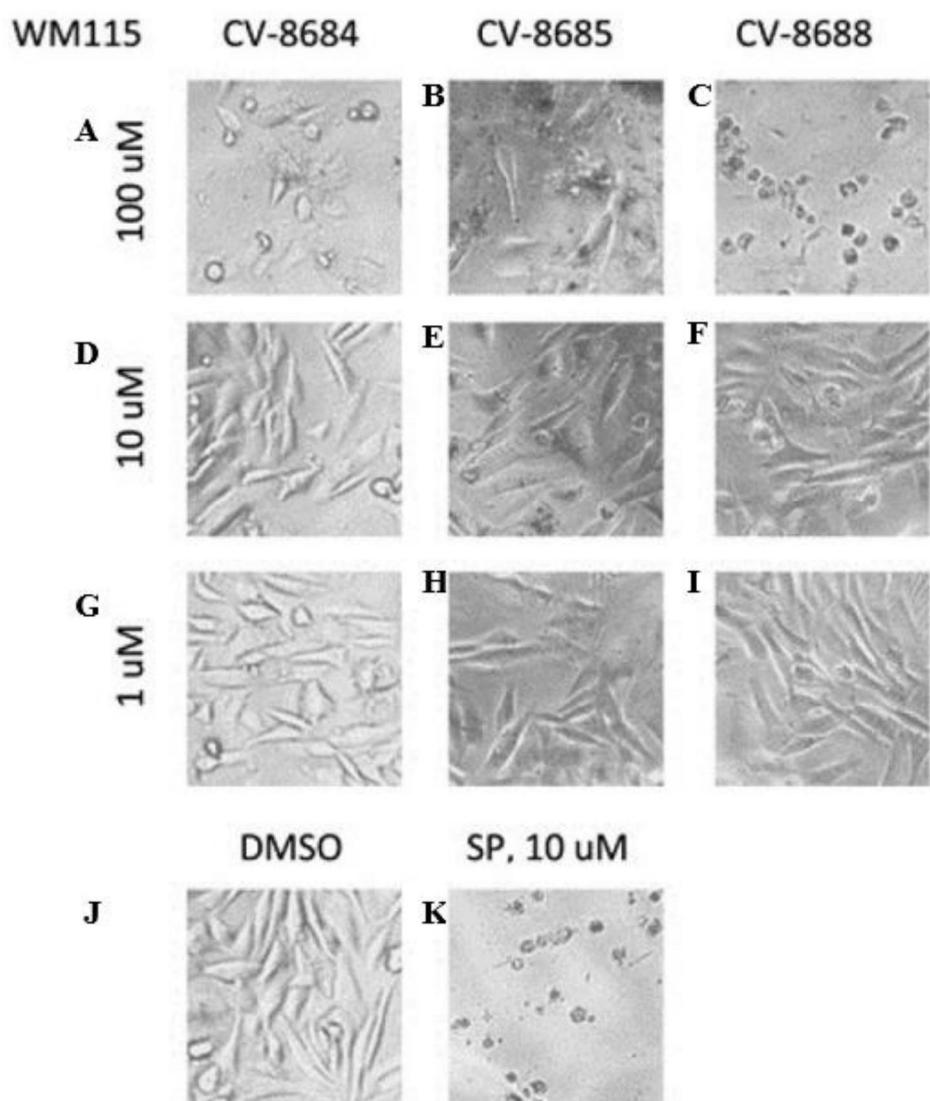


图12A-12K

测定 时间	MeWo CTG 剂量	CV-8684 剩余细胞活力(%)				WM115 CTG 剂量	CV-8684 剩余细胞活力(%)			
		n=1	n=2	平均值	STD		n=1	n=2	平均值	STD
6 小时	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 小时	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 小时	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 小时	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

图13A

测定 时间	MeWo CTG 剂量	CV-8685 剩余细胞活力(%)				WM115 CTG 剂量	CV-8685 剩余细胞活力(%)			
		n=1	n=2	平均值	STD		n=1	n=2	平均值	STD
6 小时	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 小时	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
48 小时	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 小时	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

图13B

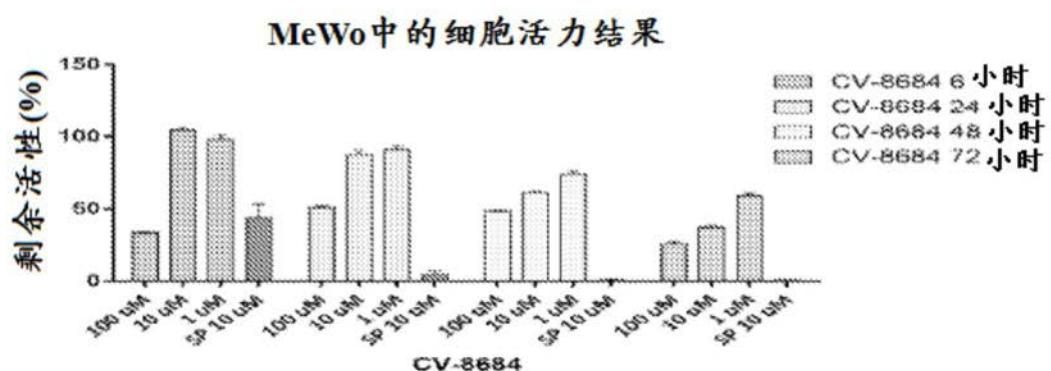
测定 时间	MeWo CTG 剂量	CV-8688 剩余细胞活力(%)				WM115 CTG 剂量	CV-8688 剩余细胞活力(%)			
		n=1	n=2	平均值	STD		n=1	n=2	平均值	STD
6小时	100	3.33	2.70	3.02	0.45	100	63.25	42.41	52.83	14.74
	10	108.32	93.82	101.07	10.25	10	96.78	95.51	96.15	0.90
	1	101.76	94.50	98.13	5.13	1	97.87	99.50	98.69	1.15
24小时	100	9.91	8.85	9.38	0.74	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小时	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小时	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

图13C

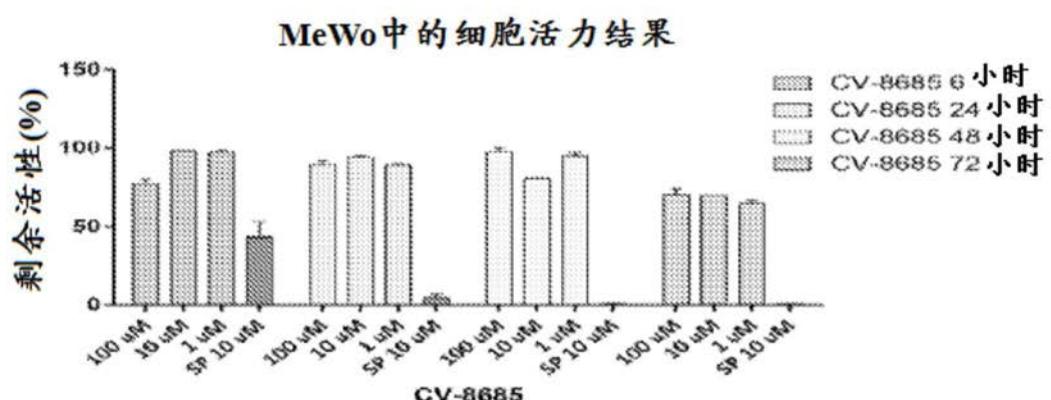
测定 时间	MeWo CTG 剂量	星形孢菌素 剩余细胞活力(%)				WM115 CTG 剂量	星形孢菌素 剩余细胞活力(%)			
		n=1	n=2	平均值	STD		n=1	n=2	平均值	STD
6小时	10	33.39	53.30	43.34	14.08	10	55.46	51.29	53.38	2.95
24小时	10	6.94	2.53	4.73	3.11	10	1.29	1.16	1.23	0.09
48小时	10	0.84	0.61	0.73	0.16	10	0.54	0.55	0.55	0.00
72小时	10	0.62	0.63	0.63	0.01	10	2.65	2.78	2.71	0.09

图13D

E



F



G

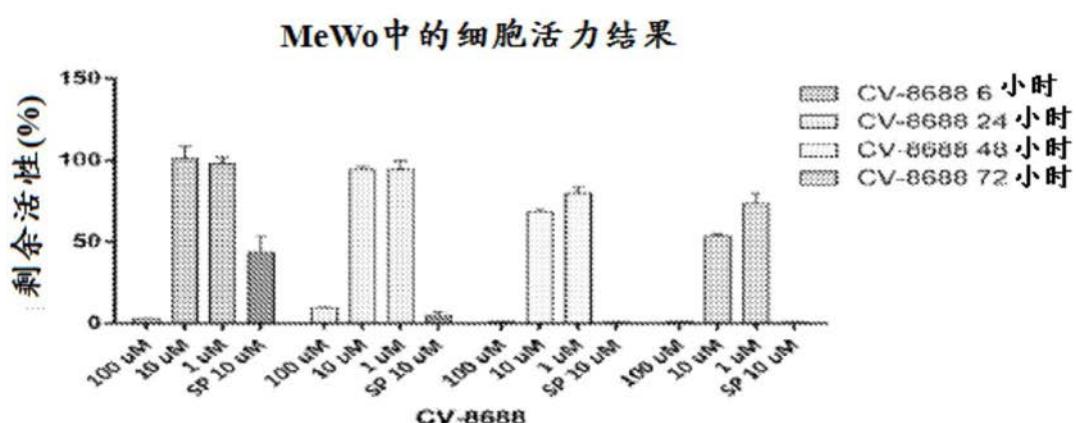
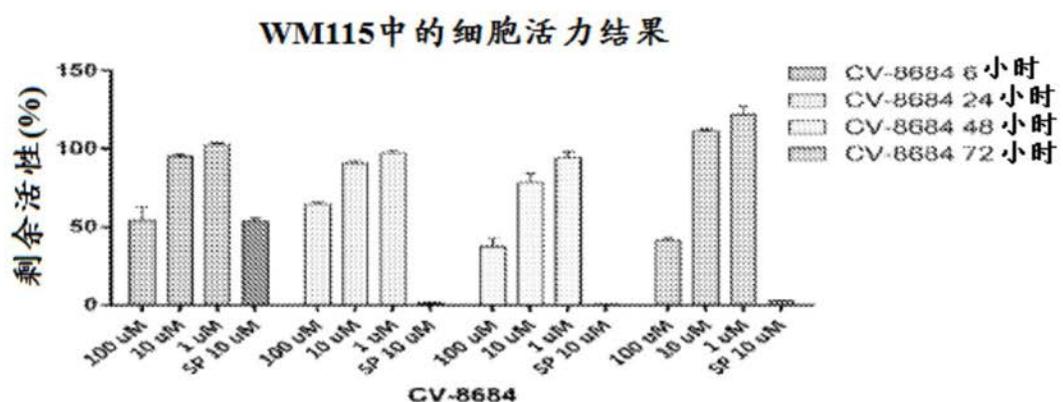
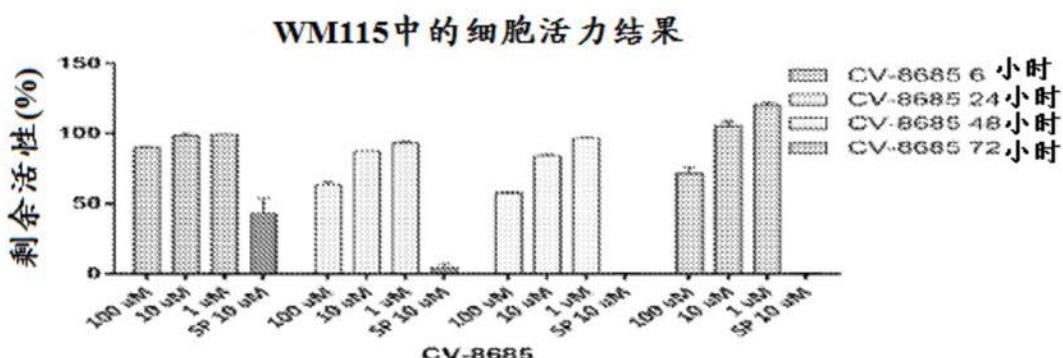


图13E-13G

H



I



J

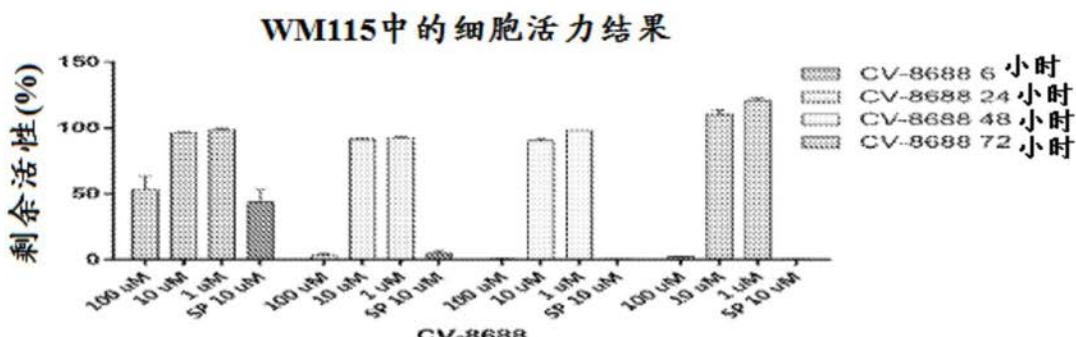


图13H-13J

化合物	细胞活力(存活细胞%)					
	MeWo 细胞系			WM115 细胞系		
	24h	48h	72h	24h	48h	72h
马拉色因 (100 uM)	51%	49%	25%	64%	37%	41%
吲哚并咔唑 (100 uM)	90%	97%	70%	64%	57%	72%
化合物II (100 uM)	9%	1%	1%	3%	1%	2%
星形孢菌素 (10 uM) PC	5%	1%	1%	1%	1%	3%

图13K

测定时间	MeWo LDH 剂量	CV-8684 LDH水平(%)				WM115 LDH 剂量	CV-8684 LDH水平(%)			
		n=1	n=2	平均值	STD		n=1	n=2	平均值	STD
6 小时	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		88.26	93.07	90.67	3.40
	1	100.67	93.76	97.22	4.89		95.04	88.86	91.95	4.37
24 小时	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		111.28	108.83	110.06	1.73
	1	116.42	104.79	110.61	8.22		109.44	113.59	111.52	2.94
48 小时	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		71.47	105.67	88.57	24.18
	1	114.69	112.52	113.60	1.53		87.84	108.38	98.11	14.52
72 小时	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		134.39	125.37	129.88	6.38
	1	83.42	75.05	79.24	5.91		155.11	144.29	149.70	7.65

图14A

测定时间	MeWo LDH 剂量	CV-8685 LDH水平(%)				WM115 LDH 剂量	CV-8685 LDH水平(%)			
		n=1	n=2	平均值	STD		n=1	n=2	平均值	STD
6 小时	100	94.68	89.90	92.29	3.38	100	91.36	80.17	85.76	7.91
	10	85.58	92.47	89.03	4.87		94.90	95.37	95.14	0.33
	1	92.44	92.44	92.44	0.01		87.67	95.81	91.74	5.76
24 小时	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		150.57	137.26	143.91	9.41
	1	101.78	105.21	103.49	2.43		94.63	109.59	102.11	10.58
48 小时	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		143.57	113.47	128.52	21.28
	1	114.41	112.82	113.62	1.12		86.50	105.02	95.76	13.10
72 小时	100	88.24	56.05	72.14	22.76	100	262.72	259.96	261.34	1.95
	10	72.96	72.35	72.66	0.43		175.23	171.15	173.19	2.89
	1	77.93	74.86	76.40	2.17		147.09	146.42	146.75	0.47

图14B

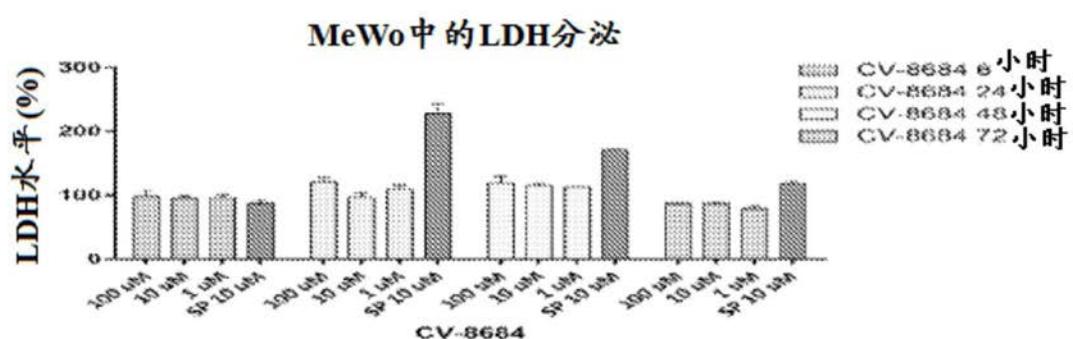
测定 时间	MeWo LDH 剂量	CV-8688 LDH水平(%)				WM115 LDH 剂量	CV-8688 LDH水平(%)			
		n=1	n=2	平均值	STD		n=1	n=2	平均值	STD
6小时	100	127.34	101.13	114.23	18.53	100	113.29	126.97	120.13	9.68
	10	89.41	84.00	86.70	3.82		95.94	90.02	92.98	4.18
	1	92.90	92.24	92.57	0.47		93.07	89.66	91.36	2.41
24小时	100	180.63	150.41	165.52	21.37	100	406.53	379.09	392.81	19.41
	10	103.64	99.45	101.55	2.96		115.00	102.91	108.96	8.55
	1	104.70	103.26	103.98	1.02		99.80	113.95	106.87	10.00
48小时	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		71.88	98.21	85.04	18.62
	1	107.03	111.80	109.42	3.37		91.02	93.94	92.43	2.07
72小时	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		108.06	111.37	109.71	2.34
	1	78.39	75.68	77.03	1.91		148.60	143.38	145.99	3.69

图14C

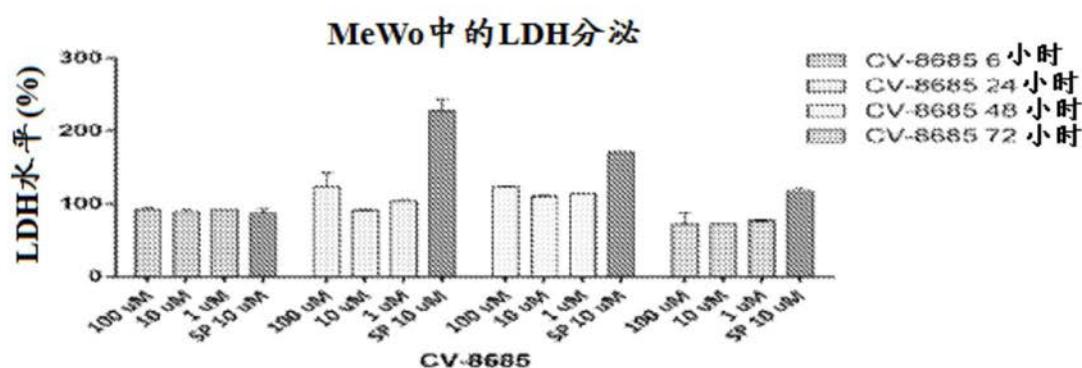
测定 时间	MeWo LDH 剂量	星形孢菌素 LDH水平(%)				WM115 LDH 剂量	星形孢菌素 LDH水平(%)			
		n=1	n=2	平均值	STD		n=1	n=2	平均值	STD
6小时	10	80.82	93.35	87.09	8.86	100	96.35	101.90	99.13	3.92
24小时	10	243.09	212.50	227.80	21.63	100	394.99	371.77	383.38	16.42
48小时	10	170.60	171.35	170.98	0.53	100	207.76	185.08	196.42	16.04
72小时	10	114.91	122.19	118.55	5.15	100	158.74	233.56	196.15	52.91

图14D

E



F



G

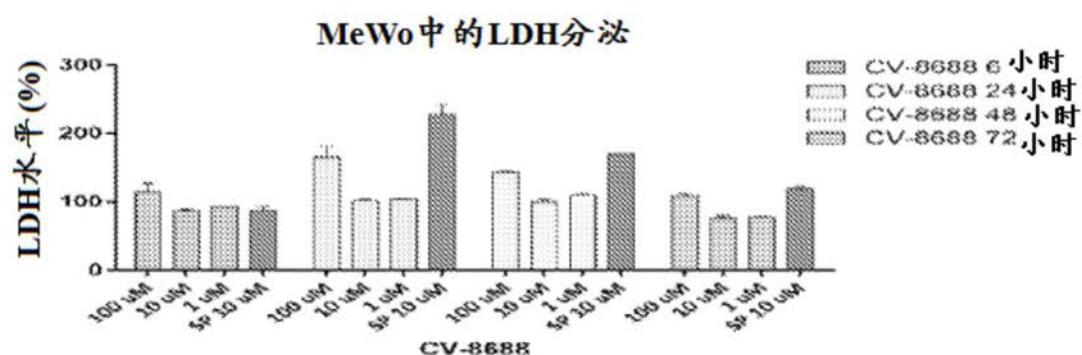
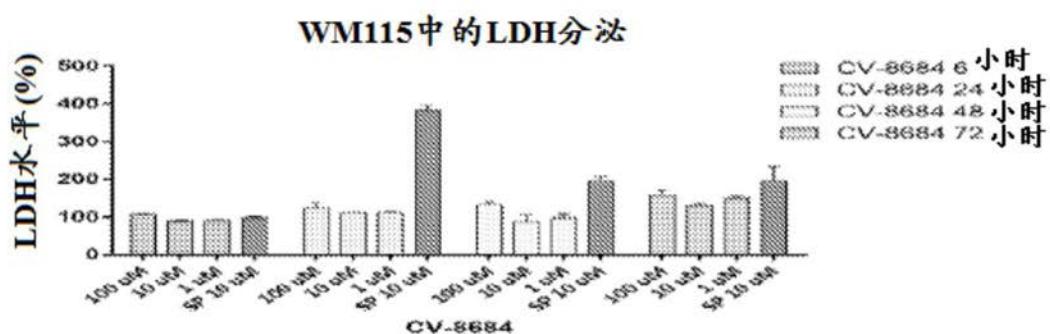
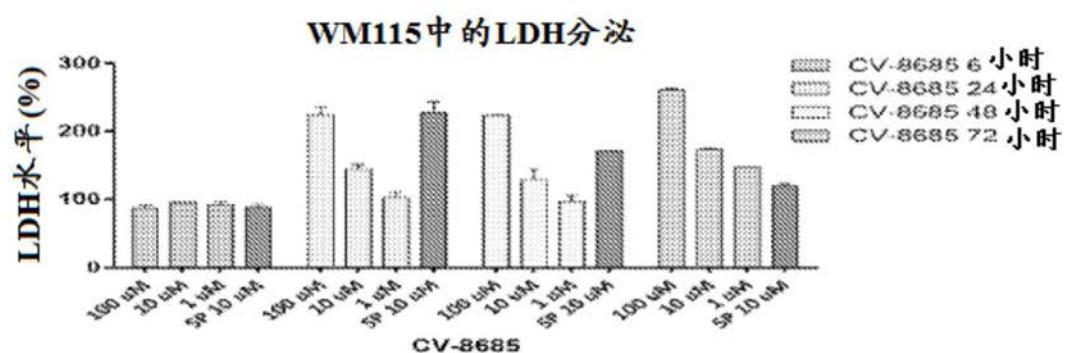


图14E-14G

H



I



J

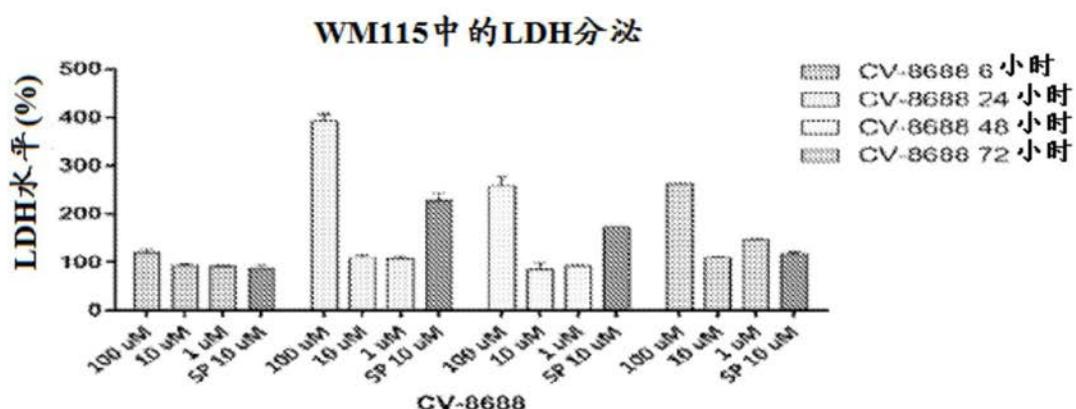


图14H-14J

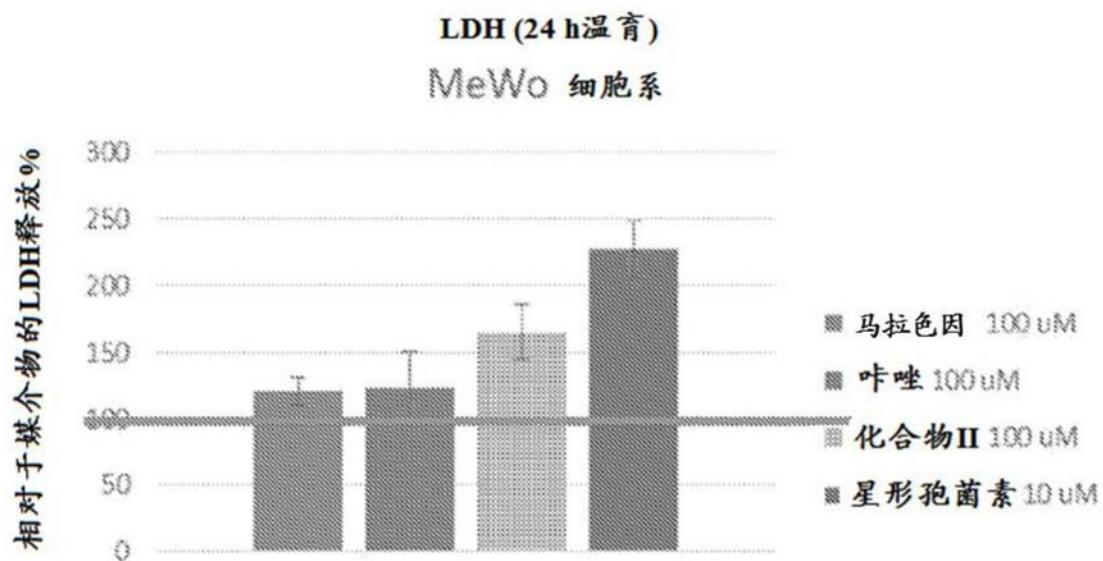


图14K

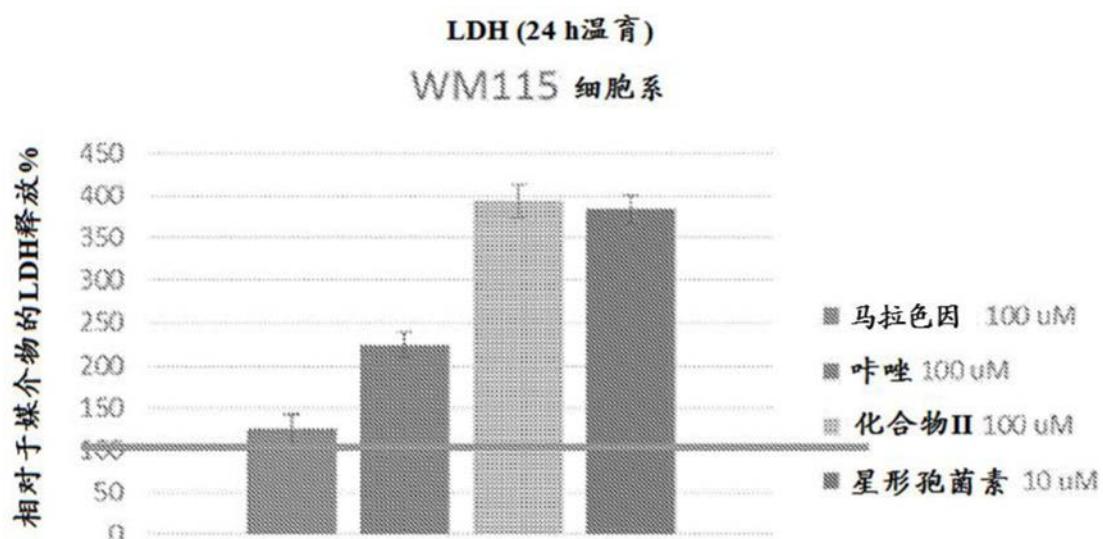


图14L

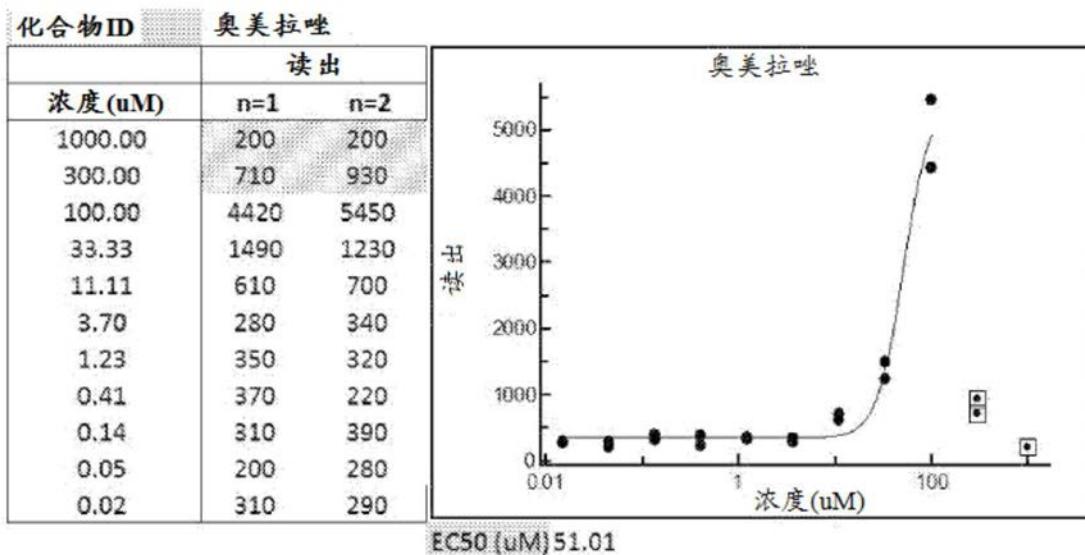


图15A

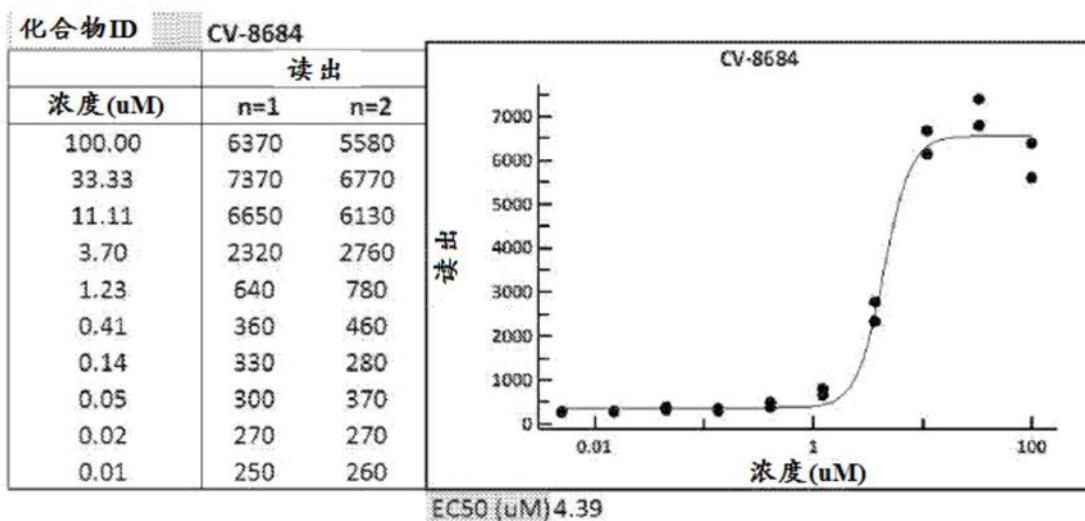


图15B

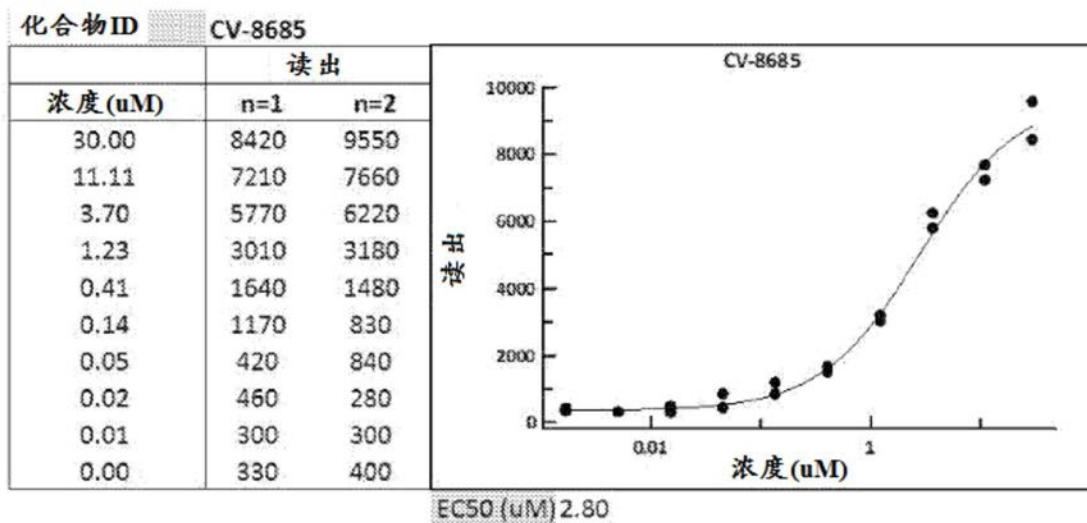


图15C

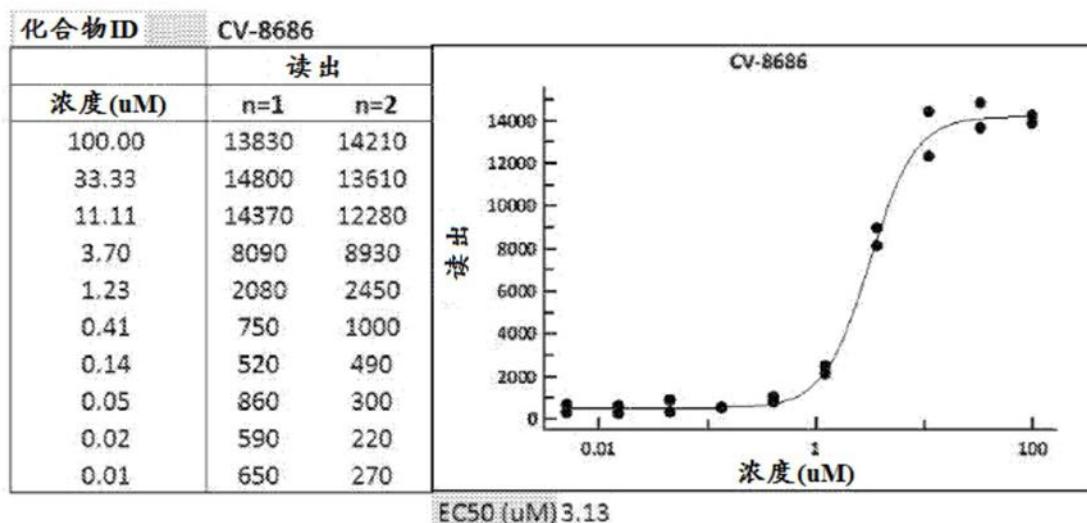


图15D

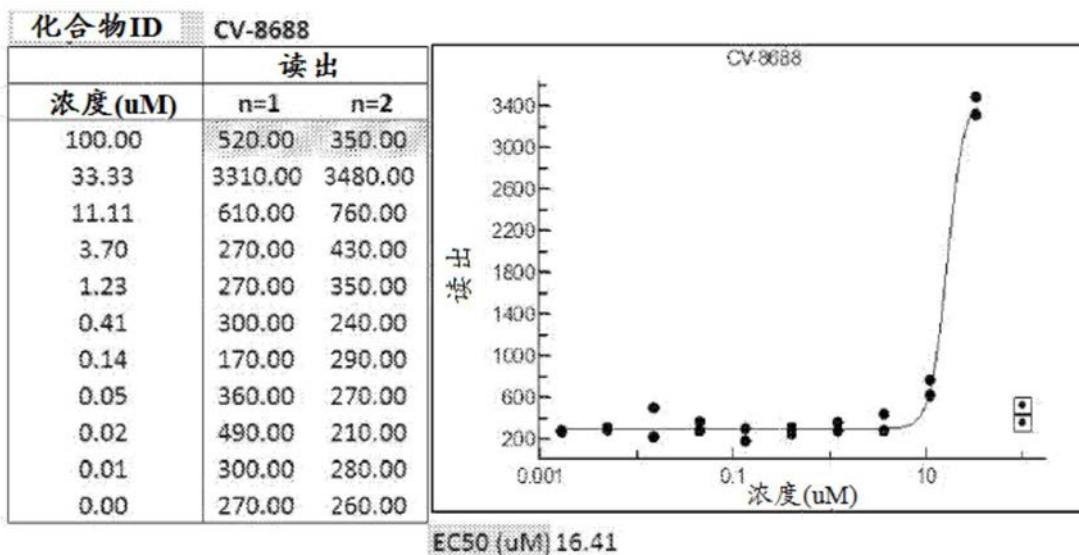


图15E

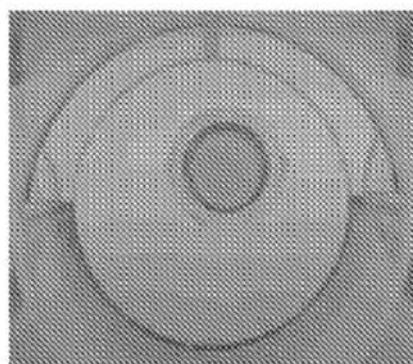
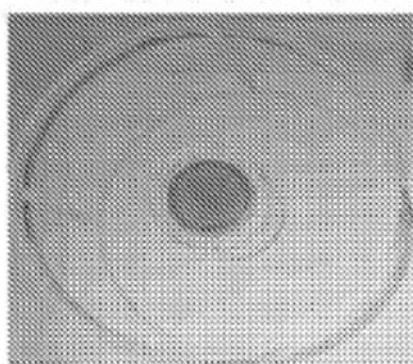
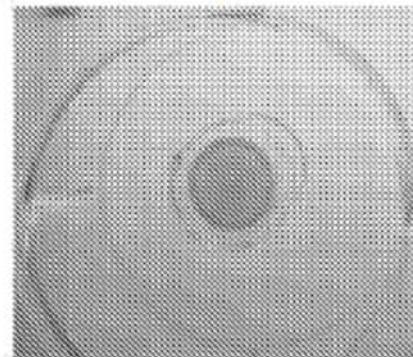
化合物代码	化合物ID	EC50(uM)
PC	奥美拉唑	51.01
化合物 01	CV-8684	4.39
化合物 02	CV-8685	2.80
化合物 03	CV-8686	3.13
化合物 04	CV-8688	16.41

图15F

对照

第0天

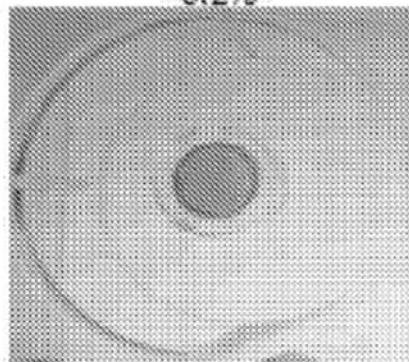
第7天

A 未处理的组织**B** 阴性对照(无菌去离子水)处理的组织**C** 阳性对照(1%曲酸)处理的组织

媒介物对照(DMSO)处理的组织

D

0.2%

**E**

0.05%

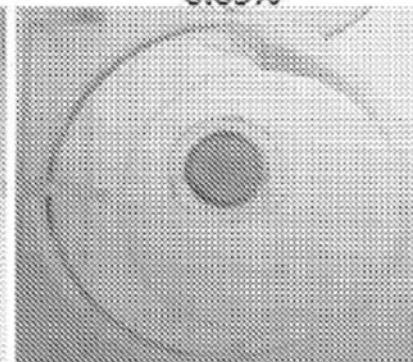


图16A-16E

测试物品处理的组织
第7天

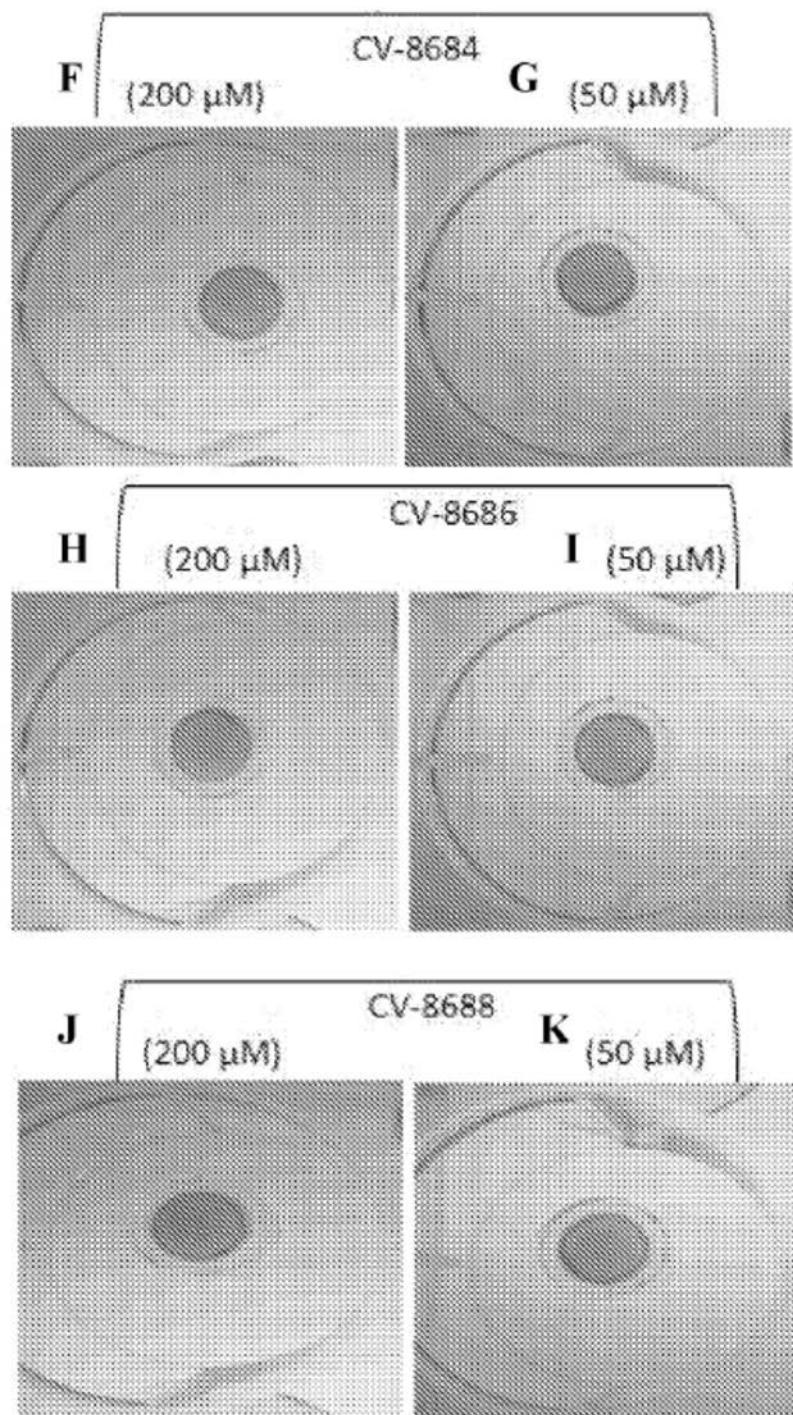


图16F-16K

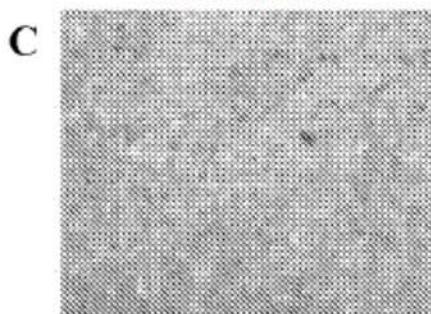
对照

第0天

A 未处理的组织



第7天

B 阴性对照(无菌去离子水)
处理的组织C 阳性对照(1%曲酸)
处理的组织

媒介物对照(DMSO)处理的组织

0.2%

0.05%

D



E



图17A-17E

测试物品处理的组织
第7天

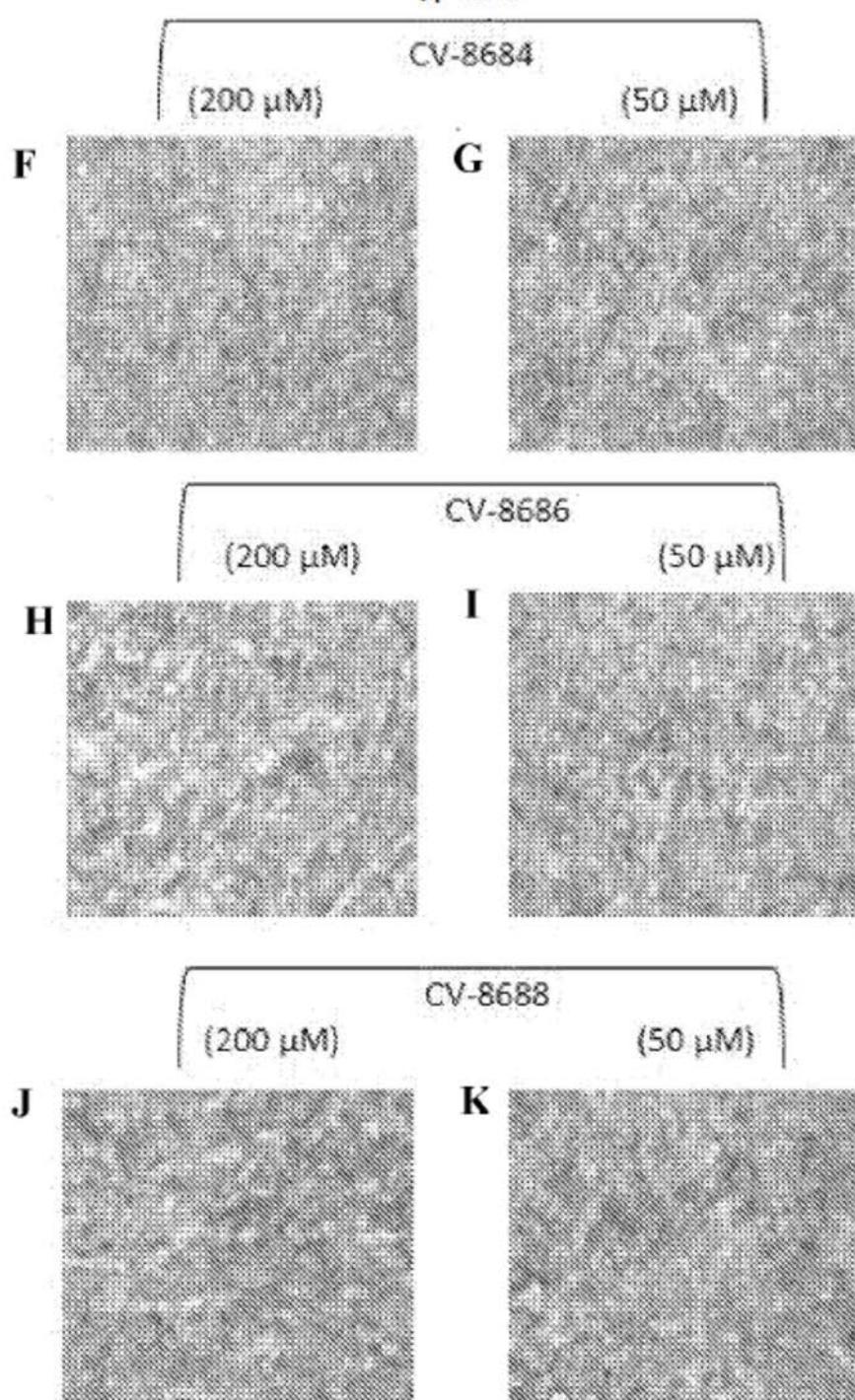


图17F-17K

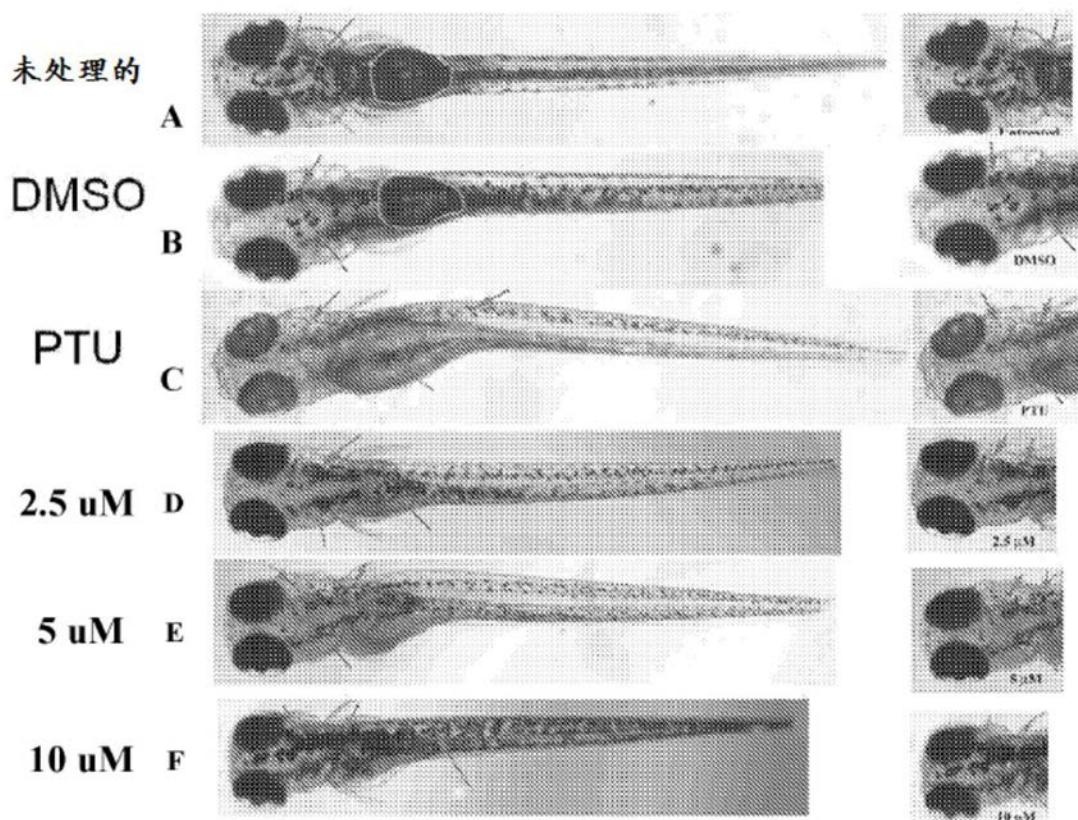


图18A-18F

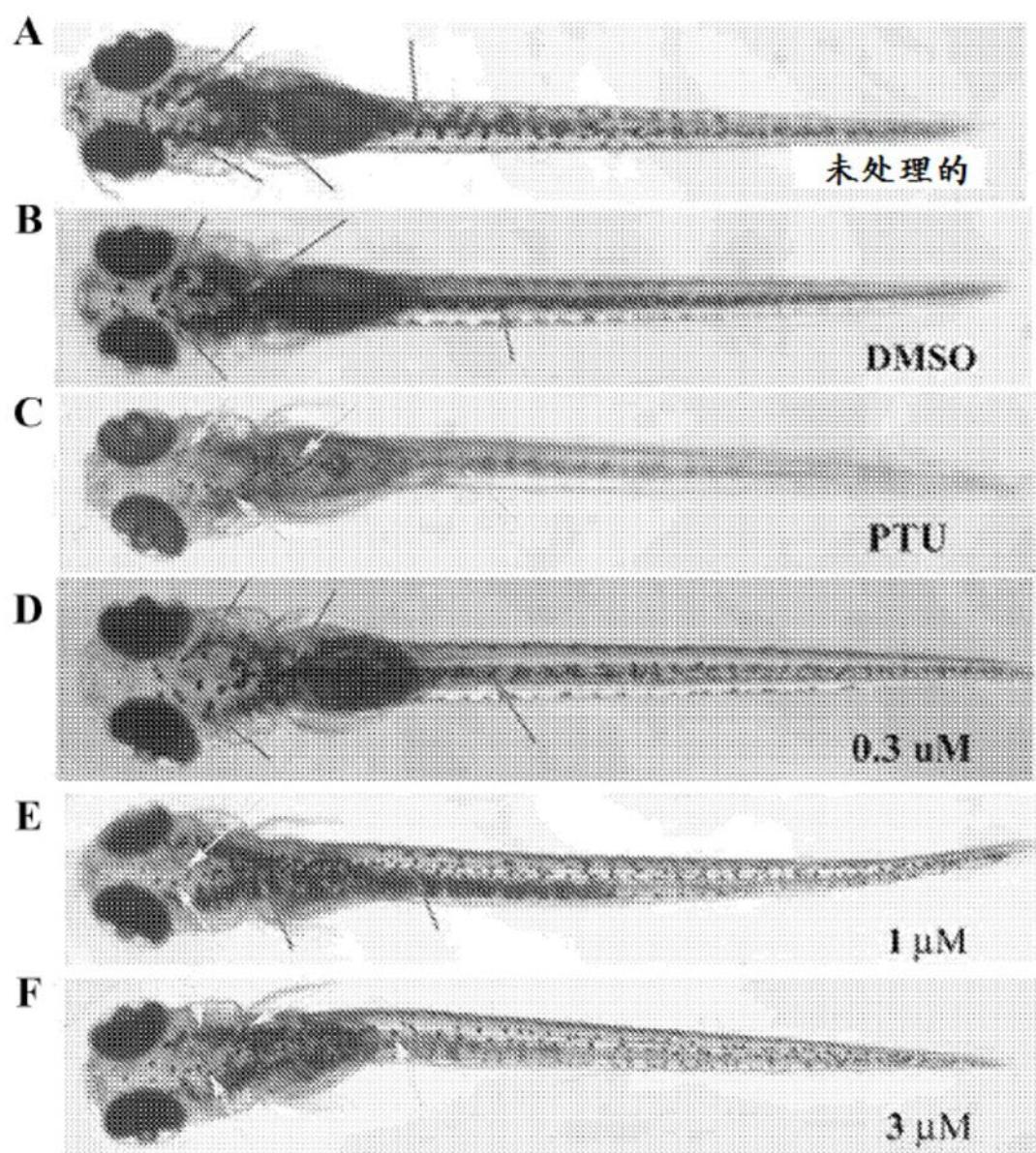


图19A-19F

条件	皮肤色素沉着减少的斑马鱼的数量			总数	皮肤色素沉着减少的斑马鱼%
	孔 1	孔 2	孔 3		
未处理的	1	0	0	1	3.3
DMSO	1	0	0	1	3.3
0.003% PTU	10	10	10	30	100.0
0.3 μ M	0	3	0	3	10.0
1 μ M	2	6	7	15	50.0
2.5 μ M	9	10	10	29	96.7
3 μ M	9	7	7	23	76.7
5 μ M*	7	5	8	20	66.7
10 μ M*	0	0	1	1	3.3

图20

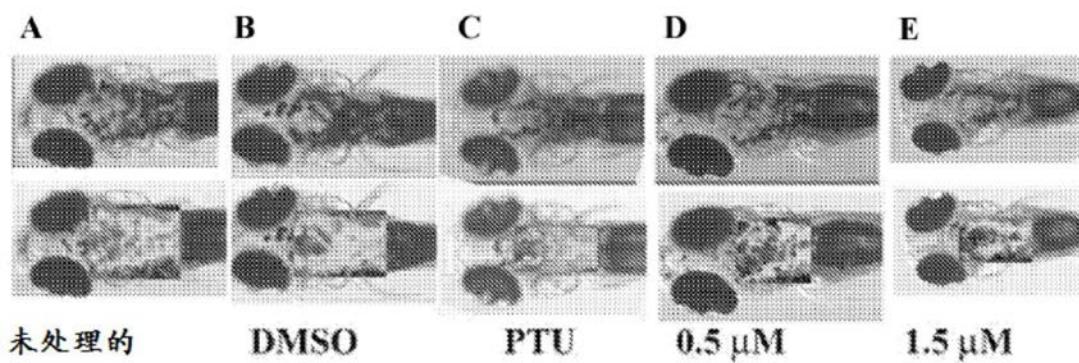
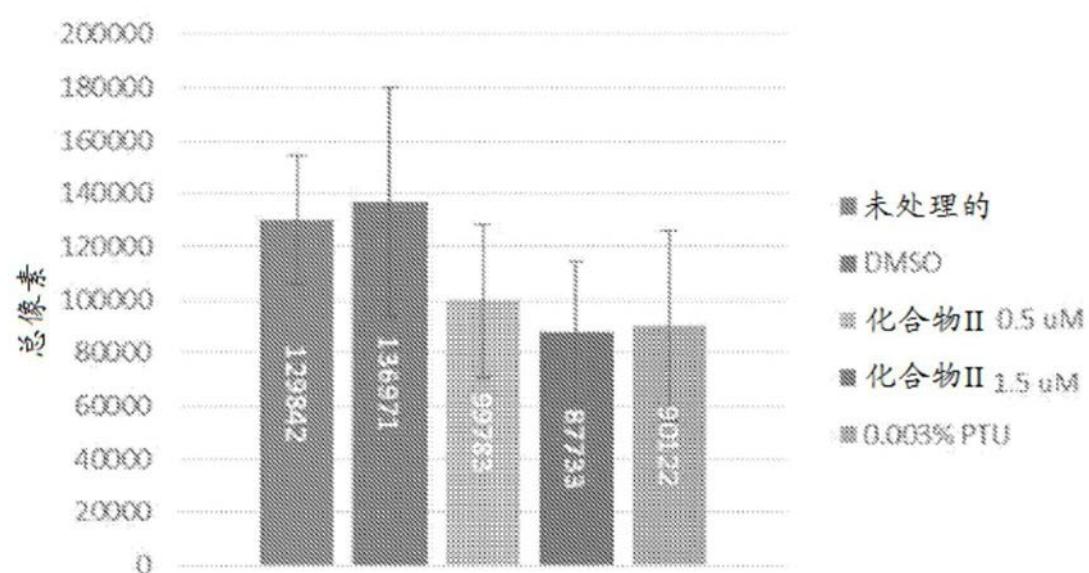
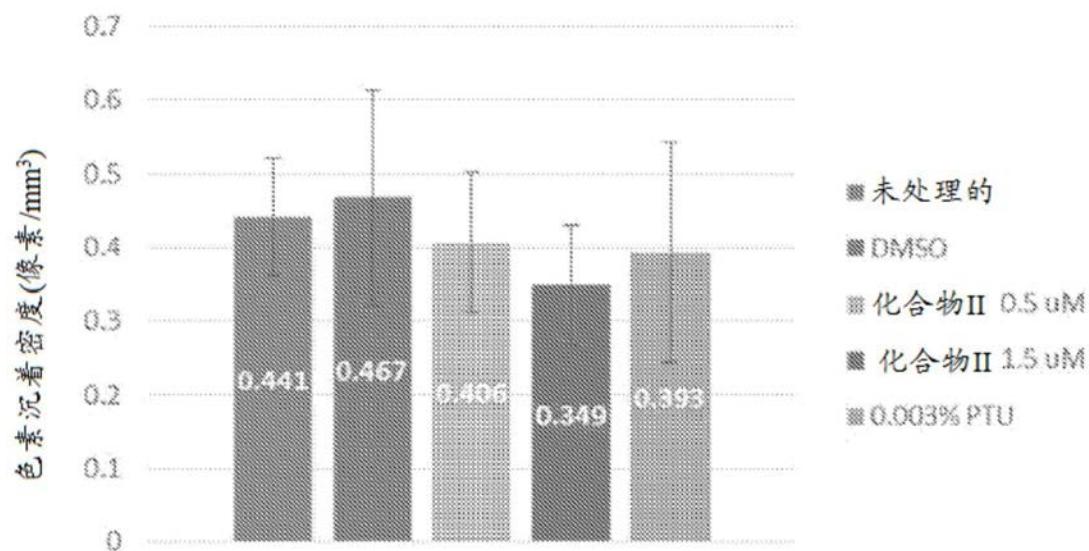


图21A-21E



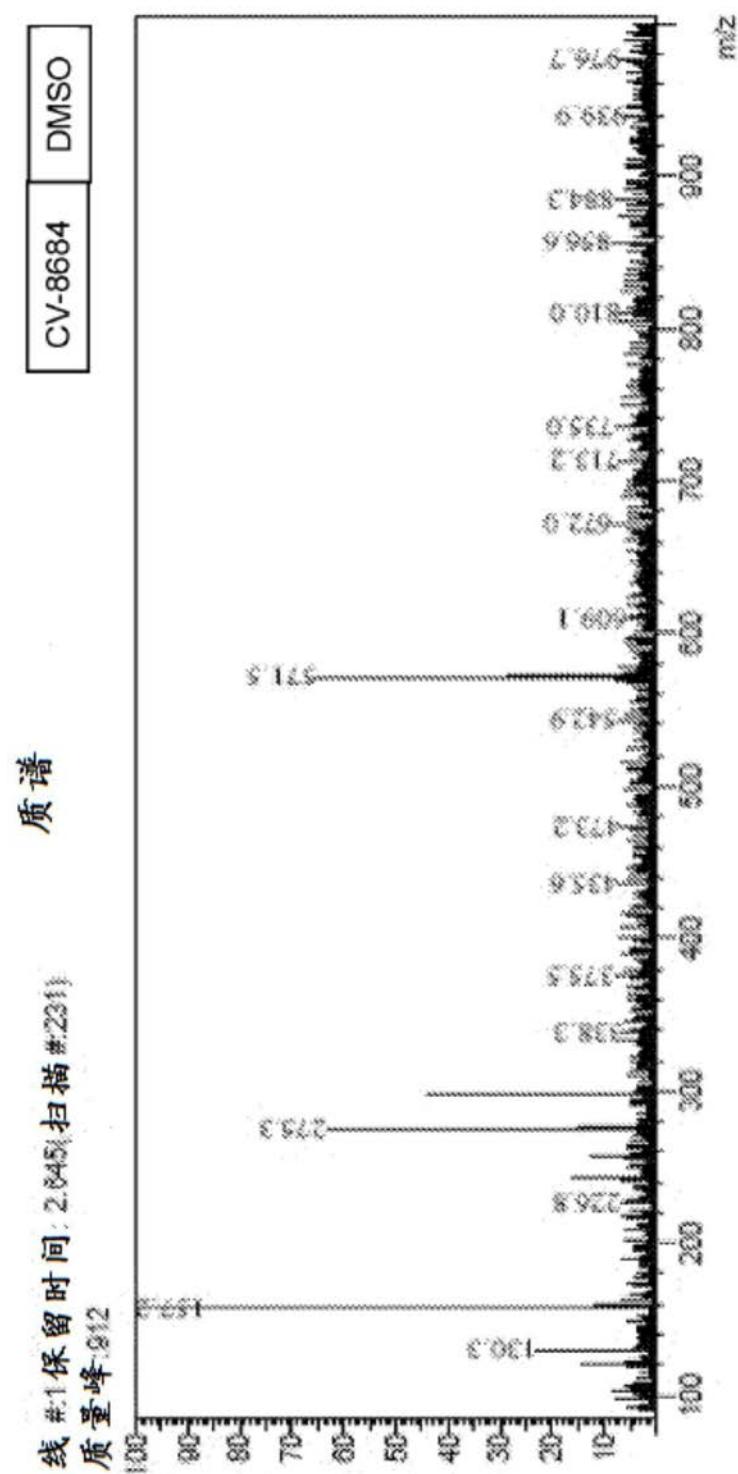


图23A

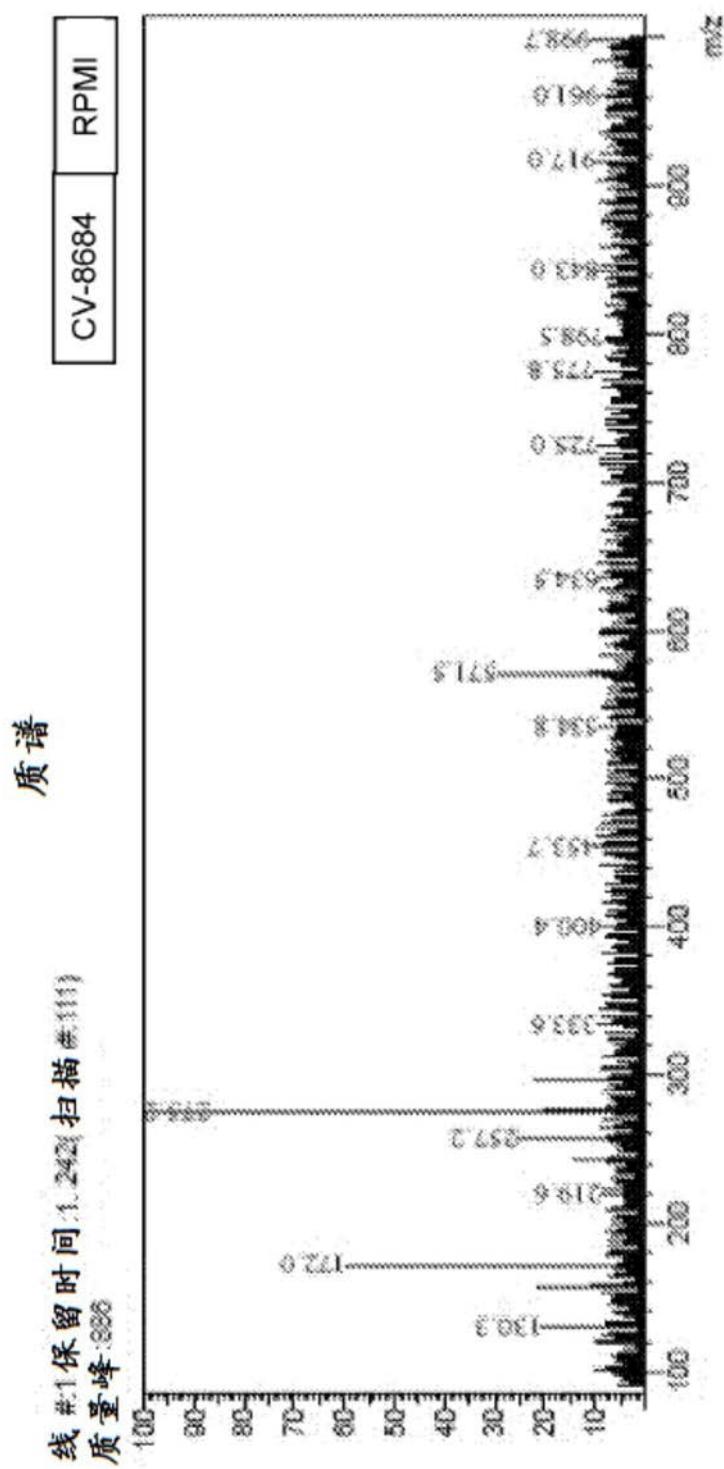


图23B

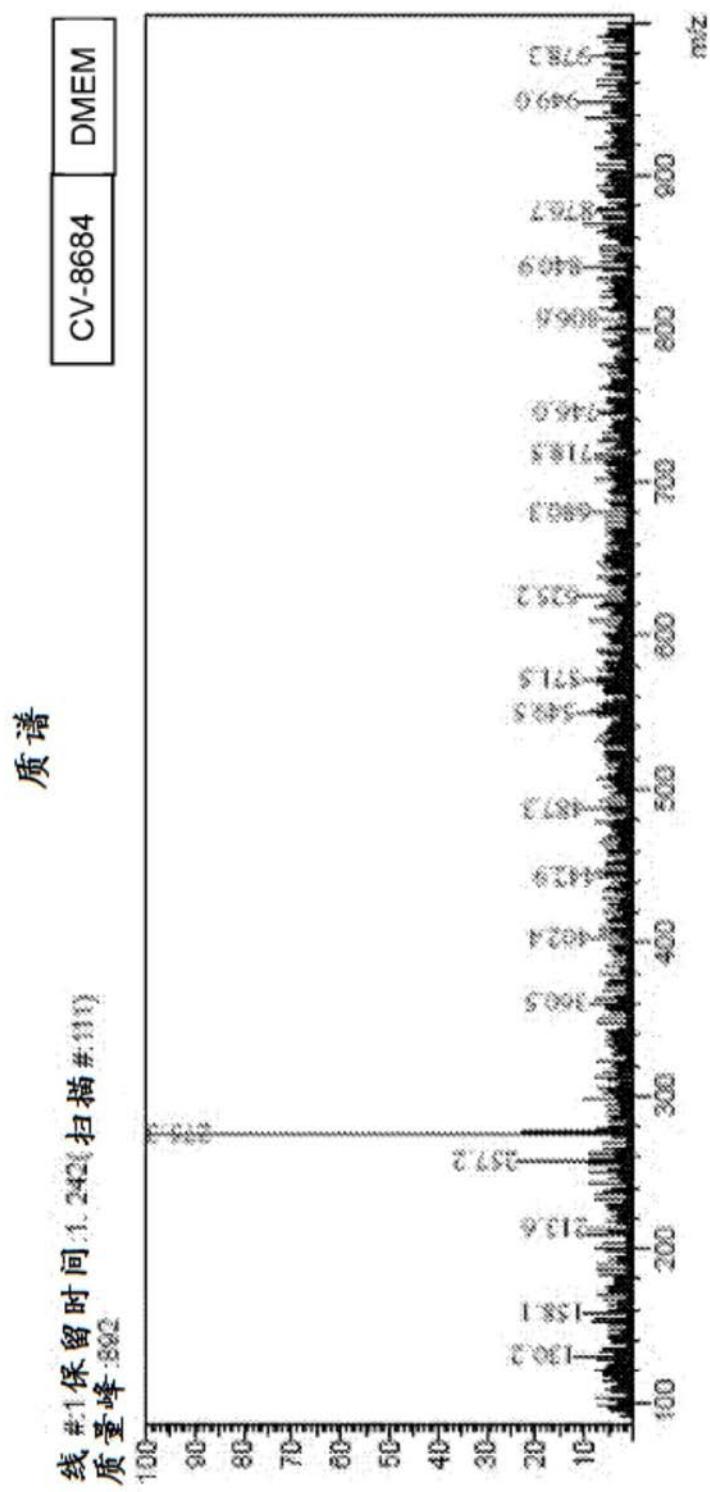


图23C

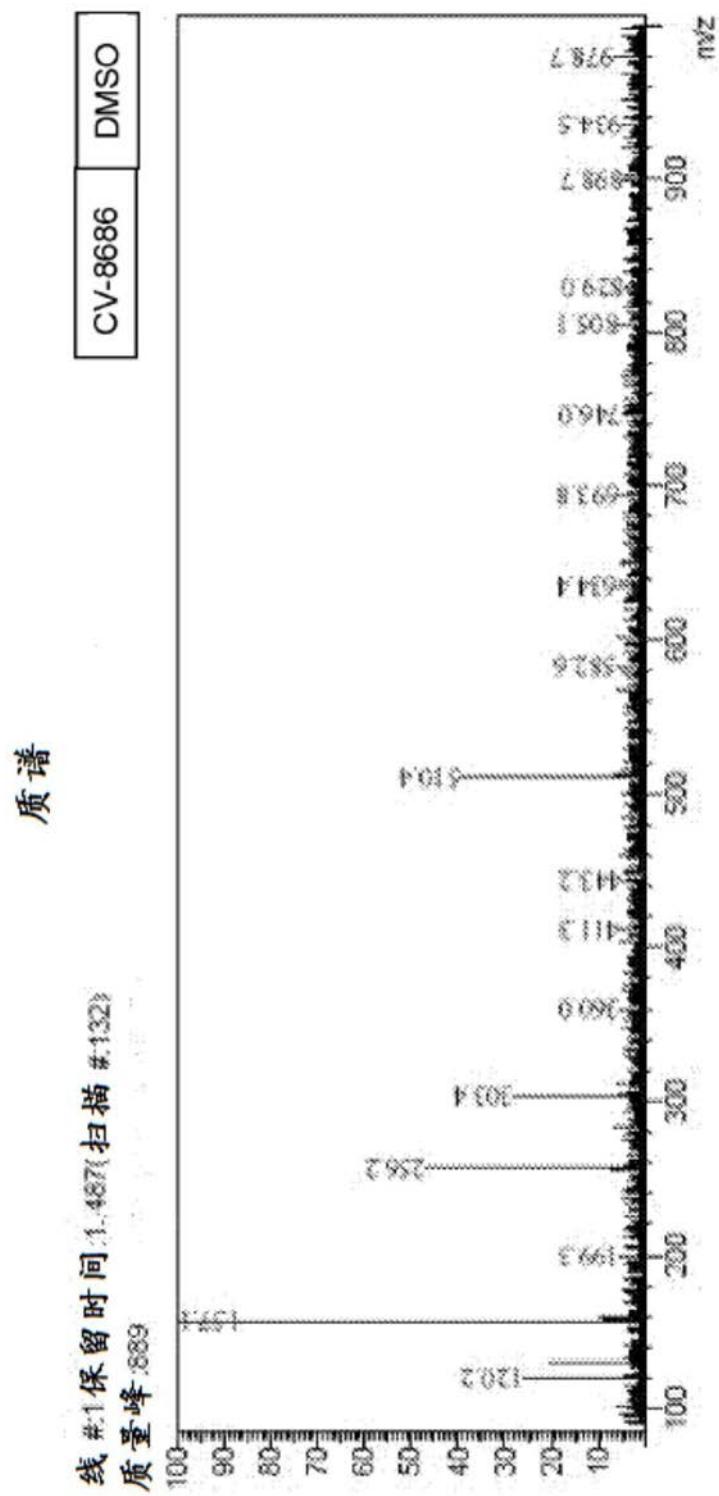
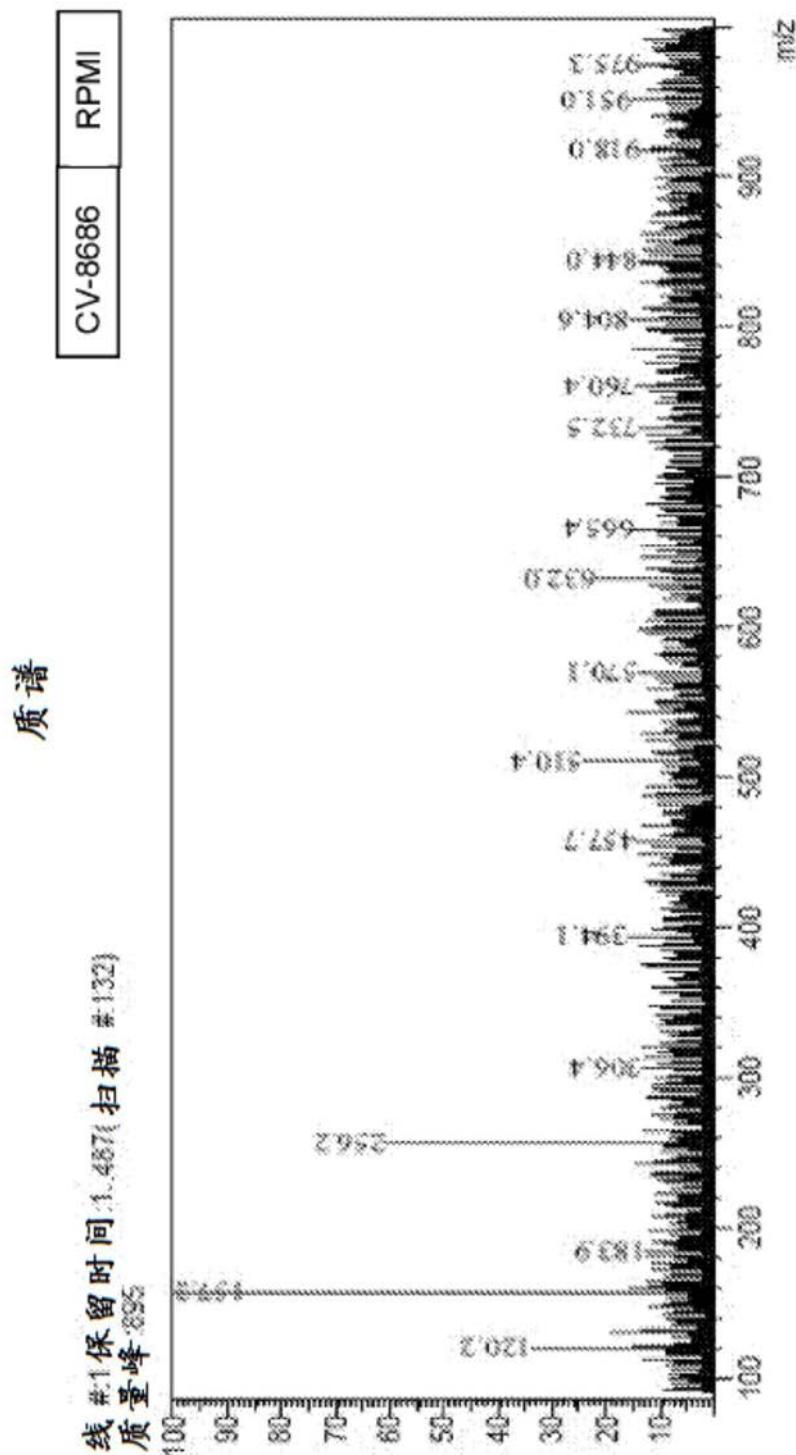


图23D



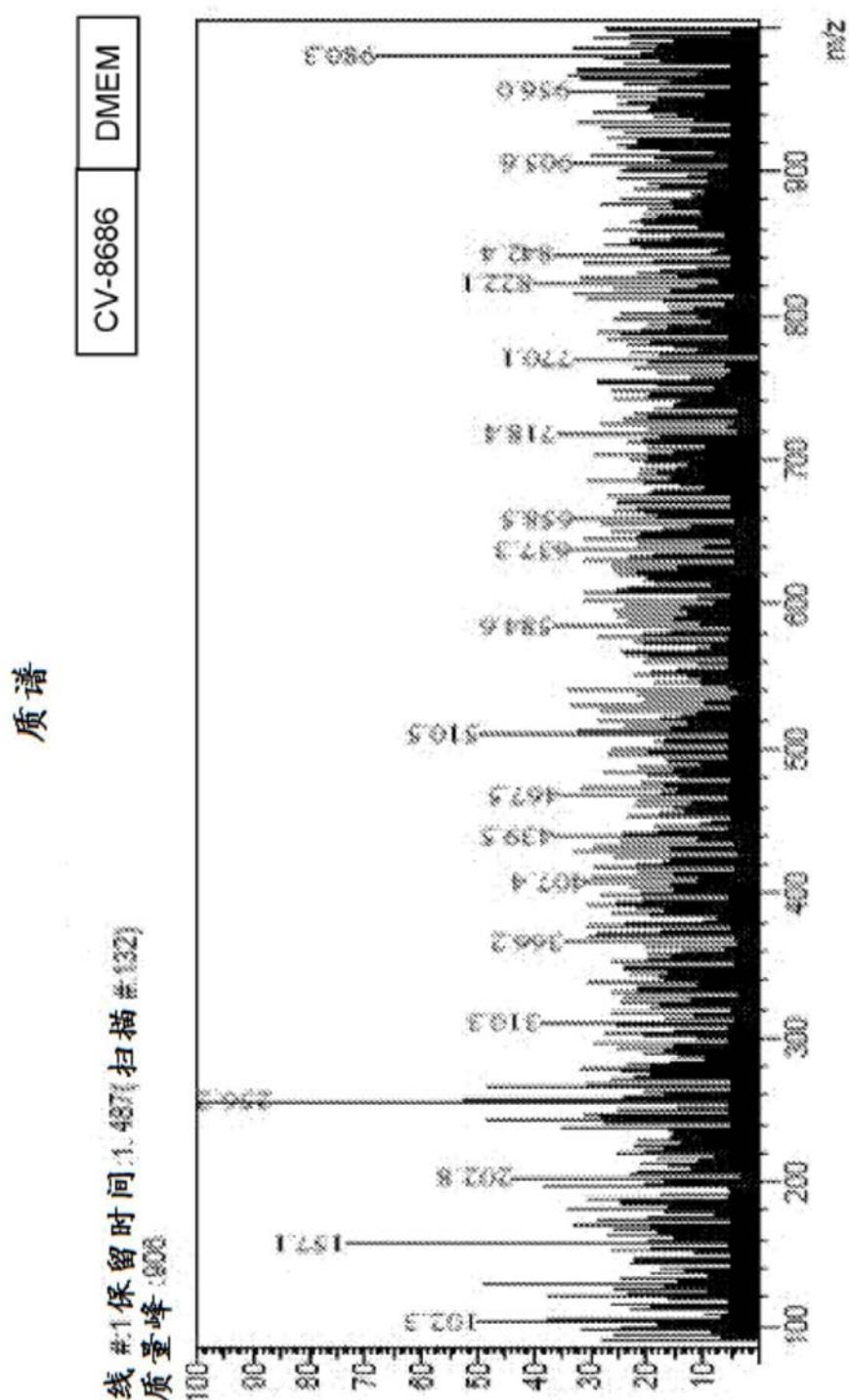


图23F

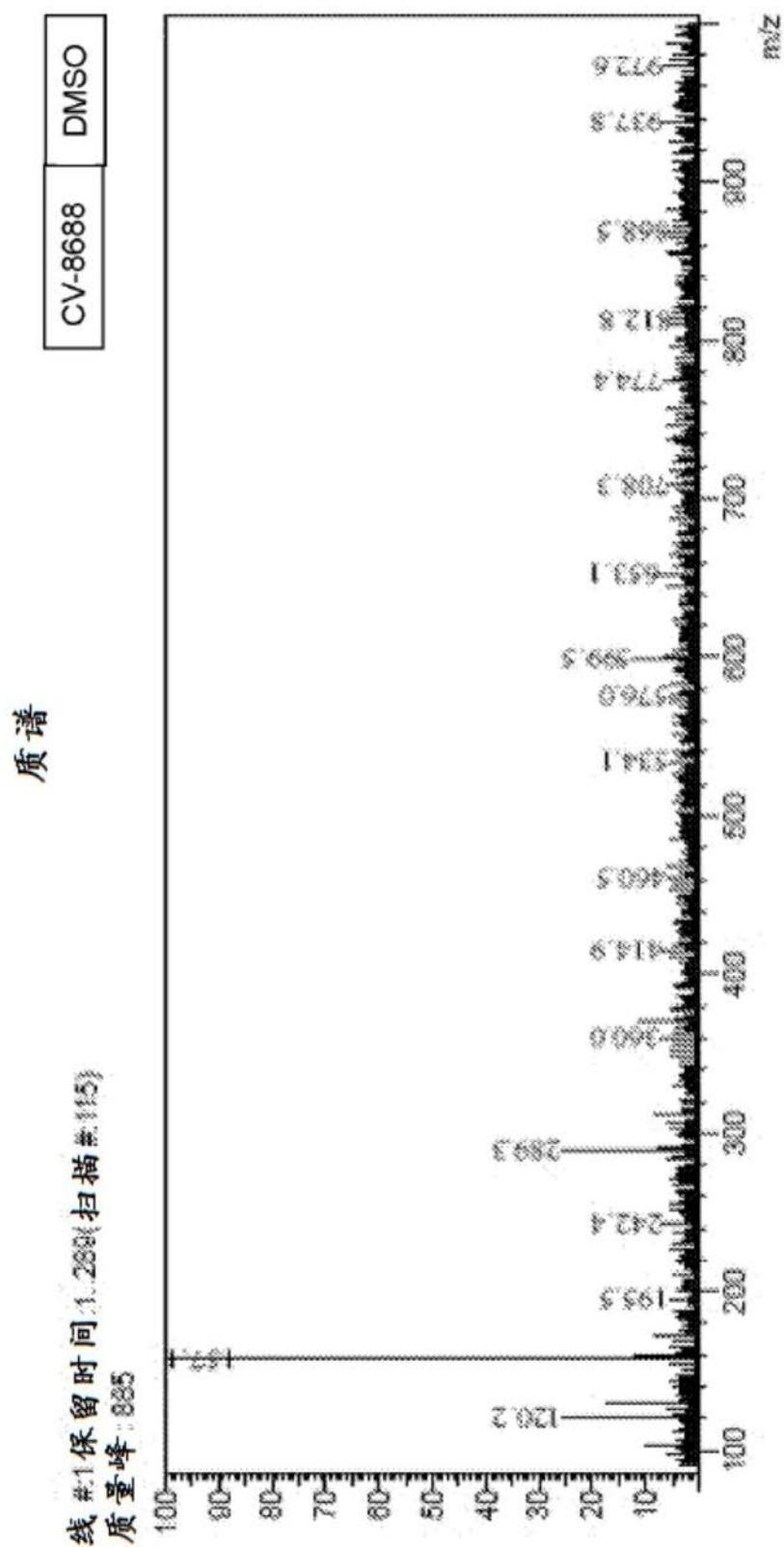


图23G

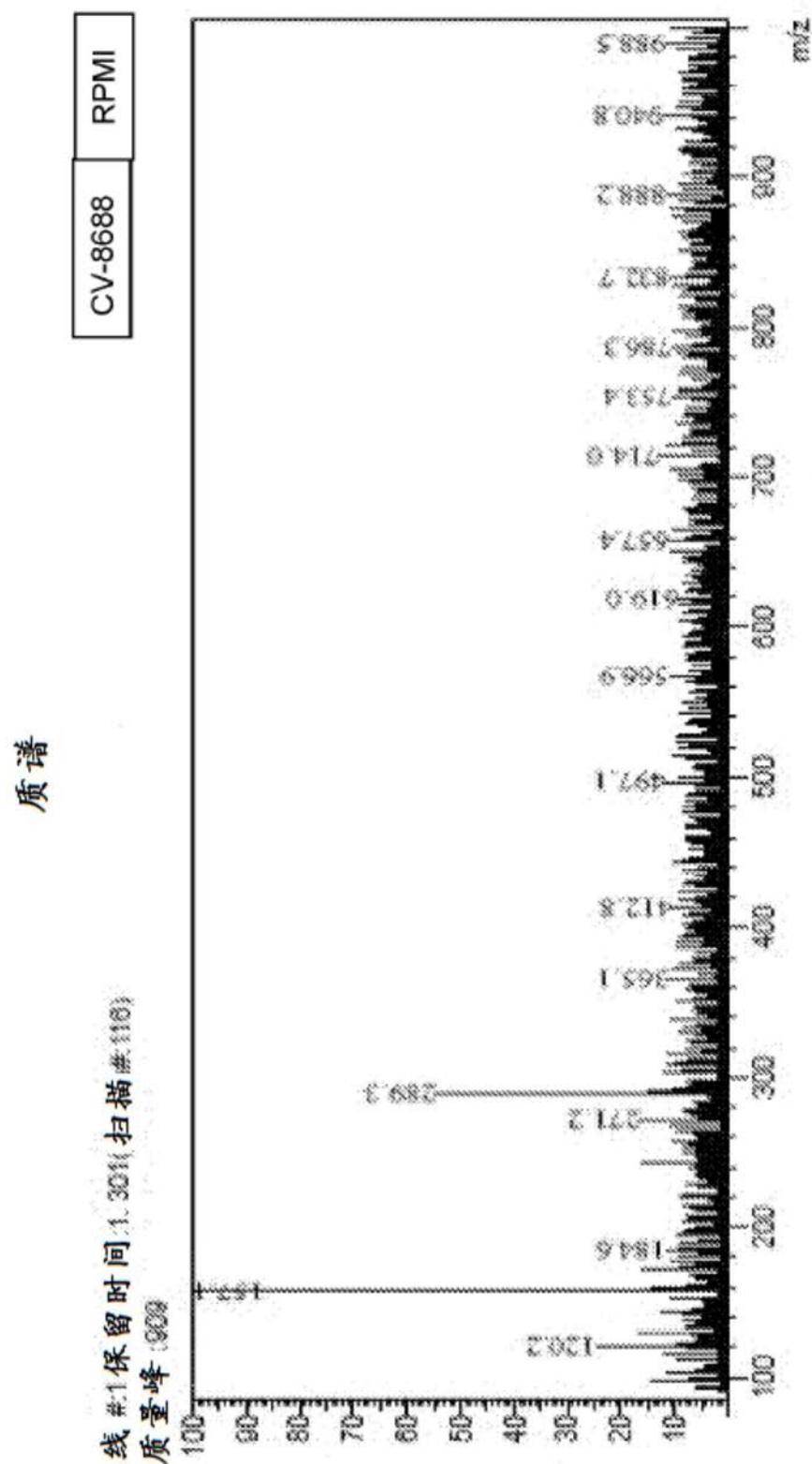
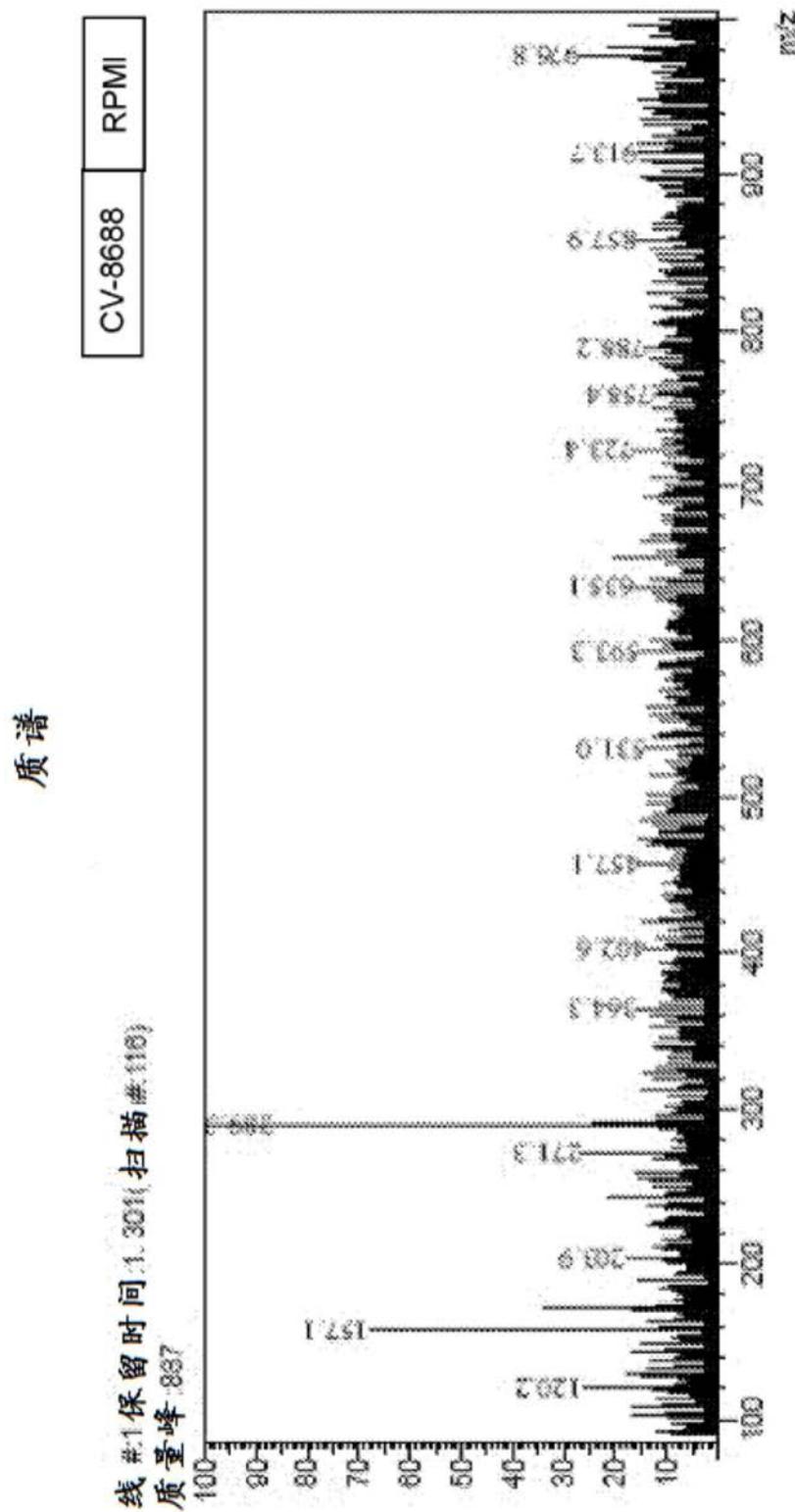


图23H



化合物	培养基	浓度 (uM)	温育时间 (小时)	ID	色谱图		
					保留时间	面积	剩余%
CV-8684	DMSO	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	DMSO	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	DMSO	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

图23J