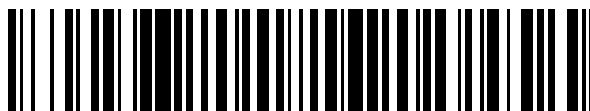


19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 528 142**

51 Int. Cl.:

A61K 8/49 (2006.01)

A61K 31/381 (2006.01)

A61Q 19/02 (2006.01)

C07D 333/46 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **14.09.2010 E 10818722 (0)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **22.10.2014 EP 2484341**

54 Título: **Inhibidor de la producción de melanina**

30 Prioridad:

28.09.2009 JP 2009223466

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

04.02.2015

73 Titular/es:

**FUJIFILM CORPORATION (100.0%)
26-30, Nishiazabu 2-chome Minato-ku
Tokyo 106-0031, JP**

72 Inventor/es:

**HONMA TOSHIYUKI y
KUBO TOSHIAKI**

74 Agente/Representante:

LINAGE GONZÁLEZ, Rafael

ES 2 528 142 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 producción de melanina

5 Campo técnico

La presente invención se refiere a un inhibidor de la producción de melanina que inhibe el melanismo de la piel inducido por rayos ultravioleta o similares, y a un producto cosmético de blanqueamiento que presenta un efecto de blanqueamiento excelente y una seguridad elevada. Además, la invención se refiere al uso de salacinol como inhibidor de la producción de melanina en un producto cosmético de blanqueamiento que presenta un efecto de blanqueamiento excelente y una seguridad elevada que inhibe el melanismo de la piel inducido por rayos ultravioleta.

Técnica anterior

15 Recientemente, la prevención o recuperación del cambio de color de la piel tal como quemaduras solares, pecas y efélides, es decir, el denominado blanqueamiento, ha suscitado atención.

20 Cuando se expone la piel a rayos ultravioleta incluidos en la luz solar, lámparas ultravioletas, y similares, la piel se inflama y los tejidos cutáneos se dañan perdiendo el denominado cutis brillante, textura fina, humedad, y similares. Particularmente, cuando se daña la dermis por los rayos ultravioleta, se generan arrugas y flacidez y puede provocarse el denominado fotoenvejecimiento.

25 El oxígeno activo generado por la exposición ultravioleta y diversos factores liberados a partir de las células cutáneas bajo la influencia de la misma potencian la actividad tirosinasa en melanocitos. La melanina que aporta el tono de color de la piel se produce a través de la oxidación de tirosina por la acción de tirosinasa en melanocitos. Cuando se activa la tirosinasa por los rayos ultravioleta, se considera que la melanina se produce en exceso y se transfiere a células epidérmicas y por tanto cambia el tono de color de la piel y se oscurece. Por consiguiente, con el fin de obtener un efecto de blanqueamiento, se requiere inhibir la producción de melanina.

30 Hasta la fecha, se han propuesto productos cosméticos de blanqueamiento que contienen ácido ascórbico, ácido kójico, arbutina, ácido elágico, o un derivado de los mismos, o diversos extractos vegetales.

35 Por otro lado, el salacinol representado por la fórmula estructural (1) que va a mencionarse más adelante es un compuesto descubierto a partir de plantas que pertenecen al género *Salacia*. Tradicionalmente se ha transmitido que raíces y troncos de plantas que pertenecen al género *Salacia* son eficaces para la prevención y el tratamiento inicial de diabetes en la medicina tradicional ayurveda en la India y Sri Lanka. En los últimos años, se ha notificado que plantas que pertenecen al género *Salacia* tienen una acción inhibitoria sobre la elevación de los niveles de glucosa en sangre y el mecanismo de acción puede atribuirse a la acción inhibitoria de la absorción de azúcar basada en una inhibición de la actividad α -glucosidasa.

Además, también se ha propuesto la aplicación de extractos en bruto de plantas que pertenecen al género *Salacia* a los denominados agentes de blanqueamiento (documentos de patente 1 y 2).

45 Documentos de la técnica anterior

Documentos de patente

50 Documento de patente 1: JP-A-2006-188463

Documento de patente 2: JP-A-2008-120774

Exposición de la invención**55 Problemas que va a solucionar la invención**

Los componentes que se conoce hasta la fecha que tienen acción de blanqueamiento tienen escasa estabilidad y solubilidad en sistemas de formulación y tampoco tienen una actividad suficiente en el organismo vivo. Además, provocan erupciones en la piel, por ejemplo, y por tanto tampoco son satisfactorios desde el punto de vista de la seguridad. Incluso cuando se usa un extracto en bruto de plantas que pertenecen al género *Salacia*, la acción de blanqueamiento no es suficiente y además, cuando se usa en una concentración alta con el fin de potenciar la acción, aparece citotoxicidad, de manera que se ha revelado que es inadecuado.

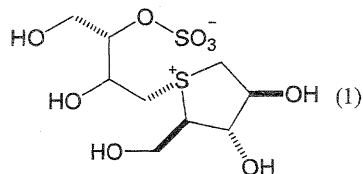
65 Por consiguiente, un componente de blanqueamiento que presenta una acción de blanqueamiento elevada y una citotoxicidad baja.

Medios para solucionar los problemas

En consideración de tales circunstancias, como resultado de estudios extensos, los presentes inventores han encontrado que el salacínol representado por la fórmula (1) tiene una acción inhibitoria de la producción de melanina excelente y además tiene estabilidad y seguridad elevadas. De ese modo, se hace posible proporcionar un producto cosmético de blanqueamiento seguro y estable.

Concretamente, la presente invención tiene la siguiente constitución.

1. Un compuesto representado por la siguiente fórmula estructural (1) para su uso como inhibidor de la producción de melanina.



2. Un producto cosmético de blanqueamiento que comprende el compuesto de fórmula estructural (1) según el punto 1 anteriormente.

3. El compuesto descrito en el punto 1 anteriormente para su uso como principio activo para la inhibición de la producción de melanina en la producción de un producto cosmético de blanqueamiento.

Ventaja de la invención

Según la invención, se proporciona un inhibidor de la producción de melanina que presenta un elevado efecto inhibitorio de la producción de melanina y que tiene una estabilidad y seguridad elevadas, específicamente, un producto cosmético de blanqueamiento que inhibe el cambio de color de la piel inducido por rayos ultravioleta o similares.

Breve descripción de los dibujos

[FIG. 1]

La figura 1 es un dibujo que muestra las curvas de inhibición de la producción de melanina de salacínol y controles comparativos.

[FIG. 2]

La figura 2 es un dibujo que muestra curvas de supervivencia celular de salacínol y controles comparativos.

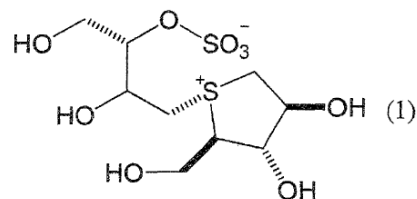
Modo para llevar a cabo la invención

A continuación se explicarán realizaciones de la presente invención en detalle.

Con el fin de explicar la invención en detalle, se mencionan ejemplos de producción y ejemplos experimentales de compuestos que van a usarse en la invención como ejemplos, pero la invención no se limita a los mismos.

El inhibidor de la producción de melanina de la invención contiene un compuesto representado por la siguiente fórmula estructural (1) como principio activo.

[Comp. quím. 2]



El compuesto representado por la fórmula estructural (1) se denomina salacínol y puede obtenerse por aislamiento y purificación a partir de plantas que pertenecen al género *Salacia* y extractos de las mismas usando un método conocido, por ejemplo cromatografía preparativa.

Las plantas que pertenecen al género *Salacia* son plantas que pertenecen a *Celastraceae* que crecen en estado silvestre principalmente en Sri Lanka, la India y el área del sureste asiático. Más específicamente, se usan uno o más tipos de plantas seleccionadas de *Salacia reticulata*, *Salacia oblonga*, *Salacia prinoides*, *Salacia chinensis*,
 5 *Salacia latifolia*, *Salacia burunoniana*, *Salacia grandiflora* y *Salacia macrocarpa*.

El extracto de las plantas que pertenecen al género *Salacia* significa un producto molido, un producto secado, un extracto, un polvo secado del mismo (polvo de extracto), o similares de partes comestibles tales como raíces, troncos, hojas, flores y frutos. También es adecuado mezclar y usar uno o más tipos de las partes. Más
 10 preferiblemente, se usa un polvo de extracto extraído a partir de raíces y troncos.

El polvo de extracto es un producto secado de uno obtenido mediante extracción con disolvente a partir de las partes comestibles mencionadas anteriormente y similares. El disolvente de extracción puede seleccionarse del grupo que consiste en agua o alcoholes tales como metanol y etanol, o disolvente mixto de agua y alcoholes o cetonas tales
 15 como acetona. Preferiblemente, se usa agua, un alcohol o un alcohol acuoso. Más preferiblemente, como disolvente de extracción, se usa etanol o agua caliente o un etanol acuoso. Con respecto a la concentración de alcohol del alcohol acuoso anterior, puede usarse uno que tiene una concentración del 30 al 90% en masa, preferiblemente del 40 al 70% en masa.

Como método de secado, puede mencionarse secado por pulverización, liofilización y similares sin limitación a los mismos.

Además, también pueden usarse los sintetizados usando métodos de síntesis conocidos, por ejemplo, el método descrito en el documento JP-A-2009-528299 (WO 2007-098567) y similares.

La cantidad de combinación de salacinol en la invención es preferiblemente del 0,0005 al 10,0% en masa (a continuación en el presente documento descrito simplemente como %) en base a la cantidad total del inhibidor de la producción de melanina o el producto cosmético de blanqueamiento. Se prefiere la cantidad de mezclado en este
 25 intervalo puesto que el efecto objetivo de la invención se vuelve suficiente.

Además, en la invención, en la producción del producto cosmético de blanqueamiento, en el caso en el que se usa salacinol como principio activo para la inhibición de la producción de melanina, la cantidad de combinación es preferiblemente del 0,0005 al 10,0% en masa en base a la cantidad total del producto cosmético de blanqueamiento de manera similar a lo anterior. El salacinol que va a combinarse puede estar en cualquier forma tal como una forma
 30 sólida o una forma de disolución y puede añadirse y combinarse en un momento apropiado durante el procedimiento de producción del producto cosmético de blanqueamiento.

Más precisamente, el blanqueamiento es una acción para impedir o recuperarse del melanismo de la piel, específicamente el cambio en el tono de color/pigmento de la piel tal como quemadura solar, pecas y efélides inducidas por una producción excesiva de melanina y para mantener o restaurar el tono de color de la piel, por
 40 ejemplo, para blanquear la piel.

Usando el inhibidor de la producción de melanina de la invención o el producto cosmético de blanqueamiento que contiene el mismo en la piel, puede obtenerse un efecto de blanqueamiento y también pueden tratarse máculas pigmentarias (por ejemplo, máculas pigmentarias seniles (pecas), efélides (pecas), cloasma, pigmentación tras inflamación, nevus, etc.).

El producto cosmético de blanqueamiento de la invención puede usarse como producto cosmético en una forma que se aplica generalmente a la piel y también como aditivo de baño.

En ambos casos del producto cosmético y el aditivo de baño, la forma farmacéutica no está particularmente limitada y pueden usarse en forma usada comúnmente. Por ejemplo, se consideran disoluciones acuosas, emulsiones (tipo W/O o tipo O/W), o polvos tales como gránulos, comprimidos o similares y pueden incorporarse adicionalmente excipientes y similares. Más específicamente, pueden mencionarse cremas, lociones lechosas, lociones cutáneas, mascarillas faciales, geles, barras, láminas, emplastos, y similares.

Puede producirse cualquiera de los mismos de maneras habituales y, por ejemplo, en el caso de lociones lechosas y similares, pueden producirse calentando y disolviendo una fase acuosa y una fase oleosa por separado y dispersando y emulsionando las mismas, seguido por enfriamiento.

Además, en el producto cosmético de blanqueamiento de la invención, pueden combinarse hidroquinona, arbutina, ácido eláxico, un derivado de vitamina C, un derivado de bifenilo, 4-(4-hidroxifenil)-2-butanol, y similares que ya se conocen y que son otro agente de blanqueamiento, con una combinación apropiada para potenciar o reforzar el efecto.

A este respecto, en el producto cosmético de la invención, de manera más precisa, en el producto cosmético que va

a usarse como preparación externa cutánea, además de lo anterior, pueden incorporarse otros componentes que pueden estar contenidos habitualmente en productos cosméticos. Por ejemplo, pueden incorporarse materias colorantes (por ejemplo, materias colorantes a base de alquitrán), pigmentos (por ejemplo, óxidos de hierro, óxidos de titanio, etc.), humectantes (por ejemplo, ácido hialurónico, glicerina, alcoholes polihidroxilados, alcoholes de azúcar, etc.), antisépticos (parabeno, etc.), tensioactivos aniónicos (alquil éter de polioxietileno, ésteres de ácidos grasos de polioxietileno, jabones de ácidos grasos, cetilsulfato de sodio, etc.), tensioactivos no iónicos (ésteres de ácidos grasos de alcohol polihidroxilado de polioxietileno, aceite de ricino endurecido con polioxietileno, ésteres de ácidos grasos de alcohol polihidroxilado, ésteres de ácidos grasos de poliglicerina, etc.), tensioactivos catiónicos (sales de tetraalquilamonio, etc.), tensioactivos anfóteros (tipo betaína, tipo sulfobetaína, tipo sulfoaminoácido, N-estearoil-L-glutamato de sodio, etc.), tensioactivos a base de sustancias naturales (lecitina, lisofosfatidilcolina, etc.), polímeros naturales (gelatina, caseína, almidón, goma arábica, goma karaya, goma guar, goma garrofín, goma tragacanto, semilla de membrillo, pectina, carragenanos, alginato de sodio, etc.), polímeros semisintéticos (metilcelulosa, hidroxietilcelulosa, hidroxipropilcelulosa, carboximetilcelulosa de sodio, etilcelulosa, etc.), polímeros sintéticos (poli(alcohol vinílico), polivinil metil éter y copolímeros, polivinilpirrolidona, poli(acrilato de sodio), polímeros de carboxivinilo, polímeros de poli(óxido de etileno), etc.), espesantes (goma de xanteno, etc.), antioxidantes (dibutilhidroxitolueno, etc.), y similares.

Ejemplos

A continuación se explicará la invención en detalle basándose en ejemplos y ejemplos de producción. La invención no se limita a los mismos.

Ejemplo de producción 1 [Aislamiento y purificación de salacinol]

Se distribuyó un kilogramo de un extracto de plantas que pertenecen al género *Salacia* en acetato de etilo/metanol y se concentró una fracción de metanol a presión reducida. Se separó un componente mediante cromatografía preparativa sobre una columna de amida para obtener 500 mg de salacinol. Se midió el salacinol obtenido en RMN, EM, y similares y se identificó mediante comparación con datos de la bibliografía. A continuación se muestran condiciones para la cromatografía preparativa.

Columna: TOSOH TSK-GEL Amide 80 10 μ l ϕ 21,5x30 cm

Velocidad de flujo: 15 ml/min

Fase móvil: acetonitrilo al 90% (v/v) (el 0,1% de ácido acético)

Detección: ESI negativa 333

Usando el salacinol obtenido en el ejemplo de producción 1, se realizaron la prueba de inhibición de la producción de melanina y la prueba de toxicidad celular siguientes. Como controles comparativos, se usaron un extracto en bruto de *Salacia* y principios activos de blanqueamiento conocidos.

Ejemplo 1

[Prueba de inhibición de la producción de melanina]

Se sembraron células de melanoma B16 en medio MEM que contenía FBS al 10% (v/v) (medio basal mínimo que contenía suero bovino fetal) para que fueran $2,5 \times 10^5$ células/pocillo en una placa de cultivo de 12 pocillos y se cultivaron durante 24 horas de manera habitual.

Tras el cultivo previo, se reemplazó el medio por un medio de prueba y se llevó a cabo el cultivo durante 72 horas. Como medio de prueba, se empleó un medio obtenido añadiendo 0,25 mmol/l de teofilina, el 0,5% (v/v) de dimetilsulfóxido al medio para el cultivo previo, y cada una de diversas muestras de evaluación para que tuviesen la concentración descrita en la tabla.

Se preparó el extracto en bruto de *Salacia* mediante el siguiente método. Tras pulverizar 0,5 kg de partes de raíz y tronco de *Salacia reticulata*, *Salacia oblonga* y *Salacia chinensis*, se añadieron 10 l de agua a las mismas y se realizó la extracción en condiciones de 100°C y 1 hora. Tras filtrarse la disolución de extracto obtenida a través de un filtro de 100 de malla, se realizó el secado por pulverización y se usó un producto obtenido como 50 g de un polvo de extracto.

Como ácido elágico, se usó ácido elágico dihidratado fabricado por Wako Pure Chemical Industries, Ltd.

Como arbutina, se usó β -arbutina fabricada por Sigma-Aldrich.

Tras finalizar el cultivo, se lavaron las células con PBS (tampón fosfato) y entonces se añadió a las mismas una

disolución acuosa de hidróxido de sodio 1 mol/l que contenía dimetilsulfóxido al 10% (v/v). Tras someterse todo a un tratamiento ultrasónico a 50°C durante 30 minutos, se midió la absorbancia de la disolución a una longitud de onda de 400 nm y se tomó como la cantidad de melanina en un pocillo. Además, al mismo tiempo, se llevó a cabo la medición del número de células vivas mediante ensayo de MTT en otra placa de cultivo (las condiciones de prueba son según el ejemplo 2). Finalmente, se normalizó la cantidad de melanina en el pocillo por el valor de medición mediante el ensayo de MTT y se tomó la cantidad resultante como cantidad de melanina por célula unitaria.

Se determinó la tasa de inhibición de la producción de melanina (%) en el caso en el que se añadió la muestra de evaluación, tomándose como 100 la cantidad de melanina en el caso en el que no se añadió muestra de evaluación.

[Resultados]

Los resultados se muestran en la tabla 1. Además, en la figura 1 se muestran curvas de inhibición de la producción de melanina de salacinol y los controles comparativos. A partir de las curvas de inhibición de la producción de melanina, se leyeron valores de CI50 a los que se inhibe el 50% de la producción de melanina. Los resultados se muestran en la tabla 2.

Tabla 1 Prueba de inhibición de la producción de melanina

Salacinol (µg/ml)	Producción de melanina	Ácido elágico (µg/ml)	Producción de melanina	Arbutina (µg/ml)	Producción de melanina
0	100,0%	0	100,0%	0	100,0%
1,998	71%	0,67646	79%	16,338	69,5%
6,66	50%	2,02938	33%	54,46	49,9%
19,98	34%			163,38	28,4%
66,6	29%			544,6	20,7%
Ácido kójico (µg/ml)	Producción de melanina	4-Metoxisalicilato de potasio (µg/ml)	Producción de melanina	Extracto en bruto de <i>Salacia</i> (µg/ml)	Producción de melanina
0	100,0%	0	100,0%	0	100,0%
8,5266	83,6%	123,69	46,0%	100	90%
28,422	77,2%	412,3	20,1%	300	59%
85,266	72,8%				
284,22	43,4%				

Tabla 2

	µg/ml
Salacinol	6,3
Ácido elágico	1,5
Arbutina	54
Ácido kójico	240
4-Metoxisalicilato de potasio	80

El salacinol de la invención mostró un efecto inhibitor de la producción de melanina dependiente de la concentración y notable. Además, se mostró que el efecto es notablemente fuerte incluso en comparación con arbutina, ácido kójico y 4-metoxisalicilato de potasio que son principios activos de blanqueamiento existentes.

Aunque el extracto en bruto de *Salacia* también mostró un efecto de inhibición de la producción de melanina, la citotoxicidad fue grave cuando la concentración superaba 300 µg/ml tal como se muestra en el ejemplo 2, de manera que el cálculo de la CI50 era imposible.

Ejemplo 2

[Prueba de citotoxicidad]

Se sembraron células de melanoma B16 en medio MEM que contenía FBS al 10% (v/v) para que fueran $1,25 \times 10^5$ células/pocillo en una placa de cultivo de 24 pocillos y se cultivaron durante 24 horas de manera habitual.

5 Tras el cultivo previo, se reemplazó el medio por un medio de prueba y se llevó a cabo el cultivo durante 72 horas. Como medio de prueba, se empleó un medio obtenido añadiendo 0,25 mmol/l de teofilina, el 0,5% (v/v) de dimetilsulfóxido al medio para el cultivo previo, y cada una de diversas muestras de evaluación para que tuviesen la concentración descrita en la tabla.

10 Tras finalizar el cultivo, se lavaron las células con PBS y entonces se añadió una disolución de MTT 0,5 mg/ml en una cantidad de 500 μ l/pocillo y se mantuvo la temperatura durante 2 horas en una incubadora. Tras esto, se añadieron 1,5 ml de dimetilsulfóxido a las mismas y entonces se midió la absorbancia a una longitud de onda de 570 nm y se tomó como índice del número de células vivas.

15 Se determinó la tasa de reactivación celular (%) en el caso en el que se añadió la muestra de evaluación, tomándose como 100 el número de células vivas en el caso en el que no se añadió muestra de evaluación.

[Resultados]

20 Los resultados se muestran en la tabla 3. Además, se muestran curvas de reactivación celular de salacinol y los controles comparativos en la figura 2.

Tabla 3. Prueba de inhibición de la producción de melanina

Salacinol (μ g/ml)	Tasa de supervivencia celular	Ácido elálgico (μ g/ml)	Tasa de supervivencia celular	Extracto en bruto de <i>Salacia</i> (μ g/ml)	Tasa de supervivencia celular
0	100,0%	0	100,0%	0	100,0%
1,998	89,6%	0,67646	117,4%	100	103%
6,66	85,0%	2,02938	107,3%	300	80%
19,98	87,9%	6,7646	48,1%	600	4%
66,6	78,8%	20,2938	25,8%		

25 El salacinol de la invención no presentó casi citotoxicidad ni siquiera en la región de concentración (hasta 66,6 μ g/ml) a la que se inhibió hasta el 29% de la producción de melanina. Por otro lado, el ácido elálgico que muestra un efecto de inhibición de la producción de melanina más fuerte que el de salacinol presentó citotoxicidad en una región de concentración alta (hasta 20,3 μ g/ml). El extracto en bruto *Salacia* también presentó citotoxicidad dependiente de la concentración.

30 Además, se observó citotoxicidad en una región de concentración alta también en arbutina, ácido kójico, 4-metoxisalicilato de potasio que se usaron como controles comparativos en el ejemplo 1 (no se muestran datos).

35 A partir de estos hechos, se mostró que el salacinol es un agente de blanqueamiento que presenta un efecto inhibidor de la producción de melanina excelente y una seguridad elevada.

Aplicabilidad industrial

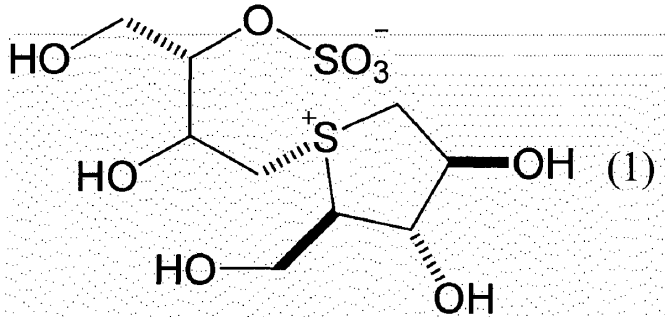
40 Según la presente invención, se proporciona un inhibidor de la producción de melanina que presenta un efecto inhibidor de la producción de melanina excelente y que tiene una estabilidad y seguridad elevadas, específicamente, un producto cosmético de blanqueamiento que inhibe cambio de color de la piel inducido por rayos ultravioleta o similares.

45 Aunque la invención se ha descrito en detalle y con referencia a realizaciones específicas de la misma, resultará evidente para el experto en la técnica que pueden realizarse diversos cambios y modificaciones en la misma sin apartarse del alcance definido por las reivindicaciones.

REIVINDICACIONES

1. Compuesto representado por la siguiente fórmula estructural (1) para su uso como inhibidor de la producción de melanina

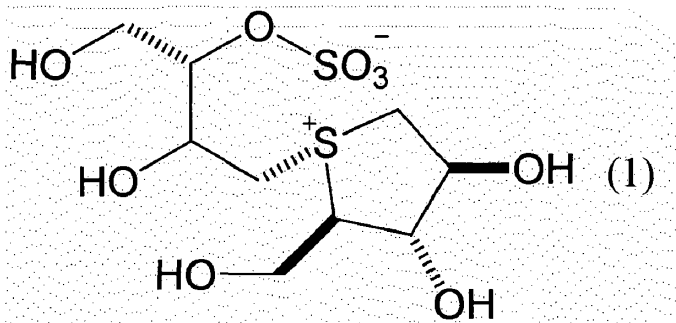
5



2. Producto cosmético de blanqueamiento que comprende el compuesto de fórmula estructural (1) según la reivindicación 1.

10

3. Composición que comprende un compuesto representado por la siguiente fórmula estructural (1) para su uso en la inhibición de la producción de melanina



15

4. Composición según la reivindicación 3, en la que el compuesto representado por la fórmula estructural (1) es un compuesto sintetizado o compuesto aislado y purificado.

FIG. 1

CURVAS DE INHIBICIÓN DE LA PRODUCCIÓN DE MELANINA

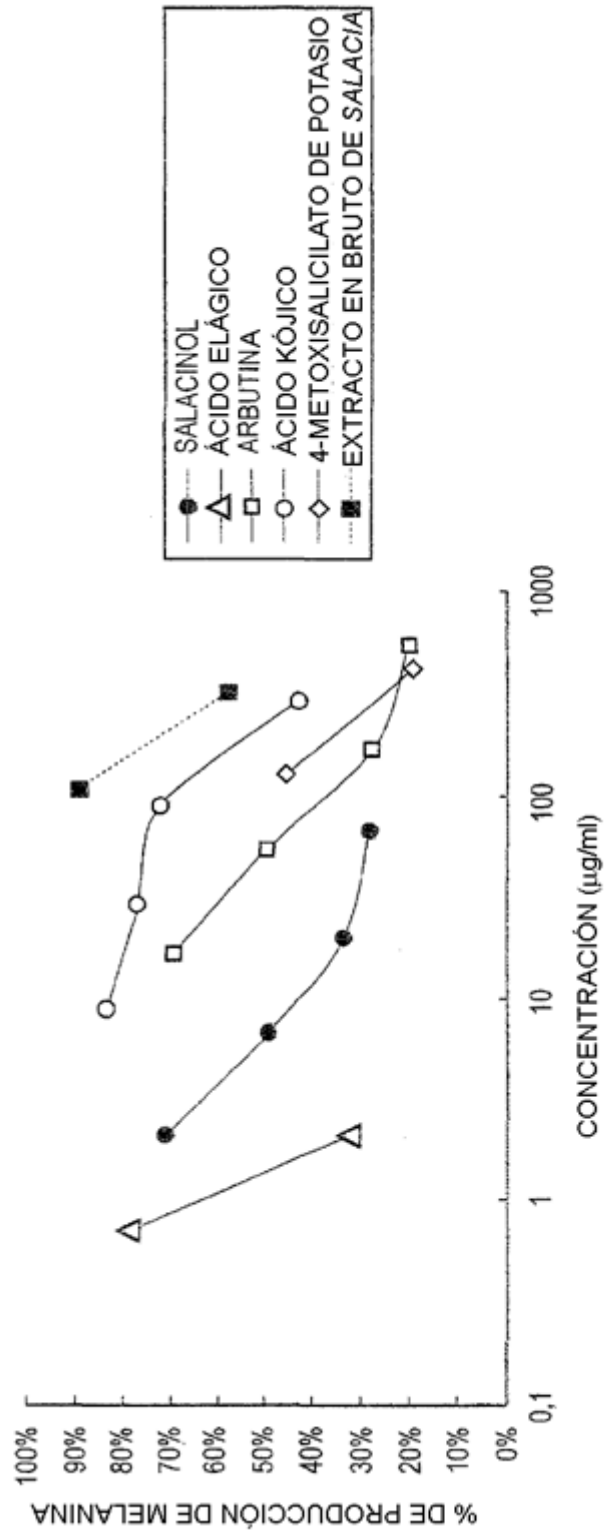


FIG. 2

