

19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 632 116**

51 Int. Cl.:

C07K 14/315 (2006.01)

A61K 8/64 (2006.01)

A61K 8/11 (2006.01)

A61Q 19/02 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

86 Fecha de presentación y número de la solicitud internacional: **20.11.2014 PCT/EP2014/075120**

87 Fecha y número de publicación internacional: **28.05.2015 WO15075116**

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **20.11.2014 E 14800064 (9)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **10.05.2017 EP 3071177**

54 Título: **Cápsulas dirigidas para la entrega de agentes de blanqueamiento cutáneo en la piel**

30 Prioridad:

20.11.2013 EP 13382467

45 Fecha de publicación y mención en BOPI de la traducción de la patente:
11.09.2017

73 Titular/es:

**INFINITEC ACTIVOS S.L. (100.0%)
Granollers 1-3 Nave 7, Poligono Industrial
Raiguer
08170 Montornés del Vallès, Barcelona, ES**

72 Inventor/es:

**MOURELLE MANCINI, MARISABEL y
CARCELLER MARGELI, MAGDALENA**

74 Agente/Representante:

ARIAS SANZ, Juan

Observaciones :

**Véase nota informativa (Remarks, Remarques
o Bemerkungen) en el folleto original publicado
por la Oficina Europea de Patentes**

ES 2 632 116 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

Cápsulas dirigidas para la entrega de agentes de blanqueamiento cutáneo en la piel

5 **Campo de la invención**

La presente invención se refiere al campo de la farmacia y la cosmética, en particular, se refiere a microcápsulas o nanocápsulas dirigidas que comprenden un compuesto de blanqueamiento cutáneo y a su uso farmacéutico para la prevención y/o tratamiento de las manchas oscuras de la piel.

10

Antecedentes

En dermatología, la hiperpigmentación es el oscurecimiento de un área de la piel o las uñas causada por un aumento o un exceso de producción de melanina. La melanina es producida por los melanocitos en la capa más profunda de la epidermis. La producción de melanina se denomina melanogénesis. Existen tres tipos básicos de melanina: eumelanina, feomelanina y neuromelanina.

15

El receptor de melanocortina 1 (MC1R) es conocido como un receptor periférico que se encuentra principalmente en distintas células cutáneas (melanocitos, queratinocitos, sebocitos y otros). MC1R está involucrado en las respuestas de la pigmentación y la inflamación, y en diversas células de melanoma, y se ha descubierto que controla las cantidades relativas de eumelanina y feomelanina en mamíferos. (Bednarek, M. et al., *Biopolymers*, 2008, 89(5), 401-408).

20

La hormona estimulante de α -melanocitos (α -MSH):

25

Ac-Ser¹-Tyr²-Ser³-Met⁴-Glu⁵-His⁶-Phe⁷-Arg⁸-Trp⁹-Gly¹⁰-Lys¹¹-Pro¹²-Val¹³-NH₂ (SEQ ID NO: 1)

es un agonista endógeno para el MC1R.

30

A partir de estudios anteriores con α -MSH y su análogo sintético (NDP- α -MSH):

Ac-Ser¹-Tyr²-Ser³-Nle⁴-Glu⁵-His⁶-D-Phe⁷-Arg⁸-Trp⁹-Gly¹⁰-Lys¹¹-Pro¹²-Val¹³-NH₂

se ha considerado que el segmento 6-9 (His⁶-D-Phe⁷-Arg⁸-Trp⁹) es esencial para la interacción ligando-receptor.

35

Se sintetizaron análogos de los péptidos mencionados anteriormente con los siguientes diversos aminoácidos en lugar de Phe⁷ y Trp⁹ en NDP- α -MSH: Ala, Val, Cha, Lys, Glu, Phe, Pip, Pro, Oic, Tic, Sar, Gly. En vista de los resultados Bednarek et al concluyen que el residuo Trp⁹ de NDP- α MSH no es esencial para el reconocimiento molecular en el receptor de melanocortina 1 humano (hMC1bR).

40

El documento WO 2008/107533 desvela una combinación de al menos un inhibidor del receptor MC1R, un inhibidor de la tirosinasa derivado de la vitamina C y un inhibidor de la transferencia de melanosomas a los queratinocitos, para mejorar la actividad del inhibidor de la tirosinasa en el tratamiento de manchas oscuras en la piel. También describe el uso de la combinación en cosméticos y en dermatología para la preparación de composiciones para la despigmentación por blanqueamiento y/o decoloración.

45

Entre los inhibidores del receptor MC1-R, el documento WO 2008/107533 enumera la proteína Agouti, Melanostatine ®5 (nombre INCI: nonapéptido-1) y el lipo aminoácido undecilenoil fenilalanina comercializado con el nombre Sepiwhite MSH®.

50

Melanostatine ®5 consiste en un nonapéptido sintético de los siguientes aminoácidos: Arg-Lys-Met-D-Phe-Phe-Pro-Pro-Trp-Val.

Sepiwhite es el nombre comercial de la N-undecil-10-enoil-L-fenilalanina. Sepiwhite es un antagonista notificado del receptor de la hormona estimulante de alfa-melanocitos (α -MSH) que reduce la producción de melanina en melanocitos cultivados.

55

Entre los inhibidores de la tirosinasa derivados de la vitamina C el documento WO 2008/107533 cita los esterres del ácido ascórbico, por ejemplo, el éster del ácido 2-glucósido ascórbico (nombre INCI: glucósido de ascorbilo, AA-2G) ácido 2-O- α -D-glucopiranosil-6-O-hexadecanoil-L-ascórbico, 6-palmitato de ascorbilo, sal de sodio o magnesio del ácido 2-fosfato ascórbico.

60

Como inhibidores de la transferencia de melanosomas, el documento WO 2008/107533 describe la Nicotinamida (nombre INCI: niacinamida) y vitamina PP. En particular, describe una composición que comprende niacianimida (0,01 %-5 %), glucósido de ascorbilo (0,01 %-5 %) y melanostatine ® (0,1-40 ppm).

65

Se ha notificado que la combinación de N-undecil-10-enoil-L-fenilalanina (Sepiwhite) y niacinamida, es significativamente más eficaz que la niacinamida sola en la reducción de la hiperpigmentación facial. Se ha descubierto que la niacinamida inhibe la transferencia de melanosomas en células cultivadas y reduce la aparición de manchas hiperpigmentadas en estudios clínicos. (Bissett, D.L., *J. Cosmet Dermatol*, 2009; 8 (4) 260-6).

5 Sin embargo, los productos de blanqueamiento cutáneo conocidos en la técnica, concretamente los inhibidores de la tirosinasa, no llegan eficientemente a los melanocitos.

Breve descripción de la invención

10 Los inventores han descubierto sorprendentemente que un agonista del receptor de MC1, es decir, el péptido de fórmula (I):



15 que es un compuesto capaz de unirse selectivamente a los receptores MCR1 en el melanocito, en combinación con un compuesto capaz de inhibir la actividad o expresión de la tirosinasa, es decir, un compuesto de blanqueamiento cutáneo, es útil para la mejora en la prevención y/o tratamiento de manchas oscuras cutáneas ya que los inhibidores de la tirosinasa llegan a los melanocitos en una manera eficiente.

20 Una de las posibles combinaciones del péptido de fórmula (I) y el compuesto de blanqueamiento cutáneo es mediante la formación de una cápsula, que puede ser una microcápsula o una nanocápsula, que encapsule el agente de blanqueamiento cutáneo y en la que el péptido de fórmula (I) esté acoplado a la superficie exterior de la cápsula que permite la dirección a los receptores MCR1 en el melanocito, es decir, los inventores han desarrollado
25 cápsulas dirigidas para la entrega de compuestos de blanqueamiento cutáneo, que mejoran el efecto blanqueador de los compuestos de blanqueamiento cutáneo. Estos son resultados sorprendentes ya que el péptido de fórmula (I) es un agonista del receptor de MC1, y no un inhibidor del receptor MC1R que normalmente se usan en la técnica por el efecto de mejorar la actividad del inhibidor de la tirosinasa, es decir, un compuesto de blanqueamiento cutáneo, en el tratamiento de manchas oscuras en la piel, por ejemplo, Melanostatine © 5 y Sepiwhite MSH ©.

30 Las microcápsulas o las nanocápsulas de la invención tienen la ventaja de que penetran profundamente en los folículos pilosos, donde la barrera posee solo unas pocas capas de corneocitos diferenciados y puede considerarse altamente permeable. Adicionalmente, los folículos pilosos pueden actuar como depósitos a largo plazo, condición beneficiosa cuando se pretende la entrega transdérmica. La entrega al folículo piloso tiene varias ventajas farmacocinéticas como una reducción o derivación de la vía tortuosa de la absorción transepidérmica, una
35 disminución de la toxicidad sistémica de los fármacos cuando el folículo actúa como depósito de entrega a largo plazo y, adicionalmente, aumenta el índice terapéutico de algunos fármacos, así como reduce la dosis aplicada o la frecuencia de administración.

40 Las microcápsulas o nanocápsulas dirigidas, y más en particular las microcápsulas o nanocápsulas bicapa dirigidas, se pueden usar como un sistema de entrega altamente eficiente con liberación sostenida y controlada del principio activo encapsulado en las células diana: los fibroblastos y los queratinocitos. En particular, las microcápsulas o nanocápsulas escapan del compartimiento endosómico y lisosómico de manera que el principio activo encapsulado se libera directamente en el citoplasma y alcanza la diana rápidamente, optimizando la aplicación y la
45 biodisponibilidad de los agentes activos encapsulados.

Además, las microcápsulas o nanocápsulas dirigidas de la invención tienen la ventaja de mostrar una gran migración y penetración en la piel en comparación con las microcápsulas convencionales.

50 De forma breve, el uso de las microcápsulas o nanocápsulas dirigidas de la presente invención permiten reducir la cantidad necesaria de principios activos con la consecuencia de que los efectos secundarios potenciales también se reducen. Además, las microcápsulas o nanocápsulas también tienen la ventaja de que son capaces de penetrar la piel y muestran una distribución uniforme en toda la epidermis.

55 Por tanto, un aspecto de la presente invención se refiere a una microcápsula o nanocápsula que comprende un compuesto de blanqueamiento cutáneo y un péptido de fórmula (I)



60 en la que

R₁, se selecciona entre el grupo que consiste en -OH, -OR₃, -SR₃, -NR₃R₄, -NHR₉, polietilenglicol o un derivado del mismo y -OR₉ en el que R₉ es polietilenglicol o un derivado del mismo;

65 R₂, se selecciona entre el grupo que consiste en H-, R₃-C(O)- y R₃-OC(O)-,

R₃ y R₄ se seleccionan independientemente entre H, alquilo C₁-C₂₄, alqueno C₂-C₂₄ y arilo C₆-C₁₀;

AA₁, se selecciona independientemente entre los grupos de aminoácidos que representan un grupo de aminoácidos aromáticos, preferentemente seleccionados entre el grupo que consiste en triptófano (incluyendo L-triptófano y D-triptófano), 3-(2-naftil)-D-alanina, 3-(1-naftil)-D-alanina, ácido 3-amino-3-(1-naftil)propiónico, ácido 3-amino-3-(bifenil)propiónico, fenilalanina, tirosina, histidina, 5-hidroxitriptófano, ácido D-1,2,3,4-tetrahidroisoquinolina-3-carboxílico y L-3,4-dihidroxifenilalanina, más preferentemente seleccionados entre el grupo que consiste en triptófano (incluyendo L-triptófano y D-triptófano), 3-(2-naftil)-D-alanina, ácido 3-amino-3-(1-naftil)propiónico, ácido 3-amino-3-(bifenil)propiónico, fenilalanina, tirosina, histidina, 5-hidroxitriptófano y L-3,4-dihidroxifenilalanina;

y sales y solvatos cosméticamente aceptables de los mismos, acoplados a la superficie exterior de la microcápsula o nanocápsula.

La presente invención hace uso de un compuesto de fórmula (I)



en la que

R₁, se selecciona entre el grupo que consiste en -OH, -OR₃, -SR₃, -NR₃R₄, -NHR₉, polietilenglicol o un derivado del mismo y -OR₉ en el que R₉ es polietilenglicol o un derivado del mismo;

R₂, se selecciona entre el grupo que consiste en H-, R₃-C(O)- y R₃-OC(O)-,

R₃ y R₄ se seleccionan independientemente entre H, alquilo C₁-C₂₄, alqueno C₂-C₂₄ y arilo C₆-C₁₀;

AA₁, se selecciona independientemente entre los grupos de aminoácidos que representan un grupo de aminoácidos aromáticos, preferentemente seleccionados entre el grupo que consiste en 3-(2-naftil)-D-alanina, 3-(1-naftil)-D-alanina, ácido 3-amino-3-(1-naftil)propiónico, ácido 3-amino-3-(bifenil)propiónico, fenilalanina, tirosina, histidina, 5-hidroxitriptófano, ácido D-1,2,3,4-tetrahidroisoquinolina-3-carboxílico y L-3,4-dihidroxifenilalanina, más preferentemente seleccionados entre el grupo que consiste en 3-(2-naftil)-D-alanina, ácido 3-amino-3-(1-naftil)propiónico, ácido 3-amino-3-(bifenil)propiónico, fenilalanina, tirosina, histidina, 5-hidroxitriptófano y L-3,4-dihidroxifenilalanina, es decir, AA₁ no es triptófano; y

sales y solvatos de los mismos, preferentemente sales cosméticamente aceptables de los mismos.

Otro aspecto se refiere al proceso para la obtención de las microcápsulas y/o nanocápsulas de la invención que comprende las etapas de

a) formar la microcápsula o nanocápsula encapsulando el compuesto blanqueador y

b) acoplar un compuesto de fórmula (I):



en la que

R₁, se selecciona entre el grupo que consiste en -OH, -OR₃, -SR₃, -NR₃R₄, -NHR₉, polietilenglicol o un derivado del mismo y -OR₉ en el que R₉ es polietilenglicol o un derivado del mismo;

R₂, se selecciona entre el grupo que consiste en H-, R₃-C(O)- y R₃-OC(O)-,

R₃ y R₄ se seleccionan independientemente entre H, alquilo C₁-C₂₄, alqueno C₂-C₂₄ y arilo C₆-C₁₀;

AA₁, se selecciona entre los grupos de aminoácidos que representan un grupo de aminoácidos aromáticos preferentemente seleccionados entre el grupo que consiste en triptófano (incluyendo L-triptófano y D-triptófano), 3-(2-naftil)-D-alanina, 3-(1-naftil)-D-alanina, ácido 3-amino-3-(1-naftil)propiónico, ácido 3-amino-3-(bifenil)propiónico, fenilalanina, tirosina, histidina, 5-hidroxitriptófano, ácido D-1,2,3,4-tetrahidroisoquinolina-3-carboxílico y L-3,4-dihidroxifenilalanina, más preferentemente seleccionados entre el grupo que consiste en triptófano (incluyendo L-triptófano y D-triptófano), 3-(2-naftil)-D-alanina, ácido 3-amino-3-(1-naftil)propiónico, ácido 3-amino-3-(bifenil)propiónico, fenilalanina, tirosina, histidina, 5-hidroxitriptófano y L-3,4-dihidroxifenilalanina; y sales y solvatos cosméticamente aceptables de los mismos, a la superficie exterior de la microcápsula o nanocápsula antes o después de la formación de la microcápsula.

Otro aspecto de la presente invención se refiere a una composición cosmética que comprende una microcápsula y/o nanocápsula como se define en la presente invención.

Otro aspecto de la presente invención se refiere al uso del péptido de fórmula (I) para la obtención de microcápsulas o nanocápsulas para la prevención cosmética y/o el tratamiento cosmético de las manchas oscuras cutáneas.

5 Otro aspecto de la presente invención se refiere a las microcápsulas o nanocápsulas como se definen en la presente invención para la prevención cosmética y/o el tratamiento cosmético de las manchas oscuras cutáneas.

La presente invención hace uso de un péptido de fórmula (II):

10 $R_5\text{-Ile-Ser-Leu-Leu-Asp-Ala-Gln-Ser-R}_6$ [R₅-(SEQ ID NO: 2)-R₆] (II)
en la que

R₅ se selecciona entre el grupo que consiste en H-, R₇-C(O)- y R₇-OC(O)-,

15 R₆ se selecciona entre el grupo que consiste en -OH, -OR₇, -SR₇, y -NR₇R₈,

R₇ y R₈ se seleccionan independientemente entre H-, alquilo C₁-C₂₄, alqueno C₂-C₂₄ y arilo C₆-C₁₀,

20 y sales aceptables y solvatos cosméticamente aceptables de los mismos.

Otro aspecto se refiere al uso del péptido de fórmula (II) como se ha definido anteriormente para la prevención cosmética y/o el tratamiento cosmético de las manchas oscuras cutáneas.

25 Otro aspecto de la presente invención se refiere a composiciones que comprenden un péptido de fórmula (II) y uno o más agentes blanqueadores tales como arbutina, vitamina C, fosfato de ascorbilo, niacinamida, dinacondrina, un péptido inhibidor de la tirosinasa, tretinoína, hidroquinona, ácido kójico y ésteres del mismo con ácidos grasos, ácido azelaico, glutatión, extractos de *Cinnamomum subavenium*, alfa-hidroxiácidos tales como ácido láctico o ácido glicólico, niacinamida, ácido ferúlico, vitamina E, ácido elágico, extractos de granada y mezclas de los mismos.

30 La invención se define por las reivindicaciones adjuntas.

Breve descripción de las figuras

35 Figura 1: % de contenido de melanina en condiciones melanógenas

Figura 2: % de viabilidad celular en condiciones melanógenas

Figura 3. Unión a los melanocitos durante 1 hora a 4 °C

40 Figura 4. Captación por los melanocitos durante 1 hora a 37 °C

Figura 5. Selectividad de la cápsula por los melanocitos en una población de células mixtas

Descripción detallada de la invención

45 En el contexto de la presente invención, los siguientes términos tienen el significado que se detalla a continuación.

50 Los términos "microcápsulas" y "nanocápsulas", también denominadas en el presente documento "cápsulas", se refieren a cápsulas con una distribución de tamaño de 10 a 10000 nm. En una realización, las cápsulas tienen una distribución de tamaño 50 a 5000 nm, de 100 a 1000 nm, preferentemente de 150 a 450 nm y más preferentemente de 180 y 400 nm. Este tamaño permite que la cápsula que sea captada por las células y que libere los principios activos en el citosol. En una realización particular, el tamaño medio de las cápsulas es de 220 nm como se determina por microscopía electrónica de barrido (MEB).

55 En el contexto de la presente invención, cuandoquiera que se mencione un aminoácido sin especificar su estequiometría se ha de entender que la mención señala los estereoisómeros tanto D como L. Por ejemplo, cualquier mención a la Leucina (o Leu) señala tanto la D-leucina como la L-leucina. Cuando se pretende una estequiometría específica, esto se indica, por ejemplo D-Ala se usa para señalar el estereoisómero D de Alanina.

60 En una realización preferida, las microcápsulas de la invención son microcápsulas poliméricas, en general hechas de uno o más polímeros biodegradables.

65 En una realización, los polímeros que forman las microcápsulas de la invención se seleccionan entre el grupo que consiste en poli(D,L-lactida-co-glicolida), ácidos polilácticos, copolímero de bloque poli(fumarato de propileno-co-etilenglicol) [P(PF-co-EG)], poli-anhídrido anhídrido poli(fumárico-co-sebácico), poli(óxido de etileno)-poli(lactida/glicolida), poli(aminoácido), alcohol polivinílico, alginato, dextrano, quitosano, hidroxiapatita, colágeno,

fibrina, ácido hialurónico, carbómeros, poli(aminoácidos) y poli(etilenglicol).

En una realización, las microcápsulas de la invención son microcápsulas bicapa poliméricas que comprenden un polímero de núcleo (también denominado en la presente invención "polímero de la capa interior") y un polímero de la cubierta exterior (también denominado en la presente invención "polímero de la capa exterior" o "polímero en la superficie exterior de la cápsula"). Los polímeros de núcleo y los polímeros de cubierta se seleccionan entre el grupo que consiste en poli(D,L-lactida-co-glicolida), ácidos polilácticos, copolímero de bloque poli(fumarato de propileno-co-etilenglicol) [P(PF-co-EG)], poli-anhídrido anhídrido poli(fumárico-co-sebácico), poli(óxido de etileno)-poli(lactida/glicolida), poli(aminoácido), alcohol polivinílico, alginato, dextrano, quitosano, hidroxiapatita, colágeno, fibrina, ácido hialurónico, carbómeros, poli(aminoácidos) y poli(etilenglicol). En una realización preferida, el polímero de núcleo y el polímero de la cubierta exterior son diferentes. En una realización preferida, el polímero de núcleo es poli(D,L-lactida-co-glicolida) (PLGA) y el polímero de la cubierta exterior es el alcohol polivinílico (PVA). En una realización preferida, al menos algunos de los grupos funcionales del polímero de núcleo, preferentemente cuando los grupos funcionales son grupos carboxilo del polímero de núcleo, están presentes preferentemente en la superficie exterior de la cápsula, junto con el polímero en la superficie exterior de la cápsula. En una realización más preferida cuando el polímero de núcleo es poli(D, L-lactida-co-glicolida) (PLGA) y el polímero de la cubierta exterior es alcohol polivinílico (PVA), los grupos carboxilo del polímero de PLGA están presentes en la superficie exterior de la cápsula. En una realización más preferida, PLGA tiene una relación molar de lactida/glicolida de 40:60 a 60:40, más preferentemente de 50:50.

En otra realización, las microcápsulas pueden estar formadas por lípidos, liposomas, micelas, nanomateriales, dendrímeros y similares.

En una realización, el péptido de fórmula (I) está unido al polímero de la cubierta exterior en la superficie de la microcápsula o nanocápsula. En una realización más particular, el péptido de fórmula (I) está unido al polímero de la cubierta exterior mediante un enlace covalente. En una realización preferida, el enlace covalente es un enlace amida entre el grupo amino del grupo N-terminal del péptido y el grupo carboxilo del polímero de PLGA presente en el exterior de la superficie. Preferentemente, el polímero de la cubierta exterior es alcohol polivinílico.

El término "alquiloilo" es igual que alcanilo, y se refiere a un radical que tiene la fórmula general RCO- en la que R es un grupo alquilo.

El término "alqueniloilo" es igual que alquenoilo, y se refiere a un radical que tiene la fórmula general RCO- en la que R es un grupo alquenilo.

Los grupos "alquilo" pueden ser ramificados o no ramificados, y preferentemente tienen de 1 a aproximadamente 24 átomos de carbono. Una clase más preferida de grupos alquilo tiene de 1 a aproximadamente 16 átomos de carbono y una clase más preferida de grupos alquilo tiene de 1 a 6 y 14 a 18. Incluso se prefieren más los grupos alquilo que tienen 1, 2, 3, 4, 15, 16 o 17 átomos de carbono. Metilo, etilo, n-propilo, isopropilo y butilo, incluyendo n-butilo, terc-butilo, sec-butilo, isobutilo, pentadecilo, hexadecilo, heptadecilo son grupos alquilo particularmente preferidos en los compuestos de la presente invención. Otra clase preferida de grupos alquilo tiene de 6 a aproximadamente 10 átomos de carbono; e inclusive más preferentemente 7, 8 o 9 átomos de carbono. Heptilo, octilo y nonilo son los grupos alquilo más preferidos de esta clase.

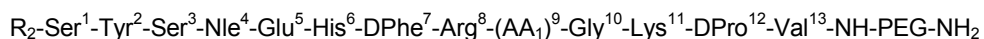
La expresión "alquenilo C₂-C₁₂" significa una cadena de hidrocarburo lineal o ramificado que tiene uno o más dobles enlaces carbono-carbono en el mismo y que tiene de dos a doce átomos de carbono, y que está unido al resto de la molécula por un enlace sencillo. El doble enlace de un grupo alquenilo puede estar sin conjugar o conjugado con otro grupo insaturado. Los grupos alquenilo adecuados incluyen, pero no se limitan a grupos alquenilo tales como vinilo, alilo, butenilo (por ejemplo, 1-butenilo, 2-butenilo, 3-butenilo), pentenilo (por ejemplo, 1-pentenilo, 2-pentenilo, 3-pentenilo, 4-pentenilo), hexenilo (por ejemplo, 1-hexenilo, 2-hexenilo, 3-hexenilo, 4-hexenilo, 5-hexenilo), butadienilo, pentadienilo (por ejemplo, 1,3-pentadienilo, 2,4-pentadienilo), hexadienilo (por ejemplo, 1,3-hexadienilo, 1,4-hexadienilo, 1,5-hexadienilo, 2,4-hexadienilo, 2,5-hexadienilo), 2-etilhexenilo (por ejemplo, 2-etilhex-1-enilo, 2-etilhex-2-enilo, 2-etilhex-3-enilo, 2-etilhex-4-enilo, 2-etilhex-5-enilo,), 2-propil-2-butenilo, 4,6-dimetil-oct-6-enilo. Un grupo alquenilo puede estar sin sustituir o sustituido con uno o dos sustituyentes adecuados.

"Ariilo" en el presente documento se refiere a radicales de anillo individual o doble de 6 a aproximadamente 10 átomos de carbono en el anillo, tales como fenilo, naftilo o indenilo. El radical ariilo puede estar opcionalmente sustituido con uno o más sustituyentes tales como hidroxilo, mercapto, halo, alquilo, fenilo, alcoxi, haloalquilo, nitro, ciano, dialquilamino, aminoalquilo, acilo, alcoxycarbonilo, etc.

Un "derivado de polietilenglicol" en la presente invención se selecciona entre poli(etilenglicol) (PEG) monofuncional, homobifuncional o heterobifuncional, también conocido como poli(oxietileno) o poli(óxido de etileno) (PEO), derivados en una gama de pesos moleculares, que contienen un grupo funcional único, o dos grupos funcionales del mismo o diferente tipo, de diversos grupos funcionales, tales como aminas, maleimidias, azidas, ésteres y tioles de NHS. Los derivados de PEG se seleccionan preferentemente entre el grupo que consiste en O,O'-bis(3-aminopropil)dietilenglicol, bis(3-aminopropil) poli(etilenglicol), poli(etilenglicol) bis(amina), metoxipolietilenglicol

amina, metoxipoli(etilenglicol) azida, poli(etilenglicol) bisazida, O-(2-Azidoetil)-O'-metil-tri(etilenglicol), O-(2-Azidoetil)-O'-metil-undeca(etilenglicol), poli(etilenglicol) metil éter azida, poli(etilenglicol) metil éter, mesilato de poli(etilenglicol) monometil éter, metacrilato de poli(etilenglicol) metil éter, O-(2-mercaptoetil)-O'-metilpoli(etilenglicol), poli(etilenglicol) metil éter tiol, tosilato de poli(etilenglicol) metil éter, 2-bromoisobutirato de poli(etilenglicol) metil éter, acetileno de poli(etilenglicol) metil éter. En una realización preferida R₉ es O,O'-Bis(3-aminopropil)di(etilenglicol) (también denominado 4,7,10-Trioxa-1,13-tridecanodiamina).

En una realización particular, R₁ se selecciona entre 4,7,10-trioxa-1,13-tridecanodiamina, indicado como NH-PEG-NH₂ en el compuesto de fórmula (I) como se indica a continuación:



En una realización particular, R₂ se selecciona entre acetilo, propanoilo, pentadecanoilo, hexadecanoilo y heptadecanoilo. En una realización preferida R₂ se selecciona entre hexadecanoilo (también denominado palmitoilo).

En una realización particular, R₃ y R₄ se seleccionan independientemente entre H, y alquilo C₁₅, C₁₆ y C₁₇.

AA₁, es un aminoácido seleccionado entre aminoácidos aromáticos. En una realización particular, el péptido de fórmula (I) está unido a la microcápsula de la invención y AA₁ se selecciona entre el grupo que consiste en triptófano (incluyendo L-triptófano y D-triptófano), 3-(2-naftil)-D-alanina, 3-(1-naftil)-D-alanina, ácido 3-amino-3-(1-naftil)propiónico, ácido 3-amino-3-(bifenil)-propiónico, fenilalanina, tirosina, histidina, 5-hidroxitriptófano, ácido D-1,2,3,4-tetrahidroisoquinolina-3-carboxílico y L-3,4-dihidroxifenilalanina.

En una realización preferida AA₁ se selecciona entre el grupo que consiste en triptófano, 3-(2-naftil)-D-alanina, ácido 3-amino-3-(1-naftil)propiónico, ácido 3-amino-3-(bifenil)-propiónico, fenilalanina, tirosina, histidina, 5-hidroxitriptófano y L-3,4-dihidroxifenilalanina.

En una realización particularmente preferida AA₁ se selecciona entre el grupo que consiste en triptófano, 3-(2-naftil)-D-alanina, ácido 3-amino-3-(1-naftil)propiónico y ácido 3-amino-3-(bifenil)-propiónico.

Las sales cosméticamente aceptables de los péptidos proporcionados por la presente invención también están dentro del alcance de la presente invención. La expresión "sales cosméticamente aceptables" significa una sal generalmente admitida para su uso en animales y más en particular en seres humanos, e incluye las sales utilizadas para formar sales de adición de bases, ya sea sales de adición de bases inorgánicas, tales como por ejemplo y en un sentido no limitante litio, sodio, potasio, calcio, magnesio o aluminio, entre otros, o sales de adición de bases orgánicas, tales como por ejemplo y en un sentido no limitante etilamina, dietilamina, etilendiamina, etanolamina, dietanolamina, arginina, lisina, histidina o piperazina entre otros, o sales de adición de ácido, ya sea sales de adición de ácidos orgánicos, tales como por ejemplo y en un sentido no limitante acetato, citrato, lactato, malonato, maleato, tartrato, fumarato, benzoato, aspartato, glutamato, succinato, oleato, trifluoroacetato, oxalato, pamoato o gluconato entre otros, o sales de adición de ácidos inorgánicos, tales como por ejemplo y en un sentido no limitante cloruro, sulfato, borato o carbonato entre otros. La naturaleza de la sal no es crítica, a condición de que sea cosméticamente aceptable. Las sales cosméticamente aceptables de los derivados peptídicos de la invención pueden obtenerse por métodos convencionales bien conocidos en el estado de la técnica [Berge S.M., Bighley L.D. y Monkhouse D.C. (1977) "Pharmaceutical Salts" *J. Pharm. Sci.* 66:1-19].

La expresión "compuesto de blanqueamiento cutáneo" o "agente de blanqueamiento cutáneo" se refiere a un compuesto capaz de aclarar y/o borrar las manchas oscuras en la piel. La presente invención se refiere como compuestos blanqueadores a compuestos que inhiben la actividad o expresión de la tirosinasa, es decir, en una realización de la presente invención, un "compuesto de blanqueamiento cutáneo" es un "inhibidor de la tirosinasa". En una realización, el compuesto de blanqueamiento cutáneo se selecciona entre el grupo que consiste en arbutina, vitamina C, fosfato de ascorbilo de sodio, niacinamida, preferentemente niacinamida PC, un péptido inhibidor de la tirosinasa y mezclas de los mismos. En una realización preferida, el compuesto de blanqueamiento cutáneo se selecciona entre el grupo que consiste en arbutina, fosfato de ascorbilo de sodio, vitamina C, niacinamida PC, un péptido inhibidor de la tirosinasa, tretinoína, hidroquinona, ácido kójico y ésteres del mismo con ácidos grasos, ácido azelaico, glutatión, extractos de *Cinnamomum subavenium*, alfa-hidroxiácidos tales como ácido láctico o ácido glicólico, niacinamida, ácido ferúlico, vitamina E, ácido elágico, extractos de granada y mezclas de los mismos.

En una realización particular la mezcla de compuestos de blanqueamiento cutáneo se selecciona entre una mezcla de dos compuestos de blanqueamiento cutáneo, más preferentemente la mezcla de compuestos de blanqueamiento cutáneo se selecciona entre una mezcla de arbutina y fosfato de ascorbilo de sodio y una mezcla de niacinamida y fosfato de ascorbilo de sodio.

En una realización preferida, el compuesto de blanqueamiento cutáneo o cada compuesto de blanqueamiento cutáneo de la mezcla de compuestos de blanqueamiento cutáneo está presente en una cantidad de aproximadamente el 0,1-30 % en peso en relación con el peso total de la cápsula, preferentemente en una cantidad

de aproximadamente el 5-25 % en peso en relación con el peso total de la cápsula, más preferentemente en una cantidad de aproximadamente el 10-20 % en peso en relación con el peso total de la cápsula. En una realización particular, el compuesto de blanqueamiento cutáneo o la mezcla de compuestos blanqueadores están presentes en una cantidad del 20 % en peso en relación con el peso total de la cápsula. En una realización más particular, la

5 mezcla de dos compuestos de blanqueamiento cutáneo está presente en una cantidad de aproximadamente el 20 % en peso, preferentemente el 10 % en peso de cada compuesto de blanqueamiento cutáneo. En una realización, la microcápsula comprende del 10 al 30 % en peso de arbutina o niacinamida en relación con el peso total de la microcápsula. En una realización, la microcápsula comprende del 0,1 % al 10 %, preferentemente del 0,1 al 3 % del péptido de fórmula (II) en relación con el peso total de la microcápsula.

10 Otro aspecto de la presente invención se refiere a un péptido inhibidor de la tirosinasa de fórmula (II). El péptido de fórmula (II) actúa intracelularmente bloqueando o inhibiendo la actividad de la tirosinasa.

15 Preferentemente, el péptido inhibidor de la tirosinasa es un péptido de fórmula (II):



en la que

20 R_5 se selecciona entre el grupo que consiste en H-, $R_7\text{-C(O)-}$ y $R_7\text{-OC(O)-}$,

R_6 se selecciona entre el grupo que consiste en -OH, -OR₇, -SR₇ y -NR₇R₈,

R_7 y R_8 se seleccionan independientemente entre H-, alquilo C₁-C₂₄, alquenilo C₂-C₂₄ y arilo C₆-C₁₀,

25 y sales y solvatos cosméticamente aceptables de los mismos.

En una realización el péptido inhibidor de la tirosinasa es un péptido de fórmula:



en la que

35 R_5 se selecciona entre el grupo que consiste en en H-, $R_7\text{-C(O)-}$ y $R_7\text{-OC(O)-}$,

R_6 se selecciona entre el grupo que consiste en -OH, -OR₇, -SR₇ y -NR₇R₈,

R_7 y R_8 se seleccionan independientemente entre H-, alquilo C₁-C₂₄, alquenilo C₂-C₂₄ y arilo C₆-C₁₀,

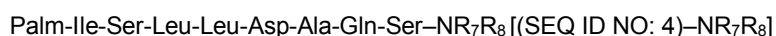
40 y sales y solvatos cosméticamente aceptables de los mismos.

En una realización R_7 y R_8 son H.

45 En una realización R_7 es alcanoilo C₁-C₂₄, preferentemente un alcanoilo C₁-C₂₄ seleccionado entre el grupo que consiste en acetilo, propanoilo, butanoilo, pentanoilo, hexanoilo, heptanoilo, octanoilo, nonanoilo, decanoilo, undecanoilo, dodecanoilo, tridecanoilo, tetradecanoilo, pentadecanoilo, hexadecanoilo, heptadecanoilo, octadecanoilo, nonadecanoilo e icosanoilo. En una realización preferida, el alcanoilo seleccionado entre el grupo consiste en acetilo, propanoilo, pentadecanoilo, hexadecanoilo y heptadecanoilo. En una realización R_5 es acetilo (Ac). En otra realización R_5 es hexadecanoilo (o frecuentemente denominado palmitoilo (Palm)).

50 En una realización, cuando R_6 es -NR₇R₈, R_7 y R_8 son H.

En una realización el péptido de fórmula (II) se selecciona entre el grupo:



y sales y solvatos cosméticamente aceptables de los mismos,

en los que R₇ y R₈ se seleccionan independientemente entre H, metilo, etilo, propilo y butilo.

5 Una "mancha oscura en la piel" o "mancha oscura cutánea" en el presente documento se refiere a la hiperpigmentación de la piel causada por el aumento de la melanina. La hiperpigmentación puede ser difusa o focal.

10 El "tratamiento cosmético" de la "mancha oscura en la piel" o "mancha oscura cutánea" se refiere a aclarar las manchas oscuras en la piel, eliminando (es decir, borrando) manchas oscuras en la piel, reduciendo el tamaño de las manchas oscuras en la piel y/o reduciendo el número de manchas oscuras en la piel.

15 La "prevención cosmética" de la "mancha oscura en la piel" o "mancha oscura cutánea" se refiere a prevenir la aparición de manchas oscuras en la piel, prevenir el oscurecimiento de las manchas oscuras en la piel ya existentes y/o prevenir el aumento del tamaño de las manchas oscuras en la piel ya existentes.

Otro aspecto de la presente invención se refiere a compuestos de fórmula general (I), en la que AA₁ no es Trp.

20 Otro aspecto de la presente invención se refiere a un proceso para la preparación de microcápsulas o nanocápsulas de la invención, que comprende las etapas de:

a) formar la microcápsula o nanocápsula que encapsula el compuesto de blanqueamiento cutáneo y

25 b) acoplar un compuesto de fórmula (I) de la invención, inclusive cuando AA₁ es Trp, a la superficie exterior de la microcápsula o nanocápsula antes o después de la formación de la microcápsula o nanocápsula.

En una realización preferida, la etapa de acoplar un compuesto de fórmula (I) de la invención, incluyendo cuando AA₁ es Trp, a la superficie exterior de la microcápsula o nanocápsula se realiza una vez que se ha formado la microcápsula o nanocápsula, es decir, después de formar la microcápsula o nanocápsula.

30 En una realización preferida, en la que la microcápsula o nanocápsula es una microcápsula o nanocápsula bicapa polimérica, la etapa de formación de la microcápsula o nanocápsula que encapsula el compuesto blanqueador comprende las etapas de

35 a1) mezclar el polímero de la capa interior con el compuesto de blanqueamiento cutáneo en un disolvente adecuado,

a2) emulsionar la mezcla obtenida en la etapa a) con el polímero de la capa exterior en un disolvente adecuado y, opcionalmente

40 a3) aislar las microcápsulas.

En una realización en la que la microcápsula o nanocápsula es una microcápsula o nanocápsula bicapa polimérica el proceso de acoplar el compuesto de fórmula (I) de la invención, inclusive cuando AA₁ es Trp, al polímero de la capa exterior, cuando dicho polímero tiene grupos carboxilo y el acoplamiento de la etapa b) comprende las etapas de

45 b1) activar los grupos carboxilo en la superficie de las cápsulas y

b2) hacer reaccionar las cápsulas activadas con el grupo amino N-terminal del compuesto de fórmula (I).

50 En otra realización, el polímero de la capa exterior tiene grupos amino y el acoplamiento de la etapa b) comprende las etapas de

b1) activar los grupos amino en la superficie de las cápsulas, y

55 b2) hacer reaccionar las cápsulas activadas con el grupo C-terminal del compuesto de fórmula (I).

En otra realización, el polímero de la capa exterior tiene grupos maleimida y el acoplamiento en la etapa b) comprende las etapas de

60 b1) activar los grupos maleimida en la superficie de las cápsulas,

b3) funcionalizar el compuesto de fórmula (I) con un grupo tiol mediante la adición de un aminoácido extra con dicho grupo o mediante la modificación de al menos uno de los grupos funcionales de los aminoácidos presentes y

65 b2) hacer reaccionar las cápsulas activadas con el grupo tiol del compuesto de fórmula (I).

En una realización el disolvente adecuado para mezclar el polímero de la capa interior con el compuesto de blanqueamiento cutáneo se selecciona entre el grupo que consiste en acetona, acetonitrilo, diclorometano (DCM), etanol, metanol, cloroformo, dimetilformamida (DMF) y acetato de etilo, preferentemente acetona.

5 En una realización el disolvente adecuado para emulsionar la mezcla obtenida en la etapa a1) con el polímero de la capa exterior se selecciona entre el grupo que consiste en agua, acetonitrilo, diclorometano (DCM), etanol, metanol, cloroformo, dimetilformamida (DMF), sulfuro de dimetilo (DMS) y acetato de etilo, preferentemente agua, etanol, metanol, dimetilformamida, y sulfuro de dimetilo (DMS) y más preferentemente agua.

10 Otro aspecto de la invención se refiere a un proceso para la obtención de microcápsulas o nanocápsulas bicapa como se definen en la invención que comprende las etapas de:

i) acoplar un compuesto de fórmula (I) de la invención, inclusive cuando AA₁ es Trp, al polímero que sirve como polímero de la capa exterior,

15 ii) mezclar el polímero de la capa interior con el compuesto de blanqueamiento cutáneo en un disolvente adecuado,

iii) emulsionar el polímero obtenido en la etapa i) con la mezcla obtenida en la etapa ii) en un disolvente adecuado y, opcionalmente

20 iv) aislar las microcápsulas.

En una realización preferida, la composición cosmética que comprende una microcápsula y/o nanocápsula de la invención comprende al menos un excipiente o adyuvante cosméticamente aceptable.

25 Los términos excipientes o adyuvantes plazo se refieren también a los vehículos. Dichos excipientes, adyuvantes o vehículos farmacéuticos pueden ser líquidos, tales como agua, aceites o tensioactivos, incluyendo los de origen de petróleo, animal, vegetal o sintético, tales como por ejemplo y en un sentido no limitante aceite de cacahuete, aceite de soja, aceite mineral, aceite de sésamo, aceites de ricino, polisorbatos, ésteres de sorbitano, sulfatos de éter, sulfatos, betaínas, glucósidos, maltósidos, alcoholes grasos, nonoxinoles, poloxámeros, polioxietilenos, polietilenglicoles, dextrosa, glicerol y similares. "Remington's Pharmaceutical Sciences" de E.W. Martin describe diluyentes, adyuvantes o excipientes como vehículos adecuados.

35 Los siguientes ejemplos son meramente ilustrativos de ciertas realizaciones de la invención y no se pueden considerar como restrictivos en modo alguno.

Ejemplos

Ejemplo 1: Preparación de las microcápsulas

40 Se añadió 1 g de poli(D, L-lactida-co-glicolida) (PLGA) (Resomer RG 502 H, relación molar lactida/glicolida de 48:52 a 52:48) en 10 ml de acetona que contenía proteína de soja hidrolizada (25 ml) (Dynachondrine™ ISR, Maymó número de lote M.1261.10, ISP Pharmaceuticals número de lote 0Y90000277) gota a gota a 100 ml de alcohol polivinílico (PVA) acuoso al 1 % (p/v), y la mezcla se emulsionó durante 3 min usando un aparato de ultrasonidos. Después de la evaporación del disolvente durante toda la noche a 4 °C, las cápsulas se recogieron por ultracentrifugación a 60000 g durante 30 min, se lavaron tres veces con agua destilada y después se liofilizaron durante 3 a 4 días.

Los siguientes péptidos de secuencia de fórmula (I):

50 Pamitoil-Ser-Tyr-Ser-Nle-Glu-His-DPhe-Arg-Trp-Gly-Lys-DPro-Val-NH-PEG-NH₂

Acetil-Ser-Tyr-Ser-Nle-Glu-His-DPhe-Arg-Trp-Gly-Lys-DPro-Val-NH-PEG-NH₂

55 en los que NH-PEG-NH₂ representa el grupo NH-(CH₂)₃-(OCH₂CH₂)₂-CH₂-NH₂

se acoplaron por el extremo N-terminal del péptido (Ser) con la microcápsula obtenida anteriormente a través de la amida unida a los grupos carboxilo en la superficie de las cápsulas presentes en la superficie de la microcápsula (perteneciente al polímero interior). Por tanto, los grupos carboxilo en la superficie de las cápsulas se activaron mediante la resuspensión de las cápsulas en tampón isotónico en solución salina de ácido 2-(N-morfolino)etanosulfónico (MES) 0,1 M pH 5,5, y luego haciéndolos reaccionar con 1-etil-3-(3-dimetilaminopropil)carbodiimida (EDAC) (10 equiv.) y N-hidroxisuccinimida (NHS) (10 equiv.) durante 1 h. Después, las cápsulas se centrifugaron (15000 rpm, 45 min) para retirar el exceso de EDAC/NHS y el subproducto de isourea soluble en agua. Las cápsulas activados (1 g) se resuspendieron en solución salina tamponada con fosfato (PBS, 40 ml) y se hicieron reaccionar con el grupo amino N-terminal del péptido de secuencia de fórmula (I) (0,150 g) a temperatura ambiente durante 2 horas. Las cápsulas recubiertas se centrifugaron (15000 rpm, 30 min) y se lavaron

con tampón PBS (10 ml, 3 veces) para retirar cualquier péptido no unido. La presencia de péptido unido a la superficie se confirmó mediante pruebas de ninhidrina de Kaiser. El péptido sin reaccionar se separó de las cápsulas después de la etapa de reacción correspondiente por análisis del sobrenadante de la centrifugación (etapa descrita anteriormente) usando ácido 2,4,6-trinitrobenzenosulfónico (TNBS) como un ensayo colorimétrico: se añadieron 700 microlitros de sobrenadante a 700 microlitros de tampón de borato de sodio 0,1 M (pH 9,2). Se añadieron 350 microlitros de solución acuosa de TNBS (1,65 mg/ml) y la solución se mezcló rápidamente. Después de la incubación a 40 °C durante 45 min, la reacción se detuvo mediante la adición de 350 microlitros de NaH₂PO₄ 0,1 M que contenía Na₂SO₃ 1,5 mM y la absorción a 420 nm se determinó en un espectrómetro UV/VIS. Las cantidades de péptido en la superficie de las nanocápsulas se calcularon restando la cantidad libre de la cantidad total añadida al sistema de reacción, siendo en ese caso 0,125 %. La relación de proteína de soja hidrolizada encapsulada a péptido de secuencia de fórmula (I) es de 25 a 0,125.

El diámetro de las cápsulas se determinó por microscopía electrónica de barrido (MEB), que muestra una distribución de tamaño entre 180 y 400 nm (tamaño promedio 220 nm).

Ejemplo 2. Ensayo de citotoxicidad

Se usaron fibroblastos dérmicos humanos y queratinocitos humanos. Las células aisladas se cultivaron en medio de cultivo DMEM suplementado con FCS al 10 % y se incubaron a 37 °C para el tratamiento de mantenimiento. Se usaron células sin tratar como control negativo. El control positivo fue SDS al 0,1 %. Las microcápsulas como se obtuvieron en el Ejemplo 1 se sometieron a ensayo en el medio de cultivo DMEM a dos concentraciones: 0,03 % y 0,3 %. Estos porcentajes en peso se refieren al peso de la microcápsula en relación con el peso total.

Las células se sembraron a razón de 20000 células por pocillo en una placa de 96 pocillos. 24 horas después de la siembra, las células se incubaron en las condiciones descritas anteriormente. Después de 48 h de incubación a 37°C, el medio de cultivo se retiró y se añadió reactivo MTT. Las células se incubaron 2 horas a 37 °C. Después se añadió DMSO y la absorbancia de la sal de formazán formada se midió a λ 570 nm. Los valores de absorbancia inferiores corresponden a células con una actividad metabólica más baja, lo que se correlaciona con un mayor daño y, por tanto, con un mayor efecto citotóxico. Por tanto, la cantidad de células vivas es proporcional a la cantidad de formazán producido. La Tabla 1 muestra el porcentaje de viabilidad celular, así como la desviación típica (DT), en las diferentes estirpes celulares después de los diferentes tratamientos.

Producto sometido a ensayo	Fibroblastos		Queratinocitos	
	% de viabilidad celular	DT	% de viabilidad celular	DT
Control	100	3,90	100	2,98
SDS	30,0	3,00	13,0	2,00
Ejemplo 1 (0,03 %)	99,8	4,00	100,0	3,00
Ejemplo 1 (0,3 %)	102	2,00	104,2	3,10

Tabla 1

Como puede observarse, las microcápsulas del Ejemplo 1 no mostraron cambios en la viabilidad celular a las diferentes concentraciones sometidas a ensayo. Por tanto, se puede concluir que las microcápsulas del Ejemplo 1 no son citotóxicas en cualquiera de las estirpes celulares empleadas.

Ejemplo 3. Ensayo de penetración en la piel

Se prepararon microcápsulas marcadas con fluoresceína siguiendo un procedimiento análogo como se describe en el Ejemplo 1, añadiendo adicionalmente el marcador de DQ-BSA a la mezcla de acetona que contenía PLGA y proteína de soja hidrolizada.

Se cultivó piel reconstituida (SkinEthic, EHR epidermis humana reconstruida) en medio de cultivo DMEM suplementado con FCS al 10 % y se incubó a 37 °C para su mantenimiento y tratamiento. Se usó EHR sin tratar como control negativo. Las formulaciones que contenían las microcápsulas marcadas con medio DQ-BSA sometieron a ensayo a tres concentraciones: 0,03 % en peso, 0,15 % en peso, 0,30 % en peso. Estos porcentajes en peso se refieren al peso de la microcápsula en relación con el peso total.

Los modelos de piel reconstituida de tamaño de 0,5 cm², 17 días, se reconstituyeron en los medios adecuados proporcionados por el proveedor inmediatamente tras su llegada al laboratorio y se mantuvieron en la incubadora a 37 °C para la recuperación completa. Después de 24 horas, el tratamiento con las microcápsulas marcadas se realizó en las condiciones detalladas en el apartado anterior. La incubación con los diferentes tratamientos se realizó durante 48 horas. Después, las muestras se congelaron y se analizaron por microscopía de fluorescencia.

Se registraron imágenes correspondientes a una sección transversal de la piel tratada con una formulación que contenía las microcápsulas como se obtiene en el Ejemplo 1 al 0,15 %. En una imagen tomada por microscopía de fluorescencia, la señal de fluorescencia verde indicó que las cápsulas penetraron y se distribuyeron uniformemente a

lo largo de toda la epidermis. La fluorescencia no apareció en el núcleo de las células cutáneas, sino solo en el citoplasma donde se degradó la cápsula, se escindió el complejo DQ-BSA y se liberó la molécula fluorescente. En una imagen comparativa obtenida por microscopía óptica después de la tinción con hematoxilina-eosina, los núcleos de las células de la piel se tiñeron de un color más oscuro.

5 En conclusión, las microcápsulas del Ejemplo 1 mostraron una penetración adecuada y una distribución uniforme en toda la epidermis.

10 **Ejemplo 4. Cultivo de melanocitos y procedimiento de incubación**

Día 1 - Se hacen crecer melanocitos humanos por tripsinización y centrifuga a 1500 rpm (433 x g) en una centrifuga Allegra X-22R (Beckman Coulter) durante 5 minutos y después se resuspenden en 1 ml de un medio de cultivo completo para contar el número de células. Un volumen de 10 µl de la solución de células se tiñen con colorante azul de tripano y las células se cuentan con un hemocitómetro. Después, una solución de células se prepara a una concentración de $2,5 \times 10^5$ células/ml en un medio completo y 100 µl de la suspensión de células es la semilla en pocillos de placas de 96 pocillos. Las placas se incuban a 37 °C en una atmósfera de CO₂ al 5 %.

20 Día 2 - Las células de semilla se lavan y se tratan con los diferentes productos en condiciones basales y en condiciones promelanógenas. Para ello, se retira el medio de los pocillos y se añaden 100 µl de los productos en medio basal con FBS al 0,5 %. Anteriormente, los productos de ensayo se solubilizan en el mismo medio. Se solubiliza arbutina en etanol.

25 Los productos se someten a ensayo a 3 concentraciones diferentes en presencia y ausencia del inductor melanógeno (100 µM), es decir, isobutil metil-xantina (IBMX). Las placas se incuban 37 °C y CO₂ al 5 % durante 5 días. Los experimentos se realizan usando 4 pocillos por condición. La acumulación de melanina en el interior de las células se controla a diario por microscopía óptica.

Días 3 y 4 - Todos los tratamientos se renuevan cada 24 horas.

30 Día 5 - Determinación de la viabilidad celular: Con el fin de determinar el número de células viables, se añaden 10 µl de CCK-8 (WST-8) en cada pocillo. Las placas se incuban a 37 °C durante 1 hora y la absorbancia se mide a 450 nm usando Synergy II multimodo (Biotek Instruments Inc., Winooski, Estados Unidos). El modo y la DT se calculan para cada concentración usando la aplicación Microsoft Excel (véase la figura 2 y la tabla 2)

35 **Ejemplo 5. Determinación de melanina**

Con el fin de determinar el contenido de melanina en las células tratadas como se describe en el ejemplo 4, el medio se retira de cada pocillo y las células se lavan con PBS 1 N y se incuban durante 3 días a 37 °C facilitando la solubilización de la melanina en NaOH.

40 Día 7 - Una vez que la solubilización de la melanina está completa, se añaden 50 µl de H₂O₂ MilliQ por pocillo y el contenido se determina por absorbancia usando un Synergy II (Biotek Instruments Inc., Winooski, EE.UU.) a 390 nm. El modo y la DT se calculan para cada concentración (véase la figura 1 y la Tabla 2).

Producto	Contenido de melanina (%)	Viabilidad celular
Control	100	100
Isobutil metil-xantina (IBMX)	174 ± 12	90
IBMX+ agente de blanqueamiento cutáneo (0,3 mg/ml de cada)	80 ± 8	100
IBMX+ agente de blanqueamiento cutáneo (0,1 mg/ml de cada)	100 ± 9	95
IBMX+ agente de blanqueamiento cutáneo (0,03 mg/ml de cada)	130 ± 12	98
IBMX+ cápsulas dirigidas (3 mg/ml)	18 ± 2	100
IBMX+ cápsulas dirigidas (1 mg/ml)	54 ± 6	91
IBMX+ cápsulas dirigidas (0,3 mg/ml)	90 ± 9	93
IBMX+ cápsulas no dirigidas (3 mg/ml)	85 ± 9	99
IBMX+ cápsulas no dirigidas (1 mg/ml)	99 ± 10	93
IBMX+ cápsulas no dirigidas (0,3 mg/ml)	130 ± 15	97

45 Tabla 2

en la que:

50 IBMX significa isobutil metil xantina. IBMX se usa en el presente documento ya que se sabe que induce melanogénesis, es decir, la síntesis de la melanina.

"Agente de blanqueamiento cutáneo" en este ejemplo se refiere a una mezcla 1:1, p/p de arbutina + fosfato de ascorbilo de sodio. En cuanto a las cápsulas, cada componente representa el 10 % del peso total lo que significa que las cápsulas 3 mg/ml contienen 0,3 mg de arbutina + 0,3 mg de fosfato de ascorbilo de sodio.

5 "Cápsulas dirigidas" se refiere a las cápsulas de la invención como se obtuvieron en el Ejemplo 1 que comprenden el agente de blanqueamiento cutáneo en un peso del 20 % con respecto al peso total de la cápsula.

"Cápsulas no dirigidas" se refiere a las cápsulas que comprenden el agente de blanqueamiento cutáneo sin el péptido de fórmula (I).

10 Los resultados muestran una disminución en el contenido de melanina cuando se usan las cápsulas dirigidas de la invención en comparación con el compuesto de blanqueamiento cutáneo no encapsulado y el compuesto de blanqueamiento cutáneo encapsulado pero no dirigido.

15 **Ejemplo 6. Determinación de melanina e inhibición de la actividad de la tirosinasa de seta**

Se determinó la actividad de varios péptidos de fórmula (II) (enumerados en la Tabla 3 a continuación) para reducir la melanina como se explica en el ejemplo 5 después de tratar las células como se explica en el ejemplo 4.

20 La actividad de varios péptidos de fórmula (II) para inhibir la actividad de la tirosinasa se determinó como se explica a continuación:

El ensayo se realizó en placas de 96 pocillos; se dosificaron en cada pocillo 100 µl de mezcla de reacción que contenía PBS pH 6,5, 25 µl de L-tirosina (1,5 mM) y 20 µl de los compuestos a diferentes concentraciones. Después, se añadieron 15 U de tirosinasa de seta (20 µl) a cada pocillo. También se sometió a ensayo una mezcla de reacción sin la adición de ningún compuesto y se usó como control de actividad máxima. Los pocillos sin enzima sirvieron como blanco de reactivo (control negativo). El ensayo se realizó usando un intervalo de concentraciones de compuesto de 0 a 100 µg/ml.

30 Las placas se incubaron a 30 °C durante 10 min y la cantidad de L-DOPA producida en la mezcla de reacción se midió usando el lector de placas Sinergy II (Biotek) a 490 nm.

La actividad se expresó como el % del máximo considerado el 100 %

SECUENCIA	% DE INHIBICIÓN DE TIROSINASA	% DE CONTENIDO DE MELANINA
Ac-Ile-Ser-Leu-Leu-Asp-Ala-Gln-Ser-NH ₂	28	87
Ac-Ile-Ser-Leu-Leu-Asp-(d)Ala-Gln-Ser-NH ₂	31	80
Ac-Ile-Ser-(d)Leu-Leu-Asp-(d)Ala-Gln-Ser-NH ₂	40	68
Palm-Ile-Ser-(d)Leu-Leu-Asp-(d)Ala-Gln-Ser-NH ₂	48	65
Palm-Ile-Ser-Leu-Leu-Asp-(d)Ala-Gln-Ser-NH ₂	42	78
Palm-Ile-Ser-Leu-Leu-Asp-Ala-Gln-Ser-NH ₂	39	85

35 Tabla 3

Ejemplo 7. Unión de la cápsula y captación en los melanocitos

40 Análisis de la unión y la captación de cápsulas dirigidas en los melanocitos (melanocitos epidérmicos humanos primarios aislados de prepucio neonatal) usando citometría de flujo. La unión de la cápsula se estudió mediante la incubación de las células con cápsulas dirigidas 20 µg/ml, con Palm-Ser¹-Tyr²-Ser³-Nle⁴-Glu⁵-His⁶-DPhe⁷-Arg⁸-Trp⁹-Gly¹⁰-Lys¹¹-DPro¹²-Val¹³-NH-(CH₂)₃-(OCH₂CH₂)₂-CH₂-NH₂ o cápsulas no dirigidas, durante 1 hora a 4 °C en medio de cultivo. Posteriormente, las células se lavaron y se analizaron por citometría de flujo. La captación se estudió mediante la incubación de células con cápsulas dirigidas 20 µg/ml o cápsulas no dirigidas a 37 °C durante 1 h. Las células se lavaron y se analizaron por citometría de flujo en un FacsCalibur (Becton Dickinson, EE.UU.). Véanse las figuras 3 y 4.

Ejemplo 8. Dirección de las cápsulas a los melanocitos dentro de una población celular mixta

50 Se incubaron distintos tipos de células con las cápsulas de la invención (50 µg/ml) que han sido dirigidas con diferentes péptidos de fórmula (Ia) o cápsulas no dirigidas (50 µg/ml) a 37 °C durante 3 h. Los péptidos de fórmula (I) utilizados para dirigir las cápsulas en este ejemplo son péptidos de fórmula Palmoil-Ser-Tyr-Ser-Nle-Glu-His-DPhe-Arg-(AA₁)Gly-Lys-DPro-Val-NH-(CH₂)₃-(OCH₂CH₂)₂-CH₂-NH₂ en la que la naturaleza del aminoácido en la posición 9 (AA₁) se indica en la primera columna de la tabla 3. Las células se lavaron y se tiñeron con el anticuerpo específico

del receptor o anticuerpo de control de isotipo para detectar específicamente distintos tipos de células. Posteriormente, las células se analizaron por citometría de flujo en un FacsCalibur. La fluorescencia asociada a las células se calculó dividiendo la intensidad de la fluorescencia celular media (ifm) para una muestra dada por la ifm de melanocitos incubados con cápsulas dirigidas, que se fijó en el 100 % (véase la figura 5 y la tabla 4).

5

Péptido (AA ₁)	Unión específica a la célula (%)					
	Melanocito	Fibroblasto	Linfocito	Monocito	Célula Dendrítica	Queratinocito
Sin péptido	24 ± 2	18 ± 2	12 ± 1	8 ± 1	14 ± 2	10 ± 1
Triptófano	90 ± 8	16 ± 2	2 ± 1	6 ± 1	9 ± 1	14 ± 2
3-(2-Naftil)-D-alanina	71 ± 7	60 ± 5	10 ± 1	8 ± 1	10 ± 1	20 ± 2
Ácido 3-amino-3-(1-naftil)propiónico	75 ± 7	23 ± 2	18 ± 2	7 ± 1	6 ± 1	16 ± 2
Ácido 3-amino-3-(bifenil)propiónico	74 ± 7	38 ± 4	42 ± 4	16 ± 2	27 ± 3	9 ± 2
Fenilalanina	85 ± 8	35 ± 4	45 ± 4	19 ± 2	7 ± 1	18 ± 2
Tirosina	80 ± 8	30 ± 3	54 ± 5	20 ± 2	5 ± 1	34 ± 3
Histidina	58 ± 6	23 ± 2	18 ± 2	31 ± 3	16 ± 2	24 ± 3
5-Hidroxitriptófano	73 ± 7	21 ± 2	10 ± 1	14 ± 1	8 ± 1	15 ± 2
L-3,4-dihidroxi-fenilalanina	80 ± 8	15 ± 2	51 ± 5	26 ± 2	20 ± 2	85 ± 8

Tabla 4

Ejemplo 9. Síntesis peptídica

10 En este Ejemplo AA se refiere a los aminoácidos del péptido. Los aminoácidos son los correspondientes al péptido de fórmula (I) o al péptido de fórmula (II). La síntesis peptídica química comienza en el extremo C-terminal del péptido y termina en el extremo N-terminal. Por tanto, el primer AA es Val para el péptido de fórmula (I), y el primer de AA es Ser para el péptido de fórmula (II).

15 Se incorporó directamente Fmoc-AA-OH (3 eq) en la resina (0,5 mmol/g) con HBTU (3 eq), DIPEA (6 eq) en DMF durante 1 h. Los lavados se realizaron con DMF (30 s, 5 veces) y DCM (30 s, 5 veces). Se usó el ensayo de Kaiser para comprobar que el acoplamiento era satisfactorio. Para la desprotección del grupo Fmoc, la resina se solvató con DMF (30 s, 5 veces), se trató con una solución de piperidina/DMF al 20 % (5 min, 3 veces) y finalmente se lavó con DMF (30 s, 5 veces) y DCM (30 s, 5 veces). Después, la resina se solvató con DMF (30 s, 5 veces). El mismo procedimiento se repitió sucesivamente n veces con los siguientes aminoácidos Fmoc-AA-OH. Finalmente, la escisión del péptido de la resina se realizó mediante el tratamiento de la resina con TFA:TIS:H₂O (95:2,5:2,5) durante 1 h, produciendo el péptido de secuencia HPLC: columna C18; UV 220 nm; flujo 1 ml/min; gradiente acetonitrilo-agua en 8 min.

25 Se describe:

[1]. Una microcápsula o nanocápsula que comprende un compuesto de blanqueamiento cutáneo y un péptido de fórmula (I):

30 $R_2\text{-Ser}^1\text{-Tyr}^2\text{-Ser}^3\text{-Nle}^4\text{-Glu}^5\text{-His}^6\text{-DPhe}^7\text{-Arg}^8\text{-(AA}_1\text{)}^9\text{-Gly}^{10}\text{-Lys}^{11}\text{-DPro}^{12}\text{-Val}^{13}\text{-R}_1$ (I)

en la que

35 R_1 , se selecciona entre el grupo que consiste en -OH, -OR₃, -SR₃, -NR₃R₄, -NHR₉, polietilenglicol o un derivado del mismo y -OR₉ en el que R₉ es polietilenglicol o un derivado del mismo;

R_2 , se selecciona entre el grupo que consiste en H-, R₃-C(O)- y R₃-OC(O)-,

R_3 y R_4 se seleccionan independientemente entre H, alquilo C₁-C₂₄, alqueno C₂-C₂₄ y arilo C₆-C₁₀;

40

AA₁, se selecciona entre los grupos de aminoácidos que representan un grupo de aminoácidos aromáticos;

y sales y solvatos cosméticamente aceptables del mismo,

acoplado a la superficie exterior de la microcápsula o nanocápsula.

[2]. La microcápsula y/o nanocápsula de acuerdo con [1] en la que el grupo de aminoácidos aromáticos se selecciona entre el grupo que consiste en triptófano (incluyendo L-triptófano y D-triptófano), 3-(2-naftil)-D-alanina, 3-(1-naftil)-D-alanina, ácido 3-amino-3-(1-naftil)propiónico, ácido 3-amino-3-(bifenil)-propiónico, fenilalanina, tirosina, histidina, 5-hidroxitriptófano, ácido D-1,2,3,4-tetrahidroisoquinolina-3-carboxílico y L-3,4-dihidroxifenilalanina.

[3]. La microcápsula y/o nanocápsula de acuerdo con cualquiera de [1] o [2] en la que el compuesto de blanqueamiento cutáneo se selecciona entre el grupo que consiste en arbutina, vitamina C, fosfato de ascorbilo, niacinamida, dinacondrina, un péptido inhibidor de la tirosinasa, tretinoína, hidroquinona, ácido kójico y ésteres del mismo con ácidos grasos, ácido azelaico, glutatión, extractos de *Cinnamomum subavenium*, alfa-hidroxiácidos tales como ácido láctico o ácido glicólico, niacinamida, ácido ferúlico, vitamina E, ácido elágico, extractos de granada y mezclas de los mismos

[4]. La microcápsula y/o nanocápsula de acuerdo con [3] en las que el compuesto de blanqueamiento cutáneo es un péptido inhibidor de la tirosinasa de fórmula (II):



en la que

R₅ se selecciona entre el grupo que consiste en H-, R₇-C(O)- y R₇-OC(O)-;

R₆ se selecciona entre el grupo que consiste en -OH, -OR₇, -SR₇, y -NR₇R₈;

R₇ y R₈ se seleccionan independientemente entre H-, alquilo C₁-C₂₄, alquenilo C₂-C₂₄ y arilo C₆-C₁₀;

y sales y solvatos cosméticamente aceptables del mismo.

[5]. La microcápsula y/o nanocápsula de acuerdo con cualquiera de [1] a [4], caracterizada porque es una microcápsula o nanocápsula polimérica, preferentemente una microcápsula o nanocápsula polimérica bicapa, en la que los polímeros que forman la microcápsula y/o nanocápsula polimérica se seleccionan entre el grupo que consiste en poli(D,L-lactida-co-glicolida), ácidos polilácticos, copolímero de bloque poli(fumarato de propileno-co-etilenglicol) [P(PF-co-EG)], poli-anhídrido anhídrido poli(fumárico-co-sebácico), poli(óxido de etileno)-poli(lactida/glicolida), poli(aminoácido), alcohol polivinílico, alginato, dextrano, quitosano, hidroxiapatita, colágeno, fibrina, ácido hialurónico, carbómeros, poli(aminoácidos) y poli(etilenglicol).

[6]. La microcápsula o nanocápsula de acuerdo con [5], caracterizada porque la microcápsula y/o nanocápsula polimérica bicapa comprende poli(D,L-lactida-co-glicolida) como polímero de la capa interior y alcohol polivinílico como polímero de la capa exterior.

[7]. La microcápsula o nanocápsula de acuerdo con cualquiera de [1] a [6], caracterizada porque el compuesto de fórmula (I) está acoplado de forma covalente al polímero de la capa exterior de la microcápsula.

[8]. La microcápsula o nanocápsula de acuerdo con cualquiera de [1] a [7], caracterizada porque la distribución de tamaño de la microcápsula y/o nanocápsula es de 10 a 10000 nm.

[9]. Un compuesto de fórmula (I)



en la que

R₁, se selecciona entre el grupo que consiste en -OH, -OR₃, -SR₃, -NR₃R₄, -NHR₉, polietilenglicol o un derivado del mismo y -OR₉ en el que R₉ es polietilenglicol o un derivado del mismo;

R₂, se selecciona entre el grupo que consiste en H-, R₃-C(O)- y R₃-OC(O)-;

R₃ y R₄ se seleccionan independientemente entre H, alquilo C₁-C₂₄, alquenilo C₂-C₂₄ y arilo C₆-C₁₀;

AA₁, se selecciona independientemente entre los grupos de aminoácidos que representan un grupo de aminoácidos aromáticos;

y sales y solvatos cosméticamente aceptables del mismo.

[10]. El compuesto de acuerdo con [9] en el que el grupo de aminoácidos aromáticos se selecciona entre el grupo

que consiste en 3-(2-naftil)-D-alanina, 3-(1-naftil)-D-alanina, ácido 3-amino-3-(1-naftil)propiónico, ácido 3-amino-3-(bifenil)-propiónico, fenilalanina, tirosina, histidina, 5-hidroxitriptófano, ácido D-1,2,3,4-tetrahidroisoquinolina-3-carboxílico y L-3,4-dihidroxifenilalanina

5 [11]. Un proceso para la obtención de las microcápsulas y/o nanocápsulas como se definen en [1] a [8] que comprende las etapas de:

a) formar la microcápsula o nanocápsula que encapsula el compuesto de blanqueamiento cutáneo y

10 b) acoplar un compuesto de fórmula (I):



en la que

15 R_1 , se selecciona entre el grupo que consiste en -OH, -OR₃, -SR₃, -NR₃R₄, -NHR₉, polietilenglicol o un derivado del mismo y -OR₉ en el que R₉ es polietilenglicol o un derivado del mismo;

20 R_2 , se selecciona entre el grupo que consiste en H-, R₃-C(O)- y R₃-OC(O)-,

R_3 y R_4 se seleccionan independientemente entre H, alquilo C₁-C₂₄, alquenilo C₂-C₂₄ y arilo C₆-C₁₀;

25 AA₁, se selecciona entre los grupos de aminoácidos que representan un grupo de aminoácidos aromáticos tales como: triptófano, 3-(2-naftil)-D-alanina, ácido 3-amino-3-(1-naftil)propiónico, ácido 3-amino-3-(bifenil)-propiónico, fenilalanina, tirosina, histidina, tiroxina, 5-hidroxitriptófano y L-3,4-dihidroxifenilalanina;

y sales y solvatos cosméticamente aceptables del mismo,

30 con el polímero de superficie exterior de la microcápsula o nanocápsula antes o después de la formación de la microcápsula.

[12]. El proceso de acuerdo con [11], en el que la microcápsula o nanocápsula es una microcápsula o nanocápsula polimérica bicapa que tiene un polímero de la capa interior y un polímero de la capa exterior y la etapa a) de formación de la microcápsula o nanocápsula comprende las etapas de

35 a1) mezclar el polímero de la capa interior con el compuesto de blanqueamiento cutáneo en un disolvente adecuado,

a2) emulsionar la mezcla obtenida en la etapa a) con el polímero de la capa exterior en un disolvente adecuado y, opcionalmente

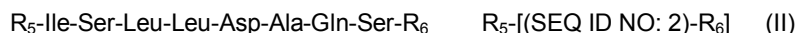
40 a3) aislar las microcápsulas.

[13]. Una composición cosmética que comprende la microcápsula y/o nanocápsula como se define en cualquiera de [1] a [8].

45 [14]. Uso del péptido de fórmula (I) como se define en [1] para la obtención de microcápsulas o nanocápsulas para la prevención cosmética y/o el tratamiento cosmético de las manchas oscuras cutáneas.

50 [15]. Uso de una microcápsula o nanocápsula como se define en cualquiera de [1] a [8] para la prevención cosmética y/o el tratamiento cosmético de las manchas oscuras cutáneas.

[16]. Un péptido de fórmula (II):



55 en la que

R_5 se selecciona entre el grupo que consiste en H-, R₇-C(O)- and R₇-OC(O)-,

60 R_6 se selecciona entre el grupo que consiste en -OH, -OR₇, -SR₇, and -NR₇R₈,

R_7 y R_8 se seleccionan independientemente entre H-, alquilo C₁-C₂₄, alquenilo C₂-C₂₄ y arilo C₆-C₁₀,

y sales y solvatos cosméticamente aceptables del mismo.

65 [17]. Uso del péptido de fórmula (II) como se define en [16] para la prevención cosmética y/o el tratamiento

cosmético de las manchas oscuras cutáneas.

[18]. Una composición que comprende un péptido de fórmula (II) como se define en [16] y uno o más agentes blanqueadores seleccionados entre el grupo que consiste en arbutina, vitamina C, fosfato de ascorbilo, niacinamida, dinacondrina, un péptido inhibidor de la tirosinasa, tretinoína, hidroquinona, ácido kójico y ésteres del mismo con ácidos grasos, ácido azelaico, glutatión, extractos de *Cinnamomum subavenium*, alfa-hidroxiácidos tales como ácido láctico o ácido glicólico, niacinamida, ácido ferúlico, vitamina E, ácido elágico, extractos de granada y mezclas de los mismos.

10 LISTADO DE SECUENCIAS

- <110> INFINITEC ACTIVOS, S.L.
PEPTIDEPHARMA NOVA, S.L.
- 15 <120> CÁPSULAS DIRIGIDAS PARA LA ENTREGA DE AGENTES DE BLANQUEAMIENTO CUTÁNEO EN LA PIEL
- <130> P10071PC00
- 20 <150> EP13382467.2
<151> 20-11-2013
- <160> 4
- 25 <170> PatentIn versión 3.5
- <210> 1
- <211> 13
- <212> PRT
- 30 <213> Homo sapiens
- <220>
- <221> MOD_RES
- <222> (1) .. (1)
- 35 <223> ACETILACIÓN
- <220>
- <221> MOD_RES
- <222> (13) .. (13)
- 40 <223> AMIDACIÓN
- <400> 1
- Ser Tyr Ser Met Glu His Phe Arg Trp Gly Lys Pro Val**
1 5 10
- 45 <210> 2
<211> 8
<212> PRT
<213> Secuencia artificial
- 50 <220>
<223> Péptido inhibidor de la tirosinasa
- <400> 2
- 55 **Ile Ser Leu Leu Asp Ala Gln Ser**
1 5
- 60 <210> 3
<211> 8
<212> PRT
<213> Artificial Sequence
- <220>

ES 2 632 116 T3

<223> Péptido inhibidor de la tirosinasa

<220>
<221> MOD_RES
5 <222> (1).. (1)
<223> ACETILACIÓN

<400> 3

Ile Ser Leu Leu Asp Ala Gln Ser
1 5

10

<210> 4
<211> 8
<212> PRT
15 <213> Secuencia artificial

<220>
<223> Péptido inhibidor de la tirosinasa

20 <220>
<221> LÍPIDO
<222> (1).. (1)
<223> PALMITATO

25 <400> 4

Ile Ser Leu Leu Asp Ala Gln Ser
1 5

REIVINDICACIONES

1. Una microcápsula o nanocápsula que comprende un compuesto de blanqueamiento cutáneo seleccionado entre el grupo que consiste en arbutina, vitamina C, fosfato de ascorbilo, niacinamida, dinacondrina, un péptido inhibidor de la tirosinasa, tretinoína, hidroquinona, ácido kójico y ésteres del mismo con ácidos grasos, ácido azelaico, glutatión, extractos de *Cinnamomum subavenium*, alfa-hidroxiácidos tales como ácido láctico o ácido glicólico, ácido ferúlico, vitamina E, ácido elágico, extractos de granada y mezclas de los mismos y un péptido de fórmula (I):

5 $R_2\text{-Ser}^1\text{-Tyr}^2\text{-Ser}^3\text{-Nle}^4\text{-Glu}^5\text{-His}^6\text{-DPhe}^7\text{-Arg}^8\text{-(AA}_1\text{)}^9\text{-Gly}^{10}\text{-Lys}^{11}\text{-DPro}^{12}\text{-Val}^{13}\text{-R}_1$ (I)

10 en la que

R_1 , se selecciona entre el grupo que consiste en -OH, -OR₃, -SR₃, -NR₃R₄, -NHR₉, polietilenglicol o un derivado del mismo y -OR₉ en el que R₉ es polietilenglicol o un derivado del mismo;

15 R_2 , se selecciona entre el grupo que consiste en H-, R₃-C(O)- y R₃-OC(O)-,

R_3 y R_4 se seleccionan independientemente entre H, alquilo C₁-C₂₄, alqueno C₂-C₂₄ y arilo C₆-C₁₀;

20 AA₁, se selecciona entre los grupos de aminoácidos que representan un grupo de aminoácidos aromáticos;

y sales y solvatos cosméticamente aceptables del mismo,

25 acoplado a la superficie exterior de la microcápsula o nanocápsula.

2. La microcápsula y/o nanocápsula de acuerdo con la reivindicación 1 en la que el grupo de aminoácidos aromáticos se selecciona entre el grupo que consiste en triptófano (incluyendo L-triptófano y D-triptófano), 3-(2-naftil)-D-alanina, 3-(1-naftil)-D-alanina, ácido 3-amino-3-(1-naftil)propiónico, ácido 3-amino-3-(bifenil)-propiónico, fenilalanina, tirosina, histidina, 5-hidroxitriptófano, ácido D-1,2,3,4-tetrahidroisoquinolina-3-carboxílico y L-3,4-dihidroxifenilalanina.

3. La microcápsula y/o nanocápsula de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 1 o 2 en la que el compuesto de blanqueamiento cutáneo es un péptido inhibidor de la tirosinasa de fórmula (II):

35 $R_5\text{-Ile-Ser-Leu-Leu-Asp-Ala-Gln-Ser-R}_6$ $R_5\text{-}[(\text{SEQ ID NO: 2})\text{-R}_6]$ (II)

en la que

40 R_5 se selecciona entre el grupo que consiste en H-, R₇-C(O)- y R₇-OC(O)-;

R_6 se selecciona entre el grupo que consiste en -OH, -OR₇, -SR₇, y -NR₇R₈;

R_7 y R_8 se seleccionan independientemente entre H-, alquilo C₁-C₂₄, alqueno C₂-C₂₄ y arilo C₆-C₁₀;

45 y sales y solvatos cosméticamente aceptables del mismo.

4. La microcápsula y/o nanocápsula de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 3, caracterizada porque es una microcápsula o nanocápsula polimérica, preferentemente una microcápsula o nanocápsula polimérica bicapa, en la que los polímeros que forman la microcápsula y/o nanocápsula polimérica se seleccionan entre el grupo que consiste en poli(D,L-lactida-co-glicolida), ácidos polilácticos, copolímero de bloque poli(fumarato de propileno-co-etilenglicol) [P(PF-co-EG)], poli-anhídrido anhídrido poli(fumárico-co-sebácico), poli(óxido de etileno)-poli(lactida/glicolida), poli(aminoácido), alcohol polivinílico, alginato, dextrano, quitosano, hidroxiapatita, colágeno, fibrina, ácido hialurónico, carbómeros, poli(aminoácidos) y poli(etilenglicol).

55 5. La microcápsula o nanocápsula de acuerdo con la reivindicación 4, caracterizada porque la microcápsula y/o nanocápsula polimérica bicapa comprende poli(D,L-lactida-co-glicolida) como polímero de la capa interior y alcohol polivinílico como polímero de la capa exterior.

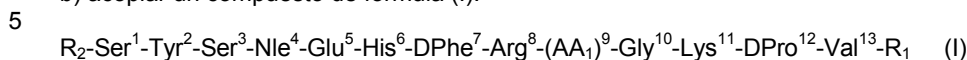
60 6. La microcápsula o nanocápsula de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 1 a 5, caracterizada porque el compuesto de fórmula (I) está acoplado de forma covalente al polímero de la capa exterior de la microcápsula.

7. La microcápsula o nanocápsula de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 1 a 6, caracterizada porque la distribución de tamaño de la microcápsula y/o nanocápsula es de 10 a 10000 nm.

65 8. Un proceso para la obtención de las microcápsulas y/o nanocápsulas como se definen en las reivindicaciones 1 a 7 que comprende las etapas de:

a) formar la microcápsula o nanocápsula que encapsula el compuesto de blanqueamiento cutáneo y

b) acoplar un compuesto de fórmula (I):



en la que

10 R_1 , se selecciona entre el grupo que consiste en -OH, -OR₃, -SR₃, -NR₃R₄, -NHR₉, polietilenglicol o un derivado del mismo y -OR₉ en el que R₉ es polietilenglicol o un derivado del mismo;

R_2 , se selecciona entre el grupo que consiste en H-, R₃-C(O)- y R₃-OC(O)-,

15 R_3 y R_4 se seleccionan independientemente entre H, alquilo C₁-C₂₄, alqueno C₂-C₂₄ y arilo C₆-C₁₀;

AA₁, se selecciona entre los grupos de aminoácidos que representan un grupo de aminoácidos aromáticos tales como: triptófano, 3-(2-naftil)-D-alanina, ácido 3-amino-3-(1-naftil)propiónico, ácido 3-amino-3-(bifenil)-propiónico, fenilalanina, tirosina, histidina, tiroxina, 5-hidroxitriptófano y L-3,4-dihidroxitriptófano;

20 y sales y solvatos cosméticamente aceptables del mismo,

con el polímero de superficie exterior de la microcápsula o nanocápsula antes o después de la formación de la microcápsula.

25 9. El proceso de acuerdo con la reivindicación 8, en el que la microcápsula o nanocápsula es una microcápsula o nanocápsula polimérica bicapa que tiene un polímero de la capa interior y un polímero de la capa exterior y la etapa a) de formación de la microcápsula o nanocápsula comprende las etapas de

30 a1) mezclar el polímero de la capa interior con el compuesto de blanqueamiento cutáneo en un disolvente adecuado,

a2) emulsionar la mezcla obtenida en la etapa a) con el polímero de la capa exterior en un disolvente adecuado y, opcionalmente

35 a3) aislar las microcápsulas.

10. Una composición cosmética que comprende la microcápsula y/o nanocápsula como se define en una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 7.

40 11. Uso del péptido de fórmula (I) como se define en la reivindicación 1 para la obtención de microcápsulas o nanocápsulas para la prevención cosmética y/o el tratamiento cosmético de las manchas oscuras cutáneas.

12. Uso de una microcápsula o nanocápsula como se define en cualquiera de las reivindicaciones 1 a 7 para la prevención cosmética y/o el tratamiento cosmético de las manchas oscuras cutáneas.

45

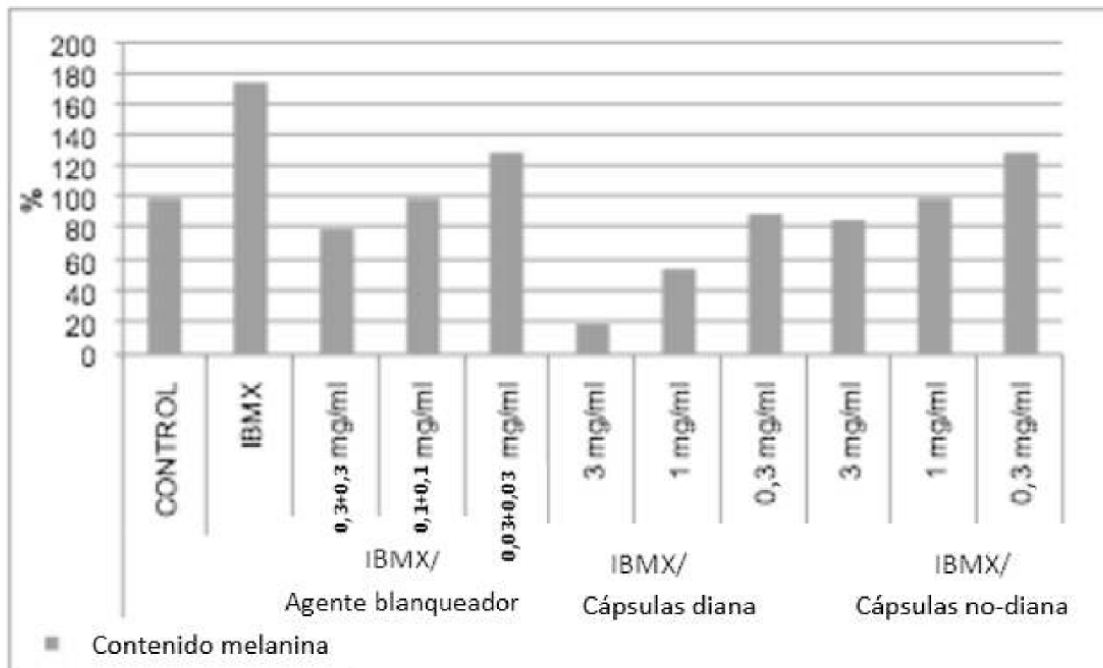


Fig. 1

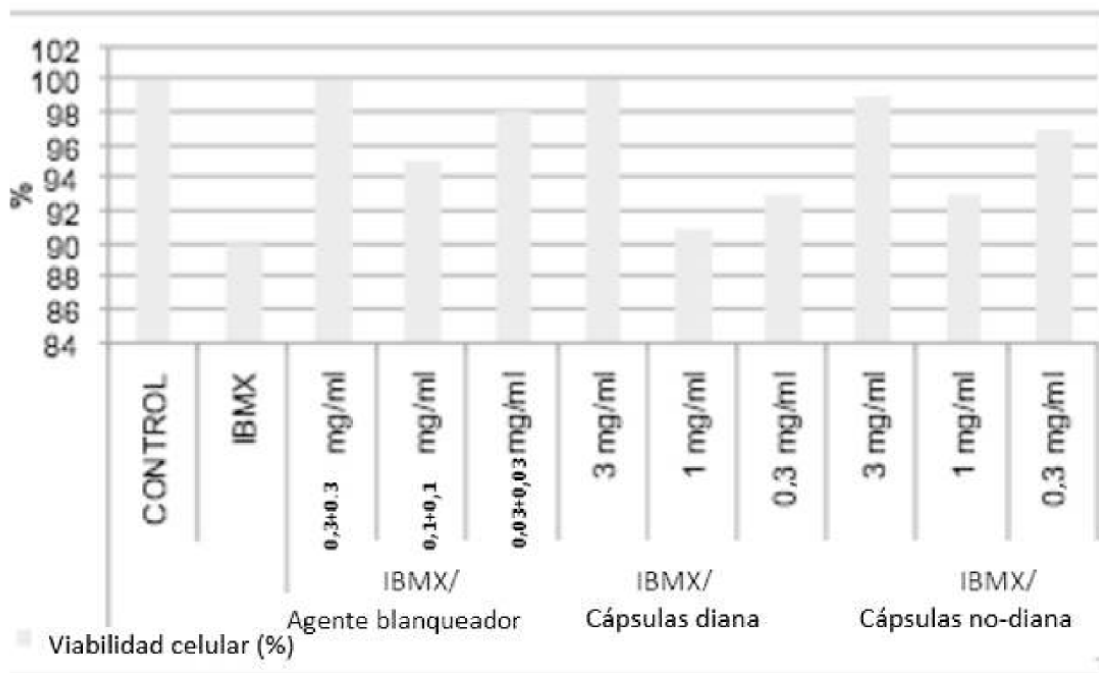


Fig. 2

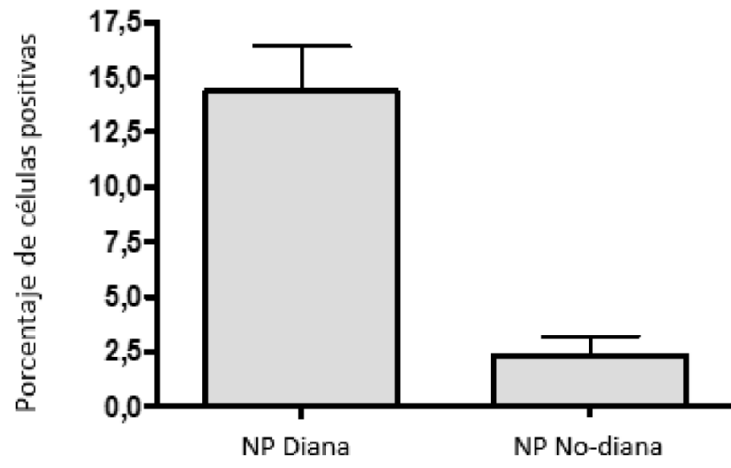


Fig. 3

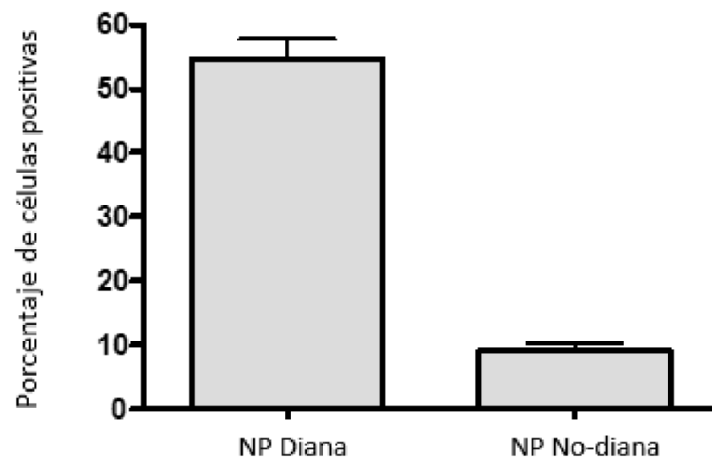


Fig. 4

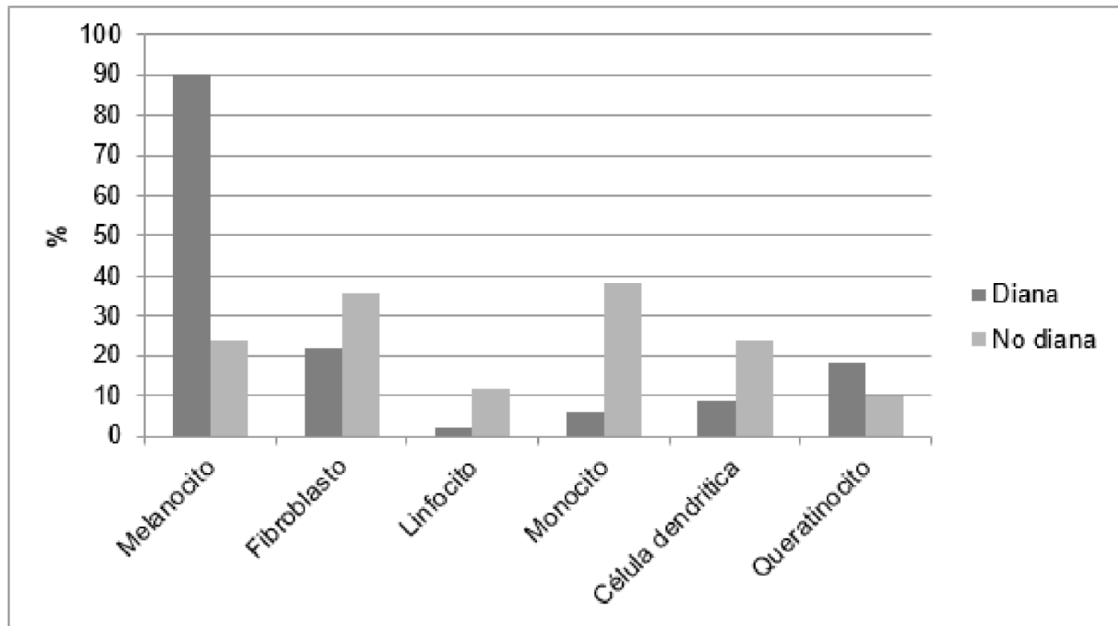


Fig. 5