



República Federativa do Brasil
Ministério da Economia
Instituto Nacional da Propriedade Industrial

(11) BR 112018073626-0 B1



(22) Data do Depósito: 19/05/2017

(45) Data de Concessão: 08/02/2022

(54) Título: USO COSMÉTICO DE COMPOSTO E USO DE COMPOSIÇÃO FARMACÊUTICA

(51) Int.Cl.: A61K 8/34; A61Q 7/00.

(30) Prioridade Unionista: 19/05/2016 IT 102016000051626.

(73) Titular(es): GIULIANI S.P.A..

(72) Inventor(es): RALF PAUS; JÉRÉMY CHERET; HANNS HATT; SERGIO BARONI.

(86) Pedido PCT: PCT EP2017062110 de 19/05/2017

(87) Publicação PCT: WO 2017/198818 de 23/11/2017

(85) Data do Início da Fase Nacional: 16/11/2018

(57) Resumo: A invenção diz respeito ao uso de compostos de fórmula geral (I), em que: R1 e R2 formam juntos uma ligação dupla, ou R1 e R2 formam juntos um grupo ciclopropila; R3, R4 são iguais ou diferentes e independentemente escolhidos a partir de hidrogênio, metila, ou R3 e R4 formam juntos uma ligação dupla; R5, R6 são iguais ou diferentes e independentemente escolhidos a partir de hidrogênio, metila; ou R5 e R6 formam juntos uma ligação dupla, ou R5 e R6 formam juntos um grupo ciclopropila; R7 = metila, ou etila; R8 = hidrogênio, ou metila. para promover o crescimento capilar e/ou inibir ou retardar a perda de cabelo no couro cabeludo humano e composições cosméticas e farmacêuticas adequadas para tal uso.

USO COSMÉTICO DE COMPOSTO E USO DE COMPOSIÇÃO FARMACÊUTICA

CAMPO DA INVENÇÃO

[001] A presente invenção diz respeito ao uso de compostos para promover o crescimento capilar e/ou inibir ou retardar a perda de cabelo em humanos, e composições para uso compreendendo tais compostos como princípios ativos.

ANTECEDENTES DA INVENÇÃO

[002] O termo sândalo refere-se a uma classe de madeiras de árvores do gênero *Santalum*. O óleo essencial de sândalo é geralmente extraído por destilação a vapor de madeira de árvores de sândalo maturada e é um componente de valor bem conhecido para perfumes.

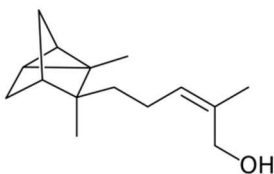
[003] Dentre os diversos usos diferentes no campo cosmético, principalmente relacionados ao seu aroma apreciado, o óleo de sândalo também é objeto de publicações de patentes sobre preparações oficiais e empíricas para vários usos diferentes, incluindo um tratamento genérico de queda de cabelo e caspa, como, por exemplo, a publicação de patente CN1075250A que descreve um extrato medicinal, definido de fato como medicina chinesa, compreendendo sândalo misturado com botão floral de magnólia, flor rosa, raiz de alcaçuz, pó de casca de peônia, *kaempferia*, lilás, *herba asari*, *ginseng* e raiz de *angelica dahurica*.

[004] As publicações CN102000293 e CN103735443 descrevem medicamentos chineses semelhantes, o primeiro feito de uma mistura de madeira de sândalo, raízes de angelica, sementes de *rhizoma kaempferiae*, talco, manjerição, índigo natural e óleo de nardo, este último feito de uma mistura de madeira de sândalo, agulhas de pinheiro e salvia *multiorrhiza*, para ser aplicado no cabelo.

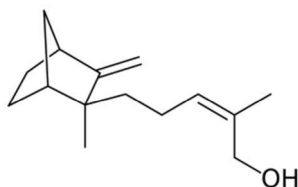
[005] Para um uso genérico substancialmente semelhante, a publicação de patente indiana IN00177MU2002A descreve uma composição para a prevenção de queda de cabelo que compreende óleo de sândalo misturado com óleo de coco, óleo de eucalipto, óleo de cravo, óleo de lavanda e óleo de alecrim.

[006] Para tais preparações empíricas, o papel específico de cada ingrediente misturado no óleo final não é definido em tais publicações, de modo que nem a função específica do ingrediente óleo de sândalo nas misturas, seja como fragrância ou possivelmente diferente disso, é determinada.

[007] Em qualquer caso, os principais componentes do óleo de sândalo são α -santalol e β -santalol, que são alcoóis mostrando basicamente uma cadeia do tipo sesquiterpênica. A fórmula estrutural do α -santalol é:



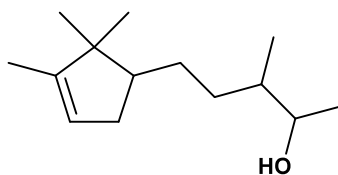
enquanto do β -santalol é:



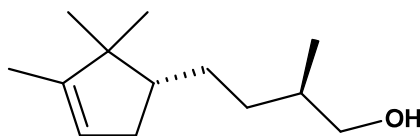
caracterizada por um grupo triciclohept-3-ila ou biciclohept-2-ila terminal, respectivamente.

[008] Por outro lado, o composto conhecido como sandalore é um odorante sintético com uma fragrância semelhante ao sândalo e, conseqüentemente, usado em perfumes, emolientes e agentes de limpeza da pele como um ingrediente menos caro que imita o cheiro do sândalo. O sandalore, assim como o composto estruturalmente semelhante denominado brahmanol, são alcoóis com uma estrutura química bastante distinta dos referidos ingredientes do óleo de sândalo natural, ou seja, α -santalol e β -santalol.

[009] Na verdade sandalore, ou pentanol de sândalo, possui a fórmula:



e o brahmanol, ou ciclopentano de sândalo, possui a fórmula:



são moléculas sintéticas, ambas caracterizadas por um grupo terminal ciclopenten-1-ila e não possuem cadeia sesquiterpênica. Eles também são objeto de publicações de patentes

sobre o tratamento de cabelos em formulações cosméticas, tais como xampus e condicionadores de cabelo, no entanto, usados apenas como fragrâncias, na verdade, para o propósito específico de usar sua propriedade de mimetizar o valor do perfume de sândalo. Por exemplo, o documento EP1561476 descreve composições desodorantes para melhorar os efeitos desodorizantes onde, entre um grande número de substâncias e um grande número de usos, o uso de sandalore e brahmanol também é descrito como fragrâncias de desodorização em produtos capilares, como xampus, condicionadores, enxágue de cabelo, corantes capilares, agentes de ondas permanentes, cera, *spray* e *mousses* para cabelos. Os materiais de fragrância de origem natural a serem usados como fragrâncias na publicação EP1561476 incluem óleo de sândalo, e sandalore e brahmanol e são definidos como nomes comerciais dos materiais acima, significando assim que de acordo com este documento não há distinção entre a fragrância fornecida pelo extrato natural e seus substitutos sintéticos.

[010] O documento EP1346720 refere-se a uma composição desodorizante para colorante de cabelo com um escopo semelhante.

[011] Não há descrição em tais publicações, nem mesmo genericamente, de tais odorantes sintéticos no tratamento da perda de cabelo, ou no uso destes para promover o crescimento capilar.

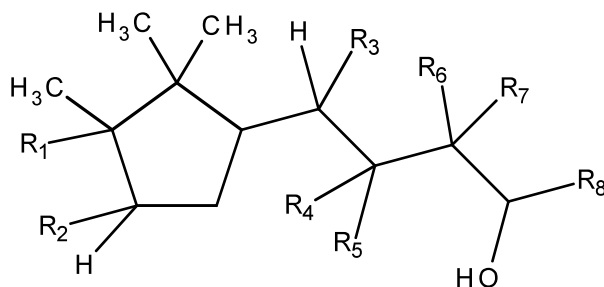
[012] De acordo com Busse *et al.*, *., A Synthetic Sandalwood Odorant Induces Wound-Healing Processes in Human Keratinocytes via the Olfactory Receptor OR2AT4*, *Journal of Investigative Dermatology*, 2014, 134: 2823–2832, sandalore e brahmanol foram identificados como agonistas do receptor de olfato cutâneo OR2AT4, e encontrado para induzir sinais de Ca^{2+} em queratinócitos humanos cultivados. A estimulação em longo prazo de queratinócitos com sandalore afeta positivamente a proliferação celular, migração e regeneração de monocamadas de queratinócitos em um ensaio de migração celular *in vitro* denominado *wound scratch assay*, e a estimulação com sândalo aumenta a cicatrização epidérmica de feridas em culturas de órgãos de pele humana.

[013] De acordo com Busse *et al.*, são descritas evidências de que o óleo de sândalo natural e outros odorantes de sândalo sintéticos não são agonistas do receptor olfativo OR2AT4 e não mostram o mesmo efeito de cicatrização de ferida epidérmica.

[014] A expressão dos receptores olfativos (ORs) não se restringe ao epitélio nasal, mas também está presente em diferentes tecidos humanos, vide Feldmesser E, Olender T, Khen M, Yanai I, Ophir R, Lancet D., *Widespread ectopic expression of olfactory receptor genes. BMC Genomics*. Maio de 2006; 22;7:121; Zhang X, Firestein S., *Nose thyself: individuality in the human olfactory genome. Genome Biol.* 2007;8(11):230; Flegel C, Manteniotis S, Osthold S, Hatt H, Gisselmann G., *Expression profile of ectopic olfactory receptors determined by deep sequencing. PLoS One.* 2013;8(2):55368). Numerosos estudos descreveram os papéis fisiológicos dos ORs em vários tipos de células humanas (Kang N, Koo J. *Olfactory receptors in non-chemosensory tissues. BMB Rep.* Nov 2012;45(11):612-22) tal como espermatozoides (Spehr M, Gisselmann G, Poplawski A, Riffell JA, Wetzel CH, Zimmer RK, Hatt H. *Identification of a testicular odorant receptor mediating human sperm chemotaxis. Science.* Mar 2003; 28;299(5615):2054-8; Veitinger T, Riffell JR *et al*, *Chemosensory Ca²⁺ dynamics correlate with diverse behavioural phenotypes in human sperm. J Biol Chem.* Maio 2011; 13;286(19):17311-25), células epiteliais prostáticas (Neuhaus E.M., Zhang W., Gelis L., Deng Y., Noldus J., Hatt H. *Activation of an Olfactory Receptor Inhibits Proliferation of Prostate Cancer Cells. J Biol Chem.* 2009;284(24):16218-16225), e células enterocromafins do intestino (Braun T, Volland P, Kunz L, Prinz C, Gratzl M. *Enterochromaffin cells of the human gut: sensors for spices and odorants. Gastroenterology.* maio de 2007;132(5):1890-901).

DESCRIÇÃO RESUMIDA DA INVENÇÃO

[015] De acordo com a presente invenção, verificou-se surpreendentemente que o crescimento capilar pode ser promovido, e que a perda de cabelo pode ser inibida ou retardada, no couro cabeludo humano pelo uso de compostos de fórmula geral (I):



em que:

R₁ e R₂ formam juntos uma ligação dupla, ou R₁ e R₂ formam juntos um grupo ciclopropila;
R₃, R₄ são iguais ou diferentes e independentemente escolhidos a partir de hidrogênio,
metila, ou R₃ e R₄ formam juntos uma ligação dupla;

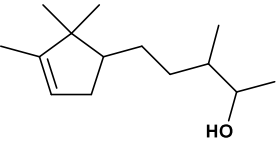
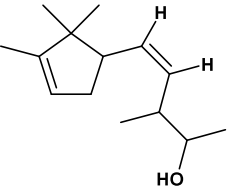

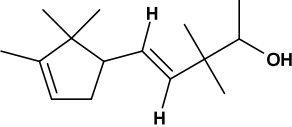
R₅, R₆ são iguais ou diferentes e independentemente escolhidos a partir de hidrogênio,
metila;

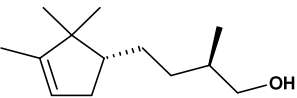
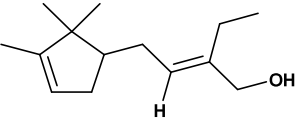
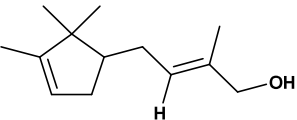
ou R₅ e R₆ formam juntos uma ligação dupla, ou R₅ e R₆ formam juntos um grupo
ciclopropila;

R₇ = metila, ou etila;

R₈ = hidrogênio, ou metila.

[016] Dentro do escopo da nova utilização de acordo com a presente invenção, os
compostos preferidos de fórmula (I), incluindo o anteriormente referido pentanol de sândalo
(composto 1) e ciclopentano de sândalo (composto 5), são apresentados na seguinte tabela:

	Composto	Nomeclatura IUPAC	CAS N°	Fórmula estrutural	Fórmula/ PM
1	pentanol de sândalo	3-metil-5-(2,2,3- trimetilciclopent-3-en-1- il)pentan-2-ol	65113-99-7		C ₁₄ H ₂₆ O 210.36
2	pentenol de sândalo	(4Z)-3-metil-5-(2,2,3- trimetilciclopent-3-en-1- il)pent-4-en-2-ol	67801-20-1		C ₁₄ H ₂₄ O 208.35
3	ciclopropano de sândalo	1-metil-2-((1,2,2- trimetilbiciclo(3.1.0)hex- 3-il)metil)-ciclopropano- metanol	198404-98- 7		C ₁₅ H ₂₆ O 222.37
4	Santol pentenol	(E)-3,3-dimetil-5-(2,2,3- trimetilciclopent-3-en-1- il)pent-4-en-2-ol	107898-54- 4		C ₁₅ H ₂₆ O 222.37

	Composto	Nomeclatura IUPAC	CAS N°	Fórmula estrutural	Fórmula/ PM
5	ciclopentano de sândalo	2-Metil-4-(2,2,3-trimetil-3-ciclopenten-1-il)butanol	72089-08-8		C ₁₃ H ₂₄ O 196.34
6	sandalrome	(E)-2-etil-4-(2,2,3-trimetilciclopent-3-en-1-il)but-2-en-1-ol	28219-61-6		C ₁₄ H ₂₄ O 208.35
7	butenol de sândalo	(E)-2-metil-4-(2,2,3-trimetil-3-ciclopenten-1-il)-2-buten-1-ol	28219-60-5		C ₁₃ H ₂₂ O 194.32

[017] Um objeto da invenção também são composições para uso na promoção do crescimento capilar, e/ou inibição ou retardamento da perda de cabelo, adequadas para administração tópica no couro cabeludo humano, em que um ou mais compostos de fórmula (I) são utilizados como princípios ativos, preferencialmente em uma quantidade entre 0,1 e 10% em peso (p/p %), formulada com ingredientes adequados para uma administração tópica.

[018] As composições da invenção são adequadas para um uso cosmético e terapêutico na promoção do crescimento capilar e/ou no tratamento da perda de cabelo no couro cabeludo humano, em que pelo menos um composto de fórmula geral (I) é compreendido como princípio ativo.

DESCRIÇÃO DETALHADA DA INVENÇÃO

[019] De modo a melhor compreender as características e vantagens da invenção, exemplos práticos e não limitantes são descritos abaixo. Os componentes são nomeados de acordo com a nomenclatura INCI.

EXEMPLOS

EXEMPLO 1

LOÇÃO

[020]

Componente (nome INCI)

quantidade (p/p %)

Álcool desnat,	15-35
PEG-40 Óleo de rícino hidrogenado	0,5-3
Pentanol de sândalo	0,1-10,0
Etoxidiglicol	0,25-1,0
Água q.s. para 100g	

EXEMPLO 2

MÁSCARA PRÉ-XAMPU

[021]

Componente (nome INCI)	quantidade (p/p %)
glicerina	1,5-4,5
copolímero de acrilometilaurato de amônio/vp	1,0-2,0
Pentanol de sândalo	0,1-10,0
ciclopentasiloxano	1,0-2,0
fenoxietanol	0,25-0,75
perfume	0,5-1,0
caprilil glicol	0,25-0,75
feniltrimeticona	0,25-0,75
silicone quaternário-17	0,1-0,4
dimeticona	0,1-0,4
lauriléter-4	0,1-0,4
sericina	0,1-0,4
acetato de tocoferila	0,1-0,3
lauriléter-23	0,1-0,3
sorbato de potássio	0,05-0,15
glicirrizato de amônio	0,05-0,15
ácido cítrico	0,04-0,08
EDTA dissódico	0,025-0,075
metoxicinamato de etilexila	0,025-0,075
dimeticonol	0,025-0,075

Água q.s. para 100g

EXEMPLO 3

GEL MODELADOR FORTALECEDOR

[022]

Componente (nome INCI)	quantidade (p/p %)
Pentanol de sândalo	0,1-10,0
PEG-40 Óleo de rícino hidrogenado	1-3
perfume	0,5-1,5
poliacrilato-14	0,5-1,5
hidroxipropilguar	0,5-1,5
hidrolisado de amido hidrogenado	0,5-1,5
hidroximetilglicinato de sódio	0,25-1,0
benzofenona-4	0,15-0,45
EDTA dissódico	0,05-0,15
poliquaternário-11	0,0025-0,025

Água q,s, para 100g

EXEMPLO 4

CONDICIONADOR DE CABELO FORTIFICANTE

[023]

Componente (nome INCI)	quantidade (p/p %)
álcool cetearílico	15-25
estearato de glicerila	15-25
dimeticona	10-20
lactato de alquila-C ₁₂₋₁₃	5-15
cloreto de cetrimônio	2,5-7,5
estearato PEG-100	2,5-7,5
ciclopentasiloxano	2-6
xilitol	2-6
Pentanol de sândalo	0,1-10,0

hidroxietilcelulose	1-3
dimeticonol	1-3
álcool benzílico	0,1-1,0
pantenol	1-3
perfume	1-2
copolímero de bis-isobutil PEG/ PPG-20/35/amodimeticona	0,5-1,0
fitantriol	0,5-1,0
benzoato de sódio	0,5-1,0
desidroacetato de sódio	0,5-1,0
etilhexanoato de cetila	0,5-1,0
butileno glicol	0,5-1,0
EDTA dissódico	0,2-0,6
polissorbato 80	0,2-0,6
sericina	0,2-0,6
ácido desidroacético	0,1-0,3
polissacarídeos de levedura	0,1-0,3
gliconolactona	0,05-0,15
Água q,s, para 100g	

EXEMPLO 5

XAMPU REVITALIZANTE

[024]

Componente (nome INCI)	quantidade (p/p %)
lauril éter sulfato de magnésio	5-10
lauroil sarcosinato de sódio	2-3
Pentanol de sândalo	0,1-10,0
lauril éter sulfosuccinato dissódico	1,5-2,5
palmato de glicerilo hidrogenado PEG-200	1-2
cocamida mipa	0,5-1,5
perfume	0,5-1

diestearato de glicol	0,5-1
Cocoato de glicerila PEG-7	0,25-0,75
betaína	0,25-0,75
cloreto de lauril metil-glucet-10 hidroxipropildimônio	0,25-0,75
lauriléter-7	0,25-0,75
poliquaternário-10	0,25-0,75
hidroximetilglicinato de sódio	0,25-0,75
proteína de trigo hidrolisada de undecilenoíla potássica	0,2-0,4
pantenol	0,1-0,3
EDTA tetrassódico	0,1-0,3
feniltrimeticona	0,05-0,15
silicone quaternário-17	0,05-0,12
lauriléter-4	0,05-0,12
lauriléter-23	0,025-0,075
cocoanfoacetato de sódio	0,025-0,075
BHA	0,005-0,015

Água q.s. para 100g

EXEMPLO 6

MOUSSE

[025]

Componente (nome INCI)	quantidade (p/p %)
álcool	10-20
Pentanol de sândalo	0,1-10,0
PEG-40 Óleo de rícino hidrogenado	1-2
glicerina	1-1,5
olivanfoacetato de sódio	0,5-1,5
perfume	0,5-1
tocoferol	0,05-0,15
EDTA dissódico	0,025-0,075

poliquaternário-16 0,025-0,075

metabissulfito de potássio 0,01-0,03

Água q.s. para 100g

BREVE DESCRIÇÃO DAS FIGURAS

[026] Com referência às Figuras 1 a 5 dos desenhos anexos;

- Figura 1: mostra imagens de imunofluorescência obtidas de amostras de tecidos da pele do couro cabeludo humano e folículos pilosos (HFs).
- Figura 2: mostra um diagrama relacionado com o alongamento da haste capilar.
- Figura 3: mostra um diagrama relacionado com o ciclo de crescimento capilar, com referência particular à fase catágena.
- Figura 4: mostra um diagrama relativo à proliferação e apoptose de queratinócitos da matriz capilar.
- Figura 5: mostra um diagrama relativo ao fator de crescimento de promoção catágena TGF β 2.

[027] As Figuras 1 a 5 dizem respeito aos resultados obtidos no seguinte estudo experimental, e são assim descritas em detalhe na descrição a seguir.

ESTUDO EXPERIMENTAL

[028] O referido composto 1 de acordo com a invenção, ou seja, pentanol de sândalo, foi escolhido dentre os compostos de fórmula (I) para ser testado para propósitos experimentais das seguinte forma. O pentanol de sândalo é denominado de Sandalore nos diagramas das Figuras 2-5.

DESCRIÇÃO DO ESTUDO

[029] Como uma primeira etapa, a técnica de imunofluorescência padrão foi utilizada em cortes de tecido cutâneo de couro cabeludo humano de doadores saudáveis, a fim de avaliar se *OR2AT4* é expresso em folículos capilares (HFs) do couro cabeludo humano.

[030] Em seguida, a fim de avaliar se a estimulação de *OR2AT4* pode influenciar no crescimento de cabelo humano, HF microdissecados foram tratados com pentanol de sândalo em uma concentração de 500 mM, como agonista e foi realizada a medição de alongamento da haste capilar (Philpott *et al.*, 1990). Adicionalmente, foi realizado um ensaio

de quinase para identificar quais vias de sinalização estão envolvidas na estimulação específica de OR2AT4 pelo pentanol de sândalo.

[031] Subsequentemente, a fim de confirmar que o efeito de prolongamento do anágeno do pentanol de sândalo é específico, foi realizada uma cultura de órgão HF usando pentanol de sândalo como agonista e um antagonista específico, Phenirat (isobutirato de fenoxietila), uma fragrância sintética, vide Busse *et al.* referência mencionada acima.

[032] Os HFs foram tratados com o veículo, pentanol de sândalo, Phenirat ou uma mistura de pentanol de sândalo e Phenirat. Para analisar as modificações do ciclo capilar, foram usados os marcadores Ki67/TUNEL para avaliar o escore do ciclo capilar, a proliferação e a apoptose dos queratinócitos da matriz capilar.

[033] Adicionalmente, investigou-se o TGF β 2, um potente indutor catágeno, com referência aos mesmos compostos acima.

[034] A fim de regular negativamente a expressão de OR2AT4 em HFs humanos e estudar o efeito disso no crescimento capilar, os HFs foram transfectados com siRNA direcionado ao OR2AT4 (OR2AT4-siRNA).

[035] As análises por qRT-PCR e (imuno)-histomorfometria foram empregadas para confirmar com sucesso uma regulação negativa mediada por siRNA do gene e proteína OR2AT4 em HF microdissecados. Finalmente, a fim de investigar como o silenciamento gênico de OR2AT4 influencia o crescimento capilar humano, a imunofluorescência Ki67/TUNEL foi usada para quantificar o escore do ciclo capilar, e a proliferação e apoptose dos queratinócitos da matriz capilar. Para verificar se o silenciamento gênico pode influenciar a indução da fase catágena, a expressão de TGF β 2 foi analisada por imunofluorescência.

MATERIAIS E MÉTODOS

ESPÉCIMES DE TECIDO

[036] A pele normal e occipital do couro cabeludo humano normal foi obtida de doadores saudáveis (na faixa etária de 38 a 69 anos) submetidos à cirurgia de *lifting* facial de rotina após consentimento informado e aprovação ética.

IMUNOFLUORESCÊNCIA

[037] As amostras emblocadas em OCT foram submetidas a cortes histológicos (6 µm de espessura) em um criostato. Os cortes foram fixados em paraformaldeído a 4%, pré-incubados com 10% de soro de cabra (para OR2AT4) ou 5% de soro de cabra + 0,3% de Triton X-100 (para caspase 3 clivada) e incubados a 4 °C durante a noite com o anticorpo primário correspondente (1/100 para OR2AT4 e 1/400 para caspase 3 clivada). A incubação dos anticorpos secundários foi realizada em temperatura ambiente por 45 min. A contracoloração com DAPI (1 µg/mL) foi realizada para visualizar os núcleos. Para TGFβ2, as amostras foram fixadas em acetona e a peroxidase endógena foi bloqueadas com H₂O₂ a 3%. Esta etapa foi seguida por uma etapa de bloqueio de avidina-biotina e uma pré-incubação com tampão TNB (Tris HCl + NaCl + Caseína). O anticorpo primário correspondente foi incubado a 4 °C durante a noite (1/1000 para TGFβ2). A incubação dos anticorpos secundários foi realizada à temperatura ambiente (TA) durante 45 min. antes de se utilizar o kit de amplificação de sinal *Tyramide* (Perkin Elmer). A contracoloração com DAPI (1 µg/mL) foi realizada para visualizar os núcleos. Para corar as células apoptóticas e proliferativas, usamos o kit *apoptag* (Merck Milipore) seguindo o protocolo do fabricante pela coloração de Ki67. O anticorpo primário foi incubado durante a noite (Ki67, 1/20) após a etapa da enzima TdT. O anticorpo secundário foi incubado durante 45 min, à TA após a etapa de incubação com anti-Digoxigenina marcado com fluorescência do kit *apoptag*. A contracoloração com DAPI (1 µg/mL) foi realizada para visualizar os núcleos. Os controles negativos foram realizados pela omissão do anticorpo primário. As imagens foram tiradas usando um microscópio de fluorescência *Keyence* (Osaka, Japão) mantendo um tempo de exposição constante durante toda a imagem para uma análise mais aprofundada.

CULTURA DE ÓRGÃO HF

[038] Amostras de couro cabeludo humano foram obtidas após o procedimento de *lifting* facial e utilizadas no mesmo dia para a microdissecção de HFs em fase anágena VI do couro cabeludo humano. Os HFs do couro cabeludo humano microdissecados foram cultivados a 37 com 5% de CO₂ em um meio mínimo William E (Gibco, Life technologies) suplementado com 2 mM de L-glutamina (Gibco), 10 ng/mL de hidrocortisona (Sigma-Aldrich), 10 µg/mL de insulina (Sigma-Aldrich) e 1% de mistura de penicilina/estreptomicina (Gibco) (WEM)

conforme anteriormente descrito (Philpott, 1990; Kloepper, 2010; Langan *et al*, 2015).

1) ESTIMULAÇÃO QUÍMICA DE HFS MICRODISSECADOS EM HUMANOS COM PENTANOL DE SÂNDALO (AGONISTA DE OR2AT4) E PHENIRAT (ANTAGONISTA DE OR2AT4)

[039] Após 24 horas de incubação, o meio WEM foi substituído e os HFs foram tratados com as substâncias correspondentes por 6 dias após as condições experimentais. Os HFs foram tratados com veículo (0,1% de DMSO), pentanol de sândalo (500 µM), Phenirat (em uma proporção de 1:1 para o agonista) ou uma mistura de pentanol de sândalo + Phenirat.

[040] Phenirat foi adicionado 30 minutos antes do pentanol de sândalo. O alongamento da haste capilar foi medido diariamente usando um microscópio binocular invertido (Philpott *et al.*, 1990) e o meio de cultura foi substituído a cada dois dias. Os HFs foram então incorporados em *cryomatrix* (Fisher Scientific) e congelados em nitrogênio líquido. Cortes de 6 µm de espessura foram cortadas com um criostato e armazenados a -80 °C para posterior análise imuno-histoquímica.

QUANTITATIVA (IMUNO)HISTOMORFOMETRIA

[041] A intensidade da coloração foi avaliada em áreas de referência bem definidas por (imuno)histomorfometria quantitativa, conforme descrito anteriormente (Bertolini *et al.*, 2014) usando o *software* NIH IMAGE (NIH, Bethesda, MD, EUA).

ANÁLISES ESTATÍSTICAS

[042] Todos os dados são expressos como média ± EPM e foram analisados pelo teste Anova unidirecional ou Kruskal Wallis quando mais de dois grupos foram comparados e teste t de Student ou Mann-Whitney quando o tratamento com pentanol de sândalo foi comparado ao veículo (*Graph Pad Prism 6, Software GraphPad, San Diego, CA, EUA*).

RESULTADOS

[043] Os resultados são descritos com referência às Figuras 1 a 5 anexas.

1) HFs HUMANOS EXPRESSAM O RECEPTOR OLFATIVO 2AT4

[044] Primeiramente, investigou-se a presença do receptor olfativo 2AT4 (OR2AT4) em HFs. O OR2AT4 foi observado nos queratinócitos da bainha radicular externa suprabulbar (ORS) de HFs anágenos do couro cabeludo humano, como demonstrado pela imunofluorescência na Figura 1. As Figuras A) a D) da Figura 1 representam a

imunofluorescência de OR2AT4 em HFs do couro cabeludo humano (vide a figura A e ampliações correspondentes) e HFs microdissecados (veja as fotos B-D e ampliações correspondentes) de três diferentes doadores ($n = 3$). CTS indica a bainha de tecido conjuntivo, DP indica a papila dérmica, HM indica a matriz capilar, IRS indica a bainha radicular interna, ORS indica a bainha radicular externa, HS indica a haste capilar, HB indica o bulbo capilar, HF designa folículos pilosos. As linhas pontilhadas delineiam a IRS (bainha radicular interna), ORS (bainha radicular externa) e DP (papila dérmica).

[045] A figura 1 mostra que o OR2AT4 é expresso em queratinócitos suprabulbares da ORS de HFs do couro cabeludo anágeno e na ORS suprabulbar e bulbar, e em queratinócitos da matriz capilar em HFs anágenos microdissecados.

[046] Os HFs anágenos microdissecados (modelo Philpott) revelaram células OR2AT4 no bulbo capilar, nomeadamente nas ORS e matriz capilar (HM), veja a Fig. 1B, adicionalmente, vide a Fig. 1D para a expressão intrafolicular suprabulbar característica.

2) ESTIMULAÇÃO ESPECÍFICA DE OR2AT4 PELO PENTANOL DE SÂNDALO PROMOVE O ALONGAMENTO DA HASTE CAPILAR E INIBE A VIA DE SINALIZAÇÃO APOPTÓTICA

[047] Para verificar se a ativação de OR2AT4 pode influenciar o ciclo capilar do HF humano, os HF humanos microdissecados foram especificamente estimulados com o potencial agonista, o pentanol de sândalo. O efeito do tratamento com pentanol de sândalo foi avaliado medindo o alongamento da haste capilar em comparação com o veículo.

[048] O alongamento do HFs foi medido em HFs microdissecados cultivados. A média \pm EPM, $n = 18$ HFs para cada doador, 2 doadores, teste t de Student, Graph Pad Prism 6. Apesar das diferenças interindividuais, os resultados revelam que o pentanol de sândalo na concentração de 500 μ M estimula o alongamento da haste capilar de culturas de HFs microdissecados derivadas de dois doadores, conforme mostrado no diagrama da Fig. 2 relatando % de alongamento *versus* dias de cultura, Sandalore comparado ao veículo.

3) A ATIVAÇÃO DE OR2AT4 PELO PENTANOL DE SÂNDALO RETARDA SIGNIFICATIVAMENTE A INDUÇÃO CATÁGENA E DIMINUI A APOPTOSE EM QUERATINÓCITOS DA MATRIZ CAPILAR HUMANA

[049] Para investigar a especificidade do efeito no crescimento capilar da estimulação de

OR2AT4 por pentanol de sândalo, HFs microdissecados foram cultivados com pentanol de sândalo e/ou Phenirat, e a análise de estadiamento do ciclo capilar foi realizada como descrito anteriormente (Kloepper, 2010; Langan *et al.*, 2015). O escore do ciclo capilar foi medido tanto nos HFs tratados quanto nos HFs após 6 dias de cultura. N = 16-24 HFs de 3 pacientes, média \pm EPM, teste de Kruskal Wallis e teste de comparações múltiplas de Dunn como teste *post hoc*, ns, teste de Mann-Whitney, # $p < 0,05$, *Graph Prism 6*.

[050] Os resultados obtidos indicam que a estimulação específica de OR2AT4 por pentanol de sândalo sozinho na concentração de 500 μ M atrasou a indução catágena em HFs tratados em comparação com veículo após 6 dias de cultura, conforme mostrado no diagrama da Figura 3. Por outro lado, tanto a referência comparativa Phenirat isoladamente como a mistura de pentanol de sândalo administrada em conjunto com Phenirat não prolongaram a fase anágena nos HF tratados em comparação com o veículo. Os dados sugerem que a estimulação do OR2AT4 pelo pentanol de sândalo promove o atraso da fase catágena, enquanto estes efeitos são contrariados pela inibição de OR2AT4 quando se utiliza Phenirat.

[051] Em resumo, a Fig. 3 mostra que o composto da invenção atrasa significativamente o desenvolvimento da fase catágena.

4) O PENTANOL DE SÂDALO DIMINUI SIGNIFICATIVAMENTE A APOPTOSE DOS QUERATINÓCITOS DA MATRIZ CAPILAR

[052] Com referência à evidência da Figura 4, para investigar se o pentanol de sândalo influencia a proliferação e apoptose dos queratinócitos da matriz capilar, foi realizada a coloração Ki67/TUNEL. Os queratinócitos da matriz capilar em proliferação (diagrama da Figura 4A) e apoptóticos (diagrama da Figura 4B) foram contados na matriz capilar dos HFs tratados e controle (tratados apenas com veículo). Imagens representativas das marcações com Ki67/TUNEL são mostradas na Fig. 4 de C a E. Média \pm EPM, n=18-21 HFs de 3 pacientes, teste de Kruskal Wallis e teste de comparações múltiplas de Dunn como teste *post hoc*, ** $p < 0.01$, *** $p < 0.001$, teste de Mann-Whitney, # $p < 0,05$, *Graph Prism 6*.

[053] Após 6 dias de cultura, a proliferação de queratinócitos da matriz capilar não se alterou nas HFs tratadas com pentanol de sândalo ou Phenirat sozinho. Entretanto, a coadministração do antagonista específico de OR2AT4, Phenirat, juntamente com o

pentanol de sândalo, induziu uma diminuição significativa na proliferação de queratinócitos da matriz capilar, conforme mostrado na Fig. 4A.

[054] O tratamento com pentanol de sândalo diminuiu significativamente a apoptose dos queratinócitos da matriz capilar, enquanto a coadministração de pentanol de sândalo + Phenirat aumentou significativamente a apoptose dos queratinócitos da matriz capilar, conforme mostrado na Fig. 4B.

5) ESTIMULAÇÃO ESPECÍFICA DE OR2AT4 PELO PENTANOL DE SÂNDALO DIMINUIU SIGNIFICATIVAMENTE O FATOR DE CRESCIMENTO PROMOTOR DA FASE CATÁGENA TGFβ2

[055] Com referência à evidência da Figura 5, para investigar como o agonista ou antagonista de OR afeta o crescimento dos HFs, a expressão do fator de crescimento promotor da catagênese relevante durante o ciclo fisiológico do HF humano, ou seja, TGFβ2 (Soma *et al.*, 2002), os ORs proximais foram examinados. Após 6 dias de tratamento com pentanol de sândalo, foi observada uma diminuição significativa na expressão de TGFβ2 ao nível da proteína, enquanto nenhuma alteração foi detectada pelo bloqueio do receptor com Phenirat. Neste caso, a coadministração de pentanol de sândalo com Phenirat mostrou um resultado comparável como obtido pela administração de pentanol de sândalo sozinho, conforme mostrado no diagrama da Figura 5A. A expressão de TGF-β2 foi mensurada em queratinócitos de ORs em HFs tratadas e veículo.

[056] Imagens representativas correspondentes da imunofluorescência de TGFβ2 são mostradas na Fig. 5, B (veículo), C (Sandalore), D (Sandalore + Phenirat).

[057] A expressão de TGFβ2 foi quantificada usando o programa *Image J*. Média ± EPM, n=14-22 HFs de 2 pacientes, teste de Kruskal Wallis e teste de comparações múltiplas de Dunn como teste *post hoc*, *p<0.05, ***p<0.001, e teste de Mann-Whitney, ns, *Graph Prism 6*.

CONCLUSÕES

[058] Os resultados apresentados acima mostram que o OR2AT4 é um modulador do crescimento capilar e o composto da invenção é um agente que prolonga a fase anágena. A estimulação de OR2AT4 pelo composto da invenção aumenta o alongamento da haste

capilar e atrasa a transição para a fase catágena, enquanto que o efeito não é obtido com o inibidor de OR2AT4 Phenirat e é substancialmente neutralizado quando o composto da invenção é coadministrado com Phenirat.

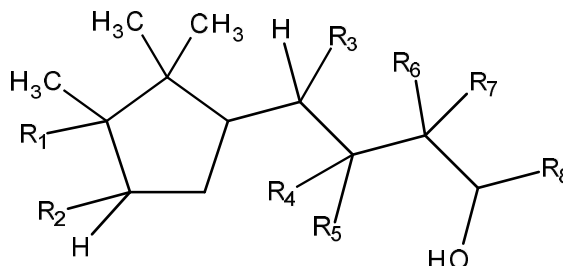
[059] A estimulação de OR2AT4 pelo composto da invenção modula as vias de sinalização apoptóticas e diminui significativamente a apoptose em queratinócitos da matriz capilar humana, enquanto este efeito não é obtido com Phenirat e é substancialmente abolido quando o composto da invenção é coadministrado com Phirirat.

[060] A estimulação de OR2AT4 pelo composto da invenção diminui significativamente o fator de crescimento promotor da fase catágena relevante, o TGF β 2, enquanto este efeito não é obtido com Phenirat.

[061] Em termos gerais, as evidências experimentais mostram que os compostos de fórmula (I) definidos acima podem ser eficazmente utilizados para promover o crescimento capilar e/ou inibir ou retardar a perda de cabelo no couro cabeludo humano.

Reivindicações

1. Uso cosmético de compostos de fórmula geral (I):



caracterizado por:

R_1 e R_2 formarem juntos uma ligação dupla, ou R_1 e R_2 formam juntos um grupo ciclopropila;
 R_3 , R_4 serem iguais ou diferentes e independentemente escolhidos a partir de hidrogênio, metila, ou R_3 e R_4 formam juntos uma ligação dupla;

R_5 , R_6 serem iguais ou diferentes e independentemente escolhidos a partir de hidrogênio, metila;

ou R_5 e R_6 formarem juntos uma ligação dupla, ou R_5 e R_6 formarem juntos um grupo ciclopropila;

R_7 = metila, ou etila;

R_8 = hidrogênio, ou metila;

sendo que tal composto de acordo com a fórmula (I) é selecionado a partir do grupo consistindo de:

3-metil-5- (2,2,3-trimetilciclopent-3-en-1-il)pentan-2-ol;

(4Z)-3-metil-5-(2,2,3-trimetilciclopent-3-en-1-il)pent-4-en-2-ol;

1-metil-2-((1,2,2-trimetilbiciclo(3.1.0)hex-3-il)metil)-ciclopropanometanol;

(E)-3,3-dimetil-5-(2,2,3-trimetilciclopent-3-en-1-il)pent-4-en-2-ol;

2-metil-4-(2,2,3-trimetil-3-ciclopenten-1-il)butanol; e,

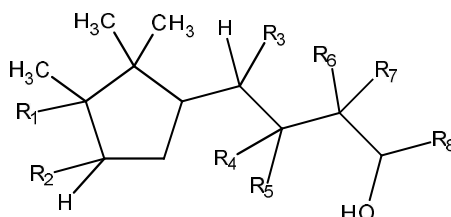
(E)-2-metil-4-(2,2,3-trimetil-3-ciclopenten-1-il)- 2-buten-1-ol;

para promover o crescimento capilar no couro cabeludo humano, em que os compostos de fórmula (I) são formulados em uma composição para administração tópica.

2. Uso cosmético, de acordo com a reivindicação 1, **caracterizado por** a composição para administração tópica compreende como princípio ativo pelo menos um

composto de fórmula (I) em uma quantidade entre 0,1 e 10% em peso (p/p %), formulado com ingredientes adequados para administração tópica.

3. Uso de composição farmacêutica, compreendendo o composto de fórmula geral (I):



caracterizados por:

R₁ e R₂ formarem juntos uma ligação dupla, ou R₁ e R₂ formarem juntos um grupo ciclopropila;

R₃, R₄ serem iguais ou diferentes e independentemente escolhidos a partir de hidrogênio, metila, ou R₃ e R₄ formarem juntos uma ligação dupla;

R₅, R₆ serem iguais ou diferentes e independentemente escolhidos a partir de hidrogênio, metila;

ou R₅ e R₆ formarem juntos uma ligação dupla, ou R₅ e R₆ formarem juntos um grupo ciclopropila;

R₇ = metila, ou etila;

R₈ = hidrogênio, ou metila

sendo que tal composto de acordo com a fórmula (I) é selecionado a partir do grupo consistindo de:

3-metil-5- (2,2,3-trimetilciclopent-3-en-1-il)pentan-2-ol;

(4Z)-3-metil-5-(2,2,3-trimetilciclopent-3-en-1-il)pent-4-en-2-ol;

1-metil-2-((1,2,2-trimetilbíciclo(3.1.0)hex-3-il)metil)-ciclopropanometanol;

(E)-3,3-dimetil-5-(2,2,3-trimetilciclopent-3-en-1-il)pent-4-en-2-ol;

2-metil-4-(2,2,3-trimetil-3-ciclopenten-1-il)butanol; e,

(E)-2-metil-4-(2,2,3-trimetil-3-ciclopenten-1-il)- 2-buten-1-ol;

para preparar um medicamento para tratamento da perda de cabelo no couro cabeludo humano, compreendendo pelo menos um composto de fórmula (I) em uma quantidade

entre 0,1 e 10% em peso (p/p %), formulado com ingredientes adequados para administração tópica.

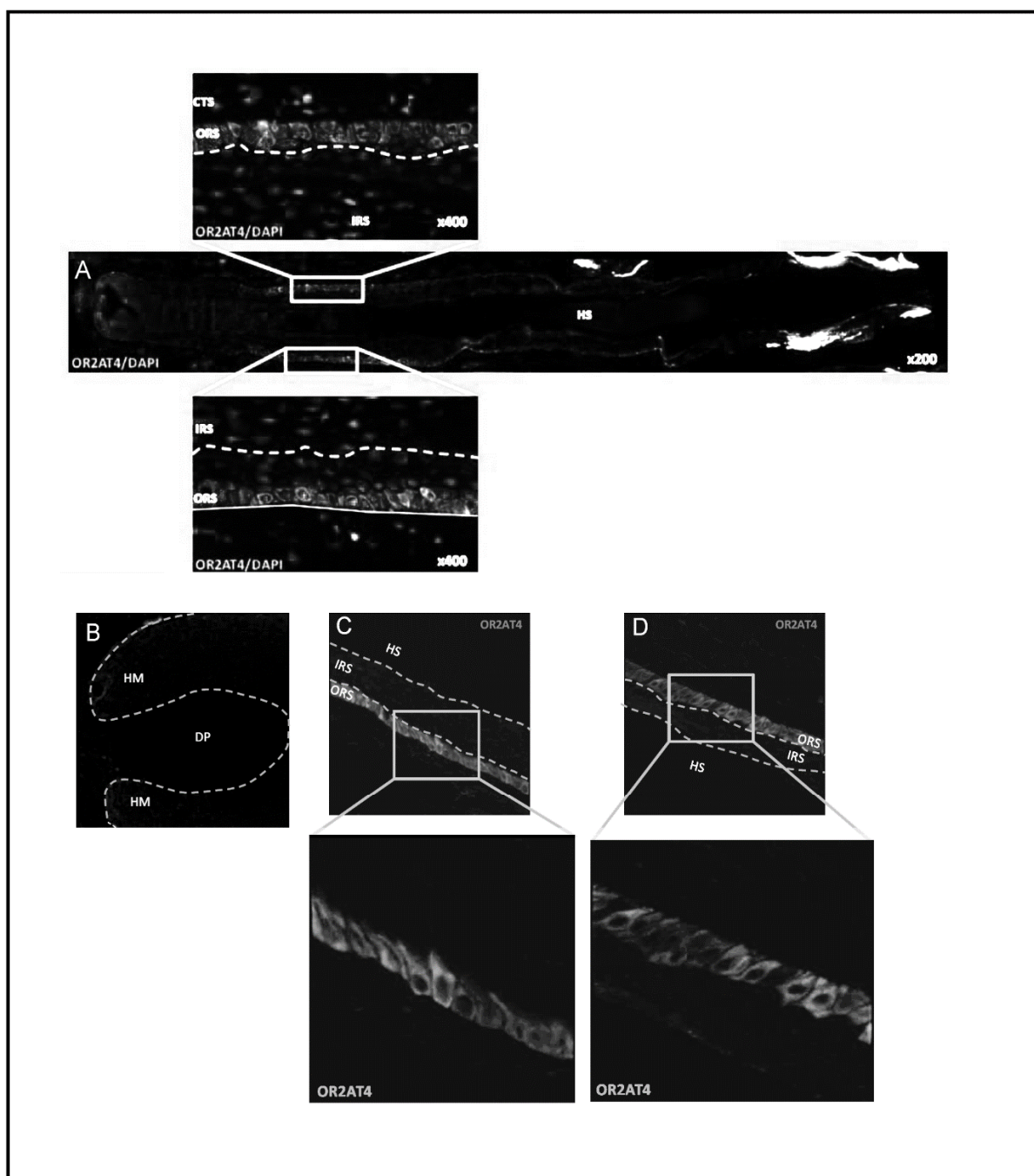


Fig. 1

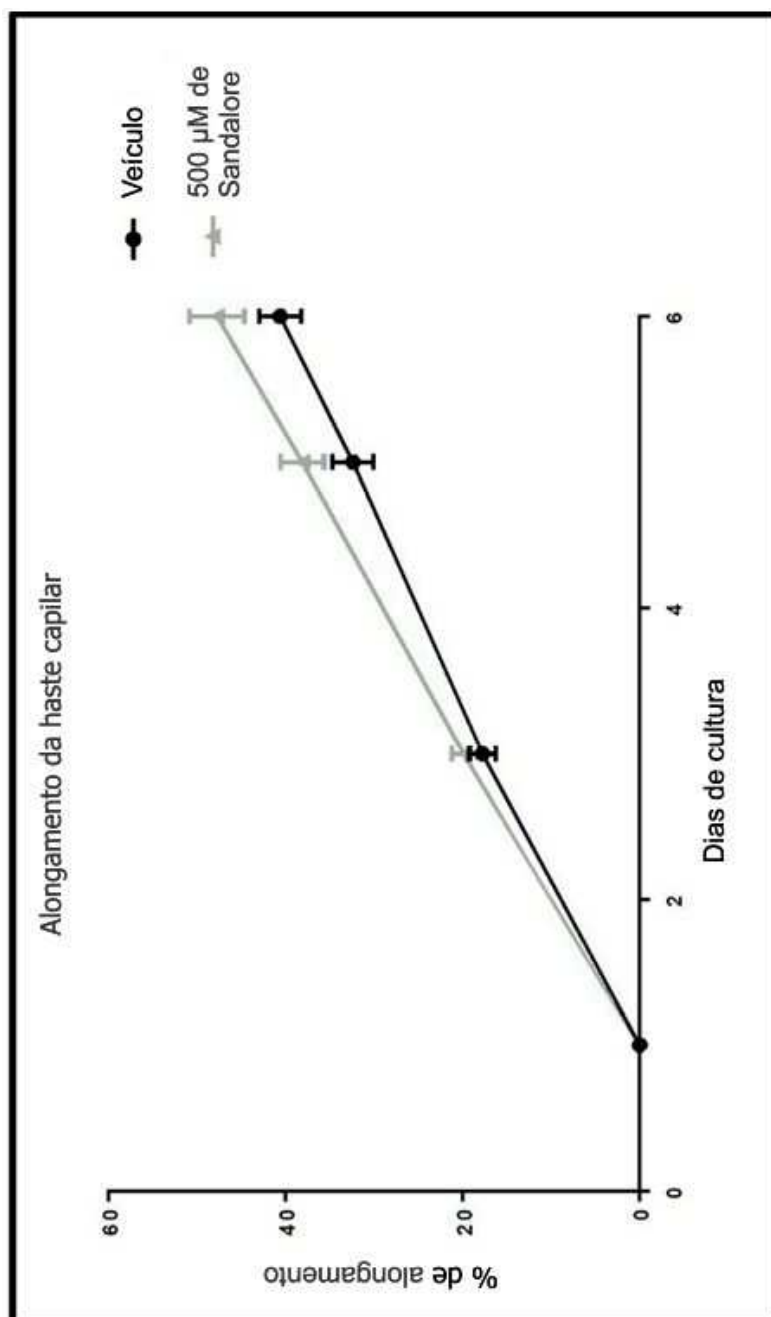
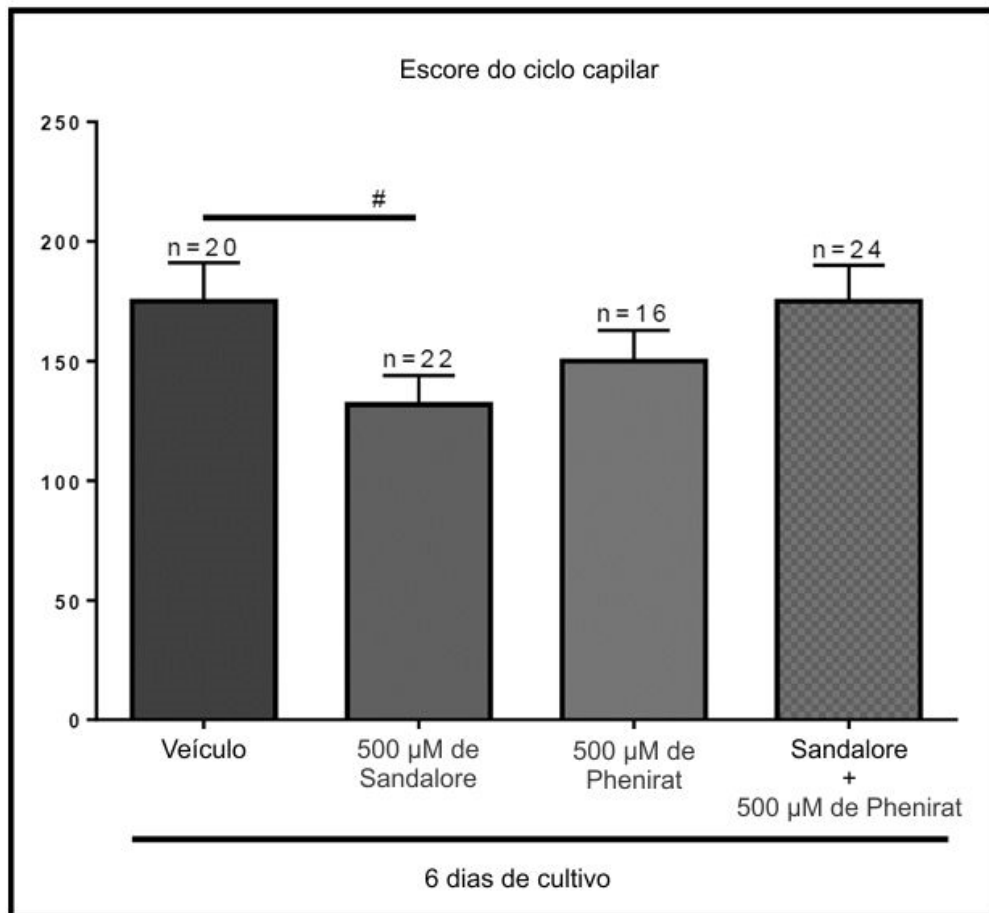


Fig. 2

**Fig. 3**

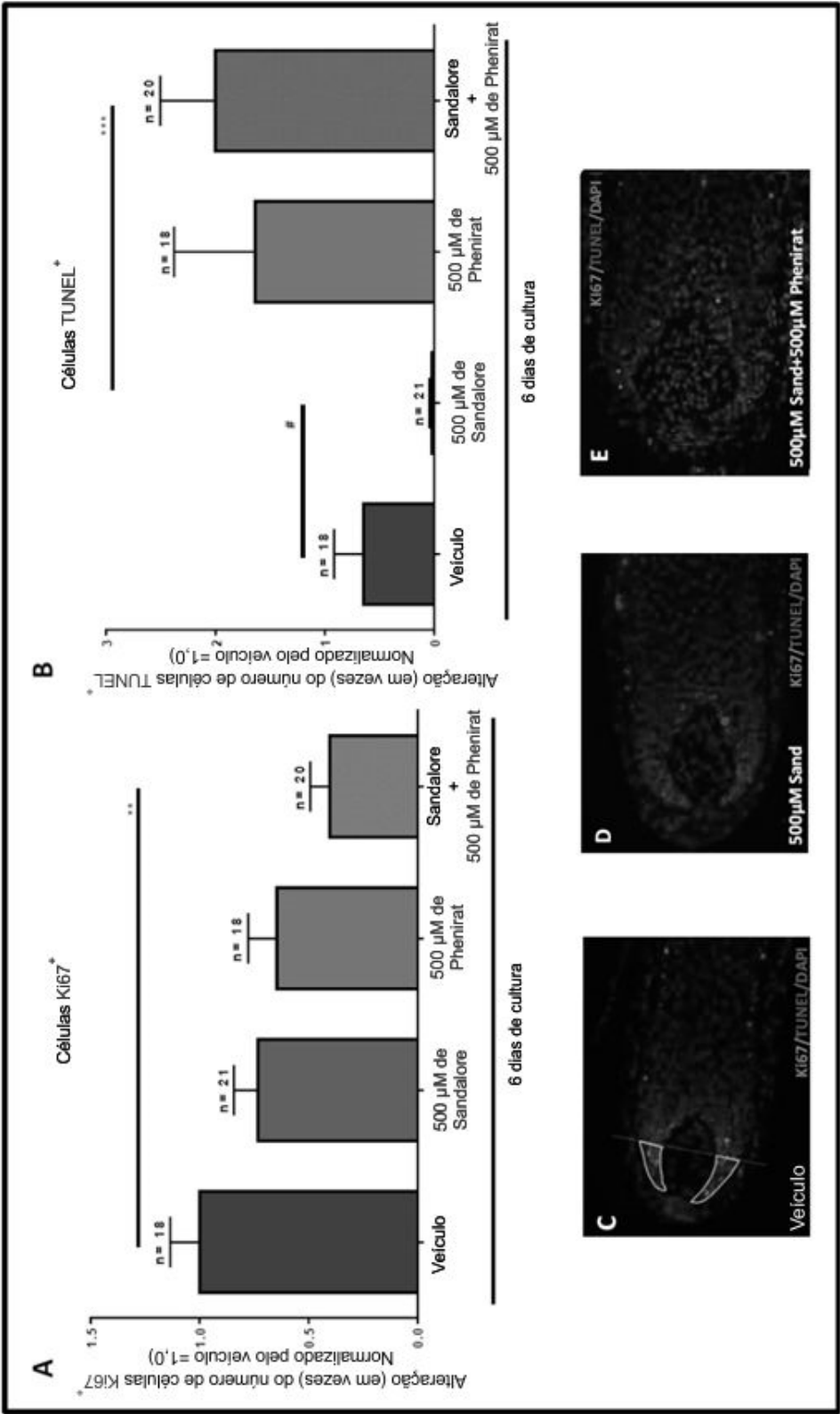


Fig. 4

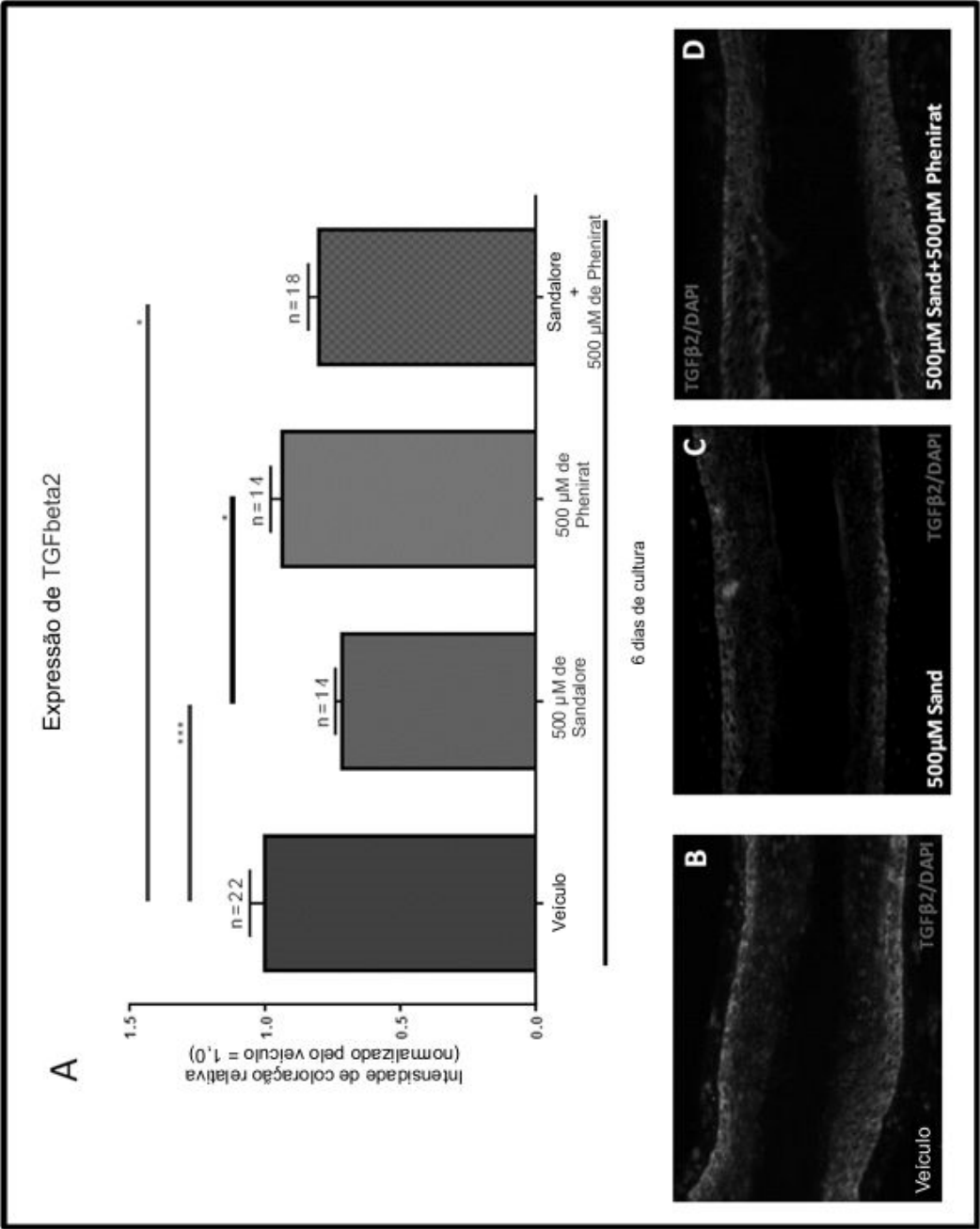


Fig. 5