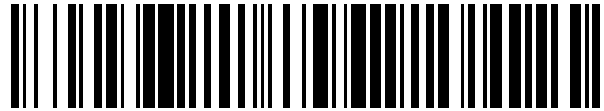


19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 933 848**

51 Int. Cl.:

A61K 47/50 (2007.01)
A61K 8/49 (2006.01)
A61K 31/506 (2006.01)
A61Q 7/00 (2006.01)
C07K 7/06 (2006.01)
C07K 7/08 (2006.01)
C07K 19/00 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

- 86 Fecha de presentación y número de la solicitud internacional: **04.08.2017 PCT/KR2017/008428**
87 Fecha y número de publicación internacional: **22.02.2018 WO18034453**
96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **04.08.2017 E 17841636 (8)**
97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **26.10.2022 EP 3501545**

54 Título: **Conjugado de minoxidil y péptido**

30 Prioridad:

19.08.2016 KR 20160105707

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

14.02.2023

73 Titular/es:

**CAREGEN CO., LTD. (100.0%)
46-38 LS-ro 91beon-gil Dongan-gu
Anyang-si, Gyeonggi-do 14119, KR**

72 Inventor/es:

**CHUNG, YONG JI y
KIM, EUN MI**

74 Agente/Representante:

CURELL SUÑOL, S.L.P.

ES 2 933 848 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

Conjugado de minoxidil y péptido

5 **[Campo técnico]**

La presente invención se refiere a un conjugado de minoxidil y péptido, y más particularmente, a un conjugado de minoxidil y péptido en el que cada actividad sinergiza entre sí mientras conserva las propiedades respectivas de minoxidil y péptido, como se define en las reivindicaciones adjuntas.

10

[Antecedentes de la técnica]

Un folículo piloso es un órgano único de la piel de los mamíferos, que se forma al crecer y extender la parte inferior de la epidermis primitiva hacia una capa de piel más profunda. El tapón de células conocido como sáculo o papila dérmica existe en la base del folículo piloso, y la papila es esencial en la circulación normal del folículo piloso y en el crecimiento del tallo piloso. El tallo piloso presenta una estructura en forma de hilo formada por células epiteliales que están compuestas por filamentos de queratina y proteínas agregadoras de filamentos fuertemente unidas a ellos.

15

20 El cabello humano repite periódicamente las fases anágena, catágena y telógena, y pasa por el proceso de pérdida y regeneración del cabello. El ciclo del cabello está determinado por la regulación hormonal y muchos factores de crecimiento, y el cabello ingresa temprano a la fase telógena a través de la fase catágena por estrés severo o desnutrición y causa síntomas severos de caída del cabello.

20

25 El fenómeno de caída del cabello del cuero cabelludo se llama caída del cabello, y los factores que afectan la caída del cabello pueden incluir factores ambientales tales como el clima, la exposición a la luz o el calor, y factores internos tales como enfermedades, nacimiento, secreción y cambios hormonales, uso de fármacos, y estados nutricionales. La caída del cabello asimismo puede ser provocada por falta de nutrición, sequedad del cuero cabelludo, estrés, etc., además de la acción enzimática. En el caso de caída del cabello debido a tales causas, la caída del cabello se puede prevenir mediante un suministro de nutrición suficiente, el manejo del cuero cabelludo, y la ingestión o administración de antioxidantes, mientras se puede promover el crecimiento del cabello.

25

30

Para tratar este fenómeno de caída del cabello, se han usado hasta ahora diversos materiales como medicamentos, pero tenían la desventaja de que el precio era demasiado caro o las diferencias individuales en la eficacia eran demasiado elevadas. Para otros productos cosméticos, han usado extractos botánicos que son más baratos pero presentan poco efecto, por lo que el efecto fue insignificante. Un ejemplo típico de un fármaco usado para la caída del cabello es minoxidil.

35

Diversos documentos han descrito el minoxidil. Como ejemplo, Hsu et al., Oncotarget, 2014, 5(8):2187-2197 describen la unión de minoxidil al receptor de andrógenos-andrógenos para suprimir la actividad informadora sensible a AR, mientras que el documento WO 2007/076993 describe la reacción catalítica usando minoxidil para la ciclación del péptido BB57. Los documentos WO 2004/043415, US 2012/238498, y US 7507719 describen composiciones que comprenden minoxidil y péptido, aunque no describen que el minoxidil y el péptido están enlazados químicamente.

40

45

El minoxidil ha sido aprobado por la FDA de los Estados Unidos de América, y se ha dado a conocer que presenta la actividad de inducir la fase anágena del ciclo capilar de la fase telógena y mantener el ciclo capilar de la fase anágena inducida, además de la función vasodilatadora como un abridor de canales de potasio único. Sin embargo, el minoxidil puede, cuando se usa, retrasar la caída del cabello, pero en realidad no podría usarse para inducir la regeneración de nuevos folículos pilosos. Además, el minoxidil presenta una baja solubilidad en agua, y por lo tanto precipita y es difícil de usar. Para solucionar estos problemas, el documento 1 de patente (publicación de patente coreana abierta al público n° 10-2012-0011632) describe una técnica para añadir un tensioactivo cuando se usa minoxidil.

50

55 Mientras tanto, existen muchos factores relacionados entre sí en el proceso de crecimiento y degeneración del cabello. Por ejemplo, se ha dado a conocer un estudio que usa una serie de factores de crecimiento para promover el crecimiento del cabello mediante la promoción del factor de crecimiento del queratinocito, la promoción de la actividad del factor de crecimiento endotelial vascular, la promoción de la ruta WINT, y la inhibición de la actividad de las proteínas implicadas en la ruta BMP. Se han descrito agentes para el crecimiento del cabello, tal como noggin, por ejemplo en los documentos WO 2010/059861, US 2011/306546, y US 2007/224150). Sin embargo, los factores de crecimiento son altamente efectivos, pero requieren un procesamiento adicional y tiempo para replegarse para obtener un factor de crecimiento natural, y asimismo requieren un procedimiento de purificación complejo para eliminar los contaminantes de *E. coli* durante el procedimiento de purificación, y es menos útil debido a su estabilidad y su alto peso molecular, y de este modo a su incapacidad para saltar fácilmente sobre la membrana protectora del cabello, en combinación con su alto precio.

60

65

En consecuencia, los inventores de la presente invención han desarrollado péptidos que pueden realizar funciones o acciones iguales o similares a las de los factores de crecimiento naturales, pero presentan una mejor estabilidad que los factores de crecimiento naturales y pueden superar los problemas causados por el gran peso molecular de los factores de crecimiento naturales, es decir, un péptido Nokkin compuesto por la secuencia de aminoácidos de SEC ID N°: 3 (documento 2 de patente: publicación de patente coreana abierta al público n° 10-2010-0085407), un péptido Keramin2 compuesto por la secuencia de aminoácidos de SEC ID N°: 2 (documento 3 de patente: publicación de patente coreana abierta al público n° 10-2009-0108323) y un péptido WINT compuesto por la secuencia de aminoácidos de SEC ID N°: 1 (documento 4 de patente: publicación de patente coreana abierta al público n° 10-2011-0023991).

Sin embargo, el minoxidil usado convencionalmente o los péptidos que consisten en las secuencias de aminoácidos de SEC ID N°: 1 a SEC ID N°: 3 aún deben mejorarse en términos de prevención de la caída del cabello y mejora del comportamiento promotor del crecimiento del cabello, reducción de los efectos secundarios, y aumento de la solubilidad en agua.

Para resolver estos problemas, los inventores de la presente invención han preparado péptidos minoxidil-Nokkin, minoxidil-Keramin 2 y minoxidil-WINT conjugando químicamente minoxidil con los péptidos que consisten en las secuencias de aminoácidos de SEC ID N°: 1 a SEC ID N°: 3, respectivamente, y han confirmado que los compuestos promueven la actividad del factor de crecimiento endotelial vascular asociada con el crecimiento del cabello, promueven la ruta WINT, e inhiben la actividad de las proteínas implicadas en la caída del cabello en la ruta principal BMP.

[Descripción]

[Problema técnico]

La presente invención es para resolver los problemas de la solución convencional para el crecimiento del cabello, y por lo tanto un objetivo técnico de la presente invención consiste en proporcionar un material que tenga propiedades fisiológicas superiores, tal como la estabilidad al agua, mientras que presenta la misma o superior prevención de la caída del cabello y/o función promotora del crecimiento del cabello, en comparación con las soluciones convencionales para el crecimiento del cabello tales como factores de crecimiento naturales, péptidos que consisten en secuencias de aminoácidos de SEC ID N°: 1 a SEC ID N°: 3, o el minoxidil.

[Solución técnica]

Para conseguir el objetivo anterior, la presente invención se proporciona en las reivindicaciones adjuntas. Otros aspectos expuestos en la presente memoria son únicamente a título informativo. Cualquier referencia en la descripción a métodos de tratamiento se refiere a los compuestos o composiciones farmacéuticas de la presente invención para la utilización en un método para tratamiento.

En la presente descripción se proporciona en particular un compuesto que presenta una estructura en la que el minoxidil y el péptido están enlazados químicamente.

Según la presente invención, el péptido se compone de 8 a 15, y más preferentemente de 10 a 12 secuencias de aminoácidos.

Según la presente invención, el péptido es un péptido soluble en agua. Según la presente invención, el péptido soluble en agua presenta una relación de aminoácidos que contienen una cadena lateral hidrófila de no menos de 50%, preferentemente no menos de 60%, más preferentemente no menos de 70%, más preferentemente no menos de 80%, más preferentemente no menos de 90%, y todavía más preferentemente 100%. Según una forma de realización preferida de la presente invención, el péptido soluble en agua presenta preferentemente no más de 5 aminoácidos, preferentemente no más de 4 aminoácidos, más preferentemente no más de 3 aminoácidos, más preferentemente no más de 2 aminoácidos, más preferentemente no más de 1 aminoácido, que presenta cadenas laterales hidrófilas, y todavía más preferentemente no presenta ningún aminoácido.

Según otra forma de realización de la presente invención, el péptido puede ser, pero no se limita a, un péptido Nokkin que consiste en la secuencia de aminoácidos de SEC ID N°: 1; un péptido Keramin2 que consiste en la secuencia de aminoácidos de SEC ID N°: 2; o un péptido WINT que consiste en la secuencia de aminoácidos de SEC ID N°: 3.

Además, la presente invención proporciona una composición farmacéutica para la prevención de la caída del cabello o la promoción del crecimiento del cabello, que comprende uno cualquiera de los compuestos descritos anteriormente.

Además, la presente invención proporciona una composición cosmética para la prevención de la caída del cabello o la promoción del crecimiento del cabello, que comprende uno cualquiera de los compuestos descritos

anteriormente.

Según una forma de realización de la presente invención, la composición cosmética puede ser, pero no se limita a, formulaciones tales como producto de lavado ("wash") de belleza emoliente, producto de lavado de belleza nutritivo, cremas nutritivas, cremas para masajes, esencias, cremas para los ojos, cremas limpiadoras, espumas limpiadoras, agua limpiadora, paquete, spray, polvos, tónico capilar, cremas capilares, lociones capilares, champú capilar, aclarados capilares, acondicionadores capilares, laca capilar, aerosol capilar, pomada, sol-gel, emulsiones, aceites, ceras, o aerosol.

10 **[Efectos ventajosos]**

Los compuestos proporcionados en la presente memoria, que presentan la estructura en la que minoxidil y el péptido están enlazados químicamente, presentan una actividad fisiológica excelente, tal como la mejora de la caída del cabello, la promoción del crecimiento del cabello y la promoción del crecimiento celular, y asimismo presentan una excelente estabilidad en el agua y la tasa de permeación de la piel, y por lo tanto pueden ser útiles como composición para la reducción de la caída del cabello y la promoción del crecimiento del cabello.

Sin embargo, los efectos no se limitan a los efectos mencionados anteriormente, y los expertos en la materia pueden apreciar claramente otros efectos no mencionados a partir de la siguiente descripción.

20 **[Descripción de los dibujos]**

La figura 1 es una fotografía que representa la solubilidad en agua del compuesto de la presente invención y el minoxidil.

La figura 2 es un gráfico que representa el grado de proliferación celular de las células endoteliales de la vena umbilical humana (HUVEC) cuando se tratan con el compuesto de la presente invención.

La figura 3 es un gráfico que representa el grado de proliferación celular de las células de la papila dérmica del cabello humano (HHDPC) cuando se tratan con el compuesto de la presente invención.

Las figuras 4 a 6 representan los resultados de confirmar la cantidad de ARNm de VEGF y TGFβ1 cuando se tratan con el compuesto de la presente invención.

La figura 7 representa el resultado de confirmar la cantidad de proteína VEGF cuando se trata con el compuesto de la presente invención.

Las figuras 8 y 9 son imágenes que representan el grado de formación de vasos sanguíneos cuando se trata con el compuesto de la presente invención.

Las figuras 10 y 11 representan los resultados de confirmar el efecto del compuesto de la presente invención sobre la translocación del núcleo de β-catenina, que es una ruta de la señal de WINT.

Las figuras 12 y 13 representan los resultados de confirmar si el compuesto de la presente invención inhibe la ruta de la señal de BMP que es un factor principal de la caída del cabello, mediante la inhibición de la activación de fosfo-Smad1/5/8 (migración del citoplasma al núcleo).

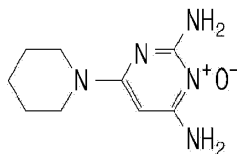
Las figuras 14 y 15 son los resultados de confirmar el grado de crecimiento del cabello cuando se trata con el compuesto de la presente invención.

50 **[Mejor modo]**

Para lograr el objetivo anterior, en la presente descripción se proporciona un compuesto que presenta una estructura en la que el minoxidil y el péptido están enlazados químicamente. La invención es como se proporciona en las reivindicaciones adjuntas.

El minoxidil es 6-amino-1,2-dihidro-1-hidroxi-2-imino-4-fenoxipirimidina, que presenta una estructura representada por la siguiente fórmula 1:

[Fórmula 1]



A continuación, la presente invención se describirá en detalle.

5

El término "péptido", como se usa en la presente memoria, se refiere a una molécula lineal formada por restos de aminoácidos unidos entre sí por un enlace peptídico. El péptido se puede preparar según métodos de síntesis biológica o química convencionales conocidos en la técnica, particularmente técnicas de síntesis en fase sólida (Merrifield, J. Amer. Chem. Soc., 85:2149-54(1963)).

10

El péptido está destinado a aumentar la solubilidad en agua del minoxidil. A este respecto, el péptido es un péptido soluble en agua. Según un aspecto de la presente descripción, el péptido se compone de 2 a 30, preferentemente 5 a 20, más preferentemente 8 a 15, y más preferentemente 10 a 12 secuencias de aminoácidos. El péptido presenta una relación de aminoácidos que contienen una cadena lateral hidrófila de no menos de 50%, preferentemente no menos de 60%, más preferentemente no menos de 70%, más preferentemente no menos de 80%, más preferentemente no menos de 90%, y todavía más preferentemente 100%.

15

Por otra parte, el péptido presenta una relación de aminoácidos que contienen una cadena lateral hidrófoba de menos de 50%, preferentemente no más de 40%, más preferentemente no más de 30%, más preferentemente no más de 20%, más preferentemente no más de 10%, y todavía más preferentemente 0%. La expresión "aminoácido que contiene una cadena lateral hidrófila", como se usa en la presente memoria, se refiere a arginina (Arg), histidina (His), lisina (Lys), ácido aspártico (Asp), ácido glutámico (Glu), serina (Ser), treonina (Thr), asparagina (Asn), glutamina (Gln), cisteína (Cys), selenocisteína (Sec), glicina (Gly), y prolina (Pro), y la expresión "aminoácido que contiene una cadena lateral hidrófoba" se refiere a alanina (Ala), valina (Val), isoleucina (Ile), leucina (Leu), metionina (Met), fenilalanina (Phe), tirosina (Tyr), y triptófano (Trp), pero no se limita a ellos, y además de los aminoácidos mencionados anteriormente presentes en la naturaleza, asimismo se pueden usar sin limitación productos modificados de los mismos y similares.

20

25

La presente invención se refiere a un compuesto que presenta una estructura en la que el minoxidil y el péptido están enlazados covalentemente, en la que

30

el péptido consiste en 8 a 15 secuencias de aminoácidos,

35

el péptido es un péptido soluble en agua que presenta una relación de aminoácidos que contiene una cadena lateral hidrófila de no menos de 50%, y

40

el aminoácido hidrófilo que contiene una cadena lateral se selecciona de entre el grupo que consiste en arginina (Arg), histidina (His), lisina (Lys), ácido aspártico (Asp), ácido glutámico (Glu), serina (Ser), treonina (Thr), asparagina (Asn), glutamina (Gln), cisteína (Cys), selenocisteína (Sec), glicina (Gly), y prolina (Pro).

45

Según una forma de realización preferida de la presente invención, el aminoácido que contiene una cadena lateral hidrófoba está presente en el péptido en una cantidad de no más de 5, preferentemente no más de 4, más preferentemente no más de 3, más preferentemente no más de 2, más preferentemente no más de 1, y todavía más preferentemente 0. Según una forma de realización de la presente invención, el péptido es preferentemente, pero no se limita a, un péptido Nokkin que consiste en la secuencia de aminoácidos de SEC ID N°: 1; un péptido Keramin2 que consiste en la secuencia de aminoácidos de SEC ID N°: 2; y un péptido WINT que consiste en la secuencia de aminoácidos de SEC ID N°: 3.

50

Según un aspecto, el compuesto de la presente invención presenta la capacidad de promover el crecimiento celular con respecto a las células endoteliales de la vena umbilical humana (HUVEC) y las células de la papila dérmica del cabello humano (HHDPCC). Según otro aspecto, el compuesto de la presente invención presenta la función de activar la ruta de transducción de señales WNT. Según otro aspecto, el compuesto de la presente invención transfiere la β -catenina al núcleo. Según otro aspecto, el compuesto de la presente invención bloquea la ruta de la señal de BMP, que es un factor principal de la caída del cabello.

55

El compuesto de la presente invención presenta una excelente estabilidad por sí mismo, pero la estabilidad puede mejorarse aún más modificando cualquier aminoácido que constituya el péptido unido al compuesto. Según una forma de realización de la presente invención, el extremo N del péptido puede unirse con un grupo protector seleccionado de entre el grupo que consiste en grupo acetilo, grupo fluorenil metoxi carbonilo, grupo formilo, grupo palmitoilo, grupo miristilo, grupo estearilo, y polietilenglicol (PEG), y por lo tanto la estabilidad se puede mejorar

60

aún más. Según otra forma de realización de la presente invención, el péptido puede unirse con un grupo protector seleccionado de entre el grupo que consiste en grupo acetilo, grupo fluorenil metoxi carbonilo, grupo formilo, grupo palmitoilo, grupo miristilo, grupo estearilo, y polietilenglicol (PEG), y por lo tanto la estabilidad se puede mejorar aún más.

5

Las modificaciones de los aminoácidos descritas anteriormente desempeñan un papel importante en la mejora de la estabilidad de los compuestos de la presente invención. El término "estabilidad", como se usa en la presente memoria, pretende comprender la estabilidad "in vitro" así como la estabilidad "in vivo", tal como la estabilidad durante el almacenamiento (por ejemplo, la estabilidad durante el almacenamiento a temperatura ambiente). Además, el grupo protector mencionado anteriormente desempeña un papel en la protección del compuesto de la presente invención frente al ataque de la proteasa in vivo e in vitro.

10

Además, la presente invención proporciona una composición para tratar o mejorar la caída del cabello, que comprende el compuesto como componente eficaz. Según otro aspecto, en la presente descripción se proporciona una composición para mejorar el estado de la piel, que comprende el péptido como componente eficaz. En la presente invención, la composición puede estar en forma de una composición farmacéutica o de un alimento natural, pero no se limita a ellos.

15

Dado que la composición de la presente invención comprende el compuesto mencionado anteriormente de la presente invención como componente eficaz, se omiten los contenidos comunes a ambos para evitar la excesiva complejidad de la presente memoria descriptiva.

20

Según una forma de realización de la presente invención, el tratamiento o la mejora de la caída del cabello mediante los compuestos de la presente invención es la promoción del crecimiento del cabello o la producción de cabello. Según una forma de realización preferida de la presente invención, el compuesto de la presente invención presenta la capacidad de promoción del crecimiento de células HUVEC y HHDP, y promueve la ruta de transducción de señales de β -catenina, una ruta de transducción de señales típica de la proteína WINT. Según otra forma de realización de la presente invención, el compuesto de la presente invención bloquea la ruta de la señal de BMP, que es un factor principal de la caída del cabello. Los experimentos con animales basados en estos resultados mostraron que el compuesto de la presente invención promovió significativamente el crecimiento del cabello. Por lo tanto, la composición de la presente invención es muy eficaz para mejorar el crecimiento del cabello y el estado de la piel. Las mejoras en el estado de la piel por el compuesto descrito son la mejora de las arrugas, la mejora de la elasticidad de la piel, la prevención del envejecimiento de la piel, la mejora de la hidratación de la piel, el tratamiento de heridas, o la regeneración de la piel.

25

30

35

Dado que la composición de la presente invención comprende el compuesto mencionado anteriormente de la presente invención como componente eficaz, se omite el contenido común a ambos para evitar la excesiva complejidad de la presente memoria descriptiva.

40

Preferentemente, la composición de la presente invención es una composición farmacéutica que comprende (a) una cantidad farmacéuticamente eficaz del compuesto mencionado anteriormente de la presente invención, y (b) un vehículo farmacéuticamente aceptable.

45

La expresión "cantidad farmacéuticamente eficaz", como se usa en la presente memoria, se refiere a una cantidad suficiente para lograr la eficacia o actividad del compuesto de la presente invención descrito anteriormente.

50

Los vehículos farmacéuticamente aceptables contenidos en la composición farmacéutica de la presente invención incluyen los que se usan convencionalmente en la preparación de formulaciones, e incluyen, por ejemplo, pero no se limitan a, lactosa, dextrosa, sacarosa, sorbitol, manitol, almidón, goma arábica, fosfato de calcio, alginato, gelatina, silicato de calcio, celulosa microcristalina, polivinilpirrolidona, celulosa, agua, jarabe, metilcelulosa, hidroxibenzoato de metilo, hidroxibenzoato de propilo, talco, estearato de magnesio, aceites minerales, y similares. La composición farmacéutica de la presente invención puede incluir además lubricantes, agentes humectantes, agentes edulcorantes, agentes aromatizantes, agentes emulsionantes, agentes de suspensión, conservantes, y similares, además de los componentes anteriores. Los vehículos y formulaciones farmacéuticamente aceptables adecuados se describen en detalle en la publicación de patente coreana abierta al público nº 2017-0027312.

55

La composición farmacéutica de la presente invención se puede preparar mediante la formulación como una forma de dosificación unitaria o mediante la inserción en un recipiente multidosis usando vehículos y/o excipientes farmacéuticamente aceptables, según un método que puede llevarse a cabo fácilmente por un experto ordinario en la materia a la que pertenece la presente invención. En este caso, las formulaciones pueden estar en forma de disoluciones, suspensiones, o emulsiones en aceite o medios acuosos, o pueden estar en forma de extractos, polvos, gránulos, comprimidos, cápsulas, o geles (por ejemplo, hidrogeles), y además pueden incluir agentes dispersantes o estabilizantes.

60

65

La composición farmacéutica según la presente invención se puede administrar por vía oral o parenteral en el momento de la administración clínica, y se puede usar en forma de preparación farmacéutica general. Es decir, la

composición farmacéutica de la presente invención se puede administrar por vía oral o parenteral como diversas formulaciones clínicas en el momento de la administración clínica real, y cuando se formula la composición farmacéutica de la presente invención, se prepara usando diluyentes o excipientes tales como cargas, extensores, aglutinantes, agentes humectantes, agentes disgregantes, y tensioactivos, que se usan habitualmente. Las formaciones sólidas para administración oral pueden incluir comprimidos, píldoras, polvos, gránulos, o cápsulas, y las formaciones sólidas pueden prepararse mezclando un extracto de hierbas o un extracto de hierbas fermentado con uno o más excipientes tales como almidón, carbonato de calcio, sacarosa, lactosa, o gelatina. Además de los excipientes simples, asimismo se usan lubricantes tales como estearato de magnesio y talco. Las formaciones líquidas para administración oral, que comprenden suspensión, líquido para uso interno, emulsión, jarabe, etc., pueden incluir diluyentes simples tales como agua o parafina líquida, así como diversos excipientes tales como agentes humectantes, agentes edulcorantes, fragancias, o conservantes. Las formulaciones para la administración parenteral pueden incluir una disolución acuosa esterilizada, un disolvente no acuoso, un agente de suspensión, una emulsión, un agente de secado por congelación, o un supositorio. La disolución y suspensión no acuosa pueden ser propilenglicol, polietilenglicol, aceite vegetal, tal como aceite de oliva, éster disponible para inyección, tal como oleato de etilo. La base del supositorio puede ser witepsol, macrogol, tween 61, aceite de cacao, aceite de laurina, glicerol, gelatina, y similares.

Las unidades de dosificación pueden contener, por ejemplo, 1, 2, 3 o 4 veces, o 1/2, 1/3 o 1/4 veces la dosis individual. La dosis individual contendrá la cantidad del fármaco activo que se administra en una dosis única, y normalmente corresponderá a la totalidad, la mitad, un tercio, o un cuarto de la dosis diaria.

La composición farmacéutica de la presente invención se puede preparar mediante la formulación como una forma de dosificación unitaria o mediante la inserción en un recipiente multidosis usando vehículos y/o excipientes farmacéuticamente aceptables, según un método que puede ser llevado a cabo fácilmente por un experto ordinario en la materia a la que pertenece la presente invención. En este caso, las formulaciones pueden estar en forma de disoluciones, suspensiones o emulsiones en aceite o medios acuosos, o pueden estar en forma de extractos, polvos, gránulos, comprimidos, cápsulas, o geles (por ejemplo, hidrogeles), y además pueden incluir agentes dispersantes o estabilizantes.

Preferentemente, la composición de la presente invención es una composición cosmética que comprende (a) una cantidad cosméticamente eficaz del compuesto de la presente invención como se describe anteriormente; y (b) un vehículo cosméticamente aceptable.

La expresión "cantidad cosméticamente eficaz", como se usa en la presente memoria, se refiere a la cantidad de la composición de la presente invención descrita anteriormente suficiente para lograr un efecto de mejora del estado de la piel.

Las composiciones cosméticas de la presente invención se pueden preparar como cualquier formulación producida convencionalmente en la técnica, por ejemplo que incluye disoluciones, suspensiones, emulsiones, pastas, geles, cremas, lociones, polvos, jabones, limpiadores que contienen tensioactivos, aceites, bases en polvo, bases de emulsión, bases de cera, y esprays, pero no se limitan a los mismos. Más específicamente, las composiciones cosméticas de la presente invención se pueden preparar en diversas formas, por ejemplo disoluciones, sol-geles, emulsiones, aceites, ceras, aerosoles, y similares, tales como producto de lavado de belleza emoliente, producto de lavado de belleza nutritivo, cremas nutritivas, cremas para masajes, esencias, cremas para los ojos, cremas limpiadoras, espumas limpiadoras, agua limpiadora, paquetes, esprays, polvos, tónico capilar, cremas capilares, lociones capilares, champú capilar, aclarados capilares, acondicionadores capilares, lacas capilares, aerosoles capilares, pomadas, y geles, pero no se limitan a ellos.

Las formulaciones de pasta, crema o gel de la presente invención pueden incluir, como componente portador, aceites animales, aceites vegetales, ceras, parafina, almidón, tragacanto, derivados de celulosa, polietilenglicol, silicona, bentonita, sílice, talco, u óxido de cinc.

Las formulaciones en polvo o en aerosol de la presente invención pueden incluir, como componente portador, lactosa, talco, sílice, hidróxido de aluminio, silicato de calcio, o polvo de poliamida, y especialmente, la formulación en aerosol puede incluir adicionalmente, pero no se limita a, propulsores tales como clorofluorohidrocarbano, propano/butano, o éter dimetilico.

Las formulaciones de disolución o emulsión de la presente invención pueden incluir como componente portador, pero no se limitan a, disolventes, agentes solubilizantes, o agentes emulsionantes, tales como agua, etanol, isopropanol, carbonato de etilo, acetato de etilo, alcohol bencílico, benzoato de bencilo, propilenglicol, aceite de 1,3-butilglicol, éster alifático de glicerol, polietilenglicol, o éster de ácido graso de sorbitán.

La formulación de suspensión de la presente invención puede incluir como componente portador, pero no se limita a, agentes diluyentes en fase líquida, tales como agua, etanol y propilenglicol, agentes de suspensión tales como alcohol isoestearílico etoxilado, éster de polioxietilensorbitol y éster de polioxietilensorbitán, celulosa microcristalina, hidróxido metálico de aluminio, bentonita, agar, y tragacanto.

Si la formulación de la presente invención es el limpiador que contiene tensioactivo, la formulación puede incluir, como componente portador, alcohol sulfato alifático, alcohol éter sulfato alifático, monoéster de ácido sulfosuccínico, isetionato, derivados de imidazolio, taurato de metilo, sarcosinato, amida éter sulfato de ácido graso, alquilamidobetaína, alcoholes alifáticos, glicérido de ácido graso, dietanolamida de ácido graso, aceites vegetales, derivados de lanolina, o éster de ácido graso de glicerol etoxilado, pero no se limita a ellos.

Si la formulación de la presente invención es un champú para el cabello, los componentes base para formar el champú para el cabello, tales como espesantes, tensioactivos, agentes de ajuste de la viscosidad, humectantes, agentes de ajuste del pH, antisépticos, aceites esenciales, etc., se mezclan con el compuesto de la presente invención. Como espesante, se puede usar CDE; el tensioactivo puede ser LES, que es un tensioactivo aniónico, y cocobetaína, que es un tensioactivo anfótero; el agente de ajuste de la viscosidad puede ser Polyquater; el humectante puede ser glicerina; el agente de ajuste del pH puede ser ácido cítrico o hidróxido de sodio; y el conservante puede ser un extracto de pomelo. Además, se pueden añadir aceites esenciales tales como madera de cedro, menta piperita, y romero, y aminoácido de seda, pentanol, y vitamina E. Según una forma de realización de la presente invención, el champú para el cabello puede comprender, pero no se limita a, 5 a 10 partes en peso de CDE, 30 a 40 partes en peso de LES, 10 a 20 partes en peso de cocobetaína, 0.1 a 0.2 partes en peso de Polyquater, 5 a 10 partes en peso de glicerina, 0.1 a 1.01 partes en peso de extracto de pomelo, 0.5 a 1 parte en peso de aminoácido de seda, 0.5 a 1 parte en peso de pentanol, 0.5 a 2 partes en peso de vitamina E, y 0.01 a 0.1 partes en peso de uno cualquiera de madera de cedro, menta piperita y romero como aceite esencial, sobre la base de 100 partes en peso del compuesto de la presente invención.

Los componentes incluidos en la composición cosmética de la presente invención pueden incluir, además del compuesto de la presente invención como componente eficaz y componentes portadores, componentes comúnmente usados en composiciones cosméticas, y pueden incluir, pero no se limitan a, adyuvantes convencionales tales como antioxidantes, estabilizantes, solubilizantes, vitaminas, pigmentos, y perfumes.

Además, la presente invención proporciona un método para la prevención de la caída del cabello o la promoción del crecimiento del cabello, que comprende la etapa de administrar transdérmicamente el compuesto a la parte afectada de un sujeto que sufre caída del cabello.

La administración percutánea puede ser, pero no se limita a, aplicación tópica, o inyección.

La parte afectada puede incluir, pero no se limita a, por lo menos aquella seleccionada de entre el grupo que consiste en cuero cabelludo, cara, barba, cabeza, bigote, cuerpo, cejas, y párpados.

El sujeto que sufre caída del cabello puede ser un paciente que sufre cualquier trastorno de caída del cabello seleccionado de entre el grupo que consiste en alopecia androgénica, alopecia areata, alopecia sistémica, alopecia degenerativa, tricotilomanía, alopecia telógena, efluvio anágeno, alopecia cicatrisada, alopecia cicatricial, cabellera rala, distrofia del tallo capilar, enfermedades infecciosas del cabello, enfermedades genéticas y quimioterapia, desequilibrio hormonal, infección micótica, y alopecia por ingestión de fármacos.

En la presente memoria en adelante, la presente invención se describirá en detalle haciendo referencia a los ejemplos y los ejemplos experimentales.

Sin embargo, los siguientes ejemplos y ejemplos experimentales se proporcionan únicamente para ilustrar la presente invención, y el contenido de la presente invención no está limitado por los siguientes ejemplos y ejemplos experimentales.

<Ejemplo 1> Síntesis y evaluación de la solubilidad del compuesto de la presente invención

<1-1> Síntesis de péptido

<1-1-1> Síntesis del péptido de SEC ID N°: 3

Se colocaron 700 mg de resina de cloruro de clorotritilo (resina CTL, Nova biochem [0064] n° de cat. 01-64-0021) en una vasija de reacción, y se le añadieron 10 ml de cloruro de metileno (MC), seguido de agitación durante 3 minutos. Se eliminó la disolución, y se le añadieron 10 ml de dimetilformamida (DMF). Después de agitar durante 3 minutos, el disolvente se eliminó de nuevo. Se añadieron al reactor 10 ml de disolución de diclorometano, y después de añadir 200 mmoles de Fmoc-Cys(trt)-OH (Bachem, Suiza) y 400 mmoles de diisopropiletilamina (DIEA), se agitaron y de este modo disolvió bien, y se hicieron reaccionar con agitación durante 1 hora. Después de la reacción, se realizó un lavado, y el metanol y DIEA (2:1) se disolvieron en diclorometano (DCM), se hicieron reaccionar durante 10 minutos, y se lavaron con un exceso de DCM/DMF (1:1). Se eliminó la disolución, y se le añadieron 10 ml de dimetilformamida (DMF). Después de agitar durante 3 minutos, el disolvente se eliminó de nuevo. Se añadieron 10 ml de la disolución de desprotección (piperidina al 20%/DMF) a la vasija de reacción, se agitaron durante 10 minutos a temperatura ambiente, y después la disolución se eliminó. Se añadió la misma

cantidad de la disolución de desprotección, y se mantuvo la reacción durante 10 minutos. Después, la disolución se retiró, y se lavó dos veces con DMF, una vez con MC, y una vez con DMF durante 3 minutos cada una, para obtener la resina Cys(trt)-CTL.

5 Al nuevo reactor se le añadieron 10 ml de disolución de DMF, se le añadieron 200 mmoles de Fmoc-His(trt)-OH (Bachem, Suiza), 200 mmoles de HoBt, y 200 mmoles de Bop, se agitaron y se disolvieron bien. Se añadieron 400 mmoles de DIEA al reactor en dos porciones, y después se agitaron durante al menos 5 minutos hasta que se disolvieron todos los sólidos. La disolución de mezcla de aminoácidos disuelta se colocó en la vasija de reacción que contenía la resina desprotegida, y se dejó reaccionar durante 1 hora a temperatura ambiente con agitación.
10 La disolución de reacción se eliminó, y se agitó con disolución de DMF tres veces durante 5 minutos cada vez, y después se eliminó. Se tomó una pequeña cantidad de la resina de reacción, y se comprobó el grado de reacción usando una prueba de Kaiser (prueba de nihidrina). La resina His(trt)-Cys(trt)-CTL se preparó desprotegiéndola dos veces de la misma manera que se ha descrito anteriormente mientras se usaba la disolución de desprotección. Después de lavar a fondo con DMF y MC, y realizar una prueba de Kaiser una vez más, se realizó el siguiente experimento de adhesión de aminoácidos como se describe anteriormente.
15

Sobre la base de la secuencia de aminoácidos seleccionada, las reacciones en cadena se realizaron en el orden de Fmoc-Cys(trt), Fmoc-Arg, Fmoc-Gln(trt), Fmoc-Val, Fmoc-Arg, Fmoc-Thr, Fmoc-Gln(trt) y Fmoc-Arg(pbf). El grupo protector de Fmoc se eliminó haciendo reaccionar dos veces con la disolución de desprotección durante 10 min, y después lavando bien. Se añadieron anhídrido acético, DIEA y HoBt, y se llevó a cabo la acetilación durante 1 hora, y después la resina peptídica así preparada se lavó tres veces cada vez con DMF, MC y metanol. El nitrógeno se hizo fluir lentamente y se secó, y después se secó completamente reduciendo la presión a vacío bajo P₂O₅. A continuación, tras añadir 30 ml de disolución de salida [95% de ácido trifluoroacético, 2.5% de agua destilada, 2.5% de tioanisol], la reacción se mantuvo durante 2 horas con agitación ocasional a temperatura ambiente. La resina se filtró, y la resina se lavó con una pequeña cantidad de disolución de TFA, y después se combinó con el licor madre. Se llevó a cabo la destilación a presión reducida de modo que el volumen total quedara aproximadamente a la mitad, y se añadieron 50 ml de éter frío para inducir la precipitación. Los precipitados se recogieron por centrifugación, y se lavaron dos veces con éter frío. El licor madre se eliminó y se secó lo suficiente bajo nitrógeno para obtener 0.65 g de péptido NH₂-Arg-Gln-Thr-Arg-Val-Gln-Arg-Cys-His-Cys-OH bruto (SEQ ID NO: 3) (Rendimiento: 92.6%). Se obtuvo un peso molecular de 1287.1 (valor teórico: 1286.5) cuando se midió usando un analizador de peso molecular.
20
25
30

<1-1-2> Síntesis de péptidos de SEC ID N°: 1 y SEC ID N°: 2

35 El péptido (Glu-Leu-Ile-Glu-His-Gly-Gly-Gly-Arg-Pro-Ala-Asp: ELIEHGGGRPAD) de SEC ID N°: 1 y el péptido (Ac-Tyr-Lys-Ser-Lys-Gly-Gly-Trp-Thr-His: Ac-YKSKKGGWTH) de SEC ID N°: 2 se sintetizaron usando el mismo método que el ejemplo <1-1-1>.

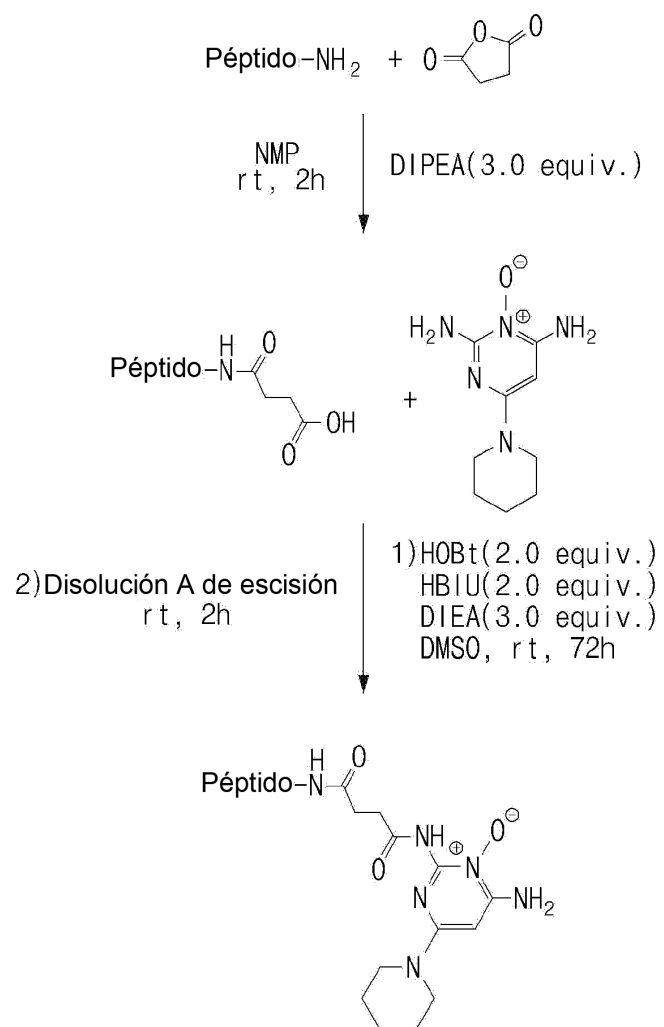
Tabla 1:

SEC ID NO	Secuencia de aminoácidos	Valor analítico (espectrómetro de masas)	
		Valor analítico	Valor teórico
1	ELIEHGGGRPAD	1250.9	1250.35
2	Ac-YKSKKGGWTH	1233.8	1233.4
3	RQTRVERCHC	1287.1	1286.5

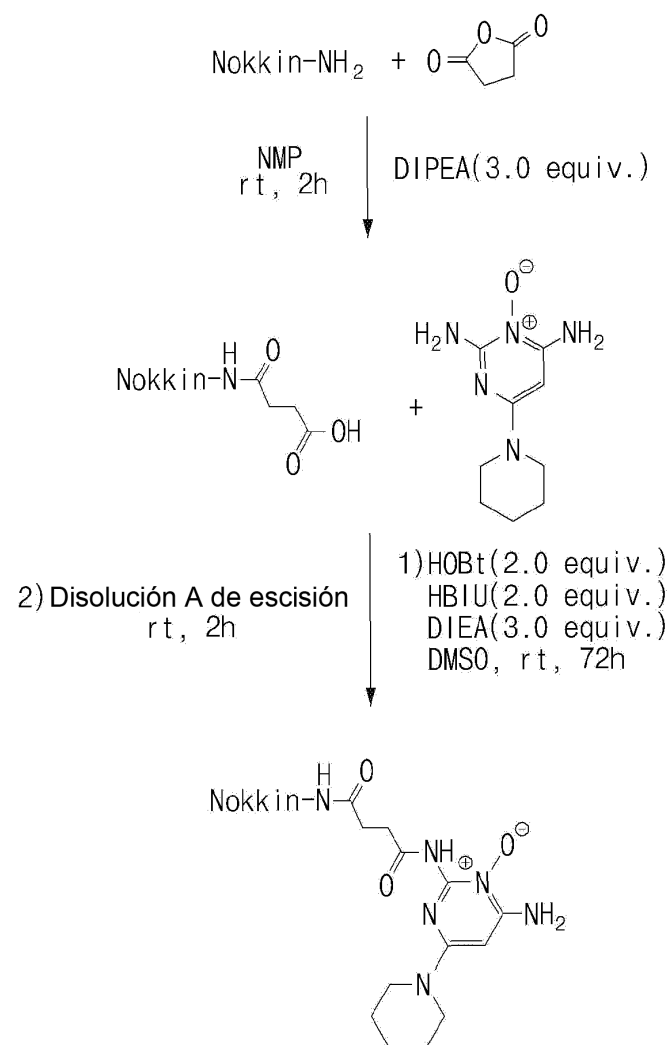
<1-2> Síntesis del compuesto de la presente invención

45 La resina peptídica (1 mmol) y 3.9 g (3 mmoles, 3.0 equiv.) de N,N'-diisopropiletilamina (DIPEA) en un reactor de péptidos se disolvieron en 10 ml de 1-metil-2-pirrolidinona (NMP), y después se añadieron 200 mg (2 mmoles, 2.0 equiv.) de anhídrido succínico y se hicieron reaccionar a temperatura ambiente durante 2 horas. El disolvente se separó por filtración y se lavó con NMP reciente (5 ml x 2) para obtener un conjugado de resina peptídica-ácido succínico. Se disolvieron 270 mg (0.2 mmoles, 2.0 equiv.) de 1-hidroxibenzotriazol (HOBt) y 759 mg (0.2 mmoles, 2.0 equiv.) de hexafluorofosfato de N,N,N',N'-tetrametil-O-(1H-benzotriazol-1-il)uronio (HBTU) en 10 ml de dimetilsulfóxido (DMSO), y se hicieron reaccionar durante 30 minutos. Se añadieron 388 mg (0.3 mmoles, 3 equiv.) de N,N'-diisopropiletilamina (DIPEA), 41.8 mg (0.2 mM) de análogo de minoxidil, y conjugado de resina peptídica-ácido succínico (0.1 mmoles), y se hicieron reaccionar a temperatura ambiente durante 72 horas, y se filtró para obtener la resina peptídica que ha reaccionado. La resina obtenida se hizo reaccionar con una disolución de escisión a temperatura ambiente durante 2 horas para eliminar la resina y el grupo protector, y se cristalizó usando 55 10 ml (10 mmoles) de éter dietílico para obtener un péptido híbrido de minoxidil.

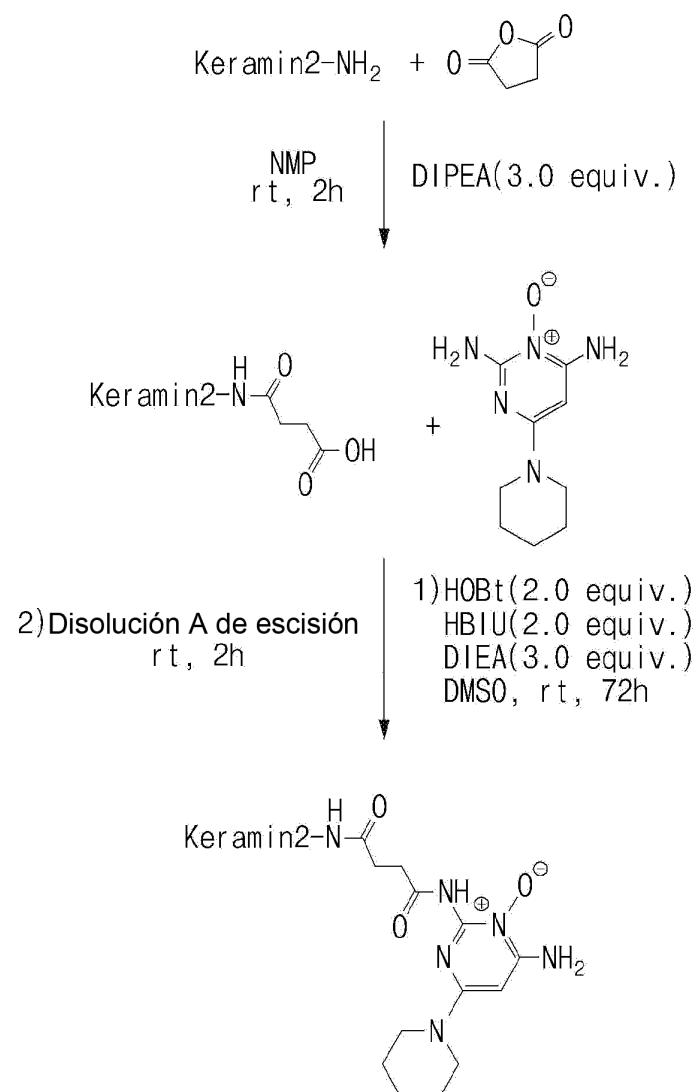
[Esquema 1 de reacción] Esquema de reacción de conjugado de minoxidil y péptido



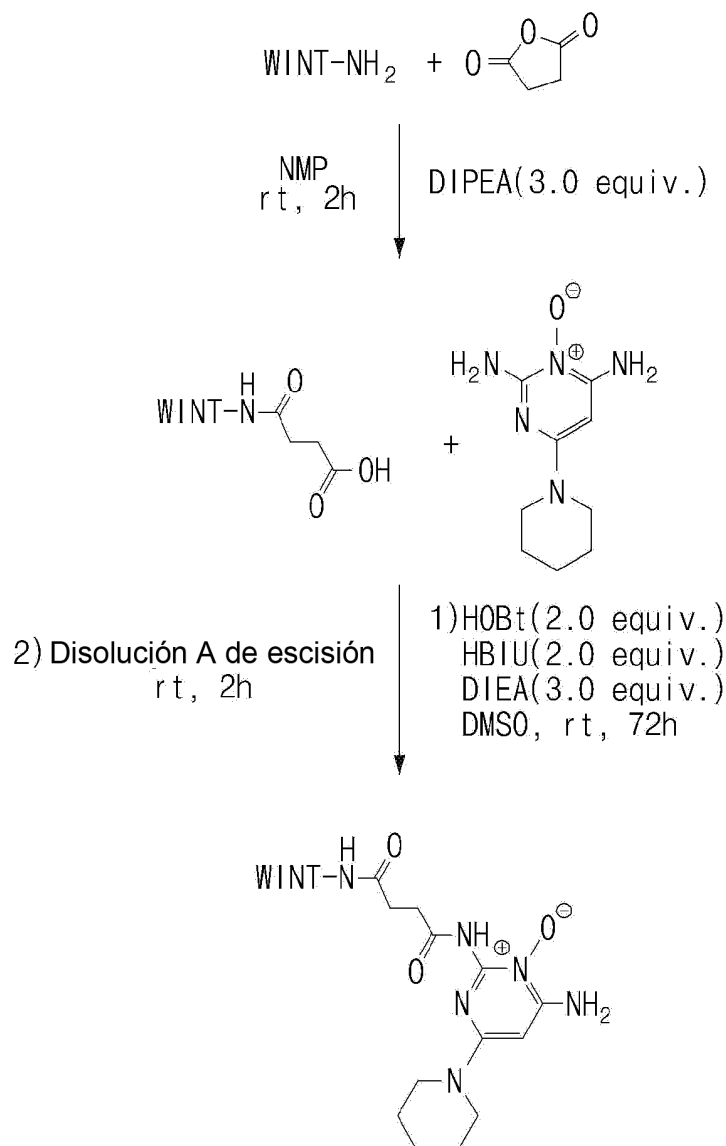
[Esquema 2 de reacción] Esquema de reacción de conjugado de minoxidil-Nokkin



[Esquema 3 de reacción] Esquema de reacción de conjugado de minoxidil-Keramin2



[Esquema 4 de reacción] Esquema de reacción de conjugado de minoxidil-WINT



5 <1-3> Evaluación de la solubilidad

El minoxidil-CG-Nokkin, el minoxidil-CG-Keramin2 y el minoxidil-CG-WINT preparados en el ejemplo 1-1 se disolvieron en DW a una concentración de 10 mg/ml, respectivamente. El minoxidil se usó como control.

10 Como resultado, se confirmó que el minoxidil era casi insoluble en agua a la misma concentración, y por lo tanto estaba en estado opaco, mientras que los tres compuestos de la presente invención se disolvieron completamente en agua (ver la figura 1).

15 <Ejemplo 2> Evaluación del grado de proliferación celular tras el tratamiento del compuesto de la presente invención

<2-1> Evaluación de la proliferación celular para células endoteliales de vena umbilical humana (HUVEC)

20 A fin de confirmar la función del compuesto de la presente invención sintetizado en el ejemplo 1, se trató HUVEC con el compuesto de la presente invención para confirmar el grado de proliferación. Se colocaron 3000 HUVEC en cada pocillo de una placa de 96 pocillos, y se incubaron en una incubadora de CO₂ durante 24 horas. Después de 24 horas, el medio se reemplazó con medio DMEM sin suero, y los tres compuestos de la presente invención sintetizados en el ejemplo 1 y minoxidil se añadieron a concentraciones de 0.5 μM, 5 μM y 50 μM, respectivamente, a las células, y se incubaron durante 72 horas. Una vez completada la incubación, se eliminó el sobrenadante de la incubación, y las células se fijaron con etanol y se lavaron tres veces con PBS (disolución salina amortiguada

25

con fosfato). Después de eliminar la disolución de lavado, las células se trataron con una disolución de SRB colorimétrica, y se lavaron minuciosamente con ácido acético al 1%. Posteriormente, las células se observaron con un microscopio para observar la viabilidad de las células. A las células teñidas se les añadió disolución de Trizma base 10 mM (pH 10.5) para eluir la SRB, y después se midió la absorbancia mediante luz ultravioleta de una longitud de onda de 560 nm para medir la viabilidad de las células.

Como resultado, se confirmó que en el caso de los tres compuestos de la presente invención a baja concentración, la proliferación celular se mostró similar a la del grupo de control, el minoxidil, pero el grado de proliferación celular aumentó notablemente en comparación con el minoxidil a medida que aumentaba la concentración (ver la figura 2).

<2-2> Evaluación de la proliferación celular para células de papila dérmica de cabello humano (HHDPC)

Se colocaron 3000 HHDPC en cada pocillo de una placa de 96 pocillos, y se incubaron en una incubadora de CO₂ durante 24 horas. El medio se reemplazó con medio DMEM sin suero, y los tres compuestos de la presente invención y minoxidil se añadieron a concentraciones de 0.5 μM, 5 μM y 50 μM, respectivamente, y se incubaron durante 72 horas. Después de completar la incubación, las células se tiñeron de la misma manera que en el ejemplo 2-1, y la SRB se eluyó para cuantificar el grado de proliferación celular.

Como resultado, se confirmó que los tres compuestos de la presente invención presentan un mayor grado de proliferación celular que el minoxidil, y el grado de proliferación celular aumenta significativamente en proporción a la concentración de tratamiento (ver la figura 3).

<Ejemplo 3> Evaluación del efecto del compuesto de la presente invención sobre la expresión de VEGF y TGFβ1

Dado que VEGF desempeña un papel en la función de angiogénesis y expansión, y el TGFβ1 afecta la caída del cabello, se confirmó el nivel de expresión de VEGF y TGFβ1 cuando se trató con el compuesto de la presente invención.

<3-1> Evaluación de la cantidad de ARNm (nivel de transcripción)

El VEGF se expresó por las HUVEC, y el TGFβ1 se expresó por células de papila dérmica de folículo piloso. Se colocaron dos células en cada placa de 6 pocillos, a una tasa de 1 x 10⁵ células/pocillo. Después de 24 horas de incubación en una incubadora de CO₂, el medio se reemplazó con medio DMEM sin suero. Se añadieron tres compuestos de la presente invención y minoxidil a las células, a una concentración de 5 μM y 50 μM, respectivamente, y se incubaron durante 24 horas. Después de recolectar las células incubadas, se extrajo el ARN usando un kit de extracción de ARN, y se realizó una RT-PCR para confirmar el grado de expresión de VEGF y TGFβ1. Los cebadores usados en la RT-PCR se muestran en la tabla 2.

Tabla 2:

Tipo de cebador	Secuencia	SEQ ID NO
VEGF directo	(5') CCATGAACTTTCTGCTGTCTT (3')	4
VEGF inverso	(5') TCGATCGTTCTGTATCAGTCT (3')	5
TGFβ1 directo	(5') GCCCTGGATACCAACTATTGC (3')	6
TGFβ1 inverso	(5') TCAGCACTTGCAGGAGTAGCG (3')	7
GAPDH directo	(5') GGAGCCAAAAGGGTCATCAT (3')	8
GAPDH inverso	(5') GTGATGGCATGGACTGTGGT (3')	9

Como resultado, los tres compuestos de la presente invención mostraron una mayor expresión de VEGF que la del minoxidil, y especialmente las expresiones de VEGF en el caso del minoxidil-Nokkin y minoxidil-Keramin2 fueron significativamente mayores que las de minoxidil (ver las figuras 4 a 6). Además, las expresiones de TGFβ1 en el caso de los tres compuestos de la presente invención fueron menores que las del minoxidil, y en particular, el nivel de expresión de TGFβ1 en el caso del minoxidil-Nokkin fue significativamente menor que el del minoxidil a la misma concentración (ver las figuras. 4 a 6). A partir de estos resultados, se puede observar que, dado que los tres compuestos de la presente invención presentan una alta cantidad de expresión de VEGF que desempeña un papel en la función de expansión y angiogénesis y presentan una baja cantidad de expresión de TGFβ1 que está implicado en la caída del cabello, los tres compuestos de la presente invención se pueden usar para prevenir o mejorar la caída del cabello.

<3-2> Evaluación de la cantidad de proteína (nivel de traducción)

Se colocaron HUVEC en cada pocillo de una placa de 6 pocillos, a 1 x 10⁵ células/pocillo. La incubación se realizó en una incubadora de CO₂ durante 24 horas. Después de reemplazar el medio con medio DMEM sin suero, los

tres compuestos de la presente invención y el minoxidil se añadieron respectivamente a las células a una concentración de 5 μM y 50 μM , y después se incubaron durante 24 horas. La proteína se extrajo usando un kit de extracción de proteínas, y se realizó una transferencia Western. Después de preparar SDS-PAGE al 12%, se cargaron 15 μg de proteína en la SDS-PAGE preparada, y se transfirieron a una membrana de PVDF. El bloqueo se realizó con disolución de leche desnatada al 5% a temperatura ambiente durante 1 hora. El anticuerpo primario (anticuerpo anti-VEGF, anticuerpo antialfa tubulina) se unió a una concentración de 1/3000 a temperatura ambiente durante 2 horas. Se realizaron tres lavados con PBST durante 10 minutos, y el anticuerpo secundario se unió a una concentración de 1/5000 a temperatura ambiente durante 1 hora. Después de lavar tres veces durante 15 minutos con BST, se realizó la detección.

Como resultado, se encontró que los tres compuestos de la presente invención son similares al minoxidil o presentan un nivel de expresión de VEGF mayor que el minoxidil (ver la figura 7). Dado que los tres compuestos de la presente invención aumentan la expresión de VEGF que desempeña un papel en la función de angiogénesis y expansión, los compuestos de la presente invención pueden ser útiles para prevenir o mejorar la caída del cabello.

<Ejemplo 4> Evaluación del grado de angiogénesis del compuesto de la presente invención

Se colocaron 200 μl de Matrigel en cada pocillo de una placa de 24 pocillos, y se incubaron durante 1 hora. Se colocaron 1×10^5 HUVEC en cada Matrigel. Se añadieron tres compuestos de la presente invención y minoxidil al Matrigel sembrado con células, a una concentración de 5 μM y 50 μM , respectivamente. El VEGF usado como control positivo se trató a una concentración de 50 nM y 100 nM. Después de 6 horas, se observó al microscopio el grado de angiogénesis de HUVEC.

Como resultado, al tratar los tres compuestos de la presente invención, el grado de angiogénesis fue excelente, y especialmente fue superior al del minoxidil, y se formaron vasos sanguíneos en un grado similar al del tratamiento con VEGF (ver la figura 8). Cuando se comparó el grado de angiogénesis en cada grupo experimental con respecto al número de vasos sanguíneos completamente formados dentro de una cierta unidad de área, los tres compuestos de la presente invención mostraron una angiogénesis relativamente buena en comparación con el minoxidil (ver la figura 9).

<Ejemplo 5> Confirmación de si el minoxidil-WINT de la presente invención participa en la translocación de β -catenina, que es una ruta de señalización de WINT, al núcleo

Las células de la papila dérmica del folículo piloso se colocaron en cada pocillo de una placa de 6 pocillos a 1×10^5 células/pocillo. La incubación se realizó en una incubadora de CO_2 durante 24 horas. Después de reemplazar el medio con medio DMEM sin suero, se añadieron respectivamente minoxidil, minoxidil-WINT, y WINT a las células, a una concentración de 5 μM y 50 μM , y después se incubaron durante 24 horas. La proteína se extrajo usando un kit de extracción de proteínas (extracción de cada una de las proteínas nucleares/citoplasmáticas). La transferencia Western se llevó a cabo de la misma manera que en el ejemplo 3-2, excepto que se usaron un anticuerpo anti-beta-catenina, un anticuerpo anti-HDAC, y un anticuerpo antialfa tubulina como anticuerpos primarios.

Como resultado, se confirmó que el minoxidil-WINT, un compuesto de la presente invención, a la misma concentración, muestra una translocación de β -catenina al núcleo, mientras que el minoxidil solo presenta un grado significativamente menor de translocación de β -catenina al núcleo (ver la figura 10). Se encontró que la translocación del minoxidil-WINT al núcleo era al menos 2.8 veces mayor que el minoxidil solo (ver la figura 11). A partir de estos resultados, puede observarse que, dado que el minoxidil-WINT, un compuesto de la presente invención, puede transferir β -catenina, que es una ruta de señalización de WINT, al núcleo, y presenta un mayor grado de translocación de β -catenina al núcleo que el minoxidil, el compuesto de la presente invención se puede usar para promover el crecimiento del cabello o prevenir la caída del cabello.

<Ejemplo 6> Confirmación de si el minoxidil-Nokkin de la presente invención participa en la translocación de fosfo-Smad1/5/8, que es una ruta de señalización de Nokkin, al núcleo

Se confirmó si el minoxidil-Nokkin de la presente invención inhibe la ruta de la señal BMP, que es un factor principal en la caída del cabello, mediante la inhibición de la activación de fosfo-Smad1/5/8 (migración desde el citoplasma al núcleo). El experimento se llevó a cabo de la misma manera que en el ejemplo 5, excepto que en presencia de BMP2, se usa minoxidil-Nokkin en lugar del minoxidil-WINT, y se usaron como anticuerpos primarios un anticuerpo anti-P-Smad1/5/8 y un anticuerpo anti-HDACI.

Como resultado, se confirmó que en el caso del tratamiento con el minoxidil-Nokkin, el suministro de P-Smad1/5/8 al núcleo se redujo en comparación con el tratamiento con el minoxidil, y como la concentración del minoxidil-Nokkin aumentó, P-Smad1/5/8 en el núcleo disminuyó aún más (ver las figuras 12 y 13). A partir de estos resultados, se puede observar que dado que el minoxidil-Nokkin de la presente invención puede bloquear la ruta de la señal BMP hacia la caída del cabello, el minoxidil-Nokkin de la presente invención se puede usar para

promover el crecimiento del cabello o prevenir la caída del cabello.

<Ejemplo 7> Identificación del crecimiento del cabello cuando se trata con el compuesto de la presente invención

5 El minoxidil-Nokkin de la presente invención se aplicó a 6 ratones C57BL machos a las 7 semanas de edad para determinar el grado de crecimiento del pelo. Se depiló el pelo del dorso de ratones C57BL/6 de 7 semanas de edad usando una crema depilatoria. Se añadieron minoxidil y minoxidil-Nokkin a PBS en concentraciones de 100 ug/ml, respectivamente, para preparar una muestra. La muestra se aplicó a la piel dorsal del ratón uniformemente una vez al día. Después de observar si crecía el pelo en la piel dorsal del ratón, se tomaron fotografías desde el punto en el que el color de la piel dorsal cambió a negro. Para el examen histológico, se sacrificaron los ratones, se recogieron las pieles dorsales de los ratones, se fijaron en PFA al 4%, y se embebieron en parafina. El bloque de inclusión se seccionó a 4 µm, se tiñó con H&E, y se observó el folículo piloso.

15 Como resultado, se confirmó que cuando se aplicó el compuesto de la presente invención, la tasa de crecimiento del pelo fue notablemente más rápida que la del grupo de control no tratado con la muestra o el grupo tratado con minoxidil (ver la figura 14). Cuando se examinó el folículo piloso mediante el ensayo de H&E, se confirmó que en el caso del grupo tratado con el compuesto de la presente invención, el folículo piloso estaba ubicado profundamente en la piel, y el número de folículos pilosos era mayor en comparación con el control o el grupo tratado con minoxidil, y el crecimiento y desarrollo de los folículos pilosos se promueven en una forma en la que la raíz del pelo en el folículo piloso crece larga y crece sobre la superficie de la piel (ver la figura 15). A partir de los resultados anteriores, puede observarse que el compuesto de la presente invención puede usarse para promover el crecimiento del cabello o prevenir la caída del cabello.

<Ejemplo de formulación>

Ejemplo 1 de formulación: producto de lavado de belleza emoliente

30 Se preparó un producto de lavado de belleza emoliente que comprende el compuesto de la presente invención preparado en el ejemplo 1-2 anterior y que presenta la siguiente composición según un método de preparación de un producto de lavado de belleza general.

Tabla 3:

Componente	Contenido (% en peso)
Compuesto de la presente invención	2.5
1,3-Butilenglicol	6
Glicerina	4
PEG 1500	1
Hialuronato de sodio	1
Polisorbato 20	0.5
Etanol	8
Antisépticos, agentes colorantes	c.s.
Benzofenona-9	0.05
Perfumes	Trazas
Agua purificada	Resto
Total	100

Ejemplo 2 de formulación 2. Crema nutritiva

40 Se preparó una crema nutritiva que comprende el compuesto de la presente invención preparado en el ejemplo 1-2 anterior y que presenta la siguiente composición según un método de preparación de una crema nutritiva general.

Tabla 4:

Componente	Contenido (% en peso)
Compuesto de la presente invención	2.5
Aceite de espuma de la pradera	3
Alcohol cetearílico	1.5
Ácido esteárico	1.5
Estearato de glicerilo	1.5
Parafina líquida	10
Cera de abejas	2
Polisorbato 60	0.6

Componente	Contenido (% en peso)
Sesquioleato de sorbitán	2.5
Escualano	3
1,3-Butilenglicol	3
Glicerina	5
Trietanolamina	0.5
Acetato de tocoferilo	0.5
Antisépticos, agentes colorantes	c.s.
Perfumes	c.s.
Agua purificada	Resto
Total	100

Ejemplo 3 de formulación. Producto de lavado de belleza nutritivo

5 Se preparó un producto de lavado de belleza nutritivo que comprende el compuesto de la presente invención preparado en el ejemplo 1-2 anterior y que presenta la siguiente composición según un método de preparación de un producto de lavado de belleza general.

Tabla 5:

Componente	Contenido (% en peso)
Compuesto de la presente invención	2.5
1,3-Butilenglicol	4
Glicerina	4
Alcohol cetearílico	0.8
Estearato de glicerilo	1
Trietanolamina	0.13
Acetato de tocoferilo	0.3
Parafina líquida	5
Escualano	3
Aceite de nuez de macadamia	2
Polisorbato 60	1.5
Sesquioleato de sorbitán	0.5
Polímero de carboxivinilo	1
Antisépticos, agentes colorantes	c.s.
Perfumes	c.s.
Agua purificada	Resto
Total	100

10

Ejemplo 4 de Formulación 4. Esencia

Se preparó una esencia que comprende el compuesto de la presente invención preparado en el ejemplo 1-2 anterior y que presenta la siguiente composición según un método de preparación de una esencia general.

15

Tabla 6:

Componente	Contenido (% en peso)
Compuesto de la presente invención	2.5
Glicerina	10
1,3-Butilenglicol	5
PEG 1500	2
Alantoína	0.1
DL-pantenol	0.3
EDTA-2Na	0.02
Hidroxietilcelulosa	0.1
Hialuronato de sodio	8
Polímero de carboxivinilo	0.2
Trietanolamina	0.18
Octildodeceth-16	0.4
Etanol	6
Perfumes, antisépticos, colorantes	c.s.
Agua purificada	Resto

Componente	Contenido (% en peso)
Total	100

Ejemplo 5 de Formulación. Suero capilar

5 Se preparó un suero capilar que comprende el compuesto de la presente invención preparado en el ejemplo 1-2 anterior y que presenta la siguiente composición según un método de preparación de un suero capilar general.

Tabla 7:

Componente	Contenido (% en peso)
Compuesto de la presente invención	1
Glicerina	10
1,3-Butilenglicol	5
PEG 1500	2
Alantoína	0.1
DL-pantenol	0.3
EDTA-2Na	0.02
Hidroxietilcelulosa	0.1
Hialuronato de sodio	8
Polímero de carboxivinilo	0.2
Trietanolamina	0.18
Octildodeceth-16	0.4
Etanol	6
Perfumes, antisépticos, colorantes	c.s.
Agua purificada	Resto
Total	100

10 Ejemplo 6 de formulación. Tónico capilar

Se preparó un tónico capilar que comprende el compuesto de la presente invención preparado en el ejemplo 1-2 anterior y que presenta la siguiente composición según un método de preparación de un tónico capilar general.

15

Tabla 8:

Componente	Contenido (% en peso)
Compuesto de la presente invención	1
Glicerina	2
1,3-Butilenglicol	2
PEG 1500	2
Alantoína	0.1
DL-pantenol	0.3
EDTA-2Na	0.02
Hialuronato de sodio	8
Polímero de carboxivinilo	0.2
Trietanolamina	0.18
Etanol	10
Perfumes, antisépticos, colorantes	c.s.
Agua purificada	Resto
Total	100

LISTADO DE SECUENCIAS

<110> CAREGEN CO., LTD.

5 <120> CONJUGADO DE MINOXIDIL Y PÉPTIDO

<130> 2017-OPA-9196

<150> KR 10-2016-0105707

10 <151> 2016-08-19

<160> 9

<170> KopatentIn 2.0

15 <210> 1
<211> 12
<212> PRT
<213> Secuencia artificial

20 <220>
<223> péptido WINT

<400> 1
Glu Leu Ile Glu His Gly Gly Gly Arg Pro Ala Asp

25 1 5 10

<210> 2
<211> 10
<212> PRT
<213> Secuencia artificial

30 <220>
<223> péptido Keramin2

<400> 2
Tyr Lys Ser Lys Lys Gly Gly Trp Thr His

35 1 5 10

<210> 3
<211> 10
<212> PRT
<213> Secuencia artificial

40 <220>
<223> péptido Nokkin

<400> 3
Arg Gln Thr Arg Val Gln Arg Cys His Cys

45 1 5 10

<210> 4
<211> 21
<212> ADN
<213> Secuencia artificial

50 <220>
<223> VEGF directo

<400> 4
ccatgaactt tctgctgtct t 21

55 <210> 5
<211> 21
<212> ADN

60 <213> Secuencia artificial

<220>
<223> VEGF inverso

ES 2 933 848 T3

<400> 5
tcgatcggtc tgtatcagtc t 21

5 <210> 6
<211> 21
<212> ADN
<213> Secuencia artificial

10 <220>
<223> TGFb1 directo

<400> 6
gccttgata ccaactattg c 21

15 <210> 7
<211> 21
<212> ADN
<213> Secuencia artificial

20 <220>
<223> TGFb1 inverso

<400> 7
tcagcactg caggagtagc g 21

25 <210> 8
<211> 20
<212> ADN
<213> Secuencia artificial

30 <220>
<223> GAPDH directo

35 <400> 8
ggagcctaaa gggatcatc 20

40 <210> 9
<211> 20
<212> ADN
<213> Secuencia artificial

<220>
<223> GAPDH inverso

45 <400> 9
gtgatggcat ggactgtgt 20

REIVINDICACIONES

1. Compuesto que presenta una estructura en la que el minoxidil y un péptido están enlazados covalentemente, en el que
- 5 el péptido consiste en 8 a 15 secuencias de aminoácidos,
- el péptido es un péptido soluble en agua que presenta una relación de aminoácidos que contienen una cadena lateral hidrófila de no menos de 50%, y
- 10 el aminoácido que contiene una cadena lateral hidrófila se selecciona de entre el grupo que consiste en arginina (Arg), histidina (His), lisina (Lys), ácido aspártico (Asp), ácido glutámico (Glu), serina (Ser), treonina (Thr), asparagina (Asn), glutamina (Gln), cisteína (Cys), selenocisteína (Sec), glicina (Gly) y prolina (Pro).
- 15 2. Compuesto según la reivindicación 1, en el que el péptido soluble en agua presenta una relación de aminoácidos que contienen una cadena lateral hidrófila de no menos de 70%.
3. Compuesto según la reivindicación 2, en el que el péptido soluble en agua presenta una relación de aminoácidos que contienen una cadena lateral hidrófila de no menos de 90%.
- 20 4. Compuesto según la reivindicación 1, en el que el péptido soluble en agua presenta 5 o menos aminoácidos que contienen una cadena lateral hidrófoba.
5. Compuesto según la reivindicación 4, en el que el péptido soluble en agua presenta 3 o menos aminoácidos que contienen una cadena lateral hidrófoba.
- 25 6. Compuesto según la reivindicación 4, en el que el aminoácido que contiene una cadena lateral hidrófoba se selecciona de entre el grupo que consiste en alanina (Ala), valina (Val), isoleucina (Ile), leucina (Leu), metionina (Met), fenilalanina (Phe), tirosina (Tyr) y triptófano (Trp).
- 30 7. Compuesto según la reivindicación 1, en el que el péptido se selecciona de entre el grupo que consiste en el péptido Nokkin que consiste en la secuencia de aminoácidos de SEC ID N°: 1; péptido Keramin2 que consiste en la secuencia de aminoácidos de SEC ID N°: 2; y péptido WINT que consiste en la secuencia de aminoácidos de SEC ID N°: 3.
- 35 8. Composición farmacéutica para la utilización en la prevención de la caída del cabello o la promoción del crecimiento del cabello que comprende el compuesto según una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 7.
9. Composición cosmética para la utilización en la prevención de la caída del cabello o la promoción del crecimiento del cabello que comprende el compuesto según una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 7.
- 40 10. Composición cosmética para la utilización según la reivindicación 9, en la que la composición cosmética es una formulación seleccionada de entre el grupo que consiste en producto de lavado de belleza emoliente, producto de lavado de belleza nutritivo, crema nutritiva, crema para masajes, esencia, crema para los ojos, crema limpiadora, espuma limpiadora, agua limpiadora, paquete, spray, polvo, tónico capilar, crema capilar, loción capilar, champú capilar, aclarado capilar, acondicionador capilar, laca capilar, aerosol capilar, pomada, sol-gel, emulsión, aceite, cera, y aerosol.
- 45

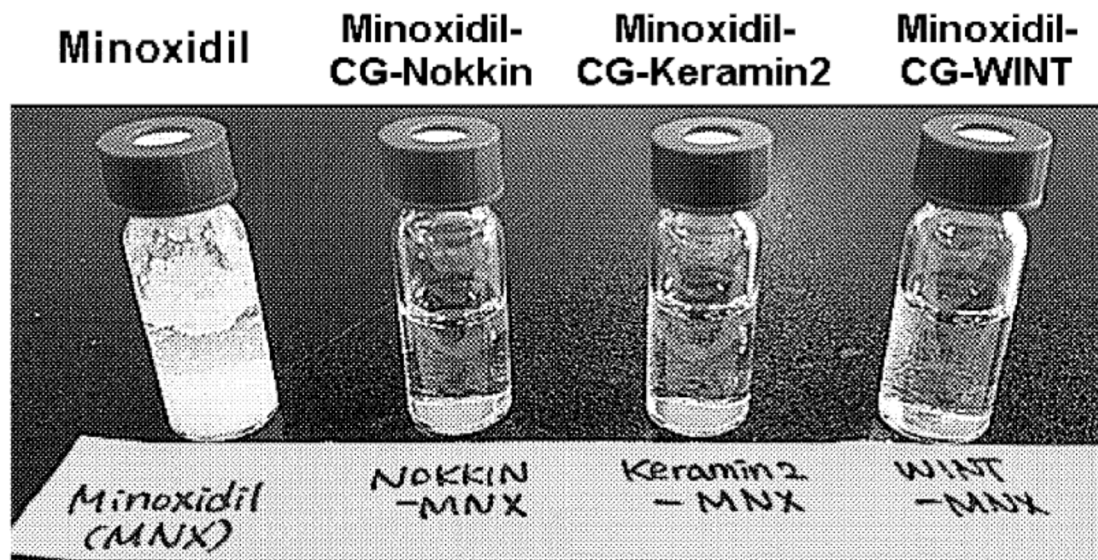


FIG. 1

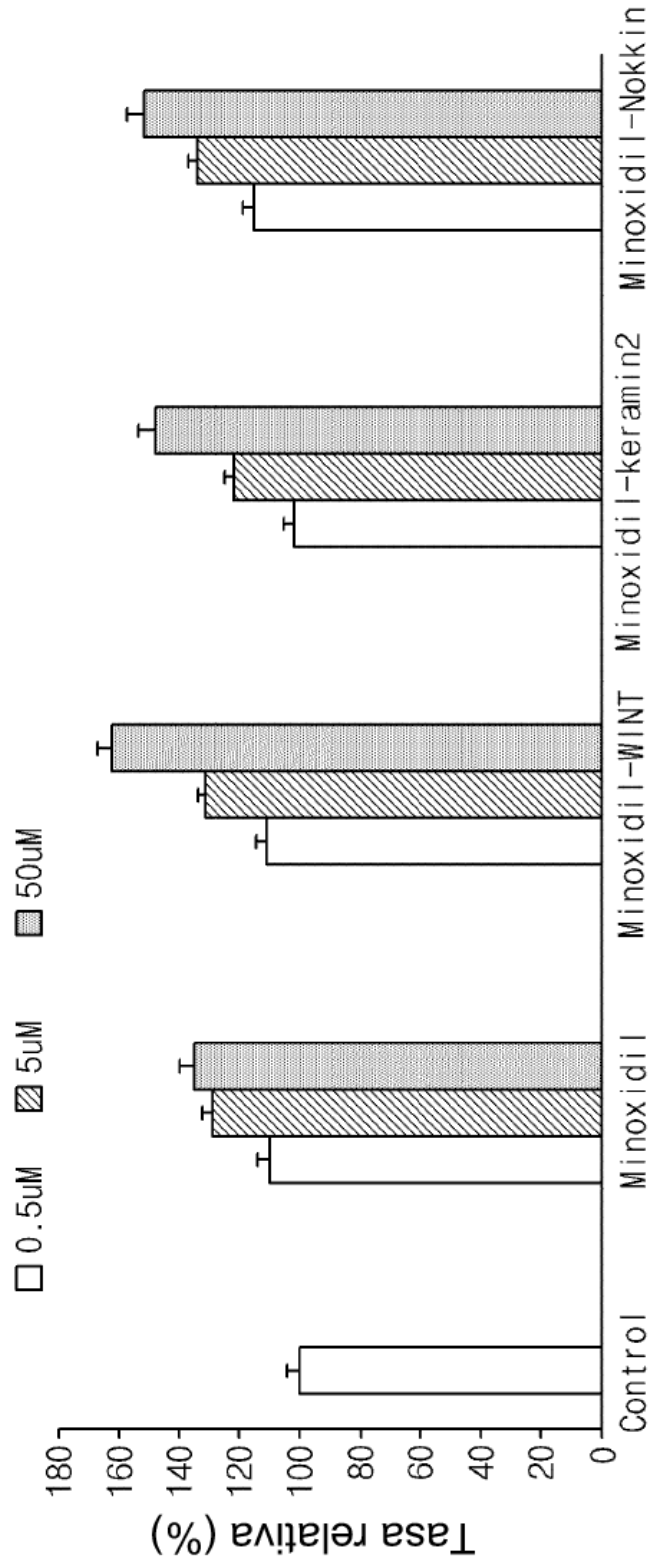


FIG. 2

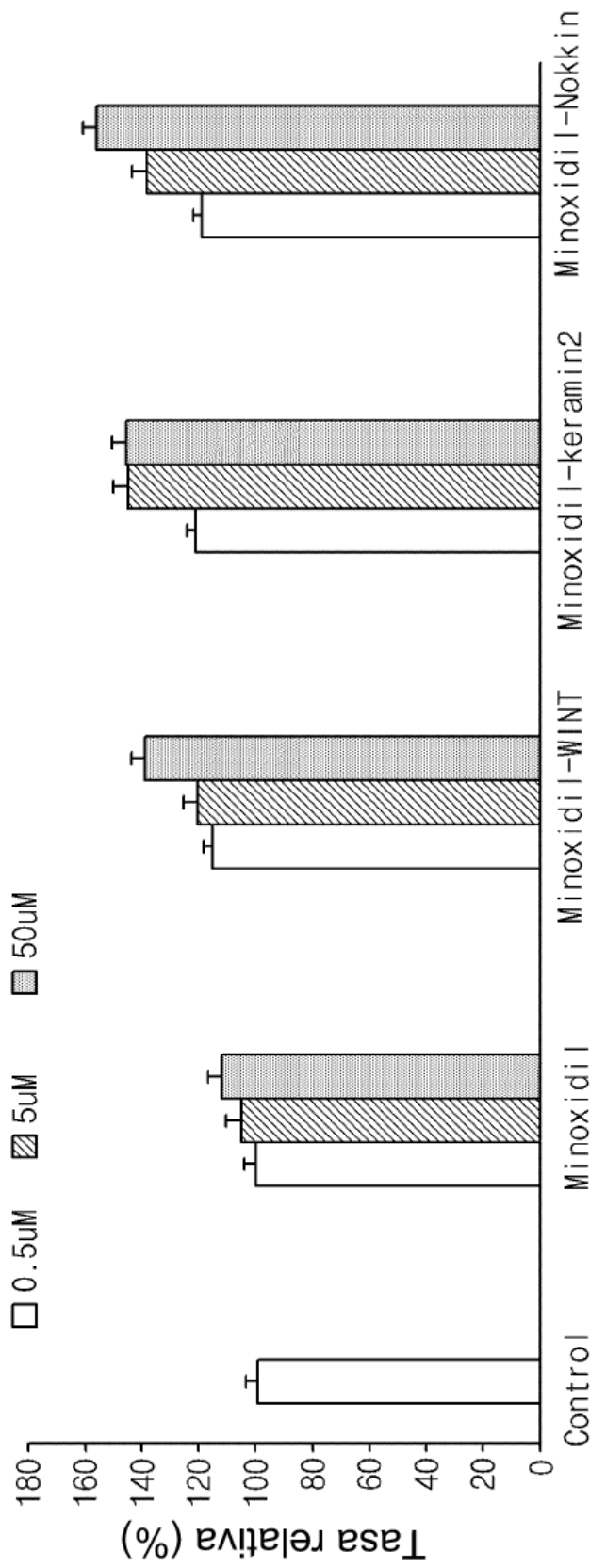


FIG. 3

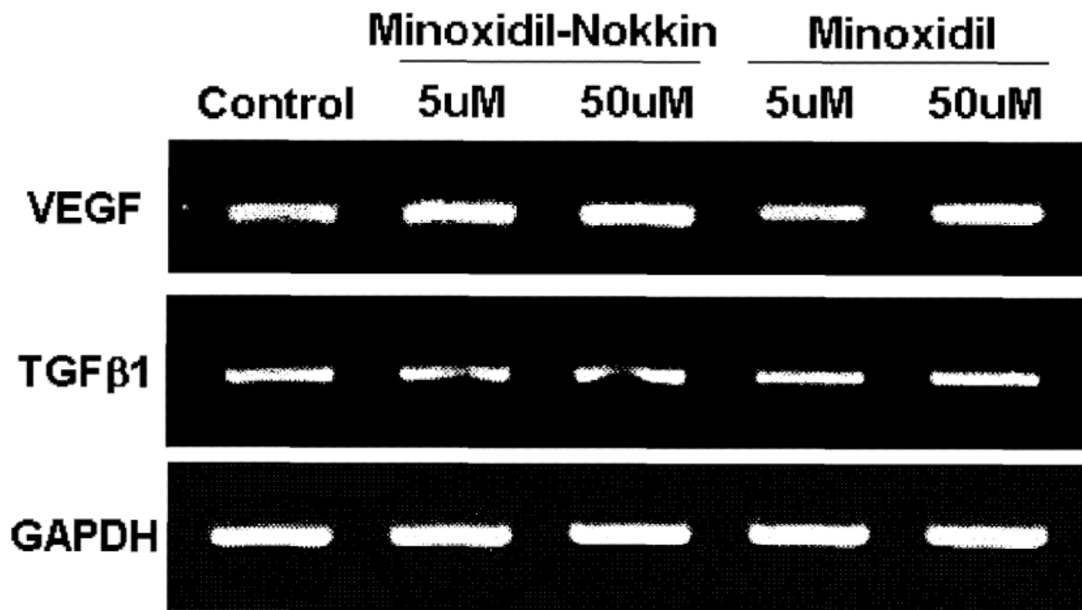


FIG. 4

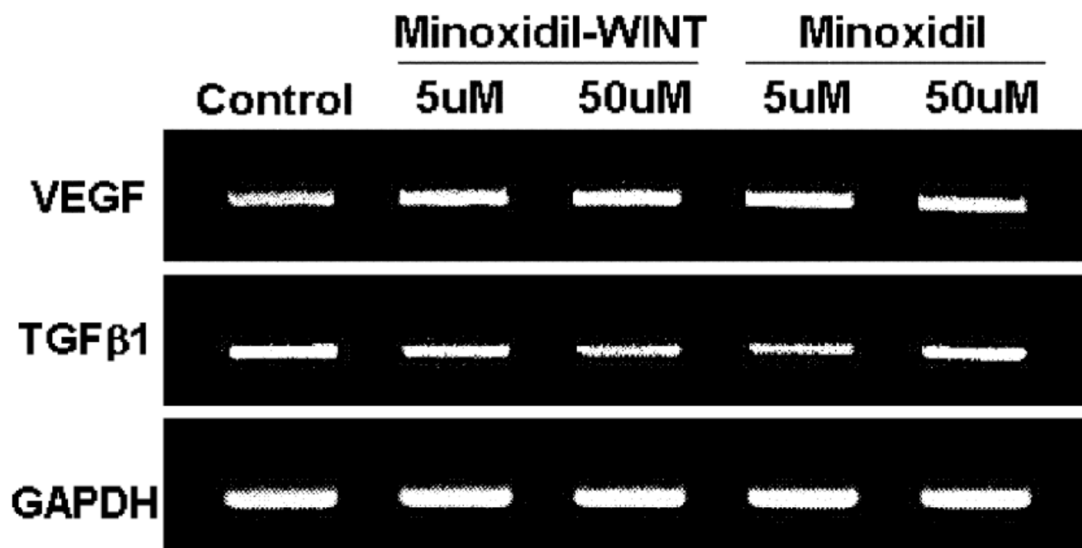


FIG. 5

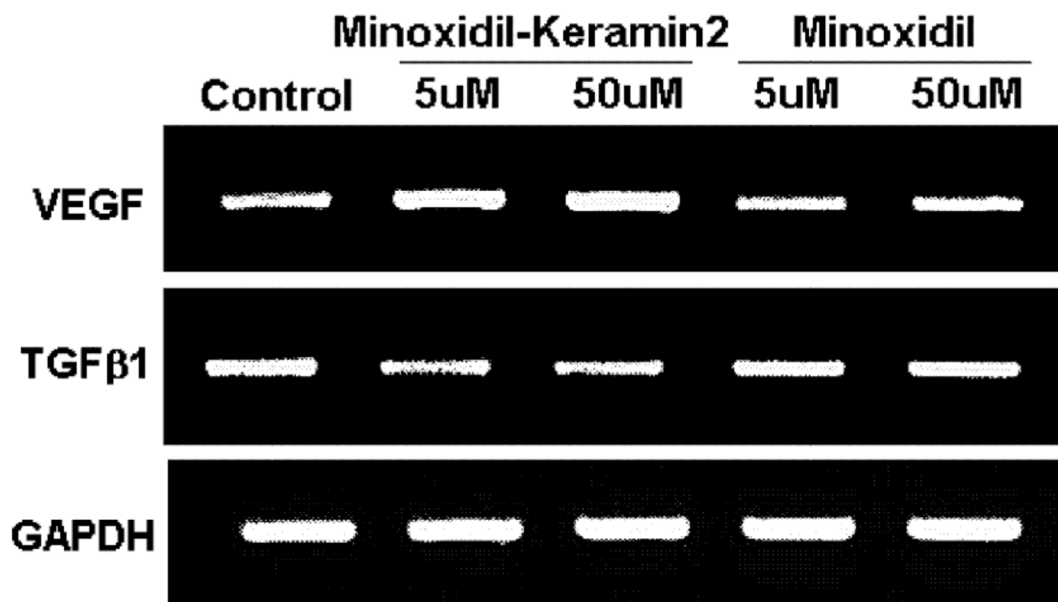


FIG. 6

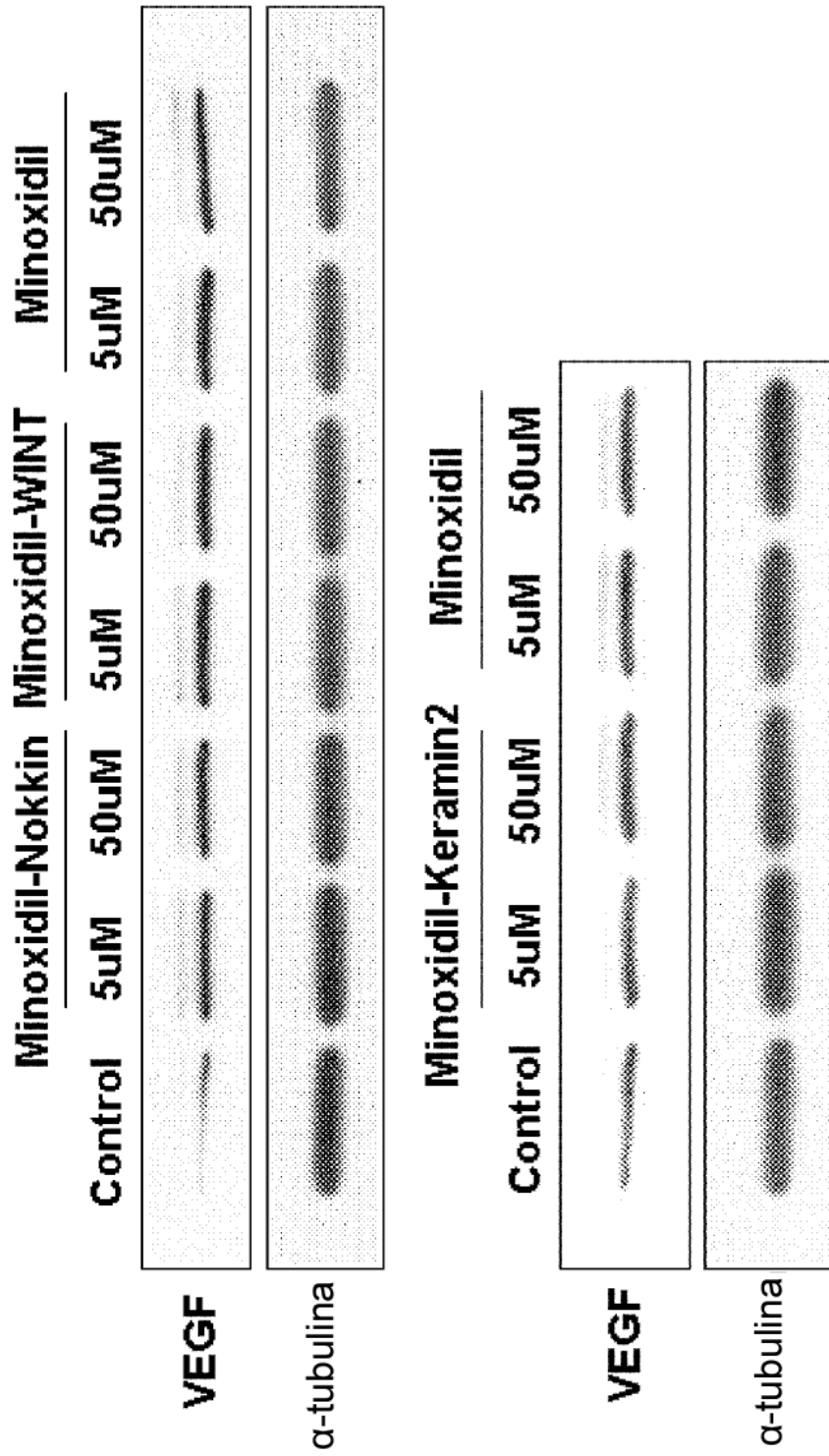


FIG. 7

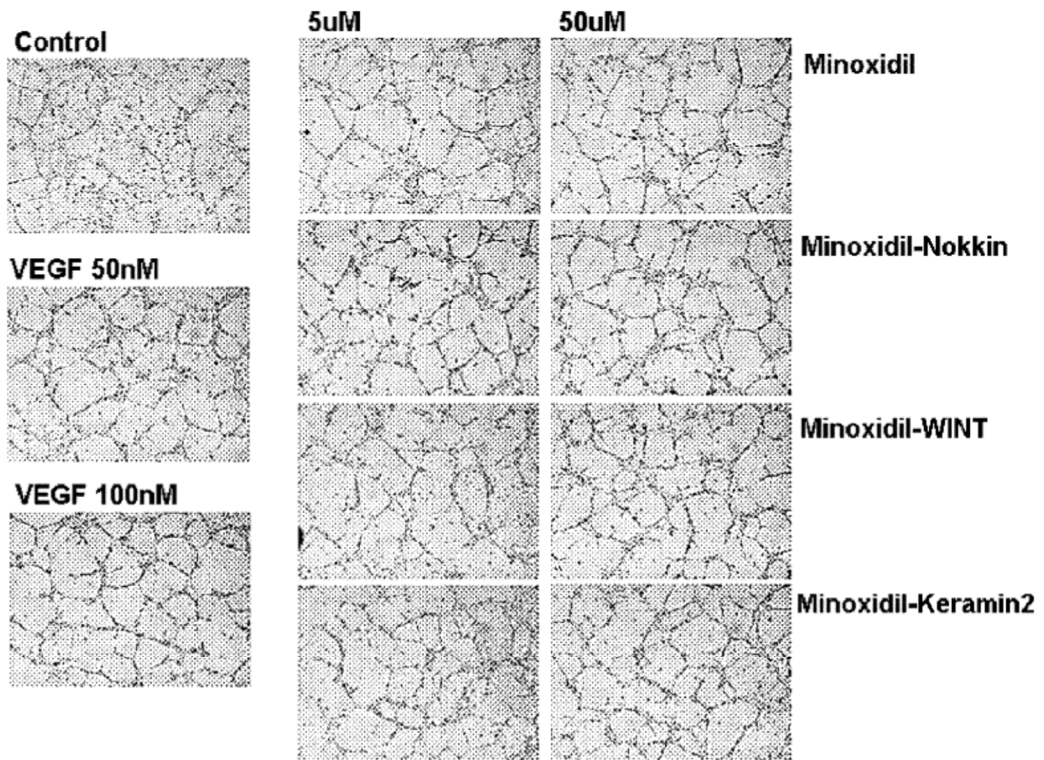


FIG. 8

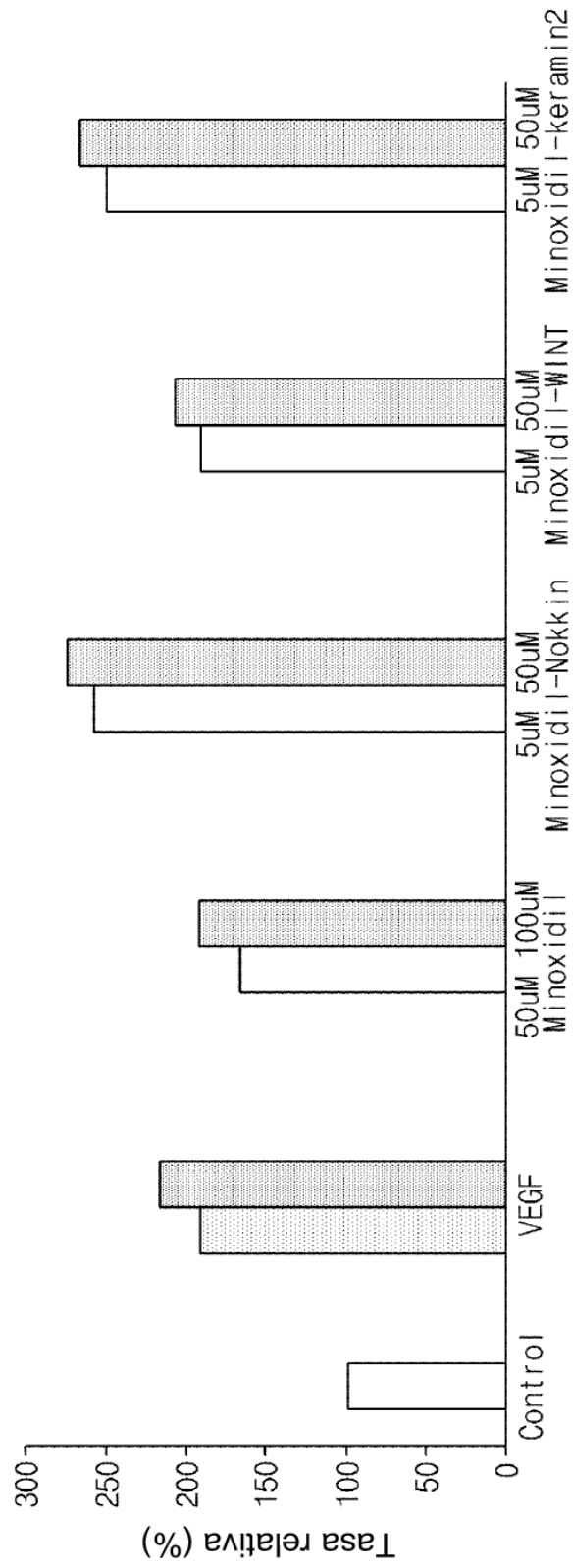


FIG. 9

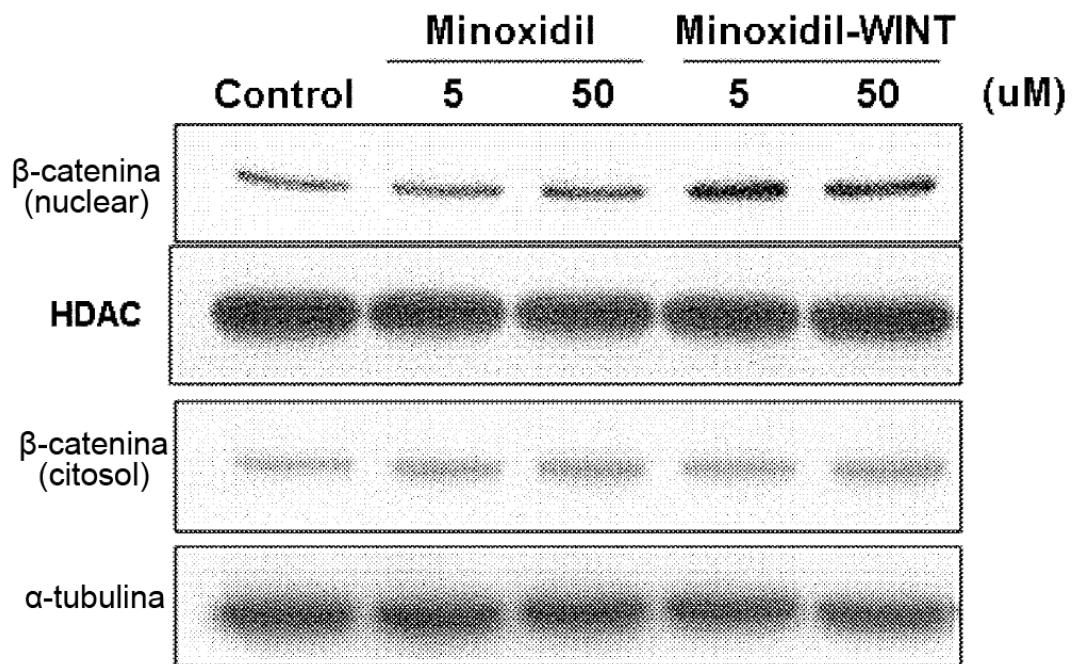


FIG. 10

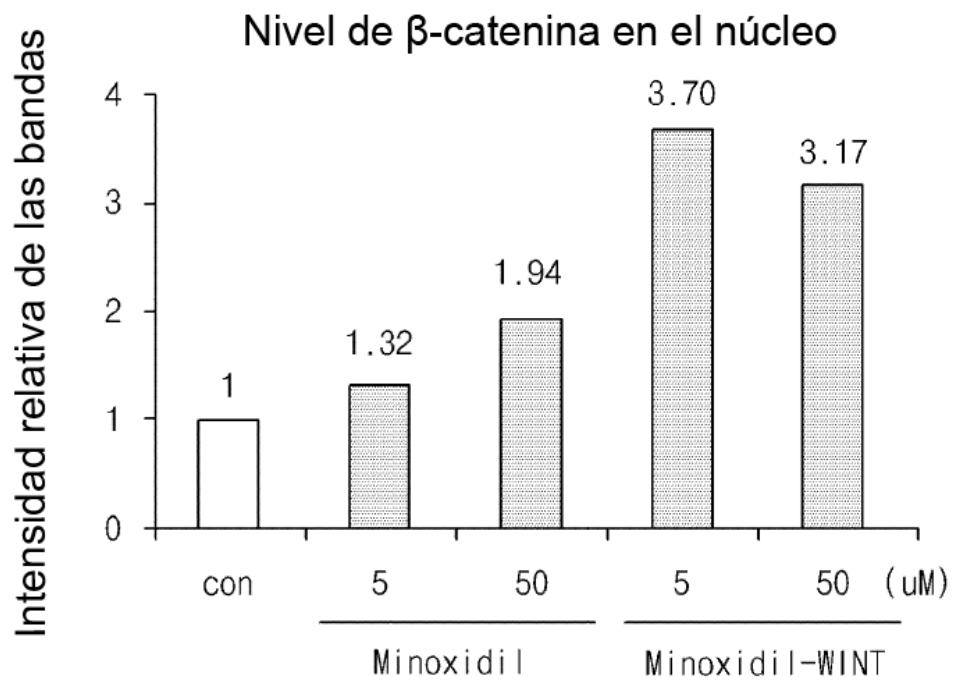


FIG. 11

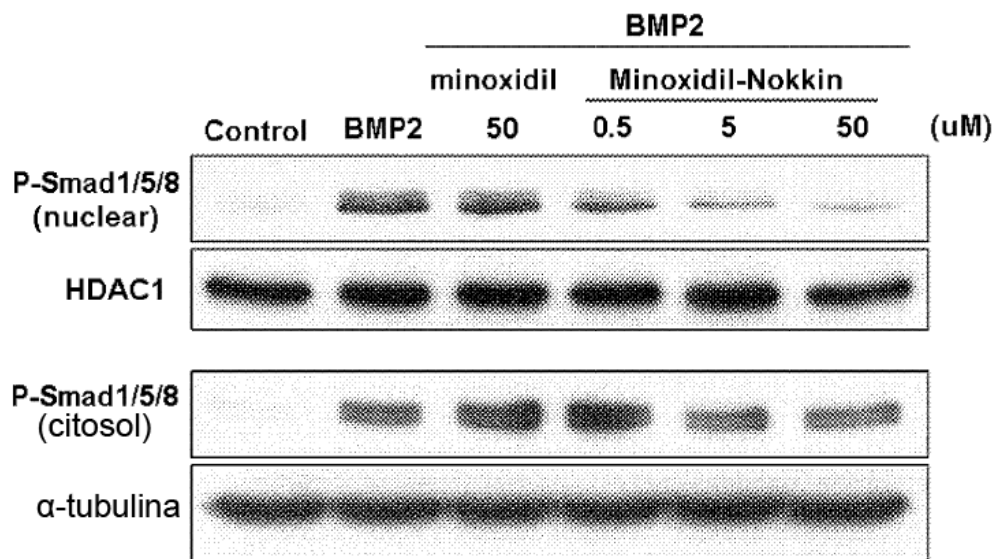


FIG. 12

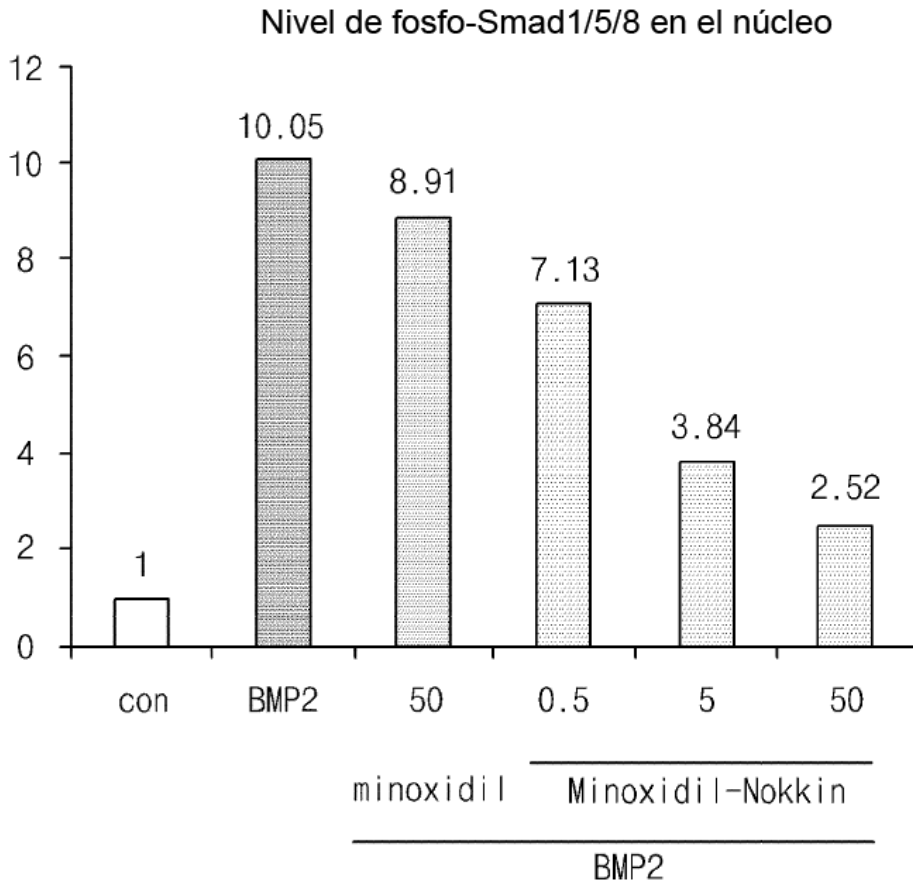


FIG. 13

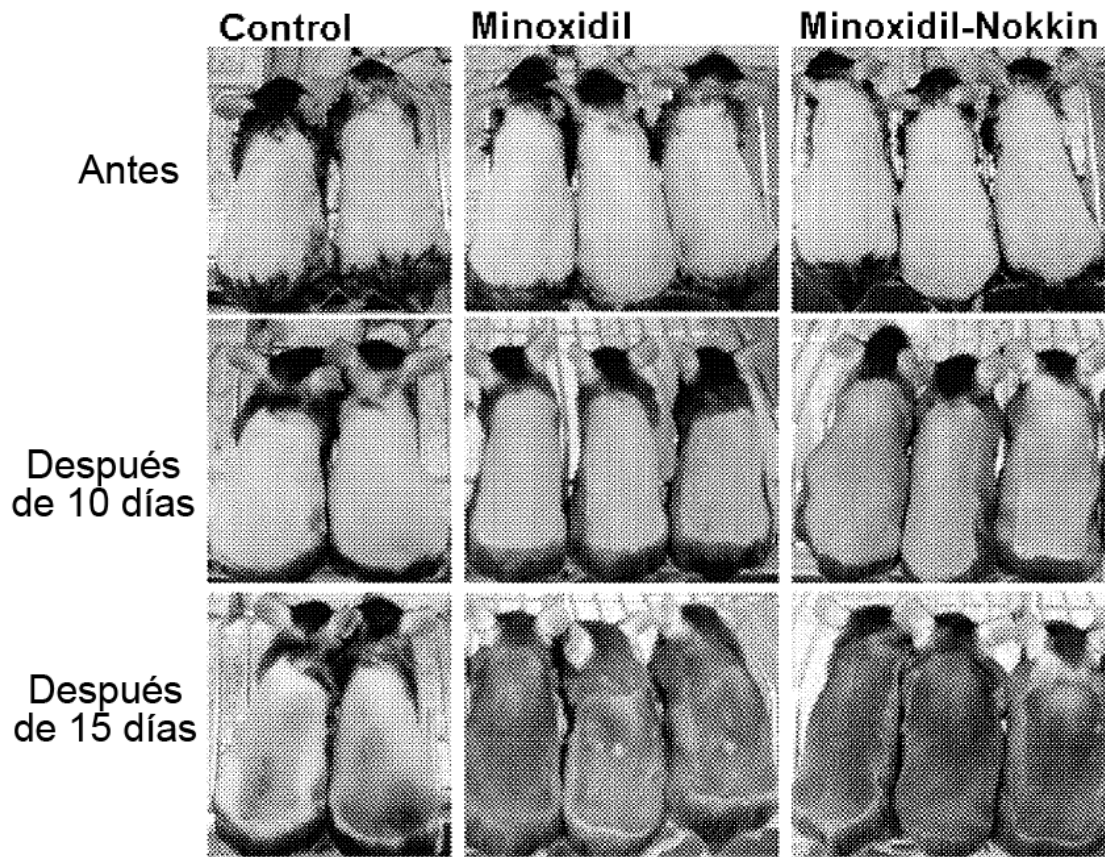


FIG. 14

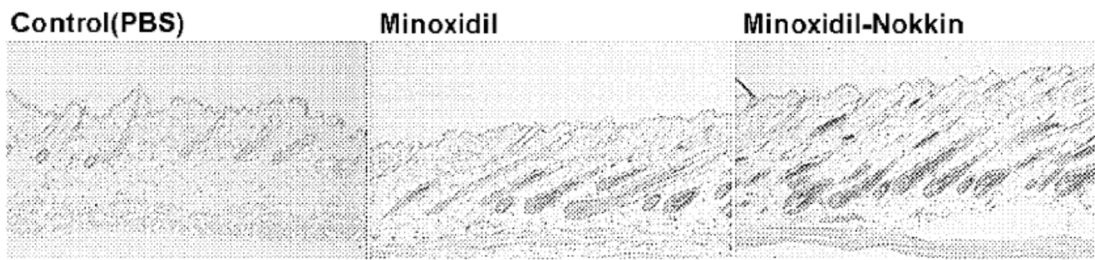


FIG. 15