

19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 438 505**

51 Int. Cl.:

A61Q 5/02 (2006.01)
A61Q 5/00 (2006.01)
A61K 8/02 (2006.01)
A61K 8/11 (2006.01)
A61K 8/41 (2006.01)
A61Q 5/12 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **29.07.2010 E 10752402 (7)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **11.09.2013 EP 2459153**

54 Título: **Composición farmacéutica o cosmética o dietética para promover un efecto de pigmentación capilar**

30 Prioridad:

29.07.2009 IT MI20091361

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

17.01.2014

73 Titular/es:

GIULIANI S.P.A. (100.0%)
Via P. Palagi 2
20129 Milano, IT

72 Inventor/es:

PAUS, RALF;
GIULIANI, GIAMMARIA;
RAMOT, YUVAL;
BECKER, ASTRID y
BARONI, SERGIO

74 Agente/Representante:

RUO, Alessandro

ES 2 438 505 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 farmacéutica o cosmética o dietética para promover un efecto de pigmentación capilar.

5 **CAMPO DE LA INVENCION**

[0001] La presente invención se refiere a la pigmentación del pelo en un hombre.

10 **TÉCNICA ANTECEDENTE**

[0002] El folículo piloso humano es un órgano complejo en el que hay interacciones de poblaciones celulares epiteliales (por ejemplo, diferentes líneas de queratinocitos, endotelio), mesenquimales (por ejemplo, fibroblastos de la dermis papilar, fibroblastos de la envoltura del tejido conectivo), neuroectodérmicas (nervios, melanocitos) y células migratorias transitorias (células inmunes, mastocitos).

15 **[0003]** El crecimiento y la pigmentación de las fibras capilares se ve afectado por varios factores intrínsecos que comprenden cambios dependiendo del ciclo capilar, la distribución del cuerpo, diferencias de edad y género, sensibilidad hormonal variable, defectos genéticos y cambios relacionados con la edad. El estudio del crecimiento del pelo también se complica por los efectos de las variables extrínsecas que comprenden el clima y las estaciones, las sustancias contaminantes, las toxinas y la exposición a productos químicos. Las diferencias descubiertas entre la regulación de la pigmentación en la epidermis y en los folículos pilosos reflejan la división en compartimentos del sistema de pigmentación de la piel de los mamíferos.

25 **[0004]** Los melanocitos de la epidermis, del bulbo del folículo piloso y de la envoltura de la raíz exterior del folículo piloso son muy diferentes entre sí, a pesar del hecho de que la pigmentación de la piel en los mamíferos debe entenderse como un sistema abierto. Las diferencias principales son las de la naturaleza de sus unidades funcionales melanocitos-queratinocitos respectivas. La unidad de melanina del bulbo capilar se encuentra en el bulbo anágeno proximal, que es una región inmunológicamente distinta de la piel y en general, está formada por un melanocito cada 5 queratinocitos en el bulbo piloso y de un melanocitos por cada queratinocito en la capa basal de la matriz del bulbo capilar. Por el contrario, cada melanocito epidérmico se asocia a 36 queratinocitos vitales en la unidad de melanina epidérmica inmunocompetente.

35 **[0005]** Sin embargo, la diferencia más obvia entre estas dos poblaciones cutáneas de melanocitos y con considerables implicaciones en la regulación de la pigmentación del pelo, es la observación de que la actividad de los melanocitos del bulbo capilar está sujeta a un control cíclico y de que la melanogénesis está estrictamente relacionada con el ciclo de crecimiento del cabello. Por otro lado, la melanogénesis cutánea parece ser continua.

RESUMEN DE LA INVENCION

40 **[0006]** Actualmente se ha descubierto de forma sorprendente, y éste es el objeto de la presente invención, que el compuesto de espermidina, es decir N-(3-aminopropil)butan-1,4-diamina, tal cual o en forma de un derivado farmacéuticamente aceptable, tal como una sal, se proporciona con una actividad de melanogénesis hacia el cabello y, por lo tanto, puede usarse de forma eficaz para promover su pigmentación, en particular la pigmentación del tallo.

45 **[0007]** Dicha actividad permite configurar el uso del compuesto activo en el hombre como un agente de pigmentación natural sin efectos secundarios negativos, por ejemplo los típicos tintes para el pelo.

50 **[0008]** El objeto de la invención es además una composición farmacéutica o cosmética o dietética adecuada para promover dicho efecto de pigmentación y, por lo tanto, que contiene espermidina como principio activo, tal cual o en forma de un derivado farmacéuticamente aceptable, tal como una sal, para su administración tópica u oral.

DESCRIPCIÓN DETALLADA DE LA INVENCION

55 **[0009]** Una sal preferida de acuerdo con la invención es triclorhidrato de espermidina, concretamente N-(3-aminopropil)butan-1,4-diamina·3HCl.

[0010] Una composición de la invención comprende preferiblemente triclorhidrato de espermidina es una solución formulada para su uso tópico. Formas adecuadas para su uso tópico son, por ejemplo, una loción, un acondicionador, un champú, una mascarilla.

60 **[0011]** Una composición diferente de la invención comprende preferiblemente triclorhidrato de espermidina en una unidad de administración formulada para su uso oral. Formas adecuadas para su uso oral son, por ejemplo, un comprimido o una cápsula, recubierta o no, o un granulado para dispersar en agua u otro líquido.

[0012] La espermidina, tal cual o en forma de un derivado farmacéuticamente aceptable, en forma de una sal, está contenida en una composición de la invención de acuerdo con una cantidad comprendida preferiblemente dentro de los siguientes intervalos:

- 10^{-7} a 1 g/100 ml, que corresponde a 0,004 a $4 \cdot 10^4$ μ M
- 10^{-5} a 1 g/100 ml, que corresponde a 0,4 a $4 \cdot 10^4$ μ M
- 10^{-4} a $2,4 \cdot 10^{-2}$ g/100 ml, que corresponde a 4 a $9 \cdot 10^2$ μ M.

[0013] Son intervalos de concentración adicionalmente preferidos los que se indican a continuación:

- 10^{-6} a 10^{-1} g/100 ml
- 10^{-5} a 10^{-2} g/100 ml
- 10^{-4} a 10^{-3} g/100 ml
- 10^{-7} a 10^{-6} g/100 ml
- 10^{-6} a 10^{-5} g/100 ml
- 10^{-5} a 10^{-4} g/100 ml
- 10^{-4} a 10^{-3} g/100 ml
- 10^{-3} a 10^{-2} g/100 ml
- 10^{-2} a 10^{-1} g/100 ml
- 10^{-1} a 1 g/100 ml

[0014] Los siguientes ejemplos de formulación ilustran la invención, pero no pretenden ser limitantes de ningún modo. Las cantidades de componentes se expresan en gramos o miligramos y en el caso de los ejemplos 1 a 4, por intervalos de concentración.

Ejemplo 1

Champú

[0015]

Composición para una solución de 100 ml		
Componente (Nomenclatura INCI)		
Lauret sulfato de magnesio	2-10	g
Lauroil sarcosinato sódico	2-10	g
Lauret sulfosuccinato disódico	0,5-5	g
Gliceril palmato hidrogenado PEG-200	0,5-5	g
Cocamida MIPA	0,5-5	g
Diestearato de glicol	0,5-5	g
Glicerina	0,5-5	g
Lauret-7	0,1-3	g
Cocoato de glicerilo PEG-7	0,1-3	g
Cloruro de lauril metil glucet-10 hidroxipropildiamonio	0,1-3	g
Policuatémio-10	0,1-3	g
Proteína de trigo undecilenoil potasio	0,1-3	g
Pantenol	0,1-3	g
EDTA tetrasódico	0,1-3	g
Triclorhidrato de espermidina	10^{-7} -1	g
Conservante	c.s.	
Corrector del pH (a un pH final de 5,0-5,5)	c.s.	
Perfume	c.s.	
Agua	c.s. a 100 ml	

Ejemplo 2

Mascarilla capilar

5 [0016]

Composición para una solución de 100 ml		
Componente (INCI)		
Glicerina	1-10	g
Taurato de acrilóil-dimetil amónico/Copolímero VP	1-10	g
Ciclopentasiloxano	1-10	g
Silicona cuaternario-15	0,1-3	g
Acetato de tocoferilo	0,1-3	g
Dimeticona	0,1-3	g
Sericina	0,1-3	g
Metil parabeno	0,05-0,1	g
C11-15 paret-5	0,05-0,1	g
C11-15 paret-9	0,05-0,1	g
Tridecet-12	0,05-0,1	g
Decil glucósido	0,01-0,5	g
Pantenil etil éter	0,01-0,5	g
EDTA disódico	0,01-0,5	g
Etil hexil metoxycinnamato	0,01-0,5	g
Ácido láctico	c.s.	
Conservante	c.s.	
Triclorhidrato de espermidina	10 ⁻⁷ -1	g
Perfume	c.s.	g
Agua	c.s. a 100 ml	

Ejemplo 3

10 Acondicionador capilar

[0017]

Composición para una solución de 100 ml		
Componente (INCI)		
Alcohol cetearílico	1-10	g
Estearato de glicerilo	1-10	g
Dimeticona	1-10	g
Lactato de alquilo C12-13	0,5-5	g
Cloruro de cetrimonio	0,5-5	g
Estearato PEG-100	0,5-5	g
Ciclopentasiloxano	0,5-5	g
Hidroxietilcelulosa	0,1-3	g
Dimeticonol	0,1-3	g
Pantenol	0,1-3	g
Bis-isobutil Peg/Ppg-20/35/copolímero amodimeticona	0,05-2	g
Fitantriol	0,05-2	g
Etilhexanoato de cetilo	0,05-2	g
Butilenglicol	0,05-2	g
EDTA disódico	0,05-2	g
Polisorbato 80	0,05-2	g
Sericina	0,05-2	g
Triclorhidrato de espermidina	10 ⁻⁷ -1	g
Conservante	c.s.	g
Perfume	c.s.	g
Agua	c.s. a 100 ml	

Ejemplo 4

Loción capilar

5 **[0018]**

Composición para una solución de 100 ml		
Componente (INCI)		
Alcohol	10-20	g
Aceite de ricino hidrogenado PEG-40	0,2-2	g
EDTA disódico	0,01-0,5	g
Perfume	c.s.	
Triclorhidrato de espermidina	10 ⁻⁷ -1	g
Agua	c.s. a 100 ml	

Ejemplo 5

10 Cápsulas de gelatina dura

[0019]

Composición para una única cápsula		
Componente		
Lactosa monohidrato	85	mg
Almidón de maíz	25	mg
Talco	5	mg
Triclorhidrato de espermidina	1,25	mg
Estearato de magnesio	1,5	mg
Cápsula de gelatina dura cubierta N° 4	1	n.

15 Ejemplo 6

Cápsulas de gelatina blanda

[0020]

20

Composición para una única cápsula		
Componente		
Aceite de soja	263,07	mg
Gelatina	129,7	mg
Glicerina	36,5	mg
Sorbitol al 70%	24,2	mg
Agua	23,274	mg
Cera de color amarillo	22	mg
Mono-diglicéridos de ácidos grasos	20	mg
Lecitina de soja	10	mg
Dióxido de titanio	0,686	mg
Triclorhidrato de espermidina	0,25	mg

Ejemplo 7

Comprimido

25

[0021]

Composición para un único comprimido		
Componente		
Celulosa microcristalina	168,97	mg
Lactosa	150	mg
Metilcelulosa	45	mg
Mono- y diglicéridos de ácidos grasos	9	mg

Dióxido de silicio coloidal	8	mg
Estearato de magnesio	2	mg
Triclorhidrato de espermidina	1,0	mg

Ejemplo 8

Comprimido recubierto de liberación lenta

[0022]

Composición para un único comprimido		
Componente		
Celulosa microcristalina	105	mg
Fosfato cálcico dihidrato bibásico	85	mg
Hidroxipropilmetilcelulosa K100	45	mg
Sepifilm TM LP 770 blanco	15	mg
Estearato de magnesio	8	mg
Hidroxipropilmetilcelulosa	6	mg
Dióxido de silicio coloidal	3,5	mg
Triclorhidrato de espermidina	0,55	mg

Ejemplo 9

Granulado efervescente en sobres para hacer una solución espontánea

[0023]

Composición para un único sobre		
Componente		
Manitol	960	mg
Ácido tartárico	530	mg
Bicarbonato sódico anhidro	280	mg
Saporífero	130	mg
Polivinilpirrolidona	45	mg
Trometamol	32	mg
Aspartamo	20	mg
Triclorhidrato de espermidina	1,25	mg
Silicio coloidal anhidro	2	mg

[0024] A continuación se encuentra la descripción de un estudio experimental con respecto a la actividad en el uso de espermidina de acuerdo con la presente invención.

ESTUDIO DE ACTIVIDAD

Muestras de tejido

[0025] Se tomó la piel de un cuero cabelludo humano normal de una mujer que se había sometido a una cirugía de estiramiento facial de rutina después de recibir el consentimiento informado. Todos los experimentos se realizaron de acuerdo con los principios de Helsinki, con la aprobación del comité ético.

Cultivo de órgano cutáneo con espesor completo

[0026] Los tejidos sometidos a biopsia con un bisturí cilíndrico de 3-4 mm se cultivaron a 37 °C durante 6 días en medio E de Williams (Biochrom, Cambridge, Reino Unido), integrado con 100 IU ml⁻¹ de penicilina, 10 µg ml⁻¹ de estreptomicina (Gibco, Karlsruhe, Alemania), 10 µg ml⁻¹ de insulina (Sigma, Taufkirchen, Alemania), 10 ng ml⁻¹ de hidrocortisona (Sigma) y 2 mmol l⁻¹ de L-glutamina (Invitrogen, Paisley, Reino Unido).

[0027] Después, se administró triclorhidrato de espermidina, o el vehículo en forma de una sustancia de referencia, a una concentración de 0,1 µM, una vez cada cambio de medio (es decir, cada 48 horas).

Micro-disección de los folículos pilosos y el cultivo de órgano

[0028] Los folículos pilosos (FP) en fase anágena VI con pigmentación normal (los folículos pilosos de color gris/blanco se excluyeron del estudio) se micro-diseccionaron de la piel del cuero cabelludo humano normal y se sometieron a un cultivo de órgano en base al modelo Philpott. Se administraron espermidina o el vehículo una vez en cada cambio de medio (es decir, cada 48 horas).

Medición de LDH

[0029] La actividad de LDH en el sobrenadante sirvió como un indicador de citotoxicidad y se midió cada día de acuerdo con las instrucciones del fabricante (Cytotoxicity Detection Kit; Roche, Mannheim, Alemania). La absorbancia de la muestra se midió a 490 nm usando un lector de placas ELISA.

Elongación del tallo piloso

[0030] Las mediciones de la longitud del tallo de los folículos pilosos se tomaron cada dos días sobre los folículos pilosos individuales usando un microscopio binocular invertido Zeiss con una retícula de medición ocular.

Determinación de la fase del ciclo del folículo piloso

[0031] La determinación de la fase del folículo piloso se realizó en base a los criterios morfológicos que se han definido anteriormente, y se determinó el porcentaje de folículos pilosos en fase anágena y en fase catágena temprana, intermedia o tardía.

Pigmentación del pelo

[0032] La tinción de Masson-Fontana se realizó para la visualización histoquímica de melanina sobre cortes congelados. La melanina se tiñó en forma de gránulos de color pardo y el nivel de pigmentación se determinó a través de la técnica cuantitativa de Masson-Fontana (Ito N., Ito T., Kromminga A., Bettermann A., Takigawa M., Kees F., Straub R. H., y Paus R. (2005): Human hair follicles display a functional equivalent of the hypothalamic-pituitary-adrenal axis and synthesize Cortisol. FASEB J 19, 1332-4).

[0033] Este procedimiento es un indicador particularmente sensible y fiable de las variaciones de la síntesis de melanina, como se demostró mediante ensayos de la actividad enzimática y la expresión de la tirosinasa convencional (Kausar S., Slominski A., Wei E. T., y Tobin D. J. (2006): Modulation of the human hair follicle pigmentary unit by corticotropin-releasing hormone and urocortin peptides. FASEB J 20, 882-95).

[0034] La intensidad de la tinción se analizó en una región de referencia definida de la unidad de pigmentación del folículo piloso usando el software ImageJ (National Institute of Health).

Medición de la proliferación y la apoptosis

[0035] Para evaluar las células apoptóticas en co-ubicación con un marcador de proliferación Ki-67, se usó el procedimiento de tinción dual TUNEL (marcado del extremo libre por dUTP) con Ki-67. Los cortes criostáticos se fijaron en paraformaldehído y ácido etanolacético (2:1) y se marcaron con digoxigenina-desoxi-UTP (kit para la identificación de apoptosis *in situ* con fluoresceína ApopTag; Intergen, Purchase, NY) en presencia de desoxinucleotidil transferasa terminal seguido de incubación con un antisuero murino anti-Ki-67 (1:20 en PBS durante una noche a 4 °C; Dako, Glostrup, Dinamarca). Las células positivas a TUNEL se visualizaron por un anticuerpo conjugado con fluoresceína isotiocianato anti-digoxigenina (kit ApopTag), mientras que se detectó Ki-67 mediante un anticuerpo de cabra anti-ratón marcado con rodamina (Jackson ImmunoResearch, West Grove, PA). Se realizaron controles negativos omitiendo la desoxinucleotidil transferasa terminal y el anticuerpo Ki-67. La contra-tinción se realizó con 4',6-diamidino-2-fenilindol (DAPI) (Roche Molecular Biochemicals GmbH, Mannheim, Alemania). Se realizó la evaluación cuantitativa histomorfométrica; se contaron las células positivas Ki-67, TUNEL o DAPI en una región de referencia definida previamente del folículo piloso y la matriz cutánea, y se determinó el porcentaje de células Ki-67/TUNEL positivas.

Inmunohistoquímica cuantitativa de K15

[0036] Se usó el procedimiento de amplificación de señales de tiramida que se ha descrito anteriormente para examinar la expresión de la queratina K15 (Kloepper y col., 2008). En resumen, las criosecciones fijadas con acetona se lavaron tres veces durante 5 minutos usando el tampón TNT (tris-HCl-NaCl-Tween) (Tris-HCl 0,1 mol/l, pH 7,5; que contenía NaCl 0,15 mol/l y Tween 20 al 0,05%). Después, la peroxidasa de rábano se bloqueó a través de lavado con H₂O₂ al 3% en un tampón fosfato isotónico (PBS) durante 15 minutos. La incubación previa se realizó con la incubación de avidina y biotina durante 15 minutos y con suero de cabra normal al 5% en TNT durante 30

minutos con etapas de lavado intermedias. Se diluyó K15 murina anti-humana (clon LHK15, Chemicon, Billerica, Estados Unidos) en TNT y se incubó durante una noche a 4 °C seguido de un anticuerpo biotinilado de cabra anti-ratón secundario (1:200 en TNT) durante 45 minutos a temperatura ambiente. Después, se administró estreptavidina-peroxidasa de rábano (kitTSA; Perkin-Elmer, Boston, MA, Estados Unidos) (1:100 en TNT) durante 30 minutos a temperatura ambiente. La reacción se amplificó con un agente de amplificación de FITC-tiramida a temperatura ambiente durante 5 minutos (1:50 es un diluyente de amplificación suministrado con el kit). La intensidad de esta inmunotinción se cuantificó mediante el software ImageJ (National Institutes of Health). La intensidad de la tinción de las regiones de referencia definidas en los folículos pilosos se midió y se comparó entre los grupos de control tratados con el vehículo únicamente y los grupos tratados con espermidina.

Análisis estadístico

[0037] El análisis estadístico se realizó usando una prueba t de Student bilateral para muestras no pareadas.

Resultados

[0038] Las figuras de los dibujos adjuntos muestran los resultados del estudio experimental descrito.

BREVE DESCRIPCIÓN DE LAS FIGURAS

[0039]

La figura 1 muestra un diagrama que se refiere a la intensidad de la pigmentación en los folículos pilosos según se mide y se compara entre el grupo de control tratado únicamente con vehículo y el grupo tratado con espermidina 3HCl en una concentración de 0,1 µM.

La figura 2 muestra las imágenes correspondientes tomadas de la visualización histoquímica de la melanina a través de tinción de Masson-Fontana.

[0040] El aumento de melanina es evidente en ambas figuras en el caso de tratamiento con espermidina y, por lo tanto, una actividad de melanogénesis significativa hacia el pelo tratado con dicho compuesto en comparación con el vehículo de referencia.

REIVINDICACIONES

- 5 **1.** Uso de espermidina, tal cual o en forma de un derivado farmacéuticamente aceptable, en forma de un principio activo para promover pigmentación del pelo, en particular la pigmentación del tallo piloso.
- 2.** Uso de acuerdo con la reivindicación 1, en el que la espermidina está en forma de triclorhidrato de espermidina, concretamente N-(3-aminopropil) butan-1,4-diamina·3HCl.
- 10 **3.** Uso de acuerdo con la reivindicación 1, en el que la espermidina se formula en una composición con cualquier excipiente adecuado para su administración tópica sobre el cuero cabelludo.
- 4.** Uso de acuerdo con la reivindicación 3, en el que la espermidina se formula en forma de una loción o un bálsamo o un champú o una mascarilla capilar.
- 15 **5.** Uso de acuerdo con la reivindicación 1, en el que la espermidina se formula en una composición con cualquier excipiente adecuado para su administración oral.
- 6.** Uso de acuerdo con la reivindicación 5, en el que la espermidina se formula en forma de un comprimido recubierto o no recubierto, o una cápsula dura o blanda, o un granulado.
- 20 **7.** Uso de acuerdo con las reivindicaciones 1, 2 y 3, en el que la espermidina se formula en una composición en una cantidad en el intervalo entre 0,004 a $4 \cdot 10^{-4}$ μ M, que corresponde a una cantidad de triclorhidrato de espermidina en el intervalo de 10^{-7} a 1 g/100 ml.
- 25 **8.** Uso de acuerdo con la reivindicación 7, en el que la espermidina se formula en una cantidad en el intervalo entre 0,4 a $4 \cdot 10^{-4}$ μ M, que corresponde a una cantidad de triclorhidrato de espermidina en el intervalo de 10^{-5} a 1 g/100 ml.
- 9.** Uso de acuerdo con la reivindicación 8, en el que la espermidina se formula en una cantidad en el intervalo entre 3,9 a $9,4 \cdot 10^{-2}$ μ M, que corresponde a una cantidad de triclorhidrato de espermidina en el intervalo de 10^{-4} a $2,4 \cdot 10^{-2}$ g/100 ml.
- 30 **10.** Uso de acuerdo con la reivindicación 5, en el que la espermidina se formula en una composición para su administración oral en una cantidad en el intervalo entre 0,14 y 0,71 mg por unidad de administración.
- 35 **11.** Uso de acuerdo con las reivindicaciones 2 y 5, en el que el triclorhidrato de espermidina se formula en una composición para su administración oral en una cantidad en el intervalo entre 0,25 a 1,25 mg por unidad de administración.

FIG. 1

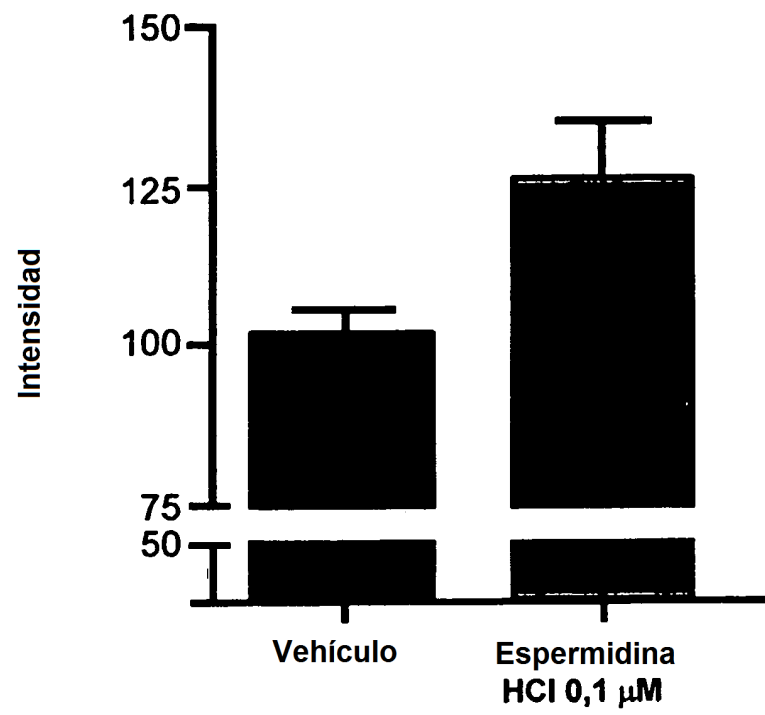
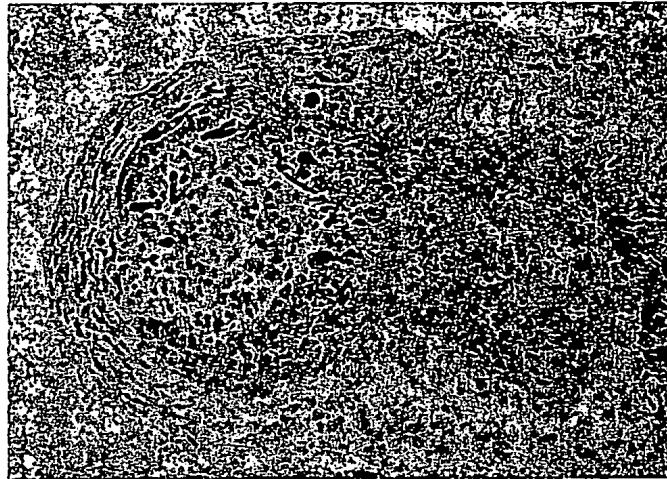
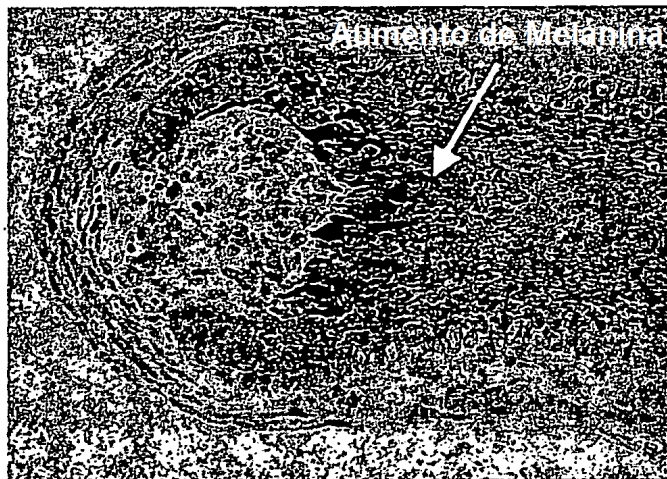


FIG. 2



Control (vehículo)



Spermidina HCl 0,1 mM