

sofw journal

Home & Personal Care Ingredients & Formulations

150
YEARS
SINCE 1874

powered by **SOFW**



Eine neue Klasse von Tyrosinase Inhibitoren für leuchtende Haut

S. Hettwer, E. Besic Gyenge, L. Schoeffel, B. Suter, B. Obermayer

Eine neue Klasse von Tyrosinase Inhibitoren für leuchtende Haut

S. Hettwer, E. Besic Gyenge, L. Schoeffel, B. Suter, B. Obermayer

Abstract

Zwar gibt es bereits einige hautaufhellende kosmetische Rohstoffe, jedoch ist deren Wirksamkeit auf die humane Tyrosinase nicht in jedem Fall direkt gemessen worden bzw. zeigte in-vitro keine überzeugende Leistung. Manche Wirkstoffe sind sogar hautreizend und werden von den Kosmetikgesetzgebungen entsprechend restringiert. Die Suche nach neuen, milderen hautaufhellenden Rohstoffen hat in den letzten Jahren zur Entwicklung vielversprechender Kandidaten geführt. Hier stellen wir einen Gerstenkeimextrakt vor, der eine neue Wirkstoffklasse – die Hordatine – enthält, die überragende Tyrosinase-Hemmeigenschaften aufweist. Das grosse Potenzial dieser Moleküle wurde mit Hilfe von künstlicher Intelligenz durch molekulares Docking an die Tyrosinase Struktur aufgedeckt.

Einleitung

Hauptpigmentvariationen und -farbe gehören zu den wichtigsten Determinanten unseres Hautbildes. Auch wenn sie von verschiedenen Ethnien unterschiedlich interpretiert werden, wird ein gleichmäßiger Hautton allgemein als Zeichen von Gesundheit, Wohlbefinden und Schönheit angesehen.

Die Hautfarbe beruht auf genetischen Unterschieden, die sich in Abhängigkeit von der geografischen Lage der Menschen und dem Zugang zu Vitamin D entwickelt haben [1]. Am Äquator mit hoher (UV-)Sonneneinstrahlung ist die Hautfarbe sehr dunkel, im hohen Norden dagegen sehr hell. Die aktuelle Evolutionstheorie besagt, dass ein Gleichgewicht zwischen der UV-B-abhängigen Vitamin-D-Synthese und dem Schutz der DNA vor UV-Strahlung hergestellt werden muss [2].

Die Hautfarbe wurde je nach Zeit und Kultur sehr unterschiedlich beurteilt. In Europa war es zeitweise modern, eine sehr

blasse Hautfarbe zu haben, ein anderes Mal war es modern, gebräunt zu sein. Zu verschiedenen Zeiten spiegelte dies die Fähigkeit der Oberschicht wider, nicht gezwungen zu sein, körperlich hart zu arbeiten, und machte ihren Status in der Gesellschaft über die Hautfarbe offensichtlich. In einigen Teilen Asiens ist eine möglichst helle Hautfarbe seit langem ein Ausdruck von Schönheit. Mit dem Heranwachsen der heutigen digitalen Generation vollzieht sich jedoch ein gewisser Wandel. Anstatt einem allgemeinen gesellschaftlichen Trend zu folgen, feiert die neue Generation Unterschiede, Individualität und Vielfalt. Im Fokus steht vor allem das "Wellbeing", also das gesunde Aussehen der Haut, das mit Glanz und Strahlkraft einhergeht.

Die Haut- und Haarfarbe hängt von zwei Melaninarten ab. Melanozyten sind in der Lage, ein schwarzes Pigment namens Eumelanin und ein hellbraunes/rötliches Pigment namens Phäomelanin zu synthetisieren. Die individuelle Kombination der beiden Pigmente macht die wunderbare Vielfalt von dunkler Haut bis zu heller Haut und von schwarzem Haar bis

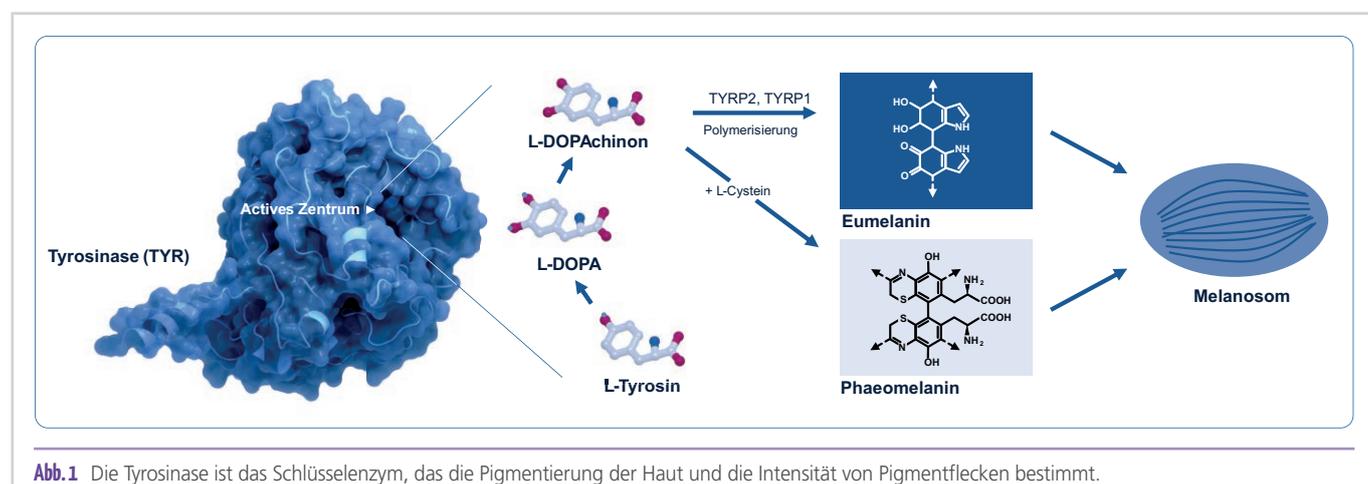


Abb. 1 Die Tyrosinase ist das Schlüsselenzym, das die Pigmentierung der Haut und die Intensität von Pigmentflecken bestimmt.

zu blondem oder rotem Haar aus. Der zentrale Schritt ist die Bildung von L-DOPAchinon aus L-Tyrosin (**Abbildung 1**). Dies geschieht durch das Enzym Tyrosinase. L-DOPAchinon wird schließlich durch die Enzyme TYRP1 und TYRP2 zu Eumelanin oder mit Hilfe von L-Cystein zu Phäomelanin umgewandelt. Beide Pigmente werden über Melanosomen auf die Keratinozyten übertragen.

Um die Haut aufzuhellen, ist die Hemmung der Tyrosinase der zentrale Wirkmechanismus. Das aktive Zentrum des Enzyms wird durch einen Inhibitor blockiert, der an die gleiche Stelle wie das Substrat bindet. Das Substrat (hier: L-Tyrosin) hat dann keinen Zugang mehr zum Enzym und kann nicht umgewandelt werden. Zu den in Kosmetika bekannten Stoffen gehören Hydrochinon oder Arbutin, Kojisäure, Azelainsäure, Glabridin und andere (vgl. **Tabelle 1**). Manche dieser Stoffe sind jedoch auf einigen Märkten verboten oder eingeschränkt und können die Haut reizen.

Der Extrakt aus Gerstenkeimen (ILLUMISCIN®-GLOW; Hordeum Vulgare Extract) fügt eine neue, bisher unbekannte, aber hochwirksame Klasse von Verbindungen hinzu: Hordatine. Diese wirken als kompetitive Inhibitoren der Tyrosinase, die sehr sanft zur Haut sind. Hordatine entstehen durch die Dimerisierung von Hydroxymitsäure-Agmatinen, z. B. p-Cumarylglumantinsäure und Feruloylglumantinsäure in unterschiedlichen Kombinationen [3]. Sie haben eine L-Tyrosin- oder L-DOPA-ähnliche Kopfgruppe, die perfekt in das aktive Zentrum der menschlichen Tyrosinase passt. Es handelt sich um eine Substanzfamilie, die sich nur durch Variationen von Methylgruppen und Hydroxygruppen an bestimmten Stellen des Grundgerüsts unterscheiden [4]. Molekulares Modelling und Tyrosinase-Inhibitionstests lassen vermuten, dass Hordatine eine sehr wirksame neue Klasse von Tyrosinase-Inhibitoren sind (siehe Abschnitt Ergebnisse).

Materialien und Methoden

Zur Bewertung der Wirksamkeit von Hordeum Vulgare Extrakt *in-vivo* wurde eine Emulsion mit 1 % Hordeum Vulgare Extrakt oder ohne Wirkstoff (Placebo) zweimal täglich über 56 Tage auf das Gesicht aufgetragen. Die Hautpigmentierung wurde mittels Mexametrie, Colorimetrie und VISIA-CR beurteilt. Darüber hinaus wurde die Hautfarbe objektiv und subjektiv anhand von Fragebögen bewertet. Die Fläche der Pigmentierung wurde mit VISIA-CR gemessen. Die Hautrötung und ITA°-Werte wurden durch Colorimetrie und VISIA-CR gemessen. Das Testpanel bestand aus 64 chinesischen Männern und Frauen im Alter von 30 – 60 Jahren. Die Studie wurde im Frühling in gemässigten Breiten durchgeführt (Ost-Zentral-China).

Hemmung der Tyrosinase: Melanomzellen wurden mit 400 μM IBMX (3-Isobutyl-1-methylxanthin) stimuliert und 72 Stunden lang mit Hordeum Vulgare Extrakt in verschiedenen Konzentrationen inkubiert. IBMX ist ein bewährter und wirksamer Stimulator der Melaninsynthese. Es erhöht die Menge der Tyrosinase in den Melanozyten. Parallel dazu wurde eine nicht-stimulierte Kontrolle durchgeführt. Die Zellen wurden in PBS gewaschen und die Tyrosinase wurde in PBS-Triton X-100 extrahiert. Die enzymatische Aktivität wurde bei 540 nm unter Verwendung von L-DOPA als Substrat und Zugabe verschiedener Konzentrationen von Hordeum Vulgare Extrakt gemessen. Dieser Test ähnelt einem zellfreien enzymatischen Assay.

Melanin-Synthese: B16-Melanomzellen wurden mit 0,1 μM NDP-MSH (Afamelanotid) stimuliert und 72 Stunden lang mit Hordeum Vulgare Extrakt in verschiedenen Konzentrationen inkubiert. NDP-MSH ist eine stärkere Variante des natürlichen Hormons α -MSH (melanozytenstimulierendes Hormon), das die Tyrosinase-Expression erhöht. Parallel dazu wurde eine



BB.2 Hordeum Vulgare Extrakt hellt Pigmentflecken und die umgebende Haut auf. Rechte Paneele: Der gekennzeichnete Ausschnitt im Bild ganz links wurde in zwei Hälften geteilt: Links vor der Behandlung, rechts nach der Behandlung. Die aufhellende Wirkung nach 56 Tagen ist deutlich sichtbar und im Panel ganz rechts mittels Pixelanalyse bei einem Pigmentfleck visualisiert.

nicht-stimulierte Kontrolle durchgeführt. Die Absorption bei 405 nm wurde gemessen und mit einer Melanin-Standardkurve verglichen.

Molecular Modelling: Für diesen Ansatz wurde die Selnergy®-Plattform (Greenpharma) mit einem KI-optimierten 3D-Modell der menschlichen Tyrosinase verwendet. Bekannte Inhibitoren und Hordatine wurden in das aktive Zentrum gemodelt und die Bindungsenergien aufgrund der Inhibitor-Protein-Wechselwirkungen berechnet.

Ergebnisse

Für die Studien wurde ein wässriger Hordeum Vulgare Extrakt verwendet, der aus den Wurzelkeimlingen von Braugerste hergestellt wird. Diese Wurzelkeimlinge werden für den Brauprozess abgeschieden und normalerweise verworfen. Das resultierende Produkt ILLUMISCIN®-GLOW ist also ein Upcycling Produkt, das sonst vernachlässigte, wertvolle pflanzenbasierte Rohstoffe für die kosmetische Industrie verfügbar macht.

In-vivo Wirksamkeit: Wirkstoff und Placebo wurden für 56 Tage im Gesicht angewendet. Messungen erfolgten nach 28 und 56 Tagen. 1% Hordeum Vulgare Extrakt reduzierte die Gesamtfläche der Pigmentflecken signifikant um bis über 35 %, gemessen mit VISIA-CR (**Abbildung 2**). Die Sichtbarkeit von Pigmentflecken wurde signifikant reduziert, und die Helligkeit der Haut wurde deutlich verbessert. Die Gesamtverringerung der Pigmentierungsfläche im gesamten Panel betrug fast 15 %. Der Wirkstoff war nach 28 Tagen viermal wirksamer als Placebo und nach 56 Tagen doppelt so wirksam (**Abbildung 3**).

Die hautaufhellende Wirkung wurde in einer objektiven visuellen Untersuchung bestätigt und durch verschiedene Messmethoden (Colorimeter, Mexameter, VISIA-CR) untermauert. Es konnte eine Reduktion der Hautpigmentierung um 20 %, signifikant über Baseline und Placebo festgestellt werden. Die aufhellende Leistung von 1 % Wirkstoff beschränkte sich hierbei nicht nur auf Pigmentflecken, sondern auch auf die umliegende Haut. **Abbildung 4** zeigt die Zusammenfassung der Farbparameter im Lab*-Farbraum. Aus den Veränderungen der L* und b*-Werte ergab sich eine Verbesserung des ITA° Wertes um über 3 Einheiten bei Pigmentflecken und bei umgebender Haut. Placebo hatte keinen oder sogar einen gegenteiligen Effekt. Dies

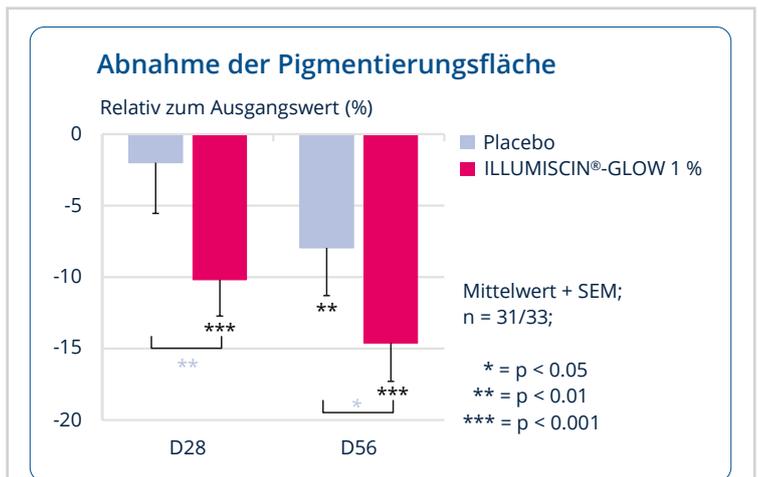


Abb. 3 Hordeum Vulgare Extrakt hellt Pigmentflecken auf und reduziert die Gesamtfläche der Flecken. Statistische Werte in schwarz sind im Vergleich zum Ausgangswert, in blau im Vergleich zu Placebo. Wilcoxon signed rank Test / Gepaarter Student's t-Test.

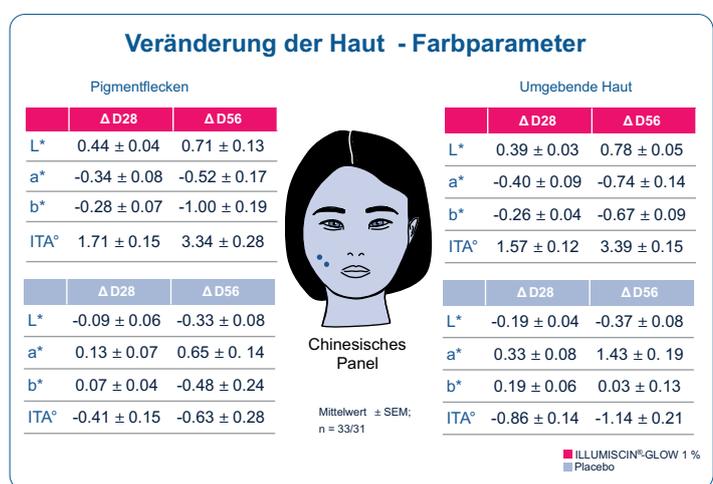


Abb. 4 Hordeum Vulgare Extrakt hellt die Haut auf und reduziert Gelb- und Rotanteile. Placebo hat gegenteilige Effekte. Wirkstoff war in allen Fälle signifikant über Ausgangswert und Placebo (p < 0.01). Wilcoxon signed rank Test / Gepaarter Student's t-Test.

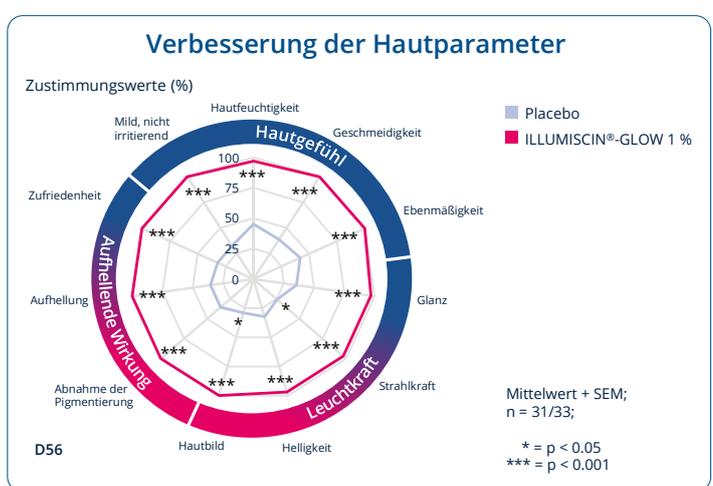


Abb. 5 Hordeum Vulgare Extrakt hat eine beeindruckende Wirksamkeits-Performance. Es verbessert das Hautbild in 3-facher Wirkung bei Hautgefühl, Leuchtkraft und Aufhellung. Signifikanz gegenüber Anfangswert und Placebo. Gepaarter Student's T-test.

ist wahrscheinlich auf den ansteigenden Sonnenstand im Studienzeitraum und die daraus resultierende Zunahme der natürlichen Bräune zurückzuführen (Januar bis März). Ebenfalls ersichtlich ist ein Rückgang der Hautrötung, was darauf schließen lässt, dass der Wirkstoff ausgesprochen hautfreundlich ist. Dies wurde auch in einem separaten dermatologischen Test an 30 Personen mit sensibler Haut bestätigt.

Neben der reinen hautaufhellenden Wirkung von *Hordeum Vulgare* Extrakt zeigte sich auch eine Erhöhung der Leuchtkraft der Haut und Verbesserung des Hautgefühls. Neben den instrumentellen Messungen zeigte sich dies eindrücklich an der subjektiven Befragung der Studienteilnehmenden. In fast allen Parametern zu Hautgefühl, Strahlkraft und Aufhellungskraft waren 100 % der Teilnehmenden überzeugt von der Wirkung, während dies bei Placebo nur 25 – 40 % waren (Abbildung 5).

In-vitro Wirksamkeit: Es zeigt sich eine deutliche konzentrationsabhängige Wirkung von *Hordeum Vulgare* Extrakt auf die Hemmung der Tyrosinase und die Melaninproduktion (Abbildung 6). Der Extrakt hemmte die Melaninproduktion mit einem IC_{50} von 0,22 %. Bei Verwendung von 2,5 % Extrakt betrug die Tyrosinase-Hemmung 65 %. Bei 1 % war die Hemmung vergleichbar mit 3 mM Kojisäure, die als Positivkontrolle verwendet wurde. Die Menge (Trockenmasse) von 3 mM Kojisäure entspricht der Trockenmasse von 1 % *Hordeum Vulgare* Extrakt.

In-silico Studie: Es gibt erhebliche Unterschiede zwischen der üblicherweise verwendeten Pilztyrosinase zur Messung einer Hemmung und der menschlichen Tyrosinase [5]. Daher ist es

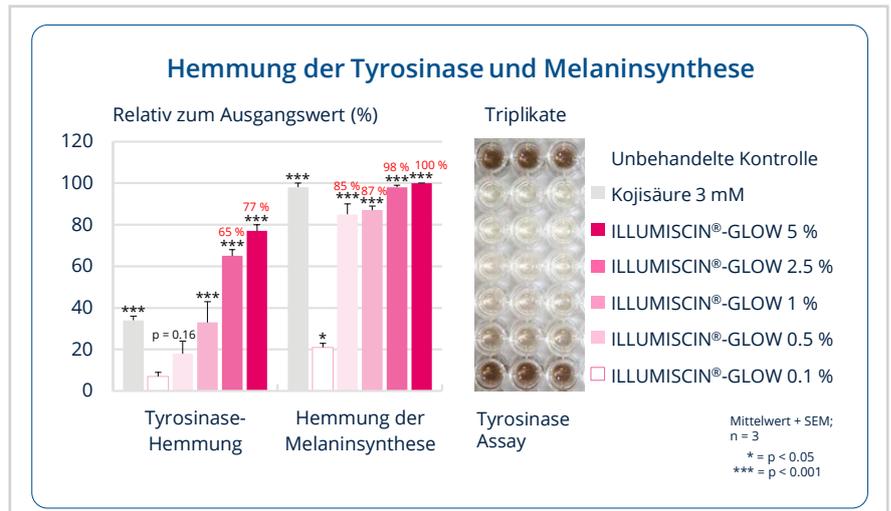


Abb 6 *Hordeum Vulgare* Extrakt hemmt die Tyrosinase und Melaninsynthese. Rechts: Mit zunehmender Konzentration des Wirkstoffes nimmt die braune Farbe des Melanins im Tyrosinase Assay ab. Ungepaarter Student's T-Test.

Inhibitor	IC_{50} auf Pilz-Tyrosinase	IC_{50} auf humaner Tyrosinase	Bindungswert
Arbutin	40 μ M ^[8]	> 4000 μ M ^[5]	6.10
L-Ascorbinsäure	> 20 μ M ^[9]	> 100 μ M ^[9]	6.60
Azelainsäure	~1000 μ M ^[10]	n.d.	7.45
Glabridin	11.4 μ M ^[11]	n.d.	5.69
Kojisäure	6 μ M ^[12]	500 μ M ^[5]	6.70
Thiamidol®	108 μ M ^[5]	1.1 μ M ^[5]	6.44
Tranexamsäure	n.d.	n.d.	7.05
Hordatin A	n.d.	n.d.	8.95
Hordatin C2	n.d.	n.d.	9.52
Hordatin C	n.d.	n.d.	10.28

n.d.: no data found in literature

Tabelle.1 Hemmwerte für verschiedene Tyrosinase-Inhibitoren. Der Bindungswert gibt die berechnete Bindungsstärke aufgrund des in-silico Modellings wieder.

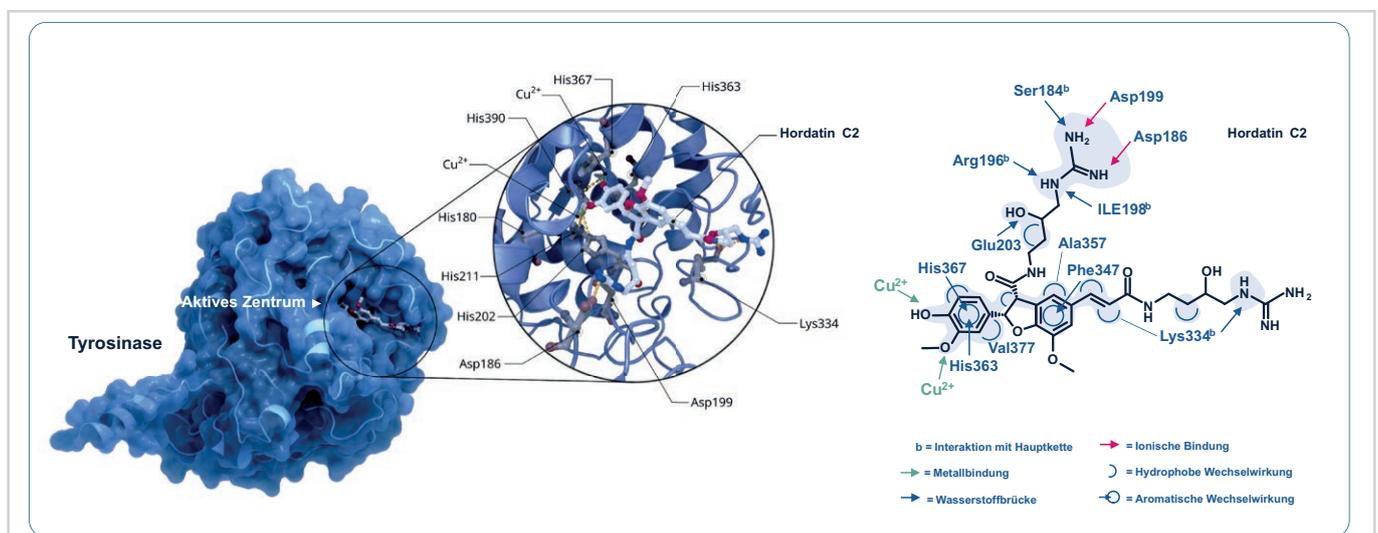


Abb.7 Hordatin besetzt das aktive Zentrum der humanen Tyrosinase. Wechselwirkungen mit Aminosäuren der Tyrosinase sind rechts dargestellt.

wichtig, die Bindungseigenschaften potenzieller Tyrosinase-Inhibitoren anhand der menschlichen Tyrosinase zu bestimmen. Da eine Röntgen-Kristallstruktur der menschlichen Tyrosinase im Moment nicht verfügbar ist, wurde sie auf der Grundlage einer bakteriellen Tyrosinasestruktur modelliert, wobei das von Alpha Fold erstellte KI-Modell der menschlichen Tyrosinase zu Hilfe genommen wurde [6,7]. Die Bindungswerte von Hordatinen aus dem *Hordeum Vulgare* Extrakt und bekannten Tyrosinase-Inhibitoren wurden gemodelt (KI-Tool Selnergy® von Greenpharma) und mit Literaturwerten verglichen (Tabelle 1). Hordatine stellten sich als vielversprechende Kandidaten heraus, die perfekt in das aktive Zentrum der menschlichen Tyrosinase passen. Wie in Abbildung 7 dargestellt, geht Hordatin C2 mehrere Wechselwirkungen mit Aminosäuren im Bereich des aktiven Zentrums ein und bindet und besetzt beide Kupferionen, wodurch die Tyrosinase inaktiv wird. Hordatine sind klassische kompetitive Inhibitoren, wie auch andere bekannte Tyrosinase-Inhibitoren wie Kojisäure oder auch Thiamidol® (Beiersdorf). Anhand der Bindungswerte kann den Hordatinen eine ähnliche hemmende Wirkung auf die menschliche Tyrosinase zugesprochen werden, wie Thiamidol®.

Diskussion

Hordeum Vulgare Extrakt (ILLUMISCIN®-GLOW, RAHN-Cosmetic Actives) stellt eine neue Klasse von Tyrosinase-Hemmern für die Kosmetik zur Verfügung, die über das reine "Whitening" hinausgeht und der Haut neue Ausstrahlung und ein gutes Hautgefühl verleiht. Seine überragende Wirksamkeit wurde in weiteren Studien in einem multi-ethnischen Studienpanel mit asiatischen, afrikanischen, indischen und europäischen Probandinnen bestätigt. ILLUMISCIN®-GLOW ist somit wirksam bei allen Hauttypen, Altersstufen, Geschlechtern und Ethnien. Ein multi-funktionales Produkt für eine multi-ethnische und diverse Welt.

RAHN-Cosmetic Actives - unveiling the secrets of beauty

Referenzen:

- [1] Del Bino S, Duval C, Bernerd F. Clinical and Biological Characterization of Skin Pigmentation Diversity and Its Consequences on UV Impact. *Int J Mol Sci* 2018, 19.
- [2] Jablonski NG, Chaplin G. Colloquium paper: human skin pigmentation as an adaptation to UV radiation. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2010, 107 Suppl 2: 8962-8968.
- [3] Pihlava J-M, Kurtelius T, Hurme T. Total hordatine content in different types of beers. *Journal of the Institute of Brewing* 2016, 122: 212-217.
- [4] Becker D, Permann S, Bakuradze T, Stegmüller S, Richling E. Isolation and Characterisation of Hordatine-Rich Fractions from Brewer's Spent Grain and Their Biological Activity on α -Glucosidase and Glycogen Phosphorylase α . *Sustainability* 2022, 14: 8421.
- [5] Mann T, Gerwat W, Batzer J, Eggers K, Scherner C, Wenck H, et al. Inhibition of Human Tyrosinase Requires Molecular Motifs Distinctly Different from Mushroom Tyrosinase. *Journal of Investigative Dermatology* 2018, 138: 1601-1608.
- [6] Jumper J, Evans R, Pritzel A, Green T, Figurnov M, Ronneberger O, et al. Highly accurate protein structure prediction with AlphaFold. *Nature* 2021, 596: 583-589.
- [7] Varadi M, Anyango S, Deshpande M, Nair S, Natassia C, Yordanova G, et al. AlphaFold Protein Structure Database: massively expanding the structural coverage of protein-sequence space with high-accuracy models. *Nucleic Acids Research* 2021, 50: D439-D444.
- [8] Jin YH, Lee SJ, Chung MH, Park JH, Park YI, Cho TH, et al. Aloesin and arbutin inhibit tyrosinase activity in a synergistic manner via a different action mechanism. *Archives of pharmacological research* 1999, 22: 232-236.
- [9] Nokinsee D, Shank L, Lee VS, Nimmanpipug P. Estimation of Inhibitory Effect against Tyrosinase Activity through Homology Modeling and Molecular Docking. *Enzyme Res* 2015, 2015: 262364.
- [10] Wang Z, Xiang H, Dong P, Zhang T, Lu C, Jin T, et al. Pegylated azelaic acid: Synthesis, tyrosinase inhibitory activity, antibacterial activity and cytotoxic studies. *Journal of Molecular Structure* 2021, 1224: 129234.
- [11] Jirawattanapong W, Saifah E, Patarapanich C. Synthesis of glabridin derivatives as tyrosinase inhibitors. *Arch Pharm Res* 2009, 32: 647-654.
- [12] Curto EV, Kwong C, Hermersdörfer H, Glatt H, Santis C, Virador V, et al. Inhibitors of mammalian melanocyte tyrosinase: in vitro comparisons of alkyl esters of gentisic acid with other putative inhibitors. *Biochemical pharmacology* 1999, 57: 663-672.

Autoren

Stefan Hettwer, Emina Besic Gyenge,
Loya Schoeffel, Brigit Suter, Barbara Obermayer

Korrespondierender Autor: Stefan Hettwer

RAHN AG | Dörflistrasse 120, Schweiz

Tel. +41443254200 | stefan.hettwer@rahn-group.com