



19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA

11 Número de publicación: **2 315 487**

51 Int. Cl.:

A61K 8/44 (2006.01)

A61K 31/41 (2006.01)

A61K 31/55 (2006.01)

A61Q 17/04 (2006.01)

A61Q 19/02 (2006.01)

C07C 233/49 (2006.01)

C07C 233/51 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

96 Número de solicitud europea: **03715039 .8**

96 Fecha de presentación : **22.01.2003**

97 Número de publicación de la solicitud: **1471881**

97 Fecha de publicación de la solicitud: **03.11.2004**

54

Título: **Utilización de un compuesto inactivante de la proteína Quinasa A en una composición que contiene un medio cosméticamente aceptable, para aclarar la piel.**

30

Prioridad: **25.01.2002 FR 02 00925**

45

Fecha de publicación de la mención BOPI:
01.04.2009

45

Fecha de la publicación del folleto de la patente:
01.04.2009

73

Titular/es: **SOCIÉTÉ D'EXPLOITATION DE
PRODUITS POUR LES INDUSTRIES CHIMIQUES,
S.E.P.I.C.
75, quai d'Orsay
75321 Paris Cédex 07, FR**

72

Inventor/es: **Stoltz, Corinne y
Garcia, Christine**

74

Agente: **Justo Vázquez, Jorge Miguel de**

ES 2 315 487 T3

Aviso: En el plazo de nueve meses a contar desde la fecha de publicación en el Boletín europeo de patentes, de la mención de concesión de la patente europea, cualquier persona podrá oponerse ante la Oficina Europea de Patentes a la patente concedida. La oposición deberá formularse por escrito y estar motivada; sólo se considerará como formulada una vez que se haya realizado el pago de la tasa de oposición (art. 99.1 del Convenio sobre concesión de Patentes Europeas).

DESCRIPCIÓN

Utilización de un compuesto inactivante de la proteína Quinasa A en una composición que contiene un medio cosméticamente aceptable, para aclarar la piel.

La presente invención tiene por objeto una nueva utilización de activos cosméticos para aclarar la piel.

La mayoría de las formulaciones cosméticas despigmentantes comercializadas, son a base de ácido kójico, de arbutina o de ascorbil fosfato de magnesio.

El documento JP06157284A describe una composición cosmética para aclarar la piel que contiene por ejemplo el compuesto (Z, Z, Z)-N-(1-oxo-9, 12,15-octadecatrienil)-L-fenilalanina y el compuesto (Z, Z, Z)-N-(1-oxo-9, 12,15-octadecatrienil)-L-valina.

El documento JP08053332A describe una composición cosmética para aclarar la piel, que contiene por ejemplo la sal monosódica de N-(2-etil-1-oxohexil)-L-triptófano.

El documento JP49093521 describe una composición destinada a un uso cosmético que contiene por ejemplo como agente activo el compuesto 1-(1-oxo-10-undecenil)-L-prolina.

El artículo de J. Leydet y otros (J. Med. Chem., vol. 39, n° 8, 1996, páginas 1626-1634) describe la N-(ω -undecilenoil) fenilalanina así como su actividad terapéutica y sus composiciones de uso farmacéutico que la contienen.

Los inventores se han interesado en el desarrollo de nuevos activos despigmentantes que tengan una mejor compatibilidad con la piel que aquellos del estado de la técnica. Ellos han puesto en evidencia que las moléculas que inactivan la proteína Quinasa A, ocasionan una despigmentación de la piel que se atribuye hasta la actualidad, a la sola inhibición de la enzima Tirosinasa fosforilada.

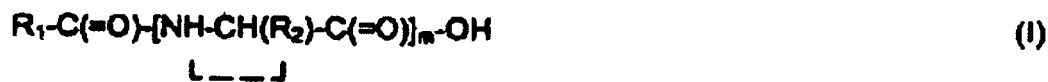
Es por esto que, según un primer aspecto, la invención tiene por objeto, la utilización de la N-(ω -undecilenoil) fenilalanina que inactiva la proteína Quinasa A en una composición que contiene un medio cosméticamente aceptable, para aclarar la piel.

La relación entre la actividad aclaradora de la piel y la inactivación de la proteína Quinasa A (PKA), puede explicarse por el siguiente mecanismo bioquímico:

La inhibición de la proteína Quinasa A induce una menor activación de la tirosinasa, debido al hecho de una menor transformación de esta última en tirosinasa fosforilada; esta menor activación de la tirosinasa causa disminución de la síntesis de melanina de donde deriva la despigmentación de la piel.

Por compuesto que inactiva la proteína Quinasa A, se designa particularmente, todo compuesto que, por incubación de la proteína Quinasa A en presencia de adenosina trifosfato y de una proteína que puede estar fosforilada, tal como por ejemplo la Histona H1, inhibe su fosforilación, con un porcentaje de inhibición superior o igual al 10%, más particularmente con un porcentaje de inhibición superior o igual al 25% y de preferencia superior o igual al 50%.

El compuesto (Ia) forma parte de la categoría de compuestos de fórmula (I):



o sus sales, en las cuales R_1 representa la cadena caracterizante de un ácido graso, saturado o insaturado, lineal o ramificado, compuesta de 3 a 30 átomos de carbono, R_2 representa la cadena caracterizante de un ácido aminado y m comprende entre 1 y 50, o de una mezcla de dichos compuestos de fórmula (I) o de sus sales, en una composición que contiene un medio cosméticamente aceptable, para aclarar la piel.

El compuesto de fórmula (I) tal como el definido anteriormente, puede estar en forma de ácido libre o en forma parcial o totalmente salinizada. Cuando el compuesto de fórmula (I) está en su forma salinizada, se trata particularmente de sales alcalinas tales como las sales de sodio, de potasio o de litio, de sales alcalino-térreas tales como las sales de calcio, de magnesio o de estroncio; de sal de amonio o de sal de un aminoalcohol como la sal de (2-hidroxi etil) amonio. También puede tratarse de sales metálicas tales como las sales divalentes de zinc o de manganeso, las sales trivalentes de hierro, de lantano, de cerio o de aluminio.

En la exposición siguiente, por compuesto de fórmula (I), se entiende compuesto de fórmula (I) en forma libre o en forma parcial o totalmente salinizado.

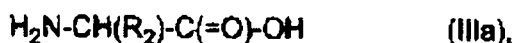
ES 2 315 487 T3

La expresión "cadena caracterizante" utilizada para definir los radicales R_1 y R_2 , designa la cadena principal no funcional del ácido graso o del ácido aminado considerado.

Por lo tanto, para un ácido graso que responde a la fórmula general $R_1-C(=O)-OH$, la cadena caracterizante será la cadena representada por R_1 .

$R_1-C(=O)-$ representa el radical, undecilenoilo.

Para un aminoácido representado por la fórmula general (IIIa):



como para un ácido aminado cíclico representado por la fórmula (IIIb):



la cadena caracterizante será la cadena representada por R_2 .

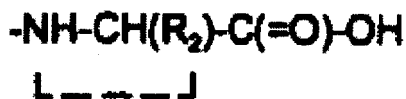
R_2 representa particularmente la cadena caracterizante del ácido aminado.

Según otra variante particular de la presente invención, se utiliza un solo compuesto de fórmula (I), tal como el definido anteriormente, en la composición que contiene el medio cosméticamente aceptable.

Según otra variante particular de la presente invención, se utiliza una mezcla de compuestos de fórmula (I) tal como el definido anteriormente y, más particularmente,

o bien una mezcla de compuestos de fórmula (I) que incluyen todos el mismo fragmento $R_1-C(=O)$

o bien una mezcla de compuestos de fórmula (I) en los cuales m es igual a 1 e incluyen todos el mismo fragmento



Los compuestos de fórmula (I) son obtenidos generalmente por N-acilación de compuestos de fórmula (IIIa) ó (IIIb), tales como los definidos anteriormente o de sus sales.

Cuando se trata de una mezcla de compuestos de fórmula (I), es por ejemplo obtenida por N-acilación de una mezcla de ácidos aminados resultantes de la hidrólisis total o parcial de proteínas de todos los orígenes.

Estas proteínas pueden ser de origen animal, tales como, por ejemplo, el colágeno, la elastina, la proteína de carne de pescado, la gelatina de pescado, la queratina o la caseína, de origen vegetal, como las proteínas de cereales, de flores o de frutas, tales como, por ejemplo, las proteínas procedentes de soya, de girasol, de avena, de trigo, de maíz, de cebada, de papa, de altramuz, de haba, de almendra dulce, de kiwi, del mango o de la manzana; también puede tratarse de proteínas obtenidas a partir de chlorellas (algas unicelulares), de algas rosadas, de levaduras o de la seda.

Esta hidrólisis se realiza por ejemplo, por calentamiento a temperaturas comprendidas entre 60 y 130°C de una proteína puesta en un medio ácido o alcalino.

Esta hidrólisis puede ser realizada igualmente por vía enzimática con una proteasa, acoplada eventualmente a una post-hidrólisis alcalina o ácida. Cuando m es superior a 1, R_2 representa una sola misma cadena o bien varias cadenas caracterizantes de diferentes ácidos aminados, según la proteína hidrolizada y el grado de hidrólisis.

ES 2 315 487 T3

Los aminogramas de algunas proteínas de origen vegetal son consignados en la tabla siguiente:

TABLA A

	Origen de la proteína (proporciones en ácidos aminados expresados en % ponderables)			
	Avena	Soya	Trigo	Girasol
Glicina	6,9	4,2	3,2	6,2
Alanina	5,9	4,2	2,6	4,8
Serina	5,6	5,1	1,7	5,1
Ácido aspártico	16,2	11,7	3,4	10,6
Ácido glutámico	28,3	19,1	37,9	23,6
Valina	2,9	5,0	4,2	4,8
Treonina	3,1	3,9	2,7	4,4

ES 2 315 487 T3

	Arginina	6,6	7,8	3,7	8,4
5	Lisina	3,6	6,2	1,9	3,2
	Prolina	4,7	5,4	11,7	3,0
	Leucina	6,4	8,1	7,1	6,4
10	Fenilalanina	1,4	5,0	5,4	4,3
	Isoleucina	2,2	4,8	3,7	4,1
15	Histidina	1,7	2,6	2,4	2,0
	Tirosina	1,5	3,5	3,1	2,7
	Metionina	1,2	1,2	1,6	1,8
20	Cisteína/Cistina	1,9	1,5	1,9	1,9
	Triptófano	-	1,0	1,0	1,3
25	Origen de la proteína (proporciones en ácidos aminados expresados en % ponderables)				
30		Altramuz	Papa	Haba	Maíz
	Glicina	0,9	4,8	4,0	2,4
35	Alanina	2,4	5,0	4,0	7,95
	Serina	6,1	5,8	4,9	5,1
40	Ácido aspártico	15,8	12,5	10,5	10,6
	Ácido glutámico	8,0	11,5	16,8	23,6
	Valina	7,9	7,1	4,5	4,8
45	Treonina	8,1	6,1	3,6	4,4
	Arginina	16,1	5,0	9,21	8,4
50	Lisina	7,1	7,8	6,5	6,2
	Prolina	-	5,1	4,4	3,0
	Leucina	7,45	10,4	7,4	8,1
55	Fenilalanina	8,6	6,4	4,4	4,3
	Isoleucina	8,7	6,1	3,9	4,1
60	Histidina	-	2,2	2,6	2,0
	Tirosina	-	5,7	3,6	2,7
	Metionina	0,6	2,4	0,8	1,8
65	Cisteína/Cistina	-	1,6	1,7	1,9

Triptófano	1, 2	1, 4	1, 2	1, 3
Ornitina	0, 4	-	-	-

5

La reacción de acilación es conocida por el hombre del arte. La misma se describe por ejemplo en la solicitud internacional publicada bajo el número WO 98/09611. La misma se aplica indiferentemente sobre un ácido aminado o sobre una mezcla de ácidos aminados. El agente de acilación consiste generalmente en un derivado activo de un ácido carboxílico de fórmula $R_1C(=O)-OH$, tal como un anhidro simétrico de este ácido o un halogenuro de ácido como el cloruro de ácido o el bromuro de ácido. También puede consistir en una mezcla de derivados activos de ácidos carboxílicos procedentes de aceites o grasas naturales de origen animal o vegetal tales como los aceites de copra, de areca, de palma, de soya, de colza, de maíz, sebo de vaca, esperma de ballena o aceite de arenque.

10

15

La invención también tiene por objeto, un procedimiento de tratamiento no terapéutico de la piel destinado a aclararla, caracterizado porque se aplica ahí una composición que contiene un medio cosméticamente aceptable y una cantidad eficaz de por lo menos el compuesto N-(ω -undecilenoil) fenilalanina que inactiva la proteína Quinasa A.

20

En las composiciones definidas anteriormente, el compuesto que inactiva la proteína Quinasa A es generalmente aplicado en una cantidad comprendida entre 0,01% y 10% de su peso, más particularmente entre 0,1% a 5% de su peso, y especialmente entre 1% y 5% de su peso.

25

Según otro aspecto particular, la invención tiene por objeto, la utilización tal como la definida anteriormente, caracterizada porque el compuesto que inactiva la proteína Quinasa A, inactiva también la adenilato ciclasa.

La relación entre la actividad aclaradora de la piel y la inactivación de la adenilato ciclasa, puede explicarse por el siguiente mecanismo bioquímico:

30

La inactivación de la adenilato ciclasa causa una menor transformación del ATP en AMP cíclico intracelular; la disminución de la tasa de AMP cíclico causa una inhibición de la proteína Quinasa A (PKA); la inhibición de la proteína Quinasa A induce una menor activación de la tirosinasa debido al hecho de una menor transformación de esta última en tirosinasa fosforilada; esta menor activación de la tirosinasa causa la disminución de la síntesis de melanina de donde se deriva la despigmentación de la piel.

35

Por compuesto que inactiva la adenilato ciclasa, se designa particularmente, en el ámbito de la presente invención, todo compuesto que, por incubación de esta enzima en presencia de adenosina trifosfato, inhibe su transformación en adenosina monofosfato cíclico, con un porcentaje de inhibición superior o igual al 10%, más particularmente con un porcentaje de inhibición superior o igual al 25% y de preferencia superior o igual al 50%.

40

Los compuestos que inactivan la adenilato ciclasa contenidos en dicha composición, son escogidos más particularmente entre los compuestos de fórmula (I), tales como los definidos anteriormente o sus sales, y especialmente entre los compuestos de fórmula (I) tales como los definidos anteriormente, en la cual $R_1-C(=O)$ es escogida entre los radicales octanillo o ω -undecilenoilo y en la cual por lo menos uno de los restos

45



50

o



55

R_2 representa la cadena caracterizante de la fenilalanina.

60

La invención también tiene por objeto un procedimiento tal como el definido anteriormente, caracterizado porque se aplica sobre la piel, una composición que contiene un medio cosméticamente aceptable y una cantidad eficaz de por lo menos el compuesto N-(ω -undecilenoil) fenilalanina que inactiva la proteína Quinasa A y la adenilato ciclasa. así como una composición farmacéutica tal como la definida anteriormente, caracterizada porque contiene una cantidad eficaz de por lo menos el compuesto N-(ω -undecilenoil) fenilalanina que inactiva la proteína Quinasa A y la adenilato ciclasa.

65

Según otro aspecto particular, la invención tiene por objeto, la utilización tal como la definida anteriormente, caracterizada porque el compuesto que inactiva la proteína Quinasa A y la adenilato ciclasa, es un compuesto que presenta afinidad frente al receptor de la Hormona Específica de Melanocito (α -MSH).

ES 2 315 487 T3

La relación entre la actividad aclaradora de la piel y la afinidad hacia el receptor de la α -MSH, puede explicarse por el siguiente mecanismo bioquímico:

5 La competencia entre la hormona α -MSH y la molécula que presenta un afinidad frente al receptor α -MSH, causa una menor tasa de fijación de dicha hormona sobre los receptores celulares; esta competencia tiene por consecuencia una inhibición de la actividad de la adenilato ciclasa que causa una menor transformación del ATP en AMP cíclico intracelular; la disminución de la tasa de AMP cíclico causa una inhibición de la enzima Proteína Quinasa A (PKA); la inhibición de la Proteína Quinasa A induce una menor activación de la tirosinasa debido al hecho de una menor transformación de esta última en tirosinasa fosforilada; esta menor activación de la tirosinasa
10 causa la disminución de la síntesis de melanina de donde se deriva la despigmentación de la piel. Es el conjunto de estas inhibiciones sucesivas lo que atestigua el carácter antagonista de la α -MSH, de los compuestos de la invención.

15 Por compuesto que presenta afinidad frente al receptor de la Hormona Específica de Melanocito, la α -MSH, se designa en el ámbito de la presente invención todo compuesto que desplaza la unión específica de un ligando radioactivo como la Nucleósido difosfato- α -Hormona Específica de Melanocito ($[I^{125}]$ NDP- α -MSH) sobre el receptor de tipo 1 de la α -Hormona Específica de Melanocito (α -MSH), denominado receptor MC1R, con un porcentaje de inhibición superior o igual al 10%, más particularmente con un porcentaje de inhibición superior o igual al 25% y de preferencia superior o igual al 50%.

20 Los antagonistas de la Hormona Específica de Melanocito, contenidos en dicha composición, son escogidos más particularmente entre los compuestos de fórmula (I), tales como los definidos anteriormente o sus sales.

25 La invención también tiene por objeto un procedimiento tal como el definido anteriormente, caracterizado porque se aplica sobre la piel, una composición que contiene un medio cosméticamente aceptable y una cantidad eficaz de por lo menos el compuesto N-(ω -undecilenoil) fenilalanina que inactiva la proteína Quinasa A y la adenilato ciclasa, que es antagonista de la Hormona Específica de Melanocito, por lo tanto una composición farmacéutica tal como la definida anteriormente, caracterizada porque contiene una cantidad eficaz de por lo menos el compuesto N-(ω -undecilenoil) fenilalanina que inactiva la proteína Quinasa A y la adenilato ciclasa, que es antagonista de la Hormona Específica de
30 Melanocito.

35 Como lo muestran los ejemplos siguientes, los compuestos aplicados en los tratamientos cosméticos o terapéuticos definidos anteriormente, se caracterizan de forma inesperada, por una actividad aclaradora de la piel superior a los compuestos del estado de la técnica. Estos son por lo tanto apropiados de forma general para los tratamientos destinados a aclarar la piel particularmente por despigmentación y más particularmente para desaparecer o atenuar las manchas coloreadas que aparecen sobre las pieles viejas.

40 Las composiciones aplicadas en dichos tratamientos, se presentan generalmente en forma de soluciones acuosas o hidroalcohólicas diluidas, en forma de emulsiones simples o múltiples, tales como las emulsiones agua en aceite (E/H), aceite en agua (H/E) o agua en aceite en agua (E/H/E), en las cuales el aceite es de naturaleza vegetal o mineral, o en forma de polvo. Estas pueden también estar dispersas o impregnadas sobre textiles o sobre materiales no tejidos que se tratan de toallitas refrescantes, de toallas de papel o de ropas.

45 Las composiciones aplicadas en dichos tratamientos son administradas al sujeto en las formas clásicas utilizadas en cosmética y en farmacia; se trata más particularmente de administraciones tópicas, orales o parenterales.

50 De forma general, los compuestos de fórmula (I) que inactivan la proteína Quinasa A, eventualmente, la adenilato ciclasa y eventualmente antagonistas de la Hormona Específica de Melanocito, que son aplicados en la invención objeto de la presente solicitud de patente, tal como la definida anteriormente, son asociados a numerosos tipos de adyuvantes o principios activos utilizados en las formulaciones cosméticas, que se trata, de cuerpos grasos, de solventes orgánicos, de espesantes, de gelificantes, de suavizantes, de antioxidantes, de opacificantes, de estabilizadores, de espumantes, de perfumes, de emulsionantes, iónicos o no, de cargas, de secuestrantes, de queladores, de conservadores, de filtros químicos o filtros minerales, de aceites esenciales, de materias colorantes, de pigmentos, de activos hidrófilos o lipófilos, de humectantes, como por ejemplo la glicerina, de conservadores, de colorantes, de perfumes, de activos
55 cosméticos, de filtros solares minerales u orgánicos, de cargas minerales, los óxidos de hierro, óxidos de titanio y el talco, de cargas sintéticas como los nylons y los poli(metacrilato de metilo) reticulados o no, de elastómeros de silicona, de sericitas o de extractos de plantas o aún de vesículas lipídicas o todos los otros ingredientes habitualmente utilizados en cosmética.

60 Como ejemplo de aceites que pueden asociarse a compuestos de fórmula (I) se pueden citar, las parafinas, las isoparafinas, los aceites minerales blancos, los aceites vegetales, los aceites animales, los aceites de síntesis, los aceites siliconados y los aceites fluorados; y más particularmente:

65 - los aceites de origen vegetal, tales como el aceite de almendras dulces, el aceite de copra, el aceite de ricino, el aceite de jojoba, el aceite de oliva, el aceite de colza, el aceite de maní, el aceite de girasol, el aceite de germen de trigo, el aceite de germen de maíz, el aceite de soya, el aceite de algodón, el aceite de alfalfa, el aceite de amapola, el aceite de calabaza, el aceite de onagro, el aceite de mijo, el aceite de cebada, el aceite de centeno, el aceite de cártamo, el aceite de bancoulier, el aceite de pasionaria, el aceite de avellana, el aceite de palma,

ES 2 315 487 T3

la mantequilla de karité, el aceite de hueso de albaricoque, el aceite de calophyllum, el aceite de sisymbrium, el aceite de aguacate, el aceite de caléndula;

- los aceites vegetales etoxilados;
- los aceites de origen animal, tales como el de escualano, el escualeno;
- los aceites minerales, tales como el aceite de parafina, el aceite de vaselina y las isoparafinas;
- los aceites sintéticos, particularmente los ésteres de ácidos grasos tales como el miristato de butilo, el miristato de propilo, el miristato de cetilo, el palmitato de isopropilo, el estearato de butilo, el estearato de hexadecilo, el estearato de isopropilo, el estearato de octilo, el estearato de isocetilo, el oleato de dodecilo, el laurato de hexilo, el dicaprilato de propilenglicol, los ésteres derivados de ácido lanólico, tales como el lanolato de isopropilo, el lanolato de isocetilo, los monoglicéridos, diglicéridos y triglicéridos de ácidos grasos como el triheptanoato de glicerol, los alquilbenzoatos, las polialfaolefinas, las poliolefinas como el poliisobuteno, los isoalcanos de síntesis como el isohexadecano, el isododecano, los aceites perfluorados y los aceites de silicona. Entre estos últimos, pueden citarse más particularmente los dimetilpolisiloxanos, metilfenilpolisiloxanos, las siliconas modificadas por aminas, las siliconas modificadas por ácidos grasos, las siliconas modificadas por alcoholes, las siliconas modificadas por alcoholes y ácidos grasos, las siliconas modificadas por grupos poliéter, las siliconas epoxi modificadas, las siliconas modificadas por grupos fluorados, las siliconas cíclicas y las siliconas modificadas por grupos alquilos.

Como otra grasa que puede asociarse a este activo, pueden citarse los alcoholes grasos o los ácidos grasos.

Entre los polímeros espesantes y/o emulsionantes utilizados en la presente invención, están por ejemplo, los homopolímeros o copolímeros del ácido acrílico o derivados del ácido acrílico, los homopolímeros o copolímeros de la acrilamida, los homopolímeros o copolímeros derivados de la acrilamida, los homopolímeros o copolímeros del ácido acrilamidometil propanosulfónico, de monómero vinílico, de cloruro de trimetilaminoetilacrilato comercializados bajo las denominaciones CARBOPOLTM, Ultrez 10, PEMULEN TR1, PEMULEN TR2, SIMULGEL A, SIMULGEL NS, SIMULGEL EPG, SIMULGEL EG, LUVIGEL EM, SALCARE SC91, SALCARE SC92, SALCARE SC95, SALCARE SC96, FLOCARE ET100, HISPAGEL, SEPIGEL 305, SEPIGEL 501, SEPIGEL 502, FLOCARE ET58, STABLEZE 06; los hidroxicoloides de origen vegetal o biosintéticos como por ejemplo la goma de xantano, la goma de karaya, los carragenatos, los alginatos; los silicatos; la celulosa y sus derivados; el almidón y sus derivados hidrófilos; los poliuretanos.

Entre las ceras utilizables en el ámbito de la presente invención, se pueden citar por ejemplo la cera de abeja; la cera de carnauba; la cera de candelilla; la cera de ouricuri; la cera de Japón; la cera de fibra de corcho o de caña de azúcar; las ceras de parafinas; las ceras de lignito; las ceras microcristalinas; la cera de lanolina; la ozocerita; la cera de polietileno; los aceites hidrogenados; las ceras de silicona; las ceras vegetales; los alcoholes grasos y los ácidos grasos sólidos a temperatura ambiente; los glicéridos sólidos a temperatura ambiente.

Entre los emulsionantes utilizables en el ámbito de la presente invención, se pueden citar por ejemplo los ácidos grasos; los ácidos grasos etoxilados; los ésteres de ácido graso y de sorbitol; los ésteres de ácidos grasos etoxilados; los poliabsorbatos; los ésteres de poliglicerol; los alcoholes grasos etoxilados; los ésteres de sacarosa; los alquilpoliglicósidos; los alcoholes grasos sulfatados y fosfatados o las mezclas de alquilpoliglicósidos y de alcoholes grasos descritos en las solicitudes de patentes francesas 2 668 080, 2 734 496, 2 756 195, 2 762 317, 2 784 680, 2 784 904, 2 791 565, 2 790 977, 2 807 435 y 2 804 432.

Como ejemplos de principios activos que se pueden asociar a compuestos de fórmula (I), con el fin de que potenciar por sinergia sus propiedades, se pueden citar los compuestos que tengan una acción aclaradora o despigmentante tales como por ejemplo la arbutina, el ácido kójico, la hidroquinona, el ácido elágico, la vitamina C, el ascorbil fosfato de magnesio, los extractos de polifenoles, los extractos de uva, los extractos de pino, los extractos de vino, los extractos de aceitunas, los extractos de jagüey, las proteínas N-aciladas, los péptidos N-acilados, los ácidos aminados N-acilados, los hidrolizados parciales de proteínas N-aciladas, los ácidos aminados, los péptidos, los hidrolizados totales de proteínas, los hidrolizados parciales de proteínas, los polioles (como por ejemplo, la glicerina, el butilen glicol...), la urea, el ácido pirrolidonecarboxílico o los derivados de este ácido, el ácido glicirretínico, el alfa-bisabolol, los azúcares o los derivados de azúcares, los polisacáridos o sus derivados, los hidroxiácidos como por ejemplo el ácido láctico, las vitaminas, los derivados de vitaminas como el Retinol, la vitamina E y sus derivados, los minerales, las enzimas, las co-enzimas, como la Coenzima Q10, las hormonas o "tipo hormona", los extractos de soya como por ejemplo, la RafferminaTM, los extractos de trigo como por ejemplo la TensinaTM o la GliadinaTM, los extractos vegetales, tales como los extractos ricos en taninos, los extractos ricos en isoflavonas o los extractos ricos en terpenos, los extractos de algas de agua dulce o marinas, las ceras esenciales, los extractos bacterianos, los minerales, los lípidos en general, los lípidos tales como las ceramidas o los fosfolípidos, los activos que tengan una acción adelgazante como por ejemplo, la cafeína o sus derivados, los activos que tengan una actividad antimicrobiana o una acción purificadora frente a las pieles grasas tales como el LipacideTM PVB, los activos que tengan una propiedad energizante o estimulante como el SepitonicTM M3 o el PhysiogénylTM el pantenol y sus derivados como el SepicapTM MP, los

ES 2 315 487 T3

activos anti-edad como el Sepilift™ DPHP, el Lipacide™ PVB, el Sepivino™, el Sepivital™, los activos hidratantes como el SEPICALM™ S, el SEPICALM™ VG y el Lipacide™ DPHP, los activos anti-envejecimiento “anti-foto envejecimiento”, los activos protectores de la integridad de la unión dermo-epidérmica, los activos que aumentan la síntesis de los compuestos de la matriz extracelular.

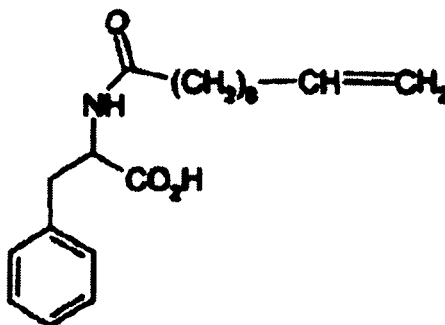
5

Como filtro solar que se puede incorporar en la composición según la invención, se pueden citar todos aquellos que figuran en la directiva cosmética 76/768/CEE modificada anexo VII.

Según un último aspecto de la presente invención, ésta tiene por objeto una emulsión cosmética que contiene la N-(ω -undecilenoil) fenilalanina de fórmula:

10

15



20

25

caracterizada porque ella contiene entre un 0,01% y un 10% de su peso, más particularmente entre 0,1% y 5% de su peso, y especialmente entre 1% y 5% de su peso.

30

El siguiente estudio experimental ilustra la invención sin imitarla sin embargo.

Evaluación in vitro de la actividad despigmentante de la undecilenoil fenilalanina

35

El objetivo de este estudio fue evidenciar la actividad despigmentante de la N-(ω -undecilenoil) fenilalanina según un mecanismo que implica el efecto antagonista de la molécula sobre el receptor de tipo 1 la α -Hormona Específica de Melanocito (α -MSH), denominado receptor MC1R. Este tipo de receptor farmacológico se encuentra principalmente en los melanocitos.

40

El control de la melanogénesis a partir de este receptor, se representa en la figura 1. Implica particularmente la adenilato ciclasa, el AMPc, la proteína quinasa A y la tirosinasa. Al fijarse sobre el receptor MC1R, la α -MSH estimula la sub-unidad α de la proteína G Estimuladora (ProtG α S). Esta última activa la enzima adenilato ciclasa que convierte la adenosina trifosfato (ATP) en adenosina monofosfato cíclico (AMPc). El AMPc activa las proteínas quinasa A (PKA), que transforman la tirosinasa en tirosinasa fosforilada que estimula la melanogénesis.

45

En una primera etapa, el estudio consistió entonces en evaluar la capacidad de fijación de la N- undecilenoil fenilalanina sobre los receptores MC1R, que se encuentran en los melanocitos.

50

En una segunda etapa, el efecto de la N-undecilenoil fenilalanina se evaluó sobre las actividades de la adenilato ciclasa, de la proteína quinasa A y de la tirosinasa.

55

En una tercera etapa, la actividad despigmentante de la N-undecilenoil fenilalanina fue determinada *in vitro* sobre cultivos de melanocitos de la línea B16/F1 por medición de los contenidos en melanina intra y extracelulares y por medición de la actividad tirosinasa.

60

En una cuarta etapa, la actividad despigmentante de la N- undecilenoil fenilalanina fue evaluada en un modelo de epidermis humanas reconstruidas pigmentadas (Fototipo IV) con el fin de probar la eficacia del producto en condiciones reales de aplicación (aplicación tópica del producto formulado).

65

Los efectos del producto fueron comparados a aquellos observados de diferentes productos despigmentantes de referencia, la hidroquinona, el ácido kójico y la arbutina.

1. Estudio de afinidad sobre los receptores MC1R

Se comparó la afinidad de la N-undecilenoil fenilalanina, del ácido kójico y de la arbutina.

ES 2 315 487 T3

Los receptores MC1R se aislaron a partir de membranas celulares de melanocitos murinos de la línea B16/F1 por el método descrito en: "Siegrist W., Oestreicher M., Stutz M., Girard J. y Eberie A. E.; J. Recep. Res., 8, 1988, 323-343".

5 La N-undecilenoil fenilalanina, la arbutina y el ácido kójico se diluyeron a una concentración de 10 mg/ml en una solución acuosa de sosa decinormal. Son probados cada uno por separado a concentraciones de 0.1 mg/ml y 1 mg/ml. La sosa no tuvo efecto sobre el parámetro estudiado.

10 Los receptores MC1R son incubados, en presencia o ausencia de estos productos, con un ligando radioactivo marcado con yodo 125, el Nucleósido difosfato- α -Hormona Específica de Melanocito [I^{125}] NDP- α -MSH a la concentración de 0,05 nM, durante 90 minutos a 22°C.

15 Los cultivos controles son incubados, en ausencia del producto, y en presencia del ligando radioactivo. Cada ensayo se realiza tres veces.

Después de 90 minutos de incubación, las membranas celulares son rápidamente filtradas y los filtros son lavados varias veces con un tampón frío. La cantidad de ligando radioactivo fijado a los receptores MC1R es medida con un contador de centelleo (Topcount, PACKARD).

20 Los resultados consignados en la siguiente tabla, son las medias de tres ensayos realizados para cada uno de los productos; son expresados en porcentajes de unión específica en relación con el grupo control y en porcentaje de inhibición de esta unión.

Productos ensayados	Actividad en relación con el control		Inhibición del enlace específico por los productos ensayados	
	a 0,1 mg/ml	a 1mg/ml	a 0,1 mg/ml	a 1mg/ml
Arbutina	100,80±0,55	96,30±4.16	0%	3,7%
Ácido kójico	104,50±1,38	124,00±1,87	0%	0%
N-undecilenoil fenilalanina	57,70±2,38	4,20±0,86	42,3%	95,8%

50 Los resultados evidencian que a las concentraciones ensayadas, ni la arbutina ni el ácido kójico, que son los compuestos despigmentantes de referencia, desplazan la unión específica del ligando, el [I^{125}] NDP- α -MSH; al contrario de la N-undecilenoil fenilalanina desplaza respectivamente un 42% y un 96% de la unión del [I^{125}] NDP- α -MSH a los receptores MC1R.

55 2- Estudio de la activación de la adenilato ciclasa

Se comparó la influencia de la N-undecilenoil fenilalanina, del ácido kójico y de la arbutina sobre la conversión del ATP en AMPc por una dosificación radioinmunológica.

60 La adenilato ciclasa que convierte el ATP en AMPc, se extrae de cerebro de ratas, por el método descrito en "Salamon Y., Londos C. y Rodbell M.; Anal. Biochem., 58, 1974, 541-548"; luego la misma es activada por 10 μ M de forskolina.

65 La N-undecilenoil fenilalanina, la arbutina y el ácido kójico se diluyeron a una concentración de 10 mg/ml en una solución acuosa de sosa decinormal. Son ensayados cada uno por separado a la concentración de 1 mg/ml. La sosa no tuvo efecto sobre el parámetro estudiado.

ES 2 315 487 T3

La enzima activada se incubaba, en presencia o ausencia de estos productos, y en presencia de ATP a 0,5 mM, durante 30 minutos a 30°C.

5 Los cultivos controles se incubaban, en ausencia de producto, y en presencia de ATP. Cada ensayo se realiza tres veces.

Después de 30 minutos de incubación, la cantidad de AMPc producido es evaluada por una dosificación radioinmunológica realizada con la ayuda de un kit comercial; la radioactividad es medida con un contador de centelleo (Topcount, PACKARD), una menor radioactividad se traduce en una menor activación de la adenilato ciclasa.

10 Los resultados consignados en la siguiente tabla, son las medias de tres ensayos realizados para cada uno de los productos; son expresados en porcentaje de actividad enzimática en relación con el grupo control y en porcentaje de inhibición.

15

Productos ensayados	Actividad enzimática en relación con el control	Inhibición de la actividad de la adenilato ciclasa
Arbutina	109,7 ± 4,6%	0%
ácido kójico	45,0 ± 6,5%	55%
N-undecilenoil fenilalanina	-16,0 ± 0,5%	100%

35

Los resultados evidencian que a 1 mg/ml, mientras que la arbutina no induce ningún efecto sobre esta enzima, el ácido kójico induce un efecto medio y la N-undecilenoil fenilalanina una inactivación incompleta.

40 3- Estudio de la actividad de la proteína quinasa A

Se comparó la influencia de la N-undecilenoil fenilalanina, del ácido kójico y de la arbutina sobre la fosforilación de la tirosinasa por la proteína quinasa A (PKA).

45 La proteína quinasa A se extrae del cerebro de la vaca por el método descrito en "Chijiwa T., Mishima A., Hagiwara M., Sano M., Hayashi K., Inoue T., Naito K., Shioka T., Hidaka H., J. Biol. Chem., 265, 1990, 5267-5272". Luego la misma es activada por 3 μM de AMPc.

50 La N-undecilenoil fenilalanina, la arbutina y el ácido kójico se diluyeron a una concentración de 10 mg/ml en una solución acuosa de sosa decinormal. Son ensayados cada uno por separado a la concentración de 1 mg/ml. La sosa no tuvo efecto sobre el parámetro estudiado.

55 La enzima activada se incubaba, en presencia o en ausencia de estos productos, y en presencia de ATP radioactivo marcado con P³³ ([γ³³P] ATP) y de 200 μg/ml de histona H₁, durante 20 minutos a 30°C.

Los cultivos controles son incubados, en ausencia de producto, y en presencia de ATP radioactivo y de histona H₁. Cada ensayo se realiza tres veces.

60 Después de 20 minutos de incubación, la cantidad de histona H₁, fosforilada marcada con P³³ es medida con un contador de centelleo (Topcount, PACKARD), una menor radioactividad se traduce en una menor activación de la proteína quinasa A.

65 Los resultados consignados en la siguiente tabla, son las medias de tres ensayos realizados para cada uno de los productos; son expresados en porcentaje de actividad enzimática en relación con el grupo control y en porcentaje de inhibición.

ES 2 315 487 T3

Productos ensayados	Actividad enzimática en relación con el control	Inhibición de la actividad de la proteína quinasa A
Arbutina	90,9 ± 8,4%	9,1%
ácido kójico	113,3 ± 5,0%	0%
N-undecilenoil fenilalanina	-0,4 ± 0,3%	100%

Los resultados evidencian que a 1 mg/ml la N-undecilenoil fenilalanina inhibe completamente la actividad de la proteína quinasa A contrariamente al ácido kójico o a la arbutina.

4- Estudio de la actividad de la tirosinasa fosforilada

Se comparó la influencia de la N-undecilenoil fenilalanina, de la hidroquinona, del ácido kójico y de la arbutina sobre la actividad de la tirosinasa fosforilada midiendo la transformación de L-Tirosina en L-DOPA y DOPAquinona que es un producto coloreado cuantificable por espectrometría (a 490 nm).

La tirosinasa utilizada es un producto comercial extraído de champiñones.

La N-undecilenoil fenilalanina, la hidroquinona, la arbutina y el ácido kójico se diluyeron a una concentración de 10 mg/ml en una solución acuosa de sosa decinormal. Son ensayados cada uno por separado a las concentraciones de 0,1 mg/ml y 1 mg/ml. La sosa no tuvo efecto sobre el parámetro estudiado.

La tirosinasa a 66,66 UI/ml es incubada, en presencia o en ausencia de estos productos, y en presencia de tirosina a 0,2 mM, durante 10 minutos a 37°C.

Los cultivos controles son incubados, en ausencia de producto, y en presencia de tirosinasa y de L-tirosina. Cada ensayo se realiza tres veces.

Después de 10 minutos de incubación, la cantidad de histona de DOPAquinona formada se mide con un espectrofotómetro a 490 nm.

Los resultados consignados en la siguiente tabla, son las medias de tres ensayos realizados para cada uno de los productos; son expresados en U/l de actividad tirosinasa y en porcentaje de inhibición de la actividad enzimática en relación con el control.

Productos ensayados	Porcentaje de inhibición de la actividad de la tirosinasa por los productos ensayados en relación con el control	
	a 0,1 mg/ml	a 1 mg/ml
Hidroquinona	78	80
Arbutina	73	80
ácido kójico	76	80
N-undecilenoil fenilalanina	80	100

Los resultados ponen en evidencia que a concentraciones de 0,1 mg/ml y de 1mg/ml, el conjunto de productos ensayados inhibe de forma significativa, la actividad de la tirosinasa. Sin embargo la actividad inhibitora de la undecilenoil fenilalanina es superior a aquella de los otros productos ensayados.

ES 2 315 487 T3

5- Estudio de la actividad despigmentante en cultivos de melanocitos B16/F1

Se comparó la influencia de la N-undecilenoil fenilalanina, de la hidroquinona, del ácido kójico y de la arbutina sobre la producción de melanina intracelular y de melanina extracelular, en cultivos de melanocitos B16/F1 y sobre la actividad de la tirosinasa fosforilada.

Los melanocitos murinos de la línea B16/F1 se siembran en placas de cultivo de 96 pocillos a una densidad de 1500 células/pocillo. Las células son cultivadas en un medio de cultivo (medio MCM) a 37°C en una atmósfera húmeda que contiene 5% de CO₂. Las células son utilizadas a un 60% de confluencia, que son 4 días después de la siembra.

El medio MCM tiene la siguiente composición: Medio DMEM (Dulbecco's Modified Eagle's Medium) que contiene 4,5 g/l de glucosa adición de L-Glutamina (2 mM), de penicilina (50 UI/ml), de estreptomycin (50 µg/ml) y de suero fetal bovino (10% v/v).

La N-undecilenoil fenilalanina se diluye a 4 mg/ml en una solución acuosa de sosa decinormal. Es ensayada a 40 µg/ml en el medio MCM. La sosa no tuvo efecto sobre los parámetros analizados.

La hidroquinona es ensayada a 5 µg/ml en el medio MCM. Teniendo en cuenta su toxicidad, no se ensayó a 40 µg/ml.

La arbutina y el ácido kójico son ensayados a 40 µg/ml en el medio MCM.

Los cultivos de melanocitos son incubados en presencia de los productos a ensayar o los productos de referencia durante 72 horas a 37°C, en una atmósfera húmeda que contiene 5% de CO₂.

Los cultivos controles son incubados, en ausencia de los productos, en el medio MCM. Estos cultivos controles se realizan sobre cada placa de cultivo.

Cada ensayo se realiza seis veces.

5.1- Medición del contenido extracelular en melanina

Después de 72 horas de incubación, los medios de incubación de células (n=6) son extraídos y almacenados a -80°C hasta el momento de la evaluación de los efectos. La melanina extracelular se cuantifica por espectrometría a 450 nm. Una serie de calibrado de melanina se realiza en paralelo.

Los resultados son expresados en µg/ml de melanina extracelular y en porcentaje de inhibición en relación con el grupo control.

Productos ensayados	Melanina extracelular (control: 43 ± 11 µg/ml)	Inhibición de la producción de melanina extracelular.
Hidroquinona a 5 µg/ml	7 ± 11 µg/ml	85 %
Arbutina a 40 µg/ml	23 ± 6 µg/ml	47 %
ácido kójico a 40 µg/ml	13 ± 2 µg/ml	70 %
N-undecilenoil fenilalanina a 40 µg/ml	12 ± 1 µg/ml	72 %

ES 2 315 487 T3

5.2- Medición del contenido intracelular de melanina

Después de 72 horas de incubación, una parte de los tapices celulares (n=3) es aclarada con tampón fosfato salino (PBS; pH=7,4) cuya composición es la siguiente: NaCl: 8g/l; Na₂HPO₄: 1,15g/l; KH₂PO₄: 0,2g/l; KCl: 0,2 g/l; CaCl₂: 0,1 g/l; MgCl₂: 0,1g/l. La melanina intracelular es solubilizada por una incubación, bajo agitación; durante 30 minutos a temperatura ambiente en presencia de sosa decanormal.

La melanina intracelular se cuantifica por espectrometría a 450 nm. Una serie de calibrado de melanina se realiza en paralelo.

Los resultados son expresados en $\mu\text{g/ml}$ de melanina intracelular y en porcentaje de inhibición en relación con el grupo control.

Productos ensayados	Melanina intracelular obtenida (control: $20 \pm 4 \mu\text{g/ml}$)	Inhibición de la producción de melanina intracelular
Hidroquinona a 5 $\mu\text{g/ml}$	$0,2 \pm 0,1 \mu\text{g/ml}$	100 %
Arbutina a 40 $\mu\text{g/ml}$	$16 \pm 2 \mu\text{g/ml}$	19 %
ácido kójico a 40 $\mu\text{g/ml}$	$17 \pm 1 \mu\text{g/ml}$	17 %
N-undecilenoil fenilalanina a 40 $\mu\text{g/ml}$	$7 \pm 3 \mu\text{g/ml}$	66 %

5.3- Medición de la actividad de la tirosinasa fosforilada

Después de 72 horas de incubación, la segunda parte de los tapices celulares (n=3) es aclarada con PBS. Las células son lisadas con TritonTM X100 a una concentración de 0,1% (p/v) durante 30 minutos a temperatura ambiente. La actividad de la tirosinasa endógena se evalúa por adición de 0,1% (p/v) de L-DOPA, después incubación de 3 horas a 37°C protegido del aire y de la luz. La DOPAquinona, formada por la reacción entre la tirosinasa y la L-DOPA, es medida por espectrometría a 450 nm. Una serie de calibrado de tirosinasa purificada se realiza en paralelo.

Los resultados son expresados en UI/ml de actividad tirosinasa y en porcentaje de inhibición en relación con el grupo control.

ES 2 315 487 T3

Productos ensayados	Actividad tirosinasa (control: $9,8 \pm 0,3$ UI/ml)	Inhibición de la actividad de la tirosinasa
Hidroquinona a 5 $\mu\text{g/ml}$	$3,0 \pm 0,3$ UI/ml	69 %
Arbutina a 40 $\mu\text{g/ml}$	$7,6 \pm 1,1$ UI/ml	23 %
ácido kójico a 40 $\mu\text{g/ml}$	$6,8 \pm 0,1$ UI/ml	31 %
N-undecilenoil fenilalanina a 40 $\mu\text{g/ml}$	$3,2 \pm 0,6$ UI/ml	67 %

5.4- Medición del contenido intracelular en proteínas

Esta dosificación permite evaluar la citotoxicidad de los productos ensayados. Se realiza en los lisados celulares preparados como se describe en el párrafo precedente.

La dosificación de las proteínas se realiza según el método de azul de Coomassie descrito por: "Bradford M.; Anal. Biochem., 72, 1976, 248-254". La medición se realiza por espectrometría a 640 nm. Una serie de calibración de albúmina sérica bovina (BSA) se realiza en paralelo.

Los resultados son expresados en mg/ml de proteínas y en porcentaje de inhibición en relación con el grupo control.

Productos ensayados	Proteínas totales (control: $0,45 \pm$ $0,01$)	Inhibición de la cantidad de proteínas
Hidroquinona a 5 $\mu\text{g/ml}$	$0,28 \pm 0,01$ mg/ml	38 %
Arbutina a 40 $\mu\text{g/ml}$	$0,43 \pm 0,01$ mg/ml	5 %
ácido kójico a 40 $\mu\text{g/ml}$	$0,41 \pm 0,02$ mg/ml	10 %
N-undecilenoil fenilalanina a 40 $\mu\text{g/ml}$	$0,38 \pm 0,01$ mg/ml	17 %

5.5- Análisis de los resultados

Después de 72 de incubación, la hidroquinona, ensayada a 5 $\mu\text{g/ml}$, inhibe respectivamente de 85% el contenido extracelular en melanina, 100% el contenido intracelular en melanina y de 69% la actividad tirosinasa. Sin embargo el efecto despigmentante de la hidroquinona proviene en parte de su efecto citotóxico pues una disminución de 38% de la cantidad total de proteínas es observada.

La arbutina, ensayada a 40 $\mu\text{g/ml}$, inhibe respectivamente de 47% el contenido extracelular en melanina, de 19% el contenido intracelular en melanina y de 23% la actividad tirosinasa. A esta concentración, la arbutina no tuvo efecto sobre el contenido total en proteínas.

El ácido kójico, ensayado a 40 $\mu\text{g/ml}$, inhibe respectivamente de 70% el contenido extracelular en melanina, de 17% el contenido intracelular en melanina y de 31% la actividad tirosinasa. A esta concentración, el ácido kójico no tuvo efecto sobre el contenido total en proteínas.

La N-undecilenoil fenilalanina, ensayada a 40 $\mu\text{g/ml}$, inhibe respectivamente de 72% el contenido extracelular en melanina, de 66% el contenido intracelular en melanina y de 67% la actividad tirosinasa. A esta concentración, la N-undecilenoil fenilalanina disminuyó de 17% el contenido total en proteínas.

La N-undecilenoil fenilalanina presenta entonces una actividad despigmentante evidenciada por una disminución concomitante de los contenidos intra y extracelulares en melanina y de la actividad tirosinasa. Su actividad despigmentante no está vinculada, contrariamente a la de la hidroquinona, a un efecto citotóxico. Presenta una actividad despigmentante superior a la de la arbutina y el ácido kójico.

25 6- Estudio de la actividad despigmentante en las epidermis humanas reconstruidas

Se comparó la influencia de la N-undecilenoil fenilalanina, de la hidroquinona, del ácido kójico y de la arbutina sobre la producción de melanina intracelular y de melanina extracelular, en los cultivos de melanocitos B16/F1 y sobre la coloración de las epidermis.

Las epidermis humanas pigmentadas (Fototipo IV) suministradas por SKINETHIC de 0,63 cm^2 , son reconstruidas a partir de un co-cultivo de queratinocitos humanos normales (piel del antebrazo, donante de 3 años, 2^{do} trozo) y de melanocitos humanos normales (piel del antebrazo, donante de 4 años del Fototipo IV, 3^{er} trozo). La relación queratinocitos/melanocitos es de 10:1. Los cocultivos son sembrados sobre filtros inertes de policarbonato. Son cultivados durante 10 días en el medio suministrado por SKINETHIC constituido de medio MCDB 153, con adición de 5 $\mu\text{g/ml}$ de insulina, de 1,5 mM de calcio y de factores de crecimiento.

Para estos ensayos, los productos son ensayados después de haber sido incorporados en una formulación cosmética que consiste en una emulsión que comprende una fase acuosa, 10% en peso de una fase grasa (LanolTM 1688), 2% en peso de un emulsionante (SIMUGELTM EG), 0,5% en peso de conservadores (0,3% de SEPICIDETM HB+ 0,2% de SEPICIDETM CI). Después de la incorporación del principio activo, la formulación se ajusta a pH=5,5.

La N-undecilenoil fenilalanina, la arbutina y el ácido kójico son incorporados calientes (75°C) en una proporción de 1% a 3% en peso por volumen (p/v).

A causa de su toxicidad, la hidroquinona es incorporada a una concentración de 0,1% en peso sobre volumen (p/v).

Las epidermis se cultivan en placas de 6 pocillos que contienen 1 ml de medio descrito anteriormente. Son incubadas a 37°C en una atmósfera húmeda que contiene 5% de CO₂.

Las formulaciones que contienen los diferentes principios activos, son aplicadas en la superficie de las epidermis, a razón de 2 μl /epidermis, con ayuda de un inoculador bacteriológico estéril. La aplicación se realiza todos los días, durante, 4 días consecutivos.

Las epidermis controles, son tratadas, con una formulación sin principio activo. Cada ensayo es realizado dos veces.

6.1 Medición cromatométrica de la pigmentación de las epidermis

Tres días después de la primera aplicación tópica, el color de la epidermis es evaluado por un cromatómetro (MINOLTA) midiendo los parámetros L*, a* y b* siguientes:

L* es el índice de luminosidad. Un producto despigmentante debe aumentar este parámetro:

a* representa el espectro de color de azul a verde. Un producto despigmentante debe disminuir este parámetro:

b* representa el espectro de color de rojo a amarillo. Un producto despigmentante debe disminuir este parámetro.

ES 2 315 487 T3

Los resultados son expresados en unidad arbitraria (UA) de cada parámetro y en porcentaje del grupo control.

Productos ensayados	L*		a*		b*	
	control: 41,38 ± 0,69 UA		control: 10,23 ± 0,51 UA		control: 7,54 ± 0,00 UA	
	UA	%	UA	%	UA	%
Hidroquinona formulada a 0,1% (p/v)	40,59 ± 2,41	-9	10,19 ± 1,21	0	7,73 ± 0,03	+3
Arbutina formulada a 1% (p/v)	40,48 ± 0,85	+2	10,02 ± 0,13	-2	7,64 ± 0,19	+1
Arbutina formulada a 3% (p/v)	41,13 ± 0,54	+1	9,86 ± 0,18	-4	7,73 ± 0,34	+3
ácido kójico formulado a 1% (p/v)	40,11 ± 1,41	+3	10,90 ± 0,51	+7	7,67 ± 0,03	+3
ácido kójico formulada a 3% (p/v)	41,69 ± 0,65	0	9,36 ± 1,02	-8	7,13 ± 0,09	-5
N-undecilenoil fenilalanina formulada a 1% (p/v)	41,34 ± 1,15	0	9,01 ± 1,33	12	5,96 ± 0,42	-21
N-undecilenoil fenilalanina formulada a 1% (p/v)	45,228 ± 1,49	+9	8,78 ± 0,52	-14	5,38 ± 0,06	-29

6.2 Medición del contenido intracelular en melanina

Tres días después de la primera aplicación tópica y después de la medición cromatométrica, la melanina intracelular es extraída por una incubación de 45 minutos a 100°C en Soluène™ 350 (200 µl/epidermis), como se describe en: "Ozeki H., Ito, S., Wakamatsu K., Hirobe T.; J. Invest. Dermatol. 105, 1995, 361-366". Las muestras son centrifugadas durante 10 minutos a 10 000 rpm.

La melanina intracelular extraída es medida por espectrofotometría a 500 nm. Una serie de calibración de melanina se realiza en paralelo.

Los resultados son expresados en mg/ml de melanina intracelular y en porcentaje de inhibición en relación con el grupo control.

ES 2 315 487 T3

5	Productos ensayados	Melanina intracelular (control: 347 ± 2 µg/ml)	Inhibición de la cantidad de melanina intracelular
10	Hidroquinona formulada a 0,1% (p/v)	317 ± 0 µg/ml	-9 %
15	Arbutina formulada a 1% (p/v)	242 ± 46 µg/ml	-28 %
20	Arbutina formulada a 3% (p/v)	263 ± 16 µg/ml	-24 %
25	ácido kójico formulado a 1% (p/v)	273 ± 2 µg/ml	-21 %
30	ácido kójico formulado a 3% (p/v)	234 ± 19 µg/ml	-33 %
35	N-undecilenoil fenilalanina formulada a 1% (p/v)	264 ± 9 µg/ml	-24 %
40	N-undecilenoil fenilalanina formulada a 3% (p/v)	264 ± 11 µg/ml	-24%
45	N-undecilenoil fenilalanina formulada a 3% (p/v)		
50			

55 6.3 Análisis de los resultados

60 La hidroquinona, ensayada en aplicación tópica a una concentración de 0,1% (p/v) en una emulsión, no tiene efecto significativo ni sobre los parámetros cromatométricos L*, a*, y b* ni sobre el contenido en melanina de las epidermis humanas reconstruidas. La ausencia de efecto despigmentante de la hidroquinona o sea es debido a la reducida concentración ensayada escogida deliberadamente como no citotóxica, o sea a la corta duración del tratamiento.

65 La arbutina, ensayada en aplicación tópica a 1 y 3% (p/v) en una emulsión, no tiene efecto significativo sobre los parámetros cromatométricos L*, a*, y b*. En cambio inhibe respectivamente de 28 y 24% el contenido en melanina de las epidermis humanas reconstruidas.

El ácido kójico, ensayado en aplicación tópica a 1 y 3% (p/v) en una emulsión, no tiene efecto significativo sobre los parámetros cromatométricos L*, a*, y b*. En cambio inhibe respectivamente de 21 y 33% el contenido en melanina de las epidermis humanas reconstruidas.

ES 2 315 487 T3

La N-undecilenoil fenilalanina, ensayada en aplicación tópica a 1% (p/v) en una emulsión, inhibe de 15% el parámetro cromatométrico b* y de 24% el contenido en melanina de las epidermis humanas reconstruidas.

5 A una concentración de 3% (p/v) la N-undecilenoil fenilalanina aumenta de 9% el parámetro L*, y disminuye de forma concomitante de 14% el parámetro de color a*, de 29% el parámetro de color b* y de 24% el contenido en melanina en las epidermis reconstruidas.

10 Estos ensayos sobre epidermis reconstruidas, hacen parecer que la N-undecilenoil fenilalanina presenta una actividad despigmentante mejorada en relación con aquellas de los productos de referencia, en que ella influye tanto sobre los parámetros cromatométricos como sobre las tasas de melanina intracelular.

7- Conclusión

15 El conjunto de resultados obtenidos en este estudio evidencian una fuerte actividad despigmentante de la N-undecilenoil fenilalanina. Esta última es cuantificada tanto en los cultivos de melanocitos como en el modelo 3D compuesto de epidermis humanas reconstruidas. Contrariamente a los productos de referencia, la actividad despigmentante de la N-undecilenoil fenilalanina pone en juego los receptores MC1R. La N-undecilenoil fenilalanina es un antagonista del receptor MC1R e inhibe todas las etapas del ciclo de la α -MSH implicadas en la melanogénesis.

Ejemplos de formulaciones cosméticas

Ejemplo 2

Emulsión de cuidado aclarante para pieles maduras

20	MONTANOV™ 202	02,00 %
30	MONTANOV™ 68	02,00 %
	Triglicéridos cápricos	10,00 %
35	caprílicos	
	Escualano	10,00 %
	Agua	QSP 100%
40	N-undecilenoil fenilalanina	01,00 %
	SEPIGEL™ 305	00,70 %
45	Ascorbil fosfato de	02,00 %
	magnesio	
	SEPICIDE™ HB	00,30 %
50	SEPICIDE™ CI	00,20 %
	Perfume	00,50 %

55

60

65

ES 2 315 487 T3

Ejemplo 3

Emulsión de cuidado tonificante para pieles maduras

5	MONTANOV™ 202	03,00 %
	Sosa a 24 %	00,06 %
10	Etil hexil metoxicinamato	06,00 %
	LANOL™ 1688	08,00 %
	Benzofenona-3	04,00 %
15	Agua	QSP 100
	N-undecilenoil fenilalanina	02,00 %
20	SIMULGEL™ NS	00,50 %
	Sepilift™ DPHP	00,50 %
	Dimeticona	02,00 %
25	Ciclometicona	02,00 %
	Arbutina	0,3 %
30	SEPICIDE™ HB	00,30 %
	SEPICIDE™ CI	00,20 %
	Perfume	00,10 %

35

Ejemplo 4

Crema de gel aclarante de alfa-hidroxiácidos

40	Hidroxietilcelulosa	00,80 %
	Etilhexil octanoato	05,00 %
45	Lactato de sodio al 60 %	14,00 %
	Agua	QSP 100 %
	N-undecilenoil fenilalaninas	03,00 %
50	SEPIGEL™ 305	04,20 %
	SEPICIDE™ HB	02,00 %
55	SEPICIDE™ CI	03,00 %
	Perfume	00,10 %

60

65

ES 2 315 487 T3

Ejemplo 5

Emulsión de cuidado aclaradora

5	MONTANOV™ L	01,00 %
	Cetil alcohol	02,00 %
10	Isodecil neopentanoato	12,00 %
	Cetearil octanoato	10,00 %
	Glicerina	03,00 %
15	Agua	QSP 100 %
	N-undecilenoil fenilalanina	01,00 %
20	SIMULGEL™ EG	02,00 %
	Ácido kójico	01,00 %
	SEPICIDE™ HB	00,30 %
25	SEPICIDE™ CI	00,20 %
	Perfume	00,10 %

30 Ejemplo 6

Loción aclarante

35	ORAMIX™ CG110	05,00 %
	KATHON™ CG	00,08 %
	Agua	QSP 100 %
40	N-undecilenoil fenilalanina	01,00 %
	Perfume	00,10 %

45 Esta loción puede venderse en frascos o impregnada en toallitas refrescantes.

Las definiciones de los productos comerciales utilizados en los ejemplos son los siguientes:

50 SEPILIFT™ DHP (Denominación INCI: Dipalmitoil hidroxiprolina), comercializado por la sociedad SEPPIC.

SEPICIDE™ HB es una mezcla conservadora que comprende Fenoxietanol, metilparaben, etilparaben, propilparaben y butil paraben, comercializado por la sociedad SEPPIC.

55 SEPICIDE™ CI es el imidazolidinil urea, comercializado por la sociedad SEPPIC.

SEPICALM™ VG (Denominación INCI: sodio palmitoil prolina se extrae de la flor de nenúfar), comercializado por la sociedad SEPPIC.

60 KATHON™ CG (Denominación INCI: Metil isotiazolinona/Metil cloroisotiazolinona).

SIMULGEL™ EG es un látex inverso de copolímero (denominación INCI: Acrilato de sodio/Copolímero de sodioacriloiddimetil taurato e isohexadecano y Poliabsorbato 80) comercializado por la sociedad SEPPIC.

65 SIMULGEL™ NS es un látex inverso de copolímero (denominación INCI: hidroxietilacrilato/Copolímero de sodio acriloiddimetil taurato y escualano y Poliabsorbato 60), comercializado por la sociedad SEPPIC.

LANOL™ 1688 es cetearil etilhexanoatel comercializado por la sociedad SEPPIC.

ES 2 315 487 T3

SEPIGEL™ 305 es un látex inverso de polímero (denominación INCI: poliacrilamida e isoparafina en C13-C14 y lauret 7).

5 MONTANOV™ L es un agente emulsionante a base de alcohol en C14-C22 y de alquil poliglucósido en C12-C20.

MONTANOV™ 68 es un agente emulsionante a base de alcohol cetearílico y cetearil poliglucósido.

10 MONTANOV™ 202 es un agente emulsionante a base de alcohol araquidílico de alcohol behenílico y de araquidil poliglucósido.

15

20

25

30

35

40

45

50

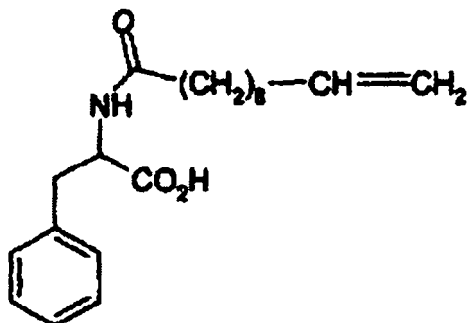
55

60

65

REIVINDICACIONES

1. Utilización no terapéutica para aclarar la piel de N-(ω -undecilenoil) fenilalanina de fórmula (Ia) la cual inactiva la proteína Quinasa A en una composición cosmética que contiene un medio cosméticamente aceptable.



(Ia).

2. Utilización tal como se define en la reivindicación 1 de la N-(ω -undecilenoil) fenilalanina de fórmula (Ia), **caracterizada** porque el compuesto de fórmula (Ia), el cual inactiva la proteína quinasa A, también inactiva la adenilato ciclasa.

3. Utilización tal como se define en la reivindicación 1 de la N-(ω -undecilenoil) fenilalanina de fórmula (Ia), **caracterizada** porque el compuesto de fórmula (Ia), el cual inactiva la proteína quinasa A y la adenilato ciclasa, es un compuesto que presenta afinidad frente al receptor de la Hormona Específica de Melanocito (α -MSH).

4. Procedimiento de tratamiento no terapéutico de la piel destinado a aclararla, **caracterizado** porque es administrado al sujeto, una composición cosmética que contiene un medio cosméticamente aceptable y una cantidad efectiva de N-(ω -undecilenoil) fenilalanina de fórmula (Ia), la cual inactiva la proteína quinasa A.

5. Procedimiento tal como se define en la reivindicación 4, en el cual dicha composición cosmética contiene entre 0,01% y 10% de su peso total, más particularmente entre 0,1% y 5% de su peso total y especialmente entre 1% y 5% de su peso total de N-(ω -undecilenoil) fenilalanina de fórmula (Ia) la cual inactiva la proteína quinasa A.

6. Procedimiento tal como se define en las reivindicaciones 4 ó 5, **caracterizado** porque la N-(ω -undecilenoil) fenilalanina de fórmula (Ia), la cual inactiva la proteína quinasa A, también inactiva la adenilato ciclasa.

7. Procedimiento tal como se define en la Reivindicación 6, **caracterizado** porque el compuesto de fórmula (Ia), el cual inactiva la proteína quinasa A y la adenilato ciclasa, presenta afinidad frente al receptor de la Hormona Específica de Melanocito.

8. Utilización de la N-(ω -undecilenoil) fenilalanina de fórmula (Ia) la cual inactiva la proteína Quinasa, para la preparación de una composición farmacéutica destinada a aclarar la piel.

9. Utilización tal como se define en la reivindicación 8 de la N-(ω -undecilenoil) fenilalanina de fórmula (Ia), **caracterizada** porque la composición farmacéutica preparada contiene entre 0,01% y 10% de su peso total, más particularmente entre 0,1% y 5% de su peso total y especialmente entre 1% y 5% de su peso total de N-(ω -undecilenoil) fenilalanina de fórmula (Ia) la cual inactiva la proteína quinasa A.

10. Utilización tal como se define en cualquiera de las Reivindicaciones 8 ó 9 de la N-(ω -undecilenoil) fenilalanina de fórmula (Ia), **caracterizada** porque el compuesto de fórmula (Ia), el cual inactiva la proteína quinasa A, también inactiva la adenilato ciclasa.

11. Utilización tal como se define en la Reivindicación 10 de la N-(ω -undecilenoil) fenilalanina de fórmula (Ia), **caracterizada** porque el compuesto de fórmula (Ia), el cual inactiva la proteína quinasa A y la adenilato ciclasa, presenta afinidad frente al receptor de la Hormona Específica de Melanocito.

12. Emulsión cosmética, **caracterizada** porque contiene entre 0,01% y 10% de su peso total, más particularmente entre 0,1% a 5% de su peso total y especialmente entre 1% y 5% de su peso total del compuesto de fórmula (Ia).