(19) OFICINA ESPAÑOLA DE PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA

(11) Número de publicación: **2 668 848**

(51) Int. Cl.:

A61K 31/05	(2006.01)	***A61Q 19/02***	(2006.01)
A61K 31/231	(2006.01)	***A61K 47/14***	(2007.01)
A61K 31/7008	(2006.01)	***A61K 9/107***	(2006.01)
A61K 8/06	(2006.01)	***A61K 9/00***	(2006.01)
A61K 9/06	(2006.01)		
A61P 17/00	(2006.01)		
A61P 17/18	(2006.01)		
A61K 8/34	(2006.01)		
A61K 8/37	(2006.01)		
A61K 8/60	(2006.01)		

(12) TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA T3

(86) Fecha de presentación y número de la solicitud internacional: **04.06.2013** **PCT/IB2013/054606**

(87) Fecha y número de publicación internacional: **12.12.2013** **WO13182996**

(96) Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **04.06.2013** **E 13739805 (3)**

(97) Fecha y número de publicación de la concesión europea: **14.02.2018** **EP 2854783**

(54) Título: **Mezcla para la inhibición de biosíntesis de melanina**

(30) Prioridad:

04.06.2012 IT BS20120092

(45) Fecha de publicación y mención en BOPI de la traducción de la patente:
22.05.2018

(73) Titular/es:

EXALYA S.R.L. (100.0%)
Via Santigaro 32
25010 San Felice del Benaco (Brescia), IT

(72) Inventor/es:

DE PAOLI AMBROSI, GIANFRANCO

(74) Agente/Representante:

CARPINTERO LÓPEZ, Mario

Observaciones :

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

ES 2 668 848 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

Mezcla para la inhibición de biosíntesis de melanina

Campo de la invención

La presente invención se refiere al campo técnico de la industria cosmética y farmacéutica, y particularmente se refiere a una mezcla para la inhibición de biosíntesis de melanina.

Estado de la Técnica

Como se sabe, la melanina es la sustancia que más contribuye en la determinación de la pigmentación de la piel humana. Prácticamente, la melanina o las melaninas, como se menciona usualmente, son pigmentos negros, marrones o rojizos de origen biológico que confieren un color característico a la piel.

La melanina es producida por melanocitos, que son células específicas que existen en la capa basal de la epidermis. Esencialmente, cuando los melanocitos se exponen a la luz y particularmente a las radiaciones ultravioletas, producen melanina a través de un proceso bioquímico.

El proceso bastante complejo de biosíntesis de melanina resulta de la oxidación del aminoácido tirosina, que es un precursor de la melanina.

Aunque la melanina desempeña una función importante en el organismo, no son infrecuentes los casos en los que existe una hiperpigmentación de la piel no deseable debido a factores que pueden ser endógenos o exógenos en naturaleza tales como envejecimiento, enfermedades, por ejemplo, enfermedades de la piel o manchas en la piel debido a la exposición al sol.

Por consiguiente, tanto en estos como en otros casos, subsiste la necesidad de controlar la biosíntesis de la melanina, y particularmente disminuir la biosíntesis de la misma o de otro modo obtener un efecto de despigmentación sobre la piel.

A este respecto, la técnica anterior ha proporcionado diversos compuestos que se basan principalmente, pero no solamente, en la capacidad de inhibir la actividad enzimática de la tirosinasa, la enzima que coopera con el oxígeno para permitir que la tirosina se oxide en dopaquinona. Otros compuestos con actividad de despigmentación facilitan la degradación proteolítica de la tirosinasa, mientras que otros inhiben la formación de la misma.

Con respecto a la tirosina, se puede decir que su oxidación es una etapa crítica y crucial en la biosíntesis de melanina ya que las etapas posteriores ocurren espontáneamente en el cuerpo humano.

El enfoque de la inhibición de la actividad enzimática de la tirosinasa se basa generalmente en una inhibición directa del proceso de oxidación de los diversos compuestos intermedios de síntesis de melanina, y consiste principalmente en inhibir su capacidad catalítica a través de normalmente un mecanismo de tipo competitivo.

Los compuestos conocidos como inhibidores de la tirosinasa pertenecen al grupo de los polifenoles, que incluyen flavonoles, flavonas, flavononas, isoflavonoles, chalconas, estilbenos, cumarinas, así como ácido kójico, glabridina y, en general, derivados del regaliz.

El documento WO 2007/077260 describe la actividad de despigmentación del difenilmetano y derivados del mismo cuando se utiliza en asociación con diversas otras sustancias cuyas actividades de despigmentación y protección contra la radiación UV son conocidas.

Sin embargo, el agente de despigmentación más poderoso conocido en la técnica anterior es la hidroquinona. La hidroquinona actúa a través de un mecanismo de tipo citotóxico aunque su acción al mismo tiempo resulta en la inhibición del crecimiento de los melanosomas, más aún también inhibe la formación de dopaquinona y dioxifenilalanina, otro compuesto obtenido de la oxidación de la tirosina por la enzima tirosinasa.

Sin embargo, la efectividad de la hidroquinona siempre se asocia con un alto potencial tóxico y citotóxico que resultó en la prohibición de su uso en el campo cosmético en muchos países, que incluyen aquellos de la Unión Europea, Japón y Sudáfrica.

Adicionalmente, en ciertos países europeos, que incluyen Italia, su uso también ha sido prohibido en el campo farmacéutico.

Por lo tanto, la técnica anterior describe diversos compuestos capaces de inhibir la producción del pigmento de la piel melanina, sin embargo, es necesario hacer frente a una eficacia no siempre satisfactoria y con el riesgo de tener efectos secundarios no deseados o incluso efectos tóxicos y citotóxicos, mientras que sería deseable tener sustancias de despigmentación con una alta efectividad, es decir, capaces de proporcionar una acción de

despigmentación considerable que sea mayor que la de las sustancias conocidas, y capaces de reducir o incluso eliminar los efectos secundarios no deseados, así como, y especialmente, los efectos tóxico y citotóxicos.

El documento WO 2009/105294 divulga procedimientos y composiciones para blanquear o aclarar la piel que comprenden por lo menos un activo de blanqueamiento contenido en estructuras de asociación.

El documento WO 2010/078985 divulga un procedimiento cosmético para controlar el pardeamiento de la piel inducido por radiación UV, que consiste en aplicar, a la superficie de la piel, por lo menos una composición que comprende: a) por lo menos un agente de despigmentación y b) por lo menos un sistema para filtrar tanto la radiación UVA como la radiación UVB; c) y opcionalmente por lo menos un agente queratolítico; en el que la composición tiene una longitud de onda crítica de más de 370 nm.

El documento de G. Vielhaber ET AL: "4-(1-Phenylethyl) 1,3-Bencenodiol: A New, Highly Efficient Lightening agent", International Journal of Cosmetic Science, 2007, 29, 1 January 2007 (2007-01-01), páginas 63-66, XP055052000, página de Internet: URL: http://onlinelibrary.wiley.com/store/10.1111/j.1467-2494.2007.00355_6.x/asset/j.1467-2494.2007.00355_6.x.pdf?v=1 &t=hcn36y4z&s=668fef297fb66ef8f0 77d9262534c6eb6b2979c9, divulga que el 4-(1-feniletil)-1,3-bencenodiol es un agente aclarador de la piel altamente eficiente que inhibe la síntesis de melanina.

El documento de Jae Sung Hwang ET AL: "Disruption of tyrosinase glycosylation by N-acetylglucosamine and its depigmenting effects in guinea pig skin and in human skin", Journal of Dermatological Science 63 (2011), 1 September 2011 (2011-09-01), páginas 199-205, XP055052115, página de Internet URL:http://ac.els-cdn.com/S0923181111001769/1- s2.0-S0923181111001769-main.pdf?_tid=162c13ce-6c8b-11e2-92f2-00000aab0f27&acdnat= 1359735720_6f6f568581896de2f81318a71b06 0679, divulga que la N-acetilglucosamina reduce la melanina en la piel humana.

El documento de Sungran Huh ET AL: "Melanogenesis Inhibitory Effect of Fatty Acid Alkyl esters Isolated from Oxalis triangularis", Biol. Pharm. Bull. 33(7), (2010), 1 Julio 2010 (2010-07-01), páginas 1242-1245, XP055052218, divulga el efecto inhibidor de la melanogénesis del linoleato de etilo.

El documento DATABASE BIOSIS [online] BIOSCIENCES INFORMATION SERVICE, PHILADELPHIA, PA, US; 1998, AIDA KAZUHIKO ET AL: "Purification and identification of melanogenesis inhibitory factors in miso", XP002691517, Database accession no. PREV199800258959; & NIPPON SHOKUHIN KAGAKU KOGAKU KAISHI, vol 45, no. 3, 1998, pages 205-209, ISSN: 1341-027x, divulga el efecto inhibidor de la melanogénesis del linoleato de etilo.

Sumario de la invención

La materia objeto que no se abarca por el alcance de las reivindicaciones no forma parte de la presente invención reivindicada.

El problema técnico que subyace a la presente invención fue proporcionar un producto de despigmentación capaz de superar los inconvenientes mencionados con referencia a la técnica anterior y que tienen las características citadas anteriormente.

De acuerdo con la invención, se ha resuelto dicho problema mediante una mezcla que comprende acetilglucosamina, 4-(1-feniletil)-1,3-bencenodiol y linoleato de etilo para su uso como un cosmético y/o medicamento, particularmente para la inhibición de biosíntesis de melanina.

Ventajosamente, la mezcla de acuerdo con la invención se puede emplear para un uso cosmético o farmacéutico mediante administración externa, por ejemplo, mediante aplicación a la piel o membranas mucosas, o mediante inyección subcutánea, tanto en el caso del tejido intacto como en el caso del tejido dañado.

Ventajosamente, la mezcla de acuerdo con la invención se puede utilizar con propósitos preventivos, mejoradores o curativos, para controlar la producción del pigmento de la piel melanina, particularmente para disminuir la producción de melanina prevista como producción de eumelanina y feomelanina, por ejemplo en el tratamiento de lesiones hiperpigmentadas de la piel, por ejemplo, pero sin limitación, lesiones que son de naturaleza patológica, inflamatoria o infecciosa, para prevenir y/o contrarrestar signos de envejecimiento de la piel que aparecen, entre otros, como alteraciones en la uniformidad del color de la piel, arrugas y pérdida del tono de la piel, y en el tratamiento de manchas solares de la piel debido a la exposición a radiación UV.

La presente divulgación ha mostrado sorprendentemente que, cuando la acetilglucosamina se asocia con 4-(1-feniletil)-1,3-bencenodiol, un derivado de difenilmetano, es capaz de ejercer una notable acción inhibidora sobre la biosíntesis de melanina que es considerablemente más alta que aquella de cada uno de dichos dos ingredientes activos cuando se utilizan individualmente.

Particularmente, la asociación de acetilglucosamina con 4-(1-feniletil)-1,3-bencenodiol no solo es significativamente más efectiva que la acción individual mostrada por cada uno de los compuestos anteriores, sino que es incluso comparable con aquella de la hidroquinona, el agente de despigmentación más efectivo conocido en la técnica

anterior, aunque no muestra niveles apreciables de citotoxicidad según se evalúa en la dosis utilizada para contrarrestar el proceso de formación del pigmento de la piel.

Preferiblemente, la presente mezcla comprende acetilglucosamina en una concentración en peso en el rango entre 0,05 % y 90 %, más preferiblemente entre 0,5 % y 10 %, aún más preferiblemente entre 2 % y 5 % en base al peso total de la mezcla.

Preferiblemente, la presente mezcla comprende 4-(1-feniletil)-1,3-bencenodiol en una concentración en peso en el rango entre 0,05 % y 90 %, más preferiblemente entre 0,1 % y 5,0 %, aún más preferiblemente entre 0,5 y 2 % en base al peso total de la mezcla. De acuerdo con la invención, se ha encontrado sorprendentemente que el efecto de la presente mezcla se mejora adicionalmente cuando está presente el linoleato de etilo además de los ingredientes activos mencionados anteriormente acetilglucosamina y 4-(1-feniletil)-1,3-bencenodiol.

Preferiblemente, el linoleato de etilo está presente en la mezcla de acuerdo con la invención en una concentración en peso en el rango entre 0,1 % y 35 %, más preferiblemente entre 0,23 % y 20 %, aún más preferiblemente entre 2 % y 15 %, en base al peso total de la mezcla.

De acuerdo con lo dicho anteriormente y aún de acuerdo con la invención, la presente mezcla se utiliza para la producción de una formulación cosmética y/o farmacéutica para el tratamiento de inhibición de la biosíntesis de melanina, y más generalmente, se utiliza para la preparación de un cosmético y/o medicamento para la inhibición de biosíntesis de melanina.

Por lo tanto, la invención también proporciona una formulación cosmética y/o farmacéutica que comprende la mezcla mencionada anteriormente y un vehículo o portador farmacéuticamente aceptable, particularmente para la inhibición de biosíntesis de melanina.

En el presente documento, el término mezcla pretende significar la asociación de los ingredientes activos anteriores acetilglucosamina y 4-(1-feniletil)-1,3-bencenodiol, con linoleato de etilo, en cualquier forma físico-química, sólida, líquida o gaseosa tal como una mezcla, una solución, una dispersión, una emulsión, una suspensión, un aerosol, un sol, un gel, una espuma.

En el presente documento, el término formulación pretende significar cualquier producto adecuado para la administración de la presente mezcla a través de una ruta externa o subcutánea, por ejemplo, como ungüento, crema, pomada, pasta, gel, leche, loción, un aerosol, una solución, una emulsión, una suspensión, un jabón y formas similares que se utilizan normalmente en cosméticos y/o farmacología.

Las características y ventajas adicionales de la invención se harán más evidentes tras la consideración de la siguiente descripción detallada de algunas realizaciones preferidas, pero no exclusivas que se muestran con propósitos ilustrativos y no limitativos.

Descripción detallada de la invención

Una mezcla de acuerdo con la presente invención comprende acetilglucosamina, 4-(1-feniletil)-1-3-bencenodiol (también conocido compuesto 4-(1-feniletil)-1,3-bencenodiol o 4-(1-feniletil)benceno-1,3-diol o 4-(1-feniletil)resorcinol o también 4-(alfa-metilbencil)resorcinol) y linoleato de etilo como ingredientes activos para un uso cosmético y/o como un medicamento, particularmente para la inhibición de biosíntesis de melanina.

La acetilglucosamina es la amida acética de la glucosamina, un amino azúcar capaz de obstaculizar la glicosilación de la enzima tirosinasa, inhibiendo de esta manera la maduración de dicha enzima (la tirosinasa es una glicoproteína que necesita ser glicosilada para poder ser activa).

4-(1-feniletil)-1,3-bencenodiol es un derivado del difenilmetano capaz de actuar como un inhibidor directo de la actividad catalítica de la tirosinasa y, simultáneamente, actuar como un sustrato preferencial sobre la tirosina (aún con referencia a la tirosinasa) en el proceso de oxidación El 4-(1-feniletil)-1,3-bencenodiol se caracteriza, entre otras cosas, por actividades antioxidantes y de barrido de radicales libres que también son características de la acetilglucosamina y, por lo tanto, como la acetilglucosamina, es útil en un sentido más general para contrarrestar tanto el envejecimiento de la piel inducido por foto como el envejecimiento cronológico.

Sorprendentemente, la invención ha demostrado que el uso combinado de los compuestos anteriores muestra un efecto en gran medida sinérgico y permite que se obtenga una acción inhibidora notable sobre la biosíntesis de melanina a niveles no citotóxicos.

Sin desear estar limitado a ninguna teoría científica o demostración, se considera que el uso combinado de acetilglucosamina y 4-(1-feniletil)-1,3-bencenodiol permite que el proceso de biosíntesis de melanina sea controlado a través de un mecanismo de acción sincronizado en el que la acetilglucosamina inhibe el proceso de glicosilación de la tirosinasa y, por lo tanto, la biodisponibilidad de esta enzima en la forma activa, mientras que el 4-(1-feniletil)-1,3-bencenodiol actúa para obstaculizar su actividad catalítica.

Particularmente, los datos experimentales obtenidos muestran que la asociación de acetilglucosamina y 4-(1-feniletil)-1,3-bencenodiol puede lograr una alta acción de despigmentación que es mayor que la conseguida por cada uno de estos compuestos cuando se utilizan individualmente.

Como se anticipó anteriormente, se considera que el efecto sinérgico se determina por el diferente mecanismo de acción de los dos compuestos para modular el proceso de biosíntesis de melanina.

Específicamente, se considera que la acetilglucosamina actúa principalmente al inhibir la glucosilación de la tirosinasa y, por lo tanto, la maduración de la enzima, siendo de esta manera capaz de disminuir la biodisponibilidad de la misma en su forma activa glicosilada, mientras que se considera que el 4-(1-feniletil)-1,3-bencenodiol actúa como un inhibidor de la actividad enzimática y, por lo tanto, de la actividad catalítica de la tirosinasa.

Los dos mecanismos conducen a una inhibición de la biosíntesis de melanina que se debe considerar no como una simple suma de las actividades intrínsecas de los dos compuestos, sino más bien como un efecto, probablemente obtenido a través de un mecanismo bioquímico sincronizado, que conduce a una disminución significativa, inesperada de la melanina producida por los melanocitos.

De hecho, se ha demostrado que solo el uso de acetilglucosamina, cuando se prueba a diferentes concentraciones de 25 µg/ml, 50 µg ml y 75 µg/ml, no puede provocar una apreciable reducción en la biosíntesis de melanina, mostrando una reducción promedio del 8 % en las tres concentraciones mencionadas anteriormente.

Por el contrario, cuando se utiliza 4-(1-feniletil)-1,3-bencenodiol a una concentración de 10 µg/ml, provoca una reducción en porcentaje de aproximadamente 50 % en la biosíntesis de melanina.

Sorprendentemente, cuando los dos compuestos acetilglucosamina y 4-(1-feniletil)-1,3-bencenodiol se asocian y se utilizan juntos en una concentración de 75 µg/ml y 10 µg/ml, respectivamente, el proceso de melanogénesis se puede reducir en hasta 72 % en términos de inhibición de la biosíntesis de melanina, que corresponde a un aumento de aproximadamente 44 % en comparación con 4-(1-feniletil)-1,3-bencenodiol solo, y de aproximadamente 25 % en comparación con la mezcla de 4-(1)-feniletil)-1,3-bencenodiol y acetilglucosamina. De acuerdo con la invención, se ha mostrado sorprendentemente que, cuando la presente mezcla también comprende linoleato de etilo, la inhibición de la biosíntesis de melanina se potencia significativamente adicionalmente.

Particularmente, se ha demostrado que una mezcla que también comprende linoleato de etilo en una concentración de 50 µg/ml, además de acetilglucosamina y 4-(1-feniletil)-1,3-bencenodiol en las concentraciones indicadas anteriormente, resulta en una inhibición de la biosíntesis de melanina cercana al 82 %, con un aumento de la actividad inhibidora sobre la biosíntesis de melanina de aproximadamente 15 % según se calcula con respecto a la capacidad inhibidora en la biosíntesis de melanina proporcionada por la asociación de acetilglucosamina y 4-(1-feniletil)-1,3-bencenodiol a las concentraciones anteriormente mencionadas, es decir, 75 µg/mly 10 µg/ml, respectivamente.

Por lo tanto, dado que se ha mostrado, entre otras cosas, que el uso de linoleato de etilo asociado con 4-(1-feniletil)-1,3-bencenodiol solo en concentraciones de 50 µg/ml y 10 µg/ml, respectivamente, causa melanina la biosíntesis se inhibirá en aproximadamente un 50 %, un resultado comparable al porcentaje del 50 % indicado anteriormente para el 4-(1-feniletil)-1,3-bencenodiol, entonces el linoleato de etilo compuesto anteriormente mencionado se puede considerar como un agente sinérgico específico de la mezcla de acuerdo la invención.

Adicionalmente, cuando se utiliza linoleato de etilo en asociación con acetilglucosamina sola en una concentración de 50 µg/ml y 75 µg/ml, respectivamente, la biosíntesis de melanina se inhibe en aproximadamente un 15 %.

Por lo tanto, de acuerdo con la invención y de acuerdo con los datos experimentales reportados, parece que, cuando la presente mezcla comprende esencialmente acetilglucosamina y 4-(1-feniletil)-1,3-bencenodiol, se puede lograr un aumento sorprendente de la capacidad inhibidora en la producción de melanina, que es aproximadamente un 44 % mayor que la inhibición obtenida con el uso de 4-(1-feniletil)-1,3-bencenodiol solo y, sin embargo, también significativo en comparación con la suma de los efectos inhibidores obtenidos con el uso de la dos componentes individualmente, dicho incremento es incluso mayor si se calcula con respecto a la inhibición conseguida con el uso de acetilglucosamina sola, y más aún, el incremento relativo en la inhibición de melanina se potencia adicionalmente sorprendentemente cuando se utiliza una mezcla de acuerdo con la invención que también comprende linoleato de etilo, cuya capacidad para inhibir la síntesis de melanina cuando se utiliza individualmente es significativamente menor que la de la presente mezcla que contiene el mismo linoleato de etilo

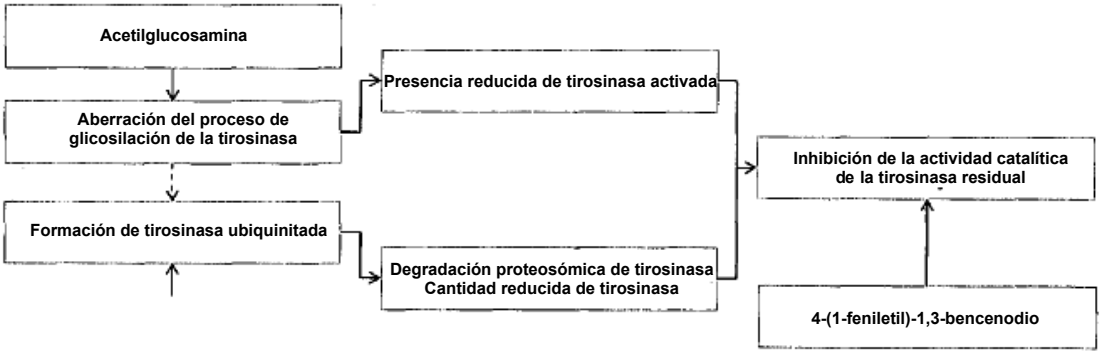
Todas las composiciones han mostrado ser no citotóxicas.

De acuerdo con el mismo procedimiento que se describe a continuación, la capacidad de la hidroquinona para inhibir la biosíntesis de melanina cuando se induce en concentraciones no citotóxicas fue de aproximadamente 40 %.

Por lo tanto, se puede postular un mecanismo de acción sinérgico específico en el que la acetilglucosamina provoca una disminución de la tirosinasa glicosilada y, por lo tanto, la activa, al mismo tiempo que promueve una digestión proteasomal que ya está estimulada por el linoleato de etilo. En esta situación, también existe la acción inhibidora

del 4-(1-feniletil)-1,3-bencenodiol sobre la actividad catalítica de la tirosinasa (que todavía está activa y biodisponible).

Este mecanismo de acción, también respaldado por los datos experimentales, se puede representar mediante el siguiente esquema.



SECCIÓN EXPERIMENTAL

Con el fin de evaluar la inhibición de la biosíntesis de melanina mediante la presente mezcla, se utilizó un modelo experimental in vitro que consistió en cultivos secundarios de un melanoma murino denominado B16. Esta cepa está compuesta de células con morfología fibroblastoide que producen melanina (Fuente: *European Collection of Cell Cultures, ECACC*).

Preparación de la muestra

Para las pruebas, los polvos de los ingredientes activos se disolvieron en etanol y propilenglicol (1:1) al 10 % (p/p) seguido de dilución en medio de cultivo DEM alto en glucosa + 10 % de FBS suplementado con antibióticos (Penicilina 2000 UI/ml, estreptomicina 1000 UI/ml, gentamicina 10 mg/ml) a las concentraciones finales de:

A) 4-(1-feniletil)-1,3-bencenodiol: 10 µg/ml;

B) Acetilglucosamina: 25 µg/ml, 50 µg/ml, 75 µg/ml;

C) linoleato de etilo: 50 µg/ml;

D) 4-(1-feniletil)-1,3-bencenodiol a una concentración de 10 µg/ml y acetilglucosamina a una concentración de 75 µg/ml;

E) 4-(1-feniletil)-1,3-bencenodiol a una concentración de 10 µg/ml, acetilglucosamina a una concentración de 75 µg/ml, y linoleato de etilo a una concentración de 75 µg/ml.

F) hidroquinona a una concentración de 5 µg/ml (concentración no citotóxica)

Tratamiento y exposición

En el paso 30, las células anteriormente mencionadas se sembraron en placas de 6 pozos durante 24 horas en una concentración de 80,000 células por pozo. Luego, se agregó medio de cultivo nuevo que contenía las muestras mencionadas anteriormente. Las células no tratadas se utilizaron como control negativo, mientras que las células tratadas con hidroquinona a una concentración no citotóxica de 5 µg/ml se utilizaron como un control positivo, como se indicó anteriormente en el punto F).

Cada muestra fue examinada en duplicado.

Después de 72 horas de exposición, se dosificaron la melanina y las proteínas intracelulares.

Dosificación de melanina

Las células se lavaron una vez con solución salina tamponada con fosfato (PBS) y luego se lisaron con NaOH 0,1 N. El lisado se calentó a 60°C durante 1 hora para permitir que se solubilizara la melanina.

Con el fin de evaluar la cantidad de melanina en el lisado celular, se tomó una lectura espectrofotométrica a una longitud de onda de 405 nm con el uso de un colorímetro (Tecan Sunrise Remote Model) equipado con un lector de placas.

Se preparó una curva estándar para melanina titulada desde 15 hasta 500 µg/ml.

Medición de proteínas totales

La dosificación de proteína se llevó a cabo de acuerdo con el procedimiento de Bradford (Bradford M., 1975). Al final del tratamiento, las células se lavaron dos veces con PBS estéril a 4°C y se lisaron mediante tratamiento con 400 µl de agua purificada a 4 ºC durante 15'.

Se agregó 100 µl del reactivo colorante 5X al lisado. Luego, se preparó una curva estándar para la albúmina titulada a 20, 40, 80 y 100 µg/ml de una manera similar. Luego, 200 µl de cada muestra, controles y estándares, cada uno por triplicado, se transfirieron a una placa de 96 pozos.

La lectura fue tomada a 595 nm con un colorímetro (Tecan, Sunrise) equipado con un lector de placas.

Interpretación de datos

Con el fin de cuantificar los contenidos de proteína y melanina, se construyó una curva de calibración estándar para albúmina y melanina, y se calcularon sus concentraciones en las muestras utilizando la fórmula de ajuste de curva y las absorbancias correspondientes.

Luego, se calcularon promedios de datos individuales y, para cada muestra, se calculó el porcentaje de reducción de melanina en comparación con el control negativo:

$$\text{\% de reducción de melanina} = \frac{100 - \text{µg/ml de contenido de melanina/ µg/ml de proteína de la muestra} * 100}{\text{µg/ml de melanina/µg/ml de contenido de proteína de control negativo}}$$

Ejemplos de formulación de la invención

Formulación 1 (referencia): emulsión farmacéutica para su uso tópico con base en 4-(1-feniletil)-1,3-bencenodiol y acetilglucosamina:

	% en peso
- esteareth 2	2,00
- esteareth 21	3,00
- Ppg-15 éter de estearilo	10,00
- ácido estearico	5,00
- butilhidroxitolueno (BHT)	0,01
- 4-(1-feniletil)-1,3-bencenodiol	2,50
- Acetilglucosamina	5,00
- alcohol etílico	5,00
- conservantes	c.s
- agua	c.s.

Una mezcla (dicha fase A) que comprende un 2 % en peso de Steareth 2, 3 % en peso de Steareth 21, 10 % en peso de Ppg-15 estearil éter, 5 % en peso de ácido esteárico, 0,01 % en peso de (BHT) y 2,50 % en peso de 4-(1-feniletil)-1,3-bencenodiol se calentó a 80°C. Esta fase A se agregó con cantidades adecuadas de agua y conservantes calentados a 75°C; finalmente, la mezcla resultante se agregó con una fase B que consistía en una mezcla que comprendía un 5 % en peso de acetilglucosamina y un 5 % de alcohol etílico calentado a 40 ºC, para obtener la formulación 1.

Formulación 2. Emulsión para su uso tópico con base en 4-(1-feniletil)-1,3-bencenodiol, linoleato de etilo y acetilglucosamina:

	% en peso
- Steareth 2	2,00
- Steareth 21	3,00

(continuación)

	% en peso
Ppg-15 estearil éter	10,00
ácido esteárico	5,00
- butilhidroxitolueno (BHT)	0,01
4-(1-feniletil)-1,3-bencenodiol	4,50
- Linoleato de etilo	10,00
- Acetilglucosamina	5,00
- alcohol etílico	5,00
- conservantes	c.s.
- agua	c.s.

La formulación 2 se preparó de una manera similar a la formulación 1, excepto que la fase A también comprendía 10 % en peso de linoleato de etilo.

Por lo tanto, de acuerdo con la invención, la presente mezcla comprende los compuestos anteriormente mencionados en las diferentes combinaciones ilustradas aquí así como en las diferentes relaciones de peso indicadas anteriormente, dependiendo del efecto deseado y la forma químico-física utilizada para aplicarlo a la piel por medio de un vehículo o portador adecuado, se puede utilizar en la producción de formulaciones cosméticas y/o farmacéuticas destinadas para su uso en el control de la producción de melanina y adaptadas para el tratamiento de lesiones hiperpigmentadas (como lentigo Solar, manchas por la edad, melasma y cloasma), para uniformizar el color de la piel, para contrarrestar la formación de radicales libres y para contrarrestar o prevenir los signos de envejecimiento de la piel, tales como arrugas y pérdida de tono de la piel, y en general para mejorar las condiciones estéticas de la piel.

Las ventajas de la presente invención, que ya parecían evidentes en el transcurso de la descripción anterior, se pueden resumir al señalar que se proporciona una mezcla que comprende acetilglucosamina y 4-(1-feniletil)-1,3-bencenodiol para su uso como un cosmético y/o medicamento, y particularmente para inhibir la biosíntesis de melanina, así como una formulación cosmética y/o farmacéutica correspondiente que comprende la presente mezcla para el tratamiento de lesiones hiperpigmentadas de la piel tales como, por ejemplo, pero sin limitación, lentigo Solar, manchas por la edad, melasma y cloasma, para uniformizar el color de la piel, para contrarrestar la formación de radicales libres y para contrarrestar o prevenir los signos de envejecimiento de la piel, como arrugas y pérdida de tono de piel, y en general para mejorar las condiciones estéticas de la piel, cuya efectividad para reducir la producción de melanina es particularmente significativa en ausencia de citotoxicidad.

Por lo tanto, la presente invención representa una mejora sustancial e innovadora con respecto a la técnica anterior conocida hasta la fecha, tanto en términos de efectividad como en términos de seguridad de uso.

En conclusión, la presente mezcla, en las diferentes realizaciones ilustradas y descritas aquí, ha mostrado sorprendentemente un efecto ampliamente mayor, es decir, sinérgico, en comparación con el efecto obtenido por cada componente de la mezcla cuando se utiliza individualmente e incluso en comparación con la suma de los efectos obtenidos al utilizar cada componente individualmente, cada caso se evalúa a un nivel no citotóxico.

REIVINDICACIONES

1. Mezcla que comprende acetilglucosamina, 4-(1-feniletil)-1,3-bencenodiol y linoleato de etilo para su uso como un cosmético y/o medicamento.

2. Mezcla para su uso de acuerdo con la reivindicación 1, en la que la acetilglucosamina está a una concentración en peso de entre 0,05 % y 90 %, preferiblemente entre 0,5 % y 10 %, más preferiblemente entre 2 % y 5 % en base al peso total de la mezcla.

3. Mezcla para su uso de acuerdo con la reivindicación 1 o 2, en la que el 4-(1-feniletil)-1,3-bencenodiol está a una concentración en peso de entre 0,05 % y 90 %, preferiblemente entre 0,1 % y 5,0 %, más preferiblemente entre 0,5 y 2 % en base al peso total de la mezcla.

4. Mezcla para su uso de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones precedentes, en la que el linoleato de etilo está a una concentración en peso de entre 0,1 % y 35 %, preferiblemente entre 0,23 % y 20 %, más preferiblemente entre 2 % y 15 % en base al peso total de la mezcla.

5. Mezcla para su uso de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones precedentes para la inhibición de biosíntesis de melanina.

6. Mezcla para su uso de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones precedentes para el tratamiento de lesiones de piel hiperpigmentada que incluyen lentigo sola, manchas por la edad (manchas de envejecimiento), melasma, cloasma.

7. Mezcla para su uso de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones precedentes para hacer uniforme el color de la piel y/o contraatacar la formación de radicales libres y/o contraatacar o prevenir signos de envejecimiento de la piel tales como arrugas y pérdida del tono de la piel.

8. Formulación cosmética y/o farmacéutica que comprende una mezcla de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones precedentes y un vehículo fisiológicamente aceptable.