



19



OFICINA ESPAÑOLA DE  
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA

11 Número de publicación: **2 308 534**

51 Int. Cl.:

**A61K 8/97** (2006.01)

**A61Q 19/02** (2006.01)

**A61Q 19/00** (2006.01)

**A61Q 17/04** (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

96 Número de solicitud europea: **05780098 .9**

96 Fecha de presentación : **22.04.2005**

97 Número de publicación de la solicitud: **175549**

97 Fecha de publicación de la solicitud: **28.02.2007**

54

Título: **Composiciones cosméticas que contienen extractos de *Nigrospora sphaerica*.**

30

Prioridad: **11.05.2004 US 843489**

45

Fecha de publicación de la mención BOPI:  
**01.12.2008**

45

Fecha de la publicación del folleto de la patente:  
**01.12.2008**

73

Titular/es: **Unilever N.V.**  
**Weena 455**  
**3013 AL Rotterdam, NL**

72

Inventor/es: **Bajor, John, Steven;**  
**Barratt, Michael, James y**  
**Bosko, Carol, Annette**

74

Agente: **Carpintero López, Mario**

ES 2 308 534 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

Composiciones cosméticas que contienen extractos de *Nigrospora sphaerica*.

5 La invención se refiere a composiciones para una aplicación tópica a la piel humana, composiciones que contienen extractos de *Nigrospora sphaerica* y procedimientos para usar las composiciones para el tratamiento y acondicionamiento y, en particular, para el aclarado de la piel.

### Antecedentes de la invención

10 Muchas personas están preocupadas por el grado de pigmentación de su piel. Por ejemplo, las personas con manchas o pecas por la edad pueden desear que estas manchas pigmentadas sean menos pronunciadas. Otras pueden desear reducir el oscurecimiento de la piel provocado por la exposición a la luz solar o aclarar su color de piel natural. Para cumplir esta necesidad, se han hecho muchos intentos de desarrollar productos que reduzcan la producción de pigmentos en los melanocitos. Sin embargo, las sustancias así identificadas tienden bastante a tener una baja eficacia o efectos secundarios no deseables como, por ejemplo, toxicidad o irritación de la piel. Por lo tanto, hay una necesidad continuada de nuevos agentes para aclarar la piel, con eficacia global mejorada, así como agentes que tiendan por sí mismos a facilitar el tratamiento en su elaboración.

20 La presente invención está basada al menos en parte en el descubrimiento de que los extractos del hongo *Nigrospora sphaerica* tienen una actividad de aclarado de la piel al menos comparables y/o demostrablemente mejor que los agentes aclaradores de la piel conocidos. El uso de *Nigrospora sphaerica* para aplicaciones cosméticas no ha sido conocido hasta ahora.

### Sumario de la invención

25 La presente invención atenúa las deficiencias de la técnica anterior e incluye, en parte, un nueva composición que contiene un vehículo farmacéuticamente o cosméticamente aceptable y un extracto de *Nigrospora sphaerica*. Las composiciones de la invención contienen la descripción del documento US-A-4.845.027 (CALENOFF ET AL) de 4 de julio de 1989 (1989-07-04) que describe (ejemplo 7) una composición adecuada para un uso tópico, que comprende 0,000001-50% de un extracto de *Nigrospora sphaerica* en PBS, 0,000001 a 50% en peso de extracto de *Nigrospora sphaerica* y, preferentemente, un extracto orgánico del mismo. Preferentemente, la cantidad de extracto es de 0,00001% a 10% en peso, más preferentemente de 0,001% a aproximadamente 7% en peso e incluso más preferentemente 0,01% a 5% en peso, para conseguir una actividad óptima de aclarado de la piel a un coste mínimo.

30 Las composiciones de la invención comprenden adicionalmente un agente ventajoso para la piel y/o un protector solar. El agente ventajoso para la piel se selecciona entre alfa-hidroxiácidos, beta-hidroxiácidos, polihidroxi-ácidos, hidroquinona, t-butil-hidroquinona, derivados de vitamina B y/o C (por ejemplo, niacinamida); ácidos dioicos, retinoides, derivados de resorcinol, ácido betulínico ácido vanílico, hidrolactina y sus mezclas. Pueden ser incluidos también protectores solares orgánicos e inorgánicos (por ejemplo, óxidos metálicos micronizados). Los protectores solares orgánicos pueden incluir benzofenona-3, benzofenona-4, benzofenona-8, metoxicinamato, etil-dihidroxi-propil-PABA, gliceril-PABA, homosalato, antranilato de metilo, octocrileno, octil-dimetil-PABA, metoxicinamato de octilo (PARSOL MCX), salicilato de octilo, PABA, ácido 2-fenilbenzimidazol-5-sulfónico, salicilato de TEA, 3-(4-metilbencilideno)-alcanfor, benzofenona-1, benzofenona-2, benzofenona-6, benzofenona-12, 4-isopropil-dibenzoilmetano, butil-metoxi-dibenzoil-metano (PARSOL 1789), etocrileno y sus mezclas.

45 La invención incluye también procedimientos para acondicionar la piel aplicando por vía tópica a la misma las composiciones de la invención que contienen extractos de *Nigrospora sphaerica*. La invención incluye también un procedimiento para aclarar la piel aplicando a la misma una composición que comprende 0,000001% a 50% en peso de un extracto de *Nigrospora sphaerica* y un vehículo cosméticamente aceptable.

50 Las composiciones de la invención son útiles para prevenir o reparar estados de la piel como arrugas, laxitud y foto-deterioro. Las composiciones y procedimientos de la invención tienen eficaces propiedades de aclarado de la piel, pueden ser más fáciles de suministrar a la piel y son económicas y están disponibles a partir de fuentes naturales.

### Descripción detallada de la invención

60 La presente invención se refiere a composiciones para una aplicación tópica a la piel humana, composiciones con contienen extractos de *Nigrospora sphaerica* y a procedimientos para usar las composiciones para el tratamiento y acondicionamiento y, particularmente, el aclarado de la piel.

65 El *Nigrospora* es un hongo dematiáceo filamentoso ampliamente distribuido en el terreno, plantas marchitas y semillas. Las colonias de *Nigrospora* son de crecimiento rápido, compactas, lanosas, al principio blancas, volviéndose grises con zonas negras y un color negro en el reverso. La *Nigrospora sphaerica* produce conidióforos que expulsan energicamente las conidias. Las conidias son negras, aisladas, unicelulares, ligeramente aplanadas horizontalmente y tienen una ranura ecuatorial delgada de gérmenes. La *Nigrospora sphaerica*, la especie mejor conocida del género *Nigrospora*, se puede encontrar en las islas Hawai y alrededor del océano Pacífico, entre otros lugares. Los extractos

## ES 2 308 534 T3

de *Nigrospora sphaerica* adecuados para ser usados en las presentes composiciones son extractos en disolventes orgánicos, por ejemplo, extractos alcohólicos (metanol) o extractos en acetato de etilo.

5 Según la presente invención, los extractos de *Nigrospora sphaerica* deben ser presentados en la composición en una cantidad de aproximadamente 0,000001% a aproximadamente 50% en peso de la composición. Preferentemente, la cantidad del extracto es de aproximadamente 0,00001% a aproximadamente 10%, más preferentemente de aproximadamente 0,001% a aproximadamente 7% e incluso más preferentemente de aproximadamente 0,01% a aproximadamente 5%, para conseguir la actividad óptima de aclarado de la piel a un coste mínimo.

10 Como se usa en la presente memoria descriptiva, la expresión “composición cosmética” está destinada a describir composiciones para una aplicación tópica a la piel humana.

15 Como se usa en la presente memoria descriptiva, la expresión “que comprende” significa que incluye, está constituida, está compuesta o que consiste y/o que consiste esencialmente.

El término “piel” como se usa en la presente memoria descriptiva incluye la piel de la cara, cuello, pecho, espalda, brazos, axilas, manos, piernas y cuero cabelludo.

20 Excepto en los ejemplos, o cuando se indique explícitamente de algún otro modo, todos los números en esta descripción que indican cantidades de material o estados de una reacción, propiedades físicas de materiales y/o un uso, debe entenderse que están modificados por la palabra “aproximadamente”. Todas las cantidades están en peso de la composición, salvo que se especifique otra cosa.

25 Debe apreciarse que en la especificación de cualquier intervalo de concentración, cualquier concentración superior particular puede estar asociada con cualquier concentración inferior particular.

### *Nigrospora sphaerica*

30 Los extractos según la presente invención son de un material del reino de los hongos; filo de Ascomycota; género de *Nigrospora* y especie de *Sphaerica*. *Nigrospora sphaerica*, como se usa de acuerdo con la presente invención, fue cultivado en las islas Hawai y alrededor del Océano Pacífico. Después de ser recolectados, los organismos se hacen crecer en un primer medio de cultivo, a partir del cual la cepa específica es aislada y separada para hacerla crecer en un segundo medio de cultivo. El *Nigrospora sphaerica* es seguidamente aislado del segundo medio de cultivo, seguido de una extracción. Las técnicas de cultivo y extracción usadas de acuerdo con la presente invención son las conocidas o adicionalmente desarrolladas por los expertos en la técnica de la microbiología. El protocolo del cultivo particular bajo el cual se hace crecer el microorganismo y el protocolo de extracción que se usó para preparar los extractos que fueron seleccionados se exponen con posterioridad. Los protocolos de cultivo y extracción se plasman adicionalmente a continuación en recetas detalladas para la preparación de medios y procedimientos de extracción.

### 40 *Detalles principales de la recogida*

La siguiente Tabla contiene información sobre la ubicación geográfica de la recogida, los medios aislados para aislar el microorganismo y las características morfológicas del microorganismo que crece en placas de aislamiento de agar.

45

(Tabla pasa a página siguiente)

50

55

60

65

TABLA 1

Ubicación/ Descripción	Colección tomada	Descripción n del tipo	Salinidad, ppt	Medios de recuperación	Temp. de recuperación	Medios de aislamiento	Formación de esporas	Textura fúngica
Islas Hawai: arrecifes de coral, muros y tubos de lava	Sublitoral	Rojo	36	PDA (almidón de patata, dextrosa)	25°C	YPG (levadura, glucosa, peptona) con SPC (soja, patata, hidrato de carbono)	FALSA	Nudos densos

## ES 2 308 534 T3

*Medios de fermentación para cultivos fúngicos y protocolo*

TABLA 2

5

Componente de los medios	Cantidad
Citrato de sodio	8 g
Harina de semilla de algodón	5 g
Manitol	5 g
Peptona	4 g
L-arginina	1,5 g

10

15

20 Se añaden los componentes de los medios a 1 l de agua marina ajustada a  $\text{pH} = 4,0 \pm 0,2$  y se fermenta en un líquido estacionario durante 16 días a  $25^{\circ}\text{C}$ .

*Protocolo de extracción*

25

Se añade un volumen aproximadamente igual de gránulos de resina HP-20 (marca DIAION, Mitsubishi, Japón) al cultivo del caldo completo; se agita durante 2 horas, se filtra, se lava dos veces con un volumen igual de  $\text{H}_2\text{O}$ , se mantiene bajo vacío durante 45 minutos para secar y se extrae el residuo con un volumen igual de MeOH (metanol). Otros disolventes orgánicos adecuados incluyen, pero sin limitación, etanol, acetona, acetato de etilo, cloroformo, etc. Finalmente, el extracto se filtra y se separa el disolvente.

30

*Identificación de microorganismos*

La identidad de los microorganismos se confirmó que era *Nigrospora sphaerica* usando el siguiente procedimiento. Los resultados de las muestras, incluidos los perfiles de adiciones grasas y coincidencias de bibliotecas se realizaron por la entidad Microbial ID Inc., Newark, Delaware.

35

*Agentes ventajosos para la piel opcionales*

40

Los agentes ventajoso para la piel adicionales adecuados incluyen agente anti-envejecimiento, de reducción de arrugas, blanqueadores de la piel, anti-acné y de reducción de cebo. Ejemplos de estos incluyen alfa-hidroxiácidos, beta-hidroxiácidos, polihidroxiácidos, hidroxiquinona, t-butil-hidroquinona, derivados de vitamina B y C, ácidos dioicos, retinoides, ácido betulínico, ácido vanílico, alantoína, un extracto de placenta, hidrolactina y derivados de resorcinol.

*Vehículo cosméticamente aceptable*

45

El vehículo cosméticamente aceptable puede actuar como un diluyente, dispersante o vehículo para los ingredientes ventajosos para la piel en la composición, con el fin de facilitar su distribución cuando la composición es aplicada a la piel.

50

El vehículo puede ser acuoso, anhidro o una emulsión. Preferentemente, las composiciones son acuosas o una emulsión especialmente emulsiones de agua en aceite o aceite en agua, preferentemente emulsiones de aceite en agua. El agua, cuando está presente, estará en cantidades que pueden variar en el intervalo de 5 a 99%, preferentemente de 20 a 70%, óptimamente entre 40 y 70% en peso.

55

Aparte del agua, los disolventes relativamente volátiles pueden servir también como vehículos en las composiciones de la presente invención. Los más preferidos son alcanoles de  $\text{C}_1\text{-C}_3$  monohidroxilados. Éstos incluyen alcohol etílico, alcohol metílico y alcohol isopropílico. La cantidad de alcohol monohidroxilado puede variar en el intervalo de 1 a 70%, preferentemente de 10 a 50%, óptimamente entre 15 y 40% en peso.

60

Los materiales emolientes pueden servir también como vehículos cosméticamente aceptables. Estos pueden estar en la forma de aceites de silicona y ésteres sintéticos. La cantidad de los emolientes puede variar en cualquier valor en el intervalo de 0,1 a 50%, preferentemente entre 1 y 20% en peso.

65

Los aceites de silicona se pueden dividir en la variedad volátil y no volátil. El término "volátil", como se usa en la presente memoria descriptiva, se refiere a los materiales que tienen una presión de vapor medible a temperatura ambiente. Los aceites de silicona volátiles son escogidos preferentemente entre polidimetilsiloxanos cíclicos o lineales que contienen de 3 a 9, preferentemente de 4 a 5 átomos de silicio. Los materiales de silicona volátiles lineales generalmente tienen viscosidades menores que aproximadamente 5 centistokes a  $25^{\circ}\text{C}$ , mientras que los materiales

## ES 2 308 534 T3

cíclicos normalmente tienen viscosidades de menos de aproximadamente 10 centistokes. Los aceites de silicona no volátiles útiles como un material emoliente incluyen polialquil-siloxanos, polialquilaril-siloxanos y copolímeros de poliéter-siloxano. Los polialquil-siloxanos esencialmente no volátiles útiles en la presente invención incluyen, por ejemplo, polidimetilsiloxanos con viscosidades de aproximadamente 5 a aproximadamente 25 millones de centistokes a 25°C. Entre los emolientes no volátiles preferidos útiles en las presentes composiciones están los polidimetilsiloxanos que tienen viscosidades de aproximadamente 10 a aproximadamente 400 centistokes a 25°C.

Entre los emolientes de ésteres están:

(1) Ésteres alquenílicos o alquílicos de ácidos grasos que tienen 10 a 20 átomos de carbono. Ejemplos de los mismos incluyen neopentanoato de isoaraquidilo, isononanoato de isononilo, miristato de oleilo, estearato de oleilo y oleato de oleilo.

(2) Éter-ésteres como ésteres de ácidos grasos y alcoholes grasos etoxilados.

(3) Ésteres de alcoholes polihidroxilados. Ésteres de etilenglicol y ácidos mono- y di-grasos, ésteres de dietilenglicol y ácidos mono- y di-grasos, ésteres de polietilenglicol (200-6.000) y ácidos mono- y di-grasos, ésteres de propilenglicol y ácidos mono- y di-grasos, monooleato de propilenglicol 2.000, monoestearato de propilenglicol etoxilado, ésteres de glicerilo y ácidos mono- y di-grasos, ésteres de poliglicerol poli-grasos, monoestearato de glicerilo etoxilado, monoestearato de 1,3-butilenglicol, diestearato de 1,3-butilenglicol, ésteres de polietileno-poliol y ácidos grasos, ésteres de sorbitán y ácidos grasos y ésteres de polioxietileno-sorbitán y ácidos grasos son ésteres de alcoholes polihidroxilados satisfactorios.

(4) Ésteres de ceras como cera de abejas, spermaceti, miristato de miristilo, estearato de estearilo y behenato de araquidilo.

(5) Ésteres de esterol, de los que son ejemplos los ésteres de colesterol y ácidos grasos.

Los ácidos grasos que tienen de 10 a 30 átomos de carbono pueden ser incluidos también como vehículos cosméticamente aceptables para las composiciones de esta invención. Son ilustrativos de esta categoría los ácidos pelargónico, láurico, mirístico, palmítico, esteárico, isoesteárico, hidroxisteárico, oleico, linoleico, ricinoleico, araquídico, behénico, y erúcido.

Pueden ser empleados también humectantes del tipo alcohol polihidroxilado como vehículos cosméticamente aceptables en las composiciones de esta invención. El humectante ayuda a aumentar la eficacia del emoliente, reduce la formación de escamas, estimula la supresión de la acumulación de escamas y mejora la textura de la piel. Alcoholes polihidroxilados típicos incluyen glicerol, polialquilenglicoles y, más preferentemente, alquilenol-poliol y sus derivados, que incluyen propilenglicol, dipropilenglicol, polipropilenglicol, polietilenglicol y sus derivados, sorbitol, hidroxipropil-sorbitol, hexilenglicol, 1,3-butilenglicol, 1,2,6-hexanotriol, glicerol etoxilado, glicerol propoxilado y sus mezclas. Para unos mejores resultados, el humectante es preferentemente propilenglicol o hialuronato de sodio. La cantidad de humectante puede variar en cualquier valor del intervalo de 0,5 a 30%, preferentemente entre 1 y 15% en peso de la composición.

Pueden ser utilizados también espesantes como parte del vehículo cosméticamente aceptable de las composiciones según la presente invención. Los espesantes típicos incluyen acrilatos reticulados (por ejemplo, Carbopol 982), acrilatos hidrófobamente modificados (por ejemplo, Carbopol 1382), un polímero de taurato, derivados celulósicos y gomas naturales. Entre los derivados celulósicos están carboximetilcelulosa de sodio, hidroxipropilmetilcelulosa, hidroxipropilcelulosa, hidroxietilcelulosa, etilcelulosa e hidroximetilcelulosa. Las gomas naturales adecuadas para la presente invención incluyen guar, xantano, esclerotio, carragenano, pectina y combinaciones de estas gomas. Las cantidades del espesante pueden variar en el intervalo de 0,0001 a 5%, habitualmente de 0,001 a 1%, óptimamente de 0,01 a 0,5% en peso.

Colectivamente el agua, disolventes, siliconas, ésteres, ácidos grasos, humectantes y/o espesantes constituirán el vehículo cosméticamente aceptable en cantidades de 1 a 99,9%, preferentemente de 80 a 99% en peso.

Puede estar presente un aceite o material aceitoso junto con un emulsionante, para proporcionar una emulsión en agua en aceite o una emulsión de aceite en agua, dependiendo ampliamente del balance medio hidrófilo/lipófilo del emulsionante empleado.

Pueden estar presentes también tensioactivos en las composiciones cosméticas de la presente invención. La concentración total del tensioactivo variará en el intervalo de 0,1 a 40%, preferentemente de 1 a 20%, óptimamente de 1 a 5% en peso de la composición. El tensioactivo se puede seleccionar entre el grupo que consiste en componentes activos aniónicos, no iónicos, catiónicos y anfóteros. Los tensioactivos no iónicos particularmente preferidos son los de un alcohol graso de C<sub>10</sub>-C<sub>20</sub> o hidrófobo ácido condensado con 2 a 100 moles de óxido de etileno u óxido de pro-

## ES 2 308 534 T3

5 pileno por mol de hidrófobo; alquil C<sub>2</sub>-C<sub>10</sub>-fenoles condensado con 2 a 20 moles de óxido de alquileo; ésteres de ácidos mono- y di-grasos y etilenglicol; monoglicérido de ácido graso; sorbitán, ácidos mono- y di-grasos de C<sub>8</sub>-C<sub>20</sub>; copolímeros de bloques (óxido de etileno/ óxido de propileno) y polioxietileno-sorbitán así como sus combinaciones. Los alquil-poliglicósidos y amidas grasas de sacáridos (por ejemplo, metil-gluconamidas) son también tensioactivos no iónicos adecuados.

10 Los tensioactivos aniónicos preferidos incluyen jabón, alquil-éter-sulfato y sulfonatos, alquil-sulfatos y sulfonatos, alquilbenceno-sulfonatos, alquil y dialquil-sulfosuccinatos, acil-C<sub>8</sub>-C<sub>20</sub>-isetionatos, acil-glutamatos, alquil C<sub>8</sub>-C<sub>20</sub>-éter-fosfatos y sus combinaciones.

### 10 *Componentes opcionales*

15 En las composiciones cosméticas de la invención, pueden ser opcionalmente añadidos plastificantes, calamina, antioxidantes, agentes quelantes así como protectores solares.

20 Pueden ser incorporados también otros componentes menores en las composiciones cosméticas. Estos ingredientes pueden incluir agentes colorantes, pigmentos, agentes de opacidad y perfumes. Las cantidades de estos otros componentes adyuvantes menores pueden variar en cualquier valor del intervalo de 0,001% hasta 20% en peso de la composición.

25 Para ser usados como un protector solar, pueden ser usados óxidos metálicos solos o mezclados y/o en combinación con protectores solares orgánicos. Ejemplos de protectores solares orgánicos incluyen, pero sin limitación, los expuestos en la Tabla siguiente.

30 La cantidad de los protectores solares orgánicos en la composición cosmética está preferentemente en el intervalo de aproximadamente 0,1% en peso a aproximadamente 10% en peso, más preferentemente de aproximadamente 1% en peso a 5% en peso. Los protectores solares preferidos son PARSOL MCX y Parsol 1789, debido a su eficacia y disponibilidad comercial.

(Tabla pasa a página siguiente)

# ES 2 308 534 T3

TABLA 3

	Nombre CTF A	Marca registrada	Proveedor
5	Benzofenona-3	UVINUL M-40	BASF Chemical Co.
	Benzofenona-4	UVINUL MS-40	BASF Chemical Co.
	Benzofenona-8	SPECRA-SORB UV-24	American Cynamide
10	Metoxicinamato	BERNEL HYDRO	Bemel Chemical
	Etil-dihidroxipropil-PABA	AMERSCREEN P	Amerchol Corp.
	Gliceril-PABA	NIPA G.M.PA.	Nipa Labs.
15	Homosalato	KEMESTER HMS	Hunko Chemical
	Antranilato de metilo	SUNAROME UVA	Felton Worldwide
	Octocrileno	UVINUL N-539	BASF Chemical Co.
20	Octil-dimetil-PABA	AMERSCOL	Amerchol Corp.
	Metoxicinamato de octilo	PARSOL MCX	Bemel Chemical
	Salicilato de octilo	SUNAROME WMO	Felton Worldwide
25	PABA	PABA	National Starch
	Ácido 2- fenilbencimidazol-5- sulfónico	EUSOLEX 232	EM Industries
30	Salicilato de TEA	SUNAROME W	Felton Worldwide
	3-(4-metilbencilideno)- alcanfor	EUSOLEX 6300	EM Industries
35	Benzofenona-1	UVINUL 400	BASF Chemical Co.
	Benzofenona-2	UVINUL D-50	BASF Chemical Co.
40	Benzofenona-6	UVINUL D-49	BASF Chemical Co.
	Benzofenona-12	UVINUL 408	BASF Chemical Co.
	4-Isopropil-dibenzoil- metano	EUSOLEX 8020	EM Industries
45	Butil-metoxi-dibenzoil- metano	PARSOL 1789	Givaudan Corp.
50	Etocrileno	UVINUL N-35	BASF Chemical Co.

## Uso de la composición

55 Los extractos fúngicos y composiciones según la invención están destinados principalmente a un producto para el cuidado personal para una aplicación tópica a la piel humana, así como para aclarar la piel, para reducir el grado de pigmentación en la piel o para uniformar el tono de la piel. En uso, una pequeña cantidad de la composición, por ejemplo de 1 a 5 ml, es aplicada a las zonas expuestas de la piel, desde un recipiente o aplicador adecuado y si es necesario, es seguidamente extendida y/o frotada sobre la piel usando la mano o los dedos o un dispositivo adecuado.

## 60 Forma del producto y envasado

65 La composición cosmética de la invención puede ser formulada como una solución que tiene una viscosidad de 4.000 a 10.000 mPas, una crema fluida que tiene una viscosidad de 10.000 a 20.000 mPas o una crema que tiene una viscosidad de 20.000 a 100.000 mPas o por encima. La composición puede ser envasada en un recipiente adecuado para adaptar su viscosidad y uso previsto por el consumidor. Por ejemplo, una loción o crema fluida puede ser envasada en una botella o un aplicador de bola giratoria o un dispositivo de aerosol accionado por un propelente o un recipiente equipado con una bomba adecuada para un accionamiento con los dedos. Cuando la composición es una crema, puede

## ES 2 308 534 T3

ser simplemente almacenada en una botella no deformable o un recipiente para apretar como un tubo o bote tapado. Cuando la composición es una barra sólida o semi-sólida, puede ser envasada en un recipiente adecuado para impulsar o extruir manual o mecánicamente la composición.

5 Consecuentemente, la invención proporciona también un recipiente dosificado que contiene una composición cos-  
méticamente aceptable como se define en la presente memoria descriptiva.

Los siguientes ejemplos están dados a modo de ejemplo, pero en ningún modo de limitación de los principios de la presente invención para ilustrar el mejor modo de llevar a cabo la invención.

### 10 Ejemplo 1

Este Ejemplo ilustra una reducción en una nueva síntesis de melanina usando los extractos de la invención de *Nigrospora sphaerica*.

15 Los extractos de *Nigrospora sphaerica* usados en todos los ejemplos que siguen se prepararon de acuerdo con los procedimientos expuestos con anterioridad.

#### *Procedimiento de cultivo de órganos*

20 Se rasuró piel gastada de cerdos pigmentados de 8 meses de edad para retirar los pelos y se lavaron a fondo para retirar el debris y reducir el contenido microbiano. La piel limpia fue seguidamente dermatomada hasta aproximada-  
mente 1 mm de grosor x 75 cm<sup>2</sup> y se colocó en matraces de cultivo de tejidos que contenían medio de Eagle modificado de Dulbecco (DMEM Cat n° 1188507) que contenía penicilina (100 unidades/ ml), estreptomycin (100 µg/ml), cana-  
micina (200 µ/ml), glutamina (2 mM) y fungizona (0,5 µg/ml). Todos los matraces se incubaron durante una noche  
25 a 37°C en presencia de 5% de dióxido de carbono. Esto permitió que la piel se equilibrara durante 18 horas antes de la adición de inhibidores de melanina. Las zonas de la piel que tenían raspaduras, ericema o una pigmentación no uniforme fueron desechadas.

30 A la siguiente mañana, la piel fue pinchada en biopsias de 4 mm de diámetro y transferida a una placa de cultivo de tejidos de 96 pocillos. A cada pocillo que contenía una biopsia, se añadieron 180 microlitros de penicilina que contenía DMEM de reciente preparación (100 unidades/ ml), estreptomycin (100 µg/ml), glutamina (2 mM), hidro-  
cortisona (100 µg/ml) y 0,4 µCi/ml de <sup>14</sup>C-tiouracilo (Moravek Biochemical) junto con 20 microlitros de extracto natural (los extractos se disolvieron inicialmente en DMSO, es decir, dimetil-sulfóxido, y se diluyeron con solución  
35 salina tamponada con fosfato). Todas las placas se devolvieron al incubador durante 3 días.

A continuación de un período de incubación de 3 días, se separó el radiomarcador en exceso no incorporado lavando las biopsias a temperatura ambiente dos veces con tampón de carbonato 0,1 M a pH 10 durante 30 minutos y 2 horas, respectivamente, usando un lavador de placas automático. Las biopsias se blanquearon seguidamente y se  
40 disolvieron mediante la adición de 100 microlitros de NaOH 1 N/3% de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> seguido de incubación durante una noche a 60°C.

Una vez seco, se añadieron 50 microlitros de HCl 2 N a cada pocillo para volver a disolver/neutralizar las mues-  
tras, seguido de la adición de 220 microlitros de combinación de centelleo (Packard MicroScint-40). Las muestras  
45 se mezclaron varias veces para asegurar una dispersión uniforme, se sellaron y se valoraron en cuanto a la incorpo-  
ración de radiomarcador usando un contador de centelleo Packard TopCount. Una reducción de la incorporación de radiomarcador se plasma en una reducción de nueva síntesis de melanina.

TABLA 4

Tratamiento	Concentración	% de reducción de radimarcador*
Extracto de <i>Nigrospora sphaerica</i>	80 µg/ml	45
	8 µg/ml	4
Ácido kójico	1,4 mg/ml (10 mM)	56
* Un valor de p estadísticamente significativo de menos de 0,05 usando ensayos t de Sdudent		

## ES 2 308 534 T3

### Ejemplo 2

#### *Procedimiento de modelo de tejido MelanoDerm*

5 Se utilizó un modelo equivalente de tejidos MelanoDerm (MEL-300 de la entidad Mat Tek, Ashlan, Massachusets) que contenía melanocitos obtenidos de individuos de piel oscura para confirmar los resultados obtenidos en el cultivo de órganos de cerdo. Los MelanoDerms se cultivaron siguiendo las instrucciones del proveedor.

10 El medio se sustituyó cada dos días durante un período de 14 días y los tratamientos que incluían los extractos naturales se añadieron a la fase media a una concentración final de 50 y 100 microgramos por ml. Se incluyó un testigo positivo, es decir, ácido kójico, que es un agente de aclarado de la piel conocido. Durante cada cambio de medio, una parte del residuo se analizó en cuanto a niveles de lactato deshidrogenasa como un indicador de la toxicidad y la tensión celular. En ningún momento estuvo el nivel de lactato deshidrogenasa por encima de los disolventes testigos de vehículos (agua o etanol).

15 La determinación del contenido de melanina en cada MelanoDerm se realizó usando el ensayo proporcionado por el fabricante. Cada MelanoDerm se homogeneizó en 450 microlitros de tampón (1% de SDS, EDTA 0,05 mM, Tris-HCl 10 mM, pH 6,8) que contenía 20 microlitros de proteinasa K (5 mg/ml) y se incubó durante una noche a 45°C. Al siguiente día, se añadieron 50 microlitros de carbonato de sodio (500 mM) y 10 microlitros de peróxido de hidrógeno (solución al 30%) a cada muestra y se incubó a 80°C durante 30 minutos y seguidamente se enfrió. La densidad óptica de la fase superior se determinó (405 nM) a continuación de la extracción de la muestra con 100 microlitros de cloroformo:metanol (2:1) y una centrifugación (10.000 g) durante diez minutos. Seguidamente se calcularon las lecturas de la densidad óptica relativas al testigo sin tratar o vehículo (agua o etanol).

25 TABLA 5

*Resultados del modelo equivalente*

Tratamiento	Concentración	% de reducción de melanina
Ácido kójico	14 micro-g/ml (10 µM)	9,5
Extracto de <i>Nigrospora sphaerica</i>	50 µg/ml	60,9*
	100 µg/ml	48,9*
* Un valor de p estadísticamente significativo de menos de 0,05 usando ensayo t de Student		

### Ejemplo 3

55 Se prepararon composiciones cosméticas dentro del alcance de la invención.

Se preparó una formulación de base mostrada en la Tabla siguiente calentando los ingredientes de la fase A de 70 a 85°C con agitación. Los ingredientes de la fase B se calentaron en un recipiente separado de 70 a 85°C con agitación. Seguidamente se añadió fase A en la fase B mientras ambas fases se mantenían de 70 a 85°C. La mezcla se agitó durante al menos 15 minutos de 70 a 85°C y seguidamente se enfrió.

65

ES 2 308 534 T3

TABLA 6

5	Ingredientes	a	b	Fase
		% p	% p	
	Palmitato de isoestearilo	6,00	6,00	A
10	Octanoato de alquilo C12-C15	3,00	3,00	A
	Estearato de PEG-100	2,00	2,00	A
15	Hidroxiestearato de glicerilo	1,50	1,50	A
	Alcohol estearílico	1,50	1,50	A
	Ácido esteárico	3,00	4,00	A
20	TEA, 99%	1,20	1,20	B
	Dimeticona	1,00	1,00	A
	Monoestearato de sorbitán	1,00	1,00	A
25	Silicato de magnesio-aluminio	0,60	0,60	B
	Acetato de vitamina E	0,10	0,10	A
30	Colesterol	0,50	0,50	A
	Dimeticona	0,01	0,01	B
	Goma de xantano	0,20	0,20	B
35	Hidroxietilcelulosa	0,50	0,50	B
	Propilparaben	0,10	0,10	B
40	EDTA de disodio	0,05	0,05	B
	Hidroxitolueno butilado	0,05	0,05	B
	Extracto de <i>Nigrospora sphaerica</i>	0,05	2,00	B
45	Niacinamida	1,00	1,00	B
	Óxido metálico	2,50	5,00	B
	Metilparaben	0,15	0,15	B
50	Agua	BAL*	BAL*	B
	Total	100.00	100.00	B
55	* BAL significa hasta completar			

60

65

## ES 2 308 534 T3

### Ejemplo 4

Se preparó una composición cosmética adicional dentro del alcance de la invención como sigue:

1. Se calienta fase A a 80°C
2. Se calienta fase B a 75°C en un recipiente separado
3. Se añade B a A y se mezcla con calentamiento durante 30 minutos
4. A 50°C se añade fase C y se mezcla durante 10 minutos.

TABLA 7

Componente	% p	Fase
Agua, DI	RESTO	A
EDTA de disodio	0,05	A
Silicato de magnesio-aluminio	0,6	A
Metil-paraben	0,15	A
Dimeticona	0,01	A
1,3-Butilenglicol	3,0	A
Hidroxietilcelulosa	0,5	A
Glicerina, USP	2,0	A
Goma de xantano	0,2	A
Trietanolamina	12	B
Ácido esteárico	3,0	B
Propil-paraben NF	0,1	B
Hidroxiestearato de glicerilo	1,5	B
Alcohol estearílico	1,5	B
Palmitato de isoestearilo	6,0	B
Octanoato de alcoholes C12-C15	3,0	B
Dimeticona	1,0	B
Colesterol NF	0,5	B
Estearato de sorbitán	1,0	B
Dióxido de titanio micronizado	5,0	C
Acetato de tocoferilo	0,1	B
Estearato de PEG-100	2,0	B
Estearoil-lactilato de sodio	0,5	B
Ácido hidroxicaprílico	0,1	C
Extracto de <i>Nigrospora sphaerica</i>	10,0	C
PARSOL MCX	2,4	C
Alfa-bisabolol	0,2	C

# ES 2 308 534 T3

Ejemplos 5-12

Se preparó un conjunto de composiciones adicionales, según el procedimiento del Ejemplo 3, dentro del alcance de la presente invención y como se recoge en la Tabla siguiente.

5

TABLA 8

10

15

20

25

30

35

40

45

50

55

60

65

Ingredientes	Fase	Ejemplos (% p)							
		base de jabón de 5 ácidos	6	7	8	9	10	11	12
Ácido esteárico	A	17,9	17,9	17,9	17,9	17,9	17,9	17,9	17,9
Cetearil-sulfato de sodio *	A		2,2		1	1,5	2	3	2
Myrj 59*	A			2	2	2	2	2	1
Span 60*	A			2	2	2	2	2	1
Extracto de <i>Nigrospora sphaerica</i>	B	0,05	0,05	2,0	2,0	3,5	3,5	5,0	10,0
Óxido de zinc micronizado	B	2,50	5,00	5,00	2,5	2,50	5,00	2,50	5,00
KOH, 22% (forma jabón <i>in situ</i> con ácido esteárico)	A	2,20							
Metoxicinamato de octilo	B	2,50			2,50	2,50		2,50	
Agua	B	BAL	BAL	BAL	BAL	BAL	BAL	BAL	BAL
Glicerina	B	1	1	1	1	1	1	1	1
*Emulsionante									

REIVINDICACIONES

- 5 1. Un procedimiento cosmético para aclarar la piel, que comprende aplicar a la piel una composición que comprende:
- a. 0,000001% en peso a 50% en peso de un extracto de *Nigrospora sphaerica*; y
  - b. Un vehículo cosméticamente aceptable.
- 10 2. Un procedimiento cosmético según la reivindicación 1, en el que dicha composición comprende adicionalmente un protector solar.
- 15 3. Un procedimiento cosmético según la reivindicación 2, en el que dicho protector solar es un óxido metálico micronizado.
- 20 4. Un procedimiento cosmético según una cualquiera de las reivindicaciones anteriores, en el que dicho extracto comprende 0,00001% a 10% en peso de dicha composición.
- 25 5. Un procedimiento cosmético según una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 3, en el que dicho extracto comprende 0,001% a 7% en peso de dicha composición.
6. Un procedimiento cosmético según una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 3, en el que dicho extracto comprende 0,01% a 5% en peso de dicha composición.
- 30 7. Un procedimiento cosmético según una cualquiera de las reivindicaciones anteriores, en el que dicho extracto de *Nigrospora sphaerica* es un extracto en disolvente orgánico.
8. Un procedimiento cosmético según una cualquiera de las reivindicaciones anteriores, en el que dicha composición comprende adicionalmente un agente ventajoso para la piel seleccionado entra el grupo que consiste en alfa-hidroxiácidos, beta-hidroxiácidos, polihidroxi-ácidos, hidroquinona, t-butil-hidroquinona, derivados de vitamina B y/o C, ácidos dioicos, retinoides, derivados de resorcinol, ácido vanílico, ácido betulínico, hidrolactina y sus mezclas.
- 35 9. Un procedimiento cosmético según una cualquiera de las reivindicaciones anteriores, en el que dicha composición comprende adicionalmente un protector solar orgánico seleccionado entre el grupo que consiste en benzofenona-3, benzofenona-4, benzofenona-8, metoxicinamato, etil-dihidroxi-propil-PABA, gliceril-PABA, homosalato, antranilato de metilo, octocrileno, octil-dimetil-PABA, metoxicinamato de octilo (PARSOL MCX), salicilato de octilo, PABA, ácido 2-fenilbenzimidazol-5-sulfónico, salicilato de TEA, 3-(4-metilbencilideno)-alcanfor, benzofenona-1, benzofenona-2, benzofenona-6, benzofenona-12, 4-isopropil-dibenzoil-metano, butil-metoxi-dibenzoil-metano (PARSOL 1789), etocrileno y sus mezclas.
- 40 10. Una composición cosmética, que comprende:
- a. 0,000001 a 50% en peso de extracto de *Nigrospora sphaerica*,
  - b. un vehículo cosméticamente aceptable, y
  - c. un agente ventajoso para la piel y/o un protector solar, en el que el agente ventajoso para la piel se selecciona entre el grupo que consiste en alfa-hidroxiácidos, beta-hidroxiácidos, polihidroxi-ácidos, hidroquinona, t-butil-hidroquinona, derivados de vitamina B y/o C, ácidos dioicos, retinoides, derivados de resorcinol, ácido vanílico, ácido betulínico, hidrolactina y sus mezclas.
- 50 11. Una composición cosmética según la reivindicación 10, en el que dicho extracto es un extracto en disolvente orgánico de *Nigrospora sphaerica*.
- 55 12. Una composición cosmética según la reivindicación 10 o la reivindicación 11, en la que dicho extracto comprende 0,00001% a 10% en peso de dicha composición.
- 60 13. Una composición cosmética según la reivindicación 10 o la reivindicación 11, en la que dicho extracto comprende 0,001% a 7% en peso de dicha composición.
14. Una composición cosmética según la reivindicación 10 o la reivindicación 11, en la que dicho extracto comprende 0,01% a 5% en peso de dicha composición.
- 65 15. Una composición cosmética según una cualquiera de las reivindicaciones 10 a 14, en la que dicho protector solar comprende un óxido metálico micronizado.

## ES 2 308 534 T3

16. Una composición cosmética según una cualquiera de las reivindicaciones 10 a 15, en el que dicho protector solar comprende un protector solar orgánico seleccionado entre el grupo que consiste en benzofenona-3, benzofenona-4, benzofenona-8, metoxicinamato, etil-dihidroxiopropil-PABA, gliceril-PABA, homosalato, antranilato de metilo, octocrileno, octil-dimetil-PABA, metoxicinamato de octilo (PARSOL MCX), salicilato de octilo, PABA, ácido 2-fenilbenzimidazol-5-sulfónico, salicilato de TEA, 3-(4-metilbencilideno)-alcanfor, benzofenona-1, benzofenona-2, benzofenona-6, benzofenona-12, 4-isopropil-dibenzoil-metano, butil-metoxi-dibenzoil-metano (PARSOL 1789), etocrileno y sus mezclas.

17. Una composición cosmética según la reivindicación 16, en la que la cantidad del protector solar orgánico en la composición cosmética está en el intervalo de 0,1% a 10% en peso de la composición cosmética.

15

20

25

30

35

40

45

50

55

60

65