

19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 387 059**

51 Int. Cl.:
A61K 31/74 (2006.01)
A61Q 19/02 (2006.01)
A61K 8/66 (2006.01)
A61K 8/97 (2006.01)
A61K 38/43 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

96 Número de solicitud europea: **02707468 .1**
96 Fecha de presentación: **14.01.2002**
97 Número de publicación de la solicitud: **1289533**
97 Fecha de publicación de la solicitud: **12.03.2003**

54 Título: **Composiciones blanqueadoras que contienen una enzima derivada del Ascomycete**

30 Prioridad:
14.02.2001 US 783229

45 Fecha de publicación de la mención BOPI:
12.09.2012

45 Fecha de la publicación del folleto de la patente:
12.09.2012

73 Titular/es:
COLOR ACCESS, INC.
7 CORPORATE CENTER DRIVE
MELVILLE, NEW YORK 11747, US

72 Inventor/es:
MAMMONE, Thomas;
MAES, Daniel, H.;
MARENUS, Kenneth, D. y
SCHNITTGER, Steven, F.

74 Agente/Representante:
Carpintero López, Mario

ES 2 387 059 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

Composiciones blanqueadoras que contienen una enzima derivada del *Ascomycete*.

Campo de la invención

5 La invención se refiere a composiciones blanqueadoras. Más específicamente, la invención se refiere a una composición blanqueadora que comprende un extracto enzimático basado en *Ascomycete*, que degrada la melanina epidérmica cuando se aplica tópicamente en la piel.

Antecedentes de la invención

10 La belleza está en los ojos de quien la mira. El deseo de blanquear la piel puede ser tan atractivo para algunos como lograr un bronceado para otros. Por lo tanto, mientras que un lunar o una piel pecosa pueden resultar atractivos para algunos, otros pueden considerar que estas manchas oscuras en la piel son poco atractivas. Se observan manchas oscuras en la piel en las áreas donde hay mayor producción de melanina. La melanina es responsable del "color" de la piel y funciona para proteger la piel de los efectos nocivos de la luz ultravioleta. En la piel, la producción de melanina, en respuesta al estímulo de la luz ultravioleta, produce el efecto bien conocido de bronceado de la piel y el aumento natural de la producción de melanina en la piel de ciertos grupos étnicos de personas produce un tono más oscuro de piel. Las composiciones blanqueadoras son útiles para aquellos a quienes les desagrada la presencia de manchas oscuras en la piel o que simplemente desean un tono de piel más claro.

15 Para lograr un efecto blanqueador en la piel, se conocen diversos tipos de agentes blanqueadores. La hidroquinona, el 4-isopropilcatecol y el éter monobencílico de hidroquinona son ejemplos de agentes blanqueantes. Sin embargo, los agentes blanqueantes requieren aplicaciones reiteradas en la piel a medida que la capa superior de células muertas de la piel se desprende. Cuando aparece la nueva capa de células muertas, las manchas se oscurecen nuevamente o reaparecen. Además, los agentes blanqueantes pueden resultar irritantes debido a su potencia y, en algunos casos, pueden causar afecciones de la piel como el leucoderma (vitiligo) y la erupción. Otro método para blanquear la piel es el uso de agentes blanqueadores como el ácido ascórbico, el ácido salicílico y el ácido láctico, que provocan que la capa superior de células muertas se desprenda o se desprende, y junto con ello también se desprenden las manchas causadas por el aumento de la producción de melanina que han migrado a la superficie de la piel. Este método, sin embargo, requiere un largo período, de aproximadamente 2 a 4 semanas, para producir un efecto blanqueador y también requiere aplicaciones frecuentes.

20 Otros agentes blanqueadores conocidos son los inhibidores de la tirosinasa como, por ejemplo, el ácido kójico, que interfiere con la producción de la melanina en la piel. La melanina se sintetiza en melanocitos, células que están presentes en la capa basal de la epidermis de la piel. Muchos precursores conducen a la producción de melanina, por ejemplo, la tirosina, la dopa, la dopaquinona mediante la acción de la tirosinasa, y el precursor indol-5,6-dihidroquinona que se polimeriza en melanina. La inhibición de cualquiera de los precursores relacionados con la producción de melanina en la piel impide en consecuencia la producción de melanina y puede lograr un efecto despigmentante o "blanqueador" en la piel.

25 Aunque se puede inhibir la producción de melanina, otro método para blanquear la piel comprende la descomposición de la melanina. Esto se describe, por ejemplo, en la Patente de Estados Unidos N.º 5.578.296, mediante el uso de un producto cultivado o procesado de una especie de hongo *Basidiomycetes* o cualquier hongo de pudrición que tenga la capacidad de descomponer la melanina. Como descompone la melanina, este método permite que se produzca melanina en la piel como protección contra la luz ultravioleta nociva. Sin embargo, la melanina en descomposición no evita el desarrollo de nuevas manchas en la piel y, por lo tanto, este método también requiere la aplicación reiterada a la igual que otros métodos blanqueadores. Además, el hongo *Basidiomycete* se pr evalúa en medios definidos con limitación de nitrógeno. La selección de l hongo *Basidiomycete* se produjo después de evaluaciones de microorganismos intensivas fallidas. Además, en JP 8119843 se describe un supresor de la melanina que contiene un extracto de *Semen Armeniacae* o *Pseudocydonia sinensis Schneid* como ingrediente activo, y en JP 6269278 se describe una cepa microbiana, MEL-1 (FERM P-12991), para decolorar la melanina desarrollada en la piel.

30 En "Degradation of Melanin by *Aspergillus fumigatus*", Applied and Environmental Microbiology, vol. 40, n.º 1, pp. 145-155 (julio de 1980), los autores Luther y Lipke también describen que una cepa de *Aspergillus fumigatus*, NRRL 6463, aislada de una pila de compost en Watertown, MA, utilizó tirosina sintética, dopa y melaninas de cabello desproteinizadas como fuentes únicas de carbono. El *Aspergillus fumigatus* descrito en el estudio desarrolla un color negro durante el transcurso de la degradación de la melanina. Por lo tanto, no se describe el uso de *Aspergillus fumigatus* en la piel como agente blanqueador. Además, la diversidad estructural de la melanina puede afectar la identidad de los microorganismos que son capaces de contribuir en las etapas de la degradación de la melanina. La composición de la melanina, aunque se produce mucho en animales marinos y terrestres, varía en la relación de sustituyentes fenólicos y en ólicos. La composición química y las propiedades físicas de determinadas clases de melanina son altamente dependientes del entorno en el que se forman. Se sabe que la melanina epidérmica tiene dos clases de melaninas, las eumelaninas y las feomelaninas. La eumelanina en particular incluye un recubrimiento péptido. Las conclusiones sobre un polímero de melanina específico no son *a priori* aplicables a una clase entera de melanina. "Melanin: Its Role in Human Photoprotection", Zise, L., et al. Eds., p. 11 a 12 (Valdenmar Publishing

Company 1995). En el estudio escrito por L uther y L ipke se utilizaron melanina de caballo desproteinizada y precursores sintéticos, y no se describió la capacidad del extracto de enzima de *Aspergillus fumigatus* de degradar la melanina cuando se aplica tópicamente en la piel. En el estado de la técnica anterior, también se desconocía que un extracto de enzima derivado de un hongo, sorprendentemente, puede ser el doble de efectivo para blanquear la piel en comparación con un inhibidor de la tirosinasa utilizado comúnmente.

Además, se descubrió el efecto de los cationes metálicos divalentes sobre la actividad hidrolítica en la melanina mediante un aislamiento de un hongo melanolítico de la especie *Acrostaphylus*, un hongo filamentoso que pertenece a Fungi Imperfecti, reclasificado como *Nodulisporium*. Se utilizó la cepa específica NDM C-101 como lo divulga Liu, Yu-tien, en "Isolation of a Melanolytic Fungus and its Hydrolytic Activity on Melanin", *Mycologia*, vol. 87, n.º 5, p.p. 651 a 654 (1995). La especie *Acrostaphylus* es saprófita de la madera y de los materiales de plantas en descomposición, por ejemplo, troncos y tocones, ramas y ramitas muertas de los árboles, y tallos y hojas muertas de las plantas herbáceas. La cepa de hongos puede utilizarse para blanquear la melanina como fuente de nitrógeno para apoyar su crecimiento en un medio que contenga una cantidad apropiada de iones metálicos divalente y, por lo tanto, puede degradar la melanina en agua contaminada.

En US -A-5676956 de Estados Unidos se divulga una composición tópica que comprende un extracto derivado de *Saccharomyces cerevisiae* para aclarar la piel debajo de los ojos.

En EP-A-0241572 se divulga el ácido kójico como agente blanqueador en composiciones cosméticas.

Ahora se ha descubierto, sorprendentemente, que un extracto de enzima derivado de *Aspergillus fumigatus* en una composición farmacéutica o cosmética puede resultar útil como agente blanqueador de la piel. En consecuencia, la presente invención proporciona una composición blanqueadora tópica que puede producir un efecto blanqueador cuando se aplica en la piel sin efectos secundarios negativos y sin la necesidad de combinarse con otros tipos de tratamientos blanqueadores.

Resumen de la invención

La presente invención se refiere a una composición farmacéutica o cosmética tópica para aplicar en la piel que comprende una cantidad blanqueadora eficaz de un extracto de enzima melanasa derivada de *Aspergillus fumigatus*. La preparación de las composiciones de la presente invención también comprende la purificación del extracto de enzima bruto antes de que se añada a la composición farmacéutica o cosmética.

Además, la presente invención incluye el método cosmético para blanquear la piel mediante la aplicación tópica de las composiciones que contienen estas enzimas derivadas de *Aspergillus fumigatus*. El método incluye la extracción de enzimas de *Aspergillus fumigatus*. Se añade el extracto de enzima melanasa a la composición farmacéutica o cosmética y se aplica tópicamente en la piel. También se incluyen en la presente invención los métodos cosméticos para degradar la producción de melanina en la piel e inhibir un bronceado inducido por los rayos UV-B mediante la aplicación tópica de las composiciones de la presente invención.

Breve descripción de los dibujos

La figura 1 es una gráfica que ilustra el efecto blanqueador de la piel sobre un bronceado inducido por los rayos UV-B por el ácido kójico al 2 % y el extracto de enzima de *Aspergillus fumigatus* al 1 % de la presente invención medido el día 7, el día 9, el día 12 y el día 14 de un régimen de tratamiento como se indica por el cambio en los valores de reflectancia.

La figura 2 es un cuadro que ilustra la reducción porcentual del color de la piel entre el día 9 y el día 14 en la piel irritada y tratada con ácido kójico al 2 % o con extracto de enzima de *Aspergillus fumigatus* al 1 % de la presente invención.

Descripción detallada de la invención

En la naturaleza, los hongos se consideran una parte fundamental del ciclo continuo de vida y muerte de los organismos. En particular, los hongos suelen reciclar la materia orgánica muerta y convertirla en nutrientes que necesitan para alimentarse. Los hongos liberan enzimas de las hifas, como parte de su sistema digestivo, hacia el ambiente que los rodea para descomponer la materia orgánica y convertirla en una forma de nutrientes que pueden absorber. Ahora se ha descubierto, sorprendentemente, que la aplicación tópica de una composición farmacéutica o cosmética que contiene un enzima melanasa derivada de *Aspergillus fumigatus* es efectiva para blanquear la piel.

Una especie particular del género *Aspergillus*, también conocido como hongos de saco, es un saprófito y puede consumir casi cualquier sustrato carbonoso. El *Aspergillus* es *Aspergillus fumigatus*. Como se muestra en la figura 1, el efecto blanqueador producido con extracto de enzima melanasa de *Aspergillus fumigatus* aproximadamente al 1 % es superior al efecto blanqueador producido utilizando ácido kójico al 2 %, el doble de la cantidad del extracto de *Aspergillus fumigatus*. La presente invención también incluye el sorprendente descubrimiento de que una cantidad eficaz de extracto de enzima de *Aspergillus fumigatus* puede degradar la melanina epidérmica cuando se aplica tópicamente en la piel.

Los conidios de *Aspergillus* se encuentran en todas partes en el ambiente. El análisis filogenético de ADNr 18S ha apoyado la separación tradicional de los hongos y las ascas, los *Ascomycetes*, y aquellos con basidios, los *Basidiomycetes*. Además, a diferencia de las esporas de los *Basidiomycetes*, que se producen fuera de los basidios y se liberan solo a una corta distancia en el espacio entre las branquias de las cuales caen al eoriamente de un sombrero, como por ejemplo, el sombrero de un hongo, las esporas de los *Ascomycetes* se pueden liberar explosivamente al aire como una nube fina y blanca. Una de las características más sobresalientes del *Ascomycetes* es la formación de ascosporas y la liberación de estas esporas de las ascas. Las ascosporas suelen dirigirse y se expulsan a la fuerza del ascocarpo. La concentración de esporas en el saco de los *Ascomycetes* puede explicar el rápido cultivo experimentado con este filo de hongos.

El género *Aspergillus* incluye aproximadamente 132 especies y 18 variantes. La especie *Aspergillus fumigatus* se puede encontrar naturalmente en materiales de plantas, en el compost, en el suelo y en los alimentos. Las diversas cepas de *Aspergillus fumigatus* se propagan en muchos agares a temperaturas que oscilan entre aproximadamente 24 °C y aproximadamente 30 °C. Las colonias de *Aspergillus fumigatus* se cultivan rápidamente a aproximadamente 45 °C en solución de agar de Czapek-Dox. El hongo aterciopelado algodonoso y de color blanco con tonos de verde o gris en la parte superior. La parte inferior es incolora, amarilla, verde o marrón. Normalmente, el *Aspergillus fumigatus* es amarillo plata y carece de pigmento oscuro, a menos que se cultive con melaninas o melanógenos. Luther, et al. p. 146. El crecimiento de la melanasa puede depender de la melanina. Los mutantes de color también pueden estar presentes en los conidios. Los conidios de *Aspergillus fumigatus* pueden ser de pared áspera a casi lisos, y de globosos a elipsoidales o subglobosos. Los conidios también son equinulados, de una célula y de aproximadamente 2,0 a 3,5 µm. Los conidióforos, que tienen conidios, son de pared delgada, lisos, verdes y terminan en una vesícula hemisférica. El *Aspergillus fumigatus* produce vesículas en forma de botellas que tienen fiálides en una disposición uniseriada, de una sola columna compacta. Las fiálides cubren la mitad superior de la vesícula. Sus cabezas de conidios también forman una sola columna compacta. La pared hifal parece ser de dos capas. Una de las capas es una capa interna traslúcida gruesa y la otra es una capa externa opaca fina.

Se puede preparar el extracto de enzima que degrada la melanina de la presente invención mediante el cultivo en primer lugar de colonias de *Aspergillus fumigatus*, las cuales están propagadas y se pueden obtener a nivel comercial, por ejemplo, de la Colección Americana de Cultivos Tipo (ATCC), Manassas, VA. Una cepa preferida es NRRL 6463 disponible en ATCC. El hongo está disponible en un punto del tubo de ensayo del proceso o liofilizado. *Aspergillus fumigates* se puede cultivar en agar extracto de malta, agar papa dextrosa, agar YpSs, agar de Czapek o medio PYG. Preferentemente, se cultiva el hongo en agar papa dextrosa en un matraz de agitación de un litro, y se cultiva hasta una densidad muy alta de aproximadamente 10^6 a 10^7 unidades formadoras de colonias por ml (cfu/ml). Estas cantidades se proporcionan como guía y se pueden ajustar según sea necesario en función del conocimiento general de un entendido en la técnica de la microbiología para lograr la tasa de crecimiento deseada.

Se extrae la enzima mediante el centrifugado de aproximadamente 500 ml de cultivo y se suspende nuevamente en aproximadamente 150 mM de NaCl, aproximadamente 50 mM de tapón Tris y aproximadamente 1 por ciento de detergente NP40. La nueva suspensión se somete a ultrasonido durante aproximadamente 30 minutos y luego se puede añadir directamente a una formulación farmacéutica o cosmética como enzima bruta aislada. Preferentemente, se purifica la enzima mediante filtrado a través de un filtro de 0,22 µm. La cantidad de enzima en la solución de extracto de enzima purificada puede ser de aproximadamente el 1 a aproximadamente el 95 por ciento; preferentemente la enzima es aproximadamente el 80 a aproximadamente el 95 por ciento de la solución purificada.

Se incorpora el extracto de enzima preparado de ese modo a una formulación farmacéutica o cosmética en una cantidad blanqueadora eficaz. El término "cantidad blanqueadora eficaz", según se utiliza aquí, significa una cantidad de enzima que reduce el color de la piel, medido con un colorímetro Minolta, en aproximadamente el 25 por ciento, preferentemente en al menos aproximadamente el 30 por ciento. Preferentemente, la cantidad blanqueadora eficaz es de aproximadamente un 0,05 a aproximadamente un 5,00 por ciento en peso de la enzima de la composición. Más preferentemente, la enzima es también presente en una cantidad de aproximadamente un 0,1 a aproximadamente un 2,0 por ciento en peso de la composición.

Un extracto de enzima derivado de la levadura de *Saccharomyces Cerevisiae* (también conocida como levadura verdadera o levadura para hornear, por ejemplo, la cepa ATCC 60219) puede ser útil en una formulación farmacéutica o cosmética como agente blanqueador para la piel. Las levaduras se caracterizan por células en gemación solitaria que experimentan reproducción meiótica por ascosporas. Su núcleo, como el de otros organismos eucariota, contiene un nucleolo y varios cromosomas que están unidos por una membrana nuclear. En las levaduras, las ascosporas se multiplican por gemación o formación de conidios (fisión). La levadura de célula única simplemente se convierte en el asca y usualmente tiene aproximadamente 4 esporas.

Se sabe que se ha informado que la levadura o la levadura para hornear estimulan la respiración de la piel. En el estado de la técnica anterior, el extracto de levadura sinérgico se combina con enzimas peroxidasa para evitar la interferencia con la actividad peroxidasa. Sin embargo, no se informó que el extracto de levadura de la solicitud de patente europea EP 1004289 tenga ningún efecto degradante sobre la melanina de la piel. La levadura extraída se puede cultivar en minerales coloidales al 10 % (Rockland Corp., Tulsa, OK) en caldo YM (comercializado por Difco Labs) durante varios días. La levadura se somete a ultrasonidos, se filtra y la enzima derivada de la levadura se añade a una composición farmacéutica o cosmética similar a la del hongo descrita anteriormente.

La presente invención también incluye el método cosmético para blanquear la piel mediante el añadido de la cantidad blanqueadora eficaz de la enzima del hongo a la composición farmacéutica o cosmética y la aplicación tópica de la composición en la piel. Las composiciones de la presente invención logran un efecto blanqueador de la piel sin oscurecerse. Las composiciones se pueden aplicar tópicamente en cualquier área de la piel que se quiera blanquear como, por ejemplo, la cara, las piernas, los brazos y el torso. Las composiciones blanqueadoras se aplican mediante el frotado en un área de la superficie de la piel de aproximadamente 2 mg/cm² y se aplican nuevamente según sea necesario, por ejemplo, diariamente. El efecto blanqueador se produce en aproximadamente 5 a 10 días. Su superioridad como agente blanqueador se observa aproximadamente a los 10 a 15 días. Las composiciones de la presente invención se pueden aplicar de manera sistemática. Por lo tanto, se pueden preparar las composiciones blanqueadoras de cualquier forma conveniente para la aplicación tópica en la piel. Tales formas incluyen, entre otras, geles, cremas, dispersiones coloidales, emulsiones (agua en aceite o aceite en agua), suspensiones, soluciones, lociones, espumas, mousses, aerosoles y otras similares.

Las composiciones blanqueadoras se formulan con diversos portadores farmacéutica o cosméticamente aceptables. El término "portador farmacéutica o cosméticamente aceptable" se refiere a un vehículo, para uso farmacéutico o cosmético, que administra los componentes activos a la dosis prevista y que no causa daño a los seres humanos u otros organismos receptores. Según se utiliza aquí, "farmacéutico" o "cosmético" se entiende que abarca los farmacéuticos o cosméticos tanto humanos como animales. Los portadores útiles incluyen, por ejemplo, agua, acetona, etanol, etilenglicol, propilenglicol, butan-1,3-diol, miristrato de isopropilo, palmitato de isopropilo o aceite mineral. Resultará evidente para los entendidos en la técnica que el portador seleccionado debe ser compatible y relativamente inerte con respecto a las composiciones blanqueadoras. La metodología y los componentes para la formulación de las composiciones son muy conocidos y se pueden encontrar, por ejemplo, en Remington's Pharmaceutical Sciences, decimotercera edición, A.R. Gennaro, Ed., Mack Publishing Co., Easton Pensilvania, 1990.

Las composiciones blanqueadoras de la presente invención se pueden combinar con uno o más filtros solares. El término "filtro solar" según se utiliza aquí, se refiere a cualquier material que sea capaz de proteger la piel de la radiación ultravioleta que tiene una longitud de onda de aproximadamente 280 a aproximadamente 400 nm, mediante la absorción eficaz de dicha radiación, o la reflexión o dispersión de dicha radiación fuera de la superficie de la piel. Ejemplos de filtros solares con los que se pueden combinar las composiciones de la presente invención en este contexto son el dióxido de titanio, óxido de zinc, benzofenonas, ácido p-aminobenzoico (PABA), octil dimetil PABA, amildimetil PABA, octil metoxicinamato, 2-etoxi p-metoxicinamato, oxibenzona, homosalato, salicilato de fenilo, p-aminobenzoato de glicerilo, benzoato de etil-p-glicosilimido y otros similares. En una formulación, el agente de filtro solar se utiliza en las cantidades normalmente utilizadas para ese agente, y la enzima se utiliza en las cantidades indicadas anteriormente.

Se pueden incluir otros ingredientes opcionales con las composiciones blanqueadoras de la presente invención, estos incluyen, entre otros, fragancias, perfumes, saborizantes, conservantes, emolientes, antisépticos, pigmentos, tinturas, colorantes, humectantes, opelentes, agentes impermeabilizantes, formadores de películas, vitaminas así como otras clases de materiales cuya presencia puede resultar conveniente desde el punto de vista cosmético, farmacéutico, medicinal o de otro tipo. Se pueden encontrar ejemplos comunes en el International Cosmetic Ingredient Dictionary de CTFA, cuarta edición, The Cosmetic, Toiletory, and Fragrance Association, Inc., Washington, D.C., 1991. Las composiciones blanqueadoras también pueden resultar útiles en los productos de maquillaje.

Las composiciones de la presente invención también pueden comprender ingredientes activos adicionales útiles que incluyen, entre otros, otros agentes blanqueadores conocidos, por ejemplo, inhibidores de la tirosinasa, por ejemplo, el ácido kojico, antioxidantes, antimicrobianos, analgésicos, anestésicos, agentes antiacné, agentes antidermatitis, agentes antipruríticos, agentes antiinflamatorios, agentes antiqueratolíticos, agentes antisequedad de la piel, antitranspirantes, agentes antipsoriásicos, agentes antiborreicos, agentes antiedad, agentes antiarrugas, agentes autobronceantes, agentes para la curación de heridas, corticosteroides u hormonas. La incorporación del ingrediente activo en la formulación se determina por su solubilidad o estabilidad en combinación con la enzima que degrada la melanina derivada de *Ascomycete* de la presente invención. Sin embargo, la selección del modo de administración de los ingredientes activos adicionales, se limita al modo de administración escogido para las composiciones blanqueadoras.

La invención se ilustra adicionalmente a través de los siguientes ejemplos, no exhaustivos:

EJEMPLOS

I. Preparación de una composición blanqueadora

	<u>Material</u>	<u>% en peso</u>
55	<u>Fase I</u>	
	Ácido esteárico	2,0
	Estearato de glicerilo	2,0

	Aceite mineral	12,0	
	Petrolato	4,0	
	Parabenos	0,4	
	<u>Fase II</u>		
5	Agua	35,0	
	Propilenglicol	5,0	
	EDTA trisódico	0,2	
	Parabenos	0,4	
	<u>Fase III</u>		
10	Agua	38,0	
	Extracto de enzima de <i>Aspergillus Fumigatus</i>		1,0

Se combinan los ingredientes de la Fase I con los ingredientes de la Fase II en recipientes separados y se calienta cada combinación con agitación a 70 °C. Luego, se añaden con agitación los ingredientes de la Fase I combinados a los ingredientes de la Fase II combinados. Se deja enfriar la mezcla a 30 °C con agitación. Se combinan y se añaden los ingredientes de la Fase III a los ingredientes de la Fase I y II para formar una emulsión final. El extracto de enzima de *Aspergillus fumigatus* es NRRL 6463 suministrado por ATCC.

II. Acción blanqueadora del extracto de enzima de *Aspergillus fumigatus*

Se realiza un estudio comparativo para determinar la eficacia de un extracto de enzima de *Aspergillus fumigatus* en comparación con la eficacia de un inhibidor de la tirosinasa conocido, el ácido kójico. Se preparan tres muestras. La primera muestra contiene la fórmula base para una loción sin añadir ningún agente blanqueador a la fórmula. La segunda muestra es la misma fórmula base con ácido kójico al 2 % añadido a la fórmula. Por último, la tercera muestra contiene el agente blanqueador de la presente invención de extracto de enzima de *Aspergillus fumigatus* al 1 % en la fórmula base, como se describió de manera similar en el Ejemplo I anterior.

Diez panelistas voluntarias participan en este estudio. Para calificar para el estudio, se exige que la panelista tenga una salud normal, sin pruebas de enfermedad aguda o crónica, inclusive problemas dermatológicos. Las panelistas son mujeres de entre 18 y 45 años, y con tipo de piel I y II. Además, las panelistas no pueden presentar efectos de quemaduras solares, erupciones, rasguños o marcas de quemaduras ya que estas afecciones podrían interferir con el análisis de los resultados de la prueba. También se excluye a las mujeres embarazadas o en período de lactancia. Luego de evaluarlas en el lugar de la prueba, se examina a las panelistas participantes para determinar que no tengan una cantidad excesiva de verrugas, nevus, lunares, quemaduras solares, bronceado, cicatrices o lesiones cutáneas activas. Por último, las panelistas no pueden utilizar retinoides, antihistaminas o agentes similares sistémicos o tópicos durante el transcurso del estudio ni en las dos semanas previas al comienzo del estudio.

Sobre las espaldas de cada una de las panelistas, se marcan cuatro zonas diferenciadas de aproximadamente 4 cm². Tres de las cuatro áreas corresponden a la loción sin agente blanqueador, a la loción con ácido kójico al 2 % y a la loción con extracto de enzima de *Aspergillus fumigatus* al 1 % de la presente invención. La cuarta área sirve como el control irradiado sin tratar. Cada panelista recibe dos veces la MED (dosis mínima de eritema) de rayos UV-B en cada área. Se irradian las zonas con un simulador solar Xenon Arc (150 vatios) con filtros (mm UG-5) para exponer la piel a radiación UV-B y UV-A. Se observa el bronceado durante 7 días después de la irradiación, momento en el cual se realizan las mediciones de referencia de color utilizando un colorímetro Minolta que mide la diferencia de reflectancia de la piel, L. El cambio en el valor de la diferencia de reflectancia es ΔL^* . Se miden los valores delta contra el valor de color de piel de referencia medido en el día 7. Se aplican los materiales de prueba en las zonas respectivas a razón de 2 mg/cm² después de la medición con el colorímetro en el día 7, y se dejan secar durante 10 minutos. Se continúan los tratamientos con los productos una vez por día durante 7 días (es decir, del día 8 al día 14 de la prueba). Se obtienen lecturas del colorímetro en el día 9, en el día 12 y en el día 14 después de la irradiación. Se observa un aumento en el bronceado de la piel con el colorímetro durante aproximadamente 9 días después de la irradiación.

Los resultados muestran que el efecto blanqueador de la piel del extracto de enzima de *Aspergillus fumigatus* al 1 % ("extracto de *Aspergillus*") es superior que el del ácido kójico 2 %, el doble de la cantidad del extracto de enzima. La comparación se mide en términos de reflectancia, ΔL^* , e indica que el extracto de enzima que contienen las composiciones de la presente invención tiene una reflectancia más baja y, por lo tanto, un mayor efecto blanqueador. Como el bronceado de la piel continuó aumentando hasta aproximadamente el día 9, se normalizan los datos para los días 12 y 14 contra los datos promedio para el día 9. Una comparación de las tres fórmulas en términos

de la reducción porcentual del color de la piel entre el día 9 y el día 14 muestra que la composición de la presente invención, que contiene la mitad de la cantidad de extracto de enzima (1 %) que la cantidad de ácido kójico (2 %), produce mayor reducción del color de la piel.

III. Acción blanqueadora del extracto de enzima de *Saccharomyces cerevisiae* (comparativo)

- 5 Se cultiva levadura en mineral coloidal al 10 % en caldo YM durante 3 días. La levadura cultivada se somete a ultrasonido en un baño de ultrasonido durante aproximadamente 30 minutos y se filtra. Se prepara la melanina mediante la incubación de 1 mg/ml, dl-3,4-dihidroxifenilalanina (DOPA) fría con 250 µCi de C¹⁴ DOPA en PBS. Se inicia la polimerización con 10 unidades/ml de tirosinasa de hongo y se deja actuar hasta que se oscurezca y se observe el pigmento de la melanina insoluble. Se almacena la melanina preparada a 4 °C.
- 10 Se prepara melanina radiomarcada con C¹⁴ insoluble a partir de melanina sintética mediante centrifugación repetida o aproximadamente 1,0 ml a aproximadamente 10.000 rpm durante aproximadamente 15 minutos. La centrifugación se repite tres veces. Se añade a aproximadamente 1,0 ml de melanina cada vez y se desecha el sobrenadante. Se suspende nuevamente el concentrado de melanina insoluble en aproximadamente 100 µls de PBS y se utiliza como sustrato. La mezcla de reacción contiene 10 µls de melanina radiomarcada, 70 µls de PBS e intervalos de aproximadamente 0, 25, 50 y 100 µls de homogeneizado o fracción celular (extracto de levadura). Se incuban las mezclas de reacción durante aproximadamente una semana a 37 °C con agitación. Se detienen las reacciones mediante el añadido de líquido de centelleo y se obtiene el recuento de melanina. Los tratamientos se realizan por triplicado. Se observa una disminución en el recuento total de melanina después de una semana de incubación. Se descubre que el extracto de levadura disminuye la cantidad de radiomarcado en un 24 por ciento, 29 por ciento y 54 por ciento para los intervalos de 25, 50 y 100 µls de extracto de levadura bruto, respectivamente.

IV. Acción blanqueadora del extracto de enzima de *Saccharomyces cerevisiae* (comparativo)

	<u>Material</u>	<u>% en peso</u>
	<u>Fase I</u>	
	Ácido esteárico	2,0
25	Estearato de glicerilo	2,0
	Aceite mineral	10,0
	Petrolato	2,0
	Parabenos	0,4
	<u>Fase II</u>	
30	Agua	40,0
	Trietanolamina	1,0
	EDTA trisódico	0,2
	Propilenglicol	5,0
	Parabenos	0,4
35	<u>Fase III</u>	
	Agua	36,0
	Extracto de levadura de <i>Saccharomyces cerevisiae</i>	1,0

- 40 Se realiza un estudio para determinar la eficacia de un extracto de enzima de *Saccharomyces cerevisiae* en comparación con la eficacia de un inhibidor de la tirosinasa conocido, el ácido kójico. Se preparan por separado muestras del extracto de enzima de levadura y del ácido kójico al 2 % en una base de estearato de trietanolamina (TEA). La primera muestra contiene la fórmula base para una loción con extracto de enzima de *Saccharomyces cerevisiae* al 1 % añadido a la fórmula. La segunda muestra es la misma base con ácido kójico al 2 % añadido a la fórmula.

- 45 Siete panelistas voluntarias participan en este estudio. Para calificar para el estudio, se exige que la panelista tenga una salud normal, sin pruebas de enfermedad aguda o crónica, inclusive problemas dermatológicos. Las panelistas son mujeres de entre 18 y 45 años, y con tipo de piel I y II. Además, las panelistas no pueden presentar efectos de quemaduras solares, erupciones, rasguños o marcas de quemaduras ya que estas afecciones podrían interferir con el análisis de los resultados de la prueba. También se excluye a las mujeres embarazadas o en

5 período de lactancia. Las panelistas deben aparentar tener una salud normal y no tener signos de enfermedad aguda o crónica, inclusive problemas dermatológicos. Luego de evaluarlas en el lugar de la prueba, se examina a las panelistas participantes para determinar que no tengan una cantidad excesiva de verrugas, nevus, lunares, quemaduras solares, bronceado, cicatrices o lesiones cutáneas activas. Por último, las panelistas no pueden utilizar retinoides, antihistaminas o agentes similares sistémicos o tópicos durante el transcurso del estudio ni en las dos semanas previas al comienzo del estudio.

10 Sobre las espaldas de cada una de las panelistas, se marcan zonas diferenciadas de aproximadamente 4 cm² para aplicar las dos muestras, es decir, la loción con ácido kójico al 2 % y la loción con extracto de enzima de *Saccharomyces cerevisiae* al 1 % de la presente invención. Se marca un área adicional como el control irradiado sin tratar. Cada panelista recibe dos veces la MED (dosis mínima de eritema) de rayos UV-B en cada área. Se irradian las zonas con un simulador solar Xenon Arc (150 vatios) con filtros (mm UG-5) para exponer la piel a radiación UV-B y UV-A. Se observa el bronceado durante 5 días después de la irradiación, momento en el cual se realizan las mediciones de referencia de color utilizando un colorímetro Minolta que mide la diferencia de reflectancia de la piel, L. El cambio en el valor de la diferencia de reflectancia es ΔL^* . Se miden los valores delta contra el valor de color de piel de referencia medido en el día 7. Se aplican los materiales de prueba en las zonas respectivas a razón de 2 mg/cm² después de la medición con el colorímetro en el día 7, y se dejan secar durante 10 minutos. Se continúan los tratamientos con los productos una vez por día durante 7 días (es decir, del día 8 al día 14 de la prueba). Se obtienen lecturas del colorímetro en el día 9, en el día 12 y en el día 14 después de la irradiación. Se observa un aumento en el bronceado de la piel con el colorímetro durante aproximadamente 9 días después de la irradiación. Los resultados indican que las muestras que contienen el extracto de enzima de levadura (1 %) producen una reducción del color de la piel.

15

20

REIVINDICACIONES

1. Una composición farmacéutica o cosmética tópica para aplicar en la piel que comprende una cantidad blanqueadora eficaz de un extracto de enzima que degrada la melanina derivado de *Aspergillus fumigatus* y un portador cosmético o farmacéutico.
- 5 2. La composición de la reivindicación 1, en la cual el extracto de enzima se deriva de la cepa NRRL 6463 de *Aspergillus fumigatus*.
3. La composición de la reivindicación 1 ó 2, en la cual la enzima es una solución de extracto purificada.
4. La composición de cualquiera de las reivindicaciones de la 1 a la 3, en la cual el extracto de enzima está presente en una cantidad de aproximadamente un 0,05 a un 5,00 por ciento en peso de la enzima en la composición.
- 10 5. La composición de cualquiera de las reivindicaciones de la 1 a la 4, que comprende además un filtro solar.
6. Un método cosmético para blanquear la piel que comprende la aplicación tópica de una composición cosmética tópica que comprende un extracto de enzima que degrada la melanina derivado de *Aspergillus fumigatus*.
- 15 7. El método de la reivindicación 6, en el cual el extracto de enzima está presente en una cantidad de aproximadamente un 0,05 a aproximadamente un 5,00 por ciento en peso de la composición.
8. La composición de cualquiera de las reivindicaciones de la 1 a la 5, para uso en la degradación de la melanina en la piel.
- 20 9. Un método cosmético para inhibir un bronceado inducido por los rayos UV-B que comprende la aplicación tópica de una composición cosmética tópica que comprende una cantidad blanqueadora eficaz de un extracto de enzima que degrada la melanina derivado de *Aspergillus fumigatus*.
10. El método de la reivindicación 9, en el cual la cantidad blanqueadora eficaz es de aproximadamente un 0,05 a aproximadamente un 5,00 por ciento en peso de la composición.