

19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 576 299**

51 Int. Cl.:

A61K 38/19 (2006.01)

A61K 8/64 (2006.01)

A61Q 7/00 (2006.01)

A61P 17/14 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **10.08.2012 E 12768879 (4)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **18.05.2016 EP 2741761**

54 Título: **Péptidos de osteopontina modificados que tienen un dominio RGD inactivado**

30 Prioridad:

10.08.2011 GB 201113770

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

06.07.2016

73 Titular/es:

**FOLLICUM AB (100.0%)
Scheelevägen 15
S-223 70 Lund, SE**

72 Inventor/es:

**ALENFALL, JAN;
DUNÉR, PONTUS y
HULTGÅRDH NILSSON, ANNA**

74 Agente/Representante:

PONS ARIÑO, Ángel

ES 2 576 299 T3

Aviso: En el plazo de nueve meses a contar desde la fecha de publicación en el Boletín europeo de patentes, de la mención de concesión de la patente europea, cualquier persona podrá oponerse ante la Oficina Europea de Patentes a la patente concedida. La oposición deberá formularse por escrito y estar motivada; sólo se considerará como formulada una vez que se haya realizado el pago de la tasa de oposición (art. 99.1 del Convenio sobre concesión de Patentes Europeas).

DESCRIPCIÓN

Péptidos de osteopontina modificados que tienen un dominio RGD inactivado

5 Campo de la invención

La presente invención se refiere a agentes para estimular el crecimiento capilar en mamíferos. En particular, se proporcionan composiciones que comprenden un polipéptido de osteopontina modificado para estimular el crecimiento capilar en mamíferos (incluyendo seres humanos).

10

Antecedentes

El crecimiento capilar es cíclico, ocurriendo en tres etapas: anagenia, la fase de crecimiento activo; catagenia, la fase degenerativa y telogenia, la fase de reposo. Después de la telogenia, se muda la fibra de cabello antigua y se genera un nuevo cabello como parte del ciclo repetido.

15

La alopecia, o pérdida del cabello, ocurre tanto en hombres como en mujeres, y se atribuye a numerosas causas incluyendo envejecimiento, niveles hormonales, estrés y quimioterapia. En estas circunstancias, cada vez más folículos pilosos permanecen en la etapa de telogenia, dando como resultado una disminución gradual de la longitud y diámetro de la fibra capilar, alcanzando finalmente la etapa de calvicie parcial o completa.

20

Son conocidos diversos tipos de pérdida del cabello, incluyendo alopecia areata, alopecia androgenética, efluvio anagénico, pérdida del cabello autoinducida, efluvio telogénico y alopecia cicatrizante. La alopecia areata, que se cree que es un trastorno autoinmunitario, empieza con pérdida del cabello en una placa redondeada del cuero cabelludo. La alopecia areata incluye la pérdida del cabello por placas moderada en el cuero cabelludo, así como la pérdida de todo el cabello del cuero cabelludo, conocida como alopecia total, y la pérdida de todo el cabello del cuero cabelludo y el vello corporal, conocido como alopecia universal. La alopecia androgenética, incluyendo calvicie de patrón masculino y femenino, se cree que está causada por una combinación de predisposición genética, envejecimiento y niveles hormonales androgénicos. La alopecia androgenética está asociada a una estimulación androgénica aumentada, que afecta adversamente a los folículos pilosos. La estimulación androgénica aumentada puede producirse por, entre otros mecanismos, niveles elevados de 5-alfa-reductasa, una enzima que convierte la testosterona en dihidrotestosterona. El efluvio anagénico es la pérdida del cabello debida a productos químicos o radiación, tal como quimioterapia o tratamiento de radiación para el cáncer. La pérdida del cabello autoinducida incluye pérdida del cabello causada por daño autoinfligido consciente o inconscientemente al cabello. Son dos tipos comunes de daño autoinducido al cabello la tricotilomanía, o pérdida del cabello resultante cuando alguien tira continuamente o arranca su propio cabello, y alopecia de tracción, que está causada por peinados tales como colas de caballo o trenzas que tiran continuamente del cabello. El efluvio telogénico es la pérdida del cabello relacionada con el estrés causado por eventos tales como, por ejemplo, cirugía, parto o terminación del embarazo. Las causas adicionales de efluvio telogénico incluyen el uso de anticonceptivos orales u otros fármacos con receta, anormalidad tiroidea, diabetes, lupus y estrés emocional. La alopecia cicatrizante incluye pérdida del cabello causada por infección e inflamación de los folículos pilosos, y pérdida del cabello causada por quemaduras u otros traumatismos.

25

30

35

40

La pérdida del cabello es un problema extendido que se considera por algunos que es cosméticamente poco atractivo y a menudo causa sufrimiento emocional al individuo afectado. Como consecuencia, hay una gran demanda de tratamientos de alopecia. Se han ensayado en muchas composiciones su capacidad de estimular el crecimiento capilar, por ejemplo promoviendo o prolongando la anagenia. Los ejemplos de dichas composiciones incluyen abridores de canal de potasio tales como minoxidil (Regaine RTM., Pharmacia Corp.) y diazóxido; inhibidores de 5-alfa-reductasa tales como finasterida (Propecia RTM., Merck & Co.) y el inmunosupresor ciclosporina A.

45

50

55

Sin embargo, dichos tratamientos conocidos para estimular el crecimiento capilar exhiben una efectividad limitada y causan efectos secundarios indeseados. Por ejemplo, entre otros efectos secundarios indeseables, los abridores de canal de potasio causan efectos cardiovasculares, la finasterida es insegura para mujeres que están embarazadas o pueden quedarse embarazadas y la ciclosporina A suprime el sistema inmunitario. Además, incluso cuando se aplican por vía tópica a las zonas en que se desea el crecimiento capilar, los tratamientos conocidos para alopecia causan a menudo el crecimiento capilar en zonas indeseadas del cuerpo, tales como el vello facial en mujeres. Dichas desventajas de las composiciones conocidas para tratar la alopecia conducen a muchos individuos que experimentan pérdida del cabello a confiar en pelucas y peluquines. Otros individuos buscan la cirugía de trasplante de cabello, que es cara, no es totalmente efectiva y a veces no es posible, por ejemplo para pacientes de

quimioterapia.

Por consiguiente, existe la necesidad de nuevos tratamientos para estimular el crecimiento capilar adecuados para uso tanto en aplicaciones médicas como cosméticas.

5

Resumen de la invención

El primer aspecto de la invención proporciona una composición para estimular el crecimiento capilar en un mamífero que comprende:

10

- a) un polipéptido de osteopontina modificado en que se inactiva un dominio RGD; y
- b) un excipiente, vehículo o diluyente farmacéuticamente y/o cosméticamente aceptable,

donde el polipéptido de osteopontina modificado consiste en una secuencia aminoacídica de SEQ ID NO: 63.

15

Por tanto, el componente activo de las composiciones de la invención deriva de una proteína osteopontina de origen natural (concretamente, el polipéptido comprende una secuencia aminoacídica correspondiente a la de una versión modificada, por ejemplo mutada, de una proteína osteopontina de origen natural).

- 20 La osteopontina, también conocida como sialoproteína ósea 1 (BSP-1 o BNSP), factor de activación temprana de linfocitos T (ETA-1), fosfoproteína secretada 1 (SPP1), 2ar y resistencia a *Rickettsia* (Ric), es un producto génico que está conservado en varias especies de mamífero.

El gen tiene varios exones, cubre 5 kilobases de longitud y en seres humanos está localizado en el brazo largo del cromosoma 4, región 13 (4q13). La proteína está compuesta por ~300 residuos aminoacídicos y es rica en residuos ácidos: 30-36 % son ácido aspártico o ácido glutámico. La osteopontina tiene ~30 residuos carbohidrato enlazados, incluyendo 10 residuos de ácido siálico, que se enlazan con la proteína durante la modificación postraducciona en el aparato de Golgi.

- 30 La osteopontina se descubrió por primera vez como una sialoproteína novedosa en osteoclastos de anclaje óseo sobre una matriz ósea mineralizada (Franzen y Heinegard, 1985, Biochem. J. 232(3) 715-24). El nombre *osteopontina* proviene de la presencia de la proteína en hueso (*osteo-*) y su capacidad de formar puentes (*-pons*) entre las células óseas y la fase mineral. El análisis de secuencia y posteriores estudios estructurales mostraron que la osteopontina es una glicoproteína de 32 kDa compuesta por una región altamente ácida de unos 10 residuos de ácido aspártico que se cree que media las propiedades de unión mineral de la osteopontina. Además, en la porción media de la molécula de osteopontina, hay también un dominio de enlace celular mediado a través de una secuencia R-G-D (Oldberg y col., 1986, Proc. Natl. Acad. Sci. USA 83(23): 8819-23).

- La osteopontina se expresa constitutivamente en osteoblastos y en varios tipos celulares epiteliales, dando como resultado que la osteopontina se secrete en muchos fluidos corporales. El hueso es el único tipo de tejido donde se deposita osteopontina y del que puede recuperarse en grandes cantidades. La expresión de osteopontina puede inducirse también en células de músculo liso vascular, en diferentes tipos de células cancerosas y entre las células inflamatorias (específicamente, macrófagos y linfocitos T). Se han atribuido varias funciones celulares importantes a la osteopontina, tales como adhesión, proliferación, migración, antiapoptosis y quimioatracción. Se cree que algunas de estas funciones están mediadas a través del dominio de adhesión celular RGD que interacciona con diferentes integrinas, principalmente con $\alpha\upsilon\beta 3$ pero también $\alpha\upsilon\beta 1$ y $\alpha\upsilon\beta 5$ (para revisión, véase Scatena y col., 2007, Arterio. Thromb. Vasc. Biol. 27: 2302-2309).

- En los últimos años, la osteopontina ha surgido como una potente citocina capaz de modular varios tipos celulares implicados en la inflamación y respuestas inmunitarias. El amplio intervalo de funciones que se atribuye a la osteopontina ha sido desconcertante y no todo puede explicarse por la única secuencia RGD de unión celular. La explicación llegó cuando se identificó un péptido de 11 aminoácidos en la osteopontina R¹⁴⁵-G-D-S-L-A-Y-G-L-R-S¹⁵⁵ (SEQ ID NO: 122) (correspondiente a los aminoácidos 144 to 154 del código UniProt P10923) y se cartografió funcionalmente después. Además del sitio R¹⁴⁵-G-D¹⁴⁷ conocido que media la unión a la integrina $\alpha\upsilon\beta 3$, se descubrieron dos regiones esenciales adicionales en la molécula de osteopontina, a saber un sitio de escisión de trombina altamente específico, concretamente R¹⁵⁴-S¹⁵⁵, y un sitio de unión a integrina críptico, concretamente S¹⁴⁸-L-A-Y-G-L-R¹⁵⁴ (SEQ ID NO: 123), que se une a una integrina $\alpha 9\beta 1$ (véase Scatena y col., *supra*). Se ha identificado también un sitio de unión adicional para $\alpha 4\beta 1$ (véase Scatena y col., *supra*).

Es un rasgo característico del polipéptido derivado de osteopontina en las composiciones de la invención que el dominio RGD naturalmente presente en la osteopontina se inactiva de tal modo que no es funcional (al menos en parte). Por ejemplo, la inactivación del dominio RGD puede prevenir que el polipéptido derivado de osteopontina se una a una o más de las integrinas a que se une la proteína osteopontina de origen natural.

5

Por tanto, en "polipéptido de osteopontina modificado" se incluyen polipéptidos correspondientes a una forma modificada de una proteína osteopontina de origen natural en que el dominio RGD no es funcional (el menos en parte), así como fragmentos y variantes de los mismos que retienen la propiedad estimuladora capilar de la osteopontina modificada "completa". Por ejemplo, el dominio RGD no funcional del polipéptido de osteopontina modificado puede ser incapaz de unirse a la integrina $\alpha v \beta 3$ (véase Scatena y col., *supra*).

10

Ventajosamente, la proteína osteopontina de origen natural es de mamífero, p.ej. de ser humano.

Los polipéptidos de osteopontina modificados presentes en las composiciones de la invención son capaces de estimular el crecimiento capilar en mamíferos.

15

En una realización, el polipéptido es capaz de estimular el crecimiento de cabello humano

En una realización adicional, el polipéptido es capaz de estimular el crecimiento de cabello *in vivo*.

20

En una realización adicional, el polipéptido es capaz de estimular el crecimiento de cabello *in vivo* con mayor eficacia que la osteopontina humana de tipo silvestre. Por "mayor eficacia", en este contexto, se incluye un inicio de acción más rápido y/o eficacia a una menor dosis y/o mayor efecto máximo (p.ej., mayor número de nuevos folículos o densidad del cabello). En una realización, el polipéptido es capaz de estimular el crecimiento de cabello *in vivo* con un inicio de acción más rápido y un mayor efecto de crecimiento capilar máximo que la osteopontina humana de tipo silvestre a la misma dosis (p.ej., véase el Ejemplo 8).

25

Se apreciará por los especialistas en la materia que la estimulación del crecimiento capilar puede estar mediada por un efecto de los folículos pilosos existentes y/o induciendo la formación de nuevos folículos pilosos.

30

Por tanto, en una realización, el polipéptido de osteopontina modificado es capaz de estimular los folículos pilosos existentes (por ejemplo, prolongando la fase anagénica y/o acortando la fase telogénica de tal modo que los folículos restantes se vuelvan activos).

En una realización adicional, el polipéptido es capaz de inducir la formación de nuevos folículos pilosos, o de células madre para producir los mismos.

35

Como se discute anteriormente, los polipéptidos de osteopontina modificados carecen de la secuencia tripeptídica activa "arginina-glicina-ácido aspártico" encontrada normalmente en proteínas osteopontina de origen natural. Se apreciará que este dominio RGD puede inactivarse mediante una serie de estrategias diferentes.

40

El polipéptido consiste en la secuencia aminoacídica de SEQ ID NO: 63.

VDTYDGDISVVYGLR **SEQ ID NO: 63** ["FOL-005"]

45

Los especialistas en la materia apreciarán que el polipéptido de osteopontina modificado puede estar glicosilado en uno o más aminoácidos. Por ejemplo, el polipéptido puede retener uno o más de los sitios de glicosilación de la proteína osteopontina correspondiente ("original") con los que puede estar enlazado un grupo carbohidrato.

Los polipéptidos de osteopontina modificados adecuados para uso en las composiciones de la invención pueden elaborarse mediante procedimientos de expresión de base celular *in vitro* bien conocidos por los especialistas en la materia (por ejemplo, véase Sambrook y Russell, 2000, "Molecular Cloning, A Laboratory Manual", 3ª edición, Cold Spring Harbor, Nueva York, que se incorpora a la presente memoria como referencia). La elección del vector de expresión y la célula hospedadora para usar puede depender de una serie de factores. Por ejemplo, si el polipéptido de osteopontina modificado se va a glicosilar, se requerirá un sistema de expresión de mamífero.

50

Los vectores de expresión y células hospedadoras adecuados están comercialmente disponibles en muchas fuentes.

Como alternativa, los polipéptidos de osteopontina modificados pueden sintetizarse mediante medios conocidos,

tales como síntesis en fase líquida y fase sólida (por ejemplo, síntesis peptídica en fase sólida con *terc-Boc* y BOP-SPPS).

Se apreciará por los especialistas en la materia que la presente invención incluye también sales de adición de ácido
5 o base farmacéutica y/o cosméticamente aceptables del polipéptido de osteopontina modificado descrito anteriormente. Los ácidos que se usan para preparar las sales de adición de ácido farmacéutica y/o cosméticamente aceptables de los compuestos básicos anteriormente mencionados útiles en esta invención son aquellos que forman sales de adición de ácido no tóxicas, concretamente sales que contienen aniones farmacéutica y/o cosméticamente aceptables tales como sales clorhidrato, bromhidrato, yodhidrato, nitrato, sulfato, bisulfato, fosfato, fosfato ácido,
10 acetato, lactato, citrato, citrato ácido, tartrato, bitartrato, succinato, maleato, fumarato, gluconato, sacarato, benzoato, metanosulfonato, etanosulfonato, bencenosulfonato, p-toluenosulfonato y pamoato [concretamente 1,1'-metilénbis-(2-hidroxi-3-naftoato)], entre otras.

Las sales de adición de base farmacéutica y/o cosméticamente aceptables pueden usarse también para producir
15 formas de sal farmacéutica y/o cosméticamente aceptables de los polipéptidos de osteopontina modificados. Las bases químicas que pueden usarse como reactivos para preparar sales de base farmacéutica y/o cosméticamente aceptables de los presentes compuestos que son de naturaleza ácida son aquellas que forman sales básicas no tóxicas con dichos compuestos. Dichas sales básicas no tóxicas incluyen, pero sin limitación, aquellas derivadas de aquellos cationes farmacéutica y/o cosméticamente aceptables tales como cationes de metal alcalino (p.ej., potasio y
20 sodio) y cationes de metal alcalinotérreo (p.ej., calcio y magnesio), amonio o sales de adición de amina hidrosolubles tales como N-metilglucamina (meglumina) y alcanolamonio inferior y otras sales básicas de aminas orgánicas farmacéuticamente aceptables, entre otras.

Se apreciará además que el polipéptido de osteopontina modificado de la invención puede liofilizarse para
25 almacenamiento y reconstituirse en un vehículo adecuado antes del uso. Puede emplearse cualquier procedimiento de liofilización (p.ej., secado por pulverización, secado de torta) y/o técnica de reconstitución adecuado. Se apreciará por los especialistas en la materia que la liofilización y reconstitución pueden conducir a grados variables de pérdida de actividad y que los niveles de uso pueden tener que ajustarse al alza para compensar. Preferiblemente, el polipéptido liofilizado pierde no más de aproximadamente un 20 %, o no más de aproximadamente un 25 %, o no
30 más de aproximadamente un 30 %, o no más de aproximadamente un 35 %, o no más de aproximadamente un 40 %, o no más de aproximadamente un 45 %, o no más de aproximadamente un 50 % de su actividad (antes de la liofilización) cuando se rehidrata.

El polipéptido de osteopontina modificado se proporciona en forma de una composición que comprende el
35 polipéptido y un excipiente, vehículo o diluyente farmacéuticamente aceptable y/o cosméticamente aceptable, seleccionado con respecto a la vía pretendida de administración y la práctica farmacéutica o cosmética estándar (por ejemplo, véase "Remington: The Science and Practice of Pharmacy", 19ª edición, 1995, Ed. Alfonso Gennaro, Mack Publishing Company, Pensilvania, EE.UU., que se incorpora a la presente memoria como referencia).

Se incluye como "farmacéuticamente aceptable" que la formulación sea estéril y libre de pirógenos. Los vehículos
40 farmacéuticos adecuados son bien conocidos en la técnica de la farmacia. El vehículo o vehículos deben ser "aceptables" en el sentido de ser compatibles con el compuesto de la invención y no nocivos para los receptores de los mismos. Típicamente, los vehículos serán agua o solución salina que serán estériles y libres de pirógenos; sin embargo, pueden usarse otros vehículos aceptables. Por tanto, "vehículo farmacéuticamente aceptable" y
45 "excipiente farmacéuticamente aceptable" incluyen cualquier compuesto o compuestos usados en la formación de una parte de la formulación que pretende que actúe meramente como vehículo, concretamente, que no se pretende que tenga actividad biológica por sí misma. El vehículo o excipiente farmacéuticamente aceptable es generalmente seguro, no tóxico y no indeseable biológicamente ni de otro modo. Un vehículo o excipiente farmacéuticamente aceptable como se usa en la presente memoria incluye tanto uno como más de uno de dichos vehículos o
50 excipientes.

Igualmente, el término "cosméticamente aceptable" se usa para designar formulaciones adecuadas para uso como
55 productos cosméticos. Los vehículos cosméticos adecuados son bien conocidos en la materia, tales como aquellos usados comúnmente en champús, lociones, cremas y otros de dichos productos.

El excipiente puede ser uno o más de carbohidratos, polímeros, lípidos y minerales. Los ejemplos de carbohidratos incluyen lactosa, sacarosa, manitol y ciclodextrinas, que se añaden a la composición, p.ej., para facilitar la liofilización. Son ejemplos de polímeros almidón, éteres de celulosa, celulosa, carboximetilcelulosa, hidroxipropilmetilcelulosa, hidroxietilcelulosa, etilhidroxietilcelulosa, alginatos, carragenanos, ácido hialurónico y

derivados del mismo, poli(ácido acrílico), polisulfonato, polietilenglicol/poli(óxido de etileno), copolímeros de poli(óxido de etileno)/poli(óxido de propileno) polivinilalcohol/poli(acetato de vinilo) de diferentes grados de hidrólisis y polivinilpirrolidona, todos de diferente peso molecular, que se añaden a la composición, p.ej., para control de la viscosidad, para conseguir bioadhesión o para proteger al lípido de la degradación química y proteolítica. Son ejemplos de lípidos ácidos grasos, fosfolípidos, monoglicéridos, diglicéridos y triglicéridos, ceramidas, esfingolípidos y glicolípidos, todos de diferente longitud de cadena de acilo y saturación, lecitina de huevo, lecitina de soja, lecitina de huevo y soja hidrogenada, que se añaden a la composición por razones similares a las de los polímeros. Son ejemplos de minerales talco, óxido de magnesio, óxido de cinc y óxido de titanio, que se añaden a la composición para obtener beneficios tales como reducción de la acumulación de líquido o propiedades de pigmento ventajosas.

10 El término “diluyente” se pretende que signifique una solución acuosa o no acuosa con el fin de diluir el péptido en la preparación farmacéutica. El diluyente puede ser uno o más de solución salina, agua, polietilenglicol, propilenglicol, etanol o aceites (tales como aceite de cártamo, aceite de maíz, aceite de cacahuete, aceite de semilla de algodón o aceite de sésamo).

15 El diluyente puede funcionar también como tampón. El término “tampón” pretende significar una solución acuosa que contiene una mezcla de ácido-base con el fin de estabilizar el pH. Son ejemplos de tampones Trizma, bicina, tricina, MOPS, MOPSO, MOBS, Tris, Hepes, HEPBS, MES, fosfato, carbonato, acetato, citrato, glicolato, lactato, borato, ACES, ADA, tartrato, AMP, AMPD, AMPSO, BES, CABS, cacodilato, CHES, DIPSO, EPPS, etanolamina, glicina, HEPPSO, imidazol, ácido imidazoláctico, PIPES, SSC, SSPE, POPSO, TAPS, TABS, TAPSO y TES.

20 Opcionalmente, la composición puede comprender un coadyuvante. El término “coadyuvante” pretende significar cualquier compuesto añadido a la formulación para aumentar el efecto biológico del péptido. El coadyuvante puede ser uno o más de sales de cinc, cobre o plata con diferentes aniones, por ejemplo pero sin limitación, fluoruro, cloruro, bromuro, yoduro, tiocianato, sulfuro, hidróxido, fosfato, carbonato, lactato, glicolato, citrato, borato, tartrato y acetatos de diferente composición de acilo.

30 Las composiciones de la invención pueden estar también en forma de microesferas biodegradables. Se han usado ampliamente poliésteres alifáticos tales como poli(ácido láctico) (PLA), poli(ácido glicólico) (PGA), copolímeros de PLA y PGA (PLGA) o policaprolactona (PCL) y polianhídridos como polímeros biodegradables en la producción de microesferas. Las preparaciones de dichas microesferas pueden encontrarse en los documentos US 5.851.451 y en EP0213303.

35 Las composiciones de la invención pueden estar también en forma de geles poliméricos, con polímeros tales como almidón, éteres de celulosa, celulosa, carboximetilcelulosa, hidroxipropilmetilcelulosa, hidroxietilcelulosa, etilhidroxietilcelulosa, alginatos, carragenanos, ácido hialurónico y derivados del mismo, poli(ácido acrílico) y polisulfonato.

40 El polipéptido de osteopontina modificado puede formularse a diversas concentraciones, dependiendo de la eficacia/toxicidad del polipéptido particular que se esté usando. Preferiblemente, la composición comprende el polipéptido de osteopontina modificado a una concentración de entre 1 nM y 1 M, por ejemplo entre 0,1 μ M y 1 mM, 1 μ M y 100 μ M, entre 5 μ M y 50 μ M, entre 10 μ M y 50 μ M, entre 20 μ M y 40 μ M y opcionalmente de aproximadamente 30 μ M. Para aplicaciones *ex vivo* e *in vitro*, las composiciones pueden comprender una concentración menor de polipéptido de osteopontina modificado, por ejemplo entre 0,0025 μ M y 1 μ M.

45 Se apreciará por los especialistas en la materia que las composiciones de la invención pueden administrarse por una variedad de vías, por ejemplo administración tópica, transdérmica, parenteral u oral.

50 Ventajosamente, las composiciones de la invención son adecuadas para administración tópica o administración intracutánea.

Por tanto, las composiciones de la invención pueden administrarse por vía tópica a la piel (p.ej. cuero cabelludo). Por ejemplo, la composición puede proporcionarse en forma de una pomada que contiene el polipéptido activo suspendido o disuelto, por ejemplo, en una mezcla con uno o más de los siguientes: aceite mineral, vaselina líquida, vaselina blanca, propilenglicol, compuestos de polioxietileno-polioxipropileno, cera emulsionante y agua. Como alternativa, el polipéptido puede formularse como una loción o crema adecuada, suspendida o disuelta, por ejemplo, en una mezcla de uno o más de los siguientes: aceite mineral, monoestearato de sorbitán, un polietilenglicol, parafina líquida, polisorbato 60, cera de ésteres de cetilo, alcohol cetearílico, 2-octildodecanol, alcohol bencílico y agua.

Opcionalmente, la composición para administración tópica puede comprender un mejorador de la penetración (por ejemplo, como se describe en Osborne y Henke, 1997, *Pharmaceutical Technology*, noviembre: 58-82 y Pathan y Setty, 2009, *Tropical Journal of Pharmaceutical Research* 8 (2): 173-179, cuyas divulgaciones se incorporan a la presente memoria como referencia).

Como alternativa, las composiciones de la invención pueden administrarse por vía parenteral, por ejemplo intracutánea. Dichas composiciones se usan mejor en forma de una solución acuosa estéril que puede contener otras sustancias, por ejemplo suficientes sales o glucosa para hacer la solución isotónica con la sangre. Las soluciones acuosas deberían estar adecuadamente tamponadas (preferiblemente a un pH de 3 a 9), si es necesario. La preparación de formulaciones parenterales adecuadas en condiciones estériles se logra fácilmente mediante técnicas farmacéuticas estándares bien conocidas por los especialistas en la materia.

Las composiciones adecuadas para administración parenteral incluyen soluciones de inyección estériles acuosas y no acuosas que pueden contener antioxidantes, tampones, bacteriostatos y solutos que vuelven la formulación isotónica con la sangre del receptor pretendido; y suspensiones estériles acuosas y no acuosas que pueden incluir agentes de suspensión y agentes espesantes. Las formulaciones pueden presentarse en envases de una dosis o múltiples dosis, por ejemplo ampollas y viales sellados, y pueden almacenarse en condición liofilizada que requiere solo la adición del vehículo líquido estéril, por ejemplo agua para inyecciones, inmediatamente antes del uso. Pueden prepararse soluciones y suspensiones de inyección extemporánea a partir de polvos, gránulos y comprimidos estériles de la clase descrita anteriormente.

Puede ser beneficioso usar un sistema de liberación prolongada, tal como formulaciones de microesferas, para suministrar los polipéptidos de osteopontina modificados.

Como alternativa, las composiciones pueden administrarse mediante un dispositivo implantado quirúrgicamente que libera el polipéptido activo directamente en el sitio requerido (concretamente la epidermis).

Las composiciones de la invención pueden suministrarse también por metodologías transdérmicas.

Por ejemplo, pueden emplearse terapia de electroporación (EPT) y/o sistemas de iontoforesis para la administración de proteínas y polipéptidos. En dichos procedimientos, se usa un dispositivo para suministrar un campo eléctrico pulsante a células, dando como resultado una permeabilidad aumentada de las membranas celulares al fármaco y una mejora significativa del suministro intracelular de fármaco.

Un procedimiento transdérmico alternativo, la electroincorporación, que utiliza partículas pequeñas de hasta 30 micrómetros de diámetro sobre la superficie de la piel, experimenta pulsos eléctricos idénticos o similares a los usados en electroporación. Las partículas se impulsan a través del estrato córneo a las capas más profundas de la piel. Las partículas pueden estar cargadas o recubiertas con fármacos o genes o pueden actuar simplemente como "balas" que generan poros en la piel a través de los cuales pueden entrar fármacos

Se han desarrollado también metodologías transdérmicas adicionales por PowderJect Pharmaceuticals (poseída ahora por Novartis AG).

Los procedimientos adecuados para administración de los polipéptidos y composiciones de la invención son bien conocidos en la materia, por ejemplo, véase "Therapeutic Protein and Peptide Formulation and Delivery", Zahra Shahrokh y col. (Eds), 1997, American Chemical Society, ISBN13: 9780841235281.

Un segundo aspecto de la invención proporciona un polipéptido que consiste en la secuencia aminoacídica de SEQ ID NO: 63 63.

En una realización, el polipéptido está aislado (p.ej., fuera del cuerpo del mamífero).

El polipéptido de la invención puede ser para uso médico en el tratamiento o la prevención de una enfermedad o afección asociada a la pérdida del cabello (como se describe con detalle a continuación).

Se describe también en la presente memoria el uso de un polipéptido de la invención para estimular el crecimiento capilar en un mamífero, donde el uso es cosmético o comercial (como se describe con detalle a continuación)

Se describen también en la presente memoria composiciones de acuerdo con el primer aspecto de la invención para uso en la estimulación del crecimiento capilar en un mamífero.

Por tanto, las composiciones pueden ser para uso en la estimulación de folículos pilosos existentes y/o la inducción del crecimiento de nuevos folículos pilosos (o de células madre para producir los mismos).

La composición puede ser para uso en el tratamiento o la prevención de una enfermedad o afección asociada a la pérdida del cabello, tal como alopecia.

10 La alopecia está típicamente asociada a la pérdida de cabello anagénico. Sin embargo, se apreciará que las composiciones de la invención pueden usarse también para el tratamiento de afecciones asociada a la pérdida de cabello telogénico.

En una realización, la alopecia se selecciona del grupo consistente en:

- 15
- a) alopecia androgénica (también conocida como alopecia androgenética, calvicie de patrón masculino o calvicie de patrón femenino);
 - b) alopecia de tracción;
 - c) efluvio anagénico;
 - 20 d) efluvio telogénico;
 - e) alopecia areata;
 - f) alopecia total;
 - g) alopecia universal;
 - h) alopecia de barba;
 - 25 i) alopecia mucinosa;
 - j) alopecia neoplásica;
 - k) alopecia cicatricial; y
 - l) alopecia cicatrizante.

30 Por ejemplo, la alopecia puede ser alopecia androgénica.

Como alternativa, la alopecia puede ser efluvio anagénico. Esta afección, resultante de la entrada temprana de cabellos en la fase telogénica, puede ser debida a una variedad de causas, incluyendo trastornos alimentarios, fiebre, parto, dolencia crónica, cirugía mayor, anemia, trastornos emocionales graves, dietas de choque, hipotiroidismo y fármacos.

Por tanto, la pérdida del cabello puede inducirse por agentes de radioterapia y/o quimioterapia. Por ejemplo, la pérdida del cabello es un efecto secundario común e inquietante del tratamiento con fármacos quimioterapéuticos tales como cisplatino, etopósido y paclitaxel.

40 Convenientemente, el mamífero es un ser humano.

Se describe también en la presente memoria el uso de un polipéptido de osteopontina modificado como se define anteriormente en relación con el primer aspecto de la invención en la preparación de un medicamento para estimular el crecimiento capilar en un mamífero.

Por tanto, el medicamento puede ser para estimular folículos pilosos existentes y/o para inducir el crecimiento de nuevos folículos pilosos (o de células madre para producir los mismos).

50 Se describe también en la presente memoria un procedimiento para estimular el crecimiento capilar en un mamífero que comprende administrar una cantidad efectiva de un polipéptido de osteopontina modificado como se define anteriormente en relación con el primer aspecto de la invención.

Por tanto, el procedimiento puede ser para estimular folículos pilosos existentes y/o inducir el crecimiento de nuevos folículos pilosos (o de células madre para producir los mismos).

La composición polipeptídica de la invención puede administrarse al paciente en una cantidad efectiva. Una "cantidad terapéuticamente efectiva" o "cantidad efectiva" o "terapéuticamente efectiva", como se usa en la presente memoria, hace referencia a aquella cantidad que proporciona un efecto estimulante sobre el crecimiento capilar.

Esta es una cantidad predeterminada de material activo calculada para producir el efecto terapéutico deseado. Como se aprecia por los especialistas en la materia, la cantidad de compuesto puede variar dependiendo de su actividad específica. Las cantidades de dosificación adecuadas pueden contener una cantidad predeterminada de composición activa calculada para producir el efecto terapéutico deseado en asociación con el diluyente requerido.

5 En los procedimientos y uso para la fabricación de composiciones de la invención, se proporciona una cantidad terapéuticamente efectiva del componente activo. Una cantidad terapéuticamente efectiva puede determinarse por el trabajador médico o veterinario especialista basándose en las características del paciente, tales como edad, peso, sexo, afección, complicaciones, otras enfermedades, etc., como es bien conocido en la materia.

10 El procedimiento puede ser para el tratamiento o la prevención de una enfermedad o afección asociada a la pérdida del cabello, tal como alopecia (p.ej., asociada a la pérdida de cabello anagénico).

Se apreciará por los especialistas en la materia que la composición del primer aspecto de la invención no está limitada a usos médicos, sino que puede usarse también como agentes cosméticos (en el sentido de que no proporcionan una mejora de la salud física como tal, sino que meramente proporcionan un beneficio estético al mamífero).

Se describe también en la presente memoria el uso de una composición de acuerdo con el primer aspecto de la invención para estimular el crecimiento capilar en un mamífero, donde el uso es cosmético.

20 Por tanto, la composición cosmética puede ser para estimular folículos pilosos existentes y/o inducir el crecimiento de nuevos folículos pilosos (o de células madre para producir los mismos).

Por ejemplo, la composición cosmética puede usarse para el tratamiento o la prevención de calvicie, que puede estar asociada a entradas y/o cabello escaso.

Dichas composiciones no están limitadas al uso en el cuero cabelludo, sino que pueden aplicarse a otro lugar del cuerpo (incluyendo la cara para fomentar el crecimiento de barba, pestañas, cejas, etc.).

30 Convenientemente, el mamífero es un ser humano.

Se apreciará por los especialistas en la materia que las composiciones de la invención pueden usarse por sí solas o en combinación con otros agentes terapéuticos o cosméticos. Por ejemplo, las composiciones de la invención pueden usarse en una terapia de combinación con tratamientos existentes para prevenir la pérdida del cabello existente y/o para estimular el crecimiento de cabello nuevo, por ejemplo abridores de canal de potasio tales como minoxidil (Regaine RTM., Pharmacia Corp.) y diazóxido; inhibidores de 5-alfa-reductasa tales como finasterida (Propecia RTM., Merck & Co.) y el inmunosupresor ciclosporina A.

Se apreciará además por los especialistas en la materia que las composiciones de la invención pueden usarse *in vivo*, *ex vivo* o *in vitro*.

Por tanto, además de aplicarse o administrarse directamente a un mamífero, las composiciones pueden usarse para estimular el crecimiento capilar *ex vivo*, por ejemplo en un explante de piel antes de injertar la piel en el mamífero.

45 Como alternativa, las composiciones pueden usarse para hacer crecer folículos pilosos *in vitro*, p.ej. en cultivo celular, que puede trasplantarse entonces a un paciente.

Se describe también en la presente memoria el uso de un polipéptido de acuerdo con el primer aspecto de la invención para estimular el crecimiento capilar *in vitro* o *ex vivo*.

50 Por ejemplo, el polipéptido puede usarse para estimular el crecimiento de folículos pilosos (o de células madre precursoras de los mismos).

Se describe también en la presente memoria un procedimiento para elaborar una composición de acuerdo con el primer aspecto de la invención, comprendiendo el procedimiento mezclar un polipéptido de osteopontina modificado en que el dominio RGD está inactivado con un excipiente, vehículo o diluyente farmacéuticamente aceptable y/o cosméticamente aceptable.

Se describirán ahora los ejemplos preferidos no limitantes que representan ciertos aspectos de la invención, con

referencia a las siguientes figuras:

La Figura 1 muestra una representación esquemática del área de muestreo de la piel de ratones.

5 La Figura 2 es una fotografía representativa de una sección transversal de piel de un ratón 48 horas después de tratarse con un polipéptido de osteopontina modificado. Los folículos en la epidermis se indican por una flecha. La densidad lineal de los folículos era de 18,3 folículos por mm (598 folículos en 32,65 mm de epidermis).

10 La Figura 3 es una fotografía representativa de una sección transversal de piel de un ratón 48 horas después de tratarse con una composición de control negativo. Los folículos en la epidermis se indican por una flecha. La densidad lineal de los folículos era de 11,7 folículos por mm (379 folículos en 32,50 mm de epidermis).

15 La Figura 4 muestra fotografías representativas de (a) un animal tratado con control el día 14 que tiene una puntuación de crecimiento capilar de 0, (b) un animal tratado con el polipéptido "Cx" "completo" ejemplar (correspondiente a la SEQ ID NO: 1, pero sin el péptido señal de 16 aminoácidos inicial, 60 nM) el día 14 que tiene una puntuación de crecimiento capilar de 1,5, (c) un animal tratado con el péptido corto ejemplar "FOL-004" (SEQ ID NO: 5, 60 nM) el día 5 que tiene una puntuación de crecimiento capilar de 2,5 y (d) un animal tratado con el péptido corto ejemplar "FOL-005" (SEQ ID NO: 5, 63 nM) el día 5 que tiene una puntuación de crecimiento capilar de 2,0.

20 La Figura 5 muestra el efecto del polipéptido "Cx" "completo" ejemplar y los polipéptidos de SEQ ID NO: 5 y 63 de la invención sobre el crecimiento capilar.

25 La Figura 6 muestra el efecto del polipéptido ejemplar de SEQ ID NO: 5 sobre el crecimiento capilar, en comparación con el correspondiente polipéptido de SEQ ID NO: 121 de osteopontina de ratón de tipo silvestre.

EJEMPLO A - Estudio *in vivo* del efecto de crecimiento capilar de osteopontina de ratón mutada en ratones

Materiales y procedimientos

30 Creación y producción del polipéptido de ensayo

Se clonó la secuencia del polipéptido de osteopontina modificado de SEQ ID. NO:1 en un vector de expresión pCEP4 mediante el uso de sitios de enzimas de restricción *XhoI* y *BamHI*. El vector de expresión pCEP4 contiene un gen de resistencia a ampicilina para expresión en bacterias y un gen de resistencia a higromicina para expresión en células EBNA eucarióticas. Se transformaron los vectores que contienen polipéptido en células bacterianas XL-10 competentes, se multiplicaron y se aislaron con el kit Qiagen midi prep. Se transfectaron entonces vectores aislados en células EBNA humanas mediante el uso del reactivo de transfección Fugene de acuerdo con el protocolo de fabricación (Invitrogen).

40 Aislamiento del polipéptido de ensayo

Se recogieron los medios del cultivo celular de EBNA que contienen el polipéptido producido después de 3 a 4 días de cultivo. Los polipéptidos producidos por el plásmido pCEP4 contienen un marcaje de His insertado, que se usa para facilitar el aislamiento con cromatografía en gel de Ni-Sepharose (Invitrogen). Se diluyó el medio recogido con tampón de unión (fosfato de sodio 20 mM, cloruro de sodio 500 mM, pH 7,8) y se añadió suspensión de Ni-Sepharose antes de la incubación en agitador durante una noche a 4 °C. Se sedimentó el gel de Ni-Sepharose mediante centrifugación a 1000 g durante 7 minutos y se vertió en una minicolumna desechable BioRad. Se retiraron las proteínas no unidas con tampón de unión seguido de tampón de lavado (fosfato de sodio 20 mM, cloruro de sodio 500 mM, pH 6,0). Se eluyeron los polipéptidos de la columna con imidazol 500 mM.

50

Diseño de estudio general

El estudio consistía en cuatro grupos experimentales que contenían cada uno 5 ratones wtC57BL/6N machos.

55 El día 1, se afeitaron cuidadosamente los cuellos de todos los ratones participantes en cuadrados de aproximadamente 1,5 x 1,0 cm y se retiraron los pelillos pequeños restantes. El día siguiente (día 0), cada animal recibió cuatro inyecciones subcutáneas de 25 µl cada una en localizaciones separadas (cada una de aprox. 0,5 x 0,5 cm) en el rectángulo afeitado (véase la Figura 1).

Cada animal recibió dos inyecciones de 25 µl de una composición que comprende un polipéptido de osteopontina modificado ejemplar de SEQ ID NO:1 ("polipéptido de ensayo" o "Cx", 60 nmol/l en PBS) y dos inyecciones de control negativo de 25 µl de PBS (de acuerdo con el esquema trazado en la Tabla 1).

5

Tabla 1: Diseño de estudio

Grupo	Aplicación intracutánea		Número de animales	
	Volumen	Tiempo programado después de la aplicación		
1	Polipéptido de ensayo + PBS	25 µl	Necropsia después de 24 h (día 1)	5
2	Polipéptido de ensayo + PBS	25 µl	Necropsia después de 48 h (día 2)	5
3	Polipéptido de ensayo + PBS	25 µl	Necropsia después de 96 h (día 4)	5
4	Polipéptido de ensayo + PBS	25 µl	Necropsia después de 336 h (día 14)	5

Se sacrificaron los animales de los grupos de tratamiento 1 a 4 24 h (grupo 1), 48 h (grupo 2), 96 h (grupo 3) y 336 h (14 días, grupo 4) después de la aplicación del compuesto, respectivamente.

10 En todos los casos, se retiraron las zonas de piel marcadas en el cuello y se procesaron como sigue: se fijaron con paraformaldehído al 4 % una de las muestras de piel tratadas con polipéptido y una de las muestras de piel de control tratadas con PBS y posteriormente se embebieron en parafina. Se congelaron inmediatamente en nitrógeno líquido las otras dos muestras de piel (tratada con polipéptido y tratada con PBS) y se almacenaron apropiadamente a -80 °C.

15

Se efectuó una tinción con hematoxilina de las secciones embebidas en parafina.

	<u>Animales</u>
Razón	Sistema de ensayo aceptado para el fin del estudio
Cepa	wtC57BL/6N macho
Fuente	Charles River GmbH Sandhofer Weg 7 D 97633 Sulzfeld
Número total de animales	20
Edad de suministro	5-6 semanas
Peso corporal e intervalo (en aclimatación)	Aprox. 30 g
Identificación	Marcado por crotal
Aclimatación	Del 17 de febrero al 1 de marzo de 2011

	<u>Cría</u>
Condiciones	Condiciones higiénicas óptimas, aire acondicionado con 10-15 cambios de aire por hora y entorno monitorizado continuamente con intervalos diana de temperatura de 22 ± 3 °C y de humedad relativa de 30-70 %, 12 horas de luz fluorescente artificial/12 horas de oscuridad
Alojamiento	Máximo de 3 animales por jaula
Dieta	M-Zucht ssniff Spezialdiäten GmbH Ferdinand Gabriel Weg 16 D-59494 Soest
Agua	Agua del grifo comunitaria (sometida a autoclave)

20

	<u>Polipéptido de ensayo</u>
Identificación	Polipéptido de osteopontina modificado de SEQ ID NO: 1
Condiciones de almacenamiento	Almacenado en tampón HEPES a 4 °C
Precauciones de seguridad	Evitar la ingestión e inhalación, vestir guantes y máscara facial, lavar con jabón y agua después de contacto cutáneo, sin precauciones especiales
Preparación de muestra	Se diluyó 15x la solución madre suministrada con PBS, obteniendo la solución de trabajo 60 nM antes de la inyección

Identidad	<u>Vehículo</u> PBS a pH 7,4
Vía de administración	<u>Tratamiento</u> Intracutánea
Frecuencia de administración	Aplicación única el día 0
Volumen de dosis	25 µl

5 Observaciones

Se registraron los siguientes parámetros:

Viabilidad/mortalidad	Diariamente
Signos clínicos	Diariamente

10 Protocolo de tinción con hematoxilina de secciones embebidas con parafina del grupo 1

1. Baño de xileno de 5 min
2. Baño de xileno de 5 min
3. Baño de EtOH al 100 % de 5 min
- 15 4. Baño de EtOH al 95 % de 5 min
5. Baño de EtOH al 70% de 5 min
6. Baño de PBS de 5min
7. Baño de hematoxilina de aproximadamente 20 s (hematoxilina Harrys)^{a),b)}
8. Baño de agua 3 veces de 3 min
- 20 9. Baño de EtOH al 70 % de 5 min
10. Baño de EtOH al 95 % de 5min
11. Baño de EtOH al 100 % de 5 min
12. Baño de xileno de 5 min
13. Baño de xileno de 5 min
- 25 14. Se monta el portaobjetos usando Permount y cubreobjetos.

a) el tiempo depende del tipo de hematoxilina usado, de 20 s a 10 min (que puede determinarse mediante el uso de portaobjetos de ensayo)

b) filtrado antes del uso

30

Resultados

Se resume en la Tabla 1 (a) y (b) siguiente el efecto del tratamiento con un polipéptido de osteopontina modificado (SEQ ID NO:1) sobre la densidad de folículos pilosos.

35

Tabla 1(a) – Animales tratados con polipéptido

Portaobjetos 1 de polipéptido tratado	Número de folículos pilosos	Longitud de epidermis, mm
Área a1	18	0,90
Área a2	21	0,90
Área a3	25	0,95
Área b1	13	0,90
Área b2	21	0,90
Área b3	26	0,95
Suma	124	5,50
Portaobjetos 2 de polipéptido tratado	Número de folículos pilosos	Longitud de epidermis, mm
Área a1	16	0,90
Área a2	18	0,90
Área a3	25	0,95
Área b1	14	0,90
Área b2	18	0,90
Área b3	19	0,95

Suma	110	5,50
Portaobjetos 3 de polipéptido tratado	Número de folículos pilosos	Longitud de epidermis, mm
Área a1	18	0,90
Área a2	13	0,90
Área a3	19	0,95
Área b1	20	0,90
Área b2	17	0,90
Área b3	14	0,90
Suma	101	5,45
Portaobjetos 4 de polipéptido tratado	Número de folículos pilosos	Longitud de epidermis, mm
Área a1	18	0,90
Área a2	17	0,90
Área a3	15	0,90
Área b1	18	0,90
Área b2	17	0,90
Área b3	13	0,90
Suma	98	5,40
Portaobjetos 5 de polipéptido tratado	Número de folículos pilosos	Longitud de epidermis, mm
Área a1	13	0,90
Área a2	10	0,90
Área a3	21	0,90
Área b1	12	0,90
Área b2	10	0,90
Área b3	16	0,90
Suma	82	5,40
Portaobjetos 6 de polipéptido tratado	Número de folículos pilosos	Longitud de epidermis, mm
Área a1	18	0,90
Área a2	10	0,90
Área a3	10	0,90
Área b1	18	0,90
Área b2	17	0,90
Área b3	10	0,90
Suma	83	5,40
Portaobjetos 7 de polipéptido tratado	Número de folículos pilosos	Longitud de epidermis, mm
Portaobjetos 34	124	5,50
Portaobjetos 38	110	5,50
Portaobjetos 42	101	5,45
Portaobjetos 46	98	5,40
Portaobjetos 50	82	5,40
Portaobjetos 54	83	5,40
Total	598	32,65

Tabla 1(b) – Animales tratados-Control

Portaobjetos 1 de polipéptido tratado	Número de folículos pilosos	Longitud de epidermis, mm
Área a1	9	0,90
Área a2	17	0,90
Área a3	7	0,90
Área b1	11	0,90
Área b2	14	0,95
Área b3	10	0,90
Suma	68	5,45

ES 2 576 299 T3

Portaobjetos 2 de polipéptido tratado	Número de folículos pilosos	Longitud de epidermis, mm
Área a1	12	0,90
Área a2	17	0,90
Área a3	7	0,90
Área b1	12	0,90
Área b2	13	0,90
Área b3	10	0,90
Suma	71	5,40
Portaobjetos 3 de polipéptido tratado	Número de folículos pilosos	Longitud de epidermis, mm
Área a1	8	0,90
Área a2	7	0,90
Área a3	11	0,90
Área b1	19	0,95
Área b2	8	0,90
Área b3	14	0,90
Suma	67	5,45
Portaobjetos 4 de polipéptido tratado	Número de folículos pilosos	Longitud de epidermis, mm
Área a1	21	0,90
Área a2	5	0,90
Área a3	2	0,90
Área b1	16	0,90
Área b2	11	0,90
Área b3	3	0,90
Suma	58	5,40
Portaobjetos 5 de polipéptido tratado	Número de folículos pilosos	Longitud de epidermis, mm
Área a1	13	0,90
Área a2	2	0,90
Área a3	9	0,90
Área b1	12	0,90
Área b2	7	0,90
Área b3	15	0,90
Suma	58	5,40
Portaobjetos 6 de polipéptido tratado	Número de folículos pilosos	Longitud de epidermis, mm
Área a1	7	0,90
Área a2	11	0,90
Área a3	10	0,90
Área b1	6	0,90
Área b2	8	0,90
Área b3	15	0,90
Suma	57	5,40
Portaobjetos 7 de polipéptido tratado	Número de folículos pilosos	Longitud de epidermis, mm
Portaobjetos 18	68	5,45
Portaobjetos 22	71	5,40
Portaobjetos 26	67	5,45
Portaobjetos 34	58	5,40
Portaobjetos 38	58	5,40
Portaobjetos 42	57	5,40
Total	379	32,50

Se muestra a continuación en la Tabla 2 un resumen de los resultados.

Tabla 2

	Nº de folículos analizados	Nº de folículos por mm
Tratamiento con SEQ ID NO: 1	356	18,3
Grupo Control	356	11,7

Se muestran en las Figuras 2 y 3 secciones de tejido representativas que muestran folículos en animales tratados y de control.

En comparación, se observó que la osteopontina de ratón de tipo silvestre no tiene efecto detectable sobre el crecimiento capilar (datos no mostrados).

10 Conclusiones

Los datos muestran que el tratamiento con el polipéptido de osteopontina modificado ejemplar de SEQ ID NO: 1 aumenta el número de folículos/mm de epidermis en aproximadamente un 60 %.

15 Estos hallazgos confirman la utilidad de los polipéptidos de tipo osteopontina de la invención en la estimulación del crecimiento capilar.

EJEMPLO B - Estudio *in vivo* del efecto de crecimiento capilar de las SEQ ID NO: 5 y 63 en ratones

20 Materiales y procedimientos

Animales

Se usaron ratones (C57BL/6) de una edad de 6 a 8 semanas.

25

Visión general del diseño de estudio

- Selección de animales en la fase telogénica del crecimiento capilar
- Pinzamiento del lomo dorsal de los animales
- 30 • Inyección subcutánea de péptido de ensayo/vehículo
- Análisis visual: porcentaje de inducción anagénica; puntuación del crecimiento capilar medio; melanogénesis visual
- Análisis histológico: recuento de folículos subcutáneos, morfometría para el grosor cutáneo.

35 Grupos de tratamiento

- Se asignaron aleatoriamente los animales a los grupos de tratamiento (véase la Tabla 3)

Tabla 3

Tratamiento	Nº de animales	Dosis	Volumen
"Cx"	5	60 nm	25 µl
"FOL-004" (SEQ ID NO: 5)	5	60 nm	25 µl
"FOL-005" (SEQ ID NO: 63)	5	60 nm	25 µl
Control de vehículo	5	-	25 µl

40

- Se administró a los animales el tratamiento especificado los días 1, 5 y 9
- Se administró el tratamiento mediante inyección subcutánea en piel dorsal pinzada

Criterios de puntuación

45

- Se observó el efecto de los tratamientos y se puntuó diariamente de acuerdo con los criterios de la Tabla 4.

Tabla 4

<i>Observación de la piel dorsal</i>	<i>Puntuación de crecimiento capilar</i>
Sin crecimiento capilar, piel rosa	0
Cambios del color de la piel, de rosa a gris sin crecimiento capilar visible	0,5
Cambios de color de la piel, de rosa a gris o negro sin crecimiento capilar visible, indicando el inicio de la anagenia	1
Crecimiento capilar disperso	1,5
Crecimiento capilar corto difuso	2
Crecimiento capilar moderado	2,5
Pelo de recubrimiento normal denso	3

Resultados

5 Se muestra en la Tabla 5 el efecto de los polipéptidos ejemplares de la invención sobre el crecimiento capilar.

Tabla 5

Animal	Día											
	1	2	5	6	7	8	9	12	13	14	15	16
(A) Vehículo (control)												
1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	NA	NA
2	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	NA	NA
3	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	NA	NA
4	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	NA	NA
5	0	0	0	0	0	0	0	0,5	1	1	NA	NA
Media	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,1	0,2	0,2	-	-
(B) "Cx" (SEQ ID NO: 1 menos el péptido señal inicial de 16 aminoácidos)												
1	0	0	0	1	1,5	2	2,5	3	3	3	NA	NA
2	0	0	0	0,5	0,5	0,5	0,5	1	1	1	NA	NA
3	0	0	0	0,5	0,5	0,5	1	1,5	1,5	1,5	NA	NA
4	0	0	0	0,5	0,5	0,5	1	1,5	1,5	1,5	NA	NA
5	0	0	0	0	0	0	0,5	1	1,5	2	NA	NA
Media	0,0	0,0	0,0	0,5	0,6	0,7	1,1	1,6	1,7	1,8	-	-
(C) FOL-004 (SEQ ID NO: 5)												
1	0	0	0,5	1	1	1	1	1,5	1,5	1,5	2,5	3
2	0	0	2,5	2,5	3	3	3	3	3	3	3	3
3	0	0	2,5	2,5	2,5	3	3	3	3	3	3	3
4	0	0	1,5	2,5	3	3	3	3	3	3	3	3
5	0	0	1,5	2	2,5	2,5	3	3	3	3	3	3
Media	0,0	0,0	1,7	2,1	2,4	2,5	2,6	2,7	2,7	2,7	2,9	3,0
(D) FOL-005 (SEQ ID NO: 63)												
1	0	0	2	2,5	3	3	3	3	3	3	3	3
2	0	0	2	3	3	3	3	3	3	3	3	3
3	0	0	0,5	0,5	1	1	1,5	2,5	2,5	2,5	3	3
4	0	0	2	2,5	2,5	3	3	3	3	3	3	3
5	0	0	0	0	0	0,5	1	2	2,5	2,5	3	3
Media	0,0	0,0	1,3	1,7	1,9	2,1	2,3	2,7	2,8	2,8	3,0	3,0

10 La Figura 4 muestra fotografías representativas de (a) un animal tratado con control el día 14 que tiene una puntuación de crecimiento capilar de 0, (b) un animal tratado con el polipéptido "Cx" "completo" ejemplar (SEQ ID NO: 1, 60 nM) el día 14 que tiene una puntuación de crecimiento capilar de 1,5, (c) un animal tratado con el péptido corto ejemplar "FOL-004" (SEQ ID NO: 5, 60 nM) el día 5 que tiene una puntuación de crecimiento capilar de 2,5 y (d) un animal tratado con el péptido corto ejemplar "FOL-005" (SEQ ID NO: 5, 63 nM) el día 5 que tiene una puntuación de crecimiento capilar de 2,0.

15

Se resumen los resultados en la Figura 5.

Los polipéptidos ejemplares FOL-004 (SEQ ID NO: 5) y FOL-005 (SEQ ID NO: 63) inducían ambos un crecimiento capilar rápido, que era evidente a partir del día 5 y se mantenía hasta el final del periodo de valoración (día 16).

Un polipéptido “completo” de la invención (“Cx”) inducía también un crecimiento capilar pronunciado, pero con un inicio más lento que FOL-004 (SEQ ID NO: 5) o FOL-005 (SEQ ID NO: 63).

Los animales tratados con control de vehículo mostraban poca señal de crecimiento capilar durante el periodo del experimento.

10 Ninguno de los polipéptidos ensayados conduce a ningún efecto adverso en los animales (sin pérdida de peso corporal ni ningún otro síntoma adverso discernible).

Conclusiones

15 Todos los polipéptidos de osteopontina mutados ensayados mostraban efectos de crecimiento capilar pronunciados *in vivo*, exhibiendo los polipéptidos ejemplares más cortos FOL-004 (SEQ ID NO: 5) y FOL-005 (SEQ ID NO: 63) un inicio de acción particularmente rápido.

EJEMPLO C – Estudio *in vivo* del efecto de crecimiento capilar en ratones del fragmento de osteopontina de tipo silvestre equivalente a la SEQ ID NO: 5

Materiales y procedimientos

Los animales, como se describen anteriormente en el Ejemplo B, se trataron como se describe en la Tabla 6:

25

Tabla 6

Tratamiento	Nº de animales	Dosis	Volumen
“FOL-001”* (=SEQ ID NO: 121)	6	60 nM	25 µl
**“FOL-001” consiste en la siguiente secuencia aminoacídica VDVPNGRGDSLAYGLR [SEQ ID NO: 121]			

Esta secuencia es un fragmento de osteopontina de ratón de tipo silvestre, y corresponde a la región de la proteína de la que deriva “FOL-004” (concretamente, “FOL-004” es una versión mutada del fragmento de tipo silvestre “FOL-001”).

30

- Se administró a los animales el tratamiento especificado los días 1, 5 y 9
- Se administraron los tratamientos por inyección subcutánea en piel dorsal pinzada

35 Crterios de puntuación

- Se observó el efecto de los tratamientos y se puntuó como se describe en el Ejemplo B.

Resultados

40

Se muestra en la Tabla 7 y la Figura 6 el efecto del polipéptido “FOL-001” sobre el crecimiento capilar.

Tabla 7

Animal	Día											
	1	2	5	6	7	8	9	12	13	14	15	16
FOL-001 (SEQ ID NO: 121, 60 nM)												
1	0	0	0,5	0,5	0,5	0,5	1	2	2	2,5	2,5	NA
2	0	0	0,5	0,5	0,5	0,5	1	2	2	2,5	2,5	NA
3	0	0	0	0	0	0	0,5	1	1	1	1	NA
4	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	NA
5	0	0	0	0	0	0	0,5	1	1	1	1	NA
6	0	0	0	0	0	0	0,5	1	1	1	1	NA
Media	0	0	0,17	0,17	0,17	0,17	0,58	1,17	1,17	1,33	1,33	-

45 El péptido FOL-001 (SEQ ID NO: 121) producía un efecto de crecimiento capilar retardado pero detectable en

ratones, que se hizo evidente aproximadamente el día 9 y alcanzó una meseta a una puntuación de aproximadamente 1,3.

Conclusiones

5 En comparación con la secuencia peptídica mutada correspondiente de la invención (FOL-004; SEQ ID NO: 5), la secuencia de tipo silvestre equivalente no mutada exhibía un inicio retardado de estimulación del crecimiento capilar con un efecto máximo de menos de un 50 % del observado con FOL-004.

10 Por tanto, el polipéptido ejemplar muestra mucha más eficacia que la secuencia de tipo silvestre no mutada equivalente.

EJEMPLO D –Estudio *in vivo* de la inducción anagénica en piel despellejada

15 Materiales y procedimientos

Los animales y tratamientos son como se describen anteriormente en el Ejemplo B.

Se sacrificaron todos los animales el día 16.

20 Observación de melanogénesis

Después de la terminación del término de valoración de crecimiento capilar para el Ejemplo B, se sacrificaron los animales, se despellejó la piel dorsal y se retiró para observación de la superficie interna.

25 Análisis histológico

Se prepararon secciones de piel despellejada para análisis histológico como se describe en el Ejemplo A. Se midieron entonces el recuento de folículos y el grosor cutáneo.

30 **Resultados**

Se resumen los resultados en las Tablas 8 y 9 siguientes.

35 **Tabla 8**

Observación de melanogénesis					
Grupo	Color de piel (externa)	% de inducción anagénica*	Color negro en la piel despellejada (día 16)	% de inducción anagénica**	Nº de animales que muestra crecimiento capilar
Cx (60 nM)	Negro (5/5 animales)	100	3/5	60	5/5
FOL-004 (60 nM)	Negro (5/5 animales)	100	1/5	20	5/5
FOL-005 (60 nM)	Negro (5/5 animales)	100	3/5	60	5/5
Vehículo	Rosa (4/5 animales)	20	1/5	20	1/5

* con respecto al cambio de color de piel externa de rosa a negro

** con respecto al color negro de la piel despellejada

Tabla 9a (todos los animales)

Grupo	Nº de animales considerados	Media ± EEM	
		Recuento de folículos subcutáneos (nº)	Grosor cutáneo
Cx (60 nM)	5	22,20 ± 10,69	308,8 ± 21,94
FOL-004 (60 nM)	5	6,20 ± 5,80	312,2 ± 15,60
FOL-005 (60 nM)	5	34,80 ± 14,58	348,80 ± 40,05
Vehículo	4*	0 ± 0	246,5 ± 8,35

Grupo	Nº de animales considerados	Media \pm EEM	
		Recuento de folículos subcutáneos (nº)	Grosor cutáneo
* Se encontró que el animal nº 5 era un valor atípico significativo ($p < 0,05$, prueba de Grub) y se ignoró así en el análisis			

Tabla 9b (animales solo en anagenia)

Grupo	Nº de animales considerados	Media \pm EEM	
		Recuento de folículos subcutáneos (nº)	Grosor cutáneo
Cx (60 nM)	3/5	36,67 \pm 10,69	308,8 \pm 21,94
FOL-004 (60 nM)	1/5	29 \pm 58	312,2 \pm 15,60
FOL-005 (60 nM)	3/5	58 \pm 14,58	348,80 \pm 40,05
Vehículo	0/4*	0 \pm 0	246,5 \pm 8,35

El ciclo de crecimiento capilar consiste en tres fases: una fase telogénica de reposo (la piel de C57BL/6 es de color rosa pálido), una fase anagénica de crecimiento capilar activo (donde la piel se vuelve gris oscura o negra) y finalmente una fase catagénica (donde se detiene el crecimiento capilar y la piel vuelve a la fase telogénica, regresando a un color rosa pálido).

En el presente estudio, se preseleccionaron los animales por su piel rosa (fase telogénica) y se administró el polipéptido de ensayo por vía subcutánea/tópica. Un buen promotor del crecimiento capilar desencadena la transición de la fase telogénica en reposo a la fase anagénica activa, y por tanto la transición de piel clara a piel oscura. Esta pigmentación oscura puede ser el resultado de la recogida de melanina en los folículos pilosos, en preparación para el crecimiento capilar nuevo durante la fase anagénica. La síntesis de melanina de los melanocitos foliculares está estrictamente acoplada con la fase anagénica, cesa durante la catagenia y está ausente en la fase telogénica. Por ello, un buen promotor del crecimiento capilar causa el ennegrecimiento de la piel dorsal. Tras la terminación, se extirpó entonces la piel dorsal de los animales por despellejamiento y se invirtió y observó en la piel despellejada la inducción de melanogénesis indicada por un ennegrecimiento visual. El análisis histológico revela el número de folículos y el grosor cutáneo. Un buen promotor del crecimiento capilar aumenta el nº de folículos en la zona subcutánea y el grosor cutáneo.

En el presente estudio, los tres polipéptidos de ensayo condujeron a la aparición de un crecimiento capilar denso después de tres inyecciones subcutáneas (véase el Ejemplo B anterior). Se observó también que, en algunos de los animales, después del crecimiento completo del pelo, el color de la piel cambió de negro a gris y a rosa, una característica de la fase catagénica. La piel despellejada recogida en el estudio mostraba la placa negra indicativa de fase anagénica (fase activa) del ciclo de crecimiento capilar debida a la acumulación de melanocitos. En estos animales, los resultados histológicos mostraban un gran número de folículos pilosos y aumento del grosor cutáneo. Pero, en algunos animales, cuando había ocurrido la fase catagénica, se encontró que la piel despellejada era de color rosa, aunque el recubrimiento de pelo estaba intacto. Por tanto, el análisis de dichas secciones de piel despellejada demostró falta de folículos en la zona subcutánea, pero un buen aumento del grosor cutáneo.

Conclusiones

Los polipéptidos de osteopontina mutados ejemplares de la invención mostraban una inducción pronunciada de anagenia, como se evidenciaba por un aumento del número de folículos pilosos en la zona subcutánea y/o un grosor cutáneo mejorado.

REIVINDICACIONES

1. Una composición para estimular el crecimiento capilar en un mamífero, que comprende:
 - 5 a) un polipéptido de osteopontina modificado en el que está inactivado un dominio RGD; y
 - b) un excipiente, vehículo o diluyente farmacéuticamente y/o cosméticamente aceptable,donde el polipéptido de osteopontina modificado consiste en la secuencia aminoacídica de SEQ ID NO: 63.
- 10 2. Un polipéptido que consiste en la secuencia aminoacídica de SEQ ID NO: 63.

FIGURA 1

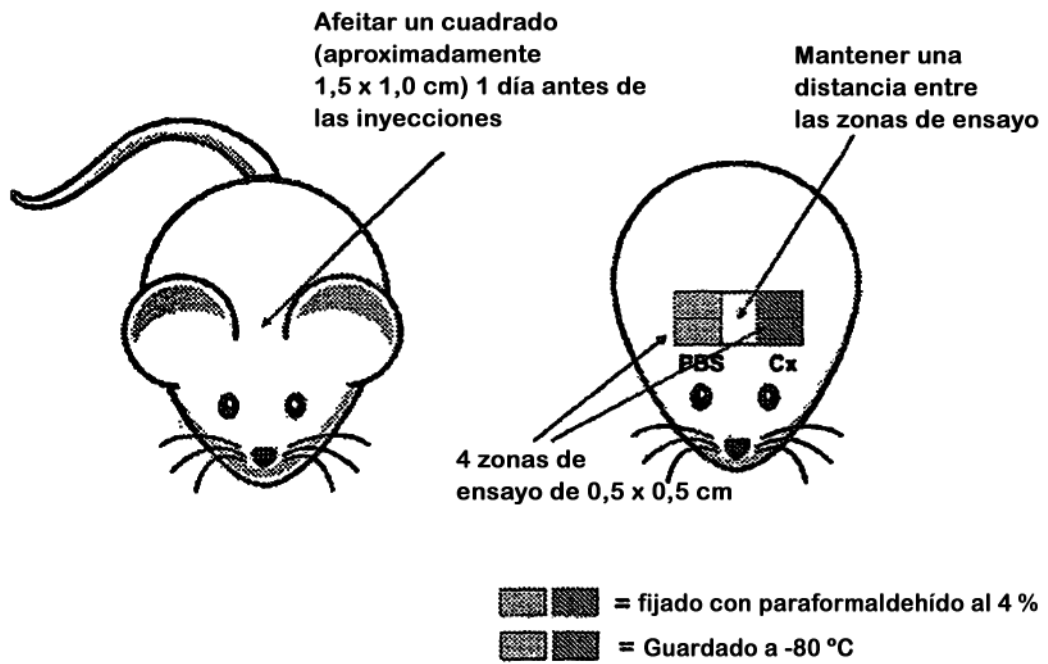


FIGURA 2

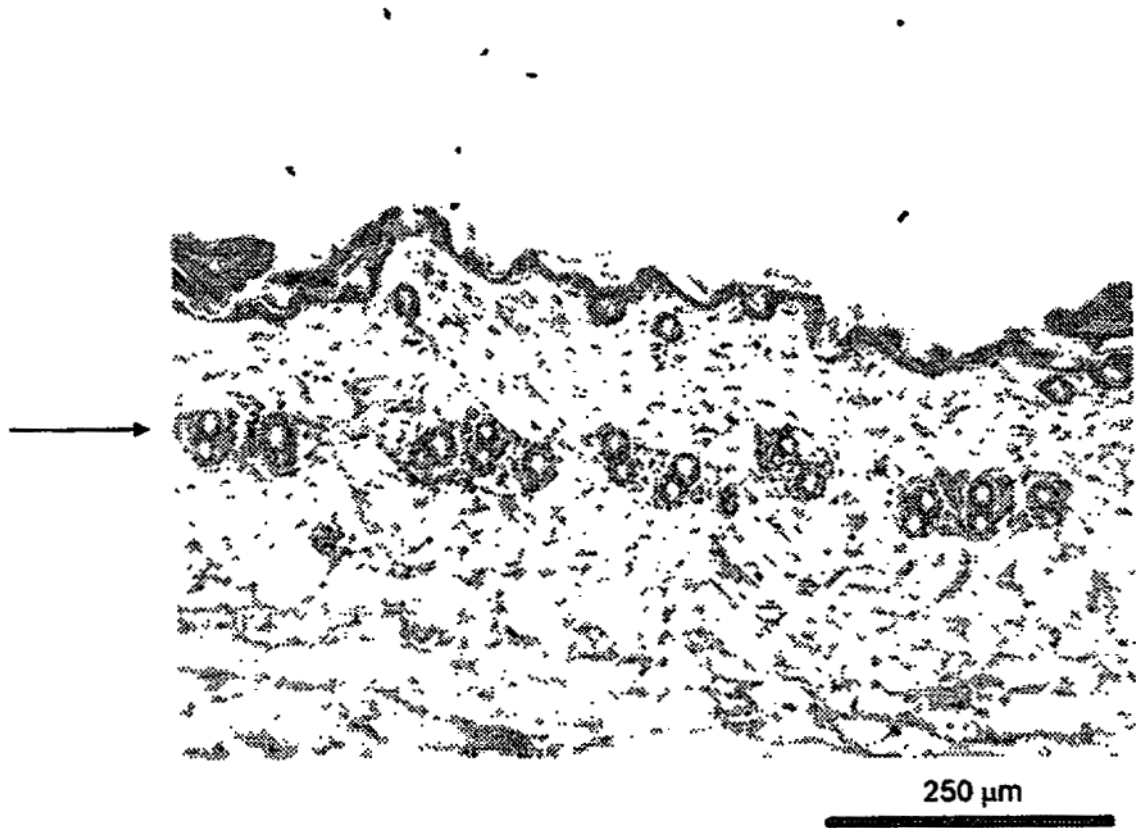


FIGURA 3

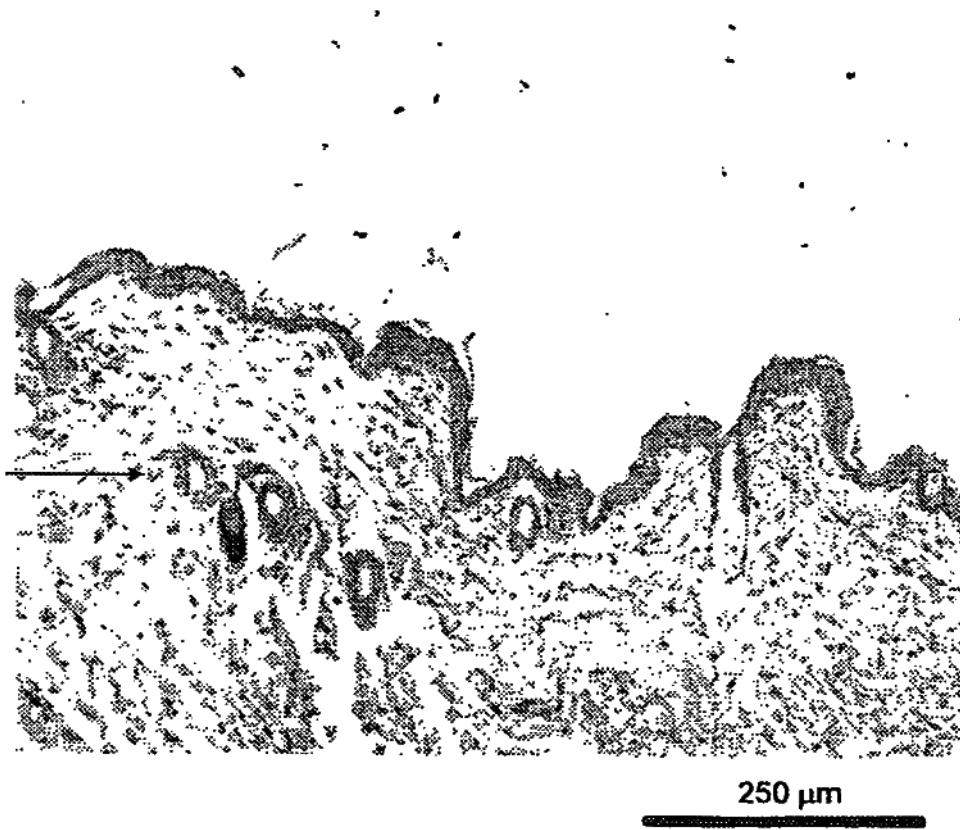


FIGURA 4(A)

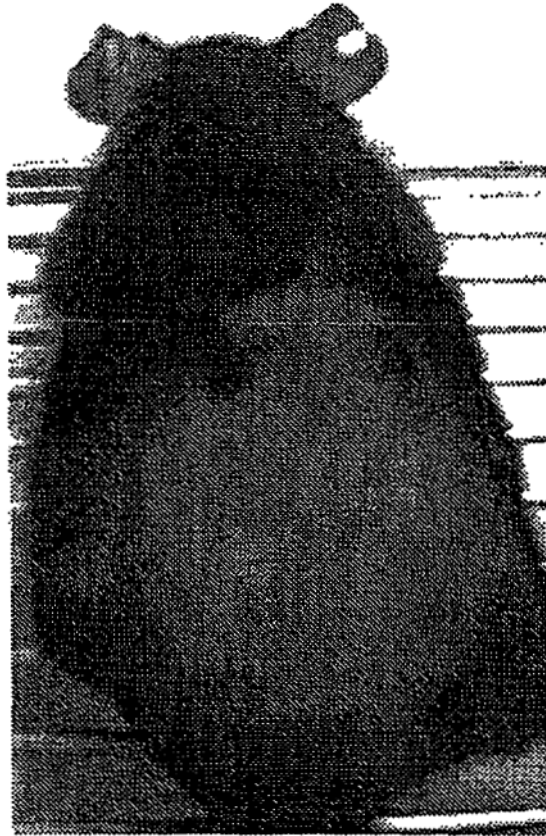


FIGURA 4(B)



FIGURA 4(C)

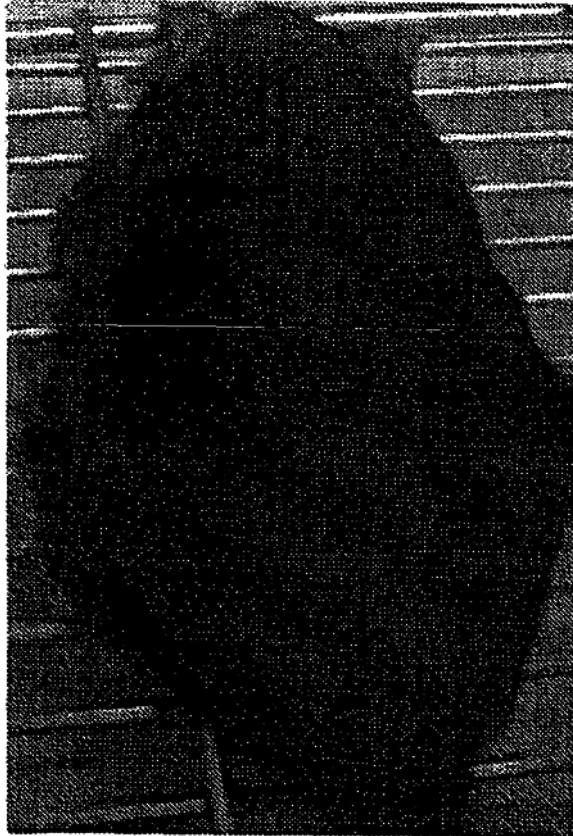


FIGURA 4(D)



FIGURA 5

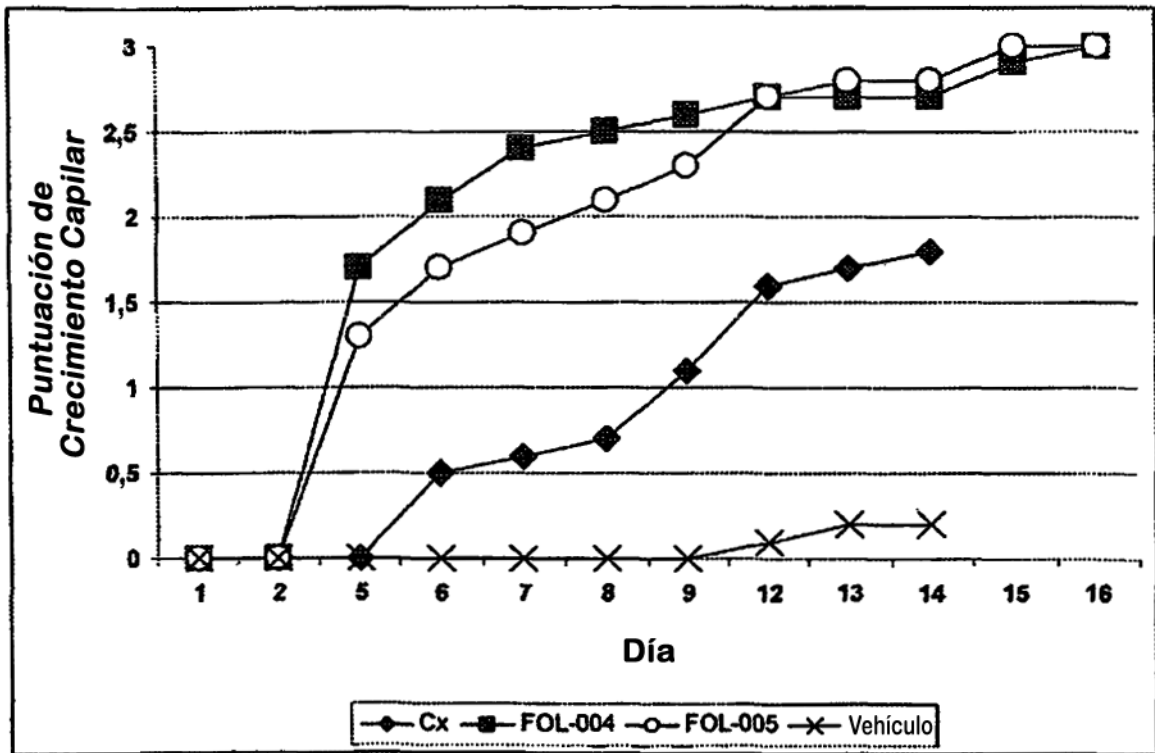


FIGURA 6

