

(12) DEMANDE INTERNATIONALE PUBLIÉE EN VERTU DU TRAITÉ DE COOPÉRATION
EN MATIÈRE DE BREVETS (PCT)

(19) Organisation Mondiale de la Propriété
Intellectuelle
Bureau international



(43) Date de la publication internationale
31 mai 2007 (31.05.2007)

PCT

(10) Numéro de publication internationale
WO 2007/060182 A1

(51) Classification internationale des brevets :
A61K 8/49 (2006.01) *A61K 31/472* (2006.01)
A61Q 19/02 (2006.01) *A61P 17/00* (2006.01)

(74) Mandataire : **ANDRAL, Christophe**; L'OREAL, 25-29
Quai Aulagnier - DIPI, F-92665 Asnieres-sur-Seine Cedex
(FR).

(21) Numéro de la demande internationale :
PCT/EP2006/068772

(81) États désignés (*sauf indication contraire, pour tout titre de protection nationale disponible*) : AE, AG, AL, AM, AT, AU, AZ, BA, BB, BG, BR, BW, BY, BZ, CA, CH, CN, CO, CR, CU, CZ, DE, DK, DM, DZ, EC, EE, EG, ES, FI, GB, GD, GE, GH, GM, GT, HN, HR, HU, ID, IL, IN, IS, JP, KE, KG, KM, KN, KP, KR, KZ, LA, LC, LK, LR, LS, LT, LU, LV, LY, MA, MD, MG, MK, MN, MW, MX, MY, MZ, NA, NG, NI, NO, NZ, OM, PG, PH, PL, PT, RO, RS, RU, SC, SD, SE, SG, SK, SL, SM, SV, SY, TJ, TM, TN, TR, TT, TZ, UA, UG, US, UZ, VC, VN, ZA, ZM, ZW.

(22) Date de dépôt international :
22 novembre 2006 (22.11.2006)

(25) Langue de dépôt : français

(26) Langue de publication : français

(30) Données relatives à la priorité :
0511977 25 novembre 2005 (25.11.2005) FR

(84) États désignés (*sauf indication contraire, pour tout titre de protection régionale disponible*) : ARIPO (BW, GH, GM, KE, LS, MW, MZ, NA, SD, SL, SZ, TZ, UG, ZM, ZW), eurasien (AM, AZ, BY, KG, KZ, MD, RU, TJ, TM), européen (AT, BE, BG, CH, CY, CZ, DE, DK, EE, ES, FI, FR, GB, GR, HU, IE, IS, IT, LT, LU, LV, MC, NL, PL, PT, RO, SE, SI, SK, TR), OAPI (BF, BJ, CF, CG, CI, CM, GA, GN, GQ, GW, ML, MR, NE, SN, TD, TG).

(71) Déposants (*pour tous les États désignés sauf US*) : **GAL-
DERMA RESEARCH & DEVELOPMENT** [—/FR];
2400 Route des Colles, Les Templiers, F-06410 Biot (FR).
INSERM [—/FR]; 101, rue de Tolbiac, F-75654 Paris
Cedex 13 (FR).

(72) Inventeurs; et

(75) Inventeurs/Déposants (*pour US seulement*) :
BERTOLOTTO, Corine [FR/FR]; 66 bd Borriglione,
F-06100 Nice (FR). **BALLOTTI, Robert** [FR/FR]; 66
bd Borriglione, F-06100 Nice (FR). **LUCIANI, Flavie**
[FR/FR]; 170, rue du Temple, F-75003 Paris (FR).
KHALED, Mehdi [US/US]; 284 Harvard street, Apt 63
(US).

Publiée :

— avec rapport de recherche internationale

*En ce qui concerne les codes à deux lettres et autres abrévia-
tions, se référer aux "Notes explicatives relatives aux codes et
abréviations" figurant au début de chaque numéro ordinaire de
la Gazette du PCT.*

(54) Title: USE OF N-(2-((3-(4-BROMOPHENYL)-2-PROPENYL)AMINO)ETHYL)-5-ISOQUINOLINESULFONAMIDE (H₈₉) IN A DEPIGMENTING PHARMACEUTICAL COMPOSITION

(54) Titre : UTILISATION DE N-[2-[[3-(4-BROMOPHENYL)-2-PROPENYL]AMINO] ETHYL]-5- ISOQUINOLINESULFO-
NAMIDE (H₈₉) DANS UNE COMPOSITION PHARMACEUTIQUE DEPIGMENTANTE

(57) Abstract: Use of N-(2-((3-(4-bromophenyl)-2-propenyl)amino)ethyl)-5-isoquinolinesulfonamide (H89) in a pharmaceutically acceptable carrier for preparing a medicament for use in treating hyperpigmentary disorders.

(57) Abrégé : Utilisation de N-(2-((3-(4-bromophényl)-2-propényl) amino) éthyl)-5- isoquinolinesulfonamide (H89) dans un sup-
port pharmaceutiquement acceptable pour préparer un médicament destiné à traiter les désordres hyperpigmentaires.



WO 2007/060182 A1

UTILISATION DE N-(2-((3-(4-BROMOPHENYL)-2-PROPENYL) AMINO) ETHYL) -5-
ISOQUINOLINESULFONAMIDE (H89) DANS UNE COMPOSITION PHARMACEUTIQUE
DEPIGMENTANTE

5 La présente invention se rapporte à une composition pharmaceutique
dépigmentante comprenant du N-[2-[[3-(4-bromophényl)-2-propényl]amino]éthyl]-
5-isoquinolinesulfonamide (H₈₉) ainsi que l'utilisation d'une telle composition pour
la préparation d'un médicament destiné au traitement des désordres
hyperpigmentaires.

10

La présente invention relève du domaine pharmaceutique et plus
particulièrement des domaines dermatologique et cosmétique.

La pigmentation constitutive de la peau résulte de la présence de
15 grains de mélanine dans les kératinocytes épidermiques. Deux catégories de
pigments ou mélanines existent : les phéomélanines, pigments jaune-orange
riches en soufre, présents chez les sujets à peau claire, et les eumélanines,
pigments marron-noir pauvres en soufre, présents chez les sujets à peau foncée.
Ces pigments sont synthétisés dans des organites intracytoplasmiques, les
20 mélanosomes, par des cellules spécialisées originaires de la crête neurale, les
mélanocytes. La synthèse de mélanines ou mélanogénèse est une voie
métabolique complexe contrôlée principalement par les enzymes de la famille de
la Tyrosinase : TYR (Tyrosinase), TYRP1 (Tyrosinase Related Protein 1) et DCT
(Dopa-Chrome Tautomérase), qui sont localisées dans la membrane du
25 mélanosome. La Tyrosinase est l'enzyme clé de cette voie de synthèse car elle
catalyse les deux premières étapes de la mélanogénèse, l'hydroxylation de la L-
Tyrosine en DOPA et l'oxydation de la DOPA en DOPAquinone (Hearing, V. J.,
and Jimenez, M. (1987) Mammalian tyrosinase -the critical regulatory control
point in melanocyte pigmentation. *Int. J. Biochem.* 19, 1141-1147) ; TYRP-1 et
30 DCT quant à elles sont surtout impliquées dans la voie de l'eumélanogénèse
(Hearing, V. J. (1999) Biochemical control of melanogenesis and melanosomal
organization. *J. Investig. Dermatol. Symp. Proc.* 4, 24-28). A l'issue de cette

réaction, la quantité et le type de mélanine générés déterminent la couleur constitutive de la peau. Cette pigmentation peut être modifiée par des facteurs extérieurs notamment les radiations solaires, qui représentent le stimulus physiologique le plus important de la mélanogénèse. Cette induction de la
5 synthèse de pigments par les radiations UV est caractérisée macroscopiquement par un assombrissement de la peau ou bronzage. Ce processus joue un rôle crucial de protection contre le photovieillissement et contre la photocarcinogénèse. Les radiations UV peuvent agir directement sur les mélanocytes ou indirectement par l'intermédiaire de la libération de facteurs
10 kératinocytaires qui régulent la mélanogénèse (Gilchrest, B. A., Park, H. Y., Eller, M. S., and Yaar, M. (1996) Mechanisms of ultraviolet light-induced pigmentation. *Photochem. Photobiol.* 63, 1-10).

Parmi les agents sécrétés par le kératinocyte sous l'influence des UV,
15 l' α -MSH (alpha-Melanocyte stimulating hormone), codée par le gène de la pro-opiomélanocortine, est l'un des activateurs les plus importants de la mélanogénèse. Les effets de l' α -MSH sont déclenchés par sa liaison au récepteur MC1 (MC1R :récepteur à la mélanocortine 1) , présent sur le mélanocyte. Le MC1R est un récepteur à 7 domaines transmembranaires couplé à une protéine
20 G de type α s qui active l'adénylate cyclase induisant une augmentation de la teneur intramélanocytaire en AMPc et l'activation de la protéine kinase A (PKA). *In vivo*, il a été observé que des injections d' α -MSH chez des volontaires humains induisaient une stimulation de la pigmentation sans exposition au soleil (Levine, N., Sheftel, S. N., Eytan, T., Dorr, R. T., Hadley, M. E., Weinrach, J. C.,
25 Ertl, G. A., Toth, K., McGee, D. L., and Hruby, V. J. (1991) Induction of skin tanning by subcutaneous administration of a potent synthetic melanotropin. *Jama.* 266, 2730-2736). De plus, une hyperpigmentation cutanée est observée chez des patients atteints du syndrome de Mc Cune-Albright chez lesquels une activation soutenue de l'adénylate cyclase entraînant une augmentation des taux
30 intracellulaires en AMPc a été observée. Chez les sujets atteints du syndrome de Carney, une mutation du gène codant pour la sous-unité régulatrice alpha type1 de la PKA conduit à une activation constitutive de la PKA. Le phénotype décrit

comprend des désordres pigmentaires tels que la présence de macules hyperpigmentées (Kirschner, L. S., Carney, J. A., Pack, S. D., Taymans, S. E., Giatzakis, C., Cho, Y. S., Cho-Chung, Y. S., and Stratakis, C. A. (2000) Mutations of the gene encoding the protein kinase A type I-alpha regulatory subunit in patients with the Carney complex. *Nat. Genet.* 26, 89-92).

In vitro, le traitement de mélanocytes humains normaux (Hunt, G., Todd, C., Cresswell, J. E., and Thody, A. J. (1994) Alpha-melanocyte stimulating hormone and its analogue Nle4DPhe7 alpha-MSH affect morphology, tyrosinase activity and melanogenesis in cultured human melanocytes. *J. Cell. Sci.* 107 (Pt 1), 205-211) ou de cellules de mélanomes (Hill, S. E., Buffey, J., Thody, A. J., Oliver, I., Bleehen, S. S., and Mac Neil, S. (1989) Investigation of the regulation of pigmentation in alpha-melanocyte-stimulating hormone responsive and unresponsive cultured B16 melanoma cells. *Pigment Cell. Res.* 2, 161-166) à l' α -MSH stimule la mélanogénèse. Ces effets peuvent être reproduits par un agent pharmacologique, la Forskoline, activateur direct de l'adénylate cyclase (Englaro, W., Rezzonico, R., Durand-Clement, M., Lallemand, D., Ortonne, J. P., and Ballotti, R. (1995) Mitogen-activated protein kinase pathway and AP-1 are activated during cAMP-induced melanogenesis in B-16 melanoma cells. *J. Biol. Chem.* 270, 24315-24320).

L'ensemble de ces données démontrent le rôle crucial de la voie AMPc / PKA dans le contrôle de la pigmentation.

Les travaux réalisés par les inventeurs ont montré que l'activation de la voie de l'AMPc / PKA, conduit à une augmentation de l'activité transcriptionnelle des gènes de la Tyrosinase (TYR), TYRP-1 et DCT provoquant une augmentation de leur expression (Bertolotto, C., Bille, K., Ortonne, J. P., and Ballotti, R. (1996) Regulation of tyrosinase gene expression by cAMP in B16 melanoma cells involves two CATGTG motifs surrounding the TATA box: implication of the microphthalmia gene product. *J. Cell. Biol.* 134, 747-755) (Bertolotto, C., Busca, R., Abbe, P., Bille, K., Aberdam, E., Ortonne, J. P., and

Ballotti, R. (1998) Different cis-acting elements are involved in the regulation of TRP1 and TRP2 promoter activities by cyclic AMP: pivotal role of M boxes (GTCATGTGCT) and of microphthalmia. *Mol. Cell. Biol.* 18, 694-702). Ainsi, l'AMPC via l'activation de la PKA et du facteur de transcription CREB (cAMP responsive element binding protein) stimule la transcription de MITF (Microphthalmia Associated Transcription Factor), un facteur de transcription de type basique hélice-boucle-hélice, dont la mutation provoque, chez l'homme et la souris, des défauts pigmentaires (Tassabehji, M., Newton, V. E., and Read, A. P. (1994) Waardenburg syndrome type 2 caused by mutations in the human microphthalmia (MITF) gene. *Nat. Genet.* 8, 251-255). MITF en se fixant à la boîte M présente dans les promoteurs des gènes des enzymes mélanogéniques stimule l'expression de TYR, TYRP1 et DCT et augmente la mélanogénèse (Bertolotto, C., Abbe, P., Hemesath, T. J., Bill, K., Fisher, D. E., Ortonne, J. P., and Ballotti, R. (1998) Microphthalmia gene product as a signal transducer in cAMP-induced differentiation of melanocytes. *J. Cell. Biol.* 142, 827-835).

Il a été montré que la Tyrosinase en tant qu'enzyme limitante de la mélanogénèse, est contrôlée par des mécanismes transcriptionnels mais également post traductionnels. Il est connu que des variations de l'activité de la Tyrosinase dans différents types cellulaires ne peuvent être expliquées sur l'unique base de la quantité d'enzymes présentes dans la cellule. Ceci met en avant l'importance d'évènements post-traductionnels dans ce phénomène (Buffey, J. A., Hill, S. E., Bleehen, S. S., Thody, A. J., and Mac Neil, S. (1991) Evidence for a calcium/calmodulin involvement in density-dependent melanogenesis in murine B16 melanoma cells. *Pigment Cell. Res.* 4, 112-119, Buffey, J. A., Edgecombe, M., and Mac Neil, S. (1993) Calcium plays a complex role in the regulation of melanogenesis in murine B16 melanoma cells. *Pigment Cell. Res.* 6, 385-393, Parker, C., and Sherbet, G. V. (1993) The Ca²⁺ channel blocker verapamil enhances melanogenesis without altering metastatic potential in the B16 murine melanoma. *Melanoma Res.* 3, 347-350, Chakraborty, A. K., Funasaka, Y., Komoto, M., and Ichihashi, M. (1998) Effect of arbutin on melanogenic proteins in human melanocytes. *Pigment Cell. Res.* 11, 206-212).

Certaines études montrent que l'activité des molécules de Tyrosinase déjà présentes dans la cellule peut être augmentée, par des phosphorylations par la PKC β (Park, H. Y., Russakovsky, V., Ohno, S., and Gilchrist, B. A. (1993) The beta isoform of protein kinase C stimulates human melanogenesis by activating tyrosinase in pigment cells. *J. Biol. Chem.* 268, 11742-11749), ou par des glycosylations (Imokawa, G., and Mishima, Y. (1986) Importance of glycoproteins in the initiation of melanogenesis: an electron microscopic study of B-16 melanoma cells after release from inhibition of glycosylation. *J. Invest. Dermatol.* 87, 319-325 ; Imokawa, G., and Mishima, Y. (1982) Loss of melanogenic properties in tyrosinases induced by glucosylation inhibitors within malignant melanoma cells. *Cancer Res.* 42, 1994-2002). Cette glycosylation de la Tyrosinase qui se déroule dans le Réticulum Endoplasmique constitue un système de contrôle rigoureux impliquant des molécules chaperonnes qui permet de limiter l'activité des protéines qui ne sont pas glycosylées correctement (Branza-Nichita, N., Negroiu, G., Petrescu, A. J., Garman, E. F., Platt, F. M., Wormald, M. R., Dwek, R. A., and Petrescu, S. M. (2000) Mutations at critical N-glycosylation sites reduce tyrosinase activity by altering folding and quality control. *J. Biol. Chem.* 275, 8169-8175), et permet ensuite l'adressage des protéines correctement modifiées vers leur compartiment cible.

20

D'autres types de régulation peuvent encore intervenir dans le mélanosome lui-même. Les domaines catalytiques de la Tyrosinase et des autres enzymes impliquées dans la mélanogénèse étant localisés à l'intérieur du mélanosome, il a été démontré que leur activité pourrait dépendre de l'environnement intramélanosomal, et notamment du pH. Il existe encore beaucoup de controverses sur le pH nécessaire à une activité optimale de la Tyrosinase ; le pH doit être acide pour certains auteurs (Devi, C. C., Tripathi, R. K., and Ramaiah, A. (1987) pH-dependent interconvertible allosteric forms of murine melanoma tyrosinase. Physiological implications. *Eur. J. Biochem.* 166, 705-711), (Tripathi, R. K., Chaya Devi, C., and Ramaiah, A. (1988) pH-dependent interconversion of two forms of tyrosinase in human skin. *Biochem. J.* 252, 481-487), neutre pour d'autres équipes (Hearing, V. J., and Ekel, T. M. (1976)

30

Mammalian tyrosinase. A comparison of tyrosine hydroxylation and melanin formation. *Biochem J.* 157, 549-557). Ainsi, le groupe de Thody met en évidence que des conditions acides dans le mélanosome sont inhibitrices de la mélanogénèse alors que celle-ci est augmentée avec le pH (Ancans, J., and Thody, A. J. (2000) Activation of melanogenesis by vacuolar type H(+)-ATPase inhibitors in amelanotic, tyrosinase positive human and mouse melanoma cells. *FEBS Lett.* 478, 57-60), (Ancans, J., Tobin, D. J., Hoogduijn, M. J., Smit, N. P., Wakamatsu, K., and Thody, A. J. (2001) Melanosomal pH controls rate of melanogenesis, eumelanin/phaeomelanin ratio and melanosome maturation in melanocytes and melanoma cells. *Exp. Cell. Res.* 268, 26-35). De plus, certains auteurs ont rapporté une augmentation de l'activité de la Tyrosinase dans les mélanomes B16 en présence de composés tels que le NH₄Cl ou encore des ionophores comme la Nigericine ou la Monensine (Saeki, H., and Oikawa, A. (1983) Stimulation of tyrosinase activity of cultured melanoma cells by lysosomotropic agents. *J. Cell. Physiol.* 116, 93-97 ; Saeki, H., and Oikawa, A. (1985) Stimulation by ionophores of tyrosinase activity of mouse melanoma cells in culture. *J. Invest. Dermatol.* 85, 423-425). A l'inverse, d'autres équipes montrent que la tyrosinase requiert un pH acide pour une activité optimale (Mani, I., Sharma, V., Tamboli, I., and Raman, G. (2001) Interaction of melanin with proteins- the importance of an acidic intramelanosomal pH. *Pigment Cell. Res.* 14, 170-179).

La protéine p, pourrait être un des acteurs de la régulation du pH intramélanosomal (Ancans, J., Hoogduijn, M. J., and Thody, A. J., (2001) Melanosomal pH, pink locus protein and their roles in melanogenesis. *J. Invest. Dermatol.* 117, 158-159 ; Brilliant, M., and Gardner, J. (2001) Melanosomal pH, pink locus protein and their roles in melanogenesis. *J. Invest. Dermatol.* 117, 386-387 ; Brilliant, M. H. (2001) The mouse p (pink-eyed dilution) and human P genes, oculocutaneous albinism type 2 (OCA2), and melanosomal pH. *Pigment Cell. Res.* 14, 86-93 ; Puri, N., Gardner, J. M., and Brilliant, M. H. (2000) Aberrant pH of melanosomes in pink-eyed dilution (p) mutant melanocytes. *J. Invest. Dermatol.* 115, 607-613). p est une protéine à 12 domaines trans-membranaires qui est

mutée dans l'OCA-2 (Oculocutaneous albinism) et chez la souris pink-eyed. Les patients atteints d'OCA2 présentent, entre autre, des défauts pigmentaires au niveau des cheveux, de la peau et des iris avec une faible capacité à bronzer. Initialement, la protéine p a été proposée comme un transporteur de Tyrosine dans le mélanosome, cette fonction a ensuite été exclue (Gahl, W. A., Potterf, B., Durham-Pierre, D., Brilliant, M. H., and Hearing, V. J. (1995) Melanosomal tyrosine transport in normal and pink-eyed dilution murine melanocytes. *Pigment Cell. Res.* 8, 229-233). Plus récemment, des études ont suggéré un rôle de la protéine p dans le contrôle du pH mélanosomal (Ancans, J., Hoogduijn, M. J., and Thody, A. J., (2001) Melanosomal pH, pink locus protein and their roles in melanogenesis. *J. Invest. Dermatol.* 117, 158-159 ; Brilliant, M., and Gardner, J. (2001) Melanosomal pH, pink locus protein and their roles in melanogenesis. *J. Invest. Dermatol.* 117, 386-387 ; Brilliant, M. H. (2001) The mouse p (pink-eyed dilution) and human P genes, oculocutaneous albinism type 2 (OCA2), and melanosomal pH. *Pigment Cell. Res.* 14, 86-93 ; Puri, N., Gardner, J. M., and Brilliant, M. H. (2000) Aberrant pH of melanosomes in pink-eyed dilution (p) mutant melanocytes. *J. Invest. Dermatol* 115, 607-613).

Cependant, d'autres travaux suggèrent que la protéine p pourrait réguler l'adressage au mélanosome des protéines Tyrosinase et TYRP-1 (Manga, P., Boissy, R. E., Pifko-Hirst, S., Zhou, B. K., and Orlow, S. J. (2001) Mislocalization of melanosomal proteins in melanocytes from mice with oculocutaneous albinism type 2. *Exp. Eye Res.* 72, 695-710) ou encore entrer en jeu dans la formation d'un complexe stabilisateur avec TYR (Lamoreux, M. L., Zhou, B. K., Rosembat, S., and Orlow, S. J. (1995) The pink-eyed-dilution protein and the eumelanin/pheomelanin switch: in support of a unifying hypothesis. *Pigment Cell. Res.* 8, 263-270).

Quoiqu'il en soit, et comme indiqué plus haut, la PKA est une protéine clé dans les voies de signalisation impliquées dans l'expression de la TYR et les inventeurs ont, de façon surprenante, mis en évidence que seul le H₈₉, connu comme un inhibiteur pharmacologique de la PKA (Hidaka H. et Kobayashi R.

(1992) Annu.Rev.Pharmacol.Toxicol. 32, 377-397), avait un fort pouvoir dépigmentant sur les cellules de mélanomes, en particulier les mélanomes de souris B16 et les mélanomes humains MNT1, contrairement aux autres inhibiteurs pharmacologiques de la PKA de la même famille comme le dihydrochlorure de H9, dihydrochlorure de HA1077, H7, et le dihydrochlorure de H8 qui eux ne sont pas actifs (voir exemple 1). En effet, la diminution de la pigmentation au sein des cellules B16 obtenue avec les autres inhibiteurs s'accompagne de toxicité entraînant la mort des cellules.

10 La demande WO 03/061768 montre que des composés dérivés d'acides aminés, en particulier la N-undécylénoyl phénylalanine, qui sont des inhibiteurs de PKA, sont efficaces pour éclaircir la peau. Mais leur structure est complètement différente de la famille des composés H, et d'autant plus du H89.

15 Le H₈₉ est connu depuis plusieurs années en tant qu'inhibiteur de la protéine kinase A, laquelle intervient dans de nombreux processus physiologiques et pathologiques tels que la régulation de l'expression génique, le métabolisme des lipides, l'apprentissage et la mémoire, ainsi que dans les processus de cancérisation.

20 Afin de comprendre les mécanismes d'action du H₈₉, les inventeurs ont étudié les effets de cette molécule sur différents paramètres régulateurs de la mélanogénèse.

25 Ils ont observé que le H₈₉ entraînait une diminution de l'expression de la Tyrosinase et de MITF ; cependant, ces effets modestes sur l'expression et l'activité de la Tyrosinase ne peuvent en aucun cas expliquer les effets dépigmentants drastiques qu'il provoque.

30 L'utilisation de sondes sensibles au pH (DAMP) a permis de montrer que la Forskoline provoquait une augmentation du pH des mélanosomes alors que le H₈₉ conduit à une acidification importante qui pourrait être responsable de

l'inhibition de la synthèse de mélanines. Enfin, les inventeurs ont découvert que la Forskoline augmente fortement l'expression du gène codant pour la protéine p et que l'inhibition spécifique de son expression bloque la pigmentation induite par la Forskoline. Bien que le H₈₉ affecte peu l'expression de p induite par la Forskoline,
5 il pourrait exercer des effets dépigmentant et acidifiant par l'intermédiaire d'une inhibition de l'activité de la protéine p.

Il existe donc une régulation physiologique du pH intramélanosomal qui joue un rôle important dans le contrôle de la mélanogénèse. Cette régulation
10 du pH du mélanosome est une piste intéressante pour l'élaboration de nouveaux agents dépigmentants.

La présente invention a par conséquent pour objet une composition pharmaceutique dépigmentante comprenant, dans un support
15 pharmaceutiquement acceptable, une quantité efficace de H₈₉ (N-[2-[[3-(4-bromophényl)-2-propényl]amino]éthyl]-5-isoquinolinesulfonamide).

Par « support pharmaceutiquement acceptable », on entend tout support approprié à la forme galénique sous laquelle sera préparée la
20 composition de l'invention. Plus particulièrement, l'homme du métier choisira le support pharmaceutiquement acceptable approprié selon que la composition de l'invention est destinée à une administration orale ou à une utilisation topique.

Par « quantité efficace », on entend une quantité suffisante pour obtenir un effet dépigmentant.
25

Les compositions pharmaceutiques dépigmentantes de l'invention peuvent par ailleurs se présenter pour la voie orale sous la forme de comprimés, de gélules, de dragées, de sirops, de suspensions, de solutions, de poudres, de
30 granulés, d'émulsions, de microsphères ou de nanosphères ou de vésicules lipidiques ou polymériques permettant une libération contrôlée.

Pour l'application topique, les compositions peuvent se présenter sous forme liquide, pâteuse, ou solide, et plus particulièrement sous forme d'onguents, de crèmes, de laits, de pommades, de poudres, de tampons imbibés, de syndets, des lingettes, de solutions, de collyres, de gels, d'émulsions huile
5 dans eau, d'émulsions eau dans huile, de sprays, de mousses, de suspensions, de lotions, de sticks, de shampoings, ou de bases lavantes. Elle peut également se présenter sous forme de suspensions de microsphères ou nanosphères ou de vésicules lipidiques ou polymériques ou de patchs polymériques et d'hydrogels permettant une libération contrôlée. Cette composition pour application topique
10 peut se présenter sous forme anhydre, sous forme aqueuse ou sous la forme d'une émulsion.

La composition pharmaceutique dépigmentante de l'invention, lorsque celle-ci est destinée à une administration orale, est administrée à une dose
15 journalière comprise entre 0,001 mg/kg à 100 mg/kg de poids corporel, en 1 à 3 prises. La composition pharmaceutique selon l'invention comprend du H89 à une concentration généralement comprise entre 0,001 et 10% en poids, de préférence entre 0,01 et 5% en poids, par rapport au poids de la composition pour l'administration par voie systémique.

20 Selon un mode de réalisation préféré de la présente invention, la composition pharmaceutique dépigmentante à usage topique comprend une quantité de H₈₉ comprise entre 0.0001% % et 10 % en poids de H₈₉ par rapport au poids total de la composition, de préférence entre 0.001% et 5 % du poids de
25 ladite composition.

Il est à noter que la composition pharmaceutique dépigmentante de la l'invention peut en outre comprendre un ou plusieurs autres composé(s) ayant une activité complémentaire et/ou empruntant d'autres voies métaboliques que
30 celle du H₈₉ tels que par exemple, un filtre solaire, un agent anti-inflammatoire stéroïdien ou non-stéroïdien, ou un autre agent dépigmentant notamment choisi

parmi un modulateur de MC1R, un dérivé phénolique, un alpha hydroxyacide, un inhibiteur de la tyrosinase et un rétinoïde.

5 Parmi les filtres solaires utilisables, on peut citer notamment les filtres solaires physiques tels que le dioxyde de titane ou l'oxyde de zinc, et les filtres solaires chimiques tels que l'octocrylene, l'ethylhexyl methoxycinnamate, l'octyl salicylate, l'avobenzone, l'oxybenzone, l'ecamsule ou le drometrizole trisiloxane ou leurs mélanges.

10 On peut citer comme autre agent dépigmentant, à titre d'exemple non limitatif :

- les dérivés phénoliques, tels que l'hydroquinone, le monoethyl éther d'hydroquinone, monobenzylether d'hydroquinone ou le 4-hydroxyanisol ;
- 15 - les hydroxyacides tels que l'acide glycolique;
- les rétinoïdes, tels que l'adapalène, la trétinoïne ou l'acide rétinoïque ;
- les modulateurs de MC1R ;
- les inhibiteurs de tyrosinase, tels que les composés
- 20 thioimidazoles décrits dans la demande FR0504444, ou les composés triazoles thiols décrits dans la demande FR0503249.

25 Bien évidemment, l'homme du métier sera tout à fait en mesure d'ajouter aux susdites compositions d'autres ingrédients ou excipients dermatologiquement (c'est-à-dire pharmaceutiquement et/ou cosmétiquement) acceptables et appropriés pour une utilisation conforme à celle ci-dessous décrite.

30 Un autre aspect de la présente invention se rapporte à l'utilisation d'une composition pharmaceutique ci-dessus décrite pour la préparation d'un médicament destiné au traitement des désordres hyperpigmentaires.

Les compositions de l'invention conviennent particulièrement bien au traitement et/ou à la prévention des désordres hyperpigmentaires tels que le melasma, le chloasma, les lentigines, le lentigo sénile, les taches de rousseur, les hyperpigmentations post-inflammatoires dues à une abrasion et/ou une brûlure et/ou une cicatrice et/ou une dermatose et/ou une allergie de contact; les nevi, les hyperpigmentations à déterminisme génétique, les hyperpigmentations d'origine métabolique ou médicamenteuse, les mélanomes ou toutes autres lésions hyperpigmentaires.

10

Les compositions selon l'invention trouvent également une application dans le domaine cosmétique, en particulier dans la protection contre les aspects néfastes du soleil, pour prévenir et/ou pour lutter contre le vieillissement photo-induit ou chronologique de la peau et des phanères.

15

La composition peut comprendre en outre tout additif usuellement utilisé dans le domaine cosmétique ou pharmaceutique, tel que des séquestrants, des antioxydants, des filtres solaires, des conservateurs, des charges, des électrolytes, des humectants, des colorants, de bases ou d'acides usuels, minéraux ou organiques, des parfums, des huiles essentielles, des actifs cosmétiques, des hydratants, des vitamines, des acides gras essentiels, des sphingolipides, des agents apaisants et protecteurs de la peau tels que l'allantoïne. Bien entendu l'homme du métier veillera à choisir ce ou ces éventuels composés complémentaires, et/ou leur quantité, de manière telle que les propriétés avantageuses de la composition selon l'invention ne soient pas, ou substantiellement pas, altérées.

20
25
30

Ces additifs peuvent être présents dans la composition à raison de 0,001 à 20 % en poids par rapport au poids total de la composition.

Les compositions pharmaceutiques de l'invention pourront également être utilisées pour la préparation d'un médicament destiné à éclaircir la peau

indépendamment de tout évènement préalable ayant conduit à un brunissement accidentel de la peau.

Les quantités des compositions de l'invention à appliquer sur la peau,
5 les fréquences d'application et la durée du traitement seront adaptées à la zone de peau à traiter ainsi qu'à la pathologie à traiter ou encore de l'effet esthétique recherché. Quel que soit le but à atteindre, l'effet recherché est d'éclaircir la peau sur une zone plus ou moins étendue. Ceci revient à l'obtention d'une réduction de la pigmentation de la peau visible à l'œil nu et constaté après une certaine durée
10 d'application d'une composition de l'invention.

L'invention a donc également pour objet un procédé cosmétique de dépigmentation de la peau ou de diminution de la production de mélanine comprenant l'application topique sur la peau à dépigmenter d'une composition
15 telle que ci-dessus décrite.

LEGENDES DES FIGURES :

Figure 1 : évaluation de H89 et ses dérivés sur la mélanogénèse
20 Voir exemple 1

Figure 2 : H₈₉ inhibe la synthèse des mélanines
(A) Dosage des mélanines en cellules B16 en condition contrôle ou stimulées par 20 µM de Forskoline (FSK) et de 5 µM de H₈₉ pendant 48 h. La
25 quantité est évaluée par mesure de l'absorbance à 405 nm et rapportée à la quantité de protéines. Les résultats sont exprimés en facteur de stimulation par rapport aux cellules contrôle et représentent la moyenne de trois expériences indépendantes.

(B) Dosage des mélanines des mélanomes MNT-1 stimulées 48 h en
30 présence de H₈₉. Les résultats sont exprimés en facteur de stimulation par rapport aux cellules contrôle.

Figure 3 : H₈₉ inhibe l'activité du promoteur de la Tyrosinase et de MITF

Les cellules B16 sont transfectées avec 0,3 µg de plasmide rapporteur pTyro (A), p-MITF (B) et pTYRP-1 (C). Elles sont stimulées 48 h en présence de 20 µM de FSK et de 5 µM de H₈₉. Les résultats sont exprimés en facteur de stimulation de l'activité luciférase basale.

Figure 4 : H₈₉ inhibe l'activité DOPA Oxydase stimulée par la Forskoline

Dosage de l'activité DOPA Oxydase sur lysat de cellules B16 (60 µg) traitées 48 h à la Forskoline 20 µM et H₈₉ 5 µM.

Figure 5 : Effet du H₈₉ sur l'activité enzymatique de la Tyrosinase

Figure 6 : Ultrastructure des mélanomes B16 en présence de Fsk et H₈₉

Microscopie électronique de coupes ultrafines de B16 traitées 48h avec différents effecteurs. Les flèches creuses représentent les mélanosomes stade I, les pleines, les mélanosomes stade II, les triangles creux les mélanosomes stade III, les pleins, les mélanosomes stade IV.

Figure 7 : Acidification des mélanosomes sous l'action du H89

Microscopie confocale des cellules B16, traitées 48h avec les différents effecteurs et marqués au DAMP (vert), et TYRP-1, B8G3 (1 :10) (A), ou Pmel17, HMB45 (1 :20) (rouge).

Les exemples ci-après ne sont mentionnés que pour illustrer certains aspects de la présente invention. En aucune manière ils ne peuvent être considérés comme limitant l'enseignement de la présente description.

EXEMPLES :

Exemple 1 : Evaluation de H89 et ses dérivés sur la mélanogénèse

a) Matériel et méthode :

- Composés :

- 5 1: dihydrochlorure de H89 (N-[2-(p-Bromocinnamylamino)ethyl]-5-isoquinolinesulfonamide dihydrochlorure)
2: dihydrochlorure de H9 (N-(2-aminoéthyl)-5-isoquinilinesulfonamide dihydrochlorure)
3, dihydrochlorure de HA1077 (1-(5-isoquinoline-sulfonyl)-homopiperazine
10 dihydrochlorure)
4: dihydrochlorure de H8 (N-(2-[méthylamino]éthyl)-5-isoquinolinesulfonamide hydrochlorure)
5: H7 (1-(5-isoquinolinesulfonyl)-2-méthylpiperazine
6: dihydrochlorure de H7 ((+/-)-1-(5-isoquinolinesulfonyl)-2-méthylpiperazine
15 dihydrochlorure
PTU (contrôle positif)

On répartit des cellules murines de mélanome B16F10 sur des plaques 96 puits (2500 cellules/puits dans 100 µl de milieu comprenant DMEM, L-Glutamine
20 200nM, pyruvate de sodium 100mM, acides aminés non essentiels 100X et sérum de veau fœtal) et on incube toute la nuit dans un incubateur humidifié sous 7% CO₂ à 37 °C.

On ajoute les composés à tester, puis les radioisotopes 2-[2-¹⁴C] thiouracile
25 (Amersham, CFQ12674 ; SA=58 mCi/mmol) et 3H L-leucine (Amersham, TRK170, SA=60 mCi/mmol) (concentration finale ¹⁴C thiouracile= 6 mCi/ml, 3H L-leucine= 2mCi/ml), et on incube pendant 24 heures. On lave les puits 2 fois avec 200 µl de 5% TCA et 2 fois avec 300µl de 5% TCA. On ôte le liquide. On ajoute 10 µl de Solvable, puis 100 µl de Microscint40.
30 On compte la radioactivité.

b) Résultats :

Les résultats sont présentés en Figure 1. La ligne bleue avec des losanges correspond à la viabilité des cellules et la ligne rouge avec des carrés correspond à la mélanogénèse normalisée. Ainsi, sur les figures, l'axe des abscisses correspond à la concentration en composés (μM), tandis que l'axe des ordonnées correspond au pourcentage par rapport au niveau basal des cellules témoins (non traitées) pour chaque paramètre (viabilité et mélanogénèse). Par exemple, un pourcentage de 100% de viabilité correspond au niveau de viabilité des cellules témoins.

- 10 Les plus fortes concentrations sont les suivantes;
Composés 1, 2 et 5: 100 μM
Composés 3 et 4: 50 μM (la plus grande concentration dans DMSO est 50 mM)
Composé 6: 25 μM (la plus grande concentration dans DMSO est 25 mM)
- 15 Conclusion : Le composé 1 (H89) montre des effets antimélanogéniques à des doses non toxiques.
Bien que les composés 2, 3 et 5 montrent des effets inhibiteurs, ces derniers s'accompagnent de toxicité.

20 **Exemple 2 : Matériel et Méthodes**

I- Matériels

A. Systèmes cellulaires

Lignées de mélanomes de souris B16F10, humains MNT-1.

25 B. Plasmides

- Le plasmide pTyro contient un fragment de 2,2 kb du promoteur de la Tyrosinase, cloné en amont du gène rapporteur de la luciférase dans le vecteur pGL₂B (Promega).
 - Le plasmide pTYRP1 contient un fragment de 1,2 kb du promoteur TYRP1, en amont du gène rapporteur de la luciférase dans le
- 30 vecteur pGL₂B.

- Le plasmide pMITF contient un fragment 2,1 kb du promoteur MITF, en amont du gène rapporteur de la luciférase dans le vecteur pGL₂B.

5 C. Anticorps

1. *Anticorps primaires*

- *Ac anti-Tyrosinase*, Pep7, polyclonal de lapin dirigé contre un peptide correspondant à la partie C terminale de la Tyrosinase de souris.
- 10 - *Ac anti-TYRP1*, Pep1, polyclonal de lapin dirigé contre un peptide correspondant à la partie C terminale de TYRP1 de souris (Dr V. Hearing, Bethesda, USA).
- *Anticorps anti-Pmel-17*, Pep13, polyclonal de lapin dirigé contre un peptide correspondant à la partie C terminale de Pmel-17 de souris (Dr V. Hearing, Bethesda, USA). HMB45, monoclonal de lapin dirigé contre une chaîne oligosaccharidique sensible à la neuraminidase (DakoCymation®France).
- 15 - *Ac anti-MITF*, monoclonal C5 dirigé contre une protéine de fusion exprimant le fragment Taq-Sac de l'ADNc de MITF humaine (Abcam).
- 20 - *Ac anti-ERK1*, monoclonal dirigé contre un peptide synthétique correspondant à la région carboxy-terminale de ERK1 de rat (ERK1) (Santa cruz).
- B8G3: anticorps monoclonal de souris contre Tyrp1 de souris. 5 (Dr Parson, Brisbane, Queensland, Australia).
- 25 - Anti-DNP, polyclonal de lapin contre le dinitrophenol. (Molecular Porbe).
- 2. *Anticorps secondaires*
- Anti lapin et anti souris, fait chez la chèvre, marqués Texas Red et FITC, utilisés au 1/1000^{ème}, Anticorps de souris IgG Alexa 350, utilisé au 1/100^{ème} Molecular Probes® distribué par Invitrogen France.
- 30

- Anti lapin et anti souris, fait de chèvre, couplés à la peroxydase provenant de chez Dakopatts® (Glostrup, Danemark) et utilisés au 1/3000^{ème}.

5 D. Tampons

- PBS (Phosphate Buffer Saline) : NaCl 140 mM, KCl 3 mM, NaH₂PO₄ 6 mM, KH₂PO₄ 1 mM, pH7
- (a) Tampon de lyse : 50 mM Tris pH 7,4, 150 mM NaCl, 1 % Triton X-100, 10 µM leupeptine, 1 mM AEBSF, 100 U/ml aprotinine, 10 mM NaF et 1 mM Na₃VO₄.
- (b) Tampon de reprise : 40 mM Na₂HPO₄, 3 % SDS, 10 % Glycérol, 0,01 % bleu de bromophénol, 10 % _beta-mercaptoéthanol.
- (c) Tampon de saturation : 10 mM Tris HCl pH 7,4 150 mM NaCl, 1 mM EDTA, 0,1 % Tween 20, 3 % BSA, 5 % gélatine.
- (d) Tampon de lavage : 10 mM Tris, pH 7,6, 150 mM NaCl, 1 % Triton X-100.
- (e) Tampon de solubilisation : 25 mM Tris pH8, 1 % Triton X-100, 2 mM EDTA, 2 mM DTT.
- (f) 1,33 mg/ml ONPG, 200 mM sodium de phosphate pH 7,3, 100 mM _beta-mercaptoéthanol, 2 mM MgCl₂.
- (g) Tampon Phosphate 0,1 M pH 6,8, 1 % Triton X-100.

15 E. Effecteurs utilisés

- Activateur de l'adénylate cyclase : Forskoline (Sigma® France)
- Inhibiteur de la PKA : H₈₉ (Biochem® France)

II- Méthodes

30 A. Culture cellulaire

- Les lignées de mélanomes de souris B16F10 sont cultivées dans du DMEM (Dulbecco's Modified Eagle's Medium) supplémenté

avec 7 % de SVF (Sérum de Veau Foetal) et 100 U/ml / 50 µg/ml de pénicilline / streptomycine.

- Les lignées de mélanomes humains MNT-1 sont cultivées dans du DMEM (Dulbecco's Modified Eagle's Medium) supplémenté avec du AIM-V medium (Gibco) 10 %, FBS 20 %, NEA (acides aminés non essentiels) 1 %, Sodium pyruvate 1 %, 100 U/ml / 50 µg/ml de pénicilline / streptomycine.

Les deux lignées cellulaires sont maintenues dans une atmosphère humidifiée à 37°C, 5 % de CO₂.

10

B. Dosage des Mélanines

Les cellules de mélanomes B16 (150.10^3 par puits de 35 mm de diamètre) sont incubées 48 h à 37°C en présence des différents effecteurs puis centrifugées. Les culots sont ensuite dissous dans 100 µl de NaOH 1M à 70°C pendant 2 h afin de dissoudre les mélanines. La quantité relative de mélanine est évaluée par mesure de la DO à 405 nm et rapportée à la quantité de protéine. Les résultats sont exprimés en niveau de stimulation par rapport à la condition contrôle.

Le même traitement est appliqué aux cellules de mélanomes humains, MNT-1.

20

C. Western blot

Les mélanomes B16 sontensemencés à 200.10^3 cellules par puits de 35 mm de diamètre, puis stimulés en Forskoline et H₈₉, à des temps variables. Les cellules sont ensuite lysées dans le tampon (a) pendant 10 minutes à 4°C. Puis, 30 µg de protéines sont dénaturées 4 minutes à 90°C dans du tampon de reprise (b).

25

Les échantillons protéiques sont ensuite séparés par électrophorèse sur un gel de polyacrylamide 10 % en présence de SDS et transférés sur une membrane de PVDF (Polyvinylidene fluoride) (Immobilon, Millipore), pré-humidifiée dans un bain de méthanol. La membrane est saturée pendant 1 heure à 25°C dans le tampon (c). L'anticorps primaire est incubé 18 h sur la membrane

30

à 4°C. Le lendemain, 3 lavages de 10 minutes sont effectués dans le tampon de lavage (d). L'anticorps secondaire couplé à la peroxydase de Raifort (Dakopatts) est ensuite incubé 1 heure à 25°C. 3 lavages sont de nouveau effectués, les protéines d'intérêt sont révélées par la technique ECL « Enhance Chemiluminescence », selon le protocole proposé par le fabricant (Amersham®).

D. Transfection et dosage de l'activité luciférase

Les cellules de mélanomes B16 ($20 \cdot 10^3$ cellules par puits de 16 mm de diamètre) sont transfectées de façon transitoire, le transfectant utilisé est un lipide cationique, la Lipofectamine (Invitrogen). Pour chaque point, 0,3 µg de plasmide rapporteur pTyro, pTYRP1 ou pMITF ainsi que 0,05 µg de pCMV_beta-gal sont incubés avec 2 µl de lipofectamine dans 25 µl d'OptiMEM (Invitrogen). Le mélange est déposé sur les cellules pendant 6 h, il est ensuite remplacé par du DMEM 7 % SVF en présence de Forskoline (20 µM) ou/et H_{89} (5 µM). Les cellules sont solubilisées 48 h après transfection dans un tampon (e) pour la mesure de leur activité luciférase et beta-galactosidase. 10 µl d'extraits cellulaires sont mis en présence de 50 µl de luciférine et l'activité luciférase est mesurée par un luminomètre. En parallèle 20 µl d'extraits cellulaires sont incubés dans 25 µl de tampon contenant de l'ONPG (f) qui permet de mesurer l'activité beta-galactosidase par spectrophotométrie à 405 nm. Pour chaque point, l'activité luciférase est corrigée par l'activité de la beta-galactosidase.

E. Mesure de l'activité DOPA Oxydase

Les B16 sontensemencées à $200 \cdot 10^3$ cellules par puits de 35 mm de diamètre, incubées en présence de Forskoline (20 µM) et H_{89} (5 µM). Les protéines sont solubilisées dans le tampon (g) pendant 3 minutes à 4°C, puis dosées par la technique Bio-rad Protein Assay. Les lysats (60 µg de protéines) sont ensuite incubés avec 200 µg de L-DOPA dans du tampon Phosphate à 37°C. Une cinétique de la réaction est réalisée par mesure de l'absorbance du produit formé à 570 nm toutes les 30 minutes.

F. Immunofluorescence indirecte

Les mélanomes B16 sont ensemencés sur des lamelles en verre à 15.10^3 cellules par puits de 24 mm de diamètre. Les cellules sont traitées 48 h à la Forskoline (20 μ M) et H_{89} (5 μ M), puis lavées avec du milieu sans sérum et
5 incubées 20 minutes en présence de DAMP (30 μ M). La fixation est réalisée à 25 °C dans du PFA (Paraformaldéhyde) 3 %, 20 minutes, les lamelles sont ensuite lavées en PBS, incubées 10 minutes dans du NH_4Cl et enfin perméabilisées en PBS 0,1 % triton 2 minutes. Les lamelles portant les cellules sont alors incubées dans l'Anti DNP, Ac secondaire de lapin marqué à la fluorescence (FITC) au
10 $1/50^{ème}$ en PBS 1 % BSA (Bovine Serum Albumine).

Puis, le marquage avec l'anticorps primaire monoclonal (B8G3 contre TYRP-1 au $1/10^{ème}$, HMB45 contre Pmel-17 au $1/20^{ème}$) est réalisé en PBS 1 % BSA. 3 lavages en PBS sont ensuite effectués, puis l'anticorps secondaire au $1/1000^{ème}$ couplé au Texas Red est incubé. Le marquage des cellules est
15 visualisé à l'aide d'un microscope à épifluorescence (Axiophot Zeiss).

G. Microscopie Electronique

Les B16 sont ensemencés à 200.10^3 cellules par puits de 35 mm de diamètre, incubés en présence de Forskoline (20 μ M) et H_{89} (5 μ M) 48 h.

20 Les cellules sont fixées en glutaraldéhyde 2 % pendant 3 h à 4 °C, suivi d'une post fixation par l'acide osmique 2 % dans l'eau, pendant 1 h à 4 °C. Les cellules subissent ensuite des déshydratations successives dans des bains d'alcool 30 °, 50 °, 75 °, 95 ° durant 15 minutes chacun puis à 100 ° toute la nuit. Une substitution est réalisée dans l'épon et l'alcool absolu en quantité 50-50 pendant 3
25 h, puis en quantité 75-25, et enfin dans l'épon pur 18 h. Les cellules sont ensuite incluses dans de la gélatine durant 2 jours à 60 °C. Des coupes de 700 Å sont enfin réalisées suivi d'un marquage à l'acétate d'uranyle et au citrate de Pb.

30 Exemple 3 : Résultats

I- Etude de l'effet du H_{89} sur la régulation de la synthèse de pigments mélaniques

A. Effet de la Forskoline et du H₈₉ sur la pigmentation des B16 et des MNT-1

La Forskoline (Fsk), activateur direct de l'adénylate cyclase, conduit à l'augmentation de l'AMPc intracellulaire, entraînant une stimulation de l'expression des enzymes mélanogéniques Tyrosinase et TYRP1. L'augmentation de l'expression de ces enzymes provoque une synthèse accrue des pigments mélaniques pour les culots cellulaires de B16 traitées 48 h à la Forskoline (20 µM) en comparaison des cellules non traitées (non montré). De façon intéressante, le H₈₉, un inhibiteur de la PKA, induit une dépigmentation des culots cellulaires stimulés par la Forskoline (non montré). Un dosage de mélanine effectué sur ces mêmes cellules montre que la quantité de mélanine dans les cellules traitées à la Forskoline est augmentée d'un facteur 4 par rapport à la condition non traitée (**Figure 2A**). Le traitement au H₈₉ provoque un blocage de la synthèse de mélanine stimulée par la Forskoline.

Les mêmes traitements sont effectués sur les cellules de mélanomes humains, MNT-1, qui sont des cellules présentant une pigmentation basale très élevée. Comme l'indique la couleur des culots (non montré) et le dosage des mélanines de MNT-1, cette pigmentation basale est inhibée en présence de H₈₉ (**Figure 2B**).

Ces observations indiquent donc que le H₈₉ peut inhiber la synthèse de mélanine à la fois basale et induite par la Forskoline.

B. Effet du H₈₉ sur l'expression des protéines mélanogéniques, Tyrosinase, TYRP1 et Pmel17, et sur le facteur de transcription MITF

Les inventeurs ont ensuite entrepris d'étudier l'effet du H₈₉ sur l'expression des protéines mélanogéniques Tyrosinase, TYRP-1 et Pmel-17, une protéine de la matrice mélanosomale qui contribue à la régulation de la mélanogénèse comme protéine structurale (Kobayashi, T., Urabe, K., Orlow, S. J., Higashi, K., Imokawa, G., Kwon, B. S., Potterf, B. and Hearing, V. J. (1994) The Pmel 17/silver locus protein. Characterization and investigation of its melanogenic function. *J. Biol. Chem.* 269, 29198-29205 ; Zhou, B. K., Kobayashi, T., Donatien,

P. D., Bennett, D. C., Hearing, V. J., and Orlow, S. J. (1994) Identification of a melanosomal matrix protein encoded by the murine si (silver) locus using « organelle scanning ». *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 91, 7076-7080). Il est nécessaire de comprendre alors si le H₈₉ agit sur la pigmentation en modifiant l'expression de ces gènes. Des expériences de Western Blot montrent que l'expression de la Tyrosinase stimulée par la Forskoline est partiellement inhibée par le H₈₉ (30 à 50 % d'inhibition). En revanche, le H₈₉ ne bloque pas la stimulation d'expression de TYRP1 et Pmel-17 induite par la Forskoline (non montré). Les inventeurs se sont intéressés en parallèle à l'expression de MITF, un facteur de transcription qui régule l'expression des enzymes mélanogéniques (Hodgkinson, C. A., Moore, K. J., Nakayama, A., Steingrimsson, E., Copeland, N. G., Jenkins, N. A., and Arnheiter, H. (1993) Mutations at the mouse microphthalmia locus are associated with defects in a gene encoding a novel basic-helix-loop-helix-zipper protein. *Cell*. 74, 395-404). En Western Blot, MITF apparaît sous forme d'un doublet de 55 et 60 kDa, la bande de plus faible mobilité électrophorétique correspond à MITF phosphorylé sur la sérine 73 par la MAPkinase ERK2 (Hemesath, T. J., Price, E. R., Takemoto, C., Badalian, T., and Fisher, D. E. (1998) MAP kinase links the transcription factor Microphthalmia to c-Kit signalling in melanocytes. *Nature* 391, 298-301). De plus, une inhibition par le H₈₉ de la stimulation induite par la Forskoline de l'expression de MITF (non montré) est observée.

Enfin, ces observations sont confirmées par l'analyse de l'activité des promoteurs Tyrosinase, TYRP1 et MITF. Après transfection transitoire avec pTYRO, pTYRP1 et pMITF, les B16 sont traitées avec les différents effecteurs. Comme le montrent les **Figures 3A et 3B** respectivement, le H₈₉ inhibe l'activité transcriptionnelle des promoteurs de la Tyrosinase et de MITF induite par la Forskoline. Par contre, il ne modifie pas l'activité du promoteur de TYRP1 (**Figure 3C**).

30 C. Effet du H₈₉ sur l'activité intrinsèque de la Tyrosinase

Les inventeurs se sont ensuite attachés à déterminer l'effet du H₈₉ sur l'activité intrinsèque de la Tyrosinase. Le résultat de la **Figure 4** révèle que le H₈₉

inhibe l'activité DOPA oxydase de la Tyrosinase. Cependant, l'activité DOPA oxydase des cellules traitées par la Fsk et le H₈₉ est diminuée de 30 à 50 % par rapport à la Fsk et reflète globalement le niveau d'expression de la Tyrosinase observée en Western Blot dans les mêmes conditions. De plus, l'ajout du H₈₉ *in vitro* pendant les réactions enzymatiques n'affecte pas l'activité DOPA Oxydase de la Tyrosinase (voir D.). On peut alors conclure que H₈₉ n'est pas un inhibiteur spécifique de la Tyrosinase (non montré).

L'ensemble de ces résultats indique que le H₈₉ en diminuant l'expression de MITF et de la Tyrosinase diminue l'activité tyrosinase et la synthèse de pigments. Cependant, ce processus ne peut pas expliquer à lui tout seul l'effet dépigmentant du H₈₉ puisque le niveau d'expression de la Tyrosinase ainsi que son activité en condition Fsk + H₈₉ restent supérieurs à celui du contrôle alors que la Fsk + H₈₉ bloquent complètement la pigmentation.

15 D. Effet du H₈₉ sur l'activité enzymatique de la Tyrosinase: test Tyrosine Hydroxylase / DOPA Oxydase

On fait réagir dans un puits (plaque 96 puits 384 µClear) :

- 40µL de solution substrat (Tyrosine-MBTH + Dopa en cofacteur)
- 20 - 5µL de lysat (ou de Tris-HCl), et
- 5µL de H89

Tampons :

- Tampon Tris HCl 50 mM, pH 7,5 en HCl.
- 25 - Tampon B, pH : 6,8 15 g NaH₂PO₄ / 1,8 L d'eau MQ (ajuster le pH) + 50 ml de DMF, ajuster le volume à 2 litres.
- Tampon de Lyse : sodium phosphate pH 6,8 à 10mM-1% Igepal

Solution substrat :

- 30 - DOPA, solution mère à 3,125mM : 3.08mg par 5ml de Tampon Tris HCl
- MBTH (+4 °C), solution à 3,75mM : 161,775mg par 200ml de Tampon B

- Tyrosine, solution à 1,25 mM : 6,795 mg par 30 ml de MBTH préparé ci-dessus + 1/500^{ème} Dopa préparée ci-dessus

H89 :

- 5 Première concentration finale = 100µM
Dilution sérielle = 3

Lysat :

- 10 Culot cellulaire de 40M cellules + 4mL de Tampon de Lyse ; sonication 10-15 secondes ; centrifugation 30min à 4000rpm à 4 °C. On utilise le surnageant pur.

On incube les plaques tests pendant 6 heures dans une étuve à 37°C. On lit la densité optique (DO) à 520 nm.

- 15 Résultat et conclusion (voir Figure 5):

On n'obtient aucune inhibition.

H89 n'est donc pas un inhibiteur de la Tyrosinase.

II- Rôle du mélanosome dans la régulation de la mélanogénèse

- 20 A. Effet du H₈₉ sur le mélanosome

Une étude en microscopie électronique a été effectuée afin d'observer l'ultrastructure du mélanosome.

- Il existe quatre stades de différenciation classiquement décrits pour les mélanosomes. Les stades I et II correspondent à des organites non mélanisés.
- 25 Les mélanosomes de stade I ont un contenu dont la structure filamentaire est encore assez mal définie. Au contraire, les mélanosomes de stade II se remplissent d'une structure interne filamenteuse. La mélanine commence à s'accumuler dans les mélanosomes de stade III. Dans les mélanosomes de stade IV, l'accumulation de pigments est telle que la structure interne n'y est plus
- 30 visible.

Comme le montre la **Figure 6**, le traitement à la Forskoline provoque une augmentation des mélanosomes de stade IV. En présence de H₈₉, on peut

observer des mélanosomes de stade plus précoce ainsi que la présence des vésicules dans les mélanosomes, provoquant une désorganisation de la structure des organelles.

5 B. Effet du H₈₉ sur le pH du mélanosome

Les domaines catalytiques de la Tyrosinase et des autres enzymes impliquées dans la mélanogénèse étant localisés à l'intérieur du mélanosome, il a été démontré que leur activité pourrait dépendre de l'environnement intramélanosomal. Récemment il a été proposé que le pH intramélanosomal
10 pouvait être un régulateur clé de la mélanogénèse. Les inventeurs ont donc étudié l'effet du H₈₉ sur le pH des mélanosomes en utilisant une sonde (DAMP) qui marque les vésicules acides. Ce composé comporte des groupements aminés (primaires et tertiaires) qui se protonnent et se chargent positivement à un pH acide. Les groupements primaires lui confèrent la possibilité d'être retenu dans
15 les organelles acides après fixation à des protéines par l'intermédiaire d'un lien aldéhydique. Le DAMP est ensuite visualisé par l'intermédiaire d'un Ac polyclonal anti-DNP couplé au FITC (vert) utilisé au 1/50^{ème}. Les mélanosomes sont marqués en rouge par les Ac dirigés contre TYRP1(A) ou Pmel-17 (B).

Les résultats (**Figure 7**) indiquent que le marquage DAMP des
20 vésicules diminue après traitement à la Forskoline et augmente sous H₈₉. De plus, la plupart des vésicules marquées au DAMP sont également positives pour les anticorps dirigés contre TYRP1 et Pmel17, indiquant que le DAMP marque principalement des mélanosomes. Ces résultats suggèrent que la synthèse accrue de mélanine sous l'effet de la Forskoline se fait à pH non acide dans le
25 mélanosome. L'acidification du pH sous l'action du traitement au H₈₉ suggère que celui-ci pourrait exercer son pouvoir dépigmentant en modifiant le pH intramélanosomal.

REVENDICATIONS

1. Utilisation de H89 pour préparer un médicament destiné à traiter les désordres
5 hyperpigmentaires.
2. Utilisation selon la revendication 1, caractérisée en ce que les désordres hyperpigmentaires sont choisis parmi le melasma, le chloasma, les lentigines, le lentigo sénile, les taches de rousseur, les hyperpigmentations post-
10 inflammatoires dues à une abrasion et/ou une brûlure et/ou une cicatrice et/ou une dermatose et/ou une allergie de contact; les nevi, les hyperpigmentations à déterminisme génétique, les hyperpigmentations d'origine métabolique ou médicamenteuse et les mélanomes.
- 15 3. Utilisation selon la revendication 1 ou 2, caractérisée en ce que la composition est administrée par voie topique.
4. Utilisation selon la revendication 1 ou 2, caractérisée en ce que la composition est administrée par voie orale.
20
5. Utilisation selon la revendication 3, caractérisée en ce qu'elle se présente sous la forme liquide, pâteuse, ou solide, et plus particulièrement sous forme d'onguents, de crèmes, de laits, de pommades, de poudres, de tampons imbibés, de syndets, de lingettes, de solutions, de collyres, de gels, d'émulsions huile dans
25 eau, d'émulsions eau dans huile, de sprays, de mousses, de suspensions, de lotions, de sticks, de shampoings, ou de bases lavantes, de suspensions de microsphères ou nanosphères ou de vésicules lipidiques ou polymériques ou de patchs polymériques et d'hydrogels permettant une libération contrôlée.
- 30 6. Utilisation selon la revendication 4, caractérisée en ce qu'elle se présente sous forme comprimés, de gélules, de dragées, de sirops, de suspensions, de solutions, de poudres, de granulés, d'émulsions, de microsphères ou de

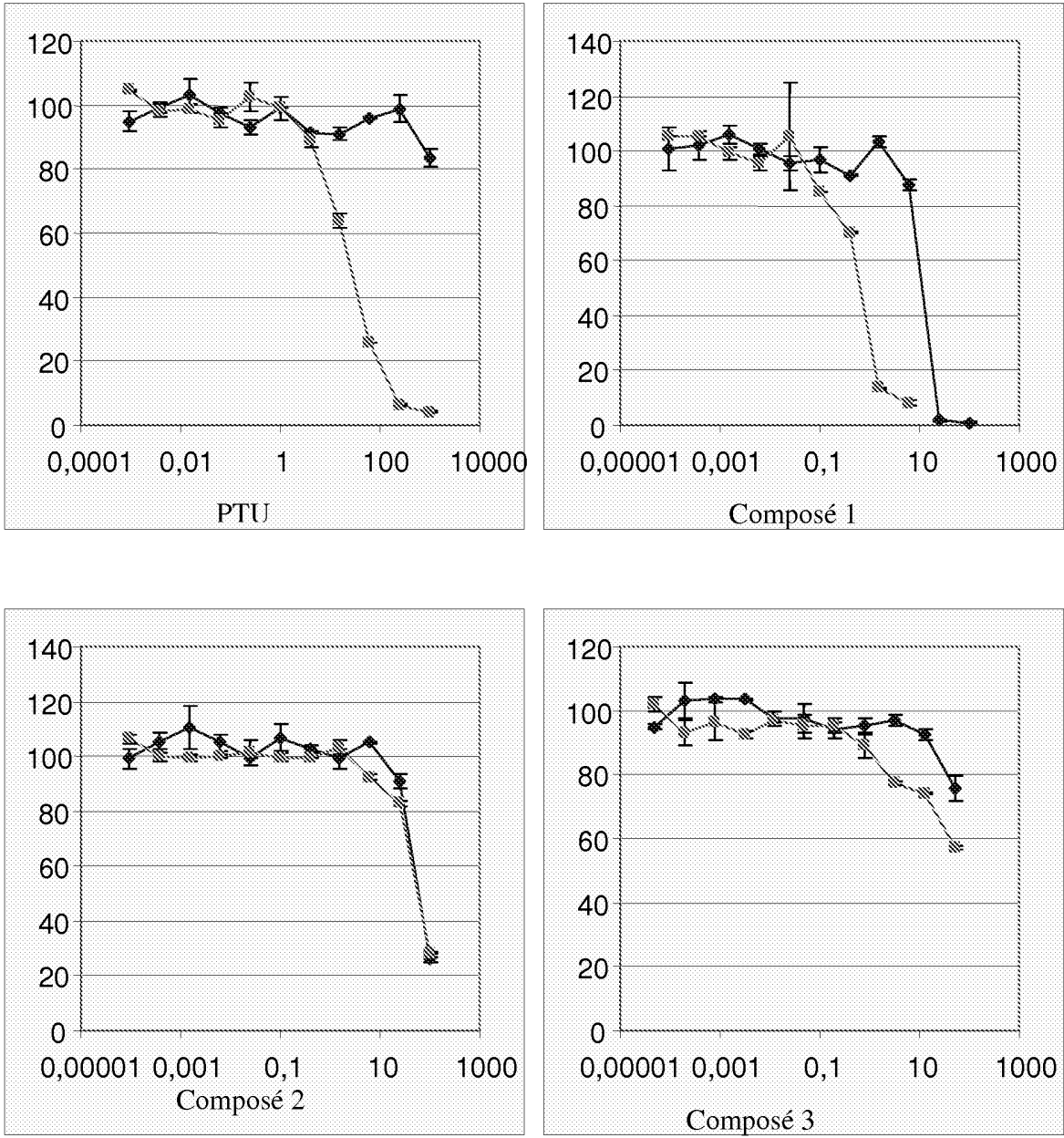
nanosphères ou de vésicules lipidiques ou polymériques permettant une libération contrôlée.

7. Utilisation selon la revendication 3, caractérisée en ce que la quantité de H₈₉
5 est comprise entre 0.0001% et 10 % en poids par rapport au poids total de la composition, de préférence entre 0.001% et 5 % du poids de ladite composition.

8. Utilisation d'une composition pharmaceutique selon l'une des revendications 1
à 7 pour la préparation d'un médicament destiné à éclaircir la peau.

10

Figure 1



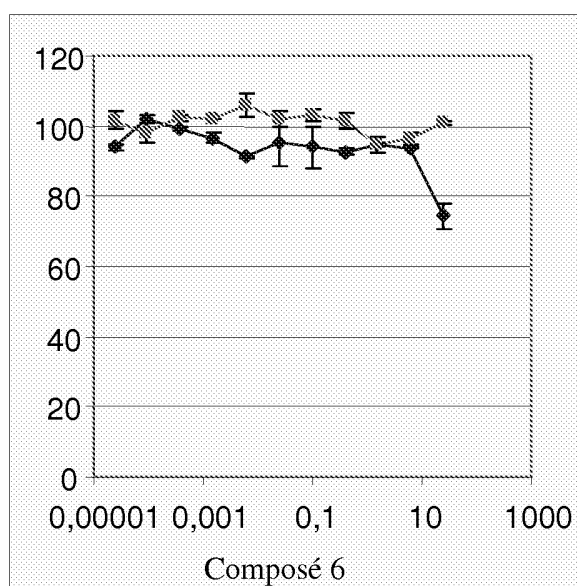
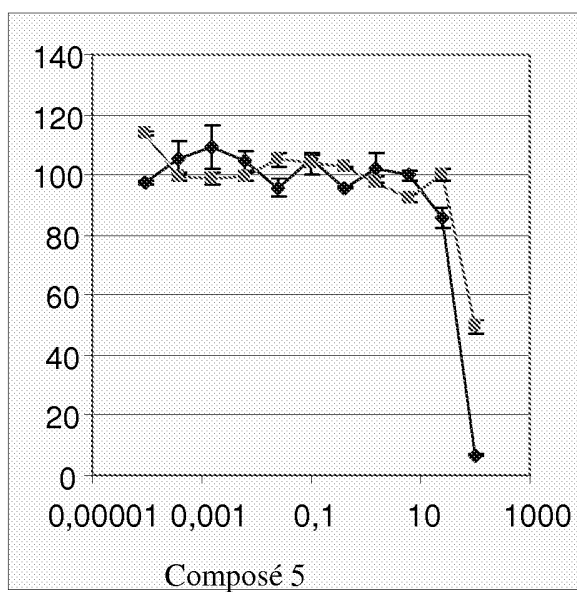
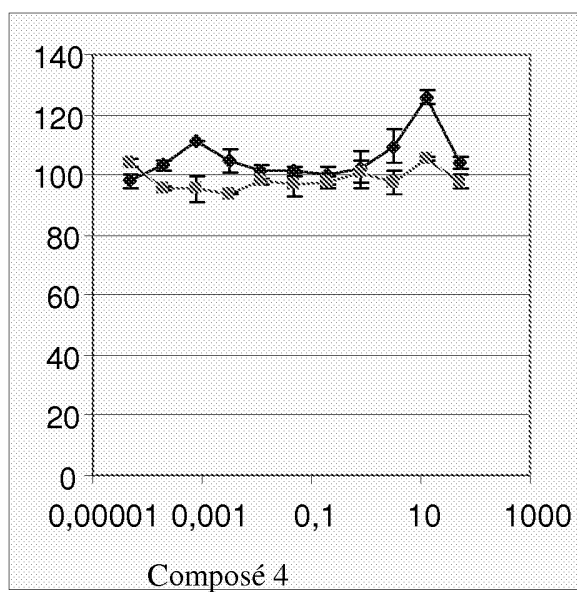


Figure 2

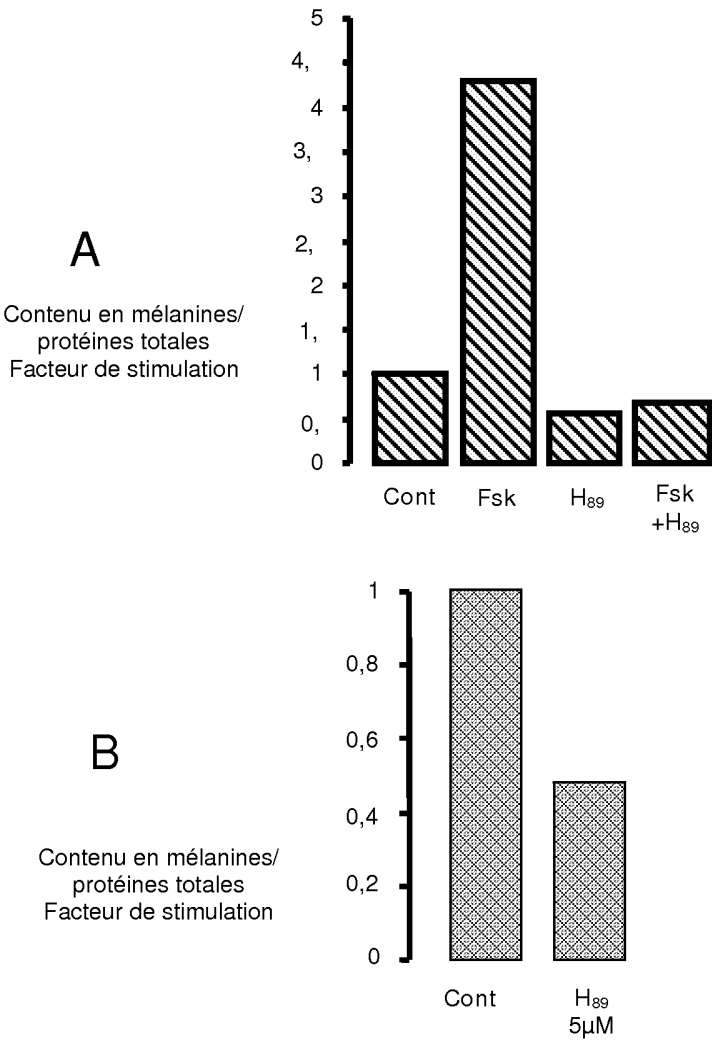
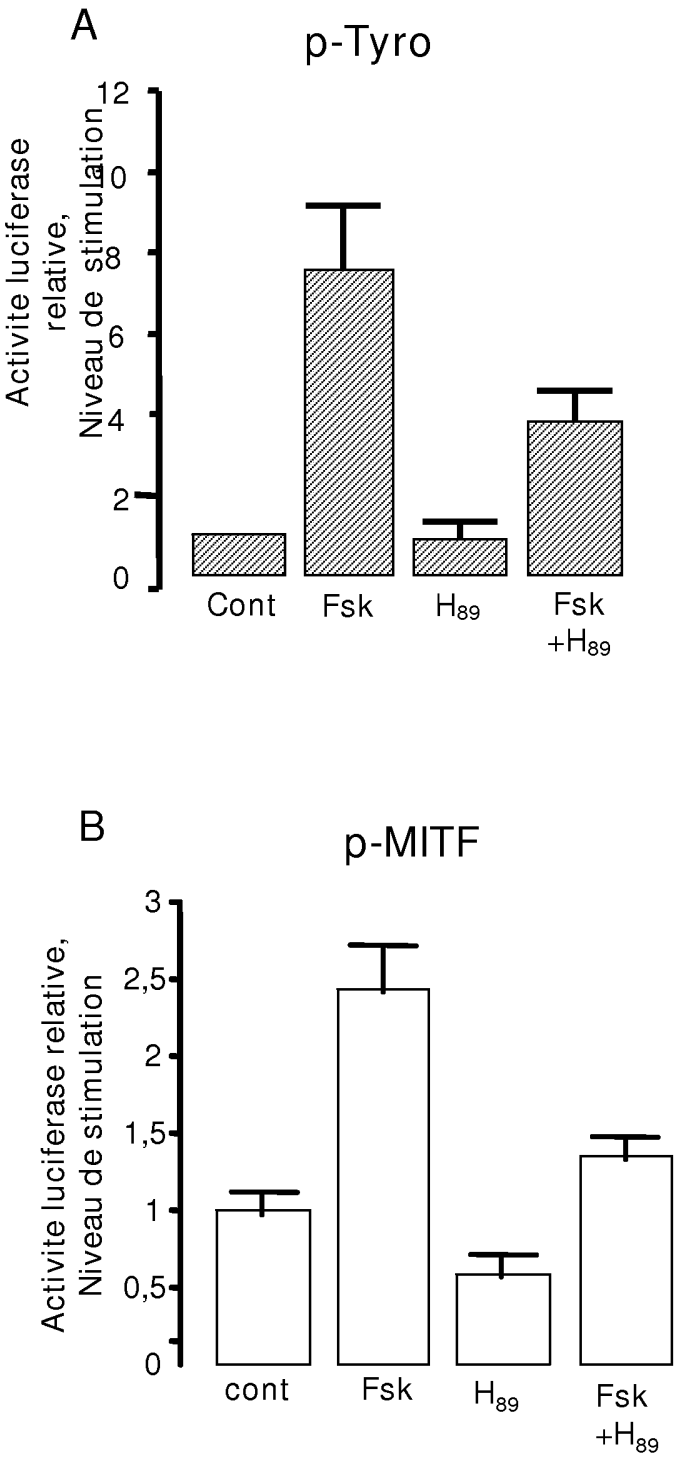
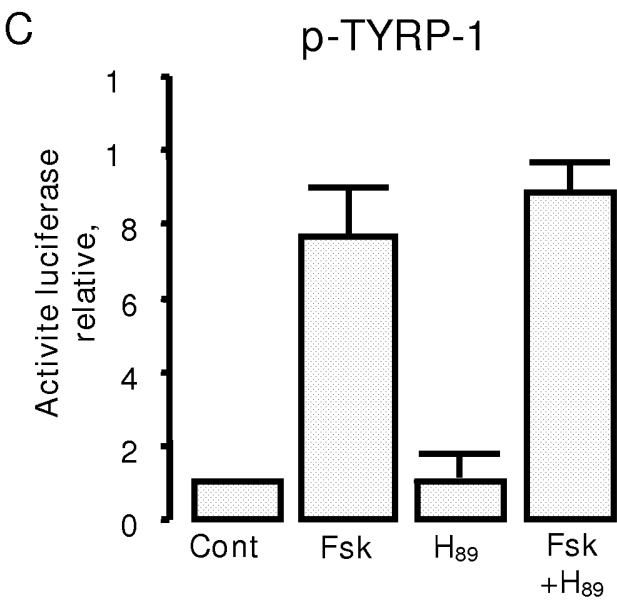


Figure 3





5 Figure 4

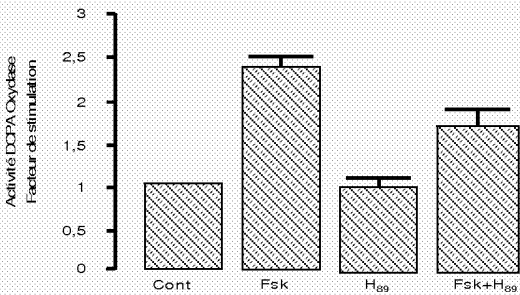
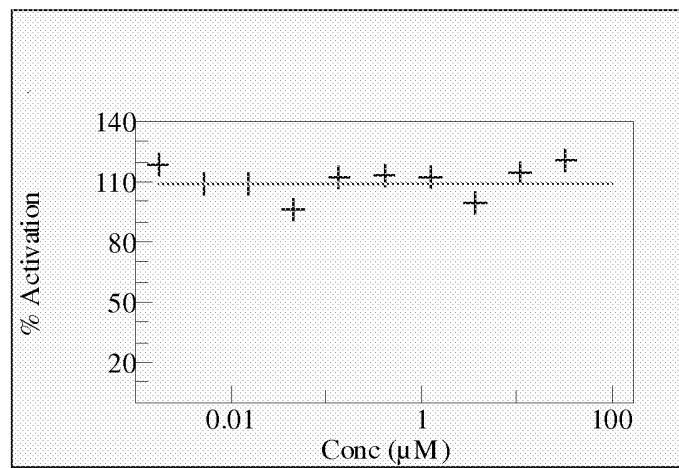


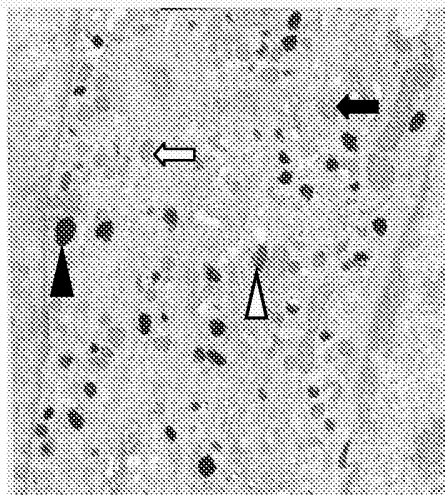
Figure 5

5

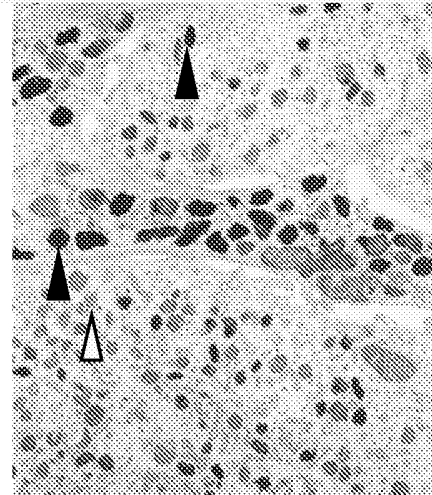


10

Figure 6



Contrôle



Forskoline

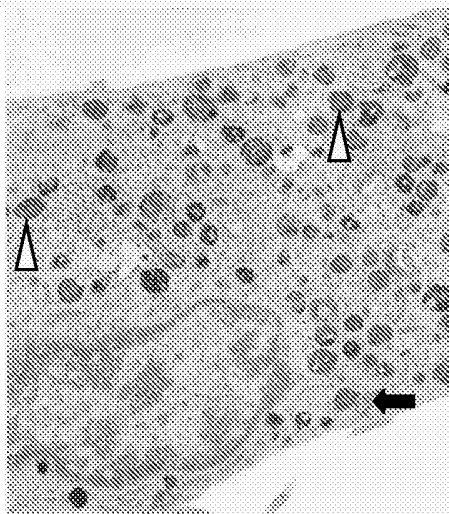
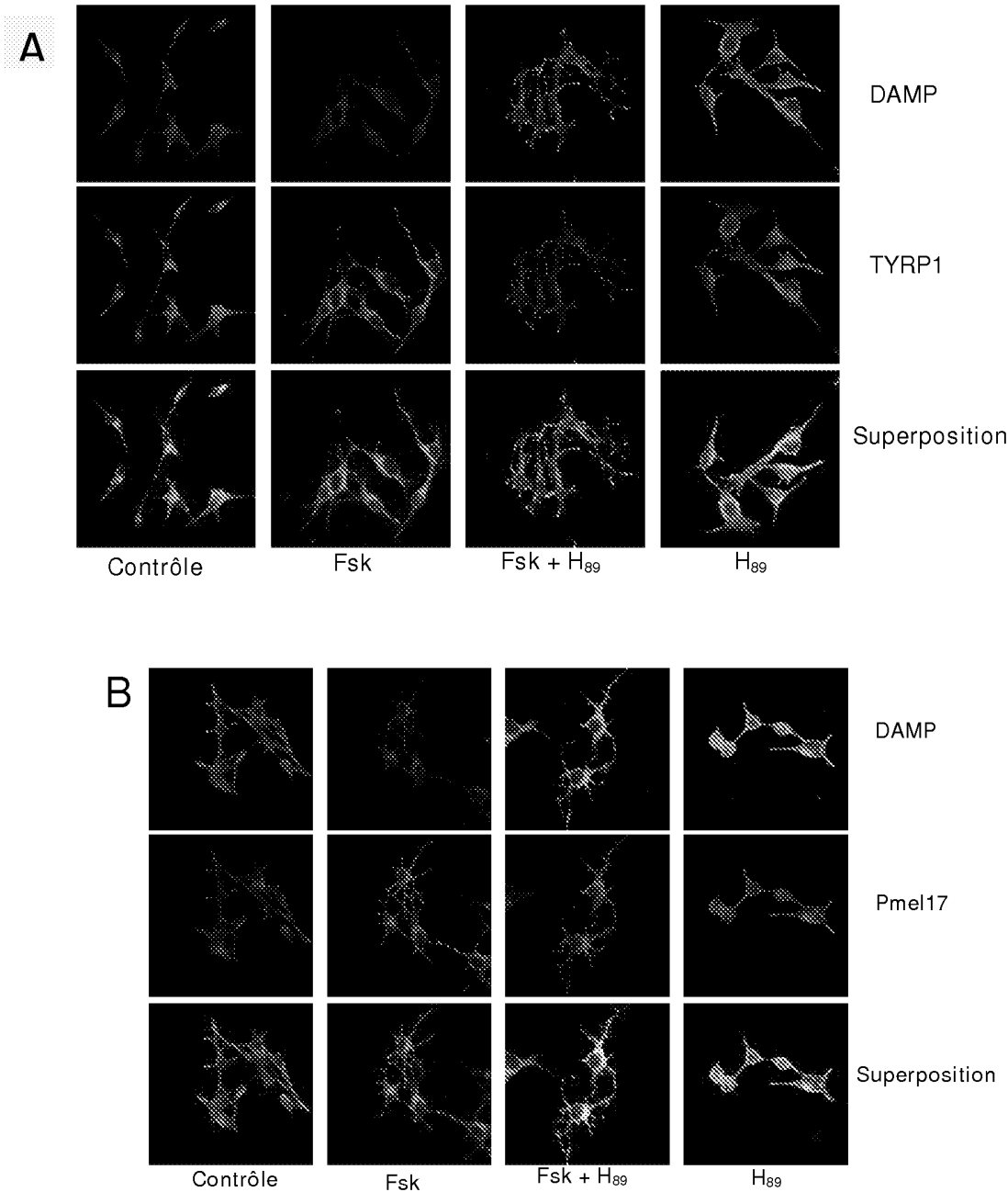
Forskoline + H₈₉H₈₉

Figure 7



INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No
PCT/EP2006/068772

A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER

INV. A61K8/49 A61Q19/02 A61K31/472 A61P17/00

According to International Patent Classification (IPC) or to both national classification and IPC

B. FIELDS SEARCHED

Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols)

A61K

Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched

Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practical, search terms used)

EPO-Internal

C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X	WO 03/061768 A (SEPPIC) 31 July 2003 (2003-07-31) claims 1,11-14 page 1, line 10 - line 21 page 7, line 4 - line 16	1,2,8
Y		3-7
Y	US 2004/220203 A1 (WANG) 4 November 2004 (2004-11-04) paragraphs [0067], [0071], [0198], [0203] - [0205], [0207], [0210], [0211]	3-7

☐ Further documents are listed in the continuation of Box C.

☒ See patent family annex.

* Special categories of cited documents :

- *A* document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance
- *E* earlier document but published on or after the international filing date
- *L* document which may throw doubts on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified)
- *O* document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means
- *P* document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed

- *T* later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention
- *X* document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step when the document is taken alone
- *Y* document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other such documents, such combination being obvious to a person skilled in the art.
- *&* document member of the same patent family

Date of the actual completion of the international search

10 January 2007

Date of mailing of the international search report

17/01/2007

Name and mailing address of the ISA/

European Patent Office, P.B. 5818 Patentlaan 2
NL - 2280 HV Rijswijk
Tel. (+31-70) 340-2040, Tx. 31 651 epo nl,
Fax: (+31-70) 340-3016

Authorized officer

ALVAREZ ALVAREZ, C

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

Information on patent family members

International application No

PCT/EP2006/068772

Patent document cited in search report		Publication date	Patent family member(s)	Publication date
WO 03061768	A	31-07-2003	EP 1471881 A2	03-11-2004
			FR 2835252 A1	01-08-2003
			JP 2005521658 T	21-07-2005
			US 2005118119 A1	02-06-2005
<hr/>				
US 2004220203	A1	04-11-2004	NONE	
<hr/>				

RAPPORT DE RECHERCHE INTERNATIONALE

Demande internationale n°

PCT/EP2006/068772

A. CLASSEMENT DE L'OBJET DE LA DEMANDE

INV. A61K8/49 A61Q19/02 A61K31/472 A61P17/00

Selon la classification internationale des brevets (CIB) ou à la fois selon la classification nationale et la CIB

B. DOMAINES SUR LESQUELS LA RECHERCHE A PORTE

Documentation minimale consultée (système de classification suivi des symboles de classement)

A61K

Documentation consultée autre que la documentation minimale dans la mesure où ces documents relèvent des domaines sur lesquels a porté la recherche

Base de données électronique consultée au cours de la recherche internationale (nom de la base de données, et si cela est réalisable, termes de recherche utilisés)

EPO-Internal

C. DOCUMENTS CONSIDERES COMME PERTINENTS

Catégorie*	Identification des documents cités, avec, le cas échéant, l'indication des passages pertinents	no. des revendications visées
X	WO 03/061768 A (SEPPIC) 31 juillet 2003 (2003-07-31) revendications 1,11-14 page 1, ligne 10 - ligne 21 page 7, ligne 4 - ligne 16	1,2,8
Y		3-7
Y	US 2004/220203 A1 (WANG) 4 novembre 2004 (2004-11-04) alinéas [0067], [0071], [0198], [0203] - [0205], [0207], [0210], [0211]	3-7

☐ Voir la suite du cadre C pour la fin de la liste des documents

☒ Les documents de familles de brevets sont indiqués en annexe

* Catégories spéciales de documents cités:

- *A* document définissant l'état général de la technique, non considéré comme particulièrement pertinent
- *E* document antérieur, mais publié à la date de dépôt international ou après cette date
- *L* document pouvant jeter un doute sur une revendication de priorité ou cité pour déterminer la date de publication d'une autre citation ou pour une raison spéciale (telle qu'indiquée)
- *O* document se référant à une divulgation orale, à un usage, à une exposition ou tous autres moyens
- *P* document publié avant la date de dépôt international, mais postérieurement à la date de priorité revendiquée

T document ultérieur publié après la date de dépôt international ou la date de priorité et n'appartenant pas à l'état de la technique pertinent, mais cité pour comprendre le principe ou la théorie constituant la base de l'invention

X document particulièrement pertinent; l'invention revendiquée ne peut être considérée comme nouvelle ou comme impliquant une activité inventive par rapport au document considéré isolément

Y document particulièrement pertinent; l'invention revendiquée ne peut être considérée comme impliquant une activité inventive lorsque le document est associé à un ou plusieurs autres documents de même nature, cette combinaison étant évidente pour une personne du métier

& document qui fait partie de la même famille de brevets

Date à laquelle la recherche internationale a été effectivement achevée

10 janvier 2007

Date d'expédition du présent rapport de recherche internationale

17/01/2007

Nom et adresse postale de l'administration chargée de la recherche internationale

Office Européen des Brevets, P.B. 5818 Patentlaan 2
NL - 2280 HV Rijswijk
Tel. (+31-70) 340-2040, Tx. 31 651 epo nl,
Fax: (+31-70) 340-3016

Fonctionnaire autorisé

ALVAREZ ALVAREZ, C

RAPPORT DE RECHERCHE INTERNATIONALE

Renseignements relatifs aux membres de familles de brevets

Demande internationale n°

PCT/EP2006/068772

Document brevet cité au rapport de recherche	Date de publication	Membre(s) de la famille de brevet(s)	Date de publication
WO 03061768	A	31-07-2003	EP 1471881 A2 03-11-2004
		FR 2835252 A1 01-08-2003	
		JP 2005521658 T 21-07-2005	
		US 2005118119 A1 02-06-2005	
US 2004220203	A1	04-11-2004	AUCUN