

19



OFICINA ESPAÑOLA DE  
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 383 682**

51 Int. Cl.:  
**A61Q 19/00** (2006.01)  
**A61K 8/23** (2006.01)  
**A61K 8/24** (2006.01)  
**A61K 8/66** (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

- 96 Número de solicitud europea: **04024815 .5**  
96 Fecha de presentación: **13.06.1997**  
97 Número de publicación de la solicitud: **1598057**  
97 Fecha de publicación de la solicitud: **23.11.2005**

54 Título: **Combinación de enzimas proteasa ácidas y tampones ácidos y su uso**

30 Prioridad:  
**13.06.1996 US 664056**

45 Fecha de publicación de la mención BOPI:  
**25.06.2012**

45 Fecha de la publicación del folleto de la patente:  
**25.06.2012**

73 Titular/es:  
**ACTIVE ORGANICS, INC.  
11230 GRADER STREET  
DALLAS, TX 75238, US**

72 Inventor/es:  
**Norton, Scott J.;  
Gillis, Glen y  
Bishop, Michael**

74 Agente/Representante:  
**Ungría López, Javier**

ES 2 383 682 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

Combinación de enzimas proteasa ácidas y tampones ácidos y su uso.

5 **1. Campo de la invención**

Esta invención se refiere a nuevas composiciones que son útiles para tratar o prevenir afecciones, enfermedades o trastornos anómalos en la piel y/o para mejorar la textura o el aspecto de la piel y/o para potenciar la exfoliación epidérmica y/o para potenciar la renovación celular epidérmica, a su uso y a un método no terapéutico usando las mismas.

10 **2. Antecedentes de la invención**

Está bien establecido que la exfoliación de las capas epidérmicas de la piel humana induce un aumento de la velocidad de la renovación celular epidérmica (E. Phillips, 1995, patente de Estados Unidos n° 5.431.913; W. P. Smith, 1994, *Cosmetics and Toiletries* 109; 41-B), La epidermis humana está compuesta por múltiples capas de células epiteliales escamosas estratificadas en un estado de renovación constante. Las células nuevas se forman primero en la capa basal, que es la membrana más interna de la epidermis. Estas células se ven desplazadas por la producción de células todavía más nuevas y después se transportan hacia la capa externa de la epidermis, el estrato córneo, donde normalmente se eliminan (exfolian) cada dos a tres semanas. La salud y el aspecto general de la piel humana dependen en gran medida de la velocidad de este proceso.

Determinadas situaciones o afecciones, tales como el envejecimiento o la exposición al ambiente, pueden alterar este proceso normal y pueden conducir a una velocidad en general reducida de renovación celular (Van Scott y Yu, 1984, *J. Am. Acad. Dermatol.* 11: 867-79). Dado que el tiempo requerido para que una capa celular migre desde la capa basal hasta el estrato córneo aumenta con la edad del sujeto, la velocidad de renovación de las células epidérmicas disminuye. Se ha comunicado que en una persona normal de veinte años de edad, las células de las capas externas de la epidermis se recambian, de media, cada dos semanas, mientras que los intervalos de recambio celular de piel más madura pueden ser hasta de dos veces más prolongados (E. Phillips, 1995, patente de Estados Unidos n° 5.431.913). La disminución de la velocidad de renovación celular debido el envejecimiento se puede ver agravada por condiciones ambientales tales como la exposición a la radiación solar u otras condiciones climáticas (K. E. Burke, 1990, *Postgraduate Medicine* 88 (1): 207-27). Una disminución en la velocidad de la renovación celular aumenta el tiempo durante el que las células de las capas externas de la piel están expuestas a las condiciones ambientales y pueden conducir a un mayor daño y/o a daño acumulado. En determinados estudios se ha sugerido que una disminución en las velocidades de recambio de células epidérmicas se asocia con un incremento en la cohesión intercorneocitos (Van Scott y Yu, 1989, *Cutis* 43: 222-28).

Las células de la capa epidérmica se mantienen juntas mediante componentes proteínicos, tales como hemidesmosomas, desmosomas, uniones comunicantes, glicosaminoglicanos, proteoglicanos y otros componentes presentes en la piel, todos los cuales poseen la capacidad de unirse entre sí y con los componentes celulares. Esta unión entre sí de las células epidérmicas se describe como "cohesión intercorneocitos" y el grado de la fuerza cohesiva implicada se ve afectado por factores tales como la hidratación y el pH. Un aumento de la cohesión intercorneocitos tiene como resultado la hiperqueratinización y se caracteriza por piel gruesa y a menudo seca o escamosa producida por la retención de células epidérmicas. El equilibrio que existe entre la cohesión y las velocidades de recambio celular es responsable del rejuvenecimiento normal de la piel joven y los desequilibrios de estos factores pueden tener como resultado el aspecto envejecido, áspero y poco atractivo de las superficies epidérmicas. La búsqueda de componentes tópicamente activos que equilibren las velocidades de renovación celular y la cohesión intercorneocitos es muy importante en los esfuerzos de investigación dermatológica hoy en día (Van Scott y Yu, 1984, *J. Am. Acad. Dermatol.* 11: 867-79).

Los recientes avances en este campo de investigación han proporcionado una serie de compuestos ácidos tópicamente activos que son prometedores a este respecto (Yu y col., 1978, patente de Estados Unidos n° 4.105.783; Yu y col., 1982, patente de Estados Unidos n° 4.363.815). Los tratamientos a largo plazo con estos compuestos ácidos tienen como resultado un aumento de la velocidad de la renovación de células epidérmicas. Se ha documentado bien la eficacia como agentes queratolíticos/de descamación de esos componentes ácidos de los que se sabe que son activos a nivel epidérmico, tales como hidroxí o cetoácidos de bajo peso molecular y sus ésteres. Se sabe que las concentraciones elevadas de estos ácidos (por ejemplo ácidos salicílico y glicólico), así como otros ácidos tales como ácido tricloroacético, poseen capacidad para destruir el tejido en el punto de aplicación (W. L. Epstein, 1990, en *Irritant Contact Dermatitis*, Jackson y Glodner, eds., Marcel Decker, Inc., Nueva York y Basel, páginas 127-165; Remington's Pharmaceutical Sciences, A. Osol, ed., Sixteenth Ed., Mack Publishing, Inc., Easton, PA. 1980). A concentraciones menores, se ha mostrado que estos ácidos poseen la capacidad para soltar las células muertas en el estrato córneo rico en queratina e interrumpir la cohesión intercorneocitos, con lo que facilitan la descamación; esta actividad se denomina "actividad queratolítica" (Remington's Pharmaceutical Sciences, A. Osol, ed., Sixteenth Ed., Mack Publishing, Inc., Easton, PA. 1980; W. P. Smith, 1994, *Cosmetics and Toiletries* 109; 41-8).

La mayoría de los queratolíticos son irritantes cutáneos, incluidos los mencionados anteriormente. Aunque se ha comentado que algunos queratolíticos son más eficaces que otros, una comparación del índice terapéutico de cada uno de estos ácidos muestra poca ventaja de uno sobre otro. El "índice terapéutico" es un método exacto de clasificar la eficacia de estos componentes que tiene en cuenta la eficacia queratolítica del componente así como los niveles de irritación a una concentración proporcionada. Se ha mostrado que incluso niveles bajos de estos componentes (concentración de ácido superior a 4%) producen una irritación cutánea. El uso de niveles incluso menores de estos componentes reduce la irritación, aunque en general reduce la eficacia queratolítica. Además, el uso prolongado de los ácidos reduce la eficacia de la inducción de renovación celular (W. P. Smith, 1994, *Cosmetics and Toiletries* 109: 418). Estos inconvenientes destacan la necesidad de una metodología para intensificar la eficacia queratolítica de estos ácidos a concentraciones no irritantes.

Durante algún tiempo se ha usado la aplicación de enzimas proteolíticas en el tratamiento tópico, por ejemplo, para la eliminación de cicatrices producidas por quemaduras y como complemento del tratamiento antimicrobiano (G. Rodeheaver, 1975, *Am. J. Surg.* 129 (5): 537-544). Estas enzimas incluyen aquéllas que en general están restringidas a fuentes vegetales, tales como de la papaya (papaína), del higo (ficina) y de la piña (bromelaína). Se han comercializado formulaciones cosméticas que contienen extractos de estas plantas y que se cree que son intensificadoras de la eliminación de las capas epidérmicas externas mediante acción proteolítica. Aunque la especificidad del sustrato y el espectro de actividad en relación con el pH sugieren que la acción proteolítica de estas formulaciones debería tener como resultado actividad queratolítica en las capas epidérmicas externas, las aplicaciones de las enzimas proteolíticas previamente usadas en el tratamiento tópico no carecen de inconvenientes.

Esas enzimas (por ejemplo, papaína, bromelaína y ficina) que se usan en la actualidad en aplicaciones cosméticas en general presentan actividad proteolítica en un amplio intervalo de pH, de pH 3 a pH 9 (Glazer y Smith, 1971, en The Enzymes, Vol. 3, P. Boyer, ed., Academic Press, Nueva York, páginas 501-546). Es probable que este amplio intervalo de pH de estas enzimas derivadas de plantas sea la causa de al menos algunos de los problemas asociados con la exposición prolongada de la piel. Los sistemas epidérmicos humanos mantienen un gradiente de pH en las capas estratificadas de la piel; se ha comunicado que las capas externas exhiben un pH medio de aproximadamente 5,5 (W. P. Smith, 1994, *Cosmetics and Toiletries* 109: 41-48). El pH de las capas sucesivas de la epidermis aumenta con la profundidad y alcanzan un pH final próximo al del intervalo fisiológico (aproximadamente un pH de 7,4) en la capa dérmica. Dado que las enzimas derivadas de plantas mencionadas anteriormente permanecen activas a lo largo de este gradiente de pH, no hay un control del pH sobre la actividad de estas enzimas vegetales cuando se aplican a la piel.

El grado de actividad terapéutica derivado de la aplicación tópica de las enzimas proteolíticas se rige por las características catalíticas intrínsecas de esas enzimas. El amplio intervalo de actividad proteolítica, en relación con el pH, mostrado por las proteasas mencionadas anteriormente (pH 3-9) permite poco o ningún control sobre la actividad proteolítica por parte de la formulación del producto (Glazer y Smith, 1971, en The Enzymes, Vol. 3, P. Boyer, ed., Academic Press, Nueva York, páginas 501-546). Se sabe que las plantas de las que se han obtenido estas enzimas producen dermatitis de contacto irritante con síntomas entre los que se incluyen prurito, edema y formación de ampollas. Se ha postulado que estas enzimas son la principal causa de esos síntomas, posiblemente a causa de las disminuciones excesivas en la cohesión intercorneocitos (W. L. Epstein, 1990, en Irritant Contact Dermatitis, Jackson y Glodner, eds., Marcel Decker, Inc., Nueva York y Basel, páginas 127-165). Las enzimas que se usan en la actualidad en aplicaciones cosméticas pueden mostrar actividad proteolítica dependiente de sustrato en todas las capas de la epidermis. La proteólisis no controlada de las proteínas epidérmicas que sirven para estabilizar la cohesión intercorneocitos podría reducir esta cohesión intercorneocitos en exceso y producir la consiguiente irritación. El ataque proteolítico en la capa basal de la epidermis, donde se origina la renovación celular, podría causar desequilibrios en la velocidad de renovación de células epidérmicas. La formación de ampollas y el edema podrían ser el resultado del ataque proteolítico sin controlar por la acción de esta clase de enzimas en la membrana basal. Esta posibilidad se ve respaldada por el hecho de que se sabe que la inyección de estas enzimas vegetales en la piel de mamíferos produce edema en la piel (Morimoto y col., 1987, *Ensho* 7 (6): 563-567). Este hallazgo se ha usado para producir edema experimental en investigación dermatológica. Además, los síntomas de dermatitis de contacto irritante que se han enumerado anteriormente son similares a los inducidos por las concentraciones más eficaces de componentes ácidos activos a nivel epidérmico que en la actualidad se usan en aplicaciones tópicas. Por tanto, un abordaje más controlado de la actividad proteolítica en relación con las aplicaciones tópicas debería producir un resultado deseable sin dar lugar a estos efectos secundarios.

Se han comunicado composiciones que contienen una enzima proteolítica, por ejemplo, pepsina, y varios ácidos para la disolución de formaciones necróticas densas, formaciones que se observan, por ejemplo, en las quemaduras de tercer grado (patente de la Unión Soviética n° 439288, 2974). No hay indicación acerca de la utilidad de estas composiciones en la intensificación de la exfoliación epidérmica o de que estas composiciones sean activas sólo durante periodos de tiempo limitados.

D. Watkins et al., *Journal of the Society of Cosmetic Chemists*, vol., 47, 1996, 287-289, describe en un estudio sobre la administración de complejos multienzimáticos en la superficie de la piel.

El documento US 5.516.517 se refiere a un proceso de tratamiento de la piel diseñado para reducir el proceso de envejecimiento de la piel y para hacer que la piel se convierta en una membrana semipermeable, en el que las etapas incluyen exfoliación, limpieza, hidratación y oxigenación.

- 5 A. Baxter et al., *Biochemical Journal*, vol. 267, n° 3, 1990, 665-669, describen estudios de sustratos e inhibidores con proteinasas aspárticas gástricas humanas.

La mención o identificación de cualquier referencia en la técnica anterior de esta solicitud no deberá limitarse como una admisión de que tal referencia esté disponible como técnica anterior con respecto a la presente invención.

10

### 3. Sumario de la invención

La presente invención proporciona una composición de acuerdo con la reivindicación 1, el uso de la composición para la preparación de un medicamento para el tratamiento o la prevención de una afección, enfermedad o trastorno anómalo en la piel de acuerdo con la reivindicación 15 y un método no terapéutico para tratar o prevenir una afección o trastorno anómalo en la piel y/o para regular los efectos de atrofia cutánea de acuerdo con la reivindicación 16. La composición comprende al menos una proteasa ácida y un tampón ácido. Para los propósitos de esta invención, la proteasa ácida es una enzima que presenta actividad peptidil hidrolasa (proteolítica) por debajo del pH medio de la superficie de la piel y es significativamente inactiva a un pH superior o igual al pH medio de la superficie de la piel, que es de aproximadamente 5,5 para seres humanos (W. P. Smith, 1994, *Cosmetics and Toiletries* 109: 41-8). En varones, el pH medio de la superficie de la piel es de aproximadamente 5,3 y en mujeres es de aproximadamente pH 6 (Ohman y Vahiquist, 1994, *Acta Dermato-Venereol.* 74 (5): 375-379). Para los propósitos de esta invención, el pH medio de la superficie de la piel (que es un pH de aproximadamente 5,5) incluye, entre otros, variaciones específicas de sexo, de forma que un pH de aproximadamente 5,5 incluye un intervalo de un pH de aproximadamente 5,3, el pH medio de la superficie de la piel de un varón, hasta un pH de aproximadamente 6, el pH medio de la superficie de la piel de una mujer. Preferentemente, a un pH superior o igual al pH medio de la superficie de la piel (aproximadamente un pH de 5,3-6), las proteasas ácidas útiles en esta invención exhiben menos de aproximadamente un 10% de la actividad enzimática que exhiben a sus pH óptimos respectivos que están por debajo del pH medio de la superficie de la piel.

30

La proteasa ácida puede estar en forma apoenzima, holoenzima, isoenzima o zimógeno. La proteasa ácida componente de la composición puede estar presente en una cantidad de aproximadamente 0,001% a aproximadamente 75% en peso de la composición final, preferentemente de aproximadamente 0,1% a aproximadamente 50%, más preferentemente de aproximadamente 1% a aproximadamente 5%. La o las proteasas poseen una actividad específica de aproximadamente 1 a aproximadamente 5.000 Unidades HUT/mg, según se ha determinado mediante el procedimiento descrito en *Food Chemicals CODEX*, 3a ed., (1981), páginas 496-497, National Academy Press, Washington, D. C., modificado como se describe en la Sección 6.1, más adelante. Preferentemente, la o las proteasas poseen una actividad específica de aproximadamente 50 a aproximadamente 3000 Unidades HUT/mg, más preferentemente de aproximadamente 500 a aproximadamente 1500 Unidades HUT/mg.

40

El tampón ácido es una composición que cuando se aplica tópicamente a la piel, reduce temporalmente el pH de la superficie de la piel hasta menos de aproximadamente un pH de 5,5, pero no inferior a un pH de aproximadamente 1, preferentemente a un pH de entre 2,5 y aproximadamente 4,5. La composición de tampón ácido comprende al menos un ácido y un transportador, vehículo o excipiente farmacéutica o cosméticamente aceptable. El componente ácido del tampón puede ser uno o más ácidos inorgánicos o uno o más ácidos orgánicos, o cualquier combinación de ácidos inorgánicos y/u orgánicos. El tampón ácido es susceptible a neutralización para el pH medio de la superficie de la piel a lo largo del tiempo por procesos epidérmicos naturales, tales como la transpiración. El tiempo necesario para neutralizar el tampón ácido, y por tanto, inactivar la proteasa, dependerá de la formulación del tampón ácido. Por ejemplo, si el tampón ácido contiene un ácido débil o un agente de amortiguación débil para contrarrestar la alcalinidad relativa de la epidermis produce periodos de tiempo más cortos; si se usa un ácido más fuerte o se emplea un agente de amortiguación más fuerte en el tampón ácido se tiene como resultado periodos de tiempo más prolongados. El componente ácido del tampón puede ser uno o más ácidos inorgánicos o uno o más ácidos orgánicos, o cualquier combinación de ácidos inorgánicos y/u orgánicos y pueden estar presentes en una cantidad de aproximadamente 0,001% a aproximadamente 95% en peso de la composición final, preferentemente de aproximadamente 0,01% a aproximadamente 25%, más preferentemente de aproximadamente 1% a aproximadamente 5%.

55

El control del periodo de tiempo necesario para que el pH de la superficie de la piel retorne a un pH de aproximadamente 5,5 después de la aplicación tópica de una composición de la presente invención permite el control de la actividad de la enzima proteasa. Es a través de este control de la actividad proteolítica que la presente invención supera los inconvenientes y complicaciones que se encontraban en la técnica anterior, tales como el prurito, el ardor, la formación de ampollas, etc., causadas por las enzimas proteolíticas de amplio espectro de pH. El periodo de tiempo necesario para que el pH de la superficie de la piel regrese a un pH de aproximadamente 5,5 está determinado por una serie de factores, incluidos el tipo de afección, la enfermedad o trastorno cutáneos que se está tratando y la sensibilidad de la piel del sujeto en particular que se está tratando. Para evitar los inconvenientes y las complicaciones encontrados en la técnica anterior, el periodo de tiempo se encuentra entre 1 minuto a 4 horas, más

60

65

preferentemente entre aproximadamente 30 minutos a aproximadamente 2 horas, más preferentemente entre aproximadamente 30 minutos a aproximadamente una hora.

5 Cabe destacar que las composiciones farmacéuticas de la presente invención son aquellas que, cuando se administran en la piel, ofrecen un beneficio o un efecto de tratamiento o prevención de una afección, enfermedad o trastorno biológico anómalo. Los beneficios o efectos del tratamiento o prevención de tal afección, enfermedad o trastorno anómalo son la reducción en la gravedad o desaparición de los síntomas o causas de la afección, enfermedad o trastorno anómalo. La reducción en la gravedad o desaparición de la afección, enfermedad o trastorno anómalo puede ser a largo o a corto plazo. Tales afecciones, enfermedades o trastornos biológicos anómalos a 10 tratar administrando una composición de la presente invención incluyen, pero sin limitación, xerodermia, xerodermia grave, caspa, acné, queratosis, soriasis, eccema, piel escamosa, prurito, manchas relacionadas con la edad, léntigo, melasma, arrugas (tanto finas como gruesas, causadas por lesión intrínseca así como extrínseca), verrugas, piel manchada, piel hiperpigmentada, piel hiperqueratósica, dermatosis inflamatoria, cambios cutáneos relacionados con la edad, piel que requiere productos de limpieza, así como los efectos de atrofia cutánea.

15 Cabe destacarse también que las composiciones cosméticas de la presente invención son tales que, cuando se administran a la piel, mejoran la textura o el aspecto de la misma o aumentan la exfoliación epidérmica y/o la renovación de las células epidérmicas, sin producir necesariamente un beneficio o un efecto de tratar o prevenir una afección, enfermedad o trastorno biológico anómalo. En este contexto, se pretende que la mejora de la textura o el 20 aspecto de la piel o la intensificación de la exfoliación epidérmica y/o la renovación de células epidérmicas incluya proporcionar a la piel una superficie de aspecto natural y/o de sensación natural de forma que aumente la belleza y/o la suavidad de la piel con respecto a su estado previo al tratamiento u ocultar síntomas no deseados de una afección, enfermedad o trastorno biológico anómalo. Esto puede incluir proporcionar un efecto hidratante temporal a la epidermis. Tales afecciones o enfermedades biológicas anómalas incluyen, pero sin limitación, xerodermia, 25 xerodermia grave, caspa, acné, queratosis, soriasis, eccema, piel escamosa, prurito, manchas asociadas con la edad, léntigo, melasma, arrugas (tanto finas como gruesas, causadas por lesión intrínseca así como extrínseca), verrugas, piel manchada, piel hiperpigmentada, piel hiperqueratósica, dermatosis inflamatoria, cambios cutáneos relacionados con la edad, piel que requiere productos de limpieza, así como los efectos de atrofia cutánea.

30 En una realización preferida la composición comprende un 1% en peso de pepsina y un 1% en peso de ácido fosfórico. En otra realización preferida la composición comprende un 1% en peso de pepsina y un 3% en peso de ácido fosfórico.

35 Sorprendentemente, se ha demostrado que las composiciones y procedimientos de la presente invención poseen efectos cosméticos contra trastornos cutáneos que hasta ahora no se han conseguido con ácidos, ácidos  $\alpha$ -hidroxicarboxílicos, ácidos salicílicos o proteasas de amplio espectro de pH por sí solos.

### 3.1. Definiciones

40 Como se usa en la presente invención, los siguientes términos pretenden incluir:

TAMPÓN ÁCIDO: Una composición que comprende un ácido y opcionalmente un transportador, vehículo o excipiente farmacéutica o cosméticamente aceptable que cuando se aplica por vía tópica a la piel reduce el pH de la superficie de la piel por debajo de aproximadamente un pH de 45 5,5 y está sujeta a la neutralización por los procesos cutáneos naturales de forma que los procesos cutáneos naturales, a lo largo de periodo de tiempo especificado anteriormente, devuelven el pH de la superficie de la piel a su valor normal (que es de aproximadamente pH 5,5). El componente ácido del tampón puede ser un ácido orgánico como se indica en la reivindicación 1.

PROTEASA ÁCIDA: Una enzima que presenta actividad peptidil hidrolasa (proteolítica) aun pH por debajo del pH medio normal de la superficie de la piel, que es de aproximadamente pH 5,5 y que es activo de un modo insignificante a un pH mayor que o igual a tal pH medio normal de la superficie de la piel, es decir, una actividad menor de aproximadamente en 10% a un pH de aproximadamente 5,5 o mayor en comparación con la actividad máxima a pH inferior a aproximadamente 5,5. La proteasa ácida puede estar en forma de apoenzima, holoenzima, isoenzima o 55 zimógeno.

60 COSMÉTICA: Una formulación para administrar a la piel, que mejora la textura o el aspecto de la misma sin que necesariamente proporcione un beneficio o un efecto de tratar o prevenir una afección o una enfermedad biológica anómala. Tal mejora incluye proporcionar un efecto 65 hidratante temporal a la epidermis de mamífero.

<p>CANTIDAD EFICAZ:</p> <p>5</p> <p>10</p> <p>15</p> <p>20</p> <p>25</p> <p>30</p> <p>35</p>	<p>RENOVACIÓN CELULAR EPIDÉRMICA:</p> <p>EXFOLIACIÓN:</p> <p>COMPOSICIÓN FARMACÉUTICA:</p> <p>ATROFIA CUTÁNEA REGULADORA:</p> <p>ATROFIA CUTÁNEA:</p>	<p>Una cantidad suficiente de la composición para inducir significativamente una modificación positiva de la afección que se va a tratar, pero lo bastante baja como para evitar la aparición de efectos secundarios graves. La cantidad eficaz de la composición variará con la afección concreto que se esté tratando, la edad y el estado físico del sujeto que se esté tratando, la gravedad de la afección, la duración del tratamiento, la naturaleza de la terapia simultánea, la composición específica empleada, el transportador particular farmacéuticamente aceptable o el transportador particular cosméticamente aceptable utilizado y factores similares dentro del conocimiento y la experiencia de los expertos en la materia.</p> <p>Proceso por el cual se forman nuevas células cutáneas en la capa basal, se transportan a la capa externa, el estrato córneo, y después se exfolian y sustituyen por células cutáneas aún más nuevas.</p> <p>La separación y eliminación de las células superficiales de un epitelio o de cualquier superficie tisular.</p> <p>Una formulación para administrar a la piel que ofrece un beneficio o un efecto de tratamiento o prevención de una afección o enfermedad biológica anómala.</p> <p>La prevención, retraso, detención, tratamiento o inversión del proceso de la atrofia en la piel de mamíferos.</p> <p>El adelgazamiento y/o degradación general de la capa de la dermis de la piel de mamíferos que se caracteriza por una disminución de los niveles de colágeno y/o elastina así como por una disminución del número, el tamaño y el potencial de multiplicación de las células fibroblastos. La atrofia cutánea es un resultado natural del proceso de envejecimiento, aunque puede deberse a factores intrínsecos o extrínsecos tales como el envejecimiento cronológico natural, el daño producido por la luz, las quemaduras o el daño producido por productos químicos, o a la exposición a contaminantes o alérgenos, por ejemplo el humo de tabaco. La atrofia cutánea a menudo es un efecto secundario indeseable que resulta del tratamiento con ácidos <math>\alpha</math>-hidroxicarboxílicos o ácidos salicílicos.</p> <p>La presente invención puede entenderse más completamente mediante referencias a la descripción detallada y los ejemplos ilustrativos con los que se pretende ilustrar las formas de realización no limitantes de la invención.</p>
--	---	--

#### 4. Breve descripción de las figuras

- 40 La figura 1 es un diagrama de barras que demuestra el efecto de la velocidad de la renovación celular con diferentes concentraciones de una proteasa ácida (Unidades HUT x 106/g) (pepsina) con dos cantidades distintas de un tampón ácido (ácido láctico). ■ 1,5% de ácido láctico, □ 3% de ácido láctico.
- 45 La figura 2 es un diagrama de barras que demuestra los incrementos porcentuales en las velocidades de exfoliación/renovación celular dadas por varias concentraciones de una proteasa ácida (Unidades HUT x 106/g) (pepsina) con respecto a las de un tampón ácido solo (ácido láctico) a concentraciones de 1,5% y 3%. ■ 1,5% de ácido láctico, □ 3% de ácido láctico.
- 50 La figura 3 es un diagrama de barras que demuestra la diferencia en la actividad de la pepsina y la AFP2000, Solvay, Inc., Elkhart IN, una proteasa ácida derivada de hongos, a varios niveles de pH en el ensayo HUT. ■ AFP 2000, □ pepsina.

#### 5. Descripción detallada de la invención

##### 55 5.1. Composiciones

La presente invención proporciona nuevas composiciones para tratar o prevenir afecciones, enfermedades o trastornos anómalos en la piel y/o para mejorar la textura o el aspecto de la piel y/o para potenciar la exfoliación epidérmica y/o para potenciar la renovación celular epidérmica. Las composiciones comprenden al menos una proteasa ácida y un tampón ácido. Tales composiciones se administran preferentemente por vía tópica, para minimizar los efectos sistémicos o los efectos secundarios indeseables. El autor de la invención no desea limitarse a un modo de acción específico; sin embargo, el autor de la invención cree que las composiciones de la presente invención cumplen con los procedimientos de la presente invención reduciendo, en primer lugar, el pH de la superficie de la piel hasta un valor inferior al pH medio de la piel, que es de aproximadamente 5,5 en los seres humanos. La reducción del pH permite la activación del componente proteasa ácida de la composición, que presenta actividad proteolítica/queratolítica durante el tiempo en el que el pH de la superficie de la piel está por debajo de

aproximadamente 5,5. Este periodo de tiempo depende de las condiciones del pH de la piel del individuo y puede regularse mediante la formulación del componente de tampón ácido. Está dentro de la capacidad de un experto en la técnica ajustar la formulación para variar el periodo de tiempo y conseguir el resultado deseado.

- 5 Durante este periodo de tiempo, los procesos epidérmicos, por ejemplo la transpiración, neutralizan el tampón ácido de forma que el pH de la superficie de la piel retorna a su valor normal, un pH medio de aproximadamente 5,5. Por tanto, el incremento del pH inactiva la proteasa ácida y la actividad proteolítica/queratolítica cesa, es decir, disminuye en aproximadamente un 90%. El periodo de tiempo durante el cual el pH de la superficie de la piel está por debajo de aproximadamente 5,5 y durante el cual el componente proteasa está activo, es de entre aproximadamente 1
- 10 minuto a aproximadamente 4 horas, preferentemente de aproximadamente 30 minutos a aproximadamente 2 horas, más preferentemente de entre aproximadamente 30 minutos a aproximadamente 1 hora.

Para los propósitos de esta invención, la proteasa ácida es una enzima que presenta una actividad peptidil hidrolasa (proteolítica) significativa a un pH por debajo de aproximadamente 5,5, que es el pH medio normal de la superficie de la piel, y que está inactiva de forma significativa a un pH de aproximadamente 5,5 o mayor. En varones, el pH medio de la superficie de la piel es de aproximadamente 5,3 y en mujeres es de aproximadamente pH 6. Para los propósitos de esta invención, el pH medio de la superficie de la piel, que es de aproximadamente 5,5, incluye, además de otros, variaciones específicas de sexo, de forma que un pH de aproximadamente 5,5 incluye un intervalo desde aproximadamente pH 5,3, el pH medio de la superficie de la piel de un varón, hasta aproximadamente un pH de 6, el pH medio de la superficie de la piel de una mujer. La proteasa está significativamente inactiva cuando su actividad es igual o inferior al 10% de la actividad en comparación, por ejemplo, con su actividad poco después de su aplicación a la piel, medida mediante el ensayo con cloruro de dansilo que se describe en la Sección 6.1. Las proteasas ácidas útiles en la presente invención son aquéllas que, en un ensayo *in vitro* a pH de aproximadamente 5,5 y mayores, presentan menos de aproximadamente el 10% de la actividad enzimática medida en el mismo ensayo *in vitro* al pH óptimo (menor de aproximadamente pH 5,5) de la proteasa concreta. Véase, por ejemplo, la

15 Sección 6.4, más adelante.

La proteasa ácida puede estar en forma de apoenzima, holoenzima, isoenzima o zimógeno. Además, las proteasas ácidas se pueden aislar de cualquier fuente conocida para el experto en la materia, tales como, por ejemplo, bacterias, hongos, células de cultivo tisular y animales. La preparación de proteasa ácida puede estar presente en una cantidad de aproximadamente el 0,001% a aproximadamente el 75% en peso de la composición final, preferentemente aproximadamente del 0,1% a aproximadamente el 50% y más preferentemente aproximadamente del 1% a aproximadamente el 5%. La proteasa (o proteasas) poseerá una actividad específica de aproximadamente 1 a aproximadamente 6000 Unidades HUT/mg, preferentemente de aproximadamente 50 a aproximadamente 3000

20 Unidades HUT/mg y más preferentemente de aproximadamente 500 a aproximadamente 1500 Unidades HUT/mg, según se determina mediante el método descrito en Food Chemicals CODEX, 3a ed., (1981), páginas 496-497, National Academy Press. Washington, DC, modificado como se describe más adelante.

Brevemente, en primer lugar se preparan las siguientes soluciones madre: SUSTRATO HEMOGLOBINA, se prepara mezclando 2 g de hemoglobina bovina en 80 ml de agua destilada. A continuación la solución se ajusta hasta un pH 2 añadiendo, por ejemplo, ácido fosfórico y/o ácido cítrico y se añade agua destilada adicional hasta un volumen total de 100 ml. Esta solución se separa en cuatro partes iguales y cada parte se ajusta hasta el pH deseado con hidróxido sódico al 50% o ácido clorhídrico al 50%. A continuación, estas soluciones finales se calientan a 30 °C durante 20 minutos y después se filtran a través de lana de vidrio. TCA STOCK se prepara disolviendo ácido tricloroacético en agua destilada hasta una concentración final de TCA al 5% (p/v).

30

35

40

45

A continuación, para cada muestra en la que se tiene que medir la actividad proteolítica, se preparan tubos marcados como "B" y "T". En cada tubo se introducen 4 ml de la solución de hemoglobina y se calienta a 37°C, de forma que la muestra se calienta previamente a 37°C. En el tubo "T", se añaden 100 µg de la solución enzimática, se agita suavemente y se incuba a 37°C durante 20 minutos. Después, a cada tubo se añaden 10 ml de la solución madre de TCA. Al tubo marcado como "B" se añade una cantidad igual de la enzima, como la que se ha añadido antes al tubo "T", que es el control para la absorbancia de fondo. Se centrifuga cada tubo y cada muestra se filtra a través de un filtro de jeringa y coloca la muestra filtrada en una cubeta de cuarzo para leer la absorbancia a 280 nm. La absorbancia real se determina restando la absorbancia de la muestra "T" de la de fondo. Se puede generar una

50

55

curva patrón midiendo cantidades conocidas de actividad proteasa.

Una unidad HUT de actividad proteolítica se define como la cantidad de enzima que produce, en un minuto en las condiciones especificadas del ensayo, un hidrolizado cuya absorbancia a 280 nm es la misma que la de una solución que contiene 1,10 µg por ml de tirosina en ácido clorhídrico 0,006 N. Las unidades HUT por gramo se determinan mediante la siguiente fórmula:

60

$$\text{HUT/g} = (\text{absorbancia a } 280 \text{ nm} \times \text{V}) / (0,0084 \times \text{T} \times \text{W})$$

en la que V es el volumen final de la solución de ensayo, T es el tiempo de reacción en minutos y W es el peso seco de la muestra de enzima original usada en el ensayo en gramos. La concentración de proteína se determina mediante cualquier método conocido en la materia, tal como, por ejemplo, el Ensayo Bradford, que se describe en

65

Current Protocols in Molecular Biology, Ausubel y col., (Eds.), John Wiley & Sons, Inc., Nueva York, 1994.

Entre los ejemplos de tales proteasas se incluyen, aunque no se limita a ellos, pepsina, catepsina, proteasa ácida urinaria humana, proteasas fúngicas derivadas de *Neurospora oryzae*, *Mucor pusillis*, *Mucor miehei*, *Rhizopus chinensis* o de *Endothia parasitica*, proteasas bacterianas rizopuspepsina, penicilopepsina y endotalepsina. Además, las proteasas pueden derivar de procesos que implican procedimientos y técnicas de modificación por ingeniería genética, ya sea con células embrionarias, maduras o inducidas y productos que incluyan segmentos de ADN, plásmidos, vectores, o expresión de los mismos, o células transformadas, o cultivos puros. Debería entenderse que se pueden usar dos o más proteasas ácidas en combinación de forma que la cantidad combinada en porcentaje de peso está dentro de los intervalos anteriormente mencionados

El tampón ácido es una composición que cuando se aplica por vía tópica a la piel, reduce el pH de la superficie de la piel a un pH menor de aproximadamente 5,5. pero no inferior a aproximadamente 1, preferentemente a un pH de aproximadamente 2,5 a un pH de aproximadamente 4,5 durante un periodo de tiempo de 1 minuto a 4 horas La composición de tampón ácido comprende un ácido inorgánico y opcionalmente, un transportador, vehículo o excipiente farmacéutica o cosméticamente aceptable. El componente ácido del tampón es susceptible de neutralización hasta el pH medio normal de la superficie de la piel a lo largo del tiempo por la acción de los procesos epidérmicos naturales, por ejemplo, por transpiración. El tiempo requerido para neutralizar el tampón ácido y, por tanto inactivar la proteasa, dependerá de la formulación del tampón ácido. Por ejemplo, si el ácido y/o agente de amortiguación en el tampón ácido son débiles con respecto a la capacidad neutralizante de la epidermis se tienen como resultado periodos de tiempo más cortos; si se emplea un ácido más fuerte o en el tampón ácido se emplea un agente de amortiguación más fuerte se tienen como resultado periodos de tiempo más largos.

El componente ácido del tampón ácido de la composición es un ácido inorgánico que puede estar presente en una cantidad de aproximadamente 0,001% a aproximadamente 95% en peso de la composición final, preferentemente de aproximadamente 0,01% a aproximadamente 25%, más preferentemente de aproximadamente 1% a aproximadamente 5%. El porcentaje en peso del componente ácido dependerá de la intensidad ácida y la molaridad. Además, la cantidad e intensidad del componente ácido de la composición debería ser tal que se produzcan niveles eficaces de actividad proteolítica/queratolítica pero no niveles significativos de irritación cutánea. Además, el ácido inorgánico del tampón ácido se selecciona del grupo que consiste en ácido fosfórico, ácido pirofosfórico, ácido trifosfórico, ácido polifosfórico y mezclas de los mismos. Debería entenderse que se pueden usar dos o más ácidos en combinación de forma que la cantidad combinada en porcentaje en peso está dentro de los intervalos mencionados anteriormente.

Opcionalmente, el tampón ácido también contiene un componente que es un transportador, vehículo o excipiente farmacéutica o cosméticamente aceptable. Los expertos en la materia conocen bien ejemplos de tales transportadores, vehículos o excipientes farmacéutica o cosméticamente aceptables y se pueden encontrar, por ejemplo, en Remington's Pharmaceutical Sciences, 18ª edición, A. R. Gennaro, Ed., Mack Publishing Co., Easton, Pennsylvania, 1990. Los expertos en la materia conocen bien ejemplos de tales transportadores, vehículos o excipientes farmacéutica o cosméticamente aceptables y se pueden encontrar, por ejemplo, en CTFA International Cosmetic Ingredient Dictionary, 4ª edición, J. M. Nikitakis, Ed., The Cosmetic, Tolley and Fragrance Association, Washington D.C., 1991.

Las composiciones de la presente invención destinadas para aplicación tópica pueden contener ingredientes transportadores, excipientes o vehículos tales como, por ejemplo, agua, acetona, etanol, etilenglicol, propilenglicol, butano-1,3-diol, isopropil miristato, isopropil palmitato, aceite mineral y mezclas de los mismos, para formar lociones, tintes, cremas, emulsiones, geles o pomadas, que son no tóxicos y farmacéutica, cosmética o dermatológicamente aceptables. Además, si se desea, a las presentes composiciones se pueden añadir hidratantes o humectantes. Ejemplos de tales ingredientes adicionales, útiles para composiciones cosméticas, se pueden encontrar en Remington's Pharmaceutical Sciences, 18ª edición, A. R. Gennaro, Ed., Mack Publishing Co., Easton, Pennsylvania, 1990 y en CTFA International Cosmetic Ingredient Dictionary, cuarta edición, J. M. Nikitakis, Ed., The Cosmetic, Tolley and Fragrance Association, Washington D.C., 1991.

Además de estos y otros vehículos que serán evidentes para los expertos habituales en la materia, se entenderá que las composiciones farmacéuticas y cosméticas de la presente invención pueden incluir otros ingredientes, tales como, por ejemplo y no a modo de limitación, aquellos que mejoran o erradican las manchas de la piel, queratosis y arrugas; analgésicos; anestésicos; agentes antiacné; antibacterianos; agentes antilevaduras; agentes antifúngicos; agentes antivirales; agentes anticaspa; agentes antidermatitis; agentes antipruríticos; antieméticos; agentes anticinéticos; agentes antiinflamatorios; agentes antihiperqueratolíticos; agentes antixerodérmicos; antitranspirantes; agentes antisoriásicos; agentes antiseborreicos; agentes acondicionadores y para el tratamiento del pelo; agentes antienvjecimiento y antiarrugas; agentes antiasmáticos; y broncodilatadores; agentes protectores solares; agentes antihistamínicos; agentes aclaradores de la piel; agentes despigmentantes; vitaminas; corticoesteroides; agentes bronceadores; hormonas; retinoides; agentes cardiovasculares tópicos; clotrimazol; ketoconazol; miconazol; griseofulvina; hidroxicina; difenidramina; pramoxina; lidocaína; procaína; mepivacaína; monobenzona; eritidocaína; procaína; mepivacaína; monobenzona; eritromicina; tetraciclina; clindamicina; mecloclina; hidroquinona; minociclina; naproxeno; ibuprofeno; teofilina; cromolina; albuterol; ácido retinoico; ácido 13-cis retinoico; hidrocortisona; 21-

acetato de hidrocortisona; 17-valerato de hidrocortisona; 17- butirato de hidrocortisona; valerato de betametasona; dipropionato de betametasona; acetónida de triamcinolona; fluocinonida; propionato de clobetasol; peróxido de benzoilo; crotamiton; propanolol; prometazina; palmitato de vitamina A; acetato de vitamina E; agentes hidrófilos espesantes usados en las formulaciones farmacéuticas y sus mezclas. Las concentraciones de estos ingredientes variarán dependiendo del uso al cual se destinan, por ejemplo, terapéutico o cosmético.

El control del periodo de tiempo requerido para que el pH de la superficie de la piel vuelva a un pH normal de aproximadamente 5,5 después de la aplicación tópica de una composición de la presente invención permite el control de la actividad de la enzima proteasa. Es a través de este control de la actividad proteolítica mediante el cual la presente invención supera los inconvenientes y complicaciones de la técnica anterior, tales como el prurito, el ardor, la formación de ampollas y otros efectos secundarios indeseables causados por enzimas proteolíticas de amplio espectro de pH. La determinación del periodo de tiempo necesario para que el pH de la piel retorne a un pH normal de aproximadamente 5,5 se determina mediante una serie de factores, incluidos el tipo de afección, enfermedad o trastorno cutáneo que se está tratando, el tipo de piel y su localización en el cuerpo y de la sensibilidad de la piel del sujeto en particular que se está tratando. Para evitar los inconvenientes y las complicaciones que se encuentran en la técnica anterior, el periodo de tiempo se encuentra entre 1 minuto a 4 horas para cualquier aplicación individual de una composición de la presente invención. El límite de tiempo dependerá de una serie de factores, tales como el propósito de la aplicación, por ejemplo, el mantenimiento diario, la eliminación de la piel seca áspera o las pautas terapéuticas/farmacéuticas. Entre otros factores se incluyen el tipo de piel, si es sensible, normal o poco sensible, si padece lesiones o lesiones graves y el modo de aplicación, por ejemplo, una única aplicación, o un lavado continuo o la extensión de una crema o loción. Otro factor es la proteasa (o proteasas) específica usada en el componente de proteasa ácida porque la actividad proteasa depende del sustrato.

## 5.2. Uso y método de la presente invención

La presente invención proporciona el uso y el método tal y como se reivindica en las reivindicaciones 15 y 16, respectivamente.

La cantidad de tampón ácido y de proteasa ácida en la composición final y la frecuencia de la administración tópica en la piel puede variar ampliamente, dependiendo de factores tales como el trastorno cutáneo particular, la gravedad del mismo, la localización y/o el tipo de piel implicada, la sensibilidad de la piel del sujeto y el grado de tratamiento deseado. Se encuentra bien dentro del ámbito del experto en la materia el regular las dosificaciones de acuerdo con las necesidades del sujeto. Como ejemplo se sugiere que la aplicación tópica varíe desde aproximadamente una vez a la semana a aproximadamente 4 o 5 veces al día, preferentemente de aproximadamente 3 veces a la semana a aproximadamente 3 veces al día, más preferentemente aproximadamente una o dos veces al día. La composición final para la administración tópica comprenderá de aproximadamente el 0,001% a aproximadamente el 95%, preferentemente de aproximadamente el 0,01% a aproximadamente el 25%, más preferentemente de aproximadamente el 0,01% a aproximadamente el 5% del componente ácido. La composición final para la aplicación tópica comprenderá de aproximadamente el 0,001% a aproximadamente el 75%, preferentemente de aproximadamente el 0,1% a aproximadamente 50%, más preferentemente de aproximadamente el 1% a aproximadamente el 5% del componente proteasa ácida. Otro modo preferido de administración es la administración crónica. La administración "crónica", como se usa en la presente memoria descriptiva, significa que el periodo de aplicación tópica puede ser durante la vida del sujeto, preferentemente durante un periodo de al menos aproximadamente un mes, más preferentemente de aproximadamente tres meses a aproximadamente veinte años, más preferentemente de aproximadamente seis meses a aproximadamente diez años, aún más preferentemente de aproximadamente un año a aproximadamente cinco años, lo que tiene como resultado el tratamiento o prevención de la afección, enfermedad o trastorno cutáneo anómalo la mejora de la textura o el aspecto de la piel o la intensificación de la exfoliación epidérmica y/o la renovación de las células epidérmicas o la regulación de los efectos de la atrofia cutánea.

En otra realización de la invención, el método, como se reivindica en la reivindicación 16, implica la administración a la piel de forma simultánea de una cantidad eficaz de la composición que comprende un tampón ácido y una proteasa ácida y una cantidad eficaz de uno o más agentes protectores solares, un agente antiinflamatorio, un agente antioxidante/secuestrante de radicales, un agente quelante, un retinoide, un material autobronceador y/o un derivado de benzofurano. Como se usa en la presente memoria descriptiva, "aplicación simultánea" o "simultáneamente" significa administrar los agentes a la piel en el mismo lugar del cuerpo aproximadamente la misma hora. Aunque esto se puede conseguir mediante la administración de los agentes a la piel por separado, el método preferido es administrar a la piel una composición que comprenda todos los agentes deseados. La cantidad de agente protector solar administrada en general varía de aproximadamente 0,02 mg a aproximadamente 1 mg por cm<sup>2</sup> de piel. La cantidad de agente antiinflamatorio administrada en general varía de aproximadamente 0,005 mg a aproximadamente 0,5 mg, preferentemente de aproximadamente 0,01 mg a aproximadamente 1 mg por cm<sup>2</sup> de piel. La cantidad de agente quelante administrada en general varía de aproximadamente 0,001 mg a aproximadamente 1 mg, preferentemente de aproximadamente 0,01 mg a aproximadamente 0,5 mg, más preferentemente de aproximadamente 0,05 mg a aproximadamente 0,1 mg por cm<sup>2</sup> de piel. La cantidad de retinoide administrada en general varía de aproximadamente 0,00001 mg a aproximadamente 0,02 mg por cm<sup>2</sup> de piel. La cantidad de derivado de benzofurano administrada en general varía de aproximadamente 0,001 mg a aproximadamente 1

mg/cm<sup>2</sup> de piel por aplicación, preferentemente de aproximadamente 0,01 a aproximadamente 0,5 mg/cm<sup>2</sup> de piel por aplicación. La cantidad de la composición que comprende un tampón ácido y una proteasa ácida administrada en general varía de aproximadamente 0,001 mg a aproximadamente 1 mg por cm<sup>2</sup> de piel por aplicación, preferentemente de aproximadamente 0,01 mg a aproximadamente 0,5 mg por cm<sup>2</sup>, más preferentemente de aproximadamente 0,05 mg a aproximadamente 0,25 mg/cm<sup>2</sup> por aplicación, en función de la gravedad de la afección que se va a tratar, la sensibilidad de la piel del sujeto, la localización del lugar del tratamiento en el sujeto y de la eficacia de los compuestos empleados.

## 6. Ejemplos

Con el fin de ilustrar de un modo más completo la naturaleza de la invención y la forma de llevar la misma a la práctica, se proporcionan los siguientes ejemplos, que de ninguna manera deben interpretarse como limitantes del resto de la descripción o del alcance de la invención.

Cabe destacar que, en las siguientes composiciones que no incluyen ácido fosfórico en el tampón ácido, no son realizaciones de la presente invención.

En las composiciones y métodos descritos en la Sección 6.1. a 6.4. se usaron los siguientes reactivos:

AFP 2000, una proteasa ácida derivada de hongos, Solvay Inc., Elkhart IN; extracto de algas/extracto de aloe, Active Organics, Inc., Dallas TX; alantoína, Sutton Laboratories, Chatham NJ; Arlacel 65, Tensioactivos ICI, Wilmington DE; ácido aspártico, Ajinomoto USA, Inc., Teaneck NJ; BHT, Eastman Kodak, Co., Rochester NY; butilenglicol, Hoechst Celanese, Co., Charlotte NC; Carbomer, B. F. Goodrich, Co., Brecksville OH; alcohol cetearílico, Lipo Chemicals, Inc., Patterson NJ; alcohol cetílico, Lipo Chemicals, Inc., Patterson NJ; ácido cítrico, Roche Vitamins y Fine Chemicals, Nutley NJ; Cosmowax, Croda Chemicals, Ltd., Parsippany NJ; ciclometicona, Dow Chemicals USA, Midland MI; dihidroxiacetona, Rona/E. Merck Industries, Hawthorne NY; dimeticona, Dow Chemicals USA, Midland MI; EDTA disódico, Ciba-Geigy Co., Greensboro NC; DL-pantenol, Vitamins y Fine Chemicals, Nutley NJ; etoxidiglicol, Gattefosse S. A., París, Francia; ácido glucónico, Sigma Chemicals, San Louis MO; Glycereth-26, Amerchol Co., Edison NJ; estearato de glicerol, Croda Chemicals, Ltd., Parsippany NJ; ácido láctico USP 88%, Rita Corporation, Woodstock IL; lecitina/ácido asiático, Active Organics, Dallas TX; metil gluceth-20, Amerchol Co., Edison NJ; metilparabeno, Napp Co., Lodi NJ; palmitato de octilo, ICI Surfactants, Wilmington DE; neopentanoato de octildodecilo, ICI Surfactants, Wilmington DE; PEG-75, Lipo Laboratories, Inc., Omaha NE; ácido fosfórico al 85%, Sigma Chemicals, Inc., San Louis MO; polacrilamida/C13-14 isoparafina/laureth-7, Seppic, Co., París, Francia; propilenglicol, Dow Chemicals USA, Midland MI; propilparabeno, Napp Co., Lodi NJ; retinil palmitato, Roche Vitamins and Fine Chemicals, Nutley NJ; ácido salicílico, Kalama Co., Seattle WA; carboximetilcelulosa sódica 7 HXF, Aqualon, Co., Wilmington DE; hialuronato sódico, Active Organics, Dallas TX; esteareth-10, Lipo Chemicals, Inc., Patterson NJ; acetato de tocoferilo, Roche Vitamins and Fine Chemicals, Nutley NJ; trietanolamina al 98%, BASF Co., Mount Olive NJ y goma xantán, Kelco, San Diego, CA.

### 6.1. Intensificación de la exfoliación cutánea

Una composición de la presente invención se sometió a ensayo a concentraciones diferentes de la proteasa ácida pepsina, 1: 15.000 NF, American Laboratories, Inc., Omaha, NE, y el ácido láctico del tampón ácido en la cara interna de los antebrazos de individuos humanos para probar la intensificación de la exfoliación cutánea y la renovación celular. Se seleccionaron veinte sujetos de edades entre 30 y 60 años y se requirió que detuvieran el uso de cualquier producto en la cara interna de sus antebrazos antebrazo, a excepción de los suministrados junto con el procedimiento de ensayo (que incluía un jabón sintético) durante 5 días antes y durante el periodo de ensayo. Ninguno de los sujetos: (1) estaba embarazada o en periodo de lactancia o con intención de quedarse embarazada durante los tres meses posteriores al ensayo; (2) presentaba una o más enfermedades transmisibles conocidas; (3) estaba participando en otros estudios clínico en el momento del ensayo; (4) padecía psoriasis, dermatitis y/o eccema; (5) estaba tomando medicación que pudiese interferir con los resultados del ensayo, incluidos retinoides, corticosteroides o antibióticos; (6) había tomado retinoides, corticosteroides o antibióticos durante los seis meses anteriores al ensayo y/o (7) había usado productos relacionados con el tabaco, tenía una piel sensible, presentaba un tipo de piel que se consideró inadecuada para el ensayo o presentaba otras características posiblemente consideradas que les hicieran no adecuados para el ensayo.

En la cara interna de cada antebrazo de cada uno de los sujetos se aplicaron parches con cuatro apósitos adhesivos de 2 x 3 cm, a los que se habían aplicado 1-2 g/cm<sup>2</sup> de cloruro de dansilo al 5% ultrapuro molido en vaselina. Tres de los apósitos de cada antebrazo se usaron como lugares de ensayo y el otro apósito se usó como control.

Los cuatro lugares de cada antebrazo de cada sujeto se cubrieron con los apósitos cargados con cloruro de dansilo y se dejaron sin tocar durante 24 horas. Al final del periodo de 24 horas, se eliminaron los apósitos, los lugares se lavaron y, en los mismos, se confirmó la tinción con cloruro de dansilo por visualización con una fuente de luz UV de onda larga. Los seis lugares de ensayo, que no eran controles, teñidos con cloruro de dansilo en cada sujeto recibieron aplicaciones tópicas dos veces al día de 1-2 ml/cm<sup>2</sup> de una selección aleatorizada de composiciones de

ensayo descritas en la Tabla I. Tras la aplicación, las composiciones de ensayo se frotaron en la piel en los lugares de ensayo hasta que los sitios se secaban. Después de verificar la tinción con cloruro de dansilo, los lugares de ensayo y los de control se dejaron sin cubrir y se trataron del mismo modo, a excepción de que los lugares de ensayo recibieron las aplicaciones de ensayo y los lugares control no recibieron ninguna composición de ensayo.

5

TABLA I

Composición de ensayo N°	Acido láctico (100%) % en peso	Proteasa ácida % en peso*	Unidades HUT/g* 10 <sup>6</sup>	Acido sórbico % conservante en peso	Agua desionizada % en peso
1	0,00	0,00	0,0	0,05	99,95
2	1,50	0,00	0,0	0,05	98,45
3	1,50	0,02	0,02	0,05	98,43
4	1,50	0,20	0,2	0,05	98,25
5	1,50	1,00	1,0	0,05	97,45
6	1,50	2,00	2,0	0,05	96,45
7	1,50	4,00	4,0	0,05	94,45
8	3,00	0,00	0,0	0,05	96,95
9	3,00	0,02	0,02	0,05	96,93
10	3,00	0,20	0,2	0,05	96,75
11	3,00	1,00	1,0	0,05	95,95
12	3,00	2,00	2,0	0,05	94,95
13	3,00	4,00	4,0	0,05	92,95

\* La proteasa acida empleada fue pepsina. 1:15.000. NF American Laboratories, Inc., Omaha NE.

La exfoliación/queratolisis del estrato córneo se determinó visualizando la tinción con cloruro de dansilo diariamente con una fuente de luz UV de onda larga para medir la eliminación de la tinción. El incremento porcentual de la exfoliación/queratolisis y la renovación celular acompañante del estrato córneo se calculó mediante la siguiente fórmula:

10

$$\% \text{ incremento} = \frac{(\text{días para la eliminación del área sin tratar} - \text{días para la eliminación del área tratada})}{\text{días para la eliminación del área sin tratar}} \times 100$$

15

TABLA II

Composición de ensayo N°	Conc. de ácido láctico (%)	Conc. de proteasa ácida* (%)	Unidades HUT/g*10 <sup>6</sup>	Efecto de la composición (% incremento sobre el valor control)	Efecto de la pepsina (% incremento sobre los valores de control del ácido láctico)
1	0,00	0,00	0,0	0 (control)	0
2	1,50	0,00	0,0	14	0 (control)
3	1,50	0,02	0,02	14	0
4	1,50	0,20	0,2	17	21
5	1,50	1,00	1,0	25	79
6	1,50	2,00	2,0	28	100
7	1,50	4,00	4,0	33	136
8	3,00	0,00	0,0	18	0 (control)
9	3,00	0,02	0,02	18	0
10	3,00	0,20	0,2	23	28
11	3,00	1,00	1,0	31	72
12	3,00	2,00	2,0	33	83
13	3,00	4,00	4,0	36	100

\* La proteasa acida empleada fue Pepsina. 1:15.000, NF-, American Laboratories, Inc., Omaha NE.

Los datos recogidos del ensayo se resumen en la Tabla II y en las Figuras 1 y 2. Como se observa en la Tabla 2, columna 5, el ácido láctico del tampón ácido en solitario tuvo algunos efectos de renovación celular/queratolíticos positivos [en comparación con la composición de ensayo 2 y 8 con respecto al control (composición de ensayo 1)] a concentraciones del 1,5 % y del 3 % en peso. Estos efectos de renovación celular/queratolíticos positivos mejoran significativamente en presencia de la proteasa ácida pepsina (véanse las composiciones de ensayo 3-7 y 9-13). También es evidente que las mejoras son dependientes de la dosis, es decir, las velocidades de renovación

20

celular/exfoliación del estrato córneo aumentan a medida que la concentración de la proteasa ácida aumenta, véase la columna 5 de la Tabla II. La Figura 1 presenta gráficamente los datos de la columna 5.

La columna 6 de la Tabla II refleja el aumento porcentual en las velocidades de renovación celular/exfoliación proporcionadas por diversas concentraciones de la proteasa ácida pepsina sobre las proporcionadas por el ácido láctico en solitario a concentraciones del 1,5 % y del 3 % en peso. Los datos de la columna 6 se presentan gráficamente en la Figura 2. Es evidente que, aunque el efecto de la proteasa ácida es significativo a las dos concentraciones de ácido láctico empleadas, las mayores mejoras porcentuales las proporciona la proteasa ácida pepsina a una concentración de ácido láctico del 1,5 % en peso.

Se observó un bajo nivel de enrojecimiento e inflamación en la piel de algunos de los sujetos sometidos a ensayo, aproximadamente el 75 % de los sitios de la piel sometida a ensayo a una concentración de ácido láctico del 3 % en peso, pero se observó escasamente a una concentración de ácido láctico del 1,5 % en peso. Además, este hallazgo fue en gran parte independiente de la presencia de pepsina. Por tanto, se consigue una renovación celular/exfoliación significativa empleando un tampón ácido a un nivel bajo, no irritante en presencia de una concentración apropiada de una proteasa ácida. A diferencia de las proteasas que son activas al intervalo de pH fisiológico, las proteasas ácidas, como se han definido en la presente memoria descriptiva, aplicadas a la piel mantienen su actividad proteolítica sólo hasta que los propios procesos naturales de la piel eleven el pH de la superficie de la piel a su valor normal de aproximadamente 5,5.

6.2. Composiciones para usar en los métodos de la presente invención

Las siguientes tablas citan formulaciones de diferentes ejemplos de composiciones de la presente invención. Todas las siguientes composiciones se ajustaron a un pH de aproximadamente 3 a 3,2, por ejemplo, con ácido fosfórico diluido o hidróxido sódico, NaOH.

TABLA III

LAVADO-AP-01	
	PORCENTAJE EN PESO
ACIDO ASPÁRTICO	1,50
AGUA DESIONIZADA	82,50
METILPARABENO	0,20
PEG 75	1,50
EDTA DISÓDICO	0,05
ALANTOÍNA	0,25
GLICERETH 26	1,00
ETOXIDIGLICOL	4,00
PROPILENGLICOL	4,00
AFP 2000	5,00
<b>TOTAL</b>	<b>100,00</b>

TABLA IV

LAVADO-AP-02	
	PORCENTAJE EN PESO
ACIDO FOSFORICO 85%	1,20
AGUA DESIONIZADA	86,80
METILPARABENO	0,20
PEG 75	1,50
EDTA DISÓDICO	0,05
ALANTOÍNA	0,25
GLICERETH 26	1,00
ETOXIDIGLICOL	4,00
PROPILENGLICOL	4,00
PEPSINA 1.000 UNIDADES HUT/MG	1,00
<b>TOTAL</b>	<b>100,00</b>

TABLA V

SUERO-AP-03	
	PORCENTAJE EN PESO
ACIDO SALICÍLICO	0,50
TRITANOLAMINA 99%	1,00
ACIDO LÁCTICO USP 88%	1,20
AGUA DESIONIZADA	82,70
CARBOXIMETILCELULOSA SÓDICA 7 HXF	0,60
METILPARABENO	0,20
PEG 75	1,50
EDTA DISÓDICO	0,05
ALANTOÍNA	0,25
METIL GLUCETH-20	1,00
GLICERETH 26	1,00
ETOXIDIGLICOL	4,00
PROPILENGLICOL	4,00
LECITINA/ACIDO ASIÁTICO	1,00
PEPSINA 1.000 UNIDADES HUT/MG	1,00
<b>TOTAL</b>	<b>100,00</b>

TABLA VI

SUERO-AP-04	
	PORCENTAJE EN PESO
ACIDO GLUCÓNICO	1,50
AGUA DESIONIZADA	84,08
METILPARABENO	0,02
CARBOXIMETILCELULOSA SÓDICA 7HXF	0,60
PEG 75	1,50
EDTA DISÓDICO	0,05
ALANTOÍNA	0,25
GLICERETH 26	1,00
ETOXIDIGLICOL	4,00
PROPILENGLICOL	4,00
LECITINA/ACIDO ASIÁTICO	1,00
PEPSINA 1.000 UNIDADES HUT/MG	1,00
<b>TOTAL</b>	<b>100,00</b>

5

TABLA VII

Loción de pepsina-AP-05	
	PORCENTAJE EN PESO
AGUA DESIONIZADA	64,75
GOMA XANTANO	0,10
EDTA DISÓDICO	0,10
ALANTOÍNA	0,50
EXTRACTO DE ALGAS (y) EXTRACTO DE ALOE	6,00
METILPARABENO	0,20
DL-PANTENOL	0,50
ETOXIDIGLICOL	4,00
BUTILENGLICOL	5,00
ALCOHOL CETÍLICO	2,00
ESTEARATO DE GLICERIL	2,00
PALMITATO DE OCTILO	4,00
CICLOMETICONA	2,00
PROPILPARABENO	0,10
BHT	0,05
POLIACRILAMIDA (e) ISOPARAFINA C13-14 (y) LAURETH-7	1,50
HIALURONATO SÓDICO	3,00
RETINIL PALMITATO	0,10
ACETATO DE TOCOFERILO	0,10
PEPSINA 1.000 UNIDADES HUT/MG	1,00
ACIDO CÍTRICO	3,00
<b>TOTAL</b>	<b>100,00</b>

TABLA VIII

Gel de renovación-AP-06	
	PORCENTAJE EN PESO
AGUA DESIONIZADA	89,60
CARBOMER	1,50
ÁCIDO SALICÍLICO	0,50
ACIDO LÁCTICO USP 88%	1,20
PROPILENGLICOL	8,00
PEPSINA 1.000 UNIDADES HUT/MG	1,00
METILPARABENO	0,15
PROPILPARABENO	0,05
<b>TOTAL</b>	<b>100,00</b>

TABLA IX

Gel de renovación-AP-07	
	PORCENTAJE EN PESO
AGUA DESIONIZADA	86,10
POLIACRILAMIDA (e) ISOPARAFINA C13-14 (y) LAURETH-7	4,00
ACIDO SALICÍLICO	0,50
ACIDO LÁCTICO USP 88%	1,20
BUTILENGLICOL	8,00
PEPSINA 1.000 UNIDADES HUT/MG	1,00
METILPARABENO	0,15
PROPILPARABENO	0,05
<b>TOTAL</b>	<b>100,00</b>

5

TABLA X

Loción de autobronceado-AP-08	
	PORCENTAJE EN PESO
AGUA DESIONIZADA	48,15
GOMA XANTANO	0,75
PROPILENGLICOL	5,00
METILPARABENO	0,20
PROPILPARABENO	0,10
PEPSINA 1.000 UNIDADES HUT/MG	2,00
ESTEARETH-10	0,70
ARLACEL1651	1,20
ESTEARATO DE PEG-40	0,40
COSMOWAX J2	1,00
ALCOHOL CETEARÍLICO	1,50
CICLOMETICONA	5,00
DIMETICONA	0,50
NEOPENTANOATO DE OCTILDODECILO	28,50
DIHIDOXIACETONA	5,00
<b>TOTAL</b>	<b>100,00</b>

### 6.3. Composición de estabilización

10 La siguiente composición a pH 3 retiene al menos el 90% de su actividad de proteasa ácida en un periodo de al menos tres meses, durante los cuales la composición se almacenó a 37°C.

	% en peso
Ciclometicona	5,0
Alcohol cetílico	1,5
Arlacel 165	1,5
Dimeticona	1,0
Sepigel 305	3,0
Fenoxietanol	1,0
EDTA disódico	0,1
Butilen glicol	10,0
Ácido cítrico/citrato sódico	3,0
Acido láctico (100%)	1,5
Acido sórbico	0,05

	% en peso
Lactosa	1,0
Pepsina; 1000 Unidades HUT/mg	1,0
H <sub>2</sub> O	70,35

#### 6.4. Actividad proteolítica a niveles variables de pH

5 Se sometieron a ensayo dos enzimas proteasa ácida en un intervalo de valores de pH para determinar si poseían actividad proteolítica a un pH inferior a aproximadamente 5,5 y si la actividad disminuía a menos de aproximadamente el 10% en comparación con su actividad al pH óptimo. La actividad proteolítica se midió determinando el efecto proteolítico sobre la hemoglobina usando el ensayo HUT, como se describe más adelante. Las dos proteasas ácidas fueron pepsina 1: 15.000 NF, a aproximadamente 1000 Unidades HUT/mg, suministrada por American Laboratories, Inc., Omaha NE, y AFP 2000, una proteasa ácida derivada de hongos suministrada por Solvay, Inc., Elkhart IN, a aproximadamente 100 Unidades HUT/mg. El ensayo se llevó a cabo en primer lugar preparando soluciones madre de SUSTRATO HEMOGLOBINA y TCA STOCK. El sustrato hemoglobina se preparó disolviendo 2 g de hemoglobina bovina, Sigma Chemicals, Inc., San Louis MO, en 80 ml de agua destilada. Esta solución se ajustó después al pH correcto, bien a pH 2, 3,6, 5,5 ó 6. Para valores de pH entre 1 y 3, se disolvieron 15 1,8 g de ácido fosfórico hasta una concentración final de 100 mM y el pH se ajustó con hidróxido sódico al 50% o ácido clorhídrico al 50%. Para valores de pH entre 3 y 6, se disolvieron 2 g de ácido cítrico hasta una concentración final de 100 mM y el pH se ajustó con hidróxido sódico al 50% o ácido clorhídrico. Las soluciones se llevaron hasta un volumen final de 100 ml mediante la adición de agua destilada. Los sustratos con diferentes valores de pH se incubaron a 30°C durante 20 minutos y después se filtraron a través de lana de vidrio. La solución de TCA STOCK se preparó disolviendo 5 g de ácido tricloroacético en 100 ml de agua destilada.

A continuación se prepararon patrones enzimáticos disolviendo 10 mg de pepsina en 10 ml de agua destilada y disolviendo 100 mg de AFP 2000 y 300 mg de ácido cítrico en 8 ml de agua destilada. Esta solución se ajustó después a un pH de aproximadamente 3,5 con HCl 6M de hidróxido sódico al 50% y el volumen final se llevó hasta 25 10 ml mediante la adición de agua destilada.

Para cada una de las muestras se marcaron cuatro tubos como "B", "T1", "T2" y "T3" y a cada tubo se añadieron 4 ml de la solución de sustrato hemoglobina, y después se calentaron a 37°C. A cada tubo marcado como "T", es decir, a los tubos "T1", "T2" y "T3", se añadieron 100 µl del patrón enzimático. A continuación se incubaron los tubos durante 20 minutos a 37°C para pepsina y 30 minutos para AFP 2000. Después a todos los tubos se añadieron 10 ml de solución de TCA stock y al tubo "B" se añadieron 100 µl de enzima. A continuación los tubos se centrifugaron durante un minuto a 1000 rpm. La muestra de cada tubo se filtró mediante un filtro de jeringa en una cubeta de cuarzo y se leyó la absorbancia a 280 nm. La absorbancia de fondo se dedujo de la de cada tubo "T" y se realizó la media de las absorbancias individuales "T1", "T2" y "T3" para cada enzima a cada pH ensayado.

35 La figura 3 demuestra que ambas enzimas eran óptimamente activas a pH 2. Además, ambas enzimas poseían una actividad menor del 10% a pH 5,5 y mayor en comparación con el nivel óptimo a pH 2. Este ensayo claramente demuestra que estas enzimas son enzimas que se pueden usar en la presente invención. Además, al usar tal ensayo puede determinarse qué enzimas adicionales son adecuadas para usar en la presente invención.

40 La invención descrita y reivindicada en la presente memoria descriptiva no debe limitarse al ámbito de las reivindicaciones específicas descritas en la presente memoria descriptiva dado que estas realizaciones pretenden ilustrar diversos aspectos de la invención. Cualquiera de las realizaciones equivalentes pretende incluirse en el ámbito de la presente invención. De hecho, diversas modificaciones de la invención, además de las mostradas y descritas en la presente memoria descriptiva, serán evidentes para los expertos en la materia a partir de la anterior descripción. Tales modificaciones también pretenden incluirse dentro del ámbito de las reivindicaciones adjuntas.

## REIVINDICACIONES

1. Una composición para tratar o prevenir una afección, enfermedad o trastorno anómalo en la piel y/o para potenciar la exfoliación epidérmica y/o para mejorar la textura o el aspecto de la piel, que comprende: (1) una proteasa ácida que es enzimáticamente activa a un pH por debajo de aproximadamente 5,5 y que es insignificativamente activa a un pH igual o superior a 5,5; y (2) un tampón ácido que comprende un ácido inorgánico que reduce el pH de la superficie de la piel hasta por debajo de aproximadamente 5,5 durante un periodo de tiempo de entre 1 minuto a 4 horas, estando el tampón ácido sujeto a la neutralización por la acción de procesos epidérmicos naturales, de forma que el pH de la superficie de la piel vuelve a un pH de aproximadamente 5,5, en el que el ácido inorgánico se selecciona del grupo que consiste en ácido fosfórico, ácido pirofosfórico, ácido trifosfórico, ácido polifosfórico y mezclas de los mismos
2. La composición de acuerdo con la reivindicación 1, en la que el tampón ácido comprende adicionalmente un transportador, vehículo o excipiente farmacéutica o cosméticamente aceptable.
3. La composición de acuerdo con la reivindicación 1, en la que la proteasa ácida se selecciona del grupo constituido por proteasas fúngicas, proteasas bacterianas y proteasas de mamífero y sus mezclas.
4. La composición de acuerdo con la reivindicación 3, en la que la proteasa ácida se selecciona del grupo constituido por pepsina, catepsina, proteasa ácida urinaria humana, rizopuspepsina, penicilopepsina, endotiapepsina y sus mezclas.
5. La composición de acuerdo con la reivindicación 2, en la que el componente transportador, vehículo o excipiente farmacéutica o cosméticamente aceptable del tampón ácido se selecciona del grupo constituido por lociones, tintes, cremas, emulsiones, geles, pomadas, agua, crema moldeable en agua, alcohol polivinílico, hidroxietilcelulosa, celulosa, polímero acrílico hidrófilo, emolientes, componentes hidratantes de la piel, estabilizantes enzimáticos, glicerol, tensioactivos, conservantes, agentes espesantes hidrófilos usados en las formulaciones farmacéuticas y sus mezclas.
6. La composición de acuerdo con la reivindicación 1, en la que la proteasa ácida está presente en una cantidad de aproximadamente 0,001% a aproximadamente 75% en peso de la composición final.
7. La composición de acuerdo con la reivindicación 6, en la que la proteasa ácida está presente en una cantidad preferentemente de aproximadamente 0,1% a aproximadamente 50% en peso de la composición final.
8. La composición de acuerdo con la reivindicación 7, en la que la proteasa ácida está presente en una cantidad de aproximadamente 1% a aproximadamente 5% en peso de la composición final.
9. La composición de acuerdo con la reivindicación 1, en la que la proteasa ácida posee una actividad específica total de aproximadamente 1 a aproximadamente 5000 Unidades HUT/mg.
10. La composición de acuerdo con la reivindicación 9, en la que la proteasa ácida posee una actividad específica total de aproximadamente 50 a aproximadamente 3000 Unidades HUT/mg.
11. La composición de acuerdo con la reivindicación 10, en la que la proteasa ácida posee una actividad específica total de aproximadamente 500 a aproximadamente 1500 Unidades HUT/mg.
12. La composición de acuerdo con la reivindicación 1, en la que el componente ácido del tampón ácido está presente en una cantidad de aproximadamente 0,001% a aproximadamente 95% en peso de la composición final.
13. La composición de acuerdo con la reivindicación 12, en la que el componente ácido del tampón ácido está presente en una cantidad de aproximadamente 0,01% a aproximadamente 25% en peso de la composición final.
14. La composición de acuerdo con la reivindicación 13, en la que el componente ácido del tampón ácido está presente en una cantidad de aproximadamente 1% a aproximadamente 5% en peso de la composición final.
15. El uso de una composición de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 1 a 14 para la preparación de un medicamento para el tratamiento o la prevención de una afección, enfermedad o trastorno anómalo en la piel seleccionado del grupo que consiste en xerodermia, xerodermia grave, caspa, acné, queratosis, soriasis, eccema, piel escamosa, prurito, verrugas, piel manchada, piel hiperpigmentada, piel hiperqueratósica, dermatosis inflamatoria y soriasis.
16. Un nuevo método terapéutico para el tratamiento o la prevención de una afección o trastorno anómalo en la piel y/o para regular los efectos de atrofia cutánea que comprende la administración por vía tópica a un sujeto sobre un área de la piel de una cantidad eficaz de una composición de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 1 a

14, en el que la afección o trastorno anómalo en la piel se selecciona del grupo que consiste en manchas relacionadas con la edad, melasmas, arrugas, léntigo y cambios cutáneos relacionados con la edad.

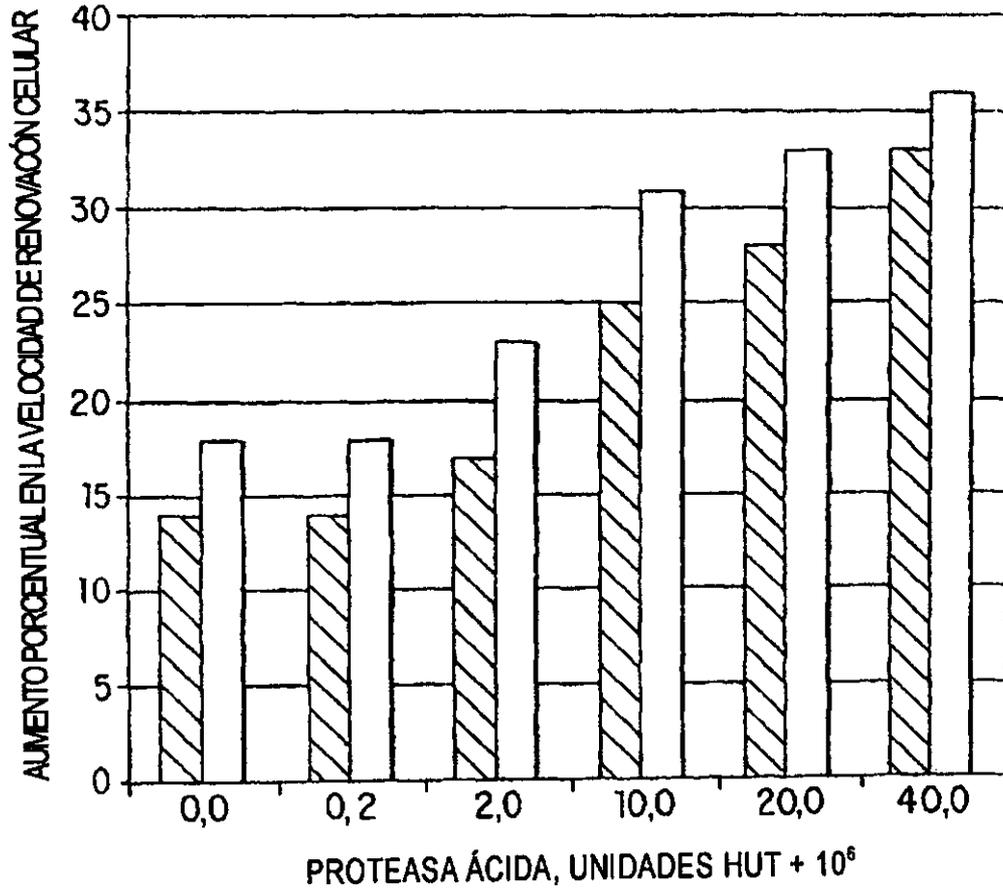


FIG. 1

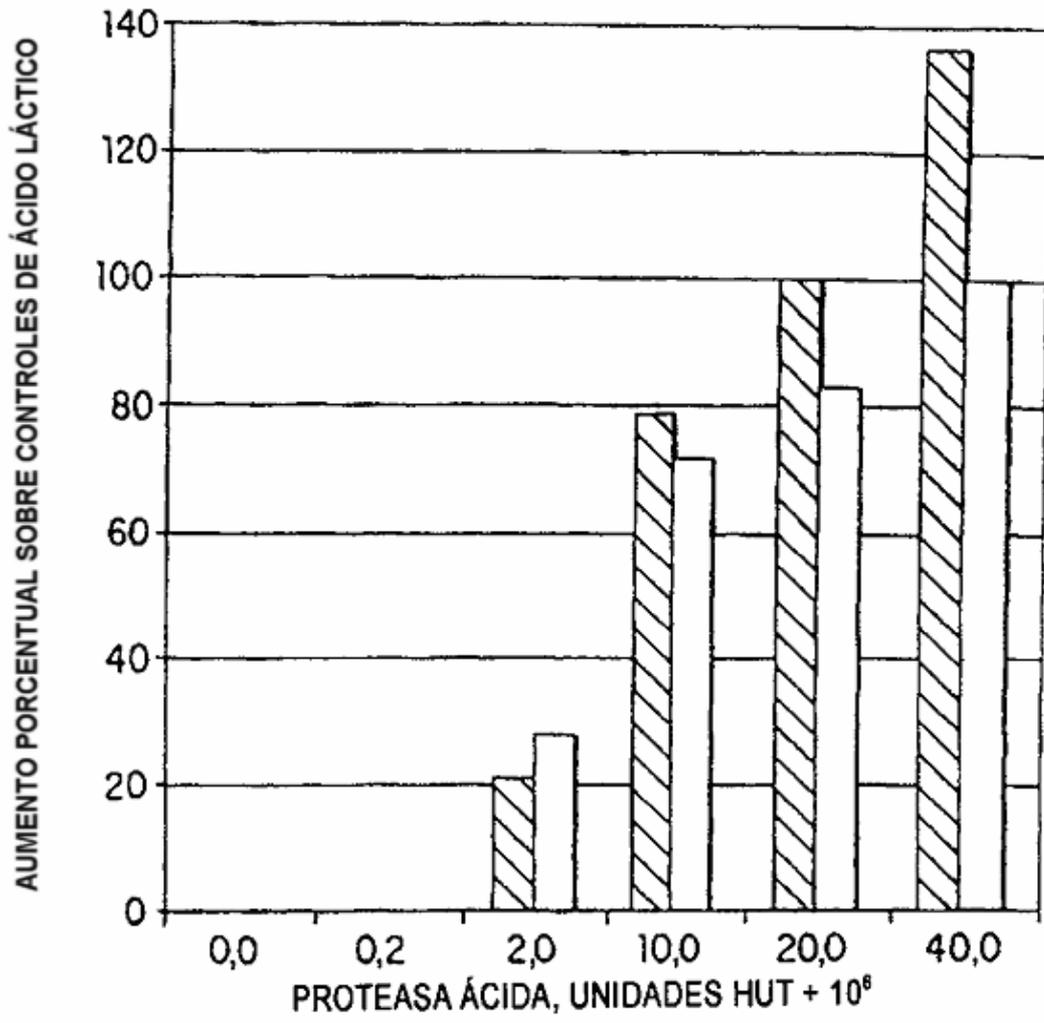


FIG. 2

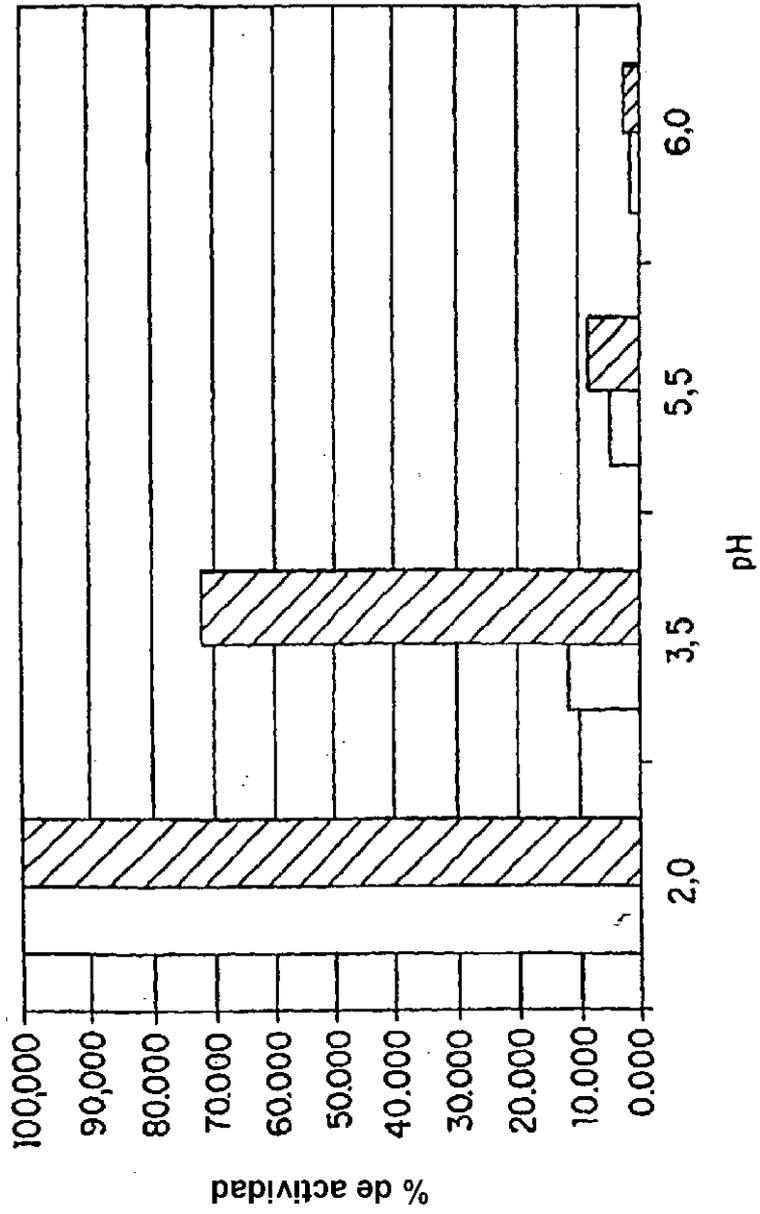


FIG. 3