



19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA

11 Número de publicación: **2 317 502**

51 Int. Cl.:

A61K 8/49 (2006.01)

A61Q 5/00 (2006.01)

A61Q 17/04 (2006.01)

A61Q 19/04 (2006.01)

A61K 31/353 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

96 Número de solicitud europea: **06709302 .1**

96 Fecha de presentación : **13.02.2006**

97 Número de publicación de la solicitud: **1845935**

97 Fecha de publicación de la solicitud: **24.10.2007**

54

Título: **Uso de la silimarina y/o de sus constituyentes como agentes promotores de la pigmentación de la piel o del cabello.**

30

Prioridad: **11.02.2005 FR 05 01446**

45

Fecha de publicación de la mención BOPI:
16.04.2009

45

Fecha de la publicación del folleto de la patente:
16.04.2009

73

Titular/es: **Greenpharma
Biopole Clermont Limagne
63360 Saint Beuzire, FR
Bioalternatives S.A.S.**

72

Inventor/es: **Bernard, Philippe y
Bernard, François-Xavier**

74

Agente: **Curell Suñol, Marcelino**

ES 2 317 502 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).

ES 2 317 502 T3

DESCRIPCIÓN

Uso de la silimarina y/o de sus constituyentes como agentes promotores de la pigmentación de la piel o del cabello.

5 El color de la piel humana depende de diferentes factores y en particular de la raza y del sexo, pero también de factores medioambientales (estación, exposición solar, etc.); depende principalmente de la naturaleza y de la concentración de melanina producida por los melanocitos. Los melanocitos son las células especializadas que, por medio de orgánulos particulares, los melanosomas, sintetizan la melanina. Ciertas personas presentan naturalmente o accidentalmente unos defectos más o menos localizados de pigmentación, que necesitan unos tratamientos locales paliativos, 10 o necesitan tratamientos más generales, que permiten estimular una pigmentación natural.

La pigmentación es naturalmente una protección eficaz contra los efectos deletéreos de los rayos ultravioletas y contra el fotoenvejecimiento cutáneo en general. La pigmentación cutánea es también una protección contra la aparición de cánceres de la piel; para unas exposiciones solares del mismo orden, las personas y etnias con la piel oscura desarrollan mucho menos cánceres cutáneos que las personas de piel pálida. 15

De la misma manera, el color de los pelos y del cabello se debe a la melanina. En diferentes periodos de su vida, en particular durante el envejecimiento, ciertas personas muestran una despigmentación progresiva del cabello, con una disminución, incluso la parada, de los procesos de melanogénesis en los melanocitos asociados al bulbo piloso. 20 Resulta muy interesante poder proponer unos tratamientos preventivos o curativos susceptibles de mantener el proceso de pigmentación del cabello o de estimular la melanogénesis y la pigmentación del cabello que tiende a blanquearse.

La exposición solar y los rayos UV tienen unos efectos deletéreos sobre el cabello, al mismo tiempo a nivel del tallo piloso (oxidación y decoloración) pero también, y de manera más dañina, sobre el bulbo del folículo, que puede conducir a la caída del cabello. La recuperación o la estimulación de una pigmentación del folículo es susceptible de 25 limitar la caída del cabello o estimular su crecimiento.

Se busca muy particularmente el uso de sustancias pro-pigmentadoras inofensivas, en aplicación tópica o sistémica en unas composiciones, y que presentan una buena eficacia con vistas a tratar las hipopigmentaciones regionales naturales (de origen genético, leucodermias, tales como el vitíligo, envejecimiento) o accidentales (cicatrices post-lesión, micosis fúngicas), así como la pérdida de pigmentación del cabello relacionado con el estrés o durante el envejecimiento. 30

El uso de sustancias inofensivas, en aplicación tópica o sistemática en unas composiciones y que protegen el cabello, limitando su caída y/o estimulando su crecimiento, en condiciones normales, de estrés, de exposición solar y/o durante el envejecimiento constituye asimismo un interés principal. 35

El mecanismo de formación de la pigmentación de la piel es complejo y hace intervenir esquemáticamente las principales etapas siguientes: 40

Tirosina → Dopa → Dopaquinona → Dopacroma → Melanina. La melanina es almacenada en unos orgánulos o melanosomas, y después se transfiere a los queratinocitos cercanos.

Cada una de estas etapas es indispensable para la pigmentación. La tirosinasa (monofenol dihidroxil-fenilalanina: 45 oxygen oxydo-reductase EC 1.14.18.1) es la primera enzima que interviene en esta sucesión de reacciones. Cataliza en particular la reacción de transformación de la tirosina en Dopa (dihidroxifenilalanina) gracias a su actividad hidroxilasa y la reacción de transformación de la Dopa en dopaquinona gracias a su actividad oxidasa. Esta tirosinasa actúa únicamente cuando está en el estado de maduración bajo la acción de ciertos factores biológicos; se usa una señalización a través de unos receptores específicos tales como los receptores de la melanocortina (MCR) para la inducción del proceso de síntesis de la melanina por los melanocitos, en particular el receptor MC1R. 50

En la epidermis, el melanocito está implicado en la unidad melánica epidérmica que comprende un melanocito rodeado de aproximadamente 36 queratinocitos cercanos. Todos los individuos, sin distinción de fototipo, tienen aproximadamente el mismo número de melanocitos para una zona cutánea determinada. Las diferencias étnicas, en 55 términos de pigmentación, no se deben al número de melanocitos, sino a las propiedades de sus melanosomas. Los melanosomas están agregados en complejos y son de tamaño pequeño. Son unos orgánulos altamente especializados cuya única función es la producción de melanina. A medida que la melanina se sintetiza en los melanosomas, éstos se desplazan de la región perinuclear hacia el extremo de las dendritas de los melanocitos. Mediante fagocitosis, el extremo de las dendritas es capturado por los queratinocitos, y los melanosomas se redistribuyen en los queratinocitos. 60 Las prolongaciones dendríticas de los melanocitos, así como la actividad fagocítica de los queratinocitos desempeñan por lo tanto una función esencial en la transferencia de la melanina. La transferencia de melanosoma es un fenómeno fagocítico considerado como habitual y utiliza unos receptores conocidos como el "protease-activated receptor 2" (PAR-2).

Aunque el porcentaje de melanina varía de una población a otra, la cantidad de tirosina no varía significativamente, y el porcentaje de ARN mensajero de la tirosina es idéntico en unas pieles blancas o negras. Las variaciones en la melanogénesis se deben por lo tanto a unas variaciones o bien de la actividad de la tirosina, o bien a la capacidad de los queratinocitos para fagocitar los melanosomas. Esto indica que el queratinocito es un actor principal de la 65

ES 2 317 502 T3

pigmentación; 1) es cuantitativamente el representante principal de la unidad melánica, es también el que influenciará, a través de unas moléculas informativas (citoquinas, hormonas) una gran parte de la actividad melanogénica; 2) es su capacidad de fagocitosis, asociada con una presentación adecuada de los melanosomas, en una red dendrítica densa, la que permitirá la distribución óptima de la melanina en la epidermis y la pigmentación.

5

Una sustancia se reconoce como pro-pigmentadora si actúa directamente o indirectamente sobre la activación del proceso de síntesis de melanina, y/o si estimula la capacidad de fagocitosis de los melanosomas por los queratinocitos.

10

Las sustancias tales como la alfa-melanotropina (alpha-melanocyte-stimulating hormone, alpha-MSH) y la corticotropina (adrenocorticotropic hormone, ACTH) estimulan la proliferación y la síntesis de melanina mediante los melanocitos, a través de la unión a unos receptores específicos, en particular al receptor MC1-R.

15

Actualmente pocos inductores naturales están disponibles y se usan para la pigmentación natural melánica de la piel o del cabello.

Subsiste la necesidad de un nuevo agente promotor de la pigmentación y/o que pigmenta la piel humana, los pelos y/o el cabello con acción más eficaz que los conocidos, y que posee una acción reforzada de manera que pueda ser usado en poca cantidad sin ningún efecto secundario a nivel de la piel.

20

El cardo mariano (*Silybum marianum* (L.) Gaertner de la familia de las *Asteraceae*, es una planta mediterránea, que crece tanto en América del norte como en América del sur, así como en Australia, usada en las farmacopeas habituales, en particular contra diversas afecciones hepáticas.

25

La silimarina es una mezcla de diferentes flavonolignanos procedentes de la taxifolina (un 2,3-dihidroflavanol) y alcohol coniferílico.

30

Esta mezcla está mayoritariamente constituida por silibina, (o 2,3-dihidro-3-(4-hidroxi-3-metoxifenil)-2-(hidroximetil)-6-(3,5,7-trihidroxi-4-oxobenzopiran-2-il)benzodioxina), un benzodioxano encontrado en dos formas de diastereoisómeros (7''R, 8''R y 7''S, 8''S), la silibina y la isosilibina o sus enantiómeros aislados.

Los demás constituyentes de la silimarina son la silidianina, la silicristina, la silandrina, la silimonina y la taxifolina, o sus enantiómeros aislados.

35

La silimarina y/o uno de sus constituyentes puros o en mezcla poseen unas propiedades antioxidantes que se usan en el tratamiento de diversas afecciones tóxicas (en particular como antihepatotóxico) y para favorecer la regeneración celular.

40

Se conoce a partir de la solicitud de patente WO 9955326 el uso de la silimarina en la restauración del índice de glutatión en las células, en los mamíferos.

Se conoce a partir del documento EP 180505 el uso de la silimarina en unas preparaciones cosméticas destinadas a retrasar el envejecimiento de la piel.

45

Se conoce a partir del documento WO 01/13879 el uso cosmético de los aceites de *Silybum marianum* para favorecer la absorción cutánea de las composiciones que comprenden además cinarina con efecto radicalario.

Se conoce asimismo a partir de Carcinogenesis, vol. 25, nº 8, 1459-1465, 2004, el uso de la silibina para la protección de la piel contra los daños provocados por los rayos UV.

50

La solicitud JP 2004 00264 da a conocer el uso de la quercetina como agente de pigmentación de la piel.

Por último, se conoce a partir del documento JP 2002 220333 y del documento US 2002/155074 el uso de la silimarina como agente de despigmentación de la piel.

55

Contra toda previsión, los solicitantes han demostrado que la silibina y los demás constituyentes de silimarina y derivados y/o análogos de la silibina presentaban una buena actividad pro-pigmentadora, incluso con una baja concentración, sin mostrar ninguna citotoxicidad.

60

La presente invención tiene por lo tanto por objeto el uso de la silimarina, o de sus constituyentes principales solos o en mezcla seleccionados de entre la silibina (o 2,3-dihidro-3-(4-hidroxi-3-metoxifenil)-2-(hidroximetil)-6-(3,5,7-trihidroxi-4-oxobenzopiran-2-il)benzodioxina), la isosilibina, la silidianina, la silicristina, la silandrina y la silimonina, sus enantiómeros aislados así como sus sales, para la preparación de composiciones dermatológicas o cosmetológicas destinadas a inducir, restaurar o estimular una pigmentación de la piel, de los pelos o del cabello.

65

El uso de los compuestos según la presente invención permite inducir, restaurar o estimular una pigmentación de la piel y del cabello protegiéndolos así de los efectos deletéreos de la exposición solar, incluyendo el fotoenvejecimiento cutáneo, la inflamación y los eritemas cutáneos, caída del cabello relacionada con la exposición solar, cánceres cutáneos y patologías foto-inducidas.

ES 2 317 502 T3

Los constituyentes y/o derivados presentes en las composiciones según la presente invención presentan la ventaja de actuar sobre varios componentes principales del mecanismo de la pigmentación, por ejemplo modulando las actividades MC1R y PAR-2 simultáneamente o independientemente uno del otro.

5 Estimulan 1) la biosíntesis de la melanina por los melanocitos, 2) la formación de una red dendrítica densa en el melanocito y 3) la actividad fagocítica de los queratinocitos, aumentando así al mismo tiempo la cantidad de melanina producida y la eficacia de la transferencia de los melanosomas a los queratinocitos cercanos.

10 Por otro lado, tratándose del cabello, se ha demostrado que 4) la invención estimulaba claramente la pigmentación del folículo (bulbo de cabello).

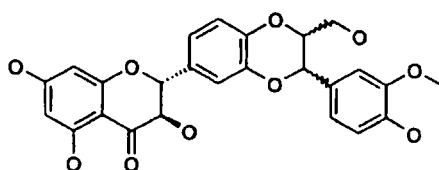
En el marco de la presente invención, se pueden usar unas sales farmacéuticamente y/o cosméticamente aceptables de los compuestos citados. Entre las sales se citarán a título de ejemplo, las sales de sodio, los pentaacetatos, los tribromuros.

15 Se pueden usar asimismo unos derivados semisintéticos o sintéticos.

Se pueden usar asimismo unos derivados glucosilados, unos ésteres o unos éteres naturales o sintéticos. Se citarán, por ejemplo, la silimarina-n-metilglucamato, unos ésteres con el ácido hemisuccínico o la silimarina pentametil o trimetil éter.

20 Todos estos compuestos están catalogados en los Chemical Abstracts, y se citarán, por ejemplo, la silimarina clasificada con los "Registry Numbers" 39468-33-2, 65666-07-1, 144160-532, 104444-08-8, 104444-07-7, sal de sodio con el RN 66-580-75-4, N-metil-glucamato con el RN 53026-30-5, hemisuccinato de sodio con el RN 52691-96-0, pentaacetato, 27900-74-9, tribromuro 27359-07-5, pentametil-éter 27359-05-3, trimetil-éter 27359-04-2.

La silibina



30 o 2-[(2R,3R)-2,3-dihidro-3-(4-hidroxi-3-metoxifenil)-2-(hidroximetil)-1,4-benzodioxin-6-il]-2,3-dihidro-3,5,7-trihidroxi-4H-1-benzopiran-4-ona, (2R,3R)-(9CI) está clasificada con el RN 25888-70-6.

40 La isosilibina o, 2-[2,3-dihidro-2-(4-hidroxi-3-metoxifenil)-3-(hidroximetil)-1,4-benzodioxin-6-il]-2,3-dihidro-3,5,7-trihidroxi-4H-1-benzopiran-4-ona, (2R,3R)-(9CI), está clasificada con el RN 72581-71-6.

45 La silidianina o, 4-[(2R,3R)-3,4-dihidro-3,5,7-trihidroxi-4-oxo-2H-1-benzopiran-2-il]-2,3,3a,7a-tetrahidro-7a-hidroxi-8-(4-hidroxi-3-metoxifenil)-3,6-metanobenzofuran-7(6H)-ona, (3R,3aR,6R,7aR,8R)-(9CI) está clasificada con el RN 29782-68-1.

La silicristina o, 2-[(2R,3S)-2,3-dihidro-7-hidroxi-2-(4-hidroxi-3-metoxifenil)-3-(hidroximetil)-5-benzofuranil]-2,3-dihidro-3,5,7-trihidroxi-4H-1-benzopiran-4-ona, (2R,3R)-(9CI) está clasificada con el RN 33889-69-9.

50 La silandrina o, 2-[(2R,3R)-2,3-dihidro-2-(4-hidroxi-3-metoxifenil)-3-(hidroximetil)-1,4-benzodioxin-6-il]-2,3-dihidro-5,7-dihidroxi-4H-1-benzopiran-4-ona, (2S)-(9CI) está clasificada con el RN 70815-2-6.

55 La silimonina o, 4-[(2S)-3,4-dihidro-5,7-dihidroxi-4-oxo-2H-1-benzopiran-2-il]-2,3,3a,7a-tetrahidro-7a-hidroxi-8-(4-hidroxi-3-metoxifenil)-3,6-metanobenzofuran-7(6H)-ona, (3R,3aR,6R,7aR,8R)-(9CI) está clasificada con el RN 70815-31-5.

La mayoría de los constituyentes de la silimarina existen en forma de isómeros diaestereoisómeros y/o enantiómeros.

60 Estos isómeros se pueden separar mediante unas técnicas conocidas por el experto en la materia, para ser usados en forma ópticamente pura como agente activo en unas composiciones según la invención.

A este respecto, se citará la publicación de David Y.W. Lee, J. Nat. Prod. 2003, 66, 1171-1174, que describe la separación de los isómeros de la silibina y de la isosilibina en silibina A, silibina B, isosilibina A e isosilibina B.

65 La silimarina se obtiene habitualmente mediante extracción, en particular de cardo mariano, y los compuestos citados anteriormente son los principales compuestos responsables de la acción terapéutica de la planta.

ES 2 317 502 T3

Un compuesto que conviene particularmente para la realización de la presente invención es la 2,3-dihidro-3-(4-hidroxi-3-metoxifenil)-2-(hidroximetil)-6-(3,5,7-trihidroxi-4-oxobenzopiran-2-il)benzodioxina o silibina, que se puede usar sin embargo en mezcla en el complejo denominado silimarina o bien purificado, incluso enantioméricamente puro (uso de un único isómero).

5

Este compuesto presenta la ventaja de ser ya usado en terapéutica como agente hepatoprotector. Ya se conocen y están a disposición numerosos datos que se refieren a su inocuidad. Además, su industrialización ya es asimismo operacional y resulta poco costosa.

10 En un modo de realización, el constituyente de la silimarina es la silibina o la isosilibina enantioméricamente pura.

En este modo de realización, los constituyentes se seleccionan de entre la silibina A, la silibina B, la isosilibina A o la isosilibina B, o sus sales solas o en mezcla.

15 Según un modo de realización, la silimarina o uno de sus constituyentes solo o en mezcla se obtienen mediante la extracción de una planta del género *Silybum* (en particular *Silybum marianum* (L.) Gaertn), de la familia de las *Asteraceae*.

20 Cuando el agente activo se obtiene mediante extracción, se entiende muy particularmente la obtención de un extracto de *Silybum*. Se trata más especialmente de un extracto de células de *Silybum* y muy específicamente de un extracto de células de por lo menos un vegetal del género *Silybum* de la familia de las asteráceas. Este material celular se puede obtener mediante cultivo *in vitro* o *in vivo*. Mediante el cultivo *in vitro*, se entiende el conjunto de las técnicas conocidas por el experto en la materia que permiten la obtención de manera artificial de un vegetal o de una parte de un vegetal. Mediante cultivo *in vivo*, se entiende el conjunto de las técnicas de cultivo que permiten obtener un vegetal o una parte de un vegetal. Así, el extracto puede ser un extracto de órgano (raíz, tallo, hoja, corteza), incluso de células de órgano, de por lo menos una planta del género *Silybum* de la familia de las asteráceas, o también de células indiferenciadas de por lo menos dicha planta. Estos extractos se enriquecen en unas proporciones variables según el tipo de extracto, con flavonolignanos. Estos extractos purificados presentan así la ventaja de estar libres de cualquier problema de toxicidad con respecto al extracto en bruto. Más particularmente, se pueden prever otras fórmulas de extracción/purificación: (i) un extracto total de la planta, (ii) un extracto que tiene como objetivo concentrar los flavonolignanos derivados de la taxifolina y por último, (iii) la obtención de taxifolina y derivados puros.

35 Se puede usar cualquier procedimiento de extracción o de purificación según la invención conocidos por el experto en la materia. En particular, se pueden citar los extractos alcohólicos (en particular metanólicos, etanólicos), acuosos o unos extractos que usan unos disolventes tales como las cetonas, los ésteres, los éteres, los polioles, los disolventes clorados y las mezclas de por lo menos dos de los disolventes citados anteriormente, tales como los extractos hidroalcohólicos.

40 Según un modo de realización, la silimarina o uno de sus constituyentes solo o en mezcla se obtienen mediante semisíntesis o síntesis.

La invención se refiere por lo tanto al uso de los compuestos descritos anteriormente en una composición, como agentes que pigmentan la piel y/o los pelos y/o el cabello. Así, se tratará de composiciones dermatológicas o cosméticas que comprenden como agente activo por lo menos un compuesto de estructura general (I) o un derivado o análogo de ésta o también por lo menos un extracto vegetal que contiene por lo menos un compuesto de estructura general (I), pudiendo dicho agente activo ser asociado ventajosamente en la composición con un vehículo compatible y apropiado para el modo de administración elegido.

50 Por ejemplo, para un uso cosmético o dermatológico, las composiciones de la invención pueden presentarse en forma de cremas, geles, lociones, leches, emulsiones aceite/agua y agua/aceite, disoluciones, ungüentos, pulverizadores, aceites corporales, lociones capilares, champús, lociones para después del afeitado, jabones, barras protectoras de labios, barras y lápices para maquillaje.

55 Se tratará entonces de composiciones dermatológicas o cosméticas que comprenden como agente activo la silimarina, o uno de sus constituyentes principales solo o en mezcla seleccionado de entre la silibina, (2,3-dihidro-3-(4-hidroxi-3-metoxifenil)-2-(hidroximetil)-6-(3,5,7-trihidroxi-4-oxobenzopiran-2-il)benzodioxina), la isosilibina, la silidianina, la silicristina, la silandrina y la silimonina, así como sus sales, pudiendo dicho agente activo ser asociado ventajosamente en la composición con un vehículo compatible y apropiado para el modo de administración elegido. En forma de gel, comprende unos excipientes apropiados tales como los ésteres de celulosa u otros agentes gelificantes, tales como el carbopol, la goma guar.

65 Estas composiciones cosméticas o dermatológicas también pueden adoptar la forma de loción o disolución en la que los extractos y/o moléculas están en forma encapsulada, por ejemplo en unas microesferas. Estas microesferas pueden estar, por ejemplo, constituidas por cuerpos grasos, por agar-agar y por agua. Los agentes activos también pueden ser incorporados en unos vectores de tipo liposomas, glucoesferas, ciclodextrinas, en unos quilomicrones, unas macro-, micro-, nano-partículas así como las macro-, micro- y nanocápsulas y también ser absorbidos sobre unos polímeros orgánicos polvorosos, los talcos, bentonitas y otros soportes minerales. Estas emulsiones disfrutan de una

ES 2 317 502 T3

buena estabilidad y se pueden conservar durante el tiempo necesario para el uso a unas temperaturas comprendidas entre 0 y 50°C sin que se produzca sedimentación de los constituyentes o separación de las fases.

5 Las composiciones cosméticas de la invención comprenden del orden de 0,01 a 10% en peso, preferentemente entre 0,1 y 2,5% de agentes activos cuando están en forma de polvo, y del orden de 0,01 a 2,5%, preferentemente entre 0,5 y 10% cuando están en forma encapsulada.

10 Para la preparación de estas composiciones, la silimarina, o uno de sus constituyentes principales solo o en mezcla seleccionado de entre la silibina, (o 2,3-dihidro-3-(4-hidroxi-3-metoxifenil)-2-(hidroximetil)-6-(3,5,7-trihidroxi-4-oxobenzopirán-2-il) benzodioxina, la isosilibina, la silidianina, la silicristina, la silandrina y la silimonina, así como sus sales o un extracto vegetal, se mezclan a los excipientes generalmente usados en cosmética.

15 Las composiciones cosméticas de la invención pueden contener asimismo unos aditivos o unos adyuvantes habituales en cosmetología, tales como, por ejemplo, unos agentes antibacterianos o unos perfumes, pero también unos lípidos de extracción y/o de síntesis, polímeros gelificantes y viscosantes, tensioactivos y emulsionantes, principios activos hidro o liposolubles, extractos de plantas, extractos de tejidos, extractos marinos, agentes activos de síntesis.

20 Las composiciones cosméticas de la presente invención pueden comprender asimismo otros principios activos complementarios elegidos por su acción, por ejemplo para la protección solar, el efecto anti-arrugas, la actividad antiradicalaria y antioxidante, la actividad anti-irritante, la nutrición celular, la respiración celular, la hidratación y la regeneración celular, los tratamientos anti-seborreicos, así como otros principios activos que tienen una acción sobre la tonicidad cutánea y la protección del cabello.

25 Las composiciones cosméticas de la presente invención se usan preferentemente a diario aplicándolas una o varias veces al día.

30 Las composiciones cosméticas de la presente invención son muy bien toleradas, no presentan ninguna fototoxicidad y su aplicación sobre la piel, durante unos periodos de tiempo prolongados, no implica ningún efecto sistémico.

35 Se puede prever asimismo una aplicación por vía oral. Conviene por lo tanto interesarse asimismo en las composiciones que comprenden por lo menos la silimarina, o uno de sus constituyentes principales solo o en mezcla seleccionado de entre la silibina, (o 2,3-dihidro-3-(4-hidroxi-3-metoxifenil)-2-(hidroximetil)-6-(3,5,7-trihidroxi-4-oxobenzopirán-2-il)benzodioxina, la isosilibina, la silidianina, la silicristina, la silandrina y la silimonina, así como sus sales, asociada con un vehículo o con un excipiente farmacéutica, cosmética y dermatológicamente aceptable.

40 Las composiciones dermocosméticas se presentan en forma de líquido, de polvo, de pasta o de emulsión, sola o en combinación con otras sustancias. Comprenden del orden de 0,01 a 25% en peso de flavonolignanos, y más particularmente de silibina, de su precursor biosintético la taxifolina y derivados, de silicristina o de un extracto vegetal que los contiene.

45 Para la preparación de estas composiciones dermocosméticas, se mezclan con unos excipientes los extractos y/o los compuestos puros citados anteriormente, solos o en mezcla y/o en forma de sales.

Los ejemplos siguientes ilustran la invención sin limitar su alcance.

Ejemplo 1

50 *Demostración de la actividad sobre la melanogénesis en unos cultivos de melanocitos*

Un ensayo biológico ha demostrado la actividad estimulante de síntesis de melanina por la silibina.

55 El efecto estimulante de la melanogénesis de la silibina se ha medido sobre unos cultivos de melanocitos humanos normales.

Para la silibina, se han determinado:

60 - después de 10 días de cultivo en unas condiciones estándares, en placas de 24 pocillos, en medio Promocell sin "acetato de forbol-miristato" (PMA):

la citotoxicidad, estimando la reducción del "metil-tiazolil-tetrazolio" (MTT), la cantidad de proteínas, mediante la dosificación según el procedimiento de Bradford y la observación de las alfombras celulares,

65 la cantidad de melanina presente en los cultivos, mediante la medición espectrofotométrica de la melanina producida, después de la extracción alcalina, con respecto al 100% del control (el control corresponde al ensayo realizado sin ningún compuesto a ensayar).

ES 2 317 502 T3

- después de 3 días de cultivo en unas condiciones estándares:

los efectos sobre la proliferación de los melanocitos humanos normales mediante la incorporación de timidina tritiada en el ADN (marcado durante las últimas 24 horas), los efectos sobre el metabolismo de los melanocitos humanos normales mediante la incorporación de leucina tritiada en las proteínas neosintetizadas (marcado durante las últimas 24 horas).

Los resultados se reúnen en las siguientes tablas:

Síntesis de melanina por los melanocitos humanos normales

Tratamiento	Concentración	Melanina (µg/ml)	sd	n	%	p	Proteínas (mg/ml)	MTT (%)
Control	-	27,7	0,38	3	100	-	0,645	100
	0,001%	41,5	0,18	3	150	P < 0,01	0,830	128
Silibina	0,0002%	37,1	0,97	3	134	P < 0,01	0,792	126
	0,00004%	31,9	0,68	3	115	P < 0,01	0,765	113

En todos los casos: concentraciones en % (p/v); sd, desviación estándar; p, significatividad estadística.

Efectos sobre la proliferación y sobre la neosíntesis de proteínas de melanocitos humanos normales

Proliferación (3H-timidina), melanocitos humanos normales						
Tratamiento	Concentración	cpm	sd	n	%	P
Control	-	6805	0	3	100	-
Silibina	0,001%	3622	750	6	53	P < 0,01
	0,0002%	5638	1104	6	83	P > 0,05
Síntesis proteica (3H-leucina), melanocitos humanos normales						
Tratamiento	Concentración	cpm	sd	n	%	P
Control	-	9751	993	12	100	-
Silibina	0,001%	12099	1995	6	124	P < 0,01
	0,0002%	11705	486	6	120	P > 0,05
Cpm, golpes por minuto						

La silibina ha provocado por lo tanto un aumento significativo de la producción de melanina en los cultivos de melanocitos humanos tratados. Esta estimulación se acompaña de un aumento moderado visible del metabolismo de los melanocitos (MTT, proteínas). Este efecto no se debe a un aumento de la proliferación de los melanocitos (incorporación de timidina), sino que por el contrario el producto, en estas condiciones artificiales, tiene tendencia a limitar la proliferación, sin ninguna actividad citotóxica. Por otro lado, la estimulación de la actividad metabólica sobre unos ensayos de tiempo más corto (neosíntesis proteica, en 72 h) confirma un efecto estimulante muy bajo del metabolismo de los melanocitos (síntesis proteica aumentada sólo 20%).

El producto, por otro lado, no ha mostrado ningún efecto sobre la proliferación/síntesis proteica de los queratinocitos.

El efecto estimulante de la melanogénesis de la silibina se ha medido sobre unas células de melanoma murino de línea B16F10.

ES 2 317 502 T3

Para la silibina, se han determinado:

- después de 7 días de cultivo en unas condiciones estándares, en placas de 24 pocillos, en medio DMEM que contiene 10% de suero de ternera:

la citotoxicidad, estimando la hidrólisis del MTT, la cantidad de proteínas, mediante la dosificación según el procedimiento de Bradford y la observación de las alfombras celulares,

la cantidad de melanina presente en los cultivos, mediante la medición espectrofotométrica de la melanina producida, después de la extracción alcalina, con respecto al 100% del control (el control corresponde al ensayo realizado sin ningún compuesto a ensayar).

Los resultados se reúnen en la siguiente tabla:

Síntesis de melanina por los melanocitos de línea B16F10

Tratamiento	Concentración	Melanina (µg/ml)	sd	n	%	p	Proteínas (mg/ml)	MTT (%)
Control	-	13,0	0,31	3	100	-	1,565	100
Silibina	0,001%	33,0	0,83	3	254	$P < 0,01$	1,457	89
	0,0002%	15,0	0,35	3	115	$P < 0,01$	1,594	100
	0,00004%	13,0	0,58	3	100	$P > 0,05$	1,553	100

La silibina ha provocado por lo tanto un aumento muy claro de la producción de melanina en los cultivos de melanocitos de línea B16F10 (250% del control al 0,001%), lo que confirma el efecto pro-pigmentador observado sobre un segundo modelo celular. En este caso, la estimulación se observa sin ninguna modificación del metabolismo celular, según los parámetros MTT y síntesis proteica, lo que confirma la especificidad de la estimulación de la síntesis de melanina.

Se ha estudiado la unión ("binding") de la silibina al receptor MC1-R ("melanocortin 1 receptor"). Unos datos estructurales han hecho sospechar una posibilidad de "binding" de estos compuestos al receptor MC1-R ("melanocortin 1 receptor") que está implicado en gran medida en la melanogénesis.

Se ha ensayado la silibina en un ensayo de desplazamiento de un ligando MC1-R extremadamente potente: desplazamiento de [¹²⁵]NDP-alfa-MSH, (según Siegrist *et al.*, 1988, J. Recept. Res., 8:323-343).

El ligando tiene una afinidad del orden de 10⁻¹⁰ M. La silibina a las concentraciones de 100 µM (0,005%) y superiores desplaza de manera significativa este ligando (10% a 100 µM; 30% a 500 µM; no se han ensayado las concentraciones superiores por razones de solubilidad), indicando un impacto específico sobre el receptor MC1-R. Se observa asimismo un efecto de estos compuestos sobre la inhibición de las fosfodiesterasas, en particular de tipo 4; AMPc aumentado.

Ejemplo 2

Demostración de la actividad sobre la dendricidad de los melanocitos

El objetivo de este ensayo es demostrar el efecto de los compuestos usados según la invención sobre la modulación morfológica de los melanocitos.

Procedimiento: se tratan los melanocitos humanos normales a partir de la inoculación con los compuestos según la invención durante 2 días, en las condiciones de los ensayos de melanogénesis sobre melanocitos humanos, y después se marcan mediante CFDA ("carboxyfluorescein succinimidyl ester diacetate") y se observan mediante microscopio con fluorescencia (coloración verde).

Observaciones: según la figura 1.

Resultados: En ausencia de los compuestos según la invención, los melanocitos en cultivo son poco dendríticos, incluso bipolares. En presencia de los compuestos según la invención, los melanocitos muestran una dendricidad claramente más importante.

ES 2 317 502 T3

Ejemplo 3

Demostración de la actividad sobre la fagocitosis de los queratinocitos

5 El objetivo de este ensayo es demostrar el efecto de los compuestos usados según la invención sobre la modulación de la fagocitosis de partículas por los queratinocitos.

10 *Procedimiento:* Se cultivan unos queratinocitos humanos normales en medio KSFM y se tratan durante 24 h con los compuestos según la invención, en presencia de perlas fluorescentes calibradas (Molecular Probes) del tamaño de los melanosomas. La fagocitosis de las partículas se observa en microscopia con fluorescencia, y después se reco-
gen las células después de la tripsinación y se analizan mediante citometría de flujo, para el número de células que han fagocitado un número umbral de partículas y la intensidad de la fluorescencia global fagocitada (10.000 células analizadas por condición, por triplicado).

15 *Observaciones:* Los efectos de la silibina se muestran en la siguiente tabla y en la figura 2:

Tratamiento	Concentración	% de células positivas*	Media	SD	% de control	P
Control	-	35,39	36	2	100	-
		33,8				
		38,02				
Silibina	0,001%	52,19	51	1	143	P < 0,01
		50,74				
		49,94				
	0,0002%	45,88	44	1	124	P < 0,01
		44,29				
		42,92				

* células que tienen una fagocitosis superior al doble de la fagocitosis basal

45 *Resultados:* la silibina induce una estimulación significativa y reproducible de la fagocitosis de partículas fluorescentes asimilables a unos melanosomas; esta estimulación dependiente de la dosis se ha medido mediante citometría de flujo y mediante observación directa de las alfombras celulares en microscopia con fluorescencia.

Ejemplo 4

Demostración de la actividad pro-pigmentadora del cabello

El objetivo de este ensayo es demostrar el efecto de los compuestos usados según la invención sobre la síntesis de la melanina en el folículo y su pigmentación.

55 *Procedimiento:* Se aíslan unos folículos de cabello humano normales mediante microdissección de escalpo humano (lifting) y se cultivan individualmente *in vitro*, en placas de 24 pocillos, según Philpott *et al.*, 1990, J. Cell. Sci., 3:463-471, con un mínimo de 15 cabellos de pigmentación homogénea por condición. Los folículos se cultivan durante 7 días en presencia de los compuestos según la invención. Los folículos se fotografían el D0 y el D7, y la pigmentación se evalúa visualmente.

60 *Observaciones:* Los efectos de la silibina se muestran en la figura 3.

65 *Resultados:* La silibina no es tóxica para el cabello y permite un alargamiento del tallo piloso, induce una pigmentación muy clara del bulbo y del tallo piloso neoformado con respecto a los controles no tratados. Los compuestos usados según la invención estimulan por lo tanto la síntesis de la melanina en el folículo y su pigmentación.

REIVINDICACIONES

5 1. Uso de la silimarina, o de sus constituyentes principales solos o en mezcla seleccionados de entre la silibina, (o 2,3-dihidro-3-(4-hidroxi-3-metoxifenil)-2-(hidroximetil)-6-(3,5,7-trihidroxi-4-oxobenzopiran-2-il)benzodioxina), la isosilibina, la silidianina, la silicristina, la silandrina y la silimonina, sus enantiómeros aislados así como sus sales, para la preparación de composiciones dermatológicas destinadas a inducir, restaurar o estimular una pigmentación de la piel, de los pelos o del cabello.

10 2. Uso cosmético de la silimarina, o de sus constituyentes principales solos o en mezcla seleccionados de entre la silibina, (o 2,3-dihidro-3-(4-hidroxi-3-metoxifenil)-2-(hidroximetil)-6-(3,5,7-trihidroxi-4-oxobenzopiran-2-il)benzodioxina, la isosilibina, la silidianina, la silicristina, la silandrina y la silimonina, sus enantiómeros aislados así como sus sales, como agentes destinados a inducir, restaurar o estimular una pigmentación de la piel, de los pelos o del cabello.

15 3. Uso según cualquiera de las reivindicaciones anteriores, **caracterizado** porque la silimarina o uno de sus constituyentes solo o en mezcla se obtienen mediante la extracción de una planta del género *Sylibum*.

20 4. Uso según cualquiera de las reivindicaciones anteriores, **caracterizado** porque la silimarina o uno de sus constituyentes solo o en mezcla se obtienen mediante semisíntesis o síntesis.

25 5. Uso según una de las reivindicaciones anteriores, **caracterizado** porque el constituyente de la silimarina es la 2,3-dihidro-3-(4-hidroxi-3-metoxifenil)-2-(hidroximetil)-6-(3,5,7-trihidroxi-4-oxobenzopiran-2-il)benzodioxina o silibina.

30 6. Uso según una de las reivindicaciones 1 a 4, **caracterizado** porque el constituyente de la silimarina es la isosilibina.

35 7. Uso según una de las reivindicaciones 1 a 4, **caracterizado** porque el constituyente de la silimarina es la silibina o la isosilibina enantioméricamente pura.

40 8. Uso según cualquiera de las reivindicaciones anteriores, **caracterizado** porque las composiciones comprenden del orden de 0,01 a 10% en peso de agentes activos.

45 9. Uso según cualquiera de las reivindicaciones anteriores, **caracterizado** porque las composiciones comprenden del orden de 0,1 a 2,5% en peso de agentes activos.

50 10. Uso según cualquiera de las reivindicaciones anteriores, **caracterizado** porque las composiciones comprenden del orden de 0,01 a 2,5% en peso de agentes activos.

55

60

65

70

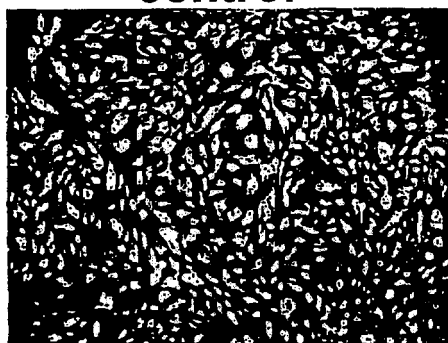
75

80

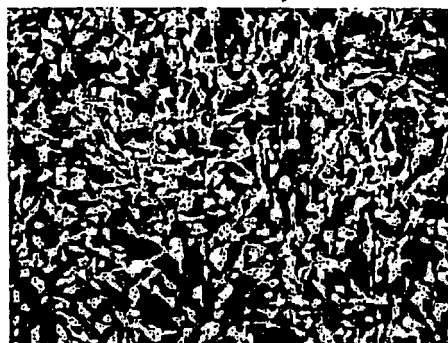
Figura 1

objetivo x10

control



silibina 0,001%



objetivo x20

control



silibina 0,001%



Figura 2

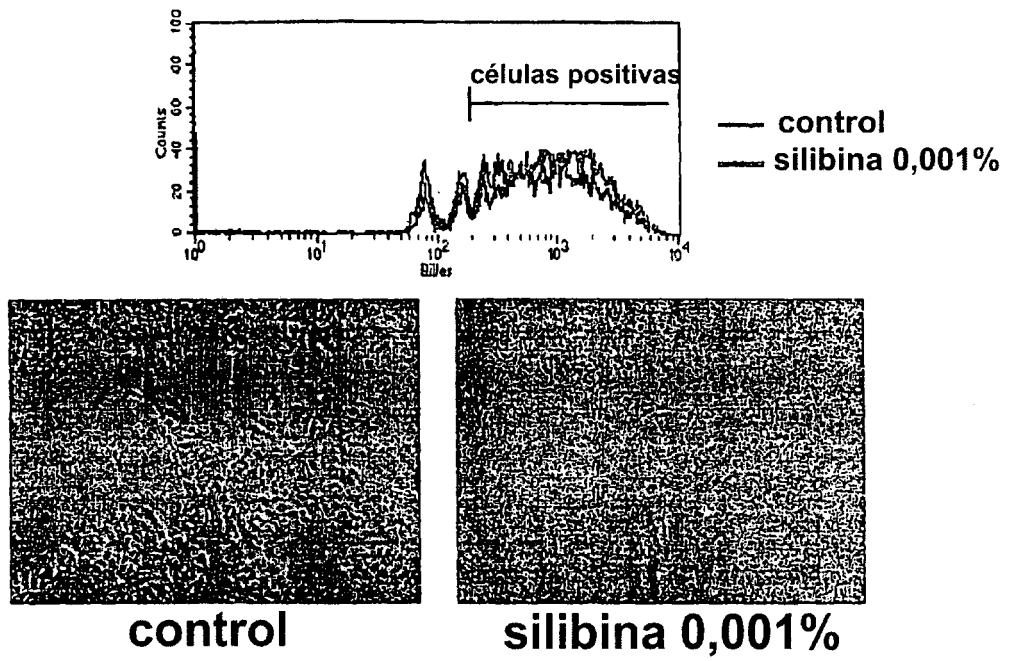
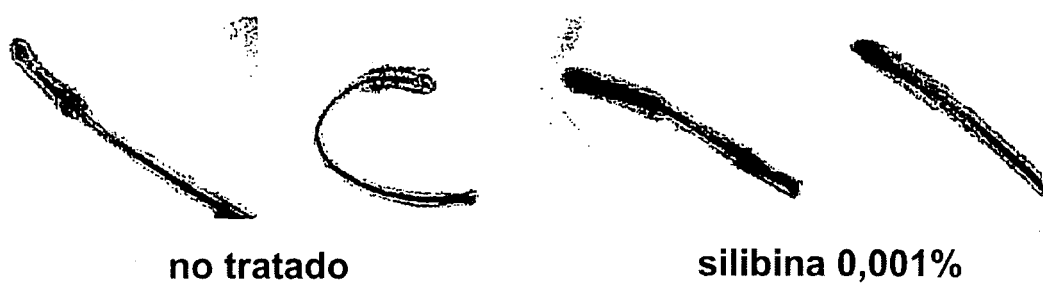


Figura 3

D0; objetivo x4



D7; objetivo x4



D7; objetivo x10

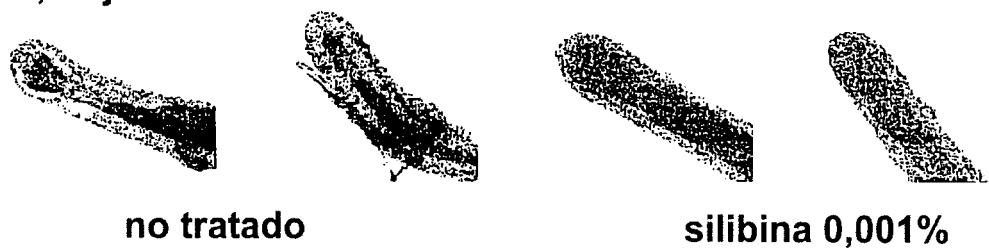
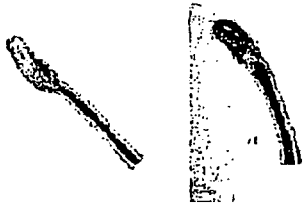


Figura 4

D0; objetivo x4



no tratado



silibina 0,001%

D7; objetivo x4



no tratado



silibina 0,001%

D7; objetivo x10



no tratado



silibina 0,001%