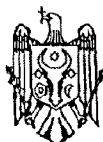




MD/EP 3661534 T2 2022.03.31

REPUBLICA MOLDOVA



(19) Agenția de Stat
pentru Proprietatea Intelectuală

(11) MD/EP 3661534 (13) T2

(51) Int. Cl.: *A61K 36/53* (2006.01.01)
A61K 31/4188 (2006.01.01)
A61K 31/132 (2006.01.01)
A61P 17/14 (2006.01.01)
A61K 8/25 (2006.01.01)
A61K 8/41 (2006.01.01)
A61K 8/67 (2006.01.01)
A61K 8/73 (2006.01.01)
A61K 8/9789 (2017.01.01)
A61Q 7/00 (2006.01.01)

(12) BREVET DE INVENȚIE EUROPEAN VALIDAT

(21) Numărul de depozit: e 2020 0611 (22) Data de depozit: 2018.08.02 (96) Numărul cererii și data de depozit a cererii de brevet european: 18758821.5, 2018.08.02 (97) Numărul de publicare și data publicării de către OEB a cererii de brevet european: 3661534, 2020.06.10 (31) Numărul cererii prioritare: 201700089680 (32) Data de depozit a cererii prioritare: 2017.08.03 (33) Țara cererii prioritare: IT	(49) Data publicării traducerii fasciculului de brevet european validat: BOPI nr. 03/2022, 2022.03.31 (80) Data publicării mențiunii acordării de către OEB: EPB nr. 42/2021, 2021.10.20 (82) Data publicării solicitării de validare a brevetului european: BOPI nr. 06/2020, 2020.06.30
(71) Solicitant: GIULIANI S.P.A., IT (72) Inventatori: GIULIANI Giammaria, CH; PAUS Ralf, DE; GRIMALDI Benedetto, IT; MARZANI Barbara, IT; BARONI Sergio, IT (73) Titular: GIULIANI S.P.A., IT (74) Mandatar autorizat: SOKOLOVA Sofia	

(54) Compoziție sinergică ca promotor al autofagiei

(57) Rezumat:

1

Invenția se referă la o compoziție sinergică cuprinzând un extract uscat dintr-o plantă din genul *Galeopsis* și un compus care

2

promovează autofagia selectat dintre biotină și R-N¹-spermidină sau o sare a acestora, în care R este hidrogensau metil sau amestecuri ale

MD/EP 3661534 T2 2022.03.31

acestora. Compozițiile sinergice conform invenției potfi sub forma unei formulări topice sau formulări orale și sunt folositoare ca promotorii autofagiei în special în celulele foliculilor firelor de păr ale scalpului uman și în promovarea creșterii părului și/sau în tratamentul subțierii sau pierderii.

Revendicări: 19

Figuri: 3

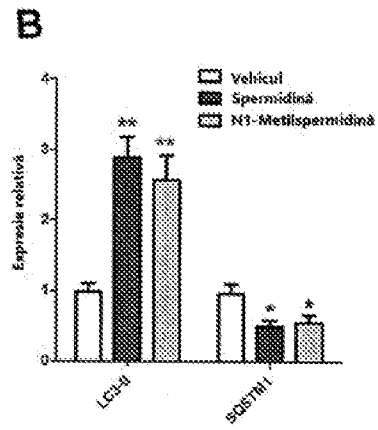


Figura 3

(54) A synergistic composition as a promoter of autophagy

(57) Abstract:

1

The invention relates to a synergistic composition comprising a dry extract of plant of genus *Galeopsis* and a compound promoting autophagy selected from biotin and R-N1-spermidine or a salt thereof, wherein R is hydrogen or methyl and mixtures thereof. The synergistic compositions according to the invention may be in the form of a topical formulation or oral formulation and is useful as

2

a promoter of autophagy especially in cells of human scalp hair follicles and in promoting hair growth and/or in the treatment of hair thinning or hair loss.

Claims: 19

Fig.: 3

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

Invenția se referă la compoziții sinergice și utilizarea lor ca promotor al autofagiei în domeniul nutrițional, medical sau cosmetic.

STADIUL TEHNICII

Autofagia (sau autofagocitoza) este mecanismul natural, reglat al celulei care dezasamblează componentele inutile sau disfuncționale. Autofagia permite degradarea ordonată și reciclarea componentelor celulare. În macroautofagie, constituenții citoplasmatici vizați sunt izolați de restul celulei într-o veziculă cu membrană dublă cunoscută sub numele de autofagozom. Autofagozomul fuzionează în cele din urmă cu lizozomii, iar conținutul este degradat și reciclat. Sunt descrise în mod obișnuit trei forme de autofagie: macroautofagie, microautofagie și autofagie mediată de însoțitori (CMA), împreună cu mitofagie. În boală, autofagia a fost văzută ca un răspuns adaptativ la stres, care promovează supraviețuirea, în timp ce în alte cazuri pare să promoveze moartea și morbiditatea celulară. În cazul extrem al foametei, defalcarea componentelor celulare promovează supraviețuirea celulară prin menținerea nivelului de energie celulară. Prin urmare, autofagia joacă un rol crucial în reglementarea sănătății, bolii și îmbătrânirii, precum procesele celulare centrale precum răspunsurile adaptive la stres, diferențierea, dezvoltarea țesuturilor și homeostazia.

În Angeleen Fleming și colab., „Modulatorii chimici ai autofagiei ca sonde biologice și potențiale terapeutice”, Nature Chemical Biology 7, 9-17 (2011) autorii au demonstrat că autofagia are funcții pleiotrope neașteptate care favorizează supraviețuirea celulei, inclusiv furnizarea de nutrienți în caz de foamă, curățarea interiorului celular, apărarea împotriva infecțiilor și prezentarea antigenului. Autofagia defectuoasă este, prin urmare, asociată cu o gamă diversă de stări de boală, inclusiv neurodegenerarea, cancerul și boala Crohn.

În Teng Yu și colab., „Țintirea autofagiei în bolile de piele, J Mol Med (2015) 93:31-38., se studiază și se raportează mecanismele autofagiei asupra patogenezei bolilor de piele. Concret, este raportat rolul autofagiei în tulburări autoimune ale pielii precum psoriazis, lupus eritematos sistemic (LES) și vitiligo, afecțiuni infecțioase ale pielii, cancer de piele, precum carcinom cu celule scuamoase și melanom.

Pentru a modula terapeutic autofagia pentru investigarea supresoarelor și inductorilor de autofagie au fost studiate modele de organe umane.

Cererile de brevet internațional WO 2014/016407A1 și WO 03/063851A1 dezvăluie o compoziție care conține spermidină și biotină pentru tratamentul căderii părului.

Yuval Ramot și colab. în „Spermidina promovează creșterea părului uman și este un modulator nou al funcțiilor celulelor stem epiteliale umane” Plus One, vol. 6, nr. 7, 27 iulie 2011 pag. 22564 dezvăluie utilizarea spermidinei în promovarea creșterii părului uman. WO 2015/063678A1 dezvăluie utilizarea extractelor de Galeopsis pentru tratamentul căderii părului. D. Pinto și colab.: „209 Extracte de Galeopsis segetum Necker pentru prevenția și tratamentul părului” în The Journal of Investigative Dermatology: Journal of the official society for investigative dermatology and the European society for dermatological research”, vol. 136 nr. 9, 1 septembrie 2016 pag. S196, dezvăluie utilizarea extractelor din Galeopsis segetum Necker pentru prevenirea și tratamentul căderii părului.

În Tobias Eiserberg și colab., „Inducerea autofagiei de către spermidină promovează longevitatea” Nature cell biology, volumul 11, numărul 11, noiembrie 2009, efectele spermidinei, o poliamină naturală, au fost studiate în drojdie, muște și viermi. Autorii au raportat că administrarea de spermidină a prelungit durata de viață a acestora. În plus, administrarea de spermidină a inhibat potențial stresul oxidativ la șoarecii în vârstă. S-a demonstrat că autofagia a constituit calea majoră de degradare lizozomală pentru reciclarea materialului celular deteriorat și potențial dăunător.

Inventatorii și-au dat seama că, ca (mini)organe complete, remodelate ciclic, cultura de organe a foliculilor de păr (HF) ale scalpului uman poate oferi un astfel de model, deoarece astfel de foliculi, după o activitate de creștere masivă (anagen) intră spontan în involuția organului determinată de apoptoză. (catagen). După cum se știe, ciclul de viață al bulbului de păr al foliculului este reprezentat în esență de trei faze ulterioare: anagen (creștere), catagen (involuție) și telogen (faza de repaus).

În mod surprinzător, inventatorii au descoperit că ciclul de viață al foliculului de păr poate fi modulat prin mecanismul de autofagie și, pe baza modelului de scalp uman, agenții de promovare a foliculului de păr au fost investigați.

Având în vedere studiul, inventatorii au emis ipoteza că HF al scalpului anagen în stadiu avansat, al căror epiteliu al matricei de păr proliferază cu o rată mai mare decât majoritatea tumorilor maligne și este expus la o serie de factori de stres, sunt susceptibile de a suferi o presiune din ce în ce mai mare

pentru a menține homeostazia tisulară. și poate necesita un flux substanțial de autofagie pentru a le menține creșterea.

După cum se știe, diferiți factori de stres afectează negativ ciclul de viață al foliculului de păr, determinând astfel o reducere a numărului de fire de păr și rădăcină acestora.

Prin urmare, un obiectiv al prezentei invenții este de a furniza o compoziție adecvată ca promotor al autofagiei în celulele foliculilor de păr ai scalpului uman.

Un alt obiectiv, prin urmare, este de a furniza o compoziție pentru promovarea creșterii părului și/sau inhibarea sau întârzierea căderii părului la nivelul scalpului uman.

Un alt obiect este furnizarea unei compoziții pentru tratamentul stărilor mediate de autofagie.

10 REZUMATUL INVENȚIEI

Pornind de la studierea culturii de organe a foliculilor de păr (HF) ai scalpului uman, inventatorii au descoperit o combinație de compuși care induc autofagie în modelul studiat și care prezintă un efect sinergic în promovarea autofagiei în special în celulele foliculilor de păr ai scalpului uman.

După investigare, compoziția având un efect sinergic a fost în mod neașteptat un extract de plantă din genul *Galeopsis* combinat cu un alt compus care promovează autofagia, în special în celulele scalpului uman selectate dintre R-N¹-spermidină sau sarea acesteia, în care R este hidrogen sau metil, biotină și un amestec al acestora.

Prin urmare, obiectivele de mai sus au fost atinse printr-o compoziție sinergică care cuprinde un extract de plantă din genul *Galeopsis* și R-N¹-spermidină sau o sare a acesteia, în care R este hidrogen sau metil.

Alternativ, obiectivele de mai sus au fost atinse printr-o compoziție sinergică care cuprinde un extract de plantă din genul *Galeopsis* și biotină.

Într-o altă variantă de realizare alternativă, obiectivele de mai sus au fost atinse printr-o compoziție sinergică care cuprinde un extract de plantă din genul *Galeopsis*, biotină și R-N¹-spermidină sau o sare a acesteia, în care R este hidrogen sau metil. De preferință și surprinzător, inventatorii au observat că administrarea compozițiilor de mai sus, fie pe cale locală, fie pe cale orală de administrare, a promovat într-un mod sinergic autofagia în celulele în special a foliculilor de păr, la un subiect care suferă de rădăcină părului, determinând astfel o îngroșare progresivă a zonelor suferinde ale scalpului.

Conform unui alt aspect, prezenta invenție asigură utilizarea cosmetică a compozițiilor de mai sus pentru stimularea creșterii fiziologice a părului, așa cum este definit în revendicarea 16.

În conformitate cu încă un alt aspect, prezenta invenție furnizează, prin urmare, compozițiile de mai sus pentru utilizare în tratamentul unei boli a scalpului așa cum este definită în revendicarea 17.

DESCRIEREA FIGURILOR

Figura 1 prezintă imagini reprezentative ale celulelor U2OS transduse cu un construct care exprimă proteina autofagică LC3 fuzionată cu o proteină fluorescentă roșie (RFP) tratată timp de 6 ore cu substanțele indicate. Inductorul de autofagie caracterizat anterior, spermidina, a fost folosit ca referință pozitivă.

Figura 2 prezintă imagini reprezentative ale celulelor U2OS transduse cu un construct care exprimă proteina SQSTM1/p62 fuzionată cu o proteină fluorescentă roșie (RFP) tratată timp de 6 ore cu substanțele indicate. Turn-over-ul SQSTM1/p62 depinde în principal de procesul de degradare mediat de autofagie.

Figura 3 prezintă nivelurile de LC3 și SQSTM1 lipitate în celulele U2OS umane tratate cu doze echimolare de N1-metilspermidină și spermidină, așa cum este raportat în Exemplul 14.

DESCRIEREA DETALIATĂ A INVENȚIEI

Prin urmare, invenția se referă la o compoziție sinergică așa cum este definită în revendicarea 1. Într-un exemplu de realizare preferat și avantajos, invenția se referă la o compoziție sinergică a unui extract de plantă din genul *Galeopsis*, R-N¹-spermidină sau o sare a acesteia, în care R este hidrogen sau metil, și biotină.

Extractul din compozițiile de mai sus provine dintr-o plantă aparținând genului *Galeopsis*.

Într-o variantă de realizare, extractul de *Galeopsis* este un extract uscat în special din specia *Galeopsis segetum*, cunoscută în mod obișnuit sub numele de urzici de câneapă, adică o specie de plantă cu flori din familia salviei, Lamiaceae.

Într-un alt exemplu de realizare, extractul de *Galeopsis* este un extract în special din specia *Galeopsis tetrahit*.

În anumite variante de realizare, extractul de plantă este un amestec de extracte din *Galeopsis segetum* și *Galeopsis tetrahit*.

Extractul conform invenției este obținut prin extracția dintr-o parte a plantei, cum ar fi rădăcină, frunze, fructe și flori, de preferință părțile aeriene ale plantei. Conform unor exemple de realizare,

extractul de plantă conform invenției este obținut prin extracția dintr-o parte a plantei sau dintr-un țesut al acesteia folosind un solvent acceptabil fiziologic ca mediu de extracție.

Prin termenul de „solvent acceptabil din punct de vedere fiziologic”, se înțelege un solvent care nu produce reacții adverse semnificative atunci când este introdus în corpul uman sau aplicat organismului uman. De obicei, prin termenul solvent se înțelege solventul utilizat pentru extragerea componentelor biologic active dintr-o porțiune de plantă de *Galeopsis*.

Un solvent adecvat pentru obținerea extractului de plantă este un lichid acceptabil din punct de vedere fiziologic în care cel puțin unele dintre componentele biologic active ale plantei selectate sunt solubile și în care nu suferă o modificare care să le priveze de activitate.

Părțile morfologice preferate ale plantei utilizate pentru efectuarea extracției este sistemul lăstarilor care include tulpini, frunze, floare și flori.

Solventul utilizat pentru efectuarea extracției poate fi un solvent acceptabil din punct de vedere fiziologic. Solvenții adecvați pot fi solvenți nepolari, cum ar fi dietil eter, cloroform, solvenți aprotici polari, cum ar fi acetatul de etil, dicloroetanul și solvenți protici polari, cum ar fi alcoolii C₁-C₆ și soluții apoase care le conțin. Se preferă utilizarea solvenților protici polari. Solvenții protici polari tipici includ apă, etanol, propanol, alcool izopropilic și amestecuri ale acestora. Solvenții preferați sunt apa, alcoolul etilic și un amestec al acestora.

În anumite exemple de realizare, după extracția cu un solvent protic polar, de preferință etanol, extractul este de preferință filtrat, concentrat și clarificat. Extractul obținut este apoi, de preferință, purificat. Purificarea este mai preferabil efectuată prin eluare în coloană cu un solvent. Solventul poate fi, de exemplu, apă sau etanol. Extractul purificat este apoi de preferință concentrat și uscat. Extractul uscat astfel obținut poate fi opțional măcinat și opțional adăugat cu excipienți pentru a se obține extractul uscat final care va fi utilizat în compozițiile conform invenției. Excipienții opționali cuprinși în extractul uscat sunt de preferință selectați din grupul constând din maltodextrină și silicagel coloidal anhidru.

Pentru a obține extractul de plantă din *Galeopsis tetrahit*, tehnicile de extracție solid-lichid pot fi utilizate pentru a separa/extrage unul sau mai multe componente biologic active din țesuturile vegetale ale plantei.

În anumite exemple de realizare, extracția unuia sau mai multor componente biologic active are loc prin macerarea unei porțiuni sau a matricii vegetale a *Galeopsis tetrahit* într-un solvent adecvat, așa cum este menționat mai sus.

De exemplu, un extract adecvat poate fi obținut prin scufundarea sau macerarea unei părți din părțile aeriene ale *Galeopsis* într-un amestec apă-etanol, pentru un timp adecvat pentru îmbogățirea solventului unuia sau mai multor componente biologic active conținute în porțiunea de plantă. În aceste condiții, extracția componentelor biologic active din țesuturile vegetale ale plantei selectate are loc, în mod substanțial, prin difuzie și/sau osmoză. Timpul de macerare a porțiunilor de plantă în solvent este variabil, de exemplu de la 1 la 48 de ore.

În conformitate cu anumite variante de realizare, extractul uscat de *Galeopsis* este obținut prin următorii pași:

- măcinarea a cel puțin o parte a plantei *Galeopsis*;
- extragerea cu un solvent, de preferință un solvent acceptabil fiziologic;
- filtrarea extractului;
- purificarea extractului filtrat, de preferință prin eluare într-o coloană cu un solvent;
- uscarea extractului purificat;
- măcinarea extractului uscat purificat.

În unele exemple de realizare, etapa de extracție poate fi repetată de două sau de trei ori.

Când solventul este îndepărtat, de exemplu prin evaporare, se poate adăuga opțional un suport solid sau un excipient, cum ar fi, cu titlu de exemplu nelimitator, amidonuri sau maltodextrine, pentru a obține extractul sub formă de pulbere uscată. De obicei, extractul obținut din *Galeopsis Tetrahit* sau *segetum*, poate fi fluid, moale sau uscat și, de preferință, este uscat.

De exemplu:

- în extractul fluid, 1 ml de extract conține componente biologic active solubile în 1 g de medicament vegetal;
- în extractul moale, solventul este parțial evaporat în special până când extractul nu umezește o hârtie de filtru;
- în extractul uscat, solventul este evaporat aproape complet pentru a obține o pulbere.

Se pot prepara extracte din *Galeopsis* de polaritate diferită.

De exemplu, este posibil să se obțină un extract cu polaritate mare utilizând un solvent polar, cum ar fi o soluție hidroalcoolică, un extract cu polaritate intermediară folosind un solvent mai puțin polar, cum ar fi acetatul de etil sau un extract apolar folosind CO₂ supercritic cu care se pot extrage fracții de fito-complexe active.

în anumite exemple de realizare, extracția este efectuată utilizând un raport de greutate între solvent și matrice vegetală variind de la 1:10 la 10:1.

Este posibil să se extragă componentele vegetale biologic active din *planta de Galeopsis* folosind tehnici de extracție alternative precum, de exemplu, prin digestie, infuzie, stoarcere, decoct, percolare, extracție în contracurent, extracție soxhlet, extracție cu gaze supercritice sau ultrasunete.

Pe lângă extractul de plantă, compoziția sinergică poate cuprinde R-N¹-spermidină sau sarea acesteia, în care R este hidrogen sau metil. Spermidina este o poliamină, având denumirea IUPAC N¹-(3-aminopropil)butan-1,4-diamină. Spermidina poate fi prezentă în compoziție sub formă de sare, de preferință o sare acceptabilă farmaceutic, mai preferabil sub formă de trichlorhidrat.

Pe lângă extractul de plantă, compoziția sinergică poate cuprinde Biotină, o vitamina B solubilă în apă, numită și vitamina B7 și cunoscută anterior ca vitamina H sau coenzima R.

Biotina este compusă dintr-un inel ureido fuzionat cu un inel tetrahidrotiofen având denumirea IUPAC acid 5-[(3aS,4S,6aR)-2-oxohexahidro-1H-tieno[3,4-d]imidazol-4-il]pentanoic (Număr CAS 58-85-5).

Inventatorii au dezvoltat pentru prima dată proprietatea biotinei de a fi un promotor al autofagiei în celulele umane, în special în celulele foliculilor de păr ai scalpului uman.

Prin urmare, prezenta dezvoltare se referă la biotină sau o compoziție care conține biotină conform oricăreia dintre exemplele de realizare descrise mai sus, pentru uz cosmetic sau nutraceutic sau medical ca promotor al autofagiei în tratamentul bolilor modulate de autofagie.

Bolile modulate de autofagie sunt de exemplu selectate din grupul constând din neurodegenerare, cancer, boala Crohn și boli de piele. În mod specific dintre bolile de piele, pot fi citate afecțiunile autoimune ale pielii, cum ar fi psoriazisul, lupusul eritematos sistemic (LES) și vitiligo, tulburările infecțioase ale pielii, tulburările de cancer de piele, cum ar fi carcinomul cu celule scuamoase și melanomul.

Pentru prima dată extractul din genul *Galeopsis*, de preferință din speciile *Galeopsis segetum* și *Galeopsis tetrahit* este utilizat ca promotor al autofagiei în tratamentul bolilor de piele.

De preferință și surprinzător, inventatorii au observat că administrarea compozițiilor de mai sus, în mod tipic fie pe calea topică, fie pe cale orală, a promovat într-un mod sinergic autofagia în celulele foliculilor de păr ai scalpului uman la un subiect care suferă de subțierea părului, determinând astfel o îngrosare progresivă a zonelor suferinde ale scalpului.

De obicei, compoziția conform invenției cuprinde un purtător, diluant sau excipient acceptabil din punct de vedere fiziologic și/sau farmaceutic.

Purtătorul, diluantul sau excipientul adecvat din punct de vedere fiziologic sau farmaceutic poate fi selectat pe baza căii de administrare pentru care este destinată compoziția farmaceutică rezultată. Orice purtător și/sau excipient adecvat pentru forma de preparat dorită pentru administrare este avut în vedere în utilizările extractului de plante sau ingredientelor active descrise aici.

În scopul prezentei invenții, termenul "purtător" se referă la un excipient, vehicul, diluant sau adjuvant, care poate fi prezent în compoziția invenției.

Compoziția conform invenției poate fi formulată într-o formă pentru aplicare topică sau într-o formă pentru administrare orală.

În unele exemple de realizare, compoziția este pentru aplicare locală. În această cerere, compoziția conform invenției poate fi aplicată, într-o cantitate eficientă, direct pe scalpul sau pielea unei ființe umane.

De exemplu, în tratamentul căderii sau al formelor de subțiere a părului se poate aplica direct pe scalp o cantitate activă din punct de vedere cosmetic/fiziologic de compoziție, o dată sau de mai multe ori pe zi convenabil pentru cicluri de 2-3 luni, alternate cu perioade de absență a tratamentului.

Conform acestor aspecte, o metodă de tratament cosmetic este dezvoltată aici cuprinzând aplicarea pe scalp, sau pe o porțiune a acestuia, a unei cantități eficiente dintr-o compoziție conform uneia sau mai multor exemple de realizare descrise și/sau revendicate aici.

Cantitatea de extract uscat de *Galeopsis*, de preferință sub forma speciilor *Galeopsis segetum* sau *Galeopsis tetrahit*, în formularea topică a compozițiilor conform invenției este în intervalul de la 0,0003% până la 0,01% greutate în greutate față de greutatea totală a formulării.

Cantitatea de biotină din formularea topică a compozițiilor conform invenției este în intervalul de la 0,0006% până la 0,075% greutate în greutate față de greutatea totală a formulării.

În formă topică, compoziția cuprinde de preferință N¹-metilspermidină. În forma topică, N¹-metil spermidină sau spermidină este de preferință cuprinsă în intervalul de 0,0005-0,1 % în greutate față de greutatea totală a formulării.

Printre excipienții obișnuiți din formularea topică pentru uz cosmetic sau pentru uz farmaceutic pot fi citați conservanți, agenți bactericizi, agenți de emulsionare, tamponi, lubrifianti, agenți de umectare, agenți de condiționare și agenți de colorare.

Compoziția pentru aplicare topică poate fi sub formă solidă, semisolidă sau fluidă. Formulările adecvate în formă solidă includ creme, geluri, unguente, paste, unguente.

În alte exemple de realizare, formularea pentru administrare locală este sub formă fluidă, de exemplu sub formă de loțiuni, geluri, șampoane, suspensii, emulsii.

În cazul formelor de formulări fluide sau semifluide, extractul de plantă poate fi diluat într-un purtător în formă lichidă acceptabilă fiziologic, cum ar fi apă, alcool, soluție hidroalcoolică sau glicerică sau amestecat cu alte lichide adecvate pentru aplicare locală.

Cu titlu de exemplu, compozițiile conform invenției sub formă lichidă pot fi preparate prin dizolvarea componentelor în apă și/sau alcool. Compoziția lichidă poate fi tamponată pentru a atinge un interval de pH selectat în mod convenabil de la 5 la 7 pentru a fi compatibil cu pH-ul scalpului și apoi filtrată și ambalată în recipiente adecvate, cum ar fi sticle sau fiole.

În unele exemple de realizare, compozițiile invenției pot cuprinde excipienți utilizați în mod obișnuit în formularea preparatelor cosmetice sau farmaceutice pentru uz local, cum ar fi conservanți, agenți bactericizi, stabilizatori, emulgatori, tampon, agenți de umectare, coloranți și alți excipienți utilizați în mod obișnuit în tehnicile de preparare.

Într-o variantă de realizare, formularea pentru aplicarea locală este sub forma unei emulsii care conține extractul purtat într-un excipient adecvat. În unele exemple de realizare, compoziția pentru aplicare topică cuprinde un excipient de tip hidroximetilceluloză și/sau gelifiere cu HLB adecvat pentru formulare și substanțe.

Conform altor exemple de realizare, compoziția invenției este în formă pentru administrare orală. În aceste cazuri, compoziția conține *componentele* așa cum s-a definit anterior și unul sau mai multe vehicule sau excipienți adecvați pentru administrare orală.

Cantitatea de extract de Galeopsis, de preferință sub forma speciilor Galeopsis segetum sau Galeopsis tetrahit, în formularea orală a compozițiilor conform invenției este în intervalul de la 0,1 mg la 20 mg per doză unică.

Cantitatea de biotină din formularea orală a compozițiilor conform invenției este în intervalul de la 0,03 mg până la 0,08 mg per doză unică.

În formă orală, compoziția cuprinde de preferință spermidină sau o sare a acesteia, mai preferabil spermidina este sub formă de sare.

În forma orală, N¹-metilspermidină (sau sarea sa) sau spermidină (sau sarea sa) este de preferință cuprinsă în intervalul de la 0,3 mg la 0,8 mg per doză unică.

Cu titlu de exemplu, excipienții adecvați pentru administrare orală includ derivați de celuloză, cum ar fi hidroximetilceluloza, hidroxipropil metilceluloza, metilceluloza, hidroxipropil celuloza, hidroxietil celuloza, carboxietil celuloza, etilhidroxietil celuloza, acetat butirat de celuloză, acetat de celuloză ftalat și amestecuri ale acestora.

Alte exemple de excipienți adecvați includ polimerii aparținând familiei lactamelor, cum ar fi pirolidona și derivații săi, de exemplu polivinilpirolidonă, polivinilpolipirolidonă și amestecurile acestora, săruri anorganice cum ar fi fosfatul de calciu sau dicalcic, lubrifianți precum stearat de magneziu, triacilgliceroli și amestecuri ale acestora.

Compozițiile pentru administrare orală pot fi sub formă solidă sau lichidă. Compozițiile tipice în formă solidă includ tablete, capsule, pulberi, granule, pastile. Exemple de compoziții sub formă lichidă includ soluții, emulsii, suspensii, siropuri. Compozițiile pot fi, de asemenea, sub formă de eliberare controlată a componentelor active conținute în acestea.

Tabletele cuprind în general un purtător sau excipient adecvat în care extractul de plantă este dispersat, de obicei sub formă uscată.

Printre excipienții sau purtătorii tipici pentru administrarea orală, agenții de dezintegrare, aditivii, conservanții pot fi incluși în formularea compoziției. În anumite exemple de realizare, compoziția invenției este un produs nutritiv, un produs dietetic sau un produs nutraceutic.

Termenul supliment nutritiv înseamnă un produs care îmbunătățește starea nutrițională și poate fi utilizat pentru a susține sau îmbunătăți activitatea funcțională a unui sau mai multor organe sau funcționalitatea corpului uman în limitele fiziologice. Compozițiile conform invenției fiind promotori de autofagie sunt, prin urmare, produse nutraceutice și cosmeceutice care favorizează creșterea părului.

Conform unui alt aspect, prezenta invenție prevede, prin urmare, utilizarea cosmetică a compozițiilor sinergice menționate mai sus, așa cum sunt definite în revendicarea 16. În conformitate cu un alt aspect specific, utilizarea formulării topice sau orale care cuprinde compozițiile menționate mai sus pentru stimularea creșterii fiziologice a părului este dezvăluită aici.

În conformitate cu încă un alt aspect, prezenta invenție asigură compozițiile sinergice menționate mai sus pentru utilizare în tratamentul așa cum este definit în revendicarea 17.

În conformitate cu un alt aspect specific, prezenta invenție prevede, prin urmare, utilizarea cosmetică a formulării topice sau orale cuprinzând compozițiile de mai sus pentru promovarea creșterii părului sau pentru tratamentul sau prevenirea căderii părului.

Legătura dintre promovarea autofagiei și activitățile menționate mai sus ale compozițiilor invenției sunt dovedite prin testele descrise în următorul Exemplu 13. În special, articolul științific al Chiara Parodi și colab.: „Autofagia este esențială pentru menținerea creșterii unui (mini)organ uman: Dovezi din cultura de organe a foliculului de păr al scalpului” publicat pe PLOS Biology vol. 16(3), 2018, 28. Mar: 10.1371/ jurnal.pbio.2002864 arată că testul efectuat pe celulele epiteliale ale osteosarcomului osos uman este un model consacrat pentru demonstrarea eficacității compoziției în stimularea creșterii părului.

Experimental se arată sinergismul în stimularea autofagiei într-un model in vitro validat. Datele și publicația arată că autofagia este esențială pentru creșterea foliculului de păr. Compoziția conform invenției stimulează autofagia și, în consecință, este eficientă în stimularea creșterii părului.

În anumite aspecte, invenția furnizează compoziția de mai sus pentru utilizare în tratamentul tulburărilor de creștere a părului, cum ar fi în cazul alopeciei androgenetice sau defluvium.

Într-un alt aspect, invenția prevede utilizarea compozițiilor de mai sus ca promotoare ale autofagiei așa cum este definit în revendicările 18 și 19.

Inventatorii au descoperit, de asemenea, că o compoziție cuprinzând N¹-metilspemidină și biotină a fost potrivită ca promotor al autofagiei în tratamentul bolilor de piele.

Cantitățile administrate și frecvența de administrare a compoziției vor depinde de tipul și severitatea bolilor de tratat.

Invenția va fi acum detaliată prin referire la exemple de realizare specifice care arată rezultatele sinergice obținute de compozițiile invenției și nu ar trebui să fie considerate limitative. Cantitățile de componente indicate sunt exprimate ca procente (%) de greutate în greutate (g/g) sau în mg per doză unică de administrare.

PĂRȚI EXPERIMENTALE

Exemplul 1

Prepararea extractului de Galeopsis segetum

Prepararea extractului uscat de Galeopsis segetum a fost realizată prin extracție cu etanol 40% urmată de purificare pe coloană. Pașii sunt descriși în paragrafele următoare.

Extracție

Părțile aeriene uscate de G. segetum au fost extrase de două ori la 50°C timp de 2 ore cu etanol 40%. Solidul și lichidul au fost separate printr-un decantor.

Levigatetele au fost filtrate, concentrate sub vid și apoi limpezite prin centrifugare.

Purificare

O coloană a fost umplută cu rășină absorbantă schimbătoare de ioni XAD7HP care a fost înmuiată anterior în etanol 95% și menținută în contact timp de 10 ore. Coloana umplută a fost apoi spălată cu apă continuând până când conductivitatea eluatului a atins aceeași valoare cu a apei încărcate.

Purificarea extractului s-a făcut pe coloana împachetată XAD7HP eluând inițial cu apă și apoi cu etanol 70%.

Eluații colectați au fost concentrați sub vid.

S-a adăugat etanol la soluția concentrată și apoi soluția a fost încălzită la 70-75°C timp de 30 de minute pentru a reduce nivelul de încărcare biologică.

Soluția a fost din nou concentrată sub vid, uscată la 50°C timp de 24 de ore și apoi măcinată și amestecată cu excipienți (maltodextrină și silicagel coloidal anhidru 90/10) pentru a se obține produsul final.

Exemplul 2

Prepararea extractului de Galeopsis tetrahit

Prepararea extractului uscat de Galeopsis tetrahit a fost efectuată urmând exact aceeași procedură descrisă la paragrafele precedente pentru extracția Galeopsis segetum.

Exemplul 3

Șampon revitalizant

Ingrediente	% g/g
Zetesol MGS/B	16-49
Lauroil Sarcosinat de sodiu	4-12
Mirasheen CP 820/G	2-6
Rewoderm LI S 80	1-4
Euxyl K 701	1-2
BC 2262	0,5-1,4
Cocamide MIPA	0,5-1,4

Proteina de grâu hidrolizată cu potasiu undecilenoil	0,5-1,4
Acid citric monohidrat	0,4-1,2
Betaină monohidrat	0,2-0,7
Clorura de lauril metil glucet-10 hidroxipropildimoniu	0,2-0,7
Gafquat 755 N-O	0,2-0,5
D-Pantenol	0,1-0,3
Etilendiamină disuccinat trisodic	0,1-0,3
BHA	0,01-0,02
Hialuronat de hidroxipropiltrimoniu	0,01-0,02
Extract uscat de Galeopsis segetum	0,003-0,009
Biotina	0,001-0,03
Meditanox H-10	0,0005-0,0015
N ¹ -Metilspermidină	0,0005-0,1
Lecitina	0,0004-0,0011
Fomblin HC/PU-CAT5	0,0002-0,0005
Apă până la 100 ml	

Exemplul 4**Șampon întăritor**

Ingrediente	% g/g
Zetesol MGS/B	15-50
N-lauroil sarcosinat de sodiu	4-12
Mirasheen CP 820/G	2-6
Rewoderm LI S 80	1-4
Euxyl K 701	1-2
Cocamide MIPA	0,5-1,4
Proteina de grâu hidrolizată cu potasiu undecilenoil	0,5-1,4
Acid citric monohidrat	0,4-1,1
BC 2262	0,3-0,8
Betaină monohidrat	0,2-0,7
Clorura de lauril metil glucet-10 hidroxipropildimoniu	0,2-0,7
Abil Soft AF 100	0,2-0,6
Gafquat 755 N-O	0,2-0,5
D-Pantenol	0,1-0,3
Etilendiamină disuccinat trisodic	0,1-0,3
BHA	0,01-0,02
Hialuronat de hidroxipropiltrimoniu	0,01-0,02
Extract uscat de Galeopsis segetum	0,003-0,009
Biotina	0,001-0,003
Meditanox H-10	0,001-0,002
N ¹ -Metilspermidină	0,001-0,002
Lecitină NAT 8539	0,0004-0,0011
Fomblin HC/PU-CAT5	0,0002-0,0005
Apă până la 100 ml	

5

Exemplul 5**Loțiune**

Ingrediente	% g/g
Etanol	9-27
Pantotenat de calciu	1-2
PEG-40 Ulei de ricin hidrogenat	1-2
Acid lactic sol. 80%	0,1-0,4
Lypobelle soiaglicon	0,04-0,13
Hialuronat de hidroxipropiltrimoniu	0,03-0,1
N ¹ -metilspermidină	0,03-0,09

Lecitină NAT 8539	0,02-0,07
Octadecil di-t-butil-4-hidroxiidrocinamat	0,02-0,07
Fomblin HC/PU-CAT5	0,009-0,027
Biotina	0,007-0,022
Meditanox H-10	0,0005-0,0015
Apă până la 100 ml	

Exemplul 6**Balsam fortifiant**

Ingrediente	% g/g
Clorura de cetil trimetil amoniu	3-9
Alcool cetil stearilic	3-8
Silsoft 8812	2-7
Arlacel 165-PA-(MV)	2-5
Stearat de gliceril	2-5
lactat de alchil C12-13	1-3
Dow Corning CE 8401	1-2
Xilitol	1-2
Bioscontrol sinergie BAS	0,3-0,9
Hidroxietilceluloza	0,3-0,9
D-Pantenol	0,3-0,8
Uniglucan G-51	0,3-0,8
Acid lactic lichid	0,1-0,4
Fitantriol	0,1-0,3
Benzoat de sodiu	0,1-0,3
Dehidroacetat de sodiu	0,1-0,3
Ciclopentasiloxan	0,1-0,2
EDTA disodic dihidrat	0,1-0,2
Sericină	0,1-0,2
Hialuronat de hidroxipropiltrimoniu	0,01-0,02
Extract uscat de Galeopsis segetum	0-0,01
Biotina	0,01-0,03
Meditanox H-10	0,001-0,002
Lecitină NAT 8539	0,0004-0,0011
Fomblin HC/PU-CAT5	0,0002-0,0005
N ¹ -metilspermidină	0,025-0,075
Apă până la 100 ml	

5

Exemplul 7**Balsam fortifiant**

Ingrediente	% g/g
Alcool cetostearilic	4-11
Clorura de cetil trimetil amoniu	3-8
Soluție cationică transparentă Aquacat PF618	2-6
1,2 Propandiol	2-5
SI-TEC AME 6057	1-3
Incroquat behenyl TMS	1-2
D-Pantenol	0,4-1,2
Fenoxietanol	0,4-1,2
Stearat de gliceril	0,4-1,2
Complexul meu	0,4-1,2
Ceraphyl 60	0,3-0,8
Collasurge - LQ- (WD)	0,3-0,8
Ulei de sofrănel	0,2-0,5
Amipearl argint intens1161	0,1-0,3

Acetat de tocoferil	0,1-0,3
Hidroxietylceluloza	0,1-0,3
Uvinul A plus B	0,1-0,2
Ciclopentasiloxan	0,1-0,2
Dekaben BL	0,1-0,2
EDTA disodic dihidrat	0,1-0,2
Rewoteric AM 2C NM	0,1-0,2
acid citric monohidrat	0,03-0,08
Hidroxitoluen butilat	0,03-0,08
Pantotenat de calciu	0,01-0,03
Hialuronat de hidroxipropiltrimoniu	0,01-0,02
Biotina	0,001-0,02
SK-Influx V	0,001-0,003
Rutin	0,0006-0,0017
Extract uscat de Galeopsis tetrahit	0,001-0,002
Meditanox H-10	0,0005-0,0015
Extract uscat din semințe de Vitis vinifera	0,0005-0,0015
Lecitină NAT 8539	0,0004-0,0012
Ulei de zeaxantina Sol. 20%	0,0002-0,0006
Fomblin HC/PU-CAT5	0,0002-0,0005
N ¹ -metilspermidină	0,0045-0,0135
Apă până la 100 ml	

Exemplul 8**Gel fortifiant**

Ingrediente (INCI)	% g/g
Polimer Fixate PLUS	2-5
PEG-40 Ulei de ricin hidrogenat	1-3
Parfum Apollon 436/F 0505436F	1-2
Sorbitol nu se cristalizează 70%	1-2
Hidroximetilglicinat de sodiu	0,5-1,5
Hidroxipropil guar	0,4-1,2
Benzofenona-4	0,15-0,45
Luviquat Polyquaternium 11	0,15-0,45
EDTA disodic dihidrat	0,05-0,15
Taurin	0,03-0,08
Pantotenat de calciu	0,01-0,03
N ¹ -metilspermidină	0,00275-0,00825
Extract uscat de Galeopsis tetrahit	0,0003-0,0009
Biotina	0,00075-0,0025
Meditanox H-10	0,0001-0,0002
Apă până la 100 ml	

5

Exemplul 9**Cremă**

Ingrediente	% g/g
Octildodecanol	11,5-15,5
Alcool cetil stearilic	8,5-11,5
Ceară de esteri cetilici	2,6-3,5
Monostearat de sorbitan	1,7-2,3
Polisorbat 60	1,3-1,7
Alcool benzilic	0,9-1,2
N ¹ -Metilspermidină	0,0428-0,058
Biotina	0,0119-0,0161
Apă până la 100 ml	

Exemplul 10**Tablete**

Ingrediente	Cantitate (mg)
Metionină	200-400
Vitamina C acoperită	50-150
Celuloză microcristalină	40-160
extract uscat din semințe de Vitis vinifera	30-90
Hidroxipropil-metilceluloză K100	20-70
Zeaxantina 5%	20-70
Acetat de vitamina E 50%	20-50
Drojdie de seleniu 2000 ppm	20-40
Bisglicinat de zinc 28,2%	10-40
Dioxid de siliciu coloidal	10-20
Olea Europaea L. extract uscat de frunze	5-15
Pantotenat de calciu	5-11
Polietilen glicol 6000	4-12
Stearat de magneziu	4-12
Polivinilpirolidonă K30	3-10
Extract uscat de Galeopsis segetum	0.1-20
Bisglicinat de cupru 30%	2-6
Rutin	1-4
Vitamina B6	1-4
Acid hialuronic	1-2
Triclorhidrat de spermidină	0,3-0,8
Acid folic	0,1-0,3
Biotină	0,03-0,08

5

Exemplul 11**Tablete**

Ingrediente	Cantitate (mg)
Celuloză microcristalină	40-160
Hidroxipropil-metilceluloză K100	20-70
Acetat de vitamina E 50%	20-50
Bisglicinat de zinc 28,2%	10-40
Dioxid de siliciu coloidal	10-20
Polietilen glicol 6000	4-12
Stearat de magneziu	4-12
Polivinilpirolidonă K30	3-10
Bisglicinat de cupru 30%	2-6
Vitamina B6	1-4
Acid hialuronic	1-2
Triclorhidrat de spermidină	0,3-0,8
Biotină	0,03-0,08

10

Exemplul 12**Tablete**

Ingrediente	Cantitate (mg)
Celuloză microcristalină	40-160
Hidroxipropil-metilceluloză K100	20-70
Acetat de vitamina E 50%	20-50
Bisglicinat de zinc 28,2%	10-40
Dioxid de siliciu coloidal	10-20
Extract uscat de Galeopsis segetum	5-20

Polietilen glicol 6000	4-12
Stearat de magneziu	4-12
Polivinilpirolidonă K30	3-10
Bisglicinat de cupru 30%	2-6
Vitamina B6	1-4

Exemplul 13**Materiale și metode****Analiza imunoblot.**

5 Celulele U2OS au fost crescute la confluență de 80% în glucoză mediu ridicat de Eagle modificat Dulbecco (4,5 g/ID-glucoză) care conține L-glutamina 4mM, ser fetal bovin (FBS) 10% și tratate cu spermidină (Lot.2010112716), Galeopsis segetum IDN 6781), Biotină (Lot. 2014124160) sau combinațiile acestora. Probele de proteine au fost extrase în tampon RIPA așa cum s-a raportat anterior (De Mei C, Ercolani L, Parodi C, Veronesi M, Vecchio CL, Bottegoni G, et al. Inhibarea duală a REV-EPBβ și autofagia ca o nouă abordare farmacologică pentru a induce citotoxicitatea în celulele canceroase. Oncogene. 2015;34(20):2597-608). Nivelurile p62/SQSTM1 și GAPDH au fost analizate cu anticorpi specifici anti-p62/SQSTM1 și anti-GADPH. Experimentele de imunoblot au fost efectuate în tampon TBS-T care conține 5% albumină serică bovină (BSA). Anticorpii anti-LC3B și anti-GAPDH au fost diluați 1:1000 și, respectiv, 1:50000. Anticorpii secundari conjugați HRP complementari au fost diluați 1:10000. La reacția cu reactivul de detectare ECL Western blot, semnalele chemiluminescente au fost obținute cu un analizor de imagine luminiscent LAS-4000 și densitatea optică a semnalului de bandă specifică a fost calculată cu software-ul de analiză a imaginii Photoshop. GAPDH a fost adoptat ca control de încărcare și semnalele GAPDH au fost utilizate pentru a normaliza nivelurile de proteină p62 între diferite probe.

20 Imunobloturile au fost repetate de cel puțin 4 ori pentru a exprima valoarea ca medie ± SEM.

Analiza fluorescență a inhibării autofagiei.

25 Celulele U2OS au fost însămânțate cu 3000 de celule/godeu în plăci cu 48 de godeuri, lamelă Nr. 1,5 neacoperită, diametru de sticlă de 6 mm, acoperite anterior cu soluție de gelatină și transduse cu 0,2 μl de baculovirus/10 000 de celule conținând o proteină himerică p62-proteină roșie fluorescentă (p62-RFP). La 48 de ore după transducție, celulele au fost tratate cu spermidină, biotină, Galeopsis sau vehicul și monitorizate timp de 24 de ore utilizând microscopia NIKON Live Cell Imaging.

Activitatea sinergică a spermidinei, G. segetum și biotinei pentru a induce autofagia în celulele umane

30 Pentru a evalua dacă biotina și/sau extractul de Galeopsis segetum pot afecta autofagia, inventatorii au monitorizat acumularea de autofagozom în celulele U2OS cultivate prin microscopie fluorescență cu celule vii (Klionsky DJ, Abdelmohsen K, Abe A, Abedin MJ, Abeliovich H, Acevedo Arozena A, et al. Orientări pentru utilizarea și interpretarea testelor pentru monitorizarea autofagiei. Autofagie. 2016; 12(1): 1-222). Astfel, celulele au fost transduse cu construct care conține proteina autofagică, LC3, fuzionată cu o proteină fluorescentă roșie (RFP). Apoi, acumularea de puncte fluorescente LC3 la adăugarea de biotină (200ng/ml) sau extract uscat de Galeopsis (100ng/ml) a fost monitorizată prin achiziționarea de imagini la fiecare 30 de minute timp de 6 ore. Spermidina (10 μM) a fost adoptată ca un control pozitiv al unui compus inductor de autofagie (Pietrocola F, Lachkar S, Enot D, Niso-Santano M, Bravo-San Pedro J, Sica V, et al. Spermidina induce autofagia prin inhibarea acetiltransferazei EP300. Moartea celulară și diferențierea. 2015;22(3):509-16).

40 Această analiză a relevat o acumulare marcată de puncte fluorescente LC3 atât în celulele tratate cu biotină, cât și cu Galeopsis (a se vedea imaginile reprezentative din Figura 1). După cum este evident în Figura 1, tratamentul cu spermidină a dus la o acumulare marcată de puncte fluorescente LC3 (adică acumularea de autofagozomi). Atât biotina, cât și extractul uscat de Galeopsis segetum au produs o acumulare similară de puncte roșii LC3.

45 Deoarece punctele LC3-RFP se pot acumula, de asemenea, la o blocare a fluxului autofagic, degradarea dependentă de autofagie a proteinei SQSTM1/p62 (Klionsky DJ, Abdelmohsen K, Abe A, Abedin MJ, Abeliovich H, Acevedo Arozena A, et al. Orientări pentru utilizarea și interpretarea testelor pentru monitorizarea autofagiei. Autofagie. 2016; 12(1): 1-222) a fost astfel monitorizată. p62 a servit ca linker între LC3 și substraturile ubiquitinate (Pankiv S, Clausen TH, Lamark T, Brech A, Bruun J-A, Outzen H, et al. p62/SQSTM1 se leagă direct de Atg8/LC3 pentru a facilita degradarea agregatelor proteice ubiquitinate prin autofagie. Jurnalul de chimie biologică. 2007;282(33):24131-45). Proteinele poliubiquitinate legate de p62 și p62 au fost încorporate în autofagozomul complet și au fost degradate în autolizozomi, servind astfel ca un indice al degradării autofagice (Klionsky DJ, Abdelmohsen K, Abe A, Abedin MJ, Abeliovich H, Acevedo Arozena A, et al. Orientări pentru utilizarea și interpretarea testelor pentru monitorizarea autofagiei. Autofagie. 2016; 12(1): 1-222).

În consecință, efectele biotinei și Galeopsis asupra degradării p62 mediată de autofagie au fost evaluate prin analizarea numărului de autofagozomi p62-RFP prin microscopie fluorescentă directă. Celulele au fost astfel transdușe cu un construct care exprimă proteina p62 fuzionată cu RFP. Apoi, punctele fluorescente p62 au fost monitorizate după adăugarea de biotină, Galeopsis, spermidină sau vehicul. Sprijinind pe deplin faptul că atât biotina, cât și Galeopsis au acționat ca inductori de autofagie, a fost observată o reducere drastică a punctelor p62-RFP în celulele tratate în comparație cu vehiculul (vezi imaginile reprezentative din Figura 2).

După cum se vede în figura 2, tratamentul cu inductorul de autofagie caracterizat anterior, spermidină, a redus semnificativ punctele fluorescente p62 și semnalele fluorescente, indicând astfel că atât biotina, cât și extractul de Galeopsis segetum acționează ca inductori de autofagie, aceste tratamente producând o reducere puternică a semnalelor fluorescente p62.

Odată validată activitatea de inducere a autofagiei a biotinei și Galeopsis și după ce s-a validat utilizarea p62 ca marker adecvat al procesului de autofagie, efectele combinațiilor de compuși asupra nivelurilor proteinei p62 au fost evaluate prin analiză imunoblot cu anticorpi specifici anti-p62 (De Mei C, Ercolani L, Parodi C, Veronesi M, Vecchio CL, Bottegoni G, et al. Inhibarea duală a REV-EPBβ și autofagia ca o nouă abordare farmacologică pentru a induce citotoxicitatea în celulele canceroase. Oncogene. 2015;34(20):2597-608).

Această analiză a indicat un efect sinergic semnificativ între spermidină, biotină și Galeopsis în inducerea degradării p62 mediată de autofagie (Tabelul 1).

tabelul 1

Tratament	Procentul de reducere a p62 față de vehicul (% ± SEM)	Reducerea p62 așteptată din efectele aditive	Efecte sinergice
Spermidină	5 ± 0,11		
Biotina	21 ± 1,5		
Galeopsis	24 ± 2,1		
Spermidină + Biotină	45 ± 2,5	26 ± 1,61	DA
Spermidină + Galeopsis	51 ± 3,3	29 ± 2,21	DA
Biotina + Galeopsis	67 ± 5,5	45 ± 3,6	DA
Spermidină + Galeopsis + Biotină	78 ± 3,9	50 ± 3,71	DA

Într-adevăr, combinația de spermidină (0,5 μM) și biotină (19,91 ng/ml) a dus la o reducere a p62 de aproape două ori mai mare decât reducerea așteptată de efectele aditive (45% față de 26%). Rezultate similare au fost obținute pentru combinația de spermidină și Galeopsis (7,9 ng/ml) (51% VS 29%) și amestec de biotină/Galeopsis (67% vs 45%). În cele din urmă, o combinație a tuturor celor trei compuși (0,5 μM spermidină + 7,9 ng/ml Galeopsis + 19,91 ng/ml biotină) a generat o reducere remarcabilă de 78% a nivelurilor de proteină p62.

Exemplul 14

Au fost evaluate nivelurile de LC3 și SQSTM1 lipitate în celulele U2OS umane tratate cu doze echimolare de N¹-metilspermidină și spermidină. Ca rezultat, în comparație cu vehiculul, ambii compuși au crescut nivelurile formei LC3-II lipitate și au stimulat degradarea SQSTM1 mediată de autofagie. Celulele U2OS umane cultivate în mod specific au fost tratate 6 ore cu vehicul sau doze echimolare de spermidină și N¹-metilspermidină (100 μM). Nivelurile de LC3 lipidat (LC3-II) și SQSTM1 au fost apoi evaluate prin analiză de imunoblotare ca în exemplul 13 cu anticorp specific. Semnalele de actină au fost adoptate ca control al încărcării. Analiza densitometrică a semnalelor proteice este raportată ca niveluri relative de proteine normalizate de ACTINĂ. Valoarea eșantionului de vehicul a fost setată la 1. Afișată ca medie ± SEM, n=3. *P<0,05 și **P<0,01, compuși față de vehicul. Rezultatele sunt raportate în figura 3 (A și B). Aceste rezultate validează faptul că N¹-metilspermidină păstrează activitatea de a induce autofagia, ca analogul său desmetilat.

(56) Referințe bibliografice citate în raportul de documentare:

- WO-A1-03/063851
- YUVAL RAMOT ET AL: "Spermidine Promotes Human Hair Growth and Is a Novel Modulator of Human Epithelial Stem Cell Functions", PLOS ONE, vol. 6, no. 7, 27 July 2011 (2011-07-27), page e22564, XP055089945, DOI: 10.1371/journal.pone.0022564
- D. PINTO ET AL: "209 Galeopsis segetum Necker extracts for the prevention and treatment of hair", THE JOURNAL OF INVESTIGATIVE DERMATOLOGY : OFFICIAL JOURNAL OF THE SOCIETY FOR INVESTIGATIVE DERMATOLOGY AND THE EUROPEAN SOCIETY FOR DERMATOLOGICAL RESEARCH, vol. 136, no. 9, 1 September 2016 (2016-09-01), page S196, XP055404298, US ISSN: 0022-202X, DOI: 10.1016/j.jid.2016.06.223
- WO-A1-2014/016407
- WO-A1-2015/063678

(57) Revendicări:

1. O compoziție sinergică care cuprinde un extract de plantă din genul Galeopsis și un compus care promovează autofagia selectat dintre R-N¹-spermidină sau o sare a acesteia, în care R este hidrogen sau metil, biotină și amestecuri ale acestora.

2. Compoziție sinergică conform revendicării 1, în care extractul de plantă din genul Galeopsis este selectat dintre speciile de Galeopsis segetum și Galeopsis tetrahit și amestecuri ale acestora.

3. Compoziție sinergică conform revendicării 2, în care extractul de plantă din genul Galeopsis este un extract uscat care poate fi obținut prin procedeul care cuprinde următoarele etape:

- măcinarea a cel puțin unei părți din planta din genul Galeopsis;
- extragerea cu un solvent, de preferință un solvent acceptabil fiziologic;
- filtrarea extractului;
- purificarea extractului filtrat, de preferință prin eluare în coloană cu un solvent;
- uscarea extractului purificat;
- măcinarea extractului uscat purificat; și
- opțional adăugarea de excipienți.

4. Compoziție sinergică conform revendicării 3, în care excipienții cuprind maltodextrină și/sau silicagel coloidal anhidru.

5. Compoziție sinergică conform oricăreia dintre revendicările 1-4, în care spermidina este prezentă în compoziție sub formă de triclorhidrat.

6. O formulare topică care cuprinde compoziția sinergică conform oricăreia dintre revendicările 1-5 și cel puțin un excipient adecvat pentru administrare topică.

7. Formulare topică conform revendicării 6, în care cantitatea de extract de plantă din genul Galeopsis este în intervalul de la 0,0003% la 0,01% în greutate față de greutatea totală a compoziției.

8. Formulare topică conform revendicării 6 sau revendicării 7, în care cantitatea de biotină este în intervalul de la 0,0006% la 0,075% în greutate în raport cu greutatea totală a compoziției.

9. Formulare topică conform oricăreia dintre revendicările 6-8, în care compoziția cuprinde R-N¹-spermidină sau o sare a acesteia, în care R este metil sau hidrogen, în intervalul 0,0005-0,1% în greutate față de greutatea totală a compoziției.

10. Formulare topică conform oricăreia dintre revendicările 6-9, în care formularea este într-o formă selectată din grupul constând dintr-un șampon, un gel, un balsam, o loțiune, un elixir, o emulsie, o spumă, un fard și o cremă.

11. O formulare orală care cuprinde compoziția sinergică conform oricăreia dintre revendicările 1-5 și cel puțin un excipient adecvat pentru administrare orală.

12. Formulare orală conform revendicării 11, în care cantitatea de extract uscat al plantei din genul *Galeopsis* în formularea orală este în intervalul de la 0,1 mg la 20 mg per doză unică.

13. Formulare orală conform revendicării 11 sau 12, în care cantitatea de biotină din formularea orală este în intervalul de la 0,03 mg la 0,08 mg per doză unică.

14. Formulare orală conform revendicării 11 sau 12, în care compoziția cuprinde R-N¹-spermidină sau o sare a acesteia, în care R este metil sau hidrogen, în intervalul de la 0,3 mg până la 0,8 mg per doză unică.

15. Formulare orală conform oricăreia dintre revendicările 11-14, în care formularea este o formulare solidă selectată din grupul constând dintr-un comprimat, o capsulă, pulberi, granule și o pilulă.

16. Utilizare cosmetică a compoziției sinergice conform oricăreia dintre revendicările 1-5 sau o formulare topică conform oricăreia dintre revendicările 6-10 sau o formulare orală conform oricăreia dintre revendicările 11-15 în promovarea creșterii părului și/sau prevenirea căderii părului.

17. Compoziție sinergică conform oricăreia dintre revendicările 1-5 sau o formulare topică conform oricăreia dintre revendicările 6-10 sau o formulare orală conform oricăreia dintre revendicările 11-15 pentru utilizare în tratamentul alopeciei androgenetice sau defluvium.

18. Compoziție sinergică conform oricăreia dintre revendicările 1-5 pentru utilizare ca promotor al autofagiei în tratamentul unei boli modulate de autofagie.

19. Compoziție sinergică pentru utilizare conform revendicării 18 în care bolile modulate de autofagie sunt selectate din grupul constând din neurodegenerare, cancer, boala Crohn și boli de piele.

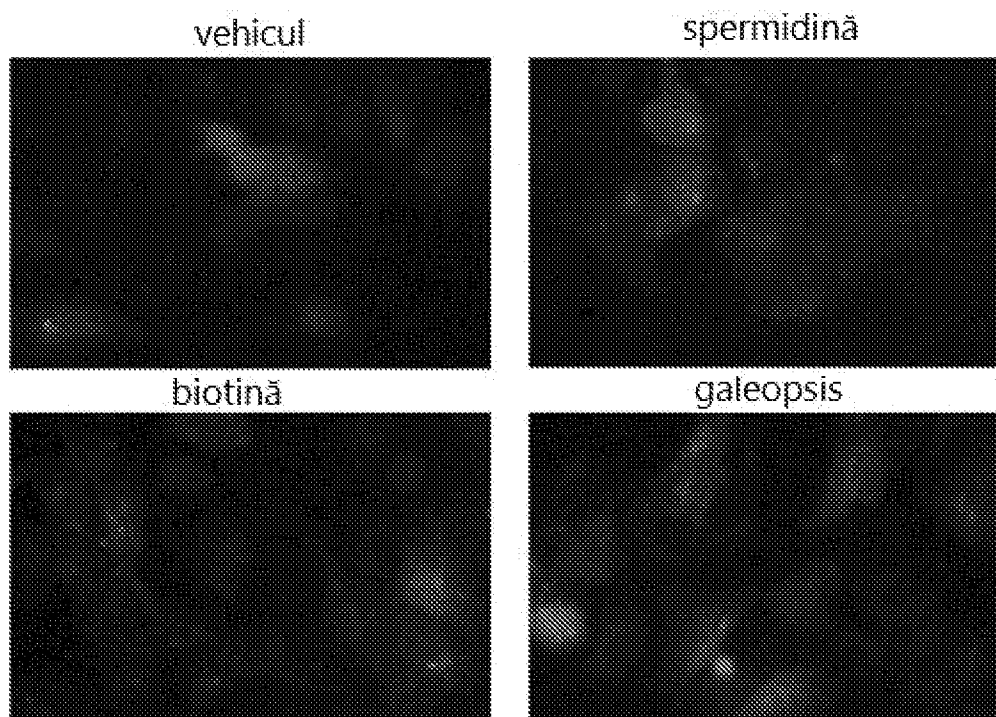


Figura 1

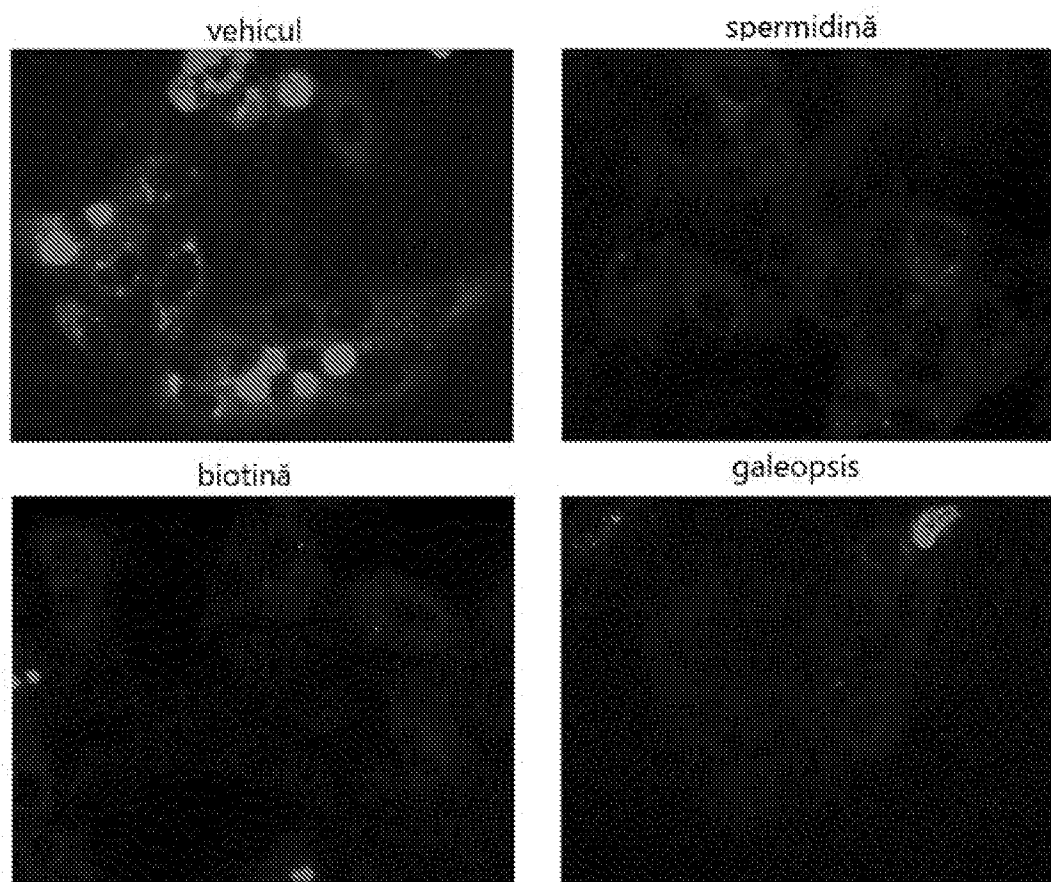


Figura 2

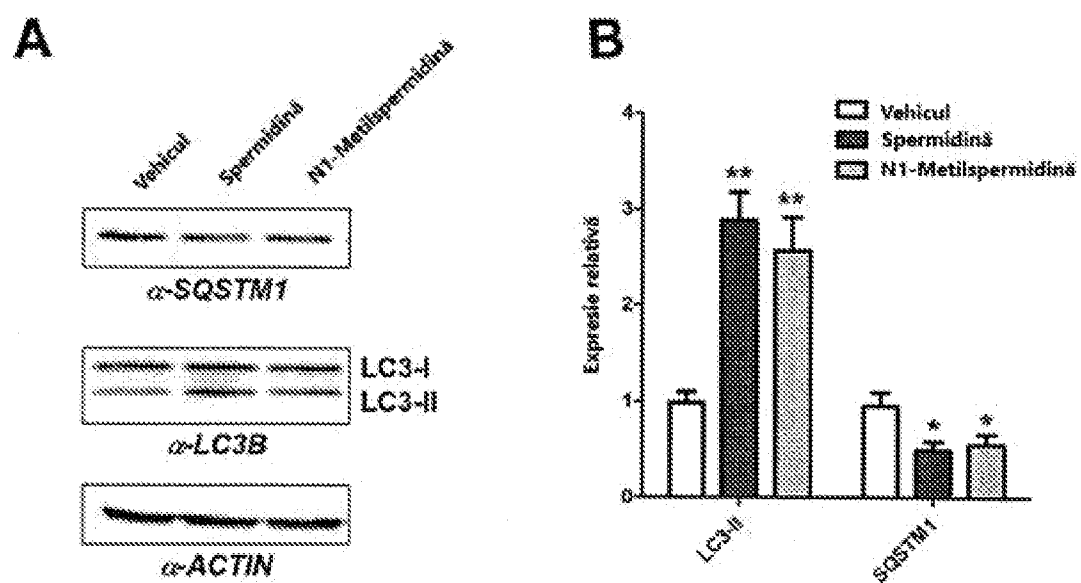


Figura 3