

19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 536 448**

51 Int. Cl.:

C07K 1/00	(2006.01) A61K 8/66	(2006.01)
C09B 29/00	(2006.01)	
C09B 67/02	(2006.01)	
C12N 1/20	(2006.01)	
C12N 9/00	(2006.01)	
C12N 9/08	(2006.01)	
C12P 21/04	(2006.01)	
C12Q 1/68	(2006.01)	
A61Q 19/02	(2006.01)	
A61Q 5/08	(2006.01)	

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **11.12.2003** **E 10176875 (2)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **11.02.2015** **EP 2338896**

54 Título: **Uso de lignina peroxidasa en el aclaramiento de piel y pelo**

30 Prioridad:

12.12.2002 US 432678 P

45 Fecha de publicación y mención en BOPI de la traducción de la patente:
25.05.2015

73 Titular/es:

R.B.T. (RAKUTO BIO TECHNOLOGIES) LTD.
(100.0%)
5 HaCarmel Street, P.O. Box 528
20 692 Yokneam Ilit, IL

72 Inventor/es:

BELINKY, PAULA;
LASSER, HAIM y
DOSORETZ, CARLOS

74 Agente/Representante:

ISERN JARA, Jorge

ES 2 536 448 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

Uso de lignina peroxidasa en el aclaramiento de piel y pelo

5 CAMPO Y ANTECEDENTES DE LA INVENCION

La presente invención se refiere a métodos de producir lignina peroxidasa y su uso en el aclaramiento de piel y pelo.

Melanina

10 El color de la piel y el pelo humano está gobernado por la cantidad, calidad y distribución de melanina, un pigmento que también está presente en plantas y microorganismos.

15 La síntesis de la melanina se inicia a partir del precursor L-tirosina que se transforma en un segundo precursor, dopaquinona, mediante la acción de tirosinasa. En la biosíntesis de la melanina de mamífero este producto intermedio puede polimerizarse mediante dos rutas importantes (Figura 1). La adición nucleófila intramolecular del grupo amino da lugar al derivado de indol leucodopacromo que, tras la polimerización, da el pigmento de marrón oscuro a negro eumelanina. En presencia de compuestos de tiol se forman derivados de tioéster de dopa; la reacción con cisteína da cisteinildopa, que tras la posterior oxidación y polimerización da el pigmento de amarillo a marrón rojizo feomelanina. Por consiguiente, la eumelanina está compuesta principalmente por unidades de 5,6-dihidroxiindol (DHI) y ácido 5,6-dihidroxiindol-2-carboxílico (DHICA), mientras que la feomelanina contiene principalmente unidades de benzotiazina (Alaluf *et al.*, 2001). La disponibilidad y relación mutua de estos dos pigmentos influye en la composición química del pigmento polimérico.

25 La síntesis de melanina tiene lugar en gránulos, que se denominan melanosomas (Cooksey *et al.*, 1997) que están presentes en células de melanocitos presentes en la capa basal epidérmica; la síntesis de melanina en estas células se induce por luz ultravioleta (UV). Tras la síntesis, la melanina migra a células epidérmicas y se dispersa en su interior, en las que la melanina se decolora tras el metabolismo dérmico y a continuación se descama en forma de suciedad en el momento de la renovación de la piel. La melanina tiene una importancia clínica, ya que protege la piel de efectos adversos producidos por la luz UV. Sin embargo, altos niveles de melanina pueden producir oscurecimiento de la piel y el pelo no deseados, mientras que la distribución heterogénea de la misma puede conducir a cloasma y pecas que pueden ser estéticamente desagradables.

Productos de aclaramiento

35 Los productos de aclaramiento de la piel se han vuelto cada vez más populares en los últimos años. El principal fin de los productos de aclaramiento de la piel es aclarar o blanquear la piel o tratar trastornos de la pigmentación tales como cloasma, pecas, marcas del embarazo y manchas de la edad. Están actualmente disponibles varios tipos de productos de aclaramiento de la piel.

40 Los productos basados en la degeneración y muerte de células de pigmentos normalmente incluyen productos químicos agresivos, tales como hidroquinona, 4-isopropilcatecol y monobencil éter de hidroquinona, que promueven el blanqueamiento de la piel y el aclaramiento de la piel o atenúan la pigmentación de la piel. Tales productos normalmente son ineficaces y pueden ser peligrosos para la piel, ya que una aplicación externa continua de estos productos puede conducir a leucoderma permanente y efectos secundarios tales como discromatosis y exantema.

Otros productos de aclaramiento se basan en la inhibición de la tirosinasa, la enzima que transforma el precursor L-tirosina en un segundo precursor, dopaquinona. Este grupo de productos incluye arbutina, un compuesto de glucosa hidroquinona que es capaz de inhibir la tirosinasa quelando iones cobre, suprimiendo así la tautomerización de dopacromo a DHICA.

50 Melanostat es otro producto de aclaramiento que actúa mediante la tirosinasa. Melanostat es un péptido sintético que funciona desactivando la melanogénesis en melanocitos.

55 Varios compuestos antioxidantes que pueden inhibir la producción de melanina también se utilizan en productos de aclaramiento. Como la síntesis de melanina implica una reacción de oxidación, el bloquear la oxidación en diversos puntos de la tirosina/DOPA a la melanina inhibe por último lugar la síntesis de melanina.

60 Un antioxidante que se utiliza para bloquear la síntesis de la melanina es L-ascórbico (vitamina C), que actúa de agente reductor sobre los productos intermedios de melanina y bloquea las reacciones oxidativas; otros antioxidantes utilizados por productos de aclaramiento incluyen bioflavonoides que normalmente se extraen de mora o regaliz.

65 Los productos de aclaramiento del pelo actúan sobre la melanina dentro de la corteza del pelo. Hay varios productos químicos que pueden aclarar el pelo, entre éstos están incluidos ácido clorhídrico, hipoclorito de sodio y peróxido de hidrógeno.

El producto químico más comúnmente usado para el aclaramiento del pelo es peróxido de hidrógeno. Para mantener la eficacia deseada, las disoluciones de peróxido de hidrógeno deben estabilizarse usando compuestos tales como acetanilida, ácidos diluidos, sílice coloidal, p-hidroxibenzoatos, sulfato de oxiquinolina, fenacetina y compuestos de estaño (estannato de sodio, hidróxido estánico, octoato estannoso). Antes de aclararse el pelo, se añade amoníaco a la disolución de peróxido de hidrógeno para potenciar la penetración del peróxido de hidrógeno a través de la cutícula, la capa externa del pelo, y para así acelerar la reacción de oxidación.

El documento JP 2002 012535 A (LION CORP), 15 de enero 2002 (15-02-2002), desvela un método de aclaramiento de una región de la piel o pelo de un sujeto, comprendiendo el método aplicar peroxidasa.

Mientras que se reduce la presente invención a la práctica, los presentes inventores no han cubierto que la isoenzima lignina peroxidasa H1 puede oxidar melanina *in vitro* y puede adicionalmente aclarar la piel y pelo *in vivo*.

Así, la presente invención proporciona composiciones cosméticas y métodos que son altamente adecuadas para el aclaramiento de la piel y el pelo.

RESUMEN DE LA INVENCION

Según un aspecto de la presente invención se proporciona una composición cosmética según la reivindicación 1 para el aclaramiento de una región de la piel o pelo de un sujeto que comprende al menos un tipo de una enzima modificadora de lignina y un vehículo cosméticamente aceptable.

Según otro aspecto de la presente invención se proporciona un kit para el aclaramiento de una región de la piel o pelo según la reivindicación 3 que comprende un primer recipiente que incluye una enzima modificadora de lignina y un segundo recipiente que incluye un aceptor de electrones.

Según todavía otro aspecto de la presente invención se proporciona un artículo de fabricación según la reivindicación 2 que comprende material de embalaje y una composición cosmética identificada para el aclaramiento de una región de la piel o pelo de un sujeto que está contenida dentro del material de embalaje, incluyendo la composición cosmética, como principio activo, una enzima modificadora de lignina y un vehículo cosméticamente aceptable.

Según características adicionales en realizaciones preferidas de la invención descritas más adelante, el método se efectúa mediante una administración tópica de una preparación que incluye al menos un tipo de enzima modificadora de lignina.

Según todavía características adicionales en las realizaciones preferidas descritas, el método se efectúa mediante administración intradérmica o subcutánea de una preparación que incluye al menos un tipo de enzima modificadora de lignina.

La enzima modificadora de lignina se incluye en una composición formulada para aplicación a la piel o pelo.

La enzima modificadora de lignina es lignina peroxidasa.

Según todavía características adicionales en las realizaciones preferidas descritas, la lignina peroxidasa es la isoenzima H1 o una forma modificada de la isoenzima H2.

Según todavía características adicionales en las realizaciones preferidas descritas, la composición cosmética comprende además un aceptor de electrones.

Según todavía características adicionales en las realizaciones preferidas descritas, el aceptor de electrones es peróxido de hidrógeno.

Según todavía características adicionales en las realizaciones preferidas descritas, la composición cosmética comprende además alcohol veratrílico.

Según todavía características adicionales en las realizaciones preferidas descritas, la composición comprende al menos un tipo de un penetrante epidérmico.

Según todavía características adicionales en las realizaciones preferidas descritas, la composición comprende al menos un tipo de un penetrante del pelo.

Según todavía características adicionales en las realizaciones preferidas descritas, el método se efectúa durante un periodo de tiempo seleccionado según un nivel de aclaramiento deseado.

Según todavía características adicionales en las realizaciones preferidas descritas, el vehículo cosméticamente aceptable incluye transcutol y/o butilenglicol.

5 Según todavía características adicionales en las realizaciones preferidas descritas, el vehículo cosméticamente aceptable incluye alcanolaminas.

La lignina peroxidasa en la composición cosmética se proporciona a una concentración de al menos 1 U/g.

10 Según todavía características adicionales en las realizaciones preferidas descritas, el peróxido de hidrógeno en la composición cosmética se proporciona a una concentración de al menos el 0,005 %.

Según todavía características adicionales en las realizaciones preferidas descritas, el alcohol veratrílico en la composición cosmética se proporciona a una concentración de al menos el 0,05 %.

15 Según todavía características adicionales en las realizaciones preferidas descritas, el primer recipiente del kit para el aclaramiento de una región de la piel o pelo comprende además alcohol veratrílico.

20 Según todavía características adicionales en las realizaciones preferidas descritas, el primer y/o segundo recipiente(s) del kit para el aclaramiento de una región de la piel o pelo incluyen adicionalmente un vehículo cosméticamente aceptable adecuado para penetración epidérmica.

25 Según todavía características adicionales en las realizaciones preferidas descritas, el primer y/o segundo recipiente(s) del kit para el aclaramiento de una región de la piel o pelo incluyen adicionalmente un vehículo cosméticamente aceptable adecuado para la penetración del pelo.

La presente invención trata satisfactoriamente los inconvenientes de las configuraciones presentemente conocidas proporcionando métodos y composiciones eficaces para el aclaramiento de una región de la piel o pelo de un sujeto.

30 A menos que se defina de otro modo, todos los términos técnicos y científicos usados en el presente documento tienen el mismo significado que comúnmente es entendido por un experto habitual en la materia a la que pertenece la presente invención. Aunque métodos y materiales similares o equivalentes a aquellos descritos en el presente documento pueden usarse en la práctica o prueba de la presente invención, métodos y materiales adecuados se describen más adelante. En caso de conflicto, la memoria descriptiva de patente, que incluye definiciones, controlará. Además, los materiales, métodos y ejemplos son ilustrativos solo y no pretenden ser limitantes.

35 BREVE DESCRIPCIÓN DE LOS DIBUJOS

La invención se describe en el presente documento, a modo de ejemplo solo, con referencia a los dibujos adjuntos. Con referencia específica ahora a los dibujos en detalle, se enfatiza que los elementos mostrados son a modo de ejemplo y para los fines de discusión ilustrativa de las realizaciones preferidas de la presente invención solo, y se presentan en la causa de proporcionar lo que se cree que es la descripción más útil y fácilmente entendida de los principios y aspectos conceptuales de la invención. A este respecto, no se hace ningún intento por mostrar detalles estructurales de la invención en más detalle de lo que es necesario para un entendimiento fundamental de la invención, haciendo evidente la descripción tomada con los dibujos para aquellos expertos en la materia cómo las diversas formas de la invención pueden integrarse en la práctica.

En los dibujos:

50 La FIG. 1 es una ilustración esquemática del estado de la técnica de la biosíntesis de melanina de mamífero adoptada de Alaluf *et al.*, 2001.

La FIG. 2 ilustra el reactor de tanque con agitación (STR) para la producción de lignina peroxidasa por *Phanerochaete chrysosporium* inmovilizada sobre espuma de poliuretano.

55 La FIG. 3 ilustra la actividad de LIP en un cultivo en fermentador de *P. chrysosporium* en función de la edad del cultivo. *P. chrysosporium* se cultivó en un fermentador STR como se describe en el Ejemplo 1 de la sección de ejemplos y se ensayó la actividad de LIP en el fluido extracelular siguiendo la oxidación de alcohol veratrílico a veratrilaldehído como se describe en los ejemplos. Las barras de error representan desviaciones estándar de 3 experimentos por duplicado.

60 La FIG. 4 ilustra la oxidación de melanina, a una concentración inicial de 70,5 µg/ml, por LIP (0,48 µM) en función de concentraciones crecientes de peróxido de hidrógeno en presencia de alcohol veratrílico 1,5 mM en tampón tartrato 50 mM, a pH 3,5. La oxidación de melanina se determinó midiendo su absorbancia a 460 nm, al principio de la reacción enzimática y después de 160 segundos, y se calcularon los porcentajes de melanina oxidada. Las barras de error representan desviaciones estándar de 3 experimentos por duplicado.

65 La FIG. 5 ilustra el efecto de concentraciones crecientes de peróxido de hidrógeno sobre la oxidación de melanina por LIP. El grado de oxidación de melanina se visualiza por la disminución en la intensidad de color en comparación con la reacción enzimática sin la inclusión de peróxido de hidrógeno (0 µM). Los números debajo de la imagen indican concentraciones de H₂O₂ expresada en µM.

La FIG. 6 ilustra el grado de oxidación de diferentes concentraciones de melanina por LIP (0,48 μ M) en tampón tartrato 50 mM a pH 3,5 en presencia de alcohol veratrílico (1,5 mM) y peróxido de hidrógeno (600 μ M). Las barras de error representan desviaciones estándar de 3 experimentos por duplicado.

La FIG. 7 ilustra el grado de oxidación de melanina en función de concentraciones de LIP. La oxidación de melanina (70 μ g/ml) se realizó por concentraciones crecientes de LIP en presencia de alcohol veratrílico (1,5 mM) y peróxido de hidrógeno (700 μ M) en tampón tartrato 50 mM a pH 3,5. Las barras de error representan desviaciones estándar de 3 experimentos por duplicado.

Las FIG. 8a-b ilustran la visualización de la oxidación de melanina por LIP cuando se usa en una formulación en crema. La decoloración de melanina se observa después de la adición de la crema activadora a la crema de LIP (Figura 8b), pero no en presencia de la crema de LIP sola (Figura 8a).

Las FIG. 9a-b ilustran el efecto de la crema de LIP sobre el blanqueamiento de la piel. Se muestra una fotografía de una mano de una mujer tomada una semana tras la aplicación de LIP (dos veces al día) en una formulación en crema. El área tratada con LIP (Figura 9a, rodeado en negro) está mucho más clara que el resto de la piel en la mano (Figura 9b).

La FIG. 10 ilustra el efecto de LIP sobre la decoloración del pelo *in vivo*. Se empapó el pelo de una mujer durante 1 h en tampón carbonato 50 mM a pH 11,5. El pelo se preincubó durante 10 segundos con 25 U de LIP y se sumergió durante 1 h en tampón tartrato a pH 3,5 con alcohol veratrílico (1,5 mM) y peróxido de hidrógeno (8,8 mM). Se observó un efecto de aclaramiento significativo en el pelo tratado con LIP (Figura 10, tubo derecho) en comparación con el pelo tratado con la misma disolución sin LIP (Figura 10, tubo izquierdo).

Las FIG. 11a-b son fotografías en color del antebrazo derecho del sujeto del estudio nº 1 que ilustra el efecto de la crema de aclaramiento de LIP sobre la pigmentación de la piel. Figura 11a - una fotografía tomada en el día 0; Figura 11b - una fotografía tomada en el día 21.

Las FIG. 12a-c ilustran el efecto de cremas de LIP o hidroquinona sobre el blanqueamiento de la piel en el sujeto del estudio nº 1. Las cremas de LIP o hidroquinona se aplicaron en las partes superiores de los antebrazos derecho e izquierdo mientras que las partes inferiores siguieron sin tratar. El grado de pigmentación de la piel se midió en ambos antebrazos en intervalos de 7 días usando el espectrómetro Derma. Figura 12a - aplicación de crema de LIP; Figura 12b - aplicación de crema de hidroquinona; columnas azules = parte superior del antebrazo derecho tratado con la crema de LIP; columnas azules claras = parte inferior sin tratar del antebrazo derecho; columnas rosas = parte superior del antebrazo izquierdo tratado con hidroquinona; columnas blancas = parte inferior sin tratar del antebrazo izquierdo; la Figura 12c es un gráfico de líneas que compara la disminución en la pigmentación de la piel en los antebrazos superiores tras 21 días de tratamiento usando la crema de LIP (Figura 12c, línea azul) o la crema de hidroquinona (Figura 12c, línea rosa). Obsérvese la brusca disminución en la pigmentación de la piel tras 21 días de tratamiento usando la crema de LIP en comparación con la moderada disminución usando la crema de hidroquinona.

Las FIG. 13a-b son fotografías en color del antebrazo derecho del sujeto del estudio nº 10 que ilustran el efecto de la crema de blanqueamiento de LIP sobre la pigmentación de la piel. Figura 13a - una fotografía tomada en el día 0; Figura 13b - una fotografía tomada en el día 21.

Las FIG. 14a-c ilustran el efecto de las cremas de LIP o de hidroquinona sobre el blanqueamiento de la piel en el sujeto del estudio nº 10. Las cremas de LIP o de hidroquinona se aplicaron en las partes superiores de los antebrazos derecho e izquierdo mientras que las partes inferiores siguieron sin tratar. El grado de pigmentación de la piel se midió en ambos antebrazos en intervalos de 7 días usando el espectrómetro Derma. Figura 14a - aplicación de crema de LIP; Figura 14b - aplicación de crema de hidroquinona; columnas azules = parte superior del antebrazo derecho tratado con la crema de LIP; columnas azules claras = parte inferior sin tratar del antebrazo derecho; columnas rosas = parte superior del antebrazo izquierdo tratado con hidroquinona; columnas blancas = parte inferior sin tratar del antebrazo izquierdo; la Figura 14c es un gráfico de líneas que compara la disminución en la pigmentación de la piel en los antebrazos superiores tras 21 días de tratamiento usando la crema de LIP (Figura 14c, línea azul) o la crema de hidroquinona (Figura 14c, línea rosa). Obsérvese la brusca disminución en la pigmentación de la piel tras 21 días de tratamiento usando la crema de LIP en comparación con la moderada disminución usando la crema de hidroquinona.

Las FIG. 15a-b son gráficos de líneas que ilustran el efecto promedio de las cremas de LIP y de hidroquinona sobre el blanqueamiento de la piel en los 12 sujetos del estudio. Figura 15a - las puntuaciones de pigmentación promedio; Figura 15b - la disminución promedio en la pigmentación como una fracción de la puntuación de pigmentación inicial.

DESCRIPCIÓN DE LAS REALIZACIONES PREFERIDAS

La presente invención es de composiciones cosméticas que pueden usarse para el aclaramiento de una región de la piel o pelo de un sujeto.

Particularmente, los métodos desvelados en el presente documento pueden usarse para tratar taces desiguales que resultan de afecciones médicas relacionadas con la hiperpigmentación tales como melasma, cloasma, manchas de la edad, pecas, ocronosis y lentigo.

Los principios y operación de la presente invención pueden entenderse mejor con referencia a los dibujos y descripciones adjuntos.

Antes de explicar al menos una realización de la invención en detalle, debe entenderse que la invención no está limitada en su aplicación a los detalles expuestos en la siguiente descripción o ejemplificados por los ejemplos. La invención es capaz de otras realizaciones o de ponerse en práctica o llevarse a cabo de diversas formas. Por tanto, debe entenderse que la fraseología y terminología empleada en el presente documento es con el fin de descripción y no debe considerarse limitante.

El grado de pigmentación de la piel es una fuente de preocupación entre la población general. Algunas personas padecen manchas de la edad y marcas del embarazo y desean que tales manchas pigmentadas sean menos pronunciadas. Otras personas tienen pecas, cloasma, melasma, ocronosis y lentigo que se tratan normalmente con productos de aclaramiento de la piel que aclaran y suavizan la pigmentación de la piel. Sin embargo, los actuales productos de aclaramiento de la piel son tanto productos químicos agresivos tales como hidroquinona que puede conducir a leucoderma permanente y efectos secundarios tales como discromatosis y exantema, como no son suficientemente eficaces en el aclaramiento de la piel. Entre ellos están los productos basados en la inhibición de la tirosinasa, la enzima que transforma el precursor L-tirosina en un segundo precursor, dopaquinona, y, por tanto, inhiben la biosíntesis de melanina. Otros productos se diseñan para bloquear las reacciones de oxidación en diversos puntos de tirosina/DOPA a melanina y por último lugar inhiben la síntesis de melanina. El último grupo de productos incluye antioxidantes tales como L-ascórbico (vitamina C) y bioflavonoides.

Los productos de aclaramiento del pelo utilizan altas concentraciones de peróxido de hidrógeno conjuntamente con amoníaco. Estos productos podrían ser una fuente de molestia para el sujeto tratado.

Como se ha ilustrado claramente en la sección de ejemplos que sigue, los presentes inventores han descubierto que la lignina peroxidasa, y en particular su isoforma H1, pueden oxidar eficazmente melanina y así pueden utilizarse para aclarar la piel o pelo de un sujeto.

Aunque la patente de EE.UU. nº 5.578.296 identificó una potencia de descomposición de melanina en el hongo Basidiomycetes y sugirió el uso de este hongo para tratar cloasma y pecas, hasta la fecha no se ha descubierto la enzima específica responsable de la descomposición de melanina en el hongo.

El método desvelado se efectúa aplicando a la región de la piel o pelo del sujeto al menos un tipo de una enzima modificadora de lignina de un modo adecuado para oxidar un pigmento (por ejemplo, melanina) contenido dentro de células de la región de la piel o pelo.

Como se usa en el presente documento, la frase "aclaramiento de una región de la piel o pelo" se refiere a reducir el tono o color de la piel o pelo reduciendo la calidad pigmentiva o concentración de pigmento de melanina contenido en ella.

Como se usa en el presente documento, el término "sujeto" se refiere a mamíferos, normalmente seres humanos, y preferentemente aquellos que tienen exceso de pigmentación de la piel o pelo, o imperfecciones de la piel tales como pecas, etc.

La enzima modificadora de lignina utilizada por la presente invención es lignina peroxidasa, que desempeña una función importante en la degradación de lignina. La secuencia de amino del sitio activo de esta peroxidasa modificadora de lignina y el mecanismo por el que oxida sustratos es similar al de la peroxidasa de rábano picante (HRP) y peroxidasa de soja (SBP). Las peroxidases modificadoras de la lignina pueden catalizar la oxidación de sustratos con alto potencial redox. Esta capacidad única está de acuerdo con un sitio activo hemo de baja densidad electrónica, que se indica por alto potencial redox [Cai y Tien (1993). J Biotechnol 30: 79-90].

Aunque cualquier isoforma de lignina peroxidasa conocida en la técnica puede utilizarse por la presente invención (Rothschild et al., 1997, Appl. Environ. Microbiol. 63: 857-861), la presente invención utiliza preferentemente la isoforma H1, ya que como se ilustra en la sección de ejemplos que sigue, esta isoforma presentó actividades de oxidación de melanina tanto *in vitro* como *in vivo*.

Pueden usarse varios enfoques para preparar la enzima modificadora de lignina utilizada por la presente invención.

Por ejemplo, la isoenzima H1 de lignina peroxidasa puede prepararse a partir del hongo *Phanerochaete chrysosporium*. Pueden producirse altos niveles de actividad enzimática de lignina peroxidasa a partir del hongo anterior cuando se cultiva en un fermentador de reactor de tanque con agitación (STR) mientras que está inmovilizado sobre espuma de poliuretano o en suspensión (Dosoretz et al., 1993, Appl Environ Microbiol. 59: 1919-26).

Según realizaciones preferidas de la presente invención, el fermentador está conectado a un sistema de refrigeración para mantener una temperatura de cultivo de 37 °C y se agita a la velocidad de 50-300 rpm, más preferentemente 100-200 rpm, lo más preferentemente a 160 rpm. Con el fin de aumentar el rendimiento de la actividad de lignina peroxidasa, el fermentador se airea a una tasa de aireación de 0,1-1 litros de aire por litro de

medio de cultivo por minutos. Según configuraciones presentemente preferidas, el fermentador se airea a una tasa de aireación de 0,2 litros de aire por litro de medio de cultivo por minuto.

Como se describe bajo Materiales y Métodos experimentales de la sección de ejemplos que sigue, *Phanerochaete chrysosporium* se cultiva bajo condiciones de cultivo que carecen de iones manganeso y que contienen glicerol como fuente de carbono. Preferentemente, el glicerol de la presente invención se proporciona a un intervalo de concentración de 3-20 gramos por litro. Según configuraciones presentemente preferidas, el glicerol se proporciona a una concentración de 6 gramos por litro.

Durante el proceso de purificación de la isoenzima H1 de lignina peroxidasa del hongo anterior, la actividad enzimática de la proteína purificada se ha probado adicionalmente por un cambio en la absorbancia a 310 nm que se produce debido a la oxidación de alcohol veratrílico a veratrilaldehído.

Como la isoenzima H1 de lignina peroxidasa puede resultar de una desfosforilación postraduccional de la isoenzima H2 (Kuan y Tien, 1989), la lignina peroxidasa usada por la presente invención puede prepararse desfosforilando la isoenzima H2 de lignina peroxidasa.

Las enzimas modificadoras de lignina usadas por la presente invención también pueden extraerse de células bacterianas modificadas para expresar la enzima modificadora de lignina como se ha desvelado en la patente de EE.UU. 5.200.338. Por ejemplo, una célula bacteriana, tal como, *E. coli*, puede transformarse con un vector de expresión que incluye la secuencia codificante de LIP (SEC ID N°: 1) puesta bajo el control regulador de un promotor constitutivo fuerte (por ejemplo, SP6). Tras la expresión, las células bacterianas pueden lisarse y el LIP puede recogerse usando técnicas cromatográficas (véase, Billman-Jacobe, 1996, Curr. Opin. Biotechnol. 7: 500-4; Harris y Emtage, 1986, Microbiol. Sci. 3: 28-31, para más detalles).

Las enzimas modificadoras de lignina usadas por la presente invención también pueden extraerse de líneas celulares de mamífero tales como células HeLa. En este caso, la secuencia codificante de LIP está puesta bajo un fuerte promotor de mamífero (por ejemplo, CMV) en un vector de expresión adecuado (por ejemplo, pcDNA3.1, Invitrogen Life Technologies, Frederick, MD, EE.UU.). Tras la transfección de células HeLa con el vector de expresión, el producto de expresión de LIP puede extraerse de las células, o medio (por ejemplo, modificando la secuencia de LIP para incluir una señal de secreción) por técnicas de purificación y cromatografía convencionales (véase Cunha y Aires-Barros, 2002. Mol. Biotechnol. 20: 29-40 para más detalles).

Aunque la enzima modificadora de lignina puede aplicarse a la piel o pelo sin necesitar co-aplicación de compuestos adicionales, la capacidad de aclaramiento de la enzima modificadora de lignina LIP se potencia cuando se aplica en presencia de un aceptor de electrones (es decir, una molécula que puede oxidar un sustrato), que sirve de activador oxidante, y/o en presencia de compuestos fenólicos, tales como alcohol veratrílico (Harvey et al., 1992, Biochem Soc Trans 20: 345-9), y veratrol que sirven de mediadores oxidantes (Ward et al., Enzyme and Microbial Technology (2002), 30: 490-498).

Así, la enzima modificadora de lignina se aplica con aplicación previa, concomitante o posterior de un activador oxidante, tal como peróxido de hidrógeno y un mediador oxidante, tal como alcohol veratrílico.

La enzima modificadora de lignina puede aplicarse a la piel o pelo en sí misma, sin embargo, con el fin de aumentar la eficiencia de aclaramiento, la enzima modificadora de lignina se incluye preferentemente en una composición cosmética que se formula para uso específico, tal como, por ejemplo, aclaramiento de la piel general, aclaramiento de pecas o aclaramiento del pelo. Estas composiciones cosméticas pueden incluir penetrantes epidérmicos tales como butilenglicol y transcutool, y penetrantes del pelo tales como alcanolaminas.

Como se usa en el presente documento, una "composición cosmética" se refiere a una preparación que incluye los principios activos descritos anteriormente en este documento (por ejemplo, LIP) y componentes químicos adicionales tales como vehículos y excipientes fisiológicamente adecuados, un activador oxidante y/o un mediador oxidante. El fin de una composición cosmética es facilitar la administración del principio activo a un organismo.

A continuación, el término "vehículo adecuado" usado se refiere a un vehículo o un diluyente que no produce irritación significativa a un organismo y no anula la actividad biológica y propiedades de la enzima modificadora de lignina.

En el presente documento, el término "excipiente" se refiere a una sustancia inerte añadida a una composición cosmética para facilitar adicionalmente la administración de un principio activo. Ejemplos, sin limitación, de excipientes incluyen carbonato cálcico, fosfato de calcio, diversos azúcares y tipos de almidón, derivados de celulosa, gelatina, aceites vegetales y polietilenglicoles.

La composición cosmética puede aplicarse de una manera local, por ejemplo, mediante la administración de la composición cosmética directamente a una región de tejido de un paciente. Vías de administración adecuadas pueden incluir, por ejemplo, inyecciones tópicas, subcutáneas e intradérmicas.

Las composiciones cosméticas de la presente invención pueden fabricarse por procesos muy conocidos en la técnica, por ejemplo, por medio de procesos convencionales de mezcla, disolución, granulación, preparación de comprimidos recubiertos de azúcar, trituración, emulsión, encapsulación, atrapamiento o liofilización.

Las composiciones cosméticas para su uso según la presente invención pueden así formularse de manera convencional usando uno o más vehículos fisiológicamente aceptables que comprenden excipientes y auxiliares, que facilitan el procesamiento de los principios activos en preparaciones. La apropiada formulación depende del enfoque de administración elegido.

Para inyección, los principios activos de la composición cosmética pueden formularse en disoluciones acuosas, preferentemente en tampones fisiológicamente compatibles tales como disolución de Hank, disolución de Ringer o tampón de sal fisiológico.

Alternativamente, el principio activo puede estar en forma de polvo para constitución con un vehículo adecuado, por ejemplo, disolución basada en agua libre de pirógenos estéril, antes de uso.

La determinación de una cantidad terapéuticamente eficaz está perfectamente dentro de la capacidad de aquellos expertos en la materia, especialmente en vista de la divulgación detallada proporcionada en el presente documento.

Para cualquier preparación usada en los métodos de la invención, la cantidad terapéuticamente eficaz o dosis puede estimarse inicialmente de ensayos *in vitro*. Como se muestra en el presente documento en la sección de ejemplos, las concentraciones de LIP y peróxido de hidrógeno podrían optimizarse de ensayos *in vitro* y adaptarse adicionalmente para un uso *in vivo*. Además, puede formularse una dosis en sistemas de cultivo de tejido o en modelos animales para lograr una concentración deseada o título. Tal información puede usarse para determinar con más exactitud dosis útiles en seres humanos.

Dependiendo de la gravedad de la pigmentación del trastorno de la piel (por ejemplo, cloasma, melasma, ocronosis y lentigo) y la sensibilidad de la piel, la dosificación puede ser una administración única o una pluralidad de administraciones, con ciclo de tratamiento que dura de varios días a varias semanas o hasta que se efectúa la cura o se logra la disminución del trastorno de la piel.

La cantidad de una composición que va a administrarse dependerá, por supuesto, del sujeto que está tratándose, la gravedad de la afección, el modo de administración, el criterio del médico que receta, etc.

La enzima modificadora de lignina incluida en la composición cosmética de la presente invención también puede proporcionarse a mayores concentraciones y recetarse por un médico como una composición farmacéutica para tratar trastornos de pigmentación de la piel tales como melasma, cloasma, ocronosis y lentigo.

Lo siguiente es una descripción de formulaciones que incorporan una enzima modificadora de lignina y se formulan para el aclaramiento de la piel o el pelo.

Aclaramiento de la piel

Para optimizar y controlar el aclaramiento de la piel, la enzima modificadora de lignina se incluye preferentemente en una composición cosmética que se formula para fines de aclaramiento de la piel.

Como la composición cosmética de aclaramiento de la piel de la presente invención se utiliza *in vivo*, la composición es preferentemente de alta pureza y está sustancialmente libre de contaminantes potencialmente perjudiciales, por ejemplo, al menos calidad de alimento nacional (NF), generalmente al menos calidad analítica, y preferentemente al menos calidad farmacéutica. Hasta el punto que un compuesto dado debe sintetizarse antes de uso, tal síntesis o posterior purificación debe producir preferentemente un producto que está sustancialmente libre de cualquier agente tóxico potencialmente contaminante que pueda ser usado durante la síntesis o procedimientos de purificación.

Principios activos

La lignina peroxidasa se incluye en la composición cosmética de la presente invención a una concentración seleccionada de un intervalo de 1-100 U/g. Según configuraciones presentemente conocidas, la enzima modificadora de lignina incluida en la composición cosmética de la presente invención se proporciona a una concentración seleccionada de un intervalo de 5-100 U/g. Se apreciará que una concentración preferida de la enzima modificadora de lignina está seleccionada según el uso específico de la composición, así, para el aclaramiento de la piel general, se utiliza una concentración preferida de 5-20 U/g, mientras que para el aclaramiento de pecas, se utiliza un intervalo más amplio de concentración de 5-100 U/g.

El aceptor de electrones (activador oxidante) usado por la composición cosmética de aclaramiento de la piel es preferentemente peróxido de hidrógeno proporcionado a una concentración de al menos el 0,005 %. El peróxido de

hidrógeno es estable, pero se descompondrá bajo condiciones neutras o alcalinas para formar agua y una especie activa de oxígeno. Las especies activas de oxígeno son muy reactivas.

La composición cosmética está preferentemente tamponada a un pH de 4 o inferior, ya que la lignina peroxidasa solo es activa a pH inferior a 4, preferentemente a pH 2,5-3,5 y el peróxido de hidrógeno es estable a tales pH.

Puede emplearse cualquier tampón que pueda mantener un pH de 4 o menos. Así, pueden usarse tampones que emplean ácido acético, ácido tartárico, ácido fosfórico o ácido cítrico por la composición cosmética de aclaramiento de la piel.

Como se muestra en la sección de ejemplos más adelante, el peróxido de hidrógeno de la presente invención está estabilizado a pH 3,5 con ácido fosfórico.

Los mediadores oxidantes usados por la presente invención son moléculas aromáticas pequeñas o compuestos más específicamente metoxilados que aumentan el potencial oxidativo y la estabilidad de la enzima modificadora de lignina. Los mediadores oxidantes usados por la presente invención son alcohol veratrílico y veratrol.

Como se demuestra en la sección de ejemplos, el alcohol veratrílico incluido en la composición cosmética de la presente invención se diluye preferentemente en agua a una concentración de al menos el 0,05 %.

Penetrantes epidérmicos

Con el fin de potenciar la absorción percutánea de los principios activos (por ejemplo, LIP), uno o más de varios agentes pueden añadirse a la composición cosmética, que incluyen, pero no se limitan a, sulfóxido de dimetilo, dimetilacetamida, dimetilformamida, tensioactivos, azona, alcohol, acetona, propilenglicol y polietilenglicol.

Como se ilustra en la sección de ejemplos que sigue, la enzima modificadora de lignina, LIP, y el activador, peróxido de hidrógeno, se mezclan preferentemente con penetrantes epidérmicos tales como butilenglicol y transcutool, respectivamente, de un modo y concentración optimizada para potenciar la penetración de la piel de LIP. El butilenglicol usado por la presente invención se proporciona a una concentración de al menos el 1 % y el transcutool se proporciona a una concentración de al menos el 3 %.

Vehículos

Además de la cantidad farmacéuticamente eficaz de un agente desvelado en el presente documento, la composición cosmética de este aspecto de la presente invención también incluye un vehículo dermatológicamente aceptable.

El término "vehículo dermatológicamente aceptable" se refiere a un vehículo que es adecuado para administración tópica sobre la piel, es decir, tejido queratinoso, tiene buenas propiedades estéticas, es compatible con los agentes activos de la presente invención y cualquier otro componente, y es seguro y no tóxico para su uso en mamíferos. Una cantidad eficaz de vehículo está seleccionada de un intervalo de aproximadamente el 50 % a aproximadamente el 99,99 %, preferentemente de aproximadamente el 80 % a aproximadamente el 99,9 %, más preferentemente de aproximadamente el 90 % a aproximadamente el 98 %, y lo más preferentemente de aproximadamente el 90 % a aproximadamente el 95 %, en peso, de la composición.

Emulsiones

El vehículo utilizado en las composiciones de la invención puede estar en una amplia variedad de formas. Éstas incluyen vehículos en emulsión, que incluyen, pero no se limitan a, emulsiones de aceite en agua, agua en aceite, agua en aceite en agua y aceite en agua en silicona, una crema, una pomada, una disolución acuosa, una loción o un aerosol. Como entenderá el experto, un componente dado se distribuirá principalmente en tanto la fase acuosa como de aceite/silicona, dependiendo de la solubilidad/dispersibilidad en agua del componente en la composición.

Las emulsiones según la presente invención generalmente contienen una cantidad farmacéuticamente eficaz de un agente desvelado en el presente documento y un lípido o aceite. Los lípidos y aceites pueden derivarse de animales, plantas o petróleo y pueden ser naturales o sintéticos (es decir, preparados por el hombre). Emulsiones preferidas también contienen un humectante, tal como glicerina. Las emulsiones contendrán preferentemente adicionalmente de aproximadamente el 1 % a aproximadamente el 10 %, más preferentemente de aproximadamente el 2 % a aproximadamente el 5 %, de un emulsionante, basado en el peso del vehículo. Los emulsionantes pueden ser no iónicas, aniónicas o catiónicas. Emulsionantes adecuados se describen en, por ejemplo, la patente de EE.UU. nº 3.755.560, concedida a Dickert, et al., 28 de agosto de 1973; la patente de EE.UU. nº 4.421.769, concedida a Dixon, et al., 20 de diciembre de 1983; y McCutcheon's Detergents and Emulsifiers, North American Edition, páginas 317-324 (1986).

La emulsión también puede contener un agente antiespumante para minimizar la espumación tras la aplicación al tejido queratinoso. Los agentes antiespumantes incluyen siliconas de alto peso molecular y otros materiales muy conocidos en la técnica para tal uso.

Emulsiones adecuadas pueden tener un amplio intervalo de viscosidades, dependiendo de la forma de producto deseada. Emulsiones de baja viscosidad a modo de ejemplo, que se prefieren, tienen una viscosidad de aproximadamente 50 centistokes o menos, más preferentemente aproximadamente 10 centistokes o menos, lo más preferentemente aproximadamente 5 centistokes o menos. La emulsión también puede contener un agente antiespumante para minimizar la espumación tras la aplicación al tejido queratinoso. Los agentes antiespumantes incluyen siliconas de alto peso molecular y otros materiales muy conocidos en la técnica para tal uso.

Un tipo de emulsión es una emulsión de agua en silicona. Las emulsiones de agua en silicona contienen una fase de silicona continua y una fase acuosa dispersa. Las emulsiones de agua en silicona preferidas de la presente invención comprenden de aproximadamente el 1 % a aproximadamente el 60 %, preferentemente de aproximadamente el 5 % a aproximadamente el 40 %, más preferentemente de aproximadamente el 10 % a aproximadamente el 20 %, en peso de una fase de silicona continua. La fase de silicona continua existe como una fase externa que contiene o rodea la fase acuosa discontinua descrita en el presente documento más adelante.

La fase de silicona continua puede contener un aceite de poliorganosiloxano. Se formula un sistema de emulsión de agua en silicona preferido para proporcionar un vehículo oxidativamente estable para la administración de una cantidad farmacéuticamente eficaz de un agente desvelado en el presente documento. La fase de silicona continua de estas emulsiones preferidas comprende entre aproximadamente el 50 % y aproximadamente el 99,9 % en peso de aceite de organopolisiloxano y menos de aproximadamente el 50 % en peso de un aceite no de silicona. En una realización especialmente preferida, la fase de silicona continua comprende al menos aproximadamente el 50 %, preferentemente de aproximadamente el 60 % a aproximadamente el 99,9 %, más preferentemente de aproximadamente el 70 % a aproximadamente el 99,9 %, e incluso más preferentemente de aproximadamente el 80 % a aproximadamente el 99,9 %, de aceite de poliorganosiloxano en peso de la fase de silicona continua, y hasta aproximadamente el 50 % de aceites no de silicona, preferentemente menos de aproximadamente el 40 %, más preferentemente menos de aproximadamente el 30 %, incluso más preferentemente menos de aproximadamente el 10 %, y lo más preferentemente menos de aproximadamente el 2 %, en peso de la fase de silicona continua. Estos sistemas de emulsión útiles pueden proporcionar más estabilidad oxidativa durante periodos de tiempo prolongados que las emulsiones de agua en aceite comparables que contienen menores concentraciones del aceite de poliorganosiloxano. Las concentraciones de aceites de no silicona en la fase de silicona continua se minimizan o evitan completamente de manera que posiblemente potencian adicionalmente la estabilidad oxidativa del compuesto activo de la invención en las composiciones. Las emulsiones de agua en silicona de este tipo se describen en la patente de EE.UU. nº 5.691.380 a Mason et al., concedida el 25 de noviembre de 1997.

El aceite de organopolisiloxano para su uso en la composición puede ser volátil, no volátil, o una mezcla de siliconas volátiles y no volátiles. El término "no volátil", como se usa en este contexto, se refiere a aquellas siliconas que son líquidas bajo condiciones ambientales y tienen un punto de inflamación (bajo una atmósfera de presión) de o superior a aproximadamente 100 grados Celsius. El término "volátil", como se usa en este contexto, se refiere a todos los otros aceites de silicona. Pueden seleccionarse organopolisiloxanos adecuados de una amplia variedad de siliconas que abarcan un amplio intervalo de volatilidades y viscosidades. Ejemplos de aceites de organopolisiloxano adecuados incluyen polialquilsiloxanos, polialquilsiloxanos cíclicos y polialquilarilsiloxanos, que son conocidos para aquellos expertos en la materia y están comercialmente disponibles.

La fase de silicona continua puede contener uno o más aceites no de silicona. Concentraciones de aceites no de silicona en la fase de silicona continua se minimizan preferentemente o evitan completamente de manera que potencien adicionalmente la estabilidad oxidativa del agente farmacéuticamente eficaz en las composiciones. Aceites no de silicona adecuados tienen un punto de fusión de aproximadamente 25 °C o menos bajo aproximadamente una atmósfera de presión. Ejemplos de aceites no de silicona adecuados para su uso en la fase de silicona continua son aquellos muy conocidos en las ciencias químicas en productos de cuidado personal tópicos en forma de emulsiones de agua en aceite, por ejemplo, aceite mineral, aceites vegetales, aceites sintéticos, aceites semisintéticos, etc.

Composiciones tópicas útiles de la presente invención comprenden de aproximadamente el 30 % a aproximadamente el 90 %, más preferentemente de aproximadamente el 50 % a aproximadamente el 85 %, y lo más preferentemente de aproximadamente el 70 % a aproximadamente el 80 % de una fase acuosa dispersada. El término "fase dispersada" es muy conocido para un experto en la materia e implica que la fase existe como pequeñas partículas o gotitas que están suspensas en y están rodeadas por una fase continua. La fase dispersada también se conoce como la fase interna o discontinua. La fase acuosa dispersada es una dispersión de pequeñas partículas acuosas o gotitas suspensas en y rodeadas por la fase de silicona continua descrita anteriormente en este documento. La fase acuosa puede ser agua, o una combinación de agua y uno o más componentes solubles o dispersables en agua. Ejemplos no limitantes de tales componentes opcionales incluyen espesantes, ácidos, bases, sales, quelantes, gomas, alcoholes y polioles solubles o dispersables en agua, tampones, conservantes, agentes protectores solares, colorantes y similares.

Las composiciones tópicas de la presente invención normalmente comprenden de aproximadamente el 25 % a aproximadamente el 90 %, preferentemente de aproximadamente el 40 % a aproximadamente el 80 %, más preferentemente de aproximadamente el 60 % a aproximadamente el 80 %, de agua en la fase acuosa dispersada en peso de la composición.

Las emulsiones de agua en silicona de la presente invención comprenden preferentemente un emulsionante. En una realización preferida, la composición contiene de aproximadamente el 0,1 % a aproximadamente el 10 % de emulsionante, más preferentemente de aproximadamente el 0,5 % a aproximadamente el 7,5 %, lo más preferentemente de aproximadamente el 1 % a aproximadamente el 5 %, de emulsionante en peso de la composición. El emulsionante ayuda a dispersar y suspender la fase acuosa dentro de la fase de silicona continua.

Puede emplearse una amplia variedad de agentes emulsionantes en el presente documento para formar la emulsión de agua en silicona preferida. Pueden usarse agentes emulsionantes conocidos o convencionales en la composición, a condición de que el agente emulsionante seleccionado sea químicamente y físicamente compatible con componentes esenciales de la composición, y proporcione las características de dispersión deseadas. Emulsionantes adecuados incluyen emulsionantes de silicona, por ejemplo, organopolisiloxanos orgánicamente modificados, también conocidos para aquellos expertos en la materia como tensioactivos de silicona, emulsionantes que no contienen silicona, y mezclas de los mismos, conocidos por aquellos expertos en la materia para su uso en productos de cuidado personal tópicos.

Emulsionantes útiles incluyen una amplia variedad de emulsionantes de silicona. Estos emulsionantes de silicona normalmente son organopolisiloxanos orgánicamente modificados, también conocidos para aquellos expertos en la materia como tensioactivos de silicona. Emulsionantes adecuados se describen, por ejemplo, en McCutcheon's, Detergents and Emulsifiers, North American Edition (1986), publicado por Allured Publishing Corporation; patente de EE.UU. nº 5.011.681 a Ciotti et al., concedida el 30 de abril de 1991; patente de EE.UU. nº 4.421.769 a Dixon et al., concedida el 20 de diciembre de 1983; y la patente de EE.UU. nº 3.755.560 a Dickert et al., concedida el 28 de agosto de 1973.

Otros vehículos tópicos preferidos incluyen emulsiones de aceite en agua, que tienen una fase acuosa continua y una fase insoluble en agua hidrófoba ("fase aceitosa") dispersa en ella. Ejemplos de vehículos adecuados que comprenden emulsiones de aceite en agua se describen en la patente de EE.UU. nº 5.073.371 a Turner, D. J. et al., concedida el 17 de diciembre de 1991 y la patente de EE.UU. nº 5.073.372, a Turner, D. J. et al., concedida el 17 de diciembre de 1991. Una emulsión de aceite en agua especialmente preferida, que contiene un agente estructurante, tensioactivo hidrófilo y agua, se describe en detalle en el presente documento más adelante.

Una emulsión de aceite en agua preferida comprende un agente estructurante para ayudar en la formación de una estructura de red de gel cristalina líquida. Sin limitarse por la teoría, se cree que el agente estructurante ayuda en proporcionar características reológicas a la composición que contribuye a la estabilidad de la composición. El agente estructurante puede también servir de emulsionante o tensioactivo. Composiciones preferidas de la presente invención comprenden de aproximadamente el 0,5 % a aproximadamente el 20 %, más preferentemente de aproximadamente el 1 % a aproximadamente el 10 %, lo más preferentemente de aproximadamente el 1 % a aproximadamente el 5 %, en peso de la composición, de un agente estructurante. Los agentes estructurantes preferidos de la presente invención están seleccionados del grupo que consiste en ácido esteárico, ácido palmítico, alcohol estearílico, alcohol cetílico, alcohol behénico, ácido esteárico, ácido palmítico, el éter de polietilenglicol de alcohol estearílico que tiene un promedio de aproximadamente 1 a aproximadamente 21 unidades de óxido de etileno, teniendo el éter de polietilenglicol de alcohol cetílico un promedio de aproximadamente 1 a aproximadamente 5 unidades de óxido de etileno, y mezclas de los mismos.

También son útiles una amplia variedad de tensioactivos aniónicos en el presente documento. Véase, por ejemplo, la patente de EE.UU. nº 3.929.678, a Laughlin et al., concedida el 30 de diciembre de 1975. Además, también son útiles en el presente documento tensioactivos anfóteros y de ión bipolar.

Las emulsiones de aceite en agua preferidas comprenden de aproximadamente el 0,05 % a aproximadamente el 10 %, preferentemente de aproximadamente el 1 % a aproximadamente el 6 %, y más preferentemente de aproximadamente el 1 % a aproximadamente el 3 % de al menos un tensioactivo hidrófilo que puede dispersar los materiales hidrófobos en la fase acuosa (porcentajes en peso del vehículo tópico). El tensioactivo, como mínimo, debe ser suficientemente hidrófilo para dispersarse en agua. Tensioactivos adecuados incluyen cualquiera de una amplia variedad de tensioactivos catiónicos, aniónicos, de ión bipolar y anfóteros conocidos. Véase McCutcheon's, Detergents and Emulsifiers, North American Edition (1986), publicado por Allured Publishing Corporation; la patente de EE.UU. nº 5.011.681 a Ciotti et al., concedida el 30 de abril de 1991; la patente de EE.UU. nº 4.421.769 a Dixon et al. concedida el 20 de diciembre de 1983; y la patente de EE.UU. nº 3.755.560. El tensioactivo exacto elegido depende del pH de la composición y los otros componentes presentes. Se prefieren tensioactivos catiónicos, especialmente compuestos de dialquilamonio cuaternario, ejemplos de los cuales se describen en la patente de EE.UU. nº 5.151.209 a McCall et al. concedida el 29 de septiembre de 1992; la patente de EE.UU. nº 5.151.210 a Steuri et al., concedida el 29 de septiembre de 1992; la patente de EE.UU. nº 5.120.532; la patente de EE.UU. nº 4.387.090; la patente de EE.UU. nº 3.155.591; la patente de EE.UU. nº 3.929.678; la patente de EE.UU. nº

3.959.461; McCutcheon's, Detergents & Emulsifiers (North-American edition 1979) M.C. Publishing Co.; y Schwartz, et al., Surface Active Agents, Their chemistry and Technology, New York: Interscience Publishers, 1949.

5 Alternativamente, otros emulsionantes catiónicos útiles incluyen amino-amidas. Ejemplos no limitantes de estos emulsionantes catiónicos incluyen fosfato de cloruro de estearamidopropil PG-dimONIO, cloruro de behenamidopropil PG dimONIO, etosulfato de estearamidopropil dimONIO, cloruro de estearamidopropildimetil (miristil acetato) amONIO, tosilato de estearamidopropildimetil cetearilamonio, cloruro de estearamidopropildimetilamonio, lactato de estearamidopropildimetilamonio, y mezclas de los mismos.

10 La emulsión de aceite en agua preferida comprende de aproximadamente el 25 % a aproximadamente el 98 %, preferentemente de aproximadamente el 65 % a aproximadamente el 95 %, más preferentemente de aproximadamente el 70 % a aproximadamente el 90 % de agua en peso del vehículo tópico.

Composiciones tópicas

15 La composición cosmética puede formularse en cualquiera de una variedad de formas utilizadas por la industria cosmética para la aplicación a la piel que incluye disoluciones, lociones, esprays, cremas, pomadas, bálsamos, geles, etc., como se describe más adelante.

20 Preferentemente, la composición cosmética se formula suficientemente viscosa para permanecer sobre el área de piel tratada, no se evapora fácilmente y/o no se elimina fácilmente por aclarado con agua, sino que se elimina con la ayuda de jabones, limpiadores y/o champús.

25 Métodos para preparar composiciones que tienen tales propiedades son muy conocidos para aquellos expertos en la materia, y se describen en detalle en Remington's Pharmaceutical Sciences, 1990 (arriba); y Pharmaceutical Dosage Forms and Drug Delivery Systems, 6th ed., Williams & Wilkins (1995).

Vehículos

30 Las composiciones tópicas de la invención objeto, que incluyen, pero no se limitan a, lociones y cremas, pueden comprender un emoliente dermatológicamente aceptable. Tales composiciones contienen preferentemente de aproximadamente el 2 % a aproximadamente el 50 % del emoliente. Como se usa en el presente documento, "emoliente" se refiere a un material útil para la prevención o alivio de sequedad, además de para la protección de la piel. Se conocen una amplia variedad de emolientes adecuados y pueden usarse en el presente documento. Véase, por ejemplo, Sagarin, Cosmetics, Science and Technology, 2ª edición, vol. 1, pág. 3243 (1972), que contiene numerosos ejemplos de materiales adecuados como emoliente. Un emoliente preferido es glicerina. La glicerina se usa preferentemente en una cantidad de o aproximadamente el 0,001 a o aproximadamente el 20 %, más preferentemente de o aproximadamente el 0,01 a o aproximadamente el 10 %, lo más preferentemente de o aproximadamente el 0,1 a o aproximadamente el 5 %, por ejemplo, el 3 %.

40 Las lociones y cremas según la presente invención generalmente comprenden una sistema de vehículo en disolución y uno o más emolientes. Las lociones normalmente comprenden de aproximadamente el 1 % a aproximadamente el 20 %, preferentemente de aproximadamente el 5 % a aproximadamente el 10 % de emoliente; de aproximadamente el 50 % a aproximadamente el 90 %, preferentemente de aproximadamente el 60 % a aproximadamente el 80 % de agua; y una cantidad farmacéuticamente eficaz de un agente descrito en el presente documento. Una crema normalmente comprende de aproximadamente el 5 % a aproximadamente el 50 %, preferentemente de aproximadamente el 10 % a aproximadamente el 20 % de emoliente; de aproximadamente el 45 % a aproximadamente el 85 %, preferentemente de aproximadamente el 50 % a aproximadamente el 75 % de agua; y una cantidad farmacéuticamente eficaz de un agente descrito en el presente documento.

50 La composición cosmética tópicamente aplicada de la presente invención también puede incluir componentes adicionales que se añaden, por ejemplo, con el fin de enriquecer las composiciones cosméticas con fragancia y factores de nutrición de la piel.

55 Tales componentes se seleccionan adecuadamente para su uso sobre tejido queratinoso humano sin inducir toxicidad, incompatibilidad, inestabilidad, respuesta alérgica y similares dentro del alcance del criterio médico sensato. Además, tales componentes opcionales son útiles a condición de que no alteren inaceptablemente los beneficios de los compuestos activos de la invención.

60 The CTFA Cosmetic Ingredient Handbook, segunda edición (1992), describe una amplia variedad de componentes cosméticos no limitantes comúnmente usados en la industria del cuidado de la piel, que son adecuados para su uso en las composiciones de la presente invención. Ejemplos de estas clases de componentes incluyen: abrasivos, absorbentes, componentes estéticos tales como fragancias, pigmentos, colores/colorantes, aceites esenciales, productos para la piel, astringentes, etc. (por ejemplo, aceite de clavo, mentol, alcanfor, aceite de eucalipto, eugenol, lactato de mentilo, destilado de hamamelis), agentes antiacné, agentes antiapelmazantes, agentes antiespumantes, agentes antimicrobianos (por ejemplo, butilcarbamato de yodopropilo), antioxidantes, aglutinantes, aditivos

biológicos, agentes de tamponamiento, agentes de carga, agentes quelantes, aditivos químicos, colorantes, astringentes cosméticos, biocidas cosméticos, desnaturalizantes, astringentes de fármacos, analgésicos externos, formadores o materiales de película, por ejemplo, polímeros, para ayudar en las propiedades de formación de películas y sustantividad de la composición (por ejemplo, copolímero de eicoseno y vinilpirrolidona), opacificantes, ajustadores del pH, propulsores, agentes reductores, secuestrantes, agentes acondicionadores de la piel (por ejemplo, humectantes, que incluyen diversos y oclusivos), agentes relajantes y/o de curación de la piel (por ejemplo, pantenol y derivados (por ejemplo, etilpantenol), aloe vera, ácido pantoténico y sus derivados, alantoína, bisabolol y glicirricinato de dipotasio), agentes de tratamiento de la piel, espesantes y vitaminas, y derivados de los mismos.

La composición cosmética puede aplicarse directamente a la piel. Alternativamente, puede administrarse mediante aplicación a la piel normal por diversos sistemas de administración de fármacos transdérmicos que se conocen en la técnica, tales como parches transdérmicos que liberan la composición en la piel en un modo de liberación con el tiempo. Otros sistemas de administración de fármacos conocidos en la técnicas incluyen frasco presurizado de aerosol, iontoforesis o sonoforesis. La iontoforesis se emplea para aumentar la permeabilidad de la piel y facilitar la administración transdérmica. Las patentes de EE.UU. n° 5.667.487 y 5.658.247 desvelan un aparato ionosónico adecuado para el transporte ultrasónico-iontoforéticamente mediado de agentes terapéuticos a través de la piel. Alternativamente, o además, también pueden emplearse liposomas o micelas como vehículo de administración.

Los principios activos incluidos en las composiciones cosméticas de la presente invención son adecuados para el aclaramiento de la piel mediante la oxidación de melanina. Sin embargo, la reacción de oxidación puede controlarse y detenerse cuando se desee mediante la adición de reactivos reductores. Estos reactivos pueden formularse en una composición cosmética separada y aplicarse sobre la piel cuando se desee.

Aclaramiento del pelo

Principios activos

Las composiciones de aclaramiento del pelo formuladas según las enseñanzas de la presente invención incluyen el agente de oxidación y mediador descritos anteriormente.

Como se demuestra en la sección de ejemplos más adelante, el aclaramiento del pelo puede lograrse en presencia de alcohol veratrílico 1,5 mM y peróxido de hidrógeno 8,8 mM en tampón tartrato a un pH de 3,5.

Emolientes

Los emolientes incluyen, pero no se limitan a, aceites y ceras de hidrocarburo, tales como aceite mineral, petrolato y similares, aceites y grasas vegetales y animales, tales como aceite de oliva, aceite de palma, aceite de ricino, aceite de maíz, aceite de soja y similares, y lanolina y sus derivados, tales como lanolina, aceite de lanoleno, cera de lanolina, alcoholes de lanolina y similares. Otros emolientes incluyen ésteres de ácidos grasos que tienen 10 a 20 átomos de carbono, tales como que incluyen mirístico, esteárico, isoesteárico, palmítico y similares, tales como miristato de metilo, miristato de propilo, miristato de butilo, estearato de propilo, isoestearato de propilo, palmitato de propilo y similares. Otros emolientes incluyen ácidos grasos que tienen 10 a 20 átomos de carbono, que incluyen esteárico, mirístico, láurico, isoesteárico, palmítico y similares. Los emolientes también incluyen alcoholes grasos que tienen diez a veinte átomos de carbono, tales como cetilo, miristilo, laurilo, isoestearilo, estearilo y similares.

Aunque algunos son solubles en agua, los alcoholes polihidroxilados y derivados de poliéter están incluidos como emolientes, que incluyen glicoles, glicerol, sorbitol, polialquilenglicoles y similares, tales como propilenglicol, dipropilenglicol, polietilenglicol 200-500 y similares. Se prefieren los ejemplos solubles en agua.

Tensioactivos

También se utiliza preferentemente un emulsionante/tensioactivo por la composición de aclaramiento del pelo de la presente invención.

Ejemplos de tensioactivos incluyen, pero no se limitan a, productos de condensación de poli(oxióxido de alquileo) de alquilo hidrófobo, alqueno, o grupos funcionales aromáticos de alquilo que tienen un hidrógeno reactivo libre disponible para la condensación con óxido de alquileo hidrófilo, poli(óxido de etileno), óxido de propileno, óxido de butileno, poli(óxido de etileno) o polietilenglicol. Son particularmente eficaces los productos de condensación de octilfenol con aproximadamente 7 a aproximadamente 13 moles de óxido de etileno, comercializados por Rohm & Haas Company bajo sus productos de la serie TRITON 100® de marca registrada.

Otros componentes tales como fragancias, agentes estabilizantes, colorantes, agentes antimicrobianos, agentes antibacterianos, antiaglomerantes, absorbentes de radiación ultravioleta y similares también están incluidos en la composición de aclaramiento del pelo de la presente invención.

Acondicionadores

También se utiliza un agente acondicionador estable a la hidrólisis ácida, tal como un compuesto de silicona que tiene al menos un resto de amonio cuaternario junto con un monoquat etoxilado, preferentemente con el fin de estabilizar y opcionalmente espesar la composición de aclaramiento del pelo de la presente invención.

También puede incluirse un espesante opcional para mejorar la estética de la composición y facilitar la aplicación de la composición al pelo. Se prefieren espesantes no iónicos en una cantidad del 0 % a aproximadamente el 3 % en peso. Espesantes a modo de ejemplo son metilcelulosa, hidroxibutylmetilcelulosa, hidroxipropilcelulosa, hidroxipropilmetilcelulosa, hidroxietilcelulosa e hidroxietilcelulosa, amida de ácido di(sebo hidrogenado)ftálico, copolímero de anhídrido maleico-metil vinil éter reticulado, goma guar, goma xantana y goma arábica.

El vehículo de la composición de acondicionamiento es predominantemente agua, pero también pueden incluirse disolventes orgánicos con el fin de facilitar la fabricación de la composición o para proporcionar propiedades estéticas, tales como control de la viscosidad. Disolventes adecuados incluyen los alcoholes inferiores como alcohol etílico y alcohol isopropílico; éteres de glicol como 2-butoxietanol, éter monoetílico de etilenglicol, éter monoetílico o éter monometílico de propilenglicol y dietilenglicol; y mezclas de los mismos. Los disolventes no acuosos pueden estar presentes en la composición de acondicionamiento de la presente invención en una cantidad de aproximadamente el 1 % a aproximadamente el 50 %, y en particular de aproximadamente el 5 % a aproximadamente el 25 %, en peso del peso total del vehículo en la composición.

Agentes acondicionadores no limitantes que pueden usarse en acondicionadores opacos incluyen: cloruro de esteariltrimetilamonio; cloruro de behenotrimetilamonio; bromuro de cetrimonio; cloruro de sojatrimonio; cloruro de sebotrimonio; cloruro de sebodimetilamonio dihidrogenado; metosulfato de behenotrimetilamonio; cloruro de PEG-2 oleamonio; bromuro de sebodimetilamonio dihidrogenado; metosulfato de sebodimetilamonio dihidrogenado; cloruro de palmitiltrimetilamonio; cloruro de sebotrimetilamonio hidrogenado; bromuro de sebotrimetilamonio hidrogenado; cloruro de dicetildimetilamonio; cloruro de diestearildimetilamonio; cloruro de dipalmitildimetilamonio; metosulfato de sebotrimetilamonio hidrogenado; tosilato de cetrimonio; cloruro de eicosiltrimetilamonio y cloruro de disebodimetilamonio.

Materiales que pueden usarse para opacificar las composiciones de la invención incluyen ésteres grasos, polímeros opacificantes tales como polímeros de estireno como OPACIFIER 653 de Morton, International, Inc.; y alcoholes grasos. Lo siguiente es una lista no limitante de alcoholes grasos: alcohol cetílico; alcohol estearílico; alcohol cetearílico; alcohol behénico; y alcohol araquidílico. Composiciones de acondicionamiento de la invención que no son claras también puede incluir Lexamine S-13, cloruro de dicetilamonio y cetareth-20.

Las composiciones de la presente invención pueden presentarse, si se desea, en un dispositivo dispensador o un kit, junto con instrucciones apropiadas para su uso y etiquetas que indican la autorización de la FDA para su uso en el aclaramiento de la piel o pelo.

El kit para el aclaramiento de una región de la piel o pelo puede incluir, por ejemplo, un recipiente que incluye una enzima modificadora de lignina provista de tampones, vehículos, penetrantes, etc., adecuados y recipientes adicionales que incluyen el agente de oxidación y el mediador descritos anteriormente.

Las enzimas modificadoras de lignina también pueden introducirse en células de la región de la piel usando enfoques de biología molecular que se conocen en la técnica.

Así, se desvela un método de aclaramiento de una región de la piel de un sujeto. El método según este aspecto de la presente invención se efectúa expresando dentro de células de la región de la piel una enzima modificadora de lignina de un modo adecuado para oxidar un pigmento contenido dentro de células de la región de la piel.

Tal expresión puede efectuarse transformando las células de la piel con un vector de expresión que incluye una secuencia codificante de la enzima modificadora de lignina funcionalmente ligada a una secuencia promotora.

Para generar un vector de expresión tal, un segmento de polinucleótido que codifica una enzima modificadora de lignina (por ejemplo, la isoforma H1 de LIP, SEC ID N°: 1), puede ligarse en un sistema de vector de expresión comercialmente disponible adecuado para transformar células de mamífero y para dirigir la expresión de la enzima modificadora de lignina dentro de las células transformadas. Se apreciará que tales sistemas de vector comercialmente disponibles pueden modificarse fácilmente mediante técnicas recombinantes comúnmente usadas con el fin de sustituir; duplicar o mutar secuencias promotoras o potenciadoras existentes y/o introducir cualquier secuencia de polinucleótidos adicional tal como, por ejemplo, secuencias que codifican marcadores de selección adicionales o secuencias que codifican polipéptidos indicadores.

Vectores de expresión de mamífero adecuados para su uso con la presente invención incluyen, pero no se limitan a, pcDNA3, pcDNA3,1(+/-), pZeoSV2(+/-), pSecTag2, pDisplay, pEF/myc/cyto, pCMV/myc/cyto, pCR3.1, que están disponibles de Invitrogen, pCI que está disponible de Promega, pBK-RSV y pBK-CMV que están disponibles de Stratagene, pTRES que está disponible de Clontech, y sus derivados.

Un vector de expresión adecuado para su uso con este aspecto de la presente invención es un vector basado en adenovirus. Los vectores de adenovirus se han usado ampliamente para aplicaciones farmacéuticas que incluyen terapia génica cutánea (Ghazizadeh S, Taichman LB. (2000) Hum Gene Ther 11: 2247-51; Carter PJ, Samulski RJ. (2000). Int J Mol Med 6: 17-27).

El vector de expresión descrito anteriormente puede administrarse a células usando una variedad de enfoques de administración que incluyen, pero no se limitan a, liposomas, parches epidérmicos, iontoforesis o endocitosis mediada por receptor.

En el último enfoque, un anticuerpo o ligando para un receptor de la superficie celular que se sabe que experimenta endocitosis se compleja con la secuencia de ADN que codifica la enzima modificadora de lignina mediante un auxiliar policatiónico covalentemente unido (por ejemplo, polilisina, protaminas). Tales complejos retienen su especificidad de unión por la superficie celular y se recogen en la célula en la que entran en el compartimento endosómico mediante procesos endocitóticos normales. Además, deben adoptarse medidas para evitar la degradación del ADN dentro del endosoma-lisosoma. Las células pueden tratarse con el agente lisosomatrópico cloroquina durante el procedimiento de transfección. Alternativamente, pueden usarse componentes de virus que entran en las células por endocitosis y poseen una capacidad de "fuga" endosómica. El adenovirus defectuoso en la replicación acoplado al complejo de ligando-ADN da eficiencias de transfección de prácticamente el 100 % sobre células de cultivo de tejido *in vitro*. Estudios preliminares han demostrado el potencial de este método para dirigir específicamente el ADN al tipo de célula de elección *in vivo* (Guy J, Drabek D, Antoniou M. (1995). Mol Biotechnol 1995 3: 237-48).

Tras la expresión dentro de células diana, el aceptor de electrones y el mediador descritos se aplican preferentemente a la región tratada con el fin de facilitar el aclaramiento.

El expresar la enzima modificadora de lignina dentro de células diana es particularmente ventajoso ya que vence la necesidad de administración intracelular de la propia enzima, mejorando así potencialmente la eficiencia del aclaramiento.

Objetivos, ventajas y características novedosas adicionales de la presente invención serán evidentes para un experto habitual en la materia tras el examen de los siguientes ejemplos, que no pretenden ser limitantes. Adicionalmente, cada una de las diversas realizaciones y aspectos de la presente invención como se han definido anteriormente en este documento y como se reivindican en la sección de reivindicaciones más adelante encuentra soporte experimental en los siguientes ejemplos.

Ejemplos

Ahora se hace referencia a los siguientes ejemplos, que junto con las descripciones anteriores, ilustran la invención de un modo no limitante.

Generalmente, la nomenclatura usada en el presente documento y los procedimientos de laboratorio utilizados en la presente invención incluyen técnicas moleculares, bioquímicas, microbiológicas y de ADN recombinante. Tales técnicas se explican minuciosamente en la bibliografía. Véanse, por ejemplo, "Molecular Cloning: A Laboratory Manual" Sambrook et al., (1989); "Current Protocols in Molecular Biology" Volumes I-III Ausubel, R. M., ed. (1994); Ausubel et al., "Current Protocols in Molecular Biology", John Wiley and Sons, Baltimore, Maryland (1989); Perbal, "A Practical Guide to Molecular Cloning", John Wiley & Sons, New York (1988); Watson et al., "Recombinant DNA", Scientific American Books, New York; Birren et al. (eds) "Genome Analysis: A Laboratory Manual Series", Vols. 1-4, Cold Spring Harbor Laboratory Press, New York (1998); metodologías como se exponen en las patentes de EE.UU. nº 4.666.828; 4.683.202; 4.801.531; 5.192.659 y 5.272.057; "Cell Biology: A Laboratory Handbook", Volumes I-III Cellis, J. E., ed. (1994); "Current Protocols in Immunology" Volumes I-III Coligan J. E., ed. (1994); Stites et al. (eds), "Basic and Clinical Immunology" (8th Edition), Appleton & Lange, Norwalk, CT (1994); Mishell and Shiigi (eds), "Selected Methods in Cellular Immunology", W. H. Freeman and Co., New York (1980); inmunoensayos disponibles se describen ampliamente en la bibliografía de patentes y científica, veánse, por ejemplo, las patentes de EE.UU. nº 3.791.932; 3.839.153; 3.850.752; 3.850.578; 3.853.987; 3.867.517; 3.879.262; 3.901.654; 3.935.074; 3.984.533; 3.996.345; 4.034.074; 4.098.876; 4.879.219; 5.011.771 y 5.281.521; "Oligonucleotide Synthesis" Gait, M. J., ed. (1984); "Nucleic Acid Hybridization" Hames, B. D., and Higgins S. J., eds. (1985); "Transcription and Translation" Hames, B. D., and Higgins S. J., eds. (1984); "Animal Cell Culture" Freshney, R. I., ed. (1986); "Immobilized Cells and Enzymes" IRL Press, (1986); "A Practical Guide to Molecular Cloning" Perbal, B., (1984) and "Methods in Enzymology" Vol. 1-317, Academic Press; "PCR Protocols: A Guide To Methods And Applications", Academic Press, San Diego, CA (1990); Marshak et al., "Strategies for Protein Purification and Characterization - A Laboratory Course Manual" CSHL Press (1996). Otras referencias generales se proporcionan en todo este documento. Se cree que los procedimientos en este documento son muy conocidos en la técnica y se proporcionan para comodidad del lector.

ANTECEDENTES

Lignina peroxidasas en el hongo P. chrysosporium

5 Hay más de 12 proteínas hemo que muestran actividad ligninolítica en el fluido extracelular de cultivos de *P. chrysosporium* BKM-F-1767. Éstas pueden clasificarse en dos tipos de peroxidasas hemo glucosiladas, lignina peroxidasa (LIP) y manganoso peroxidasa (MNP). Se ha informado que las isoenzimas H1, H2, H6, H7, H8 y H10 son LIP y se han identificado H3, H4, H5 y H9 como MNP (Farrell et al., 1989). Las isoenzimas LIP de *P. chrysosporium* están codificadas por una familia de genes estructuralmente relacionados y son diferentes en sus

10 características físicas, especificidad y estabilidad por sustrato (Farrell et al., 1989; Stewart et al., 1992). Como parte del proceso que conduce a su secreción, las isoenzimas de LIP se escinden proteolíticamente y se glucosilan (Ghose, 1987; Ritch et al., 1991; Tien y Kirk, 1984). Además, se ha informado que las isoenzimas de LIP H2, H6, H8 y H10 están fosforiladas en un resto de manosa 6-fosfato, contenido en el sacárido ligado a asparagina. El análisis de fluido extracelular envejecido ha conducido a la sugerencia de que la isoenzima H1 se deriva probablemente de

15 desfosforilación postraduccional de H2 (Kuan y Tien, 1989).

La expresión de las enzimas ligninolíticas por *P. chrysosporium* es un acontecimiento idiofásico desencadenado por la limitación de nitrógeno o carbono y depende mucho de las condiciones de cultivo y la composición del medio (Dosoretz y Grethlein, 1991; Faison y Kirk, 1985; Stewart et al., 1992; van der Woude et al., 1993). La formación de

20 LIP es particularmente dependiente de la exposición de cultivos a altas tensiones de oxígeno (Dosoretz et al., 1990; Faison y Kirk, 1985). Se ha propuesto que la transferencia de oxígeno en cultivos estacionarios está limitada, y por consiguiente se necesita una alta presión de oxígeno parcial en el espacio de cabeza del cultivo para poner a disposición oxígeno suficiente para las hifas sumergidas (Leisola et al., 1983; Michel et al., 1992). Se observó la formación de LIP en un cultivo que se expuso a aire inmovilizando el hongo sobre un soporte poroso en un cultivo

25 líquido no sumergido, que mejoró la disponibilidad del oxígeno para el hongo (Dosoretz et al., 1990; Popp et al., 1990). La concentración de Mn^{2+} en el medio afecta adversamente la formación de LIP y MNP. Aunque la formación de MNP depende del Mn, que potencia la transcripción de MNP, la formación de LIP se inhibe por Mn. Rothschild et al., (1999) mostraron que en tanto cultivos de nitrógeno limitado como de exceso de nitrógeno de *P. chrysosporium*, el alto nivel de oxígeno requerido para la formación de LIP podría sustituirse por deficiencia de Mn.

MATERIALES Y MÉTODOS EXPERIMENTALES

Crecimiento del hongo Phanerochaete chrysosporium para la producción de lignina peroxidasa - El hongo *Phanerochaete chrysosporium* BKM-F-1767 (ATCC 24725) se mantuvo a 4 °C sobre 2 % de disolución madre de

35 agar inclinado de extracto de malta (Difco, Detroit, MI, EE.UU.).

Preparación de la suspensión de esporas - Se obtuvieron esporas del hongo inoculando tapones de disoluciones madre de agar inclinado en placas de Petri que contenían agar de dextrosa de patata (PDA) esterilizado en autoclave a una concentración de 39 g/litro. A continuación, las placas de PDA se incubaron durante hasta 2

40 semanas a 37 °C. Para la preparación de la suspensión de esporas, placas de PDA se cubrieron con 0,9 % de NaCl, la suspensión de conidios se filtró a través de lana de vidrio estéril y se recogió la suspensión de esporas. A continuación, la suspensión de esporas se mantuvo congelada a -80 °C.

Preparación del inóculo - Se inocularon esporas en un medio de inóculo esterilizado (véase la formulación en el presente documento más adelante) a una concentración final de $7,5 \times 10^5$ esporas/ml. Se añadieron noventa ml de la mezcla a cada lote de fermentación (Tien y Kirk, 1988. Meth. Enzymol. 161: 238-490; Dosoretz et al., 1990, Appl. Microbiol. Biotechnol. 34: 131-7), y a continuación los lotes se taparon con tapones de algodón. Los cultivos se

45 cultivaron estáticamente durante 48 h a 37 °C como cultivos superficiales. Para la inoculación de cultivos, los contenidos de los lotes de fermentación se mezclaron durante 2 min con una mezcladora (Waring, Inglaterra).

Crecimiento del hongo en fermentador de reactor de tanque con agitación (STR) - Antes del crecimiento del hongo, se depositó espuma de poliuretano alrededor de los tubos de refrigeración del fermentador y se esterilizó el fermentador STR entero. Entonces se vertieron diez litros de un medio de fermentador (véase la formulación en el presente documento más adelante) en el fermentador STR y se añadieron 900 ml de inóculo mezclado (el contenido

50 de 10 lotes de fermentación). El fermentador se conectó a un sistema de refrigeración para mantener una temperatura de 37 °C y se agitó a 100 rpm. Se introdujo aire esterilizado en el fermentador a 2 ml/min. El flujo se cambió a 4 ml/min después de 2 días de crecimiento. El crecimiento continuó durante 3-5 días.

Se preparó *medio de inóculo* mezclando las siguientes disoluciones y se esterilizó con un membrana de filtración de 0,45 µm (MSI, Westborough, MA, EE.UU.). Para la preparación de 1 litro de medio líquido se combinaron los

60 siguientes componentes:

100 ml de medio básico para el crecimiento de *P. chrysosporium* x 10 (véase la formulación más adelante)

10 ml de disolución madre de $CaCl_2$ (13,2 g/l) (Sigma-Aldrich Corp., St Louis, MO, EE.UU.). Concentración final

65 0,132 g/l

12 ml de disolución madre de glicerol (50 g/100 ml) (Frutarom, Israel). Concentración final 6 g/l.

Se añade agua doblemente destilada hasta 1 litro.

Se preparó *medio de fermentador* del siguiente modo y se esterilizó con una membrana de filtración de 0,45 µm (MSI, Westborough, MA, EE.UU.). Para la preparación de 10 litros de medio líquido se combinaron los siguientes componentes:

100 ml de disolución madre de CaCl₂ (13,2 g/l) (Sigma, EE.UU.). Concentración final 0,0132 g/l
 120 ml de disolución madre de glicerol (50 g/100 ml) (Frutarom, Israel). Concentración final 6 g/l.
 50 ml de disolución madre de Tween-80 (10,8 ml/100 ml) (Sigma, EE.UU.). Concentración final 0,54 ml/l
 1000 ml de medio básico para el crecimiento de *P. chrysosporium* x 10 (véase la formulación a continuación)
 3,36 g de alcohol veratrílico (Sigma, EE.UU.). Concentración final 2 mM.
 7,740 litros de agua doblemente destilada (DDW) hasta un volumen final de 10 litros.

Medio básico para el crecimiento de P. chrysosporium x 10 - Se preparó medio básico para el crecimiento de *P. chrysosporium* X10 del siguiente modo: se disolvieron 7,07 gr de ácido nitrilotriacético (sal de trisodio) en 4 litros de DDW. A continuación se añadieron los siguientes reactivos: 100 g de KH₂PO₄ anhidro, 72,7 g de MgSO₄·7H₂O (o 67,39 g de MgSO₄·6H₂O), 3,5 g de NaCl, 0,35 g de FeSO₄·7H₂O, 0,63 g de CoCl₂·6H₂O, 0,35 g de ZnSO₄·7H₂O, 0,055 g de CuSO₄·5H₂O, 0,035 g de AlK(SO₄)₂·12H₂O, 0,035 g de H₃BO₃, 0,035 g de Na₂MoO₄·2H₂O, 500 ml de tampón acetato 2 M a pH 4,5, 10 g de tartrato de amonio y 50 mg de tiamina. Todos suministrados por Sigma-Aldrich Corp., St Louis, MO, EE.UU.. El pH del medio se ajustó a 4,4-4,45 con NaOH y se añadió DDW a un volumen final de 5 litros. El medio se almacenó a 4 °C.

Aislamiento y purificación de LIP del medio extracelular de Phanerochaete chrysosporium - Se filtró el medio extracelular a vacío a través de una fibra de vidrio. A continuación, el filtrado se esterilizó con una membrana de filtración de 0,45 µm (MSI, Westborough, MA, EE.UU.) y el fluido se concentró por una membrana de fibra hueca usando una bomba peristáltica (MASTERFLEX, Vernon Hills, IL, EE.UU.). A continuación, el fluido extracelular concentrado se volvió a concentrar 25 veces por ultrafiltración usando una membrana tipo PM-10 de 10 kDa de corte (Amicon, Danvers, MA) y se purificó con una columna Mono Q (HR5/5, Pharmacia, Piscataway, NJ) por HPLC-cromatografía de intercambio aniónico usando dos gradientes de acetato sódico 0,01-1,00 M. El primer gradiente fue a pH 6,0 y el segundo gradiente fue a pH 4,7, que es equivalente al valor del punto isoeléctrico (pI) de la isoenzima H1 de LIP. Se recogieron los picos de proteína y se ensayó su actividad usando la isoenzima H1 de LIP purificada de un lote previo como patrón. La absorbancia de la fracción H1 de LIP se midió a: 280 nm y 409 nm (Hewlett Packard, Waldbronn, Alemania). El grado de pureza (RZ), calculado a partir de la relación entre la absorbancia a 409 nm (A₄₀₉) y la absorbancia a 280 nm (A₂₈₀) de la isoenzima H1 de LIP purificada, fue superior a 4,0. La concentración de LIP se determinó a 409 nm usando un coeficiente de extinción de 169 M⁻¹cm⁻¹.

Ensayo de actividad de LIP - Se midió la actividad de LIP por el cambio en la absorbancia a 310 durante la oxidación de alcohol veratrílico a veratrilaldehído como se describe por Tien y Kirk (1988). El reactivo del ensayo está compuesto por alcohol veratrílico 4 mM y H₂O₂ 0,88 mM en tampón tartrato 100 mM a pH 2,5. Para el ensayo, se mezclaron 0,5 ml de medio extracelular de *P. chrysosporium* con 0,5 ml del reactivo y el aumento en la absorbancia a 310 nm se registró durante 40 s. Una unidad de LIP se define como 1 µmol de alcohol veratrílico oxidado a veratrilaldehído por minuto.

Determinación de la oxidación de melanina por LIP - Se preparó melanina sintética (Sigma, Cat nº M8631, St Louis MO, EE.UU.) a diversas concentraciones en tampón Tris 50 mM a pH 8,00. La oxidación de melanina por LIP se llevó a cabo en tampón tartrato a pH 3,5 que contiene alcohol veratrílico, y la reacción enzimática se inició mediante la adición de peróxido de hidrógeno. El grado de oxidación de la melanina se determinó midiendo la disminución en la absorbancia a 460 nm.

Preparación de crema - La crema de LIP en las realizaciones preferidas está compuesta por dos tipos de cremas: la crema enzimática y la crema activadora. Cada crema se preparó a partir de dos fases, es decir, la fase acuosa y la fase aceitosa.

Crema enzimática

Fase acuosa para la crema enzimática:

0,35 % (peso/peso) de hidantoína DMDM (Sharon Lab, Israel);
 2 % (peso/peso) de glicerina (Cognis, Alemania);
 0,1 % (peso/peso) de alcohol veratrílico (alcohol 3-dimetoxibencílico, Sigma, EE.UU.);
 81,65 % (peso/peso) de DDW (RO Water, Israel);
 0,2 % (peso/peso) de Rhodicare D (goma xantana, Rhodia, Francia);
 4 % (peso/peso) de transcitol (PEG-400, etoxidiglicol, Gattefosse, Francia);

Fase aceitosa para la crema enzimática:

- 5 5 % de aceite mineral ligero;
 2,5 % (peso/peso) de Dragorin 100 SEP (estearato de GMS & PEG-100, Dragoco, Alemania);
 3 % (peso/peso) de alcohol cetílico (Cognis, Alemania);
 0,2 % (peso/peso) de sorbato de potasio (Chisso Corp., Japón);
 1 % (peso/peso) de brij 721 (Uniqema, Italia).

10 *Preparación de la crema enzimática:* Se calentaron las fases acuosa y aceitosa de la crema enzimática a 80 °C y a continuación se mezclaron. La mezcla se homogeneizó durante 10 min y se enfrió a 55 °C. Después el pH se ajustó a 3,5 con ácido láctico.

15 Cuando la mezcla se enfrió a 40 °C, se añadió lignina peroxidasa (20-50 unidades/g). La mezcla enzimática se homogeneizó durante 1 min.

Crema activadora

Fase acuosa para la crema activadora:

- 20 82,888 (peso/peso) de DDW (RO Water, Israel);
 0,1 % (peso/peso) de EDTA disódico (Merck, Alemania);
 4 % (peso/peso) de transcutol (PEG-400, etoxidiglicol, Gattefosse, Francia);
 0,1 % (peso/peso) de sorbato de potasio (Chisso Corp., Japón):

25 *Fase aceitosa para la crema activadora:*

- 30 3,5 % (peso/peso) de brij 72 (Steareth-2, Uniqema, Italia);
 2,5 % (peso/peso) de brij 721 (Steareth-20, Uniqema, Italia);
 5 % (peso/peso) de aceite mineral;
 1,3 % (peso/peso) de alcohol cetílico (Cognis, Alemania);
 0,5 % (peso/peso) de silicona 350 (Dimethicon, Dow Corning, EE.UU.);
 0,1 % (peso/peso) de sorbato de potasio (Chisso Corp., Japón).

35 *Preparación de la crema activadora* - Se calentaron las fases acuosa y aceitosa de la crema activadora a 80 °C y se mezclaron. La mezcla se homogeneizó durante 10 min, se enfrió a 45 °C y se ajustó a pH 3,5 con ácido fosfórico.

 Cuando la mezcla se había enfriado a 40 °C se añadió peróxido de hidrógeno (Riedel-de Haen, Alemania) (0,012 % (peso/peso)) con agitación suave, se verificó el pH correcto y se homogeneizó la mezcla activadora durante 1 min.

40 *Determinación del efecto de aclaramiento de la piel in vivo* - Con el fin de cuantificar el efecto de LIP sobre el aclaramiento de la piel, se probó el color de la piel de la mano tratada usando tres longitudes de onda del cromámetro Minolta (CR-200, Japón): Minolta L mide oscuridad y brillo, Minolta A mide tonos rojos y Minolta B mide tonos amarillos. El aumento en los valores de Minolta L refleja el grado de brillo de la piel, es decir, mayores valores se corresponden con piel más brillante.

Resultados experimentales

Ejemplo 1

50 *Purificación de LIP de P. chrysosporium*

55 *Preparación de H1 de LIP altamente purificada de P. chrysosporium* - Con el fin de purificar la isoenzima H1 de LIP de *P. chrysosporium*, el hongo se cultivó en un fermentador STR (Figura 2) como se ha descrito en detalle en la sección de métodos anterior en este documento. Se detectó actividad de LIP inicial después de 48 h de crecimiento y se detectaron aumentos significativos en la actividad cuando el crecimiento se mantuvo hasta 120 h (Figura 3). Para la purificación de la isoenzima H1 de LIP, el fluido extracelular del hongo se recogió en la actividad de LIP pico (120 h). A continuación, la proteína isoenzima H1 de LIP se purificó y su concentración se determinó como se ha descrito en Métodos. Así, usando el aparato y condiciones anteriormente mencionadas, LIP puede producirse de manera fiable y su isoenzima H1 puede purificarse por HPLC.

Ejemplo 2

Optimización de melanina en una oxidación en fase acuosa

65 *Usando LIP purificada*

Con el fin de optimizar las condiciones necesarias para la oxidación de melanina por LIP, la concentración óptima de cada uno de los componentes críticos de la reacción de oxidación se determinó independientemente.

La oxidación por LIP de melanina en una fase acuosa es una función de la concentración de peróxido de hidrógeno -

Se probó primero la oxidación de melanina por LIP en una fase acuosa para la correlación con concentraciones de peróxido de hidrógeno. Se oxidó una concentración constante de melanina (70,5 µg/ml) por 0,48 µM de H1 de LIP purificada en presencia de alcohol veratrílico 1,5 mM y con concentraciones crecientes de peróxido de hidrógeno. El grado de oxidación se determinó midiendo la absorbancia de melanina a 460 nm, antes de la adición de peróxido de hidrógeno y 160 s después de eso, y se calculó en porcentajes. Generalmente, la oxidación de melanina aumentó con concentraciones crecientes de peróxido de hidrógeno hasta una meseta que se obtuvo a 700-900 µM de peróxido de hidrógeno (Figuras 4). El efecto de la concentración de peróxido sobre la oxidación de melanina se demuestra adicionalmente por comparación de mezclas de reacción en la Figura 5, en la que la mezcla de reacción se aclara significativamente con concentraciones de peróxido de hidrógeno crecientes. Así, estos resultados demuestran que la oxidación por LIP de melanina en una fase acuosa es claramente dependiente de las concentraciones de peróxido de hidrógeno, estando las concentraciones óptimas de peróxido de hidrógeno para la oxidación de melanina en el intervalo de 600 µM a 700 µM.

La oxidación por LIP de melanina es una función de la concentración inicial de melanina en una fase acuosa -

Con el fin de determinar la concentración de melanina óptima requerida para la oxidación de melanina en una fase acuosa por LIP, la reacción de oxidación se probó adicionalmente con concentraciones de melanina crecientes. La oxidación de melanina tuvo lugar por 0,48 µM de H1 de LIP purificada en presencia de alcohol veratrílico 1,5 mM y peróxido de hidrógeno 600 µM. A las concentraciones de melanina iniciales entre 15 y 45 µg/ml, la oxidación de melanina por LIP dependió de las concentraciones iniciales de melanina. La máxima oxidación de melanina (60 %) se alcanzó a las concentraciones iniciales de melanina entre 45 y 85 µg/ml (Figura 6). Así, la oxidación de melanina por LIP es claramente independiente de las concentraciones de melanina iniciales, más allá de 45 µg/ml.

La oxidación de melanina de LIP es parcialmente dependiente de la concentración de LIP en una fase acuosa -

Para optimizar adicionalmente las condiciones para la oxidación de melanina, el efecto de la concentración de LIP sobre la oxidación de melanina se probó con concentraciones óptimas de melanina (70 µg/ml), peróxido de hidrógeno (700 µM) y alcohol veratrílico (1,5 mM). La oxidación de melanina aumentó espectacularmente del 10 al 60 % cuando la concentración de LIP aumentó de 0,25 µM a 0,40 µM. Sin embargo, más allá de la concentración de LIP de 0,50 µM no se observó cambio en la oxidación de melanina (Figura 7). Así, el intervalo óptimo de concentraciones de LIP para la oxidación de melanina *in vitro* es 0,40 - 0,50 µM.

Ejemplo 3

Oxidación de melanina usando LIP en una formulación en crema

Para confirmar adicionalmente la capacidad de la isoenzima H1 de LIP para oxidar melanina y como etapa intermedia hacia el aclaramiento de la piel *in vivo*, se probó la actividad de LIP en una formulación en crema sobre melanina solubilizada en una fase acuosa.

La melanina en una fase acuosa se oxida por LIP en una formulación en crema -

Se prepararon dos tipos de crema: la crema enzimática que comprende la fracción de la isoenzima H1 de LIP (25 unidades/g de crema) y alcohol veratrílico (6 mmol/kg de crema), y la crema activadora que comprende peróxido de hidrógeno (3,52 mmol/kg de crema). Para la determinación de la actividad de LIP en una formulación en crema, la crema enzimática (0,3 g) se mezcló primero con melanina (140 µg/ml) y se observó un color negro grisáceo (Figura 8a). Cuando la crema activadora (0,3 gr) se añadió a la crema enzimática que ya contenía melanina, el color cambió inmediatamente a beis (Figura 8b). Estos resultados demuestran que la LIP en una formulación en crema es altamente eficaz en la decoloración de melanina y puede probarse adicionalmente sobre piel humana.

Ejemplo 4

*Aclaramiento de piel y pelo *in vivo* por H1 de LIP purificada en una formulación en crema*

Para probar la capacidad de LIP para aclarar la piel y el pelo *in vivo*, la enzima en una formulación en crema y acuosa se añadió a la piel y el pelo, respectivamente.

*LIP en una formulación en crema aclara la piel *in vivo* -*

Para probar la capacidad de LIP en una formulación en crema para aclarar la piel *in vivo*, la crema enzimática se aplicó y se absorbió por la piel y a continuación la crema activadora se aplicó cuatro veces en intervalos de 5 min. Cuando se repitió dos veces al día durante una semana se observó un aclaramiento significativo de las áreas de piel tratadas (Figura 9). Cuando el color de la piel de dos áreas de la mano tratada se cuantificó usando un cromámetro Minolta, se observó un claro efecto de aclaramiento de la piel de la aplicación de dos semanas de la crema de LIP (Tabla 1, % de cambio). Así, estos resultados demuestran que LIP, preparada en una formulación en crema fácil de aplicar, puede aclarar simple y eficazmente la piel *in vivo*, y

que la LIP preparada como se ha detallado en el presente documento puede adaptarse adicionalmente a otras aplicaciones de aclaramiento *in vivo*.

TABLA 1

CUANTIFICACIÓN DEL ACLARAMIENTO DE LA PIEL IN VIVO				
		Minolta L (brillo)	Minolta A (rojo)	Minolta B (amarillo)
Área I	Nivel inicial	44,8	10,5	16,34
Área I	2 semanas	48,8	10,6	17,93
Área I	% de cambio	8,9	---	9,7
Área II	Nivel inicial	49,91	10,38	19,28
Área II	2 semanas	53,8	9,39	20,63
Área II	% de cambio	7,79	----	7,0

La Tabla 1 ilustra tres conjuntos de lecturas en números absolutos tomadas del cromámetro Minolta de dos áreas en la mano tratada. El área I se corresponde con el área rodeada en la Figura 9, el área II se corresponde con datos no mostrados.

LIP en una formulación acuosa aclara el pelo in vivo - El aclaramiento de la pigmentación se requiere frecuentemente en tejidos ricos en melanina distintos de la piel. Para probar adicionalmente sus efectos de aclaramiento *in vivo*, se aplicó LIP sobre pelo humano. Antes de la aplicación de LIP, el pelo se sumergió primero durante 1 h en tampón carbonato 50 mM a pH 11,5 y a continuación se transfirió a otro tubo que contenía LIP (25 U/20 µl en agua). El pelo se incubó con LIP durante 10 segundos y a continuación se transfirió a tampón tartrato a pH 3,5 en presencia de alcohol veratrílico (1,5 mM) y peróxido de hidrógeno (8,8 mM). Se observó un efecto de aclaramiento significativo en el plazo de 1 h en presencia de LIP (Figura 10, tubo derecho) en comparación con el pelo tratado en la misma disolución pero sin LIP (Figura 10, tubo izquierdo). Así, estos resultados demuestran que en presencia de concentraciones muy bajas de peróxido de hidrógeno, el LIP en una formulación acuosa puede aclarar eficazmente pelo *in vivo*.

Ejemplo 5

Aumento de escala del proceso de preparación de LIP

Con el fin de producir grandes cantidades de lignina peroxidasa (LIP) útiles para fines comerciales, se purificó LIP del hongo *P. chrysosporium* usando un protocolo de aumento de escala.

Alta actividad de LIP obtenida usando un protocolo de fermentación de aumento de escala - Se realizó fermentación en un fermentador de 100 l usando 90 l de medio de fermentación como se ha descrito en la sección de métodos anteriormente en este documento. La condiciones de fermentación incluyeron agitación de 160 rpm y flujo de aire de 0,2 vvm. Se realizó inoculación de la misma forma que en el fermentador de 10 l que se describe en la sección de métodos anterior en este documento. Tras 7 días de crecimiento, la actividad de LIP medida fue 1600 unidades/litro.

Estos resultados demuestran que pueden producirse grandes cantidades y altas actividades catalíticas de LIP a partir del hongo *P. chrysosporium* usando fermentadores grandes y el protocolo de aumento de escala de la presente invención.

Ejemplo 6

Pruebas dermatológicas para la crema labial: pruebas hipoalergénicas, de piel sensible y sensibilizantes y de exposición sobre piel normal

Para caracterizar las propiedades dermatológicas de la crema de LIP y como requisito previo para su uso como producto cosmético, la crema de LIP se sometió a varias pruebas dermatológicas: una prueba hipoalergénica, una prueba sensibilizante y de exposición sobre piel normal, y una prueba sensibilizante y de exposición sobre piel sensible.

Métodos

Sujetos del estudio para las pruebas dermatológicas sobre piel normal: El estudio incluyó 50 voluntarios, 9 masculinos y 41 femeninos, en un intervalo de edades de 18 a 64 años. Los voluntarios tuvieron buena salud general y libres de cualquier enfermedad de la piel visible o anomalía en el área que iba a parchearse. Se requirió que cada sujeto del estudio leyera, entendiera y firmara una declaración de consentimiento informado. Los criterios de exclusión fueron los siguientes: mujeres embarazadas o lactantes, sujetos que padecen enfermedades graves o progresivas y/o patología sobre la zona tratada, sujetos usando un tratamiento (por ejemplo, retinoides, esteroides) y/o modificadores de la hidratación cutánea, sujetos con peso inestable o consumo excesivo de alcohol o tabaco.

Un resumen de las características de los sujetos del estudio se presenta en la Tabla 2 en el presente documento a continuación.

Tabla 2

CARACTERÍSTICAS DE LOS SUJETOS DEL ESTUDIO		
Sexo	Edad promedio (años)	Historia médica que probablemente influya en el estudio
F	40,36	Ninguna
M	34,33	Ninguna

Sujetos del estudio para la prueba dermatológica sobre piel sensible - Un total de 50 sujetos, 6 hombres y 44 mujeres, completaron la prueba: 22 sujetos estuvieron en el intervalo de 18 a 35, 11 sujetos en el intervalo de 36 a 45, y 17 sujetos en el intervalo de 46 a 65.

Tratamiento asociado durante el estudio - No se aplicó agua en el sitio de prueba durante la aplicación del parche; no se permitió tratamiento sistémico o tópico que probablemente modificara la piel; no se permitió el uso de productos dermofarmacéuticos o cosméticos, que incluyen productos de limpieza, sobre las zonas que se evaluaron.

Preparación de parches - Para la prueba hiperalérgica, se pusieron 2 mg de la crema de LIP de la presente invención en una cinta adhesiva Curatest® F (Lohmann & Rauscher International GmbH & Co. KG, Rengsdorf). Para las pruebas dermatológicas y las pruebas de piel sensible, cada parche incluyó 0,07-0,1 gramos de la crema de LIP en la cinta adhesiva Curatest® F.

Se llevó a cabo la *prueba repetida de irritabilidad dérmica en personas* esencialmente como se ha descrito en "Appraisal of the Safety of Chemicals in Foods, Drugs and Cosmetics" por J.H. Draize (publicado por the Association of Food and Drug Officials of the United States).

Fase de inducción - El parche se aplicó sobre sitios de contacto designados y permaneció en su sitio durante 24 horas. Al final de este periodo, se quitó el parche y el sitio se examinó para cualquier respuesta dérmica. Los sujetos del estudio descansaron durante 24 horas, después de lo cual el sitio de la piel se examinó de nuevo. A continuación se aplicó un parche al mismo sitio que se había usado previamente. La segunda aplicación fue idéntica a la primera y permaneció en su sitio 24 horas. Este procedimiento se repitió nueve veces. Los sujetos del estudio examinaron el sitio para cualquier respuesta dérmica e informaron sus observaciones antes de la siguiente aplicación. Se usó el mismo sitio durante todo el estudio. Cada aplicación se puso y retiró por el personal del Instituto de Investigación de la Piel (Tel Aviv, Israel). Una persona de control de calidad monitorizó la adherencia al protocolo del estudio.

Fase de exposición - Tras la 9ª aplicación, transcurrió un periodo de descanso de 2 semanas después del cual se aplicó una aplicación de exposición del mismo modo y al mismo sitio usado durante la fase de inducción. La aplicación de exposición se retiró después de 24 horas y el sitio se examinó y calificó para signos de irritación o sensibilización. Se realizó un examen de seguimiento a las 48 horas después de la aplicación de exposición (24 horas después de la eliminación del parche), además de 48 y 72 horas después de la eliminación.

Escala de clasificación - Los resultados de las pruebas de inducción y de exposición se clasificaron usando la siguiente escala: "0" = Sin reacción visible; "?" = reacción dudosa, es decir, eritema mínimo apenas visible, sin infiltración; "1" = reacción positiva débil, es decir, eritema, infiltración, sin pápulas discretas; "2" = reacción positiva fuerte, es decir, eritema, infiltración, pápulas, vesículas discretas; "3" = reacción positiva adicional, es decir, eritema intenso, infiltración, vesículas coalescentes/reacción bullosa; "IR" = reacción de irritación, es decir, eritema discreto sin infiltración/eritema folicular irregular/pústulas hemorrágicas y foliculares; "NT" = no probado.

Resultados de las pruebas dermatológicas

Prueba hiperalérgica - En esta prueba se registró la reacción a la aplicación de un parche que contiene la crema de LIP tras 20 minutos, 24 horas y 48 horas de la eliminación del parche. Como se muestra en la Tabla 3 en el presente documento a continuación, en los 50 sujetos del estudio no hubo reacción de la piel visible a la crema de LIP.

Tabla 3

Resultados de la prueba hiperalérgica						
Nº	Sujeto	Sexo	Edad	20 minutos	24 horas	48 horas
1	D.P.	M	37	0	0	0
2	G.B.	F	62	0	0	0
3	Z.A.	F	58	0	0	0
4	S.E.	F	64	0	0	0
5	E.R.	F	61	0	0	0
6	G.C.	F	35	0	0	0
7	S.S.	F	26	0	0	0

<i>Resultados de la prueba hipoalergénica</i>						
Nº	Sujeto	Sexo	Edad	20 minutos	24 horas	48 horas
8	D.P.	F	65	0	0	0
9	E.T.	F	46	0	0	0
10	I.M.	F	58	0	0	0
11	M.I.	F	40	0	0	0
12	G.O.	F	30	0	0	0
13	M.L.	F	49	0	0	0
14	S.A.	M	22	0	0	0
15	C.B.	F	38	0	0	0
16	B.A.	F	34	0	0	0
17	S.I.	F	45	0	0	0
18	K.S.	F	35	0	0	0
19	S.S.	F	28	0	0	0
20	F.H.	F	26	0	0	0
21	R.S.	F	44	0	0	0
22	A.A.	F	25	0	0	0
23	S.T.	M	21	0	0	0
24	F.A.	M	38	0	0	0
25	S.S.	F	42	0	0	0
26	S.R.	M	49	0	0	0
27	S.I.	M	19	0	0	0
28	C.T.	F	32	0	0	0
29	C.J.	M	35	0	0	0
30	H.P.	F	30	0	0	0
31	F.S.	F	36	0	0	0
32	P.A.	F	45	0	0	0
33	P.N.	M	51	0	0	0
34	M.R.	F	30	0	0	0
35	S.L.	F	31	0	0	0
36	T.I.	F	23	0	0	0
37	V.I.	F	30	0	0	0
38	L.A.	F	45	0	0	0
39	T.R.	F	43	0	0	0
40	C.D.	F	38	0	0	0
41	S.S.	F	36	0	0	0
42	L.B.	F	36	0	0	0
43	M.L.	F	31	0	0	0
44	A.T.	M	37	0	0	0
45	G.K.	F	42	0	0	0
46	B.P.	F	51	0	0	0
47	L.T.	F	56	0	0	0
48	I.V.	F	35	0	0	0
49	P.O.	F	43	0	0	0
50	C.P.	F	31	0	0	0
Tabla 3: Los resultados de una prueba hipoalergénica como se clasificó 20 minutos, 24 horas o 48 horas tras la eliminación de la aplicación.						

La sensibilización y exposición de piel normal a la crema de LIP produjo ausencia de cualquier reacción de la piel - La crema de LIP se insertó en los parches y se llevó a cabo la prueba repetida de irritabilidad dérmica en personas en 50 voluntarios sanos. Tras cada aplicación del parche, se registró la reacción de la piel usando la escala de clasificación descrita en la sección de métodos anterior en este documento. Como se muestra en la Tabla 4 en el presente documento a continuación, en los 50 voluntarios no hubo reacción de la piel visible durante las 9 aplicaciones de crema de la fase de inducción, además de tras la última aplicación de la fase de exposición.

Tabla 4

<i>Resultados de las pruebas de inducción y exposición de la crema de LIP</i>													
Nº	Sujeto	Sexo	Edad	<i>Resultados según la escala de clasificación</i>									
				1	2	3	4	5	6	7	8	9	10
1.	D.P.	M	37	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
2.	G.B.	F	62	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
3.	Z.A.	F	58	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
4.	S.E.	F	64	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0

Resultados de las pruebas de inducción y exposición de la crema de LIP													
Nº	Sujeto	Sexo	Edad	Resultados según la escala de clasificación									
				1	2	3	4	5	6	7	8	9	10
5.	E.R.	F	61	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
6.	G.C.	F	35	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
7.	S.S.	F	26	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
8.	D.P.	F	65	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
9.	E.T.	F	46	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
10.	I.M.	F	58	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
11.	M.I.	F	40	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
12.	G.O.	F	30	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
13.	M.L.	F	49	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
14.	S.A.	M	22	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
15.	C.B.	F	38	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
16.	B.A.	F	34	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
17.	S.I.	F	45	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
18.	K.S.	F	35	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
19.	S.S.	F	28	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
20.	F.H.	F	26	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
21.	R.S.	F	44	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
22.	A.A.	F	25	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
23.	S.T.	M	21	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
24.	F.A.	M	38	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
25.	S.S.	F	42	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
26.	S.R.	M	49	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
27.	S.I.	M	19	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
28.	C.T.	F	32	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
29.	C.J.	M	35	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
30.	H.P.	F	30	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
31.	F.S.	F	36	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
32.	P.A.	F	45	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
33.	P.N.	M	51	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
34.	M.R.	F	30	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
35.	S.L.	F	31	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
36.	T.I.	F	23	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
37.	V.I.	F	30	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
38.	L.A.	F	45	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
39.	T.R	F	43	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
40.	C.D.	F	38	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
41.	S.S.	F	36	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
42.	L.B.	F	36	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
43.	M.L.	F	31	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
44.	A.T.	M	37	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
45.	G.K.	F	42	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
46.	B.P.	F	51	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
47.	L.T.	F	56	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
48.	I.V.	F	35	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
49.	P.O.	F	43	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
50.	C.P.	F	31	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0

Tabla 4: Puntuaciones de clasificación tras cada aplicación de parche en la fase de inducción (resultados de puntuación nº 1-9) y la fase de exposición (resultados de puntuación nº 10). M = masculino; F = femenino.

Prueba dermatológica sobre piel sensible - Para caracterizar adicionalmente las propiedades sensibilizantes de la crema de LIP se llevó a cabo una prueba de parche de irritación en 50 voluntarios sanos sobre piel sensible. En la pre-prueba, se encontró que 11 sujetos tenían diversos grados de escozor: 2 con piel sensible grave, 8 con piel moderadamente sensible y 1 con piel ligeramente sensible. El parche irritante que incluye la crema de LIP se colocó sobre la espalda de los voluntarios durante 48 horas. El área probada se inspeccionó tras 1 h, 24 h y 48 horas y se encontró que no hubo reacción de la piel en ninguno de los 50 voluntarios.

Estos resultados descartan reacciones hipoalérgicas e irritantes a la crema de LIP en piel normal y sensible. Además, los resultados de la prueba repetida de irritabilidad dérmica en personas sugieren adicionalmente el uso de la crema de LIP como una composición cosmética segura.

Ejemplo 7

LA CREMA DE LIP ES ALTAMENTE EFICAZ EN EL BLANQUEAMIENTO DE LA PIGMENTACIÓN DE LA PIEL

- 5 Se comparó el efecto de la crema de LIP en el blanqueamiento de la piel con las cremas del estado de la técnica en un estudio de doble ciego.

Diseño del estudio

- 10 *Sujetos del estudio* - El estudio incluyó 12 hombres y mujeres sanos de edades 18-65 de origen asiático que estaban libres de enfermedad, sin historia de enfermedades de la piel o enfermedades atópicas (asma, fiebre del heno, rinitis alérgica) y no mostraron sensibilidad a ninguna de las sustancias que se probaron y ninguno de los componentes de la preparación cosmética. El estudio excluyó candidatos que estuvieran recibiendo tratamiento con fármacos antiinflamatorios, antihistamínicos o corticosteroides para tratamiento sistémico o local, a menos que el tratamiento se interrumpiera dos semanas en el caso del tratamiento sistémico y tres días en el caso del tratamiento local antes de enrolarse en el estudio. También se excluyeron del estudio candidatos con cáncer, enfermedad renal o enfermedad hepática en cualquier fase de diagnóstico o tratamiento, además de mujeres embarazadas y lactantes.

- 20 *Protocolo del estudio* - El estudio incluyó dos tipos de cremas que se aplicaron en un modo de doble ciego cada una sobre un antebrazo superior: la crema blanqueante de la presente invención que incluye LIP como principio activo, y un producto comercializado, 2 % de hidroquinona (Esomed Medibrands, Israel). Las cremas se aplicaron dos veces al día (es decir, mañana y noche). Las partes inferiores de los antebrazos quedaron sin tratar. Los sujetos del estudio se examinaron por el personal del Instituto de Investigación de la Piel (Tel Aviv, Israel) al principio del estudio (semana 0), y tras una, dos y tres semanas de aplicación de la crema. En cada examen se registraron la pigmentación de la piel y los efectos secundarios.

- 30 *Evaluación de la pigmentación de la piel* - Se evaluó la pigmentación de la piel usando un espectrómetro Derma (Cortex Technology, Dinamarca), se tomaron fotografías en color usando la misma distancia y exposición de luz y se hizo inspección visual por el Prof. Brenner (Jefe del Departamento Dermatológico, Centro Médico Souraski, Tel Aviv, Israel) y su equipo.

Resultados del estudio

- 35 *La crema de LIP redujo la pigmentación de la piel después de 3 semanas de aplicación* - Para evaluar el efecto de la crema de LIP en el blanqueamiento de la piel, la crema de LIP se aplicó dos veces al día sobre la parte superior del brazo derecho de 12 voluntarios sanos. Como se muestra en las Figuras 11a-b y 13a-b que incluyen fotografías representativas de dos sujetos del estudio, tras tres semanas de aplicación de la crema, la parte superior del antebrazo derecho apareció mucho más blanca que antes de la aplicación de la crema.

- 40 *La crema de LIP es más eficaz en el blanqueamiento de la piel que la crema de hidroquinona* - Se comparó el efecto de la crema de LIP en reducir la pigmentación de la piel con el de 2 % de hidroquinona. Tras 21 días de aplicación de la crema, la pigmentación del área tratada con LIP del sujeto del estudio nº 1 se redujo 3,33 unidades (Figura 12a columnas azules y Figura 12c curva azul). Por otra parte, la pigmentación del área sin tratar en el mismo antebrazo se redujo 1,13 unidades (Figura 12a, columnas azules claras). Por otra parte, tras 21 días de tratamiento usando la crema de hidroquinona, la pigmentación del área tratada se redujo solo 1 unidad (Figura 12b columnas rosas y Figura 12c curva rosa). Se observaron efectos similares en otros sujetos del estudio como se muestra en las Figuras 14a-c. Cuando se resumieron los resultados de los 12 sujetos del estudio se encontró que las reducciones promedio en la pigmentación de la piel fueron 1,57 unidades (Figura 15a, curva azul) y 1,49 unidades (Figura 15a, curva rosa) en los antebrazos tratados con LIP y tratados con hidroquinona, respectivamente. Además, cuando las reducciones en las pigmentaciones de la piel se normalizaron a la pigmentación inicial de la piel, las disminuciones promedio en las pigmentaciones de la piel fueron 4,3 % (Figura 15b, curva azul) y 3,8 % (Figura 15b, curva rosa) para los antebrazos tratados con LIP y tratados con hidroquinona, respectivamente.

- 55 En conjunto, estos resultados demuestran que la crema de LIP es altamente eficaz en reducir la pigmentación de la piel. Además, estos resultados sugieren que el efecto blanqueante relativo de la crema de LIP es superior al efecto blanqueante relativo observado usando el 2 % de crema de hidroquinona.

- 60 Se aprecia que ciertas características de la invención, que se describen, por claridad, en el contexto de realizaciones separadas, también pueden proporcionarse en combinación en una única realización. En cambio, diversas características de la invención, que se describen, por brevedad, en el contexto de una única realización, también pueden proporcionarse por separado o en cualquier subcombinación adecuada.

- 65 Aunque la invención se ha descrito conjuntamente con realizaciones específicas de la misma, es evidente que muchas alternativas, modificaciones y variaciones serán evidentes para aquellos expertos en la materia. Por consiguiente, pretende englobar todas aquellas alternativas, modificaciones y variaciones que se encuentran dentro del amplio alcance de las reivindicaciones adjuntas. Se desvelan todas las publicaciones, patentes, solicitudes de

patente y secuencias identificadas por sus números de acceso mencionados en esta memoria descriptiva. Además, la citación o identificación de cualquier referencia en la presente aplicación no debe interpretarse como una admisión a que tal referencia esté disponible como estado de la técnica para la presente invención.

5 REFERENCIAS

1. Alaluf S, Heath A, Carter N, Atkins D, Mahalingam H, Barret K, Kolb R, Smit N. (2001). Variation in melanin content and composition in Type V and VI photoexposed and photoprotected human skin: the dominant role of DHI. *Pigment Cell Res.* 14: 337-347.
2. Cooksey CJ, Garratt PJ, Land EJ, Pavel S, Ramsden CA, Riley PA, Smit NPM. (1997). Evidence of the indirect formation of the catecholic intermediate substrate responsible for the autoactivation kinetics of tyrosinase. *J. Biol. Chem.* 272: 26226-35.
3. Farrell, R. L., Murtagh, K.E., Tien, M., Mozuch, M.D., Kirk, T.K. (1989). Physical and enzymatic properties of lignin peroxidase isoenzymes from *Phanerochaete chrysosporium*. *Enzyme. Microb. Technol.* 11: 322-328.
4. Ghose, T.K. (1987). Measurements of cellulase activities. *Pure Appl. Chem.* 59: 257-268.
5. Ritch, T.G., Nipper, V.J., Akileswaran, L., Smith, A.J., Pribnow, D.G., Gold, M.H. (1991). Lignin peroxidase from the basidiomycetes *Phanerochaete chrysosporium* is synthesized as a preproenzyme. *Gene* 107: 119-126.
6. Tien, M., and Kirk, T.K. (1984). Lignin degrading enzyme from *Phanerochaete chrysosporium*. Purification, characterization and catalytic properties of a unique H₂O₂-requiring oxygenase. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 81: 2280-2284.
7. Kuan, LC. and Tien, M. (1989). Phosphorylation of lignin peroxidase from *Phanerochaete chrysosporium*: *J. Biol. Chem.* 264: 20350-20355.
8. Dosoretz, C.G. and Grethlein, H.E. (1991). Physiological aspects of the regulation of extracellular enzymes of *Phanerochaete chrysosporium*. *Appl. Biochem. Biotechnol.* 28: 253-265.
9. Stewart, P., Kersten, P., Van den Wymelenberg, A., Gaskell, J., Cullen, D. (1992). Lignin peroxidase gene family of *Phanerochaete chrysosporium*: complex regulation by carbon and nitrogen limitation and identification of a second dimorphic chromosome. *J. Bacteriol.* 174: 5036-5042.
10. van der Woude, M.W., Boominathan, K., Reddy, C. A. (1993). Nitrogen regulation of lignin peroxidase and manganese-dependent peroxidase production is independent of carbon and manganese regulation in *Phanerochaete chrysosporium*. *Arch. Microbiol.* 160: 1-4.
11. Dosoretz, C.G., Chen, H.C., Grethlein, H.E. (1990). Effect of oxygenation conditions on submerged cultures of *Phanerochaete chrysosporium*. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 34: 131-137.
12. Faison, B.D. and Kirk, T.K. (1985). Factors involved in the regulation of a ligninase activity in *Phanerochaete chrysosporium*. *Appl. Environ. Microbiol.* 49: 251-254.
13. Leisola, M., Ulmer, D., Fiechter, A. (1983). Problem of oxygen transfer during degradation of lignin by *Phanerochaete chrysosporium*. *Eur. J. Appl. Microbiol. Biotechnol.* 17: 113-116.
14. Michel, F.C., Grulcke, E.A., Reddy, C.A. (1992). Determination of the respiration kinetics for mycelial pellets of *Phanerochaete chrysosporium*. *Appl. Environ. Microbiol.* 58: 1740-1745.
15. Popp, J.L., Kalyanaraman, B., Kirk, T.K. (1990). Lignin peroxidase oxidation of Mn²⁺ in the presence of veratryl alcohol, malonic or oxalic acid, and oxygen. *Biochemistry* 29: 10475-10480.
16. Rothschild, N., Levkowitz, A., Hadar, Y., Dosoretz, C. (1999). Manganese deficiency can replace high oxygen levels needed for lignin peroxidase formation by *Phanerochaete chrysosporium*. *Appl. Environ. Microbiol.* 65: 483-8.

60 LISTADO DE SECUENCIAS

<110> Belinky, Paula
Lasser, Haim
Dosoretz, Carlos

<120> MÉTODOS DE PRODUCCIÓN DE LIGNINA PEROXIDASA Y SU USO EN EL ACLARAMIENTO DE PIEL Y PELO

<130> 27123

<160> 1

<170> PatentIn versión 3.1

<210> 1

<211> 1119

<212> ADN

<213> Phanerochaete chrysosporium

<400> 1

```

atggcggttca agcagctcct cgcagccctc tccgtcgccc tgaccctcca ggtaacccaa      60
gctgccccga acctcgacaa gcgcgtcgct tgccccgacg gcgtgcacac cgctccaac      120
gcggcggtgct gtgcatggtt cccggctctc gatgatatcc agcagaacct ctccacgggt      180
ggccagtgcg gtgccgaggc ccacgaggcc ctctgtatgg tcttccatga ctccatcgct      240
atctcgccca agcttcagtc gcagggcaag tttggcggcg gcggcgcgga cggtctgac      300
attaccttct cctcgatcga gaccacgtac caccgaaca tcggcctcga cgaggctcgtc      360
gccatccaga agccgttcac cgcaagcac ggcgtcacgc gcggcgattt catcgcggttc      420
gcgggtgccc tcggcggtgag caactgcccg ggcgcgccgc agatgcagtt ctccctcggc      480
cgccccgagg cgaagcaggc cgccccgac ggtctcgtgc cagagccctt ccacaccatc      540
gatcaggttc tcgctcgcat gcttgatgct ggtggcttcg acgagatcga gactgtctgg      600
ctgctctctg ccactccat cgcggctgcg aacgacgtcg acccgacat ctccggcctg      660
ccgttcgact ccacccctgg ccagttcgac tcccagttct tcgtcgagac gcagctccgc      720
ggtaccgcat tccctggcaa gactggtatc cagggcaccg tcatgtcccc gctcaagggc      780
gagatgcgtc tgcagacgga cacttggttc gcgcgcgact cgcgcacggc gtgcgagtgg      840
cagtccttcg tcaacaacca gacgaagctg caggaggact tccagttcat ctccacggcg      900
ctctcgacce tcggccacga catgaacgcc atgaccgact gctccgaggt catccccgcg      960
cccaagcccg tcaacttcgg cccgtcgttc ttccccgccg gtaagacgca cgccgacatc     1020
gagcaggcct gcgcattcac gccgttcccg acgctcatca ccgcccccg tccctctgcg     1080
tccgtcgctc gcatcccccc gccgccgtcc cccaactaa                               1119

```

REIVINDICACIONES

- 5 1. Una composición cosmética para el aclaramiento de una región de la piel o pelo de un sujeto que comprende una enzima lignina peroxidasa a una concentración de 1-100 U/g, un mediador oxidante, en la que dicho mediador oxidante es alcohol veratrílico o veratrol y un vehículo cosméticamente aceptable formulado para su uso sobre piel o pelo.
- 10 2. Un artículo de fabricación que comprende material de embalaje y una composición cosmética identificada para el aclaramiento de una región de la piel o pelo de un sujeto, estando dicha composición cosmética contenida dentro de dicho material de embalaje, incluyendo dicha composición cosmética una enzima lignina peroxidasa a una concentración de 1-100 U/g, un mediador oxidante, en el que dicho mediador oxidante es alcohol veratrílico o veratrol, y un vehículo cosméticamente aceptable.
- 15 3. Un kit para el aclaramiento de una región de la piel o pelo que comprende un primer recipiente que comprende una enzima lignina peroxidasa a una concentración de 1-100 U/g y un mediador oxidante, en el que dicho mediador oxidante es alcohol veratrílico o veratrol, y un segundo recipiente que comprende un aceptor de electrones.
- 20 4. El kit de la reivindicación 3, en el que dicho primer y/o dicho segundo recipiente comprende además un vehículo cosméticamente aceptable formulado para su uso sobre una piel o un pelo.
- 25 5. La composición cosmética de la reivindicación 1, el artículo de fabricación de la reivindicación 2 o el kit de la reivindicación 3 o 4, en la que dicha lignina peroxidasa es la isoenzima H1 o una forma modificada de la isoenzima H2.
- 30 6. La composición cosmética de la reivindicación 1 o 5, el artículo de fabricación de la reivindicación 2 o 5 o el kit de la reivindicación 4 o 5, en la que dicho vehículo cosméticamente aceptable comprende propilenglicol y/o polietilenglicol.
- 35 7. La composición cosmética, el artículo de fabricación o el kit de la reivindicación 1-3, en la que dicho alcohol veratrílico se proporciona a una concentración de al menos el 0,05 %.
8. La composición cosmética de la reivindicación 1, 5 o 6, el artículo de fabricación de la reivindicación 2, 5 o 6, o el kit de la reivindicación 4 o 6, en la que dicho vehículo cosméticamente aceptable incluye alcanolaminas.
9. La composición cosmética de cualquiera de las reivindicaciones 1 y 4, 5, 7, 8, el artículo de fabricación de cualquiera de las reivindicaciones 2 y 4, 5, 7, 8, el kit de cualquiera de las reivindicaciones 4, 5, 7, 8, en la que dicho vehículo cosméticamente aceptable comprende alcohol cetílico, alcohol estearílico, butilcarbamato de yodopropilo y/o alcohol miristílico.

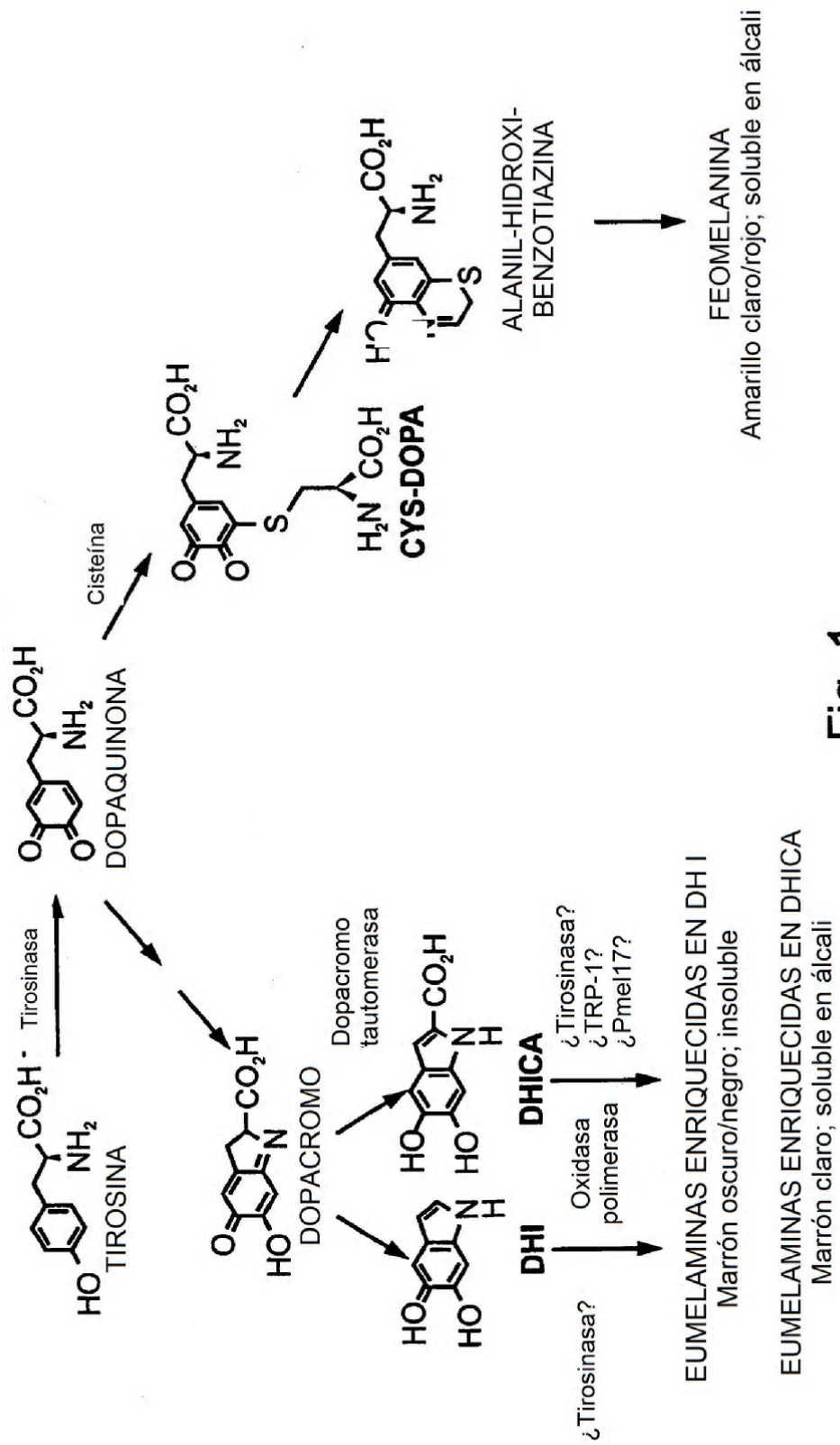


Fig. 1

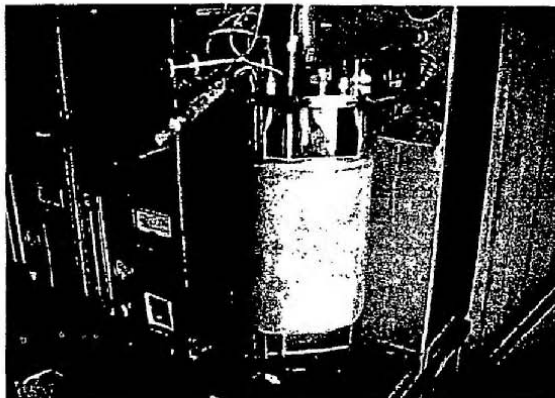
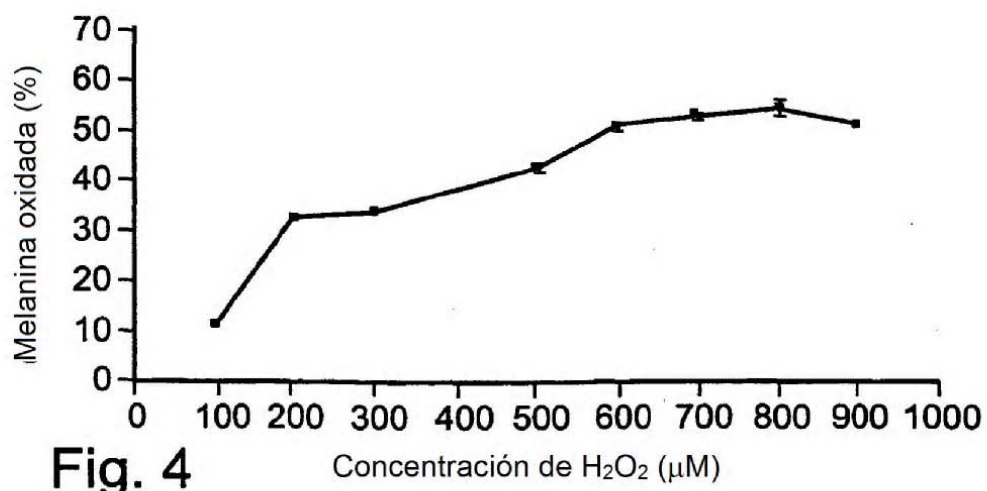
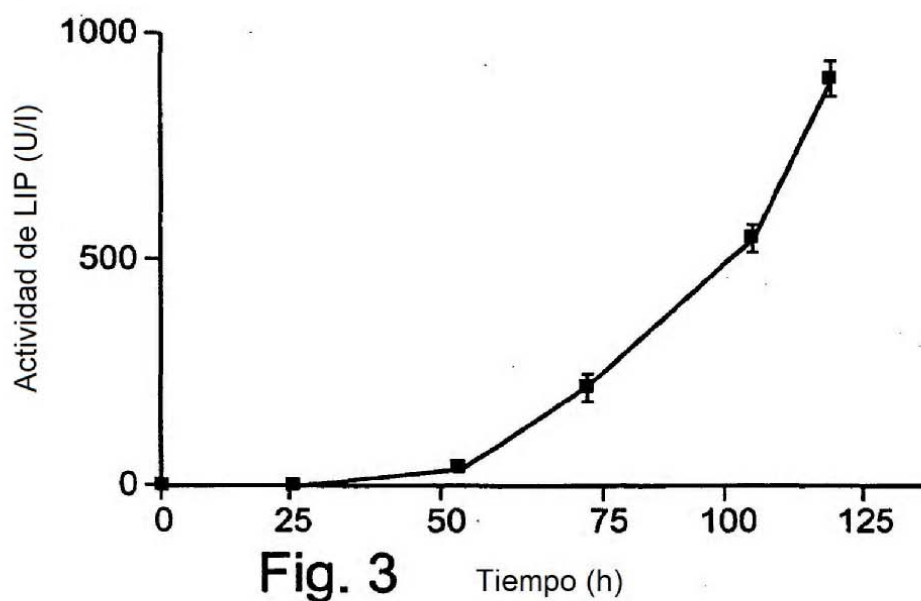


Fig. 2



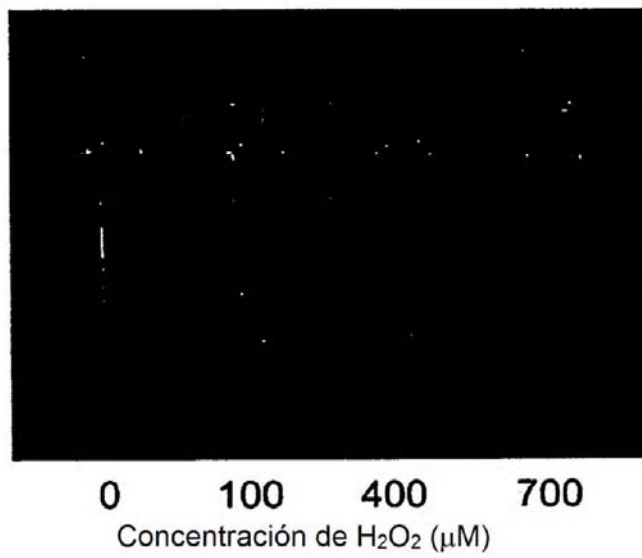


Fig. 5

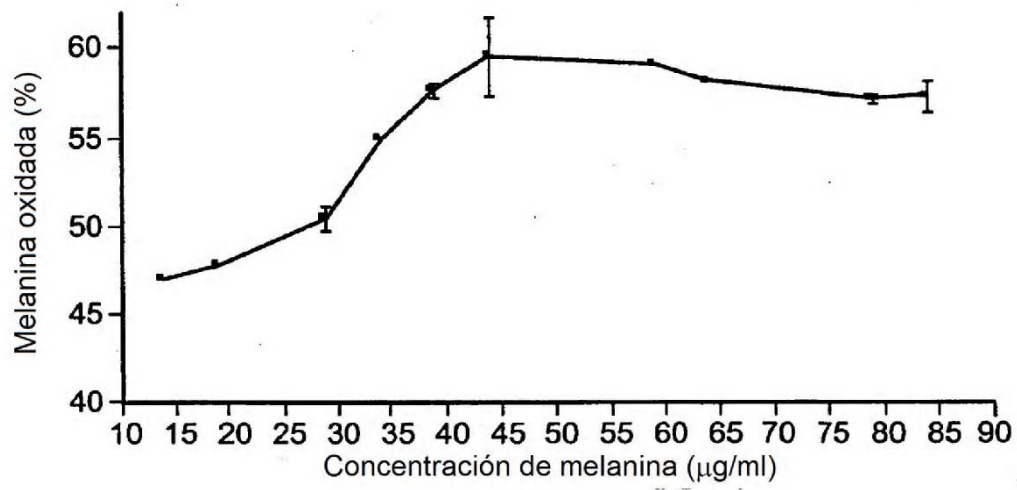


Fig. 6

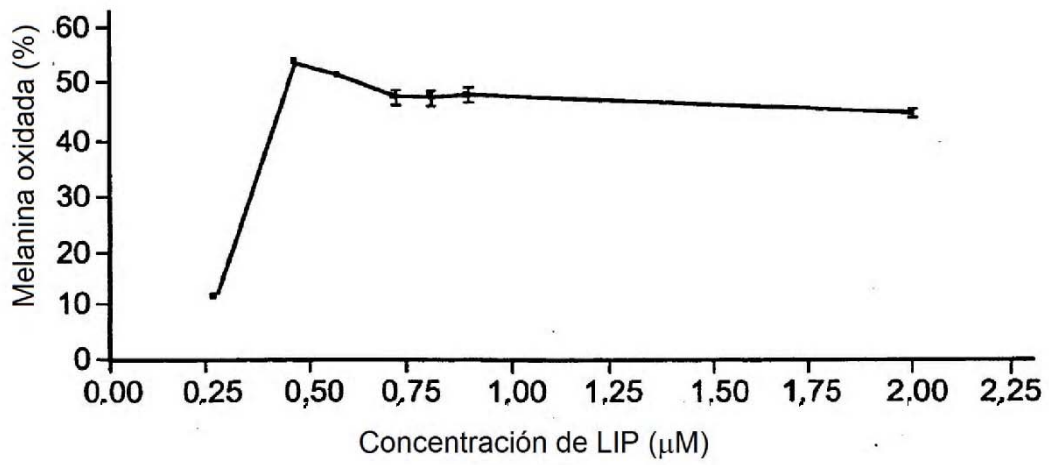


Fig. 7

Fig. 8a



Fig. 8b



Fig. 9a

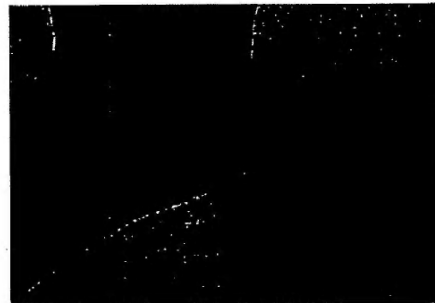


Fig. 9b



Fig. 10



Fig. 11a



Fig. 11b

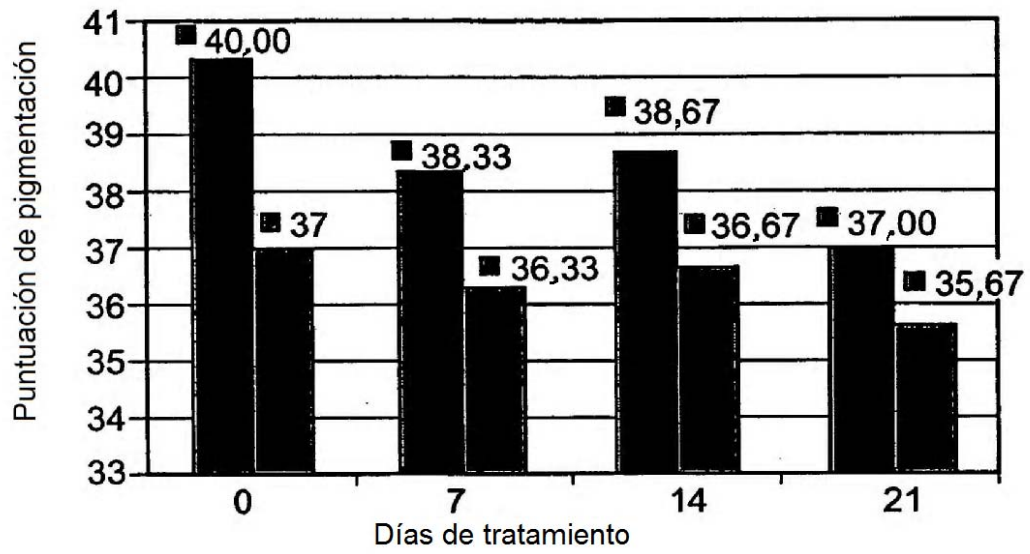


Fig. 12a

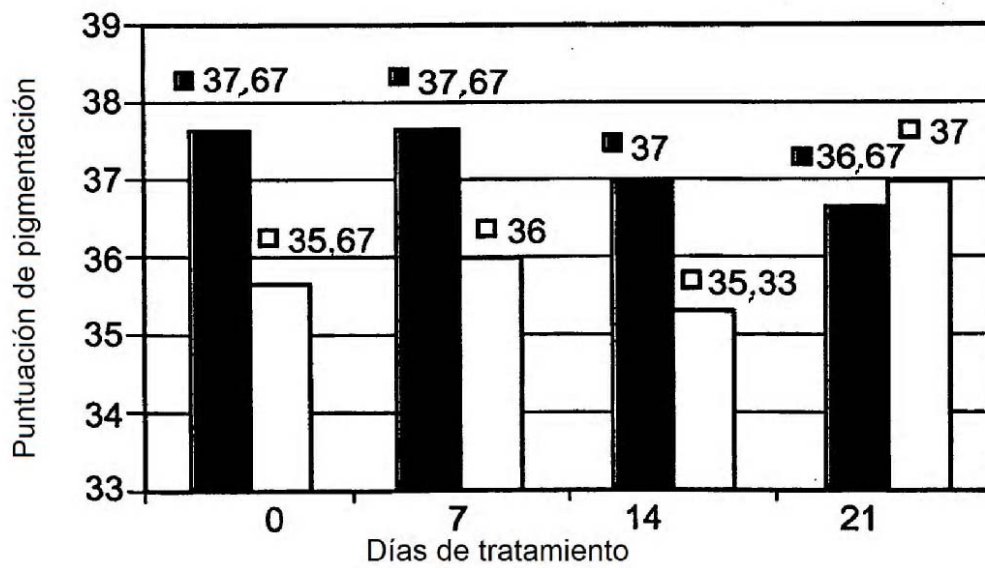


Fig. 12b

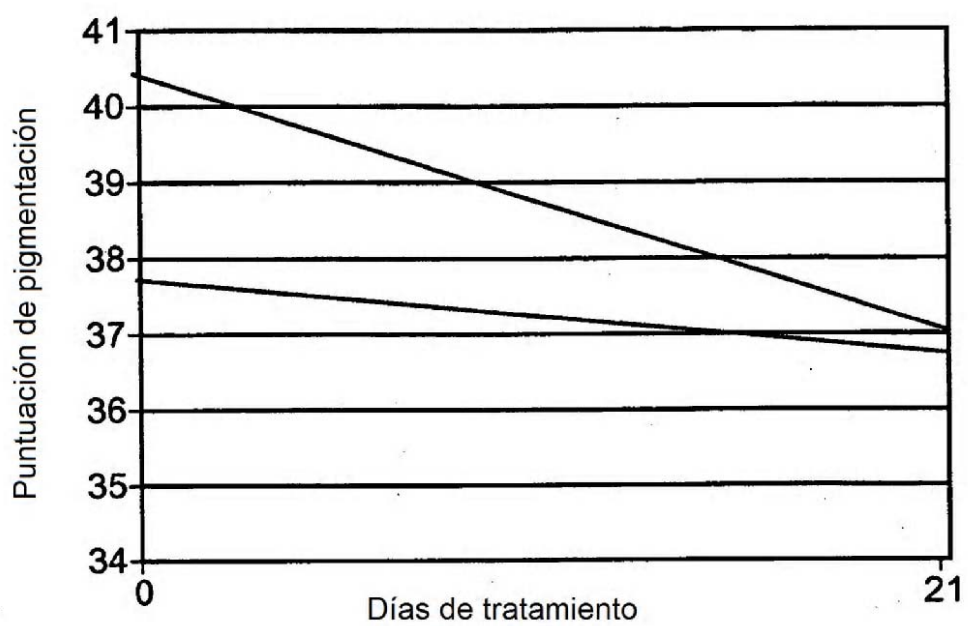


Fig. 12c



Fig. 13a

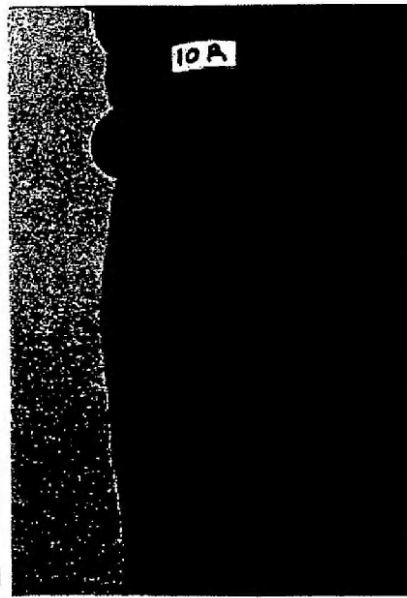


Fig. 13b

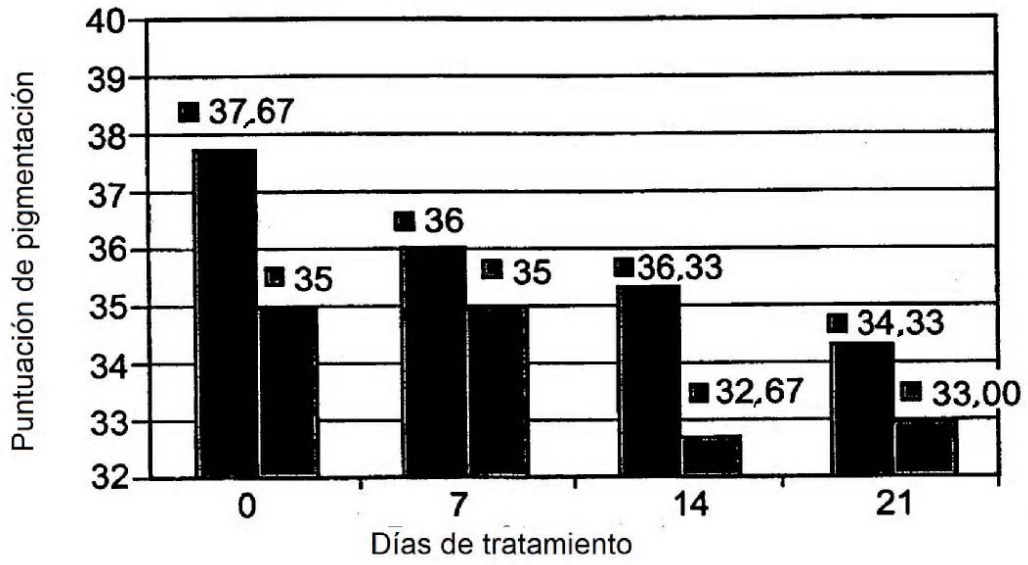


Fig. 14a

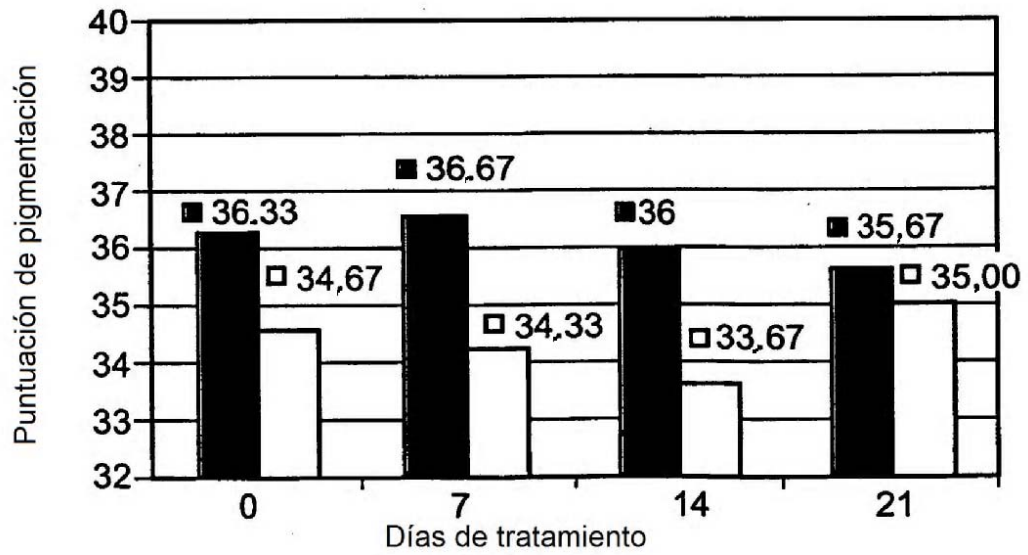


Fig. 14b

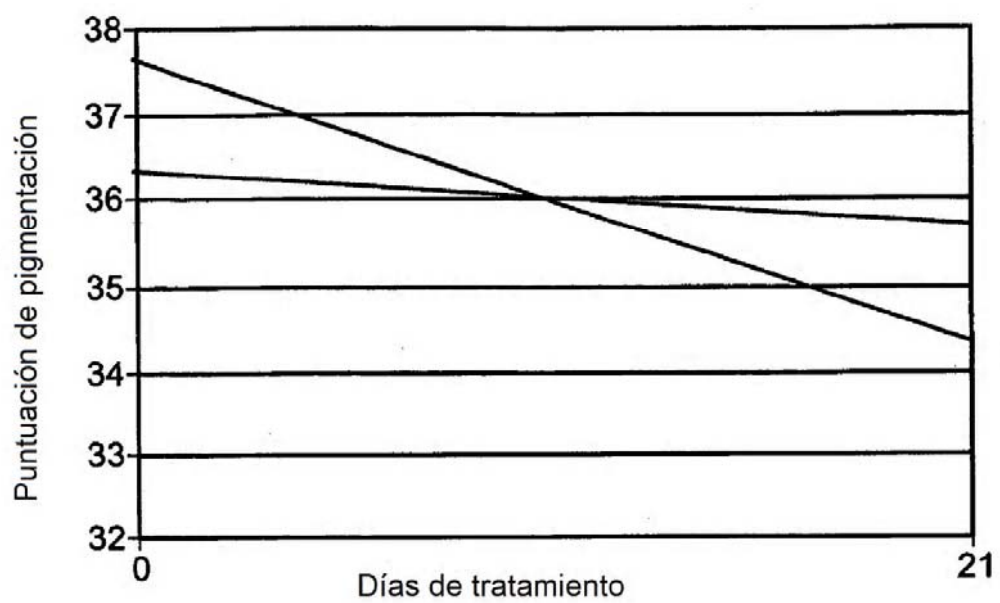


Fig. 14c

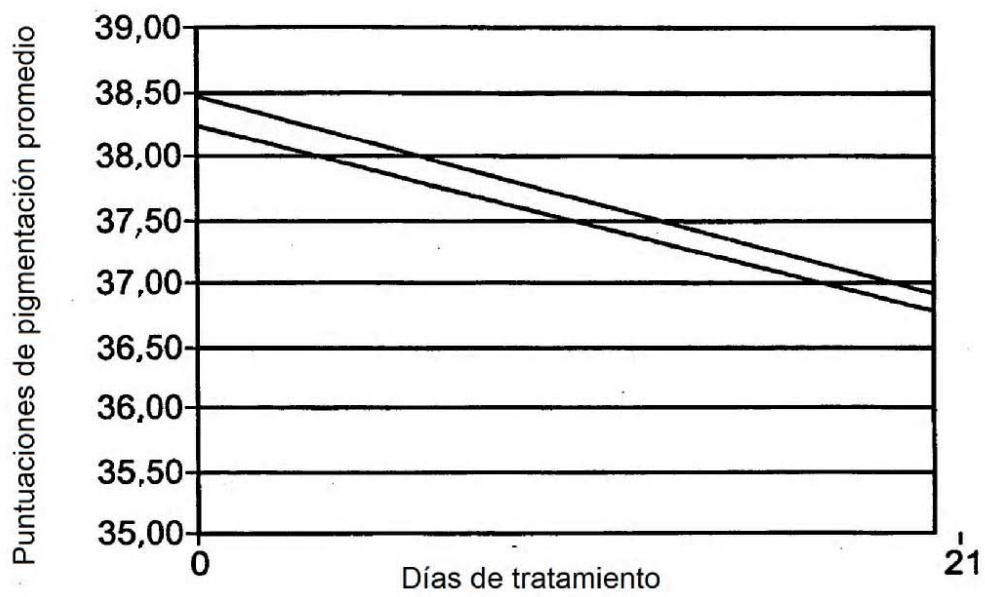


Fig. 15a

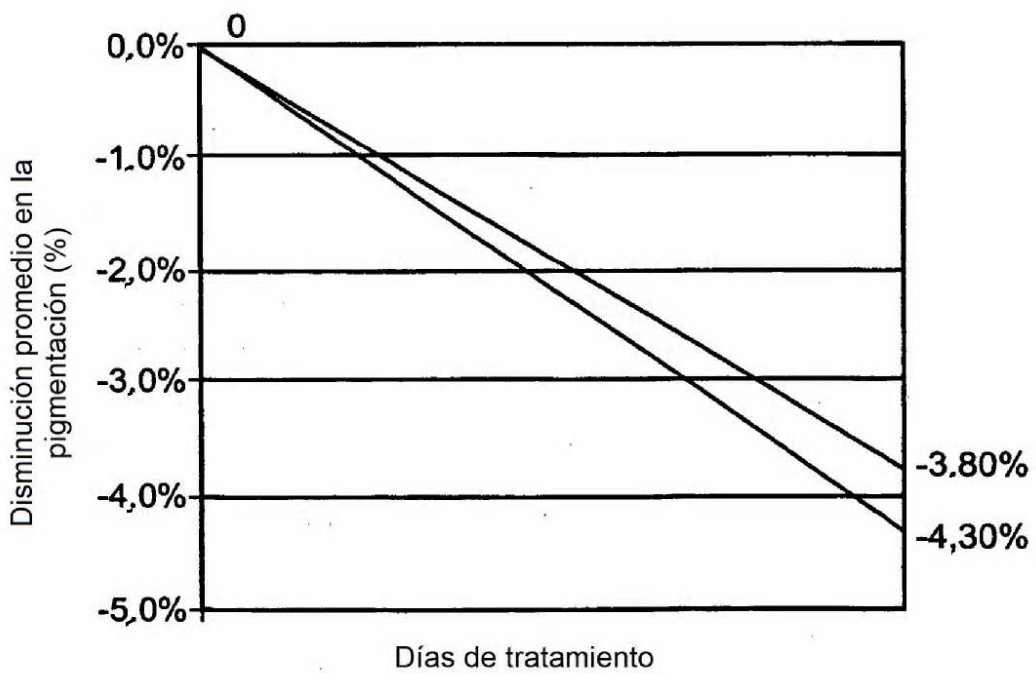


Fig. 15b