

(19)



**Евразийское
патентное
ведомство**

(11) **035986**

(13) **B1**

(12) **ОПИСАНИЕ ИЗОБРЕТЕНИЯ К ЕВРАЗИЙСКОМУ ПАТЕНТУ**

- (45) Дата публикации и выдачи патента
2020.09.09
- (21) Номер заявки
201590546
- (22) Дата подачи заявки
2013.09.13
- (51) Int. Cl. *A61K 31/196* (2006.01)
A61K 8/42 (2006.01)
A61Q 7/00 (2006.01)
A61P 17/14 (2006.01)

(54) **СПОСОБЫ ЛЕЧЕНИЯ ИЛИ ОБЛЕГЧЕНИЯ ПЛОСКОГО Фолликулярного ЛИШАЯ**

- (31) **61/700,623**
- (32) **2012.09.13**
- (33) **US**
- (43) **2015.08.31**
- (86) **PCT/EP2013/069062**
- (87) **WO 2014/041140 2014.03.20**
- (71)(73) Заявитель и патентовладелец:
НОГРА ФАРМА ЛИМИТЕД (IE)
- (72) Изобретатель:
**Джулиани Джаммария (IT), Паус
Ральф (DE), Рамот Ювал (IL), Барони
Серджо, Вити Франческа, Беллинвия
Сальваторе, Мардзани Барбара (IT)**
- (74) Представитель:
Медведев В.Н. (RU)
- (56) **WO-A2-2010091894
WO-A2-2010091892**

-
- (57) Предоставлены способы лечения или облегчения плоского фолликулярного лишая у пациента, нуждающегося в этом, включающие местное введение указанному пациенту фармацевтически приемлемой композиции, включающей N-ацетил-3-(4'-аминофенил)-2-метоксипропионовую кислоту, или ее фармацевтически приемлемую соль, или стереоизомер и фармацевтически приемлемый эксципиент.

035986
B1

035986
B1

Родственные заявки

Данная патентная заявка испрашивает приоритет U.S.S.N. 61/700623, поданной 13 сентября 2012 года, которая включена во всей полноте посредством ссылки.

Уровень техники

Структура кожи и ее придатков, волосяных фолликулов, имеет хорошо организованное строение и отличную систему, отличающуюся молекулярными механизмами, которые регулируют самообновление стволовых клеток, пролиферацию, миграцию и детерминацию линии дифференцировки. Каждый волосяной фолликул состоит из постоянной части, которая включает сальные железы и подлежащую область бугорка, и динамической обновляемой части, которая проходит циклы анагена (фазы активного роста), катагена (фазы ремоделирования) и наконец, телогена (фазы покоя). Двумя ключевыми элементами, которые контролируют циклы волосяного фолликула, являются фолликулярные эпителиальные стволовые клетки, локализующиеся в области бугорка волосяного фолликула, и специализированные мезенхимальные клетки, которые составляют фолликулярный сосочек.

Эпителиальные стволовые клетки являются мультипотентными, дающими развитие дочерним клеткам, которые могут как мигрировать дальше, чтобы функционировать как эпидермальные клетки для производства эпидермальных клеток во время заживления раны, или мигрировать вниз для превращения в предшественников волосяного матрикса, которые в дальнейшем дают развитие волосяному стержню.

Имеется несколько причин, почему рост волос может замедляться или прекращаться. Выработка волосяных волокон может прекращаться, например, потому, что клетки матрикса истощают свои пролиферативные способности: это означает, что пролиферативная способность клеток матрикса определяется один раз для всех в начале нового волосяного цикла, и что новые клетки матрикса не появляются во время всей фазы роста.

Стволовые клетки могут постоянно производить новые клетки матрикса. Производство волосяных волокон может прекращаться, когда клетки-предшественники получают команду остановить производство нового поколения.

Некоторые типы алопеции, классифицируемой как рубцующаяся или рубцовая алопеция, такие как плоский фолликулярный лишай, фронтальная фиброзная алопеция, хроническая кожная красная волчанка, фолликулярный кератоз, шиловидный кератоз или фолликулярный кератоз, представляют собой заболевания, которые вызывают разрушение стволовых клеток волосяных фолликулов и области бугорка и постоянную потерю волос. Таким образом, предотвращение разрушения стволовых клеток волосяных фолликулов таким образом, чтобы сохранить базовую способность волосяного фолликула к саморегенерации, может обеспечить повторный рост волос у пациентов, страдающих от заболеваний, связанных с разрушением стволовых клеток.

Соответственно существует необходимость в эффективных средствах, которые сохраняют стволовые клетки волосяных фолликулов таким образом, чтобы сохранить волосяной фолликул и его способность к регенерации.

Сущность

Раскрытие предоставляет способ лечения или облегчения плоского фолликулярного лишая у пациента, включающий местное введение указанному пациенту фармацевтически приемлемой композиции, включающей N-ацетил-3-(4'-аминофенил)-2-метоксипропионовую кислоту, или ее фармацевтически приемлемую соль, или стереоизомер и фармацевтически приемлемый эксципиент. В некоторых вариантах способ лечения или облегчения плоского фолликулярного лишая у пациента дополнительно включает введение соединения, выбранного из группы, состоящей из пиоглитазона, росиглитазола, доксидиклина, гидроксихлорокина, мофетила микофенолята, рифампина, клиндамицина и спермидина.

В некоторых вариантах изобретение относится к способам, где пациентом является человек. В одном аспекте изобретение относится к способу лечения или облегчения плоского фолликулярного лишая у пациента, где стереоизомером N-ацетил-3-(4'-аминофенил)-2-метоксипропионовой кислоты является N-ацетил-(S)-3-(4'-аминофенил)-2-метоксипропионовая кислота или ее фармацевтически приемлемая соль.

В другом аспекте изобретения описаны способы, где концентрация N-ацетил-(S)-3-(4'-аминофенил)-2-метоксипропионовой кислоты, или ее фармацевтически приемлемой соли, или стереоизомера в композиции составляет по меньшей мере 1 мМ.

В другом аспекте изобретения описаны способы, где концентрация N-ацетил-(S)-3-(4'-аминофенил)-2-метоксипропионовой кислоты, или ее фармацевтически приемлемой соли, или стереоизомера в композиции составляет по меньшей мере 1 мМ.

Краткое описание фигур

Фиг. 1 отображает экспериментальный дизайн исследования, описанного в примере 2.

Фиг. 2 отображает обобщенные данные, показывающие стимулирование K-15-иммунореактивности после введения N-ацетил-(R)-(-)-3-(4'-аминофенил)-2-метоксипропионовой кислоты.

Фиг. 3 показывает окрашивание DPAI K15-позитивных клеток.

Фиг. 4 отображает обобщенные данные, показывающие стимулирование K-19-иммунореактивности после введения N-ацетил-(R)-(-)-3-(4'-аминофенил)-2-метоксипропионовой кислоты.

Фиг. 5 показывает окрашивание DPAI K19-позитивных клеток.

Фиг. 6 отображает обобщенные данные, показывающие увеличенное число K19 позитивных клеток в высоких и низких концентрациях после введения N-ацетил-(R)-(-)-3-(4'-аминофенил)-2-метоксипропионовой кислоты.

Фиг. 7 отображает увеличение LDH активности после введения N-ацетил-(R)-(-)-3-(4'-аминофенил)-2-метоксипропионовой кислоты в дозировке 0,1 ммоль на 6 день (обобщенные данные).

Фиг. 8 отображает ингибирование удлинения волосяного стержня после введения высокой дозы (1 ммоль) N-ацетил-(R)-(-)-3-(4'-аминофенил)-2-метоксипропионовой кислоты на 6 день (обобщенные данные).

Фиг. 9 отображает катаген N-ацетил-(R)-(-)-3-(4'-аминофенил)-2-метоксипропионовой кислоты при различных концентрациях (обобщенные данные).

Фиг. 10 отображает тенденцию к катагену при различных дозировках N-ацетил-(R)-(-)-3-(4'-аминофенил)-2-метоксипропионовой кислоты (обобщенные данные, сравнение процентного содержания на каждой стадии цикла волоса в каждом эксперименте, n=5; 0,4=40%).

Подробное описание

Свойства и другие детали раскрытия будут описаны более подробно. Перед дальнейшим описанием настоящего изобретения собраны конкретные термины, применяемые в описании, примерах и формуле изобретения. Эти определения следует читать в свете остальной части раскрытия и понимать, как это понимается в данной области техники. Если не обозначено иное, все применяемые технические и научные термины, имеют то же самое значение, как в обычном понимании среднего специалиста в данной области техники.

Определения

"Лечение" включает любой эффект, например ослабление, снижение, модулирование или устранение, который приводит к улучшению состояния, заболевания, расстройства и т.п.

Термин "алкокси" относится к алкильной группе, присоединенной к кислороду (-O-алкил-). Типичные алкоксильные группы включают, но не ограничиваются группами с алкильной, алкенильной или алкинильной группой из 1-12, 1-8 или 1-6 атомов углерода, называемых C₁-C₁₂алкокси, C₁-C₈алкокси и C₁-C₆алкокси соответственно. Типичные алкоксильные группы включают, но не ограничиваются метоксильной, этоксильной и т.д. Сходным образом, типичные "алкеноксильные" группы включают, но не ограничиваются винилоксильной, аллилоксильной, бутеноксильной и т.д.

Термин "карбоксамидо" относится к структуре C(O)NR_bR_c.

Термин "амин" или "амино-" относится к радикалу вида NR_dR_e-, -N(R_d)R_e - или R_eN(R_d)R_f-, где R_d, R_e и R_f независимо выбирают из алкокси, алкила, алкенила, алкинила, амида, амина, арила, арилалкила, карбамат-, циклоалкил-, сложного эфира, простого эфира, формила, галогена, галоалкила, гетероарила, гетероциклила, гидро, гидроксила, кетона и нитро. Амино может прикрепляться к родительской молекулярной группе при помощи азота, R_d, R_e или R_f. Амино также может быть циклическим, например любые R_d, R_e и R_f могут соединиться вместе или с азотом для формирования 3-12-членного кольца, например, морфолина или пиперидинила. Термин "амино" также включает соответствующую соль четвертичного аммония любой аминогруппы, например -[N(R_d)(R_e)(R_f)]⁺. Типичные аминогруппы включают аминоалкильную группу, где по меньшей мере один из R_d, R_e или R_f представляет собой алкильную группу.

Термин "фенил" относится к 6-членному карбоциклическому ароматическому кольцу. Фенил можно заместить амино.

Термин "фармацевтически приемлемый носитель" или "фармацевтически приемлемый эксципиент" относится к всевозможным растворителям, дисперсионной среде, покрытиям, изотоническим или замедляющим абсорбцию средствам и т.п., которые являются совместимыми с фармацевтическим введением. Применение такой среды и средств для фармацевтически активных субстанций хорошо известно в области техники. Композиции также могут содержать другие активные соединения, обеспечивающие поддержание, дополнение или усиление терапевтических функций.

Термин "фармацевтическая композиция" относится к композиции, включающей по меньшей мере одно соединение, созданное вместе с одним или более фармацевтически приемлемыми носителями.

Термины "индивидуум", "пациент" или "субъект" применяют взаимозаменяемо, и они включают любое животное, включая млекопитающих, предпочтительно мышей, крыс, других грызунов, кроликов, собак, кошек, свиней, крупный рогатый скот, овец, лошадей или приматов, наиболее предпочтительно людей. Раскрытые соединения можно вводить млекопитающему, такому как человек, но также им могут быть другие млекопитающие, такие как животные, нуждающиеся в ветеринарном лечении, например одомашненные животные (например, собаки, кошки и им подобные), сельскохозяйственные животные (например, коровы, овцы, свиньи, лошади и им подобные) и лабораторные животные (например, крысы, мыши, морские свинки и им подобные), "Модулирование" включает антагонизм (например, ингибирование), агонизм, частичный антагонизм и/или частичный агонизм.

В настоящем описании термин "терапевтический эффективное количество" обозначает количество заявленного соединения, которое вызывает биологический или медицинский ответ в ткани, системе животного или человека, который требуется исследователю, ветеринару, врачу или другому клиницисту.

Раскрытые соединения вводят в терапевтически эффективных количествах для лечения заболевания. Альтернативно терапевтически эффективное количество соединения представляет собой количество, требуемое для достижения желаемого терапевтического и/или профилактического эффекта, такое количество, которое приводит к предотвращению или снижению симптомов, связанных с заболеванием или расстройством.

Термин "фармацевтически приемлемая(ые) соль(и)" относится к солям кислой или основной групп, которые могут присутствовать в соединениях, применяемых в настоящих композициях. Соединения, включенные в настоящие композиции, которые являются основными по природе, способны формировать большое многообразие неорганических и органических кислот. Кислоты, которые можно применять для приготовления фармацевтически приемлемых солей добавочной кислоты таких основных соединений, представляют собой те, которые образуют нетоксичные соли присоединения кислоты, т.е. соли, содержащие фармакологически приемлемые анионы, включая, но не ограничиваясь такими солями как малаты, оксалаты, хлориды, бромиды, йодиды, нитраты, сульфаты, бисульфаты, фосфаты, кислые фосфаты, изоникотинаты, ацетаты, лактаты, салицилаты, цитраты, тартраты, олеаты, таннаты, пантотенаты, битартраты, аскорбаты, сукцинаты, малеаты, гентизинаты, фумараты, глюконаты, глюкуронаты, сахараты, форматы, бензоаты, глутаматы, метансульфонаты, этансульфонаты, бензенсульфонаты, р-толуолсульфонаты и памоаты (т.е. 1,1'-метилден-бис-(2-гидрокси-3-нафтоат)). Соединения, включенные в настоящие композиции, которые включают аминокислоты, могут образовывать фармацевтически приемлемые соли с различными аминокислотами в дополнение к кислотам, упомянутым выше. Соединения, включенные в настоящие композиции, которые являются кислотными по природе, способны образовывать основные соли с различными фармацевтически приемлемыми катионами. Примеры таких солей включают соли щелочных металлов или щелочноземельных металлов, и в частности соли кальция, магния, натрия, лития, цинка, калия и железа.

Соединения раскрытия могут содержать один или более хиральных центров и/или двойных связей и, таким образом, существовать в виде стереоизомеров, таких как геометрические изомеры, энантиомеры или диастереомеры. Термин "стереоизомеры" включает все геометрические изомеры, энантиомеры или диастереомеры. Эти соединения можно обозначать символами "R" или "S" в зависимости от конфигурации замещающих групп вокруг стереогенного атома углерода. Настоящее изобретение включает различные стереоизомеры этих соединений и их смесей.

Стереоизомеры включают энантиомеры и диастереомеры. Смеси энантиомеров и диастереомеров можно обозначать "(±)" в номенклатуре, но специалист в области техники понимает, что структура может косвенно указывать на хиральный центр.

Индивидуальные стереоизомеры соединений настоящего изобретения можно приготовить синтетическим путем из имеющихся в продаже исходных материалов, которые содержат асимметричные или стереогенные центры, или путем приготовления рацемических смесей с последующими разрешающими методами, хорошо известными специалистам в данной области техники. Эти методы разрешения проиллюстрированы (1) прикреплением смеси энантиомеров к хиральному вспомогательному элементу, разделением полученной смеси диастереомеров путем рекристаллизации или хроматографии и высвобождением оптически чистого продукта из вспомогательного элемента, (2) образованием соли путем применения оптически активного разрешающего средства или (3) прямым разделением смеси оптических энантиомеров на хиральных хроматографических колонках. Стереоизомерные смеси можно разделить на их составляющие стереоизомеры при помощи хорошо известных методов, таких как хиральнофазная газовая хроматография, хиральная высокоэффективная жидкостная хроматография, кристаллизация соединения в виде хирального солевого комплекса или кристаллизация соединения в хиральном растворителе.

Стереоизомеры также можно получить из стереомерно-чистых промежуточных продуктов, реагентов и катализаторов при помощи хорошо известных асимметричных синтетических методов.

Геометрические изомеры также могут присутствовать в соединениях настоящего изобретения. Символ \cdots обозначает связь, которая может быть одинарной, двойной или тройной связью, или конфигурацией заместителей вокруг двойной связи углерод-углерод, или конфигурацией заместителей вокруг карбоциклического кольца. Заместители вокруг двойной связи углерод-углерод обозначены как находящиеся в "Z" или "E" конфигурации, где термины "Z" и "E" применяют в соответствии со стандартами IUPAC. Если не указано иное, структуры, отображающие двойные связи, включают как "E", так и "Z" изомеры.

Заместители вокруг двойной связи углерод-углерод альтернативно можно называть "цис" или "транс", где "цис" представляет собой заместителей на той же стороне, что и двойная связь, и "транс" представляет собой заместителей на противоположных сторонах от двойной связи. Конфигурация заместителей вокруг карбоциклического кольца обозначается как "цис" или "транс". Термин "цис" представляет собой заместителей на одной стороне плоскости кольца, а термин "транс" представляет собой заместителей по разные стороны плоскости кольца. Смеси соединений, где заместители располагаются как на той же стороне, так и на противоположных сторонах плоскости кольца, обозначают как "цис/транс".

Описанные соединения могут присутствовать в сольватированной, а также в несольватированной форме с фармацевтически приемлемыми растворителями, такими как вода, этанол и т.п., и подразумева-

ется, что изобретение включает как сольватированные, так и несольватированные формы. В одном варианте осуществления соединение является аморфным. В другом варианте осуществления соединение является полиморфным. В другом варианте осуществления соединение имеет кристаллическую форму.

Соединения, предусмотренные для применения в одном или более раскрытых способах, представляют собой N-ацетил-3-(4'-аминофенил)-2-метоксипропионовую кислоту, или ее фармацевтически приемлемую соль, или стереоизомер, где изомером является S энантиомер N-ацетил-3-(4'-аминофенил)-2-метоксипропионовой кислоты (т.е. N-ацетил-(S)-3-(4'-аминофенил)-2-метоксипропионовая кислота или ее фармацевтически приемлемая соль).

Настоящее изобретение также предоставляет композицию, включающую N-ацетил-3-(4'-аминофенил)-2-метоксипропионовую кислоту, или ее фармацевтически приемлемую соль, или стереоизомер; дополнительно включающую по меньшей мере одно соединение, выбираемое из группы, состоящей из пиоглитазона, росиглитазона, доксициклина, гидроксихлорохина, мофетила микофенолята, рифампина, клиндамицина и спермидина.

Способы изготовления включенных соединений можно найти, например, в WO 2007/010516 и WO 2007/010514, каждая из которых включена в данную заявку во всей полноте посредством ссылки.

Терапевтические применения

Раскрытие направлено, по крайней мере частично, на способы лечения или улучшения рубцующейся алопеции у пациента (например, человека), включающие введение терапевтически эффективного количества раскрытого соединения. Например, в настоящем описании предоставлены способы лечения или улучшения рубцующейся алопеции, включающие местное введение пациенту при необходимости в таком фармацевтически приемлемой композиции, включающей N-ацетил-3-(4'-аминофенил)-2-метоксипропионовую кислоту, или ее фармацевтически приемлемую соль, или стереоизомер, а также фармацевтически приемлемый эксципиент. В конкретных вариантах осуществления раскрытый способ дополнительно включает, например, введение соединения, выбираемого из группы, состоящей из пиоглитазона, росиглитазона, доксициклина, гидроксихлорохина, мофетила микофенолята, рифампина, клиндамицина и спермидина.

В конкретных вариантах осуществления раскрытых способов раскрытая композиция включает N-ацетил-(R)-(-)-3-(4'-аминофенил)-2-метоксипропионовую кислоту. В другом варианте осуществления раскрытых способов раскрытая композиция включает концентрацию N-ацетил-3-(4'-аминофенил)-2-метоксипропионовой кислоты, равную по меньшей мере 1 ммоль. Например, раскрытая композиция может включать концентрацию, по меньшей мере равную приблизительно 1 ммоль, приблизительно 2 ммоль, приблизительно 3 ммоль, приблизительно 4 ммоль, приблизительно 5 ммоль, приблизительно 6 ммоль, приблизительно 7 ммоль, приблизительно 8 ммоль, приблизительно 9 ммоль, приблизительно 10 ммоль. В других конкретных вариантах осуществления раскрытая композиция включает концентрацию N-ацетил-3-(4'-аминофенил)-2-метоксипропионовой кислоты по меньшей мере от приблизительно 1 до приблизительно 10 ммоль. Например, раскрытые композиции могут включать концентрацию по меньшей мере от приблизительно 1,5 до приблизительно 9,5 ммоль, от приблизительно 2 до приблизительно 9 ммоль, от приблизительно 2,5 до приблизительно 8,5 ммоль, от приблизительно 3 до приблизительно 8 ммоль, от приблизительно 3,5 до приблизительно 7,5 ммоль, от приблизительно 4 до приблизительно 7 ммоль или от приблизительно 4,5 до приблизительно 6,5 ммоль.

Например, раскрытые способы могут включать местное применение композиции, имеющей высокую концентрацию раскрытого соединения, что, например, обеспечивает эффективное количество, значительно превышающее количество, необходимое для того, чтобы, например, индуцировать рост волос. Например, такая высокая концентрация такой композиции может включать от приблизительно 1 до приблизительно 1000 ммоль или больше раскрытого соединения, например от приблизительно 1 до приблизительно 100 ммоль, от приблизительно 10 до приблизительно 100 ммоль или от приблизительно 10 до приблизительно 50 ммоль.

Раскрытые соединения можно вводить субъектам (животным и/или людям) при необходимости в таком лечении в дозировках, которые обеспечивают оптимальную фармацевтическую эффективность. Следует помнить, что дозировка, требуемая для применения в любом конкретном применении, будет варьироваться от пациента к пациенту не только из-за конкретного выбираемого соединения или композиции, но также и пути введения, природы состояния, которое лечат, возраста и состояния пациента, сопутствующих лекарственных средств или специальной диеты, которой в это время следует пациент, и других факторов, которые известны специалистам в области техники, и о том, что подходящая конечная дозировка находится в компетенции дежурного врача. Для лечения клинических состояний и заболеваний, упомянутых выше, раскрытое соединение или композицию можно вводить местно в составах лекарственных форм, содержащих общепринятые нетоксичные фармацевтически приемлемые носители, адъюванты и носители. Частота дозирования может варьироваться в зависимости от таких факторов как путь введения, величина дозировки и состояние заболевания, которое лечат. Типичная частота дозирования составляет по меньшей мере один раз в день, по меньшей мере один раз в неделю и по меньшей мере один раз каждые две недели.

Включенные составы или композиции включают раскрытое соединение и в типичных случаях так-

же могут включать фармацевтически приемлемый носитель или эксципиент.

Включенные композиции можно вводить при помощи различных средств в зависимости от предполагаемого применения, как хорошо известно в данной области техники. Раскрытые составы можно вводить местно. Эти составы можно приготовить при помощи известных средств, и при желании раскрытые композиции можно смешать с любым типичным добавочным аддитивом, таким как эксципиент, связывающее средство, дезинтегрирующее средство, лубрикант, корригирующее вещество, растворитель, суспендирующее средство, эмульгатор или покрывающее средство.

В раскрытых составах увлажняющие средства, эмульгаторы и лубриканты, такие как лаурилсульфат натрия и стеарат магния, а также красящие средства, разделяющие средства, покрывающие средства, подсластители, вкусовые и ароматизирующие средства, консерванты и антиоксиданты могут присутствовать в изготавливаемых средствах.

Способы приготовления этих составов включают стадию приведения к взаимодействию раскрытых композиций и носителя и при необходимости одного или более добавочных ингредиентов. В целом, составы изготавливают путем равномерного и близкого приведения к взаимодействию средств с жидкими носителями, или хорошо разделенными твердыми носителями, или и теми и другими, с последующим формированием продукта.

Суспензии в дополнение к заявленной композиции могут содержать суспендирующие средства, как, например, этоксилированные изостеариловые спирты, полиоксиэтиленсорбитол и эфиры сорбита, микрокристаллическая целлюлоза, метагидроксид алюминия, бентонит, агар-агар и трагакант, а также смеси вышеперечисленных веществ.

Лекарственные формы для местного введения заявленной композиции включают порошки, спреи, мази, пасты, кремы, лосьоны, гели, растворы, пластыри и летучие препараты. Активный компонент можно смешивать в стерильных условиях с фармацевтически приемлемым носителем и с любыми консервантами, буферами или пропеллентами, которые могут потребоваться.

Мази, пасты, кремы и гели в дополнение к заявленной композиции могут содержать эксципиенты, такие как животные и растительные жиры, масла, воски, парафины, крахмал, трагакант, производные целлюлозы, полиэтиленгликоли, силиконы, бентониты, кремниевую кислоту, тальк и оксид цинка или смеси вышеперечисленных веществ.

Порошки и спреи в дополнение к заявленной композиции могут содержать эксципиенты, такие как лактоза, тальк, кремниевая кислота, гидроксид алюминия, силикаты кальция и полиамидный порошок или смеси вышеперечисленных веществ. Спреи могут дополнительно содержать стандартные пропелленты, такие как хлорофторуглероды и легкоиспаряемые незамещенные углеводороды, такие как бутан и пропан.

Композиции и соединения настоящего раскрытия можно при необходимости вводить при помощи аэрозоля. Этого достигают путем приготовления водного аэрозоля, липосомального препарата или твердых частиц, содержащих соединение. Можно применять неводную (например, фторуглеродный пропеллент) суспензию. Можно применять ультразвуковые небулайзеры, поскольку они минимизируют воздействие сдвига на средство, который может привести к разрушению соединений, содержащихся в заявленных композициях.

Обычно водный аэрозоль изготавливают путем приготовления водного раствора или суспензии заявленной композиции вместе с типичными фармацевтически приемлемыми носителями и стабилизаторами. Носители и стабилизаторы варьируются в зависимости от требований конкретной заявленной композиции, но обычно включают неионные сурфактанты (Твины, Плуроники или полиэтиленгликоль), нетоксичные белки, такие как сывороточный альбумин, эфиры сорбита, олеиновая кислота, лецитин, аминокислоты, такие как глицин, буферы, соли, сахара или сахароспирты. Аэрозоли в целом изготавливают из изотонических растворов.

Раскрытые в настоящем описании фармацевтические композиции могут быть подходящими для парентерального введения и включают заявленную композицию в комбинации с одним или более фармацевтически приемлемыми стерильными изотоническими водными или неводными растворами, дисперсиями, суспензиями или эмульсиями или стерильными порошками, которые можно разбавить до стерильных вводимых растворов или дисперсий непосредственно перед введением и которые могут содержать антиоксиданты, буферы, бактериостатики, сорбаты, которые придают составу изотоничность крови предполагаемого реципиента, или суспендирующие, или загущающие средства.

Примеры подходящих водных или неводных носителей, которые можно применять в раскрытых фармацевтических композициях, включают воду, этанол, полиолы (такие, как глицерин, полипропиленгликоль, полиэтиленгликоль и тому подобные) и подходящие смеси вышеперечисленных веществ, растительные масла, такие как оливковое масло, вводимые органические эфиры, такие как этилолеат и циклодекстрины. Подходящую текучесть можно поддерживать, например, путем применения покрывающих материалов, таких как лецитин, путем поддержания требуемого размера частиц в случае дисперсий и путем применения сурфактантов. Эффективность лечения при помощи заявленных композиций можно определить при помощи набора методов, известных специалистам в данной области техники.

В описании изобретения, где композиции описаны как имеющие, включающие или включающие

конкретные компоненты, подразумевается, что композиции также в основном состоят или состоят из перечисленных компонентов. Сходным образом там, где процессы описаны как имеющие, включающие или включающие конкретные стадии процесса, процессы также в основном состоят или состоят из перечисленных стадий процесса. Кроме случаев, для которых указано иное, порядок стадий или порядок произведения конкретных действий не имеют значения, пока изобретение сохраняет работоспособность. Более того, если не указано иное, две и более стадий действий можно производить одновременно.

Примеры

Раскрытые соединения, можно приготовить несколькими путями, как хорошо известно специалисту в данной области техники органического синтеза. Более конкретно, раскрытые соединения можно приготовить при помощи реакций и техник, описанных в настоящем описании. В описании методов синтеза, описанных ниже, следует понимать, что все предложенные условия для реакций, включая выбор растворителя, атмосферу реакции, температуру реакции, длительность эксперимента и процедуры обследования, можно выбирать таким образом, чтобы это были стандартные условия для этой реакции, если не указано иное. Специалист в данной области техники органического синтеза понимает, что функциональность, присутствующую на различных частях молекулы, следует сравнить с предложенными реагентами и реакциями. Заместители, несовместимые с условиями реакций, будут очевидны для специалиста в данной области техники, и, таким образом, будут показаны альтернативные способы. Исходные материалы для примеров и имеются в продаже, и несложно приготовлены при помощи стандартных способов из известных материалов.

Пример 1. Приготовление N-ацетил-(R)-(-)-3-(4'-аминофенил)-2-метоксипропионовой кислоты (N-Ацетил E2); соединение A.

К N-ацетил-(R)-(-)-3-(4-аминофенил)-2-метоксипропионовой кислоте (40 г) в стеклянном реакторе объемом 0,5 л добавляют этилацетат (80 г) и уксусный ангидрид (62,8 г). Смесь перемешивают при 90°C в течение 1 ч. После охлаждения растворитель удаляют при помощи вакуумной дистилляции, обеспечивая маслянистый остаток. К этому остатку добавляют воду (120 г) и этилацетат (120 г). После перемешивания в течение 10 мин при 35°C слои разделяют и водный слой убирают. Растворитель органического слоя удаляют при помощи вакуумной дистилляции. Далее добавляют ацетон (120 г) и полученную смесь нагревают до завершения растворения. Раствор охлаждают до 0°C, а преципитированный продукт собирают при помощи фильтрации. Осадок промывают ацетоном (20 г) и высушивают при 65°C для получения 26 г соединения в заголовке.

Пример 2. Эффекты соединения A на маркеры стволовых клеток.

Целью настоящего исследования является определение эффектов соединения A на маркеры стволовых клеток волосяного фолликула путем оценки экспрессии маркеров стволовых клеток K15 и K19.

Материалы и методы

Образцы ткани

Нормальную кожу волосистой части головы человека получили от 6 женщин, проходящих рутинную операцию по подтяжке лица, после получения информированного согласия. Все эксперименты производятся в соответствии с рекомендациями Хельсинки и с соответствующего одобрения этического комитета. Детали о происхождении образцов записаны в таблице.

Детали образцов

	Возраст	Область волосистой части головы
Пациент 1	48	Затылочная область волосистой части головы
Пациент 2	56	Затылочная область волосистой части головы
Пациент 3	59	Затылочная область волосистой части головы
Пациент 4	55	Затылочная область волосистой части головы
Пациент 5	68	Затылочная область волосистой части головы
Пациент 6	67	Затылочная область волосистой части головы

Микродиссекция волосяного фолликула и органная культура

Произведена микродиссекция нормально пигментированных волосяных фолликулов в стадии анаген VI (HF) (серые/белые фолликулы исключены из исследования) из кожи нормальной волосистой части головы человека с последующим органным культивированием по модели Philpitt. Соединение А или носитель вводят однократно на каждое изменение среды (т.е. каждые 48/72 ч). Обзор экспериментальных процедур представлен на фиг. 1.

Количественная иммуногистохимия K15

Для исследования экспрессии K15 кератина применяют тирамидный метод усиления сигнала, как описано ранее (Клоергер с соавторами, 2008). Кратко, фиксированные в ацетоне криосрезы промывают трижды в течение 5 мин при помощи TNT (Трис-HCl NaCl Tween) буфера (0,1 моль/л Трис-HCl, pH 7,5; содержащий 0,15 моль/л NaCl и 0,05% Tween 20). Далее пероксидазу хрена блокируют путем промывания 3% H₂O₂ в натрий-фосфатном буфере (PBS) в течение 15 мин. Преинкубирование производят при помощи инкубирования авидина и биотина в течение 15 мин и 5% нормальной овечьей сыворотки в TNT в течение 30 мин со стадиями промывания между ними. Мышиный античеловеческий E15 (клон LHK15, Chemicon, Billerica, USA) разводят в TNT и инкубируют в течение ночи при 4°C с последующими биотинилированным вторичным овечьим антимышиным антителом (1:200 в TNT) в течение 45 мин при RT. Далее вводят стрептавидин пероксидазы хрена (набор TSA; Perkin-Elmer, Boston, MA, USA) (1:100 в TNT) в течение 30 мин при RT. Реакцию усиливают при помощи FITC-тирамид усиливающего реагента при RT в течение 5 мин (1:50 в усиливающем растворителе, предоставленном в наборе). Интенсивность иммуноокрашивания подсчитывают при помощи ImageJ оборудования (National Institutes of Health). Интенсивность окрашивания определенных образцовых областей в HF измеряют и сравнивают с группами контроля и лечения N соединением А. Подсчитывают процентное содержание K15-позитивных клеток по сравнению с общим количеством клеток в ORS.

Количественная иммуногистохимия K19

Описанный ранее протокол применяют для исследования экспрессии K19 (Клоергер с соавт., 2008). Кратко, фиксированные в ацетоне криосрезы предварительно обрабатывают овечьей сывороткой (10% в трис-натриевом буфере, Dako). Срезы инкубируют сначала с первичными антителами против K19 (мышинные античеловеческие: K19 - 1:10; в течение ночи при 4°C; PROGEN, Heidelberg, Germany;) и далее с FITC-мечеными овечьими антимышиными (1:200 в TBS, в течение 45 мин, RT, Jackson ImmunoResearch) иммуноглобулинами в качестве вторичных антител. Контрастное окрашивание проводят при помощи DAPI (Boehringer Mannheim, Mannheim, Germany). Интенсивность иммуноокрашивания подсчитывают при помощи ImageJ оборудования (National Institutes of Health). Интенсивность окрашивания определенных образцовых областей в HF измеряют и сравнивают с группами контроля и лечения N соединением А. Подсчитывают процентное содержание K19-позитивных клеток по сравнению с общим

количеством клеток в ORS.

Статистический анализ проводят при помощи двустороннего t-тест Стьюдента для непарных образцов. Для метааналитических целей проводится всего 6 анализов (каждый с HF от разных индивидуумов женского пола). Для кератина 19 доступно только 5 анализов, поскольку число пригодных к применению срезов волосяных фолликулов для количественной иммуногистоморфометрии недостаточно для проверки также и этого параметра. С целью исключения искажения данных индивидуальных экспериментов определяют жесткие исключаяющие критерии, которые позволяют исключить один индивидуальный эксперимент (из 5-6) по выбранному параметру. Поскольку эти критерии для исключения отличаются для каждого исследуемого параметра, различные эксперименты (т.е. один из 6 и один из 5 в случае анализа кератина 19) исключаются для каждого анализируемого параметра. Критериями исключения являются: (i) наибольшее отклонение от конечных тенденций, показанных большинством в 6 экспериментах, с целью исключения искажения данных провала или всплеска значений (на которые могут повлиять, например, лекарственные средства пациента, история болезни и т.д.); и (ii) несоответствие минимальным качественным критериям.

Результаты

Введение соединения А хорошо стимулирует иммунореактивность кератин-15 на всех тестируемых концентрациях (фиг. 2 и 3), хотя число К15-позитивных клеток не увеличивается (фиг. 4). Введение соединения А также хорошо стимулирует иммунореактивность кератина 19 на всех тестируемых концентрациях (фиг. 5), и также оказывает стимулирующий эффект на число К19-позитивных клеток по сравнению с контролем (фиг. 6). Данные показывают, что соединение А сохраняет "защитные" свойства в отношении клеток-предшественников/стволовых клеток волосяного фолликула.

Пример 3. Эффект соединения А на удлинение волосяного стержня.

Целью настоящего исследования является определение эффекта соединения А на удлинение волосяного стержня.

Материалы и методы

Образцы тканей

Детали, касающиеся происхождения образцов тканей, применяемых в настоящем примере, описаны выше в примере 2.

Измерение LDH

Активность LDH в надосадочной жидкости может служить индикатором цитотоксичности, и ее измеряют в соответствии с инструкциями производителя (набор определения цитотоксичности; Roche, Mannheim, Germany). Абсорбируемость образцов измеряют при 490 нм при помощи планшета-ридера ELISA.

Удлинение волосяного стержня

Измерения длины волосяного стержня HF производят на отдельных HF при помощи инвертированного бинокулярного микроскопа Zeiss с измерительной окулярной сеткой.

Цикл стадийности HF

Цикл стадийности HF проводят в соответствии с предварительно определенными морфологическими критериями и определяют процентное содержание HF в стадии анагена и раннего, среднего или позднего катагена.

Измерения пролиферации и апоптоза

Для оценки апоптозных клеток в колонии применяют метод двойного окрашивания с маркером пролиферации Ki-67, Ki-67/терминального дезоксиуридинового мечения концов (terminal dUTP nick-end labeling, TUNEL). Криостатные срезы фиксируют в параформальдегиде и этанол-уксусной кислоте (2:1) и помечают дигоксигенин-деокси-UTP (ApopTag флуоресцеин in situ набор определения апоптоза; Intergen, Purchase, NY) в присутствии терминальной диоксинуклеотидилтрансферазы с последующим инкубированием с мышью анти-Ki-67 антисывороткой (1:20 в PBS в течение ночи при 4°C; Dako, Glostrup, Denmark). TUNEL-позитивные клетки визуализируются при помощи антидигоксигенин флуоресцеин изотиоцианат-конъюгированного антитела (Jackson ImmunoResearch, West Grove, PA). Отрицательные контроли производят путем удаления терминальной диоксинуклеотидил трансферазы и Ki-67 антитела. Контрастное окрашивание производят при помощи 4',6-диамидино-2-фенилиндола (DAPI) (Roche Molecular Biochemicals GmbH, Mannheim, Germany). Производят количественную иммуногистоморфометрию; Ki-67- или DAPI-позитивные клетки подсчитывают в предварительно определенной области матрикса HF и определяют процентное содержание Ki-67/TUNEL-позитивных клеток. Статистический анализ проводят при помощи двустороннего t-теста Стьюдента для непарных образцов. Для метааналитических целей проводится всего 6 анализов (каждый с HF от разных индивидуумов женского пола). С целью исключения искажения данных индивидуальных экспериментов определяют жесткие исключаяющие критерии, которые позволяют исключить один индивидуальный эксперимент (из 5-6) по выбранному параметру. Поскольку эти критерии для исключения отличаются для каждого исследуемого параметра, различные эксперименты (т.е. один из 6) исключаются для каждого анализируемого параметра. Критериями исключения являются: (i) наибольшее отклонение от конечных тенденций, показанных большинством в 6 экспериментах, с целью исключения искажения данных провала или всплеска значе-

ний (на которые могут повлиять, например, лекарственные средства пациента, история болезни и т.д.); и (ii) несоответствие минимальным качественным критериям.

Результаты

LDH активность

Измерения LDH активности в надосадочной жидкости (параметр смерти клеток и лизиса клеток) показывают небольшое увеличение активности LDH только в дозировке 0,1 ммоль на 6 день (фиг. 7). Это предполагает очень низкую, если вообще существующую связанную с соединением А токсичность в условиях анализа.

Удлинение стержня волоса

Введение соединения А немного, но важно ингибирует удлинение стержня волоса в высокой дозировке (1 ммоль) (фиг. 8). Более низкие концентрации не оказывают эффектов на удлинение.

Эффекты на цикл HF

В целом соединение А индуцирует катаген при любых концентрациях совместно со сниженным удлинением стержня волоса, наблюдаемым при высокой дозировке (1 ммоль) (фиг. 9). Сильная тенденция к индуцированию катагена также очевидна в анализах отдельных 5 экспериментов (фиг. 10).

Данные показывают, что высокие дозировки соединения А (например, 1 ммоль или больше) ингибируют удлинение стержня волоса в стержнях волос кожи затылочной области волосистой части головы женщин. В дополнение все тестируемые концентрации соединения А имеют эффект индуцирования катагена, что может лежать в основе снижения удлинения стержня волоса, наблюдаемого при высокой дозировке.

Ссылки

Все публикации и патенты, упомянутые в настоящем описании, включая те, которые перечислены ниже, включены в настоящую заявку во всей полноте посредством ссылки, как если бы каждая индивидуальная публикация или патент были конкретно и индивидуально включены посредством ссылки. В случае противоречий настоящая заявка, включая любые определения здесь, осуществит контроль.

Эквиваленты

В то время как обсуждаются конкретные варианты осуществления заявленного изобретения, описание выше является иллюстрирующим, но не ограничивающим. Множество вариаций изобретения станут очевидны специалистам в области техники после обзора этой заявки. Полный объем изобретения следует определить путем ссылки на формулу изобретения, вместе с их полным объемом эквивалентов и описанием, вместе с такими вариациями.

Если не указано иное, все числа, отображающие количества ингредиентов, условия реакции и т.п. в описании и формуле изобретения, следует понимать как модифицированные во всех возможных случаях при помощи термина "приблизительно".

Соответственно, если не показано противоположное, числовые параметры, установленные в этом описании и формуле изобретения, являются приблизительными величинами, которые могут варьироваться в зависимости от желаемых свойств, которые желают получить при помощи настоящего изобретения.

Слова "включает/включающий" и слова "имеющий/включающий" при применении со ссылкой на настоящее изобретение применяют для определения присутствия установленных свойств, чисел, стадий компонентов, но они не исключают присутствие или добавление одного или более их свойств, чисел, стадий, компонентов или групп.

Следует принимать во внимание, что конкретные свойства изобретения, такие как для ясности описаны в контексте отдельных вариантов осуществления, также могут быть предоставлены в комбинации в единичном варианте осуществления. Напротив, различные свойства изобретения, которые для краткости описаны в контексте единичного варианта осуществления, можно также предоставить отдельно или в любой подходящей субкомбинации.

ФОРМУЛА ИЗОБРЕТЕНИЯ

1. Способ лечения или облегчения плоского фолликулярного лишая у пациента, включающий местное введение указанному пациенту фармацевтически приемлемой композиции, включающей N-ацетил-3-(4'-аминофенил)-2-метоксипропионовую кислоту, или ее фармацевтически приемлемую соль, или стереоизомер и фармацевтически приемлемый эксципиент.

2. Способ по п.1, дополнительно включающий введение соединения, выбранного из группы, состоящей из пиоглитазона, росиглитазола, доксициклина, гидроксихлорокина, мофетила микофенолята, рифампина, клиндамицина и спермидина.

3. Способ по п.1 или 2, где пациентом является человек.

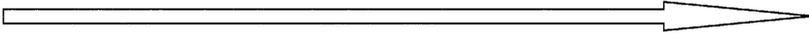
4. Способ по любому из пп.1-3, где стереоизомером N-ацетил-3-(4'-аминофенил)-2-метоксипропионовой кислоты является N-ацетил-(S)-3-(4'-аминофенил)-2-метоксипропионовая кислота или ее фармацевтически приемлемая соль.

5. Способ по любому из пп.1-4, где концентрация N-ацетил-3-(4'-аминофенил)-2-метоксипропионовой кислоты, или ее фармацевтически приемлемой соли, или стереоизомера в компози-

ции составляет по меньшей мере 1 мМ.

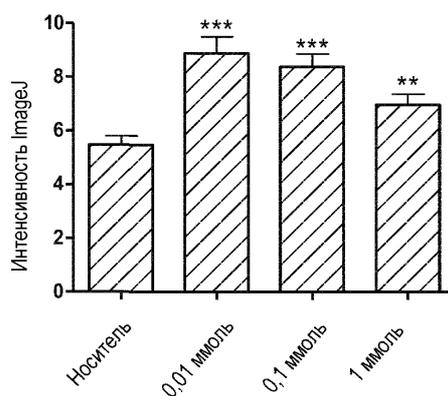
6. Способ по любому из пп.1-5, где концентрация N-ацетил-3-(4'-аминофенил)-2-метоксипропионовой кислоты, или ее фармацевтически приемлемой соли, или стереоизомера в композиции составляет от приблизительно 1 до приблизительно 10 мМ.

День 0	День 1	День 2	День 3	День 4	День 5	День 6
Микродиссекция Измерение длины волоса	Изменение среды+добавление активного средства Измерение длины волоса		Изменение среды+добавление активного средства Измерение длины волоса			Изменение длины волоса Заливка



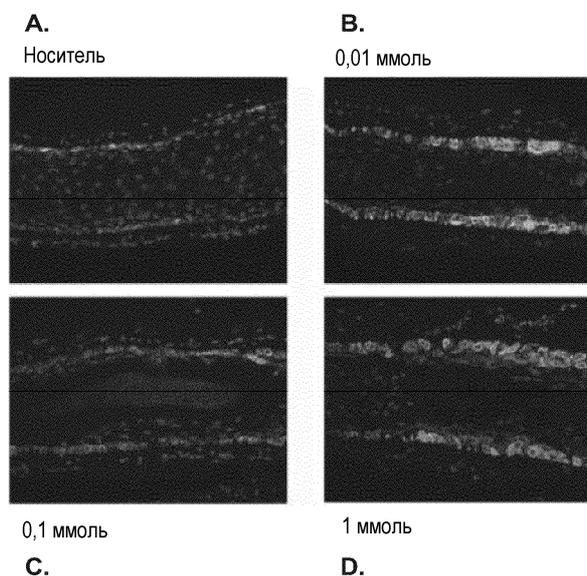
PPAR γ агонист GMG-43AC

Фиг. 1



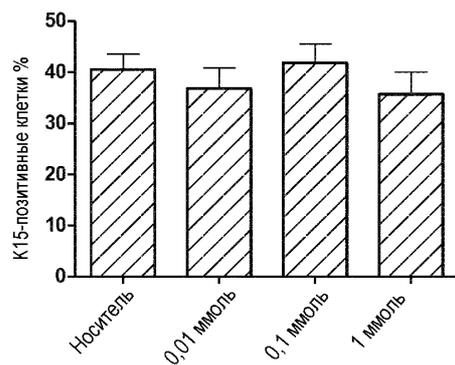
День Культивирования 0-6

Фиг. 2



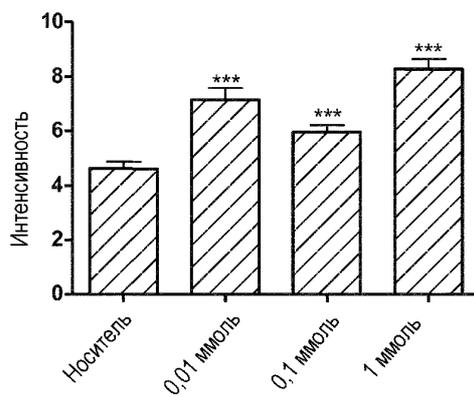
Фиг. 3

035986



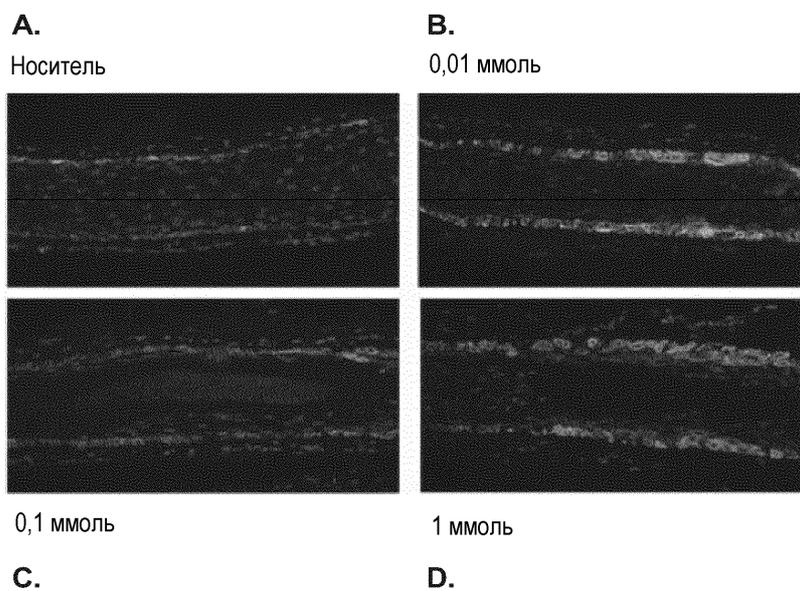
День Культивирования 0-6

Фиг. 4

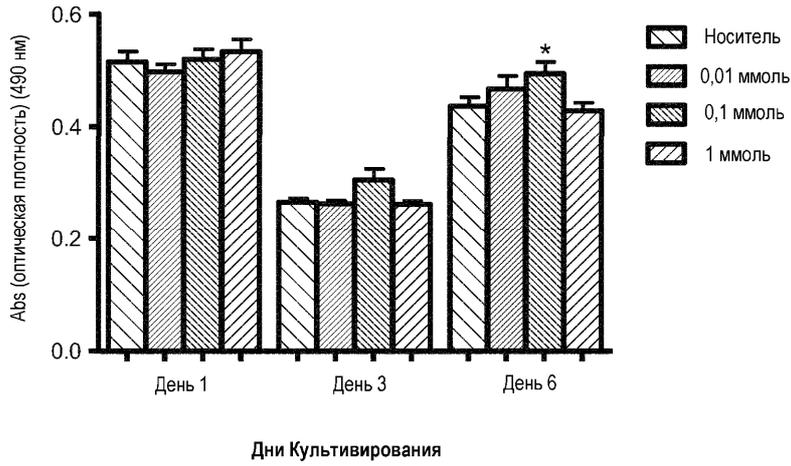


6 Дней лечения

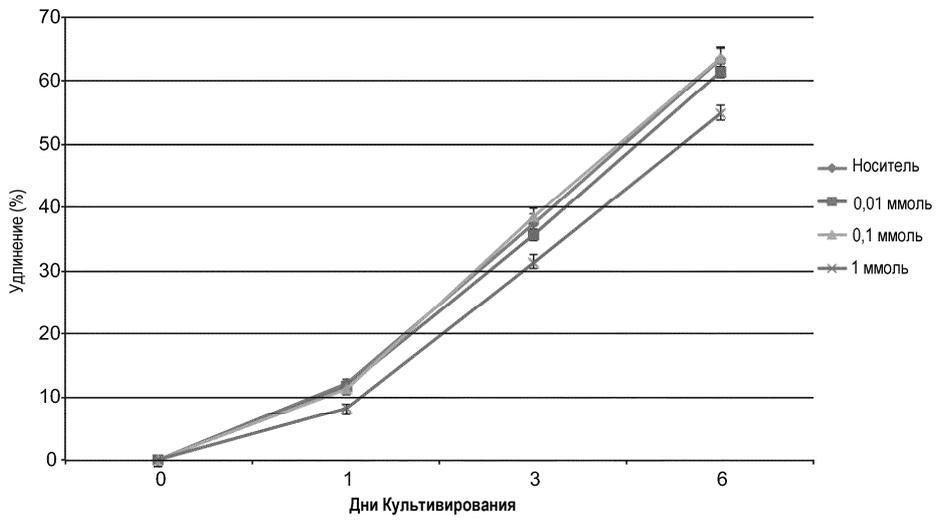
Фиг. 5



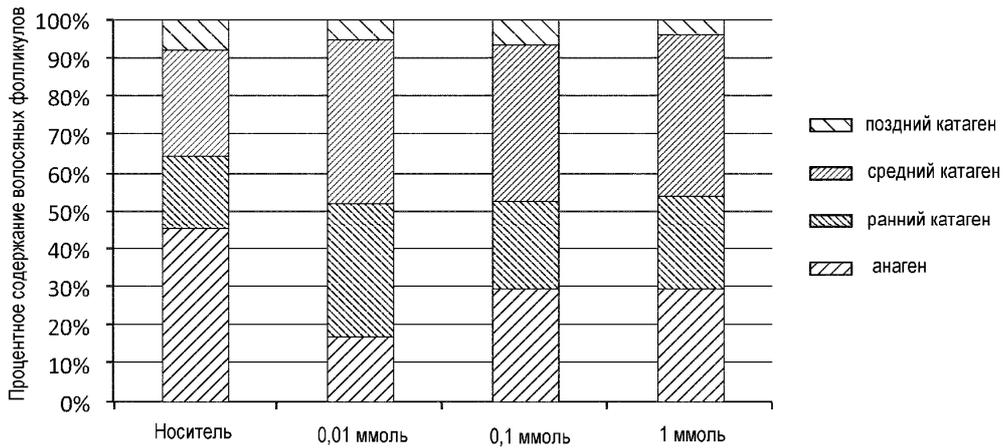
Фиг. 6



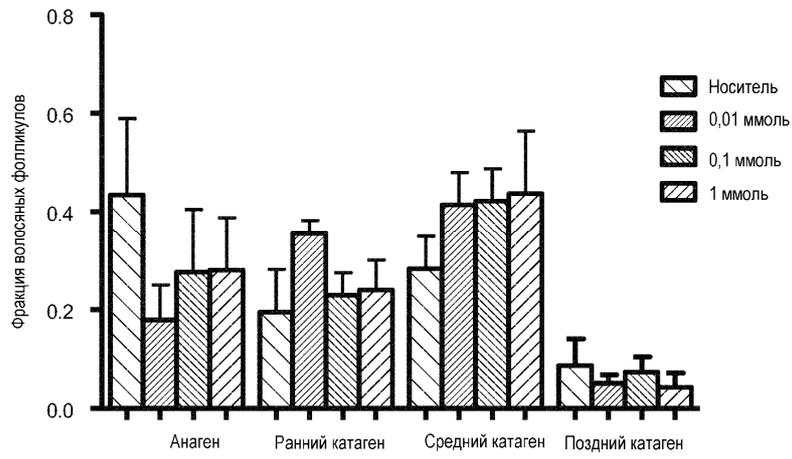
Дни Культивирования
Фиг. 7



Фиг. 8



Фиг. 9



Фиг. 10



Евразийская патентная организация, ЕАПВ

Россия, 109012, Москва, Малый Черкасский пер., 2