

19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **3 018 759**

51 Int. Cl.:

C07D 487/04 (2006.01)

C07D 209/12 (2006.01)

A61K 8/49 (2006.01)

A61Q 19/02 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

86 Fecha de presentación y número de la solicitud internacional: **10.03.2017 PCT/US2017/021843**

87 Fecha y número de publicación internacional: **14.09.2017 WO17156424**

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **10.03.2017 E 17711992 (2)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **15.01.2025 EP 3426658**

54 Título: **Malassezina y sus análogos como agentes aclarantes de la piel**

30 Prioridad:

10.03.2016 US 201662306468 P

45 Fecha de publicación y mención en BOPI de la traducción de la patente:
19.05.2025

73 Titular/es:

VERSCOLOR TECHNOLOGIES, LLC (100.00%)
3130 Wilshire Boulevard, Suite 600
Santa Monica, CA 90403, US

72 Inventor/es:

EINZIGER, MICHAEL y
SIMPSON, ANN MARIE

74 Agente/Representante:

IZQUIERDO BLANCO, María Alicia

ES 3 018 759 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

Malassezina y sus análogos como agentes aclarantes de la piel

5 Descripción

REFERENCIA CRUZADA A SOLICITUDES RELACIONADAS

10 La presente invención reivindica el beneficio de la solicitud provisional de Estados Unidos con número de serie 62/306,468, presentada el 10 de marzo de 2016.

CAMPO DE LA INVENCIÓN

15 La presente invención se refiere a composiciones cosméticas como se define en la reivindicación 1 que comprenden compuestos producidos por una levadura *Malassezia*, así como análogos químicos de compuestos producidos por una levadura *Malassezia*. La presente invención también se refiere a métodos cosméticos como se define en la reivindicación 2 de uso de compuestos (incluidos sus análogos) y composiciones.

20 **ANTECEDENTES DE LA INVENCIÓN**

En todo el mundo, las personas utilizan agentes aclarantes de la piel para lograr una serie de objetivos cosméticos, entre los que se incluyen la producción de un efecto antienvjecimiento, la corrección del daño solar y el cumplimiento de ciertos estándares culturales de belleza. Muchos productos aclarantes de la piel disponibles comercialmente, aunque son eficaces en diversos grados, contienen ingredientes nocivos, algunos de los cuales se han relacionado con el cáncer. Por tanto, existe la necesidad de nuevos agentes y formulaciones aclarantes de la piel que exhiban niveles más altos de seguridad y/o eficacia que los agentes que están actualmente en el mercado.

30 *Malassezia* es un género de levadura lipofílica que se encuentra comúnmente en la flora normal de la piel humana. *Malassezia* es responsable de una serie de enfermedades de la piel, incluida la tiña versicolor (pitiriasis versicolor), la dermatitis seborreica y la dermatitis atópica.

35 Wille G. et al., "Malassezin, A Novel Agonist of the Aryl Hydrocarbon Receptor from the Yeast *Malassezia furfur*", BIOORGANIC & MEDICINAL CHEMISTRY, PERGAMON, GB, vol. 9, no. 4, 1 de abril de 2001, páginas 955-960 se refiere a la levadura *Malassezia furfur* que convierte el triptófano en varios compuestos indólicos, uno de los cuales, la malassezina, se identificó y sintetizó a partir de N-Boc-indol-3-carbaldehído en cinco etapas, y se descubrió que cicliza fácilmente a indolo[3,2-b] carbazol, que se sabe que interactúa con el receptor de hidrocarburos de arilo (AHR).

40 US 2016/039754 A1 se refiere a un método para fabricar diindolilmetanos e indolil/pirrolometanos y los compuestos resultantes que son eficaces para modular la actividad de los receptores de hidrocarburos de arilo, para inhibir la actividad de PCSK9 y para estimular la secreción del péptido similar al glucagón 1 en mamíferos.

45 Bettina Jux et al., "The Aryl Hydrocarbon Receptor Mediates UVB Radiation-Induced Skin Tanning", Journal of Investigative Dermatology, vol. 131, n.º 1, 1 de enero de 2011, páginas 203-210 se refiere al papel del receptor de hidrocarburos de arilo (AhR) en la respuesta al estrés por UVB en queratinocitos epidérmicos.

50 Hans-Joachim Kramer et al., "Malassezin, A novel Agonist of the Aryl Hydrocarbon Receptor from the Yeast *Malassezia furfur*, Induces Apoptosis in Primary Human Melanocytes", CHEMBIOCHEM, vol. 6, n.º 5, 5 de abril de 2005, páginas 860-865 se refiere a estudios sobre melanocitos humanos en los que se observó que experimentaban apoptosis cuando se exponían a la mezcla cruda de metabolitos del triptófano de *M. furfur*, identificándose el compuesto activo como malassezina y caracterizándose como un agonista del receptor de hidrocarburos de arilo (Ah).

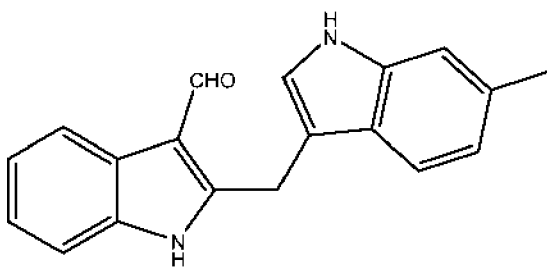
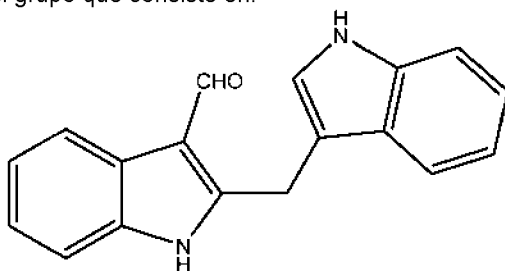
55 La tiña versicolor es una enfermedad de la piel no contagiosa causada por el crecimiento excesivo de *Malassezia* que altera localmente los niveles de pigmentación. Las levaduras *Malassezia* tienen dos vías metabólicas para sintetizar pigmentos de indol derivados de melanina y triptófano. Los pigmentos de indol incluyen malassezina, un metabolito de triptófano de *Malassezia* que puede producir apoptosis de melanocitos y contribuir con la característica de despigmentación del crecimiento excesivo de *Malassezia*.

60 La invención descrita en la presente utiliza composiciones cosméticas como se define en la reivindicación 1 que comprenden compuestos producidos por la levadura *Malassezia*, incluida la malassezina, y análogos químicos de esta, como la base para composiciones aclarantes de la piel seguras y eficaces.

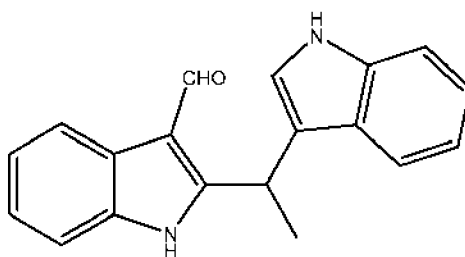
COMPENDIO DE LA INVENCIÓN

65 La presente invención se refiere a una composición cosmética que comprende:

(a) un compuesto seleccionado del grupo que consiste en:



y



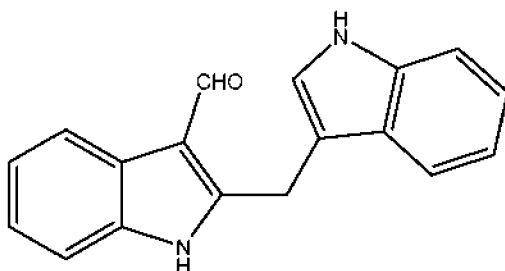
o un hidrato o sal cosméticamente aceptable de este,

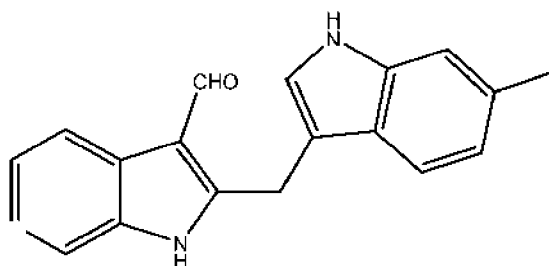
(b) un vehículo, diluyente o portador cosméticamente aceptable, y

(c) uno o más ingredientes seleccionados del grupo que consiste en perfumes, estrógenos, vitamina A, vitamina C, vitamina E, ácido pirúvico, ácido láctico, ácido glicólico, lanolina, vaselina, aloe vera, metilparabeno, propilparabeno y pigmentos.

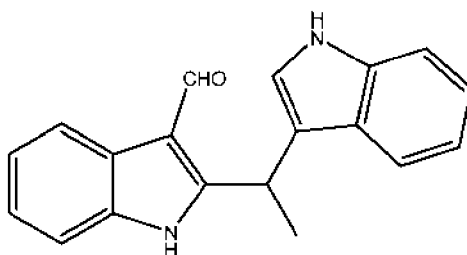
La presente invención también se refiere a un método cosmético para aclarar el tono de piel en un sujeto que comprende poner en contacto al sujeto con una composición que comprende:

(a) un compuesto seleccionado del grupo que consiste en:





y



o un hidrato, o sal cosméticamente aceptable de este. Los siguientes párrafos a lo largo de toda la descripción incluyen referencias al objeto "divulgado" en la presente descripción. Sin embargo, este objeto no es parte de la invención que se define en las reivindicaciones.

Se describe un compuesto para aclarar la piel. El compuesto es un análogo químico de un compuesto producido por una levadura *Malassezia*, o una forma cristalina, hidrato o sal cosmética o farmacéuticamente aceptable de este.

También se describe un compuesto para inducir la apoptosis de melanocitos. El compuesto es un análogo químico de un compuesto producido por una levadura *Malassezia*, o una forma cristalina, hidrato o sal cosmética o farmacéuticamente aceptable de este.

También se describe un compuesto para modular la actividad de los melanocitos. El compuesto es un análogo químico de un compuesto producido por una levadura *Malassezia*, o una forma cristalina, hidrato o sal cosmética o farmacéuticamente aceptable de este.

También se describe un compuesto para agonizar el receptor de hidrocarburo de arilo (AhR). El compuesto es un análogo químico de un compuesto producido por una levadura *Malassezia*, o una forma cristalina, hidrato o sal cosmética o farmacéuticamente aceptable de este.

También se divulga un compuesto para mejorar la hiperpigmentación causada por un trastorno de hiperpigmentación. El compuesto es un análogo químico de un compuesto producido por una levadura *Malassezia*, o una forma cristalina, hidrato o sal cosmética o farmacéuticamente aceptable de este.

También se describe un compuesto para modular la melanogénesis. El compuesto es un análogo químico de un compuesto producido por una levadura *Malassezia*, o una forma cristalina, hidrato o sal cosmética o farmacéuticamente aceptable de este.

También se describe un compuesto para modular la biogénesis de melanosomas. El compuesto es un análogo químico de un compuesto producido por una levadura *Malassezia*, o una forma cristalina, hidrato o sal cosmética o farmacéuticamente aceptable de este.

También se describe un compuesto para modular la transferencia de melanosomas. El compuesto es un análogo químico de un compuesto producido por una levadura *Malassezia*, o una forma cristalina, hidrato o sal cosmética o farmacéuticamente aceptable de este.

Una modalidad de la presente invención es una composición cosmética como se define en la reivindicación 1. También se describe una composición que comprende una levadura *Malassezia* y un vehículo, diluyente o portador cosmética o farmacéuticamente aceptable.

También se describe una composición que comprende un compuesto aislado o aislable de una levadura *Malassezia* y un vehículo, diluyente o portador cosmética o farmacéuticamente aceptable.

También se describe una composición que comprende cualquiera de los compuestos, incluidos los análogos, descritos

en la presente y un vehículo, diluyente o portador cosmética o farmacéuticamente aceptable.

Otra modalidad de la presente invención es un método cosmético como se define en la reivindicación 2. También se describe un método para aclarar la piel en un sujeto que comprende poner en contacto al sujeto con cualquiera de los compuestos o composiciones descritos en la presente.

También se describe un método para inducir la apoptosis de melanocitos en un sujeto. El método comprende poner en contacto al sujeto con cualquiera de los compuestos o composiciones descritos en la presente.

También se describe un método para modular la actividad de melanocitos en un sujeto. El método comprende poner en contacto al sujeto con cualquiera de los compuestos o composiciones descritos en la presente.

También se describe un método para agonizar un receptor de hidrocarburo de arilo (AhR) en un sujeto. El método comprende poner en contacto al sujeto con cualquiera de los compuestos o composiciones descritos en la presente.

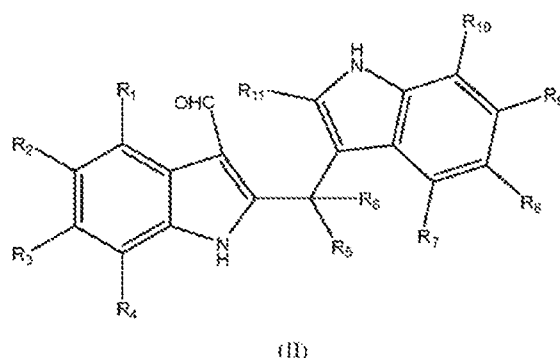
También se describe un método para mejorar la hiperpigmentación causada por un trastorno de hiperpigmentación en un sujeto que lo necesite. El método comprende poner en contacto al sujeto con cualquiera de los compuestos o composiciones descritos en la presente.

También se describe un método para modular la producción de melanina en un sujeto. El método comprende poner en contacto al sujeto con cualquiera de los compuestos o composiciones descritos en la presente.

También se describe un método para modular la biogénesis de melanosomas en un sujeto. El método comprende poner en contacto al sujeto con cualquiera de los compuestos o composiciones descritos en la presente.

También se describe un método para modular la transferencia de melanosomas en un sujeto. El método comprende poner en contacto al sujeto con cualquiera de los compuestos o composiciones descritos en la presente.

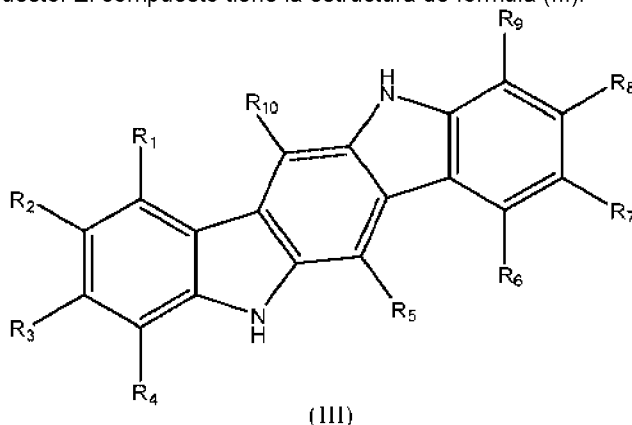
También se describe un compuesto. El compuesto tiene la estructura de fórmula (II):



en donde:

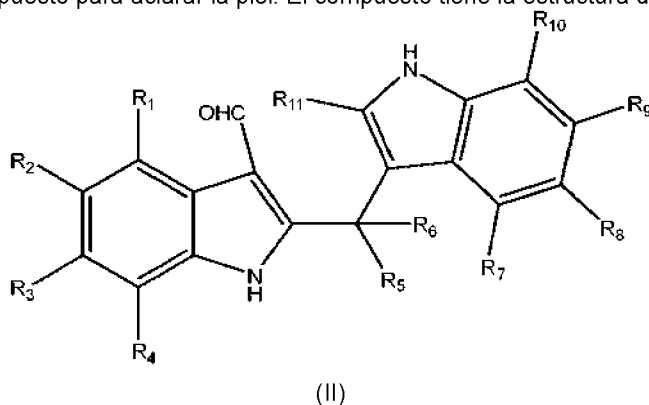
R1, R2, R3, R4, R5, R6, R7, R8, R9, R10, y R11 se seleccionan independientemente del grupo que consiste en hidrógeno y metilo, y al menos uno de R1, R2, R3, R4, R5, R6, R7, R8, R9, R10 y R11 es metilo; o una forma cristalina, hidrato o sal cosmética o farmacéuticamente aceptable de este.

También se describe un compuesto. El compuesto tiene la estructura de fórmula (III):



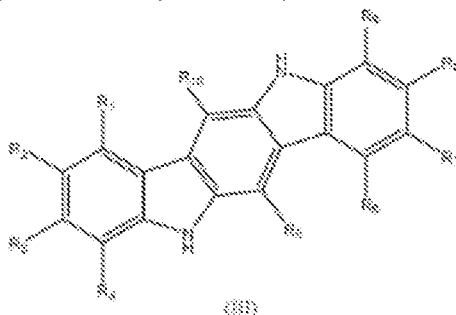
en donde: R1, R2, R3, R4, R5, R6, R7, R8, R9, y R10 se seleccionan independientemente del grupo que consiste en hidrógeno y metilo, y al menos uno de R1, R2, R3, R4, R5, R6, R7, R8, R9, y R10 es metilo; o una forma cristalina, hidrato o sal cosmética o farmacéuticamente aceptable de este.

También se describe un compuesto para aclarar la piel. El compuesto tiene la estructura de fórmula (II):



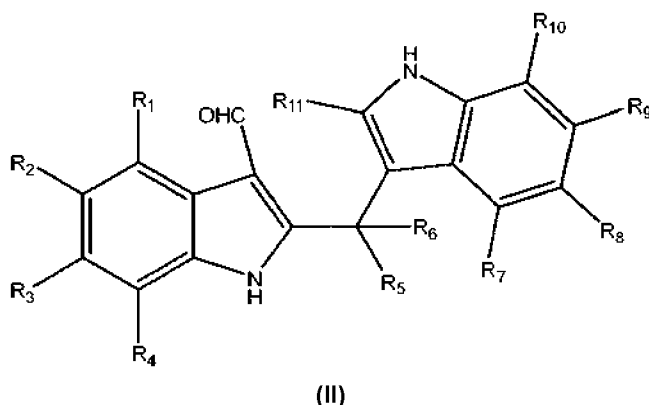
en donde: R1, R2, R3, R4, R5, R6, R7, R8, R9, R10, y R11 se seleccionan independientemente del grupo que consiste en hidrógeno y metilo; o una forma cristalina, hidrato o sal cosmética o farmacéuticamente aceptable de este.

También se describe un compuesto para aclarar la piel. El compuesto tiene la estructura de fórmula (III):



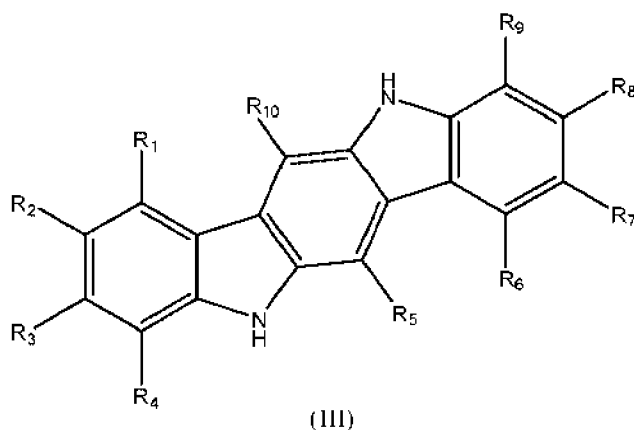
en donde: R1, R2, R3, R4, R5, R6, R7, R8, R9, y R10 se seleccionan independientemente del grupo que consiste en hidrógeno y metilo; o una forma cristalina, hidrato o sal cosmética o farmacéuticamente aceptable de este.

También se describe un compuesto para inducir la apoptosis de melanocitos. El compuesto tiene la estructura de fórmula (II):



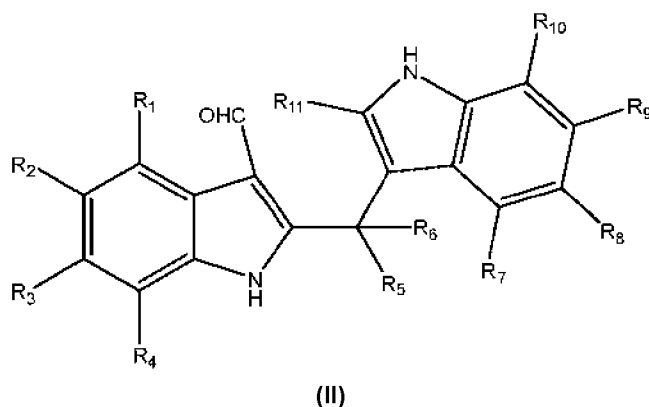
en donde: R1, R2, R3, R4, R5, R6, R7, R8, R9, R10, y R11 se seleccionan independientemente del grupo que consiste en hidrógeno y metilo; o una forma cristalina, hidrato o sal cosmética o farmacéuticamente aceptable de este.

También se describe un compuesto para inducir la apoptosis de melanocitos. El compuesto tiene la estructura de fórmula (III):



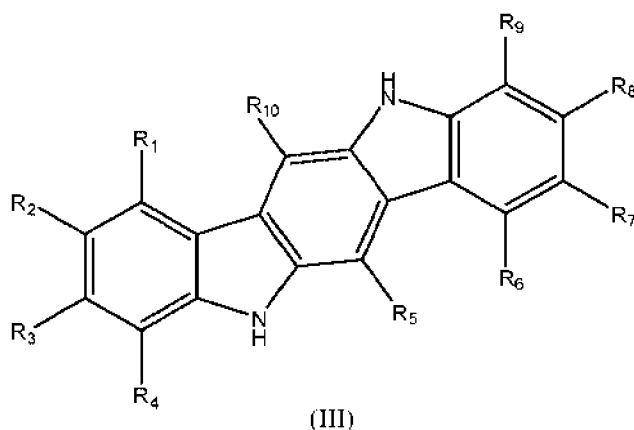
en donde: R1, R2, R3, R4, R5, R6, R7, R8, R9, y R10 se seleccionan independientemente del grupo que consiste en hidrógeno y metilo; o una forma cristalina, hidrato o sal cosmética o farmacéuticamente aceptable de este.

También se describe un compuesto para agonizar el receptor de hidrocarburo de arilo (AhR). El compuesto tiene la estructura de fórmula (II):



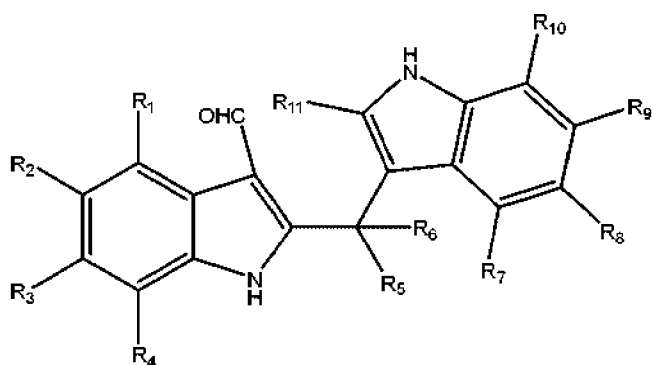
en donde: R1, R2, R3, R4, R5, R6, R7, R8, R9, R10, y R11 se seleccionan independientemente del grupo que consiste en hidrógeno y metilo; o una forma cristalina, hidrato o sal cosmética o farmacéuticamente aceptable de este.

También se describe un compuesto para agonizar el receptor de hidrocarburo de arilo (AhR). El compuesto tiene la estructura de fórmula (III):



en donde: R1, R2, R3, R4, R5, R6, R7, R8, R9, y R10 se seleccionan independientemente del grupo que consiste en hidrógeno y metilo; o una forma cristalina, hidrato o sal cosmética o farmacéuticamente aceptable de este.

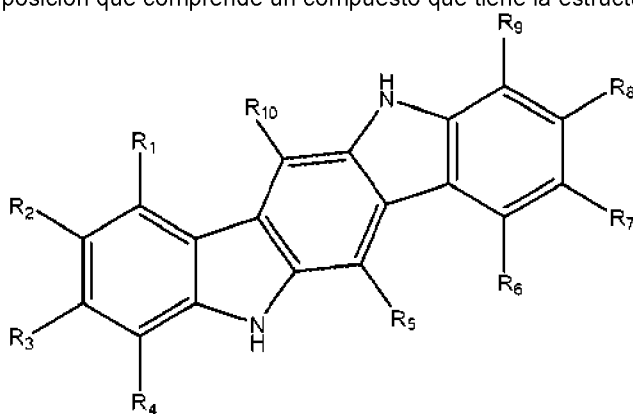
También se describe una composición que comprende un compuesto que tiene la estructura de fórmula (II):



(II)

en donde: R1, R2, R3, R4, R5, R6, R7, R8, R9, R10, y R11 se seleccionan independientemente del grupo que consiste en hidrógeno y metilo; o una forma cristalina, hidrato o sal cosmética o farmacéuticamente aceptable de este, y un vehículo, diluyente o portador cosmética o farmacéuticamente aceptable.

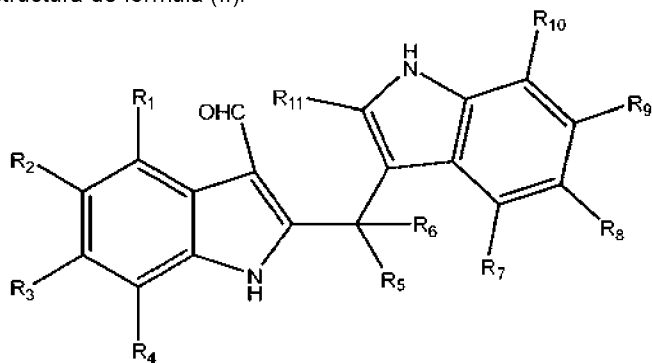
También se describe una composición que comprende un compuesto que tiene la estructura de fórmula (III):



(III)

en donde: R1, R2, R3, R4, R5, R6, R7, R8, R9, y R10 se seleccionan independientemente del grupo que consiste en hidrógeno y metilo; o una forma cristalina, hidrato o sal cosmética o farmacéuticamente aceptable de este, y un vehículo, diluyente o portador cosmética o farmacéuticamente aceptable.

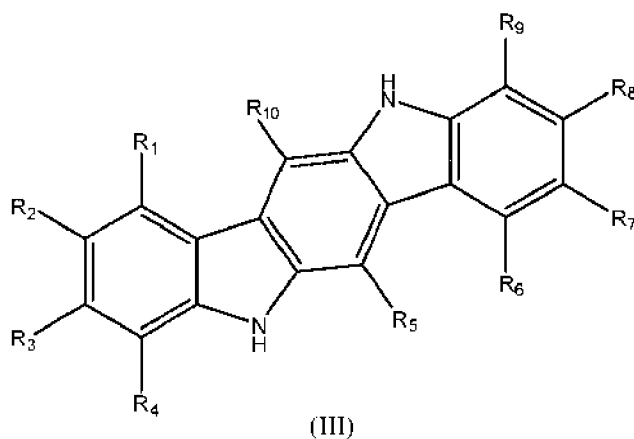
También se describe un método para aclarar la piel en un sujeto. El método comprende: poner en contacto al sujeto con un compuesto que tiene la estructura de fórmula (II):



(II)

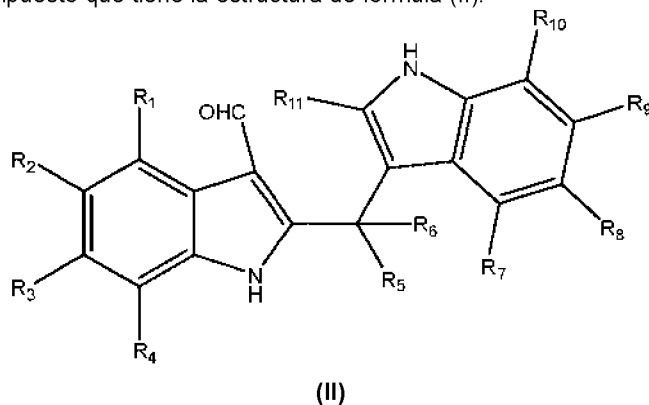
en donde: R1, R2, R3, R4, R5, R6, R7, R8, R9, R10, y R11 se seleccionan independientemente del grupo que consiste en hidrógeno y metilo; o una forma cristalina, hidrato o sal cosmética o farmacéuticamente aceptable de este.

También se describe un método para aclarar la piel en un sujeto. El método comprende: poner en contacto al sujeto con un compuesto que tiene la estructura de fórmula (III):



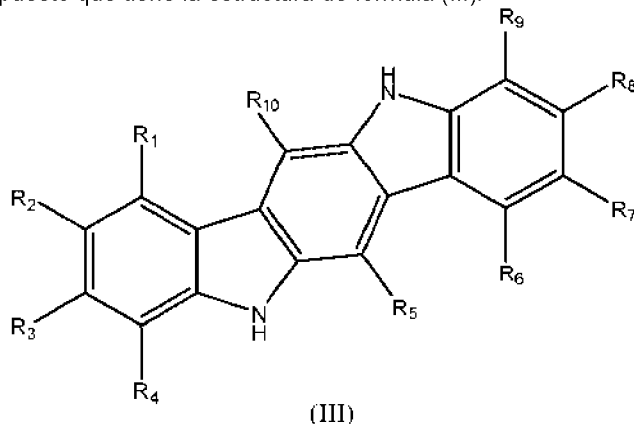
en donde: R1, R2, R3, R4, R5, R6, R7, R8, R9, y R10 se seleccionan independientemente del grupo que consiste en hidrógeno y metilo; o una forma cristalina, hidrato o sal cosmética o farmacéuticamente aceptable de este.

También se describe un método para inducir la apoptosis de melanocitos en un sujeto. El método comprende: poner en contacto al sujeto con un compuesto que tiene la estructura de fórmula (II):



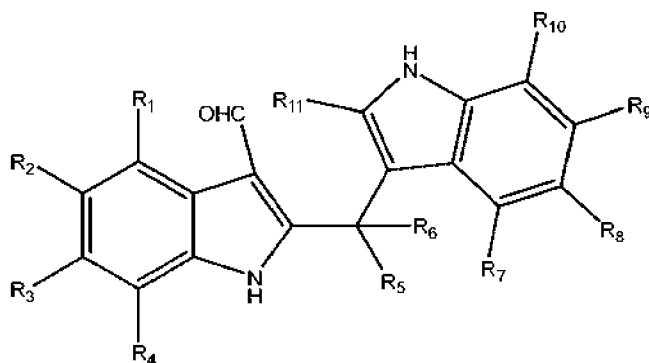
en donde: R1, R2, R3, R4, R5, R6, R7, R8, R9, R10, y R11 se seleccionan independientemente del grupo que consiste en hidrógeno y metilo; o una forma cristalina, hidrato o sal cosmética o farmacéuticamente aceptable de este.

También se describe un método para inducir la apoptosis de melanocitos en un sujeto. El método comprende: poner en contacto al sujeto con un compuesto que tiene la estructura de fórmula (III):



en donde: R1, R2, R3, R4, R5, R6, R7, R8, R9, y R10 se seleccionan independientemente del grupo que consiste en hidrógeno y metilo; o una forma cristalina, hidrato o sal cosmética o farmacéuticamente aceptable de este.

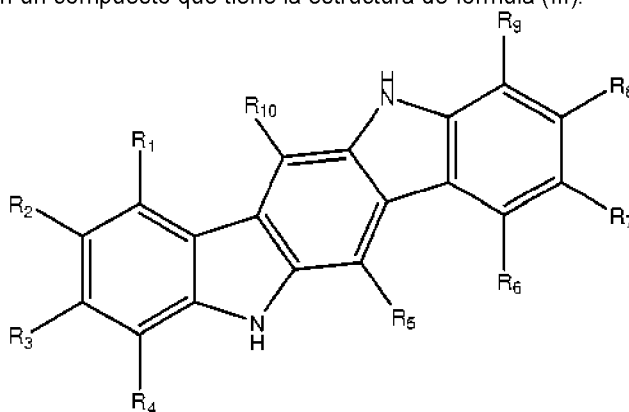
También se describe un método para agonizar un receptor de hidrocarburo de arilo (AhR) en un sujeto. El método comprende: poner en contacto al sujeto con un compuesto que tiene la estructura de fórmula (II):



(II)

en donde: R1, R2, R3, R4, R5, R6, R7, R8, R9, R10, y R11 se seleccionan independientemente del grupo que consiste en hidrógeno y metilo; o una forma cristalina, hidrato o sal cosmética o farmacéuticamente aceptable de este.

También se describe un método para agonizar un receptor de arihidrocarburo (AhR) en un sujeto. El método comprende: poner en contacto al sujeto con un compuesto que tiene la estructura de fórmula (III):



(III)

en donde: R1, R2, R3, R4, R5, R6, R7, R8, R9, y R10 se seleccionan independientemente del grupo que consiste en hidrógeno y metilo; o una forma cristalina, hidrato o sal cosmética o farmacéuticamente aceptable de este.

BREVE DESCRIPCIÓN DE LOS DIBUJOS

El archivo de la patente o la solicitud contiene al menos un dibujo a color. Las copias de esta patente o publicación de solicitud de patente con los dibujos a color serán proporcionadas por la Oficina bajo petición y pago de la cuota necesaria.

La Figura 1A es un diagrama esquemático de las capas componentes de la piel. El diagrama de inserción muestra la composición celular de la epidermis y la dermis. La Figura 1B es un diagrama esquemático que muestra los posibles mecanismos de acción de los agentes causantes de hipopigmentación.

La Figura 2 es un conjunto de esquemas sintéticos para malassezina y derivados de malassezina: Figura 2A: malassezina e indolo[3,2-b]carbazol; Figura 2B: compuestos I y IV; Figura 2C: compuesto II.

La Figura 3A es un gráfico resumido que muestra los valores de EC₅₀ de la inducción de anexina V para ciertos compuestos en células MeWo y WM115. Las Figuras 3B-3M son gráficos de líneas que muestran el porcentaje de MeWo (Figuras 3B-3G) o WM115 (Figuras 3H-3M) marcadas con anexina V después de la exposición a diversas concentraciones de los compuestos enumerados.

Las Figuras 4A-4D son gráficos que muestran niveles relativos de anexina V (%) en células MeWo y WM115 después de la exposición a diversas concentraciones de los compuestos enumerados durante 6, 24, 48 y 72 horas. Las Figuras 4E-4J son histogramas que muestran los resultados de las Figuras 4A-4D. Las Figuras 4K y 4L son histogramas que muestran el porcentaje de células MeWo (Figura 4K) y WM115 (Figura 4L) marcadas con anexina V después de 6 horas de exposición a los compuestos enumerados a las concentraciones mostradas.

Las Figuras 5A-5K son micrografías que muestran la morfología de las células MeWo después de 6 horas de tratamiento con diversas concentraciones de CV-8684, CV-8685, CV-8688, DMSO, y estaurosporina.

Las Figuras 6A-6K son micrografías que muestran la morfología de las células MeWo después de 24 horas de tratamiento con diversas concentraciones de CV-8684, CV-8685, CV-8688, DMSO, y estaurosporina.

Las Figuras 7A-7K son micrografías que muestran la morfología de las células MeWo después de 48 horas de tratamiento con diversas concentraciones de CV-8684, CV-8685, CV-8688, DMSO, y estaurosporina.

Las Figuras 8A-8K son micrografías que muestran la morfología de las células MeWo después de 72 horas de tratamiento con diversas concentraciones de CV-8684, CV-8685, CV-8688, DMSO, y estaurosporina.

Las Figuras 9A-9K son micrografías que muestran la morfología de las células WM115 después de 6 horas de tratamiento con diversas concentraciones de CV-8684, CV-8685, CV-8688, DMSO, y estaurosporina.

Las Figuras 10A-10K son micrografías que muestran la morfología de las células WM115 después de 24 horas de tratamiento con diversas concentraciones de CV-8684, CV-8685, CV-8688, DMSO, y estaurosporina.

Las Figuras 11A-11K son micrografías que muestran la morfología de las células WM115 después de 48 horas de tratamiento con diversas concentraciones de CV-8684, CV-8685, CV-8688, DMSO, y estaurosporina.

Las Figuras 12A-12K son micrografías que muestran la morfología de las células WM115 después de 72 horas de tratamiento con diversas concentraciones de CV-8684, CV-8685, CV-8688, DMSO, y estaurosporina.

Las Figuras 13A-13D son gráficos que muestran el porcentaje de células MeWo y WM115 viables que quedan después del tratamiento con diversas concentraciones de CV-8684 (Figura 13A), CV-8685 (Figura 13B), CV-8688 (Figura 13C), o estaurosporina (Figura 13D) durante 6, 24, 48, y 72 horas. La viabilidad celular se ensayó usando CellTiter-Glo®. Las Figuras 13E-13J son histogramas que muestran los resultados de las Figuras 13A-13D. La Figura 13K es un gráfico de resumen que compara los porcentajes de células MeWo y WM115 viables después de la exposición a las concentraciones enumeradas de malassezina, indolocarbazol, compuesto II y estaurosporina durante 24, 48 y 72 horas.

Las Figuras 14A-14D son gráficos que muestran los niveles de liberación de lactato deshidrogenasa ("LDH") de las células MeWo y WM115 después del tratamiento con varias concentraciones de CV-8684 (Figura 14A), CV-8685 (Figura 14B), CV-8688 (Figura 14C), o estaurosporina (Figura 14D) durante 6, 24, 48, y 72 horas. Las Figuras 14E-14J son histogramas que muestran los resultados de las Figuras 14A-14D. Las Figuras 14K y 14L son histogramas que muestran los niveles de lactato deshidrogenasa después de exponer células MeWo (Figura 14K) y WM115 (Figura 14L) a las concentraciones enumeradas de malassezina, carbazol, compuesto II y estaurosporina durante 24 horas.

Las Figuras 15A-15E muestran datos sin procesar y gráficos de línea de la activación del receptor de arilhidrocarburo ("AhR") en células HepG2 transfectadas de manera estable con un plásmido del gen indicador de luciferasa sensible a AhR tras la exposición a diversas concentraciones de omeprazol (Figura 15A), CV-8684 (Figura 15B), CV-8685 (Figura 15C), CV-8686 (Figura 15D) y CV-8688 (Figura 15E). La Figura 15F muestra los valores de EC₅₀ para cada compuesto probado.

Las Figuras 16A-16K son fotografías de matrices MelanoDerm™ en el día 0 o el día 7 después de la exposición a ningún tratamiento (Figura 16A), agua desionizada estéril (Figura 16B), 1 % de ácido kójico (Figura 16C), 0,2 % de DMSO (Figura 16D), 0,05 % de DMSO (Figura 16E), 200 µM de CV-8684 (Figura 16F), 50 µM de CV-8684 (Figura 16G), 200 µM de CV-8686 (Figura 16H), 50 µM de CV-8686 (Figura 16I), 200 µM de CV-8688 (Figura 16J) y 50 µM de CV-8688 (Figura 16K).

Las Figuras 17A-17K son fotomicrografías aumentadas 15X de matrices MelanoDerm™ en el día 0 o el día 7 después de la exposición a ningún tratamiento (Figura 17A), agua desionizada estéril (Figura 17B), 1 % de ácido kójico (Figura 17C), 0,2 % de DMSO (Figura 17D), 0,05 % de DMSO (Figura 17E), 200 µM de CV-8684 (Figura 17F), 50 µM de CV-8684 (Figura 17G), 200 µM de CV-8686 (Figura 17H), 50 µM de CV-8686 (Figura 17I), 200 µM de CV-8688 (Figura 17J) y 50 µM de CV-8688 (Figura 17K).

Las Figuras 18A-18F son fotografías de piel de pez cebra expuesto a ningún tratamiento (Figura 18A), DMSO (Figura 18B), feniltiourea ("PTU") (Figura 18C) y compuesto II a 2,5 µM (Figura 18D), 5 µM (Figura 18E) y 10 µM (Figura 18F). Las flechas rojas indican melanocitos normales.

Las Figuras 19A-19F son fotografías de pez cebra expuestos a ningún tratamiento (Figura 19A), DMSO (Figura 19B), feniltiourea ("PTU") (Figura 19C) y compuesto II a 0,3 µM (Figura 19D), 1 µM (Figura 19E) y 3 µM (Figura 19F). Las flechas rojas indican melanocitos normales. Las flechas amarillas indican melanocitos anormalmente pequeños.

La Figura 20 es un gráfico de resumen que muestra la cantidad y el porcentaje de peces cebra con pigmentación

cutánea disminuida después de la exposición a las afecciones enumeradas. Las últimas seis filas muestran los efectos de diversas concentraciones del compuesto II.

Las Figuras 21A-21E son fotografías del pez cebra tratado con ningún tratamiento (Figura 21A), DMSO (Figura 21B), PTU (Figura 21C), 0,5 μ M (Figura 21D) y 1,5 μ M (Figura 21E). Los paneles inferiores incluyen regiones de inversión de esquema de color.

Las Figuras 22A y 22B son histogramas que muestran la densidad de pigmentación medida por píxeles pigmentados/mm³ (Figura 22A) y píxeles totales (Figura 22B) de fotografías de embriones de pez cebra, ejemplificadas en las Figuras 21A-21E.

Las Figuras 23A-23C son espectros de masas de CV-8684 en DMSO (Figura 23A), medio RPMI (Figura 23B) y DMEM (Figura 23C). Las Figuras 23D-23F son espectros de masas de CV-8686 en DMSO (Figura 23D), medio RPMI (Figura 23E) y DMEM (Figura 23F). Las Figuras 23G-23I son espectros de masas de CV-8688 en DMSO (Figura 23G), medio RPMI (Figura 23H) y DMEM (Figura 23I). La Figura 23J es un gráfico resumido que muestra el porcentaje de compuesto de prueba que queda en el disolvente indicado después de 2 horas de incubación.

DESCRIPCIÓN DETALLADA DE LA INVENCION

Se describe un compuesto para aclarar la piel. El compuesto es un análogo químico de un compuesto producido por una levadura *Malassezia*, o una forma cristalina, hidrato o sal cosmética o farmacéuticamente aceptable de este.

Tal como se utiliza en la presente, el término "compuesto" se refiere a dos o más átomos que están conectados por uno o más enlaces químicos. Los enlaces químicos incluyen, pero no se limitan a, enlaces covalentes, enlaces iónicos, enlaces de hidrógeno e interacciones de van der Waals. Los enlaces covalentes incluyen enlaces simples, dobles y triples. Los compuestos incluyen, pero no se limitan a, moléculas orgánicas.

Los compuestos/moléculas orgánicas incluyen hidrocarburos lineales, ramificados y cíclicos con o sin grupos funcionales. El término " C_{x-y} " cuando se usa junto con una fracción química, tal como alquilo, alquenilo, alquinilo o alcoxi, pretende incluir grupos que contienen de x a y carbonos en la cadena. Por ejemplo, el término "alquilo C_{x-y} " significa grupos hidrocarburos saturados sustituidos o no sustituidos, incluidos los grupos alquilo de cadena lineal y alquilo de cadena ramificada que contienen de x a y carbonos en la cadena, incluidos grupos haloalquilo como trifluorometilo y 2,2,2-trifluoroetilo, etc. Los términos "alquenilo C_{x-y} " y "alquinilo C_{x-y} " se refieren a grupos alifáticos insaturados sustituidos o no sustituidos análogos en longitud y posible sustitución a los alquilos descritos anteriormente, pero que contienen al menos un enlace doble o triple, respectivamente.

El término "alifático", tal como se utiliza en la presente, significa un grupo compuesto por átomos de carbono e hidrógeno que no contiene anillos aromáticos. Por consiguiente, los grupos alifáticos incluyen grupos alquilo, alquenilo, alquenilo y carbociclilo.

El término "alquilo" significa los grupos alifáticos radicales o saturados que no tienen una estructura de anillo, lo que incluye grupos alquilo de cadena lineal y grupos alquilo de cadena ramificada.

El término "alquenilo", tal como se utiliza en la presente, significa un grupo alifático que contiene al menos un enlace doble.

El término "alquinilo", tal como se utiliza en la presente, significa un grupo alifático que contiene al menos un enlace triple.

Tal como se utiliza en la presente, un "compuesto aromático", "aromático" o un compuesto que contiene un "anillo aromático" es un arilo o un compuesto heteroarilo. El término "arilo", tal como se utiliza en la presente, incluye grupos aromáticos de anillo-sencillo sustituidos o no sustituidos en los que cada átomo del anillo es carbono. Preferiblemente, el anillo es un anillo de 3 a 8 miembros, más preferiblemente un anillo de 6 miembros. El término "arilo" también incluye sistemas de anillos policíclicos que tienen dos o más anillos cíclicos en los que dos o más carbonos son comunes a dos anillos contiguos en donde al menos uno de los anillos es aromático, p. ej., los otros anillos cíclicos pueden ser cicloalquilos, cicloalquilenilos cicloalquinilos, arilos, heteroarilos y/o heterociclilos. Los grupos arilo incluyen benceno, naftaleno, fenantreno, fenol, anilina y similares. El término "heteroarilo" incluye estructuras de anillo único aromático sustituidas o no sustituidas, preferiblemente anillos de 3 a 8 miembros, más preferiblemente anillos de 5 a 7 miembros, incluso más preferiblemente anillos de 5 a 6 miembros, cuyas estructuras de anillo incluyen al menos un heteroátomo, preferiblemente de uno a cuatro heteroátomos, más preferiblemente uno o dos heteroátomos. El término "heteroarilo" también incluye sistemas de anillos policíclicos que tienen dos o más anillos cíclicos en los que dos o más carbonos son comunes a dos anillos contiguos en donde al menos uno de los anillos es heteroaromático, p. ej., los otros anillos cíclicos pueden ser cicloalquilos, cicloalquilenilos, cicloalquinilos, arilos, heteroarilos y/o heterociclilos. Los grupos heteroarilo incluyen, por ejemplo, pirrol, furano, tiofeno, indol, imidazol, oxazol, tiazol, pirazol, piridina, pirazina, piridazina y pirimidina, y similares. Preferiblemente, ciertos compuestos incluyen al menos uno, preferiblemente dos, grupos indol así como al menos un grupo aldehído.

El término "sustituido" significa fracciones que tienen al menos un sustituyente que reemplaza un átomo de hidrógeno en uno o más carbonos de la estructura principal. Se entenderá que "sustitución" o "sustituido con" incluye la condición implícita de que dicha sustitución está de acuerdo con la valencia permitida del átomo sustituido y el sustituyente, y que la sustitución da como resultado un compuesto estable, p. ej., que no experimentan espontáneamente una transformación tal como por reordenamiento, ciclación, eliminación, etc. Los sustituyentes permisibles pueden ser uno o más e iguales o diferentes para los compuestos orgánicos apropiados.

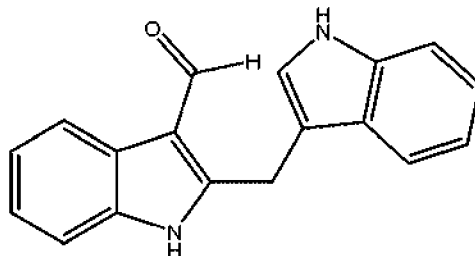
Tal como se utiliza en la presente, "aclaramiento de la piel" y sus variaciones gramaticales se refieren, en general, a cualquier reducción real o percibida de la pigmentación de la piel. Se han utilizado métodos para aclarar la piel para reducir la pigmentación de las áreas hiperpigmentadas de la piel como resultado de la edad, la exposición al sol o un trastorno de hiperpigmentación. La aplicación de los compuestos y composiciones cosméticas de la presente invención a, por ejemplo, la piel de un sujeto, puede reducir la pigmentación de modo que la piel parezca más clara o más blanca que antes de dicha aplicación. La pigmentación de la piel se puede evaluar de varias formas, incluidas, entre otras, evaluaciones visuales utilizando, por ejemplo, la escala cromática de von Luschan, la prueba de tipificación cutánea de Fitzpatrick (Fitzpatrick et al., 1988) y la Escala de Hiperpigmentación de Taylor (Taylor et al., 2005) y métodos de espectrofotometría de reflectancia (Zonios, et al., 2001). Por ejemplo, la prueba de tipificación cutánea de Fitzpatrick incluye seis tipos de piel (I-VI), y la piel Tipo VI que se convierte en el Tipo V o menos se ha "aclarado" como se usa el término en la presente. Tal como se plantea más adelante, el aclaramiento de la piel puede deberse a una serie de fenómenos, entre los que se incluyen la modulación de la actividad de los melanocitos, la inducción de la apoptosis de los melanocitos, el agonismo de un receptor de hidrocarburos de arilo (AhR) o la modulación de la producción de melanina, la biogénesis de melanosomas o la transferencia de melanosomas.

Ciertos compuestos se producen por, se aíslan de o son aislables de una levadura *Malassezia*. Las levaduras *Malassezia* yeasts son levaduras del género *Malassezia* e incluyen, pero no se limitan a, *Malassezia globosa*, *Malassezia restricta*, *Malassezia furfur*, *Malassezia sympodialis*, *Malassezia slooffiae*, *Malassezia obtusa*, *Malassezia pachydermatis*, *Malassezia dermatis*, *Malassezia japonica*, *Malassezia nana*, *Malassezia yamatoensis*, *Malassezia equine*, *Malassezia caprae*, y *Malassezia cuniculi*. (Guého, et al., 1996; Gaitanis, et al., 2013). La levadura *Malassezia* forma parte de la flora cutánea humana normal y normalmente no produce efectos patógenos. Sin embargo, la levadura *Malassezia* puede causar una serie de enfermedades, que incluyen, entre otras, pitiriasis versicolor (tanto las variedades hiperpigmentadas como hipopigmentadas), dermatitis seborreica, caspa, dermatitis atópica, foliculitis por *Malassezia*, psoriasis y papilomatosis confluyente y reticulada. (Gaitanis, et al., 2013).

Tal como se utiliza en la presente, el término "análogo químico" se refiere a un compuesto que está relacionado estructuralmente con un compuesto original y contiene diferentes grupos funcionales o sustituyentes. Por ejemplo, un compuesto original es malassezina, y los análogos químicos de malassezina contienen determinados grupos funcionales y sustituyentes que son diferentes de la malassezina. Los análogos químicos pueden tener ventajas significativas con respecto a un compuesto original determinado, lo que incluye un perfil farmacocinético adecuado para el uso cosmético. Puede generarse un análogo químico a partir de una molécula originaria mediante una o más reacciones químicas. También se pueden usar esquemas de síntesis alternativos que no se originan con un compuesto originario para generar análogos químicos.

Un compuesto es "producido por una levadura *Malassezia*" si, en el transcurso de su ciclo de vida, una levadura *Malassezia* sintetiza, secreta, acumula o genera de algún otro modo el compuesto en condiciones de crecimiento apropiadas. La levadura *Malassezia* secreta diferentes compuestos dependiendo de con qué se suplementa su medio de crecimiento. (Nazzaro-Porro, et al., 1978). Los compuestos producidos por una levadura *Malassezia* en cualquier condición de crecimiento incluyen, por ejemplo, malassezina y análogos químicos de esta.

Un compuesto producido por una levadura *Malassezia* tiene la estructura de fórmula (I):



(I)

El compuesto puede ser un análogo químico de malassezina.

La Malassezina es un ejemplo de un compuesto producido por una levadura *Malassezia*. La Malassezina, también conocida como 2-(1H-indol-3-ilmetil)-1H-indol-3-carbaldehído, es un metabolito triptófano originalmente aislado de

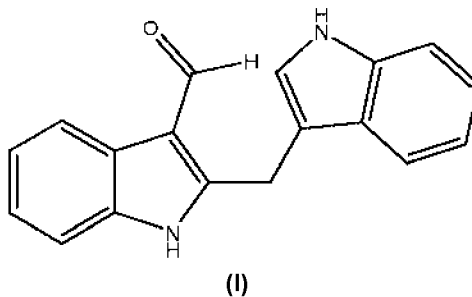
Malassezia furfur. La Malassezina es un agonista conocido del receptor de hidrocarburos de arilo (AhR), un receptor implicado en el crecimiento celular, la diferenciación y la expresión génica. (Wille *et al.*, 2001). La Malassezina también induce la apoptosis en los melanocitos humanos primarios. (Krämer, *et al.*, 2005). Recientemente, Winston-McPherson y sus colegas sintetizaron ciertos análogos químicos de malassezina, quienes examinaron la actividad agonista de AhR de los análogos. (Winston-McPherson, *et al.*, 2014).

También se describe un compuesto para inducir la apoptosis de melanocitos. El compuesto es un análogo químico de un compuesto producido por una levadura *Malassezia*, o una forma cristalina, hidrato o sal cosmética o farmacéuticamente aceptable de este.

Tal como se utiliza en la presente, el término "melanocito" se refiere a una célula dendrítica de la epidermis que normalmente sintetiza la tirosinasa y, dentro de los melanosomas, el pigmento melanina. Los melanocitos pueden exhibir regulación positiva de ciertos genes, que incluyen, pero no se limitan a, uno o más de los siguientes: tirosinasa (albinismo oculocutáneo IA), factor de transcripción asociado a microftalmia, alfa-2-macroglobulina, proteína 1 relacionada con tirosinasa, familia de portadores de solutos 16, proteína GS3955, v-kit Hardy-Zuckerman 4 sarcoma felino, albinismo ocular 1, proteína Rag D, glucogenina 2, receptor acoplado a proteína G, familia C, albinismo oculocutáneo II, deleciónado en cáncer de esófago 1, melan-A, SRY-box 10, ATPasa, Clase V, tipo 10C, metaloproteína de matriz 1, factor de crecimiento transformante latente beta b, cartucho de unión a ATP, subfamilia C, hidroxiprostaglandina deshidrogenasa 15, miembro 1 de la superfamilia transmembrana 7, glutaminil-péptido ciclotransferasa y otros genes identificados por Lee y colegas. (Lee, *et al.*, 2013).

Los melanocitos, al igual que muchos otros tipos de células, sufren muerte celular programada o apoptosis. Las vías de apoptosis de los melanocitos son conocidas por los expertos en la técnica (Wang, *et al.*, 2014), y las vías de apoptosis generalmente han sido revisadas por Elmore (Elmore, 2007). Un compuesto o composición cosmética de la presente invención "induce" la apoptosis de melanocitos, por ejemplo, provocando la activación de determinadas vías de transducción de señales proapoptóticas o provocando la represión de determinadas vías antiapoptóticas en un melanocito. Se prevé que el compuesto o composición cosmética de la presente invención puede activar/reprimir directamente una vía relacionada con la apoptosis mediante la interacción directa con una molécula de señalización de la vía o mediante la interacción indirecta con una molécula de la vía a través de la interacción directa con una o más moléculas intermediarias que no funcionan típicamente dentro de la vía.

Un compuesto producido por una levadura *Malassezia* tiene la estructura de la fórmula (I):

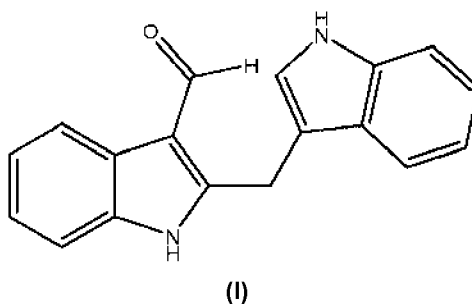


El compuesto puede ser un análogo químico de malassezina.

También se describe un compuesto para modular la actividad de melanocitos. El compuesto es un análogo químico de un compuesto producido por una levadura *Malassezia*, o una forma cristalina, hidrato o sal cosmética o farmacéuticamente aceptable de este.

La actividad de melanocitos se puede modular de varias formas, que incluyen, pero no se limitan a, inducir la apoptosis de los melanocitos o alterar la expresión génica de los melanocitos, la motilidad celular, el crecimiento celular, la producción de melanina, la biogénesis de melanosomas o la transferencia de melanosomas.

Un compuesto producido por una levadura *Malassezia* tiene la estructura de fórmula (I):



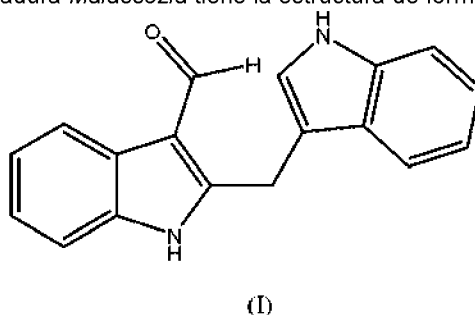
El compuesto puede ser un análogo químico de malassezina.

También se describe un compuesto para agonizar el receptor de hidrocarburo de arilo (AhR). El compuesto es un análogo químico de un compuesto producido por una levadura *Malassezia*, o una forma cristalina, hidrato o sal cosmética o farmacéuticamente aceptable de este.

Tal como se utiliza en la presente, los términos "agonista", "agonizante" y variaciones gramaticales de estos se refieren a una molécula que desencadena (p. ej., inicia o promueve), mejora, estimula o activa parcial o totalmente una o más actividades biológicas. Los agonistas incluyen sustancias naturales así como sustancias sintéticas.

Un receptor de hidrocarburo de arilo (AhR) es cualquier receptor de hidrocarburo de arilo que existe naturalmente en un sujeto como se describe en la presente. Los expertos en la técnica conocen los receptores de hidrocarburos de arilo. (Noakes, 2015). Los agonistas de los receptores de hidrocarburos de arilo incluyen, pero no se limitan a, compuestos relacionados con triptófano tales como quinurenina, ácido quinurénico, ácido cinabarinico y 6-formilindolo [3,2-b] carbazol (FICZ). La malassezina también se conoce como un agonista del receptor de hidrocarburos de arilo. (Wille, *et al.*, 2001).

Un compuesto producido por una levadura *Malassezia* tiene la estructura de fórmula (I):



El compuesto puede ser un análogo químico de malassezina.

También se describe un compuesto para mejorar la hiperpigmentación causada por un trastorno de hiperpigmentación. El compuesto es un análogo químico de un compuesto producido por una levadura *Malassezia*, o una forma cristalina, hidrato o sal cosmética o farmacéuticamente aceptable de este.

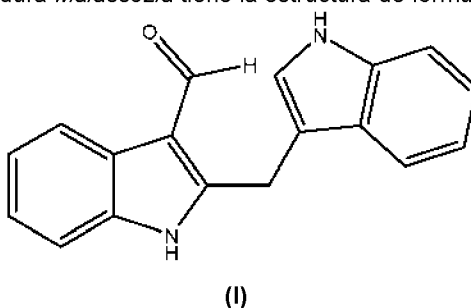
Tal como se usa en la presente, los compuestos, composiciones cosméticas de la presente invención y métodos se pueden usar para mejorar la hiperpigmentación causada por un trastorno de hiperpigmentación, por ejemplo, reduciendo el nivel de hiperpigmentación en áreas afectadas por un trastorno de hiperpigmentación, retardando la hiperpigmentación adicional o previniendo que se produzca una mayor hiperpigmentación. Sin embargo, solo el uso cosmético de las composiciones forma parte de la invención. Sin embargo, debido a que todos los sujetos pueden no responder a un protocolo, régimen o procedimiento de dosificación particular, la mejora de la hiperpigmentación provocada por un trastorno de hiperpigmentación no requiere que la respuesta fisiológica deseada o el resultado se logre en todos y cada uno de los sujetos o la población de sujetos. Por consiguiente, un sujeto o una población de sujetos determinados pueden no responder o responder de manera inadecuada a la dosificación, pero otros sujetos o poblaciones de sujetos pueden responder y, por lo tanto, experimentar una mejora en su trastorno de hiperpigmentación.

Tal como se utiliza en la presente, el término "hiperpigmentación" es un trastorno de la piel real o percibido de un color oscuro excesivo. El deterioro de la piel puede ser real, por ejemplo, atribuido a la edad, la exposición excesiva al sol o una enfermedad o afección que produzca áreas de piel oscura. Las áreas oscuras de la piel pueden tener la forma de puntos, manchas o áreas relativamente grandes de color oscuro. El deterioro de la piel también se puede percibir, por ejemplo, una percepción por parte de un individuo de que el tono de su piel es demasiado oscuro. El individuo puede tener un deseo cosmético de aclarar el tono de la piel. Este es el objeto de la invención.

Los trastornos de hiperpigmentación son trastornos en los que la hiperpigmentación es el síntoma principal y trastornos en los que la hiperpigmentación se produce como síntoma secundario. Los trastornos de hiperpigmentación incluyen, pero no se limitan a, trastornos de hiperpigmentación congénita y trastornos de hiperpigmentación adquirida. Los trastornos de hiperpigmentación congénita incluyen, entre otros, los que implican hiperpigmentación epidérmica (nevo de células nevus, nevus de Spitz y nevus spilus), hiperpigmentación dérmica (nevus azul, nevus Ohta, melanoses dérmica, nevus Ito y mancha mongol), efélides, acropigmentación reticularis, spitzepigment/acropigmentación y lentiginosis (lentiginosis generalizada, síndrome LEOPARD, lentiginosis con patrón heredado, complejo de Carney, síndrome de Peutz-Jeghers, síndrome de Laugier-Hunziker-Baran, y síndrome de Cronkhite-Canada). (Yamaguchi, *et al.*, 2014). Los trastornos de hiperpigmentación adquiridos incluyen, pero no se limitan a, lentigos/lentigo seniles, melasma/cloasma, melanoses de Riehl, mácula melanótica labial, melanoses peneana/vulvovaginal, eritromelanoses folicularis faciei Kitamura, pigmentación inducida por UV (bronceado y petaloides de pigmentación actínica), pigmentación posinflamatoria

(melanosis por fricción y dermatosis reseca), pigmentación inducida por sustancias químicas/fármacos (bifenilo policlorado, arsénico, 5-FU, bleomicina, ciclofosfamida, metotrexato, clorpromazina, fenitoína, tetraciclina y cloroquina), líneas de demarcación pigmentosa, y deposición de material extraño (tal como caroteno, plata, oro, mercurio, bismuto y tatuajes). La hiperpigmentación relacionada con trastornos sistémicos incluye trastornos del metabolismo/enzimas (hemocromatosis, enfermedad de Wilson, enfermedad de Gaucher, enfermedad de Niemann-Pick, amiloidosis, ocronosis, acantosis nigricans y porfiria cutánea tardía), trastornos endocrinos (enfermedad de Addison, síndrome de Cushing e hipertiroidismo), trastornos nutricionales (pelagra, deficiencia de vitamina B12, deficiencia de ácido fólico, enfermedad del vagabundo y prurigo pigmentosa), mastocitosis, enfermedades del colágeno, disfunción hepática y disfunción renal. La hiperpigmentación también puede relacionarse con enfermedades infecciosas (sarampión, sífilis y *Malassezia furfur*) y síndromes (enfermedad de von Recklinghausen, síndrome de Sotos, síndrome POEMS, síndrome de Naegeli, síndrome de Cantu, síndrome de McCune-Albright, síndrome de Watson y síndrome de Bloom). (Yamaguchi, *et al.*, 2014).

Un compuesto producido por una levadura *Malassezia* tiene la estructura de fórmula (I):



El compuesto puede ser un análogo químico de malassezina.

También se describe un compuesto para modular la producción de melanina. El compuesto es un análogo químico de un compuesto producido por una levadura *Malassezia*, o una forma cristalina, hidrato o sal cosmética o farmacéuticamente aceptable de este.

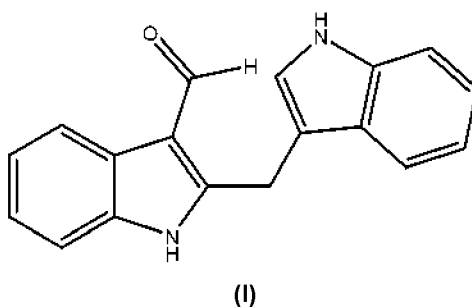
La melanina es un pigmento producido naturalmente que da color a la piel y al cabello. En la Figura 1A se muestra un diagrama esquemático de la piel. La melanina es producida por los melanocitos en orgánulos conocidos como melanosomas. Un compuesto o una composición cosmética de la presente invención modula la producción de melanina en un sujeto mediante, por ejemplo, la modulación de la biogénesis de melanosomas y la inhibición directa o indirecta de la síntesis de melanina a nivel enzimático.

La biogénesis de melanosomas se produce a través de cuatro etapas: La etapa I se caracteriza por pre-melanosomas, que son esencialmente vacuolas no pigmentadas. En la etapa II, los pre-melanosomas desarrollan estrías en las que se deposita la melanina en la etapa III. La etapa IV da como resultado melanosomas maduros que son ricos en contenido de melanina. Los compuestos y composiciones cosméticas de la presente invención modulan la biogénesis de melanosomas inhibiendo o atenuando los procedimientos biológicos que normalmente promueven cualquiera o todas estas etapas. (Wasmeier, *et al.*, 2008).

La síntesis de melanina comprende principalmente tres enzimas: tirosinasa, proteína 1 relacionada con tirosinasa y dopacromo tautomerasa. Los factores adicionales que afectan el tráfico intracelular de estas enzimas incluyen, pero no se limitan a, BLOC-1, OA1 y SLC45A2. Los compuestos y composiciones cosméticas de la presente invención pueden modular la producción de melanina, por ejemplo, inhibiendo o atenuando la actividad de cualquiera de estas enzimas o factores. (Yamaguchi, *et al.*, 2014).

Una vez que se han formado los melanosomas y se ha sintetizado la melanina, los melanosomas se deben transferir de los melanocitos epidérmicos a los queratinocitos de la piel y del cabello. Los melanosomas se originan cerca del núcleo de los melanocitos y se transportan a la periferia de los melanocitos a lo largo de microtúbulos y filamentos de actina. Los compuestos y composiciones cosméticas de la presente invención modulan la transferencia de melanosomas interfiriendo con cualquiera de los procedimientos biológicos que dan como resultado el transporte de melanosomas desde la región perinuclear a la periferia de los melanocitos y hacia los queratinocitos adyacentes. En la Figura 1B se muestra un diagrama esquemático de la síntesis de melanina, el transporte de melanina y la apoptosis de los melanocitos.

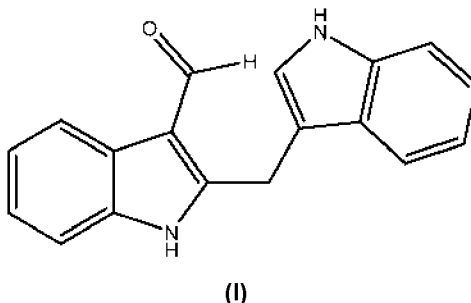
Un compuesto producido por una levadura *Malassezia* tiene la estructura de fórmula (I):



El compuesto puede ser un análogo químico de la malassezina.

También se describe un compuesto para modular la biogénesis de melanosomas. El compuesto es un análogo químico de un compuesto producido por una levadura *Malassezia*, o una forma cristalina, hidrato o sal cosmética o farmacéuticamente aceptable de este.

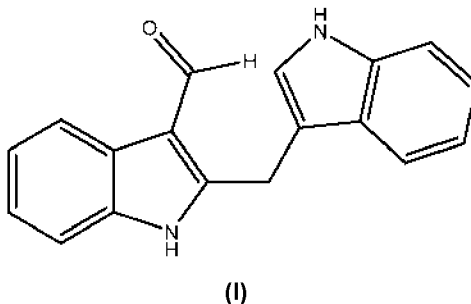
Un compuesto producido por una levadura *Malassezia* tiene la estructura de fórmula (I):



El compuesto puede ser un análogo químico de la malassezina.

También se describe un compuesto para modular la transferencia de melanosomas. El compuesto es un análogo químico de un compuesto producido por una levadura *Malassezia*, o una forma cristalina, hidrato o sal cosmética o farmacéuticamente aceptable de este.

Un compuesto producido por una levadura *Malassezia* tiene la estructura de fórmula (I):



El compuesto puede ser un análogo químico de la malassezina.

Una modalidad de la presente invención es una composición cosmética como se define en la reivindicación 1. También se describe una composición que comprende una levadura *Malassezia* y un vehículo, diluyente o portador cosmética o farmacéuticamente aceptable.

También se describe una composición que comprende un compuesto aislado o aislable de una levadura *Malassezia* y un vehículo, diluyente o portador cosmética o farmacéuticamente aceptable.

Un compuesto aislado de una levadura *Malassezia* necesariamente existe, antes del aislamiento, en una levadura *Malassezia* o es producido por una levadura *Malassezia*. Por lo tanto, un compuesto aislado de una levadura *Malassezia* se deriva de células de levadura reales. Los expertos en la técnica conocen protocolos estándar para extraer compuestos de material celular.

Un compuesto aislable de una levadura *Malassezia* no necesita derivar de células de levadura reales. En cambio, las reacciones sintéticas pueden usarse para generar compuestos producidos en levadura sin la participación de células de levadura reales. Las reacciones de síntesis orgánica son bien conocidas por los expertos en la técnica y pueden usarse

a este respecto.

También se describe una composición que comprende cualquiera de los compuestos descritos en la presente, incluidos los análogos, y un vehículo, diluyente o portador cosmética o farmacéuticamente aceptable.

Una modalidad adicional de la presente invención es un método cosmético como se define en la reivindicación 2. También se describe un método para aclarar la piel en un sujeto que comprende poner en contacto al sujeto con cualquiera de los compuestos o composiciones descritos en la presente.

Tal como se utiliza en la presente, el término "poner en contacto" y sus variaciones gramaticales se refieren a acercar dos o más materiales lo suficiente como para que puedan interactuar. Por tanto, solo con fines ilustrativos, un compuesto puede ponerse en contacto con un melanocito, por ejemplo, interactuando con un receptor en la superficie del melanocito. De forma similar, una composición cosmética de la presente invención puede entrar en contacto con un sujeto humano, por ejemplo, aplicándose directamente sobre la piel del sujeto.

Tal como se utiliza en la presente, un "sujeto" significa una célula, un tejido, un organismo de un mamífero o poblaciones de estos. Los sujetos son preferiblemente humanos, incluidas células, tejidos y seres humanos, pero por lo demás incluyen primates, animales de granja, animales domésticos, animales de laboratorio, etc. Algunos ejemplos de animales agrícolas incluyen vacas, cerdos, caballos, cabras, etc. Algunos ejemplos de animales domésticos incluyen perros, gatos, etc. Algunos ejemplos de animales de laboratorio incluyen primates, ratas, ratones, conejos, cobayas, etc.

También se describe un método para inducir la apoptosis de melanocitos en un sujeto. El método comprende poner en contacto al sujeto con cualquiera de los compuestos o composiciones descritos en la presente.

También se describe un método para modular la actividad de melanocitos en un sujeto. El método comprende poner en contacto al sujeto con cualquiera de los compuestos o composiciones descritos en la presente.

También se describe un método para agonizar un receptor de hidrocarburo de arilo (AhR). El método comprende poner en contacto al sujeto con cualquiera de los compuestos o composiciones descritos en la presente.

También se describe un método para mejorar la hiperpigmentación causada por un trastorno de hiperpigmentación en un sujeto que lo necesita. El método comprende poner en contacto al sujeto con cualquiera de los compuestos o composiciones descritos en la presente.

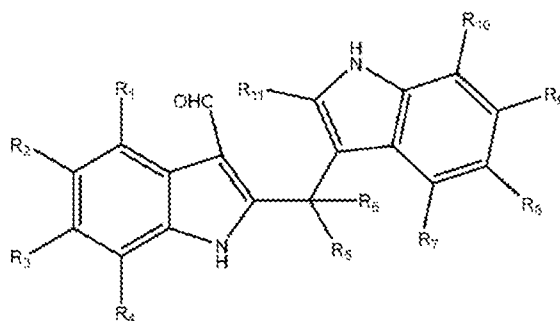
Tal como se utiliza en la presente, un sujeto que "necesita" una mejoría de la hiperpigmentación provocada por un trastorno de hiperpigmentación incluye sujetos con una necesidad real o percibida de una mejoría.

También se describe un método para modular la producción de melanina en un sujeto. El método comprende poner en contacto al sujeto con cualquiera de los compuestos o composiciones descritos en la presente.

También se describe un método para modular la biogénesis de melanosomas en un sujeto. El método comprende poner en contacto al sujeto con cualquiera de los compuestos o composiciones descritos en la presente.

También se describe un método para modular la transferencia de melanosomas en un sujeto. El método comprende poner en contacto al sujeto con cualquiera de los compuestos o composiciones descritos en la presente.

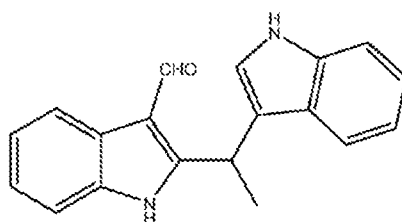
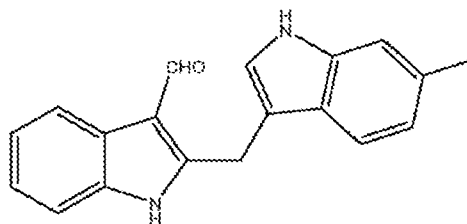
También se describe un compuesto. El compuesto tiene la estructura de fórmula (II):



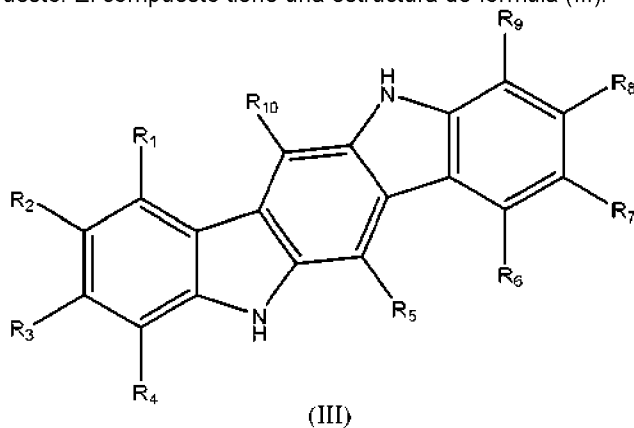
(II)

en donde: R₁, R₂, R₃, R₄, R₅, R₆, R₇, R₈, R₉, R₁₀, y R₁₁ se seleccionan independientemente del grupo que consiste en hidrógeno y metilo, y al menos uno de R₁, R₂, R₃, R₄, R₅, R₆, R₇, R₈, R₉, R₁₀ y R₁₁ es metilo; o una forma cristalina, un hidrato o una sal cosmética o farmacéuticamente aceptable de este.

También se describe el compuesto que se selecciona del grupo que consiste en:

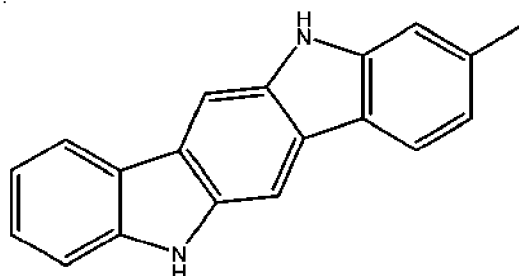


También se describe un compuesto. El compuesto tiene una estructura de fórmula (III):

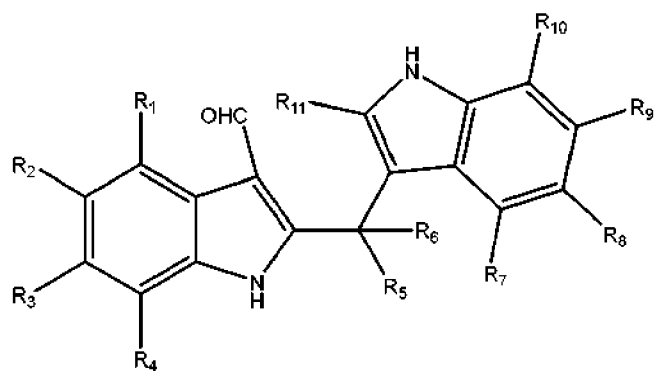


en donde: R1, R2, R3, R4, R5, R6, R7, R8, R9, y R10 se seleccionan independientemente del grupo que consiste en hidrógeno y metilo, y al menos uno de R1, R2, R3, R4, R5, R6, R7, R8, R9, y R10 es metilo; o una forma cristalina, hidrato o sal cosmética o farmacéuticamente aceptable de este.

También se describe el compuesto.



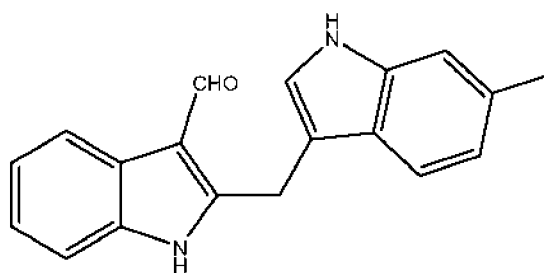
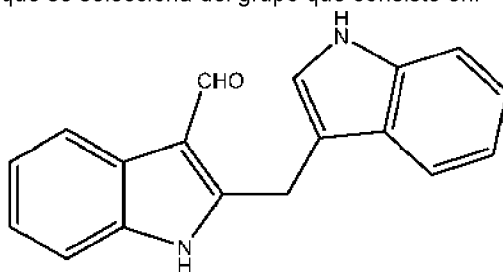
También se describe un compuesto para aclarar la piel. El compuesto tiene la estructura de fórmula (II):



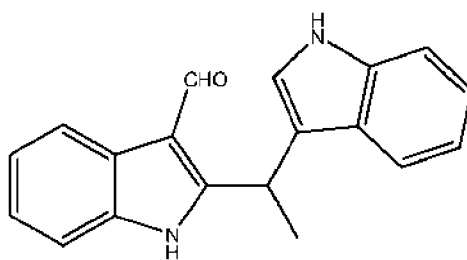
(III)

en donde: R1, R2, R3, R4, R5, R6, R7, R8, R9, R10, y R11 se seleccionan independientemente del grupo que consiste en hidrógeno y metilo; o una forma cristalina, hidrato o sal cosmética o farmacéuticamente aceptable de este.

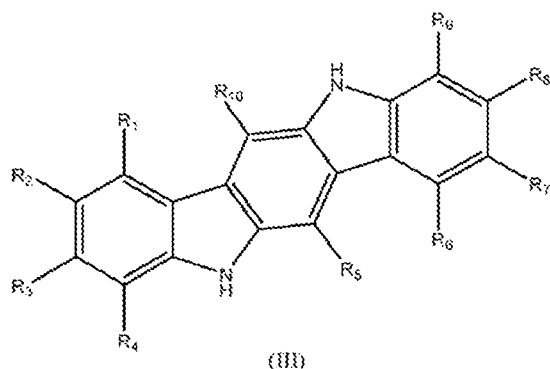
También se describe el compuesto que se selecciona del grupo que consiste en:



y

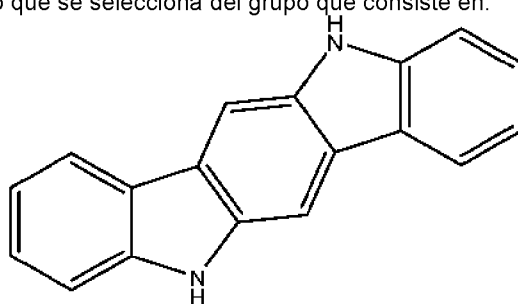


También se describe un compuesto para aclarar la piel. El compuesto tiene la estructura de fórmula (III):

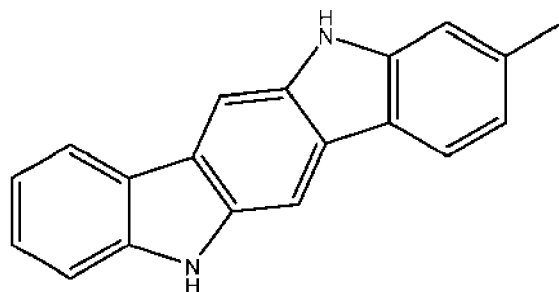


en donde: R1, R2, R3, R4, R5, R6, R7, R8, R9, y R10 se seleccionan independientemente del grupo que consiste en hidrógeno y metilo; o una forma cristalina, hidrato o sal cosmética o farmacéuticamente aceptable de este.

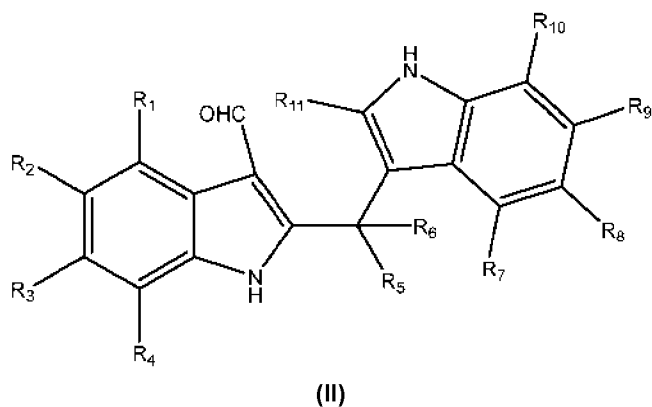
También se describe un compuesto que se selecciona del grupo que consiste en:



y

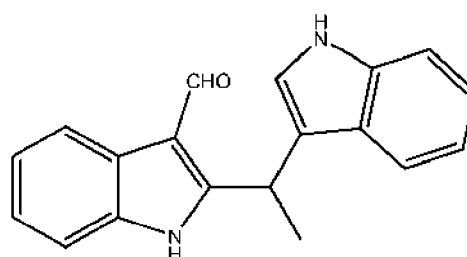
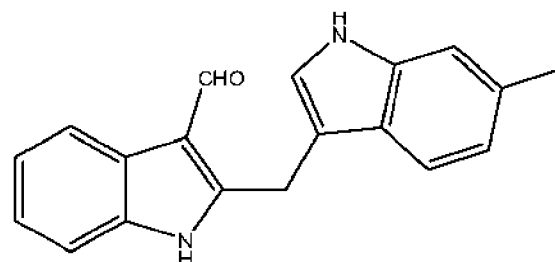
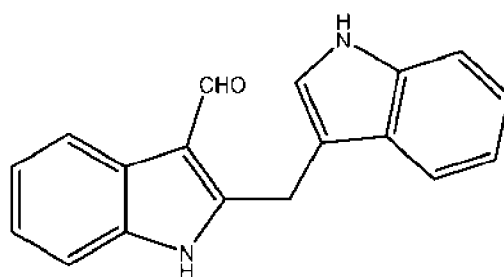


También se describe un compuesto para inducir la apoptosis de melanocitos. El compuesto tiene la estructura de fórmula (II):

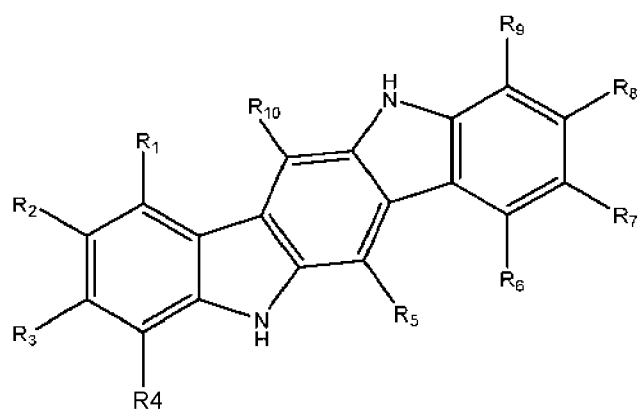


en donde: R1, R2, R3, R4, R5, R6, R7, R8, R9, R10, y R11 se seleccionan independientemente del grupo que consiste en hidrógeno y metilo; o una forma cristalina, hidrato o sal cosmética o farmacéuticamente aceptable de este.

También se describe un compuesto que se selecciona del grupo que consiste en:



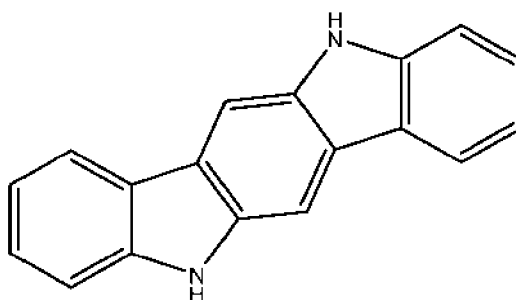
También se describe un compuesto para inducir la apoptosis de melanocitos. El compuesto tiene la estructura de fórmula (III):



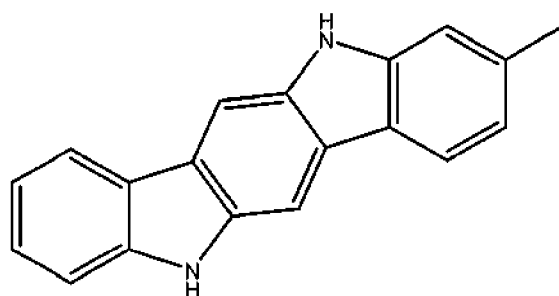
(III)

en donde: R1, R2, R3, R4, R5, R6, R7, R8, R9, y R10 se seleccionan independientemente del grupo que consiste en hidrógeno y metilo; o una forma cristalina, hidrato o sal cosmética o farmacéuticamente aceptable de este.

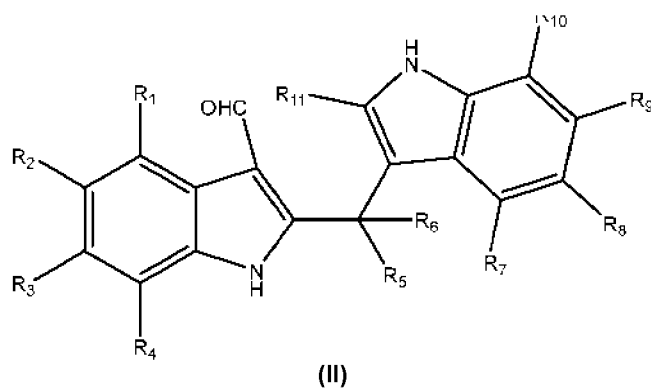
También se describe un compuesto que se selecciona del grupo que consiste en:



y

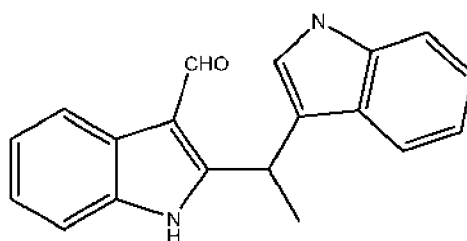
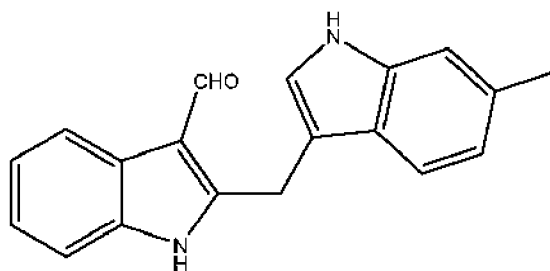
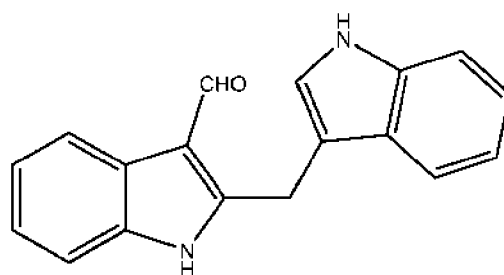


También se describe un compuesto para agonizar el receptor de hidrocarburo de arilo (AhR). El compuesto tiene la estructura de fórmula (II):

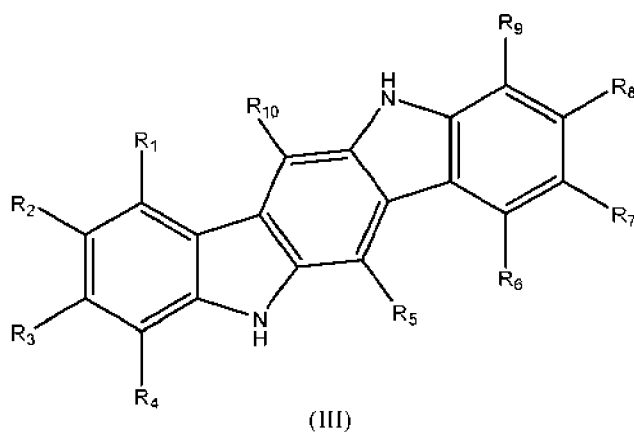


en donde: R1, R2, R3, R4, R5, R6, R7, R8, R9, R10, y R11 se seleccionan independientemente del grupo que consiste en hidrógeno y metilo; o una forma cristalina, hidrato o sal cosmética o farmacéuticamente aceptable de este.

También se describe un compuesto que se selecciona del grupo que consiste en:

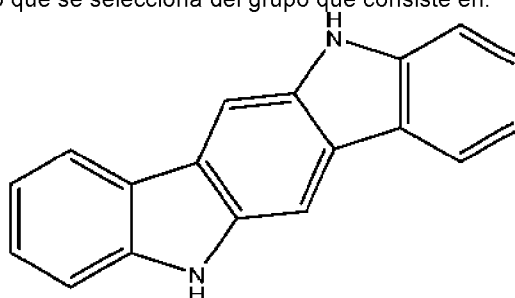


También se describe un compuesto para agonizar el receptor de hidrocarburo de arilo (AhR). El compuesto tiene la estructura de fórmula (III):

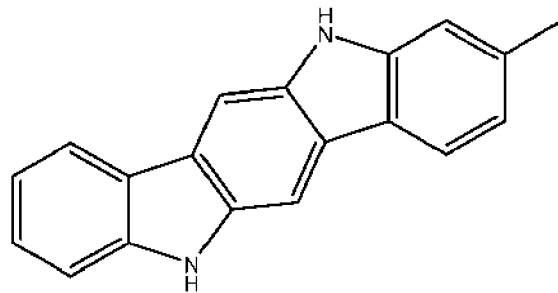


en donde: R1, R2, R3, R4, R5, R6, R7, R8, R9, y R10 se seleccionan independientemente del grupo que consiste en hidrógeno y metilo; o una forma cristalina, hidrato o sal cosmética o farmacéuticamente aceptable de este.

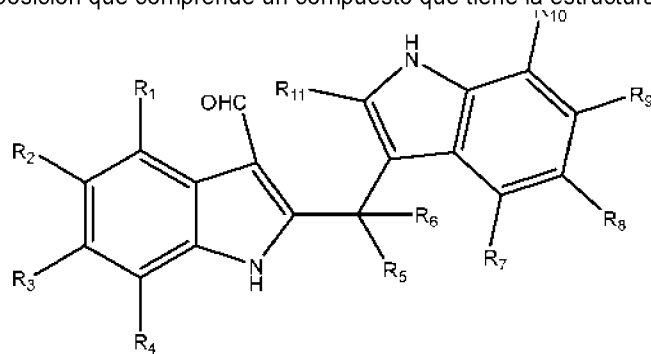
También se describe un compuesto que se selecciona del grupo que consiste en:



y



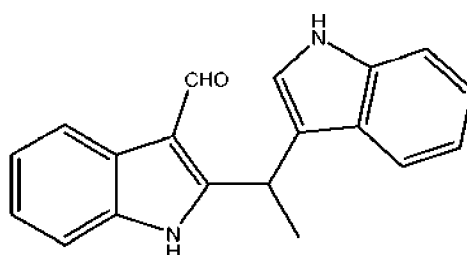
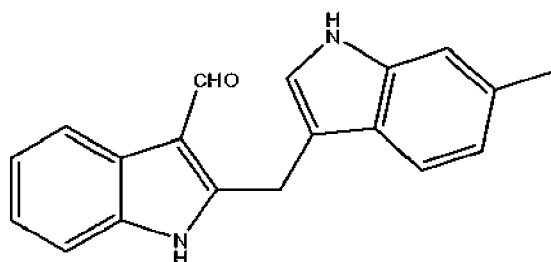
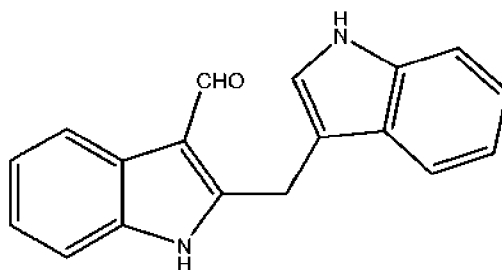
También se describe una composición que comprende un compuesto que tiene la estructura de fórmula (II):



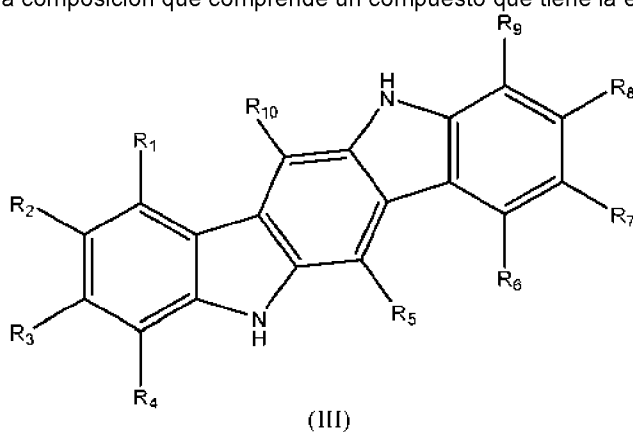
(II)

en donde: R1, R2, R3, R4, R5, R6, R7, R8, R9, R10, y R11 se seleccionan independientemente del grupo que consiste en hidrógeno y metilo; o una forma cristalina, hidrato o sal cosmética o farmacéuticamente aceptable de este, y un vehículo, diluyente o portador cosmética o farmacéuticamente aceptable.

La presente invención es una composición como se define en la reivindicación 1 que comprende un compuesto seleccionado del grupo que consiste en:

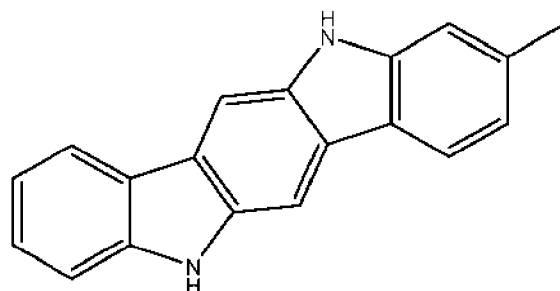
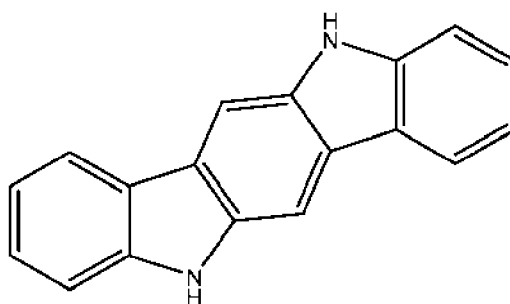


También se describe una composición que comprende un compuesto que tiene la estructura de fórmula (III):



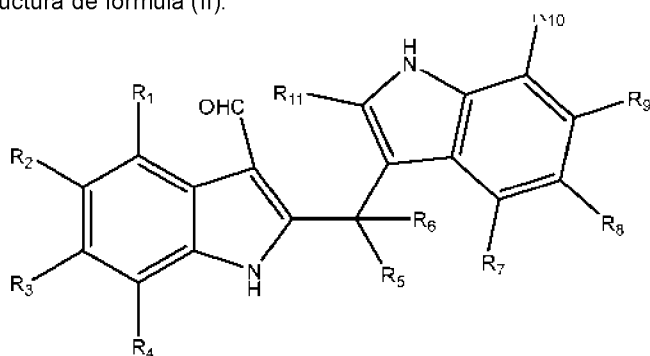
en donde: R1, R2, R3, R4, R5, R6, R7, R8, R9, y R10 se seleccionan independientemente del grupo que consiste en hidrógeno y metilo; o una forma cristalina, hidrato o sal cosmética o farmacéuticamente aceptable de este, y un vehículo, diluyente o portador cosmética o farmacéuticamente aceptable.

También se describe un compuesto que se selecciona del grupo que consiste en:



y

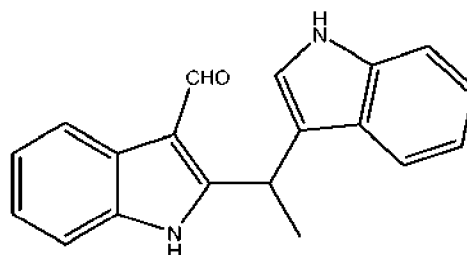
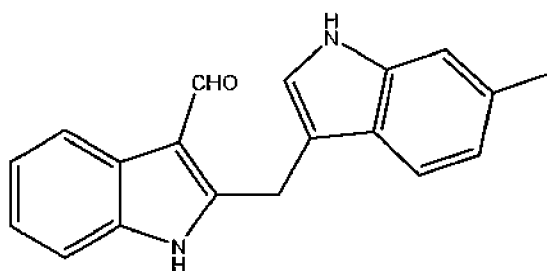
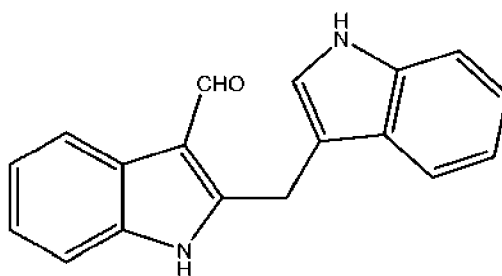
También se describe un método para aclarar la piel de un sujeto. El método comprende: poner en contacto al sujeto con un compuesto que tiene la estructura de fórmula (II):



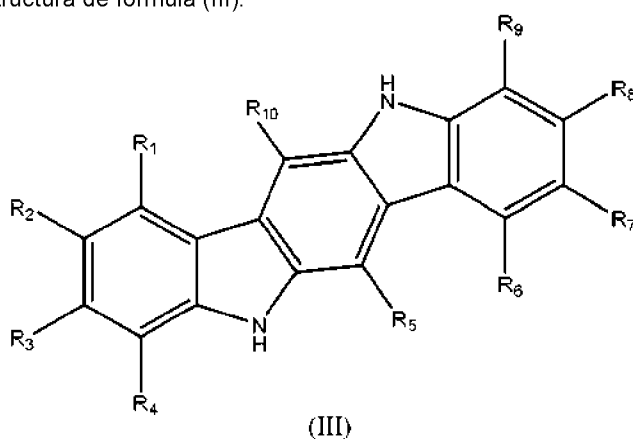
(II)

en donde: R1, R2, R3, R4, R5, R6, R7, R8, R9, R10, y R11 se seleccionan independientemente del grupo que consiste en hidrógeno y metilo; o una forma cristalina, hidrato o sal cosmética o farmacéuticamente aceptable de este.

También se describe un compuesto que se selecciona del grupo que consiste en:

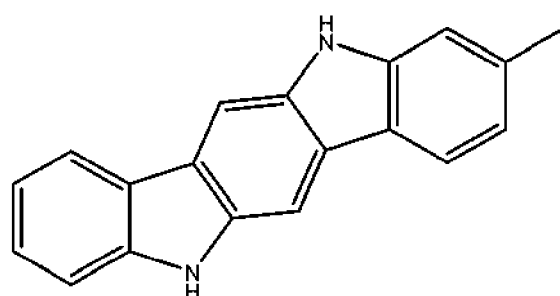
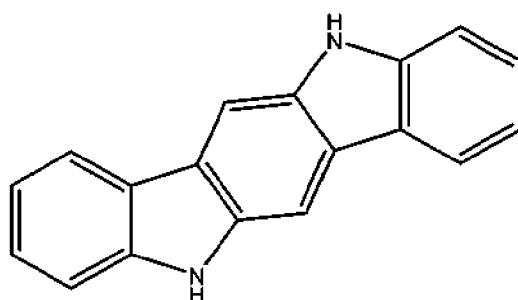


También se describe un método para aclarar la piel de un sujeto. El método comprende: poner en contacto al sujeto con un compuesto que tiene la estructura de fórmula (III):

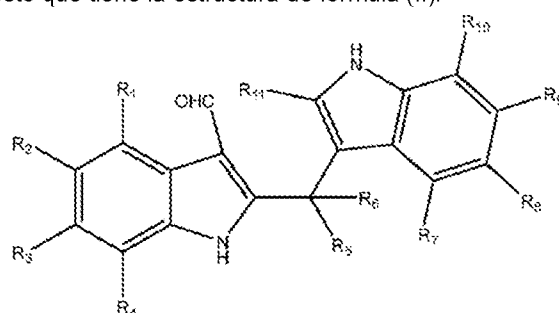


en donde: R1, R2, R3, R4, R5, R6, R7, R8, R9, y R10 se seleccionan independientemente del grupo que consiste en hidrógeno y metilo; o una forma cristalina, hidrato o sal cosmética o farmacéuticamente aceptable de este.

También se describe un compuesto que se selecciona del grupo que consiste en:



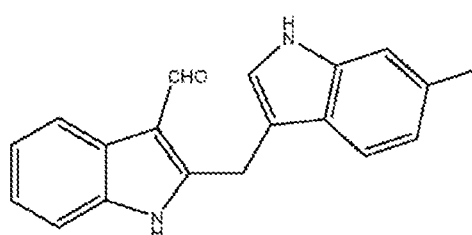
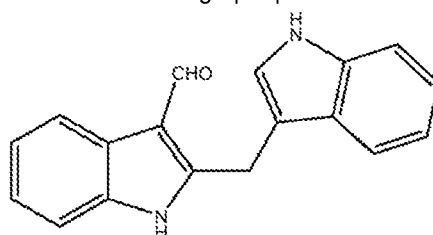
También se describe un método para inducir la apoptosis de melanocitos en un sujeto. El método comprende: poner en contacto al sujeto con un compuesto que tiene la estructura de fórmula (II):

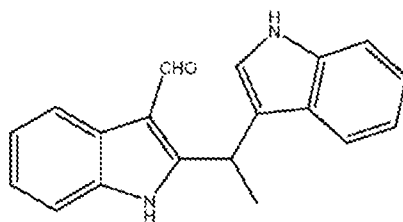


(II)

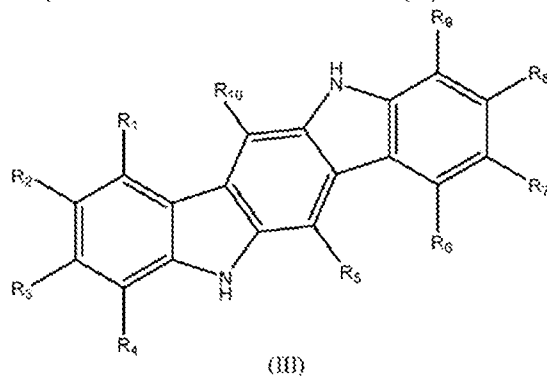
en donde: R1, R2, R3, R4, R5, R6, R7, R8, R9, R10, y R11 se seleccionan independientemente del grupo que consiste en hidrógeno y metilo; o una forma cristalina, hidrato o sal cosmética o farmacéuticamente aceptable de este.

También se describe un compuesto que se selecciona del grupo que consiste en:



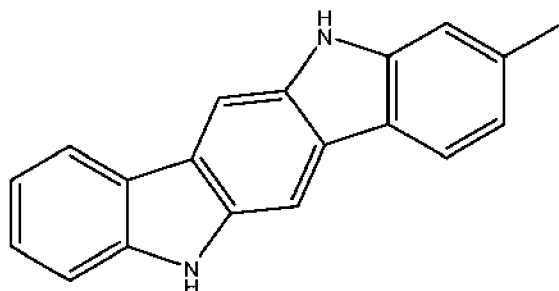
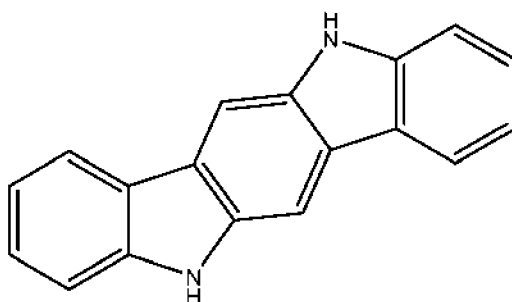


También se describe un método para inducir la apoptosis de melanocitos en un sujeto. El método comprende: poner en contacto al sujeto con un compuesto que tiene la estructura de fórmula (III):

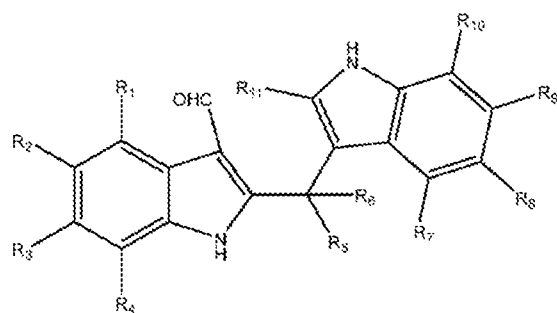


en donde: R1, R2, R3, R4, R5, R6, R7, R8, R9, y R10 se seleccionan independientemente del grupo que consiste en hidrógeno y metilo; o una forma cristalina, hidrato o sal cosmética o farmacéuticamente aceptable de este.

También se describe un compuesto que se selecciona del grupo que consiste en:



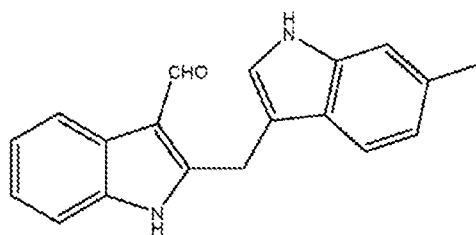
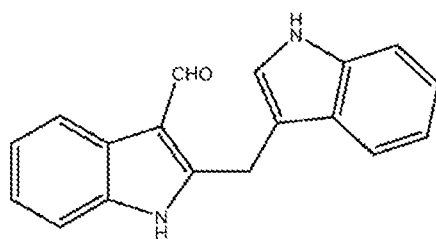
También se describe un método para agonizar un receptor de hidrocarburo de arilo (AhR) en un sujeto. El método comprende: poner en contacto al sujeto con un compuesto que tiene la estructura de fórmula (II):



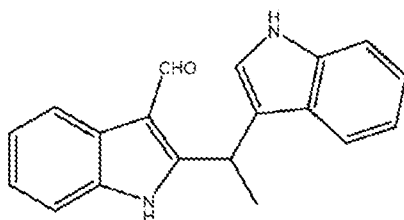
(II)

en donde: R1, R2, R3, R4, R5, R6, R7, R8, R9, R10, y R11 se seleccionan independientemente del grupo que consiste en hidrógeno y metilo; o una forma cristalina, hidrato o sal cosmética o farmacéuticamente aceptable de este.

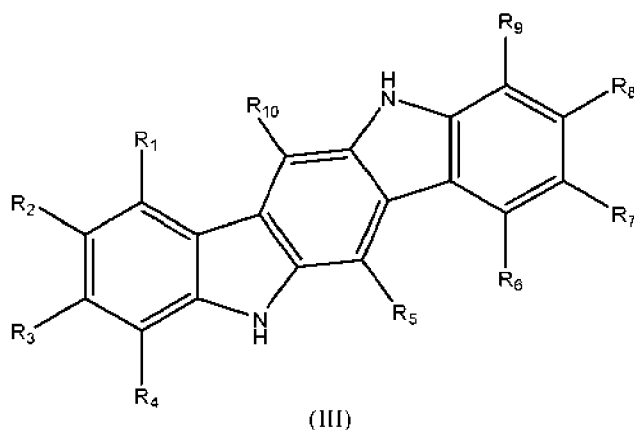
También se describe un compuesto que se selecciona del grupo que consiste en:



y

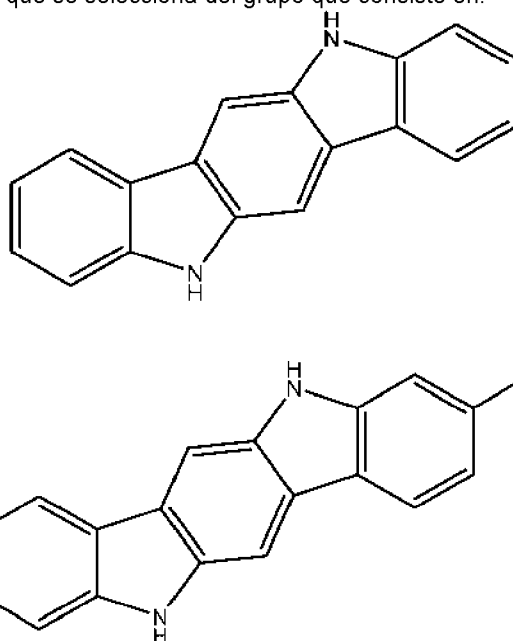


También se describe un método para agonizar un receptor de hidrocarburo de arilo (AhR) en un sujeto. El método comprende: poner en contacto al sujeto con un compuesto que tiene la estructura de fórmula (III);



en donde: R1, R2, R3, R4, R5, R6, R7, R8, R9, y R10 se seleccionan independientemente del grupo que consiste en hidrógeno y metilo; o una forma cristalina, hidrato o sal cosmética o farmacéuticamente aceptable de este.

También se describe un compuesto que se selecciona del grupo que consiste en:



Tal como se utiliza en la presente, el término "composición" significa una entidad que comprende un compuesto, así como cualquier entidad que resulte, directa o indirectamente, de combinaciones de un compuesto con otros ingredientes. Las composiciones cosméticas de la presente invención se pueden usar como, por ejemplo, reactivos de investigación *in vitro* o *in vivo*. Las composiciones cosméticas de la presente invención también se pueden aplicar directamente a la piel de un sujeto humano o no humano para un efecto cosmético.

Una composición de la presente invención se puede administrar de cualquier manera deseada y eficaz: para ingestión oral o para administración parenteral o de otro tipo de cualquier manera apropiada, como intraperitoneal, subcutánea, tópica, intradérmica, por inhalación, intrapulmonar, rectal, vaginal, sublingual, intramuscular, intravenosa, intraarterial, intratecal o intralinfática. Además, una composición cosmética de la presente invención puede administrarse junto con otras composiciones. Una composición cosmética de la presente invención puede encapsularse o protegerse de algún otro modo contra secreciones gástricas u otras, si se desea.

Las composiciones cosméticas de la invención comprenden uno o más ingredientes activos mezclados con uno o más portadores cosmética o farmacéuticamente aceptables y uno o más de otros compuestos, ingredientes y/o materiales, como se define en la reivindicación 1. Independientemente de la vía de administración seleccionada, los compuestos y composiciones cosméticas de la presente invención se formulan en formas de dosificación cosmética o farmacéuticamente aceptables mediante métodos convencionales conocidos por los expertos en la técnica.

Los vehículos, diluyentes y portadores cosmética o farmacéuticamente aceptables son conocidos en la técnica e incluyen materiales adecuados para poner en contacto con los tejidos de los seres humanos y los no humanos sin producir

toxicidad, incompatibilidad, inestabilidad, irritación, respuesta alérgica no deseadas y similares. Los vehículos, diluyentes y portadores cosmética o farmacéuticamente aceptables incluyen cualquier sustancia sustancialmente no tóxica que se puede utilizar convencionalmente, por ejemplo, para administración tópica, oral, peritoneal o subcutánea de productos cosméticos o farmacéuticos en los cuales los compuestos y las composiciones cosméticas de la presente invención permanecerán estables y biodisponibles cuando se aplican, inoculan, inyectan o se administran de algún otro modo a un sujeto humano o no humano. Los portadores cosmética o farmacéuticamente aceptables adecuados para aplicación tópica son conocidos por los expertos en la técnica e incluyen líquidos, cremas, aceites, lociones, ungüentos, geles o sólidos cosmética o farmacéuticamente aceptables, tales como cremas cosméticas de noche convencionales, cremas de base, bronceadores, protectores solares, lociones para manos, maquillaje y bases de maquillaje, mascarillas y similares. Los portadores adecuados para una forma de dosificación seleccionada y una vía de administración prevista son bien conocidos en la técnica, y los portadores aceptables para una forma de dosificación y un método de administración elegidos pueden determinarse utilizando el estado de la técnica.

Las composiciones cosméticas de la presente invención comprenden uno o más ingredientes seleccionados del grupo que consiste en perfumes, estrógenos, vitaminas A, C y E, ácido pirúvico, ácido láctico, ácido glicólico, lanolina, vaselina, aloe vera, metilparabeno, propilparabeno y pigmentos. Las composiciones pueden contener otros ingredientes convencionales en cosmética incluyendo perfumes, estrógenos, vitaminas A, C y E, alfa-hidroxi o alfa- ceto ácidos tales como los ácidos pirúvico, láctico o glicólico, lanolina, vaselina, aloe vera, metil o propil parabeno, pigmentos y similares. Los vehículos, diluyentes y portadores cosmética o farmacéuticamente aceptables no limitantes de la presente invención incluyen azúcares (p. ej., lactosa, sacarosa, manitol y sorbitol), almidones, preparaciones de celulosa, fosfatos de calcio (p. ej., fosfato dicálcico, fosfato tricálcico e hidrógeno fosfato de calcio), citrato de sodio, agua, soluciones acuosas (p. ej., solución salina, inyección de cloruro de sodio, inyección de Ringer, inyección de dextrosa, inyección de dextrosa y cloruro de sodio, inyección de lactato de Ringer), alcoholes (p. ej., alcohol etílico, alcohol propílico y alcohol bencílico), polioles (p. ej., glicerol, propilenglicol y polietilenglicol), ésteres orgánicos (p. ej., oleato de etilo y triglicéridos), polímeros biodegradables (p. ej., poliláctido-poliglicólido, poli(ortoésteres) y poli(anhídridos)), matrices elastoméricas, liposomas, microesferas, aceites (p. ej., maíz, germen, oliva, ricino, sésamo, semilla de algodón y maní), manteca de cacao, ceras (p. ej., ceras para supositorios), parafinas, siliconas, talco, silicilato, etc.

Las composiciones cosméticas de la invención pueden, opcionalmente, contener ingredientes y/o materiales adicionales comúnmente usados en composiciones cosméticas. Estos ingredientes y materiales se conocen bien en la técnica e incluyen, por ejemplo, (1) rellenos o extensores, tales como almidones, lactosa, sacarosa, glucosa, manitol, y ácido silícico; (2) aglutinantes, tales como carboximetilcelulosa, alginatos, gelatina, polivinilpirrolidona, hidroxipropilmetilcelulosa, sacarosa y acacia; (3) humectantes, tales como glicerol; (4) agentes desintegrantes, tales como agar-agar, carbonato de calcio, almidón de papa o tapioca, ácido alginico, ciertos silicatos, almidón glicolato de sodio, carboximetilcelulosa de sodio reticulada y carbonato de sodio; (5) agentes retardadores de la solución, tal como parafina; (6) aceleradores de absorción, tales como compuestos de amonio cuaternario; (7) agentes humectantes, tales como alcohol cetílico y monoestearato de glicerol; (8) absorbentes, tales como caolín y arcilla de bentonita; (9) lubricantes, tales como talco, estearato de calcio, estearato de magnesio, polietilenglicol sólido, y laurilsulfato de sodio; (10) agentes de suspensión, tales como alcoholes isostearílicos etoxilados, sorbitol de polioxietileno y ésteres de sorbitán, celulosa microcristalina, metahidróxido de aluminio, bentonita, agar-agar y tragacanto; (11) agentes amortiguadores; (12) excipientes, tales como lactosa, azúcares con leche, polietilenglicol, grasas animales y vegetales, aceites, ceras, parafinas, manteca de cacao, almidones, tragacanto, derivados de celulosa, polietilenglicol, siliconas, bentonitas, ácido silícico, talco, salicilato, óxido de zinc, hidróxido de aluminio, silicatos de calcio, y poliamida en polvo; (13) diluyentes inertes, tales como agua u otros disolventes; (14) conservantes; (15) agentes tensoactivos; (16) agentes dispersantes; (17) agentes de liberación de control o de retardo en la absorción, tal como hidroxipropilmetilcelulosa, otras matrices poliméricas, polímeros biodegradables, liposomas, microesferas, monoestearato de aluminio, gelatina, y ceras; (18) agentes opacificantes; (19) adyuvantes; (20) agentes humectantes; (21) agentes emulsionantes y de suspensión; (22), agentes solubilizantes y emulsionantes, tales como alcohol etílico, alcohol isopropílico, carbonato de etilo, acetato de etilo, alcohol bencílico, benzoato de bencilo, propilenglicol, 1,3-butilenglicol, aceites (en particular, aceites de semilla de algodón, frutos secos, maíz, germen de trigo, oliva, ricino y sésamo), glicerol, alcohol tetrahidrofurfílico, polietilenglicol y ésteres de ácidos grasos de sorbitán; (23) propulsores, tales como clorofluorohidrocarburos e hidrocarburos volátiles no sustituidos, tales como butano y propano; (24) antioxidantes; (25) agentes que hacen que la formulación sea isotónica con la sangre del receptor previsto, tales como azúcares y cloruro de sodio; (26) agentes espesantes; (27) materiales de revestimiento, tal como lecitina; y (28) agentes edulcorantes, saborizantes, colorantes, perfumantes y conservantes. Cada uno de esos ingredientes o materiales debe ser "aceptable" en el sentido de ser compatible con los demás ingredientes de la formulación y no perjudicial para el sujeto. Los ingredientes y materiales adecuados para una forma de dosificación seleccionada y una vía de administración prevista son bien conocidos en la técnica, y los ingredientes y materiales aceptables para una forma de dosificación y un método de administración elegidos pueden determinarse utilizando el estado de la técnica.

Las composiciones cosméticas de la presente invención adecuadas para la administración oral pueden estar en forma de cápsulas, sellos, píldoras, tabletas, polvos, gránulos, una solución o suspensión en un líquido acuoso o no acuoso, emulsión líquida aceite en agua o agua en aceite, un elixir o jarabe, una pastilla, un bolo, un electuario o una pasta. Estas formulaciones se pueden preparar por métodos conocidos en la técnica, p. ej., por medio de procedimientos convencionales de recubrimiento, mezclado, granulación o liofilización.

Se pueden preparar formas de dosificación sólidas para administración oral (cápsulas, tabletas, píldoras, grageas, polvos, gránulos y similares), p. ej., mezclando el ingrediente o los ingredientes activos con uno o más vehículos cosmética o farmacéuticamente aceptables y, opcionalmente, uno o más rellenos, extensores, aglutinantes, humectantes, agentes desintegrantes, agentes retardadores de la solución, aceleradores de la absorción, agentes humectantes, absorbentes, lubricantes y/o agentes colorantes. Pueden emplearse composiciones sólidas de un tipo similar como cargas en cápsulas de gelatina rellenas blandas y duras usando un excipiente adecuado. Una tableta puede prepararse por compresión o moldeo, opcionalmente con uno o más ingredientes accesorios. Las tabletas comprimidas se pueden preparar usando un aglutinante, lubricante, diluyente inerte, conservante, desintegrante, tensoactivo o agente dispersante adecuados. Las tabletas moldeadas se pueden fabricar moldeándolos en una máquina adecuada. Las tabletas y otras formas de dosificación sólidas, tales como cápsulas, píldoras y gránulos, se pueden marcar o preparar opcionalmente con recubrimientos y cubiertas, tales como recubrimientos entéricos y otros recubrimientos bien conocidos en la técnica de formulación cosmética. También se pueden formular para que proporcionen una liberación lenta o controlada del ingrediente activo que contienen. Pueden esterilizarse, por ejemplo, mediante filtración a través de un filtro de retención de bacterias. Estas composiciones también pueden contener opcionalmente agentes opacificantes y pueden ser de una composición tal que liberen el ingrediente activo solo, o preferentemente, en una cierta porción del tracto gastrointestinal, opcionalmente, de manera retardada. El ingrediente activo también puede estar en forma microencapsulada.

Las formas de dosificación líquidas para administración oral incluyen emulsiones, microemulsiones, soluciones, suspensiones, jarabes y elixires cosmética o farmacéuticamente aceptables. Las formas de dosificación líquidas pueden contener diluyentes inertes adecuados comúnmente usados en la técnica. Además de diluyentes inertes, las composiciones orales también pueden incluir adyuvantes, tales como agentes humectantes, agentes emulsionantes y de suspensión, agentes edulcorantes, aromatizantes, colorantes, perfumantes y conservantes. Las suspensiones pueden contener agentes de suspensión.

Las composiciones cosméticas de la presente invención para la administración rectal o vaginal pueden presentarse como un supositorio, que se puede preparar mezclando uno o más ingredientes activos con uno o más portadores no irritantes adecuados que son sólidos a temperatura ambiente, pero líquidos a temperatura corporal y, por lo tanto, se derretirá en el recto o en la cavidad vaginal y liberará el compuesto activo. Las composiciones cosméticas de la presente invención que son adecuadas para la administración vaginal también incluyen pesarios, tampones, cremas, geles, pastas, espumas o formulaciones en aerosol que contienen tales vehículos cosmética o farmacéuticamente aceptables que se sabe que son apropiados en la técnica.

Las formas de dosificación para administración tópica o transdérmica incluyen polvos, aerosoles, ungüentos, pastas, cremas, lociones, geles, soluciones, parches, gotas, emulsiones, suspensiones, aerosoles e inhaladores. Se pueden añadir a la formulación cualesquiera vehículos convencionales, auxiliares y opcionalmente otros ingredientes activos.

Los auxiliares preferidos provienen del grupo que comprende conservantes, antioxidantes, estabilizantes, solubilizantes, vitaminas, colorantes, mejoradores del olor, formadores de películas, espesantes y humectantes.

Las soluciones y emulsiones pueden comprender los vehículos convencionales, tales como solventes, solubilizantes y emulsionantes, por ejemplo agua, etanol, isopropanol, carbonato de etilo, acetato de etilo, alcohol bencílico, benzoato de bencilo, propilenglicol, 1,3-butilglicol, aceites, en particular aceite de semilla de algodón, aceite de cacahuete, aceite de maíz, aceite de oliva, aceite de ricino y aceite de sésamo, ésteres de ácidos grasos de glicerol, polietilenglicoles y ésteres de ácidos grasos de sorbitán, o mezclas de estas sustancias.

Las emulsiones pueden existir en diversas formas. Así, pueden ser, por ejemplo, una emulsión o microemulsión del tipo agua en aceite (W/O) o del tipo aceite en agua (O/W), o una emulsión múltiple, por ejemplo del tipo tipo agua en aceite en agua (W/OW).

Las composiciones cosméticas según la invención también pueden presentarse en forma de preparaciones dispersas, exentas de emulsionantes. Pueden ser, por ejemplo, hidrodispersiones o emulsiones de Pickering.

Las suspensiones pueden comprender vehículos convencionales, tales como diluyentes líquidos, por ejemplo agua, etanol o propilenglicol, medios de suspensión, por ejemplo alcoholes isoestearílicos etoxilados, ésteres de polioxietilensorbitol y ésteres de polioxietilensorbitán, celulosa microcristalina, metahidróxido de aluminio, bentonita, agar-agar y tragacanto, o mezclas de estas sustancias.

Las pastas, ungüentos, geles y cremas pueden comprender vehículos convencionales, por ejemplo, grasas animales y vegetales, ceras, parafinas, almidón, tragacanto, derivados de celulosa, polietilenglicoles, siliconas, bentonitas, ácido silícico, óxido de talco y zinc, o mezclas de estas sustancias.

Los aceites faciales y corporales pueden comprender vehículos convencionales, como aceites sintéticos, como ésteres de ácidos grasos, alcoholes grasos, aceites de silicona, aceites naturales, como aceites vegetales y extractos vegetales oleosos, aceites de parafina, aceites de lanolina o mezclas de estas sustancias.

Los aerosoles pueden comprender propulsores convencionales, por ejemplo, clorofluorocarburos, propano/butano o

dimetil éter.

Las composiciones cosméticas de la presente invención adecuadas para administraciones parenterales comprenden uno o más compuestos en combinación con una o más soluciones, dispersiones, suspensiones o emulsiones acuosas o no acuosas isotónicas estériles cosmética o farmacéuticamente aceptables, o polvos estériles que pueden reconstituirse en soluciones inyectables estériles o dispersiones justo antes de su uso, que pueden contener antioxidantes, reguladores de pH, solutos adecuados que hacen que la formulación sea isotónica con la sangre del receptor pretendido, o agentes de suspensión o espesantes. Se puede mantener la fluidez adecuada, por ejemplo, mediante el uso de materiales de revestimiento, mediante el mantenimiento del tamaño de partícula requerido en el caso de dispersiones y mediante el uso de tensoactivos. Estas composiciones cosméticas también pueden contener adyuvantes adecuados, tales como agentes humectantes, agentes emulsionantes y agentes dispersantes. También puede ser deseable incluir agentes isotónicos. Además, se puede producir una absorción prolongada de la forma cosmética inyectable mediante la inclusión de agentes que retrasan la absorción.

En algunos casos, para prolongar la eficacia, resulta deseable ralentizar la absorción de una inyección subcutánea o intramuscular. Esto se puede lograr por el uso de una suspensión líquida de material cristalino o amorfo con deficiente solubilidad en agua.

La velocidad de absorción del agente activo/fármaco depende entonces de su velocidad de disolución que, a su vez, puede depender del tamaño del cristal y la forma cristalina. Alternativamente, la absorción retardada de una composición administrada por vía parenteral se puede lograr disolviendo o suspendiendo la composición activa en un vehículo oleoso. Las formas de depósito inyectables se pueden preparar formando matrices de microencapsula del ingrediente activo en polímeros biodegradables. Dependiendo de la relación del ingrediente activo al polímero y de la naturaleza del polímero particular empleado, se puede controlar la velocidad de liberación del ingrediente activo. Las formulaciones inyectables de depósito también se preparan atrapando el fármaco en liposomas o microemulsiones que son compatibles con el tejido corporal. Los materiales inyectables se pueden esterilizar, por ejemplo, mediante filtración a través de un filtro de retención de bacterias.

Las composiciones cosméticas de la presente invención pueden presentarse en contenedores sellados de dosis unitaria o multidosis, por ejemplo, ampollas y viales, y pueden almacenarse en una condición liofilizada que requiere solamente la adición del portador líquido estéril, por ejemplo agua para inyección, inmediatamente antes del uso. Pueden prepararse soluciones y suspensiones para inyección extemporánea a partir de polvos, gránulos y comprimidos estériles del tipo descrito anteriormente.

En la presente invención, el término "forma cristalina" significa la estructura cristalina de un compuesto. Un compuesto puede existir en una o más formas cristalinas, que pueden tener diferentes características estructurales, físicas, farmacológicas o químicas. Se pueden obtener diferentes formas cristalinas usando variaciones en la nucleación, cinética de crecimiento, aglomeración y rotura. La nucleación se produce cuando se supera la barrera de energía de transición de fase, lo que permite que se forme una partícula a partir de una solución sobresaturada. El crecimiento de cristales es el agrandamiento de las partículas de cristal causado por la deposición del compuesto químico en una superficie existente del cristal. La tasa relativa de nucleación y crecimiento determina la distribución del tamaño de los cristales que se forman. La fuerza impulsora termodinámica tanto para la nucleación como para el crecimiento es la sobresaturación, que se define como la desviación del equilibrio termodinámico. La aglomeración es la formación de partículas más grandes a través de dos o más partículas (p. ej., cristales) que se pegan y forman una estructura cristalina más grande.

El término "hidrato", tal como se utiliza en la presente, significa una forma sólida o semisólida de un compuesto químico que contiene agua en un complejo molecular. El agua se encuentra generalmente en una cantidad estequiométrica con respecto al compuesto químico.

Tal como se utiliza en la presente, "sal cosmética o farmacéuticamente aceptable" se refiere a un derivado de los compuestos descritos en la presente en donde los compuestos se modifican mediante la producción de sales ácidas o básicas de estos. Los ejemplos de sales cosmética o farmacéuticamente aceptables incluyen, pero no se limitan a, sales de ácidos minerales u orgánicos de residuos básicos tales como aminas; sales alcalinas u orgánicas de residuos ácidos tales como ácidos carboxílicos, y similares. Por ejemplo, tales sales incluyen sales de amoníaco, L-arginina, betaína, benetamina, benzatina, hidróxido de calcio, colina, deanol, dietanolamina (2,2'-iminobis(etanol)), dietilamina, 2-(dietilamino)-etanol, 2-aminoetanol, etilendiamina, N-etil-glucamina, hidrabamina, 1H-imidazol, lisina, hidróxido de magnesio, 4-(2-hidroxietil)-morfolina, piperazina, hidróxido de potasio, 1-(2-hidroxi-etil)-pirrolidina, hidróxido de sodio, trietanolamina (2,2',2"-nitrilotris(etanol)), trometamina, hidróxido de zinc, ácido acético, ácido 2,2-dicloroacético, ácido adípico, ácido algínico, ácido ascórbico, ácido L-aspártico, ácido bencenosulfónico, ácido benzoico, ácido 2,5-dihidroxibenzoico, ácido 4-acetamido-benzoico, ácido (+)-canforico, ácido (+)-alcanfor-10-sulfónico, ácido carbónico, ácido cinámico, ácido cítrico, ácido ciclámico, ácido decanoico, ácido dodecilsulfúrico, ácido etano-1,2-disulfónico, ácido etanosulfónico, ácido 2-hidroxi-etanosulfónico, ácido etilendiamonotetraacético, ácido fórmico, ácido fumárico, ácido galárico, ácido gentésico, ácido D-glucóheptónico, ácido D-glucónico, ácido D-glucurónico, ácido glutámico, ácido glutántico, ácido glutárico, ácido 2-oxo-glutárico, ácido glicerofosfórico, glicina, ácido glicólico, ácido hexanoico, ácido hipúrico, ácido bromhídrico, ácido clorhídrico, ácido isobutírico, ácido DL-láctico, ácido lactobónico, ácido láurico, lisina, ácido maleico, ácido (-)-L-málico, ácido malónico, ácido DL-mandélico, ácido metanosulfónico, ácido galactárico, ácido

naftaleno-1,5-disulfónico, ácido naftaleno-2-sulfónico, ácido 1-hidroxi-2-naftoico, ácido nicotínico, ácido nítrico, ácido octanoico, ácido oleico, ácido orótico, ácido oxálico, ácido palmítico, ácido pamoico (ácido embónico), ácido fosfórico, ácido propiónico, ácido (-)-L-piroglutámico, ácido salicílico, ácido 4-amino-salicílico, ácido sebácico, ácido esteárico, ácido succínico, ácido sulfúrico, ácido tánico, ácido (+)-L-tartárico, ácido tiocianico, ácido p-toluenosulfónico y ácido undecilénico. Se pueden formar otras sales cosmética o farmacéuticamente aceptables con cationes de metales como aluminio, calcio, litio, magnesio, potasio, sodio, zinc y similares.

Las sales cosmética o farmacéuticamente aceptables pueden sintetizarse a partir de un compuesto descrito en la presente que contiene un radical básico o ácido mediante métodos químicos convencionales. Generalmente, tales sales se pueden preparar haciendo reaccionar las formas de ácido o base libre de estos compuestos con una cantidad suficiente de la base o ácido apropiado en agua o en un diluyente orgánico como éter, acetato de etilo, etanol, isopropanol o acetonitrilo, o una mezcla de estos.

Los compuestos se incluyen en las composiciones cosméticas de la presente invención como se define en la reivindicación 1.

La terminología usada en la presente tiene el propósito de describir solamente modalidades particulares y no pretende ser taxativa. Como se usa en la descripción y en las reivindicaciones anexas, las formas singulares "un", "una" y "el", "la" incluyen las referencias plurales, a menos que el contexto lo indique claramente de otra manera.

Para enumerar los intervalos numéricos en la presente, se contempla explícitamente cada número interviniente entre estos con el mismo grado de precisión. Por ejemplo, para el intervalo de 6-9, se contemplan los números 7 y 8 además de 6 y 9, y para el intervalo de 6,0-7,0, los números 6,0, 6,1, 6,2, 6,3, 6,4, 6,5, 6,6, 6,7, 6,8, 6,9 y 7,0 se contemplan explícitamente.

Los siguientes ejemplos se proporcionan para ilustrar más las composiciones cosméticas y los métodos cosméticos de la presente invención. Estos ejemplos son solamente ilustrativos y no pretenden limitar el alcance de la invención de ninguna manera.

EJEMPLOS

Ejemplo 1

Materiales y métodos

Aislamiento de compuestos producidos por *Malassezia*

La malassezina se aísla utilizando, por ejemplo, los procedimientos descritos en Wille et al., 2001. El protocolo se describe brevemente a continuación.

Medio

Se esteriliza un medio que consta de Tween 80 (30 ml), cicloheximida (0,5 g), cloranfenicol (0,05 g), agar (20 g) y un volumen de agua suficiente para una mezcla de 1000 ml y se mezcla con 0,3 % de L-triptofan estéril filtrado a una concentración de 0,3 % g a 50 °C. Las porciones de 10 ml se vierten en placas de petri de 10 cm y el pH se ajusta a 5,5 usando 0,1 M de HCl.

*Cultivar *Malassezia furfur* y los compuestos aislantes producidos por el *M. furfur**

Malassezia furfur se frota en el medio descrito anteriormente y se incuba durante 14 días a 30 °C. El contenido de la placa de Petri se tritura y se extrae con acetato de etilo durante 12 horas. El extracto se filtra sobre lana de vidrio, se evapora a sequedad y se disuelve en metanol. A continuación, el extracto se fracciona mediante cromatografía en Sephadex LH-20 con metanol como eluyente.

La separación adicional se realiza con cromatografía preparativa en capa fina con tolueno: formiato de etilo: ácido fórmico (10:5:3). Las zonas principales se dividen entre agua y acetato de etilo. Las fracciones se analizan para determinar la actividad de interés. Los compuestos de las fracciones de interés se aíslan mediante HPLC.

Síntesis de Malassezina y análogos químicos de Malassezina

La malassezina se sintetiza de acuerdo con el protocolo que se presenta en Wille et al., 2001. Los análogos químicos de malassezina se sintetizan de acuerdo con nuevos protocolos de síntesis, así como los descritos en Winston-McPherson, et al., 2014.

Protocolos de detección

Los compuestos iluminadores de la piel eficaces se evalúan utilizando ambos protocolos de análisis conocidos por los expertos en la técnica y métodos de análisis novedosos. Por ejemplo, la malassezina y sus análogos químicos se evalúan mediante un bioensayo de tirosinasa, como se describió anteriormente. Se utilizan otros protocolos de detección que implican modelos de tejido in vivo e in vitro, incluidos los ensayos de unión del receptor de hidrocarburo de arilo (AhR).

Bioensayo de tirosinasa

Los bioensayos de tirosinasa se realizan tal como se describe en Wille *et al.*, 2001. Brevemente, L-DOPA se mezcla con enzima tirosinasa. La extinción se mide durante 1 minuto, lo que indica la formación de dopaquinona. Usando, por ejemplo, las fracciones discutidas anteriormente, estas fracciones se disuelven en DMSO y se agregan directamente a la reacción de tirosinasa, con DMSO puro como un control. La actividad inhibidora de la tirosinasa se mide como un aumento reducido de la extinción en comparación con el control.

Ensayo de unión del receptor de airhidrocarburos

Los ensayos de unión a AhR se realizan de acuerdo con el protocolo que se describe, por ejemplo, en Song, *et al.*, 2002. En resumen, se expresan AhR humanos y murinos *in vitro* utilizando, por ejemplo, una reacción de TnT Quick-coupled Reticulocyte Lysate Systems (Promega, Madison, WI). Los estudios de unión del ligando receptor utilizan la velocidad de sedimentación en gradientes de sacarosa como se describe en Karchner, *et al.*, 1999.

Ensayo EROD

Los compuestos, composiciones y formulaciones también se evalúan usando el ensayo de etoxiresorufina-O-deetilasa (EROD) conocido por los expertos en la técnica. (Donato, *et al.*, 1993; Whyte, *et al.*, 2000; Wille *et al.*, 2001).

Ensayos de apoptosis de melanocitos

Se evalúan los compuestos candidatos para determinar la actividad inductora de apoptosis en los melanocitos. Los melanocitos epidérmicos humanos se cultivan en Medio 254 complementado con Suplemento de crecimiento de melanocitos humanos (HMGS) (Thermo-Fisher Scientific, Waltham, MA) o Medio basal de células dérmicas (ATCC, Manassas, VA). Los componentes adicionales de los medios de crecimiento de melanocitos humanos pueden incluir, entre otros, insulina (5 µg/ml), ácido ascórbico (50 µg/ml), L-glutamina (6 mM), epinefrina (1,0 µM) y cloruro de calcio (0,2 mM). Los cultivos de melanocitos humanos se mantienen a 37 °C en 5 % de CO₂.

Los compuestos candidatos se diluyen en DMSO y se mezclan directamente en cultivos de melanocitos. Se utilizan como controles volúmenes equivalentes de DMSO puro. Los ensayos de citotoxicidad conocidos por los expertos en la técnica se realizan de acuerdo con las instrucciones del fabricante. Los ensayos de citotoxicidad que se utilizan en la presente invención incluyen, entre otros, ensayo de citotoxicidad verde CellTox™, ensayos de caspasa fluorescente Apo- ONE, ensayo ApoTox-Glo™ y ensayos Caspase-Glo® (Promega, Madison, WI). La detección de fluorescencia se logra usando FACS estándar o ensayos de microscopía conocidos por los expertos en la técnica, incluidos los descritos en Krämer, *et al.*, 2005.

Se utilizan medios adicionales para evaluar la apoptosis, incluidos análisis FACS para anexina V y análisis de transferencia Western para la expresión de caspasa-9. La inmunoelectrotransferencia se realiza según métodos conocidos por los expertos en la técnica.

Ensayos de xenoinjerto de ratón

Se generan modelos de xenoinjerto de ratón de piel humana de acuerdo con los protocolos conocidos en la técnica. (Black, *et al.*, 1985; Manning *et al.*, 1973; Reed, *et al.*, 1973; Plenat, *et al.*, 1992; Scott *et al.*, 1998; Otulakowski, *et al.*, 1994). Una vez establecidos, los modelos de xenoinjerto de ratón se exponen a compuestos de la presente invención y se observan cambios en la pigmentación en comparación con los controles. Los cambios en la pigmentación de la piel se evalúan usando varias escalas de pigmentación conocidas por los expertos en la técnica, que incluyen, pero no se limitan a, la prueba de tipificación cutánea de Fitzpatrick y la escala de hiperpigmentación de Taylor. (Taylor, *et al.*, 2005).

Ensayos humanos

Los compuestos, composiciones y formulaciones se aplican a seres humanos, por ejemplo, sobre piel humana, y se comparan con sustancias de control. Los cambios en la pigmentación de la piel se evalúan usando varias escalas de pigmentación conocidas por los expertos en la técnica, que incluyen, pero no se limitan a, la prueba de tipificación cutánea de Fitzpatrick y la escala de hiperpigmentación de Taylor.

Ejemplo 2**Diana bioquímica de malassezina y sus análogos**

5 Se espera que los compuestos y composiciones cosméticas de la presente invención exhiban, por ejemplo, inhibición de tirosinasa y actividad agonista de AhR comparable a malassezina. Se espera que los compuestos y composiciones cosméticas de la presente invención exhiban, por ejemplo, una inhibición de tirosinasa más potente y un agonismo de AhR más fuerte en comparación con malassezina. Asimismo, se espera que algunos de los compuestos y composiciones cosméticas de la presente invención sean inhibidores de tirosinasa y agonistas de AhR menos eficaces que malassezina.

10 Tales compuestos, composiciones y formulaciones pueden tener perfiles de toxicidad más favorables en comparación con compuestos

Ejemplo 3**Eficacia in vitro**

15 Se espera que los compuestos y composiciones cosméticas de la presente invención induzcan la apoptosis de los melanocitos y modulen la actividad de los melanocitos, la producción de melanina, la biogénesis de melanosomas y/o la transferencia de melanosomas al menos tan potente como malassezina. También se contempla que algunos de los compuestos y composiciones cosméticas de la presente invención afectarán estos procedimientos biológicos de forma menos potente que malassezina. Tales compuestos y composiciones pueden tener perfiles de toxicidad más favorables en comparación con especies más potentes.

Ejemplo 4**Eficacia in vivo**

25 Se espera que los compuestos y composiciones cosméticas de la presente invención sean al menos tan eficaces como malassezina para iluminar la piel y mejorar la hiperpigmentación causada por trastornos de hiperpigmentación. Se espera además que los compuestos y composiciones cosméticas de la presente invención presenten perfiles farmacocinéticos favorables en términos de, por ejemplo, vida media y absorción. Ciertos compuestos exhibirán una vida media más larga, mientras que otros exhibirán una vida media más corta. De manera similar, ciertos compuestos exhibirán diferentes perfiles de absorción, con algunos compuestos que tardan más en absorberse completamente y otros que tardan menos

35 tiempo en absorberse completamente.

Ejemplo 5**Síntesis de malassezina y derivados de malassezina**

40 Se sintetizaron malassezina ("CV-8684") y su derivado ciclado indolo[3,2-b] carbazol ("CV-8685") de acuerdo con el esquema que se muestra en la Figura 2A.

Síntesis de (2-yodo-fenil)carbamato de terc-butilo, compuesto 1

45 A una solución de 2-yodo-anilina (25,0 g, 0,114 mol) en tetrahidrofurano (250 mL) a 0 °C se le agregó LiHMDS (251,0 mL, 1 M en THF, 0,251 mol) lentamente manteniendo la temperatura interna por debajo de 5 °C durante 40 min. Después de 30 min de agitación a 0°C, se añadió lentamente una solución de anhídrido BOC (27,0 g, 0,125 mol) en THF (50 ml) mientras se mantenía la temperatura interna por debajo de 5 °C durante 40 min. La mezcla de reacción se calentó a temperatura ambiente y se agitó durante 1 hora. Se añadió NH₄Cl saturado (250 ml) para detener la reacción. La capa orgánica se separó y se lavó con agua (150 ml). La capa acuosa combinada se extrajo con acetato de etilo (2 x 150 ml) y las capas se separaron. La capa de acetato de etilo se combinó con la capa orgánica original y se concentró al vacío para dar como un aceite marrón. El compuesto bruto se purificó mediante cromatografía en columna (0-5 % de acetato de etilo/hexanos). El compuesto 1 se obtuvo como un líquido amarillo claro (29,0 g, 80 %).

55

Síntesis del compuesto 2

60 Se añadió yoduro de cobre (0,95 g, 10% mol) y PdCl₂(PPh₃)₄ (1,75 g, 5% mol) a una solución desgasificada del compuesto 1 (16,0 g, 0,05 mol), propargil metil éter (4,25 g, 0,06 mol) en trietilamina (200 ml) a temperatura ambiente. Después de agitar a temperatura ambiente durante 2 horas, la reacción se completó (monitoreada por TLC usando 10 % de acetato de etilo/hexanos). La mezcla de reacción se diluyó con acetato de etilo (300 ml), la mezcla de reacción se lavó con agua, NaCl saturado y se secó sobre Na₂SO₄. El disolvente se filtró y se concentró al vacío para dar como un aceite marrón. El compuesto bruto se purificó mediante cromatografía en columna (10 % de acetato de etilo/hexano). El

65 compuesto 2 se obtuvo como un líquido amarillo claro (13,0 g, 99 %).

Síntesis del compuesto 3

- 5 A un matraz secado al horno se añadió PtCl₂ (0,26 g, 0,001 mol), Na₂CO₃ (1,6 g, 0,015 mol), indol (2,32 g, 0,02 mol) y compuesto **2** (2,6 g, 0,01 mol) en dioxano (120 ml). El matraz se desgasificó con nitrógeno, se selló y se calentó a 100 °C durante la noche. Luego se completó la reacción (monitoreada por TLC utilizando 10 % de acetato de etilo/hexanos). El disolvente se evaporó a presión reducida. La mezcla de reacción se diluyó con acetato de etilo (200 ml), la mezcla de reacción se lavó con agua, NaCl saturado y se secó sobre Na₂SO₄. El disolvente se filtró y se concentró al vacío para dar como un aceite marrón.
- 10 Se repitió esta reacción utilizando el compuesto **2** (2,6 g, 0,01 mol) en un lote diferente. Ambos lotes de compuestos brutos se combinaron y purificaron mediante cromatografía en columna (10 % de acetato de etilo/hexano). El compuesto **3** se obtuvo como un sólido de color marrón claro (3,8 g, 55 %).

Síntesis del compuesto 4

- 15 Se añadió carbonato de potasio (4,6 g, 0,0329 mol) a una solución del compuesto **3** (3,8 g, 0,0109 mol) en una mezcla de metanol (150 ml) y agua (50 ml) a temperatura ambiente. La suspensión resultante se calentó a reflujo durante la noche. Luego se completó la reacción (monitoreada por TLC utilizando 20 % de acetato de etilo/hexanos). La mezcla de reacción se enfrió a temperatura ambiente y el solvente se concentró al vacío. El residuo se recogió en acetato de etilo (200 ml) y se lavó con agua y salmuera, luego se secó (sulfato de sodio), se filtró y el solvente se concentró al vacío para dar un sólido marrón. Compuesto bruto purificado mediante cromatografía en columna (20% acetato de etilo/hexano). El compuesto **4** se obtuvo como un sólido de color naranja (2,2 g, 81 %).
- 20

Síntesis del compuesto Malassezina (CV-8684)

- 25 Se añadió dimetilformamida (20 ml) a un matraz seco de fondo redondo de dos bocas de 100 ml en argón a 0 °C. Se añadió POCl₃ (0,75 g, 0,0048 mol) lentamente mientras se mantenía la temperatura interna por debajo de 5 °C durante 10 min. Después de 30 minutos de agitación a 0 °C, se añadió lentamente una solución del compuesto **4** (1,0 g, 0,004 mol) en dimetilformamida (5 ml) mientras se mantenía la temperatura interna por debajo de 5 °C durante 10 min. La mezcla resultante se agitó a temperatura ambiente durante la noche. Luego se completó la reacción (monitoreada por TLC utilizando 20 % de acetato de etilo/hexanos). La mezcla de reacción se vertió en bicarbonato de sodio acuoso saturado (150 ml) y se agitó durante 1 hora. La mezcla resultante se extrajo con acetato de etilo (2 x 100 ml). Las capas orgánicas se combinaron y lavaron con agua, NaCl saturado y se secaron sobre Na₂SO₄. El solvente se filtró y se concentró al vacío para dar un sólido marrón. El compuesto bruto se purificó mediante cromatografía en columna (0-20 % de acetato de etilo/hexanos). Se obtuvo el compuesto **Malassezina (CV-8684)** como un sólido rosa claro (0,82 g, 74 %).
- 30
- 35

Pureza por HPLC: 97,8 % (% de área). Espectro de ¹H-RMN, ¹³C consistente con la estructura. ESI-EM: Calculado para: C₁₈H₁₅N₂O (M + H)⁺: 275, encontrado: 275,2

- 40 *Síntesis del compuesto indolo[3,2-b]carbazol (CV-8685).* Se añadió HCl concentrado (0,25 ml) a una solución de **malassezina** (0,75 g) en tetrahidrofurano (120 ml) a temperatura ambiente. La mezcla resultante se calentó a reflujo durante la noche. Luego se completó la reacción (monitoreada por TLC utilizando 40 % de acetato de etilo/hexanos). La mezcla de reacción se enfrió a temperatura ambiente y se agitó durante 1 hora. Se filtró el sólido, se lavó con tetrahidrofurano (20 ml) y se secó para dar **indolo[3,2-b]carbazol (CV-8685)** sólido amarillo claro (0,55 g, 78%).
- 45

Pureza por HPLC: 96,22 % (% de área). Espectro de ¹H-RMN, ¹³C consistente con la estructura. ESI-EM: Calculado para: C₁₈H₁₃N₂ (M + H)⁺: 257, encontrado: 257,5.

- 50 Se sintetizaron el compuesto I ("CV-8686") y el compuesto IV ("CV-8687") de acuerdo con el esquema que se muestra en la Figura 2B.

Síntesis del compuesto 5

- 55 A un matraz secado al horno se añadió PtCl₂ (1,0 g, 0,0038 mol), Na₂CO₃ (6,1 g, 0,057 mol), 6-metil indol (10,0 g, 0,076 mol) y el compuesto **2** (10,0 g, 0,038 mol) en dioxano (250 ml). El matraz se desgasificó con nitrógeno, se selló y se calentó a 100 °C durante la noche. Luego se completó la reacción (monitoreada por TLC utilizando 10 % de acetato de etilo/hexanos). El disolvente se evaporó a presión reducida. La mezcla de reacción se diluyó con acetato de etilo (400 ml), la mezcla de reacción se lavó con agua, NaCl saturado y se secó sobre Na₂SO₄. El disolvente se filtró y se concentró al vacío para dar como un aceite marrón. Compuesto bruto purificado mediante cromatografía en columna (10 % de acetato de etilo/hexano). El compuesto **5** se obtuvo como un sólido de color marrón claro (6,5 g, 47%).
- 60

Síntesis del compuesto 6

- 65 Se agregó carbonato de potasio (7,4 g, 0,054 mol) a una solución de mezcla del compuesto **5** (6,5 g, 0,018 mol) en

metanol (150 mL) y agua (50 mL) a temperatura ambiente. La suspensión resultante se calentó a reflujo durante la noche. Luego se completó la reacción (monitoreada por TLC utilizando 20 % de acetato de etilo/hexanos). La mezcla de reacción se enfrió a temperatura ambiente y el solvente se concentró al vacío. El residuo se recogió en acetato de etilo (200 ml) y se lavó con agua y salmuera, luego se secó (sulfato de sodio), se filtró y el solvente se concentró al vacío para dar un sólido marrón. Compuesto bruto purificado mediante cromatografía en columna (20 % de acetato de etilo/hexano). El compuesto **6** se obtuvo como un sólido de color naranja (3,3 g, 72 %).

Síntesis del compuesto compuesto I (CV-8686)

Se añadió dimetilformamida (20 ml) a un matraz seco de fondo redondo de dos bocas de 100 ml en argón a 0 °C. Se añadió lentamente POCl₃ (0,6 g, 0,0038 mol) mientras se mantiene la temperatura interna por debajo de 5 °C durante 10 min. Después de 30 minutos de agitación a 0 °C, añadió lentamente una solución del compuesto **6** (1,0 g, 0,0038 mol) en dimetilformamida (5 ml) mientras se mantenía la temperatura interna por debajo de 5 °C durante 10 min. La mezcla resultante se agitó a temperatura ambiente durante la noche. Luego se completó la reacción (monitoreada por TLC utilizando 20 % de acetato de etilo/hexanos). La mezcla de reacción se vertió en bicarbonato de sodio acuoso saturado (150 ml) y se agitó durante 1 hora. La mezcla resultante se extrajo con acetato de etilo (2 x 100 ml). Las capas orgánicas se combinaron y lavaron con agua, NaCl saturado y se secaron sobre Na₂SO₄. El solvente se filtró y se concentró al vacío para dar un sólido marrón. El compuesto bruto se purificó mediante cromatografía en columna (0-20 % de acetato de etilo/hexanos). Se obtuvo el **compuesto I (CV-8686)** como un sólido rosa claro (0,84 g, 75 %).

Pureza por HPLC: 97,01 % (% de área). Espectro de ¹H-RMN, ¹³C consistente con la estructura. ESI-EM: Calculado para: C₁₉H₁₇N₂O (M + H)⁺: 289, encontrado: 289,1 *Síntesis del compuesto compuesto IV (CV-8687)*

Se agregó HCl concentrado (0,3 mL) a una solución del **compuesto I** (1,0 g) en tetrahidrofurano (125 mL) a temperatura ambiente. La mezcla resultante se calentó a reflujo durante la noche. Luego se completó la reacción (monitoreada por TLC utilizando 40 % de acetato de etilo/hexanos). La mezcla de reacción se enfrió a temperatura ambiente y se agitó durante 1 hora. Se filtró el sólido, se lavó con tetrahidrofurano (20 ml) y se secó para dar el **compuesto IV (CV-8687)** sólido amarillo claro (0,84 g, 89 %).

Pureza por HPLC: 98,4 % (% de área). Espectro de ¹H-RMN, ¹³C consistente con la estructura. ESI-EM: Calculado para: C₁₉H₁₅N₂ (M + H)⁺: 271, encontrado: 271,3.

Se sintetizó el compuesto II ("CV-8688") de acuerdo con el esquema que se muestra en la Figura 2C.

Síntesis del compuesto 7

Se añadió yoduro de cobre (0,53 g, 10 % mol) y PdCl₂(PPh₃)₄ (1,0 g, 5 % mol) a una solución desgasificada del compuesto **1** (9,0 g, 0,03 mol), 3-metoxi-1-butino (2,8 g, 0,035 mol) en trietilamina (150 ml) a temperatura ambiente. Después de agitar a temperatura ambiente durante 2 horas. La reacción se completó (se controló por TLC usando 10 % de acetato de etilo/hexanos). La mezcla de reacción se diluyó con acetato de etilo (300 ml), la mezcla de reacción se lavó con agua, NaCl saturado y se secó sobre Na₂SO₄. El disolvente se filtró y se concentró al vacío para dar como un aceite marrón. El compuesto bruto se purificó mediante cromatografía en columna (10 % de acetato de etilo/hexano). El compuesto **7** se obtuvo como un líquido amarillo claro (7,0 g, 90 %).

Síntesis del compuesto 8

A un matraz secado al horno se añadió PtCl₂ (0,68 g, 0,0025 mol), Na₂CO₃ (4,0 g, 0,038 mol), indol (6,0 g, 0,05 mol) y compuesto **7** (10,0 g, 0,025 mol) en dioxano (250 ml). El matraz se desgasificó con nitrógeno, se selló y se calentó a 100 °C durante la noche. Luego se completó la reacción (monitoreada por TLC utilizando 10 % de acetato de etilo/hexanos). El disolvente se evaporó a presión reducida. La mezcla de reacción se diluyó con acetato de etilo (400 ml), la mezcla de reacción se lavó con agua, NaCl saturado y se secó sobre Na₂SO₄. El disolvente se filtró y se concentró al vacío para dar como un aceite marrón. Compuesto bruto purificado mediante cromatografía en columna (10 % de acetato de etilo/hexano). El compuesto **8** se obtuvo como un sólido de color marrón claro (3,5 g, 77%).

Síntesis del compuesto 9

Se agregó carbonato de potasio (3,8 g, 0,027 mol) a una solución de mezcla del compuesto **8** (3,3 g, 0,0091 mol) en metanol (75 mL) y agua (25 mL) a temperatura ambiente. La suspensión resultante se calentó a reflujo durante la noche. Luego se completó la reacción (monitoreada por TLC utilizando 20 % de acetato de etilo/hexanos). La mezcla de reacción se enfrió a temperatura ambiente y el solvente se concentró al vacío. El residuo se recogió en acetato de etilo (200 ml) y se lavó con agua y salmuera, luego se secó (sulfato de sodio), se filtró y el solvente se concentró al vacío para dar un sólido marrón. Compuesto bruto purificado mediante cromatografía en columna (20 % de acetato de etilo/hexano). El compuesto **9** se obtuvo como un sólido de color naranja (2,1 g, 88 %).

Síntesis del compuesto compuesto II (CV-8688)

Se añadió dimetilformamida (20 ml) a un matraz seco de fondo redondo de dos bocas de 100 ml en argón a 0 °C. Se añadió POCl₃ (0,76 g, 0,005 mol) lentamente mientras se mantenía la temperatura interna por debajo de 5 °C durante 10 min. Después de 30 minutos de agitación a 0 °C, se añadió lentamente una solución del compuesto **9** (1,3 g, 0,005 mol) en dimetilformamida (5 ml) mientras se mantenía la temperatura interna por debajo de 5 °C durante 10 min. La mezcla resultante se agitó a temperatura ambiente durante la noche. Luego se completó la reacción (monitoreada por TLC utilizando 20 % de acetato de etilo/hexanos). La mezcla de reacción se vertió en bicarbonato de sodio acuoso saturado (150 ml) y se agitó durante 1 hora. La mezcla resultante se extrajo con acetato de etilo (2 x 100 ml). Las capas orgánicas se combinaron y lavaron con agua, NaCl saturado y se secaron sobre Na₂SO₄. El solvente se filtró y se concentró al vacío para dar un sólido marrón. El compuesto crudo cristalizó en cloroformo (25 ml). Se obtuvo el **compuesto II (CV-8688)** como un sólido rosa claro (0,81 g, 53 %).

Pureza por HPLC: 98,94 % (% de área). Espectro de ¹H-RMN, ¹³C consistente con la estructura. ESI-EM: Calculado para: C₁₉H₁₇N₂O (M + H)⁺: 289, encontrado: 289,0.

Ejemplo 6

Morfología celular

La morfología celular típica después de varios tratamientos se muestra en las figuras 5A-5K, 6A-6K, 7A-7K, 8A-8K, 9A-9K, 10A-10K, 11A-11K y 12A-12K. La morfología de ambas líneas celulares se vio afectada significativamente por 100 μM de CV-8684 y CV-8688, así como por el tratamiento con estaurosporina a las 6 horas. CV-8685 pareció afectar solamente a WM115 a 100 μM.

Ejemplo 7

Actividad inductora de apoptosis de malassezina y derivados de malassezina – Ensayos de anexina V preliminares

Materiales y reactivos

El kit de ensayo de anexina V-FITC se adquirió de Beyotime Biotechnology, el medio RPMI 1640 y el medio Eagle modificado de Dulbecco ("DMEM") se adquirieron de Gibco, el suero fetal bovino ("FBS") se adquirió de Invitrogen, solución antibiótica antimicótica estabilizada (100x) se compró a Sigma, y 0,25 % de tripsina-EDTA (1X), rojo de fenol se compró a Invitrogen.

Cultivo celular

Las células MeWo (ATCC® HTB-65™) y WM115 (ATCC® CRL-1675) se adquirieron de ATCC (Manassas, VA) y se mantuvieron del siguiente modo: para MeWo: DMEM suplementado con 10 % de FBS; para WM115: RPMI 1640 suplementado con 10 % de FBS (10 % de FBS, 1 % de solución antibiótica antimicótica estabilizada).

Resumen del estudio

En las etapas intermedias de apoptosis, se traslocó la fosfatidilserina ("PS") de la valva interior a la exterior de la membrana celular, lo que expone PS al ambiente extracelular, donde se puede detectar. Los conjugados de anexina V altamente fluorescentes proporcionan métodos de detección rápidos y fiables para estudiar la externalización de PS.

Durante el primer conjunto de estudios, tanto las células MeWo como las WM115 se trataron con compuestos de prueba a 10 dosis a partir de 100 μM con una dilución de 3 veces. Se utilizó estaurosporina como control positivo. Después del tratamiento de 6 horas, se evaluó la apoptosis celular usando un ensayo de anexina V. Los compuestos de prueba evaluados fueron CV-8684, CV-8685, CV-8686, CV-8687, y CV-8688.

Procedimientos de ensayo

Para la siembra de células, se cosecharon las células y se determinó la cantidad de células utilizando el contador de células Countess®. A continuación, las células se diluyeron con medio de cultivo hasta la densidad deseada. Se añadieron 40 μl de suspensión celular por pozo al número requerido de pozos en una placa de 384 pozos (Corning 3712 - placa de fondo transparente). La densidad celular final fue de 6,000 células/pozo. Después de la siembra en placa, las placas se incubaron a 37 °C y 5 % de CO₂ durante la noche.

Para la preparación de la placa fuente de compuestos, se disolvió cada compuesto de prueba en DMSO hasta una solución madre 10 mM. Se realizó una dilución en serie de 3 veces utilizando un manipulador de líquidos EVO200™ (TECAN) para generar diez concentraciones de compuesto de prueba. Se empleó DMSO al 0,1 % como control (negativo) de vehículo. La placa fuente de compuesto se centrifugó luego a temperatura ambiente a 1,000 RPM durante 1 minuto y

se agitó usando un agitador de placas durante 2 minutos.

Para el tratamiento del compuesto, se transfirieron 40 nL de compuesto de la placa fuente de compuestos a la placa de cultivo de 384 pocillos utilizando un manipulador de líquidos Echo550 (LabCyte Inc.). Después de 6 horas de incubación, las placas se retiraron de la incubadora para su detección.

Para el ensayo de anexina V preliminar, se retiraron las placas de la incubadora y se dejaron equilibrar a temperatura ambiente durante 15 minutos. Luego se eliminó el medio de cultivo. Se añadieron a cada pozo 20 µL de anexina V-FITC premezclada y solución de trabajo de tinte Hoechst33342. A continuación, las células se incubaron a temperatura ambiente durante 20 minutos. Las placas se sellaron y centrifugaron durante 1 minuto a 1,000 RPM para eliminar las burbujas. Posteriormente, la placa se leyó utilizando un lector de placas Acumen eX3. La actividad relativa se calculó de acuerdo con la siguiente fórmula: $\text{Actividad (\%)} = 100 \% \times (\text{Conteo}_{\text{anexina V}} / \text{Conteo}_{\text{célula total}})$, y se calculó la EC₅₀ usando GraphPad Prism (v. 5.01).

Resultados

En el análisis preliminar planteado arriba, CV-8688 aumentó notoriamente la tinción de anexina V de las células MeWo, con un EC₅₀ de 908,57 nM. La estaurosporina, el control positivo, aumentó considerablemente la tinción de Anexina V en ambas líneas celulares. (Figuras 3A-3M).

Ejemplo 8

Actividad inductora de apoptosis de malassezina y derivados de malassezina: evaluación adicional mediante ensayos de Anexina V

Resumen del estudio

Para investigar adicionalmente el impacto de los compuestos de prueba sobre la apoptosis, se realizaron múltiples lecturas, que cubren diferentes etapas de la apoptosis, en las células MeWo y WM115. Ambos tipos de células se trataron con compuestos de prueba a 3 dosis (100 µM, 10 µM y 1 µM). Se utilizó estaurosporina como control positivo. Después del período de tratamiento deseado (6, 24, 48 o 72 horas), se evaluó la apoptosis midiendo los porcentajes de células que demostraban la unión de la anexina V después de la exposición a los compuestos de prueba. Los compuestos de prueba evaluados fueron CV-8684, CV-8685 y CV-8688.

Procedimientos de ensayo

La siembra de células se realizó como se planteó arriba con las siguientes excepciones: la densidad celular final fue de 4,000 células/pocillo para las detecciones de 6 horas y 24 horas, mientras que se utilizaron 2,000 células/pocillo para las detecciones de 48 horas y 72 horas. Para cada punto de tiempo, se prepararon placas de fondo transparente de 384 pozos (Corning 3712) y placas de fondo blancas sólidas (Corning 3570). Las placas se incubaron como se discutió anteriormente.

Para la preparación de la placa fuente de compuestos, se disolvió cada compuesto de prueba en DMSO hasta una solución madre 10 mM. Dos concentraciones adicionales fueron generaciones por dilución de 10 veces a 1 mM y 0,1 mM. Se usó estaurosporina como control positivo y 1 % de DMSO como control de vehículo (negativo). La placa de origen del compuesto se centrifugó a temperatura ambiente a 1,000 rpm durante 1 minuto y se agitó usando un agitador de placas durante 2 minutos.

Se transfirieron 400 nL de compuesto de prueba de la placa fuente de compuestos a las placas de cultivo de 384 pocillos utilizando el manipulador de líquidos Echo550. Después de 6, 24, 48 y 72 horas, las placas se retiraron de la incubadora para las detecciones.

Para el ensayo de anexina V, se retiraron las placas de la incubadora y se equilibraron a temperatura ambiente durante 15 minutos. Se eliminó el medio de cultivo y las células se lavaron dos veces con PBS. Se añadieron 20 µL de solución de trabajo de anexina V-FITC premezclada a cada pozo. Las células se incubaron a temperatura ambiente durante 20 minutos. Las placas se leyeron usando Acumen eX3 para contar el número de células positivas a FITC. La actividad relativa se calculó de acuerdo con la siguiente fórmula: $\text{Actividad relativa (\%)} = 100 \% \times (\text{Conteo}_{\text{muestra}} / \text{conteo}_{\text{vehículo}})$.

Resultados

CV-8684 indujo la apoptosis en la mayor concentración evaluada después de 6 horas de tratamiento en las células MeWo y WM115. CV-8685 mostró el efecto de inducción dentro de 24 horas de tratamiento en WM115, mientras que 48 horas de tratamiento parecieron provocar apoptosis en ambos tipos de células. Finalmente, CV-8688 mostró el efecto de inducción dentro de las 6 horas posteriores al tratamiento de una manera dependiente de la dosis en ambos tipos de

células. (Figuras 4A-4L).

Ejemplo 9

5 **Viabilidad celular después de la exposición a Malassezina y derivados de Malassezina – Ensayos CellTiter-Glo®**

Procedimientos de ensayo

10 El ensayo CellTiter-Glo® 2,0 se adquirió de Promega. La siembra celular, la preparación de la placa fuente del compuesto y la exposición de las células a los compuestos de prueba se realizaron como se describe en el Ejemplo 8.

15 Para el ensayo CellTiter-Glo®, se retiraron las placas de la incubadora y se equilibraron a temperatura ambiente durante 15 minutos. Los reactivos CellTiter-Glo® se descongelaron y equilibraron a temperatura ambiente antes del experimento. A continuación, se añadieron 40 µl de reactivo CellTiter-Glo® a cada pozo para la detección (en una proporción de 1:1 con respecto al medio de cultivo). A continuación, las placas se incubaron a temperatura ambiente durante 30 minutos y se leyeron usando un lector de placas EnSpire (PerkinElmer). La actividad restante se calculó de acuerdo con la siguiente fórmula:

$$20 \text{ Actividad restante (\%)} = 100\% \times (\text{Lum}_{\text{muestra}} - \text{Lum}_{\text{bkg}}) / (\text{Lum}_{\text{vehículo}} - \text{Lum}_{\text{bkg}}).$$

Resultados

25 CV-8684 mostró inhibición de la viabilidad celular dependiente de la dosis en ambas líneas celulares probadas, aunque el efecto inhibidor pareció ser más potente en las células MeWo. CV-8685 mostró el efecto inhibidor sobre la viabilidad de las células WM115 de una manera dependiente de la dosis solo después de un tratamiento de 24 horas. CV-8688 inhibió la viabilidad de ambos tipos de células de una manera dependiente de la dosis. La estaurosporina, el control positivo, ejerció una inhibición del 100 % de la viabilidad celular en ambas líneas celulares después de un tratamiento de 24 horas. (Figuras 13A-13K).

Ejemplo 10

Citotoxicidad de malassezina y derivados de malassezina: Ensayos de liberación de lactato deshidrogenasa

35 *Resumen del estudio*

El ensayo LDH mide cuantitativamente la liberación de lactato deshidrogenasa ("LDH") a los medios desde las células dañadas como un biomarcador para la citotoxicidad y la citólisis.

40 *Procedimientos de ensayo*

Se adquirió el ensayo de integridad de membrana homogénea CytoTox-ONE™ de Promega. La siembra celular, la preparación de la placa fuente del compuesto y la exposición de las células a los compuestos de prueba se realizaron como se describe en el Ejemplo 8.

50 Para el ensayo de liberación de LDH, las placas se retiraron de la incubadora y se equilibraron a temperatura ambiente durante 15 minutos. A continuación, las placas se centrifugaron a 1,000 rpm durante 1 minuto. Se transfirieron 20 µl de medio de cultivo celular a una nueva placa sólida negra de 384 pozos. Luego, se agregaron 20 µl de CytoTOX-ONE™ en cada pozo y se incubaron a temperatura ambiente durante 10 minutos. Posteriormente, se añadieron 10 µl de solución de parada a cada pozo y las placas se agitaron a 500 rpm durante 1 minuto. Las placas se leyeron usando una longitud de onda de excitación de 560 nm y una longitud de onda de emisión de 590 nm en EnSpire. La actividad relativa se calculó de acuerdo con la siguiente fórmula:

$$55 \text{ Actividad relativa (\%)} = 100\% \times (\text{Lum}_{\text{muestra}} - \text{Lum}_{\text{bkg}}) / (\text{Lum}_{\text{vehículo}} - \text{Lum}_{\text{bkg}}).$$

Resultados

60 CV-8684 no indujo una liberación significativa en ninguna de las líneas celulares después de 72 horas de incubación. CV-8685 mostró un efecto de inducción dependiente de la dosis sobre la liberación de LDH de las células WM115, pero no MeWo, después de un tratamiento de 24 horas. CV-8688 indujo la liberación de LDH a la concentración más alta probada. (Figuras 14A-14L).

65

Ejemplo 11**Potencial de activación del receptor de hidrocarburos de arilo de malassezina y derivados de malassezina**5 *Procedimientos de ensayo*

Las células HepG2-AhR-Luc se adquirieron de Pharmaron, el sistema de ensayo de luciferasa One-Glo se adquirió de Promega, el DMEM se adquirió de Hyclone y la penicilina/estreptomicina se adquirió de Solabio.

10 Se prepararon los medios de cultivo para las células HepG2 transfectadas de forma estable complementando DMEM con alta glucosa y L-glutamina, así como FBS al 10 %.

15 Se cultivaron las células HepG2-AhR-Luc en matraces T-75 a 37 °C, CO₂ al 5 % y una humedad relativa del 95 %. Se permitió que las células alcanzaran un 80-90 % de confluencia antes de la separación y división.

Se enjuagaron las células cultivadas con 5 mL de PBS. Se aspiró el PBS, se añadieron 1,5 ml de tripsina al matraz y las células se incubaron a 37 °C durante aproximadamente 5 minutos o hasta que las células se desprendieron y flotaron. La tripsina se inactivó añadiendo un exceso de medio que contenía suero.

20 Se transfirió la suspensión celular a un tubo cónico y se centrifugó a 120 g durante 10 minutos para sedimentar las células. Las células se resuspendieron en un medio de siembra a una densidad adecuada. Se transfirieron 40 µL de células a una placa de cultivo de 384 pozos (5 x 10³ células/pozo). Las placas se colocaron en la incubadora a 37 °C durante 24 horas.

25 A continuación, se prepararon soluciones madre de compuestos de prueba y control positivo de omeprazol. Se transfirieron 40 nL de soluciones de compuesto a la placa de ensayo utilizando Echo550. A continuación, la placa se volvió a colocar en la incubadora para el tratamiento del compuesto.

30 Posteriormente, después de 24 horas de tratamiento, se sacó la placa de la incubadora y se dejó enfriar a temperatura ambiente. En cada pozo se añadieron 30 µL de reactivo One-Glo igual al del medio de cultivo. Se permitió que las células se lisaran durante al menos 3 minutos y luego se midieron en un luminómetro.

Se graficaron las respuestas a la dosis utilizando el análisis de regresión no lineal en XLfit, y también se calcularon los valores de EC₅₀.

35 *Resultados*

Los resultados del ensayo de AhR-Luciferasa se muestran en las Figuras 15A-15F.

40 **Ejemplo 12****Ensayos MelanoDerm™**45 *Resumen del estudio*

El propósito de este estudio es evaluar la posible irritación dérmica del artículo de prueba para el modelo de piel MelanoDerm™ después de exposiciones repetidas para la selección de dosis para un estudio posterior. La toxicidad se determinará midiendo la conversión relativa de MTT (bromuro de 3-[4,5-dimetiltiazol-2-il] -2,5-difeniltetrazolio) en los tejidos tratados con el artículo de prueba en comparación con los tejidos tratados con el control negativo/solvente.

50 El modelo de piel MelanoDerm™ proporcionado por MatTek Corporation (Ashland, MA) se utilizará en este estudio. El tejido MelanoDerm™ consiste en queratinocitos epidérmicos normales derivados de seres humanos (NHEK) y melanocitos (NHM) que han sido cultivados para formar un modelo multicapa altamente diferenciado de la epidermis humana. Los NHM dentro de los cocultivos experimentan una melanogénesis espontánea que conduce a tejidos de diferentes niveles de pigmentación. Los cultivos se cultivan en insertos de cultivo celular en la interfaz aire-líquido, lo que permite la aplicación tópica de moduladores cutáneos. El modelo MelanoDerm™ exhibe características morfológicas y ultraestructurales similares a in vivo. Los NHM localizados en la capa de células basales de los tejidos MelanoDerm™ son dendríticos y producen espontáneamente gránulos de melanina que pueblan progresivamente las capas del tejido. Por tanto, el sistema de prueba se puede utilizar para seleccionar materiales que puedan inhibir o estimular la producción de melanina en relación con los controles negativos.

60 El diseño experimental de este estudio consiste en la determinación del pH del artículo de prueba puro en caso de ser posible (y/o la solución dosificadora según corresponda) y un ensayo definitivo para determinar la viabilidad del tejido relativa después de exposiciones repetidas. El modelo de piel MelanoDerm™ estará expuesto al artículo de prueba durante un total de 7 días. El artículo de prueba se aplicará tópicamente al modelo de piel MelanoDerm™ cada 48 horas

(dentro de un plazo de 48 ± 2 horas desde el tratamiento anterior). La toxicidad del artículo de prueba será determinada por la reducción de MTT con enzima microsomal dependiente de NAD(P)H (y, en menor grado, por la reducción de succinato deshidrogenasa de MTT) en tejidos de control y tratados con artículo de prueba. (Berridge *et al.*, 1996). Los datos se presentarán en forma de supervivencia relativa (conversión de MTT en relación con el control negativo).

5 *Materiales*

El medio de mantenimiento MelanoDerm™ (EPI-100-LLMM) y el modelo de piel MelanoDerm™ (MEL-300-A) fueron suministrados por MatTek Corporation. Sigma suministró 1 % de ácido kójico (preparado en agua desionizada estéril) y MTT (bromuro de 3-[4,5-dimetiltiazol-2-il]-2,5-difeniltetrazolio). El medio de Eagle modificado de Dulbecco (DMEM) que contenía 2 mM de L-glutamina (medio de adición MTT) fue suministrado por Quality Biological. Aldrich suministró isopropanol. La solución salina amortiguada con fosfato de Dulbecco libre de Ca^{++} y Mg^{++} estéril (CMF-DPBS) fue suministrada por Invitrogen o equivalente. El agua desionizada estéril fue suministrada por Quality Biological o equivalente. El DMSO fue suministrado por CiVenti Chem.

15 *Procedimientos de ensayo*

Los artículos de prueba generalmente se examinarán puros o según lo indique el Patrocinador (véase Anexo del protocolo 1). Se aplicarán diez microlitros (10 μL) o 25 μL de cada artículo de prueba directamente sobre el tejido para cubrir la superficie superior. Dependiendo de la naturaleza del artículo de prueba (líquidos, geles, cremas, espumas, etc.), puede ser necesario el uso de un dispositivo dosificador, malla u otra ayuda para permitir la distribución uniforme del artículo de prueba sobre la superficie del tejido.

En los días de la dosificación, cada artículo de prueba se diluirá por lo menos 200 veces utilizando el volumen adecuado de EPI-100-LLMM (o un disolvente alternativo, según se determine durante el ensayo de solubilidad). Se preparará una nueva dilución en EPI-100-LLMM para cada dosificación. La dilución final a realizar para la preparación de la solución de dosificación se determinará a partir de la evaluación de solubilidad anterior y se documentará en el libro de trabajo del estudio.

DMSO diluido como 0,5 % (v/v) en EPI-100-LLMM se utilizará como control vehículo y se dosificará a los tejidos (dosis de 10 μL y 25 μL) según el mismo procedimiento utilizado para los artículos de prueba y los controles del ensayo.

Los artículos de prueba se aplicarán tópicamente al tejido de MelanoDerm™ cada 48 horas (dentro de un marco de 48 ± 2 horas del tratamiento anterior) durante un ensayo de 7 días. Se aplicarán a cada tejido diez y 25 microlitros, respectivamente, de cada artículo de prueba. Se aplicarán a cada tejido veinticinco microlitros de los controles positivo y negativo, respectivamente.

Se determinará el pH del artículo de prueba líquido puro (y/o solución de dosificación según sea necesario), en caso de ser posible. El pH se determinará usando papel de pH (por ejemplo, con un intervalo de pH de 0 – 14 para estimar y/o un intervalo de pH de 5 – 10 para determinar un valor más preciso). Los incrementos de pH típicos en el papel de pH de intervalo más estrecho son aproximadamente de 0,3 a 0,5 unidades de pH. El incremento máximo en el papel de pH es de 1,0 unidades de pH.

El ensayo definitivo incluirá un control negativo y un control positivo. Los tejidos MelanoDerm™ designados para el control negativo del ensayo se tratarán con 25 μL de agua desionizada estéril. Se utilizarán veinticinco microlitros de 1 % de ácido kójico (preparado en agua desionizada estéril y filtrado en el momento de la preparación) para dosificar los tejidos designados. El 1 % de ácido kójico se almacenará en un tubo cubierto con papel de aluminio hasta que se use dentro de las 2 horas posteriores a la preparación. Los tiempos de exposición de los controles negativo y positivo serán idénticos a los utilizados para los artículos de prueba.

Es necesario evaluar la capacidad de cada artículo de prueba de reducir directamente el MTT. Se preparará una solución de MTT de 1,0 mg/ml en medio de adición de MTT como se describe a continuación. Se agregarán aproximadamente 25 μL del artículo de prueba a 1 mL de la solución de MTT y la mezcla se incubará en la oscuridad a $37^\circ\text{C} \pm 1^\circ\text{C}$ durante una a tres horas. Un control negativo, 25 μL de agua desionizada estéril, se analizará al mismo tiempo. Si el color de la solución MTT se vuelve azul/violeta, se presume que el artículo de prueba ha reducido el MTT. Los materiales de prueba insolubles en agua pueden mostrar reducción directa (oscurecimiento) solo en la interfaz entre el artículo de prueba y el medio.

La prueba de reducción directa de MTT para los artículos de prueba se puede haber realizado anteriormente en un estudio independiente. En tales casos, los resultados de la prueba de reducción directa MTT se pueden utilizar para este estudio específico y se hará referencia al estudio inicial.

Exposición del tejido: Al menos 16 horas después de iniciar los cultivos, se fotografiarán dos tejidos MelanoDerm™ (considerados no tratados en el día 0) con una cámara digital para ayudar en la evaluación visual del grado de pigmentación de los tejidos en el tiempo cero del ensayo. Los procedimientos exactos utilizados para recopilar imágenes de los tejidos se especificarán en el libro de trabajo del estudio y en el informe. Los tejidos MelanoDerm™ se enjuagarán

con CMF- DPBS, se secarán en papel absorbente estéril y se eliminarán el exceso de líquido. Los tejidos MelanoDerm™ se transferirán a los pozos que contienen MTT apropiados después del enjuague y se procesarán en el ensayo MTT como se describe en la sección Ensayo MTT.

Al menos 16 horas después de iniciar los cultivos, se moverán los tejidos a una placa de 6 pocillos nueva que contenga 0,9 mL de EPI-100-LLMM precalentado nuevo. La prueba se llevará a cabo durante un período de 7 días. Se tratarán dos tejidos por vía tópica el primer día y cada 48 horas (en un plazo de 48 +/- 2 horas desde el tratamiento anterior) con 10 y 25 microlitros, respectivamente, de cada artículo de prueba. El medio se actualizará diariamente (dentro de un plazo de 24 +/- 2 horas desde la realimentación anterior); los tejidos se trasladarán a una nueva placa de 6 pozos que contiene 0,9 mL de EPI-100-LLMM fresco y precalentado.

Se tratarán dos tejidos por vía tópica el primer día y cada 48 horas (en un plazo de 48 +/- 2 horas desde el tratamiento anterior) con 25 µL de controles positivos y negativos, respectivamente. El medio se actualizará diariamente (dentro de un plazo de 24 +/- 2 horas desde la realimentación anterior); los tejidos se trasladarán a una nueva placa de 6 pozos que contiene 0,9 mL de EPI-100-LLMM fresco y precalentado. Los tejidos se incubarán a 37±1°C en atmósfera humidificada de 5±1% CO₂ en aire (condiciones estándar de cultivo) para los tiempos de exposición adecuados.

En los días de dosificación, el tejido de MelanoDerm™ se enjuagará suavemente primero tres veces utilizando ~ 500 µL de CMF-DPBS para retirar cualquier artículo de prueba residual. Luego, los tejidos se trasladarán a una nueva placa de 6 pozos que contiene 0,9 mL de EPI-100-LLMM fresco precalentado y se dosificará con el artículo de prueba apropiado, control negativo o positivo. Los tejidos se incubarán a 37±1°C en atmósfera humidificada de 5±1% CO₂ en aire (condiciones estándar de cultivo) para los tiempos de exposición adecuados. El procedimiento de enjuague exacto se documentará en el libro de trabajo del estudio.

Al final de la prueba de 7 días, los tejidos MelanoDerm™ dosificados con el control negativo o positivo, y con cada artículo de prueba, se fotografiarán con una cámara digital para ayudar en la evaluación visual del grado de pigmentación de los tejidos en el final del ensayo (Día 7). Los procedimientos exactos utilizados para recopilar imágenes de los tejidos se especificarán en el libro de trabajo del estudio y en el informe. Luego, la viabilidad de los tejidos se determinará mediante la reducción de MTT como se indica a continuación.

Ensayo MTT: Una solución madre 10X de MTT preparado en PBS (filtrado en el momento de la preparación del lote) se descongelará y se diluirá en medio de adición de MTT tibio para producir la solución de 1,0 mg/ml no más de dos horas antes de su uso. Se agregarán trescientos µL de la solución de MTT a cada pozo designado de una placa de 24 pozos previamente etiquetada.

Después del tiempo de exposición, cada tejido de MelanoDerm™ designado para el ensayo de MTT se enjuagará con CMF-DPBS, se secará en papel absorbente estéril y se eliminará el exceso de líquido. Los tejidos MelanoDerm™ se transferirán a los pozos que contienen MTT apropiados después del enjuague. Las placas de 24 pozos se incubarán en condiciones estándar durante 3 ± 0,1 horas.

Después de 3 ± 0,1 horas, los tejidos MelanoDerm™ se secarán en papel absorbente estéril, se eliminará el exceso de líquido y se transferirán a una placa de 24 pocillos preetiquetada que contenga 2,0 mL de isopropanol en cada pocillo designado. Las placas se cubrirán con parafilm y se conservarán en el refrigerador (2-8°C) hasta que se recoja el último tiempo de exposición. Si es necesario, las placas pueden almacenarse durante la noche (o hasta 24 horas después de cosechar el último tiempo de exposición) en el refrigerador antes de extraer el MTT. Luego, las placas se agitarán durante al menos 2 horas a temperatura ambiente. Al final del período de extracción, el líquido dentro de los insertos de cultivo celular se decantará en el pozo del que se tomó el inserto de cultivo celular. La solución de extracto se mezclará y se transferirán 200 µL a los pozos correspondientes de la placa de 96 pozos. Se agregarán doscientos µL de isopropanol a los pozos designados como blancos. La absorbancia a 550 nm (OD550) de cada pozo se medirá con un lector de placas Vmax de Molecular Devices (con la función AUTOMIX encendida).

En los casos en los cuales se demuestre que el artículo de prueba reduce el MTT, solo los artículos de prueba que permanezcan unidos al tejido después del enjuague, que producen una señal de reducción de MTT falsa, presentan un problema. Para demostrar que el posible artículo de prueba residual no está actuando para reducir directamente el MTT, se realiza una verificación funcional en el ensayo definitivo para demostrar que el material de prueba no se une al tejido y conduce a una señal de reducción de MTT falsa.

Para determinar si el artículo de prueba residual está actuando para reducir directamente el MTT, se usa un tejido de control muerto por congelación. El tejido muerto por congelación se prepara en el IIVS colocando tejidos MelanoDerm™/EpiDerm™ (Melanoderm™ sin melanocitos) sin tratar en el congelador a -20°C al menos durante la noche, descongelando a temperatura ambiente y luego volviendo a congelar. Una vez sacrificado, el tejido puede almacenarse indefinidamente en el congelador. Los tejidos muertos por congelación pueden recibirse ya preparados de MatTek Corporation y almacenarse en el congelador a -20°C hasta su uso. Para probar la reducción del artículo de prueba residual, los tejidos muertos se tratan con el artículo de prueba de la manera normal. Todos los procedimientos de ensayo se realizarán de la misma manera que para el tejido viable. Al menos un control muerto tratado con agua desionizada estéril (control muerto negativo) se probará en paralelo ya que se espera una pequeña cantidad de reducción de MTT a partir

del NADH residual y las enzimas asociadas dentro del tejido muerto.

Si se observa poca o ninguna reducción de MTT en el control destruido con artículo de prueba, la reducción de MTT observada en el tejido viable tratado con artículo de prueba se puede atribuir a las células viables. Si hay una reducción apreciable de MTT en el control muerto tratado (en relación con la cantidad en el tejido viable tratado), se deben tomar medidas adicionales para tener en cuenta la reducción química o el artículo de prueba puede considerarse no comprobable en este sistema. Los valores de OD550 de los controles muertos se analizarán como se describe a continuación.

Los datos de absorbancia en bruto se capturarán y se guardarán como un archivo de impresión y se importarán a una hoja de cálculo de Excel. Se calculará el valor medio de OD550 de los pozos en blanco. El valor medio corregido de la OD550 de los controles negativos se determinará restando el valor medio de la OD550 de los pozos en blanco de sus valores medios de la OD550. Los valores de OD550 corregidos de las exposiciones de los artículos de prueba individuales y las exposiciones de los controles positivos se determinarán restando de cada uno el valor de OD550 medio de los pozos en blanco. Todos los cálculos se realizarán utilizando una hoja de cálculo de Excel. Aunque los algoritmos discutidos se realizan para calcular el análisis de punto final a nivel de grupo de tratamiento, los mismos cálculos se pueden aplicar a las réplicas individuales.

Exposición del artículo de prueba corr. OD550 = exposición del artículo de prueba OD550 – OD550 medio del blanco

Si se utilizan controles destruidos (KC), se realizarán los siguientes cálculos adicionales para corregir la cantidad de MTT reducida directamente por los residuos del artículo de prueba. El valor sin procesar de OD550 para el control muerto del control negativo se restará de los valores de OD550 sin procesar de cada uno de los controles muertos tratados con el artículo de prueba, para determinar los valores netos de OD550 de los controles muertos tratados con el artículo de prueba.

OD550 neto para cada artículo de prueba KC = Artículo de prueba OD550 sin procesar KC – Control negativo de OD550 sin procesar KC

Los valores de OD550 netos representan la cantidad de MTT reducido debido a la reducción directa de los residuos del artículo de prueba en momentos de exposición específicos. En general, si el valor neto de la OD550 es mayor que 0,150, la cantidad neta de reducción de MTT se restará de los valores corregidos de la OD550 de los tejidos tratados viables para obtener un valor final de la OD550 corregida. Estos valores finales de OD550 corregidos se utilizarán luego para determinar el % de viabilidades de control.

OD550 corregido final = artículo de prueba OD550 corregido (viable) – artículo de prueba OD550 neto (KC)

Finalmente, se realizará el siguiente % de cálculos de control:

% de viabilidad = $\frac{[(\text{OD550 final corregido del artículo de prueba o control positivo}) / (\text{OD550 medio corregido del control negativo})]}{\times 100}$

Resultados

Los resultados del ensayo MelanoDerm™ se muestran en las Figuras 16A-16K. Los tejidos tratados con Malasezina, compuesto I y compuesto II demostraron una pigmentación reducida el día 7 del experimento. Las Figuras 17A-17K muestran imágenes aumentadas 15X de muestras de MelanoDerm™ expuestas al tratamiento indicado.

Ejemplo 13

Ensayos de pez cebra

Procedimientos de ensayo

Compuestos: Los compuestos serán proporcionados por el patrocinador del estudio como solución Madre Maestra (MS) en la concentración soluble más alta en agua/PBS o DMSO.

Procedimientos estándar para la recolección de embriones: El pez cebra Phylonix AB se generará mediante apareamiento natural o utilizando un sistema de producción masiva de embriones (MEPS, Aquatic Habitats). Se generarán aproximadamente 50 peces cebra por hembra de pez cebra. El pez cebra se mantendrá a 28 °C en agua de pescado. El pez cebra se limpiará (se eliminará el pez cebra muerto) y se clasificará por etapa de desarrollo. Debido a que el pez cebra se nutre de un saco vitelino adherido, no se requiere alimentación durante los 6 días posteriores a la fertilización (dpf).

Solubilidad del compuesto: Solución Maestra (MS) (utilizando la **concentración** más alta) se diluirá en DMSO puro en soluciones sub-maestra (SS) es decir: 10, 50, 100, 200, 300 mM, etc. Agua de pescado [200 mg de sal marina instantánea del océano (sistemas de acuario) por litro de agua desionizada; pH 6,6 – 7,0 mantenido con regulador neutro 2,5 mg/litro (Seachem Laboratories Inc.); conductividad 850 – 950 μ S], suministrado por Phylonix, se dispensará en un recipiente de prueba, 4 ml/recipiente.

Para generar la solución del compuesto de prueba (TS), 4 μ l de cada SS se agregarán directamente al agua de mar. Ejemplo: 4 μ l de 10 mM SS añadidos al agua de los peces generarán 10 μ M TS; la concentración final de DMSO será del 0,1 %. Alternativamente, para obtener las mismas concentraciones finales de TS y DMSO, se pueden agregar 10 μ l de SS a 10 ml/recipiente de agua de pescado. Para los ensayos que pueden tolerar DMSO hasta un 1 %, se pueden utilizar 40 μ l de SS para generar 100 μ M de TS. Si se utilizan 10 ml de agua de pescado, el volumen de SS debe aumentarse proporcionalmente para obtener las mismas concentraciones finales de TS y DMSO. La solución se incubará a 28 °C durante el tiempo especificado para cada ensayo y se examinará visualmente a diario para detectar la presencia de precipitación.

Concentración máxima tolerable (MTC): MTC (LC_{10}) se utilizará como criterio estándar para la letalidad del compuesto, determinada utilizando 10 concentraciones de compuesto. Después de determinar la concentración más alta de compuesto soluble, el patrocinador del estudio seleccionará 10 concentraciones.

Se distribuirán treinta peces cebra AB de tipo salvaje de Phylonix de aproximadamente 2 dpf con corion en pocillos de microplacas de 6 pocillos que contienen 4 ml/pocillo de agua para peces y DMSO a una concentración que varía de 0,1-1 % dependiendo de la solubilidad del compuesto.

Inicialmente se probarán 10 concentraciones (es decir: 0,01, 0,05, 0,1, 0,5, 1, 5, 10, 50, 100 y 500 μ M (o hasta la concentración permitida por la solubilidad del compuesto). Si es necesario, se probarán concentraciones adicionales más altas (hasta 2000 μ M) o más bajas (hasta 0,001 μ M).

El pez cebra se incubará con cada concentración de compuesto de prueba en la oscuridad a 28°C durante 3 días. El pez cebra no tratado y tratado con 0,1-1% de DMSO se utilizará como controles de ensayo y de vehículo. Para calcular el % de letalidad, después del tratamiento, el número de peces cebra muertos se contará diariamente y se eliminará. A 5 dpf, los animales muertos se contarán para calcular el % de letalidad (= número total de peces cebra muertos/30). Tenga en cuenta que si el pez cebra muerto se desintegra, el número de peces cebra muertos se deducirá al contar el número de peces cebra vivos.

Para calcular el MTC, las curvas de letalidad se generarán trazando el % de letalidad en función de la concentración utilizando el software EXCEL. Para obtener la media y la SD de MTC, los experimentos se realizarán 3 veces.

Evaluar visualmente el efecto del compuesto sobre la pigmentación de la piel del pez cebra: Las células pigmentarias de la piel del pez cebra, incluidos los xantóforos, iridóforos y melanóforos (melanocitos), se originan en las células de la cresta neural. En el pez cebra, las células precursoras del pigmento de la piel diferenciadas expresan pigmento a ~ 24 hpf. El foco de este estudio son los melanocitos que expresan melanina, el pigmento negro de la superficie de la piel. Los melanocitos aparecen inicialmente como pequeñas manchas de color negro en la región dorsal de la cabeza. A medida que se desarrolla el pez cebra, el número de parches aumenta y se fusiona para formar bandas que se extienden hasta la región de la cola. En contraste, el pez cebra albino mutante exhibe una pigmentación de piel escasa. Los compuestos se administrarán a 2 dpf, para evaluar si los compuestos detienen el procedimiento continuo de pigmentación embrionaria, que se completa con 5 dpf. Se probarán tres concentraciones, MTC, 50% MTC y 25% MTC, para cada compuesto.

Se tratarán treinta y dos dpf de pez cebra AB de tipo salvaje Phylonix autoguiado con cada concentración de compuesto durante 3 días. Se utilizará como controles el pez cebra sin tratar y tratado con 0,1 % de DMSO. Control positivo: feniltiourea (PTU, 0,03 %).

Los peces cebra serán examinados visualmente diariamente utilizando un microscopio de luz de disección; los peces cebra tratados con compuestos y PTU serán comparados con los peces cebra sin tratar y los peces cebra de control tratados con vehículos. El número de peces cebra que presenten una disminución de la pigmentación se contará diariamente y se expresará como % de los animales de prueba; se proporcionará una imagen representativa. Para identificar la concentración óptima del compuesto y el tiempo de tratamiento para la disminución de la pigmentación, se generará una curva cinética representando el porcentaje de pez cebra que presenta una disminución de la pigmentación de la piel frente al tiempo (dpf). Se utilizará la prueba exacta de Fisher para determinar si el efecto compuesto es significativo ($P < 0,05$).

Se realizará una evaluación visual adicional del efecto del compuesto sobre la pigmentación de la piel del pez cebra después del tratamiento con: 0,1, 1 y 3 μ M. Se tratarán treinta y dos dpf de pez cebra AB de tipo salvaje Phylonix autoguiado con cada concentración de compuesto durante 3 días. Se utilizará como controles el pez cebra sin tratar y tratado con 0,1 % de DMSO. Control positivo: feniltiourea (PTU, 0,003%). El pez cebra se examinará visualmente a diario utilizando un microscopio óptico de disección; el pez cebra tratado con compuesto y PTU se comparará con el pez cebra de control no tratado y tratado con vehículo.

- En 5 dpf se contará la cantidad de peces cebra con disminución de la pigmentación y se expresarán como % de los animales de prueba; se proporcionará una imagen representativa. Para identificar la concentración óptima del compuesto y el tiempo de tratamiento para la disminución de la pigmentación, se generará una curva cinética representando el porcentaje de pez cebra que presenta una disminución de la pigmentación de la piel frente a la concentración. Se utilizará la prueba exacta de Fisher para determinar si el efecto compuesto es significativo ($P < 0,05$).
- Cuantificar el efecto del compuesto sobre la pigmentación de la piel del pez cebra: Según los resultados de la evaluación visual, utilizaremos las condiciones óptimas (concentración, tiempo de tratamiento del compuesto) para cuantificar el efecto del compuesto sobre la pigmentación de la piel del pez cebra.
- Veinte peces cebra AB de tipo salvaje Phylonix en la etapa óptima determinada por los resultados de la evaluación visual serán tratados con la concentración óptima del compuesto. Se utilizará como controles el pez cebra sin tratar y tratado con 0,1 % de DMSO. Control positivo: feniltiourea (PTU, 0,03 %).
- La imagen de vista dorsal de un pez cebra entero será capturada utilizando una cámara SPOT a 2X. La región dorsal de la cabeza y el tronco se definirá como región de interés (ROI) mediante la función de selección de Adobe Photoshop. La pigmentación de la piel negra en la ROI se resaltará utilizando la función de resaltado de Photoshop. La señal de pigmento total (PS) en píxeles se determinará mediante la función de histograma de Photoshop.
- Si el compuesto afecta el crecimiento del pez cebra, la longitud del cuerpo (L) y el ancho del tronco (W) serán menores, lo que afectará el área de ROI y el PS final. Por lo tanto, normalizaremos la medición de la señal final (FS) usando $FS = PS/L \times W$.
- Se espera que los peces cebra no tratados y tratados con vehículo presenten un valor de FS similar para demostrar que el vehículo no produce efecto. Se espera que el pez cebra tratado con PTU muestre un FS bajo para validar el ensayo. El pez cebra tratado con el compuesto se comparará con el pez cebra de control tratado con vehículo.
- Para determinar si el efecto del compuesto es significativo ($P < 0,05$), la FS media para el pez cebra tratado con compuesto se comparará con la FS media del pez cebra tratado con vehículo utilizando la prueba t de Student.
- Se realizará una cuantificación adicional del efecto del compuesto sobre la pigmentación de la piel del pez cebra después del tratamiento con: concentración de compuesto de 0,5 y 1,5 μM .
- Veinte peces cebra AB de tipo salvaje Phylonix 2 dpf serán tratados con una concentración del compuesto de 0,5 y 1,5 μM . Se utilizará como controles el pez cebra sin tratar y tratado con 0,1 % de DMSO. Control positivo: feniltiourea (PTU, 0,003%).
- La imagen de vista dorsal de un pez cebra entero será capturada utilizando una cámara SPOT a 2X. La región de la cabeza dorsal se definirá como región de interés (ROI) utilizando la función de selección de Adobe Photoshop. La pigmentación de la piel negra en la ROI se resaltará utilizando la función de resaltado de Photoshop. La señal de pigmento total (PS) en píxeles se determinará mediante la función de histograma de Photoshop.
- Si el compuesto afecta el crecimiento del pez cebra, la longitud del cuerpo (L) será más corta y el ancho del tronco (W) será menor, lo que afectará el área de ROI y el PS final. Por lo tanto, normalizaremos la medición de la señal final (FS) usando $FS = PS/L \times W$.
- Se espera que los peces cebra no tratados y tratados con vehículo presenten un FS similar para confirmar la ausencia de efecto del vehículo. Se espera que el pez cebra tratado con PTU muestre un FS bajo, validando el ensayo. El pez cebra tratado con el compuesto se comparará con el pez cebra de control tratado con vehículo.
- Para determinar si el efecto del compuesto es significativo ($P < 0,05$), la FS media para el pez cebra tratado con compuesto se comparará con la FS media del pez cebra tratado con vehículo utilizando la prueba t de Student.
- Resultados**
- Los resultados de la evaluación visual para el pez cebra expuesto al compuesto II se muestran en las Figuras 18A-18F y las Figuras 19A-19F. En la Figura 20 se muestra un gráfico que resume los resultados de la parte de evaluación visual del estudio.
- Las regiones de evaluación cuantitativa de interés y los resultados para el pez cebra expuestos al compuesto II se muestran en las Figuras 21A-21E y Figuras 22A-22B.

Ejemplo 14**Estabilidad de malassezina y derivados de malassezina en DMSO y medios de cultivo celular**

Los compuestos ensayados se prepararon a 100 µM en DMSO y medio de cultivo. Las soluciones se incubaron a temperatura ambiente durante 2 horas y se analizaron mediante LC-EM. El área del pico se usó para evaluar el compuesto que queda en el solvente.

Resultados

Los resultados de LC-MS se muestran en las Figuras 23A-23J. Los resultados indican que los compuestos son estables en medio de cultivo después de 2 horas de incubación.

DOCUMENTOS

- Berridge, M.V., Tan, A.S., McCoy, K.D., Wang, R. The Biochemical and Cellular Basis of Cell Proliferation Assays That Use Tetrazolium Salts. *Biochemica* 4:14-19 (1996).
- Black, et al. Athymic Nude Mice and Human Skin Grafting. In: Maibach, et al. (eds.). *Models in Dermatology* Vol. 1. Karger, Basel, 1985, 228-39.
- Costin, G.-E., Raabe, R. Optimized in vitro pigmentation screening assay using a reconstructed three dimensional human skin model. *Rom. J. Biochem.* 50 (1), 15-27 (2013).
- Donato, et al. A Microassay for Measuring Cytochrome P450IA1 and P450IIB1 Activities in Intact Human and Rat Hepatocytes Cultured on 96-Well Plates. *Anal Biochem.* 1993; 213(1):29-33.
- Elmore. Apoptosis: A Review of Programmed Cell Death. *Toxicologic Pathology* 2007; 35:495-516.
- Fitzpatrick, et al. The Validity and Practicality of Sun-Reactive Skin Types I Through VI. *Arch Dermatol.* 1988; 124(6):869-871.
- Gaitanis, et al. Skin Diseases Associated With Malassezia Yeasts: Facts and Controversies. *Clinics in Dermatology* 2013; 31:455-463.
- Guého, et al. The Genus Malassezia With Description of Four New Species. *Antonie Van Leeuwenhoek* 1996; 69:337-55.
- Karchner, et al. Identification and Functional Characterization of Two Highly Divergent Aryl Hydrocarbon Receptors (AHR1 and AHR2) in the Teleost *Fundulus heteroclitus*. *The Journal of Biological Chemistry* 1999; 274(47):33814-24.
- Krämer, et al. Malassezin, A Novel Analyst of the Aryl Hydrocarbon Receptor From The Yeast *Malassezia furfur*, Induces Apoptosis in Primary Human Melanocytes. *ChemBioChem* 2005; 6:860-5.
- Lee, et al. Comparison of Gene Expression Profiles Between Keratinocytes, Melanocytes and Fibroblasts. *Ann Dermatol.* 2013; 25(1):35-45.
- Manning, et al. Maintenance of Skin Xenografts of Widely Divergent Phylogenetic Origin on Congenitally Athymic (Nude) Mice. *J Exp Med* 1973; 138:488-94.
- Nazzaro-Porro, et al. Identification of Tyrosinase Inhibitors in Cultures of *Pityrosporum*. *The Journal of Investigative Dermatology* 1978; 71:205-208.
- Noakes. The Aryl Hydrocarbon Receptor: Una revisión de su papel en la fisiología y patología del tegumento y su relación con el metabolismo de triptófano. *Journal of Tryptophan Research* 2015; 8: 17-18.
- Otulakowski, et al. Use of a Human Skin-Grafted Nude Mouse Model for the Evaluation of Topical Retinoic Acid Treatment. *J Invest Dermatol* 1994; 102:515-8.
- Park, J.I., Lee, H.Y., Lee, J.E., Myung, C.H., Hwang, J.S. Inhibitory effect of 2-methyl-naphtho[1,2,3-de]quinolin-8-one on melanosome transport and skin pigmentation. *Sci. Rep. Jul.* 6:6:29189. Doi: 10.1038/srep29189 (2016).
- Plenat, et al. Host-Donor Interactions in Healing of Human Split-Thickness Skin Grafts Onto Nude Mice: In Situ Hybridization, Immunohistochemical and Histochemical Studies. *Transplantation* 1992; 53:1002-10.
- Reed, et al. Long-Term Maintenance of Normal Human Skin on Congenitally Athymic (Nude) Mice. *Proc Soc Exp Biol Med* 1973; 143:350-3.
- Scott, et al. The Permeability of Grafted Human Transplant Skin in Athymic Mice. *J Pharm Pharmacol* 1988; 40:128-9.
- Song, et al. A Ligand For The Aryl Hydrocarbon Receptor Isolated From Lung. *PNAS* 2002; 99(23):14694-9.
- Taylor, et al. The Taylor Hyperpigmentation Scale: a new visual assessment tool for the evaluation of skin color and pigmentation. *Cutis.* 2005 Oct; 76(4):270-4.
- Wang, et al. Stress-Induced RNASET2 Overexpression Mediates Melanocyte Apoptosis Via The TRAF2 Pathway In Vitro. *Cell Death and Disease* 2014; 5:e1022
- Wasmeier, et al. Melanosomas de un vistazo. *Journal of Cell Science* 2008; 121:3995-3999.
- Wille, et al. Malassezin – A Novel Agonist of the Arylhydrocarbon Receptor From The Yeast *Malassezia furfur*. *Bioorganic & Medicinal Chemistry* 2001; 9:955-60.
- Winston-McPherson, et al. Synthesis and Biological Evaluation of 2,3'-diindolylmethanes as Agonists of Aryl Hydrocarbon Receptor. *Bioorganic & Medicinal Chemistry Letters* 2014; 24:4023-4025.
- Whyte, et al. Ethoxyresorufin-O-deethylase (EROD) Activity in Fish As A Biomarker of Chemical Exposure. *Critical Reviews in Toxicology* 2000; 30(4):347-570.
- Yamaguchi, et al. Melanocytes and Their Diseases. *Cold Spring Harb Perspect Med* 2014; 4:a017046.
- Zonios, et al. Skin Melanin, Hemoglobin, and Light Scattering Properties can be Quantitatively Assessed In Vivo Using

Diffuse Reflectance Spectroscopy. J Invest Dermatol. 2001; 117:1452-1457.

5

10

15

20

25

30

35

40

45

50

55

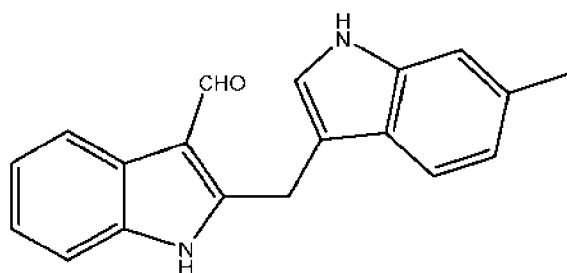
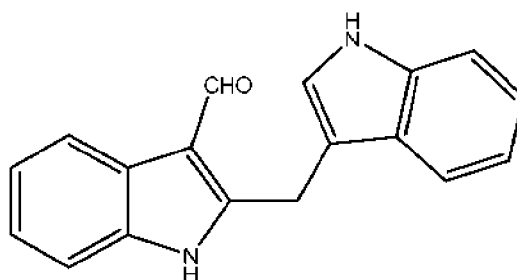
60

65

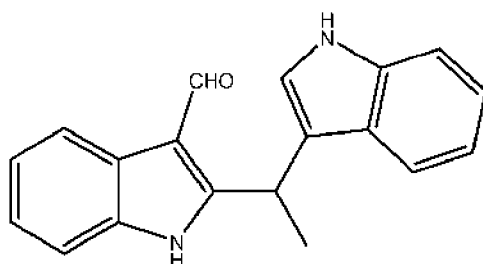
REIVINDICACIONES

1. Una composición cosmética que comprende:

(a) un compuesto que se selecciona del grupo que consiste en:



y



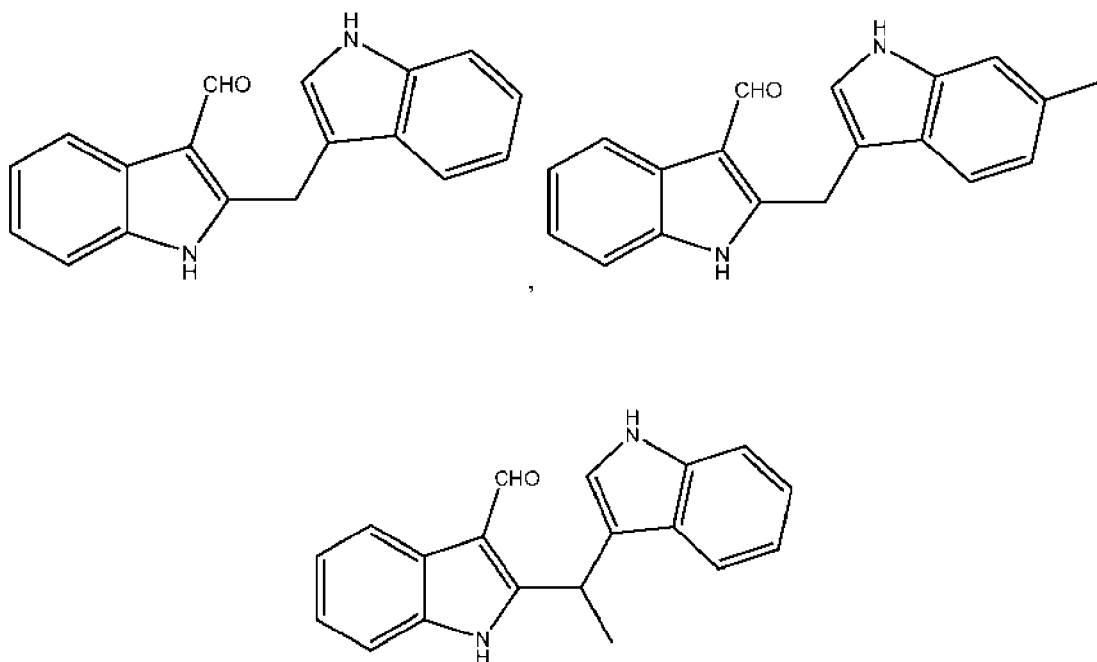
o un hidrato o sal cosméticamente aceptable de este,

(b) un vehículo, diluyente o portador cosméticamente aceptable, y

(c) uno o más ingredientes seleccionados del grupo que consiste en perfumes, estrógenos, vitamina A, vitamina C, vitamina E, ácido pirúvico, ácido láctico, ácido glicólico, lanolina, vaselina, aloe vera, metilparabeno, propilparabeno y pigmentos.

2. Un método cosmético para aclarar el tono de piel en un sujeto que comprende: poner en contacto al sujeto con una composición que comprende:

(a) un compuesto seleccionado del grupo que consiste en:



o un hidrato, o una sal cosméticamente aceptable de este.

3. El método cosmético de la reivindicación 2, en donde la composición comprende:

- (b) un vehículo, diluyente o portador cosméticamente aceptable, y
- (c) uno o más ingredientes seleccionados del grupo que consiste en perfumes, estrógenos, vitamina A, vitamina C, vitamina E, ácido pirúvico, ácido láctico, ácido glicólico, lanolina, vaselina, aloe vera, metilparabeno, propilparabeno y pigmentos.

4. El método cosmético de la reivindicación 2, en donde la composición comprende:

- (b) un vehículo, diluyente o portador cosméticamente aceptable, en donde el vehículo, diluyente o portador cosméticamente aceptable comprende uno o más ingredientes seleccionados del grupo que consiste en lactosa, sacarosa, manitol, sorbitol, un almidón, un fosfato de calcio, citrato de sodio, alcohol etílico, alcohol propílico, alcohol bencílico, un poliol, un triglicérido, un polímero biodegradable, una matriz elastomérica, liposomas, microesferas, aceite de maíz, aceite de germen, aceite de oliva, aceite de ricino, aceite de sésamo, aceite de semilla de algodón, aceite de cacahuete, manteca de cacao, una cera, parafina, silicona, talco y salicilato.

5. El método cosmético de la reivindicación 2, en donde la composición comprende:

- (b) un vehículo, diluyente o portador cosméticamente aceptable, y
- (c) uno o más compuestos, ingredientes y/o materiales cosméticamente aceptables seleccionados del grupo que consiste en:
 - (i) almidones, lactosa, sacarosa, glucosa, manitol, ácido silícico;
 - (ii) carboximetilcelulosa, alginatos, gelatina, polivinilpirrolidona, hidroxipropilmetilcelulosa, sacarosa, acacia;
 - (iii) glicerol;
 - (iv) alcohol cetílico, monoestearato de glicerol;
 - (v) caolín, arcilla de bentonita;
 - (vi) talco, estearato de calcio, estearato de magnesio, polietilenglicoles sólidos, laurilsulfato sódico;
 - (vii) alcoholes isostearílicos etoxilados, ésteres de sorbitol y sorbitán de polioxietileno, celulosa microcristalina, metahidróxido de aluminio, bentonita, agar-agar, tragacanto;
 - (viii) lactosa, azúcares de la leche, polietilenglicoles, grasas animales, grasas vegetales, aceites, ceras, parafinas, manteca de cacao, almidones, derivados de celulosa, polietilenglicol, siliconas, bentonitas, ácido silícico, talco, salicilato, óxido de zinc, hidróxido de aluminio, silicatos de calcio, polvo de poliamida;
 - (ix) conservantes;
 - (x) agentes tensioactivos;
 - (xi) hidroxipropilmetilcelulosa, liposomas, microesferas, monoestearato de aluminio, gelatina, ceras;
 - (xii) agentes humectantes;

(xiii) alcohol etílico, alcohol isopropílico, carbonato de etilo, acetato de etilo, alcohol bencílico, benzoato de bencilo, propilenglicol, 1,3-butilenglicol, aceite de semilla de algodón, aceite de cacahuete, aceite de maíz, aceite de germen, aceite de oliva, aceite de ricino, aceite de sésamo, glicerol, alcohol tetrahidrofurfurílico, polietilenglicoles, ésteres de ácidos grasos de sorbitán; y
(xiv) lecitina.

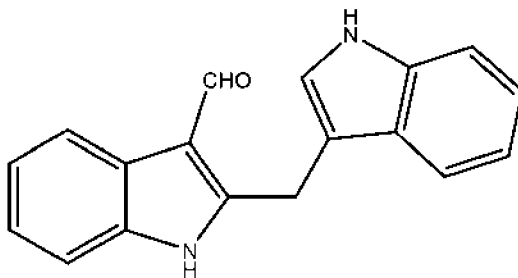
6. El método cosmético de la reivindicación 2, en donde la composición comprende:

(b) uno o más portadores cosméticamente aceptables seleccionados del grupo que consiste en una crema, aceite, loción, ungüento, gel y sólido cosméticamente aceptables.

7. El método cosmético de la reivindicación 2, en donde la composición comprende:

(b) un vehículo, diluyente o portador cosméticamente aceptable, en donde la composición es una composición tópica o transdérmica seleccionada de un polvo, spray, ungüento, pasta, crema, loción, gel, parche, emulsión y suspensión.

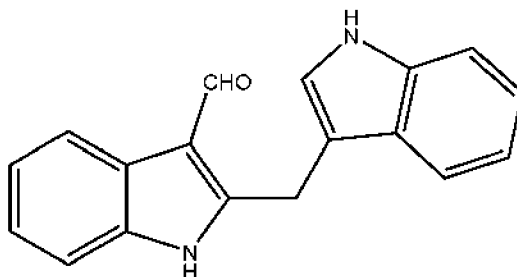
8. La composición cosmética de la reivindicación 1 o el método cosmético de cualquiera de las reivindicaciones 2 a 7, en donde el compuesto es



o un hidrato, o una sal cosméticamente aceptable de este.

9. La composición cosmética de la reivindicación 1 u 8, o el método cosmético de cualquiera de las reivindicaciones 2 a 8, en donde la composición es una emulsión o microemulsión.

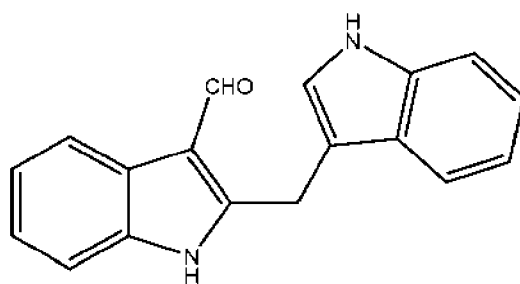
10. La composición cosmética de la reivindicación 9 o el método cosmético de la reivindicación 9, en donde el compuesto es



o un hidrato, o una sal cosméticamente aceptable de este.

11. La composición cosmética de la reivindicación 9, o el método cosmético de la reivindicación 9, en donde la composición es una emulsión o microemulsión de aceite en agua o agua en aceite.

12. La composición cosmética de la reivindicación 11 o el método cosmético de la reivindicación 11, en donde el compuesto es



o un hidrato, o una sal cosméticamente aceptable de este.

Figura 1A

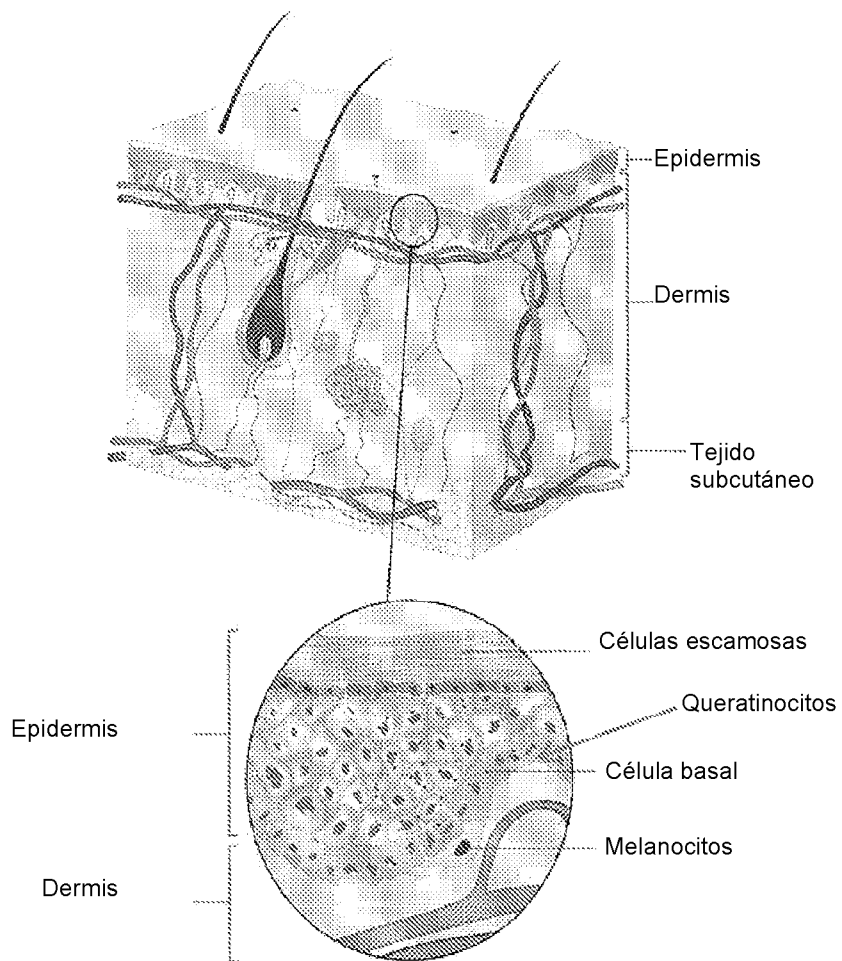
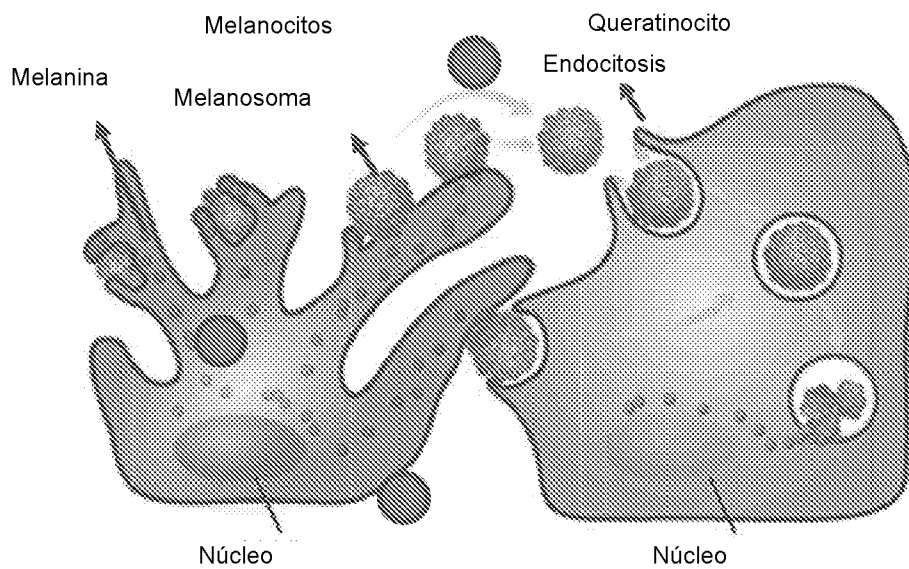


Figura 1B



- 1 – Inhibición de la síntesis de melanina - inhibición de tirosinasa
- 2 – Inhibición del transporte de melanina a queratinocitos
- 3 – Apoptosis de melanocitos

Figura 2A

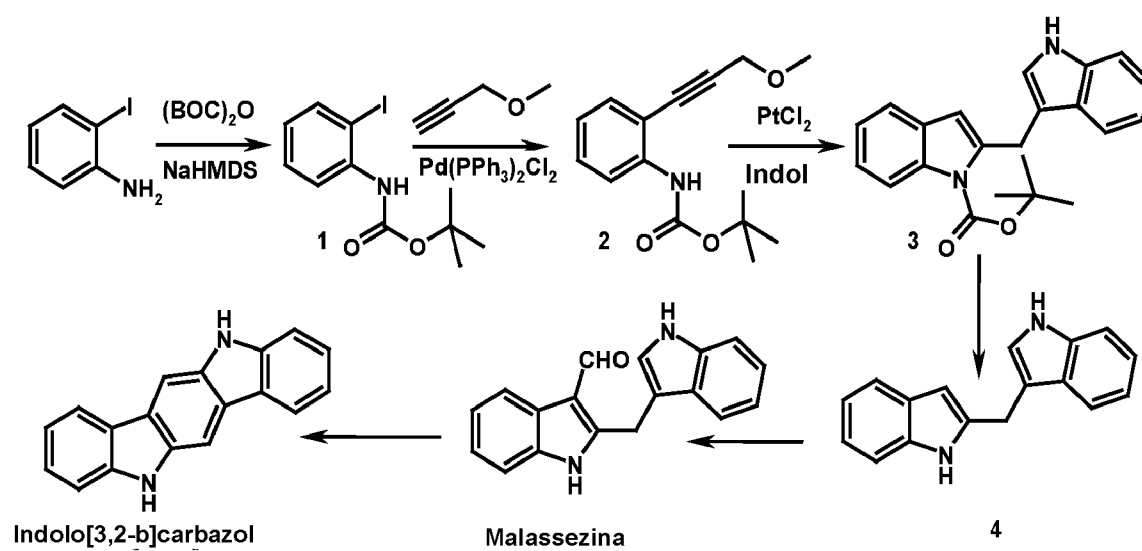


Figura 2B

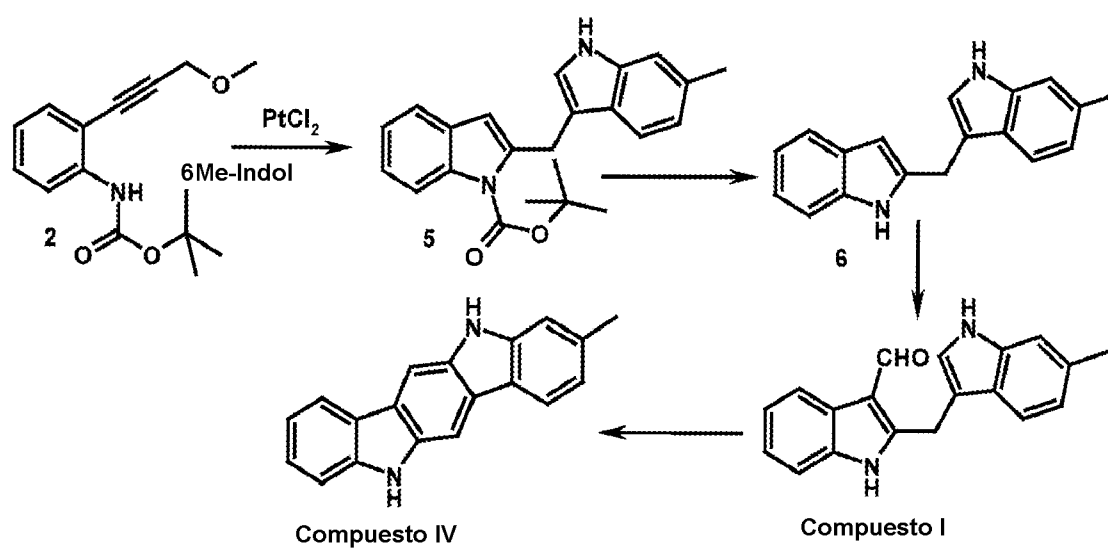


Figura 2C

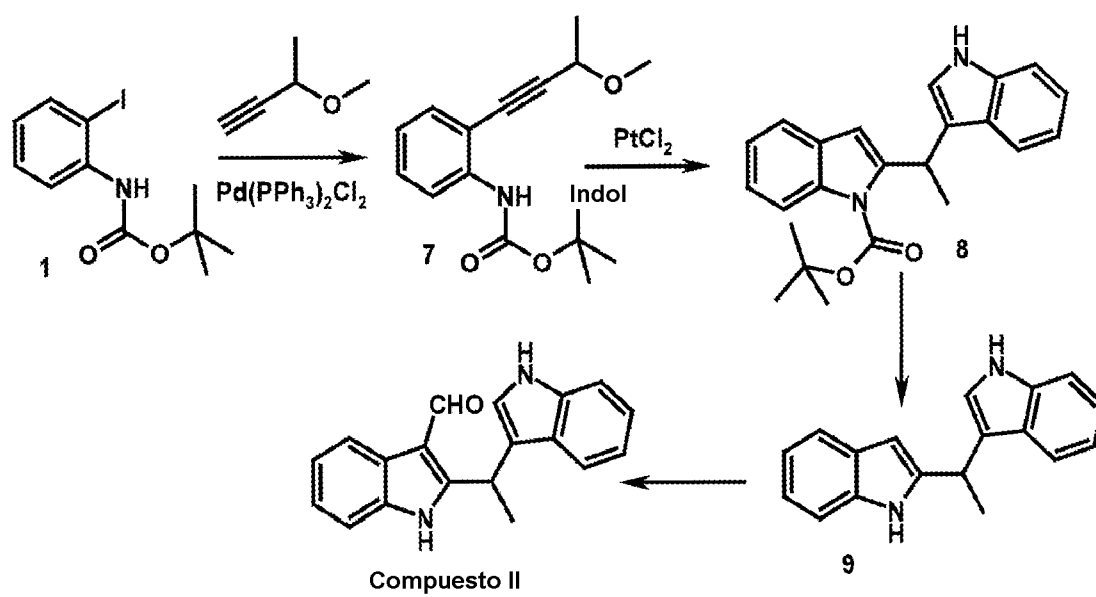


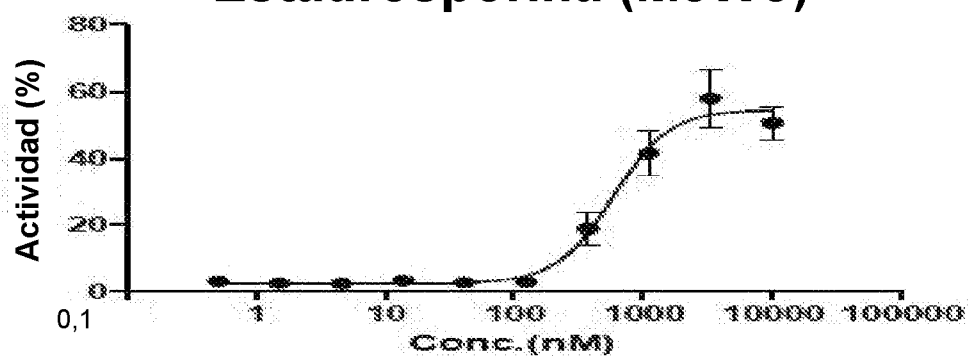
Figura 3A

ID de compuesto	EC50 [nM] en MeWo	EC50 [nM] en WM115
Estaurosporina	580,28	801,66
CV-8684	>10.000	>10.000
CV-8685	>10.000	>10.000
CV-8686	>10.000	>10.000
CV-8687	>10.000	>10.000
CV-8688	908,57	>10.000

Figuras 3B-3D

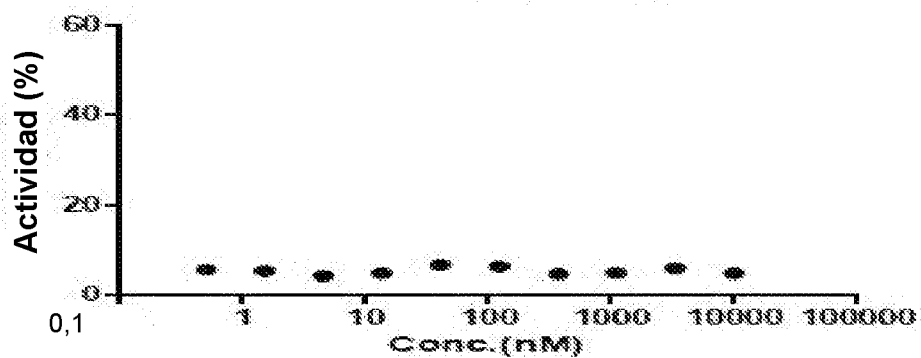
B

Estaurosporina (MeWo)



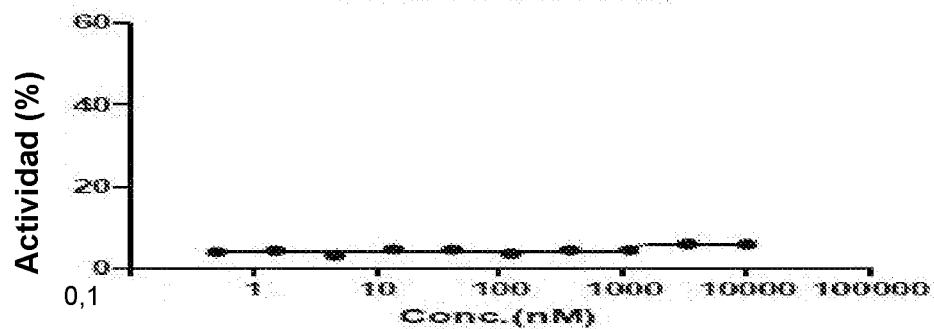
C

CV-8684(MeWo)



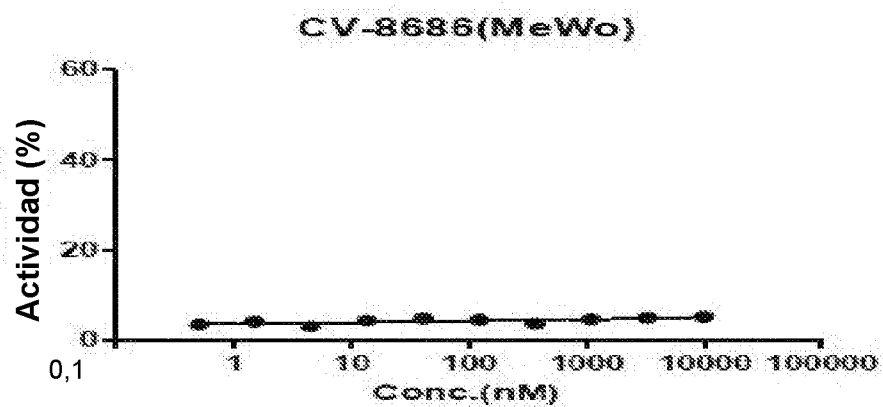
D

CV-8685(MeWo)

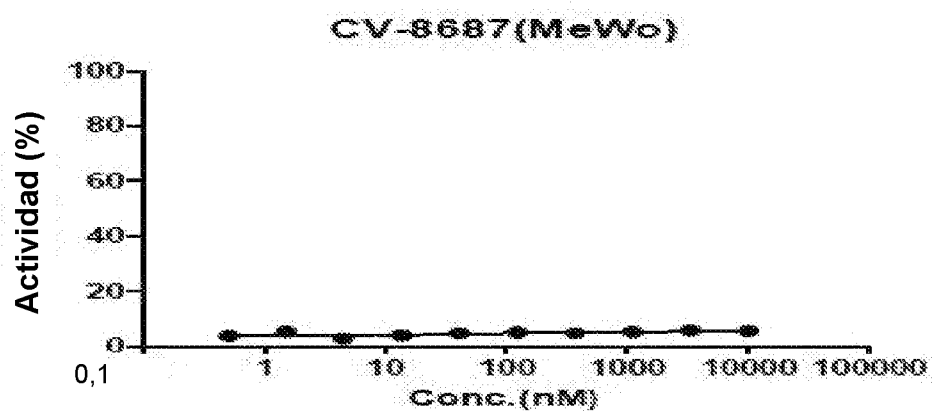


Figuras 3E-3G

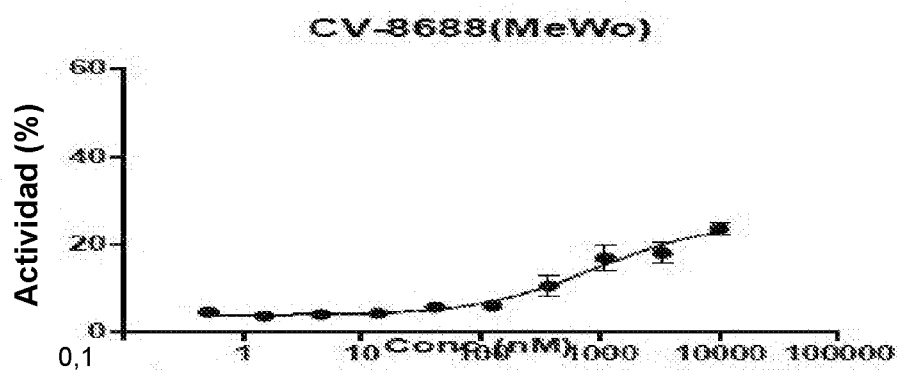
E



F



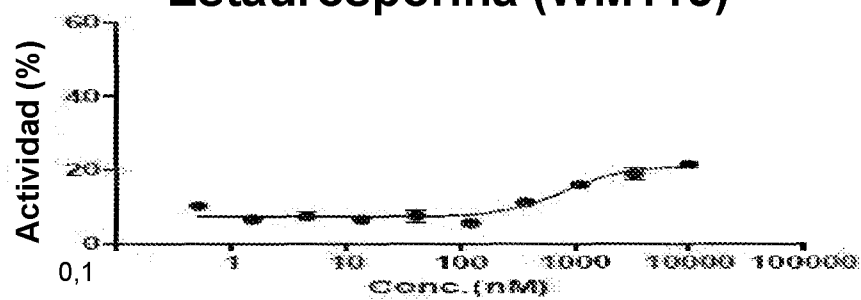
G



Figuras 3H-3J

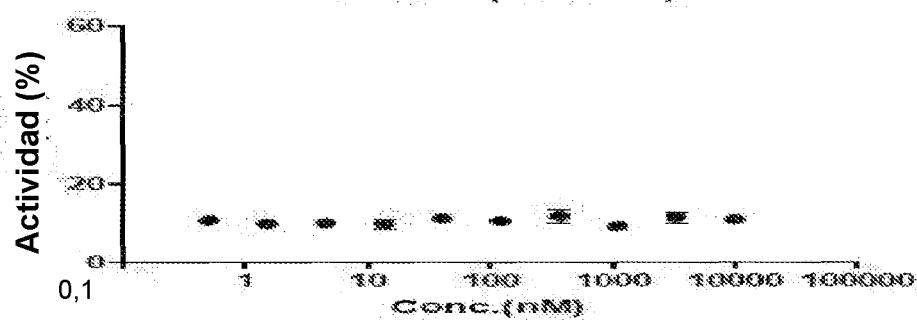
H

Estaurosporina (WM115)



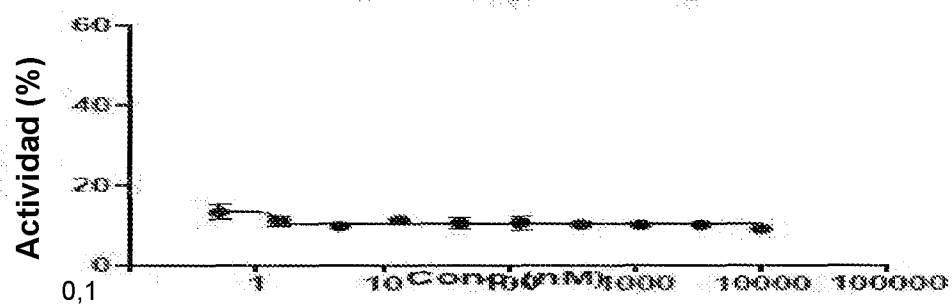
I

CV-8684(WM115)



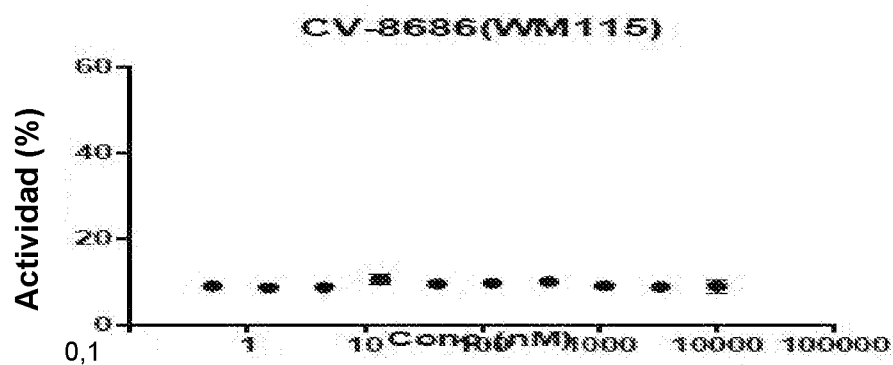
J

CV-8685(WM115)

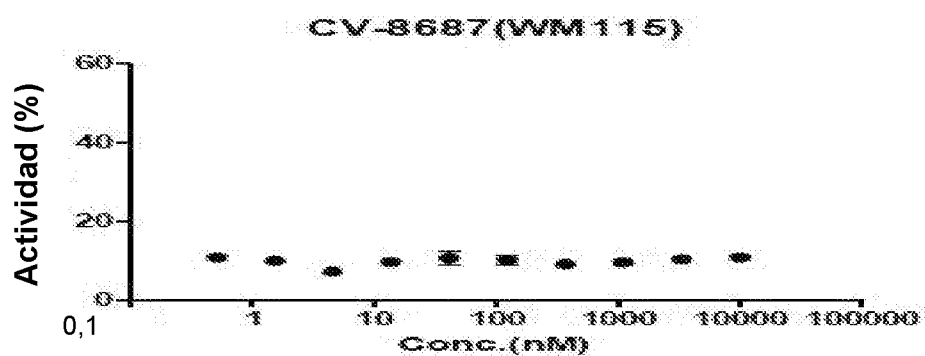


Figuras 3K-3M

K



L



M

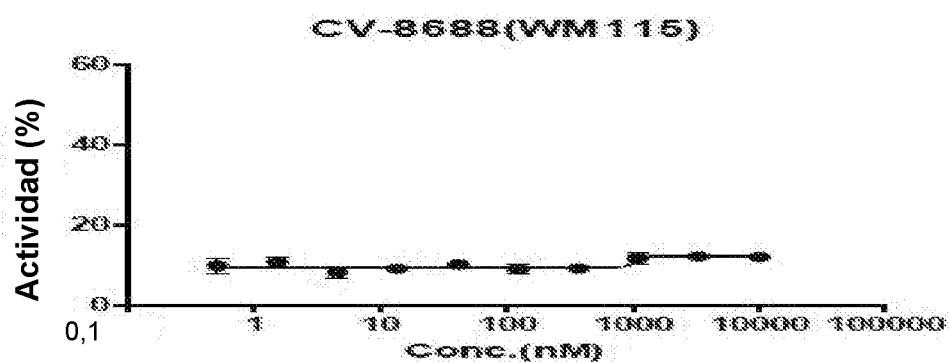


Figura 4A

Tiempo de ensayo	Dosis de anexina V de MeWo	CV-8684 Nivel relativo de anexina V (%)				Dosis de anexina V de WM115	CV-8684 Nivel relativo de anexina V (%)			
		n=1	n=2	Media	STD		n=1	n=2	Media	STD
6 h	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 h	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 h	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 h	100	30,94	8,84	19,89	15,63	100	55,13	59,27	57,20	2,93
	1	75,14	26,52	50,83	34,38	10	147,98	130,57	139,27	12,31
	1	39,78	86,30	53,04	18,75	1	113,99	118,13	116,06	2,93

Figura 4B

Tiempo de ensayo	Dosis de anexina V de MeWo	CV-8685 Nivel relativo de anexina V (%)				Dosis de anexina V de WM115	CV-8685 Nivel relativo de anexina V (%)			
		n=1	n=2	Media	STD		n=1	n=2	Media	STD
6 h	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 h	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 h	100	187,27	330,91	259,09	101,57	100	127,37	198,98	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 h	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

Figura 4C

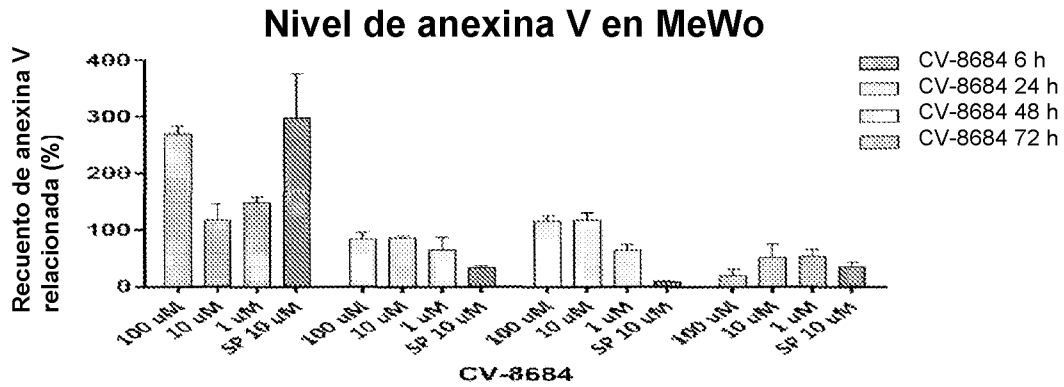
Tiempo de ensayo	Dosis de anexina V de MeWo	CV-8688 Nivel relativo de anexina V (%)				Dosis de anexina V de WM115	CV-8688 Nivel relativo de anexina V (%)			
		n=1	n=2	Media	STD		n=1	n=2	Media	STD
6 h	100	123,53	145,59	134,56	15,60	100	180,67	194,05	187,36	9,46
	10	136,76	88,24	112,50	34,32	10	122,68	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 h	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 h	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 h	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

Figura 4D

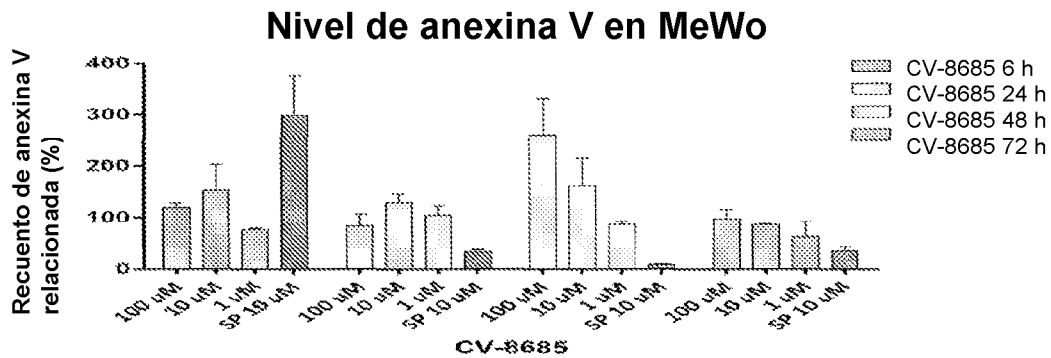
Tiempo de ensayo	Dosis de anexina V de MeWo	Estaurosporina Nivel relativo de anexina V (%)				Dosis de anexina V de WM115	Estaurosporina Nivel relativo de anexina V (%)			
		n=1	n=2	Media	STD		n=1	n=2	Media	STD
6 h	10	377,03	218,92	297,97	111,80	10	124,91	129,37	127,14	3,15
24 h	10	29,03	37,83	33,43	6,22	10	5,77	17,90	11,84	8,57
48 h	10	9,09	7,27	8,18	1,29	10	7,49	6,66	7,08	0,59
72 h	10	44,20	26,52	35,36	12,50	10	3,32	1,24	2,28	1,47

Figuras 4E-4G

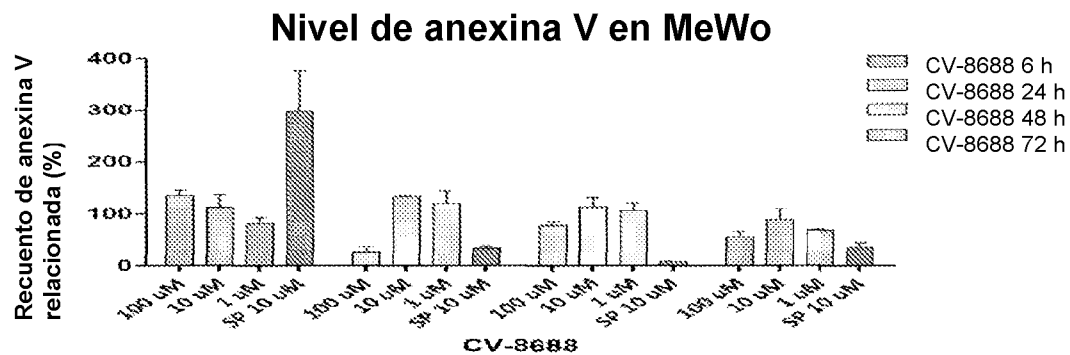
E



F

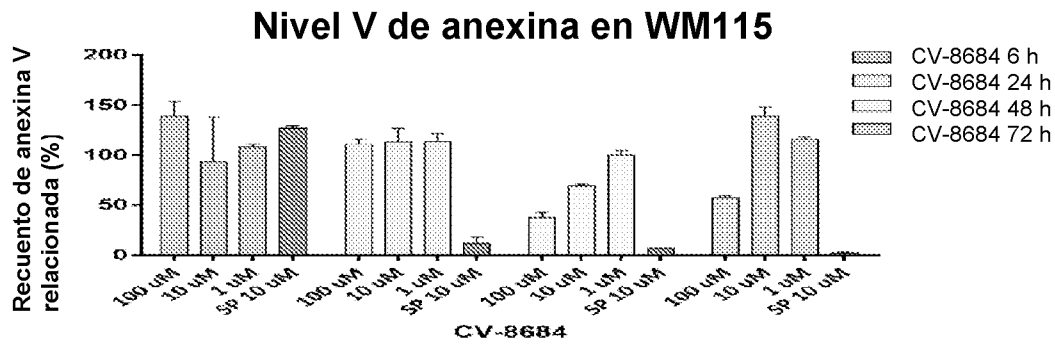


G

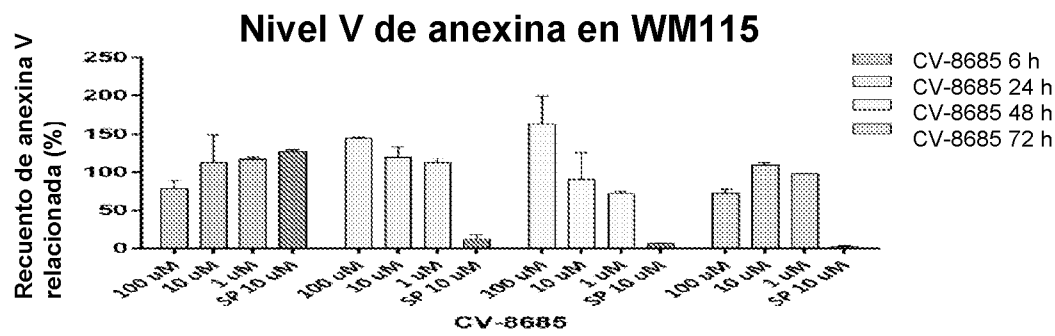


Figuras 4H-4J

H



I



J

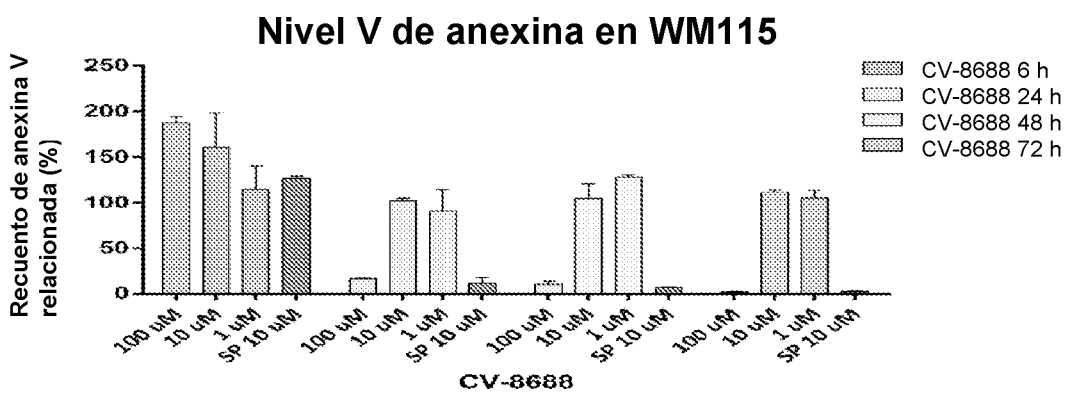


Figura 4K

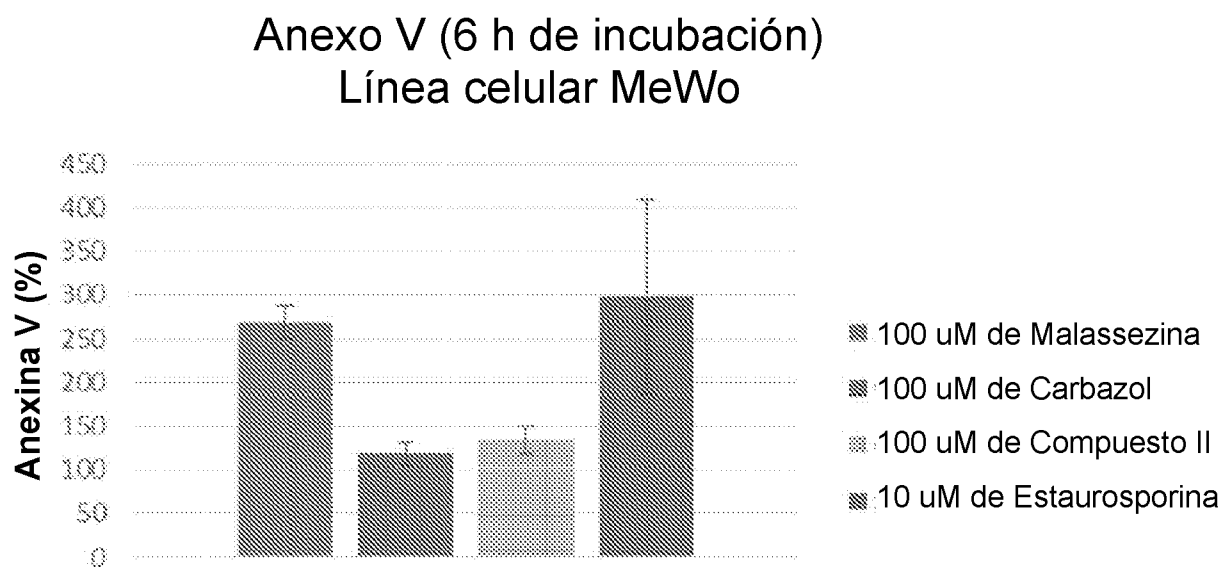
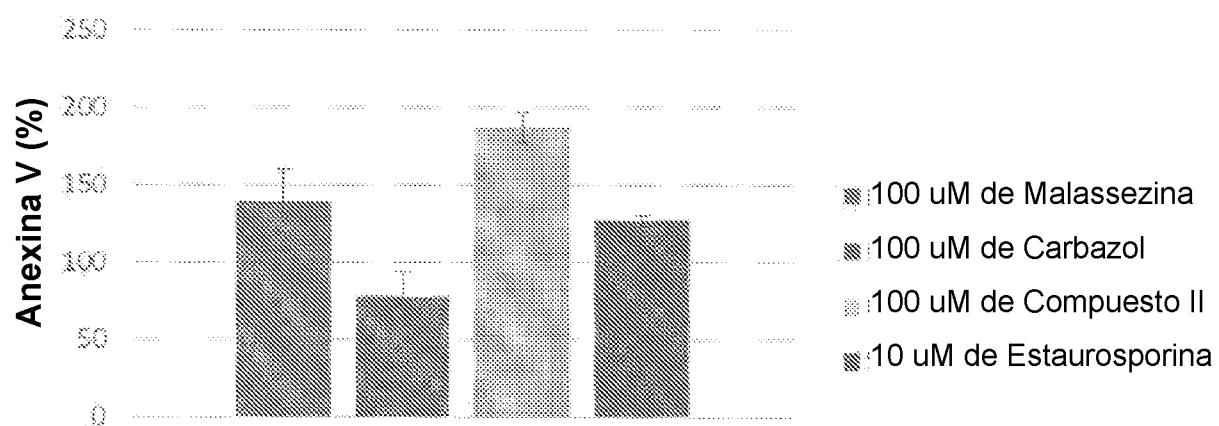
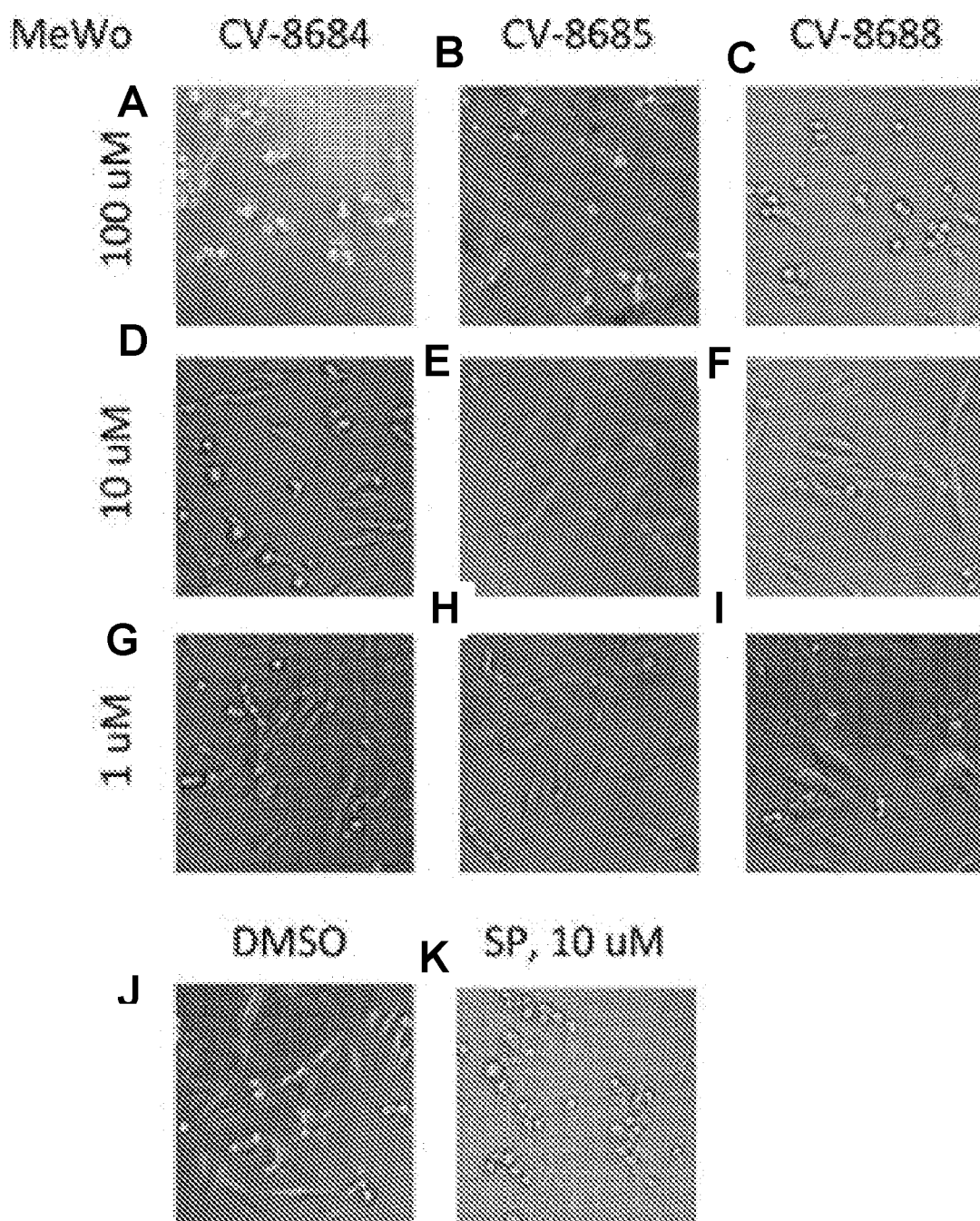


Figura 4L

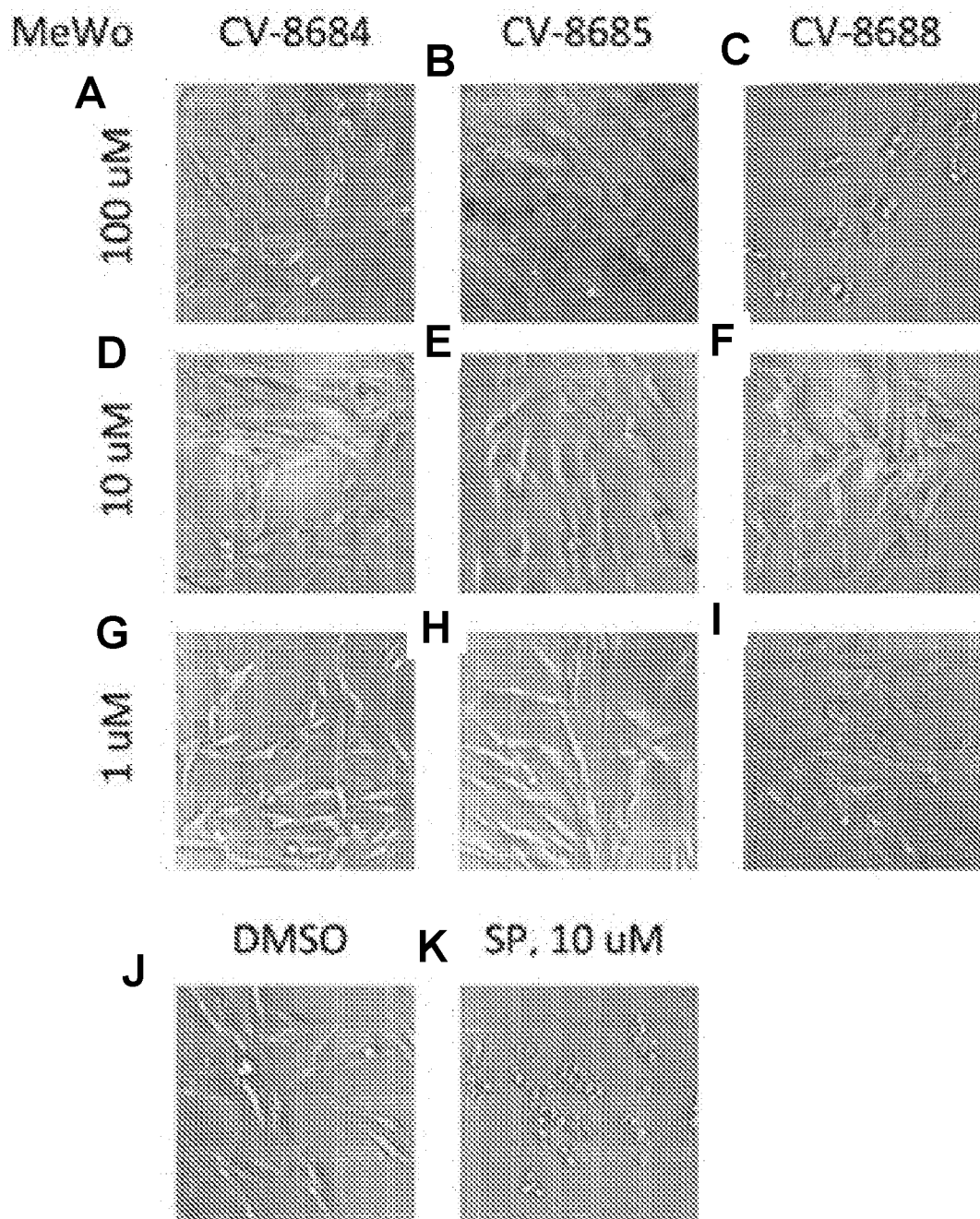
Anexina V (6 h de incubación)
Línea celular WM115



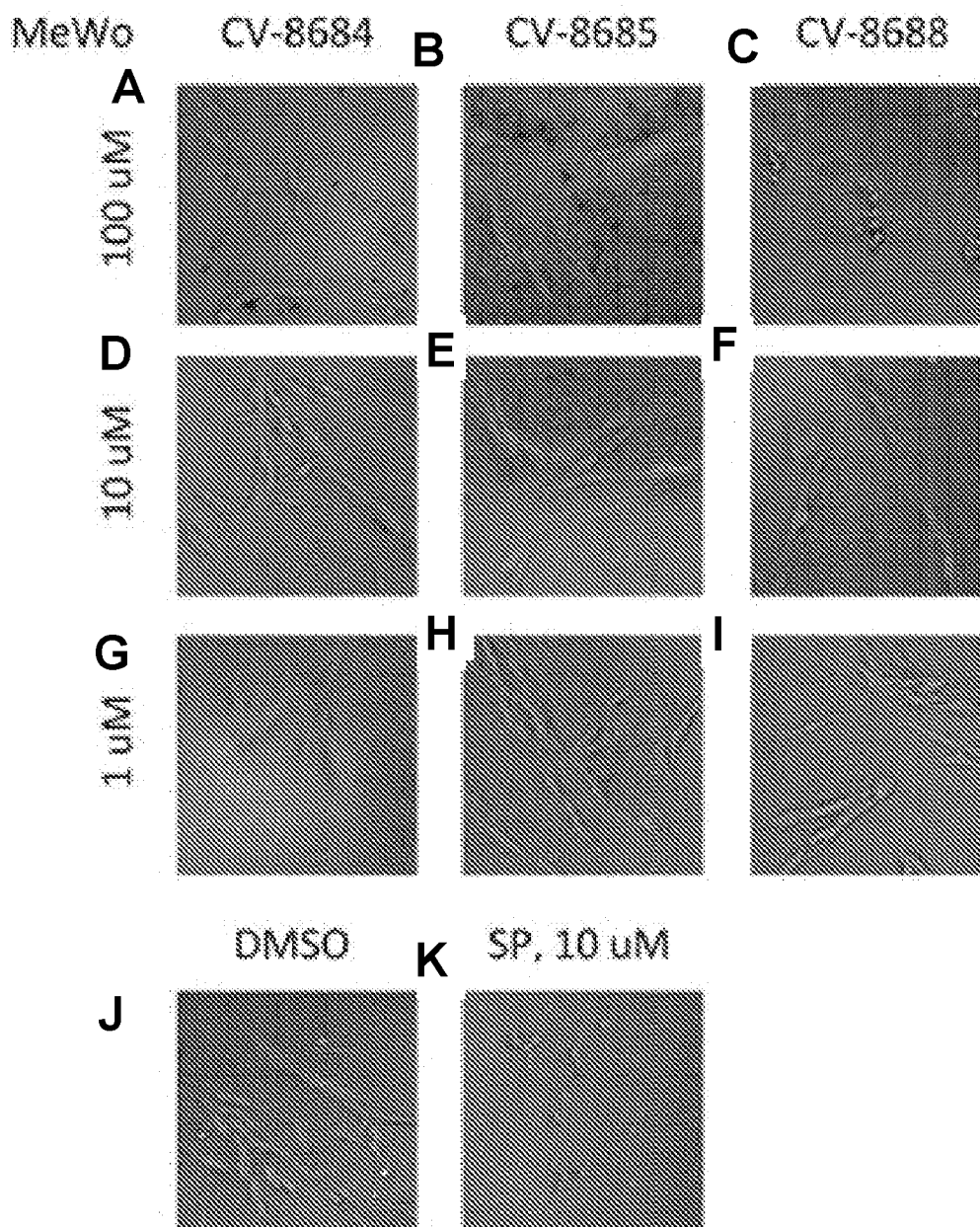
Figuras 5A-5K



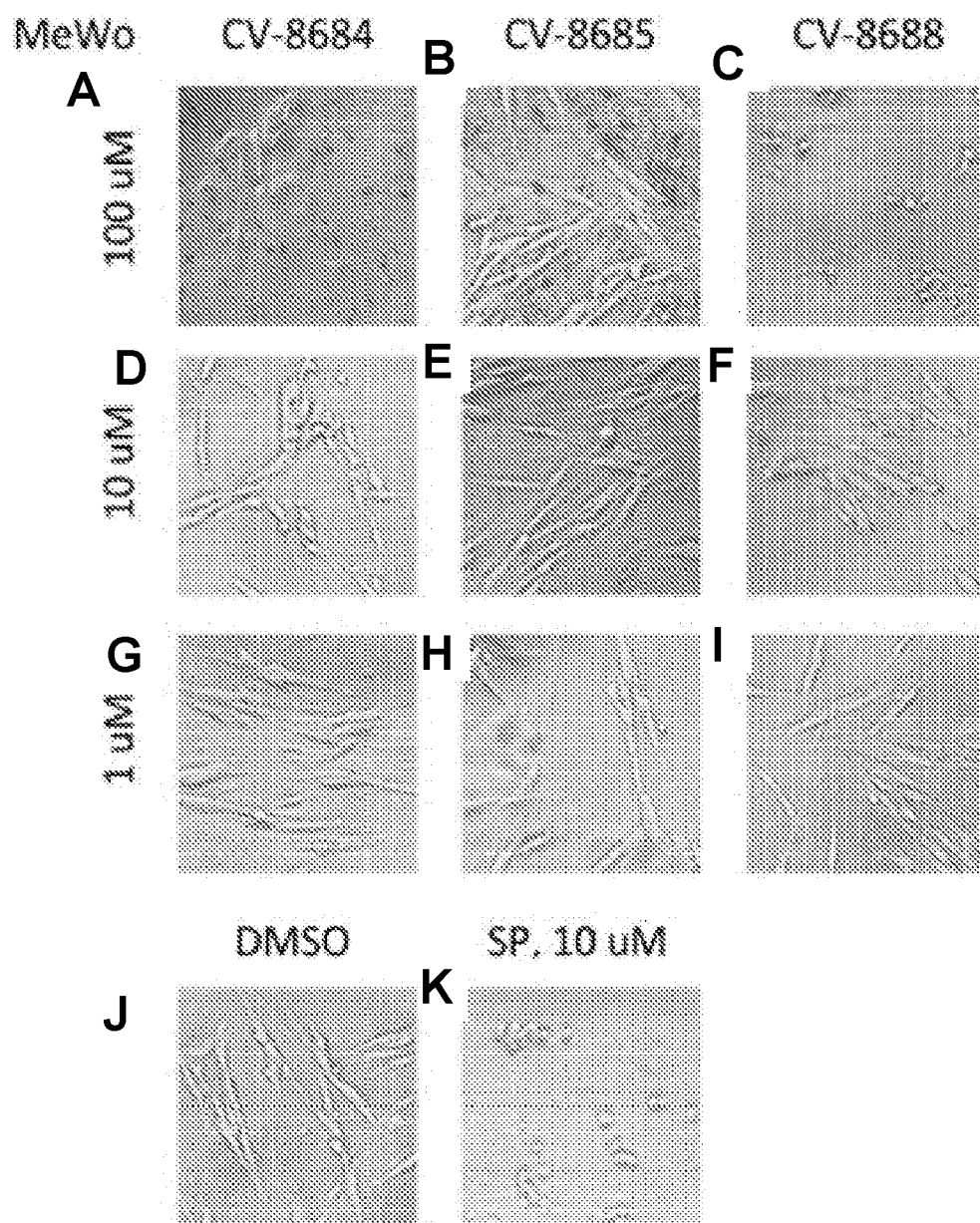
Figuras 6A-6K



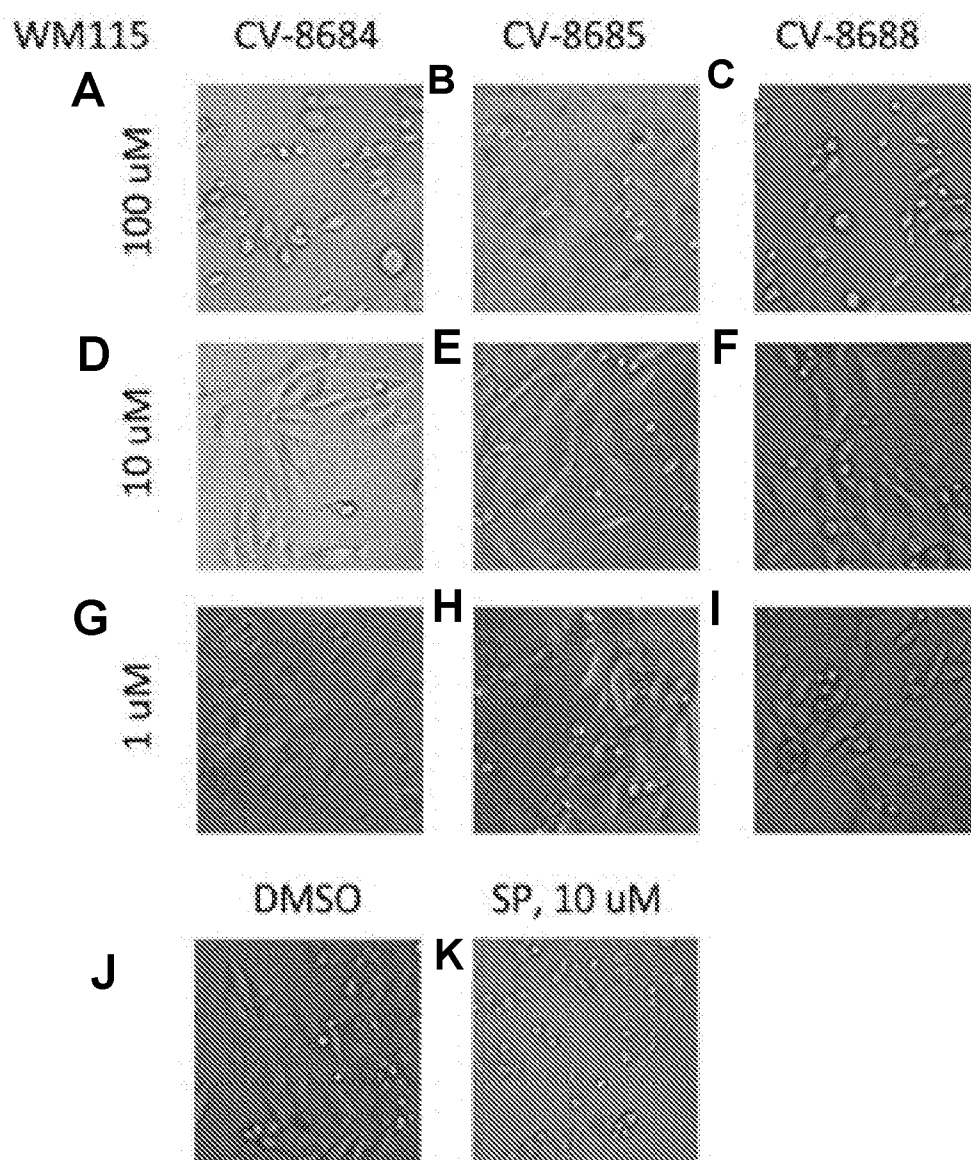
Figuras 7A-7K



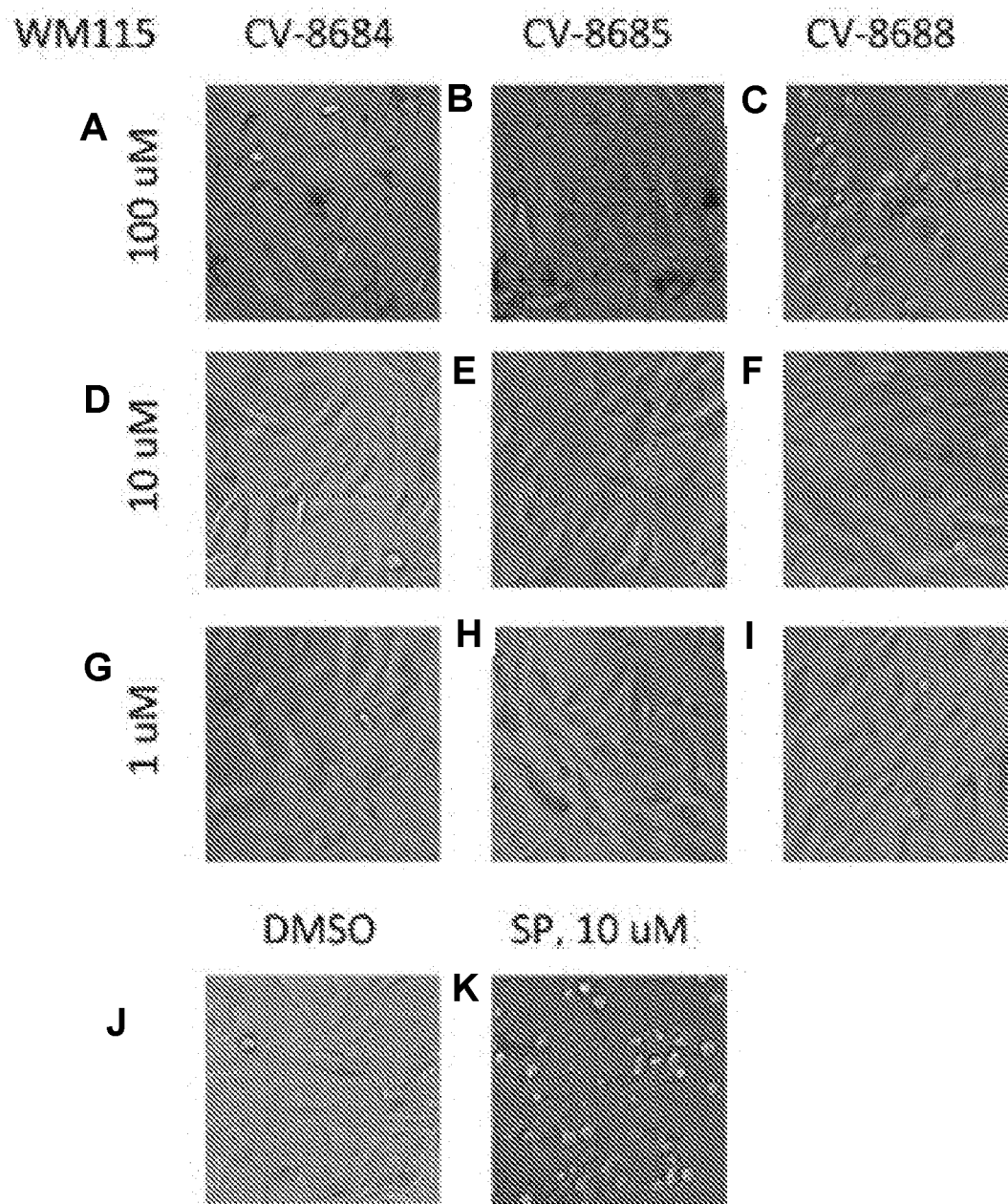
Figuras 8A-8K



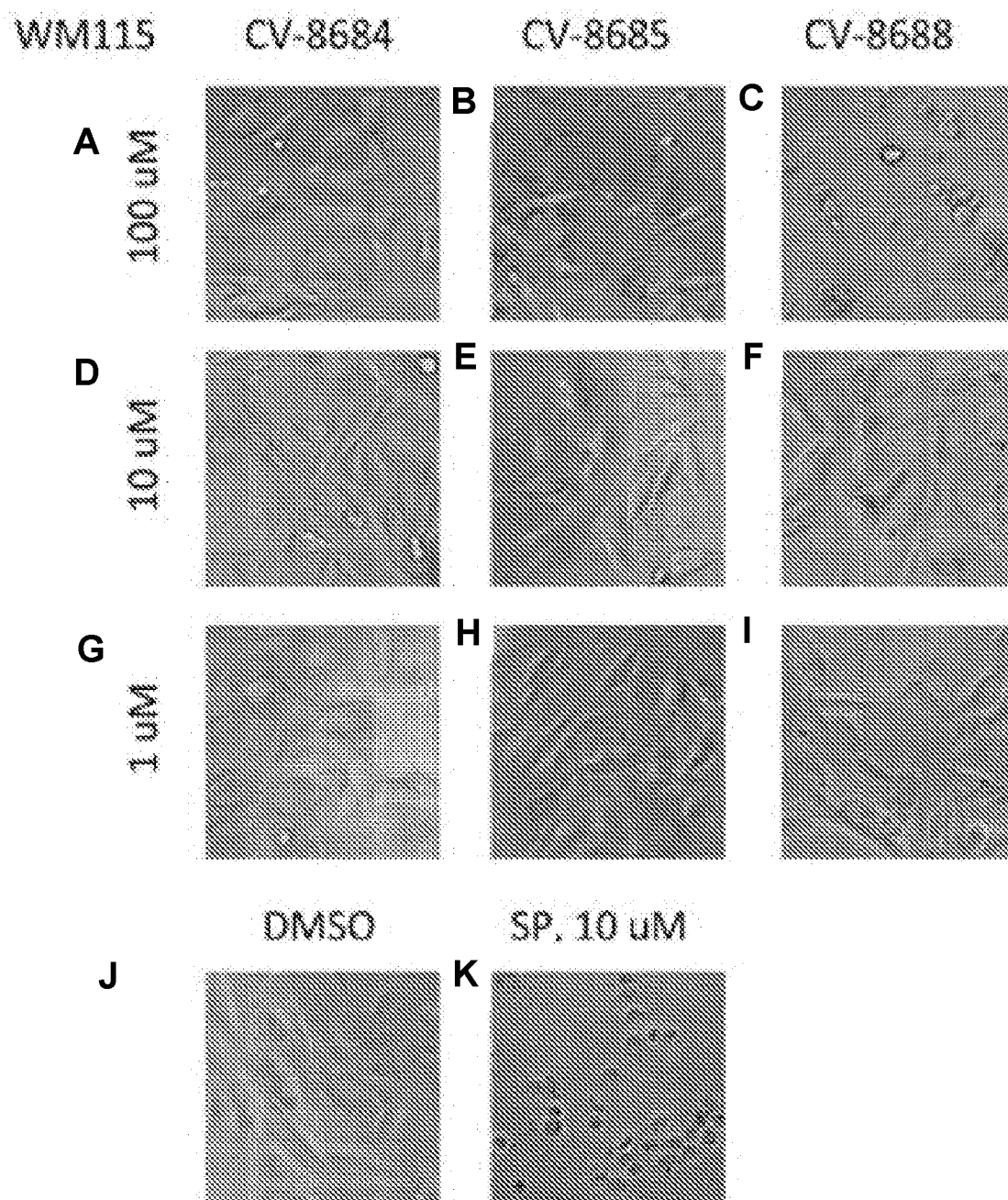
Figuras 9A-9K



Figuras 10A-10K



Figuras 11A-11K



Figuras 12A-12K

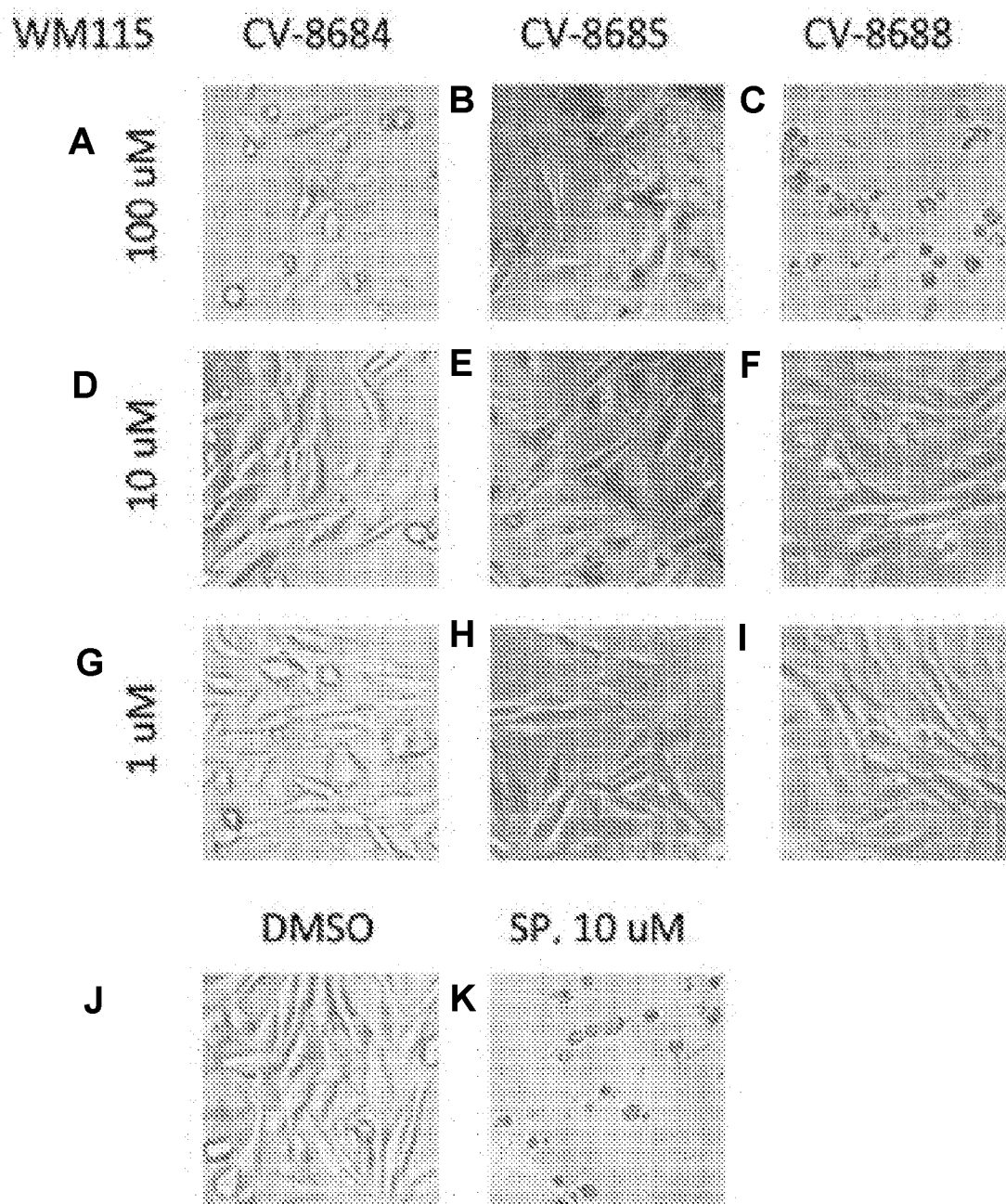


Figura 13A

Tiempo de ensayo	Dosis de CTG de MeWo	CV-8684 Viabilidad celular restante (%)				Dosis de CTG de WM115	CV-8684 Viabilidad celular restante (%)			
		n=1	n=2	Media	STD		n=1	n=2	Media	STD
6 h	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 h	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 h	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 h	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

Figura 13B

Tiempo de ensayo	Dosis de CTG de MeWo	CV-8685 Viabilidad celular restante (%)				Dosis de CTG de WM115	CV-8685 Viabilidad celular restante (%)			
		n=1	n=2	Media	STD		n=1	n=2	Media	STD
6 h	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 h	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 h	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 h	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

Figura 13C

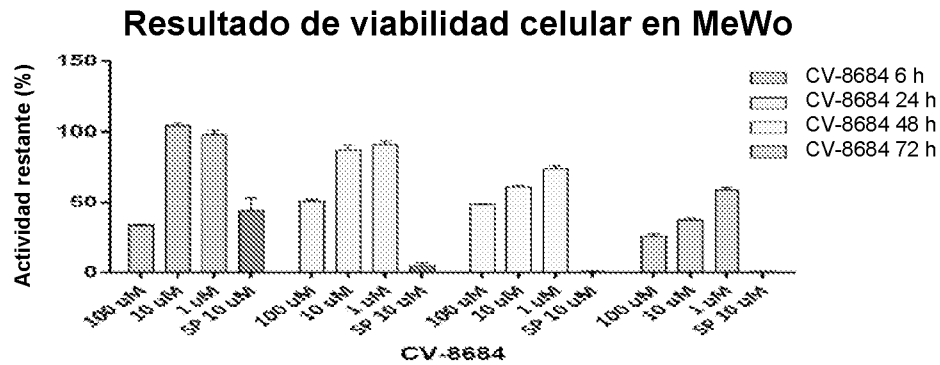
Tiempo de ensayo	Dosis de CTG de MeWo	CV-8688 Viabilidad de células restantes %				Dosis de CTG de WM115	CV-8688 Viabilidad celular restante (%)			
		n=1	n=2	Media	STD		n=1	n=2	Media	STD
6 h	100	3,33	2,70	3,02	0,45	100	63,25	42,41	52,83	14,74
	10	108,32	93,82	101,07	10,25	10	96,78	95,51	96,15	0,90
	1	101,76	94,50	98,13	5,13	1	97,87	99,50	98,69	1,15
24 h	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 h	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 h	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

Figura 13D

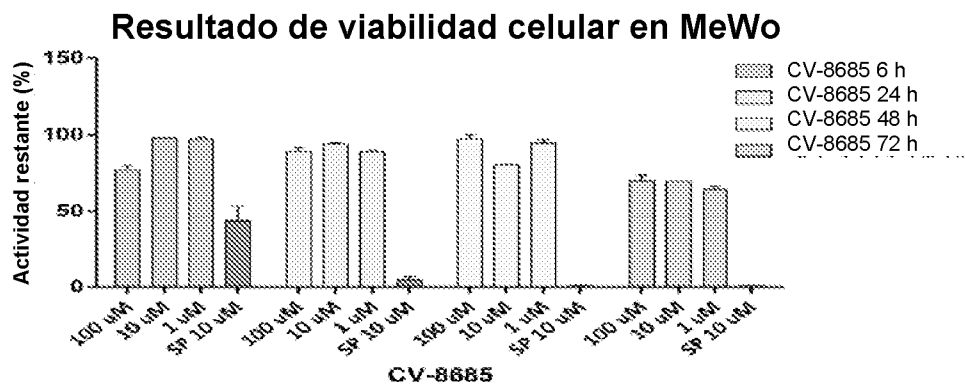
Tiempo de ensayo	Dosis de CTG de MeWo	Estaurosporina Viabilidad celular restante (%)				Dosis de CTG de WM115	Estaurosporina Viabilidad celular restante (%)			
		n=1	n=2	Media	STD		n=1	n=2	Media	STD
6 h	10	33,39	53,30	43,34	14,08	10	55,46	51,29	53,38	2,95
24 h	10	6,94	2,53	4,73	3,11	10	1,29	1,16	1,23	0,09
48 h	10	0,84	0,61	0,73	0,16	10	0,54	0,55	0,55	0,00
72 h	10	0,62	0,63	0,63	0,01	10	2,65	2,78	2,71	0,09

Figuras 13E-13G

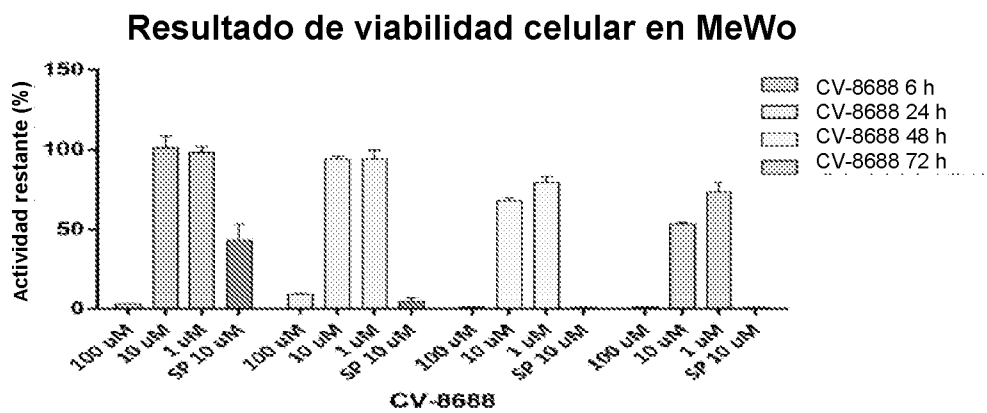
E



F

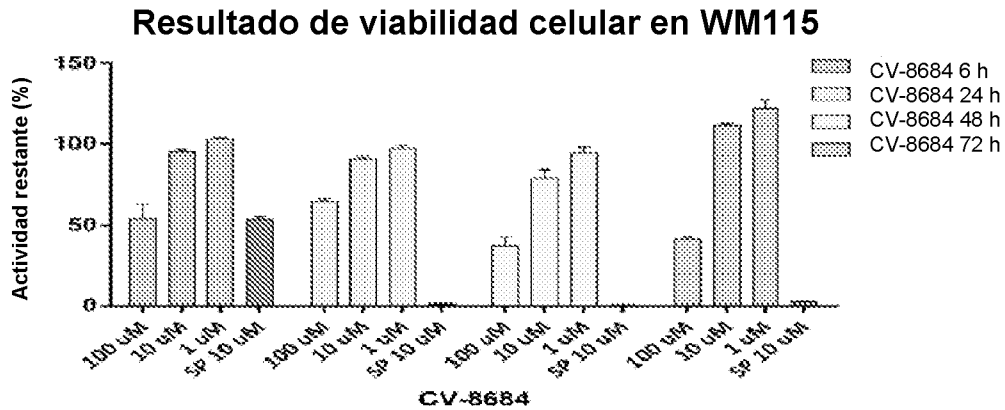


G

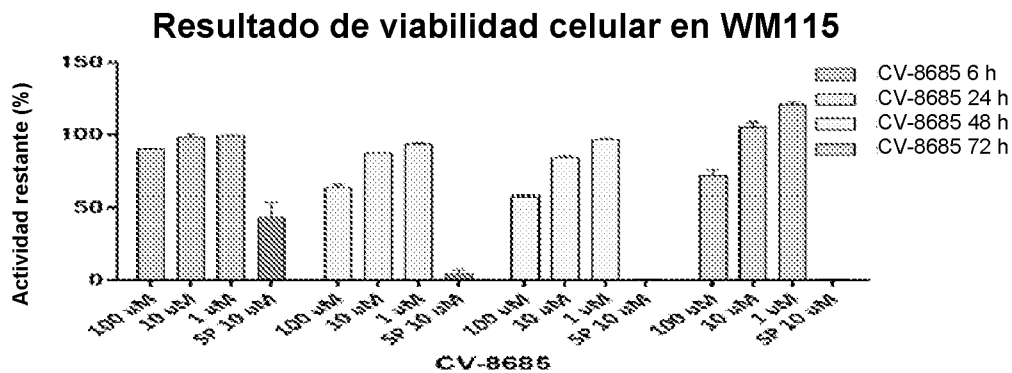


Figuras 13H-13J

H



I



J

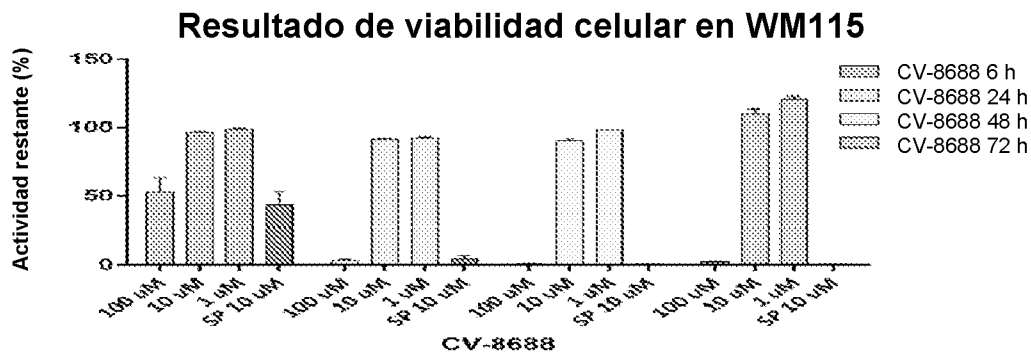


Figura 13K

Compuesto	Viabilidad celular (% de células viables)					
	Línea celular de MeWo			Línea celular de WM115		
	24 h	48 h	72 h	24 h	48 h	72 h
Malassezina (100 uM)	51 %	49 %	25 %	64 %	37 %	41 %
Indolocarbazol (100 uM)	90 %	97 %	70 %	64 %	57 %	72 %
Compuesto II (100 uM)	9 %	1 %	1 %	3 %	1 %	2 %
PC con Estaurosporina (10 uM)	5 %	1 %	1 %	1 %	1 %	3 %

Figura 14A

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

Figura 14B

Tiempo de ensayo	Dosis de LDH de MeWo	CV-8685 Nivel de LDH (%)				Dosis de LDH de WM115	CV-8685 Nivel de LDH (%)			
		n=1	n=2	Media	STD		n=1	n=2	Media	STD
6 h	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	10	94,90	95,37	95,14	0,33
	1	92,44	92,44	92,44	0,01	1	87,67	95,81	91,74	5,76
24 h	100	142,99	104,54	123,76	27,19	100	213,02	234,98	224,00	15,53
	10	92,63	89,87	91,25	1,95	10	150,57	137,26	143,91	9,41
	1	101,78	105,21	103,49	2,43	1	94,63	109,59	102,11	10,58
48 h	100	125,18	122,77	123,97	1,70	100	222,63	224,48	223,55	1,30
	10	108,43	111,15	109,79	1,92	10	143,57	113,47	128,52	21,28
	1	114,41	112,82	113,62	1,12	1	86,50	105,02	95,76	13,10
72 h	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	10	175,23	171,15	173,19	2,89
	1	77,93	74,86	76,40	2,17	1	147,09	146,42	146,75	0,47

Figura 14C

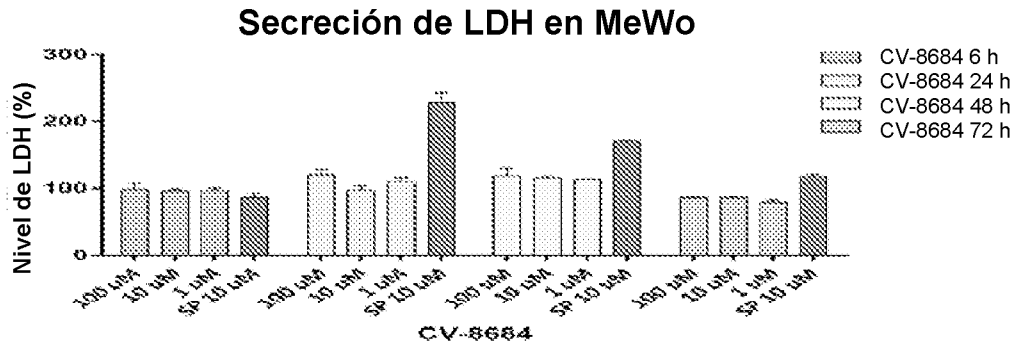
Tiempo de ensayo	Dosis de LDH de MeWo	CV-8688 Nivel de LDH (%)				Dosis de LDH de WM115	CV-8688 Nivel de LDH (%)			
		n=1	n=2	Media	STD		n=1	n=2	Media	STD
6 h	100	127,34	101,13	114,23	18,53	100	113,29	126,97	120,13	9,68
	10	89,41	84,00	86,70	3,82	10	95,94	90,02	92,98	4,18
	1	92,90	92,24	92,57	0,47	1	93,07	89,66	91,36	2,41
24 h	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	10	115,00	102,91	108,96	8,55
	1	104,70	103,26	103,98	1,02	1	99,80	113,95	106,87	10,00
48 h	100	142,36	143,69	143,03	0,94	100	240,09	276,78	258,43	25,95
	10	97,14	103,68	100,41	4,63	10	71,88	98,21	85,04	18,62
	1	107,03	111,80	109,42	3,37	1	91,02	93,94	92,48	2,07
72 h	100	104,85	111,78	108,32	4,90	100	262,85	264,08	263,47	0,87
	10	72,51	79,43	75,97	4,89	10	108,06	111,37	109,71	2,34
	1	78,39	75,68	77,03	1,91	1	148,60	143,38	145,99	3,69

Figura 14D

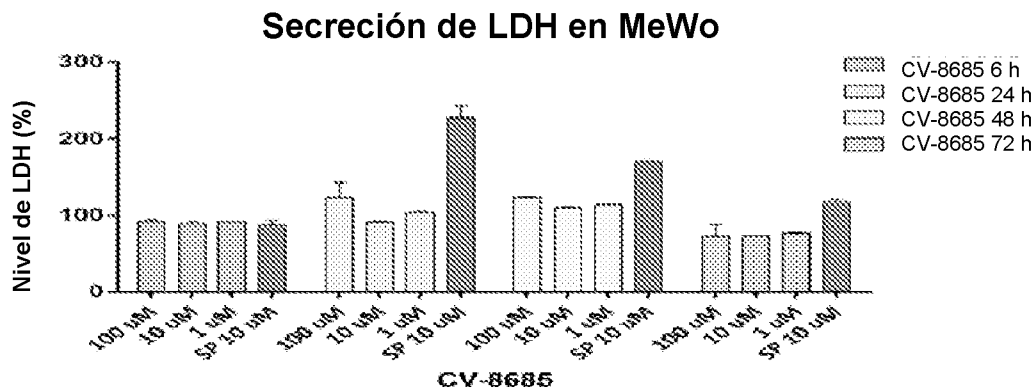
Tiempo de ensayo	Dosis de LDH de MeWo	Estaurosporina Nivel de LDH (%)				Dosis de LDH de WM115	Estaurosporina Nivel de LDH (%)			
		n=1	n=2	Media	STD		n=1	n=2	Media	STD
6 h	10	80,82	93,35	87,09	8,36	100	96,35	101,90	99,13	3,92
24 h	10	243,09	212,50	227,80	21,63	100	394,99	371,77	383,38	16,42
48 h	10	170,60	171,35	170,98	0,53	100	207,76	185,08	196,42	16,04
72 h	10	114,91	122,19	118,55	5,15	100	158,74	233,56	196,15	52,91

Figuras 14E-14G

E



F



G

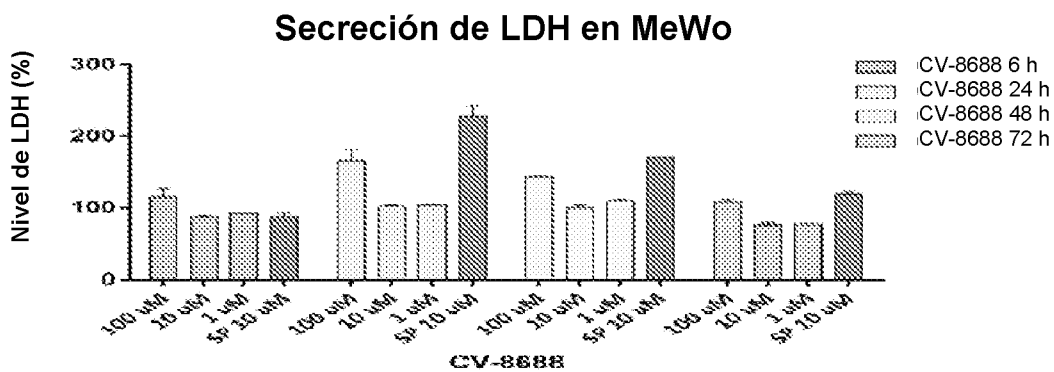


Figura 14K

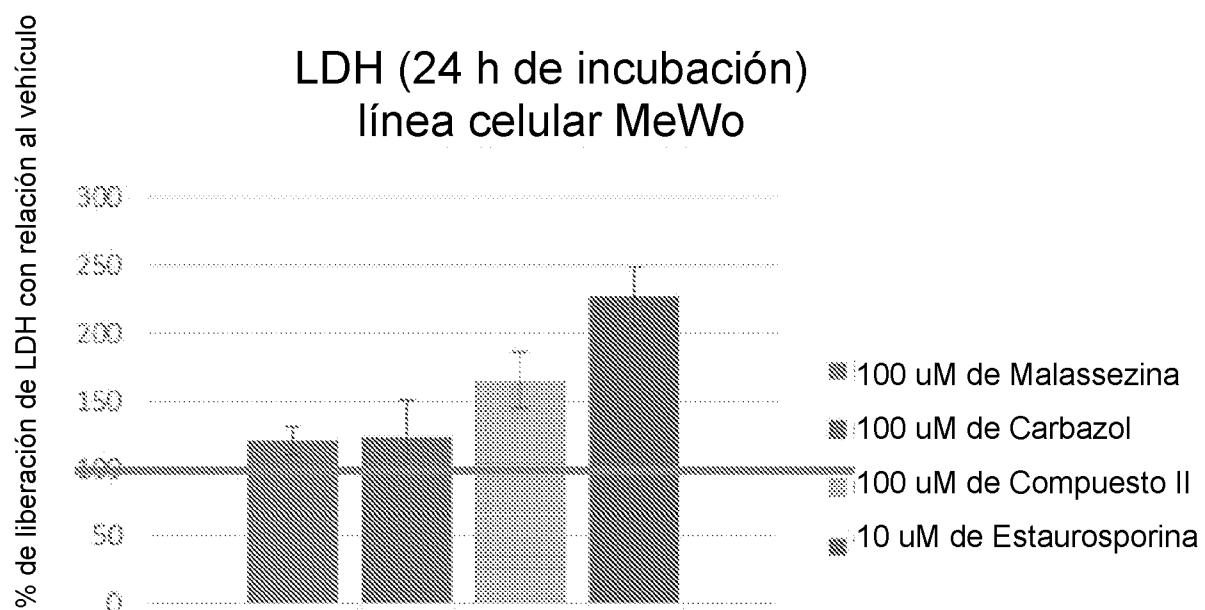


Figura 14L

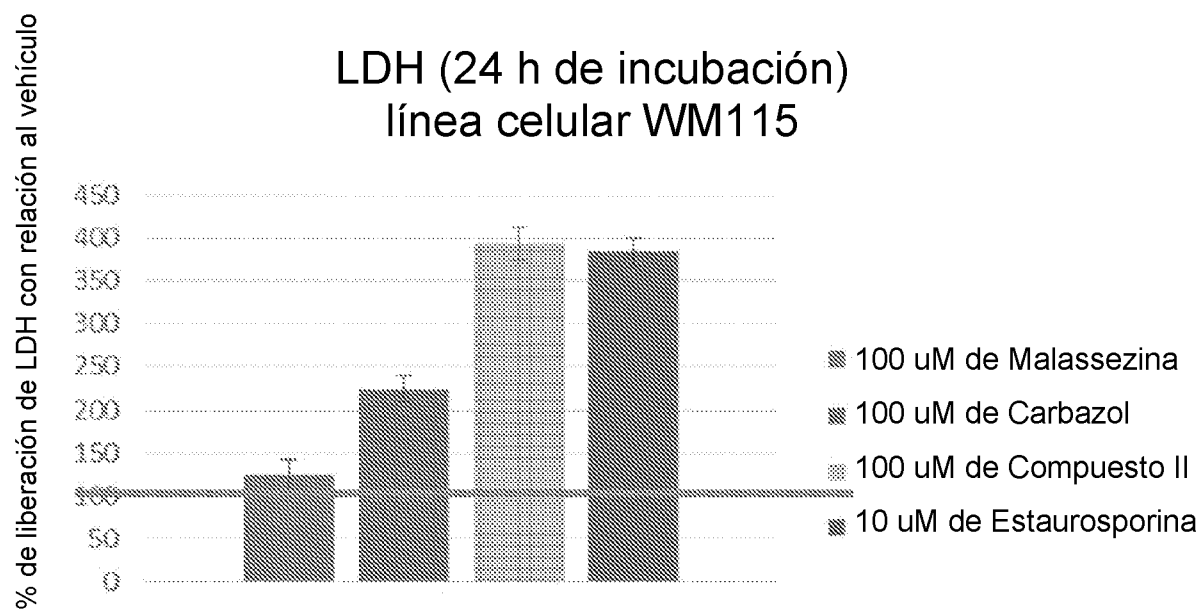


Figura 15A

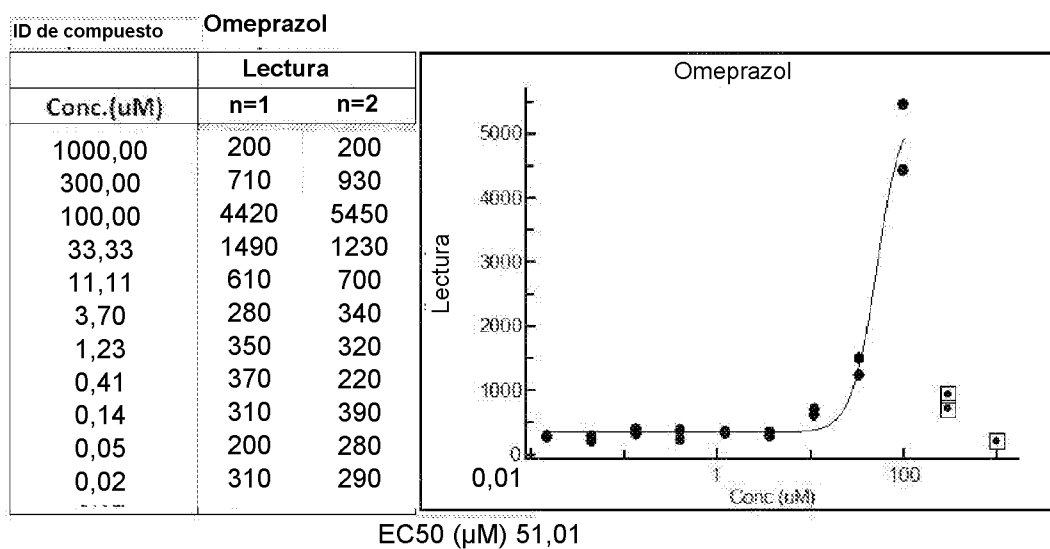


Figura 15B

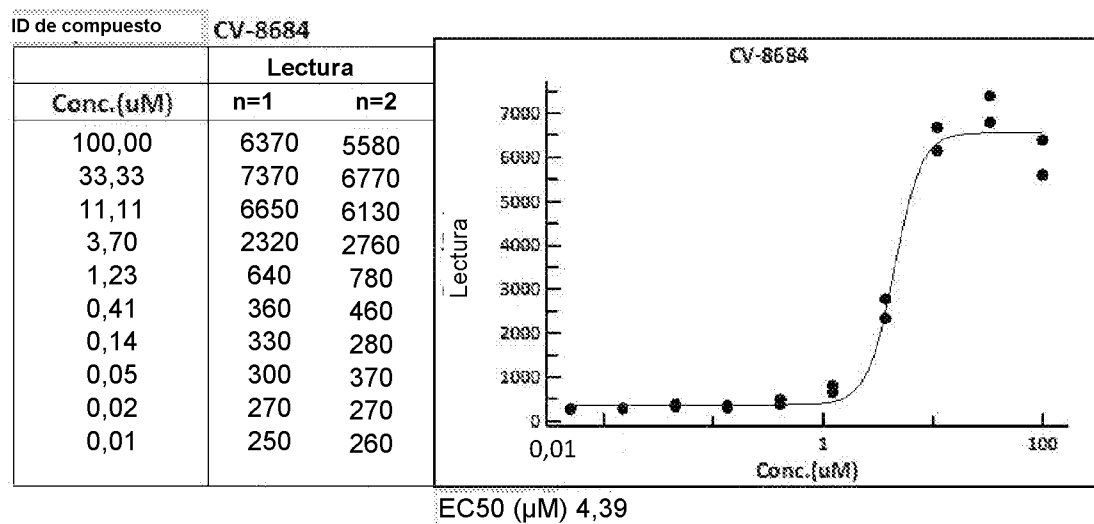


Figura 15C

ID de compuesto CV-8685

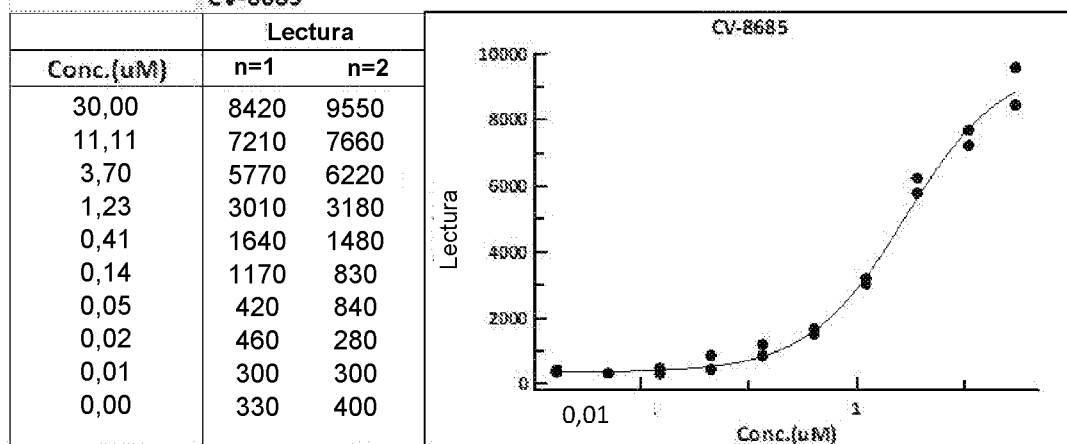


Figura 15D

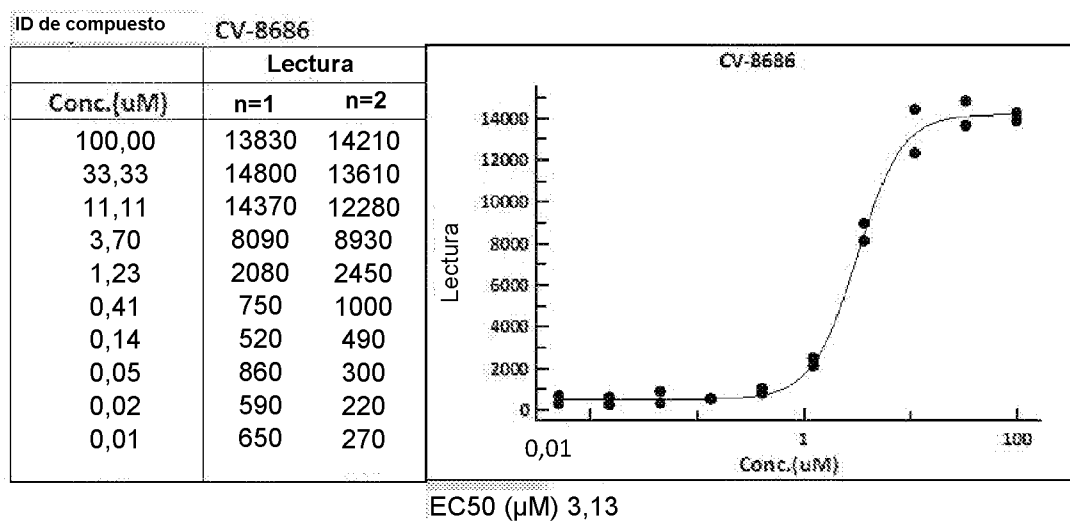


Figura 15E

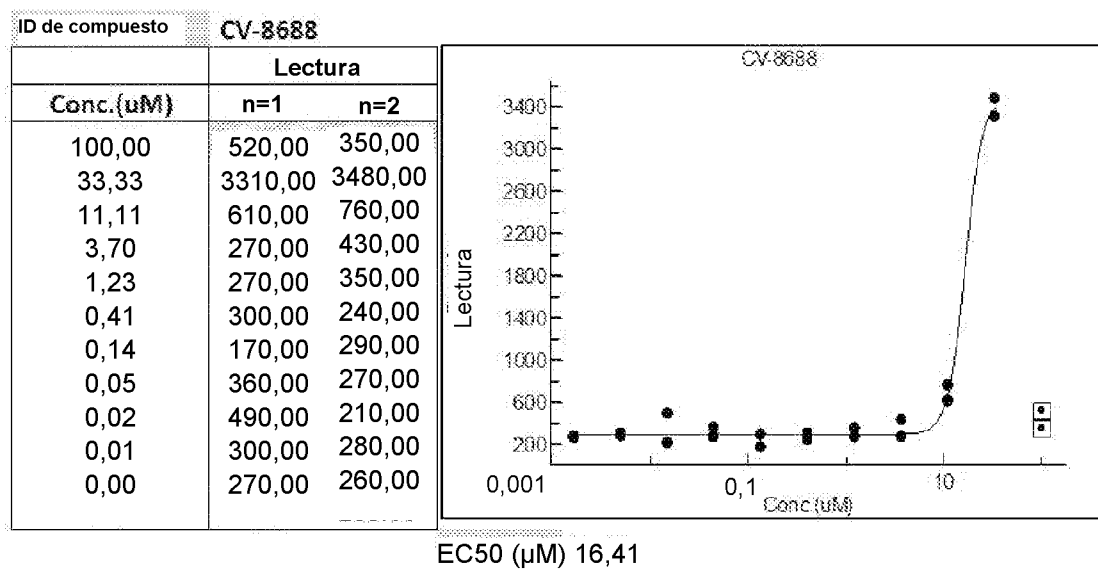


Figura 15F

Código Cpds	ID de compuesto	EC50 (uM)
PC	Omeprazol	51,01
Cpd01	CV-8684	4,39
Cpd02	CV-8685	2,80
Cpd03	CV-8686	3,13
Cpd04	CV-8688	16,41

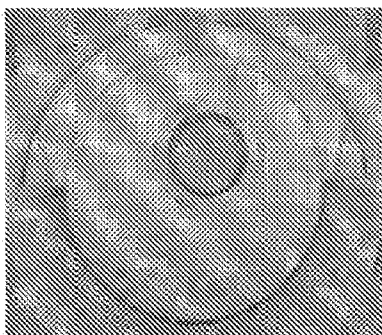
Figuras 16A-16E

Controles

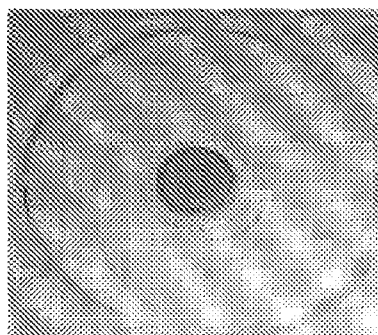
Día 0

Día 7

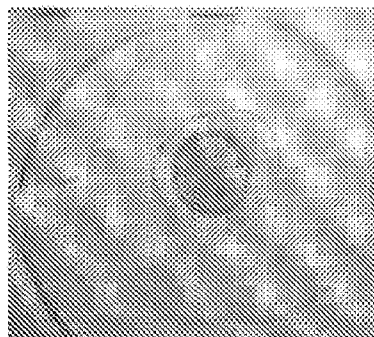
A Tejidos no tratados



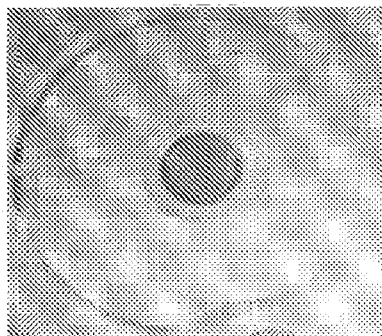
B Tejidos tratados con control negativo
(agua desionizada estéril)



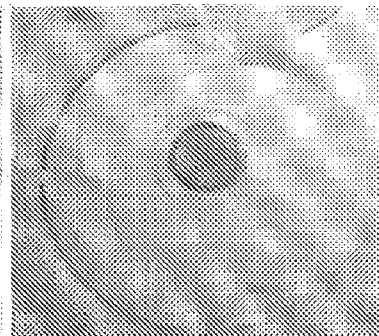
C Tejidos tratados con control positivo
(1 % de ácido kójico)



D Tejidos tratados con control con vehículo (DMSO) 0,2 %

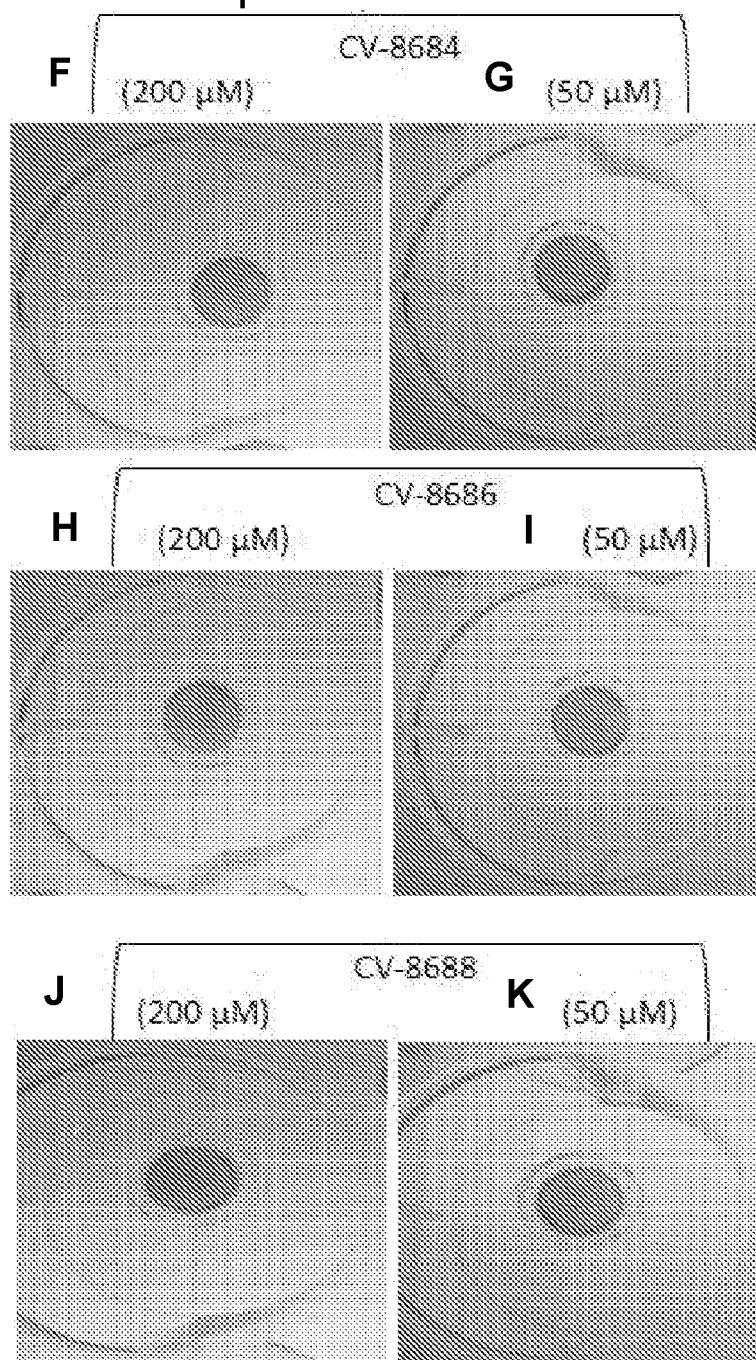


E 0,05 %



Figuras 16F-16K

Tejidos tratados con el artículo de prueba – Día 7



Figuras 17A-17E

Controles

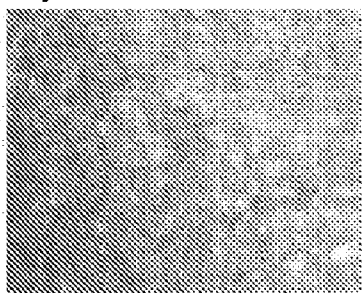
Día 0

Día 7

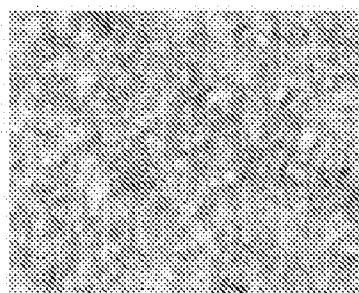
Tejidos no tratados

Tejidos tratados con control negativo
(agua desionizada estéril)

A

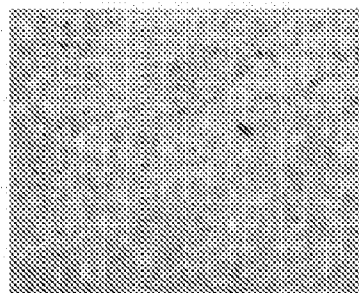


B



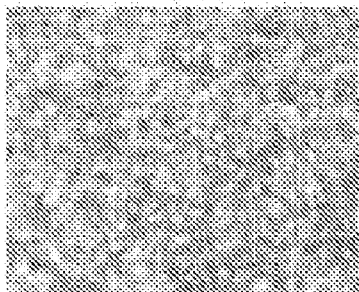
Tejidos tratados con control
positivo (1 % de ácido kójico)

C

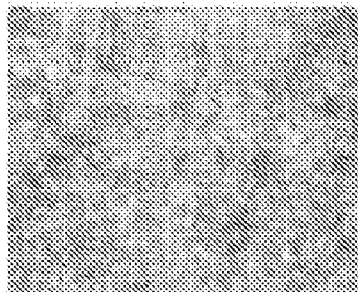


Tejidos tratados con control con vehículo
0,2 % (DMSO) 0,05 %

D

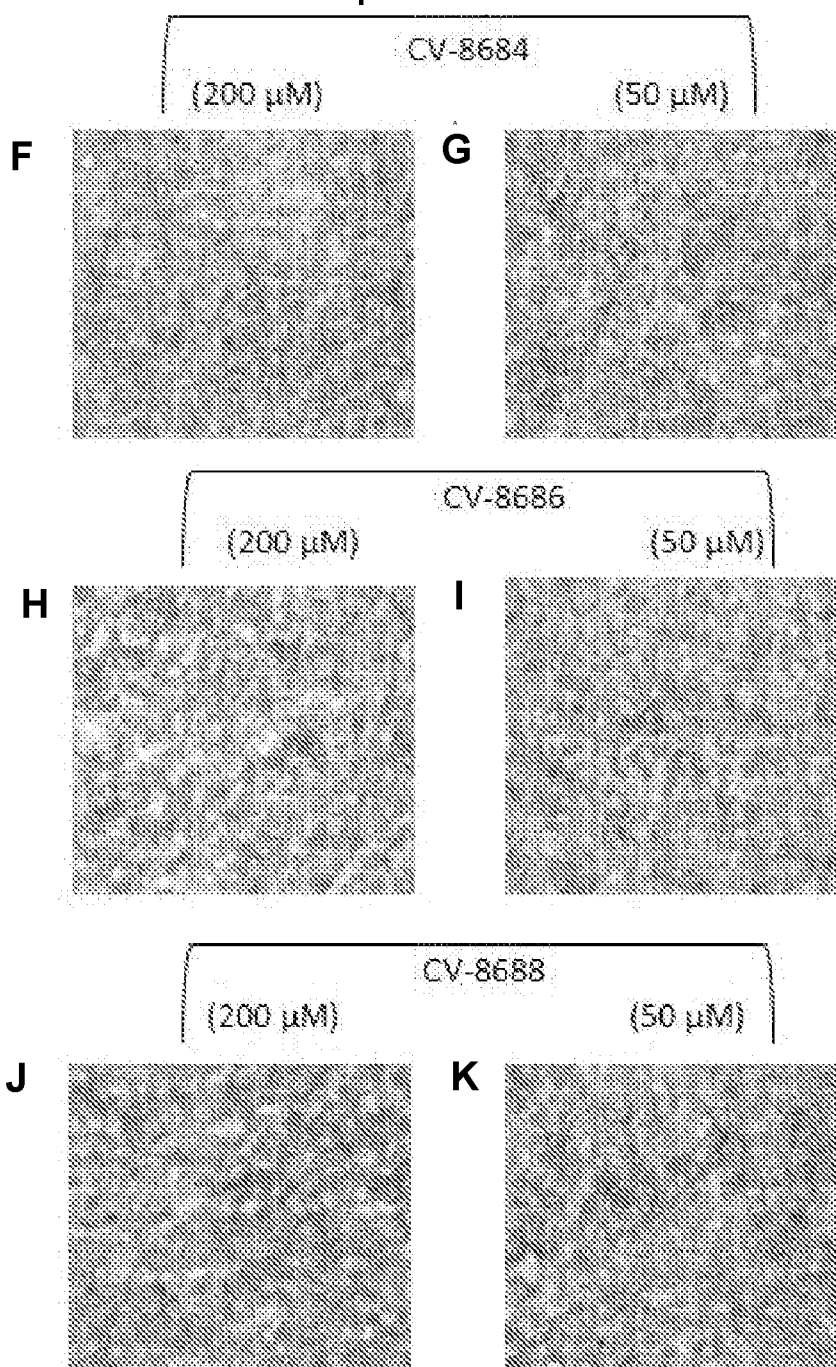


E

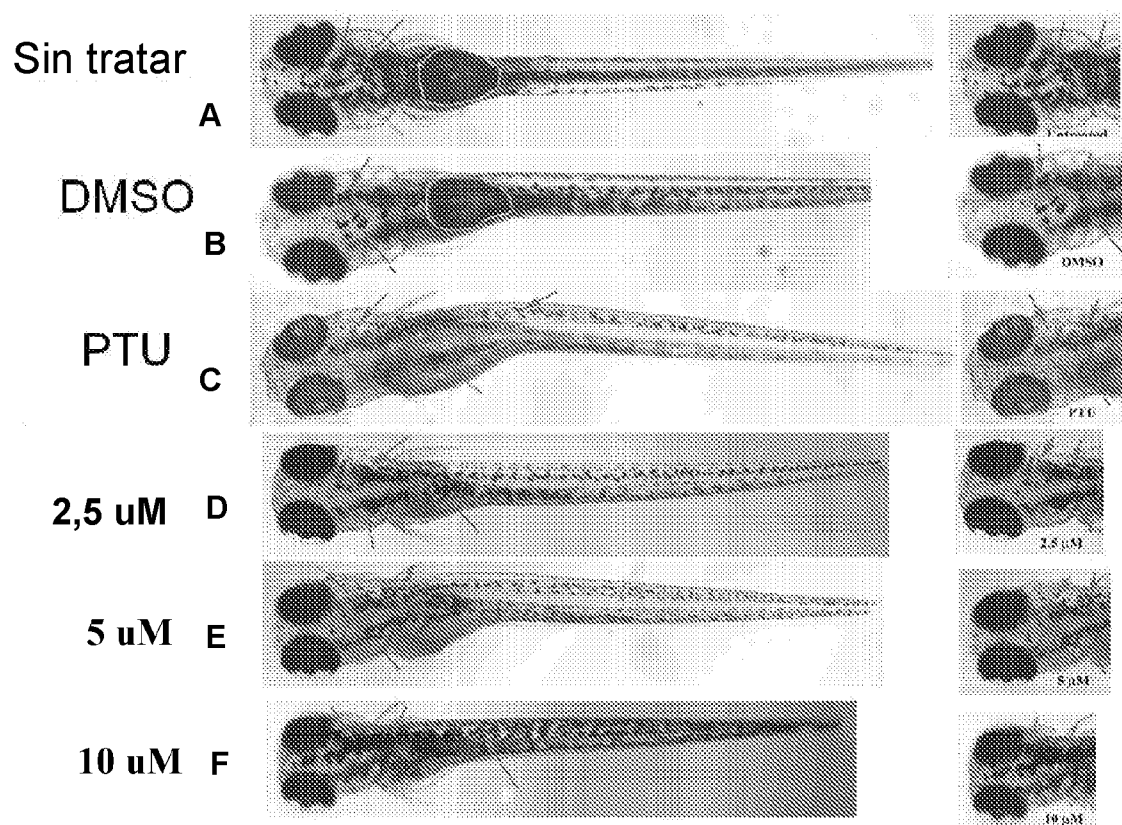


Figuras 17F-17K

Tejidos tratados con el artículo
de prueba – Día 7



Figuras 18A-18F



Figuras 19A-19F

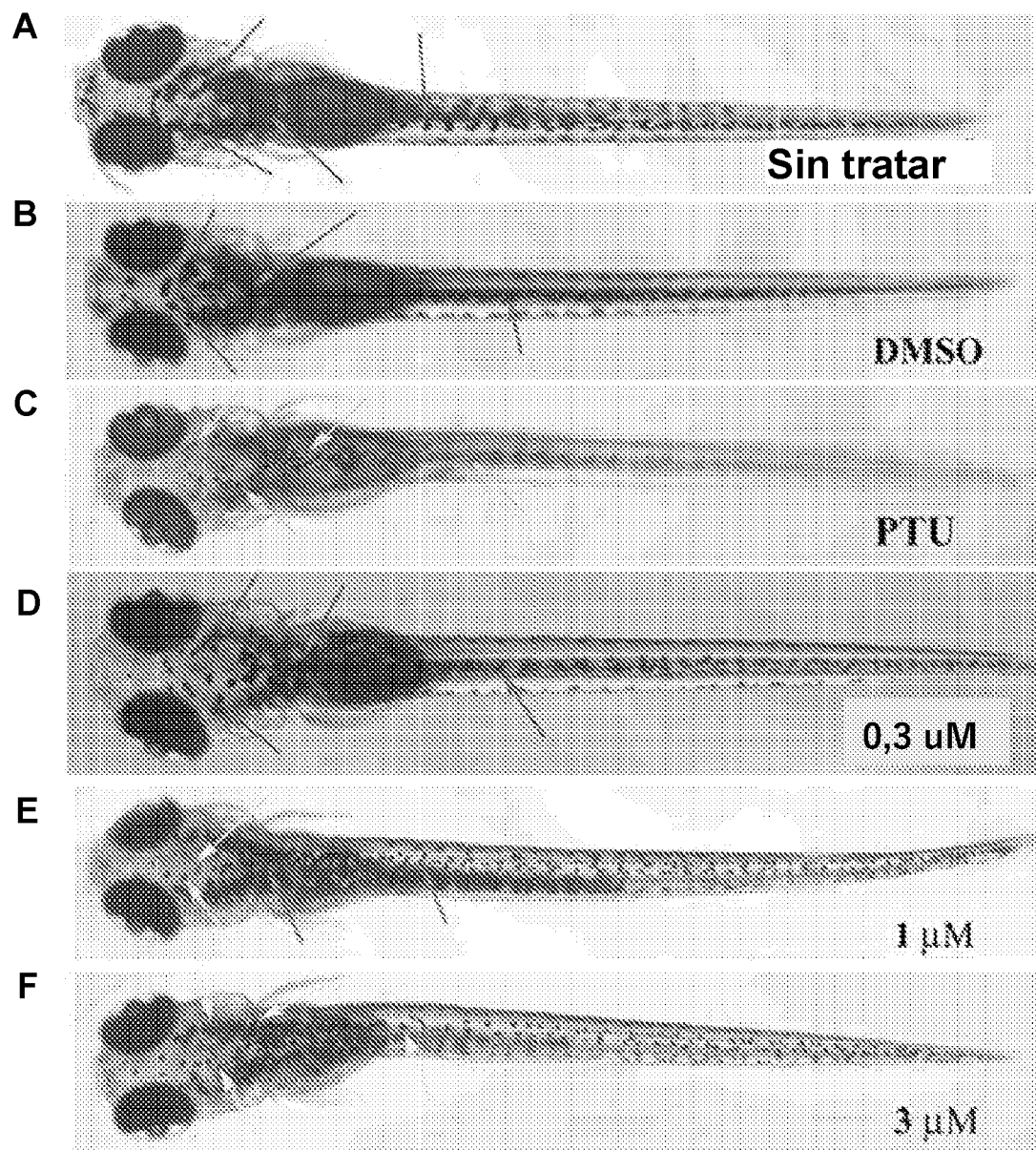


Figura 20

Condición	Cantidad de pez cebra con disminución de la pigmentación de la piel				% de pez cebra con disminución de la pigmentación de la piel
	Pocillo 1	Pocillo 2	Pocillo 3	Total	
Sin tratar	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

Figuras 21A-21E

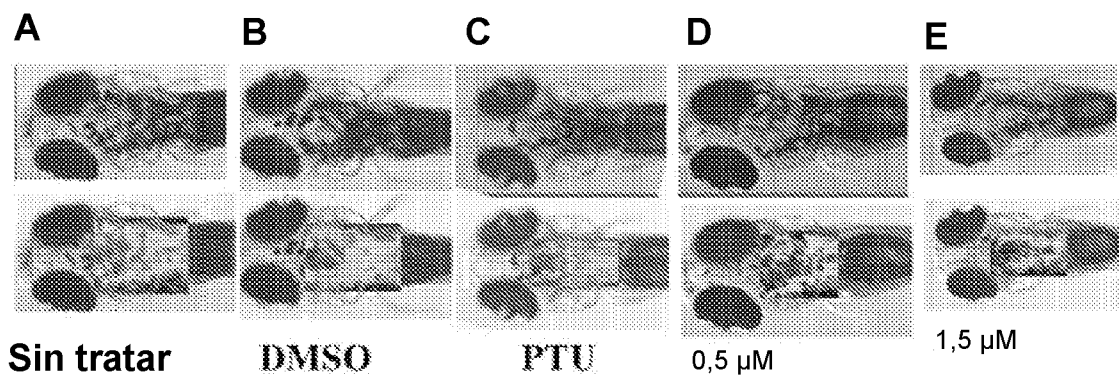


Figura 22A

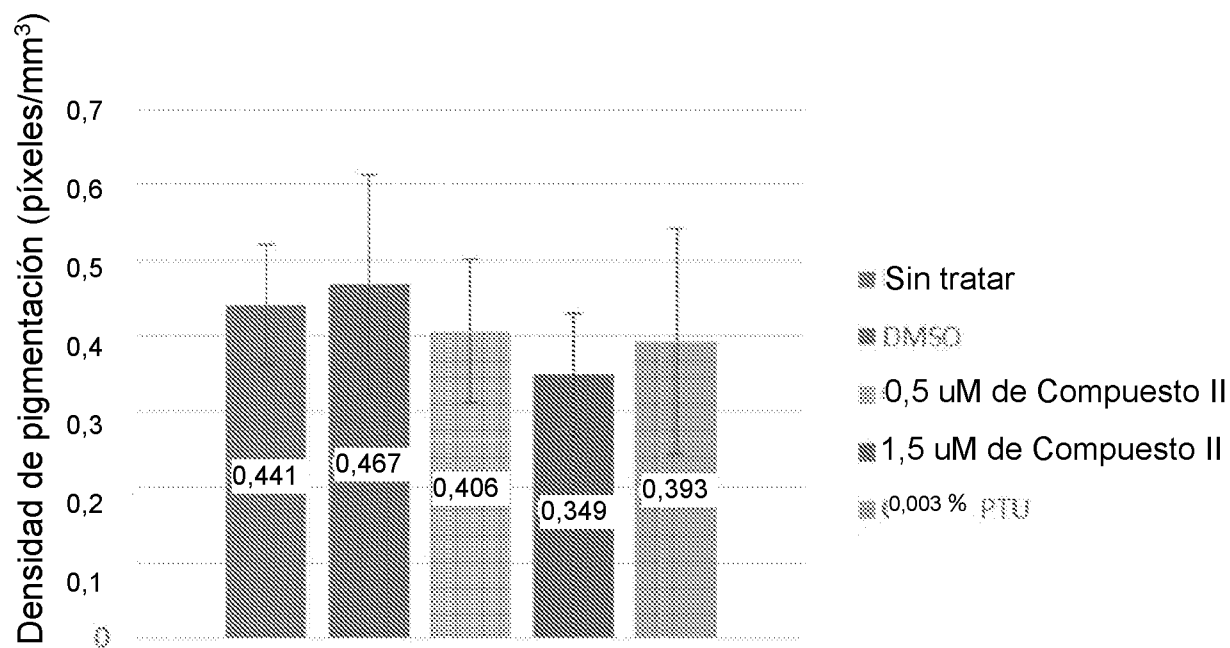


Figura 22B

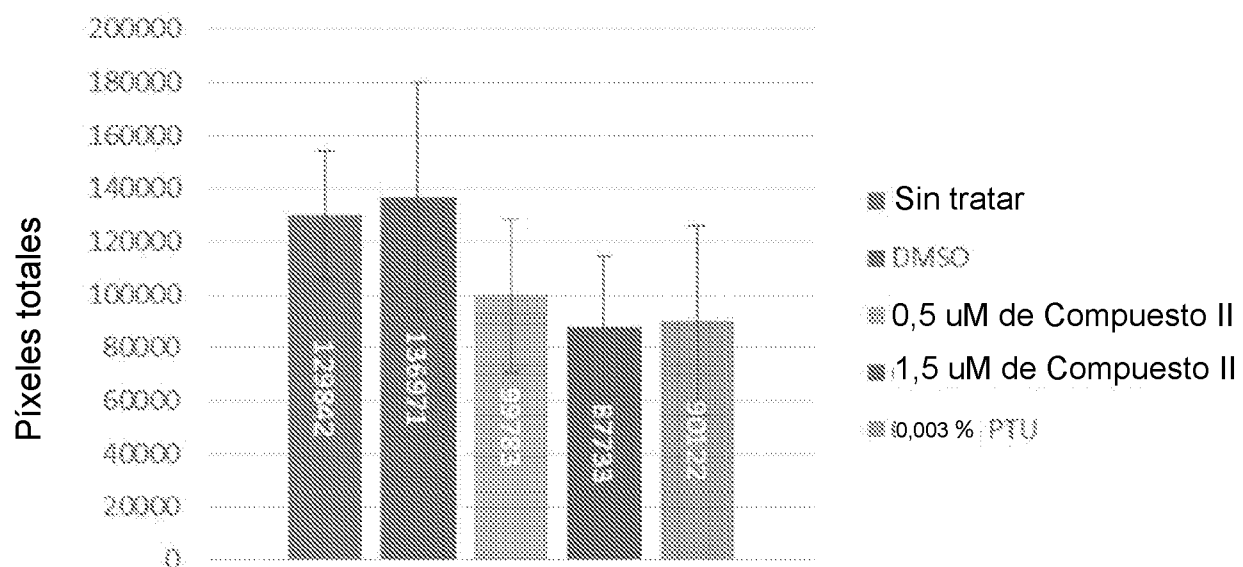


Figura 23A

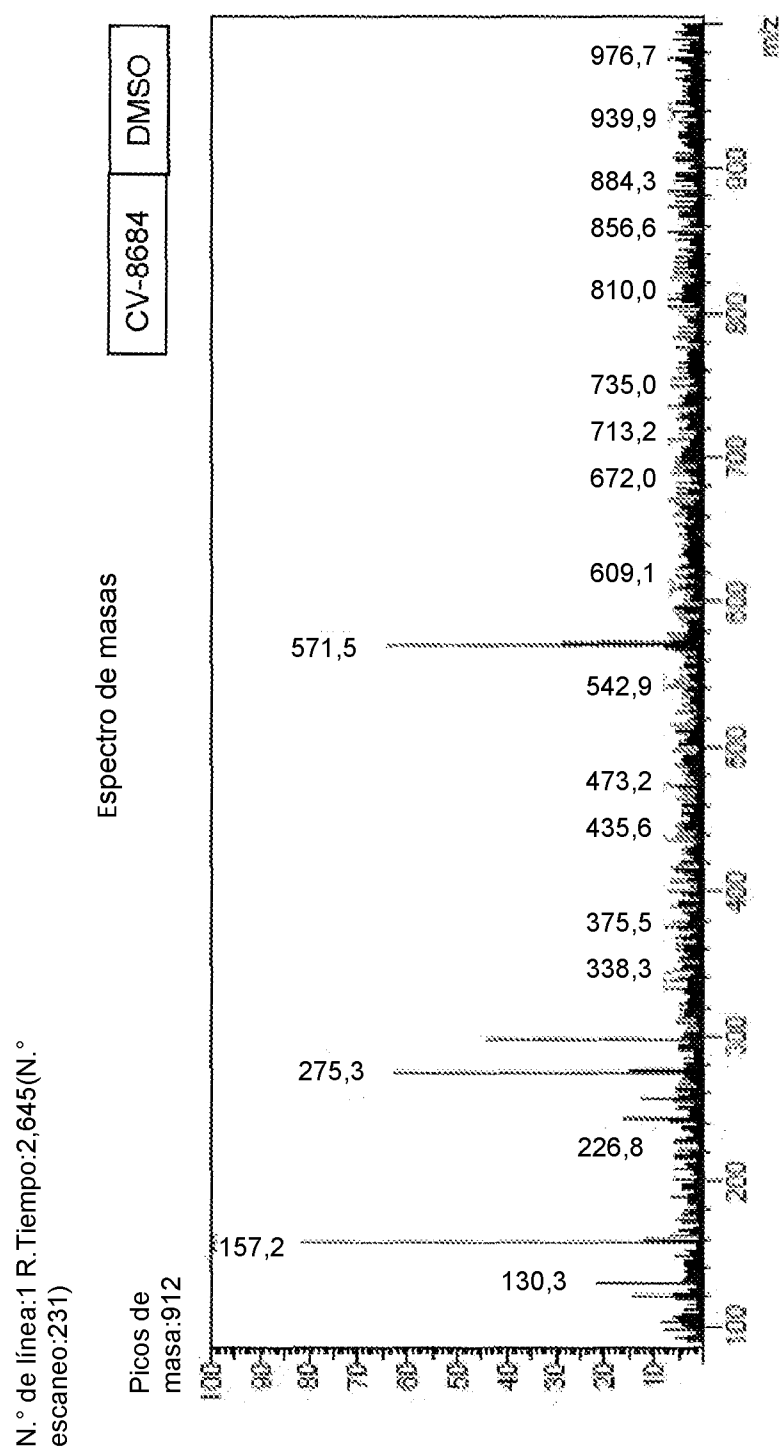


Figura 23B

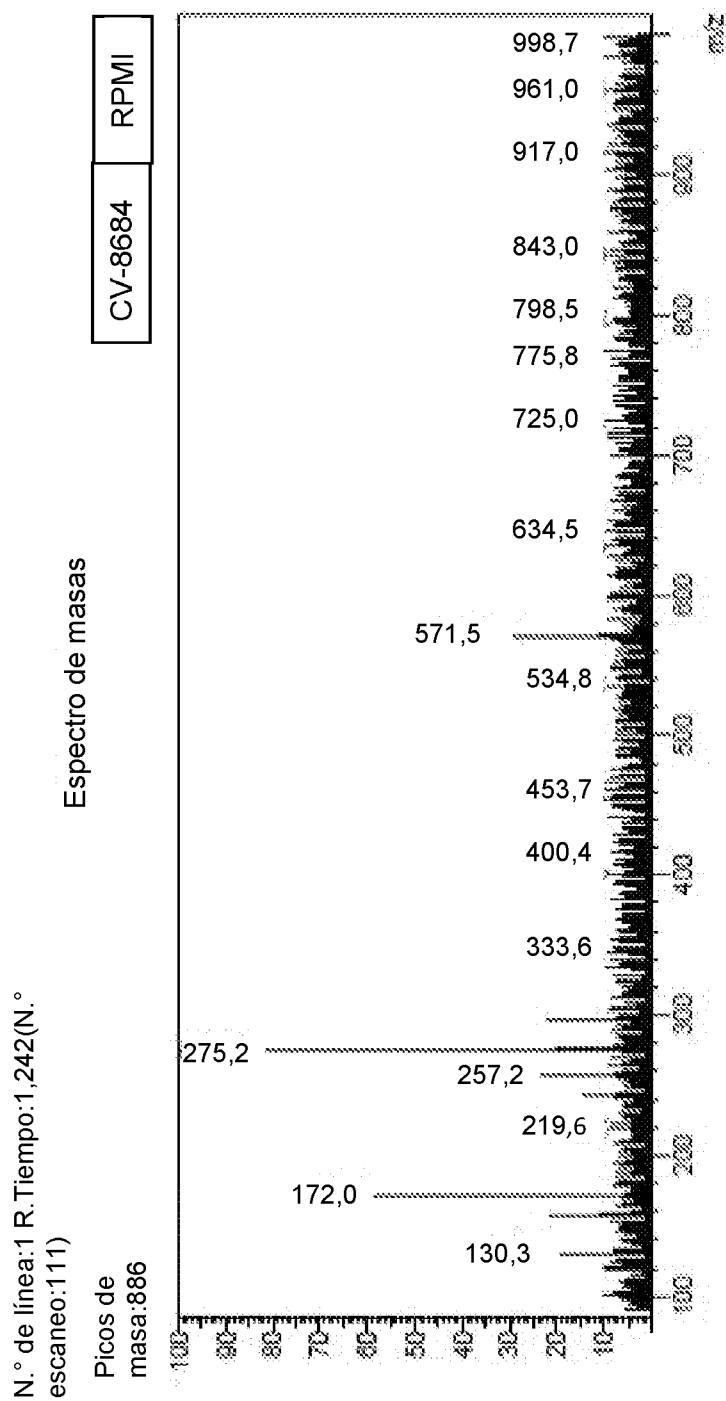


Figura 23C

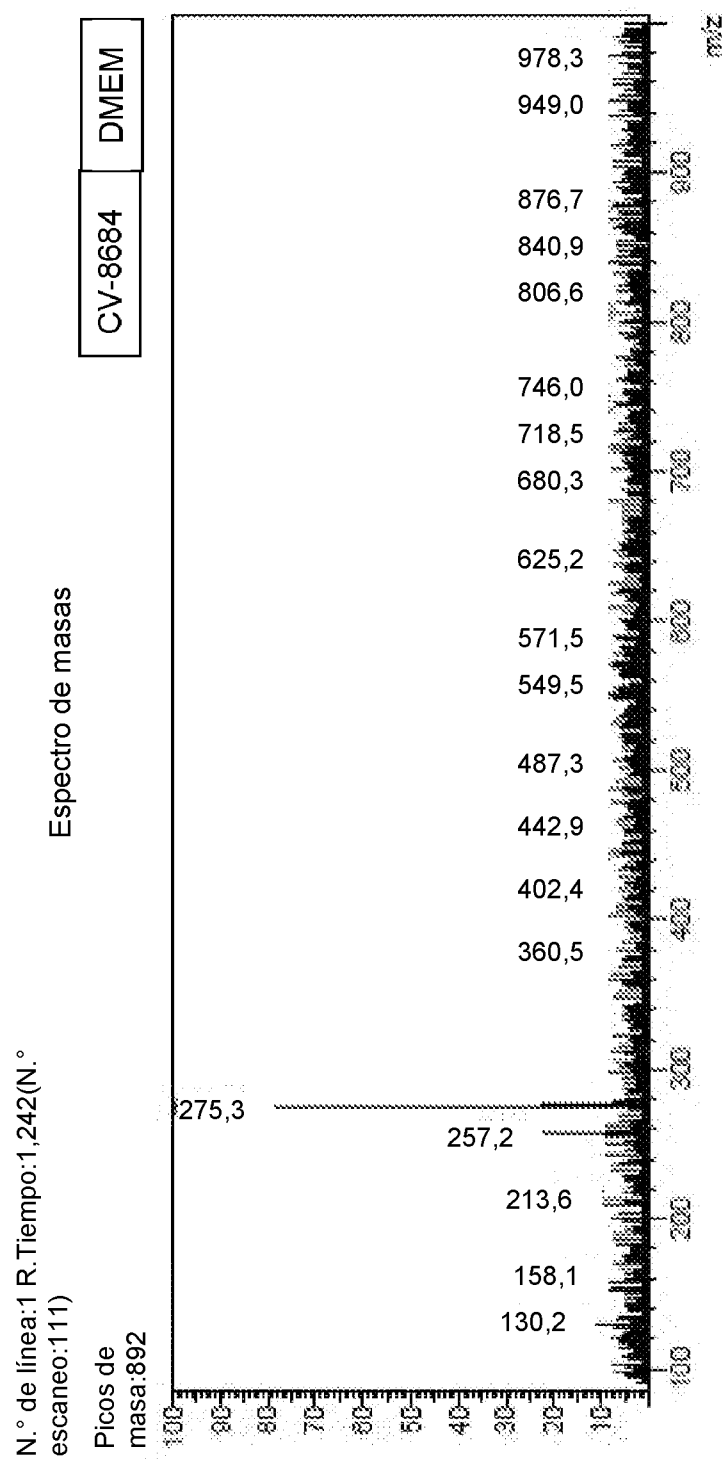


Figura 23D

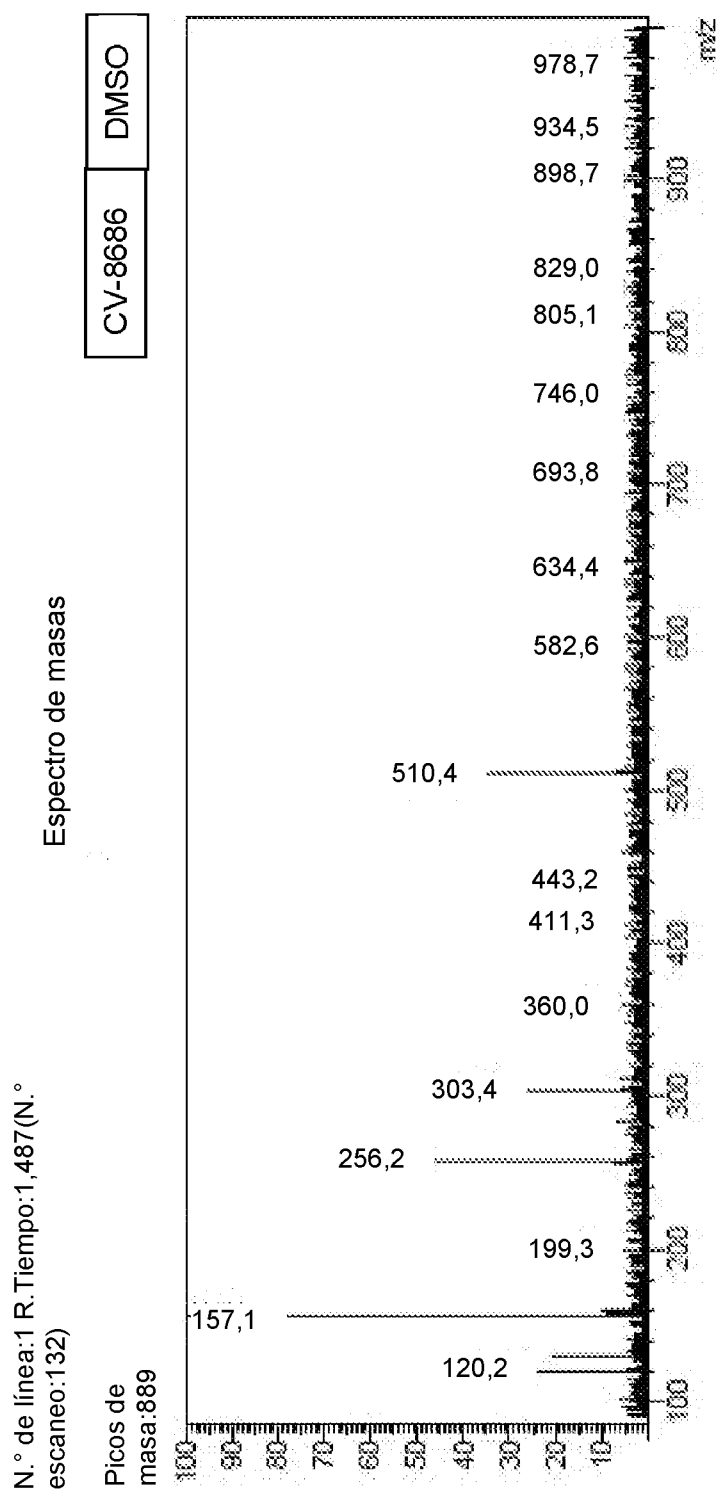


Figura 23E

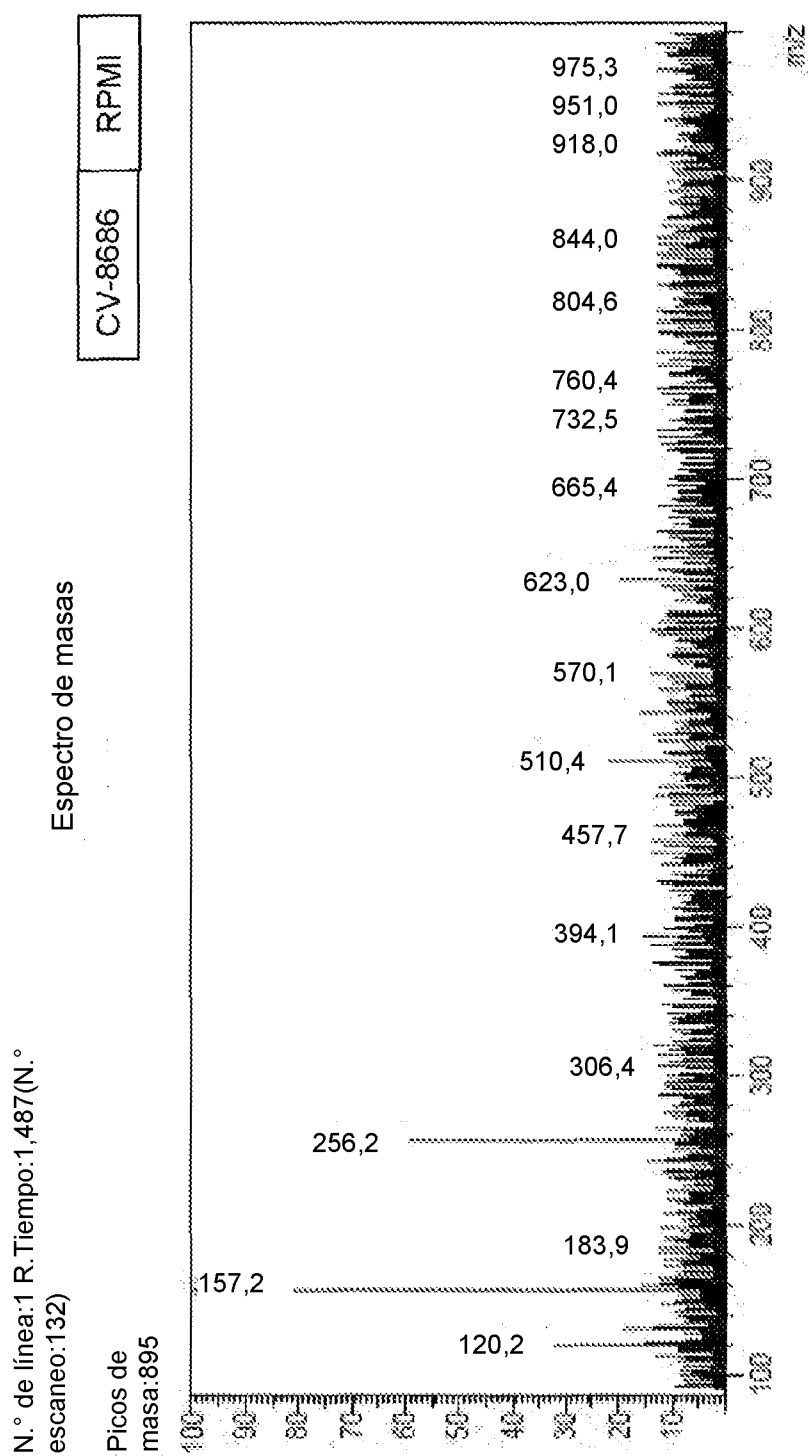


Figura 23F

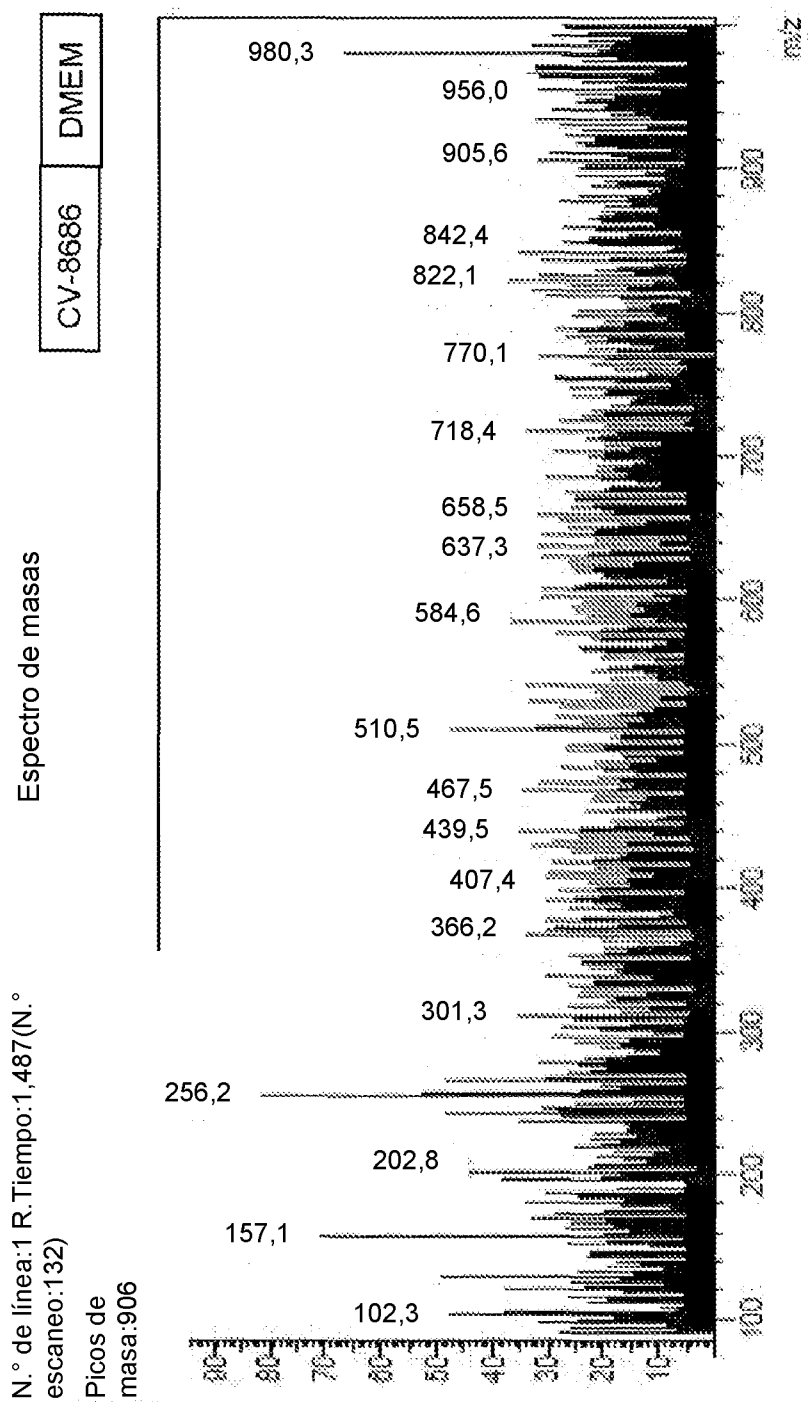


Figura 23G

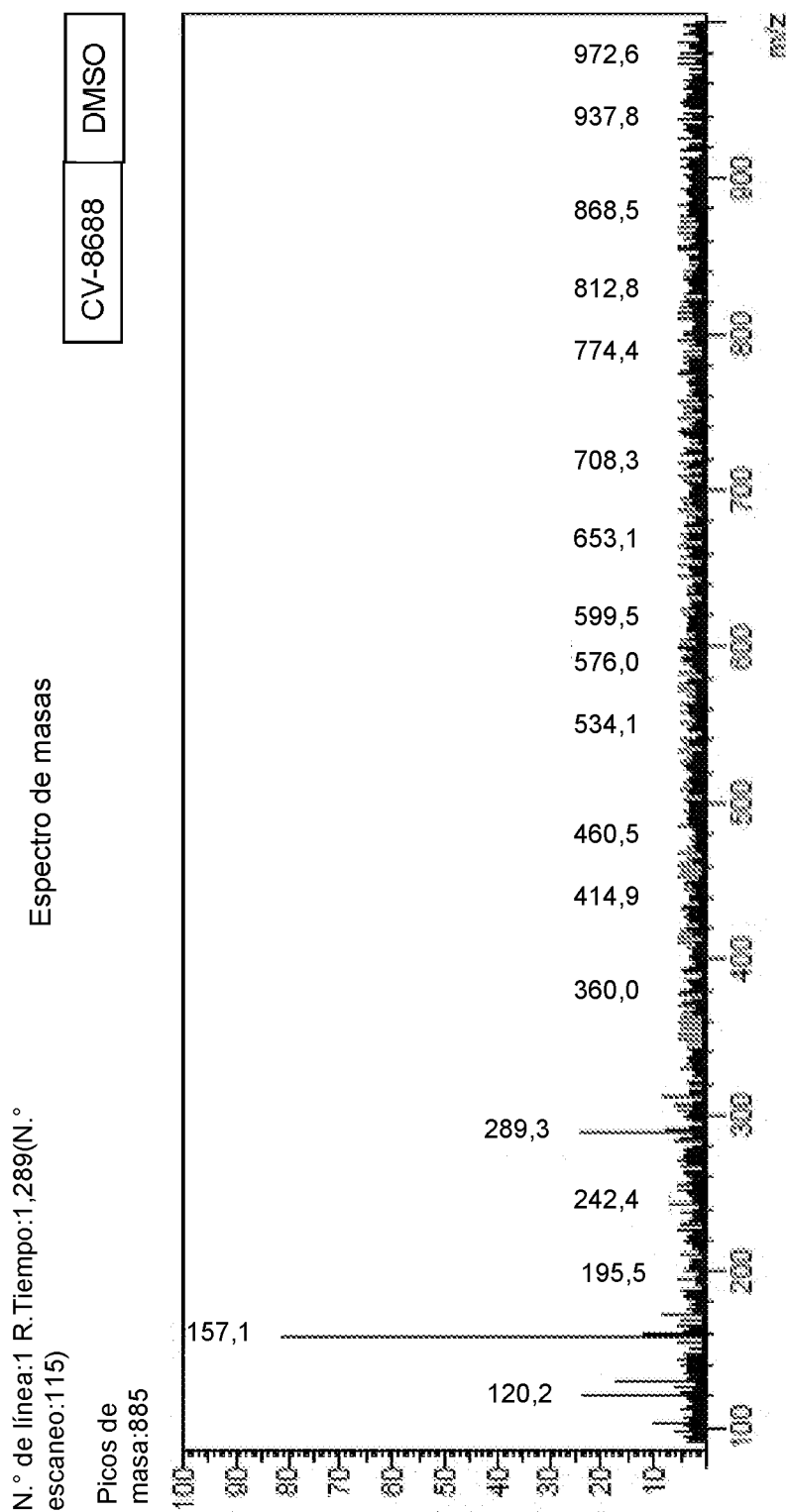


Figura 23H

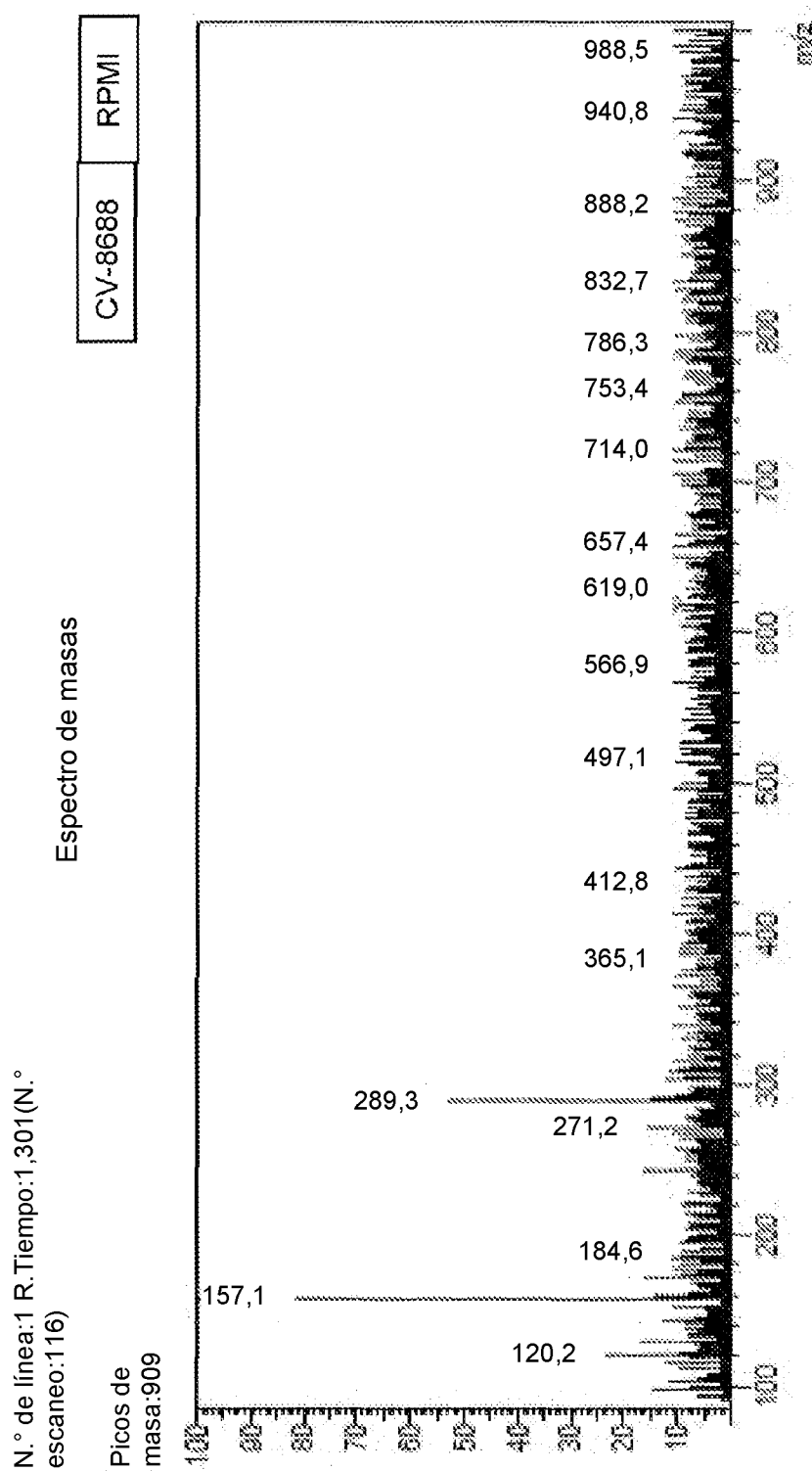


Figura 23I

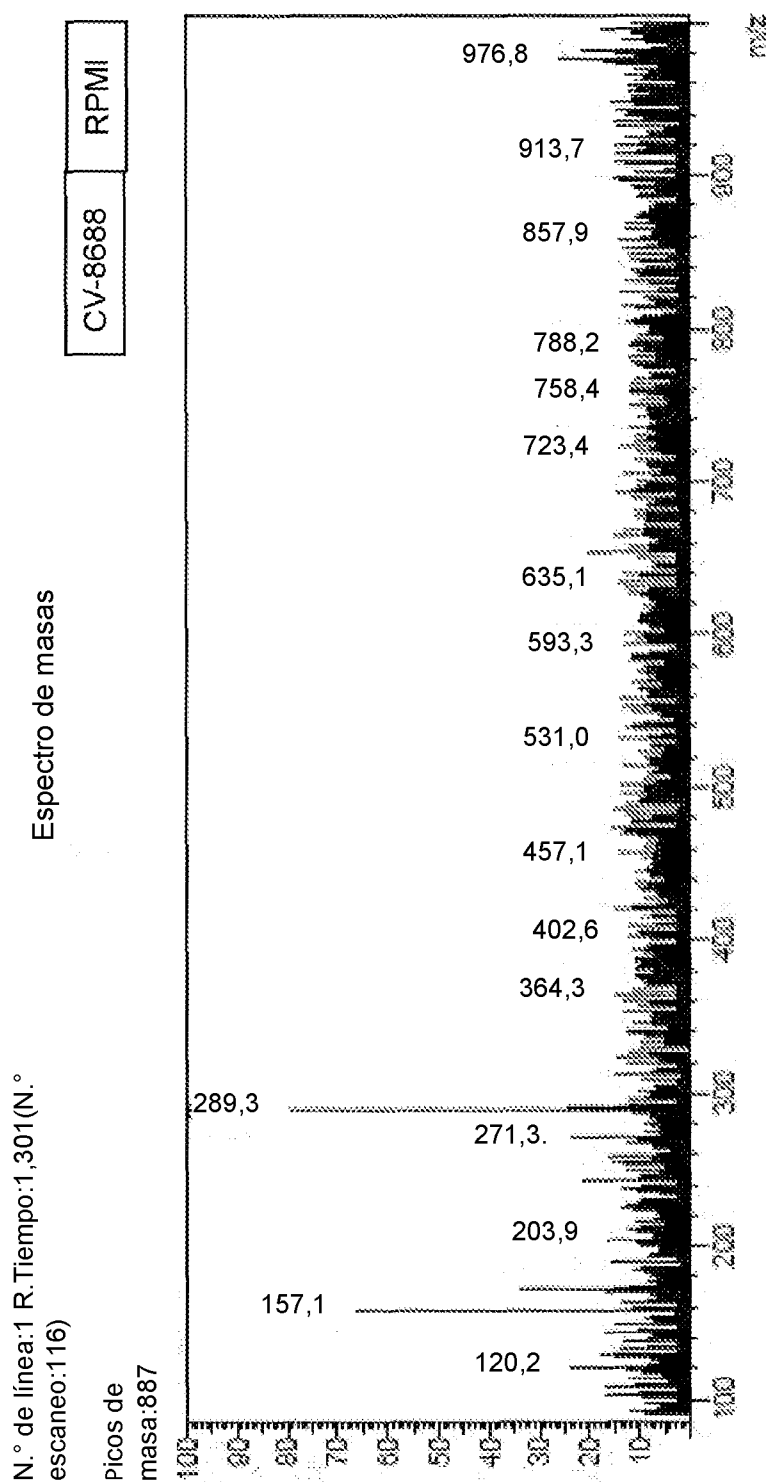


Figura 23J

Compuesto	Medio	Conc. (uM)	Tiempo de incubación (h)	ID	Cromatograma		
					Ret, Tiempo	Área	% restante
CV-8684	DMSO	100	2	1	2,65	576025,00	100,00
	RPMI	100	2	2	1,25	538008,00	98,40
	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