

19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 431 309**

51 Int. Cl.:

A61K 8/58	(2006.01) A61K 8/41	(2006.01)
A61K 8/34	(2006.01) A61K 8/63	(2006.01)
A61K 8/49	(2006.01) A61K 8/67	(2006.01)
A61K 8/73	(2006.01) A61Q 5/02	(2006.01)
A61K 8/44	(2006.01) A61Q 5/06	(2006.01)
A61K 8/35	(2006.01) A61K 8/64	(2006.01)
A61K 8/37	(2006.01)	
A61Q 5/00	(2006.01)	
A61Q 19/00	(2006.01)	
A61K 8/19	(2006.01)	

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **10.06.2003 E 03757134 (6)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **24.07.2013 EP 1515688**

54 Título: **Utilización de un complejo salen-manganeso como agente protector de los melanocitos del folículo piloso, y aplicaciones cosméticas**

30 Prioridad:

11.06.2002 FR 0207137
19.06.2002 US 389708 P

45 Fecha de publicación y mención en BOPI de la traducción de la patente:
25.11.2013

73 Titular/es:

L'ORÉAL (100.0%)
14, RUE ROYALE
75008 PARIS, FR

72 Inventor/es:

COMMO, STÉPHANE;
GAILLARD, OLIVIER y
BERNARD, BRUNO

74 Agente/Representante:

LEHMANN NOVO, María Isabel

ES 2 431 309 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

Utilización de un complejo salen-manganeso como agente protector de los melanocitos del folículo piloso, y aplicaciones cosméticas.

5 La presente invención se refiere a la utilización cosmética de un agente mimético de la actividad de la DOPAcromo tautomerasa, como agente protector de los melanocitos del folículo piloso. En particular, el agente mimético de la actividad de la DOPAcromo tautomerasa está destinado a luchar contra la desaparición de los melanocitos del folículo piloso manteniendo y/o regenerando la población de los melanocitos activos del bulbo y de los melanocitos quiescentes de la región superior del folículo piloso.

10 El folículo piloso es una invaginación tubular de la epidermis que se adentra hasta las capas profundas de la dermis. La parte inferior, o bulbo piloso, comprende en sí misma una invaginación en la que se encuentra la papila dérmica. La parte inferior del bulbo es una zona de proliferación celular en la que se encuentran los precursores de células queratinizadas que constituyen el cabello. Las células ascendentes procedentes de estos precursores se queratinizan progresivamente en la parte superior del bulbo, y este conjunto de células queratinizadas formará el tallo piloso.

15 El color del cabello y del pelo se basa, en particular, en la presencia, en cantidades y proporciones variables, de dos grupos de melaninas: las eumelaninas (pigmentos marrones y negros) y las feomelaninas (pigmentos rojos y amarillos). La pigmentación del cabello y del pelo requiere la presencia de melanocitos a nivel del bulbo del folículo piloso. Estos melanocitos están en un estado activo, es decir que sintetizan unas melaninas. Estos pigmentos son transmitidos a los queratinocitos destinados a formar el tallo piloso, lo que llevará al crecimiento de un cabello o de un pelo pigmentado. Esta estructura se denomina a continuación "unidad folicular de pigmentación".

20 En los mamíferos, la melanogénesis implica al menos tres enzimas: la tirosinasa, la DOPAcromo tautomerasa (TRP-2- por "Tyrosinase Related Protein 2) y la DHICAoxidasa (TRP-1, por "Tyrosinase Related Protein 1).

La tirosinasa es la enzima que inicia la biosíntesis de las melaninas. Está asimismo descrita como la enzima que limita la melanogénesis.

25 La TRP-2 cataliza la tautomerización del DOPAcromo en ácido 5,6-dihidroxiindol-2-carboxílico (DHICA). En ausencia de TRP-2, el DOPAcromo sufre una descarboxilación espontánea para formar el 5,6-dihidroxiindol (DHI).

30 DHICA y DHI son ambos unos precursores de pigmentos, TRP-1 oxida las moléculas de DHICA para formar unos derivados de quinonas (Pawelek JM y Chakraborty AK. The enzymology of melanogenesis. En: Nordlund JJ, Boissy RE, Hearing VJ, King RA, Ortonne J-P. The Pigmentary System: Physiology and Pathophysiology. Nueva York: Oxford university press; 1998. p. 391-400).

Las tres enzimas, tirosinasa, TRP-2 y TRP-1, aparecen específicamente implicadas en la melanogénesis. Además, la actividad de estas tres enzimas se ha descrito como necesaria para la actividad máxima de biosíntesis de las eumelaninas.

35 La expresión de TRP-2 se ha observado en el pelo de ratones negros, al mismo tiempo en los melanocitos activos del bulbo y en los melanocitos quiescentes de la vaina epitelial externa. Además, se sabe que la actividad DOPAcromo tautomerasa es aumentada durante la fase anágena en el ratón negro. Sin embargo, no se estableció ninguna correlación clara entre la expresión de TRP-2 y la intensidad de la pigmentación (Sturm *et al.*, 1995).

40 Por otra parte se ha descrito TRP-2 como confiriendo también a los melanocitos que la expresan una resistencia a agentes que dañan el ADN, tal como el cis-diaminadichloroplatinio (II) (Chu *et al.* y Pak *et al.* 2000). Estos resultados sugieren que TRP-2 estaría asimismo implicada en una función independiente de la melanogénesis, la enzima podría desempeñar un papel de citoprotector.

45 El cabello y el pelo sufren un ciclo. Este ciclo comprende una fase de crecimiento (fase anágena), una fase de degeneración (fase catágena) y una fase de reposo (fase telógena) tras la cual se desarrolla una nueva fase anágena. Debido a este ciclo piloso, y contrariamente a la unidad de pigmentación epidérmica, la unidad folicular de pigmentación debe también ser cíclicamente renovada.

50 Este proceso se ha descrito recientemente en el ser humano (Commo S y Bernard B., 2000, Pigment Cell Res. 13: 253-259). Se ha demostrado más particularmente que durante la transición telógena-anágena, una parte de los melanocitos inactivos contenidos en la cápsula telógena proliferativa, se posiciona alrededor de la papila dérmica del bulbo incipiente y empieza a expresar unas enzimas necesarias para la síntesis de las melaninas: esta población de melanocitos corresponde a los melanocitos activos del bulbo. En paralelo, la otra parte de los melanocitos sigue inactiva en la región superior del folículo piloso: esta población de melanocitos corresponde a los melanocitos quiescentes de la región superior del folículo piloso.

Estas enzimas melanógenas se expresarán en los melanocitos del bulbo durante todo el tiempo de la fase-anágena, pero no se expresarán más durante las fases catágena y telógena. El ciclo normal de los melanocitos en el folículo

piloso humano requiere la presencia de melanocitos quiescentes en la región superior del folículo piloso, región denominada de otra manera “depósito”, que estarán cíclicamente activados para regenerar la unidad folicular de la pigmentación. Este mecanismo de renovación celular que participa en el mantenimiento de la pigmentación es específico de la unidad folicular de pigmentación; no se vuelve a encontrar en la unidad epidérmica de pigmentación.

5 Se admite que la canicie (blaqueamiento natural del cabello) está asociada a una disminución de melanina en el tallo piloso. La causa de esta disminución no está aún dilucidada. Se enumeran varias hipótesis, podría estar relacionada con una disminución de la actividad melanógena, por analogía con el mecanismo de pigmentación de la piel, pero también con una alteración de la transferencia de las melaninas o con una disminución del número de melanocitos en el bulbo (Tobin y Paus, 2001); y ninguna demostración en pigmentación del cabello ha permitido hasta ahora validar una u otra de estas hipótesis.

La solicitud internacional WO 99/39728 describe un método que utiliza unas neutrofinas, sus fragmentos, o ciertos pseudo-ligandos de los factores del crecimiento de los nervios, para inhibir la muerte celular de los melanocitos de la epidermis, pero no de los melanocitos de folículo piloso.

15 La solicitud europea EP 0 545 147 describe la utilización de proteínas conjugadas con metales, que pueden ser por ejemplo la superóxido dismutasa, unas glutatión peroxidasas o un citocromo c, para impedir o disminuir el encanecimientos del cabello.

La patente americana US 5 965 157 describe unas formulaciones de activos pigmentantes, en unos liposomas, para favorecer su direccionamiento hacia los folículos pilosos.

La solicitud europea EP 0 327 345 describe la utilización del propil-galato para oscurecer el cabello.

20 La solicitud europea EP 0 580 409 describe unos aminoácidos, cuya metionina, y unos derivados N-acetilados de aminoácidos, como agentes que estimulan el crecimiento del cabello.

La solicitud española ES 2 052 450 describe un procedimiento de obtención de una composición que comprende unos extractos vegetales pigmentantes, utilizable como loción capilar, comprendiendo dicha composición final al menos metionina en una cantidad de 40 mg.

25 La solicitud japonesa JP 07 002677 describe la utilización por vía oral de quercetina como agente que restaura el cabello, que pretende en particular la prevención de la canicie.

La solicitud japonesa JP 04 124122 describe la utilización de quercetina como componente de un agente para luchar contra el encanecimiento del cabello.

30 La patente americana US 5 696 109 describe la actividad anti-oxidante de complejos salen-manganeso y sus utilizaciones farmacéuticas y cosméticas, que no incluye una utilización como protectores de los melanocitos o agentes activos contra la despigmentación del cabello.

Ahora bien, la solicitante acaba de poner en evidencia dos resultados que validan por primera vez la hipótesis según la cual la canicie estaría relacionada con una disminución del número de melanocitos activos en el bulbo y a una disminución del número de melanocitos quiescentes en la región superior del folículo piloso. Esta disminución y/o desaparición precoz de los melanocitos es específica al folículo piloso y no afecta de manera visible a la epidermis.

35 Hasta ahora, se pensaba en efecto que unos melanocitos quiescentes estaban presentes en los folículos pilosos del cabello blanco (Takada *et al.*, 1992, Horikawa *et al.*, 1996, Jenner y Randall 2000).

Ahora bien, la solicitante ha constatado que la progresión de la canicie está asociada a una disminución del número de melanocitos en los bulbos pilosos, que, a pesar de estar en número restringido, sintetizan y transfieren las melaninas. La solicitante ha observado asimismo de manera inesperada y sorprendente que la población de melanocitos quiescentes de la región superior del folículo piloso humano (también denominada “depósito”) es asimismo disminuida durante el proceso de canicie, el cabello blanco poseen sólo algunos –incluso ningún–melanocitos, al contrario del infundíbulo y de la epidermis parecida a estos cabellos blancos. Esta desaparición afecta prematura y específicamente a los melanocitos contenidos en el cabello.

40 Parece por lo tanto necesario luchar contra la desaparición de los melanocitos de los folículos pilosos humanos, proceso que afecta al mismo tiempo a los melanocitos activos de los bulbos y a los melanocitos quiescentes de la región superior de los folículos pilosos, para luchar contra la canicie.

45 Por otra parte, la solicitante ha constatado asimismo de manera inesperada que la enzima TRP-2 no está expresada en los melanocitos de los folículos pilosos humanos pigmentados (marrones, negros y pelirrojos) en los individuos caucásicos, asiáticos y africanos. Esta enzima sólo es detectada en los melanocitos activos del bulbo, en los melanocitos quiescentes de la región superior del folículo piloso humano, aunque está expresada en la epidermis y el infundíbulo del individuo caucásico, africano y asiático. La ausencia de TRP-2 está asociada a la desaparición precoz de melanocitos que no la expresan, es decir, los melanocitos quiescentes de la región superior del folículo piloso y los melanocitos activos del bulbo.

La solicitante ha demostrado por lo tanto que la TRP2, que desempeña un papel en la melanogénesis (síntesis de melanina) a nivel de la unidad epidérmica de pigmentación, podría desempeñar un papel diferente y desconocido hasta ahora, en la unidad folicular de pigmentación: la presencia de un compuesto con actividad mimética de TRP2
5 podría permitir mantener y/o regenerar la población de melanocitos quiescentes de la región superior del folículo piloso y la población de melanocitos activos del bulbo, y favorecer así la renovación cíclica de la unidad folicular responsable del mantenimiento de la pigmentación del cabello, de las pestañas y/o del pelo.

La solicitante ha identificado un medio para mantener y/o regenerar la población de melanocitos del folículo piloso responsables de la pigmentación del cabello: en efecto, ha demostrado que era posible mimetizar la actividad TRP-
10 2. Por otra parte, se ha evaluado la actividad citoprotectora de agentes miméticos de TRP2 en condiciones que inducen a la apoptosis y/o a la senescencia de los melanocitos del folículo piloso.

Así, ha elaborado un medio para prevenir y/o limitar y/o detener el desarrollo de la canicie e incluso mantener la pigmentación natural del cabello y/o del pelo gris o blanco.

Así, la presente solicitud describe la utilización cosmética de un agente mimético de la actividad de la DOPAcromo tautomerasa, como agente protector de los melanocitos del folículo piloso.

15 La presente invención se refiere en particular a la utilización cosmética de un agente mimético de la actividad de la DOPAcromo tautomerasa, como agente protector de los melanocitos del folículo piloso, siendo dicho agente mimético de la actividad de la DOPAcromo tautomerasa un complejo salen-manganeso.

20 Por "agente protector de los melanocitos del folículo piloso" se entiende un agente capaz de proteger los melanocitos del folículo piloso, en particular contra unos agentes citotóxicos responsables de la senescencia y/o de la apoptosis de los melanocitos del folículo piloso. Entre los agentes citotóxicos, se pueden citar unas moléculas de carácter genotóxico y unas moléculas que inducen a un estrés oxidativo como la TNF alfa, las lipofuscinas, la TGF beta, el ligante de Fas/CD95, la IL1 beta, los iones ferrosos y cobrizos, unos compuestos químicos genotóxicos como la cisplatina y la oxaplatina, o también unos compuestos como la ciclofosfamida.

25 Se entiende por agente mimético de la actividad de la DOPAcromo tautomerasa un compuesto capaz de reproducir los efectos de la DOPAcromo tautomerasa sobre el metabolismo y la supervivencia de los melanocitos.

En particular, el agente mimético de la actividad de la DOPAcromo tautomerasa según la invención está destinado a luchar contra la desaparición de los melanocitos del folículo piloso manteniendo y/o regenerando la población de los melanocitos activos del bulbo y de los melanocitos quiescentes de la región superior del folículo piloso.

30 El agente mimético de la actividad de la DOPAcromo tautomerasa según la invención está asimismo destinado a favorecer la renovación cíclica de la unidad folicular de pigmentación.

En particular, la presente solicitud describe la utilización de un agente mimético de la actividad de la DOPAcromo tautomerasa para prevenir y/o limitar y/o detener el desarrollo de la canicie.

La presente solicitud describe también la utilización de un agente mimético de la actividad de la DOPAcromo tautomerasa para mantener la pigmentación natural del cabello y/o del pelo gris.

35 En particular, el objeto de la invención se refiere a la utilización de un agente mimético de la actividad de la DOPAcromo tautomerasa para prevenir y/o limitar y/o detener el desarrollo de la canicie, siendo dicho agente mimético de la actividad de la DOPAcromo tautomerasa un complejo salen-manganeso.

40 El objetivo de la invención se refiere asimismo a la utilización de un agente mimético de la actividad de la DOPAcromo tautomerasa para mantener la pigmentación natural del cabello y/o del pelo gris, siendo dicho agente mimético de la actividad de la DOPAcromo tautomerasa un complejo salen-manganeso.

La solicitud describe unos agentes miméticos de la actividad de la DOPAcromo tautomerasa (TRP-2) que se pueden seleccionar en particular entre los compuestos siguientes:

- moléculas sintéticas miméticas de SOD (metaforo), por ejemplo los complejos de manganeso tales como se describen en los documentos US 5637578, 5610293, 5874421;

45 - los compuestos anti-oxidantes: tales como unos derivados de tetrahydro-5,6,7,8-naftaneol-1, en particular los descritos en la patente EP 0 404 640, unos derivados benzoheterociclos oxigenados (véase la patente EP 0 685 473), unos derivados de ciclodextrinas (véase la patente EP 0 778 287), unos compuestos siliciados derivados de ácido ascórbico (véase la patente WO 01/30784), de la pirrolidona carboxilato de lisina o de arginina (véase la patente EP 0 511 118), unos derivados de benciliden alcanfor ter-butilo (véase la patente US 4,952,391),
50 unos derivados de benciliden ciclanona (véase la patente FR 2636531), unos diorganopolisiloxanos modificados (véase la patente EP 0 370 868), unos derivados lipófilos del bencilidenalcanfor (véase la patente EP 0 390 681), unos derivados hidrófilos del bencilidenalcanfor (véase la patente EP 0 390 682), unos derivados de bencil-ciclanona (véase la patente EP 0 390 683), unos polímeros antioxidantes tales como se describen en la patente US 4,281,192, unas asociaciones de mono- y di-éster de ácido cinámico y de vitamina C (véase la patente EP 0 664 290), unas

poliaminas, tales como putrescina, espermidina, espermina, di-aminas, tri-aminas, tetra-aminas; el propil galato, la quercetina, el trolox, la histidina, el triptofano, la metionina, unos quelantes de metales (21.aminoesteroides), el complejo salen-manganeso (por ejemplo: EUK-8), el α -fenil-ter-butilnitrol (PBN) (y los compuestos derivados) o el ebseleno;

5 Los compuestos no antioxidantes, tal como el MIF y sus análogos (Macrophage Migration Inhibiting Factor, véase Rosengren *et al.* Mol. Med., 1996, 2(1):143-9).

La solicitud describe también una composición para luchar contra la canicie, que comprende, en un medio cosméticamente aceptable, al menos un agente mimético de la actividad de la DOPA tautomerasa (TRP2) tal como se ha descrito anteriormente.

10 Otro objeto de la invención es una composición para luchar contra la canicie, que comprende, en un medio cosméticamente aceptable, al menos un complejo salen-manganeso, estando dicho complejo salen-manganeso asociado a otro activo seleccionado entre los agentes de lucha de los estados descamativos del cuero cabelludo, unos agentes que favorecen el nuevo crecimiento del cabello, unos extractos vegetales con actividad pigmentante.

15 La composición según la invención comprende una cantidad de agente mimético de la actividad de la DOPAcromo tautomerasa comprendida entre el 0,001% y el 10% en peso por volumen, preferiblemente entre el 0,01 y el 5% en peso por volumen y aún más preferiblemente entre el 0,1 y el 1% en peso por volumen.

La composición según la invención se puede administrar por vía oral o ser aplicada sobre la piel (sobre cualquier zona cutánea del cuerpo recubierta de pelo) y/o sobre el cuero cabelludo.

20 Por vía oral, la composición según la invención puede contener el o los agentes miméticos de la actividad de la DOPAcromo tautomerasa, unos compuestos activos en solución en un líquido alimenticio tal como una solución acuosa o hidroalcohólica, eventualmente aromatizada. Puede asimismo estar incorporado en un excipiente sólido que se puede ingerir y presentarse por ejemplo en forma de gránulos, de pastillas, de comprimidos o de grageas. Pueden asimismo estar colocados en solución en un líquido alimenticio acondicionado el mismo eventualmente en
25 unas cápsulas ingeribles.

Según el modo de administración, la composición de la invención puede presentarse en cualquier forma galénica normalmente utilizada, particularmente en cosmetología.

Una composición preferida de la invención es una composición cosmética adaptada a una aplicación tópica sobre el cuero cabelludo y/o la piel.

30 Para una aplicación tópica, la composición utilizable puede estar en particular en forma de una disolución acuosa, hidroalcohólica u oleosa, o de dispersión de tipo loción o suero, de emulsiones de consistencia líquida o semi-líquida de tipo leche, obtenidas por dispersión de una fase grasa en una fase acuosa (H/E) o a la inversa (E/H), o de suspensiones o emulsiones de consistencia blanda de tipo crema o gel acuoso o anhidros, o también de microcápsulas o micropartículas, o de dispersiones vesiculares de tipo iónico y/o no iónico. Puede así presentarse
35 en forma de ungüento, de tinte, de crema, de pomada, de polvo, de parche, de tampón empapado, de disolución, de emulsión o de dispersión vesicular, de loción, de gel, de spray, de suspensión, de champú, de aerosol o de espuma. Pueden ser anhidras o acuosas. Pueden también consistir en unas preparaciones sólidas que constituyen unos jabones o unas pastillas de lavado.

Estas composiciones son preparadas según los métodos habituales.

40 La composición utilizable puede en particular ser una composición para cuidados capilares, y en particular un champú, una loción de marcado, una loción tratante, una crema o un gel de peinado, una composición de tintes (en particular tintes de oxidación) eventualmente en forma de champúes colorantes, unas lociones reestructurantes para el cabello, de mascarilla.

La composición cosmética será preferiblemente una crema, una loción capilar, un champú o un acondicionador.

45 Las cantidades de los diferentes constituyentes de las composiciones utilizables son las clásicamente utilizadas en los campos considerados.

50 Cuando la composición utilizable es una emulsión, la proporción de la fase grasa puede ir del 5% al 80% en peso, y preferentemente del 5% al 50% en peso con respecto al peso total de la composición. Los aceites, las ceras, los emulsionantes y los co-emulsionantes utilizados en la composición en forma de emulsión se seleccionan entre los clásicamente utilizados en el campo cosmético. El emulsionante y el co-emulsionante están presentes, en la composición, en una proporción que va del 0,3% al 30% en peso, y preferentemente del 0,5 al 20% en peso con respecto al peso total de la composición. La emulsión puede, además, contener unas vesículas lipídicas.

Cuando la composición utilizable es una disolución o un gel oleoso, la fase grasa puede representar más del 90% del peso total de la composición.

En una variante de la invención, la composición será tal que el agente mimético de la actividad de la DOPAcromo tautomerasa está encapsulado en un revestimiento tal como unas microesferas, unas nanoesferas, unas oleosomas o unas nanocápsulas, el revestimiento se seleccionará según la naturaleza química del agente mimético de la actividad de la DOPAcromo tautomerasa.

5 A título de ejemplo, las microesferas se podrán preparar según el método descrito en la solicitud de patente EP 0 375 520.

Las nanoesferas podrán presentarse en forma de suspensión acuosa y estar preparadas según los métodos descritos en las solicitudes de patente FR 0015686 y FR 0101438.

10 Los oleosomas consisten en una emulsión de aceite en agua formada por unos glóbulos oleosos provistos de un revestimiento de cristal líquido laminado disperso en una fase acuosa (véase las solicitudes de patente EP 0 641 557 y EP 0 705 593).

15 El agente mimético de la actividad de la DOPAcromo tautomerasa porá asimismo estar encapsulado en unas nanocápsulas que consisten en un revestimiento laminado obtenido a partir de un tensioactivo siliconado (véase la solicitud de patente EP 0 780 115), las nanocápsulas podrán también ser preparadas a base de poliésteres sulfónicos hidrodispersables (véase la solicitud de patente FR 0113337).

El agente mimético de la actividad de la DOPAcromo tautomerasa podrá estar acompañado en la superficie de glóbulos oleosos catiónicos, sea cual sea su tamaño (véanse las solicitudes de patente EP 1 010 413, EP 1 010 414, EP 1 010 415, EP 1 010 416, EP 1 013 338, EP 1 016 453, EP 1 018 363, EP 1 020 219, EP 1 025 898, EP 1 120 101, EP 1 120 102, EP 1 129 684, EP 1 160 005 y EP 1 172 077).

20 El agente mimético de la actividad de la DOPAcromo tautomerasa puede finalmente estar acompañado en la superficie de nanocápsulas o nanopartículas provistas de un revestimiento laminado (véanse los documentos EP 0 447 318 y EP 0 557 489) y que contiene un tensioactivo catiónico en la superficie (véanse las referencias citadas anteriormente para los tensioactivos catiónicos).

25 En particular, se preferirá una composición tal como el revestimiento que contiene el agente mimético de la actividad de la DOPAcromo tautomerasa a un diámetro inferior o igual a 10 μm . Cuando el revestimiento no forma una vesícula esférica, se entiende por diámetro la dimensión mayor de la vesícula.

30 De manera conocida, la composición puede también contener unos adyuvantes habituales en el campo cosmético, tales como los gelificantes hidrófilos o lipófilos, los aditivos hidrófilos o lipófilos, los conservantes, los antioxidantes, los disolventes, los perfumes, las cargas, los filtros, los absorbentes de olor y las materias colorantes. Las cantidades de estos diferentes adyuvantes son las clásicamente utilizadas en el campo cosmético, y por ejemplo son del 0,01% al 10% del peso total de la composición. Estos adyuvantes, según su naturaleza, pueden ser introducidos en la fase grasa, en la fase acuosa y/o en las esférulas lipídicas.

35 Como aceites o ceras utilizables en la invención, se pueden citar los aceites minerales (aceite de vaselina), los aceites vegetales (fracción líquida de la manteca de karité, el aceite de girasol), los aceites animales (perhidroescualeno), los aceites de síntesis (aceite de purcelina), los aceites o ceras siliconados (ciclometicona), y los aceites fluorados (perfluoropoliéteres), las ceras de abejas, de carnauba o de parafina. Se pueden añadir a estos aceites unos alcoholes grasos y unos ácidos grasos (ácido esteárico).

40 Como emulsionantes utilizables en la invención, se puede citar por ejemplo el estearato de glicerol, el polisorbato 60 y la mezcla de PEG-6/PEG-32/glicol estearato vendido bajo la denominación de Tefose[®] 63 por la compañía Gattefosse.

Como disolventes utilizables en la invención, se pueden citar los alcoholes inferiores, en particular el etanol y el isopropanol, el propilenglicol.

45 Como gelificantes hidrófilos utilizables en la invención, se pueden citar los polímeros carboxivinílicos (carbomer), los copolímeros acrílicos tales como los copolímeros de acrilatos/alquilacrilatos, las poliacrilamidas, los polisacáridos tales como la hidroxipropilcelulosa, las gomas naturales y las arcillas y, como gelificantes lipófilos, se pueden citar las arcillas modificadas como las bentonas, las sales metálicas de ácidos grasos como los estearatos de aluminio y la sílice hidrófoba, la etilcelulosa, el polietileno.

Las composiciones descritas en la solicitud pueden asociar al menos un compuesto mimético de la actividad de TRP-2 con otros agentes activos. Entre estos agentes activos, se pueden citar a título de ejemplo:

50 - los agentes que modulan la diferenciación y/o la proliferación y/o la pigmentación de las células de la piel, tales como el retinol y sus ésteres, la vitamina D y sus derivados, los estrógenos tales como el estradiol, los moduladores de AMPc tales como los derivados de POMC, la adenosina, o la forskolina y sus derivados, las prostaglandinas y sus derivados, la triyodotironina y sus derivados;

- unos extractos de vegetales tales como los de Iridáceas o de soja, extractos que pueden entonces contener o no unas isoflavonas;
- unos extractos de micro-organismos;
- 5 - los agentes antirradicales libres tales como el α -tocoferol o sus ésteres, las superóxido dismutasas o sus miméticos, algunos quelantes de metales o el ácido ascórbico y sus ésteres;
- los anti-seborréicos, tales como algunos aminoácidos azufrados, el ácido 13-cis-retinoico, el acetato de ciproterona;
- los otros agentes para combatir los estados descamativos del cuero cabelludo como el zinc piritiona, el disulfuro de selenio, el climbazol, el ácido undecilénico, el ketoconazol, la piroctona olamina (octopirox) o la ciclopiroctona (ciclopirox);
- 10 en particular, podrá tratarse de principios activos que estimulan el nuevo crecimiento y/o que favorecen la disminución de la caída del cabello, se pueden más particularmente citar a título no limitativo:
 - los ésteres de ácido nicotínico, de los cuales en particular el nicotinato de tocoferol, el nicotinato de bencilo y los nicotinatos de alquilo de C₁-C₆ como los nicotinatos de metilo o de hexilo;
 - 15 - los derivados de pirimidina, como el 2,4-diamino-6-piperidinopirimidina-3-óxido o "Minoxidil" descritos en las patentes US 4,139,619 y US 4,596,812; el Aminexil o 2,4-diamino-pirimidin-3-óxido descrito en el documento W096/09048;
 - los agentes inhibidores de la lipoxigenasa o inductor de la ciclooxidasas que favorecen el nuevo crecimiento del cabello como los descritos por la solicitante en la solicitud de patente europea EP 0 648 488;
 - 20 - los agentes antibacterianos tales como los macrólidos, los piranosidos y las tetraciclinas, y en particular la Eritromicina;
 - los agentes antagonistas de calcio, como la Cinnarizina, la Nimodipina y la Nifedipina;
 - unas hormonas, tales como el estriol o unos análogos, o la tiroxina y sus sales;
 - unos agentes antiandrógenos, tales como la oxendolona, la espironolactona, el dietilestibestrol y la flutamina;
 - 25 - unos inhibidores esteroideos o no esteroideos de las 5- α -reductasas tales como los descritos por la solicitante en las solicitudes de patentes europeas EP 0 964 852 y EP 1 068 858, o también la finastérida;
 - unos agonistas de los canales potásicos que dependen del ATP tales como la cromocalima y el nicorandil;
 - unos extractos vegetales de actividad pro-pigmentante como los extractos de crisantemo tales como se describen en el documento FR 2768343 y los extractos de Sanguisorba descritos en el documento FR 2782920A.
- 30 Preferentemente, el agente mimético de la actividad de la DOPAcromo tautomerasa está asociado a otro activo seleccionado entre los agentes para luchar contra los estados descamativos del cuero cabelludo, unos agentes que favorecen el nuevo crecimiento del cabello, unos extractos vegetales con actividad propigmentante.
- La presente solicitud describe asimismo un procedimiento de tratamiento cosmético de la canicie, caracterizado porque se administra o se aplica sobre la zona a tratar una composición tal como la definida anteriormente, que comprende al menos un agente mimético de la actividad de la DOPAcromo tautomerasa.
- 35 La solicitud describe asimismo un procedimiento de tratamiento cosmético destinado a mantener la pigmentación natural del cabello y/o del pelo gris o blanco, caracterizado por que se administra o se aplica sobre la zona a tratar una composición tal como la definida anteriormente, que comprende al menos un agente mimético de la actividad de la DOPAcromo tautomerasa
- 40 Otro objeto de la presente invención se refiere a un procedimiento de tratamiento cosmético no terapéutico de la canicie, caracterizado porque se administra o se aplica sobre la zona a tratar una composición cosmética que comprende, en un medio cosméticamente aceptable, al menos un complejo salen-manganeso o una composición según la invención tal como se ha definido anteriormente que comprende, en un medio cosméticamente aceptable, al menos un complejo salen-manganeso, estando dicho complejo salen-manganeso asociado a otro activo seleccionado entre los agentes para luchar contra los estados descamativos del cuero cabelludo, unos agentes que favorecen el nuevo crecimiento del cabello, unos extractos vegetales con actividad propigmentante.
- 45 La invención se refiere asimismo a un procedimiento de tratamiento cosmético destinado a mantener la pigmentación natural del cabello y/o del pelo gris o blanco, caracterizado por que se administra o se aplica sobre la zona a tratar una composición cosmética que comprende, en un medio cosméticamente aceptable, al menos un complejo salen-manganeso o una composición según la invención tal como se ha definido anteriormente que

comprende, en un medio cosméticamente aceptable, al menos un complejo salen-manganeso, estando dicho complejo salen-manganeso asociado a otro activo seleccionado entre los agentes para luchar contra los estados descamativos del cuero cabelludo, unos agentes que favorecen el nuevo crecimiento del cabello, unos extractos vegetales con actividad propigmentante.

5 Los procedimientos de tratamiento de la canicie y de pigmentación del cabello y/o del pelo gris o blanco pueden asimismo consistir en la ingestión de una composición que comprende al menos un agente mimético de la actividad de la DOPAcromo tautomerasa.

Las zonas a tratar pueden ser, por ejemplo y sin ninguna limitación, el cuero cabelludo, las cejas, el bigote y/o la barba y cualquier zona de la piel recubierta de pelo.

10 Más particularmente, los procedimientos de tratamiento cosmético de la canicie y de la pigmentación natural del cabello y/o del pelo gris o blanco descritos en la solicitud consisten en aplicar una composición que comprende al menos un agente mimético de la actividad de la DOPAcromo tautomerasa seleccionado entre:

- moléculas sintéticas miméticas de SOD (metáfora), por ejemplo, los complejos de manganesos tales como se describen en US 5637578, 5610293, 5874421;

15 - los compuestos anti-oxidantes: tales como unos derivados de tetrahidro-5,6,7,8-naftaneol-1, en particular los descritos en la patente EP 0 404 640, unos derivados benzoheterociclos oxigenados (véase la patente EP 0 685 473), unos derivados de ciclodextrinas (véase la patente EP 0 778 287), unos compuestos siliciados derivados de ácido ascórbico (véase la patente WO 01/30784), de la pirrolidona carboxilato de lisina o de arginina (véase la patente EP 0 511 118), unos derivados de benciliden alcanfor ter-butilo (véase la patente US 4,952,391),
 20 unos derivados de benciliden ciclanona (véase la patente FR 2636531), unos diorganopolisiloxanos modificados (véase la patente EP 0 370 868), unos derivados lipófilos del bencilidenalcanfor (véase la patente EP 0 390 681), unos derivados hidrófilos del bencilidenalcanfor (véase la patente EP 0 390 682), unos derivados de bencil-ciclanona (véase la patente EP 0 390 683), unos polímeros antioxidantes tales como se describen en la patente US 4,281,192, unas asociaciones de mono- y di-éster de ácido cinámico y de vitamina C (véase la patente EP 0 664 290), unas poliaminas, tales como putrescina, espermidina, espermina, di-aminas, tri-aminas, tetra-aminas; el propil galato, la quercetina, el trolox, la histidina, el triptofano, la metionina, unos quelantes de metales (21.aminoesteroides), el complejo salen-manganeso (por ejemplo: EUK-8), el α -fenil-ter-butilnitrol (PBN) (y los compuestos derivados) o el ebseleno;

30 - los compuestos no antioxidantes, tal como el MIF y sus análogos (Macrophage Migration Inhibiting Factor, véase Rosengren *et al.* Mol. Med., 1996, 2(1):143-9).

Los procedimientos de tratamiento cosmético para luchar contra la canicie y/o para mantener la pigmentación natural del cabello y/o del pelo gris o blanco, pueden por ejemplo consistir en aplicar la composición sobre el cabello y el cuero cabelludo, por la tarde, guardar la composición toda la noche y eventualmente efectuar un enjabonado por la mañana o lavar el pelo con la ayuda de esta composición y dejar de nuevo en contacto algunos minutos antes de aclarar. La composición conforme a la invención se reveló particularmente interesante cuando se aplicó en forma de loción capilar, eventualmente aclarada o incluso en forma de un champú.

35 La presente solicitud describe también un método de identificación de un agente mimético de la actividad de la DOPAcromo tautomerasa que consiste en determinar la capacidad de un compuesto para disminuir la inducción de una muerte celular en melanocitos que no expresan la DOPAcromo tautomerasa en referencia a una población de melanocitos que expresan la DOPAcromo tautomerasa, el método comprende las etapas siguientes:

a- se cultiva una población de melanocitos;

45 b- separación en dos poblaciones de la población de melanocitos obtenida al final de la etapa (a), denominadas respectivamente Mel-A y Mel-B, se cultiva Mel-A en un medio A en el que los melanocitos expresan poco o nada la DOPAcromo tautomerasa y de Mel-B en un medio B que contiene al menos un factor que favorece la expresión de la DOPAcromo tautomerasa;

c- exposición de la población Mel-A a una condición que induce a la apoptosis o a la senescencia en cultivo en presencia (población Mel-A(+)) o en ausencia (población Mel-A(-)) de un compuesto para el cual se desea ensayar la actividad mimética de la DOPAcromo tautomerasa;

50 d- exposición de la población Mel-B a una condición que induce a la apoptosis o a la senescencia en cultivo idéntica a la condición seleccionada en la etapa (c) en ausencia del compuesto para el cual se desea ensayar la actividad DOPAcromo tautomerasa;

e- comparación de unas respuestas apoptótica o senescente de la población Mel-A(+) con Mel-A(-) y de Mel-A(+) con Mel-B;

f- selección de unos compuestos para los cuales la respuesta es tal que la citotoxicidad observada en el ensayo Mel-A(+) es menor que la observada en el ensayo Mel-A(-), y la citotoxicidad observada en el ensayo Mel-A(+) es parecida a la observada en el ensayo Mel-B.

5 En un modo de realización particular, descrito aquí, los melanocitos son cultivados en la etapa (a) en un medio M2 (PromoCell, Heidelberg, D). El cultivo de la etapa (a) se puede realizar según diferentes modalidades:

- en un sistema de cultivo monocapa en el que las células son inoculadas directamente en el mismo plástico;

- las células pueden también ser inoculadas sobre uno o varios compuestos de matriz extracelular, tales como colágeno, elastina, fibronectina, laminina;

10 - las células pueden ser cultivadas en un sistema tridimensional, tal como un cabello disecado, un cabello arrancado, una piel reconstruida *in vitro*.

Esta etapa (a) se realiza preferiblemente durante un tiempo comprendido entre 2 y 18 horas necesarias para la adherencia de las células.

Para la realización de las etapas siguientes, el medio de cultivo de la etapa (a) se sustituye después por un medio apropiado al ensayo:

15 - para la etapa (b), se trata:

para la población de melanocitos Mel-A, de un medio que no favorece la expresión de TRP-2 o bien de un medio que contiene un factor que reprime la expresión de la DOPAcromo tautomerasa para la población Mel-A, pudiendo este factor ser un factor que neutraliza los ARN mensajeros que codifican para la TRP2 (método anti-sentido, siRNA) con la ayuda de secuencias nucleotídicas apropiadas.

20 para la población de melanocitos Mel-B de un medio que favorece la expresión de TRP-2; este medio puede también contener un factor que induce a la expresión de la DOPAcromo tautomerasa. Por ejemplo, este factor se puede seleccionar entre: la hexametileno bisacetamida (HMBA), la glicirizina, el dietilestilbestrol, el estradiol, el caenferol, la forskolina.

25 La expresión de TRP2 se puede obtener también después de la transfección de la región que codifica el gen humano de TRP-2 (por ejemplo tal como se describe en genebank nº S69231, nº NM_001922, nº AJ000503) en cualquier vector apropiado (ejemplo: pcDNA[®] Vector, invitrogen, Groningen, CH, N). En este caso, el ensayo se puede realizar sobre melanocitos o sobre cualquier otro tipo de células de mamíferos (ejemplo: fibroblastos, queratinocitos).

30 Según un modo de realización particular, se utilizará en la etapa (b), para la población de melanocitos Mel-A, un medio que contiene un factor que neutralizan los ARN mensajeros que codifican la TRP2 (método anti-sentido, siRNA) con la ayuda de secuencias nucleotídicas apropiadas.

Como oligonucleótidos bicatenario capaz de provocar la extinción del ARN mensajero que codifica la TRP2, se podrán utilizar las 3 secuencias nucleotídicas siguientes (posiciones 838, 1589 y 2164 respectivamente del gen que codifica para la TRP2):

35 Las SEC ID de números impares corresponden a la hebra 5' antisentido; las SEC ID de números pares corresponde a la hebra 5' sentido.

838

SEC ID N° 1: 5'- AACATCCATTCCTTGAGTCCTCCTGTCTC -3'

SEC ID N° 2: 5'- AAAGGACTCAAGGAATGGATGCCTGTCTC -3'

40 1589

SEC ID N° 3: 5'- AAGTGATGAGCCTTCATAATTCCTGTCTC -3'

SEC ID N° 4: 5'- AAAATTATGAAGGCTCATCACCTGTCTC -3'

2164

SEC ID N° 5: 5'- AATCCTCACTGTTCTTCTTGCCTGTCTC -3'

45 SEC ID N° 6: 5'- AACAGAAGGAACAGTGAGGACCTGTCTC -3'

La funcionalidad de estas secuencias SiRNAs, como inhibidores específicos de la TRP2, se verifica mediante una medición de transferencia western de la extinción de la expresión de la TRP2 en unos melanocitos en presencia de estos SiRNAs en forma de dúplex (hebra antisentido y hebra sentido).

5 Para la realización de las etapas (c) y (d), las poblaciones Mel-A y Mel-B están expuestas a una condición que induce a la apoptosis o a la senescencia en cultivo, podría tratarse, por ejemplo, de un factor pro-apoptico (TNF α), de la ausencia de un factor de supervivencia (IGF-1), de un tratamiento por cis-platina (Pak B.J. *et al.*, 2000, Melanoma Res. 10:499-505) o la oxaliplatina, de un agente tóxico (ciclofosfamida), de un estrés oxidativo (H₂O₂, dietilmaleato) (véase Vaux D.L. & Strasser A., 1996, Proc. Natl. Acad. Sci. 93:2239-2244).

10 Para la realización de la etapa (e), se podrán utilizar los métodos de revelación de la apoptosis o de senescencia siguientes:

15 - la respuesta apoptótica se puede determinar mediante cualquier método que permite revelar la apoptosis celular, por ejemplo, identificación de la fragmentación del ADN después de la electroforesis sobre gel de agarosa, marcación de los fragmentos de ADN mediante el método de "TUNEL" (Gavrieli Y *et al.* J Cell Biol 1992;119:493-501), revelación de la anexina V (ApoAlert Annexin V Apoptosis Kit (1996) CLONTECHniques XI(3):9-11 (BD Biosciences, Bélgica, medición de la actividad de caspasa (ApoAlert Caspase Assay Kit (BD Biosciences, Bélgica). En particular, la apoptosis se puede cuantificar con la ayuda del kit «Cell Death Détection ELISA plus, realizado según el protocolo dado por el proveedor (Roche 1 774 425).

20 - la respuesta senescente se puede determinar mediante cualquier método que permite revelar la senescencia celular, por ejemplo, la determinación de un acortamiento de los telómeros, la medición de la actividad de la telomerasa (TRAPeze kit, Intergen), la determinación de la disminución del índice de ciclina E, la determinación de la disminución del índice de proteína P105 Rb fosforilada (Bandyopadhyay D *et al.* Experimental Gerontology 2001; 36:1265-1275), la medición de la actividad beta-Galactosidasa (Dimri GP *et al.* PNAS 1995; 92:9363-9367).

25 La solicitud describe también la utilización de un agente mimético de la actividad de la DOPAcromo tautomerasa susceptible de ser identificada mediante el método descrito anteriormente, en un procedimiento de tratamiento cosmético para prevenir y/o limitar y/o detener el desarrollo de la canicie y/o para mantener la pigmentación natural del cabello y/o del pelo gris o blanco.

30 La solicitud describe finalmente la utilización de un agente mimético de la actividad de la DOPAcromo tautomerasa susceptible de ser identificado mediante el método descrito anteriormente, para la preparación de una composición cosmética destinada a prevenir y/o limitar y/o detener el desarrollo de la canicie y/o para mantener la pigmentación natural del cabello y/o del pelo gris o blanco.

La solicitud describe también un método de evaluación de la actividad citoprotectora de un agente mimético de la actividad de la DOPAcromo tautomerasa susceptible de ser identificado mediante el método descrito anteriormente, que comprende las etapas siguientes:

35 a- cultivo de una población de melanocitos en un medio que limita la expresión de la TRP-2 a una expresión basal débil;

b- adición de un compuesto mimético de la actividad de la DOPAcromo tautomerasa al medio de cultivo;

c- exposición de unas células a una condición que induce a la apoptosis o a la senescencia;

d- medición de la citotoxicidad;

e- selección de unos compuestos que imitan la actividad de la DOPAcromo tautomerasa con un efecto citoprotector.

40 En un modo de realización particular, los cultivos celulares se realizan en estufa, a 37°C, 5% de CO₂.

45 En particular, la etapa (a) se podrá realizar según el protocolo siguiente: los melanocitos se inoculan a D0 con un medio M2 (PromoCell, Heidelberg, D). Después de un tiempo necesario para la adherencia de las células comprendido entre 2 y 18 horas, el medio se sustituye por un medio en el que los melanocitos expresan poco o nada la TRP-2 (expresión basal débil):DMEM :F12 (Gibco BRL - 42400-044), Ultrosor G (Gibco BRL - 15950-017) 0,5%, PC-1 (BioWhittaker) 344022) 0,5%, bFGF (Pepro Tech Inc 100-18B) 5 ng/ml, heparina (Sigma H-3149) 75 ng/ml, 1% antibióticos, 1% glutamina. Las células son mantenidas en este medio de cultivo el tiempo comprendido entre 12 y 72 horas necesario para la disminución de la expresión de TRP-2.

La etapa (b) se podrá realizar según el protocolo siguiente: los melanocitos son tratados en cultivo mediante el compuesto mimético de la actividad de la DOPAcromo tautomerasa.

50 La etapa (c) se podrá realizar por ejemplo según le protocolo siguiente: las células son tratadas con cis-platino (por ejemplo entre 5 y 50 μ M) en el medio de cultivo durante el tiempo necesario para la inducción de la apoptosis, este tiempo está generalmente comprendido entre 12 y 24 horas.

La etapa (d) se podrá realizar por ejemplo según el protocolo siguiente: la citotoxicidad se puede medir con la ayuda del kit "Cell Proliferation Kit II (XTT)" realizado según el protocolo dado por el proveedor (Roche 1-465-015). La apoptosis se puede cuantificar con la ayuda del kit "Cell Death Detection ELISA plus", realizado según el protocolo dado por el proveedor (Roche 1 774 425).

5 Figuras:

Figura 1: esta figura reúne diferentes fotografías que representan la distribución de los melanocitos en el folículo piloso durante la fase anágena visualizada con microscopio.

Leyendas:

10 (A) es una serie de clichés de la vaina epitelial externa aumentada 40 veces, (B) es una serie de clichés de la vaina epitelial externa (centrada sobre el tallo) aumentada 20 veces y (C) es una serie de clichés del bulbo aumentado 20 veces.

(1) representa un cabello muy oscuro, (2) un cabello moderadamente pigmentado, (3) a (5) un cabello de diferentes matices de gris y (6) un cabello blanco.

15 Figura 2: Estas fotografías permiten visualizar la expresión de TRP-2 en los melanocitos de la epidermis y del cabello (vaina epitelial externa y bulbo piloso).

Estudio inmunohistológico analizado en microscopía confocal láser.

Figura 3: Estas fotografías representan los resultados obtenidos después de la realización de los ensayos de transferencia western descritos en el ejemplo 2B.

20 Ejemplo 1 - revelación inmunohistoquímica de los melanocitos en los folículos pilosos en diferentes etapas de blanqueamiento, por marcación de la proteína pMel-17.

Se han estudiado más de 120 folículos pilosos aislados a partir de biopsias procedentes de 8 donantes de 49 a 71 años de edad.

A – Protocolo de aislamiento de los folículos pilosos enteros (Commo S y Bernard BA Pigment Cell Res 2000;13: 253-259).

25 Unos fragmentos de biopsia son incubados en la dispasa (2, 4 U/ml, Boehringer Mannheim, D) durante una noche a +04°C. El cabello es después aislado con la ayuda de pinzas bajo binoculares.

B – Protocolo de inmunomarcado sobre folículos pilosos enteros (Commo S y Bernard BA Pigment Cell Res 2000; 13:253-259)

30 El cabello entero se fija en etanol a -20°C durante 10 minutos. Cada etapa de los procedimientos de fijación y de marcado está seguida de lavados con tampón fosfato (pH 7,4 (PBS))-Tween 20 0,05%. Salvo que se precise de otra manera, todas las etapas se realizan a temperatura ambiente. Las peroxidases endógenas de la muestra son neutralizadas incubando la muestra en una solución de peróxido de hidrógeno al 0,1% durante 10 minutos. Para bloquear los sitios de fijación no específicos, la muestra se incuba con leche desnatada al 1%, durante 15 minutos. El anticuerpo (Ac) primario NK1-beteb que reconoce específicamente la proteína pMel-17 (Monosan, Paris, F) se diluye al 1/40 en PBS-Tween al 0,05%, que contiene el 10% de suero normal (X0907, DAKO, Trappes, F). El Ac primario se incuba durante 18 horas sobre el cabello a +04°C. El Ac secundario acoplado a la biotina (E-433, DAKO, Trappes, F) se diluye al 1/400 y se incuba durante 30 minutos. El cabello se incuba después en presencia de estreptavidina-biotina-peroxidasa (K-0377, DAKO, Trappes, F), y finalmente se revela el inmunomarcado en presencia de 3-amino-9-etilcarbazol (AEC) (AEC kit-101, Sigma, Saint Quentin Fallavier, F).

40 Comparando los clichés (B1) a (B5) de la figura 1, se constata que la disminución de pigmentación del cabello está asociada a una disminución de melanina en el bulbo y a una disminución de melanocitos en el bulbo (véanse C1 a C5). El cabello blanco cuyo tallo está desprovisto de melanina (B6) no contiene melanocito en el bulbo (C6). El cabello gris y blanco contiene una cantidad variable de melanocitos en la parte alta de la vaina epitelial externa, pudiendo esta cantidad incluso ser nula en el caso del cabello blanco (A3 a 6), a diferencia del cabello pigmentado (A1 y 2).

45 Ejemplo 2 – puesta en evidencia de la expresión diferencial de la DOPAcromo tautomerasa en los melanocitos de folículos pilosos y de la epidermis en el individuo caucásico.

A – Estudio inmunohistológico analizado en microscopía confocal láser

50 A.1 – Obtención de pares congelados de folículos pilosos (Commo S y Bernard BA Pigment Cell Res 2000; 13:253-259)

Un fragmento de biopsia de cuero cabelludo que contiene unos folículos pilosos está incluido en tissue-Tek-OCT (Miles, Naperville, IL, USA) y después se congela sobre hielo seco. La biopsia congelada se corta después (7 μ m) con la ayuda de un criostato (CM3050, Leica, Rueil-Malmaison, F).

5 A.2 – Protocolo de aislamiento de los folículos pilosos enteros y de los fragmentos epiteliales de piel (Commo S y Bernard BA *Pigment Cell Res* 2000;13:253-259)

Unos fragmentos de biopsia son incubados en la dispasa (2,4 U/ml, Boehringer Mannheim, D) durante una noche a +04°C. El compartimiento epitelial se separa de la dermis con la ayuda de pinzas bajo binoculares. Las estructuras epiteliales son después micro-disecadas para separar los folículos pilosos y la epidermis, y después se clasifican.

A.3 – Protocolo de inmunomarcado sobre folículos pilosos enteros, fragmentos de piel y corte congelado

10 Los cabellos enteros, los fragmentos epiteliales de piel y los cortes congelados son fijados en etanol a -20°C durante 10 minutos. Cada etapa de los procedimientos de fijación y de marcado está seguida de lavados con tampón fosfato (pH 7,4 (PBS))-Tween 20 0,05%. Salvo que se precise de otra manera, todas las etapas se llevan a cabo a temperatura ambiente. Las peroxidases endógenas de la muestra son neutralizadas incubando la muestra en una disolución de peróxido de hidrógeno al 0,1% durante 10 minutos. Para bloquear los sitios de fijación no específicos, la muestra se incuba con leche desnatada al 1%, durante 15 minutos. Los anticuerpos (Ac) primarios son diluidos en PBS-Tween al 0,05%, que contiene 10% de suero normal (X0907, DAKO, Trappes, F). Los Ac primarios NK1-beteb que reconocen específicamente la proteína pMel-17 (1/40, Monosan, Paris, F) y α PEP8h (1/2000, Dr VJ.Hearing, NIH, Bethesda, MD, USA) que reconocen específicamente la proteína TRP2 humana (Virador *et al*, 2001) se incuban simultáneamente durante 18 horas a +04°C sobre el cabello entero y los fragmentos epiteliales de piel, y 30 minutos a temperatura ambiente sobre los cortes congelados. El Ac secundario de cabra dirigido contra las inmunoglobulinas (Ig) G2b acoplado a la Cy3 (M32410, TEBU, le Perray en Yveline, F) se diluye al 1/80, y el Ac secundario dirigido contra las Ig acoplado a la Cy5 (111-175-144, Jackson Immunoresearch Lab. Inc. West Grove, PA, USA) se diluye al 1/500, y son incubados simultáneamente durante 30 minutos sobre las muestras. Los inmunomarcadores son analizados en microscopía confocal láser (LSM510, Carl Zeiss, Oberkochen, D).

25 Conclusiones de las observaciones: se constata en la figura 2 la presencia de TRP-2 en los melanocitos de la epidermis, sin embargo, esta enzima no está expresada ni en los melanocitos de la vaina epitelial del folículo piloso, ni en los melanocitos de bulbo piloso.

B – estudio bioquímico por análisis en transferencia western

30 B.1 – Protocolo de extracción de proteína de folículos pilosos humanos y de melanocitos (Commo S *et al*. *Differentiation* 2000; 66:157-164)

35 - Extracción proteica a partir de bulbos pilosos: los folículos pilosos son aislados después del tratamiento de biopsias de cuero cabelludo a la dispasa (2,4 U/ml, Boehringer Mannheim, D), durante una noche a +04°C. Después del aislamiento, los folículos pilosos son micro-disecados para aislar la parte del bulbo piloso. Se aíslan así 80 bulbos pilosos y se colocan en un tampón de lisis apropiado para la extracción proteico y el análisis en transferencia western.

- Extracción proteica a partir de cultivo de melanocitos: los melanocitos cultivados en medio M2 (PromoCell, Heidelberg, D) son lisados con un mismo tampón de lisis apropiado para la extracción proteica y el análisis de transferencia western.

40 La transferencia western (véase el protocolo en Maniatis *et al*.) se realiza con los anticuerpos siguientes: α PEP8h, anticuerpos policlonal específico de la TRP-2 humana dada por Dr VJ Hearing (NIH, Bethesda, USA), y T311, anticuerpo monoclonal específico de la tirosina humana (Novocastra, New Castle, UK).

45 Se observa (figura 3) que la tirosina es detectada en los extractos de bulbos pilosos. La enzima no es detectada en los extractos de vaina epitelial externa. La expresión de la tirosina está regulada. Esta enzima no está expresada o lo está poco, en los melanocitos inactivos (que no producen melanina), es el caso de los melanocitos contenidos en el cuero cabelludo inter-folicular de individuo caucásico.

Por otra parte, la DOPAcromo tautomerasa (TRP-2) no es detectada ni en los extractos de bulbo ni en los extractos de vaina epitelial externa. La expresión de la TRP-2 no sigue a la de la tirosina y la inducción de la melanogénesis, no está expresada en los melanocitos activos de los bulbos pilosos.

Ejemplo 3 – Composiciones

50 - Loción capilar

Agente mimético de la actividad de la DOPAcromo tautomerasa	0,5 g
Propilenglicol	20 g

ES 2 431 309 T3

Etanol a 95°		30 g
Agua	csp	100 g

Esta loción se aplica cotidianamente sobre las zonas a tratar y preferentemente sobre el conjunto del cuero cabelludo durante al menos 10 días y preferiblemente 1 a 2 meses.

5 Se constata entonces una disminución de la aparición de cabellos blancos o grises y una repigmentación del cabello gris.

- Champú tratante

Agente mimético de la actividad de la DOPAcromo tautomerasa		1,5 g
Poligliceril 3-hidroxilariléter		26 g
Hidroxipropilcelulosa vendida bajo la denominación de Klucell G por la compañía Hercules		2 g
Conservantes		ps
Etanol 95°		50 g
Agua	csp	100 g

Este champú se utiliza a cada lavado con un tiempo de reposo de aproximadamente un minuto. Un uso prolongado, del orden de dos meses, conduce a la repigmentación progresiva del cabello gris.

10 Este champú puede asimismo ser utilizado a título preventivo a fin de retrasar el blanqueamiento del cabello.

- Gel tratante

Agente mimético de la actividad de la DOPAcromo tautomerasa		0,75 g
Aceites esenciales de eucalipto		1 g
Econozol		0,2 g
lauril poligliceril-6-cetearil glicoéter		1,9 g
Conservantes		cs
Carbopol 934P vendido por la compañía BF Goodrich Corporation		0,3 g
Agente de neutralización		cs pH 7
Agua	csp	100 g

Este gel se aplica sobre las zonas a tratar dos veces por día (por la mañana y por la tarde) con un masaje final. Después de tres meses de aplicación, se observa una repigmentación del pelo o del cabello de la zona tratada.

15 LISTADO DE SECUENCIAS

SEC ID N° 1: 5'- AACATCCATTTCCTTGAGTCCTCCTGTCTC -3'

SEC ID N° 2: 5'- AAAGGACTCAAGGAATGGATGCCTGTCTC -3'

SEC ID N° 3: 5'- AAGTGATGAGCCTTCATAATTCCTGTCTC-3'

SEC ID N° 4: 5'- AAAATTATGAAGGCTCATCACCTGTCTC -3'

20 SEC ID N° 5: 5'- AATCCTCACTGTTCCCTTCTTGCCTGTCTC -3'

SEC ID N° 6: 5'-AACAAGAAGGAACAGTGAGGACCTGTCTC -3'

REIVINDICACIONES

1. Utilización cosmética no terapéutica de un agente mimético de la actividad de la DOPAcromo tautomerasa, como agente protector de los melanocitos del folículo piloso, siendo dicho agente mimético de la actividad de la DOPAcromo tautomerasa un complejo salen-manganeso.
- 5 2. Utilización según la reivindicación 1, caracterizada por que el agente mimético de la actividad de la DOPAcromo tautomerasa está destinado a luchar contra la desaparición de los melanocitos del folículo piloso manteniendo y/o regenerando la población de melanocitos activos del bulbo y de los melanocitos quiescentes de la región superior del folículo piloso.
- 10 3. Utilización según una de las reivindicaciones 1 ó 2, caracterizada porque el agente mimético de la actividad de la DOPAcromo tautomerasa está destinado a favorecer la renovación cíclica de la unidad folicular de pigmentación.
4. Utilización según una de las reivindicaciones 1 a 3, caracterizada por que el agente mimético de la actividad de la DOPAcromo tautomerasa está destinado a prevenir y/o limitar y/o detener el desarrollo de la canicie.
5. Utilización según una de las reivindicaciones 1 a 3, caracterizada por que el agente mimético de la actividad de la DOPAcromo tautomerasa está destinado a mantener la pigmentación natural del cabello y/o del pelo gris.
- 15 6. Composición cosmética para luchar contra la canicie que comprende, en un medio cosméticamente aceptable, al menos un complejo salen-manganeso, estando dicho complejo salen-manganeso asociado a otro activo seleccionado entre los agentes para luchar contra los estados descamativos del cuero cabelludo, unos agentes que favorecen el nuevo crecimiento del cabello, unos extractos vegetales con actividad propigmentante.
- 20 7. Composición según la reivindicación 6, caracterizada por que comprende una cantidad de agente mimético de la actividad de la DOPAcromo tautomerasa comprendida entre el 0,001 y el 10% en peso por volumen, preferiblemente entre el 0,01 y el 5% en peso por volumen y aún más preferiblemente entre el 0,1 y el 1% en peso por volumen.
8. Composición según cualquiera de las reivindicaciones 6 a 7, caracterizada por que está adaptada a una administración por vía oral.
- 25 9. Composición según cualquiera de las reivindicaciones 6 a 7, caracterizada por que está adaptada a una aplicación tópica sobre el cuero cabelludo y/o sobre las zonas de la piel recubiertas de pelo.
10. Composición según la reivindicación 9, caracterizada por que es una crema o un gel de peinado, una loción capilar, en particular una loción de moldeado o una loción tratante o una loción reestructurante para el cabello, una composición de tinte, un champú o un acondicionador.
- 30 11. Composición según cualquiera de las reivindicaciones 6 a 10, caracterizada por que el agente mimético de la actividad de la DOPAcromo tautomerasa está encapsulado en un revestimiento tal como unas microesferas, unas nanoesferas, unos oleosomas o unas nanocápsulas.
12. Composición según la reivindicación 11, caracterizada por que el revestimiento en el que el agente mimético de la actividad de la DOPAcromo tautomerasa está encapsulado tiene un diámetro inferior o igual a 10 μm .
- 35 13. Procedimiento de tratamiento cosmético no terapéutico de la canicie, caracterizado por que se administra o se aplica sobre la zona a tratar una composición cosmética que comprende, en un medio cosméticamente aceptable, al menos un complejo salen-manganeso o una composición según una de las reivindicaciones 6 a 12.
- 40 14. Procedimiento de tratamiento cosmético no terapéutico, destinado a mantener la pigmentación natural del cabello y/o del pelo gris o blanco, caracterizado por que se administra o se aplica sobre la zona a tratar una composición cosmética que comprende, en un medio cosméticamente aceptable, al menos un complejo salen-manganeso o una composición según una de las reivindicaciones 6 a 12.

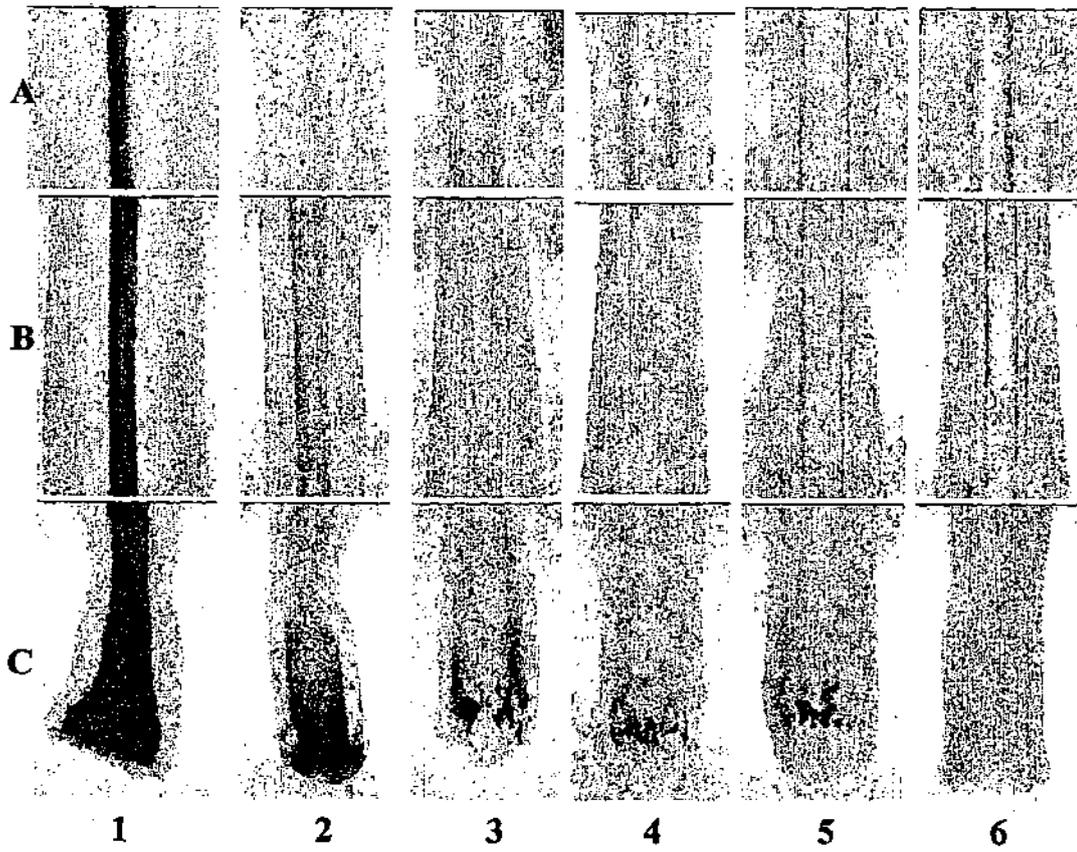


FIGURA 1

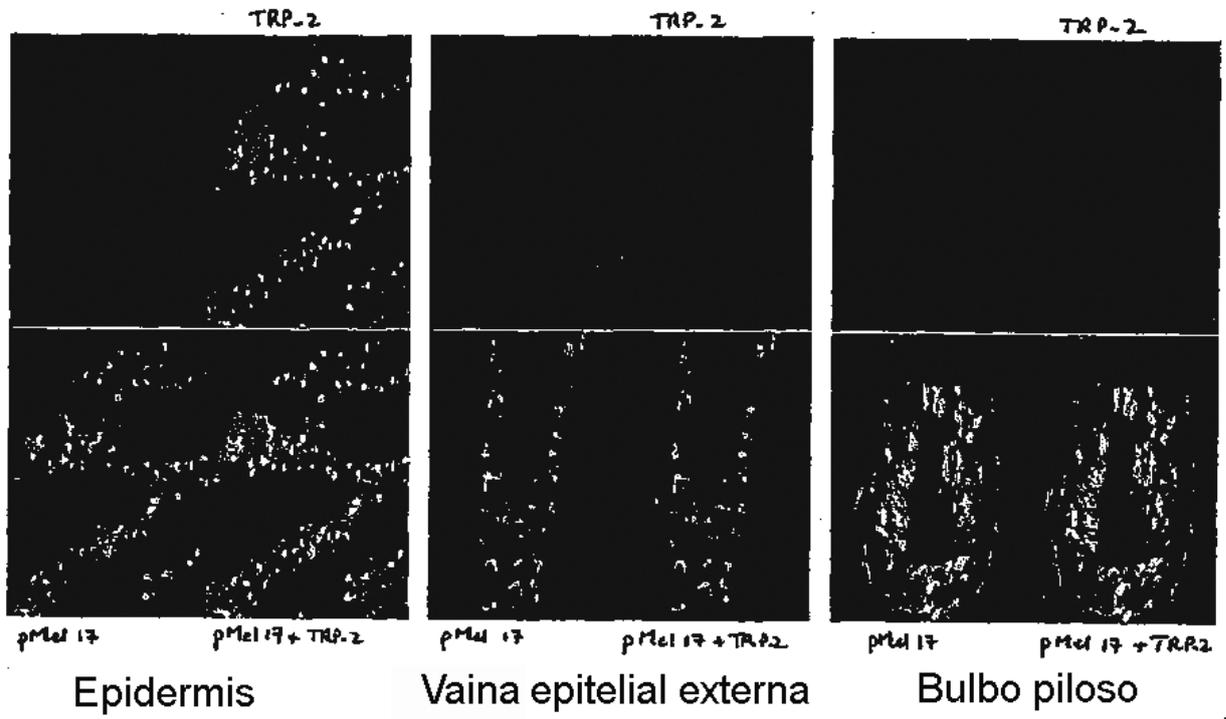


FIGURA 2

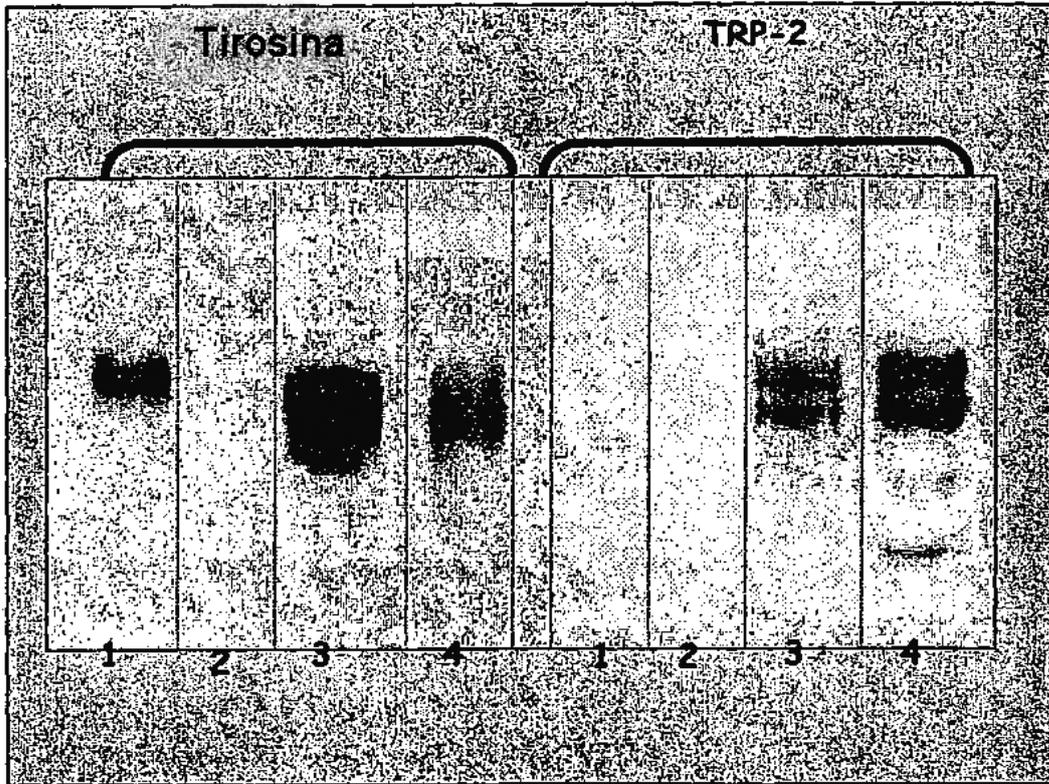


FIGURA 3