



19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA

11 Número de publicación: **2 352 974**

51 Int. Cl.:
A61K 31/135 (2006.01)
A61P 17/00 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

96 Número de solicitud europea: **07013932 .4**
96 Fecha de presentación : **28.02.2001**
97 Número de publicación de la solicitud: **1857109**
97 Fecha de publicación de la solicitud: **21.11.2007**

54 Título: **Inhibidores de tirosinasa de melanocitos como aclaradores tópicos de la piel.**

30 Prioridad: **29.02.2000 US 185610 P**

45 Fecha de publicación de la mención BOPI:
24.02.2011

45 Fecha de la publicación del folleto de la patente:
24.02.2011

73 Titular/es: **MEDIQUEST THERAPEUTICS, Inc.**
22322 20th Avenue, S.E., Suite 100
Bothell, Washington 98021, US

72 Inventor/es: **Dooley, Thomas, P. y**
Curto, Ernest, V.

74 Agente: **Zea Checa, Bernabé**

ES 2 352 974 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

CAMPO DE LA INVENCION

5 [0001] La presente invención se refiere a compuestos y métodos para inhibir la actividad de la tirosinasa de melanocitos en la piel de mamíferos, para reducir la expresión y producción de pigmentación de la piel y, de este modo, aclarar el color de la piel de mamíferos.

ANTECEDENTES DE LA INVENCION

10 [0002] La melanogénesis es el proceso de producción y posterior distribución de melanina por melanocitos dentro de la piel y los folículos pilosos [1, 2]. Los melanocitos tienen orgánulos similares a lisosomas especializados denominados melanosomas que contienen varias enzimas que median la producción de melanina. La enzima tirosinasa que contiene cobre cataliza la oxidación del aminoácido tirosina en DOPA y, posteriormente, DOPA-quinona. Al menos dos enzimas melanosómicas adicionales están implicadas en la ruta de la eumelanogénesis, que produce pigmentos marrones y negros, incluyendo TRP-1 (DHICA oxidasa) y TRP-2 (DOPAcromo tautomerasa). Dependiendo de la incorporación de un reactivo que contiene azufre (por ejemplo, cisteína o glutatión) en los productos, la ruta de melanogénesis diverge para producir feomelaninas (pigmentos ámbar y rojos).

15 [0003] El color percibido de la piel y del pelo está determinado por la proporción de eumelaninas respecto a feomelaninas y en parte por la sangre dentro de la dermis. El equilibrio en los matices de la piel está regulado genéticamente por muchos factores, incluyendo, pero sin limitación: (a) los niveles de expresión de tirosinasa, TRP-2 y TRP-1; (b) la conjugación con tiol (por ejemplo, con glutatión o cisteína) que conduce a la formación de feomelaninas; (c) la hormona estimulante de melanocitos α (α -MSH) y el receptor de melanocortina, que está acoplado a la ruta de la adenilato ciclasa/proteína quinasa A; [15] (d) el producto del locus *agutí*, la proteína señal de *agutí*, que se ha documentado que regula negativamente la pigmentación de los melanocitos del pelo en roedores; [16] y (e) mecanismos todavía desconocidos que regulan la captación y distribución de melanosomas en queratinocitos de la matriz del pelo y epidérmica de receptores. [2, 13, 14].

35 [0004] Las anomalías de la pigmentación cutánea humana se producen

como resultado de factores tanto genéticos como ambientales. La exposición de la piel (especialmente caucásica) a radiación ultravioleta, particularmente en las longitudes de onda de UVB (es decir, intermedias), regula positivamente la síntesis de tirosinasa de melanocitos, dando como resultado una melanogénesis aumentada y, por lo tanto, el bronceado. Sin embargo, la exposición aguda o persistente a UVB puede dar como resultado la formación de lesiones o regiones de la piel hiperpigmentadas, incluyendo cáncer de piel por melanoma maligno. [17] Tanto los daños actínicos como las anomalías constitucionales pueden producir regiones afectadas tales como melasma, manchas de la edad, manchas parduzcas, pecas y otros léntigos. [3, 18, 19].

[0005] El vitiligo es la inversa de la hiperpigmentación, en el cual los melanocitos cutáneos se han destruido o no producen suficiente pigmento. [17, 18, 20] Aunque sería deseable restaurar la pigmentación perdida en la piel afectada por vitiligo con terapias tópicas, esto ha demostrado ser muy difícil de conseguir en una alta proporción de sujetos. Como alternativa a la terapia con PUVA o al camuflaje cosmético con lociones autobronceantes de dihidroxiacetona, [18] se podría reducir la pigmentación normal de la piel no afectada para reducir el contraste. Además, se ha desarrollado una demanda comercial global de agentes aclaradores de la piel como productos cosmeticéuticos de “tocador”, ya que algunos individuos de piel oscura de muchos países y razas prefieren un color de piel más blanco por razones psicológicas o sociológicas. [4, 5].

[0006] Todavía no se ha demostrado que algunos agentes supuestamente “activos” o “funcionales” para aclarar el color de la piel (por ejemplo, arbutina, ácido kójico, niacinamida, regaliz, ascorbil fosfato de magnesio, entre otros) sean clínicamente beneficiosos cuando se analizan críticamente en estudios cuidadosamente controlados [5, 6, 25]. Los productos farmacéuticos autorizados por la FDA de los Estados Unidos que contienen hidroquinona (“HQ”) al 2-4% son de mínimamente a moderadamente eficaces. Sin embargo, la HQ ha demostrado ser citotóxica para melanocitos de mamífero cultivados y mutagénica en *Salmonella* y células de mamífero V79 de hámster chino, [3-6, 10, 11, 25]. La HQ parece ser un intermedio importante en la bioactivación del carcinógeno benceno [12]. Aunque en la bibliografía dermatológica se ha afirmado repetidamente durante muchos años sin subsanarse que la HQ es un inhibidor de la tirosinasa, este compuesto no es un inhibidor eficaz de la enzima de mamíferos [5, 6, 25]. El

mecanismo de acción *in vitro* de la hidroquinona parece ser principalmente un efecto citotóxico melanocítico. Su mecanismo de acción clínico sobre piel completa continúa siendo desconocido.

5 [0007] En vista de estas desventajas bioquímicas del agente blanqueador de la piel convencional, la HQ, es altamente deseable identificar otros compuestos con características de eficacia y seguridad mejoradas. El gentisato de metilo ("MG"), el éster metílico del ácido gentísico (GA; ácido 2,5-dihidroxibenzoico) es un inhibidor moderadamente potente de la acumulación de melanina en un tamiz primario de cultivo de células
10 melanocíticas murinas [6, 25]. El GA es un producto natural de la raíz del género *Gentiana*, denominado así en honor a Gentius, un rey ilirio (grecorromano) del siglo 2º a. C. que se dice que descubrió por primera vez las propiedades medicinales de la planta [7]. Se cree que la sal sódica del GA es un analgésico y un agente antiinflamatorio. El GA es un metabolito
15 ubicuo producido, no sólo por plantas, sino también por *Penicillium patulum* y *Polyporus tumulosus*, y se excreta en la orina de mamíferos después de la ingestión de salicilatos [8, 9]. El MG y el GA son compuestos fenólicos simples estructuralmente similares a la HQ, aunque carecen de la actividad mutagénica de la HQ [25]. El MG no se ha desarrollado como un producto
20 aclarador de la piel tópico disponible en el mercado hasta la fecha.

[0008] Dos publicaciones de patente de Sansei Seiyaku también describen varios compuestos que supuestamente son activos como inhibidores de la tirosinasa o como agentes aclaradores de la piel, la JP 5-124925 y la JP 5-124922. Los compuestos son diversos bencimidazoltioles, pero no se han
25 desarrollado como productos aclaradores de la piel tópicos disponibles en el mercado hasta la fecha. Además, la feniltiourea (PTU) se ha descrito como un inhibidor de la tirosinasa [30-32].

[0009] Un objeto es proporcionar métodos y composiciones para tratar afecciones médicas relacionadas con la hiperpigmentación tales como
30 melasma, manchas de la edad, pecas, ocronosis, hiperpigmentación postinflamatoria, léntigo y otras imperfecciones de la piel pigmentadas.

[0010] Otro objeto de la presente invención es proporcionar métodos y composiciones para inhibir la tirosinasa de melanocitos de mamíferos, la enzima limitante de la velocidad en la producción de melanina a partir de
35 tirosina y DOPA.

[0011] Otro objeto más de la invención es proporcionar métodos y composiciones para absorber radiación ultravioleta (UVR) y, por lo tanto,

proteger la piel de la UVR y del fotoenvejecimiento.

[0012] Un objeto adicional de la invención es proporcionar composiciones antioxidantes que protejan la piel de daños oxidativos y/o prevenir la descomposición oxidativa de formulaciones de productos.

5 **[0013]** Otro objeto es facilitar el descubrimiento de compuestos que inhiban la tirosinasa de mamíferos en extractos acelulares de melanocitos o células de melanoma de mamífero, usando una oxidación de DOPA colorimétrica o un ensayo de sustrato de DOPA o tirosina radiomarcado ($CI_{50} \leq 300 \mu M$).

10 **[0014]** Otro objeto es facilitar el descubrimiento de compuestos que inhiban la producción de pigmento *de novo* (síntesis y/o acumulación) en células de melanoma o melanocitos de mamífero cultivados ($CI_{50} \leq 300 \mu M$).

[0015] Otro objeto es facilitar la evaluación de compuestos para determinar su toxicidad en melanocitos, melanomas u otros cultivos celulares de mamíferos ($CI_{50} \geq 300 \mu M$).

15 **[0016]** Otro objeto es proporcionar una composición de la materia y/o identidad de compuestos que son eficaces y/o muestran una toxicidad reducida usando uno o más de los bioensayos descritos en otros objetos, con características bioquímicas equivalentes a o superiores a la hidroquinona o al gentisato de metilo.

20 **[0017]** Otro objeto más es proporcionar la síntesis de derivados de compuestos activos y/o funcionales de la invención, incluyendo por síntesis orgánica, química combinatoria, química medicinal, cristalografía de rayos X, diseño racional de fármacos y otros métodos.

25 **[0018]** Otro objeto es proporcionar el uso de formulaciones de la presente invención para productos cosméticos, cosmeticeúticos, farmacéuticos de venta sin receta y farmacéuticos con prescripción.

30 **[0019]** Otro objeto es proporcionar formulaciones de la presente invención con el fin de reducir o impedir la pigmentación en el pelo, aunque durante la biosíntesis del pelo, como resultado del bloqueo de la producción de pigmento dentro de los melanocitos de los folículos pilosos.

35 **[0020]** Otro objeto es proporcionar los compuestos activos y/o funcionales de la presente invención para su uso en la inhibición de la tirosinasa o enzimas similares a tirosinasa de especies que no sean mamíferos, por ejemplo para su uso en la industria de la ciencia alimentaria para la inhibición del pardeamiento enzimático.

[0021] Otro objeto más es proporcionar los compuestos activos y/o funcionales de la presente invención para su uso en la inhibición de enzimas

tirosina hidroxilasas para reducir la biosíntesis de DOPA y/o catecolaminas.

DESCRIPCIÓN RESUMIDA DE LA INVENCION

5 [0022] Se proporcionan varias clases de compuestos que reducen o impiden la producción de pigmento por melanocitos de mamífero. Los compuestos inhiben preferiblemente la actividad enzimática de la tirosinasa de melanocitos, aunque algunos compuestos controlan la producción de pigmento en células melanocíticas sin ser potentes inhibidores de la enzima. Por lo tanto, los compuestos pueden usarse en aplicaciones en las cuales se
10 desee controlar o impedir la producción de pigmentos en la piel de mamíferos. Unos pocos ejemplos de dichas aplicaciones incluyen:

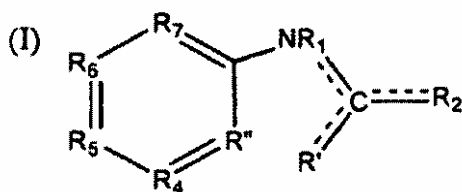
1. Como un producto de tocador para aclarar la piel de un individuo, especialmente de individuos de piel oscura;
2. Para disminuir los matices de las imperfecciones de la piel pigmentadas tales como pecas y manchas de la edad;
- 15 3. Para disminuir marcas de pigmentación desiguales e irregularidades del color de la superficie;
4. Para tratar afecciones médicas relacionadas con hiperpigmentación, tales como melasma, ocronosis y léntigo;
- 20 5. Para aclarar la pigmentación del pelo cuando se aplica a piel que contiene folículos pilosos pigmentados;
6. Para disminuir la hiperpigmentación postinflamatoria resultante de traumatismos o cirugía invasiva por un estiramiento facial, tratamiento con láser o cirugía cosmética; y
- 25 7. Para reducir la pigmentación cutánea en la piel normal adyacente a áreas afectadas por vitiligo, disminuyendo de este modo el contraste de color entre la piel normal y afectada por vitiligo.

[0023] Se han descubierto varias clases de compuestos activos aclaradores de la piel con los que puede ponerse en práctica la presente invención.
30 Estos compuestos presentan actividad en los ensayos de pigmentación de cultivos celulares de melanocitos y/o tirosinasa de mamífero, aunque con una citotoxicidad mínima o ninguna citotoxicidad. Estos compuestos presentan características que son equivalentes a o superiores al agente blanqueador de la piel convencional conocido, la hidroquinona, o al inhibidor de la tirosinasa convencional conocido, el gentisato de metilo.
35

[0024] Los compuestos se aplican típicamente por vía tópica en la piel en la que se busca reducir la actividad tirosinasa por medio de una loción o parche

oclusivo. Los compuestos pueden extenderse sobre un área más amplia para producir un difuminado del tono de la piel uniforme, o pueden aplicarse localmente a imperfecciones de la piel y otras afecciones localizadas para minimizar las irregularidades de la piel. Además, debido a que la mayoría de los compuestos son selectivos contra la tirosinasa de melanocitos, los compuestos también pueden administrarse por vía sistémica por métodos que incluyen administraciones oral, intradérmica, transdérmica, intravenosa y parenteral. El producto funciona inhibiendo la producción de melanina en células por debajo de la superficie de la piel. Debido a que la piel se renueva naturalmente por sí misma cada aproximadamente 28 días, cuando los compuestos de la presente invención se administran, las células queratinocíticas pigmentadas viejas (diferenciadas) se desprenden gradualmente y finalmente los queratinocitos con menos melanina son llevados a la superficie dando a la piel un aspecto más claro de un tono más uniforme.

[0025] En una primera realización principal los compuestos de la presente invención son compuestos relacionados con feniltiourea representados por la fórmula (I) siguiente:



en la cual:

- 1) R₁ es H o una valencia para formar un enlace;
- 2) R₂ es S o SH;
- 3) una de las líneas de puntos (----) representa un enlace;
- 4) R₄, R₅, R₆ y R₇ son independientemente CR₈ o N;
- 5) R₈ es (i) hidrógeno, (ii) halógeno, (iii) NO₂, (iv) -CN, (v) -OR₁₀, (vi) -NHSO₂-alquilo C₁₋₃, (vii) -NHCO-alquilo C₁₋₅, (viii) oxima, (ix) hidrazina, (x) -NR₉R₁₀, (xi) HSO₂, (xii) HSO₃, (xiii) tio-alquilo C₁₋₅, (xiv) aciloxi C₁₋₅, (xv) H₂PO₃, (xvi) tiol, (xvii) -COOR₉, (xviii) alquino C₁₋₅ o (xix) -alquilo C₁₋₅, -alqueno C₁₋₅, arilo, heteroarilo o heterociclo, opcionalmente sustituido con uno o más de -OH, -SH, C(O)H, COOR₉, aciloxi C₁₋₅, halógeno, NR₉R₁₀, tioéter C₁₋₅ o alcoxi C₁₋₅;
- 6) R₉ es hidrógeno o alquilo C₁₋₃;
- 7) R₁₀ es hidrógeno o alquilo C₁₋₅ opcionalmente sustituido con -OH;

8) R" es CH;

DESCRIPCIÓN DETALLADA DE LA INVENCION

5 Discusión

10 [0026] Como se ha indicado anteriormente, se han descubierto compuestos para inhibir o impedir la formación de melanina en la piel para el tratamiento de diversas afecciones asociadas con la melanina. Por ejemplo, el compuesto puede usarse como un producto de "tocador" para aclarar la piel de un individuo, especialmente de individuos de piel oscura. Como alternativa, el compuesto puede usarse para reducir marcas de pigmentación desiguales e irregularidades del color de la superficie, o para disminuir imperfecciones de la piel pigmentadas tales como pecas y manchas de la edad, y afecciones médicas relacionadas con hiperpigmentación tales como melasma, ocronosis y léntigo. Los compuestos también pueden usarse para aclarar el pelo cuando se aplican a piel que contiene folículos pilosos pigmentados, y para disminuir la hiperpigmentación postinflamatoria resultante de traumatismos o cirugía invasiva por un estiramiento facial, tratamiento con láser o cirugía cosmética. Los compuestos activos o

15 funcionales también pueden usarse para reducir la pigmentación de la piel en la piel normal adyacente a áreas afectadas por vitíligo, disminuyendo de este modo el contraste de color entre la piel normal y la afectada por vitíligo.

20 [0027] La invención proporciona por lo tanto un método para aclarar la piel de mamíferos que incluye aplicar o administrar de otro modo una cantidad de tratamiento eficaz de un compuesto activo aclarador de la piel seleccionado de un bencimidazol, una feniltiourea, un feniltiol, un fenol bi-o multicíclico, tiofenoamina, una benzotiamida, una fenilamina o una sal o éster farmacéuticamente aceptable del mismo, opcionalmente en un vehículo farmacéuticamente aceptable, a un sujeto mamífero que lo

25 necesite. La invención también incluye una composición farmacéutica para administración tópica o sistémica general, incluyendo formulaciones orales, intradérmicas, transdérmicas, de parche oclusivo, intravenosas y parenterales, que incluyen una cantidad del compuesto inhibidora de pigmento eficaz. La presente invención se refiere principalmente a

30 composiciones que inhiben la actividad de la tirosinasa de mamífero y que, por lo tanto, tienen un valor medicinal y/o cosmético. Sin embargo, la presente invención también puede abarcar compuestos que inhiben la

35

formación de melanina dentro de melanocitos por medio de mecanismos distintos de la actividad de la tirosinasa.

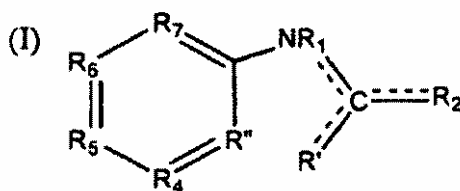
5 [0028] Muchos de los compuestos también poseen otras actividades que son beneficiosas cuando se integran en las composiciones de la presente invención. Por ejemplo, muchos de los compuestos también absorben luz UV y por lo tanto pueden usarse para bloquear los efectos perjudiciales de los rayos del sol. Algunos de los compuestos también poseen propiedades antioxidantes y, por lo tanto, pueden inhibir daños oxidativos en la piel o contribuir a la estabilidad de la formulación.

10 [0029] Además, aunque no relacionados por sí mismos con la pigmentación de la piel, algunos de los compuestos de la presente invención también pueden inhibir la tirosina hidroxilasa (TH). Esta enzima es estructuralmente diferente de la tirosinasa, pero también cataliza la formación de DOPA a partir de tirosina. La TH es crítica para la formación de catecolaminas. Por lo
15 tanto, algunos de los compuestos de la presente invención que inhiben casualmente la actividad de TH pueden tener utilidad para reducir la biosíntesis de catecolaminas, por ejemplo, para su uso como "sondas" inhibitorias en experimentos de laboratorio en los que es deseable una reducción en las reservas de catecolaminas. [30-32]

20

Compuestos de la Presente Invención

[0030] En una primera realización principal los compuestos de la presente invención son bencimidazoltiol y compuestos relacionados con feniltiourea representados por la fórmula (I) siguiente:



en la cual:

- 30
- R₁ es H o una valencia para formar un enlace;
 - R₂ es S o SH;
 - una de las líneas de puntos (----) representa un enlace;
 - R₄, R₅, R₆ y R₇ son independientemente CR₈ o N;
 - R₈ es (i) hidrógeno, (ii) halógeno, (iii) NO₂, (iv) -CN, (v) -OR₁₀, (vi) -NHSO₂-alquilo C₁₋₃, (vii) -NHCO-alquilo C₁₋₅, (viii) oxima, (ix) hidrazina, (x) -NR₉R₁₀, (xi) HSO₂, (xii) HSO₃, (xiii) tio-alquilo C₁₋₅, (xiv) aciloxi C₁₋₅,

(xv) H_2PO_3 , (xvi) tiol, (xvii) $-COOR_9$, (xviii) alquínilo C_{1-5} o (xix) -alquilo C_{1-5} , -alquénilo C_{1-5} , arilo, heteroarilo o heterociclo, opcionalmente sustituido con uno o más de $-OH$, $-SH$, $C(O)H$, $COOR_9$, aciloxi C_{1-5} , halógeno, NR_9R_{10} , tioéter C_{1-5} o alcoxi C_{1-5} ;

- 5 f. R_9 es hidrógeno o alquilo C_{1-3} ;
 g. R_{10} es hidrógeno o alquilo C_{1-5} opcionalmente sustituido con $-OH$;
 h. R'' es CH ;
 i.
 j. R' es CH_3 .

10 **[0031]** Una serie de subrealizaciones de la primera realización principal se definen cuando R_1 , R_2 y R' son como se han definido anteriormente, R'' es CH y:

R_4 , R_5 , R_6 y R_7 se seleccionan independientemente de CR_8 , 2 ó 3 de R_4 , R_5 , R_6 y R_7 son CH y R_8 es hidrógeno.

15 **Propiedades de los Compuestos de la Presente Invención**

[0032] En la presente invención, uno o los tres bioensayos *in vitro* pueden utilizarse para evaluar la eficacia y toxicidad de compuestos aclaradores de la piel candidatos. Los tres bioensayos caracterizan los compuestos con respecto a la inhibición de la enzima tirosinasa de mamífero (acelular), la pigmentación en células de cultivo de melanocitos y la citotoxicidad de células de cultivo de mamíferos. Se han desarrollado ensayos tanto enzimáticos sin células como de pigmentación basados en células [5, 6, 25] usando la línea celular de melanocitos de mamífero Mel-Ab, una línea celular derivada de ratón C57BL/6 que produce altos niveles de melanina. [21] Una ventaja diferente de esta estrategia es que los seres humanos comparten similitudes de secuencia sustanciales en sus genes (ADN) y proteínas (tales como tirosinasa) con los ratones, respecto a especies que no sean de mamíferos (por ejemplo, champiñones). Así, los melanocitos Mel-Ab de ratón pueden servir como sustitutos adecuados para melanocitos humanos para muchos fines farmacológicos.

[0033] Estos melanocitos murinos adherentes se cultivan en plástico de cultivo de tejidos en medio complementado con suero bovino fetal, 12-O-tetradecanoilforbol-13-acetato (TPA) para estimular la división celular por regulación negativa de la proteína quinasa C, [22, 23] y toxina del cólera para estimular la actividad de la adenilato ciclasa en ausencia de α -MSH. [15, 24] Pueden usarse lisados celulares de células Mel-Ab como preparaciones de enzima tirosinasa. Se han validado ensayos de placas

5 multipocillo [5, 6, 25] para inhibición enzimática (por ejemplo, oxidación de DOPA por medición colorimétrica o incorporación de sustrato radiomarcado en melanina) y para ensayos de pigmentación en células Mel-Ab cultivadas. Después de 4 días de tratamiento de células cultivadas, el contenido de melanina se determina usando un espectrofotómetro a 400+ nm. [6, 25] Este ensayo puede detectar una pérdida aparente en la pigmentación resultante de la inhibición de la síntesis *de novo* (por ejemplo, por inhibición de la tirosinasa, o la ruta de la adenilato ciclasa u otra ruta) o un mecanismo citostático/citotóxico. Por lo tanto es una selección primaria general. Se usa en paralelo con el ensayo enzimático de tirosinasa para determinar si un inhibidor de la pigmentación a nivel celular está actuando principalmente a nivel enzimático.

10 **[0034]** Para determinar la citotoxicidad, puede usarse cristal violeta u otros métodos de tinción para cuantificar el número de células adherentes después de un periodo de tratamiento por un agente. La HQ se usa típicamente como control positivo en el ensayo puesto que presenta una CI_{50} en el intervalo bajo de microgramos por mililitro en cultivo de Mel-Ab usando este ensayo, aunque debido a la citotoxicidad y no a la inhibición de la pigmentación por sí misma. [6] Debería señalarse que muchos inhibidores identificados en ensayos enzimáticos sin células podrían tener dificultades posteriores con su toxicidad o administración en ensayos basados en células melanocíticas. Por lo tanto, los tres ensayos *in vitro* en combinación proporcionan una caracterización excelente de compuestos aclaradores de la piel candidatos.

15 **[0035]** Una ventaja distinta de los sistemas de selección (desarrollados por los inventores de la presente invención) es que se centran en la tirosinasa de mamíferos al contrario que las enzimas que no son de mamíferos usadas frecuentemente por otros investigadores, tales como la tirosinasa del champiñón. Puesto que las características bioquímicas y farmacológicas de una enzima o isozima pueden variar espectacularmente entre especies de organismos (por ejemplo, debido a similitudes en la estructura primaria, secundaria y terciaria) es altamente preferible que los aclaradores de la piel tópicos candidatos destinados a uso en seres humanos se descubran basándose en su acción bioquímica contra una fuente de mamífero de la enzima. La tirosinasa del champiñón (y en algunos casos polifenol oxidasas vegetales) se ha usado en la amplia mayoría de los estudios de inhibidores anteriores. [28, 29] Aunque la tirosinasa fúngica presenta diferencias

20

25

30

35

sustanciales con la tirosinasa o tirosinasas de mamíferos, se ve como una estrategia sustancialmente inferior para la selección farmacológica. Por lo tanto, los métodos descritos por los inventores de la presente invención para seleccionar frente a tirosinasa de mamífero o dentro de melanocitos se

5 prefieren mucho sobre otras estrategias de exploración posibles. [5, 6, 25].

[0036] La “afinidad” cinética de sustrato de tirosinasa de mamífero por L-tirosina es de aproximadamente $K_M = 600 \mu\text{M}$. Un agente aclarador de la piel candidato potencialmente eficaz se considera que es deseable, activo y/o funcional si produce una inhibición del 50% de la actividad enzimática de la

10 tirosinasa de mamífero a concentraciones por debajo de la mitad de la “afinidad” de la enzima por tirosina en extractos enzimáticos acelulares ($CI_{50} \leq 300 \mu\text{M}$) y de la producción de pigmento en cultivos celulares de melanocitos ($CI_{50} \leq 300 \mu\text{M}$). En realizaciones preferidas el agente tiene una CI_{50} frente a la tirosinasa en extractos enzimáticos acelulares de menos de

15 200, 100, 50 ó 25 μM y/o una CI_{50} frente a la producción de pigmento en cultivos celulares de melanocitos de menos de 200, 100, 50 ó 25 μM .

Además, es deseable que los compuestos presenten una citotoxicidad mínima, por ejemplo, conservando de este modo la viabilidad del 50% o más de las células cultivadas ($CI_{50} \geq 300 \mu\text{M}$), como se demuestra por el número

20 de células adherentes. En realizaciones preferidas el agente presenta una toxicidad a concentraciones superiores a 500, 750 ó 1000 μM .

[0037] Curto, E.V., et al. (1999) [25] describe que el gentisato de metilo es un agente aclarador de la piel candidato “eficaz” basándose en bioensayos *in vitro*, porque tiene una CI_{50} de $11,2 \pm 4$ ($\mu\text{g/ml}$) frente a la actividad de la

25 tirosinasa en ensayos sin células, una CI_{50} de $30,9 \pm 5$ ($\mu\text{g/ml}$) en cultivos celulares de melanocitos y una CI_{50} de citotoxicidad de melanocitos de $118,7 \pm 12$ ($\mu\text{g/ml}$). Por lo tanto, el gentisato de metilo representa un patrón frente al que pueden evaluarse la eficacia y la citotoxicidad de otros compuestos inhibidores de la tirosinasa. Al contrario que el MG, la hidroquinona es un

30 patrón inferior que presenta una citotoxicidad potente y una inhibición enzimática mínima. [5, 6, 25].

[0038] Significativamente, muchos de los compuestos particulares de esta invención son comparables con, o agentes aclaradores de la piel candidatos más eficaces que, el gentisato de metilo. Por lo tanto, en otra realización la

35 invención proporciona métodos para inhibir la producción de pigmento, que incluyen administrar una cantidad de tratamiento eficaz de un compuesto inhibidor de pigmento, en los que (i) el compuesto inhibe la actividad de la

5 tirosinasa equivalente a o superior al gentisato de metilo en extractos
enzimáticos acelulares de células de melanoma o melanocitos de mamíferos
cuando se evalúa usando una oxidación de DOPA colorimétrica o un ensayo
de sustrato de DOPA o tirosina radiomarcado como se describe en Curto, E.
10 V., et al. (1999) [25], o (ii) el compuesto inhibe la producción de pigmento *de
novo* (síntesis y/o acumulación) equivalente a o superior al gentisato de
metilo cuando se evalúa en células de melanoma o melanocitos de mamífero
cultivados. Curto, E. V., et al. (1999) [25]. En una realización preferida, la
toxicidad del compuesto en cultivos de melanocitos, melanoma u otras
10 células de mamífero es equivalente a o inferior a la toxicidad del gentisato de
metilo. Curto, E. V., et al. (1999) [25].

[0039] En otra realización, las predicciones orbitales moleculares basadas en
ordenador pueden ayudar a la comprensión y predictibilidad de las
relaciones de estructura-actividad, de modo que puedan identificarse y
15 evaluarse otros compuestos eficaces. Véase Sakurada, J., et al., "Kinetic
and molecular orbital studies on the rate of oxidation of monosubstituted
phenols and anilines by horseradish peroxidase compound II." *Biochemistry*
29: 4093-4098 (1990) [26].

20 **Definiciones y Uso de los Términos**

[0040] Se pretenden las siguientes definiciones y construcción de términos, a
menos que se indique otra cosa:

[0041] Los valores específicos y preferidos enumerados a continuación para
radicales, sustituyentes e intervalos son únicamente ilustrativos; no excluyen
25 otros valores definidos u otros valores dentro de intervalos definidos para los
radicales y sustituyentes.

[0042] Halo es fluoro, cloro, bromo o yodo.

[0043] Alquilo, alcoxi, alquenilo, alquinilo, etc. indican grupos tanto lineales
como ramificados; pero la referencia a un radical individual tal como "propilo"
30 abarca sólo el radical de cadena lineal, haciéndose referencia
específicamente a un isómero de cadena ramificada tal como "isopropilo".

[0044] El término alquilo, como se usa en la presente memoria, a menos que
se especifique otra cosa, se refiere a un hidrocarburo saturado lineal,
ramificado o cíclico, primario, secundario o terciario de C₁ a C₁₀ y
35 específicamente incluye metilo, etilo, propilo, isopropilo, ciclopropilo, butilo,
isobutilo, t-butilo, pentilo, ciclopentilo, isopentilo, neopentilo, hexilo, isohexilo,
ciclohexilo, ciclohexilmetilo, 3-metilpentilo, 2,2-dimetilbutilo y 2,3-

dimetilbutilo. Cuando el contexto de este documento permite que el alquilo esté sustituido, los restos con los que puede sustituirse el grupo alquilo se seleccionan del grupo que consiste en hidroxilo, amino, alquilamino, arilamino, alcoxi, ariloxi, arilo, heterociclo, halo, carboxi, acilo, aciloxi, amido, nitro, ciano, ácido sulfónico, sulfato, ácido fosfónico, fosfato o fosfonato no protegido o protegidos cuando sea necesario, como saben los expertos en la materia, por ejemplo, como se muestra en Greene, et al., Protective Groups in Organic Synthesis, John Wiley and Sons, Segunda Edición, 1991, incorporado por la presente como referencia.

10 **[0045]** La expresión alquilo inferior, como se usa en la presente memoria, y a menos que se especifique otra cosa, se refiere a un grupo alquilo C₁ a C₄ saturado lineal, ramificado o, si es apropiado, cíclico (por ejemplo, ciclopropilo) que incluye formas tanto sustituidas como no sustituidas. A menos que se indique específicamente otra cosa en esta solicitud, cuando el alquilo es un resto adecuado, se prefiere alquilo inferior. De forma similar, cuando un alquilo o alquilo inferior es un resto adecuado, se prefiere alquilo no sustituido o alquilo inferior.

[0046] Los términos alqueno y alquino se refieren a restos alquilo, incluyendo formas tanto sustituidas como no sustituidas, en las cuales al menos un enlace C-C saturado se sustituye por un doble o triple enlace. Por lo tanto, un alqueno (C₂-C₆) puede ser vinilo, alilo, 1-propeno, 2-propeno, 1-butenilo, 2-butenilo, 3-butenilo, 1-penteno, 2-penteno, 3-penteno, 4-penteno, 1-hexeno, 2-hexeno, 3-hexeno, 4-hexeno o 5-hexeno. De forma similar, un alquino (C₂-C₆) puede ser etino, 1-propino, 2-propino, 1-butino, 2-butino, 3-butino, 1-pentino, 2-pentino, 3-pentino, 4-pentino, 1-hexino, 2-hexino, 3-hexino, 4-hexino o 5-hexino.

[0047] El término "alqueno" se refiere a un radical alquilo divalente saturado de cadena lineal de fórmula -(CH₂)_n-, en la cual n puede ser 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9 ó 10.

30 **[0048]** Como se usa en la presente memoria, con las excepciones que se indican, un "arilo" pretende referirse a cualquier anillo de carbono estable monocíclico, bicíclico o tricíclico de hasta 8 miembros en cada anillo, en el cual al menos un anillo es aromático según se define por la regla de Huckel 4n + 2. Los ejemplos de sistemas de anillo de arilo incluyen fenilo, naftilo, tetrahidronaftilo y bifenilo. El grupo arilo puede sustituirse con uno o más restos seleccionados del grupo que consiste en hidroxilo, amino, alquilamino, arilamino, alcoxi, ariloxi, alquilo, heterociclo, halo, carboxi, acilo, aciloxi,

35

amido, nitro, ciano, ácido sulfónico, sulfato, ácido fosfónico, fosfato o fosfonato, no protegido o protegido según sea necesario, como saben los expertos en la materia, por ejemplo, como se muestra en Greene, et al., Protective Groups in Organic Synthesis, John Wiley and Sons, Segunda Edición, 1991.

[0049] El término heterociclo o heterocíclico, como se usa en la presente memoria excepto donde se indica, representa un anillo heterocíclico monocíclico de 5 a 7 miembros estable o bicíclico de 8 a 11 miembros estable que está saturado o no saturado, incluyendo heteroarilo, y que consiste en átomos de carbono y de uno a tres heteroátomos seleccionados del grupo que consiste en N, O, S y P; y en el cual los heteroátomos de nitrógeno y azufre pueden estar opcionalmente oxidados y el heteroátomo de nitrógeno puede estar opcionalmente cuaternizado, e incluyendo cualquier grupo bicíclico en el cual cualquiera de los anillos heterocíclicos definidos anteriormente esté condensado con un anillo de benceno. El anillo heterocíclico puede unirse a cualquier heteroátomo o átomo de carbono que de como resultado la creación de una estructura estable.

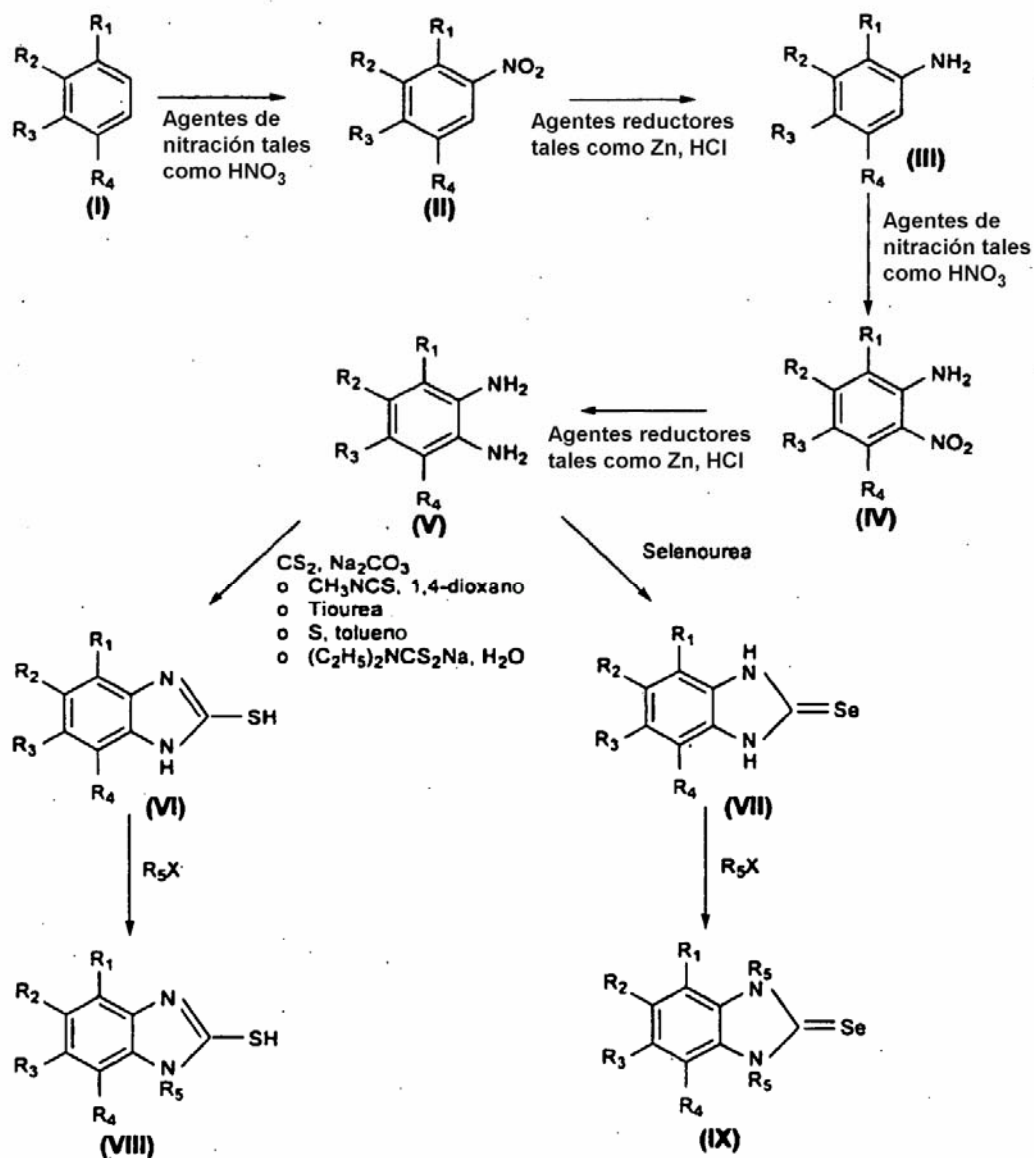
[0050] Los ejemplos no limitantes de grupos heteroarilo y heterocíclico incluyen furilo, furanilo, piridilo, pirimidilo, tienilo, isotiazolilo, imidazolilo, tetrazolilo, pirazinilo, benzofuranilo, benzotiofenilo, quinolilo, isoquinolilo, benzotienilo, isobenzofurilo, pirazolilo, indolilo, isoindolilo, benzimidazolilo, purinilo, carbazolilo, oxazolilo, tiazolilo, isotiazolilo, 1,2,4-tiadiazolilo, isooxazolilo, pirrolilo, quinazolinilo, cinolinilo, ftalazinilo, xantinilo, hipoxantinilo, tiofeno, furano, pirrol, isopirrol, pirazol, imidazol, 1,2,3-triazol, 1,2,4-triazol, oxazol, isoxazol, tiazol, isotiazol, pirimidina o piridazina, y pteridinilo, aziridinas, tiazol, isotiazol, 1,2,3-oxadiazol, tiazina, piridina, pirazina, piperazina, pirrolidina, oxaziranos, fenazina, fenotiazina, morfolinilo, pirazolilo, piridazinilo, pirazinilo, quinoxalinilo, xantinilo, hipoxantinilo, pteridinilo, 5-azacitidinilo, 5-azauracililo, triazolopiridinilo, imidazolopiridinilo, pirrolopirimidinilo, pirazolopirimidinilo, adenina, N6-alquilpurinas, N6-benzilpurina, N6-halopurina, N6-vinipurina, N6-acetilénico purina, N6-acil purina, N6-hidroalquil purina, N6-tioalquil purina, timina, citosina, 6-azapirimidina, 2-mercaptopirimidina, uracilo, N5-alquil-pirimidinas, N5-bencilpirimidinas, N5-halopirimidinas, N5-vinil-pirimidina, N5-acetilénico pirimidina, N5-acil pirimidina, N5-hidroalquil purina y N6-tioalquil purina e isoxazolilo. Los restos heteroaromático y heterocíclico pueden sustituirse opcionalmente como se ha descrito anteriormente para arilo, incluyendo

sustituirse con uno o más sustituyentes seleccionados de hidroxilo, amino, alquilamino, arilamino, alcoxi, ariloxi, alquilo, heterociclo, halo, carboxi, acilo, aciloxi, amido, nitro, ciano, ácido sulfónico, sulfato, ácido fosfónico, fosfato o fosfonato, no protegidos o protegidos cuando sea necesario, como saben los expertos en la materia, por ejemplo, como se muestra en Greene, et al., Protective Groups in Organic Synthesis, John Wiley and Sons, Segunda Edición, 1991.

[0051] El heteroaromático puede estar parcialmente o totalmente hidrogenado, como se desee. Como ejemplo no limitante, puede usarse dihidropiridina en lugar de piridina. Los grupos de oxígeno y nitrógeno funcionales en el grupo heteroarilo pueden protegerse según sea necesario o se desee. Son bien conocidos por los expertos en la materia grupos protectores adecuados e incluyen trimetilsililo, dimetilhexilsililo, t-butildimetilsililo y t-butildifenilsililo, tritilo o tritilo sustituido, grupos alquilo, grupos acilo tales como acetilo y propionilo, metanosulfonilo y p-toluenosulfonilo.

[0052] El término acilo se refiere a un éster del ácido carboxílico en el cual el resto no carbonilo del grupo éster se selecciona de alquilo lineal, ramificado o cíclico o alquilo inferior, alcoxialquilo incluyendo metoximetilo, aralquilo incluyendo bencilo, ariloxialquilo tal como fenoximetilo, arilo incluyendo fenilo opcionalmente sustituido con halógeno, alquilo C₁ a C₄ o alcoxi C₁ a C₄, ésteres de sulfonato tales como alquilo o aralquilo sulfonilo incluyendo metanosulfonilo, el éster mono-, di- o trifosfato, tritilo o monometoxitritilo, bencilo sustituido, trialquilsililo (por ejemplo, dimetil-t-butilsililo) o diferencilmetilsililo. Los grupos arilo en los ésteres comprenden óptimamente un grupo fenilo. La expresión “acilo inferior” se refiere a un grupo acilo en el cual el resto no carbonilo es alquilo inferior.

[0053] El término alcoxi, como se usa en la presente memoria y a menos que se especifique otra cosa, se refiere a un resto de estructura -O-alquilo en el cual el alquilo es como se ha definido anteriormente.

Métodos Sintéticos**Benzimidazoles****[0054]**

5

[0055] Precursor: Benceno mono- o multisustituido. La mayoría están disponibles en el mercado o pueden prepararse fácilmente a partir de compuestos comerciales. La definición de los sustituyentes del anillo de benceno R_1 , R_2 , R_3 y R_4 se proporciona en las fórmulas (I) y (II) en la sección de Descripción Resumida de la Invención.

10

[0056] Reactivos: Ácido nítrico, Cinc, Ácido clorhídrico, Disulfuro de carbono, Isotiocianato de metilo, Tiourea, Azufre, Dietilditiocarbamato de

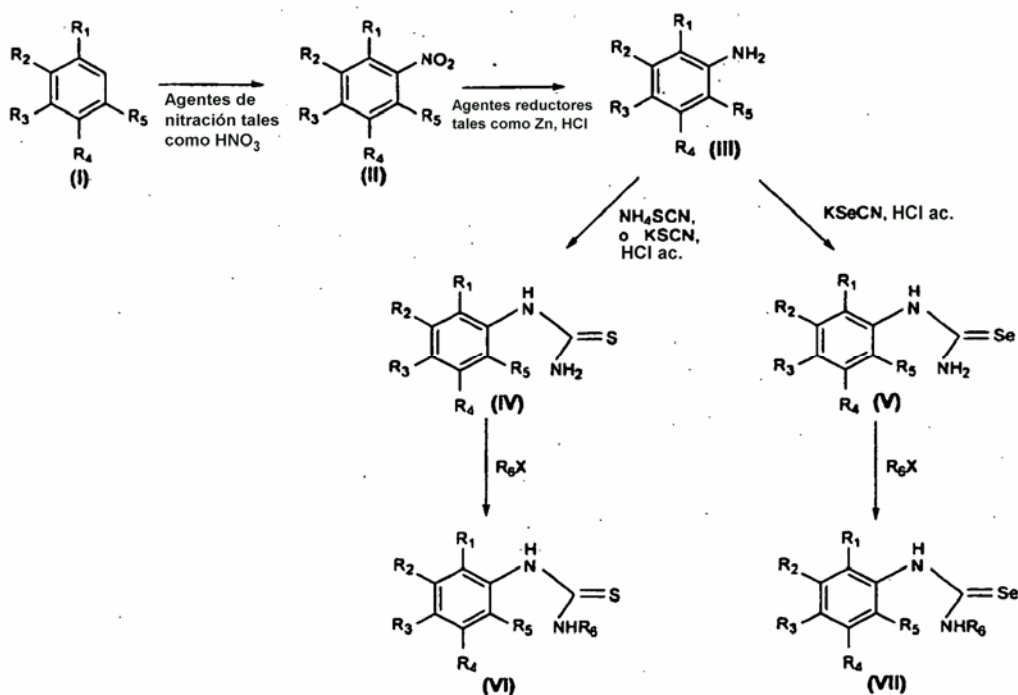
sodio, Selenourea, **Disolventes:** 1,4-Dioxano, Tolueno, Piridina, Diclorometano, Tetrahidrofurano, Agua. **Bibliografía:** Saxena, D. B.; Khajuria, R. K.; Suri, O. P. Synthesis and Spectral Studies of 2-Mercaptobenzimidazole Derivatives. J. Heterocycl. Chem., 19, 681-683, (1982).

5 [0057] Los derivados de 1,2-fenilendiamina (**V**) pueden prepararse mediante una doble reacción de nitración/reducción sobre benceno sustituido (**I**), algunos sustituyentes pueden necesitar protección en las condiciones de reacción anteriores. La ciclación de (**V**) con CS₂, o CH₃NCS, o tiourea, o S, o 10 (C₂H₅)₂NCS₂Na puede dar los derivados de 2-mercaptobenzimidazol deseados (**VI**). La reacción de (**VI**) con R₆X (R₆ puede ser un grupo alquilo o acilo; X es Cl, Br, I) puede producir productos alquilados (**VIII**). Los derivados de 2-Benzimidazolina-selenio (**VII**) y (**IX**) pueden sintetizarse de forma similar haciendo reaccionar selenourea con (**V**).

15

Feniltioureas

[0058]



20 [0059] **Precursor:** Benceno sustituido. La mayoría están disponibles en el mercado o pueden prepararse fácilmente a partir de compuestos comerciales. La definición de los sustituyentes del anillo de benceno R₁, R₂,

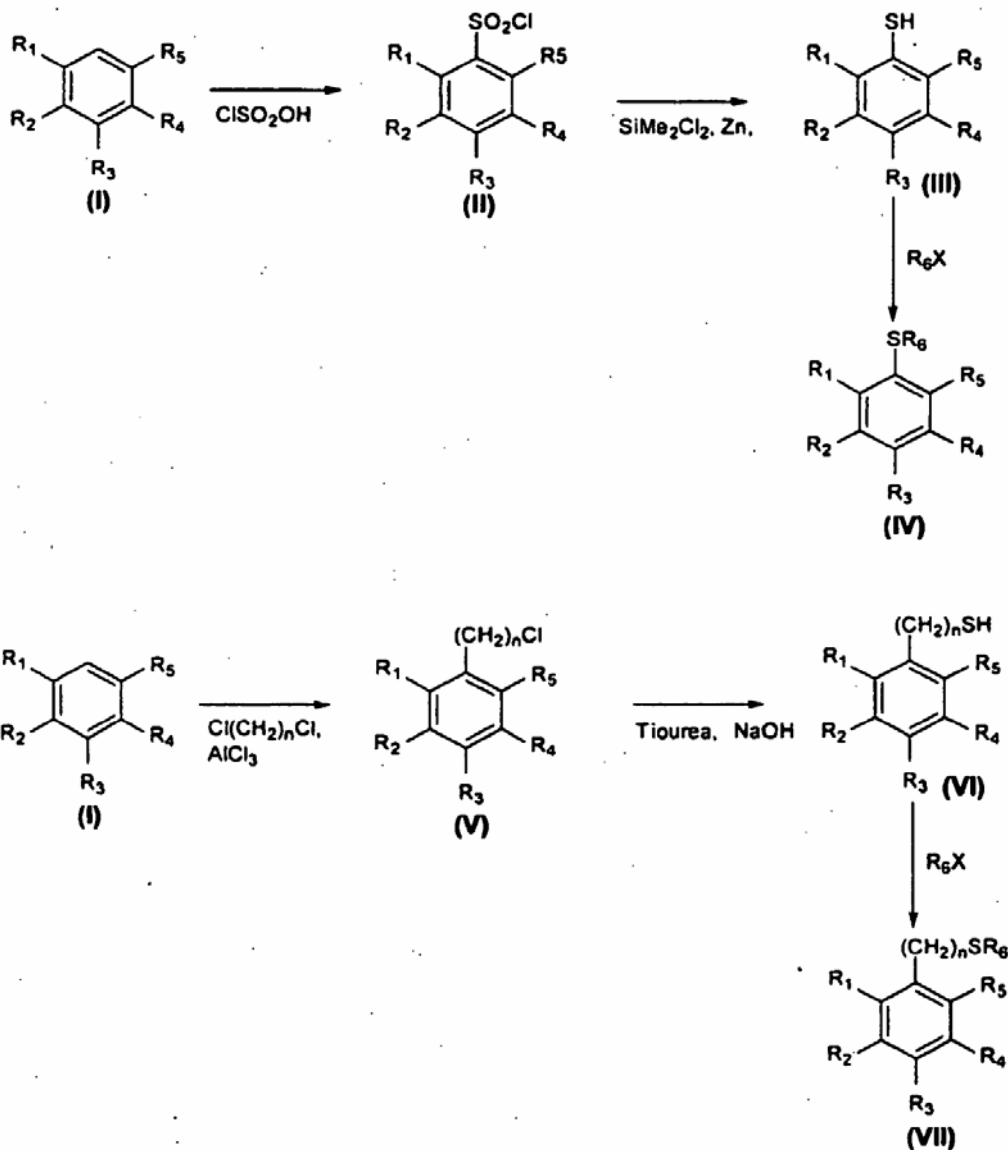
R₃, R₄ y R₅ se proporciona en las fórmulas (I) y (II) en la sección de Descripción Resumida de la Invención.

[0060] Reactivos: Ácido nítrico, Cinc, Ácido clorhídrico, Tiocianato de amonio, Tiocianato de potasio, Selenocianato de potasio.

5 **[0061] Disolventes:** Acetonitrilo, Piridina, Diclorometano, Tetrahidrofurano, Agua.

[0062] Bibliografía: Rasmussen, C. R.; Villani, F. J., Jr.; Weaner, L. E.; Reynolds, B. E.; Hood, A. R.; Hecker, L. R., Nortey, S. O.; Hanslin, A.; Costanzo, M. J.; et al. Improved Procedures for the Preparation of
10 Cycloalkyl-, and Arylalkyl-, and Arylthioureas. *Synthesis*, 6, 456-459, (1988).

[0063] Pueden prepararse diversos compuestos de ariltioruea **(IV)** por reacción de la anilina correspondiente **(III)** con NH₄SCN o KSCN en solución acuosa de HCl. La alquilación de **(IV)** por R₆X (R₆ puede ser un grupo alquilo o acilo; X es Cl, Br, I) puede dar un producto monoalquilado **(VI)**. Por
15 sustitución de KSCN con KSeCN, los análogos de selenio **(V)** también pueden prepararse.

Feniltioles**[0064]**

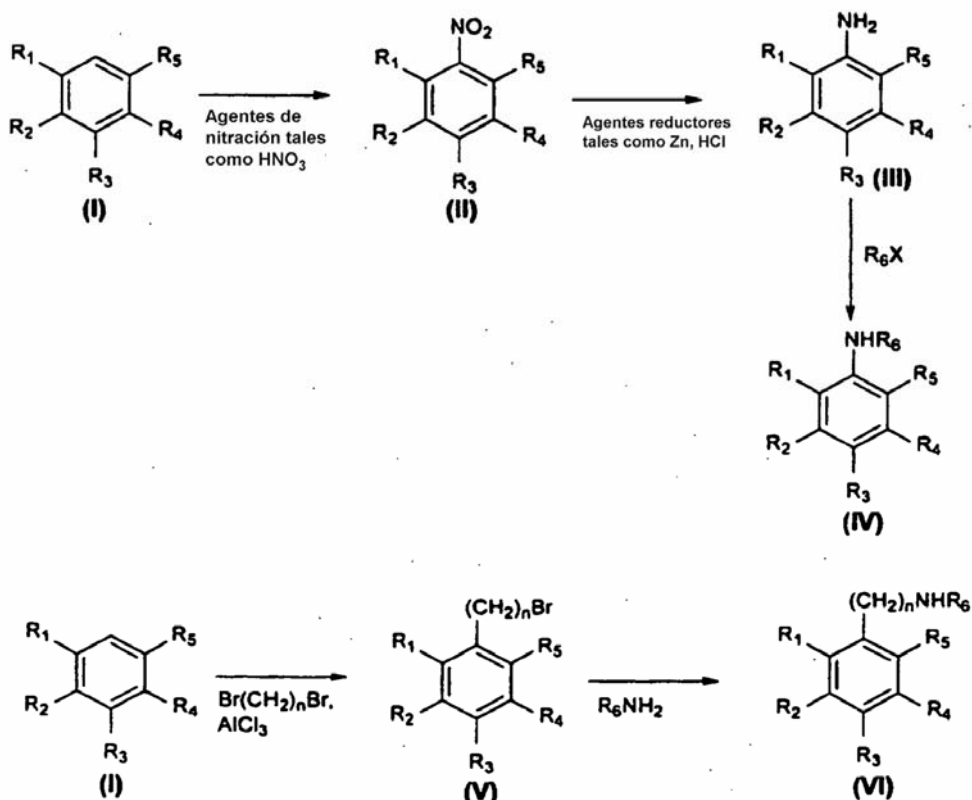
- 5 **[0065] Precursor:** Benceno sustituido. La mayoría están disponibles en el mercado o pueden prepararse fácilmente a partir de compuestos comerciales. La definición de los sustituyentes del anillo de benceno R_1 , R_2 , R_3 , R_4 y R_5 se proporciona en las fórmulas (I) y (II) en la sección de Descripción Resumida de la Invención.
- 10 **[0066] Reactivos:** Ácido clorosulfónico, Diclorodimetilsilano, Cinc, $\text{Cl}(\text{CH}_2)_n\text{Cl}$ (n es 1-3), Cloruro de Aluminio, Tiourea, Hidróxido de sodio.
- [0067] Disolventes:** Tetrahidrofurano, Benceno, Dimetilsulfóxido, Agua.

[0068] Bibliografía: Uchiro, H.; Kobayashi, S. Non-aqueous Reduction of Aromatic Sulfonyl Chlorides to Thios Using a Dichlorodimethylsilane-zinc-dimethylacetamide System. *Tetrahedron Lett.*, 40, 3179-3182, (1999).

[0069] Los cloruros de arilsulfonilo sustituidos (**II**) pueden prepararse fácilmente a partir de compuestos aromáticos sustituidos (**I**) por reacción con ácido clorosulfónico en exceso. La reducción de (**II**) con diclorodimetilsilano/cinc dará los derivados de feniltiol deseados (**III**). Los mercaptanos de fenilalquilo sustituidos (**VI**) pueden prepararse a partir de los compuestos de cloro correspondientes (**V**) que pueden obtenerse a partir de la reacción de alquilación de (**I**) (reacción de *Friedel-Crafts*). Ambos compuestos de tior (**III**) y (**VI**) pueden reaccionar con haluro de alquilo R_6X para formar los sulfuros correspondientes (**IV**) y (**VII**).

Fenilaminas

15 **[0070]**



[0071] Precursor: Benceno sustituido. La mayoría están disponibles en el mercado o pueden prepararse fácilmente a partir de compuestos comerciales. La definición de los sustituyentes del anillo de benceno R_1 , R_2 ,

20

R₃, R₄ y R₅ se proporciona en las fórmulas (I) y (II) en la sección de Descripción Resumida de la Invención.

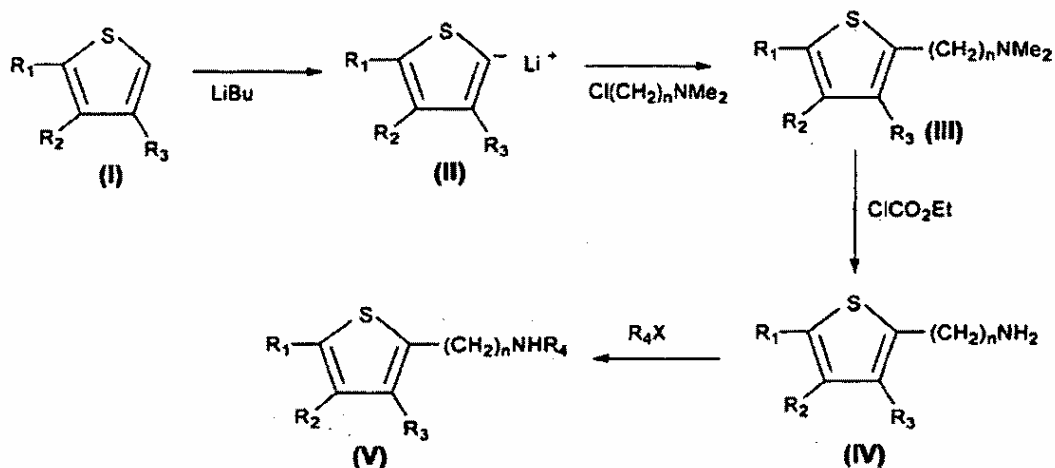
[0072] Reactivos: Ácido nítrico, Cinc, Ácido clorhídrico, Br(CH₂)_nBr (n es 1-3), Cloruro de aluminio.

5 **[0073] Disolventes:** Benceno, Tetrahidrofurano, Éter dietílico, Agua.

[0074] La preparación de los productos (II), (IV) y (V) es la misma que se ha descrito anteriormente. La reacción de (V) con alquilamina R₆NH₂ (R₆ es hidrógeno o alquilo) puede dar derivados de arilalquilamina (VI).

10 Tiofenoaminas

[0075]



15 **[0076] Precursor:** Tiofeno sustituido. La mayoría están disponibles en el mercado o pueden prepararse fácilmente a partir de fuentes comerciales. La definición de los sustituyentes del anillo R₁, R₂ y R₃ es la misma que la proporcionada en las fórmulas (I) y (II) en la sección de Descripción Resumida de la Invención. **Reactivos:** Butillitio, Cl(CH₂)_nNMe₂ (n es 1-3), Cloroformato de etilo.

20 **[0077] Disolventes:** Éter dietílico, Tetrahidrofurano, Benceno.

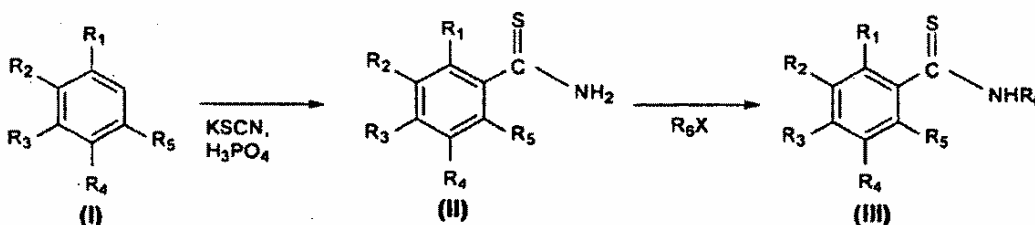
[0078] Bibliografía: Hallberg, A.; Gronowitz, S. On The Reaction of Some Thienyllithium Derivatives with 1-Chloro-2-dimethylaminoethane. *Chem. Scr.*, 16, 42-46, (1980).

25 **[0079]** La reacción de tiofeno sustituido con butillitio puede dar sal de 2-tienillitio (II), puede ser necesaria la protección de algunos sustituyentes. La 2-tiofenoalquilamina sustituida (III) puede prepararse por reacción de (II) con 1-cloro-2-dimetilaminoalcano. Los productos (III), (IV) y (V) pueden

convertirse entre sí por reacciones de alquilación/desalquilación usando haluro de alquilo R_4X y $ClCO_2Et$, respectivamente.

Benzotiamidas

5 [0080]



[0081] **Precursor:** Benceno sustituido. La mayoría están disponibles en el mercado o pueden prepararse fácilmente a partir de compuestos comerciales. La definición de los sustituyentes del anillo de benceno R_1 , R_2 , R_3 , R_4 y R_5 se proporciona en las fórmulas (I) y (II) en la sección de Descripción Resumida de la Invención.

[0082] **Reactivos:** Tioacianato de potasio, Ácido polifosfórico, Ácido sulfúrico.

[0083] **Disolventes:** Benceno, Agua.

15 [0084] **Bibliografía:** Sastry, S.; Kudav, N. A. One-step Synthesis of Aromatic Thio Amides: Reaction of Aromatic Compounds with Potassium Thiocyanate in Polyphosphoric Acid or Sulfuric Acid. Indian J. Chem., Sect. B, 18B, 45 (1979).

[0085] Los derivados de benzotioamida (II) pueden prepararse a partir de benceno sustituido (I) en una sola etapa por reacción con KSCN en ácido polifosfórico o ácido sulfúrico. El producto alquilado (III) puede obtenerse usando haluro de alquilo R_6X (X es Cl, Br, I).

Formulaciones Farmacéuticas y Regímenes de Dosificación

25 [0086] En una realización, un compuesto de esta invención se aplica o se administra a la piel durante un periodo apropiado y usando un número suficiente de dosificaciones para conseguir un aclaramiento de la piel. La concentración de compuesto activo en la composición dependerá de las velocidades de absorción, inactivación y excreción del compuesto, así como de otros factores conocidos por los expertos en la materia. Debe señalarse que los valores de dosificación también variarán con la gravedad de la afección a aliviar. Debe entenderse además que para cualquier sujeto

particular, deberían ajustarse los regímenes de dosificación específicos con el tiempo de acuerdo con la necesidad individual y el juicio profesional de la persona que administre o supervise la administración de las composiciones, y que los intervalos de concentración expuestos en la presente memoria son
5 solamente ejemplares y no pretenden limitar el alcance o la práctica de la composición reivindicada. El ingrediente activo puede administrarse como una sola dosis o puede dividirse en varias dosis más pequeñas a administrar a intervalos de tiempo variables.

[0087] Las formulaciones tópicas y de otro tipo de estos compuestos activos
10 y/o funcionales son de utilidad en el aclaramiento de la pigmentación cutánea en seres humanos y otros animales. Estas formulaciones pueden ser útiles para fines cosméticos puros, simplemente para obtener un color de piel más claro para la percepción de un embellecimiento. Las formulaciones también tienen valor medicinal y pueden, por ejemplo, disminuir la
15 hiperpigmentación de melasma, manchas de la edad, pecas y otras imperfecciones de la piel. Los compuestos de esta invención actúan principalmente inhibiendo la tirosinasa de melanocitos de mamífero, la enzima limitante de la velocidad en la producción de melanina a partir de tirosina y DOPA. Algunos compuestos también absorben radiación
20 ultravioleta (UVR) y por lo tanto pueden proteger la piel de UVR y fotoenvejecimiento. Además, algunos compuestos pueden ser antioxidantes que protegen la piel de daños oxidativos y/o pueden prevenir la descomposición oxidativa de formulaciones de producto.

[0088] Si es deseable estas formulaciones también podrían usarse para
25 reducir la pigmentación del pelo, aunque durante la biosíntesis del pelo, por bloqueo de la producción de pigmento dentro de los melanocitos de los folículos pilosos. Las formulaciones probablemente no afectarían a las porciones de pelo pigmentadas ya emergidas a diferencia de un agente blanqueador.

[0089] Las formulaciones útiles en la presente invención contienen
30 cantidades biológicamente eficaces del compuesto o compuestos activos y/o funcionales. Los expertos en la materia entienden que una cantidad biológicamente eficaz del compuesto activo significa que se proporciona una cantidad suficiente del compuesto en la composición de modo que, tras su
35 administración al ser humano o animal, por ejemplo, por vía tópica, se proporciona suficiente agente activo en cada aplicación para dar el resultado deseado. Sin embargo, la cantidad biológicamente eficaz del compuesto

activo es a un nivel que no sea tóxico para el ser humano o animal durante la duración del tratamiento. Por vehículo biológicamente compatible adecuado, cuando el compuesto se aplica tópicamente, se entiende que el vehículo puede contener cualquier tipo de excipiente adecuado en forma de composiciones cosméticas, adyuvantes farmacéuticos, lociones protectoras solares, cremas y similares. En una realización, el compuesto activo se administra en un vehículo liposomal.

[0090] El compuesto activo se administra durante un periodo de tiempo suficiente para aliviar los síntomas no deseados y los signos clínicos asociados con la afección a tratar, o para conseguir el nivel de aclaramiento de la piel deseado. La dosificación individual, programa de dosificación y duración del tratamiento puede determinarse por evaluaciones clínicas por los expertos en la materia.

[0091] Las soluciones o suspensiones para aplicación tópica pueden incluir los componentes siguientes: un diluyente estéril tal como agua para inyección, solución salina, aceites no volátiles, polietilenglicoles, glicerina, propilenglicol u otros disolventes sintéticos; agentes antibacterianos tales como alcohol bencílico o metil parabenos; antioxidantes tales como ácido ascórbico o bisulfito de sodio; agentes quelantes tales como ácido etilendiaminotetraacético (EDTA); tampones tales como acetatos, citratos o fosfatos; y agentes para el ajuste de la tonicidad tales como cloruro sódico o dextrosa, el pH puede ajustarse con ácidos o bases tales como ácido clorhídrico o hidróxido de sodio.

[0092] Se conocen vehículos, excipientes o formulaciones adecuadas para aplicación tópica e incluyen lociones, suspensiones, pomadas, emulsiones de aceite en agua, emulsiones de agua en aceite, cremas, geles, tinturas, pulverizaciones, polvos, pastas y parches oclusivos o transdérmicos de liberación lenta. Pueden usarse agentes espesantes, emolientes y estabilizantes para preparar composiciones tópicas. Los ejemplos de agentes espesantes incluyen vaselina, cera de abeja, goma xantana o polietilenglicol, humectantes tales como sorbitol, emolientes tales como aceite mineral, lanolina o sus derivados, o escualeno. Varias soluciones y pomadas están disponibles en el mercado, especialmente para aplicaciones dermatológicas.

[0093] Los compuestos pueden promocionarse en forma de sales farmacéuticamente aceptables. Como se usa en el presente documento, la expresión “sales o complejos farmacéuticamente aceptables” se refiere a

sales o complejos que conservan la actividad biológica deseada del compuesto precursor y presentan, si acaso, efectos toxicológicos no deseados mínimos. Son ejemplos de dichas sales (a) sales de adición de ácido formadas con ácidos inorgánicos (por ejemplo, ácido clorhídrico, ácido bromhídrico, ácido sulfúrico, ácido fosfórico, ácido nítrico y similares) y sales formadas con ácidos orgánicos tales como ácido acético, ácido oxálico, ácido tartárico, ácido succínico, ácido málico, ácido ascórbico, ácido benzoico, ácido tánico, ácido pamoico, ácido algínico, ácido poliglutámico, ácido naftalenosulfónico, ácido naftalenodisulfónico y ácido poligalaturónico;

5 (b) sales de adición de base formadas con cationes metálicos polivalentes tales como cinc, calcio, bismuto, bario, magnesio, aluminio, cobre, cobalto, níquel, cadmio y similares, o con un catión orgánico formado a partir de N,N-dibenciletilen-diamina o etilendiamina; o (c) combinaciones de (a) y (b); por ejemplo, una sal de tanato de cinc o similares.

10 **[0094]** Los compuestos pueden modificarse para aumentar su utilidad como composiciones farmacéuticas. Por ejemplo, es bien sabido en la técnica que diversas modificaciones de la molécula activa, tales como la alteración de la carga, pueden afectar a la solubilidad en agua y lípidos y por lo tanto alterar el potencial para su absorción percutánea. El vehículo o excipiente también

15 puede modificarse para aumentar la absorción cutánea, aumentar el efecto de depósito y minimizar la irritación o efectos neurofarmacológicos potenciales de la composición. Véase, en general, Arndt, et al. [27].

20 **[0095]** Por lo tanto, la invención proporciona diversas formulaciones como aclaradores de la piel tópicos que contienen los compuestos activos y/o funcionales descritos anteriormente. La invención proporciona además formulaciones como antioxidantes tópicos que contienen los compuestos activos y/o funcionales descritos anteriormente. En otra realización más la invención proporciona formulaciones como protectores solares tópicos que contienen los compuestos activos y/o funcionales descritos anteriormente.

25 Dichas formulaciones pueden prepararse en combinación con otros ingredientes activos y/o funcionales usados en productos de cuidado de la piel (por ejemplo, protectores solares orgánicos e inorgánicos, antioxidantes, antiinflamatorios, antieritematosos, antibióticos, antimicrobianos, humectantes u otros ingredientes). Otros ingredientes pueden formularse

30 con los compuestos para aumentar su efecto, incluyendo, pero sin limitación, vitamina C, vitamina E, ascorbilfosfato de magnesio, extracto de aloe vera y ácidos retinoicos. Además, pueden incluirse alfa-hidroxiácidos para acelerar

35

el proceso de aclaramiento de la piel exfoliando la piel coloreada superficial.

5 [0096] Los compuestos de la presente invención también pueden formularse para vías de administración alternativas distintas de la aplicación tópica, incluyendo, pero sin limitación, la administración sistémica general, oral, intradérmica, transdérmica, de parches oclusivos, intravenosa o parenteral, y composiciones farmacéuticas conocidas generalmente por los expertos en la materia.

10 [0097] Los compuestos también pueden formularse junto con otros ingredientes activos y/o funcionales usados en productos de cuidado de la piel dependiendo del uso deseado de la formulación. Por ejemplo, los compuestos pueden formularse con protectores solares orgánicos o inorgánicos, un antioxidante, un antiinflamatorio, un antieritematoso, un antibiótico, un antimicrobiano, un humectante u otros ingredientes.

15 [0098] Los compuestos activos y/o funcionales descritos anteriormente también pueden ser de utilidad para inhibir enzimas tipo tirosinasa de especies que no sean de mamíferos, por ejemplo, para su uso en la industria de la ciencia alimentaria para la inhibición del pardeamiento enzimático. [28, 29] La inhibición de polifenol oxidasas vegetales por agentes descritos en la presente memoria puede tener casualmente actividad frente a estas enzimas que no son de mamíferos. Los expertos en la materia conocen en general formulaciones adecuadas para la pulverización o tratamiento de frutas. El tratamiento mediante estas formulaciones que contienen los inhibidores enzimáticos de la presente invención podría mejorar la vida útil de alimentos vegetales o fúngicos.

25

EJEMPLOS

Ejemplo de Referencia 1: Benzoimidazoltioles

30 [0099] Una primera clase de compuestos basados en el compuesto de molde bencimidazoltiol (estructura izquierda inferior) se ensayaron para la inhibición de tirosinasa, inhibición de pigmento de cultivo celular y toxicidad por métodos descritos en Curto, E. V., et al. (1999) [25]. Los resultados de los ensayos se proporcionan en la Tabla 1.

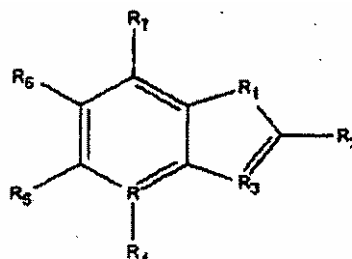
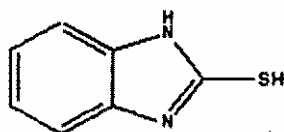


TABLA 1

Nº ID	R ₁	R ₂	R ₃	R ₅	R ₆	R	E	P	T	ε	λ _{máx}
138	NH	SH	N	H	H	C	0,25	-	-	14300	300
140	NH	SH	N	CH ₃	H	C	0,12	2,4	>1000	6300	305
084	NH	SH	N	OCH ₃	H	C	0,07	1,6	>1000	10000	310
040	S	SH	N	H	H	C	8	-	-		
091	S	SH	N	H	OCH ₂ CH ₃	C	>1000	>1000	>1000		
205	NH	=S	N(CO)CH ₃	H	H	C	0,5	8,3	35		
098	NH	=Se	NH	H	H	C	0,8	14	132		
135	NH	=S	NH	H	H	N	4	256	>1000		

*Inhibición [μM] según se midió en tres ensayos. Aquí “E” es la concentración de compuesto que produce una inhibición de pigmento del 50% en el sistema de ensayo **enzimático** de mamífero sin células. “P” es para la concentración de compuesto que produce una inhibición del 50% en el sistema de ensayo de **pigmento** de cultivo de melanocitos de mamífero. “T” es la concentración de compuesto que destruye el 50% de las células en el sistema de ensayo de **toxicidad** de cultivo de melanocitos de mamífero. El coeficiente de extinción de compuesto es ϵ [DO/M x cm] a la longitud de onda de la absorbancia máxima $\lambda_{\text{máx}}$ [nm].

Ejemplo de Referencia 2: Tiofenoles

- 5 [0100] Una segunda clase de compuestos basados en el compuesto de molde bencenotiol se ensayaron para la inhibición de tirosinasa, inhibición de pigmento de cultivo celular y toxicidad por métodos descritos en Curto, E. V., et al. (1999) [25]. Los resultados de los ensayos se proporcionan en la Tabla 2.

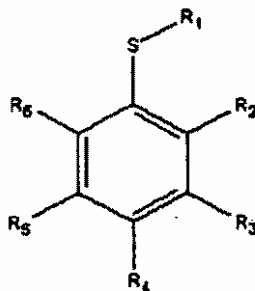


TABLA 2

Nº ID	R ₁	R ₂	R ₃	R ₄	R ₅	E	P	T	ε	λ _{máx}
099	H	H	OCH ₃	H	H	53	85	202	3000	265
102	H	H	H	SCH ₃	H	0,24	115	126	2300	280
083	H	H	H	NH(CO)CH ₃	H	19	82	542	4700	265
103	H	H	OCH ₃	OCH ₃	H	8	8	>1000	4300	250
093	H	OCH ₃	H	H	OCH ₃	500	200	200	2700	305
148	(CO)CH ₃	H	H	NH(CO)CH ₃	H	500	30	125	3300	255

*Inhibición [μM] según se midió en tres ensayos. Aquí “E” es la concentración de compuesto que produce una inhibición de pigmento del 50% en el sistema de ensayo **enzimático** de mamífero sin células. “P” es para la concentración de compuesto que produce una inhibición del 50% en el sistema de ensayo de **pigmento** de cultivo de melanocitos de mamífero. “T” es la concentración de compuesto que destruye el 50% de las células en el sistema de ensayo de **toxicidad** de cultivo de melanocitos de mamífero. El coeficiente de extinción de compuesto es ϵ [DO/M x cm] a la longitud de onda de la absorbancia máxima $\lambda_{\text{máx}}$ [nm].

Ejemplo 3: Feniltioureas

- 5 [0101] Una tercera clase de compuestos basados en el compuesto de molde feniltiourea (estructura izquierda inferior) se ensayaron para la inhibición de tirosinasa, inhibición de pigmento de cultivo celular y toxicidad por métodos descritos en Curto, E. V., et al. (1999) [25]. Los resultados de los ensayos se proporcionan en la Tabla 3.

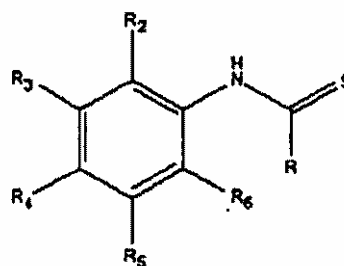
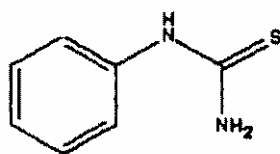


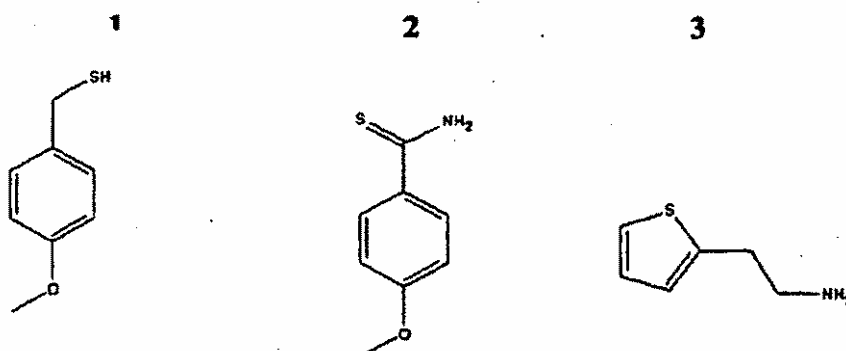
TABLA 3

Nº ID	R ₂	R ₃	R ₄	R ₅	R	E	P	T	ε	λ _{máx}
033	H	H	H	H	NH ₂	2	12	>1000		
181	OCH ₃	H	H	H	NH ₂	> 1000		>1000		
105	H	F	H	H	NH ₂	1,52	1,78	>1000	11000	255
104	H	OH	H	H	NH ₂	4	8	>1000		
131	H	CH ₃	H	H	NH ₂	0,82	2,28	>1000		
053	H	H	OCH ₃	H	NH ₂	8	30	60		
049	H	H	NH(CS)NH ₂	H	NH ₂	4	250	>1000		
101	H	CH ₃	H	CH ₃	NH ₂	250	125	>1000		
054	H	H	H	H	CH ₃	16	16	>1000		

*Inhibición [μM] según se midió en tres ensayos. Aquí “E” es la concentración de compuesto que produce una inhibición de pigmento del 50% en el sistema de ensayo **enzimático** de mamífero sin células. “P” es para la concentración de compuesto que produce una inhibición del 50% en el sistema de ensayo de **pigmento** de cultivo de melanocitos de mamífero. “T” es la concentración de compuesto que destruye el 50% de las células en el sistema de ensayo de **toxicidad** de cultivo de melanocitos de mamífero. El coeficiente de extinción de compuesto es ϵ [DO/M x cm] a la longitud de onda de la absorbancia máxima $\lambda_{\text{máx}}$ [nm].

Ejemplo de Referencia 4: Miscelánea

- 5 [0102] Un cuarto grupo de compuestos variados de estructura diversa se ensayaron también para la inhibición de tirosinasa, inhibición de pigmento de cultivo celular y toxicidad por métodos descritos en Curto, E. V., et al. (1999) [25]. Los resultados de los ensayos se proporcionan en la Tabla 4.



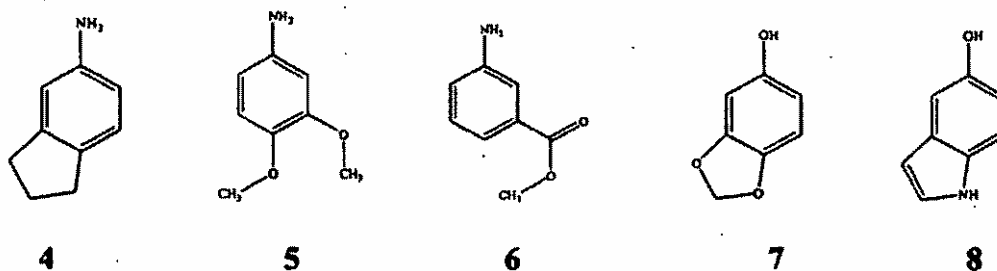


TABLA 4

Nº	Nº ID	E	P	T	ϵ	λ máx
1	081	5	81	500	1000	275
2	100	32	62	>1000		
3	073	>1000	100	>1000		
4	079	73	71	472		
5	006	110	182	>1000		
6	092	79	236	>1000		
7	009	98	209	775		
8	026	54	153	367		

*Inhibición [μM] según se midió en tres ensayos. Aquí "E" es la concentración de compuesto que produce una inhibición de pigmento del 50% en el sistema de ensayo **enzimático** de mamífero sin células. "P" es para la concentración de compuesto que produce una inhibición del 50% en el sistema de ensayo de **pigmento** de cultivo de melanocitos de mamífero. "T" es la concentración de compuesto que destruye el 50% de las células en el sistema de ensayo de **toxicidad** de cultivo de melanocitos de mamífero. El coeficiente de extinción de compuesto es ϵ [DO/M x cm] a la longitud de onda de la absorbancia máxima $\lambda_{\text{máx}}$ [nm].

Bibliografía:

[0103]

- 5 1. Hearing VJ Jr., "Monophenol monooxygenase (tyrosinase): Purification, properties, and reactions catalyzed." *Methods Enzymol* 142: 154-165, 1987.
2. Spritz RA et al., "Genetic-disorders of pigmentation," *Adv Hum Genet* 22: 1-45, 1994.
- 10 3. Frenk E, "Treatment of melasma with depigmenting agents." *Melasma: New Approaches to Treatment*, págs. 9-15. Martin Dunitz Ltd., Londres, 1995.
4. Dooley TP, "Is there room for a moderate level of regularity oversight?"

- En: Drug Discovery Approaches for Developing Cosmeceuticals: Advanced Skin Care and Cosmetic Products (Ed. Hori W), Cap. 1.4. International Business Communications, Southborough, MA, 1997.
5. Dooley TP, "Topical skin depigmentation agents: Current products and discovery of novel inhibitors of melanogenesis." J. Dermatol. Treat. 8: 275-279, 1997.
6. Dooley TP, et al., "Development of an in vitro primary screen for skin depigmentation and antimelanoma agents." Skin Pharmacol. 7: 188-200, 1994.
- 10 7. Morse JL (Ed.), "An Abridgment of The New Funk & Wagnalls Encyclopedia," The Universal Standard Encyclopedia, Vol, 10, págs. 3662-3663. Unicorn, Nueva York, 1955.
8. Budavari S (Ed.), "Gentisic acid," Merck Index, 11^a Ed., Resumen N^o 4290, pág. 688. Merck & Co., Rahway, NJ, 1989.
- 15 9. J-Hua L, et al., "Direct analysis of salicylic acid, salicyl acyl glucuronide, salicyluric acid and gentisic acid in human plasma and urine by high-performance liquid chromatography." J. Chromatogr. [B] 675: 61-70, 1996.
10. Glatt HR, et al., "Multiple activation pathways of benzene leading to products with varying genotoxic characteristics." Environ Health Perspect 82: 81-89, 1989.
- 20 11. Glatt HR, "Endogenous mutagens derived from amino acids." Mutat. Res. 238: 235-243, 1990.
12. La Du BN, "Alcaptonuria and ochronotic arthritis." Mol. Biol. Med. 8: 25 31-38, 1991.
- 13 Hearing VJ, "Mammalian monophenol monooxygenase (tyrosinase): purification, properties, and reactions catalyzed." Methods Enzymol. 142: 154-65, 1987.
14. Spritz RA, et al., "Genetic disorders of pigmentation." Adv. Hum. 30 Genet. 22: 1-45, 1994.
15. Hadley ME et al, "Melanotropic peptides for therapeutic and cosmetic tanning of the skin." N Y Acad. Sci. 680: 424-39, 1993.
16. Sakai C et al, "Modulation of murine melanocyte function in vitro by agouti signal protein." EMBO J. 16: 3544-52, 1997.
- 35 17. Dooley TP, "Recent advances in cutaneous melanoma oncogenesis research." Onco. Res. 6: 1-9, 1994.
18. Benmaman O, et al., "Treatment and camouflaging of pigmentary

- disorders." *Clin. Dermatol.* 6: 50-61, 1998.
19. Zaumseil R-P, et al., "Topical azelaic acid in the treatment of melasma: pharmacological and clinical considerations." En: Castanet J, Frenk E, Gaupe K et al (Eds) *Melasma: new approaches to treatment.* Martin Dunitz: Londres, págs. 16-40, 1995.
- 5 20. Schallreuter KU, "Epidermal adrenergic signal transduction as part of the neuronal network in the human epidermis." *J. Invest. Dermatol.* 2: 37-40, 1997.
21. Bennett DC, et al., "A line of non-tumorigenic mouse melanocytes, syngeneic with the B16 melanoma and requiring a tumour promoter for growth." *Int. J. Cancer* 349: 414-18, 1987.
- 10 22. Dooley TP et al., "Polyoma middle T abrogates TPA requirement of murine melanocytes and induces malignant melanoma." *Oncogene* 3: 531-6, 1988.
- 15 23. Brooks G et al., "Protein kinase C down-regulation, and not transient activation, correlates with melanocyte growth." *Cancer Res.* 51: 3281-8, 1991.
24. O'Keefe E, et al., "Cholera toxin mimics melanocyte stimulating hormone in inducing differentiation in melanoma cells." *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 71: 2500-4, 1974.
- 20 25. Curto, E.V., et al., "Inhibitors of Mammalian Melanocyte Tyrosinase: In Vitro Comparisons of Alkyl Esters of Gentisic Acid with Other Putative Inhibitors." *Biochem. Pharmacol.* 57: 663-672, 1999.
26. Sakurada, J., et al., "Kinetic and molecular orbital studies on the rate of oxidation of monosubstituted phenols and anilines by horseradish peroxidase compound II." *Biochemistry* 29: 4093-4098, 1990.
- 25 27. Arndt, et al., "The Pharmacology of Topical Therapy", *Dermatology in General Medicine*, 1987; T. B. Fitzpatrick, A. Z. Eisen, K. Wolff, I. M. Freedberg y K. F. Austen, eds., 3ª ed., McGraw Hill, Inc., Nueva York, págs. 2532-2540.
- 30 28. Lee, C.Y. y Whitaker, J.R. (Eds.) *Enzymatic Browning and its Prevention.* Pub. American Chemical Society, Washington, DC, 1995.
29. Lerch, K. "Tyrosinase: Molecular and active-site structure." En Lee, C.Y. y Whitaker, J.R. (Eds.) *Enzymatic Browning and its Prevention.* Pub. American Chemical Society, Washington, DC, págs.64-80, 1995.
- 35 30. Mishima, H., et al., "Fine structural demonstration of tyrosinase activity in the retinal pigment epithelium of normal and PTU-treated chick

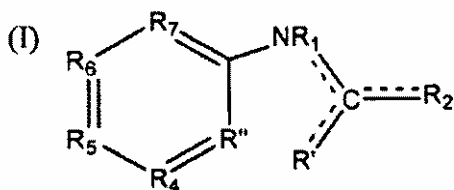
embryos." Albrecht Von Graefes Arch. Klin. Exp. Ophthalmol. 211: 1-10, 1979.

5 31. Dryja, T.P., et al., "Demonstration of tyrosinase in the adult bovine uveal tract and retinal pigment epithelium." Invest. Ophthalmol. Vis. Sci. 17: 511-514, 1978.

32. Higashi, Y., et al., "Inhibition of tyrosinase reduces cell viability in catecholaminergic neuronal cells." J. Neurochem. 75: 1771-1774, 2000.

REIVINDICACIONES

1. Método de reducción de la pigmentación de la piel para efectos cosméticos en un mamífero, que comprende administrar al mamífero una cantidad eficaz de un compuesto definido por la estructura (I), o una sal o éster farmacéuticamente aceptable del mismo:



en la cual:

- a. R₁ es H o una valencia para formar un enlace;
- b. R₂ es S o SH;
- c. una de las líneas de puntos (----) representa un enlace;
- d. R₄, R₅, R₆ y R₇ son independientemente CR₈ o N;
- e. R₈ es (i) hidrógeno, (ii) halógeno, (iii) NO₂, (iv) -CN, (v) -NHSO₂-alquilo C₁₋₃, (vi) -NHCO-alquilo C₁₋₅, (vii) oxima, (viii) hidrazina, (ix) -NR₉R₁₀, (x) HSO₂, (xi) HSO₃, (xii) tioalquilo C₁₋₅, (xiii) aciloxi C₁₋₅, (xiv) H₂PO₃, (xv) tiol, (xvi) -COOR₉, (xvii) alquinilo C₁₋₅ o (xviii) alquilo C₁₋₅, alquenilo C₁₋₅, arilo, heteroarilo o heterociclo, opcionalmente sustituido con uno o más -OH, -SH, C(O)H, COOR₉, aciloxi C₁₋₅, halógeno, NR₉R₁₀, tioéter C₁₋₅ o alcoxi C₁₋₅;
- f. R₉ es hidrógeno o alquilo C₁₋₃;
- g. R₁₀ es hidrógeno o alquilo C₁₋₅ opcionalmente sustituido con -OH;
- h. R'' es CH y no forma un enlace con R';
- i. R' es CH₃.
2. El método de la reivindicación 1, en el cual R₄, R₅, R₆ y R₇ son iguales o diferentes y se seleccionan de CR₈, en el que R₈ es H y en el cual 2 ó 3 de R₄, R₅, R₆ y R₇ son CH.
3. El método de la reivindicación 1, en el que el compuesto tiene una CI₅₀ frente a la actividad tirosinasa de mamífero de menos de o igual a 300 μM y una CI₅₀ de citotoxicidad en células melanocíticas de mamífero superior a 500 μM.

4. El método de la reivindicación 1, en el que el compuesto tiene una CI_{50} frente a la producción de melanina en células melanocíticas de mamífero de menos de o igual a $300 \mu\text{M}$ y una CI_{50} de citotoxicidad en células melanocíticas de mamífero superior a $500 \mu\text{M}$.

5

5. El método de la reivindicación 1, en el que el compuesto absorbe radiación ultravioleta.

6. El método de la reivindicación 1, en el que el compuesto es un antioxidante.

10

7. El método de la reivindicación 1, en el que el mamífero es un ser humano.

8. El método de la reivindicación 1, en el que la administración es mediante formulación tópica o un parche oclusivo.

15

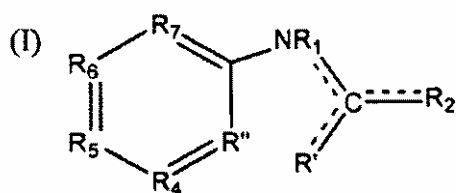
9. El método de la reivindicación 1, en el que el método es para aclarar la pigmentación de la piel.

10. El método de la reivindicación 1, en el que el compuesto es tioacetanilida [$\text{CH}_3\text{CSNHC}_6\text{H}_5$].

20

11. Compuesto definido por la estructura (I), o una sal o éster farmacéuticamente aceptable del mismo:

25



en la cual:

a. R_1 es H; o una valencia para formar un enlace;

b. R_2 es S o SH;

30

c. una de las líneas de puntos (----) representa un enlace;

d. R_4 , R_5 , R_6 y R_7 son independientemente CR_8 o N;

e. R_8 es (i) hidrógeno, (ii) halógeno, (iii) NO_2 , (iv) -CN, (v) - NHSO_2 -alquilo C_{1-3} , (vi) -NHCO-alquilo C_{1-5} , (vii) oxima, (viii) hidrazina, (ix) - NR_9R_{10} , (x)

- 5 HSO₂, (xi) HSO₃, (xii) tioalquilo C₁₋₅, (xiii) aciloxi C₁₋₅, (xiv) H₂PO₃, (xv) tiol, (xvi) -COOR₉, (xvii) alquinilo C₁₋₅ o (xviii) alquilo C₁₋₅, alquenilo C₁₋₅, arilo, heteroarilo o heterociclo, opcionalmente sustituido con uno o más -OH, -SH, C(O)H, COOR₉, aciloxi C₁₋₅, halógeno, NR₉R₁₀, tioéter C₁₋₅ o alcoxi C₁₋₅;
- f. R₉ es hidrógeno o alquilo C₁₋₃;
- g. R₁₀ es hidrógeno o alquilo C₁₋₅ opcionalmente sustituido con -OH;
- h. R" es CH y no forma un enlace con R';
- i. R' es CH₃.
- 10 para su uso en un método terapéutico para aclarar la piel o para tratar tipos de piel desiguales.
12. El compuesto para el uso de la reivindicación 11, en el cual R₄, R₅, R₆ y R₇ son iguales o diferentes y se seleccionan de CR₈, en el que R₈ es H y en el que 2 ó 3 de R₄, R₅, R₆ y R₇ son CH.
- 15
13. El compuesto para el uso de la reivindicación 11, en el cual el compuesto tiene una CI₅₀ frente a la actividad de tirosinasa de mamífero de menos de o igual a 300 μM y una CI₅₀ de citotoxicidad en células melanocíticas de mamífero superior a 500 μM.
- 20
14. El compuesto para el uso de la reivindicación 11, en el cual el compuesto tiene una CI₅₀ frente a la producción de melanina en células melanocíticas de mamífero de menos de o igual a 300 μM y una CI₅₀ de citotoxicidad en células melanocíticas de mamífero superior a 500 μM.
- 25
15. El compuesto para el uso de la reivindicación 11, en el que el compuesto absorbe radiación ultravioleta.
- 30
16. El compuesto para el uso de la reivindicación 11, en el que el compuesto es un antioxidante.
17. El compuesto para el uso de la reivindicación 11, en el que el mamífero es un ser humano.
- 35
18. El compuesto para el uso de la reivindicación 11, en el que la administración es mediante una formulación tópica o un parche oclusivo.

19. El compuesto para el uso de la reivindicación 11, que es para aclarar la pigmentación cutánea.
20. El compuesto para el uso de la reivindicación 11, en el que el uso es
5 para tratar afecciones médicas relacionadas con hiperpigmentación tales como melasma, manchas de la edad, pecas, ocronosis, hiperpigmentación postinflamatoria y léntigo.
21. El compuesto para el uso de la reivindicación 11, en el que el compuesto
10 es tioacetanilida [$\text{CH}_3\text{CSNHC}_6\text{H}_5$].
22. El método de la reivindicación 1 o el compuesto para el uso de la reivindicación 11, en el cual R_2 es S.

REFERENCIAS CITADAS EN LA DESCRIPCIÓN

5 *Esta lista de referencias citadas por el solicitante únicamente es para comodidad del lector. Dicha lista no forma parte del documento de patente europea. Aunque se ha tenido gran cuidado en la recopilación de las referencias, no se pueden excluir errores u omisiones y la EPO rechaza toda responsabilidad a este respecto.*

Documentos de patente citados en la descripción

- 10 • JP 5124925 A [0008] • JP 5124922 A [0008]

Bibliografía no relativa a patentes citada en la descripción

- 15 • **Sakurada, J. et al.** Kinetic and molecular orbital studies on the rate of oxidation of monosubstituted phenols and anilines by horseradish peroxidase compound II. *Biochemistry*, 1990, vol. 29, 4093-4098 [0041]
- **Greene et al.** Protective Groups in Organic Synthesis. John Wiley and Sons, 1991 [0046] [0050] [0052]
- **Saxena, D. B. ; Khajuria, R. K. ; Suri, O. P.** Synthesis and Spectral Studies of 2-Mercaptobenzimidazole Derivatives. *J. Heterocycl. Chem.*, 1982, vol. 19, 681-683 [0058]
- 20 • **Rasmussen, C. R. ; Villani, F. J., Jr. ; Weaner, L. E. ; Reynolds, B. E. ; Hood, A. R. ; Hecker, L. R. ; Nortey, S. O. ; Hanslin, A. ; Costanzo, M. J. et al.** Improved Procedures for the Preparation of Cycloalkyl-, and Arylalkyl-, and Arylthioureas. *Synthesis*, 1988, vol. 6, 456-459 [0064]
- **Uchiro, H. ; Kobayashi, S.** Non-aqueous Reduction of Aromatic Sulfonyl Chlorides to Thios Using a Dichlorodimethylsilane-zinc-dimethylacetamide System. *Tetrahedron Lett.*, 1999, vol. 40, 3179-3182 [0070]
- 25 • **Sastry, S. ; Kudav, N. A.** One-step Synthesis of Aromatic Thio Amides: Reaction of Aromatic Compounds with Potassium Thiocyanate in Polyphosphoric Acid or Sulfuric Acid. *Indian J. Chem., Sect. B*, 1979, vol. 18B, 455 [0086]
- **Hearing VJ Jr.** Monophenol monooxygenase (tyrosinase): Purification, properties, and reactions catalyzed. *Methods Enzymol*, 1987, vol. 142, 154-165 [0105]
- 30 • **Spritz RA et al.** Genetic-disorders of pigmentation. *Adv Hum Genet*, 1994, vol. 22, 1-45 [0105]
- Treatment of melasma with depigmenting agents. **Frenk E.** Melasma: New Approaches to Treatment. Martin Dunitz Ltd, 1995, 9-15 [0105]
- Is there room for a moderate level of regularity oversight?. **Dooley TP.** Drug Discovery Approaches for Developing Cosmeceuticals: Advanced Skin Care and Cosmetic Products. International Business Communications, 1997 [0105]
- **Dooley TP.** Topical skin depigmentation agents: Current products and discovery of novel inhibitors of melanogenesis. *J. Dermatol. Treat.*, 1997, vol. 8, 275-279 [0105]
- **Dooley TP et al.** Development of an in vitro primary screen for skin depigmentation and antimelanoma agents. *Skin Pharmacol.*, 1994, vol. 7, 188-200 [0105]
- An Abridgment of The New Funk & Wagnalls Encyclopedia. The Universal Standard Encyclopedia. Unicorn, 1955, vol. 10, 3662-3663 [0105]
- Gentisic acid. Merck Index. Merck & Co, 1989, 688 [0105]
- **J-Hua L et al.** Direct analysis of salicylic acid, salicyl acyl glucuronide, salicyluric acid and gentisic acid in human plasma and urine by high-performance liquid chromatography. *J. Chromatogr.*, 1996, vol. 675, 61-70 [0105]
- **Glatt HR et al.** Multiple activation pathways of benzene leading to products with varying genotoxic characteristics. *Environ Health Perspect*, 1989, vol. 82, 81-89 [0105]
- **Glatt HR.** Endogenous mutagens derived from amino acids. *Mutat. Res.*, 1990, vol. 238, 235-243 [0105]
- **La Du BN.** Alcaptonuria and ochronotic arthritis. *Mol. Biol. Med.*, 1991, vol. 8, 31-38 [0105]
- **Hearing VJ.** Mammalian monophenol monooxygenase (tyrosinase): purification, properties, and reactions catalyzed. *Methods Enzymol.*, 1987, vol. 142, 154-65 [0105]
- **Spritz RA et al.** Genetic disorders of pigmentation. *Adv. Hum. Genet.*, 1994, vol. 22, 1-45 [0105]
- **Hadley ME et al.** Melanotropic peptides for therapeutic and cosmetic tanning of the skin. *N Y Acad. Sci.*, 1993, vol. 680, 424-39 [0105]
- **Sakai C et al.** Modulation of murine melanocyte function in vitro by agouti signal protein. *EMBO J.*, 1997, vol. 16, 3544-52 [0105]
- **Dooley TP.** Recent advances in cutaneous melanoma oncogenesis research. *Onco. Res.*, 1994, vol. 6, 1-9 [0105]
- **Benmaman O et al.** Treatment and camouflaging of pigmentary disorders. *Clin. Dermatol.*, 1998, vol. 6, 50-61 [0105]

- Topical azelaic acid in the treatment of melasma: pharmacological and clinical considerations. **Zaunseil R-P et al.** Melasma: new approaches to treatment. Martin Dunitz, 1995, 16-40 [0105]
- **Schallreuter KU.** Epidermal adrenergic signal transduction as part of the neuronal network in the human epidermis. *J. Invest. Dermatol.*, 1997, vol. 2, 37-40 [0105]
- 5 • **Bennett DC et al.** A line of non-tumorigenic mouse melanocytes, syngeneic with the B16 melanoma and requiring a tumour promoter for growth. *Int. J. Cancer*, 1987, vol. 349, 414-18 [0105]
- **Dooley TP et al.** Polyoma middle T abrogates TPA requirement of murine melanocytes and induces malignant melanoma. *Oncogene*, 1988, vol. 3, 531-6 [0105]
- 10 • **Brooks G et al.** Protein kinase C down-regulation, and not transient activation, correlates with melanocyte growth. *Cancer Res.*, 1991, vol. 51, 3281-8 [0105]
- **O'Keefe E et al.** Cholera toxin mimics melanocyte stimulating hormone in inducing differentiation in melanoma cells. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 1974, vol. 71, 2500-4 [0105]
- 15 • **Curto, E.V. et al.** Inhibitors of Mammalian Melanocyte Tyrosinase: In Vitro Comparisons of Alkyl Esters of Gentisic Acid with Other Putative Inhibitors. *Biochem. Pharmacol.*, 1999, vol. 57, 663-672 [0105]
- **Sakurada, J. et al.** Kinetic and molecular orbital studies on the rate of oxidation of monosubstituted phenols and anilines by horseradish peroxidase compound II. *Biochemistry*, 1990, vol. 29, 4093-4098 [0105]
- The Pharmacology of Topical Therapy. **Arndt et al.** Dermatology in General Medicine. McGraw Hill, Inc, 1987, 2532-2540 [0105]
- Enzymatic Browning and its Prevention. American Chemical Society, 1995 [0105]
- Tyrosinase: Molecular and active-site structure. **Lerch, K.** Enzymatic Browning and its Prevention. American Chemical Society, 1995, 64-80 [0105]
- **Mishima, H. et al.** Fine structural demonstration of tyrosinase activity in the retinal pigment epithelium of normal and PTU-treated chick embryos. *Albrecht Von Graefes Arch. Klin. Exp. Ophthalmol.*, 1979, vol. 211, 1-10 [0105]
- **Dryja, T.P. et al.** Demonstration of tyrosinase in the adult bovine uveal tract and retinal pigment epithelium. *Invest. Ophthalmol. Vis. Sci.*, 1978, vol. 17, 511-514 [0105]
- **Higashi, Y. et al.** Inhibition of tyrosinase reduces cell viability in catecholaminergic neuronal cells. *J. Neurochem.*, 2000, vol. 75, 1771-1774 [0105]