

19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 447 853**

51 Int. Cl.:

A61K 8/34 (2006.01)
A61K 8/42 (2006.01)
A61K 8/63 (2006.01)
A61K 8/64 (2006.01)
A61K 31/7048 (2006.01)
A61Q 5/00 (2006.01)
A61Q 5/10 (2006.01)
A61Q 7/00 (2006.01)
A61Q 5/06 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **10.06.2003 E 03757133 (8)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **20.11.2013 EP 1515687**

54 Título: **Utilización de un agente inductor de la expresión de la DOPAcromo tautomerasa (TRP-2) como agente protector de los melanocitos del folículo piloso**

30 Prioridad:

11.06.2002 FR 0207136

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

13.03.2014

73 Titular/es:

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

72 Inventor/es:

**COMMO, STÉPHANE y
BERNARD, BRUNO**

74 Agente/Representante:

LEHMANN NOVO, María Isabel

ES 2 447 853 T3

Aviso: En el plazo de nueve meses a contar desde la fecha de publicación en el Boletín europeo de patentes, de la mención de concesión de la patente europea, cualquier persona podrá oponerse ante la Oficina Europea de Patentes a la patente concedida. La oposición deberá formularse por escrito y estar motivada; sólo se considerará como formulada una vez que se haya realizado el pago de la tasa de oposición (art. 99.1 del Convenio sobre concesión de Patentes Europeas).

DESCRIPCIÓN

Utilización de un agente inductor de la expresión de la DOPAcromo tautomerasa (TRP-2) como agente protector de los melanocitos del folículo piloso

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

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

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

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

La tirosinasa es la enzima que inicia la biosíntesis de las melaninas. Esta se describe también como la enzima que limita la melanogénesis.

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

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

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

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

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

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

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

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

folículo piloso humano requiere la presencia de melanocitos quiescentes en la región superior del folículo piloso, región denominada de otro modo "depósito", que estarán cíclicamente activados para regenerar la unidad folicular de pigmentación. Este mecanismo de renovación celular que participa en el mantenimiento de la pigmentación es específico de la unidad folicular de pigmentación; no se encuentra en la unidad epidérmica de pigmentación.

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

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

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

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

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

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

35 La solicitante ha puesto en evidencia por lo tanto que la TRP-2, que desempeña un papel en la melanogénesis (síntesis de melanina) a nivel de la unidad epidérmica de pigmentación, podría desempeñar un papel diferente y desconocido hasta ahora, en la unidad folicular de pigmentación: su inducción podría permitir mantener y/o regenerar la población de melanocitos quiescentes de la región superior del folículo piloso y la población de melanocitos activos del bulbo, y favorecer así la renovación cíclica de la unidad folicular responsable del mantenimiento de la pigmentación del cabello, de las pestañas y/o del pelo.

40 La solicitante ha mostrado que es posible inducir la síntesis de TRP-2. Induciendo la síntesis de TRP-2, se ha identificado un medio para mantener y/o regenerar la población de melanocitos del folículo piloso responsables de la pigmentación del cabello. Por otra parte, se ha evaluado la actividad citoprotectora de agentes inductores de TRP2 en unas condiciones que inducen la apoptosis y/o la senescencia de los melanocitos del folículo piloso.

45 Se identificó así un medio para prevenir y/o limitar y/o detener el desarrollo de la canicie y mantener la pigmentación del cabello y/o del pelo gris o blanco.

Así, un primer aspecto de la invención se refiere a la utilización cosmética no terapéutica de un agente inductor de la expresión de la DOPAcromo tautomerasa, como agente protector de los melanocitos del folículo piloso.

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

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

El agente inductor de la expresión de la DOPAcromo tautomerasa según la invención está asimismo destinado a favorecer la renovación cíclica de la unidad folicular de pigmentación.

La invención se refiere por lo tanto a la utilización de un agente inductor de la expresión de la DOPAcromo tautomerasa para prevenir y/o limitar y/o detener el desarrollo de la canicie.

- 5 Se refiere igualmente a la utilización de un agente inductor de la expresión de la DOPAcromo tautomerasa para mantener la pigmentación natural del cabello y/o del pelo gris.

Se entiende por agente inductor de la expresión de la DOPAcromo tautomerasa un compuesto capaz de estimular la síntesis de la enzima DOPAcromo tautomerasa.

- 10 Podrá tratarse de un vector de expresión que codifica para la DOPAcromo tautomerasa. Para la construcción de este vector de expresión de la enzima, se preferirá utilizar un promotor específico de un tejido, en particular un promotor específico de melanocitos.

Entre los agentes inductores de la expresión de la DOPAcromo tautomerasa (TRP-2) se pueden citar los compuestos siguientes:

- el hexametileno bisacetamida (HMBA Fang *et al.*, 2001);
- 15 - las hormonas esteroideas, tales como el dietilestilbestrol y/o el estradiol (Kippenberger *et al.* 1998);
- la glicirrizina (Jung *et al.*, 2001);
- la forskolina;
- el kaempferol.

- 20 El documento FR-A-2639828 divulga la utilización del kaempferol encapsulado en los liposomas como agente activo en las composiciones destinadas a favorecer la pigmentación del cabello.

El agente inductor de la expresión de la DOPAcromo tautomerasa puede ser un modulador de un factor endógeno, tal como un modulador de la expresión de Sox10, capaz de activar el promotor de la DOPAcromo tautomerasa (TRP-2).

- 25 El agente inductor de la expresión de la DOPAcromo tautomerasa podrá ser un vector de expresión que codifica para un agente inductor de la expresión de la DOPAcromo tautomerasa, tal como Sox10.

Para la construcción de un vector de expresión de un agente inductor, se puede utilizar un promotor específico de un tejido, en particular un promotor específico de melanocitos y/o de queratinocitos.

La expresión del agente inductor de la DOPAcromo tautomerasa por el vector de expresión puede ser a su vez inducible.

- 30 Según la invención, el agente inductor de la DOPAcromo tautomerasa es el Kaempferol encapsulado.

Otro objeto de la invención es la utilización no terapéutica de una composición según la reivindicación 6.

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

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

- 40 Por vía oral, la composición según la invención puede contener el o los agentes inductores de la expresión de la DOPAcromo tautomerasa, unos compuestos activos en solución en un líquido alimenticio tal como una solución acuosa o hidroalcohólica, eventualmente aromatizada. Pueden también ser incorporados en un excipiente sólido ingerible y presentarse por ejemplo en forma de gránulos, de píldoras, de comprimidos o de grageas. Pueden también estar colocados en solución en un líquido alimenticio, envasado a su vez eventualmente en unas cápsulas ingeribles.

- 45 Según el modo de administración, la composición de la invención puede presentarse en todas las formas galénicas normalmente utilizadas, particularmente en cosmetología. Una composición preferida de la invención es una composición cosmética adaptada a una aplicación tópica sobre el cuero cabelludo y/o la piel.

Para una aplicación tópica, la composición utilizable según la invención puede estar en particular en forma de una solución acuosa, hidroalcohólica u oleosa, o de dispersión de tipo loción o suero, de emulsiones de consistencia líquida o semilíquida de tipo leche, obtenidas por dispersión de una fase grasa en una fase acuosa (H/E) o a la

- 5 inversa (E/H), o de suspensiones o emulsiones de consistencia blanda de tipo crema o gel acuoso o anhidros, o también de microcápsulas o micropartículas, o de dispersiones vesiculares de tipo iónico y/o no iónico. Puede así presentarse en forma de ungüento, de tinte, de crema, de pomada, de polvo, de parche, de tampón empapado, de solución, de emulsión o de dispersión vesicular, de loción, de gel, de spray, de suspensión, de champú, de aerosol o de espuma. Pueden ser anhidras o acuosas. Pueden también consistir en unas preparaciones sólidas que constituyen unos jabones o unas pastillas de limpieza.
- Estas composiciones son preparadas según los métodos habituales.
- 10 La composición utilizable según la invención puede en particular ser una composición para cuidados capilares, y en particular un champú, una loción de marcado, una loción tratante, una crema o un gel de peinado, una composición de tintes (en particular tintes de oxidación) eventualmente en forma de champús colorantes, unas lociones reestructurantes para el cabello, de mascarilla.
- La composición cosmética según la invención será preferiblemente una crema, una loción capilar, un champú o un acondicionador.
- 15 Las cantidades de los diferentes constituyentes de las composiciones utilizables según la invención son las clásicamente utilizadas en los campos considerados.
- 20 Cuando la composición utilizable según la invención es una emulsión, la proporción de la fase grasa puede ir del 5% al 80% en peso, y preferentemente del 5% al 50% en peso con respecto al peso total de la composición. Los aceites, las ceras, los emulsionantes y co-emulsionantes utilizados en la composición en forma de emulsión se seleccionan entre los clásicamente utilizados en el campo cosmético. El emulsionante y el co-emulsionante están presentes, en la composición, en una proporción que va del 0,3% al 30% en peso, y preferentemente del 0,5 al 20% en peso con respecto al peso total de la composición. La emulsión puede, además, contener unas vesículas lipídicas.
- 25 Cuando la composición utilizable según la invención es una solución o un gel oleoso, la fase grasa puede representar más del 90% del peso total de la composición.
- El agente inductor de la expresión de la DOPAcromo tautomerasa está encapsulado en un revestimiento tal como unas microesferas, unas nanoesferas, unos oleosomas o unas nanocápsulas.
- A título de ejemplo, las microesferas podrán ser preparar según el método descrito en la solicitud de patente EP 0 375 520.
- Las nanoesferas podrán presentarse en forma de suspensión acuosa y ser preparadas según los métodos descritos en las solicitudes de patente FR 0015686 y FR 0101438.
- 30 Los oleosomas consisten en una emulsión de aceite en agua formada por unos glóbulos oleosos provistos de un revestimiento de cristal líquido laminado disperso en una fase acuosa (véanse las solicitudes de patente EP 0 641 557 y EP 0 705 593).
- 35 El agente inductor de la expresión de la DOPAcromo tautomerasa podrá asimismo estar encapsulado en unas nanocápsulas que consisten en un revestimiento laminado obtenido a partir de un tensioactivo siliconado (véase la solicitud de patente EP 0 780 115), las nanocápsulas podrán también ser preparadas a base de poliésteres sulfónicos hidrodispersables (véase la solicitud de patente FR 0113337).
- 40 El agente inductor de la expresión de la DOPAcromo tautomerasa podrá también estar acomplejado en la superficie de glóbulos oleosos catiónicos, sea cual sea su tamaño (véanse las solicitudes de patente EP 1 010 413, EP 1 010 414, EP 1 010 415, EP 1 010 416, EP 1 013 338, EP 1 016 453, EP 1 018 363, EP 1 020 219, EP 1 025 898, EP 1 120 101, EP 1 120 102, EP 1 129 684, EP 1 160 005 y EP 1 172 077).
- 45 El agente inductor de la expresión de la DOPAcromo tautomerasa puede finalmente estar acomplejado en la superficie de nanocápsulas o nanopartículas provistas de un revestimiento laminado (véanse los documentos EP 0 447 318 y EP 0 557 489) y que contiene un tensioactivo catiónico en la superficie (véanse las referencias citadas anteriormente para los tensioactivos catiónicos).
- En particular, se preferirá una composición tal que el revestimiento en el que el agente inductor de la expresión de la DOPAcromo tautomerasa tenga un diámetro inferior o igual a 10 μm .
- 50 De manera conocida, la composición según la invención puede contener también unos adyuvantes habituales en el campo cosmético, tales como los gelificantes hidrófilos o lipófilos, los aditivos hidrófilos o lipófilos, los conservantes, los antioxidantes, los disolventes, los perfumes, las cargas, los filtros, los absorbentes de olor y las materias colorantes. Las cantidades de estos diferentes adyuvantes son las clásicamente utilizadas en el campo cosmético, y son por ejemplo del 0,01% al 10% del peso total de la composición. Estos adyuvantes, según su naturaleza, pueden ser introducidos en la fase grasa, en la fase acuosa y/o en las esférulas lipídicas.

- 5 Como aceites o ceras utilizables en la invención, se pueden citar los aceites minerales (aceite de vaselina), los aceites vegetales (fracción líquida de la manteca de karité, aceite de girasol), los aceites animales (perhidroescualeno), los aceites de síntesis (aceite de Purcelina), los aceites o ceras siliconados (ciclometicona) y los aceites fluorados (perfluoropoliéteres), las ceras de abejas, de carnauba o de parafina. Se puede añadir a estos aceites unos alcoholes grasos y unos ácidos grasos (ácido esteárico).
- Como emulsionantes utilizables en la invención, se puede citar por ejemplo el estearato de glicerol, el polisorbato 60 y la mezcla de PEG-6/PEG-32/estearato de glicol vendida bajo la denominación de Tefose[®] 63 por la compañía Gattefosse.
- 10 Como disolventes utilizables en la invención, se pueden citar los alcoholes inferiores, en particular el etanol y el isopropanol, el propilenglicol.
- 15 Como gelificantes hidrófilos utilizables en la invención, se pueden citar los polímeros carboxivinílicos (carbómero), los copolímeros acrílicos tales como los copolímeros de acrilatos/alquilacrilatos, las poliacrilamidas, los polisacáridos tales como la hidroxipropilcelulosa, las gomas naturales y las arcillas y, como gelificantes lipófilos, se pueden citar las arcillas modificadas como las bentonas, las sales metálicas de ácidos grasos como los estearatos de aluminio y la sílice hidrófoba, la etilcelulosa, el polietileno.
- Las composiciones utilizables según la invención pueden asociar al menos un agente inductor de la expresión de TRP-2 con otros agentes activos. Entre estos agentes activos, se pueden citar a título de ejemplo:
- 20 - los agentes que modulan la diferenciación y/o la proliferación y/o la pigmentación de las células de la piel, tales como el retinol y sus ésteres, la vitamina D y sus derivados, los estrógenos tales como el estradiol, los moduladores de AMPc tales como los derivados de POMC, la adenosina, o la forskolina y sus derivados, las prostaglandinas y sus derivados, la triyodotironina y sus derivados;
- unos extractos de vegetales tales como los de iridáceas o de soja, extractos que pueden contener entonces o no unas isoflavonas;
- unos extractos de microorganismos;
- 25 - los agentes antirradicales libres, tales como el α -tocoferol o sus ésteres, las superóxido dismutasas o sus miméticos, algunos quelantes de metales o el ácido ascórbico y sus ésteres;
- los anti-seborreicos, tales como algunos aminoácidos azufrados, el ácido 13-cis-retinoico, el acetato de ciproterona;
- 30 - los otros agentes para combatir los estados descamativos del cuero cabelludo como la zinc piritona, el disulfuro de selenio, el climbazol, el ácido undecilénico, el ketoconazol, la piroctona olamina (octopirox) o la ciclopiroctona (ciclopirox);
- en particular, podrá tratarse de activos que estimulan el nuevo crecimiento y/o que favorecen la disminución de la caída del cabello, se pueden más particularmente citar a título no limitativo:
- 35 - los ésteres de ácido nicotínico, entre ellos especialmente el nicotinato de tocoferol, el nicotinato de bencilo y los nicotinatos de alquilo de C₁-C₆, como los nicotinatos de metilo o de hexilo;
- los derivados de pirimidina, como el 2,4-diamino-6-piperidinopirimidina-3-óxido o "Minoxidil" descrito en las patentes US 4,139,619 y US 4,596,812; el Aminexil o 2,4-diamino-pirimidina-3-óxido descrito en el documento WO96/09048;
- los agentes inhibidores de lipoxigenasa o inductor de ciclo-oxidasa que favorecen el nuevo crecimiento del cabello, como los descritos por la solicitante en la solicitud de patente europea EP 0 648 488;
- 40 - los agentes antibacterianos, tales como los macrólidos, los piranósidos y las tetraciclinas, y en particular la Eritromicina;
- los agentes antagonistas de calcio, como la Cinarizina, la Nimodipina y la Nifedipina;
- unas hormonas, tales como el estriol o unos análogos, o la tiroxina y sus sales;
- unos agentes antiandrógenos, tales como la oxendolona, la espironolactona y la flutamida;
- 45 - unos inhibidores esteroideos o no esteroideos de las 5- α -reductasas, tales como los descritos por la solicitante en las solicitudes de patente europea EP 0 964 852 y EP 1 068 858 o también el finasteride; unos agonistas de los canales potásicos dependientes del ATP, tales como la cromakalima y el nicorandil;
- unos extractos vegetales de actividad pro-pigmentante, como los extractos de crisantemo tales como se describen en el documento FR 2768343 y los extractos de Sanguisorba descritos en el documento FR 2782920A1.

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

Figuras:

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

Leyendas:

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

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

Figura 2: Estas fotografías permiten visualizar la expresión de TRP-2 en los melanocitos de la epidermis y del cabello (vaina epitelial externa y bulbo piloso). Estudio inmunohistológico analizado en microscopia confocal láser.

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

Figura 4: Esta fotografía representa una transferencia Western que muestra el efecto inductor de la expresión de TRP2 de la forskolina (Fk) con respecto a un control.

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

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

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

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

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

30 El cabello entero se fija en etanol a -20°C durante 10 minutos. Cada etapa de los procedimientos de fijación y de marcado está seguida de lavados con tampón fosfato (pH 7,4 (PBS))-Tween20 0,05%. Salvo precisión, todas las etapas se llevan a cabo a temperatura ambiente. Las peroxidasas endógenas de la muestra son neutralizadas incubando la muestra en una solución de peróxido de hidrógeno al 0,1% durante 10 minutos. Para bloquear los sitios de fijación no específicos, la muestra se incuba con leche desnatada al 1%, durante 15 minutos. El anticuerpo (Ac) primario NK1-beteb que reconoce específicamente la proteína pMel-17 (Monosan, Paris, F) se diluye al 1/40 en PBS-Tween al 0,05%, que contiene el 10% de suero normal (X0907, DAKO, Trappes, F). El Ac primario se incuba durante 18 horas sobre el cabello a +04°C. El Ac secundario acoplado a la biotina (E-433, DAKO, Trappes, F) se diluye al 1/400 y se incuba durante 30 minutos. El cabello se incuba después en presencia de estreptavidina-biotina-peroxidasa (K-0377, DAKO, Trappes, F), y finalmente el inmunomarcado se revela en presencia de 3-amino-9-etilcarbazol (AEC) (AEC kit-101, Sigma, Saint Quentin Fallavier, F.).

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

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

A - Estudio inmunohistológico analizado en microscopia confocal láser

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

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

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

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

A.3 - Protocolo de inmunomarcado sobre folículo piloso entero, fragmento de piel y corte congelado

- 10 El cabello entero, los fragmentos epiteliales de piel y los cortes congelados son fijados en etanol a -20°C durante 10 minutos. Cada etapa de los procedimientos de fijación y de marcado está seguida de lavados con tampón fosfato (pH 7,4 (PBS))-Tween20 0,05%. Salvo precisión, todas las etapas se llevan a cabo a temperatura ambiente. Las peroxidases endógenas de la muestra son neutralizadas incubando la muestra en una solución de peróxido de hidrógeno al 0,1% durante 10 minutos. Para bloquear los sitios de fijación no específicos, la muestra se incuba con leche desnatada al 1%, durante 15 minutos. Los anticuerpos (Ac) primarios son diluidos en PBS-Tween al 0,05%, que contiene el 10% de suero normal (X0907, DAKO, Trappes, F). Los Ac primarios NK1-beteb que reconocen específicamente la proteína pMel-17 (1/40, Monosan, Paris, F), y α PEP8h (1/2000, Dr VJ.Hearing, NIH, Bethesda, MD, USA) que reconocen específicamente la proteína TRP2 humana (Virador *et al.* 2001) son incubados simultáneamente durante 18 horas a +04°C sobre el cabello entero y los fragmentos epiteliales de piel, y 30 minutos a temperatura ambiente sobre los cortes congelados. El Ac secundario de cabra dirigido contra las inmunoglobulinas (Ig) G2b acoplado a la Cy3 (M32410, TEBU, le Perray en Yveline, F) se diluye al 1/80, y el Ac secundario dirigido contra las Ig acoplado a la Cy5 (111-175-144, Jackson Immunoresearch Lab. Inc. West Grove, PA, USA) se diluye al 1/500 y se incuban simultáneamente durante 30 minutos sobre las muestras. Los inmunomarcados son analizados en microscopia confocal láser (LSM510, Carl Zeiss, Oberkochen, D).
- 15
- 20
- 25 Conclusión de las observaciones: en la figura 2 se constata la presencia de TRP-2 en los melanocitos de la epidermis, no obstante, esta enzima no está expresada ni en los melanocitos de la vaina epitelial del folículo piloso, ni en los melanocitos del bulbo piloso.

B - Estudio bioquímico por análisis en transferencia Western

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

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

35

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

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

Observaciones y comentarios de la figura 3:

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

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

- 50 Ejemplo 3: Puesta en evidencia del efecto inductor de la forskolina sobre la expresión de la DOPAcromo tautomerasa (TRP2)

En una primera etapa (a), los melanocitos son inoculados el J0 con un medio M2 ((PromoCell, Heidelberg, D). Después de un tiempo necesario para la adherencia de las células comprendido entre 2 y 18 horas, el medio se sustituye por un medio en el que los melanocitos no expresan, o la expresan poco, la DOPAcromo tautomerasa

(expresión de TRP-2 basal) o bien que expresan una DOPAcromo tautomerasa inactiva: DMEM: F12 (Gibco BRL - 42400-044), Ultrosor G (Gibco BRL - 15950-017) 0,5%, PC-1 (BioWhittaker 344022) 0,5%, bFGF (Pepro Tech Inc 100-18B) 5 ng/ml, heparina (Sigma H-3149) 75 ng/ml, 1% de antibióticos, 1% de glutamina. Las células son mantenidas en este medio de cultivo durante un tiempo comprendido entre 12 y 72 horas, necesarias a la disminución de la expresión de TRP-2.

5 En una etapa (b), la forskolina (20 μ M) se añade al medio de cultivo; los melanocitos son incubados en este medio durante 24h (etapa c).

La revelación del índice de TRP2 (etapa d) se realiza mediante el método clásico de la transferencia Western, en presencia de un anticuerpo α PEP8h que reconoce específicamente la proteína TRP2 humana (Virador *et al.*, 2001).

10 La vimentina (proteína del citoesqueleto de los melanocitos) se utiliza para asegurar que la carga proteica es equivalente en los diferentes ensayos.

Los resultados presentados en la figura 4 muestran que la forskolina es capaz de inducir la expresión de la DOPAcromo tautomerasa (TRP2) con respecto al control.

Ejemplo 4 - Composiciones

15 - Loción capilar

Inductor de la DOPAcromo tautomerasa	0,5 g
Propilenglicol	20 g
Etanol 95°	30 g
Agua csp	100 g

Esta loción se aplica diariamente en las zonas a tratar y preferentemente sobre el conjunto del cuero cabelludo durante al menos 10 días y preferiblemente de 1 a 2 meses. Se constata entonces una disminución de la aparición de cabellos blancos o grises y una repigmentación del cabello gris.

20 - champú tratante

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

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

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

25 - Gel tratante

Inductor de la DOPAcromo tautomerasa	0,75 g
Aceites esenciales de eucalipto	1 g
Econozol	0,2 g
Lauril poligliceril 6-cetearilglicoéter	1,9 g
Conservantes	cs
Carbopol 934P vendido por la compañía BF Goodrich Corporation	0,3 g

ES 2 447 853 T3

Agente de neutralización	cs pH 7
Agua csp	100 g

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

REIVINDICACIONES

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

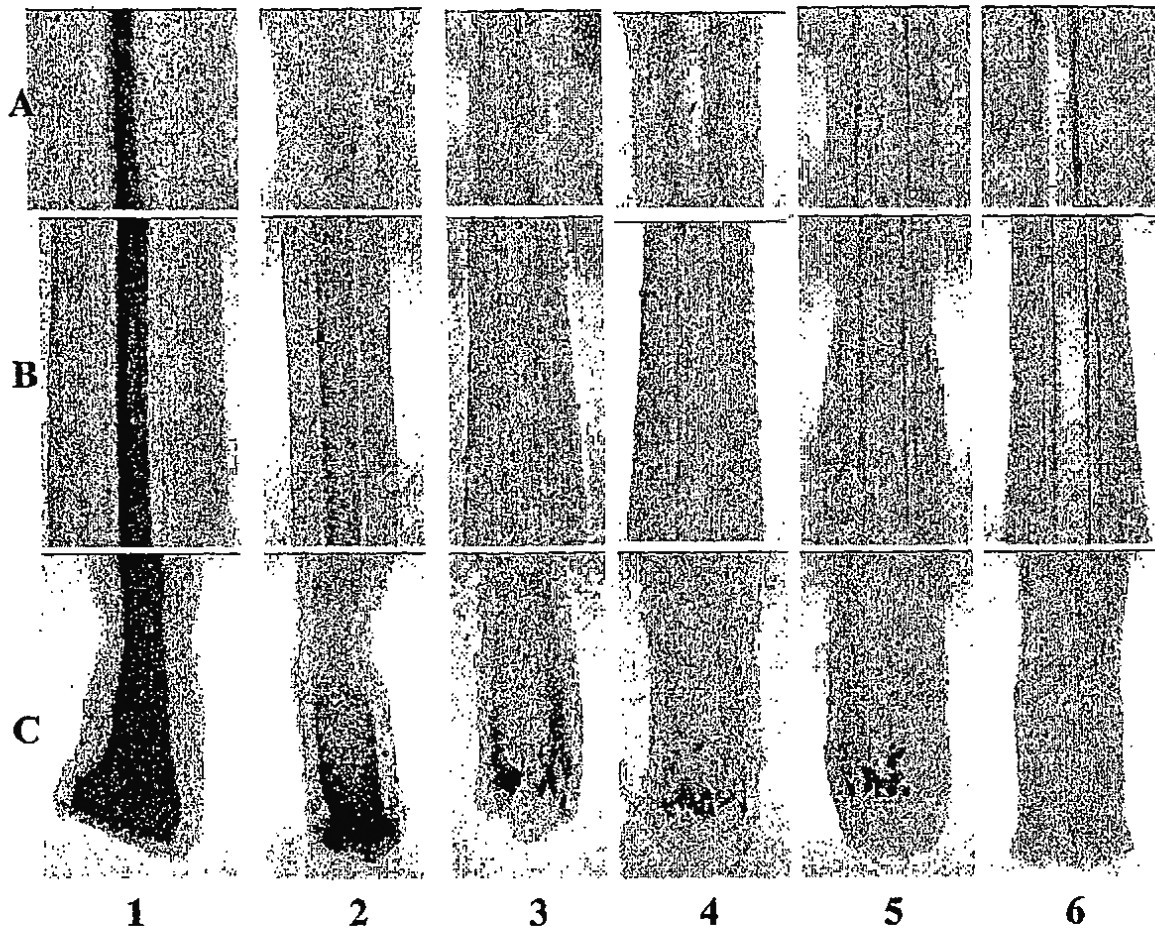


Figura 1

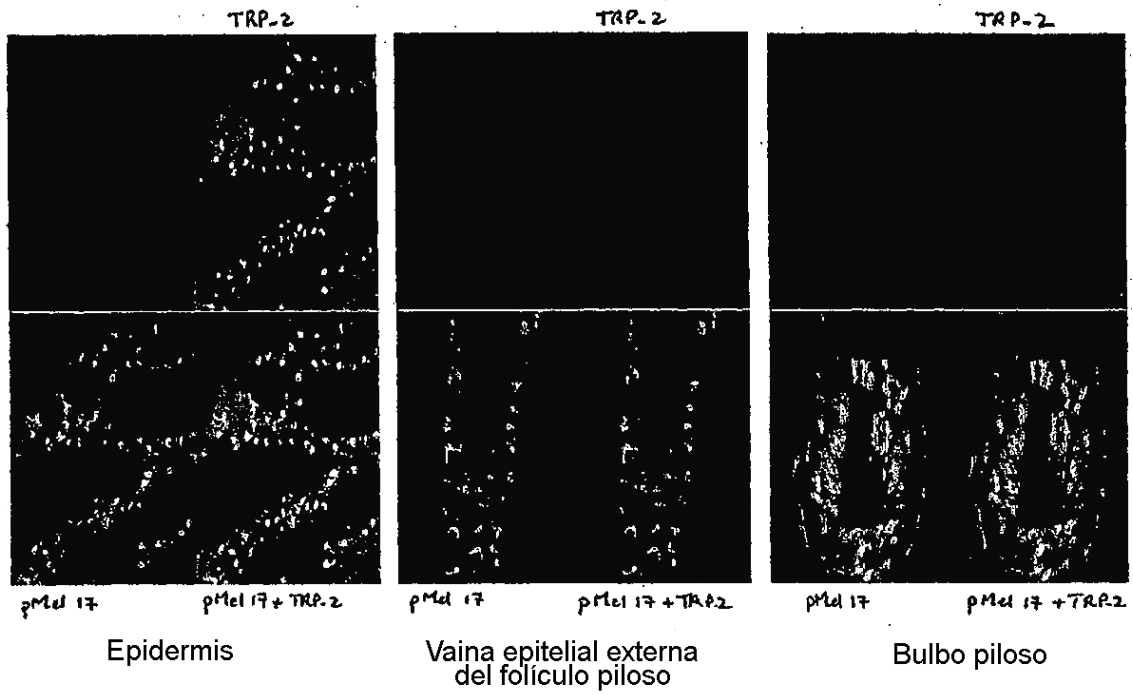


Figura 2

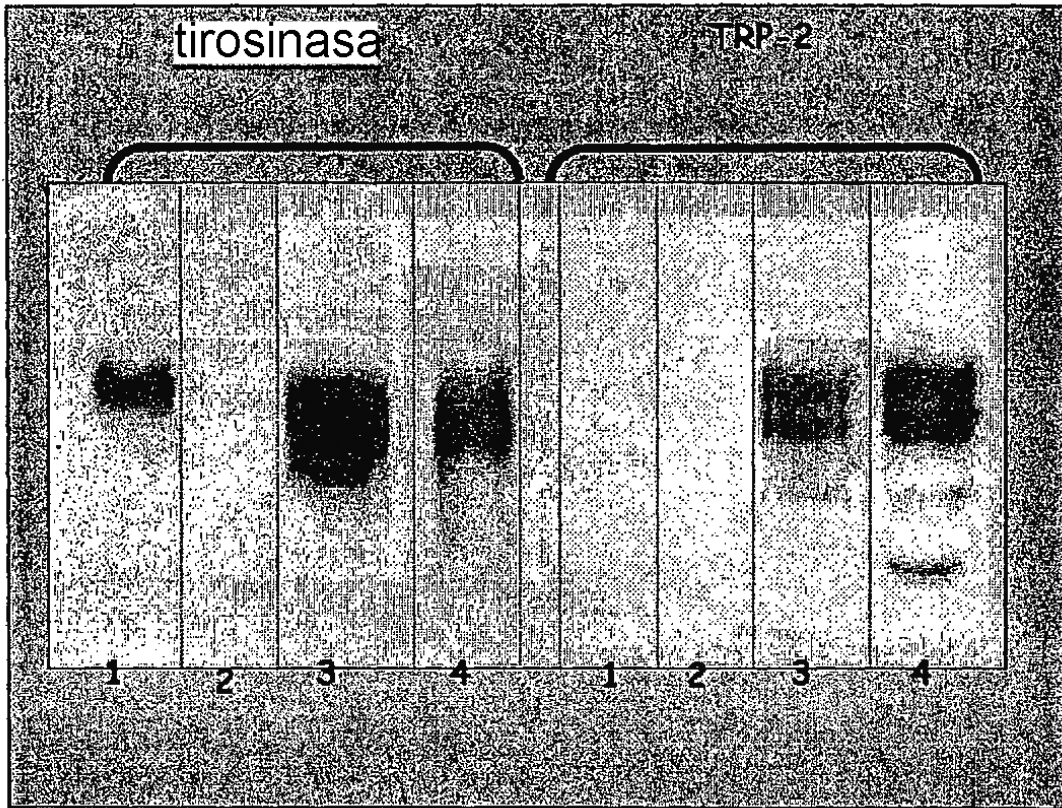


Figura 3

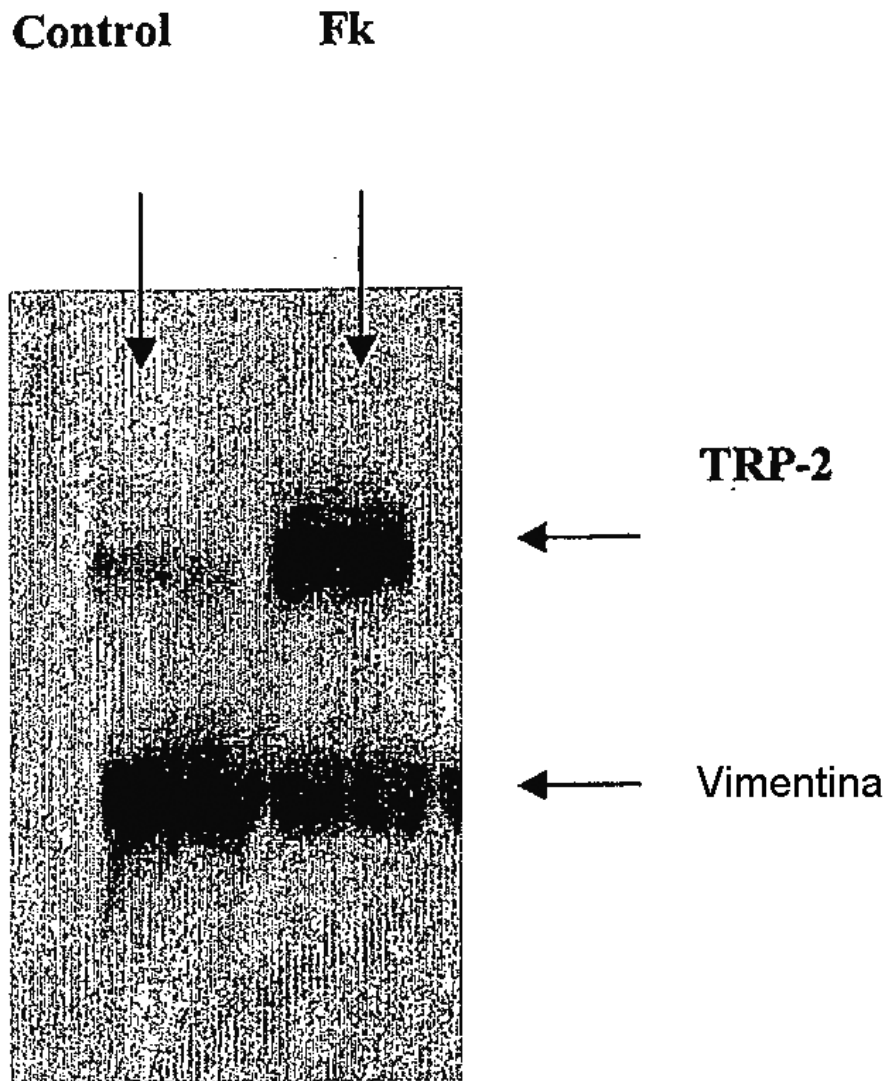


Figura 4