(19) OFICINA ESPAÑOLA DE PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA

(11) Número de publicación: **2 438 730**

(51) Int. Cl.:

A61K 8/97 (2006.01)
A61Q 19/02 (2006.01)
A61K 36/28 (2006.01)

(12) TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA T3

(96) Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **23.12.2003** **E 03785938 (6)**

(97) Fecha y número de publicación de la concesión europea: **09.10.2013** **EP 1737538**

(54) Título: **Formulaciones despigmentantes tópicas que comprenden un extracto de Bellis perennis**

(45) Fecha de publicación y mención en BOPI de la traducción de la patente:
20.01.2014

(73) Titular/es:

CLR-CHEMISCHES LABORATORIUM DR. KURT RICHTER GMBH (100.0%)
BENNIGSENSTRASSE 25
12159 BERLIN, DE

(72) Inventor/es:

JOHN, S.

(74) Agente/Representante:

CARPINTERO LÓPEZ, Mario

ES 2 438 730 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

Formulaciones despigmentantes tópicas que comprenden un extracto de Bellis perennis

La presente invención se refiere a formulaciones tópicas que tienen un efecto despigmentante sobre la piel humana para uso cosmético y farmacéutico.

Bellis perennis L., comúnmente conocida como margarita inglesa o césped margarita, pertenece a la familia de las *Asteraceae*.

Se usa ampliamente en homeopatía para tratar diferentes complejos de síntomas tales como artrosis, pérdida del apetito y trastornos del sueño. Además, *Bellis perennis L.* también se usa tradicionalmente para el tratamiento de problemas dermatológicos tales como acné, eccema, heridas de mala cicatrización y traumatismos más profundos del tejido (véanse, por ejemplo, H.A. Hoppe, Drogenkunde, vol. 1, Angiospermen, 8ª edt., 1975; Dr. F. Losch, Kräuterbuch; G. Leibold, Moderne Naturheilpraxis, Bassermann Verlag, 1993; M. Lange-Ernst, S. Ernst, Lexikon der Heilpflanzen, Honos Verlag; y W.D. Storl, Heilkräuter und Zauberpflanzen, AT Verlag, 2ª edt., 2000).

Más recientemente, *Bellis perennis L.* ha sido objeto de investigaciones farmacológicas y se ha identificado que componentes particulares, tales como glucósidos de triterpenos, presentan un amplio perfil de actividad farmacológica tal como efectos neuroprotectores antifúngicos y antimicrobianos, anticancerígenos y también post-isquémicos (véanse, por ejemplo, los documentos DE 42 06 233; US 6.444.233; G. Bader y col., Pharmazie 1990 Jul;45(8); P. Avato y col.; Planta Med 1997 Dec; 63(6); y C. Desevedavy y col.; Journal Nat Prod 1989 Jan-Feb; 52(1)).

Ahora se ha descubierto inesperadamente que los extractos de *Bellis perennis L.* tienen un efecto inhibidor sobre la melanogénesis y así pueden usarse para la despigmentación de piel humana.

La melanina, que es responsable de la pigmentación de la piel, se produce en melanosomas que están localizados en los melanocitos. La síntesis de melanina implica procesos oxidativos, por los cuales la tirosina se hidroxila a dihidroxifenilalanina (DOPA) por la enzima tirosinasa. La DOPA se convierte entonces finalmente en melanina por una compleja cadena de reacciones oxidativas. La melanina se acumula en los queratinocitos del estrato basal y alcanza la superficie de la piel con los queratinocitos debido a la continua diferenciación de queratinocitos. Los queratinocitos que contienen melanina diferenciada forman el estrato córneo como corneocitos. Los procesos oxidativos conducen a cambios del color de la melanina que se vuelven evidentes en la pigmentación de la piel individual dependiendo del tipo de piel y otros factores externos. El proceso de pigmentación anteriormente mencionado puede dar lugar a decoloración y en particular a piel que parece irregular, que se considera frecuentemente no deseable desde un punto de vista cosmético. Además, el proceso también puede ser objeto de diversos trastornos patológicos, que tienen aspectos muy diversos.

En los últimos años ha habido una demanda creciente de productos cosméticos y farmacéuticos despigmentantes. El patrón de pigmentación irregular de la hiperpigmentación adquirida tal como melasma (cloasma), melanodermia postinflamatoria, lentigo solar, pecas (efélides), manchas de la edad (lentigo senil), manchas de la pigmentación que aparecen sobre la piel tras la exposición al sol frecuentemente junto con fármacos tales como anticonceptivos orales u otra medicación hormonal, o perfume, o en el embarazo se produce por diversos factores, que incluyen inflamación, desequilibrio de hormonas, y algunas veces trastornos genéticos. La irradiación UV agrava adicionalmente estas afecciones de la piel.

El uso de cosméticos y productos farmacéuticos despigmentantes (aclaramiento de la piel, iluminación de la piel o blanqueamiento) varía significativamente entre culturas. Mientras que en los países occidentales se usa principalmente para la prevención o el tratamiento de la (hiper)pigmentación irregular anteriormente mencionada, en Asia y África también se usan productos de aclaramiento de la piel para hacer la piel más blanca, más aclarada y más iluminada.

En el contexto de la presente invención debe observarse que los términos despigmentante, blanqueante, aclarador, iluminador y decolorante se usan como sinónimos cuando describen agentes que se usan para prevenir o disminuir la hiperpigmentación y también complexión más oscura no deseada.

Composiciones convencionales que se han desarrollado para la despigmentación generalmente contienen ácido kójico, glabridina, arbutina, ácido elágico, ácido azelaico, ácido ascórbico y derivados de los mismos, extracto de placenta, rucinol e hidroquinona, y extractos de plantas de una amplia variación de plantas tales como baya silvestre, mora, gayuba, regaliz, limón, *Matricaria chamomilla*, semilla de comino, wolo, berro o mezclas de cualquiera de las anteriores mencionadas.

Una visión general sobre enfoques químicos e instrumentales para tratar hiperpigmentación se facilita por S. Briganti y col., en Pigment Cell Res 16:101-110; 2003.

Algunas sustancias que presentan actividad despigmentante no pueden usarse cosméticamente o para fines farmacéuticos debido a su toxicidad (por ejemplo, sales de mercurio), a la irritación cutánea que inducen

(mercaptoaminas, agentes oxidantes como peróxido de hidrógeno) o debido a la inestabilidad de ácido ascórbico o a la actividad reducida de sus derivados. Otros compuestos tales como derivados fenólicos, corticosteroides, polifenoles, diversos extractos vegetales que se usan como componentes en muchas preparaciones despigmentantes, están ahora en el mercado. Sin embargo, estos compuestos muestran efectos secundarios como la hidroquinona o son de acción muy lenta.

Se considera que la hidroquinona es cancerígena, así se ha implementado un procedimiento legal para prohibir su uso cosmético en Europa.

Así, existe la demanda creciente del agente despigmentante ideal que, a la vez que presente un efecto decolorante/blanqueante/aclarador/iluminador potente, rápido y selectivo sobre los melanocitos hiperactivados, no deba asociarse a ningún efecto secundario a corto o largo plazo. Además, el agente de despigmentación deseado debe ser estable y compatible con otros componentes cosméticos o farmacéuticos.

En un aspecto, la presente invención se refiere a un extracto de *Bellis perennis L.* para su uso como un agente despigmentante en un procedimiento terapéutico de despigmentar piel humana. La invención también se refiere a una composición que comprende tal extracto como agente despigmentante para su uso en un procedimiento terapéutico de despigmentación de piel humana.

En otro aspecto, la invención se refiere a un extracto de *Bellis perennis L.* para su uso como un agente despigmentante en un procedimiento terapéutico para tratar o prevenir hiperpigmentación adquirida o inherente. La invención también se refiere a una composición que comprende tal extracto como agente despigmentante para su uso en un procedimiento terapéutico para tratar o prevenir hiperpigmentación adquirida o inherente.

En otro aspecto adicional, la invención se refiere al uso de un extracto de *Bellis perennis L.* como agente despigmentante para la despigmentación cosmética de piel humana.

En un aspecto todavía adicional, la invención se refiere al uso de un extracto de *Bellis perennis L.* como agente despigmentante para tratar o prevenir cosméticamente hiperpigmentación adquirida o inherente.

Como se usa en la presente invención, el término hiperpigmentación se refiere a un contenido de melanina elevado localizado o generalizado de la piel, que puede ser adquirido o inherente.

La hiperpigmentación que puede tratarse según la presente invención incluye nevo pigmentado, nevo moteado, efélides, lentigos, nevo combinado, nevo en traje de baño, nevo sistemático, neurofibromatosis (v. Recklinghausen), síndrome de Peutz-Jeghers, enfermedad de Albright, nevo azul, mancha mongólica, nevo tardío, cloasma, en particular cloasma gravídico, o cloasma virginal perioral, línea negra, melanosis de Riehl, melanodermitis toxica, poiquilodermia reticulada, angiodermitis pigmentaria y purpúrica, hiperpigmentación poslesional, fitofotodermatosis, dermatitis de Berloque, pigmentación (de Berloque) por agua de colonia, liquen rojo o impétigo después de psoriasis, incontinencia pigmentaria, melanosis debida a arsénico, hemocromatosis idiopática, diabetes bronce, cirrosis del hígado, enfermedad de Addison, enfermedad de Graves, melanocarcinosis, pelagra, esprúe, tuberculosis o anemia perniciosa.

Además, las composiciones farmacéuticas según la presente invención también pueden usarse para la terapia de hipopigmentación (leucodermia) para nivelar las manchas blancas.

Por tanto, indicaciones preferidas son así nevo acrómico, nevo anémico, poliosis, albinismo, vitíligo, leucodermia adquirida de Sutton, hipopigmentación poslesional tal como leucodermia psoriásica, leucodermia sifilítica, vitíligo grave, pinta, kwashiorkor, despigmentación tóxica (por ejemplo, debido a hidroquinona o furcina), discromia parasítica, pitiriasis versicolor alba, estreptodermia alba simple, síndrome de Vogt-Koyanagi, canicie precoz, síndrome de Simmonds-Sheehan y síndrome de Werner.

Particularmente se prefiere el tratamiento de vitíligo, proporcionando una mejor alternativa a la hidroquinona presentemente usada que contiene composiciones que presentan efectos secundarios.

Las composiciones cosméticas según la presente invención pueden usarse para despigmentar la piel humana en caso de patrón de pigmentación irregular debido a hiperpigmentación adquirida tal como melasma (cloasma); melanodermia postinflamatoria; lentigo solar; pecas (efélides); manchas de la edad (lentigo senil); manchas de la pigmentación que aparecen sobre la piel tras la exposición al sol frecuentemente junto con fármacos tales como anticonceptivos orales u otra medicación hormonal, perfume, o en el embarazo, decoloración debido a quimioabrasiones y dermoabrasión, acondicionamiento superficial pre-y pos-láser, o eliminación de vello pre- y pos-láser; queratosis pigmentaria o hipopigmentación después de traumatismos (cicatrices).

Además, también pueden usarse para aclarar/iluminar la complexión o formas de hiperpigmentación e hipopigmentación mencionadas anteriormente.

Como ya se ha mencionado anteriormente, la presente invención se basa en el hallazgo inesperado de que los extractos de *Bellis perennis L.* presentan un efecto inhibidor sobre la melanogénesis. El efecto despigmentante es muy marcado y tiene una aparición muy rápida.

Según la presente invención puede usarse cualquier extracto de *Bellis perennis L.* obtenido por decocción, digestión, percolación, extracción con Soxhlet, maceración o cualquier otro procedimiento apropiado conocido para el experto habitual en la materia.

Medios de extracción y disolventes adecuados son agua, tampones acuosos, glicoles o mezclas de glicol-agua, alcoholes o mezclas de alcohol-agua, glicerina o mezclas de glicerina-agua.

Medios de extracción /disolventes preferidos son agua o tampón acuoso, etanol, mezclas de etanol-agua, y metanol o mezclas de metanol-agua. Adicionalmente también pueden usarse según la presente invención extractos obtenidos por extracción con glicoles como propilenglicol, butilenglicol o mezclas de agua de los mismos que tienen preferentemente un contenido de agua del 5 al 60%. En una realización preferida se usa un tampón citrato de sodio según Sörensen (tampón que contiene citrato de disodio 0,1 M y HCl 0,1 N, que tiene un pH entre 1,2 y 5,0, preferentemente entre 2,0 y 5,0, lo más preferido pH 3,0). En otra realización preferida se usa un tampón fosfato según Sörensen (fosfato de potasio 0,06 M y fosfato de disodio 0,06 M, intervalo de pH 5 a 8, preferiblemente pH 5).

Los extractos pueden prepararse a partir de material vegetal fresco o secado, por lo que puede usarse la planta completa o las cabezas de flor de *Bellis perennis L.* Se prefiere el uso de las cabezas de flor.

La proporción entre fármaco y medio de extracción oscila de 1:10 a 1:200. La proporción preferida es 1:20.

Otro objetivo de la presente invención es proporcionar un procedimiento para producir un extracto acuoso de *Bellis perennis L.* y un extracto obtenido por ese procedimiento.

Los siguientes ejemplos solo son para fines ilustrativos y no deben limitar el alcance de la invención.

	Medio de extracción	Cantidad de material vegetal seco	Temperatura	Tiempo de extracción
Ejemplo 1	95% de agua	5%	100 ºC	1 h
Ejemplo 2	95% de tampón que contiene fosfato de potasio 0,06 M y fosfato de disodio 0,06 M, pH 5,0	5%	80 ºC	12 h
Ejemplo 3	95% de etanol (70%)	5%	25 ºC	10 días

Según la invención, el tiempo y la temperatura de extracción pueden variar dependiendo del medio de extracción, particularmente se prefiere un tiempo de extracción entre 1 h y 10 días, la temperatura puede oscilar preferentemente entre 25 ºC y 100 ºC.

Una realización particularmente preferida de la presente invención es un extracto obtenido a partir de flores secas por extracción con agua (es decir, decocción) a una temperatura de 100 ºC durante 1 h, por lo que la proporción fármaco: medio de extracción es 1:20. El extracto en bruto se enfría a 40 ºC o por debajo y se centrifuga para separar constituyentes insolubles y se esteriliza por filtración (tamaño de poro: 0,2 µm). Entonces se lleva a cabo ósmosis inversa para prevenir la formación de sedimentos catalizada por electrolitos específicos para *Bellis perennis L.* Entonces se añaden tampón, preferiblemente tampón citrato según Sörensen (39,9% de citrato de disodio 0,1 M y 60,1% de HCl 0,1 N, pH 3,0) y un conservante, preferentemente 0,2% de sorbato de potasio, al extracto libre de electrolitos. Para prevenir la posible decoloración del extracto producida por componentes de alto peso molecular, los últimos se separan por medio de ultrafiltración (corte de MW: 100 kDa).

La base bioquímica precisa para el efecto despigmentante del extracto de *Bellis perennis L.* es desconocida. Como se ha expuesto brevemente, el efecto despigmentante es muy pronunciado y de rápida aparición.

A diferencia de la mayoría de los agentes de despigmentación o blanqueamiento presentemente usados que son potentes inhibidores de tirosinasa y así también pueden presentar los efectos secundarios anteriormente mencionados, el extracto de *Bellis perennis L.* solo muestra una débil inhibición de tirosinasa. La inhibición de tirosinasa tiene lugar en los melanosomas de los melanocitos. Por tanto, el inhibidor necesita pasar la barrera de la piel, alcanzar los melanocitos y pasar la membrana celular. Dependiendo de la molécula, esto puede tener efectos secundarios tales como efectos citotóxicos.

La actividad despigmentante del extracto puede ser debida al menos en parte a un efecto antioxidativo como, por ejemplo, mediadores de inflamación inducida por UV tales como radicales libres que son capaces de estimular los melanocitos para potenciar la síntesis de la melanina. Al contrario del ácido ascórbico que también se usa para la despigmentación de la piel humana, la capacidad antioxidativa del extracto de *Bellis perennis L.* es estable y no requiere ninguna formulación técnica o derivatización particular.

El extracto de *Bellis perennis* L. de la presente invención tiene una capacidad antioxidante distinta, que eficazmente inhibe los procesos oxidativos en los melanocitos y así en consecuencia puede reducir la síntesis de la nueva melanina. Como estos procesos son responsables de una pigmentación potenciada en el estrato córneo, el extracto según la presente invención es eficaz en diferentes capas de la piel. Así, el efecto de aclaramiento es debido a influir y moderar los mecanismos intracelulares y no debido a un efecto de filtración de UV externo.

Sin embargo, el efecto despigmentante muy importante y rápidamente observable de *Bellis perennis L.* no puede únicamente atribuirse a su efecto antioxidante, sino que es probable que sea debido a la modulación de otras etapas bioquímicas que participan en la biosíntesis de melanina. Así, su efecto también puede ser debido a su influencia sobre la endotelina. Los antagonistas de endotelina son conocidos por producir una inhibición cuatro veces acelerada de la síntesis de melanina, ya que no necesitan entrar en los melanosomas para inhibir la tirosinasa o los procesos oxidativos. La penetración en capas más profundas de la epidermis es suficiente para inhibir la endotelina (véase Matsuda y col., Cosm Toil (10) 65-77(1996)).

Los extractos pueden incluirse en formulaciones cosméticas y farmacéuticas comunes conocidas para el experto habitual en la materia (véanse, por ejemplo, Bauer y col., Pharmazeutische Technologie, 5ª edt. Govi-Verlag Frankfurt, 1997; Rudolf Voigt, Pharmazeutische Technologie, 9ª edt., Deutscher Apotheker Verlag Stuttgart, 2000), tal como cremas O/W y W/O, emulsiones O/W y W/O, geles, emulsiones múltiples (W/O/W y O/W/O), dispersiones cosméticas (hidrodispersiones y lipodispersiones), barras, formulaciones que comprenden un tensioactivo o disoluciones simples (aceitosas o acuosas).

Según la presente invención, el extracto de *Bellis perennis L.* puede formularse también en combinación con otros extractos de plantas o compuestos químicos mencionados anteriormente que tienen un efecto despigmentante, antiinflamatorio o antioxidante.

Las composiciones para su uso según la presente invención pueden comprender de aproximadamente el 1% a aproximadamente el 10% de extracto de *Bellis perennis*, se prefiere un contenido de aproximadamente el 2% al 5%.

Se prefiere particularmente un contenido de aproximadamente el 2%, 3%, 4% o el 5%.

Los ejemplos de formulación más adelante solo están incluidos para fines ilustrativos y no deben limitar el alcance de la invención.

Ejemplo 1 de formulación: Crema aclaradora de la piel (O/W)

Fase	Nombre comercial	INCI	Cantidad (peso/peso)
A	Tego Care PS	Glucósido de cetearilo	4,00%
	Arlamol HD	Isohexadecano	6,00%
	Tegosoft MM	Miristato de miristilo	1,00%
	Tegosoft OS	Estearato de octilo	6,00%
	Lanette O	Alcohol cetearílico	2,00%
	Abil 350	Dimeticona	3,00%
B	Agua	Agua	71,40%
	Glicerina	Glicerina	2,00%
C	Phenonip	Fenoxietanol, metilparabeno, etilparabeno, butilparabeno, propilparabeno, isobutilparabeno	0,60%
	Aerosil 200	Sílice	1,00%
D	Ácido cítrico	Ácido cítrico	c.s.p.

(continuación)

Fase	Nombre comercial	INCI	Cantidad (peso/peso)
E	Extracto de *Bellis perennis L.*		3,00%

Las fases A y B se calientan por separado a 70 ºC. La fase A se añade a la fase B, y luego se homogeneízan durante 2 minutos. El homogeneizado se enfría entonces a 30ºC con agitación. Entonces se añade la fase C al homogeneizado y se agita para obtener una emulsión homogénea. El pH se ajusta a aproximadamente pH 4,0 a 5,0 con la fase D. Entonces se añade la fase E a la emulsión.

Ejemplo 2 de formulación: Loción aclaradora de la piel (O/W)

Fase	Componente	INCI	Cantidad (peso/peso)
A	Amphisol K	Cetilestearato de potasio	2,00%
	Myritol 318	Triglicérido caprílico/cáprico	4,00%
	Tegosoft TN	Estearato de sacarosa	4,00%
	Cetiol SN	Isononato de cetearilo	1,00%
	Tegin	Estearato de glicerilo	3,00%
	Lanette 16	Alcohol cetílico	1,00%
	Abil 350	Dimeticona	0,1%
B	Agua	Agua	72,85%
	Glicerina	Glicerina	3,00%
	Keltrol RD	Goma xantana	0,25%
C	Poliglicol 400	PEG 400	5,00%
	Phenonip	Fenoxietanol, metilparabeno, etilparabeno, butilparabeno, propilparabeno, isobutilparabeno	0,80%
D	Extracto de *Bellis perennis L.*		3,00%
E	Ácido cítrico	Ácido cítrico	c.s.p.

Se dispersa goma xantana en la fase B. Las fases A y B se calientan por separado a 75 ºC. Entonces se añade la fase A a la fase B con agitación, seguido de homogeneización. El homogeneizado resultante se enfría a 30 ºC y se añaden las fases C y D. El pH se ajusta a aproximadamente 4,5-5,0 mediante la adición de la fase E.

Ejemplo 3 de formulación: Gel aclarador de la piel

Fase	Componente	INCI	Cantidad (peso/peso)
A	Agua	Agua	84,90%
	Elfacos CD 481	Hidroxietilcelulosa	1,50%
	Abil B 88183	PEG/PPG-20/6 dimeticona	2,00%

(continuación)

Fase	Componente	INCI	Cantidad (peso/peso)
B	Glicerina Phenonip	Glicerina Fenoxietanol, metilparabeno, etilparabeno, butilparabeno, propilparabeno, isobutilparabeno	3,00% 0,60%
C	NaOH al 10% Ácido cítrico	Hidróxido sódico Ácido cítrico	c.s.p. c.s.p.
D	Poliglicol 400	PEG-400	5,00%
E	Extracto de Bellis perennis		3,00%

Se dispersa hidroxietilcelulosa en agua, luego se añade Abil B 88183. Se prepara la fase B y se añade a la fase A. El pH se ajusta a aproximadamente 8,5 con NaOH (10%) para obtener un gel claro. Entonces el pH se ajusta a aproximadamente pH 4,0 a 5,0 con ácido cítrico. Entonces se añade la fase D con agitación. Finalmente se añade la fase E y se mezcla para obtener un gel homogéneo.

El extracto según la presente invención no mostró ningún efecto citotóxico en estudios *in vitro* en queratinocitos humanos (HaCaT) o células de melanoma de ratón (B16V). Como se demuestra en las Tablas 1 y 2 más adelante, el extracto según la presente invención no tuvo ningún efecto citotóxico e incluso estimuló la actividad metabólica de las células. La actividad metabólica de las células probadas se probó por la prueba de MTT, la absorbancia se midió a 570 nm.

Principio de la prueba de MTT:

La sal de tetrazolio amarillenta MMT se reduce a azul de formazano oscuro mediante escisión del anillo por deshidrogenasa mitocondrial (succinato). La intensidad de este cambio de color puede medirse por un lector de ELISA y los valores obtenidos (DO = densidad óptica a 570 nm) pueden usarse como medida de la viabilidad celular.

En las mitocondrias en las que las deshidrogenasas están localizadas tienen lugar los procesos metabólicos oxidativos de las células. Este proceso tiene como objetivo convertir la energía de oxidación en ATP rico en energía por la fosforilación oxidativa. Como esto requiere la participación de deshidrogenasas, hay una relación directa entre la elevada actividad de deshidrogenasa, resultando metabolismo potenciado y elevado potencial de energía celular.

Prueba de citotoxicidad en células de melanoma de ratón (B16V)

Se cultivaron células de melanoma de ratón en medio RPMI 1640 complementado con 10% de SBF, L-glutamina y gentamicina. Después de la tripsinación, 5 x 10^3 células se transfirieron a los pocillos de una placa de microtitulación. Tuvo que dializarse extracto de *Bellis perennis* que contiene conservantes (corte de MW: 500 Da). Las diluciones de muestra se filtraron en los pocillos apropiados con medio junto con 10% de SBF. Como control se usaron pocillos con medio más SBF sin dilución de muestra. La placa se incubó a 37 ºC, 5% de CO_2 durante 72 horas. Se añadieron 10 µl de una disolución de MTT (5 mg/ml) a 100 µl/pocillo. La placa se incubó a 37 ºC, 5% de CO_2 durante 2 horas. El sobrenadante se eliminó y se añadió una disolución de resolución de formazano (99,4% de DMSO, 0,6 ml de ácido acético, 10,0 g de sulfato de laurilo) a cada pocillo. La actividad potenciadora citotóxica o metabólica puede medirse leyendo la absorción a 570 nm en un lector de microplacas (MRX, Dynex).

Tabla 1: Determinación de la citotoxicidad sobre células de melanoma de ratón (B16V)

% de extracto	**DO 570 nm**
0 (control)	1,48
1,00	1,65
1,50	1,66
2,00	1,70

(continuación)

% de extracto	DO 570 nm
2,50	1,65
3,00	1,68
3,50	1,69

Prueba de citotoxicidad en queratinocitos humanos (HaCaT)

Se cultivaron queratinocitos humanos normales (HaCaT) en medio de Eagle modificado por Dulbecco (DMEM) complementado con 5% de SBF. Antes de la tripsinación en fase estacionaria, las células se pretrataron con disolución de EDTA. Se preparó una suspensión de células y se sembró en placas de microtitulación a 3 x 10^4 células /pocillo. Entonces se llevó a cabo la prueba de MTT análogamente a como se ha descrito anteriormente y la absorción se leyó a 570 nm.

Tabla 2: Determinación de la citotoxicidad sobre queratinocitos humanos (HaCaT)

% de extracto	DO 570 nm
0 (control)	0,70
0,20	0,71
0,40	0,70
0,60	0,70
0,80	0,76
1,20	0,81
1,60	0,83
1,80	0,82
2,00	0,84

También se realizó la misma prueba con un extracto según la presente invención que se había almacenado durante 5 meses a temperatura ambiente.

Tabla 3: Determinación de la citotoxicidad sobre queratinocitos humanos (HaCaT) después de 5 meses de almacenamiento a temperatura ambiente

% de extracto	% de DO 570 nm
0 (control)	100%
0,20	117,2
0,50	123,0
0,80	127,3
1,10	128,6
1,40	130,3
1,75	130,3
2,00	128,8

Como puede derivarse de la Tabla 3 anterior, el extracto según la presente invención es estable y mantiene su efecto

estimulante sobre el metabolismo de células, a la vez que no muestra efecto citotóxico.

Como consecuencia de un efecto antioxidante supuesto e inhibición de endotelina descrita anteriormente o por otros efectos adicionales desconocidos, podría demostrarse un fuerte efecto inhibidor de melanina, *in vitro*, además de *in vivo*.

Inhibición *in vitro* de melanina

Se cultivaron células de melanoma de ratón en medio RPMI 1640 complementado con 10% de SBF, L-glutamina y gentamicina. Después de la tripsinación 3,5 x 10^5 células/ml se envasaron en matraces T25 con 8 ml de medio. La incubación durante 48 horas (37 ºC, 10% de CO_2) fue seguida de eliminación de medio y cuidadoso lavado con 3 ml de tampón fosfato (PBS). Tuvo que dializarse extracto de *Bellis perennis* que contiene conservantes (corte de MW: 500 Da). Las muestras se diluyeron en 8 ml de medio y se transfirieron a matraces T25. Los matraces que solo contuvieron medio sin muestra sirvieron de control. Los matraces se incubaron durante 72 horas (37 ºC, 10% de CO_2) y la aplicación se repitió y los matraces se incubaron durante otras 48 horas. Después de completarse la incubación el medio se eliminó y las células se lavaron con 3 ml de PBS. Las células se tripsinaron y se determinó la cifra de células para cada matraz (suspensión homogénea de células). Entonces, los sedimentos de células se lavaron con 4 ml de PBS, se centrifugaron a 1100 rpm durante 10 min y se añadieron 2 ml de ácido triclórico al 5% a cada sedimento y se mezclaron bien. Se repitió la etapa de centrifugación y el sobrenadante se desechó. La melanina se suspendió con 1,3 ml de NaOH 1 N y la absorbancia se leyó a 475 nm.

Tabla 4: Efecto despigmentante *in vitro* sobre células de melanoma de ratón (B16V)

% de extracto	**% de DO 475 nm**
0 (control)	100
0,50	89
1,00	62
1,60	38
2,00	27

(Documentación fotográfica del efecto despigmentante véase la Fig. 1).

También se realizó la misma prueba con un extracto según la presente invención que se había almacenado durante 5 meses a temperatura ambientes.

Tabla 5: Determinación de la estabilidad sobre células de melanoma de ratón (B16V) después de 5 meses de almacenamiento

% de extracto	**% de DO 475 nm**
0 (control)	100
0,50	88
1,00	71
1,60	44
2,0	30

Evaluación *in vitro* del efecto despigmentante

Diseño de la prueba

En el estudio se incluyeron 5 voluntarios (de Filipinas; fenotipo asiático, edad: 19-39) con piel sana.

La prueba se llevó a cabo usando el sitio interior del antebrazo como sitio de prueba. Las mediciones se llevaron a cabo a una temperatura de 20 ºC +/- 1 ºC y una humedad relativa del 50% +/- 10%. Los voluntarios se habituaron a condiciones ambiente durante 30 min antes de los procedimientos experimentales. Después de la primera medición (cromámetro) se

aplicaron el producto de prueba y un producto de placebo (idéntico al producto de prueba, pero que no comprendía extracto de *Bellis perennis* L.). Un campo permaneció sin tratar y sirvió de área de control. La dosis de aplicación fue aproximadamente 2 mg/cm^2 (aplicación con una jeringuilla de 1 ml Omnifix, Braun Melsungen AG, Alemania). La medición se evaluó durante el tratamiento en el día 14 y 28 aproximadamente 4 horas después de la última aplicación diaria. Durante el periodo de 4 semanas, los productos se aplicaron dos veces al día en casa. Los sujetos fueron instruidos para no usar ninguna otra preparación tópica sobre el área de prueba empezando 3 días antes de la prueba hasta después de la prueba. Para la limpieza solo se permitió agua o un gel sin jabón suave (Eubos® flüssig blau).

Medición

El color de la piel se midió con un cromámetro Minolta CR300 (Minolta, Japón) en cumplimiento con el sistema de la Comisión Internacional de la Iluminación (CIE), según la cual el registro de color se ajusta a la sensibilidad al color no lineal del ojo humano. Un color se expresa en un sistema de coordenadas tridimensional con los ejes verde-rojo (a*), amarillo-azul (b*) y L* (brillo). La superficie de la piel se ilumina por una linterna de xenón y la luz enviada se registra y se analiza por un fotorreceptor. En piel blanqueada se observa un cambio positivo sobre el eje L*. Cada valor es el promedio de tres registros. Antes de cada serie de medición, el instrumento se calibró contra el azulejo blanco patrón. Las mediciones son según las pautas del Grupo de normalización de la Sociedad europea de dermatitis de contacto (Fullerton y col., Contact Dermatitis, 1996, 35, 1-10).

Biometría

Los datos de medición se computerizaron centralmente después de la comprobación de la validez y el aseguramiento de calidad. La evaluación se llevó a cabo usando el software WinSTAT® Add-in para Excel-R.K. Fitch, Alemania.

Resultados

La formulación de prueba según la invención con 2% de extracto de *Bellis perennis* mostró después de 2 y 4 semanas de tratamiento un claro efecto blanqueante/aclarador (aproximadamente el 40% de reducción del contenido de melanina) en comparación con el área sin tratar y el área tratada con placebo (véase la Fig. 2). Esta despigmentación o efecto blanqueante es significativamente superior a los resultados que pueden lograrse con agentes despigmentantes o blanqueantes de la técnica anterior.

No se observó incompatibilidad en ninguno de los sujetos.

Evaluación *in vivo* de la aceptación dermatológica por la prueba repetida de parche humano

Diseño de la prueba

Con el fin de determinar cualquier posible efecto irritante de la piel de formulaciones según la invención, se realizó la prueba repetida de parche humano (J.E. Wahlberg: “Patch Testing” en R.J.G. Rycroft, T. Menne', P.J. Frosch y Benezra (eds.), Textbook of Contact Dermatitis, Springer-Verlag, Berlín (1992), pág. 241-265, pág. 241-265) con una formulación de prueba que comprende 10% (peso/peso) de extracto de *Bellis perennis L.* que permitió la evaluación del potencial de irritación de la piel de la formulación.

La prueba se realizó con 50 voluntarios entre la edad de 18 y 65 que tienen piel sensible.

El producto de prueba se aplicó sin diluir en cámaras de prueba cuadradas (cámaras de prueba Haye; HAL Allergie GmbH, Düsseldorf, Alemania) a la espalda de sujetos de prueba durante tres semanas (semanalmente: tres veces durante un periodo de 24 horas bajo oclusión). Después de dos semanas, las cámaras de prueba llenadas con el producto se aplicaron a la misma área tratada y a un área sin tratar para probar una posible sensibilización. Los sitios de tratamiento se evaluaron para la presencia de irritación por un evaluador entrenado usando una escala de puntuación visual de 5 puntos a las 24 horas (30 min después de la retirada del parche), 48 horas, 72 horas y 96 horas después de la aplicación del parche.

Escala de puntuación:

Eritema: 0: sin eritema; 1: ligero eritema; 2: eritema significativo; 3: eritema marcado; 4: fuerte eritema

Fisura: 0: sin fisura; 1: fisura mínima; 2: eritema por fisura significativamente perceptible; 3: fisura marcada; 4: ulceración

Descamación: 0: sin descamación; 1: descamación mínima; 2: descamación moderada; 3: descamación significativa; 4: costra de escamas cerradas

Resultados

Los resultados de prueba que explican resumidamente los datos para eritema, formación de fisura y descamación se enumeran a continuación en la Tabla 6.

Ningún sujeto mostró ninguna reacción o irritación al producto de prueba. Basándose en los resultados de prueba puede demostrarse que las composiciones según la presente invención no producen irritación de la piel y no podría observase indicio de sensibilización.

Tabla 6:

Nº de muestra	Reacciones durante las 3 primeras semanas	Reacción después de 5 semanas											
		después de 24 h			después de 48 h			después de 72 h			después de 96 h		
		E	F	S	E	F	S	E	F	S	E	F	S
1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
2	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
3 (E)	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
4	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
5	Irritación por tirita	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
6	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
7	Irritación por tirita	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
8	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
9	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
10	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
11	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
12 (E)	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
13	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
14	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
15	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
16 (E)	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
17	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
18	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
19	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
20	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
21	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
22	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
23 (E)	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
24	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
25	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0

(continuación)

Nº de muestra	Reacciones durante las 3 primeras semanas	Reacción después de 5 semanas											
		después de 24 h			después de 48 h			después de 72 h			después de 96 h		
		E	F	S	E	F	S	E	F	S	E	F	S
26	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
27 (E)	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
28	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
29	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
30	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
	Suma	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
31	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
32 (E)	Irritación por tirita	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
33 (E)	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
34	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
35	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
36	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
37	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
38	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
39	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
40 (E)	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
41	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
42 (E)	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
43	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
44 (E)	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
45	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
46	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
47	Irritación por tirita	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
48	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
49	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
50	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
	Suma	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0

Otra ventaja de las composiciones según la presente invención es el hecho de que, debido a la actividad bactericida y antifúngica de *Bellis perennis L.,* la adición de tan solo el 0,2% de sorbato de potasio demostró ser suficiente en pruebas de exposición microbiológica.

Los agentes despigmentantes convencionalmente usados tales como arbutina, ácido kójico e hidroquinona presentan

principalmente su efecto por inhibición de tirosinasa. Aparte de los problemas de estabilización, su uso a largo plazo también puede conducir a problemas dermatológicos. Así, la presente invención proporciona un agente despigmentante y composiciones que comprenden dicho agente despigmentante que inhiben la síntesis de melanina conduciendo a un rápido aclaramiento de la piel, a la vez que son dermatológicamente bien toleradas.

REIVINDICACIONES

1. Extracto de *Bellis perennis L.* para su uso como agente despigmentante en un procedimiento terapéutico de despigmentar piel humana.

2. Extracto de *Bellis perennis L.* para su uso como agente despigmentante en un procedimiento terapéutico para tratar o prevenir hiperpigmentación adquirida o inherente.

3. Extracto de *Bellis perennis L.* para su uso como agente despigmentante en un procedimiento terapéutico de la reivindicación 2, en el que dicha hiperpigmentación está seleccionada de hiperpigmentación post-inflamatoria y queratosis pigmentaria.

4. Composición que comprende un extracto de *Bellis perennis L.* como agente despigmentante para su uso en un procedimiento terapéutico de despigmentación de piel humana.

5. Composición que comprende un extracto de *Bellis perennis L.* como agente despigmentante para su uso en un procedimiento terapéutico para tratar o prevenir hiperpigmentación adquirida o inherente.

6. Composición que comprende un extracto de *Bellis perennis L.* como agente despigmentante para su uso en un procedimiento terapéutico de la reivindicación 5, en la que dicha hiperpigmentación está seleccionada de hiperpigmentación post-inflamatoria y queratosis pigmentaria.

7. Composición de cualquiera de las reivindicaciones 4-6, en la que dicha composición es una crema, una pomada, una emulsión (leche), un tónico (loción), barra, dispersión, una formulación que comprende un tensioactivo, una disolución o un gel.

8. Composición de cualquiera de las reivindicaciones 4-7, en la que dicha composición comprende entre el 1% (peso/peso) y el 10% (peso/peso) de dicho extracto de *Bellis perennis L.*

9. Composición de la reivindicación 8, en la que dicha composición comprende entre el 2% (peso/peso) y el 5% (peso/peso) de dicho extracto de *Bellis perennis L.*

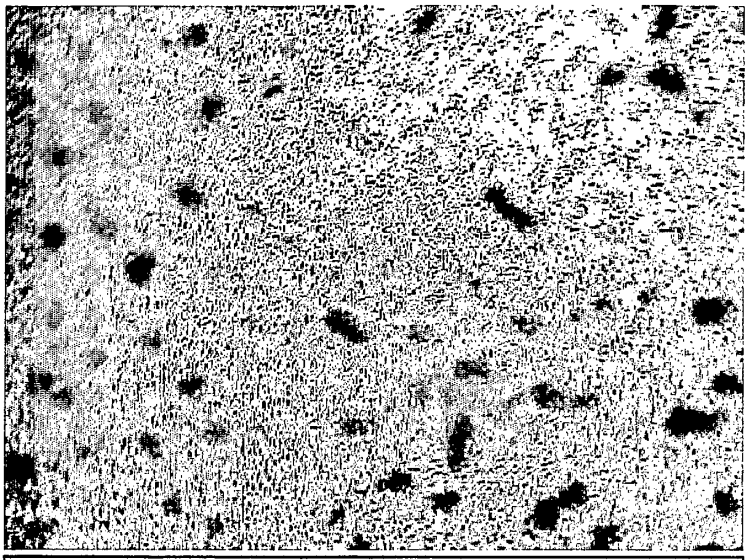
10. Composición de la reivindicación 9, en la que dicha composición comprende el 3% (peso/peso) de dicho extracto de *Bellis perennis L.*

11. Uso de un extracto de *Bellis perennis L.* como agente despigmentante para la despigmentación cosmética de piel humana.

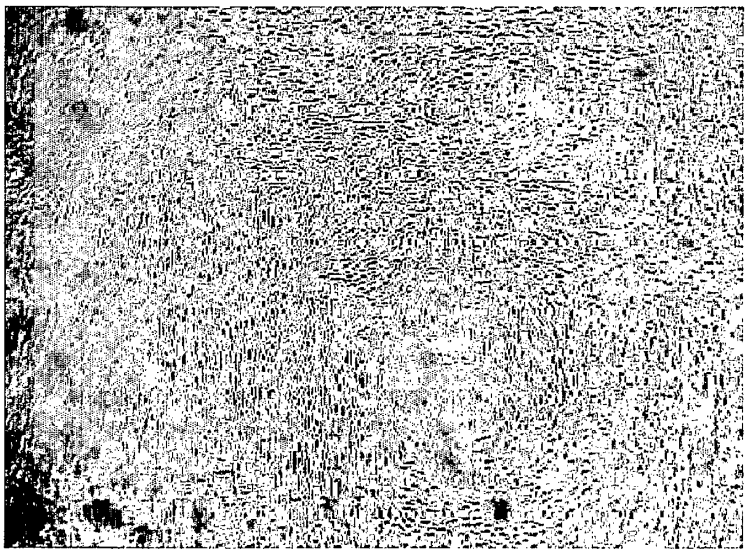
12. Uso de un extracto de *Bellis perennis L.* como agente despigmentante para tratar o prevenir cosméticamente hiperpigmentación adquirida o inherente.

13. Uso de la reivindicación 12, en el que dicha hiperpigmentación está seleccionada de manchas pigmentarias, nevo pigmentario, lentigo senil, pecas, efélides, melasma y cloasma.

Fig. 1: Efecto blanqueante en células de melanoma de ratón (B16V)

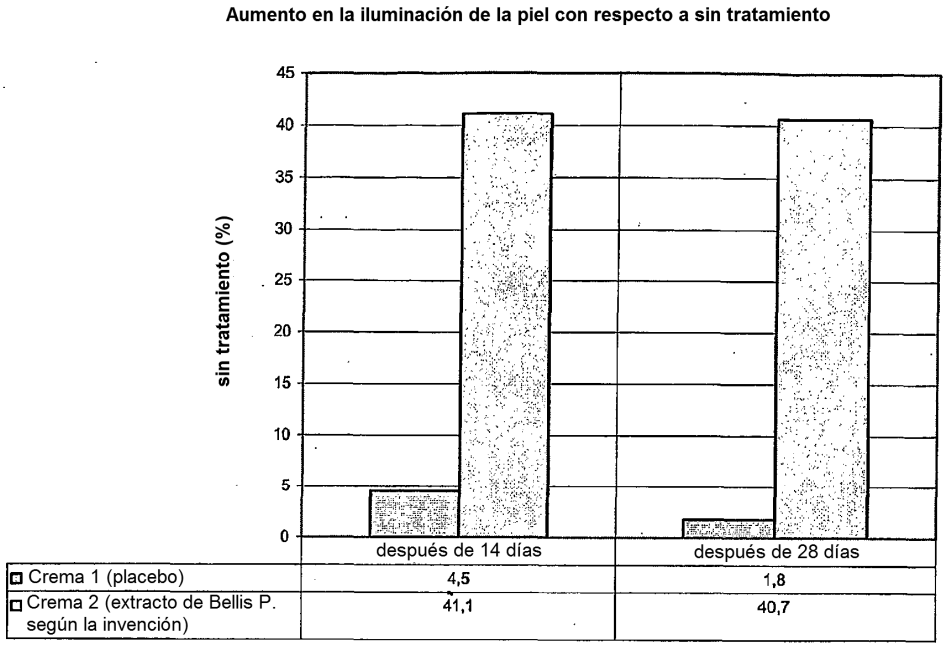


Células de melanoma de ratón B16V incubadas con RPMI 1640 suplementadas con 10% de SBF = Control



Células de melanoma de ratón B16V incubadas con RPMI 1640 suplementadas con 10% de SBF y 1% de Bellis Perennis

Fig. 2:


Aumento en la iluminación de la piel con respecto a sin tratamiento
sin tratamiento (%)
45
40
35
30
25
20
15
10
5
0
después de 14 días
después de 28 días
Crema 1 (placebo)
4,5
1,8
Crema 2 (extracto de Bellis P. según la invención)
41,1
40,7