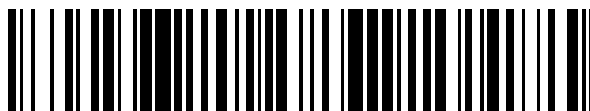


19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 642 038**

51 Int. Cl.:

A61K 8/27	(2006.01)
A61K 8/44	(2006.01)
A61K 8/60	(2006.01)
A61K 8/64	(2006.01)
A61K 8/67	(2006.01)
A61K 8/23	(2006.01)
A61Q 5/00	(2006.01)
A61Q 7/00	(2006.01)
A61K 8/19	(2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

- 86 Fecha de presentación y número de la solicitud internacional: **21.12.2005 PCT/FR2005/003228**
- 87 Fecha y número de publicación internacional: **29.06.2006 WO06067335**
- 96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **21.12.2005 E 05850571 (0)**
- 97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **20.09.2017 EP 1827365**

54 Título: **Utilización de una base nutritiva compleja en el campo cosmético, especialmente el capilar**

30 Prioridad:

21.12.2004 FR 0413658

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

15.11.2017

73 Titular/es:

**THOREL, JEAN-NOEL (100.0%)
3 RUE LAROCHELLE
F-75014 PARIS, FR**

72 Inventor/es:

GATTO, HUGUES

74 Agente/Representante:

ISERN JARA, Jorge

ES 2 642 038 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 una base nutritiva compleja en el campo cosmético, especialmente el capilar

5 La presente invención se refiere a una base nutritiva compleja (abreviada como BNC) en medio acuoso, también denominada base econutritiva, adaptada para el tratamiento del cabello y/o del cuero cabelludo en el hombre o la mujer, y de sus diferentes usos en el campo de la cosmética capilar.

10 Por "base nutritiva compleja", se entiende cualquier composición o formulación, en medio acuoso, que se distingue, como se indica a continuación, de un medio de cultivo celular, por que excluye cualquier factor de crecimiento celular, y/o cualquier extracto de origen animal o celular, sin trazador, y que se parece a un medio de cultivo celular, porque permite por sí misma un cultivo viable in vitro de queratinocitos epidérmicos humanos, por ejemplo, durante al menos 72 horas, con al menos una proliferación clonal en el primer paso, sin asistencia nutritiva viva, tales como fibroblastos.

15 Se han descrito BNC de este tipo en el documento WO/96/21421, que describe su uso, sola o combinada con otros componentes, bien como principio activo o bien como excipiente.

20 Una BNC tal como la considerada de acuerdo con la presente invención, no incluye, ni en su composición original ni en su aplicación, factores de crecimiento de origen celular, por ejemplo, EGF (Epidermal Growth Factor [factor de crecimiento epidérmico]), y/o ningún extracto biológico de origen animal o celular.

25 Por naturaleza, estos extractos no solamente tienen una composición variable, es decir, indeterminada, incluso a veces un origen biológico mal determinado y, por tanto, sin posibilidad de trazabilidad o sin trazar, sino que también determinados componentes tienen una indeterminación en lo que respecta a su estructura química, especialmente bioquímica, exacta.

30 Una BNC tal como la considerada de acuerdo con la presente invención, no incluye ningún extracto biológico tal como suero feto de ternera (SFT), ni ningún extracto de glándula pituitaria de buey, no trazable o sin trazar.

Por "trazar" o "trazable", se entiende la característica según la que el origen y posteriormente el tratamiento de una materia biológica pueden establecerse y controlarse.

35 Una BNC de acuerdo con la presente invención no incluye, por ejemplo, ningún extracto biológico celular, vegetal o animal, trazable o no, trazado o no.

Una BNC considerada de acuerdo con la presente invención no incluye ningún principio activo medicamentoso, tal como un antibiótico.

40 Dichas BNC están constituidas, además del medio acuoso, por una fracción de aminoácidos, de los que algunos son esenciales, menor del 0,5%, preferentemente del 0,35% en peso, por una fracción de vitaminas hidrosolubles inferior al 0,2%, y preferentemente al 0,015% en peso, y por una fracción inorgánica, con oligoelementos y sales metálicas, inferior al 5%, y preferentemente al 2% en peso, siendo el resto de la composición agua.

45 Preferentemente, una BCN de acuerdo con la invención está completamente formulada en fase acuosa, a partir de entidades químicas, bioquímicas y biológicas, donde la estructura de cada una de ellas está identificada, por ejemplo, se sabe su nomenclatura o está en un índice, de forma que la composición química de la BNC está estrictamente definida.

50 Una BCN de acuerdo con la invención es el resultado de una acción de la mano del hombre, y este hecho no sería asimilable a ningún extracto de origen natural y/o biológico obtenido, por ejemplo, mediante el fraccionamiento de un material biológico, por ejemplo, animal o vegetal.

55 De acuerdo con el documento WO 96/21421, una base nutritiva de este tipo tiene, por ejemplo, la composición siguiente, según la Tabla 1 siguiente:

Tabla 1

COMPONENTES	Concentración en mg/l
Agua	q.s.p.
<u>Aminoácidos</u>	9,2
L-Alanina	
L-Arginina HCl	421,4
L-Asparagina (anhidra)	14,2
Ácido L-aspártico	4,0
L-Cisteína HCl. H ₂ O	42,0
Ácido L-glutámico	14,8
L-Glutamina	1754,4
Glicina	7,6
L-Histidina HCl. H ₂ O	50,0
L-Isoleucina	6,0
L-Leucina	131,2
L-Lisina HCl	54,0
L-Metionina	13,5
L-Fenilalanina	10,0
L-Prolina	34,6
L-Serina	126,1
L-Treonina	24,0
L-Triptófano	9,3
L-Tirosina 2 Na 2H ₂ O	11,7
L-Valina	70,3
<u>Vitaminas</u>	0,02
d-Biotina	
Ácido fólico	0,80
Nicotinamida	0,04
Pantotenato D-Ca	0,30
Piridoxina HCl	0,06
Riboflavina	0,04
Tiamina HCl	0,30
l-Inositol	18,0
Piruvato de sodio	55,0
Timidina	0,73
Adenina (HCl)	24,0
Ácido DL-lipoico	0,20
<u>Componentes inorgánicos</u>	6800,0
Cloruro de sodio	
KCl	112,0
Na ₂ HPO ₄	284,0
CuSO ₄ .5H ₂ O	0,003
Acetato de sodio	300,0 (anhidro)
D-Glucosa	1080,0
Hepes (piperazina)	6600,0
Fosforiletanolamina	0,06768
Etanolamina	0,04684
Sulfato de sodio	3,4
Bicarbonato de sodio	1160,0
FeSO ₄ .7H ₂ O	1,39
MgCl ₂ .6H ₂ O	120,0
CaCl ₂ .2H ₂ O	De 13,0 a 22,05
ZnSO ₄ .7H ₂ O	0,144
(NH ₄) ₆ Mo ₇ O ₂₄ .4H ₂ O	0,00120
Na ₂ SiO ₃ .5H ₂ O	0,142
MnCl ₂ .4H ₂ O	0,00002
SnCl ₂ .2H ₂ O	0,00011
NH ₄ VO ₃	0,00057

Bien 2808,3 mg o
bien 0,281% en
peso

Es decir
99,49 mg
o
0099% en peso

Es decir, de
16474,2 mg a
16483,25 mg o
aproximadamente
un 1,65% en peso

El documento EP-A-0 383 467 describe la utilización de jarabe de melazas, obtenidas de la industria azucarera, mediante aplicación local sobre el cuero cabelludo (u otras zonas pilosas), para tratar los problemas de caspa y luchar contra la caída del cabello.

5 Una jarabe de melaza es un extracto natural obtenido por fraccionamiento o separación a partir de la caña de azúcar, cuya composición exacta sigue siendo indefinida o variable dependiendo de su origen, y que tiene un importante contenido, que representa al menos el 5% de la composición total del jarabe, de azúcares, es decir, glucosa, sacarosa, fructosa, y mono oligosacáridos.

10 El documento FR-A-2 535 201 describe una composición o preparación cosmética destinada especialmente a mejorar la nutrición de los folículos pilosos. La parte activa de esta composición consiste básicamente en un medio para el cultivo in vitro de células epiteliales humanas aisladas, complementado con suero de feto de ternera.

15 Como se ha indicado anteriormente, un medio de cultivo celular, adicionalmente complementado con suero de feto de ternera, no es una BNC tal como pretende la presente invención.

20 De acuerdo con el documento-A-2 535 201, para mejorar el paso de las sustancias nutritivas desde el medio de cultivo a través de la piel, la composición cosmética comprende un vehículo o soporte dermófilo que comprende, por ejemplo, alcohol etílico, polialcoholes o poliglicoles, y emulsionantes, así como agentes rubefacientes que tienen el papel de vasodilatadores locales.

25 Un vehículo o soporte de transporte, no "ecológico", parece incompatible con una BNC tal como pretende la presente invención, y que está constituida principalmente por agua, ya que no respeta el equilibrio biológico de la parte superficial del cuerpo humano.

30 El documento US-C-5 597 575 describe una composición médica tópica, para estimular el rebrote del cabello, que incluye como principio activo una o varias vitaminas liposolubles, tales como la vitamina D3 (o algunos de sus derivados metabólicos activos), preferentemente fijados sobre micropartículas minerales no cargadas.

35 Análogamente a Minoxidil, principio activo analizado a continuación y que es un vasodilatador local, el modo de acción de esta composición es el resultado de la irritación inducida por la vitamina D3 en el cuero cabelludo, irritación que produce una vasodilatación superficial, la que estimula el crecimiento del tallo piloso, ya que el aumento de la vascularización de la papila dérmica favorece el aporte de nutrientes a las células de la matriz del folículo piloso.

40 Pero un efecto vasodilatador de ese tipo, generado por la acción irritante del principio activo, va siempre acompañado de una pequeña inflamación local, inaceptable en un tratamiento cosmético.

45 La presente invención tiene por objeto resolver los inconvenientes de las soluciones de la técnica anterior identificados en lo que antecede.

50 En general, la invención tiene por objeto adaptar una BNC tal como se ha definido anteriormente para responder específicamente a las necesidades nutricionales de los queratinocitos de los folículos pilosos o de la matriz del tallo del pelo (zona de crecimiento del tallo piloso situada por debajo de la papila dérmica del folículo piloso).

55 Más concretamente, gracias a la aplicación local de una base adaptada de esta forma, la invención tiene por objeto un tratamiento cosmético del cabello y/o del cuero cabelludo en el hombre o la mujer, que actúa por simple puesta en contacto de la BNC con el cuero cabelludo o el cabello; y esto, además de, o independientemente de cualquier acción mecánica, tal como el masaje del cuero cabelludo, que favorezca la irrigación sanguínea del bulbo piloso o la vascularización del folículo piloso y, por tanto, el crecimiento del tallo piloso, y con exclusión de cualquier efecto vasodilatador, aumentando la vascularización de la papila dérmica, y favoreciendo por sí mismo el aporte de nutrientes a las células de la matriz del folículo piloso.

60 La invención tiene también por objeto un tratamiento no terapéutico del cabello y/o del cuero cabelludo que favorezca el rebrote del cabello y que establezca el fenómeno de caída, con exclusión de cualquier otra actividad relacionada con la caspa.

65 En un primer paso, la presente invención tiene por objeto una base nutritiva compleja en medio acuoso que se distingue de un medio de cultivo celular por que excluye cualquier factor de crecimiento celular, y cualquier extracto biológico de origen animal o celular, de composición indeterminada, sin trazador, y que se parece a un medio de cultivo celular, porque permite por sí misma un cultivo viable in vitro de un inóculo de queratinocitos epidérmicos humanos, con al menos una proliferación clonal de estos últimos en el primer paso, sin asistencia nutritiva viva, estando constituida dicha base, además del medio acuoso, por una fracción de aminoácidos inferior al 0,5%, y preferentemente al 0,35% en peso, una fracción de vitaminas hidrosolubles inferior al 0,2%, y preferentemente al 0,015%, y una fracción inorgánica, con oligoelementos y sales metálicas, inferior al 5% en peso, y preferentemente al 2% en peso, de acuerdo con la reivindicación 1.

De acuerdo con la invención, dicha base comprende una concentración en peso total de aminoácido(s) azufrado(s) suficiente para permitir, en condiciones convencionales in vitro, un aumento de la síntesis de queratinas del tallo piloso del cabello en el hombre o la mujer.

5 Dicha BNC incluye, además, al menos una de las características siguientes, que se pueden considerar solas o en combinación:

- su concentración en peso total de aminoácido(s) azufrado(s) es como máximo igual a 104 mg/l,
- 10 - su concentración en peso total de aminoácidos, de los que los aminoácidos azufrados, está comprendida entre 0,25 y 0,35%, y por ejemplo igual a aproximadamente un 0,326%,
- la concentración en peso de la fracción de vitaminas está comprendida entre 0,005 y 0,011%,
- su concentración en peso de componentes orgánicos, con oligoelementos y sales metálicas, está comprendida entre 1,25 y 1,35%, y por ejemplo igual a un 1,347-1,348% en peso,
- 15 - su concentración en glucosa está comprendida entre 0,1% y 0,6%, y por ejemplo comprendida entre 0,45% y 0,6%,
- su concentración en L-hidroxiprolina está comprendida entre 0,01% y 0,01%, y por ejemplo comprendida entre 0,003% y 0,01%,
- su concentración en ácido ascórbico está comprendida entre 0,00001%, y 0,001%, y por ejemplo comprendida entre 0,0001% y 0,001%
- 20 - su concentración en cada uno de los compuestos siguientes, es decir adenosina, guanina, desoxirribosa y ribosa, está comprendida entre 0,000001% y 0,0001%, y por ejemplo comprendida entre 0,00001% y 0,0001%,
- comprende una cantidad cosméticamente activa de al menos un inhibidor de la enzima 5 α -reductasa de tipo I.
- el inhibidor de la enzima 5 α -reductasa de tipo I comprende una sal de cinc, por ejemplo, de sulfato de cinc, y/o vitamina B6.
- 25 - la base nutritiva compleja comprende una cantidad total de calcio comprendida entre 0 y 22,05 mg/l, y preferentemente comprendida entre 5 y 15 mg/l,
- la base nutritiva compleja comprende péptidos extraídos de la leche, a una concentración comprendida entre 0,01 y 1% en peso,
- el pH de la fase acuosa está ajustado entre 7,4 y 7,5,
- 30 - la osmolaridad de la fase acuosa está ajustada, como máximo, entre 300 y 350 μ Osm.

La presente invención tiene por objeto, por tanto, adaptar una BNC, tal como se ha definido anteriormente, a diferentes aplicaciones cosméticas, como el tratamiento del cabello y/o del cuero cabelludo en el hombre o la mujer.

35 En un segundo paso, la invención se refiere a una composición cosmética de uso local, especialmente para el tratamiento del cabello y/o del cuero cabelludo en el hombre, que comprenda una BNC tal como se ha definido anteriormente.

40 En un tercer paso, la presente invención se refiere al uso de una BNC tal como se ha definido anteriormente, para fabricar u obtener una composición cosmética adaptada a un tratamiento no terapéutico del cabello y/o del cuero cabelludo en el hombre o la mujer.

45 En un cuarto paso, la invención se refiere a un procedimiento de tratamiento no terapéutico del cabello y/o del cuero cabelludo, en el hombre o la mujer, que consiste de una forma general en aplicar de una forma local y superficial, sobre el cuero cabelludo, una BNC tal como se ha definido anteriormente.

Un procedimiento de este tipo permite tratar la alopecia andrógena del adulto, en el hombre o la mujer.

50 Un procedimiento de este tipo permite estimular el crecimiento de queratinocitos en la matriz del tallo del cabello y, por tanto, favorecer el rebrote del cabello, y estabilizar el fenómeno de caída. Por tanto, este procedimiento está indicado en el caso de una caída de cabello moderada, y especialmente en caso de alopecia andrógena.

Preferentemente, la BNC se aplica una o dos veces al día sobre el cuero cabelludo del hombre o de la mujer en tratamiento.

55 La función inhibidora de la enzima 5 α -reductasa de tipo I, de cualquier producto, compuesto o sustancia, o de cualquier cantidad cosmética activa de esta última, se puede caracterizar o poner de relevancia según las enseñanzas de la publicación:

60 - D. Stamatiadis et al, "Inhibition of 5 α -reductase activity, in human skin by zinc and azelaic acid", British Journal of Dermatology (1988) 119, 627-632; cf especialmente las páginas 628-629.

De acuerdo con este método de caracterización:

- 65 - los materiales usados son 1,2[³H]-testosterona, [¹⁴C]-testosterona, [¹⁴C]-dihidrotestosterona, y [¹⁴C]- Δ 4-androstenodiona, y los [¹⁴C]-androstenodiones, así como el NADPH;

- la fuente in vitro de la enzima 5 α -reductasa está compuesta por muestras de piel de prepucios de bebés de 2 a 3 meses;
- se incuban los homogenatos de esta piel en presencia de concentraciones crecientes de [³H]-testosterona y de NADPH, así como el producto o la sustancia candidata a la inhibición; tras la adición de los [¹⁴C] esteroides, se separan los metabolitos, y se determinan las cantidades de testosterona y de Δ 4-androstenodiona.

Tratándose de péptidos naturales, o de origen natural, que se pueden utilizar de acuerdo con la presente invención, se utilizarán fracciones o extractos obtenidos a partir de leche de origen animal, denominados a partir de ahora en el presente documento "Milk Peptide Complex [Complejo de péptidos lácteos]" o MPC, por ejemplo, el extracto denominado Whey Protein (Lactis Proteinum) que tiene como n.º CAS 84082-51-9 y el n.º EINECS 281-998-7, fabricado y vendido por la empresa CLR-Chemisches Laboratorium de la República Federal de Alemania.

Este extracto tiene, como ejemplo, los datos analíticos siguientes:

pH	5,0-7,0
(0,5% de MPC en polvo en H ₂ O)	
Pérdida tras desecación (2 h a 102°C)	2,0-6,0%
Nitrógeno (Kjeldahl)	1,4-1,9%
Proteínas (Kit Sigma BCA-1)	11,0-16,0%
Lactosa (Kit Boehringer)	65,0-71,0%
Ácido (+) Láctico (Kit Boehringer)	4,5-8,0%
Cenizas (1000°C)	6,0-9,0%
Grasa residual	<0,5%
Electroforesis (SDS-PAGE)	corresponde
Actividad biológica CE ₅₀ (ensayo de migración)	50-500 μ g/ml

Como se trata de aminoácido(s) azufrado(s) que se pueden utilizar de acuerdo con la característica de composición (f), su concentración en peso que permite aumentar la síntesis de las queratinas del tallo piloso, se puede determinar mediante la aplicación del ensayo descrito en el ejemplo 3.

Como se trata en particular del tratamiento del cabello y/o del cuero cabelludo, la aplicación de la presente invención conlleva las siguientes ventajas determinantes:

- desarrollo del crecimiento de queratinocitos en la matriz del tallo del cabello, lo que favorece el crecimiento o el rebrote del cabello y estabiliza el fenómeno de caída, especialmente en el caso de alopecia andrógena del adulto,
- prácticamente no existe ningún efecto secundario o indeseable, tal como hipertriosis a distancia.

Más generalmente, en sus aplicaciones cosméticas, una BNC de acuerdo con la presente invención tiene un uso especialmente simple, no graso y no adherente. Es bien tolerada localmente, y está desprovista de efectos secundarios e indeseados, tales como irritaciones locales, sensaciones de ardor y prurito, eczema de contacto y, en algunos casos, modificación de la presión arterial y del pulso.

Una BNC de acuerdo con la presente invención parece desprovista de citotoxicidad, independientemente de su concentración en la composición a la que pertenece, por ejemplo, con un excipiente.

La presente invención se describe ahora, como ejemplo, con una composición en peso de acuerdo con la Tabla 2.

En particular, a continuación, en su aplicación capilar, es decir, para el tratamiento del cabello y/o del cuero cabelludo, una BCN de acuerdo con la invención se comparará con una especialidad farmacéutica que tenga la misma indicación, pero médica, es decir, el Minoxidil (Denominación común internacional).

Tabla 2

NRO. LÍNEA	DENOMINACIÓN INTERNACIONAL NOMENCLATURA DEL INGREDIENTE COSMÉTICO (NOMBRE INCI)	CONCENTRACIÓN En mg/l
1	AGUA	q.s.p. (1000 ml)

NRO. LÍNEA	DENOMINACIÓN INTERNACIONAL NOMENCLATURA DEL INGREDIENTE COSMÉTICO (NOMBRE INCI)	CONCENTRACIÓN En mg/l
2	CLORURO DE SODIO (Cl)	6085

ES 2 642 038 T3

NRO. LÍNEA	DENOMINACIÓN INTERNACIONAL NOMENCLATURA DEL INGREDIENTE COSMÉTICO (NOMBRE INCI)	CONCENTRACIÓN En mg/l
3	GLUTAMINA (AA)	2043,2
4	BICARBONATO DE SODIO (CI)	1160
5	GLUCOSA (CI)	4500
6	ARGININA HCl (AA)	421,4
7	ACETATO DE SODIO (CI)	300
8	FOSFATO DISÓDICO (CI)	284
9	LEUCINA (AA)	131,2
10	SERINA (AA)	136,6
11	CLORURO DE Mg (CI)	120,0
12	CLORURO DE K (CI)	112
13	VALINA (AA)	70,3
14	PIRUVATO DE SODIO (V)	55
15	LISINA HCl (AA)	54
16	HISTIDINA HCl (AA)	50
17	CISTEÍNA HCl (AA)*	84
18	ADENINA (V)	24
19	TREONINA (AA)	24
20	CLORURO DE Ca (CI)	0 a 22,05
21	INOSITOL (V)	18
22	ÁCIDO GLUTÁMICO (AA)	29,5
23	ASPARAGINA (AA)	29,2
24	METIONINA (AA)*	20
25	TIROSINA (AA)	11,7
26	FENILALANINA (AA)	10,0
27	TRIPTÓFANO (AA)	9,3
28	ALANINA (AA)	18,1
29	GLICINA (AA)	15,1
30	ISOLEUCINA (AA)	6,0
31	ÁCIDO ASPÁRTICO (AA)	17,3
32	SULFATO DE SODIO (CI)	3,4

NRO. LÍNEA	DENOMINACIÓN INTERNACIONAL NOMENCLATURA DEL INGREDIENTE COSMÉTICO (NOMBRE INCI)	CONCENTRACIÓN En mg/l
33	SULFATO FERROSO (CI)	1,4
34	ÁCIDO FÓLICO (V)	1,8
35	TIMIDINA (V)	0,73
36	CIANOCOBALAMINA (V)	0,41
37	PANTOTENATO DE CALCIO (V)	1,3
38	TIAMINA HCl (V)	1,3
39	ÁCIDO TIÓCTICO (V)	0,3
40	SULFATO DE CINCO (CI)	0,288
41	SILICATO DE SODIO (CI)	0,142
42	PIRIDOXINA HCl (CI)	2,1
43	NIACINAMIDA (V)	1,04
44	RIBOFLAVINA (V)	0,4
45	BIOTINA (V)	0,02
46	SULFATO DE COBRE (CI)	0,003
47	MOLIBDATO AMÓNICO (CI)	0,00120
48	VANADATO AMÓNICO (CI)	0,003
49	CLORURO DE Mn (CI)	0,00002
50	HIALURONATO DE SODIO (CI)	700
51	HIDROXIPROLINA (AA)	30
52	PROLINA (AA)	46
53	ÁCIDO ASCÓRBICO (V)	1
54	ADENOSINA (V)	0,1
55	GUANINA (AA)	0,1
56	DESOXIRIBOSA (CI)	0,1
57	RIBOSA (CI)	0,1
58	"COMPLEJO DE PÉPTIDOS LÁCTEOS" (CI)	200
59	CLORURO DE COLINA (AA)	1
60	MIOINOSITOL (V)	2

A= Aminoácido
 = 3258 mg
 = 0,326% en peso
 * = Aminoácido azufrado

V= Vitamina
 = 109,5 mg
 =0,011 % en peso

CI= Componente inorgánico
 = 13466 mg a 13488 mg
 = 1,347% a 1,348% en peso

Ejemplo 1

5 Se trata de un ensayo relativo al Minoxidil, como compuesto de referencia, para comparar a continuación la eficacia de una BCN de acuerdo con la invención, con respecto a dicho compuesto de referencia.

El objetivo del ensayo es evaluar el efecto del Minoxidil (en forma de sulfato hidrosoluble) sobre la viabilidad celular de queratinocitos humanos normales.

10 La viabilidad celular de los queratinocitos se evalúa mediante la técnica de conversión del WST-1(*), que consiste en evaluar la actividad del sistema mitocondrial succinato-tetrazolio reductasa de las células vivas.

15 El WST-1 (Boehringer/Roche) se reduce en un precipitado coloreado de formazán. La viabilidad celular se determina mediante lectura espectrofotométrica a 450 nm. La intensidad de la densidad óptica es proporcional al número de células vivas.

(*) Sal de tetrazolio WST-1: (4-(3-(4-yodofenil)-2-(4-nitrofenil)2H-5-tetrazolio)-1,3-benzeno disulfonato).

20 Se obtuvieron los siguientes resultados:

Hasta una concentración del 0,01%, se observa una ausencia de efecto citotóxico del Minoxidil, tras 24 y 48 h de contacto. Incluso, se puede notar un efecto de estimulación del crecimiento celular a una concentración del 0,001%.

25 Más allá de esto, se observa, a partir del 0,1%, un efecto citotóxico muy importante, de una intensidad similar para las 3 concentraciones más elevadas.

Se aplica el siguiente método:

30 Siembra

Los queratinocitos se sembraron en microplacas de 96 pocillos a razón de 20.000 células por pocillo en 200 µl de medio de cultivo convencional KSFM (Invitrogen). Las placas se incubaron durante 24 h a 37°C en atmósfera húmeda que contenía un 6% de CO₂.

35 Intervalo de concentraciones estudiadas

Las diferentes concentraciones a ensayar se prepararon a partir de una solución madre de Minoxidil (sulfato hidrosoluble) al 5% en PBS.

40 El intervalo de concentraciones estudiadas está comprendido entre 0,0001% y 2%.

Tratamiento

45 Tras la eliminación del medio KSFM, las diferentes diluciones de Minoxidil se pusieron en contacto con las células. Los medios no se renovaron durante la experimentación.

Cada punto se realizó por cuadruplicado.

50 La citotoxicidad (ensayo del WST-1) se midió después de 24 y 48 horas de contacto.

Análisis

La densidad óptica se leyó con un lector de microplacas ELISA a 450 nm.

55 Ejemplo 2

El objetivo de este ensayo es evaluar el crecimiento de queratinocitos humanos normales, sembrados a baja densidad en la BNC cuya composición se describe en la Tabla 2.

60 El estudio se realizó en esta BNC, con 0,2 mg/ml de complejo MPC (y sin complejo MPC), comparado con el medio de cultivo normalizado de queratinocitos, el KSFM.

Se procedió de la forma siguiente:

Los queratinocitos se sembraron a baja densidad en una placa de 96 pocillos en el medio normalizado KSFM, y crecieron durante 24 horas después de la siembra en este medio.

5

El 2º día, las células se introdujeron en los diferentes medios estudiados:

- KSFM
- BNC de acuerdo con la tabla 2, sin complejo MPC
- BNC de acuerdo con la tabla 2, con complejo MPC a 0,2 mg/ml

10

Cada condición se realizó por cuadruplicado. Los medios se renovaron cada 3 días durante la experimentación.

La densidad celular se evaluó 24 h después de la siembra de las células, antes de la puesta en contacto con las diferentes condiciones del estudio (= T0), a continuación, la concentración de los queratinocitos se evaluó en el 2º, 4º, 6º y 8º días de cultivo según el método de conversión del WST-1 (lectura a 450 nm).

15

El crecimiento celular se analizó por medida de la viabilidad celular en diferentes momentos de la experimentación:

20

- En presencia de complejo MPC a la concentración de 0,2 mg/ml, se observa un crecimiento celular continuo de los queratinocitos con la BNC de acuerdo con la Tabla 2.
- Sin adición del complejo MPC, se observa una ausencia de crecimiento celular con la BNC de acuerdo con la Tabla 2 (en condiciones hipocalóricas).

25

En conclusión, en las condiciones experimentales así definidas, con una BNC que comprendía un complejo MPC a la concentración de 0,2 mg/ml, se observó un crecimiento celular regular de queratinocitos humanos normales durante los 8 días del cultivo, de una intensidad superior a la observada con la misma BNC, pero sin dicho complejo.

Ejemplo n.º 3

30

Se trata de evaluar el efecto de la BCN de acuerdo con la Tabla 1 sobre la proliferación y diferenciación de fragmentos de cuero cabelludo mantenidos en supervivencia.

El fin de este ensayo es poner de manifiesto la eficacia de la base de acuerdo con la Tabla 1 sobre la supervivencia ex vivo de fragmentos de cuero cabelludo humano. La evaluación de la proliferación mediante el anticuerpo Ki67 se llevó a cabo en la vaina epitelial externa que rodea el cabello. La evaluación de la diferenciación de los queratinocitos mediante un anticuerpo dirigido contra citoqueratinas totales se realizó en el tallo piloso del cabello y, más especialmente, en su corteza.

35

Se aplicaron los siguientes materiales y métodos:

40

1) Mantenimiento en supervivencia de cuero cabelludo en presencia de la BNC de acuerdo con la Tabla 1

Fragmentos de cuero cabelludo de 5 donantes diferentes (pacientes afectados por alopecia andrógena, tomados en la confluencia entre la zona donde persiste cabello y la zona alopécica) se depositaron en inserciones introducidas en pocillos de cultivo.

45

Puesto que la BNC carece de conservantes, se añadieron antibióticos (fungizone, gentamicina). La eficacia de la BNC sobre la supervivencia y diferenciación de los fragmentos de piel se comparó con la obtenida en presencia de un tampón fosfato de tipo PBS. La BNC de acuerdo con la Tabla 1 comparada con el PBS se añadió diariamente en el fondo de los pocillos, realizándose un paso por difusión lenta entre ambos compartimentos mediante una membrana porosa (12 µm).

50

Los fragmentos de cuero cabelludo se mantuvieron en supervivencia en una estufa a 37°C y en una atmósfera aire/CO₂ 5% durante 48 horas.

55

Análisis

Los fragmentos de cuero cabelludo se fijaron en solución de Bouin y se incluyeron en parafina.

60

La evaluación inmunohistoquímica de la proliferación se estudió en la vaina epitelial externa que rodea el cabello. Esta vaina epitelial externa está considerada histológicamente como la prolongación de la epidermis superficial. La evaluación de la diferenciación se realizó en el plano cortical del tallo piloso. Efectivamente, la parte central del tallo piloso está constituida por médula (columna central constituida por células sin núcleo), corteza compuesta por células queratinizadas que contienen pigmentos de melanina y cutícula.

65

a) Análisis inmunohistoquímico de la actividad mitótica de la vaina epitelial externa de los folículos pilosos

5 La proliferación epitelial se analizó mediante inmunohistoquímica mediante un anticuerpo dirigido contra Ki67 (marcador de las células en fases M, S, G1 y G2 del ciclo celular). La inmunodetección se llevó a cabo mediante una técnica de inmunoperoxidasa indirecta en 3 capas, amplificada (kit DAKO) y revelada con DAB.

El número de células marcadas se evaluó en la vaina epitelial externa de secciones del bulbo piloso presentes en el cuero cabelludo (8 a 10 por copa). De esta forma se calculó el número de células en proliferación.

10 b) Análisis inmunohistoquímico de la diferenciación epitelial de la corteza del tallo piloso

La diferenciación epitelial se puso de manifiesto con un anticuerpo dirigido contra las citoqueratinas totales (Novocastra).

15 La inmunodetección se llevó a cabo mediante una técnica de inmunoperoxidasa indirecta en 3 capas (kit ABC Peroxydase, Vector Laboratories) y revelada con DAB (Diaminobenzidina).

20 La intensidad del marcado inmunohistoquímico se evaluó mediante las puntuaciones semicuantitativas siguientes para todos los folículos pilosos de la copa de cuero cabelludo examinada:

- negativo: puntuación 0 -
- ligero: puntuación 1
- moderado: puntuación 2
- importante: puntuación 3
- 25 - muy importante: puntuación 4

3) Estadística

30 El análisis estadístico se realizó mediante la denominada prueba de Student de desviación reducida, o prueba de muestras emparejadas. El umbral de significado se fijó en el 5%.

Se obtuvieron los siguientes resultados:

35 a) Análisis inmunohistoquímico de la actividad mitótica en la vaina epitelial externa de los folículos pilosos

El análisis de la actividad mitótica se expone en la tabla I siguiente.

40 El tratamiento con la BNC de acuerdo con la Tabla 1 permitió aumentar significativamente la renovación de las células epiteliales ($p < 0,05$). Efectivamente, después del tratamiento, un 7,6% de las células de la vaina epitelial externa están marcadas con el anticuerpo dirigido contra Ki67, en comparación con un 2,6% de los cueros cabelludos tratados con PBS. También se realizó un análisis del índice mitótico en la epidermis superficial. Los resultados también favorecen la BNC de acuerdo con la Tabla 1, con un índice de proliferación del 6,4% versus 1,1% ($p < 0,05$).

45 b) Análisis para inmunohistoquímico de la diferenciación epitelial en la corteza del tallo piloso

El análisis de la diferenciación epitelial se expone en la tabla II siguiente.

50 La diferenciación epitelial tiende a ser de mejor calidad en los cueros cabelludos tratados con la BNC de acuerdo con la Tabla 1, en comparación con los tratados con PBS: la puntuación global obtenida es de 3,3 frente a 2,4. No se ha obtenido una diferencia significativa, sin embargo, el análisis caso por caso permite observar una diferenciación mucho mejor en 3 casos tratados con BNC de acuerdo con la Tabla 1 sobre 5, y una diferenciación no modificada en 1 caso.

55 tabla I:

Proliferación celular (inmunohistoquímica mediante el anticuerpo dirigido contra Ki67): % de células marcadas en la epidermis superficial y en la vaina epitelial externa de los folículos pilosos

	epidermis	Vaina epitelial externa
Cuero cabelludo + BNC de acuerdo con la Tabla 1	6,4 ± 2,7*	7,6 ± 1,9*
Cuero cabelludo + PBS	1,1 ± 0,9	2,6 ± 1,9

*: comparación entre la BNC de acuerdo con la Tabla 1 y el control PBS: diferencia estadísticamente significativa (prueba de Student emparejada monolateral, $p < 0,05$)

5 tabla II:

Diferenciación epitelial (inmunohistoquímica mediante un anticuerpo dirigido contra citoqueratinas totales) de la corteza de los tallos pilosos

Cuero cabelludo + BNC de acuerdo con la tabla 1	2,4 ± 1
Cuero cabelludo + PBS	3,3 ± 0,9

10 En conclusión, el tratamiento con la BNC de acuerdo con la Tabla 1 permite obtener un aumento estadísticamente significativo del índice mitótico en la vaina epitelial externa de los folículos pilosos. La diferenciación epitelial de la corteza de los tallos pilosos mejora, pero sin embargo, sin carácter significativo.

15 Ejemplo n.º 4

Este ensayo tiene por objeto someter a ensayo el efecto de la BNC de acuerdo con la Tabla 2 sobre la estimulación del bulbo piloso (proliferación celular) a partir de fragmentos de cuero cabelludo mantenidos en supervivencia.

20 De acuerdo con el ejemplo n.º 3, se puso de manifiesto un aumento estadísticamente significativo del índice mitótico en la vaina epitelial externa tras el mantenimiento en supervivencia de folículos pilosos en presencia de una BNC de acuerdo con la Tabla 1.

25 El objetivo del presente estudio es poner de manifiesto la eficacia de una BCN de acuerdo con la invención y de acuerdo con la Tabla 2, sobre la estimulación del bulbo piloso. La evaluación de la proliferación celular, mediante el anticuerpo dirigido contra Ki67, se realizó en la zona matricial del bulbo (zona de crecimiento del tallo piloso), pero también en la vaina epitelial externa del folículo piloso.

Se aplicaron los siguientes materiales y métodos

30 1) Mantenimiento en supervivencia de cuero cabelludo en presencia de una BNC de acuerdo con la Tabla 2

Fragmentos de cuero cabelludo procedente de 6 donantes diferentes (estiramiento cervico-facial de sujeto no alopecico) se depositaron en inserciones introducidas en pocillos de cultivo.

35 La eficacia de la BNC de acuerdo con la Tabla 2 sobre la supervivencia y la estimulación de los bulbos pilosos se comparó, por una parte, con la obtenida en presencia de un tampón fosfato de tipo PBS y, por otra parte, en presencia de un compuesto de referencia estudiado en 2 concentraciones, Minoxidil al 0,01 y al 2% (dilución en el tampón PBS), Minoxidil al 0,01%, que es una dosis no citotóxica sobre cultivos en monocapa de queratinocitos humanos normales, al 2% que es la concentración utilizada in vivo en el ser humano, en la mayoría de especialidades comercializadas para el tratamiento de la alopecia. Puesto que carecen de conservantes, se añadieron antibióticos a todos los medios estudiados (fungizone, gentamicina). Se añadieron diariamente en el fondo de los pocillos, realizándose un paso por difusión lenta entre ambos compartimentos mediante una membrana porosa (12 µm).

45 Los fragmentos de cuero cabelludo se mantuvieron en supervivencia en una estufa a 37°C y en una atmósfera aire/CO₂ 5% durante 48 horas.

2) Análisis inmunohistoquímico de la actividad mitótica en el bulbo piloso y en la vaina epitelial externa del folículo piloso

50 Los fragmentos de cuero cabelludo se fijaron en solución de Bouin y se incluyeron en parafina.

La evaluación inmunohistoquímica de la proliferación se realizó en el bulbo piloso, así como en la vaina epitelial externa que rodea el cabello. Esta vaina epitelial externa está considerada histológicamente como la prolongación de la epidermis superficial.

5 La proliferación epitelial se analizó mediante inmunohistoquímica mediante un anticuerpo dirigido contra Ki67 (marcador de las células en fases M, S, G1 y G2 del ciclo celular). La inmunodetección se llevó a cabo mediante una técnica de inmunoperoxidasa indirecta en 3 capas, amplificada (kit DAKO) y revelada con AEC.

10 El número de células marcadas de la vaina epitelial externa se contó entre el origen de las glándulas sebáceas y el comienzo de la zona bulbosa. Por otra parte, también se enumeraron las células de la matriz marcadas en los bulbos pilosos. De esta forma, se calculó el número de células en proliferación con respecto a las células no marcadas.

3) Estadística

15 El análisis estadístico se realizó mediante la denominada prueba de Student de desviación reducida, o prueba de muestras emparejadas. El umbral de significado se fijó en el 5%.

Se obtuvieron los siguientes resultados:

20 a) Análisis inmunohistoquímico de la actividad mitótica en los bulbos pilosos

El análisis de la actividad mitótica se expone en la tabla I siguiente.

25 La incubación de fragmentos de cuero cabelludo en presencia de la BNC de acuerdo con la Tabla 2 indujo un aumento significativo del índice mitótico en las células de la matriz del bulbo piloso (15,2% de células marcadas), en comparación con el tampón PBS (0,26% de células positivas) o con el Minoxidil 0,01% (4,2% de células positivas) ($p < 0,05$). El índice de proliferación obtenido con la BNC de acuerdo con la Tabla 2 está próximo al observado con el Minoxidil al 2% (11,60% de células positivas).

30 b) Análisis inmunohistoquímico de la actividad mitótica en la vaina epitelial externa de los folículos pilosos

El análisis de la actividad mitótica se expone en la tabla II siguiente.

35 La incubación de fragmentos de cuero cabelludo en presencia de la BNC de acuerdo con la Tabla 2 indujo un aumento significativo del índice mitótico en los queratinocitos de la vaina epitelial externa de los folículos pilosos (22,3% de células marcadas), en comparación con el tampón PBS (2,6% de células positivas) ($p < 0,05$). De acuerdo con el ejemplo n.º 3, el tratamiento con una BNC de acuerdo con la Tabla 1 ya había permitido aumentar significativamente la renovación de las células en la vaina epitelial, pero con una eficacia muy inferior a la medida de acuerdo con la Tabla 2 ($p < 0,05$). Efectivamente, después del tratamiento, solamente un 7,6% de las células de la vaina epitelial externa estaban marcadas con el anticuerpo dirigido contra Ki67, en comparación con un 2,6% de los cueros cabelludos tratados con PBS.

tabla I:

45 Proliferación celular (inmunohistoquímica mediante el anticuerpo dirigido contra Ki67): % de células de la matriz marcadas en el bulbo del folículo piloso

N = 6	%
Cuero cabelludo + BNC de acuerdo con la Tabla 2	15,2 ± 6,7*#
Cuero cabelludo + PBS	0,26 ± 0,6
Cuero cabelludo + Minoxidil 0,01%	4,2 ± 2,45
Cuero cabelludo + Minoxidil 2%	11,6 ± 8,7

50 * comparación entre BNC de acuerdo con la Tabla 2 y PBS: diferencia estadísticamente significativa (prueba de Student emparejada monolateral, $p < 0,05$)

comparación entre BNC de acuerdo con la Tabla 2 y Minoxidil 0,01%: diferencia estadísticamente significativa (prueba de Student emparejada monolateral, $p < 0,05$)

55

tabla II

Proliferación celular (inmunohistoquímica mediante un anticuerpo dirigido contra Ki67): % de células marcadas en la vaina epitelial externa de los folículos pilosos

5

N = 6	%
Cuero cabelludo + BNC de acuerdo con la Tabla 2	22,3 ± 4,4*#
Cuero cabelludo + PBS	2,6 ± 2,7
Cuero cabelludo + Minoxidil 0,01%	10,2 ± 5
Cuero cabelludo + Minoxidil 2%	17,6 ± 7#

* comparación entre BNC de acuerdo con la Tabla 2 y PBS: diferencia estadísticamente significativa (prueba de Student emparejada monolateral, $p < 0,05$)

10 # comparación entre BNC de acuerdo con la Tabla 2 y Minoxidil 0,01%: diferencia estadísticamente significativa (prueba de Student emparejada monolateral, $p < 0,05$)

comparación entre Minoxidil 0,01% y Minoxidil 2%: diferencia estadísticamente significativa (prueba de Student emparejada monolateral, $p < 0,05$).

15

N = 5, para recuerdo	%
Cuero cabelludo + BNC de acuerdo con la Tabla 1	7,6 ± 1,9*
Cuero cabelludo + PBS	2,6 ± 1,9

20 En este estudio, se pone de manifiesto un aumento significativo de la proliferación de los queratinocitos en la vaina epitelial externa de los folículos pilosos con la BNC de acuerdo con la Tabla 2, en comparación con el Minoxidil 0,01% (10,2% de células positivas) ($p < 0,05$). Este índice de proliferación celular (22,3%) está cerca del obtenido con el Minoxidil 2% (17,6% de células positivas).

25 En conclusión, con un modelo de fragmento de cuero cabelludo mantenido en supervivencia, el tratamiento con una BNC de acuerdo con la Tabla 2 permite obtener un aumento estadísticamente significativo del índice mitótico de las células de la matriz del bulbo piloso y de los queratinocitos de la vaina epitelial externa de los folículos pilosos. El resultado es muy superior al obtenido con una BNC de acuerdo con la Tabla 1.

REIVINDICACIONES

1. Base nutritiva compleja en medio acuoso, destinada a su uso en un tratamiento para favorecer el brote de cabello y estabilizar el fenómeno de caída, que se distingue de un medio de cultivo celular, por que excluye cualquier factor de crecimiento celular, y cualquier extracto biológico de origen animal o celular, de composición indeterminada, sin trazabilidad, que se parece a un medio de cultivo celular, y constituida, además del medio acuoso, por una fracción de aminoácidos inferior al 0,5%, y preferentemente al 0,35% en peso, por una fracción de vitaminas hidrosolubles inferior al 0,2%, y preferentemente al 0,015%, y por una fracción inorgánica, con oligoelementos y sales metálicas, inferior al 5% en peso, y preferentemente al 2% en peso, y por qué comprende además las siguientes características:
- una concentración en peso total de aminoácido(s) azufrado(s) como máximo igual a 104 mg/l
 - péptidos extraídos de la leche a una concentración comprendida entre 0,01 y 1% en peso.
 - la concentración en peso total de aminoácidos, de los que los aminoácidos azufrados, está comprendida entre 0,25 y 0,35%,
 - la concentración en peso de la fracción de vitaminas está comprendida entre 0,005 y 0,015%,
 - la concentración en peso de componentes inorgánicos, con oligoelementos y sales metálicas, está comprendida entre 1,25 y 1,35%,
 - la concentración de glucosa está comprendida entre 0,1% y 0,6%,
 - la concentración de hidroxiprolina está comprendida entre 0,003% y 0,01%,
 - la concentración de ácido ascórbico está comprendida entre 0,00001% y 0,001%,
 - la concentración de cada uno de los compuestos siguientes, es decir adenosina, guanina, desoxirribosa y ribosa, está comprendida entre 0,000001% y 0,0001%,
 - comprende al menos un inhibidor de la enzima 5 α -reductasa de tipo I,
 - comprende una cantidad total de calcio comprendida entre 0 y 22,05 mg/l.
2. Base de acuerdo con la reivindicación 1, caracterizada por que la concentración en peso total de aminoácidos, entre los que los aminoácidos azufrados es igual a aproximadamente un 0,326%.
3. Base de acuerdo con la reivindicación 1, caracterizada por que la concentración de peso de la fracción de vitaminas es igual a aproximadamente un 0,011%.
4. Base de acuerdo con la reivindicación 1, caracterizada por que la concentración en peso de componentes inorgánicos, con oligoelementos y sales metálicas, es igual a 1,347-1,348% en peso.
5. Base de acuerdo con la reivindicación 1, caracterizada porque su concentración en glucosa está comprendida entre 0,45% y 0,6%.
6. Base de acuerdo con la reivindicación 1, caracterizada porque su concentración de ácido ascórbico está comprendida entre 0,0001% y 0,001%.
7. Base de acuerdo con la reivindicación 1, caracterizada por que su concentración en cada uno de los compuestos siguientes, es decir adenosina, guanina, desoxirribosa y ribosa, está comprendida entre 0,00001% y 0,0001%.
8. Base de acuerdo con la reivindicación 1, caracterizada por que el inhibidor de la enzima 5 α -reductasa de tipo I es una sal de cinc, por ejemplo, de sulfato de cinc, y/o vitamina B6.
9. Base de acuerdo con la reivindicación 1, caracterizada por que comprende una cantidad total de calcio comprendida entre 5 y 15 mg/l.
10. Base de acuerdo con la reivindicación 1, caracterizada por que el pH de la fase acuosa está ajustado entre 7,4 y 7,5.
11. Base de acuerdo con la reivindicación 1, caracterizada por que la osmolaridad de la fase acuosa está ajustada, como máximo, entre 300 y 350 μ Osm.
12. Base nutritiva compleja de acuerdo con una de las reivindicaciones 1 a 11 destinada a usarse como medicamento para el tratamiento de la alopecia andrógena del adulto, en el hombre o la mujer.