

FOLHA DO RESUMO

Modalidade e n.º (11) 01-Nr. 99.408 L	T D	Data do pedido: (22) 1991/10/31	Classificação Internacional (51)
Requerente (71): THE PROCTER & GAMBLE COMPANY, norte-americana, com sede em One Procter & Gamble Plaza Cincinnati, Ohio 45202, Estados Unidos da América			
Inventores (72): Teresa K.WONG, Raphael WARREN, ambos residentes nos Estados Unidos da América.			
Reivindicação de prioridade(s) (30)			Figura (para interpretação do resumo)
Data do pedido	País de Origem	N.º de pedido	
1990/10/31	US	606289	
Epígrafe: (54) PROCESSO PARA A PREPARAÇÃO DE UMA COMPOSIÇÃO PARA REGULAR O CRESCIMENTO DO CABELO COM — PREENDENDO UM FACTOR DE CRESCIMENTO SOBRENADANTE DERIVADO DA CÉLULA EPITELIAL.			
Resumo: (máx. 150 palavras) (57) A presente invenção diz respeito a um processo para a preparação de uma composição para regular o crescimento do cabelo compreendendo um sobrenadante derivado a partir de uma cultura de células epiteliais que compreende um factor estimulante de crescimento com características de mitogenicidade para células da papila dérmica, mitogenicidade para células 3T3, perda de mitogenicidade para células epidérmicas, e um peso molecular maior do que cerca de 3.000 D; e um veículo farmacêuticamente aceitável.			

NÃO PREENCHER AS ZONAS SOMBREADAS


28 FEV. 1992

1 PROCESSO PARA A PREPARAÇÃO DE UMA COMPOSIÇÃO PARA REGULAR
O CRESCIMENTO DO CABELO COMPREENDENDO UM FACTOR DE CRESCI-
MENTO SOBRENADANTE DERIVADO DE CÉLULA EPITELIAL

5 CAMPO TÉCNICO

A presente invenção diz respeito a novas composições que regulam o crescimento do cabelo.

TÉCNICAS ANTECEDENTES DA INVENÇÃO

10 A sociedade em geral continua a ligar um estigma à perda de cabelo. O desejo de ter uma cabeça cheia de cabelo saudável tem resultado numa variedade de aproximação à "cura" de calvície. A investigação do folículo capilar encontra-se entre a variedade de estudos de crescimento do cabelo que tem sido referido na literatura especializada.

15 Existem duas características essenciais do folículo capilar. Estas incluem os epitélios e um compartimento dérmico especializado chamado papila dérmica. Os epitélios dão origem às células de raiz (stem cell) epidérmicas que por sua vez dão origem à bainha da raiz exterior, dando origem à célula matriz, que dá origem à bainha de raiz interior e fibra de cabelo. O tamanho da papila dérmica está relacionado com o tamanho do folículo capilar, e o tamanho do folículo está relacionado com o comprimento do cabelo produzido. Por exemplo, folículos de cabelo terminais no couro cabeludo em indivíduos cabeludos são mais compridos e produzem cabelo comprido e espesso. Estes folículos contêm papilas dérmicas grandes. Em contraste, os folículos lanuginosos vulgarmente observados num couro cabeludo careca são pequenos e produzem cabelo curto e fino. Estes folículos lanuginosos contêm papilas dérmicas pequenas. Observações semelhantes que dizem respeito ao relacionamento entre o tamanho da papila e o folículo capilar, e em última análise com o crescimento do cabelo, têm sido feitas com animais com pelo. Os factores específicos que regulam o tamanho da papila dérmica podem em última análise regular o

20

25

30

35

26/FEV. 1992

1 crescimento de cabelo.

O Pedido de Patente Europeia nº 0.215.274, Eisinger, atribuído ao Memorial Hospital para Cancro e Doen-
ças Congêneres, publicado em 25 de Março de 1987, expõe a
5 sonicação das células epidérmicas para extrair os materiais intracelulares. Também são expostos métodos para melhorar o sarar de feridas, regenerar a epiderme, e melhorar o crescimento de cabelo através da aplicação de um extracto de célula epidérmica.

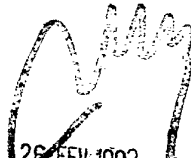
10 Eisinger, M., S. Sadan, I.A. Silver e R.B. Flick, (Março, 1988) "Growth Regulation of Skin Cells by Epidermal Cell- Derived Factors: Implicações para Sarar Feridas", Procedures of the National Academy of Sciences, Vol. 85, pp. 1937-1941, expõe um factor de crescimento de-
15 rivado de célula epidérmica derivado por sonicação das células epidérmicas ou de um sobrenadante isento de células. O factor tem as seguintes características: 1) é directamente mitogénico para células epidérmicas; 2) não é directamente mitogénico para células 3T3; 3) inibe directamente a a-
20 ctividade metabólica de fibroblasto; e 4) tem um peso molecular aproximado de 1000 daltons.

O Pedido de Patente Mundial 89/07425, Sackier, Wood, Krishnan e Wigginton, atribuído a Genethics Ltd., publicado em 24 de Agosto de 1989, reivindica um un-
25 guento, loção, pomada ou gel contendo células epiteliais de âmnio e extractos de tais células epiteliais dispersos num veículo farmacêuticamente aceitável. '07245 expõe além disso que uma tal composição pode ser usada para estimular o folículo capilar e crescimento de cabelo.

30 Objectivos da Presente Invenção

É um objectivo da presente invenção fornecer composições para regular o crescimento de cabelo.

É também um objectivo da presente invenção fornecer composições para regular o crescimento do cabelo
35 que são adequadas para aplicação tópica.


28. FEV. 1992

1 É também um objectivo da presente invenção
fornecer composições para regular o crescimento de cabelo
que são adequadas para aplicação através de uma injeção
cutânea.

5 É também um objectivo da presente invenção
fornecer métodos para regular o crescimento de cabelo que
compreendem a aplicação na pele ou pelo de um mamífero de
uma composição tópica.

10 É também um objectivo da presente invenção
fornecer métodos para regular o crescimento de cabelo que
compreendem a injeção cutânea de uma composição.

SUMÁRIO DA INVENÇÃO

15 A presente invenção diz respeito a uma com-
posição para regular o crescimento de cabelo compreendendo
uma quantidade segura e eficiente de um sobrenadante deri-
vado a partir de uma cultura de células epiteliais, de pre-
ferência células epiteliais proliferativas, que compreendem
um factor estimulador de crescimento com características
de mitogenicidade para células da papila dérmica, mitogeni-
20 cidade para células 3T3, falta de mitogenicidade para célu-
las epidérmicas, e um peso molecular superior a cerca de
3.000 daltons; e um veículo farmacêuticamente aceitável.

DESCRIÇÃO DETALHADA DA INVENÇÃO

25 Tal como é aqui usada, "mitogenicidade" si-
gnifica a capacidade para estimular crescimento (mitose)
nas células.

30 Tal como é aqui usado, "regular o crescimen-
to de cabelo" significa induzir a formação de um maior nú-
mero de madeixas de cabelo, e/ou aumentar o diâmetro da ma-
deixa de cabelo, e/ou alongar a madeixa de cabelo, e/ou evi-
tar, retardar, ou controlar o processo de perda de cabelo.

 Tal como é aqui usado, "células proliferati-
vas" significa células sofrendo mitose.

35 Tal como é aqui usado, "células epiteliais"
refere-se às células que cobrem todas as superfícies desco-


26. FEV. 1992

1 bertas, cutâneas, mucosas, e serosas, incluindo as glându-
las e outras estruturas delas derivadas, por exemplo, cor-
nea, esofágica, epiderme e células epiteliais de folí-
culos pilosos, mas não incluindo células epiteliais de
5 âmnio. Tais células podem ser células não-malignas normais,
ou células transformadas/imortalizadas.

Tal como é aqui usado, "células epiteliais
de folículos pilosos" refere-se a células epiteliais que
envolvem a papila dérmica no folículo piloso, por exem-
10 plo, células base, bainha da raiz exterior, células matriz,
células de bainha de raiz interior. Tais células podem ser
células não-malignas normais, ou células transformadas/imor-
talizadas.

Tal como é aqui usado, "células epidérmicas"
15 refere-se a células epiteliais na epiderme. Tais células po-
dem ser células não-malignas normais, ou células transfor-
madas/imortalizadas.

Tal como é aqui usado, "epiderme" refere-se
à camada celular contínua estratificada queratinizante que
20 abrange todo o organismo e termina em orifícios corporais
nas junções mucocutâneas, mas não incluindo as células epi-
teliais do folículo piloso.

Tal como é aqui usado "aplicação tópica" si-
gnifica colocar directamente ou espalhar sobre a pele exte-
rior.
25

Tal como é aqui usado, "células transforma-
das" refere-se a células que se converteram espontâneamente
a um estado de crescimento ilimitado, isto é, adquirirem a
capacidade de crescer através de um número infinito de divi-
sões em cultura.
30

Tal como é aqui usado, "células imortaliza-
das" refere-se a células que foram alteradas por meios quí-
micos e/ou meios recombinantes tais que a célula tem a ca-
pacidade de crescer através de um número indefinido de divi-
sões em cultura.
35


26. FEV. 1992

1 Tal como é aqui usado, "injecção cutânea" significa a introdução de uma substância imediatamente por de baixo ou para dentro da pele por uma agulha hipodérmica.

5 Tal como é aqui usado, todas as percentagens são em peso a não ser que seja especificado o contrário.

As composições da presente invenção compreendem um factor de crescimento derivado de célula epitelial que estimula a actividade de mitogénica da célula da papila dérmica e aumenta o crescimento de cabelo. Além da
10 respectiva mitogenicidade das células da papila dérmica, outras características do factor de crescimento incluem 1) mitogenicidade para células 3T3, 2) uma falta de mitogenicidade para células epidérmicas, 3) um peso molecular superior a cerca de 3.000 daltons, 4) sensibilidade a quimotripsina, e 5) retém 90% até 40% de mitogenicidade para células da papila dérmica a seguir à exposição a temperaturas
15 de 50°C e 100°C, respectivamente, durante uma hora.

O factor de crescimento de cabelo derivado de célula a ser utilizado na presente invenção pode ser obtido através da cultura de células epiteliais em meio nutritivo seguido da separação do sobrenadante de tais culturas, centrifugando o sobrenadante para remover células e fragmentos de células, e concentrando e dialisando o sobrenadante para isolar substâncias que têm um peso molecular
20 aparente de cerca de 3.000 D.

O concentrado isento de células assim obtido contém o factor de crescimento de cabelo derivado de célula epitelial tendo um peso molecular aparente de cerca de 3.000 D. Este factor de crescimento de cabelo é então incorporado nas composições de acordo com a invenção juntamente com um veículo adequado. Alternativamente, o concentrado isento de células a seguir à diálise, pode ser seco, de preferência por criodessecação, antes da incorporação nas composições de acordo com a invenção.

35 Embora o factor de crescimento de cabelo


26.FEV.1992

1 tenha um peso molecular aparente de cerca de 3.000 D. jul-
ga-se que certos fragmentos derivados do factor de cresci-
mento de cabelo podem também mostrar actividade na regula-
ção do crescimento de cabelo.

5 De acordo com uma concretização preferida
da invenção, o sobrenadante de cultura de célula epitelial
isento de células é concentrado em pelo menos 40 até 50 ve-
zes, de preferência pelo menos 100 vezes, para fornecer um
concentrado contendo o factor de crescimento de cabelo, ter-
10 do um nível de proteína não superior a 10 mg/ml, de prefe-
rência 2 até 3 mg/ml.

A quantidade de factor de crescimento de
cabelo a ser incorporado com um veículo adequado em compo-
sições para utilização tópica pode variar largamente, mas
15 em geral, uma quantidade expressa como proteína a partir
de cerca de 0,00001% até cerca de 20%, de preferência a par-
tir de cerca de 0,001% até cerca de 10%, de maior preferên-
cia de cerca de 0,01% até cerca de 5% por peso da composi-
ção fornecerá uma dose adequada de factor de crescimento
20 para a pele a seguir à aplicação tópica.

A quantidade de factor de crescimento de ca-
belo a ser incorporada com o veículo adequado em composi-
ções para injeções cutâneas pode variar largamente, mas
em geral, uma quantidade expressa como uma proteína de a
25 partir de cerca de 0,00001% até cerca de 10%, de preferên-
cia a partir de cerca de 0,001% até cerca de 10%, de maior
preferência a partir de cerca de 0,01% até cerca de 10%,
por peso da composição, fornecerá uma dose adequada de fac-
tor de crescimento de cabelo para a área de alvo a seguir
30 à injeção cutânea.

Os exemplos que se seguem pretendem ilus-
trar o processo para obtenção do factor de estimulação de
crescimento quando aplicada a uma amostra particular. Eles
não pretendem limitar o invento.

35

26.FEV.1992

EXEMPLO I

Preparação do Factor de Estimulação de Crescimento Derivado
de Célula Epidérmica

As células epidérmicas de prepúcio humano são preparadas de acordo com o método de S. T. Boyce e R. G. Ham (J Tissue Culture Meth 9, 83-93, 1985) com as seguintes modificações. Após o tratamento do prepúcio com colagenase, a epiderme é colocada em 0,0125% de tripsina em solução salina tamponada com Hepes. A epiderme é então triturada para libertar células epidérmicas individuais. As células epidérmicas crescem num meio de cultura de célula de KGM (Clonetics; # 3001). As células epidérmicas são subcultivadas usando 3,0 Unidades/ml de dispase a 37°C até que as células se separem da superfície. KGM é então adicionado numa razão volumétrica de 5:1 em relação à dispase. A suspensão das células é então transferida para um tubo cónico e centrifugada a 200 x G durante 5 minutos. As células são ressuspensas com KGM fresco para formação de placas. As células são desenvolvidas para a passagem #2 na qual são enxaguados e o meio de cultura mudado para 'Meio Basal de Queratinócitos' (meio que não contém extracto de pituitária nem os factores de crescimento que se seguem, normalmente presentes no meio de cultura, incluindo, hidrocortisona, insulina, e factor de crescimento epidérmico; KBM Clonetics #3101). As células epidérmicas são incubadas neste meio até cerca de 48 horas momento no qual o meio cultura é decantado. Este meio ('Meio Definido Condicionado') é então centrifugado a 100.000 x G durante 30 minutos. O meio é fraccionado e concentrado através de ultrafiltração usando um filtro Amicon Centricon-3 tendo uma selecção (cutoff) de peso molecular de cerca de 3.000D. O retido, tendo um peso molecular maior do que cerca de 3.000 D, conterá toda a actividade do factor de crescimento tal como determinado no ensaio do mitogénico de célula da papila dérmica abaixo, em que não haverá actividade no filtrado que contém material


26 FEB. 1992

1 tendo um peso molecular menor do que cerca de 3.000 D.

Métodos alternativos para fraccionamento e
concentração do meio condicionado podem incluir a diálise
do meio contra uma membrana tendo uma selecção específica
5 de peso molecular, seguida da liofilização do meio, e fi-
nalmente a reconstituição do meio num tampão adequado.

EXEMPLO II

Preparação do Factor Estimulante de Crescimento Derivado de Célula Epitelial de Folículo Humano

10 Os folículos capilares são obtidos a partir
de biópsias de couro cabeludo. Os folículos são cuidadosa-
mente dissecados e imersos no Meio de Eagle modificado por
Dulbecco (DMEM) tamponado com HEPES 25mM (ácido N-2-hidro-
xietilpiperazino-N'-2-etanossulfónico) e complementado com
15 antibióticos tal como descrito por H-J Stark et al (Diffe-
rentiations 35, 236-248, 1987). Os folículos são transferi-
dos para uma placa de cultura de tecido de 35 mm contendo
o acima mencionado meio. O meio é então aspirado e os folí-
culos cobertos com 0,1% de tripsina (1:250) e 0,02% de EDTA
20 em solução salina tamponada com fosfato (PBS) sem cálcio ou
magnésio e incubado durante 10 minutos a 37°C. É obtido uma
única suspensão de células pipetando vigorosamente os folí-
culos em DMEM suplementado com 10% de soro de vitelo acaba-
do de nascer. Caso seja necessário, os folículos são sequen-
25 cialmente tratados outra vez com tripsina. A suspensão de
células é colhida e centrifugada a 200 x G durante 10 minu-
tos. As células são enxaguadas mais uma vez em DMEM sem so-
ro. As células epiteliais são desenvolvidas num meio de cul-
tura de célula de KGM (clonetics: #3001). Células epiteli-
30 ais são subcultivadas usando 3,0 Unidades/ml de dispase a
37°C até as células se soltarem da superfície. KGM é então
adicionado numa razão volumétrica de 5:1 em relação à dispa-
se. A suspensão de células é então transferida para um tubo
cónico e centrifugada a 200 x G durante 5 minutos. As célu-
35 las são ressuspensas com KGM fresco para formação de pla-

26.FEV.1992

1 cas. As células desenvolvem-se para a passagem #2 altura
em que as células são enxaguadas e o meio de cultura muda-
do para 'Meio Definido' (meio que não contém extracto de
5 pituitária nem os factores de crescimento seguintes, normal-
mente presentes no meio da cultura, incluindo hidrocortiso-
na, insulina, e factor de crescimento epidérmico; KBM Clo-
netics #3101). As células epiteliais são incubadas neste
meio até cerca de 48 horas altura em que o meio de cultura
é decantado. Este meio ('Meio Definido Condicionado') é en-
10 tão centrifugado a 100.000 x G durante uma hora. O meio é
fraccionado e concentrado através de ultrafiltração usando
um filtro Amicon Centricon-3 tendo uma selecção de peso mo-
lecular de 3.000 D. O retido tendo um peso molecular maior
do que 3.000 conterá todas a actividade do factor de cres-
15 cimento tal como está abaixo determinada no ensaio do mito-
géneo de célula da papila dérmica, onde não haverá activida-
de no filtrado que contém o material tendo um peso molecu-
lar menor do que 3.000 D.

20 Métodos alternativos para fraccionar e con-
centrar o meio condicionado podem incluir a diálise do meio
contra uma membrana tendo uma selecção específica de peso
molecular, seguido da liofilização do meio, e finalmente a
reconstituição do meio em cultura adequada.

EXEMPLO III

25 Ensaio do Mitogéneo de Célula da Papila Dérmica

A. Preparação de Células da Papila Dérmica do Couro Cabelu- do Humano

30 As células da papila dérmica do couro cabe-
ludo humano (PDh) são preparadas usando um procedimento mo-
dificado de metodologias existentes (A.G. Messenger, Br J
Dermatol 110, 685-689, 1984; e C. A. B. Jahoda e R. F. Oli-
ver, Br J Dermatol 105, 623-627, 1981; e C. A. B. Jahoda e
R. F. Oliver, J Embryol Exp Morph 79, 211-224, 1984). A pe-
le do couro cabeludo humano é obtida a partir de uma cirur-
35 gia de redução do couro cabeludo e colocada em Meio de

26.FEV.1992

1 Eagle modificado por Dulbecco estéril e gelado/F-12 (1:1)
contendo 20% de soro de feto de vitelo e antibióticos. Nas
48 horas após cirurgia, a pele é dissecada, a gordura remo-
vida, e folículos de cabelo individuais colhidos e coloca-
5 dos em meio Chang gelado (Hana Biological #T101-058) contem-
do 10% de soro de vitela definido de Hyclone (Hyclone Lab
A-2151-L); ('Chang Completo'). Cortam-se os bulbos e são
microdissecados para obter a papila dérmica. São colhidas
10 dez papilas dérmicas deste modo, transferidas para um tubo
cônico estéril contendo 2 ml de meio Chang completo, e cen-
trifugadas a 200 x G durante 5 minutos. O meio é aspirado e
as papilas dérmicas são ressuspensas em 2 ml de Chang com-
pleto contendo Colagenase Tipo IV a 65 Unidades/ml. A colo-
15 genase é preparada com uma reserva de 1mg/ml em solução sa-
lina tamponada com fosfato. Após 30 minutos a 37°C num ba-
nho de água em agitação, as papilas dérmicas são colhidas
por centrifugação a 200 x G durante 5 minutos. O grão de pa-
pila é enxaguado uma vez em Chang completo e é transferido
20 para um único alvéolo (2,0 cm²) de uma placa de 24 alvéolos
(Linbro # 76-033-05) contendo 0,5 ml de Chang completo e in-
cubado a 37°C numa atmosfera humidificada contendo 5% de
CO₂.

Logo que se observe o crescimento a partir
do transplante (geralmente três dias), o meio de cultura é
25 substituído três vezes por semana. À medida que as células
se tornam confluentes, as células são removidas com 0,25%
de tripsina em Solução de Sal Equilibrada de Dulbecco e são
transferidos para um frasco de cultura de células T-25 de
25 cm² (Passagem # 1) contendo 5 ml de Chang completo. As
30 células PDh da Passagem # 3 são usadas nos ensaios promoto-
res de crescimento. Cada passagem representa um aumento
três vezes aproximado em número de células da papila dérmica.

B. Ensaio do Mitogênico de Célula da Papila Dérmica

O método que se segue é uma medida de acti-


26. FEV. 1992

1 vidade mitótica das células da papila dérmica e pode ser
usado para detectar factores de crescimento (M. B. Sporn e
A. B. Roberts, Nature 332, 217-219, 1988). Células da papi-
la dérmica humana são plaqueadas para 20 - 40% de confluên-
5 cia em mistura 1:1 de Chang Completo e Meio de Eagle modifi-
cado por Dulbecco ('DMEM' rico em glucose) contendo 15% de
soro de feto de vitelo e antibióticos ('DMEM' Completo). No
dia seguinte o meio é mudado para DMEM Completo. No dia se-
guinte o meio é mudado para DMEM contendo 0,5% de soro de
10 vitelo fetal. Durante as últimas quatro horas de uma incu-
bação de 24 horas, as células são incubadas com (metil-3-H)-
-timidina. Este ponto representa a actividade mitótica de
linha base das células da papila dérmica. As células radio-
-marcadas são então solubilizadas numa solução contendo
15 0,1% de dodecilsulfato de sódio, EDTA 0,05mM, e Tris 1,0mM
pH 8,0. O ADN radio-marcado precipitável por ácido triclo-
roacético e etanol é determinado e normalizado para o teor
total de ADN celular na amostra (C. Lebarca e K. Paigen,
Analyt Biochem 102, 344-351, 1980).

20 As células da papila dérmica que permanecem
são então expostas a (a) DMEM Completo fresco (controlo po-
sitivo) (b) DMEM fresco contendo 0,5% de soro de feto de vi-
telo (controlo negativo), (c) mistura 1:1 de DMEM fresco
contendo 0,5% de soro de vitelo fetal e Meio Definido Condi-
25 cionado, ou (d) mistura 1:1 de DMEM fresco contendo 0,5% de
soro de vitelo fetal e Meio Simulado Condicionado. O meio
usado em (c) e (d) é ajustado para uma concentração final
de soro de vitelo fetal de 0,5% e CaCl_2 1,0 mM antes de se
adicionar às células PDh. Durante as últimas quatro horas
30 de uma incubação de 24 horas as células são incubadas com
(metil-3-H)-timidina. As células são processadas ADN rádio-
-marcado precipitável por ácido e etanol tal como acima des-
crito para a medição da linha base.

35 Os resultados mostram que o Meio Definido
Condicionado induz um aumento significativo em incorporação


26 FEV. 1992

1 de timidina em relação ao controlo simulado.

EXEMPLO IV

Ensaio de Mitogénico de Célula 3T3

5 O ensaio de mitogénico de célula 3T3 é baseado no ensaio descrito por Scher, C. D., et al. Nature 281, 390-392, 1979; Cohen, S. e Carpenter, G. Proc Nat Acad Sci, USA 72, 1317-1320, 1975; e Gospodarowicz, D F Biol Chem 250, D J Biol Chem 250, 2515-2520, 1975.

10 As células 3T3 de Balb/c são plaqueadas e crescem numa placa de cultura de tecido de 24 alvéolos em Meio de Eagle modificado por Dulbecco (DMEM +10% de soro de vitelo acabado de nascer. O meio é mudado três vezes por semana até à confluência, altura em que o meio é mudado para DMEM + 0,5% de soro. Após a mudança do meio uma vez durante

15 as 48 horas seguintes os alvéolos são divididos em grupos de alvéolos triplicados. No Grupo I, [³H]-timidina é adicionada durante as últimas 4 horas do período de 48 horas e subsequentemente processada para a incorporação de timidina no ADN celular ('Controlo de Linha Base no Momento Zero').

20 No Grupo II, o meio é mudado para DMEM + 0,5% de soro e as células incubadas por mais 24 horas, radio-marcadas e processadas tal como descrito ('Controlo Negativo'). No Grupo III, o meio é mudado para DMEM + 10% de soro e as células incubadas por mais 24 horas, radio-marcadas e processadas tal como descrito ('Controlo de Soro Positivo'). No Grupo

25 IV, o meio é mudado para uma mistura 1:1 de DMEM + 0,5% de soro e Meio Definido Condicionado. Antes de misturar os dois meios, o meio condicionado é ajustado para 0,5% de soro e CaCl₂ 1mM. Ao fim das 24 horas de incubação, as células são radio-marcadas e processadas tal como descrito. No

30 Grupo V, o meio é mudado para uma mistura 1:1 de DMEM + 0,5% de soro e meio simulado. Antes de misturar os dois meios, o meio simulado é ajustado para 0,5% de soro e CaCl₂ 1mM. Ao fim das 24 horas de incubação, as células são radio-marcadas e processadas tal como descrito.

35


26 FEV. 1992

1 Os dados daí resultantes mostrarão que o
Meio Definido Condicionado induz um aumento significativo
na incorporação de timidina em relação ao controlo simula-
do.

5

EXEMPLO V

Ensaio do Mitogénico na Célula Epitelial

As células epiteliais do prepúcio humano e
meio condicionado são preparados tal como previamente des-
crito. Para o ensaio de mitogénico, as células epiteliais na
10 passagem $\neq$ 1 são separadas com dispase plaqueadas a 10-25%
de confluência em cada placa de 8 alvéolos (8 cm²) em meio
KGM completo. O meio é mudado três vezes por semana até que
se atinja aproximadamente 70% de confluência. As células
são mantidas neste meio durante cinco dias adicionais para
15 reduzir a actividade mitogénica e causar depleção do meio da
respectiva actividade do factor de crescimento. Durante as
últimas quatro horas desta incubação, (metil-³H)-timidina é
adicionada a um conjunto de três alvéolos ('actividade mitó-
tica de linha base). No fim do período de incubação de qua-
tro horas, as células são enxaguadas e solubilizadas numa
20 solução contendo 0,1% de dodecil sulfato de sódio. EDTA,
0,05mM e Tris 1,0 mM pH 8,0. O ADN radio-marcado precipitá-
vel por ácido tricloroacético e etanol/éter é determinado
e normalizado para o teor total de ADN celular na amostra.
25 Para as células que permanecem, após a incubação de cinco
dias, o meio ('meio velho') é removido e guardado. A um con-
junto de três alvéolos é novamente adicionado o meio velho
('controlo negativo'). A um segundo conjunto de alvéolos é
adicionado KGM fresco ('controlo positivo'). A um terceiro
30 conjunto de alvéolos, uma mistura 1:1 de meio velho e meio
definido condicionado é adicionada ('teste'). A um quarto
conjunto de alvéolos uma mistura 1:1 de meio velho e meio
condicionado simulado é adicionada ('controlo simulado').
Durante as últimas quatro horas de uma incubação de 24 ho-
ras, as células são incubadas e radio-marcadas com timidina
35


26. FEV. 1992

1 tal como acima descrito.

Os resultados daí resultantes mostrarão que o Meio Definido Condicionado não contém factores que são mitogénicos às células epiteliais humanas relativamente ao controlo simulado.

EXEMPLO VI

Sensibilidade às Proteases

A. Sensibilidade à Protease: Tripsina

O meio condicionado derivado a partir das células epidérmicas do prepúcio é preparado tal como previamente descrito. O meio é tratado com tripsina tipo III (Sigma T-8253) numa concentração final que pode ir até 100 µg/ml a 37°C durante cerca de quatro horas. É então adicionado inibidor de tripsina de soja tipo I-S (Sigma Y-9003) para uma concentração final de 1 mg/ml. A mistura é então centrifugada a 20000 G durante trinta minutos, decantada, esterilizada por filtração. Este meio é testado no ensaio do mitogénico da célula da papila dérmica. Os dados mostram que a actividade de mitogenicidade do meio condicionado não é afectada pelo tratamento com tripsina em relação a um controlo que é tratado idênticamente mas sem tripsina.

B. Sensibilidade à Protease: Quimotripsina

O meio condicionado derivado a partir de células epidérmicas do prepúcio é preparado tal como anteriormente descrito. O meio é tratado com quimotripsina tipo I-S (Sigma C-7762) numa concentração final que pode ir até 100 µg/ml a 37°C durante até cerca de cinco horas. O inibidor de tripsina de soja tipo I-S (Sigma Y-9003) é então adicionado para uma concentração final de 1 mg/ml. A mistura é então centrifugada a 20000 G durante trinta minutos, decantada e esterilizada por filtração. Este meio é testado no ensaio do mitogénico da célula da papila dérmica. Os dados mostram que a actividade de mitogenicidade do meio condicionado decresceu significativamente no que diz respeito ao controlo que é tratado idênticamente mas sem quimotripsina.


28. FEV. 1992

1

EXEMPLO VII

Sensibilidade ao Calor

5 O meio condicionado derivado das células e-
pidérmicas do prepúcio é preparado tal como anteriormente
descrito. O meio é dividido em aliquotas e aquecido em ba-
nho de água a 50°C, 60°C, 70°C, 80°C, ou 100°C durante trinta
minutos. O meio também é mantido num banho de gelo duran-
te trinta minutos. Após este período, o meio é centrifuga-
do a 20000 G durante trinta minutos, decantado, e esterili-
10 zado por filtração. Este meio é testado no ensaio do mito-
géneo da célula da papila dérmica. Os resultados mostram
que há um declínio linear da actividade do factor de cres-
cimento de cerca de 90% até cerca de 40% após o meio condi-
cionado ser aquecido entre cerca de 50°C e cerca de 80°C.
15 À actividade do factor de crescimento permanece a cerca de
40% entre cerca de 80°C e cerca de 100°C.

Composições Reguladoras do Crescimento do Cabelo

20 A presente invenção diz respeito a composi-
ções para regular o crescimento de cabelo compreendendo uma
quantidade segura e efectiva de um factor de crescimento de
cabelo derivado de célula epitelial tendo as característi-
cas de mitogenicidade para células da papila dérmica, mito-
genicidade para células 3T3, uma falta de mitogenicidade pa-
ra células epidérmicas, e um peso molecular maior do que
25 cerca de 3.000 daltons; e um veículo farmacêuticamente acei-
tável. Tal como é aqui usado, "quantidade segura e efecti-
va" significa uma quantidade de composto ou composição su-
ficiente para induzir significativamente uma modificação
positiva na condição a ser tratada, mas suficientemente bai-
30 xa para evitar sérios efeitos secundários (a uma razão be-
nefício/risco razoável), dentro do âmbito de um parecer ín-
tegro.

O Veículo

35 As composições da presente invenção compre-
endem um veículo farmacêuticamente aceitável sólido, semi-


26. FEV. 1992

1 -sólido ou líquido para permitir aos factores estimulantes
de crescimento a atingirem o alvo desejado com uma concen-
tração apropriada. Tal como é aqui usado, "veículo farma-
cêuticamente aceitável" significa uma substância enchimento
5 diluente que é adequada para a administração a um humano ou
animal inferior. O veículo em si pode ser inerte ou pode
possuir benefícios fisiológicos ou farmacêuticos próprios.
A natureza do veículo será determinada através do método es-
colhido para a administração da composição. O método de a-
10 dministração da composição do factor estimulante de cresci-
mento pode abranger desde métodos internos, tal como injec-
ção, até métodos tópicos externos.

Um método preferido de administração dos
factores de estimulação de crescimento é através de uma in-
15 jeção cutânea. O veículo para facilitar tal administração
seria compreendido de preferência por água ou uma solução
salina.

Mod. 71 - 20.000 ex. - 90/08

Um método mais preferido de administração
dos factores de crescimento é através da aplicação tópica.
20 A aplicação tópica é de preferência alcançada com composi-
ções nas formas de pulverizações, tónicos, cremes, loções,
champôs, e similares.

Composições tópicas da presente invenção
podem ser formuladas como líquidos, por exemplo como uma
25 loção, creme, champô, condicionador ou leite. Tais composi-
ções líquidas podem ser formuladas para utilização em con-
junção com um aplicador como um aplicador de esfera, ou um
aparelho pulverizador como uma lata aerosol contendo prope-
lente, ou um recipiente adaptado com uma bomba para distri-
30 buir o produto líquido.

Alternativamente, as composições da inven-
ção podem ser sólidas ou semi-sólidas, por exemplo "barras",
cremes ou geles. Tais composições sólidos ou semi-sólidos
podem ser formulados para serem usadas em conjugão com um
35 aplicador adequado ou simplesmente um tubo, ou garrafa, ou


28. FEV. 1992

1 como um tecido impregnado de líquido, com um pano de limpeza.

5 A selecção de um veículo para este fim apresenta uma vasta gama de possibilidades dependendo da forma de produto desejada da composição. Veículos adequados podem ser classificados tal como depois aqui descritos.

10 O termo "veículo tópico" refere-se a substâncias que podem actuar como diluentes, dispersantes, ou solventes para os factores estimulantes de crescimento que assim asseguram que possam ser aplicados a, e mesmo distribuídos sobre, o alvo seleccionado a uma concentração apropriada. O veículo é de preferência um que possa ajudar a penetração dos factores estimulantes de crescimento na pele para alcançar de imediato a zona circunvizinha do folículo do cabelo. Veículos tópicos úteis nas composições do assunto da invenção podem incluir água como veículo, e/ou pelo menos um veículo cosméticamente aceitável sem ser água. Veículos úteis em composições tópicas de acordo com a invenção podem incluir lipossomas, redes de latex, micrófagos e várias formas de microencapsulação dos factores estimuladores de crescimento.

25 Geralmente, o veículo ou é orgânico por natureza ou uma emulsão aquosa e capaz de levar os factores estimulantes de crescimento a dispersarem-se ou dissolverem-se nele. O veículo pode incluir emolientes farmacêuticamente aceitáveis, aumentadores de penetração na pele, agentes corantes, fragâncias, emulsionantes, agentes espessantes, e solventes.

30 Segue-se uma descrição mais detalhada das composições tópicas preferidas:

1. Loções

35 As loções podem compreender uma quantidade efectiva (de preferência a partir de cerca de 0,01% até cerca de 10%, de maior preferência a partir de cerca de 0,1% até cerca de 1%) dos factores estimuladores de crescimento;


26. FEV. 1992

1 a partir de 1% até 50%, de preferência a partir de 3% até
15%, de um emoliente; o equilíbrio sendo água, um álcool
C₂ ou C₃, ou uma mistura de água e de álcool. São conheci-
dos vários emolientes. Exemplos de tais emolientes são os
5 seguintes:

a. Óleos hidrocarbonetos e ceras. Exemplos
são óleo mineral, vaselina, parafina, cerasina, ozoquerite,
cera microcristalina, polietileno, e "per-hidroesqualeno".

10 b. Óleos de silicone, como os dimetilpoli-
siloxanos, metilfenilpolisiloxanos, copolímeros glicol-si-
licone solúveis em água e em álcool e fluídos de silicone
voláteis como o ciclometicano.

15 c. Gorduras triglicerido e óleos tais como
aqueles derivados de recursos marinhos, animais e vegetais.
Exemplos incluem óleo castor, óleo de açafrão, óleo de se-
mente de algodão, óleo de milho, óleo de azeitona, óleo de
fígado de bacalhau, óleo de amêndoa, óleo de abacate, óleo
de palma, óleo de sésamo, e óleo de soja.

20 d. Ésteres acetoglicerido, como por exemplo
monogliceridos acetilados.

e. Gliceridos etoxilados, como por exemplo
mono-estearato de glicerilo etoxilado.

25 f. Ésteres alquílicos de ácidos gordos ten-
do de 10 a 20 átomos carbonos. Ésteres metílicos, isopropí-
lico e butílico de ácidos gordos são úteis aqui. Os exem-
plos incluem laurato de hexilo, laurato de iso-hexilo, pal-
mitato de iso-hexilo, palmitato de isopropilo, miristato de
isopropilo, oleato de decilo, oleato de isodecilo, esteara-
to de hexadecilo, estearato de decilo, isoestearato de iso-
propilo, adipato de diisopropilo, adipato de di--iso-hexi-
lo, adipato de di-hexilodecilo, sebacato de di-isopropilo,
lactato de laurilo, lactato de miristilo e lactato de ceti-
lo.

35 g. Ésteres alcenílicos de ácidos gordos ten-
do de 10 até 20 átomos de carbono. Exemplos deles incluem


26 FEB 1992

1 miristato oleílico, estearato oleílico, e oleato oleílico.

h. Ácidos gordos tendo de 8 a 22 átomos de carbono. Exemplos adequados incluem ácidos pelargônico, laurílico, mirístico, palmítico, esteárico, iso-esteárico, hidroxi-esteárico, oleico, linoleico, ricinoleico, araquidônico, beênico, e erúcico.

i. Álcoois gordos tendo de 8 até 22 de átomos de carbono. Álcoois laurílico, miristílico, cetílico, hexadecílico, estearílico, iso-estearílico, hidroxi-estearílico, oleílico, ricinoleílico, beenílico, erucílico e 2-octildodecílico são exemplos de álcoois gordos satisfatório.

j. Éteres de álcool gordo. Álcoois gordos etoxilados de 8 até 20 átomos de carbono incluem álcoois laurílico, cetílico, estearílico, iso-estearílico, oleílico, e de colesterol tendo ligados a eles desde 1 até 50 grupos de óxido de etileno ou de 1 até 50 grupos de óxido de propileno, ou misturas deles.

k. Ésteres éter tais como ésteres de ácido gordo de álcoois gordos etoxilados.

l. Lanolinas e derivados. Lanolina, óleo de lanolina, cera de lanolina, álcoois de lanolina, ácidos gordos de lanolina, lanolato de isopropilo, lanolina etoxilada, álcoois de lanolina etoxilado, colesterol etoxilado, álcoois de lanolina propoxilada, lanolina acetilada, álcoois de lanolina acetilada, linoleato de álcoois de lanolina, acetato de ricinoleato de álcoois de lanolina, acetato de ésteres-álcoois etoxilados, hidrogenolise de lanolina, lanolina hidrogenada etoxilada, lanolina de sorbitol etoxilada, e bases de absorção de lanolina semi-sólida e líquida são ilustrativos de emolientes derivados de lanolina.

m. Álcoois poli-hídricos e derivados de poliéter. Propileno glicol, dipropileno glicol, polipropileno glicol (P.M. 2.000-4.000), polioxipropileno-polióxietileno glicóis, polioxietileno-polioxipropileno glicóis, gli-


26. FEV. 1992

1 cerol, glicerol etoxilado, glicerol propoxilado, sorbitol,
sorbitol etoxilado, hidroxipropil sorbitol, polietileno gli-
col (P.M. 200-6.000), metoxipolietileno glicóis 350, 550,
5 750, 2.000, 5.000, homopolímeros poli(óxido de etileno)
(P.M. 100.000-5.000.000). Polialquilenos glicóis e derivados,
hexileno glicol (2-metil-2,4-pentanodiol), 1,3-butileno gli-
col, 1,2,6-hexanotriol, eto-hexadiol USP (2-etil-1,3-hexa-
nodiol) glicol vicinal C₁₅C₁₈, e derivados polioxipropile-
no de trimetilolpropano são exemplos deles.

10 n. Ésteres de álcool poli-hídrico. Mono- e
di-ésteres de ácido gordo de etilenoglicol, mono- e di-és-
teres de ácido gordo de dietilenoglicol, mono- e di-ésteres
de ácido gordo de polietilenoglicol (P.M. 200-6.000), mono-
e di-ésteres de ácido gordo de propilenoglicol, mono-oleato
15 de polipropilenoglicol 2000, mono-estearato de polipropile-
noglicol 2000, mono-estearato de polipropilenoglicol etoxi-
lado, mono- e di-ésteres de ácido gordo de glicerilo, poli-
-ésteres de ácido gordo de glicerol, mono-estearato de gli-
cerilo etoxilado, mono-estearato de 1,3-butilenoglicol, di-
20 -estearato de 1,3-butilenoglicol, éster de ácido gordo de
polioxietilenoglicol, ésteres de ácido gordo de sorbitano e
ésteres de ácido gordo de polioxietilenosorbitano são éste-
res de álcool poli-hídrico satisfatórios.

25 o. Ésteres de cera como por exemplo estea-
rato de cera de abelhas, espermacete, miristato miristíli-
co, estearato estearílico.

p. Derivados de cera de abelha, por exemplo,
polioxietilenosorbital de cera de abelha. Estes são produ-
tos de reacção de cera de abelha com sorbitol etoxilado va-
30 riando o teor de óxido de etileno formando uma mistura de
ésteres-éter.

q. Ceras vegetais incluindo ceras de carnaú-
ba e candelilha.

35 r. Fosfolípidos tais como leticina e deriva-
dos.


26. FEV. 1992

1 s. Esteroles. Colesteroles, ésteres de ácido gordo de colesterol são exemplos deles.

5 t. Amidas tais como amidas de ácido gordo, amidas de ácido gordo etoxilados, alcanoamidas de ácido gorduroso sólido.

10 As loções de preferência compreendem ainda desde 1% até 10%, de maior preferência desde 2% até 5%, de um emulsificante. Os emulsionantes podem ser não iônicos, aniônicos ou catiónicos. Exemplos de emulsionantes não iônicos satisfatórios incluem álcoois gordos tendo de 10 até 20 de átomos de carbono, álcoois gordos tendo de 10 até 20 átomos de carbono condensados com 2 até 20 mole de óxido de etileno ou óxido de propileno, alquil fenóis com de 6 até 12 átomos de carbono na cadeia alquilo condensados com de 2 até 20 mole de óxido etileno, mono- e di-ésteres de ácido gordo de óxido de etileno mono- e di-ésteres de ácido de etileno glicol em que a porção ácido gordo contém desde 20 átomos de carbono, dietileno glicol, polietileno glicóis, de peso molecular de 200 até 6.000, propileno glicóis de 20 peso molecular de 200 até 3.000, glicerol, sorbitol, sorbitano polioxietileno-sorbitol, polietileno sorbitano e ésteres de cera hidrofílicos. Emulsionantes aniônicos adequados incluem os sabões de ácido gordo, como por exemplo, sabões de ácido, potássio e trietanolamina, em que a porção ácido gordo contém desde 10 até 20 átomos de carbono. Outros emulsionantes aniônicos adequados incluem os alquilsulfatos de metal alcalino, amônio ou de amônio substituído, alquil arilsulfonatos, sulfonatos de alquiletoxi éter tendo de 10 até 30 átomos de carbono na porção alquilo. Os sulfonatos de alquiletoxi éter contêm desde 1 até 50 unidades de óxido de etileno. Emulsionantes catiónicos satisfatórios são os compostos de amônio quaternário, morfolínio e piridínio. Alguns dos emolientes descritos nos parágrafos anteriores também têm propriedades emulsionantes. Quando uma loção é formulada contendo um tal emoliente, um emulsificante adicio-


26. FEV. 1992

1 nal não é necessário, embora possa ser incluído na composi-
ção.

5 O equilíbrio da loção ou um álcool C_2 ou C_3
ou uma mistura de água e de álcool. As loções são formula-
das misturando simplesmente todos os componentes em conjun-
to. De preferência o composto da presente invenção é dissol-
vido na mistura. Podem ser incluídos componentes opcionais
convencionais. Um tal aditivo é um agente espessante num
nível a partir de 1% até 10% da composição. Exemplos de a-
gentes espessantes adequados incluem: polímeros de carboxi-
polimetileno reticulados, celulose de etilo, polietileno
glicóis, goma alcantira, goma "kharaya", gomas de xantana e
bentonite, hidroxietilo celulose, e hidroxipropil celulose.

2. Cremes

15 Os cremes compreendem uma quantidade efecti-
va (de preferência de cerca de 0,01% até cerca de 10%, de
maior preferência desde cerca de 1% até cerca de 5%) dos
factores estimuladores de crescimento; desde 5% até 50%, de
preferência desde 10% até 25%, de um emoliente; sendo o e-
quilíbrio água. Os emolientes acima descritos podem também
20 ser usados nas composições de creme. Opcionalmente a forma-
ção do creme contém um emulsionante adequado tal como des-
crito anteriormente. Quando um emulsionante é incluído, es-
tá na composição a um nível desde 3% até 50%, de preferên-
cia desde 5% até 20%.

3. Soluções

30 A forma de solução compreende uma quantidade
efectiva (de preferência desde cerca de 0,01% até cerca de
10%, de maior preferência desde cerca de 0,1% até cerca de
1% dos factores estimuladores de crescimento; sendo o equi-
líbrio água e/ou um solvente orgânico adequado. Materiais
orgânicos adequados úteis como solventes ou uma parte de um
sistema solvente são os seguintes: propileno glicol, polie-
tileno glicol, (P.M. 200-600), polipropileno glicol (P.M.
425-2025), glicerina, esteres de sorbitol, 1,2,6-hexanotriol,
35


26. FEV. 1992

1 etanol, isopropanol, tartarato de dietilo, butanodiol, e
suas misturas. Tais sistemas solventes podem também conter
água.

5 Estas composições na forma de solução po-
dem ser aplicadas à pele tal como estão, ou então podem ser
formuladas para um aerosol e aplicadas à pele como uma pul-
verização. As composições de aerosol compreendem ainda des-
de 50% até 80%, de preferência desde 30% até 50% de um pro-
pulsor adequado. Exemplos de tais propulsores são
10 os hidrocarbonetos de baixo peso molecular clorados, fluo-
rados e clorofluorados. Óxido nitroso, dióxido de carbono,
butano, e propano são também usados como gases propulso-
res. Estes propulsores são usados num nível suficien-
te para expulsar os conteúdos dos recipientes.

15 4. Geles

As composições de gel podem ser formuladas
simplesmente através da mistura de um agente espessante a-
dequado às composições de solução anteriormente descritas.
Exemplos de agentes espessantes adequados foram anteriormen-
te descritos no que diz respeito às loções.

20 As composições de gel compreendem uma quan-
tidade efectiva (de preferência desde cerca de 0,01% até
cerca de 10%, de maior preferência desde cerca de 1% até
cerca de 5%) dos factores estimuladores de crescimento; des-
de 5% até 75%, de preferência desde 10% até 50%, de um sol-
25 vente orgânico como previamente descrito; desde 0,5% até
20%, de preferência desde 1% até 10% do agente espessante;
sendo o equilíbrio água.

5. Sólidos

30 As composições de formas sólidas têm utili-
zação como composições tipo-barras com o fim de serem apli-
cadas ao couro cabeludo ou outras partes do corpo. Tais
composições compreendem uma quantidade efectiva (de prefe-
rência desde cerca de 0,1% até cerca de 10%, de maior pre-
35 ferência desde cerca de 1% até cerca de 5%) dos factores


26. FEV. 1992

1 estimuladores de crescimento, e desde 50% até 98% de prefe-
rência desde 60% até 90% dos emolientes anteriormente des-
critos. Esta composição pode ainda compreender desde 1% até
5 20%, de preferência desde 5% até 15%, de um agente espessan-
te adequado, e opcionalmente emulsionantes e água. Agentes
espessantes anteriormente descritos no que diz respeito a
loções são aqui adequadas.

Intensificadores de Penetração

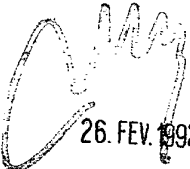
10 A presença de intensificador de penetração
pode potenciar o benefício do factor estimulador de cresci-
mento melhorando a respectiva assimilação através da stra-
tum corneum no seu local de acção nas imediações próximas
do folículo de cabelo próximo da papila dérmica.

15 O intensificador de penetração pode confor-
memente funcionar numa variedade de maneiras. Pode, por e-
xemplo, melhorar a distribuição do promotor de crescimento
de cabelo na superfície da pele. Alternativamente, pode au-
mentar a respectiva divisão para a pele a partir da compo-
sição quando aplicada tópicamente, ajudando assim a sua pas-
20 sagem para o seu local de acção. Outros mecanismos que au-
mentam o benefício dos factores estimuladores de crescimen-
to podem também estar envolvidos.

25 Exemplos de intensificadores de penetração
incluêm, mas não são limitados a: 1-dodecilazaciclo-heptan-
-2-ono em combinação com certos dióis C_3-C_4 ou uma azaci-
cloalkil-2-ono substituída na posição 1 (ver U.S. Patente
4.557.934, Cooper, concedida a 10 de Dezembro de 1985); uma
combinação binária de um diol C_3-C_4 e um "composto de de-
sordenação do envelope celular" (ver U.S. Patente 4.552.872,
30 Cooper, Loomans e Fwzi, concedida em 12 de Novembro de 1985);
uma combinação binária de N-(2-hidroxietil)pirrolidona e um
"composto de desordenação do envelope celular" (ver U.S. Pa-
tente 4.537.776, Cooper, concedida em 27 de Agosto de 1985),
um composto compreendendo álcool laurílico, sebacato di-iso-
35 propílico, sebacate, di-butílico, adipate dioctílico, dipe-


26. FEV. 1992

1 largonato de propileno glicol, myristate etílico, laurato
butílico, miristate butílico, palmitato, isopropílico, ál-
cool oleílico, sebacate dietílico, sebacate dioctílico, aze-
late dioctílico, laurato hexílico, caprato etílico, esteara-
5 to butílico, isoestearato isopropílico, pelargonato 2-etil-
hexílico, benzoato butílico, benzoato benzílico, salicilato
benzílico, ftalato di-butílico e/ou laurato etílico (ver
U.S. Patente 4.299.826, Luedders, concedida em 10 de Novem-
bro de 1981); um éster de açúcar em combinação com um de
10 sulfóxido ou fosfina (ver U.S. Patente 4.150.114, Smith,
concedida em 17 de Abril de 1979; U.S. Patente 4.148.917,
Smith, concedida em 10 de Abril de 1979; U.S. Patente
4.148.887, Smith concedida em 10 de Abril de 1979, U.S. Pa-
tente 4.148.874, Smith, concedida em 10 de Abril de 1979;
15 U.S. Patente 4.130.667, Smith, 19 de Dezembro de 1978; U.S.
Patente 4.130.643, Smith, concedida em 19 de Dezembro de
1978; U.S. Patente 4.046.886, Smith, concedida em 6 de De-
zembro de 1977; U.S. Patente 3.952.099, Smith, concedida em
20 de Abril de 1976; U.S. Patente 3.952.099, Smith, conce-
20 dida em 20 de Abril de 1976; U.S. Patente 3.896.238, Smith,
concedida em 22 de Julho de 1975); um veículo compreendendo
sulfóxidos alifáticos (Ver U.S. Patente 3.953.599, MacMil-
lan e Lyness, concedida em 27 de Abril de 1976; U.S. Paten-
te 3.903.256, MacMillan e Lyness, concedida em 2 de Setem-
25 bro de 1975; U.S. Patente 3.839.566, MacMillan e Lyness,
concedida em 1 de Outubro de 1974; U.S. Patente 3.678.156,
MacMillan e Lyness, concedida em 18 de Julho de 1972); um
veículo compreendendo uma combinação binária de um diol
 C_3-C_4 ou triol C_3-C_6 e um composto lípido polar álcool C_{16}
30 ou C_{18} específico (Ver Pedido de Patente Europeia 249.397.
Kasting, Smith, Massaro e Snyder, publicada em 16 de Dezem-
bro de 1987); um veículo compreendendo um diol C_3-C_4 , éster
de diol ou éter de diol e um composto de desordenação do
envelope celular (Ver Pedido de Patente Europeia 095 813,
35 Cooper, publicada em 7 de Dezembro de 1983; Pedido de Paten-


26. FEV. 1992

- 1 te Europeia 043 738, Wickett, Cooper e Loomais, publicado
em 13 de Janeiro de 1982); um veículo compreendendo um al-
canol primário C₆-C₁₄ e um de propano- ou butano diol (Ver
5 Pedido de Patente Europeia 013 459, Wickett, Cooper e Loo-
mans, publicado em 23 de Julho de 1980);

Outros Estimuladores de Crescimento de Cabelo

- A composição de acordo com a invenção tam-
bém pode opcionalmente compreender outros estimulantes de
crescimento de cabelo capazes de funcionar de formas dife-
10 rentes para aumentar o benefício dos factores estimuladores
de crescimento. Exemplos de outras substâncias que elas pró-
prias possuem a capacidade de regular o crescimento de ca-
belo incluem, mas não são limitados a elas, minoxidilo, áci-
do retinóico, diazóxido, gly-his-lys (também conhecido co-
15 mo factor da célula de fígado) e respectivos derivados de
metal de transição, ciclosporina, anti-inflamatórios, blo-
queadores do canal de cálcio, anti-bacterianos, agentes ten-
sio-activos não iónicos, mucopolisacarídes, antiandrogéneos
inibidores de glycosidase, e inibidores de glicosaminogli-
20 canase.

Agentes Estabilizadores de Proteínas

- O factor de crescimento é proteico, e por
isso o seu próprio benefício em promover o crescimento de
cabelo pode ser mantido ou melhorado incluindo um agente de
25 estabilização de proteína na composição de acordo com a in-
venção. Com um exemplo deste efeito, deve-se notar que a pe-
le contém proteases naturais que podem pelo menos degradar
parcialmente o promotor de crescimento de cabelo. Por isso,
a presença de um agente estabilizador de proteína como um
30 inibidor de protease ou uma proteína secundária que competi-
rá com o promotor de crescimento de cabelo para degradação
através das proteases de pele naturais, pode proteger o pro-
motor de crescimento de cabelo até atingir as imediações
próximas do bulbo do cabelo.

- 35 Exemplos de agentes estabilizadores de pro-

26. FEV. 1997

1 teínas correspondentes incluem glicerol, ácido etilenodiaminotetraacético, cisteína, α_2 -macroglobulina soro, e outros inibidores de proteinase.

Outros Ingredientes

5 A composição de acordo com a invenção pode conter outros ingredientes sem ser aqueles já mencionados, dependendo na forma do produto pretendido. É, por exemplo, possível incluir antisépticos, conservantes, anti-oxidantes, agentes corantes, sabões e detergentes.

10 A composição de acordo com a invenção pode também ser utilizada como um veículo de larga variedade de ingredientes cosmética e farmacêuticamente activos, particularmente ingredientes que têm alguns benefícios efectivos quando aplicados à pele para além da promoção do crescimento de cabelo.

15 A composição de acordo com a invenção pode também opcionalmente compreender um perfume em quantidade suficiente para tornar a composição aceitável ao consumidor e agradável de usar. Geralmente, o perfume formará desde 20 0,01% até 0,1% em peso da composição.

Uso das Composições para Induzir, Manter ou Aumentar o Crescimento de Cabelo

25 A invenção também preve para o uso dos factores de crescimento de cabelo isolados a partir de células epiteliais cultivadas no tratamento da calvície. Os seguintes métodos de utilização podem ser usados para reverter, travar, ou evitar o começo da calvície.

30 As composições de acordo com a invenção são de preferência pretendidas para aplicação por injeção cutânea. A quantidade da composição e a frequência da injeção cutânea pode variar largamente, dependendo das necessidades pessoais. Como um exemplo de aplicação por injeção cutânea, sugere-se que uma composição adequada para injeção cutânea compreendendo os factores estimuladores de crescimento seja 35 injectada de preferência desde uma vez por dia até uma vez

26. FEV. 1992

1 de seis em seis meses, de maior preferência desde três ve-
zes por semana até uma vez por mês, e de maior preferência
desde uma vez por semana até duas vezes por mês. A composi-
5 ção para injeção cutânea conterà desde cerca de 4pg/kg a-
té cerca 4 $\mu\text{g/kg}$, dos factores estimuladores de crescimen-
to por dose, de preferência desde cerca de 400 pg/kg até
cerca de 4 $\mu\text{g/kg}$, de maior preferência desde cerca de 2
ng/kg até cerca de 3 $\mu\text{g/kg}$, e de maior preferência desde
cerca de 50 ng/kg até cerca de 0,3 $\mu\text{g/kg}$. O período de in-
10 jeções seria ao longo de um período desde cerca de um mês
até cerca de dez anos, de preferência de cerca de três me-
ses até cerca de dois anos, de preferência de cerca de três
meses até cerca de dois anos, de maior preferência desde
cerca de seis meses até cerca de um ano, resultando assim
15 na regulação de crescimento de cabelo.

Mod. 71 - 20.000 ex. - 90/08

Um método de maior preferência da aplicação
das composições de acordo com a presente invenção envolve
a aplicação tópica ao couro cabeludo de um sujeito humano
para regular o crescimento de cabelo, particularmente onde
20 a cabeça já está calva, ou onde existe evidência que pode
sugerir que uma pessoa se tornará calva (isto é, perda de
cabelo). A quantidade da composição e a frequência de apli-
cação ao cabelo e/ou couro cabeludo pode variar largamente,
dependendo das necessidades pessoais, mas é sugerido como
25 um exemplo que a aplicação tópica abrange desde cerca de 1
até cerca de 10 vezes diárias, de preferência desde cerca
de 2 até cerca de 6 vezes diárias, de maior preferência des-
de cerca de 3 até cerca de 4 vezes diárias, e de maior pre-
ferência uma vez por dia. A composição para aplicação tópi-
ca conterà desde cerca de 1 ng/cm^2 até cerca de 1 mg/cm^2 do
30 factor estimulador de crescimento por dose, de preferência
desde cerca de 100 ng/cm^2 até cerca de 0,9 mg/cm^2 , de maior
preferência de cerca de 0,5 $\mu\text{g/cm}^2$ até cerca de 0,7 mg/cm^2 ,
e de maior preferência desde cerca de 10 $\mu\text{g/cm}^2$ até cerca
de 0,5 mg/cm^2 . O período de aplicação tópica seria de pre-
35

26 FEB. 1992

1 ferência por um período de cerca de um mês até cerca de dez
anos, de maior preferência desde cerca de três meses até
cerca de dois anos, de maior preferência ainda desde cerca
de seis meses até cerca de um ano, daí resultando na regu-
5 lação do crescimento de cabelo.

Os exemplos que se seguem descrevem e demons-
tram ainda as concretizações preferidas dentro do alcance
da presente invenção. Os exemplos são dados unicamente para
fins de ilustração, e não são para serem interpretados como
10 limitações da presente invenção uma vez que muitas varia-
ções dela são possíveis sem se afastar do seu espírito e
alcance.

Exemplos VIII-X ilustram um tônico de acor-
do com a invenção que é adequado para aplicação tópica ao
couro cabeludo afim de promover o crescimento de cabelo. A
15 loção tem a seguinte formulação.

	<u>Exemplo VIII</u>	<u>Exemplo IX</u>	<u>Exemplo X</u>
	(%P/P)	(%P/P)	(%P/P)
Factor de crescimento cabelo	0.1	1.0	10.0
20 Etanol	10.0	15.0	15.0
Glicerol	1.0	2.0	3.0
Perfume	0.2	0.2	0.2
Água	qs	qs	qs

25 O tônico é aplicado ao couro cabeludo numa
dose de um ml, uma vez por dia. À medida que o efeito se
torna perceptível, pode-se reduzir a frequência da aplica-
ção.

Exemplos XI-XIII ilustram uma loção que po-
de ser usada tópicamente no tratamento de calvície ou cabe-
ças masculinas ou femininas, com formação de calvície

	<u>Exemplo XI</u>	<u>Exemplo XII</u>	<u>Exemplo XIII</u>
	(%P/P)	(%P/P)	(%P/P)
Hidroxietil celulose	0.4	---	0.4
35 Etanol absoluto	15.0	15.0	15.0

26 FEB 1992

1	Propano-1,2-diol	---	---	30.6
	Butano-1,3-diol	33.4	33.4	---
	Benzoato parametílico	0.2	0.2	0.2
	Factor de crescimento de cabelo	1.0	0.1	5.0
5	Perfume	0.5	0.5	0.5
	Água	qs	qs	qs

10 A loção é aplicada ao couro cabeludo numa dose de um ml, uma vez por dia. À medida que o efeito se torna perceptível, pode-se reduzir a frequência de aplicação.

Exemplo XIV ilustra uma emulsão de água-em-óleo contendo um factor de crescimento de cabelo de acordo com a invenção.

15	<u>Exemplo XIV</u> (%P/P)		
	<u>Fase Oleosa</u>		
	Mono-oleato de sorbitano	20.0	
	Quaternium-18 hectorite	5.0	
	Parafina Líquida	75.0	
20	<u>Fase Aquosa</u>		
	Promotor de crescimento de cabelo	1.0	
	Goma de Xantana	1.0	
	Conservante	0.3	
	Perfume	0.2	
25	Cloreto de sódio (solução 1% P/P)	qs	

A emulsão foi preparada tirando 10 partes em volume da fase do óleo e a ela juntando devagar com agitação 90 partes em volume da fase aquosa.

30 O exemplo XV ilustra um creme de óleo-em-água contendo um factor de crescimento de cabelo de acordo com a invenção.

35	<u>Exemplo XV</u> (%P/P)		
	<u>Fase Oleosa</u>		


26. FEV. 1994

1	Álcool cetearílico	5.0
	Óleo silicone, fluído 200	1.0
	Myristato isopropílico	2.0
	Estearoil-2-lactilato de Sódio	2.0
5	<u>Fase Aquosa</u>	
	Propilenoglicol	5.0
	Citrato de Sódio	0.2
	Factor de crescimento de cabelo	0.1
	Perfume	0.1
10	Água Purificada	qs até 100

O creme foi preparado misturando a fase do óleo e aquecendo-o para 65°C. Combina-se a fase aquosa e aquece-la para 70°C. Junta-se a fase aquosa à fase oleosa com agitação adequada. Mistura-se com agitação adequada enquanto arrefece.

Os seguintes exemplos XVI-XVIII ilustram champôs a serem utilizados para lavar o cabelo e o couro cabeludo, e para regular o crescimento do cabelo no couro cabeludo.

20		<u>Exemplo XVI</u>
		(% P/P)
	Sulfonato de éter laurílico de sódio	41.4
	(2 EQ): 21% AD	
25	Ácido lauril dimetilaminoacético	4
	betaina: 30% AD	
	Dietanolamino de ácido gordo de côco	1.5
	Olet-3fosfato (Ácido CRODAFOS N 3 [®] ; Croda	1
	Poliamina de sebo PEG-15 (POLYQUART	1.5
	N [®] ; Henkel): 50% activo	
30	Conservante, matéria corante, sal	0.58
	Factor de crescimento de cabelo	10.0
	Perfume	qs
	Água	até 100

35


26. FEV. 1992

1

Exemplo XVII

(% P/P)

Sulfato de éter laurílico de sódio

12

100% AD

5

POLYQUART H ^(R): 50% activo

2.5

Ácido CRODAFOS N 3 ^(R)

2.5

Factor de crescimento de cabelo

8.0

Sulfato de zinco

5

Perfume

qs

10

Água

até 100

Exemplo XVIII

(% P/P)

Sulfato laurílico de mono-etanolamina:

20

100% AD

15

POLYQUART H ^(R): 50 activo

3

Ácido CRODAFOS N 3 ^(R)

1.7

Dietanolamida de côco

5

Factor de crescimento de cabelo

10

Perfume

qs

20

Água

até 100

pH ajustado para 6,5

O champô é aplicado ao couro cabeludo numa dose de um ml. O champô, é friccionado no couro cabeludo e depois retirado por enxaguamento. O champô é aplicado de novo ao couro cabeludo, friccionado no couro cabeludo e retirado por enxaguamento.

Os exemplos XIX-XXVII ilustram loções de acordo com a invenção, cada uma contendo um intensificador de actividade que pode ser usada tópicamente no tratamento de calvície ou cabeças masculinas ou femininas com formação de calvície, afim de regular o crescimento de cabelo.

Exemplo XIX Exemplo XX Exemplo XXI

(% P/P)

(% P/P)

(% P/P)

Minoxidil

0.5

2.0

5.0

35

Etanol absoluto

20.0

20.0

20.0


26. FEV. 1992

1	Propileno Glicol	30.0	30.0	30.0
	Factor de crescimento de			
	cabelo	5.0	1.0	0.1
	Perfume	0.2	0.2	0.2
5	Água	qs	qs	qs
		<u>Exemplo XXII</u>	<u>Exemplo XXIII</u>	<u>Exemplo XXIV</u>
		(% P/P)	(% P/P)	(% P/P)
	Cu II:Éster Gly-his-lys-			
	-n-octílico	0.1	1.0	5.0
10	Etanol absoluto	20.0	20.0	20.0
	Propileno glicol	30.0	30.0	30.0
	Factor de crescimento de			
	cabelo	5.0	2.0	0.5
	Perfume	0.2	0.2	0.2
15	Água	qs	qs	qs
		<u>Exemplo XXV</u>	<u>Exemplo XXVI</u>	<u>Exemplo XXVII</u>
		(% P/P)	(% P/P)	(% P/P)
	Furildioxima	0.1	1.0	5.0
	Etanol absoluto	20.0	20.0	20.0
20	Propileno glicol	30.0	30.0	30.0
	Factor de crescimento de			
	cabelo	10.0	3.0	1.0
	Perfume	0.2	0.2	0.2
	Água	qs	qs	qs
25	Os exemplos XXVIII e XXIX que se seguem i-			
	lustram formas injectáveis de factor de crescimento de cabe-			
	lo para promover o crescimento do cabelo no couro cabeludo.			
		<u>Exemplo XXVIII</u>	<u>Exemplo XXIX</u>	
		(% P/P)	(% P/P)	
30	Promotor de crescimento			
	de cabelo	0.1	0.1	
	Solução de Ringer	qs	---	
	Solução de Ringer lectosa	---	qs	
35	Embora concretizações particulares do pro-			
	pósito da invenção tenha sido descritas será óbvio para os			

1 técnicos na arte que várias alterações e modificações do
propósito da invenção podem ser feitas sem se afastar do es-
pírito e âmbito da invenção. Pretende-se abranger nas rei-
vindicações apenas, todas essas modificações que estejam
5 dentro do âmbito da invenção.

Lisboa,

26 FEV. 1992

Por THE PROCTER & GAMBLE COMPANY



ENG.º MANUEL MONIZ PEREIRA

Adjunto do AOP Eng.º Vasco Leite

Arco da Conceição, 3-1.º - 1100 LISBOA


26 FEV. 1994

- R E I V I N D I C A Ç Õ E S -

1 1a.- Processo para a preparação de uma composição para regular o crescimento de cabelo, caracterizado por compreender:

5 a. um sobrenadante derivado de uma cultura de células epiteliais que compreende de cerca de 0,00001 a cerca de 20% em peso de um factor estimulante de crescimento, tendo o factor as seguintes características:

10 i. mitogenicidade para células da papila dérmica,

 ii. mitogenicidade para células 3T3,

 iii. perda de mitogenicidade para células epidérmicas, e

15 iv. um peso molecular superior a cerca 3.000 daltons; e

 b. um veículo farmacêuticamente aceitável.

20 2a.- Processo de acordo com a reivindicação 1, caracterizado por o factor estimulante de crescimento ter a característica adicional da actividade do ensaio da mitogene da célula da papila dérmica diminuída seguida do tratamento com Quimotripsina tipo I-S numa concentração final superior a cerca de 100 µg/ml a cerca de 37º durante cerca de 5 horas.

25 3a.- Processo de acordo com qualquer das reivindicações 1 ou 2 caracterizado por o factor estimulante de crescimento ter a característica adicional de reter desde cerca de 40% até cerca de 90% da actividade do ensaio da mitogene da célula da papila dérmica seguida de tratamento de aquecimento de cerca de 50º até cerca de 100º C.

30 4a.- Processo de acordo com a reivindicação 1 caracterizado por a composição compreender desde cerca de 0,01% até cerca de 10% do factor estimulante de crescimento e o veículo ser um veículo tópico.

35 5a.- Processo de acordo com a reivindicação

1 4 caracterizado por as células serem células epiteliais de
folículos de cabelo.

6a.- Processo de acordo com a reivindicação
4 caracterizado por as células serem células epidérmicas.

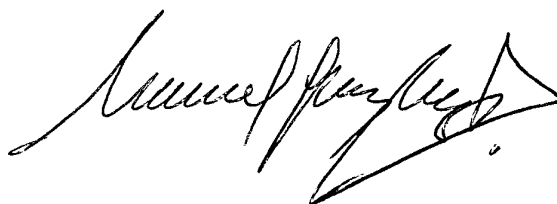
5 7a.- Processo de acordo com a reivindicação
1 caracterizado por o veículo ser um veículo injectável.

8a.- Processo de acordo com a reivindicação
4 caracterizado por o veículo tópico compreender desde cerca
de 1% até cerca de 50% de um emoliente.

10 9a.- Processo de acordo com a reivindicação
1 caracterizado por compreender adicionalmente uma quantidade
segura e efectiva de minoxidilo.

Lisboa, 26 FEV. 1992

Por THE PROCTER & GAMBLE COMPANY



ENG.º MANUEL MONIZ PEREIRA

Adjunto do AOPI Eng.º Vasco Leite

Arco da Conceição, 3-1.º - 1100 LISBOA