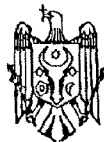




MD/EP 3458020 T2 2021.03.31

REPUBLICA MOLDOVA

(19) Agenția de Stat
pentru Proprietatea Intelectuală

(11) MD/EP 3458020 (13) T2

(51) Int. Cl.: A61K 8/34 (2006.01.01)
A61Q 7/00 (2006.01.01)
A61K 31/045 (2006.01.01)
A61P 17/14 (2006.01.01)

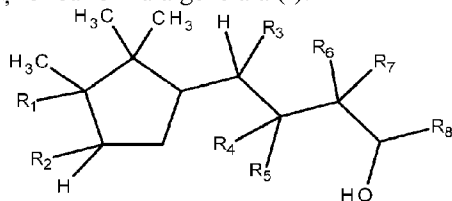
(12) BREVET DE INVENȚIE EUROPEAN VALIDAT

(21) Numărul de depozit: e 2019 0369 (22) Data de depozit: 2017.05.19 (96) Numărul cererii și data de depozit a cererii de brevet european: 17730678.4, 2017.05.19 (97) Numărul de publicare și data publicării de către OEB a cererii de brevet european: 3458020, 2019.03.27 (31) Numărul cererii prioritare: UA20163604 (32) Data de depozit a cererii prioritare: 2016.05.19 (33) Țara cererii prioritare: IT	(49) Data publicării traducerii fasciculului de brevet european validat: BOPI nr. 03/2021, 2021.03.31 (80) Data publicării mențiunii eliberării de către OEB: EPB nr. 47/2020, 2020.11.18 (82) Data publicării solicitării de validare a brevetului european: BOPI nr. 04/2019, 2019.04.30
(71) Solicitant: GIULIANI S.P.A., IT (72) Inventatori: PAUS Ralf, DE; CHERET Jeremy, DE; HATT Hanns, DE; BARONI Sergio, IT (73) Titular: GIULIANI S.P.A., IT (74) Mandatar autorizat: SOKOLOVA Sofia	

- (54) Compuși pentru promovarea creșterii părului și/sau inhibarea sau întârzierea pierderii părului la om și compoziții pentru asemenea utilizări
- (57) Rezumat:

1

Invenția se referă la utilizarea compușilor cu formula generală (I):



2

in care:

R₁ și R₂ formează împreună o legătură dublă sau R₁ și R₂ formează împreună o grupare ciclopropil;

R₃, R₄ sunt aceleași sau diferite și alese independent dintre hidrogen, metil sau R₃ și R₄ formează împreună o dublă legătură;

R₅, R₆ sunt aceleași sau diferite și alese independent dintre hidrogen, metil; sau R₅ și R₆ formează împreună o legătură dublă sau

MD/EP 3458020 T2 2021.03.31

R₅ și R₆ formează împreună o grupare ciclopropil;

R₇ = metil sau etil;

R₈ = hidrogen sau metil,

pentru promovarea creșterii părului și/sau inhibarea sau întârzierea căderii părului

la nivelul scalpului uman și compoziții cosmetice sau farmaceutice potrivite pentru asemenea utilizare.

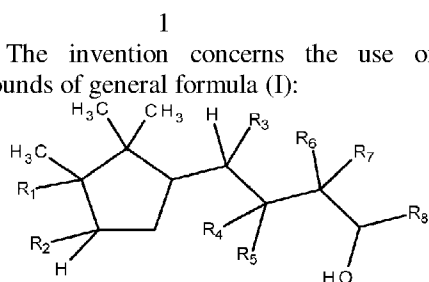
Revendicări: 16

Figuri: 5

(54) Compounds for promoting hair growth and/or inhibiting or delaying hair loss in humans, and compositions for such uses

(57) Abstract:

The invention concerns the use of compounds of general formula (I):



wherein:

R₁ and R₂ form together a double bond, or R₁ and R₂ form together a cyclopropyl group;

R₃, R₄ are the same or different and independently chosen from hydrogen, methyl, or R₃ and R₄ form together a double bond;

R₅, R₆ are the same or different and independently chosen from hydrogen, methyl; or R₅ and R₆ form together a double bond, or R₅ and R₆ form together a cyclopropyl group;

R₇ = methyl, or ethyl;

R₈ = hydrogen, or methyl,

for promoting hair growth and/or inhibiting or delaying hair loss in the human scalp, and cosmetic and pharmaceutical compositions suitable for such use.

Claims: 16

Fig.: 5

Descriere:**(Descrierea se publică în varianta redactată de solicitant)****DOMENIUL INVENȚIEI**

- 5 Invenția se referă la utilizarea compușilor pentru a promova creșterea părului și/sau a inhiba sau întârzia pierderea părului la om și compozițiile pentru o astfel de utilizare cuprinzând compuși ca principii active.

STADIUL TEHNICII

- 10 Termenul lemn de santal se referă la o clasă de păduri din copaci din genul Santalum. Uleiul esențial de lemn de santal este de obicei extras prin distilarea cu abur a lemnului din copacii de santal maturi și este o componentă bine cunoscută pentru parfumuri.

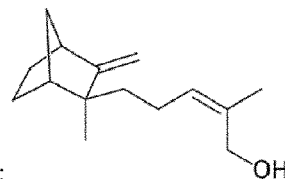
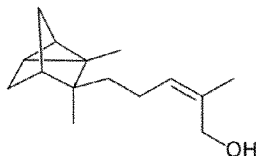
- 15 Dintre o serie de utilizări diferite în domeniul cosmetic, în cea mai mare parte legate de mirosul său apreciat, uleiul de lemn de santal este, de asemenea, subiectul publicațiilor de brevet cu privire la preparatele oficinale și empirice pentru o serie de utilizări diferite, inclusiv un tratament generic al căderii părului și al mătreții, precum de exemplu publicarea brevetului CN1075250A care descrie un extract medicinal, definit de fapt ca medicină chineză, cuprinzând lemn de santal amestecat cu muguri de magnolie, floare de trandafir, rădăcină de lemn dulce, pudră de coajă de bujor, kaempferia, liliac, herba asari, ginseng și rădăcină de angelica dahurica.

- 20 CN102000293 și CN103735443 descriu medicamente chinezești similare, primul făcut dintr-un amestec de lemn de santal, rădăcini de angelică, semințe de rhizoma kaempferiae, talc, busuioc sfânt, indigo natural și nard, cea de-a doua dintr-un amestec de lemn de santal, rădăcină de floare de lână, ace de pin salvia miltiorrhiza, de aplicat pe păr.

- 25 Pentru o utilizare generică substanțial similară, publicația de brevet indian IN00177MU2002A descrie o compoziție pentru prevenirea căderii părului care cuprinde ulei de lemn de santal amestecat cu ulei de cocos, ulei de eucalipt, ulei de cuișoare, ulei de lavandă și ulei de rozmarin.

- 30 Pentru astfel de preparate empirice, rolul specific al fiecărui ingredient amestecat în uleiul final nu este definit în astfel de publicații, astfel încât nici funcția specifică a ingredientului ulei de lemn de santal din amestecuri, fie ca parfum, fie ca, posibil, altceva, nu este determinată.

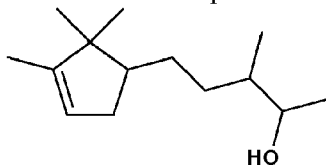
În orice caz, principalele componente ale uleiului de lemn de santal sunt α -santalol și β -santalol, care sunt alcooli care prezintă practic un lanț de tip sesquiterpenic. Formula structurală a α -santalolului este:



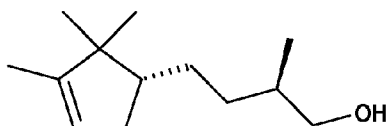
- 35 în timp ce a β -santalolului este: caracterizată printr-o grupare tricyclohept-3-il terminală sau, respectiv, o grupă bicyclohept-2-il.

- Pe de altă parte, compusul cunoscut sub numele de sandalore este un miros sintetic cu un parfum similar cu lemnul de santal și, în consecință, utilizat în parfumuri, emolienți și agenți de curățare a pielii ca ingredient mai puțin costisitor care imită parfumul de lemn de santal. Sandalore, precum și compusul similar structural numit brahmanol, sunt alcooli având o structură chimică destul de distinctă de ingredientele menționate din uleiul natural de lemn de santal, adică α -santalol și β -santalol.

De fapt sandalore sau sandal pentanol, având formula:



- 45 și brahmanol, sau sandal ciclopentan, având formula:



sunt molecule sintetice caracterizate ambele printr-o grupare ciclopenten-1-il terminală și nu au lanț sesquiterpenic. Ele sunt, de asemenea, subiectul publicațiilor de brevet cu privire la tratamentul părului în formulări cosmetice, cum ar fi șampoanele și balsamurile de păr, cu toate acestea utilizate doar ca parfumuri, de fapt în scopul specific al utilizării proprietății lor de a imita parfumul de lemn de santal. De exemplu EP1561476 descrie compozițiile deodorante pentru îmbunătățirea efectelor deodorizante în care, printre un număr mare de substanțe și un număr mare de utilizări, utilizarea sandalorului și brahmanolului este, de asemenea, descrisă ca parfumuri deodorizante în produsele de îngrijire a părului, cum ar fi șampoane, balsamuri, clătirea părului, agenți de colorare, agenți pentru onduleuri permanente, ceară, spray de păr și mousse. Materialele parfumate de origine naturală care urmează să fie utilizate ca parfumuri în EP1561476 includ ulei de lemn de santal, iar sandalore și brahmanol sunt definite ca denumiri comerciale ale materialelor de mai sus, ceea ce înseamnă că, conform acestui document, nu există nicio distincție între parfumul oferit de extractul natural și înlocuitorii săi sintetici.

EP1346720 se referă la o compoziție de deodorant pentru culoarea părului având un domeniu similar. Nu există o descriere în astfel de publicații, nici măcar generic, a unor astfel de substanțe odorizante sintetice pentru tratamentul căderii părului sau pentru promovarea creșterii părului.

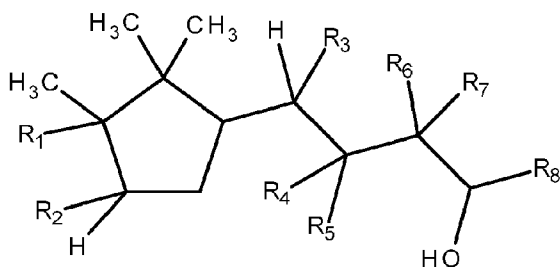
Conform Busse și colab., un miros sintetic de lemn de santal induce procese de vindecare a rănilor în keratinocite umane prin intermediul receptorului olfactiv OR2AT4, Journal of Investigative Dermatology, 2014, 134: 2823-2832, sandalore și brahmanol au fost identificați ca agonisti ai receptorului olfactiv cutanat OR2AT4 și s-au constatat că induc semnale Ca^{2+} în keratinocite umane cultivate. Stimularea pe termen lung a keratinocitelor cu sandalore afectează pozitiv proliferarea celulară, migrația și regenerarea monostratelor de keratinocite într-un test in vitro de zgârieturi ale plăgii, iar stimularea sandalore îmbunătățește vindecarea epidermică a rănilor în culturile de organe ale pielii umane.

Potrivit lui Busse și colab., sunt descrise dovezi că uleiul natural de lemn de santal și alte substanțe aromatizante sintetice nu sunt agonisti ai receptorului olfactiv OR2AT4 și nu prezintă același efect de vindecare a rănilor epidermice.

Expresia receptorilor olfactivi (OR) nu este limitată la epiteliul nazal, dar este prezentă și în diferite țesuturi umane, vezi Feldmesser E, Olender T, Khen M, Yanai I, Ophir R, Lancet D., Expresie ectopică larg răspândită a genelor receptorilor olfactivi. BMC Genomics. 22 mai 2006; 7:121; Zhang X, Firestein S., Nose thyself: individuality in the human olfactory genome. Genomul Biol. 2007; 8 (11):230; Flegel C, Manteniotis S, Osthold S, Hatt H, Gisselmann G., Profilul de expresie al receptorilor olfactivi ectopici determinați prin secvențierea profundă. PLoS One. 2013; 8 (2):55368). Numeroase studii au descris rolurile fiziologice pentru OR în diferite tipuri de celule umane (Kang N, Koo J. Receptorii olfactivi din țesuturile necemosenzoriale. BMB Rep. 2012 noiembrie; 45 (11): 612-22) cum ar fi spermatozoizii (Spehr M, Gisselmann G, Poplawski A, Riffell JA, Wetzel CH, Zimmer RK, Hatt H. Identificarea unui receptor odorizant testicular care mediază chemiotaxia spermei umane. Science. 28 martie 2003; 299 (5615): 2054-8; Veitinger T, Riffell JR și colab., Dinamica chemosenzorială Ca^{2+} se corelează cu fenotipuri comportamentale diverse în sperma umană. J Biol Chem. 2011 13 mai; 286 (19): 17311-25), celule epiteliale de prostată (Neuhaus EM, Zhang W, Gelis L, Deng Y, Noldus J, Hatt H. Activarea unui receptor olfactiv inhibă proliferarea celulelor de cancer de prostată. J Biol Chem. 2009; 284 (24): 16218-16225) și celulele enterocromafine ale intestinului (Braun T, Volland P, Kunz L, Prinz C, Gratzl M. Celule enterocromafine ale intestinului uman: senzori pentru condimente și mirosuri. Gastroenterologie. 2007 mai; 132 (5): 1890-901).

REZUMATUL INVENȚIEI

Conform prezentei invenții, s-a constatat în mod surprinzător că creșterea părului poate fi promovată și că pierderea părului poate fi inhibată sau întârziată la nivelul scalpului uman prin utilizarea compuşilor cu formula generală (I):



in care:

R₁ și R₂ formează împreună o legătură dublă sau R₁ și R₂ formează împreună o grupare ciclopropil;

5 R₃, R₄ sunt aceleași sau diferite și alese independent dintre hidrogen, metil sau R₃ și R₄ formează împreună o dublă legătură;

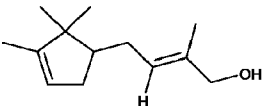
R₅, R₆ sunt aceleași sau diferite și alese independent dintre hidrogen, metil; sau R₅ și R₆ formează împreună o legătură dublă sau R₅ și R₆ formează împreună o grupare ciclopropil;

R₇ = metil sau etil;

10 R₈ = hidrogen sau metil.

În cadrul noii utilizări conform prezentei invenții, compușii preferați cu formula (I), inclusiv sandal pentanolul menționat anterior (compusul 1) și sandal ciclopentanul (compusul 5), sunt raportați în tabelul următor:

Compus	Numele IUPAC	CAS Nr	Formula structurala	Formula / MW
1 sandal pentanol	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 sandal pentenol	(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 sandal ciclopropan	1-metil-2-((1,2,2-trimetilbicyclo (3.1.0) hex-3-il) metil) -ciclopropan-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
5 sandal ciclopentan	2-Metil-4-(2,2,3-trimetil-3-ciclopenten-1-il) butanol	72089-08-8		C ₁₃ H ₂₄ O 196.34
6 sandalrom	(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 sandal butenol	(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

Compus	Numele IUPAC	CAS Nr	Formula structurala	Formula / MW
				

Un obiect al invenției sunt, de asemenea, compozițiile destinate utilizării în promovarea creșterii părului și/sau inhibării sau întârzierii căderii părului, adecvate pentru administrarea topică pe scalpul uman, în care unul sau mai mulți compuși cu formula (I) sunt utilizați ca principii active, de preferință într-o cantitate între 0,1 și 10% în greutate (greutate/greutate), formulată cu ingredient adecvate pentru o administrare topică.

Compozițiile conform invenției sunt potrivite atât pentru o utilizare cosmetică, cât și pentru o utilizare terapeutică în promovarea creșterii părului și/sau tratamentul căderii părului la nivelul scalpului uman, în care cel puțin un compus cu formula generală (I) este cuprins ca principiu activ.

DESCRIEREA DETALIATĂ A INVENȚIEI

Pentru a înțelege cel mai bine caracteristicile și avantajele invenției, sunt descrise mai jos exemple practice nelimitative ale acestora. Componentele sunt denumite în conformitate cu nomenclatura INCI.

EXEMPLE

EXEMPLUL 1

LOȚIUNE

componentă (numele INCI)	cantitate (g/g%)
Alcool denat	15-35
PEG-40 Ulei de ricin hidrogenat	0.5-3
Sandal pentanol	0.1-10.0
Etoxidiglicol	0.25-1.0
Aqua q.s. până la 100 g	

EXEMPLUL 2

MASCA PRE-ȘAMPON

componentă (numele INCI)	cantitate (g/g%)
glicerină	1.5-4.5
copolimer de acrilildimetiltaurat de amoniu / vp	1.0-2.0
sandal pentanol	0.1-10.0
ciclopentasiloxan	1.0-2.0
fenoxietanol	0.25-0.75
parfum	0.5-1.0
glicol caprilil	0.25-0.75
fenil trimeticonă	0.25-0.75
siliciu quaternium-17	0.1-0.4
dimeticonă	0.1-0.4
laureth-4	0.1-0.4

componentă (numele INCI)	cantitate (g/g%)
sericină	0.1-0.4
acetat de tocoferil	0.1-0.3
laureth-23	0.1-0.3
sorbat de potasiu	0.05-0.15
glicirratat de amoniu	0.05-0.15
acid citric	0.04-0.08
edta disodică	0.025-0.075
etilhexil metoxicinamat	0.025-0.075
dimeticonol	0.025-0.075
aqua q.s. până la 100 g	

EXEMPLUL 3

GEL STILIZANT CU ÎNTĂRIRE

5

Componentă (nume INCI)	cantitate (g/g%)
sandal pentanol	0.1-10.0
ulei de ricin PEG-40 hidrogenat	1-3
parfum	0.5-1.5
poliacrilat-14	0.5-1.5
hidroxipropil guar	0.5-1.5
hidrolizat de amidon hidrogenat	0.5-1.5
hidroximetilglicinat de sodiu	0.25-1.0
benzofenona-4	0.15-0.45
edta disodică	0.05-0.15
polyquaternium-11	0.0025-0.025
aqua q.s. până la 100 g	

EXEMPLUL 4

BALSAM DE PĂR FORTIFIANT

10

Componentă (nume INCI)	cantitate (g/g%)
alcool cetearilic	15-25
stearat de gliceril	15-25
dimeticonă	10-20
C12-13 alchil lactat	5-15
clorură de cetrimonium	2.5-7.5
PEG-100 stearat	2.5-7.5
ciclopentasiloxan	2-6
xilitol	2-6
sandal pentanol	0.1-10.0

Componentă (nume INCI)	cantitate (g/g%)
hidroxietylceluloză	1-3
dimeticonol	1-3
alcool benzilic	0.1-1.0
pantenol	1-3
parfum	1-2
copolimer bis-izobutil PEG / PPG-20/35 / amodimeteticonă	0.5-1.0
fitantriol	0.5-1.0
benzoat de sodiu	0.5-1.0
dehidroacetat de sodiu	0.5-1.0
cetil etilhexanoat	0.5-1.0
glicol butilic	0.5-1.0
edta disodică	0.2-0.6
polisorbat 80	0.2-0.6
sericină	0.2-0.6
acid dehidroacetic	0.1-0.3
polizaharide de drojdie	0.1-0.3
gluconolactonă	0.05-0.15
aqua q.s. până la 100 g	

EXEMPLUL 5
ȘAMPON REVITALIZANT

5

Componentă (nume INCI)	cantitate (g/g%)
lauret sulfat de magneziu	
sarcosinat de lauril de sodiu	
sandal pentanol	0.1-10.0
lauros sulfosuccinat disodic	
PEG-200 gliceril palmat hidrogenat	
cocamida mipa	0.5-1.5
parfum	
glicol distearat	
PEG-7 cocoat gliceril	0.25-0.75
betaină	0.25-0.75
clorură de lauril metil glucet-10 hidroxipropildimoniu	0.25-0.75
laureth-7	0.25-0.75
polyquaternium-10	0.25-0.75
hidroximetilglicinat de sodiu	0.25-0.75
proteine din grau hidrolizate de undecilenoil potasiu	
pantenol	0.1-0.3

Componentă (nume INCI)	cantitate (g/g%)
edet tetrasodic	
fenil trimeticonă	0.05-0.15
siliciu quaternium-17	0.05-0.12
laureth-4	0.05-0.12
laureth-23	0.025-0.075
cocoamfacetat de sodiu	0.025-0.075
BHA	1 0.005-0.015
aqua q.s. până la 100 g	

EXEMPLUL 6 **MOUSSE**

5

Componentă (nume INCI)	cantitate (g/g%)
alcool	10-20
sandal pentanol	0.1-10.0
Ulei de ricin PEG-40 hidrogenat	1-2
glicerină	1-1.5
olivamfacetat de sodiu	0.5-1.5
parfum	0.5-1
tocoferol	0.05-0.15
EDTA disodic	0.025-0.075
polyquaternium-16	0.025-0.075
metabisulfid de potasiu	0.01-0.03
aqua q.s. până la 100 g	

SCURTĂ DESCRIERE A DESENELOR

Cu referire la Figurile 1-5 ale desenelor însoțitoare,

Fig. 1 prezintă imagini de imunofluorescență prelevate din probe de țesuturi ale pielii scalpului uman și foliculi de păr (HF).

Fig. 2 prezintă o diagramă referitoare la alungirea cuticulei firului de păr.

Fig. 3 prezintă o diagramă referitoare la ciclul de creștere a părului, cu referire specială la faza catagenică.

Fig. 4 prezintă o diagramă referitoare la proliferarea și apoptoza keratinocitelor matricei de păr.

Fig. 5 prezintă o diagramă referitoare la factorul de creștere care promovează catagenul TGFβ2.

Figurile 1-5 se referă la rezultatele obținute în următorul studiu experimental și sunt astfel descrise în detaliu în următoarea descriere.

STUDIU EXPERIMENTAL

Compusul 1 menționat conform invenției, adică sandal pentanolul, a fost ales dintre compușii cu formula (I) pentru a fi testați în scopuri experimentale după cum urmează. Sandal pentanolul este numit Sandalore în diagramele din Fig. 2-5.

Designul studiului

Ca prim pas, tehnica standard de imunofluorescență a fost utilizată pe secțiunile de țesut ale pielii scalpului uman de la donatori sănătoși pentru a evalua dacă OR2AT4 este exprimat în foliculii de păr ai scalpului uman (HF).

Apoi, pentru a evalua dacă stimularea OR2AT4 poate influența creșterea părului uman, HF microdisecate au fost tratate cu sandal pentanol la o concentrație de 500 μM, deoarece s-a

efectuat măsurarea agonistului și a alungirii cuticulei firului de păr (vezi Philpott și colab., 1990). În plus, s-a efectuat un test de kinază pentru a identifica căile de semnalizare care sunt implicate în stimularea specifică a OR2AT4 de către sandal pentanol.

5 Ulterior, pentru a confirma că efectul de prelungire anagen al sandal pentanolului este specific, s-a efectuat o cultură de organe HF folosind sandal pentanol ca agonist și un antagonist specific, Phenirat (fenoxietil izobutirat), un parfum sintetic, vezi Busse și colab. referință menționată mai sus.

10 HF-urile au fost tratate fie cu vehicul, sandal pentanol, cu Phenirat sau cu un amestec de sandal pentanol și Phenirat. Pentru a analiza modificările ciclului părului, Ki67 / TUNEL au fost efectuate și utilizate pentru a evalua scorul ciclului părului și proliferarea și apoptoza keratinocitelor matricei părului.

În plus, TGFβ2, un puternic inductor de catagen, a fost investigat cu referire la aceiași compuși de mai sus.

15 Pentru a regla în jos expresia OR2AT4 în HF umane și pentru a studia efectul acestuia asupra creșterii părului, HF au fost transfectate cu OR2AT4-siARN.

20 Analizele qRT-PCR și (imuno-) histomorfometrie au fost folosite pentru a confirma o reglare descendentă mediată de siARN a genei OR2AT4 și a proteinelor în HF microdisectate. În cele din urmă, pentru a investiga cum influențează reducerea OR2AT4 creșterea părului uman, imunofluorescența Ki67 / TUNEL a fost utilizată pentru a cuantifica scorul ciclului părului și proliferarea și apoptoza keratinocitelor matricei părului.

Pentru a verifica dacă reducerea poate influența inducerea catagenului, expresia TGFβ2 a fost analizată prin imunofluorescență.

Materiale și metode

Exemplare de țesut

25 Pielea scalpului uman normal, temporal și occipital, a fost obținută de la donatori sănătoși (într-un interval de vârstă 38 - 69 de ani) supuși unei intervenții chirurgicale de lifting facial de rutină după consimțământul informat și aprobarea etică.

Imunofluorescență

30 Probele incorporate OCT au fost secționate (6 μm grosime) cu un criostat. Secțiunile au fost fixate în paraformaldehidă 4%, pre-incubate cu 10% ser de capră (pentru OR2AT4) sau 5% ser de capră + 0,3% Triton X-100 (pentru caspaza 3 scindată) și incubate cu anticorpul primar corespunzător la 4 °C peste noapte (1/100 pentru OR2AT4 și 1/400 pentru caspaza 3 scindată). Incubarea secundară a anticorpilor a fost efectuată la temperatura camerei timp de 45 de minute.

35 Contrastarea cu DAPI (1 μg/ml) a fost efectuată pentru a vizualiza nucleeele. Pentru TGFβ2, probele au fost fixate în acetona și peroxidazele endogene au fost blocate cu 3% din H₂O₂. Această etapă a fost urmată de o etapă de blocare a avidin-biotinei și o preincubare cu tampon TNB (Tris HCl + NaCl + cazeină). Anticorpul primar corespunzător a fost incubat la 4 °C peste noapte (1/1000 pentru TGFβ2). Incubația secundară a anticorpilor a fost efectuată la RT timp de 45 de minute înainte de a utiliza setul de amplificare a semnalului Tyramide (Perkin Elmer).

40 Contracolorarea cu DAPI a fost efectuată pentru a vizualiza nucleeele. Pentru a colora celulele apoptotice și proliferante, am folosit kitul apoptag (Merck Milipore) urmând protocolul fabricării urmat de colorarea Ki67. Anticorpul primar a fost incubat peste noapte (Ki67, 1/20) după etapa enzimei TdT. Anticorpul secundar a fost incubat timp de 45 de minute la RT după etapa anti-Digoxigenină marcată fluorescent a kitului de apoptag. Contrastarea cu DAPI a fost efectuată pentru a vizualiza nucleeele. Controalele negative au fost efectuate prin omiterea anticorpului primar. Imaginile au fost realizate folosind un microscop cu fluorescență Keyence (Osaka, Japonia), menținând un timp de expunere stabilit constant pe tot parcursul imagisticii pentru analize ulterioare.

Cultura organelor HF

50 Probele de scalp uman au fost obținute după procedura de lifting facial și utilizate în aceeași zi pentru microdisecarea HF ale scalpului anagen VI uman. HF-urile microdisectate ale scalpului uman au fost cultivate la 37 °C cu 5% CO₂ într-un mediu minim de mediu William's E (Gibco, Life Technologies) suplimentat cu 2mM de L-glutamină (Gibco), 10 ng/ml hidrocortizon (Sigma-Aldrich), 10 μg/ml insulină (Sigma-Aldrich) și 1% penicilină / streptomycină mix (Gibco) (WEM) așa cum s-a descris anterior (Philpott, 1990; Kloepper, 2010; Langan și colab., 2015).

1) Stimularea chimică a HF-urilor microdisectate umane cu sandal pentanol OR2AT4 (agonist) și Phenirat (antagonist)

60 După 24 de ore de incubare, mediul WEM a fost înlocuit și HF-urile au fost tratate cu substanțele corespunzătoare timp de 6 zile după condițiile experimentale. HF-urile au fost tratate

fie cu vehicul (0,1% DMSO), sandal pentanol (500 uM), Phenirat (intr-un raport 1:1 față de agonist), fie cu un amestec sandal pentanol + Phenirat.

Phenirat a fost adăugat cu 30 de minute înainte de sandal pentanol. Alungirea cuticulei firului de păr a fost măsurată zilnic folosind un microscop binocular inversat (Philpott și colab., 1990) și mediul de cultură a fost înlocuit în fiecare a doua zi. HF-urile au fost apoi incorporate în criomatrix (Fisher Scientific) și au fost congelate în azot lichid. Secțiuni de 6 μm grosime au fost tăiate cu un criostat și depozitate la -80 °C pentru analize imunohistochemice ulterioare.

(Imuno-) histomorfometrie cantitativă

Intensitatea colorării a fost evaluată în zone de referință bine definite prin histomorfometrie cantitativă (imuno-), așa cum s-a descris anterior (Bertolini și colab., 2014) folosind software-ul NIH IMAGE (NIH, Bethesda, MD, SUA).

Analize statistice

Toate datele sunt exprimate ca media ± SEM și au fost analizate prin testul One Way Anova sau Kruskal Wallis atunci când au fost comparate mai mult de 2 grupuri și testul t Student sau testul Mann-Whitney când tratamentul cu sandal pentanol a fost comparat cu vehiculul (Graph Pad Prism 6, Software GraphPad, San Diego, CA, SUA).

REZULTATE

Rezultatele sunt descrise cu referire la desenele anexate din Fig. 1 la 5.

1) HF umane exprimă receptorul olfactiv 2AT4

În primul rând a fost investigată prezența receptorului olfactiv 2AT4 (OR2AT4) în HF. OR2AT4 a fost observat în keratinocitele învelișului radicular exterior suprabulbar (ORS) ale HF ale anagenului scalpului uman, așa cum se arată prin imunofluorescență în Figura 1. Imaginile A) până la D) din Fig. 1 reprezintă imunofluorescența OR2AT4 în HF în pielea scalpului uman (vezi imaginea A și mărimi corespunzătoare) și HF microdisecate (vezi imagini BD și mărimi corespunzătoare) de la trei donatori diferiți (n = 3). CTS înseamnă învelișul țesutului conjunctiv, DP pentru papila dermică, HM pentru matricea părului, IRS pentru învelișul interior al rădăcinii, ORS pentru învelișul exterior al rădăcinii, HS pentru cuticula firului de păr, HB pentru bulbul de păr, HF pentru foliculii de păr. Liniile punctate delimitează IRS (învelișul interior al rădăcinii), ORS (învelișul exterior al rădăcinii) și DP (papila dermică).

Fig. 1 arată că OR2AT4 este exprimat în keratinocite ORS suprabulare ale HF ale scalpului anagen și în ORS suprabulbar și bulbar și în keratinocite ale vârfurilor matricei părului în HF anagene microdisecate.

HF anagene microdisectate (modelul Philpott) au dezvăluit celule OR2AT4 în bulbul părului, și anume în vârfurile ORS și matricea de păr (HM), vezi Fig.1B, pe lângă expresia intrafoliculară suprabulbară caracteristică, vezi Fig. 1D.

2) Stimularea specifică a OR2AT4 de către sandal pentanol promovează alungirea cuticulei firului de păr și inhibă calea de semnalizare apoptotică

Pentru a verifica dacă activarea OR2AT4 poate influența ciclul părului HF uman, HF umane microdisecate au fost stimulate în mod specific cu potențialul agonist, sandal pentanol. Efectul tratamentului cu sandal pentanol a fost evaluat prin măsurarea alungirii cuticulei firului de păr comparativ cu vehiculul.

Alungirea HF a fost măsurată în HF microdisecate cultivate. Media ± SEM, n = 18 HF pentru fiecare donator, 2 donatori, test t Student, Graph Pad Prism 6. În ciuda diferențelor interindividuale, rezultatele arată că sandal pentanolul la concentrația de 500μM stimulează alungirea arborelui părului de HF microdisecate cultivate provenind de la 2 donatori, așa cum se arată în diagrama din Fig. 2 raportând% alungire versus zile de cultură, sandalore comparativ cu vehiculul.

3) Activarea OR2AT4 de către sandal pentanol întârzie semnificativ inducerea catagenului și scade apoptoza în keratinocitele matricei părului uman

Pentru a investiga specificitatea efectului asupra creșterii părului a stimulării OR2AT4 prin sandal pentanol, HF microdisecate au fost cultivate cu sandal pentanol și/sau Phenirat, iar pe ciclul părului s-au efectuat analize de etapizare așa cum s-a descris anterior (Kloepper, 2010; Langan și colab., 2015). Scorul ciclului părului a fost măsurat atât în HF tratate, cât și în vehicul, după 6 zile de cultură. N = 16-24 HF de la 3 pacienți, Media ± SEM, testul Kruskal Wallis și testul de comparații multiple Dunn ca test post hoc, ns, test Mann-Whitney, #p <0,05, Graph Pad Prism 6.

Rezultatele obținute indică faptul că stimularea specifică a OR2AT4 de către sandal pentanol singur la concentrația de 500μM a întârziat inducerea catagenului în HF-urile tratate comparativ cu vehiculul după 6 zile de cultură, așa cum se arată în diagrama din Figura 3. Dimpotrivă, atât referința comparativă Phenirat singur cât și amestecul de sandal pentanol administrat împreună cu Phenirat nu au prelungit anagenul în IC tratate comparativ cu vehiculul.

Datele sugerează că stimularea OR2AT4 de către sandal pentanol promovează întârzierea catagenului, în timp ce aceste efecte sunt contracarate de inhibarea OR2AT4 atunci când se utilizează Phenirat.

Pentru a rezuma, Fig. 3 arată că compusul invenției întârzie semnificativ dezvoltarea catagenului.

4) Sandal pentanolul scade semnificativ apoptoza keratinocitelor matricei părului

Cu referire la dovezile din Figura 4, pentru a investiga dacă sandal pentanolul influențează proliferarea și apoptoza keratinocitelor matricei părului, s-a efectuat colorarea Ki67 / TUNEL. Keratinocitele proliferatoare (diagrama din Figura 4A) și apoptotice (diagrama din Figura 4B) ale matricei părului au fost numărate în matricea de păr a HF-urilor tratate și vehiculului. Imaginile reprezentative ale Ki67 / TUNEL sunt prezentate în Fig. 4 de la C la E. Media $\pm$ SEM, $n = 18-21$ HF de la 3 pacienți, testul Kruskal-Wallis și testul de comparații multiple Dunn ca test post hoc, ** $p < 0,01$, *** $p < 0,001$, test Mann-Whitney # $p < 0,05$, Graph Pad Prism 6.

După 6 zile de cultură, proliferarea keratinocitelor în matricea părului nu s-a modificat la IC tratate cu sandal pentanol sau Phenirat singur. Cu toate acestea, administrarea concomitentă a antagonistului specific al OR2AT4, Phenirat, împreună cu sandal pentanol au indus o scădere semnificativă a proliferării keratinocitelor matricei părului, după cum se arată în Fig. 4A.

Tratamentul cu sandal pentanol a scăzut semnificativ apoptoza keratinocitelor matricei părului, în timp ce administrarea concomitentă de pentanol sandal + Phenirat a crescut semnificativ apoptoza keratinocitelor matricei părului, așa cum se arată în figura 4B.

5) Stimularea specifică a OR2AT4 de către sandal pentanol a scăzut semnificativ factorul de creștere care promovează catagenul TGF β 2

Cu referire la dovezile din Figura 5, pentru a investiga în continuare modul în care agonistul și antagonistul OR afectează creșterea HF, expresia factorului de creștere relevant care promovează catagenul în timpul ciclului HF uman fiziologic, adică TGF β 2 (Soma și colab., 2002), s-a examinat în OR proximal. După 6 zile de tratament cu sandal pentanol, s-a observat o scădere semnificativă a expresiei TGF β 2 la nivelul proteinei, în timp ce nu s-a detectat nicio modificare prin blocarea receptorului cu Phenirat. În acest caz, administrarea concomitentă de sandal pentanol cu Phenirat a arătat un rezultat comparabil, obținut prin administrarea de sandal pentanol singur, așa cum se arată în diagrama din Figura 5A. Expresia TGF β 2 a fost măsurată în keratinocite ORS în HF tratate și din vehicul.

Imaginile reprezentative corespunzătoare ale imunofluorescenței TGF β 2 sunt prezentate în Fig. 5, B (vehicul), C (sandalore), D (sandalore + Phenirat).

Expresia TGF β 2 a fost cuantificată utilizând imaginea J. Media $\pm$ SEM, $n = 14-22$ HF de la 2 pacienți, testul de comparații multiple al lui Kruskal-Wallis și Dunn ca test post hoc, * $p < 0,05$, *** $p < 0,001$ și Mann- Test Whitney, ns. Graph Pad Prism 6.

Concluzii

Rezultatele de mai sus arată în general că OR2AT4 este un modulator al creșterii părului și compusul conform invenției este un agent de prelungire a anagenului. Stimularea OR2AT4 de către compusul conform invenției crește alungirea cuticulei firului de păr și întârzie tranziția fazei catagene, în timp ce efectul nu este obținut cu inhibitorul OR2AT4 Phenirat și este substanțial contracarat atunci când compusul invenției este co-administrat cu Phenirat.

Stimularea OR2AT4 de către compusul conform invenției modulează căile de semnalizare apoptotică și scade semnificativ apoptoza în keratinocitele matricei părului uman, în timp ce acest efect nu este obținut cu Phenirat și este contracarat în mod substanțial atunci când compusul invenției este administrat concomitent cu Phenirat. Stimularea OR2AT4 de către compusul conform invenției scade semnificativ factorul de creștere relevant care promovează catagenul, TGF β 2, în timp ce acest efect nu este obținut cu Phenirat.

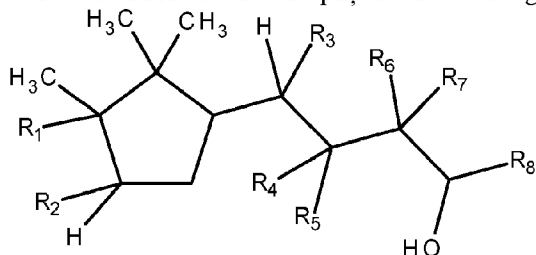
În termeni generali, dovezile experimentale arată că compușii cu formula (I), astfel cum sunt definiți mai sus, pot fi utilizați eficient pentru promovarea creșterii părului și/sau inhibarea sau întârzierea căderii părului la nivelul scalpului uman.

(56) Referințe bibliografice citate în raportul de documentare:

- EP-A1- 2 957 283
- EP-A2- 1 238 650
- EP-A2- 1 346 720
- US-B1- 7 879 910

(57) Revendicări:

1. Utilizarea cosmetică a compușilor cu formula generală (I):



in care:

R₁ și R₂ formează împreună o legătură dublă sau R₁ și R₂ formează împreună o grupare ciclopropil;

R₃, R₄ sunt aceleași sau diferite și alese independent dintre hidrogen, metil sau R₃ și R₄ formează împreună o dublă legătură;

R₅, R₆ sunt aceleași sau diferite și alese independent dintre hidrogen, metil; sau R₅ și R₆ formează împreună o legătură dublă sau R₅ și R₆ formează împreună o grupare ciclopropil;

R₇ = metil sau etil;

R₈ = hidrogen sau metil,

pentru promovarea creșterii părului și/sau inhibarea sau întârzierea căderii părului la nivelul scalpului uman.

2. Utilizare conform revendicării 1 **caracterizată prin aceea că** compusul cu formula (I) este 3-metil-5-(2,2,3-trimetilciclopent-3-en-1-il) pentan-2-ol.

3. Utilizare conform revendicării 1 **caracterizată prin aceea că** compusul cu formula (I) este (4Z) -3-metil-5- (2,2,3-trimetilciclopent-3-en-1-il) pent-4-en-2-ol.

4. Utilizare conform revendicării 1 **caracterizată prin aceea că** compusul cu formula (I) este 1-metil-2 - ((1,2,2-trimetilbiciclo (3.1.0) hex-3-il) metil) -ciclopropanemetanol.

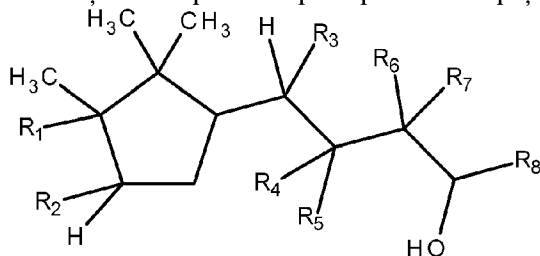
5. Utilizare conform revendicării 1 **caracterizată prin aceea că** compusul cu formula (I) este (E) -3,3-dimetil-5- (2,2,3-trimetilciclopent-3-en-1-il) pent-4-en-2-ol.

6. Utilizare conform revendicării 1 **caracterizată prin aceea că** compusul cu formula (I) este 2-metil-4- (2,2,3-trimetil-3-ciclopenten-1-il) butanol.

7. Utilizare conform revendicării 1 **caracterizată prin aceea că** compusul cu formula (I) este (E) -2-etil-4- (2,2,3-trimetilciclopent-3-en-1-il) but-2-en-1-ol.

8. Utilizare conform revendicării 1 **caracterizată prin aceea că** compusul cu formula (I) este (E) -2-metil-4- (2,2,3-trimetil-3-ciclopenten-1-il) -2-buten-1-ol.

9. Utilizare cosmetică a unei compoziții cosmetice pentru promovarea creșterii părului și/sau inhibarea sau întârzierea căderii părului la nivelul scalpului uman în care compoziția cosmetică menționată cuprinde ca principiu activ cel puțin un compus cu formula (I):



in care

R₁ și R₂ formează împreună o legătură dublă sau R₁ și R₂ formează împreună o grupare ciclopropil;

R₃, R₄ sunt aceleași sau diferite și alese independent dintre hidrogen, metil sau R₃ și R₄ formează împreună o dublă legătură;

R₅, R₆ sunt aceleași sau diferite și alese independent dintre hidrogen, metil; sau R₅ și R₆ formează împreună o legătură dublă sau R₅ și R₆ formează împreună o grupare ciclopropil;

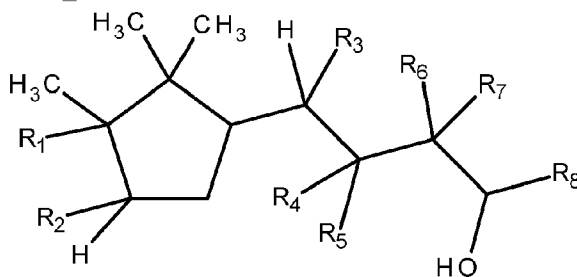
R₇ = metil sau etil;

R₈ = hidrogen sau metil.

10. Utilizare cosmetică a unei compoziții cosmetice conform revendicării 9 **caracterizată prin aceea că** cuprinde ca principiu activ cel puțin un compus cu formula (I) într-o cantitate între 0,1 și 10% în greutate (procente în greutate), formulat cu ingrediente adecvate pentru o administrare topică.

11. Utilizare cosmetică a unei compoziții cosmetice conform revendicării 9 **caracterizată prin aceea că** compusul cu formula (I) este 3-metil-5- (2,2,3-trimetilciclopent-3-en-1-il) pentan-2-ol și/sau 2-metil-4- (2,2, 3-trimetil-3-ciclopenten-1-il) butanol.

12. Compuși cu formula generală (I):



in care:

R₁ și R₂ formează împreună o dublă legătură sau R₁ și R₂ formează împreună o grupare ciclopropil;

R₃, R₄ sunt identici sau diferiți și aleși independent dintre hidrogen, metil sau R₃ și R₄ formează împreună o dublă legătură;

R₅, R₆ sunt identici sau diferiți și aleși independent dintre hidrogen, metil;

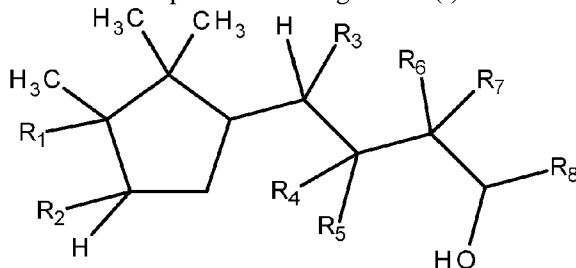
sau R₅ și R₆ formează împreună o dublă legătură, sau R₅ și R₆ formează împreună o grupare ciclopropil;

R₇ = metil sau etil;

R₈ = hidrogen sau metil,

pentru o utilizare terapeutică în promovarea creșterii părului și/sau tratamentul căderii părului la nivelul scalpului uman.

13. Compoziție farmaceutică pentru utilizare în promovarea creșterii părului și/sau tratamentul căderii părului la nivelul scalpului uman, **caracterizată prin aceea că** cuprinde ca principiu activ un compus cu formula generală (I):



in care:

R₁ și R₂ formează împreună o dublă legătură sau R₁ și R₂ formează împreună o grupare ciclopropil;

R₃, R₄ sunt identici sau diferiți și aleși independent dintre hidrogen, metil sau R₃ și R₄ formează împreună o dublă legătură;

R₅, R₆ sunt identici sau diferiți și aleși independent dintre hidrogen, metil;

sau R₅ și R₆ formează împreună o dublă legătură, sau R₅ și R₆ formează împreună o grupare ciclopropil;

R₇ = metil sau etil;

R₈ = hidrogen sau metil.

14. Compoziție farmaceutică pentru utilizare conform revendicării 13 **caracterizată prin aceea că** cuprinde ca principiu activ cel puțin un compus cu formula (I) într-o cantitate între 0,1 și 10% în greutate (procente în greutate), formulat cu ingrediente adecvate pentru o administrare topică.

15. Compoziție farmaceutică pentru utilizare conform revendicării 13 **caracterizată prin aceea că** cuprinde ca principiu activ compusul 3-metil-5- (2,2,3-trimetilciclopent-3-en-1-il) pentan-2-ol.

16. Compoziție farmaceutică pentru utilizare conform revendicării 13 **caracterizată prin aceea că** cuprinde ca principiu activ compusul 2-metil-4- (2,2,3-trimetil-3-ciclopenten-1-il) butanol.

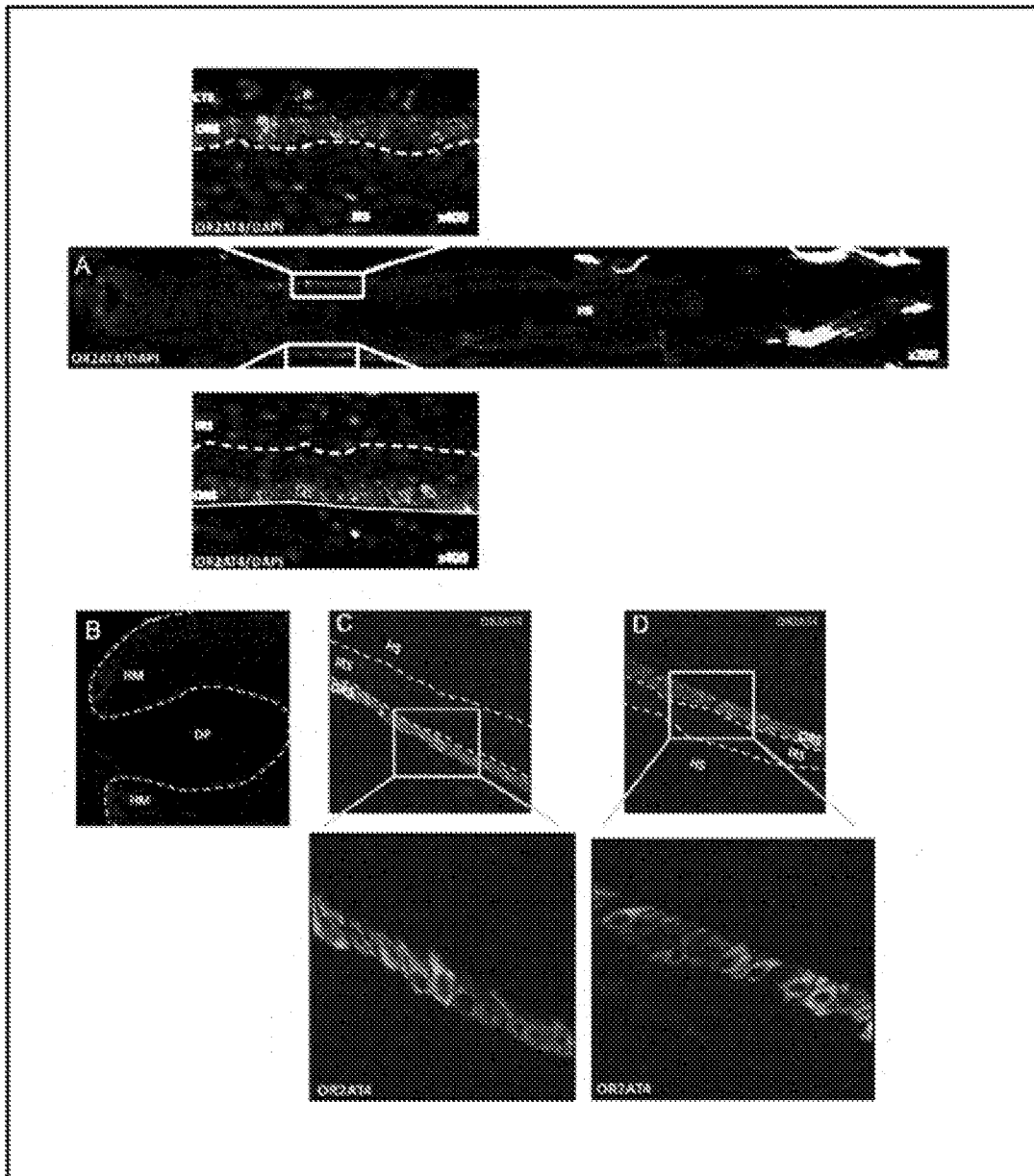


Fig. 1

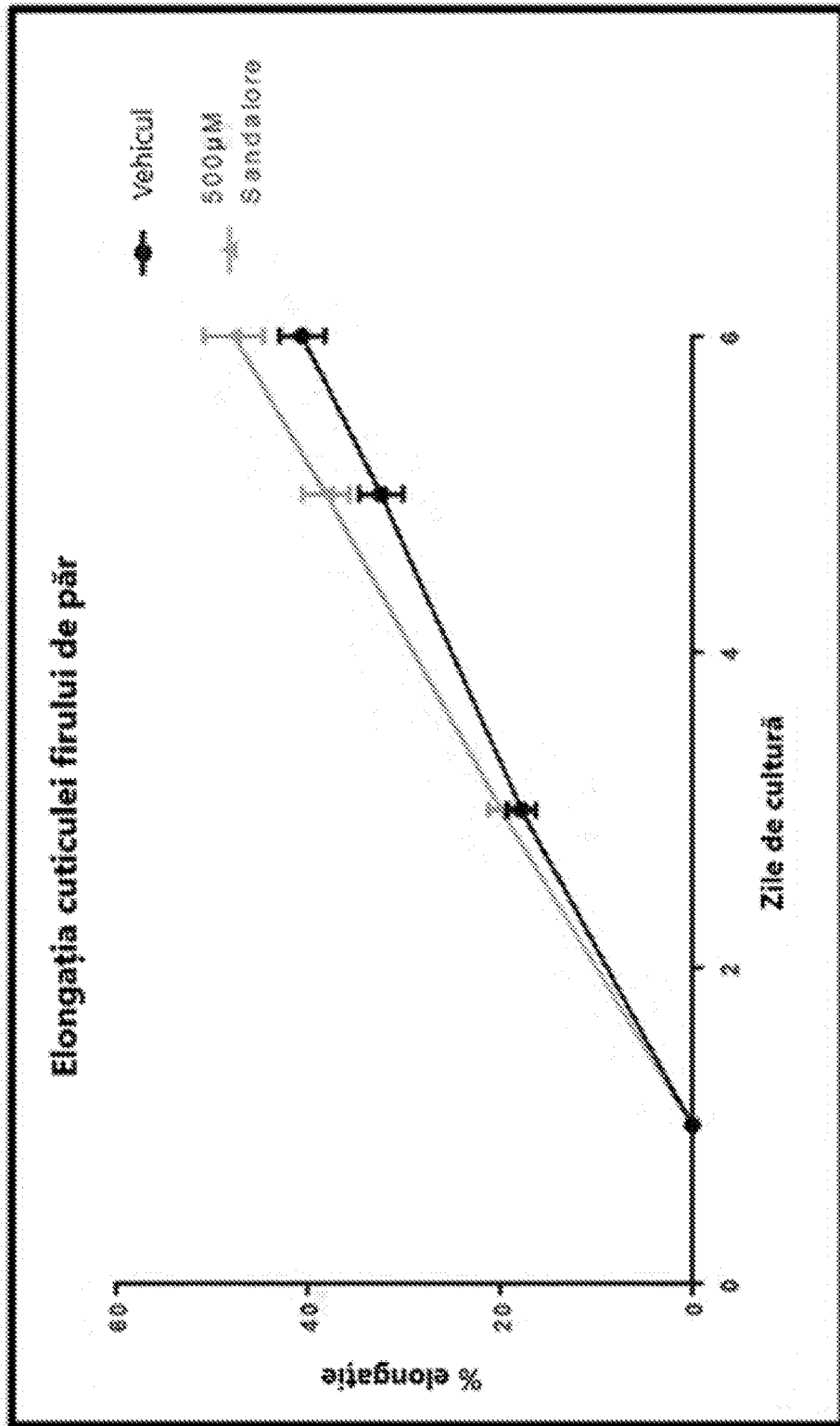


Fig. 2

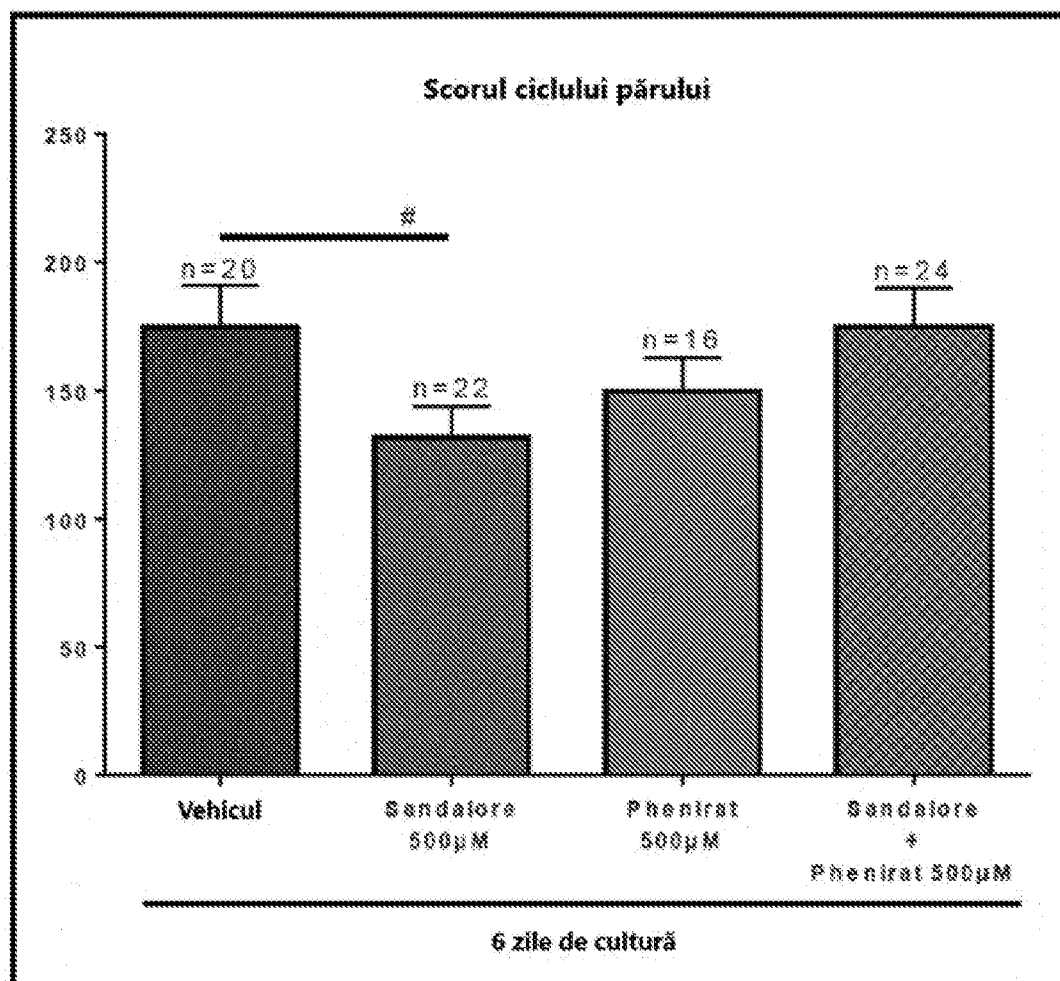


Fig. 3

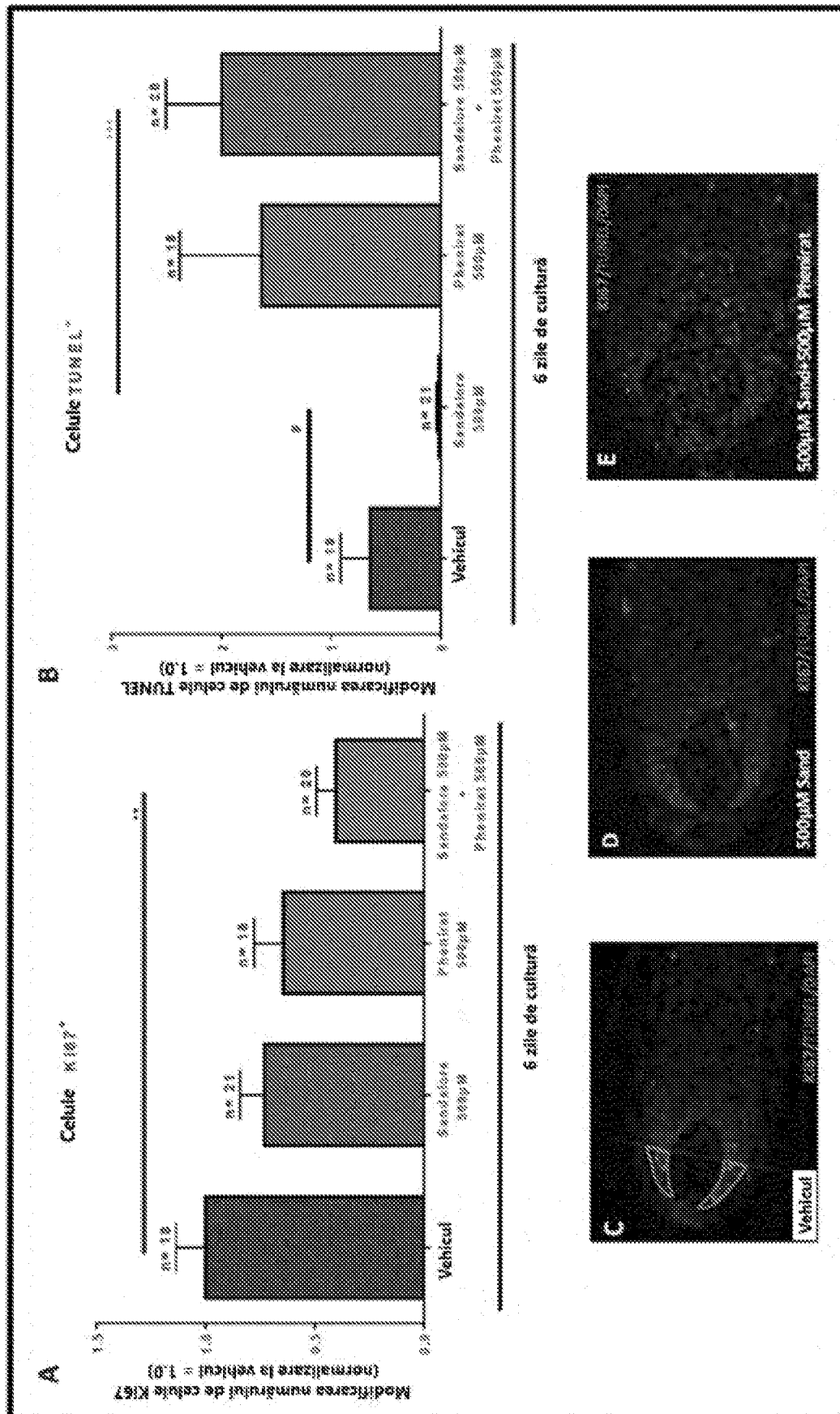


Fig. 4

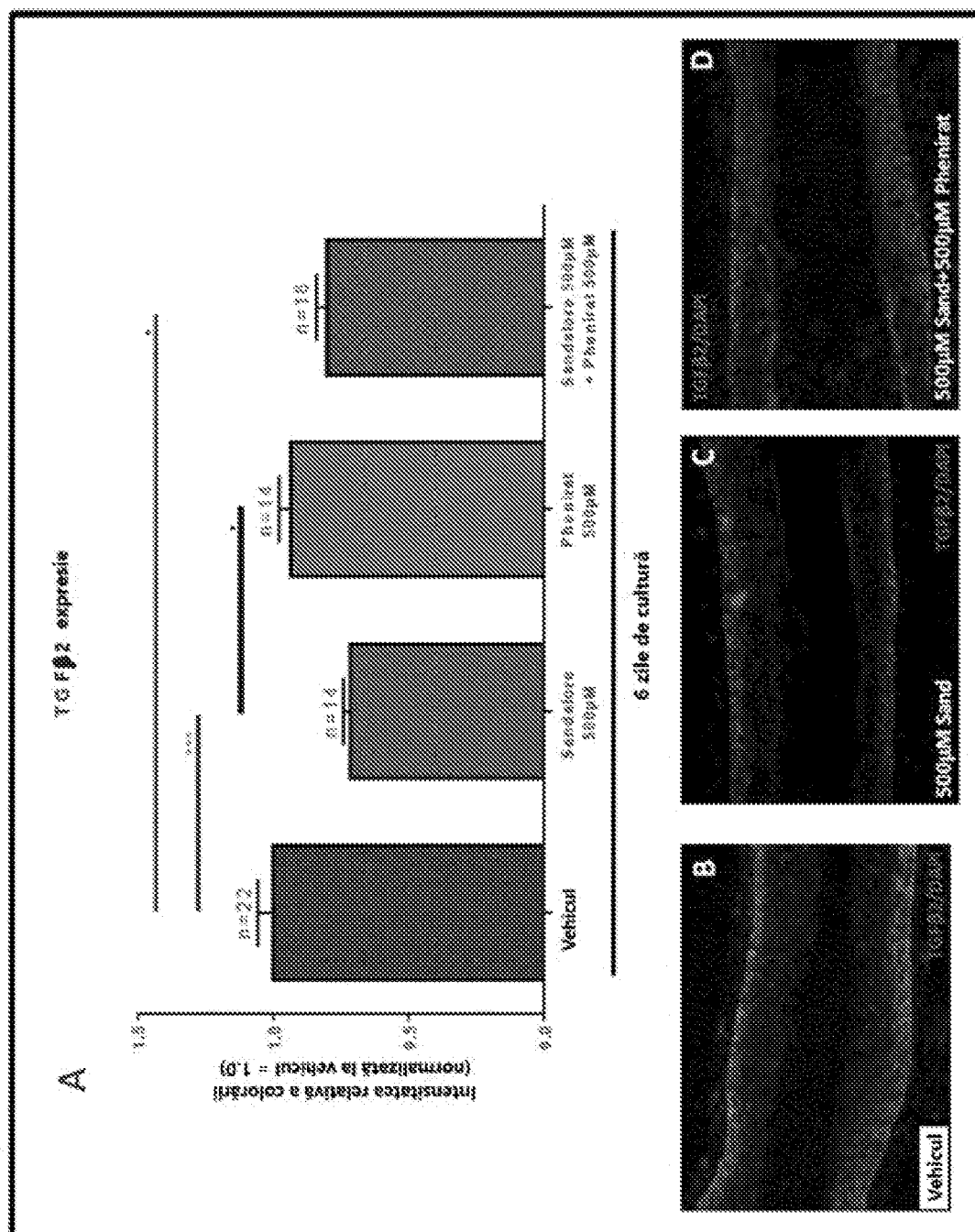


Fig. 5