

COMPOSICIÓN PARA LA PREVENCIÓN O EL TRATAMIENTO DE LA CAÍDA
DEL CABELLO QUE INCLUYE HAPLN1

CAMPO TÉCNICO

5 **[0001]** La presente invención se refiere a una
composición farmacéutica para prevenir o tratar la caída del
cabello, que comprende la proteína 1 de unión de hialuronano
y proteoglicano (HAPLN1, del inglés "hyaluronan and
proteoglycan link protein 1") como principio activo. La
10 proteína HAPLN1 de la presente invención hace que el cabello
crezca al promover la proliferación de las células de la
matriz germinal del cabello a través de una ruta de
señalización ERK1/2 (es decir, una ruta de señalización no
canónica) activada por una proteína TGF- β cuando se
15 administra.

ANTECEDENTES DE LA TÉCNICA

[0002] En total, aproximadamente 35 millones de hombres
y 25 millones de mujeres sufren caída del cabello, y el
número de pacientes con caída del cabello ha aumentado cada
20 año. El cabello tiene varias funciones, incluida la
apariencia, aislamiento térmico, protección del cuero
cabelludo y amortiguación de la fricción. Entre ellas, de
manera particular, el cabello está relacionado directamente
con la autoestima y la sociabilidad, por lo que muchas
25 personas están muy interesadas en el cuidado del cabello por
razones estéticas.

[0003] El cabello humano es un conjunto de aproximadamente 100.000 cabellos individuales, cada uno de los cuales se produce por un folículo piloso. El folículo piloso sirve como depósito de células madre que pueden generar todas las líneas celulares necesarias para reconstruir el propio folículo, el epitelio y la glándula sebácea. El folículo piloso está compuesto por células de la papila dérmica, células de la matriz germinal del cabello, paredes externas e internas de las células del folículo piloso y una protuberancia (Figura 1).

[0004] El cabello repite el ciclo de crecimiento del cabello de anágena, catágena y telógena (Figura 2). La anágena suele durar de 3 a 5 años y es una etapa en la que el cabello crece por la proliferación y queratinización de los queratinocitos de las células de la matriz germinal del cabello a medida que se desarrollan las células de la papila dérmica y las células de la matriz germinal del cabello. La catágena dura de 10 a 14 días y es una etapa en la que el folículo piloso se contrae a medida que se produce la apoptosis de las células del folículo piloso. La telógena se mantiene durante aproximadamente 3 a 4 meses y es una etapa en la que se detiene la generación de cabello y se suministran nuevas células a todo el folículo piloso para preparar la siguiente anágena.

[0005] Las rutas de señalización implicadas en el ciclo del crecimiento del cabello incluyen rutas de señalización que implican Wnt, Shh, JAK, TGF β /BMP,

testosterona, etc. Entre ellas, las rutas de señalización Wnt, Shh y JAK se activan al final de la telógena para promover la entrada en la anágena.

5 **[0006]** De este modo, el cabello humano siempre mantiene un número constante de cabellos porque tiene un ciclo de crecimiento del cabello constante. Sin embargo, cuando la caída del cabello progresa, la papila presente en la raíz del cabello se vuelve más pequeña, y cuando la papila dérmica se vuelve más pequeña, el grosor del cabello se vuelve más delgado y, al mismo tiempo, el período del cabello se acorta y el cabello recién crecido se vuelve más delgado. Por lo tanto, cuando la caída del cabello progresa, las hebras del cabello se vuelven esponjosas y el ciclo del cabello se vuelve mucho más corto y el cabello se cae después de que ha crecido un poco.

10

15

[0007] La caída del cabello se puede dividir en gran medida en cuatro tipos: caída del cabello de patrón masculino, caída del cabello de patrón femenino, alopecia areata y efluvio telógeno. La caída del cabello de patrón masculino se debe en gran parte a causas genéticas y está relacionada con la 5 α -reductasa. La 5 α -reductasa convierte la hormona masculina testosterona en 5 α -dihidrotestosterona (DHT), que reduce los folículos pilosos, provocando la caída del cabello. La principal causa de la caída del cabello de patrón femenino es la secreción desequilibrada de hormonas debido al parto o la menopausia. Asimismo, varios hábitos y ambientes, incluido el estrés mental en la vida social, la exposición

20

25

a la contaminación del aire, el consumo de alimentos procesados, una enfermedad grave debido a fiebre alta, el desequilibrio nutricional, el uso de medicamentos contra el cáncer y de medicamentos antitiroideos, la administración de anticonceptivos orales, el champú, los rayos ultravioleta fuertes o el sudor durante el ejercicio, los hábitos dietéticos, la presión psicológica, etc., también se conocen como las principales causas de la caída del cabello.

[0008] En la actualidad, los tratamientos para la caída del cabello más utilizados en Corea incluyen finasterida (nombre del producto: Propecia®), dutasterida (nombre del producto: Avodart®) y minoxidil (nombre del producto: Myoxydil® o Rogaine®). La finasterida y la dutasterida son inhibidores de la 5 α -reductasa que inhiben la conversión de la testosterona en 5 α -dihidrotestosterona (DHT). Sin embargo, estos productos presentan efectos secundarios tales como la disminución de la libido, la impotencia y la pérdida de la capacidad de conducción y de rendimiento. Mientras tanto, el minoxidil, cuyo mecanismo aún no se ha dilucidado por completo, es un abridor de canales de potasio que hiperpolariza las membranas celulares, pero se cree que mejora la salud de los folículos pilosos mediante el aumento del suministro de oxígeno, sangre, nutrientes, etc. a los folículos pilosos a través de la vasodilatación y la apertura de los canales de potasio. Sin embargo, este producto también muestra efectos secundarios, tales como picazón, eritema, irritación de la piel e

irritación de los ojos en una parte en la que se aplica el producto, y también se observa crecimiento de vello no deseado en otras partes del cuerpo además de la cabeza. Dado que los efectos secundarios de estos productos existentes amplifican la ansiedad de los pacientes y, en los casos intensos, puede dar lugar a la negación de la administración, se están realizando esfuerzos constantes para desarrollar fármacos que tengan menos efectos secundarios.

[0009] La proteína 1 de unión de hialuronano y proteoglucano (HAPLN1) es una proteína de la matriz extracelular que se encuentra en el cartílago. Esta proteína juega un papel en la estabilización de los agregados de ácido hialurónico y proteoglucanos, y se informa que participa en la unión de las células.

[0010] Como se informó recientemente en un estudio, la publicación de patente de EE. UU. N.º 2012/0128632 presenta un método para identificar células dérmicas tricogénicas, tales como las células de la papila dérmica y las células de la vaina dérmica, que pueden inducir la formación de folículos pilosos, y propone HAPLN1 como uno de los biomarcadores que se pueden utilizar para detectar e identificar células dérmicas tricogénicas. Asimismo, el registro de patente de EE. UU. n.º 8,334,136 enumera aproximadamente 20 genes implicados en la adhesión celular en las células de la papila dérmica y menciona la posibilidad de promover la formación de folículos pilosos mediante el mantenimiento o el aumento de la expresión de los genes. Sin

embargo, entre los 20 genes, HAPLN1 se divulga en la patente, y los resultados que confirman si la expresión de estos genes promueve realmente la formación de folículos pilosos no se divulgan en absoluto.

5 **[0011]** Los documentos anteriores simplemente mencionan HAPLN1 como uno de los biomarcadores para identificar las células de la papila dérmica o células de la vaina dérmica o distinguirlas de otras células, y no mencionan en absoluto que la administración directa de la
10 proteína HAPLN1 como principio activo produce el efecto de prevenir o tratar la caída del cabello. Además, hasta la fecha no se ha realizado ninguna investigación que, entre las muchas rutas implicadas en el ciclo de crecimiento del cabello, la activación de la ruta de señalización de ERK1/2,
15 que se activa por la proteína TGF- β , es eficaz en el tratamiento de la caída del cabello, y, en particular, la HAPLN1 actúa sobre las células de la matriz germinal para activar la ruta anterior.

DESCRIPCIÓN DE LAS REALIZACIONES

20 **PROBLEMA TÉCNICO**

[0012] Un objetivo de la presente invención es proporcionar una composición farmacéutica para prevenir o tratar la caída del cabello, que tenga efectos secundarios reducidos mientras tiene excelentes efectos de tratamiento
25 para la caída del cabello, en comparación con los tratamientos convencionales para la caída del cabello que se acompañan de efectos secundarios graves.

[0013] Otro objetivo de la presente invención es proporcionar una composición farmacéutica que presente un efecto de prevención o tratamiento de la caída del cabello mediante un mecanismo de acción diferente al utilizado en los tratamientos convencionales para la caída del cabello.

[0014] Otro objetivo de la presente invención es proporcionar una composición farmacéutica para el crecimiento del cabello promoviendo la proliferación de las células de la matriz germinal del cabello. El cabello repite el ciclo de anágena, catágena y telógena, entre las cuales la anágena es una etapa en la que las células de la matriz germinal se diferencian de manera activa para generar cabello y, en esta etapa, se determina el grosor y la longitud del cabello. Dado que la anágena es la etapa más esencial en el tratamiento de la caída del cabello, es importante desarrollar un agente terapéutico para promover el inicio de la anágena de los folículos pilosos o ayudar a la proliferación de las células de la matriz germinal del cabello durante la anágena.

SOLUCIÓN AL PROBLEMA

[0015] La presente invención proporciona una composición farmacéutica para prevenir o tratar la caída del cabello, que comprende la HAPLN1 como principio activo.

[0016] La presente invención también proporciona una composición cosmética para prevenir o mejorar la caída del cabello, que comprende la HAPLN1 como principio activo.

[0017] En una realización, la HAPLN1 activa una ruta de señalización no canónica, y la ruta de señalización no canónica es una ruta de señalización ERK1/2 activada con una proteína TGF- β . Por consiguiente, la HAPLN1 de la presente invención promueve la proliferación de las células de la matriz germinal del cabello para permitir el crecimiento del cabello.

[0018] En una realización, la composición farmacéutica de la presente invención puede ser para la prevención o el tratamiento de la caída del cabello de patrón masculino, caída del cabello de patrón femenino, alopecia areata o efluvio telógeno. Asimismo, la caída del cabello puede reducir la expresión de la proteína HAPLN1 en las células de la matriz germinal del cabello.

[0019] En una realización, la composición farmacéutica de la presente invención se utiliza sola o en combinación con otros agentes terapéuticos.

EFFECTOS VENTAJOSOS DE LA DIVULGACIÓN

[0020] La composición farmacéutica de la presente invención comprende, como principio activo, HAPLN1, que es una proteína intracelular que constituye la matriz extracelular y, por lo tanto, tiene efectos secundarios reducidos, en comparación con los agentes terapéuticos convencionales para la caída del cabello.

[0021] Asimismo, la HAPLN1 contenida en la composición farmacéutica de la presente invención como principio activo activa una ruta de señalización ERK1/2

activada por una proteína TGF- β , es decir, una ruta de señalización no canónica, permitiendo así el crecimiento del cabello a través de la proliferación de las células de la matriz germinal del cabello. Dicho mecanismo de acción es completamente diferente al utilizado en los agentes terapéuticos convencionales para la caída del cabello, y nunca se ha conocido hasta la fecha. Por consiguiente, la HAPLN1 se puede utilizar como un nuevo concepto de tratamiento de la caída del cabello y puede sugerir una estrategia innovadora y una nueva dirección en la investigación sobre el tratamiento de la caída del cabello en el futuro.

BREVE DESCRIPCIÓN DE LOS DIBUJOS

[0022] La figura 1 es un diagrama esquemático que muestra la estructura de un folículo piloso.

[0023] La figura 2 es un diagrama esquemático que muestra un ciclo de crecimiento del cabello.

[0024] La figura 3 es un diagrama esquemático que muestra el mecanismo por el cual la HAPLN1 promueve la proliferación de las células de la matriz germinal del cabello y el crecimiento del cabello.

[0025] Las figuras 4 y 5 muestran los niveles de expresión de la proteína HAPLN1 y el ARNm de HAPLN1 en cada una de anágena, catágena y telógena en el ciclo de crecimiento del cabello.

[0026] La figura 6 muestra los resultados que confirman el aumento de la proteína T β RII en las células de la matriz germinal del cabello humano mediante la HAPLN1.

5 **[0027]** La figura 7 muestra los resultados que confirman el aumento de la proteína T β RII en las células de la matriz germinal del cabello humano mediante la HAPLN1 y/o el HA.

10 **[0028]** La figura 8 muestra los resultados que confirman el efecto de la deficiencia de la HAPLN1 endógena sobre la concentración de la proteína T β RII en las células de la matriz germinal de cabello humano.

15 **[0029]** La figura 9 muestra los resultados que confirman el efecto de la HAPLN1 exógena y/o el HA en la concentración de la proteína T β RII en las células de la matriz germinal de cabello humano deficientes en la HAPLN1 endógena.

20 **[0030]** La figura 10 muestra los resultados que confirman el efecto de la HAPLN1 exógena en la concentración de las proteínas T β RII y HAS2 en las células de la matriz germinal de cabello humano deficientes en HA endógeno.

[0031] La figura 11 muestra los resultados que confirman el efecto de la deficiencia de CD44 en la concentración de la proteína T β RII en las células de la matriz germinal del cabello humano.

25 **[0032]** La figura 12 muestra los resultados que confirman el efecto o efectos de la HAPLN1 y/o el HA en la

concentración de la proteína T β RII en las células de la matriz germinal humanas deficientes en CD44.

5 **[0033]** La figura 13 muestra los resultados que confirman los efectos de la HAPLN1 y/o el HA en la concentración de la proteína T β RII de la membrana celular.

[0034] Las figuras 14 a 16 muestran los resultados que confirman los efectos de la HAPLN1 y/o el HA en p-ERK1/2, p-Smad2, p-MEK1/2 y pc-Raf en las células de la matriz germinal del cabello humano.

10 **[0035]** La figura 17 muestra los resultados que confirman que se promovió la proliferación celular en el grupo tratado con la HAPLN1 y/o el HA en presencia de TGF- β 2.

15 **[0036]** La figura 18 muestra los resultados que confirman la expresión de la proteína HAPLN1 y la proteína T β RII en cada ciclo de crecimiento del cabello.

20 **[0037]** La figura 19 muestra un programa experimental y los resultados que confirman el efecto de la administración sistémica intraperitoneal de HAPLN1 en el crecimiento del pelo de ratones.

[0038] La figura 20 muestra un programa experimental y los resultados del mismo que confirman el efecto de la administración sistémica intraperitoneal del ARNip de HAPLN1 en el crecimiento del pelo de ratones.

25 **[0039]** La figura 21 muestra los resultados que confirman la proliferación celular cuando las células de la

papila dérmica se trataron con la proteína HAPLN1, CX3CL1 o CDON, o con minoxidil.

5 **[0040]** La figura 22 muestra los resultados que confirman la proliferación celular cuando las células de la matriz germinal humana se trataron con la proteína HAPLN1, CX3CL1 o CDON.

MEJOR MODO

10 **[0041]** En lo sucesivo en el presente documento, las realizaciones y ejemplos de la presente invención se describirán en detalle con referencia a los dibujos adjuntos para que los expertos en la materia puedan llevar a cabo fácilmente la presente divulgación. Sin embargo, la presente solicitud puede llevarse a cabo de diversas formas y no se limita a las realizaciones y los ejemplos descritos en el
15 presente documento.

20 **[0042]** A lo largo de la memoria descriptiva de la presente solicitud, cuando una parte "comprende" un determinado componente, significa que se pueden incluir además otros componentes en lugar de excluir otros componentes a menos que se indique de manera específica lo
20 contrario.

25 **[0043]** La presente invención se refiere a una composición farmacéutica para prevenir o tratar la caída del cabello, que comprende la HAPLN1 como principio activo. En una realización, la presente invención proporciona un método para prevenir o tratar la caída del cabello en un sujeto, comprendiendo el método administrar una cantidad eficaz de

la proteína HAPLN1 al sujeto que lo necesita. En otra realización, la presente invención proporciona el uso de la proteína HAPLN1 para prevenir o tratar la caída del cabello.

5 **[0044]** La HAPLN1 es una proteína presente en el organismo y se ha utilizado como biomarcador para identificar células específicas o distinguirlas de otras células en estudios convencionales relacionados con el tratamiento de la caída del cabello. Cuando la proteína HAPLN1 de la presente invención se utiliza directamente como principio
10 activo, presenta excelentes efectos para prevenir o tratar la caída del cabello mientras tiene efectos secundarios relativamente reducidos, en comparación con los agentes terapéuticos convencionales para la caída del cabello acompañados de efectos secundarios graves.

15 **[0045]** En particular, cuando la proteína HAPLN1 de la presente invención se utiliza directamente como principio activo, el crecimiento del cabello se promueve de una manera completamente diferente al tratamiento para la caída del cabello existente. De manera específica, la proteína HAPLN1
20 de la presente invención activa una ruta de señalización no canónica y, en este caso, la ruta de señalización no canónica es una ruta de señalización ERK1/2 que se activa con una proteína TGF- β . A través de la ruta de señalización, HAPLN1 promueve la proliferación de las células de la matriz
25 germinal del cabello y permite el crecimiento del cabello, presentando de ese modo un efecto de prevención o tratamiento de la caída del cabello.

[0046] La activación de la ruta de señalización no canónica de la proteína HAPLN1, que se identifica por primera vez en la presente invención, se describirá a continuación con más detalle.

5 **[0047]** Con respecto al mecanismo de señalización de TGF- β , cuando una célula de la matriz germinal del cabello se estimula mediante TGF- β , TGF- β se une al receptor 2 de TGF- β (T β RII) de la célula de la matriz germinal del cabello. Después de eso, T β RII se une al receptor 1 de TGF- β (T β RI) para formar un complejo T β R. El complejo T β R entra en la
10 célula mediante endocitosis y el ciclo celular se detiene mediante la señalización de Smad2/3 durante la endocitosis dependiente de clatrina. Esta ruta es una ruta de señalización canónica. Sin embargo, cuando la caveolina-1 induce endocitosis, T β RI y T β RII finalmente se degradan
15 mediante la señalización de Smad7. En este proceso, la ruta de señalización de TGF- β se activa y, además de la ruta canónica de Smad, hay un mecanismo Ras-ERK1/2 de una ruta no canónica, tal como Ras-ERK1. La activación de la señalización Ras-ERK1/2 conduce a la proliferación celular.
20

[0048] En la presente invención, se reveló por primera vez que HAPLN1 activa la ruta Ras-ERK1/2, es decir, una ruta no canónica en el mecanismo de señalización de TGF- β (Figura 3). Ahora se describirá el mecanismo específico.
25 El ácido hialurónico (HA, del inglés "Hyaluronic Acid") se produce por la ácido hialurónico sintasa 2 (HAS2, del inglés "hyaluronic acid synthase 2") en las células. El HA se une

al CD44 de la membrana celular (receptor del HA) y el CD44 se une al T β R. Es decir, el HA se une de manera indirecta al T β R. Para inducir la endocitosis del HA, el HA es esencialmente descompuesto mediante hialuronidasa (HYAL2).

5 La HAPLN1 induce la estabilización del HA mediante la unión del HA con proteoglucanos. La HAPLN1 inhibe a la HYAL2 para que no descomponga el HA al permitir que el HA esté estrechamente rodeado por proteoglucanos, o inhibe que el HA se descomponga mediante especies reactivas de oxígeno (ROS,
10 del inglés "reactive oxygen species"). Como resultado, la HAPLN1 inhibe la inclusión del T β R, previene la actividad del mecanismo de Smad2/3 y la degradación del T β R, y aumenta el T β RII de la membrana celular. Por consiguiente, la ruta de señalización no canónica, es decir, el mecanismo Ras-
15 ERK1/2, se activa mediante la HAPLN1, y se promueve la proliferación celular, conduciendo finalmente al crecimiento del cabello.

[0049] Por lo tanto, la proteína HAPLN1 de la presente invención promueve la proliferación celular a
20 través de la señalización Ras-ERK1/2 activada por la proteína TGF- β , y se puede utilizar para prevenir o tratar la caída del cabello. En particular, la proteína HAPLN1 de la presente invención promueve la proliferación de las células de la matriz germinal del cabello, induciendo así el crecimiento
25 del cabello.

[0050] Tal como se utiliza en el presente documento, la expresión "caída del cabello" se refiere a un estado en

el que no hay cabello en el área donde el cabello debería existir normalmente, independientemente de la causa de la misma, y puede ser, por ejemplo, caída del cabello de patrón masculino, caída del cabello de patrón femenino, alopecia areata o efluvio telógeno.

[0051] En otra realización, la presente invención proporciona una composición cosmética para prevenir o mejorar la caída del cabello, que comprende la HAPLN1 como principio activo. La composición cosmética puede ser, por ejemplo, un cosmético para el cabello, y la formulación del mismo no está particularmente limitada, y puede seleccionarse de manera adecuada dependiendo del propósito pretendido.

[0052] Por ejemplo, la composición cosmética se puede formular como una solución, suspensión, emulsión, pasta, gel, crema, loción, polvo, jabón, limpiador que contiene tensioactivo, aceite, base en polvo, base en emulsión, base de cera y pulverizador, pero sin limitarse a estos. Más específicamente, la composición cosmética para el cabello puede incluir, por ejemplo, un agente limpiador, tal como champú, acondicionador y limpiador corporal, un agente de peluquería, tal como tónico para el cabello, gel o espuma, un agente nutritivo para el cabello o un tinte para el cabello.

[0053] En una realización de la presente invención, la composición cosmética puede contener varias bases y aditivos adecuados, según sea necesario, y el inventor puede

seleccionar fácilmente los tipos y las cantidades de estos ingredientes. La composición cosmética puede contener aditivos aceptables, según sea necesario, y puede incluir además, por ejemplo, componentes, tales como conservantes, colorantes, aditivos, etc. que se utilizan comúnmente en la materia.

MODO DE LA DIVULGACIÓN

[0054] En lo sucesivo en el presente documento, la presente invención se describirá con más detalle mediante los siguientes ejemplos, pero los siguientes ejemplos son únicamente con fines ilustrativos y no se pretende que limiten el alcance de la presente invención.

[0055]

[0056] [Ejemplo 1]

[0057] Confirmación de la proteína HAPLN1 y la expresión del ARNm de HAPLN1 en cada ciclo de crecimiento del cabello

[0058] En este ejemplo, la expresión de la proteína HAPLN1 se confirmó en cada ciclo de crecimiento del cabello utilizando piel de ratón.

[0059] La piel del ratón se recogió a los 23 días de edad (anágena temprana), 32 días de edad (anágena), 40 días de edad (catágena) y 44 días de edad (telógena), y estaba fresca y congelada. La sección de tejido de la piel se preparó para que tuviera un grosor de 8 μm , y se detectó la presencia o ausencia de la proteína HAPLN1 utilizando un

anticuerpo HAPLN1 (Abcam, EE. UU.). La inmunofluorescencia se llevó a cabo de acuerdo con un método experimental común.

[0060] Como resultado, como se muestra en la figura 4, se confirmó que la HAPLN1 se expresó de manera significativa en las células de la matriz germinal del
5 cabello en la fase anágena, y también se confirmó que el nivel de expresión de la HAPLN1 se redujo en las fases catágena y telógena.

[0061] Posteriormente, se identificó ARNm de HAPLN1
10 en la piel de ratón para determinar en qué células se produjo la HAPLN1.

[0062] La piel de ratón se recogió a los 32 días de edad (anágena), 40 días de edad (catágena) y 44 días de edad (telógena), y la sección de tejido de la piel se cortó en
15 parafina hasta un grosor de 8 µm. La detección se realizó con una sonda de ARNm de HAPLN1 (ACDbio, EE. UU.), y la experimentación de hibridación *in situ* se realizó de acuerdo con el método experimental del fabricante (ACDbio; RNAscope® 2.5 HD Assay-BROWN, CA, EE. UU.).

[0063] Como resultado, como se muestra en la figura 5, se confirmó que el ARNm de HAPLN1 se expresaba a partir de las células de la matriz germinal del cabello en la anágena, y la expresión no se confirmó en las fases catágena y telógena.

[0064]

[0065] [Ejemplo 2]

[0066] Confirmación del aumento de la proteína T β RII en las células de la matriz germinal del cabello humano mediante la HAPLN1

5 **[0067]** En este ejemplo, se confirmó si la HAPLN1 aumentaba la cantidad al prevenir la degradación del T β RII.

[0068] Se trataron con HAPLN1 células de la matriz germinal de cabello humano mediante concentración. De manera específica, se repartieron células de matriz germinal de cabello humano (HHGMC, del inglés "human hair germinal matrix cells") en una placa de 6 pocillos de poli-D-lisina a 10 5.0×10^4 por pocillo y se cultivaron durante 24 horas. Después de 24 horas, el medio se eliminó y se reemplazó con un nuevo medio sin suero. Se trataron con HAPLN1 0, 5, 10 y 20 ng/ml y se incubaron durante 24 horas. Después de recoger 15 las células, se añadió un tampón de lisis (Tris-HCl 25 mM, EDTA 1 mM, Tritón-X100 al 0.1 %, inhibidor de fosfatasa e inhibidor de proteasa) y todas las células se rompieron mediante sonicación. Se midió el T β RII en la muestra usando transferencia Western. La densidad óptica de T β RII se comparó 20 con la de GAPDH usando un densitómetro (es decir, concentración óptica de T β RII $\div$ concentración óptica de GAPDH). En este caso, GAPDH se utilizó como control de carga.

[0069] Como resultado, como se muestra en la figura 6, se confirmó que el T β RII aumentó a 20 ng/ml de HAPLN1.

25 **[0070]** A partir de esto, se confirmó que el T β RII aumentó cuando se trataron con HAPLN1 las células de la matriz germinal de cabello humano.

[0071]

[0072] **[Ejemplo 3]**

[0073] Confirmación del aumento de la proteína T β RII
en las células de la matriz germinal del cabello humano
mediante HAPLN1 y/o HA

[0074] Se asumió que la HAPLN1 afecta al T β RII
mediante la estabilización del HA en lugar de actuar
directamente sobre el T β RII en la ruta de señalización de
TGF- β . Para confirmar esto, se realizó un experimento de
tratamiento con HAPLN1 y HA juntos.

[0075] Se repartieron células de la matriz germinal
de cabello humano en una placa de 6 pocillos de poli-D-lisina
a una concentración de 5.0×10^4 por pocillo y se cultivaron
durante 24 horas. Después de 24 horas, el medio se eliminó
y se reemplazó con un nuevo medio sin suero. Se trataron con
HAPLN1 25 ng/ml, se trataron con HA 25 μ g/ml, y después de
1 hora, se trataron con TGF- β 2 (2 ng/ml). Después de 23 horas,
se recogieron las células, se añadió un tampón de lisis
(Tris-HCl 25 mM, EDTA 1 mM, Tritón-X100 al 0.1 %, inhibidor
de fosfatasa e inhibidor de proteasa) y todas las células se
rompieron mediante sonicación. Se midieron T β RI y T β RII en
la muestra usando transferencia Western. La densidad óptica
de T β RII se comparó con la de GAPDH usando un densitómetro.

[0076] Como resultado, como se muestra en la figura
7, se confirmó que el T β RII aumentó cuando se trataron con
HAPLN1 o HA las células de la matriz germinal del cabello
humano.

[0077] A partir de esto, se volvió a confirmar que el T β RII aumentó significativamente cuando se trataron con HAPLN1 sola y, en particular, se confirmó que la HAPLN1 mejoró aún más el aumento de T β RII mediante el HA. Sin embargo, dado que no hubo cambios en la concentración del T β RI, el aumento del T β RII mediante la HAPLN1 se considera selectivo.

[0078]

[0079] [Ejemplo 4]

[0080] Confirmación del efecto de la deficiencia de la HAPLN1 endógena en la concentración de proteína T β RII en las células de la matriz germinal del cabello humano

[0081] Para confirmar el efecto de la HAPLN1 endógena en la concentración de la proteína T β RII en las células de la matriz germinal del cabello humano, se hicieron deficientes en HAPLN1 endógena mediante el uso de ARNip de HAPLN1.

[0082] Se repartieron células de la matriz germinal de cabello humano en una placa de 6 pocillos de poli-D-lisina a una concentración de 5.0×10^4 por pocillo y se cultivaron durante 24 horas. Después de 24 horas, el medio se eliminó y se reemplazó con un medio con bajo contenido de suero. Se añadieron ARNip de HAPLN1 y ARNip de secuencia aleatoria en cada cantidad de 25 pmol por pocillo y después se cultivaron durante 24 horas. Después de recoger las células, se añadió un tampón de lisis (Tris-HCl 25 mM, EDTA 1 mM, Tritón-X100 al 0.1 %, inhibidor de fosfatasa e inhibidor de proteasa) y

todas las células se rompieron mediante sonicación. Se midieron HAPLN1 y T β R11 en la muestra usando transferencia Western. La densidad óptica de cada uno de HAPLN1 y T β R11 se comparó con la de GAPDH usando un densitómetro.

5 **[0083]** Como resultado, como se muestra en la figura 8, se confirmó que el T β R11 también disminuyó cuando las células de la matriz germinal del cabello humano, se hicieron deficientes en HAPLN1 endógena mediante el tratamiento de ARNip de HAPLN1.

10 **[0084]**

[0085] [Ejemplo 5]

[0086] Confirmación del efecto de la HAPLN1 exógena y/o HA en la concentración de la proteína T β R11 en células de matriz germinal de cabello humano con deficiencia de la HAPLN1 endógena

15

[0087] Se determinó si la proteína T β R11 aumentaba en las células de la matriz germinal del cabello humano, que se hicieron deficientes en HAPLN1 usando ARNip de HAPLN1.

[0088] Las células de la matriz germinal de cabello humano se repartieron en una placa de 6 pocillos de poli-D-lisina a una concentración de 5.0×10^4 por pocillo y se cultivaron durante 24 horas. Después de 24 horas, el medio se eliminó y se reemplazó con un medio con bajo contenido de suero. Se añadieron ARNip de HAPLN1 y ARNip de secuencia aleatoria a una concentración de 25 pmol por pocillo y se incubaron durante 24 horas. Después de que se eliminaron el ARNip y el medio, el medio se reemplazó con un medio sin

20

25

suero al que se le añadió HAPLN1 (25 ng/ml) o HA (25 µg/ml) y se cultivó durante 1 hora. Se trataron con TGF-β2 (2 ng/ml) y se incubaron durante 23 horas. Después de recoger las células, se añadió un tampón de lisis (Tris-HCl 25 mM, EDTA 1 mM, Tritón-X100 al 0.1 %, inhibidor de fosfatasa e inhibidor de proteasa) y todas las células se rompieron mediante sonicación. Se midió el TβRII en la muestra usando transferencia Western. La densidad óptica de TβRII se comparó con la de GAPDH usando un densitómetro.

10 **[0089]** Como resultado, como se muestra en la figura 9, se confirmó que se recuperó la disminución de TβRII cuando se trataron con HAPLN1 exógena y/o HA las células de la matriz germinal de cabello humano deficientes en la HAPLN1 endógena.

15 **[0090]**

[0091] [Ejemplo 6]

[0092] Confirmación del efecto de la HAPLN1 exógena en las concentraciones de proteínas TβRII y HAS2 en células de la matriz germinal de cabello humano deficientes en HA endógeno

20

[0093] 4-MU (4-metilumbeliferrona) es un inhibidor de la hialuronano sintasa 2 (HAS2) productora de HA, que produce HA. Para confirmar el efecto del HA producido en las células, la producción de HA en las células se inhibió con 4-MU.

25 **[0094]** Las células de la matriz germinal del cabello humano, en las que el HA endógeno se inhibió mediante el tratamiento con 4-MU, se repartieron en una placa de 6

pocillos de poli-D-lisina a una concentración de 5.0×10^4 por pocillo y se cultivaron durante 24 horas. Después de 24 horas, el medio se eliminó y se reemplazó con un nuevo medio sin suero. Se trataron con HAPLN1 25 ng/ml, y después de 1 hora, se trataron con TGF- β 2 (2 ng/ml). Después de 23 horas, se recogieron las células, se añadió un tampón de lisis (Tris-HCl 25 mM, EDTA 1 mM, Tritón-X100 al 0.1 %, inhibidor de fosfatasa e inhibidor de proteasa) y todas las células se rompieron mediante sonicación. Se midieron HAS2 y T β RII en la muestra usando transferencia Western. La densidad óptica de cada uno de HAS2 y T β RII se comparó con la de GAPDH usando un densitómetro.

[0095] Como resultado, como se muestra en la figura 10, se confirmó que los niveles de HAS2 y T β RII disminuyeron cuando se trataron con 4-MU, y los niveles de HAS2 y T β RII se recuperaron cuando se trató con la HAPLN1.

[0096]

[0097] [Ejemplo 7]

[0098] En el ejemplo 3, se confirmó que la HAPLN1 regula el T β RII a través del HA. Sin embargo, el HA no se une directamente al T β RII, pero CD44, que es un receptor del HA, se une al T β RII.

[0099] En este ejemplo, se confirmó si CD44 era uno de los factores importantes en el proceso de regulación del T β RII, y si CD44 era realmente un factor esencial en el proceso de aumento del T β RII mediante la HAPLN1.

[00100] Confirmación del efecto de la deficiencia de CD44 en la concentración de la proteína T β RII en las células de la matriz germinal del cabello humano

5 **[00101]** En primer lugar, se confirmó cómo cambiaba la concentración de la proteína T β RII cuando las células de la matriz germinal del cabello humano eran deficientes en CD44.

10 **[00102]** Las células de la matriz germinal del cabello humano, que se hicieron deficientes en CD44 endógeno mediante el tratamiento de ARNip de CD44, se repartieron en una placa de 6 pocillos de poli-D-lisina a una concentración de 5.0×10^4 por pocillo y se cultivaron durante 24 horas. Después de 24 horas, el medio se eliminó y se reemplazó con un medio con bajo contenido de suero. Se añadieron ARNip de CD44 y ARNip de secuencia aleatoria a una concentración de 15 25 pmol por pocillo y se incubaron durante 24 horas. Después de recoger las células, se añadió un tampón de lisis (Tris-HCl 25 mM, EDTA 1 mM, Tritón-X100 al 0.1 %, inhibidor de fosfatasa e inhibidor de proteasa) y todas las células se rompieron mediante sonicación. Se midieron CD44 y T β RII en 20 la muestra usando transferencia Western. La densidad óptica de cada uno de CD44 y T β RII se comparó con la de GAPDH usando un densitómetro.

25 **[00103]** Como resultado, como se muestra en la figura 11, se confirmó que la concentración de la proteína T β RII se redujo de manera significativa en las células de la matriz germinal de cabello humano deficientes en CD44.

[00104] 2. Confirmación del efecto(s) de la HAPLN1 y/o el HA en la concentración de proteína T β RII en células de matriz germinal de cabello humano deficientes en CD44

5 **[00105]** Posteriormente, se confirmó el efecto o efectos de la HAPLN1 y/o el HA en la concentración de la proteína T β RII en células de matriz germinal de cabello humano deficientes en CD44.

10 **[00106]** Las células de la matriz germinal del cabello humano, que se hicieron deficientes en CD44 mediante el uso de ARNip de CD44, se repartieron en una placa de 6 pocillos de poli-D-lisina a una concentración de 5.0×10^4 por pocillo y se cultivaron durante 24 horas. Después de 24 horas, el medio se eliminó y se reemplazó con un medio con bajo contenido de suero. Se añadieron ARNip de CD44 y ARNip de
15 secuencia aleatoria a una concentración de 25 pmol por pocillo y se incubaron durante 24 horas. Después de que se eliminaron el ARNip y el medio, el medio se reemplazó con un medio sin suero al que se le añadió HAPLN1 (25 ng/ml) o HA (25 μ g/ml) y se cultivó durante 1 hora. Se trataron con TGF-
20 β 2 (2 ng/ml) y se incubaron durante 23 horas. Después de recoger las células, se añadió un tampón de lisis (Tris-HCl 25 mM, EDTA 1 mM, Tritón-X100 al 0.1 %, inhibidor de fosfatasa e inhibidor de proteasa) y todas las células se rompieron mediante sonicación. Se midió el T β RII en la
25 muestra usando transferencia Western. La densidad óptica de T β RII se comparó con la de GAPDH usando un densitómetro.

[00107] Como resultado, como se muestra en la figura 12, no se confirmó que el T β R_{II} se recuperó incluso con tratamiento con la HAPLN1 y/o el HA cuando las células de la matriz germinal del cabello humano eran deficientes en CD44.

5 **[00108]** Del experimento anterior, se confirmó que CD44 era un factor esencial en el proceso de aumento del T β R_{II} mediante la HAPLN1 y el HA.

[00109]

[00110] [Ejemplo 8]

10 **[00111]** Confirmación del efecto(s) de la HAPLN1 y/o el HA en obre la concentración de la proteína T β R_{II} de la membrana celular

[00112] Se asumió que la HAPLN1 produciría un aumento en el T β R_{II} de la membrana celular mediante la inhibición de la endocitosis del T β R_{II}, y se realizó un experimento para demostrar esto.

[00113] Todas las proteínas presentes en la membrana celular se marcaron con biotina y se realizó una inmunoprecipitación con un anticuerpo de biotina para aislar solo la proteína de la membrana celular. Para confirmar los cambios en la proporción de T β R_{II} entre las proteínas de la membrana celular, se realizó una transferencia Western. Ahora se describirá el método experimental específico.

20 **[00114]** Se repartieron células de la matriz germinal de cabello humano en una placa de 100 mm de poli-D-lisina a una concentración de 2.7×10^6 y se cultivaron durante 24 horas. Después de 24 horas, el medio se eliminó y se

reemplazó con un nuevo medio sin suero. Se trataron con HAPLN1 25 ng/ml y con HA 25 µg/ml, y después de 1 hora, se trataron con TGF-β2 (2 ng/ml). Para marcar con biotina después de 23 horas, se trataron con EZ-Link™ Sulfo-NHS-LC-Biotina (Thermo Fisher Scientific, MA, EE. UU.) a una concentración de 250 µg/ml y se incubaron a 4 °C durante 1 hora. La reacción de marcaje con biotina se terminó mediante el tratamiento con Tris-HCl 50 mM. Después de recoger las células, se añadió un tampón de lisis (Tris-HCl 50 mM, NaCl 150 mM, NP-40 al 1 %, inhibidor de fosfatasa e inhibidor de proteasa) y todas las células se rompieron mediante sonicación. Las proteínas de la membrana celular se aislaron mediante la realización de experimentos de inmunoprecipitación utilizando anticuerpos antibiotina. Se midió el TβRII en la muestra de proteína de membrana aislada usando transferencia Western. La densidad óptica de TβRII se comparó con la de GAPDH usando un densitómetro.

[00115] Como resultado, como se muestra en la figura 13, se confirmó que la concentración de la proteína TβRII de la membrana celular aumentó cuando se trató con la HAPLN1 y/o el HA.

[00116]

[00117] [Ejemplo 9]

[00118] Investigación del efecto de la proliferación celular y el mecanismo de acción de la HAPLN1

[00119] En este ejemplo, para confirmar cómo la HAPLN1 induce la proliferación celular, se determinó el efecto de la HAPLN1 en la ruta Smad2 y la ruta ERK1/2.

[00120] Se repartieron células de la matriz germinal de cabello humano en una placa de 6 pocillos de poli-D-lisina a una concentración de 5.0×10^4 por pocillo y se cultivaron durante 24 horas. Después de 24 horas, el medio se eliminó y se reemplazó con un nuevo medio sin suero. Se trataron con HAPLN1 25 ng/ml y con HA 25 µg/ml, se incubaron durante 23 horas y después se estimularon con TGF-β2 (2 ng/ml) durante 1 hora. Después de recoger las células, se añadió un tampón de lisis (Tris-HCl 25 mM, EDTA 1 mM, Tritón-X100 al 0.1 %, inhibidor de fosfatasa e inhibidor de proteasa) y todas las células se rompieron mediante sonicación. Se midieron ERK1/2, p-Smad2, p-MEK1/2 y pc-Raf en la muestra usando transferencia Western. Las densidades ópticas de p-ERK1/2, p-Smad2, p-MEK1/2 y pc-Raf se compararon con las de ERK1/2, Smad2/3, MEK1 y c-Raf usando un densitómetro. En este caso, se utilizaron ERK1/2, Smad2/3, MEK1 y c-Raf como controles de carga.

[00121] Como resultado, tal como se muestra en las figuras 14 a 16, se confirmó que la señalización de ERK1/2 se activó mediante el TGF-β2 en células tratadas con la HAPLN1 y/o el HA. Asimismo, se confirmó que la HAPLN1 mejoró la activación de la señalización de ERK1/2 con HA. Sin embargo, no hubo cambios en la fosforilación de Smad2. Asimismo, se confirmó que MEK1/2 y c-Raf, que se encuentran

en los mecanismos ascendentes de ERK1/2, tenían actividades aumentadas por el tratamiento con la HAPLN1 y/o el HA.

[00122] A partir de esto, se confirmó que la señal ERK se activó mediante la HAPLN1, lo que indica que la señalización se logra a través de una ruta no canónica. Sin embargo, se confirmó que la HAPLN1 no activó la ruta canónica de Smad2/3.

[00123]

[00124] [Ejemplo 10]

[00125] Investigación del efecto de la proliferación celular y el mecanismo de acción de la HAPLN1

[00126] Se repartieron células de la matriz germinal de cabello humano en una placa de 96 pocillos de poli-D-lisina a una concentración de 2.0×10^4 por pocillo y se cultivaron durante 24 horas. Después de 24 horas, el medio se eliminó y se reemplazó con un nuevo medio sin suero. Se trataron con HAPLN1 25 ng/ml y con HA 25 µg/ml, se incubaron durante 1 hora y después se estimularon con el TGF-β2 (2 ng/ml) durante 23 horas. Se trataron con CCK-8 (Enzo Biochem, NY, EE. UU.) y se incubaron a 37 °C durante 1 hora. La absorbencia se midió a 450 nm y los resultados se muestran en la figura 17.

[00127] Se confirmó que se promovió la proliferación celular en el grupo tratado con la HAPLN1 y/o el HA en presencia del TGF-β2, en comparación con el grupo de control. Esto sugiere que la HAPLN1 promueve la proliferación de

células de la matriz germinal del cabello humano a través de la ruta de señalización no canónica del TGF- β .

[00128]

[00129] [Ejemplo 11]

5 **[00130]** Confirmación de la expresión de la proteína HAPLN1 y la proteína T β RII en cada ciclo de crecimiento del cabello

10 **[00131]** En este ejemplo, HAPLN1 y T β RII se tiñeron con fluorescencia en cada ciclo de pelo de la piel de ratón y se confirmó la expresión de la proteína HAPLN1 y la proteína T β RII.

15 **[00132]** La piel de ratón se recogió a los 32 días de edad (anágena), 40 días de edad (catágena) y 44 días de edad (telógena), y estaba fresca y congelada. La sección de tejido de la piel se preparó para que tuviera un grosor de 8 μ m, y se detectó la presencia o ausencia de las proteínas HAPLN1 y T β RII usando un anticuerpo HAPLN1 (Abcam, EE. UU.) y un anticuerpo T β RII. La inmunofluorescencia se llevó a cabo de acuerdo con un método experimental común.

20 **[00133]** Como resultado, como se muestra en la figura 18, se confirmó que la HAPLN1 se expresaba en las células de la matriz germinal del cabello en la fase anágena, y también se confirmó que la expresión de la HAPLN1 estaba reducida en las fases catágena y telógena. Asimismo, se confirmó que la HAPLN1 y el T β RII se expresaron en la misma ubicación en la matriz germinal del cabello de la fase anágena (colocalización). Esto sugiere que la HAPLN1 y el T β RII

25

contribuyen a la proliferación de las células de la matriz germinal del cabello humano.

[00134]

[00135] [Ejemplo 12]

5 **[00136]** Observación de cambios en el ciclo de crecimiento del cabello mediante la HAPLN1 en modelos animales

10 **[00137]** 1. Confirmación del efecto de la administración sistémica intraperitoneal de la HAPLN1 sobre el crecimiento del pelo de ratón

[00138] La HAPLN1 en el cuerpo disminuye con la edad. Se administró la HAPLN1 a ratones C57 de 20 meses de edad con una disminución de la HAPLN1 en el cuerpo.

15 **[00139]** Dado que los ratones C57 tenían diferentes ciclos de crecimiento del cabello, los ciclos de todos los ratones se ajustaron de manera uniforme a través de dos ciclos de crecimiento del cabello (véase el esquema de la figura 19). Después de eso, se inyectó la HAPLN1 por vía intraperitoneal a 0.1 mg/kg una vez cada 3 días.

20 **[00140]** Como resultado, como se muestra en la figura 19, el grupo tratado con la HAPLN1 entró en la fase anágena en un corto período de tiempo.

25 **[00141]** 2. Confirmación del efecto de la administración sistémica intraperitoneal de ARNip de HAPLN1 en el crecimiento del pelo de ratón

[00142] Se administró ARNip de HAPLN1 a ratones C57 de 7 semanas de edad, y se observó cómo cambió el ciclo de

crecimiento del cabello de acuerdo con la deficiencia de HAPLN1. Para este fin, se inyectó ARNip de HAPLN1 (Dharmacon; Accell HAPLN1 siRNA SMARTpool, CO, EE. UU.) por vía intraperitoneal dos veces por semana a 4 nmol durante 4 semanas (véase el esquema de la figura 20).

[00143] Como resultado, como se muestra en la figura 20, se confirmó que el grupo al que se administró el ARNip de HAPLN1 mostró una entrada relativamente lenta en el ciclo de crecimiento del cabello, en comparación con el grupo de control.

[00144]

[00145] [Ejemplo 13]

[00146] Verificación del efecto de HAPLN1, CX3CL1 y CDON en células papilares dérmicas proliferantes o células de matriz germinal capilar

[00147] La patente de EE. UU. n.º 8,334,136 propone la posibilidad de que se pueda promover la formación de folículos pilosos o la regeneración del cabello mediante el mantenimiento o el aumento de la expresión de genes de adhesión celular, tales como HAPLN1, CX3CL1, CDON, etc. presentes en las células de la papila dérmica. En este ejemplo, cuando la proteína HAPLN1, CX3CL1 o CDON expresada por los genes de adhesión celular se trató directamente en las células de la papila dérmica o en las células de la matriz germinal del cabello, se verificó si el efecto proliferativo se expresaba realmente o no.

[00148] 1. Confirmación del efecto proliferativo de células de la papila dérmica

[00149] Las células de la papila dérmica humana se cultivaron en una incubadora a 37 °C y CO₂ al 5 % utilizando un medio de proliferación de células de papila dérmica (Promocell). Cuando estaba llena de células en un 90 %, las células se separaron con una solución de tripsina/EDTA al 0.05 % y después se centrifugaron a 1000 rpm durante 3 minutos para recuperar solo las células. Las células se repartieron en una placa de 96 pocillos a 2.0×10^3 por pocillo, se cultivaron durante 24 horas, y se diluyeron HAPLN1, CX3CL1 y CDON para tener una concentración final de 25 ng/ml en medio sin suero. Después de eliminar el medio de cultivo existente, se repartieron 200 µl de HAPLN1, CX3CL1 y CDON diluidos en cada pocillo y se cultivaron durante 1 hora. Para reducir una variación experimental, se trataron 3 pocillos por grupo (triplicación). Asimismo, se trataron con minoxidil, que se sabe que hace proliferar las células de la papila dérmica, 10 µM y se estableció como control positivo.

[00150] Del mismo modo descrito anteriormente, se diluyeron HAPLN1 (25 ng/ml), CX3CL1 (25 ng/ml,) CDON (25 ng/ml) o minoxidil (10 µM) y TGF-β2 recombinante humano hasta una concentración final de 2 ng/ml, y el medio del grupo que contenía TGF-β2 se reemplazó por 200 µl. Para reducir una variación experimental, se trataron 3 pocillos por grupo (triplicación).

[00151] Después de la incubación durante 23 horas, se retiró la placa de la incubadora y se añadieron 20 µl de solución CCK-8 (WST-8) a la placa que contenía el medio y el reactivo por 200 µl del medio para que la reacción se llevara a cabo a 37 °C durante 1 hora. Posteriormente, la absorbencia se midió a 450 nm usando un lector de microplacas, y los resultados de la misma se muestran en la figura 21.

[00152] Como se muestra en la figura 21, cuando el TGF-β2 está presente o ausente, se confirmó una actividad proliferativa de las células de la papila dérmica significativa en el grupo de control positivo tratado con minoxidil (*** P <0.001). Sin embargo, todas las HAPLN1, CX3CL1 y CDON no hicieron proliferar las células de la papila dérmica o más bien inhibieron la proliferación de las mismas. Es decir, se puede ver que incluso si la proteína expresada por los genes de adhesión celular en las células de la papila dérmica se administra a las células de la papila dérmica, no aparece el efecto de proliferación de las células de la papila dérmica.

[00153] 2. Confirmación del efecto proliferativo de células de la matriz germinal del cabello

[00154] Se liberaron células de la matriz germinal de cabello humano en un matraz recubierto de poli-D-lisina usando un medio con células madre mesenquimales (MSCM, del inglés "mesenchymal stem cell medium") y se cultivaron en una incubadora de CO₂ al 5 % a 37 °C. Cuando estaban llenos de células en un 90 %, las células se separaron con una

solución de tripsina/EDTA al 0.05 %, y después solo se recogieron las células mediante centrifugación a 1000 rpm durante 3 minutos. Las células recogidas se repartieron en placas de 96 pocillos recubiertas de poli-D-lisina (BD bioscience) a 2.0×10^3 por pocillo y se cultivaron durante 24 horas, y las concentraciones finales de HAPLN1, CX3CL1 y CDON se diluyeron a 25 ng/ml en un medio sin suero. El proceso posterior se realizó de la misma manera que el experimento para las células de la papila dérmica para medir la absorbencia, y los resultados se muestran en la figura 22.

[00155] Como se muestra en la figura 22, la HAPLN1 mostró una actividad de proliferación de células de la matriz germinal del cabello significativa en ausencia del TGF- β 2 (*P < 0.05), y, una actividad de proliferación de células de la matriz germinal del cabello particularmente superior en presencia del TGF- β 2 (***P < 0.001). Por lo tanto, se confirmó que tiene un efecto de proliferación de las células de la matriz germinal del cabello humano a través de la ruta de señalización del TGF- β . Sin embargo, como en las células de la papila dérmica, CX3CL1 y CDON también mostraron un resultado de inhibir la proliferación celular en las células de la matriz germinal del cabello.

[00156] Aunque la patente de EE. UU. n.º 8,334,136 establece la posibilidad de que se pueda promover la formación de folículos pilosos o la regeneración del cabello mediante el mantenimiento o el aumento de la expresión de

los genes de adhesión celular presentes en las células de la papila dérmica, finalmente se puede confirmar que todas las proteínas expresadas por genes de adhesión celular no proliferan realmente las células de la papila dérmica o las células de la matriz germinal del cabello.

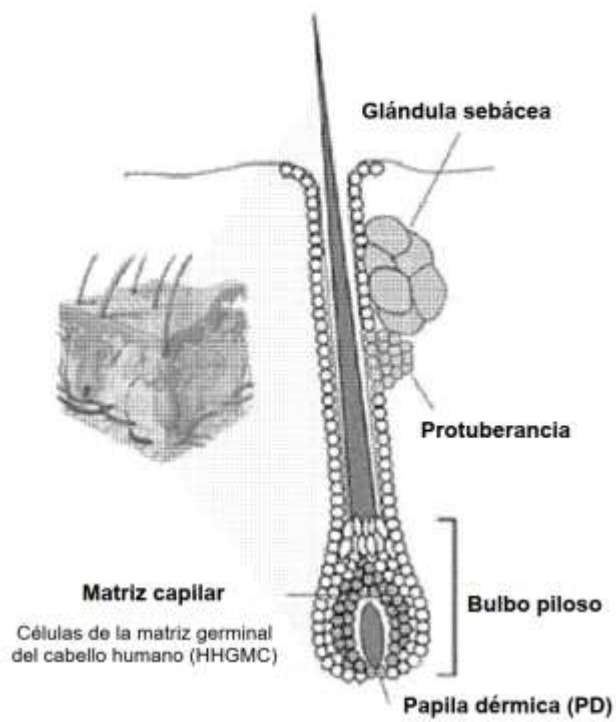
[00157] Por lo tanto, se puede observar que solo la proteína HAPLN1 tiene el efecto de prevenir o tratar la caída del cabello al promover la proliferación de las células de la matriz germinal del cabello y el crecimiento del cabello.

[00158]

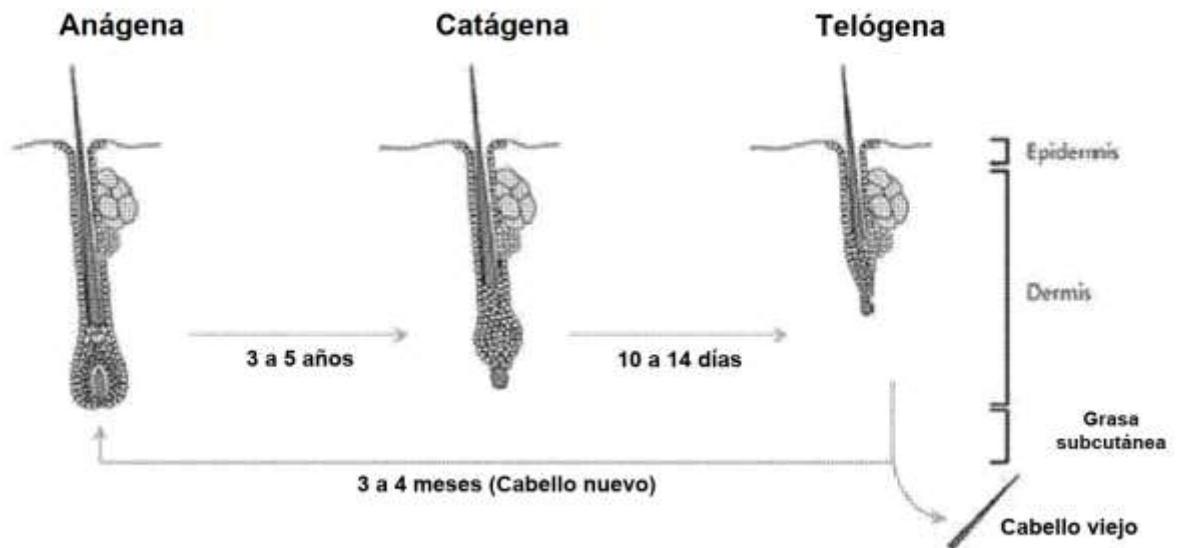
[00159] Aunque se han descrito con detalle partes específicas de la presente invención, para una persona experta en la materia es obvio que dicha descripción específica es solo una realización preferida, y el alcance de la presente invención no está limitado por la misma. Por lo tanto, el alcance práctico de la presente invención estará definido por las reivindicaciones adjuntas y los equivalentes de las mismas.

[00160] Se hace constar que con relación a esta fecha, el mejor método conocido por la solicitante para llevar a la práctica la citada invención, es el que resulta claro de la presente descripción de la invención.

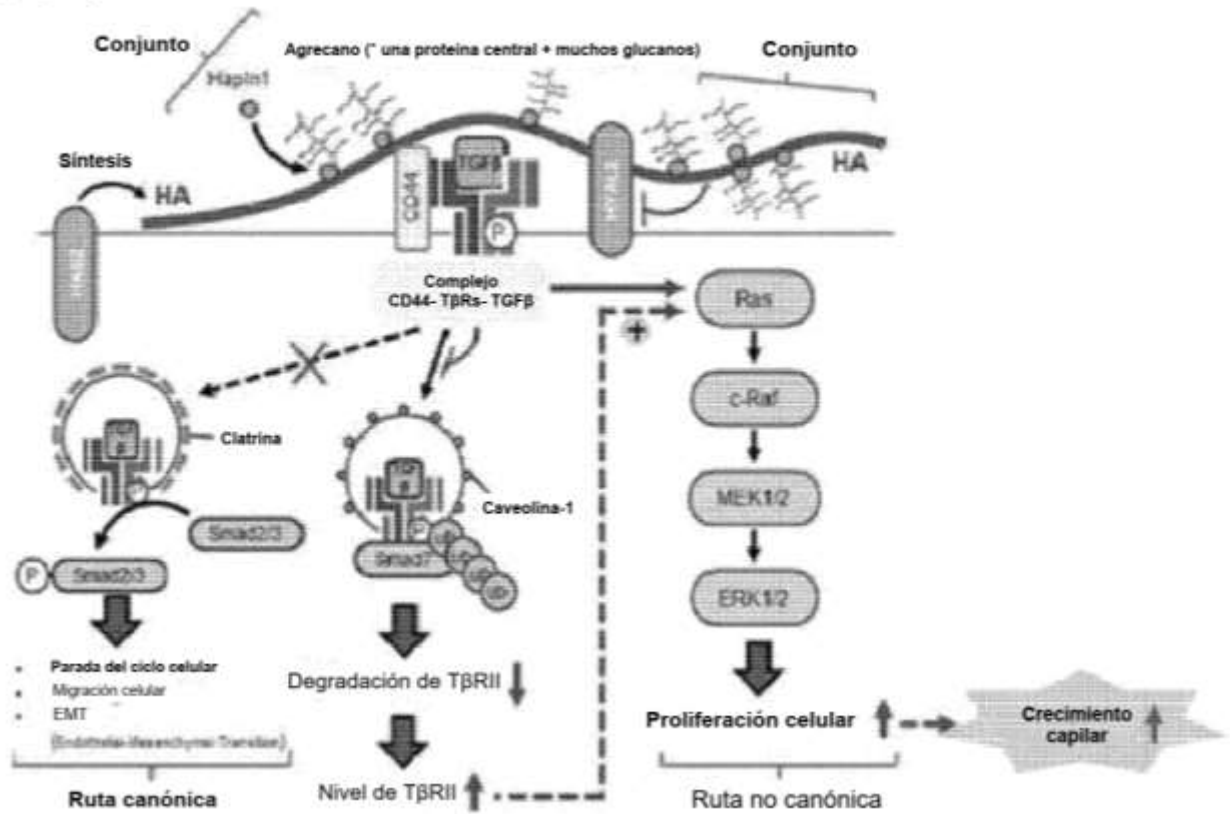
[Fig. 1]



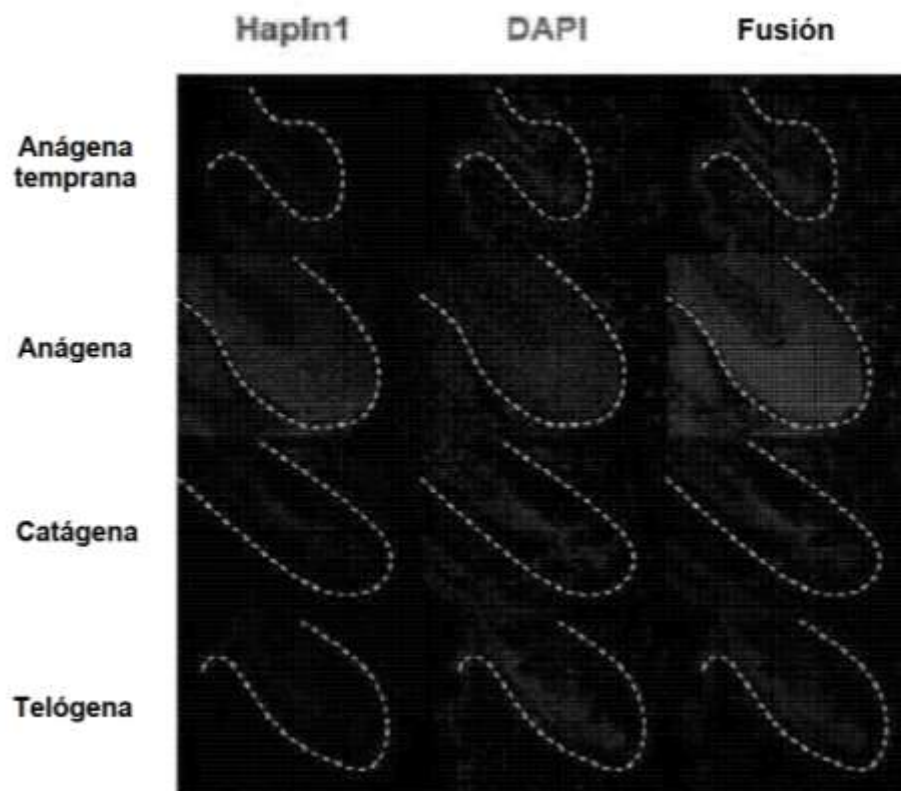
[Fig. 2]



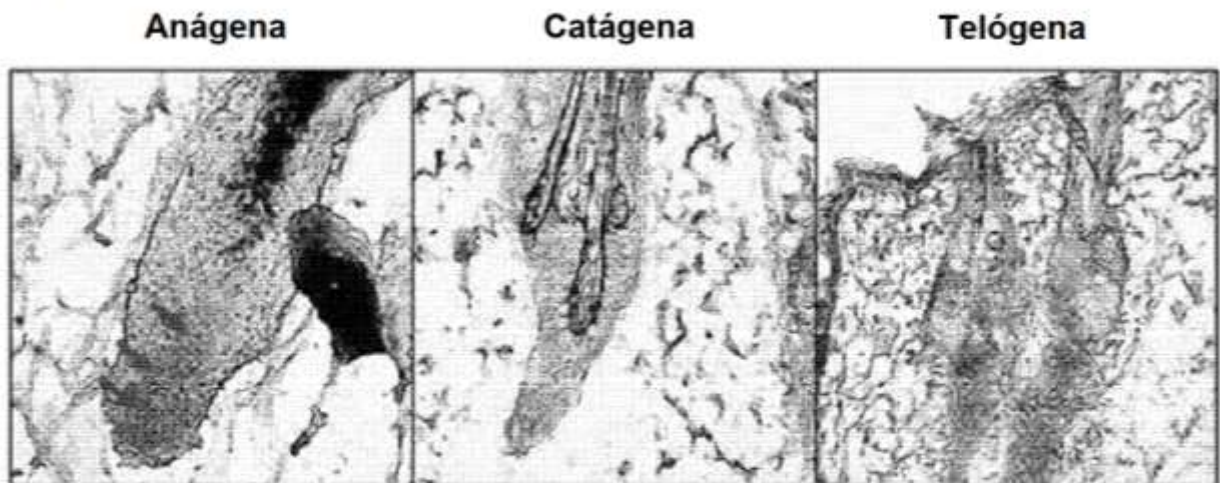
[Fig. 3]



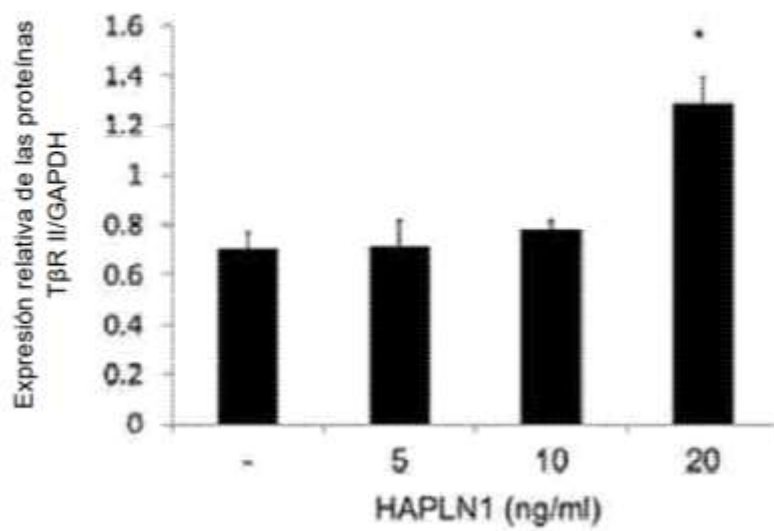
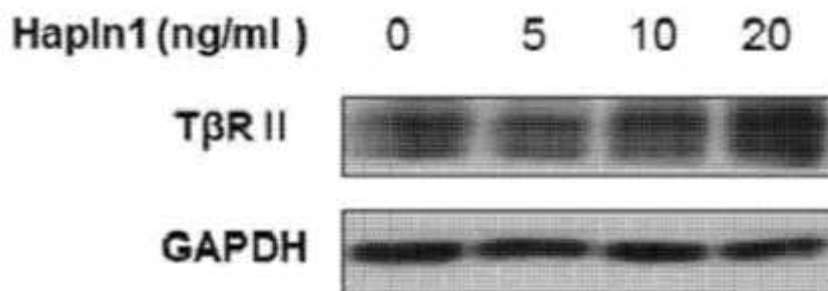
[Fig. 4]



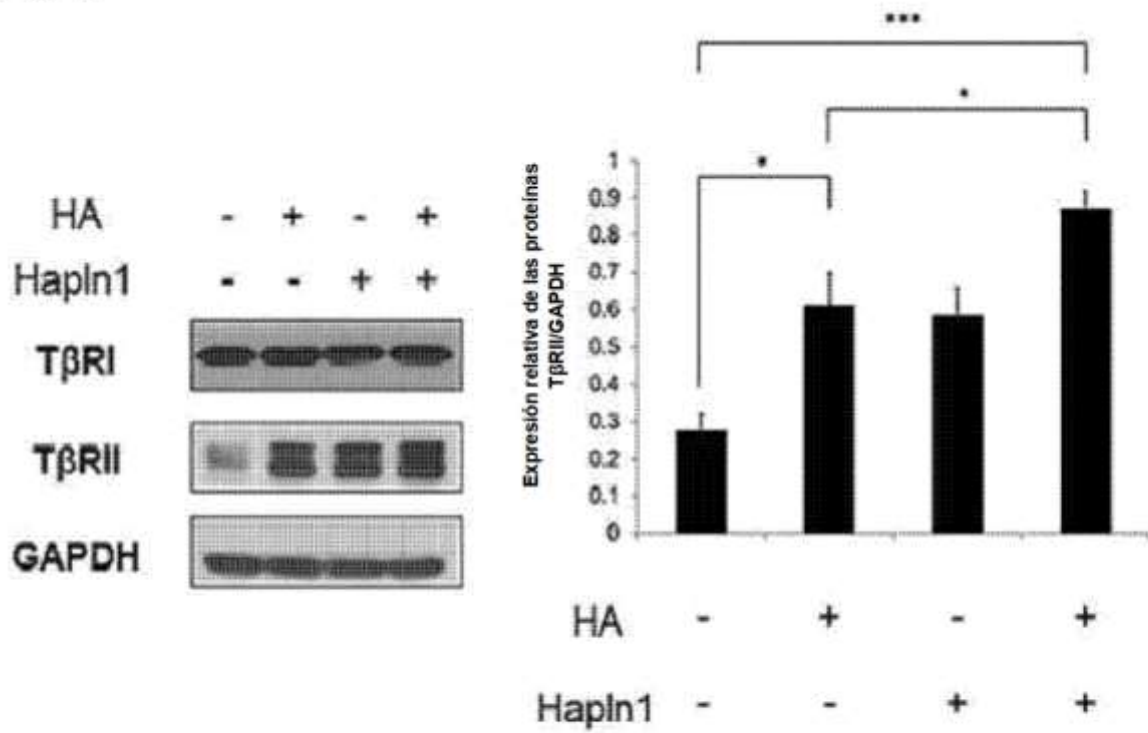
[Fig. 5]



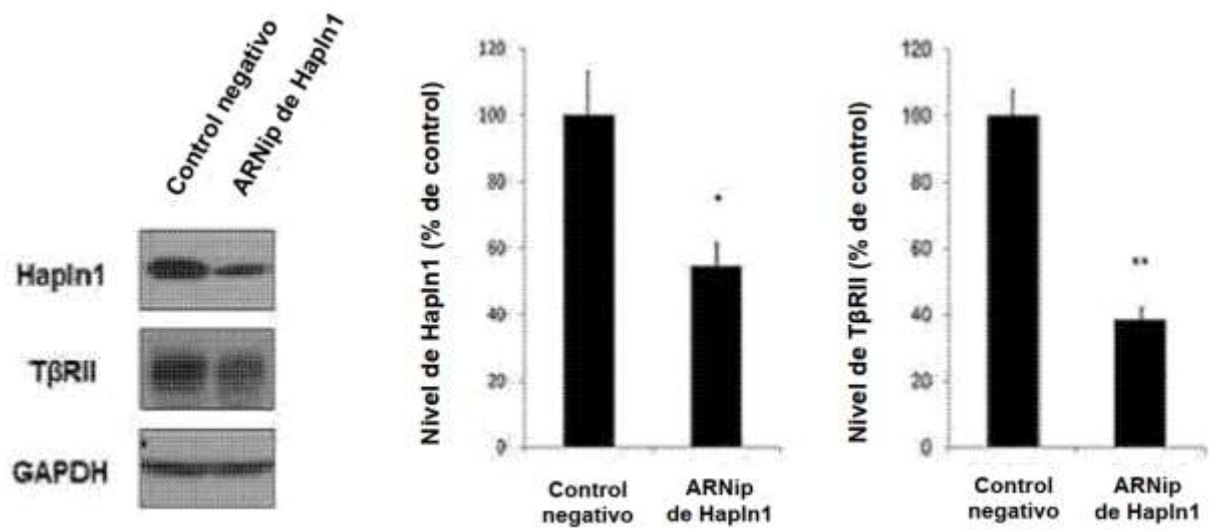
[Fig. 6]



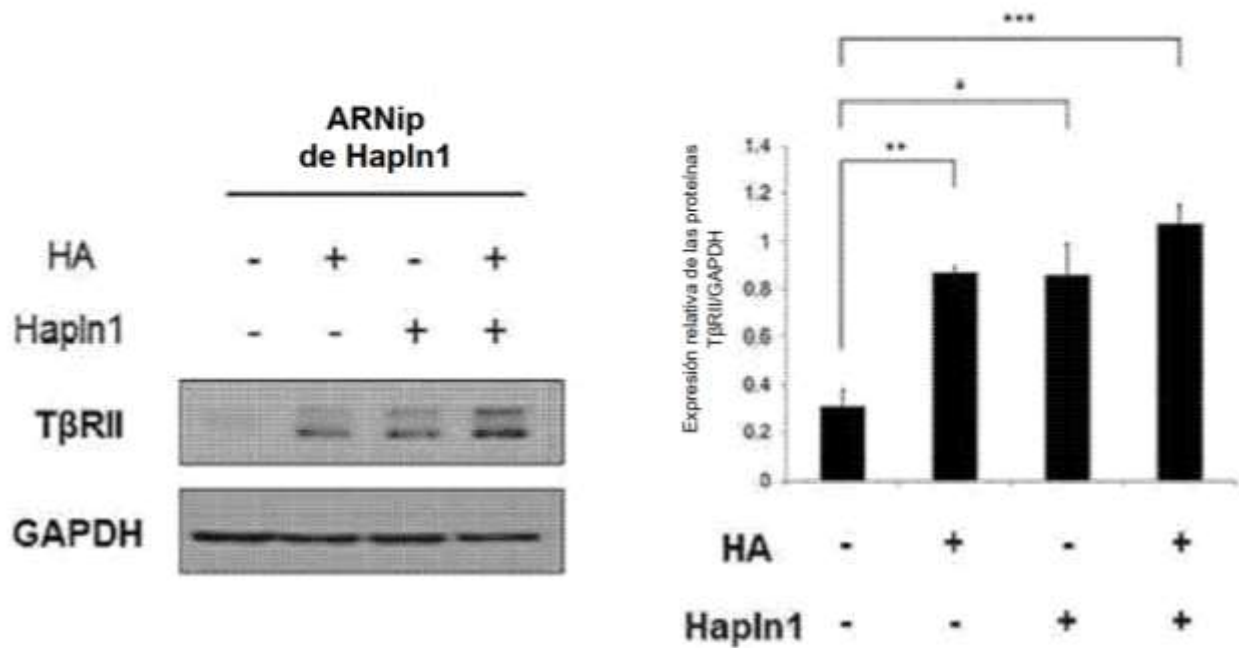
[Fig. 7]



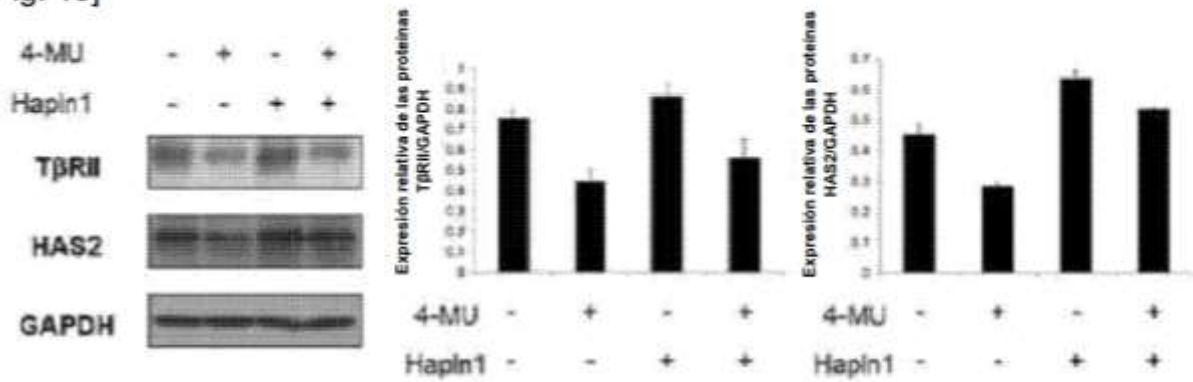
[Fig. 8]



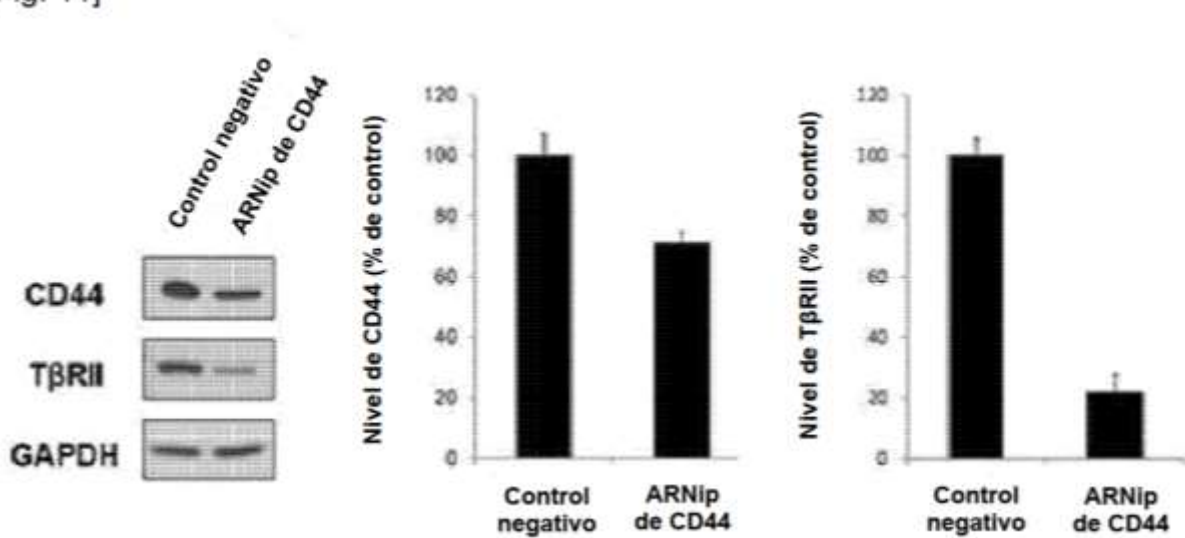
[Fig. 9]



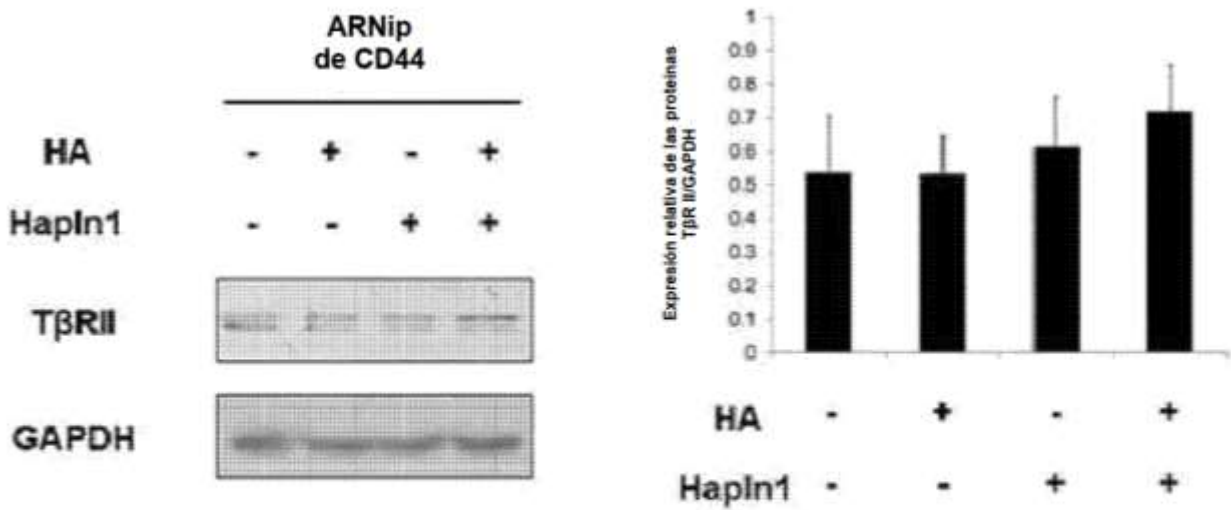
[Fig. 10]



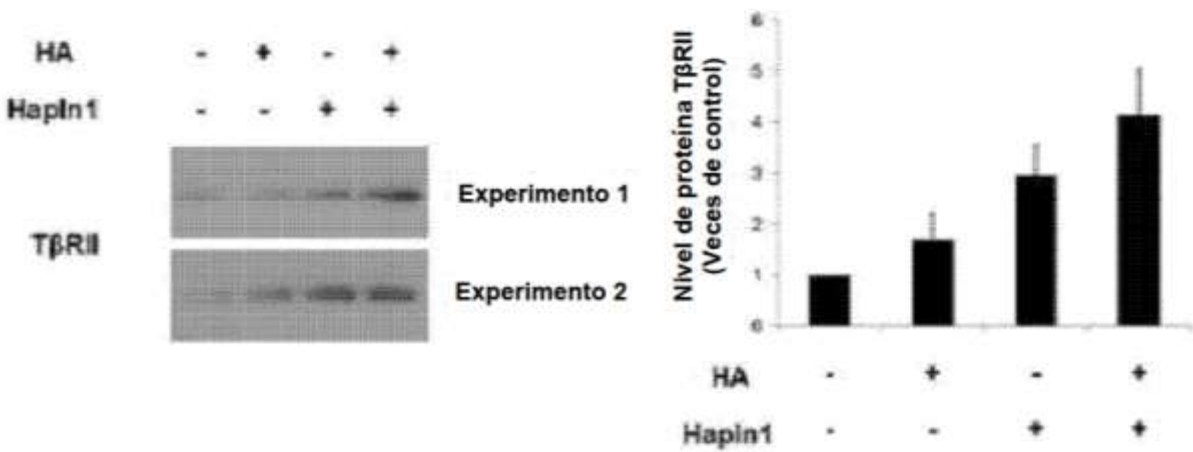
[Fig. 11]



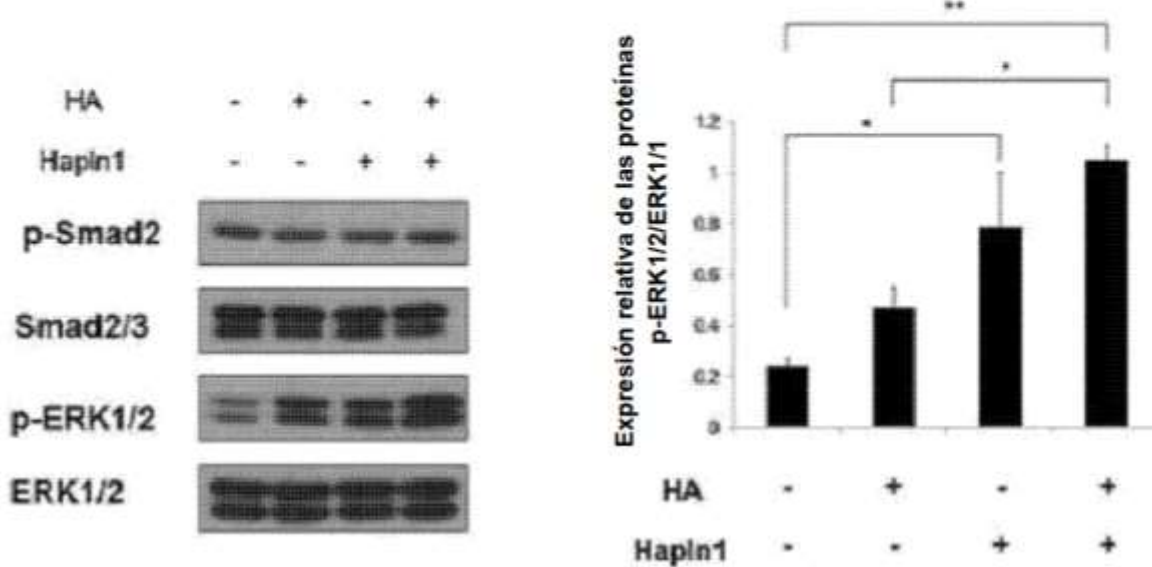
[Fig. 12]



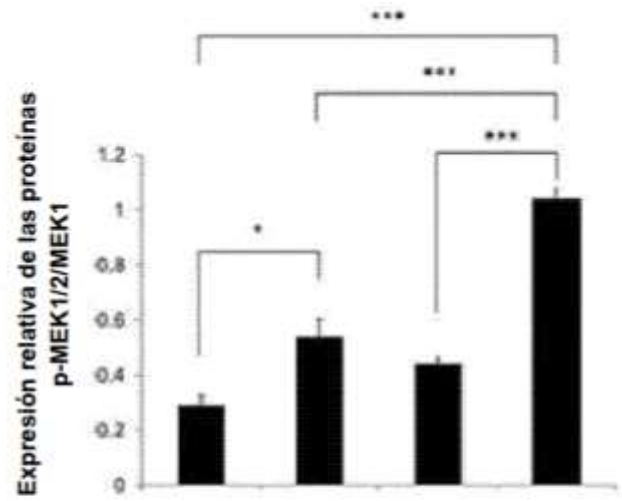
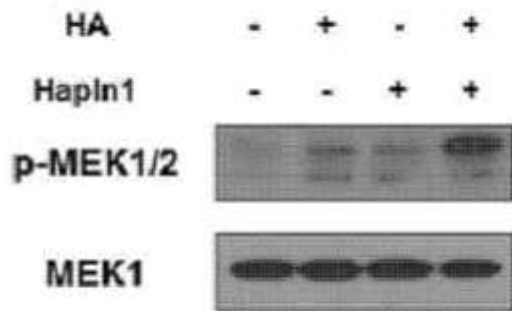
[Fig. 13]



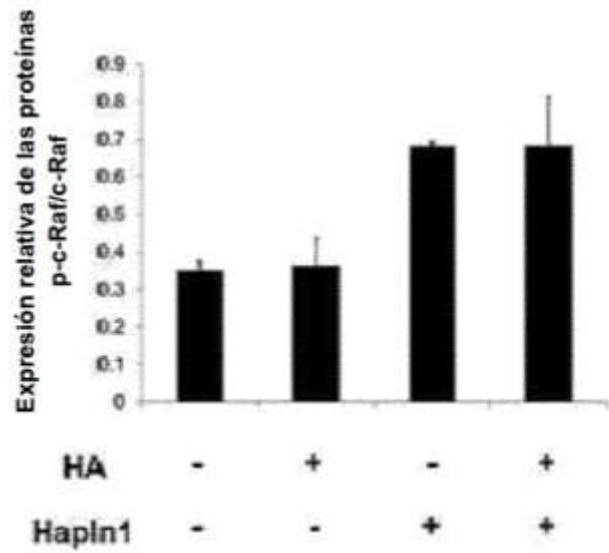
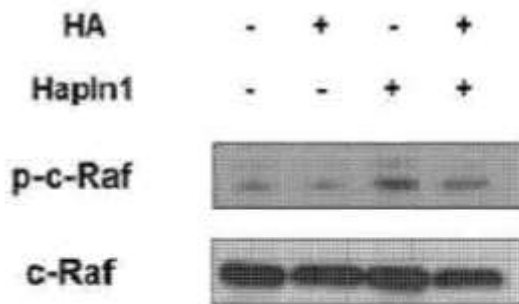
[Fig. 14]



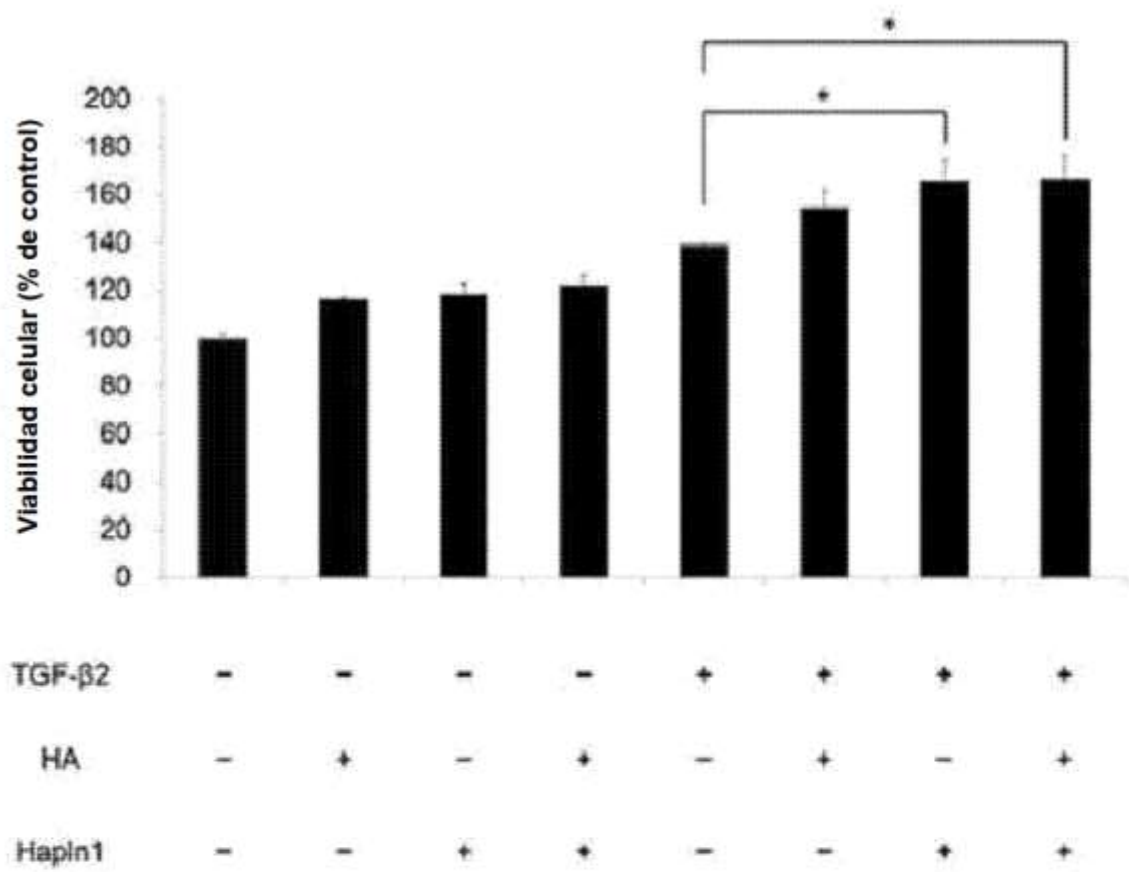
[Fig. 15]



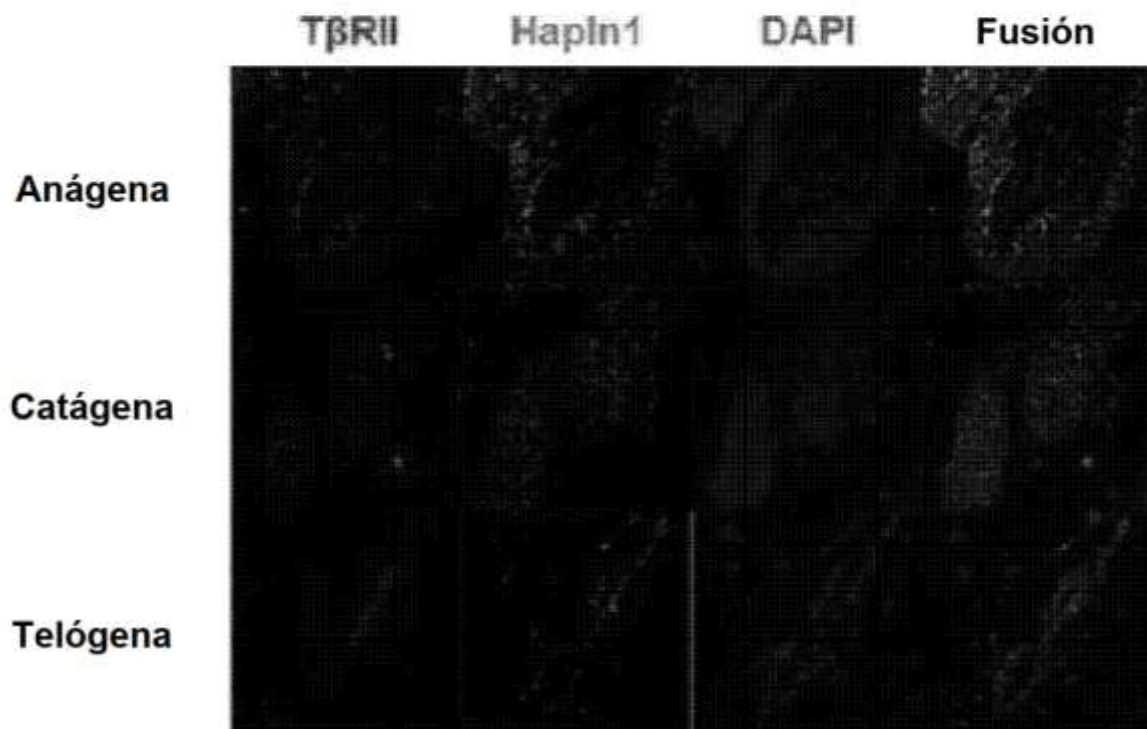
[Fig. 16]



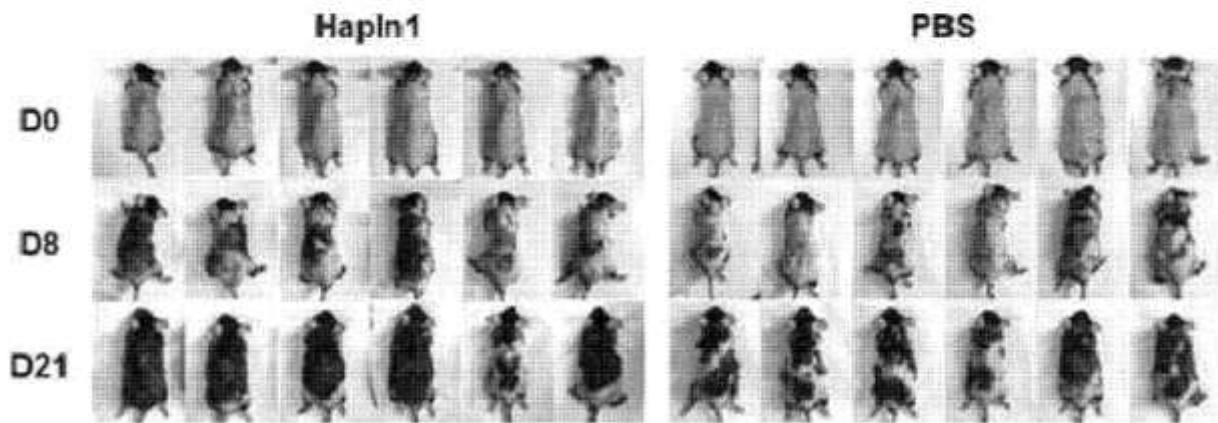
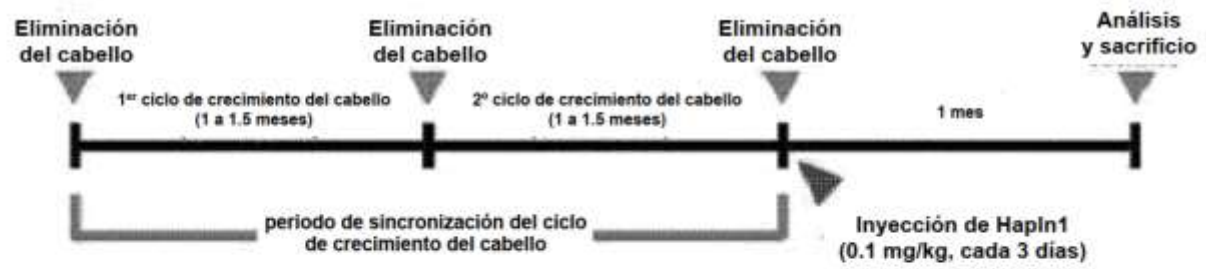
[Fig. 17]



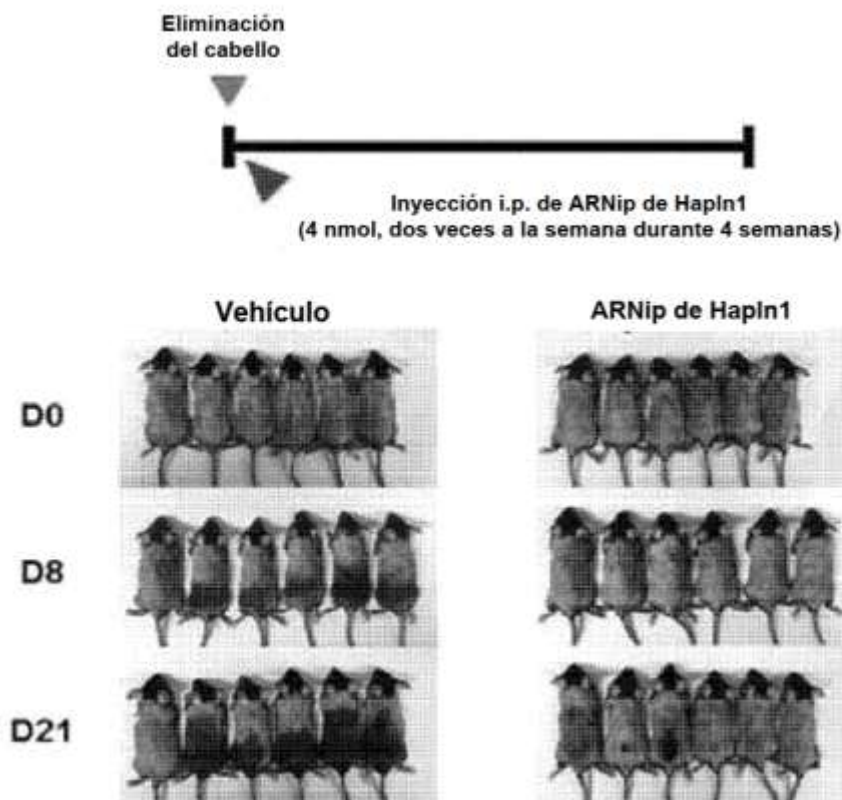
[Fig. 18]



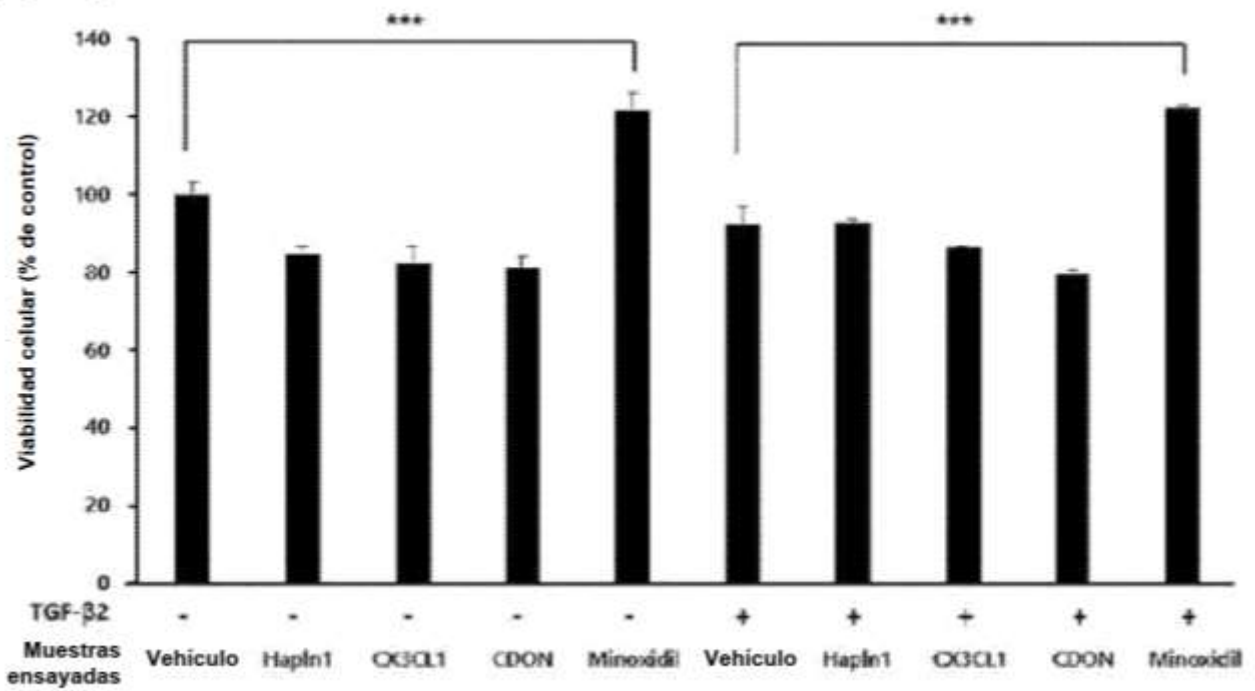
[Fig. 19]



[Fig. 20]



[Fig. 21]



[Fig. 22]

