(19) OFICINA ESPAÑOLA DE PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA

(11) Número de publicación: **2 711 133**

(51) Int. CI.:

A61K 31/132 (2006.01)
A61K 8/41 (2006.01)
A61Q 7/00 (2006.01)
A61P 17/14 (2006.01)

(12) TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA T3

(86) Fecha de presentación y número de la solicitud internacional: **26.07.2013 PCT/EP2013/065793**

(87) Fecha y número de publicación internacional: **30.01.2014 WO14016407**

(96) Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **26.07.2013 E 13753286 (7)**

(97) Fecha y número de publicación de la concesión europea: **21.11.2018 EP 2877168**

(54) Título: **Composición farmacéutica o cosmética para tratar la alopecia**

(30) Prioridad:

27.07.2012 IT MI20121323

(45) Fecha de publicación y mención en BOPI de la traducción de la patente:
30.04.2019

(73) Titular/es:

GIULIANI S.P.A. (100.0%)
Via Palagi, 2
20129 Milano, IT

(72) Inventor/es:

GIULIANI, GIAMMARIA;
PAUS, RALF;
BENEDUSI, ANNA;
MARZANI, BARBARA y
BARONI, SERGIO

(74) Agente/Representante:

RUO , Alessandro

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

Composición farmacéutica o cosmética para tratar la alopecia

Campo de la invención

[0001] La presente invención se refiere a una composición farmacéutica o cosmética para tratar la alopecia y, en general, para combatir la pérdida excesiva de cabello. La invención se define mediante las reivindicaciones. Cualquier materia objeto que no pertenezca al alcance de las reivindicaciones se proporciona a título meramente informativo.

Técnica anterior

[0002] El folículo piloso (FP) es uno de los niniórganos más complejos del cuerpo humano, con capacidad para regenerarse. El ciclo de crecimiento del cabello durante la vida postnatal describe los cambios morfohistológicos en el tallo y el folículo a lo largo del tiempo. La actividad cíclica comienza con la producción de cabello, seguida de un rápido crecimiento y alargamiento del tallo (fase anágena). Posteriormente, el folículo y el cabello experimentan una regresión impulsada por la apóptosis (fase catágena), seguida de una fase de reposo (telógeno) y, finalmente, una fase de pérdida de cabello (exógeno).

[0003] Estas transformaciones implican una rápida remodelación de los componentes epiteliales y dérmicos basados en los cambios en la expresión y/o actividad de las citocinas, hormonas, enzimas, neurotransmisores y sus receptores afines, y factores de transcripción que se reconocen como mediadores clave del ciclo capilar.

[0004] Todos los pelos del cuerpo están sujetos a un ciclo de vida similar, aunque la extensión, la duración de las fases y la longitud del tallo varían entre las diferentes zonas del cuerpo y entre los individuos, dependiendo de su programación genética, edad y estado de salud. Por otra parte, son muchos los reguladores que participan en la biología del cabello, afectando a la morfogénesis y regulando el inicio de la fase anágena y la duración.

[0005] Existen varias hormonas que participan en la regulación del ciclo de crecimiento del cabello, incluyendo la melatonina, la prolactina, la hormona estimulante de los melanocitos (HEM), la hormona tiroidea y los estrógenos. Por ejemplo, se ha encontrado que la prolactina participa en la regulación del crecimiento capilar tanto en ratones como en seres humanos.

[0006] Muchos de estos reguladores pueden ser diana de los tratamientos clínicos. Por ejemplo, excluyendo los folículos del pubis y las axilas, los andrógenos requieren la enzima 5α-reductasa, que es capaz de metabolizar la testosterona a 5α-dihidrotestosterona (DHT), el metabolito más potente. De hecho, este es un mecanismo usado tanto en el campo clínico como en el cosmético para contrarrestar la pérdida de cabello en los casos de alopecia androgenética. A diferencia de la pérdida de cabello, el crecimiento excesivo de cabello puede ser un problema, en particular, para las mujeres. En contraste con la alopecia androgenética, el hirsutismo y la hipertricosis se deben a una fase anágena extendida acompañada de un agrandamiento anómalo de los folículos pilosos.

[0007] Los tratamientos habituales para combatir este estado son el uso de cremas y ceras depilatorias, que solo alivian el problema temporalmente, ya que la irritación o el desgarro inducen rápidamente la fase anágena del folículo piloso y a que vuelva a crecer. Otros sistemas usados son la electrólisis y la fototermólisis selectiva, con el uso de láseres para destruir el tallo piloso y la papila dérmica de los folículos pilosos. Los últimos tratamientos disponibles son muy agresivos.

[0008] Para resolver estos problemas, se necesitan métodos nuevos y más eficaces. En las últimas décadas, existe un particular interés científico en el papel de la ornitina descarboxilasa (ODC) y las poliaminas en el ciclo capilar. Este interés se debe principalmente al hecho de que el folículo es uno de los órganos más proliferativos. La ODC, la enzima limitante de la velocidad en la biosíntesis de la poliamina, es una diana para los fármacos inhibidores (tales como la eflornitina), que produce una reducción de la velocidad del crecimiento del vello facial *in vivo* y la inhibición del crecimiento del cabello humano en el cultivo de órganos.

[0009] Para fines clínicos, para controlar la cantidad de cabello producido, una estrategia es cambiar la duración de la fase anágena, acortándola en los casos de hirsutismo o aumentándola para combatir la alopecia. En general, los trastornos del folículo humano tales como el hirsutismo, las canas y la alopecia tienen efectos negativos considerables en la psique y la autoestima de los individuos afectados.

[0010] La patente EP 1469843 del mismo solicitante describe una composición para uso farmacéutico, cosmético o dietético para combatir la pérdida de cabello, en la que el principio activo es la poliamina, conocida como espermidina o *N'*-(3-aminopropil)-1,4-diaminobutano, tanto para uso oral como para uso tópico en el cuero cabelludo. La fórmula para la espermidina es: H_2N-$(CH_2)_3$-NH-$(CH_2)_4$-NH_2.

[0011] Esta patente informa sobre pruebas experimentales de que una composición que contiene espermidina,

como tal y en combinación con otros micronutrientes añadidos, puede retardar y detener la pérdida excesiva de cabello y, al mismo tiempo, mejorar la resistencia y el estado general de salud del mismo. La prueba de tracción mostró que la espermidina aumenta la resistencia a la tracción del cabello, mientras que el tricograma y la prueba de lavado mostraron las mejoras que se producen en el bulbo piloso. Además de una reducción sustancial en el número de pelos perdidos tras el lavado, también se reduce el número de pelos perdidos en la fase telógena (pérdida patológica) con respecto al número de pelos perdidos en la fase exógena (pérdida por reemplazo natural). Por tanto, el tratamiento con espermidina mejora sustancialmente el ciclo capilar alterado por la enfermedad de la pérdida de cabello en el telógeno, devolviéndolo a los niveles fisiológicos normales. La espermidina es, por lo tanto, un principio activo eficaz para combatir la alopecia.

[0012] Sin embargo, la espermidina, al igual que otras poliaminas, está sujeta a oxidación, en especial, en el caso de la aplicación tópica en el cuero cabelludo, en la que el compuesto permanece en contacto prolongado con el aire durante algún tiempo antes de ser absorbido por la piel y realizar su acción. Cualquier oxidación de la espermidina durante este tiempo antes de la absorción generaría productos de oxidación que ya no son activos, si no potencialmente dañinos.

[0013] La presente invención tiene como objetivo principal encontrar una solución a este problema. De las soluciones teóricas, la posible protección química de los grupos funcionales amina sometidos a oxidación, en general, no parece ser adecuada en la práctica, en especial, en vista de la técnica anterior resumida por las siguientes patentes.

[0014] El documento WO9937277 describe poliaminas sustituidas para reducir el crecimiento del vello de los mamíferos mediante la selección de una zona de la piel donde se va a producir este efecto y aplicar en esta zona de la piel una composición dermatológicamente aceptable, que comprende una poliamina sustituida como inhibidor de la vía de la hipusina biosintética, en una cantidad que reduce eficazmente el crecimiento del vello. El crecimiento del vello no deseado en los mamíferos, incluyendo los seres humanos, en particular, el crecimiento del vello estimulado por los andrógenos, puede reducirse tanto en casos de crecimiento normal como en casos de un aumento debido a anomalías o trastornos (por ejemplo, hirsutismo). El documento WO02062341 se refiere a una composición farmacéutica adecuada para la aplicación tópica en un ser humano y otro mamífero para controlar el crecimiento del vello en la zona en la que se aplica, que comprende una cantidad eficaz de una poliamina sustituida o una sal de la misma. En este caso, se describe un mecanismo de inhibición de la ODC (ornitina descarboxilasa) a partir de poliamina, que se une irreversiblemente a la ODC presente en la célula para evitar que la ODC catalice la descarboxilación de la ornitina en putrescina. De acuerdo con esta patente, se puede regular el crecimiento del vello aplicando determinadas poliaminas sustituidas, que evitan principalmente la formación de ODC en las células en las que se absorben, en seres humanos y otros mamíferos. De esta manera, en lugar de actuar como verdaderos inhibidores de la ODC, se cree que las poliaminas sustituidas en cuestión funcionan al prevenir la síntesis de la ODC. Los ejemplos experimentales de este documento muestran que la poliamina administrada, en este caso, la dietil-homoespermina, detiene el crecimiento del pelo afeitado en ratones.

Sumario de la invención

[0015] En cualquier caso, independientemente del mecanismo biológico que haya detrás del efecto final logrado para prevenir el crecimiento del cabello, esta técnica anterior conocida no fomenta, como una hipotética solución práctica, la solución de sustituir la espermidina con grupos funcionales para obtener un efecto opuesto de estimulación del crecimiento en la zona de aplicación sobre la piel del cuero cabelludo, que es el objeto de la presente invención.

[0016] Al mismo tiempo, un objeto adicional de la presente invención es proporcionar compuestos que pueden ser, al menos para algunas propiedades, incluso más activos que la espermidina para combatir la pérdida de cabello.

Descripción detallada de la invención

[0017] Contrariamente a lo que podría suponerse a partir de la técnica anterior resumida anteriormente, según la presente invención, se ha encontrado ahora que, sorprendentemente, los siguientes compuestos de fórmula (I) RN^1-espermidina o 1,4-butanodiamina, *N*-(3-aminopropil)-N^1-R,

(I) $H_2N\text{-}(CH_2)_3\text{-}N^1(R)\text{-}(CH_2)_4\text{-}NH_2$

en la que R es un sustituyente unido a la función amina secundaria de la espermidina, seleccionado entre:

- grupos alquilo saturados, lineales o ramificados, que consisten en de 1 a 6 átomos de carbono, tales como metilo, etilo, propilo, isopropilo, butilo, isobutilo, pentilo, hexilo;
- grupo cicloalquilo saturado que es ciclohexilo;
- o una de sus sales farmacéuticamente aceptables,

tienen una actividad contra la pérdida capilar esencialmente comparable a la de la espermidina, pero sin estar sujetos al problema de la oxidación en presencia de aire ambiental durante la aplicación tópica en el cuero cabelludo. De hecho, son tan estables con respecto al aire, que hacen posible una aplicación eficaz para uso tópico en el cuero cabelludo sin transformarse en subproductos oxidados que son inactivos o no activos de acuerdo con los objetos de la presente invención.

[0018] En particular, también, sorprendentemente, estos compuestos de acuerdo con la presente invención resultan ser más activos que la espermidina para combatir la alopecia, al menos con respecto a las propiedades particulares como se ha descrito anteriormente.

[0019] Por lo tanto, la presente invención se refiere al uso cosmético de estos compuestos de R-N^1-espermidina (I) para combatir la pérdida de cabello y a composiciones farmacéuticas que los comprenden como principios activos, para su uso en combatir la pérdida capilar.

[0020] Un compuesto preferido de fórmula (I) de acuerdo con la presente invención es N^1-metilespermidina o *N*-(3-aminopropil)-N^1-metil-1,4-butanodiamina (número de registro CAS 51460-23-2), de fórmula:

(II) $H_2N\text{-}(CH_2)_3\text{-}N^1(CH_3)\text{-}(CH_2)_4\text{-}NH_2$

usado en una composición de acuerdo con la invención como tal o como una sal farmacéuticamente aceptable, por ejemplo, triclorhidrato (3HCl)) o trimaleato. Un compuesto preferido adicional de fórmula (I) de acuerdo con la presente invención es N^1-ciclohexilespermidina o *N*-(3-aminopropil)-N^1-ciclohexil-1,4-butanodiamina (número de registro 183070-28-2),de fórmula:

(III) $H_2N\text{-}(CH_2)_3\text{-}N^1(C_6H_{11})\text{-}(CH_2)_4\text{-}NH_2$

usado en una composición de acuerdo con la invención como tal o como una sal farmacéuticamente aceptable, por ejemplo, triclorhidrato (3HCl)) o trimaleato. Un compuesto preferido adicional de fórmula (I) de acuerdo con la presente invención es N^1-etilespermidina o *N*-(3-aminopropil)-N^1-etil-1,4-butanodiamina (número de registro CAS 97141-36-1), de fórmula:

(IV) $H_2N\text{-}(CH_2)_3\text{-}N^1(C_2H_5)\text{-}(CH_2)_4\text{-}NH_2$

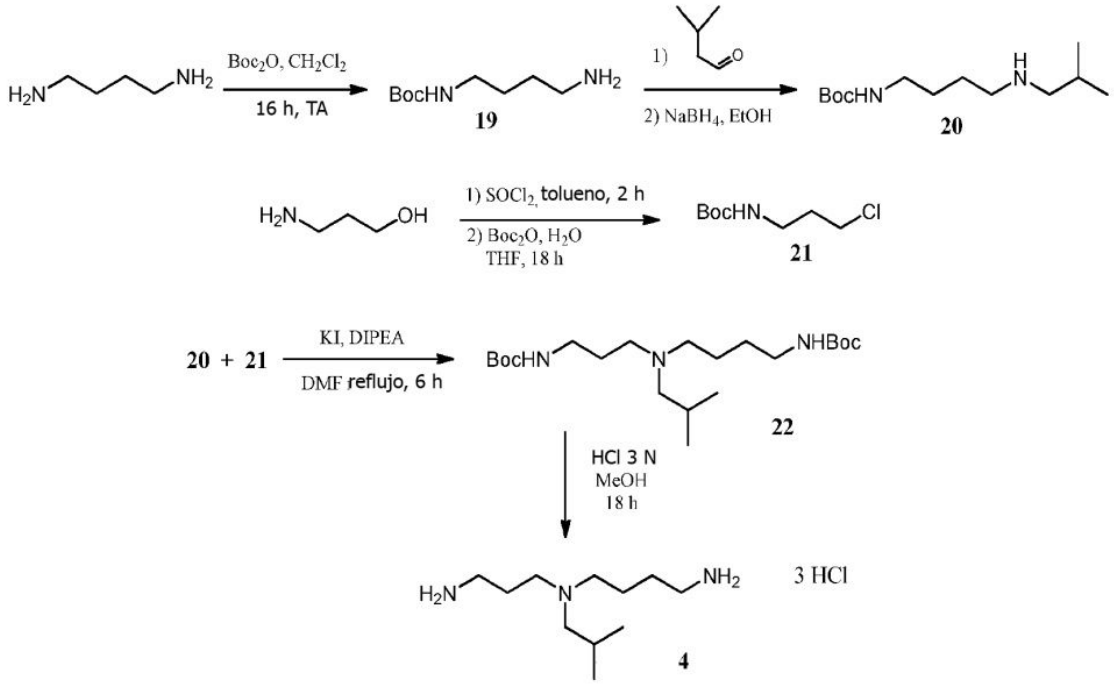
usado en una composición de acuerdo con la invención como tal o como una sal farmacéuticamente aceptable, por ejemplo, triclorhidrato (3HCl)) o trimaleato. Un compuesto preferido adicional de fórmula (I) de acuerdo con la presente invención es N^1-propilespermidina o *N*-(3-aminopropil)-N^1-propil-1,4-butanodiamina (número de registro 62659-14-7),de fórmula:

(V) $H_2N\text{-}(CH_2)_3\text{-}N^1(C_3H_7)\text{-}(CH_2)_4\text{-}NH_2$

usado en una composición de acuerdo con la invención como tal o como una sal farmacéuticamente aceptable, por ejemplo, triclorhidrato (3HCl)) o trimaleato. Un compuesto preferido adicional de fórmula (I) de acuerdo con la presente invención es N^1-isobutilespermidina o *N*-(3-aminopropil)-N^1-isobutil-1,4-butanodiamina, de fórmula:

(VI) $H_2N\text{-}(CH_2)_3\text{-}N^1(C_4H_9)\text{-}(CH_2)_4\text{-}NH_2$

usado en una composición de acuerdo con la invención como tal o como una sal farmacéuticamente aceptable, por ejemplo, triclorhidrato (3HCl)) o trimaleato. Este compuesto (VI) no se conoce en la bibliografía. Por lo tanto, a continuación, se describe un método para sintetizarlo, haciendo referencia al siguiente esquema de reacción, en el que el compuesto (VI) se separa como compuesto 4.



[0021] Síntesis del compuesto 19: se disolvió butanodiamina (1 g, 0,0113 mol, 5 eq) en CH_2Cl_2 (15 ml). A la solución, se añadió Boc_2O (0,619 g, 0,00283 mol, 1 eq) disuelto en CH_2Cl_2 (15 ml). La mezcla de reacción se dejó en agitación a TA durante 16 horas. Se evaluó la estructura del producto mediante TLC CH_2Cl_2 8/MeOH 2/NH_4O ac. 33 % 0,2. Se filtró la suspensión formada, y se secó el filtrado mediante un evaporador rotatorio. Se eluyó el residuo aceitoso con EtOAc (15 ml) y se lavó con una solución saturada de NaCl (3 x 10 ml) para eliminar el exceso de diamina sin reaccionar. Se deshidrataron los extractos orgánicos sobre sulfato de sodio y se evaporaron. Se obtuvieron 0,520 g de un aceite amarillo. Rendimiento 97,65 %. RMN ^1H (400 MHz, $CDCl_3$) δ 1,38 (s, 9H), 1,52-1,59 (m, 4H), 2,34 (s a, 2H, intercambio de D_2O), 2,72-2,79 (m, 2H), 3,19-3,24 (m, 2H), 5,95 (s a, 1H, intercambio de D_2O).

[0022] Síntesis del compuesto 20: se disolvió el compuesto anteriormente mencionado 19 (0,358 g, 0,00190 mol, 1 eq) en EtOH (5 ml). A la solución, se añadieron tamices moleculares 3 A e isobutiraldehído (0,137 g, 0,00190 mol, 0,17 ml, 1 eq). La mezcla de reacción se agitó a TA durante 18 horas. Se añadió $NaBH_4$ (0,144 g, 0,0038 mol, 2, eq), y se agitó la mezcla a TA durante 16 h. Se evaluó la estructura del producto mediante TLC CH_2Cl_2 9/MeOH 1/NH_4OH ac. 33 % 0,1. Se evaporó el disolvente y se eluyó el residuo aceitoso con CH_2Cl_2 (10 ml) y se lavó con una solución saturada de NaCl (5 ml). Se deshidrataron los extractos orgánicos sobre sulfato de sodio y se evaporaron, y el residuo obtenido se purificó mediante cromatografía ultrarrápida usando una mezcla de CH_2Cl_2 9/MeOH 1/NH_4OH ac. 33 % 0,1 como fase eluyente. Se obtuvieron 0,215 mg de un aceite incoloro. Rendimiento 46,33 %. RMN de ^1H (400 MHz, $CDCl_3$) δ 0,88 (d, 6H, *J* = 6,8 Hz), 1,41 (s, 9H), 1,49-1,52 (m, 4H), 1,72-1,75 (m, 1H), 2,38 (d, 2H, *J* = 7,2 Hz), 2,59 (t, 2H, *J* = 6,6 Hz), 3,07-3,09 (m, 2H), 4,95 (s a, 1H, intercambio de D_2O).

[0023] Síntesis del compuesto 21: se disolvió aminopropanol (0,49 g, 0,51 ml, 0,00652 mol, 1 eq) en tolueno (5 ml). A la solución, se añadió $SOCl_2$ (3,10 g, 1,90 ml, 0,00261 mol, 4 eq) en un baño con hielo. La mezcla de reacción se agitó a la temperatura de reflujo durante 2 horas. Se evaluó la estructura del producto mediante TLC CH_2Cl_2 9/MeOH 1/NH_4OH ac. 33 % 0,1. Se evaporó el disolvente y se eluyó el residuo aceitoso con H_2O (10 ml), y se lavó con CH_2Cl_2 (5 ml). La fase acuosa se usó sin purificaciones adicionales en la siguiente etapa, se añadió Net3 (0,659 mg, 0,9 ml, 0,00652 mol, 1 eq) a la solución, y se agitó la mezcla a TA durante 30 minutos. Se añadió una solución de Boc_2O (1,42 g, 0,00652 mol, 1 eq) en THF (10 ml). La mezcla de reacción se agitó a TA durante 18 horas. La desaparición del producto de partida se evaluó mediante TLC de éter de petróleo 8/EtOAc 2. Los disolventes se evaporaron y el residuo se eluyó con EtOAc y se lavó con H_2O. Se deshidrataron los extractos orgánicos sobre sulfato de sodio y se evaporaron. Se obtuvieron 1,23 g de un aceite marrón. Rendimiento 97,70 %. RMN ^1H (400 MHz, $CDCl_3$) δ 1,43 (s, 9H), 1,94-1,97 (m, 2H), 3,26 (t, 2H, *J* = 6,4 Hz), 3,58 (t, 2H, *J* = 6,4), 4,75 (s a, 1H, intercambio de D_2O).

[0024] Síntesis del compuesto 22: se disolvió el compuesto anteriormente mencionado 20 (0,120 g, 0,00049 mol, 1 eq) en DMF (3 ml). A la solución, se añadió el compuesto 21 anteriormente mencionado (0,104 g, 0,00054 mol, 1,1 eq) disuelto en DMF (2 ml). La mezcla de reacción se agitó a la temperatura de reflujo durante 6 horas. Se evaluó la estructura del producto mediante TLC CH_2Cl_2 9/MeOH 1/NH_4OH ac. 33 % 0,03. Se evaporó el disolvente y

se purificó el residuo aceitoso mediante cromatografía ultrarrápida usando una mezcla de CH_2Cl_2 9/MeOH 1/NH_4OH ac. 33 % 0,03 como la fase eluyente. Se obtuvieron 0,084 mg de un aceite amarillo. Rendimiento 42,71 %. RMN de ^1H (400 MHz, $CDCl_3$) δ 0,87 (d, 6H, *J* = 6,8 Hz), 1,43 (s, 18H), 1,57-1,61 (m, 7H), 1,98-2,01 (m, 2H), 2,31-2,35 (m, 2H), 2,38-2,42 (m, 2H), 3,10-3,12 (m, 2H), 3,16-3,18 (m, 2H), 4,72 (s a, 1H, D_2O de intercambio), 5,69 (s a, 1H, intercambio de D_2O).

[0025] Síntesis del compuesto 4: sobre dicho compuesto 22 (0,084 g, 0,00021 mol, 1 eq), disuelto en MeOH (2 ml) y mantenido en un baño de hielo, se gotea HCl 3 N (10 ml). La mezcla de reacción se agitó a temperatura ambiente durante 18 horas. Se evaluó la desaparición del producto de partida mediante TLC (CH_2Cl_2 9/MeOH 1/NH_4OH ac. 0,03. Se evaporó el MeOH y se lavó el residuo acuoso con éter etílico (2 x 8 ml) y se secó. Se obtuvieron 0,065 g de compuesto 4 en forma de una sal triclorhidrato. Rendimiento 100 %. RMN de ^1H (400 MHz, D_2O) δ 1,02 (d, 6H, *J* = 6,8 Hz), 1,76-1,78 (m, 2H), 1,79-1,84 (m, 2H), 2,14-2,17 (m, 3H), 3,06-3,25 (m, 6H), 3,26-3,33 (m, 4H); RMN de ^{13}C (100 MHz, D_2O) δ 19,27; 20,15; 21,26; 23,83; 28,92; 36,52; 38,77; 50,18; 52,66; 58,88; 60,59. MS (ESI+) m/z = 202 (M+H)+
Las Fig. 7, 8 y 9 de los dibujos adjuntos muestran, respectivamente, RMN de ^1H, RMN de ^{13}C y espectros de masas del compuesto 4, es decir, de fórmula (VI) como se ha definido anteriormente.

COMPOSICIONES DE EJEMPLO

[0026] A continuación, se describen algunos ejemplos de composiciones de acuerdo con la invención para uso tópico en el cuero cabelludo a modo de ejemplo no limitante. En los ejemplos siguientes, se hace referencia a la N^1-metil-espermidina por el nombre INCI correspondiente necesario para su uso en productos cosméticos, en concreto: N-metilespermidina. Esto también se aplica al resto de compuestos de la invención dados como ejemplos.

Ejemplo 1

TRATAMIENTO DE CHAMPÚ PARA REDUCIR LA PÉRDIDA CAPILAR

[0027]

Componente (denominación INCI)	Cantidad % p/p
Laureth-sulfosuccinato de disodio	1,00-5,00
Laureth-sulfato de magnesio	5,00-9,00
Cocoato de glicerilo de PEG-7	0,50-1,00
Cocamida-MIPA	0,50-2,00
Gliceril-palmato hidrogenado de PEG-200	0,50-2,00
Policuaternio-10	0,10-0,50
Lauroil-sarcosinato de sodio	1,00-4,00
EDTA tetrasódico	0,05-0,20
N-metilespermidina	0,001-0,30
Biotina	0,01-0,10
Pantotenato de calcio	0,01-3,0
Proteína de trigo undecilenoílo potásico	0,50-1,00
Laureth-4	0,01-0,80
Perfume	0,10-0,80
Glicol-diestearato	0,50-1,00
Laureth-7	0,50-0,80
Cocoanfoacetato de sodio	0,05-3,00
Cocoamidopropil-betaína	0,01-2,00
Laureth-sulfato de sodio	0,01-3,00
Hidroximetilglicinato de sodio	0,20-0,45
Hidróxido sódico	c.s.
Ácido cítrico	c.s.
Agua	c.s. 100,00

Ejemplo 2

TRATAMIENTO DE LOCIÓN PARA REDUCIR LA PÉRDIDA CAPILAR

[0028]

Componente (denominación INCI)	Cantidad % p/v
Agua	c.s. 100 ml
Hialuronato de hidroxipropiltrimonio	0,005-0,50
Poliuretano-26	0,004-4,0
Lecitina (*Glycine max L.*)	0,005-5,0

Componente (denominación INCI)	Cantidad % p/v
Alcohol desnaturalizado	15,0-20,0
N-metilespermidina	0,005-0,30
Biotina	0,01-0,10
Pantotenato de calcio	0,1-3,0
Rutina	0,001-0,05
Aceite de ricino hidrogenado de PEG-40	0,5-2,0
Di-*t*-butil-4-hidroxihidrocinnamato de octadecilo	0,05
Perfume	0,20
Zeaxantina	0,002-0,01
Aceite de semilla de *Helianthus annuus*	0,001-0,01
Ácido láctico	c.s. para pH 5,0

Ejemplo 3

ACONDICIONADOR BALSÁMICO DE AYUDA EN LA REDUCCIÓN DE LA PÉRDIDA CAPILAR

[0029]

Componente (denominación INCI)	Cantidad % p/v
Agua	c.s. 100 ml
Alcohol cetearílico	0,50-7,00
Aceite de ricino hidrogenado de PEG-40	0,50-2,00
Cloruro de estearalconio	0,10-2,00
N-metilespermidina	0,010-0,30
EDTA disódico	0,025-0,05
Perfume	0,20
Hidroximetilglicinato de sodio	0,20-0,45
Ácido láctico	c.s. para pH 5,0

Ejemplo 4

TRATAMIENTO BALSÁMICO PARA REDUCIR LA PÉRDIDA CAPILAR

[0030]

Componente (denominación INCI)	Cantidad p/v (%)
Agua	c.s. 100 ml
EDTA disódico	0,025-0,05
Xilitol	0,50-1,50
Pantenol	0,50-1,50
Hidroxietilcelulosa	0,10-0,90
Cloruro de cetrimonio	0,50-5,00
Copolímero de bis-Isobutil-PEG/PPG-20/35/Amodimeticona	0,05-0,75
Etilhexanoato de cetilo	0,05-1,00
Polisorbato 80	0,05-4,00
Butilenglicol	0,05-3,00
Ciclopentasiloxano	0,10-3,00
Lactato de alquilo C_{12-13}	0,50-5,00
Glicerilestearato	1,00-5,00
Estearato de PEG-100	0,50-4,00
Dimeticona	1,00-4,00
Dimeticonol	0,10-0,80
Alcohol cetearílico	1,00-5,00
Fenoxietanol	0,30-0,90
Caprililglicol	0,30-0,90
Zeaxantina	0,00005-0,00030
Rutina	0,0005-0,003
N-metilespermidina	0,00010-0,15
Perfume	0,10-0,30

Ejemplo 5

TRATAMIENTO CAPILAR DE SUERO INTENSIVO

[0031]

Componente (denominación INCI)	Cantidad % p/v
Agua	c.s. 100 ml
Alcohol desnat. Tipo C	10,00-20,00
Pantotenato de calcio	0,05-2,00
N-metilespermidina	0,05-0,210
Octatrienoato de potasio	0,001-0,18
Biotina	0,005-0,020
Extracto de hoja de *Ajuga reptans*	0,001-0,10
Fermento de soja de lactobacilo	0,01-0,15
Pantenol	0,10-1,00
Hialuronato de hidroxipropiltrimonio	0,002-0,50
Poliuretano-26	0,004-4,0
Lecitina (*Glycine max L.*)	0,005-5,0
Aceite de ricino hidrogenado de PEG-40	0,50-2,00
Perfume	0,10-0,30
Hidroxipropil guar	0,10-0,40
Etoxidiglicol	0,10-0,70
Ácido láctico	0,05-0,50

Ejemplo 6

TRATAMIENTO ANTIPÉRDIDA DE SUERO INTENSIVO

[0032]

Componente (denominación INCI)	Cantidad % p/v
Agua c.s.	100 ml
Glicerina	di1,00-8,00
Copolímero de acriloil-dimetiltaurato de amonio/VP	0,50-5,00
Ciclopentasiloxano	1,00-8,00
Fenoxietanol	0,30-0,90
Perfume	0,10-0,70
Cuaternio de silicona-15	0,20-1,90
Dimeticona	0,10-6,00
Glicirrizato de amonio	0,05-0,75
Pareth-5 C_{11-15}	0,05-1,00
Pareth-9 C_{11-15}	0,05-1,00
EDTA disódico	0,025-0,05
N-metilespermidina	0,025-0,210
Pantotenato de calcio	0,010-0,50
Etilparabeno	0,010-0,030
Metilparabeno	0,05-0,120
Trideceth-5	0,010-0,40
Trideceth-10	0,010-0,40
Ácido láctico	c.s. para pH 4,5

Ejemplo 7

TRATAMIENTO DE CHAMPÚ PARA REDUCIR LA PÉRDIDA CAPILAR

[0033]

Componente (denominación INCI)	Cantidad % p/p
Laureth-sulfosuccinato de disodio	1,00-5,00
Laureth-sulfato de magnesio	5,00-9,00
Cocoato de glicerilo de PEG-7	0,50-1,00
Cocamida-MIPA	0,50-2,00
Gliceril-palmato hidrogenado de PEG-200	0,50-2,00
Policuaternio-10	0,10-0,50
Lauroil-sarcosinato de sodio	1,00-4,00
EDTA tetrasódico	0,05-0,20
Trimaleato de *N*-metilespermidina	0,002-0,60
Biotina	0,01-0,10
Pantotenato de calcio	0,01-3,0
Proteína de trigo undecilenoílo potásico	0,50-1,00

Laureth-4	0,01-0,80
Glicol-diestearato	0,50-1,00
Hidroximetilglicinato de sodio	0,20-0,45
Agua	c.s. 100,00

Ejemplo 8

TRATAMIENTO DE LOCIÓN PARA REDUCIR LA PÉRDIDA CAPILAR

[0034]

Componente (denominación INCI)	Cantidad % p/v
Agua	70-90
Alcohol etílico	10-20
Aceite de ricino hidrogenado de polioxietileno	0,5-2,5
Solución de ácido láctico 80 %	0,2-0,4
Trimaleato de *N*-metilespermidina	0,05-0,3
Perfume Agrumes 2807/03	0,05-0,3
Hialuronato de hidroxipropiltrimonio	0,01-0,1
Lecitina NAT 8539	0,01-0,1
Di-*t*-butil-4-hidroxihidrocinnamato de octadecilo	0,01-0,1
Fluorolink 5032	0,01-0,1

Ejemplo 9

GEL FORTIFICANTE PARA EL PEINADO

[0035]

Componente (denominación INCI)	Cantidad % p/v
Agua	85-95
Polímero Fixate PLUS	1,5-3,5
Aceite de ricino hidrogenado de PEG-40	1-3
Perfume	0,5-2
Sorbitol	0,5-2
Hidroximetilglicinato de sodio	0,5-2
Hidroxipropil guar	0,2-1,2
Benzofenona-4	0,05-1
Gafquat 755N	0,05-1
EDTA disódico dihidratado	0,05-1
Taurina	0,025-0,1
D-pantotenato de calcio	0,01-0,05
Rutina	0,005-0,02
Zeaxantina	0,005-0,02
Extracto seco de *Ajuga reptans*	0,005-0,02
Trimaleato de *N*-metilespermidina	0,0015-0,006
Biotina	0,0001-0,0004

Ejemplo 10

TRATAMIENTO DE LOCIÓN PARA REDUCIR LA PÉRDIDA CAPILAR

[0036]

Componente (denominación INCI)	Cantidad % p/v
Alcohol desnat.	15,0-20,0
N-(3-aminopropil)-N1-isobutil-1,4-butanodiamina	0,005-0,30
Biotina	0,01-0,10
Pantotenato de calcio	0,1-3,0
Rutina	0,001-0,05
Aceite de ricino hidrogenado de PEG-40	0,5-2,0
Di-*t*-butil-4-hidroxihidrocinnamato de octadecilo	0,05
Zeaxantina	0,002-0,01
Ácido láctico	c.s. para pH 5,0
Agua	c.s. 100 ml

Ejemplo 11

TRATAMIENTO CAPILAR DE SUERO INTENSIVO

[0037]

Componente (denominación INCI)	Cantidad % p/v
Alcohol desnat. Tipo C	10-20
N-(3-aminopropil)-N1-etil-1,4-butanodiamina	0,05-0,2.0
Hialuronato de hidroxipropiltrimonio	0,002-0,5
Poliuretano-26	0,004-4,0
Lecitina (*Glycine max L.*)	0,005-5,0
Aceite de ricino hidrogenado de PEG-40	0,50-2,0
Hidroxipropil guar	0,10-0,4
Etoxidiglicol	0,10-0,7
Ácido láctico	0,05-0,5
Agua	c.s. 100 ml

SECCIÓN EXPERIMENTAL Y GRÁFICOS ADJUNTOS

[0038] Se llevaron a cabo las siguientes pruebas sobre la actividad de N^1-metilespermidina o *N*-(3-aminopropil)-N^1-metil-1,4-butanodiamina, el compuesto de fórmula (II) de acuerdo con la invención, bien como una base libre o como una sal, bien triclorhidrato (3HCl) o trimaleato, en comparación con la espermidina (3HCl) como control.

[0039] En las Fig. 1 y 2, la prueba pertinente también se extiende a N^1-ciclohexilespermidina, N^1-etilespermidina, N^1-propilespermidina y N^1-isobutilespermidina, en concreto, los compuestos de las fórmulas (III), (IV), (V), (VI) de acuerdo con la invención, en forma de sal triclorhidrato (3HCl).

[0040] En este sentido, en la presente descripción, se adjuntan los dibujos de acuerdo con los siguientes dibujos.

Las Fig. 1 y 2 son gráficos de los resultados de una prueba del ensayo de MTT.
La Fig. 3 es una gráfica de los resultados de una prueba antioxidante.
La Fig. 4 es una gráfica de los resultados de una prueba de alargamiento del cabello.
Las Fig. 5 y 6 son gráficos de los resultados de las fases anágena y catágena de la prueba de la Fig. 4.

[0041] Por último, como se ha indicado anteriormente, las Fig. 7, 8 y 9 muestran, respectivamente, RMN de ^1H, RMN de ^{13}C y espectros de masas del compuesto 4, es decir, de fórmula (VI) como se ha definido anteriormente.

[0042] También se estudiaron la estabilidad y la reactividad de los compuestos de fórmula (I) tras exponer una solución de los mismos al aire ambiental.

1. Ensayo de MTT

Introducción

[0043] El ensayo de MTT es una prueba usada para analizar la viabilidad celular (Mosmann, **1**983). Es una prueba colorimétrica basada en el uso del MTT de sal tetrazolio, que mide la viabilidad celular que luego se puede cuantificar mediante un lector espectrofotométrico de microplacas. El MTT (bromuro de 3-(4,5-dimetiltiazol-2-il)-2,5-difeniltetrazolio, un tetrazol), un compuesto amarillo, se reduce a formazán, una sustancia púrpura, en las mitocondrias celulares. La absorbancia de esta solución coloreada se puede cuantificar midiéndola a una longitud de onda dada (570 nm) usando un espectrofotómetro. La absorbancia máxima dependerá del disolvente usado. Esta reducción solo tiene lugar cuando las enzimas reductasas mitocondriales están activas y, por lo tanto, la conversión a formazán puede estar directamente relacionada con el número de células viables. Cuando se compara la cantidad de formazán producida por las células tratadas con una sustancia con la cantidad producida por las células de control no tratadas, es posible deducir la eficacia de la sustancia analizada para causar la muerte celular produciendo una curva de dosis-respuesta. Las soluciones de MTT disueltas en PBS o medio de cultivo celular, sin rojo fenol, son de color amarillento. En las células viables, las deshidrogenasas mitocondriales cortan el anillo de tetrazolio, produciendo cristales de formazán de color púrpura, que son insolubles en soluciones acuosas. Los cristales se pueden disolver en isopropanol acidificado o DMSO. La solución púrpura resultante se analiza por espectrofotometría. Un aumento en el número de células producirá un aumento en el formazán obtenido y un aumento en la absorbancia. El uso de la prueba de MTT tiene limitaciones, influenciadas por: 1) el estado fisiológico de las células y 2) los cambios en la actividad de las deshidrogenasas mitocondriales en diferentes tipos de células. A pesar de ello, el ensayo de MTT para la determinación celular es útil para medir el crecimiento celular en respuesta a mitógenos, estímulos antigénicos, factores de crecimiento y otros reactivos que potencian el crecimiento celular, estudios de citotoxicidad y en la creación de curvas de crecimiento celular. El ensayo de MTT para la determinación de células es particularmente útil cuando los cultivos se preparan en placas de múltiples pocillos. Para

obtener mejores resultados, el número de células debe determinarse durante la fase de crecimiento exponencial.

MATERIALES

Modelo biológico

[0044] Se obtuvo una estirpe celular de queratinocitos humanos NCTC2544 (Perry V. P. *et al*., 1957) del Instituto Nacional para la Investigación del Cáncer en Génova, Italia.

CÓDIGO DEL CATÁLOGO ICLC	HL97002
DEPOSITOR	Prof. M. Ferro, DIMES, Patología general, Universidad de Génova, Italia
REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS	• *Arch Dermatol Res* 1976; 256 (3): 255-260-PMID: 990102 • *Arch Dermatol Res* 1976; 261 (1): 27-31

Parámetros del cultivo

[0045] Se cultivó la estirpe celular en medio EMEM (EBSS) con la adición de FBS al 10 %, L-glutamina 2 mM, Solución x1 de NEAA al 1 % y penicilina al 1 % (10.000 U/ml)/estreptomicina (10.000 µg/ml) y se mantuvo a 37 ºC, CO_2 al 5 % en matraces de cultivo de 25 cm^2. Cada dos días, se dividieron los cultivos confluentes 1:3-1:6, después se lavaron con PBS x1 (sin Ca^{2+} y Mg^{2+}), usando tripsina/EDTA y se sembraron a 2-5 x 10^4 células/cm^2, 37 ºC, con CO_2 al 5 %.

[0046] Medio de congelación: medio de cultivo con adición de FBS al 20 %, L-glutamina 2 mM, mezcla de penicilina/estreptomicina al 1 % y DMSO al 10 %.

[0047] Cuantificación celular: Ensayo de azul de trípano.

Reactivos e instrumentos

[0048]

REACTIVOS	PROVEEDOR
EMEM (EBSS) sin L-glutamina	Lonza (BE12-125F)
Solución de NEAA líquida (x100)	Lonza (BE13-114E)
ES con FBS cualificadas	Lonza (DE14-850F)
MEZCLA DE PEN-ESTREP (Penicilina a 10.000 UI/ml, estreptomicina a 10.000 UI/ml)	Lonza (DE17-602F)
L-glutamina 200 mM	Lonza (BE17-605E)
DMSO	Lonza (D2438)
PBS x1 sin Ca^{2+} o Mg^{2+}	Lonza (BE17-516F)
MEZCLA DE TRIPSINA-VERSENE (EDTA) (x1)	Lonza (BE17-161E)
Azul de trípano	Sigma (T8154-20 ml)

INSTRUMENTOS	PROVEEDOR
Microscopio de contraste de fase invertida (Mod: DMIL)	Leica
Campana de flujo laminar (Mod: Gemini) + lámpara UV con equipo antirreflejo	División de fabricación estéril
Incubadora de CO_2 HeraCell (Mod:150 ADV)	Thermo Scientific
Baño digital de 15 l para agua, de +5 ºC a +100 ºC (Mod: Swbd1, BS-SWB2D)	Stuart
Congelador horizontal-85 ºC ULT130, 120 l (Mod: Labfrost, MME-TE21140)	Elcold
Cámara Burker para recuento de células, con terminales (DI-DA-443/3)	Carlo Erba
Scales (Mod. AM100)	Mettler

MÉTODOS

Día 1: Siembra de las células

[0049] Cuando las células de queratinocitos humanos NCTC 2544 alcanzaron una confluencia del aproximadamente 80 %, se separaron y se recogieron con tripsina/EDTA, se sembraron a una densidad de 5 x 10^4 células/ml en placas de 96 pocillos y luego se incubaron a 37 ºC, CO_2 al 5 % (24 h).

Días 2-3: Exposición a los reactivos 24-48 h

[0050] Cuando las células hubieron alcanzado una confluencia del aproximadamente 80 %, se expusieron a concentraciones crecientes de los compuestos activos mencionados anteriormente de acuerdo con la invención: N^1-metilespermidina, como base libre y como triclorhidrato (3HCI) y sal trimaleato; y también N^1-cicloesilespermidina, N^1-etilespermidina, N^1-propilespermidina, N^1-isobutilespermidina como sal triclorhidrato (3HCI) y sal triclorhidrato de espermidina como referencia para la comparación. Cada compuesto se ensayó por duplicado. Se analizaron las siguientes concentraciones de todos los compuestos: 1 nM, 500 nM, 1 µM, 500 µM (concentración final en el medio de cultivo). Se usó SDS como patrón interno.

[0051] Tras preparar las diluciones deseadas de cada compuesto, se retiró el medio de cultivo de la placa y se sembraron los pocillos con 100 µl de cada concentración. En cada placa, se incluyeron controles que solo contenían medio de cultivo.

[0052] Se incubaron las células a 37 ºC, CO_2 al 5 %, para diferentes tiempos de tratamiento (24-48 h).

Día 4: Ensayo de MTT

[0053] Al final del tratamiento con los compuestos de interés (24-48 h) en una placa de 96 pocillos, se retiró el medio y se reemplazó con 100 µl/pocillo de solución de MTT, y las placas se incubaron durante 3 h a 37 ºC, con CO_2 al 5 %. Se disolvió la sal MTT en PBS (5 mg/ml) y se añadió a las células en una dilución 1:10 en medio de EMEM, sin rojo fenol, complementado con FCS al 10 %, glutamina 2 mM, solución de NEAA x100 al 1 % (líquido) y mezcla de antibióticos al 1 %.

[0054] Se cubrió la placa con papel de aluminio. Posteriormente, se retiró el medio cuidadosamente. Se añadieron 100 µl de DMSO a cada pocillo para disolver el producto de formazán de color púrpura. Se cubrieron las placas con papel de aluminio y se agitaron durante 15 min a temperatura ambiente.

[0055] Se leyó la absorbancia de las soluciones a 570 nm con un filtro de referencia a 630 nm en un lector de microplacas ELX808 de Biotek, usando un protocolo predefinido y, tras definir correctamente el diseño de la placa.

Recopilación de datos y análisis estadístico

[0056] Los datos de densidad óptica se registraron directamente del software del lector de microplacas ELX808 de Biotek. El software realiza automáticamente cualquier transformación.

- Transformación 1: cálculo de la DO Delta a 570-630 nm (tras la sustracción automática del blanco)
- Transformación 2: cálculo del % de vitalidad (con respecto al control).

[0057] Los datos obtenidos se exportaron seguidamente a Excel y se analizaron estadística y gráficamente, a fin de determinar las concentraciones no citotóxicas a las que se podían analizar los compuestos.

Reactivos e instrumentos usados

[0058]

REACTIVOS	PROVEEDOR
EMEM (EBSS) sin L-glutamina	Lonza (BE12-125F)
Solución de NEAA líquida (x100)	Lonza (BE13-114E)
ES con FBS cualificadas	Lonza (DE14-850F)
MEZCLA DE PEN-ESTREP (Penicilina a 10.000 UI/ml, Estreptomicina a 10.000 UI/ml)	Lonza (DE17-602F)
L-glutamina 200 mM	Lonza (BE17-605E)

REACTIVOS	PROVEEDOR
DMSO	Lonza (D2438)
PBS x1 sin Ca^{2+} o Mg^{2+}	Lonza (BE17-516F)
Mezcla de TRIPSINA-VERSENE (EDTA) (x1)	Lonza (BE17-161E)
Azul de trípano	Sigma (T8154-20 ml)
MEM Eagle EBSS (x2), SIN L-Gln, rojo de fenol	Lonza (BE12-668-E)
MTT	Sigma (M2128 1G)

INSTRUMENTOS	PROVEEDOR
Microscopio de contraste de fase invertida (Mod: DMIL)	Leica
Campana de flujo laminar (Mod: Gemini) + lámpara UV con equipo antirreflejo	División de fabricación estéril
Incubadora de CO_2 HeraCell (Mod: 150 ADV)	Thermo Scientific
Baño digital de 15 l para agua, de +5 °C a +100 °C (Mod: Swbdl, BS-SWB2D)	Stuart
Congelador horizontal a -85 °C ULT130, 120 l (Mod: Labfrost, MME-TE21140)	Elcold
Cámara Burker para recuento de células, con terminales (DI-DA-443/3)	Carlo Erba
Scales (Mod. AM100)	Mettler
Lector de microplacas (Mod: ELX808) + Software Gen5	BioTek

Resultados

[0059] Las Fig. 1 y 2 resumen los resultados obtenidos en las gráficas a las 24 horas (Fig. 1) y 48 horas (Fig. 2) respectivamente. Las ocho columnas que se dan ahí para cada grupo de igual concentración, como se ha especificado en las mismas, se deben atribuir respectivamente, de izquierda a derecha, para: la espermidina, N^1-metilespermidina, N^1-ciclohexilespermidina, N^1-etilespermidina, N^1-propilespermidina, N^1-isobutilespermidina, todas en forma de sal triclorhidrato (3HCl); sal trimaleato de N^1-metilespermidina; base libre de N^1-metilespermidina.

[0060] La viabilidad celular se expresa en porcentaje frente al control, es decir, la población celular crece en condiciones convencionales sin la adición de espermidina o de compuestos de acuerdo con la invención. A las concentraciones analizadas (1 nM, 500 nM, 1 mM, 500 mM), la espermidina no tiene efectos citotóxicos tras 24 o 48 horas de exposición de la estirpe celular de queratinocitos humanos (NCTC2544). De forma similar, la viabilidad celular tras el tratamiento de 24 o 48 h con los compuestos de acuerdo con la invención (a las mismas concentraciones de espermidina) no se reduce sustancialmente, y en algunos casos incluso se mejora, lo que demuestra la falta de citotoxicidad del compuesto. Los resultados obtenidos para los compuestos de acuerdo con la invención no son estadísticamente diferentes de los obtenidos para la espermidina.

[0061] En general, se puede concluir que el ensayo de MTT no demuestra citotoxicidad para los compuestos de acuerdo con la invención.

2. PRUEBA ANTIOXIDANTE - Producción de especies reactivas de oxígeno (ROS)

[0062] La producción de especies reactivas de oxígeno (ROS) se controló mediante espectrofluorometría usando diacetato de 2',7'-diclorofluoresceína (DCFFI-DA) según lo descrito por Tobi *et al.* (Tobi S. E., Paul N., T. McMillan J. J. Photochem. *Photobiol*, B 2000: 57: 102-112).

[0063] Se separaron las células NCTC2544 mencionadas anteriormente (~ 80 % de confluencia) con tripsina/EDTA y se sembraron a una densidad de 5 x 10^4 células por pocillo, en placas de 96 pocillos. Posteriormente, se trataron las células con la *N*-metilespermidina de acuerdo con la invención y espermidina. Se analizaron las siguientes concentraciones de *N*-metilespermidina y espermidina: 1 nM, 500 nM, 1 µM, 500 µM, 1 mM (concentración final en el medio de cultivo).

[0064] Se usó α-tocoferol (250 µg/ml) a modo comparativo. Las placas se incubaron a 37 °C, en CO_2 al 5 %, durante 1,5 h. Las células cultivadas en medio basal con FBS al 10 % se usaron como control.

[0065] la gráfica de la Fig. 3 resume los resultados obtenidos. Los resultados obtenidos al determinar la

concentración intracelular de especies reactivas de oxígeno (ROS) confirmaron la actividad antioxidante de la espermidina como se informaba en la bibliografía. En comparación con las células de control tratadas con H_2O_2, las células tratadas con 250 µg/ml de α-tocoferol, espermidina y *N*-metilespermidina muestran una disminución en la concentración de los productos de ROS. Al comparar la actividad antioxidante de la espermidina con la de la *N*-metilespermidina, no se demostró una diferencia significativa.

3. PRUEBA DE ALARGAMIENTO DEL TALLO PILOSO

[0066] Se probó la actividad de la *N*-metilespermidina en un modelo *ex vivo* que permitió medir el efecto sobre el alargamiento del tallo piloso.

Materiales y métodos

[0067] El cultivo de órganos de los folículos pilosos (FP) en la fase anágena VI implicó la microdisección del FP de la piel del cuero cabelludo humano (área temporo-frontal) después del consentimiento informado de los sujetos que se sometieron a cirugía (lifting facial), de acuerdo con la Declaración de Helsinki y con la aprobación del Comité de Ética de la Universidad de Lübeck. En este modelo, la fase de crecimiento (anágena) del FP continuó durante varios días para producir un tallo pigmentado a una velocidad similar a la fase anágena *in vivo*, además de presentar una actividad de crecimiento cíclico *in vitro*, entrando espontáneamente en la fase de regresión del ciclo capilar (catágena).

[0068] Para estudios inmunohistoquímicos, se cultivaron los folículos aislados durante 6 días consecutivos.

[0069] Se administraron espermidina, *N*-metilespermidina y el vehículo (agua destilada) una vez por cada cambio de medio de cultivo (cada 48 horas), a una concentración de 0,5 µM.

[0070] Las secciones congeladas se almacenaron a -80 ºC hasta que se usaron.

Medición del crecimiento capilar

[0071] Las mediciones del alargamiento del tallo tras el tratamiento con vehículo, espermidina y *N*-metilespermidina se tomaron los días 0, 1, 4 y 6, usando un microscopio binocular invertido Zeiss con un ocular que contenía una retícula (Carl Zeiss, Oberkochen, Alemania).

Resultados

[0072] Los resultados del alargamiento del tallo se muestran en la gráfica de la Fig. 4, que muestra los resultados en el día 6. Tanto la espermidina como la *N*-metilespermidina de acuerdo con la invención mejoran significativamente el alargamiento del tallo piloso con respecto al vehículo. La diferencia observada entre la espermidina y la *N*-metilespermidina no es estadísticamente significativa y, por lo tanto, el efecto del alargamiento debe considerarse comparable en los dos casos comparados.

4. RESULTADOS PARA LAS FASES ANÁGENA Y CATÁGENA

[0073] Los siguientes resultados para las fases anágena y catágena, resumidos en las gráficas de las Fig. 5 y 6, también se obtuvieron del mismo modelo *ex vivo* de folículos pilosos (FP) descrito para la prueba anterior de alargamiento del tallo capilar.

[0074] La gráfica de la Fig. 5 muestra el porcentaje de folículos tratados con *N*-metilespermidina en las diferentes fases del ciclo de crecimiento.

[0075] A partir de esto, se puede ver que, tras 6 días de tratamiento, la *N*-metilespermidina produce un aumento significativo en el porcentaje de folículos pilosos en la fase anágena y una disminución en aquellos en la fase catágena. En presencia de *N*-metilespermidina, solo el 30 % (aproximadamente) de los folículos entran en la fase catágena espontáneamente, mientras que, en presencia del vehículo, más del 60 % de los folículos entran en la fase catágena.

[0076] La gráfica de la Fig. 6 muestra los valores porcentuales correspondientes al control de las fases del folículo obtenidos para la espermidina (0,5 µM) y la *N*-metil-espermidina (0,5 µM).

[0077] La comparación entre los dos compuestos demuestra sorprendentemente un efecto mayor de prolongación de la fase anágena en el caso de la *N*-metilespermidina que con la espermidina. Por lo tanto, el número de pelos que entraron a la fase catágena (dividida en etapas: inicial, intermedia y final) fue significativamente menor después del tratamiento con *N*-metilespermidina que con espermidina.

5. RESULTADOS PARA LA REACTIVIDAD

[0078] Se estudiaron las propiedades de 1,4-butanodiamina,*N*-(3-aminopropil)-N^1-metilo (II) y 1,4-butanodiamina,*N*-(3-aminopropil)-N^1-ciclohexilo (III) tras la exposición al aire mediante la comparación con el correspondiente derivado no sustituido, en el que el grupo N^1-amina que carece del sustituyente R se convierte en un grupo amina secundario, en concreto, 1,4-butanodiamina,*N*-(3-aminopropilo). Dado que uno de los productos comunes de la oxidación del grupo amino secundario adopta la forma de los derivados *N*-nitrosos que se forman mediante la reacción con los óxidos de nitrógeno presentes en el aire, los derivados nitrosados que se formaron al dejar una solución de los compuestos de prueba en contacto con el aire ambiental se determinaron como un parámetro de reactividad.

Materiales y métodos

[0079] La instrumentación usada consistió en una etapa en la que se llevaron a cabo tanto el análisis de los iones nitrito como el análisis de las *N*-nitrosaminas, este último en condiciones de fuerte desnitrosificación. El óxido de nitrógeno que se desarrolló de acuerdo con la cantidad de iones de nitrito y el que se desarrolló de acuerdo con la cantidad de grupos nitrosos se evaluó por medio de un detector quimioluminométrico.

[0080] El contenido de iones NO^2 se analizó usando una mezcla reductora de ácido acético/yoduro de potasio (5 ml/1 ml de solución de H_2O al 5 %) a una temperatura de 0-4 ºC. Se analizaron los grupos nitrosos usando una mezcla desnitrosante de ácido acético/ácido bromhídrico (5 ml/1 ml) a una temperatura de 70 ºC.

[0081] Los reactivos se encuentran disponibles en el mercado, por ejemplo, de Sigma-Aldrich. Se usaron gases de alta pureza (He_2 y NO).

[0082] El método para determinar la oxidación al aire del compuesto fue el siguiente.

a) se sembró por duplicado una solución 2 mM de la sustancia de ensayo en agua purificada, en una cantidad igual a 500 µl en pocillos apropiados de placas de seis pocillos de material plástico inerte (poliestireno);
b) se diluyó la solución en cada pocillo con 500 µl de una mezcla de agua purificada y etanol (85/15) libre de contaminación. Esto potencia la dispersión de la película líquida en la superficie del pocillo;
c) se expone la placa preparada de esta manera al aire ambiental durante 72 h;
d) al final del tiempo de exposición, se eluye el residuo del pocillo con 1 ml de agua purificada y luego se usa para el análisis quimioluminométrico.

Resultados

[0083]

Compuesto	Derivados nitrosos tras exposición de 72 h
1,4-butanodiamina,*N*-(3-aminopropilo)	2,3 ppm
1,4-butanodiamina,*N*-(3-aminopropil)-N^1-metilo	ausente
1,4-butanodiamina,*N*-(3-aminopropil)-N^1-ciclohexilo	ausente

6. CONCLUSIONES

[0084] En términos de la falta de citotoxicidad, la actividad antioxidante hacia ROS y el alargamiento del tallo, el experimento anterior demuestra que un compuesto de acuerdo con la invención proporciona resultados que no son esencialmente diferentes de los que se pueden obtener con la espermidina.

[0085] Además, sorprendentemente, la *N*-metilespermidina parece tener una mayor actividad que la espermidina en la prolongación de la fase anágena del cabello.

[0086] Aunque el alargamiento estimulante del tallo y la prolongación de la fase anágena contribuyen al crecimiento fisiológico del cabello, desde el punto de vista clínico, el resultado de la extensión de la fase anágena puede considerarse más significativa y relevante en cuanto a la acción del alargamiento del tallo piloso, ya que una fase anágena prolongada tiene una influencia positiva directa en la reducción de la pérdida de cabello, lo que es el objeto principal de la invención.

[0087] Una actividad para prolongar la fase anágena y la inhibición relativa de la fase catágena, como se ha indicado anteriormente para la *N*-metilespermidina, es útil para combatir muchas formas diferentes de pérdida de cabello o alopecia, caracterizada por un exceso de efluvio debido a una reducción no fisiológica de la fase anágena, por ejemplo, como resultado de los andrógenos, la inflamación perifolicular, la deficiencia de hierro y de estrógenos, o la administración de fármacos que causan efluvio no fisiológico como efecto secundario.

[0088] De la descripción anterior en su conjunto, se puede ver, por tanto, que los compuestos de fórmula general (I) son activos de acuerdo con los objetos de la presente invención, y también lo suficientemente estables como para permitir una aplicación eficaz para el uso tópico en el cuero cabelludo sin que se transformen potencialmente en una sustancia diferente, que ya no sea activa, como resultado de la oxidación.

REIVINDICACIONES

1. Uso cosmético de compuestos de fórmula (I) R-N^1-espermidina o 1,4-butanodiamina,*N*-(3-aminopropil)-N^1-R,

(I) $H_2N-(CH_2)_3-N^1(R)-(CH_2)_4-NH_2$

en la que R es un sustituyente unido a la función amina secundaria de la espermidina, seleccionado entre:

- grupos alquilo saturados, lineales o ramificados, que consisten en de 1 a 6 átomos de carbono;
- grupo cicloalquilo saturado que es ciclohexilo o una de sus sales farmacéuticamente aceptables, para combatir la pérdida de cabello.

2. Uso cosmético de acuerdo con la reivindicación 1, en el que dicho compuesto de fórmula (I) se aplica por vía tópica en el cuero cabelludo.

3. Uso cosmético de acuerdo con la reivindicación 1, en el que dicho compuesto de fórmula **(I)** es N^1-metilespermidina o *N*-(3-aminopropil)-N^1-metil-1,4-butanodiamina de fórmula:

(II) $H_2N-(CH_2)_3-N^1(CH_3)-(CH_2)_4-NH_2$

4. Uso cosmético de acuerdo con la reivindicación 1, en el que dicho compuesto de fórmula (I) es N^1-ciclohexilespermidina o *N*-(3-aminopropil)-N^1-ciclohexil-1,4-butanodiamina de fórmula:

(III) $H_2N-(CH_2)_3-N^1(C_6H_{11})-(CH_2)_4-NH_2$

5. Uso cosmético de acuerdo con la reivindicación 1, en el que dicho compuesto de fórmula (I) es N^1-etilespermidina o *N*-(3-aminopropil)-N^1-etil-1,4-butanodiamina de fórmula:

(IV) $H_2N-(CH_2)_3-N^1(C_2H_5)-(CH_2)_4-NH_2$

6. Uso cosmético de acuerdo con la reivindicación 1, en el que dicho compuesto de fórmula (I) es N^1-propilespermidina o *N*-(3-aminopropil)-N^1-propil-1,4-butanodiamina de fórmula:

(V) $H_2N-(CH_2)_3-N^1(C_3H_7)-(CH_2)_4-NH_2$

7. Uso cosmético de acuerdo con la reivindicación 1, en el que dicho compuesto de fórmula (I) es N^1-isobutilespermidina o *N*-(3-aminopropil)-N^1-isobutil-1,4-butanodiamina de fórmula:

(VI) $H_2N - (CH_2)_3 - N^1(C_4H_9) - (CH_2)_4 - NH_2$

8. Uso cosmético de acuerdo con la reivindicación 1, en el que dicho compuesto de fórmula (I) está en forma de sal triclorhidrato.

9. Uso cosmético de acuerdo con la reivindicación 1, en el que dicho compuesto de fórmula (I) está en forma de sal con ácido maleico.

10. Uso cosmético de acuerdo con la reivindicación 1, para potenciar el crecimiento fisiológico del cabello simultáneamente por medio de un efecto de estimulación del alargamiento del tallo piloso y de prolongación de la fase anágena.

11. Composición farmacéutica para uso terapéutico para combatir la pérdida de cabello en la que un compuesto de fórmula (I) R-N^1-espermidina o 1,4-butanodiamina,*N*-(3-aminopropil)-N^1-R,

(I) $H_2N-(CH_2)_3-N^1\ (R) - (CH_2)_4 - NH_2$

en la que R es un sustituyente unido a la función amina secundaria de la espermidina, seleccionado entre:

- grupos alquilo saturados, lineales o ramificados, que consisten en de 1 a 6 átomos de carbono;
- grupo cicloalquilo saturado que es ciclohexilo;

o una de sus sales farmacéuticamente aceptables, se formula con excipientes adecuados para la administración tópica en el cuero cabelludo.

12. Composición para el uso de acuerdo con la reivindicación 11, en el que dicho compuesto de fórmula (I) es N^1-metilespermidina o *N*-(3-aminopropil)-N^1-metil-1,4-butanodiamina de fórmula:

(II) $H_2N - (CH_2)_3 - N^1(CH_3) - (CH_2)_4 - NH_2$

13. Composición para el uso de acuerdo con la reivindicación 11, en el que dicho compuesto de fórmula (I) es N^1-ciclohexilespermidina o *N*-(3-aminopropil)-N^1-ciclohexil-1,4-butanodiamina de fórmula:

(III) $H_2N - (CH_2)_3 - N^1(C_6H_{11}) - (CH_2)_4-NH_2$

14. Composición para el uso de acuerdo con la reivindicación 11, en el que dicho compuesto de fórmula (I) es N^1-etilespermidina o *N*-(3-aminopropil)-N^1-etil-1,4-butanodiamina de fórmula:

(IV) $H_2N - (CH_2)_3 - N^1(C_2H_5) - (CH_2)_4- NH_2$

15. Composición para el uso de acuerdo con la reivindicación 11, en el que dicho compuesto de fórmula (I) es N^1-propilespermidina o *N*-(3-aminopropil)-N^1-propil-1,4-butanodiamina de fórmula:

(V) $H_2N - (CH_2)_3 - N^1(C_3H_7) - (CH_2)_4 - NH_2$

16. Composición para el uso de acuerdo con la reivindicación 11, en el que dicho compuesto de fórmula (I) es N^1-isobutilespermidina o *N*-(3-aminopropil)-N^1-isobutil-1,4-butanodiamina de fórmula:

(VI) $H_2N - (CH_2)_3 - N^1(C_4H_9) - (CH_2)_4 - NH_2$

17. Composición para el uso de acuerdo con la reivindicación 11, en la que dicho compuesto de fórmula (I) está presente en una cantidad de entre el 0,001 y el 0,30 por ciento en peso.

18. Compuesto N^1-isobutilespermidina o compuesto *N*-(3-aminopropil)-N^1-isobutil-1,4-butanodiamina de fórmula:

(VI) $H_2N - (CH_2)_3 - N^1(C_4H_9) - (CH_2)_4 - NH_2$

19. Compuestos de fórmula (I) R-N^1-espermidina o 1,4-butanodiamina,*N*-(3-aminopropil)-N^1-R,

(I) $H_2N-(CH_2)_3-N^1(R)-(CH_2)_4-NH_2$

en la que R es un sustituyente unido a la función amina secundaria de la espermidina, seleccionado entre:

- grupos alquilo saturados, lineales o ramificados, que consisten en 1 a 6 átomos de carbono;
- grupo cicloalquilo saturado que es ciclohexilo;

o una de sus sales farmacéuticamente aceptables, para su uso en el tratamiento de la alopecia.

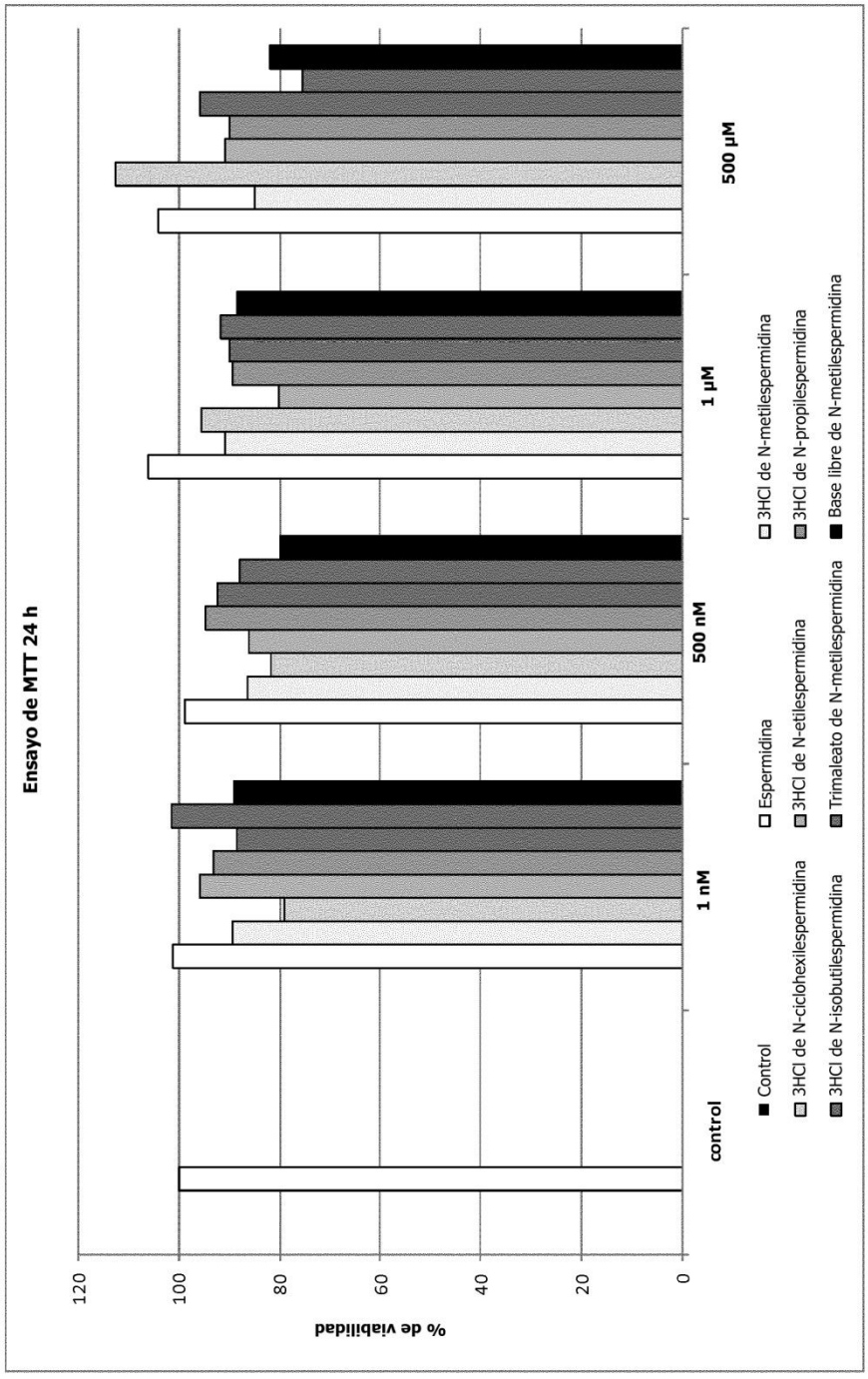

Ensayo de MTT 24 h
% de viabilidad
120
100
80
60
40
20
0
control
1 nM
500 nM
1 µM
500 µM
Control
Espermidina
3HCl de N-metilespermidina
3HCl de N-ciclohexilespermidina
3HCl de N-etilespermidina
3HCl de N-propilespermidina
3HCl de N-isobutilespermidina
Trimaleato de N-metilespermidina
Base libre de N-metilespermidina

Fig. 1

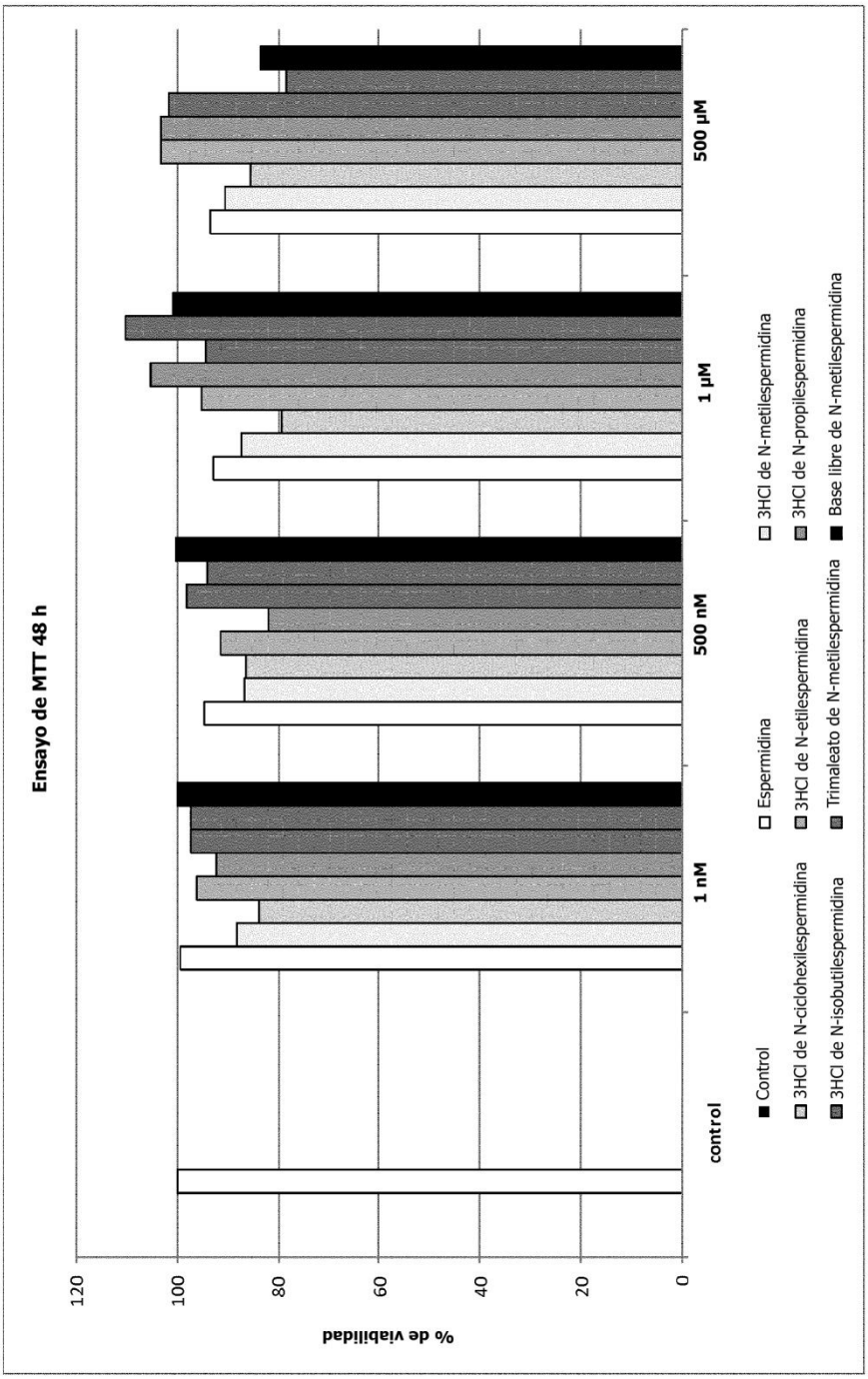

Ensayo de MTT 48 h
% de viabilidad
120
100
80
60
40
20
0
control
1 nM
500 nM
1 µM
500 µM
Control
Espermidina
3HCl de N-metilespermidina
3HCl de N-ciclohexilespermidina
3HCl de N-etilespermidina
3HCl de N-propilespermidina
3HCl de N-isobutilespermidina
Trimaleato de N-metilespermidina
Base libre de N-metilespermidina

Fig. 2

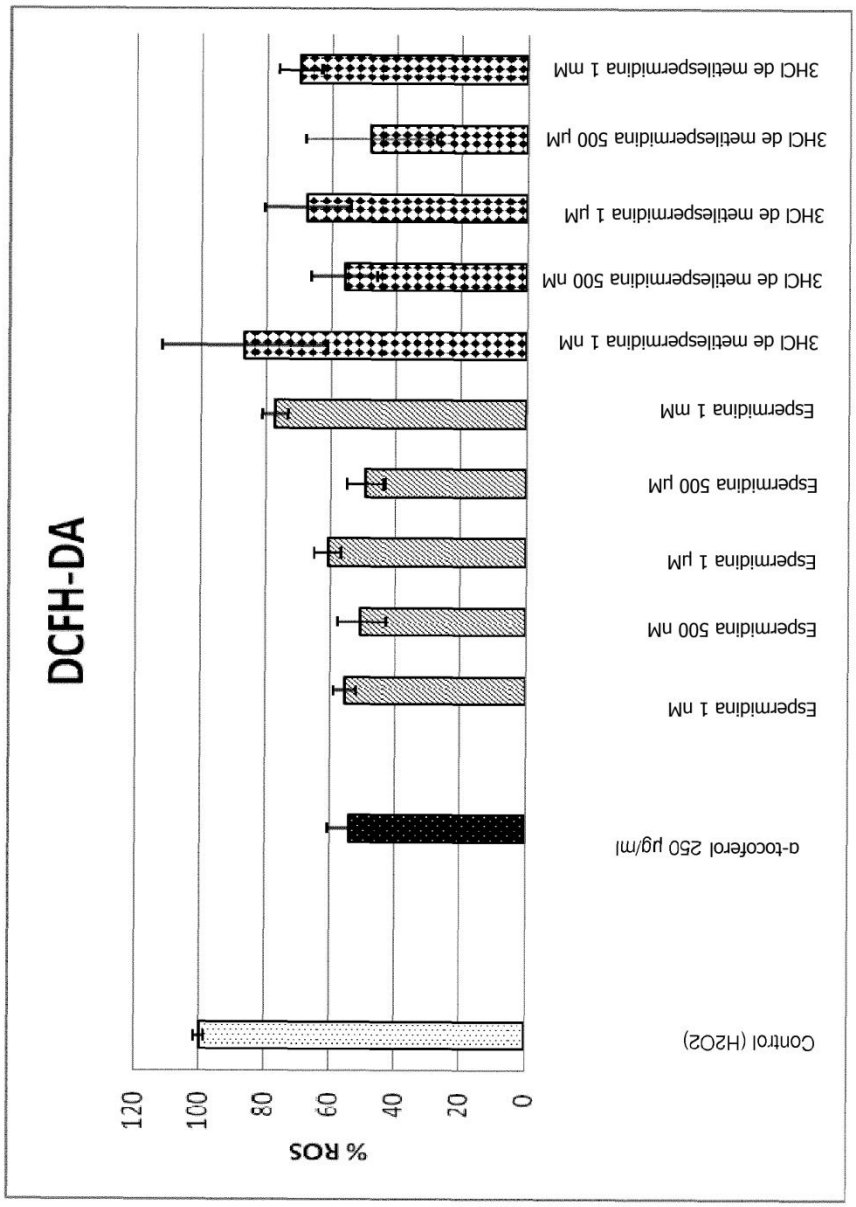

DCFH-DA
% ROS
120
100
80
60
40
20
0
Control (H2O2)
α-tocoferol 250 µg/ml
Espermidina 1 nM
Espermidina 500 nM
Espermidina 1 µM
Espermidina 500 µM
Espermidina 1 mM
3HCl de metilespermidina 1 nM
3HCl de metilespermidina 500 nM
3HCl de metilespermidina 1 µM
3HCl de metilespermidina 500 µM
3HCl de metilespermidina 1 mM

Fig. 3

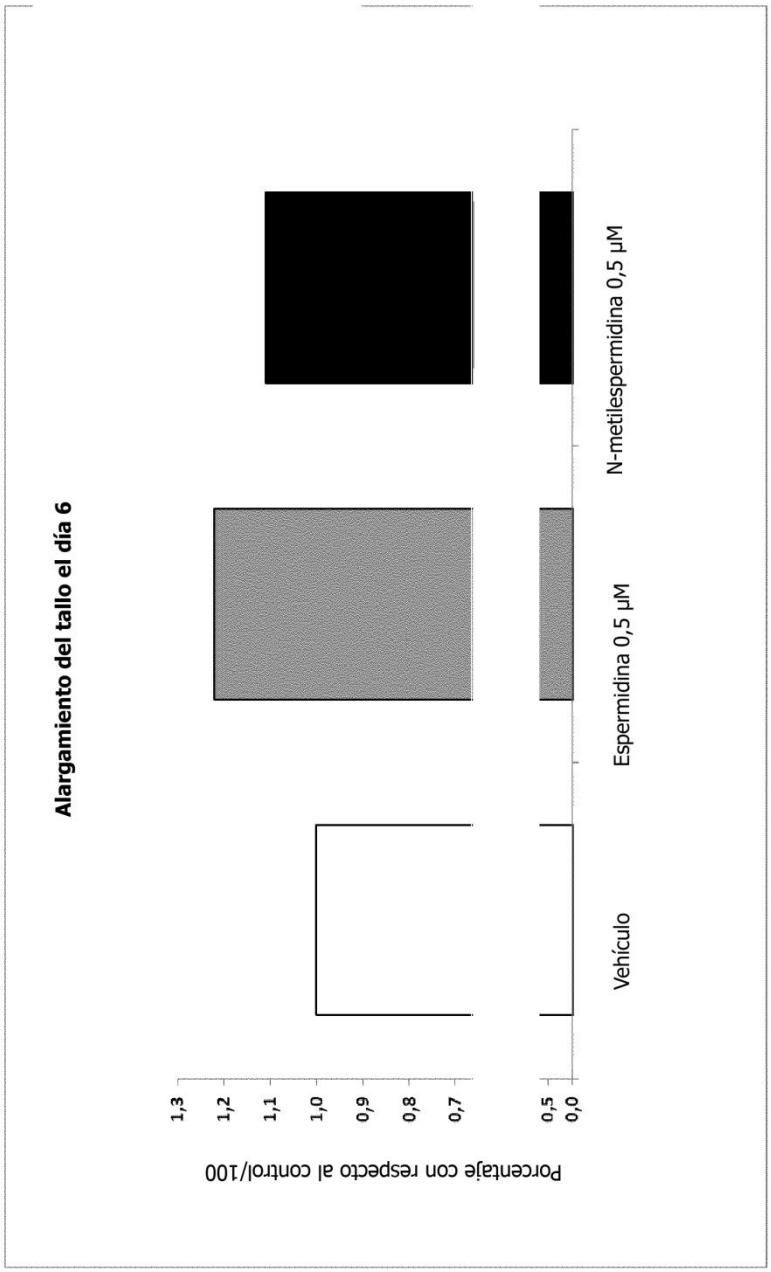

Alargamiento del tallo el día 6
Porcentaje con respecto al control/100
1,3
1,2
1,1
1,0
0,9
0,8
0,7
0,5
0,0
Vehículo
Espermidina 0,5 µM
N-metilespermidina 0,5 µM

Fig. 4

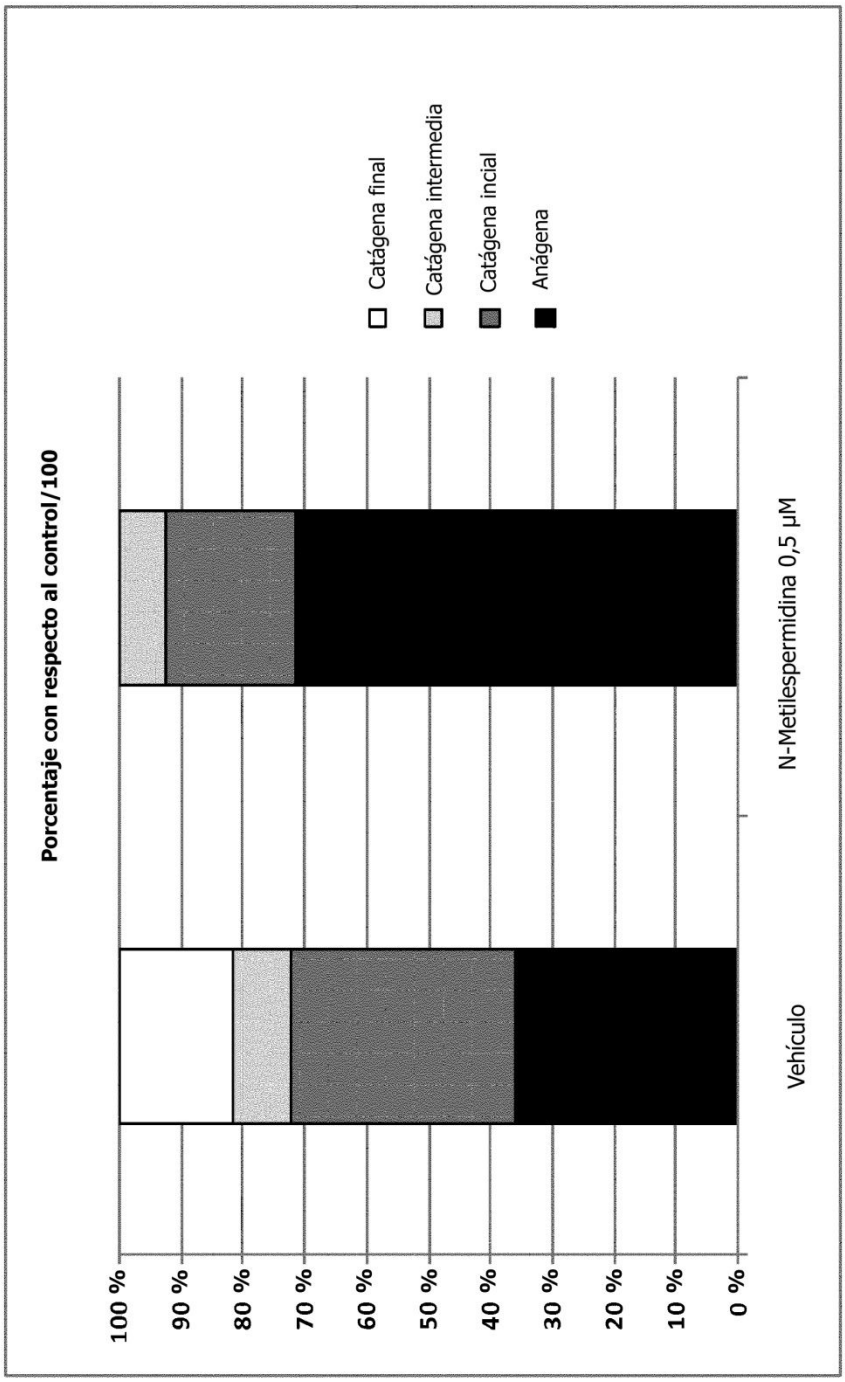

Porcentaje con respecto al control/100
100 %
90 %
80 %
70 %
60 %
50 %
40 %
30 %
20 %
10 %
0 %
Vehículo
N-Metilespermidina 0,5 µM
Catágena final
Catágena intermedia
Catágena incial
Anágena

Fig. 5

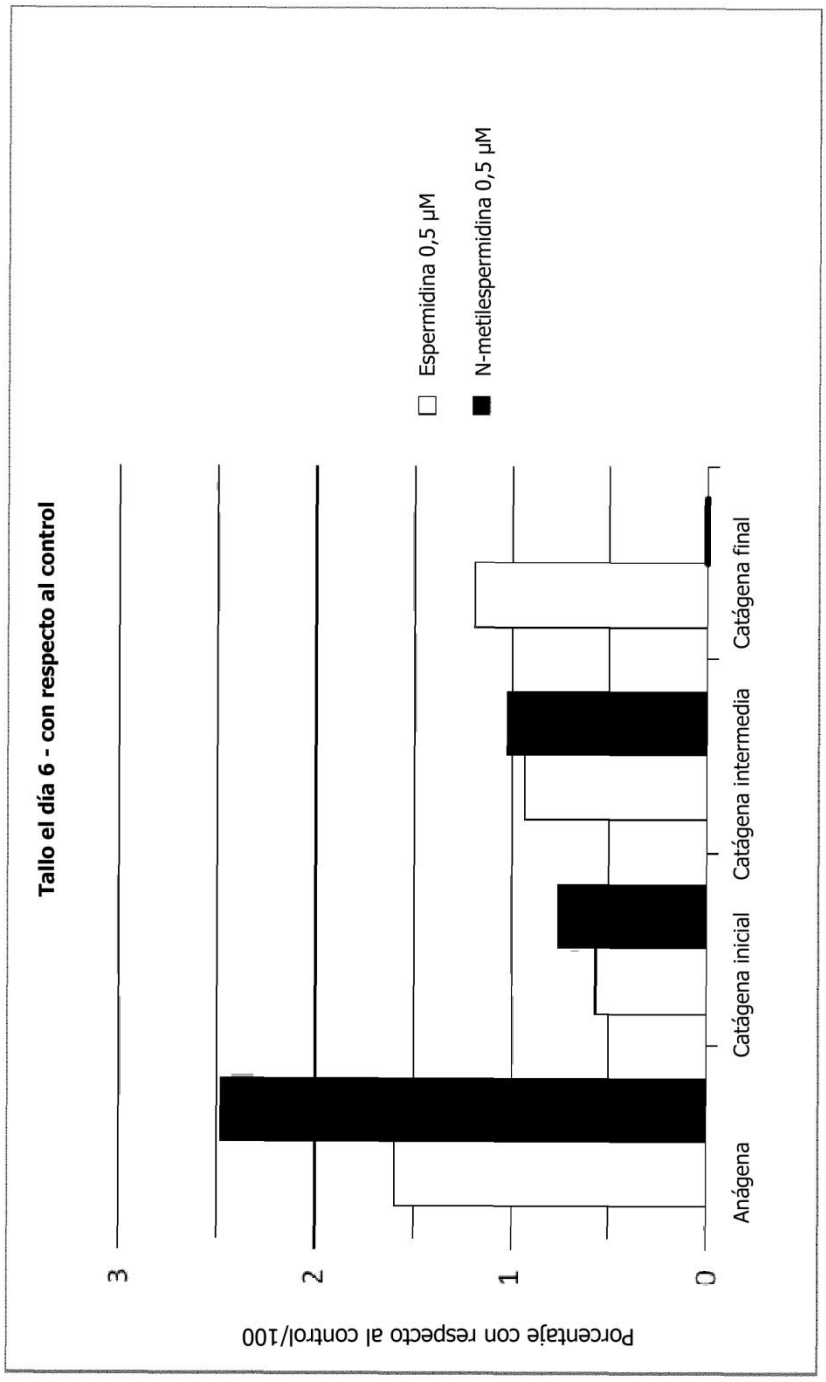

Tallo el día 6 - con respecto al control
Espermidina 0,5 µM
N-metilespermidina 0,5 µM
Porcentaje con respecto al control/100
0
1
2
3
Anágena
Catágena inicial
Catágena intermedia
Catágena final

Fig. 6

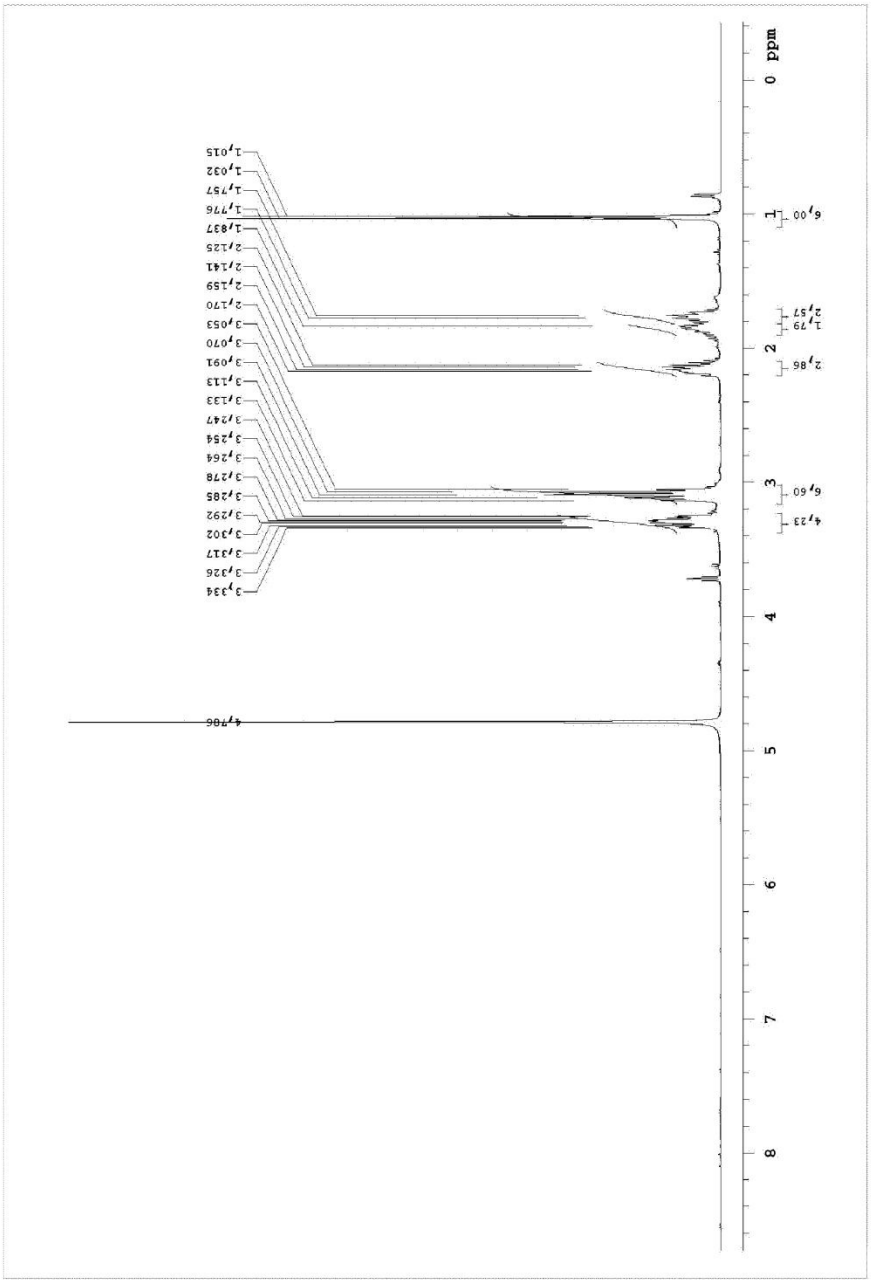

ppm
0
1
2
3
4
5
6
7
8
6,00
2,86
1,79
2,57
6,60
4,23
4,706
3,334
3,326
3,317
3,302
3,292
3,285
3,278
3,264
3,254
3,247
3,133
3,113
3,091
3,070
3,053
2,170
2,159
2,141
2,125
1,837
1,776
1,757
1,032
1,015

Fig. 7

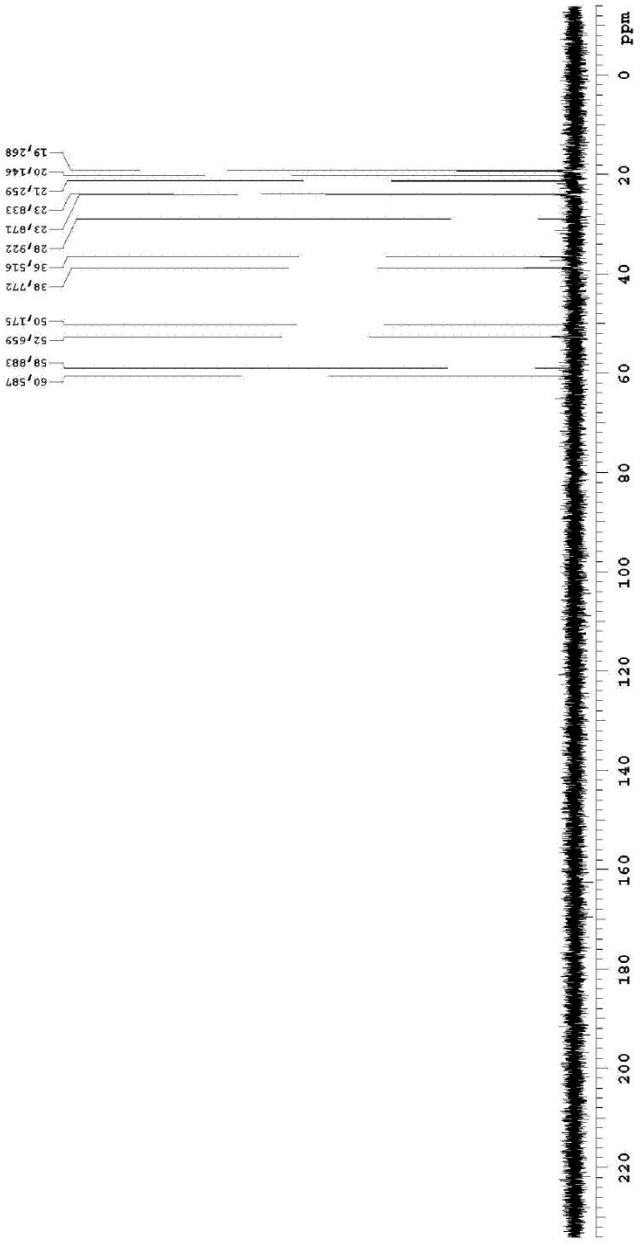

19,268
20,146
21,259
23,833
23,871
28,922
36,516
38,772
50,175
52,659
58,883
60,587
ppm
0
20
40
60
80
100
120
140
160
180
200
220

Fig. 8

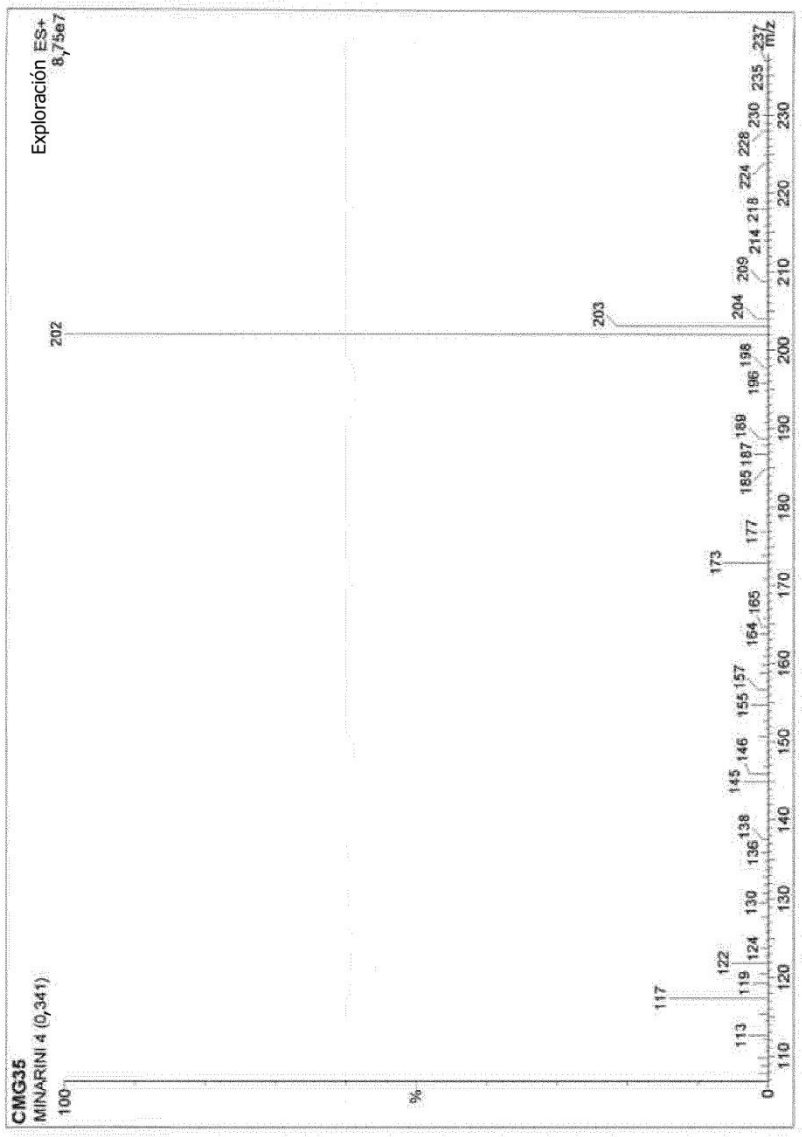

CMG35
MINARINI 4 (0,341)
Exploración ES+
8,75e7
100
%
0
202
203
117
122
173
m/z

Fig. 9