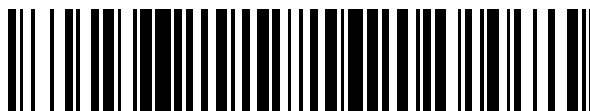


19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 427 142**

51 Int. Cl.:

A61K 8/49 (2006.01)

A61Q 19/02 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **28.11.2003** **E 03775960 (2)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **12.06.2013** **EP 1570838**

54 Título: **Inhibidor de la elongación de dendritas para melanocito y preparaciones para la piel para uso externo que lo contiene**

30 Prioridad:

03.12.2002 JP 2002350733

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

29.10.2013

73 Titular/es:

POLA CHEMICAL INDUSTRIES INC. (100.0%)
6-48, Yayoi-cho, Suruga-ku
Shizuoka-shi, Shizuoka 422-8009, JP

72 Inventor/es:

TADA, AKIHIRO;
KANAMARU, AKIKO y
SAEKI, YUKO

74 Agente/Representante:

VALLEJO LÓPEZ, Juan Pedro

ES 2 427 142 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

Inhibidor de la elongación de dendritas para melanocito y preparaciones para la piel para uso externo que lo contiene

Campo técnico

- 5 La presente invención se refiere a un inhibidor de la elongación de dendrita para melanocitos.

Antecedentes de la técnica

Muchas mujeres esperan tener piel clara y hermosa, y por lo tanto se han desarrollado muchos cosméticos blanqueantes. Por ejemplo, cosméticos blanqueantes pueden estar representados por cosméticos que contienen ácido ascórbico o un derivado del mismo, el ácido kójico o un derivado del mismo, ácido tranexámico o un derivado del mismo, glucósido de hidroquinona, o similares. Sin embargo, la mayoría de estos cosméticos tienen un mecanismo que utiliza la acción de inhibir la tirosinasa e inhibir la biosíntesis de la melanina, y nosotros tuvimos que decir que hay un límite sobre su efecto. Esto es, aun cuando los cosméticos blanqueantes que contienen estos ingredientes como ingredientes activos son eficaces para los síntomas, tales como manchas de la edad, pecas y la tez oscura que se derivan de la producción anormalmente acelerada de la melanina, nosotros tuvimos que decir que tales cosméticos blanqueadores no tienen mucho efecto sobre la discromatosis al que apenas contribuye la cantidad de melanina producida. En otras palabras, existen discromatosis para las que los inhibidores de la tirosinasa son menos eficaces o no lo son, y se ha deseado que se desarrollen medios para aliviar tales discromatosis.

Por otro lado ejemplos de discromatosis a los que la cantidad de melanina producida menos contribuye, incluyen aquellos que resultan de la migración acelerada de gránulos de melanina a partir de las dendritas melanocíticas. Aunque se considera tratar tales discromatosis mediante la inhibición de la elongación de las dendritas que se produce cuando los melanocitos permiten que los gránulos de melanina migren, no se han conocido tantos agentes blanqueantes que utilicen un mecanismo de este tipo. Esto es, puede decirse que ha habido una demanda para el desarrollo de agentes blanqueantes que utilicen un mecanismo de este tipo.

Achillea millefolium L. es una planta fuente en la que los inventores han encontrado Centaureidin (5,7-dihidroxi-3,6-dimetoxi-2-(5-hidroxi-4-metoxifenil)-4H-1-benzopirano-4-ona; en lo sucesivo, también referida como "Compuesto 1"), que es un compuesto representado por la fórmula general (1). Se sabía ya que su extracto es útil como humectante para cosméticos (documento JP-A 02-172907), y en la estabilización de ácido kójico en cosméticos (documento JP-A 07-17848), que tiene acción inhibidora de la tirosinasa (documento JP-A 08-104646), que tiene acción de erradicar oxígeno activo (documento JP-A 11-246336), que tiene acción inhibidora de α -MSH (documento JP-A 11-349435), y así sucesivamente. Sin embargo, no se sabía en absoluto que Centaureidin inhibiera el alargamiento de las dendritas melanocíticas y que fuera útil para aliviar, por tal acción, discromatosis, sobre la que los inhibidores de la producción de melanina que utilizan la acción inhibidora de la tirosinasa habitual son menos eficaces o no lo son.

Por otra parte, era conocido un compuesto representado por la fórmula general (1), tal como Centaureidin:

1) que se encuentra en las plantas del género *Artemisia* y es útil para el tratamiento de enfermedades alérgicas (solicitud internacional publicada WO 2002041909);

2) que tiene acción contra el cáncer (Patente de EE.UU. N° 493540); y

3) que se encuentra en plantas del género *Centaurea cyanus* (Flamini Guido et. al., Phytochemistry, 58 (8), 1229-1233, 2001).

Sin embargo, no se sabía en absoluto que dicha sustancia está presente en *Achillea millefolium* L. de la familia Asteraceae. No se sabía en absoluto que la sustancia inhibe el alargamiento de las dendritas melanocíticas, y que es útil para aliviar, por tal acción, discromatosis sobre la que los inhibidores de la producción de melanina con una acción inhibidora de la tirosinasa habitual son menos eficaces o no lo son.

Descripción de la invención

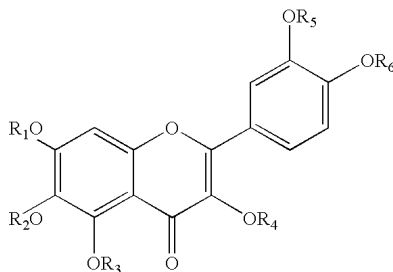
La presente invención se ha realizado en tales circunstancias, y un objetivo de la presente invención es proporcionar un ingrediente útil para la inhibición de la elongación de las dendritas melanocíticas y aliviar, por esta acción, discromatosis sobre la que los inhibidores de la producción de melanina con una acción inhibidora de la tirosinasa habitual son menos eficaces o no lo son.

A la luz de tales circunstancias, los inventores de la presente invención han realizado extensos estudios y redoblado esfuerzos para adquirir un ingrediente útil para la inhibición de la elongación de las dendritas melanocíticas y aliviar, por esta acción, discromatosis sobre la que los inhibidores de la producción de melanina con una acción inhibidora de la tirosinasa habitual son menos eficaces o no lo son. Como resultado, los inventores de la presente invención han completado la presente invención encontrando que un compuesto representado por la fórmula general (1) y/o una sal del mismo, que está presente en *Achillea millefolium* L. de la familia tienen (tiene) tal acción. A saber, la

presente invención se refiere a una técnica que se muestra a continuación.

(1) Un inhibidor de la elongación de dendrita para melanocitos que consiste en un compuesto representado por la siguiente fórmula general (1):

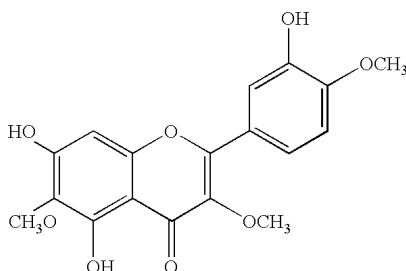
formula (1)



5 y/o una sal del mismo,

en la que R₁, R₂, R₃, R₄, R₅ y R₆ representan cada uno independientemente un átomo de hidrógeno o un grupo alquilo C₁₋₄.

10 (2) El inhibidor de la elongación de dendrita para melanocitos de acuerdo con (1), caracterizado porque el compuesto representado por la fórmula general (1) es Centaureidin indicado por la siguiente fórmula.



Mejor modo de llevar a cabo la invención

(1) Inhibidor de la elongación de dendrita para melanocito de la presente invención

15 Un inhibidor de la elongación de dendrita de melanocitos de la presente invención consiste en un compuesto representado por la fórmula general (1) anteriormente descrita y/o una sal del mismo.

En la fórmula general (1), R₁, R₂, R₃, R₄, R₅ y R₆ representan cada uno independientemente un átomo de hidrógeno o un grupo alquilo.

20 El grupo alquilo es preferiblemente un grupo alquilo C₁₋₄, y ejemplos del mismo incluyen un grupo metilo, un grupo etilo, un grupo propilo, un grupo 1-metiletilo, un grupo n-butilo, un grupo 1-metilpropilo, un grupo 2-metilpropilo, y un grupo 1,1-dimetiletilo. De ellos, es particularmente preferido un grupo metilo.

El compuesto representado por la fórmula general (1) preferiblemente puede ser ejemplificado por Centaureidin.

Tal compuesto representado por la fórmula general (1) puede ser utilizado directamente, o puede utilizarse en una forma de sal después del tratamiento con álcali.

25 La sal se puede aplicar sin limitación particular siempre que sea fisiológicamente aceptable, y preferiblemente se puede ejemplificar por las sales de metales alcalinos tales como sales de sodio y sales de potasio, sales de metales alcalino-térreos tales como sales de calcio y sales de magnesio, sales de amonio, sales de amina orgánicas tales como sales de trietanolamina, y sales de trietilamina, y sales de aminoácidos básicos tales como sales de lisina y sales de arginina. Particularmente preferidas son sales de metales alcalinos, que se preparan fácilmente.

30 Tal compuesto representado por la fórmula general (1) y/o una sal del mismo puede ser purificado, y puede ser un extracto de una planta o una fracción del mismo, o similar, que contiene una cantidad eficaz del compuesto representado por la fórmula general (1) y/o la sal del mismo.

35 Se pueden utilizar como tales plantas, plantas del género *Achillea* sp. de la familia Asteraceae, preferiblemente *Achillea millefolium* L. de la familia Asteraceae. Una planta utilizada en la extracción del compuesto representado por la fórmula general (1) y/o la sal del mismo puede ser la planta entera, una parte de la planta que contiene el compuesto representado por la fórmula general (1) y/o la sal del mismo, o un producto procesado de la planta. Por

ejemplo, un extracto de la parte sobre el nivel del suelo del género *Achillea millefolium* L. de la familia Asteraceae puede ser purificado y fraccionado para obtener el compuesto representado por la fórmula general (1) y/o la sal del mismo. El compuesto representado por la fórmula general (1) y/o la sal del mismo puede ser identificado por análisis de rayos X o similar.

- 5 El extracto puede ejemplificarse de forma particular preferiblemente por un extracto con un disolvente altamente polar. El disolvente altamente polar se puede preferiblemente ejemplificar mediante: éteres tales como éter dietílico, éter isopropílico, y tetrahidrofurano; hidrocarburos halogenados tales como cloruro de metileno y cloroformo; ésteres tales como acetato de etilo y formiato de metilo; cetonas tales como acetona y metiletilcetona; nitrilos tales como acetonitrilo; alcoholes tales como 1,3-butanediol, etanol, y alcohol isopropílico; y agua. De ellos, se prefieren particularmente alcoholes. Se observa que el disolvente anteriormente descrito puede ser un tipo o una mezcla de dos o más tipos de ellos.

- 10 La extracción puede llevarse a cabo normalmente mediante la adición de 1 a 10 veces en peso de un disolvente con respecto a toda la planta o a una parte de la planta, seguido por inmersión durante unos pocos días, si se lleva a cabo a temperatura ambiente, o unas pocas horas, si se lleva a cabo alrededor del punto de ebullición. Después de la extracción, el disolvente puede eliminarse por concentración a vacío o similar, si es necesario. El compuesto representado por la fórmula general (1) se puede aislar a partir del extracto del que el disolvente se ha eliminado, por extracción líquido-líquido con acetato de etilo y agua, y similares, o purificación por cromatografía en columna de gel de sílice utilizando, por ejemplo, cloroformo-metanol como disolvente de elución, o similares.

(Ejemplo de producción)

- 20 Diez kilogramos de un producto seco de la parte sobre el nivel del suelo del género *Achillea millefolium* L. de la familia Asteraceae se cortó en piezas estrechas, que a continuación se añadieron a 50 litros de etanol y se calentaron a reflujo durante 3 horas. Después de enfriar a temperatura ambiente, la mezcla resultante se concentró bajo concentración a vacío, y se añadió 1 litro de acetato de etilo y agua a la misma. La mezcla resultante se sometió a extracción líquido-líquido para eliminar la fase de acetato de etilo, seguido de concentración a vacío para preparar un extracto. Después de disuelto en cloroformo, el residuo se cargó en cromatografía de columna de gel de sílice y se purificó con un disolvente de elución de cloroformo: metanol = 100:1 a 70:30 para dar 211,5 mg del Compuesto 1. La estructura se determinó por análisis de rayos-X.

Ejemplos

- 30 Aunque la presente invención se describirá con más detalle en lo sucesivo con referencia a los Ejemplos, se entiende que la presente invención no se pretende que esté limitada únicamente a tales Ejemplos.

Ejemplo 1

De acuerdo con un método que se muestra abajo, la acción inhibidora sobre el alargamiento de las dendritas se examinó utilizando melanocitos humanos. (Reactivo, etc.) Las células, el medio basal, y los aditivos de amplificación fueron adquiridos de KURABO INDUSTRIES LTD.

- 35 (Célula) Melanocito humano normal

(Medio) Medio basal (Medio 1545) suplementado con reactivos que se describen abajo

(Reactivo) Aditivo de amplificación: extracto de pituitaria bovina (BPE)

- 40 (concentración final de 0,4 % v/v en el medio), suero bovino fetal (FBS) (concentración final de 0,5 % v/v en el medio), factor de crecimiento de fibroblastos básico humano recombinante (rFGF-B) (concentración final de 3 ng/ml en el medio), hidrocortisona (concentración final de 0,18 µg/ml en el medio), insulina (concentración final de 5 µg/ml en el medio), transferrina (concentración final de 5 µg/ml en el medio), forbol 12-miristato 13-acetato (PMA) (concentración final de 10 ng/ml en el medio), heparina (concentración final de 3 µg/ml en el medio), y solución PSA (solución mezcla de la concentración de penicilina de 50,000 unidades/ml, concentración de estreptomina de 50 µg/ml, y la concentración de anfotericina B de 12,5 µg/ml; adición de 1 ml con respecto a 500 ml del medio)

- 45 (Método)

El extracto de *Achillea millefolium* L. y el Compuesto 1 (Centaureidin) obtenido en el ejemplo anteriormente descrito de producción se diluyeron en un medio basal de manera que la concentración de Centaureidin se llevó hasta 100 µg/ml, para hacer una solución de muestra. Se observa que un control es una solución que tiene sólo medio basal.

- 50 Se inocularon melanocitos humanos normales en una microplaca de 48 pocillos (3,000 células/pocillo, 200 µl de medio) y se cultivaron a 37 °C.

Después de 24 horas, se le añadieron 50 µl de la solución de muestra a la misma.

La inhibición contra el alargamiento de las dendritas se observó 24 horas después de la adición de la solución de

muestra.

(Resultado)

El resultado se muestra en la Tabla 1 por la longitud de la dendrita. Se ve que la dendrita se alarga en el control por el efecto de la adición del factor de crecimiento, mientras que la elongación se inhibe en el grupo al que se añade Centaureidin.

5

Tabla 1

Compuesto añadido	Longitud de la dendrita (μm)
Centaureidin	26 ± 8
Extracto de <i>Achillea millefolium</i> L.	108 ± 21
Control	140 ± 29

Aplicabilidad industrial

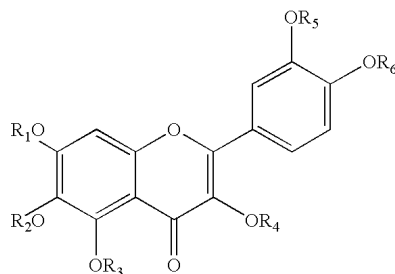
De acuerdo con la presente invención, se puede proporcionar un ingrediente útil para la inhibición de la elongación de las dendritas melanocíticas y aliviar, por esta acción, discromatosis para las que los inhibidores de la producción de melanina que utilizan los inhibidores de la tirosinasa usuales son menos eficaces o no lo son.

10

REIVINDICACIONES

1. Un compuesto representado por la siguiente fórmula general (1):

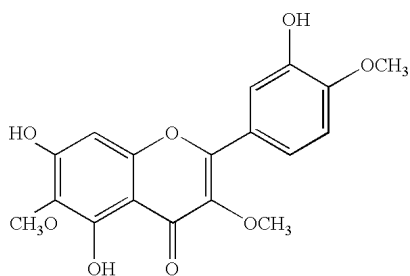
formula (1)



5 y / o una sal del mismo,

donde R₁, R₂, R₃, R₄, R₅ y R₆ representan cada uno independientemente un átomo de hidrógeno o un grupo alquilo C₁₋₄, para el tratamiento de discromatosis mediante la inhibición de la elongación de las dendritas melanocíticas.

2. El compuesto según la reivindicación 1, caracterizado porque el compuesto representado mediante la fórmula general (1) es Centaureidin que tiene la fórmula



10

3. El compuesto según la reivindicación 1 o 2, caracterizado porque el compuesto es para aliviar discromatosos en la que los inhibidores de tirosinasa tienen efecto insuficiente.