

19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 435 440**

51 Int. Cl.:

A61K 36/704 (2006.01)

A61K 33/38 (2006.01)

A61K 8/19 (2006.01)

A61P 17/14 (2006.01)

A61Q 7/00 (2006.01)

A61K 8/97 (2006.01)

A61K 8/81 (2006.01)

A61K 8/64 (2006.01)

A61K 8/11 (2006.01)

A61K 8/02 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **10.02.2009 E 09839852 (2)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **14.08.2013 EP 2396010**

54 Título: **Composición que comprende nanopartículas de plata y extractos de Polygonum multiflorum Thunb. y utilización de la misma**

45 Fecha de publicación y mención en BOPI de la traducción de la patente:
19.12.2013

73 Titular/es:

TSAI, MINGFEN (100.0%)
No. 6, Lane 288 Ho-Ping 1st Road Kaohsiung
Taiwan, CN

72 Inventor/es:

TSAI, MINGFEN

74 Agente/Representante:

CURELL AGUILÁ, Mireia

ES 2 435 440 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 nanopartículas de plata y extractos de *Polygonum multiflorum Thunb.* y utilización de la misma.

Campo de la invención

La presente invención se refiere a una composición farmacéutica que comprende una cantidad eficaz de nanopartículas de plata y extractos de *Polygonum multiflorum Thunb.*, y a la utilización de dicha composición farmacéutica en la preparación de un medicamento para aumentar el crecimiento del pelo en un individuo.

Antecedentes de la invención

Las nanopartículas metálicas han atraído cada vez más la atención de la comunidad química por sus importantes aplicaciones en diversas áreas, como la catálisis y la electrónica a nanoescala (referencias: (a) El-Sayed, M. A. Acc. Chem. Res. 2004, 37, 326. (b) Ho, C.-M.; Yu, W.-Y.; Che, C.-M. Angew. Chem. Int. Ed. 2004, 43, 3303. (c) Lang, H.; May, R. A.; Iversen, B. L.; Chandler, B. D. J. Am. Chem. Soc. 2003, 125, 14832. (d) Lewis, L. N. Chem. Rev. 1993, 93, 2693). Recientemente, se ha dedicado mucho esfuerzo al desarrollo de aplicaciones biomédicas con nanopartículas metálicas. Aunque se han logrado avances significativos en el marcaje biológico (referencias: (a) Nicewamer-Pena, S. R.; Freeman, R. G.; Reiss, B. D.; He, L.; Pena, D. J.; Walton, I. D.; Cromer, R.; Keating, C. D.; Natan, M. J. Science 2001, 294, 137. (b) Elghanian, R.; Storhoff, J. J.; Mucic, R. C.; Letsinger, R. L.; Mirkin, C. A. Science 1997, 277, 1078), en la bibliografía se han documentado muy pocas aplicaciones terapéuticas de dichas nanopartículas metálicas. Un ejemplo notable son las propiedades antimicrobianas de las nanopartículas de plata, que se han utilizado para la cicatrización de heridas (Wright, J. B.; Lam, K.; Hansen, D.; Burrell, R. E. Am. J. Inf. Cont. 1999, 27, 344).

El documento KR 2008 0035848 A da a conocer composiciones que comprenden un extracto de *Polygonum multiflorum*, nanopartículas de plata, agua purificada y un estabilizador, concretamente proteínas o péptidos presentes en extractos vegetales, tales como un extracto de soja negra.

El documento WO 2007/014497 A1 da a conocer una composición farmacéutica para aumentar el crecimiento del pelo que comprende una cantidad eficaz de nanopartículas de plata, por lo menos un estabilizador y por lo menos un diluyente farmacéuticamente aceptable.

El documento WO 2007/046636 A1 da a conocer una composición que comprende un extracto de una mezcla de hierbas que comprende *Rehmania glutinosa Libschitz* var. *purpurea* Makino, *Polygonum multiflorum Thunb* y *Polygonatum sibiricum Red.* Se ha podido observar un efecto promotor sobre el crecimiento de células epiteliales del pelo y el crecimiento del pelo, así como un efecto inhibitor sobre la caída del mismo.

La alopecia areata es una afección en la que se produce una pérdida del pelo en el cuero cabelludo y otras partes del cuerpo. Se ha documentado su asociación con la autoinmunidad, por la cual los folículos pilosos son fijados por el sistema inmunitario, lo que provoca la detención del crecimiento del pelo. Otra observación es que en el cuero cabelludo de los hombres genéticamente predispuestos a sufrir pérdida de pelo de patrón masculino, en los que la fase de crecimiento del pelo se acorta, existen niveles elevados de una hormona natural llamada dihidrotestosterona (DHT). En último término, los pelos devienen tan pequeños que resultan prácticamente invisibles. Si no se detiene, este proceso puede provocar la típica calvicie masculina.

La alopecia areata suele comenzar con una o más placas pequeñas, redondas y lisas de calvicie en el cuero cabelludo, y puede progresar hasta la pérdida total del pelo del cuero cabelludo (alopecia total) o la pérdida total del pelo del cuerpo (alopecia universal). Desde el punto de vista epidemiológico, la alopecia areata afecta aproximadamente al 1,7 por ciento de la población de todo el mundo, incluidos más de 4,7 millones de personas sólo en los Estados Unidos, y se trata de una afección o enfermedad que tiene un profundo impacto en la imagen individual de la persona y su confianza en sí misma, por lo que afecta a su calidad de vida, tanto en el trabajo como en la escuela.

La alopecia areata puede afectar a hombres y mujeres de todas las edades y razas. Su aparición se produce con mayor frecuencia en la infancia o primera edad adulta, y puede ser muy nociva desde el punto de vista psicológico. Aunque no es mortal, la alopecia areata afecta sin duda a la calidad de vida de la persona, y su aparición repentina, sus episodios recurrentes y su curso impredecible tienen un profundo impacto psicológico en la vida de los afectados por esta enfermedad.

Contenido de la invención

El uso combinado de nanopartículas de plata recubiertas con PVP y *Polygonum multiflorum Thunb* tiene un efecto sinérgico en la promoción del crecimiento del pelo. Una composición farmacéutica que comprende una cantidad

eficaz de nanopartículas de plata y extractos de *Polygonum multiflorum Thunb* es más potente que las nanopartículas de plata aisladas para inducir el crecimiento del pelo.

5 Por consiguiente, la presente invención se refiere a una composición farmacéutica que comprende una cantidad eficaz de nanopartículas de plata, por lo menos un estabilizador, extractos en etanol de las raíces de *Polygonum multiflorum Thunb* y por lo menos un diluyente farmacéuticamente aceptable.

10 El estabilizador puede ser, por ejemplo, una o más proteínas y/o péptidos, preferentemente transferrina o albúmina sérica humana, y más preferentemente albúmina sérica humana (ASH). En una forma de realización, el estabilizador es la polivinilpirrolidona.

En una forma de realización, las nanopartículas de plata de la composición farmacéutica tienen un diámetro comprendido entre 1 nm y 100 nm.

15 En una forma de realización, la concentración de las nanopartículas de plata de la composición farmacéutica está comprendida entre 10 μM y 10 mM, y preferentemente entre 10 μM y 1 mM.

20 En una forma de realización, la concentración de los extractos de *Polygonum multiflorum Thunb* de la composición farmacéutica está comprendida entre 1 g/l y 1.000 g/l, y preferentemente entre 1 g/l y 100 g/l.

25 En una forma de realización preferida, la composición farmacéutica según la presente invención comprende un diluyente que se selecciona de entre el grupo que comprende agua, etanol, DMSO, acetonitrilo, tampón Hepes, tampón de fosfato, tampón de Tris, tampón de citrato, suero o cualquier otro tipo de disolvente o solución fisiológicamente relevante, y una mezcla de los mismos.

La presente invención se refiere asimismo a la utilización de una composición farmacéutica tal como se ha descrito anteriormente en la preparación de un medicamento para aumentar el crecimiento del pelo en un individuo.

30 La presente invención se refiere asimismo a la utilización de una composición farmacéutica que comprende una cantidad eficaz de nanopartículas de plata y extractos en etanol de raíces de *Polygonum multiflorum Thunb* en la preparación de un medicamento para aumentar el crecimiento del pelo en un individuo.

35 En la utilización según la presente invención, la composición farmacéutica comprende una cantidad eficaz de nanopartículas de plata, extractos en etanol de raíces de *Polygonum multiflorum Thunb*, por lo menos un estabilizador y por lo menos un diluyente farmacéuticamente aceptable.

40 En la utilización según la presente invención, el estabilizador puede ser, por ejemplo, una o más proteínas y/o péptidos, preferentemente transferrina o albúmina sérica humana, y más preferentemente albúmina sérica humana (ASH). En una forma de realización, el estabilizador es la polivinilpirrolidona.

En una forma de realización de la utilización según la presente invención, las nanopartículas de plata de la composición farmacéutica tienen un diámetro comprendido entre 1 nm y 100 nm.

45 En una forma de realización de la utilización según la presente invención, la concentración de las nanopartículas de plata de la composición farmacéutica está comprendida entre 10 μM y 10 mM, y preferentemente entre 10 μM y 1 mM.

50 En una forma de realización de la utilización según la presente invención, la concentración de los extractos de *Polygonum multiflorum Thunb* de la composición farmacéutica está comprendida entre 1 g/l y 1.000 g/l, y preferentemente entre 1 g/l y 100 g/l.

55 En una forma de realización preferida de la utilización según la presente invención, la composición farmacéutica según la presente solicitud comprende un diluyente que se selecciona de entre el grupo que comprende agua, etanol, DMSO, acetonitrilo, tampón Hepes, tampón de fosfato, tampón de Tris, tampón de citrato, suero o cualquier otro tipo de disolvente o solución fisiológicamente relevante, y una mezcla de los mismos.

El receptor preferentemente es humano.

60 Existen numerosos métodos para generar nanopartículas de plata con diferentes formas y tamaños (referencias: (a) Raveendran, P.; Fu, J.; Wallen, S. L. J. Am. Chem. Soc. 2003, 125, 13940. (b) Sun, Y.; Xia, Y. Science 2002, 298, 2176. (c) Esumi, K.; Suzuki, A.; Yamahira, A.; Torigoe, K. Langmuir 2000, 16, 2604).

65 La albúmina sérica humana (ASH) es la proteína plasmática más abundante del sistema circulatorio. Trabajos previos han demostrado que esta proteína sérica se puede utilizar para estabilizar diversas nanopartículas metálicas (referencia: Xie, H.; Tkachenko, A. G.; Glomm, W. R.; Ryan, J. A.; Brennaman, M. K.; Papanikolas, J. M.; Franzen, S.; Feldheim, D. L. Anal. Chem. 2003, 75, 5797).

La composición farmacéutica según la presente invención, que comprende nanopartículas de plata recubiertas con PVP y *Polygonum multiflorum Thunb*, tiene un efecto sinérgico en la promoción del crecimiento del pelo.

5 Breve descripción de las figuras

La figura 1 es una fotografía de *Polygonum multiflorum Thunb*.

La figura 2 es una fotografía de comprimidos de PMT disponibles en el mercado a través de Shou Wu Pian, Shanghai Lei Shang Yun Pharmaceutical Co. Ltd.

La figura 3 muestra una película transparente de 1 cm x 1 cm con una rejilla de cuadrados de 0,2 cm x 0,2 cm.

La figura 4 muestra fotografías de la zona anterior del lomo de ratones tras el tratamiento durante 8 semanas con control del vehículo (sólo PVP, imagen A), nanopartículas de plata recubiertas con PVP (nanoAg-PVP, imagen B) o nanopartículas de plata recubiertas con PVP y mezcladas con un 5% de minoxidil, imagen C). Las nanoAg-PVP parecen inducir el crecimiento de pelo nuevo, mientras que la adición de un 5% de minoxidil reduce este efecto.

La figura 5 muestra fotografías de ratones tras el tratamiento durante 8 semanas con control del vehículo (sólo PVP), un 10% de PMT solo, una concentración 0,1 mM de nanopartículas de plata recubiertas con PVP (nanoAg-PVP) o una mezcla de nanoAg-PVP 0,1 mM y un 10% de PMT.

La figura 6 muestra el porcentaje de superficie cubierta de pelo en la zona de aplicación de apósito de la piel de ratones tratados sólo con PVP (control del vehículo), un 10% de PMT solo, una concentración 0,1 mM de nanoAg-PVP y una concentración 0,1 mM de nanoAg-PVP más un 10% de PMT tras 3, 4, 5, 6, 7 y 8 semanas de tratamiento.

La figura 7 muestra el porcentaje de superficie cubierta de pelo en la zona de aplicación de apósito de la piel de ratones lampiños, medido tras 8 de semanas de tratamiento con soluciones que contienen (1) sólo nanoAg-PVP (2) nanoAg-PVP más un 1% (p/v) de PMT (3) nanoAg-PVP más un 10% de PMT y (4) nanoAg-PVP más un 50% de PMT (n = 6, 7, 8 y 7, respectivamente; véase la tabla 3.1).

La figura 8 muestra la tinción con Ki-67 en la piel (sección transversal) de ratones lampiños tratados por vía transcutánea durante 8 semanas con una concentración 0,1 mM de nanoAg-PVP o nanoAg-PVP 0,1 mM + 10% de PMT.

La figura 9 muestra la hibridación *in situ* (ISH) para determinar células CD34 en la sección transversal (400x) de la piel tratada con nanoAg-PVP o nanoAg-PVP + PMT.

La figura 10 muestra el número de células CD34 (por ISH) por folículo piloso (contadas en la sección transversal de la vaina del pelo, a 400x, de modo similar a como se muestra en la figura 9) en la zona de aplicación de apósito de la piel de ratones con distintos tratamientos.

La figura 11 muestra la medición del peso corporal de ratones tratados en varias condiciones.

45 Modo de poner en práctica la invención

A continuación, se describe la presente invención con mayor detalle en los siguientes ejemplos. Sin embargo, no se debe considerar que la presente invención resulte limitada por dichos ejemplos en ningún sentido. El experto en la materia apreciará cómo se pueden variar las preparaciones de ejemplo para obtener los resultados deseados.

Ejemplos

55 Materiales y métodos

Materiales. Todos los productos químicos, salvo que se indique lo contrario, se adquirieron a través de Sigma-Aldrich Chemical Co.

60 Lavado de los utensilios de vidrio para la preparación de nanopartículas de plata

El matraz Erlenmeyer se sumergió en el baño de base (200 g de granulos de hidróxido de sodio en 2 l de agua bidestilada (ddH₂O)). El matraz se lavó con ddH₂O, a continuación con agua Milli-Q y finalmente con ácido nítrico concentrado. Se hizo hervir una mezcla de ácido clorhídrico concentrado y ácido nítrico concentrado (relación en volumen = 1:3) en el matraz Erlenmeyer durante 30 minutos a fin de eliminar todos los metales presentes en el recipiente. A continuación, el matraz se lavó con agua Milli-Q antes de proceder a la síntesis de las nanopartículas de plata.

Preparación de nanopartículas de plata recubiertas con albúmina sérica humana (ASH)

5 Se incorporaron 180 mg/l de citrato de sodio dihidratado tribásico y 16 mg/l de nitrato de plata en 1 l de agua Milli-Q y se mezcló durante aproximadamente 5 minutos. A continuación, se añadieron 50 mg de borohidruro de sodio en polvo a la mezcla y se mezcló durante 20 minutos. A continuación se observó una solución de color amarillo, a la cual se añadieron 12 g de ASH.

10 Cuando se disolvió toda la albúmina sérica humana (ASH), la solución se filtró a través de un filtro de 22 µm. La solución se guardó a 4°C antes de su utilización.

Preparación de nanopartículas de plata recubiertas de polivinilpirrolidona (PVP)

15 Para preparar 100 ml de nanopartículas de plata recubiertas con polivinilpirrolidona (PVP), se disolvieron 5 g de PVP-K30 (de Sigma-Aldrich Ltd, EE. UU.) en 100 ml de etanol al 60%, y tras la compleción de la disolución se añadieron 100 mg de nitrato de plata en polvo. A continuación, se añadieron 25 mg de NaBH₄ en 1 ml de agua Milli-Q a la solución. La solución final, que contenía una concentración 0,1 mM de nanopartículas de plata, se guardó a 4°C antes de su utilización.

Administración tópica de las sustancias químicas evaluadas a ratones lampiños

20 Se adquirieron ratones lampiños atímicos con una edad de cuatro semanas con antecedentes de Balb/c a través del Jackson Laboratory, EE. UU. Los animales se dividieron aleatoriamente en diferentes grupos a fin de aplicarles diferentes tratamientos de apósitos diarios en un área de 1 cm x 1 cm en la parte posterior del tronco (zona del cuello o zona anterior del lomo) durante 8 semanas. La gasa de 1 cm x 1 cm estaba empapada con una solución de nanopartículas de plata (correspondientemente recubiertas con ASH o con PVP) y se cubrió con otra venda de crepé de algodón de 4 cm de ancho sin estirar, seguida de otra venda de 4 cm de ancho estirada. Finalmente, el apósito se fijó con cinta adhesiva. Tras 8 semanas de tratamiento, los ratones se sacrificaron por dislocación cervical, se recogieron fragmentos de piel de las zonas de aplicación del apósito y éstos se fijaron con paraformaldehído al 4% para su análisis.

Preparación de *Polygonum multiflorum Thunb* (PMT)

35 Se prepararon y se aislaron tres tipos de muestras a partir del extracto en etanol de las raíces de *Polygonum multiflorum Thunb*; son:

(A) Extractos de la raíz (véase la figura 1)

40 Se trituraron 100 g de raíces secas de PM y se sumergieron en 1.000 ml de etanol al 50% (es decir, la relación "raíces frente a etanol al 50%" fue de 1:10). Tras 48 horas, se recogió la solución, se filtró y posteriormente se concentró a presión reducida con un rotavapor a vacío. A continuación, los extractos concentrados se congelaron y secaron, y se guardaron a 4°C hasta su utilización. Normalmente, se obtiene una cantidad de 10 g de extractos secos a partir de 100 g de las raíces secas de PMT. Para los experimentos, se disolvieron 100 g de los extractos secos en polvo en 1.000 ml (es decir, un 10% p/v) de ddH₂O a 70°C y, tras su completa disolución, la solución de PMT se guardó a 4°C hasta su utilización.

(B) Disolución de comprimidos de PMT disponibles en el mercado

50 La solución de *Polygonum multiflorum Thunb* (PMT) que se utiliza en este estudio también se preparó disolviendo 100 g de comprimidos de PMT (disponibles en el mercado a través de Shou Wu Pian, Shanghai Lei Yun Shang Pharmaceutical Co. Ltd., China; véase la figura 2) en 1.000 ml de ddH₂O a 70°C y, tras la completa disolución, la solución de PMT se guardó a 4°C hasta su utilización.

Mezcla de PMT con nanopartículas de plata recubiertas con PVP

55 Para obtener la mezcla de nanopartículas de plata recubiertas de PVP con PMT, la solución de nanopartículas de plata recubiertas de PVP se preparó tal como se ha descrito anteriormente, excepto porque la PVP se disuelve en etanol absoluto en lugar de etanol al 60%. Se mezcló una solución de 100 g/l de PMT disuelto con una solución de nanopartículas de plata recubiertas con PVP 0,17 mM en una relación de volumen de 4:6.

Cálculo del área cubierta de pelo en la piel tratada

60 El área cubierta de pelo se mide colocando una película transparente de 1 cm x 1 cm (con una rejilla de cuadrados de 0,2 cm x 0,2 cm, tal como se muestra en la figura 3) encima de la piel.

65

El porcentaje de cobertura de pelo se calcula en ratones con un crecimiento visible de pelo nuevo tras el tratamiento mediante la siguiente ecuación:

$$\frac{(\text{Número de cuadrados cubiertos de pelo})}{25} \times 100\%$$

5 Hibridación *in situ* (ISH) para determinar células CD34 e inmunotinción con Ki-67

La hibridación *in situ* para células CD34 de ratón se llevó a cabo en secciones fijadas sobre parafina de 5 µm de espesor de tejidos fijados con formalina. Se desparafinaron las películas fijadas con parafina mediante xileno y se rehidrataron con un gradiente de concentración de etanol. Tras el desparafinado, las secciones se incubaron en una solución que contenía HCl 0,2 N y un 0,3% de trítón a temperatura ambiente durante 30 minutos, y a continuación se digirieron con 10 µg/ml de proteinasa K (Invitrogen) a 37°C durante 15 minutos. La digestión con PK se detuvo con glicina 0,1 M durante 10 minutos a temperatura ambiente. Las secciones se lavaron en 2X SSC y se hibridaron con una sonda de ARNc sentido y antisentido 2 ng/µl marcada con DIG durante la noche a 46°C en un tampón de hibridación que contenía formamida desionizada al 50%, 2X SSC, sulfato de dextrano al 10%, 5x solución de Denhardt, 0,25 mg/ml de ARNt de levadura y SDS al 0,5%. Las secciones se lavaron en 2x SSC/50% de formamida a 46°C durante 15 minutos, dos veces, a continuación en 0,1X SSC/30% de formamida a 46°C durante 15 minutos, a continuación en 0,1X SSC/30% de formamida a temperatura ambiente durante 15 minutos, y en 0,1X SSC a temperatura ambiente durante 15 minutos. Se detectaron las sondas hibridadas utilizando fragmentos de F(ab) anti-DIG de oveja conjugados con fosfatasa alcalina (Roche) y colorimetría con solución de NBT/BCIP (Roche). A continuación se proporcionó a las secciones medio de fluorescencia con DAPI (Vector Laboratories). La sonda de CD34 de ratón marcada con DIG corresponde a los nucleótidos 379-773 [NM_133654 (antígeno CD34 (CD34) de *Mus musculus*, ARNm)].

La tinción de Ki-67 se realizó en secciones de 5 µm de grosor fijadas en parafina de tejido cutáneo fijado con formalina. Se desparafinaron las películas fijadas con parafina mediante xileno y se rehidrataron con un gradiente de concentración de etanol. A continuación, las secciones se calentaron en un horno de microondas en tampón de citrato de sodio 10 mM (pH 6,0) durante 15 minutos. Posteriormente, los portaobjetos se tiñeron con anticuerpo anti-Ki-67 de conejo 1:200 (LabVision, Estados Unidos) o con la misma concentración de IgG de conejo purificada (Zymed, EE. UU.; como isotipo) a 4°C durante la noche. A continuación, las secciones se incubaron con anticuerpo anti-IgG de conejo (H + L) de cabra 1:200 AlexaFluor 594 (Molecular Probes, EE. UU.) a temperatura ambiente durante 1 hora. Finalmente, se proporcionó a las secciones VECTASHIELD® con DAPI (Vector Laboratories, Estados Unidos). La imagen se estudió en un microscopio de fluorescencia (microscopio Nikon E600).

En paralelo al experimento, se incluyeron controles positivos y negativos. Los controles positivos fueron secciones de bazo de ratón. Los controles negativos fueron secciones de piel teñidas con IgG de conejo purificada como anticuerpo primario.

La tinción nuclear de Ki-67 se consideró positiva. El porcentaje de células positivas a Ki-67 se calculó del siguiente modo:

$$\% \text{ de células positivas a Ki-67} = \frac{\text{Número de células positivas a Ki-67}}{\text{Número de células positivas a DAPI}}$$

Medición del peso corporal de los animales sometidos a ensayo

45 Los pesos corporales de los ratones se midieron con una balanza eléctrica dos veces por semana.

Resultados

50 1. La aplicación transcutánea (tópica) de una concentración 0,1 mM de nanopartículas de plata (nanoAg) recubiertas con PVP (nanoAg-PVP) indujo crecimiento del pelo en ratones lampiños, mientras que la mezcla de nanoAg-PVP con un 5% de minoxidil redujo dicho efecto.

55 La figura 4 muestra fotografías de la zona anterior del lomo de ratones tras el tratamiento durante 8 semanas con control del vehículo (sólo PVP, imagen A), nanopartículas de plata recubiertas con PVP (nanoAg-PVP, imagen B) o nanopartículas de plata recubiertas con PVP y mezcladas con un 5% de minoxidil, imagen C). Las nanoAg-PVP parecen inducir el crecimiento de pelo nuevo, mientras que la adición de un 5% de minoxidil reduce este efecto.

Tabla 1.1. Porcentaje de superficie cutánea cubierta de pelo en la zona de aplicación de apósito tras 8 semanas de tratamiento con control del vehículo, nanoAg-PVP 0,1 mM o nanoAg-PVP 0,1 mM mezcladas con un 5% de minoxidil. La adición de un 5% de minoxidil parece reducir el efecto de crecimiento del pelo de las nanoAg-PVP ($p < 0,001$ por prueba t).

Condiciones	Control del vehículo (sólo PVP)	nanoAg-PVP	nanoAg-PVP + 5% de minoxidil (MXD)
Parámetros (día 56)			
Número de ratones con crecimiento visible del pelo	0/16(0%)	13/16 (81,3%)	8/16 (50%)
% de área cubierta de pelo en la zona de aplicación del apósito (media \pm SD)	0%	72 \pm 8%	28 \pm 11%*

PS: * $p < 0,001$, en comparación con nanoAg-PVP

2. La mezcla de nanoAg-PVP más un 10% de PMT es más potente que las nanoAg-PVP solas para inducir el crecimiento del pelo, mientras que un 10% de PMT solo no tuvo ningún efecto.

Tal como se puede observar en la figura 5, la adición de PMT tiene un efecto sinérgico sobre el crecimiento del pelo de una concentración 0,1 mM de nanoAg-PVP. Los ratones se trataron durante 8 semanas con control del vehículo (sólo PVP), con un 10% de PMT solo, con una concentración 0,1 mM de nanopartículas de plata recubiertas con PVP (nanoAg-PVP) o con una mezcla de nanoAg-PVP 0,1 mM y un 10% de PMT. Los ratones tratados con nanoAg-PVP + PMT presentaron un área cubierta de pelo significativamente mayor que los tratados con nanoAg-PVP (imagen inferior derecha frente a imagen inferior izquierda).

Tabla 2.1. Porcentaje de respuesta y porcentaje de área cubierta de pelo en la zona de la piel de aplicación de apósito en ratones lampiños tratados sólo con PVP (control del vehículo), un 10% de PMT, una concentración 0,1 mM de nanoAg-PVP o nanoAg-PVP 0,1 mM más un 10% de PMT durante 8 semanas. El porcentaje de respuesta en cada grupo fue del 0%, el 0%, el 75% y el 91,7%, respectivamente. En los individuos que presentaron crecimiento del pelo, el porcentaje de área cubierta de pelo en la zona de la piel de aplicación de apósito fue del 74,5 \pm 7,4% para los ratones tratados con una concentración 0,1 mM de nanoAg-PVP, y del 88,9 \pm 8,8% para los tratados con nanoAg-PVP más un 10% de PMT.

Condiciones	sólo PVP	sólo 10% de PMT	nanoAg-PVP	nanoAg-PVP + 10% de PMT
Parámetros				
Número de ratones con crecimiento visible del pelo	0/6 (0%)	0/6 (0%)	10/12 (83,3%)	11/12 (91,7%)
% de área cubierta de pelo	0%	0%	74,5 \pm 7,4%	88,9 \pm 8,8%

En la figura 6 se puede observar el porcentaje de área cubierta de pelo en la zona de la piel de aplicación de apósito en los ratones tratados sólo con PVP (control del vehículo), con sólo un 10% de PMT, con una concentración 0,1 mM de nanoAg-PVP y con nanoAg-PVP 0,1 mM más un 10% de PMT tras 3, 4, 5, 6, 7 y 8 semanas de tratamiento. Tras 7 y 8 semanas de tratamiento, los ratones tratados con nanoAg-PVP + PMT presentaban un área cubierta de pelo significativamente mayor que los tratados sólo con nanoAg-PVP. El porcentaje de respuesta y el porcentaje real de área cubierta de pelo a las 8 semanas también se indican en la tabla 2.1 (* $p < 0,05$; ** $p < 0,01$).

3. Un 10% (p/v) de PMT es la cantidad de PMT con un efecto sinérgico más óptimo cuando se mezcla con una solución de nanoAg-PVP para promover el crecimiento del pelo.

Tabla 3.1. En experimentos separados, se midió el porcentaje de respuesta y el porcentaje de área cubierta de pelo en la piel tratada con apósito de ratones lampiños tras 8 semanas de tratamiento con soluciones que contienen (1) sólo nanoAg-PVP, (2) nanoAg-PVP más un 1% (p/v) de PMT, (3) nanoAg-PVP más un 10% de PMT y (4) nanoAg-PVP más un 50% de PMT. Se observaron efectos óptimos de promoción del crecimiento del pelo en nanoAg-PVP con adición de un 10% o un 50% de PMT (véase la figura 7)

Condiciones	sólo nanoAg-PVP	nanoAg-PVP + 1% de PMT	nanoAg-PVP + 10% de PMT	nanoAg-PVP + 50% de PMT
Parámetros				
Número de ratones con crecimiento visible del pelo	6/8 (75%)	7/8 (87,5%)	8/8 (100%)	7/8 (87,5%)
% de área cubierta de pelo	69,3 \pm 4%	69,1 \pm 6,1%	87,3 \pm 4,1%*	84,8 \pm 3,9%*

Tal como se puede observar en la figura 7, el porcentaje de área cubierta de pelo en la piel tratada con apósito de ratones lampiños se midió tras 8 semanas de tratamiento con soluciones que contienen (1) sólo nanoAg-PVP, (2) nanoAg-PVP más un 1% (p/v) de PMT, (3) nanoAg-PVP más un 10% de PMT y (4) nanoAg-PVP más un 50% de

PMT (n = 6, 7, 8 y 7, respectivamente; véase la tabla 3.1). Se observaron efectos óptimos de promoción del crecimiento del pelo para nanoAg-PVP con adición de un 10% o un 50% de PMT. *** p < 0,001 entre la adición del 0% y el 10%, y también entre el 0% y el 50%. No se observó diferencia estadística entre la adición del 0% y el 1%, o entre el 10% y el 50%.

5 4. Tanto nanoAg-PVP como nanoAg-PVP + 10% de PMT indujeron la expresión de Ki-67 y CD34 de las células en las raíces del pelo (en comparación con los ratones tratados sólo con vehículo), mientras que se observó un mayor número de células CD34+ en los ratones tratados con nanoAg-PVP + 10% de PMT.

10 La figura 8 muestra la tinción de Ki-67 en la piel (sección transversal) de ratones lampiños tratados por vía transcutánea durante 8 semanas con nanoAg-PVP 0,1 mM o nanoAg-PVP 0,1 mM + 10% de PMT. En los ratones de los dos grupos tratados habían aumentado las células Ki-67 (+) en las raíces del pelo (columna izquierda). En la columna central se observan los controles de isotipo, y en la columna de la derecha la tinción con DAPI, que muestra los núcleos celulares. Los resultados son representativos de 3 experimentos independientes.

15 La figura 9 muestra la hibridación *in situ* (ISH) para CD34 en la sección transversal (400x) de la piel tratada con nanoAg-PVP o nanoAg-PVP + PMT. En comparación con el tratamiento con control del vehículo (sólo PVP), el tratamiento con nanoAg-PVP y NanoAg-PVP + PMT indujo más expresión de ARNm de CD34 en la vaina del pelo, y se encontraron más células CD34+ en el grupo tratado con nanoAg-PVP + PMT. El control de sentido para CD34 se muestra en la columna izquierda. La contratinción con DAPI para mostrar los núcleos celulares se muestra en la fila inferior. Los resultados son representativos de 3 experimentos independientes.

20

25 La figura 10 muestra el número de células CD34+ (por ISH) por folículo piloso (contabilizadas en la sección transversal de la vaina del pelo, 400x, de manera similar a como se muestra en la figura 9) en la piel tratada con apósito de ratones con diferentes tratamientos. El tratamiento con adición de un 10% de PMT a las nanoAg-PVP indujo un número significativamente mayor de células CD34+ que el tratamiento con nanoAg-PVP (p < 0,05). Los resultados son representativos de 3 experimentos independientes.

30 5. La aplicación tópica durante 8 semanas no causó cambios apreciables en la ganancia de peso corporal.

35 La figura 11 muestra la medición del peso corporal de ratones tratados en diversas condiciones. El peso corporal de los ratones tratados se controló semanalmente, y no se observó ningún cambio significativo del peso corporal de los ratones entre los diferentes grupos a lo largo del tratamiento, lo que indica que ninguno de los tratamientos causó efectos sistémicos significativos o apreciables en las condiciones generales de los ratones. Nota: nAg = nanoAg; el PMT utilizado fue del 10% (p/v).

REIVINDICACIONES

- 5 1. Composición farmacéutica que comprende una cantidad eficaz de nanopartículas de plata, por lo menos un estabilizador, extractos en etanol de las raíces de *Polygonum multiflorum Thunb* y por lo menos un diluyente farmacéuticamente aceptable.
2. Composición farmacéutica según la reivindicación 1, en la que se utilizan una o más proteínas y/o péptidos y/o polivinilpirrolidona como estabilizadores.
- 10 3. Composición farmacéutica según la reivindicación 2, en la que la proteína se selecciona de entre el grupo que consiste en transferrina y albúmina sérica humana.
- 15 4. Composición farmacéutica según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 3, en la que las nanopartículas de plata presentan un diámetro de 1 nm a 100 nm y la concentración de las nanopartículas de plata en la composición es de 10 μ M a 10 mM.
5. Composición farmacéutica según la reivindicación 4, en la que la concentración de las nanopartículas de plata en la composición es de 10 μ M a 1 mM.
- 20 6. Composición farmacéutica según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 3, en la que la concentración de los extractos de *Polygonum multiflorum Thunb* en la composición es de 1 g/l a 1.000 g/l.
- 25 7. Composición farmacéutica según la reivindicación 6, en la que la concentración de los extractos de *Polygonum multiflorum Thunb* en la composición es de 1 g/l a 100 g/l.
- 30 8. Composición farmacéutica según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 3, en la que el diluyente se selecciona de entre el grupo que consiste en agua, etanol, DMSO, acetonitrilo, tampón Hepes, tampón de fosfato, tampón de Tris, tampón de citrato, suero o cualquier otro tipo de disolvente o solución fisiológicamente relevante, y una mezcla de los mismos.
- 35 9. Utilización de una composición farmacéutica según las reivindicaciones 1 a 8 en la preparación de un medicamento para aumentar el crecimiento del pelo en un receptor.
10. Utilización según la reivindicación 9, en la que el receptor es humano.

Fig. 1

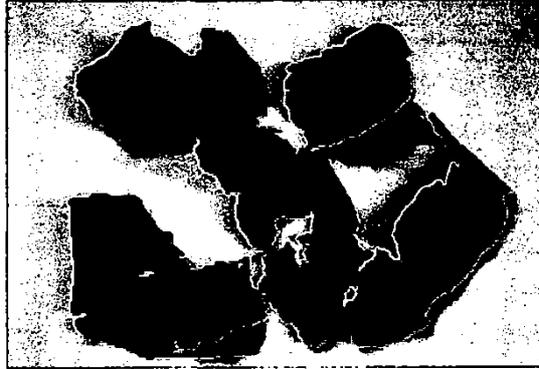


Fig. 2



Fig. 3

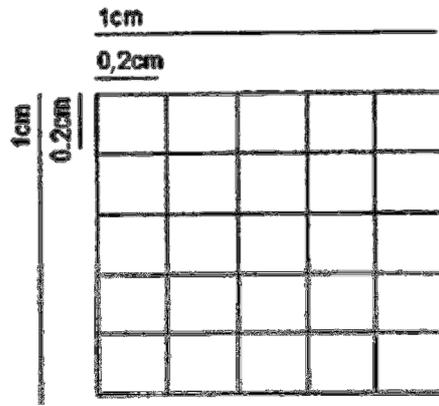
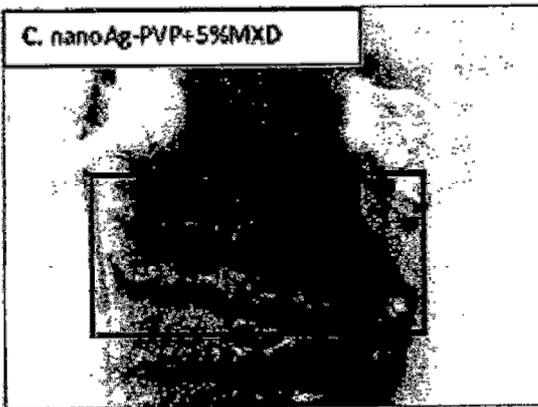
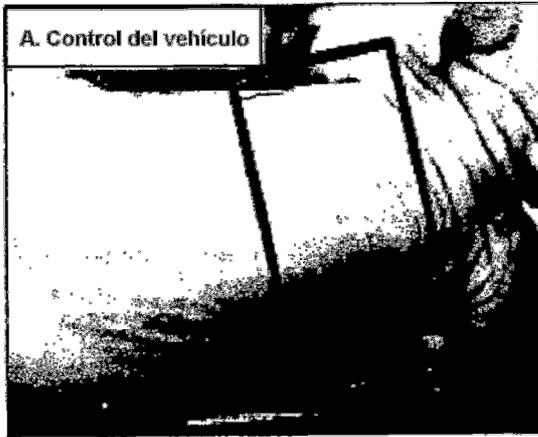
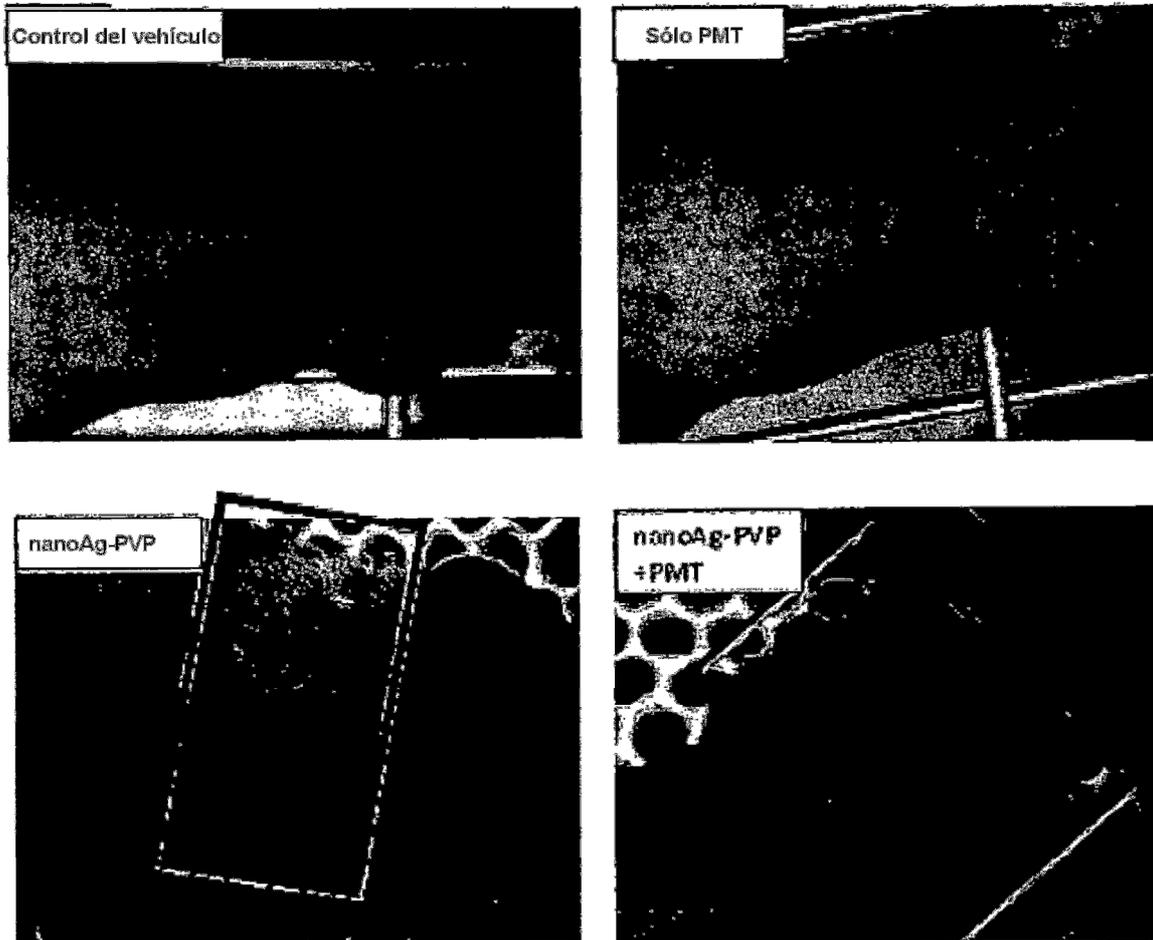


Fig. 4



PS: : Zona de aplicación de apósito

Fig. 5



PS:  : zona de aplicación de apósito

Fig. 6

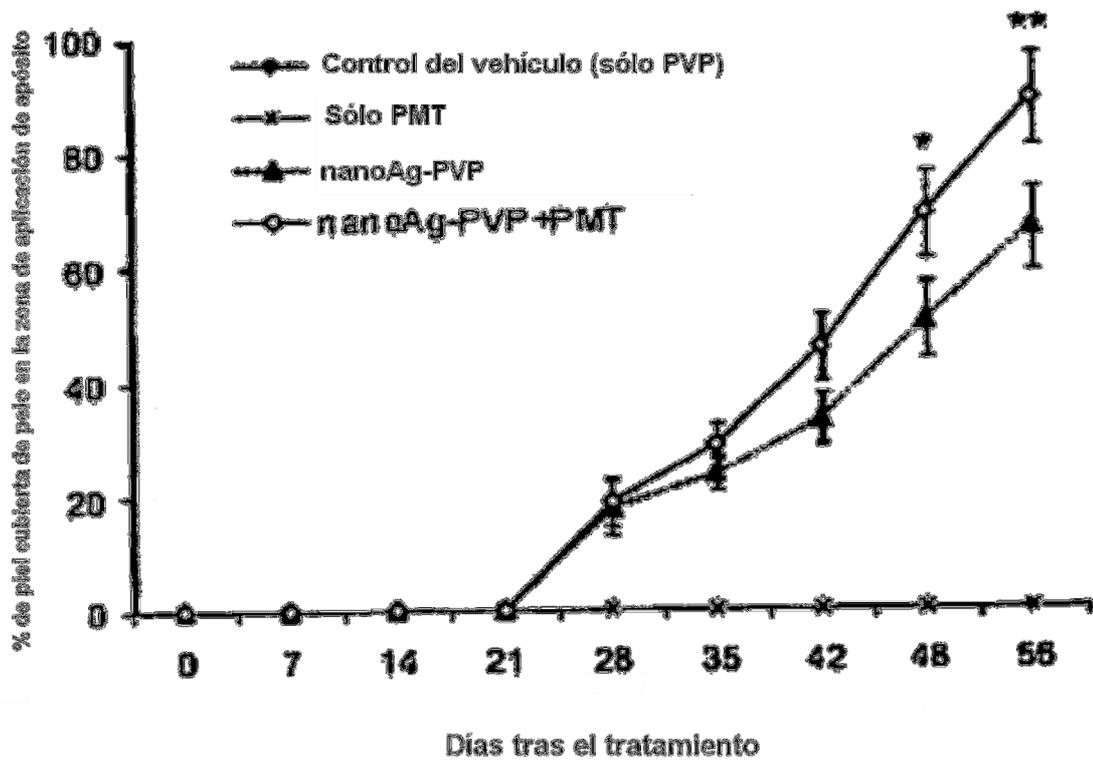


Fig. 7

Fig 3.1

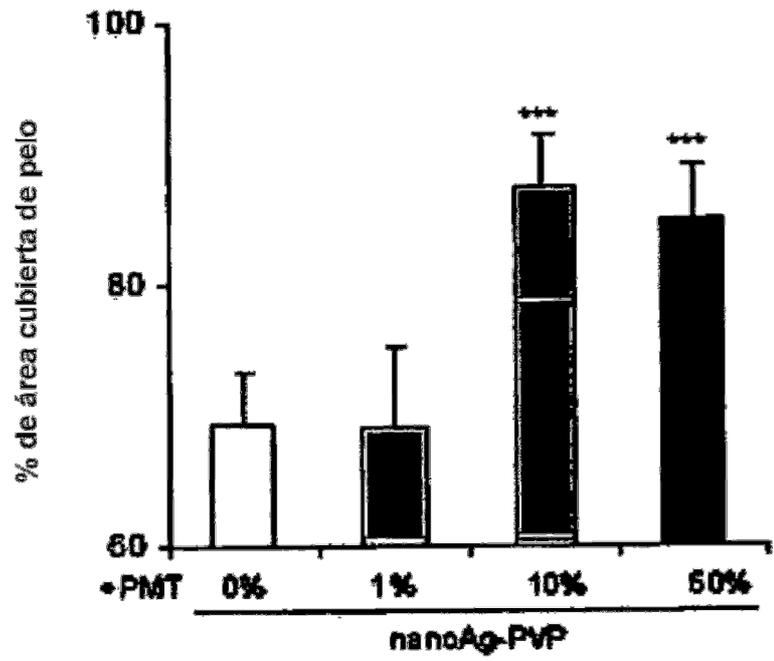


Fig. 8

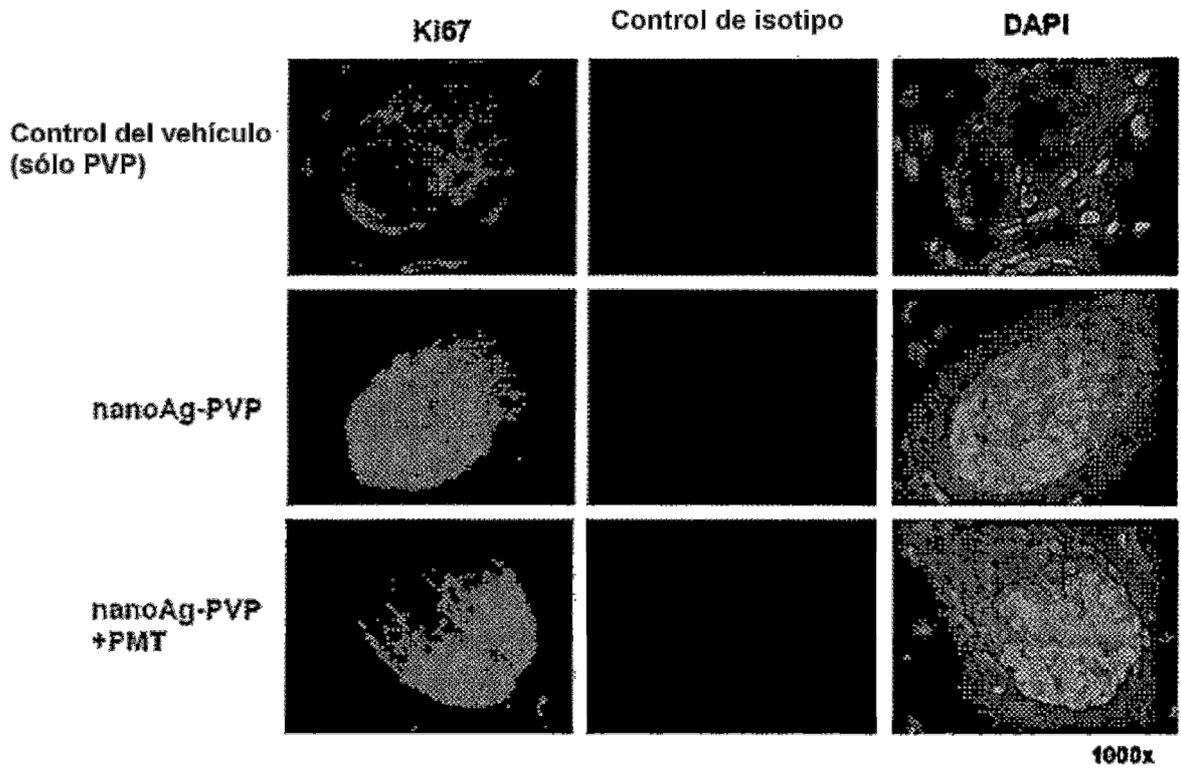


Fig. 9

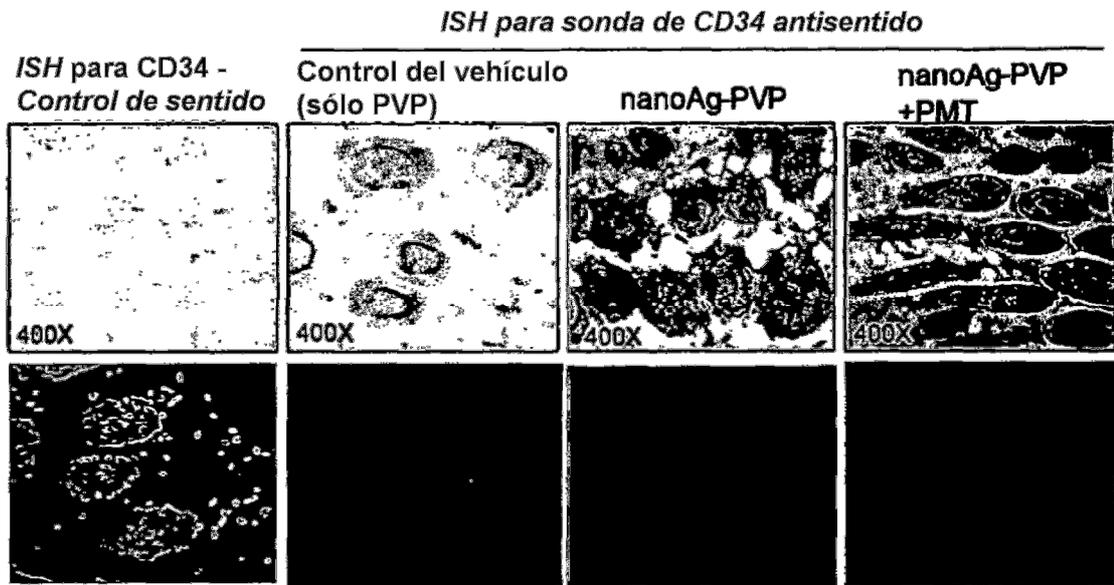


Fig. 10

Células CD34(+) por folículo piloso (sección transversal, 400x)

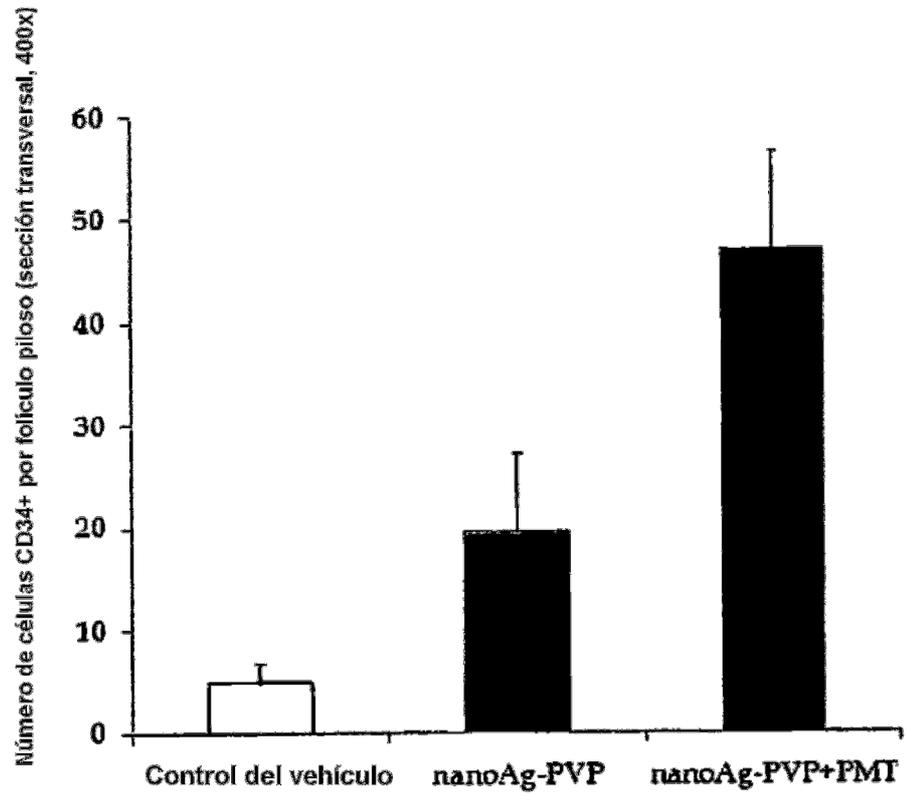


Fig. 11