

19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 424 323**

51 Int. Cl.:

A61K 31/201 (2006.01)
A61K 31/202 (2006.01)
A61K 31/7048 (2006.01)
A61K 8/36 (2006.01)
A61K 8/60 (2006.01)
A61P 17/08 (2006.01)
A61P 17/14 (2006.01)
A61Q 7/00 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **18.03.2008 E 08719394 (2)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **15.05.2013 EP 2124922**

54 Título: **Composición que comprende rutin y ácido graso poliinsaturado con una actividad inhibidora sobre 5-alfa-reductasa**

30 Prioridad:

21.03.2007 IT MI20070555

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

01.10.2013

73 Titular/es:

**GIULIANI S.P.A. (100.0%)
VIA P. PALAGI 2
20129 MILANO, IT**

72 Inventor/es:

**GIULIANI, GIAMMARIA;
BENEDUSI, ANNA y
BARONI, SERGIO**

74 Agente/Representante:

CURELL AGUILÁ, Mireia

ES 2 424 323 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

Composición que comprende rutin y ácido graso poliinsaturado con una actividad inhibidora sobre 5-alfa-reductasa.

5 La presente invención se refiere a una composición con actividad inhibidora sobre 5- α -reductasa.

En particular, la invención se refiere a una composición adecuada para su utilización en la normalización del sebo y en el trofismo de los bulbos capilares, para combatir el adelgazamiento del cabello y la pérdida de cabello y en la alopecia.

10 La presente invención procede del campo de los productos farmacéuticos, dietéticos o cosméticos adecuados para estimular el crecimiento del cabello y regular la producción cutánea de sebo.

15 La presente invención procede del campo del campo de las preparaciones adecuadas para combatir la pérdida de cabello y estimular el crecimiento del cabello y restablecer las condiciones fisiológicas en los bulbos capilares y glándulas sebáceas.

20 Es sabido que la alopecia androgénica es el tipo de calvicie que afecta a la mayoría de las personas que padecen la pérdida de cabello. Ésta consiste en una miniaturización progresiva y un afloramiento de los folículos capilares. Existe una predisposición genética hacia la alopecia androgénica. Lo más probable es que se transmitan las enzimas implicadas en la conversión y recogida de hormonas androgénicas, es decir, las dos formas isoenzimáticas de 5-alfa-reductasa (tipo 1 y tipo 2), P 450 aromatasas y el receptor citosólico de andrógenos. Esta enzima que se expresa principalmente en las células foliculares, actúa transformando la testosterona, la principal hormona masculina, en su derivado activo dihidrotestosterona o DHT, uno de los factores responsables de la alopecia androgénica, del efлюvio telógeno y de la seborrea.

25 DHT es perjudicial para los folículos capilares genéticamente predispuestos del cuero cabelludo. Esta hormona está implicada en la transformación de la pelambre en cabello terminal en adolescentes y en seborrea. La enzima 5-alfa-reductasa es abundante en el cuero cabelludo para favorecer la acumulación de DHT.

30 Además, es específicamente en las estructuras foliculares del cuero cabelludo donde se producen grandes cantidades de 5-alfa-reductasa y por consiguiente grandes cantidades de DHT, que, al interferir con el trofismo de los folículos produce el adelgazamiento del cabello.

35 Se han estudiado por lo tanto sustancias activas que, al bloquear o reducir la actividad de 5-alfa-reductasa, producen una disminución en las concentraciones de DHT y por consiguiente una reducción en los efectos perjudiciales sobre el cabello.

40 Es también sabido que el tipo 1 de 5-alfa-reductasa está principalmente localizado en las glándulas sebáceas, en el hígado, secundariamente en los queratinocitos de la piel y en el folículo, en las papilas dérmicas, en las glándulas sudoríparas. El tipo 2 de la 5-alfa-reductasa está situado en el epidídimo, en las vesículas seminales, la próstata y la piel genital del feto, en la vaina epitelial de los folículos capilares, en los fibroblastos de la piel genital.

45 Entre las sustancias más ampliamente utilizadas para combatir la pérdida del cabello están los inhibidores de 5-alfa-reductasa, entre los que la finasterida, que ha demostrado ser eficaz en el tratamiento de la alopecia y la excesiva producción de sebo.

50 La utilización de esta molécula, sin embargo, está acompañada de efectos secundarios entre los que están la reducción de la libido, la impotencia, agresión cutánea, reducción en el volumen de esperma así como una contraindicación general en caso de embarazo.

Para superar estos inconvenientes, se ha recurrido a la utilización de sustancias alternativas de origen natural con pocos efectos secundarios.

55 Los estudios sobre una planta originaria de Japón, *Boehmeria nivea* var. nipononivea perteneciente a la familia de las Urticáceas ha demostrado que los extractos tienen una acción significativa para estimular el crecimiento del cabello.

60 Los estudios clínicos efectuados por el mismo solicitante han comprobado que el extracto acuoso de *Boehmeria* produce efectos terapéuticos sumamente significativos. El extracto vegetal de *Boehmeria* se ha aplicado por consiguiente como agente regulador del trofismo capilar en formulaciones para uso oral o tópico.

65 Las urticáceas son responsables de reacciones alérgicas, también graves, y por consiguiente están contraindicadas particularmente en personas expuestas al riesgo de asma atópica. Ya que es probable que el fitocomplejo extractado de la planta en si mismo contenga sustancias responsables de estas reacciones alérgicas, es por consiguiente también necesario contraindicar el uso de productos que contienen el extracto de *Brohemeria* en

personas expuestas al riesgo de alergias, en particular personas asmáticas.

Esto representa una causa grave de preocupación que además desanima a todos los potenciales usuarios de adoptar el producto.

- 5 Por consiguiente se siente necesidad en el estado actual de aprovecharse de los preparados de origen vegetal alternativos a *Boehmeria nipononivea* cuya utilización sin embargo minimiza los riesgos de reacciones alérgicas.

10 Uno de los objetivos de la presente invención por consiguiente consiste en proporcionar una composición a base de principios activos de origen natural que, aunque presentan actividad en el bulbo capilar y regulación del sebo, minimiza o elimina los riesgos de desarrollar las reacciones alérgicas típicas de las urticáceas.

15 A la vista de estos objetivos según el primer aspecto de la presente invención, se proporciona una composición según la reivindicación 1. Según otras formas de realización de la presente invención, se proporcionan las combinaciones según las reivindicaciones 5 y 6.

20 El solicitante procedió a examinar los constituyentes conocidos de *Boehmeria nipononivea* y a verificar los efectos fisiológicos ejercidos a escala experimental. A partir de este estudio, se descubrió que ninguno de los constituyentes conocidos solo permite que se obtengan resultados que sean comparables al extracto completo. Durante esta investigación, sin embargo, el solicitante consiguió efectuar la invención en cuestión lo que sorprendentemente permite obtener efectos que son comparables o superiores a los que pueden obtenerse con el extracto completo, utilizando una combinación apropiada de solo dos de sus constituyentes. Existen sustancias puras de origen natural y están disponibles en el mercado: rutin y ácidos grasos poliinsaturados.

25 Rutin es un principio activo que pertenece a la familia de los flavonoides, grupo de sustancias polifuncionales con actividad de interés funcional en el campo nutritivo y terapéutico. Desde un punto de vista de químico, los flavonoides son difenilpropanoides divididos en varios grupos en función del grado de oxidación del anillo heterocíclico. La naturaleza de los grupos funcionales determina la actividad de los flavonoides como agentes antioxidantes y antiinflamatorios.

30 El solicitante ha descubierto que al asociar rutin con ácidos poliinsaturados omega 6, en una composición, no solamente se obtiene un gran actividad sino que el riesgo de desarrollar reacciones alérgicas asociadas a la utilización de extractos de *Boehmeria nipononivea* se reduce o elimina considerablemente.

35 Además de una acción sobre 5-alfa-reductasa, los ácidos poliinsaturados utilizados dentro del alcance de la invención ejercen otras funciones importantes tanto de tipo estructural, ya que son componentes fundamentales de las membranas celulares de todos los tejidos, como también metabólico, ya que toman parte en una serie de reacciones de oxidación y ciclación para la formación de prostaglandinas y leucotrienos que participan en la regulación de numerosas funciones del organismo.

40 Según una forma de realización de la invención, los ácidos poliinsaturados omega-6 (PUFA) que pueden utilizarse dentro del alcance de la invención se seleccionan de entre el grupo que comprende:

Denominación corriente		Denominación química
Ácido linoleico	18:2 (n-6)	Ácido 9,12-octadecadienoico
Ácido gamma-linolénico	18:3 (n-6)	Ácido 6,9,12-octadecatrienoico
Ácido eicosadienoico	20:2 (n-6)	Ácido 11,14-eicosadienoico
Ácido dihomogammalinolénico	20:3 (n-6)	Ácido 8,11,14-eicosatrienoico
Ácido araquidónico	20:4 (n-6)	Ácido 5,8,11,14-eicosatetraenoico
Ácido docosadienoico	22:2 (n-6)	Ácido 13,16-docosadienoico
Ácido adrénico	22:4 (n-6)	Ácido 7,10,13,16-docosatetraenoico
Ácido docosapentanoico	22:5 (n-6)	Ácido 4,7,10,13,16-docosapentaenoico

45 Entre estos ácidos poliinsaturados omega-6, los ácidos gamma-linolénicos, identificados con la abreviatura AGL, y el ácido linoleico han demostrado ser los más eficaces en la regulación de la actividad de la enzima 5-alfa-reductasa.

Una composición preferida de la invención por lo tanto comprende la asociación de ácido gamma-linolénico, ácido linoleico y rutin en un excipiente farmacéuticamente o fisiológicamente aceptable.

50 AGL es un ácido graso esencial (AGE) de la familia omega-6. Los AGE son esenciales para la salud y no se producen en el cuerpo pero deben administrarse con los alimentos. Los AGE son necesarios para las funciones cerebrales normales, el crecimiento, el desarrollo, la nutrición ósea, la regulación del metabolismo y el mantenimiento de los procesos reproductivos. AGL ejerce también un acción antiinflamatoria además de actuar sobre el crecimiento de los queratinocitos, normalizando las características lipídicas.

55 El ácido linoleico es otro ácido graso de la familia omega-6 que se convierte en AGL en el organismo.

El solicitante ha descubierto además una fuente natural muy rica en ácidos grasos poliinsaturados y en particular ácido linoleico y ácido linolénico en aceite de borraja (*Borago officinalis L.*).

5 En particular, el aceite de borraja tiene la composición siguiente:

Denominación corriente	Isómeros	Especificaciones	Procedimiento
Ácido oleico	C18:1	> = 150 mg/g	GLC
Ácido linoleico	C18:2	> = 360 mg/g	GLC
Ácido gamma-linolénico (GLA)	C18:3	> = 225,4 mg/g	GLC
Ácidos grasos saturados		> = 120 mg/g	AOAC
Ácidos grasos insaturados		> = 220 mg/g	AOAC
Ácidos grasos poliinsaturados		> = 566 mg/g	AOAC

Según una forma de realización de la invención, el aceite de borraja se aplica como ingrediente rico en AGL y ácido linoleico, en la composición de la invención.

10 La composición de la invención se aplica en el campo farmacéutico o dietético para la regulación de la producción de sebo en la piel y/o el trofismo de los folículos capilares. En particular la composición de uso en atrofia bulbar, efluvio telógeno y alopecia androgénica.

15 Con respecto a la utilización del extracto de *Boehmeria nipononivea*, la utilización de la composición de la invención también proporciona una serie de ventajas sumamente significativas entre las que se encuentran:

- la utilización de principios activos de origen natural que son puros, bien controlados y con una calidad constante; el extracto por el contrario presenta una variabilidad típica de productos de este tipo;
- la ausencia de problemas asociados al suministro estacional de plantas cuyo extracto se produce y la falta de disponibilidad periódica consiguiente de materias primas; el extracto de *Boehmeria* se prepara de hecho solo una vez al año, cuando la planta se recoge, y debe adquirirse en cantidades enormes con los consiguientes problemas de almacenamiento y conservación;
- bajos costes de los principios activos naturales;
- ningún problema de polución microbiológica observada frecuentemente en el extracto de *Boehmeria* que, como todos los extractos de fármacos, está caracterizado normalmente por cargas microbianas mucho mayores que las de las sustancias puras;
- como ya se ha mencionado, una reducción considerable en la verificación de las respuestas alérgicas atribuida a algunos de los componentes presentes en los extractos vegetales de las urticáceas (*Boehmeria nipononivea*).

35 La utilización de la composición de la invención también da lugar a una reducción de la secreción de sebo con efectos beneficiosos sobre el acné y la seborrea y una regulación del crecimiento fisiológico del cabello, con un efecto favorable sobre la alopecia androgénica y el efluvio telógeno.

40 Las composiciones de la invención para uso general o tópico pueden producirse en forma de comprimidos, píldoras, cápsulas, solución, suspensión, jarabe, loción, espuma, crema y en formas adecuadas para la liberación controlada de los principios activos.

45 Los preparados para la administración de la invención se efectúan según técnicas de preparación habituales de productos dietéticos y/o farmacéuticos, añadiendo uno o más excipientes fisiológicamente aceptables a los principios activos sinérgicos.

Se utilizan por lo tanto, excipientes fisiológicamente aceptables, mezclados con conservantes, estabilizantes, excipientes, vehículos y agentes aromatizantes.

50 Una composición típica para uso oral, por ejemplo, está en forma de comprimido con un núcleo que contiene los principios activos descritos anteriormente, dentro de una película de recubrimiento. El recubrimiento comprende por lo general una o más sustancias seleccionadas de entre metilhidroxipropil celulosa, celulosa microcristalina, ácido esteárico y pigmentos adecuados tales como dióxido de titanio, óxido de hierro y similares.

55 En la composición de la invención, los principios activos de la invención están presente por lo general en cantidades variables, oscilando por lo general entre 0,1% en peso al 15% en peso, más preferentemente entre 1 y 10% en peso.

Según otra forma de realización, se proporciona un procedimiento para regular la producción de sebo en la piel y el trofismo de los folículos capilares que comprende la administración o aplicación de una preparación del tipo descrito anteriormente a una persona que necesita el tratamiento.

- 5 Según otro aspecto de la invención, se proporciona la utilización de un ácido graso poliinsaturado omega-6 y rutin para la producción de una composición destinada a regular la actividad de 5-alfa-reductasa, particularmente adecuada para regular la producción de sebo de la piel y/o el trofismo de los folículos capilares.

10 Los ejemplos siguientes se proporcionan a título puramente ilustrativo de la presente invención y de ninguna manera debe considerarse que limitan el alcance de la protección según las reivindicaciones adjuntas.

Ejemplo 1

15 Comprimido recubierto para uso oral como integrador alimenticio indicado como útil para el trofismo de los bulbos capilares y durante la menopausia.

	Fosfato cálcico dibásico dihidratado	186 mg
20	Celulosa microcristalina	170 mg
	Aceite de borraja (ácido graso poliinsat. omega-6	60 mg
	Extracto émblico anhidro	100 mg
25	Isoflavonas de soja	100 mg
	Hidroxipropilmetilcelulosa	70 mg
30	Quelato de aminoácido con cinc	37,5 mg
	Quelato de aminoácido con cobre al 10%	12 mg
	Mono- y di-glicéridos de ácidos grasos	11 mg
35	Rutin	10 mg
	d-pantotenato de calcio	9,9 mg
40	Dióxido de silicio (sílice colidal)	7,5 mg
	Triclorhidrato de espermidina	0,55 mg
	Ácido fólico	0,33 mg
45	Biotina	0,165 mg
	Resveratrol	0,05 mg
50	Sepifilm LP030	25 mg
	Sepifilm TM lípido 770 blanco	24,575 mg
	Óxido de hierro amarillo (E 172)	0,25 mg
55	Óxido de hierro rojo (E 172)	0,175 mg

Ejemplo 2

60 Comprimido para uso oral.

60	1-metionina	300 mg
	Aceite de borraja (ácido graso poliinsat. omega-6)	40-100 mg
65	Rutin	3-12 mg

	Ácido ascórbico	90 mg
	Acetato de vitamina E (d1-alfa tocoferol)	15 mg
5	Vitamina B6 (Piridoxina)	2,7 mg
	Triclorohidrato de espermidina	0,5 mg
	d-pantotenato cálcico	9 mg
10	d-biotina	0,15 mg
	Quelato de aminoácido con cinc	37,5 mg
	Quelato de aminoácido con cobre	12,5 mg
15	Ácido fólico	0,33 mg
	Celulosa microcristalina	50-150 mg
20	Hidroxipropilmetilcelulosa	40-60 mg
	Dextrina	5-15 mg
	Dióxido de silicio	5-7 mg
25	Fosfato dicálcico dibásico dihidratado	50-120 mg
	Estearato de magnesio	5-8 mg

30 **Ejemplo 3**

Comprimido de uso oral con actividad reguladora del sebo para combatir la caspa.

35	<i>Lactobacillus rhamnosus</i>	1 x 10 ⁹ ufc/cpr
	Aceite de borraja (ácido graso poliinsat. omega-6)	40-100 mg
	Rutin	3-12 mg
40	Metionina	200 mg
	Vit. B5 (Pantotenato cálcico)	9 mg
	Vit. B6 (Piridoxina)	2 mg
45	Biotina	0,23 mg
	Beta-caroteno	7,2 mg
50	Vit. B2 (Riboflavina)	1,6 mg
	Extracto de ajuga anhidro	2,5 mg
	Quelato de aminoácido con cinc	37,5 mg
55	Vitamina C	60 mg
	Vitamina E (acetato de d1-alfa tocoferol)	15 mg
60	Levadura con selenio	0,2 mg
	Quelato de aminoácido con cobre	12,5 mg
	Celulosa microcristalina	50-150 mg
65	Hidroxipropilmetilcelulosa	40-60 mg

	Fosfato dicálcico dibásico dihidratado	50-120 mg
5	Estearato de magnesio	5-10 mg
	Dióxido de silicio	5-10 mg

Ejemplo 4

10 Comprimido de uso oral para la prevención de la alopecia androgénica en adultos jóvenes.

	Triclorohidrato de espermidina	0,5 mg
15	d-pantotenato cálcico	9 mg
	d-biotina0,15 mg
	Quercitina	0,9 mg
20	Aceite de borraja (ácido graso poliinsat. omega-6)	40-100 mg
	Rutin	3-12 mg
	Clorhidrato de L-arginina	242 mg
25	Extracto de <i>Ajuga reptans</i> anhidro	5 mg
	Cinc (como quelato de aminoácido)	7,5 mg
30	Cobre (como quelato de aminoácido)	1,2 mg
	Dextrina de tapioca	40-100 mg
35	Celulosa microcristalina	130-200 mg

Ejemplo 5

Cápsulas para uso oral con una acción estimulante sobre los bulbos capilares y normalizadora del sebo.

40	Ácidos gamma-linoléico y linoleico	20-50 mg
	Dextrina de tapioca	40-100 mg
45	Rutin	3-12 mg
	Celulosa microcristalina	50-150 mg
	Fosfato dicálcico dibásico dihidratado	50-150 mg
50	Estearato de magnesio	3-8 mg
	Dióxido de silicio	3-6 mg
55	Gelatina natural (recubrimiento externo)	cantidad suficiente

Ejemplo 6

Loción para uso tópico con una acción trófica sobre los bulbos capilares y normalizadora del suero.

60	Ácido cítrico	0,04-0,052 mg
	EDTA disódico	0,03-0,06 mg
65	Alcohol	15-20 mg
	Aceite de ricino hidrogenado con PEG-40	0,5-3 mg

	Tween 20	0,5-1,0 mg
5	Perfume	0,10 mg
	Ácido grasos poliinsaturados omega-6	0,5-1,8 mg
	Rutin	0,2-0,5 mg
10	Agua	complemento a 100 ml

Ejemplo 7

Champú anticaspa

15	EDTA disódico	0,1-0,3 mg
	Polyquaternium-10	0,1-0,3 mg
20	Polyquaternium-55	0,1-0,5 mg
	Ácido cítrico	0,6-0,8 mg
25	Arginina	0,05-0,1 mg
	Proteína de trigo hidrolizada con undecilonoil potásico	3,6 mg
	Lauroil sarcosinato sódico	1,5 mg
30	Cocamida mipa	1-3 mg
	Piroctona olamina	0,1-0,5 mg
35	Éter laurílico sulfosuccinato disódico	1-5 mg
	Capriloil glutamato disódico	0,4-1 mg
	Coceth sulfato de cinc	1-8 mg
40	Gliceril palmato hidrogenado con Peg-200	0,5-3 mg
	Gliceril cocoato con Pet-7	0,5-2 mg
45	Laureth-2	0,05-2 mg
	Aceite de ricino hidrogenado con Peg-40	0,2-1 mg
	Fenil trimeticona	0,05-3 mg
50	Silicona quaternium-15	0,005-1 mg
	Laureth-4	0,01-0,5 mg
55	Aceite de borraja (ácido graso poliinsat. Omega-6)	0,5-1,8 mg
	Rutin	0,2-0,5 mg
	Perfume	cantidad suficiente
60	Agua	complemento a 100 ml

Se efectuó un estudio sobre la composición del ejemplo 1 para evaluar la capacidad de los principios activos contenidos en la misma de modular la actividad de la enzima 5-alfa-reductasa *in vitro*, después del tratamiento de hasta 72 horas con el material ensayado en una estirpe celular de fibroblastos murinos. Esta enzima está presente en la piel, en los melanocitos, fibroblastos, queratinocitos, convierte la testosterona en dihidrotestosterona (DHT) y ejerce una función clave en muchos trastornos de la piel tales como el acné común, hirsutismo, seborrea y alopecia.

En la prueba en cuestión, los fibroblastos se trataron con testosterona para aumentar la producción basal de 5-alfa-reductasa, y a continuación con el material en estudio a diferentes concentraciones durante un periodo de hasta 48 horas.

5 El contenido de DHT producida por las células tratadas se en diferentes criterios de valoración (en este caso específico a las 24 y 48 horas) por el método ELISA y, por comparación con las células sin tratar, puede estimarse el porcentaje de inhibición de la actividad enzimática específica.

10 Un extracto valorado de *Serenoa Repens* (palmito enano), planta muy conocida en farmacopea por su capacidad de inhibir la 5-alfa-reductasa y utilizarse con esta finalidad en el tratamiento de la hiperplasia prostática en el hombre, se utilizó como referencia positiva.

15 Como material comparativo se utilizaron los siguientes productos:

Extracto anhidro de *Boehmeria nipoonivea*
Aceite de borraja en polvo (omega-6)
Rutin

20 Procedimiento experimental

Procedimiento de ensayo:

Modelo experimental

25 El modelo celular utilizado para el ensayo *in vitro* está representado por:

fibroblastos murinos (células 3T3). La estirpe celular procede de fibroblastos de la cepa Swiss de ratones albinos estabilizada por embriones.

Preparación de la muestra de ensayo

Las muestras se disolvieron en una solución de etanol absoluto y agua (1:1) y a continuación se diluyeron en el medio a las concentraciones siguientes:

- 35 - Extracto anhidro de *Boehmeria nipoonivea* 10 µg/ml
- Aceite de borraja en polvo (omega-6) 6 µg/ml
40 - Rutin 0,5 µg/ml
- Mezcla de aceite de borraja en polvo (omega-6) y Rutin de la invención: 6,5 µg/ml

Referencia positiva

45 Se utilizó *Serenoa repens* a una concentración final de 10 µg/ml como referencia positiva, en presencia de 1 µg/l de testosterona.

Procedimiento de ensayo

Fase de preincubación

Las células se plantan en matraces de 25 cm² (T25) en un medio de cultivo DMEM (medio esencial mínimo de Dulbecco) con adición de 10% de SBF (suero bovino fetal). Una vez se ha alcanzado la confluencia, los cultivos se tratan durante 24 horas con 10 ng/ml de testosterona.

Fase de tratamiento

60 Después de la fase de preincubación, los cultivos celulares se tratan con los materiales de partida indicados a la concentración final prevista. Como referencia positiva se utiliza el extracto de *Serenoa repens* a 0,1 mg/ml, mientras que la referencia negativa consiste en placas tratadas con el disolvente. La exposición se prolonga durante 24 a 48 horas en una incubadora a 37°C, 5% de CO₂, renovando el medio cada 24 horas. Cada muestra se prueba por duplicado. Al final del experimento, se efectúa un recuento celular para evaluar posibles efectos citotóxicos. La determinación de la cantidad de DHT y testosterona presentes se efectúa por ensayos de inmunodiagnóstico (ELISA) en los compartimentos extracelular (medios de cultivo acondicionados) e intracelular (extractos celulares).

Preparación de los extractos celulares

Al final del experimento, se recoge el medio de cultivo de cada matraz y se prepara un extracto celular. Éste se prepara en cuatro fases:

- 5 - tripsinización de la capa celular *in situ* en el matraz
- centrifugación y recogida de las células en gránulos
- 10 - extracción con Triton X-100 (1% en medio basal)
- baño de ultrasonidos durante 30 minutos

Determinación de DHT

15 Se extrajeron 50 µl de medio de cultivo de cada cavidad, para utilizar en la determinación de DHT mediante el ensayo ELISA, llevado a cabo a temperatura ambiente a cada criterio de valoración (24-48 horas). El procedimiento comprende el tratamiento de una curva patrón, calculada en un intervalo de concentraciones apropiadas. El ensayo ELISA utiliza un anticuerpo específico dirigido contra DHT humana inmovilizada en un sustrato sólido y un reactivo (DHT conjugada con peroxidasa de rábanp picante) que compite por la unión con el anticuerpo. La reacción se revela por medio de una solución del sustrato y desarrolla un compuesto coloreado, inversamente proporcional a la concentración de DHT. La absorbancia a 450 nm se lee para cada muestra.

25 Las muestras se leen a una longitud de onda de 450 nm.

Cálculo de los resultados

Determinación de la dihidrotestosterona (DHT) final

30 Como se especificó anteriormente, la concentración real de DHT se calcula según la fórmula:

$$[\text{DHT medida}] - [\text{suero bovino con DHT}] - [\text{reticulación de testosterona}]$$

35 en la que la cantidad de DHT presente en el medio (procedente del suero bovino) es igual a 0,1 ng/ml.

La reticulación de testosterona se calcula según la fórmula: [concentración de testosterona] x 8,7/100.

En este punto, es posible calcular el porcentaje de inhibición de 5-alfa-reductasa. El resultado se expresa como la media experimental medida. El error experimental total se estima que no es superior al 10%.

40 El % de actividad de 5-alfa-reductasa se calcula con respecto a la referencia sin tratar con la sustancia que se está examinando:

$$45 \quad \% \text{ de reducción} = \frac{[\text{absorbancia media de referencia} - \text{absorbancia media del producto tratado}]}{\text{absorbancia media de referencia}} \times 100$$

Resultados

	24 horas		48 horas	
	DHT, pg/ml	Inhibición, %	DHT, pg/ml	Inhibición, %
Referencia negativa	99,0		35,1	
Referencia positiva: <i>Serenoa repens</i> 10 µg/ml	98,2	0,8	27,8	20,8
Extracto seco de <i>Boehmeria</i> , 10 µg/ml	95,0	4,0	26,6	24,2
Mezcla de omega-6 y Rutin, 6 µg/ml	95,2	3,8	23,6	32,8

50 Los resultados demuestran que entre las sustancias ensayadas, la mezcla de ácidos grasos poliinsaturados omega-6 con rutin resulta ser más eficaz que el extracto de *Boehmeria* en la inhibición de la actividad de la enzima 5-alfa-reductasa con una actividad máxima a las 48 horas (-32,8%).

55 El efecto de *Boehmeria* y de la mezcla de ácidos grasos poliinsaturados omega-6 con rutin se demuestra más rápidamente con respecto a la referencia positiva, que consiste en *Serenoa repens*.

REIVINDICACIONES

- 5 1. Composición para regular el trofismo de los folículos capilares y/o la producción de sebo en la piel para su utilización en el tratamiento de la atrofia bulbar, el efluvio telógeno, la alopecia androgénica, el acné y la seborrea que comprende ácido gamma-linolénico, ácido linoleico y rutin en un excipiente farmacéuticamente aceptable.
- 10 2. Composición para su utilización según la reivindicación 1, caracterizada porque dicho ácido gamma-linolénico y ácido linoleico están presentes en una cantidad comprendida entre 0,01 y 10% en peso y dicho rutin está presente en una cantidad comprendida entre 0,001 y 10% en peso con respecto al peso total de la composición.
- 15 3. Composición para su utilización según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 2, caracterizada porque la composición comprende además uno o más entre los componentes siguientes: extracto émblico anhidro, isoflavonas de soja, quelato de aminoácido y cinc, quelato de aminoácido y cobre, d-pantotenato de calcio, triclorhidrato de espermidina, ácido fólico, biotina y resveratrol.
- 20 4. Composición para su utilización según cualquiera de las reivindicaciones anteriores, caracterizada porque comprende aceite de borraja y rutin.
- 25 5. Combinación de ácido gamma-linolénico, ácido linoleico y rutin para regular el trofismo de los folículos capilares y/o la producción de sebo en la piel para su utilización en el tratamiento de la atrofia bulbar, el efluvio telógeno, la alopecia androgénica, el acné y la seborrea.
- 30 6. Combinación de aceite de borraja y rutin para su utilización en la regulación de la producción de sebo en la piel y/o del trofismo de los folículos capilares.
7. Combinación para su utilización según cualquiera de las reivindicaciones 5 a 6, en la que dicha composición es un integrador alimenticio o un producto dietético para uso oral.
8. Combinación para su utilización según cualquiera de las reivindicaciones 5 a 6, en la que dicha composición es un producto farmacéutico para aplicación tópica.