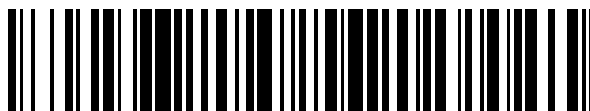


19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 688 202**

51 Int. Cl.:

A61K 36/185 (2006.01)

A61P 17/14 (2006.01)

A61K 8/97 (2007.01)

A61Q 7/00 (2006.01)

A61K 36/53 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

86 Fecha de presentación y número de la solicitud internacional: **28.10.2014** **PCT/IB2014/065655**

87 Fecha y número de publicación internacional: **07.05.2015** **WO15063678**

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **28.10.2014** **E 14809516 (9)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **27.06.2018** **EP 3062636**

54 Título: **Uso de un extracto vegetal para la prevención y el tratamiento de la caída del cabello**

30 Prioridad:

28.10.2013 IT MI20131792

45 Fecha de publicación y mención en BOPI de la traducción de la patente:
31.10.2018

73 Titular/es:

GIULIANI S.P.A. (100.0%)

Via P. Palagi 2

20129 Milano, IT

72 Inventor/es:

GIULIANI, GIAMMARIA;

BENEDUSI, ANNA y

MARZANI, BARBARA

74 Agente/Representante:

RUO , Alessandro

ES 2 688 202 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

Uso de un extracto vegetal para la prevención y el tratamiento de la caída del cabello

5 Campo de la invención

[0001] La presente invención se refiere al uso de un extracto vegetal para la prevención y el tratamiento de la caída del cabello.

10 [0002] La presente invención se origina en el campo de la tricología y de los productos nutricionales o dietarios.

[0003] En particular, la presente invención se refiere al uso de un extracto vegetal para estimular el crecimiento fisiológico del cabello en las áreas afectadas por el debilitamiento del cabello y/o la calvicie.

15 Técnica antecedente

[0004] El cabello tiene un papel protector y se considera un anejo cutáneo junto con las glándulas sebáceas, las glándulas sudoríparas y las uñas. El cabello tiene una característica única y peculiar: la ciclicidad.

20 [0005] El ciclo de vida del bulbo piloso está esencialmente representado por tres fases subsiguientes: anágena (crecimiento), catágena (involución) y telógena (fase de reposo).

[0006] El período de crecimiento del cabello es seguido por una fase de regresión, durante el cual la parte más profunda del folículo experimenta muerte celular programada.

25 [0007] Al final de esta fase, el ciclo se reinicia. Las fases biológicas de este fenómeno residen en la capacidad de las células madre del bulbo para dejar, en pasos alternos, su estado de inactividad. Durante el crecimiento del bulbo y la fase de producción de cabello las actividades de proliferación, diferenciación y supervivencia prevalecen y están reguladas por factores de crecimiento. La fase de regresión, por el contrario, se caracteriza por la activación de las rutas moleculares que inducen la apoptosis en las células del bulbo.

[0008] Si se considera el papel del cabello en las relaciones sociales, la caída de cabello puede ser difícil de enfrentar para muchas personas.

35 [0009] En la fase anágena, la papila dérmica genera señales químicas que activan e instruyen a las células madre de la protuberancia (*bulge*), las cuales forman la matriz capilar migrando a la base del folículo. Con esta "migración", las células madre de la protuberancia crean un "trayectoria" de células que dará lugar a la envoltura externa de la raíz o EER.

40 [0010] En respuesta a señales adicionales de la papila dérmica, las células de la matriz, que derivan de las células madre, proliferan y comienzan el proceso de diferenciación, moviéndose hacia arriba para formar el eje y la cubierta interna del folículo piloso.

45 [0011] El inicio de la fase catágena se caracteriza por la finalización de la proliferación celular y la apoptosis de las células de la matriz. Durante la fase catágena, la papila dérmica migra hacia la porción más baja de la protuberancia. Se cree que esta proximidad estrecha de la papila con la protuberancia es esencial para iniciar otro ciclo de producción de cabello. Esto permite la interacción/activación de las células de la protuberancia en reposo y un nuevo ciclo de crecimiento del cabello.

50 [0012] Tras la transición catágena/telógena, algunas células de la protuberancia migran para encontrarse con la papila, generando el germen del pelo.

55 [0013] En la fase telógena el pelo contiene una población celular en su base, que de hecho se llama germen del pelo, emplazada en estrecha proximidad con la papila dérmica. El germen del pelo se activa para proliferar hacia el final de la fase telógena, incluso antes que la protuberancia, para formar, rodeando la papila, la matriz del bulbo nuevo.

60 [0014] Distintos factores, entre los cuales el estrés, la falta de sustancias nutritivas y el envejecimiento, afectan negativamente el ciclo de vida del bulbo piloso, determinando una reducción del número de pelos y su debilitamiento.

65 [0015] En individuos que padecen alopecia androgénica (AAG), con el tiempo los folículos que se forman otra vez al comienzo de la nueva fase anágena, se vuelven más pequeños, conduciendo a la formación de cabello con un diámetro más pequeño en comparación con el diámetro inicial. Como consecuencia, se produce la formación de cabello microscópico. Se observó que a pesar de los folículos de la atrofia del cuero cabelludo, todavía hay un abastecimiento de células madre que se convierten en células progenitoras, aunque en menor grado en

comparación con el cuero cabelludo en condiciones fisiológicas.

[0016] La mayoría de las preparaciones para el cabello disponibles en el mercado se centran en los bulbos pilosos y actúan sobre el metabolismo del cuero cabelludo, la alimentación, la oxigenación y la microcirculación, mejorando las condiciones que contribuyen al crecimiento fisiológico del cabello.

[0017] Están disponibles en el mercado distintos productos y tratamientos para tratar y prevenir la caída del cabello. Sin embargo, el uso de los productos que hasta la fecha han demostrado ser particularmente eficaces en el tratamiento de la caída del cabello, tales como el minoxidil o algunos fármacos antiesteroideos de origen sintético, no está exento de inconvenientes. Específicamente, el uso tópico de minoxidil puede determinar la aparición de efectos secundarios de un cierto alcance, como erupciones cutáneas, inflamaciones locales, cefalea, mientras que la administración oral de fármacos tales como finasterida puede determinar la aparición de disfunciones hormonales con posibles efectos negativos en la vida sexual.

[0018] Otros productos actualmente utilizados en el campo de la tricología, a pesar de estar basados en productos de origen natural, por el contrario, tienen el inconveniente de ser fabricados a través de procedimientos de preparación complejos y, por lo tanto, son particularmente caros. El documento WO 2006/100101 A1 divulga un extracto vegetal de *Ajuga reptans* que pertenece a la familia *laminaceae* para su uso en el tratamiento de la caída del cabello o alopecia, que comprende isoflavonas.

[0019] La publicación de Oto N. "Hair papilla cell growth promoter useful as hair restorer, contains plant extracts chosen from Thymus serpyllum extract, rosemary extract, turmeric extract, white birch extract and black tea extract" WPI/Thomson, 24 de agosto de 2006, divulga un extracto vegetal estimulante del crecimiento de las células de la papila capilar procedente *laminaceae*, es decir, *Thymus serpyllum*. El extracto vegetal es para su uso en el tratamiento de la alopecia y la caída del cabello en forma de crema, champú o polvo.

[0020] La publicación de Sendula M. con el título "Cosmetic plant extract product for hair and skin regeneration" vol. 2000, n.º 36, 28 de mayo de 2000, divulga un extracto vegetal de ortiga, que pertenece a la familia *lamiaceae*, para su uso en el tratamiento de la caída del cabello.

[0021] En consecuencia, actualmente existe la necesidad de proporcionar productos que contengan sustancias que sean activas en la estimulación del proceso fisiológico del crecimiento del cabello y cuyo uso no provoque efectos secundarios significativos.

[0022] Uno de los objetos de la invención es proporcionar una composición o preparación que contiene agentes activos de origen sintético que son adecuados para estimular el crecimiento fisiológico del cabello en sujetos que padecen caída o debilitamiento del cabello, y cuyo uso apenas tenga efectos secundarios significativos.

[0023] Otro objeto de la invención es proporcionar una composición para uso tricológico que puede aplicarse de forma local o administrarse por vía oral, cuyos agentes activos son de origen vegetal y obtenibles a través de métodos simples.

Sumario de la invención

[0024] En el campo técnico de la invención, el solicitante ha descubierto que un extracto vegetal obtenido de una planta herbácea seleccionada estimula el proceso fisiológico del crecimiento del cabello cuando se aplica de forma local en el cuero cabelludo o cuando se administra por vía oral.

[0025] En particular, el solicitante ha descubierto inesperadamente que la planta de *Galeopsis segetum* Necker contiene uno o más principios activos que estimulan la actividad del bulbo piloso y contribuyen a restablecer las condiciones fisiológicas del crecimiento del cabello.

[0026] En conformidad con un primer aspecto de la invención, por lo tanto, se proporciona el uso no terapéutico de un extracto vegetal de *Galeopsis segetum* Necker en el tratamiento o la prevención de la caída del cabello.

[0027] En conformidad con un segundo aspecto, la presente divulgación proporciona un extracto vegetal de *Galeopsis segetum* Necker para su uso en el tratamiento o la prevención de la caída del cabello.

[0028] Sorprendentemente, se ha observado que el extracto vegetal de *Galeopsis segetum* Necker administrado por vía tópica u oral en un sujeto que padece debilitamiento del cabello, determina un engrosamiento progresivo de las áreas más debilitadas del cuero cabelludo.

[0029] En conformidad con un tercer aspecto, la presente divulgación proporciona el uso de una composición que comprende un extracto vegetal de *Galeopsis segetum* Necker y un vehículo fisiológicamente aceptable, para estimular el crecimiento fisiológico del cabello.

[0030] En conformidad con un cuarto aspecto, se proporciona una composición que comprende un extracto vegetal de *Galeopsis segetum* Necker y un vehículo fisiológicamente aceptable para su uso en el tratamiento o la prevención de la alopecia androgénica o el defluvio.

- 5 **[0031]** Normalmente, la composición de la invención contiene una cantidad tricológicamente activa de uno o más principios activos presentes en el extracto de *Galeopsis segetum* Necker.

Breve descripción de las figuras

- 10 **[0032]** Las características y ventajas de la presente invención se harán más evidentes a partir de las tablas de dibujos adjuntas, en donde:

La Figura 1 muestra un gráfico de barras relacionado con los datos de citotoxicidad obtenidos mediante el ensayo de MTT del Ejemplo 8 en las muestras: de biomasa vegetal, extracto hidroalcohólico de *Galeopsis segetum*, extracto de *Galeopsis segetum* en etil acético, extracto de *Galeopsis segetum* en CO₂ supercrítico, dentro del intervalo de dosis de 2-200 µg/ml durante 24, 48 y 72 horas;

La Figura 2 muestra un gráfico de barras que informa los resultados del ensayo de MTT con estrés oxidativo inducido en muestras de α-tocoferol, biomasa vegetal, extracto hidroalcohólico, extracto de etil acético y extracto con CO₂ supercrítico de *Galeopsis segetum*, como se informa en la Tabla 1 del Ejemplo 8;

La Figura 3 muestra un gráfico de barras que representa los datos sobre la producción de ROS intracelulares mediante el ensayo del Ejemplo 8 de muestras representadas por α-tocoferol, biomasa vegetal y extracto hidroalcohólico, extracto de etil acético y extracto con CO₂ supercrítico procedente de *Galeopsis segetum*;

La Figura 4 muestra un gráfico de barras que representa los efectos sobre la actividad de la isoforma 2 de la 5-alfa-reductasa, de muestras de α-tocoferol, biomasa vegetal y extracto hidroalcohólico, extracto de etil acético y extracto con CO₂ supercrítico de *Galeopsis segetum*, como se informa en el Ejemplo 8.

La Figura 5 muestra un gráfico de barras que representa los efectos sobre la expresión de citoqueratina 6A de dos concentraciones por cada una de biomasa vegetal, extracto hidroalcohólico de *Galeopsis segetum*, extracto de *Galeopsis segetum* en etil acético, extracto de *Galeopsis segetum* en CO₂, como se informa en el Ejemplo 8.

La Figura 6 muestra un gráfico de barras relacionado con un ensayo de MTT a las 24 horas, que demuestra el porcentaje de actividad celular en comparación con un control, determinado por el tratamiento con extractos vegetales que contienen cantidades crecientes de *Galeopsis segetum* Necker, en conformidad con el Ejemplo 7.

La Figura 7 muestra los datos de caracterización de los tres extractos de *Galeopsis segetum* descritos en el Ejemplo 9 mediante de una cromatografía CCF con eluyente de alta polaridad;

La Figura 8 muestra los datos de caracterización de los tres extractos de *Galeopsis segetum* descritos en el Ejemplo 9 mediante de una cromatografía CCF con eluyente de alta polaridad;

La Figura 9 muestra un gráfico con el espectro de FT-IR del extracto hidroalcohólico de *Galeopsis Segetum* del Ejemplo 9;

La Figura 10 muestra un gráfico con el espectro de FT-IR del extracto con etil acético de *Galeopsis Segetum* del Ejemplo 9;

La Figura 11 muestra un gráfico con el espectro de FT-IR del extracto con CO₂ supercrítico de *Galeopsis Segetum* del Ejemplo 9;

Descripción detallada de la invención

[0033] El solicitante ha encontrado que el extracto vegetal de *Galeopsis segetum* Necker, cuando se administra de forma local o por vía cutánea, realiza una acción estimulante sobre las células del folículo, reactivando el ciclo de vida de los folículos pilosos.

[0034] Además, sorprendentemente, se ha descubierto que la actividad tricológica del extracto de *Galeopsis segetum* Necker también se realiza sobre los bulbos pilosos inactivos del cuero cabelludo, normalmente presentes en las zonas del cuero cabelludo en donde se encuentra un debilitamiento del cabello.

[0035] En conformidad con un primer aspecto de la invención, por lo tanto, se proporciona el uso no terapéutico de un extracto vegetal procedente de la planta de *Galeopsis segetum* Necker en el tratamiento o la prevención de la caída del cabello.

[0036] En conformidad con un segundo aspecto, la presente divulgación proporciona un extracto vegetal de la planta de *Galeopsis segetum* Necker, para su uso en la estimulación del crecimiento fisiológico del cabello.

[0037] La planta de la que se obtiene el extracto vegetal de la base de la invención es *Galeopsis segetum* Necker (*G. ochroleuca* Lam., *G. dubia* Leers, *G. villosa* Huds., también conocida como *Galeopsis*), una especie herbácea de porte erguida con flores labiadas típicas, perteneciente a la familia *Lamiaceae*.

[0038] Un extracto vegetal para los usos divulgados en el presente documento puede obtenerse de las raíces, hojas, frutos o flores de la planta de *Galeopsis segetum* Necker o de dos o más de estas partes de la planta.

[0039] En algunas realizaciones, el extracto vegetal se obtiene de la parte aérea de la planta de *Galeopsis segetum* Necker.

[0040] De acuerdo con algunas realizaciones, el extracto vegetal de la invención se obtiene por extracción de una parte de la planta, en particular las partes aéreas o su tejido vegetal, usando como medio de extracción un disolvente fisiológicamente aceptable o comestible. El término comestible significa un disolvente fisiológicamente aceptable que puede absorber el cuerpo humano.

[0041] Un disolvente adecuado para obtener el extracto vegetal es un líquido fisiológicamente aceptable y/o comestible en donde los componentes biológicamente activos son solubles y en donde no experimentan alteración que los prive de su actividad.

[0042] En algunas realizaciones, el disolvente es hidrófilo y se selecciona de agua, acetato de etilo, etanol o mezclas de los mismos.

[0043] Para obtener el extracto vegetal de la planta de *Galeopsis segetum* Necker, pueden emplearse técnicas de extracción usando CO₂ supercrítico o técnicas sólido-líquido adecuadas para separar/extraer de los tejidos vegetales de la planta uno o más componentes biológicamente activos, para restablecer las condiciones fisiológicas de actividad del bulbo piloso.

[0044] En determinadas realizaciones, la extracción de uno o más componentes biológicamente activos tiene lugar por maceración de una porción o matriz vegetal de *Galeopsis segetum* Necker en un disolvente adecuado, por ejemplo, una mezcla hidroalcohólica.

[0045] Por ejemplo, una porción o matriz vegetal, normalmente de partes aéreas, de la planta de *Galeopsis segetum* Necker se sumerge en un disolvente adecuado, por ejemplo, una mezcla de agua- etanol, durante un tiempo adecuado para enriquecer el disolvente de uno o más componentes biológicamente activos. En estas condiciones, la extracción en el disolvente de los componentes biológicamente activos presentes en los tejidos vegetales de la planta tiene lugar por difusión y ósmosis.

[0046] Normalmente, durante la maceración la matriz de la planta de *Galeopsis segetum* Necker se pone en contacto con el solvente durante un tiempo variable para obtener la extracción de una cantidad eficaz del componente biológicamente activo. En determinadas realizaciones, el tiempo de maceración puede variar de 1 a 48 horas.

[0047] En determinadas realizaciones, el extracto vegetal de *Galeopsis segetum* Necker se administra a una concentración de 0,01 a 100 mg/ml.

[0048] En conformidad con determinadas realizaciones, la preparación de un extracto adecuado de *Galeopsis segetum* Necker comprende las siguientes etapas:

- triturar una parte de la planta, por ejemplo, las partes aéreas,
- añadir un disolvente de extracción, por ejemplo, para obtener una relación en peso de fármaco/disolvente hidroalcohólico comprendida entre aproximadamente 1:10 y aproximadamente 1:50,
- macerar,
- extraer,
- filtrar,
- concentrar el filtrado, por ejemplo, a presión reducida por evaporación del disolvente,
- opcionalmente, continuar la evaporación hasta eliminar el disolvente
- opcionalmente, secar el extracto.

[0049] En determinadas realizaciones, la etapa de extracción puede repetirse dos o tres veces, hasta empobrecer el material a extraer.

[0050] En la etapa final de eliminación del disolvente por evaporación, se puede añadir opcionalmente un vehículo sólido, tal como, como ejemplo no limitante, almidones o maltodextrinas, para obtener el extracto en forma de polvo seco.

[0051] En conformidad con otra realización, el método de extracción de *Galeopsis segetum* Necker comprende las siguientes etapas:

- triturar, por ejemplo, las partes aéreas de la planta
- transferir el polvo obtenido a un percolador adecuado.
- lixiviar, por ejemplo, con una cantidad de disolvente de extracción para tener una relación en peso de fármaco/disolvente de aproximadamente 1:20 a aproximadamente 1:100
- recircular parte del lixiviado hasta empobrecer el material a extraer

- comprimir el lecho vegetal extraído para recuperar todo el disolvente de extracción
- filtrar el lixiviado
- concentrar el filtrado, por ejemplo, a presión reducida por evaporación del disolvente
- opcionalmente, continuar la evaporación hasta eliminar el disolvente

5 - opcionalmente, secar el extracto.

[0052] De acuerdo con algunas realizaciones, en la etapa final de eliminación del disolvente por evaporación, se añade un vehículo sólido, por ejemplo un almidón o maltodextrinas, para obtener el extracto en forma de polvo seco.

10 **[0053]** Normalmente, el extracto obtenido puede ser fluido, blando o seco. Por ejemplo, en el extracto fluido, 1 ml de extracto contiene componentes biológicamente activos solubles en 1 g de fármaco vegetal, en el extracto blando el disolvente se evapora parcialmente, en particular hasta que el extracto humedece un papel de filtro, en el extracto seco el disolvente se evapora casi por completo para obtener un polvo.

15 **[0054]** Es posible preparar extractos de *Galeopsis segetum* con distinta polaridad. Por ejemplo, es posible obtener un extracto de alta polaridad usando un disolvente polar tal como una solución hidroalcohólica, un extracto de polaridad intermedia usando un disolvente menos polar tal como acetato de etilo o un extracto no polar usando CO₂. Las técnicas de extracción preferentes son aquellas con un disolvente de alta polaridad y con CO₂ supercrítico. En particular, con estas técnicas se extrae de manera eficaz una fracción del fitocomplejo que realiza una actividad
20 inhibidora sobre la enzima 5-alfa-reductasa, que desempeña un papel importante en la alopecia androgénica y es una diana de la finasterida, un compuesto conocido que tiene actividad antiandrogénica, eficaz en la estimulación del crecimiento del cabello y en la reactivación del ciclo fisiológico de los folículos pilosos.

25 **[0055]** En determinadas realizaciones, la extracción se lleva a cabo usando una relación en peso entre el solvente y la matriz vegetal comprendida entre 1:10 y 10:1.

[0056] Otros métodos para obtener el extracto vegetal de la invención incluyen técnicas de extracción por digestión, infusión, exprimiendo, decocción, lixiviación, extracción a contracorriente, soxhlet, extracción con gases supercríticos o ultrasonido.

30 **[0057]** En algunas realizaciones, el componente biológicamente activo contenido en el extracto de *Galeopsis segetum* Necker comprende al menos un flavonoide, en particular, seleccionado del grupo que comprende hipolaetina 4'-metil éter 7-(2"-alosil) glucósido monoacetilado, hipolaetina 4'-metil éter 7-(2"-alosil) glucósido diacetilado, isoscutellareina 7-(2"-alosil) glucósido monoacetilado, hipolaetina 4'-metil éter 7-(2"-alosil) glucósido,
35 hipolaetina 7-(2"-alosil) glucósido monoacetilado, isoscutellareina 7-(2"-alosil) glucósido e hipolaetina 7-(2"-alosil) glucósido diacetilado.

40 **[0058]** El solicitante ha descubierto que los flavonoides particularmente activos para estimular la actividad del bulbo capilar son hipolaetina 4'-metil éter 7-(2"-alosil) glucósido monoacetilado y/o hipolaetina 4'-metil éter 7-(2"-alosil) glucósido diacetilado.

[0059] En algunas realizaciones, las composiciones de la invención tienen un contenido de extracto vegetal de *Galeopsis segetum* Necker comprendido entre el 0,01 y el 10 % p/p, por ejemplo el 3 % p/p.

45 **[0060]** Los componentes biológicamente activos contenidos en el extracto vegetal de la invención reactivan el ciclo de vida de los folículos pilosos, incluso cuando están inactivos, del cuero cabelludo en zonas debilitadas y/o zonas afectadas por la calvicie. Esta acción se traduce en un recrecimiento del cabello también en zonas del cuero cabelludo donde el cabello está debilitado. En conformidad con un tercer aspecto, la presente divulgación proporciona el uso de una composición que comprende un extracto vegetal de *Galeopsis segetum* Necker y un
50 vehículo fisiológicamente aceptable, en el tratamiento y/o la prevención de la caída del cabello o para estimular el crecimiento fisiológico del cabello.

55 **[0061]** En conformidad con un cuarto aspecto, se proporciona una composición que comprende un extracto vegetal de *Galeopsis segetum* Necker y un vehículo fisiológicamente aceptable para su uso en el tratamiento o la prevención de la alopecia androgénica o el defluvio.

[0062] En particular, la composición de la invención comprende una cantidad activa de uno o más componentes biológicamente activos extraídos de la planta de *Galeopsis segetum* Necker.

60 **[0063]** Normalmente, la composición de la invención es un dispositivo médico, una composición farmacéutica, un suplemento dietario o nutricional, o un cosmético.

65 **[0064]** La composición de la invención, cuando se administra de forma local o por vía sistémica, aumenta la viabilidad de las células del folículo, tanto en la fase anágena como en la fase de miniaturización, y reactiva las células inactivas del cuero cabelludo al regenerar los folículos y estimular el crecimiento del cabello nuevo.

[0065] En algunas realizaciones, la composición de la invención comprende un vehículo, diluyente o excipiente fisiológica y/o farmacéuticamente aceptable.

[0066] Normalmente, el vehículo fisiológicamente aceptable de la composición de la invención es un excipiente, vehículo o diluyente adecuado para aplicación tópica y/o administración oral.

[0067] Dentro del alcance del presente documento, el término "vehículo" se refiere a un excipiente, vehículo, diluyente o adyuvante que puede estar presente en la composición de la invención. Se contempla en los usos del extracto vegetal descrito en el presente documento y los principio activos presentes en el mismo cualquier vehículo y/o excipiente adecuado para la forma de preparación deseada para la administración.

[0068] Normalmente, la composición de la invención usa componentes de origen vegetal que son biológicamente activos y sustancialmente libres de efectos secundarios, cuando se administra por vía oral o local.

[0069] En algunas realizaciones, la composición de la invención se administra por vía oral. En otras realizaciones, la composición se aplica a la piel y en particular al cuero cabelludo.

[0070] El vehículo, diluyente o excipiente fisiológica y/o farmacéuticamente aceptable se puede seleccionar basándose en la vía de administración para la que se pretende la composición farmacéutica resultante.

[0071] En algunas realizaciones, la vía de administración de la composición de la invención es tópica. En estos casos, la composición de la invención puede aplicarse, en una cantidad eficaz, de forma directa al cuero cabelludo.

[0072] Por ejemplo, en el tratamiento de la alopecia androgénica, se puede aplicar directamente al cuero cabelludo una cantidad cosméticamente activa de la composición de la invención, una o múltiples veces al día, de forma conveniente para ciclos que duran 2-3 meses, alternando con períodos de descanso.

[0073] De acuerdo con otro aspecto de la invención, se proporciona un método de tratamiento cosmético que comprende la aplicación al cuero cabelludo de una cantidad eficaz de una composición del tipo descrito anteriormente.

[0074] La composición para aplicación tópica puede estar en forma sólida, semisólida o fluida. Las formulaciones en forma sólida adecuadas incluyen cremas, geles, pastas, pomadas.

[0075] En otras realizaciones, la formulación para administración local está en forma fluida, por ejemplo, en forma de lociones, geles, champús, suspensiones, emulsiones.

[0076] En el caso de formulaciones en forma fluida o semifluida, el extracto vegetal puede diluirse en un vehículo en la forma líquida fisiológicamente aceptable, tal como agua, alcohol, solución hidroalcohólica o glicérica, o mezclarse con otros líquidos adecuados para aplicación local.

[0077] A modo de ejemplo, las composiciones de la invención en forma líquida pueden prepararse disolviendo los componentes biológicamente activos del extracto en agua y/o alcohol. La composición líquida puede tamponarse para lograr un intervalo de pH convenientemente seleccionado de entre 5 y 7, para que sea compatible con el pH del cuero cabelludo, y después se filtra y se envasa en recipientes adecuados tales como viales o ampollas.

[0078] En algunas realizaciones, las composiciones de la invención pueden comprender excipientes comúnmente usados en la formulación de preparaciones cosméticas o farmacéuticas, para el uso local, tales como conservantes, agentes bactericidas, agentes estabilizantes, agentes emulsionantes, tampones, agentes humectantes, agentes colorantes y otros excipientes comúnmente utilizados en las técnicas de preparación cosmética/farmacéutica.

[0079] En una realización, la formulación para aplicación local está en forma de una emulsión que contiene el extracto transportado en un excipiente adecuado.

[0080] A modo de ejemplo, los excipientes adecuados son derivados de celulosa tales como hidroximetilcelulosa, hidroxipropilmetilcelulosa, metilcelulosa, hidroxipropilcelulosa, hidroxietilcelulosa, carboxietilcelulosa, etilhidroxietil celulosa, butirato acetato de celulosa, ftalato acetato de celulosa y mezclas de los mismos.

[0081] Ejemplos adicionales de excipientes adecuados comprenden los polímeros que pertenecen a la familia de las lactamas, tales como pirrolidona y sus derivados, por ejemplo, polivinilpirrolidona, polivinilpolipirrolidona y mezclas de los mismos, sales inorgánicas tales como calcio o fosfato de dicalcio, lubricantes tales como, por ejemplo, estearato de magnesio, triacilglicerol y mezclas de los mismos.

[0082] En algunas realizaciones, la composición para aplicación tópica comprende un excipiente del tipo hidroximetilcelulosa y/o agentes gelificantes con un HLB adecuado para la formulación y las sustancias.

[0083] De acuerdo con otras realizaciones, la administración de la composición de la invención tiene lugar por vía oral.

[0084] Las composiciones para administración oral pueden estar en forma sólida o líquida. Las composiciones en forma sólida típicas comprenden comprimidos, cápsulas, polvos, gránulos, píldoras. Las composiciones en forma líquida típicas comprenden soluciones, emulsiones, suspensiones, jarabes. Todas las composiciones comprenden también formas de liberación controlada de las mismas.

[0085] En general, los comprimidos comprenden un vehículo o excipiente adecuado en donde el extracto vegetal está disperso, normalmente en forma seca.

[0086] Los componentes biológicamente activos de la composición de la invención pueden estar presentes en cantidades variables, por ejemplo, comprendidas entre el 0,0001 % en peso y el 10 % en peso, normalmente entre el 0,1 y 5 % en peso.

[0087] En conformidad con determinadas realizaciones, la composición de la invención comprende adicionalmente una o más sustancias activas, tales como vitaminas, minerales, micronutrientes y otras sustancias activas en la estimulación de la actividad del folículo piloso.

[0088] En conformidad con algunas realizaciones, la composición para administración oral es un alimento funcional, una composición nutricional, un producto dietario, un suplemento o un producto dietario o un dispositivo médico.

[0089] Alimentos funcionales significa cualquier alimento o ingrediente alimenticio modificado que pueda proporcionar un beneficio o protección frente a una desventaja o una condición fisiológica, además de las sustancias nutritivas tradicionales que contenga.

[0090] Producto nutricional significa un producto aislado o purificado a partir de sustancias comestibles. Un producto nutricional es tal cuando muestra tener una ventaja fisiológica o proporcionar protección frente a una desventaja o trastorno fisiológico.

[0091] Suplemento dietario o nutricional significa un producto que contiene una vitamina, mineral, extracto vegetal, aminoácido, metabolito, extracto, concentrado o mezclas de estos ingredientes.

[0092] La cantidad administrada y la frecuencia de administración de la composición dependerán del tipo y la gravedad de la afección tricológica a tratar. La composición de la invención es eficaz para prevenir y/o tratar las formas de calvicie o debilitamiento del cabello, tales como, por ejemplo, el defluvio y la alopecia androgénica.

[0093] La presente invención se describirá ahora con referencia a los siguientes ejemplos que se proporcionan con fines ilustrativos y no deben considerarse como limitantes del alcance de la presente invención.

EJEMPLO 1

[0094] Comprimido para uso oral

Extracto seco de <i>Galeopsis segetum</i>	100-300 mg
Celulosa microcristalina	80-340 mg
Fosfato de calcio dibásico dihidrato	50-100 mg
Sílice coloidal	2,5-10 mg
Estearato de magnesio	2,5-10 mg
PEG-4000	0,5-2,5 mg
Carboximetilcelulosa de sodio reticulada	0,25-0,5 mg
Alginato de sodio	0,25-0,5 mg
Hidroxipropilmetilcelulosa	0,25-0,5 mg

EJEMPLO 2

[0095] Producto granular para uso oral

Eritritol	20-40 % p/p
Extracto seco de <i>Galeopsis segetum</i>	0,5-4 % p/p
Manitol	10-30 % p/p

(continua)

Agente saborizante	5-10 % p/p
Sucralosa	0,1-0,3 % p/p
Almidón según sea necesario para	100

EJEMPLO 3

[0096] Comprimido para uso oral

5

Sacarosa refinada	50-90 mg
Extracto blando de <i>Galeopsis segetum</i>	50-100 mg
Talco	10-20 mg
Almidón de maíz	5-25 mg
Azúcar en polvo	5-15 mg
sorbitol no cristizable al 70 %	5-10 mg
Estearato de magnesio	1-3 mg
Goma arábica	2-3 mg
Dióxido de titanio	1-2,5 mg
Gelatina	1-3 mg
Copolímero de ácido metacrílico de tipo A	1-2,5 mg
Carbonato de magnesio ligero	0,5-1 mg
Polietilenglicol 6000	0,1-0,3 mg
Ftalato de dibutilo	0,1-0,25 mg
Hidroxibenzoato de metilo	0,01-0,03 mg
Celulosa microcristalina según sea necesario para	300 mg

EJEMPLO 4

[0097] Loción para aplicación en cabello y cuero cabelludo

10

Alcohol etílico desnaturalizado de tipo C	500-1500 mg
Extracto fluido de <i>Galeopsis segetum</i>	50-300 mg
Aceite de ricino hidrogenado polioxietilenado	12,2-48,8 mg
Fragancia	3-12 mg
EDTA disódico dihidrato	1,5-6 mg
Agua según sea necesario para	5 ml

EJEMPLO 5

[0098] Champú para tratamiento

15

Zetesol MGS	30-50 % p/v
Protelan LS 9011	5-15 % p/v
Mirasheen CP 820/G	2-6 % p/v
Rewoderm LI S 80	2-4 % p/v
BC 2262	0,5-1,5 % p/v
Cocamida MIPA	0,5-1,5 % p/v
Protelan AG 11	0,5-1,5 % p/v
Ácido cítrico	0,5-1,5 % p/v
Fragancia	0,5-1,5 % p/v
Hidroximetilglicinato de sodio	0,5-1,5 % p/v
Betaína	0,25-0,75 % p/v
Lauril metil glucet-10 hidroxipropildimonio cloruro	0,25-0,75 % p/v
Policuaturnio-10	0,2-0,6 % p/v

(continua)

tetra sodio-EDTA	0,1-0,3 % p/v
Pantenol	0,1-0,3 % p/v
Extracto fluido de <i>Galeopsis segetum</i>	0,05-1,0 % p/v
Butilhidroxianisol (BHA)	0,005-0,02 % p/v
Agua según sea necesario para	100 ml

EJEMPLO 6**[0099]** Emulsión cutánea

5

Propilenglicol	6-8 g
Estearato de gliceril palmitato	3-5 g
Aceite de coco	2-4 g
Alcohol cetosteárilico (25) OE	1-3 g
Cera emulsionante	1-3 g
Alcohol bencílico	0,5-1,5 g
Extracto blando de <i>Galeopsis segetum</i>	0,5-1,5 g
Alcohol cetílico (6) OE	0,25-1,0 g
Agua según sea necesario para	100 g

EJEMPLO 7

10 **[0100]** Los efectos proliferativos del extracto de *Galeopsis segetum* se han estudiado en células HFDPC-c (PromoCell®) mantenidas en cultivo en presencia de medio de cultivo para la papila dérmica folicular, siguiendo las instrucciones del fabricante (PromoCell®).

[0101] La actividad proliferativa se evaluó mediante un ensayo de MTT.

15 **[0102]** El ensayo de MTT (3-(4,5-dimetiltiazol-2-il)-2,5-difeniltetrazolio) es un ensayo colorimétrico utilizado para evaluar la proliferación celular *in vitro* [Mosmann T, 1983], dado que permite medir la proliferación y la viabilidad celulares mediante la evaluación de la actividad mitocondrial. Este método es muy útil para medir el crecimiento celular después del tratamiento con mitógenos, estímulos antigénicos, factores de crecimiento y para estudios de citotoxicidad.

20

[0103] El ensayo proporciona el uso de un agente oxidante cromogénico, el MTT, que consiste en un sistema policíclico ($C_{18}H_{16}BrN_5S$) provisto de un anillo tetrazólico que las deshidrogenasas mitocondriales u otros sistemas de transporte de electrones pueden reducir fácilmente, formando, mediante la apertura del anillo tetrazólico, un compuesto cromogénico nitrogenado designado como formazán. Dicho formazán forma cristales insolubles en el ambiente intracelular, para los que las membranas son sustancialmente impermeables: por lo tanto, se permite la entrada de la molécula a la célula, pero no la salida del producto, si se ha metabolizado correctamente, es decir, si las cadenas de transporte de electrones aún están metabólicamente activas.

25

30 **[0104]** Los cristales de formazán se solubilizan en dimetilsulfóxido (DMSO), provocando así que la solución cambie de amarillo a azul oscuro-violeta.

[0105] Las células HFDPC-C se sembraron a una densidad de 5×10^4 células/pocillo en placas de 96 pocillos. Después de 24 horas, una vez lograda una confluencia de aproximadamente el 80 %, las células se trataron con 6 concentraciones crecientes de extracto de *Galeopsis segetum* N.: 0,01; 0,05; 0,1; 0,5; 1 y 2 mg/ml en medio completo. Las células de control, por otro lado, se mantuvieron en cultivo en medio completo.

35

[0106] Las placas se incubaron a 37 °C, en CO₂ por debajo del 5 % durante 24 horas, al final de esto, el medio de cultivo se reemplazó por una solución de 100 µl de MTT (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, EE. UU.) 0,5 mg/ml en medio de cultivo completo.

40

[0107] Después de 3 horas de incubación a 37 °C, se recogió el medio y los cristales de formazán se solubiliaron con 100 µl por pocillo de DMSO (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, EE. UU.). La placa, recubierta con aluminio, se colocó en un agitador mecánico (Arhos 160-PBI International, Milán, Italia) a 120 rpm durante 15 minutos a temperatura ambiente.

45

[0108] La absorbancia de la solución teñida se midió mediante un lector espectrofotométrico de microplacas (BioTek Instruments Inc., Bad Friedrichshall, Alemania) a una longitud de onda de 570 nm (longitud de onda de

referencia a 630 nm).

[0109] Los datos se expresaron como el porcentaje de viabilidad celular en comparación con las células control (ctr), de acuerdo con la siguiente fórmula:

$$\% \text{ de viabilidad celular / ctr} = (\text{Abs. de la muestra} / \text{Abs. del ctr}) * 100$$

[0110] Todos los ensayos se realizaron por duplicado.

[0111] Los resultados de la prueba muestran un aumento dependiente de la dosis de la proliferación celular, lo que indica un estímulo del crecimiento celular de las células foliculares.

[0112] Las células madre del folículo piloso desempeñan un papel importante en el ciclo del pelo, pero se sabe que con el envejecimiento se produce una pérdida de las mismas y de la capacidad para restablecer la regeneración capilar. A partir de las células madre, se forman las células de la matriz, cuyo crecimiento y diferenciación están bajo la influencia de sustancias producidas por las células de la papila dérmica. La actividad secretora de la papila dérmica está bajo el control de sustancias producidas por las células del estrato espinoso de la envoltura externa de la raíz o por hormonas. De hecho, las células del estrato espinoso producen péptidos mayores de 3000 Dalton que tienen la capacidad de provocar un aumento de dos a cinco veces el número de mitosis de las células de la papila. Recientemente se ha descubierto que el factor de crecimiento de fibroblastos (bFGF) y el factor de crecimiento derivado de plaquetas (PDGF) potencian el crecimiento de las células de la papila dérmica. En particular, estas proteínas aumentan la síntesis de estromelisin (una enzima metaloproteínasa) que actúa sobre las células de la papila y acelera el crecimiento de la misma. Las células de la papila dérmica producen numerosas citocinas que afectan la proliferación de las células de la matriz capilar. Por consiguiente, el efecto, tal como el ejercido por el extracto de *Galeopsis*, que estimula el crecimiento de estas células, es ventajoso para estimular el crecimiento del cabello.

EJEMPLO 8

OBJETO DEL TRABAJO EXPERIMENTAL

[0113] El procedimiento experimental que se informa a continuación tiene como objeto estudiar la actividad *in vitro* de distintas muestras de *Galeopsis segetum*, sometidas a distintos procedimientos de extracción, para caracterizar la actividad antioxidante y la actividad de estímulo del crecimiento del cabello de las mismas.

MATERIALES

Muestras sometidas a ensayo

[01141]

NOMBRE INTERNO	A	C	D	E
NOMBRE DE IDENTIFICACIÓN EXCLUSIVO	BIOMASA VEGETAL	MUESTRA HIDROALCOHÓLICA SECA	MUESTRA EN ETIL ACÉTICO	EXTRACTO EN CO2
LOT	Lot C/181286	Lot 921/30/D	Lot 921/30/G	Lot 522/14/23/A
ALMACENAMIENTO	T. A.	T. A.	T. A.	T. A.
CONCENTRACIONES	2-10-20-50-100-200 µg/ml	2-10-20-50-100-200 µg/ml	2-10-20-50-100-200 µg/ml	2-10-20-50-100-200 µg/ml

[0115] Todos los extractos se diluyeron a 100 mg/ml en DMSO y se filtraron en condiciones estériles. Las reservas se almacenaron a -20 °C.

Reactivos y equipos utilizados

[0116]

REACTIVOS	PROVEEDOR
Peróxido de hidrógeno al 30 %	SIGMA, 216763
Agarosa (para uso rutinario)	SIGMA, A9539-100G
Suero fetal bovino	ATCC, 30-2030
diacetato de 2',7'-dicloro-fluorescina	SIGMA, 35845
Dimetilsulfóxido	SIGMA, D2438-50ML
Medio Eagle modificado por Dulbecco	ATCC, 30-2002-500 ml
Solución salina tamponada con fosfato de Dulbecco	SIGMA, D8537
Solución de bromuro de etidio (10 mg/ml, para biología molecular, solución acuosa)	SIGMA, E1510
Tampón de carga de gel, ARNasa, ninguna detectada	SIGMA, G2526
Kit de transcripción inversa de ADNc de alta capacidad, 200 reacciones	APPLIED BYOSYSTEMS, 4368814
Medio para células madre mesenquimatosas	INNOPROT, P60115
MTT	SIGMA-Aldrich, M2128
Penicilina-estreptomicina	SIGMA, P0781
PreMix Ex Taq	TAKARA, RR039A
Kit para desprendimiento de células primarias	INNOPROT, P60305
TaqMan® Gene Expression Assays para SRD5A1 Mm00614213ml	APPLIED BYOSYSTEMS, 4331182
TaqMan® Gene Expression Assays para SRD5A2 Mm00446421ml	APPLIED BYOSYSTEMS, 4331182
TaqMan® Gene Expression Assays para β actina Mm00466519ml	APPLIED BYOSYSTEMS, 4331182
Testosterona	SIGMA, 86500
Solución de tripsina-EDTA	SIGMA, T3924
α -tocoferol	SIGMA, T3251
GeneAllRibospin mini 50	Gene-all, 304-150
Human Keratin, type II cytoskeletal 6A(KRT6A) ELISA kit 96T	CSB-EL012561HU
Película para placa de ELISA	Starlab (E2796-9793)
placa de 96 pocillos para ensayos de ELISA ((NUNC MAXI SORP)	Sigma (M9410, Sigma)
Cellytic M	SIGMA, C2978
Cóctel inhibidor de proteasas	SIGMA, T1500

EQUIPO	PROVEEDOR
Espectrofotómetro (MOD:6715, BS-6715B0)	Jenway UVA/IS
baño de agua digital de 15 l +5 °C a + 100 °C (Mod: Swbd1, BS-SWB2D)	Stuart
Balanza (Mod. XS204)	Mettler Toledo
Cabina de flujo laminar (Mod: Gemini) + lamp de UV con equipo anti reflejos	Steril Manufacturing Division
Incubador HeraCell CO ₂ (Mod:150 ADV)	ThermoScientific
congelador horizontal a 85 °C ULT130, 120 l (Mod: Labfrost, MME-TE21140)	Elcold
Cámara de recuento de Burkert s/pinzas (DI-DA-443/3)	Carlo Erba
Autolector de microplacas (EL 808)	Biotek
Agitador vortical	Arhos160-PBI International
Lector de fluorescencia para microplacas Fluoroskan Ascent FL	Thermo Fisher Scientific Inc., Waltham, MA

Modelos biológicos utilizados

Cultivos de fibroblastos embrionarios murinos

[0117] La línea inmortalizada de fibroblastos embrionarios murinos BALB/c3T3, Clon A31 (ATCC, Manassas, VA, EE.UU.), se obtuvo del Istituto Nazionale di Ricerca sul Cancro (Genova, Italia).

[0118] Las células se mantuvieron en cultivo en matraces estériles de 25 cm³ y se incubaron a 37 °C en una atmósfera húmeda con CO₂ por debajo del 5 %. Como medio de cultivo se utilizó DMEM (medio Eagle modificado por Dulbecco, ATCC, Manassas, VA, EE. UU.) con suero fetal de ternera al 10 % (SFB) añadido, aminoácidos no esenciales (ANE) al 1 %, una mezcla de penicilina y estreptomicina al 1 % (mezcla de Pen-Estrep). Estos últimos reactivos se compraron todos en Lonza, Inc. (Barcelona, España)

[0119] Durante la etapa de cultivo, cada 2 días se realizó una división 1:3, hasta alcanzar una confluencia del 80 %, lavando con PBS 1X (Lonza, Barcelona, España) y desprendiendo las células con una solución de tripsina-EDTA (Lonza, Barcelona, España) a 37 °C durante 2 minutos.

CÓDIGO DEL CATÁLOGO DE ICLC	CCL-163™
TITULAR	Aaronson S.
REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS	• 10993-5:1999. Aaronson SA, Todaro GJ. Development of 3T3-like lines from Balb-c mouse embryo cultures: transformation susceptibility to SV40. J. Cell. Physiol. 72: 141-148, 1968. PubMed: 4301006 • Todaro GJ, Aaronson SA. Properties of clonal lines of murine sarcoma virus transformed Balb-3T3 cells. Virology 38: 174-202, 1969. PubMed: 4306523 • Aaronson SA, Todaro GJ. Basis for the acquisition of malignant potential by mouse cells cultivated <i>in vitro</i>. Science 162: 1024-1026, 1968. PubMed: 4301647 • Jainchill JL, Todaro GJ. Stimulation of cell growth <i>in vitro</i> by serum with and without growth factor. Relation to contact inhibition and viral transformation. Exp. Cell Res. 59: 137-146, 1970. PubMed: 4194429 • Thompson SA, <i>et al.</i> COOH-terminal extended recombinant amphiregulin with bioactivity comparable with naturally derived growth factor. J. Biol. Chem. 271: 17927-17931, 1996. PubMed: 8663535 • Anderson MT, <i>et al.</i> Simultaneous fluorescence-activated cell sorter analysis of two distinct transcriptional elements within a single cell using engineered green fluorescent proteins. Proc. Natl. Acad. Sci. USA 93: 8508-8511, 1996. PubMed: 8710900 • Evaluación biológica de dispositivos médicos. Parte 5: Pruebas de citotoxicidad <i>in vitro</i>. Sidney, NSW, Australia: StandardsAustralia;Standards Australia AS ISO 10993.5-2002. • Evaluación biológica de dispositivos médicos-Parte 5: Pruebas de citotoxicidad <i>in vitro</i>. Ginebra (Suiza): Organización Internacional de Normalización/ANSI;ISO

5

Cultivos celulares de células de la envoltura externa de la raíz del folículo piloso humano

[0120] Las células de la envoltura externa de la raíz del folículo piloso humano (HHFORSC, forma siglada de *human hair follicle outer root sheath cells*) proporcionadas por Innoprot, se aislaron en Scien Cell Research Labs a partir de la envoltura de la raíz externa capilar. La línea celular se cultivó en medio para células madre mesenquimatosas (MSCM, forma siglada de *medium for mesenchymal stem cells*): 500 ml de medio basal, suero fetal bovino (FBS) al 10 %, complemento para el crecimiento de células madre mesenquimatosas al 1 % (MSCGS, forma siglada de *mesenchymal stem cells growth supplement*), solución de penicilina y estreptomina al 1 % (solución P/S) y mantenidas en matraces de cultivo de 25 cm² a 37 °C y en CO₂ por debajo del 5 %. Antes de proceder a la siembra en placas de las células, el matraz tuvo que recubrirse con poli-L-lisina (2 µg/cm²).

[0121] Cada dos días los cultivos confluentes se dividieron 1:3-1:6, después del lavado con DPBS (solución salina tamponada con fosfato de Dulbecco), utilizando la solución T/E (solución de tripsina/EDTA) y TNS (solución de neutralización de tripsina), y se sembraron a 2-5x10⁴ cél/cm², 37 °C, CO₂ al 5 %.

Controles

ENSAYO DE MTT (BALB3T3)

[0122] CONTROL POSITIVO: Células no tratadas en medio DMEM con (Medio Eagle modificado por Dulbecco, ATCC, Manassas, VA, EE. UU.) con suero fetal bovino al 10 % (SFB) añadido, aminoácidos no esenciales (ANE) al 1 %, una mezcla de penicilina y estreptomina al 1 % (Mezcla de Pen-Estrep), y mantenidas en placas de cultivo de 25 cm² (96 pocillos) a 37 °C y en CO₂ por debajo del 5 %.

ENSAYO DE DCFH-DA Y PRUEBA DE ESTRÉS OXIDATIVO INDUCIDO POR MTT (BALB3T3)

[0123] CONTROL NEGATIVO: Células no tratadas en medio DMEM (Medio Eagle modificado por Dulbecco, ATCC, Manassas, VA, EE. UU.) con suero fetal bovino al 2,5% (SFB) añadido, aminoácidos no esenciales (ANE) al 1 %, una mezcla de penicilina y estreptomina al 1 % (Mezcla de Pen-Estrep), y mantenidas en placas de cultivo de 25 cm² (96 pocillos) a 37 °C y en CO₂ por debajo del 5 %.

[0124] CONTROL POSITIVO: Células tratadas durante 2 horas con peróxido de hidrógeno 1 mM en medio DMEM (Medio Eagle modificado por Dulbecco, ATCC, Manassas, VA, EE. UU.) con suero fetal bovino al 2,5% (SFB)

añadido, aminoácidos no esenciales (ANE) al 1 %, una mezcla de penicilina y estreptomicina al 1 % (Mezcla de Pen-Estrep), y mantenidas en placas de cultivo de 25 cm² (96 pocillos) a 37 °C y en CO₂ por debajo del 5 % (en la oscuridad).

5 ESTUDIO DE LA ACTIVIDAD DE INDUCCIÓN DE LA 5-ALFA-REDUCTASA (BALB3T3)

[0125] CONTROL NEGATIVO: Células no tratadas en medio DMEM (Medio Eagle modificado por Dulbecco, ATCC, Manassas, VA, EE. UU.) con suero fetal bovino al 10 % (SFB) añadido, aminoácidos no esenciales (ANE) al 1 %, una mezcla de penicilina y estreptomicina al 1 % (Mezcla de Pen-Estrep) y testosterona 10 ng/ml, y mantenidas en placas de cultivo de 25 cm² (12 pocillos) a 37 °C y en CO₂ por debajo del 5 %.

[0126] CONTROL POSITIVO: Células tratadas durante 24 horas con finasterida (0,05 mg/ml) en medio DMEM (Medio Eagle modificado por Dulbecco, ATCC, Manassas, VA, EE. UU.) con suero fetal bovino al 10 % (SFB) añadido, aminoácidos no esenciales (ANE) al 1 %, una mezcla de penicilina y estreptomicina al 1 % (Mezcla de Pen-Estrep) y testosterona 10 ng/ml, y mantenidas en placas de cultivo de 25 cm² (12 pocillos) a 37 °C y en CO₂ por debajo del 5 %.

ESTUDIO DE LA EXPRESIÓN DE LA KERATINA 6A (EER)

[0127] CONTROL NEGATIVO: Células no tratadas en MSCM, suero fetal bovino (FBS) al 10 %, complemento para el crecimiento de células madre mesenquimatosas al 1 % (MSCGS), solución de penicilina y estreptomicina al 1 % (solución P/S) y mantenidas en placas de cultivo de 25 cm² (12 pocillos) a 37 °C y en CO₂ al 5 %.

[0128] Antes de proceder a la siembra en placas de las células, el matraz tuvo que recubrirse con poli-L-lisina (2 µg/cm²).

MÉTODOS

- Ensayo de citotoxicidad preliminar (ensayo de MTT) -principio del método con BALB3T3

[0129] El ensayo de MTT (3-(4,5-dimetiltiazol-2-il)-2,5-difeniltetrazolio) es un ensayo colorimétrico utilizado para evaluar la proliferación celular *in vitro*, dado que permite medir la proliferación y la viabilidad celulares mediante la evaluación de la actividad mitocondrial. Este método es muy útil para medir el crecimiento celular después del tratamiento con mitógenos, estímulos antigénicos, factores de crecimiento y para estudios de citotoxicidad.

[0130] El ensayo proporciona el uso de un agente oxidante cromogénico, el MTT, que consiste en un sistema policíclico (C₁₈H₁₆BrN₅S) provisto de un anillo tetrazólico que las deshidrogenasas mitocondriales u otros sistemas de transporte de electrones pueden reducir fácilmente, formando, mediante la apertura del anillo tetrazólico, un compuesto cromogénico nitrogenado designado como formazán. El formazán forma cristales insolubles en el ambiente intracelular, para los que las membranas son sustancialmente impermeables: por lo tanto, se permite la entrada de la molécula a la célula, pero no la salida del producto, si se ha metabolizado correctamente, es decir, si las cadenas de transporte de electrones aún están metabólicamente activas.

[0131] Los cristales de formazán se solubilizan en dimetilsulfóxido (DMSO), provocando así que la solución cambie de amarillo a azul oscuro-violeta.

Procedimiento experimental

[0132] El ensayo se realizó siguiendo el método de Mosmann (1983), con algunas pequeñas modificaciones. Las células BALB3T3 se sembraron a una densidad de 5*10⁴ células/pocillo en placas de 96 pocillos. Después de 24 horas, una vez lograda una confluencia de aproximadamente el 80 %, las células se trataron con 6 concentraciones crecientes distintas de los extractos de *Galeopsis segetum* (biomasa vegetal; muestra hidroalcohólica seca; muestra en etil acético; extracto en CO₂) 2-10-20-50-100-200 mg/ml en medio completo. Las células de control, por otro lado, se mantuvieron en cultivo en medio completo.

[0133] Las placas se incubaron a 37 °C, en CO₂ por debajo del 5 % durante 24, 48 y 72 horas. Al final de todos los tratamientos, se recogió el medio y se reemplazó por 100 µl de una solución de MTT 0,5 mg/ml (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, EE. UU.) en medio de cultivo completo.

[0134] Después de 3 horas de incubación a 37 °C, se recogió el medio y los cristales de formazán se solubiliaron con 100 µl por pocillo de DMSO (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, Estados Unidos). La placa, recubierta con aluminio, se colocó en un agitador mecánico (Arhos 160-PBI International, Milán, Italia) a 120 rpm durante 15 minutos a temperatura ambiente.

[0135] La absorbancia de la solución teñida se midió mediante un lector espectrofotométrico de microplacas (BioTek Instruments Inc., Bad Friedrichshall, Alemania) a una longitud de onda de 570 nm (longitud de onda de

referencia a 630 nm).

[0136] Los datos se expresaron como el porcentaje de viabilidad celular en comparación con las células control (ctr), de acuerdo con la siguiente fórmula:

$$\% \text{ de viabilidad celular /ctr} = (\text{Abs. de la muestra} / \text{Abs. del ctr}) * 100$$

[0137] Todos los ensayos se realizaron al menos por duplicado.

MTT en BALB3T3 con estrés oxidativo inducido

Principio del método

[0138] Los fibroblastos murinos BALB3T3 representan uno de los modelos validados para estudiar el estrés oxidativo *in vitro* (Subirade *et al.*, 1995; Kutuk *et al.*, 2004).

[0139] Los estudios realizados en 2005 por Rajapakse y colaboradores (2005) han resaltado la posibilidad de emplear un método ampliamente utilizado y versátil, como el ensayo de MTT para estudiar la actividad antioxidante *in vitro* de compuestos activos. Específicamente, mediante este método, es posible estudiar los efectos protectores de tales compuestos en células sometidas posteriormente a estrés oxidativo. La inducción de estrés oxidativo se realiza mediante incubación con peróxido de hidrógeno, un agente inductor de la producción de daño oxidativo en células mediante la formación de ROS. Los posibles efectos protectores pueden determinarse mediante la evaluación de la viabilidad celular posterior al estrés oxidativo de las células pretratadas/preexpuestas a los compuestos activos a analizar, en comparación con las células sometidas al mismo estrés oxidativo. Una mayor viabilidad celular corresponderá a un efecto protector de los compuestos probados.

Procedimiento experimental

[0140] El ensayo se realizó de acuerdo con el método descrito por Coda y colaboradores (Coda *et al.*, 2012), con algunas modificaciones.

[0141] Se sembraron fibroblastos murinos BALB3T3 en una placa de 96 pocillos a una densidad de 5×10^4 células/pocillo y se incubaron a 37 °C, en CO₂ por debajo del 5 %, hasta alcanzar una confluencia del 80 %.

[0142] Posteriormente, las células se incubaron durante 16 horas con los extractos de *Galeopsis segetum* (biomasa vegetal; muestra hidroalcohólica seca; muestra en etil acético; extracto en CO₂) a las siguientes concentraciones: 20-50 y 100 µg/ml.

[0143] Las diluciones se prepararon a partir de una reserva 1000X en DMSO, se filtraron en condiciones estériles y se usó medio DMEM con suero fetal de ternera fetal (SFT) al 2,5% añadido, aminoácidos no esenciales (ANE) al 1 %, una mezcla de penicilina y estreptomycinina al 1 % (mezcla de Pen-Estrep).

[0144] Se usaron como control positivo células tratadas con H₂O₂ 1 mM; por otro lado, se usaron como control negativo células mantenidas en medio de cultivo solo (DMEM SFT al 2,5 %).

[0145] Al final del pretratamiento de 16 horas, las células se lavaron con PBS 1X y se incubaron durante 90 minutos con una solución de H₂O₂ 1 mM (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, EE. UU) en medio sin suero, en oscuridad, a 37 °C y CPO₂ al 5 %.

[0146] Una vez finalizada la etapa de inducción de estrés oxidativo, se realizó la evaluación de la viabilidad celular de las diversas muestras de acuerdo con el método descrito en la sección 4.1.2 (ensayo de MTT).

[0147] Los datos se expresaron como el porcentaje de viabilidad celular en comparación con las células control no estresadas (ctr), de acuerdo con la siguiente fórmula:

$$\% \text{ de viabilidad celular / ctr} = (\text{Abs. de la muestra} / \text{Abs. del ctr}) * 100$$

[0148] Todos los ensayos se realizaron al menos por duplicado.

Estudio de los efectos de los extractos de *Galeopsis segetum* sobre la producción de ROS mediante el ensayo de DCFH-DA-BALB3T3

Principio del método

[0149] La producción de ROS en la línea celular de fibroblastos murinos BALB3T3 se determinó a través de espectrofluorimetría mediante el ensayo de 2,7-diclorofluorescina-diacetato (DCFH-DA), como describen Tobi y

colaboradores (Tobi *et al.*, 2000). DCFFI-DA es un compuesto no fluorescente en su forma lipófila, que tiene la capacidad de difundir a través de la membrana celular. Una vez dentro de la célula, es desacetilado por esterasas intracelulares para dar 2,7-diclorofluorescina reducida (DCFH), que también es no fluorescente. DCFH, al ser incapaz de cruzar la membrana celular de nuevo, se acumula en consecuencia en las células (Curtin *et al.*, 2002). La reacción con las ROS intracelulares conduce a la oxidación de DCFH para dar 2,7-diclorofluorescina (DCF), un compuesto altamente fluorescente. La intensidad de tal fluorescencia se puede detectar con un fluorímetro, lo que permite estimar la cantidad de ROS producida en las células.

Procedimiento experimental

[0150] El protocolo utilizado para este experimento representa una versión modificada de la descrita en un trabajo de Tobi y colaboradores (Tobi *et al.*, 2000).

[0151] Se sembraron fibroblastos murinos BALB3T3 en placas de 96 pocillos a una densidad de 5×10^4 células/pocillo y se incubaron hasta alcanzar una confluencia del 80 %. Posteriormente, las células se incubaron durante 16 horas con los extractos de *Galeopsis segetum* (biomasa vegetal; muestra hidroalcohólica seca; muestra en etil acético; extracto en CO₂) a las siguientes concentraciones: 20-50 y 100 µg/ml.

[0152] Las diluciones se prepararon a partir de una reserva 1000X en DMSO, se filtraron en condiciones estériles y se usó medio DMEM con suero fetal de ternera fetal (SFT) al 2,5% añadido, aminoácidos no esenciales (ANE) al 1 %, una mezcla de penicilina y estreptomina al 1 % (mezcla de Pen-Estrep).

[0153] Se usaron como control positivo células tratadas con H₂O₂ 1 mM; por otro lado, se usaron como control negativo células mantenidas en medio de cultivo solo (DMEM SFT al 2,5 %).

[0154] α-tocoferol, analizadas a una concentración de 25-50-250-500 µM; Al final de la incubación, la inducción de estrés oxidativo se llevó a cabo mediante un tratamiento de 90 minutos con una solución de H₂O₂ 4 mM, en oscuridad, a 37 °C y CO₂ al 5 %. Una vez finalizado el tratamiento, las células se lavaron dos veces con PBS 1X y se lisaron con tampón de lisis CelLytic™ (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, EE. UU.) de acuerdo con el protocolo del proveedor.

[0155] Posteriormente, los lisados se transfirieron a una placa negra de 96 pocillos y se leyó de forma espectrofluorométrica la fluorescencia de la DCF usando un lector de fluorescencia de microplacas FluorescenceAscent FL (Thermo Fisher Scientific Inc., Waltham, MA, EE. UU.), con longitudes de onda de excitación y emisión de 485 y 538 nm, respectivamente. Los valores de emisión (URF) obtenidos para cada muestra, relacionados con la producción de ROS intracelulares, se compararon con el valor de emisión obtenido para el control negativo (ctr, células tratadas con H₂O₂ 1 mM) y se expresaron como porcentaje de ROS producidos de acuerdo con la siguiente ecuación:

$$\% \text{ de ROS producidos/ ctr} = (\text{Abs. 538 nm de la muestra} / \text{Abs. 538 nm del ctr}) * 100$$

[0156] Todos los ensayos se realizaron al menos por duplicado.

Estudio de los efectos de los extractos de *Galeopsis segetum* sobre la actividad de la 5 alfa reductasa (isoforma 2)-BALB3T3

Procedimiento experimental

[0157] La expresión génica de la isoforma 2 de la 5 alfa-reductasa (SRD5A2) en células BALB3T3 se evaluó mediante RT-PCR cuantitativa (transcripción inversa-reacción en cadena de la polimerasa cuantitativa-qRT-PCR).

[0158] Este análisis tuvo 3 pasos secuenciales:

- extracción de ARN total;
- transcripción reversa en ADNc;

qRT-PCR.

[0159] Se sembraron fibroblastos murinos BALB3T3 en placas de 12 pocillos a una densidad de $0,5 \times 10^6$ células/pocillo y se incubaron hasta alcanzar una confluencia del 80 %. Posteriormente, las células se incubaron durante 24 horas con los extractos de *Galeopsis segetum* (biomasa vegetal; muestra hidroalcohólica seca; muestra en etil acético; extracto en CO₂) a las siguientes concentraciones: 20-50 y 100 µg/ml.

[0160] Las diluciones se prepararon a partir de una reserva 1000X en DMSO, se filtraron en condiciones estériles y se usó medio DMEM con suero fetal de ternera fetal (SFT) al 10% añadido, aminoácidos no esenciales (ANE) al 1 %, una mezcla de penicilina y estreptomina al 1 % (mezcla de Pen-Estrep).

[0161] Por otro lado, se usaron como control negativo células mantenidas en medio de cultivo solo (DMEM SFT al 2,5 %).

5 **[0162]** La finasterida, un inhibidor selectivo de la isoforma 2 (SRD5A2) de la 5 alfa reductasa, se analizó a la concentración de 0,05 mg/ml.

[0163] Al final de la incubación, se realizó la extracción de ARN.

10 El ARN total se extrajo de las células BALB3T3 utilizando el kit comercial Ribospin™ (Gene All Biotechnology Co., LTD)

[0164] Al final de la incubación con los compuestos activos de interés, las células se lavaron con PBS (1X) y finalmente se sometieron al procedimiento de extracción de ARN. Al final de la extracción, utilizando un espectrofotómetro (Jenway UV/VIS MOD: 6715, BS-6715B0), las concentraciones se calcularon en µg/ml de ARN
15 total extraído a la longitud de onda de 260 nm.

[0165] Finalmente, la integridad del ARN (2 µg/ml) se evaluó mediante un procesamiento electroforético en gel de agarosa al 1 %.

20 **[0166]** El ARN total se convirtió en ADNc (ADN complementario), usando una enzima que tiene la capacidad de sintetizar una molécula de ADN usando una cadena de ARN como molde; esta enzima ADN polimerasa ARN dependiente toma el nombre de transcriptasa inversa.

25 **[0167]** Esta se une al extremo 3' de una única cadena de ARN y por medio de cebadores aleatorios y de desoxinucleótidos trifosfato (DNTP) sintetiza la cadena de ADNc.

[0168] Para este fin, se utilizó un "PrimeScript™ RT Reagent Kit (perfect Real Time)" (TakaraBio Inc., Japón) con 5X PrimeScript Buffer (para tiempo real); PrimeScript RT Enzyme Mix1; Cebador OligodT; 6 meros aleatorios; dH2O sin ARNasa.

30 **[0169]** El ARN extraído y cuantificado se diluyó a una concentración de 2 µg/ml y se transcribió de forma inversa a ADNc. Se preparó una mezcla maestra de 10 µl (que contiene tampón 5X PrimeScript (para tiempo real); PrimeScript RT Enzyme Mix1; Cebador OligodT 50 µM; 6 meros aleatorios 100 µM) a los que se añadieron 10 µl
35 ARN (2 µg/ml).

[0170] Las muestras se colocaron en un termociclador (Mx3000P Real Time PCR System de Stratagene, Agilent Technologies Italia S.p.A., Milán, Italia) y se sometieron a transcripción inversa en las siguientes condiciones:

40 37 °C durante 15 minutos;
85 °C durante 5 segundos;
4 °C de espera.

[0171] Al final de la transcripción inversa, las muestras se complementaron con 30 µl de agua DEPC para obtener una concentración final de ADNc de 40 ng/µl.

45 **[0172]** La qRT-PCR es un método para amplificar y cuantificar en tiempo real los amplicones producidos controlando la fluorescencia emitida durante la reacción.

50 **[0173]** Para la amplificación por RT-PCR, se utilizó el sistema de sonda TaqMan® (Applied Biosystems). Se utilizaron las siguientes sondas TaqMan: Mm00446421ml (SDR5A2) y Mm00466519ml (β-actina). Como gen de control (constitutivo) se utilizó β-actina.

[0174] La sonda Taqman es un tipo de sonda que permite desarrollar fluorescencia al avanzar la amplificación. En su extremo 5' está unido un indicador (fluoróforo FAM™), mientras que en el extremo 3' hay un extintor. La proximidad entre el indicador y el extintor cancela la emisión de la señal de fluorescencia. Con la actividad 5' exonucleasa de la ADN polimerasa termoestable (polimerasa Taq) se detecta fluorescencia y se puede evaluar la acumulación de productos de amplificación aumentando la fluorescencia del indicador, que aumenta en cada ciclo.

[0175] Para qRT-PCR, se organizó una mezcla maestra de la siguiente manera:

60 • 10 µl de "2X Premix Ex Taq";
• 1 µl de "20x TaqMan Gene Expression Assays" (que contiene 2 cebadores y sonda fluorescente etiquetada con el fluoróforo FAM™);
• 0,4 µl de referencia pasiva Rox II;
65 • 5 µl de agua DEPC.

[0176] La mezcla maestra se complementó con 4 µl de ADNc para el gen diana y 1 µl de ADNc para el gen de constitutivo.

[0177] La amplificación se realizó en las siguientes condiciones para 40 ejecuciones:

- 5 • 95 °C, 30 s (activación de la Amplitaq);
- 95 °C, 5 s (desnaturalización);
- 60 °C, 20 s (apareamiento-extensión);

[0178] Cada análisis se realizó por duplicado.

[0179] Los datos obtenidos se analizaron de acuerdo con el método $2^{-\Delta\Delta C_t}$ y, por lo tanto, fue posible calcular los valores con respecto a la expresión del gen de interés, normalizados con respecto al gen constitutivo y calibrados en la muestra de control (células no tratadas):

$$\Delta\Delta C_t = \Delta C_{t\text{diana-constitutivo}}(\text{control}) - \Delta C_{t\text{diana-constitutivo}}(\text{células tratadas})$$

[0180] Asumiendo una eficacia de amplificación del 100 %, se calculó $2^{-\Delta\Delta C_t}$.

Estudio de los efectos de los extractos de *Galeopsis segetum* sobre la expresión de la citoqueratina 6A-EER

Procedimiento experimental

[0181] Para el estudio de la expresión de citoqueratina 6A en células de la EER se utilizó un kit comercial: el kit Human Keratin, type II cytoskeletal 6A(KRT6A) ELISA kit 96T (CSB).

Día 1:

Cuando las células (*HHFORSC*) alcanzaron aproximadamente el 80 % de confluencia, se desprendieron con tripsina/EDTA y se sembraron a una densidad de 1×10^6 células/ml en placas de 12 pocillos y luego se incubaron a 37 °C, CO₂ al 5 % (24 h).

Día 2:

Cuando las células alcanzaron aproximadamente el 80 % de confluencia, se expusieron a los compuestos activos a analizar: biomasa vegetal; muestra hidroalcohólica seca; muestra en etil acético; extracto en CO₂, a las siguientes concentraciones: 20-50 y 100 µg/ml.

Las diluciones se prepararon a partir de una reserva 1000X en DMSO, se filtraron en condiciones estériles y se usó medio para células madre mesenquimatosas.

Día 3:

Al final de la incubación se lisaron las células usando tampón de lisis Cell Lytic™ complementado con inhibidor de proteasas al 1 % y los lisados se usaron para los ensayos de ELISA.

[0182] Para normalizar la expresión de la proteína sobre el contenido total de proteínas en la muestra, se evaluó la cantidad de proteína total en cada muestra mediante el ensayo de Bradford (Bradford, 1976).

RESULTADOS

[0183] Los resultados obtenidos por la experimentación se ilustran en las Figuras 1-5 adjuntas, que muestran lo siguiente:

5.1 Ensayo de citotoxicidad preliminar (ensayo de MTT)-BALB3T3

[0184] La figura 1 muestra los datos obtenidos mediante el ensayo de MTT (media ± DT). En la prueba, los extractos de *Galeopsis segetum*, extracto seco (biomasa vegetal), el extracto hidroalcohólico (muestra hidroalcohólica seca), el extracto de etil acético (muestra en etil acético) y el extracto en CO₂ (extracto en CO₂) se evaluaron en el intervalo de dosis de 2-200 µg/ml, durante 24, 48 y 72 horas. Los resultados muestran que ninguno de los compuestos probados es citotóxico.

5.2 MTT en BALB3T3 con estrés oxidativo inducido

[0185] La Figura 2 muestra los resultados de la experimentación con MTT, con estrés oxidativo inducido en las muestras indicadas en la siguiente Tabla 1.

Muestras	Actividad eliminadora
α-tocóferol 25 µM	43,10
BIOMASA VEGETAL 50 µg/ml	22,14
MUESTRA HIDROALCOHÓLICA SECA 50 µg/ml	37,64
MUESTRA EN ETIL ACÉTICO 50 µg/ml	50,13

EXTRACTO EN CO ₂ 50 µg/ml	48,58
--------------------------------------	-------

[0186] Específicamente, La Figura 2 muestra la actividad antioxidante de la biomasa vegetal, extracto hidroalcohólico, extracto de etil acético, extracto en CO₂, mientras que la Tabla 2 muestra los datos de la actividad eliminadora.

[0187] Los resultados muestran cómo los extractos expresan actividad antioxidante. Se demuestra cómo los procesos de extracción determinan una mejora de dicha actividad, en especial la extracción en etil acético y CO₂. Si se considera la actividad eliminadora de la biomasa vegetal (22,14), esto se mejora después de la extracción hidroalcohólica (37,64; + 70 %) y cada vez más con la extracción con etil acético y CO₂ (50,13 y 48,58, respectivamente; en promedio + 123 %).

5.3 Estudio de los efectos de los extractos de *Galeopsis segetum* sobre la producción de ROS mediante el ensayo de DCFPI-DA-BALB3T3

[0188] Los datos para la actividad de protección de las células frente al estrés oxidativo inducido por H₂O₂ se muestran en la Fig. 3.

[0189] El estrés oxidativo inducido produce una situación de sufrimiento celular que conduce a una pérdida significativa de población celular. El tratamiento con los compuestos (biomasa vegetal, extracto hidroalcohólico, extracto de etil acético, extracto en CO₂) muestra una capacidad de protección frente al proceso apoptótico inducido por el estrés oxidativo. Dicha actividad está en línea con lo que se ha observado para la actividad antioxidante y es relevante para los extractos en etil acético y CO₂.

5.4 Estudio de los efectos de los extractos de *Galeopsis segetum* sobre la actividad de la 5 alfa reductasa (isoforma 2)-BALB3T3

[0190] La Fig. 4 muestra los datos de expresión génica de la isoforma 2 de la 5 alfa-reductasa, diana de la Finasterida.

[0191] *Galeopsis segetum* (biomasa vegetal) muestra una actividad inhibidora frente a la 5 alfa-reductasa de tipo 2. Además, los extractos hidroalcohólicos y de CO₂ (50 y 100 µg/ml) muestran tal actividad, mientras que es menos evidente en la extracción con etil acético.

5.5 Estudio de los efectos de los extractos de *Galeopsis segetum* sobre la expresión de la citoqueratina 6A-EER

[0192] La Figura 5 muestra los valores relacionados con la citoqueratina 6A, un marcador bien conocido de células madre foliculares en donde desempeña un papel importante para la homeostasis y el crecimiento del cabello.

[0193] Los datos obtenidos muestran que la biomasa vegetal no tiene la capacidad de estimular tal queratina, mientras que las muestras obtenidas con la extracción hidroalcohólica y en etil acético (en ambas dosis analizadas), y la extracción en CO₂ (solo la dosis más alta), tiene la capacidad de estimularla.

[0194] El grado de estímulo de tal queratina por parte de la muestra de etil acético es significativa.

Conclusión

[0195] Las pruebas llevadas a cabo han mostrado:

- ausencia de citotoxicidad de todas las muestras analizadas en el intervalo de 2-200 microg./ml, hasta las 72 h de tratamiento celular (fibroblastos) (ensayo de MTT)
- buena actividad antioxidante de todos los compuestos, cabe señalar que las extracciones mejoran la actividad antioxidante. En comparación con la biomasa vegetal, la extracción hidroalcohólica mejora tal actividad en +70 %, mientras que la extracción en etil acético y CO₂ lo hace en el 123 % (ensayo de diclorofluoresceína).
- tal actividad también se refleja en la protección de las células después del estrés oxidativo inducido (prueba en fibroblastos)
- la prueba sobre el estímulo de la síntesis de citoqueratina 6A por EER (células foliculares de la envoltura externa de la raíz) establece que la biomasa vegetal no tiene la capacidad de estimular la síntesis de la misma, mientras que las extracciones hidroalcohólica, en etil acético y en CO₂ (en este caso solo a la dosis más alta probada) inducen la síntesis de tal queratina.

EJEMPLO 9

Introducción

[0196] El presente ejemplo se refiere a la preparación de tres extractos que tienen una polaridad distinta, obtenidos a partir de las partes aéreas de *Galeopsis segetum*. El más polar se preparó por extracción con etanol acuoso.

Inicialmente, se realizó una exploración de los disolventes para identificar el contenido alcohólico más adecuado.

[0197] Usando CO₂ supercrítico se preparó un extracto no polar.

[0198] Extrayendo los componentes menos polares del extracto hidroetanólico con acetato de etilo se preparó un extracto que tenía polaridad intermedia.

[0199] Estos extractos se usaron para explorar la actividad.

1. Objeto de las pruebas

[0200] Preparación de tres extractos que tienen distinta polaridad, obtenidos de las partes aéreas de *Galeopsis segetum* y caracterización de los mismos.

[0201] Se prepararon los siguientes extractos:

- Extracto hidroalcohólico seco de *Galeopsis segetum*-IDN6764
- Extracto seco con acetato de etilo de *Galeopsis segetum*-IDN 6765
- Extracto con CO₂ de *Galeopsis segetum*-IDN 6766

2. Etapa experimental

2.1 Biomasa

[0202] Todo el trabajo al que se hace referencia en el presente documento se llevó a cabo en las partes aéreas de *Galeopsis segetum* CoA 1054/9394.

2.2 Extracto hidroalcohólico: Exploración del contenido de etanol

[0203] Para encontrar el mejor disolvente de extracción en términos de rendimiento, características y patrón de metabolitos secundario mediante CCF, se realizó una exploración con distintos contenidos de etanol, concretamente el 20 %, 40 % y 70 %. Para cada prueba, se suspendieron 20 g de biomasa de medio en 400 ml de disolvente a 50 °C, mezclando durante 4 horas. Las suspensiones se filtraron y las soluciones se concentraron hasta sequedad.

[0204] Cada extracto se evaluó con respecto al rendimiento de extracción, las características y la CCF. Los resultados se muestran en la **Tabla 1**

Tabla 1

Muestra	Disolvente de extracción	Rendimiento de extracto seco	Características	CCF [#] (Rf de las manchas principales 0,57 y 0,80)
921/28/A	Etanol al 20 %	14,8 %	Polvo marrón	Intensidad inferior a 921/28/B y 921/28/C
921/28/B	Etanol al 40%	12,0 %	Polvo marrón	Similar a 921/28/C
921/28/C	Etanol al 70%	13,1 %	Polvo verdoso pegajoso	Similar a 921/28/B
[#] La comparación de las intensidades de las manchas se llevó a cabo en la misma concentración (5 %).				

[0205] De acuerdo con la CCF, los mejores disolventes de extracción son EtOH al 40 % y 70 %. Por otro lado, este último extracto contiene más clorofila, lo que da lugar a un extracto verdoso y pegajoso. Por este motivo, se seleccionó el disolvente de extracción en § EtOH al 40%.

2.3 Preparación del extracto hidroalcohólico seco de *Galeopsis segetum*-IDN6764 (prueba ref. 921/30/D)

[0206]

a) se vertieron en un percolador 100 g de partes aéreas terrestres de *Galeopsis segetum*, CofA 1054/9394, se cubrió con 0.54 l de etanol al 40 %, se calentó a 50 °C y se dejó en condiciones estáticas durante 4 h.

Una vez que se realizó la descarga, se realizaron tres extracciones adicionales (3 x 0,3 l), usando la misma temperatura y el mismo tiempo de contacto.

b) Se recogieron los lixiviados y se concentraron al vacío para obtener una suspensión de aproximadamente 0,15 l y un 10 % de residuo seco.

c) La suspensión se centrifugó para separar el residuo insoluble y la solución limpia se concentró al vacío hasta que se secó.

[0207] El residuo se secó a 50 °C al vacío durante 24 h.

Rendimiento: 14,79 g de extracto hidroalcohólico seco de *Galeopsis segetum*-IDN6764, lot 921/30/D, rendimiento p/p de CofA 14/0605/LRE: 14,79 %

2.4 Preparación de extracto seco de *Galeopsis segetum*-IDN6765 (prueba ref. 921/30/D) con etil acetato

[0208]

a) se vertieron en un percolador 850 g de partes aéreas terrestres de *Galeopsis segetum*, CofA 1054/9394, se cubrió con 4.6 l de alcohol al 40 %, se calentó a 50 °C y se dejó en condiciones estáticas durante 4 h.

Una vez que se realizó la descarga, se realizaron tres extracciones adicionales (4 x 2,5 l), manteniendo la misma temperatura y el mismo tiempo de contacto.

b) Se recogieron los lixiviados y se concentraron al vacío para obtener una suspensión de aproximadamente 1,4 l y un 10 % de residuo seco.

c) La suspensión se centrifugó para separar el residuo insoluble y la solución limpia se sometió a extracción con etil acetato (3 x 0,35 l).

d) Las fases orgánicas se unieron y se concentraron hasta obtener una masa blanda. Se añadió agua (10 ml) y la suspensión se concentró nuevamente hasta obtener una masa blanda. Este tratamiento se repitió para eliminar cualquier residuo acetato de etilo.

[0209] Finalmente, el residuo se secó a 50 °C al vacío durante 24 h.

Rendimiento: 2,85 g de extracto seco con acetato de etilo de *Galeopsis segetum*-IDN6765, lot 921/30/G, rendimiento p/p de CofA 14/0606/LRE: 0,34 %

2.5 Preparación de extracto de *Galeopsis segetum* con CO₂-IDN6766

[0210]

a) se vertieron en el recipiente de un extractor 5 kg de partes aéreas terrestres de *Galeopsis segetum*, CofA 1054/9394. La extracción se realizó de acuerdo con las siguientes condiciones:

- Temperatura, 55 °C
- Presión, 27,0-28,0 atm (270-280 bar)
- flujo de CO₂, 70 kg/h
- Tiempo de extracción, 4,5 h

b) La extracción proporciona una emulsión (94 g). La emulsión se secó a 60 °C al vacío durante 4 h.

Rendimiento: 74 g de extracto de *Galeopsis segetum* con CO₂-IDN6766, lot 522/14/23A, de CofA 14/0604/LRE. Rendimiento p/p: 1,48 %

3. Resultados

[0211] Los extractos se caracterizaron realizando las siguientes detecciones:

- Aspecto
- Identificación con CCF, como se muestra en las Fig. 7 y 8 adjuntas
- Identificación con FT-IR, como se muestra en las Fig. 9-11 adjuntas

[0212] Los resultados se informan en la **Tabla 2**

Tabla 2

Muestra	Aspecto	Identificación con CCF	Identificación con FT-IR
Extracto hidroalc. seco de <i>Galeopsis s.</i> lot 921/30/D, CofA 14/0605/LRE	Polvo fino marrón	Fijación 1 (eluyente de alta polaridad)	Fijación 3
Extracto seco con acetato de etilo de <i>Galeopsis s.</i> lot 921/30/G, CofA 14/0606/LRE	Polvo fino verdoso	Fijación 2 (eluyente de baja polaridad)	Fijación 4
Extracto con CO ₂ de <i>Galeopsis s.</i> lot 522/14/23A, CofA 14/0604/LRE	Masa pastosa marrón		Fijación 5

4. Conclusión

[0213] De las partes aéreas de *Galeopsis segetum* se prepararon y caracterizaron tres extractos que tenían distinta polaridad.

REIVINDICACIONES

1. Un uso no terapéutico de un extracto vegetal de *Galeopsis segetum* Necker en el tratamiento o la prevención de la caída del cabello.
- 5 2. El uso de acuerdo con la reivindicación 1, en donde dicho extracto vegetal se obtiene por extracción sobre una porción o tejido de una planta de *Galeopsis segetum* Necker con un disolvente fisiológicamente aceptable, preferentemente seleccionado de agua, alcohol etílico y mezclas de los mismos, o dióxido de carbono en la fase supercrítica.
- 10 3. Un uso no terapéutico de acuerdo con la reivindicación 1, en donde el extracto vegetal de *Galeopsis segetum* Necker está incluido en una composición que comprende un vehículo fisiológicamente aceptable.
- 15 4. El uso de acuerdo con la reivindicación 3, **caracterizado por que** el extracto vegetal comprende un flavonoide seleccionado del grupo que comprende hipolaetina 4'-metil éter 7-(2"-alosil) glucósido monoacetilado, hipolaetina 4'-metil éter 7-(2"-alosil) glucósido diacetilado, isoscutellareina 7-(2"-alosil) glucósido monoacetilado, hipolaetina 4'-metil éter 7-(2"-alosil) glucósido, hipolaetina 7-(2"-alosil) glucósido monoacetilado, isoscutellareina 7-(2"-alosil) glucósido e hipolaetina 7-(2"-alosil) glucósido diacetilado, o mezclas de los mismos.
- 20 5. El uso de acuerdo con la reivindicación 4, en donde dicho flavonoide es hipolaetina 4'-metil éter 7-(2"-alosil) glucósido monoacetilado, hipolaetina 4'-metil éter 7-(2"-alosil) glucósido diacetilado, o mezclas de los mismos.
- 25 6. El uso de acuerdo con la reivindicación 3, **caracterizado por que** la composición está en una forma para administración oral o aplicación tópica.
7. El uso de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 3-6, **caracterizado por que** la composición está en una forma para aplicación tópica seleccionada de loción, emulsión, champú, crema o pomada.
- 30 8. El uso de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 3-6, **caracterizado por que** la composición está en una forma para administración oral seleccionada de comprimido, píldora o polvo granulado.
- 35 9. El uso de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 3-6, en donde la composición comprende adicionalmente uno o más ingredientes seleccionados de vitaminas, minerales, micronutrientes y mezclas de los mismos.
10. El uso de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 3-9, **caracterizado por que** la composición es un nutracéutico, un alimento funcional, un suplemento dietario, un suplemento alimenticio, un producto farmacéutico o un producto cosmético.
- 40 11. Una composición que comprende un extracto vegetal de *Galeopsis segetum* Necker y un vehículo fisiológicamente aceptable, para su uso en el tratamiento o la prevención de la alopecia androgénica o el defluvio.
12. Una composición para su uso de acuerdo con la reivindicación 11, para administración oral o aplicación tópica.

Fig.1
Ensayo de MTT

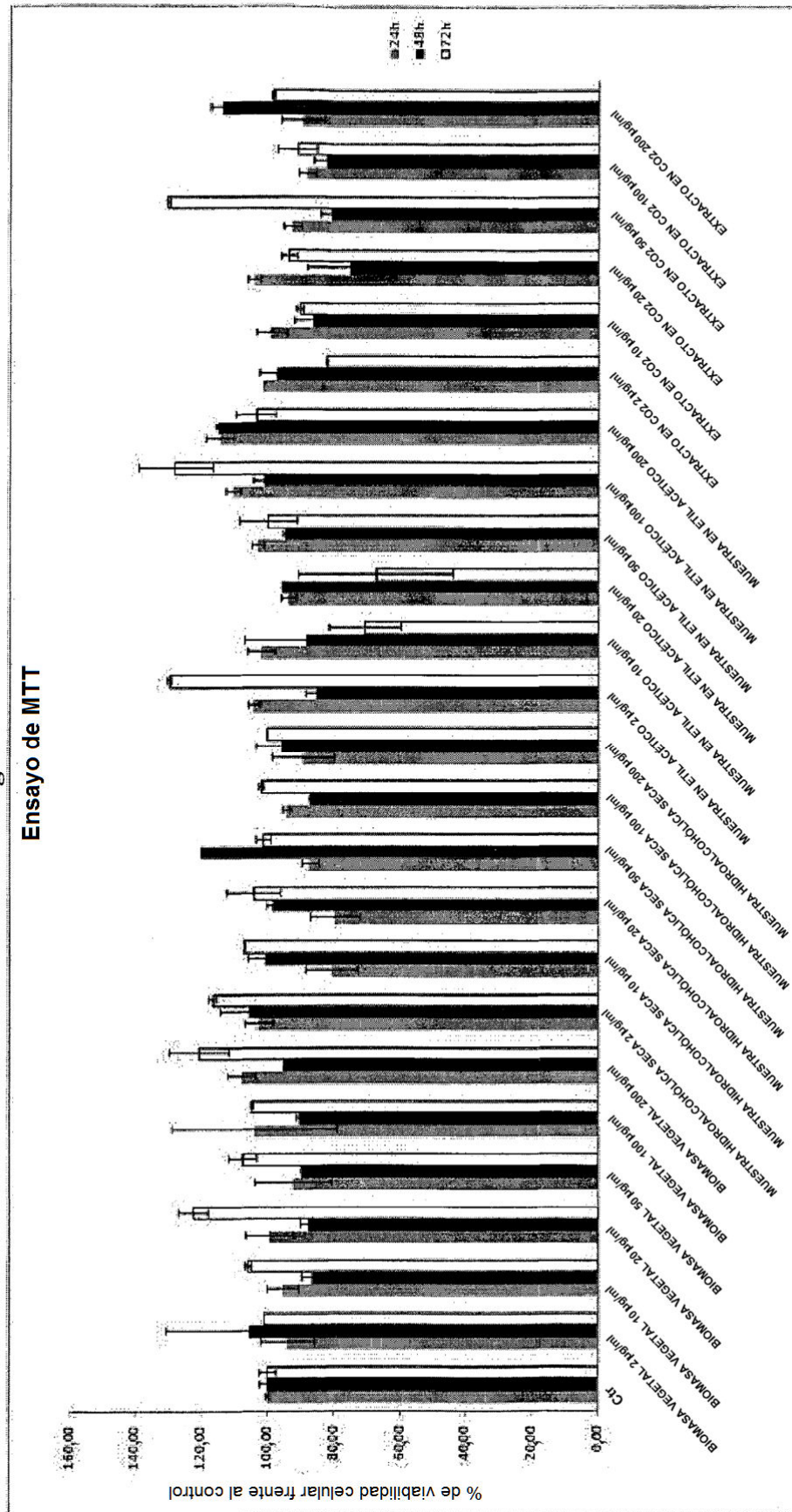


Fig.2

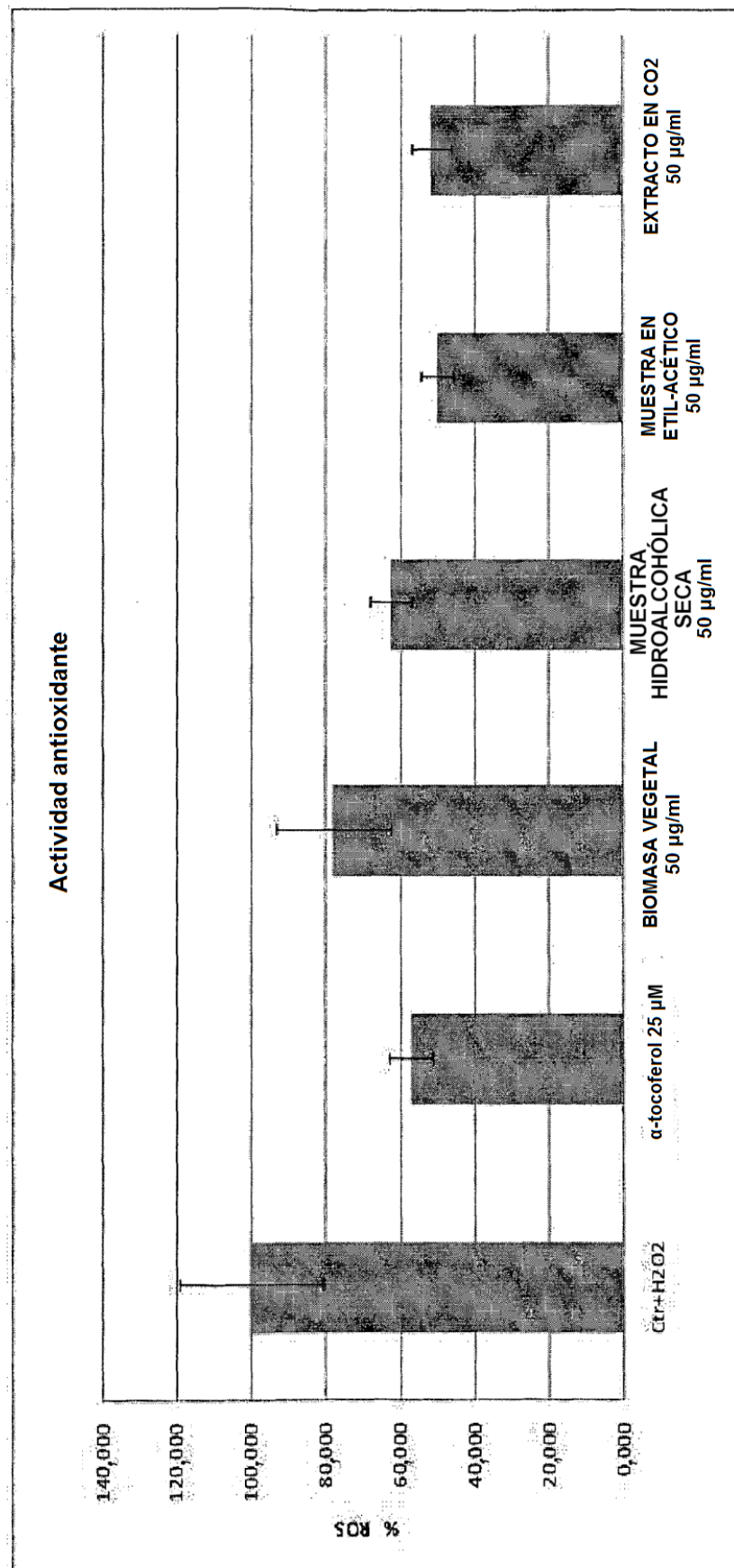


Fig.3

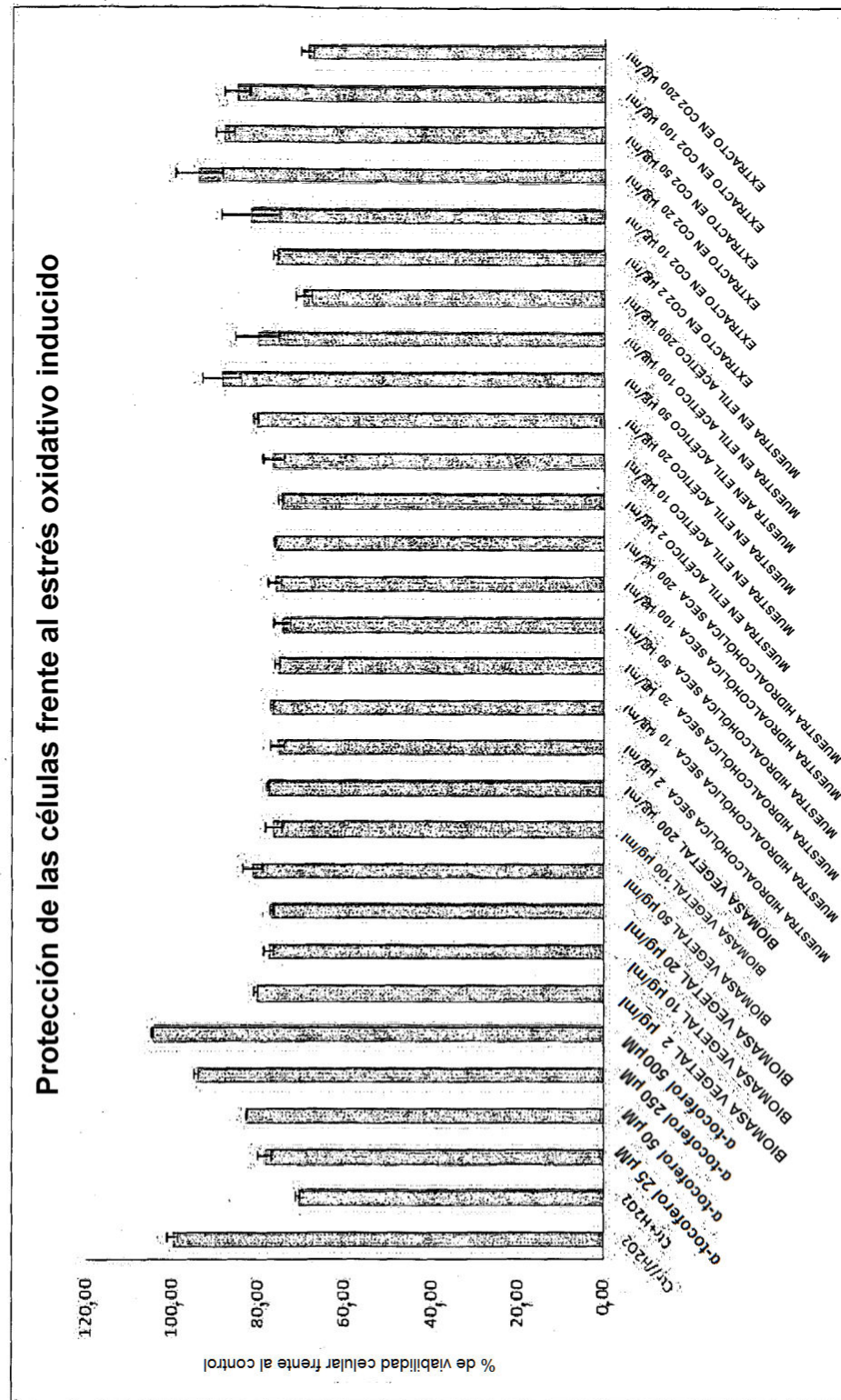


Fig.4

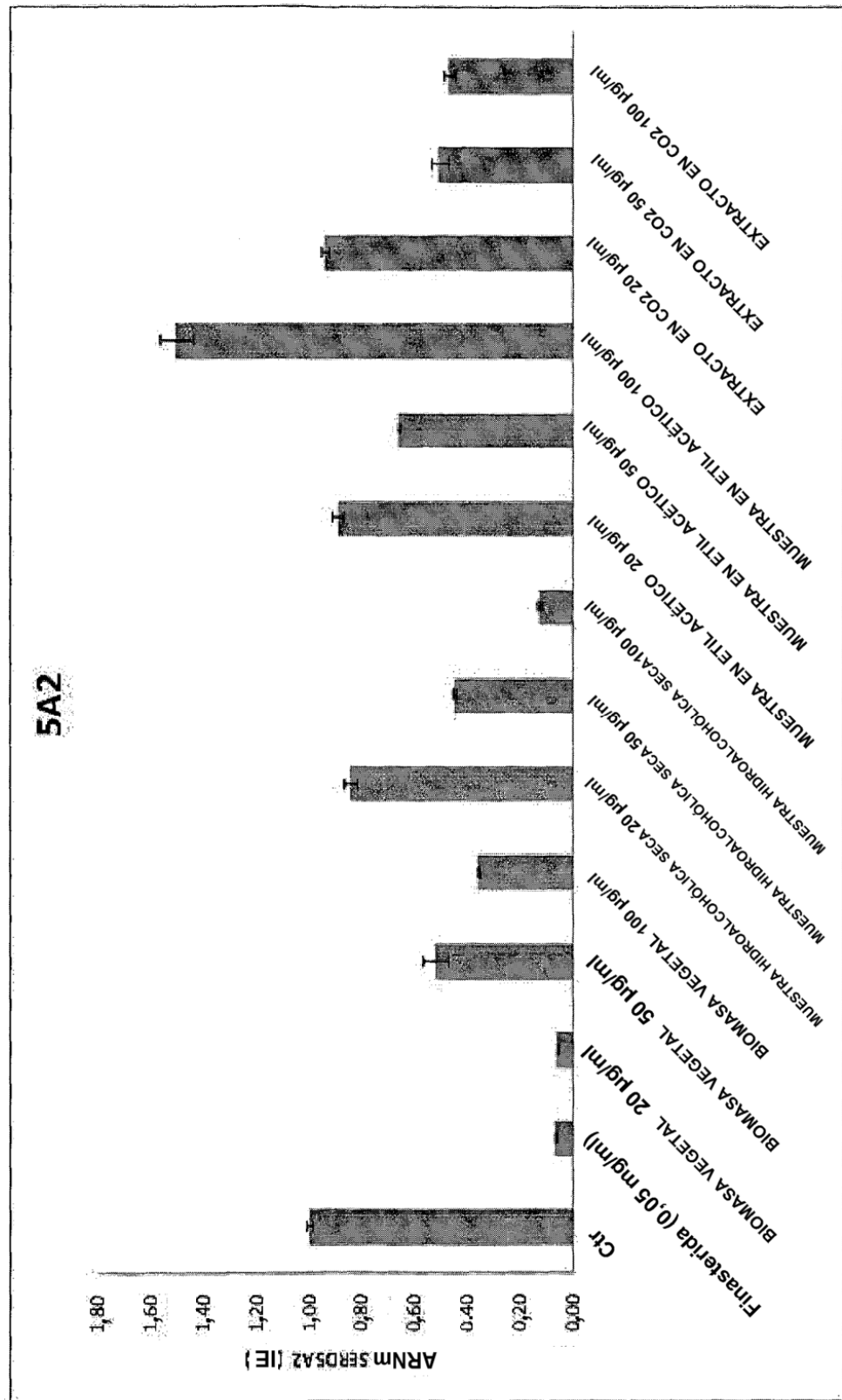


Fig.5

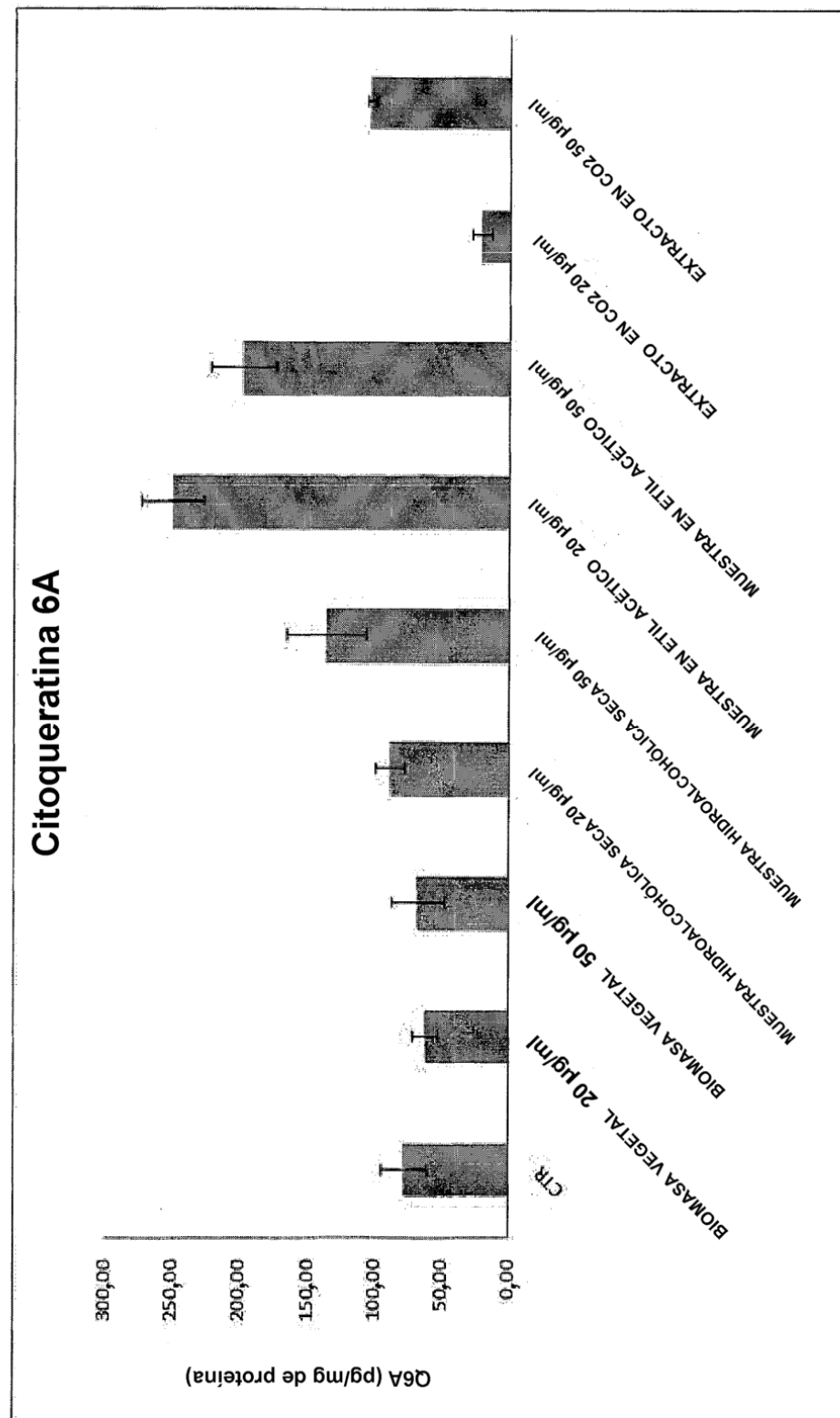


Fig.6

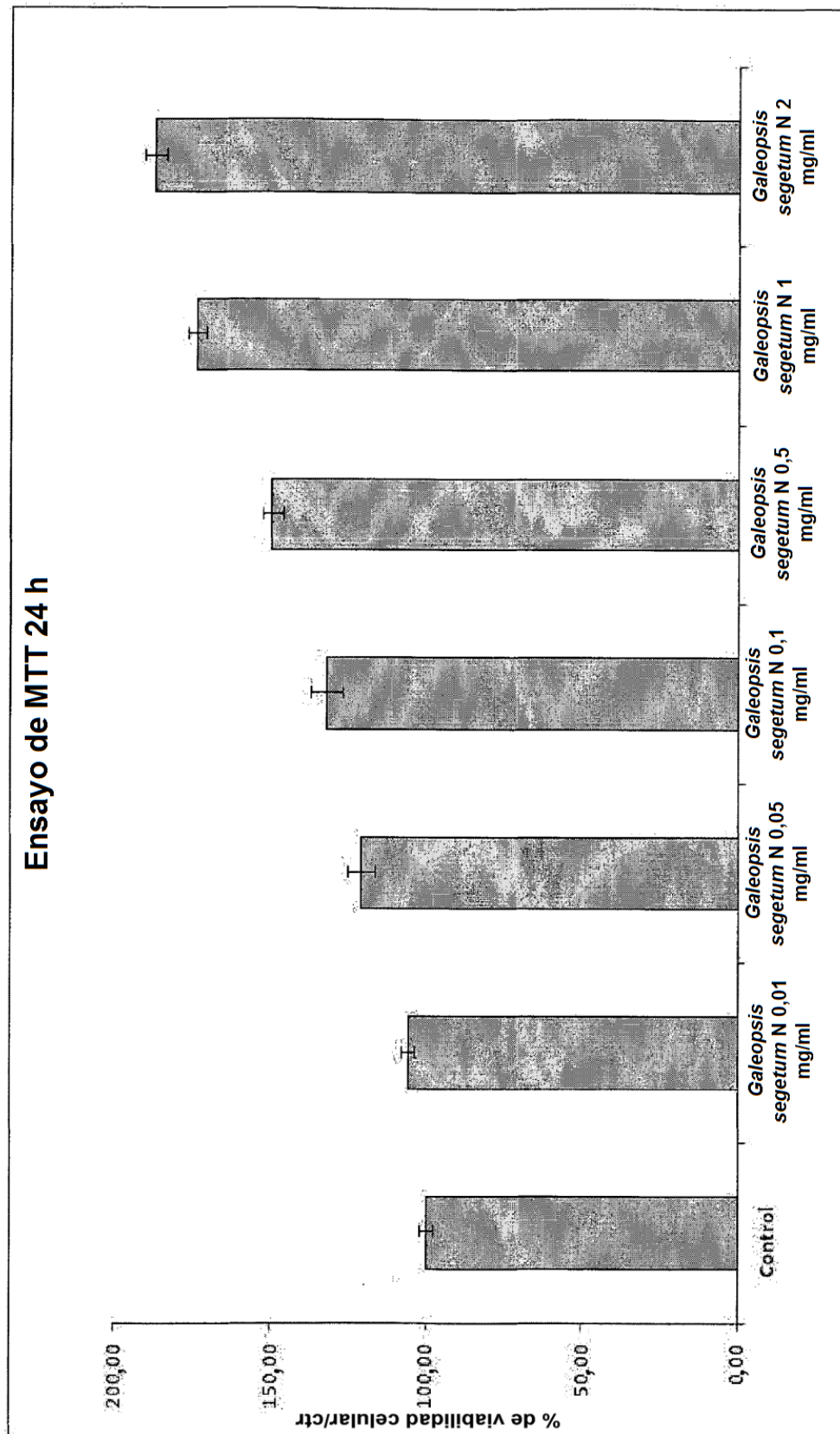


Fig.8

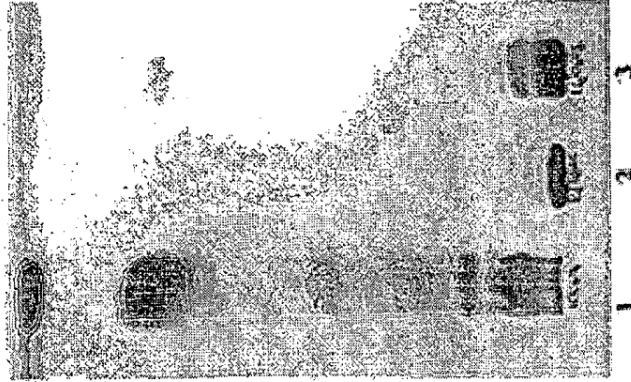


Fig.7

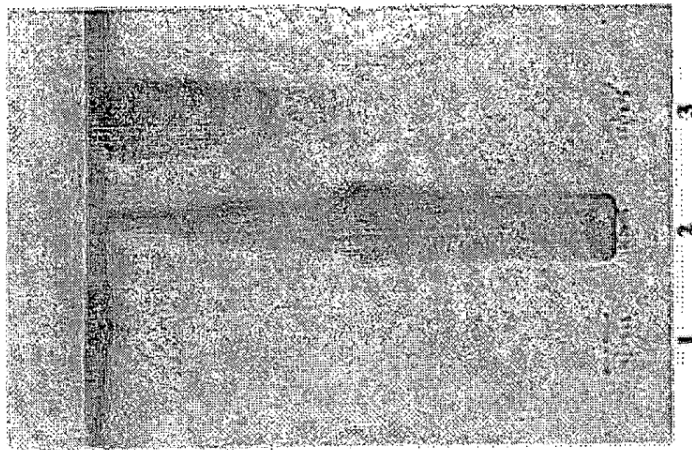


Fig. 9

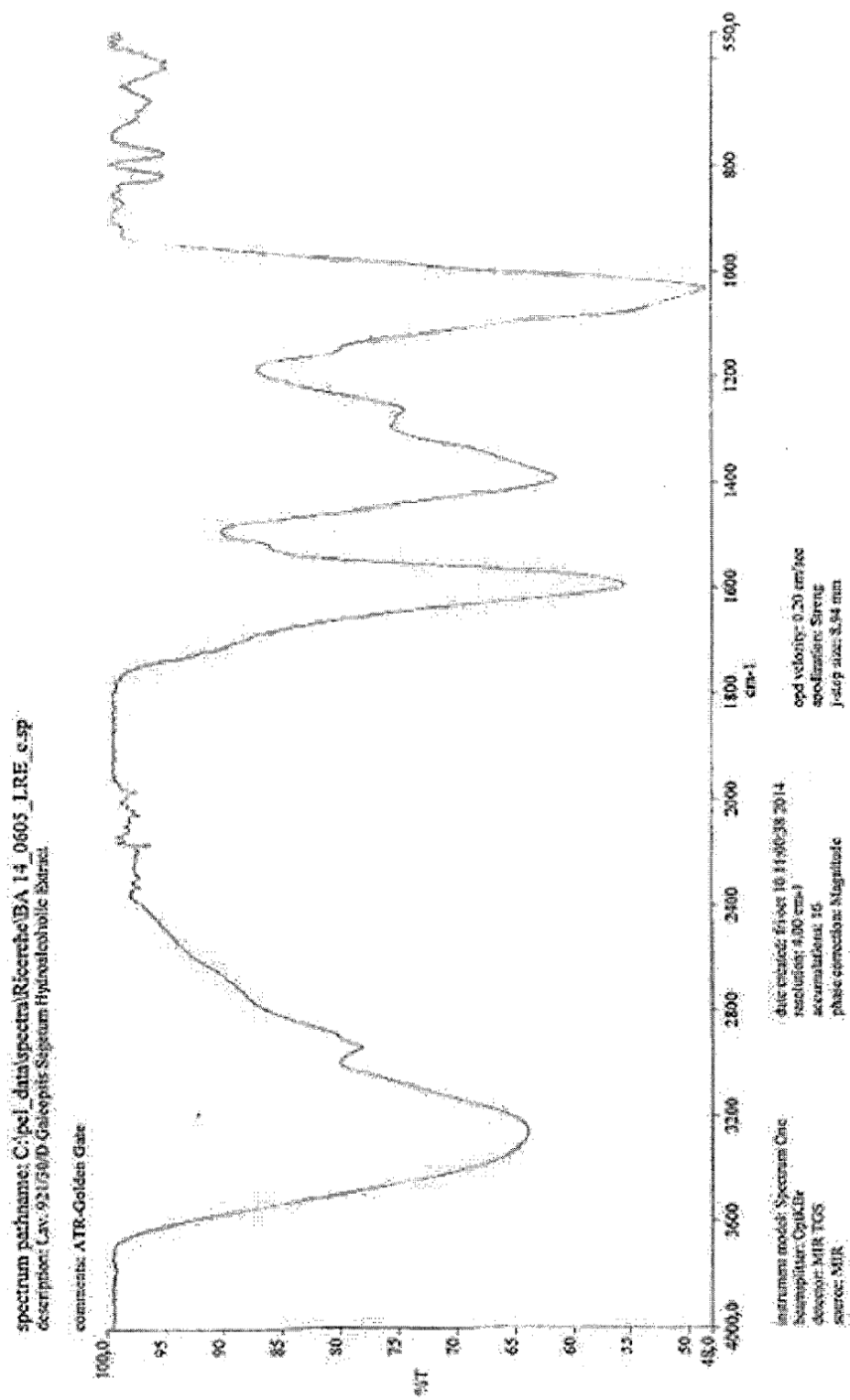


Fig. 10

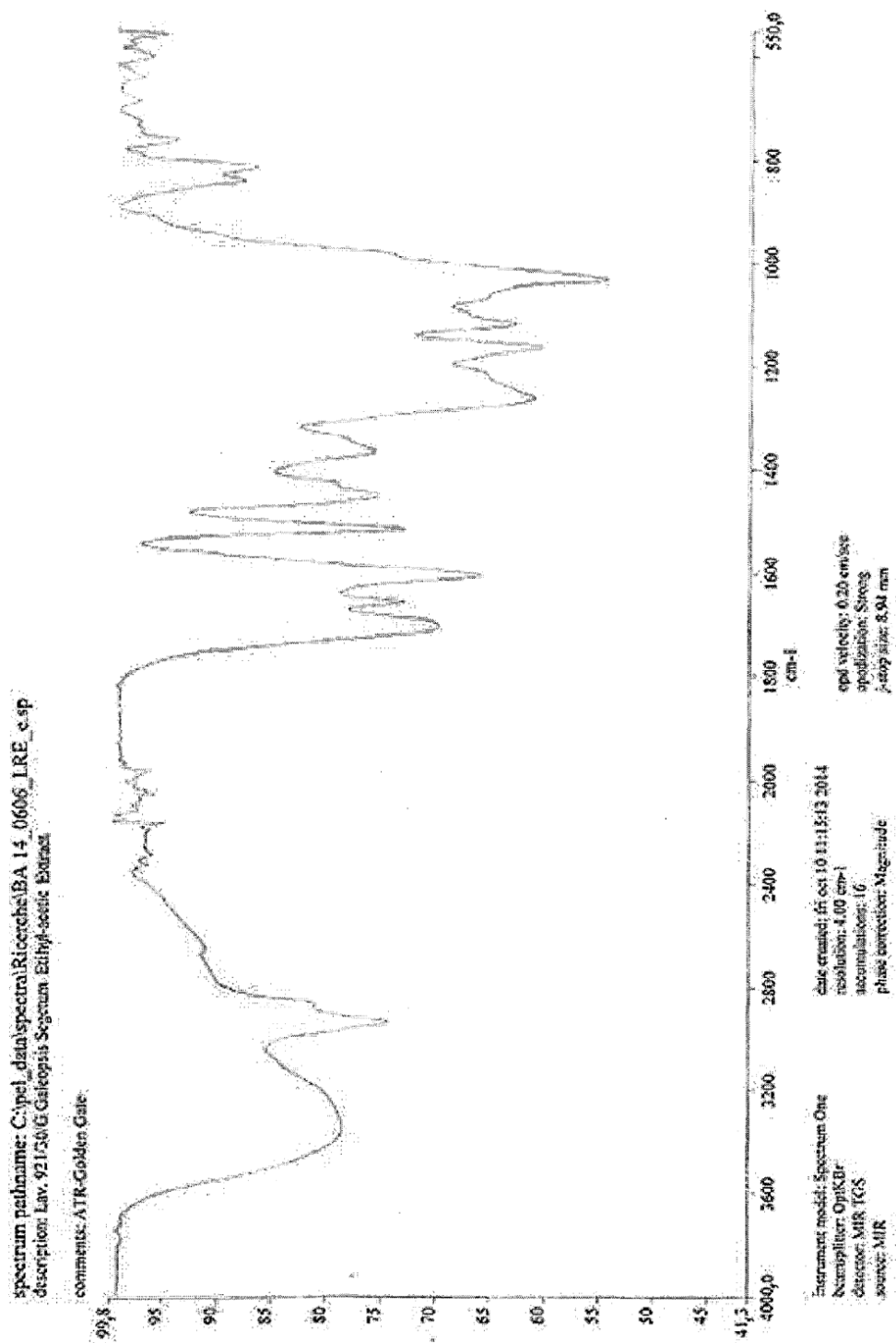


Fig.11

