

(19)



Евразийское  
патентное  
ведомство

(21) 201991988 (13) A1

(12) ОПИСАНИЕ ИЗОБРЕТЕНИЯ К ЕВРАЗИЙСКОЙ ЗАЯВКЕ

(43) Дата публикации заявки  
2020.01.24

(22) Дата подачи заявки  
2017.08.25

(51) Int. Cl. A61K 31/405 (2006.01)  
A61K 31/404 (2006.01)  
A61K 8/49 (2006.01)  
A61P 17/14 (2006.01)

(54) КОМПОЗИЦИИ И СПОСОБЫ ДЛЯ СПОСОБСТВОВАНИЯ РОСТУ ВОЛОС С ПОМОЩЬЮ ИНГИБИТОРОВ МРС1

(31) 62/463,232

(32) 2017.02.24

(33) US

(86) PCT/US2017/048701

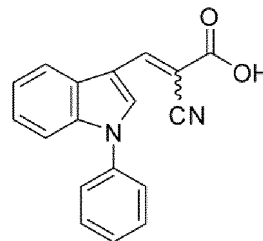
(87) WO 2018/039612 2018.03.01

(71) Заявитель:  
ДЗЕ РИДЖЕНТС ОФ ДЗЕ  
ЮНИВЕРСИТИ ОФ КАЛИФОРНИЯ  
(US)

(72) Изобретатель:  
Лоури Уилльям И., Кристофк Хитер  
(US)

(74) Представитель:  
Медведев В.Н. (RU)

(57) В данном документе предложены способы ускорения, способствования или восстановления роста волос, включающие введение субъекту, нуждающемуся в этом, эффективного количества соединения формулы (I). Также предложены композиции, содержащие соединение формулы (I).



201991988

A1

A1

201991988

**КОМПОЗИЦИИ И СПОСОБЫ ДЛЯ СПОСОБСТВОВАНИЯ РОСТУ ВОЛОС С ПОМОЩЬЮ  
ИНГИБИТОРОВ МРС1****РОДСТВЕННЫЕ ЗАЯВКИ**

Данная заявка испрашивает преимущество приоритета по предварительным заявкам на патенты США № 62/380205, поданной 26 августа 2016 года, и 62/463232, поданной 24 февраля 2017 года, включенными в данный документ посредством ссылки в полном объеме.

**УРОВЕНЬ ТЕХНИКИ**

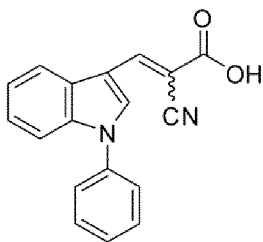
Более 400 миллионов человек во всем мире имеют облысение. Облысение по мужскому типу поражает около 50% мужского населения в возрасте 50 лет и старше. Доступные средства для роста волос дают короткие, редкие волосы и требуют постоянного нанесения. То есть, как только обработка прекращается, рост новых волос заканчивается и возобновляется выпадение волос.

В настоящее время Управление по санитарному надзору за качеством пищевых продуктов и медикаментов (FDA) одобрило два лекарственных препарата для лечения облысения: ROGAIN® (местный миноксидил) и PROPECIA® (пероральный финастерид). Миноксидил является единственным одобренным FDA лекарством для лечения женского облысения, но он действует только при выпадении волос на голове. Финастерид используется у мужчин только потому, что он может вызвать врожденные дефекты у беременных. Финастерид также оказывает неблагоприятное воздействие на сексуальное здоровье.

Существует потребность в улучшенных композициях и способах ускорения, способствования или восстановления роста волос с меньшим количеством нежелательных эффектов.

**СУЩНОСТЬ ИЗОБРЕТЕНИЯ**

Один аспект раскрытия относится к способам ускорения, способствования или восстановления роста волос, включающим введение субъекту, нуждающемуся в этом, эффективного количества соединения формулы (I):

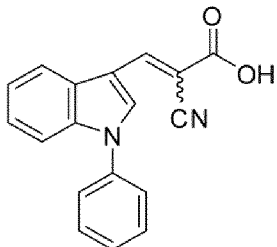


(I)

или его фармацевтически приемлемой соли.

В некоторых вариантах осуществления в данном документе раскрыты способы лечения патологического состояния, выбранного из алопеции, выпадения волос, истончения волос и облысения.

Другой аспект раскрытия относится к композициям, содержащим соединение формулы (I):



(I)

или его фармацевтически приемлемую соль, и носитель или наполнитель, подходящий для местного применения на кожу.

В некоторых вариантах осуществления, раскрытых в данном документе, указанные композиции могут использоваться при изготовлении лекарственного средства для лечения патологического состояния, как описано в данном документе.

#### КРАТКОЕ ОПИСАНИЕ ГРАФИЧЕСКИХ МАТЕРИАЛОВ

На **фиг. 1a** продемонстрирована активность лактатдегидрогеназы в нише стволовых клеток волосяного фолликула. Иммуногистохимическое (ИГХ) окрашивание в отношении экспрессии Ldha в ходе цикла развития волос демонстрирует белок Ldha, ограниченный нишей стволовых клеток волосяного фолликула (HFSC), выпуклость, обозначенную скобкой. ИГХ окрашивание на общий Ldh в эпидермисе демонстрирует экспрессию в межфолликулярном эпидермисе, воронке, сальной железе и выпуклости волосяного фолликула, показанной в скобках. ИГХ окрашивание для Sox9 на серийных срезах разграничивает популяцию HFSC. Масштабная линейка, 20 мкм.

На **фиг. 1b** иммуноблоттинг FACS-выделенных популяций HFSC ( $\alpha 6low/Cd34^+$  и  $\alpha 6hi/Cd34^+$ ) в сравнении со всем эпидермисом (Epi) демонстрирует дифференциальную экспрессию Ldha в нише стволовых клеток. Sox9 представляет собой маркер HFSC, и  $\beta$ -актин представляет собой контроль для нанесения.

На **фиг. 1c** колориметрический анализ активности фермента Ldh в эпидермисе демонстрирует наибольшую активность в выпуклости (скобки) и в подкожном мышечном слое (скобка). Данная активность

была увеличена в выпуклости на разных этапах цикла развития волос. Активность обозначена темным цветом; серый является ядерным контрастным красителем. Отметим также, что развивающиеся стержни волос у пигментированных мышей демонстрируют сильные отложения меланина, как наблюдается в данном документе; на волосяных стержнях никогда не было темных пятен, указывающих на активность Ldh.

На **фиг. 1d** активность Ldh в отсортированных клеточных популяциях, измеренная с использованием анализа с использованием планшетного ридера, также демонстрирует самую высокую активность Ldh в двух отдельных популяциях HFSC ( $\alpha 6low/Cd34^+$  и  $\alpha 6hi/Cd34^+$ ) по сравнению с эпидермальными клетками (Epi) и фибробластами (FB). Каждый столбец представляет средний сигнал для каждого типа клеток, где  $n=9$  мышей объединены из 3 независимых экспериментов. Показано как среднее значение  $\pm$  СОС. Выполнен парный t-тест,  $P < 0,05$  приведено для каждого типа клеток по сравнению с эпидермальными клетками.

На **фиг. 1e** HFSC и эпидермальные клетки были выделены во время телогена (50-е сутки) с помощью FACS, а метаболиты были выделены и проанализированы с помощью ЖХ-МС. Тепловые карты демонстрируют относительные уровни метаболитов гликолитического цикла и цикла трикарбоновых кислот из клеток, выделенных от разных мышей, в независимых экспериментах с клетками от трех животных в каждом. G6P-F6P, глюкозо-6-фосфат и фруктозо-6-фосфат; FBP, фруктоза-бисфосфат; DHAP, дигидроксиацетонфосфат; 3PG, 3-фосфоглицерат; и  $\alpha$ KG, альфа-кетоглутарат. Звездочки указывают на значительную разницу в уровнях метаболитов между эпидермальными клетками и HFSC.

**фиг. 1f** представляет активность Ldh в отсортированных популяциях стволовых клеток, измеренную с использованием анализа с использованием планшет-ридера, который демонстрирует повышенную активность Ldh, когда стволовые клетки активируются при переходе телогена в анаген (Tel-Ana).

**фиг. 1g** представляет собой карту интенсивностей, демонстрирующую относительные уровни метаболитов гликолитического цикла и цикла трикарбоновых кислот, выделенных из покоящихся (50-е сутки) и активированных (70-е сутки) HFSC. Звездочки указывают на значительную разницу между уровнями метаболитов HFSC.

**фиг. 1h** представляет собой карту интенсивностей,



демонстрирующую относительные уровни метаболитов гликолитического и цикла трикарбоновых кислот, выделенных из покоящихся (телоген, 50-е сутки), активированных (телоген-анаген, 70-е сутки) и HFSC, которые вернулись в состояние покоя (анаген, 90-е сутки). Pyr, пируват; Lac, лактат.

**Фиг. 1i** представляет анализ представленности групп генов (GSEA) по данным транскриптома РНК-секвенирования<sup>11</sup> из HFSC по сравнению со всем эпидермисом, который демонстрирует обогащение для связанных с гликолизом генов в HFSC (нормализованный показатель представленности (NES) = 1,72)

**Фиг. 1j** представляет GSEA по данным транскриптома микроматричного анализа от HFSC по сравнению со всем эпидермисом, который демонстрирует представленность связанных с гликолизом генов в HFSC (NES=1,45)

**Фиг. 1k** представляет данные РНК-секвенирования от HFSC, отсортированных во время телогена или перехода телоген-анаген (Tel-Ana), которые демонстрируют индукцию *Ldha*.

На **Фиг. 2a** изображено удаление активности *Ldh* с блокированной активацией HFSC. У *Ldha*<sup>+/+</sup> животных начинался цикл развития волос (анаген) синхронно на около 70-е сутки, как измерено при помощи удаления волос и наблюдения, начиная с 50-ых суток. У *K15CrePR; Ldha*<sup>f1/f1</sup> животных, получавших мифепризонт, обнаружены нарушения входа в анаген.

**Фиг. 2b** представляет кожную патологию, демонстрирующую, что *K15CrePR; Ldha*<sup>+/+</sup> животные входили в нормальный анаген, характеризуемый ростом фолликула и утолщением подкожной клетчатки, тогда как *Ldha*<sup>f1/f1</sup> животные ничего не демонстрировали и оставались в телогене.

**Фиг. 2c** представляет анализ активности фермента *Ldh*, который продемонстрировал сильную активность в HFSC у *K15CrePR; Ldha*<sup>+/+</sup> животных, в то время как *K15CrePR; Ldha*<sup>f1/f1</sup> животные испытывали недостаток данной активности в HFSC. (Ниша HFSC указана в скобках).

**Фиг. 2d** представляет график, демонстрирующий процент фолликулов в телогене, переходе телоген-анаген и анагене у *K15CrePR; Ldha*<sup>+/+</sup> мышей по сравнению с *K15CrePR; Ldha*<sup>f1/f1</sup> мышами.

**Фиг. 2e** представляет собой карту интенсивностей, демонстрирующую относительные уровни метаболитов гликолитического цикла и цикла трикарбоновых кислот, выделенных из *Ldha*<sup>+/+</sup> HFSC и *Ldha*<sup>f1/f1</sup> HFSC, и измеренных с помощью ЖХ-МС.

Звездочки указывают на значительную разницу между уровнями метаболитов HFSC.

**Фиг. 2f** представляет иммуногистохимическое окрашивание на Ki-67, маркер пролиферации, который отсутствует в *Ldha*<sup>f1/f1</sup> HFSC. Фосфо-S6, маркер в HFSC, в начале нового цикла развития волос, отсутствовал в *Ldha*<sup>f1/f1</sup> HFSC. Окрашивание на *Ldha* продемонстрировало специфическую делецию в HFSC. Скобки указывают на выпуклость. Окрашивание на *Sox9* демонстрирует, что HFSC все еще присутствовали в нише с удаленным *Ldha*. Масштабная линейка, 20 мкм.

На **Фиг. 2g** представлены животные со специфически удаленным *Ldha* в их контролируемых *Lgr5CreER* HFSC, которые демонстрируют серьезные нарушения при входе в анаген. **Справа** – кожная патология, демонстрирующая, что *Lgr5CreER;Ldha*<sup>f1/f1</sup> животные в основном оставались в телогене. Масштабные линейки соответствуют 100 мкм.

**Фиг. 2h** представляет анализ активности фермента в эпидермисе, который демонстрирует, что у *Lgr5CreER;Ldha*<sup>f1/f1</sup> животных этой активности в HFSC не было. Масштабные линейки соответствуют 20 мкм.

**Фиг. 2i** представляет ЖХ-МС анализ метаболитов от указанных мышей.

На **Фиг. 3a** изображена делеция *Mps1* в стволовых клетках волосяных фолликулов, активирующих новый цикл развития волос. У *Mps1*<sup>f1/f1</sup> животных наблюдали пигментацию и рост волос, что соответствовало входу в анагеновый цикл через 9 недель, тогда как у *Mps1*<sup>+/+</sup> животных пигментация и рост волос не проявлялись так рано.

**Фиг. 3b** представляет выделение при помощи проточной цитометрии популяций HFSC выпуклостей у *Mps1*<sup>+/+</sup> мышей по сравнению с *Mps1*<sup>f1/f1</sup> мышами с последующим вестерн-блоттингом, которое показало успешное удаление белка *Mps1* в нише стволовых клеток. β-актин представляет собой контроль для нанесения.

**Фиг. 3c** представляет анализ с помощью планшетного ридера на активность *Ldh* в отсортированных популяциях HFSC, который демонстрирует повышенную активность в *Mps1*<sup>f1/f1</sup> HFSC по сравнению с *Mps1*<sup>+/+</sup> HFSC.

На **Фиг. 3d** количественное определение фенотипа справа демонстрирует процент фолликулов в телогене, переходе телоген-анаген и анагене у *Mps1*<sup>+/+</sup> мышей по сравнению с *Mps1*<sup>f1/f1</sup> мышами.

**Фиг. 3е** представляет гистологию кожи дикого типа по сравнению с кожей с удаленным *Mrc1*, которая продемонстрировала индукцию анагена в отсутствие *Mrc1*. Масштабные линейки соответствуют 100 мкм.

**Фиг. 3f** представляет иммуногистохимическое окрашивание Ki-67, маркера пролиферации, который активен только в HFSC в начале нового цикла развития волос, который присутствовал только в *Mrc1<sup>fl/fl</sup>* HFSC через 8,5 недель, в соответствии с их ускоренным входом в новые циклы развития волос. Фосфо-S6, другой маркер, который активен только в HFSC в начале нового цикла развития волос, присутствовал только в *Mrc1<sup>fl/fl</sup>* HFSC. Окрашивание на Sox9 демонстрирует, что HFSC присутствовали в нише с удаленным *Mrc1*.

На **Фиг. 3g** делеция *Mrc1* у мышей, несущих аллель *Lgr5CreER*, демонстрирует сильную индукцию цикла развития волос. Обратите внимание, что красные прямоугольники указывают на области роста новых волос.

**Фиг. 3h.** представляет количественную оценку пигментации в указанных генотипах через три независимых помета.

На **Фиг. 3i** животные, получавшие местное лечение соединением формулы (I) (20 мкМ), демонстрировали пигментацию и рост волос, что указывает на вход в анаген после 8 суток лечения. Полный анаген, на который указывает полноволосный покров, был достигнут после 14 суток лечения. У мышей, получавших местное лечение с контролем растворителем, не было ни пигментации, ни роста волос даже после 12 суток лечения. **Справа** – кожная патология, демонстрирующая, что у животных, получавших соединение формулы (I), начинался ускоренный анаген через 8 недель, что характеризовалось замедлением роста фолликула и утолщением подкожной клетчатки, в то время как животные, получавшие лечение контролем растворителем, ничего не демонстрировали и оставались в телогене.

**Фиг. 3j** представляет график, демонстрирующий время до наблюдаемого фенотипа у мышей в сравнении с соединением формулы (I).

**Фиг. 3k** представляет анализ активности фермента Ldh в эпидермисе, который продемонстрировал сильную активность в HFSC у животных, получавших лечение контрольным растворителем и соединением формулы (I). Ферментативную активность Ldh также наблюдали в межфолликулярном эпидермисе животных, получавших лечение соединением формулы (I). Активность Ldh обозначена

темным пятном; серый представляет собой ядерный прочный красный контрастный краситель

**Фиг. 31** представляет метаболический анализ лактата в HFSC, выделенных из кожи, обработанной соединением формулы (I), в течение 48 часов.

На **Фиг. 4a** изображена стратегия сортировки, используемая для выделения двух популяций клеток из выпуклости. Данную конкретную сортировку использовали для выделения образцов белка, показанных при помощи вестерн-блоттинга на Фиг. 1d.

На **Фиг. 4b** изображено иммуногистохимическое (ИГХ) окрашивание (вверху) с использованием антитела, специфически распознающего *Ldha*, и (внизу) с использованием антитела, распознающего множество изоформ белка лактатдегидрогеназы (*Ldh*). Масштабная линейка, 20 мкм.

**Фиг. 4c** представляет окрашивание для Ki-67, которое маркирует делящиеся клетки на различных этапах цикла развития волос. Скобками указана ниша HFSC.

**Фиг. 4d**, сверху представляет подтверждение колориметрического анализа активности фермента *Ldh*. Наибольшую активность фермента *Ldh* наблюдали в выпуклости HFSC и в мышцах. Активность обозначена темным цветом; серый представляет собой ядерный прочный красный контрастный краситель. В отсутствие субстратного лактата не было обнаружено никакой активности (темный цвет). **Внизу:** дополнительная проверка колориметрического анализа активности фермента *Ldh*. Ферментативную активность подавляют, обрабатывая кожу соляной кислотой (HCl) перед добавлением окрашивающего раствора с субстратным лактатом. Активность *Ldh* (темный цвет) не обнаружена. Кожа, в которой активность фермента не ингибируется HCl, проявляет наибольшую активность фермента *Ldh* в выпуклости HFSC и в мышцах. Масштабная линейка, 50 мкм.

**Фиг. 4e** представляет анализ данных секвенирования РНК для подтверждения того, что HFSC при переходе телоген-анаген действительно находились в таком переходе. Известно, что переход телогена в анаген обусловлен сигналингом *Shh* (факторы *Gli* являются мишенями) и *Wnt* (*Lef1*, *Axin*, *Ccnd1* являются мишенями) и коррелирует с повышенной пролиферацией (*Ki67* и *Pcna*). Кроме того, *Sox4* был ранее идентифицирован как регулятор перехода телоген-анаген.

На **Фиг. 4f** представлены данные о *K15CrePR;Ldha<sup>f1/f1</sup>* животных,

получавших лечение мифепристоном в течение телогена (50-е сутки), которым давали развиваться в течение 6 месяцев. Ни у одной из *K15CrePR;Ldha<sup>f1/f1</sup>* мышей не наблюдали полного восстановления роста волос по сравнению с контрольными животными, у которых все волосы полностью восстановились.

**Фиг. 4g** представляет долгосрочное гистологическое исследование *K15CrePR;Ldha<sup>f1/f1</sup>* мышей, которое показало, что *Ldha*-null HFSC оставались в телогене, в то время как HFSC дикого типа проходили через анаген и затем возвращались в телоген. Это видно из толстых срезов (50 микрон, справа), которые демонстрируют увеличенное количество клубковых волосков в ДТ по сравнению с *Ldha*-null фолликулами. Масштабные линейки соответствуют 100 микрометрам (слева) и 20 микрометрам (посередине и справа).

**Фиг. 4h** представляет ИГХ на маркер HFSC *Sox9*, которое продемонстрировало, что делеция *Ldha* из HFSC не влияет на их присутствие в выпуклости даже через 6 месяцев. Кроме того, ИГХ и анализ активности и *Ldh* демонстрируют, что делеция *Ldha* была устойчивой. Из-за мозаичности делеции, в некоторых частях *K15CrePR;Ldha<sup>f1/f1</sup>* кожи *Ldha* не был удален. В нижнем ряду показана ткань кожи, несущая волосы, у *K15CrePR;Ldha<sup>f1/f1</sup>* мышей, где *Ldha* еще экспрессировалась, демонстрируя, что рост новых волос у *K15CrePR;Ldha<sup>f1/f1</sup>* мышей был вызван отсутствием делеции *Ldha*, вызванной мозаичным подходом, используемым для опосредования Cre-рекомбинации. Масштабные линейки соответствуют 20 микрометрам.

**Фиг. 4i.** Чтобы определить, как потеря *Ldha* в HFSC влияет на различные сигнальные пути, ранее связанные с циклом развития волос, мы провели ИГХ на маркеры, которые указывают на активность этих путей в телогене и в переходе телоген-анаген. Обратите внимание, что pStat5, по-видимому, подавляется при нормальном переходе телогена в анаген, и, по-видимому, этого не происходит в *Ldha*-null HFSC. Похоже, что на pStat1 и pStat3 не повлияла потеря *Ldha*. Экспрессия *Gli3*, мишени сигналинга *Shh*, обычно индуцируется в активированном зародыше волоса, происходящем из HFSC, но *Ldha*-null HFSC не образуют активный зародыш волоса. На активацию пути Wnt указывает ядерная локализация  $\beta$ -катенина, и очень мало ядерного  $\beta$ -катенина было обнаружено в *Ldha*-null HFSC. Масштабные линейки соответствуют 6 микрометрам.

**Фиг. 4j.** Через шесть месяцев после инициации делеции *Mps1* в

HFSC (*K15CrePR;Mpc1<sup>fl/fl</sup>*), у мышей, у которых отсутствует *Mpc1*, не наблюдается нежелательных явлений, определяемых по циклу развития волос (слева), патологии (в середине, Н и Е) или окрашиванию на HFSC (справа, *Sox9*). Масштабные линейки соответствуют 100 микрометрам на средней панели и 50 микрометрам на правой панели.

**Фиг. 4к.** Чтобы продемонстрировать, что делеция *Mpc1* специфически стимулирует пролиферацию в HFSC, мы использовали *K15CrePR;Ldha<sup>fl/fl</sup>* мышей, несущих аллель lox-stop-lox-Tomato, чтобы исследовать K15+ HFSC и пролиферацию с делецией *Mpc1* и без нее (слева). Кроме того, мы использовали ires-GFP в аллеле *Lgr5CreER* для окрашивания на Ki-67 и GFP и искали совместную локализацию с делецией *Mpc1* и без нее (справа). Белые скобки обозначают область выпуклости. Масштабные линейки представляют собой 20 микрометров.

На **Фиг. 4л** представлена делеция *Mpc1* у мышей, несущих аллель *Lgr6CreER*, которая не проявляет преждевременной индукции цикла развития волос.

**Фиг. 4м** представляет анализ активности *Ldh* в отсортированных HFSC от контрольных мышей или мышей с опосредованной *Lgr6CreER* делецией *Mpc1*, который продемонстрировал повышенную активность в клетках, лишенных *Mpc1*.

**Фиг. 4н** представляет анализ путей KEGG, который демонстрирует гены, связанные с метаболическими путями, индуцированными в HFSC (красный), по сравнению с подавленными (зеленый).

На **Фиг. 5а** продемонстрировано, что у *Ldha* +/+ животных синхронно начинается цикл развития волос (анаген) на 70-е сутки, как измерено при помощи удаления волос и наблюдения, начиная с 50-ых суток. *Ldha* <sup>fl/fl</sup> животные, у которых *Ldha* специфически удален в их HFSC, контролируемых *Lgr5CreER*, демонстрируют серьезные нарушения при входе в анаген. **Справа** – кожная патология, демонстрирующая, что у *Ldha* +/+ животных начинается нормальный анаген, характерный для роста фолликула и утолщения подкожной клетчатки, в то время как *Ldha* <sup>fl/fl</sup> животные ничего не демонстрировали и оставались в телогене.

На **Фиг. 5б** анализ активности фермента *Ldh* в эпидермисе демонстрирует сильную активность в HFSC у *Ldha* +/+ животных, в то время как у *Ldha* <sup>fl/fl</sup> животных эта активность отсутствует в

HFSC. (Ниша HFSC указана в скобках).

**Фиг. 6a** представляет дополнительные повторные эксперименты в отношении потери MPC1 в HFSC. Два независимых эксперимента, в которых потеря MPC1 в HFSC была инициирована лечением мифепристоном на 50-е сутки.

**Фиг. 6b** представляет дополнительный повторный эксперимент по метаболомическому анализу лактата после 48-72 часов лечения соединением формулы (I). Эксперименты также показали увеличение уровня лактата, аналогичное приведенным на Фиг. 3.

**Фиг. 7.** Животные, получающие местное лечение соединением формулы (I) (20 мкМ), продемонстрировали более полный рост волос. Мыши, получавшие местное лечение контролем растворителем, продемонстрировали пятнистый рост волос.

### ПОДРОБНОЕ ОПИСАНИЕ СУЩНОСТИ ИЗОБРЕТЕНИЯ

Стволовые клетки волосяного фолликула (HFSC) представляют собой покоящиеся, долгоживущие клетки, которые отвечают за поддержание клеточного гомеостаза фолликула. В то время как обычно дремлющие, HFSC быстро активируются, чтобы делиться во время нового цикла волос. Как известно, состояние покоя HFSC регулируется рядом внутренних и внешних механизмов.

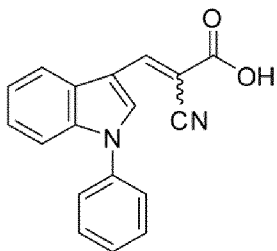
Волосяной фолликул способен подвергаться периодическим циклам покоя (телоген), регенерации (анаген) и дегенерации (катаген). Способность волосяного фолликула поддерживать данный цикл зависит от наличия стволовых клеток волосяного фолликула, которые находятся в выпуклости (Фиг. 1a). В начале анагена стволовые клетки выпуклости активируются сигналами, полученными от дермального сосочка, который на этой стадии примыкает к области выпуклости. Данные стволовые клетки выходят из выпуклости и пролиферируют вниз, создавая след, который становится наружным корневым влагалищем (ORS). Стволовые клетки выпуклости способны давать начало различным типам клеток волосяного фолликула. Способность HFSC сохранять состояние покоя и при этом становиться пролиферативными в течение пары суток, прежде чем вернуться в состояние покоя, уникальна для этой ткани.

HFSC демонстрируют способность переходить туда и обратно между состояниями пролиферации и покоя *in vivo* во время цикла развития волос<sup>1,2</sup>. Новые способы для изучения метаболизма HFSC *in vivo* предоставлены в данном документе. Доказано, что этим клеткам необходим гликолиз и активность лактатдегидрогеназы,

чтобы обеспечить их реактивацию после продолжительных периодов покоя. Кроме того, эти результаты были использованы для выявления новых фармакологических способов стимуляции активации HFSC и цикла развития волос.

#### Способы применения

В одном аспекте раскрытие обеспечивает способы ускорения, способствования или восстановления роста волос, включающие введение субъекту, нуждающемуся в этом, эффективного количества соединения формулы (I):



(I)

или его фармацевтически приемлемой соли.

Используемая в данном документе фраза «восстановление роста волос» означает улучшение роста волос. Например, это включает пролиферацию или активацию стволовых клеток волосяного фолликула, например, переход волосяных фолликулов из фазы покоя в фазу активного роста. Кроме того, когда у субъекта проявляются симптомы, такие как алопеция, выпадение волос, истончение волос и облысение, лечение раскрытым в данном документе соединением или композицией уменьшает эти симптомы по сравнению с предшествующим лечением. В некоторых вариантах осуществления восстановление роста волос измеряется относительно отсутствия введения соединения формулы (I).

Неограничивающие примеры улучшений роста волос, связанных с ускорением, способствованием или восстановлением роста волос, могут быть выбраны из:

- (a) улучшения толщины корневого влагалища;
- (b) улучшения крепления волос;
- (в) уменьшения выпадения волос;
- (d) уменьшения ломкости волос;
- (e) увеличения прочности волос;
- (f) улучшения скорости роста волос;
- (g) улучшения блеска;
- (h) улучшения количества видимых прядей волос;
- (i) улучшения длины волос;



- (j) улучшения объема прядей волос;
- (k) переход от фазы телогена к фазе анагена;
- (l) вход в новый цикл развития волос;
- (m) увеличения волосяных фолликулов в фазе роста;
- (n) увеличения активации стволовых клеток волосяного фолликула (HFSC);
- (o) активации покоящихся HFSC;
- (p) увеличения гликолиза в HFSC;
- (q) активации лактатдегидрогеназы в HFSC.

В некоторых вариантах осуществления введение включает местное нанесение композиции, содержащей соединение, на пораженный участок.

В некоторых вариантах осуществления у субъекта проявляются симптомы, выбранные из алопеции, выпадения волос, истончения волос и облысения. В некоторых вариантах осуществления у субъекта проявляются симптомы, выбранные из выпадения волос, истончения волос и облысения.

В некоторых вариантах осуществления у субъекта проявляется облысение. В некоторых вариантах осуществления облысение представляет собой облысение по мужскому типу или облысение по женскому типу.

В некоторых вариантах осуществления у субъекта проявляются симптомы, выбранные из выпадения волос и истончения волос. В некоторых вариантах осуществления выпадение или истончение волос вызвано анагеновой алопецией или телогеновой алопецией.

В некоторых вариантах осуществления анагеновая аллопеция вызывается химиотерапией (например, цитостатическими лекарственными средствами) и приемом внутрь токсичных продуктов (например, крысиного яда).

В некоторых вариантах осуществления телогеновая аллопеция вызывается стрессом (например, прививками, физической травмой (включая автомобильную аварию, хирургическое вмешательство и роды), хроническим заболеванием и некоторыми лекарственными средствами, включая антидепрессанты) и диетой (например, недостатком железа, избытком железа, недостатком цинка, недостатком L-лизина, недостатком витамина B6, недостатком витамина B12 и избытком витамина A).

В некоторых вариантах осуществления выпадение волос или истончение волос вызвано аутоиммунным расстройством.

В некоторых вариантах осуществления алопецию выбирают из

ювенильной алопеции, преждевременной алопеции, сенильной алопеции, гнездной алопеции, андрогенной алопеции, механической алопеции, послеродовой алопеции и симптоматической алопеции.

В некоторых вариантах осуществления соединение наносят на волосяной фолликул.

В некоторых вариантах осуществления соединения формулы (I) используют при изготовлении лекарственного средства для лечения любых симптомов или патологических состояний, описанных в данном документе.

В некоторых вариантах осуществления патологическое состояние представляет собой замедление или остановку роста волос. В некоторых вариантах осуществления патологическое состояние замедления или остановки роста волос выбирают из алопеции, выпадения волос, истончения волос и облысения. В некоторых вариантах осуществления патологическое состояние выбирают из алопеции, выпадения волос, истончения волос и облысения.

В некоторых вариантах осуществления способов, раскрытых в данном документе, способ включает активацию покоящейся HFSC. В некоторых вариантах осуществления покоящаяся HFSC находится в субъекте. В некоторых вариантах осуществления покоящаяся HFSC находится в испытуемом человеке.

В некоторых вариантах осуществления способов, раскрытых в данном документе, способ включает повышение гликолиза в HFSC. В некоторых вариантах осуществления уровни гликолитических метаболитов увеличиваются по отношению к отсутствию введения соединения формулы (I). В некоторых вариантах осуществления гликолитические метаболиты выбирают из глюкозы; G6P, глюкозо-6-фосфата; F6P, фруктоза-6-фосфата; FBP, фруктоза-бисфосфата; DHAP, дигидроксиацетонфосфата; 3PG, 3-фосфоглицерата; 3PL, 3-фосфолактата; и  $\alpha$ KG, альфа-кетоглутарата. В некоторых вариантах осуществления гликолитические метаболиты выбирают из глюкозы; G6P; F6P; FBP; DHAP; 3PG; и 3PL.

В некоторых вариантах осуществления способов, раскрытых в данном документе, способ включает активацию лактатдегидрогеназы в HFSC.

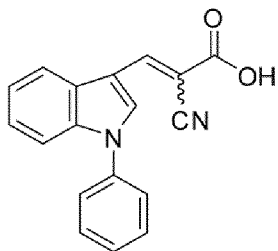
В некоторых вариантах осуществления способов, раскрытых в данном документе, HFSC представляет собой HFSC человека. В некоторых вариантах осуществления HFSC находится в испытуемом человеке.

### Композиции

В другом аспекте данное раскрытие обеспечивает фармацевтическую композицию, содержащую соединение формулы (I), необязательно смешанное с фармацевтически приемлемым носителем или разбавителем.

Композиции и способы согласно данному раскрытию могут быть использованы для лечения индивидуума, нуждающегося в этом. В определенных вариантах осуществления индивидуум представляет собой млекопитающее, такое как человек, или млекопитающее, не являющееся человеком. При введении животному, такому как человек, композицию или соединение предпочтительно вводят в виде фармацевтической композиции, содержащей, например, соединение формулы (I) согласно раскрытию и фармацевтически приемлемый носитель. Фармацевтически приемлемые носители хорошо известны в данной области техники и включают, например, водные растворы, такие как вода или забуференный физиологический раствор, или другие растворители или носители, такие как гликоли, глицерин, масла, такие как оливковое масло, или инъецируемые органические сложные эфиры. Наполнители могут быть выбраны, например, для осуществления отсроченного высвобождения агента или для избирательного воздействия на одну или более клеток, тканей или органов. Фармацевтическая композиция может быть в единичной лекарственной дозе, такой как таблетка, капсула (включая вскрываемую капсулу и желатиновую капсулу), гранула, лиофилизированный порошок для разведения, порошок, раствор, сироп, крем, лосьон или тому подобное. Композиция также может присутствовать в системе для трансдермальной доставки, например, в трансдермальном пластыре. Композиция также может присутствовать в растворе или композиции, подходящей для местного введения.

В некоторых вариантах осуществления данное раскрытие обеспечивает композицию, содержащую соединение формулы (I):



(I)

или его фармацевтически приемлемую соль, и носитель или

наполнитель, подходящий для местного применения на кожу.

В некоторых вариантах осуществления носитель или наполнитель обычно безопасен и не вызывает раздражения при нанесении на кожу, в частности, при нанесении на волосы или кожу головы.

Фармацевтически приемлемый носитель может содержать физиологически приемлемые агенты, которые действуют, например, для стабилизации, увеличения растворимости или увеличения абсорбции соединения, такого как соединение формулы (I), раскрытого в описании. Такие физиологически приемлемые агенты может включать, например, углеводы, такие как глюкоза, сахароза или декстраны, антиоксиданты, такие как аскорбиновая кислота или глутатион, хелатирующие агенты, низкомолекулярные белки или другие стабилизаторы или наполнители. Выбор фармацевтически приемлемого носителя, включая физиологически приемлемый агент, зависит, например, от пути введения композиции. Приготовление композиции может представлять собой самоэмульгирующуюся систему доставки лекарственных средств или самомикроэмульгирующуюся систему доставки лекарственных средств. Композиция (препарат) также может представлять собой липосому или другую полимерную матрицу, которая может содержать, например, соединение формулы (I) согласно раскрытию. Например, липосомы, которые содержат фосфолипиды или другие липиды, являются нетоксичными, физиологически приемлемыми и метаболизируемыми носителями, которые относительно просты в изготовлении и применении.

Фраза «фармацевтически приемлемый» используется в данном документе для обозначения тех соединений, материалов, композиций и/или лекарственных форм, которые с медицинской точки зрения подходят для применения в контакте с тканями людей и животных без чрезмерной токсичности, раздражения, аллергической реакции или других проблем или осложнений, и имеют разумное соотношение польза/риск.

Используемая в данном документе фраза «фармацевтически приемлемый носитель» означает фармацевтически приемлемый материал, композицию или носитель, такой как жидкий или твердый наполнитель, разбавитель, вспомогательное вещество, растворитель или материал для инкапсулирования. Каждый носитель должен быть «приемлемым» в смысле совместимости с другими ингредиентами лекарственной формы и безвредности для пациента. Некоторые примеры материалов, которые могут служить в качестве

фармацевтически приемлемых носителей, включают: (1) сахара, такие как лактоза, глюкоза и сахароза; (2) крахмалы, такие как кукурузный крахмал и картофельный крахмал; (3) целлюлозу и ее производные, такие как натрия карбоксиметилцеллюлоза, этилцеллюлоза и ацетат целлюлозы; (4) порошкообразный трагакант; (5) солод; (6) желатин; (7) тальк; (8) вспомогательные вещества, такие как масло какао и воски для суппозиторий; (9) масла, такие как арахисовое масло, хлопковое масло, сафлоровое масло, кунжутное масло, оливковое масло, кукурузное масло, соевое масло (например, масло сои глициновой), льняное масло (например, масло семени льна обыкновенного) и эвкалиптовое масло (например, масло листьев эвкалипта шаровидного); (10) гликоли, такие как пропиленгликоль; (11) многоатомные спирты, такие как глицерин, сорбит, маннит и полиэтиленгликоль; (12) сложные эфиры, такие как этилолеат и этиллаурат; (13) агар; (14) буферные агенты, такие как гидроксид магния и гидроксид алюминия; (15) альгиновую кислоту; (16) апирогенную воду; (17) изотонический солевой раствор; (18) раствор Рингера; (19) этиловый спирт; (20) фосфатные буферные растворы; и (21) другие нетоксичные совместимые субстанции, используемые в фармацевтических композициях.

В некоторых вариантах осуществления носитель выбирают из многоатомных спиртов (например, пропиленгликоля, бутиленгликоля, пентиленгликоля, гексиленгликоля, каприлилгликоля и глицерина), карбитола, гликолевых эфиров (например, этиленгликоль монобутилового эфира, монометилового эфира пропиленгликоля, монобутилового эфира пропиленгликоля, дипропиленгликоля и диэтиленгликоля), простых алкиловых эфиров (например, моноэтилового эфира диэтиленгликоля (этоксидигликоля) и монобутилового эфира диэтиленгликоля), апирогенной воды, спирта (например, этилового спирта, изопропанола, пропанола, бутанола, бензилового спирта и фенилэтилового спирта).

В некоторых вариантах осуществления композиция представляет собой эмульсию. Эмульсии включают масло в воде, силикон в воде, вода в масле, вода в силиконе и тому подобное. При составлении в виде эмульсии обычно включается эмульгатор.

В некоторых вариантах осуществления композиция дополнительно содержит ингредиент, выбранный из поверхностно-активного вещества, загустителя, ароматизатора, УФ-экранирующего агента, воска, силикона, консерванта, масла, витамина,

провитамина, замутняющего агента, антиоксиданта, эмульгатора, наполнителя, растворителя и буфера. Примеры вышеперечисленных агентов можно найти в Международном словаре и справочнике косметических ингредиентов, двенадцатое издание, 2008 г. или в интернете (полностью включенном в данный документ посредством ссылки).

Примеры поверхностно-активного вещества включают, но не ограничиваются ими, OLETH-5 (олеил полиоксиэтилен), олеиновую кислоту, додецилсульфат натрия, лаурилсульфат натрия и полуксамер 407.

Примеры загущающего агента включают, но не ограничиваются ими, жирные спирты (например, цетиловый спирт и олеиловый спирт), этоксилированные фенолы (например, октоксинол-1, ноноксинол-4 и ноноксинол-9) и полимеры (например, гидроксипропилметилцеллюлозу и гидроксипропилметилцеллюлозу).

Примеры УФ-экранирующего агента включают, но не ограничиваются ими, авобензон, бензофенон-4, оксibenзон, октиноксат, диоксид титана и оксид цинка.

Примеры воска включают, но не ограничиваются этим, пчелиный воск, канделильский воск, карнаубский воск и гидрированное касторовое масло.

Примеры консервантов включают, но не ограничиваются ими, изотиазолиноны, парабены, феноксиэтанол, бензойную кислоту, бензоат натрия, сорбиновую кислоту и сорбат калия.

Примеры масла включают, но не ограничиваются ими, масло авокадо, кокосовое масло, льняное масло, арахисовое масло, хлопковое масло, сафлоровое масло, кунжутное масло, оливковое масло, кукурузное масло и соевое масло.

Примеры витаминов включают, но не ограничиваются ими, витамин Е, витамин С, витамин В.

Примеры фармацевтически приемлемых антиоксидантов включают, но не ограничиваются ими: (1) водорастворимые антиоксиданты, такие как аскорбиновая кислота, эриторбиновая кислота и изоаскорбиновая кислота, гидрохлорид цистеина, бисульфат натрия, метабисульфит натрия, сульфит натрия и т.п.; (2) маслорастворимые антиоксиданты, такие как аскорбилпальмитат, бутилированный гидроксианизол (ВНА), бутилированный гидрокситолуол (ВНТ), лецитин, пропилгаллат, альфа-токоферол и тому подобное; и (3) хелатирующие металлы агенты, такие как лимонная кислота, этилендиаминтетрауксусная кислота (ЭДТА),

сорбит, винная кислота, фосфорная кислота и тому подобное.

Примеры эмульгатора включают, но не ограничиваются ими, цетеарет-20, цетеарет-25, цетеариловый спирт, лецитин, глицерилстеарат, сорбитанстеарат, глицерил олеат, полиглицерилолеат, сорбитанолеат, изопропилпальмитат, полисорбат 20, полисорбат 60, полисорбат 80, стеариновую кислоту и цетилфосфат.

В некоторых вариантах осуществления композицию наносят в форме, выбранной из шампуня, ополаскивателя для волос, кондиционера для волос, помады, геля для волос, мусса, водно-спиртового тоника, крема, спрея, эмульсии и жидкости.

В некоторых вариантах композиция представляет собой эмульсию, содержащую воду и стеариновую кислоту. В некоторых вариантах осуществления композиция представляет собой эмульсию, содержащую фармацевтически приемлемый носитель, эмульгатор, масло и ароматизатор. В некоторых вариантах осуществления композиция представляет собой эмульсию, содержащую воду, пропиленгликоль, желатин, стеариновую кислоту, льняное масло, соевое масло, эвкалиптовое масло и ароматизатор.

В некоторых вариантах осуществления композиция представляет собой эмульсию, содержащую лецитиновый органогель-пльороник. В некоторых вариантах осуществления композиция представляет собой эмульсию, содержащую воду, полксамер (например, полксамер 407) и лецитин. В некоторых вариантах осуществления композиция представляет собой эмульсию, содержащую воду, полксамер (например, полксамер 407), лецитин и этоксидигликоль. В некоторых вариантах осуществления композиция представляет собой эмульсию, содержащую воду, полксамер 407, сорбат калия, лецитин, изопропилпальмитат и сорбиновую кислоту. В некоторых вариантах осуществления композиция представляет собой эмульсию, содержащую воду, полксамер 407, сорбат калия, лецитин, изопропилпальмитат, сорбиновую кислоту и этоксидигликоль. В некоторых вариантах осуществления композиция представляет собой эмульсию, содержащую гель PLO (лецитиновый органогель высокого качества) или гель PLO Ultramax.

Композицию (препарат) можно вводить субъекту любым из ряда способов введения, включая, например, пероральное введение (например, капли, как в водных или неводных растворах или суспензиях, таблетки, капсулы (включая, вскрываемые капсулы и желатиновые капсулы), болюсы, порошки, гранулы, пасты для

нанесения на язык); всасывание через слизистую оболочку полости рта (например, сублингвально); трансдермально (например, в виде пластыря, нанесенного на кожу); и местно (например, в виде крема, мази или спрея, нанесенных на кожу, или в виде продукта, нанесенного на волосы). В определенных вариантах осуществления соединение может быть просто растворено или суспендировано в стерильной воде. Подробности подходящих способов введения и подходящих для них композиций можно найти, например, в патенте США №№ 6110973, 5763493, 5731000, 5541231, 5427798, 5358970 и 4172896, а также в цитируемых там патентах.

Композиции могут быть удобно представлены в единичной лекарственной форме и могут быть получены любыми способами, хорошо известными в области фармации. Количество активного ингредиента, которое можно комбинировать с материалом-носителем для получения единичной стандартной лекарственной формы, будет варьироваться в зависимости от хозяина, которого лечат, конкретного способа введения. Количество активного ингредиента, которое можно комбинировать с материалом-носителем для получения единичной лекарственной формы, обычно будет таким количеством соединения, которое оказывает терапевтический эффект. Как правило, из ста процентов данное количество будет варьироваться от около 0,001 процента до около 99 процентов активного ингредиента. В некоторых вариантах осуществления данное количество будет составлять от около 5 процентов до около 70 процентов. В некоторых вариантах осуществления данное количество будет составлять от около 10 процентов до около 30 процентов. В некоторых вариантах осуществления данное количество будет составлять от около 0,001 до около 10 процентов по массе композиции.

Способы приготовления данных составов или композиций включают стадию объединения активного соединения, такого как соединение формулы (I) согласно раскрытию, с носителем и, необязательно, одним или более дополнительными ингредиентами. Как правило, составы готовят путем равномерного и тщательного объединения соединения согласно данному раскрытию с жидкими носителями или тонкоизмельченными твердыми носителями или обоими, а затем, при необходимости, придания формы продукту.

Композиции согласно раскрытию, подходящие для перорального введения, могут быть в форме капсул (включая вскрываемые капсулы и желатиновые капсулы), крахмальных капсул, пилюль, таблеток,



пастилок (с использованием ароматизированной основы, обычно сахарозы и аравийской камеди или трагаканта), лиофилизированного порошка, порошка, гранул или в виде раствора или суспензии в водной или неводной жидкости, или в виде жидкой эмульсии «масло в воде» или «вода в масле», или в виде эликсира или сиропа, или в виде пастилок (с использованием инертной основы, такой как желатин и глицерин, или сахароза и аравийская камедь) и/или в виде средств для полоскания рта и тому подобного, каждое из которых содержит заранее определенное количество соединения согласно данному раскрытию в качестве активного ингредиента. Композиции или соединения также можно вводить в виде болюса, электуария или пасты.

Для приготовления твердых дозированных лекарственных форм для перорального введения (капсулы (включая вскрываемые капсулы и желатиновые капсулы), таблетки, пилюли, драже, порошки, гранулы и тому подобное) активный ингредиент смешивают с одним или более фармацевтически приемлемыми носителями, такими как цитрат натрия или дикальций фосфат и/или любым из следующих материалов: (1) наполнители или сухие разбавители, такие как крахмалы, лактоза, сахароза, глюкоза, маннит и/или кремниевая кислота; (2) связывающие агенты, такие как, например, карбоксиметилцеллюлоза, альгинаты, желатин, поливинилпирролидон, сахароза и/или аравийская камедь; (3) увлажнители, такие как глицерин; (4) разрыхлители, такие как агар-агар, карбонат кальция, картофельный или тапиоковый крахмал, альгиновая кислота, некоторые силикаты и карбонат натрия; (5) агенты для замедления растворения, такие как парафин; (6) ускорители абсорбции, такие как четвертичные аммониевые соединения; (7) смачивающие агенты, такие как, например, цетиловый спирт и глицеринмоноостеарат; (8) абсорбенты, такие как каолин и бентонитовая глина; (9) смазывающие агенты, такие как тальк, стеарат кальция, стеарат магния, твердые полиэтиленгликоли, лаурилсульфат натрия и их смеси; (10) комплексообразующие агенты, такие как модифицированные и немодифицированные циклодекстрины; и (11) окрашивающие агенты. В случае капсул (включая вскрываемые капсулы и желатиновые капсулы), таблеток и пилюль, композиции могут дополнительно содержать буферные агенты. Твердые композиции схожего типа также могут быть использованы в качестве наполнителей в мягких и твердых желатиновых капсулах с использованием таких вспомогательных

веществ, как лактоза или молочные сахара, а также высокомолекулярные полиэтиленгликоли и т.п.

Таблетка может быть изготовлена путем прессовки или формовки, необязательно, с одним или более дополнительными ингредиентами. Прессованные таблетки могут быть приготовлены с использованием связывающего вещества (например, желатина или гидроксипропилметилцеллюлозы), смазывающего вещества, инертного разбавителя, консерванта, рыхлителя (например, гликолята крахмала натрия или сшитой натрий-карбоксиметилцеллюлозы), поверхностно-активного или диспергирующего агента. Формованные таблетки можно получить формованием в подходящей машине для смешивания порошкового соединения, увлажненного инертным жидким разбавителем.

Таблетки и другие твердые дозированные лекарственные формы композиций, такие как драже, капсулы (включая вскрываемые капсулы и желатиновые капсулы), пилюли и гранулы, могут быть необязательно снабжены рисками или приготовлены с покрытиями и оболочками, такими как энтеросолюбильные покрытия и другие хорошо известные в фармацевтике покрытия. Они также могут быть составлены таким образом, чтобы обеспечить медленное или контролируемое высвобождение активного ингредиента в нем, используя, например, гидроксипропилметилцеллюлозу в различных пропорциях, чтобы обеспечить желаемый профиль высвобождения, другие полимерные матрицы, липосомы и/или микросферы. Их можно стерилизовать, например, фильтрованием через задерживающий бактерии фильтр или включением стерилизующих агентов в форме стерильных твердых композиций, которые можно растворить в стерильной воде или какой-либо другой стерильной инъекционной среде непосредственно перед использованием. Эти композиции могут также необязательно содержать средства, придающие непрозрачность, и могут представлять собой композицию, в которой они высвобождают активный(ые) ингредиент(ы) только или предпочтительно в определенной части желудочно-кишечного тракта, необязательно, с задержкой. Примеры заливочных композиций, которые можно использовать, включают полимерные вещества и воски. Активный ингредиент также может быть в микрокапсулированной форме, если необходимо, с одним или более из вышеописанных наполнителей.

Жидкие лекарственные формы, пригодные для перорального введения, включают фармацевтически приемлемые эмульсии,

лиофильные порошки для разведения, микроэмульсии, растворы, суспензии, сиропы и эликсиры. Помимо активного ингредиента, жидкие лекарственные формы могут содержать инертные разбавители, обычно применяемые в данной области техники, например, такие как вода или другие растворители, циклодекстрины и их производные, солюбилизующие агенты и эмульгаторы, такие как этиловый спирт, изопропиловый спирт, этилкарбонат, этилацетат, бензиловый спирт, бензилбензоат, пропиленгликоль, 1,3-бутиленгликоль, масла (в частности, хлопковое, арахисовое, кукурузное, масло зародышей пшеницы, оливковое, касторовое и кунжутное масло), глицерин, тетрагидрофуриловый спирт, полиэтиленгликоли и сложные эфиры жирных кислот и сорбита, а также их смеси.

Помимо инертных разбавителей, композиции для ухода за полостью рта могут также включать вспомогательные вещества, такие как смачивающий агент, эмульгатор, суспендирующий агент, подсластитель, ароматизатор, краситель, ароматизатор и консервант.

Суспензии, помимо активных соединений могут содержать суспендирующие агенты, такие как, например, этоксилированные изостеариловые спирты, полиоксиэтиленсорбит и сложные эфиры сорбита, микрокристаллическую целлюлозу, метатгидроксид алюминия, бентонит, агар-агар и трагакант, а также их смеси.

Лекарственные формы для местного или трансдермального введения включают порошки, аэрозоли, мази, пасты, кремы, лосьоны, гели, растворы и пластыри. Активное соединение может быть смешано в стерильных условиях с фармацевтически приемлемым носителем и с любыми консервантами, буферами или растворителями, которые могут потребоваться.

Мази, пасты, кремы и гели могут содержать, помимо активного соединения, наполнители, такие как животные и растительные жиры, масла, воски, парафины, крахмал, трагакант, производные целлюлозы, полиэтиленгликоли, силиконы, бентониты, кремниевая кислота, тальк и оксид цинка или их смеси.

Порошки и спреи могут содержать, помимо активного соединения, вспомогательные вещества, такие как лактоза, тальк, кремниевая кислота, гидроксид алюминия, силикаты кальция и полиамидный порошок, или смеси указанных веществ. Кроме того, спреи могут содержать обычные распыляющие вещества, такие как хлорфторуглеводороды и летучие незамещенные углеводороды, такие как бутан и пропан.

Трансдермальные пластыри имеют дополнительное преимущество, заключающееся в обеспечении контролируемой доставки соединения согласно данному раскрытию в организм. Такие лекарственные формы могут быть изготовлены путем растворения или диспергирования активного соединения в подходящей среде. Усилители поглощения также могут быть использованы для увеличения потока соединения через кожу. Скорость такого потока может контролироваться или обеспечением мембраны, контролирующей скорость высвобождения, или диспергированием соединения в полимерной матрице или геле.

Примеры подходящих водных и неводных носителей, которые могут использоваться в композициях согласно раскрытию, включают воду, этанол, полиолы (такие как глицерин, пропиленгликоль, полиэтиленгликоль и тому подобное) и их подходящие смеси, растительные масла, такие как оливковое масло и инъеклируемые органические сложные эфиры, такие как этилолеат. Соответствующую текучесть можно поддерживать, например, путем использования покрывающих веществ, таких как лецитин, путем поддержания требуемого размера частиц в случае дисперсии и с использованием поверхностно-активных веществ.

Эти композиции могут также содержать адъюванты, такие как консерванты, увлажняющие агенты, эмульгаторы и диспергирующие агенты. Предотвращение воздействия микроорганизмов может быть обеспечено включением различных антибактериальных и противогрибковых агентов, например, парабена, хлорбутанола, фенолсорбиновой кислоты и тому подобного. Также может быть желательно включить в композиции изотонические агенты, такие как сахара, хлорид натрия и тому подобное. Кроме того, продленная абсорбция инъеклируемой фармацевтического препарата может быть вызвано включением агентов, которые замедляют всасывание, таких как моностеарат алюминия и желатин.

Фармацевтические композиции могут дополнительно включать компоненты для обеспечения замедленного высвобождения и/или комфорта. Такие компоненты включают высокомолекулярные анионные мукомиметические полимеры, гелеобразующие полисахариды и тонкоизмельченные субстраты-носители лекарственного средства. Эти компоненты более подробно обсуждаются в патенте США № 4911920; 5403841; 5212162; и 4861760. Полное содержание этих патентов включено в данный документ посредством ссылки во всей их полноте для всех целей.

Для использования в способах согласно данному раскрытию

активные соединения могут быть даны *per se* или в виде композиции, содержащей, например, от 0,001 до 99,5% (более предпочтительно, от 0,001 до 10%) активного ингредиента в комбинации с фармацевтически приемлемым носителем.

Фактические уровни доз активных ингредиентов в композициях могут варьироваться, чтобы получить количество активного ингредиента, которое эффективно для достижения желаемого терапевтического ответа для конкретного пациента, композиции и способа введения, без токсичности для пациента.

Выборный уровень дозы будет зависеть от множества факторов, включая активность конкретного используемого соединения или комбинации соединений или их сложного эфира, соли или амида, путь введения, время введения, скорость выведения конкретного используемого(ых) соединения(й), продолжительность лечения, другие лекарственные средства, соединения и/или материалы, используемые в комбинации с конкретным(ыми) соединением(ями), возраст, пол, масса, состояние, общее состояние здоровья и предшествующая история болезни пациент, которого лечат, и подобные факторы, хорошо известные в медицине.

Врач или ветеринар, имеющий обычные навыки в данной области техники, может легко определить и назначить терапевтически эффективное количество требуемой композиции. Например, врач или ветеринарный врач может начинать дозы композиции или соединения с уровней, меньших, чем те, которые требуются для достижения желаемого терапевтического эффекта, и постепенно увеличивать дозу до тех пор, пока не будет достигнут желаемый эффект. Под «терапевтически эффективным количеством» подразумевается концентрация соединения, достаточная для достижения желаемого терапевтического эффекта. Обычно считается, что эффективное количество соединения будет варьироваться в зависимости от массы, пола, возраста и истории болезни субъекта. Другие факторы, которые влияют на эффективное количество, могут включать, но не ограничиваются ими, тяжесть состояния пациента, расстройство, которое лечат, стабильность соединения и, если желательно, другой тип терапевтического средства, вводимого с соединением формулы (I) согласно раскрытию. Большая общая доза может быть доставлена путем многократного введения агента. Способы определения эффективности и дозы известны специалистам в данной области техники (Isselbacher et al. (1996) Harrison's Principles of Internal Medicine 13 ed., 1814-1882, включенный в

данный документ посредством ссылки).

Как правило, подходящая суточная доза активного соединения, используемого в композициях и способах согласно раскрытию, будет представлять собой такое количество соединения, которое является самой низкой дозой, эффективной для получения терапевтического эффекта. Такая эффективная доза обычно зависит от факторов, описанных выше.

При желании эффективную суточную дозу активного соединения можно вводить в виде одной, двух, трех, четырех, пяти, шести или более частей доз, вводимых отдельно с соответствующими интервалами в течение суток, необязательно, в стандартных лекарственных формах. В некоторых вариантах осуществления данного раскрытия активное соединение может вводиться два или три раза в сутки. В некоторых вариантах осуществления активное соединение будут вводить один раз в сутки.

Пациентом, получающим такое лечение, является любое нуждающееся животное, включая приматов, в частности людей, и других млекопитающих, таких как лошади, крупный рогатый скот, свиньи и овцы; и домашняя птица и домашние животные в целом.

Изобретение, в целом описываемое, будет более легко понято со ссылкой на следующие примеры, которые включены только в целях иллюстрации определенных аспектов и вариантов осуществления данного изобретения и не предназначены для ограничения изобретения.

#### **ПРИМЕРЫ**

##### Сокращения

ACN ацетонитрил

AEC 3-амино--9-этилкарбазол

BCA анализ на основе бицинхониновой кислоты

BCS бычья/телячья сыворотка

DMCO диметилсульфоксид

FACS сортировка клеток активируемая флуоресценцией (проточная цитометрия)

HFSC стволовые клетки волосяного фолликула

Hk гексокиназа

Ldh лактатдегидрогеназа

Ldha лактатдегидрогеназа A

Ldha лактатдегидрогеназа B

НАД β-никотинамидадениндинуклеотид

НАДН восстановленный β-никотинамидадениндинуклеотид

ОСТ среда с оптимальной температурой для изготовления срезов

ФСБ фосфатно-солевой буфер

PLO лецитиновый органогель-пляроник

p-S6 фосфо-S6 рибосомный белок

p-Stat3 фосфорилированный переносчик сигнала и активатор транскрипции 3

RIPA радиоиммунопреципитационный анализ

Цикл ТСА цикл трикарбоновых кислот

ХТТ 2,3-бис (2-метокси-4-нитро-5-сульфофенил)-2Н-тетразолий-5-карбоксанилид

### Материалы и способы

#### Мыши

Животные были приобретены в Jackson Lab (*K15-CrePR*, *Lgr5-CreER* и *Lgr6-CreER*), Rutter Lab (*Mpc<sup>f1/f1</sup>*) и Seth Lab (*Ldha<sup>f1/f1</sup>*) (Xie, H. et al., *Cell Metab.*, **19**, 795-809 (2014)) и их содержали в условиях, установленных IUCUC и ARC. Для экспериментов, включающих анализ стадии телогена цикла развития волос, животных отбирали на 50-е сутки после рождения, животных с переходом телоген-анаген отбирали на 70-е сутки, животных в анагене отбирали на 90-е сутки после рождения. Для экспериментов, включающих анализ трансгенных животных, *K15-CrePR* животных брили и лечили внутрибрюшными инъекциями мифепристона, а *Lgr5-CreER* и *Lgr6-CreER* животных брили и лечили тамоксифеном (10 мг/мл, растворенным в подсолнечном масле, 2 мг в сутки в течение 3 суток) во время телогена (50-е сутки после рождения) и контролировали восстановление роста волос после удаления волос. Фенотипы, показанные для получавших лечение животных, были получены через 3-4 недели после введения мифепристона. На Фиг. 3 C57BL/6J животных дикого типа брили на 50-е сутки после рождения и местно обрабатывали гелем Transderma PLO (лецитиновым органогелем премиум класса), гелем PLO Ultramax Base (TR220) (носителем) или соединением формулы (I) (соединение (I)) (20 мкМ) (продукт Sigma Aldrich PZ0160) в течение указанных периодов времени. В данном исследовании использовали как самцов, так и самок в приблизительно равных количествах, без видимых различий в фенотипе между полами. Все описанные фенотипы являются репрезентативными для минимума n=3 пар из одного помета, как указано в описании каждого эксперимента. Никакой статистический показатель не использовали для предварительного определения

размера выборки, а статистические данные не использовали для измерения эффектов, поскольку результаты были по существу положительными или отрицательными, как представлено на фигурах. Описанные результаты включают данные от всех получавших лечение животных. Исследователи не были ослеплены в отношении распределения во время сбора экспериментальных данных, и эксперименты не были рандомизированы. Приведенные результаты были репрезентативными изображениями по меньшей мере от трех независимо получавших лечение животных, и генотипирование выполняли как до, так и после лечения животных для подтверждения.

#### *Гистология, иммуноокрашивание и иммуноблоттинг*

Ткани выделяли из указанных генотипов и помещали в свежую среду с оптимальной температурой для изготовления срезов (ОСТ) для замороженных тканевых препаратов или фиксировали в течение ночи в 4% формалине и помещали в парафин. Для замороженной ткани изготовление срезов проводили на криостате Leica 3200 и фиксировали в течение 5 минут в 4% параформальдегиде. Из ткани, заключенной в парафин, изготавливали срез, депарафинизировали и подготавливали для гистологии. Все срезы, подготовленные для окрашивания, блокировали в окрашивающем буфере, содержащем соответствующий контрольный IgG (коза, кролик и т. д.). Иммуногистохимию проводили на фиксированной в формалине ткани, заключенной в парафин, с извлечением цитратного или трис-буферного антигена со следующими антителами: Ki67 (Abcam ab16667, 1:50), p-S6 (Cell Signaling CST2215, 1:50), Sox9 (Abcam ab185230, 1:1000), Ldha (Abcam ab47010, 1:100), Ldh (Abcam ab125683, 1:100), p-Stat3 (Abcam ab68153, 1:200), p-Stat1 (Abcam ab109461, 1:200), p-Stat5 (Abcam ab32364; 1:50), Gli3 (Abcam ab6050; 1:100),  $\beta$ -катенин (Abcam ab32572; 1:500). Для обнаружения использовали систему пероксидазы DAKO EnVision+HRP (Dako K400911-2) и субстратный хромоген Dako AEC (Dako K346430-2). Изображения собирали на вертикальном микроскопе Olympus BX43 и вертикальном флуоресцентном микроскопе Zeiss Model Axio Imager M1. Пробы белка для вестерн-блоттинга и ферментативных анализов извлекали из FACS-отсортированных популяций эпидермальных клеток в буфере для лизиса RIPA (Pierce) с ингибиторами Halt протеазы и фосфатазы (Thermo-Fisher) и осаждали в ацетоне для концентрации. Были использованы следующие антитела:  $\beta$ -актин (Abcam ab8227; 1:1000),  $\beta$ -актин (Santa Cruz sc-47778; 1:1000), C-Мyc (Abcam



ab32072; 1:1000), N-Мyc (Santa Cruz sc-53993; 1:200), H3K27Ac (Abcam ab177178; 1:200), Mpc1 (Sigma HPA045119).

#### *Выделение клеток и FACS*

Всю кожу дорсальной и вентральной части мышей иссекали и помещали на поверхность трипсина (0,25%) в течение 1 ч при 37 ° С или в течение ночи при 4 ° С. Эпидермис отделяли от дермы путем выскабливания, а клетки эпидермиса механически диссоциировали с помощью пипетки. Эпидермальные клетки фильтровали через сетчатые фильтры для клеток 70 мкм в 20% бычьей телячьей сыворотки (BCS), отбирали при 300 г и дважды промывали фосфатно-солевым буфером (ФСБ). Затем клетки фильтровали через сетчатый фильтр для клеток 40 мкм и окрашивали для флуоресцентно-активированной сортировки клеток (FACS) с обработкой моноклональным антителом к CD34 (RAM34), ФИТЦ, eBioscience™ (№ по каталогу: 11-0341-82) и моноклональным антителом к CD49d (интегрин-альфа 4) (R1-2), ФЭ, eBioscience™ (№ по каталогу: 12-0492-81). Стратегия гейтирования приведена на Фиг. 4а. Клетки отсортированы с помощью высокоскоростных клеточных сортеров BD FACS Aria. Одиночные положительные и двойные положительные популяции собирали в 20% BCS, буфере для лизиса RIPA (Thermo Scientific, Pierce) или 80% метаноле для ферментативных анализов, вестерн-блоттинга или масс-спектрометрического анализа, соответственно.

#### *Анализ Ldh с помощью планшетного ридера*

Активность Ldh определяли в клеточных лизатах путем измерения образования растворимого формазана 2,3-бис (2-метокси-4-нитро-5-сульфофенил) -2Н-тетразолий-5-карбоксанилида (ХТТ) в прямой зависимости от продукции НАДН с течением времени при 475 нм при 37 °С с использованием планшет-ридера Synergy-MX (Biotek Instruments). Лизаты готовили в буфере (Thermo Scientific Pierce) для радиоиммунопреципитационного анализа (RIPA). Содержание белка определяли с использованием набора для анализа белка на основе бицинониновой кислоты BCA Protein Assay Kit (Thermo Scientific Pierce). 10 мкл белка использовали на лунку. Раствор для окрашивания содержал 50 мМ Трис-буфера, pH 7,4, 150 мкМ ХТТ (Sigma), 750 мкМ β-никотинамидадениндинуклеотида (НАД) (Sigma), 80 мкМ феназинметосульфата (Sigma) и 10 мМ субстратного лактата (Sigma). Активность Ldh определяли в клеточных лизатах путем измерения изменения абсорбции их обычного субстрата или продукта, восстановленного β-никотинамидадениндинуклеотида

(НАДН), в течение времени при 340 нм при 25°C с использованием планшет-ридера Synergy-MX (Biotek Instruments).

#### *Анализ Ldh in situ*

Криостатные срезы кожи мыши кратковременно фиксировали (4% формалин в течение 5 минут), промывали ФСБ с pH 7,4 и затем инкубировали с подходящим раствором для определения активности LDH. Среда для окрашивания содержала 50 мМ Трис, pH 7,4, 750 мкМ НАД (Sigma), 80 мкМ феназинметосульфата (Sigma), 600 мкМ хлорида нитротетразолия синего (Sigma), 10 мМ MgCl<sub>2</sub> (Sigma) и 10 мМ субстратного лактата (Sigma). Предметные стекла инкубировали со средой для окрашивания при 37 °C до достижения желаемой интенсивности, затем окрашивали контрастным красителем, используя Nuclear Fast Red (Vector, Берлингейм, Калифорния), и готовили препараты, используя VectaMount (Vector, Берлингейм, Калифорния). Контрольные реакции проводили с использованием инкубационной среды, в которой отсутствовала смесь субстратов или НАД.

#### *Метаболомический анализ на основе масс-спектрометрии*

Эксперименты проводили, как описано в Folmes, C. D. et al. Somatic oxidative bioenergetics transitions into pluripotency-dependent glycolysis to facilitate nuclear reprogramming. *Cell Metab* **14**, 264–271. Для экстракции внутриклеточных метаболитов FACS-отсортированные клетки быстро промывали холодным 150 мМ ацетатом аммония (pH 7,3) с последующим добавлением 1 мл холодного 80% метанола (MeOH) на сухом льду. Суспензии клеток переносили в пробирки типа Eppendorf и добавляли 10 нмоль D/L-норвалина. После тщательного перемешивания суспензию осаждали центрифугированием ( $1,3 \times 10^4$  об/мин, 4 °C). Супернатант переносили в стеклянный флакон, метаболиты высушивали в вакууме и ресуспендировали в 70% ацетонитриле. Для масс-спектрометрического анализа образца 5 мкл впрыскивали в колонку Luna NH<sub>2</sub> (150 мм × 2 мм, Phenomenex). Образцы анализировали с помощью UltiMate 3000RSLC (Thermo Scientific), соединенного с масс-спектрометром Q Exactive (Thermo Scientific). Q Exactive запускали с переключением полярности (+3,50 кВ / -3,50 кВ) в режиме полного сканирования с диапазоном масса/заряд 65–975. Разделение осуществляли с использованием А) 5 мМ ацетата аммония (NH<sub>4</sub>AcO) (pH 9,9) и В) ацетонитрила (ACN). Градиент начинался с 15% А) до 90% А) в течение 18 минут, затем следовали изократическим этапом в течение 9 минут и обращением к начальным

15% А) в течение 7 минут. Метаболиты определяли количественно с помощью TraceFinder 3.3 с использованием точных измерений массы ( $\leq 3$  м.д.) и времени удерживания.

#### *Статистические данные*

В данном исследовании использовали как самцов, так и самок в приблизительно равных количествах, без видимых различий в фенотипе между полами. Все описанные фенотипы являются репрезентативными для минимума  $n=3$  пар из одного помета, как указано в описании каждого эксперимента. Для анализа фенотипа восстановления роста волос никакой статистический показатель не использовали для предварительного определения размера выборки, а статистические данные не использовали для измерения эффектов, поскольку результаты были по существу положительными или отрицательными, как представлено на фигурах. Описанные результаты включают данные от всех получавших лечение животных. Исследователи не были ослеплены в отношении распределения во время сбора экспериментальных данных, и эксперименты не были рандомизированы. Все приведенные результаты были репрезентативными изображениями по меньшей мере от трех независимо получавших лечение животных, и генотипирование выполняли как до, так и после лечения животных для подтверждения. Для графиков все сравнения показаны с помощью двустороннего непарного  $t$ -критерия Стьюдента, и все графики, столбцы или линии указывают на среднее значение, а столбцы с ошибками указывают стандартную ошибку среднего (СОС).

#### Пример 1: Активность лактатдегидрогеназы увеличена в нише стволовых клеток волосяного фолликула

Многочисленные исследования выявили уникальные профили экспрессии генов в HFSC по сравнению с другими фолликулярными клетками или клетками межфолликулярного эпидермиса<sup>3-6</sup>. Многие из этих профилей регулируются транскрипционными факторами, которые, как было показано позже, играют важную роль в гомеостазе HFSC<sup>7</sup>. Лактатдегидрогеназа чаще всего кодируется генами *Ldha* и *Ldhb* у млекопитающих, белковые продукты которых образуют гомо- или гетеротетрамеры для катализа НАДН-зависимого восстановления пирувата в лактат и НАД<sup>+</sup>-зависимого окисления лактата в пируват<sup>8</sup>. При иммуноокрашивании *Ldha*, по-видимому, увеличивается в покоящихся HFSC *in situ* (телоген) (Фиг. 1a), ИГХ с антителом, которое распознает *Ldha*, и *Ldhb* показали, что только *Ldha*, по-видимому, локализован в нише HFSC (Фиг. 4a).

HFSC, как известно, проходят последовательные циклы покоя (телогена), перемежающиеся с короткими периодами пролиферации, коррелирующими с началом цикла развития волос (переход телоген-анаген). Хорошо известно, что пролиферация или активация HFSC является необходимым условием для продвижения цикла развития волос. ИГХ анализ также продемонстрировал, что экспрессия *Ldha* была увеличена в HFSC ( $\alpha$ Sox9+) в течение трех стадий цикла развития волос (Фиг. 1a). Соответственно, иммуноблоттинг лизатов из отсортированных клеток показал почти исключительную экспрессию *Ldha* в базальных HFSC ( $\alpha$ 6HiCD34+) и значительно больше *Ldhb* в популяциях как базальных ( $\alpha$ 6HiCD34+), так и супрабазальных ( $\alpha$ 6LoCD34+) HFSC относительно общего эпидермиса (Фиг. 1b)<sup>3</sup>. Стратегия сортировки приведена на Фиг. 4b.

Чтобы определить, коррелируют ли характер экспрессии *Ldha* с активностью фермента *Ldh*, для оценки способности активности *Ldh in situ* использовали колориметрический ферментативный анализ. Обычно проводимый на белковых лизатах или аликвотах с помощью планшет-ридера (Nguyen, H., et al., *Cell*, **127**, 171–183 (2006)), анализ активности *Ldh* был адаптирован для работы *in situ* на срезах замороженной ткани. Следует отметить, что, поскольку в анализах активности *Ldh* как *in situ*, так и *in vitro* используется избыточный субстрат (лактат), результаты этих анализов отражают потенциал для активности *Ldh*, а не активность в стационарном состоянии.

Применение этого анализа к образцам кожи продемонстрировало, что потенциал активности *Ldh* был значительно выше в HFSC, что согласуется с профилем экспрессии *Ldha* (Фиг. 1c). Кроме того, активность *Ldh* была повышена в HFSC в ходе цикла развития волос (Фиг. 1c). В качестве контроля анализа, проводимые без ферментативного субстрата (лактата) или на ткани, обработанной кислотой, дали нулевую активность (Фиг. 4d). Для дополнительной проверки этих результатов были отсортированы эпидермальные популяции, были получены клеточные лизаты из отсортированных клеток, и был проведен аналогичный колориметрический ферментативный анализ для лизатов отсортированных клеток, который также показал повышенную активность *Ldh* в HFSC (Фиг. 1d). Для лучшей характеристики метаболизма HFSC был проведен метаболомический анализ на отсортированных популяциях из кожи мыши при помощи метода жидкостной хроматографии–масс–спектрометрии (ЖХ–МС) (Фиг. 1e).

Некоторые гликолитические метаболиты, включая глюкозу/фруктозо-6-фосфат, фруктозо-бисфосфат, дигидроксиацетонфосфат, 3-фосфоглицерат и лактат, были обычно выше в HFSC по сравнению с общим эпидермисом в трех независимых экспериментах (выделенных от разных мышей в разные дни). Наоборот, большинство метаболитов цикла трикарбоновых кислот не были неизменно различны между эпидермисом и HFSC (Фиг. 1e). В совокупности эти результаты позволяют предположить, что хотя все клетки эпидермиса экстенсивно используют цикл трикарбоновых кислот для генерации энергии, HFSC также обладают повышенной экспрессией *Ldha*, активностью *Ldh* и гликолитическим метаболизмом.

Таким образом, измерение метаболизма по всему циклу развития волоса позволит зафиксировать любые динамические изменения, происходящие в HFSC, которые коррелируют с активацией или покоем. Анализ данных РНК-секвенирования из HFSC, выделенных во время телогена или перехода телоген-анаген, продемонстрировал не только то, что *Ldha* является преобладающей изоформой *Ldh*, экспрессируемой в HFSC (Фиг. 1k), но также индуцируется во время перехода телоген-анаген (Фиг. 1i и 1j) (NIHGEORGSE67404 и GSE51635). Для подтверждения того, что клетки, анализируемые с помощью РНК-секвенирования, действительно были или в телогене, или в переходе телогена в анаген, были оценены важные маркеры данного перехода, включая пути *Shh* и *Wnt* (*Gli1*, 2, 3; *Lef1*, *Axin1*, *Axin2*, *Ccnd1*) а также маркеры пролиферации (*Ki-67*, *Pcna* и *Sox4*) (Фиг. 4e).

Анализ активности *Ldh in vitro* в отношении лизатов из отсортированных HFSC выявил умеренную индукцию активности *Ldh*, коррелирующую с переходом телогена в анаген (Фиг. 1f, справа). Стадирование цикла развития волос подтверждено иммуноокрашиванием *Ki-67* для определения активации HFSC (Фиг. 4c). Кроме того, измерения метаболитов, выделенных из отсортированных HFSC, которые находятся в стационарной фазе, продемонстрировали увеличение лактата в HFSC, когда они переходят от телогена к переходу телоген-анаген, а затем снова уменьшаются в анагене, когда HFSC возвращаются в состояние покоя (Фиг. 1h).

#### Пример 2: Удаление активности *Ldh* блокирует активацию HFSC

Чтобы определить, функционально ли связана активность *Ldh* со способностью HFSC оставаться в состоянии покоя или активироваться в начале цикла развития волос, *Ldha* специально

удаляли из HFSC. Используя преимущества мышей с аллелями *Ldha*, фланкированными loxP-сайтами<sup>12</sup>, этот фермент был удален в HFSC путем скрещивания с мышами, несущими аллель<sup>5</sup> K15CrePR5re, как известно, индуцируемый мифепристоном конкретно в HFSC. Делецию *Ldha* в HFSC инициировали введением мифепристона во время телогена (50-е сутки) и приводило к типичной мозаичной рекомбинации аллелей, фланкированных loxP-сайтами, по всей коже спины. У мышей с HFSC-специфической делецией *Ldha* не проходил правильный цикл развития волос, при этом большинство фолликулов оставалось в телогене по меньшей мере у 33 пар из одного помета через 3-4 недели после лечения мифепристоном (Фиг. 2a).

Гистология продемонстрировала, что волосные фолликулы ДТ входили в переход телогена в анаген обычно к 70-ым суткам, и это сопровождалось типичным увеличением гиподермы ниже (Фиг. 2b). Однако у кожи спины с делецией *Ldha* подкожная клетчатка не увеличивалась, и переход телогена в анаген был резко прекращен (Фиг. 2b). В областях с сильной фенотипической пенетрантностью активность *Ldh* была строго прекращена в компартменте HFSC (Фиг. 2c), демонстрируя, что аллель *Ldha* является критически важным для активности *Ldh* в HFSC и согласуется с тем фактом, что изоформа «а» *Ldh* экспрессируется на самом высоком уровне. Количественная оценка прогрессирования цикла развития волос у многочисленных животных продемонстрировала, что большинство фолликулов, лишенных *Ldha*, остаются в телогене (Фиг. 2d).

Кроме того, чтобы подтвердить фенотипы, *Ldha* также был удален с помощью независимой HFSC-специфической стратегии Cre. *Lgr5-CreER* был использован для отслеживания линий дифференцировки на различных моделях взрослых стволовых клеток, и было показано, что он маркирует клетки с высокой регенерационной способностью, включая HFSC (Jaks, V. et al., *Nat Genet* **40**, 1291–1299 (2008)). *Lgr5CreER;Ldha<sup>fl/fl</sup>* мыши, получавшие тамоксифен на 50-е сутки после рождения перед синхронизированным циклом развития волос, также не смогли активировать анаген по меньшей мере в 20 парах из одного помета (Фиг. 2g). Анализ *Ldh in situ* и метаболомика подтвердили успешную делецию *Ldha* у этих животных (Фиг. 2h и Фиг. 2i).

Эффект потери активности *Ldha* в K15+ клетках контролировали в течение шестимесячного периода и обнаружили, что делеция *Ldha* приводила к мозаичной, но постоянной блокаде активации HFSC в некоторых частях кожи спины (Фиг. 4f). Эти данные подтверждают,

что активность *Ldh* требуется для активации HFSC, а не просто является маркером HFSC. Более внимательный взгляд на эти долгосрочные делеции *Ldha* показал, что *Ldha*-null HFSC продолжали экспрессировать типичные маркеры, но не имели активности *Ldh* и не могли инициировать новые циклы развития волос, в то время как те фолликулы, которые избежали удаления, продолжали экспрессировать *Ldha* и нормально проходили цикл (Фиг. 4g и Фиг. 4h).

После сортировки HFSC от животных с делецией *Ldha* или без нее, метаболомический анализ на основе ЖХ-МС продемонстрировал, что уровни лактата, а также уровни других гликолитических метаболитов были сильно снижены в отсутствие *Ldha* (Фиг. 2e), что является функциональным подтверждением того, что стратегия нацеливания была успешной. Тот факт, что гликолитические метаболиты перед лактатом также подавлялись, предполагает, что HFSC могут адаптировать свой метаболизм для количественного учета потери активности *Ldh*. Иммуноокрашивание маркеров активации и пролиферации HFSC указывало на недостаточность активации HFSC. Было ясно, что Ki67 и pS6 в изобилии присутствуют в нише HFSC в начале цикла развития волос<sup>13</sup>, и оба этих маркера отсутствовали в коже спины с удаленным *Ldha* (Фиг. 3f). Иммуноокрашивание на *Ldha* также подтвердило успешное удаление данного белка, в то время как окрашивание на *Sox9*, маркер HFSC, указывало, что эти клетки оставались в своей нише, но просто не активировались в отсутствие *Ldha* (Фиг. 3f). Также считается, что индукция цикла развития волос регулируется с помощью сигналов от путей *Shh*, *Wnt* и *Jak-Stat*. Каждый из них анализировали с помощью ИГХ в нормальных фолликулах или фолликулах с делецией *Ldha*, и было обнаружено, что в целом эти пути не были активированы в *Ldha*-null HFSC, которые не смогли войти в переход телоген-анаген (Фиг. 4i).

### Пример 3: Делеция *Mpc1* в стволовых клетках волосных фолликулов активирует новый цикл развития волос.

K15CrePR животные были скрещены с теми, у которых были фланкированы loxP для митохондриального переносчика пирувата 1 (*Mpc1*) (*K15CrePR;Mpc1<sup>f1/f1</sup>*). *Mpc1*, как гетеродимер с *Mpc2*, образует митохондриальный переносчик пирувата MPC, транспортер на внутренней мембране митохондрий, необходимый для поступления пирувата в митохондрии<sup>15</sup>. Было показано, что потеря функции *Mpc1* стимулирует выработку лактата за счет усиления превращения

пирувата в лактат с помощью Ldh<sup>16</sup>.

У животных с делецией *Mprc1* в HFSC наблюдали сильное ускорение циклов развития волос вентральной и дорсальной части туловища со всеми типичными признаками перехода телоген-анаген (Фиг. 3a) (12 пар однопометных особей; дополнительные животные представлены на Фиг. 6a). Получавшие лечение мифепристоном *K15CrePR;Mprc1<sup>fl/fl</sup>* животные были единственными, у кого были обнаружены какие-либо признаки анагена в дорсальной части к 70-ым суткам. Вестерн-блоттинг на отсортированных HFSC подтвердил потерю белка *Mprc1* (Фиг. 3b). Важно, что очищенные HFSC, лишенные *Mprc1*, демонстрировали сильную индукцию активности Ldh (Фиг. 3c). Количественная оценка цикла развития волос дорсальной стороны на трех парах однопометников продемонстрировала сильную индукцию анагена в коже спины с отсутствием *Mprc1* (Фиг. 3d), а гистология продемонстрировала, что индукция анагена была нормальной по внешнему виду с типичным увеличением гиподермы (Фиг. 3e). Иммуоокрашивание продемонстрировало индукцию в *Mprc1-null* HFSC различных маркеров активации цикла развития волос, таких как Ki-67 и pS6, в то время как экспрессия *Sox9* не изменялась (Фиг. 3f). Делеция *Mprc1* в длительном эксперименте не приводила к аберрантным фолликулам или истощению HFSC, что оценивалось по патологии и окрашиванию на *Sox9* (Фиг. 4j). Кроме того, делеция *Mprc1* с *Lgr5CreER* продемонстрировала очень похожий фенотип с делецией с *K15CrePR* (Фиг. 3f и Фиг. 3g), подтверждая тот факт, что удаление данного белка в HFSC приводит к их активации (n=12 пар однопометников). Наконец, иммунофлюоресценция для *Ires-GFP Lgr5CreER* трансгена вместе с Ki-67 и отслеживание линий дифференцировки с помощью *K15CrePR;Mprc1<sup>fl/fl</sup>;lsl-Tomato* мышей также продемонстрировали, что HFSC действительно пролиферировали после индукции делеции *Mprc1* тамоксифеном или мифепристоном (Фиг. 4k).

С другой стороны, делеция *Mprc1* в верхней части фолликула (воронка, предшественники сальных желез) и ограниченное количество межфолликулярных клеток с *Lgr6CreER*<sup>28</sup>, по-видимому, не влияют на цикл развития волос (*Lgr6CreER;Mprc1<sup>fl/fl</sup>*) (n=10 пар однопометных) или общий гомеостаз кожи в течение не менее 2 месяцев (Фиг. 4l). Анализ активности Ldh на *Lgr6+* клетках, отсортированных из кожи дикого типа или кожи с делецией, продемонстрировал, что делеция *Mprc1* была эффективной (Фиг. 4m). Вместе эти результаты демонстрируют, что увеличение выработки



лактата посредством блокады пирувата в цикле трикарбоновых кислот оказывает сильное влияние на способность HFSC, но не других клеток волосяного фолликула, становятся активированными, чтобы инициировать новый цикл развития волос.

Соединение формулы (I) является хорошо известным фармакологическим ингибитором митохондриального переносчика пирувата и, как известно, в результате стимулирует выработку лактата в различных условиях.<sup>17</sup> Местное лечение животных в телогене (50-е сутки) соединением формулы (I) привело к сильному ускорению цикла развития волос, а также к незначительной гиперпролиферации межфолликулярного эпидермиса (Фиг. 3i). Количественное определение цикла развития волос у по меньшей мере 6 пар животных (носитель по сравнению с соединением формулы (I)) продемонстрировало сильное ускорение цикла развития волос, начинающееся всего через 3-5 суток (Фиг. 3j). Подобно генетической делеции *Mps1*, фармакологическая блокада митохондриального переносчика пирувата путем местного применения соединения формулы (I) в течение 48 часов в течение телогена способствовала увеличению активности Ldh в межфолликулярном эпидермисе, что согласуется с повышенной способностью продуцировать лактат (Фиг. 3k). Наконец, метаболический анализ продемонстрировал, что местное применение соединения формулы (I) увеличивает общий уровень лактата в отсортированных HFSC (Фиг. 3l).

Вместе эти данные демонстрируют, что выработка лактата через Ldha важна для активации HFSC, и что HFSC могут поддерживать высокую способность к гликолитическому метаболизму по меньшей мере частично благодаря активности Мус. Генетическое или фармакологическое нарушение продукции лактата может модулировать активность HFSC.

#### Пример 4: Лечение старых мышей ускоряет цикл развития волос

17-месячных мышей бреют и через сутки обрабатывают ДМСО или 20 мкМ соединения формулы (I), разведенного в геле PLO (лецитиновый органогель-плюроник). Изображения делали в указанный день после удаления волос и выполнялись в течение 30 суток. Старые мыши, которых лечили ДМСО, снова покрывались пятнами, в то время как лечение соединением формулы (I) приводило к более полному восстановлению роста (Фиг. 7).

#### **Список литературы**

1. Fuchs, E., Merrill, B. J., Jamora, C. & DasGupta, R. At

the roots of a never-ending cycle. *Dev Cell* **1**, 13-25 (2001).

2. Lavker, R. M. et al. Hair follicle stem cells: their location, role in hair cycle, and involvement in skin tumor formation. *The Journal of investigative dermatology* **101**, 16S-26S (1993).

3. Blanpain, C., Lowry, W. E., Geoghegan, A., Polak, L. & Fuchs, E. Self-renewal, multipotency, and the existence of two cell populations within an epithelial stem cell niche. *Cell* **118**, 635-648 (2004).

4. Tumber, T. et al. Defining the epithelial stem cell niche in skin. *Science* **303**, 359-363 (2004).

5. Morris, R. J. et al. Capturing and profiling adult hair follicle stem cells. *Nat Biotechnol* **22**, 411-417 (2004).

6. Trempus, C. S. et al. Enrichment for living murine keratinocytes from the hair follicle bulge with the cell surface marker CD34. *J Invest Dermatol* **120**, 501-511 (2003).

7. Nguyen, H., Rendl, M. & Fuchs, E. Tcf3 governs stem cell features and represses cell fate determination in skin. *Cell* **127**, 171-183 (2006).

8. Lowry, W. E. et al. Defining the impact of beta-catenin/Tcf transactivation on epithelial stem cells. *Genes Dev* **19**, 1596-1611 (2005).

9. Fromm, H. J. The nature of pyruvate involved in the enzymic formation of L-lactate in the rabbit-muscle lactate dehydrogenase reaction. *Biochim Biophys Acta* **99**, 540-542 (1965).

10. Paus, R., Muller-Rover, S. & Botchkarev, V. A. Chronobiology of the hair follicle: hunting the "hair cycle clock". *J Invest Dermatol Symp Proc* **4**, 338-345 (1999).

11. Wang, L., Siegenthaler, J. A., Dowell, R. D. & Yi, R. Foxc1 reinforces quiescence in self-renewing hair follicle stem cells. *Science* **351**, 613-617, doi:10.1126/science.aad5440 (2016).

12 Xie, H. et al. Targeting lactate dehydrogenase--a inhibits tumorigenesis and tumor progression in mouse models of lung cancer and impacts tumor-initiating cells. *Cell metabolism* **19**, 795-809, doi:10.1016/j.cmet.2014.03.003 (2014).

13. Kellenberger, A. J. & Tauchi, M. Mammalian target of rapamycin complex 1 (mTORC1) may modulate the timing of anagen entry in mouse hair follicles. *Exp Dermatol* **22**, 77-80, doi:10.1111/exd.12062 (2013).

14. Jaks, V. et al. Lgr5 marks cycling, yet long-lived,

hair follicle stem cells. *Nat Genet* **40**, 1291-1299, doi:10.1038/ng.239 (2008).

15. Bricker, D. K. et al. A mitochondrial pyruvate carrier required for pyruvate uptake in yeast, *Drosophila*, and humans. *Science* **337**, 96-100, doi:10.1126/science.1218099 (2012).

16. Schell, J. C. et al. A role for the mitochondrial pyruvate carrier as a repressor of the Warburg effect and colon cancer cell growth. *Mol Cell* **56**, 400-413, doi:10.1016/j.molcel.2014.09.026 (2014).

17. Patterson, J. N. et al. Mitochondrial metabolism of pyruvate is essential for regulating glucose-stimulated insulin secretion. *J Biol Chem* **289**, 13335-13346, doi:10.1074/jbc.M113.521666 (2014).

18. Hsu, P. & Qu, C. K. Metabolic plasticity and hematopoietic stem cell biology. *Current opinion in hematology* **20**, 289-294, doi:10.1097/MOH.0b013e328360ab4d (2013).

19. Harris, J. M. et al. Glucose metabolism impacts the spatiotemporal onset and magnitude of HSC induction in vivo. *Blood* **121**, 2483-2493, doi:10.1182/blood-2012-12-471201 (2013).

20. Takubo, K. et al. Regulation of glycolysis by Pdk functions as a metabolic checkpoint for cell cycle quiescence in hematopoietic stem cells. *Cell Stem Cell* **12**, 49-61, doi:10.1016/j.stem.2012.10.011 (2013).

21. Simsek, T. et al. The distinct metabolic profile of hematopoietic stem cells reflects their location in a hypoxic niche. *Cell Stem Cell* **7**, 380-390, doi:10.1016/j.stem.2010.07.011 (2010).

22. Shin, J. et al. Single-Cell RNA-Seq with Waterfall Reveals Molecular Cascades underlying Adult Neurogenesis. *Cell Stem Cell* **17**, 360-372, doi:10.1016/j.stem.2015.07.013 (2015).

23. Ito, M. et al. Stem cells in the hair follicle bulge contribute to wound repair but not to homeostasis of the epidermis. *Nat Med* **11**, 1351-1354 (2005).

24. Subramanian, A. et al. Gene set enrichment analysis: a knowledge-based approach for interpreting genome-wide expression profiles. *Proc Natl Acad Sci U S A* **102**, 15545-15550, doi:10.1073/pnas.0506580102 (2005).

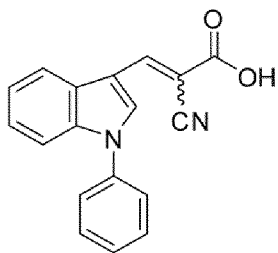
#### Включение посредством ссылки

Все публикации патентных заявок США и РСТ и патенты США, процитированные в данном документе, настоящим полностью включены

посредством ссылки, как если бы каждая отдельная публикация или патент были специально и отдельно указаны для включения посредством ссылки. В случае конфликта данная заявка, включая любые определения в данном документе, будет иметь преимущественную силу.

# ФОРМУЛА ИЗОБРЕТЕНИЯ

1. Способ ускорения, способствования или восстановления роста волос, включающий введение субъекту, нуждающемуся в этом, эффективного количества соединения формулы (I):



(I)

или его фармацевтически приемлемой соли.

2. Способ по п. 1, отличающийся тем, что введение включает местное нанесение композиции, содержащей указанное соединение, на пораженный участок.

3. Способ по п. 1 или п. 2, отличающийся тем, что у субъекта проявляются симптомы, выбранные из алопеции, выпадения волос, истончения волос и облысения.

4. Способ по любому из предшествующих пунктов, отличающийся тем, что у субъекта проявляются симптомы, выбранные из выпадения волос, истончения волос и облысения.

5. Способ по любому из предшествующих пунктов, отличающийся тем, что у субъекта проявляется облысение.

6. Способ по п. 5, отличающийся тем, что облысение представляет собой облысение по мужскому типу или облысение по женскому типу.

7. Способ по любому из пп. 1-4, отличающийся тем, что у субъекта проявляются симптомы, выбранные из выпадения волос и истончения волос.

8. Способ по п. 7, отличающийся тем, что выпадение волос или истончение волос вызвано анагеновой алопецией или телогеновой алопецией.

9. Способ по п. 3, отличающийся тем, что алопецию выбирают из ювенильной алопеции, преждевременной алопеции, сенильной алопеции, гнездной алопеции, андрогенной алопеции, механической алопеции и симптоматической алопеции.

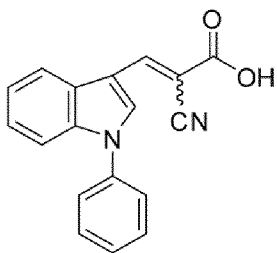
10. Способ по любому из предшествующих пунктов, отличающийся тем, что указанное соединение наносят на волосяной фолликул.

11. Способ по любому из предшествующих пунктов, отличающийся тем, что указанное соединение формулы (I) применяют ежесуточно.

12. Способ по любому из предшествующих пунктов, отличающийся тем, что субъект представляет собой млекопитающее.

13. Способ по любому из предшествующих пунктов, отличающийся тем, что субъект представляет собой человека.

14. Композиция, содержащая соединение формулы (I):



(I)

или его фармацевтически приемлемую соль, и носитель или наполнитель, подходящий для местного применения на кожу.

15. Композиция по п. 14, отличающаяся тем, что концентрация указанного соединения составляет от около 0,001% до около 10% по массе композиции.

16. Композиция по п. 14 или п. 15, отличающаяся тем, что указанная композиция представляет собой эмульсию.

17. Композиция по любому из пп. 14-16, отличающаяся тем, что композиция дополнительно содержит ингредиент, выбранный из поверхностно-активного вещества, загустителя, ароматизатора, УФ-экранирующего агента, воска, силикона, консерванта, масла, витамина, провитамина, замутняющего агента, антиоксиданта, эмульгатора, наполнителя, растворителя и буфера.

18. Композиция по любому из пп. 14-17, отличающаяся тем, что композиция дополнительно содержит эмульгатор.

19. Композиция по любому из пп. 14-18, отличающаяся тем, что указанную композицию наносят в форме, выбранной из шампуня, ополаскивателя для волос, кондиционера для волос, помады, геля для волос, мусса, водно-спиртового тоника, крема, спрея, эмульсии и жидкости.

20. Применение композиции по любому из пп. 14-19 в изготовлении лекарственного средства для лечения состояния, замедляющего или останавливающего рост волос.

21. Применение по п. 20, отличающееся тем, что указанное состояние замедления или остановки роста волос выбирают из алопеции, выпадения волос, истончения волос и облысения.

22. Применение композиции по любому из пп. 14-19 в изготовлении лекарственного средства для лечения состояния, выбранного из алопеции, выпадения волос, истончения волос и облысения.

23. Применение по п. 21 или п. 22 для лечения облысения.

24. Применение по п. 23, отличающийся тем, что облысение представляет собой облысение по мужскому типу или облысение по женскому типу.

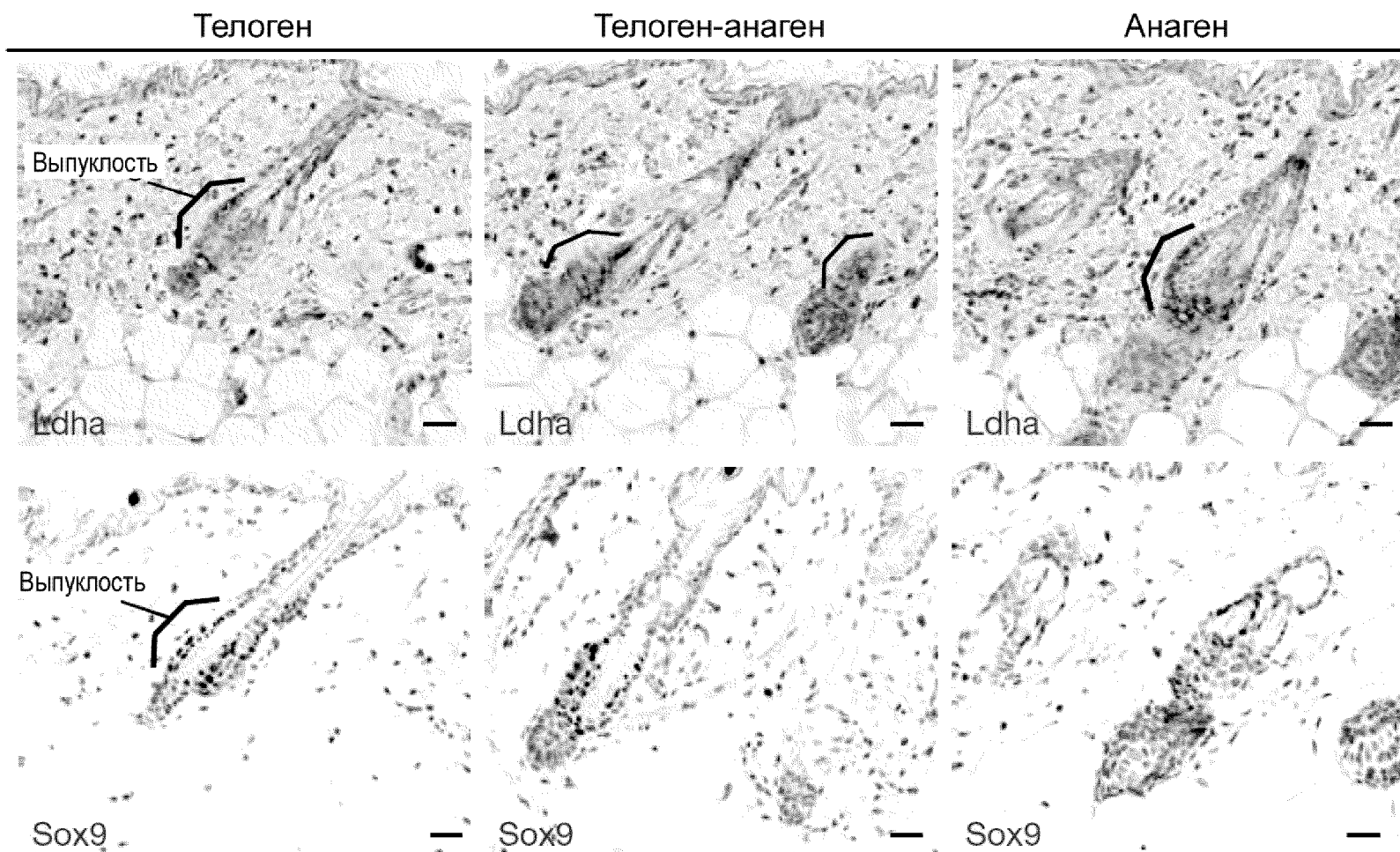
25. Применение по п. 21 или п. 22 для лечения состояния, выбранного из выпадения волос и истончения волос.

26. Применение по п. 25, отличающееся тем, что выпадение волос и истончение волос вызвано анагеновой алопецией или телогеновой алопецией.

27. Применение по п. 21 или п. 22, отличающееся тем, что алопецию выбирают из ювенильной алопеции, преждевременной алопеции, сенильной алопеции, гнездной алопеции, андрогенной алопеции, механической алопеции и симптоматической алопеции.

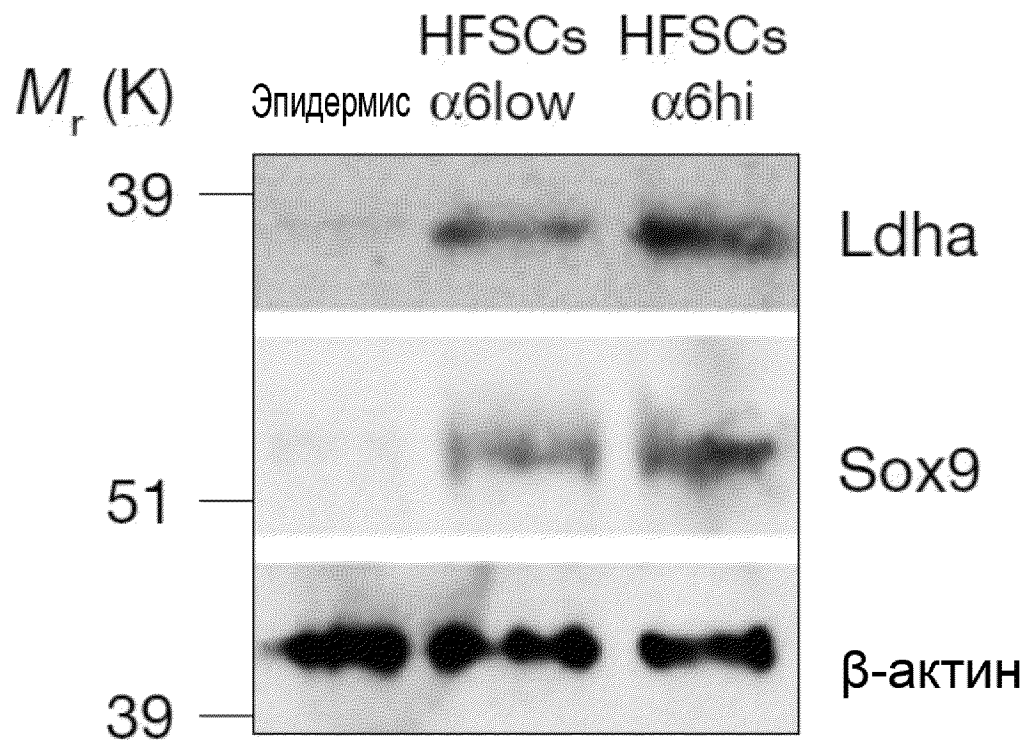
По доверенности

Фиг. 1а

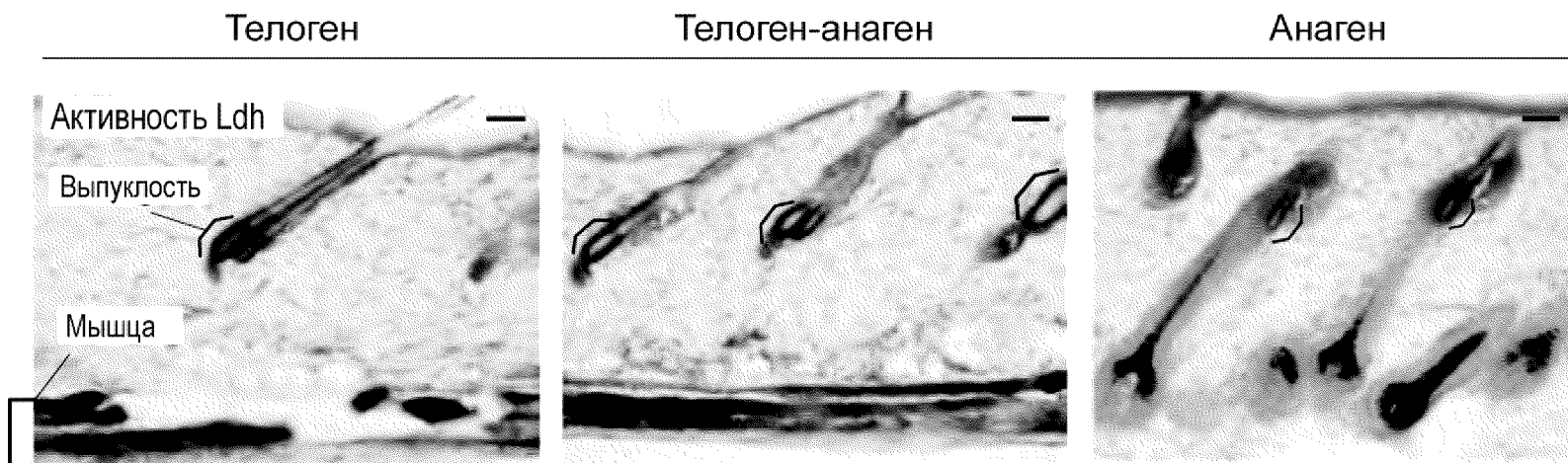




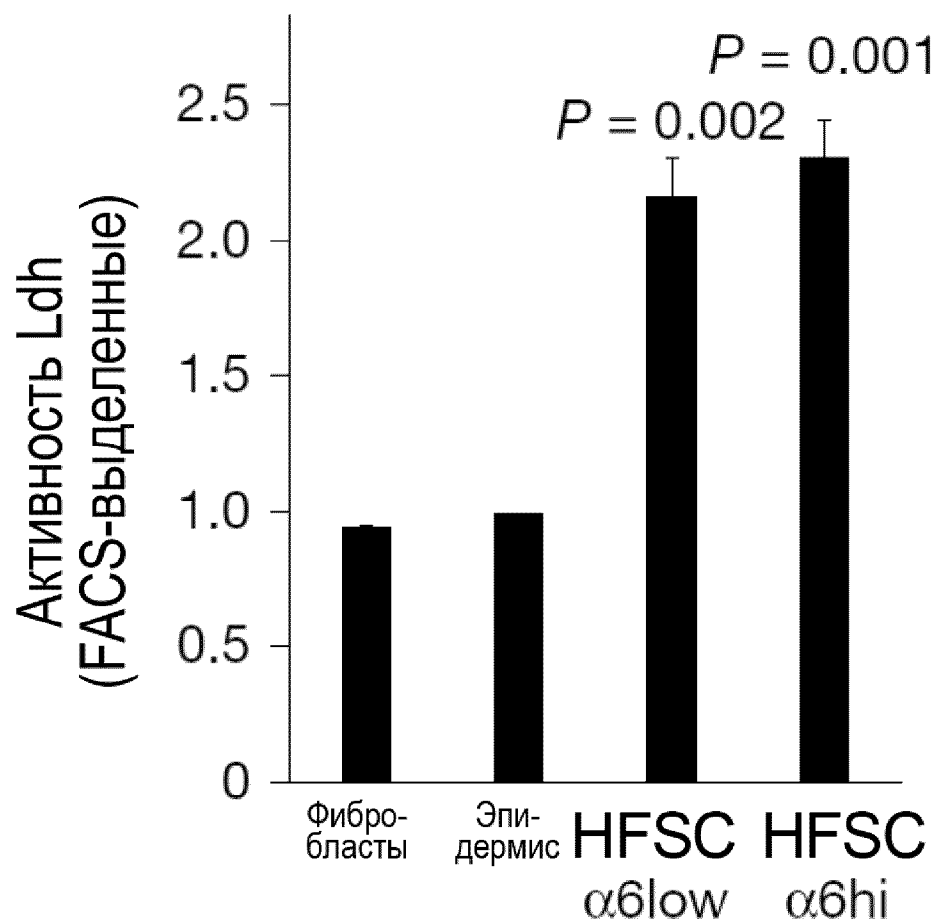
Фиг. 1b



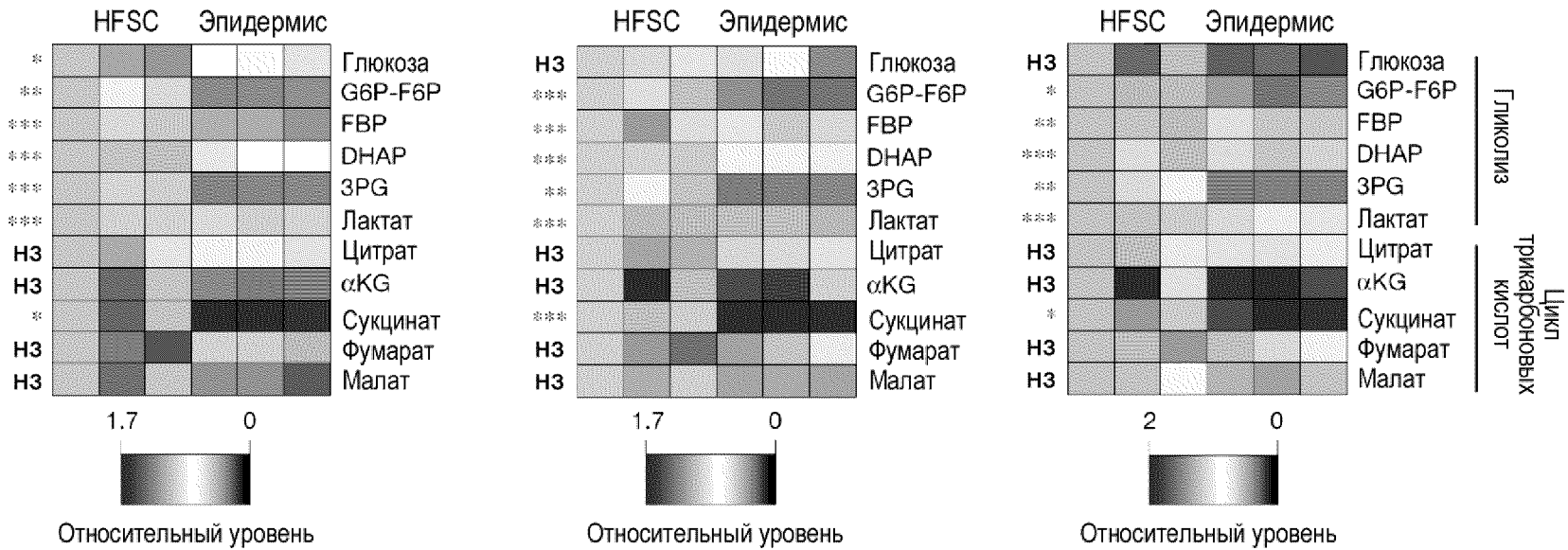
Фиг. 1с



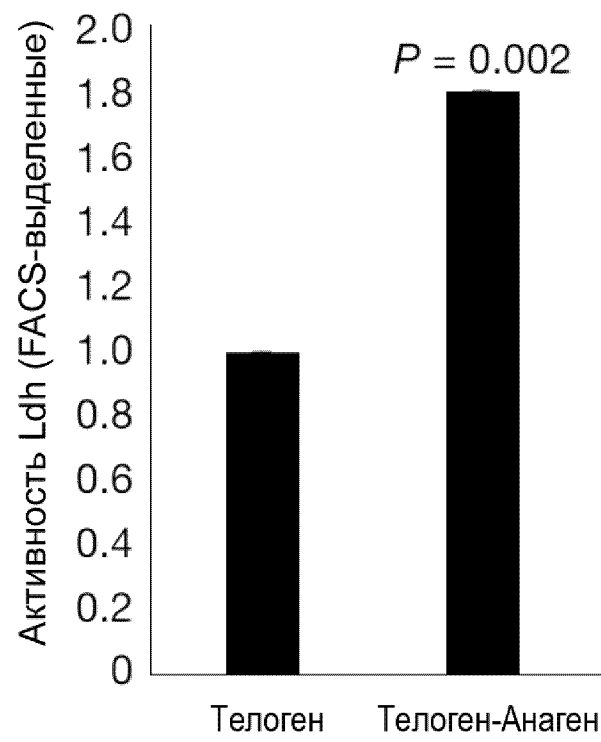
Фиг. 1d



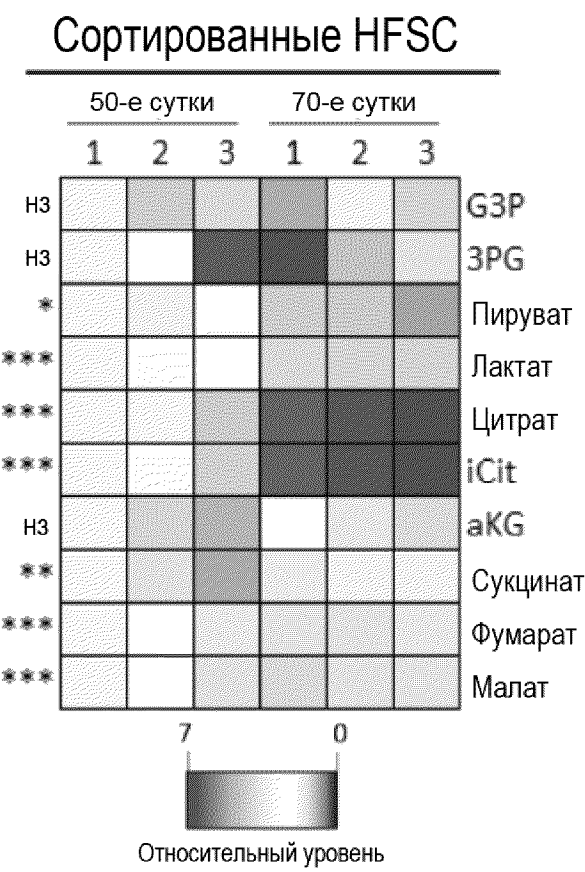
Фиг. 1е



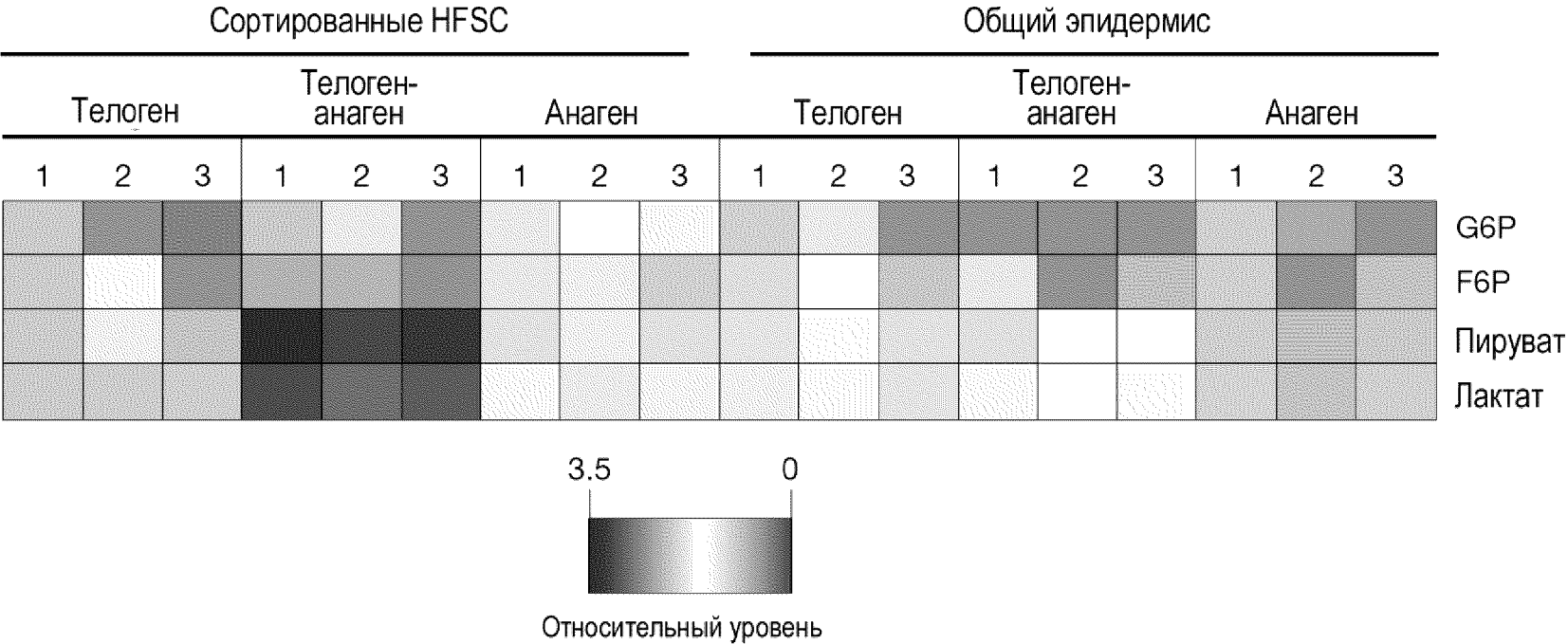
Фиг. 1f



Фиг. 1g

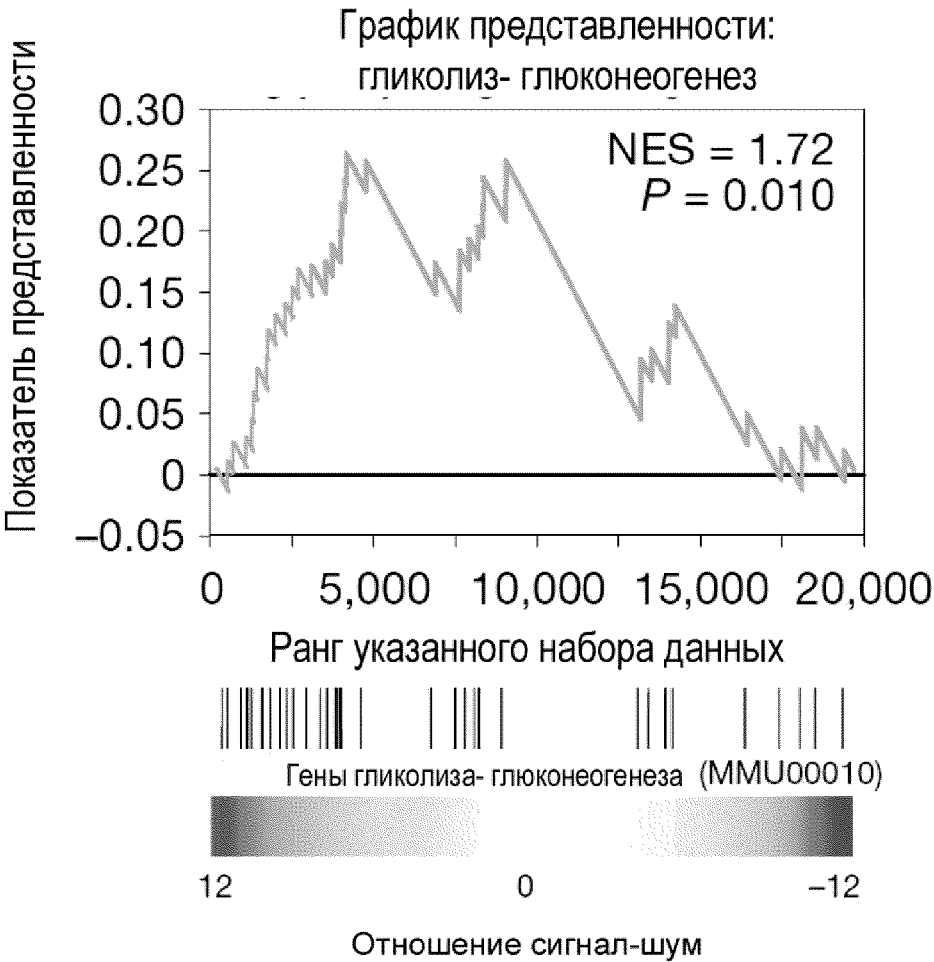


Фиг. 1h



Фиг. 1i

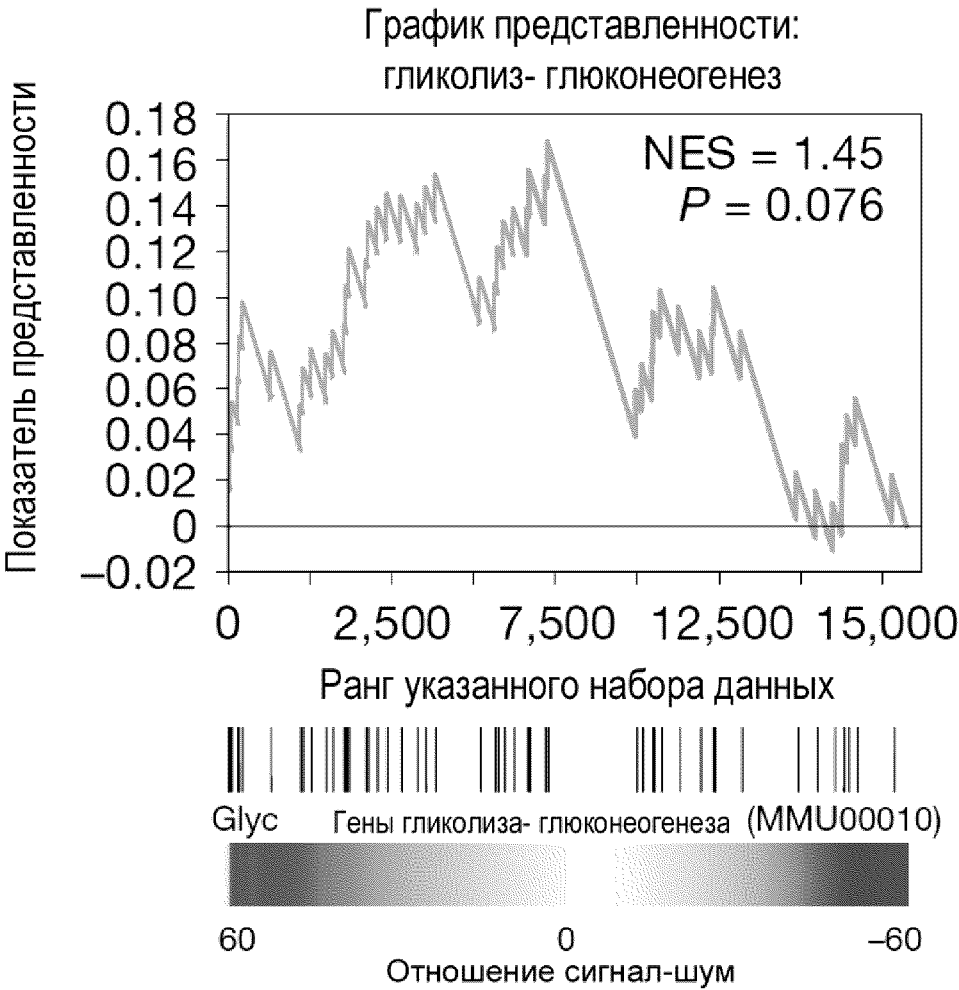
HFSC в телогене по сравнению с телогеном-анагеном (РНК-секвенирование)



| Символ гена    | Ранг в перечне генов | Ранговый метрический показатель |
|----------------|----------------------|---------------------------------|
| <i>Ldha</i>    | 341                  | 3.39                            |
| <i>Aldoa</i>   | 501                  | 2.90                            |
| <i>Aldh1a3</i> | 869                  | 2.30                            |
| <i>Aldh3a2</i> | 1,046                | 2.09                            |
| <i>Hkdc1</i>   | 1,097                | 2.05                            |
| <i>Pdhb</i>    | 1,191                | 1.95                            |
| <i>Tpi1</i>    | 1,472                | 1.71                            |
| <i>Fbp1</i>    | 1,511                | 1.68                            |
| <i>Adh5</i>    | 1,735                | 1.54                            |
| <i>Aldh7a1</i> | 2,020                | 1.36                            |
| <i>Gm5506</i>  | 2,210                | 1.28                            |

Фиг. 1j

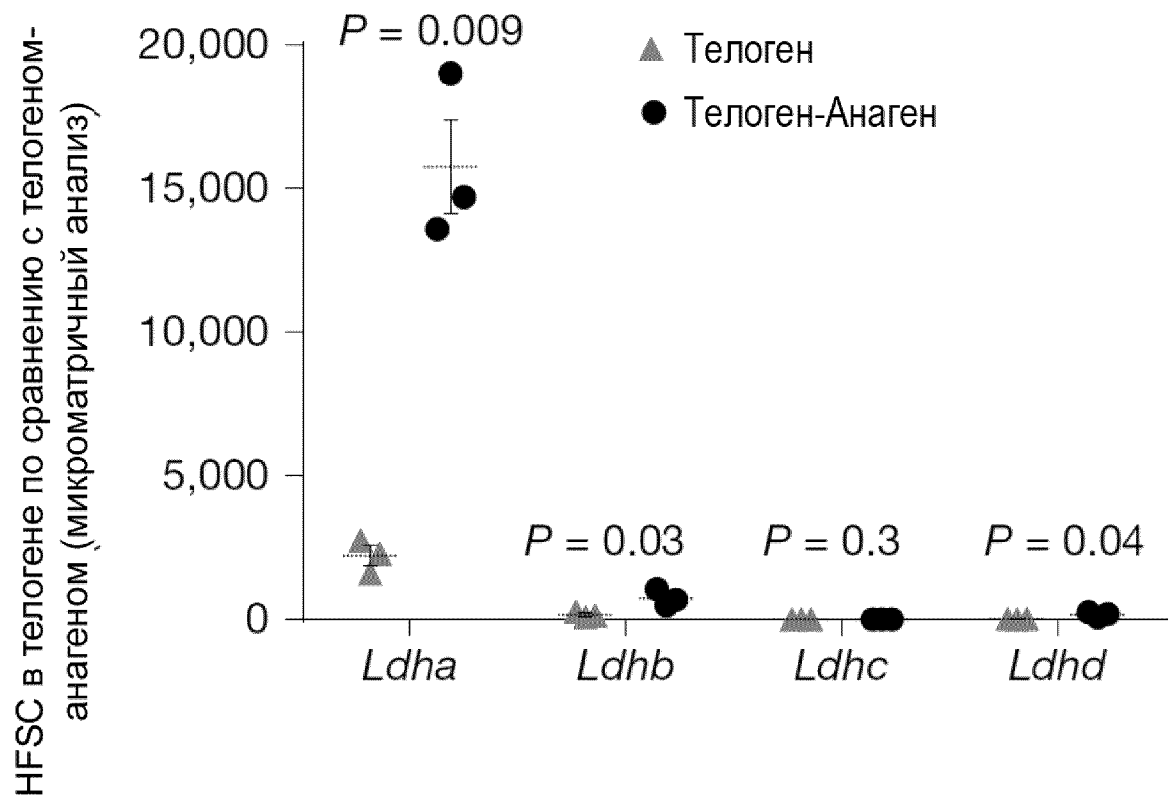
HFSC в телогене по сравнению с телогеном-анагеном (микроматричный анализ)



| Символ гена  | Ранг в перечне генов | Ранговый метрический показатель |
|--------------|----------------------|---------------------------------|
| <i>Pgam1</i> | 58                   | 21.9                            |
| <i>Pkm2</i>  | 92                   | 16.2                            |
| <i>Pfkl</i>  | 234                  | 9.6                             |
| <i>Gapdh</i> | 262                  | 8.9                             |
| <i>Ldha</i>  | 342                  | 7.4                             |
| <i>Eno1</i>  | 993                  | 3.9                             |
| <i>Hkdc1</i> | 1,676                | 2.8                             |
| <i>Pgm2</i>  | 1,735                | 2.7                             |
| <i>Fbp1</i>  | 1,919                | 2.5                             |
| <i>Adpgk</i> | 2,265                | 2.2                             |
| <i>Adh5</i>  | 2,265                | 2.1                             |
| <i>Acss2</i> | 2,418                | 2.0                             |
| <i>Hk3</i>   | 2,734                | 1.9                             |
| <i>Pgk1</i>  | 2,791                | 1.9                             |
| <i>Pklr</i>  | 3,234                | 1.7                             |

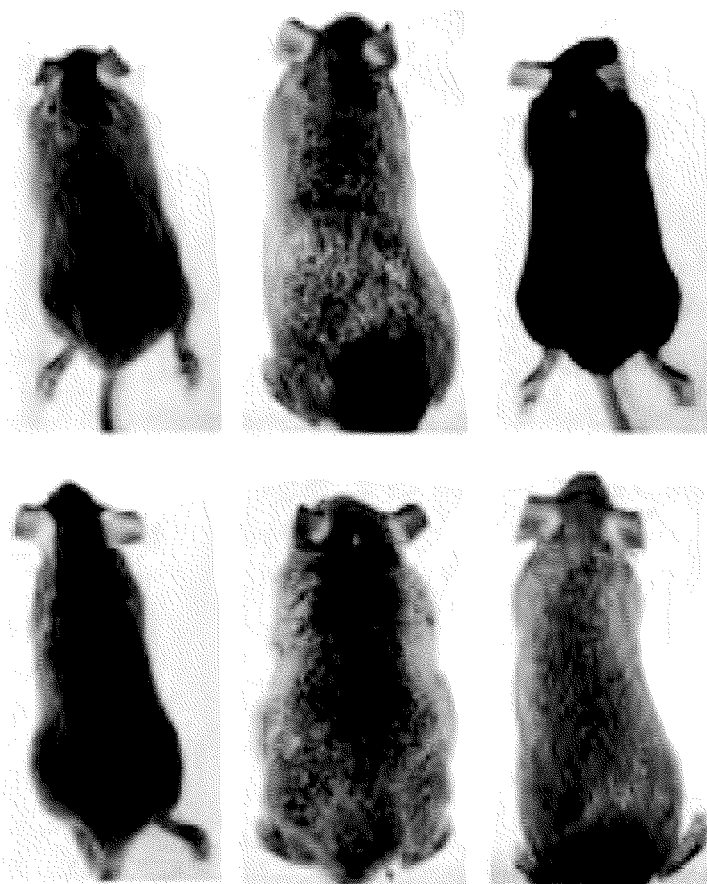


Фиг. 1k

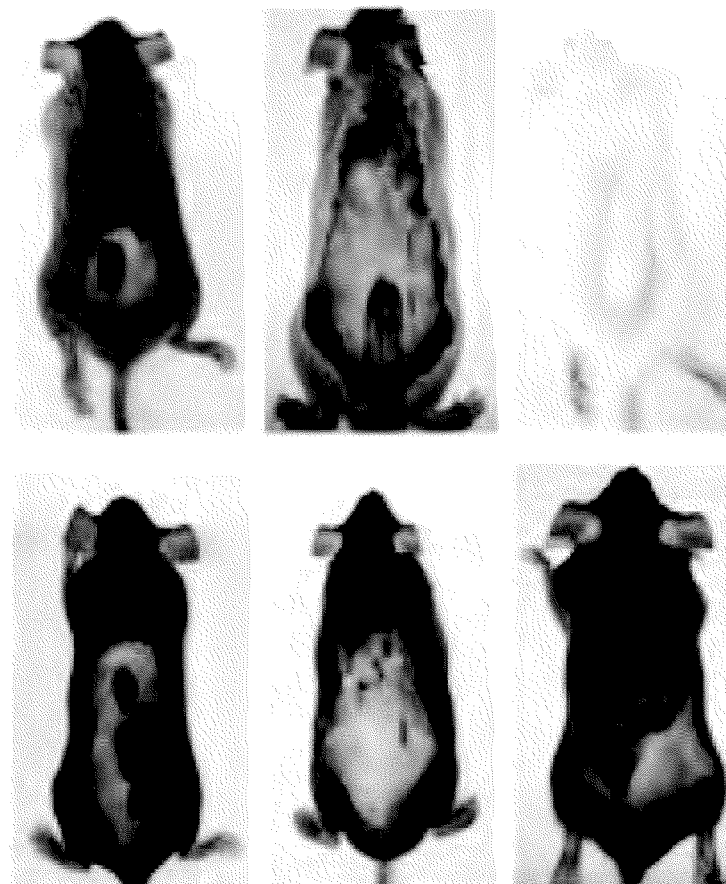


Фиг. 2а

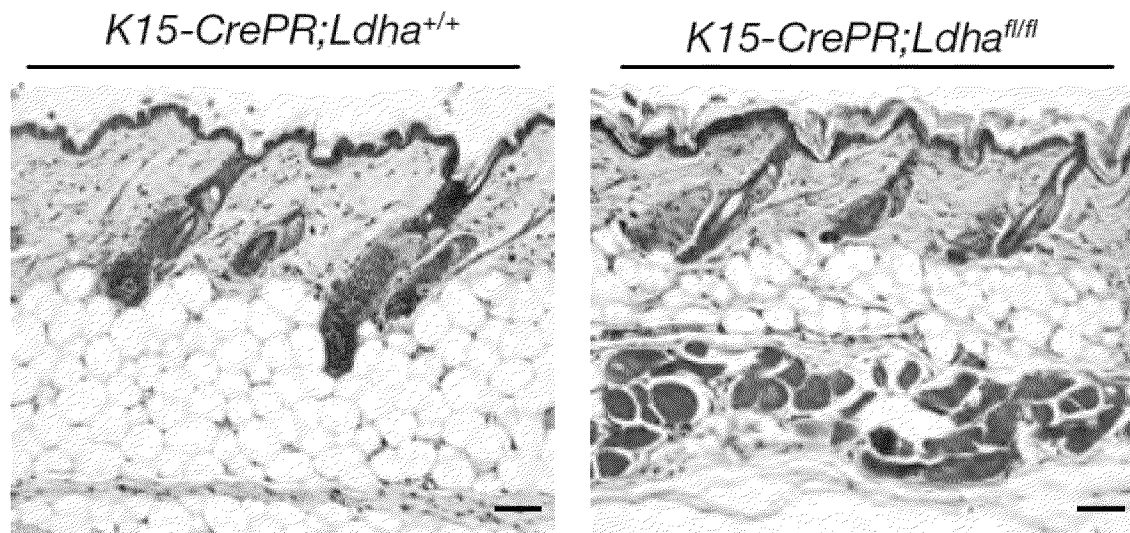
*K15-CrePR;Ldha<sup>+/+</sup>*



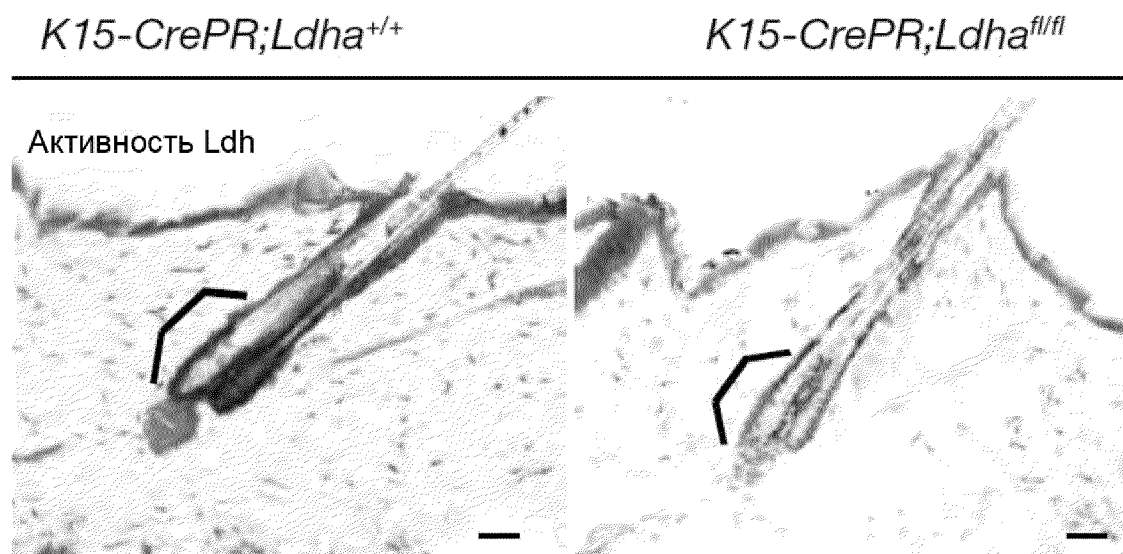
*K15-CrePR;Ldha<sup>fl/fl</sup>*



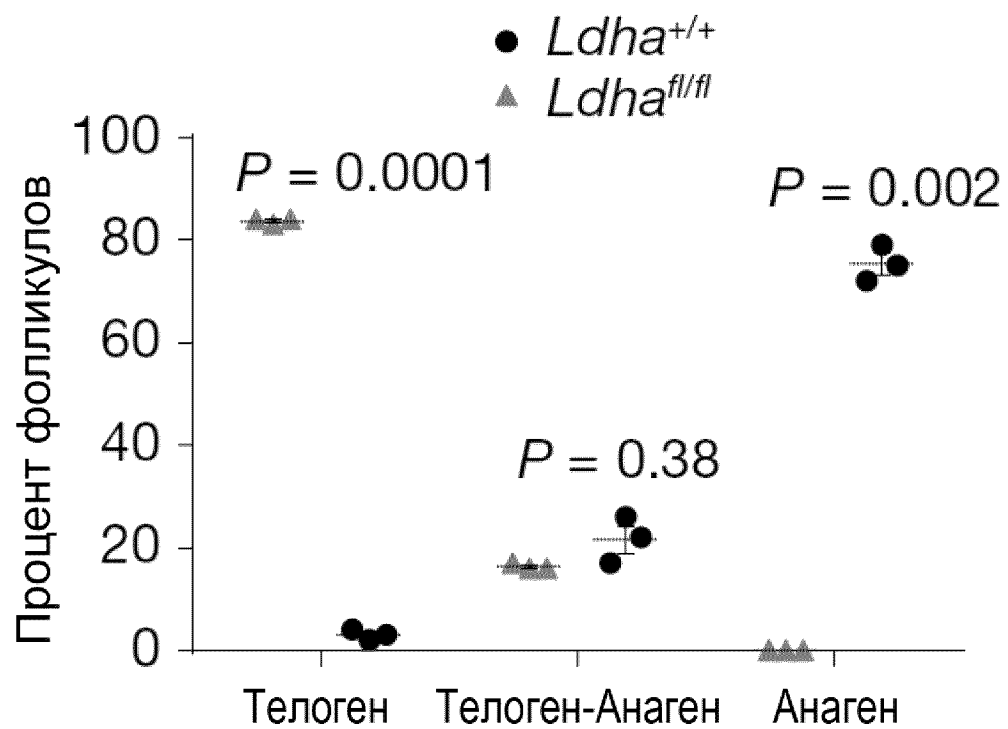
Фиг. 2b



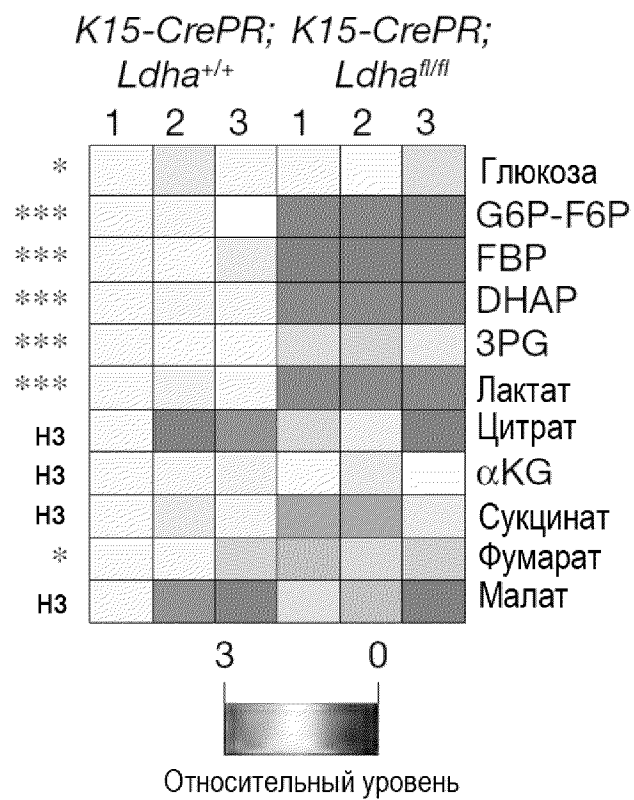
Фиг. 2с



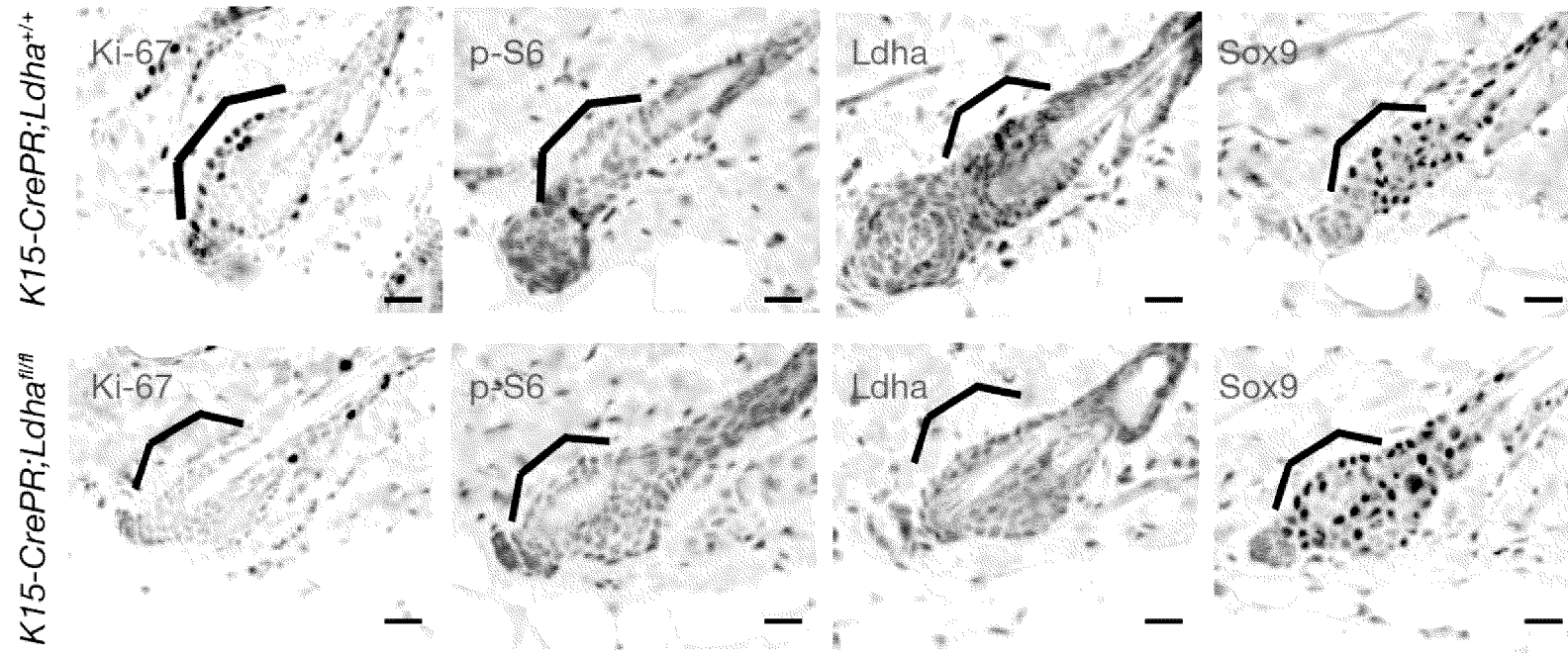
Фиг. 2d



Фиг. 2е

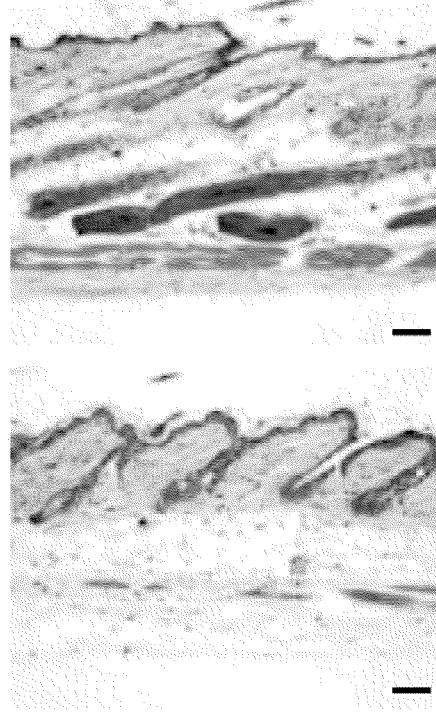
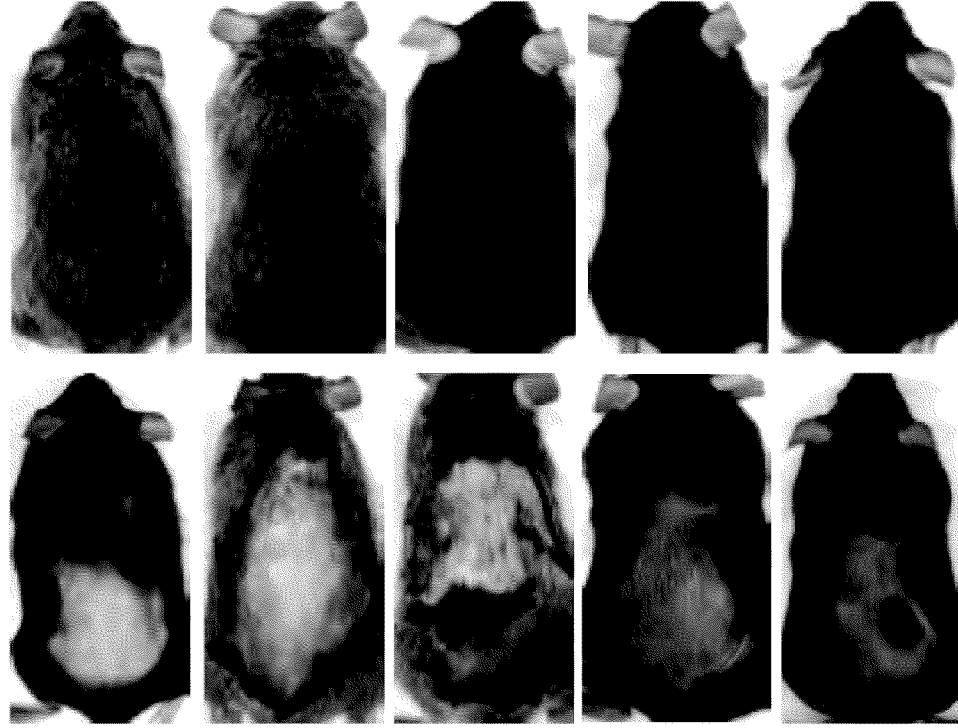


Фиг. 2f



Фиг. 2g

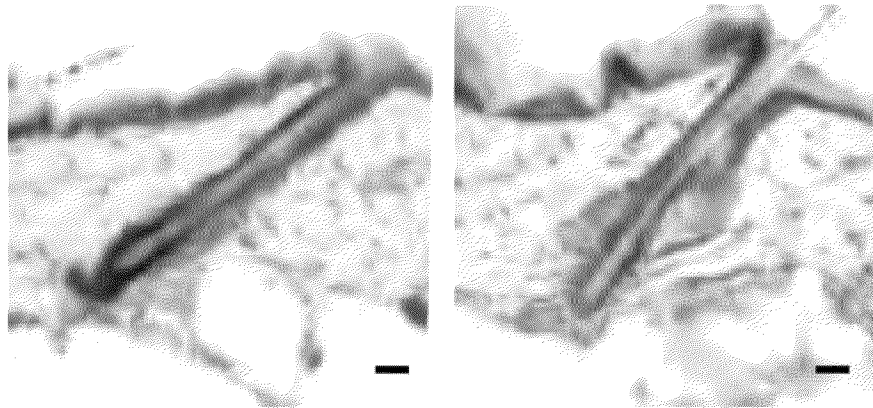
*Lgr5-CreER; Ldha<sup>fl/fl</sup> Lgr5-CreER; Ldha<sup>+/+</sup>*



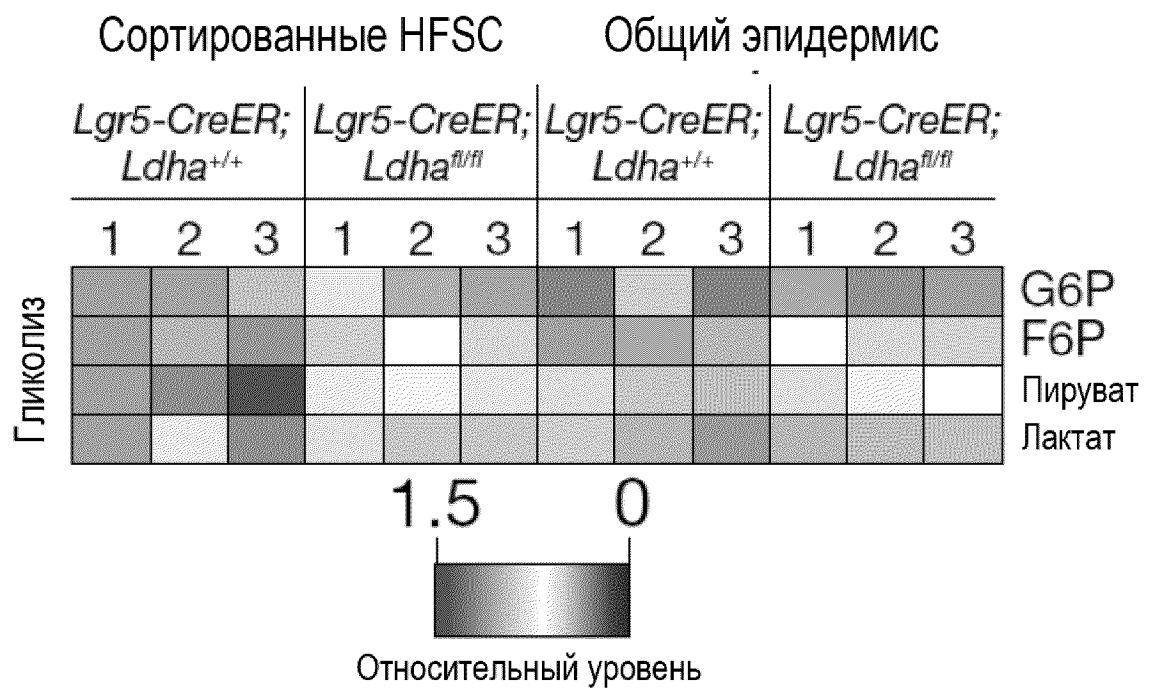
Фиг. 2h

*Lgr5-CreER;Ldha<sup>+/+</sup>*   *Lgr5-CreER;Ldha<sup>fl/fl</sup>*

АКТИВНОСТЬ Ldh



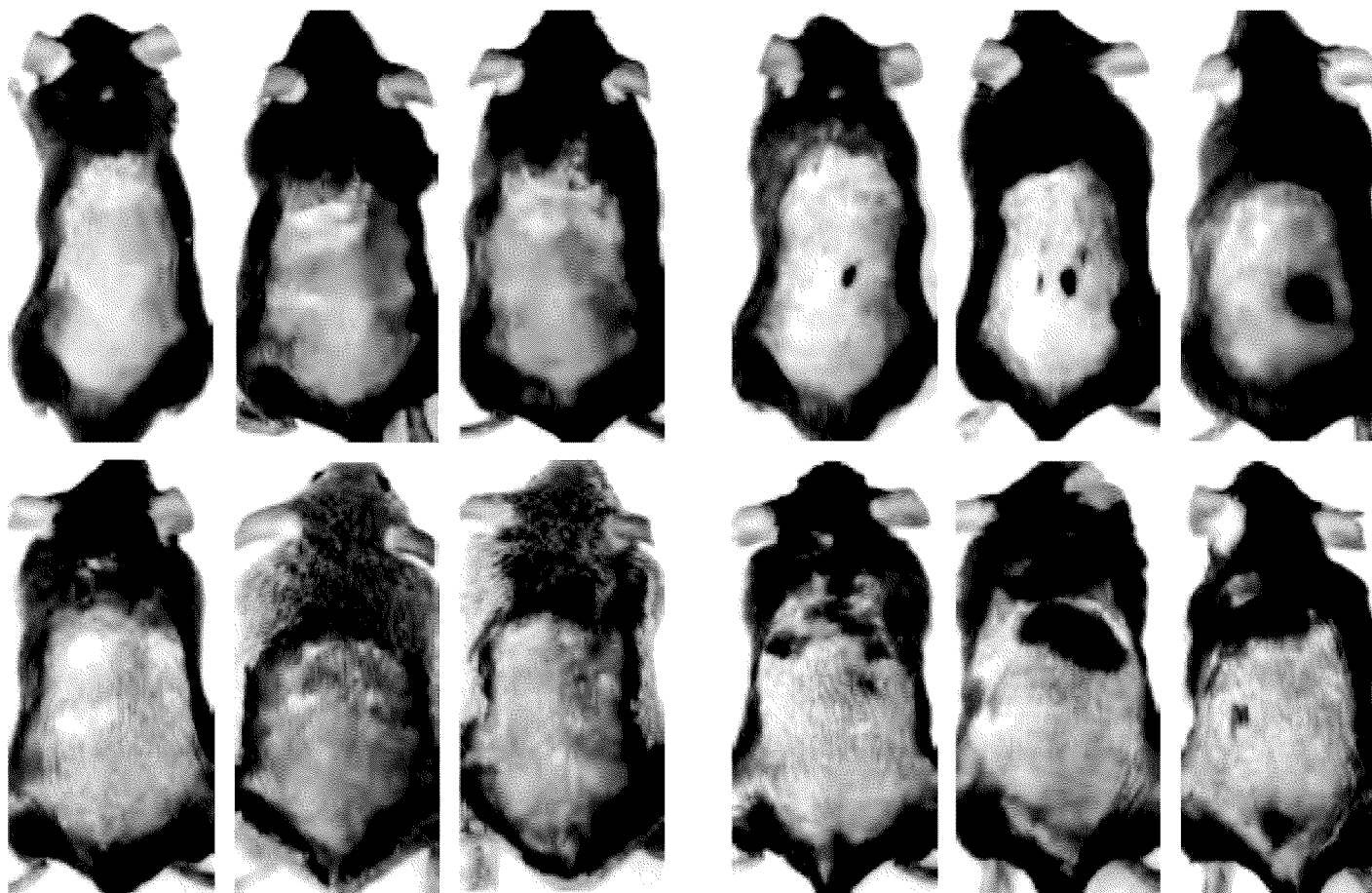
Фиг. 2i



Фиг. 3а

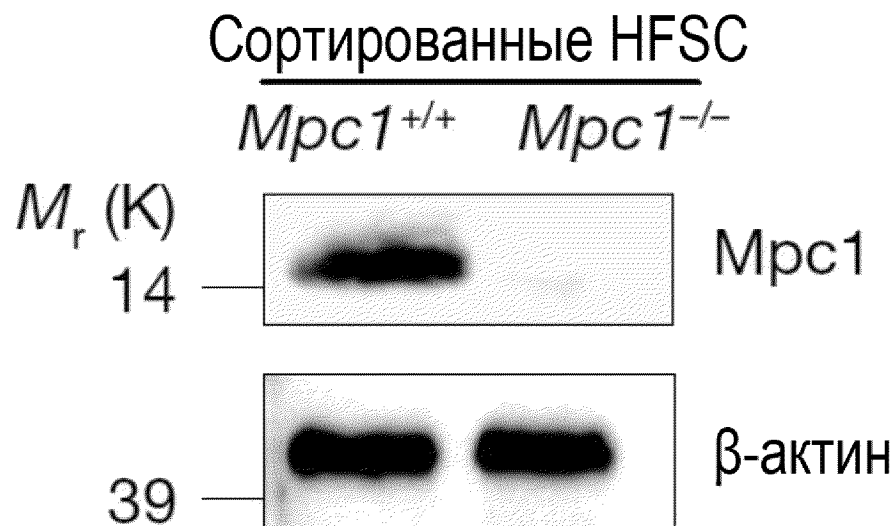
*K15-CrePR;Mpc1<sup>+/-</sup>*

*K15-CrePR;Mpc1<sup>fl/fl</sup>*

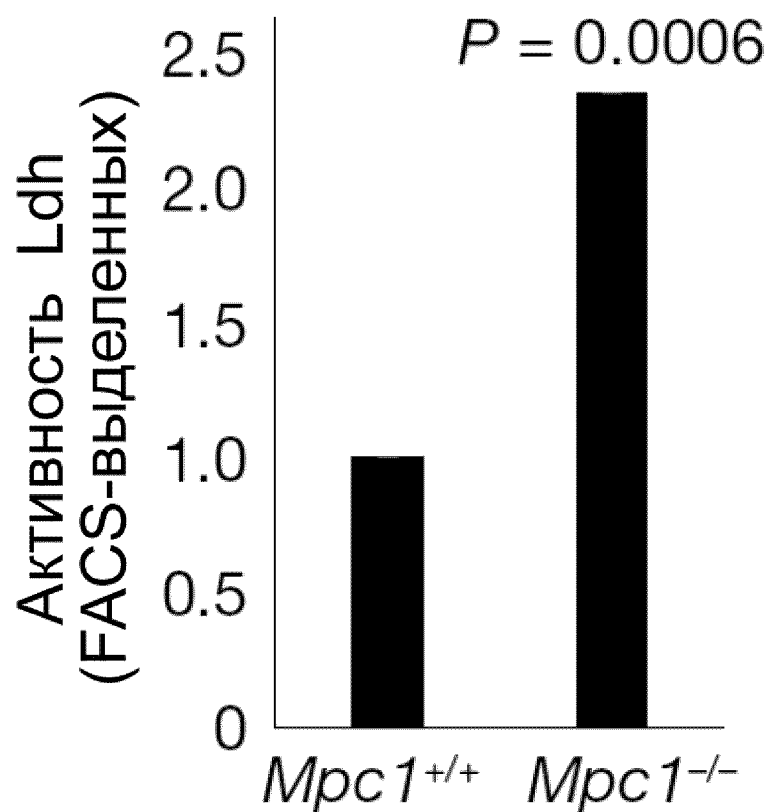




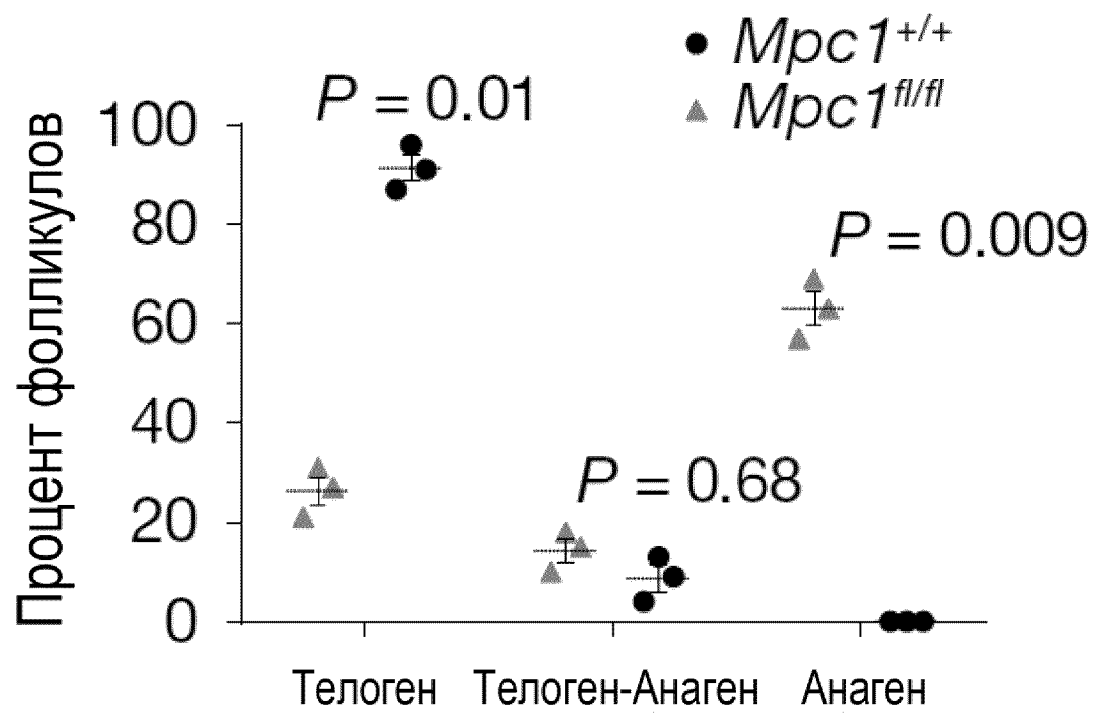
Фиг. 3b



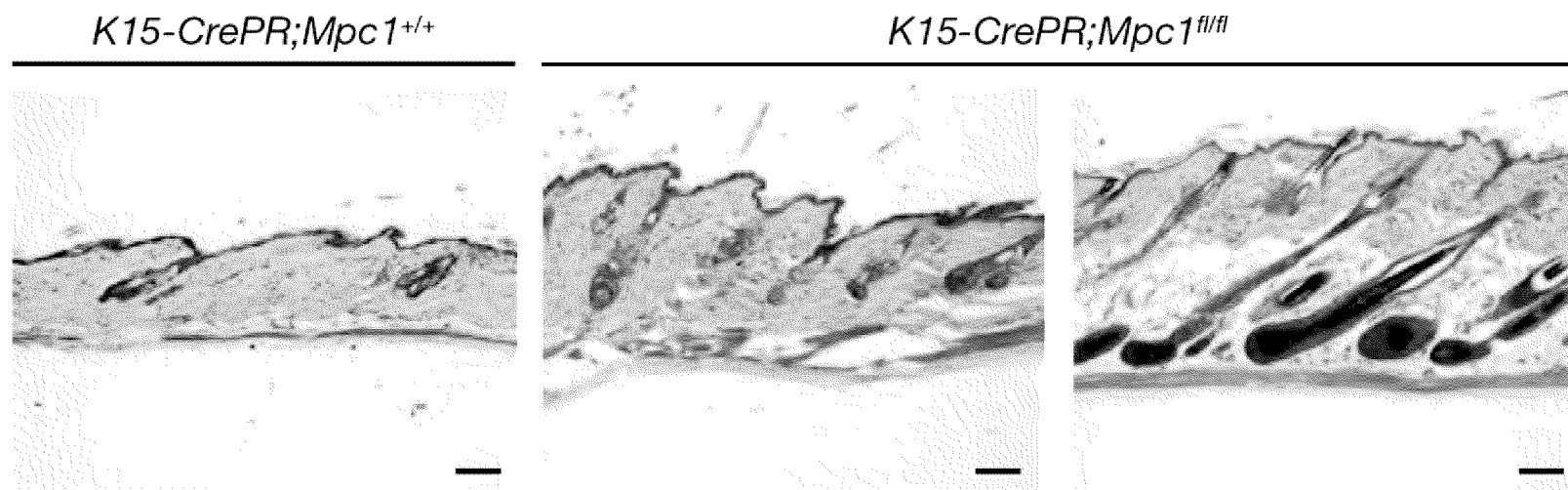
Фиг. 3с



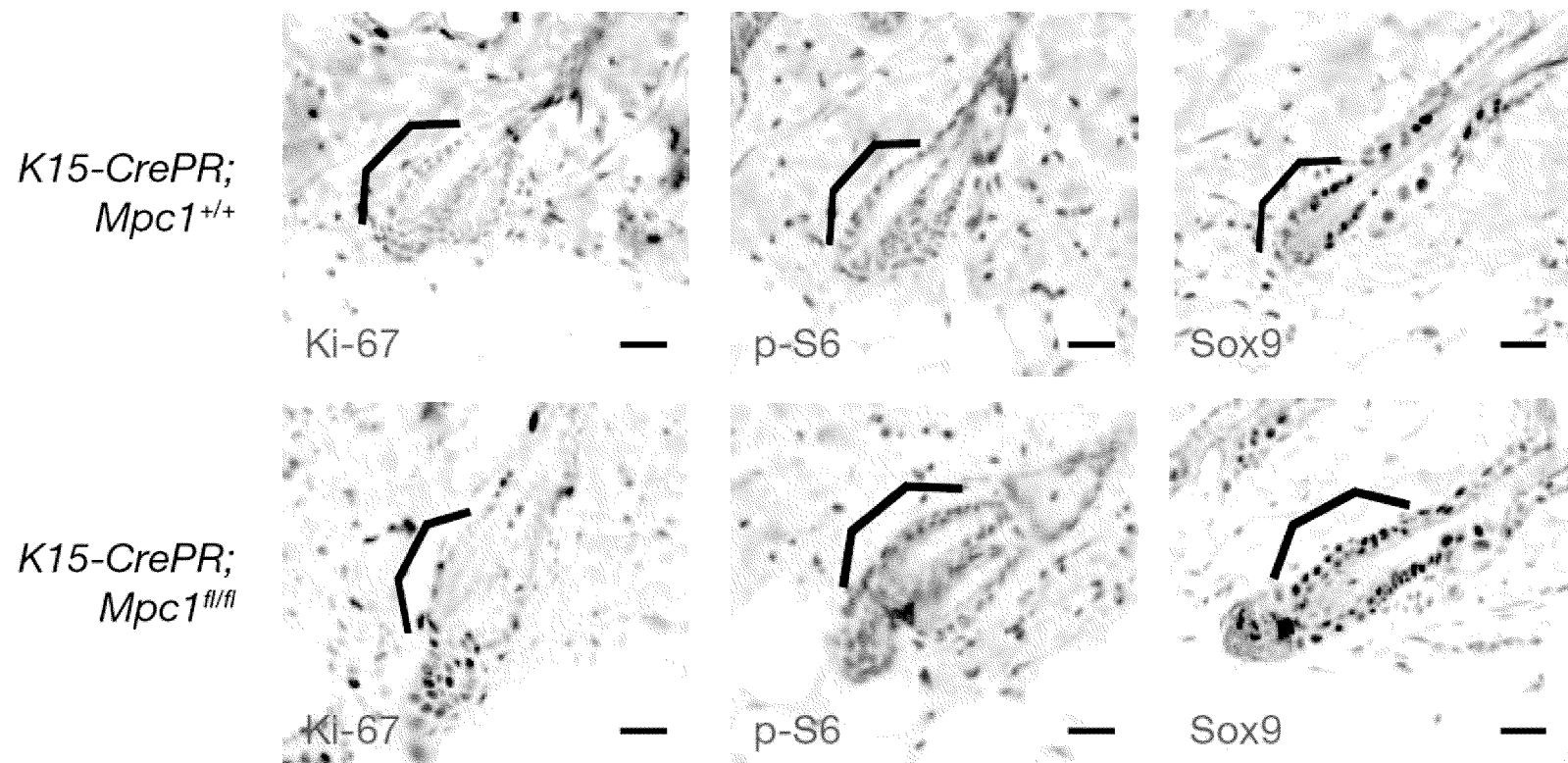
Фиг. 3d



Фиг. 3е

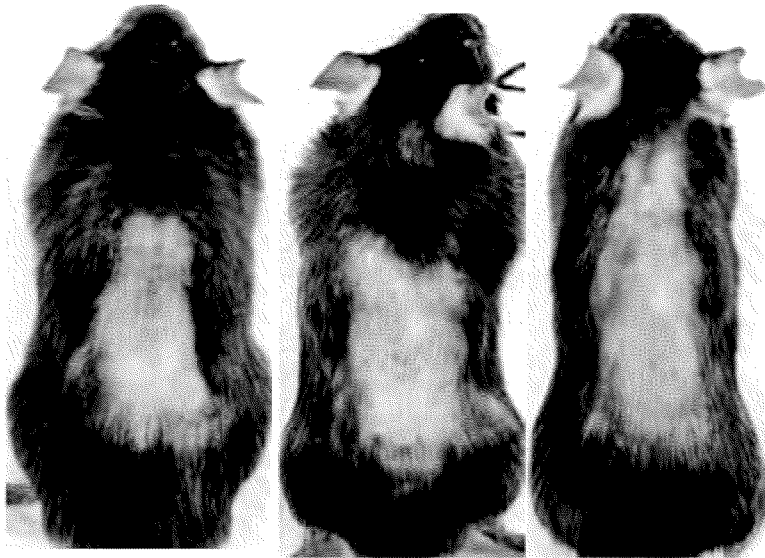


Фиг. 3f

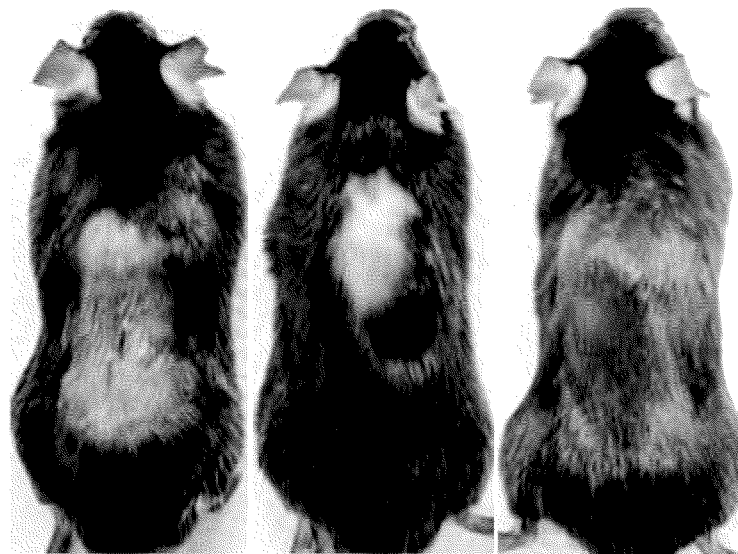


Фиг. 3g

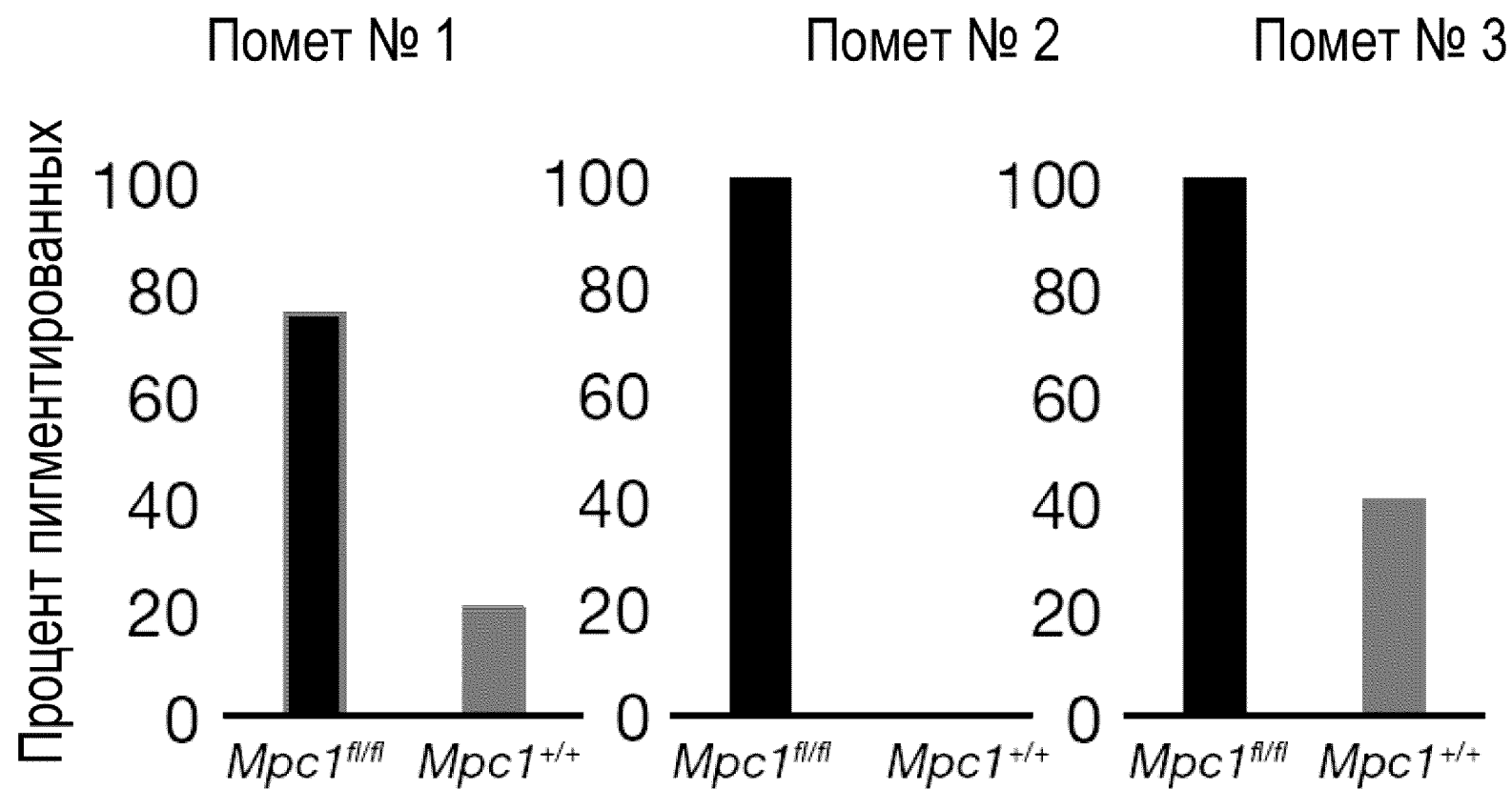
*Lgr5-CreER;Mpc1<sup>+/+</sup>*



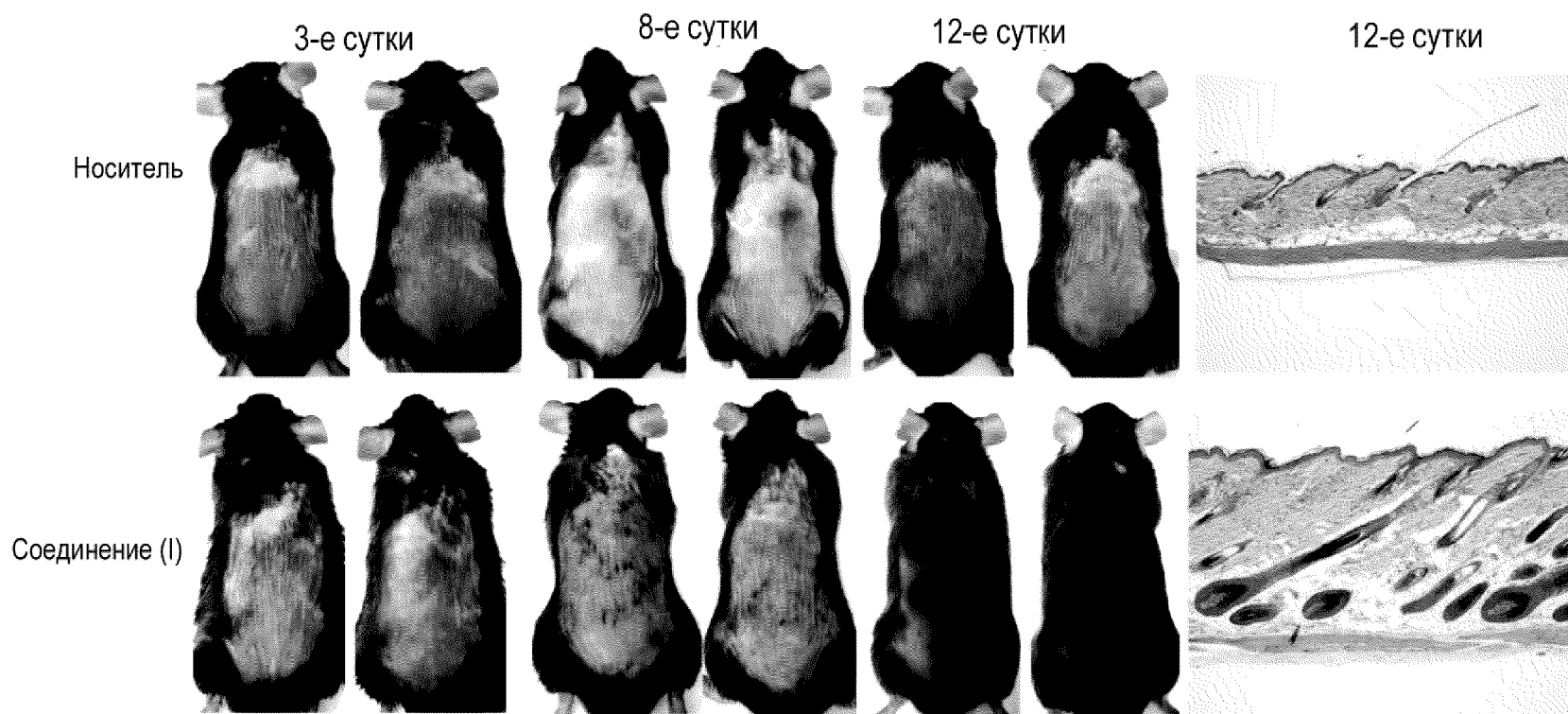
*Lgr5-CreER;Mpc1<sup>fl/fl</sup>*



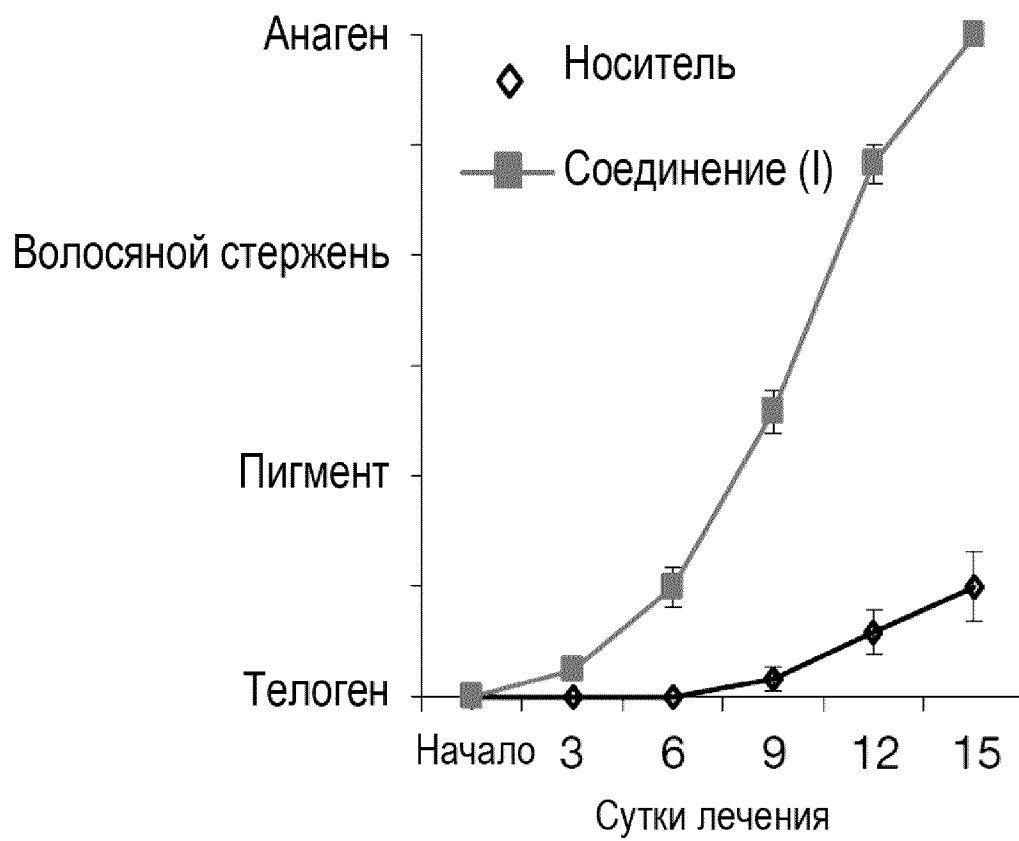
Фиг. 3h



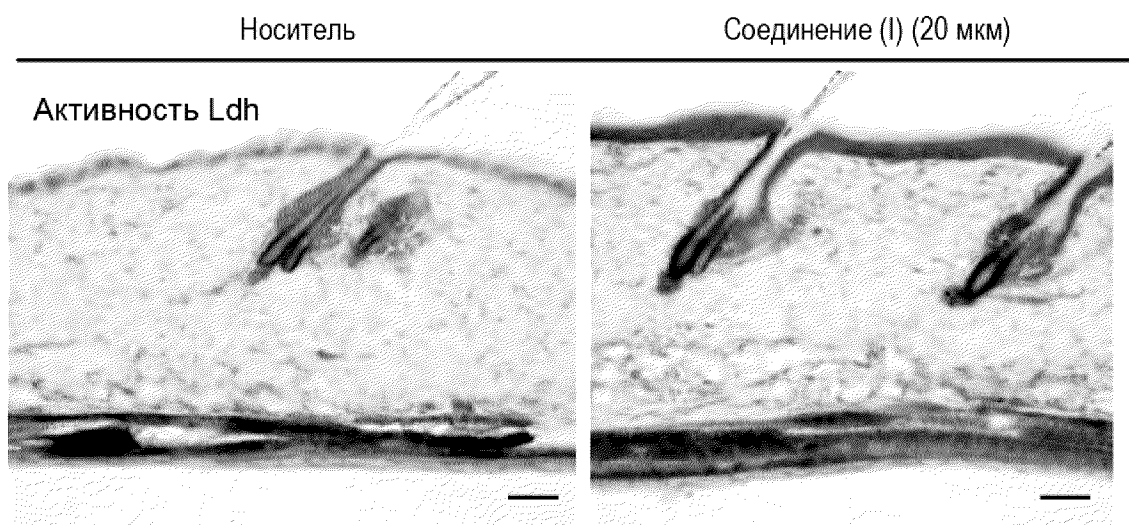
Фиг. 3i



Фиг. 3j

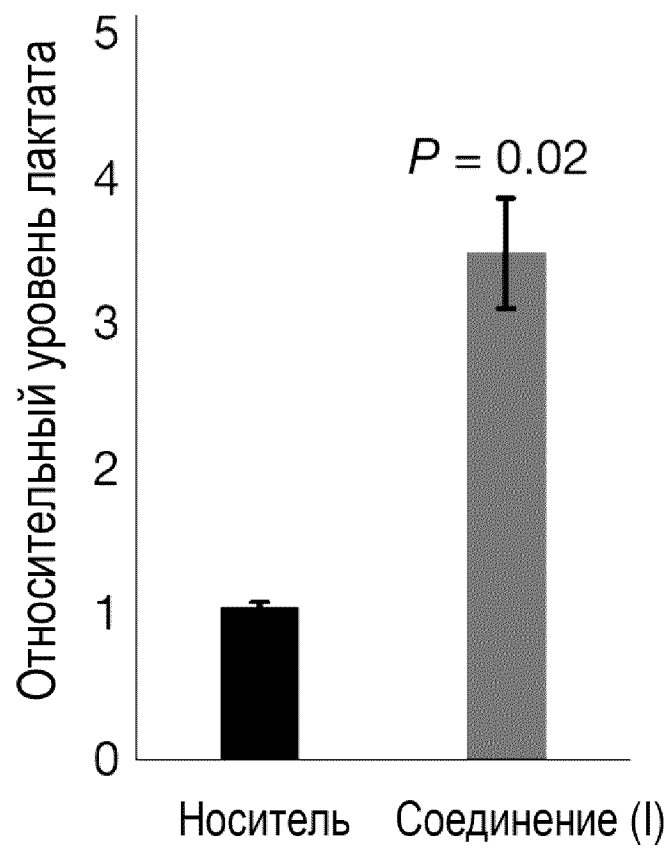


Фиг. 3k

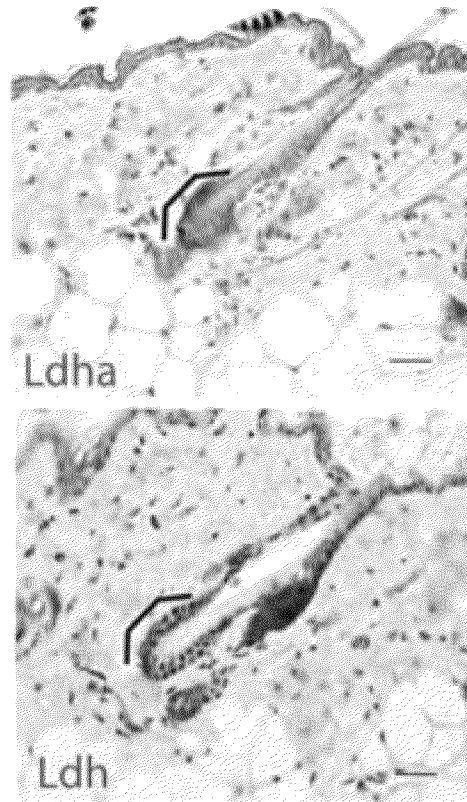




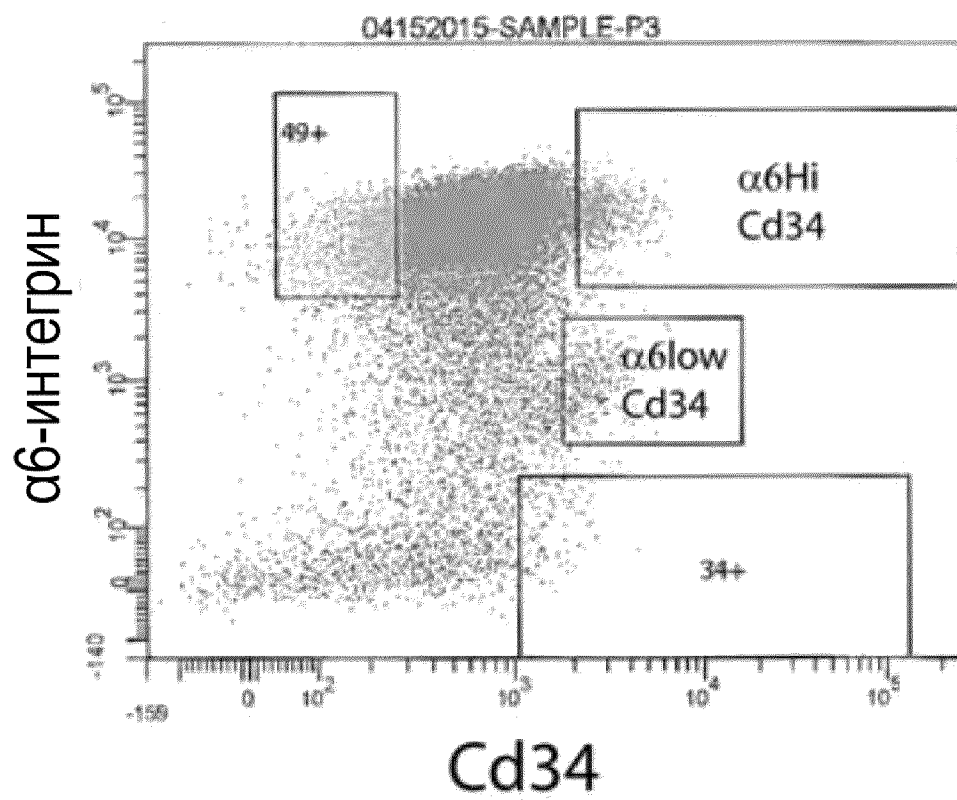
Фиг. 3I



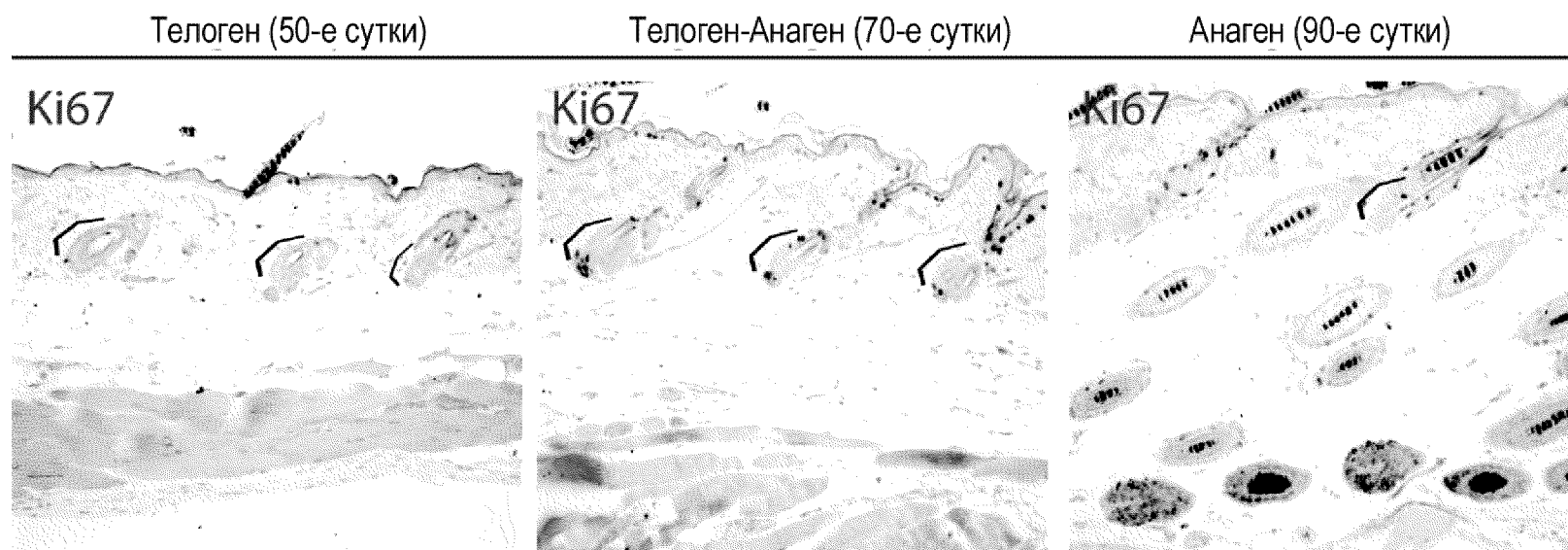
Фиг. 4а



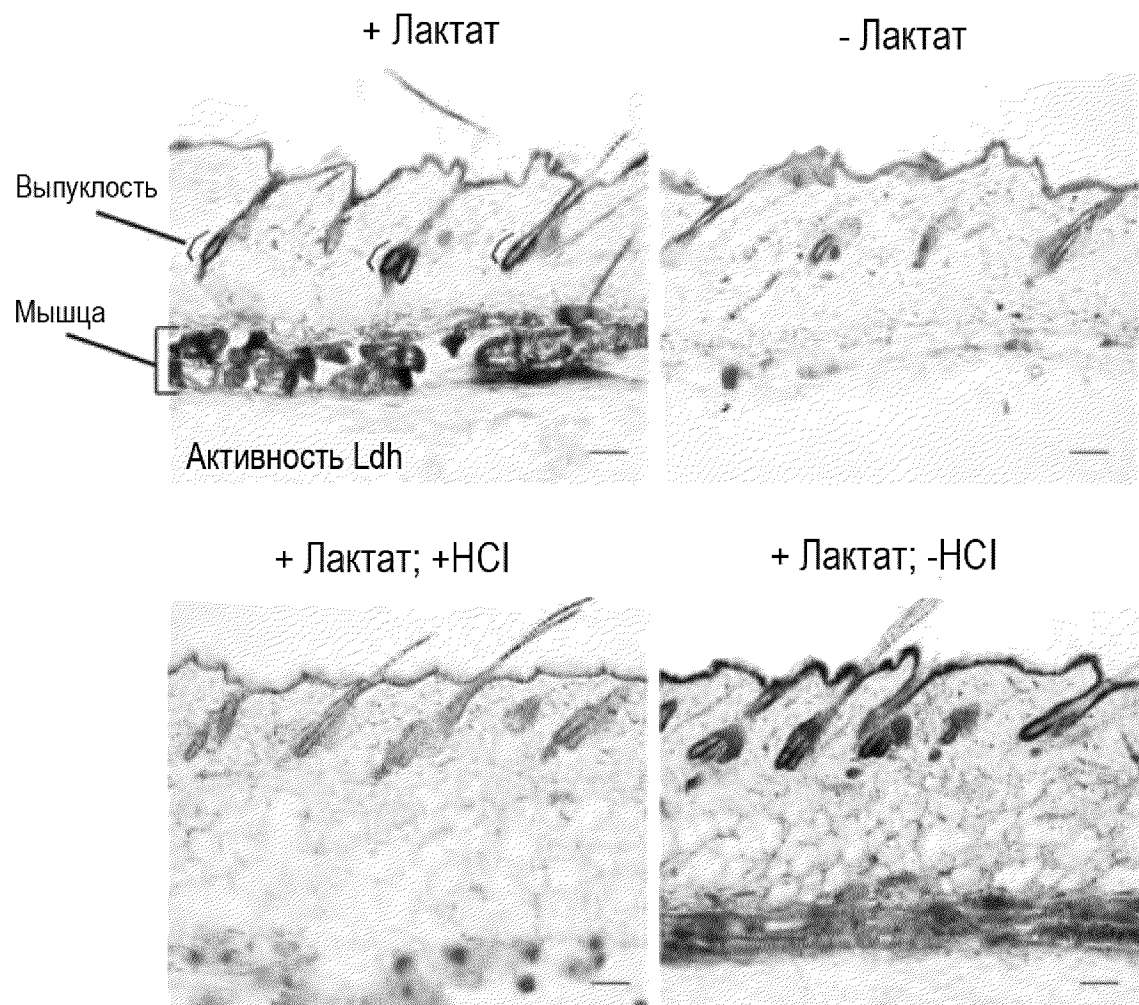
Фиг. 4b



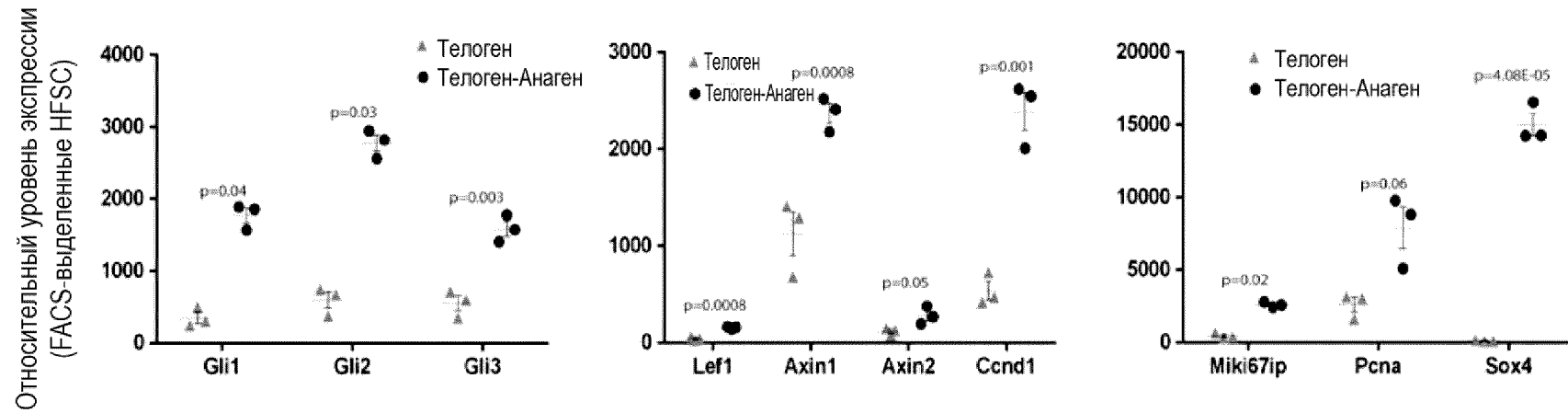
Фиг. 4с



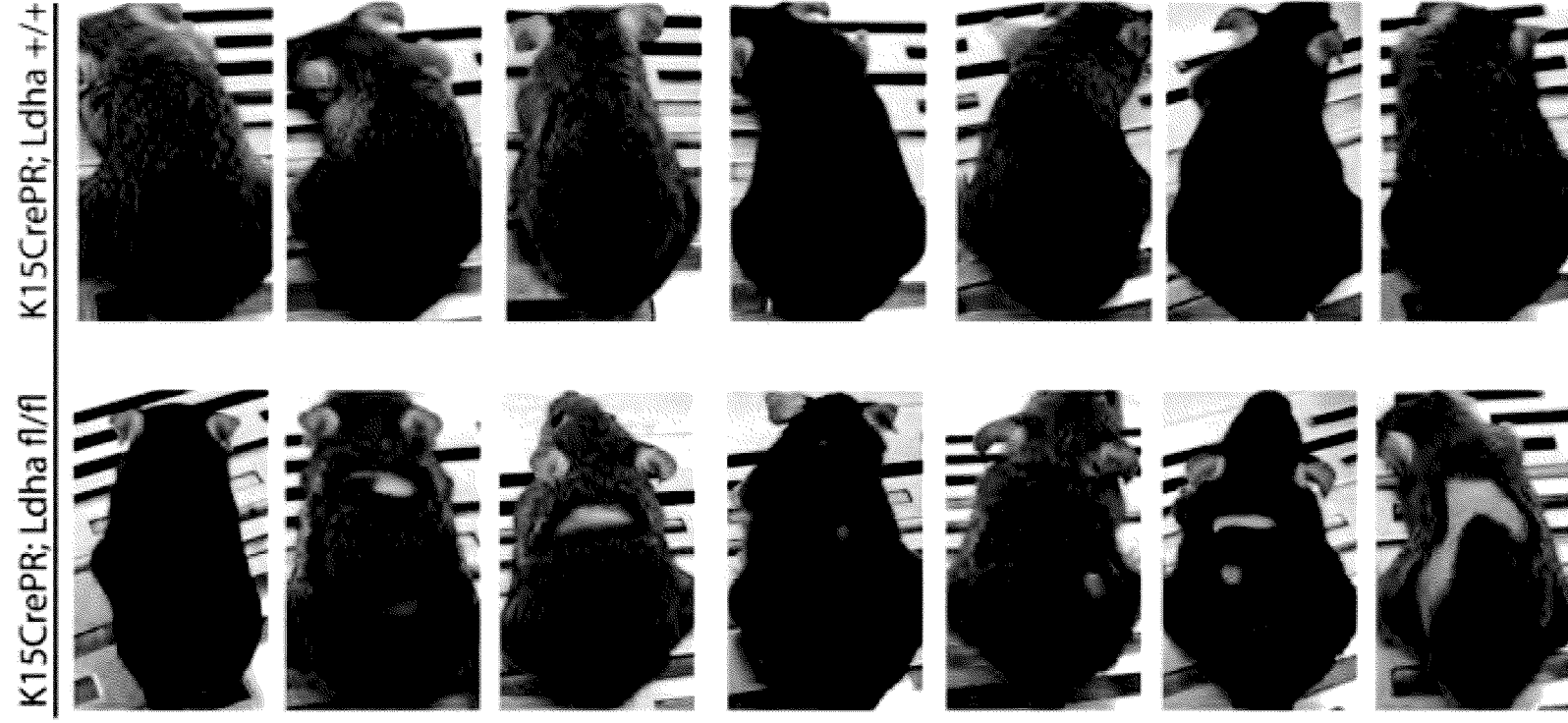
Фиг. 4d



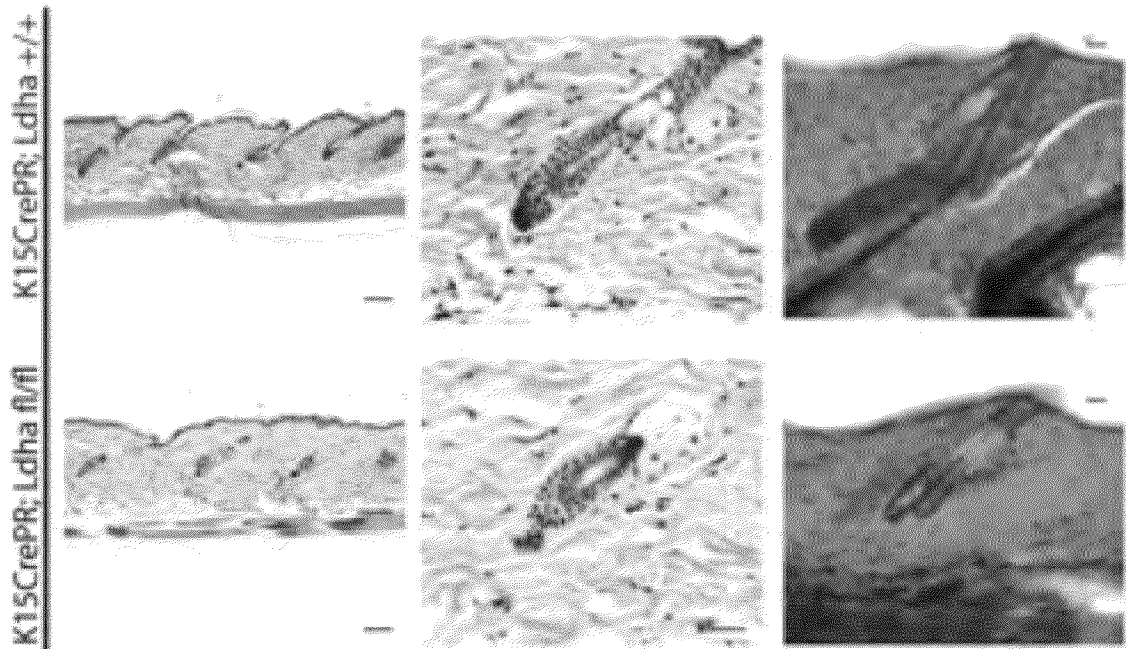
Фиг. 4е



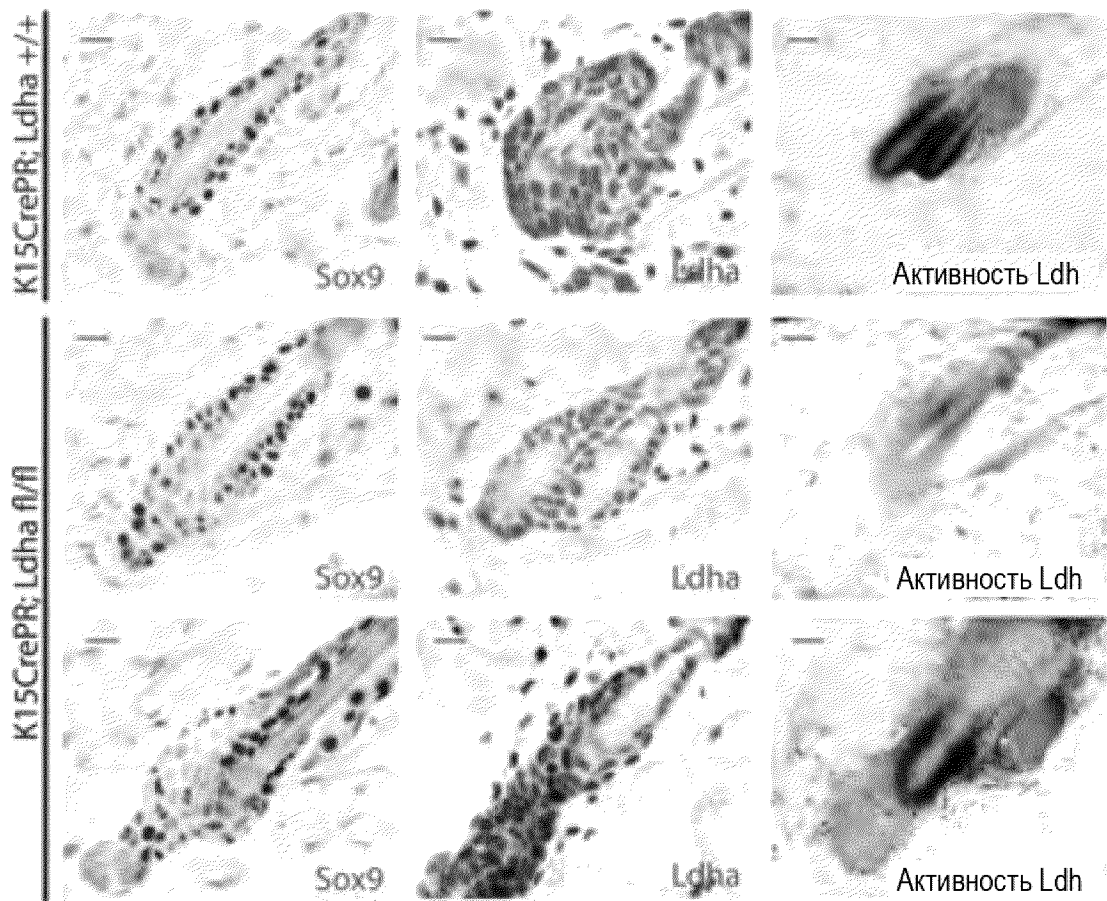
Фиг. 4f



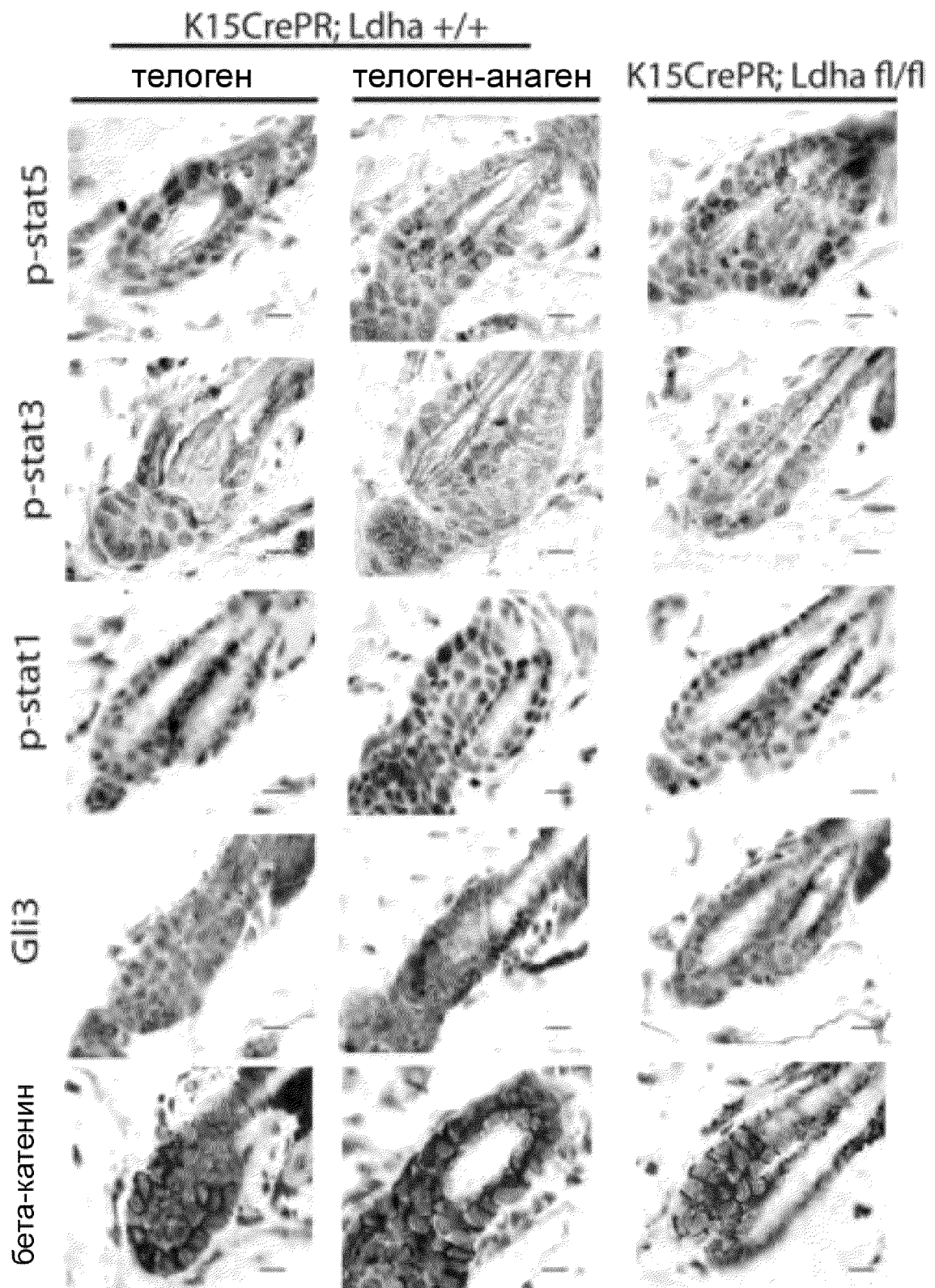
Фиг. 4g



Фиг. 4h

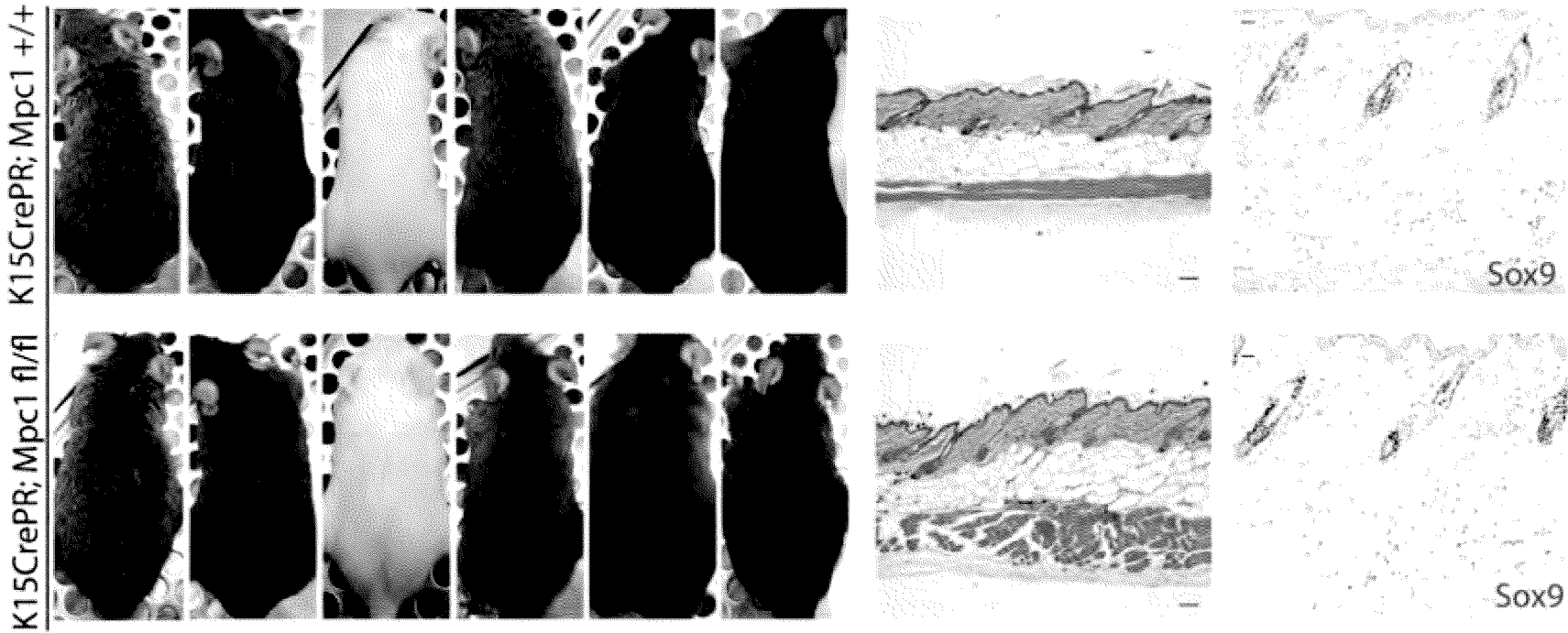


Фиг. 4i

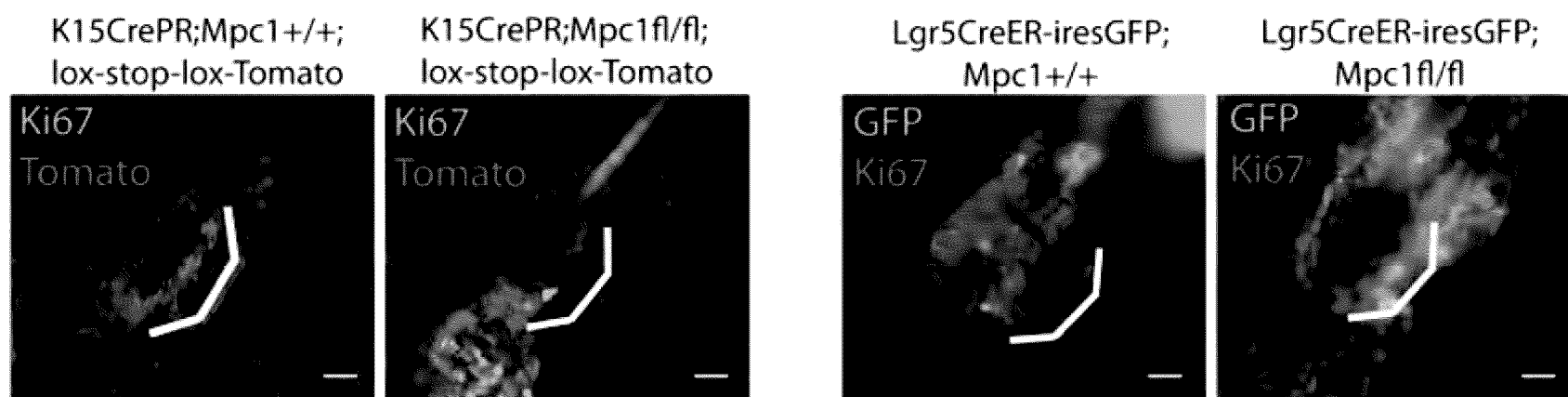




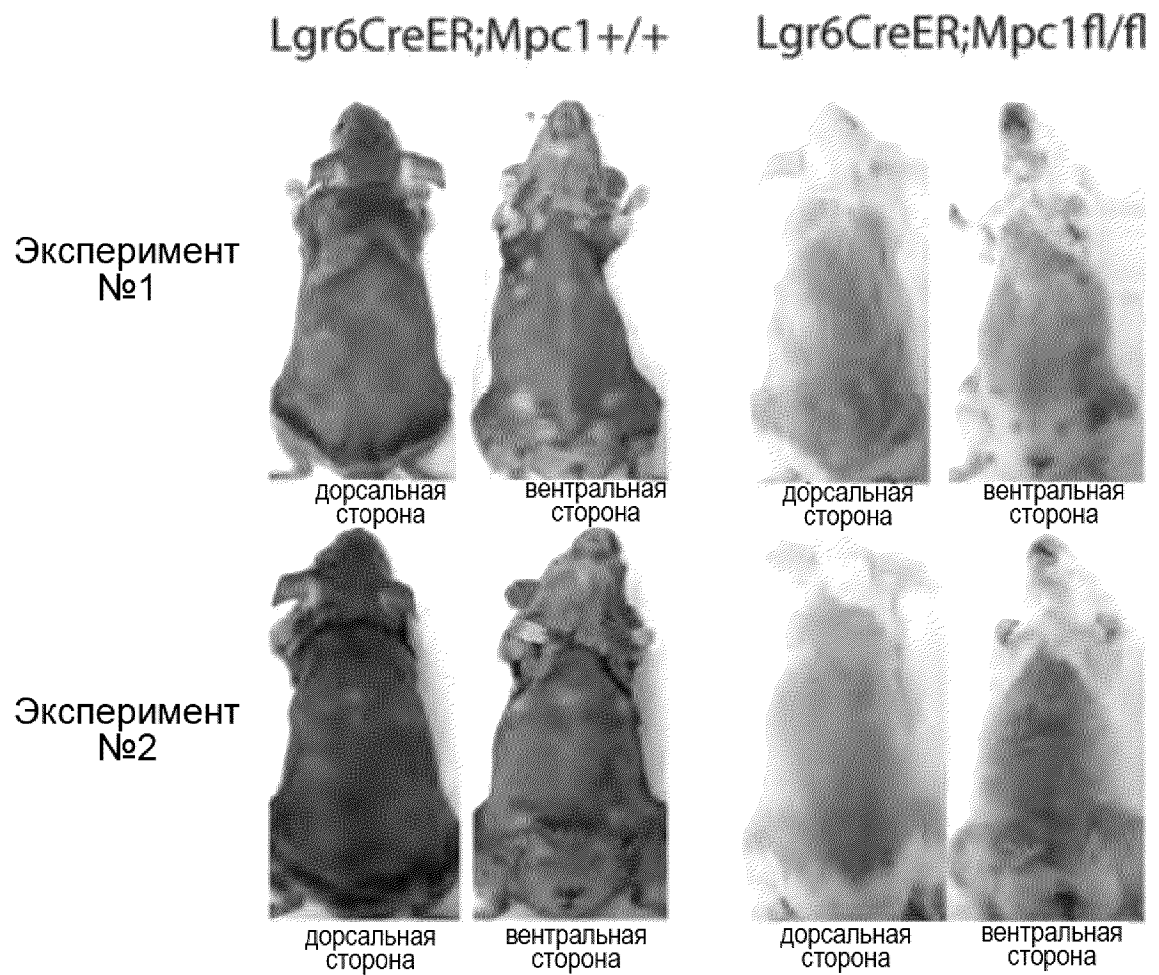
Фиг. 4j



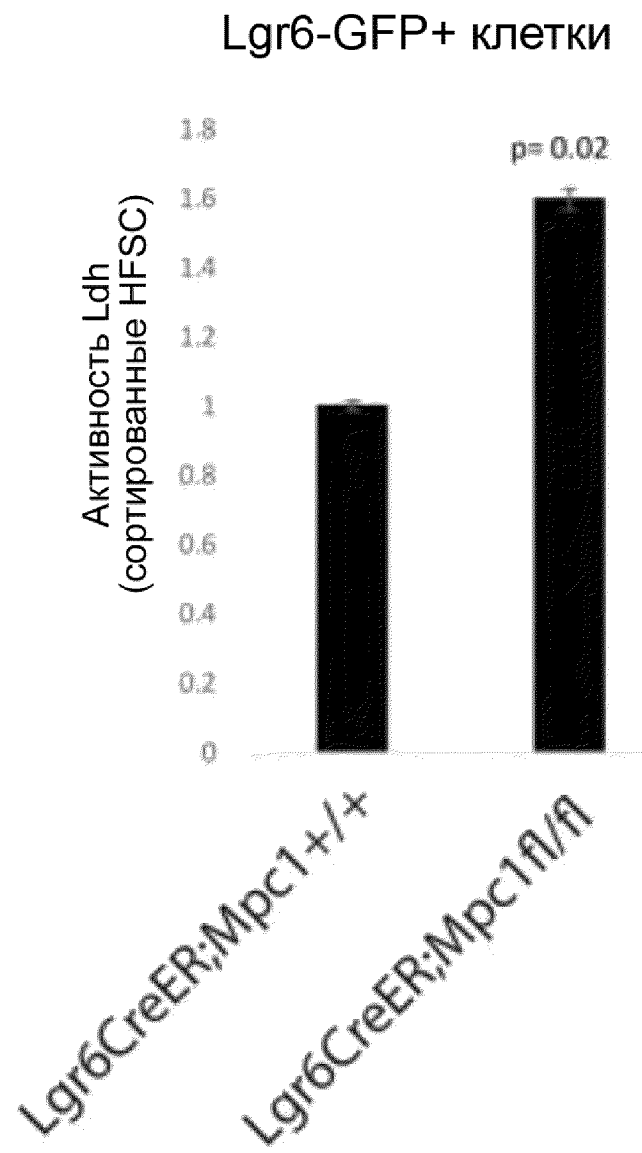
Фиг. 4k



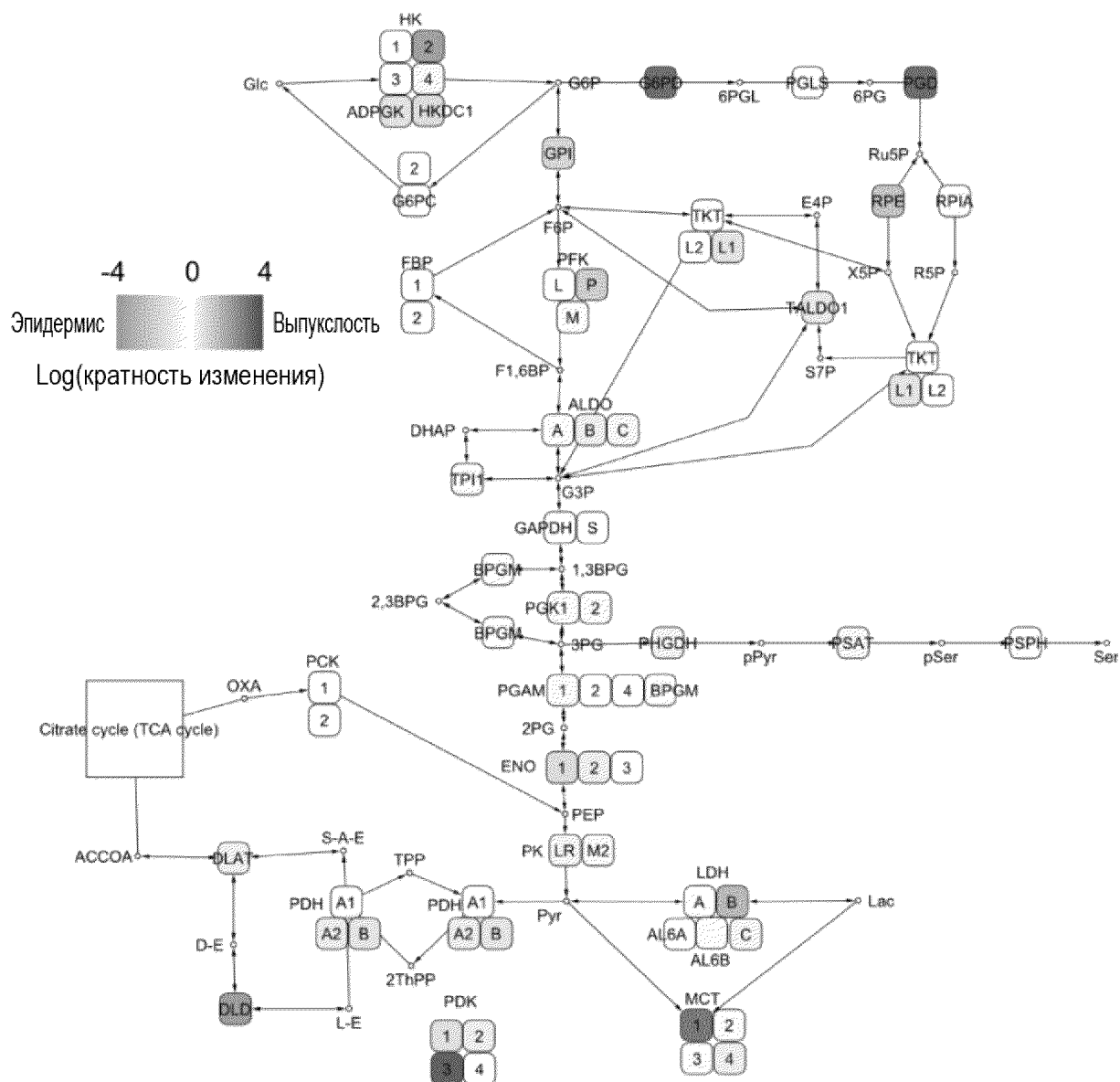
Фиг. 4I



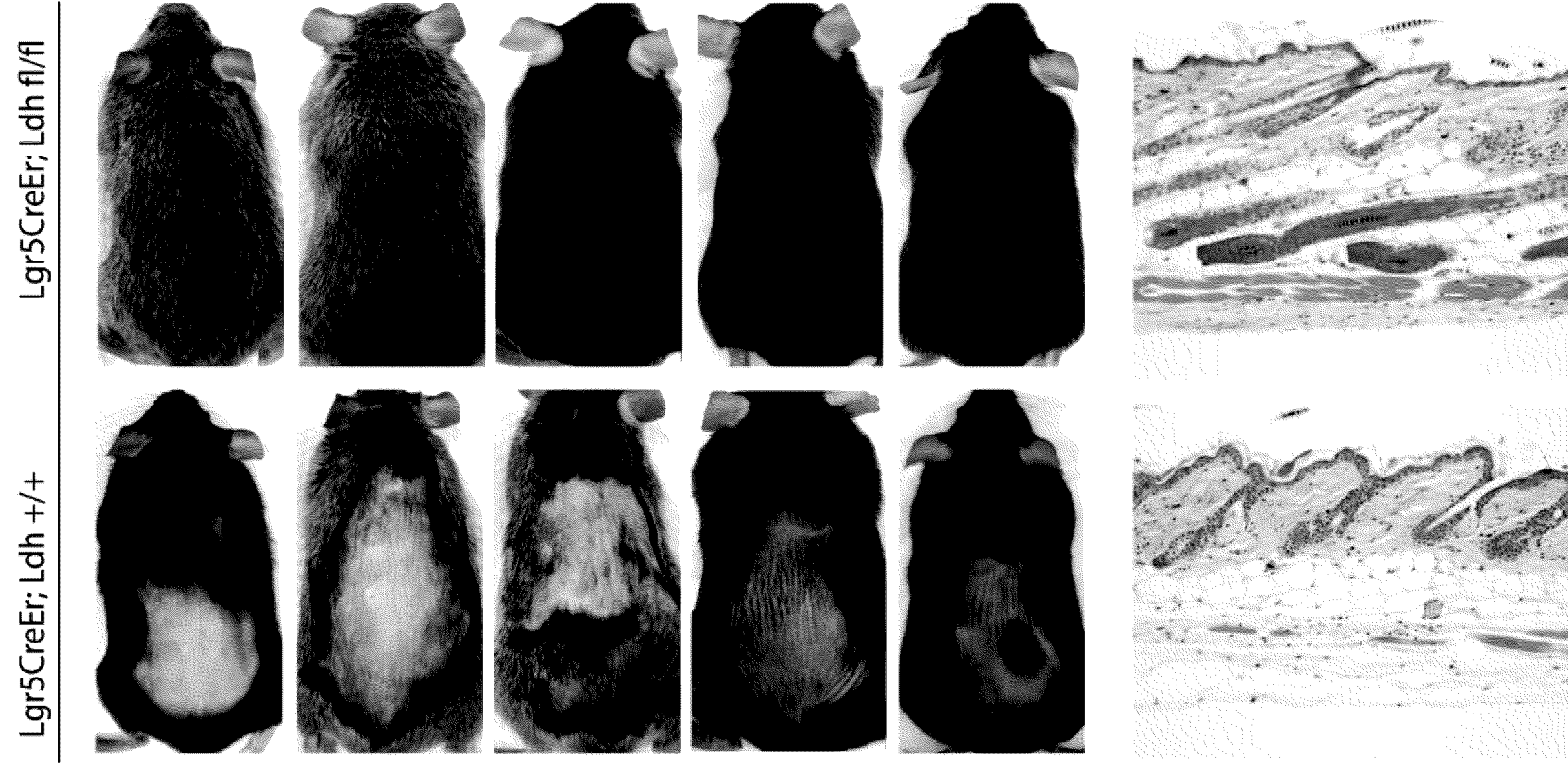
Фиг. 4m



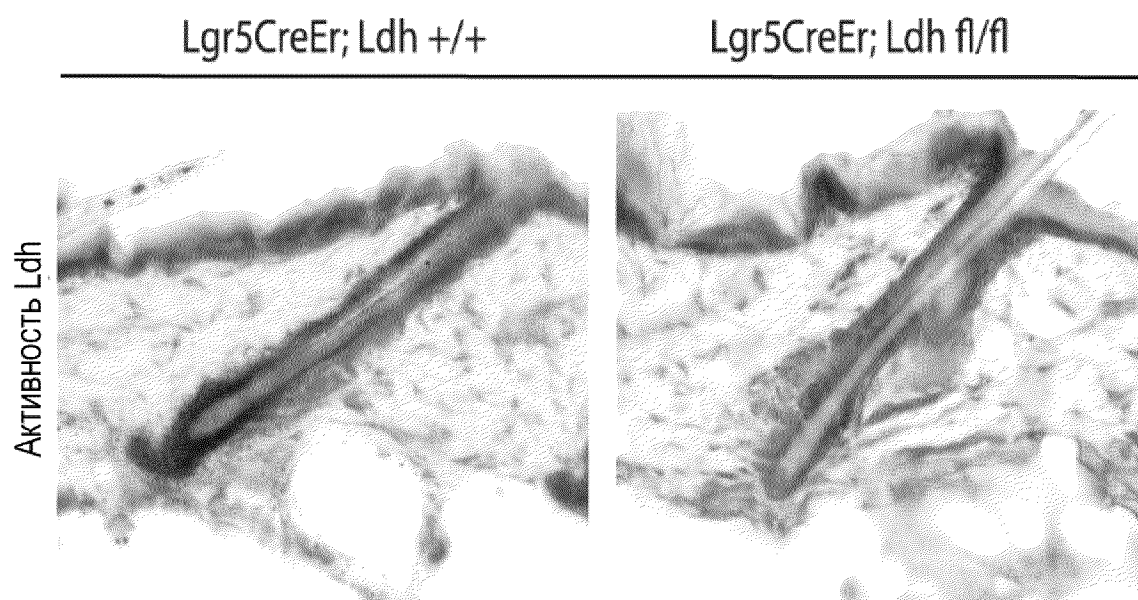
## Среднее Выпуклость/Эпидермис



Фиг. 5а



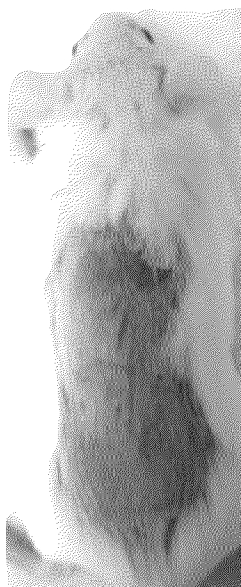
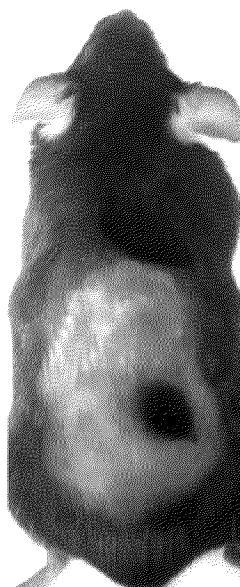
Фиг. 5b



Фиг. 6а

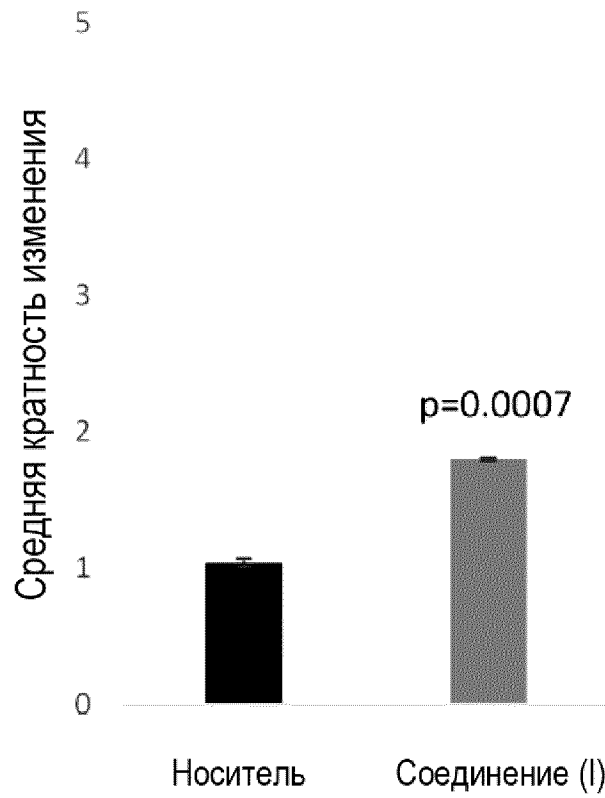
K15CrePR; Mpc1 +/+

K15CrePR; Mpc1 fl/fl

дорсальная  
сторонавентральная  
сторонадорсальная  
сторонавентральная  
сторонадорсальная  
сторонавентральная  
сторонадорсальная  
сторонавентральная  
сторона



Фиг. 6b



Фиг. 7

