

19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 939 193**

51 Int. Cl.:

A61K 38/07 (2006.01)
A61K 36/746 (2006.01)
A61K 36/87 (2006.01)
A61K 36/9066 (2006.01)
A61K 38/08 (2009.01)
A61K 36/23 (2006.01)
A61K 36/63 (2006.01)
A61P 17/14 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

- 86 Fecha de presentación y número de la solicitud internacional: **31.03.2017** **PCT/EP2017/057711**
87 Fecha y número de publicación internacional: **19.10.2017** **WO17178250**
96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **31.03.2017** **E 17715116 (4)**
97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **07.12.2022** **EP 3442556**

54 Título: **Péptidos y composiciones farmacéuticas, nutracéuticas o veterinarias para la prevención y/o el tratamiento de la caída del cabello**

30 Prioridad:

11.04.2016 EP 16164645

45 Fecha de publicación y mención en BOPI de la traducción de la patente:
19.04.2023

73 Titular/es:

VYTRUS BIOTECH, S.L. (100.0%)
C. Sant Gaietà, 121, 2°
08221 Terrassa, Barcelona, ES

72 Inventor/es:

EXPÓSITO TARRÉS, OSCAR;
JANÉ FONT, ALBERT;
LAPLANA LASIERRA, SARA;
MAS DUARTE, MARIA;
RUIZ MEDINA, TARIK;
GALLEGO PALACIOS, ANA y
SABATER JARA, ANA BELEN

74 Agente/Representante:

CONTRERAS PÉREZ, Yahel

Observaciones:

Véase nota informativa (Remarks, Remarques o Bemerkungen) en el folleto original publicado por la Oficina Europea de Patentes

ES 2 939 193 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

Péptidos y composiciones farmacéuticas, nutracéuticas o veterinarias para la prevención y/o el tratamiento de la caída del cabello

5

La presente solicitud reivindica el beneficio de la Solicitud de Patente Europea EP16164645 presentada el 11 de abril de 2016.

10 La presente invención se refiere al campo del tratamiento de la caída del cabello por cualquier causa. En particular, se refiere a compuestos y composiciones, particularmente formulaciones tópicas, que comprende los péptidos para mejorar la alopecia y otras enfermedades del cabello.

Antecedentes de la técnica

15 Muchas son las causas de la caída del cabello y se conocen varios tipos de caída del cabello, tales como alopecia areata, alopecia androgénica, alopecia de patrón femenino, etc. Además la pérdida de cabello puede estar relacionada con el síndrome metabólico, debida a la medicación (quimioterapia), una deficiencia de vitaminas o minerales o debida a infecciones fúngicas del cuero cabelludo

20 Minoxidil (3-óxido de 6-piperidin-1-ilpirimidina-2,4-diamina) es uno de los principios activos más usados y conocidos en el tratamiento de la alopecia, en particular de la alopecia androgénica. Los efectos secundarios comunes incluyen ardor o irritación del ojo, picor, enrojecimiento o irritación en el área tratada, así como el crecimiento de vello no deseado en otras partes del cuerpo. Se desveló en la publicación de patente de EE.UU. US4139619 como ingrediente de una composición tópica para aplicación a la piel de mamíferos para aumentar la tasa de crecimiento terminal del vello. La publicación de patente de EE.UU. US4596812 desvela el uso particular de minoxidil en el tratamiento de la alopecia.

La melatonina también se propuso para el tratamiento de la alopecia de patrón femenino androgénica en la publicación de patente de EE.UU. US 6281241, en particular debido a su efecto en la reducción de la tasa telogénica y para el

30

Aparte, también se proponen extractos de plantas con el objetivo de aplicar compuestos más naturales para el tratamiento de la caída del cabello. Como un ejemplo, la publicación de la solicitud de patente WO2007113851 propuso composiciones novedosas para la prevención de la caída del cabello y/o la promoción del crecimiento del cabello, en el cual varios extractos de *Vernonia* sp. se usaron como principios activos contra enfermedades del cabello asociadas al manejo de la alopecia androgénica inducida por testosterona.

35

Otros extractos, ahora de *Curcuma* sp. y su principio activo curcumina, parecía evitar la caída del cabello cuando se administraba junto con resveratrol y otros ingredientes como se deduce de la publicación de la solicitud de patente WO2006087759. La Tabla 1 en el Ejemplo 1 del documento WO2006087759 ilustra que algunos de los pacientes tratados experimentaron crecimiento de cabello en áreas calvas.

40

También principalmente a la curcumina presente en los extractos de *Curcuma* sp., el documento de Pumthong *et al.* "Curcuma aeruginosa, a novel botanically derived 5 α -reductase inhibitor in the treatment of male-pattern baldness: a multicenter, randomized, double-blind, placebo-controlled study", Journal of Dermatological Treatment. -2012; vol. n.º 23, pp.: 385-392, desvela el uso de un extracto de *Curcuma aeruginosa* (extracto de hexano) para el tratamiento de la alopecia androgénica. Aunque se lograron datos significativos con la combinación de minoxidil y el extracto de *Curcuma*, los autores postularon que debido a su papel como inhibidor de la 5 α -reductasa, también se observó un efecto sinérgico debido a la estimulación directa del crecimiento del cabello producido por minoxidil.

50

A pesar de todos estos enfoques desvelados anteriormente para tratar y/o prevenir la caída del cabello, sigue existiendo la necesidad de principios activos alternativos y composiciones que los comprendan para hacer frente a la caída del cabello por cualquier causa. En particular existe una necesidad de principios activos con eficacia probada, con efectos secundarios minimizados o nulos y que puedan fabricarse de forma ambientalmente independiente y

55

Sumario de la invención

Los inventores descubrieron sorprendentemente que los sobrenadantes libres de células resultantes de la eliminación de células enteras en una suspensión de cultivo de células desdiferenciadas vegetales contienen cócteles de compuestos, actuando sinérgicamente junto con otros productos extracelulares contenidos en el sobrenadante con el fin de promover el crecimiento del cabello y la proliferación de células de la papila dérmica del folículo piloso (HFDPC). Por otra parte, probaron que los péptidos contenidos en fracciones peptídicas aisladas de dichos sobrenadantes libres de células, dichos péptidos implicados principalmente en la defensa de las plantas, el crecimiento y el desarrollo

65

dérmica del folículo piloso y proliferación de queratinocitos de la matriz del cabello. Por lo tanto, siendo tanto los péptidos como cualquier fracción de un sobrenadante libre de células que los contenga útiles en el tratamiento de la caída del cabello.

5 Un primer aspecto de la invención es una composición farmacéutica, nutracéutica o veterinaria que comprende:

(a) un péptido de fórmula (I) o una sal farmacéutica o veterinariamente aceptable del mismo, junto con excipientes y/o portadores farmacéuticamente, nutracéuticos o veterinarios aceptables,

(R¹)_(m)-Xaa₁IXaa₂T(Q)_(p)(R²)_(n) (I) (SEQ ID NO: 1)

10 en donde:

R¹ es un radical -C(O)-alquilo (C₁-C₂₀), acilando el residuo N-terminal de la secuencia peptídica;
R² es un radical -NR₄R₅, amidando el residuo C-terminal de la secuencia peptídica, seleccionándose R₄ y R₅ de H y alquilo (C₁-C₃);

15 m, n y p, son números enteros de 0 a 1; y

Xaa₁ y Xaa₂ son residuos de tirosina con el grupo hidroxilo de la cadena lateral del aminoácido opcionalmente reemplazado por un radical -OSO₃R³; seleccionándose R³ de H y alquilo (C₁-C₃) y dicho péptido seleccionado del grupo que consiste en:

20 CH₃-C(O)- Xaa₁IYT-NH₂ (SEQ ID NO: 2), en donde Xaa₁ es un residuo de tirosina con el grupo hidroxilo de la cadena lateral reemplazado por un radical -OSO₃H;

CH₃-C(O)- YIXaa₂T-NH₂ (SEQ ID NO: 3), en donde Xaa₂ es un residuo de tirosina con el grupo hidroxilo de la cadena lateral reemplazado por un radical -OSO₃H;

25 CH₃-C(O)- Xaa₁IYTQ-NH₂ (SEQ ID NO: 4) en donde Xaa₁ es un residuo de tirosina con el grupo hidroxilo de la cadena lateral reemplazado por un radical -OSO₃H;

CH₃-C(O)- YIXaa₂TQ-NH₂ (SEQ ID NO: 5), en donde Xaa₂ es un residuo de tirosina con el grupo hidroxilo de la cadena lateral reemplazado por un radical -OSO₃H;

CH₃-C(O)- YIYT-NH₂ (SEQ ID NO: 6);

CH₃-C(O)- YIYTQ-NH₂ (SEQ ID NO: 7)

30 Xaa₁IYT (SEQ ID NO: 8), en donde Xaa₁ es un residuo de tirosina con el grupo hidroxilo de la cadena lateral reemplazado por un radical -OSO₃H;

YIXaa₂T (SEQ ID NO: 9), en donde Xaa₂ es un residuo de tirosina con el grupo hidroxilo de la cadena lateral reemplazado por un radical -OSO₃H;

35 Xaa₁IYTQ (SEQ ID NO: 10) en donde Xaa₁ es un residuo de tirosina con el grupo hidroxilo de la cadena lateral reemplazado por un radical -OSO₃H;

YIXaa₂TQ (SEQ ID NO: 11), en donde Xaa₂ es un residuo de tirosina con el grupo hidroxilo de la cadena lateral reemplazado por un radical -OSO₃H;

YIYT (SEQ ID NO: 12);

YIYTQ (SEQ ID NO: 13);

40 Xaa₁IXaa₂T (SEQ ID NO: 14), en donde Xaa₁ y Xaa₂ son ambos un residuo de tirosina con el grupo hidroxilo de la cadena lateral reemplazado por un radical -OSO₃H;

Xaa₁IXaa₂TQ (SEQ ID NO: 15), en donde Xaa₁ y Xaa₂ son ambos un residuo de tirosina con el grupo hidroxilo de la cadena lateral reemplazado por un radical -OSO₃H;

CH₃-C(O)- YIYT (SEQ ID NO: 16);

45 CH₃-C(O)- YIYTQ (SEQ ID NO: 17);

YIYT-NH₂ (SEQ ID NO: 18);

YIYTQ-NH₂ (SEQ ID NO: 19);

y mezclas de los mismos; y

50

(b) vitaminas, aminoácidos y sales farmacéutica, nutracéutica o veterinariamente aceptables de hierro, magnesio, cobre y zinc, en donde en la composición la relación en peso de hierro a cobre es de 25:1 a 900:1, de zinc a cobre es de 30:1 a 400:1 y de magnesio a cobre es de 570:1 a 5800:1;

para su uso en la prevención y/o el tratamiento de una pérdida de cabello en una enfermedad que provoca pérdida de cabello.

55

Este aspecto también podría formularse como el uso de una composición farmacéutica, nutracéutica o veterinaria que comprende (a) una secuencia peptídica de fórmula (I) y seleccionada de SEQ ID NO: 2 a SEQ ID NO: 19 o una sal farmacéuticamente, nutracéutica o veterinaria aceptable de las mismas; y (b) vitaminas, aminoácidos y sales farmacéutica, nutracéutica o veterinariamente aceptables de hierro, magnesio, cobre y zinc, en donde en la composición la relación en peso de hierro a cobre es de 25:1 a 900:1, de zinc a cobre es de 30:1 a 400:1 y de magnesio a cobre es de 570:1 a 5800:1 para la preparación de un medicamento para la profilaxis y/o el tratamiento de una pérdida de cabello de mamífero en una enfermedad que provoca pérdida de cabello de mamífero.

65 Como se ilustra en los ejemplos a continuación, los péptidos en la composición del primer aspecto de la invención

proporcionaron un efecto más alto que el minoxidil en términos de proliferación de HFDPC. Las composiciones que los componen, tales como los sobrenadantes libres de células de plantas que previamente apoyaron el crecimiento de un cultivo en suspensión de células vegetales desdiferenciadas, también mostraron efectos iguales o incluso mayores que el minoxidil.

5

Los péptidos de la composición del primer aspecto propuestos para el uso de acuerdo con la invención son compuestos que imitan a la fitosulfocina- β (PSK- β), aislados de medios acondicionados de células vegetales en suspensión (véase Matsubayashi *et al.*, "Phytosulfokine, sulphated peptides that induce the proliferation of single mesophyll cells of *Asparagus officinalis* L.", Proc. Natl. Acad. Sci.- 1996, vol. n.º 93, pp.: 7623-7627). Según el conocimiento del inventor,

10 esta es la primera vez que la fitosulfoquina- β (PSK- β) o un derivado de la fitosulfoquina- β (PSK- β) se propone como un medicamento, en particular como agente para prevenir o tratar la caída del cabello.

Los inventores también han desarrollado composiciones eficaces particulares, en particular, composiciones tópicas para administrarse en el cuero cabelludo o en la calva deseada. Estas composiciones comprenden todos aquellos

15 ingredientes que permiten la proliferación de HFDPC y proporcionan a estas células proliferadas los materiales para permitir el crecimiento del cabello. El crecimiento del cabello se efectúa de esta manera en el cuero cabelludo, pero también en cualquier lugar donde se apliquen las composiciones y donde el cabello esté habitualmente presente, tal como en las pestañas, las cejas y la barba.

20 Por lo tanto, en un segundo aspecto, la invención se refiere a composiciones farmacéuticas, nutracéuticas o veterinarias que comprenden vitaminas, aminoácidos, sales farmacéuticamente, nutracéuticas o veterinarias aceptables de hierro, magnesio, cobre y zinc, junto con excipientes y/o portadores farmacéuticamente, nutracéuticos o veterinarios aceptables, en donde la relación en peso de hierro a cobre es de 25:1 a 900:1, de zinc a cobre es de 30:1 a 400:1 y de magnesio a cobre es de 570:1 a 5800:1;

25 comprendiendo además la composición un péptido, o un sal farmacéuticamente, nutracéutica o veterinaria aceptable del mismo, seleccionándose dicho péptido del grupo que consiste en:

CH₃-C(O)- Xaa₁IYT-NH₂ (SEQ ID NO: 2), en donde Xaa₁ es un residuo de tirosina con el grupo hidroxilo de la cadena lateral reemplazado por un radical -OSO₃H;

30 CH₃-C(O)- YIXaa₂T-NH₂ (SEQ ID NO: 3), en donde Xaa₂ es un residuo de tirosina con el grupo hidroxilo de la cadena lateral reemplazado por un radical -OSO₃H;

CH₃-C(O)- Xaa₁IYTQ-NH₂ (SEQ ID NO: 4) en donde Xaa₁ es un residuo de tirosina con el grupo hidroxilo de la cadena lateral reemplazado por un radical -OSO₃H;

35 CH₃-C(O)- YIXaa₂TQ-NH₂ (SEQ ID NO: 5), en donde Xaa₂ es un residuo de tirosina con el grupo hidroxilo de la cadena lateral reemplazado por un radical -OSO₃H;

CH₃-C(O)- YIYT-NH₂ (SEQ ID NO: 6);

CH₃-C(O)- YIYTQ-NH₂ (SEQ ID NO: 7)

Xaa₁IYT (SEQ ID NO: 8), en donde Xaa₁ es un residuo de tirosina con el grupo hidroxilo de la cadena lateral reemplazado por un radical -OSO₃H;

40 YIXaa₂T (SEQ ID NO: 9), en donde Xaa₂ es un residuo de tirosina con el grupo hidroxilo de la cadena lateral reemplazado por un radical -OSO₃H;

Xaa₁IYTQ (SEQ ID NO: 10) en donde Xaa₁ es un residuo de tirosina con el grupo hidroxilo de la cadena lateral reemplazado por un radical -OSO₃H;

YIXaa₂TQ (SEQ ID NO: 11), en donde Xaa₂ es un residuo de tirosina con el grupo hidroxilo de la cadena lateral

45 reemplazado por un radical -OSO₃H;

YIYT (SEQ ID NO: 12);

YIYTQ (SEQ ID NO: 13);

Xaa₁IXaa₂T (SEQ ID NO: 14), en donde Xaa₁ y Xaa₂ son ambos un residuo de tirosina con el grupo hidroxilo de la cadena lateral reemplazado por un radical -OSO₃H;

50 Xaa₁IXaa₂TQ (SEQ ID NO: 15), en donde Xaa₁ y Xaa₂ son ambos un residuo de tirosina con el grupo hidroxilo de la cadena lateral reemplazado por un radical -OSO₃H;

CH₃-C(O)- YIYT (SEQ ID NO: 16);

CH₃-C(O)- YIYTQ (SEQ ID NO: 17);

YIYT-NH₂ (SEQ ID NO: 18);

55 YIYTQ-NH₂ (SEQ ID NO: 19);

y/o un sobrenadante libre de células de una suspensión de cultivo de células vegetales desdiferenciadas, o una fracción de dicho sobrenadante libre de células, en donde dicho sobrenadante libre de células o dicha fracción comprende péptidos de 4 a 300 aminoácidos de longitud, dichos péptidos seleccionados de factores peptídicos de crecimiento vegetal, factores de transcripción de plantas, factores epigenéticos y mezclas de los mismos,

60 comprendiendo dichos factores peptídicos de crecimiento vegetal el péptido seleccionado del grupo que consiste en cualquiera de SEQ ID NO: 2 a SEQ ID NO: 19 y dicho sobrenadante libre de células o dicha fracción sin tener contenido de células citoplasmáticas de la lisis celular y membranas y/o paredes celulares.

65 Otro aspecto de la invención es el uso en combinación de un péptido seleccionado del grupo que consiste en:

CH₃-C(O)- Xaa₁IYT-NH₂ (SEQ ID NO: 2), en donde Xaa₁ es un residuo de tirosina con el grupo hidroxilo de la cadena lateral reemplazado por un radical -OSO₃H;
 CH₃-C(O)- YIXaa₂T-NH₂ (SEQ ID NO: 3), en donde Xaa₂ es un residuo de tirosina con el grupo hidroxilo de la
 5 cadena lateral reemplazado por un radical -OSO₃H;
 CH₃-C(O)- Xaa₁IYTQ-NH₂ (SEQ ID NO: 4) en donde Xaa₁ es un residuo de tirosina con el grupo hidroxilo de la cadena lateral reemplazado por un radical -OSO₃H;
 CH₃-C(O)- YIXaa₂TQ-NH₂ (SEQ ID NO: 5), en donde Xaa₂ es un residuo de tirosina con el grupo hidroxilo de la
 10 cadena lateral reemplazado por un radical -OSO₃H;
 CH₃-C(O)- YIYT-NH₂ (SEQ ID NO: 6);
 CH₃-C(O)- YIYTQ-NH₂ (SEQ ID NO: 7)
 Xaa₁IYT (SEQ ID NO: 8), en donde Xaa₁ es un residuo de tirosina con el grupo hidroxilo de la cadena lateral reemplazado por un radical -OSO₃H;
 YIXaa₂T (SEQ ID NO: 9), en donde Xaa₂ es un residuo de tirosina con el grupo hidroxilo de la cadena lateral reemplazado por un radical -OSO₃H;
 15 Xaa₁IYTQ (SEQ ID NO: 10) en donde Xaa₁ es un residuo de tirosina con el grupo hidroxilo de la cadena lateral reemplazado por un radical -OSO₃H;
 YIXaa₂TQ (SEQ ID NO: 11), en donde Xaa₂ es un residuo de tirosina con el grupo hidroxilo de la cadena lateral reemplazado por un radical -OSO₃H;
 20 YIYT (SEQ ID NO: 12);
 YIYTQ (SEQ ID NO: 13);
 Xaa₁IXaa₂T (SEQ ID NO: 14), en donde Xaa₁ y Xaa₂ son ambos un residuo de tirosina con el grupo hidroxilo de la cadena lateral reemplazado por un radical -OSO₃H;
 Xaa₁IXaa₂TQ (SEQ ID NO: 15), en donde Xaa₁ y Xaa₂ son ambos un residuo de tirosina con el grupo hidroxilo de
 25 la cadena lateral reemplazado por un radical -OSO₃H;
 CH₃-C(O)- YIYT (SEQ ID NO: 16);
 CH₃-C(O)- YIYTQ (SEQ ID NO: 17);
 YIYT-NH₂ (SEQ ID NO: 18);
 YIYTQ-NH₂ (SEQ ID NO: 19);
 30

o una sal farmacéuticamente, sal nutracéutica o veterinaria aceptable del mismo, o de una composición farmacéutica, nutracéutica o veterinaria que lo comprende; y

de una composición farmacéutica, nutracéutica o veterinaria que comprende vitaminas, aminoácidos o sales farmacéuticamente, nutracéuticas o veterinarias aceptables de los mismos; sales orgánicas o inorgánicas farmacéuticamente, nutracéuticas o veterinarias aceptables de hierro, magnesio, cobre y zinc, junto con excipientes y/o portadores farmacéuticamente, nutracéuticos o veterinarios aceptables, en donde la relación en peso de hierro a cobre es de 25:1 a 900:1, de zinc a cobre es de 30:1 a 400:1 y de magnesio a cobre es de 570:1 a 5800:1;

tales como promotor del crecimiento del cabello y para la proliferación de células de la papila dérmica del folículo piloso.

Breve descripción de los dibujos

La FIG. 1, relacionada con el Ensayo 1, es un gráfico con el índice de proliferación (%) de las células de la papila dérmica del folículo piloso (HFDPC, por sus siglas en inglés), cuando se tratan con varias composiciones. BM Ctrl significa control basal (HFDPC no tratadas), que se le otorga un valor del 100 % del índice de proliferación: FGF significa factor de crecimiento de fibroblastos, VEGF significa factor de crecimiento endotelial vascular, C1 y C2 corresponden a diferentes concentraciones de sobrenadantes libres de células de las especies probadas, como se indica en la Tabla 1, comprendiendo dichos sobrenadantes (también conocidos como medios acondicionados) péptidos de 4 a 300 aminoácidos de longitud. Los nombres de las especies vegetales también se han abreviado como se indica en la Tabla 1. El péptido 4Aa y 5Aa son péptidos de SEQ ID NO: 6 y 7, respectivamente. En el eje Y el índice de proliferación en porcentaje (%).

La FIG. 2, relacionada con el Ensayo 1, es un gráfico con el índice de proliferación (%) de las células de la papila dérmica del folículo piloso (HFDPC), cuando se trata con el péptido 4Aa que lleva varias modificaciones en el extremo terminal. "Ctrl Basal" significa control basal (HFDPC no tratadas), que se le otorga un valor del 100 % del índice de proliferación. C1, C2 y C3 representan diferentes concentraciones de péptidos, correspondiente a 5,86 µg/ml, 2,93 µg/ml y 1,46 µg/ml, respectivamente. La primera columna corresponde al péptido 4Aa en donde ambos extremos están libres (SEQ ID NO: 12); la segunda columna corresponde al péptido 4Aa en donde el extremo N-terminal está acetilado y el extremo C-terminal está libre (SEQ ID NO: 16); la tercera columna corresponde al péptido 4Aa en donde el extremo N-terminal está libre y el extremo C-terminal está amidado (SEQ ID NO: 18); y la cuarta columna corresponde al péptido 4Aa en donde el extremo N-terminal está acetilado y el extremo C-terminal está amidado (SEQ ID NO: 6).

La FIG. 3, relacionada con el Ensayo 1, es un gráfico con el índice de proliferación (%) de las células de la papila dérmica del folículo piloso (HFDPC), cuando se trata con el péptido 5Aa que lleva varias modificaciones en el extremo terminal. "Ctrl Basal" significa control basal (HFDPC no tratadas), que se le otorga un valor del 100 % del índice de proliferación. C1, C2 y C3 representan diferentes concentraciones de péptidos, correspondiente a 5,86 µg/ml, 2,93 µg/ml y 1,46 µg/ml, respectivamente. La primera columna corresponde al péptido 5Aa en donde ambos extremos están libres (SEQ ID NO: 13); la segunda columna corresponde al péptido 5Aa en donde el extremo N-terminal está acetilado y el extremo C-terminal está libre (SEQ ID NO: 17); la tercera columna corresponde al péptido 5Aa en donde el extremo N-terminal está acetilado y el extremo C-terminal está amidado (SEQ ID NO: 7).

La FIG. 4, relacionada con el Ensayo 1, es un cromatograma de HPLC de un sobrenadante libre de células de *Daucus carota* y un péptido de SEQ ID NO: 6. Eje Y, intensidad de los picos, eje X, tiempo de retención (T) en minutos (min).

La FIG. 5, relacionada con el Ensayo 1, es un gráfico que muestra los niveles de expresión de miARN-22 (FIG. 5 (B)) y miARN-31 (FIG. 5 (A) y (C)) en secretomas de HFDPC tratados con el péptido de SEQ ID NO: 6 o bien los sobrenadantes libres de células de *Curcuma longa*.

La FIG. 6, relacionada con el Ensayo 2, es un gráfico con el índice de proliferación (%) de fibroblastos dérmicos capilares (HDF), cuando se trata con el péptido 4Aa que lleva varias modificaciones en el extremo terminal. "Ctrl Basal" significa control basal (HDF no tratadas), que se le otorga un valor del 100 % del índice de proliferación. C1, C2 y C3 representan diferentes concentraciones de péptidos, correspondiente a 25 µg/ml, 12,5 µg/ml y 1,25 µg/ml, respectivamente. La primera columna corresponde al péptido 4Aa en donde ambos extremos están libres (SEQ ID NO: 12); la segunda columna corresponde al péptido 4Aa en donde el extremo N-terminal está acetilado y el extremo C-terminal está libre (SEQ ID NO: 16); la tercera columna corresponde al péptido 4Aa en donde el extremo N-terminal está libre y el extremo C-terminal está amidado (SEQ ID NO: 18); y la cuarta columna corresponde al péptido 4Aa en donde el extremo N-terminal está acetilado y el extremo C-terminal está amidado (SEQ ID NO: 6).

La FIG. 7, relacionada con el Ensayo 2, es un gráfico con el índice de proliferación (%) de fibroblastos dérmicos capilares (HDF), cuando se trata con el péptido 5Aa que lleva varias modificaciones en el extremo terminal. "Ctrl Basal" significa control basal (HDF no tratadas), que se le otorga un valor del 100 % del índice de proliferación. C1, C2 y C3 representan diferentes concentraciones de péptidos, correspondiente a 1,25 µg/ml, 0,63 µg/ml y 0,25 µg/ml, respectivamente. La primera columna corresponde al péptido 5Aa en donde ambos extremos están libres (SEQ ID NO: 13); la segunda columna corresponde al péptido 5Aa en donde el extremo N-terminal está acetilado y el extremo C-terminal está libre (SEQ ID NO: 17); la tercera columna corresponde al péptido 5Aa en donde el extremo N-terminal está libre y el extremo C-terminal está amidado (SEQ ID NO: 19); y la cuarta columna corresponde al péptido 5Aa en donde el extremo N-terminal está acetilado y el extremo C-terminal está amidado (SEQ ID NO: 7).

La FIG. 8 y la FIG. 9, relacionadas con el Ensayo 3, representan imágenes del cuero cabelludo de las partes occipital (A) y frontal (B) y microfotografías de densidad capilar (C) realizadas con Trichoscan® de voluntarios que recibieron el péptido de SEQ ID NO: 6 (FIG. 8) o un sobrenadante libre de células de *Curcuma longa* que comprende péptidos de fórmula (I) (FIG. 9).

La FIG. 10, relacionada con el Ensayo 4, es un gráfico con el índice de proliferación (%) de las células de la papila dérmica del folículo piloso (HFDPC), cuando se trata con una composición fortificante a diferentes concentraciones. "Ctrl Basal" significa control basal (HDFPC no tratadas), que se le otorga un valor del 100 % del índice de proliferación.

La FIG. 11, relacionada con el Ensayo 4, es un gráfico con el índice de proliferación (%) de fibroblastos dérmicos capilares (HDF), cuando se trata con una composición fortificante a diferentes concentraciones. "Ctrl Basal" significa control basal (HDF no tratadas), que se le otorga un valor del 100 % del índice de proliferación.

La FIG. 12, relacionada con el Ensayo 4, es un gráfico con el índice de proliferación (%) de queratinocitos humanos inmortalizados (HaCat), cuando se trata con una composición fortificante a diferentes concentraciones. "Ctrl Basal" significa control basal (HDFPC no tratadas), que se le otorga un valor del 100 % del índice de proliferación.

La FIG. 13, relacionada con el Ensayo 4, es un gráfico con el índice de proliferación (%) de las células de la papila dérmica del folículo piloso (HFDPC), cuando se trata con una composición fortificante diferente de la de la FIG. 10 y 12, a diferentes concentraciones. "Ctrl Basal" significa control basal (HDFPC no tratadas), que se le otorga un valor del 100 % del índice de proliferación.

La FIG. 14, relacionada con el Ensayo 4, es un gráfico con el índice de proliferación (%) de fibroblastos dérmicos capilares (HDF), cuando se trata con la composición fortificante como en la FIG. 13 a diferentes concentraciones.

"Ctrl Basal" significa control basal (HDF no tratadas), que se le otorga un valor del 100 % del índice de proliferación.

- 5 La FIG. 15, relacionada con el Ensayo 4, es un gráfico con el índice de proliferación (%) de queratinocitos humanos inmortalizados (HaCat), cuando se trata con la composición fortificante como en la FIG. 13 a diferentes concentraciones. "Ctrl Basal" significa control basal (HDFPC no tratadas), que se le otorga un valor del 100 % del índice de proliferación.
- 10 La FIG. 16, relacionada con el Ensayo 5, es un gráfico con el índice de proliferación (%) de fibroblastos dérmicos humanos (HDF), cuando se tratan con un péptido 4Aa de fórmula (I), con una composición fortificante o con una combinación de ambos. "Ctrl Basal" significa control basal (HDF no tratadas), que se le otorga un valor del 100 % del índice de proliferación.
- 15 La FIG. 17, relacionada con el Ensayo 6 (Ejemplo de referencia), es un gráfico que representa el potencial de curación de heridas de los fibroblastos dérmicos del cabello (HDF) tratados con el péptido 4Aa que lleva diversas modificaciones de sulfatación. "Ctrl Basal" significa control basal y consiste en HDF tratadas con FBS al 0,1 %. Se representan dos controles positivos, tratados con FBS al 10 % o bien TGF- β 1 (15 ng/ml). El péptido 4AaS1 consiste en una versión modificada del péptido 4Aa, que lleva un radical -OSO₃H en la primera tirosina del péptido (SEQ ID NO: 2); y el péptido 4AaS2 consiste en una versión modificada del péptido 4Aa, que lleva un radical -OSO₃H en la segunda tirosina del péptido (SEQ ID NO: 3).
- 20

Descripción detallada de la invención

25 Todos los términos y expresiones usados en esta solicitud, a menos que se indique de otro modo, se entenderán en su significado habitual como se conoce en la técnica. Otras definiciones más específicas para determinados términos y expresiones usados en la presente solicitud son las que se establecen a continuación y pretenden aplicarse de manera uniforme a lo largo de la memoria descriptiva y de las reivindicaciones a menos que una definición expresamente establecida de otra manera proporcione una definición más amplia.

30 Por "pérdida de cabello de mamífero en una enfermedad que provoca pérdida de cabello" se entenderá que el cabello se pierde o se cambia con una frecuencia superior a la asociada a la salud o la renovación convencional del cabello, o que el cabello se debilita o no vuelve a crecer después de haberse caído, diciéndose "pérdida de cabello" provocada por algún trastorno o enfermedad, cuyo síntoma o consecuencia es que la cantidad de cabello en un área en particular está disminuida o la cantidad de cabello en un área en particular es un cabello débil. La "pérdida de cabello" también

35 puede deberse a cualquier otra circunstancia, tales como los efectos secundarios de la medicación. En particular las causas, las enfermedades o los trastornos que provocan la caída del cabello se entenderá que comprenden: alopecia (es decir, alopecia androgénica, alopecia androgénica de patrón femenino, alopecia areata, alopecia estacional, alopecia difusa, relacionada con el síndrome metabólico), medicación (es decir, quimioterapia), hipotricosis, deficiencia de vitaminas o minerales, tricotilomanía, hipotiroidismo, cabello fuertemente tirado, infecciones fúngicas del cuero cabelludo, pérdida de cabello debido a procesos técnicos (debido a tratamientos capilares estresantes, tales como tinción), fragilidad del cabello y menopausia y combinaciones de los mismos.

40

Como se usa en el presente documento, la expresión "sal farmacéuticamente, nutracéutica o veterinaria aceptable" se refiere a aquellas sales que son, dentro del alcance del buen criterio médico, adecuadas para su uso en contacto

45 con los tejidos de seres humanos o animales inferiores sin excesiva toxicidad, irritación, respuesta alérgica y similares y que son acordes con una relación beneficio/riesgo razonable. Las sales farmacéuticamente aceptables son bien conocidas en la técnica. Son ejemplos de sales de adición de ácidos no tóxicas farmacéuticamente aceptables las sales de un grupo amino formadas con ácidos inorgánicos, tales como ácido clorhídrico, ácido bromhídrico, ácido fosfórico, ácido sulfúrico y ácido perclórico o con ácidos orgánicos tales como ácido acético, ácido trifluoroacético,

50 ácido oxálico, ácido maleico, ácido tartárico, ácido cítrico, ácido succínico o ácido malónico o usando otros métodos usados en la técnica tales como intercambio iónico. Otras sales farmacéuticamente aceptables incluyen sales de adipato, alginato, ascorbato, aspartato, bencenosulfonato, benzoato, bisulfato, borato, butirato, alcanforato, alcanforsulfonato, citrato, ciclopentanopropionato, digluconato, dodecilsulfato, etanosulfonato, formiato, fumarato, glucoheptonato, glicerofosfato, gluconato, hemisulfato, heptanoato, hexanoato, yodhidrato, 2-hidroxi-etanosulfonato,

55 lactobionato, lactato, laurato, lauril sulfato, malato, maleato, malonato, metanosulfonato, 2-naftalenosulfonato, nicotinato, nitrato, oleato, oxalato, palmitato, pamoato, pectinato, persulfato, 3-fenilpropionato, fosfato, picrato, pivalato, propionato, estearato, succinato, sulfato, tartrato, tiocianato, p-toluenosulfonato, undecanoato, valerato y similares. Las sales derivadas de bases apropiadas incluyen metal alcalino, metal alcalinotérreo y amonio. Las sales de metales alcalinos o alcalinotérreos representativas incluyen sodio, litio, potasio, calcio, magnesio y similares. Las sales

60 farmacéuticamente aceptables adicionales incluyen, cuando sea apropiado, amonio no tóxico, amonio cuaternario y cationes de amina formados usando contraiones tales como haluro, hidróxido, carboxilato, sulfato, fosfato, nitrato, sulfonato de alquilo inferior y sulfonato de arilo.

Las "composiciones nutracéuticas" son composiciones comestibles que incluyen suplementos dietéticos, soluciones

65 de rehidratación oral (SRO), aditivos alimentarios, cereales para bebés y fórmulas infantiles. Los suplementos

dietéticos pretenden suministrar nutrientes, (vitaminas, minerales, ácidos grasos o aminoácidos) que faltan o no se consumen en cantidad suficiente en la dieta de una persona (bebés, mujeres embarazadas, personas mayores, etc.).

La expresión "cantidad farmacéuticamente, nutracéutica o veterinaria eficaz" como se usa en el presente documento, significa una cantidad de un principio activo lo suficientemente alta como para suministrar el beneficio deseado, pero lo suficientemente baja para evitar efectos secundarios graves dentro del alcance del criterio médico o veterinario.

La expresión alquilo (C_1-C_3) se refiere a una cadena de alquilo lineal o ramificada saturada que tiene de 1 a 3 átomos de carbono. Son ejemplos ilustrativos no limitantes: metilo, etilo, propilo e isopropilo.

La expresión radical $-C(O)$ -alquilo (C_1-C_{20}), se refiere a una cadena de ácido alcanoilo lineal o ramificada saturada que tiene de 2 a 21 átomos de carbono. Son ejemplos ilustrativos no limitantes: acetilo, propanoilo, isopropanoilo, butanoilo, isobutanoilo, sec-butanoilo, *terc*-butanoilo, n-pentanoilo, neo-pentanoilo, n-hexanoilo, n-miristoilo (o n-tetradecanoilo) y n-palmitoilo (o n-hexadecanoilo). Los radicales $-C(O)$ -alquilo (C_1-C_{20}) particulares en la presente invención son acetilo, n-miristoilo (o n-tetradecanoilo) y n-palmitoilo (o n-hexadecanoilo).

El término "aminoácido" que constituye las secuencias peptídicas se refiere a una molécula que contiene tanto un grupo amino como un grupo carboxilo. En determinadas realizaciones, un aminoácido es un alfa aminoácido. Los aminoácidos adecuados incluyen, sin limitación, alfa-aminoácidos naturales tales como L-isómeros de los 20 alfa-aminoácidos de origen natural comunes. Los aminoácidos usados en la construcción de péptidos de la presente invención pueden prepararse mediante síntesis orgánica u obtenerse por otras vías, tales como, por ejemplo, degradación o aislamiento de una fuente natural.

Cuando en la presente invención se indica que los residuos de tirosina son unos en los cuales su grupo hidroxilo de cadena lateral se ha reemplazado por un radical $-OSO_3R^3$; seleccionándose R^3 de H y alquilo (C_1-C_3), debe entenderse que engloba aquellas tirosinas sulfatadas ($-OSO_3H$) y sus sales farmacéuticamente aceptables (debido al equilibrio iónico con contraiones). La sulfatación de tirosina es una modificación postraducciona natural donde se añade un grupo sulfato a un residuo de tirosina de una molécula de proteína. La sulfatación está catalizada por la tirosilproteína sulfotransferasa (TPST) en el aparato de Golgi. La reacción catalizada por TPST es una transferencia de sulfato del donante de sulfato universal 3'-fosfoadenosina-5'-fosfosulfato (PAPS) al grupo hidroxilo de la cadena lateral de un residuo de tirosina. En péptidos sintéticos con tirosinas sulfatadas, pueden emplearse reacciones enzimáticas, así como reacciones químicas de sulfatación ampliamente conocidas por el experto.

La expresión "sobrenadante libre de células que previamente apoyó el crecimiento de un cultivo en suspensión de células vegetales desdiferenciadas" se refiere únicamente al líquido que contenía las células vegetales desdiferenciadas durante el crecimiento o cultivo en suspensión en un medio de cultivo y para cualquier fin (producción de metabolitos secundarios, producción de biomasa, etc.). El sobrenadante libre de células no contiene el contenido de citoplasma liberado por la lisis de las células vegetales, así como cualquier parte de la célula vegetal resultante de la disrupción de la misma (fragmentos de membrana, fragmentos de pared celular, etc.). El sobrenadante libre de células comprende entre los ingredientes del medio de cultivo inicial que no han sido consumidos, también aquellos compuestos secretados por las células vegetales al medio extracelular. Entre estos compuestos se encuentran los factores peptídicos de crecimiento vegetal, factores de transcripción y factores epigenéticos. El sobrenadante libre de células también se denomina medio nutritivo acondicionado o medio acondicionado o medio celular acondicionado (usado aquí de manera intercambiable). Cuando se dice que los sobrenadantes libres de células son "*sin tener contenido celular citoplasmático procedente de la lisis celular y sin tener membranas y/o paredes celulares*" debe entenderse que puede estar presente trazas de algunas membranas y/o paredes celulares, y componentes citoplasmáticos (componentes nucleicos, orgánulos, etc.) debido a la ruptura espontánea de células aisladas que ocurre ocasionalmente durante el proceso de cultivo.

En una realización particular los péptidos de fórmula (I) en la composición del primer aspecto para su uso en la prevención y/o el tratamiento de la pérdida de cabello en una enfermedad que provoca pérdida de cabello en mamíferos son aquellos en los que m y n son 1 y p es de 0 a 1. Más en particular m y n son 1 y p es de 0 a 1 y R^1 es un radical $-C(O)-CH_3$, R^2 es un radical $-NH_2$ y R^3 es hidrógeno (H).

Estos péptidos son $CH_3-C(O)-Xaa_1IYT-NH_2$ (SEQ ID NO: 2), en donde Xaa_1 es un residuo de tirosina con el grupo hidroxilo de la cadena lateral reemplazado por un radical $-OSO_3H$;

$CH_3-C(O)-YIXaa_2T-NH_2$ (SEQ ID NO: 3), en donde Xaa_2 es un residuo de tirosina con el grupo hidroxilo de la cadena lateral reemplazado por un radical $-OSO_3H$;

$CH_3-C(O)-Xaa_1IYTQ-NH_2$ (SEQ ID NO: 4) en donde Xaa_1 es un residuo de tirosina con el grupo hidroxilo de la cadena lateral reemplazado por un radical $-OSO_3H$;

$CH_3-C(O)-YIXaa_2TQ-NH_2$ (SEQ ID NO: 5), en donde Xaa_2 es un residuo de tirosina con el grupo hidroxilo de la cadena lateral reemplazado por un radical $-OSO_3H$;

$CH_3-C(O)-YIYT-NH_2$ (SEQ ID NO: 6); y

$CH_3-C(O)-YIYTQ-NH_2$ (SEQ ID NO: 7).

En una realización particular adicional los péptidos de fórmula (I) en la composición del primer aspecto para su uso en la prevención y/o el tratamiento de la pérdida de cabello en una enfermedad que provoca pérdida de cabello en mamíferos son aquellos en donde m es 1, n es 0 y p r es de 0 a 1 y R¹ es un radical -C(O)-CH₃ y R³ es H. Estos
5 péptidos de fórmula (I) son CH₃-C(O)- YIYT (SEQ ID NO: 16); y CH₃-C(O)-YIYTQ (SEQ ID NO: 17).

En una realización particular adicional los péptidos de fórmula (I) en la composición del primer aspecto para su uso en la prevención y/o el tratamiento de la pérdida de cabello en una enfermedad que provoca pérdida de cabello en mamíferos son aquellos en donde m es 0, n es 1 y p es de 0 a 1, R² es un radical -NH₂ y R³ es H. Estos péptidos de
10 fórmula (I) son YIYT-NH₂ (SEQ ID NO: 18); e YIYTQ-NH₂ (SEQ ID NO: 19).

También en una realización particular adicional los péptidos de fórmula (I) en la composición del primer aspecto para su uso en la prevención y/o el tratamiento de la pérdida de cabello en una enfermedad que provoca pérdida de cabello en mamíferos son aquellos en donde m y n son ambos 0 y p es de 0 a 1. Estos péptidos de fórmula (I) son Xaa₁IYT
15 (SEQ ID NO: 8), en donde Xaa₁ es un residuo de tirosina con el grupo hidroxilo de la cadena lateral reemplazado por un radical -OSO₃H; YIXaa₂T (SEQ ID NO: 9), en donde Xaa₂ es un residuo de tirosina con el grupo hidroxilo de la cadena lateral reemplazado por un radical -OSO₃H; Xaa₁IYTQ (SEQ ID NO: 10) en donde Xaa₁ es un residuo de tirosina con el grupo hidroxilo de la cadena lateral reemplazado por un radical -OSO₃H; YIXaa₂TQ (SEQ ID NO: 11),
20 en donde Xaa₂ es un residuo de tirosina con el grupo hidroxilo de la cadena lateral reemplazado por un radical -OSO₃H; YIYT (SEQ ID NO: 12); YIYTQ (SEQ ID NO: 13); Xaa₁IXaa₂T (SEQ ID NO: 14), en donde Xaa₁ y Xaa₂ son ambos un residuo de tirosina con el grupo hidroxilo de la cadena lateral reemplazado por un radical -OSO₃H; y Xaa₁IXaa₂TQ (SEQ ID NO: 15), en donde Xaa₁ y Xaa₂ son ambos un residuo de tirosina con el grupo hidroxilo de la cadena lateral reemplazado por un radical -OSO₃H

25 En otras determinadas realizaciones, opcionalmente en combinación con cualquier realización anterior o posterior, los péptidos en la composición del primer aspecto para su uso de acuerdo con la invención se seleccionan del grupo que consiste en:

CH₃-C(O)- Xaa₁IYT-NH₂ (SEQ ID NO: 2), en donde Xaa₁ es un residuo de tirosina con el grupo hidroxilo de la
30 cadena lateral reemplazado por un radical -OSO₃H;
CH₃-C(O)- YIXaa₂T-NH₂ (SEQ ID NO: 3), en donde Xaa₂ es un residuo de tirosina con el grupo hidroxilo de la cadena lateral reemplazado por un radical -OSO₃H;
CH₃-C(O)- Xaa₁IYTQ-NH₂ (SEQ ID NO: 4) en donde Xaa₁ es un residuo de tirosina con el grupo hidroxilo de la
35 cadena lateral reemplazado por un radical -OSO₃H;
CH₃-C(O)- YIXaa₂TQ-NH₂ (SEQ ID NO: 5), en donde Xaa₂ es un residuo de tirosina con el grupo hidroxilo de la cadena lateral reemplazado por un radical -OSO₃H;
CH₃-C(O)- YIYT-NH₂ (SEQ ID NO: 6);
CH₃-C(O)- YIYTQ-NH₂ (SEQ ID NO: 7);
Xaa₁IYT (SEQ ID NO: 8), en donde Xaa₁ es un residuo de tirosina con el grupo hidroxilo de la cadena lateral
40 reemplazado por un radical -OSO₃H;
YIXaa₂T (SEQ ID NO: 9), en donde Xaa₂ es un residuo de tirosina con el grupo hidroxilo de la cadena lateral reemplazado por un radical -OSO₃H;
Xaa₁IYTQ (SEQ ID NO: 10) en donde Xaa₁ es un residuo de tirosina con el grupo hidroxilo de la cadena lateral reemplazado por un radical -OSO₃H;
YIXaa₂TQ (SEQ ID NO: 11), en donde Xaa₂ es un residuo de tirosina con el grupo hidroxilo de la cadena lateral
45 reemplazado por un radical -OSO₃H;
YIYT (SEQ ID NO: 12);
YIYTQ (SEQ ID NO: 13);
Xaa₁IXaa₂T (SEQ ID NO: 14), en donde Xaa₁ y Xaa₂ son ambos un residuo de tirosina con el grupo hidroxilo de la
50 cadena lateral reemplazado por un radical -OSO₃H;
Xaa₁IXaa₂TQ (SEQ ID NO: 15), en donde Xaa₁ y Xaa₂ son ambos un residuo de tirosina con el grupo hidroxilo de la cadena lateral reemplazado por un radical -OSO₃H;
CH₃-C(O)- YIYT (SEQ ID NO: 16);
CH₃-C(O)- YIYTQ (SEQ ID NO: 17);
55 YIYT-NH₂ (SEQ ID NO: 18);
YIYTQ-NH₂ (SEQ ID NO: 19);

y mezclas de los mismos.

60 En una realización más particular, los péptidos en la composición del primer aspecto se seleccionan del grupo que consiste en:

CH₃-C(O)- YIYT-NH₂ (SEQ ID NO: 6);
CH₃-C(O)- YIYTQ-NH₂ (SEQ ID NO: 7);
65 Xaa₁IYT (SEQ ID NO: 8), en donde Xaa₁ es un residuo de tirosina con el grupo hidroxilo de la cadena lateral

reemplazado por un radical $-\text{OSO}_3\text{H}$;

YIXaa_2T (SEQ ID NO: 9), en donde Xaa_2 es un residuo de tirosina con el grupo hidroxilo de la cadena lateral reemplazado por un radical $-\text{OSO}_3\text{H}$;

YIYT (SEQ ID NO: 12);

5 YIYTQ (SEQ ID NO: 13);

$\text{Xaa}_1\text{IXaa}_2\text{T}$ (SEQ ID NO: 14), en donde Xaa_1 y Xaa_2 son ambos un residuo de tirosina con el grupo hidroxilo de la cadena lateral reemplazado por un radical $-\text{OSO}_3\text{H}$;

$\text{Xaa}_1\text{IXaa}_2\text{TQ}$ (SEQ ID NO: 15), en donde Xaa_1 y Xaa_2 son ambos un residuo de tirosina con el grupo hidroxilo de la cadena lateral reemplazado por un radical $-\text{OSO}_3\text{H}$;

10

y mezclas de los mismos.

Todos estos péptidos de fórmula (I) se formulan en las composiciones farmacéuticas, nutracéuticas o veterinarias, en donde son uno de los principios activos contra la caída del cabello.

15

Quando se formulan en las composiciones farmacéuticas, nutracéuticas o veterinarias, los péptidos de fórmula (I) pueden estar, en una realización particular, convenientemente protegido contra proteasas y/o preparados para penetrar en las células. Los agentes que facilitan la administración del péptido de la invención a través de una membrana celular sin afectar negativamente la capacidad del péptido para promover la proliferación celular y el crecimiento del cabello incluyen péptidos penetrantes fusionados o unidos a los mismos; liposomas; y nanopartículas (1-300 nm).

20

En una realización particular del primer aspecto, las composiciones para el uso previsto son composiciones tópicas que se aplican sobre el cuero cabelludo y/o las regiones calvas. Las composiciones tópicas particulares se seleccionan del grupo que consiste en soluciones, cremas, lociones, pomadas, emulsiones, aerosoles y pulverizados sin aerosol, geles, pomadas y suspensiones, todas ellas composiciones aclarables y no aclarables. Por lo tanto, el crecimiento del cabello se efectúa en cualquier lugar donde se aplican las composiciones y donde el cabello suele estar presente, tal como en las pestañas, las cejas, el cuero cabelludo y la barba.

25

30 Como se indica las composiciones farmacéuticas, nutracéuticas o veterinarias para el uso propuesto comprenden vitaminas, aminoácidos, sales orgánicas o inorgánicas farmacéuticamente o veterinarias aceptables de hierro, magnesio, cobre y zinc.

Estas composiciones que comprenden las vitaminas, las sales metálicas y los aminoácidos, proporcionan a la zona tratada o a la zona de aplicación la mezcla de nutrientes celulares (como una composición de refuerzo) que permiten que las células de la papila y la matriz de la papila (queratinocitos) formen o produzcan cabello nuevo.

35

En una realización más particular las composiciones farmacéuticas, nutracéuticas o veterinarias para el uso propuesto de acuerdo con el primer aspecto comprenden las vitaminas seleccionadas del grupo que consiste en vitamina C, vitamina B1, vitamina B3, vitamina B5, vitamina B6, vitamina B2, biotina (que es la vitamina B8 soluble en agua), vitamina B9, mioinositol y mezclas de los mismos.

40

En otra realización también más particular, las composiciones farmacéuticas, nutracéuticas o veterinarias para el uso propuesto de acuerdo con el primer aspecto comprenden aminoácidos, o sales de los mismos, seleccionados del grupo que consiste en ácido glutámico, fenilalanina, glicina, metionina, prolina, cisteína y mezclas de los mismos. En otra realización particular los hidrolizados de proteínas, más en particular hidrolizados de caseína, están comprendidos en el mismo.

45

En la composición farmacéutica, nutracéutica o veterinaria para su uso como se indica anteriormente, la relación en peso de hierro a cobre es de 25:1 a 900:1, de zinc a cobre es de 30:1 a 400:1 y de magnesio a cobre es de 570:1 a 5800:1. La relación en peso entre los elementos se refiere al peso del elemento en la formulación. En otra realización más particular, en combinación con las realizaciones anteriores o siguientes, la relación en peso de hierro a cobre es de 700:1 a 900:1, de zinc a cobre es de 300:1 a 400:1 y de magnesio a cobre es de 2300:1 a 5800:1. Las relaciones de peso particulares de todos los elementos como Fe/Cu/Zn/Mg son: 868/1/307/5730; y 25/1/307/2856.

50

En aún otra realización también más particular, las composiciones farmacéuticas, nutracéuticas o veterinarias para el uso propuesto comprenden como las sales aceptables de hierro, magnesio, cobre y zinc las sales inorgánicas seleccionadas del grupo que consiste en sulfato de hierro, sulfato de cobre, sulfato de zinc, sulfato de magnesio y mezclas de los mismos.

55

En otra realización particular, la composición farmacéutica, nutracéutica o veterinaria para su uso como se indica anteriormente, comprende un péptido de fórmula (I) que es un péptido seleccionado de cualquiera de SEQ ID NO: 2 a SEQ ID NO: 19 o una sal farmacéuticamente o veterinaria aceptable del mismo, vitamina C, vitamina B1, vitamina B2, vitamina B3, vitamina B5, vitamina B6, vitamina B8, vitamina B9, glicina, metionina, fenilalanina, prolina, cisteína, ácido glutámico, sulfato de zinc, sulfato de cobre, sulfato de magnesio y sulfato de hierro junto con excipientes y/o

60

65

portadores farmacéuticamente, nutracéuticos o veterinarios aceptables.

En una realización particular de la composición farmacéutica, nutracéutica o veterinaria para su uso como se describe anteriormente en el primer aspecto y también opcionalmente en combinación con cualquier realización anterior o posterior, el péptido de fórmula (I) se proporciona en la composición como un ingrediente comprendido en, o de un sobrenadante libre de células que previamente soportó el crecimiento de un cultivo en suspensión de células vegetales desdiferenciadas, o una fracción de dicho sobrenadante libre de células, en donde dicho sobrenadante libre de células o dicha fracción comprende péptidos de 4 a 300 aminoácidos de longitud, dichos péptidos seleccionados de factores peptídicos de crecimiento vegetal, factores de transcripción de plantas, factores epigenéticos y mezclas de los mismos y dicho sobrenadante libre de células o dicha fracción sin contenido celular citoplasmático procedente de la lisis celular y membranas y/o paredes celulares.

Muchos de estos sobrenadantes libres de células o fracciones de los mismos están disponibles en el mercado.

15 También pueden obtenerse genéricamente por un método que comprende:

- (a) cultivar células vegetales desdiferenciadas a partir de un callo friable en un medio de cultivo nutritivo líquido de 5 a 15 días, para obtener un medio acondicionado que soporte el crecimiento de las células vegetales desdiferenciadas;
- 20 (b) eliminar células vegetales enteras del medio acondicionado sin lisar las células, para obtener un sobrenadante libre de células que comprende péptidos de 4 a 300 aminoácidos de longitud; y
- (c) opcionalmente llevar a cabo un proceso de separación de proteínas mediante una técnica de separación seleccionada del grupo consistente en cromatografía, filtración, ultrafiltración, precipitación de proteínas y combinaciones de los mismos, para obtener una fracción del sobrenadante libre de células.

25 En otra realización particular, la composición farmacéutica, nutracéutica o veterinaria para su uso como se propone anteriormente en el primer aspecto, comprende el péptido de fórmula (I) proporcionado en la composición como un ingrediente de un sobrenadante libre de células de una suspensión de cultivo de células vegetales desdiferenciadas de una planta seleccionada del grupo que consiste en *Daucus carota*, *Centella asiatica*, *Sarcocapnos crassifolia*, *Curcuma longa*, *Vitis vinifera*, *Lithops pseudotruncatella*, *Morinda citrifolia* y *Olea europaea*.

30 En efecto, estos sobrenadantes libres de células o fracciones de los mismos que comprenden péptidos de 4 a 300 aminoácidos de longitud pueden ser la fuente natural de los péptidos de fórmula (I), que en los ejemplos se demuestran como altamente activos.

35 En otra realización particular del primer aspecto la composición farmacéutica, nutracéutica o veterinaria, es para uso en la prevención y/o el tratamiento de la pérdida de cabello en mamíferos (en particular, pérdida de cabello en seres humanos) en una enfermedad o trastorno que provoca pérdida de cabello en mamíferos seleccionado de alopecia, medicación (en particular, quimioterapia), hipotricosis, deficiencia de vitaminas o minerales, tricotilomanía, hipotiroidismo, cabello fuertemente tirado, infecciones fúngicas del cuero cabelludo, pérdida de cabello debida a procesos técnicos, fragilidad del cabello, menopausia y combinaciones de los mismos.

45 En otra realización particular, la composición farmacéutica, nutracéutica o veterinaria del primer aspecto, son para su uso en la prevención y/o el tratamiento de la pérdida de cabello en mamíferos del cuero cabelludo, la barba, las pestañas y las cejas. Esto significa que también se usan para promover el crecimiento del cabello en la barba, para alargar las pestañas y para aumentar la densidad del cabello en el área de las cejas.

50 En particular, las composiciones del primer aspecto son para su uso en la prevención y/o el tratamiento de alopecia seleccionada de alopecia androgénica, alopecia androgénica de patrón femenino, alopecia areata, alopecia estacional, alopecia difusa, alopecia relacionada con el síndrome metabólico.

55 De acuerdo con el segundo aspecto, la invención se refiere a composiciones farmacéuticas, nutracéuticas o veterinarias que comprenden vitaminas, aminoácidos, sales orgánicas o inorgánicas farmacéuticamente, nutracéuticas o veterinarias aceptables de hierro, magnesio, cobre y zinc, junto con excipientes y/o portadores farmacéuticamente, nutracéuticos o veterinarios aceptables,

en donde la relación en peso de hierro a cobre es de 25:1 a 900:1, de zinc a cobre es de 30:1 a 400:1 y de magnesio a cobre es de 570:1 a 5800:1;

60 comprendiendo además la composición un péptido, o un sal farmacéuticamente, nutracéutica o veterinaria aceptable del mismo, seleccionándose dicho péptido del grupo que consiste en:

65 $\text{CH}_3\text{-C(O)-Xaa}_1\text{IYT-NH}_2$ (SEQ ID NO: 2), en donde Xaa_1 es un residuo de tirosina con el grupo hidroxilo de la cadena lateral reemplazado por un radical $-\text{OSO}_3\text{H}$;

$\text{CH}_3\text{-C(O)-YIXaa}_2\text{T-NH}_2$ (SEQ ID NO: 3), en donde Xaa_2 es un residuo de tirosina con el grupo hidroxilo de la

cadena lateral reemplazado por un radical $-\text{OSO}_3\text{H}$;
 $\text{CH}_3\text{-C(O)- Xaa}_1\text{IYTQ-NH}_2$ (SEQ ID NO: 4) en donde Xaa_1 es un residuo de tirosina con el grupo hidroxilo de la
 cadena lateral reemplazado por un radical $-\text{OSO}_3\text{H}$;
 $\text{CH}_3\text{-C(O)- YIXaa}_2\text{TQ-NH}_2$ (SEQ ID NO: 5), en donde Xaa_2 es un residuo de tirosina con el grupo hidroxilo de
 5 la cadena lateral reemplazado por un radical $-\text{OSO}_3\text{H}$;
 $\text{CH}_3\text{-C(O)- YIYT-NH}_2$ (SEQ ID NO: 6);
 $\text{CH}_3\text{-C(O)- YIYTQ-NH}_2$ (SEQ ID NO: 7)
 Xaa_1IYT (SEQ ID NO: 8), en donde Xaa_1 es un residuo de tirosina con el grupo hidroxilo de la cadena lateral
 reemplazado por un radical $-\text{OSO}_3\text{H}$;
 10 YIXaa_2T (SEQ ID NO: 9), en donde Xaa_2 es un residuo de tirosina con el grupo hidroxilo de la cadena lateral
 reemplazado por un radical $-\text{OSO}_3\text{H}$;
 Xaa_1IYTQ (SEQ ID NO: 10) en donde Xaa_1 es un residuo de tirosina con el grupo hidroxilo de la cadena lateral
 reemplazado por un radical $-\text{OSO}_3\text{H}$;
 YIXaa_2TQ (SEQ ID NO: 11), en donde Xaa_2 es un residuo de tirosina con el grupo hidroxilo de la cadena lateral
 15 reemplazado por un radical $-\text{OSO}_3\text{H}$;
 YIYT (SEQ ID NO: 12);
 YIYTQ (SEQ ID NO: 13);
 $\text{Xaa}_1\text{IXaa}_2\text{T}$ (SEQ ID NO: 14), en donde Xaa_1 y Xaa_2 son ambos un residuo de tirosina con el grupo hidroxilo
 de la cadena lateral reemplazado por un radical $-\text{OSO}_3\text{H}$;
 20 $\text{Xaa}_1\text{IXaa}_2\text{TQ}$ (SEQ ID NO: 15), en donde Xaa_1 y Xaa_2 son ambos un residuo de tirosina con el grupo hidroxilo
 de la cadena lateral reemplazado por un radical $-\text{OSO}_3\text{H}$;
 $\text{CH}_3\text{-C(O)- YIYT}$ (SEQ ID NO: 16);
 $\text{CH}_3\text{-C(O)- YIYTQ}$ (SEQ ID NO: 17);
 YIYT-NH_2 (SEQ ID NO: 18);
 25 YIYTQ-NH_2 (SEQ ID NO: 19);

y/o un sobrenadante libre de células de una suspensión de cultivo de células vegetales desdiferenciadas, o una
 fracción de dicho sobrenadante libre de células, en donde dicho sobrenadante libre de células o dicha fracción
 comprende péptidos de 4 a 300 aminoácidos de longitud, dichos péptidos seleccionados de factores peptídicos de
 30 crecimiento vegetal, factores de transcripción de plantas, factores epigenéticos y mezclas de los mismos,
 comprendiendo dichos factores peptídicos de crecimiento vegetal el péptido seleccionado del grupo que consiste
 en cualquiera de SEQ ID NO: 2 a SEQ ID NO: 19 y dicho sobrenadante libre de células o dicha fracción sin tener
 contenido de células citoplasmáticas de la lisis celular y membranas y/o paredes celulares.

35 La invención se refiere, en particular, también a nuevas composiciones farmacéuticas o veterinarias tópicas que
 comprenden vitaminas, aminoácidos, sales orgánicas o inorgánicas farmacéuticamente aceptables de hierro,
 magnesio, cobre y zinc, junto con excipientes y/o portadores farmacéuticamente o veterinarios aceptables,

40 en donde la relación en peso de hierro a cobre es de 25:1 a 900:1, de zinc a cobre es de 30:1 a 400:1 y de magnesio
 a cobre es de 570:1 a 5800:1;

comprendiendo además la composición un péptido, o un sal farmacéuticamente, nutracéutica o veterinaria
 aceptable del mismo, seleccionándose dicho péptido del grupo que consiste en:

45 $\text{CH}_3\text{-C(O)- Xaa}_1\text{IYT-NH}_2$ (SEQ ID NO: 2), en donde Xaa_1 es un residuo de tirosina con el grupo hidroxilo de la
 cadena lateral reemplazado por un radical $-\text{OSO}_3\text{H}$;
 $\text{CH}_3\text{-C(O)- YIXaa}_2\text{T-NH}_2$ (SEQ ID NO: 3), en donde Xaa_2 es un residuo de tirosina con el grupo hidroxilo de la
 cadena lateral reemplazado por un radical $-\text{OSO}_3\text{H}$;
 $\text{CH}_3\text{-C(O)- Xaa}_1\text{IYTQ-NH}_2$ (SEQ ID NO: 4) en donde Xaa_1 es un residuo de tirosina con el grupo hidroxilo de la
 50 cadena lateral reemplazado por un radical $-\text{OSO}_3\text{H}$;
 $\text{CH}_3\text{-C(O)- YIXaa}_2\text{TQ-NH}_2$ (SEQ ID NO: 5), en donde Xaa_2 es un residuo de tirosina con el grupo hidroxilo de
 la cadena lateral reemplazado por un radical $-\text{OSO}_3\text{H}$;
 $\text{CH}_3\text{-C(O)- YIYT-NH}_2$ (SEQ ID NO: 6);
 $\text{CH}_3\text{-C(O)- YIYTQ-NH}_2$ (SEQ ID NO: 7)
 55 Xaa_1IYT (SEQ ID NO: 8), en donde Xaa_1 es un residuo de tirosina con el grupo hidroxilo de la cadena lateral
 reemplazado por un radical $-\text{OSO}_3\text{H}$;
 YIXaa_2T (SEQ ID NO: 9), en donde Xaa_2 es un residuo de tirosina con el grupo hidroxilo de la cadena lateral
 reemplazado por un radical $-\text{OSO}_3\text{H}$;
 Xaa_1IYTQ (SEQ ID NO: 10) en donde Xaa_1 es un residuo de tirosina con el grupo hidroxilo de la cadena lateral
 60 reemplazado por un radical $-\text{OSO}_3\text{H}$;
 YIXaa_2TQ (SEQ ID NO: 11), en donde Xaa_2 es un residuo de tirosina con el grupo hidroxilo de la cadena lateral
 reemplazado por un radical $-\text{OSO}_3\text{H}$;
 YIYT (SEQ ID NO: 12);
 YIYTQ (SEQ ID NO: 13);
 65 $\text{Xaa}_1\text{IXaa}_2\text{T}$ (SEQ ID NO: 14), en donde Xaa_1 y Xaa_2 son ambos un residuo de tirosina con el grupo hidroxilo

de la cadena lateral reemplazado por un radical -OSO₃H;

Xaa₁IXaa₂TQ (SEQ ID NO: 15), en donde Xaa₁ y Xaa₂ son ambos un residuo de tirosina con el grupo hidroxilo de la cadena lateral reemplazado por un radical -OSO₃H;

CH₃-C(O)- YIYT (SEQ ID NO: 16);

5 CH₃-C(O)- YIYTQ (SEQ ID NO: 17);

YIYT-NH₂ (SEQ ID NO: 18);

YIYTQ-NH₂ (SEQ ID NO: 19);

10 y/o un sobrenadante libre de células de una suspensión de cultivo de células vegetales desdiferenciadas, o una fracción de dicho sobrenadante libre de células, en donde dicho sobrenadante libre de células o dicha fracción comprende péptidos de 4 a 300 aminoácidos de longitud, dichos péptidos seleccionados de factores peptídicos de crecimiento vegetal, factores de transcripción de plantas, factores epigenéticos y mezclas de los mismos, comprendiendo dichos factores peptídicos de crecimiento vegetal el péptido seleccionado del grupo que consiste en cualquiera de SEQ ID NO: 2 a SEQ ID NO: 19 y dicho sobrenadante libre de células o dicha fracción sin tener
15 contenido de células citoplasmáticas de la lisis celular y membranas y/o paredes celulares.

En una realización particular de estas composiciones farmacéuticas, nutracéuticas o veterinarias y también de las composiciones tópicas farmacéuticas o veterinarias, el sobrenadante libre de células de una suspensión de cultivo de células vegetales desdiferenciadas, o una fracción de dicho sobrenadante libre de células son de una planta
20 seleccionada del grupo que consiste en *Daucus carota*, *Centella asiatica*, *Sarcocapnos crassifolia*, *Curcuma longa*, *Vitis vinifera*, *Lithops pseudotruncatella*, *Morinda citrifolia* y *Olea europaea*.

En otra realización particular de las composiciones farmacéuticas, nutracéuticas o veterinarias, así como también de las composiciones tópicas farmacéuticas o veterinarias de acuerdo con la invención, el péptido de fórmula (I) se
25 selecciona particularmente de:

CH₃-C(O)- YIYT-NH₂ (SEQ ID NO: 6);

CH₃-C(O)- YIYTQ-NH₂ (SEQ ID NO: 7);

30 Xaa₁IYT (SEQ ID NO: 8), en donde Xaa₁ es un residuo de tirosina con el grupo hidroxilo de la cadena lateral reemplazado por un radical -OSO₃H;

YIXaa₂T (SEQ ID NO: 9), en donde Xaa₂ es un residuo de tirosina con el grupo hidroxilo de la cadena lateral reemplazado por un radical -OSO₃H;

YIYT (SEQ ID NO: 12);

YIYTQ (SEQ ID NO: 13);

35 Xaa₁IXaa₂T (SEQ ID NO: 14), en donde Xaa₁ y Xaa₂ son ambos un residuo de tirosina con el grupo hidroxilo de la cadena lateral reemplazado por un radical -OSO₃H;

Xaa₁IXaa₂TQ (SEQ ID NO: 15), en donde Xaa₁ y Xaa₂ son ambos un residuo de tirosina con el grupo hidroxilo de la cadena lateral reemplazado por un radical -OSO₃H;

CH₃-C(O)- YIYT (SEQ ID NO: 16);

40 CH₃-C(O)- YIYTQ (SEQ ID NO: 17);

YIYT-NH₂ (SEQ ID NO: 18);

YIYTQ-NH₂ (SEQ ID NO: 19);

y mezclas de los mismos.

45 En también otra realización particular de este aspecto de la invención, la composición farmacéutica, nutracéutica o veterinaria comprende un péptido de fórmula (I) o una sal farmacéuticamente o veterinaria aceptable del mismo; vitamina C, vitamina B1, vitamina B2, vitamina B3, vitamina B5, vitamina B6, vitamina B8, vitamina B9, glicina, metionina, fenilalanina, prolina, cisteína, ácido glutámico, sulfato de zinc, sulfato de cobre, sulfato de magnesio y
50 sulfato de hierro junto con excipientes y/o portadores farmacéuticamente, nutracéuticos o veterinarios aceptables, en donde como se indica el péptido de fórmula (I) se selecciona de CH₃-C(O)- YIYT-NH₂ (SEQ ID NO: 6);

CH₃-C(O)- YIYTQ-NH₂ (SEQ ID NO: 7);

55 Xaa₁IYT (SEQ ID NO: 8), en donde Xaa₁ es un residuo de tirosina con el grupo hidroxilo de la cadena lateral reemplazado por un radical -OSO₃H;

YIXaa₂T (SEQ ID NO: 9), en donde Xaa₂ es un residuo de tirosina con el grupo hidroxilo de la cadena lateral reemplazado por un radical -OSO₃H;

YIYT (SEQ ID NO: 12);

YIYTQ (SEQ ID NO: 13);

60 Xaa₁IXaa₂T (SEQ ID NO: 14), en donde Xaa₁ y Xaa₂ son ambos un residuo de tirosina con el grupo hidroxilo de la cadena lateral reemplazado por un radical -OSO₃H;

Xaa₁IXaa₂TQ (SEQ ID NO: 15), en donde Xaa₁ y Xaa₂ son ambos un residuo de tirosina con el grupo hidroxilo de la cadena lateral reemplazado por un radical -OSO₃H;

CH₃-C(O)- YIYT (SEQ ID NO: 16);

65 CH₃-C(O)- YIYTQ (SEQ ID NO: 17);

YIYT-NH₂ (SEQ ID NO: 18);
YIYTQ-NH₂ (SEQ ID NO: 19);

y mezclas de los mismos. Más en particular es SEQ ID NO: 6

5

La combinación de los péptidos de fórmula (I) y las composiciones (soluciones) que comprenden sales de hierro, de cobre, de magnesio y de zinc, junto con vitaminas y aminoácidos de la invención, tiene un efecto sinérgico en términos de proliferación de fibroblastos dérmicos humanos (HDF). Esto hace que la combinación sea útil en el tratamiento de la caída del cabello, pero también como agente de regeneración de tejidos.

10

En una realización particular, las composiciones farmacéuticas, nutracéuticas o veterinarias de la invención el péptido de SEQ ID NO: 6 o una sal farmacéuticamente o veterinaria aceptable del mismo vitamina C, vitamina B1, vitamina B2, vitamina B3, vitamina B5, vitamina B6, vitamina B8, vitamina B9, glicina, metionina, fenilalanina, prolina, cisteína, ácido glutámico, sulfato de zinc, sulfato de cobre, sulfato de magnesio y sulfato de hierro junto con excipientes y/o portadores farmacéuticamente, nutracéuticos o veterinarios aceptables.

15

En otra realización particular, las composiciones farmacéuticas, nutracéuticas o veterinarias comprenden hidrolizado de proteína, tiamina, niacina, ácido pantoténico, piridoxina, biotina, ácido fólico, riboflavina, ácido ascórbico, ácido cítrico, mioinositol, cloruro cálcico, sulfato de magnesio, dihidrogenofosfato potásico, sulfato de zinc, sulfato de cobre y quelato etilendiaminotetraacético de hierro. Más en particular, comprende hidrolizado de caseína.

20

Estas composiciones, son agentes inductores de la proliferación de fibroblastos de mamíferos y de células de papila dérmica de mamíferos. Por lo tanto, la invención radica en que son agentes inductores de la proliferación, para su uso en la prevención y/o el tratamiento de una pérdida de cabello en una enfermedad que provoca pérdida de cabello.

25

Estos sobrenadantes libres de células sin el contenido interno del citoplasma celular y sin las membranas y/o paredes celulares se denominan aquí medios nutrientes acondicionados o medios acondicionados o medios celulares acondicionados. Los sobrenadantes libres de células contienen por lo tanto, no solo cantidades de aquellos compuestos inicialmente presentes en los medios de cultivo donde se cultivaron células vegetales desdiferenciadas y que no se consumieron, sino también otros compuestos que desdiferencian las células vegetales liberados al medio.

30

Las fracciones de dichos sobrenadantes libres de células que comprenden péptidos de 4 a 300 aminoácidos de longitud, siendo factores de crecimiento vegetal, factores epigenéticos de plantas o factores de transcripción de plantas, también puede definirse como composiciones "aisladas" (o fracciones aisladas) que comprenden péptidos de 4 a 300 aminoácidos de longitud y que pueden obtenerse del sobrenadante libre de células que previamente soportó el crecimiento de un cultivo en suspensión de células vegetales desdiferenciadas. En particular, el aislamiento de dichas composiciones comprende separar o recuperar un líquido de dicho sobrenadante con los factores peptídicos de crecimiento vegetal mediante al menos un proceso de separación de proteínas, comprendiendo dicho proceso al menos uno de cromatografía (seleccionada de extracción en fase sólida (SPE), cromatografía de exclusión por tamaño (SEC) y combinación en cascada de las mismas), filtración (en particular por filtración de flujo tangencial (TFF)), precipitación de proteínas y combinaciones de los mismos.

35

40

En otra realización particular, estos sobrenadantes libres de células o fracciones aisladas de los mismos incluyen cócteles de péptidos, comprendiendo dichos cócteles al menos un péptido de factores de crecimiento vegetal seleccionado del grupo que consiste en Fitosulfocina- α (PSK- α), Fitosulfocina- β (PSK- β), Péptido vegetal que contiene tirosina-1 sulfatada (PSY1), Factor de alcalinización rápida (RALF), Factor inhibidor de la diferenciación del elemento traqueal (TDIF), Clavata-3 (CLV3), Relacionado con la región circundante de Clavata-Embrión (CLE), Determinante de tapete-1 (TPD1), Factor de patrón epidérmico-1 (EPF1), Inflorescencia Deficiente en Abcisión (IDA), Relacionado con la región circundante del embrión (ESR), Péptido Polaris (PLS), Factor de crecimiento del meristema de la raíz (RGF), Proteína secretada por óvulos (EC1), Péptido codificado en el extremo C (CEP), Nodulina temprana (ENOD40), Sistemina, Proteínas ricas en cisteína S-locus (SCR) y mezclas de los mismos, lo que significa una combinación de todos ellos, de solo dos, tres, cuatro o más de dos hasta comprender todos los péptidos enumerados.

50

Los sobrenadantes libres de células o fracciones aisladas de los mismos incluyen los péptidos de fórmula (I) de SEQ ID NO: 14 y 15 particulares. Por lo tanto, también son fuente de los péptidos activos en el tratamiento de la caída del cabello de la invención.

55

Otros péptidos además de los factores de crecimiento vegetal peptídicos también están presentes en una realización particular de los sobrenadantes libres de células que previamente apoyaron el crecimiento de un cultivo en suspensión de células vegetales desdiferenciadas o una fracción de dichos sobrenadantes libres de células. Estos péptidos son en particular factores peptídicos de transcripción vegetal, incluyendo, entre otros, la desdiferenciación inducida por heridas (WIND), Wuschel (WUS), Teosinte Branched1/Cycloidea/Proliferating Cell Factor (TCP) y factor transcripcional para el mantenimiento del meristema de la raíz (PLETHORA), y mezclas de los mismos. Estos factores de transcripción regulan la formación de meristemas de brotes, mantenimiento de células madre y diferenciación de células somáticas.

60

65

Trazas de otros compuestos, conocidos habitualmente como factores epigenéticos, también están incluidos en los sobrenadantes libres de células, o una fracción de dichos sobrenadantes libres de células debido a la rotura residual de algunas células durante el cultivo (como se enunció anteriormente), que puede suministrar los contenidos nucleares y citoplasmáticos en los medios de cultivo, aunque reducido a cantidades mínimas. Los ejemplos de estos factores epigenéticos vegetales se seleccionan del grupo que consiste en Cromometilasa (CMT), Metiltransferasa de dominio reorganizado (DRM), Metiltransferasa (MET) y algunas auxinas, implicado en los procesos de metilación de NA; el factor de remodelación de la cromatina PICKLE de la familia CHP (las proteínas CHD derivan su nombre de la presencia de tres dominios de similitud de secuencia: un dominio modificador de la organización de la cromatina (cromodominio), un dominio SWI2/SNF2 ATPasa/Helicasa y un motivo con similitud de secuencia con un dominio de unión al ADN), el factor de remodelación de la cromatina DDM1 (de Decrease In DNA Methylation-1), implicado en la descondensación y remodelación de la cromatina; la histona H3 metiltransferasa Kryptonita (KYP), implicada en la remodelación de histonas; moléculas de ARN pequeño; y mezclas de todas estas proteínas y compuestos. Por factores epigenéticos se entienden aquellas biomoléculas, particularmente de naturaleza peptídica, que controlan marcas en una célula para el ADN que controla la expresión o el silenciamiento de genes.

A lo largo de toda la descripción y las reivindicaciones la palabra "comprender" y variaciones de la palabra, no pretenden excluir otras características técnicas, aditivos, componentes o etapas. Adicionalmente, la palabra "comprender" abarca el caso de "que consiste en". Los siguientes ejemplos se proporcionan a modo de ilustración y no tienen por objeto ser limitantes de la presente invención.

Ejemplos

Ejemplo 1.- Preparación de péptidos de fórmula (I)

Las secuencias peptídicas ensayadas se ensamblaron mediante métodos en fase sólida usando un esquema de protección basado en Fmoc en una resina de amida Rink. La cadena lateral de los residuos Tyr (Y) se protegió con un grupo t-butilo. La desprotección de los grupos N-terminales de cloruro de fluorenilmetiloxycarbonilo (Fmoc) se realizó con piperidina al 20 % en dimetilformamida (DMF) en 5 min. La síntesis se realizó en un sintetizador automático Prelude (Protein Technologies, Tucson, Arizona, EE.UU.). Después del ensamblaje de la cadena, el péptido-resina se trató con ácido trifluoroacético al 90 %-triisopropilsilano al 5 %-agua al 5 % durante 1 h, el filtrado correspondiente se trató con 3 volúmenes de éter etílico enfriado para precipitar el péptido. Después de la centrifugación, el sobrenadante se retiró con cuidado y el sedimento (que contenía los péptidos) se volvió a disolver en ácido acético acuoso (5 % v/v) y se liofilizó. La purificación del producto bruto se realizó mediante HPLC preparativa de fase inversa usando gradientes de agua/acetonitrilo (ambos con ácido trifluoroacético al 0,05 %). Los péptidos purificados eran homogéneos (>95 %) por HPLC y tenían la masa molecular esperada por espectrometría de masas por electropulverización.

Con esta metodología se obtuvieron y se ensayaron las siguientes secuencias como se ilustrará en los siguientes ensayos: CH₃-C(O)- YIYT-NH₂ (SEQ ID NO: 6), CH₃-C(O)- YIYTQ-NH₂ (SEQ ID NO: 7), YIYT (SEQ ID NO: 12), YIYTQ (SEQ ID NO: 13), CH₃-C(O)- YIYT (SEQ ID NO: 16), CH₃-C(O)- YIYTQ (SEQ ID NO: 17), YIYT-NH₂ (SEQ ID NO: 18) y YIYTQ-NH₂ (SEQ ID NO: 19).

Para ensayos *in vivo* (véase a continuación) se disolvió tetrapéptido de acetilo (SEQ ID NO: 6) (0,025 % p/p) en una solución tamponada que contenía sales, vitaminas y aminoácidos. Esta solución tamponada fue como sigue:

- 500 ml/l de una solución fortificante a 2X

Preparada a partir de (a) una solución 100X, 30 ml/l [donde la solución de refuerzo 100X comprendía ZnSO₄·5H₂O (860 mg/l); 100 µl de solución de CuSO₄·5H₂O (25 g de CuSO₄·5H₂O por litro de solución de Fe), MgSO₄·5H₂O (18054 mg/l), Vitamina C (5000 mg/l), Vitamina B1 (tiamina, 50 mg/l), vitamina B3 (niacina, 50 mg/l), vitamina B5 (D-pantotenato cálcico, 50 mg/l), vitamina B6 (piridoxina, 50 mg/l), glicina (2000 mg/l), metionina (3000 mg/l), fenilalanina (1500 mg/l), prolina (3000 mg/l), cisteína (3000 mg/l), ácido glutámico (750 mg/l), c.s. de solución de FeSO₄·7H₂O (Na₂EDTA·2H₂O (4,46 g/l), FeSO₄·7H₂O (3,503 g/l) en agua miliQ];

(b) solución madre de vitaminas 5x, 400 ml/l [donde la solución en barra de vitamina 5x es vitamina B2 (riboflavina, 2,5 mg/l), biotina 2,5 mg/l, vitamina B9 (ácido fólico, 2,5 mg/l) en agua miliQ];

(c) una solución madre de aminoácidos 20X, 100 ml/l [donde el 20X es ácido glutámico (450 mg/l), L-fenilalanina (300 mg/l) en agua miliQ]

(d) Conservante a 1 %, 10 ml/l

(e) en 1 l de agua miliQ.

- 500 ml/l de solución salina tamponada con fosfato (PBS) 2X a pH 6,8

Para ensayos *in vitro* en células de papila dérmica del folículo piloso (HFDPC), fibroblastos dérmicos humanos (HDF) o queratinocitos epidérmicos inmortalizados (HaCat), péptidos sintetizados (SEQ ID NO: 6, SEQ ID NO: 7, SEQ ID

NO: 12, SEQ ID NO: 13, SEQ ID NO: 16, SEQ ID NO: 17, SEQ ID NO: 18 y SEQ ID NO: 19) se disolvieron en los medios de cultivo. Los HFDPC eran de folículos pilosos humanos normales del cuero cabelludo temporal de un solo donante: se usaron de un varón caucásico de 54 años (Ref. 602-05a. Lote. 2092. de CELL APPLICATIONS, INC). Los HDF se obtuvieron de muestras de prepucio, excedentes de cirugía de donantes jóvenes (0-3 años) y establecidos usando el método convencional de crecimiento de explantes y disociación enzimática de células proliferantes. Y los queratinocitos humanos inmortalizados (HaCat) se obtuvieron de una línea celular de queratinocitos inmortalizados aneuploides de piel humana adulta

Ejemplo 2. - Preparación de sobrenadantes libres de células de *Curcuma longa* y de formulaciones que las comprenden para ensayos *in vivo*.

Medio acondicionado de *C. longa*

Consistía en el medio extracelular de una suspensión celular de *Curcuma longa* mezclada con agua y/o glicerol (1:1).

El proceso para la obtención de la suspensión celular libre de células de *Curcuma longa* se llevó a cabo mediante:

Volúmenes iguales (1:1) de los medios extracelulares de un cultivo celular de *Curcuma longa* a 1° brix se mezclaron con una solución fortificante que contenía minerales (sales inorgánicas), vitaminas y aminoácidos. Los grados Brix miden la cantidad de sólidos secos disueltos en una muestra. Estos sólidos pueden ser azúcar, sales, etc. y es un modo de determinar el crecimiento celular en cultivos. Ambos componentes (medio extracelular de una solución de *Curcuma longa* y fortificante) se prepararon por separado y después se mezclaron como:

- Las células de *Curcuma longa* se cultivaron en medio SunB como una suspensión celular hasta que el sobrenadante fue de 1° Brix.
- La suspensión se filtró usando un filtro de poliéster monofilamento de 0,80 µm.
- Se añadió un 1 % de Geogard Ultra como conservante a los medios extracelulares recuperados por filtración.
- Se necesitó agitación magnética para incorporar correctamente el conservante.
- Se añadió el mismo volumen de la solución fortificante (2X, como anteriormente) para medios acondicionados a los medios extracelulares

Ensayo 1. Proliferación *in vitro* de fibroblastos humanos de células de la papila dérmica del folículo piloso (HFDPC)

Para probar los efectos de los sobrenadantes libres de células, así como de los péptidos de la invención, se realizó un ensayo de proliferación en células de papila de folículo piloso humano (CELL APPLICATIONS, INC; Folículos pilosos humanos normales del cuero cabelludo temporal. Donante único: varón caucásico de 54 años; Ref. 602-05a. Lote. 2092.).

A continuación la Tabla 1 muestra el material probado y los controles en la FIG. 1:

Muestras ensayadas en la FIG. 1	
Control basal (Ctrl): células no tratadas mantenidas en medio de cultivo	
Control positivo: células tratadas con factor de crecimiento de fibroblastos (FGF)	
Control positivo: células tratadas con factor de crecimiento endotelial vascular (VEGF)	
Minoxidil (Mx) ((≥ 99 % (TLC)), SIGMA, Ref. M4145. Solución madre: 16,67 mg/ml en Etanol (25 mg de Minoxidil + 1,5 ml de Etanol).	
<i>Centella asiatica</i> (CA) C1 3,0 µg/ml y C2 6,0 µg/ml	
<i>Curcuma longa</i> (CL): C1 3,0 µg/ml y C2 6,0 µg/ml	
<i>Daucus carota</i> (DC): C1 1,6 µg/ml y C2 1,5 µg/ml (a las 48 h)	
<i>Vitis vinifera</i> (VV): C1 6,3 µg/ml y C2 12,5 µg/ml	
<i>Sarcocapnos crassifolia</i> (SC): C1 12,5 µg/ml y C2 25,0 µg/ml	
<i>Morinda citrifolia</i> (MC): C1 3,1 µg/ml y C2 6,0 µg/ml	
<i>Olea europaea</i> (OE): C1 25,0 µg/ml y C2 50,0 µg/ml	
<i>Lithops</i> sp.(LP): C1 3,0 µg/ml y C2 1,5 µg/ml	
Péptido 4Aa (CH ₃ -C(O)- YIYT-NH ₂) (SEQ ID NO: 6): C1 5,0 µg/ml y C2 2,5 µg/ml	
Péptido 5Aa (CH ₃ -C(O)- YIYTQ-NH ₂) (SEQ ID NO: 7): C1 0,04 µg/ml y C2 0,2 µg/ml	

La siguiente Tabla 2 muestra las concentraciones evaluadas de péptidos en la FIG. 2 y 3:

Péptido	C1 (µg/ml)	C2 (µg/ml)	C3 (µg/ml)
P4Aa	5,83	2,93	1,46
P5Aa	5,86	2,93	1,46

El medio de cultivo fue Papilla Cell Basal Medium suplementado con el kit Growth Supplements (Composición relativa:

Suero bovino fetal, factores de crecimiento y antibióticos. Aplicación: 6 % v/v).

Los sobrenadantes libres de células (también marcados como Pre-pre-LyoP3) se obtuvieron en particular como sigue:

Los cultivos de suspensión celular de las especies ensayadas se obtuvieron a partir de inóculos de suspensiones celulares cultivadas a 200 ml. Los inóculos (1/5 de inóculo en relación al volumen total de cultivo) se inocularon en matraces de 2000 ml que contenían 800 ml de medio líquido Murashige & Skoog (MS) suplementado con 20-30 g/l de sacarosa (por ejemplo, 30 g) y hormonas y se colocó en un agitador rotatorio a 100 rpm en la oscuridad a 25 °C. Los cultivos celulares se cultivaron durante 12 días, cuando se clarificaron (es decir, se eliminaron las células evitando la lisis) por centrifugación a 4600 rpm durante 30 min, para obtener los medios condicionados, que se estudió adicionalmente. Para purificar mejor los medios acondicionados, se realizó una TFF (Filtración de flujo tangencial) en el producto resultante. El proceso comprendió; una etapa de flujo, un equilibrado, una filtración, una diafiltración y una etapa final de higienización. Durante el proceso, se usaron 2,5 l de PBS, 2,5 l de etanol al 20 % y NaOH 1 N. Después de esa TFF, se realizó una purificación en fase inversa (RP) (Oligopurificación) con el objetivo de recuperar aquellos compuestos secretados por las células vegetales durante el crecimiento en suspensión. La purificación incluyó 9 etapas: adición de 5 Volúmenes de columna (VC) de agua ácido trifluoroacético (TFA) al 0,1 %, adición de 5 VC de CAN TFA al 0 1 %, inclusión de 5 VC de agua TFA al 0,1 % y la adición de TFA para conseguir el 0,1 %. Después la muestra se cargó, se recogió y se lavó con 1 CV agua TFA al 0,1 %. La elución se fraccionó en CAN al 25-50-5-100 % con TFA al 0,1 %. El producto se evaporó y se resuspendió en RP A. Al final de esta purificación, se obtuvo el medio 2 preacondicionado (sobrenadante sin células). Este medio 2 preacondicionado se purificó usando un CEX (cromatografía de intercambio catiónico) y un AEX (purificador híbrido Emphaze). El proceso comprendió 16 etapas; adición de 5 VC CEX A (acetato sódico 50 mM pH 4,5), 5 VC CEX B (acetato sódico 50 mM NaCl 1 M pH 4,5) y 5 VC CEX A. También se realizó una dilución 1:5 y un ajuste de pH a 4,5 con CEX A para tal carga de muestra, una recogida de la muestra, un lavado con 1 VC CEX A y una elución fraccionada con CEX B a 125 mM-250 mM-500 mM-1 M. La elución recibió: 5 VC AEX A (Glicina 50 mM pH 9), 5 VC AEX B (Glicina 50 mM NaCl 1 M a pH 9) y 5 VC AEX A. Se realizó una dilución 1:5 en AEX A y un ajuste a pH 9, así como una carga de muestra, una recogida de la muestra, un lavado con 1 VC AEX A y una elución fraccionada con AEX B a 125 mM-250 mM-500 mM-1 M. Se obtuvo una suspensión libre de células final (marcada Pre pre-LyoP 3). Después se liofilizó y se resuspendió para su uso a las concentraciones deseadas.

30 Materiales

RP A: Agua TFA al 0,1 %
 RP B: CAN TFA al 0,1 %
 CEX A: Acetato sódico 50 mM pH 4,5
 CEX B: Acetato sódico 50 mM pH 4,5
 AEX A: Glicina 50 mM pH 9
 AEX B: Glicina 50 mM NaCl 1 M pH 9

Los péptidos ensayados fueron los sintetizados como en el Ejemplo 1.

La proliferación de HFDPC se evaluó determinando el índice de proliferación (%). La replicación del ADN celular se cuantificó mediante la incorporación de bromodesoxiuridina (BrdU) en el ADN de las células tratadas. El ensayo BrdU permite medir la proliferación celular en función de la capacidad celular de incorporar BrdU durante la fase S del ciclo celular. Las células que se dividieron incorporaron BrdU que se detecta además por medio de anticuerpos y detección inmunocitoquímica.

Las células se sembraron en confluencia en una placa de 96 pocillos. Después de la estabilización y la sincronización de los cultivos celulares se añadieron los productos probados (a la concentración final indicada en la Tabla 1 de los Ejemplos). Después de esto, se añadió BrdU a los cultivos y los HFDPC se incubaron a 37 °C hasta la incorporación completa de BrdU. Las cantidades de BrdU fueron proporcionales al número de divisiones celulares y, por lo tanto, al crecimiento del cultivo tratado.

Los datos se representan en la FIG. 1, la FIG. 2 y la FIG. 3, en donde se muestra el índice de proliferación (%) de HFDPC, calculado como el porcentaje de crecimiento en relación con el control basal (HFDPC no tratado) al que se le otorga un valor del 100 % del índice de proliferación.

Como puede verse en la FIG. 1, los sobrenadantes libres de células de la invención promovieron la proliferación celular tomando como referencia o control basal las células no tratadas cultivadas con medios. Para algunas especies, los sobrenadantes libres de células que comprenden los péptidos con un peso molecular igual o inferior a 30 kDa (de 4 a 300 aminoácidos de longitud) el índice de proliferación fue mucho mayor incluso que los controles positivos. Si no, el índice de proliferación fue del mismo orden que los controles positivos. Adicionalmente, el péptido probado de SEQ ID NO: 6 mostró los mejores resultados. Por lo tanto, confirmando que los péptidos, como se define en la invención, son útiles en el tratamiento de la pérdida de cabello de mamíferos (en particular humanos).

Como puede observarse tanto en la FIG. 2 y 3, los péptidos 4Aa y 5Aa pueden promover la proliferación celular

independientemente de si las modificaciones están presentes en sus extremos terminales (columnas 2-4) o no (columna 1).

Para determinar la presencia de los péptidos activos en los sobrenadantes libres de células ensayados, se realizó una cromatografía HPLC del sobrenadante libre de células de *Daucus carota*, *Curcuma longa* y *Centella asiatica* (preparado como se indica en el Ensayo 1) y de un péptido de SEQ ID NO: 6. La HPLC se realizó como sigue:

El polvo de cultivos celulares liofilizados de *Centella asiatica*, *Daucus carota* y *Curcuma longa* se resuspendieron en 2 ml de Agua (0,1 % NaOH 1 M), se agitaron en vórtex y se centrifugaron a 10000 rcf durante 5 min. Después el sobrenadante se filtró a través de un filtro de celulosa de 0,45 y se inyectó en HPLC. El sistema HPLC consistió en un cromatógrafo Waters 1795, una columna Waters Spherisorb® 5 µM OLDS2 4,6 µM x 250 mm y detector DAD Waters 2996. La fase móvil consistió en agua + TFA 0,045 % (A) y acetonitrilo + TFA 0,036 % (B) con el siguiente gradiente (t (min), % de B): (0, 0), (4, 0), (19, 100), (23, 0), (25, 0). El volumen de inyección fue de 20 µl, el caudal fue de 1 ml/min y la longitud de onda se fijó en 220 nm. El tiempo de retención del péptido fue de 12,2 min.

- 15 De 12,0 a 12,5 minutos de elución (en particular a 12,165) la muestra de *Daucus carota* presentó un pico como en el cromatograma de péptidos. Estos datos se representan en la FIG. 4. Debido a la fuente natural del péptido detectado en *Daucus carota*, derivado de PSK-beta, la secuencia peptídica era la de SEQ ID NO: 14.

Aunque los datos no se muestran, los geles SDS PAGE de los sobrenadantes libres de células de *Curcuma longa* y *Centella asiatica* mostraron bandas de proteína a 100 kDa, ≈37 kDa, ≈ 20 kDa, por debajo de 15 kDa y a 2 kDa para *Centella asiatica*. Para *Curcuma longa* también se observaron bandas a 100 kDa, ≈ 25 kDa y menos de 15 kDa. Las bandas a menores de 15 kDa y más en particular en la banda a 2 kDa contienen los péptidos de fórmula (I) en cualquiera de sus opciones sulfatadas o no sulfatadas.

- 25 Se analizaron los secretomas (sobrenadantes que podrían recuperarse de los cultivos HFDPC expuestos con los materiales probados de la Tabla 1) para detectar la presencia y los niveles de factores de crecimiento de células animales y de microARN asociados al crecimiento del cabello en la papila dérmica. Aunque los datos no se muestran, los niveles de factor de crecimiento de insulina 1 (IGF-1) determinados a las 24 h y 48 h después del tratamiento con los compuestos de la Tabla 1 fueron más altos que en las HFDPC no tratadas y comparables o incluso más altos que en las células tratadas con minoxidil. Estos niveles más altos fueron significativos cuando las HFDPC se trataron con el péptido de SEQ ID NO: 6. Se observaron resultados similares (a las 24 y 48 h) al analizar los niveles de factor de crecimiento de fibroblastos 7 (FGF-7). Ambos factores de crecimiento están asociados a la promoción del crecimiento del cabello.

- 35 A partir de estos secretomas de HFDPC, también se detectaron los niveles de los microARN miARN-31 y miARN-22 (FIG. 5). El péptido de SEQ ID NO: 6, así como el sobrenadante libre de células de *Curcuma longa* (CL) mostró un aumento del índice de expresión de miARN-31 (FIG. 5 (C) para el péptido a tres concentraciones diferentes y (A) para el sobrenadante libre de células de *Curcuma longa* en dos concentraciones diferentes), en relación con los controles. Aparte, el sobrenadante libre de células de *Curcuma longa* a dos concentraciones diferentes también mostró una disminución del índice de expresión de miARN-22 (FIG. 5 (B)), en relación con los controles. El miARN-31 está asociado con la promoción del crecimiento del cabello, y miARN-22 con la promoción de la caída del cabello (caída del cabello para la renovación del cabello).

Ensayo 2. Proliferación *in vitro* de fibroblastos dérmicos humanos (HDF).

- 45 Con el fin de probar más los efectos de los péptidos de la invención en un entorno adicional, se realizó un ensayo de proliferación en fibroblastos dérmicos humanos (HDF).

Modelo celular:

- 50 Se obtuvieron fibroblastos dérmicos humanos normales (HDF) a partir de muestras de prepucio, excedentes de cirugía de donantes jóvenes (0-3 años) y establecidos usando el método convencional de crecimiento de explantes y disociación enzimática de células proliferantes. Las células se propagaron y se cultivaron en medio de crecimiento (GM): medio de glucosa de 1 g/l de Dulbecco, suplementado con suero bovino fetal al 10 % (FBS, PAA); L-glutamina 2 mM (Lonza); y antibióticos (Penicilina 100 µg/ml y Estreptomicina 100 U/ml, Lonza). Para el subcultivo de rutina y la propagación del cultivo primario, las células se lavaron dos veces con PBS (solución salina tamponada con fosfato, pH 7,4), se recogieron con tripsina-EDTA (Gibco) y se contaron en cámara de Neubauer antes de sembrarlas en un nuevo frasco de cultivo celular (Falcon, 75 cm²).

- 60 Los péptidos ensayados fueron los sintetizados como en el Ejemplo 1.

Los productos de prueba se prepararon a las concentraciones finales definidas mediante su dilución en medio de mantenimiento (medio de glucosa de 1 g/l de Dulbecco, suplementado con suero bovino fetal al 1 % (FBS, PAA); L-glutamina 2 mM (Lonza); y antibióticos (Penicilina 100 µg/ml y Estreptomicina 100 U/ml, Lonza), justo antes de cada aplicación.

A continuación, la Tabla 3 muestra las concentraciones evaluadas de la FIG. 6 y 7, para cada péptido de fórmula (I):

Péptido	C1 (µg/ml)	C2 (µg/ml)	C3 (µg/ml)
P4Aa	25	12,5	1,25
P5Aa	1,25	0,63	0,25

5 En la FIG. 6, la primera columna corresponde al péptido 4Aa en donde ambos extremos están libres (SEQ ID NO:12); la segunda columna corresponde al péptido 4Aa en donde el extremo N-terminal está acetilado y el extremo C-terminal está libre (SEQ ID NO: 16); la tercera columna corresponde al péptido 4Aa en donde el extremo N-terminal está libre y el extremo C-terminal está amidado (SEQ ID NO:18); y la cuarta columna corresponde al péptido 4Aa en donde el extremo N-terminal está acetilado y el extremo C-terminal está amidado (SEQ ID NO: 6).

10

En la FIG. 7, la primera columna corresponde al péptido 5Aa en donde ambos extremos están libres (SEQ ID NO:13); la segunda columna corresponde al péptido 5Aa en donde el extremo N-terminal está acetilado y el extremo C-terminal está libre (SEQ ID NO: 17); la tercera columna corresponde al péptido 5Aa en donde el extremo N-terminal está libre y el extremo C-terminal está amidado (SEQ ID NO:19); y la cuarta columna corresponde al péptido 5Aa en donde el

15 extremo N-terminal está acetilado y el extremo C-terminal está amidado (SEQ ID NO: 7).

La proliferación de HDF se evaluó determinando el índice de proliferación (%). La replicación del ADN celular se cuantificó mediante la incorporación de bromodesoxiuridina (BrdU) en el ADN de las células tratadas. El ensayo BrdU permite medir la proliferación celular en función de la capacidad celular de incorporar BrdU durante la fase S del ciclo celular. Las células que se dividieron incorporaron BrdU que se detecta además por medio de anticuerpos y detección inmunocitoquímica.

20 Las células se sembraron en confluencia en una placa de 96 pocillos. Después de la estabilización y la sincronización de los cultivos celulares, se añadieron los productos ensayados. Después de esto, se añadió BrdU a los cultivos y los HDF se incubaron a 37 °C hasta la incorporación completa de BrdU. Las cantidades de BrdU fueron proporcionales al número de divisiones celulares y, por lo tanto, al crecimiento del cultivo tratado.

25 Los datos se representan en la FIG. 6 y la FIG. 7, en donde se muestra el índice de proliferación (%) de HDF, calculado como el porcentaje de crecimiento en relación con el control basal (HDF no tratado) al que se le otorga un valor del 100 % del índice de proliferación.

30 Como se observó en experimentos realizados en HFDPC, la FIG. 6 y 7 revelan que tanto los péptidos 4Aa como 5Aa pueden promover la proliferación celular de HDF independientemente de si las modificaciones están presentes en sus extremos terminales (columnas 2-4) o no (columna 1). En el caso del péptido 4Aa, la FIG. 6 muestra que la presencia de al menos una modificación aumenta aún más su actividad promotora de la proliferación celular.

Ensayo 3. Prueba *in vivo* de péptidos de fórmula (I) y de sobrenadantes libres de células de *Curcuma longa*

40 El sobrenadante libre de células de *Curcuma longa* preparado como se indica en el Ejemplo 2, así como el péptido de SEQ ID NO: 6 en la solución fortificante tamponada con PBS 2X descrita en el Ejemplo 1 se probaron en varones y mujeres (n= 60, de 18 a 60 años) con problemas de caída del cabello. Se excluyeron aquellos voluntarios que recibieron un tratamiento capilar tres meses antes del ensayo, voluntarios con patologías cutáneas en el cuero cabelludo (psoriasis, dermatitis, etc.) y alergia a los compuestos en las formulaciones.

45 Los compuestos probados se aplicaron diariamente.

En el tiempo 0 (T0) se tomaron fotografías del cuero cabelludo (parte frontal y occipital), tricogramas para determinar el ciclo de la fase del cabello (fase telógena o anágena), la prueba de peinado (número de cabellos perdidos durante el peinado), y la densidad capilar por microfotografía con Trichoscan®.

50

En t= 45 días y t= 90 días, se realizó la prueba de peinado y las pruebas de densidad (Trichoscan®)

En t= 150 días nuevamente como en t= 0.

55 Los voluntarios se separaron en tres grupos. Grupo 1 que recibe SEQ ID NO: 6 en la solución de refuerzo tamponada con PBS 2X descrita en el Ejemplo 1; Grupo 2 que recibe sobrenadante libre de células de *Curcuma longa* preparado como se indica en el Ejemplo 2, y el Grupo 3 el placebo.

60 Los datos se muestran en la siguiente Tabla 2 para la densidad capilar. Esta tabla incluye los valores medios determinados de aumento de la densidad capilar tras evaluar en cada voluntario el número de cabellos en una muestra de 0,25 cm² son, densidad capilar en t=0 y t= 90, y dicho incremento en relación al valor t= 0

Tabla 4. Aumento en la densidad capilar

Grupo	Aumento de densidad capilar
1 (voluntarios 1 a 20, hombres y mujeres)	14,66 %
2 (voluntarios 21 a 40, hombres y mujeres)	15,61 %
3 (voluntarios 41 a 60, hombres y mujeres)	2,80 %

En la Tabla 5, resultados más detallados de la densidad del cabello y el aumento de la densidad del cabello de los voluntarios del grupo 1:

5

Tabla 5

Voluntario	N.º DE CABELLOS / 0,25 cm ²			DENSIDAD DEL CABELLO 1/cm ²			AUMENTO DE LA DENSIDAD DEL CABELLO T90	AUMENTO DE LA DENSIDAD DEL CABELLO T150
	T0	T90	T150	T0	T90	T150		
1	31	31	31	123,31	123,31	123,31	0,00 %	0,00 %
2	15	21	26	59,67	83,53	103,42	39,99 %	73,32 %(*)
	T0	T90	T150	T0	T90	T150		
3	31	34	34	123,31	135,24	135,24	9,67 %	9,67 %
4	26	29	37	103,42	115,35	147,18	11,54 %	42,31 %
5	24	28	30	95,47	111,38	119,33	16,66 %	24,99 %
6	33	35	35	131,27	139,22	139,22	6,06 %	6,06 %
7	22	31	30	87,51	123,31	119,33	40,91 %	36,36 %
8	27	30	31	107,4	119,33	123,11	11,11 %	14,63 %
9	22	27	26	87,51	107,4	103,42	22,73 %	18,18 %
10	32	43	39	127,29	171,04	155,13	34,37 %	21,87 %
11	37	39	35	147,18	155,13	139,22	5,40 %	-5,41 %
12	35	41	36	139,22	163,09	143,2	17,15 %	2,86 %
13	28	30	38	111,38	119,33	151,15	7,14 %	35,71 %
14	29	29	29	115,35	115,35	115,35	0,00 %	0,00 %
15	27	30	31	107,4	119,33	123,31	11,11 %	14,81 %
16	52	47	48	206,84	186,95	190,93	-9,62 %(*)	-7,69 %(*)
17	31	-	-	123,31	-	-	-	-
18	20	34	32	79,55	135,24	127,29	70,01 %(*)	60,01 %
19	21	22	29	83,53	87,51	115,35	4,76 %	38,09 %
20	27	27	29	107,4	107,4	115,35	0,00 %	7,40 %
							Media: 14,03 %	Media: 19,27 %

(*)-valores mínimos y máximos, no se considera al determinar la media de los valores

En la Tabla 6, resultados más detallados de la densidad del cabello y el aumento de la densidad del cabello de los voluntarios del grupo 2:

10

Tabla 6

Voluntario	N.º DE CABELLOS / 0,25 cm ²			DENSIDAD DEL CABELLO 1/cm ²			AUMENTO DE LA DENSIDAD DEL CABELLO T90	AUMENTO DE LA DENSIDAD DEL CABELLO T150
	T0	T90	T150	T0	T90	T150		
1	38	45	39	151,15	179	155,13	18,43 %	2,63 %
2	33	33	33	131,27	131,27	131,27	0,00 %	0,00 %
3	29	43	54	115,35	171,04	214,8	48,28 %	86,22 %(*)
4	26	29	30	103,42	115,35	119,33	11,54 %	15,38 %
5	26	39	39	103,42	155,13	155,13	50,00 %	50,00 %
6	38	39	42	151,15	155,13	167,06	2,63 %	10,53 %
7	23	37	35	91,49	147,18	139,22	60,87 %(*)	52,17 %
8	21	26	27	83,53	103,42	107,4	23,81 %	28,58 %
9	33	39	43	131,27	155,13	171,04	18,18 %	30,30 %
10	31	-	-	123,31	-	-	-	-
	T0	T90	T150	T0	T90	T150		
11	36	40	41	143,2	159,11	163,09	11,11 %	13,89 %
12	24	28	27	95,47	111,38	107,4	16,66 %	12,50 %
13	29	27	30	111,35	107,4	119,33	-3,55 %	7,17 %
14	19	23	19	75,58	91,49	75,58	21,05 %	0,00 %

(continuación)

Voluntario	N.º DE CABELLOS / 0,25 cm ²			DENSIDAD DEL CABELLO 1/cm ²			AUMENTO DE LA DENSIDAD DEL CABELLO T90	AUMENTO DE LA DENSIDAD DEL CABELLO T150
15	36	37	34	143,2	147,8	135,24	3,21 %	-5,56 %(*)
16	63	70	61	250,6	278,44	242,64	11,11 %	-3,18 %
17	30	31	32	119,33	123,31	127,29	3,34 %	6,67 %
18	34	35	34	135,24	139,22	135,24	2,94 %	0,00 %
19	28	34	42	111,38	135,24	167,06	21,42 %	49,99 %
20	22	19	26	87,57	75,58	103,42	-13,69 %(*)	18,10 %
							Media: 15,30 %	Media: 17,34 %
(*) : valores mínimos y máximos, no se considera al determinar la media de los valores								

Se muestran imágenes del cuero cabelludo (parte frontal y occipital) y densidad capilar por microfotografía con Trichoscan® para un voluntario del grupo 1 (FIG. 8) y para un voluntario del grupo 2 (FIG. 9). En ambas figuras (A) y 5 (B) se muestran imágenes de las partes occipital y frontal, respectivamente. En (C) las imágenes Trichoscan®.

De todos los ensayos sobre la densidad del cabello, pudo concluirse que con un aumento de la densidad del cabello del 19,27 % (grupo 1) aparecieron hasta 14000 cabellos nuevos en el cabello completo. De la misma manera, con un aumento de la densidad del cabello del 17,34 % (grupo 2) aparecieron hasta 13500 cabellos nuevos en el cabello 10 completo.

La siguiente Tabla 7 muestra los resultados de la prueba de peinado. En particular, esta tabla incluye los valores medios determinados para la prueba de peinado (número de cabellos perdidos durante el peinado). A partir de los resultados de la prueba de peinado en t = 0, t= 45 y t= 90 el porcentaje de reducción de la caída del cabello se calcula 15 contrastando los valores de t= 0 con los valores en t= 45 y en t= 90.

Tabla 7: % de reducción de la caída del cabello

Grupo	% de reducción de caída del cabello	
	t=0 frente a t=45	t=0 frente a t=90
1 (voluntarios 1 a 20, hombres y mujeres)	40,48	39,72
2 (voluntarios 21 a 40, hombres y mujeres)	52,94	56,79
3 (voluntarios 41 a 60, hombres y mujeres)	23,44	24,22

En la Tabla 8, resultados más detallados de la pérdida de cabello de los voluntarios del grupo 1:

20

Tabla 8

Voluntario	PRUEBA DE PEINADO T0	PRUEBA DE PEINADO T45	% DE REDUCCIÓN DE LA CAÍDA DEL CABELLO T0 frente a T45	PRUEBA DE PEINADO T90	% DE REDUCCIÓN DE LA CAÍDA DEL CABELLO T0 frente a T90	PRUEBA DE PEINADO T150	% DE REDUCCIÓN DE LA CAÍDA DEL CABELLO T0 frente a T150
1	31	24	-22,58	23	-25,81	20	-35,48(*)
2	39	14	-64,10	22	-43,59	16	-58,97
3	80	46	-42,50	59	-26,25	36	-55,00
4	69	92	33,33	62	-10,14	20	-71,01
5	51	7	-86,27	6	-88,24	5	-90,20
6	122	54	-55,74	88	-27,87	13	-89,34
7	43	23	-46,51	28	-34,88	13	-69,77
8	42	13	-69,05	28	-33,33	19	-54,76
9	51	88	72,55	36	-29,41	22	-56,86
10	65	184	183,08(*)	154	136,92(*)	24	-63,08
11	60	34	-43,33	60	0,00	18	-70,00
12	104	58	-44,23	50	-51,92	12	-88,46
13	115	60	-47,83	61	-46,96	20	-82,61
14	286	62	-78,32	84	-70,63	23	-91,96(*)
15	72	50	-30,56	27	-62,50	29	-59,72
16	535	10	-98,13(*)	12	-97,76(*)	95	-82,24
17	49	31	-36,73	-	-	-	-
18	89	28	-68,54	45	-49,44	19	-78,65
19	147	101	-31,29	118	-19,73	42	-71,43
20	200	66	-67,00	91	-54,50	167	-16,50
			Media 40,48		Media 39,72		Media 68,15

(*): valores mínimos y máximos, no se considera al determinar la media de los valores

En la Tabla 9, resultados más detallados de la pérdida de cabello de los voluntarios del grupo 2:

Tabla 9

Voluntario	PRUEBA DE PEINADO T0	PRUEBA DE PEINADO T45	% DE REDUCCIÓN DE LA CAIDA DEL CABELLO T0 frente a T45		PRUEBA DE PEINADO T90	% DE REDUCCIÓN DE LA CAIDA DEL CABELLO T0 frente a T90		PRUEBA DE PEINADO T150	% DE REDUCCIÓN DE LA CAIDA DEL CABELLO T0 frente a T150	
			21,05(*)			136,84(*)			35	
21	38	46	-73,17		20	-51,22		37	-7,89	
22	41	11	-92,50(*)		53	-66,88		26	-9,76	
23	160	12	-82,41		31	-71,30		28	-83,75	
24	108	19	-9,64		61	-26,51		51	-74,07	
25	83	75	-85,37		18	-78,05		9	-38,55	
26	82	12	-82,24		11	-89,72(*)		16	-89,02	
27	107	19	-15,38		21	-46,15		31	-85,05	
28	39	33	-59,30		46	-46,51		38	-20,51	
29	86	35	-		-	-		-	-55,81	
30	67	-	-80,33		19	-84,43		4	-	
31	122	24	-14,79		99	-30,28		167	-96,72(*)	
32	142	121	-80,91		22	-80,00		17	17,61(*)	
33	110	21	-54,24		21	-64,41		55	-84,55	
34	59	27	-77,78		19	-64,81		23	-6,78	
35	54	12	-39,05		45	-57,14		26	-57,41	
36	105	64	0,00		36	-37,93		14	-75,24	
37	58	58	-28,26		63	-31,52		43	-75,86	
38	92	66	-60,34		33	-43,10		20	-53,26	
39	58	23	-56,79		12,00	-85,19		19,00	-65,52	
40	81	35	Media 52,94		Media 56,79	Media 56,45			-76,54	
(*) : valores mínimos y máximos, no se considera al determinar la media de los valores										

Como se deriva de las Tablas 7 a 9, se observó una reducción significativa del % de pérdida de cabello cuando el péptido de SEQ ID NO: 6 o el medio acondicionado de *Curcuma longa* se aplicaron a voluntarios. Comparando resultados en T45, T90 y T150 con t=0 (T0) el porcentaje de reducción de la pérdida de cabello ya era digno en T45 y aumentó con el tiempo para el péptido y se mantuvo después de T45 para la *Curcuma longa*.

Ensayo 4. Ensayo de proliferación *in vitro* para probar el efecto de las soluciones fortificantes (Ejemplo de referencia).

Para probar el efecto de una solución fortificante sola, se realizaron ensayos de proliferación en células de papila de foliculo piloso humano (HFDPC), fibroblastos dérmicos humanos (HDF) y queratinocitos humanos inmortalizados (HaCat).

Esta solución fortificante también se denomina solución tamponada, solución nutritiva o genéricamente como composición farmacéutica, nutracéutica o veterinaria que comprende vitaminas, aminoácidos y sales farmacéutica, nutracéutica o veterinariamente aceptables de hierro, magnesio, cobre y zinc, junto con excipientes y/o portadores farmacéuticamente, nutracéuticos o veterinarios aceptables,

Por lo tanto, una de las soluciones tamponadas ensayadas fue como sigue:

20 - 500 ml/l de una solución fortificante a 2X

Preparada a partir de (a) una solución 100X, 30 ml/l [donde la solución de refuerzo 100X comprendía ZnSO₄.5H₂O (860 mg/l); 100 µl de solución de CuSO₄.5H₂O (25 g de CuSO₄.5H₂O por litro de solución de Fe), MgSO₄.5H₂O (18054 mg/l), Vitamina C (5000 mg/l), Vitamina B1 (tiamina, 50 mg/l), vitamina B3 (niacina, 50 mg/l), vitamina B5 (D-pantotenato cálcico, 50 mg/l), vitamina B6 (piridoxina, 50 mg/l), glicina (2000 mg/l), metionina (3000 mg/l), fenilalanina (1500 mg/l), prolina (3000 mg/l), cisteína (3000 mg/l), ácido glutámico (750 mg/l), c.s. de solución de FeSO₄.7H₂O (Na₂EDTA.2H₂O (4,46 g/l), FeSO₄.7H₂O (3,503 g/l) en agua milliQ];

(b) solución madre de vitaminas 5x, 400 ml/l [donde la solución en barra de vitamina 5x es vitamina B2 (riboflavina, 2,5 mg/l), biotina 2,5 mg/l, vitamina B9 (ácido fólico, 2,5 mg/l) en agua miliQ;

(c) una solución madre de aminoácidos 20X, 100 ml/l [donde el 20X es ácido glutámico (450 mg/l), L-fenilalanina (300 mg/l) en agua miliQ]

(d) Conservante a 1 %, 10 ml/l

(e) en 1 l de agua miliQ.

- 500 ml/l de solución salina tamponada con fosfato (PBS) 2X a pH 6,8

HFDPC, HDF y la metodología del ensayo se han descrito en los Ensayos 1 y 2. Los queratinocitos humanos inmortalizados (HaCat) se obtuvieron de una línea celular de queratinocitos inmortales aneuploides de piel humana adulta...

Los datos se representan en la FIG. 10, 11 y 12, en donde se muestra la viabilidad celular relativa de HFDPC, HDF y queratinocitos, respectivamente. La viabilidad celular relativa se calcula como el porcentaje de células vivas en relación con el control basal (células no tratadas) al que se le otorga un valor del 100 % de viabilidad celular.

Como se observa en la FIG. 10-12, la solución fortificante de la invención promueve la proliferación de los tres tipos de células diferentes, tomando como referencia o control basal las células no tratadas cultivadas con medios.

Se probó otra solución que comprende vitaminas, aminoácidos y sales farmacéutica, nutracéutica o veterinariamente aceptables de hierro, magnesio, cobre y zinc, junto con excipientes y/o portadores farmacéuticamente, nutracéuticos o veterinarios aceptables. En particular, se probó una composición que comprende hidrolizado de proteína (hidrolizado de caseína), tiamina, niacina, ácido pantoténico, piridoxina, biotina, ácido fólico, riboflavina, ácido ascórbico, ácido cítrico, mio-inositol, cloruro cálcico, sulfato de magnesio, fosfato de potasio, sulfato de zinc, sulfato de cobre y quelato de hierro.

Los datos se representan en la FIG. 13-15, en donde se muestra la viabilidad celular relativa de HFDPC, HDF y queratinocitos, respectivamente.

Las FIG. 13-15 muestran que esta solución alternativa también promueve la proliferación de los tres tipos de células diferentes probados, en comparación con las células no tratadas.

Ambas composiciones ensayadas comprendían sales de hierro, de cobre, de zinc y de magnesio, en donde la relación en peso de hierro:cobre:zinc:magnesio fue de la relación 25:1:30:570 a la relación 900:1:400:5800. Esto significa que ambas composiciones ensayadas contenían sales de hierro, de cobre, de zinc y de magnesio, en donde la relación en peso de hierro a cobre fue de 25:1 a 900:1, de zinc a cobre fue de 30:1 a 400:1 y de magnesio a cobre fue de 570:1 a

5800:1.

En particular, la relación en peso de hierro:cobre:zinc:magnesio fue de 868:1:307:5730 en la primera solución (la de las FIG. 10-12), y de 25:1:307:2856 en la segunda solución (de las FIG. 13-15) descritas anteriormente. Estas relaciones en peso en estos ejemplos particulares correspondieron a mg del elemento indicado (Fe, Cu, Zn y Mg). Más en particular corresponden a mg/l en las composiciones.

Ensayo 5. Ensayo de proliferación *in vitro* para probar el efecto de los péptidos de fórmula (I) combinados con la solución fortificante (que comprende sales, vitaminas y aminoácidos) de la invención

Con el fin de probar si hubo un efecto sinérgico de la combinación de los péptidos de la invención y las soluciones que comprenden sales de hierro, de cobre, de magnesio y de zinc, junto con vitaminas y aminoácidos de la invención, se realizaron los ensayos de proliferación en fibroblastos dérmicos humanos (HDF).

El péptido ensayado, la solución fortificante y el cultivo de HDF ya han sido descritos en los ensayos anteriores.

A continuación la Tabla 10 muestra el material probado y los controles:

Muestras ensayadas
Control basal (Ctrl): células no tratadas mantenidas en medio de cultivo
Péptido 4Aa (CH ₃ -C(O)- YIYT-NH ₂) (SEQ ID NO: 6)
Solución Nutritiva: es la solución fortificante como se describe en el Ensayo 4 con la proporción de hierro:cobre:zinc:magnesio fue 868:1:307:5730.
P+NS: Péptido 4Aa y Solución Nutritiva usados en combinación.

Los datos se representan en la FIG. 16, en donde se muestra el índice de proliferación (%) de HDF, calculado como el porcentaje de crecimiento en relación con el control basal (HDF no tratado) al que se le otorga un valor del 100 % del índice de proliferación.

La FIG. 16 revela que tanto el péptido 4Aa como la solución fortificante solas pueden promover la proliferación celular.

Por otra parte, se demuestra que el uso de ambos en combinación aumenta más del doble la proliferación de HDF en comparación con su uso solo. Por lo tanto, está claro que el uso de los péptidos y la solución fortificante de la invención en combinación provoca un efecto sinérgico sobre la proliferación de HDF.

Ensayo 6. Ensayo de cicatrización de heridas (Ejemplo de referencia).

Para probar el efecto del estado de sulfatación de los péptidos sobre su actividad, por la presente se proporciona como ejemplo de referencia un ensayo de cicatrización de heridas realizado en fibroblastos dérmicos humanos (HDF). El objetivo de este ejemplo es mostrar que los péptidos sulfatados tienen la misma actividad que los péptidos no sulfatados.

A continuación la Tabla 11 muestra las características de los productos probados y de los controles:

Tabla 11. Muestras ensayadas en ensayo de cicatrización de heridas

Muestras ensayadas
Control basal (BC) Suero bovino fetal (FBS) al 0,1 % Control positivo (Ctrl+) al 10 % (FBS)
Control positivo (Ctrl+) factor de crecimiento tisular-β1 (TGF-β1)
Péptido 4Aa (SEQ ID NO: 6): 5 µg/ml y 0,05 µg/ml
Péptido 4AaS1 (SEQ ID NO: 2): 5 µg/ml y 0,05 µg/ml
Péptido 4AaS2 (SEQ ID NO: 3): 5 µg/ml y 0,05 µg/ml

Se sembraron fibroblastos dérmicos humanos en una placa de 24 pocillos y se cultivaron hasta confluencia. Se realizó un rayado de 2 mm de ancho sobre la monocapa de cultivo. Después se añadieron los productos de prueba en medio de cultivo y se siguió el proceso de cicatrización mediante microscopía de contraste de fase. Con este objetivo, se tomaron fotografías al inicio de la prueba (T= 0 h) antes del raspado y después del tratamiento (a las 12 h y a las 72 h). El proceso de cicatrización se evaluó cuantificando la reducción del área de la herida en cada momento.

Los datos al final de la prueba (5 días de tratamiento) se representan en la FIG. 17, en donde el potencial de cicatrización de la herida se representa como el área cicatrizada (en μm^2) para el péptido ensayado.

Los resultados derivan de una prueba por triplicado. Los valores del área cicatrizada (o % de cicatrización) son los valores medios.

De esta FIG. 17 se deduce directamente que todos los péptidos probados fueron más eficaces que el control basal y proporcionaron efectos similares a los controles positivos o incluso superiores. Estos datos permiten afirmar que los péptidos son verdaderos promotores de la cicatrización de heridas.

Adicionalmente, la FIG. 17 revela que la actividad de 4Aa es independiente de su estado de sulfatación, ya que los péptidos sulfatados 4AaS1 y 4AaS2 tienen la misma actividad que el péptido no sulfatado 4Aa.

REFERENCIAS CITADAS EN LA SOLICITUD

- 15 - US4139619
- US4596812
- US6281241
- WO2007113851
- 20 - WO2006087759
- Pumthong *et al.* "Curcuma aeruginosa, a novel botanically derived 5 α -reductase inhibitor in the treatment of male-pattern baldness: a multicenter, randomized, double-blind, placebo-controlled study", Journal of Dermatological Treatment. -2012; vol. n.º 23, pp.: 385-392
- Matsubayashi *et al.*, "Phytosulfokine, sulphated peptides that induce the proliferation of single mesophyll cells of Asparagus officinalis L.", Proc. Natl. Acad. Sci.- 1996, vol. n.º 93, pp.: 7623-7627.
- 25

REIVINDICACIONES

1. Una composición farmacéutica, nutracéutica o veterinaria que comprende

- 5 (a) un péptido de fórmula (I) o una sal farmacéutica o veterinariamente aceptable del mismo, junto con excipientes y/o portadores farmacéuticamente, nutracéuticos o veterinarios aceptables, $(R^1)_{(m)}-Xaa_1IXaa_2T(Q)_{(p)}(R^2)_{(n)}$ (I) (SEQ ID NO: 1) en donde:

- 10 R^1 es un radical $-C(O)-$ alquilo (C_1-C_{20}), acilando el residuo N-terminal de la secuencia peptídica;
 R^2 es un radical $-NR_4R_5$, amidando el residuo C-terminal de la secuencia peptídica, seleccionándose R_4 y R_5 de H y alquilo (C_1-C_3);
 m , n y p , son números enteros de 0 a 1; y
 Xaa_1 y Xaa_2 son residuos de tirosina con el grupo hidroxilo de la cadena lateral del aminoácido opcionalmente
 15 reemplazado por un radical $-OSO_3R^3$, seleccionándose R^3 de H y alquilo (C_1-C_3) y dicho péptido seleccionado del grupo que consiste en:

- $CH_3-C(O)-Xaa_1IYT-NH_2$ (SEQ ID NO: 2), en donde Xaa_1 es un residuo de tirosina con el grupo hidroxilo de la cadena lateral reemplazado por un radical $-OSO_3H$;
 20 $CH_3-C(O)-YIXaa_2T-NH_2$ (SEQ ID NO: 3), en donde Xaa_2 es un residuo de tirosina con el grupo hidroxilo de la cadena lateral reemplazado por un radical $-OSO_3H$;
 $CH_3-C(O)-Xaa_1IYTQ-NH_2$ (SEQ ID NO: 4) en donde Xaa_1 es un residuo de tirosina con el grupo hidroxilo de la cadena lateral reemplazado por un radical $-OSO_3H$;
 $CH_3-C(O)-YIXaa_2TQ-NH_2$ (SEQ ID NO: 5), en donde Xaa_2 es un residuo de tirosina con el grupo hidroxilo de la cadena lateral reemplazado por un radical $-OSO_3H$;
 25 $CH_3-C(O)-YIYT-NH_2$ (SEQ ID NO: 6);
 $CH_3-C(O)-YIYTQ-NH_2$ (SEQ ID NO: 7)
 Xaa_1IYT (SEQ ID NO: 8), en donde Xaa_1 es un residuo de tirosina con el grupo hidroxilo de la cadena lateral reemplazado por un radical $-OSO_3H$;
 $YIXaa_2T$ (SEQ ID NO: 9), en donde Xaa_2 es un residuo de tirosina con el grupo hidroxilo de la cadena lateral reemplazado por un radical $-OSO_3H$;
 Xaa_1IYTQ (SEQ ID NO: 10) en donde Xaa_1 es un residuo de tirosina con el grupo hidroxilo de la cadena lateral reemplazado por un radical $-OSO_3H$;
 $YIXaa_2TQ$ (SEQ ID NO: 11), en donde Xaa_2 es un residuo de tirosina con el grupo hidroxilo de la cadena lateral reemplazado por un radical $-OSO_3H$;
 35 $YIYT$ (SEQ ID NO: 12);
 $YIYTQ$ (SEQ ID NO: 13);
 Xaa_1IXaa_2T (SEQ ID NO: 14), en donde Xaa_1 y Xaa_2 son ambos un residuo de tirosina con el grupo hidroxilo de la cadena lateral reemplazado por un radical $-OSO_3H$;
 Xaa_1IXaa_2TQ (SEQ ID NO: 15), en donde Xaa_1 y Xaa_2 son ambos un residuo de tirosina con el grupo hidroxilo de la cadena lateral reemplazado por un radical $-OSO_3H$;
 $CH_3-C(O)-YIYT$ (SEQ ID NO: 16);
 $CH_3-C(O)-YIYTQ$ (SEQ ID NO: 17);
 $YIYT-NH_2$ (SEQ ID NO: 18);
 45 $YIYTQ-NH_2$ (SEQ ID NO: 19); y mezclas de los mismos; y

(b) vitaminas, aminoácidos y sales farmacéutica, nutracéutica o veterinariamente aceptables de hierro, magnesio, cobre y zinc, en donde en la composición la relación en peso de hierro a cobre es de 25:1 a 900:1, de zinc a cobre es de 30:1 a 400:1 y de magnesio a cobre es de 570:1 a 5800:1;

- 50 para su uso en la prevención y/o el tratamiento de una pérdida de cabello en una enfermedad que provoca pérdida de cabello.

2. La composición farmacéutica, nutracéutica o veterinaria para su uso de acuerdo con la reivindicación 1, que
 55 comprende un péptido de fórmula (I) como se define anteriormente, o un sal farmacéuticamente o veterinaria aceptable, vitamina C, vitamina B1, vitamina B2, vitamina B3, vitamina B5, vitamina B6, vitamina B8, vitamina B9, glicina, metionina, fenilalanina, prolina, cisteína, ácido glutámico, sulfato de zinc, sulfato de cobre, sulfato de magnesio y sulfato de hierro junto con excipientes y/o portadores farmacéuticamente, nutracéuticos o veterinarios aceptables.

- 60 3. La composición farmacéutica, nutracéutica o veterinaria para su uso de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 1-2, en donde el péptido de fórmula (I), como se ha definido anteriormente, se proporciona en la composición como un ingrediente comprendido en un sobrenadante libre de células que previamente soportó el crecimiento de un cultivo en suspensión de células vegetales desdiferenciadas, o una fracción de dicho sobrenadante libre de células, en donde dicho sobrenadante libre de células o dicha fracción comprende péptidos de 4 a
 65 300 aminoácidos de longitud, dichos péptidos seleccionados de factores peptídicos de crecimiento vegetal, factores

de transcripción de plantas, factores epigenéticos y mezclas de los mismos, y dicho sobrenadante libre de células o dicha fracción sin tener contenido celular citoplasmático procedente de la lisis celular y membranas y/o paredes celulares.

5 4. La composición farmacéutica, nutracéutica o veterinaria para su uso de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 1-3, en donde la enfermedad que provoca la pérdida de cabello en mamíferos se selecciona de alopecia, hipotricosis, deficiencia de vitaminas o minerales, tricotilomanía, hipotiroidismo, una infección fúngica del cuero cabelludo y combinaciones de los mismos.

10 5. Una composición farmacéutica, nutracéutica o veterinaria que comprende vitaminas, aminoácidos o sales farmacéuticamente, nutracéuticas o veterinarias aceptables de los mismos; sales orgánicas o inorgánicas farmacéuticamente, nutracéuticas o veterinarias aceptables de hierro, magnesio, cobre y zinc, junto con excipientes y/o portadores farmacéuticamente, nutracéuticos o veterinarios aceptables, en donde la relación en peso de hierro a cobre es de 25:1 a 900:1, de zinc a cobre es de 30:1 a 400:1 y de magnesio a cobre es de 570:1 a 5800:1;

15 comprendiendo además la composición un péptido, o un sal farmacéuticamente, nutracéutica o veterinaria aceptable del mismo, seleccionándose dicho péptido del grupo que consiste en:

20 $\text{CH}_3\text{-C(O)-Xaa}_1\text{IYT-NH}_2$ (SEQ ID NO: 2), en donde Xaa_1 es un residuo de tirosina con el grupo hidroxilo de la cadena lateral reemplazado por un radical $-\text{OSO}_3\text{H}$;
 $\text{CH}_3\text{-C(O)-YIXaa}_2\text{T-NH}_2$ (SEQ ID NO: 3), en donde Xaa_2 es un residuo de tirosina con el grupo hidroxilo de la cadena lateral reemplazado por un radical $-\text{OSO}_3\text{H}$;
 $\text{CH}_3\text{-C(O)-Xaa}_1\text{IYTQ-NH}_2$ (SEQ ID NO: 4) en donde Xaa_1 es un residuo de tirosina con el grupo hidroxilo de la cadena lateral reemplazado por un radical $-\text{OSO}_3\text{H}$;
25 $\text{CH}_3\text{-C(O)-YIXaa}_2\text{TQ-NH}_2$ (SEQ ID NO: 5), en donde Xaa_2 es un residuo de tirosina con el grupo hidroxilo de la cadena lateral reemplazado por un radical $-\text{OSO}_3\text{H}$;
 $\text{CH}_3\text{-C(O)-YIYT-NH}_2$ (SEQ ID NO: 6);
 $\text{CH}_3\text{-C(O)-YIYTQ-NH}_2$ (SEQ ID NO: 7)
 Xaa_1IYT (SEQ ID NO: 8), en donde Xaa_1 es un residuo de tirosina con el grupo hidroxilo de la cadena lateral reemplazado por un radical $-\text{OSO}_3\text{H}$;
30 YIXaa_2T (SEQ ID NO: 9), en donde Xaa_2 es un residuo de tirosina con el grupo hidroxilo de la cadena lateral reemplazado por un radical $-\text{OSO}_3\text{H}$;
 Xaa_1IYTQ (SEQ ID NO: 10) en donde Xaa_1 es un residuo de tirosina con el grupo hidroxilo de la cadena lateral reemplazado por un radical $-\text{OSO}_3\text{H}$;
35 YIXaa_2TQ (SEQ ID NO: 11), en donde Xaa_2 es un residuo de tirosina con el grupo hidroxilo de la cadena lateral reemplazado por un radical $-\text{OSO}_3\text{H}$;
 YIYT (SEQ ID NO: 12);
 YIYTQ (SEQ ID NO: 13);
 $\text{Xaa}_1\text{IXaa}_2\text{T}$ (SEQ ID NO: 14), en donde Xaa_1 y Xaa_2 son ambos un residuo de tirosina con el grupo hidroxilo de la cadena lateral reemplazado por un radical $-\text{OSO}_3\text{H}$;
40 $\text{Xaa}_1\text{IXaa}_2\text{TQ}$ (SEQ ID NO: 15), en donde Xaa_1 y Xaa_2 son ambos un residuo de tirosina con el grupo hidroxilo de la cadena lateral reemplazado por un radical $-\text{OSO}_3\text{H}$;
 $\text{CH}_3\text{-C(O)-YIYT}$ (SEQ ID NO: 16);
 $\text{CH}_3\text{-C(O)-YIYTQ}$ (SEQ ID NO: 17);
45 YIYT-NH_2 (SEQ ID NO: 18);
 YIYTQ-NH_2 (SEQ ID NO: 19);
y/o un sobrenadante libre de células de una suspensión de cultivo de células vegetales desdiferenciadas, o una fracción de dicho sobrenadante libre de células, en donde dicho sobrenadante libre de células o dicha fracción comprende péptidos de 4 a 300 aminoácidos de longitud, dichos péptidos seleccionados de factores peptídicos de crecimiento vegetal, factores de transcripción de plantas, factores epigenéticos y mezclas de los mismos,
50 comprendiendo dichos factores peptídicos de crecimiento vegetal el péptido seleccionado del grupo que consiste en cualquiera de SEQ ID NO: 2 a SEQ ID NO: 19 y dicho sobrenadante libre de células o dicha fracción sin tener contenido de células citoplasmáticas de la lisis celular y membranas y/ o paredes celulares.

55 6. La composición farmacéutica, nutracéutica o veterinaria de acuerdo con la reivindicación 4, que es una composición tópica.

7. La composición farmacéutica, nutracéutica o veterinaria de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 5-6, en donde el péptido se selecciona de:

60 $\text{CH}_3\text{-C(O)-YIYT-NH}_2$ (SEQ ID NO: 6);
 $\text{CH}_3\text{-C(O)-YIYTQ-NH}_2$ (SEQ ID NO: 7);
 Xaa_1IYT (SEQ ID NO: 8), en donde Xaa_1 es un residuo de tirosina con el grupo hidroxilo de la cadena lateral reemplazado por un radical $-\text{OSO}_3\text{H}$;
65 YIXaa_2T (SEQ ID NO: 9), en donde Xaa_2 es un residuo de tirosina con el grupo hidroxilo de la cadena lateral

reemplazado por un radical $-\text{OSO}_3\text{H}$;

YIYT (SEQ ID NO: 12);

YIYTQ (SEQ ID NO: 13);

Xaa₁IXaa₂T (SEQ ID NO: 14), en donde Xaa₁ y Xaa₂ son ambos un residuo de tirosina con el grupo hidroxilo de la cadena lateral reemplazado por un radical $-\text{OSO}_3\text{H}$;

Xaa₁IXaa₂TQ (SEQ ID NO: 15), en donde Xaa₁ y Xaa₂ son ambos un residuo de tirosina con el grupo hidroxilo de la cadena lateral reemplazado por un radical $-\text{OSO}_3\text{H}$;

CH₃-C(O)-YIYT (SEQ ID NO: 16);

CH₃-C(O)-YIYTQ (SEQ ID NO: 17);

YIYT-NH₂ (SEQ ID NO: 18);

YIYTQ-NH₂ (SEQ ID NO: 19); y mezclas de los mismos.

8. La composición farmacéutica, nutracéutica o veterinaria de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 5-7, que comprende el péptido de SEQ ID NO: 6 o una sal farmacéuticamente o veterinaria aceptable; vitamina C, vitamina B1, vitamina B2, vitamina B3, vitamina B5, vitamina B6, vitamina B8, vitamina B9, glicina, metionina, fenilalanina, prolina, cisteína, ácido glutámico, sulfato de zinc, sulfato de cobre, sulfato de magnesio y sulfato de hierro junto con excipientes y/o portadores farmacéuticamente, nutracéuticos o veterinarios aceptables.

9. Uso en combinación de un péptido seleccionado del grupo que consiste en:

CH₃-C(O)-Xaa₁IYT-NH₂ (SEQ ID NO: 2), en donde Xaa₁ es un residuo de tirosina con el grupo hidroxilo de la cadena lateral reemplazado por un radical $-\text{OSO}_3\text{H}$;

CH₃-C(O)-YIXaa₂T-NH₂ (SEQ ID NO: 3), en donde Xaa₂ es un residuo de tirosina con el grupo hidroxilo de la cadena lateral reemplazado por un radical $-\text{OSO}_3\text{H}$;

CH₃-C(O)-Xaa₁IYTQ-NH₂ (SEQ ID NO: 4) en donde Xaa₁ es un residuo de tirosina con el grupo hidroxilo de la cadena lateral reemplazado por un radical $-\text{OSO}_3\text{H}$;

CH₃-C(O)-YIXaa₂TQ-NH₂ (SEQ ID NO: 5), en donde Xaa₂ es un residuo de tirosina con el grupo hidroxilo de la cadena lateral reemplazado por un radical $-\text{OSO}_3\text{H}$;

CH₃-C(O)-YIYT-NH₂ (SEQ ID NO: 6);

CH₃-C(O)-YIYTQ-NH₂ (SEQ ID NO: 7)

Xaa₁IYT (SEQ ID NO: 8), en donde Xaa₁ es un residuo de tirosina con el grupo hidroxilo de la cadena lateral reemplazado por un radical $-\text{OSO}_3\text{H}$;

YIXaa₂T (SEQ ID NO: 9), en donde Xaa₂ es un residuo de tirosina con el grupo hidroxilo de la cadena lateral reemplazado por un radical $-\text{OSO}_3\text{H}$;

Xaa₁IYTQ (SEQ ID NO: 10) en donde Xaa₁ es un residuo de tirosina con el grupo hidroxilo de la cadena lateral reemplazado por un radical $-\text{OSO}_3\text{H}$;

YIXaa₂TQ (SEQ ID NO: 11), en donde Xaa₂ es un residuo de tirosina con el grupo hidroxilo de la cadena lateral reemplazado por un radical $-\text{OSO}_3\text{H}$;

YIYT (SEQ ID NO: 12);

YIYTQ (SEQ ID NO: 13);

Xaa₁IXaa₂T (SEQ ID NO: 14), en donde Xaa₁ y Xaa₂ son ambos un residuo de tirosina con el grupo hidroxilo de la cadena lateral reemplazado por un radical $-\text{OSO}_3\text{H}$;

Xaa₁IXaa₂TQ (SEQ ID NO: 15), en donde Xaa₁ y Xaa₂ son ambos un residuo de tirosina con el grupo hidroxilo de la cadena lateral reemplazado por un radical $-\text{OSO}_3\text{H}$;

CH₃-C(O)-YIYT (SEQ ID NO: 16);

CH₃-C(O)-YIYTQ (SEQ ID NO: 17);

YIYT-NH₂ (SEQ ID NO: 18);

YIYTQ-NH₂ (SEQ ID NO: 19);

o una sal farmacéuticamente, sal nutracéutica o veterinaria aceptable del mismo, o de una composición farmacéutica, nutracéutica o veterinaria que lo comprende; y

de una composición farmacéutica, nutracéutica o veterinaria que comprende vitaminas, aminoácidos o sales farmacéuticamente, nutracéuticas o veterinarias aceptables de los mismos; sales orgánicas o inorgánicas farmacéuticamente, nutracéuticas o veterinarias aceptables de hierro, magnesio, cobre y zinc, junto con excipientes y/o portadores farmacéuticamente, nutracéuticos o veterinarios aceptables, en donde la relación en peso de hierro a cobre es de 25:1 a 900:1, de zinc a cobre es de 30:1 a 400:1 y de magnesio a cobre es de 570:1 a 5800:1; tales como promotor del crecimiento del cabello y para la proliferación de células de la papila dérmica del folículo piloso.

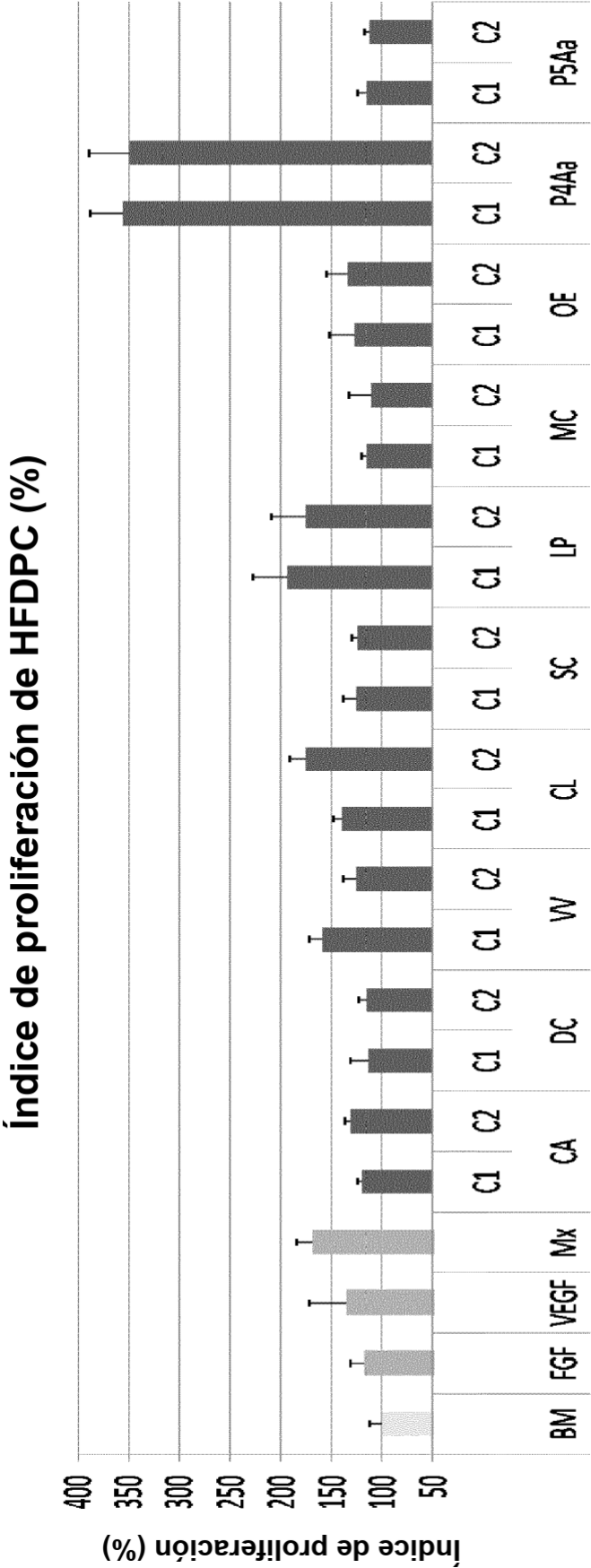


FIG. 1

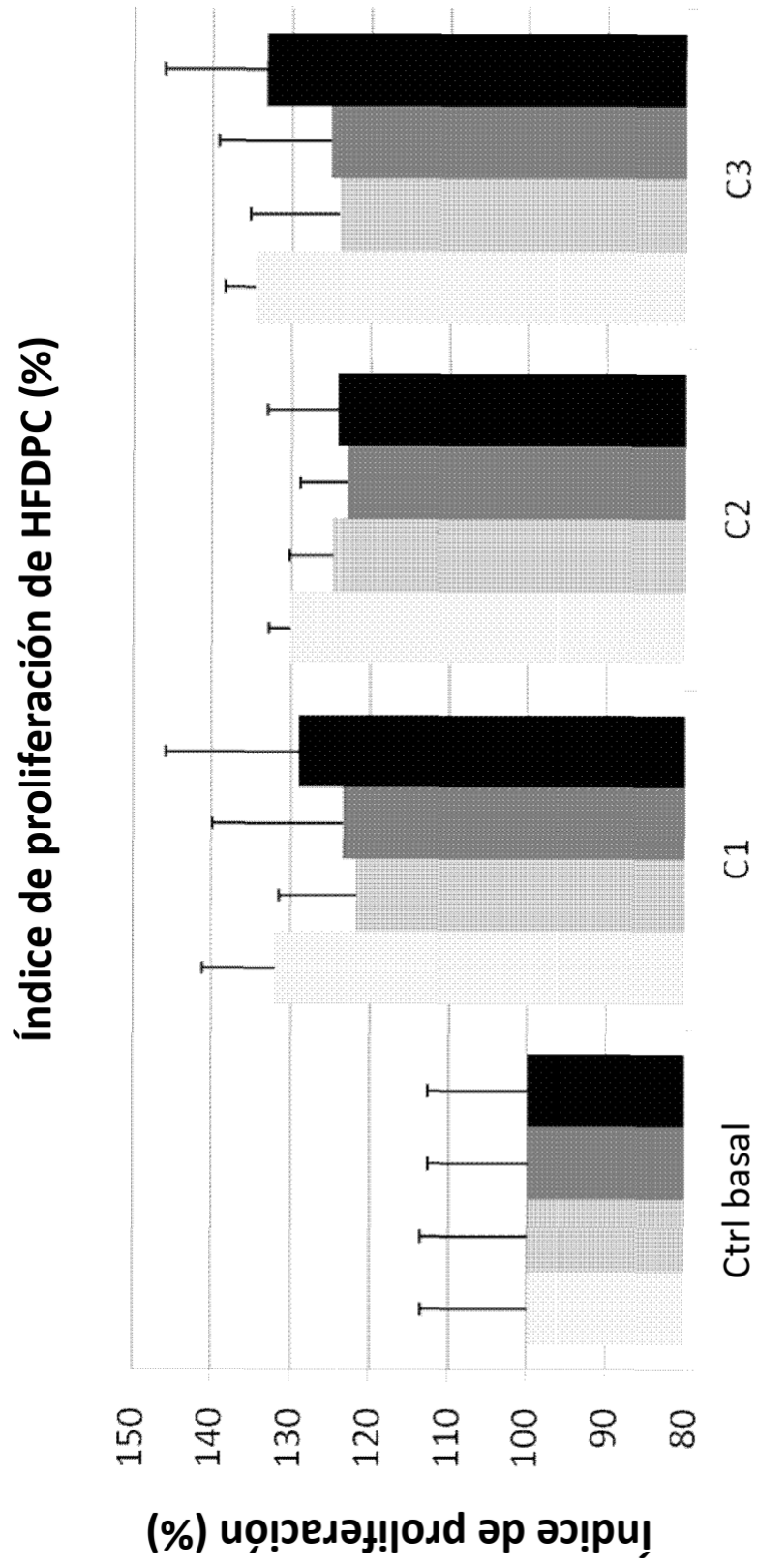


FIG. 2

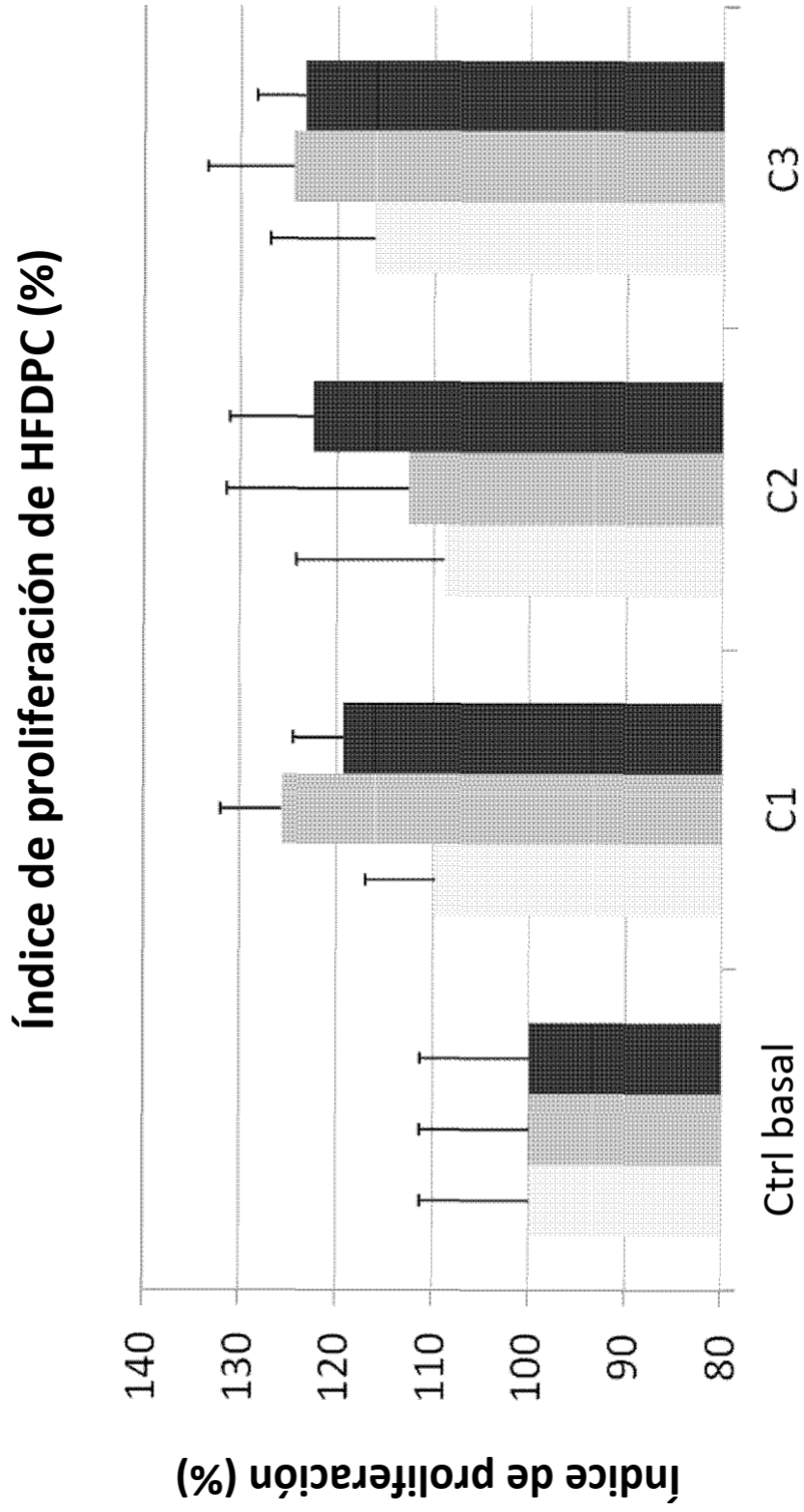


FIG. 3

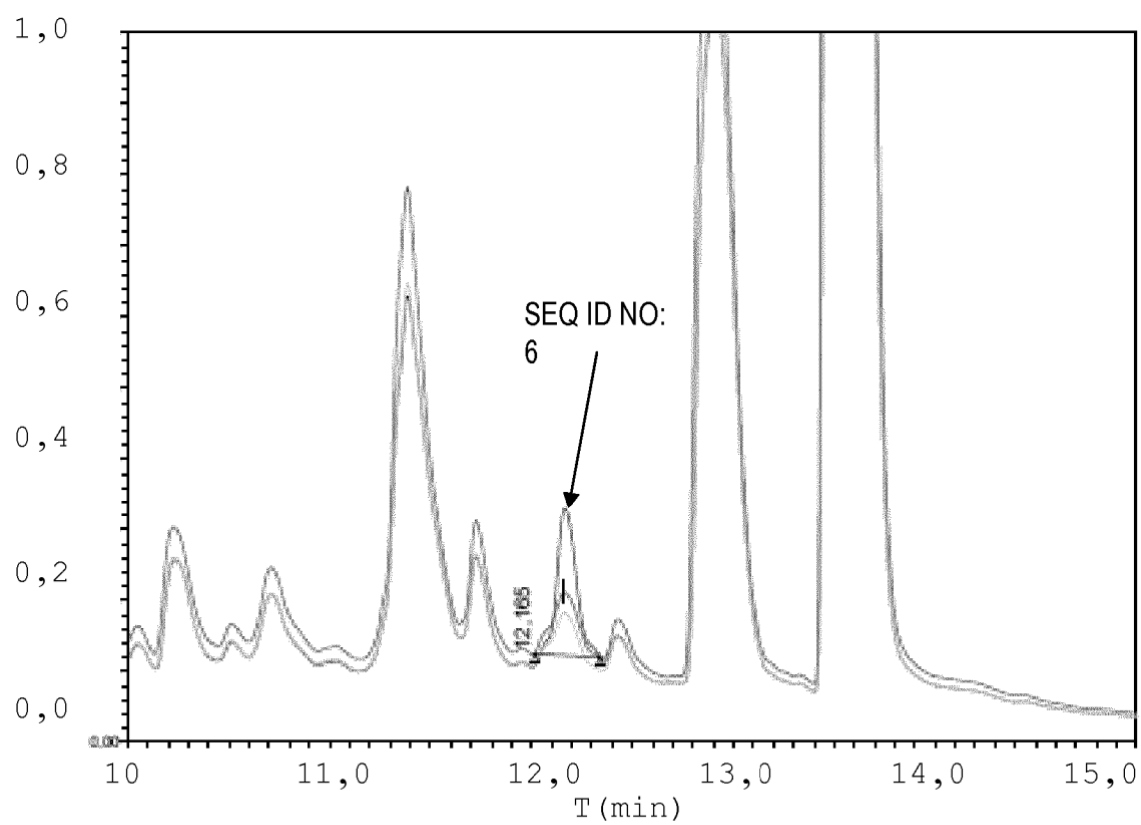
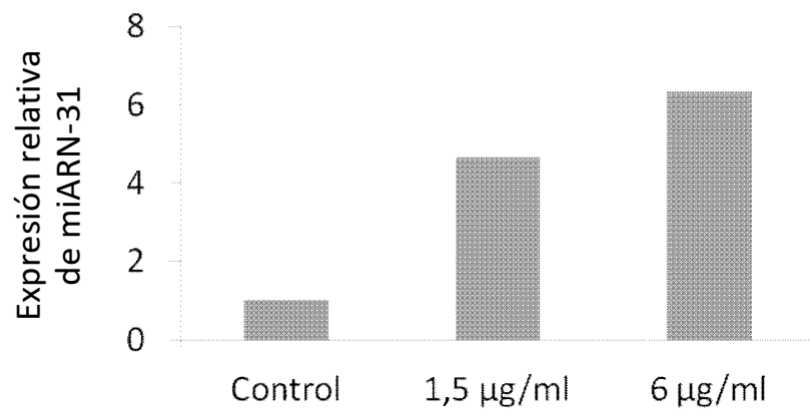
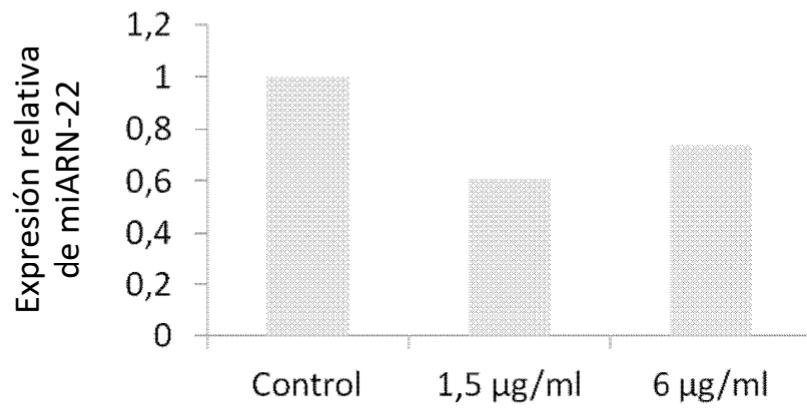


FIG. 4

A



B



C

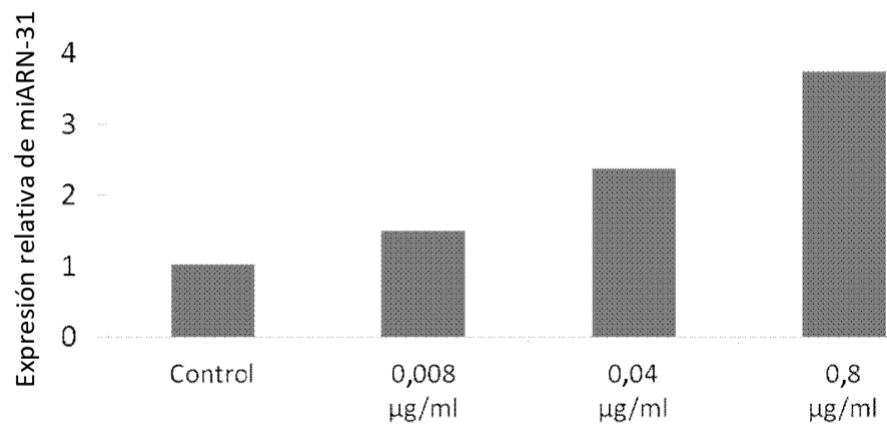


FIG. 5

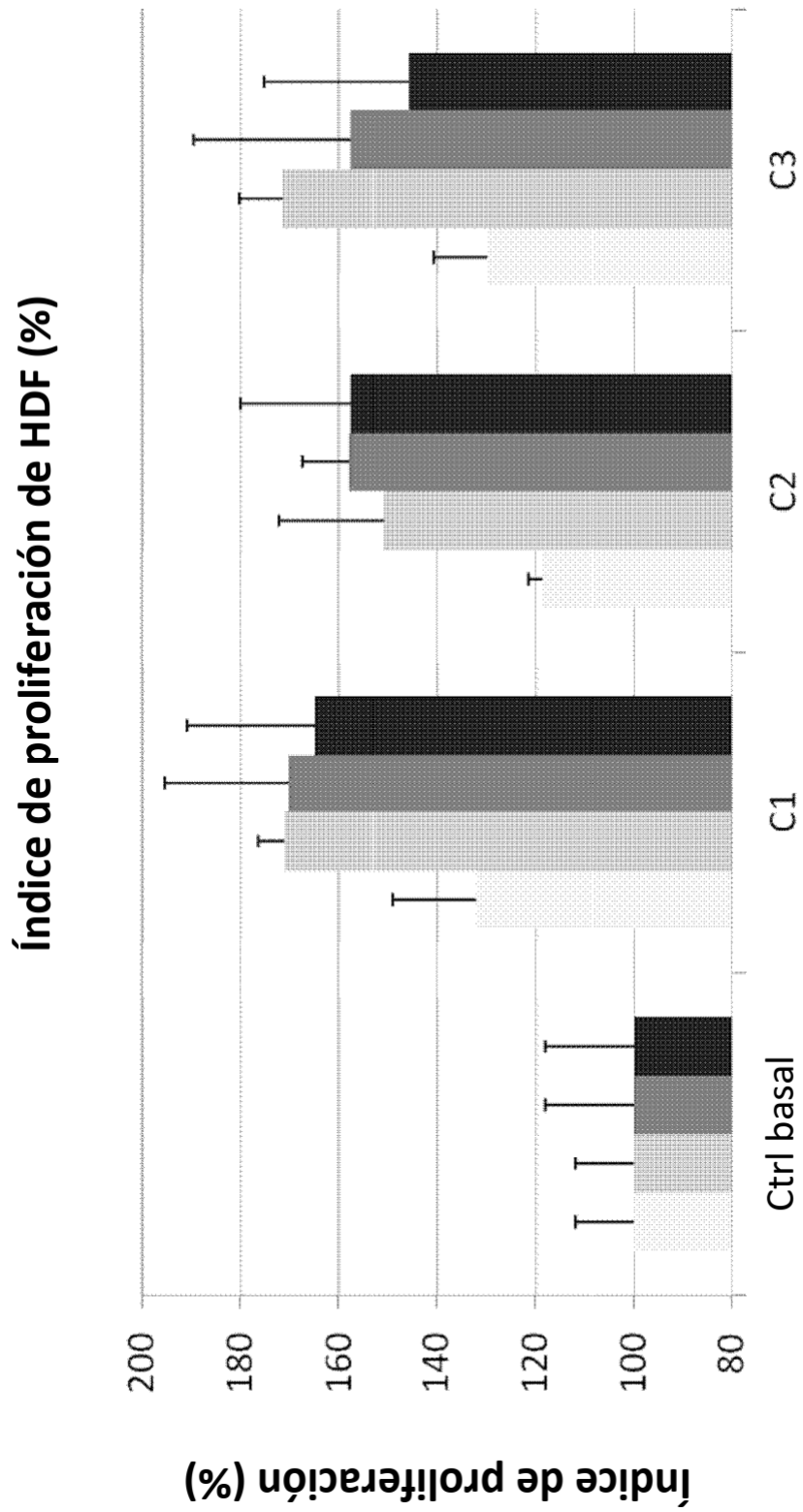


FIG. 6

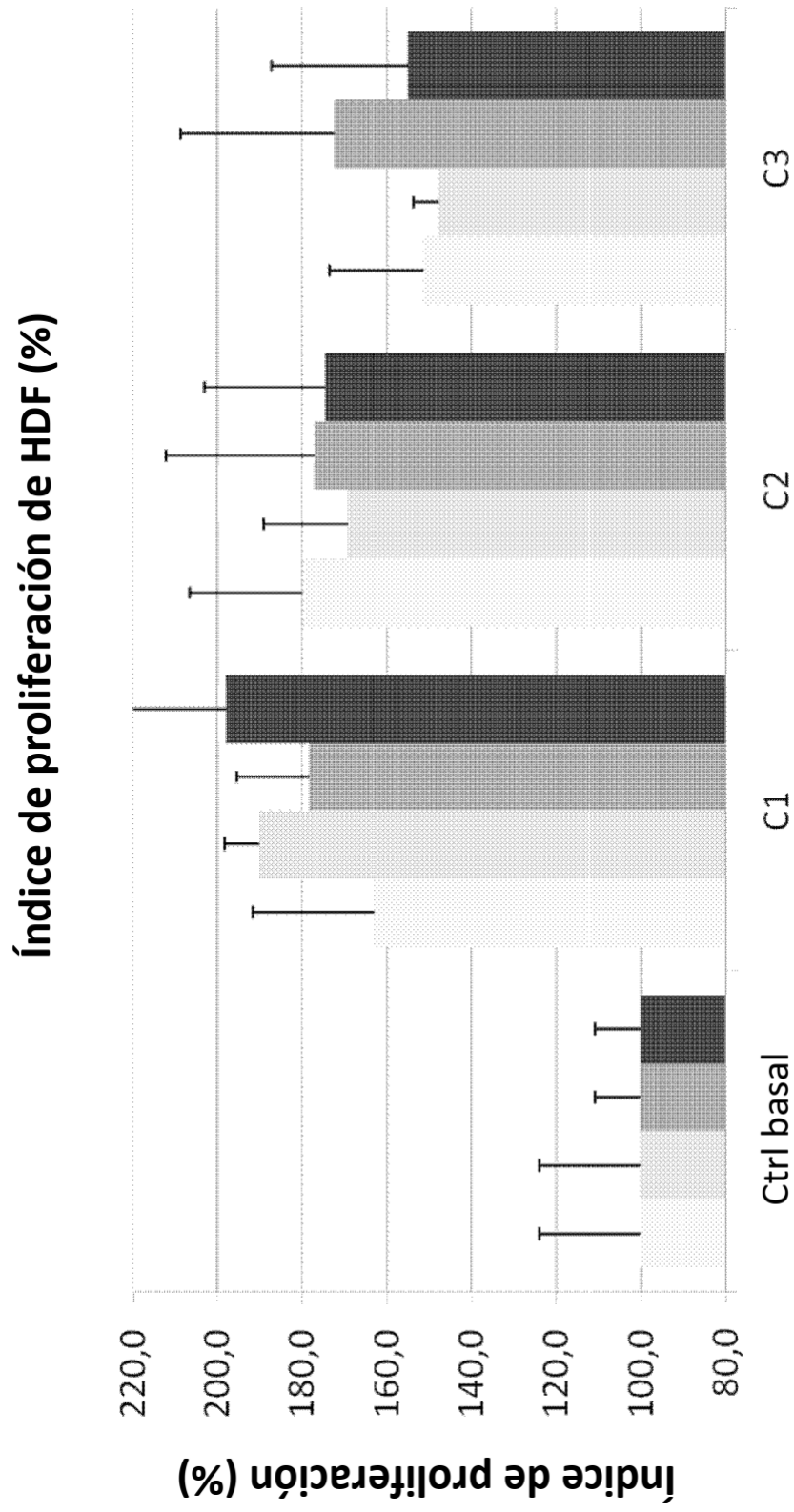


FIG. 7

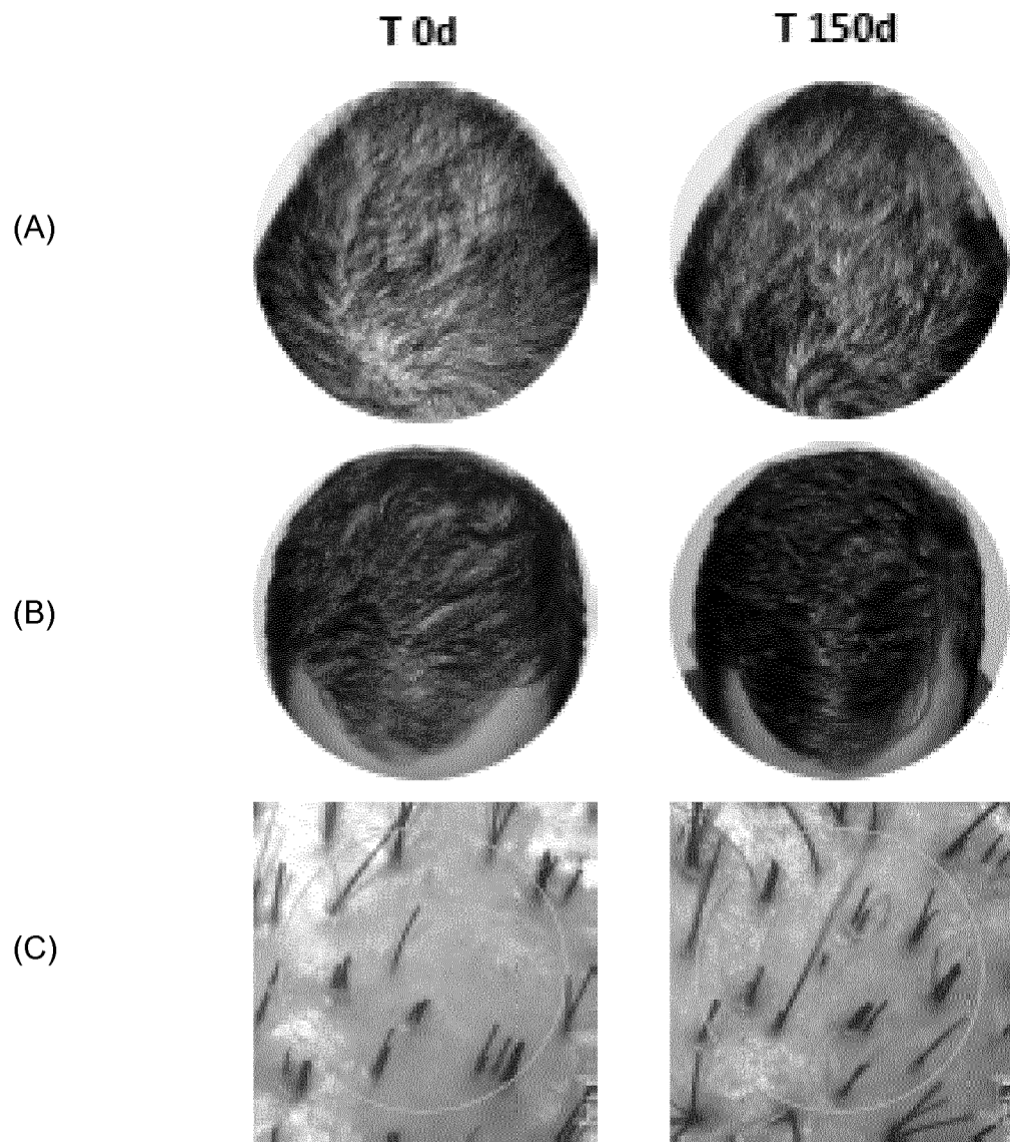


FIG. 8

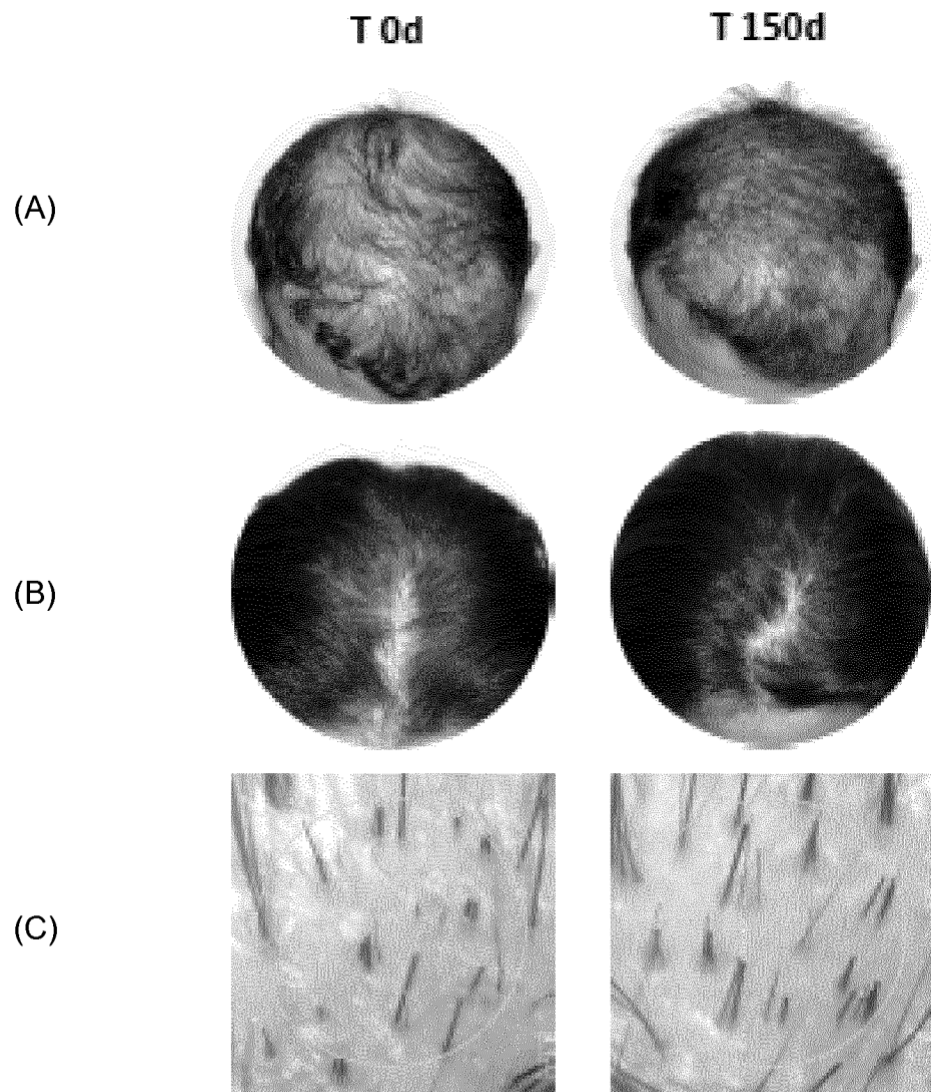


FIG. 9

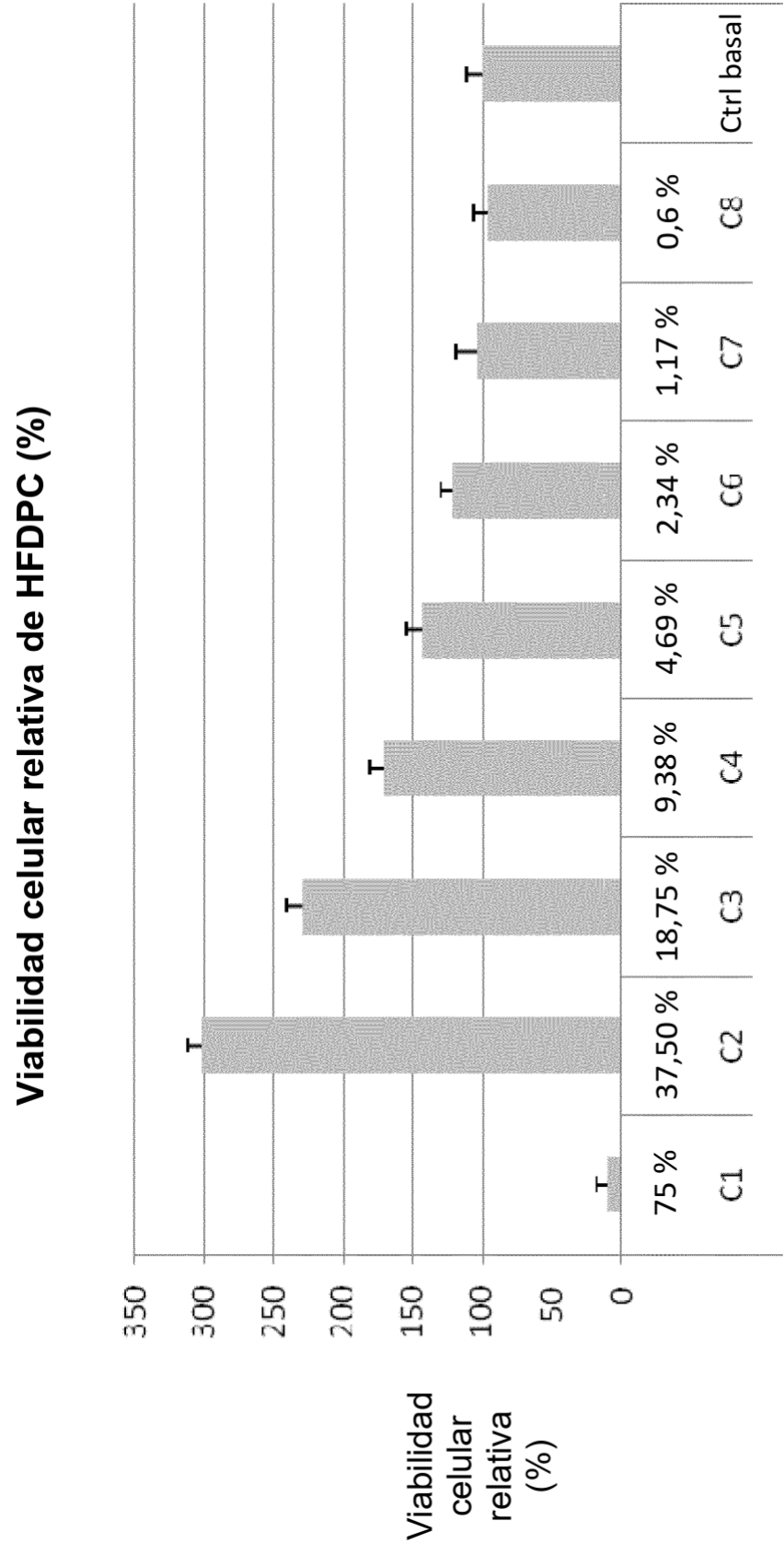


FIG. 10

Viabilidad celular relativa de HDF (%)

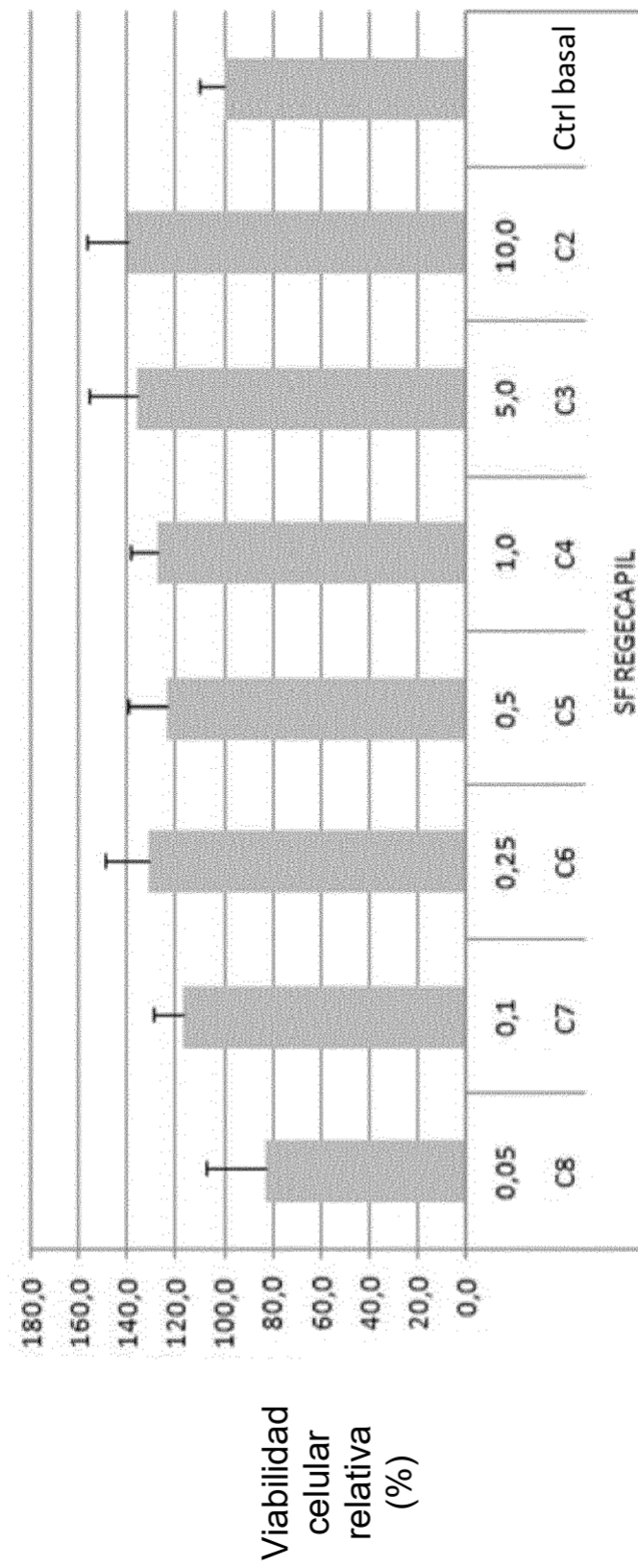


FIG. 11

Viabilidad celular relativa de queratinocitos

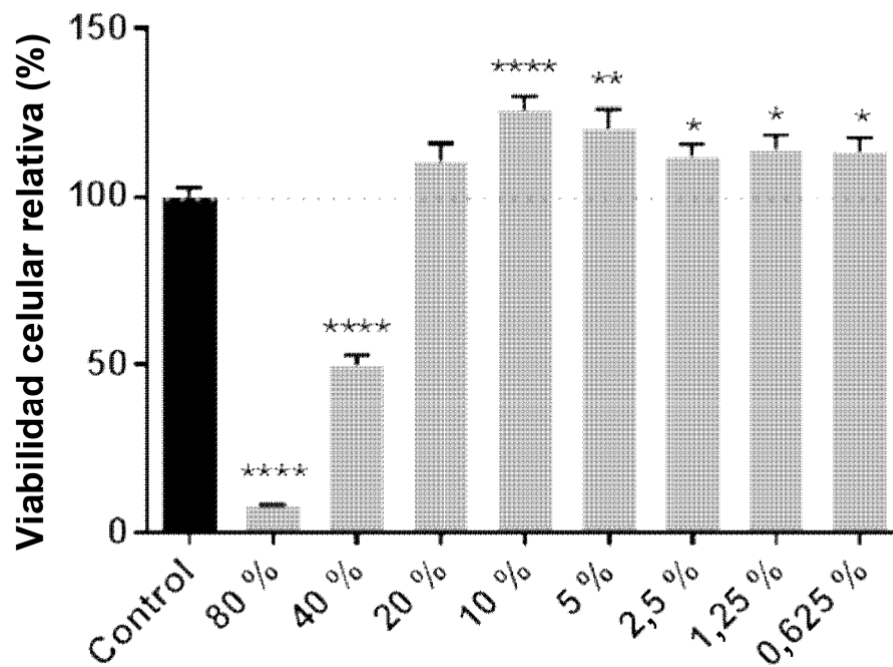


FIG. 12

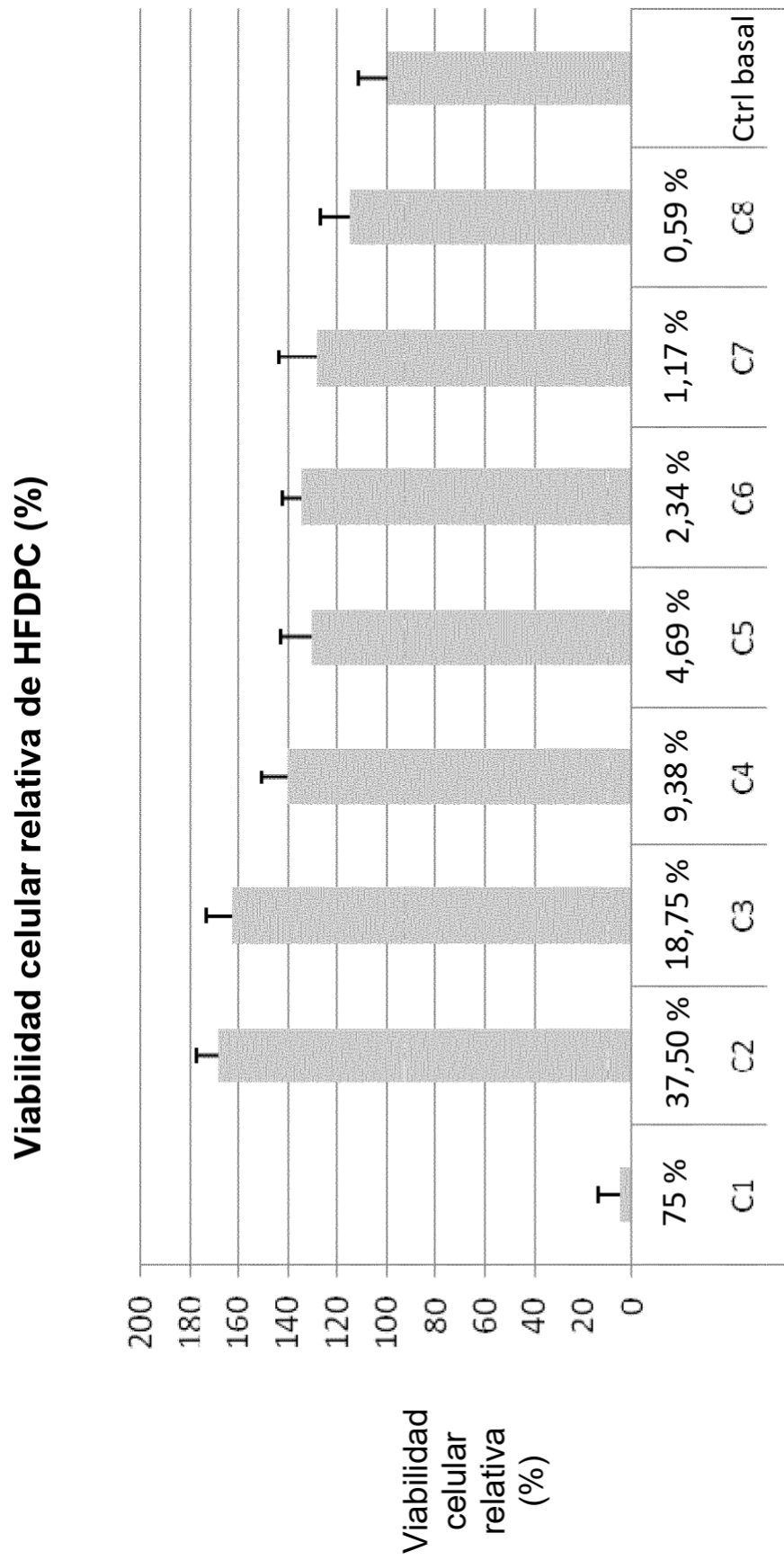


FIG. 13

Viabilidad celular relativa de HDF (%)

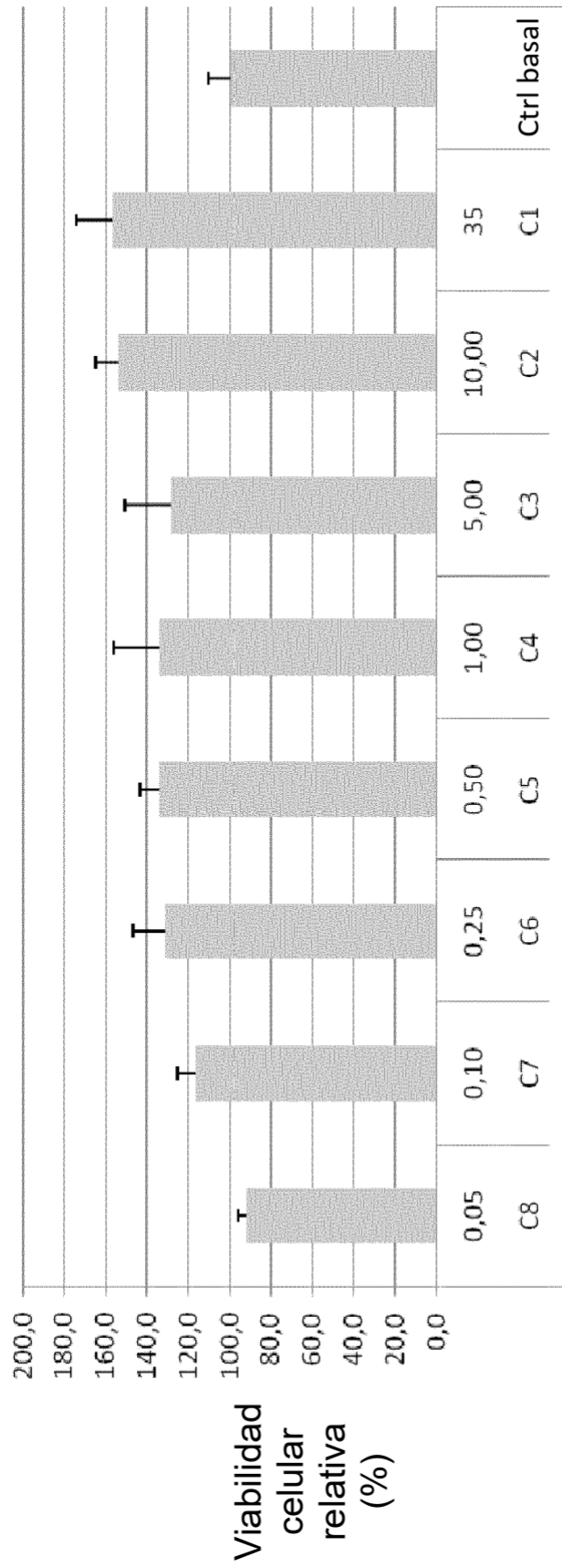


FIG. 14

Viabilidad celular relativa de queratinocitos

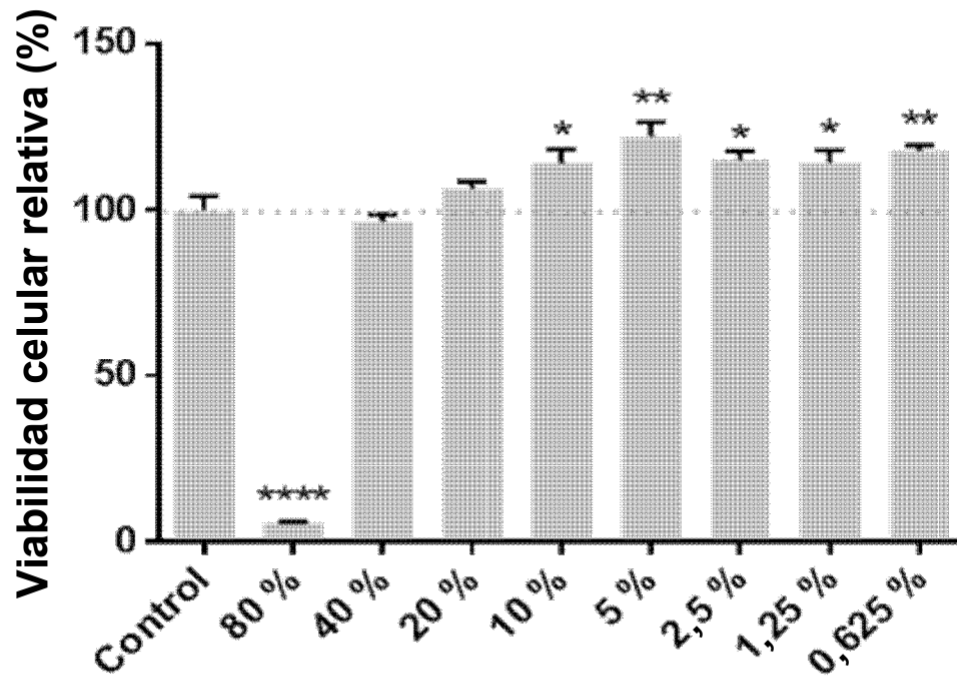


FIG. 15

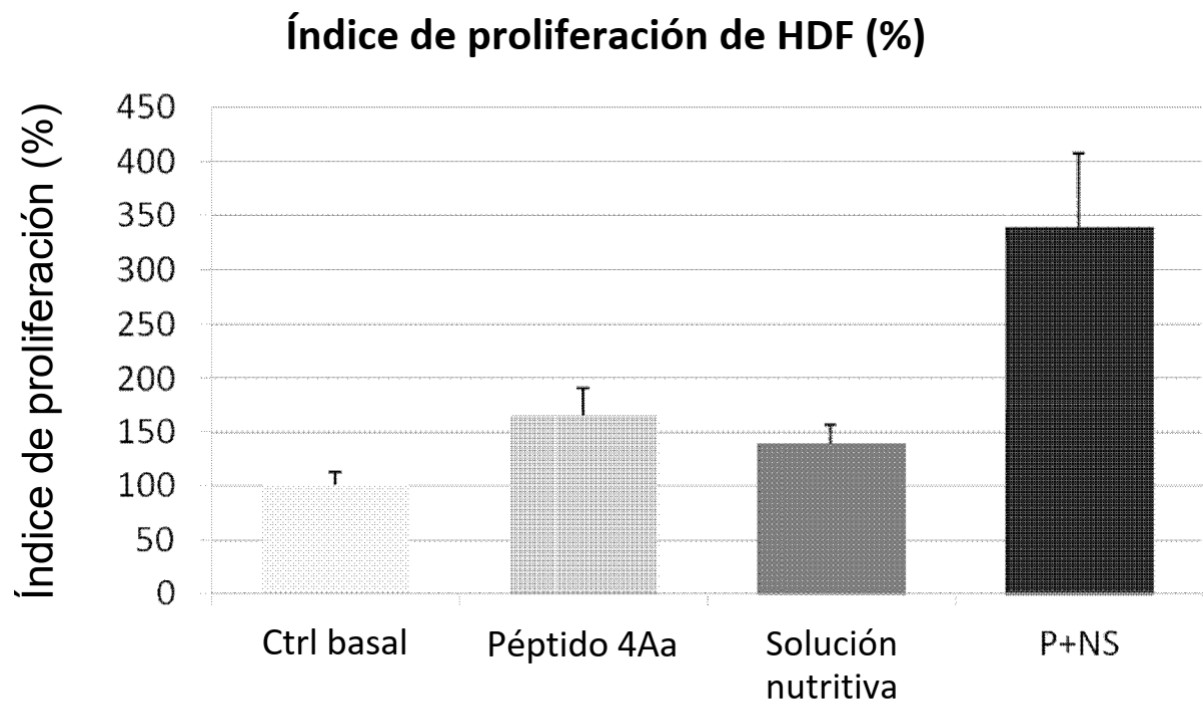


FIG. 16

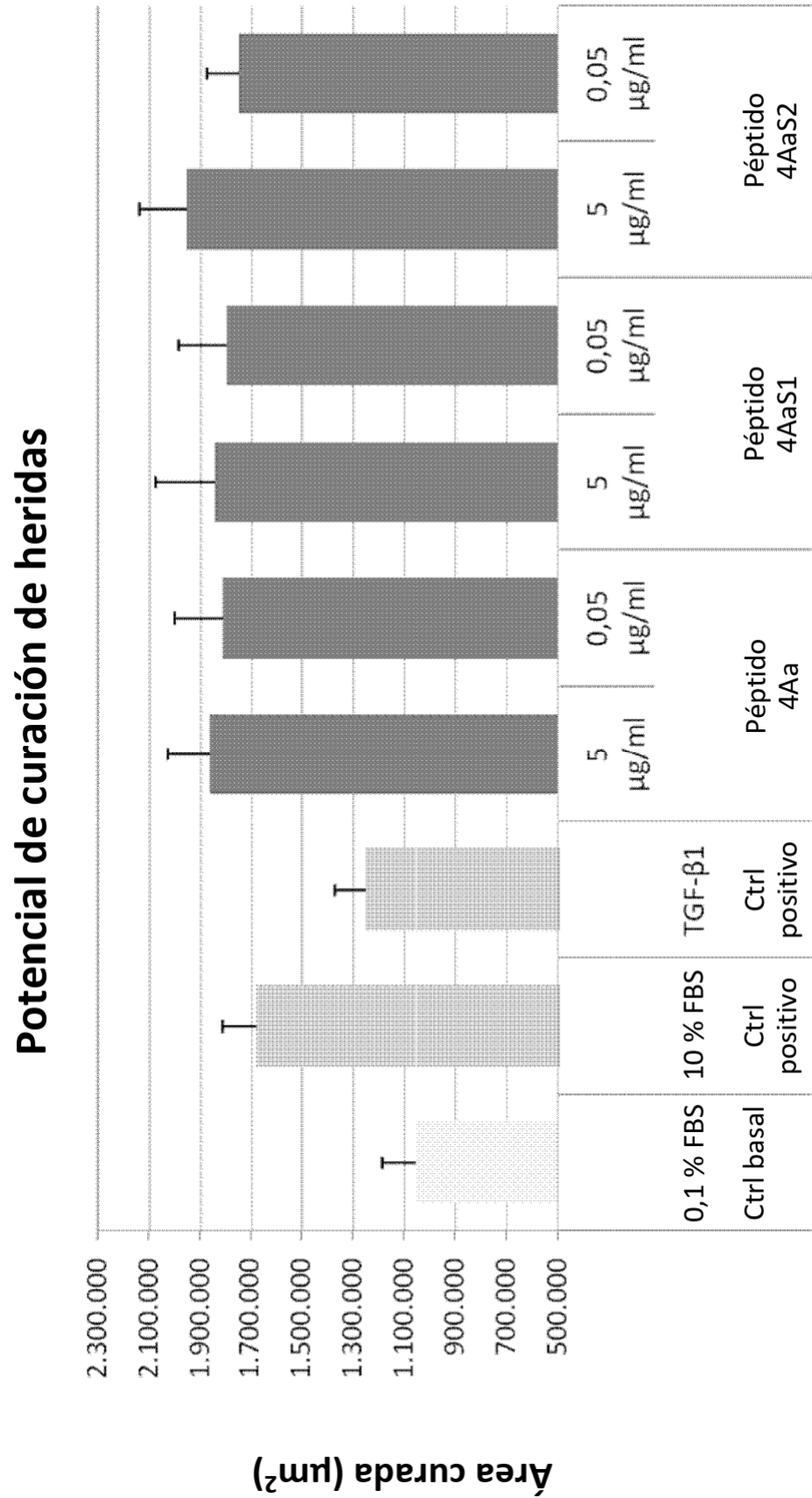


FIG. 17

REFERENCIAS CITADAS EN LA DESCRIPCIÓN

Esta lista de referencias citadas por el solicitante es únicamente para la comodidad del lector. No forma parte del documento de la patente europea. A pesar del cuidado tenido en la recopilación de las referencias, no se pueden excluir errores u omisiones y la EPO niega toda responsabilidad en este sentido.

Documentos de patentes citados en la descripción

- EP 16164645 A [0001]
- US 4139619 A [0004] [0138]
- US 4596812 A [0004] [0138]
- US 6281241 B [0005] [0138]
- WO 2007113851 A [0006] [0138]
- WO 2006087759 A [0007] [0138]

Literatura diferente de patentes citada en la descripción

- **PUMTHONG et al.** Curcuma aeruginosa, a novel botanically derived 5 α -reductase inhibitor in the treatment of male-pattern baldness: a multicenter, randomized, double-blind, placebo-controlled study. *Journal of Dermatological Treatment*, 2012, vol. 23, 385-392 [0008]
- **MATSUBAYASHI et al.** Phytosulfokine, sulphated peptides that induce the proliferation of single mesophyll cells of *Asparagus officinalis* L. *Proc. Natl. Acad. Sci.*, 1996, vol. 93, 7623-7627 [0014] [0138]
- **PUMTHONG et al.** Curcuma aeruginosa, a novel botanically derived 5 α -reductase inhibitor in the treatment of male-pattern baldness: a multicenter, randomized, double-blind, placebo-controlled study. *Journal of Dermatological Treatment.*, 2012, vol. 23, 385-392 [0138]