

19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 384 506**

51 Int. Cl.:
A61K 31/015 (2006.01)
A61K 31/05 (2006.01)
A61K 31/085 (2006.01)
A61K 31/09 (2006.01)
A61K 31/357 (2006.01)
A61K 31/40 (2006.01)
A61P 17/00 (2006.01)
A61P 35/00 (2006.01)
C07D 233/02 (2006.01)
C07D 323/00 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

96 Número de solicitud europea: **05762186 .4**
96 Fecha de presentación: **27.05.2005**
97 Número de publicación de la solicitud: **1748767**
97 Fecha de publicación de la solicitud: **07.02.2007**

54 Título: **1-(3-Metil-2,4-dimetoxifenil)-3-(2',4'-dihidroxifenil)-propano como un potente inhibidor de tirosinasa**

30 Prioridad:
28.05.2004 US 575599 P

45 Fecha de publicación de la mención BOPI:
06.07.2012

45 Fecha de la publicación del folleto de la patente:
06.07.2012

73 Titular/es:
Unigen, Inc.
2660 Willamette Drive, N.E.
Lacey, WA 98516, US;
Jia, Qi y
Zhao, Ji-Fu

72 Inventor/es:
JIA, Qi y
ZHAO, Ji-Fu

74 Agente/Representante:
de Elzaburu Márquez, Alberto

ES 2 384 506 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

1-(3-Metil-2,4-dimetoxifenil)-3-(2',4'-dihidroxifenil)-propano como un potente inhibidor de tirosinasa.

Solicitudes relacionadas

Esta solicitud reivindica el beneficio de la solicitud provisional de EE.UU. nº de seri 60/575.599, presentada el 28 de mayo de 2004, titulada "diarilalcanos como potentes inhibidores de enzimas binucleares".

Campo de la invención

Esta invención se refiere al compuesto 1-(3-metil-2,4-dimetoxifenil)-3-(2',4'-dihidroxifenil)-propano para ser usado en el tratamiento de enfermedades y estados mediados por enzimas binucleares. Específicamente, dicho compuesto inhibe la actividad de una enzima que tiene un sitio activo binuclear. Está incluido en la presente invención el compuesto nuevo 1-(3-metil-2,4-dimetoxifenil)-3-(2',4'-dihidroxifenil)-propano y se describen en la presente memoria descriptiva composiciones comprendidas por uno o más diarilalcano(s). Los diarilalcanos reivindicados y descritos en la presente memoria descriptiva pueden ser aislados a partir de una o más fuentes vegetales o pueden ser obtenidos mediante síntesis orgánicas. Se describen en la presente memoria descriptiva métodos para aislar estos compuestos a partir de una fuente natural y métodos para sintetizar estos compuestos. Los diarilalcanos pueden ser obtenidos mediante una modificación sintética de un compuesto que se produce de forma natural aislado a partir de una fuente vegetal.

Antecedentes de la invención

Hay una gran demanda de productos capaces de inhibir o prevenir la pigmentación excesiva de la piel. La melanina, el pigmento natural de la piel, es un polímero nitrogenoso sintetizado en melanosomas, que son orgánulos unidos a membranas presentes en los melanocitos. La melanina se produce en concentraciones variables, dependiendo del tipo de piel (disposición genética) y de las condiciones medioambientales. Los melanocitos son células que se producen en la membrana basal de la epidermis y suponen entre un 5% y 10% del contenido celular (aproximadamente 1.200-1.500 melanocitos por cm^2). Cuando son estimulados por factores como la luz ultravioleta (UV), los melanocitos se dividen más rápidamente, produciendo así cantidades mayores de melanina. La melanina es seguidamente transportada en melanosomas maduros hasta los queratinocitos, en la epidermis, en la que resultan visibles en forma de un color marrón de la piel.

El número de melanocitos en la piel humana es más o menos el mismo, independientemente del color de la piel. El color de la piel depende grandemente de la cantidad y el tipo de melanina producida (eumelanina negra o feomelanina amarilla a roja-marrón). Los asiáticos y las personas de piel brillante tienen niveles inferiores de eumelanina que las personas de piel oscura y, correspondientemente, menos protección contra los efectos de la radiación. Las personas con el pelo rojo se caracterizan por una pigmentación con feomelanina y tienen poca o ninguna foto-protección. Adicionalmente, la distribución de melanina en la piel varía también. En personas con la piel clara, la mayor parte del pigmento se sitúa en la capa basal, mientras que en los que tienen la piel oscura, la melanina se extiende por todas partes, alcanzando la capa cornea.

La sobreproducción de melanina puede provocar diferentes tipos de color anormal de la piel, color del cabello y otras enfermedades y estados de la piel. Principalmente hay dos estados relacionados con los trastornos de pigmentación de la piel. Un oscurecimiento de la piel que incluye melanina anormalmente elevada provocada por la exposición a UV y el envejecimiento; y una distribución anormal de los pigmentos de la piel que dan lugar a manchas de envejecimiento, manchas hepáticas e hiperpigmentación inducida por fármacos y heridas/enfermedades (Seiberg et al. (2000) J. Invest. Dermatol. 115:162; Paine et al. (2001) J. Invest. Dermatol. 116:587).

Los moduladores de la melanogénesis (la producción de melanina pueden ser diseñados o escogidos para funcionar en una diversidad de formas como se ilustra en la figura 1. Con referencia a la figura 1, pueden actuar directamente modulando la estructura de melanosomas y funcionar antes de la síntesis de melanina, pueden actuar inhibiendo la producción o función de enzimas como tirosinasa, que están involucradas en las síntesis de melanina, pueden cambiar la relación de eumelanina/feomelanina o pueden funcionar amortiguando los mecanismos responsables de la transferencia de melanosomas desde los melanocitos a los queratinocitos. (Briganti et al. (2003) Pigment Cell Research 16:101-110).

La tirosinasa es un enzima clave en la producción de melanina. Cataliza tres reacciones: la hidroxilación de tirocina a 3,4-dihidroxifenilalanina (DOPA), la oxidación de DOPA a DOPA quinona y la oxidación de DHI (5,6-dihidroxiindol) a indol-quinona- (Hearing et al. (1991) FASEB 53:515). Se ha determinado que la tirosinasa necesita tanto el sustrato como los iones de metal divalente para su actividad catalítica. Los procedimientos actualmente usados para inhibir la síntesis de melanina con el fin de aclarar la piel están basados principal en sustancias que inhiben la actividad de tirosinasa, directamente o interaccionando con la propia tirosinasa, o indirectamente, por ejemplo, formando complejos con los iones metálicos necesarios.

La tirosinasa pertenece a la familia de proteínas de cobre de tipo 3, que contienen dos iones de cobre en su sitio activo. Los estudios sobre la estructura del sitio activo de la tirosinasa han puesto de manifiesto que dos iones de

cobre están estrechamente espaciados y cada ion está coordinado a tres histidinas a través del átomo de nitrógeno N-ε de su cadena lateral, como se ilustra en la figura 2. (Pfaffner and Lerch (1981) Biochem. 20: 6029; Cuff et al. (1998) J. Mol. Biol. 278:855). Los iones de cobre binucleares pueden existir en tres formas redox principales: la forma reducida $\text{Cu}^{\text{I}}\text{-Cu}^{\text{I}}$, la forma $\text{Cu}^{\text{II}}\text{-O}_2\text{-Cu}^{\text{II}}$ que se une reversiblemente a O_2 en forma del peróxido y la forma restante de la enzima, en la que los iones Cu^{2+} están normalmente unidos en forma de un puente mediante un ligando pequeño. Se ha determinado que el estado redox $\text{Cu}^{\text{II}}\text{-O}_2\text{-Cu}^{\text{II}}$ es clave para la actividad enzimática de la tirosinasa. En este estado, la tirosinasa cataliza la introducción de un segundo grupo hidroxilo en la posición orto de un mono-fenol (como tirosina) una reacción que es clave para biosíntesis de melanina.

Cualquier compuesto que interfiera con el acceso, formación de ligandos o la oxidación de monofenoles en el sitio activo de la tirosinasa será un inhibidor eficaz de la tirosinasa, que dará lugar potencialmente a una disminución de la producción de melanina y un color más claro de la piel. En términos generales, los iones de cobre en el sitio activo de tirosinasa pueden ser fácilmente quelados con pares de electrones aislados en el oxígeno, nitrógeno, azufre y halógenos. (Weder et al. (1999) Inorg. Chem. 38:1736). La figura 3 ilustra las estructuras y mecanismos de la acción de diversos inhibidores de tirosinasa conocidos. (Briganti et al. (2003) Pigment Cell Research 16:101-110; Seo et al. (2003) J. Agric. Food Chem. 51:2837).

Con referencia a la figura 3, se puede observar que los compuestos con estructuras similares a 3,4-dihidroxifenilalanina (DOPA), como la hidroquinona, inhiben la tirosinasa y son también agentes melanocitolíticos (patente de EE.UU. n° 5.523.077). Por ejemplo, la arbutina, aislada a partir de las hojas de gayuba común *Uvae ursi*, es un beta-glucopiranoácido de hidroquinona que se produce de forma natural, que inhibe la tirosinasa y efectúa la síntesis de melanina en melanocitos humanos (Chakraborty et al. (1998) Pigment Cell Res. 11:206; patente de EE.UU. n° 5.980.904). El mecanismo de acción de la arbutina incluye la competición de L-tirocina o L-dopa para unirse al sitio activo de tirosinasa. No suprime la expresión ni la síntesis de la proteína. (Maeda and Fukuda (1996) J. Pharmacol. Exp. 276:765). Los compuestos de tipo arbutina sintética inhiben también fuertemente la tirosinasa humana. (Sugimoto et al. (2003) Chem. Pharm. Bull. 51:798). El kinobeaon A, una nueva diquinona aislada a partir de células cultivadas de cártamo (*Carthamus tinctorius* L.), tiene una actividad inhibidora de tirosinasa mayor que la del ácido kójico (Kanehira et al. (2003) Planta Med. 69:457). Si son aplicadas durante períodos de tiempo prolongados o en concentraciones elevadas, las hidroquinonas pueden tener efectos secundarios graves. Adicionalmente, las hidroquinonas pueden conducir a una despigmentación permanente y, por tanto a una fotosensibilidad aumentada de la piel cuando es expuesta a la luz UV.

Actualmente están siendo usadas sustancias para aclarar la piel mejor toleradas que son de origen natural. Por ejemplo, el ácido kójico es un derivado natural de hidroxil-γ-pirona derivado de soluciones de hidratos de carbono que contienen ciertas bacterias. Con referencia a la figura 3, se puede observar que el ácido kójico es un orto-dihidroxifenol oxidado. El ácido kójico se conoce que forma quelatos fuertes con iones metálicos, especialmente Cu^{II} . (Gerard and Hugel (1975) Bull. Soc. Chim. Fr. 42:2404). Es un inhibidor de tirosina quinasa que es un potente competitivo pero de unión lenta. (Cabanès et al. (1994) J. Pharm. Pharmacol. 46:982). Estudios recientes han mostrado que el ácido kójico actúa como un ligando de unión mediante puente, que se une fuertemente al complejo de dicobre (II) y al aducto de dicobre-dioxígeno, evitando así la unión del sustrato de catecol a la enzima. (Battaini et al. (2000) JBIC 5:262). El ácido kójico y sus ésteres han sido patentados para ser usados como blanqueadores de la piel (véanse las patentes de EE.UU. n° 4.369.174, 4.771.060, 5.824.327, 5.427.775 y 4.990.330).

Los flavonoides son otra clase de productos naturales que han sido descritos como inhibidores de tirosinasa. (Shimizu et al. (2000) Planta Med. 66:11; Xie et al. (2003) Biochem. 68: 487). Los inhibidores de tirosinasa activos incluyen flavonas (Likhitwitayawuid et al. (2000) Planta Med. 66: 275), falvonoles (Kubo and Kinoshita (1999) J. Agric. Food Chem. 47:4121), flavonoides prenilados (Kuniyoshi et al. (2002) Planta Med. 68:79; Son et al. (2003) Planta Med. 69:559; Kim et al. (2003) Biol. Pharm. Bull. 26:1348), flavanos (No et al. (1999) Life Sci. 65:PL241; Kim et al. (2004) Biomacromolecules 5:474), y dihidro-calconas (Shoji et al. (1997) Biosci. Biotechnol. Biochem. 61:1963).

Otros tipos de inhibidores de tirosinasa incluyen: derivados de fenol (Sakuma et al. (1999) Arch. Pharm. Res. 22: 335; Kerry and Rice-Evans (1999) J. Neurochem. 73:247; Battaini et al. (2002) J. Biol. Chem. 277: 44606), benzaldehídos (Kubo and Kinoshita (1999) Plant Medica 65:19; Chen et al. (2003) J. Enzyme Inhib. Med. Chem. 18:491; Nihei et al. (2004) Bioorg. Med. Chem. 14:681), derivados de ácido benzoico (Curto et al. (1999) Biochem Pharmacol. 57: 663; Chen et al. (2003) J. Protein Chem. 22: 607; Miyazawa et al. (2003) J. Agric. Food Chem. 51:9653; Kubo et al. (2003) Z. Naturforsch [C] 58:713), cupferron (Xie et al. (2003) Int. J. Biochem. Cell Biol. 35: 1658), benzodipirano de raíz de *Glycyrrhiza uralensis* (Yokota et al. (1998) Pigment Cell Res. 11:335), compuestos de tiohidroxilo (Park et al. (2003) J. Protein Chem. 22: 613), terpenoides (Oh et al. (2002) Planta Med. 68: 832), y oxazolodionotona (Seo et al. (1999) Planta Med. 65:683). Los inhibidores de tirosinasa naturales más potentes conocidos son estilbenos ($\text{IC}_{50} = 0,3\text{-}5\text{ }\mu\text{M}$) (Shin et al. (1998) Biochem Biophys. Res. Commun. 243:801; Ohguchi et al. (2003) Biosci. Biotechnol. Biochem. 67: 1587), estilbeno- glicósidos (Iida et al. (1995) Planta Med. 61:425) y resorcinoles 4-sustituídos (Shimizu et al. (2000) Planta Med. 66:11).

Un estudio de la estructura/actividad de los resorcinoles 4-sustituídos pone de manifiesto que los sustituyentes hidrófobos y menos voluminosos, como $-\text{CH}_2\text{C}_6\text{H}_5$ y los grupos alquilo, es decir, $-\text{CH}_2\text{CH}_2\text{CH}_3$ tienen una mayor potencia con valores de IC_{50} de menos de $10\text{ }\mu\text{M}$ (Shimizu et al. (2000) Planta Med. 66:11). El mecanismo de acción de los resorcinoles 4-sustituídos a estado caracterizado como una inhibición competitiva de unión lenta de la

oxidación de DL-β-(3,4-dihidroxifenil)alanina (DL-dopa) (Jimenez y García-Carmona (1997) J. Agric. Food Chem. 45:2061) sin que se comprendan adicionalmente los efectos quelantes de metales sobre iones de cobre binucleares.

El *Aloe*, un miembro de la familia de los lirios, es una planta intrincada que contiene muchas sustancias biológicamente activas (Cohen et al. (1992) in Wound Healing/Biochemical and Clinical Aspects, 1st ed. W B Saunders, Philadelphia). Son conocidas más de 360 especies de *Aloe*, la mayoría de las cuales son autóctonas de África. Históricamente, los productos de *Aloe* han sido usados en aplicaciones demartológicas para el tratamiento de quemaduras, cicatrices y otras heridas. Estos usos han estimulado una gran cantidad de investigación para identificar compuestos a partir de plantas de *Aloe* que tienen actividad clínica. (Véase, por ejemplo, Grindlay and Reynolds (1986) J. of Ethnopharmacology 16:117- 151; Hart et al. (1988) J. of Ethnopharmacology 23: 61-71).

Yagi et al. describen un grupo de compuestos aislados a partir de *Aloe*, particularmente aloesina y uno de sus derivados, 2"-O-feruloilaloesina, que son inhibidores eficaces de tirosinasa. (Yagi et al. (1987) Plant Medica 515-517; Yagi et al. (1977) Z. Naturforsch 32c: 731-734). La aloesina, 5-metilcromona C-glucocilada inhibía la actividad de tirosinasa hidroxilasa humana de una forma dependiente de la dosis con una IC₅₀ de 0,92 mM y también inhibía la actividad de DOPA oxidasa de una forma dependiente de la dosis con un valor de IC₅₀ = 0,70 Mm en comparación con el ácido kójico que tiene una IC₅₀ = 0,41 mM y la arbutina que tiene una IC₅₀ de 3,02 mM. La inhibición de la actividad enzimática de tirosinasa y la formación consecuente de melanina mediante aloesina fue confirmada en un ensayo basado en células que usaba células de melanoma de múridos B16F1. La biosíntesis de melanina fue inhibida por la aloesina (IC₅₀ = 0,167 mM) de una manera dependiente de la dosis. (Jones et al. (2002) Pigment. Cell Res. 15:335). El mecanismo de acción de la inhibición de tirosinasa para cromonas de *Aloe* se supone que está relacionado con la reducción de iones de cobre. Han sido patentadas cromonas de *Aloe* naturales (patente de EE.UU. nº 6.451.357), semisintéticas (patente de EE.UU. nº 5.801.256, patente de EE.UU. nº 6.083.976) y formuladas (patente de EE.UU. nº 6.123.959) por su capacidad de blanqueamiento de la piel.

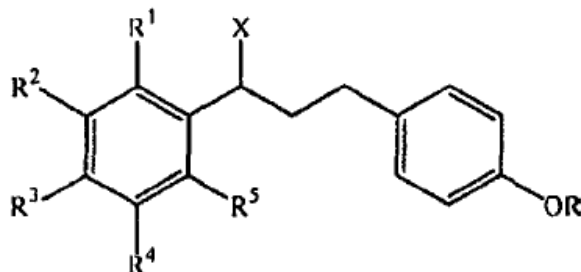
El ácido ascórbico (vitamina C a partir de fuentes sintéticas y naturales como frutas cítricas) y sus derivados han sido utilizados también para el blanqueamiento de la piel. En la mayoría de los casos, la vitamina C se formula con ácido kójico y otros inhibidores de tirosinasa (patentes de EE.UU. nº 4.910.921, 6.458.379 y 5.916.915). Otros compuestos blanqueadores de la piel descritos incluyen extractos de plantas de olivos (patente de EE.UU. nº 6.682.763), ácidos grasos insaturados de cadena larga (patente de EE.UU. nº 6.669.932), curcuminas (patente de EE.UU. nº 6.641.845), extractos de enzimas (patente de EE.UU. nº 6.514.506), coumestrol (patente de EE.UU. nº 6.503.941), ácidos hidroxil-carboxílicos (patentes de EE.UU. nº 6.417.226, 6.365.137, 5.609.875 y 5.262.153), beta-glucanos (documento US 6.251.877), cromonas de *Aloe* (patente de EE.UU. nº 6.083.976), compuestos de fenilalanina (patente de EE.UU. nº 5.767.158), rutina (patente de EE.UU. nº 5.145.782), escinol (patente de EE.UU. nº 5.728.683), ácidos salicílicos (patente de EE.UU. nº 5.700.784), angiogenina (patente de EE.UU. nº 5.698.185), mercaptodextrano (patente de EE.UU. nº 6.077.503), ácido helágico (patente de EE.UU. nº 6.066.312), ácidos fosfínicos (patente de EE.UU. nº 6.280.715), compuestos que contienen boro (patente de EE.UU. nº 5.993.835), extractos de plantas (de *Pueraria*, patente de EE.UU. nº 6.352.685; *Morus*, patentes de EE.UU. nº 6.197.304; 6.066.312 y 5.872.254, fermentado de cerezas acerolas, patente de EE.UU. nº 5.747.006; furanonas, patente de EE.UU. nº 5.602.256; y otras patente de EE.UU. nº 5.773.014).

Los diarilalcanos son una clase rara de producto natural. Hasta la fecha, hay más de 179.000 compuestos naturales citados en el diccionario Dictionary of Natural Products on CD-ROM (Chapman & Hall/CRC, Version 12: 2 January 2004), de los que solamente 82 son diarilpropanos (n = 3). La *Broussonetia papyrifera* es un árbol caduco de la familia Moracea y han sido aislados más de veinte diarilpropanos a partir de este género solamente (Keto et al. (1986) Chem. Pharm. Bull. 34: 2448; Ikuta et al. (1986) Chem. Pharm. Bull. 34:1968; Takasugi et al. (1984) Chem. Lett. 689; Gonzalez et al. (1993) Phytochem. 32: 433). Un bioensayo dirigido al fraccionamiento de un extracto de *Broussonetia papyrifera* produjo cuatro diarilpropanos que no tenían actividad inhibidora de aromataasa. (Lee et al. (2001) J. Nat. Prod. 64:1286). Sin embargo, dos diarilpropanos fenilados aislados a partir de la misma planta exhibían citotoxicidad contra diversas líneas de células cancerígenas (Ko et al. (1999) J. Nat. Prod. 62:164) y la broussonin A exhibía actividad anti-fúngica (Iida et al. (1999) Yakugaku Zasshi. 119:964).

Ha sido aislado también un cierto número de diarilalcanos a partir de la especie *Irianthera* (Myristicaceae) (Alvea et al. (1975) Phytochem. 14:2832; de Almeida et al. (1979) Phytochem. 18:1015; Braz et al. (1980) Phytochem. 19:1195; Diaz et al. (1986) Phytochem. 25: 2395). Cuatro dihidrocalconas aisladas a partir de *Iryanthera lancifolia* mostraron actividad antioxidante (Silva et al. (1999) J. Nat. Prod. 62: 1475). Se aisló también un cierto número de diarilpropanos a partir de especies *Virola* de Myristicaceae. (Braz et al. (1976) Phytochem. 15:567; Hagos et al. (1987) Plant Med. 53:57; Gonzalez et al. (1993) Phytochem. 32: 433; Kijjoa et al. (1981) Phytochem. 20:1385; Talukdar et al. (2000) Phytochem. 53:155).

Otros diarilpropanos aislados a partir de fuentes naturales incluyen los de *Pterocarpats marsupium* (Fabaceae) (Rao et al. (1984) Phytochem. 23: 897; Maurya et al. (1985) J. Nat. Prod. 48:313), *Lindera umbellata* (Lauraceae) (Morimoto et al. (1985) Chem. Pharm. Bull. 33:2281), *Helichrysum mundii* (Compositae) (Bohlmann et al. (1978) Phytochem. 17:1935), *Viscum angulatum* (Loranthaceae) (Lin et al. (2002) J. Nat. Prod. 65:638), de los *Acacia tortilis* (Leguminosae), que tienen un efecto de relajación de músculos lisos (Hagos et al. (1987) Planta Med. 53:27), *Xanthocercis zambeziaca* (Leguminosae) (Bezuidenhout et al. (1988) Phytochem. 27:2329), y compuestos citotóxicos de *Knema glomerata* (Myristicaceae) (Zeng et al. (1994) J. Nat. Prod. 57:376).

La patente Japonesa nº JP 05213729A expone el uso de dihidrocalconas sintéticas como inhibidores de melanina para el tratamiento inflamación de la piel, manchas, pecas y cromatosis que resulta de quemaduras solares y la patente japonesa nº JP 2000095721 describe hidrocalcona como inhibidores de tirosinasa. Los compuestos descritos en la presente memoria descriptiva tienen la siguiente fórmula general:



en la que X se selecciona entre H, OH o =O; R es H o Me y R¹-R⁵ se seleccionan independientemente entre H, OR y NH₂. Por tanto, la dihidrocalconas descritas contienen un único sustituyente hidroxi/metoxi en un anillo fenilo y cinco sustituyentes no específicos (R¹-R⁵) en el segundo anillo. No se midió ninguna inhibición enzimática para ninguna de las composiciones reivindicadas, en lugar de ello la inhibición de melanina se determinó mediante la medición de la cantidad de melanina producida por células de la piel cultivadas y cambios de color en la piel de animales a continuación de una estimulación con UV. Se describe en la presente memoria descriptiva la síntesis de uno de los compuestos descritos en el documento JP 05213729 A, 1-(4-hidroxifenil-3-(4'-hidroxifenil)-1-propanol), y la medición de su capacidad para inhibir tirosinasa. Este compuesto exhibió una inhibición solamente moderada de tirosinasa (IC₅₀ = 305 µM, Tabla 2). Se describen en la presente memoria descriptiva diarilalcanos que tienen un modelo de sustitución único en el que al menos uno de los dos anillos aromáticos Ar₁ o Ar₂ están sustituidos con 1-5 grupos R' (R'₁-R'₅) y en el que al menos dos de dichos R'₁-R'₅ no son H. Estos compuestos exhiben una capacidad inesperada para inhibir la actividad de tirosinasa, que es 4-600 veces mayor que la del compuesto expuesto en el documento JP 05213729.

Sumario de la invención

La presente invención incluye el compuesto 1-(3-metil-2,4-dimetoxifenil)-3-(2',4'-dihidroxifenil)-propano. Dicho compuesto inhibe la actividad de una enzima con un sitio activo binuclear denominada en la presente memoria descriptiva enzima binuclear, y puede ser administrado a un hospedante que lo necesita en una cantidad eficaz de dicho compuesto, en que dicho compuesto puede ser sintetizado y/o aislado a partir de una o más plantas. Ejemplos de enzimas binucleares incluyen, pero sin limitación tirosinasa, arginasa, ureasa, citocromo c, oxidasa, heme-cobre oxidasa bombeadora de protones, monóxido de carbono deshidrogenasa/acetil-coenzima A sintasa bifuncional, ribonucleótido reductasa, metalo-beta-lactamasa, H(+)-ATP ASA y oxidasa alternativa y fósforotriesterasa bacteriana.

El compuesto 1-(3-metil-2,4-dimetoxifenil)-3-(2',4'-dihidroxifenil)-propano según esta invención puede ser administrado por vía interna o tópica a un hospedante que necesita una cantidad terapéuticamente eficaz de dicho compuesto. Dependiendo de la enzima binuclear que esté siendo inhibida, el compuesto 1-(3-metil-2,4-dimetoxifenil)-3-(2',4'-dihidroxifenil)-propano se reivindica en la presente memoria descriptiva para ser usado en el tratamiento de infecciones microbianas, fúngicas, de malaria o virales, en la producción reducida de óxido nítrico, excitación sexual anormal en masculina y femenina, estados antiinflamatorios, tensión activa por óxidos, metabolismo anormal de fármacos, cánceres y tumores sólidos. Dicho compuesto es reivindicado también en la presente memoria descriptiva para ser usado en el tratamiento de enfermedades periodontales, estados precancerosos orales, cánceres orales y otras enfermedades malignas orales, protectores dentales y dientes sensibles, secuelas, pulpitis, irritación dolor e inflamación provocados por la implantación física de dentaduras orales, trauma, lesiones, bruxismo y otras heridas menores en la boca, protectores dentales o en la lengua, placa y cálculos dentales, descalcificación dental, proteolisis y caries (deterioro dental).

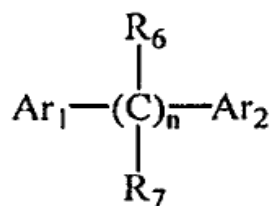
Dicho compuesto se reivindica también en la presente memoria descriptiva para ser usado en el tratamiento del oscurecimiento y deterioro de la piel debidos a una exposición a luz ultravioleta, bronceado solar, manchas de hiperpigmentación provocadas por el envejecimiento de la piel, enfermedades hepáticas, quemaduras térmicas y heridas tóxicas, pigmentación de la piel debida a estados inflamatorios provocados por infecciones fúngicas, microbianas y virales, vitilago, carcinoma y melanoma.

Dicho compuesto se describe también en la presente memoria descriptiva para ser usado en el tratamiento del oscurecimiento y deterioro de la piel que resulta de productos químicos, calor, viento y entornos secos y para prevenir y tratar las arrugas, embolsamientos de la piel, líneas y círculos oscuros alrededor de los ojos, calmantes para piel sensible y para prevenir y tratar la dermatitis y otros estados alérgicos relacionados de la piel. Además de su uso para la prevención y el tratamiento de las enfermedades y estados anteriormente descritos de la piel, las composiciones terapéuticas descritas en la presente memoria descriptiva proporcionan una composición eficaz que

produce la ventaja de una apariencia suave y rejuvenecida de la piel con un color de la piel mejorado, elasticidad aumentada, envejecimiento reducido y retrasado, apariencia y textura joven mejorada y flexibilidad, firmeza, suavidad y tersura aumentadas.

- 5 Mediante una quelación con diarilalcanos de iones metálicos, se pueden usar también para suministrar iones metálicos esenciales en la corriente sanguínea del hospedante y/o portar iones metálicos a través de la piel o la barrera sanguínea/cerebral, así como otras membranas. El compuesto 1-(3-metil-2,4-dimetoxifenil)-3-(2',4'-dihidroxifenil)-propano es administrado a un hospedante que necesita una cantidad terapéuticamente eficaz de dicho compuesto, junto con el (o los) ion(es) de metal(es) que va(n) a ser suministrado(s). En esta capacidad, los diarilalcanos pueden ser tratados para tratar enfermedades y estados que incluyen, pero sin limitación, anemia y otras deficiencias de hierro, inflamación, obesidad y diabetes mellitus, enfermedades periodontales, estados precancerosos orales, cánceres orales y otras enfermedades malignas orales, protectores dentales y dientes sensibles, secuelas, pulpitis, irritación, dolor e inflamación provocados por la implantación física de dentaduras orales, trauma, lesiones, bruxismos y otras heridas menores en la boca, en los protectores dentales o en la lengua, placa y cálculos dentales, descalcificación dental, proteolisis y caries (deterioro), insomnio por infecciones virales, función de inmunidad suprimida, osteoporosis, amenorrea, dismenorrea, epilepsia, hipertensión, colesterolemia, vasoespasmos coronarios y cerebrales, diarrea, enfermedad de Parkinson, enfermedad de Alzheimer, cánceres, artritis reumatoide, infertilidad masculina y degeneración macular. Los iones metálicos se seleccionan entre el grupo que incluye, pero sin limitación cobre, cromo, hierro, boro litio, selenio, calcio, manganeso, magnesio, molibdeno y otros iones metálicos.
- 10 Los dialquilalcanos y dialquil-alcanoles pueden ser usados en la industria alimentaria para evitar la coloración marrón y cambios de color en frutas, setas y otros productos alimenticios.
- 15
- 20

También se describe en la presente memoria descriptiva una composición de materia comprendida por uno o más diarilalcanos, en que dichos diarilalcanos se seleccionan entre el grupo de compuestos representados por la siguiente estructura general:

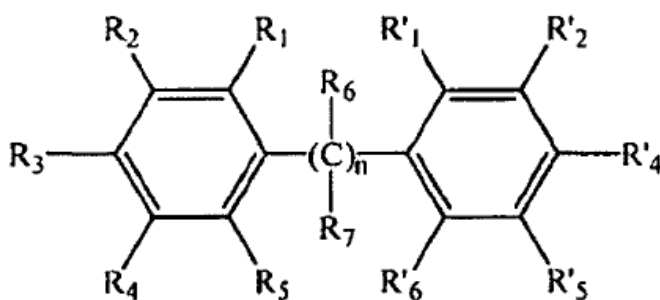


- 25 en la cual
- Ar¹ y Ar² se seleccionan independientemente entre el grupo que consiste en un anillo aromático o heteroaromático sustituido de cinco o seis miembros, en el que cada anillo aromático o heteroaromático de seis miembros está independientemente sustituido con 1-5 grupos R' (R'₁-R'₅) y cada anillo aromático o heteroaromático de cinco miembros está sustituido con 1-4 grupos R' (R'₁-R'₄), excepto cuando Ar₁ y Ar₂ son ambos un anillo aromático de seis miembros, es decir un grupo fenilo, al menos uno de Ar₁ y Ar₂ está sustituido con 1-5 grupos R' (R'₁-R'₅), en que al menos dos de dichos de R'₁-R'₅ no son H
- 30

en la cual

- 35 R' se selecciona independientemente entre el grupo que consiste en -H, -OH, -SH, -OR, -CN, -SR, -NH₂, -NHR, -NR₂, X y un glicósido o un monosacárido u oligosacárido comprendido por 2-6 monosacáridos, en que dicho(s) monosacárido(s) se selecciona(n) independiente entre el grupo que consiste en una aldopentosa, metilaldopentosa, aldohexosa, cetohexosa y sus derivados químicos; en que R es un grupo alquilo que tiene entre 1-20 átomos y X es un halógeno seleccionado entre el grupo que consiste en Cl, Br, F o I;
- 40 R₆ y R₇ se seleccionan independientemente entre el grupo que consiste en -H, -OH, -OR, -CN, -NHR, -NH₂ y -X, en que R es un grupo alquilo que tiene entre 1-20 átomos de carbono y en que X es un halógeno seleccionado entre el grupo que consiste en Cl, Br, F o I; y n = 1 a 10. En una realización preferida n = 2-4.

Los diarilalcanos descritos en la presente memoria descriptiva se pueden seleccionar entre el grupo de compuestos representados por la siguiente estructura general:



en la cual

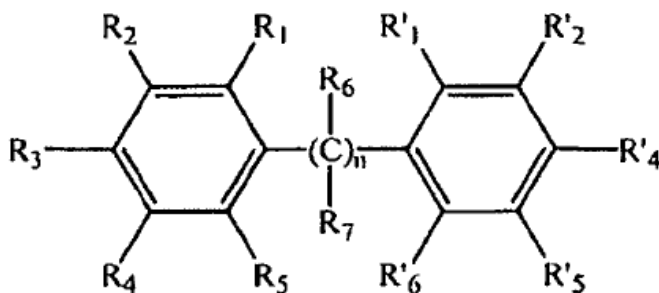
$R_1, R_2, R_3, R_4, R_5, R'_1, R'_2, R'_3, R'_4,$ y R'_5 se seleccionan independientemente entre el grupo que consiste en $-H,$ $-OH,$ $-SH,$ $-OR,$ $-CN,$ $-SR,$ $-NH_2,$ $-NHR,$ $-NR_2,$ X y un glicósido de un monosacárido u oligosacárido comprendido por 2-6 monosacáridos, en que dicho(s) monosacárido(s) se selecciona(n) independientemente entre el grupo que consiste en una aldopentosa metil-aldopentosa, aldohexosa, cetohexosa y sus derivados químicos; en que R es un grupo alquilo que tiene entre 1-20 átomos de carbono y X es un halógeno seleccionado entre el grupo que consiste en Cl, Br, F, I y en que al menos 2 de R_1-R_5 o al menos dos de $R'_1-R'_5$ no son H ;

R_6 y R_7 se seleccionan independientemente entre el grupo que consisten en $-H,$ $-OH,$ $-OR,$ $-CN,$ $-NHR,$ $-NH_2,$ y $-X,$ en que R es un grupo alquilo que tiene entre 1-20 átomos de carbono y en que X es un halógeno seleccionado entre el grupo que consiste en Cl, Br, F o I ; y

$n = 1$ a 10 . En una realización preferida $n = 2-4$.

Los diarilalcanos descritos o reivindicados en la presente memoria descriptiva pueden ser aislado a partir de una o más plantas seleccionadas entre la familia de plantas que incluye, pero sin limitación, las familias Compositae, Fabaceae, Lauraceae, Leguminosae, Liliaceae, Loranthaceae, Moraceae y Myristicaceae. Los diarilalcanos descritos o reivindicados en la presente memoria descriptiva pueden ser también extraídos, concentrados y purificados a partir de los géneros de plantas altas que incluyen, pero sin limitación, Acacia, Broussonetia, Dianella, Helichrysum, Iryanthera, Knema, Lindera, Pterocarpus, Viscum y Xanthocercis. Los diarilalcanos se pueden encontrar en diferentes partes de plantas que incluyen, pero sin limitación los tallos, cortezas de tallos, maderas del núcleo, troncos, cortezas de los troncos, ramilletes, tubérculos, raíces, cortezas de raíces, brotes jóvenes, semillas, rizomas, flores y otros órganos reproductores, hojas y otras partes aéreas. Los diarilalcanos pueden ser aislados a partir de una planta o plantas de los géneros Broussonetia, Dianella y Iryanthera.

Los diarilalcanos descritos o reivindicados en la presente memoria descriptiva pueden ser obtenidos mediante métodos sintéticos. En la presente memoria descriptiva se describe un método para sintetizar diarilalcanos y diarilalcanoles, comprendiendo dicho método la reducción de un compuesto que tiene la siguiente estructura general:



en la cual

R_1-R_5 y $R'_1-R'_5$ y n son como se definieron anteriormente y en que R_6 y R_7 forman conjuntamente uno o más grupo(s) carbonilo. El agente reductor se puede seleccionar entre cualquier agente reductor conocido para la reducción de cetonas a alcoholes que incluyen, pero sin limitación borohidruros, H_2 en presencia de un catalizador, NaH y $LiAlH_4$. El agente reductor puede ser $NaBH_4$.

Los diarilalcanos descritos o reivindicados en la presente memoria descriptiva pueden ser obtenidos mediante una modificación sintética d un compuesto que se produce de forma natural aislado a partir de una fuente vegetal. Por ejemplo, e producto que se produce de forma natural buteína se aísla a partir de una fuente de plantas, se deshidrata y se reduce para producir el correspondiente diarilalcanol.

Los diarilalcanos descritos o reivindicados en la presente memoria descriptiva pueden sr obtenidos mediante la

reacción de dos compuestos aromáticos apropiadamente sustituidos. Las reacciones químicas factibles para sintetizar estos compuestos a partir de compuestos aromáticos sustituidos incluyen, pero sin limitación, condensación aldólica entre un benzaldehído sustituido y una acetofenona sustituida; reacción de Claisen-Schmidt o condensación aldólica cruzada entre un aldehído y una cetona; reacción de Grignard usando un haluro de organomagnesio de un anillo aromático sustituido para unir el segundo anillo aromático sustituido a través de una reacción de adición al grupo carbonilo en la molécula; reagrupamiento de Claisen mediante una isomerización intramolecular, en la que un fenol esterificado con grupos de sustitución apropiados se isomerizará para unirse a los segundos anillos aromáticos en la posición orto del fenol seguido de una reacción de reducción y una reacción de acoplamiento de Suzuki, en la que dos anillos aromáticos sustituidos se convierten en ácidos aril-borónicos y se unen mediante un haluro de alquilo usando un catalizador de paladio cuidadosamente seleccionado. Estas reacciones son conocidas por los expertos en la técnica y las condiciones para estas reacciones se pueden determinar usando la información descrita en la presente memoria descriptiva para la síntesis de estos compuestos.

Se describe en la presente memoria descriptiva una estrategia que combina un ensayo de inhibición con un procedimiento químico de des-replicación para identificar extractos de plantas activas y los compuestos particulares en esos extractos que inhiben específicamente enzimas binucleares. Esta aproximación incluye una combinación de aislamiento de productos naturales, síntesis orgánica, modelación molecular y ensayos de inhibición enzimática para optimizar la estructura y maximizar la eficacia del fármaco. Este método se describe en la solicitud de EE.UU. nº de serie 10/185.758, presentada el 27 de junio de 2002 titulada "Método para generar, seleccionar y des-replicar bibliotecas de productos naturales para el descubrimiento de agentes terapéuticos". La eficacia de este método se demuestra usando un ensayo de inhibición de tirosinasa como se describe en la sección de ejemplos posterior. La pureza de los diarilalcanos evaluada según el método de esta invención está en el intervalo de 0,01% a 100%, dependiendo de la metodología usada para obtener el (o los) compuesto(s).

En una realización preferida, la dosis del compuesto 1-(3-metil-2,4-dimetoxifenil)-3-(dihidroxifenil)-propano se administra al hospedante que la necesita en una cantidad no tóxica eficaz, seleccionada, generalmente en el intervalo de 0,001% a 100% basado en el peso total de la formulación final y/o 0,001 mg a 200 mg por kilogramo basado en el peso corporal del hospedante. Los expertos en la técnica, usando ensayos clínicos rutinarios, serán capaces de determinar las dosis óptimas para la dolencia particular que esté siendo tratada. La presente invención proporciona opciones comercialmente viables para la síntesis y/o aislamiento, purificación y formulación de diarilalcanos para producir una composición de materia que tenga una actividad fisiológica deseable. Dicho compuesto de esta invención puede ser administrado mediante cualquier método por un experto en la técnica. Los modos de administración incluyen, pero sin limitación, la administración enteral (oral), administración parenteral (intravenosa, subcutánea e intramuscular) y la aplicación tópica. Dicho compuesto según esta invención puede ser administrado por vía interna o tópica a un paciente que lo necesita en una cantidad terapéuticamente eficaz de diarilalcanos puros o en una mezcla sintetizados y/o aislados a partir de una planta única o plantas múltiples. En una realización preferida, la composición es administrada por vía tópica.

Debe entenderse que tanto la descripción general que antecede como la descripción detallada que sigue son únicamente ilustrativas y explicativas y no son restrictiva de la invención tal como se reivindica.

Breve descripción de los dibujos

La Figura 1 ilustra el procedimiento de melanogénesis, junto con diversos mecanismos potenciales para regular este procedimiento.

La Figura 2 ilustra la estructura del sitio activo de tirosinasa. Como se puede observar en esta Figura, dos iones de cobre están estrechamente separados y cada uno está coordinado a tres histidinas a través del átomos de nitrógeno N-ε de su cadena lateral.

La Figura 3 expone la estructura, nombre, mecanismo de acción y otros efectos de inhibidores de tirosinasas conocidos.

La Figura 4 ilustra el cromatograma HPLC/UV de una fracción de HTP que contiene el UP288 (1-2-metoxi-4-hidroxifenil)-3-(2'-hidroxi-5'-metoxifenil)-propano (1) como se indica de forma resaltada.

La Figura 5 expone la estructura química y el espectro ¹³C-RMN de UP288 (1).

La Figura 6 ilustra las curvas de respuesta a la dosis inhibidora de tirosinasa y los valores de IC₅₀ para UP288 y ácido kójico.

La Figura 7 expone el aislamiento guiado por bioensayos de dos compuestos activos (UP302 a y UP302 b) a partir de *Dianella ensifolia* (P0389) (planta completa).

La Figura 8 expone el cromatograma HPLC/UV de la fracción de UP302 enriquecida después de múltiples separaciones de columna.

La figura 9 expone un espectro gHSQC de DUP302 a (2), que ilustra las uniones entre protones y átomos de

carbono.

La Figura 10 ilustra gráficamente la inhibición de la actividad de tirosinasa a diversas concentraciones de inhibidor UP302a y sustrato L-DOPA. Este estudio cinético puso de manifiesto que el UP302 a es un inhibidor competitivo de la enzima tirosinasa.

- 5 La Figura 11 ilustra la inhibición de la producción endógena de melanina a partir de células B16F1 de ratón mediante ácido kójico y UP302 a (2). Cada muestra fue ensayado por triplicado a 10 concentraciones diferentes.

La Figura 12 expone la conformación tridimensional de UP302 a después de una minimización de energía MM2.

La Figura 13 ilustra la conformación tridimensional de UP302 a cuando se coordina a dos iones de cobre en el estado de oxidación $\text{Cu}^{\text{II}}\text{-O}_2\text{-Cu}^{\text{II}}$.

- 10 La Figura 14 expone las distancias entre átomos adyacentes de UP302 a cuando es quelado con iones de cobre en la forma de peróxido ($\text{Cu}^{\text{II}}\text{-O}_2\text{-C}^{\text{II}}$) como se calcula en el Ejemplo 17.

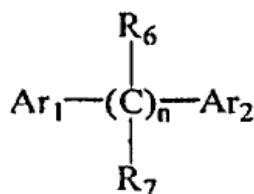
Descripción detallada de la realización preferida.

- La presente invención se refiere al compuesto 1-(3-metil-2,4-dimetoxifenil)-3-(2',4'-dihidroxifenil)-propano para ser usado en el tratamiento de enfermedades y estados mediados por enzimas binucleares. Específicamente, dicho compuesto inhibe la actividad de una enzima que tiene un sitio activo binuclear. Está incluido en la presente invención el nuevo compuesto 1-(3-metil-2,4-dimetoxifenil)-(2',4'-dihidroxifenil)-propano y se describen en la presente memoria nuevas composiciones que comprenden uno o más diarilalcano(s). Los diarilalcanos reivindicados o descritos en la presente memoria descriptiva pueden ser aislados a partir de una o más fuentes vegetales o pueden ser obtenidos mediante síntesis orgánica. Se describen en la presente memoria descriptiva métodos para aislar estos compuestos a partir de una fuente natural y métodos para sintetizar estos compuestos. Los diarilalcanos pueden ser obtenidos mediante modificación sintética de un compuesto que se produce de forma natural aislado a partir de una fuente vegetal.

- Se usan diversos términos en la presente memoria descriptiva para hacer referencia a aspectos de la presente invención. Para ayudar a la clarificación de la descripción de los componentes de esta invención, se proporcionan las siguientes definiciones. Salvo que se defina otra cosa, todos los términos técnicos y científicos usados en la presente memoria descriptiva tienen el significado comúnmente comprendido por un experto en la técnica a la que pertenece esta invención.

- Debe apreciarse, que como se usan en la presente memoria descriptiva, el término "una" entidad se refiere a una o más de esa entidad; por ejemplo, un diarilalcano se refiere a uno o más diarilalcanos. Como tales, los términos "un" o "uno o más" y "al menos uno" se usan de forma intercambiable en la presente memoria descriptiva.

"Diarilalcanos", como se usa en la presente memoria descriptiva, son una clase específica de compuestos aromáticos que tienen la siguiente estructura general: La presente descripción incluye también una nueva composición de materia comprendida por uno o más diarilalcanos, en que dichos diarilalcanos se seleccionan entre el grupo de compuestos representados por la siguiente estructura general:



en la cual

- Ar₁ y Ar₂ se seleccionan independientemente entre el grupo que consiste en un anillo aromático o heteroaromático de cinco o seis miembros sustituido, en que cada anillo aromático o heteroaromático de 6 miembros está sustituido independientemente con 1-5 grupos R' (R'₁-R'₅) y cada anillo aromático o heteroaromático de 5 miembros está sustituido con 1-4 grupos R' (R'₁-R'₄), excepto cuando Ar₁ y Ar₂ son ambos un anillo aromático de 6 miembros, es decir, un grupo fenilo y al menos uno de Ar₁ y Ar₂ está sustituido con 1-5 grupos R' (R'₁-R'₅), en que al menos dos de dichos R'₁-R'₅ no son H,

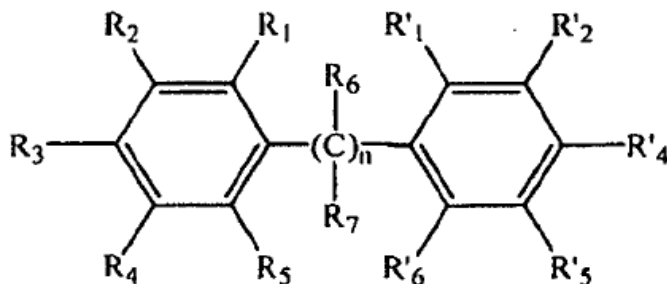
en la cual

- R' se selecciona independientemente entre el grupo que consiste en -H, -OH, -SH, -OR, -CN, -SR, -NH₂, -NHR, -NR₂, y X y un glicósido de un monosacárido u oligosacárido comprendido por 2-6 monosacáridos, en que dicho(s) monosacárido(s) se selecciona(n) independientemente entre el grupo que consiste en una aldopentosa, metil-aldopentosa, aldohexosa, cetohexosa y sus derivados químicos; en que R es un grupo alquilo que tiene 1-

20 átomos de carbono y X es un halógeno, seleccionado entre el grupo que consiste Cl, Br, F e I;

R₆ y R₇ se seleccionan independientemente entre el grupo que consiste en -H, -OH, -OR, -CN, -NHR, -NH₂, y -X, en que R es un grupo alquilo que tiene entre 1-20 átomos de carbono y en que X es un halógeno, seleccionado entre el grupo que consiste en Cl, Br, F o I; y n= 1 a 10. En una realización preferida n = 2-.

- 5 Los diarilalcanos y diarilalcanoles descritos en la presente memoria descriptiva se pueden seleccionar entre el grupo de compuestos representados por la siguiente estructura general:



en la cual

- 10 R₁, R₂, R₃, R₄, R₅, R'₁, R'₂, R'₃, R'₄ y R'₅ se seleccionan independientemente entre el grupo que consiste en -H, -OH, -SH, -OR, -CN, -SR, -NH₂, -NHR, -NR₂, Xy un glicósido de un monosacárido u oligosacárido comprendido por 2-6 monosacáridos, en que dicho(s) monosacárido(s) se selecciona(n) independientemente entre el grupo que consiste en una aldopentosa, metil-aldopentosa, aldohexosa, cetohexosa y sus derivados químicos; en que R es un grupo alquilo que tiene entre 1-20 átomos de carbono y X es un halógeno seleccionado entre el grupo que consiste en Cl, Br, F, I y en que al menos dos de R₁-R₅ o al menos de dos de R'₁-R'₅ no son H.

- 15 R₆ y R₇ se seleccionan independientemente entre el grupo que consiste en -H, -OH, -OR, -CN, -NHR, -NH₂, y -X, en que R es un grupo alquilo que tiene 1-20 átomos de carbono y en que X es un halógeno seleccionado entre el grupo que consiste en Cl, Br, F e I; y

n = 1 a 10. En una realización preferida n= 2-4.

- 20 "Diarilalcanoles" como se usa en la presente memoria descriptiva, son un tipo de diarilalcanos" que tienen al menos un grupo hidróxilo (R₆ y/o R₇ = OH) unido a los átomos de carbono de alquilo entre los dos anillos aromáticos.

- 25 "Enzima binuclear", como se usa en la presente memoria descriptiva, se refiere a una enzima que tiene un sitio activo binuclear, de la que es un ejemplo la tirosinasa que tiene dos iones de cobre en su sitio activo, como se expuso con anterioridad. Las enzimas binucleares incluyen, pero sin limitación tirosinasa, arginasa, ureasa, citocromo c oxidasa, heme-cobre oxidasa bombeadora de protones, monóxido de carbono deshidrogenasa/acetil-coenzima A sintasa bifuncional, ribonucleótido reductasa, metalo-beta-nactamasa, H (+) ATPasa y oxidasa alternativa y fosfotriesterasa bacteriana.

"Terapéutico" como se usa en la presente memoria descriptiva, incluye la prevención, tratamiento y/o profilaxis. Cuando se usa terapéutico se refiere a seres humanos, así como a otros animales.

- 30 "Dosis o cantidad farmacéuticamente o terapéuticamente eficaz" se refiere a un nivel de dosificación suficiente para inducir un resultado biológico deseado. Ese resultado puede ser el alivio de los signos, síntomas o causas de una enfermedad o cualquier otra alteración de un sistema biológico que se desee. La dosificación precisa variará según una diversidad de factores, que incluyen, pero sin limitación la edad y el tamaño del sujeto, la enfermedad y el tratamiento que se esté efectuando.

- 35 "Placebo" se refiere a la sustitución de la dosis o cantidad de dosis farmacéuticamente o terapéuticamente eficaz para inducir un efecto biológico deseado que pueda aliviar los signos, síntomas o causas de una enfermedad con una sustancia no activa.

- 40 Un "hospedante" o "paciente" o "sujeto" es un mamífero vivo, ser humano o animal, para el que se desea una terapia. El "hospedante", "paciente" o "sujeto" se refiere generalmente al receptor de la terapia que va a ser practicada según el método de la invención. Debe apreciarse que la invención descrita en la presente memoria descriptiva puede ser usada para aplicaciones veterinarias así como humanas y que el término "hospedante" no debe ser concebido de una forma limitante. En el caso de aplicaciones veterinarias, los intervalos de las dosificaciones se pueden determinar como se describe con posterioridad, teniendo en cuenta el peso corporal del animal.

- 45 Como se describe en la presente memoria descriptiva, un "vehículo farmacéuticamente aceptable" se refiere a cualquier vehículo que no interfiera con la eficacia de la actividad biológica del ingrediente activo y que no sea tóxico

para el hospedante al que está siendo administrado. Ejemplos de “vehículos farmacéuticamente aceptables” incluyen, pero sin limitación, cualquiera de los vehículos farmacéuticos estándar como solución salina, es decir, solución de Ringer, una solución salina tamponada, agua, una solución de dextrosa, albumina de suero y otros excipientes y conservantes para la formación de comprimidos o capsulas de las formulaciones.

- 5 El compuesto de 1-(3-metil-2,4-dimetoxifenil)-3-(2',4'-dihidroxifenil)-propano inhibe la actividad de una enzima con un sitio activo binuclear, denominada en la presente memoria descriptiva enzima binuclear. Dicho compuesto puede ser administrado a un hospedante que lo necesita en una cantidad eficaz de dicho compuesto. Los diarilalcanos reivindicados o descritos en la presente memoria descriptiva pueden ser sintetizados y/o aislados a partir de una o más plantas. Ejemplos de enzimas binucleares son tirosinasa, arginasa, ureasa, citocromo c oxidasa, heme-cobre oxidasa bombeadora de protones, monóxido de carbono deshidrogenasa /acetil-coenzima A sintasa bifuncional, ribonucleótido reductasa, metalo-beta-lactamasa, H(+)-ATPasa y oxidasa alternativa y fosfotriesterasa bacteriana.

- 10 La presente invención incluye también un método para la prevención y el tratamiento de enfermedades y estados relacionados con la actividad de enzimas binucleares. El compuesto 1-(3-metil-2,4-dimetoxifenil)-3-(2',4'-dihidroxifenil)-propano según esta invención puede ser administrado por vía interna o tópica a un hospedante que necesita una cantidad terapéuticamente eficaz de dicho compuesto. Dependiendo de la enzima binuclear que esté siendo inhibida, el compuesto 1-(3-metil-2,4-dimetoxifenil)-3-(2',4'-dihidroxifenil)-propano se reivindica en la presente memoria descriptiva para ser usado en el tratamiento de infecciones microbianas, fúngicas, de malaria o virales, la producción reducida de óxido nítrico, la excitación sexual anormal masculina y femenina, tensión oxidativa de estados antiinflamatorios, metabolismo anormal de fármacos y para ser usado en el tratamiento de enfermedades periodontales, estados pre-cancerosos, orales, cánceres orales y otras enfermedades malignas orales, protectores dentales y dientes sensibles, secuelas, pulpitis, irritación, dolor e inflamación provocados por la implantación física de dentaduras orales, trauma, heridas, bruxismo y otras heridas menores en la boca, en los protectores dentales o en la lengua, placa dental y cálculos, descalcificación dental, proteolisis y caries (deterioro dental), cánceres y tumores sólidos.

- 25 Dicho compuesto es reivindicado también en la presente memoria descriptiva para ser usado en el tratamiento del oscurecimiento y deterioro de la piel debidos a la exposición a la luz ultravioleta, bronceado solar, manchas de hiperpigmentación, provocadas por el envejecimiento de la piel, enfermedades hepáticas, quemaduras térmicas y heridas tóxicas, pigmentación de la piel, debida a estados inflamatorios provocados por infecciones fúngicas, microbianas y virales, vitilago, carcinoma y melanoma.

- 30 Dicho compuesto es descrito también en la presente memoria descriptiva para ser usado en el tratamiento y deterioro de la piel que resulta de productos químicos, calor, viento y entornos secos para prevenir y tratar las arrugas, embolsamientos, líneas y círculos oscuros de la piel alrededor de los ojos, piel sensible delicada y para evitar y tratar la dermatitis y otros estados alérgicos relacionados de la piel. Además de su uso para la prevención y el tratamiento de las enfermedades y los estados anteriormente descritos de la piel, las composiciones terapéuticas descritas en la presente memoria descriptiva proporcionan una composición eficaz que produce la ventaja de una apariencia suave y joven de la piel con un color de la piel mejorado, elasticidad aumentada, envejecimiento reducido y retrasado, apariencia y textura joven mejorada y flexibilidad aumentada, firmeza, suavidad y tersura.

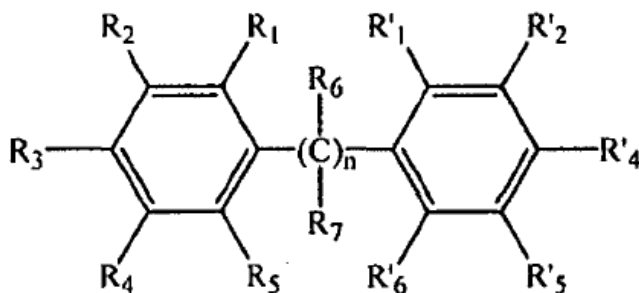
- 40 Mediante la quelación con iones metálicos, los diarilalcanos pueden ser usados también para suministrar iones metálicos esenciales a la corriente sanguínea del hospedante y/o portar iones metálicos a través de la piel o la barrera sanguínea/cerebral, así como otras membranas. Dicho compuesto puede ser administrado a un hospedante que lo necesita en una cantidad terapéuticamente eficaz de dicho compuesto junto con el (o los) ion(es) de metal(es) que va(n) a ser suministrado(s). En esta capacidad, los diarilalcanos pueden ser usados para tratar enfermedades y estados que incluyen, pero sin limitación anemia y otras deficiencias de hierro, inflamación, obesidad y diabetes, enfermedades periodontales, estados pre-cancerosos orales, cánceres orales y otras enfermedades malignas orales, protecciones dentales y dientes sensibles, secuelas, pulpitis, irritación, dolor e inflamación provocados por la implantación física de dentaduras orales, trauma, lesiones, bruxismo y otras heridas menores en la boca, en los protectores dentales o en la lengua, placa y cálculos dentales, descalcificación dental, proteolisis y caries (deterioro dental) e infecciones virales. Los iones metálicos se seleccionan entre el grupo que incluye pero sin limitación cobre, hierro, zinc selenio, magnesio y otros iones metálicos.

- 50 Los dialquilalcanos pueden ser usados en la industria alimenticia para prevenir la coloración marrón y los cambios de color en frutas, setas y otros productos alimenticios.

- Los diarilalcanos que pueden ser usados de acuerdo con lo que sigue incluyen compuestos ilustrados mediante la estructura general anteriormente expuesta. Los diarilalcanos reivindicados o descritos en la presente memoria descriptiva pueden ser obtenidos mediante métodos sintéticos o pueden ser aislados a partir de una o más familias de plantas seleccionadas entre el grupo que incluye, pero sin limitación, Compositae, Fabaceae, Lauraceae, Leguminosae, Liliaceae, Loranthaceae, Moraceae y Myristicaceae. Los diarilalcanos reivindicados o descritos en la presente memoria descriptiva pueden ser extraídos, concentrados y purificados a partir de los géneros de plantas altas que incluyen, pero sin limitación, Acacia, Broussonetia, Dianella, Helichrysum, Iryanthera, Knema, Lindera, Pterocarpus, Viscum y Xanthocercis. Los diarilalcanos se pueden encontrar en diferentes partes de la planta que incluyen, pero sin limitación, los tallos, cortezas de los tallos, maderas nucleares, troncos, cortezas de troncos,

ramilletes, tubérculos, raíces, cortezas de raíces, brotes jóvenes, semillas, rizomas, flores y otros órganos reproductores, hojas y otras partes aéreas. Los diarilalcanos pueden ser aislados a partir de una planta o plantas de los géneros *Broussonetia*, *Dianella* y *Iryanthera*.

- 5 Los diarilalcanos descritos o reivindicados en la presente memoria descriptiva pueden ser obtenidos mediante métodos sintéticos. En la presente memoria descriptiva se describe un método para sintetizar diarilalcanos y diarilalcanoles, comprendiendo dicho método reducir un compuesto que tiene la siguiente estructura general:



en la cual

- 10 R_1 - R_5 y R'_1 - R'_5 y n son como se definieron anteriormente y en la que R_6 y R_7 forman conjuntamente uno o más grupo(s) carbonilo. El agente reductor puede ser seleccionado entre cualquier agente reductor conocido para la reducción de cetonas a alcoholes que incluyen, pero sin limitación borohidruros, H_2 en presencia de un catalizador, NaH y $LiAlH_4$. El agente reductor puede ser $NaBH_4$.

- 15 Los diarilalcanos descritos o reivindicados en la presente memoria descriptiva pueden ser obtenidos mediante una modificación sintética de un compuesto que se produce de forma natural aislado de una fuente vegetal. Por ejemplo, el compuesto que se produce de forma natural buteína es aislado a partir de una fuente vegetal, deshidratado y reducido para producir el correspondiente diarilalcanol.

- 20 Los diarilalcanos descritos o reivindicados en la presente memoria descriptiva pueden ser obtenidos mediante la reacción de dos compuestos aromáticos apropiadamente sustituidos. Las reacciones químicas factibles para sintetizar estos compuestos a partir de dos compuestos aromáticos sustituidos incluyen, pero sin limitación condensación aldólica entre un benzaldehído sustituido y una acetofenona sustituida; reacción de Claisen-Schmidt o condensación aldólica cruzada entre un aldehído y una cetona; reacción de Grignard usando un haluro de organomagnesio de un anillo aromático sustituido para enlazar el segundo anillo aromático sustituido a través de una reacción de adición al grupo carbonilo en la molécula; reagrupamiento de Claisen mediante una isomerización intra-molecular, en la que un fenol esterificado con grupos de sustitución apropiados se isomerizará para unirse a los segundos anillos aromáticos en la posición orto del fenol seguido de una reacción de reducción y reacción de acoplamiento de Suzuki, en la que dos anillos aromáticos sustituidos son convertidos en ácidos arilborónicos y seguidamente unidos mediante un haluro de alquilo usando un catalizador de paladio cuidadosamente seleccionado. Estas reacciones son bien conocidas por un experto en la técnica y las condiciones para estas reacciones pueden ser determinadas usando la información expuesta en la presente memoria descriptiva para la síntesis de estos compuestos.

Debe apreciarse que en toda esta solicitud se proporcionan diversas citaciones.

- 35 Se describe en la presente memoria descriptiva una estrategia que combina un ensayo de inhibición de tirosinasa con un procedimiento químico de des-replicación para identificar extractos de plantas activos y los compuestos particulares en esos extractos que inhiben específicamente la enzima binuclear tirosinasa. Como se indicó anteriormente, las enzimas que inhiben tirosinasa pueden conducir a una reducción en la producción de melanina, aclarando así eficazmente la piel. Puede ser generada una biblioteca de extractos vegetales extrayendo polvos de plantas secas con un disolvente orgánico, como se describe en el ejemplo 1. El ensayo de inhibición de tirosinasa se desarrolló siguiendo un método que se describe por Jones et al. (2002) *Pigment. Cell Res.* 15:335, como se describe en el ejemplo 2. Usando este ensayo, se seleccionó un total de 11444 extractos de plantas en cuanto a su capacidad para inhibir la actividad de tirosinasa de hongos. Esta selección primaria identificó 20 extractos de plantas (1,75% de proporción de éxito) con potente actividad inhibidora de tirosinasa. La Tabla 1 recoge el porcentaje de inhibición de tirosinasa por cuatro de estos extractos aislados a partir de cuatro géneros diferentes.

- 45 Con el fin de identificar eficazmente activos a partir de los extractos de plantas activos, se usó un procedimiento de fraccionamiento de producción elevada, como se describe en el ejemplo 3. Brevemente, los extractos activos fueron fraccionados usando un sistema de purificación de producción elevada (HTP). Cada una de las fracciones fue seguidamente ensayada en cuanto a su capacidad para inhibir la actividad de tirosinasa como por el ensayo primario descrito en el ejemplo 2. Después de la des-replicación, usando una combinación de HPLC con detectores PDA y MS acoplados con una base de datos de estructuras, la búsqueda y eliminación de fracciones que contenían inhibidores de tirosinasa conocidos, como polifenoles y cromonas, se escogió un total de siete extractos activos para

el aislamiento y purificación a gran escala guiados por bioensayos, como se describe en los ejemplos 4-6, usando los extractos de *Broussonetia kazinoki* Sieb. Et Zucc (Moraceae) y *Dianella ensifolia* (L.) DC. (Liliaceae) para fines de ilustración.

El ejemplo 4 describe la extracción, separación y purificación del nuevo diarilpropano: 1-(2-metoxi-4-hidroxifenil)-3-(2'-hidroxi-5'-metoxifenil)-propano (UP288) (1) a partir de *Broussonetia kazinoki* Sieb. Et Zucc (Moraceae) (planta completa) usando el método general expuesto en los ejemplos 1-3. La Figura 4 ilustra el cromatograma HPLC/UV de la fracción HTP que contiene el UP288. La estructura del compuesto activo UP288 fue elucidada usando una combinación de métodos espectroscópicos como se expone en el ejemplo 4. La Figura 5 expone la estructura química y el espectro ^{13}C -RMN de UP288. La Figura 6 ilustra las curvas de respuesta a la dosis inhibidora de tirosinasa y los valores de IC_{50} para UP288 con relación a ácido kójico. La Figura ilustra que el UP288 (1) es un potente inhibidor de tirosinasa como el ácido kójico, que tiene una $\text{IC}_{50} = 24 \mu\text{M}$.

Sorprendentemente, se aislaron dos diarilalcanos similares y se identificaron a partir de una familia de plantas totalmente diferentes *Dianella ensifolia* (L.) DC. (Liliaceae), como se describe en el ejemplo 5. La Figura 7 expone esquemáticamente el aislamiento guiado por bioensayo de estos dos compuestos activos (UP02 a (2) y el Ejemplo de referencia UP302b (3)) a partir de *Dianella ensifolia* (planta completa). Con referencia a la Figura 7, se puede observar que solamente quince fracciones de columna de un total de 264 muestras recogidas exhibió una potente inhibición de tirosinasa. Un análisis HPLC (Figura 8) de las fracciones activas combinadas mostró que los compuestos activos eran componentes menores en el mejor conjunto, que ya había sido fuertemente enriquecida. Unos laboriosos esfuerzos de separación y purificación produjeron dos nuevos compuestos activos que fueron completamente caracterizados mediante RMN y otros métodos espectroscópicos, como se ilustra en el Ejemplo 5 y la Figura 9, como 1-(3-metil-2,4-dimetoxifenil)-3-(2',4'-dihidroxifenil)-propano (UP302a, $\text{IC}_{50} = 0,24 \mu\text{M}$) (2) y el ejemplo de referencia 1-(3-metil-2,4-dimetoxifenil)-3-(2,5-dihidroxifenil)-propano (IP302b), $\text{IC}_{50} = 1,2 \mu\text{M}$) (3).

El ejemplo 6 describe el aislamiento a gran escala de UP302a (2), el inhibidor de tirosinasa más potente, aislado a partir de *Dianella ensifolia* (DE) (planta completa). Haciendo referencia al Ejemplo 6, a partir de 4,3 kg de biomasa seca, se obtuvo un total de 30 mg de UP302a (2) puro después de múltiples fraccionamientos de columna sobre gel de sílice, resinas CG-161 y C-18. La estructura y la función biológica del compuesto aislado fueron confirmadas.

Debido a la poca abundancia natural de diarilalcanos/diarilalcanoles, se desarrollaron métodos para sintetizar estos compuestos biológicamente activos, como una fuente comercial alternativa de esta clase de compuestos. El Ejemplo 7 describe un método general para la síntesis de diarilalcanos a través de la reducción de calconas sustituidas. Para fines de ilustración, se describe la reducción de 2,4-dihidroxifenil-3',4'-dimetoxifenilcalcona (4) a 1-(2,4-dihidroxifenil)-3-(3',4'-dimetoxifenil)-1-propanol 5 usando borohidruro de sodio. Sin embargo, como se expone en el ejemplo 7, se sintetizó un cierto número de otros diarilalcanos usando este método general. Todos los compuestos sintetizados mostraron una actividad inhibidora de tirosinasa elevada a moderada. Con respecto al método general descrito en el Ejemplo 7, pueden ser usados cualesquiera otros agente reductores conocidos para efectuar esta reducción que incluyen, pero sin limitación, otros borohidruros, H_2 en presencia de un catalizador NaH y LiAlH_4 .

Usando la reacción general descrita en el Ejemplo 7, otras diversas diarilpropanonas sustituidas se convirtieron en diarilpropanos y/o diarilpropanoles como se demuestra en los Ejemplos 8, 9 y 10. El ejemplo 11 demuestra la síntesis de diarilpropanol usando glicósido flavonoide aislado a partir de una fuente natural como material de partida.

Se describen también en la presente memoria descriptiva métodos para sintetizar esta clase de compuestos mediante la reacción de dos compuestos aromáticos apropiadamente sustituidos. Esta realización se ilustra en el Ejemplo 12, usando la reacción de resorcinol con ácido 3-metoxi-4-hidroxisinámico para fines de ilustración. Las reacciones químicas factibles para sintetizar estos compuestos a partir de dos compuestos aromáticos sustituidos incluyen, pero sin limitación, la condensación aldólica entre un benzaldehído sustituido y una acetofenona sustituida, reacción de Claisen-Schmidt o condensación aldólica cruzada entre un aldehído y una cetona; reacción de Grignard usando un haluro de organomagnesio de un anillo aromático sustituido para unir el segundo anillo sustituido a través de una reacción de adición al grupo carbonilo en la molécula; reagrupamiento de Claisen mediante isomerización intra-molecular, en la que un fenol esterificado con grupos de sustitución apropiados será isomerizado para unirse a los segundos anillos aromáticos en la posición orto del fenol seguido de una reacción de reducción y reacción de acoplamiento de Suzuki, en la que dos anillos aromáticos sustituidos son convertidos en ácidos arilborónicos y seguidamente son unidos mediante un haluro de alquilo usando un catalizador de paladio cuidadosamente seleccionado. Estas reacciones son bien conocidas por los expertos en la técnica y las condiciones para estas reacciones pueden ser determinadas usando la información descrita en la presente memoria descriptiva para la síntesis de estos compuestos.

El Ejemplo 13 expone los valores de IC_{50} para un cierto número de diarilalcanos descritos como ejemplos de referencia y diarilalcanoles sintetizados según los métodos descritos en la presente memoria descriptiva. Los compuestos fueron evaluados usando el método general descrito en el ejemplo 2. El valor de IC_{50} para cada muestra se calculó usando programas de ordenador de valores cinéticos para verificar que la reacción era lineal a un valor especificado de tiempo y concentración. Usando los métodos descritos en los Ejemplos de referencia 7-12, se sintetizó un total de 24 compuestos y se evaluaron en cuanto a su capacidad para inhibir tirosinasa. Los resultados se exponen en la Tabla 2. Con referencia a la Tabla 2, se puede observar que los valores de IC_{50} de los

diarilalcanos sintéticos eran comparables a los diarilpropanos que se producen de forma natural. Por tanto, estas, dos clases de compuestos son capaces de inhibir tirosinasa hasta aproximadamente el mismo alcance. Los diarilalcanos y/o diarilalcanos más activos tenían tres átomos de carbono entre los dos anillos aromáticos. Usando los cálculos descritos en el Ejemplo 17, esta característica estructural se demostró que era crítica con el fin de generar conformaciones intra-moleculares paralelas y superpuestas. Sin embargo, los diarilalcanos que contenían dos y cuatro átomos de carbono entre los dos anillos aromáticos, como 1-(2,4-dihidroxifenil)-2-(4'-metoxifenil)-1-etanol ($IC_{50} = 77 \mu M$) y 1,4-bis-(3,4-dihidroxifenil)-2,3-dimetil-butano ($IC_{50} = 700 \mu M$) también eran capaces de inhibir significativamente la actividad de tirosinasa.

Usando el método descrito en el Ejemplo 2, la inhibición de tirosinasa por UP302a (2) se evaluó usando L-DOPA como el sustrato, como se expone en el Ejemplo 14. Los resultados se exponen en la Figura 10. Este estudio puso de manifiesto que el UP302a (2) es un potente inhibidor competitivo que tiene un efecto de la duración. De forma interesante, la actividad de tirosinasa no se reanudó durante varios días después de una incubación con UP302a. Por el contrario, la actividad de tirosinasa fue totalmente restablecida después de solamente 1 hora a continuación de una incubación con ácido kójico. Como dos de los sustituyentes en los anillos aromáticos de UP302a eran grupos metoxi, el inhibidor no puede ser fácilmente hidroxilado y/o oxidado. Esto puede explicar tanto la eficacia como la duración de la actividad inhibidora de UP302a. Por tanto, se puede concluir que estos compuestos tendrán un efecto de larga duración.

La eficacia de la composición reivindicada se demostró también midiendo la inhibición de melanina producida en un ensayo in vitro sobre una línea celular B-16, como se describe en el Ejemplo 15. Los resultados se exponen en la Figura 11. La reducción de melanina endógena por UP302a (2) era casi seis veces mayor que la del ácido kójico. Adicionalmente, la inhibición de la producción de melanina inducida por MSH mediante UP302a fue también significativamente mayor que la del ácido kójico. Como era de esperar, el ejemplo de referencia UP288 (1) era comparable al ácido kójico en el modelo de la línea celular B-16.

El Ejemplo 16 describe un ensayo para valorar la citotoxicidad de dos diarilpropanos UP288 (1) y UP302a (2) con relación al ácido kójico. A una concentración de $250 \mu M$, que estaba por encima de la IC_{50} de la totalidad de los tres compuestos ensayados, los diarilpropanos mostraron perfiles de seguridad similares a los del ácido kójico.

El Ejemplo 17 describe los análisis de moderación molecular realizados para determinar la conformación 3-D más estable de los diarilalcanos y diarilalcanos activos. Los cálculos de los mecanismos moleculares se realizaron usando el software Chem3D. Estos cálculos pusieron de manifiesto que el inhibidor de quirosinasa más potente 1-(3-metil-2,4-dimetoxifenil)-3-(2',4'-dihidroxifenil)-propano (UP302a (2), $IC_{50} = 0,24 \mu M$) tiene una conformación tridimensional muy única con los dos anillos aromáticos superpuestos uno a otro, como se ilustra en la figura 12. La energía total minimizada para la conformación es $-4,7034 \text{ KJ/mol}$ y la distancia entre los dos anillos aromáticos es de $3,28 \text{ \AA}$. Los grupos hidroxilos fenólicos en el primer anillo aromático están justo por encima de los dos grupos metoxi en el segundo anillo aromático, siendo la distancia entre dos átomos de oxígeno de $2,99 \text{ \AA}$ y $3,16 \text{ \AA}$, respectivamente, como se ilustra en la figura 14. El sitio activo de la enzima tirosinasa binuclear tiene dos iones de cobre complejados a una molécula de oxígeno en un estado de oxidación de peróxido $[Cu^{II}-O_2-Cu^{II}]$, que es clave para el mecanismo mediante el cual la tirosinasa cataliza la introducción de un grupo hidroxilo en la posición orto del anillo aromático de un mono-fenol (como tirosina). (Decker et al. (2000) *Angew. Chem. Int. Ed.* 39:1591). Las distancias interatómicas se expresaron como $3,56 \text{ \AA}$ para Cu-Cu, $1,90 \text{ \AA}$ para Cu-O y $1,41 \text{ \AA}$ para O-O (Kitajima et al. (1989) *J. Am. Chem. Soc.* 111:8975). La conformación paralela del 1-(3-metil-2,4-dimetoxifenil)-3-(2',4'-dihidroxifenil)-propano (UP302a, $IC_{50} = 0,24 \mu M$) se quelará perfectamente con ambos iones de cobre del complejo $[Cu^{II}-O_2-Cu^{II}]$ de la parte superior y de la parte inferior, como se ilustra en las Figuras 13 y 14. Esta quelación dual por el inhibidor de ambos iones de cobre en el sitio activo bloqueará totalmente el acceso al sustrato, como L-Dopa a la enzima, inhibiendo así eficazmente la función de la proteína. Usando la misma aproximación, los diarilalcanos y diarilalcanos aislados y sintéticos recogidos en la Tabla 2 fueron analizados. Los resultados de este análisis indican que los compuestos con conformación retorcida o no paralela no tenían ninguna capacidad o solamente una capacidad débil para inhibir la actividad de tirosinasa.

A partir de estos estudios, se ha determinado que los inhibidores de diarilalcanos más eficaces tienen dos a tres sustituyentes en un anillo aromático y cero a múltiples sustituyentes en el segundo anillo aromático. Las estructuras más favorables son aquellas en las que al menos un anillo aromático está sustituido en las posiciones 2 y 4. Preferentemente, los anillos son aromáticos y/o heteroaromáticos de 6 miembros, según se demostró mediante dos de los compuestos de referencia aislados, 1-(2-hidroxi-4-metoxifenil)-3-(2',3',4',5'-tatrahidro-benzo(b)dioxosin-8-il)-1-propanol; $IC_{50} = 72 \mu M$ y 3-(5'-cloro-1'-metil-1'-hidroimidazol-2'-il)-1-(2-hidroxi-4-metoxifenil)-1-propanol; $IC_{50} = 225 \mu M$.

El compuesto 1-(3-metil-2,4-dimetoxifenil)-3-(2',4'-dihidroxifenil)-propano de esta invención y las composiciones descritas en la presente memoria descriptiva pueden ser administrados mediante cualquier método conocido por un experto en la técnica. Los modos de administración incluyen, pero sin limitación, la administración enteral (oral), administración parenteral (intravenosa, subcutánea e intramuscular) y la aplicación tópica. Dicho compuesto según esta invención puede ser administrado por vía interna o tópica a un paciente que necesita una cantidad terapéuticamente eficaz de dicho compuesto.

El compuesto 1-(3-metil-2,4-dimetoxifenil)-3-(2',4'-dihidroxifenil)-propano de la presente invención o los compuestos descritos en la presente memoria descriptiva pueden ser formulados como composiciones farmacéuticas, que incluyen otros componentes como un excipiente farmacéuticamente y/o cosméticamente aceptable, un adyuvante y/o un vehículo. Por ejemplo, el compuesto de la presente invención o los compuestos descritos en la presente memoria descriptiva pueden ser formulados en un excipiente que pueda tolerar el hospedante que va a ser tratado. Un excipiente es una sustancia inerte usada como diluyente o vehículo para un agente terapéutico como un diarilalcano o una mezcla de diarilalcános. Ejemplos de estos excipientes incluyen, pero sin limitación agua, solución salina, solución de Ringer, solución de dextrosa, manitol, solución de Hank, conservantes y otras soluciones de sales acuosas fisiológicamente equilibradas. Pueden ser usados vehículos no acuosos como aceites fijos, aceite de sésamo, oleato de etilo o triglicéridos. Otras formulaciones útiles incluyen suspensiones que contienen agentes que aumentan la viscosidad, como carboximetilcelulosa de sodio, sorbitol o dextrano. Los excipientes pueden contener también cantidades menores de aditivos, como sustancias que aumenten la isotonicidad y la estabilidad química. Ejemplos de tampones incluyen tampón de fosfato, tampón de bicarbonato, tampón de tris, histidina, citrato y glicina o sus mezclas, mientras que ejemplos de conservantes incluyen, pero sin limitación EDYA, EDTA de disodio, BHA, BHT, vitamina C, Vitamina E, bisulfito de sodio, SnCl₂, timerosal, m- u o-cresol, formalina y alcoholbencílico. Las formulaciones estándar pueden ser líquidas o sólidas, que pueden ser adsorbidas en un líquido adecuado como una suspensión o solución para la administración. Por tanto, en una formulación no líquida, el excipiente puede comprender destroxa, albúmina de suero humano, conservantes, etc. A los que se puede añadir agua esterilizada o solución salina antes de la administración.

En una realización de la presente invención, dicho compuesto puede incluir también un adyuvante o vehículo. Los adyuvantes son normalmente sustancias que generalmente mejoran la respuesta biológica del hospedante a un agente bioactivo específico. Adyuvantes adecuados incluyen, pero sin limitación, adyuvante de Freund, otros componentes de paredes celulares bacterianas, aluminio, magnesio, cobre, zinc, hierro, calcio y otras sales basadas en iones metálicos, sílice, polinucleótidos, toxoides, proteínas del suero, proteínas de capas virales, otras preparaciones derivadas de bacterias, gamma-interferón; adyuvantes de copolímeros de bloques como adyuvante Titermax de Hunter (Vaxcel.TM., Inc. Norcross, Ga.), adyuvantes de Ribi (disponibles en la empresa Ribi ImmunoChem Research, Inc., Hamilton, Mont.); y saponinas y sus derivados, como Quil A (disponible en la empresa Superfos Biosector A/S, Dinamarca). Los vehículos son normalmente compuestos que aumentan la semivida de una composición terapéutica en el hospedante tratado. Los vehículos adecuados incluyen, pero sin limitación formulaciones polímeras de liberación controlada, implantes biodegradables, liposomas, bacterias, virus, aceites, ésteres y glicoles.

En una realización, la composición se preparara en forma de una formulación de liberación controlada, que libera lentamente la composición de la presente invención en el hospedante. Como se usa en la presente memoria descriptiva, una formulación de liberación controlada comprende el compuesto de la presente invención en un vehículo de liberación controlada. Los vehículos de liberación controlada serán conocidos por los expertos en la técnica. Las formulaciones de liberación controlada preferidas son biodegradables (bioerosionables).

El compuesto 1-(3-metil-2,4-dimetoxifenil)-3-(2',4'-dihidroxifenil)-propano de la presente invención y las composiciones descritas en la presente memoria descriptiva se administran preferentemente por vía tópica por cualquier medio adecuado, conocido por los expertos en la técnica para administrar por vía tópica composiciones terapéuticas que incluyen, pero sin limitación un ungüentos, geles, lociones o bases para cremas, o en forma de una pasta dental, líquido de lavado bucal o aplicado como revestimiento en materiales de higiene dental o en forma de una emulsión, en forma de un parche, venda o máscara, una gasa no adherente, un vendaje, una compresa o una bayeta de tela. El ejemplo 18 describe la preparación de dos formulaciones de crema con un contenido activo a 0,01% y 0,1% de diarilalcano(s) puro(s) y/o en mezcla por peso total de la fórmula. Esta aplicación tópica puede ser administrada por vía local a cualquier zona afectada, usando cualquier medio estándar conocido para una administración tópica. Una composición terapéutica puede ser administrada en una diversidad de formas de dosificaciones unitarias dependiendo del método de administración. Para modos de suministro particulares, el compuesto 1-(3-metil-2,4-dimetoxifenil)-3-(2',4'-dihidroxifenil)-propano de la presente invención puede ser formulado en un excipiente descrito en la presente memoria descriptiva. El compuesto de la presente invención puede ser administrado a cualquier hospedante, preferentemente a mamíferos y, más preferentemente, a seres humanos. El modo particular de administración dependerá del estado que va a ser tratado.

En una realización, un ungüento adecuado está comprendido por la concentración deseada de un diarilalcano único o una mezcla de dos o más diarilalcános, que sea una cantidad eficaz y no tóxica generalmente seleccionada en el intervalo de 0,001% a 100% basado en el peso total de la formulación tópica, de 65 a 100% (preferentemente 75 a 96%) de parafina blanda blanca, de 0 a 15% de parafina líquida y de 0 a 7% (preferentemente 3 a 7%) de lanolina o un derivado o equivalente sintético de la misma. En otra realización, el ungüento puede comprender una matriz de polietileno-parafina líquida.

En una realización, una crema adecuada está comprendida por un sistema emulsionante junto con la concentración deseada de un diarilalcano único o una mezcla de dos o más diarilalcános, como se proporcionó anteriormente. El sistema emulsionante está comprendido preferentemente por dos a 10% de alcoholes de polioxietileno (por ejemplo, la mezcla disponible bajo la marca registrada Cetomacrogol® 1000), de 10 a 25% de alcohol estearílico, de 20 a 60% de parafina líquida y de 10 a 65% de agua; junto con uno o más conservantes, por ejemplo de 0,1 a 1% de

N,N"-metilenobis[N'3-(hidroximetil)-2,5-dioxo-4-imidazolinil]urea] (disponible bajo la denominación Imidurea USNF), de 0,1 a 1% de 4-hidroxibenzoatos de alquilo (por ejemplo, la mezcla disponible en Nipa Laboratories bajo la marca registrada Nipastat), de 0,01 a 0,1% de butil-4-hidroxibenzoato de sodio (disponible en Nipa Laboratories bajo la marca registrada Nipabutyl sodio) y de 0,1 a 2% de fenoxetanol.

- 5 En una realización, un gel adecuado está comprendido por un sistema semi-sólido en el que está incluida una fase líquida en una matriz polímera tridimensional con un elevado grado de reticulación. La Fase líquida puede estar comprendida por agua, junto con la cantidad deseada de un diarilalcano único o una mezcla de dos o más diarilalcenos, de 0 a 20% de aditivos miscibles con agua, por ejemplo, glicerol, polietilenglicol o propilenglicol y de 0,1 a 10%, preferentemente de 0,5 a 2% de un agente espesante que puede ser un producto natural seleccionado entre el grupo que incluye, pero sin limitación, tragacanto, pectina, carragenano, Agar y ácido algínico o un compuesto sintético o semi-sintético, seleccionado entre el grupo que incluye, pero sin limitación metilcelulosa y carboxipolimetileno (carbopol), junto con uno o más conservantes, seleccionados entre el grupo que incluye, pero sin limitación, por ejemplo, de 0,1 a 2% de 4-hidroxibenzoato de metilo (metil-paraben) o fenoxietanol diferencial. Otra base adecuada está comprendida por la cantidad deseada de un diarilalcano único o una mezcla de diarilalcenos, junto con 70^a 90% de polietilenglicol (por ejemplo, ungüento de polietilenglicol que contiene 40% de polietilenglicol 3350 y 60% de polietilenglicol 400 preparado de acuerdo con la entidad U.S. National Formulary (USNF)), de 5 a 20% de agua, de 0,02 a 0,25% de un antioxidante (por ejemplo hidroxitolueno butilado) y de 0,005 a 0,1% de un agente quelante (por ejemplo ácido etilendiamino-tetraacético (EDTA)).

- 20 La expresión "parafina blanda como se usa anteriormente abarca las fases para cremas o ungüentos de parafina blanda blanca y parafina blanda amarilla. El término lanolina abarca grasa de lana virgen y grasa de lana purificada. Los derivados de lanolina incluyen, en particular lanolinas que han sido químicamente modificadas con el fin de alterar sus propiedades físicas o químicas y los equivalentes sintéticos de lanolina incluyen, en particular, compuestos sintéticos o semi-sintéticos y mezclas que son conocidas y se usan en la técnicas farmacéuticas y cosméticas como alternativas a la lanolina y se pueden denominar, por ejemplo sustitutos de lanolina.

- 25 Un equivalente sintético adecuado de lanolina que puede ser usado es el material disponible bajo la marca registrada Softisan® conocido como Softisan 649. El Softisan 649, disponible en la empresa Dynamit Nobel Aktiengesellschaft, es un éster de glicerina o ácidos grasos vegetales naturales, de ácido isoesteárico y de ácido adípico; sus propiedades son expuestas por H. Hermsdorf en la publicación Fette, Seifen, Anstrichmittel, Issue No. 84, No.3 (1982), pág. 3-6.

- 30 Las demás sustancias anteriormente mencionadas como constituyentes de bases adecuadas para ungüentos o cremas y sus propiedades se exponen en trabajos de referencia estándar, por ejemplo, la farmacopea. El cetomacrogol 1000 tiene la fórmula $\text{CH}_3(\text{CH}_2)_m(\text{OCH}_2\text{-CH}_2)_n\text{OH}$, en la que m puede ser 15 o 17 y n puede ser 20 a 24. El hidroxitolueno butilado es 2,6-di-terc-butil-p-cresol. Nipastat es una mezcla de 4-hidroxibenzoatos de metilo, etilo, propilo y butilo.

- 35 El compuesto de la invención o la composición descrita en la presente memoria descriptiva pueden ser producidos mediante técnicas farmacéuticas convencionales. Por tanto, el compuesto o las composiciones anteriormente mencionados, por ejemplo, se pueden preparar convenientemente mezclando conjuntamente a una temperatura elevada, preferentemente 60-70°C, la parafina blanda, parafina líquida si está presente y lanolina o derivado o equivalente sintético de la misma. La mezcla puede ser seguidamente enfriada a temperatura ambiente y, después de la adición de la sal de calcio cristalina hidratada de mupirocina, junto con el córtico esteroide y cualesquiera otros ingredientes, se agita para asegurar una dispersión adecuada.

- 45 Independientemente de la manera de administración, la dosis específica se calcula según el peso corporal aproximado del hospedante. Otros refinamientos de los cálculos necesarios para determinar la dosificación apropiada para el tratamiento que incluye cada una de las formulaciones anteriormente mencionadas, se hace rutinariamente por los expertos en la técnica y está dentro del alcance y las tareas rutinarias realizadas por los mismos sin una excesiva experimentación, especialmente considerando la información de la dosificación y los ensayos descritos en la presente memoria descriptiva. Estas dosificaciones pueden ser determinadas mediante el uso de los ensayos establecidos para determinar las dosificaciones utilizadas conjuntamente con los datos apropiados de respuesta a la dosis.

- 50 Los siguientes ejemplos se proporcionan para fines solamente ilustrativos y no están destinados a limitar el alcance de la invención.

Ejemplos

Ejemplo 1. Preparación de extractos orgánicos a partir de plantas secas

- 55 Un material de plantas secas se trituró hasta un tamaño de partículas no mayor que 2 mm y una parte (60 g) se transfirió a un matraz Erlenmeyer y se extrajo con 600 ml de metanol: diclorometano (1:1). La mezcla se agitó durante una hora, se filtró y la biomasa se extrajo nuevamente con metanol:diclorometano (1:1) (600ml). Los extractos orgánicos se combinaron y se evaporaron bajo vacío para proporcionar un extracto orgánico a partir de cada material vegetal. Cada extracto (aproximadamente 75 mg) se disolvió seguidamente en 1,5 ml de DMSO hasta

una concentración de 50 mg/ml, que seguidamente se almacenó en un congelador a -70°C. Se usó una parte alícuota del extracto para el ensayo de tirosinasa, como se describe en el ejemplo 2.

Ejemplo 2. Ensayo de inhibición de tirosinasa.

Se llevó a cabo un ensayo de inhibición de tirosinasa usando el método descrito por Jones et al. (2002) *Pigment. Cell Res.* 15:335. Usando este método, la conversión de L-Dopa, un sustrato de tirosinasa, en dopacromo, se sigue verificando la absorción a 450 nm. La tirosinasa se preparó en Tampón de fosfato de potasio 50 mM, pH 6,8 (Tampón del ensayo) a U/ml y se almacenó a -20°C en partes alícuotas de 1 ml antes de ser usada. Para ser usadas en los ensayos, las soluciones de enzimas madres se descongelaron y se diluyeron hasta 200 U/ml con tampón del ensayo. Se preparó una solución de trabajo 2 mM de sustrato L-DOPA, en tampón del ensayo para cada ensayo. Las muestras se disolvieron en DMSO al 10% (0,5 ml) y se diluyeron hasta 5 ml con tampón del ensayo. La mezcla de reacción consistía en 0,050, ml de L-DOPA 2 mM, 0,050 ml de tirosinasa de setas a 200 U/ml y 0,050 ml de inhibidor. El volumen de la reacción se ajustó a 200 µl con tampón del ensayo. Los ensayos se realizaron en placas de microtitulación de fondo redondeado Falcon 3097 de 96 pocillos (Beckton Dickinson, NJ). La apariencia de dopacromo se midió con un contador WALLAC 1420 Multilable Counter (Turku, Finlandia). La velocidad media se determinó a partir de la velocidad enzimática lineal medida mediante el cambio de absorbancia (ΔA_{450}) a 450 nm por minuto. El porcentaje de inhibición de tirosinasa por las muestras del ensayo se determinó mediante una comparación de la absorbancia de las muestras frente al testigo usando la fórmula (1):

$$(\text{Absorción de testigo negativo} - \text{absorción de la muestra}) / \text{absorción del testigo negativo} \times 100 \quad (1)$$

Los resultados se exponen en la Tabla 1.

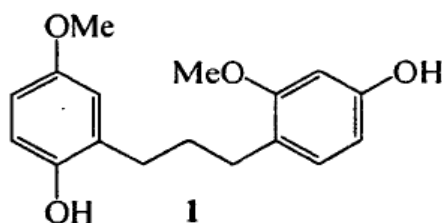
Tabla 1. Actividad inhibidora de tirosinasa de cuatro extractos de plantas

Nombre latino de plantas y partes	cantidad	Peso del extracto orgánico	Porcentaje de inhibición de tirosinasa (concentración mg/ml)
<i>Broussonetia kazinoki</i> Planta completa	20 g	1,1 g	68% (a 0,125 mg/ ml)
<i>Rhus chinensis cecidiums</i>	20 g	12,8 g	31% (a 0,125 mg/ ml)
<i>Polygonum multiflorum</i> Tubérculos	20 g	2,4 g	43% (a 0,125 mg/ ml)
<i>Dianella ensifolia</i> Planta completa	20 g	1,7 g	57% (a 0,125 mg/ ml)

Ejemplo 3. Fraccionamiento HTP de extractos de plantas activos

Se introdujo extracto orgánico activo (400 mg) en una columna rápida de fase normal, previamente rellena (2 cm y de x 8,2 cm, 10 g de gel de sílice). La columna se eluyó usando un sistema de purificación a fondo elevada Hitachi (HTP) con una fase móvil gradiente de (A) 50:50 de EtOAc:hexano y (B) metanol de 100% A a 100% B en 30 minutos a un caudal de 5 ml/minuto. La separación se verificó usando un detector UV de longitud de onda de banda ancha y las fracciones se recogieron en una placa de 96 pocillos profundos a 1,9 ml/pocillo usando un colector de fracciones Gilson. La placa de muestras se secó bajo vacío reducido y centrifugación. Se usó DMSO (1,5 ml) para disolver las muestras en cada celda y se recogió una parte (100 µl) para el ensayo de inhibición de tirosinasa por duplicado.

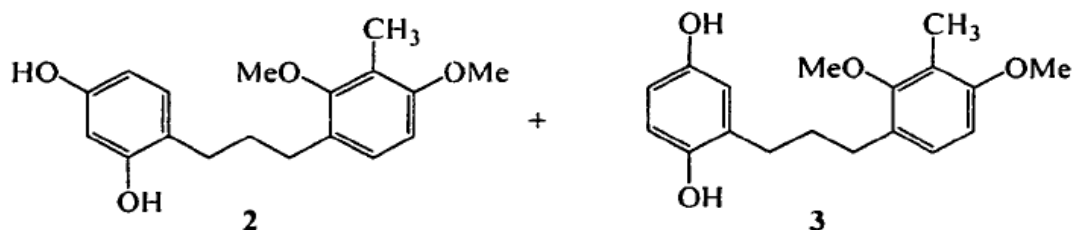
Ejemplo 4. Extracción, separación y purificación de ejemplo de referencia 1-(2-metoxi-4-hidroxifenil)-3-(2'-hidroxifenil)-propano (1) a partir de *Broussonetia kazinoki* (BK) (planta completa)



Broussonetia kazinoki (100 g de planta completa) y se extrajo tres veces con 800 ml de MeOH: DCM (1:2). El extracto seco (6 g) se fraccionó usando una columna de gel de sílice con una elución gradiente con disolvente de hexano/acetato de etilo (50/50) a MeOH. Las fracciones se recogieron en dos conjuntos de 88 tubos de ensayo. Se utilizó Lc/MS/PDA para comprobar cada una de las fracciones, que seguidamente se combinaron basándose en la analogía de su composición. Las fracciones combinadas se evaporaron para separar disolvente, se secaron y su actividad de inhibición de tirosinasa se midió como se describe en el Ejemplo 2. Se encontró que las fracciones (P0346-HTP-F2, P0346-HTP-F4) eran las más activas y estas fracciones se combinaron y se etiquetaron como DK-F2-4. Después de la evaporación del disolvente, la DK-F2-4 se separó adicionalmente en una columna de fase inversa previamente rellena (columna C-18) usando un gradiente de agua/ MeOH. Se observaron diez y ocho picos del compuesto a continuación de la separación. Se realizaron catorce columnas de fase inversa y se combinaron las fracciones similares de cada realización. Un pico del compuesto denominado UP288 en la fracción combinada y enriquecida mostró una fuerte actividad de inhibición de tirosinasa (Figura 4). Después de la separación y purificación mediante HPLC preparativa, se obtuvieron 6 mg de 1-(2-metoxi-4-hidroxifenil)-3-(2'-hidroxi-5'-metoxifenil)-propano (UP288) (1). La estructura de este compuesto se evaluó usando espectroscopía MS y RMN (^1H , ^{13}C , HMQC y HMBC). La Figura 5 expone la estructura química y el espectro ^{13}C -RMN de UP288. El UP288 es un inhibidor de tirosinasa que tiene una actividad comparable al ácido kójico con un valor de IC_{50} de 24 μM . La Figura 6 ilustra las curvas de respuestas a la dosis inhibidora de tirosinasa y los valores de IC_{50} para UP288 y ácido kójico.

1-(2-metoxi-4-hidroxifenil)-3-(2'-hidroxi-5'-metoxifenil)-propano (UP288). Rendimiento 0,006% (pureza > 96%, HPLC); UV λ_{max} : 281,0 nm; MS (Super Sound Ionization, Positive ion detection) : m/z 289 (M + 1, 100%); ^1H -RMN (400 MHz, $(\text{CD}_3)_2\text{SO}$): δ 1,70 (2H, m, CH_2), 2,46 (4H, m, 2 CH_2), 3,68 (3H, s, OCH_3), 3,73 (3H, s, OCH_3), 6,26 (1H, q, H-5), 6,35 (1H, d, H-3), 6,55 (1H, q, H-14), 6,65 (1H, d, H-13), 6,72 (1H, d, H-16), 6,86 (1H, d, H-6), 8,69 (1H, s, OH), 9,20 (1H, s, OH); ^{13}C -RMN (100 MHz, $(\text{CD}_3)_2\text{SO}$): δ 28,5 (C-8), 31,6 (C-9), 34,5 (C-10), 55,0 (C-7), 55,6 (C-17), 98,9 (C-3), 106,4 (C-5), 112,4 (C-16), 115,2 (C-13), 119,7 (C-1), 119,8 (C-14), 120,3 (C-11), 120,4 (C-6), 132,9 (C-12), 144,6 (C-4), 147,2 (C-17) y 158,3 (C-7).

Ejemplo 5. Extracción, separación y purificación de 1-(3-metil-2,4-dimetoxifenil)-3-(2',4'-dihidroxifenil)-propano (UP302a) (2) y Ejemplo de referencia 1-(3-metil-2,4-dimetoxifenil)-3-(2',5'-dihidroxifenil)-propano (UP302b) (3) a partir de *Dianella ensifolia* (P0389) (planta completa)



Se trituró *Dianella ensifolia* (P0389, 300 g de planta completa) y se extrajo tres veces con 800 ml de MeOH: DCM (1:2). El extracto seco (5 g) se fraccionó usando una columna de gel de sílice con una elución gradiente con disolvente de hexano/acetato de etilo (50/50) a MeOH. Las fracciones se recogieron en dos conjuntos de 264 tubos de ensayo. Se utilizó LC/MS/PDA para verificar cada una de las fracciones, seguidamente se combinaron en 22 fracciones basadas en la analogía de sus composición (Figura 7). Las fracciones combinadas se evaporaron para separar el disolvente, se secaron y se midió su actividad de inhibición de tirosinasa como se describe en el Ejemplo 2. Se encontró que las fracciones P0389-HTP-F12, P0389-HTP-F13 y P0389-HTP-F14 eran las que se separaron en una columna de fase inversa previamente rellena (columna RP) usando un gradiente de agua/ MeOH. Se observaron dos picos principales y once picos de compuestos menores a continuación de la separación. Los compuestos correspondientes a cada uno de estos picos fueron aislados a continuación de siete separaciones adicionales en columnas RP. Todos los compuestos recogidos se secaron y se ensayaron en cuanto a la actividad inhibidora de tirosinasa. Dos de los once picos menores denominados UP302a y UP302b, respectivamente, exhibieron una fuerte actividad inhibidora de tirosinasa (Figura 8). Después de una separación y purificación, se obtuvieron dos compuestos activos: 1-(3-metil-2,4-dimetoxifenil)-3-(2',4'-dihidroxifenil)-propano (UP302a, 10 mg) (2) y 1-(3-metil-2,4-dimetoxifenil)-3-(2',5'-dihidroxifenil)-propano (UP302b, 6 mg) (3). Las estructuras de estos dos compuestos se dilucidaron usando espectroscopía MS y RMN (^1H , ^{13}C , gHSQC y HMBC). La Figura 9 expone el

espectro gHSQC de UP302a. Los ensayos de inhibición de tirosinasa mostraron que el UP302a era el inhibidor más potente con una IC_{50} de 0,24 μ M, mientras que el UP302b tenía una IC_{50} de 12 μ M.

1-(3-metil-2,4-dimetoxifenil)-3-(2',4'-dihidroxifenil)-propano (UP302a) (2). Rendimiento 0,02% (pureza > 98%, HPLC); UV λ_{max} : 279,8 nm; MS (Super Sound Ionization, detección de iones positivos): m/z 303 (M + 1, 100%); 1H -RMN (400 MHz, $(CD_3)_2SO$): δ 1,70 (2H, m, CH_2), 2,03 (3H, s, CH_3), 2,43 (2H, m, CH_2), 2,49 (2H, m, CH_2), 3,58 (3H, s, OCH₃), 3,73 (3H, s, OCH₃), 6,11 (1H, q, H-16), 6,25 (1H, d, H-14), 6,65 (1H, d, H-5), 6,76 (1H, d, H-17), 6,97 (1H, d, H-6), 8,93 (1H, s, OH), 9,03 (1H, s, OH); ^{13}C -RMN (100 MHz, $(CD_3)_2SO$): δ 28,8 (C-9), 29,3 (C-11), 31,1 (C-10), 55,3 (C-7), 55,9 (C-8), 102,4 (C-14), 105,8 (C-16), 106,1 (C-5), 118,4 (C-1), 118,6 (C-12), 126,9 (C-3), 127,0 (C-6), 130,1 (C-17), 155,7 (C-13), 156,2 (C-15), 156,3 (C-4) y 156,8 (C-2).

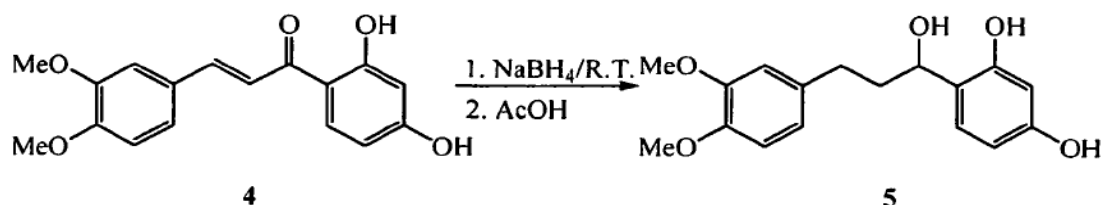
1-(3-metil-2,4-dimetoxifenil)-3-(2',5'-dihidroxifenil)-propano (UP302b) (3). Rendimiento 0,01 % (pureza > 95%, HPLC); UV λ_{max} : 279,8 nm; MS (Super Sound Ionization, detección de iones positivos): m/z 303 (M + 1, 100%); 1H -RMN (400 MHz, $(CD_3)_2CO$): δ 1,82 (2H, m, CH_2), 2,07 (3H, s, CH_3), 2,52 (2H, m, CH_2), 2,56 (2H, m, CH_2), 3,63 (3H, s, OCH₃), 3,77 (3H, s, OCH₃), 6,64 (1H, q, H-15), 6,72 (1H, d, H-14), 6,64 (1H, d, H-5), 6,70 (1H, d, H-17), 7,00 (1H, d, H-6), 7,65 (1H, s, OH), y 7,69 (1H, s, OH).

Ejemplo 6. Aislamiento a gran escala de 1-(3-Metil-2,4-dimetoxifenil)-3-(2',4'-dihidroxifenil)-propano (UP302a) (2) a partir de *Dianella ensifolia* (DE) (planta completa)

Se recogió *Dianella ensifolia* (4,3 kg de planta completa) se trituró y se extrajo tres veces usando un extractor de percolación con metanol como disolvente. Los extractos se combinaron y se evaporaron para separar el metanol. El extracto en bruto se puso seguidamente en suspensión en agua y se dividió en partes con SM. Las capas se separaron y la capa de CM se evaporó para proporcionar 60 g de material. UN análisis LC-MS/PDA de las dos capas, puso de manifiesto que la mayoría del UP302a estaba presente en la capa de DCM, con solamente una cantidad menor presente en la capa acuosa. El extracto de DCM se fraccionó en tres columnas separadas de gel de sílice eluyendo con un gradiente de hexano-EtOAc. Se obtuvo un total de 15 sub-fracciones y se analizaron mediante HPLC-MS/PDA. El compuesto diana (UP302a) se encontró en las fracciones 6 a 9, que se combinaron para producir un total de 3 g de UP302a enriquecido. El UP302a enriquecido se separó adicionalmente en una columna abierta rellena con resina CG-161 que eluía con un gradiente de agua-MeOH. Se recogió un total de 23 fracciones, eluyendo el UP302a en las fracciones 15 a 21. Seguidamente se combinaron las fracciones 15-21 y el disolvente se evaporó para producir 700 mg de un sólido, que se purificó adicionalmente mediante HPLC preparativa en una columna C-18 para generar 30 mg de UP302a. La estructura, actividad inhibidora de tirosinasa y pureza del producto purificado se confirmaron mediante RMN, ensayo de inhibición enzimática y LC-MS/PDA.

Ejemplo de referencia 7. Síntesis de diarilalcanos mediante reducción con borohidruro de sodio de calconasa sustituidas

Se describe a continuación un método general para la síntesis de diarilalcanos mediante reducción con borohidruro de sodio de calconas sustituidas, usando la reducción de 2,4-dihidroxi-3',4'-dimetoxicalcona (4) para fines de ilustración.



La 2,4-dihidroxi-3',4'-dimetoxicalcona (4) (40 mg) se disolvió en 1-propanol (5 ml), seguido de la adición de borohidruro de sodio (15 mg) y la mezcla se dejó reaccionar a temperatura ambiente durante 2 horas. Tras completarse la reacción, se añadió ácido acético al 20% (0,2 ml) y la mezcla se calentó a 80°C durante 5 minutos y se enfrió. Seguidamente la mezcla se separó en una columna C18 previamente rellena, eluyendo con un gradiente de MeOH/H₂O para proporcionar 1-(2,4-dihidroxifenil)-3-(3,4-dimetoxifenil)-1-propanol (5). La estructura del compuesto (5) se confirmó mediante espectroscopía MS y UV, 1D y 2D 1H -RMN.

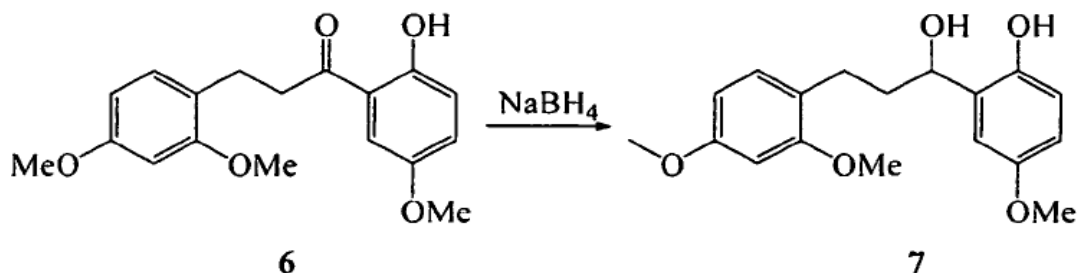
1-(2,4-dihidroxifenil)-3-(3',4'-dimetoxifenil)-1-propanol (5). Rendimiento 60% (pureza > 98%, HPLC); UV λ_{max} : 278,5 nm; MS (Super Sound Ionization, detección de iones positivos): m/z 305 (M + 1, 100%); 1H -RMN (400 MHz, $(CD_3)_2SO$): δ 1,93 (2H, m, CH_2), 2,60 (2H, m, CH_2), 4,49 (1H, m, CH-OH), 3,78 (3H, s, OCH₃), 3,80 (3H, s, OCH₃), 6,28 (1H, q, H-5), 6,31 (1H, d, H-3), 6,98 (1H, d, H-6), 6,71 (1H, q, H-5'), 6,77 (1H, d, H-2'), 6,83 (1H, d, H-6').

Usando el método general anteriormente descrito se redujeron los siguientes compuestos a sus correspondientes alcoholes: 2,4-dihidroxi-2'-hidroxicalcona, 2'-hidroxi-4'-metoxi-2,4-dimetoxi-calcona, 4'-hidroxi-4-hidroxi-calcona, 2', 4'-dihidroxi-2-hidroxi-calcona, 2',4'-dihidroxi-3,4-dimetoxi-calcona, 2', 4',6'-trimetoxi-3,4-dimetoxi-calcona y 2'-hidroxi-4'-metoxi-3,4,5-trimetoxi-calcona para proporcionar 1-(2,4-dihidroxifenil)-3-(2'-hidroxifenil)-1-propanol, 1-(2-hidroxi-4-

metoxifenil)-3-(2',4'-dimetoxifenil)-1-propanol, 1-(4-hidroxifenil)-3-(4'-hidroxifenil)-1-propanol, 1-(2,4-dihidroxifenil)-3-(2'-hidroxifenil)-1-propanol, 1-(2,4-dihidroxifenil)-3-(3',4'-dimetoxifenil)-1-propanol, 1-(2,4,6-trimetoxifenil)-3-(3',4'-dimetoxifenil)-1-propanol y 1-(2-hidroxi-4-metoxifenil)-3-(3',4',5'-trimetoxifenil)-1-propanol.

5 Ejemplo de referencia 8. Síntesis de difenil-propanoles sustituidos mediante reducción con borohidruro de sodio de diarilpropanonas sustituidas.

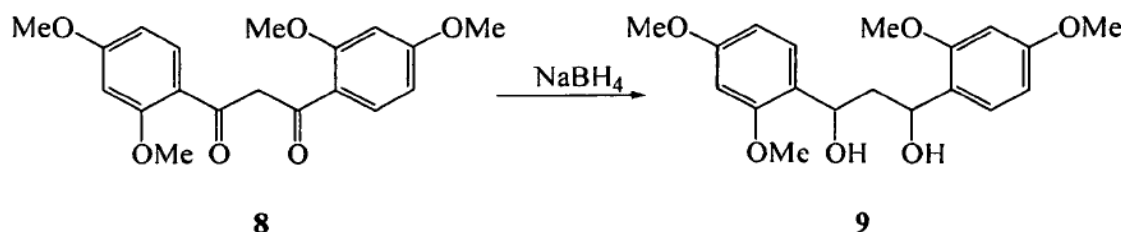
Se describe a continuación un método general para las síntesis de difenil propanoles sustituidos mediante reducción con borohidruro de sodio de diarilpropanona sustituidas, usando la reducción de 1-(2-hidroxi-5-metoxifenil)-3-(2',4'-dimetoxifenil)-1-propanona (6) para fines de ilustración.



10 Se disolvió 1-(2-hidroxi-5-metoxifenil)-3-(2',4'-dimetoxifenil)-1-propanona (6) (5 mg) en 1-propanol (1ml), seguido de la adición de borohidruro de sodio (2 mg) y la mezcla se dejó reaccionar a temperatura ambiente durante 5 horas. Tras completarse la reacción, se añadió ácido acético al 20% (0,2 ml) para neutralizar el borohidruro de sodio en exceso. La mezcla de reacción se separó seguidamente en una columna C₁₈ previamente rellena, eluyendo con un gradiente de MeOH/H₂O para proporcionar 1-(2-hidroxi-5-metoxifenil)-3-(2',4'-dimetoxifenil)-1-propanol (7).

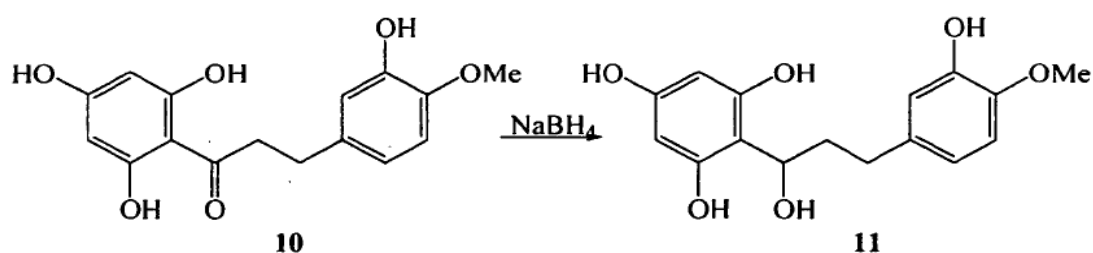
15 Siguiendo el procedimiento sintético general anteriormente descrito, se redujeron los siguientes compuestos de diarilalcanos: 1-(2-hidroxi-4,6-dimetoxifenil)-3-(3'-metoxi-4'-hidroxifenil)-1-propanona, 3-(5'-benciloxi-4'-metoxi-2'-metilfenil)-1-(2-hidroxi-4,5-dimetoxifenil)-1-propanona, 1-(2-hidroxi-4-metoxifenil)-3-(2',3',4',5'-tetrahidro-
20 bezo(b)dioxocin-8'-il)-1-propanona y 3-(5'-cloro-1'-metil-1'-hidro-imidazol-2'-il)-1-(2-hidroxi-4-metoxifenil)-1-propanona para proporcionar 1-(2-hidroxi-4,6-dimetoxifenil)-3-(3'-metoxi-4'-hidroxifenil)-1-propanol, 3-(5'-benciloxi-4'-metoxi-2'-metilfenil)-1-(2-hidroxi-4,5-dimetoxifenil)-1-propanol, 1-(2-hidroxi-4-metoxi-fenil)-3-(2',3',4',5'-tetrahidro-
bezo(b)dioxocin-8-il)-1-propanol y 3-(5'-cloro-1'-metil-1'-hidro-imidazol-2'-il)-1-(2-hidroxi-4-metoxifenil)-1-propanol, respectivamente.

Ejemplo de referencia 9. Síntesis de 1,3-bis(2,4-dimetoxifenil)-propan-1,3-diol (9)



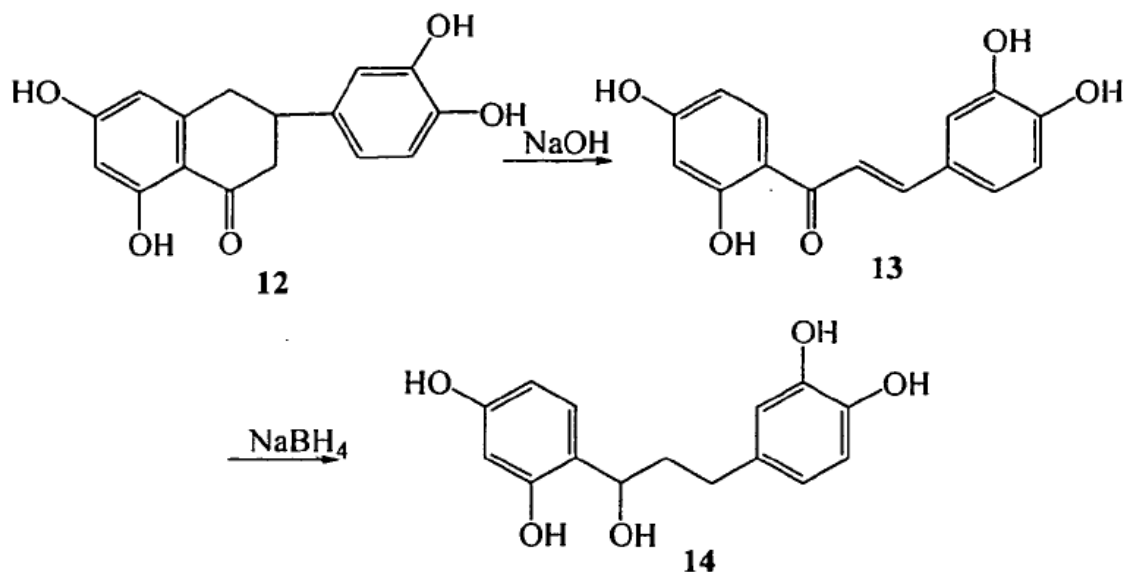
25 Se disolvió 1,3-bis(2,4-dimetoxifenil)-propan-1,3-diona (8) en 1-propanol (1 ml), seguido de la adición de borohidruro de sodio (3 mg) y la mezcla se dejó reaccionar a temperatura ambiente durante 3 horas. Tras completarse la reacción, se añadió ácido acético al 20% (0,2 ml) para neutralizar el borohidruro de sodio en exceso. La mezcla seguidamente se separó en una columna C₁₈ previamente rellena, eluyendo con un gradiente de MeOH/H₂O para proporcionar 1,3-bis(2,4-dimetoxifenil)-propan-1,3-diol (9).

30 Ejemplo de referencia 10. Síntesis de 1-(2,4,6-trihidroxifenil)-3-(3'-hidroxi-4'-metoxifenil)-1-propanol (11) a partir de Neohesperidina



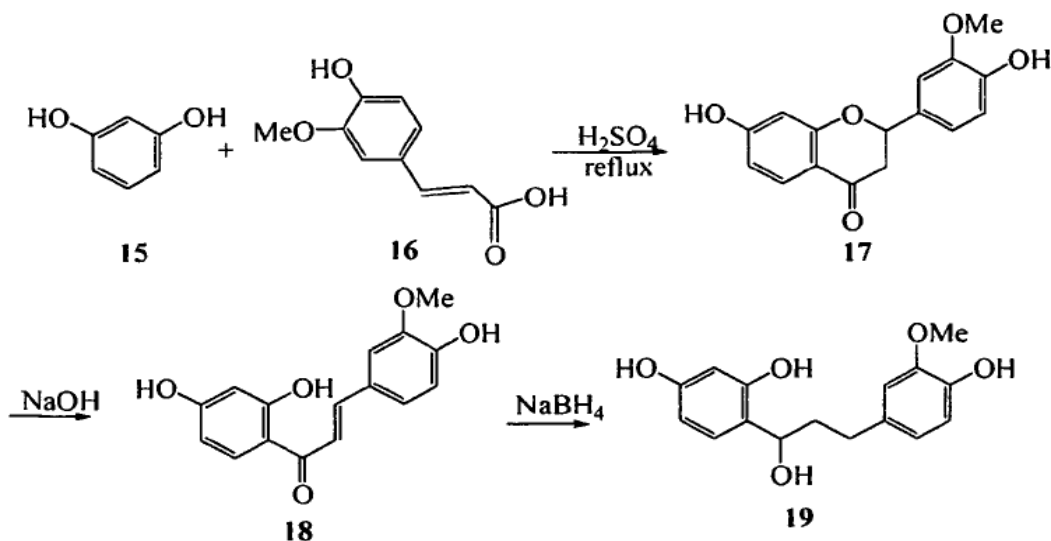
La neohesperidina es un glicósido de dihidrocalcona. Se puso en suspensión un peso total de 100 mg de neohesperidina en 10 ml de HCl1N y se calentó a 80°C durante 2 horas. El producto hidrolizado (10) se enfrió y se extrajo con acetato de etilo (3 x 10 ml). Las capas de acetato de etilo se combinaron, se evaporaron para separar acetato de etilo y se disolvieron en 1-propanol (5 ml). Se añadió borohidruro de sodio (25 mg) a la solución de propanol y se agitó a temperatura ambiente durante 2 horas. Después de completarse la reacción, la mezcla se separó en una columna C₁₈ previamente rellena, eluyendo con un gradiente de MeOH/H₂O para proporcionar 1-(2,4,6-trihidroxifenil)-3-(3'-hidroxi-4'-metoxifenil)-1-propanol (11).

Ejemplo de referencia 11. Extracción, purificación y modificación estructural de butrina para sintetizar 1-(2,4-dihidroxifenil)-3-(3',4'-dihidroxifenil)-1-propanol (14)



La butrina es un glicósido con elevado contenido de flavonona que ha sido extraído con metanol a partir de flores secas de *Butea frondosa* y se purificó mediante separaciones cromatográficas en columnas de fase inversa múltiples. Después de separar los azúcares mediante hidrólisis con HCl, se produjo butina (12) y se purificó mediante RP-HTP (rendimiento de 1,5% a partir de la planta completa). La butina se trató seguidamente con hidróxido de sodio al 10% a 80°C para obtener buteína (13) que se redujo con borohidruro de sodio para obtener 1-(2,4-dihidroxifenil)-3-(3',4'-dihidroxifenil)-1-propanol (14) (IC₅₀ = 250 nM).

Ejemplo de referencia 12. Síntesis de 1-(2,4-dihidroxifenil)-3-(3'-metoxi-4'-hidroxifenil)-1-propanol (19)



Se llevaron a reflujo resorcinol (15) ácido 3-metoxi-4-hidroxisínámico (16) H₂SO₄ (5%) en THF durante 4 horas, para proporcionar 7,4'-dihidroxi-3'-metoxi-flavonona (17) (rendimiento de 90%). El producto, 7,4'-dihidroxi-3'-metoxi-flavonona (17) se trató con hidróxido de sodio al 10% a 80°C durante 1 hora seguido de reducción con borohidruro

de sodio en propanol para proporcionar, según confirmó una detección con LC-MS/PDA, 1-(2,4-dihidroxifenil)-3-(3'-metoxi-4'-hidroxifenil)-1-propanol (19). El producto en bruto exhibe una actividad inhibidora de tirosinasa bastante fuerte. La mezcla se purificó adicionalmente mediante HTP.

Ejemplo de referencia 13. Mediciones de IC₅₀ de la inhibición de tirosinasa mediante diarilalcanos sintéticos

- 5 La inhibición de tirosinasa mediante de diarilalcanos sintéticos se midió usando el método descrito en el Ejemplo 2. El valor de IC₅₀ de cada muestra se calculó usando un software de características cinéticas para verificar si la reacción era lineal a unos valores especificados de tiempo y concentración. Usando los métodos descritos en los ejemplos 7-12 se sintetizó un total de 24 compuestos y se evaluaron en cuanto a su capacidad para inhibir tirosinasas. Los resultados se exponen en la Tabla 2.

10

Tabla 2. Valores de IC₅₀ de diarilalcanos y/o diarilalcanos sintéticos

Nombre del compuesto	Inhibición de tirosinasa (IC ₅₀)
1-(2,4-dihidroxifenil)-3-(3',4'-dihidroxifenil)-1-propanol	0,5 µm
1-(2,4-dihidroxifenil)-3-(3',4'-dimetoxifenil)-1-propanol	0,85 µm
1-(2,4-dihidroxifenil)-3-(2'-hidroxifenil)-1-propanol	0,7 µm
1-(2,4-dihidroxifenil)-3-(2'-metoxifenil)-1-propanol	3 µm
1-(2,4-dihidroxifenil)-3-(4'-metoxifenil)-1-propanol	6 µm
1-(2,4,6-trihidroxifenil)-3-(4'-aminofenil)-1-propanol	8 µm
1-(2,4-dihidroxifenil)-3-fenil-1-propanol	8 µm
1-(2,4-dihidroxifenil)-3-(3'-metoxi-4'-hidroxifenil)-1-propanol	8,5 µm
1-(2-hidroxi-4-metoxifenil)-3-(3',4',5'-trimetoxifenil)-1-propanol	11 µm
1-(2-hidroxi-4-metoxifenil)-3-(2',4'-dimetoxifenil)-1-propanol	25 µm
1-(2-hidroxi-5-metoxifenil)-3-(3',4'-dimetoxifenil)-1-propanol	30 µm
1-(2,4-dihidroxifenil)-2-(4'-metoxifenil)-1-etanol	77 µm
1-(2-hidroxi-4-metoxifenil)-3-(2',3',4',5'-tetrahydro-benzo(b)dioxocin-8'-il)-1-propanol	72 µm
3-(5'-cloro-1'-metil-1'-hidro-imidazol-2'-il)-1-(2-hidroxi-4-metoxifenil)-1-propanol	225 µm
1-(4-hidroxifenil)-3-(4'-hidroxifenil)-1-propanol	305 µm
1-(2-hidroxi-4,6-dimetoxifenil)-3-(3'-metoxi-4'-hidroxifenil)-1-propanol	375 µm
1-(2,4-dihidroxifenil)-2-(3',4'-dimetoxifenil)-1-etanol	431 µm
1,4-bis- (3,4-dihidroxifenil)-2,3-dimetilbutano	700 µm
1-(2-hidroxi-5-metoxifenil)-3-(2',4'-dimetoxifenil)-1-propanol	1000 µm
1-(2,4-dihidroxifenil)-2-(2',4'-diclorofenil)-1-etanol	1000 µm
1-(2,4,6-trihidroxifenil)-3-(3'-hidroxi-4'-metoxifenil)-1-propanol	1200 µm
1,3-bis(2,4-dimetoxifenil)-propan-1,3-diol	1200 µm

Nombre del compuesto	Inhibición de tirosinasa (IC ₅₀)
1-(2,4,6-trihidroxifenil)-3-(3'-hidroxi-4'-metoxifenil)-1-propanol	1200 µM
1-(2,4,6-trimetoxifenil)-3-(3',4'-dimetoxifenil)-1-propanol	1500 µM

Ejemplo 14. Características cinéticas de inhibición enzimática

Usando el método descrito en el Ejemplo 2, se evaluó la inhibición de tirosinasa a concentraciones diferentes (0, 261, 522, 1044 nM) de un inhibidor (UP302a) usando L-DOPA a concentraciones de 0,75, 1,25 y 2,5 mM como sustrato. Como se muestra en la Figura 10, se encontró que el UP302a es un inhibidor competitivo con efecto

Ejemplo 15. Inhibición de la producción de melanina a partir de la línea celular B-16

La inhibición de la producción de melanina se evaluó usando dos ensayos diferentes. En el primer ensayo, la inhibición de la producción de melanina se evaluó sin producción de β -MSH; mientras que en el segundo ensayo la inhibición de la producción de melanina se midió con inducción de β -MSH en el medio de cultivo celular. Brevemente, se hicieron crecer células B16 F1 (ATCC nº CRL-622) hasta confluencia y seguidamente se sembraron a 40.000 células por pocillo. Las células se dejaron unir durante una noche a 37°C en un entorno humidificado que contenía 5% de CO₂. En el día 2, se añadieron inhibidores a las células a concentraciones que variaban en el intervalo de 0-1.000 µM por triplicado y se dejaron incubar durante cuatro días. La cantidad de β -MSH necesaria para inducir la formación de melanina se determinó mediante la adición de hormona a concentraciones que variaban en el intervalo de 0-1.000 nM en aumentos de diez veces. Una vez que se determinó la concentración apropiada de β -MSH, las células se sembraron como anteriormente, dejando que se unieran durante una noche y seguidamente se incubaron conjuntamente con inhibidores de tirosinasa a concentraciones que variaban en el intervalo de 0-1.000 µM. El desarrollo del color se comprobó visualmente cada mañana. Después del desarrollo del color, se separaron 200 µl de materia sobrenadante celular de cada pocillo y se midió la absorbancia a 450 nm. Las lecturas resultantes se usaron para determinar la IC₅₀ para la formación de melanina en el ensayo celular con y sin inducción de β -MSH. Para una comparación inicial de la toxicidad celular, se usaron pocillos tratados de 250 µM para realizar un ensayo de lactato deshidrogenasa (LDH). La LDH es una enzima metabólica que sale de células deterioradas o muertas. La enzima convierte un cromóforo en presencia de NAD⁺ para producir un cambio de color que puede ser verificado por vía espectrofotométrica.

Los resultados de este ensayo pusieron de manifiesto que todos los inhibidores naturales ensayados (Ejemplo de referencia UP288, UP302a y Ejemplo de referencia UP302b) eran al menos tan buenos, sino mejores inhibidores que el ácido fólico. Hubo algunas diferencias en los valores de IC₅₀ bajo los dos conjuntos de condiciones. La inhibición mediante ácido fólico mejoró desde una IC₅₀ de 170 µM para el experimento endógeno hasta una IC₅₀ de 67 µM en el experimento inducido. De los inhibidores ensayados con relación al ácido fólico, el compuesto UP302b fue el único que mostró un aumento de la IC₅₀ bajo los dos conjuntos de condiciones, aumentado desde una IC₅₀ de 5,2 µM hasta una IC₅₀ de 34 µM. Los valores de IC₅₀ medidos para la inhibición de tirosinasa fueron relativamente los mismos para todos los compuestos ensayados, con la excepción de los dos compuestos UP302 y UP302b, que tenían valores de IC₅₀ bajos de 0,2 µM y 0,3 µM, respectivamente, en comparación con 28 µM y 5,2 µM en el ensayo endógeno y 40 µM y 34 µM en el ensayo inducido. Estas diferencias pueden ser debidas a la penetración celular disminuida por UP302a (2) y UP302b (3), en comparación con los otros inhibidores. Sin embargo, esto es superado por la resistencia de su inhibición de la enzima.

La tabla 3 proporciona resultados de estos dos ensayos para los inhibidores UP288 y UP302a con relación al ácido fólico.

Ejemplo 16. Ensayo de toxicidad celular.

Los pocillos tratados con compuestos fueron usados para realizar un ensayo de lactato deshidrogenasa (LDH). La LDH es una enzima metabólica que sale de las células deterioradas o muertas. La enzima convierte un cromóforo en presencia de NAD⁺ para producir un cambio de color que puede ser comprobado por vía espectrofotométrica. La citotoxicidad fue examinada a una concentración de 250 µM. A esta concentración, ninguno de estos compuestos es significativamente más citotóxico que el ácido fólico. Sin embargo, debe apreciarse que la citotoxicidad se ensayó solamente a una concentración (250 µM). Como se muestra en la Tabla 3, el UP288 (1) y el UP302a (2) mostraron una citotoxicidad moderada, que era comparable a la del ácido fólico.

Tabla 3. Inhibición de tirosinasa de setas y formación de melanina en células B16 F1 de ratón mediante compuestos aislados y comparación de la toxicidad celular

Compuesto	Inhibición de tirosinasa IC ₅₀ (μM)	Inhibición de melanina endógena IC ₅₀ (μM)	Inhibición de melanina inducida por MSH IC ₅₀ (μM)	Toxicidad celular (LDH)
Ejemplo de referencia UP288	24,0	108	105	0,315
UP302a	0,24	28	40	0,265
Ácido kójico	29	170	67	0,260

Ejemplo 17. Cálculos mecánicos moleculares (EBM2)

Los cálculos mecánicos moleculares se realizaron usando un software Chem3D para fines de minimización de energía y determinación de la conformación 3-D más estable. Se usaron los siguientes parámetros: Intervalo de las etapas = 2,0 fs, intervalo de los marcos = 10 fs, terminación después de 10.000 etapas, velocidad de calentamiento/enfriamiento = 1.000 Kcal/átomo/PS, temperatura diana = 3.000 °K. Propiedades: órdenes de enlaces pi y resumen de energía estérica. Fueron analizados todos los compuestos naturales y sintéticos y otras estructuras de diarilalcanos y diarilalcanoles. Se encontró que el inhibidor de tirosinasa más potente, 1-(3-metil-2,4-dimetoxifenil)-3-(2,4-dihidroxifenil)-propano (UP302a (2), IC₅₀ = 0,24 μM), aislado a partir de plantas completas de *Dianella ensifolia* (L.) DC, tiene una conformación tridimensional muy única en la que los dos anillos aromáticos estaban superpuestos uno a otro. La energía total minimizada para la conformación es de 4, 7034 KJ/mol. La distancia entre los dos anillos aromáticos era de 3,28 Å. Los grupos hidroxilos fenólicos en el primer anillo aromático estaban justo por encima de los dos grupos metoxilos en el segundo anillo aromático, siendo la distancia entre dos átomos de oxígeno de 2,99 y 3,16 Å, respectivamente, como se ilustra en las figuras 12-14. Esta conformación paralela intramolecular permite que este compuesto pueda ser perfectamente quelado con iones de cobre de la enzima binuclear cuando está en la forma de peróxido [Cu^{II}-O₂-Cu^{II}] a partir de la parte superior y la inferior.

Ejemplo 18. Formulación de la composición de diarilalcanos en forma de una crema

El UP302a está comprendido por un diarilpropano sustituido como componente activo principal. Estos compuestos son solubles en disolventes altamente polares que incluyen, pero sin limitación, etanol, propilenglicol y etilenglicol. Pueden ser formulados con un excipiente, adyuvante y/o vehículo farmacéutica, cosméticamente aceptable. Ejemplos de estos excipientes incluyen, pero sin limitación, agua, tampones, solución salina, solución de Ringer, solución de dextrosa, manitol, solución de Hank, conservantes y otras soluciones de sales fisiológicamente equilibradas. Pueden ser usados también vehículos no acuosos que incluyen, pero sin limitación, aceites fijos, aceite de sésamo, oleato de etilo o triglicéridos. Otras formulaciones incluyen, pero sin limitación, suspensiones que contienen agentes para aumentar la viscosidad que incluyen, pero sin limitación, carboximetilcelulosa, sorbitol o dextrano. Los excipientes pueden contener también cantidades menores de aditivos o conservantes como antioxidantes, para aumentar el color y la estabilidad química. El UP302 puede ser preparado también en una formulación de liposomas para aumentar su penetración en la piel o en forma de una formulación de liberación controlada, que libera lentamente la composición del ingrediente activo en el hospedante.

El UP302a es administrado preferentemente por vía tópica en forma de un ungüento, gel, loción o base de crema o en forma de una emulsión, un parche, venda o máscara, una gasa no adherente, un vendaje, una compresa o una bayeta de tela. Esta aplicación tópica puede ser administrada por vía local a cualquier zona afectada usando cualquier medio estándar conocido para una administración tópica. El UP302 puede ser administrado a seres humanos y animales.

Una composición terapéutica de UP302a puede ser administrada en una diversidad de formas de dosificaciones unitarias, dependiendo del método de administración y las indicaciones dirigidas a diana. Una cantidad no tóxica eficaz está generalmente recomendada en el intervalo de 0,01% a 5% basada en el peso total de la formulación tópica. Dos concentraciones diferentes de UP302a (0,01% y 0,5% en peso) fueron formuladas en crema, como se ilustra en la Tabla 4 y 5. Para preparar estas cremas, el diarilalcano fue disuelto en agua a temperatura ambiente y fue homogeneizado en un mezclador hasta que se dispersó completamente en la solución (aproximadamente 5 minutos) para producir una composición A. A temperatura ambiente y sin agitación ni remover, el carbómero Ultrez-21 fue añadido a la solución homogeneizada rociándolo sobre la superficie y permitiendo que se humedeciera completamente (no había zonas blancas visibles) y que entrará en la solución. Con una agitación suave, la solución se calentó seguidamente a 40°C y se añadió glicerina y la composición se mezcló durante 5 minutos adicionales para proporcionar la composición B. A 40°C, la composición A se añade a la composición B y la composición se mezcla bien hasta que se hace homogénea (aproximadamente 5 minutos). La emulsión resultante se enfría a 30°C y el pH se ajusta a aproximadamente 5,5 (5,3 a 5,7) titulando con un neutralizador mientras se agita con una barra agitadora y/o espátula. La emulsión se hizo altamente viscosa debido al cambio conformacional inducido por la neutralización del carbómero. Tras agitar la emulsión, se conseguirá una viscosidad adecuada para una crema de emulsión. La composición se mezcló hasta ser uniforme, se vertió en recipientes de almacenamiento limpios y se

almacenó entre 2°C y 8°C.

Tabla 4. Composición de crema de diarilalcano al 0,01%

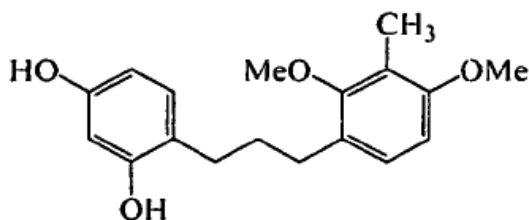
Fase	Ingrediente	% (p/p)	Peso (g)
Acuosa	Agua purificada	84,00	12,6
	Diarilalcano (UP302a)	0,1	0,015
	Carbómero Ultrez 21	0,50	0,075
	Glicerina	8,00	1,2
Aceite	Gliceril-cocoato de PEG-7	3,00	0,45
	Triglicérido caprílico/cáprico	2,67	0,4
Neutralizador pH	Hidróxido de sodio (18% p/v), calidad de biología molecular	0,00	0,0
suma	Siete ingredientes	100	15

Tabla 5. Composición de crema de UP302 al 0,1%

Fase	Ingrediente	% (p/p)	Peso (g)
Acuosa	Agua purificada	84,00	12,6
	Diarilalcano (UP302a)	0,1	0,015
	Carbómero Ultrez 21	0,50	0,075
	Glicerina	8,00	1,2
Aceite	Gliceril-cocoato de PEG-7	3,00	0,45
	Triglicérido caprílico/cáprico	2,67	0,4
Neutralizador pH	Hidróxido de sodio (18% p/v), calidad de biología molecular		
suma	7 ingredientes	99,7	15

REIVINDICACIONES

1. El compuesto 1-(3-metil-2,4-dimetoxifenil)-3-(2',4'-dihidroxifenil)-propano



2. El compuesto según la reivindicación 1, para ser usado en el tratamiento de una infección microbiana, infección fúngica, infección de malaria, infección viral, producción reducida de óxido nítrico, excitación sexual anormal masculina y femenina, estados inflamatorios, tensión oxidativa, metabolismo anormal de fármacos, cánceres y tumores sólidos.
3. El compuesto según la reivindicación 1, para ser usado para tratar enfermedades periodontales, estados pre-cancerosos orales, cánceres orales y otras enfermedades malignas orales, protectores dentales y dientes sensibles, secuelas, pulpitis, irritación, dolor e inflamación provocados por la implantación física de dentaduras orales, trauma, lesiones, bruxismo y otras heridas menores en la boca, protectores dentales o en la lengua, placa y cálculos dentales, descalcificación dental, proteolisis y caries (deterioro dental).
4. El compuesto según la reivindicación 1, para ser usado en el tratamiento del oscurecimiento y deterioro de la piel debidos a una exposición a luz ultravioleta, bronceado solar, manchas de hiper-pigmentación provocadas por el envejecimiento de la piel, enfermedades hepáticas, quemaduras térmicas y heridas tóxicas, pigmentación de la piel debida a estados inflamatorios provocados por infecciones fúngicas, microbianas y virales, vitilago, carcinoma y melanoma.

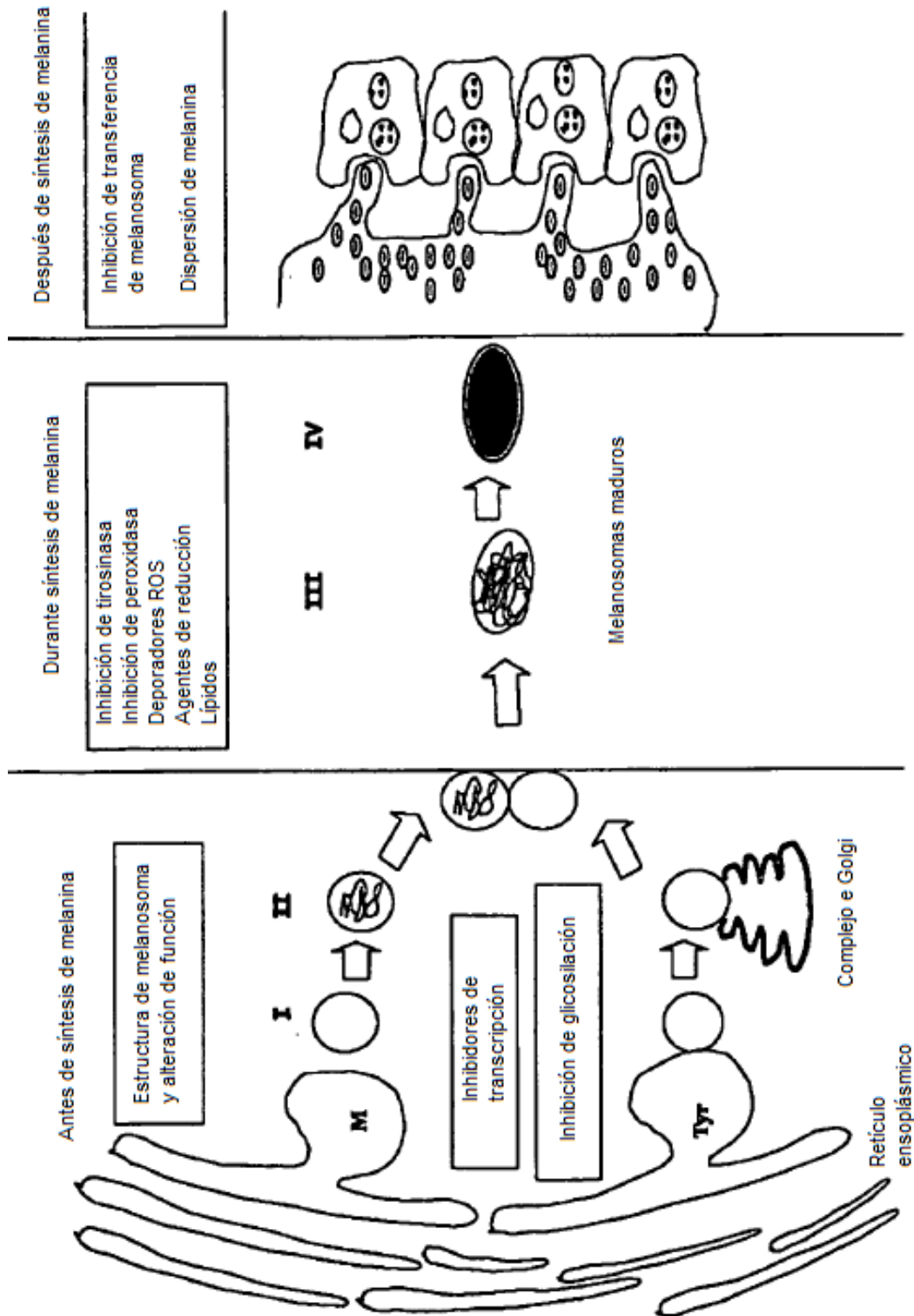


FIG. 1

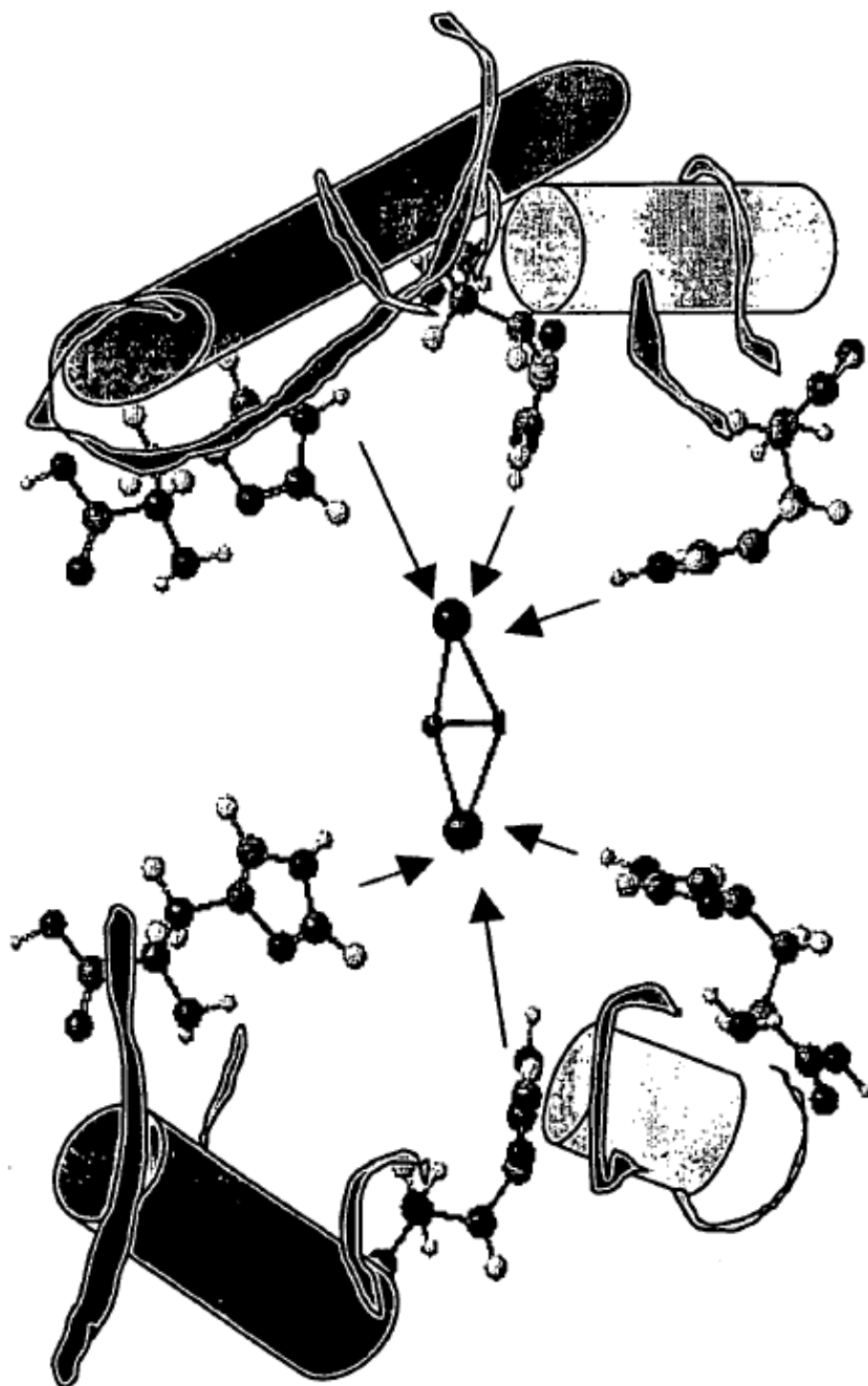


FIG.2

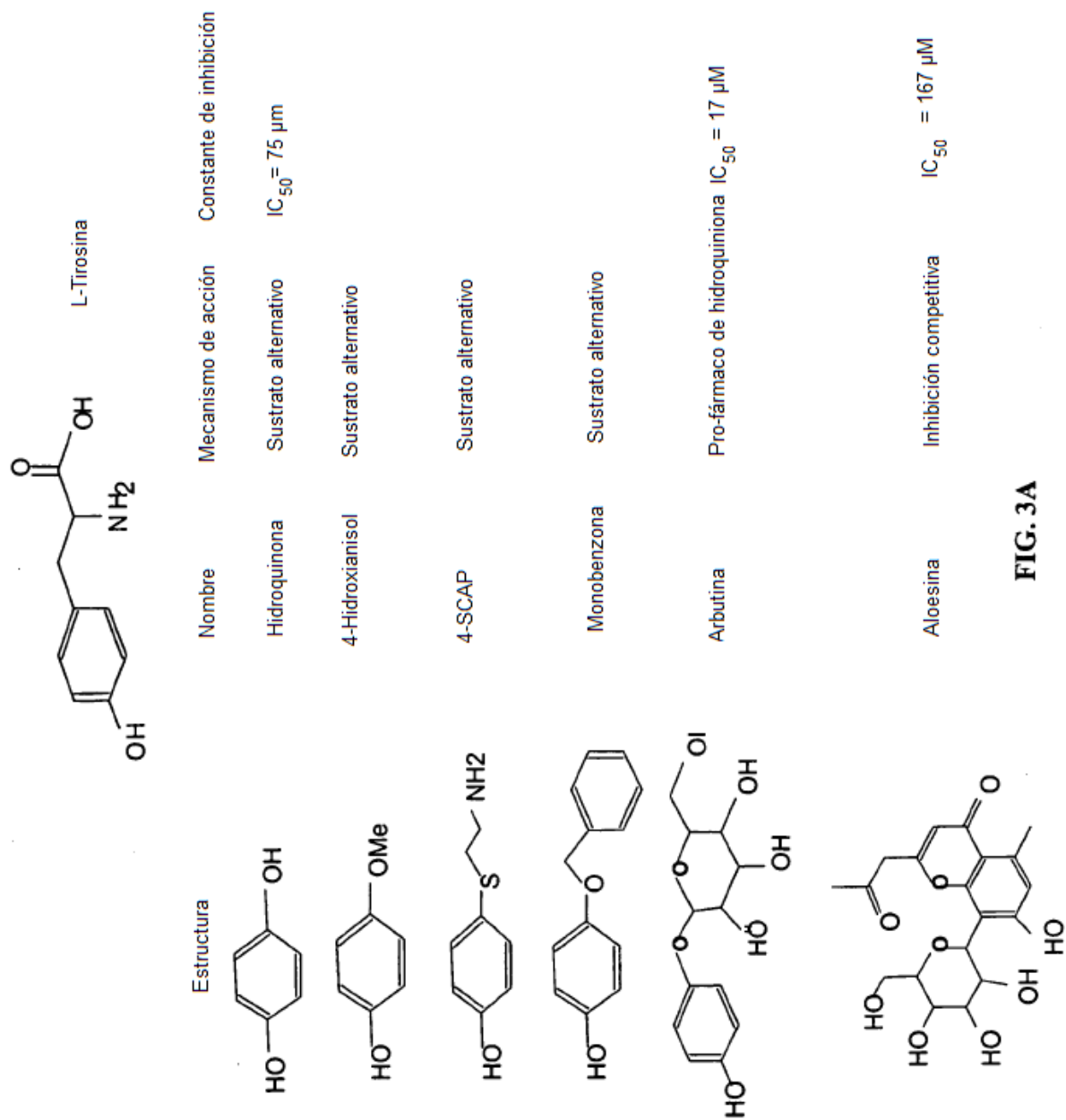


FIG. 3A

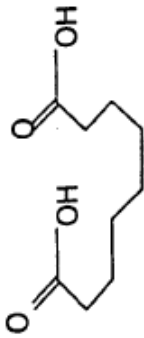
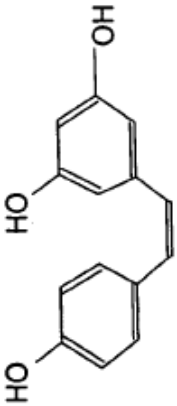
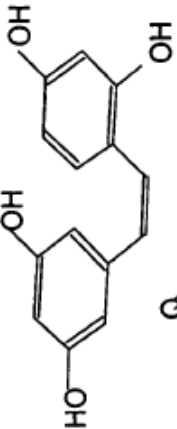
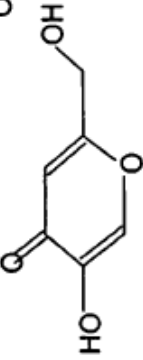
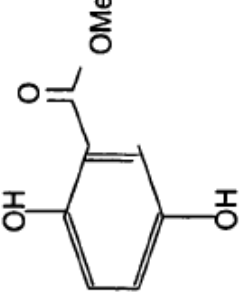
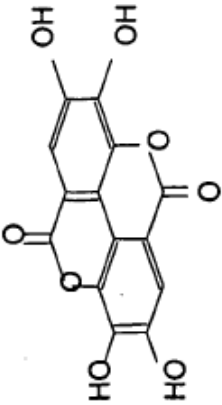
Estructura	Nombre	Mecanismo de acción	Constante de inhibición
	Ácido Azelaico	Tirosinasa de bolques a sitio activo	$K_i=0,00273$
	Resveratrol	Sustrato alternativo	$IC_{50} = 54 \mu M$
	Oxiresveratrol	Inhibidor no competitivo	$IC_{50} = 1,2 \mu M$
	Ácido kójico	Quelación de cobre	$IC_{50} = 6,2 \mu M$
	Gentisato de metilo	Quelación de cobre	$IC_{50} = 11,2 \mu M$
	Ácido elágico	Quelación de cobre	

FIG. 3B

1-(2-Metoxi-4-hidroxifenil)-3-(2-hidroxi-5-metoxifenil)-propano

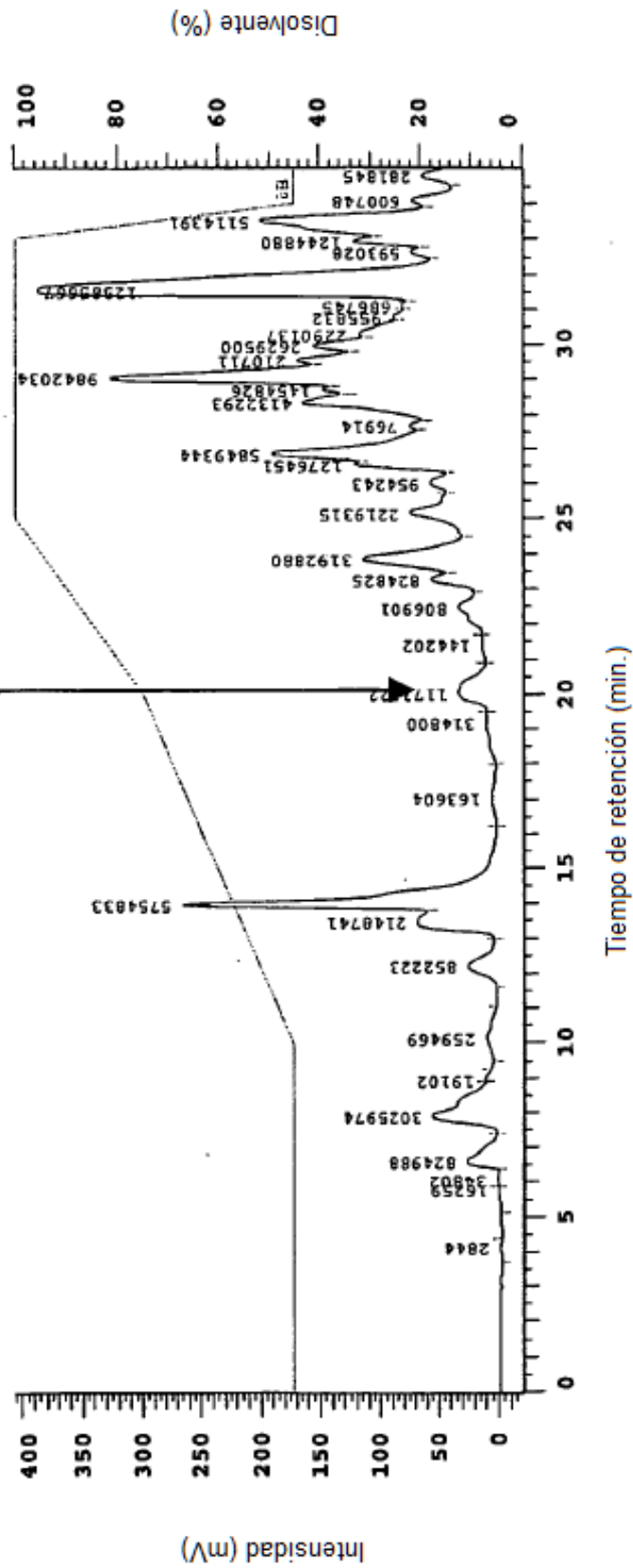


FIG.4

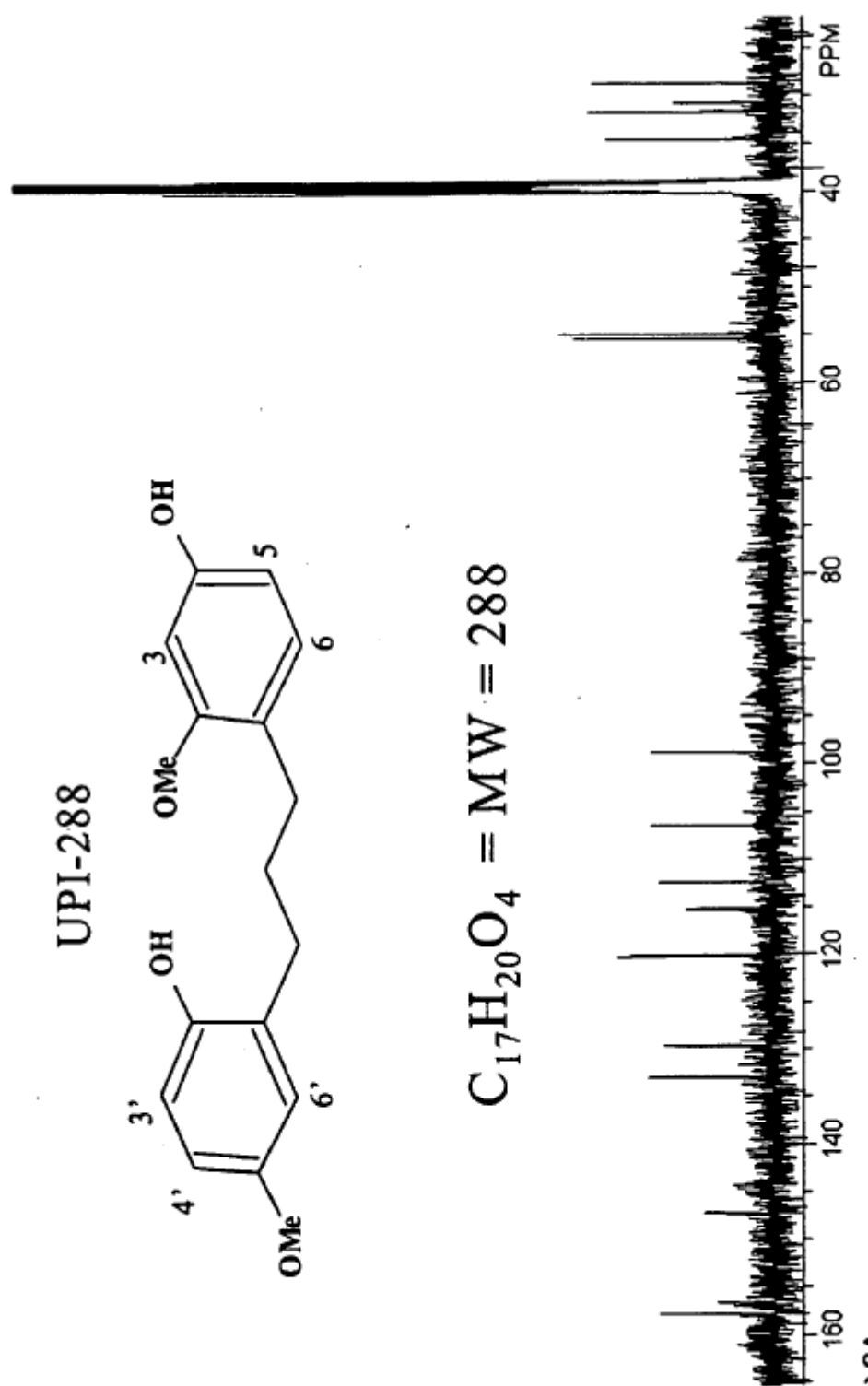


FIG.5

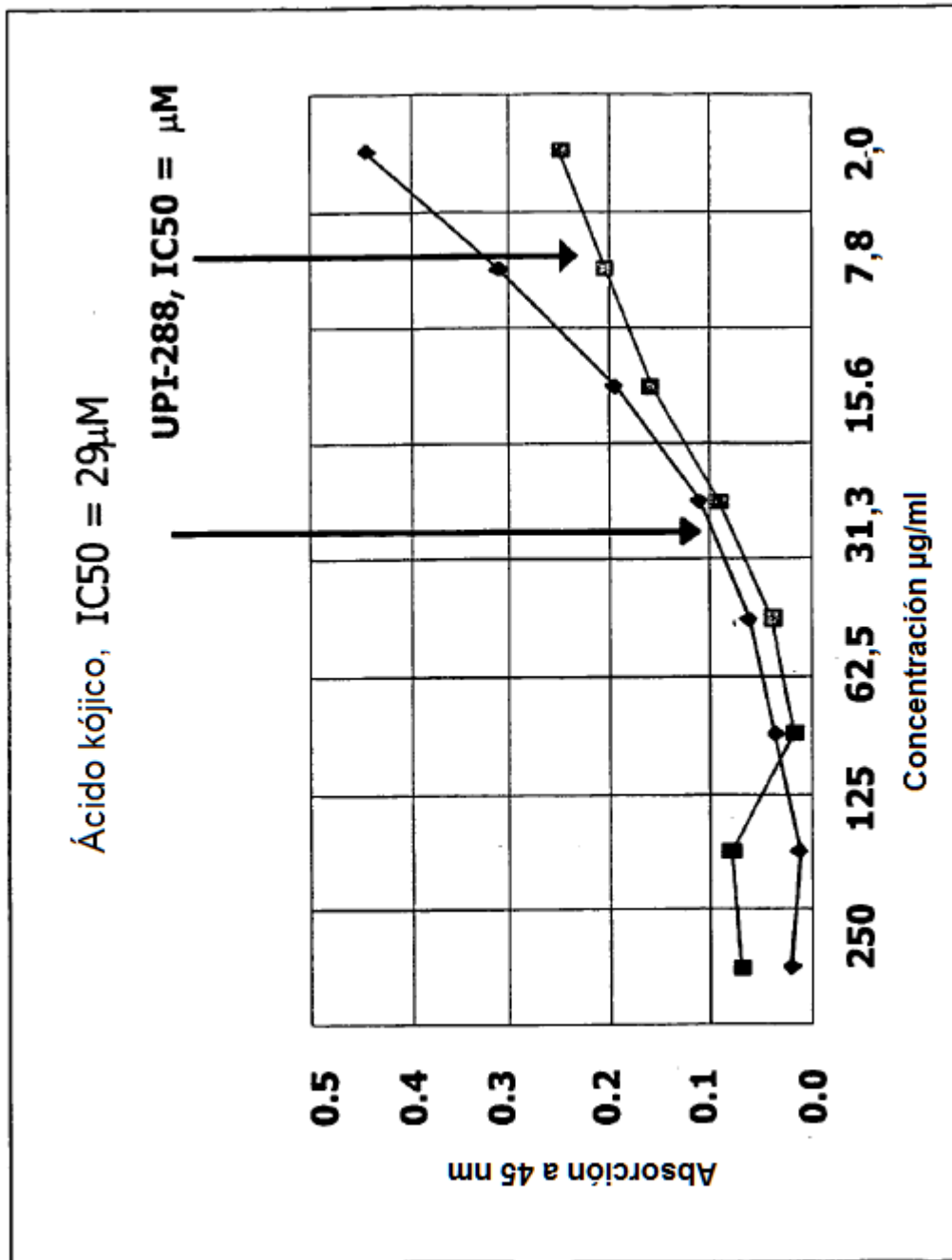


FIG.6

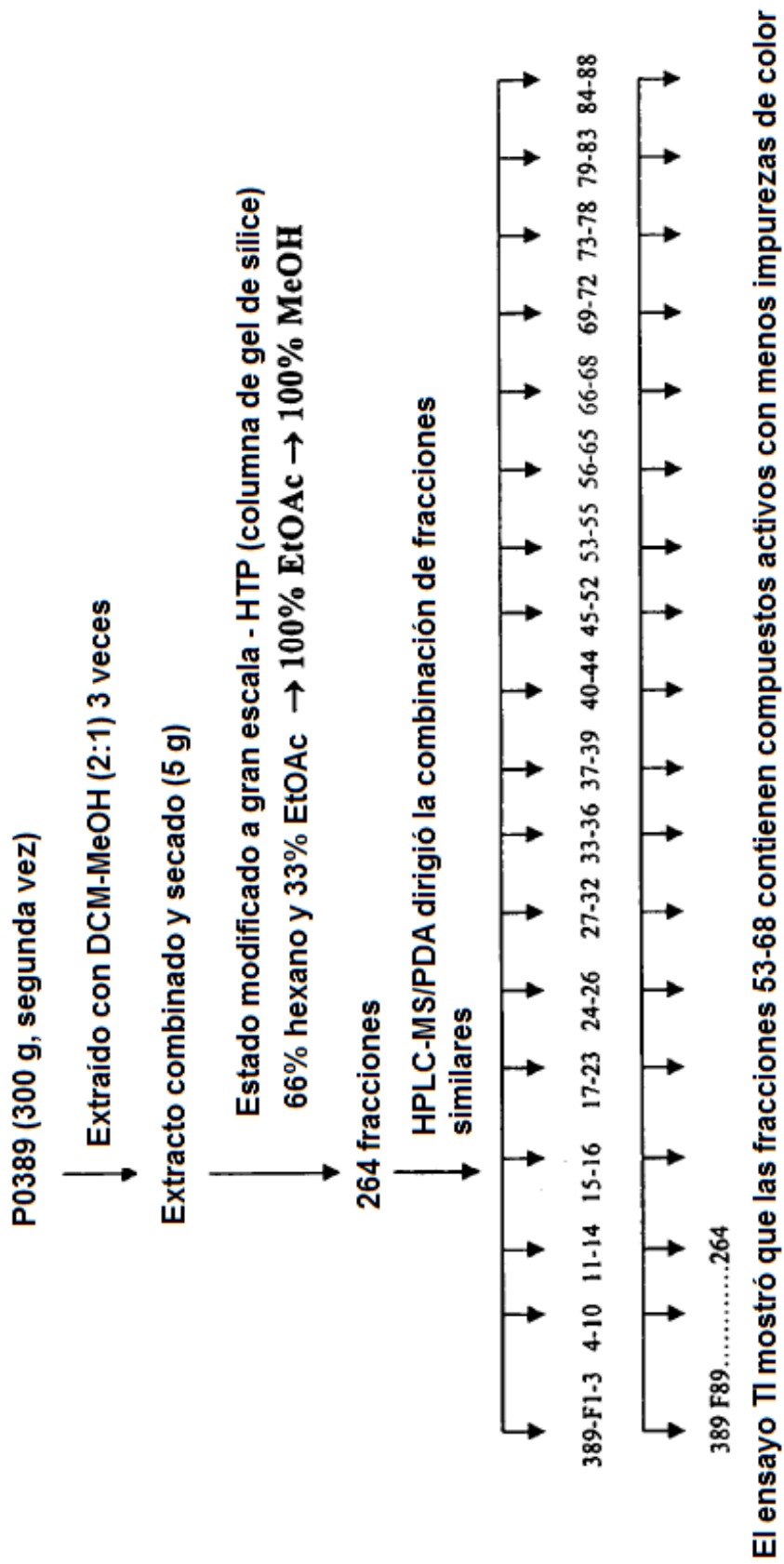


FIG. 7

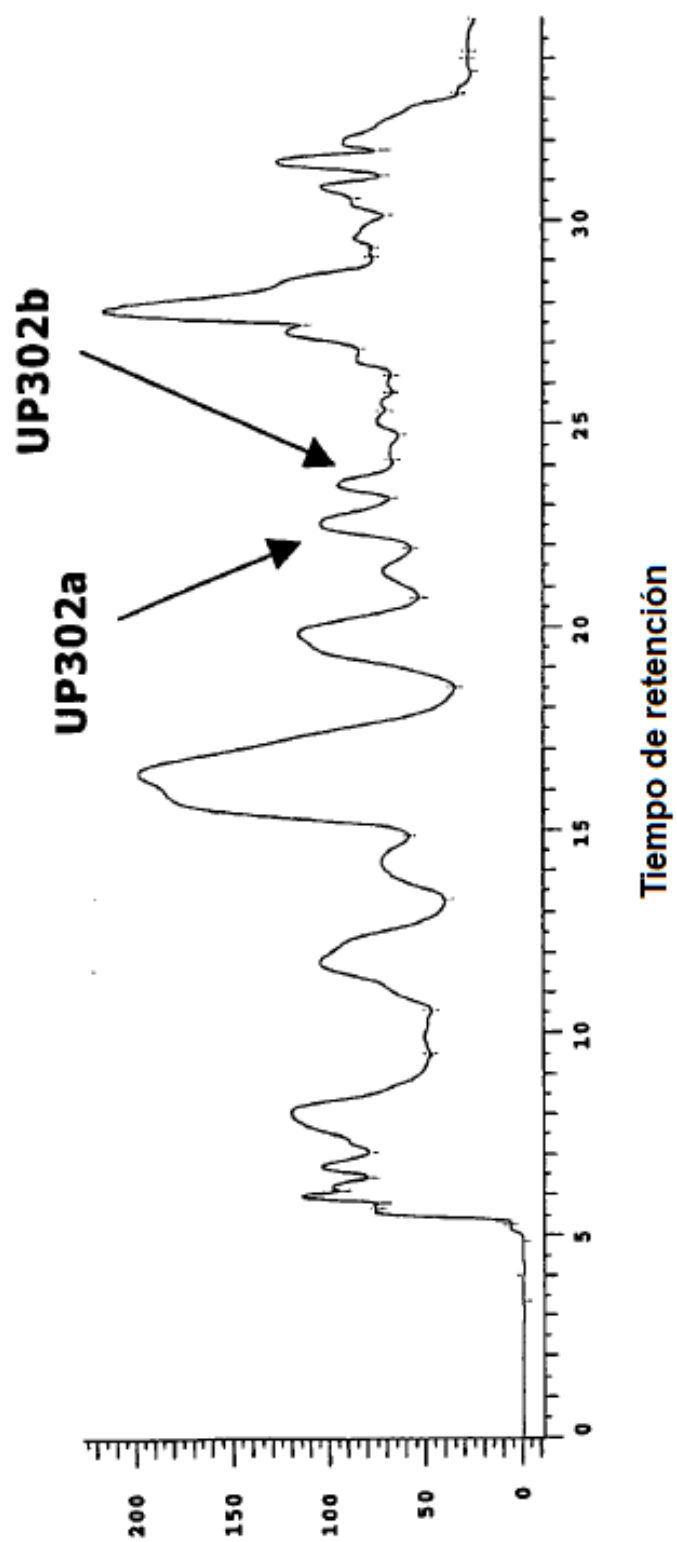


FIG. 8

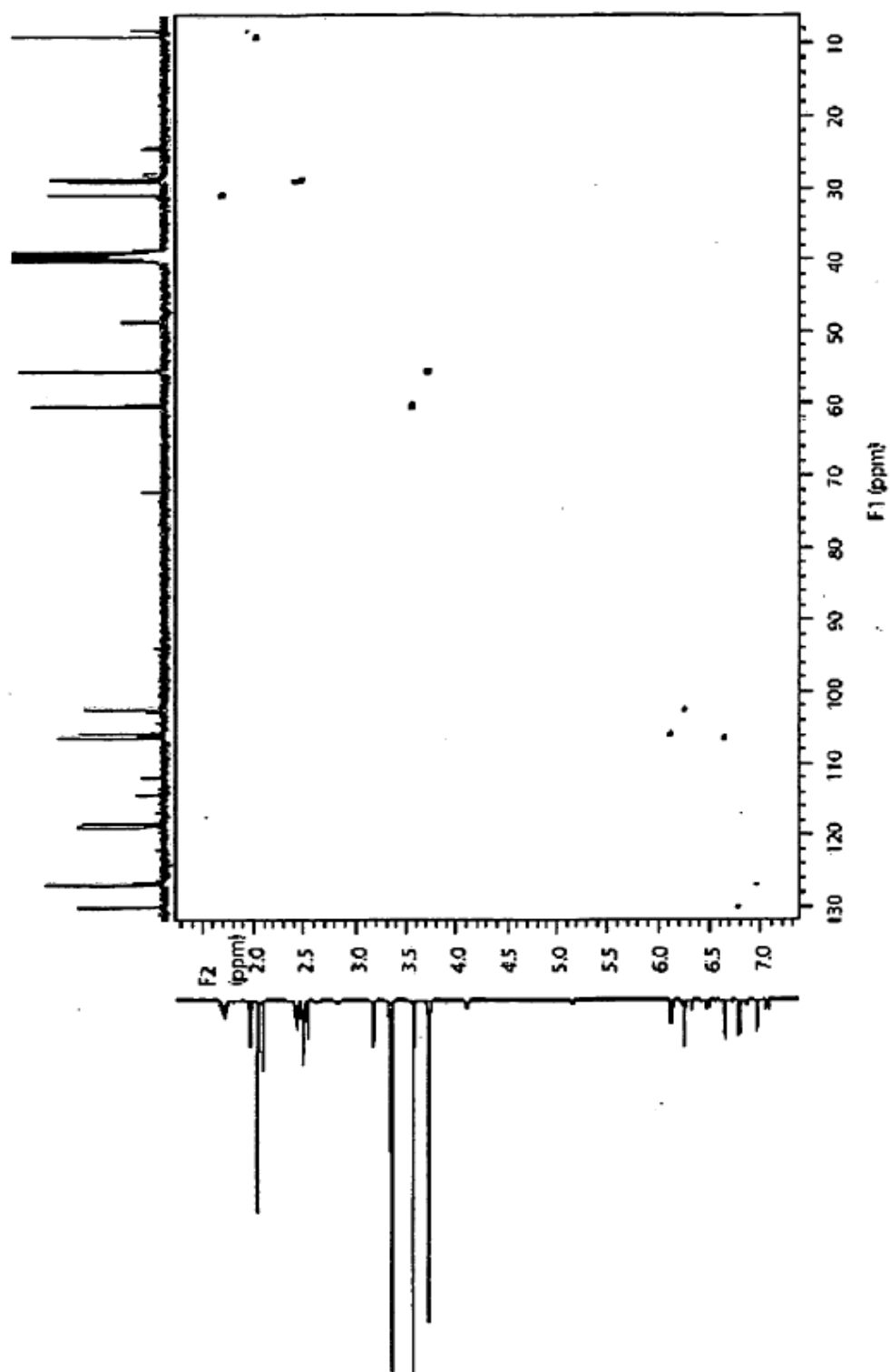


FIG. 9

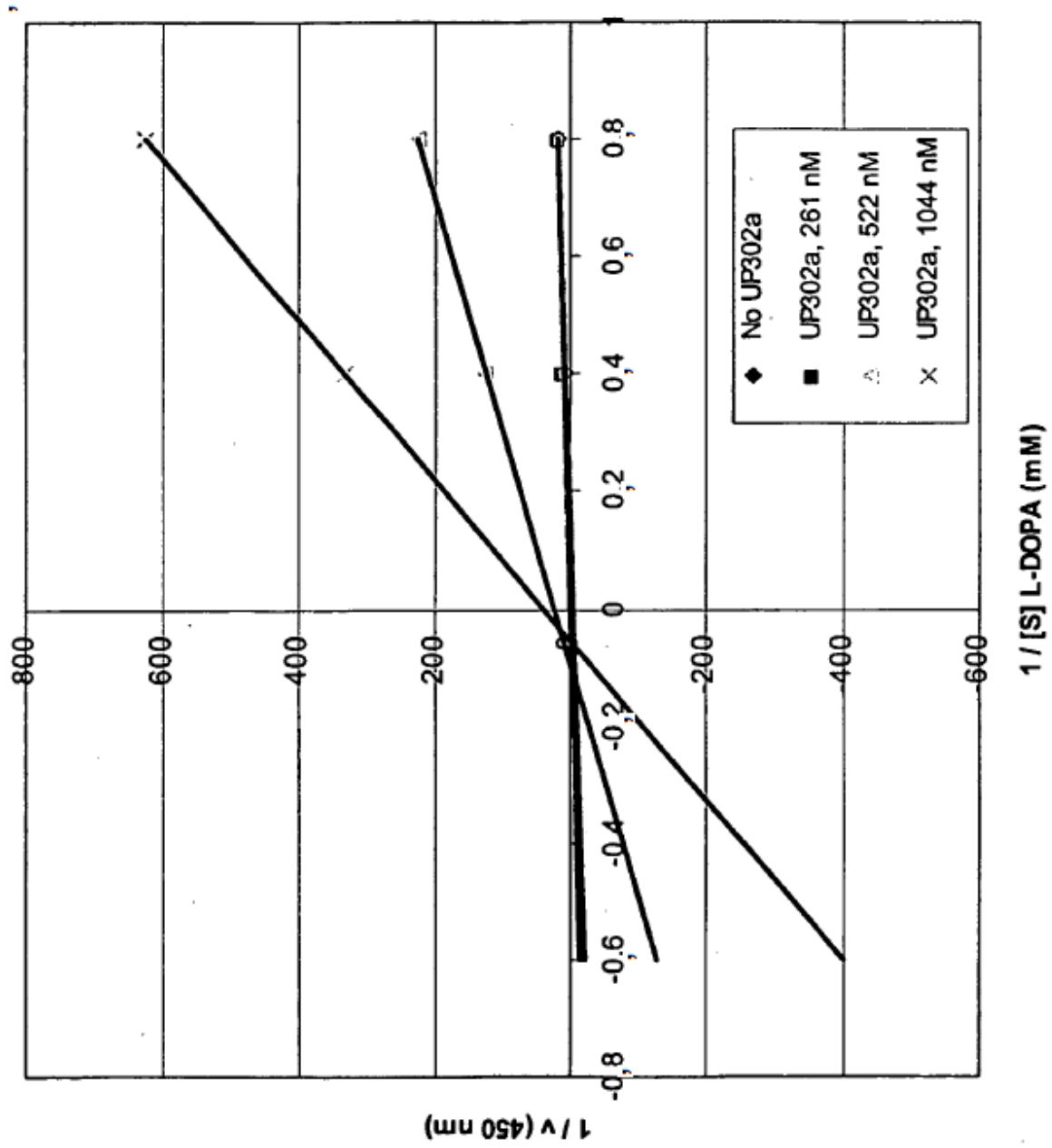


FIG.10

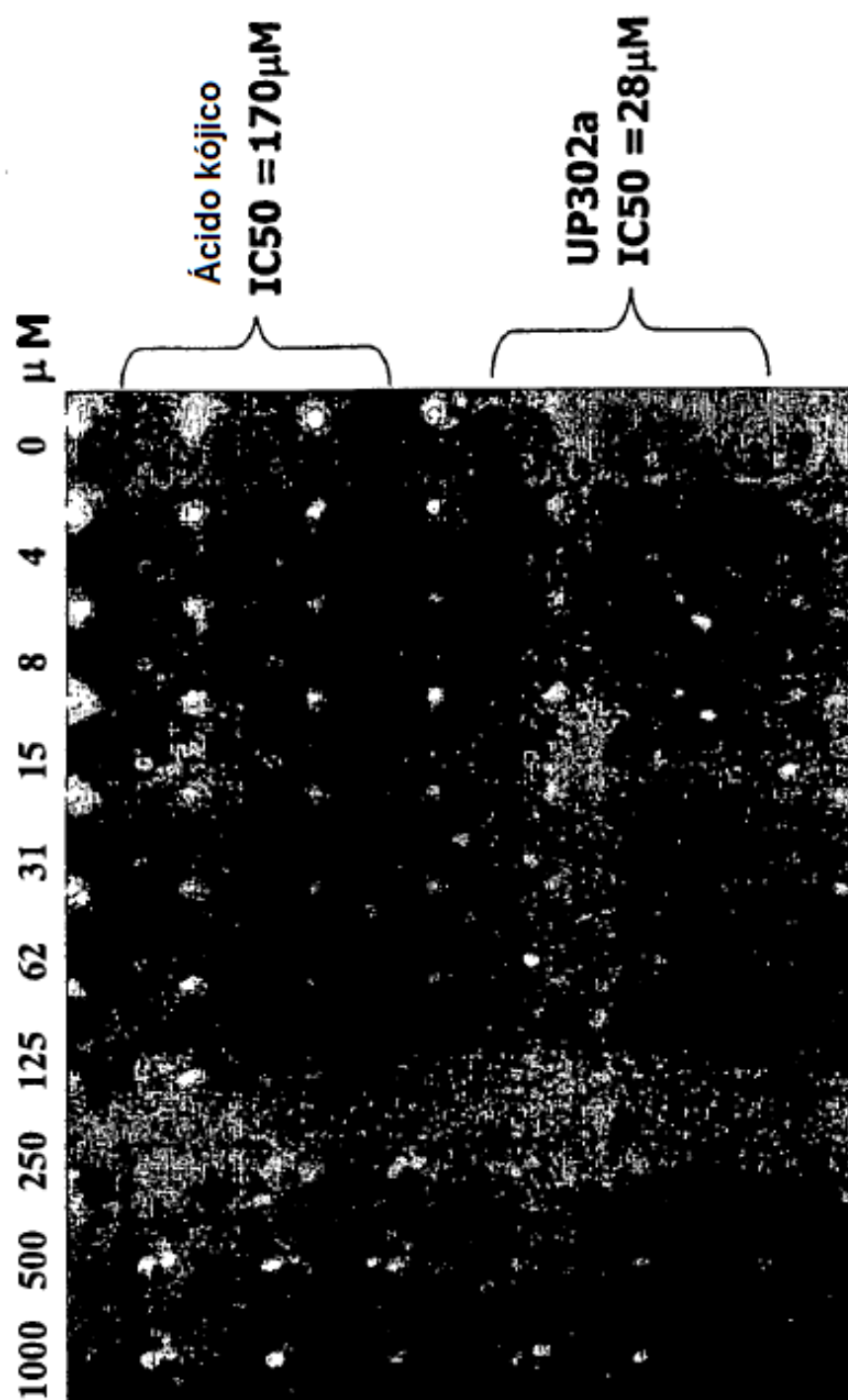


FIG. 11

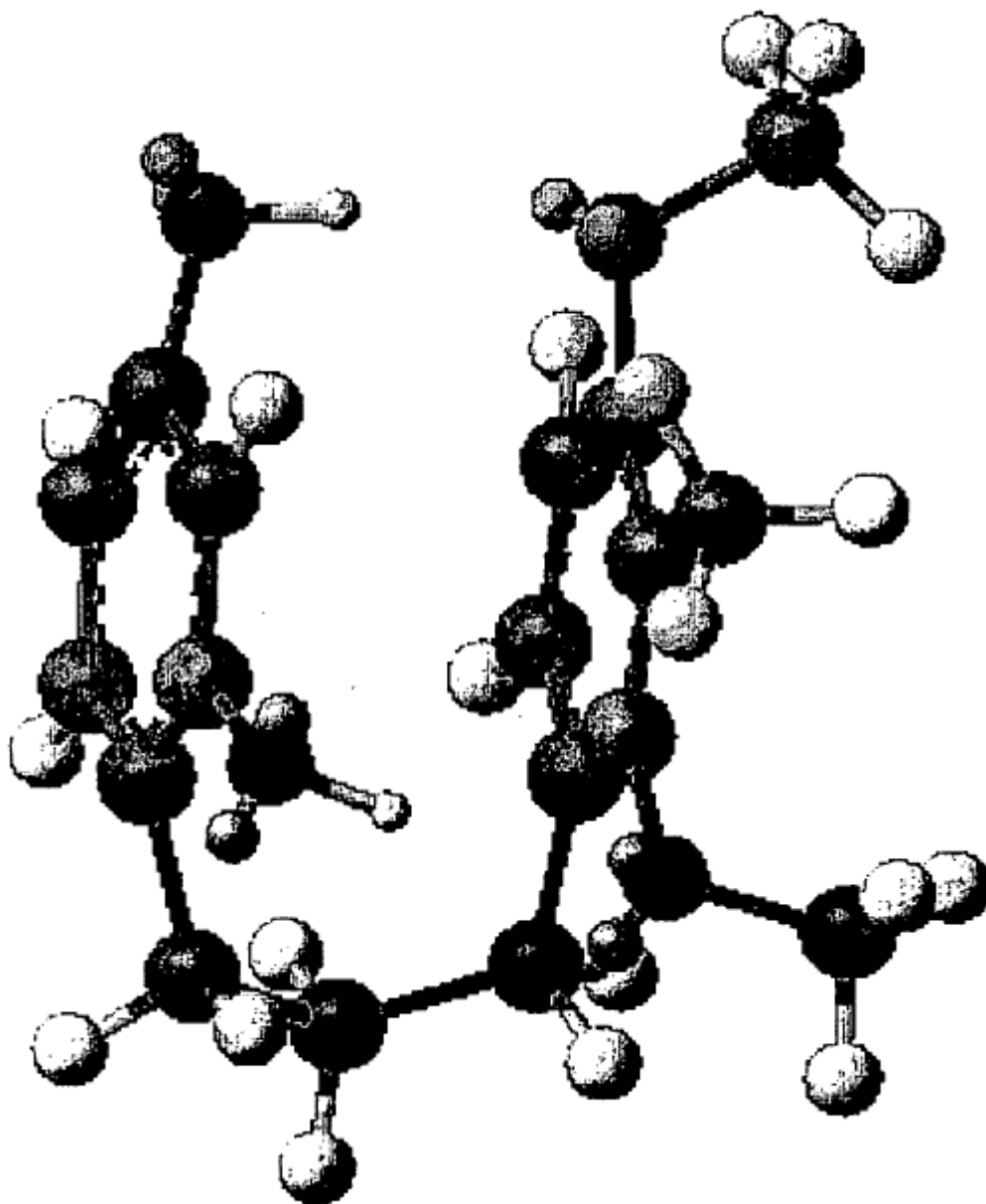


FIG. 12

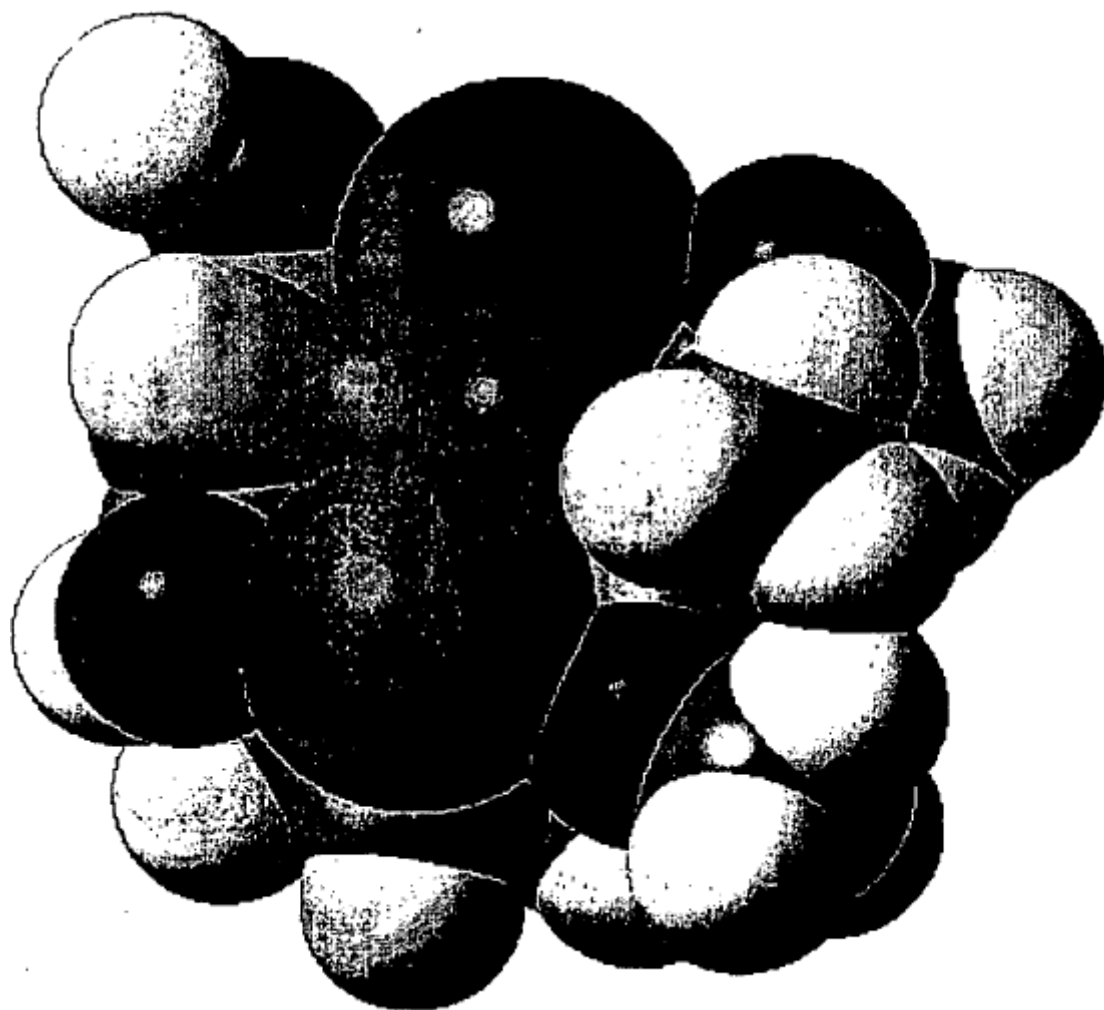


FIG. 13

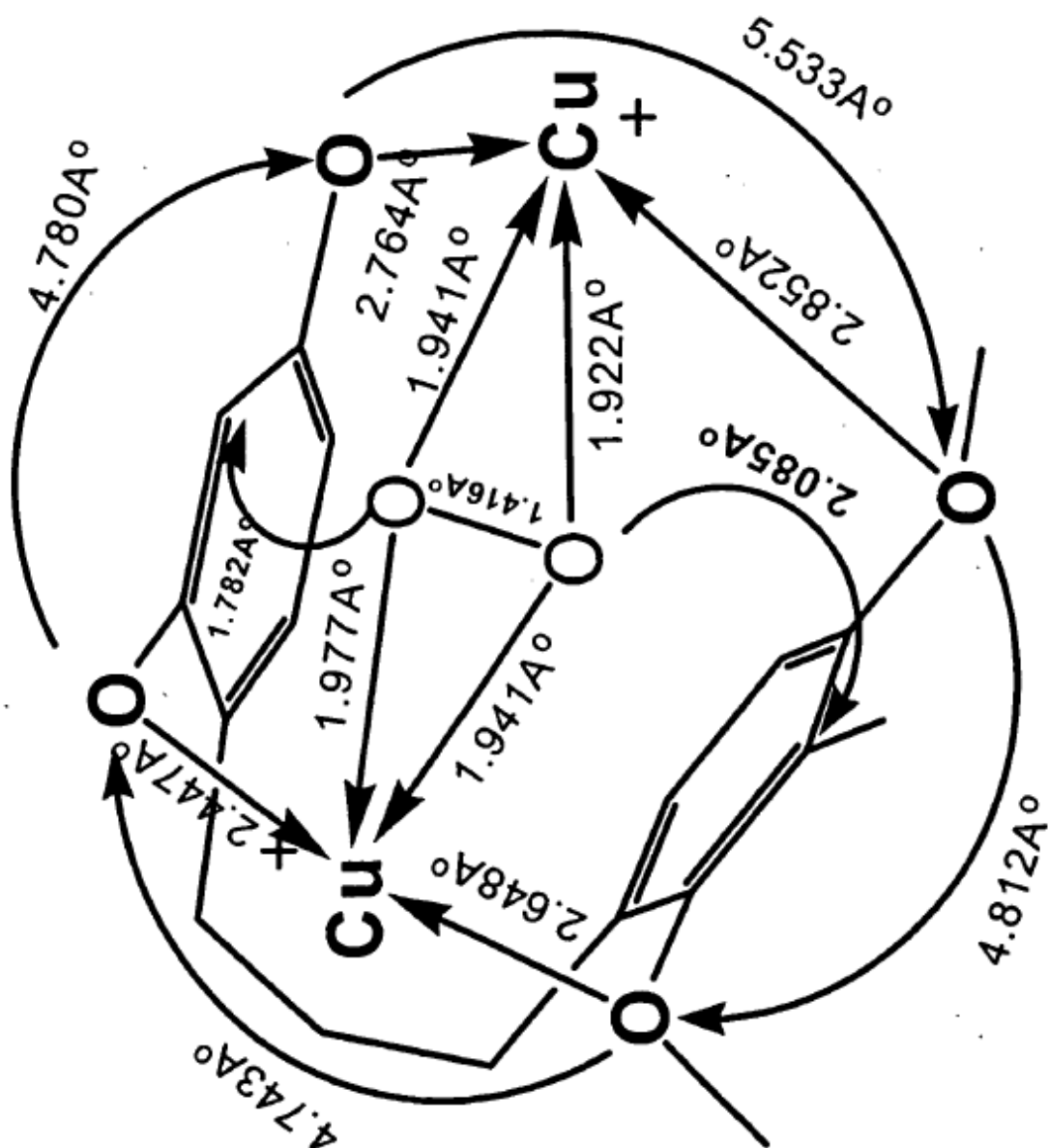


FIG. 14